
**Femtosekundenspektroskopie im mittleren
infraroten Spektralbereich:
Isomerisierung von Hemithioindigo und
Hemithioindigo-Chromopeptiden**

Nadja Regner



München 2011

**Femtosekundenspektroskopie im mittleren
infraroten Spektralbereich:
Isomerisierung von Hemithioindigo und
Hemithioindigo-Chromopeptiden**

Nadja Regner

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

vorgelegt von
Nadja Regner
aus München

München, den 30. Mai 2011

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Zinth

Zweitgutachter: Prof. Dr. Peter Gilch

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juli 2011

*Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems,
das gelöst werden will.*

Galileo Galilei

Kurzfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die ultraschnelle Photoreaktion des Hemithioindigo vor dem Hintergrund biophysikalischer Anwendungen untersucht. Der experimentelle Zugang erfolgt durch den Einsatz zeit- und frequenz aufgelöster Anreg- Abtastspektroskopie im infraroten Spektralbereich. Das photochrome Hemithioindigo (HTI) zeigt eine lichtinduzierte Z→E Isomerisierungsreaktion, die für eine definiert getriebene Strukturänderung in Peptiden eingesetzt werden kann.

Im ersten Teil der Arbeit wird der Einfluss verschiedener Substituenten am Stilbenteil des Hemithioindigo auf die Isomerisierungsreaktion untersucht. Als Substituenten werden Gruppen mit starken Elektronen-Donor- (OMe-HTI) und Elektronen-Akzeptor-Eigenschaften (CN-HTI) in para-Position am Stilbenteil des Hemithioindigo verwendet, die das Elektronensystem des Photoschalters beeinflussen. Ferner wird das unsubstituierte HTI-Chromophor (H-HTI) untersucht. Die Auswirkungen effektiver Ladungsverschiebungen in der Struktur des Hemithioindigo-Moleküls durch die verschiedenen Substituenten können beobachtet werden. In der zeitaufgelösten IR-Spektroskopie des photoinduzierten Z→E-Isomerisierungsprozesses zeigt sich, dass die Kinetiken für die verschiedenen Substitutionen stark unterschiedlich sind. Bei allen drei Stoffsystemen zeigen sich Signaturen von Abkühlvorgängen im Zeitbereich 1–10ps. Beim OMe-HTI ist dieser Abkühlvorgang der Isomerisierung überlagert. Durch ein Vergleich der Amplituden der Ausbleichbanden mit der cw-Absorption kann die Quantenausbeute der Isomerisierungsreaktionen abgeschätzt werden. Die Energiebarriere, die die Geschwindigkeit der Isomerisierungskinetik bestimmt, steigt von OMe- über H- bis zu CN-HTI an.

Der zweite Teil der Arbeit zeigt die Untersuchungen an zwei HTI-Chromopeptidsystemen. Parallel zu den Chromopeptiden werden die reinen Photoschalter untersucht. Nach der elektronischen Anregung in den S_1 -Zustand relaxiert das HTI in einen Zustand mit Ladungstrennungscharakter von dem aus die eigentliche Isomerisierung und somit die Relaxation in den Grundzustand erfolgt. Aus den transienten IR-Daten ist abzulesen, dass die elektronische Anregung des HTI die Aminosäuren der Peptidsysteme in unmittelbarer Nähe des Schaltermoleküls instantan erreicht. Die Relaxation der Schaltermoleküle im angeregten S_1 -Zustand ist unabhängig davon, ob sie mit einem Peptid verbunden sind. Die Relaxationszeit τ_2 mit der das Molekül isomerisiert verlangsamt sich hingegen durch die anhängenden Peptidsysteme. Die Isomerisierungsreaktion des linearen para-Peptidsystems ist innerhalb des Beobachtungszeitraums abgeschlossen, wohingegen das zyklische meta-Peptidsystem sehr viel langsamere Kinetiken zeigt.

