

Femtosekunden-Spektroskopie schnellster Strukturänderungen in Peptid-Chromophor-Komplexen

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

vorgelegt von Sebastian Spörlein
aus München

11. Juni 2001

Abgabedatum:	11.06.2001
1. Gutachter:	Prof. Dr. J. Wachtveitl
2. Gutachter:	Prof. Dr. H. Gaub
Tag der mündlichen Prüfung:	24.07.2001

Abstract

Die dreidimensionale Struktur von Proteinen ist das entscheidende Kriterium für deren biologische Funktionstüchtigkeit. Der Mechanismus, welcher der Faltung von Aminosäureketten zugrunde liegt, ist aber bis heute nur in Ansätzen bekannt. Da die Nutzung von gezielter Proteinfaltung enorme Vorteile und Verbesserungen z.B. beim Design von neuen Medikamenten bringen wird, ist die Erlangung eines tieferen Verständnisses des Faltungsmechanismus in vielerlei Hinsicht erstrebenswert. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten femtosekundenspektroskopischen Untersuchungen an Azobenzol und Azo-Peptiden im sichtbaren Spektralbereich sollen neue Erkenntnisse über die schnellsten Prozesse zu Beginn einer Faltungsreaktion bringen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein neues Lasersystem (regenerativer Verstärker) konzipiert und realisiert. Die wichtigsten Randbedingungen waren eine Ausgangsimpulsenergie ≥ 1 mJ pro Lichtimpuls bei gleichzeitig möglichst niedrigem Rauschen und hoher Strahlstabilität. Anschließend an die erfolgreiche Inbetriebnahme des Femtosekundenlasers erfolgte der Aufbau bzw. Umbau des Pump-Probe-Experimentes. Die wichtigsten Forderungen dafür waren die Bereitstellung eines zeitlich sehr kurzen Lichtimpulses bei einer Wellenlänge $\lambda_{\text{pump}} = 480$ nm für das Starten der zu untersuchenden Reaktion sowie die gleichzeitige Meßbarkeit von Transienten bei verschiedenen Abtastwellenlängen im Spektralbereich von 320 – 900 nm. Zur Erzeugung des Anreglichtimpulses wurde ein nichtkollimierter optisch-parametrischer Verstärker aufgebaut und optimiert. Für die Optimierung des Abtastwellenlängenbereiches wurde erstmals Kalziumfluorid als Medium zur Erzeugung des Abtastweißlichtes verwendet. Aufgrund der fehlenden Möglichkeit, die anfallenden Datenmengen sinnvoll und schnell bearbeiten zu können, wurde eine umfangreiche Auswertesoftware mit Benutzeroberfläche entworfen und programmiert.

Im Anschluß an die Fertigstellung der experimentellen Aufbauten wurden im zweiten Teil dieser Arbeit erstmals femtosekundenspektroskopische Untersuchungen an verschiedenen Peptid-Chromophor-Komplexen durchgeführt, die lichtinduzierte Konformationsänderungen vollziehen können. Als Photoschalter diente dabei in allen Fällen Azobenzol, dessen Photochemie bekannt ist. Im Rahmen der Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß sich der Chromophor Azobenzol gleichzeitig als Trigger und als spektroskopische Sonde für Konformationsänderungen verwenden läßt. Das verwendete Modellpeptid bestand aus einer acht Aminosäuren langen Peptidkette sowie einem chemisch modifizierten Azobenzol. Aus dem Vergleich der Ergebnisse für eine lineare und eine zyklisierte Peptidvariante sollten neue Erkenntnisse über die schnellsten Prozesse bei der Faltung von Proteinen gewonnen werden. Als Vergleichssystem diente eine weitere Gruppe von Azo-peptiden, bei welcher die Flexibilität einer der beiden Bindungen des Chromophors zur Aminosäurekette durch einen Spacer erhöht worden ist. Es konnte gezeigt werden, daß nach der lichtinduzierten Isomerisierung des Chromophors in den zyklischen Peptiden ein Rearrangement der Aminosäuren teilweise auf Zeitskalen > 100 ps beginnt und bis in den Nanosekundenbereich andauert. Abhängig vom Modellsystem (zyklisches oder bityklisches Peptid, mit oder ohne Spacer) und der Isomerisierungsrichtung wurden unterschiedliche Isomerisierungsgeschwindigkeiten und -quantenausbeuten sowie sehr langsame Kinetiken bis in den Nanosekundenbereich erhalten. Eine einfache mechanistische Modellvorstellung kann modellsystemübergreifend alle Ergebnisse zu erklären. Dabei spielt die Kraft, welche die Peptidkette auf den Chromophor auszuüben vermag, eine entscheidende Rolle. Femtosekunden-Pump-Probe-Experimente im sichtbaren Spektralbereich sind also durchaus in der Lage, neue Erkenntnisse zur Lösung des Proteinfaltungsproblems beizutragen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Das Experiment	5
2.1	Der experimentelle Aufbau	6
2.1.1	Die Femtosekunden-Lichtquelle	6
2.1.2	Der optisch parametrische Verstärker	10
2.1.3	Die experimentelle Technik: Das Pump-Probe-Experiment	16
2.1.4	Zusätzliche Infrastruktur	23
2.1.5	Technische Daten im Überblick	25
2.2	Meßdatenerfassung	27
2.2.1	Datenaufnahme	27
2.2.2	Versuchsdurchführung	28
2.2.3	Datenaufbereitung	30
3	Konformationskontrolle - Ein Überblick	35
4	Azobenzol und Azo-Peptide: vom Photoschalter zur Konformationsdynamik	40
4.1	Azobenzol	40
4.1.1	Struktur und Photoreaktion	40
4.1.2	Dauerstrichcharakterisierung	42
4.1.3	Weitere Anwendungen von Azobenzol	45
4.2	Untersuchte Proben im Überblick	46
4.3	Chromophore APB und AMPB	49
4.3.1	Allgemeines	49
4.3.2	Dauerstrichcharakterisierung	49
4.4	APB-Peptide	51
4.4.1	Allgemeines	51
4.4.2	NMR-Strukturen	52
4.4.3	Dauerstrichcharakterisierung	53
4.5	AMPB-Peptide	55
4.5.1	Allgemeines	55

4.5.2	NMR-Strukturen	56
4.5.3	Dauerstrichcharakterisierung	57
4.6	Probenpräparation und Vorüberlegungen	58
4.7	Zusammenfassung der spektroskopischen Eigenschaften	60
5	Zeitaufgelöste Untersuchungen an Azobenzol und APB-Peptiden	63
5.1	Azobenzol	65
5.1.1	<i>trans</i> → <i>cis</i> -Isomerisierung	65
5.1.2	<i>cis</i> → <i>trans</i> -Isomerisierung	67
5.2	Lineares Azopeptid	69
5.2.1	<i>trans</i> → <i>cis</i> -Isomerisierung	69
5.2.2	<i>cis</i> → <i>trans</i> -Isomerisierung	72
5.3	Monozyklisches Azopeptid	74
5.3.1	<i>trans</i> → <i>cis</i> -Isomerisierung	74
5.3.2	<i>cis</i> → <i>trans</i> -Isomerisierung	76
6	Zeitaufgelöste Untersuchungen an modifizierten Azopeptiden	79
6.1	AMPB	79
6.1.1	<i>trans</i> → <i>cis</i> -Isomerisierung	79
6.1.2	<i>cis</i> → <i>trans</i> -Isomerisierung	81
6.2	Lineares AMPB-Peptid	83
6.2.1	<i>trans</i> → <i>cis</i> -Isomerisierung	83
6.2.2	<i>cis</i> → <i>trans</i> -Isomerisierung	85
6.3	Monozyklisches AMPB-Peptid	88
6.3.1	<i>trans</i> → <i>cis</i> -Isomerisierung	88
6.3.2	<i>cis</i> → <i>trans</i> -Isomerisierung	90
6.4	Bizyklisches AMPB-Peptid	92
6.4.1	<i>trans</i> → <i>cis</i> -Isomerisierung	92
6.4.2	<i>cis</i> → <i>trans</i> -Isomerisierung	94
7	Diskussion	97
7.1	Azobenzol	99
7.1.1	<i>trans</i> → <i>cis</i> -Isomerisierung	99
7.1.2	<i>cis</i> → <i>trans</i> -Isomerisierung	102
7.1.3	Isomerisierungsmechanismus	104
7.2	Die APB-Familie	107
7.2.1	Der Chromophor APB	107
7.2.2	Das Modellpeptid lAPB	107
7.2.3	Das Modellpeptid cAPB	112
7.3	Die AMPB-Familie	122

7.3.1	Der Chromophor AMPB	122
7.3.2	Das Modellpeptid IAMPB	125
7.3.3	Die Modellpeptide cAMPB und bcAMPB	129
8	Zusammenfassung	143

Abbildungsverzeichnis

1.1	Energieflächen zur Beschreibung der Proteinfaltung	3
2.1	Prinzipskizze Femtosekunden-Lasersystem	6
2.2	Skizze Femtosekunden-Oszillator	7
2.3	Skizze regenerativer Verstärker	9
2.4	Autokorrelation Femtosekundenlichtimpuls aus NOPA	14
2.5	Weißlichtspektren von Saphir und CaF ₂	18
2.6	Prinzipskizze Pump-Probe-Aufbau	19
2.7	Prinzipskizze Pump-Probe-Aufbau (2)	22
2.8	Spektrum Hg(Xe)-Bogenlampe mit UG11 + WG320	24
2.9	Prinzipskizze Spritzenpumpe	25
3.1	Prinzip der photoinduzierten Konformationsänderung	37
3.2	Struktur der Thioredoxin Reduktase aus <i>E.coli</i>	38
4.1	Räumliche Struktur Azobenzol	41
4.2	Dauerstrichspektrum Azobenzol	43
4.3	Dauerstrichspektrum A(M)PB	50
4.4	NMR-Strukturen des monozyklischen APB-Peptids	53
4.5	Dauerstrichspektren APB-Peptide	54
4.6	NMR-Strukturen des mono- und bizyklischen AMPB-Peptids	56
4.7	Dauerstrichspektren AMPB-Peptide	58
5.1	Azobenzol t→c: fs-Daten	65
5.2	Azobenzol t→c: transiente Spektren und Amplitudenspektren	66
5.3	Vergleich zwischen Meßdaten und angepaßter Modellfunktion	67
5.4	Azobenzol c→t: fs-Daten	68
5.5	Azobenzol c→t: transiente Spektren und Amplitudenspektren	69
5.6	IAPB t→c: fs-Daten	70
5.7	IAPB t→c: transiente Spektren und Amplitudenspektren	71
5.8	IAPB c→t: fs-Daten	72
5.9	IAPB c→t: transiente Spektren und Amplitudenspektren	73

5.10	cAPB $t \rightarrow c$: fs-Daten	75
5.11	cAPB $t \rightarrow c$: transiente Spektren und Amplitudenspektren	76
5.12	cAPB $c \rightarrow t$: fs-Daten	77
5.13	cAPB $c \rightarrow t$: transiente Spektren und Amplitudenspektren	78
6.1	AMPB $t \rightarrow c$: fs-Daten	80
6.2	AMPB $t \rightarrow c$: transiente Spektren und Amplitudenspektren	81
6.3	AMPB $c \rightarrow t$: fs-Daten	82
6.4	AMPB $c \rightarrow t$: transiente Spektren und Amplitudenspektren	83
6.5	IAMPB $t \rightarrow c$: fs-Daten	84
6.6	IAMPB $t \rightarrow c$: transiente Spektren und Amplitudenspektren	85
6.7	IAMPB $c \rightarrow t$: fs-Daten	86
6.8	IAMPB $c \rightarrow t$: transiente Spektren und Amplitudenspektren	87
6.9	cAMPB $t \rightarrow c$: fs-Daten	88
6.10	cAMPB $t \rightarrow c$: transiente Spektren und Amplitudenspektren	89
6.11	cAMPB $c \rightarrow t$: fs-Daten	90
6.12	cAMPB $c \rightarrow t$: transiente Spektren und Amplitudenspektren	91
6.13	bcAMPB $t \rightarrow c$: fs-Daten	93
6.14	bcAMPB $t \rightarrow c$: transiente Spektren und Amplitudenspektren	94
6.15	bcAMPB $c \rightarrow t$: fs-Daten	95
6.16	bcAMPB $c \rightarrow t$: transiente Spektren und Amplitudenspektren	96
7.1	Skizze Potentialflächen bei Isomerisierung	98
7.2	Potentialflächen bei Isomerisierung	105
7.3	Vergleich von Transienten von IAPB und cAPB ($t \rightarrow c$)	114
7.4	Vergleich von Transienten von IAPB und cAPB ($c \rightarrow t$)	117
7.5	Erklärung der Nanosekundenkinetik bei cAPB ($c \rightarrow t$)	119
7.6	Vergleich der Blauverschiebung der $\pi\pi^*$ -Bande von IAPB und cAPB ($c \rightarrow t$)	120
7.7	Vergleich von Transienten IAPB und IAMPB ($t \rightarrow c$)	126
7.8	Vergleich von Transienten IAPB und IAMPB ($c \rightarrow t$)	128
7.9	Vergleich von Transienten von IAMPB, cAMPB und bcAMPB ($t \rightarrow c$)	131
7.10	Erklärung der Pikosekundenkinetik bei cAMPB ($t \rightarrow c$)	133
7.11	Absorptionsänderungen durch das Verschieben von Absorptionsbanden	137
7.12	Reaktionsmodell für bcAMPB ($c \rightarrow t$)	138
7.13	Vergleich von Transienten von IAMPB, cAMPB und bcAMPB ($c \rightarrow t$)	141
8.1	Rauhe S_1 -Potentialfläche	145

Tabellenverzeichnis

2.1	Technische Daten Ti:Saphir-Oszillator und Verstärker	26
2.2	Experimentelle Parameter im Überblick	26
4.1	Quantenausbeuten Photoisomerisierung Azobenzol	45
4.2	Untersuchte Proben und verwendete Abkürzungen	46
4.3	Strukturformeln und Symbole	48
4.4	Zusammenfassung Charakteristika cw-Differenzspektren	61
4.5	Zusammenfassung optische Charakteristika der Proben	62
7.1	Zusammenfassung Ergebnisse fs-Messungen für APB-Familie	121
7.2	Zusammenfassung Ergebnisse fs-Messungen für AMPB-Familie	142

1 Einleitung

Den Begriff „Eiweiß“ bzw. Protein kennt jeder z.B. von den Nährwertangaben auf Lebensmittelverpackungen. Kaum jemandem ist aber bewußt, wo überall in Organismen Proteine von Bedeutung sind: Ohne Proteine wäre die Photosynthese nicht möglich, welche durch die Freisetzung von riesigen Mengen an Sauerstoff die Voraussetzung allen höheren Lebens schuf. Wir könnten nicht sehen und nicht atmen. Unsere Haut und Sehnen würden unter geringer Belastung reißen. Ganz allgemein wäre in einem Organismus keine Kontrolle und Katalyse von biochemischen Reaktionen möglich. Dies bedeutet auch, daß Verletzungen nicht verheilen könnten und kein Immunsystem existent wäre, welches in den Organismus eindringende Krankheitserreger bekämpft.

Aufgrund der vielfältigen Aufgaben und der immensen Bedeutung von Proteinen für das Leben versucht man seit langem, Proteine zu verstehen. Was bestimmt nun ihre Eigenschaften? Ein Protein ist zuerst einmal eine lineare Kette von kleinen Untereinheiten, den sogenannten Aminosäuren¹, die in einer für das Protein charakteristischen Reihenfolge angeordnet sind, die Primärstruktur des Proteins genannt wird.

Die funktionellen Eigenschaften erhält diese Aminosäurekette erst, wenn sie eine eindeutig bestimmte räumliche Struktur (Sekundär-, Tertiär- und evtl. Quartärstruktur) einnimmt. Die Frage ist nun, woher die Aminosäurekette die Information erhält, wie und auf welchem Weg sie sich falten muß. Denn im genetischen Code von Organismen ist nur die Primärstruktur von Proteinen, nicht aber deren dreidimensionale räumliche Gestalt gespeichert. Anfang der 1960er Jahre zeigten Anfinsen et al., daß Proteine, deren dreidimensionale Struktur zerstört² wurde, wieder in die ursprüngliche räumliche Struktur zurückfalten können, sobald die Umgebungsbedingungen dies zulassen [[ANFINSEN et al., 1961](#), [ANFINSEN, 1973](#)]. Das Falten und Entfalten sind also reversible Vorgänge, die sich wiederholen lassen, solange die Primärstruktur nicht zerstört wird. Deshalb muß durch die Aminosäuresequenz, d.h. die Primärstruktur, die dreidimensionale Gestalt abhängig von den Umgebungsbedingungen schon festgelegt sein. Diese Frage ist unter dem Stichwort „Das Proteinfaltungsproblem“ bekannt (siehe z.B. [[CREIGHTON, 1990](#), [CHAN und DILL, 1993](#)]).

Präziser formuliert stellen sich unter anderem die Fragen, auf welchem Reaktionsweg das

¹In der Natur kommen 20 verschiedene Aminosäuren vor.

²Das Auflösung der nativen dreidimensionalen räumlichen Struktur unter Erhaltung der Aminosäuresequenz nennt man „Entfalten“.

1 Einleitung

Protein seine natürliche, biologisch aktive Konformation³ einnimmt, warum gefaltete Proteine stabil sind und warum die Aminosäuresequenz das Ergebnis des Faltungsprozesses festlegt. Welchen Nutzen bringt es, diese Fragen zu beantworten? Neben der akademischen Genugtuung, einen der wichtigsten Bausteine des Lebens verstanden zu haben, verspricht das Verständnis der Proteinfaltung auch einen tatsächlichen Vorteil. Wäre es möglich, aus der Primärstruktur die Sekundär- bis Quartärstruktur zu berechnen, so könnte z.B. ein gezielteres und ausgefeilteres Design von Medikamenten erfolgen, da auch die Wirksamkeit und Spezifität von Arzneimitteln sehr eng mit der räumlichen Struktur des Wirkstoffes verknüpft ist.

Schon im Jahr 1968 erkannte C. Levinthal, daß der Faltungsvorgang von Proteinen nicht ein rein zufallsbestimmtes Abtasten aller möglichen Konformationen auf der Suche der richtigen Struktur sein kann⁴ [LEVINTHAL, 1968]. Denn selbst ein relativ kleines Protein, bestehend aus nur 100 Aminosäuren, bräuchte zum Ausprobieren aller möglichen Konformationen etwa 10^{27} Jahre, selbst wenn sich jede Aminosäure relativ zum nächsten Nachbarn nur in drei verschiedenen Positionen anordnen kann und das Ausprobieren einer Konformation nur 100 fs ($1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$) dauert. Tatsache ist aber, daß sich selbst viel größere Proteine in Sekunden bis Minuten komplett falten. Der Ausweg aus diesem, als Levinthal Paradoxon bezeichneten Dilemma war die Forderung von bestimmten Reaktionswegen bzw. einer treibenden Kraft, die dem Protein den Weg zum gefalteten Zustand weisen [LEVINTHAL, 1968, ZWANZIG et al., 1991].

Auch heute noch ist der molekulare Mechanismus der Proteinfaltung eines der großen ungelösten Rätsel der Molekularbiologie. Lange Zeit wurde zur Beschreibung der Faltung von Proteinen ein einfaches sequentielles Modell verwendet: Der Faltungsprozeß führt durch eine Reihe von wohldefinierten Zwischenzuständen (Intermediaten) [KIM und BALDWIN, 1982]. Dies impliziert, daß die Faltungsreaktion entlang eines genau definierten Reaktionspfades verläuft. Auch wenn viele experimentelle Untersuchungen die Existenz von solchen Intermediaten aufzeigten, so mußte man Ende der 80er Jahre dennoch erkennen, daß dieses sequentielle Modell nicht die optimale Beschreibung für die Vorgänge während der Proteinfaltung darstellt [KIM und BALDWIN, 1990].

In einem neueren Konzept zur Untersuchung der Faltungsvorgänge wird das sequentielle Durchlaufen von Intermediaten auf definierten Reaktionspfaden durch die Bewegung auf einer Energielandschaft mit vielen, parallel nebeneinander existierenden Faltungswegen ersetzt. Der Faltungsvorgang wird nun als diffusionsähnlicher Prozeß gesehen, bei dem die Bewegung der einzelnen Aminosäureketten im Ensemble asynchron abläuft. Dies bedeutet, daß jede Kette, getrieben von der Brownschen Molekularbewegung, von ihrer Startkonformation aus unterschiedliche Konformationen durchläuft, aber schließlich in derselben nativen Struktur landet. Dies ist vergleichbar mit Wasser, welches auf verschiedensten Wegen die Berghänge eines Tales hinunterläuft, schließlich aber doch in demselben See aufgefangen wird.

Innerhalb des neuen Konzeptes ist der Ausdruck „Energielandschaft“ von entscheidender Be-

³Eine Konformation beschreibt ein bestimmtes räumliches Aussehen.

⁴Vergleichbar mit der Suche einer Nadel im Heuhaufen.

deutung. Unter Energielandschaft ist die freie Energie jeder möglichen Konformation der Aminosäurekette als Funktion aller Freiheitsgrade, z.B. der Dihedralwinkel entlang des Proteinrückgrates, zu verstehen. Trägt man die freie Energie in Abhängigkeit von z.B. zwei generalisierten Koordinaten auf, so ergibt sich für ein Protein, idealisiert dargestellt, eine trichterförmige Energielandschaft (vgl. Abb. 1.1). Ein Punkt auf dieser Oberfläche repräsentiert ein Protein in einer bestimmten Konformation. Ein Ensemble von N nicht gefalteten Proteinen wird in dieser Energielandschaft durch einen Satz von N Punkten irgendwo auf der Fläche außerhalb des globalen Minimums beschrieben. Geht eine Aminosäurekette im Laufe des Faltungsvorganges mehr intramolekulare Verbindungen (z.B. H-Brücken, etc.) ein, so erniedrigt sich ihre interne freie Energie und der verfügbare Bereich im Konformationsraum: der Punkt auf der Potentialfläche nähert sich dem Hals des Trichters. Jedes Protein des Ensembles wird für sich selbst dem Gradienten der Potentialfläche folgen und so zum tiefsten Punkt der Energielandschaft, dem gefalteten Zustand, gelangen. Dabei beschreibt jeder Punkt auf der Energiefläche eine für seinen Ausgangszustand charakteristische Trajektorie. In Abbildung 1.1 ist diese idealisierte Energielandschaft „aufgerauht“. Sie enthält z.B. kinetische Fallen, Energiebarrieren und nur einige schmale Durchgänge zum nativen Zustand. In einem derartigen Modell ist es auch möglich, daß die Trajektorien der Proteine (zum Teil) erst durch lokale Nebenminima führen, die Proteine also möglicherweise erst fehlgefaltet vorliegen, um dann thermisch aktiviert den Weg in den nativen Zustand zu finden [DILL und CHAN, 1997]. Der Aufenthalt von vielen Proteinen in einem Nebenminimum kann unter Umständen als strukturell genau definiertes Intermediat detektiert werden.

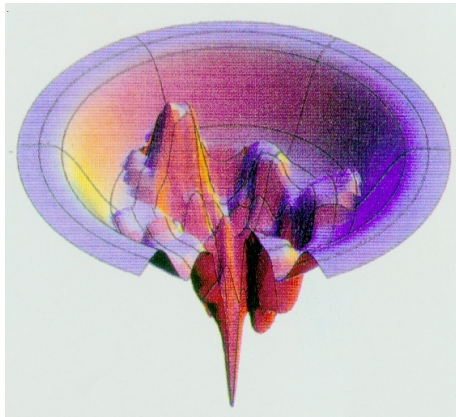


Abbildung 1.1: Eine „rauhe“ trichterförmige Energielandschaft zur Beschreibung der Proteinfaltung. Die Abbildung ist [DILL und CHAN, 1997] entnommen.

Die bisher durchgeführten experimentellen Untersuchungen zeigten, daß die Faltung von Proteinen meist in einem Zeitbereich von Mikrosekunden bis Minuten abläuft [MUÑOZ et al., 1997, BURTON et al., 1998, ZHOU und KARPLUS, 1999]. Hierbei konnten aber nur die großräumigen Strukturänderungen untersucht werden. Die schnellen Vorgänge am Beginn der Faltungsreaktion blieben jedoch verborgen. Eine allgemein verwendete untere Schranke für den Zeitbereich, auf dem eine Faltungsreaktion ablaufen kann, ist 10 ns (= $10 \cdot 10^{-9}$ s) für die Bildung von α -Helices [WILLIAMS et al., 1996, THOMPSON et al., 1997]. Der Großteil der auftretenden Reaktionen ist aber wesentlich langsamer. Eine schnellere Reaktion der Aminosäuren als 10 ns konnte bisher nicht beobachtet werden und galt als unwahrscheinlich.

Speziell die ersten Bewegungen der Aminosäuren wären für die Beantwortung der Frage interessant, ob sich bei der Faltung eines Proteins tatsächlich erst relativ schnell kleinräumige Sekundärstrukturelemente ausbilden, die sich anschließend in einem weiteren langsameren Schritt zur endgültigen 3D-Struktur zusammenfügen [WRIGHT et al., 1988]. Die Alternative

1 Einleitung

hierzu wäre, daß die Faltung durch die gleichzeitige Bildung von Sekundär- und Tertiärstruktur beschrieben wird. Da es einige Schwierigkeiten bereitet, die Faltungsreaktion an den größten (=kompliziertesten) Systemen im Detail zu verstehen, erscheint es sinnvoll, insbesondere die schnellsten Vorgänge an sehr kleinen Proteinen (=Peptiden) zu studieren. Allerdings sind die experimentellen Erkenntnisse über den Beginn von Faltungsreaktionen bei den Peptiden gering, insbesondere weil die Experimentier- und Präparierkunst erst seit einigen Jahren so weit fortgeschritten ist, daß Experimente im Zeitbereich von Pikosekunden ($1 \text{ ps} = 10^{-12} \text{ s}$) bis zehn Nanosekunden möglich sind. Das Problem ist dabei nicht die Durchführung von Experimenten mit einer hohen Zeitauflösung von hundert Femtosekunden. Vielmehr haperte es lange Zeit an Systemen bzw. Experimentiertechniken, um Faltungsreaktionen auf der Femtosekundenzeitskala auszulösen. Denn es bringt keinerlei Erkenntnisse, ein System mit extrem hoher Zeitauflösung zu beobachten, den Startzeitpunkt der interessierenden Reaktion jedoch nur sehr ungenau festzulegen. In den letzten Jahren jedoch sind ein paar Ansätze vorgestellt worden, die eine Synchronisation des Beginns der Faltungsreaktion der Peptide im untersuchten Ensemble auf unter einer Pikosekunde ermöglichen (vgl. Kapitel 3).

Der Ansatz dieser Arbeit, um die schnellsten Vorgänge bei der Faltung von Peptiden zu untersuchen, ist die Verwendung eines kleinen zyklischen⁵ Peptides, welches durch einen in das Peptidrückgrat intergrierten Photoschalter zu einer Konformationsänderung gezwungen werden kann. Als Chromophor wurde Azobenzol verwendet, welches als Reaktion auf die Absorption eines Photons geeigneter Wellenlänge seine geometrische Längenausdehnung innerhalb weniger Pikosekunden um einen Faktor 2 ändern kann. Die geänderten geometrischen Randbedingungen nach der Längenänderung induzieren im restlichen Peptid einen Konformationsübergang. Mit einem derartigen System ist es im Rahmen dieser Arbeit das erste Mal gelungen, die schnellsten Ereignisse bei der Peptidfaltung auf der Zeitskala von einer Nanosekunde zu beobachten. Der experimentell erhaltene Befund einer initialen Reaktion der Aminosäurekette in etwa 1 ns deckt sich mit theoretischen Rechnungen, die ebenfalls Zeitskalen von einigen hundert Pikosekunden bis wenige Nanosekunden vorhersagen [TOBIAS et al., 1991, DAURA et al., 1998]. Detailliertere Informationen über die Bewegung der Aminosäuren werden in Kürze weitere Experimente im infraroten Spektralbereich bringen. Damit wird man der Lösung des Rätsels der Proteinfaltung einen Schritt näherkommen.

⁵d.h. zu einem Ring geschlossenen

2 Das Experiment

Das Interesse und die Neugierde, unterschiedlichste real ablaufende Prozesse in der Natur zu verstehen, ist der Menschheit schon seit langem zu eigen. Allerdings sind Untersuchungen immer auf solche Vorgänge beschränkt, die der Zeitauflösung der verfügbaren Meßinstrumente zugänglich sind. Waren einst Sekunden das schnellste Maß, so ermöglichten mechanische Schalter Untersuchungen im Millisekundenbereich. Stroboskopische Beleuchtungstechniken erschlossen daraufhin die Mikrosekundendomäne. Die schnellste, heute erhältliche Elektronik hingegen läßt Experimente mit einer Auflösung bis in den sub-Nanosekunden Bereich zu. Aber dann?

Gerade die in der Bio- und Molekülphysik interessierenden Reaktionen sind teilweise nochmals um vier bis fünf Größenordnungen schneller, laufen also auf der Femtosekundenzeitskala ($1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$) ab. Dies ist der Zeitbereich, auf der Schwingungen einzelner Atome in Molekülen ablaufen, Ladungstransferprozesse (z.B. in der Photosynthese) stattfinden, sowie auch Geometrieänderungen von kleineren Molekülen vonstatten gehen. Da eine direkte Beobachtung derart schneller Vorgänge prinzipiell nicht möglich ist, muß man sich diverser „Tricks“ bedienen und zu indirekten Meßmethoden greifen.

Eine Möglichkeit eröffnet die sogenannte Pump-Probe-Spektroskopie. Hier regt ein intensiver kurzer Anregungsimpuls (Pump-Puls) die Probe elektronisch (und/oder vibronisch) an. Ein zu diesem zeitlich verzögerter schwacher und ebenfalls kurzer Abtastimpuls (Probe-Puls) „mißt“ die Transmission der Probe zu der aktuell eingestellten Verzögerungszeit zwischen den beiden Lichtimpulsen. Wiederholt man diese Messung für viele verschiedene Verzögerungszeiten, so erhält man einen Verlauf der Transmission in Abhängigkeit der Zeit und kann daraus die Dynamik der untersuchten Probe im fs-Regime bestimmen.

So einfach dieses Prinzip klingt, so lange hat es gedauert, bis es im Femtosekundenbereich einsatzfähig war. Denn es gibt eine wichtige Voraussetzung: man muß Lichtimpulse zur Verfügung haben, deren zeitliche Dauer kürzer oder maximal gleich der zu untersuchenden Reaktionsdynamik ist, denn die Pulsbreiten bestimmen das zeitliche Auflösungsvermögen. Dies bedeutet, daß Lichtimpulse von wenigen Femtosekunden Dauer zur Verfügung stehen müssen. Doch erst Anfang der achtziger Jahre gelang es erstmals, Lichtblitze mit Pulslängen von weniger als 100 fs reproduzierbar zu erzeugen [FORK et al., 1981]. Und es bedurfte nochmals einiger Jahre, bis Pulsdauern unter 30 fs „routinemäßig“ eingesetzt werden konnten [VALDMANIS et al., 1985]. Damit waren die Grundvoraussetzungen vorhanden, um Moleküle bei ihrer Bewegung „direkt“ verfolgen zu können. Anfang der neunziger Jahre waren dann

2 Das Experiment

stabile, intensive Lichtquellen verfügbar [SQUIER et al., 1991], die die Entwicklung von kollinearen (OPA¹) und nichtkollinearen parametrischen Verstärkern (NOPA) ermöglichten. Diese eröffnen die Möglichkeit, kurze und in der Wellenlänge kontinuierlich durchstimmbare Lichtimpulse zu erzeugen und somit für die Anwendung zu optimieren. Intensive Forschung lieferte die Grundlage dafür, daß heute Lasersysteme zur Verfügung stehen, welche Lichtimpulse von unter 10 fs Dauer emittieren. Gute Zusammenfassungen des momentanen Standes der Technik sind z.B. in [STEINMEYER et al., 1999] oder ausführlicher in [BACKUS et al., 1998] zu finden.

Das vorliegende Kapitel soll einen Überblick über die Pulserzeugung, die mit den erzeugten Lichtimpulsen durchgeführten Messungen, sowie die anschließend notwendige Datenaufbereitung und -auswertung geben.

2.1 Der experimentelle Aufbau

Ein Teil der Aufgabenstellung bestand darin, das für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen verwendete Lasersystem zu planen und anschließend aufzubauen. Daher soll dieses im folgenden Abschnitt kurz dargestellt und charakterisiert werden. Die Beschreibung gliedert sich in eine kurze Einführung in die Erzeugung intensiver ultrakurzer Lichtimpulse, die ausführliche Behandlung von parametrischen Verstärkern sowie die detaillierte Erläuterung des eigentlichen Experimentes.

2.1.1 Die Femtosekunden-Lichtquelle

Da sich das Mitte der achtziger Jahre vorgestellte Konzept des „regenerative chirped pulse amplifiers“ als sehr zuverlässig erwies, erfolgt heute die Erzeugung von fs-Pulsen oft nach diesem Prinzip, und wurde auch in dieser Arbeit umgesetzt.

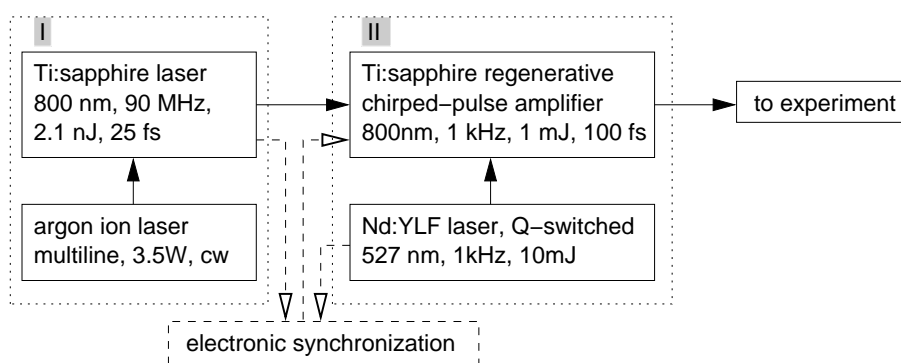


Abbildung 2.1: *Prinzipische Skizze Femtosekunden-Lasersystem:*

In einem speziell konzipierten Laserresonator werden schwache fs-Lichtimpulse erzeugt (I). Diese werden anschließend in einem optischen Verstärker in der Intensität nachverstärkt (II).

¹Optical Parametric Amplifier

Die Generierung der Lichtimpulse erfolgt hier in zwei Schritten (siehe auch Abb. 2.1):

- I) In einem Ti:Saphir ($\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$) Oszillator werden mit Hilfe nichtlinearer optischer Methoden schwache fs-Lichtimpulse erzeugt.
- II) Diese werden in den optischen Resonator des regenerativen Verstärkers als seed²-Licht eingekoppelt und um etwa sechs Größenordnungen in der Intensität verstärkt. Die elektronische Synchronisation stimmt die Repetitionsrate des Oszillators (80 MHz) auf die des Verstärkers (1 kHz) ab.

(I) Der Oszillator: Die Quelle der ultrakurzen Lichtimpulse

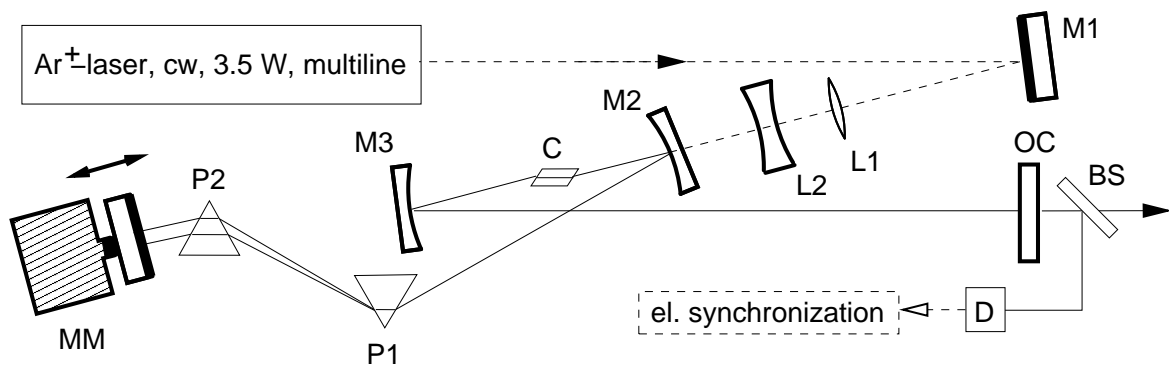


Abbildung 2.2: Skizze Femtosekunden-Laser in X-Faltung:

BS: Strahlteiler, C: temperaturstabilisierter Ti:Saphir-Kristall, D: Photodiode, M: Spiegel, MM: Beweglicher Spiegel, L: Linsen, OC: Auskoppelspiegel, P: Prismen

Die Theorie der Fouriertransformation zeigt: je kürzer ein Lichtimpuls werden soll, desto breiter ist das benötigte Frequenzspektrum, aus dem dieser zusammengesetzt ist. Für sehr kurze Pulse (wenige zehn Femtosekunden lang) im nahen Infrarot bedeutet dies spektrale Breiten von einigen zehn Nanometern. Allerdings genügt es nicht, einfach Licht in diesem Spektralbereich zur Verfügung zu stellen: die verschiedenen longitudinalen Moden des Resonators müssen in fester Phasenbeziehung zueinander stehen.

Somit ergeben sich zwei Anforderungen an einen fs-Oszillator:

- Das verwendete Lasermedium muß eine sehr große Fluoreszenz- und somit Verstärkungsbandbreite aufweisen.
- Es wird ein Mechanismus benötigt, der die einzelnen Resonatormoden (Wellenlängen) phasenrichtig fest miteinander koppelt.

²engl. seed: säen

2 Das Experiment

Mit Ti:Saphir (mit Titanionen dotierter Saphirkristall, Al_2O_3) steht ein Material zur Verfügung, welches zwei wichtige Kriterien an ein Lasermedium in idealer Weise erfüllt: die breitbandige Fluoreszenz reicht von etwa 700 nm bis 1100 nm, die Absorption liegt im Bereich von 400 nm bis 600 nm. Zusätzlich weist das Material noch weitere für einen Laserbetrieb günstige physikalische Eigenschaften auf [MOULTON, 1986]. Es bedurfte aber dennoch einiger Zeit [SPENCE et al., 1991], bis ein brauchbarer Modenkopplungsmechanismus gefunden war, da die bis dahin gängige Methode der passiven³ Modenkopplung mittels der Kombination von langsamer Sättigung von Absorber und Verstärker für Ti:Saphir-Laser nicht anwendbar ist. Das Verfahren der Wahl heißt Kerr-Linsen-Moden-Kopplung, ein nichtlinearer optischer Prozeß, welcher ebenfalls eine passive Modenkopplung bewirkt.

Propagiert ein elektrisches Feld sehr hoher Feldstärke durch ein Medium, so ist die Antwort⁴ des Mediums nicht mehr linear, d.h. nicht mehr proportional zum anliegenden elektrischen Feld. Daraus folgt, daß der Brechungsindex n des Mediums zeitabhängig wird: $n(\lambda, I(t, \vec{x})) = n_0(\lambda) + n_2 I(t, \vec{x})$, wobei n_2 als nichtlinearer Brechungsindex bezeichnet wird und für Festkörper typischerweise in der Größenordnung von einigen $10^{-16} \text{ cm}^2/\text{W}$ liegt (siehe z.B. [REED et al., 1995]). Es resultieren daraus unter anderem folgende Effekte:

- longitudinaler Kerr-Effekt (Selbst-Phasen-Modulation): Man betrachte einen Ort \vec{x} im Medium. Propagiert ein intensiver Lichtimpuls durch das Medium, so ändert sich der Brechungsindex an einer Stelle \vec{x} mit der Zeit. Dies läßt sich auch in eine nichtlineare Phasenverschiebung umformulieren, was gleichbedeutend zu einer Frequenzverschiebung des Laserlichtes ist: In der ansteigenden Flanke des Impulses verschiebt sich das Spektrum zu roten Wellenlängen und in der abfallenden entsprechend zu blauen. Es werden also neue Frequenzen erzeugt, die gleichzeitig in fester Phasenbeziehung zueinander stehen.
- transversaler Kerr-Effekt (Selbst-Fokussierung): Betrachtet man ein Laserbündel mit gaußförmiger Intensitätsverteilung über den Querschnitt, so hat es in der Mitte die höchste Intensität und „spürt“ dort somit den größten Brechungsindex. Somit erfährt der zentrale Teil des Lichtbündels eine größere zeitliche Verzögerung wie Licht im Randbereich des Bündels. Dies ist identisch zu einem Durchgang durch eine konvexe⁵ Linse, nur daß in diesem Fall die Kerr-Linse vom Puls selbst erzeugt ist und die fokussierende Wirkung nur während des Durchganges des intensivsten Teiles des Laserimpulses durch das Medium auftritt.

Der Ti:Saphir-Oszillator wird deshalb so aufgebaut, daß der Resonator nur in Kombination mit der Kerr-Linse eine hohe Güte besitzt, während ohne Kerr-Linse (also z.B. im Dauerstrichbetrieb) die Verluste erheblich größer sind. Damit wirkt diese als „künstlicher, schnell sättigbarer

³„Passiv“ heißt in diesem Zusammenhang, daß der Impuls im Resonator selbst die Modenkopplung synchronisiert. Aktive Modenkopplung hingegen benötigt eine externe Modulation bzw. Synchronisation des Resonators.

⁴d.h. die induzierte Polarisation

⁵= fokussierend

Absorber“. Die durch die Kerr-Linse phasenstarr gekoppelten Resonatormoden werden aufgrund der großen Verstärkungsbandbreite des Lasermediums ebenfalls verstärkt. Somit kann sich innerhalb eines solchen Resonators ein stabiler Betriebsmodus aufbauen, in dem nur *ein* sehr kurzer Lichtimpuls im Resonator umläuft, von dem ein Teil mittels eines teildurchlässigen Spiegels ausgekoppelt wird (OC, siehe Abb. 2.2). Da in der Praxis die Modenkopplung nicht selbststartend ist, wurde in den Resonator ein beweglicher Endspiegel eingebaut (MM), der zu Fluktuationen der Laserintensität führt, die den Modenkopplungsprozeß starten.

Ein im Resonator umlaufender Impuls würde durch die Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD⁶) im Ti:Saphir Kristall (C) zeitlich immer länger werden. Um dies zu kompensieren, führt man über eine Quarzprismenanordnung (P) denselben Betrag an negativer GVD ein [FORK et al., 1984].

Der hier vorgestellte Oszillator liefert 25 fs lange Lichtimpulse mit einer Wiederholrate von 90 MHz und einer Pulsenergie von 2.1 nJ (vgl. Abschnitt 2.1.5).

Durch Verwendung von sehr breitbandigen „gechirpten⁷“ Spiegeln und anderen optischen Finissen ist es derzeit möglich, Lichtimpulse mit einer Länge von nur 5.8 fs direkt aus einem Oszillator zu erzeugen [JUNG et al., 1997, SUTTER et al., 1999].

(II) Der regenerative Verstärker

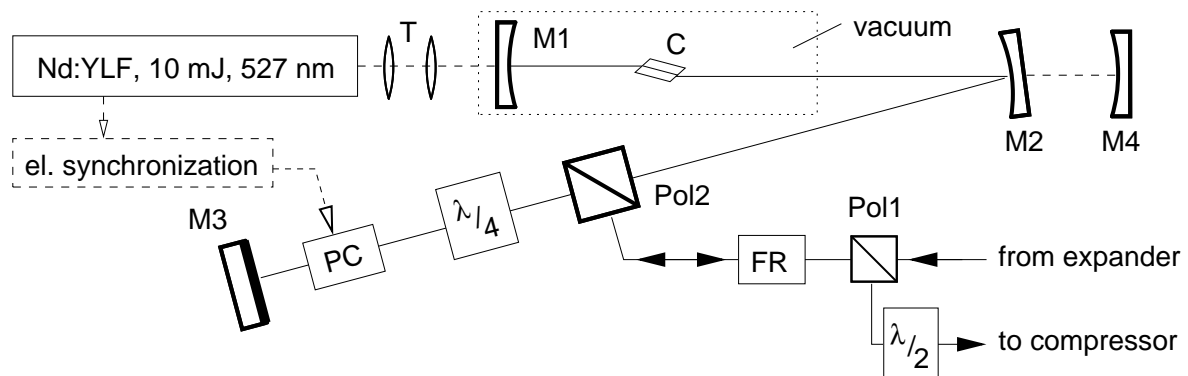


Abbildung 2.3: Skizze regenerativer chirped-pulse Verstärker:

C: temperaturstabilierter Ti:Saphir-Kristall, FR: Faradayrotator, M: Spiegel, PC: Pockelszelle, Pol: Polarisatoren, T: Teleskop

Für die in den folgenden Kapiteln vorgestellten Messungen reicht die Pulsenergie aus dem Oszillator bei weitem nicht aus, da für die im Experiment benötigten Frequenzkonversionsprozesse Pulsenergien von mehreren zehn Mikrojoule erforderlich sind. Deshalb müssen die Laserimpulse nachverstärkt werden (Abb. 2.3).

⁶engl. group velocity dispersion: aufgrund des wellenlängenabhängigen Brechungsindex ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichtimpulses in Materie ebenfalls von der Wellenlänge abhängig

⁷engl. chirp: zwitschern

Ein Nanosekundenlaserimpuls aus einem frequenzverdoppelten Nd:YLF-Laser „pumpt“⁸ 1000 mal pro Sekunde einen Ti:Saphir-Kristall (C) innerhalb eines zweiten Resonators. Ist der Pumpvorgang abgeschlossen und somit die Besetzungsinversion maximal, wird ein Impuls aus dem fs-Oszillator über einen optischen Schalter⁹ in den Verstärker eingekoppelt. Nach etwa 15 Umläufen hat der Impuls einen großen Teil der im Lasermaterial deponierte Energie aufgenommen und wird mit einer etwa sechs Größenordnungen höheren Energie wieder ausgekoppelt. Damit dieser intensive Lichtblitz nicht zurück in den Oszillator gelangt, ist zwischen diesem und dem Verstärker eine optische Diode¹⁰ eingebaut, welche die zum Verstärker laufenden und von diesem zurückkommenden Impulse räumlich trennt.

Um eine Zerstörung der Optik aufgrund der auftretenden hohen Spitzenintensitäten zu vermeiden, werden die Pulse aus dem Oszillator zeitlich gedehnt („gechirped“) und nach dem Verstärkungsvorgang wieder rekomprimiert. Dies geschieht durch Einführung von positiver bzw. negativer Gruppengeschwindigkeitsdispersion, was z.B. durch geeignete Gitteranordnungen realisiert werden kann [TREECY, 1969], [MARTINEZ et al., 1984]. Zusätzlich ist hier der Bereich um den Kristall und den Endspiegel (M1) evakuiert, um den Einfluß von Staub zu minimieren sowie den Kristall zur Effizienzsteigerung auf -8°C temperieren zu können. Das hier realisierte System stellt Lichtimpulse von etwa 100 fs Pulsdauer bei einer Wiederholrate von 1 kHz und einer Pulsenergie von 1 mJ zur Verfügung (siehe auch Tabelle 2.1 in Abschnitt 2.1.5).

Die kürzesten zur Zeit aus einem regenerativen Verstärker erhaltenen Impulse haben eine Dauer von etwa 16 fs [BACKUS et al., 1998, VERLUISE et al., 2000]. Derart kurze Lichtimpulse sind für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente eher hinderlich, so daß kein Wert darauf gelegt wurde, möglichst kurze Pulsdauern mittels eines regenerativen Verstärkers zu erzeugen (siehe auch folgenden Abschnitt). Ziel war vielmehr, ein stabil laufendes Lasersystem mit relativ hoher Ausgangsleistung aufzubauen. Die ultrakurzen Lichtimpulse unter 20 fs Dauer bei den benötigten Wellenlängen werden dann mit den nachfolgend beschriebenen parametrischen Verstärkern erzeugt.

2.1.2 Der optisch parametrische Verstärker

So einfach wie die oben beschriebene Lichtquelle mittlerweile zu handhaben ist, so unflexibel ist diese bezüglich ihrer Wellenlängenabstimmbarkeit. Da die meisten interessanten Moleküle nicht im Wellenlängenbereich um 800 nm absorbieren, ist es für die spektroskopischen Untersuchungen von grundlegender Bedeutung, ultrakurze Lichtimpulse so zu generieren, daß deren Wellenlängen im Absorptionsbereich der zu untersuchenden Proben liegen.

Die Entwicklung des optisch parametrischen Verstärkers (OPA) hat der Ultrakurzzeitspektroskopie in den letzten Jahren einen großen Fortschritt gebracht. Da diese Technik auch in dieser Arbeit Anwendung fand, sollen nachfolgend die Grundlagen der parametrischen Verstärkung

⁸Aufbau einer Inversion: ein elektronisch angeregtes Niveau ist stärker besetzt als der zugehörige Grundzustand

⁹Eine Kombination aus einer Pockelszelle (PC), einer Wellenplatte ($\lambda/4$) und einem Polarisator (Pol2).

¹⁰Eine Kombination aus einem Faradayrotator (FR) und einem Polarisator (Pol1).

etwas näher beschrieben werden. Hierzu wird der Begriff der nichtlinearen Optik kurz vorgestellt. Anschließend folgt die genauere Darstellung der optisch parametrischen Verstärkung. Der Abschnitt endet mit einer Zusammenfassung, welche den Stand der Technik und mögliche Anknüpfstellen für weitere Verbesserungen beinhaltet.

Nichtlineare Optik

Die aus dem täglich Leben bekannte „lineare Optik“ ist eine Näherung, die nur für kleine¹¹ elektrische Feldstärken gültig ist. Für diesen Fall läßt sich die potentielle Energie $V(x)$ für die Valenzelektronen harmonisch nähern. In einer vereinfachenden eindimensionalen Darstellung ergibt sich $V(x) = \frac{m}{2} \omega_0^2 x^2$, wobei m die Elektronenmasse, x die Auslenkung der Elektronen aus ihrer Ruhelage und ω_0 die Eigenfrequenz des Systems ist.

Die Elektronenauslenkung $x(t)$ und in Folge auch die induzierte mikroskopische Polarisation $p(x)$ sind dann proportional zu einem von außen anliegenden elektrischen Feld $E(t)$. Gleiches gilt auch für die lineare makroskopische Polarisation $P_L(t)$.

$$x(t) = -\frac{e}{m\omega_0^2} E(t); \quad p(t) = -Nex(t); \quad P_L(t) = \epsilon_0 \chi^{(1)} E(t) \quad (2.1)$$

e : Elementarladung

m : Elektronenmasse

N : Elektronendichte

ϵ_0 : elektrische Feldkonstante

ω_0 : Eigenfrequenz

$\chi^{(1)}$: elektrische Suszeptibilität

Als wichtige Konsequenz des linearen Zusammenhanges zwischen angelegtem externen elektrischen Feld und induzierter makroskopischer Polarisation folgt das Superpositionsprinzip: Wenn mehrere elektromagnetische Wellen gleichzeitig durch ein Medium propagieren, so beeinflussen sich diese nicht gegenseitig. Dies bedeutet, daß durch Wechselwirkung von Licht und Materie im Gültigkeitsbereich der linearen Optik kein Licht mit einer anderen Frequenz als der eingestrahnten entsteht.

Bei hohen Feldstärken, wie sie bei sehr kurzen intensiven Laserimpulsen auftreten, reicht diese lineare Näherung nicht mehr aus. Es müssen Terme höherer Ordnung bei der Entwicklung des Elektronenpotentials $V(x)$ berücksichtigt werden. Der Übersichtlichkeit wegen sei hier eine eindimensionale Entwicklung von $V(x)$ angegeben:

$$V(x) = \frac{m}{2} \omega_0^2 x^2 + Dx^3 + Bx^4 + \dots \quad (2.2)$$

Die Polarisation $P(t)$ kann nun wie folgt geschrieben werden:

$$\begin{aligned} P_i(t) &= \epsilon_0 \left[\sum_j \chi_{ij}^{(1)} E_j(t) + \sum_{jk} \chi_{ijk}^{(2)} E_j(t) E_k(t) + \sum_{jkl} \chi_{ijkl}^{(3)} E_j(t) E_k(t) E_l(t) + \dots \right] \\ &= P_i^L(t) + P_i^{NL}(t), \end{aligned} \quad (2.3)$$

¹¹Kleine Feldstärke heißt in diesem Zusammenhang klein gegenüber den innerhalb von Atomen herrschenden Feldern.

2 Das Experiment

wobei die Indizes jeweils über die drei Raumrichtungen laufen.

Der erste Term ($\sum_j \chi_{ij}^{(1)} E_j(t)$, lineare Suszeptibilität) beschreibt den linearen Anteil der makroskopischen Polarisation ($\vec{P}^L(t)$), die weiteren Terme lassen sich zur nichtlinearen Polarisation $\vec{P}^{NL}(t)$ zusammenfassen, wobei $\chi^{(2)}$ die quadratische und $\chi^{(3)}$ entsprechend die kubische Ordnung beschreibt. In Festkörpern liegen die Größenordnungen der Suszeptibilitäten für $\chi^{(1)}$ bei 1, für $\chi^{(2)}$ bei $10^{-10} \frac{\text{cm}}{\text{V}}$ und für $\chi^{(3)}$ bei $10^{-17} \frac{\text{cm}^2}{\text{V}^2}$ [BERGMANN und SCHÄFER, 1993].

Diese nichtlinearen Beiträge führen dazu, daß sich elektromagnetische Felder in Materie untereinander beeinflussen. Festzuhalten ist, daß durch die Wechselwirkung mehrerer Lichtbündel im Festkörper neue Frequenzen entstehen können.

Die Frequenzverdopplung (SHG)¹² und die optische parametrische Verstärkung (OPA) sind Beispiele für nichtlineare Effekte zweiter Ordnung ($\chi^{(2)} \neq 0$, vgl. Gl. 2.3), die aus Symmetriegründen nur in Kristallen ohne Inversionszentrum wie zum Beispiel BBO¹³ zu beobachten sind. Als Effekte dritter Ordnung ($\chi^{(2)} = 0, \chi^{(3)} \neq 0$, vgl. Gl. 2.3) seien die direkte Frequenzverdreifachung (THG)¹⁴, die Zweiphotonenabsorption, die Selbstphasenmodulation sowie die Selbstfokussierung genannt. Die beiden letztgenannten Effekte wurden schon im Zusammenhang mit der Kerr-Linsen-Modenkopplung im Ti:Saphir Oszillator erwähnt (siehe Abschnitt 2.1.1).

Die optisch parametrische Verstärkung

Wie oben beschrieben, verknüpft die Nichtlinearität zweiter Ordnung zwei elektromagnetische Felder mit einem weiteren. Eine Möglichkeit der Wechselwirkung stellt die optisch parametrische Verstärkung dar: Ein hochenergetisches Photon (P) wird in zwei energieärmere (S,I) unter Berücksichtigung der Energieerhaltung aufgespalten. Hierbei ist anzumerken, daß die zwei entstehenden Photonen nicht notwendigerweise dieselbe Energie haben müssen. Vielmehr ist es das frei wählbare Teilungsverhältnis, welches die faszinierende Abstimbarkeit der OPAs gewährleistet. In der Literatur wird das aufzuteilende Photon als Pump photon bezeichnet. Die entstehenden Photonen werden Signal- (höherenergetisch) und Idler photon (niederenergetisch) genannt. Für die in dieser Arbeit aufgebauten OPAs gilt: Die Pump photonen haben eine Zentralwellenlänge von 400 nm, die Signal photonen haben Wellenlängen im sichtbaren Spektralbereich (460-750 nm). Entsprechend werden die Idler photonen im Infraroten generiert.

Dieser Prozeß kann in passenden Kristallen spontan (induziert durch Vakuumfluktuationen) ablaufen. Zusätzlich kann die Konversionseffizienz in einem bestimmten Wellenlängenbereich konzentriert werden, wenn neben dem Pumpimpuls auch noch Photonen mit einer, den erwarteten Signal photonen entsprechenden, Zentralwellenlänge bereitgestellt werden¹⁵. Anschau-

¹²engl: Second Harmonic Generation

¹³ β -Barium-Borat

¹⁴engl: Third Harmonic Generation

¹⁵Man kann dies mit der stimulierten Emission bei einer Laseraktivität vergleichen.

lich bedeutet dies, daß die Energie von Photonen aus dem Pumpimpuls auf Signal- und Idlerphotonen aufgeteilt wird und am Ende des nichtlinearen Mediums mehr Signal-Photonen zur Verfügung stehen als vorher (\rightarrow Verstärkung). Zusätzlich wird ein neues elektromagnetisches Feld erzeugt (Idler). Als Folge dieser Umwandlung nimmt die Intensität des Pumplichtes ab.

Neben der Energieerhaltung muß auch die Impulserhaltung gewährleistet sein. Dies bedeutet, daß sich die drei beteiligten Wellenvektoren zu Null addieren lassen müssen (= Phasenanpassung), bzw. daß die Phasengeschwindigkeit des Pumpfeldes gleich der Summe der Phasengeschwindigkeiten von Signal- und Idlerfeld sein muß. Als Gleichung geschrieben lautet die Bedingung für die Phasenanpassung: $\vec{k}_{pump} = \vec{k}_{signal} + \vec{k}_{idler}$

Hier sind zwei Fälle zu unterscheiden:

- Die beiden Wellenvektoren \vec{k}_{signal} und \vec{k}_{idler} sind parallel. Dann gilt die skalare Gleichung $k_{pump} = k_{signal} + k_{idler}$. Dies ist der Fall der kollinearen Phasenanpassung.
- Die beiden Wellenvektoren sind nicht parallel. Dies führt zu der flexibleren nichtkollinearen Phasenanpassung.

Zu beachten ist, daß die Erfüllung der Phasenanpassungsbedingung nur in doppelbrechenden Materialien möglich ist¹⁶ (vgl. z.B. auch [YARIV, 1991, Kap. 8]).

Was sind nun die Unterschiede? Setzt man eine kollineare Geometrie voraus und ist das Medium so ausgerichtet, daß die skalare Phasenanpassungsbedingung erfüllt ist, so läßt sich einfach zeigen, daß die Gruppengeschwindigkeiten v^g der drei beteiligten elektromagnetischen Felder nicht gleich sind. Dies bedeutet anschaulich, daß die Schwerpunkte des Pump-, des Signal- und des Idlerimpulses mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Medium propagieren ($v_p^g < v_s^g < v_I^g$). Wird nun an einer Stelle im nichtlinearen Kristall ein Pumpphoton aufgespalten, so wird das generierte Idlerphoton schneller durch das Medium propagieren wie das zugehörige Signalphoton. Eben jene schnellen Idlerphotonen können aber auch als Seed-Photonen fungieren. Dies heißt aber, daß räumlich vor den (verstärkten) „Original-Signalphotonen“ nochmals durch parametrische Verstärkung Signalphotonen erzeugt werden. Entsprechend erzeugt der propagierende Signalimpuls fortlaufend Idlerphotonen räumlich hinter den schon vorhandenen. Es resultiert daraus ein nicht komprimierbarer Impuls, dessen minimale Impulsdauer durch die Länge des Kristalles und die Dauer des Pumpimpulses bestimmt ist.

In der nichtkollinearen Geometrie steht ein weiterer Freiheitsgrad zur Verfügung. So kann die Phasenanpassung für viele verschiedene Winkel Ω zwischen \vec{k}_{signal} und \vec{k}_{idler} erreicht werden.

¹⁶Im Bereich der normalen Dispersion, d.h. außerhalb jeglicher Absorptionsbanden, steigt der Brechungsindex (und sinkt damit die Phasengeschwindigkeit) für Licht bei abnehmender Wellenlänge. Somit läßt sich in einem „normalen“ Medium niemals die Phasenanpassungsbedingung erfüllen. Verwendet man jedoch ein doppelbrechendes Material, so kann dieses so orientiert werden, daß die Phasengeschwindigkeit für das kurzwellige Pumplicht größer als die der beiden anderen propagierenden Felder ist. Es kann also erst unter Verwendung der Doppelbrechung und verschiedener Polarisierungen eine Phasenanpassung erfolgen.

2 Das Experiment

Stellt man die Richtung der schnellen Idlerwelle \vec{k}_{idler} so ein, daß die Projektion der Gruppengeschwindigkeit \vec{v}_I^g in Richtung der Signalwelle \vec{v}_S^g gleich der Gruppengeschwindigkeit \vec{v}_S^g ist ($\vec{v}_I^g \cdot \cos(\Omega) = \vec{v}_S^g$), so verschwindet der oben beschriebene Effekt der Pulsverbreiterung. Der Signalpuls verbreitert sich nur noch leicht seitlich, was die räumliche Modenqualität beeinträchtigen kann, nicht aber die zeitliche Komprimierbarkeit. Hier sei noch auf ein nützliches Hilfsmittel zur Berechnung des Nichtkollinearitätswinkels Ω hingewiesen: das Programmpaket SNLO kann vielerlei Berechnungen für diverse nichtlineare Kristalle ausführen und ist kostenlos erhältlich [SMITH, 2000].

In [RIEDLE et al., 2000] ist sehr übersichtlich gezeigt, daß die eben genannte Projektionsbedingung äquivalent dazu ist, daß die Phasenfehlانpassung $\Delta\vec{k} = \vec{k}_{pump} - \vec{k}_{signal} - \vec{k}_{idler}$ in erster Näherung nicht mehr von der Signalwellenlänge abhängt. Dies ist gleichbedeutend zu der Aussage, daß eine breitbandige Phasenanpassung und somit Verstärkung möglich ist. Somit ist die ideale Voraussetzung geschaffen, intensive und sehr kurze und entsprechend breitbandige Laserimpulse zu generieren. Der nichtkollineare optisch parametrische Verstärker verstärkt also die angebotenen Seedphotonen derart, daß die sonstigen Pulseigenschaften des Seedfeldes unbeeinflusst bleiben.

Verwendet man als Seed-Lichtquelle Weißlicht (vgl. Abschnitt 2.1.3), welches z.B. in Saphir generiert werden kann, so ist man mittels des NOPAs in der Lage, einen frei wählbaren Bruchteil des Weißlichtspektrums um mehrere Größenordnungen in der Intensität zu verstärken. Welcher Wellenlängenausschnitt dies ist, kann der Experimentator durch die Wahl des Phasenanpassungswinkels und des zeitlichen Überlapps von Pumpimpuls und dem gewünschten Teil des Seedimpulses bestimmen.

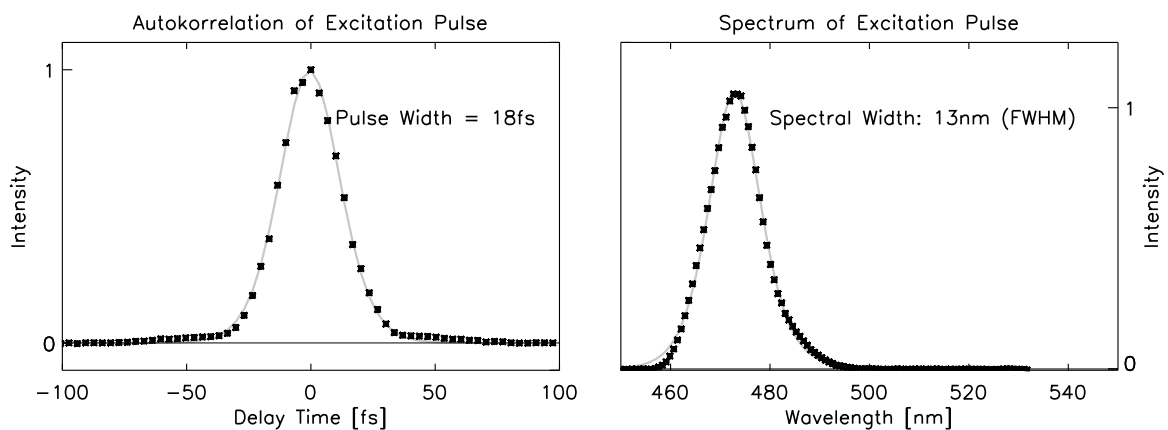


Abbildung 2.4: links: Autokorrelationsmessung von Femtosekundenlichtimpulsen, die durch einen nichtkollinearen parametrischen Verstärker erzeugt wurden. Grau ist eine Anpassung mit einer sech^2 -Funktion eingezeichnet. Diese ergibt eine Pulsbreite von 18 fs (FWHM). rechts: Das Spektrum der Lichtimpulse. Eine Datenanpassung mit der zu einem sech^2 -förmigen Puls gehörenden spektralen Verteilung liefert eine spektrale Breite von etwa 13 nm. Das Zeit-Bandbreite-Produkt liegt mit 0.32 sehr nahe am theoretischen Wert von 0.315. Diese Impulse wurden bei den Femtosekundenmessungen (vgl. Kapitel 5f.) zur Anregung der Proben verwendet (vgl. auch Abschnitt 2.1.3).

Die zeitliche Kompression des verstärkten Lichtes erfolgt im sichtbaren Spektralbereich im einfachsten Falls über einen Prismenkompressor [FORK et al., 1984].

Somit es möglich, routinemäßig im Labor wellenlängenabstimmbare Pulse mit Pulsdauern unter 20 fs zu erzeugen, welche Pulsenergien im Bereich von einigen μJ erzeugen [CERULLO et al., 1997, WILHELM et al., 1997, RIEDLE et al., 2000]. Ein Beispiel einer Autokorrelation und des zugehörigen Spektrums von Lichtimpulsen aus einem selbstgebauten NOPA ist in Abb. 2.4 gezeigt. Mit diesen Pulsen wurde ein Teil der später beschriebenen Messungen durchgeführt. Eine vollständige Angabe der Pulsparameter findet sich in Abschnitt 2.1.5, Tabelle 2.2.

Stand der Technik

Die Entwicklung neuer Materialien mit sehr großen Nichtlinearitäten und hohen Zerstörungsschwellen wie z.B. BBO und nicht zuletzt die Verfügbarkeit von immer stabileren und zuverlässigeren Femtosekundenlichtquellen führte in den letzten zehn Jahren zu einer intensiven Weiterentwicklung und Optimierung der parametrischen Verstärker speziell auch für Femtosekundenanwendungen. Desweiteren wurde ein großer Fortschritt durch die Verwendung von Weißlicht (siehe Abschnitt 2.1.3) als Seedlicht erzielt [REED et al., 1995]. Die durch die kollineare Geometrie bedingten Grenzen für die erreichbaren Pulsdauern (siehe oben) konnten durch einen nichtkollinearen Aufbau für optisch parametrische Oszillatoren (OPO) umgangen und somit Pulsdauern unter 20 fs erreichen werden [GALE et al., 1995]. Seit Ende der 90er Jahre stehen nun mit NOPAs sehr stabile, abstimmbare Laserlichtquellen im sichtbaren und nahen infraroten Spektralbereich zur Verfügung. Im Moment zeichnen sich zwei Richtungen ab, in welche die Entwicklungen führen: Einige Gruppen versuchen, durch diverse Optimierungsstrategien möglichst immer kürzere Lichtimpulse zu erzeugen. Andere nutzen die vorhandene Technik, um chemische Reaktionen zu untersuchen und in einem zweiten Schritt auch zu beeinflussen.

Im Folgenden sollen noch technische Besonderheiten verschiedener Entwicklungen angesprochen werden, mit deren Hilfe kürzestmögliche Impulse erzeugt werden können. Ein Ansatz ist, die Prismenkompressortechnik zu verbessern und z.B. statt der normalen Brewsterprismen jeweils Paare von sehr dünnen, schmalen Prismen zu verwenden, um die Materialdispersion zu verringern [CERULLO et al., 1998]. Eine andere Möglichkeit wurde von [SHIRAKAWA et al., 1999] vorgestellt: diese komprimierten das Weißlicht vor der Verstärkung, um eine möglichst große Bandbreite zu erhalten. Zusätzlich verkippten sie die Pulsfront des Pumpimpulses für einen besseren Überlapp. Das Ergebnis sind die zur Zeit kürzesten Pulse von 4.7 fs Dauer.

Eine andere Strategie besteht darin, auf den Prismenkompressor zu verzichten und statt dessen eine aktiv geregelte Dispersionskontrolle einzubauen. Beispiele hierfür sind deformierbare Spiegel ([ZEEK et al., 1999]) sowie 4-f Gitteranordnungen, bei denen in der Fourierebene z.B. ein LCD-Display angebracht ist. Durch Anlegen von Spannungen an die einzelnen Pixel kann der Brechungsindex und damit die Lichtlaufzeit separat für einzelne Wellenlängenbereiche

eingestellt werden ([YELIN et al., 1997]). [VERLUISE et al., 2000] konnten zeigen, daß Femtosekundenlichtimpulse auch allein mit Hilfe eines akusto-optischen Kristalles komprimiert werden können.

Der große Vorteil der aktiven Dispersionskontrolle ist, daß man diese auch zur Erzeugung von nahezu beliebig einstellbaren Impulsformen verwenden kann. So sind Experimente durchführbar, bei denen ein bestimmter Phasen- und Amplitudenverlauf vorgegeben und die Auswirkung auf die induzierten Reaktionen studiert wird. Koppelt man eine Meßgröße in den kontrollierenden Computer zurück, so besteht die Möglichkeit die beste Pulsform durch Anwenden diverser Algorithmen zu ermitteln. Die Technik, chemische Reaktionen durch speziell geformte Laserimpulse zu steuern, ist eng mit den Begriffen „pulse shaping¹⁷“ und „coherent control¹⁸“ verknüpft (siehe z.B. [TANNOR und RICE, 1988, YAN et al., 1993, ASSION et al., 1998, GORDON et al., 1999]).

Zum Abschluß dieses Abschnittes sei noch darauf hingewiesen, daß die Methoden zur Charakterisierung von ultrakurzen bzw. in der Pulsform aktiv modifizierten Lichtimpulsen alles andere als trivial sind. Zwei moderne Methoden dazu sind „frequency-resolved optical gating (FROG)“ und „spectral phase interferometry for direct electric field reconstruction (SPIDER)“, welche z.B. in [GALLMANN et al., 1999] und [GALLMANN et al., 2000, GALLMANN et al., 2001] beschrieben sind.

2.1.3 Die experimentelle Technik: Das Pump-Probe-Experiment

Viele physikalische, chemische und biochemische Prozesse laufen auf einer bis in den Zeitbereich von wenigen Femtosekunden reichenden Zeitskala ab. Eine gute Möglichkeit, solch schnelle Vorgänge zu untersuchen, bietet die Pump-Probe-Spektroskopie¹⁹. Hierbei wird die zu untersuchende Probe von einem ersten, intensiven Laserimpuls angeregt (Anregimpuls). Die Weiterentwicklung des Zustandes der Probe (z.B. die Absorption des elektronisch angeregten Zustandes) wird mittels eines zweiten, schwachen Laserimpulses (Abtastimpuls) beobachtet. Die 'Weiterentwicklung beobachten' bedeutet hier, daß die Transmission der Probe in Abhängigkeit der Verzögerungszeit t_D zwischen dem Anreg- und dem Abtastimpuls aufgezeichnet wird. In einem derartigen Experiment ist die zeitliche Auflösung auch durch die Pulsdauern der beiden Lichtimpulse beschränkt. Deswegen wurden für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente die oben vorgestellten Pulserzeugungsverfahren eingesetzt (siehe Abschnitt 2.1.2).

Bei der Art der Detektion des Abtastimpulses sind zwei prinzipielle Varianten zu unterscheiden:

- Die spektral integrale Messung verwendet im Prinzip einen einzigen Detektor (z.B. Si-Diode), der das gesamte durch die zu messende Probe transmittierte Licht unabhängig

¹⁷engl. pulse shaping: Lichtimpulsformung

¹⁸engl. coherent control: kohärente Kontrolle

¹⁹engl. pump probe spectroscopy: Anreg-Abtast-Spektroskopie

von der Wellenlänge aufammelt.

- Bei einer spektral auflösenden Messung²⁰ wird das Abtastlicht nach der Probe durch ein Spektrometer spektral aufgespalten und dann mittels mehrerer Detektoren (z.B. CCD²¹, Si-Diodenarray) registriert. Hat man eine spektral sehr breitbandige Lichtquelle zur Verfügung, so bietet diese Art der Detektion die Möglichkeit, Messungen bei vielen Abtastwellenlängen gleichzeitig durchzuführen.

Die hier vorgestellten Experimente wurden mit der letztgenannten Detektionsmethode ausgeführt.

Die Weißlichterzeugung

Um Lichtimpulse mit hoher spektraler Breite (sogenanntes „Weißlicht“²²) zu erhalten, bieten sich diverse Alternativen an. So ist es möglich, in edelgasgefüllten Hohlfasern [NIBBERING et al., 1997, NISOLI et al., 1997] oder auch in sehr dünnen Quarzfasern²³ [KNOX et al., 1985] große Bandbreiten zu erzielen. Neuerdings sind auch Quarzfasern im Einsatz, deren Kern von sehr vielen Hohlräumen umgeben ist. Die wabenförmige Mikrostruktur führt dazu, daß diese Faser eine negative Gruppengeschwindigkeitsdispersion besitzt [RANKA et al., 2000a], was die Erzeugung der bisher breitesten Spektren (Breite 550 THz) ermöglichte [RANKA et al., 2000b]. Eine andere, sehr häufig verwendete Methode ist die Weißlichterzeugung in transparenten Festkörpern [FORK et al., 1983]. Das am meisten verbreitete Medium hierfür ist Saphir, in welchem sich sehr stabile Pulse erzeugen lassen, sowohl hinsichtlich der Amplitudenschwankungen von Impuls zu Impuls als auch bezüglich der Langzeitstabilität über viele Tage hinweg.

Eine exakte Beschreibung des der Weißlichterzeugung in transparenten Medien zugrunde liegenden Mechanismus ist derzeit noch nicht verfügbar, es gibt jedoch Erklärungsansätze: Neben der Selbstphasenmodulation und der Selbstfokussierung [REED et al., 1995] und vielen anderen nichtlinearen Effekten wie dem parametrischen Vier-Photonen-Mischen, der stimulierten Raman- und Brillouinstreuung und der Ausbildung von Schockwellen [BELLINI und HÄNSCH, 2000] bestimmt auch die Bandlücke des verwendeten Materials die spektralen Eigenschaften des Kontinuums [BRODUER und CHIN, 1998, BRODUER und CHIN, 1999].

Fokussiert man Licht mit etwa 1 μ J Pulsenergie und 800 nm Wellenlänge in Saphir, so erhält man einen Impuls, dessen Spektrum von etwa 450 nm bis ins nahe Infrarot (ca. 1600 nm) reicht (vgl. Abb. 2.5 (links) und Version 1 des Versuchsaufbaues). Innerhalb von jeweils 10 nm Bandbreite ist dabei eine Energie von ca. 0.1 nJ enthalten [REED et al., 1995]. Tauscht man Saphir gegen CaF₂, welches eine größere Bandlücke besitzt und somit eine größere Bandbreite

²⁰auch: dispersive Messung

²¹Charge Coupled Device

²²In der Fachliteratur als „white light continuum“ oder auch „supercontinuum“ bezeichnet.

²³sogenannte Monomode-Fasern

2 Das Experiment

erzeugen sollte, so erhält man das in Abbildung 2.5 rechts gezeigte Spektrum, welches bis in den ultravioletten Spektralbereich reicht (vgl. Versuchsaufbau 2).

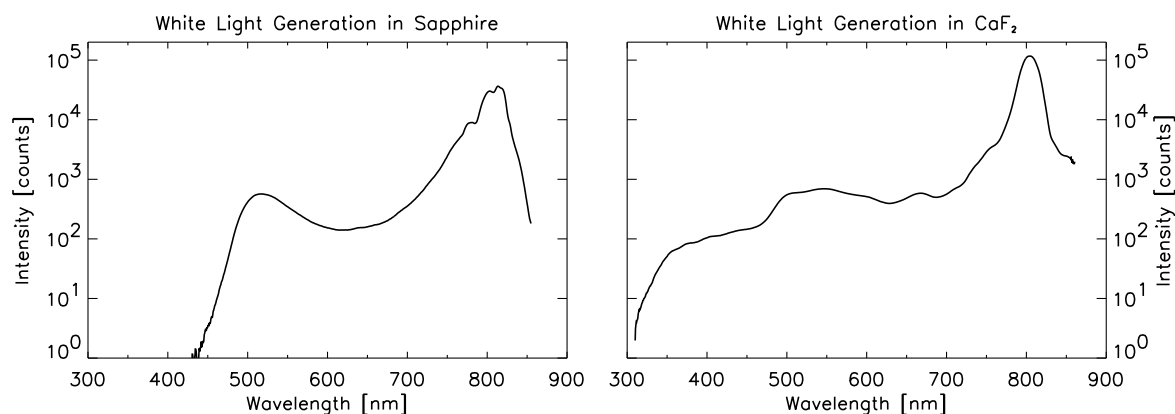


Abbildung 2.5: Weißlichterzeugung in den transparenten Medien Saphir (links) und CaF₂ (rechts). Die Intensitäten der beiden Spektren sind nicht aufeinander normiert und nicht auf die spektrale Empfindlichkeit des Spektrometers korrigiert.

Doch obwohl der Entstehungsprozeß sehr kompliziert und von vielen Parametern abhängig ist, konnte gezeigt werden, daß dieser gut kontrollierbar ist. Erzeugt man mit annähernd denselben Pulsparametern zwei unabhängige Weißlichtkontinua, so kann man diese, trotz der Vielzahl an der Entstehung beteiligten nichtlinearen Prozesse, zur stabilen Interferenz bringen, und zwar über den kompletten Spektralbereich [BELLINI und HÄNSCH, 2000]. Dies ist auch für die Pump-Probe-Experimente von Bedeutung, denn diese Technik wäre mit Weißlicht als Abtastlicht nicht anwendbar, wenn die Erzeugung jedesmal andere, z.B. im Zeitnullpunkt verschobene, Weißlichtimpulse generieren würde.

Die Technik, Weißlicht als Abtastlicht zu verwenden, bringt leider nicht nur Vorteile: Aufgrund der Gruppengeschwindigkeitsdispersion erreichen die verschiedenen spektralen Komponenten des Weißlichtes die zu untersuchende Probe zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Beispiele siehe unten), was bei der Auswertung der Meßdaten berücksichtigt werden muß. Durch eine Minimierung der Lichtweglänge kann der Einfluß der Dispersion auf die Zeitauflösung gering gehalten werden. Neben dem wellenlängenabhängigen Zeitnullpunkt²⁴ erhält man sowohl durch die dispersive Detektion als auch durch den „gechirpten“ Abtastimpuls während des zeitlichen Überlapps von Anreg- und Abtastimpuls nichtresonante kohärente Artefakte im Meßsignal [KOVALENKO et al., 1999]. Diese Erschweren die Interpretierbarkeit der Meßdaten innerhalb der Kreuzkorrelationsbreite des Experimentes erheblich, bieten zum anderen aber auch die Möglichkeit, den Abtastimpuls genauer charakterisieren zu können, was aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurde.

²⁴Zeitpunkt, an dem der Anreglichtimpuls und die Komponente des Abtastlichtimpulses mit der Wellenlänge λ_{probe} zeitgleich die Probe erreichen.

Der Femtosekunden-Aufbau

Die ersten Messungen wurden im Sommer 1999 durchgeführt. Zur Kontrolle wurden im Sommer 2000 Teile der Messungen wiederholt. Desweiteren konnte der Datenbestand während dieser zweiten Meßphase erheblich erweitert werden, zum einen, da weitere Proben zur Verfügung standen, zum anderen, weil ein größerer Wellenlängenbereich zugänglich war. Da die experimentellen Aufbauten zwar vom Prinzip her gleich, aber in den Details doch recht unterschiedlich waren, werden hier beide mit ihren jeweiligen Besonderheiten vorgestellt. Hierbei orientiert sich die Beschreibung im Groben an der Reihenfolge in der die optischen Komponenten im Experiment durchlaufen werden.

Version 1 Etwa die Hälfte der gesamten Ausgangsleistung des oben beschriebenen Verstärkersystems standen für die Experimente bereit, der Rest wurde für ein anderes Experiment verwendet. Von den verfügbaren $400\mu\text{J}$ wurden etwa 2% zur Erzeugung des Abtastlichtes verwendet (oberer Ast in Abb. 2.6). Der übrige Teil war für die Erzeugung des Anreglichtes mittels eines NOPAs reserviert (unterer Ast).

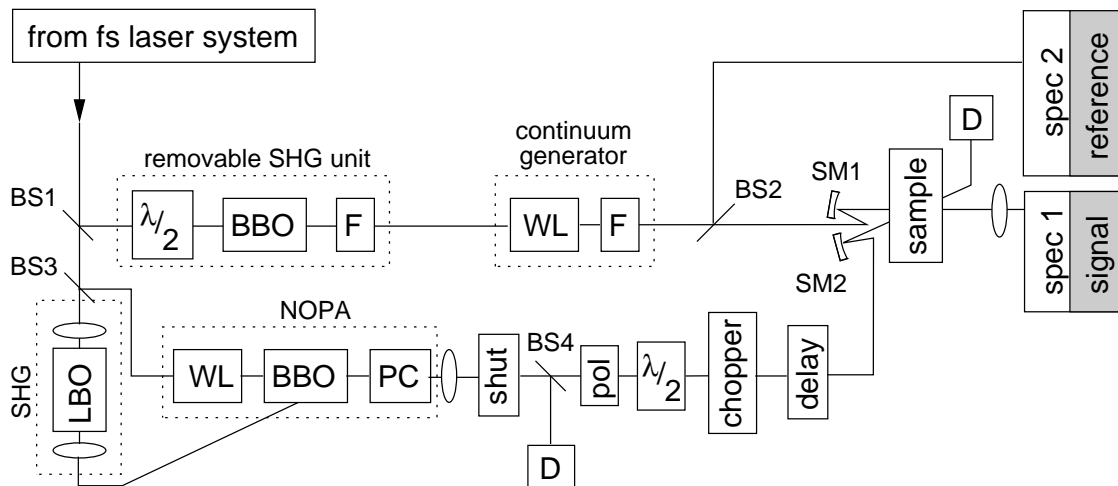


Abbildung 2.6: *Prinzipische Skizze Pump-Probe-Aufbau: BBO: β -Bariumborat, BS: Strahlteiler, D: Detektor, delay: variable Verzögerung, chopper: Chopperrad für Korrektur der Anlagendrift (siehe Text), F: Filter, LBO: Lithiumtriborat, pol: Polarisator, PC: Prismenkompressor, shut: mechanischer Strahlblocker (siehe Text), spec: Spektrometer und Vielkanaldetektor, SHG: Frequenzverdoppler, SM: sphärische Hohlspiegel, WL: Weißlichterzeugung in Saphir*

Die Erzeugung des Abtastweißlichtes erfolgte in diesem Aufbau in einer 2 mm dicken, in Z-Richtung orientierten²⁵ Saphirscheibe. Erzeugt man das Kontinuum mit Laserimpulsen, deren Zentralwellenlänge 800 nm ist, so ist der spektral zugängliche Bereich auf Abtastwellenlängen $\lambda_{probe} \geq 450$ nm beschränkt (siehe Abb. 2.5). Der gewünschte Meßbereich für λ_{probe} reicht

²⁵Saphir ist doppelbrechend. Daher muß auf die Ausrichtung der optischen Achse geachtet werden.

2 Das Experiment

aber von etwa 300 nm bis 700 nm, weswegen auch mit frequenzverdoppelten Laserimpulsen (400 nm) Weißlicht erzeugt wurde. Dafür konnte eine Verdopplereinheit vor der Kontinuums-erzeugung eingebaut werden. Diese bestand aus einer achromatischen $\lambda/2$ -Wellenplatte zur Anpassung der Polarisation, einem Verdopplerkristall und einem Filter, welcher für die Laserfundamentale nahezu keine Transmission zeigt. Die Polarisationen wurden hierbei immer so eingestellt, daß das generierte Weißlicht parallel zur Oberfläche des optischen Tisches polarisiert war²⁶. Mittels eines variabel einstellbaren Strahlteilers (nicht eingezeichnet) war es möglich, die Pulsenergie so einzustellen, daß diese in beiden Fällen etwa $1 \mu\text{J}$ in der Saphirplatte betrug.

Damit das verglichen zum Weißlicht extrem intensive erzeugende Laserlicht nicht in die Probe gelangt, muß es herausgefiltert werden. Dies geschah mit geeigneten hochreflektierenden Spiegeln. Wurde das Kontinuum mit der Laserfundamentalen erzeugt (800 nm), dann wurde ein HR800-Spiegel (Hersteller: Laser Components) als Filter eingesetzt. Im Falle der Erzeugung mit der zweiten Harmonischen (400 nm) kam ein HR400-Spiegel (Hersteller: Laser Components) zum Einsatz. Je nach Reflexionswinkel des Spiegels konnte der nutzbare Spektralbereich dann entweder auf $\lambda_{probe} = 350 \dots 410 \text{ nm}$ oder auf $\lambda_{probe} = 410 \dots 520 \text{ nm}$ eingestellt werden. Das so gefilterte Abtastlicht wurde durch einen Strahlteiler in zwei Bündel aufgespalten, wovon eines, ohne die Probe zu passieren, auf ein Spektrometer gelenkt wurde. Das zweite Bündel wurde mittels eines sphärischen Hohlspiegels (SM1) auf die Probe fokussiert (Bündelradius je nach Wellenlänge etwa 40 - 120 μm) und anschließend mit einer Linse auf den Spalt des zweiten Spektrometers abgebildet. Eine genauere Beschreibung der Detektion und der Meßdatenaufnahme erfolgt in Abschnitt 2.2.1.

Aufgrund der Saphirscheibe, die als Weißlicht erzeugendes Medium diente, und den relativ dicken Filtern (Spiegelsubstrate) betrug die Dispersion des Zeitnullpunktes (siehe auch Abschnitt 28, S. 18) im Wellenlängenbereich von 352 – 400 nm 0.55 ps²⁷, von 408 – 520 nm 1.22 ps und von 490 – 700 nm 0.21 ps.

Um Anregungsimpulse bei einer Wellenlänge von 470 nm zu erhalten, wurde ein nichtkollinear optisch parametrischer Verstärker (NOPA) eingesetzt, wie er in Abschnitt 2.1.2 vorgestellt wurde. Das benötigte Seedlicht wurde in einer 2 mm dicken Saphirplatte erzeugt. Als Pumplicht für den NOPA wurde das frequenzverdoppelte Licht des Verstärkers verwendet, dessen Erzeugung in [NÄGELE, 1998] detailliert beschrieben ist. Da die gewünschte Wellenlänge am Rande des zugänglichen Spektralbereiches eines so betriebenen NOPAs liegt, ist die erhaltene Konversionseffizienz geringer als die in der Literatur angegebenen Werte, welche sich auf Wellenlängen $\geq 500 \text{ nm}$ beziehen. Zu erreichen waren etwa $2 \mu\text{J}$ Pulsenergie am Ausgang des NOPA bei einer Pumpulsenergie von mehreren zehn Mikrojoule. Die so erhaltenen Impulse wurden mittels eines Prismenkompressors auf Pulsdauern unter 20 fs komprimiert (siehe Abb. 2.4).

²⁶Im Nachhinein hat sich herausgestellt, daß diese Bedingung nicht immer erfüllt war. Messungen, bei denen dies der Fall war, wurden für die weitere Auswertung nicht verwendet.

²⁷Zeitdifferenz zwischen den Nullpunkten der Kanäle mit der längsten und der kürzesten gemessenen Wellenlänge.

Im Anschluß an den Prismenkompressor folgte ein Strahlblocker, der durch einen Elektromagneten in den Strahlengang des Anreglichtes gedreht werden kann. Angesteuert wurde der Magnet von der Kontrolleinheit der Spritzenpumpe, welche die Probe durch die Meßküvette pumpt (siehe unten, 36). Die nachfolgende Diode diente zum einen zur Kontrolle von Energie und Rauschen des Anreglichtes, zum anderen zur Synchronisation der Messung mit der Spritzenpumpe: blockierte die Steuereinheit der Pumpe mittels des Strahlblockers das Anreglicht, so wurde über die Diode das Meßprogramm angehalten, bis der Strahlblocker wieder entfernt war. Mittels des Polarisators und der achromatischen $\lambda/2$ -Wellenplatte konnte die Polarisation des Anreglichtes relativ zum Abtastlicht definiert eingestellt werden. Die Messungen wurden mit paralleler, senkrechter und magischer Ausrichtung der Polarisierungen durchgeführt. Da die Anlagenparameter nicht über die gesamte Meßzeit von mehreren Stunden pro Probe stabil gehalten werden können, korrigiert die Meßroutine langsame Veränderungen der Nulllinien. Hierfür ist ein weiterer Strahlblocker notwendig, der vom Meßprogramm gesteuert wird. Nun wurde das Anreglichtbündel noch über eine in der Länge variable Verzögerungsstrecke geleitet, um die verschiedenen Verzögerungszeiten t_D zwischen Anreg- und Abtastlichtimpuls einstellen zu können. Positioniert wird die Verzögerungsstrecke mittels eines auf einen Mikrometer genau positionierbaren²⁸ Schrittmotors, der von der Meßroutine gesteuert wird. Hiermit sind Verzögerungszeiten t_D bis 1.4 ns einstellbar. Das Anreglicht wurde dann mittels eines sphärischen Hohlspiegels (SM2) auf die Probe fokussiert (Bündelradius etwa 100 μm), wobei die Impulsenergien zwischen 0.5 und 1.1 μJ betragen.

Die Probe wurde durch eine Meßküvette aus Quarzglas, eine Spezialanfertigung der Firma Hellma, gepumpt, welche einen Durchflußkanal mit einer Breite von 1 mm und einer Schichtdicke von 0.5 mm besitzt. Die Anschlußstutzen befinden sich direkt über den Enden des Kanals. Als Frontglas ist eine nur 0.3 mm dicke Quarzglasscheibe aufgesetzt, um Dispersions-effekte zu minimieren.

Eine Zusammenfassung der experimentellen Parameter des oben beschriebenen experimentellen Aufbaus findet sich in Abschnitt 2.1.5, Tabelle 2.2.

Version 2 Da die erreichten Anlagenparameter und die Handhabbarkeit des experimentellen Aufbaues noch nicht den gewünschten Anforderungen entsprachen, wurde der Meßplatz nochmals vollständig überarbeitet. Wesentliche Neuerungen gegenüber der Version 1 waren:

- Die Erzeugung des frequenzverdoppelten Laserlichtes wird nun in BBO vorgenommen.
- Der parametrische Verstärker besteht aus zwei Untereinheiten: einem Vorverstärker, der die Aufgabe hat, genügend Seedphotonen für die zweite Stufe zur Verfügung zu stellen, damit diese in Sättigung betrieben werden kann. Es konnten hiermit Lichtimpulse bei etwa $\lambda_{pump} = 480 \text{ nm}$ erzeugt werden, die ein reduziertes Schuß-zu-Schuß-Rauschen von unter einem Prozent (rms) aufwiesen. Allerdings litt dabei die Komprimierbarkeit der Impulse. Da das Ziel dieser Arbeit die Untersuchung von Reaktionen war, die langsamer als etwa 200 fs ablaufen, konnte dieser Verlust an Zeitauflösung toleriert werden.

²⁸Dies entspricht einer zeitlichen Schrittweite von 6.67 fs wegen der einfachen Faltung.

2 Das Experiment

- Eine weitere $\lambda/2$ -Wellenplatte vor dem Polarisator ermöglichte eine genaue Einstellung der Anregungsenergie.

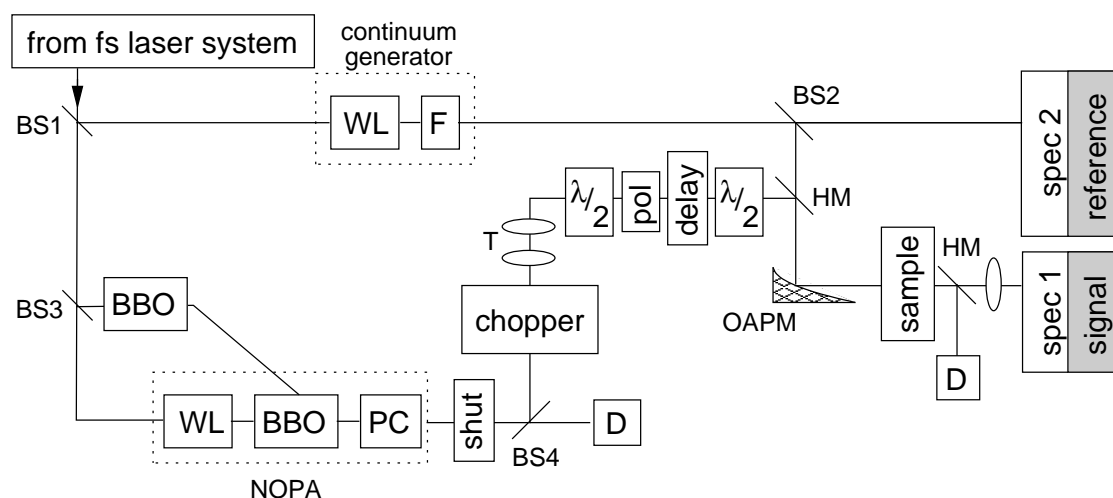


Abbildung 2.7: Prinzipskizze Pump-Probe-Aufbau Version 2: BBO: β -Bariumborat, BS: Strahlteiler, D: Detektor, delay: variable Verzögerung, driftkorr chopper: Chopperrad für Korrektur der Anlagen-drift (siehe Text), F: Filter, HM: Halbierter Spiegel, OAPM: off-axis Parabolspiegel, pol: Polarisator, PC: Prismenkompressor, shut: mechanischer Strahlblocker (siehe Text), spec: Spektrometer und Vielkanaldetektor, T: Teleskop, WL: Weißlichterzeugung

- Saphir als Medium zur Abtastlichterzeugung wurde durch Kalziumfluorid (CaF_2) ersetzt. Da das Spektrum von mit der Laserfundamentalen in CaF_2 erzeugten Lichtimpulsen bis etwa 300 nm reicht (vgl. Abbildung 2.5), sind nicht mehr wie bei Aufbau 1 drei sondern nur noch eine Messung notwendig, um den interessierenden Wellenlängenbereich von etwa 320 nm bis 650 nm abzudecken. Anfängliche Probleme mit der Haltbarkeit²⁹ konnten durch kontinuierliches Verschieben der CaF_2 -Platte gelöst werden. Die Reduktion des im Strahlengang vorhandenen Materials um einen Faktor 5 (von ca. 1 cm auf 2 mm) brachte eine erhebliche Minderung der Nullpunktsdispersion auf nur noch 0.7 ps über den gesamten verwendeten Spektralbereich, womit weitere Meßzeit eingespart werden konnte. Ebenso konnte erstmals für den gesamten Spektralbereich bei der Mittelung von 30000 Laserpulsen Absorptionsänderungen $< 10^{-4}$ aufgelöst werden.
- Der hochreflektierende Spiegel als Filter nach der Weißlichterzeugung wurde durch einen 96% reflektierenden Auskoppelspiegel ersetzt, dessen Substratdicke nur 1 mm betrug (Hersteller: Laser Components).
- Desweiteren wurde ein Paraboloidspiegel zur Fokussierung der Lichtbündel auf die Probe eingesetzt, um die Abbildungseigenschaften zu verbessern. Der Fokusdurchmesser

²⁹Nach wenigen Minuten kam der Prozeß der Weißlichterzeugung zum Erliegen. Grund hierfür war die Zerstörung der Kristalloberfläche, vermutlich aufgrund von lokaler thermischer Überlastung.

des Anregungslichtbündels betrug etwa $100\mu\text{m}$, wohingegen der des Abtastlichtes je nach Wellenlänge zwischen $30\mu\text{m}$ und $70\mu\text{m}$ lag.

- Ein Teleskop vor der variablen Verzögerungsstrecke gewährleistete größtmögliche Parallelität des Strahlenbündels im Bereich dieser Strecke.
- Die variable Verzögerungsstrecke war für einen Teil der Messungen vierfach gefaltet, um Messungen bis zu Verzögerungszeiten von $t_D = 3.4\text{ ns}$ durchführen zu können.

Der Meßplatz selbst, an dem sich die Probe befand, wurde gegenüber der ersten Version nicht verändert. In Abschnitt 2.1.5 Tabelle 2.2 sind die wichtigsten experimentellen Parameter tabellarisch zusammengefaßt.

Durch weitere konsequente Reduktion des Materials im Abtaststrahlengang, die Verwendung von dünneren Küvetten und die Erzeugung von komprimierbaren Anregpulsen unter Verwendung von CaF_2 als Seedlichtquelle für den NOPA sind in jüngster Vergangenheit (November 2000) mit diesem Aufbau Kreuzkorrelationsbreiten von 20 fs im sichtbaren Spektralbereich erreicht worden [HUBER et al., 2001].

2.1.4 Zusätzliche Infrastruktur

Zusätzlich zu den optischen Aufbauten am Lasertisch waren noch weitere Geräte notwendig, um die ab Kapitel 5 vorgestellten Experimente durchführen zu können. Diese sollen hier beschrieben werden.

UV-Belichtungsmodul

Die untersuchten Proben können in zwei Konformationen vorliegen (siehe Kapitel 4ff.), wobei der *trans*-Zustand thermisch langzeitstabil ist (siehe Abschnitt 4.1.1). Um während der *cis*-Messungen ein stationäres Konzentrationsverhältnis aufrecht zu erhalten, muß die Probe dauernd belichtet werden. Der hierzu für alle Proben verwendbare Spektralbereich umfaßt Wellenlängen von 330 – 380 nm. Da die Anzahl der pro Zeiteinheit isomerisierbaren Moleküle linear mit der Lichtintensität skaliert, ist eine möglichst hohe Lichtleistung in diesem Wellenlängenbereich notwendig.

Solche Anforderungen erfüllen z.B. Hg(Xe) Bogenlampen. Die hier verwendete Ausführung hat eine elektrische Leistungsaufnahme von 1000 W. Diese Lampen emittieren von etwa 220 nm bis ins Infrarote, wobei dem kontinuierlichem Spektrum einige intensive Spektrallinien überlagert sind. Das Spektrum wird durch einen wassergekühlten Filter (UG11, 2 mm, [SCHOTT, 1990]) auf den Wellenlängenbereich unter 380 nm eingeschränkt, in welchem sich noch drei Spektrallinien hoher Intensität bei etwa 313 nm, 335 nm und 365 nm befinden. Da

2 Das Experiment

die kurzwelligste Komponente für die Messungen an den Azopeptiden nicht verwendbar ist³⁰, wurde mittels eines zweiten Filters (WG320, 2 mm, [SCHOTT, 1990]) die Transmission der Filteranordnung auf den Spektralbereich 320 – 380 nm eingeschränkt. In Abbildung 2.8 ist das Spektrum der Hg(Xe)-Bogenlampe nach der Filterung zu sehen.

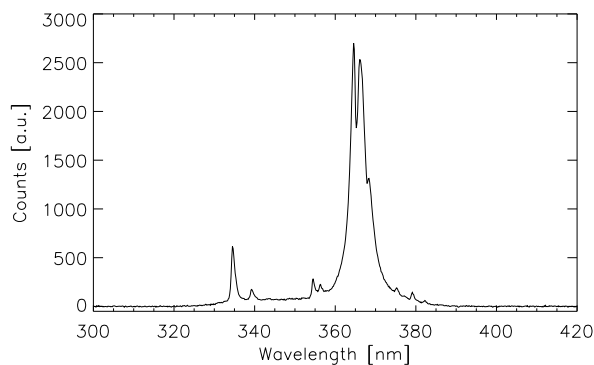


Abbildung 2.8: Spektrum Hg(Xe)-Bogenlampe nach Transmission durch die Filtergläser UG11 und WG320, je 2 mm.

Da der Betrieb der Lampe mit einer erheblichen Wärmeentwicklung und nicht zu vernachlässigenden elektromagnetischen Störfeldern³¹ verknüpft ist, wurde diese in einem Nebenraum betrieben und das Licht mittels eines geeigneten Lichtleiters zum Probenreservoir (siehe unten) geführt. Am Ende des Lichtleiters standen 100 mW Lichtleistung zur Verfügung, welche hauptsächlich auf die Spektrallinie bei 365 nm konzentriert war.

Pumpenstand und Meßküvette

Die Bildung von langlebigen Photoprodukten aufgrund der Isomerisierung erfordert einen Austausch des Probenvolumens vor jedem Laserschuss. Eine mögliche Lösung ist die Verwendung einer Durchflußküvette. Gleichzeitig müssen die Experimente mit sehr begrenzten Probenmengen (3 ml) durchgeführt werden. Da sämtliche untersuchte Proben in dem Lösungsmittel DMSO³² gelöst waren, ist eine weitere Voraussetzung die Lösungsmittelverträglichkeit aller damit in Berührung stehenden Komponenten.

Eine Möglichkeit, dies zu realisieren, ist eine Spritzenpumpe (siehe Abb. 2.9). Die Probe wird in eine gasdichte Spritze (Firma Hamilton) gefüllt und auf einen motorisierten Schlitten gespannt. Dieser zieht und schiebt den Kolben der Spritze mit definierter, einstellbarer Geschwindigkeit hin und her. Durch den Teflonschlauch wird die Probe durch die Meßküvette in das Ausgleichsgefäß (eine Glaspipette) gedrückt bzw. zurück in die Spritze gesogen.

³⁰Die Proben würden dann im Maximum der *cis*- $\pi\pi^*$ -Bande beleuchtet und das Konzentrationsverhältnis zu Ungunsten der *cis*-Isomerenkonzentration verschoben (vgl. Kapitel 4ff).

³¹Das Dunkelrauschen der Detektoren nimmt meßbar zu.

³²DMSO: Dimethylsulfoxid

Um in den Umkehrpunkten der Bewegung eine Photoakkumulation zu vermeiden, wurde zusätzlich während der Umkehrphase die Messung automatisch angehalten, indem ein elektrisches Signal an einen im Strahlengang eingebauten Strahlblocker gesendet wurde, solange sich der Kolben der Spritze im Umkehrbereich befand (vgl. Abschnitt 2.1.3).

Bei einigen Messungen ergab sich zusätzlich die Notwendigkeit, die Meßdaten nur dann aufzuzeichnen, wenn sich der Kolben in eine bestimmte Richtung bewegt (z.B. in die Spritze hinein), da teilweise im ultravioletten Spektralbereich starke Signalschwankungen je nach Pumprichtung zu registrieren waren. Das Licht aus dem UV-Belichtungsmodul konnte bei Bedarf am Beginn der Glaspipette (sehr nahe bei der Küvette) sowie am vorderen Ende der Spritze eingestrahlt werden.

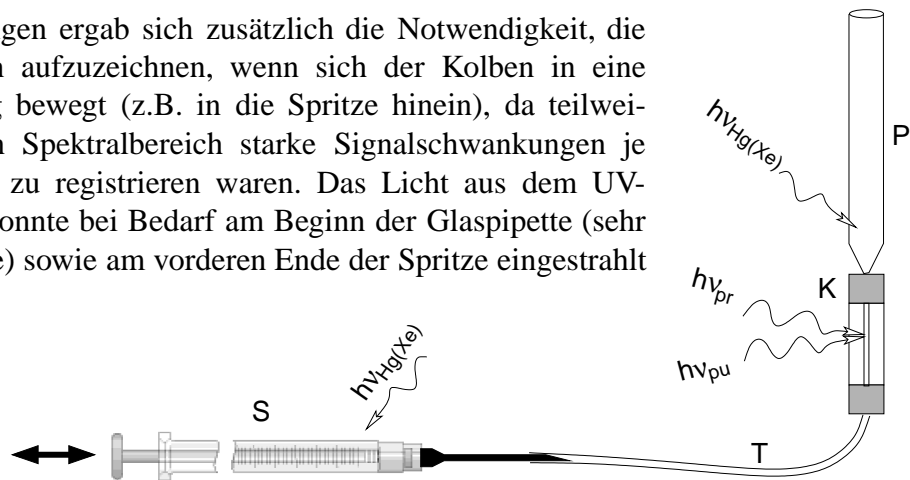


Abbildung 2.9: *Prinzipskizze Spritzenpumpe: S: Gasdichte Hamiltonspritze 5ml, T: Teflonschlauch, K: Meßküvette aus Quarzglas, P: Glaspipette als Auffangbehälter, $h\nu_{pu}$: Anregungsimpuls, $h\nu_{pr}$: Abtastimpuls, $h\nu_{Hg(Xe)}$: Belichtung mit UV-Belichtungsmodul*

2.1.5 Technische Daten im Überblick

Zum schnellen Nachschlagen folgen auf der nächsten Seite tabellarisch zusammengefaßt die wichtigsten Parameter des Femtosekunden-Oszillators, des regenerativen Verstärkers und der beiden aufgebauten Experimente.

2 Das Experiment

	Oszillator	Verstärker
Pumplaser in der 2. Meßserie	Ar ⁺ -Laser, 3.5 W cw, multiline YVO ₄ -Festkörperlaser, 2.7 W cw, 527 nm	Nd:YLF, 10 mJ, 527 nm
Zentralwellenlänge λ	800 nm	800 nm
Bandbreite	44 nm	15 nm
Pulsbreite ³³ T_{FWHM}	25 fs mit ext. Kompression	100 fs
Repetitionsrate	90 MHz	1 kHz
Pulsenergie	2.1 nJ	1 mJ (nach Kompressor)
Transmission Expander		≈ 72 %
Transmission Kompressor		≈ 66 %
Puls-zu-Puls Schwankung	nicht bestimmt	< 1%

Tabelle 2.1: Technische Daten des Ti:Saphir-Oszillators und des regenerativen Verstärkers

		Version 1	Version 2
		des experimentellen Aufbaus	
Anregung:	Erzeugung mit	NOPA einstufig	NOPA zweistufig
	Zentralwellenlänge	470 nm	480 nm
	Pulsbreite T_{FWHM}	20 fs	40 – 80 fs
	Pulsenergie am Probenort	0.5 – 1.1 μ J	0.3 – 0.4 μ J
	Bündeldurchmesser	100 μ m	100 μ m
Abtastlicht:	Erzeugung mit	Saphir	CaF ₂
	gleichzeitig verwendbare Wellenlängenbereiche	350 – 410 nm 410 – 520 nm 490 – 700 nm	300 – 1100 nm
	Bündeldurchmesser	40 – 120 μ m	30 – 70 μ m
	verwendete Fokussierspiegel	2 sphärische für Anreg/Abtastlicht	1 off-axis Paraboloid für beide Bündel
	max. Verzögerungszeit t_D	1.4 ns	1.7 ns bzw. 3.4 ns
	Kreuzkorrelationsbreite	ca. 80 fs	ca. 50 – 80 fs

Tabelle 2.2: Experimentelle Parameter im Überblick

³³FWHM: Volle Breite auf halber Höhe (full width at half maximum)

2.2 Meßdatenerfassung

Der Weg von Photonen im Detektor bis zu fertig aufbereiteten Meßdaten ist ähnlich weit wie der von der Erzeugung von Femtosekundenpulsen bis zum Anregen der zu untersuchenden Probe mit Licht der gewünschten Wellenlänge. Daher werden in den folgenden Abschnitten die Meßdatenaufnahme, die Durchführung der Meßreihen und die nachfolgende Datenaufbereitung genauer vorgestellt.

2.2.1 Datenaufnahme

Die zu untersuchenden Proben zeigen Transmissionsänderungen im Promillebereich. Da das Rauschen des Lasers und auch des Weißlichtes erheblich größer ist, ist die Verwendung einer Referenzdetektion³⁴ erforderlich. Hierzu wird das Abtastlicht mittels des Strahlteilers BS2 (siehe Abbildung 2.6) in zwei Bündel aufgespalten. Ein Teil passiert das vom Anregungslichtimpuls beleuchtete und somit angeregte Probenvolumen, ehe die Intensität $I_{\text{signal}}(\lambda_{\text{probe}}, t_{\text{D}})$ von dem Detektor hinter dem Spektrometer 1 (spec1) gemessen wird. Die Intensität $I_{\text{ref}}(\lambda_{\text{probe}}, t_{\text{D}})$ des zweiten Teiles dient als Referenz und wird direkt vom einem weiteren Detektor am Spektrometer 2 (spec2) bestimmt. Als Detektoren werden Siliziumdiodenarrays mit 46 Elementen (Hersteller: Hamamatsu, Serie 4114) eingesetzt, wovon 42 Elemente verwendet werden. Die Frontfenster dieser Diodenzeilen bestehen aus Quarzglas, um auch im ultravioletten Spektralbereich eine hohe Sensitivität zu erhalten. Aus der Diodengröße, den Abbildungseigenschaften der Spektrometer und der Strichzahl der eingesetzten Gitter ergibt sich für die verwendete Konfiguration eine Wellenlängenauflösung von 8 nm pro Diodenelement.

Das Signal der Detektoren wird mit speziellen Vorverstärker-Impedanzwandlern verstärkt [SEEL et al., 1997], bevor es von einem 96-Kanal Analog-Digital-Wandler (Hersteller: Le Croy, 1885F) digitalisiert wird. 84 Eingänge sind durch die zwei Diodenzeilendetektoren belegt, die restlichen Kanäle können frei beschaltet werden, so z.B. mit Kontrolldioden, welche die Schuß-zu-Schuß-Schwankungen des Lasersystems und des NOPA überwachen. Hierbei ist zu bemerken, daß die Datenaufnahme für die AD-Wandlung nur in einem sehr kurzen, einstellbaren Zeitfenster von etwa 800 ns durchgeführt wird. Außerhalb dieses „Gate-Fensters“ ist es egal, welche Signale am Eingang des Wandlers anliegen. Dadurch kann ein signifikanter Anteil an Streulicht, z.B. durch Licht im Raum, unterdrückt werden. Details zur speziellen, nicht PC-kompatiblen Hardwareschnittstelle des AD-Wandlers sind in [ZUREK, 1992, HOCHE, 1996] zu finden.

Ein PC liest nach jedem Laserschuß die Werte $I_{\text{signal}}(\lambda_{\text{probe}}, t_{\text{D}})$ und $I_{\text{ref}}(\lambda_{\text{probe}}, t_{\text{D}})$ zu einer bestimmten Verzögerungszeit³⁵ t_{D} aus. Da bei einer bestimmten Verzögerungspositi-

³⁴Die Meßwerte von Signal- und Referenzspektrometer werden durcheinander dividiert. Dadurch wird der Einfluß des Amplitudenrauschens minimiert.

³⁵Diese ist durch eine bestimmte Schrittmotorposition festgelegt.

2 Das Experiment

on t_D mehrere Laserschüsse gemittelt werden³⁶, wird eine im Meßprogramm frei wählbare Anzahl N an Meßwerten addiert und durch Subtraktion des Dunkelstromes korrigiert: $\bar{I}(\lambda_{\text{probe}}, t_D) = \sum_{i=1}^N [I_i(\lambda_{\text{probe}}, t_D) - I_{\text{dunkel}}(\lambda_{\text{probe}})]$, wobei $I_i(\lambda_{\text{probe}}, t_D)$ die beim Laserschuß i gemessene Intensität am der Wellenlänge λ_{probe} entsprechenden Detektorelement (Signal bzw. Referenz) bezeichnet. Durch Division dann wird ein normiertes Signal $\bar{N}(\lambda_{\text{probe}}, t_D) = \bar{I}_{\text{signal}}(\lambda_{\text{probe}}, t_D) / \bar{I}_{\text{ref}}(\lambda_{\text{probe}}, t_D)$ berechnet.

Vor jeder Messung wird noch die „Grundlinie“ $\bar{N}^o(\lambda_{\text{probe}})$ ohne Anregungsimpuls³⁷ aufgenommen. Während der Messung wird diese durch eine gleitende Mittelwertbildung immer wieder aktualisiert, damit eine langsame Veränderung der Grundlinie, die aufgrund von thermischen Instabilitäten des Lasersystems unausweichlich ist, keinen Einfluß auf die Meßergebnisse nimmt.

Letztendlich aufgezeichnet wird der Term

$$\bar{S}(\lambda_{\text{probe}}, t_D) = \frac{\bar{N}(\lambda_{\text{probe}}, t_D)}{\bar{N}^o(\lambda_{\text{probe}})}. \quad (2.4)$$

Nochmals hervorzuheben ist, daß wirklich jeder einzelne Laserschuß von den Detektoren ausgelesen. Eine Unterdrückung von statistischen „Ausreißern“ bei der Mittelung der Meßwerte erfolgte nicht.

In einer Datei werden die Meßwerte $\bar{S}(\lambda_{\text{probe}}, t_D)$ für jede eingestellte Verzögerungszeit t_D aufgezeichnet. Ist ein Durchlauf (auch „Scan“ genannt) beendet, beginnt die Meßroutine automatisch mit dem nächsten: eine neue Datei wird angelegt und die Messung bei der ersten Schrittmotorposition (Verzögerungszeit t_D) wieder aufgenommen. Dies geschieht so lange, bis die Meßreihe abgebrochen wird.

2.2.2 Versuchsdurchführung

War das Lasersystem meßbereit und die Proben in den gewünschten Konzentrationen vorbereitet, so gab es für die durchzuführenden Tätigkeiten einen genau ausgearbeiteten und auf Zeitersparnis optimierten „Meßkatalog“.

Mit leichten Abänderungen sah dieser meist wie folgt aus:

1. Kontrolle der Justage des Teleskops, der variablen Verzögerungsstrecke (vgl. Abb. 2.7) und des Bündelüberlapps und -radius von Anreg- und Abtastlichtimpuls, sowie Einstellen der Anregungsenergie und Eichen der Kontrollioden.
2. Aufzeichnen des Dauerstrichspektrums der Probe

³⁶Die Größenordnung liegt bei etwa 6000 gemittelten Meßwerten pro Schrittmotorposition und Scan

³⁷Der Anregungslichtimpuls wird automatisch geblockt (vgl. Femtosekundenaufbau, Chopperrad für Driftkorrektur, Abb. 2.6).

3. Messung des Lösungsmittels DMSO (10 Scans): par. Polarisationsgeometrie (\parallel)
4. Messung des Lösungsmittels (10 Scans): senkrechte Polarisationsgeometrie (\perp)
5. Messung der Probe (z.B. Azobenzol, siehe Kapitel 4) $trans \rightarrow cis$ (10 Scans): \perp Polarisationsgeometrie
6. Kontrolle des Dauerstrichspektrums auf Photoproduktanreicherung
7. Messung der Probe $trans \rightarrow cis$ (10 Scans): \parallel Polarisationsgeometrie
8. Kontrolle des Dauerstrichspektrums auf Photoproduktanreicherung
9. Belichten der Probe mit dem UV-Belichtungsmodul, um ein möglichst hohe cis -Konzentration zu erhalten
10. Aufzeichnen des Dauerstrichspektrums der Probe
11. Einrichten des UV-Belichtungsmodules zum Beleuchten der Probe
12. Kontrollmessung des Lösungsmittels (5 Scans): \parallel Polarisationsgeometrie
13. Messung der Probe $cis \rightarrow trans$ (10 Scans): \parallel Polarisationsgeometrie
14. Kontrolle des Dauerstrichspektrums auf Photoproduktanreicherung
15. Messung der Probe $cis \rightarrow trans$ (10 Scans): \perp Polarisationsgeometrie
16. Kontrolle des Dauerstrichspektrums auf Photoproduktanreicherung
17. Messung des Lösungsmittels (5-10 Scans): \perp Polarisationsgeometrie
18. Messung des Lösungsmittels (5-10 Scans): \parallel Polarisationsgeometrie

Für einen „Scan“ wurden etwa³⁸ 160 Verzögerungszeitpunkte t_D durch die variable Wegstrecke eingestellt. Die ersten 100 Zeitpunkte um den Zeitnullpunkt wurden mit äquidistantem Abstand aufgenommen (Schrittweite 13.3 fs, dies entspricht $2 \mu\text{m}$ Fahrweg des Schrittmotors). Die verbleibenden Positionen wurden mit exponentiell zunehmendem Abstand gewählt, damit bis in den Zeitbereich von Nanosekunden Meßdaten aufgezeichnet werden konnten. An jedem Zeitpunkt t_D wurden typischerweise $N = 6000$ Meßwerte gemittelt.

Für die Isomerisierungsrichtung $trans \rightarrow cis$ wurden die Proben in geringerer Konzentrationen untersucht als für die Richtung $cis \rightarrow trans$, da eine möglichst gute Ausnutzung der Detektordynamik angestrebt wurde.

³⁸Der Meßpunktabstand wurde je nach Zielsetzung der Meßserie (neue Messung, Kontrollmessung) etwas variiert.

2 Das Experiment

Das genaue Messen des Lösungsmittels ist erforderlich, um die auftretenden Meßartefakte um den Zeitnullpunkt korrigieren zu können. Da diese sehr kritisch von den Anlagenparametern abhängen, sind diese Daten auch ein guter Indikator für die Stabilität des Lasersystems.

Die Durchführung einer solchen Meßserie beansprucht etwa 18-20 Stunden. Hierbei bestand das größte Problem darin, das Lasersystem über diese lange Zeit stabil zu halten. War dies nicht möglich, so mußte die Reihe unterbrochen, das Problem beseitigt und die Messung an geeigneter Stelle wieder aufgenommen werden. Dies sollte möglichst so geschehen, daß die erhaltenen Daten vergleichbar, d.h. mit gleichen und bekannten experimentellen Parametern wie Anregungsenergie, Bündenradien, etc. aufgenommen sind.

2.2.3 Datenaufbereitung

Zu Beginn dieser Arbeit stand für die weitere Auswertung der Meßdaten nur ein sehr rudimentäres Auswerteprogramm zur Verfügung. Da die bis dahin eingesetzte Software den Datenmengen und Auswerteanforderungen nicht gewachsen und zudem sehr instabil war, bestand eine weitere Aufgabe darin, zusammen mit meinem Kollegen Ingo Lutz eine Anwendung zu entwickeln, welche die Ansprüche und Anforderungen so gut wie möglich erfüllt. Als Grundlage hierzu wurde das Softwarepaket IDL³⁹ verwendet, welches sowohl für das Betriebssystem Linux wie auch für Windows erhältlich ist.

Es entstanden vier Programmpakete zur Bearbeitung definierter, aufeinander aufbauender Aufgaben:

- Kontrolle, einfache Korrekturmöglichkeit und Mittelung der einzelnen aufgenommenen Scans.
- Korrektur der Meßartefakte (Abziehen des Lösungsmittelsignales), Korrektur der Dispersion des Zeitnullpunktes, Skalierungsmöglichkeit.
- Vergleich mehrerer Messungen an gleichen oder verschiedenen Proben, Berechnungen (z.B. Anisotropie), Erstellen von transienten Spektren, Datendarstellung (3D-Graphen), Datenanpassung sowohl von einzelnen Wellenlängen als auch global für den gesamten Datensatz.
- Übersichtliche Verwaltung und Auswertung der aufgezeichneten Dauerstrich-, Fluoreszenz-, und Anregungslichtspektren, Importmöglichkeit für transiente Spektren und mittels Datenanpassung gewonnene Amplitudenspektren.

Mittelung der Einzelscans

³⁹Interactive Data Language

Die Mittelung ausgewählter Scans im ersten Programmpaket erfolgt noch auf der Basis des normierten Signals $\bar{S}(\lambda_{\text{probe}}, t_{\text{D}})$ (Gl. 2.4). Neben der Kontrolle der Messungen ist die Normierung auf eine bestimmte Anregungsenergie möglich.

Korrekturen der Meßdaten

Für die weitere Datenauswertung ist die Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda_{\text{probe}}, t_{\text{D}})$ der Probe in Abhängigkeit der Abtastwellenlänge λ_{probe} und der Verzögerungszeit t_{D} die gewünschte Größe. Setzt man die Absorptionsänderung ΔA gleich der Differenz aus der Absorption bei Anregung (A) und ohne Anregung (A^o), $\Delta A(\lambda_{\text{probe}}, t_{\text{D}}) = A(\lambda_{\text{probe}}, t_{\text{D}}) - A^o(\lambda_{\text{probe}})$, und verwendet die Beziehung $A = -\log T$, wobei T die Transmission der Probe bezeichnet, so erhält man die gewünschte Verknüpfung der Absorptionsänderung mit dem gespeicherten Wert \bar{S} :

$$\Delta A(\lambda_{\text{probe}}, t_{\text{D}}) = -\log \frac{T(\lambda_{\text{probe}}, t_{\text{D}})}{T^o(\lambda_{\text{probe}})} = -\log \bar{S}(\lambda_{\text{probe}}, t_{\text{D}}) \quad (2.5)$$

Die Identität des Transmissionsverhältnisses und dem normierten Intensitätsverhältnis \bar{S} in Gl. 2.5 ergibt sich unter Verwendung von $T = \frac{I_{\text{signal}}}{I_{\text{signal},0}}$ und $I_{\text{signal},0} = \text{const} \cdot I_{\text{ref}}$ durch die Umformung $\frac{T}{T^o} = \frac{I_{\text{signal}}}{I_{\text{signal},0}} \frac{I_{\text{signal},0}}{I_{\text{signal}}^o} = \frac{I_{\text{signal}}}{I_{\text{ref}}} \frac{I_{\text{ref}}^o}{I_{\text{signal}}^o} \frac{\text{const}}{\text{const}}$.

Wie schon oben in Abschnitt 28 über die Weißlichterzeugung erwähnt, bedingt die Verwendung eines gechirpten Abtastlichtimpulses in Verbindung mit der dispersiven Detektion nicht-resonante Meßartefakte um den Zeitnullpunkt⁴⁰, welche auch in reinem Lösungsmittel zu beobachten sind. Durch Subtraktion des Lösungsmittelsignales ΔA^{solv} von den Meßkurven ΔA^{samp} , die mit den zu untersuchenden Proben gewonnen wurden, versucht man ein möglichst reines Signal der Probe zu erhalten (vgl. [KOVALENKO et al., 1998]). Da es nicht immer möglich ist, ohne kleine Korrekturen diese Subtraktion vorzunehmen⁴¹, mußte eine Möglichkeit geschaffen werden, diese Korrektur getrennt für jede einzelne Wellenlänge vorzunehmen. Die korrigierte Absorptionsänderung ΔA ergibt sich also wie folgt:

$$\Delta A(\lambda_{\text{probe}}, t_{\text{D}}) = C \cdot \left[\begin{array}{l} \Delta A^{\text{samp}}(\lambda_{\text{probe}}, t_{\text{D}} - t_0(\lambda_{\text{probe}})) - \dots \\ \Delta A^{\text{solv}}(\lambda_{\text{probe}}, t_{\text{D}} - t_0(\lambda_{\text{probe}}) + t_{\text{kor}}(\lambda_{\text{probe}})) \cdot c(\lambda_{\text{probe}}) \end{array} \right]$$

Die globale Normierungskonstante C kann zur Skalierung der Meßdaten verwendet werden, z.B. auf die Absorption der Probe. Die Werte $t_0(\lambda_{\text{probe}})$ bezeichnen die Dispersionsverschiebung des Nullpunktes und werden so gewählt, daß beim Zeitpunkt $t_{\text{D}} = 0$ fs auch der tatsächliche Zeitnullpunkt der Meßkurve liegt. Das Auffinden dieser Werte ist eine schwierige

⁴⁰Zeitpunkt, an dem der Anreglichtimpuls und die Komponente des Abtastlichtimpulses mit der Wellenlänge λ_{probe} zeitgleich die Probe erreichen.

⁴¹Es ist unvermeidlich, daß z.B. die Strahlage des Lasersystems mit der Zeit leicht variiert und somit die experimentellen Parameter beeinflusst.

2 Das Experiment

Aufgabe. Es gibt jedoch die Möglichkeit, sich z.B. an den Lösungsmittelartefakten zu orientieren. Desweiteren können die erhaltenen Werte $t_0(\lambda_{\text{probe}})$ mit einer Dispersionsfunktion angepaßt werden, welche die Dispersion für gegebene Materialien und Materialstärken anhand der Sellmeierkoeffizienten bestimmt. Unter der Voraussetzung, daß nicht irgendwelche Effekte verzögert auftreten, ist davon auszugehen, daß die Wahl der Werte t_0 in Ordnung ist, wenn folgende zwei Bedingungen zutreffen:

- Die Wertepaare $(\lambda_{\text{probe}}, t_0(\lambda_{\text{probe}}))$ können durch eine Dispersionskurve angepaßt werden.
- Die aus der Anpassung erhaltenen Parameter (Materialstärken) stimmen mit den experimentellen Gegebenheiten überein.

Stimmt die Nullpunktdispersion $t_0(\lambda_{\text{probe}})$ der Proben-Meßkurve nicht mit der des Lösungsmittels überein, was schon durch eine geringe Änderung der Anlagenparameter verursacht sein kann, so muß mittels der Werte $t_{\text{kor}}(\lambda_{\text{probe}})$ eine kleine Verschiebung für jede einzelne Wellenlänge vorgenommen werden.

Zusätzlich kann das „Gewicht“ der Lösungsmittelkurve global und/oder wellenlängenspezifisch durch geeignete Wahl der Faktoren $c(\lambda_{\text{probe}})$ verändert werden. Derartige Korrekturen sind notwendig, da z.B. aufgrund der Absorption der Proben die Signalamplituden der Lösungsmittelartefakte in der Probenlösung geringer als im reinen Lösungsmittel sein können.

Weitere Auswertungsmöglichkeiten

Das dritte Programmpaket ermöglicht die Weiterbearbeitung von beliebigen korrigierten Meßdaten. So wurden alle Messungen verglichen, die an derselben Probe, aber an verschiedenen Tagen, durchgeführt wurden. Da diese Messungen teilweise unterschiedliche Spektralbereiche umfassen, wurde aus diesen ein neuer „kompletter“ Datensatz generiert, mit dem anschließend weitergearbeitet wurde.

Berechnungen Da für Moleküle in der Größe von Azobenzol die Rotationskonstanten in Lösung im Zeitbereich von mehreren zehn Pikosekunden liegen, erhält man bei paralleler und auch senkrechter Polarisationsgeometrie eine zusätzliche Kinetik aufgrund der Rotationsdepolarisation [FLEMING, 1986]. Möchte man diese nicht im Meßsignal enthalten haben, muß entweder die Messung in der Geometrie des „magischen Winkels (54.7°)“ durchgeführt oder das Signal, das der Messung unter dem magischen Winkel entspricht, aus Messungen unter paralleler (ΔA^{\parallel}) und senkrechter (ΔA^{\perp}) Geometrie berechnet werden [FLEMING et al., 1976], [LESSING und VON JENA, 1979, Seite 794]. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sind nach der zweiten Methode berechnet:

$$\Delta A^{\text{mag}} = \frac{\Delta A^{\parallel} + 2 \cdot \Delta A^{\perp}}{3} \quad (2.6)$$

Nur der Vollständigkeit halber sei angeführt, daß auch das Anisotropiesignal $r(\lambda_{\text{probe}}, t_{\text{D}})$ für alle Proben berechnet wurde:

$$r = \frac{\Delta A^{\parallel} - \Delta A^{\perp}}{3 \cdot \Delta A^{\text{mag}}}$$

Ebenso war es notwendig Meßkurven von verschiedenen Proben voneinander zu subtrahieren.

Datenanpassung Eine Datenanpassung erfordert immer zwei Schritte: zuallererst muß ein Modell existieren, von welchem man annimmt, daß es die in der Probe ablaufenden Reaktionen beschreibt. Anschließend konstruiert man aus dem Modell eine Modellfunktion, welche die Absorptionseigenschaften der Probe in Abhängigkeit der Verzögerungszeit t_{D} und der Abtastwellenlänge λ_{probe} mit den modellinhärenten Parametern beschreibt.

Ein einfacher Ansatz sieht mehrere Zustände $i = 0 \dots n$ mit individuellen Absorptionswirkungsquerschnitten $\sigma_i(\lambda_{\text{probe}})$ vor, welche mit zeitabhängigen Besetzungszahlen $N_i(t)$ bevölkert sind. Der Zustand $i = 0$ bezeichnet hierbei den Grundzustand. Dann gilt für die Absorptionsänderung:

$$\Delta A(\lambda_{\text{probe}}, t_{\text{D}}) = \sum_{i=1}^n [\sigma_i(\lambda_{\text{probe}}) - \sigma_0(\lambda_{\text{probe}})] \cdot N_i(t_{\text{D}}) \quad (2.7)$$

Zur allgemeingültigen Beschreibung der Besetzungsdichten N_i muß man den Dichtematrix-Formalismus zur Berechnung einsetzen. Kann man jedoch davon ausgehen, daß in einem Zustand die übergangsrelevanten Moden thermisch relaxiert sind, bevor der Übergang in einen weiteren erfolgt, so können die Übergänge zwischen den verschiedenen Zuständen mit Raten beschrieben werden [ZINTH und KAISER, 1992]. Das Reaktionsschema wird dann durch folgende Differentialgleichung beschrieben:

$$\frac{dN_i(t)}{dt} = - \sum_{j=1}^n k_{ij} N_j(t) + \delta_{i1} I_{\text{pump}}(t) N_0 \sigma_{\text{pump}} \quad (2.8)$$

k_{ij} bezeichnet die Reaktionsrate vom Zustand j in den Zustand i , $I_{\text{pump}}(t)$ die Anregungsintensität, σ_{pump} der Grundzustandswirkungsquerschnitt bei der Anregungswellenlänge, N_0 die Besetzungsdichte des Grundzustandes sowie δ_{ij} das Kroneckersymbol. Die Lösung von Gleichung (2.8) ist eine Summe von Exponentialfunktionen $\exp(-t_{\text{D}}/\tau_i)$, wobei die reziproken Zeitkonstanten $1/\tau_i$ die Eigenwerte der Ratenmatrix k_{ij} sind, welche mittels der Pump-Probe-Spektroskopie bestimmt werden. Zu beachten ist, daß die Anzahl der Eigenwerte, d.h. die Zahl der aus dem Experiment ermittelten Zeitkonstanten, gleich der Anzahl der Zustände ist.

Unter Berücksichtigung der normierten Kreuzkorrelationsfunktion $K(t_{\text{D}})$ zwischen Anregungs- und Abtastlichtimpuls kann aus den Gleichungen (2.7) und (2.8) die Beziehung $\Delta A(\lambda_{\text{probe}}, t_{\text{D}}) = \sum_{i=1}^n \int_0^{\infty} a_i(\lambda_{\text{probe}}, \tau_i) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \cdot K(t_{\text{D}} - t) dt$ für die Absorptionsänderung hergeleitet werden. Für gaußförmige Lichtimpulse mit einer $(1/e)$ -Kreuzkorrelationsbreite t_{CC}

2 Das Experiment

vereinfacht sich diese zu

$$\Delta A(\lambda_{\text{probe}}, t_D) = \sum_i a_i(\lambda_{\text{probe}}, \tau_i) \exp\left(\frac{t_{CC}^2}{4\tau_i^2} - \frac{t}{\tau_i}\right) \frac{1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t}{t_{CC}} - \frac{t_{CC}}{2\tau_i}\right)}{2}, \quad (2.9)$$

wobei $\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt$ die sogenannte „Fehlerfunktion“⁴² darstellt. Die Gewichtungsfaktoren $a_i(\lambda_{\text{probe}}, \tau_i)$ in Abhängigkeit der Abtastwellenlängen λ_{probe} bilden das sogenannte „Amplitudenspektrum“ der Zerfallszeit τ_i .

Für eine aussagekräftige Datenanalyse versucht man nun eine Anpassung aller Meßkurven einer Probe und Isomerisierungsrichtung mittels sinnvoller Wahl der Anzahl N von Zuständen sowie geeigneter Wahl der Zerfallszeiten τ_i und Amplituden $a_i(\lambda_{\text{probe}}, \tau_i)$.

Hierzu wurde das am Lehrstuhl entwickelte Programm URMEL⁴³ verwendet [HARTL, 1993] und in die IDL-Applikationen integriert. Dieses Programm ermittelt mit der Methode der kleinsten Quadrate den besten Satz von Parametern τ_i und $a_i(\lambda_{\text{probe}}, \tau_i)$ für eine vorgegebene Zahl N von Zerfallszeiten.

Wie zu Beginn des Abschnittes beschrieben, gelten die Formeln (2.8) und (2.9) zur Beschreibung der transienten Absorptionsänderung nur für den Fall von Übergängen zwischen definierten, thermisch relaxierten Zuständen. Wie in späteren Kapiteln ausgeführt, sind diese Annahmen nicht immer gerechtfertigt. So liegen die Reaktionszeiten teilweise unter den Relaxationszeiten. Ebenso kann z.B. bei Kühlvorgängen nicht von einem Zustand mit einem definierten Wirkungsquerschnitt $\sigma(\lambda_{\text{probe}})$ gesprochen werden. Vielmehr ist dann der Wirkungsquerschnitt zusätzlich zeitabhängig.

Deshalb ist die vorgestellte Art der Datenanpassung nur als eine erste Näherung zu sehen, welche die Zeitbereiche, in welchen Reaktionen auftreten, ermittelt und Gewichtungen der Exponentialanteile berechnet.

⁴²Im Englischen „error function“ genannt.

⁴³„Unglaublich rasanter Marquartalgorithmus mit externem Linearfit“.

3 Die Kontrolle der Konformation – Ein Überblick

Dieses Kapitel soll eine kurze Zusammenfassung des Themenkomplexes „Konformationskontrolle“ bieten. Nach einer Besprechung der Gebiete, in welche die Konformationskontrolle mittlerweile Einzug gehalten hat, folgt ein Abschnitt über verschiedene Realisierungsmöglichkeiten von Konformationskontrolle. Abschließend wird das für diese Arbeit verwendete Konzept vorgestellt.

Die Konformation¹ eines Proteins ist sehr eng mit seiner Funktion und Funktionstüchtigkeit verknüpft. So laufen ungezählte biochemische Vorgänge nur dann ab, wenn auch die Strukturen der beteiligten Reaktanden aufeinander abgestimmt sind. Ohne diese Konformations sensitivität würden wir nicht überleben. Daher besteht ein fundamentales Interesse daran, die Struktur eines Peptides oder auch Proteins vorhersagen zu können. Hierfür ist das Verständnis des Proteinfaltungsprozesses, also der dynamischen Vorgänge beim Aufbau der dreidimensionalen Gestalt, unabdingbar. Die aktuelle Forschung zielt darauf ab, ein tieferes Verständnis dieser Konformationsdynamik zu erreichen und darauf aufbauend das Wissen zur gezielten Kontrolle von Konformationen einzusetzen. Von Bedeutung ist die gerichtete Steuerung von Konformationen nicht nur in der Biologie. Auch in den Materialwissenschaften findet sie beim Aufbau von makromolekularen Strukturen immer mehr Anwendungen (vgl. Einleitung in [CLAVIER et al., 2000] und dortgenannte Referenzen). So werden Sensoren für verschiedenste Aufgaben konstruiert (z.B. Chemosensoren für TNT [YANG und SWAGER, 1998]). Ebenso wird an Strukturen geforscht, welche auf die Umgebung reagieren, z.B. durch einen Phasenübergang [MCMILLAN et al., 1999]. Desweiteren gibt es im gesamten medizinisch pharmazeutischen Bereich viele Anwendungsgebiete: z.B. ist die Leistungsfähigkeit von Polymernetzwerken stark an die dreidimensionale Architektur gekoppelt, da die Struktur die Wechselwirkung zwischen Polymer und Lösungsmittel bestimmt und somit biomedizinisch wichtige Eigenschaften wie Lösungsmittelpermeabilität definiert. Ebenfalls erforscht werden Systeme, die Reagenzien transportieren und durch äußere Einflüsse (z.B. Lichteinwirkung) gesteuert wieder freigeben können. Derartige Konstrukte wären z.B. für den Transport von Medikamenten denkbar² [BISBY et al., 1999].

Die eben aufgezählten Anwendungen, welche sich hauptsächlich auf das Design von Makro-

¹Man könnte auch sagen, das dreidimensionale Erscheinungsbild.

²Stichworte in der Literatur sind „drug delivery“ und „photodynamic therapy“.

3 Konformationskontrolle - Ein Überblick

molekülen (Polymeren) beschränken, basieren auf dem bisher vorhandenen Wissen und sind noch sehr durch das Experimentieren bestimmt. Eine Konstruktion am Computer mit vorher-sagbaren Eigenschaften für die erzeugten Moleküle gibt es noch nicht.

Um dem Geheimnis der Faltung von Proteinen auf die Spur zu kommen, ist ein anderer Ansatz notwendig. Dazu werden schon seit relativ langer Zeit Experimente an diversen Proteinen durchgeführt. So können Konformationsübergänge durch eine Änderung des pH-Wertes ausgelöst werden. Durch Mischen von Reagenzien ist dabei eine Zeitauflösung von Millisekunden erreichbar, unter Verwendung von „caged protons“ läßt sich die Dynamik bis hin zur Nanosekundenzeitskala untersuchen [GUTMAN und NACHLIEL, 1985]. Ebenso kann die (Ent-)Faltungsreaktion³ gestartet werden, indem mittels eines Lasers ein Temperatursprung in einer Proteinlösung induziert wird. Eine weitere Alternative ist, die Faltungsreaktion durch einen Elektronentransfer zu starten. So war es möglich, ungefaltetes, oxidiertes Cytochrom c durch den optisch induzierten Transfer eines Elektrons zu reduzieren und damit die Faltung innerhalb weniger Nanosekunden zu initiieren [PASCHER et al., 1996]. Dieses Vorgehen ist allerdings nur bei wenige Systemen wie z.B. Cytochrom c anwendbar. Allen genannten Methoden gemeinsam ist, daß sie sich nur zur Untersuchung von relativ langsamen, großräumigen Strukturänderungen auf Zeitskalen von Nanosekunden bis Sekunden eignen.

Neuerdings gibt es Ansätze, den Faltungsprozeß „optisch zu triggern“. Anders als bei den vorgenannten Methoden, welche im Zeitbereich von Nanosekunden bis Sekunden den Aufbau der sekundären (z.B. α -Helix und β -Faltblatt) und tertiären Strukturelementen untersuchen, stehen bei den optisch getriggerten Experimenten die Abläufe ganz zu Beginn des Faltungsvorganges im Vordergrund des Interesses. Deshalb werden für diese Untersuchungen auch nur relativ kleine Peptide eingesetzt, deren native Struktur man kennt. Aufgrund der Überschaubarkeit der Systeme sollte eine Interpretation der Meßergebnisse, wie sie z.B. aus Pump-Probe-Experimenten zu erhalten sind, dahingehend möglich sein, daß eine Zuordnung zu den Umordnungsvorgängen im Peptid ohne Spekulationen stattfinden kann. Hat man dann die zugrunde liegenden Prinzipien dieser kleinen Systeme einmal verstanden, so kann man daran gehen, auch die Faltung von größeren Proteinen und anderen Makromolekülen detailliert zu beschreiben.

Eine mögliche Strategie zur Untersuchung kleiner Modellpeptide ist das Starten des Faltungsprozesses mittels lichtinduzierten Aufbrechens einer Bindung⁴. Als Beispiel sei der Einbau von Aminothiotyrosinen in eine Aminosäurekette genannt [LU et al., 1997]. Zwischen den Schwefelatomen von zwei so modifizierten Aminosäuren kann eine Disulfidbrücke ausgebildet werden, welche das dazwischenliegende Peptidstück in eine nicht-native Konformation zwingt. Wird die Bindung mittels eines Laserimpulses gespalten⁵, so kann das Peptid in seine native Form zurückkehren, was z.B. durch UV-Pump/IR-Probe-Spektroskopie verfolgt werden kann [VOLK et al., 1997].

Eine andere Möglichkeit ist das Ausnützen von geometrischen Änderungen von Molekülen

³Bei Temperaturerhöhung falten sich nur kalt denaturierende Proteine.

⁴In der Literatur als „photocleavage“ bezeichnet.

⁵Das Brechen der Bindung geschieht innerhalb von 200 fs [VOLK et al., 1997].

bei Lichtanregung. Dieser als Photoisomerisierung bezeichnete Vorgang wird auch in der Natur angewandt, um Konformationsänderungen auszulösen: So wird der Sehprozeß durch eine Isomerisierung des Farbstoffs Retinal (11-*cis* → *all-trans*) ausgelöst, was schließlich Strukturänderungen im Opsin-Protein bewirkt und letztendlich die Freisetzung des Chromophores bewirkt [KOCHENDOERFER und MATHIES, 1995]. In ähnlicher Weise wird die transmembrane Ionenpumpe Bakteriorhodopsin durch die Photoisomerisierung des *all-trans* Retinals zum 13-*cis*-Isomer angetrieben [LANYI, 1999].

Zur Untersuchung von schnellen Faltungsvorgängen können photoschaltbare Moleküle folgendermaßen eingesetzt werden: Besitzt man ein Molekül, welches reversibel und sehr schnell photoisomerisiert und dabei seine Geometrie ändert, so kann man dieses dazu verwenden, Peptidstücke in native oder nicht-native Konformationen zu zwingen. So kann man z.B. mit einem derartigen Chromophor zwei Cysteine in einer Aminosäuresequenz miteinander verbinden und durch die Hin- und Rückisomerisierung zwei Abstandsbereiche für diese beiden Aminosäuren vorgeben. In Folge bildet sich in der einen Konformation eine α -Helix aus, während dieses Strukturelement nach der Isomerisierung verschwindet [KUMITA et al., 2000]. Alternativ kann ein solcher Photoschalter auch, als Aminosäure getarnt, in das Rückgrat eines Peptids eingebaut werden. Hat das Peptidstück eine geeignete Länge und wird zyklisiert, also zu einem Ring geschlossen, so kann durch die Längenänderung des Schalters eine Konformationsänderung im Peptid induziert werden [RENNER et al., 2000a] (vgl. Abb. 3.1).

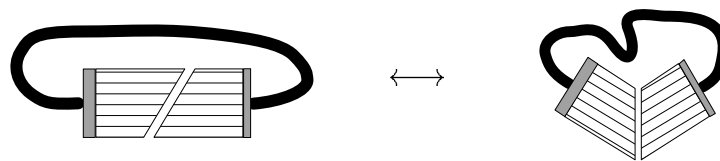


Abbildung 3.1: Prinzip der photoinduzierten Konformationsänderung. Ein photoschaltbarer Baustein ist in eine Aminosäuresequenz eingebettet. Das Peptid ist zu einem Ring geschlossen, wobei das Peptidrückgrat schematisch als schwarze Linie dargestellt ist. In einem Zustand des Schalters hat das Peptid keinen großen Konformationsraum zur Verfügung – es ist nahezu gestreckt (links). Verringert der Photoschalter durch Isomerisierung seine Länge, so kann das Peptid seine bevorzugte native Struktur einnehmen (rechts, vgl. auch Abb. 4.4).

Diese zuletzt beschriebene Art der photoinduzierten Konformationsänderung ist auch die Grundlage der in dieser Arbeit untersuchten Proben. Der Rest dieses Kapitels widmet sich nun der Beschreibung des Peptidstückes, welches für die Konstruktion des Zylopeptides verwendet wurde. Der Photoschalter, in diesem Fall das Azobenzol, wird in Kapitel 5 ausführlich vorgestellt.

Als Hauptbestandteil des Modellpeptids wurde das katalytisch aktive Zentrum -Cys-Ala-Thr-Cys- der Thioredoxin Reduktase⁶ aus *Escheridia coli* (*E.coli*) gewählt. Die Aufgabe dieses Proteins ist es, Thioredoxin zu reduzieren und somit einen reversiblen Oxidations-Reduktions-

⁶Die *E.coli* Thioredoxin Reduktase ist ein globuläres Protein aus 321 Aminosäuren. In Säugetieren hingegen kommt eine etwas andere Form der Thioredoxin Reduktase vor.

3 Konformationskontrolle - Ein Überblick

Zyklus des Thioredoxins zu ermöglichen. Das Thioredoxin wird durch Abgabe von Elektronen u.a. an Enzyme wie die Ribonukleotid Reduktase und Thioredoxin Peroxidase oxidiert und führt u.a. zu Zellwachstum und inhibiert Apoptose [MUSTACICH und POWIS, 2000, BEHRENDT, 2000].

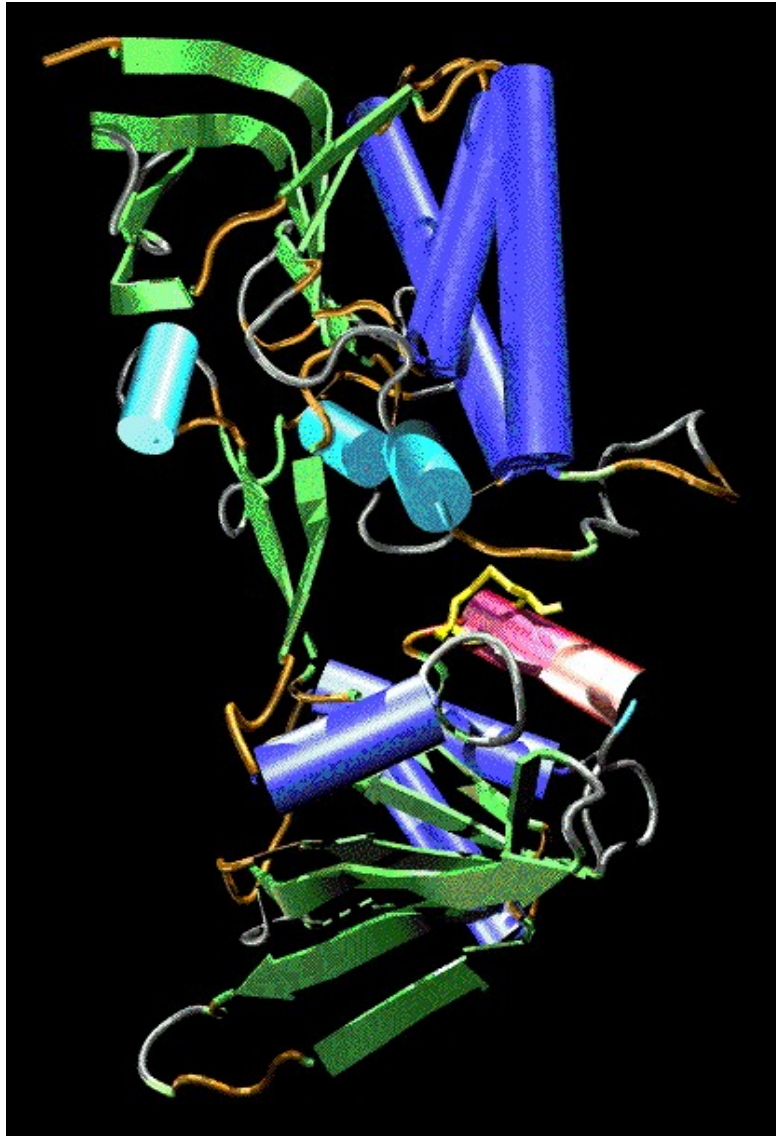


Abbildung 3.2: Röntgenstruktur der Thioredoxin Reduktase aus E.coli . In violett sind Bereiche mit α -helikaler, in türkis mit 3_{10} -helikaler Konformation eingezeichnet. In grün sind Regionen mit β -Faltblattstruktur gekennzeichnet. Die Farbe grau steht für γ -turn, ocker für coil-Bereiche. Der biochemisch aktive und für die Experimente verwendete Teil des Proteins ist in dunkel- und hellrot eingefärbt. Hierbei kennzeichnet die dunkelrote Farbe Bereiche mit α -helikaler, die hellrote Färbung Abschnitte mit 3_{10} -helikaler Konformation. Zusätzlich ist gelb die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen gekennzeichnet (PDB-Code: 1TDE).

Abbildung 3.2 zeigt rötlich schattiert den Bereich der Thioredoxin Reduktase, dessen Ami-

nosäuresequenz im Modellpeptid verwendet wurde (Aminosäuren 134-141⁷). Dieses System wurde ausgewählt, da es durch die Rückgratzyklisierung viel Freiheit läßt, konformationelle Einschränkungen oder Freiheitsgrade einzuführen. Durch Schließen der Disulfidbrücke (vgl. Abb. 3.2) bietet es zusätzlich die Möglichkeit, den Konformationsraum weiter einzuschränken.

Die Verwendung dieser rückgratzyklisierten Azo-Peptid-Verbindung vereint deshalb viele Vorteile in sich. Einige der unten aufgeführten Punkte wurden noch nicht diskutiert, sind aber der Vollständigkeit der Auflistung wegen schon hier angeführt:

- Das Azobenzol als Trigger isomerisiert sehr schnell und liefert somit einen definierten Startpunkt der Konformationsänderung.
- Die Photoreaktion ist reversibel.
- Das System ist langzeitstabil.
- Das System ist klein genug, um erhaltene Meßsignale interpretieren zu können, aber dennoch groß genug, um Strukturelemente auszubilden.
- Es ist für spektroskopische Methoden wie Femtosekunden Pump-Probe-Spektroskopie zugänglich.
- Die Peptidkonformation kann zusätzlich durch Schließen einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen extern beeinflusst werden.
- Die Cysteine bieten die Möglichkeit, externe Farbstoffe als Sonden zur Untersuchung an das Peptidrückgrat zu koppeln.

⁷entspricht: Ala-Cys-Ala-Thr-Cys-Asp-Gly-Phe

4 Azobenzol und Azo-Peptide: vom Photoschalter zur Konformationsdynamik

In diesem Kapitel werden die grundlegenden Eigenschaften von Azobenzol und den davon abgeleiteten Azopeptiden vorgestellt. Anschließend folgen in Bezug auf die Femtosekundenmessungen wichtige Überlegungen zur Probenpräparation sowie eine tabellarische Übersicht über wichtige physikalische Eigenschaften der untersuchten Proben.

4.1 Azobenzol

Die Azogruppe -N=N- bildet die zentrale Einheit für eine große Klasse von organischen Verbindungen, den Diazenen. Sie besteht aus zwei sp^2 -hybridisierten Stickstoffatomen, die über eine Doppelbindung verbunden sind. Bei Azobenzol¹ sind zwei Phenylringe an die Azogruppe gekoppelt (vgl. Abb. 4.1).

Azobenzol wird schon seit vielen Jahrzehnten² für die Herstellung von Farbstoffen und Pharmazeutika verwendet. Da das Molekül auch in der Wissenschaft seit langem erforscht wird, sind die Struktur sowie die wesentlichen optischen und dynamischen Eigenschaften bekannt.

4.1.1 Struktur und Photoreaktion

Einer der Gründe, warum gerade dieses Molekül in letzter Zeit immer häufiger verwendet wird, ist seine Fähigkeit, lichtinduziert seine Geometrie zu verändern: es existiert in zwei stereoisomeren Formen, dem *trans*- und dem *cis*-Azobenzol³. Durch Einstrahlung von Licht geeigneter Wellenlängen kann ein sehr schneller, reversibler Übergang zwischen den beiden Isomeren vollzogen werden. Die Zeitskala für die Hin- und Rückisomerisierung liegt in

¹chem. Summenformel: $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{N}_2$; in der neuen chemischen Nomenklatur Diphenyldiazen genannt.

²Die erstmalige Herstellung von Azobenzol erfolgte im Jahre 1832 [FALBE und REGNITZ, 1995].

³In der chemischen Literatur werden das *trans*- bzw. das *cis*-Isomer auch oft als „E“ bzw. „Z“-Form bezeichnet.

der Größenordnung von wenigen hundert Femtosekunden (vgl. auch Kapitel 5ff). Das *trans*-Isomer (Abb. 4.1, rechts) ist energetisch stabiler. Die *cis*-Form isomerisiert bei Raumtemperatur thermisch aktiviert in die *trans*-Konformation mit einer Zeitkonstanten von vielen Stunden. Die Potentialbarriere beträgt dabei etwa $90 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ [RAU, 1973]. Die Photoisomerisierung ist die Hauptreaktion bei Azobenzol und den modifizierten Azobenzolen. Nebenreaktionen wie Photoreduktion, Photooxidation oder Photozyklisierung treten, wenn überhaupt, nur mit Quantenausbeuten unter 10^{-3} auf [RAU, 1990].

Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob die geometrische Struktur des *trans*-Azobenzols planar⁴ oder leicht verdrillt⁵ ist. Kristallstrukturen legen eine planare Geometrie nahe, während Elektronen-Streuexperimente in der Gasphase eine Nichtplanarität aufzeigen, in welchen die Phenylringe um 30° aus der N=N-C Ebene herausgedreht sind [TRAETTEBERG et al., 1977]. Das Fehlen von unpolarisierten Ramanbanden in Azobenzol und Isotopenanaloga hat zu dem Schluß geführt, daß die molekulare Symmetrie durch C_i beschrieben wird (vgl. [BISWAS und UMAPATHY, 1997] und Referenzen darin).

Aufgrund der sterischen Hinderung der beiden Phenylringe in der *cis*-Konfiguration muß dieses Isomer verdrillt sein. Röntgenstreuexperimente ergaben für *cis*-Azobenzol eine Rotation eines Phenylringes um 53.3° aus der N=N-C-Ebene heraus. Auch für diese Konfiguration gibt es Angaben zur Symmetrie: in [RAU, 1973] wird die C_{2v} -Symmetrie angegeben. Die Streuexperimente und neuere Rechnungen sprechen für eine einfache C_2 -Symmetrie [BISWAS und UMAPATHY, 1997]. Abbildung 4.1 gibt eine qualitative Vorstellung der räumlichen Struktur von Azobenzol. Der Abstand der beiden „Enden“ des Azobenzols beträgt in der *trans*-Konfiguration 9.0 \AA , in der *cis*-Form 5.5 \AA .