Die photochrome Isomerisierung von HTI ermöglicht es also Strukturänderungen in Peptiden auf der sub 100-ps-Zeitskala zu induzieren.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	vii
Einleitung	1
1 Grundlagen	5
1.1 Untersuchungsmethoden	5
1.1.1 Stationäre Absorptionsspektroskopie	5
1.1.2 Zeitaufgelöstes Messen: Anreg-Abtastspektroskopie	11
1.2 Proteine und Peptide	13
1.3 Stoffsysteme	17
2 Experimentelle Verfahren	21
2.1 Femtosekunden-Infrarot-Spektrometer	21
2.1.1 Femtosekunden Lasersystem	23
2.1.2 Erzeugung der Impulse für das Anreg-Abtast-Experiment	25
2.1.3 Messplatz und Datenerfassung	28
2.2 Zeitaufgelöste Messungen	32
2.2.1 Probenvorbereitung und Charakterisierung	32
2.2.2 Justage der IR-Messapparatur und Ermittlung der Apparatefunktion	32
2.2.3 Bestimmung der Absorptionsänderung	34
2.2.4 Datenanalyse	36
3 Z→E-Isomerisierung von Hemithioindigo	41
3.1 Z/E-Isomerisierung von Hemithioindigo	41
3.2 Zeitaufgelöste UV/Vis-Spektroskopie	43
3.3 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie	45
3.4 Stationäre IR-Charakterisierung	46
3.5 Zeitaufgelöste IR-Spektroskopie	48
3.6 Datenanalyse	49
3.6.1 Sequentielles Reaktionsmodell	51
3.6.2 Verzweigte Reaktionsmodelle	51
3.7 Diskussion	52

4	HTI Stilben Substitution	55
4.1	Substituenteneffekte	55
4.1.1	Induktiver Effekt	55
4.1.2	Mesomerer Effekt / Resonanzeffekt	56
4.2	HTI-Chromophore	57
4.2.1	Stationäre UV/Vis-Spektren	57
4.2.2	Stationäre Infrarot-Charakterisierung	58
4.2.3	Zeitaufgelöste Vis-Spektroskopie	60
4.2.4	Zeitaufgelöste IR-Spektroskopie	61
4.2.5	Diskussion	73
5	Chromopeptide auf Basis der HTI ω-Aminosäure	79
5.1	Das lineare Peptid, para-System	80
5.1.1	Stationäre Infrarot-Charakterisierung	81
5.1.2	Zeitaufgelöste UV/Vis Spektroskopie	82
5.1.3	Zeitaufgelöste IR-Spektroskopie	85
5.2	Das zyklische Peptid, meta-System	92
5.2.1	Stationäre Infrarot-Charakterisierung	92
5.2.2	Zeitaufgelöste UV/Vis Spektroskopie	95
5.2.3	Zeitaufgelöste IR-Spektroskopie	97
5.3	Diskussion	104
	Zusammenfassung	109
A	Glossar	113
A.1	Buchstabencode der Aminosäuren	113
B	Messdaten und Zwischenergebnisse	115
B.1	Zerfallsassoziierte Spektren	115
B.1.1	HTI Stilben Substitution	115
B.1.2	Chromopeptide auf Basis der HTI ω -Aminosäure	117
	Literaturverzeichnis	119
	Danksagung	xi

Einleitung

Proteine verleihen der Zelle Struktur und fungieren als molekulare Maschinen, die Stoffe transportieren und speichern. Zum Beispiel dient Hämoglobin als Träger des Sauerstoffs in den Erythrozyten. Eisen wird im Blut durch das Protein Transferrin transportiert und in der Leber mit Ferritin gespeichert. Chemische Reaktionen werden in biologischen Systemen durch spezifische Makromoleküle, sogenannten Enzymen katalysiert. Proteine können Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eingehen. Diese Eigenschaft ist von besonderer Bedeutung bei der Immunabwehr. Proteine in Form von Antikörpern können Viren und Bakterien erkennen und diese für die Zellzerstörung markieren [Str94]. Das Verständnis der Funktionsweise und des Verhaltens von Proteinen bzw. Peptiden ist also von fundamentaler Bedeutung für die Biologie.