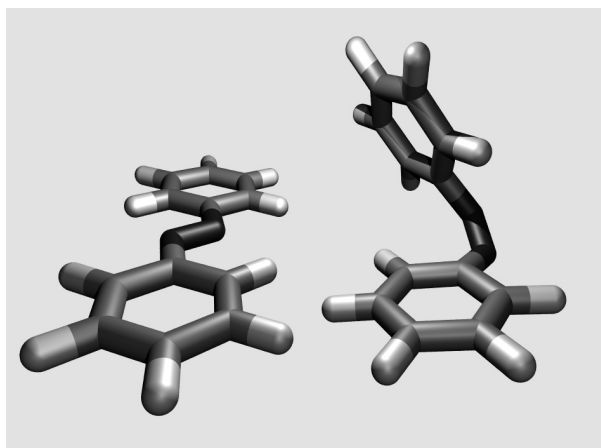


Abbildung 4.1: Räumliche Struktur von *trans*- (links) und *cis*-Azobenzol (rechts). Zwischen den beiden Isomeren kann durch Einstrahlen von Licht geeigneter Wellenlänge reversibel hin- und hergeschaltet werden. Hierdurch ändert sich der Abstand der beiden „Enden“ des Azobenzoles von 9.0 \AA (*trans*) auf 5.5 \AA (*cis*) fast um einen Faktor 2.

⁴ C_{2h} -Symmetrie [RAU, 1973]

⁵ C_i -Symmetrie

Der prinzipielle Vorgang bei der Isomerisierung ist folgender: Ein Molekül wird durch Absorption eines Photons in einen elektronisch angeregten Zustand versetzt, von dem es nach einer gewissen Zeit strahlungslos auf die Grundzustandspotentialfläche zurückkehrt und dort energetisch relaxiert. Da die Grundzustandsfläche vereinfacht dargestellt zwei Minima⁶ aufweist [MONTI et al., 1982], kann die Reaktion in einem anderen Zustand enden als sie begann: das Molekül ist isomerisiert. Das Verhältnis von isomerisierten zu angeregten Molekülen wird Quantenausbeute (Ψ) genannt.

Der detaillierte Isomerisierungsmechanismus ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Im Moment akzeptiert ist, daß nach einer Anregung von Azobenzol in der höherenergetischen $\pi\pi^*$ -Bande (siehe Abb. 4.2) die Isomerisierung durch eine Rotation eines Phenylringes um die N–N Bindungsachse erfolgt. Dies bedeutet eine große Bewegung des Phenylrings durch das Lösungsmittel. Hingegen isomerisiert Azobenzol bei Anregung in der niederenergetischen $n\pi^*$ -Bande mittels einer Inversionsbewegung [MONTI et al., 1982, RAU, 1984, RAU, 1990]. Semiempirische Berechnungen der Potentialhyperflächen von Grundzustand und erstem angeregten Zustand in Abhängigkeit von zwei Reaktionskoordinaten (Rotation und Inversion) zeigen jedoch, daß die Isomerisierung nicht ausschließlich über eine Inversion abläuft [WACHTVEITL et al., 1998, MÜLLER et al., 1998]. Daher wird noch ein anderer Reaktionspfad diskutiert: der sogenannte „hula twist“-Mechanismus. Nach der Anregung von Azobenzol in der $n\pi^*$ -Bande bewegt sich jenes Stickstoffatom der Azogruppe, bei dem eines der nichtbindenden Elektronen angeregt wurde, aus der molekularen Ebene, welche durch den direkt benachbarten Phenylring definiert ist, heraus. Dadurch wird eine Inversionsbewegung dieses Phenylringes ermöglicht.

4.1.2 Dauerstrichcharakterisierung

Sämtliche vorgestellte Dauerstrichabsorptionsmessungen wurden mit einem 2-Kanal Absorptionsspektrometer Lambda 19 (Firma Perkin Elmer) bei etwa 18° Raumtemperatur durchgeführt. Nach einer Nulllinien-Eichung mit einer lösungsmittelgefüllten Küvette im Strahlengang wurden die Absorptionsspektren für das reine *trans*-Isomer⁷ aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Belichtung der Probe (vgl. Abschnitt 2.1.4) und somit die teilweise Photoisomerisierung in die *cis*-Konformation. In den folgenden Abbildungen sind die gemessenen Absorptionsspektren des photostationären *cis-trans*-Isomerengemisches gezeigt. Diese sind mit „*cis*“ bezeichnet, worunter „hauptsächlich *cis*“ zu verstehen ist. Zur Minimierung von systematischen Meßfehlern wurde bei der Aufnahme der Absorptionsspektren großer Wert darauf gelegt, daß für die Belichtung der jeweiligen Probe der Meßaufbau nicht verändert, d.h. auch die Küvette nicht aus dem Spektrometer entnommen wurde. Für Kontrollmessungen während den Femtosekundenmessungen wurde jeweils etwas Probe aus dem Probenkreislauf entnommen und sofort im Spektrometer gemessen. Die Küvetten bestanden aus Quarzglas (Firma Hellma) und besaßen eine Schichtdicke von 100 μm . Das für eine Dauerstrichmessung benötigte Probenvolumen betrug daher etwa 20 μl .

⁶Diese können dem *trans*- und dem *cis*-Zustand zugeordnet werden.

⁷Die Präparation einer Lösung, in der nur das *trans*-Isomer vorliegt, ist in Abschnitt 4.6 beschrieben.

Azobenzol zeigt nur eine sehr schwache Fluoreszenz und keinerlei Phosphoreszenz [RAU, 1990]. Hier am Lehrstuhl durchgeführte Messungen ergaben für Azobenzol bei Anregung mit 488 nm eine Fluoreszenz im Bereich von 550 nm bis 700 nm mit einem breiten Maximum um 580 nm.

Absorptionseigenschaften

Die beiden Isomere des Azobenzols zeigen im sichtbaren Spektralbereich bei Wellenlängen kleiner als 500 nm ein deutlich unterschiedliches Absorptionsverhalten (siehe Abb. 4.2). Das *trans*-Isomer ist durch eine sehr schwache, langwellige $n\pi^*$ -Bande⁸ um 445 nm und eine intensive $\pi\pi^*$ -Bande⁹ bei 322 nm charakterisiert¹⁰. Bei *cis*-Azobenzol liegt das Maximum der $n\pi^*$ -Bande bei 432 nm, das der $\pi\pi^*$ -Bande bei ca. 288 nm. Die exakte Lage der Maxima der $\pi\pi^*$ -Bande von *trans*- und *cis*-Azobenzol ist von der Polarität des Lösungsmittels abhängig.

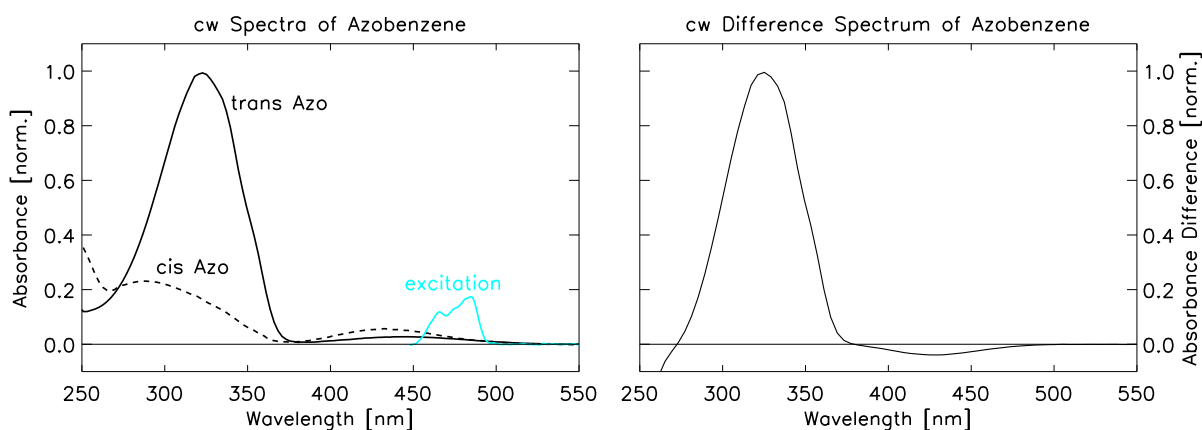


Abbildung 4.2: links: Dauerstrichspektren von *trans*-Azobenzol (durchgezogene Linie) und *cis*-Azobenzol (gestrichelt, vgl. Text) gelöst in DMSO. Das Maximum der Absorption in der $\pi\pi^*$ -Bande von *trans*-Azobenzol wurde auf 1.0 normiert. In türkis ist das Spektrum des Anregimpulses der Femtosekundenmessungen eingezeichnet.

rechts: Differenzspektrum von Azobenzol. Dargestellt ist die Differenz der Absorption von *trans*- und *cis*-Azobenzol. Das Spektrum wurde auf 1.0 normiert.

Bei beiden Isomeren ist die langwellige Bande vollkommen unstrukturiert, ebenso die $\pi\pi^*$ -Bande von *cis*-Azobenzol. Die kurzwellige Bande von *trans*-Azobenzol zeigt, abhängig vom Lösungsmittel, Andeutungen einer Schwingungssubstruktur (220 cm^{-1} und 1300 cm^{-1} –

⁸ Bei diesem energetisch tiefliegenden Übergang wird eines der nichtbindenden Elektronen der Stickstoffatome in ein antibindendes Molekülorbital π^* angeregt.

⁹ Die kurzwelligen Banden gehören zum energetisch höherliegenden $\pi\pi^*$ -Übergang, bei dem ein Elektron des delokalisierten π -Elektronensystems (das sich über beide Phenylringe einschließlich der Azogruppe erstreckt) in ein antibindendes π^* -Molekülorbital angeregt wird.

¹⁰ Diese Werte gelten für eine Lösung von Azobenzol in DMSO.

1400 cm⁻¹), welche deutlicher bei tiefen Temperaturen zum Vorschein tritt, aber stets viel weniger ausgeprägt ist wie im isosterischen Stilben [RAU und KORTÜM, 1967]. Zu beachten ist, daß der niederenergetische *trans*- $n\pi^*$ -Übergang im planaren Molekül symmetrieverboten ist. Damit die beobachtete Oszillatorenstärke erreicht wird, muß zusätzlich zu einer leichten Verdrillung des *trans*-Azobenzols eine relativ starke Kopplung zum $\pi\pi^*$ -Übergang vorhanden sein¹¹. Eben diese Kopplung könnte ein Grund für die Strukturlosigkeit der Banden sein [RAU und KORTÜM, 1967].

Berechnet man die Differenz der gemessenen *trans*- und *cis*-Absorption und normiert diese in der kurzwelligen Bande auf 1, so erhält man das in Abb. 4.2 rechts gezeigte Differenzspektrum, welches ein Maximum bei 324 nm und ein Minimum bei 428 nm aufweist.

Aufgrund der unterschiedlichen Absorption der beiden Isomere ist Azobenzol auch für Femtosekundenuntersuchungen gut geeignet. In Verbindung mit der großen Geometrieänderung bei der Isomerisierung stellt es einen hervorragenden optischen Trigger dar.

Bestimmung der maximal erreichten *cis*-Isomerenkonzentration

Wie aus dem Differenzspektrum in Abb. 4.2 rechts ersichtlich ist, liegt die ideale Belichtungswellenlänge für die *trans*→*cis*-Photoisomerisierung von Azobenzol in DMSO bei 324 nm. Da sich die $\pi\pi^*$ -Banden von *trans*- und *cis*-Azobenzol teilweise überlappen, stellt sich bei Belichtung in der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande ein photostationäres Konzentrationsgleichgewicht ein, welches von den Extinktionskoeffizienten der Isomere und den Quantenausbeuten der Reaktionen abhängt. Es ist somit nicht möglich, reines *cis*-Azobenzol in Lösung einfach durch Belichten zu präparieren. Da auch bei den Ultrakurzzeitmessungen immer ein gewisser Bruchteil *trans*-Isomere vorhanden ist und somit auch angeregt wird, ist es von Bedeutung, den genauen Anteil von *trans*-Azobenzol im Gemisch zu ermitteln. Da die Extinktionskoeffizienten von Azobenzol in DMSO nicht verfügbar sind, muß man sich mit einer Abschätzung der oberen Schranke für den *trans*-Anteil begnügen. Diese läßt sich ermitteln, indem man vom gemessenen *cis*-Absorptionsspektrum soviel *trans*-Spektrum subtrahiert, bis das resultierende Spektrum eindeutig unphysikalisch wird¹². Im vorliegenden Fall von Azobenzol in DMSO ergibt sich eine Obergrenze der *trans*-Konzentration von 10%.

Die zur Erzeugung des *cis*-Isomeres verwendete Belichtungswellenlänge von 365 nm aus dem UV-Belichtungsmodul (siehe Seite 23) ist für reines Azobenzol nicht optimal. Bei der Verwendung der, für Azobenzol günstigeren, 313 nm-Linie würden die modifizierten Azobenzole, deren $\pi\pi^*$ -Banden zu längeren Wellenlängen verschoben sind (siehe unten), in einem Spektralbereich belichtet, in dem das *trans*-Isomer etwa gleich stark absorbiert wie das *cis*-Isomer. Dies verschiebt, unter Berücksichtigung der Quantenausbeuten, das Isomerenverhältnis zu Ungunsten des *cis*-Isomers. Somit ist die Wahl der 365 nm-Hg(Xe)-Linie ein guter Kompromiß, um eine möglichst hohe Konzentration von *cis*-Azobenzol bzw. *cis*-Isomeren der verschiedenen Azopeptide zu erhalten.

¹¹ Man könnte auch sagen, die *trans*- $n\pi^*$ -Bande „borgt“ sich Oszillatorstärke vom $\pi\pi^*$ -Übergang.

¹² Ein Beispiel wäre das Auftreten von negativer Absorption.

Quantenausbeuten

Die Quantenausbeute Ψ , d.h. die Wahrscheinlichkeit für eine Isomerisierungsreaktion nach Anregung mit Licht, ist vom Ausgangsisomer, vom angeregten elektronischen Zustand ebenso wie vom Lösungsmittel abhängig. Tabelle 4.1 gibt eine Auswahl der veröffentlichten Quantenausbeuten bei Raumtemperatur wieder. Allerdings sind für Azobenzol in DMSO keine Werte verfügbar. Die starke Streuung der angegebenen Quantenausbeuten ist unter anderem durch die Unsicherheiten bei der Bestimmung der Absorptionskoeffizienten bedingt. Die Quantenausbeuten sind bei Anregung in der $n\pi^*$ -Bande immer höher als bei einer Anregung in der $\pi\pi^*$ -Bande. Dies ist ein Beispiel für die Verletzung der Regeln von Kasha, daß höher angeregte Zustände immer erst in den niedrigsten angeregten Zustand übergehen, um von dort in den Grundzustand zu wechseln (strahlend oder nichtstrahlend). Wäre dies hier auch der Fall, dürften die Quantenausbeuten nicht unterschiedlich sein. Jedoch durchläuft das Molekül je nach Anregungswellenlänge unterschiedliche Reaktionspfade, wie oben schon beschrieben. Diese Tatsache kann die Verletzung der Kashaeregeln erklären. Die hohen Quantenausbeuten sind ein weiterer guter Grund dafür, Azobenzol als optischen Trigger einzusetzen.

Lösungs- mittel	$\pi\pi^*$		$n\pi^*$		Zitate
	t→c	c→t	t→c	c→t	
n-Hexan	0.11	0.27	0.25	0.56	[BORTOLUS und MONTI, 1979]
n-Hexan		0.44		0.55	[SIAMPIRINGUE et al., 1987]
n-Hexan	0.10	0.44	0.2	0.68	[STEGEMEYER, 1962]
n-Hexan	0.10	0.42	0.28	0.55	[RONAYETTE et al., 1974]
Ethanol	0.2		0.36	0.45	[BIRNBAUM und STYLE, 1954]
Ethanol	0.15	0.24	0.28	0.51	[BORTOLUS und MONTI, 1979]
Acetonitril	0.15	0.21	0.31	0.46	[BORTOLUS und MONTI, 1979]

Tabelle 4.1: Quantenausbeuten Ψ für die Photoisomerisierung von Azobenzol in verschiedenen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur [RAU, 1990]

4.1.3 Weitere Anwendungen von Azobenzol

Neben der in dieser Arbeit dargestellten Verwendung von Azobenzol als photoinduzierter Trigger für Konformationsänderungen, wird dieses Molekül aufgrund seiner Fähigkeit zu isomerisieren auch in diversen anderen Anwendungen eingesetzt. So wird Azobenzol z.B. an Polystyrol als Sonde zur Untersuchung der direkten Umgebung verwendet [KIM und PAIK SUNG, 1996]. Deweiteren fungiert es in Polymeren und Flüssigkristallen als Grundlage für optische Speichermedien [IKEDA und TSUTSUMI, 1995, HO et al., 1996, KAWATA und KAWATA, 2000]. Auch kann mit Azobenzol die Ausrichtung von Polymeren in Filmen und Polymerflüssigkristallen beeinflusst werden [WU et al., 1999]. Ein weiteres For-

schungsgebiet sind die extrem verzweigten Dendrimere, deren Struktur und damit physikalische Eigenschaften durch die Isomerisierung von gezielt eingebauten Azobenzolen reversibel geändert werden können [JUNGE und MCGRATH, 1999]. Ebenfalls mit Dendrimern wurde gezeigt, daß auch eine infrarotinduzierte Isomerisierung von Azobenzol durch Vielphotonenanregung möglich ist [JIANG und AIDA, 1997]. Weitere Anwendungen sind in der Literatur beschrieben, z.B. in [JUNGE und MCGRATH, 1999] und [CLAVIER et al., 2000].

4.2 Untersuchte Proben im Überblick

Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über die Proben, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Hierzu sind in Tabelle 4.2 die Probenbezeichnung in ausführlicher und abgekürzter Form angegeben. Im weiteren Text werden meist die Abkürzungen verwendet. Die an das Azobenzol gebundene Peptidkette ist in allen Fällen dieselbe: sie besteht aus den acht Aminosäuren, die in der Thioredoxin Reduktase das katalytisch aktive Zentrum darstellen (vgl. Kap. 53, S. 37).

Gruppe	Abkürzung	vollständige Bezeichnung	cw-Mess. siehe Seite	fs-Mess. siehe Seite
1	Azo	Azobenzol (Diphenyldiazen)	43	65
2	APB	(4-Aminophenyl)azobenzoessäure	50	—
	AMPB	(4-Aminomethylphenyl)azobenzoessäure	50	79
3	lAPB	lineare Peptidkette; Photoschalter: APB	54	69
	cAPB	zyklisierte Peptidkette (Monozyklus); Photoschalter: APB	54	74
4	lAMPB	lineare Peptidkette; Photoschalter: AMPB	58	83
	cAMPB	zyklisierte Peptidkette (Monozyklus); Photoschalter: AMPB	58	88
	bcAMPB	zyklisierte Peptidkette (Bizeyklus); Photoschalter: AMPB	58	92

Tabelle 4.2: Untersuchte Proben mit vollständiger Bezeichnung und im Text verwendeten Abkürzungen. Rechts sind die Seitenzahlen angegeben, ab denen die Dauerstrichmessungen bzw. die Femtosekundenuntersuchungen der jeweiligen Probe zu finden sind.

Die Proben lassen sich in vier Gruppen einteilen:

1. Der reine Schalter Azobenzol
2. Die photoisomerisierbaren Pseudoaminosäuren APB und AMPB
3. Die APB-Peptide, die das Azobenzolderivat APB als Photoschalter enthalten
4. Die AMPB-Peptide, die das Azobenzolderivat AMPB als Photoschalter enthalten

Das erste Element der zweiten Gruppe, das APB, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, da dessen $\pi\pi^*$ -Banden so stark rotverschoben sind, daß diese mit den $n\pi^*$ -Banden überlappen und somit eine selektive Anregung des $n\pi^*$ -Überganges nicht zulassen. Der Systematik wegen ist dieser Chromophor in die Tabellen 4.2 und 4.3 aufgenommen.

Um im weiteren Text die Übersichtlichkeit zu erhöhen, werden in Tabelle 4.3 Symbole eingeführt, welche am Rand abgebildet werden und andeuten sollen, daß der nun folgende Abschnitt sich mit dieser Probe beschäftigt.

Dazu wurde versucht, in diese Symbole die wesentlichen Strukturinformationen zu integrieren: die zwei schraffierten Blöcke charakterisieren den Schalter Azobenzol. Direkt daran angeschlossen folgen die als grauer Kasten gezeichnete Carboxyl- bzw. Aminogruppe, die den Chromophor als Aminosäure maskieren (vgl. Abschnitt 4.3). An diese Pseudeaminosäuren (APB und AMPB) ist dann die Peptidkette angehängt, wobei die Anzahl der Aminosäuren an jedem Ende des Chromophores durch die Länge der Kette angedeutet wird. Im Falle der vierten Probengruppe ist zwischen dem Phenylring und der Aminogruppe noch der, als Kreis gezeichnete, flexible „Methylen-Spacer“ angedeutet. Die Bedeutung des Spacers wird in Abschnitt 4.5 näher erläutert.

Ebenfalls in der Tabelle abgebildet sind die chemischen Strukturformeln. Für den Chromophor AMPB und das lineare Peptid IAMPB ist der Methylen-Spacer grau hinterlegt, damit der Unterschied zur den Proben aus der dritten Gruppe deutlich wird.

Die nun folgenden Abschnitte orientieren sich an der Struktur der Tabelle 4.2. Nach der Vorstellung der Pseudoaminosäuren APB und AMPB werden zuerst die APB-Peptide und anschließend die AMPB-Peptide charakterisiert.

4 Azobenzol und Azo-Peptide: vom Photoschalter zur Konformationsdynamik

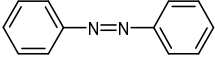

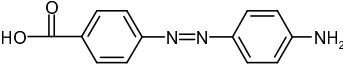

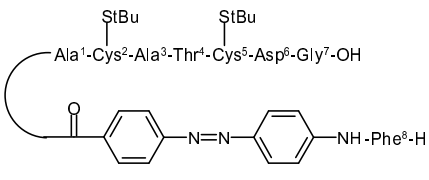
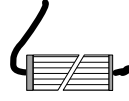
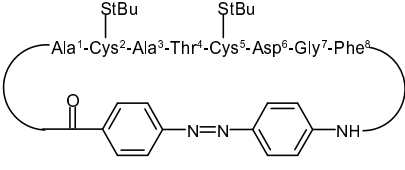

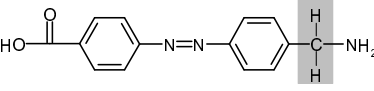

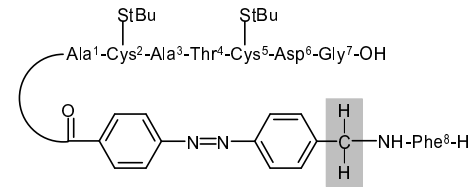
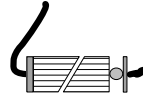
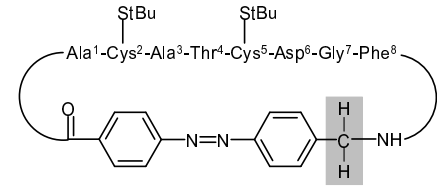
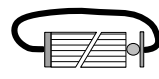
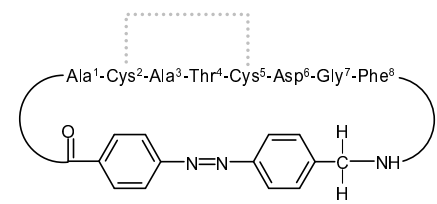

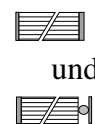
Abkürzung	Strukturformel	verwendetes Symbol
Azo		
APB		
lAPB		
cAPB		
AMPB		
lAMPB		
cAMPB		
bcAMPB		

Tabelle 4.3: Übersicht über die untersuchten Proben. In der mittleren Spalte sind die Strukturformeln der einzelnen Proben angegeben, wobei die Aminosäuren der Peptidkette nur durch ihren Namen dargestellt sind. Die gestrichelte Linie bei bcAMPB von Cys² nach Cys⁵ veranschaulicht die geschlossene Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen. Rechts sind die zugehörigen Symbole gezeigt.

4.3 Die Chromophore APB und AMPB



4.3.1 Allgemeines

Kleine zyklische Peptide besitzen vergleichsweise starre Strukturen. Da die lichtinduzierte *trans*→*cis*-Isomerisierung des Azobenzols mit großen geometrischen Änderungen verbunden ist (siehe oben), sollte dessen Einbau in das Peptidrückgrad niedermolekularer zyklischer Peptide ein ideales System ergeben, lichtinduzierte Konformationsübergänge an Modellpeptiden zu untersuchen. Die beiden Photoschalter APB und AMPB wurden gewählt, da diese als photoschaltbare Einheit direkt in das Peptidrückgrad eingebaut werden können. Hergestellt werden diese durch Addition einer Amino- bzw. Aminomethylengruppe und einer Carboxylgruppe jeweils an den *p*-Positionen der beiden Phenylringe. Das Azobenzol so wird als Pseudoaminosäure „getarnt“. In [BEHRENDT, 2000] und [BEHRENDT et al., 1999] sind die Details der Synthese beschrieben.

APB bildet das Starrste derartige Azobenzolderivat und sollte daher die neuen geometrischen Zwangsbedingungen aufgrund einer Isomerisierung bestmöglich auf zyklische Peptide übertragen können.

Der zweite Azobenzol-Photoschalter (AMPB) enthält zusätzlich eine Methylengruppe zwischen der Aminofunktion und dem Phenylring. Diese unterbricht die Konjugation des π -Elektronensystems und dient als kleiner flexibler Spacer.

4.3.2 Dauerstrichcharakterisierung

Durch das Anbringen einer Aminogruppe an einen Phenylring des Azobenzols erwartet man hauptsächlich eine Beeinflussung des π -Elektronensystems, wie es schon für andere Aminoazobenzole beobachtet wurde [RAU, 1990]. Das APB besitzt ein vollständig konjugiertes π -Elektronensystem, in dem das freie Elektronenpaar der Aminogruppe im Zusammenwirken mit der Carboxylgruppe an einem „push-pull“-Effekt beteiligt ist. Die Derivatisierung bewirkt eine so starke bathochrome Verschiebung der $\pi\pi^*$ -Banden von APB relativ zu Azobenzol, daß die $\pi\pi^*$ - mit den $n\pi^*$ -Banden, die ihre Lagen nur unbedeutend ändern, überlappen [WACHTVEITL et al., 1997].

Obwohl nachgewiesen wurde, daß auch dieses modifizierte Azobenzol isomerisiert¹³, wurde es in dieser Arbeit nicht weiter untersucht, da eine Vergleichbarkeit der Meßdaten aufgrund des Bandenüberlappes und den daraus resultierenden unterschiedlichen Anregungsverhältnissen relativ zu den anderen Proben nicht gegeben ist.

Aufgrund der Unterbrechung des delokalisierten π -Elektronensystems durch die Methylengruppe erwartet man für AMPB eine Reduktion der Verschiebung der $\pi\pi^*$ -Banden. Wie die

¹³Die thermische Rückreaktion ist im Vergleich zu Azobenzol erheblich beschleunigt. So kehrt *cis*-APB innerhalb weniger Minuten wieder in der *trans*-Zustand zurück [WACHTVEITL et al., 1997].

Absorptionsspektren in Abb. 4.3 zeigen, ist dies tatsächlich der Fall, sodaß dieser Chromophor in die Reihe der zu untersuchenden Proben aufgenommen werden konnte.

Absorptionseigenschaften

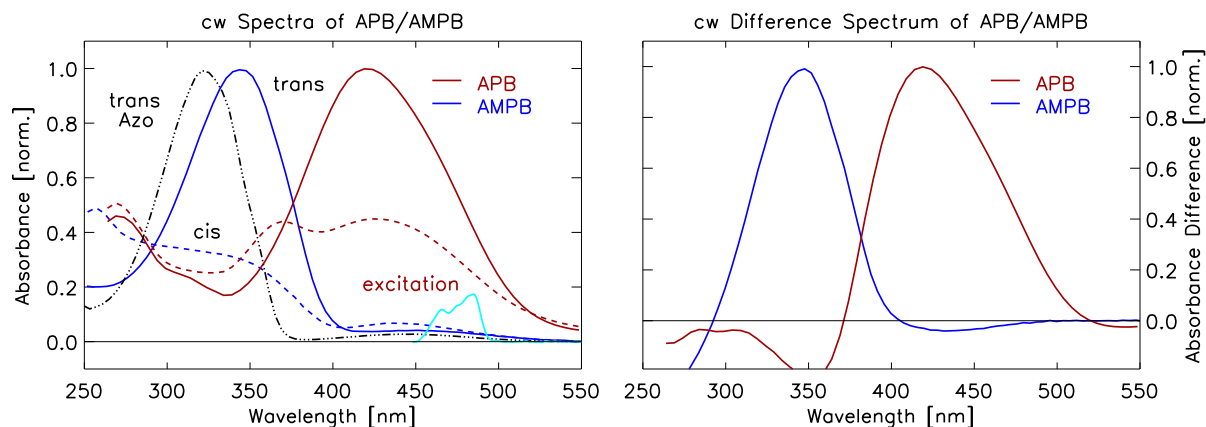


Abbildung 4.3: Dauerstrichspektren der Azobenzolderivate APB und AMPB gelöst in DMSO: links: In rotbraun ist das Absorptionsspektrum von APB, in blau das von AMPB gezeigt. Als durchgezogene Linie ist jeweils die Absorption des *trans*-Isomers, gestrichelt die des *cis*-Isomers (vgl. Text) dargestellt. Das Maximum der Absorption in der $\pi\pi^*$ -Bande von *trans*-A(M)PB wurde auf 1.0 normiert. In türkis ist das Spektrum des Anregimpulses der Femtosekundenmessungen eingezeichnet. Zum Vergleich ist die normierte Absorption von *trans*-Azobenzol (gestrichpunktete Linie, vgl. auch Abb. 4.2) angegeben.

rechts: Differenzspektrum von APB und AMPB. Dargestellt ist die jeweils Absorptionsdifferenz zwischen *trans*- und *cis*-Isomer. Die Spektren wurden auf 1.0 normiert.

Ebenso wie Azobenzol zeigen auch die beiden Isomere des AMPB im sichtbaren Spektralbereich ein deutlich unterschiedliches Absorptionsverhalten (siehe Abb. 4.3). Die $\pi\pi^*$ -Bande von *trans*-APB hat ihr Maximum bei 420 nm. Das *trans*-Isomer von AMPB hingegen besitzt eine, relativ zu Azobenzol um etwa 5 nm rotverschobene, schwache $n\pi^*$ -Bande bei 450 nm und eine intensive $\pi\pi^*$ -Bande bei 343 nm. Der Einbau des Methylenspacers reduziert somit die Rotverschiebung der $\pi\pi^*$ -Bande um 77 nm. Das Maximum der $n\pi^*$ -Bande des *cis*-AMPB (437 nm) ist ebenfalls um 5 nm rotverschoben. Die $\pi\pi^*$ -Bande zeigt ein Maximum bei 257 nm mit einer ausgeprägten Schulter bei 300 nm. Das Differenzspektrum weist Extrema bei 346 nm und 434 nm auf.

In der Literatur sind für die Lage der Absorptionsmaxima sehr ähnliche Werte angegeben [RENNER et al., 2000b]. Leichte Diskrepanzen sind auf die Art der Präparation zurückzuführen (vgl. Abschnitt 4.6)

Entsprechend dem Vorgehen bei Azobenzol wurde bei AMPB nach Belichtung in der $\pi\pi^*$ -Bande eine maximal verbliebene *trans*-Isomerenkonzentration von $\leq 20\%$ erhalten.

Die Quantenausbeuten sind bis jetzt nicht verlässlich bestimmt worden. Jedoch legen die Dau-

erstrichspektren in Verbindung mit den verfügbaren Extinktionskoeffizienten und der Zeit, die zur Erreichung des photostationären Gleichgewichtes bei definierter Belichtung benötigt wird, nahe, daß die Quantenausbeuten sich nicht stark von jenen für Azobenzol unterscheiden.

4.4 APB-Peptide

4.4.1 Allgemeines

Zur Untersuchung von Konformationsdynamik benötigt man neben den als Aminosäure markierten Chromophoren noch ein in der Länge passendes Peptid. Wie in Kapitel 53 schon erläutert, wurde als Modellpeptid das aktive Zentrum der Thioredoxin Reduktase verwendet. Dies besteht aus der Aminosäuresequenz Ala-Cys-Ala-Thr-Cys-Asp-Gly-Phe. Die Cysteine bieten desweiteren die Möglichkeit, durch die Bildung einer Disulfidbrücke¹⁴ die Geometrie zu verändern und dabei den zugänglichen Konformationsraum einzuschränken. Soll keine Disulfidbrücke gebildet werden, so müssen die Cysteine mit Schutzgruppen¹⁵ versehen werden, um unerwünschte Nebenreaktionen zu verhindern.

Der Chromophor stellt als „neunte Aminosäure“ die Verbindung zwischen dem Alanin und dem Phenylalanin her.

Um Unterschiede in der Antwort des Peptidrückgrates auf die Photoisomerisierung besser herausarbeiten zu können, wurde sowohl das lineare (IAPB), d.h. nicht zyklisierte Peptid, als auch die zyklisierte (cAPB) Variante untersucht. Die lineare Form hat dabei die Sequenz Phe-APB-Ala-Cys-Ala-Thr-Cys-Asp-Gly, d.h. an dem C-terminalen Ende des Chromophores befindet sich eine sieben Aminosäuren lange Kette, am N-terminalen Ende hingegen nur eine Aminosäure. Da die beiden Peptide IAPB und cAPB nahezu dieselbe Molmasse und dieselben spektroskopischen Eigenschaften besitzen (siehe unten), sollten Unterschiede in der Dynamik allein durch die Zyklisierung und der damit einhergehenden Konformationsdynamik hervorgerufen sein.

Vorstufen zu diesem linearen Oktapeptid wurden ebenfalls kurz untersucht. Jedoch sind sowohl die Dauerstrichspektren als auch die Femtosekundenmessungen an dem Peptidstück Phe-APB-Ala nahezu identisch zu dem kompletten linearen APB-Peptid, sodaß auf eine Beschreibung in dieser Arbeit verzichtet wurde. Festzuhalten ist, daß die Länge der Aminosäurekette in den untersuchten Fällen keinen Einfluß auf die spektralen und dynamischen Eigenschaften des Chromophores hat, solange die Addition nur auf einer Seite erfolgt.

Von dem zu einem Ring geschlossenen Peptid gibt es die zwei Varianten mit und ohne Disulfidbrücke, das bi- und das monozyklische APB-Peptid. Jedoch hat sich in NMR-Analysen herausgestellt, daß der Bizyklus keinen definierten Konformationsübergang mehr durchführen kann, da der Chromophor sehr starr ist und die Schwefelbrücke zusätzlich einschränkend

¹⁴In der Thioredoxin Reduktase ist die Disulfidbrücke ebenfalls geschlossen (vgl. Abb. 3.2).

¹⁵Für die APB-Peptide IAPB und cAPB wurde StBu (*S-tert*-Buthylthio) als Schutzgruppe verwendet.



wirkt [RENNER et al., 2000a]. Diese sehr starke Spannung im Peptidrückgrat hat sich auch in der Synthese durch ungewollte Nebenreaktionen und sehr geringe Syntheseausbeuten bemerkbar gemacht [BEHRENDT, 2000]. Deshalb wurde hier auf die Untersuchung dieser Variante verzichtet (vgl. aber Abschnitt 4.5).

4.4.2 NMR-Strukturen

Für die Interpretation der Femtosekundenmessungen ist die Kenntnis der genauen Struktur des zyklischen Peptides cAPB bei den beiden Schalterstellungen *trans* und *cis* von elementarer Bedeutung. Christian Renner vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried hat von allen in dieser Arbeit untersuchten zyklischen Peptiden NMR-Strukturbestimmungen durchgeführt [RENNER et al., 2000a, RENNER et al., 2000b] und die Ergebnisse zur Verfügung gestellt.

Eine direkte Transformation der aufgenommenen NMR-Spektren in eine eindeutige Struktur ist nicht möglich. Daher werden verschiedene, mit den erhaltenen Spektren konsistente Strukturen ausgewählt und deren Energieinhalt berechnet. Zur zusätzlichen Einschränkung der möglichen Strukturen wurden dazu noch anderweitig verfügbare, experimentell bestimmte Randbedingungen in den Strukturen mitberücksichtigt. Die zehn energieärmsten ermittelten Strukturen werden dann verwendet und, nach der Ausrichtung an bestimmten Punkten, gemeinsam dargestellt. Ein gutes Maß dafür, wie eindeutig die erhaltenen Strukturen sind, ist die Berechnung der mittleren quadratischen Abweichung der Atompositionen des Peptidrückgrates (im weiteren Textverlauf auch als „rmsd¹⁶“ abgekürzt). Ist der Wert klein, streuen die Positionen wenig und die Struktur ist klar definiert. Im entgegengesetzten Fall ist entweder keine definierte Struktur vorhanden oder es existieren mehrere Subkonformationen, die ihrerseits dann bestimmte Strukturelemente besitzen können.

Abbildung 4.4 zeigt eine Überlagerung der zehn energieärmsten Strukturen des monozyklischen APB-Peptides für die *trans*- und *cis*-Konformation des Chromophores. Für die *trans*-Konfiguration (Abb. 4.4 oben) beträgt die ermittelte mittlere quadratische Abweichung der Rückgratatompositionen 0.57Å.

Im Gegensatz hierzu ergibt sich für die rmsd des APB-Peptides in der *cis*-Konformation (Abb. 4.4 unten) ein Wert von 1.26Å, welcher etwa doppelt so groß ist wie für den *trans*-Zustand. Aufgrund der kompakteren Geometrie des *cis*-Azobenzols (siehe auch Abb. 4.1) ist diese Konformation erheblich weniger gespannt. Dies ist auch in den NMR-Strukturen zu erkennen. Zu sehen ist ebenso, daß noch eine zweite Peptidkonformationsfamilie mit geringerer Häufigkeit auftritt. Berechnungen zeigen, daß die sichtbare Hauptkonformation die relevante Struktur darstellt [RENNER et al., 2000a].

¹⁶root mean square deviation

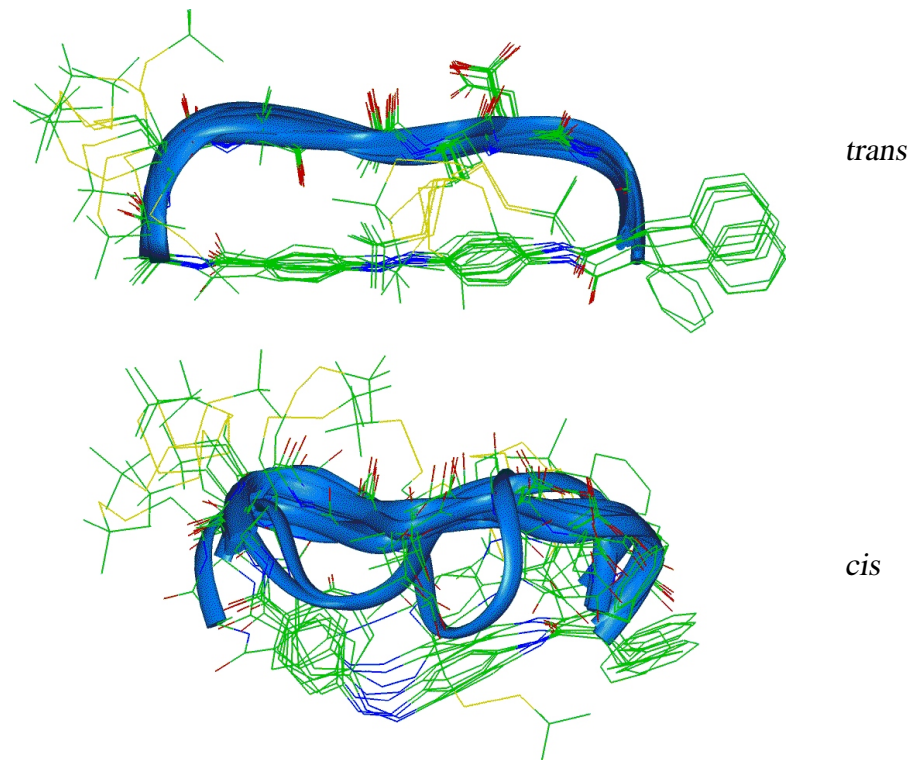


Abbildung 4.4: Ensemble der zehn energieärmsten NMR-Strukturen des monozyklischen APB-Peptids in der *trans*-Konfiguration (oben) und *cis*-Konfiguration (unten). Der Chromophor selbst sowie die Seitenketten der Aminosäuren sind als Skelettmodell dargestellt. Dabei werden, den Konventionen entsprechend, Kohlenstoffatome grün, Stickstoffatome blau, Sauerstoffatome rot und Schwefelatome gelb eingefärbt. Die Wasserstoffatome sind nicht gezeigt. Das Peptidrückgrat selbst ist als blaues Band eingezeichnet. Die Abbildung ist [RENNER *et al.*, 2000a] entnommen.

4.4.3 Dauerstrichcharakterisierung

Die in dem vorliegenden Modellpeptid enthaltenen Aminosäuren zeigen keine signifikante Absorption in dem für Azobenzol bzw. den Chromophor APB interessierenden Wellenlängenbereich von 300 – 700 nm. Ebenso zeigt das Oktapeptid dort keine Absorptionsbanden. Somit bleibt die Möglichkeit erhalten, die Isomerisierung spektroskopisch über die Absorptionsänderungen des Azobenzolchromophors zu verfolgen.

Durch den partiellen Doppelbindungscharakter der Peptidbindung zwischen dem APB-Chromophor und der Aminosäure Phenylalanin wird der „push-pull-Effekt“ des reinen APB-Moleküls reduziert, womit zu erwarten ist, daß die $\pi\pi^*$ -Banden der Azopeptide nicht so stark rotverschoben wie die von APB sind (vgl. Abb. 4.5). Wie die Dauerstrichabsorptionsspektren ebenfalls zeigen, hat die Zyklisierung des Peptides nur sehr geringe Auswirkungen auf die Absorptionseigenschaften im sichtbaren Spektralbereich.

Somit sind, im Gegensatz zum freien Chromophor APB, die Peptide lAPB und cAPB einer

ultrakurzzeitspektroskopischen Untersuchung im Kontext dieser Arbeit zugänglich. Die Anregung kann wie bei Azobenzol in der langwelligen Flanke der $n\pi^*$ -Bande erfolgen, ohne gleichzeitig bei einem Teil der Moleküle einen Übergang in der $\pi\pi^*$ -Bande zu induzieren.

Absorptionseigenschaften

Auch bei den Azopeptiden IAPB und cAPB bleibt im sichtbaren Spektralbereich ein deutlich unterschiedliches Absorptionsverhalten des *trans*- und *cis*-Isomers erhalten. Das *trans*-Isomer von IAPB (in Abb. 4.5 rot gezeichnet) besitzt eine, relativ zu APB um 53 nm blauverschobene $\pi\pi^*$ -Bande bei 367 nm und eine $n\pi^*$ -Bande bei etwa 460 nm, deren Position allerdings nicht gut lokalisierbar ist. Das Maximum der $n\pi^*$ -Bande des *cis*-IAPB ist im Vergleich zu Azobenzol etwas rotverschoben und relativ zu APB unverschoben. Dies macht deutlich, daß durch den Einbau des Photoschalters in die Aminosäurekette nur die delokalisierte π -Elektronenstruktur beeinflusst wird, während sich kein Einfluß auf die $n\pi^*$ -Bande zeigt. Die *cis*- $\pi\pi^*$ -Bande zeigt ein Maximum bei 263 nm mit einer sehr ausgeprägten Schulter bei etwa 340 nm.

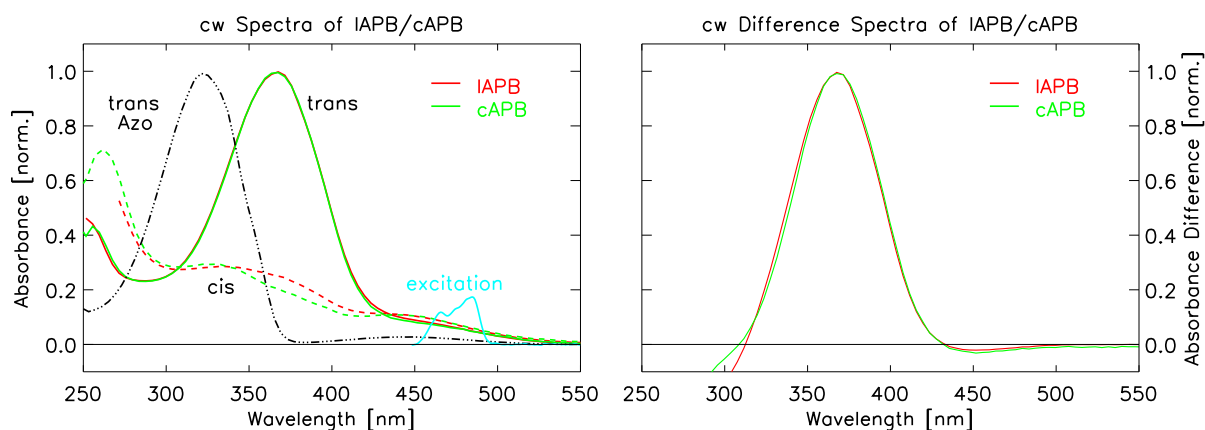


Abbildung 4.5: Dauerstrichspektren der APB-Peptide gelöst in DMSO:

links: In rot ist das Absorptionsspektrum des linearen APB-Peptids (IAPB), in grün das des monozyklischen APB-Peptids (cAPB) gezeigt. Als durchgezogene Linie ist jeweils die Absorption des *trans*-Isomers, gestrichelt die des photostationären *cis*-Isomerengemisches dargestellt. Das Maximum der Absorption in der $\pi\pi^*$ -Bande von *trans*-I/cAPB wurde jeweils auf 1.0 normiert. In türkis ist das Spektrum des Anregimpulses der Femtosekundenmessungen eingezeichnet. Zum Vergleich ist die normierte Absorption von *trans*-Azobenzol (vgl. Abb. 4.2) angegeben.

rechts: Differenzspektren von IAPB und cAPB. Dargestellt ist jeweils die Absorptionsdifferenz zwischen *trans*- und *cis*-Isomer. Die Spektren wurden auf 1.0 normiert.

Wie der Abbildung 4.5 und den Tabellen 4.4 und 4.5 zu entnehmen ist, hat die Zyklisierung auf die Elektronenstruktur und damit auf das Absorptionsspektrum nur einen kleinen Einfluß. Einzig die Schulter im Bereich um 350 nm ist bei *cis*-IAPB scheinbar deutlicher ausgeprägt. Diese kann aber auch von einem höheren *trans*-Anteil herrühren, da das lineare Pep-

tid eine verglichen mit cAPB hohe thermische Rückisomerisierungsrate hat, was auch von [RENNER et al., 2000a] beobachtet wurde. Die normierten Differenzspektren sind innerhalb der Meßgenauigkeit identisch und weisen Extrema bei 451 nm und 368 nm auf.

Die Abschätzung (vgl. Abschnitt 66) der minimal erreichten *trans*-Isomerenkonzentration nach Belichtung in der $\pi\pi^*$ -Bande ergibt sowohl für lAPB als auch für cAPB einen maximalen Restanteil *trans*-Isomere von $\leq 15\%$.

In den in der Literatur beschriebenen Experimenten wurde für cAPB ein Anteil von 22% *trans*-Molekülen im photostationären Zustand erzielt [RENNER et al., 2000a]. Durch eine Optimierung der Filterkombinationen zur Einschränkung des Belichtungsspektrums konnte der Anteil an *trans*-Isomeren für cAPB auf unter 15% gedrückt werden. In [RENNER et al., 2000a] wurde zur Filterung des Spektrums der Hg(Xe)-Lampe nur ein UG1-Filter verwendet, welcher den Spektralbereich von 300 – 400 nm passieren läßt. Somit könnte durch die sehr kurzwellige Belichtung mit Wellenlängen unter 320 nm eine Anregung in der *cis*- $\pi\pi^*$ -Bande erfolgt sein, welche zu einer Verschlechterung des Isomerenverhältnisses führte. Eine derartige Beobachtung wurde auch im Laufe dieser Arbeit gemacht, als eine Belichtung auch mit der kurzwelligsten Hg-Linie (313 nm) erfolgte.

Eine Zusammenfassung der spektroskopischen Daten geben die Tabellen 4.4 und 4.5

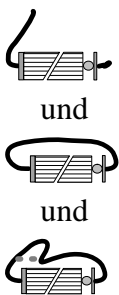
4.5 AMPB-Peptide

4.5.1 Allgemeines

Neben den Modellpeptiden mit APB als Chromophor standen auch noch drei Varianten des oben vorgestellten Oktapeptides mit AMPB als Photoschalter zur Verfügung. Die ermittelten NMR-Strukturen legten es nahe, daß sich neben der Untersuchung des linearen Peptides lAMPB auch die detaillierte Spektroskopie sowohl der mono- (cAMPB) wie auch der bizyklischen (bcAMPB) Variante lohnen sollte. Die aufgrund der zusätzlichen Methylengruppe vorhandene größere Flexibilität der Pseudoaminosäure AMPB sollte es ermöglichen, daß in diesem Falle auch der Bizyklus bcAMPB definierte Konformationsübergänge durchführen kann. Ob dadurch für das monozyklische System soviel Freiraum vorhanden ist, daß dort keine in Femtosekundenexperimenten erkennbaren Strukturänderungen mehr induziert werden können, war zu Beginn nicht klar. Deshalb wurden alle drei Modellsysteme untersucht.

Die Aminosäuresequenz ist die gleiche wie in den APB-Peptiden. Ebenfalls gleich ist die Aufteilung der Aminosäuren im linearen Peptid lAMPB.

Die genauen Details der Synthese sind in [BEHRENDT et al., 1999] und [BEHRENDT, 2000] beschrieben. Auch bei diesen Peptiden waren die Cysteine von lAMPB und cAMPB mit der Schutzgruppe StBu geschützt.



4.5.2 NMR-Strukturen

Die Berechnung der NMR-Strukturen und die Erstellung der Abbildungen erfolgte nach demselben Prinzip wie bei den APB-Peptiden (siehe S. 52).

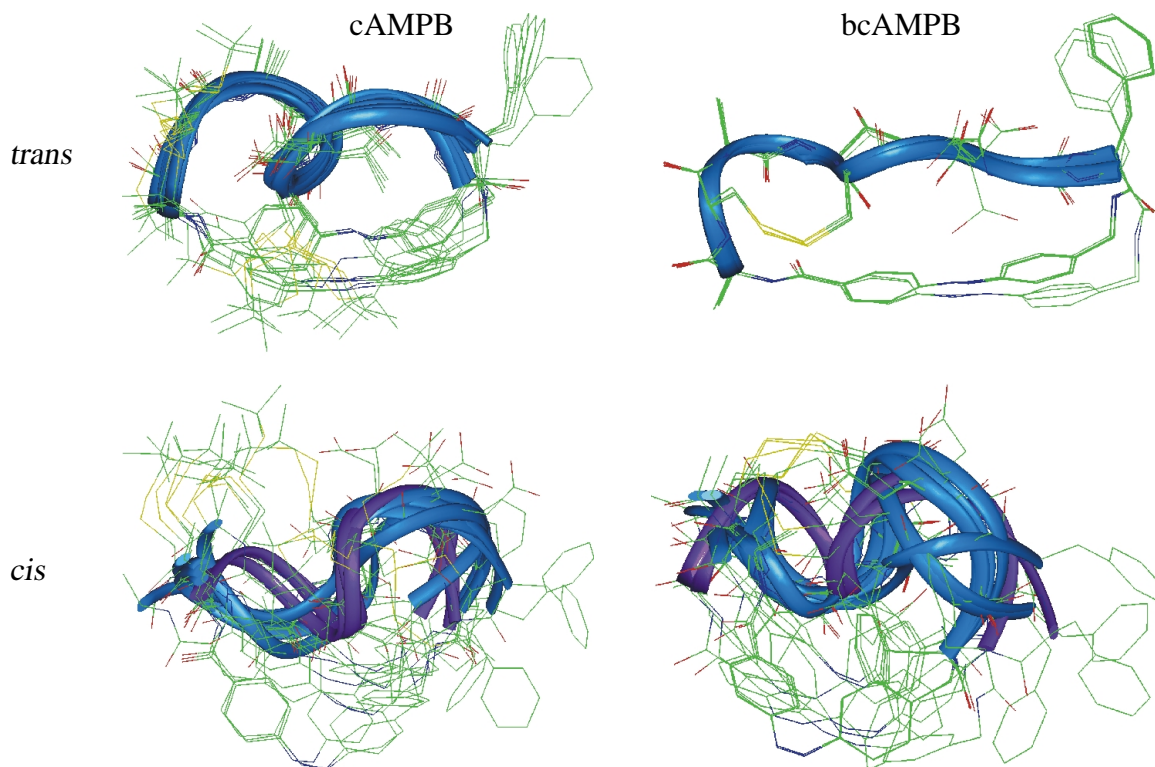


Abbildung 4.6: Ensemble der zehn energieärmsten NMR-Strukturen des monozyklischen (links) und bilyklischen (rechts) AMPB-Peptids in der jeweiligen *trans*-Konfiguration (oben) und *cis*-Konfiguration (unten). Die violett und blau gezeichneten Peptidrückgrate gehören jeweils einer Konformationsfamilie an. Die Abbildungen sind [RENNER et al., 2000b] entnommen.

Die NMR-Spektren des monozyklischen AMPB-Peptides sind in der *trans*- und *cis*-Konfiguration jeweils durch zwei so unterschiedliche Resonanzsätze charakterisiert, daß diese eine Zuordnung zu zwei Konformationsfamilien erzwingen [RENNER et al., 2000b]. Jedoch waren für die weniger stark populierte Familien teilweise nicht genügend Interprotonabstände als Randbedingungen für die Strukturberechnung extrahierbar. Eindeutig ist, daß die Strukturen der repräsentativen Konformere in der *trans*-Konfiguration signifikant stärker konvergieren als in der *cis*-Geometrie. Für die mittlere quadratische Abweichung ergibt sich für die zehn energieärmsten Strukturen für *trans*-cAMPB ein Wert von 0.68\AA , während man für *cis*-cAMPB 1.67\AA erhält. Zusätzlich ergibt sich für das *trans*-Isomer auch eine sehr hohe Konvergenz der Seitenkettenpositionen, wie in Abb. 4.6 links oben deutlich zu sehen ist.

Wie schon bei den APB-Peptiden, so ist auch beim cAMPB dem Peptidrückgrat in der *cis*-Konformation ein größerer Konformationsraum zugänglich, welches sich durch das Anstei-

gen des rmsd-Wertes bemerkbar macht. Die am stärksten populierte Konformationsfamilie bildet eine S-förmige Struktur des Peptidrückgrates aus, während eine zweite, geringer besetzte Gruppe eine mehr helikale Struktur besitzt, welche in Abb. 4.6 links unten durch die violett gezeichneten Bänder dargestellt ist.

Ebenso wie beim cAMPB wurde auch beim disulfidverbrückten bcAMPB für das *trans*-Isomer eine, relativ zum *cis*-Isomer, signifikant höhere Konvergenz des Peptidrückgrates gefunden. Die rmsd-Werte betragen 0.19Å für die *trans*- und 1.54Å für die *cis*-Konfiguration. Dieser deutlich kleinere Wert für den *trans*-Zustand im Vergleich zum monozyklischen Peptid ist eine natürliche Folge der stärkeren konformationellen Einschränkung im Bicyklus durch die doppelte Ringstruktur. Die Zyklisierung und die geschlossene Disulfidbrücke geben sehr restriktive Zwangsbedingungen für die relativen Positionen der Aminosäuren vor. In Abbildung 4.6 rechts oben ist die sehr hohe Konvergenz der zehn energieärmsten Strukturen deutlich zu sehen.

4.5.3 Dauerstrichcharakterisierung

Aufgrund der zusätzlichen Methylengruppe bei den AMPB-Peptiden ist eine geringere Beeinflussung des π -Elektronensystems durch die Ankopplung von weiteren Aminosäuren an den Chromophor AMPB zu erwarten als bei den APB-Peptiden. In der Literatur wird berichtet, daß überhaupt kein Einfluß zu erkennen war [RENNER et al., 2000b]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen belegen dies.

Absorptionseigenschaften

Das *trans*-Isomer von lAMPB (in Abb. 4.5 pink gezeichnet) besitzt eine, relativ zu AMPB um etwa 7 nm blauverschobene $\pi\pi^*$ -Bande bei 339 nm und eine $n\pi^*$ -Bande bei 444 nm. Das Maximum der $n\pi^*$ -Bande des *cis*-lAPB liegt spektral zwischen den entsprechenden Absorptionsmaxima von Azobenzol und AMPB. Die $\pi\pi^*$ -Bande zeigt ein Maximum bei 257 nm mit einer sehr ausgeprägten Schulter zwischen etwa 300 nm und 350 nm. Ein Vergleich mit den Literaturwerten ergibt eine gute Übereinstimmung für alle Banden.

Wie der Abbildung 4.7 sowie den Tabellen 4.4 und 4.5 zu entnehmen ist, hat die Zyklisierung des Peptidrückgrates auf den $n\pi$ - und den niederenergetischsten $\pi\pi^*$ -Übergang nahezu keinen Einfluß. Die Blauverschiebung des Maximums der $n\pi^*$ -Bande bei bcAMPB um 5 nm ist nicht signifikant, da die Extremalwertbestimmung aufgrund der Form des Spektrums nicht sehr genau ist. Insgesamt zeigt das Spektrum des bityklischen Peptids leichte Abweichungen zu denen von lAMPB und cAMPB. Die normierten Differenzspektren sind innerhalb der Meßgenauigkeit identisch und weisen Extrema bei 430 nm und 340 nm auf (s. Abb. 4.7 rechts).

Die Abschätzung (vgl. Abschnitt 66) der minimal erreichten *trans*-Isomerenkonzentration bei Belichtung in der $\pi\pi^*$ -Bande ergibt für lAMPB und cAMPB einen maximalen Restanteil von $\leq 10\%$ an *trans*-Isomeren und für bcAMPB eine Grenze von $\leq 15\%$.

4 Azobenzol und Azo-Peptide: vom Photoschalter zur Konformationsdynamik

Die in der Literatur berichteten größeren Werte von 22% *trans*-Molekülen im photostationären Zustand haben vermutlich ihre Ursache ebenfalls in der Art der Belichtung, wie in Abschnitt 4.4.3, Seite 55, bei den APB-Peptiden ausgeführt [RENNER et al., 2000b].

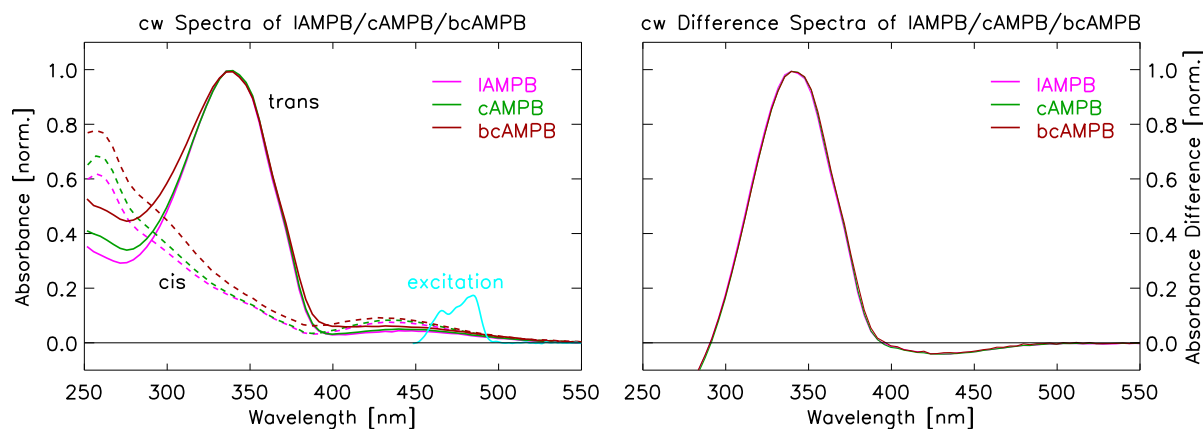


Abbildung 4.7: Dauerstrichspektren der AMPB-Peptide gelöst in DMSO:

links: In pink ist das Absorptionsspektrum des linearen AMPB-Peptids (IAMPB), in dunkelgrün das des monozyklischen AMPB-Peptids (cAMPB) und in braun das des bityklischen AMPB-Peptids (bcAMPB) gezeigt. Als durchgezogene Linie ist jeweils die Absorption des *trans*-Isomers, gestrichelt die des photostationären *cis*-Isomeregemisches dargestellt. Das Maximum der Absorption in der $\pi\pi^*$ -Bande von *trans*-I/c/bcAMPB wurde jeweils auf 1.0 normiert. In türkis ist das Spektrum des Anregimpulses der Femtosekundenmessungen eingezeichnet.

rechts: Differenzspektren von IAMPB, cAMPB und bcAMPB. Dargestellt ist jeweils die Absorptionsdifferenz zwischen *trans*- und *cis*-Isomer. Die Spektren wurden auf 1.0 normiert. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der Differenzspektren sind die Einzelkurven in dieser Darstellung nicht mehr getrennt sichtbar.

4.6 Probenpräparation und Vorüberlegungen

In diesem Abschnitt sollen die wichtigsten Überlegungen zur Vorbereitung der oben vorgestellten Proben auf die Femtosekundenmessungen vorgestellt werden.

Einer der wichtigsten Faktoren ist das Lösungsmittel. Da die ablaufenden Reaktionen auch von der Wahl der Lösungsmittels abhängen, ist es wichtig, daß alle Proben in demselben Lösungsmittel gelöst werden, um eine Vergleichbarkeit der Meßdaten zu gewährleisten. Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde DMSO¹⁷ als Lösungsmittel gewählt. Dies hat verschiedene Gründe: Zum einen wurden die NMR-Strukturen in der deuterierten Variante d_6 -DMSO erstellt. Zum anderen sind speziell die Peptide in DMSO sehr gut löslich. Da für die Femtosekundenuntersuchungen eine relativ hohe Konzentration der Proben notwendig ist,

¹⁷Dimethylsulfoxid; relativ unpolar, molare Masse $78.13 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ [SCHRADER, 1989], chem. Summenformel: $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$

um ausreichend hohe Signale zu erreichen, war dies ein ebenfalls wichtiger Punkt. Desweiteren ist DMSO nahezu nicht flüchtig, so daß sich die Konzentration der untersuchten Probe während der Messungen nicht aufgrund von Verdunstung des Lösungsmittels veränderte.

Bedauerlicherweise hat DMSO auch einige unangenehme Eigenschaften. So darf, aufgrund seiner Tendenz in viele Materialien hineinzudiffundieren, der gesamte Probenkreislauf nur aus Teflon und Glas bestehen, um störende Effekte wie das Auswaschen von Weichmachern z.B. aus Plastikschräuchen zu verhindern. Dies wurde bei der Konstruktion des Meßaufbaues berücksichtigt (vgl. Abschnitt 36). Desweiteren beginnt DMSO ab einer Wellenlänge von etwa 270 nm zu absorbieren, wodurch Untersuchungen kurzweilig von dieser Absorptionskante sehr erschwert bzw. unmöglich werden.

Das reine *trans*-Azobenzol (Firma Merck, Reinheit > 98%) wurde so verwendet, wie es erworben wurde. Alle anderen Proben wurden in Martinsried in der Arbeitsgruppe von Prof. L. Moroder synthetisiert und ebenfalls ohne Weiterbearbeitung direkt gelöst. Einzig der Chromophor AMPB war ohne Vorbehandlung nur sehr schlecht löslich. Deshalb wurden die 5 ml Lösung mit 140 µl Natronlauge (NaOH, 1 M) versetzt. Das sich bildende Salz $\text{Na}^+ \text{AMPB}^-$ löst sich in DMSO gut. Aus allen Proben wurden störende Streuteilchen durch Zentrifugieren¹⁸ entfernt.

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Absorptionseigenschaften der *trans*- und *cis*-Isomere wurden von jeder Probe zwei Lösungen von je 3-4 ml hergestellt. Deren Konzentrationen wurden so eingestellt, daß eine optimale Ausnutzung der Dynamik der Detektoren und der anschließenden Elektronik gewährleistet war. Genauere Angaben sind in den Tabellen von Abschnitt 4.7 zu entnehmen.

Eine ebenfalls sehr wichtige Größe ist die bei einem Laserimpuls angeregte Anzahl von Molekülen relativ zur Gesamtzahl der im Anregungsvolumen vorhandenen. Eine Abschätzung liefert folgendes: Die Anregung der Photoreaktion erfolgte mit Lichtimpulsen, die eine Energie von 0.4 µJ bei 480 nm hatten. Weniger als zwei Drittel dieser Energie entfallen auf das hier betrachtete Volumen¹⁹. Diese Energie entspricht bei der angegebenen Wellenlänge einer Photonenzahl von $5.4 \cdot 10^{11}$. Davon werden bei einer Absorption $A = 0.03$ bei der Anregungswellenlänge $1 - 10^{-A} = 6.7\%$ der Photonen absorbiert. Im angeregten Volumen von 100 µm Durchmesser und 0.5 mm Schichtdicke – dies entspricht $3.9 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3$ – befinden sich bei einer angenommenen mittleren Konzentration von 0.5 – 3 mM etwa $1.2 - 7.0 \cdot 10^{12}$ Farbstoffmoleküle. Daraus folgt, daß pro Laserschuß etwa 0.5 – 3% der Moleküle im Anregungsvolumen ein Photon absorbieren.

Unter Berücksichtigung der Quantenausbeuten für beide Isomerisierungsvorgänge ergibt sich, daß für die *trans*→*cis*-Richtung bei einer Stunde Meßzeit und 4 ml Probenvolumen etwa 1% aller vorhandenen Moleküle isomerisiert wurden, vorausgesetzt, daß keine Rückreaktion stattfindet. Viele der untersuchten Proben, insbesondere die Peptidverbindungen, zeigten allerdings eine relativ schnelle thermische Rückreaktion von der *cis*- in die *trans*-Konformation

¹⁸10 Minuten bei 10000 g

¹⁹Dies hängt mit der Definition des Bündeldurchmessers zusammen. Nimmt man ein gaußförmiges Strahlprofil an, so entfallen 56% der Energie auf die Fläche innerhalb des hier bestimmten Radius.

[WACHTVEITL et al., 1997]. Daher ist der oben abgeschätzte Anteil an Photoprodukten ein obere Grenze, die für diese Proben sicherlich nicht erreicht wurde. Die Dauerstrichspektren, die zur Kontrolle dieser Photoproduktbildung während der Femtosekundenmessungen aufgenommen wurden, zeigten jedenfalls keine bzw. allenfalls kaum meßbare Veränderungen der Absorption.

Im *cis*→*trans*-Fall erhält man als obere Grenze eine Photoproduktakkumulation von etwa 4%, welche in den Dauerstrichspektren sichtbar sein sollte. Da noch dazu die thermische Relaxation in den *trans*-Zustand die Anhäufung von (Photo)produkten noch erhöht, wurde bei allen Messungen dieser Isomerisierungsrichtung eine Belichtung mit dem UV-Belichtungsmodul (siehe 2.1.4) vorgenommen, um ein stationäres Gleichgewicht aufrecht zu erhalten. Zusätzlich wurden Kontrollspektren aufgenommen.

4.7 Zusammenfassung der spektroskopischen Eigenschaften

In den nachfolgenden Tabellen sind die wichtigsten Eigenschaften und experimentellen Parameter der untersuchten Proben zusammengefaßt:

- Positionen der Maxima der $n\pi^*$ und $\pi\pi^*$ -Bande für das *trans*- und *cis*-Isomer sowie für das Differenzspektrum (= *trans* — *cis*-Absorption). Der absolute Fehler bei der Bestimmung der Bandenpositionen ist ± 2 nm.
- Anteil des jeweils eigentlich nicht gewünschten Isomeres in der Lösung. Dieser Wert ist als Obergrenze zu sehen. Absolute Fehlergrenzen sind etwa +1% und -3%.
- nur für Azobenzol: Die Quantenausbeuten Ψ für die Isomerisierung. Die angegebenen Werte sind nur Richtwerte, da die exakte Quantenausbeute in DMSO nicht bekannt ist (vgl. Tabelle 4.1 in Abschnitt 67).
- Absorption der Proben bei einer Schichtdicke von 0.5 mm für die zeitaufgelösten Untersuchungen bei der Anregungswellenlänge (480 nm) sowie im Maximum der $n\pi^*$ und $\pi\pi^*$ -Bande. Der relative Fehler für die angegebenen Absorptionen liegt zwischen 10% und 15%. Die angegebenen Absorptionen sind auf zwei Stellen signifikant. Der leichteren Lesbarkeit und Vergleichbarkeit wegen wurde auf die korrektere Exponentialschreibweise verzichtet.
- Konzentration der Probe bei den Ultrakurzzeitmessungen.
- Lage der isosbestischen Punkte (Nulldurchgänge des Differenzspektrums).

4.7 Zusammenfassung der spektroskopischen Eigenschaften

Differenzspektren			
Probe	λ_{max} [nm]		Isosbestische Punkte [nm]
	$n\pi^*$ -Bande	$\pi\pi^*$ -Bande	
Azobenzol	428	324	273, 378
AMPB	434	346	292, 406
lAPB	451	368	313 (309), 433 (434)
cAPB	452	368	309 (314), 432 (442)
lAMPB	432	340	290, 394
cAMPB	430	341	291 (286), 394 (395)
bcAMPB	426	340	290 (286), 397 (395)

Tabelle 4.4: Zusammenfassung der wichtigsten spektroskopischen Eigenschaften der Differenzspektren der untersuchten Proben. In Klammern sind die Literaturwerte angegeben: lAPB und cAPB [RENNER et al., 2000a]; AMPB, cAMPB und bcAMPB [RENNER et al., 2000b].

Probe	M_n [$\frac{g}{mol}$]	λ_{max} [nm] oder Schulte	$\pi\pi^*$ -Bande	Schulte	ungew. Isom. ant.	A_{480}	$A_{\pi\pi^*_{max}}$ [mOD]	$A_{\pi\pi^*_{max}}$	Konz. [mM]
Azobenzol	trans	182.23	445 (440)	322 (316)	0%	160	255	8400	8.8
	cis		432 (435)	288 (280)	$\leq 10\%$	95	245	1030	4.2
AMPB (Na-Salz)	trans	255	450 (451)	343 (331)	0%	25	31	740	0.5
	cis		437 (436)	257 (265)	$\leq 20\%$	100	160	—	1.6
IAPB	trans	1297	≈ 460 (-)	367 (369)	0%	29	49	470	0.4
	cis		≈ 440 (450)	263 (260)	$\leq 15\%$	68	110	—	0.84
cAPB	trans	1167.4	≈ 456 (-)	366 (370)	0%	22	39	350	0.36
	cis		441 (448)	261 (263)	$\leq 15\%$	120	210	—	2.3
IAMPB	trans	1311	444 (451)	339 (340)	0%	14	19	620	0.5
	cis		434 (435)	257 (263)	$\leq 10\%$	125	250	—	3.6
cAMPB	trans	1182	445 (451)	338 (340)	0%	13	18	550	0.46
	cis		435 (435)	258 (264)	$\leq 10\%$	125	250	—	3.5
bcAMPB	trans	1003	445 (452)	338 (339)	0%	37	52	1100	1.5
	cis		430 (435)	256 (263)	$\leq 10\%$	88	185	—	3.3

Tabelle 4.5: Zusammenfassung der wichtigsten spektroskopischen Eigenschaften der untersuchten Proben (gelöst in DMSO). In Klammern sind die Literaturwerte angegeben: Azobenzol in Ethanol [NÄGELLE, 1998]; IAPB und cAPB [RENNER et al., 2000a]; AMPB, IAMPB, cAMPB und bcAMPB [RENNER et al., 2000b].

5 Zeitaufgelöste Untersuchungen an Azobenzol und APB-Peptiden

Das vorliegende Kapitel stellt die Ergebnisse der Femtosekundenuntersuchungen an Azobenzol und den beiden Modellpeptiden IAPB und cAPB vor. In den einzelnen Abschnitten werden jeweils zuerst die Daten in verschiedenen Darstellungen für die Isomerisierungsrichtung *trans*→*cis* gezeigt, gefolgt von den entsprechenden Ausführungen für die Rückreaktion *cis*→*trans*. Dabei wird jeweils erst der „Rohdatensatz“ besprochen, wie er am Ende der Datenaufbereitung (vgl. Abschnitt 2.2 ab Seite 27) zur Verfügung steht. Der Begriff „Rohdatensatz“ impliziert folgende schon durchgeführte Bearbeitungsschritte:

- Subtraktion der störenden Meßsignale, die durch das Lösungsmittel verursacht sind.
- Korrektur der absoluten Zeitnullpunkte anhand der Lösungsmittelsignale.
- Kontrolle dieser Korrektur anhand der erhaltenen Dispersionskurve.
- Vergleich und Vereinigung verschiedener Meßreihen zu einem kompletten Rohdatensatz für eine bestimmte Polarisationsrichtung
- Normierung der Signale auf eine Probenabsorption von 0.05 bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{pump}} = 480 \text{ nm}$ und einer Schichtdicke von 0.5 mm. Dies ermöglicht den Vergleich der absoluten gemessenen Absorptionsänderungen der verschiedenen Proben. Der Fehler der absoluten Werte beträgt allerdings etwa 30%.
- Berechnung der Signale nach Gl. 2.6, die für eine Messung unter dem magischen Winkel erwartet werden.
- Subtraktion eines bestimmten Anteiles „*trans*-Signal“ von den gemessenen *cis*-Signalen zur Unterdrückung der Beiträge, die durch, in *cis*→*trans*-Messungen immer vorhandene, Moleküle in *trans*-Konformation verursacht sind. Der Bruchteil des zu subtrahierenden *trans*-Signales wird aus den Dauerstrichspektren bestimmt (vgl. auch Tab. 4.5).
- Renormierung der aus der Subtraktion erhaltenen Daten auf eine Konzentration von 100% *cis*-Isomere.

Der Grund für die ausschließliche Weiterverwendung der „magischen“ Meßdaten liegt darin, daß bei dieser Meßgeometrie keine Signale auftreten, die durch Rotationsdepolarisation verursacht werden. Durch das polarisierte Anregungslicht erfolgt eine Photos Selektion bei der Anregung der Moleküle: es werden bevorzugt jene Moleküle absorbiert, deren Übergangsdipolmoment parallel zum Feldvektor des Anregungslichtimpulses orientiert sind. Durch das polarisierte Abtastlicht erhält man aufgrund der einfachen geometrischen Rotation der Moleküle eine Änderung des Meßsignales, auch wenn die Probe ihre Absorption nicht ändert. Da die Rotationsdepolarisationszeiten und die beobachteten Kinetiken teilweise auf derselben Zeitskala liegen, soll durch die Berechnung der Signale für eine „magische“ Anreg/Abtastgeometrie eine Fehlinterpretation der Meßkurven verhindert werden.

Diese so aufbereiteten Rohdaten werden jeweils in einem 3D-Graphen dargestellt. In x-Richtung ist darin die Zeit in Pikosekunden, in y-Richtung die Abtastwellenlänge in Nanometern aufgetragen. Die z-Achse gibt die gemessene Absorptionsänderung zum jeweiligen Zeitpunkt bei der entsprechenden Wellenlänge an. Zu beachten ist ferner, daß die Zeitachse von -1 bis +1 ps im linearen Maßstab skaliert ist, ab dann bis zu 1 ns logarithmisch. Zusammen mit der Art der Meßdatengewinnung ergeben sich somit in dieser Darstellung äquidistante Meßpunkte in x-Richtung. Der Übersichtlichkeit halber wurden die Daten mit einer Farbtabelle unterlegt, welche von rot über gelb, grün, türkis nach blau verläuft¹. Der Farbtabelle inhärent sind in äquidistanten Farbindexabständen dunklere Farbtöne, so daß direkt in den farbkodierten Daten Höhenlinien zu erkennen sind. Die Farbtabelle wurde immer so skaliert, daß die Farbe türkis der Absorptionsänderung Null entspricht. Blaue Farbtöne stehen für eine negative Absorptionsänderung, rote für eine positive. Am oberen Rand der Darstellung ist zusätzlich jeweils noch eine Konturdarstellung eingearbeitet, wobei schwarze Linien für positive und rote Linien für negative Absorptionsänderungen stehen. Der Abstand der Höhenlinien ist nicht in allen Darstellungen identisch, sondern wurde entsprechend einer maximaler Aussagekraft gewählt. Ebenso ist die Skalierung in z-Richtung den jeweiligen Signalen angepaßt und kann von einer Abbildung zur anderen variieren. Ansonsten wurde jedoch darauf geachtet, daß in sämtlichen 3D-Darstellungen dieselbe Skalierung in x- und y-Richtung verwendet wurde. Für die Interpretation der Daten wichtig ist die Tatsache, daß die Meßdaten bis zu einer Verzögerungszeit $t_D = 100$ fs nicht aussagekräftig sind, da in diesem Zeitbereich die kohärenten Meßartefakte durch das Lösungsmittel, welche sich nicht immer perfekt subtrahieren lassen, in unterschiedlichem Umfang vorhanden sind.