Die eigentliche biologische Funktion eines Peptids wird von seiner nativen, dreidimensionalen Struktur bestimmt. Daher ist es eine zentrale Frage der Biochemie, wie Proteine ihre native Form erreichen. Die Abfolge der Aminosäuren in der linearen Aminosäurekette bewirkt spezifische Wechselwirkungen und bestimmt die spätere native Struktur. Für den Faltungsprozess selbst werden verschiedene Modelle diskutiert. Die Bekanntesten sind das Nucleation-Condensation-Modell (die Struktur wächst um wenige kritische Faltungskerne), das Framework-Modell (Sekundärstrukturelemente falten sich und ordnen sich dann zur nativen Struktur) oder das Modell des hydrophoben Kollaps (Beginn der Faltung durch Bildung erster Sekundärstrukturelemente und Ausrichtung hydrophober sowie hydrophiler Seitenketten nach innen beziehungsweise nach außen zur wässrigen Umgebung) [Gia03]. Die native Struktur ist bereits in der Aminosäuresequenz codiert, dennoch ist es bislang nicht möglich aus der Sequenz von Aminosäuren eine Vorhersage über die Funktion und Struktur des gefalteten nativen Proteins zu machen. Auch die Umgebung des Proteins kann seine Struktur beeinflussen. In seiner natürlichen Umgebung nimmt ein Protein seine native Form ein und kann damit Funktionen im Organismus erfüllen. Ändert man diese Umgebung, zum Beispiel pH-Wert, Temperatur oder Druck, kann es zu einer geänderten Struktur kommen. Eine Fehlfaltung kann dazu führen, dass das Protein seine Funktion nicht mehr ausführen kann und es so z.B. zu Aggregationen kommt oder dass es im Organismus sogar toxisch wirkt. Wäre man andererseits in der Lage, die Faltung gezielt zu steuern, zum Beispiel durch Photoschalter, könnte man Einfluss auf die Funktion von Proteinen nehmen. So ist es beispielsweise denkbar sie über die Photoschalter gezielt zu aktivieren oder auszuschalten und so neue medikamentöse Mechanismen zu ermöglichen.

Um Protein-Faltungsprozesse verstehen zu können, müssen alle Zustände entlang der spezifischen Reaktionskoordinate in Abhängigkeit der Zeit charakterisiert werden. NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse liefern detaillierte Informationen zur Struktur von Peptiden und Proteinen in nativer Umgebung. Die Zeitauflösung solcher Experimente reicht aber nur in den μs -Bereich und die Beobachtung beschränkt sich auf langsame Strukturänderungen. Der Faltungsprozess kann in mehrere zeitliche Abschnitte unterteilt werden, von der ersten Kontaktbildung zweier Aminosäuren im random coil¹ auf der Sub-Nanosekundenzeitskala [Fie07]) bis zur Bildung der Tertiärstruktur (Mikro- bis Millisekunden). Er variiert stark je nach Peptid oder Protein und kann bis in den Bereich von Stunden reichen [McC87, Bie99, Kub04].

Die Beobachtung der initialen Peptid-Faltungsprozesse ist durch die Anwendung photoschaltbarer Aminosäuren ermöglicht worden. Optisch steuerbare Schaltermoleküle haben sich als mechanische Trigger zur strukturellen Umordnung von Peptiden bewährt. Für Azobenzolderivate konnte erfolgreich demonstriert werden, dass diese geeignet sind, gezielte Konformationsänderungen in Peptidstrukturen auszulösen und auch die Funktionalität des Peptids zu steuern [Hop09]. Die im Peptid induzierten strukturellen Änderungen können mit hoher Zeitauflösung (für Azobenzol im Bereich von nur wenigen Pikosekunden) zum Beispiel mittels Infrarot-Detektion der Amid-I-Bande sichtbar gemacht werden. Für diese Experimente wird Azobenzol als Pseudoaminosäure in kleine Peptidstrukturen bestehend aus etwa 10–20 Aminosäuren integriert. Untersuchungen mit Azobenzolderivaten liefern bis zum jetzigen Zeitpunkt viele aussagekräftige Studien zum Thema der initialen Faltungsdynamik [Ham00b, Spö02, Bre03a, Bre03b, Wac04, Sat04b, Sch07]. Die Toxizität und Oxidierbarkeit der Azobenzol-basierten photoschaltbaren Aminosäuren macht sie jedoch für Studien *in vivo* wenig geeignet. Die spektroskopischen Eigenschaften dieser Azobenzol-Verbindungen weisen einen weiteren Nachteil auf. Die lichtinduzierte Isomerisierung ist zwar sehr schnell ($< 10\text{ps}$), sie muss jedoch durch die $n\pi^*$ -Anregung initiiert werden. Bei beiden isomeren Formen (E und Z) des Azobenzols zeigen die $n\pi^*$ -Absorptionsbanden einen großen spektralen Überlapp, außerdem besitzen sie sehr kleine Absorptionsquerschnitte. Die selektive Anregung nur eines Isomers ist so nahezu ausgeschlossen. Dies kann die Deutung der experimentellen Ergebnisse aus den zeitaufgelösten Faltungsexperimenten erheblich erschweren.

Die vorliegende Arbeit behandelt den Einsatz photochromer Hemithioindigo-Verbindungen (HTI) als lichtinduzierte Schalter in biologisch relevantem Bereich. HTI hat sich bereits in früheren Experimenten als Schaltermolekül bewährt [Cor09] und ist in der Lage einige der oben genannten Probleme zu lösen. Das photochrome HTI isomerisiert wie

¹Als random coil wird ein Protein oder ein Teilstück davon bezeichnet, das keine erkennbare Sekundärstruktur aufweist.

Azobenzol auf der Pikosekunden-Zeitskala, weist aber für beide Isomere Z und E stärker getrennte Absorptionsbanden mit großen Extinktionskoeffizienten auf.

Die Untersuchungen am HTI wurden mit stationärer Absorptionsspektroskopie, und zeitaufgelöster Spektroskopie im sichtbaren und infraroten Spektralbereich durchgeführt. Kapitel 1 stellt die Grundlagen der verwendeten spektroskopischen Techniken sowie einiger Proteine und Peptide vor.

Das Kapitel 2 beschäftigt sich mit den verwendeten experimentellen Verfahren. Hierbei wird zunächst das Lasersystem als Ausgangspunkt der wesentlichen experimentellen Arbeiten vorgestellt. Anschließend wird auf die Erzeugung der Impulse zur Anregung der Probe und zum zeitabhängigen Abtasten der sich daraus ergebenden Absorptionsänderungen eingegangen. Im zweiten Teil des Kapitels 2 wird die Vorbereitung und Charakterisierung der Proben sowie die Justage des Femtosekunden-Infrarot-Spektrometers zur eigentlichen Messung diskutiert. Am Ende des Kapitels wird detailliert auf die Verarbeitung des im Experiment gewonnenen Messsignals und die damit verbundene Datenauswertung eingegangen.

In den Kapiteln 3, 4 und 5 finden sich die Ergebnisse der Untersuchungen. Kapitel 3 stellt das HTI-Molekül als ultraschnellen Photoschalter vor. Durch die Kombination verschiedener zeitaufgelöster Experimente gelingt es hier ein belastbares Modell des Reaktionspfades der Z→E-Isomerisierung zu entwickeln. In Kapitel 5 werden Messungen zu Schaltvorgängen am Photoschalter selbst und in Verbindung mit zwei Peptiden in para- und meta-Bindung vorgestellt und verglichen. Eine Diskussion der Ergebnisse schließt das Kapitel ab. Kapitel 4 beschäftigt sich mit dem Einfluss polarer Substituenten auf die spektroskopischen photochemischen Eigenschaften von HTI-Molekülen. Alle diskutierten Ergebnisse stützen sich auf verschiedene experimentelle Techniken. Wesentliche Aussagen werden dabei mit Hilfe der experimentell anspruchsvollen zeitaufgelösten Infrarot-Spektroskopie gewonnen.

Kapitel 1

Grundlagen

Ziel der Arbeit ist die Beobachtung der Reaktionsdynamik von Photoschaltern, die zur photoinduzierten Strukturänderungen von Proteinen und Peptiden eingesetzt werden.

Das folgenden Kapitel erläutert die Grundlagen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Untersuchungsmethoden sowie der untersuchten Stoffsysteme.

1.1 Untersuchungsmethoden

Der folgende Abschnitt stellt die verwendeten Untersuchungsmethoden vor. Die stationäre Spektroskopie dient zur genauen Charakterisierung spektraler Eigenschaften der zu untersuchenden Probe. Ferner erhält man Informationen über geeignete Lösungsmittel und Probenkonzentrationen. Im sichtbaren und im UV Bereich werden die Spektren durch elektronische Übergänge bestimmt. Infrarotspektren geben die Eigenschaften der Molekülschwingungsmoden wieder.

Der Mechanismus der lichtinduzierten Reaktion wird mit zeitaufgelöster Spektroskopie untersucht. Es wird das allgemeine Prinzip der Femtosekunden-Spektroskopie vorgestellt und auf die Messdatenverarbeitung eingegangen. In Kapitel 2.1 wird der Aufbau des Femtosekunden-Infrarot-Spektrometers dargestellt.