Nach der Vorstellung und Besprechung dieser Übersichtsdarstellung folgt jeweils ein Abschnitt, der sich mit den transienten Spektren zu bestimmten Verzögerungszeiten t_D und den aus der Datenanpassung erhaltenen Amplitudenspektren (Gl. 2.9 Abschnitt 2.2.3) beschäftigt. Auch hier wurde immer dieselbe x-Achsenkalierung verwendet. Diese andere Art der Darstellung der Daten ist notwendig, um gewisse Teilaspekte der Meßdaten besser sichtbar zu machen.

Am Beispiel Azobenzol wird für die Isomerisierungsrichtung *trans*→*cis* ein Vergleich der Meßdaten mit der Anpassung vorgenommen, um die Qualität der Modellierung zu demonstrieren.

¹Es wurde die IDL-interne Farbtabelle „EOS A“ verwendet.



5.1 Azobenzol

5.1.1 *trans*→*cis*-Isomerisierung

Nach einer Anregung von *trans*-Azobenzol in der langwelligen Flanke der $n\pi^*$ -Bande bei 480 nm (vgl. Abb. 4.2) setzt im gesamten untersuchten Wellenlängenbereich von 366 – 647 nm innerhalb der Meßgenauigkeit instantan eine transiente Absorptionszunahme ein. Der weitere zeitliche Verlauf der transienten Absorption ist durch einen relativ einheitlichen multiexponentiellen Zerfall gekennzeichnet. Im Abtastwellenlängenbereich um 480 nm konnten aufgrund der starken Streuung des Anregungslichtes und dem daraus resultierenden Rauschen einige Meßkurven nicht verwendet werden.

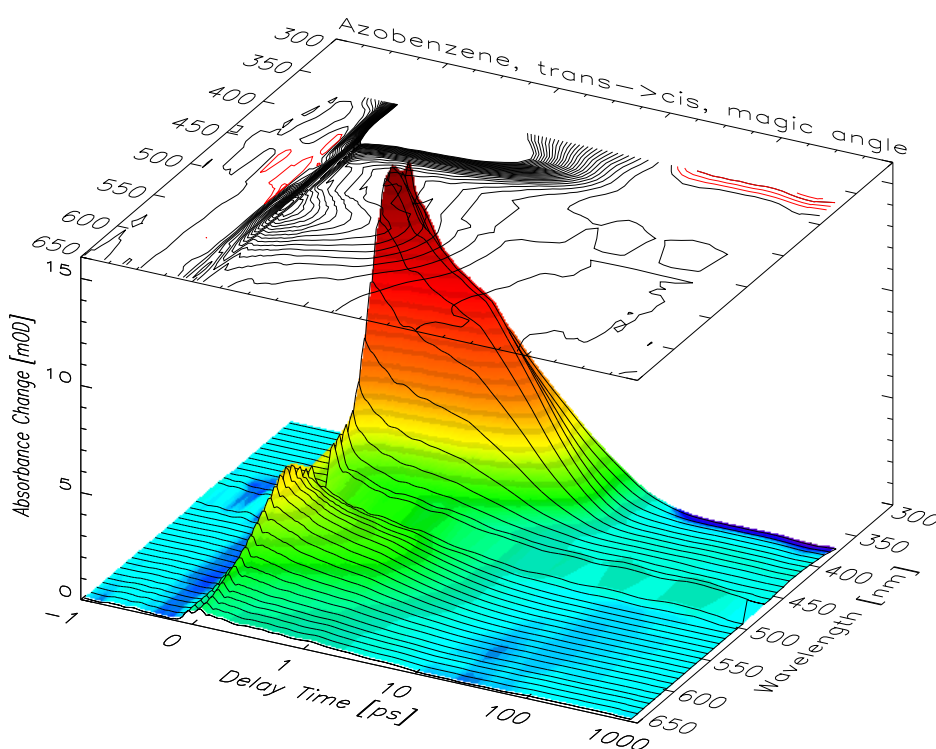


Abbildung 5.1: Femtosekundenmessungen an Azobenzol (*t*→*c*) berechnet nach Gl. 2.6. Die transiente Absorption klingt mit den zwei Zeitkonstanten 440 fs und 3.3 ps ab. Bei Abtastwellenlängen $\lambda_{\text{probe}} \leq 400$ nm ist eine zusätzliche Zerfallszeit von 11 ps für eine korrekte Anpassung notwendig. Desweiteren ist ein konstanter Anteil (Zerfallszeit unendlich) notwendig, um die zu langen Verzögerungszeiten verbleibende Absorptionsänderung durch Photoproduktbildung zu modellieren.

Außerhalb der Grundzustandsbanden ($\lambda_{\text{probe}} \geq 500$ nm) zeigt sich die größte Absorptionsänderung bei etwa $\lambda_{\text{probe}} = 530$ nm, wie in Abb. 5.1 zu erkennen ist. Danach fallen die Kurven mit den zwei Zeitkonstanten 440 fs und 3.3 ps auf Null ab.

Innerhalb der Grundzustandsbande ist die dominante transiente Absorptionsbande bei 400 nm

auffällig. Die genaue Analyse der Abnahme dieser Bande ergibt, daß zusätzlich zu den eben genannten zwei Zeitkonstanten eine dritte notwendig wird. Diese Zerfallszeit liegt bei 11 ps und hat einen, zu kürzeren Wellenlängen hin, zunehmenden Anteil am Gesamtverlauf der Absorptionskurven. Zu langen Verzögerungszeiten $t_D \geq 50$ ps fällt das Signal nicht auf Null ab, sondern bleibt auf einem wellenlängenabhängigen Wert konstant. Hier ist die Bildung des Photoproduktes *cis*-Azobenzol sichtbar. In der $n\pi^*$ -Bande von etwa 380 – 500 nm bleibt aufgrund des größeren Absorptionsquerschnittes des *cis*-Isomers netto eine Absorptionszunahme übrig, welche allerdings in Abb. 5.1 aufgrund des geringen Effektes nur sehr schwach zu erkennen ist (vgl. Höhenliniendiagramm). Hingegen ergibt sich in der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande eine langanhaltende Absorptionsabnahme, die deutlich als blauer Bereich in der Abbildung zu erkennen ist. Wegen der starken Absorption von *trans*-Azobenzol in der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande war der Abtastwellenlängenbereich auf $\lambda_{\text{probe}} \geq 366$ nm eingeschränkt.

Die Abbildung 5.2 links zeigt die Daten als eine Folge von transienten Spektren zu bestimmten Verzögerungszeiten t_D . Hier sind nochmals deutlicher die Gleichförmigkeit der Kinetik sowie die zwei transienten Banden zu sehen. Man erkennt, daß nach $t_D = 50$ ps ist die Reaktion vollständig abgeschlossen ist: die transienten Spektren bleiben ab dieser Verzögerungszeit konstant und stimmen mit dem Dauerstrichdifferenzspektrum (gestrichelt eingezeichnet) überein.

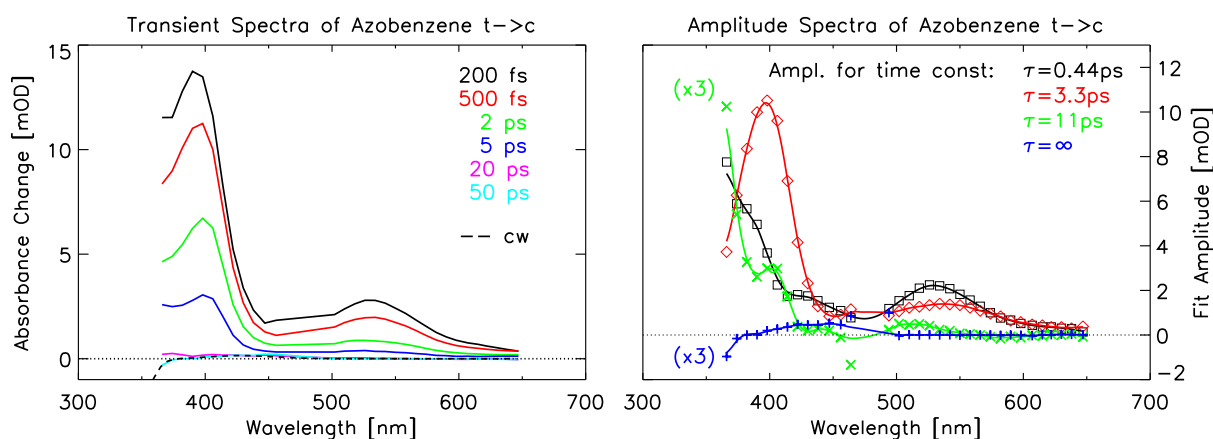


Abbildung 5.2: links: Transiente Spektren von Azobenzol ($t \rightarrow c$) zu den Verzögerungszeiten $t_D = 0.2, 0.5, 2.0, 5.0, 20$ und 50 ps (aus Abb. 5.1). Zusätzlich ist noch das Dauerstrichdifferenzspektrum gestrichelt eingezeichnet (vgl. Abb. 4.2).

rechts: Anpassung der Meßdaten aus Abb. 5.1 mittels der Modellfunktion (siehe Abschnitt 46) mit den Zeitkonstanten $\tau = 0.44$ ps (schwarz), 3.3 ps (rot), 11 ps (grün) sowie einer ∞ -Komponente (blau). Gezeigt sind die ermittelten Amplituden zu den Zeitkonstanten.

Als Demonstrationsbeispiel, wie gut die in Abschnitt 46 vorgestellte Modellfunktion (Gl. 2.9) an die realen Daten angepaßt werden kann, wird exemplarisch für diese Messung auch die Datenanpassung gezeigt (siehe S. 34). In Abbildung 5.3 links sind nochmal die Meßdaten aus Abbildung 5.1 als Konturgraph dargestellt. Rechts daneben ist der angepaßte Modelldatensatz abgebildet. Als Parameter für die Modellfunktion wurden die Zeitkonstanten und Amplitu-

denspektren aus Abbildung 5.2 verwendet, welche durch die Anpassungsprozedur ermittelt wurden. Wie eindeutig zu erkennen ist, gibt das Modell die Meßdaten sehr gut wieder.

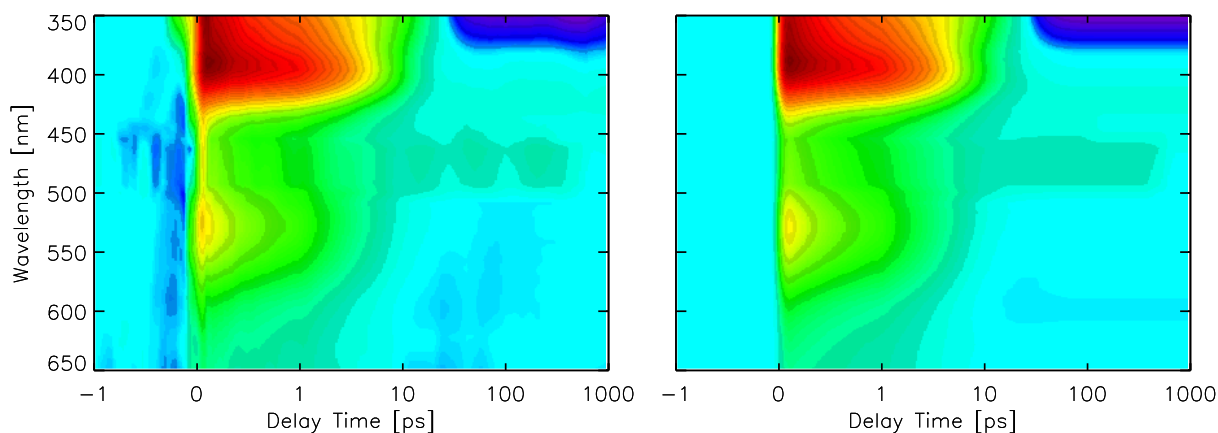


Abbildung 5.3: Vergleich der Meßdaten mit der angepaßten Modellfunktion: Dargestellt sind links die Meßdaten (Azobenzol $t \rightarrow c$, vgl. Abb. 5.1) und rechts eine Anpassung dieser mit der in Abschnitt 46 vorgestellten Modellfunktion. Die gute Übereinstimmung ist deutlich zu sehen. Die für eine gute Reproduktion der Messung benötigten Zeitkonstanten sind $\tau = 0.13, 1.1, 11$ ps sowie eine ∞ -Komponente (Amplitudenspektren siehe Abb. 5.2).

5.1.2 $cis \rightarrow trans$ -Isomerisierung

Die Untersuchung der $cis \rightarrow trans$ -Isomerisierung von Azobenzol erfolgte im Spektralbereich von 334 – 648 nm. Für die Berechnung der Absorptionsänderungen des reinen cis -Azobenzoles wurden 10% der bei $trans$ -Azobenzol erhaltenen Signale von den gemessenen „ cis “-Transienten subtrahiert (vgl. Anfang des Kapitels). Daher ist der Abtastwellenlängenbereich wie für $trans$ -Azobenzol auf $\lambda_{\text{probe}} \geq 366$ nm beschränkt.

Außerhalb der Grundzustandsbanden ($\lambda_{\text{probe}} \geq 500$ nm) folgt dem instantanen Aufbau einer Absorption ein multiexponentielles Abklingen mit den Zeitkonstanten 130 fs, 1.1 ps und 11 ps, wobei die schnellste Zerfallszeit die größte Amplitude besitzt (vgl. Abb. 5.5 rechts). Der größte Effekt direkt nach der Anregung ist bei etwa $\lambda_{\text{probe}} = 540$ nm lokalisiert. Ein Vergleich der transienten Spektren Abb. 5.5 und 5.2 zeigt, daß die transiente Absorptionsbande in diesem Spektralbereich für die $cis \rightarrow trans$ -Isomerisierung breiter ist als für die umgekehrte Reaktionsrichtung.

In der $n\pi^*$ -Bande (ca. 380 – 480 nm) folgt der anfänglichen Absorption ein rasches Ausbleichen. Dies ist eine Folge der Abnahme der cis -Azobenzol Konzentration gegenüber dem Ausgangszustand vor der Anregung, da das gebildete $trans$ -Azobenzol bei diesen Wellenlängen schwächer absorbiert (vgl. Abb. 4.2).

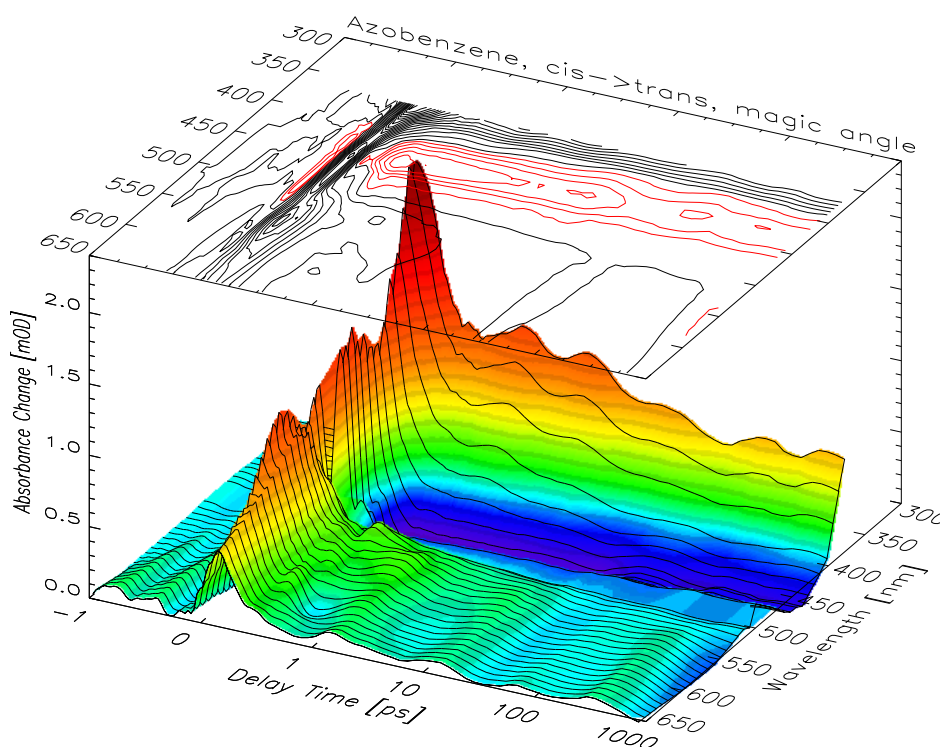


Abbildung 5.4: Femtosekundenmessungen an Azobenzol ($c \rightarrow t$). Der Signalbeitrag von 10% *trans*-Azobenzol ist herausgerechnet. Zur vollständigen Beschreibung der Transienten sind für den gesamten Abtastwellenlängenbereich drei Zeitkonstanten (130 fs, 1.1 ps und 11 ps) notwendig. Die größte Amplitude besitzt die sehr schnelle Zerfallszeit. Desweiteren ist ein konstanter Anteil (Zerfallszeit unendlich) notwendig, um die zu langen Verzögerungszeiten verbleibende Absorptionsänderung durch Photoproduktbildung zu modellieren.

Bei kurzen Abtastwellenlängen im Bereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande stellt man ebenfalls ein triexponentielles Abklingen der Absorption fest. Dieser Anstieg ist zu kürzeren Wellenlängen hin immer deutlicher sichtbar. Die verbleibende Absorptionsänderung zu langen Verzögerungszeiten t_D ist wiederum auf die Photoproduktbildung zurückzuführen. Wie in der Abbildung ebenfalls zu erkennen ist, zeigen die Transienten regelmäßige Signalschwankungen, deren Ursache nicht vollständig geklärt werden konnte. Beobachtet wurde, daß die Durchflußrichtung der Probe durch die Küvette eine große Rolle spielte, und somit aufgrund der wechselnden Pumprichtung der Spritzenpumpe diese Meßartefakte induziert sein könnten. Trotz dieser störenden Einflüsse war aber auch für *cis*-Azobenzol eine Datenanpassung möglich.

Wie in Abbildung 5.5 links zu sehen ist auch hier die Reaktion nach etwa 20 ps abgeschlossen. Das ab dieser Verzögerungszeit stationäre transiente Spektrum gleicht dem Dauerstrichdifferenzspektrum von Azobenzol (gestrichelt gezeichnet).

Die Amplitudenspektren (Abb. 5.5 rechts) verdeutlichen, daß die schnelle Absorptionsabnahme (schwarze Kurve) über den gesamten gemessenen Spektralbereich zu finden ist und den Großteil der Kinetik ausmacht. Dahingegen sind die Amplituden der Zerfallszeiten 1.1 ps

(rot) und 11 ps (grün) sehr klein. Das teilweise negative Vorzeichen deutet darauf hin, daß diese Kinetiken nicht nur von der Depopulation thermisch relaxierter Zustände verursacht sein kann sondern eher einem Kühlprozeß bzw. einer energetischen Relaxation zugeordnet werden muß (vgl. Diskussion Kapitel 7). Ebenfalls negative Amplituden können durch eine stimulierte Emission auftreten. Diese ist aber bei Azobenzol sowie auch den Azopeptiden nicht sichtbar. Die Amplitude der ∞ -Zeitkonstante zeigt das Absorptionsspektrum zu späten Verzögerungszeiten $t_D > 1$ ns, welches identisch mit dem Dauerstrichdifferenzspektrum von Azobenzol ist.

Ein Vergleich mit Literaturdaten findet in der Diskussion statt.

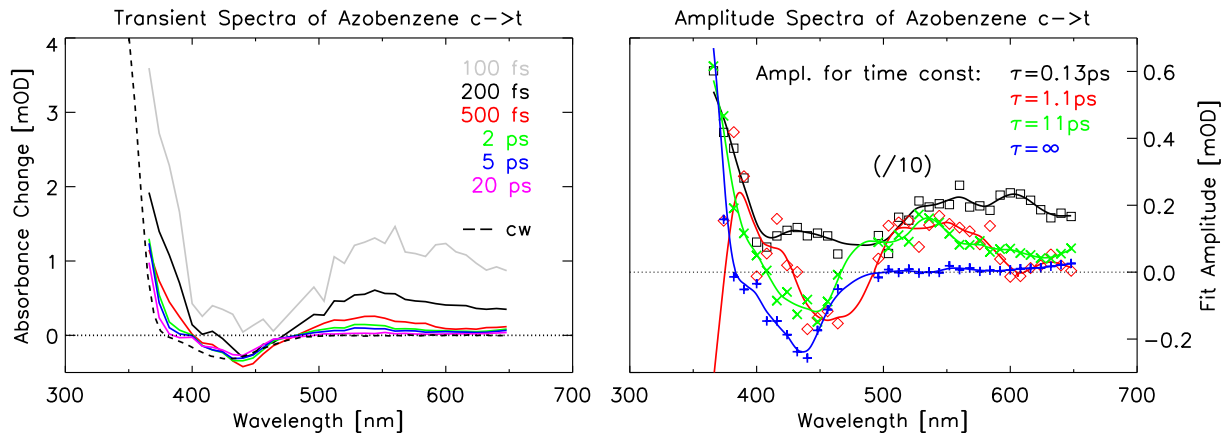


Abbildung 5.5: links: Transiente Spektren von Azobenzol ($c \rightarrow t$) zu den Verzögerungszeiten $t_D = 0.1, 0.2, 0.5, 2.0, 5.0$ und 20 ps (aus Abb. 5.4, rechts). Zusätzlich ist noch das Differenzspektrum gestrichelt eingezeichnet (vgl. Abb. 4.2).

rechts: Anpassung der Meßdaten aus Abb. 5.4 mittels der Modellfunktion (siehe Abschnitt 46) mit den Zeitkonstanten $\tau = 0.13$ ps (schwarz), 1.1 ps (rot), 11 ps (grün) sowie einer ∞ -Komponente (blau). Gezeigt sind die ermittelten Amplituden zu den Zeitkonstanten.

5.2 Lineares Azopeptid

5.2.1 $trans \rightarrow cis$ -Isomerisierung

Die elektronische Anregung von $trans$ -IAPB durch Lichtimpulse mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{pump}} = 480$ nm erzeugt bei allen untersuchten Wellenlängen von $342 - 646$ nm eine instantane Absorptionsänderung. Die in Abbildung 5.6 sichtbaren scharfen Zacken bei $t_D = 0$ ps in der $trans-\pi\pi^*$ -Bande sind auf eine Zweiquantenabsorption in IAPB zurückzuführen und somit Meßartefakt.

Im langwelligen Spektralbereich ohne Grundzustandsabsorption ($\lambda_{\text{probe}} \geq 550$ nm) zeigt sich eine transiente Bande mit einem schwach ausgeprägten Maximum bei $\lambda_{\text{probe}} = 580$ nm. Das multiexponentielle Abklingen dieser Absorption läßt sich gut mit drei Zeitkonstanten



(390 fs, 1.9 ps, 9.5 ps) beschreiben. Die Amplituden der schnellen Komponente sind ungefähr konstant und in derselben Größenordnung wie diejenigen der mittleren Zeitkonstante, welche bei etwa $\lambda_{\text{probe}} = 590 \text{ nm}$ ein Maximum besitzt. Die Amplitude der langsamen Komponente nimmt zu kürzeren Wellenlängen hin zu (vgl. auch Abb. 5.7 rechts). Im Unterschied zu reinem *trans*-Azobenzol (vgl. Abb. 5.2) hat hier die Zeitkonstante im 10 ps-Bereich in diesem Spektralbereich eine nichtverschwindende Amplitude. Wie in der Diskussion näher erläutert wird, ist dies mit einem, relativ zu Azobenzol, langlebigen angeregten Zustand zu verknüpfen.

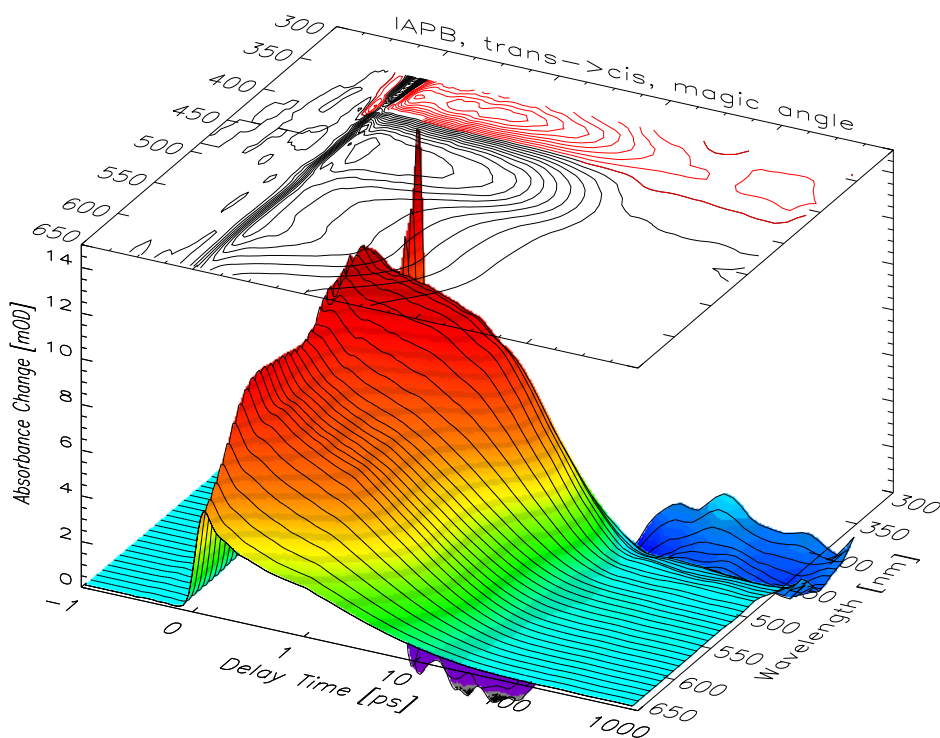


Abbildung 5.6: Femtosekundenmessungen an linearen APB-Peptiden ($t \rightarrow c$) berechnet nach Gl. 2.6. Zur vollständigen Beschreibung der Transienten sind für den langwelligen Abtastwellenlängenbereich drei Zeitkonstanten (390 fs, 1.9 ps und 9.5 ps) notwendig. Im Bereich der Grundzustandsbanden benötigt man eine zusätzliche Zerfallszeit von 120 ps, deren Amplitude allerdings sehr klein ist. Desweiteren ist ein konstanter Anteil (Zerfallszeit unendlich) notwendig, um die zu langen Verzögerungszeiten verbleibende Absorptionsänderung durch Photoproduktbildung zu modellieren.

Die in Abbildung 5.6 sichtbare Dynamik in der $n\pi^*$ -Bande (ca. 420 – 550 nm) gleicht der eben beschriebenen zeitlichen Entwicklung der Absorption nur auf den ersten Blick. Die Analyse ergibt, daß in dieser spektralen Region das Verschwinden der Absorption zum überwiegenden Teil durch eine Zeitkonstante (9.5 ps) beschrieben werden kann.

In der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande ($\lambda_{\text{probe}} \leq 420 \text{ nm}$) hingegen ist der Wellenlängenbereich unter 400 nm nach der Anregung durch eine sofortige Absorptionsabnahme gekennzeichnet. Die Dynamik ist durch zwei wesentliche Anteile geprägt. Zum einen erfolgt mit 390 fs eine weitere Absorptionsabnahme. Nachfolgend klingt das Signal mit 9.5 ps ab. Zu langen Zeiten bleibt eine rest-

liche negative Absorptionsänderung bestehen, die der Bildung des Photoproduktes *cis*-IAPB zugeschrieben werden kann. Von der Amplitude ungefähr eine Größenordnung schwächer ist noch eine Zerfallskinetik mit 120 ps zu identifizieren. Die Amplitude dieser Zeitkonstante (vgl. Abb. 5.7) ist für Wellenlängen $\lambda_{\text{probe}} \leq 380$ nm nicht mehr aussagekräftig, da in diesem Spektralbereich das Signal-Rausch-Verhältnis zu klein wird, um über Amplitudenstärken von ca. 1 mOD Aussagen treffen zu können. Der Spektralbereich zwischen 400 und 420 nm bildet eine Übergangszone, in der eine sehr starke Wellenlängenabhängigkeit der Meßkurven besteht. Dennoch ist eine Anpassung mit den drei genannten Zeitkonstanten möglich.

Alle drei Zeitkonstanten sind denen von *trans*-Azobenzol sehr ähnlich. Vor allem die Zeitkonstante der schnellsten Kinetik, die bei Azobenzol mit der Isomerisierungszeit in Verbindung gebracht wird, ist bei IAPB etwa gleich groß zu der von *trans*-Azobenzol.

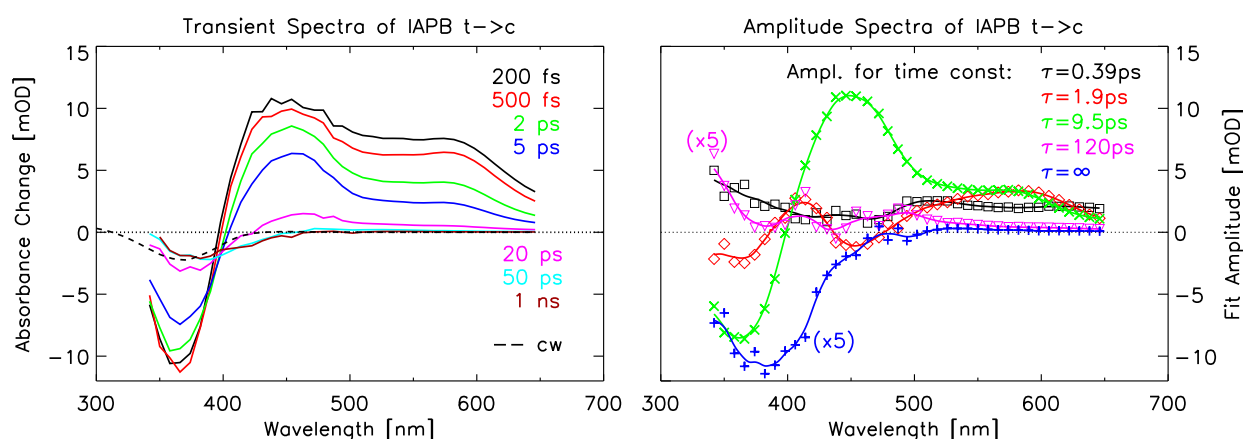


Abbildung 5.7: links: Transiente Spektren von linearen APB-Peptiden ($t \rightarrow c$) zu den Verzögerungszeiten $t_D = 0.2, 0.5, 2.0, 5.0, 20, 50$ ps und 1 ns (aus Abb. 5.6). Zusätzlich ist noch das Differenzspektrum gestrichelt eingezeichnet (vgl. Abb. 4.5). Das transiente Spektrum zu $t_D = 200$ ps ist identisch zu jenem bei $t_D = 1$ ns und deshalb der Übersichtlichkeit wegen weggelassen.

rechts: Anpassung der Meßdaten aus Abb. 5.6 mittels der Modellfunktion (siehe Abschnitt 4.6) mit den Zeitkonstanten $\tau = 0.39$ ps (schwarz), 1.9 ps (rot), 9.5 ps (grün), 120 ps (magenta) sowie einer ∞ -Komponente (blau). Gezeigt sind die ermittelten Amplituden zu den Zeitkonstanten.

Die transienten Spektren in Abbildung 5.7 links zeigen nochmals deutlich das Ausbleichen der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande direkt nach der Anregung ($t_D = 200$ fs). Die Position des Minimums ($\lambda_{\text{probe}} = 360$ nm) ist hierbei fast identisch zum Maximum der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande des *trans*-Dauerstrichspektrums (bei 367 nm, vgl. Tab. 4.5). Die beiden Maxima des transienten Spektrums ($t_D = 200$ fs) bei 450 nm und etwa 580 nm sind gegenüber denen des transienten Spektrums bei $t_D = 200$ fs von *trans*-Azobenzol um 50 nm rotverschoben. Dies ist innerhalb der Fehlergrenzen identisch zur Rotverschiebung der Dauerstrich-*trans*- $\pi\pi^*$ -Bande von Azobenzol zu IAPB. Die Stärke der Absorption hat dabei in der langwelligeren Bande (580 nm) auf Kosten der kurzwelligeren zugenommen, so daß bei IAPB nach $t_D = 200$ fs die Absorption bei $\lambda_{\text{probe}} = 580$ nm und 450 nm fast gleich groß ist, im Gegensatz zu Azobenzol. Desweiteren ist bei etwa 395 nm ein isosbestischer Punkt sichtbar. Bei Verzögerungszeiten $t_D \geq 50$ ps ist, außer

in der langwelligen Flanke der $n\pi^*$ -Bande, keine Absorptionsänderung mehr zu beobachten, so daß davon ausgegangen werden kann, daß ein stationärer Zustand erreicht ist. Allerdings ist zu langen Verzögerungszeiten $t_D = 1$ ns eine Rotverschiebung des transienten Absorptionsspektrums gegenüber dem Differenzspektrum (vgl. gestrichelte Linie) zu erkennen.

5.2.2 *cis*→*trans*-Isomerisierung

Für die Berechnung der Absorptionsänderungen von reinem *cis*-IAPB wurden 15% der bei *trans*-IAPB erhaltenen Signale von den gemessenen „*cis*“-Transienten subtrahiert (vgl. Anfang des Kapitels).

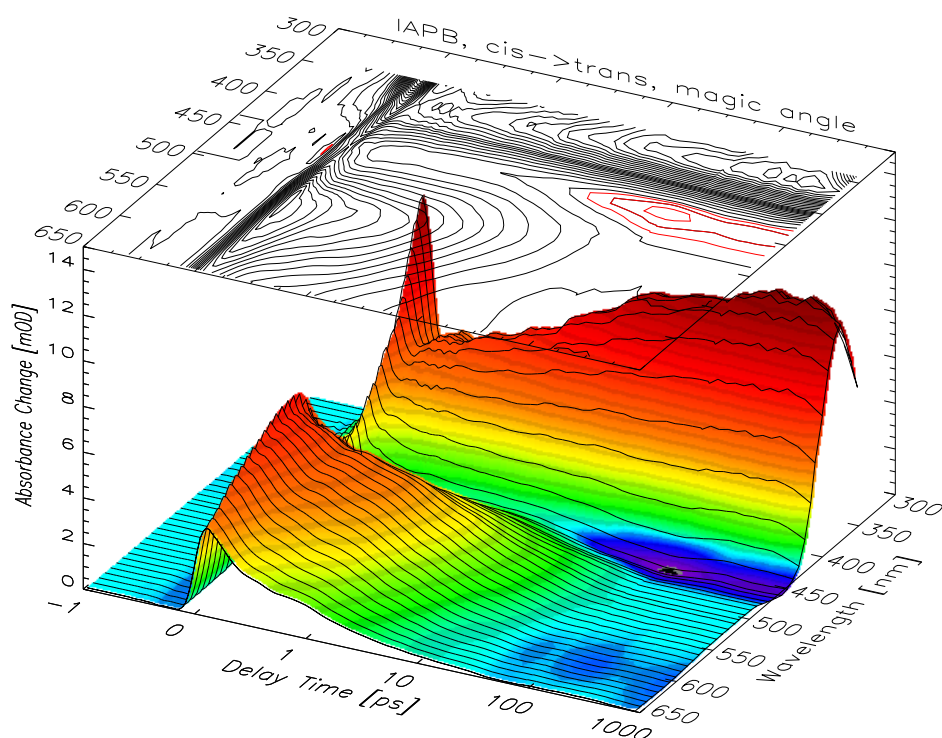


Abbildung 5.8: Femtosekundenmessungen an linearen APB-Peptiden (*c*→*t*). Der Signalbeitrag von 15% *trans*-IAPB ist herausgerechnet. Zur vollständigen Beschreibung der Transienten sind für den langwelligen Abtastwellenlängenbereich drei Zeitkonstanten (380 fs, 3.4 ps und 33 ps) notwendig. Zusätzlich ist ein konstanter Anteil (Zerfallszeit unendlich) notwendig, um die zu langen Verzögerungszeiten verbleibende Absorptionsänderung durch Photoproduktbildung zu modellieren.

Für die *cis*→*trans*-Isomerisierung beobachtet man im gesamten untersuchten Spektralbereich von $\lambda_{\text{probe}} = 334 - 647$ nm unmittelbar nach dem Anregungsimpuls eine Absorptionzunahme der Probe (vgl. Abb. 5.8). Bei Abtastwellenlängen $\lambda_{\text{probe}} < 400$ nm sind im Zeitbereich der Kreuzkorrelationsbreite wieder deutliche Zweiquantenabsorptionssignale sichtbar.

Langwellig von der $n\pi^*$ -Absorption ($\lambda_{\text{probe}} \geq 550\text{ nm}$) ist ein Abklingen des Meßsignales mit drei Zeitkonstanten zu beobachten: eine schnelle Kinetik (380 fs) dominiert bei $\lambda_{\text{probe}} = 600\text{ nm}$. Hier beobachtet man eine Verlangsamung der schnellsten Dynamik relativ zu Azobenzol, im Gegensatz zur $trans \rightarrow cis$ -Reaktionsrichtung. Der Anteil der mittleren Zerfallszeit (3.4 ps) ist im Bereich von 550 – 600 nm maximal. Die langsame Komponente (33 ps) dominiert zu blauerem Wellenlängen hin und trägt in der $n\pi^*$ -Bande (ca. 420 – 550 nm) am meisten bei, während die Amplituden der beiden anderen Zerfallszeiten in der kurzwelligeren Flanke dieser Bande nur gering sind (vgl. Abb. 5.9 rechts). Im Übergangsbereich zur $trans-\pi\pi^*$ -Bande (420 – 450 nm) war eine Anpassung der Daten im Zeitbereich um 10 ps mit diesen Zerfallszeiten nur eingeschränkt möglich. Die transienten Absorptionskurven, die in der $trans-\pi\pi^*$ -Bande aufgenommen wurden, können ebenfalls mit den drei genannten Zeitkonstanten angepaßt werden. Der signifikante Unterschied zu den anderen Spektralbereichen ist, daß die anfänglich geringe zusätzliche Absorption noch erheblich zunimmt, wobei die mittlere und langsame Zeitkonstante die Dynamik beherrschen. Zu langen Verzögerungszeiten ($t_D \geq 200\text{ ps}$) ist keine zeitliche Veränderung der Meßwerte mehr feststellbar. Die verbleibende Absorptionsänderung ist auf die Bildung des Photoproduktes $trans$ -IAPB zurückzuführen.

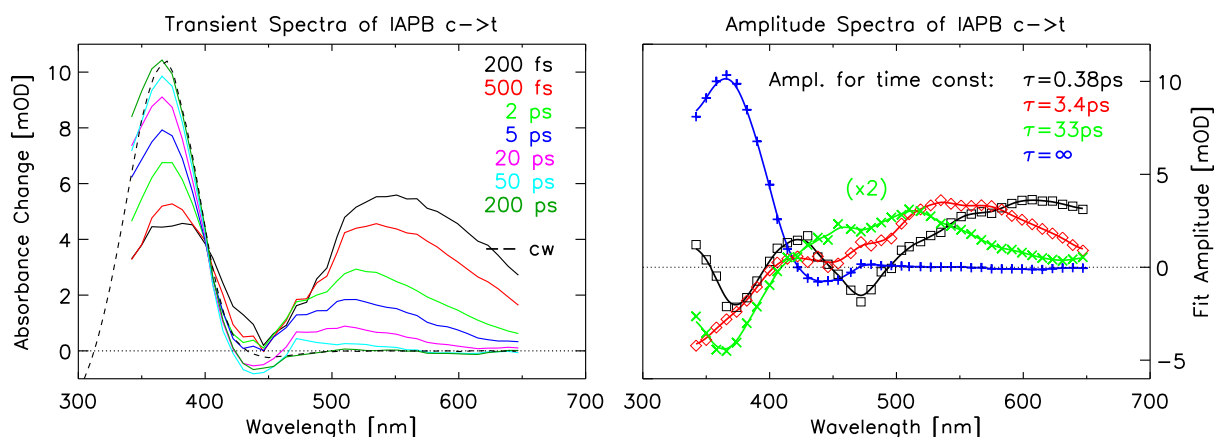


Abbildung 5.9: links: Transiente Spektren von linearen APB-Peptiden ($c \rightarrow t$) zu den Verzögerungszeiten $t_D = 0.2, 0.5, 2.0, 5.0, 20, 50$ und 200 ps (aus Abb. 5.8). Zusätzlich ist noch das Differenzspektrum gestrichelt eingezeichnet (vgl. Abb. 4.5). Das transiente Spektrum bei $t_D = 1\text{ ns}$ ist identisch zu demjenigen nach $t_D = 200\text{ ps}$ und daher weggelassen.

rechts: Anpassung der Meßdaten aus Abb. 5.8 mittels der Modellfunktion (siehe Abschnitt 46) mit den Zeitkonstanten $\tau = 380\text{ fs}$ (schwarz), 3.4 ps (rot), 33 ps (grün) sowie einer ∞ -Komponente (blau). Gezeigt sind die ermittelten Amplituden zu den Zeitkonstanten.

Abbildung 5.9 links zeigt die transienten Spektren zu den angegebenen Verzögerungszeiten. Hier ist nochmal sehr gut zu erkennen, daß außerhalb der Grundzustandsabsorption die schnelleren Kinetiken dominieren, während sich die Absorption im restlichen untersuchten Spektralbereich innerhalb der ersten 500 fs kaum ändert. Man erkennt weiterhin, daß die Reaktion für $\lambda_{\text{probe}} \leq 550\text{ nm}$ erst nach 200 ps abgeschlossen ist. Bei langen Wellenlängen ist schon nach 50 ps keine Veränderung mehr detektierbar. Sehr deutlich ausgeprägt ist wiederum der

isosbetische Punkt bei etwa 400 nm. Die verbleibende Absorptionsänderung zu langen Verzögerungszeiten $t_D \geq 1$ ns mit einem Maximum bei 365 nm ist dem Dauerstrichdifferenzspektrum sehr ähnlich und somit wahrscheinlich durch die Bildung des Photoproduktes *trans*-IAPB verursacht, d.h. die Photoreaktion ist vollständig abgeschlossen. Die Maxima der transienten Spektren bei $t_D = 200$ fs liegen bei 370 nm und 550 nm. Das langwelligere von beiden ist somit gegenüber *cis*-Azobenzol um 10 nm rotverschoben. Das Minimum bei 440 nm fällt mit dem Dauerstrichabsorptionsmaximum der $n\pi^*$ -Bande von *cis*-Azobenzol zusammen (vgl. Tab. 4.5) und ist daher wohl durch das Ausbleichen dieser Bande verursacht. Das kurzwellige Maximum läßt sich nicht mit Azobenzol vergleichen, da dort keine so kurzwelligen Meßdaten vorliegen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß bei IAPB der Anteil der Kinetiken im Zeitbereich von mehreren Pikosekunden erheblich größer ist als bei Azobenzol. Jedoch wurde sowohl bei Azobenzol als auch bei dem linearen APB-Peptid keinerlei Dynamik im Nanosekundenzeitbereich beobachtet.

5.3 Monozyklisches Azopeptid

Nach der Auswertung der bis jetzt vorgestellten Messungen war die nun bevorstehende Untersuchung der zyklisierten Probe und der anschließende Vergleich mit dem linearen Peptid eine der spannendsten Aufgaben. Wie unten dargelegt, ergeben sich für diese beiden Peptide deutliche Unterschiede in den aufgezeichneten Absorptionsdaten: der erste Hinweis auf eine beobachtbare Konformationsdynamik.

5.3.1 *trans*→*cis*-Isomerisierung

Die Daten in Abbildung 5.10 ähneln auf den ersten Blick denen des linearen Peptides (Abb. 5.6). Auch das zyklisierte Peptid zeigt direkt nach der elektronischen Anregung durch 480 nm-Lichtimpulse bei allen untersuchten Wellenlängen ($\lambda_{\text{probe}} = 326 - 630$ nm) eine instantane Absorptionsänderung: langwellig von $\lambda_{\text{probe}} = 398$ nm eine Absorptionszunahme, für $\lambda_{\text{probe}} < 398$ nm eine Abnahme.

Desweiteren sind vier Zeitkonstanten für eine zufriedenstellende Datenanpassung notwendig: 260 fs, 1.2 ps, 7.7 ps und 100 ps. Diese sind im Vergleich zu IAPB etwas kleiner. Die relativen Beiträge der einzelnen Zerfallszeiten sind allerdings etwas anders verteilt (vgl. Abb. 5.11 rechts). Der hauptsächliche Unterschied zu IAPB ist die stärkere Gewichtung der schnellsten Zeit. Diese Zerfallszeit (260 fs) ist erheblich kleiner als für das lineare Peptid (390 fs), aber immer noch einen Faktor 2 langsamer als die von *cis*-Azobenzol (130 fs). Auch die beiden anderen Zeiten (1.2 ps und 7.7 ps) sind etwas kleiner als bei IAPB. Die spektrale Charakteristik der Amplitudenspektren der drei Zeitkonstanten 260 fs, 1.2 ps, 7.7 ps ist denen von IAPB ähnlich. Hingegen unterscheidet sich das Amplitudenspektrum der langsamen Komponente (100 ps) sowohl in der Form als auch in der Maximalamplitude stark von dem Amplitudenspektrum der 120 ps-Kinetik von IAPB. Auch erkennt man an den Amplituden, daß der Anteil

der 100-ps-Komponente bei cAPB im langwelligen Spektralbereich etwa 5 mal größer als bei IAPB ist.

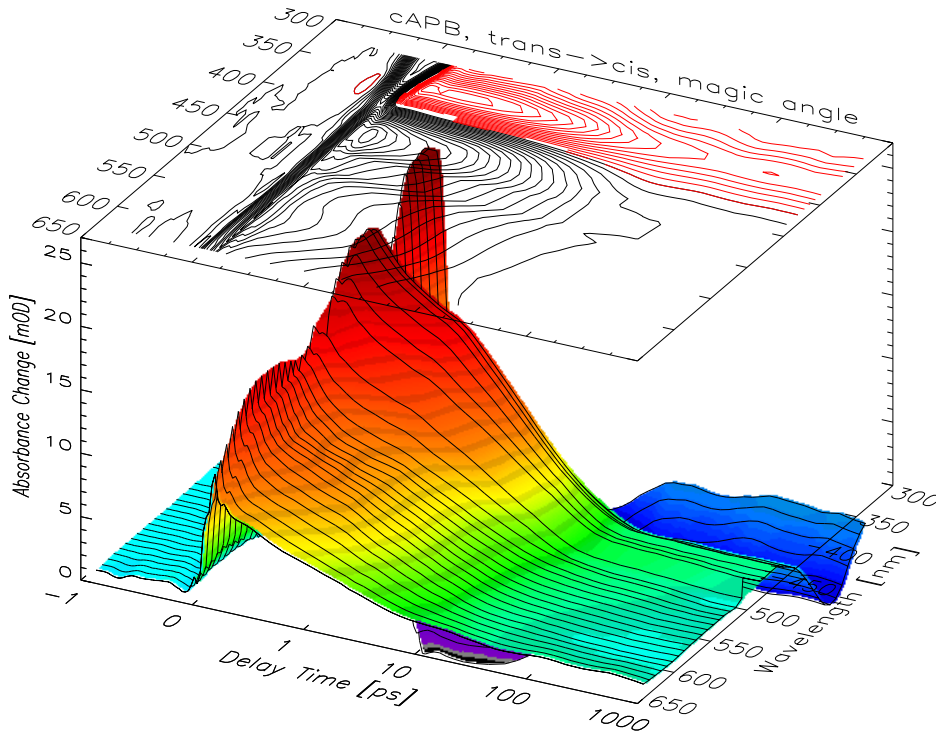


Abbildung 5.10: Femtosekundenmessungen an monozyklischen APB-Peptiden ($t \rightarrow c$) berechnet nach Gl. 2.6. Zur vollständigen Beschreibung der Transienten sind für den langwelligen Abtastwellenlängenbereich vier Zeitkonstanten (260 fs, 1.2 ps, 7.7 ps und 100 ps) notwendig. Desweiteren ist ein konstanter Anteil (Zerfallszeit unendlich) notwendig, um die zu langen Verzögerungszeiten verbleibende Absorptionsänderung durch Photoproduktbildung zu modellieren.

In den transienten Spektren (Abb. 5.11 links) ist zu sehen, daß die Absorption über den gesamten spektralen Bereich $\lambda_{\text{probe}} \geq 420$ nm sehr gleichförmig mit der Zeit abnimmt². Bei Abtastwellenlängen $450 \text{ nm} \leq \lambda_{\text{probe}} \leq 550$ nm ist jedoch auch ein geringer Anteil der 100-ps-Kinetik zu erkennen (vgl. auch Diskussion, Abb. 7.3). Im Bereich der $\text{trans-}\pi\pi^*$ -Bande herrscht eine langsamere Dynamik vor. Für $t_D \geq 200$ ps jedoch ist im untersuchten Wellenlängenbereich keine Veränderung mehr detektierbar. Ebenso wie bei IAPB liegt das Maximum der Absorptionsabnahme für $t_D = 200$ fs bei $\lambda_{\text{probe}} \approx 360$ nm. Der Grund ist das Ausbleichen der $\text{trans-}\pi\pi^*$ -Grundzustandsbande. Die beiden Maxima des transienten Spektrums ($t_D = 200$ fs) bei $\lambda_{\text{probe}} = 430$ nm und etwa $\lambda_{\text{probe}} = 560$ nm sind gegenüber denen des transienten Spektrums bei $t_D = 200$ fs von trans-IAPB um 20 nm blauverschoben. Desweiteren ist die Absorptionsänderung zur Zeit $t_D = 200$ fs bei $\lambda_{\text{probe}} = 430$ nm relativ zu $\lambda_{\text{probe}} = 560$ nm größer als bei IAPB. Die verbleibende Absorptionsänderung zu langen Verzögerungszeiten $t_D \geq 1$ ns ist

²Abtastwellenlängen $\lambda_{\text{probe}} \geq 420$ nm umfassen die $n\pi^*$ -Bande und den Spektralbereich außerhalb der Grundzustandsbanden.

dem Dauerstrichdifferenzspektrum sehr ähnlich, d.h. die Photoreaktion scheint vollständig abgeschlossen.

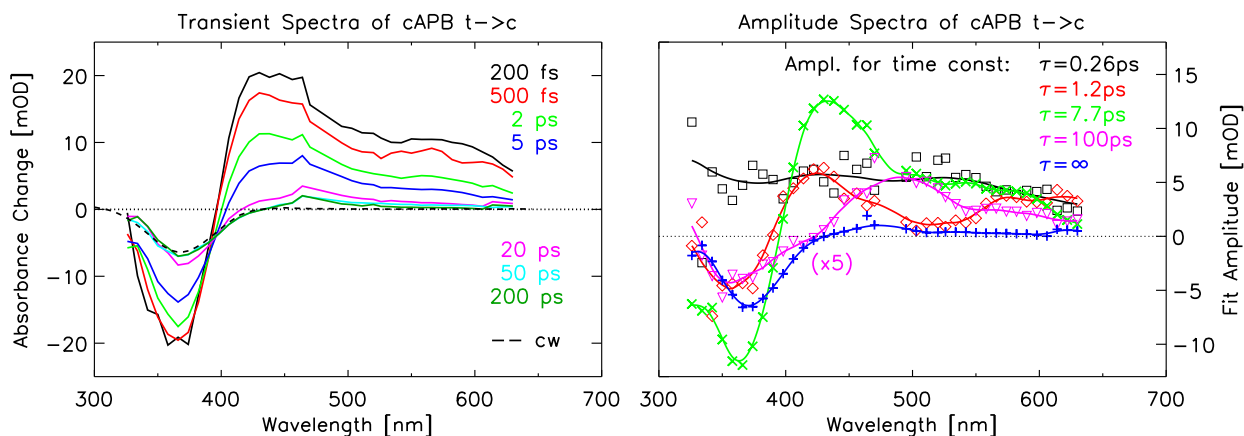


Abbildung 5.11: links: Transiente Spektren von monozyklischen APB-Peptiden ($t \rightarrow c$) zu den Verzögerungszeiten $t_D = 0,2, 0,5, 2,0, 5,0, 20, 50$ und 200 ps (aus Abb. 5.10). Zusätzlich ist noch das Dauerstrichdifferenzspektrum gestrichelt eingezeichnet (vgl. Abb. 4.5).

rechts: Anpassung der Meßdaten aus Abb. 5.10 mittels der Modellfunktion (siehe Abschnitt 46) mit den Zeitkonstanten $\tau = 0,26$ ps (schwarz), $1,2$ ps (rot), $7,7$ ps (grün), 100 ps (magenta) sowie einer ∞ -Komponente (blau). Gezeigt sind die ermittelten Amplituden zu den Zeitkonstanten.

Zusammenfassend kann für die $trans \rightarrow cis$ -Reaktionsrichtung festgestellt werden, daß nur ein kleiner Unterschied zwischen den Femtosekundenmessungen am linearen und zyklischen APB-Peptid detektierbar war. So wurde bei cAPB im Zeitbereich von 100 ps deutlich stärkere Absorptionsänderungen beobachtet wie bei lAPB. Auch sind die Kinetiken im zyklisierten Peptid alle insgesamt etwas schneller als bei lAPB.

5.3.2 $cis \rightarrow trans$ -Isomerisierung

Für die Berechnung der Absorptionsänderungen von reinem cis -cAPB wurden 15% der bei $trans$ -cAPB erhaltenen Signale von den gemessenen „ cis “-Transienten subtrahiert.

Man beobachtet für die $cis \rightarrow trans$ -Isomerisierung fast im gesamten untersuchten Spektralbereich ($\lambda_{\text{probe}} = 334 - 631$ nm) unmittelbar nach dem Anregungsimpuls eine Absorptionzunahme der Probe (vgl. Abb. 5.12). Einzige Ausnahme sind die Transiente bei $\lambda_{\text{probe}} = 450$ nm, welche eine Abnahme aufweist. Die direkt am Zeitnullpunkt sichtbare, sehr schnelle Absorptionzu- und wieder -abnahme bei Wellenlängen $\lambda_{\text{probe}} \geq 450$ nm ist nicht auf eine Reaktion der Probe sondern auf das nicht vollständig subtrahierbare Lösungsmittelsignal zurückzuführen. Auch ist bei Abtastwellenlängen $\lambda_{\text{probe}} < 400$ nm im Zeitbereich der Kreuzkorrelationsbreite ein deutliches Zweiquantenabsorptionssignal sichtbar. Somit sind die Meßdaten erst ab Verzögerungszeiten $t_D \geq 150$ fs zuverlässig auswertbar. Im Abtastwellenlängenbereich um

$\lambda_{\text{probe}} = 480 \text{ nm}$ mußten einige Meßkurven aufgrund der starken Streuung des Anregungslichtes und dem daraus resultierenden Rauschen weggelassen werden.

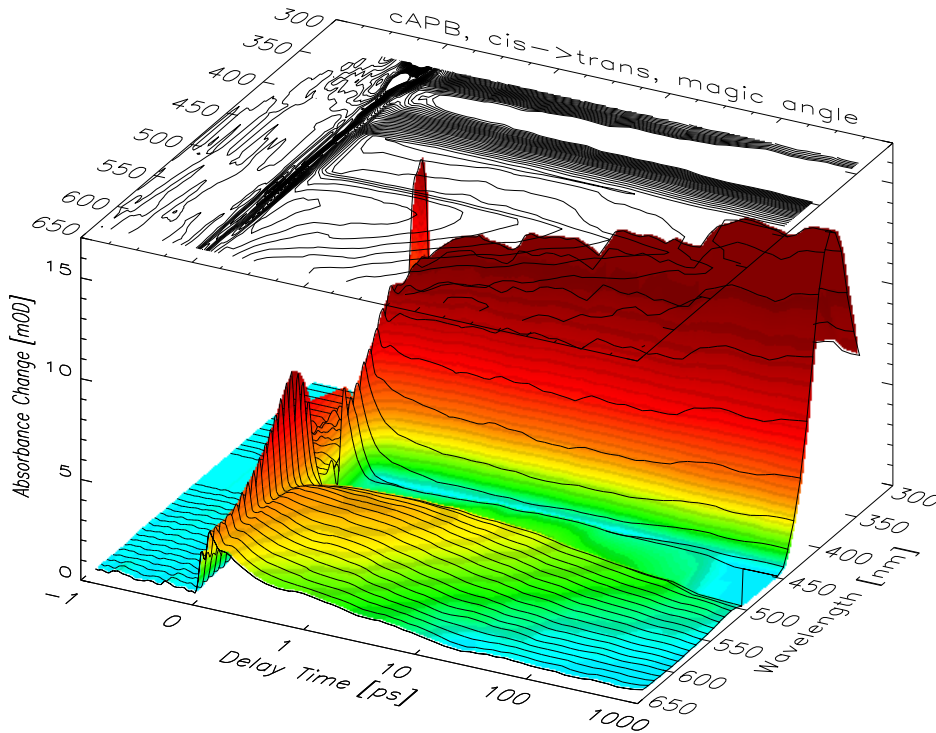


Abbildung 5.12: Femtosekundenmessungen an monozyklischen APB-Peptiden ($c \rightarrow t$). Der Signalbeitrag von 15% trans-cAPB ist herausgerechnet. Zur vollständigen Beschreibung der Transienten sind für den gesamten Abtastwellenlängenbereich vier Zeitkonstanten (230 fs, 2.7 ps, 60 ps und 1.4 ns) notwendig. Desweiteren ist ein konstanter Anteil (Zerfallszeit unendlich) notwendig, um die zu langen Verzögerungszeiten verbleibende Absorptionsänderung durch Photoproduktbildung zu modellieren.

Eine Besonderheit dieser Messung im Vergleich zu allen bisher vorgestellten fällt sofort auf: hier ist zum ersten Mal auch auf der Nanosekundenzeitskala eine Dynamik zu erkennen. Deutlich zu sehen ist dies sowohl im Maximum der $\text{trans-}\pi\pi^*$ -Bande als auch in der langwelligen Flanke der $n\pi^*$ -Absorption ($\lambda_{\text{probe}} = 500 \text{ nm}$).

In der $n\pi^*$ -Bande und bei Abtastwellenlängen außerhalb der Grundzustandsabsorption läßt sich das Abklingen der transienten Absorption in Abbildung 5.12 links nur durch die Verwendung von vier Zeitkonstanten (230 fs, 2.7 ps, 60 ps und 1.4 ns) zufriedenstellend anpassen. Dabei trägt die 230 fs-Zeitkonstante maximal bei $\lambda_{\text{probe}} = 600 \text{ nm}$ bei. Die Amplitude der nächstlangsameren Zeit hat ihr Maximum bei $\lambda_{\text{probe}} = 570 \text{ nm}$, das der 62 ps-Komponente liegt bei $\lambda_{\text{probe}} = 510 \text{ nm}$. Schließlich ist der Beitrag der Nanosekundendynamik um $\lambda_{\text{probe}} = 490 \text{ nm}$ am größten (vgl. Abb. 5.13 rechts).

Im Übergangsbereich zwischen $n\pi^*$ - und $\text{trans-}\pi\pi^*$ -Bande (400 – 430 nm) beobachtet man in den Meßkurven nach einem biexponentiellen Abfall ein ebenfalls biexponentielles Wieder-

ansteigen der Absorption mit 60 ps und 1.4 ns. Hingegen zeigen die Transienten im Bereich des Maximums der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande sowie in deren kurzwelligen Flanke eine ausschließliche Zunahme der Absorption, die sich auch mit den vier genannten Zeiten modellieren läßt. Der Anteil der Nanosekundenzeit nimmt dabei zu kürzeren Wellenlängen hin ab.

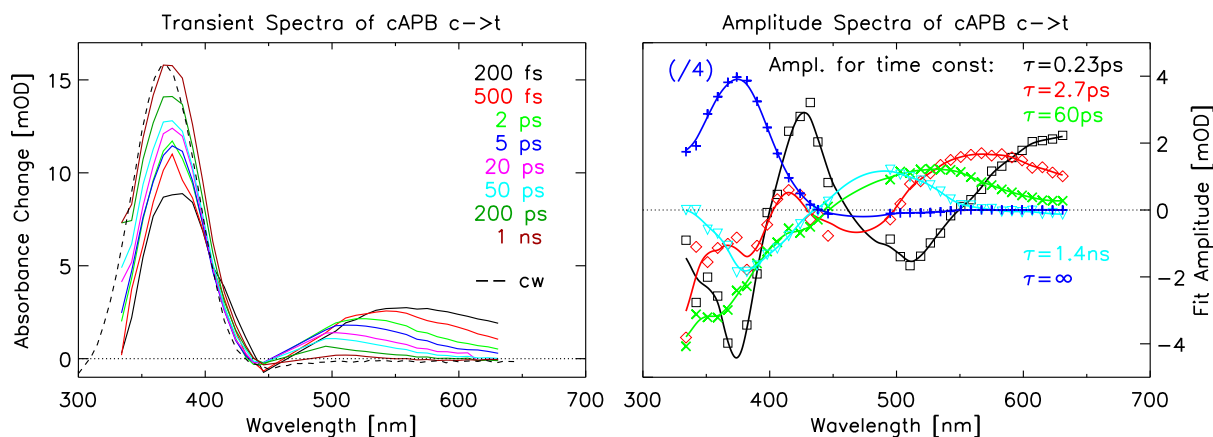


Abbildung 5.13: *Transiente Spektren von monozyklischen APB-Peptiden (c→t) zu den Verzögerungszeiten $t_D = 0.2, 0.5, 2.0, 5.0, 20, 50, 200$ ps und 1 ns (aus Abb. 5.12). Zusätzlich ist noch das Dauerstrichdifferenzspektrum gestrichelt eingezeichnet (vgl. Abb. 4.5).*

rechts: Anpassung der Meßdaten mittels der Modellfunktion (siehe Abschnitt 46) mit den Zeitkonstanten $\tau = 230$ fs (schwarz), 2.7 ps (rot), 60 ps (grün), 1.4 ns (türkis) sowie einer ∞ -Komponente (blau). Gezeigt sind die ermittelten Amplituden zu den Zeitkonstanten.

Insgesamt ist im beobachteten Zeitbereich bis 1.4 ns die Reaktion bzw. Bewegung des Peptides für diese Isomerisierungsrichtung noch nicht beendet. Wie allerdings Abbildung 5.13 zu entnehmen ist, gleicht das transiente Spektrum bei Verzögerungszeiten $t_D \geq 1$ ns, abgesehen von einer leichten Rotverschiebung, schon sehr dem Dauerstrichdifferenzspektrum (gestrichelte Linie) – ein Hinweis darauf, daß der Chromophor in cAPB seinen stationären Endzustand nahezu erreicht hat. Die Zeitkonstanten der bis hierher vorgestellten Proben sind in Tabelle 7.1 am Ende der Diskussion der APB-Peptide zusammengestellt.

6 Zeitaufgelöste Untersuchungen an modifizierten Azopeptiden

Das vorliegende Kapitel stellt die Ergebnisse der Femtosekundenuntersuchungen an dem Chromophor AMPB sowie den daraus abgeleiteten AMPB-Peptiden IAMPB, cAMPB und bcAMPB vor. Die Abfolge der Darstellungen ist dieselbe wie in Kapitel 5. Eine übersichtliche Zusammenstellung der erhaltenen Zeitkonstanten ist in Tabelle 7.2 am Ende von Kapitel 7 gegeben.

6.1 AMPB



6.1.1 *trans*→*cis*-Isomerisierung

Nach der Anregung von *trans*-AMPB in der langwelligen Flanke der $n\pi^*$ -Bande bei $\lambda_{\text{pump}} = 480 \text{ nm}$ (vgl. Abb. 4.3) ist im gesamten untersuchten Wellenlängenbereich von 334 – 630 nm eine instantan transiente Absorptionsänderung detektierbar. Negative Absorptionsänderungen durch das Ausbleichen der starken *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande erhält man für die Abtastwellenlängen $\lambda_{\text{probe}} = 334 \text{ nm} - 374 \text{ nm}$. Für $\lambda_{\text{probe}} \geq 382 \text{ nm}$ ist die initiale Absorptionsänderung positiv. Im Abtastwellenlängenbereich um die Anregungswellenlänge konnten aufgrund der starken Streuung des Anregungslichtes und dem daraus resultierenden Rauschen einige Meßkurven nicht verwendet werden.

Wie in den Abbildungen 6.1 und 6.2 zu erkennen ist, klingt im Spektralbereich außerhalb der Grundzustandsabsorption ($\lambda_{\text{probe}} \geq 520 \text{ nm}$) die transiente Absorption mit drei Zeitkonstanten (470 fs, 1.6 ps, 7.9 ps) spektral relativ homogen ab. Auch in der $n\pi^*$ -Bande (400 – 520 nm) und der $\pi\pi^*$ -Bande (280 – 400 nm) kann das Abklingen des Signales mit den drei genannten Zeitkonstanten modelliert werden, wobei die Amplitude der langsamen Zerfallszeit ein deutliches Maximum bei $\lambda_{\text{probe}} = 420 \text{ nm}$ aufweist (vgl. Abb. 6.2 rechts).

Die primäre Kinetik (470 fs) ist also etwas langsamer als bei Azobenzol (440 fs) und bei IAPB (390 fs). Die beiden anderen Zeitkonstanten sind verglichen zu Azobenzol (vgl. Abschnitt 5.1) kleiner, im Vergleich zu IAPB nahezu gleich groß.

Die Amplitudenspektren (Abb. 6.2, rechts) der Zeitkonstanten sind denen von IAPB sehr ähn-

lich. So sind die Amplituden der 470 fs-Zerfallszeit, wie bei *trans*-IAPB, nahezu konstant. Auch die spektrale Abhängigkeit der 7.9 ps-Kinetik ist identisch zu der von IAPB ($t \rightarrow c$), abgesehen von der spektralen Verschiebung des Maximums im Spektralbereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption ($\lambda_{\text{probe}} \leq 390 \text{ nm}$). Lediglich die Amplituden der 1.9 ps-Zerfallszeit zeigen im Bereich der $n\pi^*$ -Bande eine andere spektrale Abhängigkeit wie IAPB. Eine Kinetik im 100 ps-Zeitbereich war bei dieser Probe nicht zu beobachten.

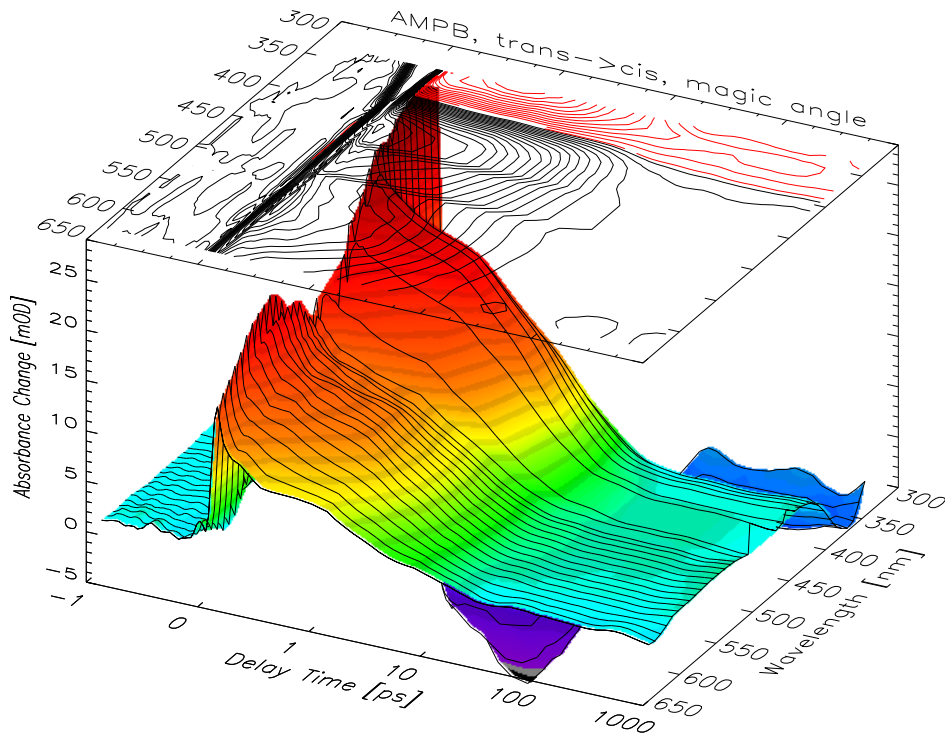


Abbildung 6.1: Femtosekundenmessungen an AMPB ($t \rightarrow c$) berechnet nach Gl. 2.6. Die transiente Absorption klingt mit den drei Zeitkonstanten 470 fs, 1.6 ps und 7.9 ps ab. Desweiteren ist ein konstanter Anteil (Zerfallszeit unendlich) notwendig, um die zu langen Verzögerungszeiten verbleibende Absorptionsänderung durch Photoproduktbildung zu modellieren.

Die transienten Spektren (Abb. 6.2 links) von AMPB $t \rightarrow c$ zeigen große Ähnlichkeit zu denen von IAPB (Abb. 5.7 links): zu frühen Verzögerungszeiten ($t_D \approx 200 \text{ fs}$) erkennt man für Abtastwellenlängen $> 400 \text{ nm}$ zwei Maxima. Für AMPB liegen diese bei etwa 427 nm und 560 nm, für IAPB bei ca. 448 nm und 570 nm. Vergleicht man die Rotverschiebung der Maxima um 21 nm bzw. 10 nm mit jener der Grundzustandsbanden (vgl. Tab. 4.5, so ergeben sich sehr ähnliche Werte: die Dauerstrich- $\pi\pi^*$ -Bande von *trans*-IAPB ist um 24 nm rotverschoben gegenüber *trans*-AMPB, die $n\pi^*$ -Bande um 10 nm. Das Minimum in den transienten Spektren bei $\lambda_{\text{probe}} = 340 \text{ nm}$ ist durch das Ausbleichen der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande durch die Anregung verursacht: die spektrale Position des Minimums ist identisch zu der des Maximums der Dauerstrich-*trans*- $\pi\pi^*$ -Bande. Bei Verzögerungszeiten $t_D \geq 50 \text{ ps}$ ist keine Absorptionsänderung mehr sichtbar, so daß davon ausgegangen werden kann, daß ein stationärer Zustand

erreicht ist. Die verbleibende Absorptionsänderung bei $t_D \geq 1$ ns ist der Bildung des Photo-
produktes *cis*-AMPB zuzuschreiben.

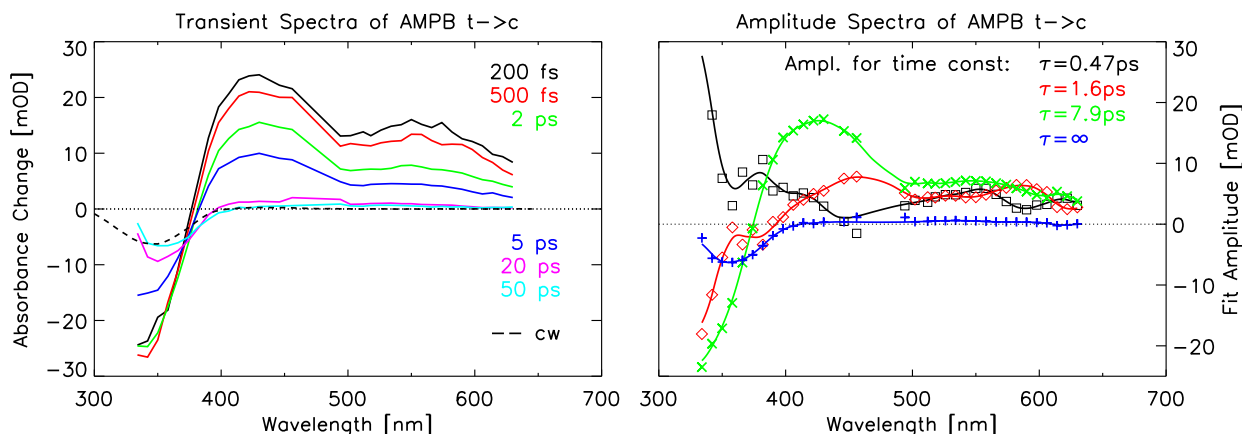


Abbildung 6.2: links: Transiente Spektren von AMPB ($t \rightarrow c$) zu den Verzögerungszeiten $t_D = 0.2, 0.5, 2.0, 5.0, 20$ und 50 ps (aus Abb. 6.1). Zusätzlich ist noch das Dauerstrichdifferenzspektrum gestrichelt eingezeichnet (vgl. Abb. 4.3). Die transienten Spektren bei den Verzögerungszeiten $t_D = 200$ ps und $t_D = 1$ ns sind nicht gezeigt, da diese zu jenem nach $t_D = 50$ ps identisch sind. rechts: Anpassung der Meßdaten aus Abb. 6.1 mittels der Modellfunktion (siehe Abschnitt 46) mit den Zeitkonstanten $\tau = 0.47$ ps (schwarz), 1.6 ps (rot), 7.9 ps (grün) sowie einer ∞ -Komponente (blau). Gezeigt sind die ermittelten Amplituden zu den Zeitkonstanten.

6.1.2 *cis* \rightarrow *trans*-Isomerisierung

Für die Berechnung der Absorptionsänderungen des reinen *cis*-AMPB wurden 20% der bei *trans*-AMPB erhaltenen Signale von den gemessenen „*cis*“-Transienten subtrahiert. Man beobachtet im gesamten untersuchten Spektralbereich von $\lambda_{\text{probe}} = 342 - 630$ nm unmittelbar nach dem Anregungsimpuls eine Absorptionszunahme der Probe (vgl. Abb. 6.3). Bei Abtastwellenlängen $\lambda_{\text{probe}} < 400$ nm sind im Zeitbereich der Kreuzkorrelationsbreite deutliche Zweiquantenabsorptionssignale sichtbar.

Wie in Abbildungen 6.3 und 6.4 zu erkennen ist, beobachtet man langwellig von der $n\pi^*$ -Absorption ($\lambda_{\text{probe}} \geq 550$ nm) ein Abklingen des Meßsignals mit drei Zeitkonstanten: eine schnelle Kinetik (250 fs) dominiert bei $\lambda_{\text{probe}} = 650$ nm. Diese schnellste Kinetik ist beim *cis* \rightarrow *trans*-Übergang des Chromophors AMPB somit erheblich schneller als bei IAPB (380 fs), aber immer noch einen Faktor zwei langsamer als bei reinem Azobenzol (130 fs). Die mittlere Zerfallszeit (2.9 ps) ist ebenfalls etwas kleiner als bei IAPB (3.4 ps). Der spektrale Verlauf des Amplitudenspektrums der 2.9 ps-Kinetik ist demjenigen der 3.4 ps-Zeitkonstante bei IAPB sehr ähnlich und weist ein Maximum bei $\lambda_{\text{probe}} = 530 - 560$ nm auf. Den beiden Kinetiken dürfte also derselbe physikalische Prozeß zugrunde liegen. Das Amplitudenspektrum der langsamen Komponente (12 ps) zeigt denselben spektralen Verlauf wie jenes der 2.9 ps-Kinetik. Dies ist anders als bei IAPB. Dort war das Maximum des Spektrums der 33 ps-Zeitkonstante

nochmals blauverschoben gegenüber der 3.4-ps-Kinetik. Aufgrund der Ähnlichkeit der Amplitudenspektren der Zerfallszeiten 2.9 ps und 12 ps kann bei AMPB davon ausgegangen werden, daß diese denselben Vorgang im Molekül beschreiben, der nur von verschiedenen Teilgruppen von Molekülen unterschiedlich schnell durchlaufen wird.

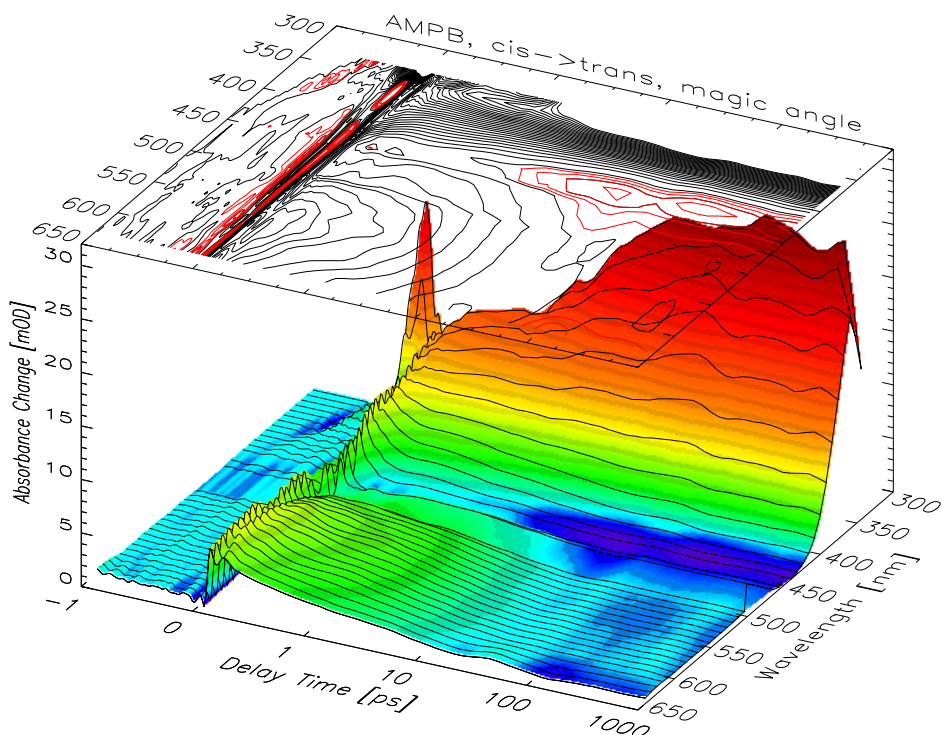


Abbildung 6.3: Femtosekundenmessungen an AMPB ($c \rightarrow t$). Der Signalbeitrag von 20% $trans$ -AMPB ist herausgerechnet. Zur vollständigen Beschreibung der Transienten sind für den gesamten Abtastwellenlängenbereich drei Zeitkonstanten (250 fs, 2.9 ps und 12 ps) notwendig. Zusätzlich ist ein konstanter Anteil (Zerfallszeit unendlich) notwendig, um die zu langen Verzögerungszeiten verbleibende Absorptionsänderung durch Photoproduktbildung zu modellieren.