1.1.1 Stationäre Absorptionsspektroskopie

Bei der stationären Absorptionsspektroskopie im sichtbaren sowie im infraroten Spektralbereich wird die durch eine Probe transmittierte elektromagnetische Strahlungsleistung in Abhängigkeit der Wellenlänge λ gemessen. Dazu wird die molekülspezifische Abschwächung von Licht beim Durchgang durch die zu untersuchende Probe ermittelt. Die Absorption ist definiert als negativer dekadischer Logarithmus der Transmission T . Dabei ergibt sich die Transmission T aus dem Verhältnis der transmittierten Intensität I zur ein-

gestrahlten Intensität I_0 gemäß

$$A(\lambda) = -\log(T(\lambda)) = -\log\left(\frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)}\right) = \varepsilon(\lambda)c_M d \quad . \quad (1.1)$$

Das Lambert-Beer-Gesetz zeigt die Abhängigkeit der Absorption $A(\lambda)$ der Probe vom dekadischen Extinktionskoeffizient $\varepsilon(\lambda)$ in $[l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$, der Konzentration c_M der Probe in $[\text{mol} \cdot l^{-1}]$ und der Schichtdicke in $[\text{cm}]$. Die Absorption wird in der Einheit der optischen Dichte (OD) angegeben. Dabei bedeutet $A = 1 \text{ OD}$ eine Absorption von 90% der eingestrahlten Photonen. Ein Photon kann mit einem Molekül wechselwirken, wenn seine Energie der Energiedifferenz ΔE zweier energetischer Zustände im Molekül entspricht:

$$\Delta E = E_1 - E_2 = h\nu \quad . \quad (1.2)$$

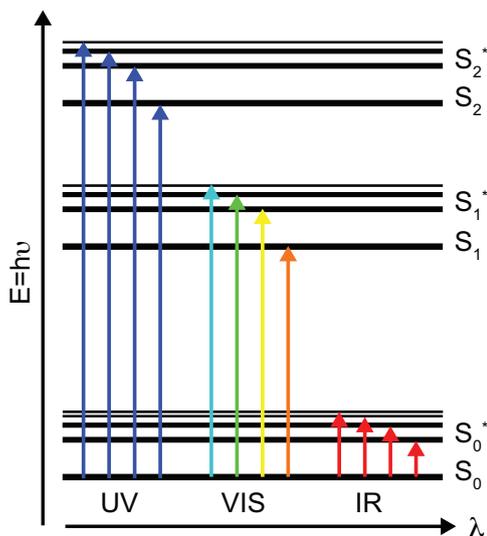


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung möglicher Energieniveaus in einem Molekül. Der elektronische Grundzustand ist mit S_0 bezeichnet. S_1 und S_2 stehen für den ersten beziehungsweise zweiten elektronisch angeregten Zustand. Die mit * markierten Niveaus sind vibronisch angeregte Zustände. Die farbigen Pfeile markieren die möglichen Absorptionen für die verschiedenen Wellenlängen.

Abbildung 1.1 zeigt schematisch mögliche elektronische und vibronische Zustände eines Moleküls. Die Energie der Strahlung im ultravioletten (UV) bis sichtbaren (Vis, engl.: visible) Spektralbereich ist ausreichend um mit den äußeren Elektronen eines Moleküls in Wechselwirkung zu treten. Das bedeutet ein Molekül im Grundzustand kann Licht im UV und sichtbaren Spektralbereich absorbieren und befindet sich danach in einem elektronisch angeregten Zustand.

Abbildung 1.2 zeigt ein typisches Absorptionsspektrum von HTI in Methanol. Es sind deutlich zwei getrennte Absorptionsbanden zu erkennen. Im sichtbaren Spektralbereich (400 bis 450nm) ist die Absorption des Grundzustands S_0 in den ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 zu erkennen. Eine weitere stärker ausgeprägte Bande ist im ultravioletten Spektralbereich bei 300 bis 340nm zu finden. Hier zeigt sich die Absorption in den

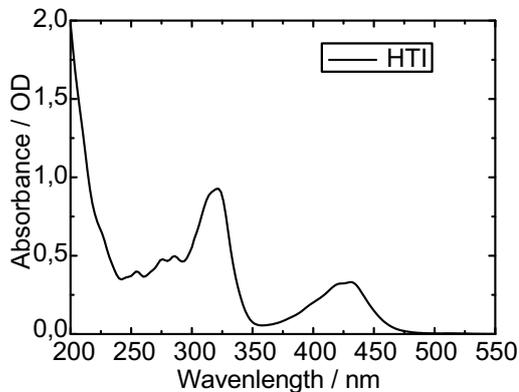


Abbildung 1.2: Absorptionsspektrum von HTI in Methanol. Die Bande bei 400 bis 450 nm zeigt die Absorption $S_0 \rightarrow S_1$ im sichtbaren Spektralbereich. Getrennt davon ist die $S_0 \rightarrow S_2$ (UV) Absorptionsbande zwischen 300 und 350 nm zu erkennen.