Das zur Zerfallszeit „unendlich“ gehörende Amplitudenspektrum (blau in Abb. 6.4, rechts) unterscheidet sich in einer Hinsicht von demjenigen bei IAPB. Und zwar nicht so sehr von der Form, welche auch hier dem Dauerstrichdifferenzspektrum gleicht, sondern von der Größe der Amplitude im Maximum. AMPB ($c \rightarrow t$) zeigt bei etwa gleich starkem Anfangseffekt im langwelligen Abtastwellenlängenbereich ($\lambda_{\text{probe}} \approx 550 \text{ nm}$) eine zweieinhalbfach höhere, nicht mehr abklingende Absorptionsänderung im Maximum der $trans$ - $\pi\pi^*$ -Absorption. Da diese verbleibende Absorptionsänderung auf die Bildung des Photoproduktes $trans$ -AMPB zurückzuführen ist, gibt dies einen Hinweis auf eine höhere Quantenausbeute bei AMPB relativ zu IAPB.

Die transienten Spektren (Abb. 6.4, links) weisen zu frühen Verzögerungszeiten $t_D = 200 \text{ fs}$ im Bereich um $\lambda_{\text{probe}} = 450 \text{ nm}$ ein Minimum auf, welches durch das Ausbleichen des cis -Grundzustandes verursacht sein kann. An der sich aufbauenden Absorption im blauen Spek-

tralbereich erkennt man die Bildung des Photoproduktes *trans*-AMPB: das Maximum der Bande etwa bei 340 nm paßt gut zu dem des Dauerstrichdifferenzspektrums (vgl. Abb. 4.3 und Tab. 4.4). Den transienten Spektren ist zu außerdem entnehmen, daß ab Verzögerungszeiten $t_D \geq 50$ ps keine zeitliche Veränderung der Meßwerte mehr feststellbar ist, die Photoreaktion also abgeschlossen sein muß.

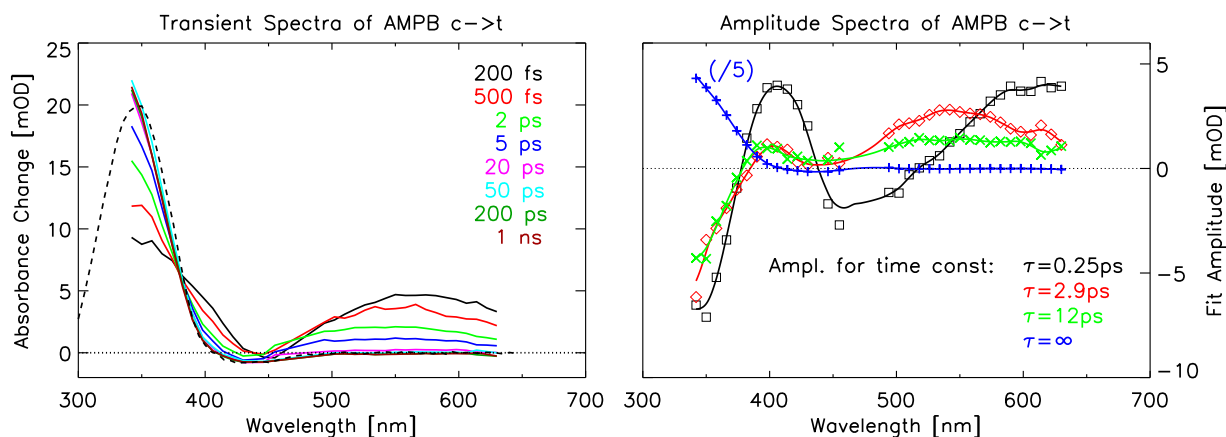


Abbildung 6.4: links: Transiente Spektren von AMPB (*c*→*t*) zu den Verzögerungszeiten $t_D = 0.2, 0.5, 2.0, 5.0, 20, 50, 200$ ps und 1 ns (aus Abb. 5.3, rechts). Zusätzlich ist noch das Differenzspektrum gestrichelt eingezeichnet (vgl. Abb. 4.3).

rechts: Anpassung der Meßdaten aus Abb. 6.3 mittels der Modellfunktion (siehe Abschnitt 46) mit den Zeitkonstanten $\tau = 0.25$ ps (schwarz), 2.9 ps (rot), 12 ps (grün) sowie einer ∞ -Komponente (blau). Gezeigt sind die ermittelten Amplituden zu den Zeitkonstanten.

6.2 Lineares AMPB-Peptid

6.2.1 *trans*→*cis*-Isomerisierung

Die elektronische Anregung von *trans*-IAMPB durch Lichtimpulse mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{pump}} = 480$ nm erzeugt bei allen untersuchten Wellenlängen von 342 – 606 nm eine instantane Absorptionsänderung.

Im langwelligen Spektralbereich ohne Grundzustandsabsorption ($\lambda_{\text{probe}} \geq 530$ nm) zeigt sich eine transiente Bande mit einem Maximum bei $\lambda_{\text{probe}} = 560$ nm. Das biexponentielle Abklingen dieser Absorption läßt sich gut mit zwei Zeitkonstanten (580 fs, 8.8 ps) beschreiben. Der Anteil der schnellen Komponente ist in diesem Spektralbereich ungefähr konstant und etwas kleiner wie jener der 8.8 ps-Zeitkonstante. Die Form und die Größe des Amplitudenspektrums der 8.8 ps-Zerfallszeit ist dem der 9.5 ps-Zeit von IAPB (vgl. Abb. 5.7 rechts) ähnlich. Dies ist wiederum ein Hinweis darauf, daß diese Kinetiken denselben physikalischen Vorgang im Molekül beschreiben.

Die in Abbildung 6.5 sichtbare Dynamik in der $n\pi^*$ -Bande (ca. 400 – 530 nm) gleicht der eben beschriebenen zeitlichen Entwicklung der Absorption nur begrenzt. In dieser spektralen Region überwiegt das Verschwinden der transienten Absorption mit einer Zeitkonstanten (8.8 ps).

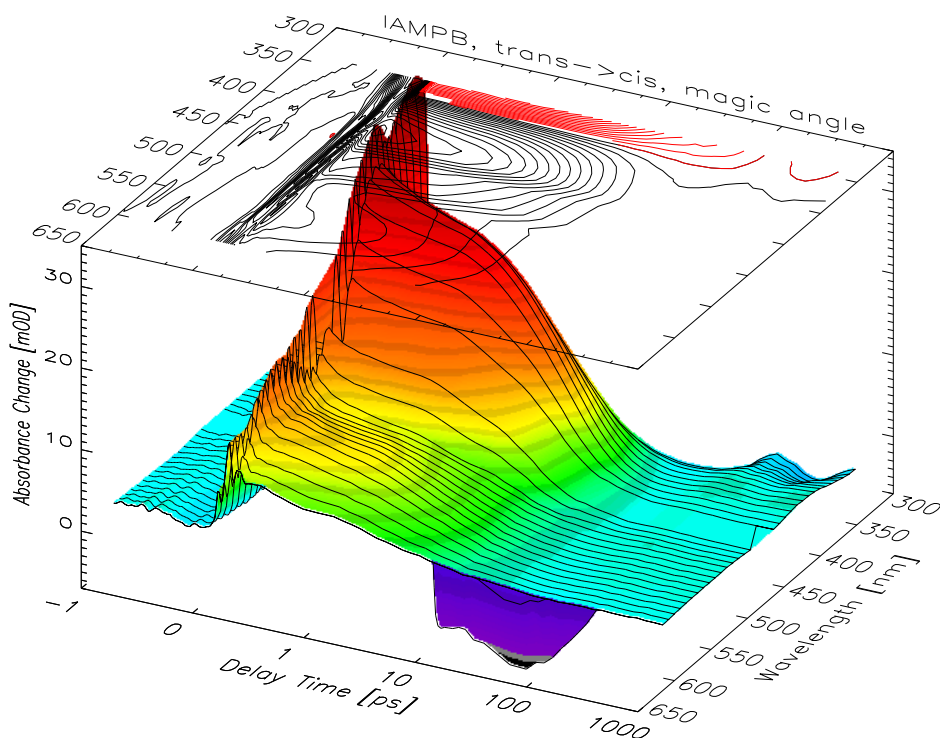


Abbildung 6.5: Femtosekundenmessungen an linearen AMPB-Peptiden ($t \rightarrow c$) berechnet nach Gl. 2.6. Zur vollständigen Beschreibung der Transienten sind für den gesamten Abtastwellenlängenbereich drei Zeitkonstanten (580 fs, 8.8 ps und 93 ps) notwendig. Desweiteren ist ein konstanter Anteil (Zerfallszeit unendlich) notwendig, um die zu langen Verzögerungszeiten verbleibende Absorptionsänderung durch Photoproduktbildung zu modellieren.

Im Bereich der $trans-\pi\pi^*$ -Bande ($\lambda_{\text{probe}} \leq 400$ nm) sind die Absorptionsänderungen durch zwei gegenläufige Effekte bestimmt: durch die Abnahme der transienten Absorption mit 580 fs und die biexponentielle Zunahme mit 8.8 ps und 93 ps. Die 93 ps-Kinetik ist nur in diesem Spektralbereich sichtbar (Abb. 6.6, rechts: magenta Kurve). Der spektrale Verlauf des Amplitudenspektrums der 8.8 ps-Zeit gleicht jenem der 7.9 ps-Zeit von $trans$ -AMPB (vgl. Abb. 6.2) sowie jenem der 9.5 ps-Zeit von $trans$ -IAPB (vgl. Abb. 5.7). Für den Vergleich mit IAPB muß man die Rotverschiebung der $trans-\pi\pi^*$ -Bande um 30 nm gegenüber IAPB mitberücksichtigen. Zu langen Zeiten bleibt eine restliche negative Absorptionsänderung bestehen, die der Bildung des Photoproduktes cis -IAPB zugeschrieben werden kann.

Die dominanten Kinetiken (0.58 ps und 8.8 ps) sind somit denen vom reinen Chromophor AMPB ($t \rightarrow c$, 470 fs, 7.9 ps) sehr ähnlich. Bei IAPB konnten allerdings keine Absorptionsänderungen mit Zeitkonstanten von etwa 1.6 ps wie bei AMPB ($t \rightarrow c$) extrahiert werden. Dafür war bei AMPB ($t \rightarrow c$) keine Kinetik mit einer Zeitkonstanten > 10 ps nachweisbar.

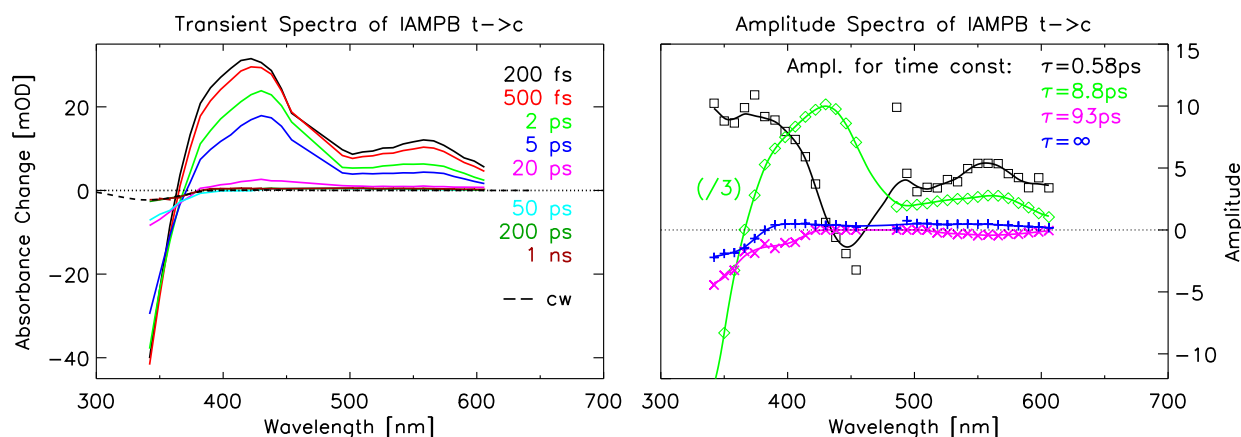


Abbildung 6.6: links: Transiente Spektren von linearen AMPB-Peptiden ($t \rightarrow c$) zu den Verzögerungszeiten $t_D = 0.2, 0.5, 2.0, 5.0, 20, 50$ und 200 ps (aus Abb. 6.5). Zusätzlich ist noch das Differenzspektrum gestrichelt eingezeichnet (vgl. Abb. 4.7). Das transiente Spektrum für $t_D = 1$ ns ist nicht gezeigt, da es identisch zu jenem bei $t_D = 200$ ps ist.

rechts: Anpassung der Meßdaten aus Abb. 6.5 mittels der Modellfunktion (siehe Abschnitt 46) mit den Zeitkonstanten $\tau = 0.58$ ps (schwarz), 8.8 ps (grün), 93 ps (magenta) sowie einer ∞ -Komponente (blau). Gezeigt sind die ermittelten Amplituden zu den Zeitkonstanten.

Die transienten Spektren in Abbildung 6.6 links zeigen nochmals deutlich das Ausbleichen der $trans-\pi\pi^*$ -Bande direkt nach der Anregung ($t_D = 200$ fs). Die Position des Minimums liegt knapp außerhalb des Meßbereiches ebenso wie das Maximum der $trans-\pi\pi^*$ -Bande des $trans$ -Dauerstrichspektrums (bei 339 nm, vgl. Tab. 4.5). Die beiden Maxima des transienten Spektrums ($t_D = 200$ fs) bei 425 nm und 560 nm sind gegenüber denen des transienten Spektrums bei $t_D = 200$ fs von $trans$ -AMPB verschoben: die kurzwellige transiente Absorptionsbande um 5 nm zu kürzeren Wellenlängen hin. Die entspricht auch der Verschiebung der $trans-\pi\pi^*$ -Bande der beiden Proben. Dagegen ist das langwelligere Maximum rotverschoben gegenüber AMPB. Bei Verzögerungszeiten $t_D \geq 200$ ps ist keine Absorptionsänderung mehr zu beobachten, so daß davon ausgegangen werden kann, daß der Chromophor zu diesem Zeitpunkt die Photoreaktion abgeschlossen hat.

6.2.2 $cis \rightarrow trans$ -Isomerisierung

Für die Berechnung der Absorptionsänderungen des reinen cis -IAMPB wurden 10% der bei $trans$ -IAMPB erhaltenen Signale von den gemessenen „ cis “-Transienten subtrahiert. Auch die elektronische Anregung von cis -IAMPB durch Lichtimpulse mit einer Wellenlänge von $\lambda_{probe} = 480$ nm erzeugt bei allen untersuchten Wellenlängen von $342 - 606$ nm eine instantane Absorptionsänderung: eine sofortige Abnahme der Absorption ist bei dieser Reaktionsrichtung nur für den Bereich der $n\pi^*$ -Bande zu beobachten (blauer Bereich in Abb. 6.7). Die positiven Signale in Abbildung 6.7 um den Zeitnullpunkt sind nicht korrigierbare Meßsignale vom Lösungsmittel.

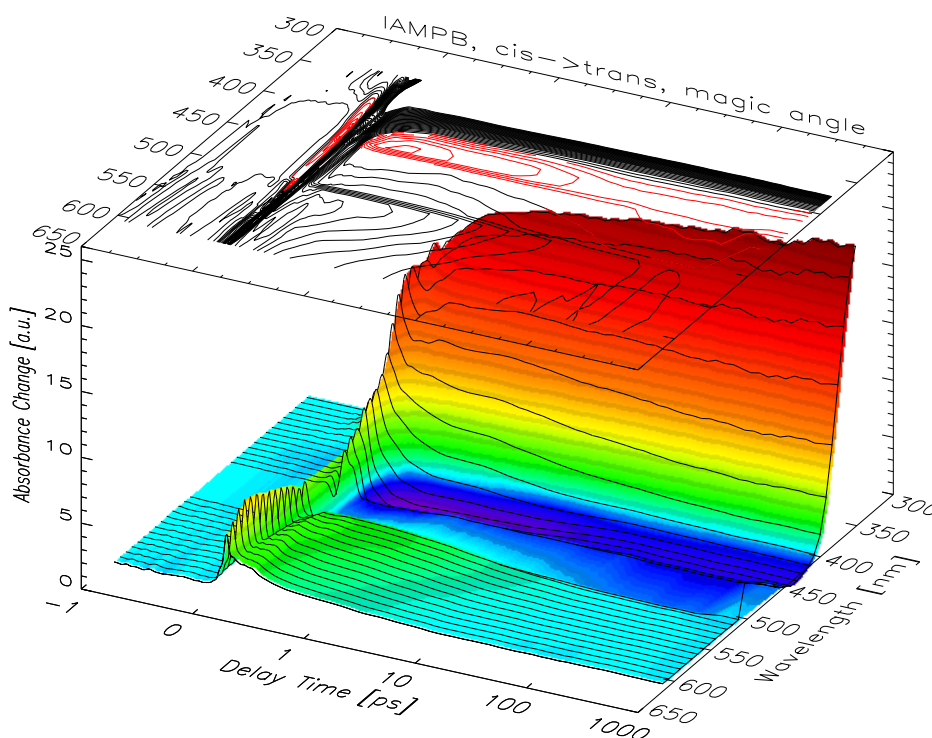


Abbildung 6.7: Femtosekundenmessungen an linearen AMPB-Peptiden ($c \rightarrow t$). Der Signalbeitrag von 10% *trans*-IAMPB ist herausgerechnet. Zur vollständigen Beschreibung der Transienten sind für den langwelligen Abtastwellenlängenbereich drei Zeitkonstanten (250 fs, 1.3 ps, 10 ps) notwendig. Zur Anpassung der Daten im Bereich der Grundzustandsabsorption benötigt man eine weitere Zerfallszeit von 58 ps. Zusätzlich ist ein konstanter Anteil (Zerfallszeit unendlich) notwendig, um die zu langen Verzögerungszeiten verbleibende Absorptionsänderung durch Photoproduktbildung zu modellieren.

Im Spektralbereich der $n\pi^*$ -Bande und langwellig davon (außerhalb der Grundzustandsabsorption) zeigt sich zu frühen Verzögerungszeiten ($t_D = 200$ fs) eine transiente Bande mit einem schwach ausgeprägten Maximum bei etwa $\lambda_{\text{probe}} = 550$ nm, welche schnell zu kürzeren Wellenlängen schiebt. Das multiexponentielle Abklingen dieser Absorption läßt sich mit drei Zeitkonstanten (250 fs, 1.3 ps, 10 ps) gut beschreiben. Die schnellsten Prozesse nach der Anregung laufen somit gleich schnell ab wie bei reinem AMPB ($c \rightarrow t$). Der Anteil der 1.3 ps-Zerfallszeit ist im Bereich um $\lambda_{\text{probe}} = 540$ nm maximal, während die langsame Komponente (10 ps) zu blauerem Wellenlängen hin dominiert (500 nm) und für $\lambda_{\text{probe}} \geq 550$ nm verschwindet (vgl. Abb. 6.8 rechts). Im Übergangsbereich von der $n\pi^*$ - zur $trans-\pi\pi^*$ -Bande ($\lambda_{\text{probe}} = 390 - 430$ nm) war eine Anpassung der Daten im Zeitbereich um 10 ps mit diesen Zerfallszeiten nur eingeschränkt möglich.

Im Bereich der Grundzustandsabsorption ($\lambda_{\text{probe}} \leq 550$ nm) benötigt man für eine gut Beschreibung der Meßkurven durch Exponentialzerfälle zusätzlich zu den drei schon genannten Kinetiken eine weitere Zerfallszeit von 58 ps, welche nur in diesem Spektralbereich sichtbar ist. Ein Vergleich der Amplitudenspektren von IAMPB und AMPB für die $cis \rightarrow trans$ -

Reaktionsrichtung zeigt, daß die Amplitudenverläufe der drei schnellsten Zeiten einander ähnlich sind. Allerdings verschwindet im langwelligen Spektralbereich bei IAMPB die 10-ps-Kinetik. Die zu langen Zeiten verbleibende restliche negative Absorptionsänderung (modelliert durch die Zeitkonstante unendlich), zeigt die Bildung des Photoproduktes *trans*-IAMPB an.

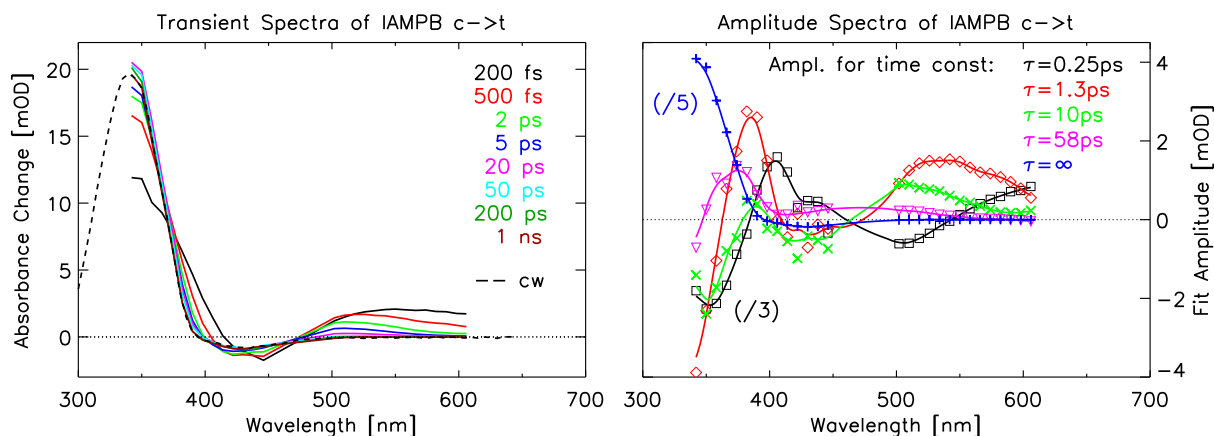


Abbildung 6.8: links: Transiente Spektren von linearen AMPB-Peptiden (*c*→*t*) zu den Verzögerungszeiten $t_D = 0.2, 0.5, 2.0, 5.0, 20, 50, 200$ ps und 1 ns (aus Abb. 6.7). Zusätzlich ist noch das Differenzspektrum gestrichelt eingezeichnet (vgl. Abb. 4.7).

rechts: Anpassung der Meßdaten aus Abb. 6.7 mittels der Modellfunktion (siehe Abschnitt 46) mit den Zeitkonstanten $\tau = 0.25$ ps (schwarz), 1.3 ps (rot), 10 ps (grün), 58 ps (magenta) sowie einer ∞ -Komponente (blau). Gezeigt sind die ermittelten Amplituden zu den Zeitkonstanten.

Die transienten Spektren in Abbildung 6.8 links zeigen ein Ausbleichen im Spektralbereich der $n\pi^*$ -Bande direkt nach der Anregung ($t_D = 200$ fs). In der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande entsteht eine Absorptionsbande, deren Maximum knapp außerhalb des Meßbereiches liegt, ebenso wie das Maximum der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande des *trans*-Dauerstrichspektrums (bei 339 nm, vgl. Tab. 4.5). Somit kann dieser Aufbau der Absorption mit der Produktbildung assoziiert werden. Das Maximum des transienten Spektrums zu frühen Verzögerungszeiten ($t_D = 200$ fs) bei $\lambda_{\text{probe}} = 550$ nm ist gegenüber dem von *cis*-AMPB um 10 nm rotverschoben. Bei Verzögerungszeiten $t_D \geq 50$ ps ist keine wesentliche Absorptionsänderung mehr zu beobachten, so daß davon ausgegangen werden kann, daß ein Großteil der angeregten Chromophore zu diesem Zeitpunkt einen stationären Zustand erreicht hat. Ein kleiner Rest zeigt in der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande noch eine Kinetik im Bereich von einigen hundert Pikosekunden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß sich die jeweiligen Kinetiken von IAMPB und dem reinen Chromophor AMPB für beide Reaktionsrichtungen relativ ähnlich sind. Auch zu IAPB finden sich Parallelen, die den Schluß zulassen, daß verwandte Prozesse, wie z.B. die Bildung der Produktabsorption, in sehr ähnlichen Zeiträumen ablaufen.

6.3 Monozyklisches AMPB-Peptid

Ebenso wie bei der APB-Peptidfamilie war nach der Durchführung der bis jetzt vorgestellten Messungen die Untersuchung der zyklisierten Proben cAMPB und bcAMPB eine wichtige Aufgabe. Der anschließende Vergleich sowohl mit der linearen Vorstufe lAMPB als auch mit cAPB sollte Erkenntnisse über den Einfluß des Methylenspacers auf die Triggerung des Faltungsvorganges sowie die Rückkopplung der Bewegung der Aminosäurekette auf den Chromophor bringen.

6.3.1 *trans*→*cis*-Isomerisierung

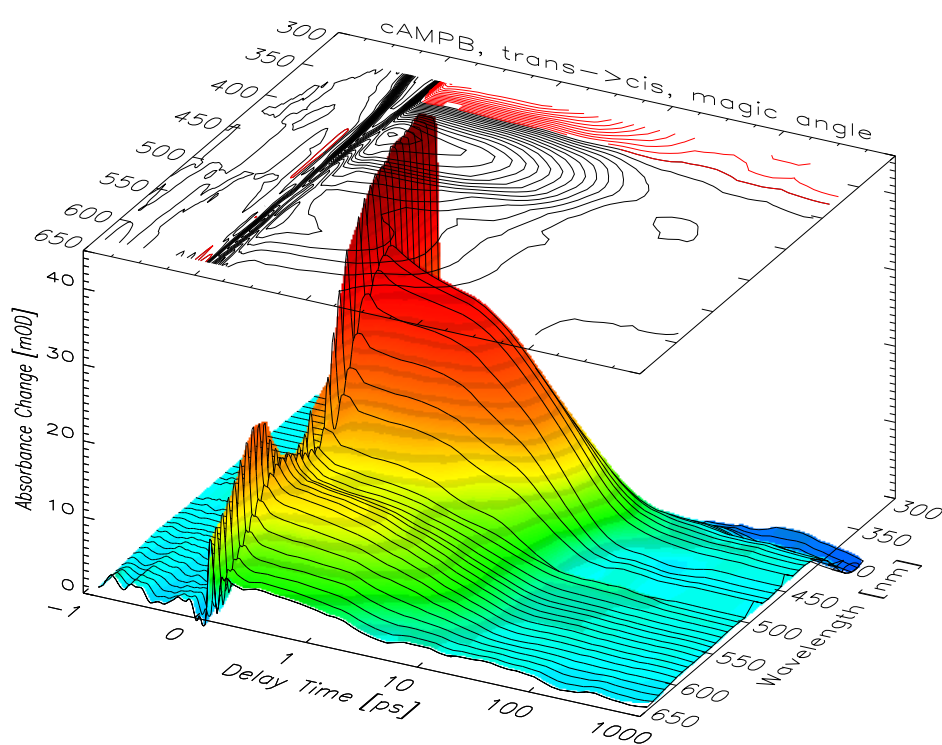


Abbildung 6.9: Femtosekundenmessungen an monozyklischen AMPB-Peptiden (*t*→*c*) berechnet nach Gl. 2.6. Zur vollständigen Beschreibung der Transienten sind für den langwelligen Abtastwellenlängenbereich zwei Zeitkonstanten (1.7 ps, 9.6 ps) notwendig (vgl. Text). Im Bereich der Grundzustandsbanden benötigt man eine zusätzliche Zerfallszeit von 120 ps, deren Amplitude allerdings sehr klein ist. Desweiteren ist ein konstanter Anteil (Zerfallszeit unendlich) notwendig, um die zu langen Verzögerungszeiten verbleibende Absorptionsänderung durch Photoproduktbildung zu modellieren.

Die Daten in Abbildung 6.9 ähneln denen des linearen Peptides (Abb. 6.5). Auch das zyklisierte Peptid zeigt direkt nach der elektronischen Anregung durch 480 nm-Lichtimpulse bei allen untersuchten Wellenlängen ($\lambda_{\text{probe}} = 334 - 630 \text{ nm}$) eine instantane Absorptionsänderung:

langwellig von $\lambda_{\text{probe}} = 366 \text{ nm}$ eine Absorptionzunahme, für $\lambda_{\text{probe}} < 366 \text{ nm}$ eine Abnahme. Im gesamten beobachteten Spektralbereich sind um den Zeitnullpunkt ($t_D = 0 \text{ fs}$) starke Meßsignale sichtbar. Die Ursache hierfür ist, daß die Subtraktion der Lösungsmittelsignale von den Meßdaten in diesem Fall nur sehr eingeschränkt erfolgreich war. Möglicherweise ist zwischen der Messung der Probe und dem Lösungsmittel das Laserbündel gedriftet.

Die Datenanpassung erfolgte insgesamt mit drei Zeitkonstanten: 1.7 ps, 9.6 ps und 120 ps. Eine schnellere Kinetik, wie sie bei allen zuvor untersuchten Proben immer sichtbar war, konnte aus den Daten mittels des verwendeten Fitalgorithmus nicht extrahiert werden. Der Grund hierfür ist, daß wegen der schwierigen Lösungsmittelkorrektur die Meßdaten erst ab $t_D = 200 \text{ fs}$ verwendet werden konnten. Zusätzlich tritt ein, ebenfalls durch das Lösungsmittel verursachtes, oszillierendes Signal auf, welches die Bestimmung einer Zeitkonstanten im 400 fs-Bereich unmöglich macht. Aufgrund des Fehlens einer Zeitkonstante im Subpikosekundenbereich erscheinen in dem Amplitudenspektrum der 1.7 ps-Zeitkonstante die Kinetiken mehrere Prozesse überlagert, die bei den anderen Proben auf verschiedene Zeitbereiche verteilt waren. Daher zeigt das Amplitudenspektrum der 1.7 ps-Kinetik einen ungewöhnlichen spektralen Verlauf. Ein direkter Vergleich der Daten mit denen von IAMPB ($t \rightarrow c$) zeigt, daß auch bei dieser Probe (cAMPB) eine Kinetik mit etwa 0.6 ps enthalten ist (vgl. Diskussion Abb. 7.9). Wie aus Abbildung 6.10 ersichtlich, ist die Form und die Größe des Amplitudenspektrums der 9.6 ps-Zerfallszeit dem der 7 ps-Zeit von IAMPB (vgl. Abb. 6.6 rechts) ähnlich. In der $\text{trans-}\pi\pi^*$ -Bande kann zusätzlich eine 120 ps-Kinetik mit geringer Amplitude beobachtet werden.

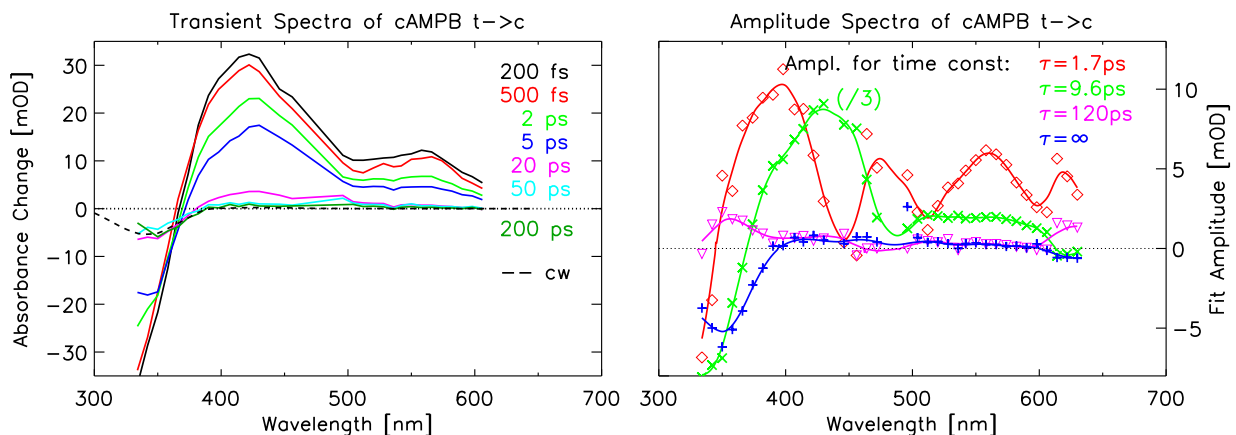


Abbildung 6.10: links: Transiente Spektren von monozyklischen AMPB-Peptiden ($t \rightarrow c$) zu den Verzögerungszeiten $t_D = 0.2, 0.5, 2.0, 5.0, 20, 50$ und 200 ps (aus Abb. 6.9). Zusätzlich ist noch das Dauerstrichdifferenzspektrum gestrichelt eingezeichnet (vgl. Abb. 4.7). Das transiente Spektrum für $t_D = 1 \text{ ns}$ ist nicht gezeigt, da es identisch zu demjenigen für $t_D = 200 \text{ ps}$ ist.

rechts: Anpassung der Meßdaten aus Abb. 6.9 mittels der Modellfunktion (siehe Abschnitt 46) mit den Zeitkonstanten $\tau = 1.7 \text{ ps}$ (rot), 9.6 ps (grün), 120 ps (magenta) sowie einer ∞ -Komponente (blau). Gezeigt sind die ermittelten Amplituden zu den Zeitkonstanten.

Die zu langen Zeiten verbleibende Absorptionsänderung gleicht von der Form dem Dauerstrichdifferenzspektrum (vgl. Abb. 4.7) und beschreibt die Photoproduktbildung.

Die transienten Spektren (Abb. 6.10) von cAMPB zeigen, ebenso wie bei lAMPB und AMPB, deutlich das Ausbleichen der $trans-\pi\pi^*$ -Bande direkt nach der Anregung ($t_D = 200$ fs). Die Position des Minimums liegt direkt am Rand des Meßbereiches. Bei 338 nm ist auch das Maximum der $trans-\pi\pi^*$ -Bande des $trans$ -Dauerstrichspektrums lokalisiert (vgl. Tab. 4.5). Die beiden Maxima des transienten Spektrums ($t_D = 200$ fs) bei $\lambda_{probe} = 425$ nm und $\lambda_{probe} = 550$ nm befinden sich an denselben spektralen Positionen wie jene bei lAMPB. Bei Verzögerungszeiten $t_D \geq 200$ ps ist keine wesentliche Absorptionsänderung mehr zu beobachten, so daß davon ausgegangen werden kann, daß der Großteil der angeregten Chromophore zu diesem Zeitpunkt die Photoreaktion abgeschlossen hat.

6.3.2 $cis \rightarrow trans$ -Isomerisierung

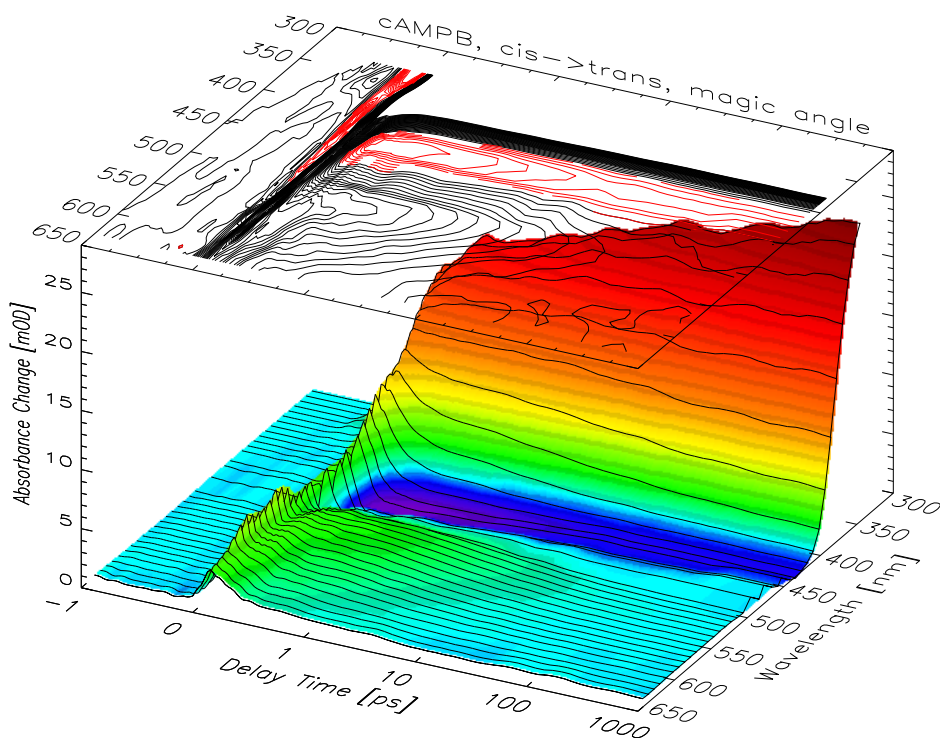


Abbildung 6.11: Femtosekundenmessungen an monozyklischen AMPB-Peptiden ($c \rightarrow t$). Der Signalbeitrag von 10% $trans$ -cAMPB ist herausgerechnet. Zur vollständigen Beschreibung der Transienten sind für den gesamten Abtastwellenlängenbereich vier Zeitkonstanten (190 fs, 1.3 ps, 9.3 ps und 180 ps) notwendig. Zusätzlich ist ein konstanter Anteil (Zerfallszeit unendlich) notwendig, um die zu langen Verzögerungszeiten verbleibende Absorptionsänderung durch Photoproduktbildung zu modellieren.

Für die Berechnung der Absorptionsänderungen des reinen cis -cAMPB wurden 10% der bei $trans$ -cAMPB erhaltenen Signale von den gemessenen „ cis “-Transienten subtrahiert. Ähnlich wie bei cis -lAMPB erhält man nach der elektronischen Anregung von cis -cAMPB durch

Lichtimpulse mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{pump}} = 480 \text{ nm}$ bei allen untersuchten Wellenlängen von 334 – 630 nm eine instantane Absorptionsänderung: eine sofortige Abnahme der Absorption ist bei dieser Reaktionsrichtung im Spektralbereich der $n\pi^*$ -Bande zu beobachten (blauer Bereich in Abb. 6.11). Die in der Abbildung in diesem Spektralbereich sichtbaren positiven Signale um den Zeitnullpunkt sind Meßartefakte.

Das multiexponentielle Abklingen der transienten Absorption läßt sich im gesamten untersuchten Spektralbereich mit vier Zeitkonstanten (190 fs, 1.3 ps, 9.3 ps, 180 ps) sehr gut beschreiben. Die schnellsten Prozesse nach der Anregung (190 fs) laufen schneller ab als bei reinem AMPB ($c \rightarrow t$, 250 fs) und bei IAMPB (250 fs). Ebenso wie bei AMPB und IAMPB ist der Betrag der schnellsten Kinetik im Spektralbereich $\lambda_{\text{probe}} \geq 500 \text{ nm}$ für $\lambda_{\text{probe}} = 600 \text{ nm}$ am größten. Die Amplituden der 1.3 ps-Zerfallszeit sind im Bereich um $\lambda_{\text{probe}} = 540 \text{ nm}$ maximal, während die Amplituden der 9.3 ps-Kinetik zu blauerem Wellenlängen hin dominiert (500 nm) und für $\lambda_{\text{probe}} \geq 580 \text{ nm}$ verschwindet (vgl. Abb. 6.12 rechts). Beide letztgenannte Zeitkonstanten (1.3 ps, 9.3) sind gleich groß wie die entsprechenden bei IAMPB (1.3 ps, 10 ps). Von der Größe der Amplitude etwa einen Faktor drei schwächer, vom spektralen Verlauf her aber dem Amplitudenspektrum der 9.3 ps-Zeit ähnlich, ist die Amplitude der 180 ps-Zeit, welche ebenfalls für $\lambda_{\text{probe}} \geq 580 \text{ nm}$ keinen Beitrag liefert und bei $\lambda_{\text{probe}} = 500 \text{ nm}$ und 390 nm ein Maximum besitzt.

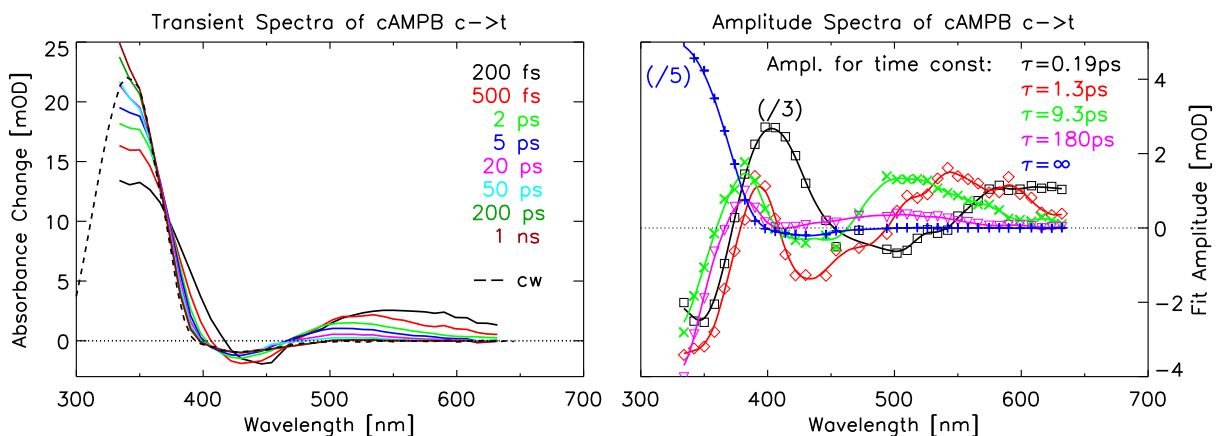


Abbildung 6.12: Transiente Spektren von monozyklischen AMPB-Peptiden ($c \rightarrow t$) zu den Verzögerungszeiten $t_D = 0.2, 0.5, 2.0, 5.0, 20, 50, 200 \text{ ps}$ und 1 ns (aus Abb. 6.11). Zusätzlich ist noch das Dauerstrichdifferenzspektrum gestrichelt eingezeichnet (vgl. Abb. 4.7).

rechts: Anpassung der Meßdaten mittels der Modellfunktion (siehe Abschnitt 46) mit den Zeitkonstanten $\tau = 0.19 \text{ ps}$ (schwarz), 1.3 ps (rot), 9.3 ps (grün), 180 ps (magenta) sowie einer ∞ -Komponente (blau). Gezeigt sind die ermittelten Amplituden zu den Zeitkonstanten.

In der $trans-\pi\pi^*$ -Bande ($\lambda_{\text{probe}} \leq 390 \text{ nm}$) fällt ein Unterschied zu IAMPB ($c \rightarrow t$) auf: die Amplitude der 180 ps-Zeit ist negativ, während die der 58 ps-Zeit bei IAMPB positiv war. Die Bedeutung dieses Unterschiedes wird in der Diskussion ausführlich behandelt (vgl. Abschnitt 7.3.3). Die zu langen Zeiten verbleibende Absorptionsänderung (modelliert durch die ∞ -Zeitkonstante) ist durch die Bildung des Photoproduktes *trans*-cAMPB verursacht.

Die transienten Spektren in Abbildung 6.12 (links) zeigt im Spektralbereich außerhalb der Grundzustandsabsorption zu frühen Verzögerungszeiten eine transiente Bande mit einem schwach ausgeprägten Maximum bei $\lambda_{\text{probe}} = 550 \text{ nm}$, welches schnell zu kürzeren Wellenlängen schiebt. Ebenso ist ein Ausbleichen im Bereich der $n\pi^*$ -Bande direkt nach der Anregung ($t_D = 200 \text{ fs}$) zu erkennen. In der $trans\text{-}\pi\pi^*$ -Bande entsteht eine Absorptionsbande, deren Maximum knapp außerhalb des Meßbereiches liegt, ebenso wie das Maximum der $trans\text{-}\pi\pi^*$ -Bande des Absorptionsspektrums (bei 338 nm , vgl. Tab. 4.5). Der Aufbau dieser Absorption spiegelt die Produktbildung wieder.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die bei cAMPB auftretenden Kinetiken denen bei lAMPB und AMPB für beide Reaktionsrichtungen ähnlich sind. Ein Vergleich der Amplitudenspektren von cAMPB und lAMPB für die $cis \rightarrow trans$ -Reaktionsrichtung zeigt, daß die Amplitudenverläufe der drei schnellsten Zeiten einander gleichen, ebenso wie diejenigen von lAMPB und AMPB (vgl. Abschnitt 6.2). Einziger wirklich bemerkenswerter Unterschied zwischen den Kinetiken der $cis \rightarrow trans$ -Reaktion von cAMPB und lAMPB ist eine langsame Kinetik im Bereich von hundert Pikosekunden, welche bei cAMPB im Spektralbereich der $trans\text{-}\pi\pi^*$ -Absorption ein umgekehrtes Vorzeichen hat wie bei lAPB. Ob diese Kinetik durch eine Bewegung der angebrachten und zyklisierten Aminosäurekette verursacht ist, wird in Kapitel 7 dargelegt.



6.4 Bizyklisches AMPB-Peptid

6.4.1 $trans \rightarrow cis$ -Isomerisierung

Nach der elektronischen Anregung von $trans\text{-bcAMPB}$ in der langwelligen Flanke der $n\pi^*$ -Bande bei $\lambda_{\text{probe}} = 480 \text{ nm}$ (vgl. Abb. 4.7) ist auch bei dieser Probe im gesamten untersuchten Wellenlängenbereich von $342 - 614 \text{ nm}$ innerhalb der Meßgenauigkeit eine instantan transiente Absorptionsänderung detektierbar. Negative Absorptionsänderungen durch das Ausbleichen der starken $trans\text{-}\pi\pi^*$ -Bande erhält man für die Abtastwellenlängen von $\lambda_{\text{probe}} = 342 \text{ nm} - 358 \text{ nm}$. Für $\lambda_{\text{probe}} \geq 366 \text{ nm}$ ist die initiale Absorptionsänderung positiv.

Wie in den Abbildungen 6.13 und 6.14 zu erkennen ist, kann der gesamte Datensatz mit drei Zeitkonstanten (300 fs , 1.6 ps , 10 ps) gut angepaßt werden. Die primäre Kinetik (300 fs) ist bei bcAMPB also erheblich schneller als bei allen anderen Proben in $trans$ -Konfiguration der AMPB-Familie, deren kleinste Zeitkonstanten im Bereich von 500 fs liegen. Die beiden anderen Zerfälle (1.6 ps , 10 ps) sind etwa gleich schnell wie bei AMPB. Auffällig ist, daß keine langsame Kinetik im Zeitbereich $> 20 \text{ ps}$ sichtbar ist, im Gegensatz zum linearen und monozyklischen AMPB-Peptid.

Die Amplitudenspektren der 300 fs und der 10 ps -Zeit sind denen der entsprechenden Zeitkonstanten bei AMPB ähnlich (vgl. Abb. 6.14, rechts). Zusätzlich gleicht das Amplitudenspektrum der 10 ps -Zeit auch dem der 8.8 ps -Kinetik von lAMPB und der 9.6 ps -Kinetik von cAMPB. Hingegen ist das Amplitudenspektrum der mittleren Zerfallszeit (1.6 ps) von

bcAMPB vom spektralen Verlauf keinem Amplitudenspektrum von AMPB, lAMPB oder cAMPB ähnlich. Insbesondere das Maximum bei $\lambda_{\text{probe}} = 400\text{ nm}$ ist charakteristisch für bcAMPB ($t \rightarrow c$).

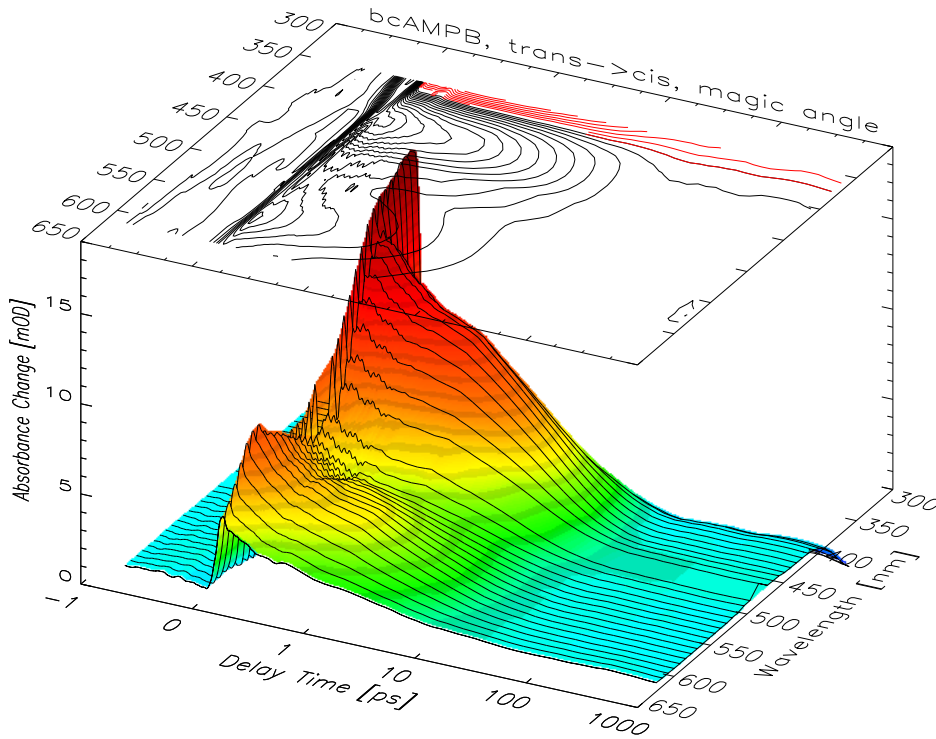


Abbildung 6.13: Femtosekundenmessungen an bizyklischen AMPB-Peptiden ($t \rightarrow c$) berechnet nach Gl. 2.6. Zur vollständigen Beschreibung der Transienten sind für den untersuchten Abtastwellenlängenbereich drei Zeitkonstanten (300 fs, 1.6 ps und 10 ps) notwendig. Desweiteren ist ein konstanter Anteil (Zerfallszeit unendlich) notwendig, um die zu langen Verzögerungszeiten verbleibende Absorptionsänderung durch Photoproduktbildung zu modellieren.

Auch in den transienten Spektren (Abb. 6.14 links) von bcAMPB $t \rightarrow c$ erkennt man die weitgehende Übereinstimmung der Entwicklung der Absorption zwischen den untersuchten AMPB-Proben. Auf ein paar Besonderheiten sei hier hingewiesen: Während das Maximum zu frühen Verzögerungszeiten ($t_D \approx 200\text{ fs}$) bei $\lambda_{\text{probe}} = 560\text{ nm}$ relativ zu cAMPB unverschoben ist, ist das zweite, kurzwelligere um etwa 15 nm blauverschoben auf $\lambda_{\text{probe}} = 410\text{ nm}$. Man erkennt aber deutlich, daß die Zentralwellenlänge dieser zuletzt genannten transienten Bande innerhalb von 5 ps auf 430 nm schiebt. Ein Effekt, der bei AMPB ($t \rightarrow c$) überhaupt nicht auftritt und bei den beiden anderen AMPB-Peptiden nur sehr schwach.

Bei Verzögerungszeiten $t_D \geq 50\text{ ps}$ ist keine Absorptionsänderung mehr sichtbar, so daß davon ausgegangen werden kann, daß ein stationärer Zustand erreicht ist. Die verbleibende Absorptionsänderung bei $t_D \geq 1\text{ ns}$ zeigt an, daß das Photoprodukt *cis*-AMPB gebildet worden ist.

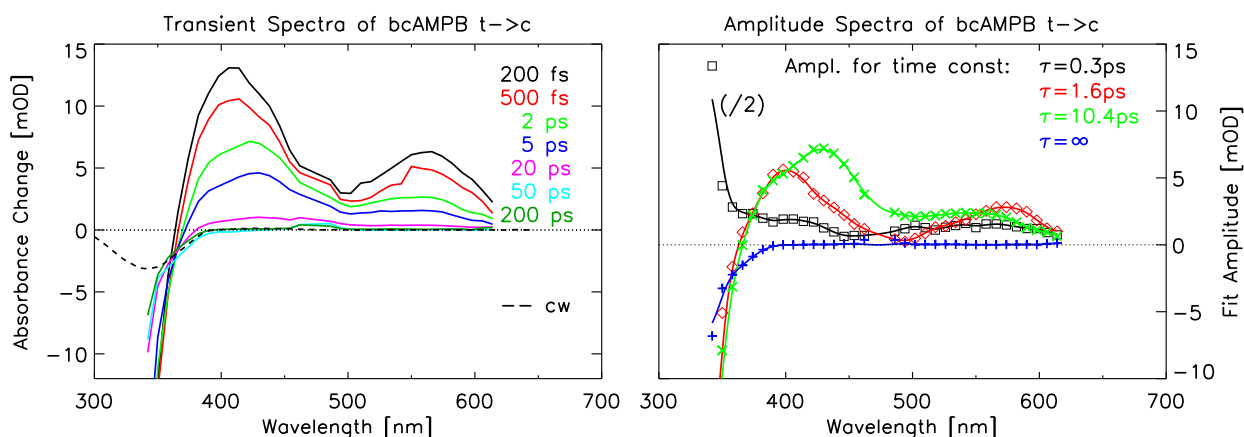


Abbildung 6.14: links: Transiente Spektren von bityklischen AMPB-Peptiden ($t \rightarrow c$) zu den Verzögerungszeiten $t_D = 0.2, 0.5, 2.0, 5.0, 20, 50$ und 200 ps (aus Abb. 6.13). Zusätzlich ist noch das Differenzspektrum gestrichelt eingezeichnet (vgl. Abb. 4.7). Das transiente Spektrum $t_D = 1$ ns ist identisch zu jenem bei $t_D = 200$ ps und deshalb weggelassen.

rechts: Anpassung der Meßdaten aus Abb. 6.13 mittels der Modellfunktion (siehe Abschnitt 46) mit den Zeitkonstanten $\tau = 0.3$ ps (schwarz), 1.6 ps (rot), 10 ps (grün) sowie einer ∞ -Komponente (blau). Gezeigt sind die ermittelten Amplituden zu den Zeitkonstanten.

6.4.2 $cis \rightarrow trans$ -Isomerisierung

Für die Berechnung der Absorptionsänderungen des reinen cis -bcAMPB wurden 10% der bei $trans$ -bcAMPB erhaltenen Signale von den gemessenen „ cis “-Transienten subtrahiert. Man beobachtet für die $cis \rightarrow trans$ -Isomerisierung im gesamten untersuchten Spektralbereich ($\lambda_{\text{probe}} = 342 - 614$ nm) unmittelbar nach dem Anregungsimpuls eine Absorptionzunahme der Probe (vgl. Abb. 6.15). Die direkt am Zeitnullpunkt erfolgende, sehr schnelle Zu- und anschließende Abnahme der Absorption bei Wellenlängen $\lambda_{\text{probe}} \geq 400$ nm ist nicht auf eine Reaktion der Probe sondern auf das nicht vollständig subtrahierbare Lösungsmittelsignal zurückzuführen. Desweiteren ist bei Abtastwellenlängen $\lambda_{\text{probe}} < 400$ nm im Zeitbereich der Kreuzkorrelationsbreite ein deutliches Zweiquantenabsorptionssignal sichtbar. Somit sind die Meßdaten erst ab Verzögerungszeiten $t_D \geq 150$ fs zuverlässig auswertbar. Im Abtastwellenlängenbereich um $\lambda_{\text{probe}} = 480$ nm mußten einige Meßkurven aufgrund der starken Streuung des Anregungslichtes und dem daraus resultierenden Rauschen weggelassen werden.

Ebenso wie beim zyklischen APB-Peptid tritt bei der $cis \rightarrow trans$ -Isomerisierung des bityklischen AMPB-Peptids zum ersten Mal in der AMPB-Familie auch auf der Nanosekundenzeitskala eine Dynamik auf. Zu sehen ist dies im Maximum der $trans$ - $\pi\pi^*$ -Bande.

In der $n\pi^*$ -Bande und bei Abtastwellenlängen außerhalb der Grundzustandsabsorption läßt sich das Abklingen der transienten Absorption durch die Verwendung von drei Zeitkonstanten (300 fs, 5.4 ps und 100 ps) anpassen (vgl. Abb. 6.15). Dabei trägt die 300 fs-Zeitkonstante maximal bei 600 nm bei. Die schnellste Dynamik bei bcAMPB ist somit signifikant langsamer

als bei den beiden anderen AMPB-Peptiden. Das Amplitudenspektrum der nächstlangsameren Zeit (5.4 ps) hat ihr Maximum bei $\lambda_{\text{probe}} = 550 \text{ nm}$, das der 100 ps-Komponente liegt bei etwa $\lambda_{\text{probe}} = 510 \text{ nm}$ (vgl. Abb. 6.16 rechts). Der Beitrag der 100 ps-Zeit erreicht in der langwelligen Flanke der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande nochmal ein Maximum ($\lambda_{\text{probe}} = 375 \text{ nm}$). Die in diesem Spektralbereich muß für eine gute Datenanpassung eine 1 ns-Kinetik hinzugenommen werden. Diese Nanosekundenkinetik liefert bei $\lambda_{\text{probe}} = 360 \text{ nm}$ den maximalen Beitrag zu den Transienten.

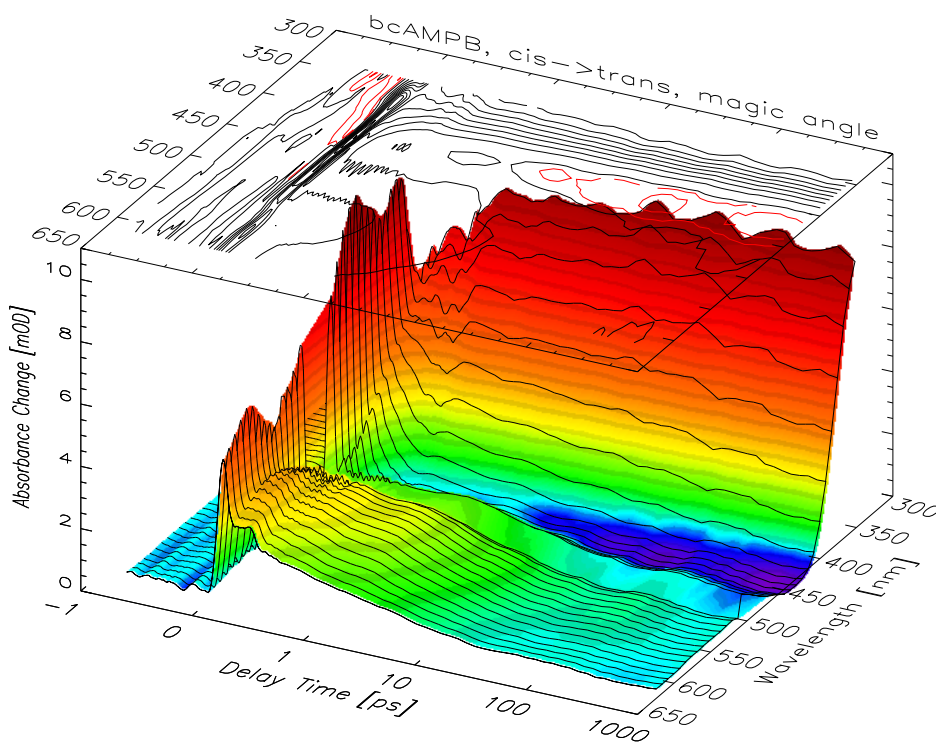


Abbildung 6.15: Femtosekundenmessungen an bicyklischen AMPB-Peptiden (*c*→*t*). Der Signalbeitrag von 10% *trans*-bcAMPB ist herausgerechnet. Zur vollständigen Beschreibung der Transienten sind für den langwelligen Abtastwellenlängenbereich drei Zeitkonstanten (300 fs, 5.4 ps und 100 ps) notwendig. Im Bereich der Grundzustandsbanden benötigt man eine zusätzliche Zerfallszeit von 1 ns. Desweiteren ist ein konstanter Anteil (Zerfallszeit unendlich) notwendig, um die zu langen Verzögerungszeiten verbleibende Absorptionsänderung durch Photoproduktbildung zu modellieren.

Die Amplitudenspektren der beiden schnellsten Zeitkonstanten sind mit denen der anderen Proben vom spektralen Verlauf vergleichbar. Zu berücksichtigen ist, daß das Spektrum der 5.4 ps-Zeit mit dem der 1.3 ps-Zeit von lAMPB und cAMPB verglichen werden muß. Dies bedeutet, daß der zugrunde liegende Prozeß bei bcAMPB langsamer abläuft als bei den Vergleichsproben. Die 100 ps-Kinetik weist ein Spektrum auf, welches in der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande dem der 58 ps-Zeit von lAMPB (*c*→*t*) und auch der 120 ps-Zeit von cAMPB (*t*→*c*) gleicht. Der spektrale Verlauf des Amplitudenspektrums der 180 ps-Zeit von cAMPB (*c*→*t*) in diesem Spektralbereich ist jedoch vollkommen anders. Im Wellenlängenbereich $\lambda_{\text{probe}} \geq 450 \text{ nm}$ hin-

gegen gleichen sich die Amplitudenspektren der genannten Dynamiken von bcAMPB ($c \rightarrow t$) und cAMPB ($c \rightarrow t$). Mögliche Ursachen dafür werden in Abschnitt 7.3.3 diskutiert.

Die Nanosekundenkinetik ist nur im Bereich der $trans\text{-}\pi\pi^*$ -Bande sichtbar. Eine nicht vollständig unterdrückte Rotationsdepolarisation als Ursache für dieses Signal scheidet aus, da ein derartiger Effekt ein Spektrum hervorbringen muß, welches dem der unendlichen Zeitkonstante gleicht (bis auf einen Skalierungsfaktor). Hier ist aber deutlich zu sehen, daß das Maximum des Amplitudenspektrums der 1 ns-Zerfallszeit um mindestens 20 nm gegenüber dem Amplitudenspektrum der ∞ -Zeitkonstante rotverschoben ist.

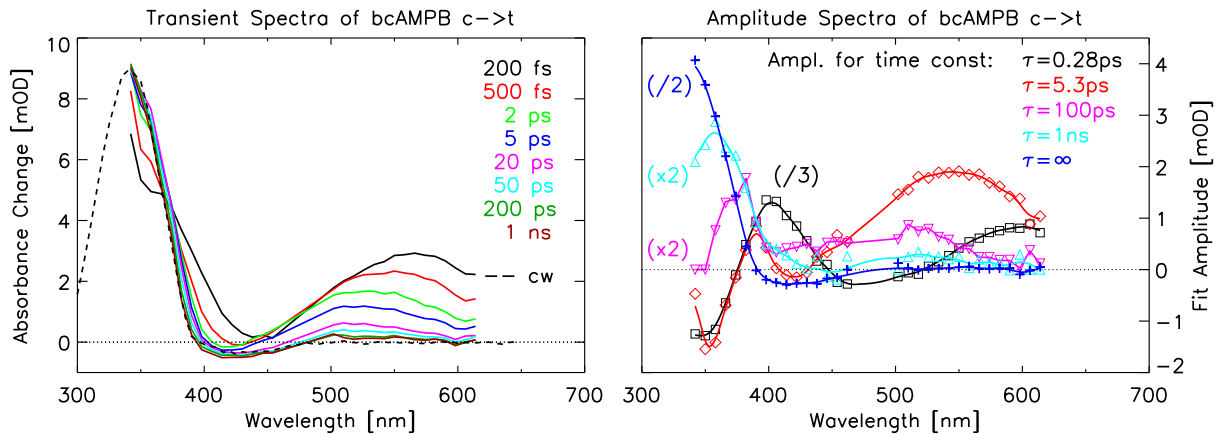


Abbildung 6.16: Transiente Spektren von bityklischen AMPB-Peptiden ($c \rightarrow t$) zu den Verzögerungszeiten $t_D = 0.2, 0.5, 2.0, 5.0, 20, 50, 200 \text{ ps}$ und 1 ns (aus Abb. 6.11). Zusätzlich ist noch das Differenzspektrum gestrichelt eingezeichnet (vgl. Abb. 4.7).

rechts: Anpassung der Meßdaten mittels der Modellfunktion (siehe Abschnitt 46) mit den Zeitkonstanten $\tau = 0.30 \text{ ps}$ (schwarz), 5.4 ps (rot), 100 ps (magenta), 1 ns (türkis) sowie einer ∞ -Komponente (blau). Gezeigt sind die ermittelten Amplituden zu den Zeitkonstanten.

Die transienten Spektren in Abbildung 6.16 (links) zeigen außerhalb der Grundzustandsabsorption das charakteristische Verschieben der transienten Bande, wie dies z.B. auch bei cAMPB beobachtet wurde. Im Bereich der $n\pi^*$ -Bande erkennt man direkt nach der Anregung ($t_D = 200 \text{ fs}$) ein Ausbleichen. In der $trans\text{-}\pi\pi^*$ -Bande entsteht eine Absorptionsbande, deren Maximum knapp außerhalb des Meßbereiches liegt, ebenso wie das Maximum der $trans\text{-}\pi\pi^*$ -Bande des $trans$ -Dauerstrichspektrums (bei 338 nm , vgl. Tab. 4.5). Dieser Aufbau der Absorption ist mit der Produktbildung ($trans\text{-bcAMPB}$) verbunden.

Zusammenfassend kann ausgesagt werden, daß es beim bityklischen AMPB-Peptid sichtbare Auswirkungen der Peptidkette auf die Isomerisierungsreaktion des Chromophores gibt: bei bcAMPB ist für die $trans \rightarrow cis$ -Isomerisierung vor allem die schnellste Kinetik gegenüber den anderen AMPB-Peptiden beschleunigt, in der umgekehrten Reaktionsrichtung ($c \rightarrow t$) verlangsamt. Zusätzlich tritt bei der $cis \rightarrow trans$ -Isomerisierung eine Nanosekündendynamik auf. Ob diese mit einer Faltungsbewegung des Peptidrückgrates in Verbindung gebracht werden kann, wird im nächsten Kapitel diskutiert.

7 Diskussion

Eine Hauptaufgabe dieser Arbeit war es, eine Antwort auf folgende Fragen zu finden:

- Azobenzol hat sich als gut geeigneter, schneller Photoschalter dargestellt [NÄGELE et al., 1997, NÄGELE, 1998]. Bleibt diese Eigenschaft aber auch in den Peptid-Chromophor-Verbindungen erhalten, d.h. schaltet der Chromophor auch nach dem Einbau in ein Peptid noch schnell genug und mit hoher Quantenausbeute?
- Finden die ersten Faltungsvorgänge in kleinen Modellpeptiden auf einer Zeitskala statt, die der Femtosekundspektroskopie zugänglich ist, also innerhalb von etwa einer Nanosekunde?
- Gibt es eine Rückkopplung von der sich bewegenden Aminosäurekette auf den Chromophor, die in VIS-Experimenten sichtbar wird, so daß der Farbstoff neben der Funktion der optischen Triggerung der Faltungsreaktion auch noch als Sonde verwendet werden kann?

Unter der Voraussetzung, daß man die Rückkopplung beobachten kann, würde man aufgrund der NMR-Strukturen (Abb. 4.4 und 4.6) erwarten, daß die durch den Faltungsvorgang verursachten Effekte beim zyklischen APB und beim bizyklischen AMPB am größten sind. Die Auswirkungen im zyklischen AMPB-Peptid sollten geringer sein, da die *trans*-Struktur nicht so restriktiv definiert ist wie bei den beiden anderen Zyklopeptiden. Falls es einen Einfluß der Faltungsdynamik der zyklisierten Aminosäurekette auf den Chromophor gibt, so erwartet man für die linearen Azopeptide deutlich andere Signale als für die jeweiligen Zyklopeptide. Die Antworten auf diese Fragen erfolgen getrennt für die zwei Chromophortypen (APB/AMPB), nachdem zuvor anhand der gemessenen Daten von Azobenzol die dynamischen Eigenschaften des Farbstoffes dargestellt wurden.

Im ersten Teil der Diskussion wird die Dynamik der zu Pseudoaminosäuren umgewandelten „reinen“ Chromophore APB und AMPB im Hinblick auf die Fragestellung untersucht und mit der Dynamik von Azobenzol verglichen. Anschließend folgen jeweils die linearen Peptide als Vorstufen für die zyklischen Moleküle. Ein Vergleich der Transienten der linearen und zyklischen Peptide sollte dann Rückschlüsse auf die Dynamik von Konformationsänderungen zulassen.

Vor Beginn der eigentlichen Diskussion wird schematisch die Isomerisierungsreaktion in einem Potentialflächenbild vorgestellt. Damit soll die Ursache für verschiedene Meßsignalbeiträge erläutert werden.

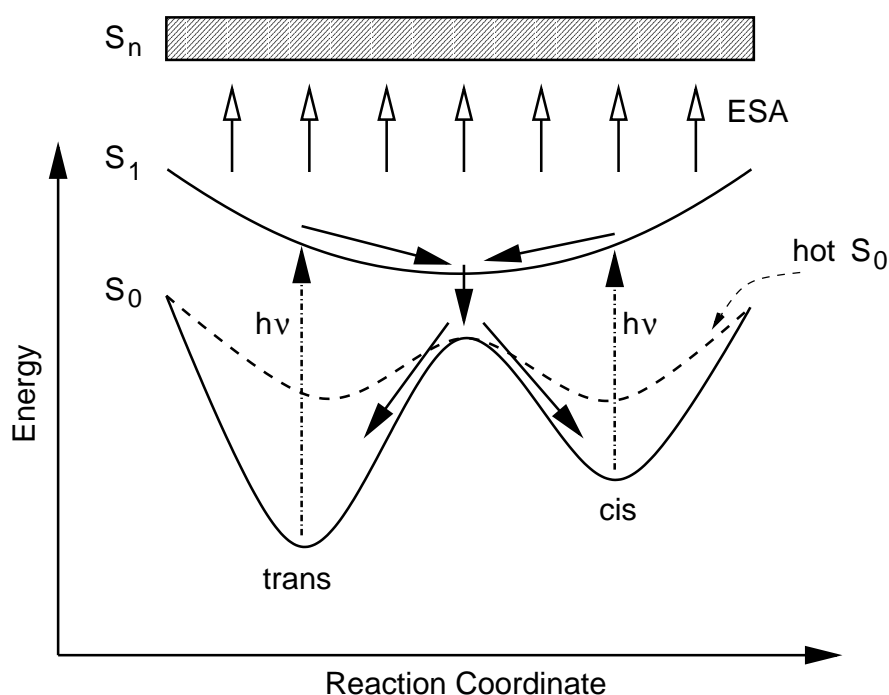


Abbildung 7.1: Einfaches eindimensionales Potentialflächenbild für die Isomerisierungsreaktion: Nach Anregung ($h\nu$) in den ersten angeregten Zustand (S_1) folgt eine Bewegung entlang der Reaktionskoordinate in das Minimum der S_1 -Fläche. Von dort erfolgt die strahlungslose Rückkehr auf die Grundzustandspotentialfläche. Nach der Equilibrierung mit der Umgebung sind die angeregten Moleküle entweder wieder im Ausgangszustand oder isomerisiert und befinden sich im anderen Potentialminimum. Solange das System sich im angeregten Zustand befindet, kann excited-state-Absorption (ESA) sowie stimulierte Emission (nicht eingezeichnet) auftreten.

Die Anregung ($h\nu$) des Moleküls erfolgt aus einem der beiden Minima der Grundzustandspotentialfläche (*trans* bzw. *cis*) auf die Potentialfläche des ersten angeregten Zustandes (S_1). Nach einer Bewegung entlang der Reaktionskoordinate in das Minimum der S_1 -Fläche erfolgt der strahlungslose Übergang auf die S_0 -Potentialfläche und von dort die Rückkehr in eines der beiden Minima der S_0 -Fläche. Die Verweildauer des Moleküls im S_1 -Zustand läßt sich spektroskopisch z.B. mit Hilfe der $S_1 \rightarrow S_n$ -Absorption (ESA¹) bestimmen. Solange sich das Molekül dort befindet, kann es durch die Absorption eines weiteren Photons in höherliegende Zustände (S_n) angeregt werden. Bei Azobenzol z.B. beobachtet man für beide Reaktionsrichtungen eine ausgeprägte $S_1 \rightarrow S_n$ -Absorption im langwelligen Spektralbereich ($\lambda_{\text{probe}} \geq 550 \text{ nm}$). Da die stimulierte Emission einen sehr kleinen Wirkungsquerschnitt besitzt, wird ihr Signalbeitrag von dem der starken excited-state Absorption überdeckt. Gleichzeitig mit der Anregung erhält man außerdem ein Ausbleichen der Absorption aus dem Grundzustand aufgrund der

¹engl. excited state absorption

nun kleineren Besetzungsdichte des Ausgangszustandes. Mit der Rückkehr der Moleküle in die Minima der Grundzustandspotentialfläche geht dieses Ausbleichen wieder zurück bzw. es erscheint eine Photoproduktabsorption.

Nach dem strahlungslosen $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang befindet sich das Molekül in einem „heißen“ Grundzustand (gestrichelt in Abb. 7.1 eingezeichnet), wie er schon mehrfach beobachtet wurde [WILD et al., 1985, KAISER und SEILMEIER, 1987, LÄRMER et al., 1989, HAMM et al., 1997]. Es setzt ein Energieumverteilungsprozeß innerhalb des Moleküls und anschließend auch mit dessen Umgebung ein, bis sich Lösungsmittelmoleküle und gelöster Stoff im thermodynamischen Gleichgewicht befinden. Wirken nach der Rückkehr des Moleküls auf die Grundzustandsfläche externe Zwangsbedingungen, z.B. aufgrund einer mechanischen Spannung, die durch eine Peptidkette verursacht wird, so wird die Grundzustandsenergie angehoben sein. Dies führt solange zu einer Rotverschiebung des Absorptionsspektrums, bis die äußeren Einflüsse verschwinden.

Die Zeitbereiche für Übergänge zwischen elektronischen Zuständen und für Kühlprozesse liegen jeweils im Bereich von wenigen Pikosekunden und überlappen daher teilweise. Deshalb kann in den vorgestellten Amplitudenspektren eine genaue Zuordnung der beobachteten Amplituden zu den zugrundeliegenden Prozessen oft nicht ohne Zusatzinformationen erfolgen. Dies erschwert die detaillierte Interpretation der gezeigten Ergebnisse.

7.1 Azobenzol



Das Verständnis des detaillierten Ablaufs der Photoreaktion von Azobenzol ist mittlerweile weit fortgeschritten, auch wenn bei einzelnen Details noch Unklarheiten bestehen. Die im Rahmen dieser Arbeit aufgenommenen Meßergebnisse sollen im Hinblick auf die nachfolgende Diskussion der Peptiddynamik untersucht und mit veröffentlichten Daten verglichen bzw. in Beziehung gebracht werden. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit nicht die Aufklärung der Azobenzolisomerisierung war, wird im folgenden auf eine Weiterentwicklung des Isomerisierungsmodelles verzichtet. Am Ende des Abschnittes 7.2.3 (Seite 112) sind in Tabelle 7.1 die Quantenausbeuten sowie die aus der Datenanpassung erhaltenen Zeitkonstanten von Azobenzol, lAPB und cAPB aufgelistet.

7.1.1 *trans*→*cis*-Isomerisierung

An den Anfang der Diskussion soll ein Vergleich mit schon bekannten Messungen an *trans*-Azobenzol gestellt werden. Anschließend folgt eine detaillierte Auseinandersetzung mit den in Abschnitt 5.1 vorgestellten Meßergebnissen.

Zeitaufgelöste Messungen bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{pump}} = 435 \text{ nm}$ im Maximum der $n\pi^*$ -Bande, die hier am Lehrstuhl durchgeführt wurden [NÄGELE et al., 1997, NÄGELE, 1998], ergaben ähnliche Kinetiken wie die in Abschnitt 5.1 vorgestellten. Die Ab-

klingszeiten bei den Messungen von Nägele et al. waren mit 320 fs und 2.1 ps etwas kleiner. Die zugehörigen Amplitudenspektren zeigen jeweils ein Maximum bei etwa $\lambda_{\text{probe}} = 530$ nm, an derselben spektralen Position wie die Amplitudenspektren der 440 fs- und 3.3 ps-Kinetik (vgl. Abb. 5.2 rechts). Die starke Absorptionsbande um 400 nm lag bei den Messungen von Nägele außerhalb des untersuchten Spektralbereiches. Die jeweiligen Verhältnisse der Amplituden der schnellen und langsameren Zeitkonstante unterscheiden sich: Für die Daten von Nägele ergibt sich im Maximum bei $\lambda_{\text{probe}} = 530$ nm ein Quotient von etwa 2 („schnell“ zu „langsam“), während er bei den hier vorgestellten Messungen etwa 1.5 beträgt. Weiter im roten Spektralbereich (z.B. $\lambda_{\text{probe}} = 650$ nm) ergibt sich ein Verhältnis von 5 für den Datensatz von Nägele, im Gegensatz zu einem Wert von 1 in dieser Arbeit. Dies bedeutet, daß in den hier vorgestellten *trans*-Azobenzol-Messungen ein größerer Anteil von Molekülen länger auf der S_1 -Potentialfläche verweilt als bei den Experimenten von Nägele et al. Ursache für die leicht anderen Zeitkonstanten und Amplitudenverhältnisse könnte die unterschiedliche Anregungswellenlänge sein. Der Start der Reaktion erfolgt dadurch in einem anderen Bereich des S_1 -Potentialfläche. Dies könnte einen etwas geänderten Reaktionsablauf nach sich ziehen (vgl. unten, Abschnitt 7.1.3).

Lednev et al. beobachten bei einer Anregung in der kurzwelligen Flanke der $n\pi$ -Bande ebenfalls eine biexponentielle Kinetik (600 fs und 2.5 ps). Erfolgte die Anregung allerdings auf der langwelligen Seite des Maximums der $n\pi^*$ -Absorption, so erhielten sie ein monoexponentielles Abklingen der transienten Absorption mit 2.3 ps [LEDNEV et al., 1998b]. Dies steht im Gegensatz zu den in Kapitel 5 vorgestellten Messungen. Diese Diskrepanz könnte zum einen dadurch erklärt werden, daß die eine Messung ($\lambda_{\text{pump}} = 503$ nm) mit einer Zeitauflösung von 500 fs in einem sehr schmalen Wellenlängenbereich ($\lambda_{\text{probe}} = 390 - 420$ nm) durchgeführt wurde. Aufgrund der relativ geringen Zeitauflösung könnte es durchaus sein, daß eine schnellere Kinetik nicht nachgewiesen werden konnte. Zum anderen hatte die zweite derartige Messung ($\lambda_{\text{pump}} = 445$ nm) von Lednev, die vergleichbare Ergebnisse wie die von Nägele et al. ergeben sollte, eine geringere Datenqualität. Dadurch war trotz der ausreichenden Zeitauflösung (180 fs) die schnelle Dynamik nicht sichtbar. Zudem machen Lednev et al. keine Angaben über Konzentrationen und Anregungsenergie-dichten, welche auch ursächlich für die unterschiedlichen Ergebnisse sein können. Das von Lednev angegebene transiente Spektrum, aufgenommen 900 fs nach einer Anregung mit $\lambda_{\text{pump}} = 445$ nm, gleicht qualitativ dem in Abbildung 5.2 gezeigten. Die Signalverhältnisse der beiden Maxima (400 nm und 540 nm) zueinander sind allerdings bei Lednev fast um den Faktor 2 geringer [LEDNEV et al., 1998b, Abb. 3] als im transienten Spektrum bei $t_D = 900$ fs (nicht gezeigt) der Daten aus Abbildung 5.1.

Experimente von Azuma et al. an einem leicht modifizierten Azobenzol² sowie von Lednev et al. an reinem *trans*-Azobenzol ergaben, daß bei einer Anregung in der $\pi\pi^*$ -Bande der Übergang vom zweiten angeregten Zustand in den ersten in weniger als etwa 200 fs stattfinden muß. Der Übergang in den Grundzustand findet dann in einem Zeitbereich von 1 – 10 ps statt [AZUMA et al., 1998, LEDNEV et al., 1998b].

Die transienten Spektren in Abbildung 5.2 zeigen, daß *trans*-Azobenzol in der ersten Piko-

²Azuma et al. haben die Experimente an dem Flüssigkristall *trans*-4-butyl-4'-methoxyazobenzol in Lösung (n-Hexan) durchgeführt.

sekunde nach einer $n\pi^*$ -Anregung ($\lambda_{\text{pump}} = 480\text{ nm}$) außerhalb der Grundzustandsbanden ($530\text{ nm} \leq \lambda_{\text{probe}} \leq 650\text{ nm}$) eine deutliche Absorption aufweist. Eine Rotverschiebung des Grundzustandes kann hierfür nicht die Ursache sein, da einem heißen Grundzustand mit einer typischen Temperatur von 1000K [HAMM et al., 1997] in einfacher Näherung ein etwa 10 nm rotverschobenes Grundzustandsspektrum zugeordnet werden kann. Da *trans*-Azobenzol langwellig von $\lambda_{\text{probe}} = 530\text{ nm}$ nicht mehr absorbiert (vgl. Abb. 4.2), kann die auftretende Absorptionsbande mit einem Maximum um 550 nm nicht durch einen heißen Grundzustand erklärt werden. Einzig verbleibende mögliche Ursache ist eine excited-state Absorption.

Die Amplitudenspektren aus der Datenanpassung der 440 fs- und 3.3 ps-Kinetik (Abb. 5.2, rechts) sind beide im Spektralbereich $\lambda_{\text{probe}} \geq 500\text{ nm}$ positiv. Dies ist, wie eben ausgeführt, dem Verschwinden einer excited-state Absorption zuzuschreiben. Also verläßt ein Teil der angeregten *trans*-Azobenzolmoleküle die S_1 -Potentialfläche mit 440 fs, der Rest mit 3.3 ps. Die Unterschiede zwischen beiden Amplitudenspektren im Bereich der Grundzustandsabsorption weisen aber darauf hin, daß sich die Ausgangszustände der den Kinetiken zugrund liegenden Prozesse an verschiedenen Stellen der S_1 -Fläche befinden müssen. Außerdem fällt auf, daß der Spektralverlauf der Amplituden der langsamen Zeitkonstante (3.3 ps) dem Absorptionsspektrum des Grundzustandes sehr ähnlich ist – allerdings um etwa 80 nm rotverschoben. Diese Ähnlichkeit eines Amplitudenspektrums mit dem Grundzustandsspektrum der Probe ist auch bei allen anderen Proben für die $t \rightarrow c$ -Isomerisierung zu finden.

Erstmals sichtbar wurde bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen eine Kinetik mit 11 ps. Aufgrund des spektralen Verlaufs des Amplitudenspektrums dieser Kinetik und dem Wert der Zeitkonstanten liegt die Vermutung nahe, daß hierbei ein intermolekularer Abkühlprozeß beobachtet wurde (vgl. unten *cis* \rightarrow *trans*-Reaktion).

Die verbleibende Absorptionsänderung zu langen Zeiten $t_D \geq 1\text{ ns}$ bzw. die Notwendigkeit der Verwendung einer ∞ -Zeitkonstanten in der Datenanpassung ist der Photoproduktbildung zuzuschreiben: ein gewisser Bruchteil der angeregten Moleküle ist isomerisiert. Da *cis*-Azobenzol ein anderes Absorptionsspektrum wie *trans*-Azobenzol aufweist und langzeitstabil ist, ist auch bei $t_D = 1\text{ ns}$ noch eine Absorptionsänderung detektierbar. Eine Abschätzung der Isomerisierungsquantenausbeute aus dem Verhältnis von gemessener langlebiger Absorptionsänderung im Maximum der $n\pi^*$ -Bande zu maximal möglichem Signal, wenn 100% der angeregten Moleküle³ isomerisieren würden, ergibt eine Quantenausbeute von $\Psi = 20\%$ (vgl. auch Bemerkungen in Abschnitt 7.2.2). Dies ist in guter Übereinstimmung zu den in der Literatur veröffentlichten Werten (vgl. Tab. 4.1). Ob die Photoisomerisierung nur mit 440 fs bzw. 3.3 ps abläuft oder aber beide Kinetiken auch eine Photoproduktbildung beinhalten, kann anhand der Amplitudenspektren nicht entschieden werden.

³Pro Anregungsimpuls werden 0.8% der im Anregungsvolumen vorhandenen Moleküle angeregt.

7.1.2 *cis*→*trans*-Isomerisierung

Auch die *cis*→*trans*-Isomerisierung wurde schon früher am Lehrstuhl untersucht, allerdings erfolgte die Anregung wiederum bei $\lambda_{\text{pump}} = 435 \text{ nm}$. Damals erhielt man eine dominante Kinetik mit 180 fs und zwei weitere mit einer 0.9 ps-Zeitkonstanten und einer variablen Zeit von 3-20 ps [NÄGELE et al., 1997]. Eine zusätzliche, von Nägele et al. bei größeren Abtastwellenlängen gefundene Dynamik mit einer charakteristischen Zeit von 2.1 ps konnte in den neuen Untersuchungen nicht beobachtet werden. Allerdings könnte dies an den kleinen Signalen nahe der Auflösungsgrenze des Systems liegen. Die Amplitudenspektren der 0.9 ps-Kinetik und der variablen Zeitkonstante von Nägele sind denen der 1.1 ps- und 11 ps-Kinetik (Abbildung 5.5 rechts) vom spektralen Verlauf ähnlich [NÄGELE, 1998]. Auch die Amplitudenverhältnisse (schnell zu langsam) sind bei beiden Messungen vergleichbar.

Im Spektralbereich $\lambda_{\text{probe}} \geq 580 \text{ nm}$ erkennt man sowohl an den transienten Spektren als auch an dem sehr dominanten Amplitudenspektrum der 130 fs-Kinetik (Abb. 5.5), daß die Abnahme der Besetzungsdichte des angeregten Zustandes überwiegend mit der Zeitkonstanten 130 fs geschieht. Ob mit der 130 fs-Kinetik auch eine Photoproduktbildung verknüpft ist, kann mittels des zugehörigen Amplitudenspektrums nicht beurteilt werden. Allgemein erkennt man in Amplitudenspektren eine Absorptionzunahme bei einem Übergang von einem Zustand in den nächsten durch negative Amplituden im entsprechenden Spektralbereich. Mit der Bildung des Photoproduktes *trans*-Azobenzol muß die Absorption im Spektralbereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption ($\lambda_{\text{max}} = 320 \text{ nm}$) relativ zum *cis*-Ausgangszustand stark zunehmen. Bei Azobenzol würde man deshalb für $\lambda_{\text{probe}} \leq 380 \text{ nm}$ negative Werte für die Amplituden der 130 fs-Kinetik erwarten, wenn mit dieser Zeitkonstanten heißes *trans*-Azobenzol gebildet wird. Gleichzeitig mit der Absorptionzunahme durch die Bildung von *trans*-Azobenzol erfolgt aber auch eine Absorptionsabnahme aufgrund der abnehmenden Besetzungsdichte des angeregten Zustandes. Besitzt die excited-state Absorption einen sehr großen Wirkungsquerschnitt, so kann am Rand der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption ($\lambda_{\text{probe}} = 360 - 380 \text{ nm}$) das Signal der abklingenden excited-state Absorption dasjenige der Photoproduktbildung überwiegen. Es sind dann in diesem Wellenlängenbereich positive Amplituden sichtbar.

Der spektrale Verlauf des zehnmal schwächeren Amplitudenspektrums der 11 ps-Kinetik ist charakteristisch für ein Kühlspektrum (vgl. Abb. 5.5). Es liegt somit die Interpretation nahe, daß das mit 130 fs gebildete heiße *trans*-Azobenzol mit 11 ps abkühlt. Im Verlauf des Abkühlvorganges verschiebt sich das Absorptionsspektrum zu kürzeren Wellenlängen hin (vgl. Diskussion der Abb. 7.11). Im Spektralbereich der langwelligen Flanke der $\pi\pi^*$ - und $n\pi^*$ -Absorption erwartet man daher während des Abkühlens eine Absorptionsabnahme. Dies führt in diesem Spektralbereich zu positiven Amplituden der damit verbundenen Zerfallskinetik. Im Abtastwellenlängenbereich der kurzwelligen Flanken der Grundzustandsabsorption sollte hingegen eine Zunahme der Absorption und somit bei der Datenanpassung negative Amplituden auftreten. Genau dieser Vorzeichenwechsel ist im Amplitudenspektrum der 11 ps-Kinetik sichtbar. Im Amplitudenspektrum der 11 ps-Kinetik kann aber noch ein zusätzlicher Beitrag enthalten sein: aufgrund der sehr kleinen Amplituden für $\lambda_{\text{probe}} \geq 550 \text{ nm}$ kann nicht endgültig entschieden werden, ob ein sehr kleiner Bruchteil der angeregten Moleküle die S_1 -Potentialfläche erst nach etwa 11 ps verläßt.

Die Amplituden der 1.1 ps-Kinetik verschwinden im langwelligen Spektralbereich ($\lambda_{\text{probe}} \geq 600\text{ nm}$). Da der angeregte Zustand bei allen anderen untersuchten Proben auch in diesem Wellenlängenbereich absorbiert hat, erscheint es unwahrscheinlich, daß dies bei Azobenzol anders ist. Daher muß die 1.1 ps-Kinetik einen anderen Ursprung als einen $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang besitzen, da sonst auch für $\lambda_{\text{probe}} \geq 600\text{ nm}$ von Null verschiedene Amplituden auftreten müßten. Eine mögliche Ursache ist die intramolekulare Energieumverteilung [KAISER, 1985, KAISER und SEILMEIER, 1987]. Nach dem schnellen Übergang auf die S_0 -Potentialfläche geht die Besetzungsverteilung der Schwingungsmoden des Moleküls von einer nichtthermischen in eine thermische Verteilung über. Am Ende dieses Prozesses kann dem Molekül dann eine interne Temperatur von etwa 1000 K zugeordnet werden [WILD et al., 1985, HAMM et al., 1997]. Das in Verbindung mit dieser Energieumverteilung erwartete Amplitudenspektrum entspricht aber nur begrenzt demjenigen der 1.1 ps-Kinetik von *cis*-Azobenzol. Die 1.1 ps-Kinetik kann daher nicht eindeutig einem bestimmten physikalischen Prozeß zugeordnet werden.

Eine Größenordnung langsamer vollzieht sich der Wärmeaustausch zwischen dem Molekül und dem umgebenden Lösungsmittel (Wärmebad) [KAISER, 1985]. In einem Zeitbereich von 10 – 20 ps kühlt das Molekül auf die Umgebungstemperatur ab [HAMM et al., 1997]. Thomas Nägele hat die für diesen Abkühlvorgang charakteristische Wellenlängenabhängigkeit der zugehörigen Zeitkonstanten nachweisen können und eine variable Zeitkonstante von 3 – 20 ps gefunden [NÄGELE, 1998]. Da die Untersuchung dieser Vorgänge nicht Schwerpunkt dieser Arbeit war, wurden im Rahmen der Auswertung der Meßergebnisse keine variierenden Zeitkonstanten verwendet. Die beobachtete Zeit von 11 ps paßt aber gut zu einem „Mittelwert“ der variablen Zeiten. Theoretische Rechnungen konnten unlängst bestätigen, daß die Energieabgabe des Azobenzols an das Lösungsmittel in diesem Zeitrahmen abläuft [CARSTENS, 2001].

Eine Frage drängt sich nun auf: Warum sieht man diese Thermalisierungs- und Kühlvorgänge bei *trans*-Azobenzol nicht so deutlich? Eine mögliche Antwort ist, daß die durch das Abkühlen hervorgerufenen Absorptionsänderungen klein sind im Vergleich zu denen durch die excited-state- und die Grundzustandsabsorption verursachten. Deshalb wird man den charakteristischen spektralen Verlauf der Amplitudenspektren nur erkennen, wenn keine Absorption in höhere Zustände erfolgen kann. Es darf also im Zeitbereich des Abkühlens keinen $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang geben. Für *cis*-Azobenzol ist dies (weitgehend) erfüllt. Nach dem sehr schnellen Potentialflächenwechsel muß fast die gesamte durch die Anregung deponierte Energie umverteilt werden. Daher kann man sowohl die intra- wie auch die intermolekulare Energieumverteilung beobachten. Angeregte *trans*-Azobenzolmoleküle verweilen hingegen teilweise erheblich länger im angeregten Zustand (3.3 ps). Da in diesem Fall sowohl die intramolekulare Energieumverteilung als auch der $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang auf ähnlichen Zeitskalen ablaufen, wird im zugehörigen Amplitudenspektrum das Thermalisierungssignal von der viel stärkeren Abnahme der excited-state Absorption überdeckt. Vergleicht man aber die Amplitudenspektren der 11 ps-Zeitkonstante von *trans*- und *cis*-Azobenzol, so erkennt man eine ziemlich große Übereinstimmung — ein Hinweis dafür, daß die zugrundeliegenden Prozesse dieselben sind: das intermolekulare Abkühlen erfolgt bei beiden Isomeren mit einer Zeitkonstanten von 11 ps.

Berechnet man die Isomerisierungsquantenausbeute auf die gleiche Weise wie bei *trans*-

Azobenzol, so erhält man $\Psi = 30\%$, wobei 1.1% der Moleküle im Probenvolumen angeregt wurden. Dieser Wert erscheint im Vergleich zu den Literaturwerten ($\Psi_{lit} \approx 50\%$) etwas niedrig. Wie in Abschnitt 7.2.2 näher ausgeführt, beträgt allerdings der relative Fehler der Quantenausbeutebestimmung etwa 50%, so daß innerhalb der Fehlergrenzen eine Übereinstimmung gegeben ist.

7.1.3 Isomerisierungsmechanismus

Ein wichtiger Aspekt bei den photochemischen Eigenschaften von Azobenzol ist der Reaktionsmechanismus. Welche Reaktionswege sind denkbar? Hängen diese von den unterschiedlichen Anregungsbedingungen ab und sind die Modellvorstellungen mit den experimentellen und theoretischen Ergebnissen vereinbar? Hinweise, daß die Verhältnisse komplizierter sind als z.B. bei Stilben, gab es beispielsweise durch eine Analyse der spektralen Abhängigkeit der Quantenausbeuten. Bei einer Anregung in der $n\pi^*$ -Bande ist die Quantenausbeute für beide Reaktionsrichtungen größer als die entsprechende bei $\pi\pi^*$ -Anregung (vgl. z.B. [RAU, 1990] und Referenzen darin). Desweiteren wurde festgestellt, daß auch mit Kronether verbrückte Azobenzole isomerisieren [RAU und LÜDDECKE, 1982, RAU, 1984, LEDNEV et al., 1998a]. Diese Derivate sind sterisch daran gehindert, eine Rotationsbewegung um die N=N-Bindung auszuführen. Zusätzlich stieg die Quantenausbeute dieser modifizierten Azobenzole bei $\pi\pi^*$ -Anregung auf den Wert bei einer $n\pi^*$ -Anregung an. Deshalb wird heute angenommen, daß der Isomerisierungsreaktion je nach Anregungswellenlänge unterschiedliche Isomerisierungsmechanismen zugrunde liegen: der Anregung in der $n\pi^*$ -Bande folgt eine Inversionsbewegung, bei der das Molekül einen semilinearen Zwischenzustand durchläuft. Hingegen erfolgt bei einer Anregung in der $\pi\pi^*$ -Bande eine Rotation eines Phenylringes um die N-N-Bindungsachse [RAU, 1990]. Auch theoretische Berechnungen von Absorptionsspektrum und Resonanz-Raman-Anregungsprofilen der $n\pi^*$ -Bande geben Hinweise auf eine Inversionsbewegung [BISWAS und UMAPATHY, 1995].

Anhand der experimentellen Befunde wurden von Monti et al. sowie Rau et al. theoretische Berechnungen durchgeführt [MONTI et al., 1982, RAU, 1984]. Das Ergebnis waren Potentialkurven, die nach den Computerberechnungen noch so modifiziert wurden, daß die bekannten experimentellen Fakten Berücksichtigung fanden.

In Abbildung 7.2 sind die einfachen eindimensionalen Potentialverläufe für den Grundzustand sowie den ersten und zweiten angeregten Zustand ($n\pi^*$ und $\pi\pi^*$ -Anregung) dargestellt. Dort sind die Ergebnisse von Monti und Mitarbeitern (Inversionsrichtung) und Rau (Rotationsrichtung) vereint. Anhand dieser Potentialdarstellung lassen sich viele beobachtete Ergebnisse erklären: so erfolgt natürlicherweise bei $n\pi^*$ -Anregung eine Inversionsbewegung, da die Rotation durch eine hohe Potentialbarriere verhindert wird. Dagegen beginnt nach einer $\pi\pi^*$ -Anregung erst eine Rotationsbewegung, bis ein Übergang auf die S_1 -Fläche stattfindet und die Reaktion dann entsprechend der Topologie dieser Potentialfläche weiterläuft [MONTI et al., 1982, RAU, 1990, AZUMA et al., 1998, LEDNEV et al., 1998b].

Der $n\pi^*$ -Anregung in den S_1 -Zustand folgt eine Bewegung in Richtung des Potentialmi-

nimums. Die Geschwindigkeit, mit der dieses erreicht wird, hängt auch von der Steigung des Potentials im jeweiligen Franck-Condon-Bereich ab. Bei *trans*-Azobenzol ist die S_1 -Potentialfläche insgesamt flacher als bei *cis*-Azobenzol, woraus für *trans*-Isomere eine langsamere Isomerisierungsreaktion als für *cis*-Isomere folgen sollte. Dies wird für die jeweils schnellste Kinetik der beiden Isomere auch beobachtet. Der strahlungslose Übergang auf die Grundzustandsfläche erfolgt mit der größten Wahrscheinlichkeit im Potentialminimum der S_1 -Fläche, da sich hier die beiden Potentialflächen am nächsten kommen. Mit der Zeit gibt das Molekül dann die noch überschüssige Energie an die Umgebung ab: es kühlt ab.

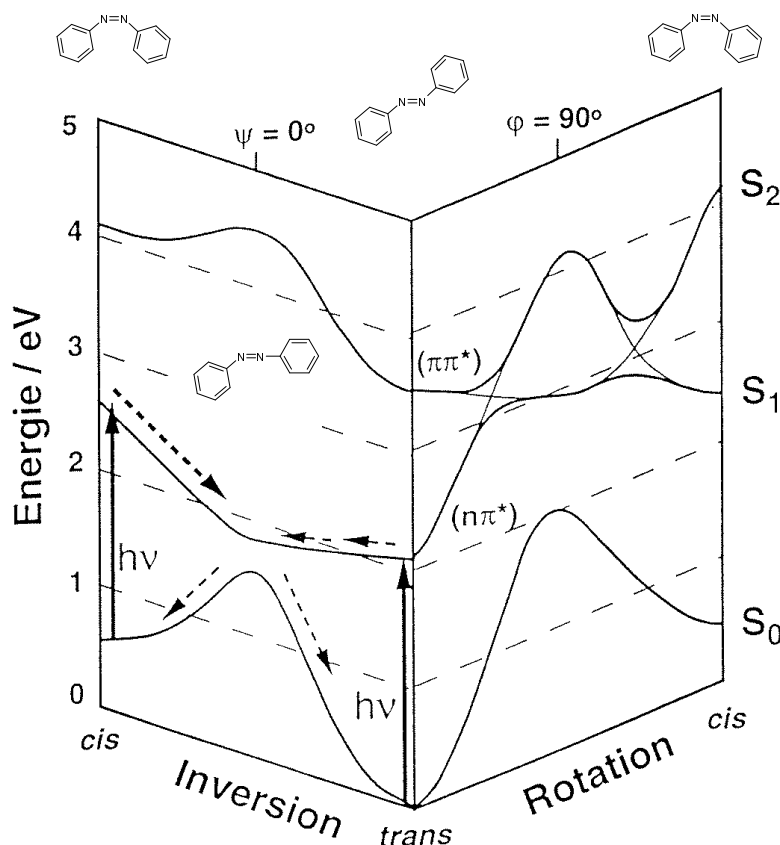


Abbildung 7.2: Eindimensionale Potentialkurvenverläufe für den Grundzustand sowie den ersten und zweiten angeregten Zustand. Die Abbildung vereint die Ergebnisse der Rechnungen von Monti und Mitarbeitern (Inversionsrichtung, [MONTI et al., 1982]) sowie Rau et al. (Rotationsrichtung, [RAU, 1990]). Die Abbildung ist [NÄGELE, 1998] entnommen.

In den letzten Jahren hat sich immer mehr gezeigt, daß diese einfache adiabatische Darstellung verbessert werden kann, indem man ultraschnelle Reaktionen durch Bewegungen auf multidimensionalen Potentialflächen beschreibt [SCHNEIDER et al., 1990]. In diesem Fall können die Potentialflächen der elektronischen Zustände entartet sein. Die Potentialflächen können dann durch einen „Reaktionstrichter“ miteinander verknüpft sein, der einen äußerst schnellen Übergang vom angeregten Zustand in den Grundzustand ermöglicht (koni-scher Schnitt, siehe z.B. [STOCK und DOMCKE, 1993, KLESSINGER, 1995, STOCK, 1995,

SEIDNER und DOMCKE, 1994, SEIDNER et al., 1995]). Dies ist im eindimensionalen adiabatischen Bild nicht möglich, da es dort keine Durchkreuzung von Potentialkurven geben darf.

Für Azobenzol kann man sich den Reaktionsablauf dann so vorstellen: nach der Anregung auf die S_1 -Potentialfläche erfolgt vom Franck-Condon-Bereich aus eine Bewegung auf dieser Fläche in Richtung des lokalen Gradienten. Dieser führt zu einem Minimum, dessen Energie mit der eines Maximums der Grundzustandsfläche entartet ist (konischer Schnitt). Derjenige Teil der Moleküle, der diesen Schnittpunkt direkt trifft, wechselt sehr schnell auf die Grundzustandsfläche. Der andere Teil benötigt mehr Zeit zum „Finden“ des konischen Schnittes und ermöglicht das Auftreten einer langlebigeren excited-state Absorption. Mit diesem Modell läßt sich auch der beobachtete größere Anteil von langsamer reagierenden *trans*-Azobenzolmolekülen bei langwelligeren Anregungswellenlängen im Vergleich zu den Messungen von Nägele et al. verstehen. Je niedriger die Anregungsenergie ist, desto näher am Minimum der S_1 -Fläche erfolgt der $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang, da der energetische Abstand der S_0 - und der S_1 -Potentialfläche zum Minimum der S_1 -Fläche hin abnimmt. Setzt man näherungsweise einen parabelförmigen Potentialverlauf für die Energie des S_1 -Zustandes an, so ist die S_1 -Fläche bezüglich der interessierenden Reaktionskoordinate umso flacher je näher an ihrem Minimum man sich befindet. Somit ist die Franck-Condon-Region umso flacher, je langwelliger die Anregungswellenlänge ist. Die Bewegung in Richtung des Minimums startet daher bei einer langwelligen Anregung nicht so gerichtet auf den konischen Schnitt zu wie bei einer Anregung mit Licht kürzerer Wellenlänge. Die Folge ist, daß im ersten Fall mehr Moleküle den sehr schnellen Übergangsbereich der Potentialflächen „verfehlen“. Das von Lednev et al. beobachtete Verschwinden der sehr schnellen Kinetik (600 fs) bei $\lambda_{\text{pump}} = 503 \text{ nm}$ (vgl. Bemerkung oben und [LEDNEV et al., 1998b]) könnte auch damit erklärt werden, daß bei dieser Wellenlänge nur ein sehr kleiner Teil in sehr kurzer Zeit isomerisiert. Der kleine Signalbeitrag der schnellen, aber nur schwach populierten Spezies könnte es Lednev, in Verbindung mit der schlechten Zeitaufösung, unmöglich gemacht haben, diese schnelle Spezies zu beobachten.

Es sind also noch weitere Experimente notwendig, um eine wirklich detaillierte Beschreibung der Isomerisierungsbewegung von Azobenzol geben zu können. Wahrscheinlich sind mehrere Reaktionskoordinaten an der Isomerisierung maßgeblich beteiligt. Denn eine reine Inversionsbewegung ist aus sterischen Gründen nicht möglich: die beiden Phenylringe würden beim *cis*-Isomer zusammenstoßen. Daher muß noch eine Torsionskoordinate hinzugenommen werden. Diese beschreibt die Drehung um eine N–C-Bindung. Dadurch können sich die Phenylringe gegeneinander verdrehen und das Molekül kann diejenige *cis*-Konfiguration einnehmen, welche in Experimenten gemessen wurde (vgl. Abb. 4.1). Der Hula-Twist-Isomerisierungsmechanismus, der in Abschnitt 4.1.1 schon erwähnt wurde, beinhaltet eine solche Torsionskoordinate [WACHTVEITL et al., 1998].

Zusammenfassung Azobenzol

Azobenzol stellt sich als gut geeigneter Photoschalter dar, um in Modellpeptiden eine (Ent-)Faltungsreaktion zu starten:

- es isomerisiert sehr schnell (440fs und 3.3ps für die *trans*→*cis*- und 130fs für die *cis*→*trans*-Reaktionsrichtung). Beide Isomere haben ihre Reaktion nach spätestens 20ps abgeschlossen.
- die Quantenausbeuten sind relativ hoch.
- die beiden Isomere absorbieren unterschiedlich und sind somit einer selektiven Präparation und spektroskopischen Untersuchung zugänglich.
- Der Farbstoff ist über lange Zeit photostabil.

7.2 Die APB-Familie

7.2.1 Der Chromophor APB

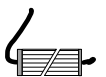


Wie schon weiter oben ausgeführt, wurde der Chromophor APB wegen der spektralen Lage seiner Absorptionsbanden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Am Lehrstuhl wurden allerdings schon früher femtosekundenspektroskopische Untersuchungen von APB durchgeführt, wobei nur die *trans*→*cis*-Reaktion betrachtet wurde [WACHTVEITL et al., 1997]. Die Anregung erfolgte bei $\lambda_{\text{pump}} = 435 \text{ nm}$ in der $\pi\pi^*$ -Bande. Es konnte gezeigt werden, daß auch APB in etwa 1ps mit einer Quantenausbeute von ca. 20% isomerisiert. Desweiteren wurde im Bereich von 3-15ps ein Absorptionssignal gefunden, dessen spektraler Verlauf typisch für das intermolekulare Abkühlen ist (vgl. Diskussion Abschnitt 7.1.2). Es konnte nicht ausgeschlossen werden, daß ein geringerer Teil der APB-Moleküle evtl. erst auf dieser Zeitskala isomerisiert.

Somit war gesichert, daß zumindest für die *trans*→*cis*-Reaktionsrichtung die Eigenschaft, schnell und mit hoher Quantenausbeute zu isomerisieren, erhalten bleibt.

7.2.2 Das Modellpeptid IAPB



Die Untersuchung des linearen APB-Peptides ist ein wichtiger Zwischenschritt auf dem Weg vom bereits vorgestellten Azobenzol zum zyklischen Azopeptid. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß IAPB lichtinduziert isomerisiert. In welchem Zeitbereich dieser Prozeß abläuft, war unbekannt. Am Ende des Abschnittes 7.2.3 (Seite 112) sind in Tabelle 7.1 die Quantenausbeuten sowie die aus der Datenanpassung erhaltenen Zeitkonstanten von Azobenzol, IAPB und cAPB aufgelistet.

trans→*cis*-Isomerisierung

Wie aus Abbildung 5.7 ersichtlich, benötigt man zur Anpassung der Daten sehr ähnliche Zeitkonstanten wie bei *trans*-Azobenzol. Die schnellste Zeitkonstante bei IAPB (390 fs) ist unwesentlich schneller als bei reinem Azobenzol (440 fs). Das Auftreten einer solch schnellen Kinetik bedeutet, daß auch bei der Anregung von IAPB in der $n\pi^*$ -Bande ein Reaktionsschritt der Isomerisierungsbewegung sehr schnell geschieht und/oder ein Bruchteil der angeregten Moleküle vollständig isomerisiert.

Am Auftreten von Amplituden im langwelligen Spektralbereich, welche nur durch eine excited-state Absorption hervorgerufen werden können, erkennt man, daß einige angeregte Moleküle die S_1 -Zustandsfläche erst mit einer Zeitkonstanten von 9.5 ps verlassen. Die negativen Amplituden dieser Zeitkonstante um $\lambda_{\text{probe}} = 360$ nm entstehen durch den Rückgang des Ausbleichsignals aufgrund der Wiederbesetzung des *trans*-Ausgangszustandes. Bei dieser Kinetik beobachtet man also hauptsächlich Moleküle, die nicht isomerisieren, sondern nach der Anregung in den Ausgangszustand zurückkehren. Da das Maximum der Amplituden ($\lambda = 450$ nm) der 9.5 ps-Zeit um 50 nm rotverschoben zu jenem der 3.3 ps-Zeit von Azobenzol ($\lambda = 400$ nm) auftritt und in den Dauerstrichspektren das Maximum der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption ebenfalls bei IAPB um fast 50 nm gegenüber Azobenzol rotverschoben ist, liegt der Schluß nahe, daß die Amplituden dieser Kinetiken bei Azobenzol und IAPB gleichen mit dem Grundzustand verknüpften Prozessen zuzuordnen sind.

Ob zu den Amplitudenspektren der 1.9 ps-Zeitkonstante eventuell zwei Prozesse, die excited-state Absorption im gesamten Spektralbereich und ein Kühlen im Bereich der Grundzustandsabsorption, beitragen, kann anhand der vorliegenden Daten nicht entschieden werden. Der spektrale Verlauf der Amplituden der 1.9 ps-Kinetik legt dergleichen aber nahe.

Das Vorhandensein einer 120 ps-Zeitkonstanten darf nicht überbewertet werden. Die Amplitude ist über den gesamten gemessenen Spektralbereich sehr klein. Vor allem bei $\lambda_{\text{probe}} \geq 550$ nm, wo ein Nachweis der Besetzung des angeregten Zustandes einfach ist, beträgt ihr Anteil nur 1% des Gesamteffektes. Die Ursache für diese Kinetik könnte folgende sein: Nach der Isomerisierung von *trans*-IAPB muß das Phenylalanin an dem einem Ende des Chromophores einen Platz sehr viel näher bei den restlichen Aminosäuren einnehmen wie vor der Isomerisierung (vgl. auch die Strukturformel Tab. 4.3). Möglicherweise beeinflußt das aufgrund von sterischen Behinderungen notwendige Rearrangement des Phenylringes den Chromophor und führt zu der sehr schwachen 120 ps-Kinetik.

Berechnet man aus der in Tabelle 4.5 genannten Konzentration und dem Absorptionsspektrum den Prozentsatz der angeregten Moleküle pro Anregungslichtimpuls, so erhält man 3.6%. Die Isomerisierungsquantenausbeute läßt sich folgendermaßen bestimmen: zuerst berechnet man aus den bekannten Absorptionsspektren der beiden Isomere das Differenzspektrum $D(\lambda) = A_{\text{trans}}(\lambda) - A_{\text{cis}}(\lambda)$. Die Spektren sind dabei auf die Konzentration der *trans*-Probe während der Femtosekundenmessung normiert. Für die maximale Absorptionsdifferenz im Spektralbereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption erhält man somit einen Wert $D(\lambda_{\text{max}})$. Multipliziert man $D(\lambda_{\text{max}})$ mit dem Prozentsatz R der pro Laserlichtimpuls angeregten Moleküle im Anregungsvolumen, so

erhält man eine Größe $d = D(\lambda_{max}) * R$. Diese gibt an, welche Absorptionsänderung man bei der Wellenlänge λ_{max} messen würde, wenn alle angeregten Moleküle isomerisieren würden. Aus den Meßdaten liest man ab, wie groß die Absorptionsänderung bei derselben Wellenlänge zu späten Verzögerungszeiten $\Delta A(t_D \geq 1 \text{ ns}, \lambda_{max})$ ist. Setzt man voraus, daß nach 1 ns jegliche Photoproduktbildung abgeschlossen ist, so kann man die Quantenausbeute durch Division berechnen:

$$\Psi = \frac{\Delta A(t_D \geq 1 \text{ ns}, \lambda_{max})}{d}$$

Hier ist jedoch Vorsicht geboten! Ist das zur Berechnung von d verwendete Differenzspektrum so skaliert wie oben gefordert, dann dürfen zur Bestimmung von $\Delta A(t_D \geq 1 \text{ ns}, \lambda_{max})$ die in dieser Arbeit abgebildeten Daten nicht direkt verwendet werden. Denn wie in der Einleitung zu Kapitel 5 beschrieben wurde, sind die Daten für die Abbildungen aus Gründen der Vergleichbarkeit so skaliert, daß $A_{trans}(480 \text{ nm}) = 0.05$ bei einer Schichtdicke von 0.5 mm gilt (vgl. Seite 63). Vor der Weiterverwendung der aus den Abbildungen abgelesenen Werte müssen diese auf die Konzentration der Probe bei den Femtosekundenmessungen reskaliert werden. Die größten Fehlerquellen bei der Berechnung der Quantenausbeuten resultieren aus nur ungenau bekannten Konzentrationen der Proben, wodurch auch der Prozentsatz R einen entsprechenden Fehler aufweist. Ebenfalls mit großen Fehlern behaftet sind die Absorptionsspektren $A_{trans}(\lambda)$ und $A_{cis}(\lambda)$ im Spektralbereich der $n\pi^*$ -Absorption. Daher ist der relative Fehler der nach obiger Methode berechneten Quantenausbeute etwa $\frac{\Delta\Psi}{\Psi} = 50\%$.

Zur Überprüfung der berechneten Quantenausbeuten läßt sich auf einem anderen Weg eine obere Schranke Ψ_{max}^{TS} für die Quantenausbeute bestimmen⁴. Nimmt man an, daß im Bereich der $trans-\pi\pi^*$ -Absorption der Wirkungsquerschnitt der excited-state Absorption Null ist, so ist der Quotient aus der Absorptionsänderung zu sehr frühen Verzögerungszeiten $t_D = 200 \text{ fs}$ und derjenigen bei $t_D = 1 \text{ ns}$ gleich der Quantenausbeute. Berechnet man dieses Verhältnis für die Wellenlänge λ_{max} mit dem größten Effekt im Bereich der $trans-\pi\pi^*$ -Absorption, so erhält man:

$$\Psi_{max}^{TS} = \frac{\Delta A(t_D \geq 1 \text{ ns}, \lambda_{max})}{\Delta A(t_D = 200 \text{ fs}, \lambda_{max})}$$

Da beide Absorptionsänderungen aus demselben Datensatz gewonnen werden und die absolute Skalierung der Meßdaten nicht in die Größe Ψ_{max}^{TS} eingeht, ist ihr relativer Fehler sehr gering und beträgt etwa $\frac{\Delta\Psi_{max}^{TS}}{\Psi_{max}^{TS}} = 5\%$. Dies heißt, daß die so berechnete obere Schranke einen sehr restriktiven Grenzwert darstellt. Will man die Annahme aufgeben, daß der Wirkungsquerschnitt der excited-state Absorption Null ist, so steht man vor dem Problem, welche Absorptionsänderung die excited-state Absorption bei der Wellenlänge λ_{max} zu frühen Verzögerungszeiten hervorruft. Als einfache Näherung bietet es sich an, den maximalen Wert der Absorptionsänderung $\Delta A(t_D = 200 \text{ fs}, \lambda_{max}^{rot})$ im Wellenlängenbereich außerhalb der Grundzustandsabsorption zu verwenden. Denn in diesem Wellenlängenbereich wird das Meßsignal zu frühen Verzögerungszeiten nur durch die $S_1 \rightarrow S_n$ -Absorption der angeregten Moleküle hervorgerufen. Eine

⁴Das 'TS' steht für transientes Spektrum.

Abschätzung der Quantenausbeute berechnet sich dann mit

$$\Psi^{TS} = \frac{\Delta A(t_D \geq 1 \text{ ns}, \lambda_{max})}{\Delta A(t_D = 200 \text{ fs}, \lambda_{max}) - \Delta A(t_D = 200 \text{ fs}, \lambda_{max}^{rot})}$$

Der Wert Ψ^{TS} ist meist etwas zu groß, da die näherungsweise verwendete Absorptionsänderung $\Delta A(t_D = 200 \text{ fs}, \lambda_{max}^{rot})$ für die excited-state Absorption bei λ_{max} eher zu klein ist.

Für die c→t-Reaktionsrichtung läßt sich die Methode der Quantenausbeuteberechnung aus den transienten Spektren (Ψ_{max}^{TS} und Ψ^{TS}) nicht einsetzen, da das Ausbleichen des Grundzustandes in der *cis*- $\pi\pi^*$ -Bande ($\lambda_{max} = 270 \text{ nm}$) untersucht werden müßte. Diese Wellenlänge liegt aber weit außerhalb des untersuchten Spektralbereiches.

Wendet man das beschriebene Verfahren auf die Meßdaten von IAPB (t→c) an, so erhält man die zueinander konsistenten Werte $\Psi \approx 7\%$, $\Psi_{max}^{TS} = 20\%$ und $\Psi^{TS} = 11\%$. Diese Ergebnisse zeigen, daß die *trans*→*cis*-Isomerisierungsquantenausbeute von IAPB einen Faktor 3 kleiner ist als die von reinem *trans*-Azobenzol, sowie einen Faktor 2 kleiner als jene von *trans*-APB.

Die Ursache der Reduktion der Isomerisierungsquantenausbeute ist die zusätzliche Masse an den Enden des Chromophores. Dies erklärt sich folgendermaßen: Der angeregte *trans*-Chromophor beginnt die Isomerisierungsbewegung. Diese initiale Kinetik ist sogar etwas schneller als bei Azobenzol. Sehr bald aber verlangsamt sich die mit der Isomerisierung verbundene Geometrieänderung, da die Aminosäuren durch den Chromophor mitbewegt werden müssen. Diese Verlangsamung der Bewegung in Richtung des Minimums (S_1) sowie eine eventuelle Veränderung des Reaktionspfades auf der S_1 -Potentialfläche hat zur Folge, daß die Wahrscheinlichkeit steigt, schon vor dem Erreichen des Potentialminimums auf die S_0 -Fläche zu wechseln. Dort angelangt, gibt es aber nur eine mögliche Reaktionsrichtung und die führt zurück in den *trans*-Ausgangszustand: die Quantenausbeute ist erniedrigt.

Da das Verhältnis der Anzahl der Aminosäuren an den Enden des Chromophores 1:7 beträgt, wird sich aufgrund der geringeren Massenträgheit hauptsächlich jenes Ende bewegen, an dem sich nur eine Aminosäure befindet. Ein interessantes Experiment, welches die These unterstützen würde, daß die Massenträgheit für den Rückgang der Quantenausbeute verantwortlich ist, wäre die Untersuchung eines Linearpeptides mit einem Aufteilungsverhältnis der Aminosäuren von 4:4. Da dann beide Enden des Chromophores gleich stark behindert sind und sich langsamer bewegen werden als mit nur einer Aminosäure, sollte die Quantenausbeute bei einer derartigen Probe gegenüber dem Wert $\Psi = 7\%$ nochmals reduziert sein.

cis→*trans*-Isomerisierung

Die für IAPB beobachteten Kinetiken (380 fs, 3.4 ps, 33 ps) unterscheiden sich bei der c→t-Reaktionsrichtung erheblich von jenen für Azobenzol. Die schnellste Dynamik ist bei IAPB (c→t) fast einen Faktor 3 langsamer als bei Azobenzol. Möglicherweise ist dies eine Auswirkung der höheren Massenträgheit aufgrund der Aminosäuren. Allerdings erfolgte bei der

$t \rightarrow c$ -Isomerisierung auch keine dramatische Verlangsamung der schnellsten Kinetik. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist eine geänderte Steigung der S_1 -Potentialfläche in der Frank-Condon-Region. Durch das Anbringen des N- und C-Terminus an das Azobenzol könnte die Steigung der S_1 -Potentialfläche gegenüber *cis*-Azobenzol reduziert sein. Da aber keine Erkenntnisse über die Dynamik von *cis*-APB vorliegen, kann hier keine endgültige Aussage darüber getroffen werden, ob auch bei APB ($c \rightarrow t$) schon eine Verlangsamung der schnellsten Kinetik auftritt oder ob diese durch die Aminosäuren verursacht ist.

Vor allem die Amplitudenspektren der Zeitkonstanten 380 fs und 33 ps weisen im Bereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande ($\lambda_{\text{probe}} \leq 400$ nm) eine zum Dauerstrichdifferenzspektrum sehr ähnliche Form auf. Das negative Vorzeichen in diesem Wellenlängenbereich bedeutet einen Anstieg der Absorption, d.h. die Bildung eines Zustandes, der – zumindest in der $\pi\pi^*$ -Bande – wie *trans*-IAPB absorbiert. Somit liegt es nahe, dies als Photoproduktbildung von *trans*-IAPB zu interpretieren. Dies heißt, daß die Bildung von *trans*-IAPB auf drei Zeitskalen stattfindet. Dieses Verhalten ist völlig anders als bei Azobenzol. Dort gibt es nur eine sehr schnelle, extrem dominante Kinetik (130 fs), die für die Bildung von *trans*-Azobenzol in Frage kommt. Die Aussage, daß auch die 33 ps-Kinetik einen $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang beschreibt, wird gestützt durch den im zugehörigen Amplitudenspektrum bei $\lambda_{\text{probe}} \geq 550$ nm sichtbaren Beitrag der excited-state Absorption. Die $S_1 \rightarrow S_n$ -Absorption ist nicht mehr so langwellig wie bei den schnelleren Dynamiken. Dies läßt sich wie folgt erklären: je mehr Zeit nach der Anregung vergeht bevor der Übergang in den Grundzustand stattfindet, desto mehr überschüssige Energie konnte das Molekül bereits an das Lösungsmittel abgeben. Damit verbunden erwartet man eine Blauverschiebung der Absorption des angeregten Zustandes. Exakt dies beobachtet man bei den Amplituden der drei Zeitkonstanten. Das anfängliche Maximum des Amplitudenspektrums der 380 fs-Zerfallszeit bei $\lambda_{\text{probe}} = 600$ nm verschiebt sich um 70 nm auf etwa 530 nm (3.4 ps-Kinetik). Dann wandert das Amplitudenmaximum nur mehr 30 nm zu $\lambda_{\text{probe}} = 500$ nm (33 ps-Kinetik). Das erst schnelle und dann langsamere Verschieben (vgl. auch die transienten Spektren in Abb. 5.9 links) paßt zu der Tatsache, daß die Energieabgabe an das Lösungsmittel erst schnell (bei großem „Temperaturunterschied“ zwischen Molekül und Umgebung) geschieht und dann immer langsamer wird.

Mit den in Tabelle 4.5 genannten Daten berechnet sich der Anteil der pro Anregungslichtimpuls angeregten Moleküle im Anregungsvolumen zu $R = 3.9\%$. Hiermit berechnet sich nach der bei der $t \rightarrow c$ -Isomerisierung beschriebenen Methode eine Quantenausbeute $\Psi = 44\%$. Diese ist somit im Rahmen der Fehlergrenzen gleich groß wie jene von *cis*-Azobenzol. Eine obere Schranke für die Quantenausbeute wie bei *trans*-IAPB läßt sich aufgrund der spektralen Gegebenheiten von *cis*-IAPB mit den vorhandenen Daten nicht ermitteln.

Zusammenfassung IAPB

Es konnte nachgewiesen werden, daß die lineare Vorstufe IAPB die $t \rightarrow c$ - sowie die $c \rightarrow t$ -Isomerisierung immer noch innerhalb von Pikosekunden durchführt. Die Reaktionen zeigen allerdings deutlich multiexponentiellen Charakter ($t \rightarrow c$: 390 fs, 1.9 ps, 9.5 ps; $c \rightarrow t$: 380 fs, 3.4 ps, 33 ps). Ursache dieser Multiexponentialität ist die Massenträgheit der Aminosäurekette.

Je nach der momentanen Konformation der Aminosäurekette ist ein Erreichen jenes Bereiches auf der S_1 -Fläche, von dem ein Übergang auf die Grundzustandpotentialfläche erfolgen kann, schneller oder aber langsamer möglich.

Die schnellste Kinetik der $t \rightarrow c$ -Reaktion von IAPB (390 fs) ist gegenüber Azobenzol (440 fs) leicht beschleunigt. Für die $c \rightarrow t$ -Reaktion ergibt sich eine Verlangsamung der schnellsten Kinetik von 130 fs (Azobenzol) auf 380 fs (IAPB). Der Schluß, daß aufgrund der Beschleunigung ($t \rightarrow c$) bzw. Verlangsamung ($c \rightarrow t$) der schnellsten Kinetik auch die Quantenausbeuten relativ zu Azobenzol erhöht ($t \rightarrow c$) bzw. erniedrigt ($c \rightarrow t$) sein sollten, ist allerdings nicht richtig. Denn die Isomerisierungsquantenausbeute ist für die $t \rightarrow c$ -Richtung gegenüber Azobenzol signifikant reduziert ($\Psi = 7\%$), für die $c \rightarrow t$ -Richtung ($\Psi = 44\%$) allerdings im Rahmen der Fehlergrenzen identisch zu jener von Azobenzol. Dies bedeutet, daß die Reaktionsgeschwindigkeit in den ersten paar hundert Femtosekunden nicht mit der Isomerisierungsquantenausbeute gekoppelt ist. Vielmehr zeigt der multiexponentielle Charakter der Dynamiken, daß die Aminosäuren für beide Isomerisierungsrichtungen zu einer erheblichen Verzögerung des $S_1 \rightarrow S_0$ -Überganges führen. Somit bleibt als Erklärung für die beobachteten Quantenausbeuten nur eine Änderung der Beschaffenheit der S_1 -Potentialfläche. Auf dem Weg von der *trans*-Franck-Condon-Region ins globale Minimum der S_1 -Fläche müssen mehr kinetische Fallen (lokale Minima) bzw. Gelegenheiten für einen $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang existieren als auf dem Reaktionspfad der angeregten *cis*-Moleküle. Die angeregten *cis*-IAPB-Moleküle erreichen das globale Minimum der S_1 -Fläche vielleicht etwas verzögert gegenüber Azobenzol, wechseln aber erst dort auf die S_0 -Fläche über: die Isomerisierungsquantenausbeute ist ähnlich zu jener von *cis*-Azobenzol. Für *trans*-IAPB eröffnen sich mehr Möglichkeiten als für *trans*-Azobenzol, frühzeitig auf die Grundzustandpotentialfläche zu wechseln: die Quantenausbeute ist reduziert.



7.2.3 Das Modellpeptid cAPB

Mithilfe dieser Probe sollte die spannende Frage bzgl. der Sichtbarkeit von Konformationsdynamik in Modellpeptiden beantwortet werden. Es stellte sich heraus, daß dieses zyklische Peptid sehr wohl photoinduziert Konformationsübergänge vollzieht, welche aufgrund von Rückwirkungen auf den Chromophor in pump-probe-Experimenten im sichtbaren Spektralbereich erkennbar sind.

Von den NMR-Strukturuntersuchungen (vgl. Abschnitt 4.4.2) war bekannt, daß ein Konformationsübergang nach der lichtinduzierten Isomerisierung des Chromophores stattfindet. Für die Begriffsdefinition von „Faltung“ und „Entfaltung“ sind jedoch zwei Sichtweisen möglich. Zum einen gibt es die physikalisch-entropische Sichtweise von Faltung. In diesem Bild steht der Begriff Faltung für einen Übergang von einem Zustand mit großem zugänglichen Konformationsraum (=große Anzahl von möglichen Konformationen) zu einem Zustand mit einer gegenüber dem Ausgangszustand eingeschränkten Anzahl von Konformationen. Für Proteine im allgemeinen bedeutet Faltung also den Übergang von nicht-nativen Zuständen zur nativen Struktur. Auf das zyklische Azopeptid cAPB angewendet, muß man beim *cis* \rightarrow *trans*-

Übergang von einer lichtinduzierten Faltung sprechen, da für diese Reaktionsrichtung eine Einschränkung des Konformationsraumes erfolgt (vgl. NMR-Struktur, Abb. 4.4). Auf der anderen Seite gibt es eine biologische Sichtweise, bei welcher sich der Begriff Faltung durch das Ausbilden von Sekundär-/Tertiärstrukturelementen definiert. Für „normale“ Proteine entspricht der Prozeß der Faltung also wieder dem Aufbau der nativen räumlichen Struktur. Bei den in dieser Arbeit untersuchten zyklischen Peptiden ist in der biologischen — und intuitiven — Sichtweise aber der *trans*→*cis*-Übergang als Faltung zu bezeichnen, da das Peptid für diese Reaktionsrichtung Sekundärstrukturelemente ausbildet (vgl. NMR-Struktur und [RANKA et al., 2000b]). Somit ist für die zyklischen Peptide die Definition von Faltung in der physikalisch-entropischen und der biologischen Sichtweise genau entgegengesetzt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit findet die biologische Definition von Faltung Anwendung.

Von den NMR-Strukturuntersuchungen ist bekannt, daß cAPB reversibel eine lichtinduzierte Faltungs-/Entfaltungsreaktion durchführen kann. Zudem lieferten die Experimente am linearen APB-Peptid den Beweis, daß der Chromophor in dieser linearen Vorstufe immer noch sehr schnell isomerisiert (vgl. vorangegangener Abschnitt). Zusammen mit der Tatsache, daß die Absorptionsspektren von linearem und zyklischem Peptid nahezu identisch sind (vgl. Abb. 4.5), waren gute Voraussetzungen für einen Vergleich von Femtosekundenmessungen an den beiden Peptiden vorhanden. Die Gleichheit der Dauerstrichspektren kann, in Übereinstimmung mit den NMR-Daten, so interpretiert werden, daß im stationären *trans*- bzw. *cis*-Zustand keine signifikante Verzerrung des Azobenzoles vorhanden sein kann, da diese eine unterschiedliche Lage der $n\pi^*$ - und $\pi\pi^*$ -Banden bewirken sollte. Derartige Veränderungen sind aber in den Spektren nicht erkennbar.

Am Ende des Abschnittes 7.2.3 (Seite 121) sind in Tabelle 7.1 die Quantenausbeuten sowie die aus der Datenanpassung erhaltenen Zeitkonstanten von Azobenzol, IAPB und cAPB aufgelistet.

trans→*cis*-Isomerisierung

Wie an Abbildung 5.11 ersichtlich ist, benötigt man zur Anpassung der Daten, ebenso wie im Falle des Linearpeptids, vier Zerfallszeiten (260 fs, 1.2 ps, 7.7 ps, 100 ps). An den Ergebnissen fällt folgendes auf: zum einen ist die schnellste Kinetik um 30% schneller als im nichtzyklischen Peptid. Die Ursache hierfür könnte eine leichte mechanische Vorspannung des Chromophores sein, welche die initiale Reaktion beschleunigt. Erklärbar ist diese mechanische Vorspannung dadurch, daß die Aminosäurekette durch den Farbstoff in eine sehr gestreckte Konformation gezwungen wird (vgl. Abb. 4.4.2). Allerdings kann die durch die Aminosäurekette ausgeübte Kraft auf den Chromophor nicht sehr groß sein. Denn wäre der *trans*-Zustand durch die mechanische Vorspannung energetisch über den *cis*-Zustand angehoben (vgl. Abb. 7.1), dann müßte der *cis*-Zustand die thermisch langzeitstabile Konformation sein, was Renner et al. widerlegen konnten [RENNER et al., 2000a]. Dies heißt, daß auch in den zyklischen Peptiden gilt: $E_{trans} < E_{cis}$.

In Abbildung 7.3 sind die Transienten von IAPB und cAPB für die *trans*→*cis*-Reaktions-

richtung für vier Abtastwellenlängen gegenübergestellt: eine Transiente im Maximum der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande ($\lambda_{\text{probe}} = 366\text{ nm}$), eine in der langwelligen Flanke der $n\pi^*$ -Bande ($\lambda_{\text{probe}} = 504\text{ nm}$), eine knapp außerhalb der Grundzustandsbanden ($\lambda_{\text{probe}} = 552\text{ nm}$) und eine bei $\lambda_{\text{probe}} = 608\text{ nm}$ weit rotverschoben zur Grundzustandsabsorption. Die Transienten sind so normiert, daß die Absorptionsänderung kurz nach der Anregung ($t_D = 150\text{ fs}$) jeweils für beide Proben gleich groß ist. Dadurch werden nachfolgende Unterschiede in den Kinetiken deutlicher sichtbar. An den Kurven erkennt man, daß in den ersten paar hundert Femtosekunden das zyklische Peptid (rote Kurven) über einen weiten Spektralbereich eine schnellere Dynamik zeigt als das lineare (schwarze Kurven).

Somit kann davon ausgegangen werden, daß von der Peptidkette auf den Chromophor ein leichter Zug ausgeübt wird, der die Isomerisierungsbewegung begünstigt. Hierfür sprechen noch zwei weitere experimentelle Befunde: die relativ zum Gesamteffekt größere Amplitude der schnellsten Zeitkonstante sowie die Auswertung der Quantenausbeuten.

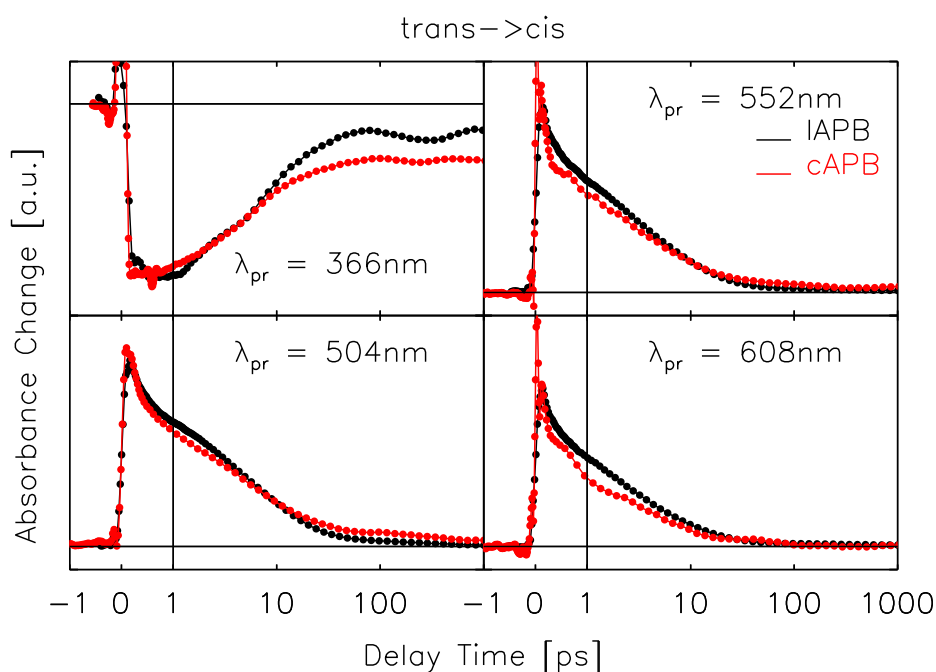


Abbildung 7.3: Vergleich von Transienten des linearen und zyklischen APB-Peptides für die Reaktionsrichtung *trans*→*cis* bei vier ausgewählten Abtastwellenlängen. Die Meßkurven sind so normiert, daß die Unterschiede in den Kinetiken besonders gut sichtbar werden.

Die schnellste Kinetik, die bei Azobenzol mit der Isomerisierung verknüpft wird (siehe Abschnitt 7.1), weist bei cAPB eine doppelt so hohe Amplitude auf wie bei IAPB. Ein doppelt so großer Absorptionsquerschnitt der excited-state Absorption als Ursache der größeren Amplitude bei cAPB scheint unwahrscheinlich. Denn im gesamten Spektralbereich ist das Verhältnis der Amplituden der schnellsten Kinetiken (cAPB zu IAPB) etwa 2:1. Die optischen Eigenschaften der höher angeregten Zustände von IAPB und cAPB müssen sich daher stark

unterscheiden. Die Unterschiede in den Potentialflächen von lAPB und cAPB müßten sich zufällig so einstellen, daß der Wirkungsquerschnitt für eine $S_1 \rightarrow S_n$ -Absorption unabhängig von der Wellenlänge bei cAPB doppelt so groß ist wie bei lAPB. Zusätzlich dürfen der $S_0 \rightarrow S_1$ - und $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang nicht verändert sein, da die Absorptionsspektren von *trans*-lAPB und *trans*-cAPB identisch sind (vgl. Abb. 4.5). Daher muß das beschriebene Amplitudenverhältnis so interpretiert werden, daß der Anteil der in dieser Zeit isomerisierenden Moleküle erheblich größer ist als bei lAPB. Die Aussage der „unterstützten Isomerisierung“ wird durch die Quantenausbeuten untermauert. Pro Anregungslichtimpuls werden 3.2% der Moleküle im betrachteten Volumen angeregt. Nach dem in Abschnitt 7.2.2 beschriebenen Verfahren berechnet sich die Isomerisierungsquantenausbeute zu $\Psi = 26\%$, knapp vier mal so groß wie bei lAPB. Die Abschätzung der Quantenausbeute anhand der transienten Spektren ergibt $\Psi_{max}^{TS} = 32\%$ sowie $\Psi^{TS} = 21\%$. Somit kann man mit Sicherheit sagen, daß die Quantenausbeute der *trans*→*cis*-Reaktion für cAPB signifikant größer ist als die von lAPB.

Wie kann der Anstieg der Isomerisierungsquantenausbeute bei cAPB relativ zu lAPB erklärt werden? Die natürliche und logische Fortsetzung der bei lAPB eingeführten Modellvorstellung gibt die Lösung. Die Reduktion der Quantenausbeute bei lAPB gegenüber Azobenzol war durch das Vorhandensein von kinetischen Fallen sowie der langsamen Bewegung auf der S_1 -Potentialfläche begründet worden. Die Zyklisierung bei cAPB führt zu einer Veränderung der S_1 -Fläche: zum einen ist die initiale Reaktion erheblich beschleunigt. Zum anderen müssen die bei lAPB vorhandenen lokalen Minima bei cAPB entweder schwächer ausgeprägt oder sogar vollkommen verschwunden sein. Daher erreicht der Chromophor von cAPB im Laufe des Isomerisierungsvorganges eine ähnliche Region auf der S_1 -Fläche wie *trans*-Azobenzol. Dies hat zur Folge, daß sich auch die Isomerisierungsquantenausbeute von cAPB wieder der von Azobenzol angleicht.

Vergleicht man die beiden Zeitkonstanten 1.2 ps und 7.7 ps mit denen von lAPB (1.9 ps und 9.5 ps), so erkennt man, daß in cAPB beide etwas kleiner sind. Die zugehörigen Amplituden zeigen im langwelligen Spektralbereich eine excited-state Absorption an. Somit sind diese Zerfallskinetiken auch mit einem $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang verknüpft. Die Form der Amplitudenspektren der 1.2 ps- und 7.7 ps-Kinetik in der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande gleicht der des *trans*-Absorptionsspektrums von cAPB. Dies weist auf einen Rückgang des Ausbleichsignals und somit auf eine zumindest teilweise Rückbesetzung des *trans*-Grundzustandes mit diesen Zeitkonstanten hin. Die kleineren Werte der Zeitkonstanten zeigen auch, daß der Chromophor in cAPB quasi zum Übergangsbereich der beiden Potentialflächen geführt wird. Die mögliche Isomerisierung läuft hier also schneller als bei lAPB ohne Einflüsse des zyklisierten Peptids. Es muß allerdings betont werden, daß sich der „Führungseffekt“ auf diese beiden Zeitkonstanten erheblich geringer auswirkt als bei der schnellsten Kinetik.

Ebenso wie bei lAPB tritt auch bei cAPB eine Absorptionsänderung im Bereich von 100 ps auf. Ein Vergleich des Amplitudenspektrums der 100 ps-Zeit von cAPB mit dem der 33 ps-Zeitkonstanten von lAPB (c→t) liefert eine große Übereinstimmung der beiden Spektren. Wie in Abschnitt 7.2.2 diskutiert, beschreibt dieses Signal die langsame Besetzung des *trans*-Grundzustandes ausgehend von einem vibronisch „abgekühlten“ S_1 -Zustand. Anders als bei lAPB (c→t) bedeutet aber die Bildung einer *trans*-Absorption hier eine Rückbesetzung des

Ausgangszustandes, d.h. man beobachtet eine Verlustreaktion, welche die Isomerisierungsquantenausbeute reduziert. Es gibt zwei Gründe, warum man die Verlustreaktionen bei der $t \rightarrow c$ -Isomerisierung sehr gut sehen kann, während sie bei der entgegengesetzten Reaktionsrichtung ($c \rightarrow t$) weitgehend verborgen bleibt. Zum einen ist die Quantenausbeute für die $t \rightarrow c$ -Isomerisierung geringer als für die $c \rightarrow t$ -Isomerisierung. Dies heißt, daß bei einer Anregung von N *trans*-Molekülen eine größere Anzahl dieser Moleküle wieder in den Ausgangszustand zurückkehren als bei der Anregung von N *cis*-Isomeren. Zum anderen besitzt nur der *trans*-Zustand im untersuchten Spektralbereich einen charakteristischen Verlauf des Absorptionsspektrums (die $\pi\pi^*$ -Absorptionsbande), so daß die Bildung von *trans*-Isomeren eindeutig erkennbar ist. Aus der Größe der Amplitude der 100ps-Zeit im Maximum der $\pi\pi^*$ -Bande ($\lambda_{\text{probe}} = 366\text{nm}$) relativ zum maximalen Ausbleicheffekt bei einer Anregung von 3.2% der Moleküle im Anregungsvolumen ergibt sich der Anteil der langsam reagierenden Moleküle zu etwa 10%. Dabei ist der – in den Amplitudenspektren gegenläufige – Effekt der excited-state Absorption mitberücksichtigt. Wie in Abbildung 7.3 gut zu erkennen ist, ist dieser langsame Anteil an Molekülen beim zyklischen Peptid erheblich größer als bei der linearen Vorstufe (vgl. $\lambda_{\text{probe}} = 504\text{nm}$ bzw. 552nm). Aufgrund der zyklisierten Peptidkette gibt es einen größeren Teil von Molekülen, deren Konformation ein rasches Erreichen des $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergangsbereiches auf der S_1 -Potentialfläche nicht gestattet. Erst durch ein aufwendiges Rearrangement der Aminosäuren nähern sich diese Moleküle sehr langsam (100 ps) dem Minimum der S_1 -Fläche und wechseln auf die Grundzustandspotentialfläche. Der $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang geschieht aber hauptsächlich in einem Gebiet der Potentialflächen, wo auf der S_0 -Fläche nur die Rückkehr in den *trans*-Ausgangszustand möglich ist: von diesen langsamen *cAPB*-Molekülen isomerisiert (fast) keines.

cis→*trans*-Isomerisierung

Beim Betrachten der transienten Spektren sowie der Amplitudenspektren fällt eine sehr langsame Kinetik auf, die bisher bei keiner anderen in diesem Kapitel diskutierten Probe beobachtet wurde: die Absorption ändert sich auch noch auf der Nanosekundenzeitskala. Bevor jedoch dieses näher behandelt wird, erfolgt ein Vergleich der übrigen Ergebnisse mit den bisherigen Erkenntnissen.

Vergleicht man die aus der Datenanpassung erhaltenen Zeitkonstanten der schnellsten Kinetiken von *cAPB* und *IAPB*, so scheint die initiale Reaktion bei *cAPB* schneller (230 fs) als *IAPB* (380 fs). Man ist versucht, diese Beschleunigung von *cAPB* gegenüber *IAPB* mit jener bei der $t \rightarrow c$ -Isomerisierung zu vergleichen. Ein Blick auf die Transienten in Abbildung 7.4 zeigt jedoch, daß *cAPB* bei der $c \rightarrow t$ -Reaktion in den ersten 500 fs eine allenfalls unwesentlich schnellere Dynamik aufweist wie *IAPB*. Offensichtlich gibt es bei *cAPB* ($c \rightarrow t$) eine Diskrepanz zwischen den direkt aus den Transienten gewonnenen Aussagen und jenen, die aus der Datenanpassung resultieren. Was ist die Ursache für die falsche Zeitkonstante bei der schnellsten Kinetik von *cAPB*? Der Grund muß die Qualität der Meßdaten sein: ein großes, nicht korrigierbares Störsignal durch das Lösungsmittel um den Zeitnullpunkt sowie ein ungünstiges Signal-Rausch-Verhältnis im Spektralbereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption ließen den

Algorithmus zur Datenanpassung bei der Bestimmung der kleinsten Zeitkonstante auf den Wert $\tau = 230$ fs konvergieren. Tatsache ist, daß sich mit einer fest vorgegebenen Zeitkonstante $\tau = 300$ fs für diese schnellste Kinetik eine genauso gute Datenanpassung erreichen ließ. Dies bedeutet, daß die schnellste Kinetik bei cAPB eine Zeitkonstante von etwa 300 fs besitzt und somit etwa genauso schnell ist wie jene von IAPB, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem Vergleich der Transienten.

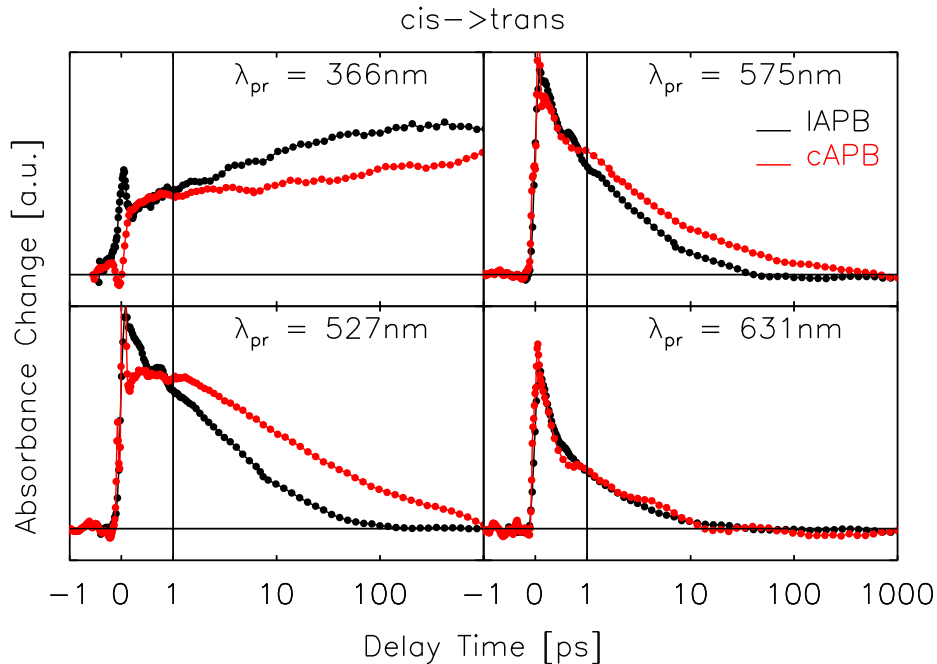


Abbildung 7.4: Vergleich von Transienten des linearen und zyklischen APB-Peptides für die Reaktionsrichtung *cis*→*trans* bei vier ausgewählten Abtastwellenlängen. Die Meßkurven sind so normiert, daß die Unterschiede in den Kinetiken besonders gut sichtbar werden.

Berechnet man nach der in Abschnitt 7.2.2 beschriebenen Methode die Isomerisierungsquantenausbeute, so erhält man $\Psi = 77\%$. Somit liegt der ermittelte Wert über dem von IAPB ($\Psi = 44\%$, *c*→*t*). Aufgrund der erwähnten Unsicherheiten bei der Bestimmung der Quantenausbeute (relativer Fehler etwa 50%) könnten die Quantenausbeuten von cAPB und IAPB allerdings innerhalb der Fehlergrenzen auch identisch sein. Dies ist auf den ersten Blick erstaunlich. Intuitiv würde man erwarten, daß die Quantenausbeute bei cAPB gegenüber derjenigen von IAPB reduziert ist, da der Chromophor während der Isomerisierung durch seine geometrische Streckung die Peptidkette von der gefalteten in eine gestreckte Konformation überführen muß. Daß dabei mehr Chromophore in den *cis*-Ausgangszustand zurückkehren, scheint nicht unplausibel. Aus der Tatsache, daß die Quantenausbeute von cAPB und IAPB aber gleich sind, folgt, daß die Peptidkette auf die anfängliche Isomerisierungsbewegung des Chromophores keinen Einfluß hat. Dies wäre z.B. dann der Fall, wenn die natürliche geo-

metrische Länge⁵ des Peptides etwas größer als der geometrische Abstand der beiden Enden des Chromophores ist. Beginnt der Chromophor nach der Anregung mit der Isomerisierungs- bewegung, dann wird er anfangs von der Peptidkette leicht angetrieben. Dies wäre mit der geringfügigen Beschleunigung der schnellsten Kinetik von cAPB gegenüber lAPB vereinbar. Der Chromophor erreicht die Region auf der S_1 -Potentialfläche, von der ein Übergang auf die S_0 -Fläche möglich ist. Die geometrische Länge des Chromophores steigt dabei so an, daß die Peptidkette keine Kraft mehr auf den Photoschalter ausübt und umgekehrt. Für den Chromophor besteht während der Bewegung auf der S_1 -Fläche also nahezu kein Unterschied zwischen einer offenen bzw. zyklisierten Peptidkette. Daher ist auch die Isomerisierungsquan- tenausbeute für lAPB und cAPB etwa gleich. Diejenigen Chromophore, die isomerisieren und die gestreckte *trans*-Konfiguration einnehmen wollen, spüren mit der weiteren Vergrößerung des geometrischen Abstandes der beiden Enden immer mehr den Einfluß der Peptidkette. Dies führt zu einer drastischen Verlangsamung der Weiterreaktion (=Streckung des Peptidrückgrates bzw. Entfaltung des Peptids) in das S_0 -Minimum des *trans*-Zustandes und zum Auftreten der Nanosekundenkinetik (siehe unten).

Die beiden Zeitkonstanten (2.7 ps und 60 ps) sowie die mit ihnen verknüpften Amplituden- spektren sind denen von lAPB ebenfalls ähnlich (vgl. Abb. 5.9). Das zusätzliche Minimum im Amplitudenspektrum der 2.7 ps-Zerfallszeit könnte zum einen durch den Rückgang des Ausbleichsignals der *cis*- $n\pi^*$ -Bande verursacht sein. Zum anderen könnte eine fehlerhafte Skalierung der Meßdaten dafür verantwortlich sein: die Experimente zur Untersuchung der *c*→*t*-Isomerisierung können nicht an Proben durchgeführt werden, die zu Beginn der Messungen eine *cis*-Isomerenkonzentration von 100% aufweisen. Somit ist in den aufgezeichneten Transienten bei einer *c*→*t*-Messung immer ein gewisser Signalbeitrag enthalten, der von an- geregten *trans*-Isomeren hervorgerufen ist. Um die Transienten zu erhalten, die ausschließlich von angeregten *cis*-Isomeren stammen, muß der in den Meßdaten enthaltene Beitrag der *trans*- Isomere subtrahiert werden (vgl. Einleitung 5). Dazu benötigt man aber das genaue Isomeren- verhältnis während der *c*→*t*-Messung sowie die genauen Konzentrationen der Probenlösungen bei der *t*→*c*- und der *c*→*t*-Messung. Da aber die Bestimmung des Isomerenverhältnisses sowie der Konzentrationen stark fehlerbehaftet ist, ist es daraus möglich, daß von den gemessenen *c*→*t*-Transienten 20% zuviel *t*→*c*-Transienten subtrahiert wurden. Daraus kann das zusätzli- che Minimum im Amplitudenspektrum der 2.7 ps-Kinetik resultieren. Da das Meßsignal von *trans*-cAPB nach den ersten 50 ps weitgehend abgeklungen ist, beeinflußt eine fehlerhafte Sub- traktion der Meßdaten nicht den Zeitbereich $t_D \geq 50$ ps und somit auch nicht das Amplituden- spektrum der 60 ps-Kinetik von cAPB (*c*→*t*). Im Amplitudenspektrum der 60 ps-Zeitkonstante ist im Bereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande wieder das Entstehen der Produktabsorption sichtbar. Die 2.7 ps und 60 ps-Kinetiken stellen somit im Hinblick auf die Fragestellung dieser Arbeit keine Besonderheit dar.

Anders verhält es sich mit der nur bei cAPB auftretenden Kinetik im Nanosekundenbereich. Ein exakter Wert für diese Zerfallszeit ist nicht angebbar, da die Femtosekundenuntersuchun- gen nur bis zu Verzögerungszeiten von $t_D = 3.4$ ns durchgeführt wurden. Der Wert, den der Fit-

⁵Als natürliche geometrische Länge wird hier der geometrische Abstand von einem zum anderen Ende der Aminosäurekette bezeichnet, wenn das Peptid keinen Zwangsbedingungen (z.B. Zyklisierung) ausgesetzt ist.

Algorithmus liefert (1.4 ns), ist daher sehr fehlerbehaftet. Der exakte Wert der Zeitkonstante sollte im Bereich von 1 – 3 ns liegen, ist aber für die Interpretation der Nanosekundenkinetik nicht von Bedeutung. Denn alle anderen auftretenden Kinetiken sind mindestens eine Größenordnung schneller. Daher wird das Amplitudenspektrum dieser Nanosekundenkinetik nur unwesentlich von dem genauen Wert der Zeitkonstante beeinflusst. Zudem ist auch nicht zu erwarten, daß man die Kinetiken in diesem Zeitbereich mit nur einer Zeitkonstante beschreiben kann: Der Start der Entfaltungsreaktion erfolgt von sehr vielen verschiedenen Konformationen aus, wie dies auch in den NMR-Strukturen sichtbar ist. Deshalb wird die Reaktionsgeschwindigkeit individuell für jedes Peptid unterschiedlich sein. Es ist daher eine grobe Näherung, nur eine einzige Zeitkonstante zur Beschreibung des Faltungsvorganges zu verwenden. Die erhaltene Zeitkonstante ist als eine vereinfachende Zusammenfassung der tatsächlich auftretenden Kinetiken aufzufassen. Deutlich sichtbar ist die sehr langsame Kinetik auch in den Transienten in Abbildung 7.4, insbesondere bei Abtastwellenlängen in der roten Flanke der $n\pi^*$ -Bande und etwas rotverschoben davon. Weit im roten Spektralbereich verschwindet die Nanosekundenkinetik völlig – hier gleichen sich die Transienten von linearem und zyklischem Peptid fast vollkommen (vgl. $\lambda_{\text{probe}} = 631 \text{ nm}$).

Eine Besonderheit des Amplitudenspektrums der 1-3 ns-Kinetik ist die Lage des Minimums im Bereich der $trans-\pi\pi^*$ -Absorption ($\lambda_{\text{min}} = 390 \text{ nm}$): kein zuvor gezeigtes Amplitudenspektrum hatte ein Minimum an einer spektral so weit gegenüber der $trans-\pi\pi^*$ -Absorption rotverschobenen Position. Der spektrale Verlauf der Amplituden der Nanosekundenkinetik im Wellenlängenbereich $\lambda_{\text{probe}} \leq 440 \text{ nm}$ weist auf die Bildung eines rotverschobenen absorbierenden, $trans$ -cAPB-ähnlichen Zustandes hin. Zugleich erkennt man für $\lambda_{\text{probe}} \geq 440 \text{ nm}$ das Verschwinden einer gegenüber dem Spektrum der 60 ps-Kinetik nochmal blauverschobenen Absorptionsbande. Derartige Signale können nur zustande kommen, wenn eine Reaktion von einem Zustand Z (vgl. Abb. 7.5) in der Nähe des Übergangsbereiches der beiden Potentialflächen zu einem Zustand T in der Nähe der

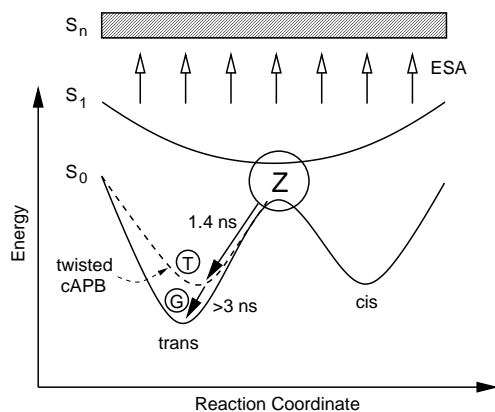


Abbildung 7.5: Erklärung der Ursache der Nanosekundenkinetik bei cAPB, $cis \rightarrow trans$ -Reaktion (vgl. Text).

$trans$ -cAPB-Gleichgewichtslage stattfindet (gestrichelte Linie). Damit verschwindet die langwellige Absorption und zugleich entsteht eine, die der $trans$ -cAPB-Absorption gleicht, jedoch spektral etwas rotverschoben ist. Die Zeitskala der weiteren langsamen Relaxation ($> 3 \text{ ns}$) in den Grundzustand G, der auch in den Absorptionsspektren und NMR-Spektren beobachtet wird, ist Femtosekundenmessungen nicht zugänglich.

Wie in den transienten Spektren (Abb. 5.13, links) erkennbar ist, entspricht die Position der Bande bei $t_D = 1 \text{ ns}$ im Wellenlängenbereich der $\pi\pi^*$ -Bande nicht vollständig der des Dauerstrichdifferenzspektrums. Ermittelt man das Bandenmaximum ($\lambda_{\text{probe}} \leq 430 \text{ nm}$) in den einzelnen transienten Spektren, z.B. über die Anpassung einer Gaußfunktion, so erhält man die

7 Diskussion

Lage der Maxima in Abhängigkeit der Verzögerungszeit t_D (siehe Abb. 7.6 links (IAPB) und rechts (cAPB)). Man sieht deutlich den Unterschied: während das Zentrum der $\pi\pi^*$ -Bande beim linearen Peptid ab etwa $t_D = 200$ ps nicht mehr weiter zu kurzen Wellenlängen schiebt, ist beim zyklischen Peptid über den gesamten Zeitraum von 1 ns eine kontinuierliche Blauverschiebung der Zentralwellenlänge sichtbar, die auch bei $t_D = 1$ ns noch nicht abgeschlossen scheint.

Der unterschiedliche Wert für die Zentralwellenlänge der $\pi\pi^*$ -Absorption zu sehr späten Verzögerungszeiten $t_D \geq 2$ ns für IAPB ($\lambda_{center} = 365$ nm) und cAPB ($\lambda_{center} = 371$ nm) ist möglicherweise auf eine nicht optimale Eichung der Spektrometer im Pump-Probe-Experiment zurückzuführen (siehe spec1 und spec2 in Abb. 2.7). Eine Abweichung von ± 2 nm ist durchaus denkbar.

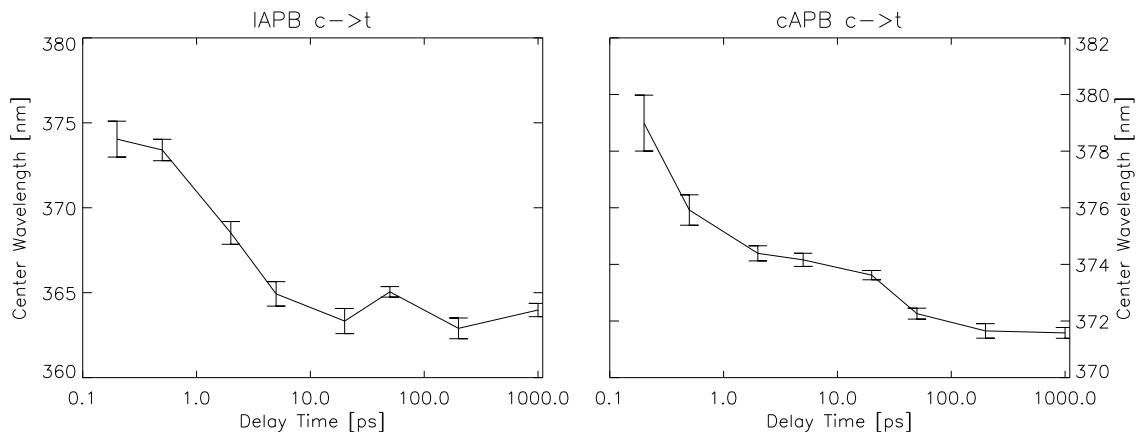


Abbildung 7.6: Verschiebung der Zentralwellenlänge der Absorptionsbande im Bereich der $\pi\pi^*$ -Absorption von IAPB c->t(links) und cAPB c->t(rechts)

Was ist nun die Ursache dieser Nanosekundenkinetik? Wie oben bereits beschrieben, werden bei cAPB die nach einer Anregung isomerisierten Chromophore durch die Peptidkette erst einmal daran gehindert, die gestreckte *trans*-Konformation einzunehmen. Der Chromophor befindet sich durch das zyklisierte Peptid in einer geometrisch verspannten Konfiguration. Die Weiterbewegung in die relaxierte *trans*-Konformation wird wahrscheinlich in mehreren Stufen ablaufen. Erst einmal werden diejenigen Aminosäuren auf den Zug durch den Chromophor reagieren, die in direktem Kontakt mit dem Photoschalter stehen. Das Rearrangement dieser beiden Aminosäuren dürfte es dem Chromophor ermöglichen, schon fast die endgültige Konformation einzunehmen. Somit könnte die strukturelle Anpassung dieser zwei Aminosäuren die Ursache für die beobachtete Nanosekundenkinetik sein. Auf einer noch langsameren Zeitskala ordnet sich nun die gesamte Peptidkette um, bis sie die energieärmste Konformation eingenommen hat.

Zusammenfassung cAPB

Die Zyklisierung verursacht deutlich sichtbare Veränderungen im dynamischen Verhalten des Azo-Peptides. Bei der $t \rightarrow c$ -Reaktion ist die schnellste Kinetik aufgrund einer mechanischen Vorspannung des Chromophores durch das entfaltete Peptid beschleunigt. Auch die Isomerisierungsquantenausbeute steigt für diese Reaktionsrichtung im Vergleich zu lAPB ($t \rightarrow c$) an, da die bei *trans*-lAPB vorhandenen kinetischen Fallen auf der S_1 -Potentialfläche durch die treibende Kraft der Peptidkette leichter überwunden werden können. Die weitere Bewegung der Aminosäuren ist in den hier durchgeführten Experimenten bei der $t \rightarrow c$ -Isomerisierung nicht sichtbar gewesen. Für die $c \rightarrow t$ -Isomerisierung ergibt sich folgendes Bild: im *cis*-Ausgangszustand scheint das Peptid den Photoschalter leicht zu strecken. Erfolgt eine Anregung des Chromophores, so wird die initiale Bewegung des Chromophores ein wenig beschleunigt. Bei der weiteren Isomerisierungsbewegung auf der S_1 -Potentialfläche und dem Übergang auf die Grundzustandspotentialfläche spürt der Photoschalter erst einmal nichts mehr von der Peptidkette, da der Abstand der Enden des Farbstoffes identisch zur natürlichen geometrischen Länge des Peptides ist. Bei denjenigen Molekülen, deren Photoschalter isomerisiert und sich weiter streckt, erfolgt nun eine starke Behinderung der Isomerisierungsbewegung durch die Peptidkette. Da der Chromophor eine gestreckte *trans*-Konformation einnehmen möchte, beginnen sich zunächst einmal die Aminosäuren direkt am Photoschalter zu reorganisieren. Dieser Prozeß könnte die beobachtete Nanosekundenkinetik hervorrufen. Die weitere Relaxation in die *trans*-Konformation mit einer Bewegung aller Aminosäuren sollte dann auf einer langsameren Zeitskala erfolgen. Die detaillierte Antwort auf die exakte Bewegung der Aminosäuren aber kann mit Experimenten im sichtbaren Spektralbereich nicht gegeben werden.

In der nachfolgenden Tabelle sind nochmals die ermittelten Zeitkonstanten sowie die berechneten Quantenausbeuten von Azobenzol und den APB-Peptiden zusammengestellt.

Probe	<i>trans</i> \rightarrow <i>cis</i>							<i>cis</i> \rightarrow <i>trans</i>				
	Zeiten [ps]				Ψ [%]	Ψ_{max}^{TS} [%]	Zeiten [ps]				Ψ [%]	
Azo	0.44		3.3	11		20	—	0.13	1.1	11		30-50
lAPB	0.39	1.9	9.5		120	7	20	0.38	3.4	33		44
cAPB	0.26	1.2	7.7		100	26	32	0.23-0.3	2.7	64	1400	77

Tabelle 7.1: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse aus den Messungen an Azobenzol und den APB-Peptiden für die $t \rightarrow c$ - sowie die $c \rightarrow t$ -Isomerisierung. Neben den jeweils zur Anpassung der Meßdaten benötigten Zeitkonstanten sind noch die (maximalen) Quantenausbeuten angegeben. Die Zeitkonstanten in den jeweils ersten drei Spalten sind so angeordnet, daß Kinetiken mit einem ähnlichen Amplitudenspektrum untereinander stehen.

7.3 Die AMPB-Familie



7.3.1 Der Chromophor AMPB

Anders als bei dem Chromophor APB sind bei AMPB die $n\pi^*$ - und die $\pi\pi^*$ -Bande spektral wieder klar getrennt. Eine Untersuchung dieses Moleküles erschien sinnvoll, weil durch einen Vergleich mit dem linearen AMPB-Peptid die Möglichkeit gegeben ist, Einflüsse und Änderungen zu studieren, die durch das Anbringen der Aminosäuren verursacht sind. Dieser Aspekt ist in der APB-Familie aufgrund der spektralen Eigenschaften des APB-Chromophores nicht zugänglich. Außerdem sind keine femtosekundenspektroskopischen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an AMPB veröffentlicht.

trans→*cis*-Isomerisierung

Die Amplitudenspektren aus der Datenanpassung von AMPB (Abb. 6.2, rechts) weisen im Vergleich zu den bisher vorgestellten Proben im wesentlichen denselben spektralen Verlauf auf. Hinter der schnellsten sichtbaren Kinetik (470 fs) steht ein Prozeß, bei dem die Absorption relativ gleichmäßig über den Spektralbereich $\lambda_{\text{probe}} \geq 350$ nm abnimmt. Im Potentialbild (vgl. Abb. 7.1) könnte dies sowohl dem Übergang von der Franck-Condon-Region in das Minimum der S_1 -Fläche als auch zusätzlich dem Übergang auf die Grundzustandspotentialfläche entsprechen. Die gleich starken Amplituden der drei Kinetiken (470 fs, 1.6 ps und 7.9 ps) im langwelligen Spektralbereich ($\lambda_{\text{probe}} \geq 530$ nm) weisen darauf hin, daß nur ein Bruchteil der angeregten Moleküle die S_1 -Potentialfläche in 470 fs verläßt. Der größere Teil muß einige Pikosekunden im elektronisch angeregten Zustand verweilen, da sonst keine excited-state Absorption in diesem Zeitbereich zu beobachten wäre.

Die Amplituden der 7.9 ps-Zeit zeigen eine zu denen der 9.5 ps-Zerfallszeit von IAPB sehr ähnliche spektrale Abhängigkeit. Im Wellenlängenbereich $\lambda_{\text{probe}} \leq 500$ nm sind die Positionen des Minimums (≈ 340 nm) und des Maximums (420 nm) des Amplitudenspektrums der 7.9 ps-Kinetik gegenüber den Extrema des Amplitudenspektrums der 9.5 ps-Zeitkonstante bei IAPB um etwa 25 nm blauverschoben. Die *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption von IAPB und AMPB sind ebenfalls um diesen Betrag zueinander verschoben (vgl. Tab. 4.5). Die Kinetiken gehören also zu ähnlichen Prozessen in AMPB und IAPB. Da die spektrale Lage des Minimums des Amplitudenspektrums der 7.9 ps-Kinetik im Bereich der $\pi\pi^*$ -Bande mit der maximalen *trans*-AMPB Absorption zusammenfällt und auch die Form des Amplitudenspektrums der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande von AMPB ähnlich ist, liegt die Interpretation nahe, daß die negativen Amplituden der 7.9 ps-Kinetik in diesem Wellenlängenbereich die Rückbesetzung des *trans*-Zustandes beschreiben. Dies heißt, daß die mit dieser Zeitkonstante reagierenden Moleküle zwar angeregt werden, aber keine Isomerisierung vollziehen. Da diese beim Übergang in den Ausgangszustand auch die S_1 -Potentialfläche verlassen, geht die vom angeregten Zustand ausgehende excited-state Absorption ebenfalls zurück. Die positiven Amplituden für $\lambda_{\text{probe}} \geq 400$ nm der 7.9 ps-Zeitkonstante beschreiben ein Abnehmen der excited-state Absorp-

tion in diesem Spektralbereich. Somit ist gezeigt, daß die 7.9 ps-Kinetik, zumindest zum überwiegenden Teil, durch die Entvölkerung der S_1 -Potentialfläche und die Wiederbesetzung des *trans*-Ausgangszustandes verursacht ist. Das Spektrum der 1.6 ps-Zeit enthält hingegen noch andere Beiträge. Zum einen ist wiederum ein Verschwinden der excited-state Absorption zu sehen ($\lambda_{\text{probe}} \geq 500 \text{ nm}$), zum anderen eine Absorptionszunahme im *trans*- $\pi\pi^*$ -Bereich. Der spektrale Verlauf des Amplitudenspektrums läßt sich jedoch nicht alleine durch diese Anteile erklären. Da auch Kühlprozesse auf dieser Zeitskala eine Rolle spielen, sind diese sicherlich mit verantwortlich für die kompliziertere Form dieses Amplitudenspektrums.

Die direkte Beobachtung der Bildung des Photoproduktes *cis*-AMPB bereitet Schwierigkeiten. Ein charakteristisches spektrales Merkmal von *cis*-AMPB wäre die *cis*- $\pi\pi^*$ -Bande. Diese liegt jedoch weit außerhalb des untersuchten Spektralbereiches ($\lambda_{\text{max}} \approx 260 \text{ nm}$). In der $n\pi^*$ -Bande jedoch ist der Absorptionsunterschied zwischen dem *trans*- und *cis*-Isomer so gering, daß man anhand der vorhandenen Daten nicht beurteilen kann, ob die beobachtete Kinetik durch die Bildung des *cis*- oder *trans*-Isomeres verursacht ist. Im Spektralbereich der $n\pi^*$ -Bande kann man lediglich erkennen, daß das Ausbleichen⁶ dieser Bande wieder zurückgeht, der $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang also erfolgt ist.

Im Amplitudenspektrum der 470 fs-Kinetik erkennt man bei $\lambda_{\text{probe}} = 450 \text{ nm}$ ein Minimum. Eine einfache Abschätzung soll veranschaulichen, daß diese „Delle“ im Spektrum durch das Wiedererscheinen der $n\pi^*$ -Absorption (sowohl *trans* wie *cis*) verursacht sein kann. Eine Unterscheidung, welches Isomer entsteht, ist aber nicht möglich: Die Absorption von *cis*-AMPB im Maximum der $n\pi^*$ -Bande beträgt (laut Tabelle 4.5) $A = 0.16$. Umgerechnet auf die Konzentration der *trans*-AMPB-Probe ergibt dies $A = \frac{0.5}{1.6} * 0.16 = 0.05$. Da die Absorption der *trans*-Isomere bei $\lambda_{\text{pump}} = 480 \text{ nm}$ in der Messung nur $A = 0.025$ beträgt, die dargestellten Transienten aber auf eine Absorption $A = 0.05$ bei $\lambda_{\text{pump}} = 480 \text{ nm}$ normiert sind, ergibt sich für die skalierte Absorption von *cis*-AMPB im Maximum der $n\pi^*$ -Bande $A = 0.1$. Diese Absorption würde man im Maximum der $n\pi^*$ -Bande messen, wenn man alle Moleküle einer *trans*-AMPB-Lösung (mit Absorption $A = 0.05$ bei $\lambda_{\text{pump}} = 480 \text{ nm}$) in die *cis*-Konformation überführen würde. Nimmt man erst einmal an, daß 100% der angeregten Moleküle isomerisieren, so erhält man bei einer Anregung von 2.5% der im Anregungsvolumen vorhandenen *trans*-AMPB-Moleküle eine maximale Photoproduktabsorption $A_{\text{photo}} = 0.0025$. Würde keines der angeregten Moleküle isomerisieren, so würden diese im Maximum der $n\pi^*$ -Bande eine Absorption von $A = 0.062 \cdot 2.5\% = 0.0016$ aufweisen. In dem Amplitudenspektrum derjenigen Kinetik, die der Isomerisierung zugeordnet ist, sind damit die Werte der Amplituden im Spektralbereich der $n\pi^*$ -Absorption um $0.0016 - 0.0025$ kleiner als im Bereich außerhalb der Grundzustandsabsorption, sofern der Wirkungsquerschnitt der excited-state Absorption im untersuchten Wellenlängenbereich ungefähr konstant ist. Will man unterscheiden, welches Isomer mit der beobachteten Kinetik gebildet worden ist, so muß man entscheiden können, ob der Unterschied der Amplitudenwerte 0.0016 (=Bildung 0% *cis*-Isomer), 0.0018 (=Bildung 20% *cis*-Isomere) oder 0.0025 (=100% *cis*-Isomere) beträgt. Im Amplitudenspektrum der 470 fs-Kinetik ist ein Amplitudenunterschied von $0.0015 - 0.004$ zu sehen. Eine genauere Bestimmung dieses Wertes ist nicht möglich, da die exakte Form des excited-state Spektrums

⁶Verursacht durch den Anreglichtimpuls.

nicht bekannt ist. Somit kann die 470 fs-Kinetik nicht direkt der Photoproduktbildung zugeordnet werden. Anhand der transienten Spektren zu späten Verzögerungszeiten $t_D \geq 1$ ns bzw. dem Amplitudenspektrum der ∞ -Zeitkonstante kann allerdings festgestellt werden, daß ein Teil der angeregten Moleküle isomerisiert ist. In welcher Zeit, kann nicht eindeutig gezeigt werden. Aus den transienten Spektren kann jedoch entnommen werden, daß in AMPB nach 50 ps jegliche Reaktion abgeschlossen ist und somit die Isomerisierung schneller abgelaufen sein muß.

Ein Vergleich der für AMPB ($t \rightarrow c$) erhaltenen Amplitudenspektren legt den Schluß nahe, daß die 470 fs-Kinetik hauptsächlich durch isomerisierende Moleküle verursacht ist, während die beiden anderen Kinetiken (1.6 ps und 7.9 ps) zum großen Teil die „Verlustreaktion“ zurück in den *trans*-Ausgangszustand darstellen. Diese Aussage gründet sich auf die Form der Spektren im Spektralbereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption: in den Amplitudenspektren der beiden langsamen Zeitkonstanten (1.6 ps und 7.9 ps) ist die Entstehung von *trans*-Isomeren zu sehen, in demjenigen der 470 fs-Kinetik nicht. Bewiesen werden kann die Aussage aber nur durch eine Messung in der *cis*- $\pi\pi^*$ -Bande.

Die Berechnung des Prozentsatzes der angeregten Moleküle pro Anregungslichtimpuls liefert $R=2.5\%$ (vgl. Tab. 4.5). Daraus berechnet sich die Quantenausbeute zu $\Psi = 22\%$ (vgl. Abschnitt 7.2.2), ein zu APB vergleichbarer Wert (vgl. Abschnitt 7.2.1). Die Abschätzung Quantenausbeute aus den transienten Spektren liefert $\Psi_{max}^{TS} = 27\%$ und $\Psi^{TS} = 17\%$. Damit sollte der wahre Wert der Quantenausbeute etwas kleiner als 20% sein.

cis→*trans*-Isomerisierung

Wie aus der Form der Amplitudenspektren (Abb. 6.4) im Spektralbereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande der drei Kinetiken (250 fs, 2.9 ps und 12 ps) ersichtlich ist, erfolgt die Photoproduktbildung (*trans*-AMPB) mit allen drei Zeitkonstanten. Denn die Form der drei Amplitudenspektren im Spektralbereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande weist auf die Bildung eines Zustandes hin, welcher so wie *trans*-AMPB absorbiert. Somit erfolgt der Übergang von *cis*- nach *trans*-AMPB multiexponentiell in einem Zeitraum von wenigen hundert Femtosekunden bis zu einigen zehn Pikosekunden. Desweiteren ist das Maximum der Bande im langwelligen Spektralbereich ($\lambda_{probe} \geq 500$ nm) des Amplitudenspektrums der 2.9 ps-Kinetik wieder gegenüber demjenigen der 250 fs-Kinetik blauverschoben. Eine derartige Verschiebung wurde schon bei IAPB ($c \rightarrow t$) beschrieben (vgl. Abschnitt 80). Das Maximum des Amplitudenspektrums der 12 ps-Zeitkonstante (AMPB) für $\lambda_{probe} \geq 500$ nm befindet sich an derselben spektralen Position wie jenes der 2.9 ps-Kinetik. Dies ist ein klarer Unterschied zu IAPB. Dort war das Maximum des Amplitudenspektrums der 33 ps-Kinetik nochmals gegenüber demjenigen der 3.4 ps-Zeitkonstante blauverschoben. Es ist bekannt, daß im allgemeinen das vibronische Abkühlen umso schneller stattfindet, je größer ein Molekül ist. Somit sollte auch das Abkühlen des angeregten Zustandes von IAPB schneller oder gleichschnell ablaufen wie bei AMPB. Wenn die spektrale Verschiebung des Maximums der Amplitudenspektren der 3.4 ps- und 33 ps-Kinetik von IAPB durch ein weiteres vibronisches Abkühlen des angeregten Zustandes hervorgerufen wäre, dann müßte man auch bei AMPB eine spektrale Verschiebung der Maxima der

Amplitudenspektren der 2.9ps- und 12ps-Kinetik sehen. Denn AMPB sollte, wie oben dargestellt, nicht schneller abkühlen als IAPB. Nun ist aber eine derartige spektrale Verschiebung bei AMPB nicht sichtbar. Daraus läßt sich schließen, daß der Ausgangszustand für die 33ps-Kinetik bei IAPB in AMPB nicht existiert oder nicht zugänglich ist. Der physikalische Prozeß, welcher der 33ps-Kinetik bei IAPB zugrunde liegt, muß also ein anderer sein als jener der 12ps-Zeitkonstante von AMPB.

Die große spektrale Ähnlichkeit der Amplitudenspektren der 2.9ps- und 12ps-Kinetik führt vielmehr noch zu einer anderen Interpretation: es gibt zwei Spezies im Besetzungsverhältnis 2:1 von abgekühlten Molekülen im angeregten Zustand, die unterschiedlich lange für den Übergang auf die Grundzustandspotentialfläche benötigen. Da beide Populationen abgekühlt sind, werden sie sich an benachbarten Stellen auf der S_1 -Potentialfläche aufhalten und dieselbe Energie besitzen. Die Folge ist, daß die spektrale Lage und die Wirkungsquerschnitte der excited-state Absorption beider Spezies nahezu identisch sind. Nur die Wahrscheinlichkeit für den $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang ist für beide verschieden.

Mit der in Abschnitt 7.2.2 vorgestellten Methode berechnet sich (mit einem Anteil von 2.8% angeregter Moleküle pro Anregungslichtimpuls) eine sehr hohe Isomerisierungsquantenausbeute von etwa $\Psi = 70\%$. Eine obere Schranke für die Quantenausbeute wie bei *trans*-AMPB läßt sich mit den vorhandenen Daten nicht ermitteln, da das Maximum der *cis*- $\pi\pi^*$ -Bande weit außerhalb des untersuchten Spektralbereiches liegt.

Zusammenfassung AMPB

Der Chromophor AMPB stellt sich in den Femtosekundenuntersuchungen als ausgezeichneter Photoschalter dar. Die Isomerisierung erfolgt insgesamt etwas langsamer und zeitlich etwas dispersiver als in Azobenzol. Trotzdem ist der Isomerisierungsvorgang nach wenigen zehn Pikosekunden abgeschlossen. Hinzu kommt, daß die Quantenausbeuten ($t \rightarrow c$: 20%, $c \rightarrow t$: 70%) mit denen von Azobenzol vergleichbar sind. Dies bedeutet, daß die für die Triggerung der Faltungsreaktion relevanten Parameter erhalten geblieben sind. Somit ist eine Anwendung des Chromophores bei den AMPB-Peptiden bzgl. der schnellen Initiierung einer Faltungsbewegung erfolgversprechend.

7.3.2 Das Modellpeptid IAMPB

Die dynamischen Eigenschaften von IAMPB müssen vor allem im Vergleich zu denen von IAPB sowie dem Chromophor AMPB gesehen werden, um mögliche Unterschiede aufgrund der zusätzlichen Methylengruppe zu erkennen.



trans→*cis*-Isomerisierung

Die initiale Reaktion von IAMPB nach einer Anregung bei $\lambda_{\text{pump}} = 480 \text{ nm}$ verläuft — nach den Ergebnissen der Datenanpassung — etwas langsamer (580 fs) als die von IAPB (390 fs). Allerdings sind bei dieser Messung die durch das Lösungsmittel verursachten Signale um den Zeitnullpunkt nicht vollkommen korrigierbar, weshalb die Meßdaten erst ab $t_D = 150 \text{ fs}$ zur Datenanpassung verwendet werden konnten. Der visuelle Vergleich der Transienten der beiden Linearpeptide zeigt, daß die Kinetiken in diesen beiden Proben nahezu identisch sind.

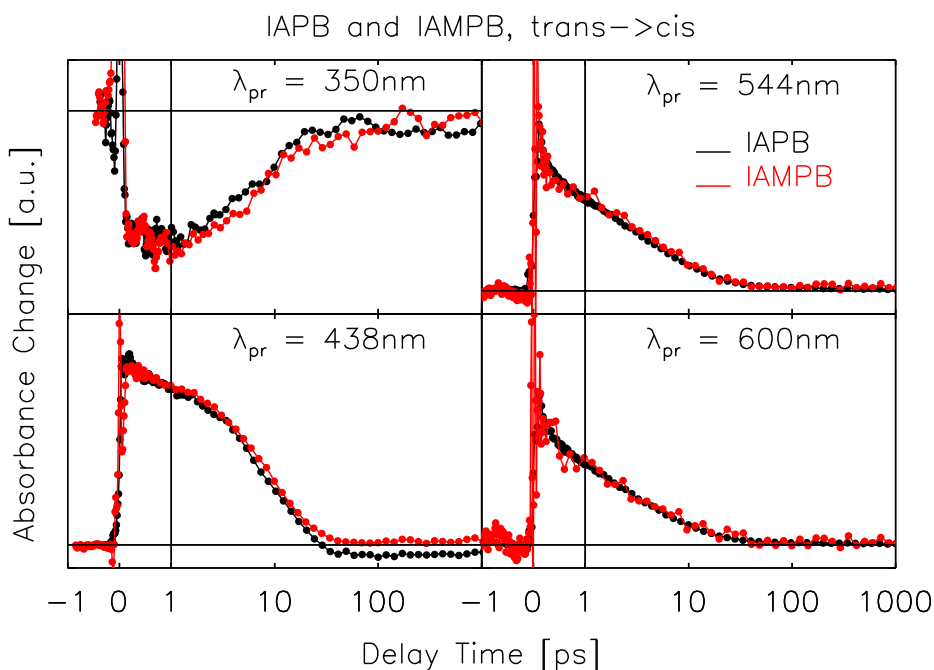


Abbildung 7.7: Vergleich von Transienten des linearen APB- und AMPB-Peptides für die Reaktionsrichtung *trans*→*cis* bei vier ausgewählten Abtastwellenlängen. Die Meßkurven sind so normiert, daß die Unterschiede in den Kinetiken besonders gut sichtbar werden.

In Abbildung 7.7 sind für vier Abtastwellenlängen die Transienten von IAPB (schwarz) und IAMPB (rot) dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Kurven jeweils bei $t_D = 200 \text{ fs}$ aufeinander normiert. In allen Graphen erkennt man eine nahezu völlige Übereinstimmung der Transienten. Der Unterschied zu späten Verzögerungszeiten bei $\lambda_{\text{probe}} = 438 \text{ nm}$ ist in der spektralen Lage des isobetischen Punktes der Dauerstrichabsorptionsspektren begründet. Bei dieser Wellenlänge absorbiert *trans*-IAPB stärker als das *cis*-Isomer, während bei IAMPB die Verhältnisse genau umgekehrt liegen.

Das Amplitudenspektrum der dominanten Kinetik (8.8 ps) zeigt qualitativ denselben spektralen Verlauf wie dasjenige der 9.5 ps-Kinetik von IAPB. Wieder geht ein großer Teil der angeregten Moleküle mit 8.8 ps auf die Grundzustandspotentialfläche über und relaxiert zurück in den *trans*-Ausgangszustand, isomerisiert also nicht. Eine ausführlichere Diskussion dieser Kinetik erfolgt weiter unten in Abschnitt 7.3.3.

Die Form des Amplitudenspektrums der sehr schwach beitragenden 93 ps-Kinetik ist anders als z.B. bei IAPB. Der spektrale Verlauf des Amplitudenspektrums im Spektralbereich der $\pi\pi^*$ -Bande weist auf eine Bildung von *trans*-IAMPB mit 93 ps hin. Eine Bildung von *trans*-Isomeren auf der Zeitskala von 100 ps ist bei IAPB nicht sichtbar.

Die Quantenausbeute ergibt sich, bei einer Anregung von 1.5% der Moleküle im Anregungsvolumen, zu $\Psi = 7\%$. Die Abschätzung der oberen Schranke liefert $\Psi_{max}^{TS} = 5\%$. Die Fehler beider Werte sind bei den AMPB-Peptiden größer als bei den APB-Peptiden, da sich die *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande zum größeren Teil außerhalb des untersuchten Wellenlängenbereiches befindet. Dadurch ist die Bestimmung der maximalen Absorptionsänderungen $\Delta A(t_D \geq 1 \text{ ns}, \lambda_{max})$ erschwert. Der aus dem Dauerstrichdifferenzspektrum berechnete maximale Wert für die Absorptionsänderung im Maximum der $\pi\pi^*$ -Bande beträgt $d \approx 30 \text{ mOD}$, wenn 100% der Moleküle isomerisieren würden (vgl. Abschnitt 7.2.2). Ein Vergleich mit den transienten Spektren (Abb. 6.6) zeigt, daß dieser Wert zu klein ist, da die Signalamplitude zu frühen Verzögerungszeiten $\Delta A(t_D = 200 \text{ fs}, \lambda_{max}) = 40 \text{ mOD}$ beträgt. Die Ursache für diese Diskrepanz sind sehr wahrscheinlich Skalierungsfehler der transienten Meßkurven. Die Gründe hierfür wurden weiter oben schon ausführlich erläutert. Der wahre Wert für die Quantenausbeute dürfte im Bereich um 5% liegen, ist also vergleichbar mit der Quantenausbeute für IAPB ($t \rightarrow c$).

Ebenso wie bei der APB-Familie wird somit durch die Massenträgheit der Aminosäuren die $t \rightarrow c$ -Isomerisierungsquantenausbeute gegenüber dem freien Chromophor erheblich reduziert. Der Einbau eines Spacers hat auf die Quantenausbeute keinerlei Auswirkung. Dies ist verständlich, da der Chromophor trotz der Methylengruppe die Aminosäuren für die Isomerisierung mitbewegen muß.

cis \rightarrow *trans*-Isomerisierung

Auch die Ergebnisse der Messungen an IAMPB $c \rightarrow t$ reihen sich gut in die bisher gewonnenen Erkenntnisse über die APB-Peptide sowie den Chromophor AMPB ein. In Abbildung 6.8 (links) erkennt man im langwelligen Spektralbereich ($\lambda_{probe} \geq 500 \text{ nm}$) wieder das Verschieben des excited-state Spektrums zu blauen Wellenlängen hin, wie dies auch für IAPB ($c \rightarrow t$) beobachtet wurde (vgl. Diskussion, Abschnitt 80). Auch im übrigen Spektralbereich ist der qualitative Verlauf der spektralen Abhängigkeit der Amplituden bei IAMPB und IAPB ähnlich. So ist im Bereich der $\pi\pi^*$ -Bande eine Photoproduktbildung mit drei Zeitkonstanten (250 fs, 1.3 ps und 10 ps) sichtbar. Lediglich das Minimum in den Amplitudenspektren der 1.3 ps- und 10 ps-Kinetik bei $\lambda_{probe} = 440 \text{ nm}$ ist bei IAMPB deutlicher ausgeprägt. Dies könnte aber auch dadurch verursacht sein, daß von den gemessenen *cis*-IAMPB-Kurven ein zu großer Anteil der *trans*-Kurven abgezogen wurde (vgl. Diskussion cAPB $c \rightarrow t$, Seite 118). Der schwache Beitrag der 58 ps-Zerfallszeit in der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande kann zwei Ursachen haben: Ein Bruchteil der angeregten Moleküle könnte von einem *trans*-ähnlichen, energetisch hochliegenden Zustand (vgl. Zustand 1 in Abb. 7.12) in 58 ps zum *cis*-Ausgangszustand rückisomerisieren. Damit verbunden wäre ein Verschwinden einer der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption ähnlichen, aber sehr weit rotverschobenen (30 nm) Absorption. Oder aber dieser Zustand 1 relaxiert in 58 ps nach *trans*-IAMPB. Damit verbunden wäre ein Blauverschiebung des zugehörigen Absorptionsspektrums

(eine ausführliche Diskussion der Auswirkung von spektral schiebenden Absorptionsbanden folgt in Abschnitt 7.3.3). Der Zustand 1, der mit 250 fs und 1.3 ps besetzt wird, besitzt ein ca. 10 – 15 nm rotverschobenes $trans-\pi\pi^*$ -Absorptionsspektrum. Die spektrale Lage des Maximums des Amplitudenspektrums der 58 ps-Kinetik im Bereich der $trans-\pi\pi^*$ -Bande paßt zu einem vollständigen Relaxieren eines so absorbierenden Zustandes, was für die zweite Interpretationsmöglichkeit spricht.

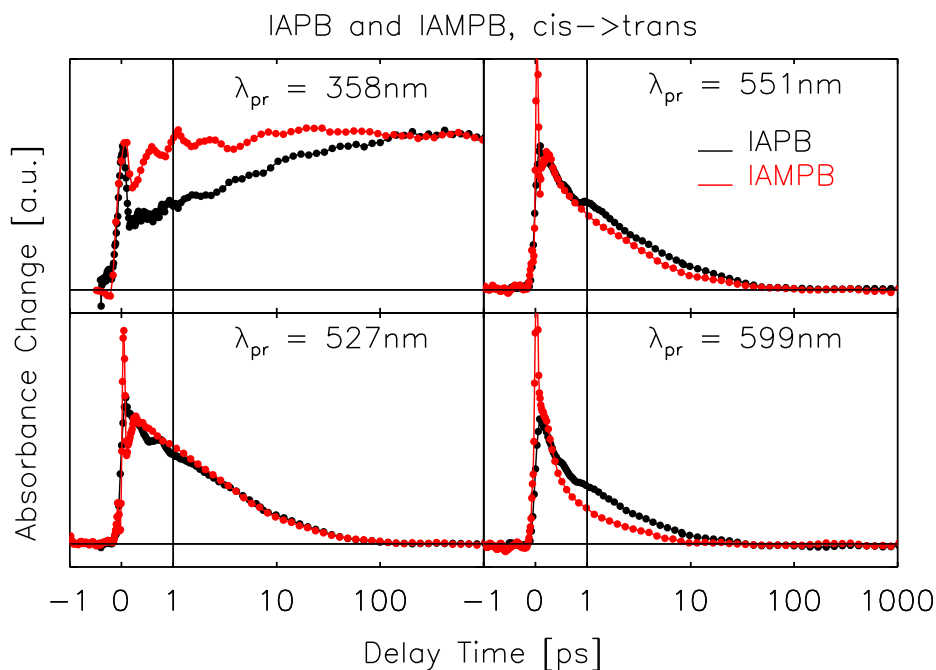


Abbildung 7.8: Vergleich von Transienten des linearen APB- und AMPB-Peptides für die Reaktionsrichtung $cis \rightarrow trans$ bei vier ausgewählten Abtastwellenlängen. Die Meßkurven sind so normiert, daß die Unterschiede in den Kinetiken besonders gut sichtbar werden.

Ein direkter Vergleich der Transienten der $cis \rightarrow trans$ -Reaktion der Linearpeptide zeigt, daß IAMPB direkt nach der Anregung eine etwas schnellere Kinetik aufweist als IAPB (vgl. Abb 7.8, $\lambda_{probe} = 599 \text{ nm}$). Im Bereich der $\pi\pi^*$ - und $n\pi^*$ -Bande sind die in den Transienten auftretenden Kinetiken zwar ähnlich, die zugehörigen Amplitudenspektren jedoch sind teilweise sehr unterschiedlich. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die S_n -Potentialflächen ($n > 1$) bei einer Anregung aus dem cis -Zustand bei IAPB und IAMPB etwas unterschiedliche Form haben müssen. Eine mögliche Ursache für die beobachteten Unterschiede der Transienten von IAPB und IAMPB bei der $cis \rightarrow trans$ -Reaktion könnte eine, durch die bei IAMPB zusätzlich vorhandene Methylengruppe verursachte, geänderte Geometrie sein. In der cis -Konfiguration könnten aufgrund des Spacers andere sterische Hinderungen⁷ als bei IAPB auftreten. Dies bedingt für die cis -Isomere von IAMPB veränderte Potentialverläufe sowie das Auftreten der 58 ps-Kinetik. In der $trans$ -Konfiguration hingegen ist das Phenylalanin am N-terminalen Ende

⁷z.B. von den Seitengruppen der Aminosäuren

des Chromophors von vorne herein von den restlichen Aminosäuren am C-terminalen Ende räumlich separiert. Somit sollten bei den *trans*-Isomeren von IAPB und IAMPB keine großen Unterschiede auftreten. Dies konnte in den Femtosekundenmessungen bestätigt werden.

Die Quantenausbeute für die *cis*→*trans*-Isomerisierung beträgt $\Psi = 70\%$ bei 1.6% angeregten Molekülen im Anregungsvolumen. Somit liegt der ermittelte Wert über dem von IAPB ($\Psi = 44\%$, *c*→*t*). Aufgrund der erwähnten Unsicherheiten bei der Bestimmung der Quantenausbeute (relativer Fehler etwa 50%) könnten die Quantenausbeuten von IAMPB und IAPB (*c*→*t*) allerdings innerhalb der Fehlergrenzen auch identisch sein. Die bisher generelle Eigenschaft, daß die Quantenausbeute für die *cis*→*trans*-Reaktion größer als für die *trans*→*cis*-Richtung ist, ist auch hier eindeutig gegeben.

Zusammenfassung

IAMPB verhält sich in vielerlei Hinsicht ähnlich wie IAPB, das Pendant aus der APB-Familie. Das *trans*-IAMPB-Peptid ist bezüglich der Kinetiken von IAPB (*t*→*c*) nicht unterscheidbar. Das *cis*-Isomer von IAMPB hingegen isomerisiert etwas schneller als *cis*-IAPB. Die Quantenausbeuten sind ebenfalls mit dem linearen APB-Peptid vergleichbar und betragen etwa 5% (*t*→*c*) bzw. 70% (*c*→*t*). Die Voraussetzungen für eine Studie der zyklischen AMPB-Peptide sind somit genauso gut wie bei der APB-Familie.

7.3.3 Die Modellpeptide cAMPB und bcAMPB

Die Erkenntnisse aus den NMR-Strukturen (Abb. 4.6) lassen erwarten, daß die Auswirkungen der Zyklisierung auf den Isomerisierungsvorgang beim bizeyklischen AMPB-Peptid größer sein sollten als beim monozyklischen AMPB. Denn im *trans*-Zustand ist die Einschränkung des Konformationsraumes für bcAMPB erheblich stärker als für cAMPB. Außerdem ist beiden Peptiden in der *cis*-Konfiguration des Chromophores ein größerer Konformationsraum zugänglich. Die erwarteten Auswirkungen sollten sich sowohl in den Isomerisierungsquantenausbeuten und den initialen Isomerisierungskinetiken äußern als auch zu einem Auftreten von sehr langsamen Prozessen auf der Zeitskala von wenigen Nanosekunden führen, wie dies bei der APB-Familie beobachtet wurde. Der visuelle Vergleich der NMR-Strukturen von cAPB und cAMPB/bcAMPB legt hierbei nahe, daß für das bizeyklische Peptid eine ähnliche Beeinflussung des Isomerisierungsvorganges wie für cAPB zu erwarten ist. Hingegen sollten bei cAMPB die in den Ergebnissen sichtbaren Auswirkungen der Zyklisierung geringer ausfallen. Ob die vereinfachende Vorstellung, daß zum einen die Zyklisierung bzw. die Bewegung der Peptidkette zu einer Kraft auf den Chromophor führt, welche die Isomerisierung hemmt oder beschleunigt und zum anderen die spektrale dynamische Antwort des Chromophores die Bewegung der Peptidkette widerspiegelt, für eine Erklärung der beobachteten Ergebnisse ausreichend ist, soll anhand der durchgeführten Messungen diskutiert werden.



trans→*cis*-Isomerisierung

Beim Vergleich der aus der Datenanpassung erhaltenen Kinetiken von cAMPB und bcAMPB fällt zu allererst auf, daß beim monozyklischen AMPB-Peptid vermeintlich keine schnelle Kinetik auftritt, da die schnellste Zerfallszeit 1.7 ps beträgt (vgl. Abb. 6.10). Die kritische Betrachtung der Ergebnisse zeigt, daß bei dem Datensatz von cAMPB der Algorithmus zur Datenanpassung bei der Bestimmung einer schnellen Zeitkonstante versagen muß. Denn zum einen sind die Meßdaten aufgrund von nicht korrigierbaren Meßsignalen durch das Lösungsmittel erst ab einer Verzögerungszeit von $t_D = 200$ fs verwendbar. Zum anderen erschwert das vorhandene Rauschen der Daten eine Anpassung mit einer Zeitkonstanten im Bereich von 400 fs, zumal nur eine, verglichen mit den nachfolgenden Kinetiken, kleine Amplitude zu erwarten ist.

Die für das bizyklische AMPB-Peptid erhaltene schnellste Zeitkonstante (300 fs) ist 1.5-2 mal kleiner als jene von lAMPB (580 fs) und AMPB (470 fs). Der direkte Vergleich der schnellsten Reaktionskinetiken von bcAMPB und cAMPB mittels Zeitkonstanten ist aus oben genannten Gründen nicht möglich. Man kann jedoch an den transienten Spektren von lAMPB, cAMPB und bcAMPB (Abb. 6.6, 6.10 und 6.14) erkennen, daß die zeitliche Entwicklung der Absorption von lAMPB und cAMPB sehr ähnlich ist. Es erfolgt bei beiden Proben im Zeitschritt von $t_D = 200$ fs auf $t_D = 500$ fs im Spektralbereich $\lambda_{\text{probe}} \geq 360$ nm eine ca. halb so große Absorptionsabnahme wie im Zeitschritt von $t_D = 500$ fs auf $t_D = 2$ ps. Hingegen sieht man an den transienten Spektren von bcAMPB, daß hier die Größe der Absorptionsabnahme in den ersten 500 fs etwa vergleichbar ist mit jener von $t_D = 500$ fs bis $t_D = 2$ ps, also schneller abläuft als bei lAMPB und auch bei cAMPB.

Der visuelle Vergleich der Transienten von lAMPB, cAMPB und bcAMPB bei vier Abtastwellenlängen (vgl. Abb. 7.9) verdeutlicht und erweitert die Aussagen: das lineare und das monozyklische AMPB-Peptid besitzen nahezu identische Kinetiken. Der Unterschied in der zu langen Verzögerungszeiten verbleibenden Absorptionsänderung bei $\lambda_{\text{probe}} = 350$ nm ist vor allem durch die unterschiedlichen Isomerisierungsquantenausbeuten bedingt (siehe unten). Das Peptid bcAMPB hingegen zeigt eine wesentlich schnellere Absorptionsabnahme innerhalb der ersten 500 fs. Daher sollte man für die Kinetiken und auch die zugehörigen Amplitudenspektren von cAMPB und lAMPB ähnliche Werte erwarten. Das Fehlen einer Zeitkonstanten im 400 fs-Zeitbereich ist somit tatsächlich auf ein, in diesem Fall unvermeidliches, Versagen des Fitalgorithmus zurückzuführen.

Die naheliegende Erklärung für den Unterschied in den schnellsten Reaktionszeiten von AMPB, lAMPB und cAMPB auf der einen Seite und bcAMPB auf der anderen ist folgende: Wie schon bei den APB-Peptiden gesehen, bewirkt die Zyklisierung der Aminosäurekette eine Zugkraft auf den Chromophor im *trans*-Zustand. Durch den, bei der AMPB-Familie zusätzlich vorhandenen flexiblen Spacer kann die mechanische Spannung im monozyklischen AMPB-Peptid reduziert werden, indem sich die Methylengruppe etwas aus ihrer Gleichgewichtslage⁸

⁸Die Gleichgewichtslage definiert sich durch die Position der Methylengruppe ohne zusätzliche externe Kraft (vgl. lAMPB).

herausbewegt. Dadurch wird der Einfluß der externen Kraft auf das Azobenzol selbst vermindert. Da die Methylengruppe nicht in das konjugierte π -Elektronensystem integriert ist (vgl. Abschnitt 4.3.2), muß mit der Veränderung der Position dieser Gruppe nicht zwangsläufig eine Veränderung des Absorptionsspektrums einhergehen. Die äußere Kraft auf den lichtabsorbierenden Teil des Chromophores wird bei cAMPB somit geringer sein als bei cAPB. Der Konformationsraum, welcher der Aminosäurekette zugänglich ist, ist aufgrund des Spacers für cAMPB größer als für cAPB, wie auch die NMR-Strukturen zeigen. Wird jedoch die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen geschlossen (bcAMPB), reduziert sich die geometrische Ausdehnung des Peptides und der mechanische Zug auf den Chromophor wächst. Damit verbunden beschleunigt sich auch die initiale Reaktion von *trans*-bcAMPB bei einer Anregung, wie dies auch bei den Experimenten an *trans*-cAPB beobachtet wurde. Beim monozyklischen *trans*-AMPB-Peptid hingegen ist die externe treibende Kraft auf den Chromophor durch den Spacer so stark reduziert, daß keine Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit festzustellen ist. Verglichen mit lAMPB und cAMPB besitzt bei bcAMPB die Amplitude der schnellsten Kinetik für $\lambda_{\text{probe}} \geq 500$ nm einen größeren relativen Anteil am Gesamtsignal. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die treibende Kraft der Peptidkette: es reagieren bei bcAMPB prozentual mehr Moleküle in 300 fs als bei lAMPB in 580 fs.

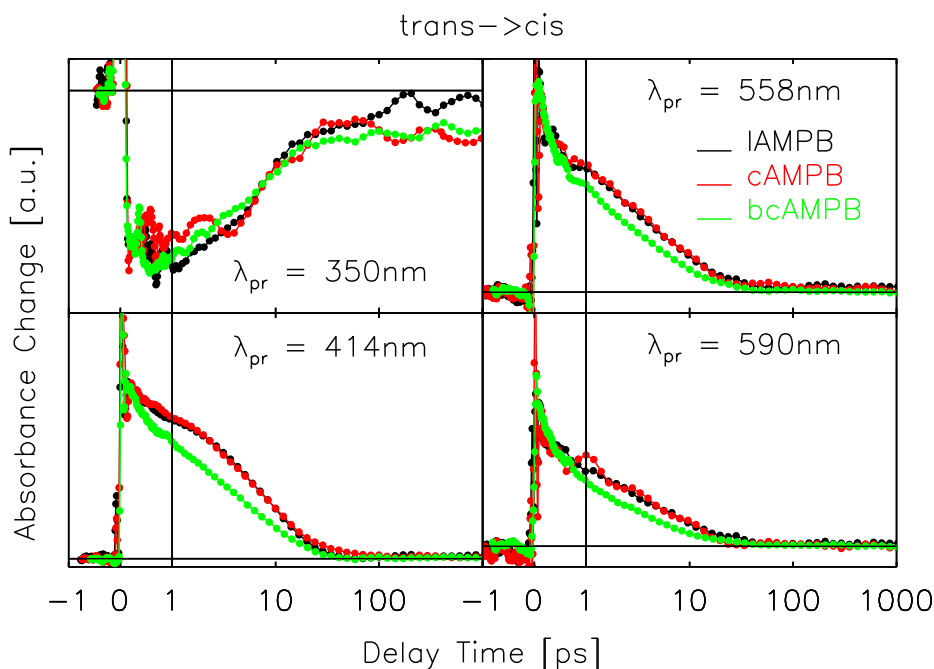


Abbildung 7.9: Vergleich von Transienten des linearen (schwarz), zyklischen (rot) und bizeyklischen (grün) AMPB-Peptides für die Reaktionsrichtung *trans*→*cis* bei vier ausgewählten Abtastwellenlängen. Die dargestellten Meßkurven wurden so aufeinander normiert, daß die Absorptionsänderung bei $t_D = 200$ fs für alle drei Proben gleich groß ist.

Die Zeitkonstanten im Bereich weniger Pikosekunden (AMPB: 1.6 ps, cAMPB: 1.7 ps, bcAMPB: 1.6 ps) sind von der Zyklisierung nicht beeinflusst. Lediglich der spektrale Verlauf

der Amplitudenspektren ist bei bcAMPB verglichen zu AMPB leicht unterschiedlich (vgl. Abb. 6.2 und 6.14). Bei lAMPB konnte keine Kinetik in diesem Zeitbereich gefunden werden. Das Amplitudenspektrum der 1.7 ps-Kinetik von cAMPB kann wiederum nur bedingt einbezogen werden, da dieses durch das Fehlen einer schnelleren Kinetik verfälscht ist. Trotzdem erkennt man in diesem Amplitudenspektrum bei $\lambda_{\text{probe}} \geq 450 \text{ nm}$ positive Amplituden, ein globales Maximum bei $\lambda_{\text{probe}} = 400 \text{ nm}$ sowie zu noch kürzeren Wellenlängen stark abnehmende Amplituden. Somit ist dieses Amplitudenspektrum demjenigen der 1.6 ps-Kinetik von bcAMPB qualitativ ähnlich. Der spektrale Verlauf der Amplituden im Bereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption bedeutet in allen Fällen (AMPB, cAMPB, bcAMPB) die Bildung eines Zustandes, der so absorbiert wie das jeweilige *trans*-Isomer. Man beobachtet daher den Rückgang des Ausbleichens der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande. Im langwelligen Spektralbereich ($\lambda_{\text{probe}} \geq 500 \text{ nm}$) weisen die positiven Amplituden auf einen $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang hin. Somit beobachtet man bei dieser Kinetik hauptsächlich den Übergang vom angeregten Zustand in der *trans*-Ausgangszustand. Ob desweiteren auch *cis*-Isomere mit einer Zeitkonstanten im Zeitbereich von 1 – 2 ps gebildet werden, kann nicht entschieden werden.

Im 10 ps-Zeitbereich sind die Kinetiken der AMPB-Peptide sowie des AMPB-Chromophores einander sehr ähnlich. Der spektrale Verlauf der Amplituden der zugehörigen Zeitkonstanten (AMPB: 7.9 ps; lAMPB: 8.8 ps; cAMPB: 9.6 ps; bcAMPB: 10 ps) ist bei den vier Proben nahezu identisch und beschreibt wieder einen Übergang von der S_1 -Potentialfläche in den *trans*-Ausgangszustand und damit einen Verlustkanal im Hinblick auf die Isomerisierungsquantenausbeuten. Die Amplitudenspektren der 8.8 ps-Zeit (lAMPB) und 9.6 ps-Zeit (cAMPB) sind zusätzlich vom absoluten Wert sowie vom relativen Anteil am Gesamtsignal fast gleich. In beiden Proben dominiert diese Kinetik (vgl. Abb. 6.6 und 6.10). Beim bizyklischen Peptid ist die Kinetik im 10 ps-Zeitbereich langsamer (10.4 ps) als bei lAMPB/cAMPB. Ursache dafür könnte die Reorganisation der direkt an den Chromophor anschließenden Aminosäuren sein: nach der Anregung bewegt sich der Chromophor auf der S_1 -Potentialfläche auf das Minimum der S_1 -Fläche zu. Dort angekommen wird die Geometrie des Farbstoffes einem Zwischenzustand zwischen der *trans*- und der *cis*-Konformation entsprechen. Bei dem Anteil der angeregten Moleküle, der etwa 10 ps im angeregten Zustand verweilt, beginnen sich die zum Chromophor benachbarten Aminosäuren der neuen Geometrie anzupassen. Diese Anpassungsbewegung wird umso schneller geschehen, je größer die Kräfte auf die Aminosäuren, d.h. die mechanische Ringspannung ist. Sie vollzieht sich also bei bcAMPB schneller als bei cAMPB und bei cAMPB schneller als bei lAMPB. Ein Großteil der Moleküle vollendet allerdings die Isomerisierungsbewegung nicht (siehe unten), sondern kehrt in den *trans*-Zustand zurück. Diese Rückkehr in den *trans*-Zustand ist aber umso schwieriger, je weiter die Reorientierung der erwähnten Aminosäuren fortgeschritten ist und wird deshalb bei bcAMPB langsamer geschehen als bei cAMPB und bei cAMPB wiederum langsamer als bei lAMPB. Ebenso ist die Abnahme der relativen Stärke der Amplitude der 10 ps-Zeitkonstante von bcAMPB im Vergleich zu cAMPB im Bereich der Grundzustandsabsorption zu verstehen: mit wachsender Schwierigkeit, in den *trans*-Ausgangszustand zurückzukehren, sollte sich die Isomerisierungswahrscheinlichkeit erhöhen. Dadurch verringert sich der charakteristische Beitrag zum Amplitudenspektrum der 10 ps-Kinetik im Spektralbereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption. Bei cAMPB ist diese Auswirkung der Zyklisierung nicht so stark, weswegen bei diesem Molekül die 9.6 ps-Kinetik stärker hervortritt als bei bcAMPB.

Eine Kinetik mit einer Zeitkonstanten größer als einhundert Pikosekunden ist nur bei dem monozyklischen AMPB-Peptid ($t \rightarrow c$) erkennbar gewesen. Die Amplitude der 120 ps-Zeit (cAMPB) hat außerdem nur weniger als 10% Anteil am Gesamtsignal und tritt nur in der $\pi\pi^*$ -Bande auf. Als Ursache dieses Signals kommen drei Prozesse in Frage. Zum einen könnte die Rotationsdepolarisation (siehe Beginn Kapitel 5) ein derartiges Amplitudenspektrum hervorrufen, wenn das Signalverhältnis der Messungen mit paralleler und senkrechter Polarisationsgeometrie gestört war⁹. Dafür würde sprechen, daß die Bandenform exakt mit dem des Spektrums der ∞ -Zeitkonstante übereinstimmt. Dagegen spricht, daß bei keiner anderen bisher diskutierten Probe eine Rotationsdepolarisation sichtbar war.

Andere mögliche Ursachen könnten Prozesse sein, wie sie in Abbildung 7.10 dargestellt sind: Nach der Anregung kehren die cAMPB-Moleküle schnell auf die Grundzustandsfläche zurück. Wie oben ausgeführt, wird ein erheblicher Anteil der angeregten Moleküle zurück in den Ausgangszustand reagieren. Ein gewisser Bruchteil der Chromophore wird jedoch aufgrund der schon begonnenen Bewegung der Peptidkette daran gehindert sein, sofort wieder die für

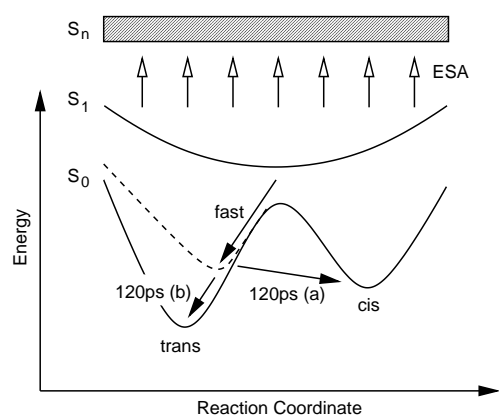


Abbildung 7.10: Erklärung der Ursache der Pikosekundenkinetik bei cAMPB, $trans \rightarrow cis$ -Reaktion (vgl. Text).

den Farbstoff optimale *trans*-Geometrie einzunehmen. Dieser „verspannte“ Chromophor ist energetisch etwas angehoben, was zu einem rotverschobenen *trans*-Absorptionsspektrum führt (in Abb. 7.10 übertrieben eingezeichnet). Nun sind zwei Varianten denkbar. Zum einen könnte doch noch eine, nun thermisch aktivierte, Isomerisierung erfolgen (Variante a). Zum anderen ist ein langsames Entspannen des Chromophores mit einer Zeitkonstanten von 120 ps vorstellbar (Variante b.) Da im langwelligen Spektralbereich keine Absorptionsänderung auf der 100 ps-Zeitskala beobachtet wurde, kann der verspannte Zwischenzustand energetisch nicht sehr weit über dem Potentialminimum des *trans*-Zustandes liegen. Dann spricht aber gegen die Variante a, daß eine sehr hohe Potentialbarriere thermisch überwunden werden muß, um die Isomerisierung doch noch zu vollziehen. Ein Übergang von einem energetisch leicht angehobenen zum relaxierten Zustand sollte mit einem Amplitudenspektrum verknüpft sein, welches in erster Näherung der Ableitung des Absorptionsspektrums entspricht (siehe Diskussion unten,

den Farbstoff optimale *trans*-Geometrie einzunehmen. Dieser „verspannte“ Chromophor ist energetisch etwas angehoben, was zu einem rotverschobenen *trans*-Absorptionsspektrum führt (in Abb. 7.10 übertrieben eingezeichnet). Nun sind zwei Varianten denkbar. Zum einen könnte doch noch eine, nun thermisch aktivierte, Isomerisierung erfolgen (Variante a). Zum anderen ist ein langsames Entspannen des Chromophores mit einer Zeitkonstanten von 120 ps vorstellbar (Variante b.) Da im langwelligen Spektralbereich keine Absorptionsänderung auf der 100 ps-Zeitskala beobachtet wurde, kann der verspannte Zwischenzustand energetisch nicht sehr weit über dem Potentialminimum des *trans*-Zustandes liegen. Dann spricht aber gegen die

⁹In Messungen unter dem „magischen Winkel“ sollte keine Rotationsdepolarisation zu sehen sein. In dieser Arbeit wurden jedoch nur Messungen mit zueinander parallel und senkrecht orientierter Polarisation von Anregungs- und Abtastlichtimpuls durchgeführt. Aus diesen Meßdaten wurde das Signal für eine Messung unter magischem Winkel berechnet (Gl. 2.6). Es könnten sich jedoch zwischen der Messung mit paralleler und senkrechter Anreg/Abtastgeometrie die experimentellen Parameter verändert haben. Möglich ist dies z.B. dadurch, daß zwischen den beiden Messungen das Experiment nachjustiert werden mußte. Ist im Anschluß an die Justage z.B. der Bündelradius des Anregungslichtes ein wenig größer als vor der Justage, so werden weniger Moleküle pro Volumeneinheit angeregt. Dadurch wird das erhaltene Meßsignal kleiner sein als es ohne die Änderung der Systemparameter gewesen wäre. In Folge davon verschwinden Signalbeiträge der Rotationsdepolarisation bei der Berechnung der Meßkurven für den magischen Winkel nicht mehr vollständig.

c→t-Richtung, Abb. 7.11). Die Ableitung des Absorptionsspektrums von *trans*-cAMPB ist bei 370 nm maximal und verschwindet bei 340 nm sowie bei ≈ 400 nm. Das Amplitudenspektrum der 120 ps-Zeit von cAMPB gleicht somit zwar qualitativ der Ableitung des Absorptionsspektrums von *trans*-cAMPB. Das Maximum des Amplitudenspektrums liegt jedoch bei ≈ 360 nm und ist somit relativ zum Maximum der Ableitung (370 nm) etwa 10 nm blauverschoben. Dies spricht gegen Variante b. Die oben dargelegten Argumente lassen daher die Rotationsdepolarisation als die plausibelste Ursache der 120 ps-Kinetik bei cAMPB erscheinen. Ebenso ist auch eine Überlagerung der genannten Prozesse denkbar. Eine endgültige Entscheidung für ein Modell kann anhand der vorliegenden Daten nicht gefällt werden.

Einen weiteren Hinweis, daß das einfache Bild einer mechanischen Spannung auf den Chromophor aufgrund der Zyklisierung zutreffend ist, gibt die Auswertung der Quantenausbeuten. Für deren Berechnung nach der in Abschnitt 7.2.2 beschriebenen Methode wird die maximale Produktabsorption im Spektralbereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption benötigt. Die spektrale Position des Maximums der Produktabsorptionsbande (Dauerstrichdifferenzspektrum) liegt aber außerhalb des untersuchten Meßbereiches. Zudem nimmt das Rauschen der Transienten zu blauen Wellenlängen immer mehr zu. Daher ist der Fehler der angegebenen Quantenausbeuten bei den AMPB-Peptiden größer als bei der APB-Familie. Die maximalen Quantenausbeuten Ψ_{max}^{TS} sind ebenfalls mit einem größeren Fehler behaftet als bei den APB-Peptiden. Eine Tendenz beim Vergleich der Quantenausbeuten von lAMPB, cAMPB und bcAMPB ist aber trotzdem sichtbar. Für cAMPB ergibt sich, bei einer Anregung von 1.5% der Moleküle im Anregungsvolumen, eine Quantenausbeute $\Psi = 22\%$ und $\Psi_{max}^{TS} = 18\%$ sowie $\Psi^{TS} \approx 14\%$. Innerhalb der Fehlergrenzen kann somit die Forderung $\Psi < \Psi_{max}$ erfüllt werden.

Bei bcAMPB ist die Bestimmung der Quantenausbeuten noch etwas schwieriger, da nicht eindeutig ist, bei welcher Wellenlänge der Wert der Absorptionsänderung für die Berechnung abgelesen werden soll. Ein stures Ablesen der Werte führt auf $\Psi = 35\%$ (1.3% der Moleküle im Anregungsvolumen werden angeregt) und $\Psi_{max}^{TS} = 25\%$. Nimmt man in den transienten Spektren die Absorptionsänderung der kurzweiligsten Transiente etwas kleiner an als gemessen, um einen vermeintlich physikalisch sinnvolleren Verlauf der Spektren zu erreichen (vgl. auch das gestrichelt eingezeichnete Dauerstrichdifferenzspektrum in den transienten Spektren Abb. 6.10, links), dann ergibt sich $\Psi = 20\%$ und $\Psi_{max}^{TS} = 10\%$.

Hilfe bietet in diesem Fall das Betrachten der Abbildung 7.9. Bei der Abtastwellenlänge $\lambda_{probe} = 350$ nm ist die Produktbildung sehr gut sichtbar. Nimmt man an, daß die Grundzustandsabsorption sowie die Absorption aus dem angeregten Zustand bei den drei AMPB-Peptiden jeweils etwa gleich groß ist, dann muß die Absorptionsänderung zu frühen Verzögerungszeiten bei lAMPB, cAMPB und bcAMPB gleich sein. Unter dieser Annahme sind die Transienten in Abbildung 7.13 aufeinander normiert. Die Produktabsorption $\Delta A(t_D \geq 1 \text{ ns}, \lambda_{probe} = 350 \text{ nm})$ ist bei beiden zyklischen Peptiden gleich groß und etwa dreimal so groß wie bei lAMPB. Multipliziert man die für lAMPB erhaltene (maximale) Quantenausbeute mit dem Faktor drei, dann ergibt sich für cAMPB und bcAMPB $\Psi_{max}^{TS} \approx 15\%$. Dies ist mit dem oben angegebenen Wert für die maximale Quantenausbeute verträglich. Ebenso ergibt sich $\Psi = 15\%$, ein Wert, der mit den berechneten Quantenausbeuten von cAMPB und bcAMPB

vereinbar ist. Somit liegt die Quantenausbeute der Isomerisierung von cAMPB und bcAMPB bei etwa 15 – 20%. Sie ist signifikant höher als bei lAMPB. Ein Unterschied zwischen den Quantenausbeuten der beiden zyklischen Peptide war allerdings nicht feststellbar. Dies bedeutet, daß die Zyklisierung diese Isomerisierung zwar unterstützt, eine höhere mechanische Vorspannung aber nicht zu einem weiteren Ansteigen der Quantenausbeute führt. Es erfolgt dann nur eine Beschleunigung der Reaktion.

cis→*trans*-Isomerisierung

Die schnellste Kinetik bei der *cis*→*trans*-Isomerisierung des Chromophores von cAMPB ist tendenziell etwas schneller (190 fs) als bei reinem AMPB (250 fs) und lAMPB (250 fs), während bei bcAMPB eine Verlangsamung dieser Kinetik (300 fs) gegenüber den anderen AMPB-Peptiden auftritt. Die initiale *cis*→*trans*-Reaktion ist bei bcAMPB somit genauso langsam wie diejenige der *t*→*c*-Richtung. Ebenso wie bei AMPB und lAMPB erkennt man in den Amplitudenspektren der schnellsten Kinetiken von cAMPB und bcAMPB im Spektralbereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption den Aufbau einer Produktabsorption (vgl. Abb. 6.12 und 6.16). Jedoch absorbiert der gebildete Produktzustand etwas rotverschoben ($\lambda_{max} = 350$ nm) gegenüber dem stationären *trans*-Zustand ($\lambda_{max} = 338$ nm), eine Tatsache, die bei AMPB nicht beobachtet wurde¹⁰. Die Amplitude der 190 fs-Zeit von cAMPB hat, verglichen mit jener der 250 fs-Kinetik von lAMPB, einen größeren relativen Anteil am Gesamtsignal. Der Anteil der Amplitude der 300 fs-Kinetik bei bcAMPB ist hingegen gegenüber cAMPB wieder reduziert. Ursache für den geringeren Anteil der 300 fs-Kinetik am Meßsignal könnte die Anzahl der in diesem Zeitbereich reagierenden Moleküle sein. Diese Anzahl sollte bei bcAMPB verringert sein. Denn verglichen zu cAMPB startet bei bcAMPB ein größerer Prozentsatz aller *cis*-Isomere die Isomerisierungsbewegung mit Konformationen, welche eine schnelle Reaktion nicht zulassen.

Das Amplitudenspektrum der 1.3 ps-Zeit von cAMPB weist im langwelligen Spektralbereich $\lambda_{probe} \geq 500$ nm relativ zum Spektrum der 190 fs-Zeitkonstante eine Blauverschiebung auf, deren Ursache vermutlich ein Abkühlen des angeregten Zustandes ist und bei den APB-Peptiden schon diskutiert wurde (vgl. Abschnitt 80). Im Spektralbereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption des Amplitudenspektrums ist die Bildung eines intermediären Photoproduktes mit 1.3 ps erkennbar. Dieses absorbiert ebenfalls rotverschoben gegenüber dem stationären *trans*-cAMPB, wie jenes der 190 fs-Kinetik. Es muß daher noch mindestens ein weiterer Reaktionsschritt folgen, bei dem sich die Absorption des Photoproduktes derjenigen von *trans*-cAMPB angleicht.

In bcAMPB konnte eine Zeitkonstante von etwa 1.3 ps auch durch die Hinzunahme eines weiteren Exponentialzerfalles nicht nachgewiesen werden. Ein Vergleich des Amplitudenspektrums der 5.4 ps-Kinetik bei bcAMPB mit jenem der 1.3 ps-Zeitkonstante von lAMPB und auch cAMPB liefert im Spektralbereich $\lambda_{probe} \geq 450$ nm eine weitgehende Übereinstimmung der Bandenform und -position. Bei kürzeren Wellenlängen ($\lambda_{probe} \leq 450$ nm) gleicht das

¹⁰Bei AMPB bildet sich mit 250 fs ein Zustand, der so wie *trans*-AMPB in der Dauerstrichabsorptionsmessung absorbiert ($\lambda_{max} = 340$ nm, vgl. Abb. 4.3).

Amplitudenspektrum von bcAMPB (5.4 ps) mehr dem der 10 ps-Kinetik von lAMPB. Es beschreibt die Bildung eines gegenüber *trans*-bcAMPB ca 15 nm rotverschoben absorbierendes Photoproduktes. Vermutlich ist die 1.3 ps-Kinetik von lAMPB bei bcAMPB auf 5.4 ps verlangsamt. Dadurch sind die Prozesse, die bei lAMPB der 1.3 ps- und 10 ps-Kinetik zugrunde liegen, bei bcAMPB durch den verwendeten Fitalgorithmus nicht mehr trennbar. Somit überlagern sich die Beiträge dieser Prozesse im Amplitudenspektrum der 5.4 ps-Zeit. Ein Grund für die Verlangsamung der Kinetik von 1.3 ps auf 5.4 ps könnte die Peptidkette sein, die im bizyklischen Peptid aufgrund der reduzierten geometrischen Länge die Isomerisierungsbewegung des Chromophores zu einem früheren Zeitpunkt bremst als dies im monozyklischen Peptid der Fall ist.

Die nur bei cAMPB, aber nicht bei bcAMPB vorhandene Kinetik im 10 ps-Zeitbereich (cAMPB: 9.3 ps) besitzt ein sehr ähnliches Amplitudenspektrum wie die 10 ps-Kinetik von lAMPB. Die relative Amplitudenstärke der 9.3 ps-Zeitkonstante am Gesamtsignal ist bei cAMPB höher als diejenige der 10 ps-Kinetik bei lAMPB. Dies bedeutet, daß bei cAMPB ein größerer Anteil der angeregten Moleküle langsamer reagiert als in lAMPB. Am spektralen Verlauf des Amplitudenspektrums der 9.3 ps-Kinetik im Spektralbereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption erkennt man, daß auch mit dieser Zeitkonstante *trans*-cAMPB gebildet wird.

Die Amplitudenspektren der langsamen Kinetiken (Zeitkonstanten > 50 ps) von lAMPB, cAMPB und bcAMPB ergeben auf den ersten Blick ein sehr uneinheitliches Bild. Die 180 ps-Zeit von cAMPB besitzt ein Spektrum, welches dem der 9.3 ps-Kinetik sehr ähnlich sieht. Nur ist die Amplitudenstärke im langwelligen Spektralbereich relativ zur *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande bei der 180 ps-Zeitkonstante kleiner als bei der 9.3 ps-Zeit. Der Amplitudenverlauf im Spektralbereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption weist scheinbar auf die Bildung von *trans*-cAMPB mit 180 ps hin. Die 58 ps bzw. 100 ps-Kinetik bei lAMPB bzw. bcAMPB beschreibt hingegen einen anderen Prozeß. Denn im Bereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption unterscheiden sich die zu diesen Kinetiken gehörenden Amplitudenspektren stark von demjenigen der 180 ps-Zeitkonstante von cAMPB. Eine mögliche Interpretation bzw. Lösung dieses Problems folgt weiter unten. Der spektrale Verlauf der Amplituden der 58 ps (lAMPB), 180 ps (cAMPB) und 100 ps-Kinetik (bcAMPB) im Wellenlängenbereich $\lambda_{\text{probe}} \geq 400$ nm weist auf ein Verschwinden einer langwelligen Absorption hin. Dies bedeutet, daß der Ausgangszustand für diese Kinetik entweder auf der S_1 -Potentialfläche liegt oder ein energetisch stark angehobener S_0 -Zustand sein muß. Im ersten Fall resultiert die langwellige Bande im Amplitudenspektrum von der excited-state Absorption. Im anderen Fall ist die Grundzustandsabsorption durch die Anhebung der Energie des Grundzustandes rotverschoben. Im Spektralbereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande würde man für einen langsamen Übergang vom angeregten Zustand in das *trans*-Minimum der Grundzustandspotentialfläche in den Amplitudenspektren negative Amplituden erwarten, die einen spektralen Verlauf ähnlich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption zeigen. Denn bei einem langsamen Übergang (Zeitkonstante > 50 ps) ist das Abkühlen auf der Grundzustandsfläche nicht sichtbar, da der Kühlvorgang erheblich schneller abläuft (vgl. Abschnitt 7.1). Somit ist in den Amplitudenspektren die direkte Bildung des relaxierten Photoproduktes (*trans*-Isomer) mit dieser Zeitkonstante sichtbar. Würde die Kinetik in diesem Zeitbereich die Reaktion zurück in die *cis*-Konformation beschreiben, würde man in den Amplitudenspektren nur die Abnahme

der excited-state Absorption sehen, da die *cis*-Isomere der AMPB-Familie im Wellenlängenbereich um 350 nm nur sehr schwach absorbieren. Zwar ist über die Form des excited-state Spektrums nicht viel bekannt, so daß keine Vorhersagen für den Amplitudenverlauf gemacht werden können. Es kann jedoch die sichere Aussage getroffen werden, daß im Fall der Rückreaktion in den *cis*-Zustand im Wellenlängenbereich der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande im Amplitudenspektrum der zugehörigen Kinetik nur positive Amplituden durch das Abklingen der excited-state Absorption auftreten können.

Welche Signale im Spektralbereich der Grundzustandsbanden zu erwarten sind, wenn der Ausgangszustand ein energetisch angehobener Zustand auf der Grundzustandspotentialfläche ist, soll anhand von Abbildung 7.11 erläutert werden. Die energetische Anhebung führt in einfachster Näherung nur zu einer Rotverschiebung des Dauerstrichabsorptionsspektrums, da der energetische Abstand zu den elektronisch angeregten Zuständen verringert wird. Im oberen Teil von Abbildung 7.11 ist das *trans*-bcAMPB Absorptionsspektrum eingezeichnet (durchgezogene Linie). Zusätzlich ist dasselbe Spektrum um 5 nm (---) und um 15 nm (-·-·-) spektral rotverschoben gezeigt. Im unteren Teil der Abbildung sind im gleichen Maßstab Differenzspektren (rotverschoben – Originalspektrum bzw. 15 nm verschoben – 5 nm verschoben) dargestellt.

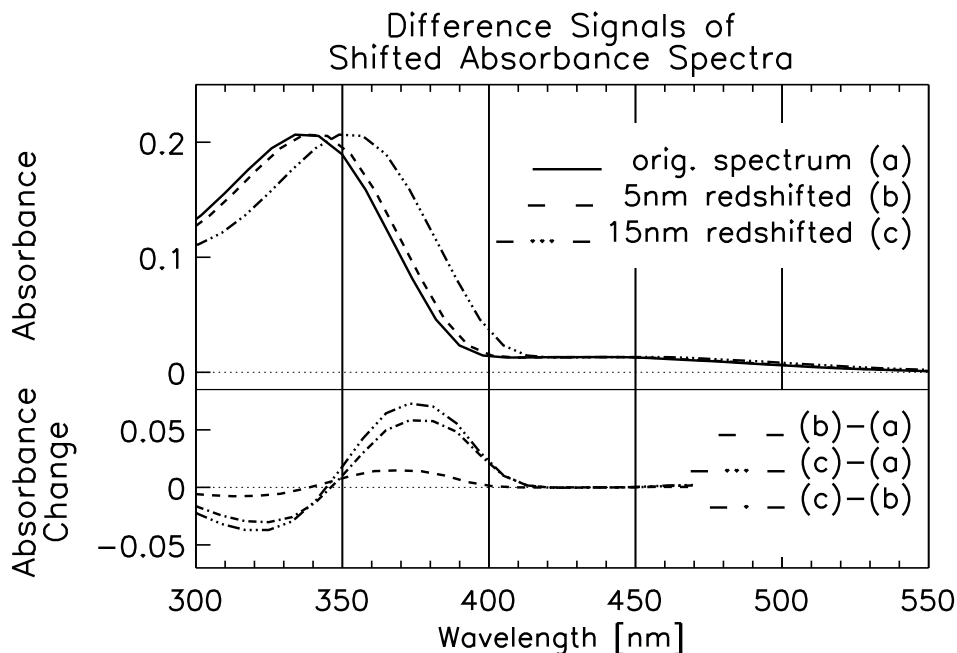


Abbildung 7.11: Erwartete Absorptionsänderungen, die durch das spektrale Schieben von Absorptionsbanden verursacht werden. Im oberen Teil ist das Absorptionsspektrum von *trans*-bcAMPB sowie dasselbe Spektrum um 5 nm bzw. 15 nm rotverschoben gezeigt. Im unteren Teil sind in demselben Maßstab wie in der oberen Abbildung die möglichen Differenzabsorptionsspektren dargestellt.

Man erkennt, daß die Differenzspektren in etwa die negative Ableitung des Absorptionsspektrums wiedergeben (v.a. ---). Zusätzlich sieht man, daß die Extremalwerte des Differenzspektrums umso geringer werden, je kleiner die Verschiebung der Spektren zueinander ist. Für

den $trans-\pi\pi^*$ -Bereich des Amplitudenspektrums der 100 ps-Kinetik von bcAMPB ergibt sich die größte Übereinstimmung mit dem Differenzspektrum (b)-(c) (— · —). Dieses ist mit einem Prozeß verknüpft, der von einem Zustand mit einem etwa 15 nm rotverschobenen Spektrum startet und bei einem Zustand endet, welcher ein, relativ zum bcAMPB- $trans$ -Isomer, ca. 5 nm rotverschobenes Absorptionsspektrum besitzt. Es sprechen also einige Punkte dafür, daß die 100 ps-Kinetik in bcAMPB eine Absenkung der Grundzustandsenergie beschreibt und nicht einen Übergang vom angeregten Zustand. Desweiteren wird diese These dadurch unterstützt, daß die schnelleren Kinetiken (300 fs und 5.4 ps) die Besetzung eines Zustandes beschreiben, dessen Absorptionsmaximum 10 – 15 nm rotverschoben von demjenigen der $trans-\pi\pi^*$ -Absorption von bcAMPB liegt.

Das Amplitudenspektrum der 1 ns-Kinetik weist keine Absorptionsänderung im langwelligen Spektralbereich auf. Deshalb kann diese Kinetik keinen $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang beschreiben. Vergleicht man die Form des Amplitudenspektrums in der $trans-\pi\pi^*$ -Bande mit den oben abgebildeten Differenzspektren, so erkennt man eine gute Übereinstimmung mit dem gestrichelten Spektrum, welches durch eine Verschiebung des Absorptionsspektrums um 5 nm entsteht.

Somit drängt sich folgende Interpretation auf: direkt nach der Anregung von bcAMPB beginnt der Chromophor mit der Isomerisierungsbewegung. Es folgt in 300 fs und 5.4 ps ein Übergang auf die Grundzustandspotentialfläche. Bei demjenigen Teil der Moleküle, der isomerisiert, erfolgt eine Relaxation in Richtung des $trans$ -Minimums der Grundzustandspotentialfläche. Diese Relaxation geschieht aber nicht, wie z.B. bei Azobenzol, in weniger als 10 ps. Vielmehr bildet sich, aufgrund des Einflusses der Peptidkette auf den Chromophor, ein energetisch höherliegendes Photoprodukt mit einer dem relaxierten $trans$ -Zustand ähnlichen Geometrie (Zustand 1 in Abb. 7.12). Der Chromophor möchte den $trans$ -Zustand einnehmen, wird aber durch die Peptidkette daran gehindert. Es ist ein verspannter $trans$ -Chromophor entstanden. Die Absorption, insbesondere im Bereich der $trans-\pi\pi^*$ -Bande, dieses intermediären Photoproduktes ist relativ zum Dauerstrichabsorptionsspektrum ca. 15 nm rotverschoben, wie den Amplitudenspektren der beiden Kinetiken (300 fs und 5.4 ps) zu

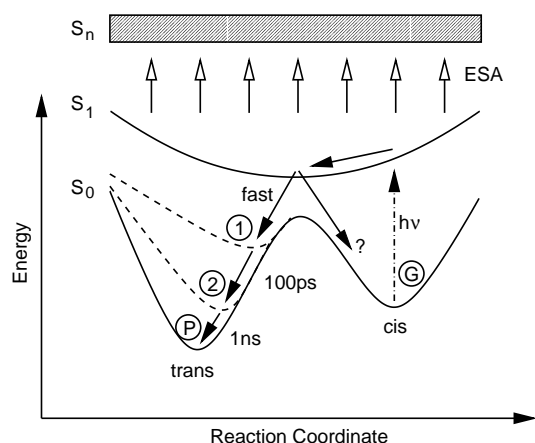


Abbildung 7.12: Reaktionsmodell für bcAMPB ($c \rightarrow t$). Auf dem Weg zum Photoprodukt P durchlaufen die Moleküle die Zwischenzustände 1 und 2. Unbekannt ist, wie die Relaxation in den Ausgangszustand G erfolgt.

entnehmen ist. Im Laufe der Zeit werden sich erst die direkt an den Chromophor angrenzenden Aminosäuren rearrangieren, später auch das restliche Peptid. Mit dieser Reorganisation ist die energetische Relaxation des Farbstoffes verbunden. Diese ist auf der 100 ps- und 1 ns-Zeitskala sichtbar. In 100 ps relaxiert das System so weit, daß das Absorptionsspektrum des Chromophores nur noch um 5 nm gegenüber dem Dauerstrichspektrum rotverschoben ist (Zustand 2 in Abb. 7.12). Mit dem Übergang von 1 \rightarrow 2 ist auch das Verschwinden der langwelligen Absorption verknüpft. Die weitere Entspannung des Chromophores in die stationäre

trans-Konfiguration (Zustand P) erfolgt in etwa 1 ns. Dann hat die externe Kraft der Peptidkette auf den Chromophor so weit nachgelassen, daß eine Beeinflussung des Absorptionsspektrums in den hier vorgestellten Experimenten nicht mehr sichtbar ist. Die Frage, ob sich die Peptidkette auf einer langsameren Zeitskala noch weiter umorganisiert, kann daher mit den durchgeführten Experimenten nicht beantwortet werden. Hierfür sind zeitaufgelöste Messungen im infraroten Spektralbereich notwendig.

Akzeptiert man dieses Reaktionsmodell, so bleibt die Frage zu klären, warum die Amplitude der 1 ns-Kinetik größer als die der 100 ps-Zeitkonstante ist, obwohl man nach Abbildung 7.11 genau den umgekehrten Fall erwarten würde. Eine mögliche Erklärung ist, daß nur ein Bruchteil aller Moleküle, deren Chromophor isomerisiert ist, den Zwischenzustand 1 bevölkern. Ein derartiges Szenario ist durchaus plausibel, wenn man berücksichtigt, daß in der *cis*-Konfiguration des Chromophores mehrere verschiedene Peptidkonformationsfamilien auftreten können (vgl. NMR-Strukturen Abb. 4.6). Werden durch einen Lichtimpuls Moleküle aus verschiedenen Startkonformationen angeregt, so ist es durchaus vorstellbar, daß die Moleküle verschiedenen Reaktionspfaden auf der S_1 -Fläche folgen: Ein Bruchteil der angeregten Moleküle weist eine räumliche Struktur auf, die einen einfachen und schnellen Übergang direkt in Zustand 2 ermöglicht. Für einen anderen Teil wiederum ist erst eine größere Umorganisation der Aminosäuren notwendig, bevor der Chromophor die Chance hat, einen relaxierten *trans*-Zustand zu erreichen. Die 100 ps-Kinetik wird nur vom letztgenannten Teil verursacht, während der Übergang von Zustand 2 \rightarrow P von allen isomerisierten Molekülen durchlaufen wird. Zusätzlich zu den bisher diskutierten Reaktionspfaden tritt sicher auch die Rückreaktion vom angeregten Zustand in den *cis*-Ausgangszustand G auf („?“ in Abb. 7.12). Eventuell gibt es sogar noch eine Rückisomerisierung von Zustand 1 \rightarrow G. Vorgänge dieser Art sind in den transienten Spektren und Amplitudenspektren nur sehr schwer zu identifizieren, da es im untersuchten Spektralbereich bei den *cis*-Isomeren keine charakteristische Absorption¹¹ wie für den *trans*-Zustand gibt. Daher kann zu diesen Vorgängen keine detailliertere Aussage getroffen werden.

Ein Blick auf das Amplitudenspektrum der 58 ps-Kinetik von lAMPB (*c* \rightarrow *t*) in Abbildung 6.8 zeigt, daß dieses Spektrum dem der 100 ps-Zeitkonstanten von bcAMPB gleicht. Somit liegt die Interpretation nahe, daß auch bei lAMPB zumindest ein Teil der angeregten Moleküle einen Zwischenzustand 1 bevölkert. Dieser muß auf der Grundzustandspotentialfläche energetisch hochliegend sein, da sonst im Amplitudenspektrum keine langwellige positive Bande auftreten würde. Im Unterschied zu bcAMPB relaxiert lAMPB mit einer Zeitkonstanten von 58 ps direkt in den Photoproduktzustand P. Eine mögliche Ursache für das Auftreten der 58 ps-Kinetik sowie das Fehlen einer solchen bei lAPB wurde bereits diskutiert.

Ein großes Rätsel birgt die Diskrepanz der spektralen Charakteristik der Zeitkonstanten im 100 ps-Zeitbereich von lAMPB und bcAMPB auf der einen und cAMPB auf der anderen Seite. Denn während die 180 ps-Kinetik von cAMPB so interpretiert werden kann, daß mit dieser Zeit ein Übergang vom angeregten Zustand in die *trans*-Konformation erfolgt, scheint bei lAMPB und bcAMPB auf der 100 ps-Zeitskala die Relaxation innerhalb der *trans*-

¹¹Hierzu müßte der Meßbereich bis auf etwa $\lambda_{\text{probe}} = 250$ nm ausgedehnt werden.

Konfiguration und nicht die Bildung von *trans*-Isomeren der dominante Prozess zu sein. Eine mögliche Erklärung ist eine teilweise Beimischung eines Rotationsdepolarisationssignales bei den Messungen an cAMPB. Für die beiden anderen Proben (lAMPB und bcAMPB) scheidet ein solcher Beitrag aus, da der spektrale Verlauf der Amplitudenspektren der langsamen Kinetiken nicht dem der ∞ -Zeitkonstante gleicht. Bei cAMPB allerdings kann aufgrund der Form des Amplitudenspektrums der 180 ps-Kinetik im Bereich der Grundzustandsabsorption die Existenz eines Rotationsdepolarisationsbeitrages nicht ausgeschlossen werden. Auch war bei der *trans*→*cis*-Isomerisierung von cAMPB eine 120 ps-Kinetik beobachtet worden, deren Ursprung nicht eindeutig festzulegen war. Dort war ebenfalls ein Beitrag durch die Rotationsdepolarisation in Erwägung gezogen worden. Für eine grobe Abschätzung kann man annehmen, daß die 120 ps-Kinetik bei cAMPB (t→c) vollständig durch Rotationsdepolarisation verursacht ist und setzt denselben relativen Beitrag¹² auch bei der c→t-Reaktionsrichtung voraus. Dann erhält man nach der Subtraktion dieses Effektes ein Amplitudenspektrum $a(\lambda) = a(\tau = 180 \text{ ps}, \lambda) - (-\frac{1}{3}a(\tau = \infty, \lambda))$ mit folgender Eigenschaft: in der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande ist der spektrale Verlauf des Amplitudenspektrums (180 ps) demjenigen der Amplitudenspektren von lAMPB (58 ps) und bcAMPB (100 ps) sehr ähnlich. Damit würde sich die Interpretation der 180 ps-Kinetik von cAMPB besser in das bestehende Reaktionsmodell integrieren lassen. Da die t→c und die c→t-Isomerisierung von cAMPB direkt hintereinander gemessen wurde, ist es durchaus möglich, daß speziell bei den Messungen an cAMPB die experimentellen Parameter vom Optimum abgewichen sind.

Bisher entstand der Eindruck, daß die Zyklisierung das Isomerisierungsverhalten des monozyklischen AMPB-Peptides nicht sonderlich beeinflusst. In Abbildung 7.13 erkennt man bei $\lambda_{\text{probe}} = 598 \text{ nm}$, daß die Transienten von lAMPB und cAMPB völlig identisch sind. Das bityklische Peptid zeigt im Vergleich zu diesen direkt nach der Anregung eine langsamere Reaktion. Desweiteren ist bei bcAMPB die Dynamik im Zeitbereich von 1 – 10 ps erheblich stärker — ein Zeichen dafür, daß ein größerer Bruchteil der angeregten Moleküle die S_1 -Potentialfläche langsamer verläßt als dies bei lAMPB und cAMPB der Fall ist. Am Rand der langwelligen Flanke der $n\pi^*$ -Bande ($\lambda_{\text{probe}} = 550 \text{ nm}$) tritt eine Änderung auf: das monozyklische Peptid ist hier zwar immer noch schneller als bcAMPB, aber langsamer als das lineare AMPB-Peptid. Bei noch etwas kürzeren Wellenlängen ($\lambda_{\text{probe}} = 518 \text{ nm}$) gleichen sich nun die Transienten von cAMPB und bcAMPB, während allein lAMPB eine schnellere Dynamik aufweist. In der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande ist kein Unterschied in den primären Kinetiken bis $t_D = 1 \text{ ps}$ sichtbar. Ob die in Abbildung 7.13 ($\lambda_{\text{probe}} = 342 \text{ nm}$) sichtbare Kinetik im Bereich von 100 ps – 1000 ps von cAMPB echt¹³ ist, kann hier nicht entschieden werden (vgl. oben).

Mittels der Transienten (Abb. 7.13) kann man auch Aussagen über die Quantenausbeuten gewinnen. Man erkennt an der nahe am Maximum der *trans*- $\pi\pi^*$ -Absorption aufgenommenen Kurve ($\lambda_{\text{probe}} = 342 \text{ nm}$), daß $\Psi_{\text{cAMPB}} \approx \Psi_{\text{lAMPB}}$ und $\Psi_{\text{bcAMPB}} \approx 0.75 * \Psi_{\text{cAMPB}}$. Diese Aussage kann getroffen werden, wenn die Kurven auf dieselbe Absorptionsänderung bei $t_D = 200 \text{ fs}$ skaliert wurden, wie in Abbildung 7.13 geschehen. Desweiteren muß beachtet werden, daß

¹²Amplituden $a(\tau = 120 \text{ ps}, \lambda) \approx -\frac{1}{3}a(\tau = \infty, \lambda)$, $\lambda = 340 \dots 380 \text{ nm}$

¹³Echt im Sinne davon, daß die Prozesse, welche die Kinetik verursachen, in der Probe ablaufen. Ein Rotationsdepolarisationssignal wäre mit dieser Definition eine „unechte“ Kinetik.

die Werte für die Quantenausbeute von cAMPB größere Unsicherheiten ausweisen wie jene von lAMPB und bcAMPB, da nicht geklärt ist, ob in den Transienten von cAMPB auch ein Rotationsdepolarisationsanteil enthalten ist (siehe oben). Eine weitere Voraussetzung, daß die eben genannten Beziehungen der Quantenausbeuten aus der Abbildung entnommen werden können, ist die Gleichheit der Absorptionsänderung direkt nach der Anregung der AMPB-Peptide. Denn wenn sich die Absorptionswirkungsquerschnitte der angeregten Zustände der AMPB-Peptide unterscheiden, ist die oben durchgeführte Skalierung auf die Gleichheit des Signales nach $t_D = 200$ fs nicht mehr sinnvoll. Zusätzlich ist für die Abschätzung der Quantenausbeuten noch zu berücksichtigen, daß bcAMPB eine Nanosekundenkinetik aufweist, also die in Abbildung 7.13 sichtbare Absorption für $t_D > 1$ ns sich noch ändert.

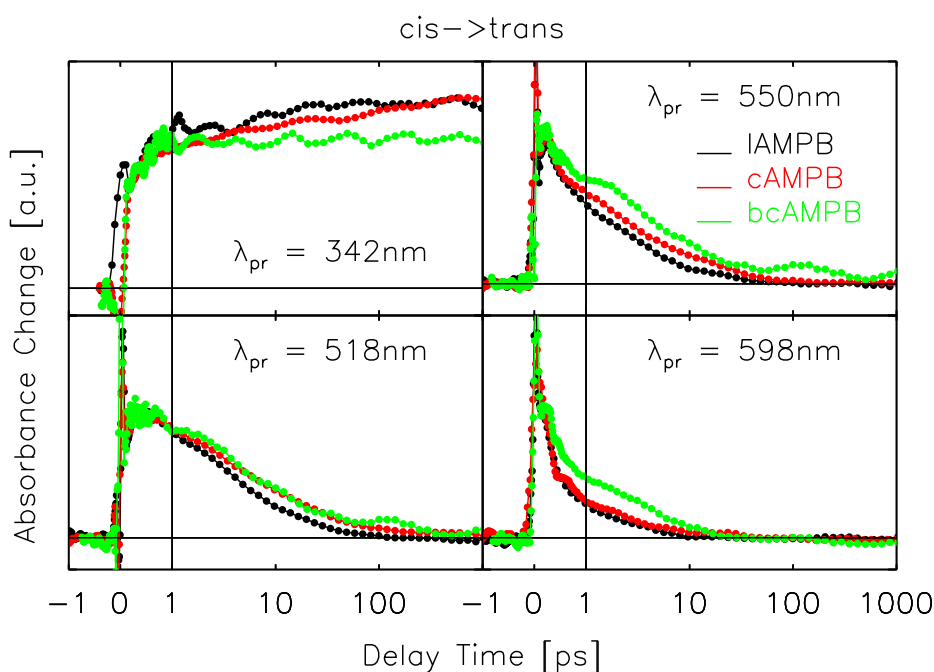


Abbildung 7.13: Vergleich von Transienten des linearen (schwarz), zyklischen (rot) und bizyklischen (grün) AMPB-Peptides für die Reaktionsrichtung $cis \rightarrow trans$ bei vier ausgewählten Abtastwellenlängen. Die dargestellten Meßkurven wurden so aufeinander normiert, daß die Absorptionsänderung bei $t_D = 200$ fs für alle drei Proben gleich groß ist.

Ermittelt man nach der in Abschnitt 7.2.2 beschriebenen Methode die Quantenausbeuten, so ergeben sich bei einer Anregung von 1.7% (cAMPB) bzw. 1.3% (bcAMPB) der Moleküle im Anregungsvolumen die Quantenausbeuten $\Psi = 70\%$ bzw. $\Psi = 50\%$. Diese Ergebnisse passen zu der aus dem Vergleich der Transienten gewonnenen Aussage, daß die Quantenausbeute bei bcAMPB gegenüber lAMPB und cAMPB reduziert ist: die mechanische Spannung in der Aminosäurekette ist im bizyklischen AMPB-Peptid so groß, daß ein verglichen zu cAMPB größerer Anteil angeregter Chromophore an der Isomerisierung gehindert, bzw. nach der Isomerisierung zu einer sofortigen Rückisomerisierung in den cis -Ausgangszustand gezwungen wird. Hingegen ist bei cAMPB keine Auswirkung der Zyklisierung auf die Quantenausbeute

sichtbar. Die Quantenausbeute von cAMPB ist innerhalb der Fehlergrenzen genauso groß wie diejenige von cAPB und lAMPB.

Zusammenfassung

Der Einfluß der Zyklisierung auf die *cis*→*trans*-Isomerisierung ist sowohl bei den monozyklischen als auch bei den bizyklischen AMPB-Peptiden sichtbar. Bei cAMPB ist die Auswirkung gering, aber dennoch durch einen Vergleich der transienten Absorptionskurven nachweisbar. Dahingegen zeigt die Isomerisierungsreaktion von bcAMPB deutliche Veränderungen gegenüber den beiden anderen AMPB-Peptiden: Für die *t*→*c*-Reaktion wird die initiale Kinetik auf 300 fs beschleunigt, während bei der *c*→*t*-Richtung sich diese auf 300 fs verlangsamt. Auch die Reaktionsgeschwindigkeiten von bcAMPB im Pikosekundenzeitbereich sind für *t*→*c* höher und für *c*→*t* niedriger als bei lAMPB und cAMPB. Desweiteren ist bei bcAMPB (*c*→*t*) der Einfluß der Peptidkonformationsdynamik auf den Chromophor erkennbar, sichtbar an dem Auftreten einer Nanosekundenkinetik in Verbindung mit einem damit verknüpften Amplitudenspektrum, welches auf die vollständige geometrische Relaxation des Chromophores hinweist. Diese Kinetik ist von derjenigen bei cAPB (*c*→*t*) zu unterscheiden. Bei cAPB war im Zeitbereich von einer Nanosekunde die Bildung eines verspannten Chromophores zu sehen, welcher vermutlich auch noch auf längeren Zeitskalen relaxiert. Grund für diesen Unterschied ist der Methylenspacer bei den AMPB-Peptiden: die auf Zeitskalen > 2 ns ablaufenden Bewegungen der Aminosäurekette ist bei bcAMPB nicht sichtbar, weil der bewegliche Spacer diese Bewegungen ausgleicht und den mechanischen Stress auf den Chromophor stark reduziert. Bei cAPB hingegen wird jeder mechanische Zug in der Peptidkette an den Farbstoff weitergegeben, wodurch auch kleine Abweichungen der Peptidkonformation von der relaxierten Struktur den Chromophor beeinflussen. Beim monozyklischen AMPB-Peptid hingegen ist der Chromophor fast vollständig von der Peptidbewegung entkoppelt.

In der nachfolgenden Tabelle sind nochmals die ermittelten Zeitkonstanten sowie die berechneten Quantenausbeuten von AMPB und den AMPB-Peptiden zusammengestellt.

Probe	<i>trans</i> → <i>cis</i>						<i>cis</i> → <i>trans</i>				
	Zeiten [ps]			Ψ [%]	Ψ _{max} ^{TS} [%]	Zeiten [ps]			Ψ [%]		
AMPB	0.47	1.6	7.9		22	27	0.25	2.9	12		70
lAMPB	0.58		8.8	93	7	5	0.25	1.3	10	58	70
cAMPB	1.7		9.6	120	22	15-21	0.19	1.3	9.3	180	70
bcAMPB	0.3	1.6	10		20-35	10-25	0.3	5.4		100; 1000	50

Tabelle 7.2: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse aus den Messungen an AMPB und den AMPB-Peptiden für die *t*→*c*- sowie die *c*→*t*-Isomerisierung. Neben den jeweils zur Anpassung der Meßdaten benötigten Zeitkonstanten sind noch die (maximalen) Quantenausbeuten angegeben. Die Zeitkonstanten in den jeweils ersten drei Spalten sind so angeordnet, daß Kinetiken mit einem ähnlichen Amplitudenspektrum untereinander stehen.

8 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, Informationen darüber zu gewinnen, ob sich Faltungsvorgänge in kleinen Modellpeptiden auch auf der Femto- bis Nanosekundenzeitskala abspielen. Die bisher teilweise herrschende Meinung, daß die Bewegung einer Aminosäure beim Faltungsvorgang schnellstens im 10 ns-Zeitbereich ablaufen kann [GALZITSKAYA et al., 2001], konnte, zumindest für die hier vorgestellten getriebenen Systeme, eindeutig als Fehleinschätzung eingestuft werden.

Das Studium schnellster Konformationsdynamik bedurfte einiger Voraussetzungen, die in den letzten Jahren geschaffen wurden und zu Beginn dieser Arbeit erfüllt waren: Kenntnisse über das Isomerisierungsverhalten von Azobenzol und die Verfügbarkeit von ausreichend Probenmaterial. Der Chromophor Azobenzol isomerisiert innerhalb weniger hundert Femtosekunden mit hoher Quantenausbeute und bildet ein langlebiges Photoprodukt — das jeweils andere Isomer —, wie femtosekundenspektroskopische Untersuchungen zeigten [NÄGELE, 1998]. Bei dem Isomerisierungsvorgang ändert sich die geometrische Länge des Azobenzoles um fast einen Faktor zwei. Somit schien Azobenzol das geeignete Molekül zu sein, um eine photoinduzierte Konformationsänderung auszulösen. Die Synthese von geeigneten kleinen Peptiden, die als Aminosäure getarntes Azobenzol in der Aminosäuresequenz enthalten, erfolgte am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter Prof. L. Moroder. Ebenso wurde dort die Zyklisierung dieser Modellpeptide sowie u.a. eine NMR-spektroskopische Untersuchung der Proben vorgenommen [BEHRENDT, 2000, RENNER et al., 2000a, RENNER et al., 2000b].

Für die Durchführung der femtosekundenspektroskopischen Untersuchungen wurde im ersten Jahr der Arbeit ein neues Lasersystem aufgebaut. Zusammen mit dem Kollegen Ingo Lutz wurde ein regenerativer Verstärker mit einer Wiederholrate von 1 kHz konzipiert und realisiert. Die wichtigsten Randbedingungen waren eine hohe Ausgangsimpulsenergie von etwa 1 mJ pro Lichtimpuls bei gleichzeitig möglichst niedrigem Rauschen und hoher Strahlstabilität. Außerdem sollte das System möglichst kompakt aufgebaut werden, um auf dem optischen Tisch Platz für zwei getrennte experimentelle Aufbauten verfügbar zu haben. Anschließend erfolgte der Aufbau bzw. Umbau des Pump-Probe-Experimentes. Da die Anregung der zu untersuchenden Proben in der langwelligen Flanke der $n\pi^*$ -Absorption ($\lambda_{\text{pump}} = 480$) erfolgen sollte, war die direkte Verwendung des frequenzverdoppelten Laserlichtes ($\lambda = 400$ nm) aus dem Verstärkersystem nicht möglich. Die notwendige Wellenlängenkonversion erfolgte durch die Verwendung von nichtkollinearen optisch-parametrischen Verstärkern, deren Design auf die Generierung von Licht bei $\lambda = 480$ nm optimiert werden mußte. Das vorhandene Detek-

tionssystem, welches ein gleichzeitiges Aufzeichnen von 42 Meßkurven bei verschiedenen Wellenlängen ermöglicht (Vielkanaldetektion), wurde in das Experiment integriert. Im Zuge der Optimierung des zugänglichen Abtastwellenlängenbereiches wurde dabei das Medium zur Erzeugung des Abtastweißlichtes von Saphir auf Kalziumfluorid umgestellt. Aufgrund der fehlenden Möglichkeit, die anfallenden Datenmengen sinnvoll und schnell bearbeiten zu können, wurde im Anschluß an die erste Meßserie eine Auswertesoftware mit Benutzeroberfläche entworfen und programmiert.

Welche Erkenntnisse konnten aus den Messungen gewonnen werden? Bekannt war zu Beginn dieser Arbeit nur, daß reines Azobenzol als optisches Triggermolekül sehr gut geeignet erschien. Einfache Absorptionsmessungen zeigten, daß der Chromophor auch nach dem Einbau in die Peptide isomerisiert. Die NMR-Messungen belegten, daß sich auch die Konformation des Peptidrückgrates stark ändert [RENNER et al., 2000a, RENNER et al., 2000b]. Zu beantworten war die Frage, wie schnell und mit welchen Quantenausbeuten die Isomerisierungsreaktionen ($t \rightarrow c$, $c \rightarrow t$) des Farbstoffes in den linearen und zyklisierten Peptiden ablaufen. Es stellte sich heraus, daß in allen untersuchten Proben ein Teil der angeregten Chromophore weiterhin in einigen hundert Femosekunden isomerisiert. Allerdings ist der Anteil der Moleküle mit langsamer Photochemie (d.h. die Isomerisierung erfolgt im Pikosekundenzeitbereich) größer als bei reinem Azobenzol. Dies gilt vor allem für die *cis* \rightarrow *trans*-Reaktion. Somit wurde der Beweis erbracht, daß die durchgeführten Experimente so, wie sie geplant waren, auch sinnvoll sind: auch bei den Zylopeptiden erfolgt die Änderung der geometrischen Ausdehnung des Chromophores sehr schnell innerhalb von Pikosekunden. Man darf deshalb von einem klar definierten Startzeitpunkt des Faltungsvorganges im Peptidrückgrat dieser Moleküle sprechen. Desweiteren ist den durchgeführten Messungen zu entnehmen, daß der Chromophor Azobenzol neben seiner Eigenschaft als Trigger auch noch als Sonde für die Peptidbewegung fungiert. Die Aminosäurekette beeinflusst während ihrer Faltungsbewegung den Chromophor so stark, daß die zeitliche Veränderung der optischen Eigenschaften des Azobenzoles gut detektierbar ist.

Faltungsreaktionen können als Bewegung entlang eines (komplizierten) Reaktionspfades auf einer mehrdimensionalen Potentialfläche beschrieben werden. Diese Potentialflächen sind keineswegs glatt sondern weisen mehrere lokale Minima auf [FRAUENFELDER et al., 1991]. Moleküle, welche sich falten, verweilen auf dem Weg zur nativen Struktur unter Umständen sehr lange in diesen lokalen Minima und sind dann als fehl- oder noch nicht vollständig gefaltete Intermediate sichtbar.

Wendet man eine ähnliche Beschreibung auch auf das sehr vereinfachende eindimensionale Potentialbild an (vgl. Diskussion Abb. 7.1), so erhält man ein schematisches Bild, wie es in Abbildung 8.1 gezeigt ist. Betrachtet man die Energieflächen nur sehr ungenau, so erscheint die Potentialfläche des angeregten Zustandes als parabelförmig und glatt. Nach der Anregung erfolgt eine Bewegung zum Minimum der S_1 -Fläche und von dort aus der Übergang auf die Grundzustandspotentialfläche sowie die Relaxation in den Ausgangs- oder in den Photoproduktzustand. Es ergibt sich aber folgendes Problem: die Kinetiken im Zeitbereich von etwa 10 ps aller Proben außer Azobenzol wurden als $S_1 \rightarrow S_0$ Übergang gedeutet. Innerhalb dieser Zeitspanne müsste die überschüssige Energie des angeregten Zustandes abgegeben worden

sein, so daß sich das Molekül energetisch im Minimum des S_1 -Zustand aufhalten sollte. Nun erscheint in der linken Bildhälfte dieses Minimum dasselbe zu sein, egal, ob ein *trans*- oder ein *cis*-Isomer angeregt wurde. Tatsache ist aber, daß sich die Amplitudenspektren der Kinetiken isomerenabhängig stark unterscheiden. Dies spricht gegen die Aussage, daß sich die angeregten *trans*- bzw. *cis*-Moleküle nach der Relaxation im angeregten Zustand in demselben Minimum befinden.

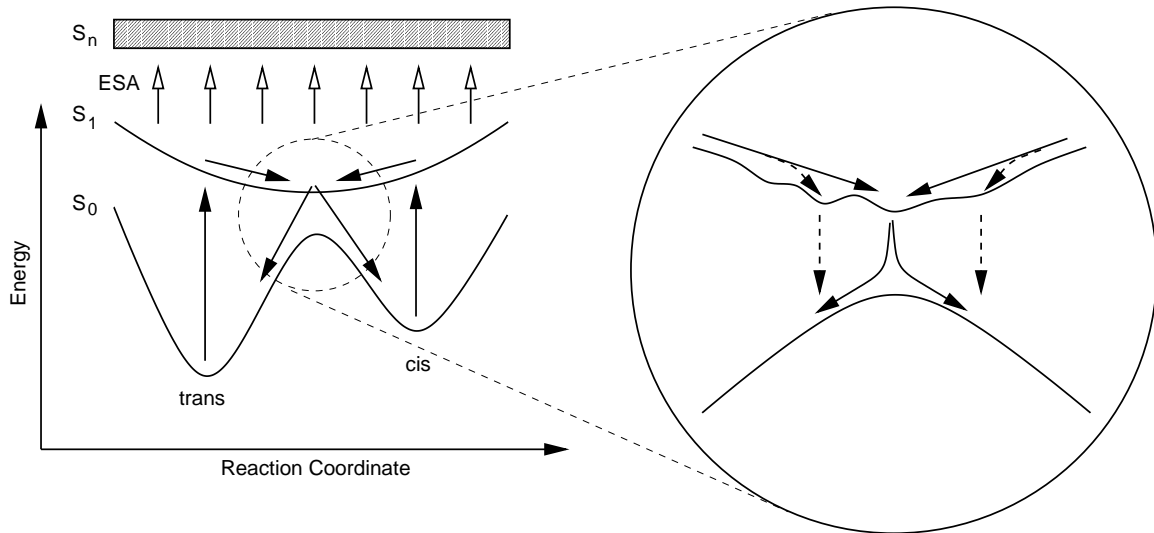


Abbildung 8.1: Eine „rauhe“ S_1 -Potentialfläche als Erklärungsansatz für das Auftreten von unterschiedlichen Quantenausbeuten und excited-state-Spektren.

Ist die Potentialfläche aber „rauh“, dann ergeben sich Reaktionspfade, wie sie in der Vergrößerung auf der rechten Bildhälfte von Abbildung 8.1 zu sehen sind. Für einen mehr oder minder großen Bruchteil der angeregten Moleküle endet die Bewegung entlang der Reaktionskoordinate schon frühzeitig in einem lokalen Potentialminimum. Da ein Entkommen aus diesem Minimum nicht einfach möglich ist, bleiben die „eingesperrten“ Moleküle relativ lange Zeit an dieser Position. Dadurch gewinnt der direkte Übergang von diesem Minimum auf die Grundzustandsfläche an Bedeutung (senkrechte Pfeile nach unten), auch wenn die Übergangswahrscheinlichkeit sehr viel kleiner ist verglichen mit derjenigen im Bereich der vermiedenen Kreuzung (bzw. des konischen Schnittes). Alle diejenigen Moleküle, die von einem solchen Nebenminimum auf die S_0 -Fläche wechseln, relaxieren anschließend wieder zurück in den Ausgangszustand, isomerisieren also nicht. Auch läßt sich durch das Vorhandensein solcher lokalen Minima zwanglos erklären, daß die langsam reagierenden Moleküle, je nach angeregtem Isomer, unterschiedlich absorbieren. Somit ergibt sich auch eine einfache Erklärung, warum die Isomerisierungsquantenausbeuten bei den linearen Peptiden (APB und AMPB) reduziert ist. Nimmt man an, daß bei diesen Peptiden die Geschwindigkeit der Bewegung auf der S_1 -Fläche aufgrund der größeren Masse und der damit verbundenen Trägheit reduziert ist, so ist zu erwarten, daß mehr Moleküle von den ersten auftretenden lokalen Minima der S_1 -Fläche eingefangen werden. Da alle diese Moleküle nicht isomerisieren, ist die Quantenausbeute gegenüber Azobenzol bzw. AMPB reduziert.

Bei den zyklischen Peptiden nimmt die Quantenausbeute wieder zu. Dies ist zu verstehen, wenn man die durch die Zyklisierung hervorgerufene externe Kraft auf den Chromophor mitberücksichtigt. Die potentielle Energie von Molekülen ist angehoben, wenn eine bestimmte Konfiguration der Moleküle nur mit dieser externen Kraft aufrecht erhalten werden kann. Bereiche der Potentialfläche, denen Reaktionskoordinaten ohne externe Kraft zugeordnet sind, werden nicht beeinflußt. Damit ergibt sich, analog zum einem kraftmikroskopischen Experiment, eine Verzerrung der Potentialfläche und als Folge davon ein mögliches Verschwinden von lokalen Minima.

Auch mit einem rein mechanischen Bild läßt sich dies verstehen. Alle Chromophore sind sowohl im *trans*- wie im *cis*-Zustande durch die Peptidkette zumindest leicht vorgespannt. Dies bedeutet in allen Fällen eine treibende Kraft in Richtung der Isomerisierungsordinate. Die lokalen Minima, in denen die linearen Peptide aufgehalten wurden, werden übersprungen und die Quantenausbeute erhöht sich. Ist die treibende Kraft besonders groß wie z.B. bei der *trans*→*cis*-Reaktion von cAPB und bcAMPB, so wird die meßbare schnellste Kinetik sogar beschleunigt. Die Moleküle isomerisieren schneller, als das reine Azobenzol bzw. AMPB. Die Quantenausbeute erhöht sich dadurch aber nicht mehr. Wirkt die Kraft der Peptidkette der Isomerisierungsbewegung entgegen, so erkennt man sogar eine Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeit wie bei bcAMPB (*c*→*t*).

Bei der *cis*→*trans*-Isomerisierung von cAPB und bcAMPB beobachtet man zusätzlich noch eine Kinetik auf der Nanosekundenzeitskala. Diese wird dadurch verursacht, daß der Chromophor nach der Anregung isomerisiert, von der Peptidkette aber an der Einnahme der gewünschten *trans*-Konfiguration gehindert wird — der Farbstoff ist noch verspannt. Im Laufe der Zeit geben die Aminosäuren der durch den Chromophor ausgeübten Kraft nach — der Farbstoff relaxiert, wodurch sich sein Absorptionsspektrum spektral verschiebt. Dies ist der Beweis, daß die Bewegung von den weiter vom Chromophor entfernten Aminosäuren und somit auch der Beginn der Faltungsreaktion im Zeitbereich von wenigen Nanosekunden ablaufen kann.

Weitere Experimente im infraroten Spektralbereich mit Femto- und Nanosekundenzeitauflösung sowie Messungen der Temperaturabhängigkeit der Kinetiken werden weitere Einsichten in das spannende Gebiet der schnellsten Prozesse der Proteinfaltung geben.

Literaturverzeichnis

- [AGRAWAL, 1989] GOVIND P. AGRAWAL (1989). *Nonlinear Fiber Optics*. Academic Press, Inc.
- [ANFINSEN, 1973] C.B. ANFINSEN (1973). *Principles that govern the folding of protein chains*. *Science*, 181(96):223–230.
- [ANFINSEN et al., 1961] C.B. ANFINSEN, E. HABER, M. SELA und F.H. JR. WHITE (1961). *The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 47:1309–1314.
- [ASSION et al., 1998] A. ASSION, T. BAUMERT, M. BERGT, T. BRIXNER, B. KIEFER, V. SEYFRIED, M. STREHLE und G. GERBER (1998). *Control of Chemical Reactions by Feedback-Optimized Phase-Shaped Femtosecond Laser Pulses*. *Science*, 282:919–922.
- [AZUMA et al., 1998] J. AZUMA, N. TAMAI, A. SHISHIDO und T. IKEDA (1998). *Femtosecond dynamics and stimulated emission from S_2 state of a liquid crystalline trans-azobenzene*. *Chemical Physics Letters*, 288:77–82.
- [BACKUS et al., 1998] S. BACKUS, C.G. DURFEE, M.M. MURNANE und H.C. KAPTEYN (1998). *High power ultrafast lasers*. *Review of Scientific Instruments*, 69(3):1207–1223.
- [BEHRENDT, 2000] R. BEHRENDT (2000). *Photoschaltung von Konformation und Bioaktivität zyklischer Modellpeptide*. Doktorarbeit, Technische Universität München, Fakultät für Chemie.
- [BEHRENDT et al., 1999] R. BEHRENDT, M. SCHENK, H.-J. MUSIOL und L. MORODER (1999). *Photomodulation of conformational states. Synthesis of cyclic peptides with backbone-azobenzene moieties*. *J. Pept. Sci.*, 5(11):519–529.
- [BELLINI und HÄNSCH, 2000] M. BELLINI und T.W. HÄNSCH (2000). *Phase-locked white-light continuum pulses: toward a universal optical frequency-comb synthesizer*. *Optics Letters*, 25(14):1049–1051.
- [BERGMANN und SCHÄFER, 1993] BERGMANN und SCHÄFER (1993). *Lehrbuch der Experimentalphysik: Optik*, Bd. 3. Walter de Gruyter, neunte Aufl.
- [BIRNBAUM und STYLE, 1954] P.P. BIRNBAUM und D.W. STYLE (1954). *Trans. Faraday Soc.*, 50:1192.
- [BISBY et al., 1999] R.H. BISBY, C. MEAD und C.G. MORGAN (1999). *Photosensitive liposomes as ‘cages’ for laser-triggered solute delivery: the effect of bilayer cholesterol on kinetics of solute release*. *FEBS Letters*, 463:165–168.
- [BISWAS und UMAPATHY, 1995] N. BISWAS und S. UMAPATHY (1995). *Wavepacket dynamical studies on trans-azobenzene: absorption spectrum and resonance Raman excitation profiles of the $n-\pi^*$ transition*. *Chemical Physics Letters*, 236:24–29.
- [BISWAS und UMAPATHY, 1997] N. BISWAS und S. UMAPATHY (1997). *Density Functional Calculations of Structures, Vibrational Frequencies, and Normal Modes of trans- and cis-Azobenzene*. *J. Phys. Chem.*, 101:5555–5566.
- [BORTOLUS und MONTI, 1979] P. BORTOLUS und S. MONTI (1979). *J. Phys. Chem.*, 83:648.
- [BRODUER und CHIN, 1998] A. BRODUER und S.L. CHIN (1998). *Band-Gap Dependence of the Ultrafast White-Light Continuum*. *Physical Review Letters*, 80(20):4406–4409.

Literaturverzeichnis

- [BRODUER und CHIN, 1999] A. BRODUER und S.L. CHIN (1999). *Ultrafast white-light continuum generation and self-focusing in transparent condensed media*. J. Opt. Soc. Am. B, 16(4):637–650.
- [BURTON et al., 1998] R.E. BURTON, J.K. MYERS und T.G. OAS (1998). *Protein Folding Dynamics: Quantitative Comparison between Theory and Experiment*. Biochemistry, 37(16):5337–5343.
- [CARSTENS, 2001] H. CARSTENS (2001). *persönliche Mitteilungen*.
- [CERULLO et al., 1997] G. CERULLO, M. NISOLI und S. DE SILVESTRI (1997). *Generation of 11 fs pulses tunable across the visible by optical parametric amplification*. Appl. Phys. Lett., 71(25):3616.
- [CERULLO et al., 1998] G. CERULLO, M. NISOLI, S. STAGIRA und S. DE SILVESTRI (1998). *Sub-8-fs pulses from an ultrabroadband optical parametric amplifier in the visible*. Optics Letters, 23(16):1283–1285.
- [CHAN und DILL, 1993] H.S. CHAN und K.A. DILL (1993). *The Protein Folding Problem*. Physics Today, S. 24–32.
- [CLAVIER et al., 2000] G. CLAVIER, F. ILHAN und V.M. ROTELLO (2000). *Photochemical Control of the Macroconformation of Polystyrene Using Azobenzene Side Chains*. Macromolecules, 33(25):9173–9175.
- [CREIGHTON, 1990] E. CREIGHTON (1990). *Protein folding*. Biochem. J., 270:1–16.
- [DAURA et al., 1998] X. DAURA, B. JAUN, D. SEEBACH, W.F. VAN GUNSTEREN und A.E. MARK (1998). *Reversible Peptide folding in Solution by Molecular Dynamics Simulation*. J. Mol. Biol., 280:925–932.
- [DILL und CHAN, 1997] K.A. DILL und H.S. CHAN (1997). *From Levinthal to pathways to funnels*. nature structural biology, 4(1):10–19.
- [DMITRIEV et al., 1991] V.G. DMITRIEV, G.G. GURZADYAN und D.N. NIKOGOSYAN (1991). *Handbook of Nonlinear Optical Crystals*. Springer Series in Optical Sciences, Vol. 64. Springer Verlag.
- [FALBE und REGNITZ, 1995] J. FALBE und M. REGNITZ, Hrsg. (1995). *Römpe Chemie Lexikon*. Thieme Verlag Stuttgart.
- [FLEMING, 1986] G.R. FLEMING (1986). *Chemical Applications of Ultrafast Spectroscopy*. Oxford University Press, New York.
- [FLEMING et al., 1976] G.R. FLEMING, J.M. MORRIS und G.W. ROBINSON (1976). *Direct observation of rotational diffusion by picosecond spectroscopy*. Chemical Physics, 17:91–100.
- [FORK et al., 1981] R.L. FORK, B.I. GREENE und C.V. SHANK (1981). *Generation of optical pulses shorter than 0.1 psec by colliding pulse mode locking*. Appl. Phys. Lett., 38:671–672.
- [FORK et al., 1984] R.L. FORK, O.E. MARTINEZ und J.P. GORDON (1984). *Negative dispersion usings pairs of prisms*. Optics Letters, 9(5):150–152.
- [FORK et al., 1983] R.L. FORK, C.V. SHANK, C. HIRLIMANN, R. YEN und W.J. TOMLINSON (1983). *Femtosecond white-light continuum pulses*. Optics Letters, 8(1):1–3.
- [FRAUENFELDER et al., 1991] H. FRAUENFELDER, S.G. SLIGAR und P.G. WOLYNES (1991). *The Energy Landscapes and Motions of Proteins*. Science, 254:1598–1603.
- [GALE et al., 1995] G.M. GALE, M. CAVALLARI, T.J. DRISCOLL und F. HACHE (1995). *Sub-20-fs tunable pulses in the visible from an 82-MHz optical parametric oscillator*. Optics Letters, 20(14):1562–1564.
- [GALLMANN et al., 2000] L. GALLMANN, G. STEINMEYER, D.H. SUTTER, N. MATUSCHEK und U. KELLER (2000). *Collinear type II second-harmonic-generation frequency-resolved optical gating for the characterization of sub-10-fs optical pulses*. Optics Letters, 25(4):269–271.
- [GALLMANN et al., 2001] L. GALLMANN, G. STEINMEYER, D.H. SUTTER, T. RUPP, C. IACONIS, I.A. WALMSLEY und U. KELLER (2001). *Spatially resolved amplitude and phase characterization of femtosecond optical pulses*. Optics Letters, 26(2):96–98.

- [GALLMANN et al., 1999] L. GALLMANN, D.H. SUTTER, N. MATUSCHEK, G. STEINMEYER, U. KELLER, C. IACONIS und I.A. WALMSLEY (1999). *Characterization of sub-6-fs optical pulses with spectral phase interferometry for direct electric-field reconstruction*. Optics Letters, 24(18):1314–1316.
- [GALZITSKAYA et al., 2001] O.V. GALZITSKAYA, D.N. IVANKOV und A.V. FINKELSTEIN (2001). *Folding nuclei in proteins*. FEBS Letters, 489:113–118.
- [GORDON et al., 1999] R.J. GORDON, L. ZHU und T. SEIDEMAN (1999). *Coherent Control of Chemical Reactions*. Acc. Chem. Res., 32:1007.
- [GUTMAN und NACHLIEL, 1985] M. GUTMAN und E. NACHLIEL (1985). *Transient deprotonation of bacterial halorhodopsin by photoexcited base*. FEBS Letters, 190:29–32.
- [HAMM et al., 1997] P. HAMM, S.M. OHLINE und W. ZINTH (1997). *Vibrational cooling after ultrafast photoisomerization of azobenzene by femtosecond infrared spectroscopy*. J. Chem. Phys., 106:519–529.
- [HARTL, 1993] I. HARTL (1993). *Das Programm URMEL zur Anpassung zeitaufgelöster Messungen in der Ultrakurzzeitspektroskopie*. Praktikumsarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- [HO et al., 1996] M. HO, A. NATANSOHN und P. ROCHON (1996). *Azo Polymers for Reversible Optical Storage: 9. Copolymers Containing Two Types of Azobenzene Side Groups*. Macromolecules, 29:44–49.
- [HOCHÉ, 1996] R. HOCHÉ (1996). *Aufbau einer Vielkanaldetektion zur Messung transienter Absorptionsänderungen im Femtosekundenbereich und erste Anwendungen*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- [HUBER et al., 2001] R. HUBER, H. SATZGER, W. ZINTH und J. WACHTVEITL (2001). *Noncollinear optical parametric amplifiers with output parameters improved by the application of a white light continuum generated in CaF₂*. Opt. Commun., submitted.
- [IKEDA und TSUTSUMI, 1995] T. IKEDA und O. TSUTSUMI (1995). *Optical Switching and Image Storage by Means of Azobenzene Liquid-Crystal Films*. Science, 268:1873–1875.
- [JIANG und AIDA, 1997] D. JIANG und T. AIDA (1997). *Photoisomerization in dendrimers by harvesting of low-energy photons*. Nature, 388:454–456.
- [JUNG et al., 1997] I.D. JUNG, F.X. KÄRTNER, N. MATUSCHEK, D.H. SUTTER, F. MORIER-GENOUD, G. ZHANG, U. KELLER, V. SCHEUER, M. TILSCH und T. TSCHUDI (1997). *Self-starting 6.5fs pulses from a Ti:sapphire laser*. Optics Letters, 22(13):1009–1011.
- [JUNGE und MCGRATH, 1999] D.M. JUNGE und D.V. MCGRATH (1999). *Photoresponsive Azobenzene-Containing Denrimers with Multiple Discrete States*. J. Am. Chem. Soc., 121:4912–4913.
- [KAISER, 1985] W. KAISER (1985). *Intramolecular vibrational energy redistribution and intermolecular energy dissipation of polyatomic molecules in liquids*. Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie, 89(3):213–217.
- [KAISER und SEILMEIER, 1987] W. KAISER und A. SEILMEIER (1987). *Vibrational energy redistribution in solution*. Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie, 91(11):1201–1205.
- [KAWATA und KAWATA, 2000] S. KAWATA und Y. KAWATA (2000). *Three-Dimensional Optical Data Storage Using Photochromic Material*. Chem. Rev., 100:1777–1788.
- [KIM und BALDWIN, 1982] P.S. KIM und R.L. BALDWIN (1982). *Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding*. Ann. Rev. Biochem., 51:459–489.
- [KIM und BALDWIN, 1990] P.S. KIM und R.L. BALDWIN (1990). *Intermediates in the folding reactions of small proteins*. Ann. Rev. Biochem., 59:631–660.
- [KIM und PAIK SUNG, 1996] Y.S. KIM und C.S. PAIK SUNG (1996). *Microenvironments at Specific Chain Sites in Atactic Polystyrene Gels Studied by Photoisomerization*. Macromolecules, 29:462–467.

Literaturverzeichnis

- [KLESSINGER, 1995] M. KLESSINGER (1995). *Konische Durchdringungen und der Mechanismus von Singulett-Photoreaktionen*. *Angewandte Chemie*, 107:597–599.
- [KNOX et al., 1985] W.H. KNOX, R.L. FORK, M.C. DOWNER, R.H. STOLEN und C.V. SHANK (1985). *Optical pulse compression to 8fs at a 5-kHz repetition rate*. *Appl. Phys. Lett.*, 46:1120–1121.
- [KOCHENDOERFER und MATHIES, 1995] G.G. KOCHENDOERFER und R.A. MATHIES (1995). *Ultrafast Spectroscopy of Rhodopsins — Photochemistry at Its Best!*. *Israel Journal of Chemistry*, 35:211–226.
- [KOVALENKO et al., 1999] S.A. KOVALENKO, A.L. DOBRYAKOV, J. RUTHMANN und N.P. ERNSTING (1999). *Femtosecond spectroscopy of condensed phases with chirped supercontinuum probing*. *Physical Review A*, 59(3):2369–2384.
- [KOVALENKO et al., 1998] S.A. KOVALENKO, J. RUTHMANN und N.P. ERNSTING (1998). *Femtosecond hole-burning spectroscopy with stimulated emission pumping and supercontinuum probing*. *J. Chem. Phys.*, 109(5):1894–1900.
- [KUMITA et al., 2000] J.R. KUMITA, O.S. SMART und G.A. WOOLLEY (2000). *Photo-control of helix content in a short peptide*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97(8):3803–3808.
- [LANYI, 1999] J.K. LANYI (1999). *Progress toward an explicit mechanistic model for the light-driven pump, bacteriorhodopsin*. *FEBS Letters*, 464(3):103–107.
- [LÄRMER et al., 1989] F. LÄRMER, T. ELSÄSSER und W. KAISER (1989). *Ultrashort vibronic and thermal relaxation of dye molecules after femtosecond ultraviolet excitation*. *Chemical Physics Letters*, 156(4):381–386.
- [LEDNEV et al., 1998a] I.K. LEDNEV, T. YE, L. ABBOTT, R.E. HESTER und J.N. MOORE (1998). *Photoisomerization of a Capped Azobenzene in Solution Probed by Ultrafast Time-Resolved Electronic Absorption Spectroscopy*. *J. Phys. Chem.*, 102:9161–9166.
- [LEDNEV et al., 1996] I.K. LEDNEV, T. YE, R.E. HESTER und J.N. MOORE (1996). *Femtosecond Time-Resolved UV-Visible Absorption Spectroscopy of trans-Azobenzene in Solution*. *J. Phys. Chem.*, 100:13338–13341.
- [LEDNEV et al., 1998b] I.K. LEDNEV, T. YE, P. MATOUSEK, M. TOWRIE, P. FOGGI, F.V.R. NEUWAHL, S. UMAPATHY, R.E. HESTER und J.N. MOORE (1998). *Femtosecond time-resolved UV-Visible absorption spectroscopy of trans-azobenzene: dependence on excitation wavelength*. *Chemical Physics Letters*, 290:68–74.
- [LESSING und VON JENA, 1979] H.E. LESSING und A. VON JENA (1979). *Continuous Picosecond Spectroscopy of Dyes*. In: M.L. STITCH, Hrsg.: *Laser Handbook*, Kap. B6, S. 753–847. North-Holland Publishing Company.
- [LEVINTHAL, 1968] C. LEVINTHAL (1968). *Are there pathways for protein folding?*. *J. Chim. Phys.*, 65:44–45.
- [LOCHBRUNNER et al., 1999] S. LOCHBRUNNER, T. WILHELM, J. PIEL, S. SPÖRLEIN und E. RIEDLE (1999). *Sub-20-fs tunable pulses in the visible and NIR by noncollinear optical parametric amplification (NOPA)*. In: M.M. FEJER, H. INJEYAN und U. KELLER, Hrsg.: *OSA Trends in Optics and Photonics*, Bd. 26, S. 366, Washington, DC. OSA.
- [LU et al., 1997] H.S.M. LU, M. VOLK, Y. KHOLODENKO, E.A. GOODING, R.M. HOCHSTRASSER und DEGRADO W.F. (1997). *Aminothiopyrosine Disulfide, an Optical Trigger for Initiation of Protein Folding*. *J. Am. Chem. Soc.*, 119(31):7173–7180.
- [MARTINEZ et al., 1984] O.E. MARTINEZ, J.P. GORDON und R.L. FORK (1984). *Negative group-velocity dispersion using refraction*. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1(10):1003–1006.
- [MAYER et al., 1999] S.G. MAYER, C.L. THOMSEN, M.P. PHILPOTT und P.J. REID (1999). *The solvent-dependent isomerization dynamics of 4-(dimethylamino)azobenzene (DMAAB) studied by subpicosecond pump-probe spectroscopy*. *Chemical Physics Letters*, 314:246–254.

- [MCMILLAN et al., 1999] R.A. MCMILLAN, K.L. CARAN, R.P. APKARIAN und V.P. CONTICELLO (1999). *High-resolution Topographic Imaging of Environmentally Responsive, Elasin-Mimetic Hydrogels*. *Macromolecules*, 32:9067–9070.
- [MONTI et al., 1982] S. MONTI, G. ORLANDI und P. PALMIERI (1982). *Features of the photochemically active state surfaces of azobenzene*. *Chemical Physics*, 71:87–99.
- [MOULTON, 1986] P.F. MOULTON (1986). *Spectroscopic and laser characteristics of Ti:Al₂O₃*. *J. Opt. Soc. Am. B*, 3(1):125–133.
- [MÜLLER et al., 1998] A.M. MÜLLER, S. LOCHBRUNNER, W.E. SCHMID und W. FUŠ (1998). *Low-Temperature Photochemistry of Previtamin D: A Hula-Twist Isomerization of a Triene*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37(4):505–507.
- [MUSTACICH und POWIS, 2000] D. MUSTACICH und G. POWIS (2000). *Thioredoxin reductase*. *Biochem. J.*, 346:1–8.
- [MUÑOZ et al., 1997] V. MUÑOZ, P.A. THOMPSON und J. HOFRICHTER (1997). *Folding dynamics and mechanism of beta-hairpin formation*. *Nature*, 390:196–199.
- [NÄGELE, 1998] T. NÄGELE (1998). *Ultraschnelle Photoisomerisierung von Azobenzolen*. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- [NÄGELE et al., 1997] T. NÄGELE, R. HOCHÉ, W. ZINTH und J. WACHTVEITL (1997). *Femtosecond photoisomerization of cis-azobenzene*. *Chemical Physics Letters*, 272:489–495.
- [NIBBERING et al., 1997] E.T.J. NIBBERING, O. DÜHR und G. KORN (1997). *Generation of intense tunable 20-fs pulses near 400 nm by use of a gas-filled hollow waveguide*. *Optics Letters*, 22(17):1335–1337.
- [NISOLI et al., 1994] M. NISOLI, S. DE SILVESTRI, V. MAGNI, O. SVELTO, R. DANIELIUS, A. PISKARSKAS, G. VALIULIS und A. VARANAVICIUS (1994). *Highly efficient parametric conversion of femtosecond Ti:sapphire laser pulses at 1 kHz*. *Optics Letters*, 19(23):1973–1975.
- [NISOLI et al., 1997] M. NISOLI, S. DE SILVESTRI, O. SVELTO, R. SZIPÖCS, K. FERENCZ, C. SPIELMANN, S. SARTANIA und F. KRAUSZ (1997). *Compression of high-energy laser pulses below 5 fs*. *Optics Letters*, 22(8):522–524.
- [PASCHER et al., 1996] T. PASCHER, J.P. CHESICK, J.R. WINKLER und H.B. GRAY (1996). *Protein Folding Triggered by Electron Transfer*. *Science*, 271:1558–1560.
- [PETROV et al., 1994] V. PETROV, F. SEIFERT und F. NOACK (1994). *High repetition rate travelling wave optical parametric generator producing nearly bandwidth limited 50 fs infrared light pulses*. *Appl. Phys. Lett.*, 65:268–270.
- [PRESS et al., 1992] W.H. PRESS, S.A. TEUKOLSKY, W.T. VETTERLING und B.P. FLANNERY (1992). *Numerical Recipes in C*. Cambridge University Press, 2. Aufl.
- [RANKA et al., 2000a] J.K. RANKA, R.S. WINDELER und A.J. STENTZ (2000). *Optical properties of high-delta air-silica microstructure optical fibers*. *Optics Letters*, 25(11):796–798.
- [RANKA et al., 2000b] J.K. RANKA, R.S. WINDELER und A.J. STENTZ (2000). *Visible continuum generation in air-silica microstructure optical fibers with anomalous dispersion at 800 nm*. *Optics Letters*, 25(1):25–27.
- [RAU, 1973] H. RAU (1973). *Spektroskopische Eigenschaften organischer Azoverbindungen*. *Angew. Chem.*, 6:248–258.
- [RAU, 1984] H. RAU (1984). *Further evidence for rotation in the π, π^* and inversion in the n, π^* photoisomerization of azobenzenes*. *Journal of Photochemistry*, 26:221–225.
- [RAU, 1990] H. RAU (1990). *Azo Compounds*. In: H. DÜRR und H. BOUAS-LAURENT, Hrsg.: *Studies in Organic Chemistry, Photochromism, Molecules and Systems*, Bd. 40, Kap. 4, S. 165–192. Elsevier-Verlag, Amsterdam.

Literaturverzeichnis

- [RAU und KORTÜM, 1967] H. RAU und G. KORTÜM (1967). *Über die Schwingungsstruktur der Absorptionsspektren von Azobenzol. Das Problem der kontinuierlichen Banden.* Berichte der Bunsengesellschaft, 71:48–53.
- [RAU und LÜDDECKE, 1982] H. RAU und E. LÜDDECKE (1982). *?* J. Am. Chem. Soc., 104:1616–1620.
- [REED et al., 1995] M.K. REED, M.K. STEINER-SHEPARD, M.S. ARMAS und D.K. NEGUS (1995). *Microjoule-energy ultrafast optical parametric amplifiers.* J. Opt. Soc. Am., 12(11):2229 ff.
- [RENNER et al., 2000a] C. RENNER, R. BEHRENDT, S. SPÖRLEIN, J. WACHTVEITL und L. MORODER (2000). *Photomodulation of Conformational States. I. Mono- and Bicyclic Peptides with (4-Amino)-phenylazobenzoic Acid as Backbone Constituent.* Biopolymers, 54:489–500.
- [RENNER et al., 2000b] C. RENNER, J. CRAMER, R. BEHRENDT und L. MORODER (2000). *Photomodulation of Conformational States. II. Mono- and Bicyclic Peptides with (4-Aminomethyl)-phenylazobenzoic Acid as Backbone Constituent.* Biopolymers, 54:501–514.
- [RIEDLE et al., 2000] E. RIEDLE, M. BEUTTER, J. PIEL, S. SCHENKL, S. SPÖRLEIN und W. ZINTH (2000). *Generation of 10 to 50 fs pulses tunable through all of the visible and the NIR.* Applied Physics B, 71:457–465.
- [RONAYETTE et al., 1974] J. RONAYETTE, R. ARNAUD und J. LEMAIRE (1974). *Can. J. Chem.*, 52:1848–1857.
- [SCHNEIDER et al., 1990] R. SCHNEIDER, W. DOMCKE und H. KOPPEL (1990). *Aspects of dissipative electronic and vibrational dynamics of strongly vibronically coupled systems.* J. Chem. Phys., 92(2):1045–1061.
- [SCHOTT, 1990] SCHOTT (1990). *Optische Farb- und Filtergläser.*
- [SCHRADER, 1989] B. SCHRADER, Hrsg. (1989). *Raman, Infrared Atlas of Organic Compounds.* VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, zweite Aufl.
- [SEEL et al., 1997] M. SEEL, E. WILDERMUTH und W. ZINTH (1997). *A multichannel detection system for application in ultra-fast spectroscopy.* Measurement Science and Technology, 8:449–452.
- [SEIDNER und DOMCKE, 1994] L. SEIDNER und W. DOMCKE (1994). *Microscopic modeling of photoisomerization and internal-conversion dynamics.* Chemical Physics, 186:27–40.
- [SEIDNER et al., 1995] L. SEIDNER, G. STOCK und W. DOMCKE (1995). *Nonperturbative approach to femto-second spectroscopy: General theory and application to multidimensional nonadiabatic photoisomerization processes.* J. Chem. Phys., 103(10):3998–4010.
- [SESSION et al., 1993] R.J. SESSION, S.T. REPINEC, A.Z. SZARKA und R.M. HOCHSTRASSER (1993). *Femtosecond laser studies of the cis-stilbene photoisomerization reactions.* J. Chem. Phys., 98:6291–6315.
- [SHIRAKAWA et al., 1999] A. SHIRAKAWA, I. SAKANE, M. TAKASAKA und T. KOBAYASHI (1999). *Sub-5-fs visible pulse generation by pulse-front-matched noncollinear optical parametric amplification.* Appl. Phys. Lett., 74(16):2268–2270.
- [SIAMPIRINGUE et al., 1987] N. SIAMPIRINGUE, C. GUYOT, S. MONTI und P. BORTOLUS (1987). *J. Photochem.*, 37:185–188.
- [SMITH, 2000] ARLEE SMITH (2000). *SNLO.* Sandia national Laboratories Albuquerque. <http://www.sandia.gov/imrl/XWEB1128/xxtal.htm>.
- [SPENCE et al., 1991] D.E. SPENCE, P.N. KEAN und W. SIBBETT (1991). *60-fsec pulse generation from a self-mode-locked ti:sapphire laser.* Optics Letters, 16:42–44.
- [SQUIER et al., 1991] J. SQUIER, F. SALIN, G. MOUROU und D. HARTER (1991). *100-fs pulse generation and amplification in Ti:Al₂O₃.* Optics Letters, 16:324–326.
- [STEGEMEYER, 1962] H. STEGEMEYER (1962). *J. Phys. Chem.*, 66:2555–2560.

- [STEINMEYER et al., 1999] G. STEINMEYER, D.H. SUTTER, L. GALLMANN, N. MATUSCHEK und U. KELLER (1999). *Frontiers in Ultrashort Pulse Generation: Pushing the Limits in Linear and Nonlinear Optics*. Science, 286(19):1507–1512.
- [STOCK, 1995] G. STOCK (1995). *Classical description of nonadiabatic photoisomerization processes and their real-time detection via femtosecond spectroscopy*. J. Chem. Phys., 103(23):10015–10029.
- [STOCK und DOMCKE, 1993] G. STOCK und W. DOMCKE (1993). *Femtosecond Spectroscopy of Ultrafast Nonadiabatic Excited-State Dynamics on the Basis of ab Initio Potential-Energy Surfaces: The S₂ State of Pyrazine*. J. Phys. Chem., 97(48):12466–12472.
- [STRYER, 1994] LUBERT STRYER (1994). *Biochemie*. Spektrum Akad. Verlag, 2. korr. Nachdruck der vierten Aufl.
- [SUTTER et al., 1999] D.H. SUTTER, G. STEINMEYER, L. GALLMANN, N. MATUSCHEK, F. MORIERGENOUD, U. KELLER, V. SCHEUER, G. ANGELOW und T. TSCHUDI (1999). *Semiconductor saturable-absorber mirror-assisted Kerr-lens mode-locked Ti:sapphire laser producing pulses in the two-cycle regime*. Optics Letters, 24(9):631–633.
- [TANNOR und RICE, 1988] D.J. TANNOR und S.A. RICE (1988). *Coherent Pulse Sequence Control of Product Formation in Chemical Reactions*. Adv. Chem. Phys., 70:441.
- [THOMPSON et al., 1997] P.A. THOMPSON, W.A. EATON und J. HOFRICHTER (1997). *Laser Temperature Jump Study of the HelixCoil Kinetics of an Alanine Peptide Interpreted with a 'Kinetic Zipper' Model*. Biochemistry, 36(30):9200–9210.
- [TOBIAS et al., 1991] D.J. TOBIAS, J.E. MERTZ und C.L. BROOKS (1991). *Nanosecond Time Scale Folding Dynamics of a Pentapeptide in Water*. Biochemistry, 30:6054–6058.
- [TRAETTEBERG et al., 1977] M. TRAETTEBERG, I. HILMO und K. HAGEN (1977). *A Gas Electron Diffraction Study of the Molecular Structure of Trans-Azobenzene*. J. Mol. Struct., 39:231.
- [TREECY, 1969] E.P. TREECY (1969). *Optical Pulse Compression With Diffraction Gratings*. IEEE Journal of Quantum Electronics, QE-5(9):454 ff.
- [VALDMANIS et al., 1985] J.A. VALDMANIS, R.L. FORK und J.P. GORDON (1985). *Generation of optical pulses as short as 27 femtoseconds directly from a laser balancing self-phase modulation, group-velocity dispersion, saturable absorption, and saturable gain*. Optics Letters, 10:131–133.
- [VERLUISE et al., 2000] F. VERLUISE, V. LAUDE, Z. CHENG, CH. SPIELMANN und P. TOURNOIS (2000). *Amplitude and phase control of ultrashort pulses by use of an acousto-optic programmable dispersive filter: pulse compression and shaping*. Optics Letters, 25:575–577.
- [VOLK et al., 1997] M. VOLK, Y. KHOLODENKO, H.S.M. LU, E.A. GOODING, DEGRADO W.F. und R.M. HOCHSTRASSER (1997). *Peptide Conformational Dynamics and Vibrational Stark Effects Following Photo-initiated Disulfide Cleavage*. J. Phys. Chem. B, 101:8607–8616.
- [WACHTVEITL et al., 1997] J. WACHTVEITL, T. NÄGELE, B. PUELL, W. ZINTH, M. KRÜGER, S. RUDOLPH-BÖHNER, D. OESTERHELT und L. MORODER (1997). *Ultrafast Photoisomerisation of Azobenzene Compounds*. J. Photochem. Photobiol., 105:283–288.
- [WACHTVEITL et al., 1998] J. WACHTVEITL, T. NÄGELE, A.J. WURZER, M. SCHENK und L. MORODER (1998). *Ultrafast Photomodulation of Conformation in Azobenzene Containing Cyclic Peptides*. In: T. EL-SAEISSER, J.G. FUJIMOTO, D.A. WIERSMA und W. ZINTH, Hrsg.: *Ultrafast Phenomena XI*, Chemical Physics, S. 609–611. Springer Verlag.
- [WILD et al., 1985] W. WILD, A. SEILMEIER, N.H. GOTTFRIED und W. KAISER (1985). *Ultrafast investigations of vibrationally hot molecules after internal conversion in solution*. Chemical Physics Letters, 119(4):259–263.

Literaturverzeichnis

- [WILHELM et al., 1997] T. WILHELM, J. PIEL und E. RIEDLE (1997). *Sub-20-fs pulses tunable across the visible from a blue-pumped single-pass noncollinear parametric converter*. Optics Letters, 22(19):1494–1497.
- [WILLIAMS et al., 1996] S. WILLIAMS, T.P. CAUSGROVE, R. GILMANSHIN, K.S. FANG, R.H. CALLENDER, W.H. WOODRUFF und R.B. DYER (1996). *Fast Events in Protein Folding: Helix Melting and Formation in a Small Peptide*. Biochemistry, 35(3):691–697.
- [WRIGHT et al., 1988] P.E. WRIGHT, H.J. DYSON und R.A. LERNER (1988). *Conformation of peptide fragments of proteins in aqueous solution: Implications for initiation of protein folding*. Biochemistry, 27(19):7167–7175.
- [WU et al., 1999] Y. WU, Q. ZHANG, A. KANAZAWA, T. SHIONO, T. IKEDA und Y. NAGASE (1999). *Photo-induced Alignment of Polymer Liquid Crystals Containing Azobenzene Moieties in the Side Chain. 5. Effect of the Azo Contents on Alignment Behavior and Enhanced Response*. Macromolecules, 32:3951–3956.
- [YAN et al., 1993] Y.J. YAN, R.E. GILLILAN, R.M. WHITNELL, K.R. WILSON und S.J. MUKAMEL (1993). *J. Phys. Chem.*, 97:2320.
- [YANG und SWAGER, 1998] J. YANG und T.M. SWAGER (1998). *Fluorescent Porous Polymer Films as TNT Chemosensors: Electronic and Structural Effects*. J. Am. Chem. Soc., 120:11864–11873.
- [YARIV, 1991] A. YARIV (1991). *Optical Electronics*. John Wiley & Sons, 4. Aufl.
- [YELIN et al., 1997] D. YELIN, D. MESHULACH und Y. SILBERBERG (1997). *Adaptive femtosecond pulse compression*. Optics Letters, 22:1793–1795.
- [ZEEK et al., 1999] E. ZEEK, K. MAGINNIS, S. BACKUS, U. RUSSEK, M. MURNANE, G. MOUROU, H. KAPTEYN und G. VDOVIN (1999). *Pulse compression by use of deformable mirrors*. Optics Letters, 24(7):493–496.
- [ZHOU und KARPLUS, 1999] Y. ZHOU und M. KARPLUS (1999). *Interpreting the folding kinetics of helical proteins*. Nature, 401:400–403.
- [ZINTH und KAISER, 1992] W. ZINTH und W. KAISER (1992). *Ultrafast Coherent Spectroscopy*. In: W. KAISER, Hrsg.: *Ultrashort Laser Pulses - Generation and Applications*, Bd. 60 d. Reihe *Topics in Applied Physics*, S. 236–277. Springer-Verlag, zweite Aufl.
- [ZUREK, 1992] M. ZUREK (1992). *Entwicklung und Charakterisierung eines Meßsystems zur präzisen Detektion kurzer Lichtimpulse*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- [ZWANZIG et al., 1991] R. ZWANZIG, A. SZABO und B. BAGGHI (1991). *Levinthal's paradox*. Proc. Natl. Acad. Sci., 89:20–22.

Besonders danken möchte ich ...

Josef Wachtveitl für die Korrektur dieser Arbeit, das mir entgegengebrachte Vertrauen, die mehr oder minder zahlreichen Diskussionen mit scheinbar unendlichen Vorräten an passenden Veröffentlichungen. Ich will hoffen, daß wir uns nie ganz aus den Augen verlieren.

Ingo Lutz für langjährige hervorragende Zusammenarbeit. Ohne Ingo wäre diese Arbeit nicht vollendet worden.

Erik Baigar für seine immerwährende und selbstlose Unterstützung bei Problemen jeder Art. Erik, laß uns noch viele Kletter- und Hochtouren gemeinsam durchführen!

Selma Schenkl für ihre Geduld, mich als Betreuer zu ertragen, und die vielen aufmunternden Worte während unendlich langer Meßnächte, wenn der Laser mal wieder nicht so wollte wie er sollte, und und und. Ich hoffe, wir bleiben auf immer Freunde.

Robert Huber für die lustige und produktive Zeit zusammen im Labor.

Prof. Zinth für die einzigartige Gelegenheit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können, die große Entfaltungs- und Gestaltungsfreiheit sowie die Chance, eine Menge zu lernen. Desweiteren für die zahlreichen Verbesserungsvorschläge für das etwas spröde Diskussionskapitel.

Prof. Gaub für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Prof. Riedle für viele lehrreiche und informative Diskussionen.

der Besetzung von Z20 als da wären Robert Huber, Arne Sieg, Helmut Satzger, Christopher Root, Tobias Schrader für ein sehr gutes Arbeitsklima. Ich wüsche Euch viel Glück mit unserem Verstärker.

Peter Gilch für die zahlreichen kurzen und längeren Diskussionen und das stets offene Ohr für Fragen aller Art.

Den Sekretärinnen Frau Podolski und Frau Klemradt für das immer vorhandene Lächeln, welches sie einem entgegenbrachten, sobald man das Sekretariat betrat. Mögen sie dem Lehrstuhl noch lange erhalten bleiben!

der Computeradministrationstruppe für die stetige Arbeit im Hintergrund, um das Computersystem des BMO am Laufen zu halten.

Heiko Carstens für überaus interessante Diskussionen über seine theoretischen Rechnungen an den Azo-Peptiden.

Benno Fonrobert für die lustige Büronachbarschaft und gute Reden auf Weihnachtsfeiern.

Rudi Schwarz, Alfons Storck, Christian Hausmann und Harald Hoppe — den Herren der mechanischen und optischen Werkstätten — für die fast rund um die Uhr vorhandene Bereitschaft, mir bei kleinen und großen Problemen technischer Art instantan zu helfen.

Allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche (Arbeits-)Atmosphäre und die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft bei Problemen jeglicher Art.

Raymond Behrendt, Christian Renner, Anna Cattani und Prof. Moroder für die Präparation und NMR-spektroskopische Untersuchung der Azo-Peptide und die immer vorhandene Erklärungsbereitschaft bei Fragen aller Art sowie die Gelassenheit, wenn wieder einmal die Forderung nach 50mg Probe aufkam...

Thomas Nägele und Heinz Huber für die vielen unterstützenden Hinweise, daß es nichts bringt, sich vorzeitig aus dem Staub zu machen.

meinen Eltern für die fortwährende uneingeschränkte Unterstützung, insbesondere in der Zeit, als gar nichts so lief, wie ich mir dies vorgestellt hatte.

Meinen Freunden, daß sie mich nicht „vergessen“ haben, auch wenn ich zeitweise geistig nicht anwesend war. Insbesondere: Selma Schenkl, Martin Stark, Angelika Kapfer und Axel Maisch. Nicht zu vergessen meine treue Alpenvereins„jugend“gruppe, die mich auf zahlreichen Bergtouren begleitet hat und hoffentlich noch begleiten wird.

und

Meiner Frau Andrea für ihre große Geduld mit mir im Allgemeinen und im Besonderen sowie für ihre mir entgegengebrachte Fürsorge und Liebe.

Lebenslauf

Sebastian Spörlein

geboren am 4.2.1972 in München

verheiratet

1978 – 1982 Grundschule Taufkirchen

1982 – 1991 Gymnasium Unterhaching

1991 Abitur am Gymnasium Unterhaching

1991 – 1997 Studium der Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität München

1997 Diplom in Physik (LMU)

Thema der Diplomarbeit: „Femtosekundenspektroskopie der Primärreaktion bakterieller Reaktionszentren im nahen infraroten Spektralbereich“

1997 – 2001 wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für BioMolekulare Optik an der Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München