S_2 Zustand vom Grundzustand S_0 aus. Noch tiefer im ultravioletten Bereich (ab 220 nm) zeichnet sich die nächste Absorptionsbande ab.

Photonen im infraroten Spektralbereich können im Allgemeinen keine elektronischen Anregungen auslösen. Eine schwingende oder rotierende Atomgruppe kann jedoch mit der Bewegung einer elektrischen Ladung verbunden sein. Dies gilt, wenn die Ladungsverteilung in einem Molekül nicht symmetrisch oder die Verteilung durch die Schwingungsbewegung der Atome unsymmetrisch ist (siehe Abbildung 1.3). Infrarotes Licht geeigneter Frequenz kann von einem Molekül absorbiert werden, wenn mit der anzuregenden Schwingung eine Dipolmomentänderung in der betreffenden Atomgruppe einher geht. Ein elektrischer Dipol $\vec{p}(t)$ definiert sich über den Abstand $\vec{r}(t)$ zwischen einer positiven und negativen Ladung

$$\vec{p} = q\vec{r} \quad . \quad (1.3)$$

mit $\vec{p}(t)$ in [Asm], Ladung q in [As] und $\vec{r}(t)$ in [m]. Das elektrische Feld $E(t)$ der elektromagnetischen Welle koppelt mit dem Dipolmoment $\vec{p}(t)$ des Moleküls. Als einfaches klassisches Modell kann man sich die zwei Partialladungen $+\delta q$ und $-\delta q$ verbunden durch eine Feder vorstellen. Der Potentialverlauf eines zweiatomigen Moleküls entspricht einem anharmonischen Oszillator. Als Näherung wird häufig das Morse-Potential verwendet. Die Potentialkurve ist unsymmetrisch bezüglich des Gleichgewichtsabstands R_e (siehe Abbildung 1.4). Für Abstände kleiner R_e ($R < R_e$) wird das Potential stark repulsiv. Eine Vergrößerung des Abstandes bewirkt eine Lockerung der Bindung bis zur Dissoziation. Das Morse-Potential (1.4) ist für zweiatomige Moleküle eine gute Näherung.

$$E_{\text{pot}} = E_{\text{diss}}(1 - e^{-a(R-R_e)})^2 \quad (1.4)$$

Die Dissoziationsenergie ist mit E_{diss} bezeichnet. Die Größe a ist eine molekülspezifische Größe. Sie enthält die reduzierte Masse und die Schwingungsfrequenz des harmonischen

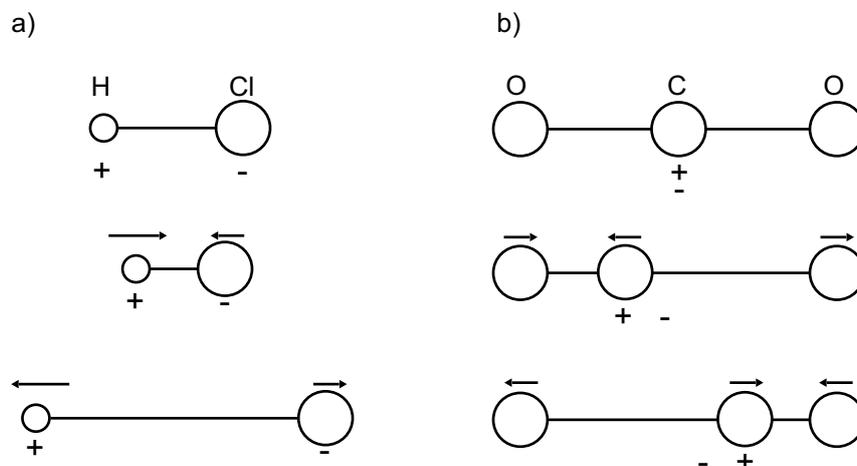


Abbildung 1.3: Dipolmomentänderung bei Molekülschwingungen. Abbildung a) zeigt Chlorwasserstoff. Ein Molekül bestehend aus Atomen mit unterschiedlichen Partialladungen ändert bei Schwingung sein Dipolmoment. Abbildung b) stellt Kohlendioxid dar, es ist in der Gleichgewichtslage dipolfrei. Eine asymmetrische Schwingung der Ladungsschwerpunkte der negativ geladenen O-Atome verursacht ein Dipolmoment.

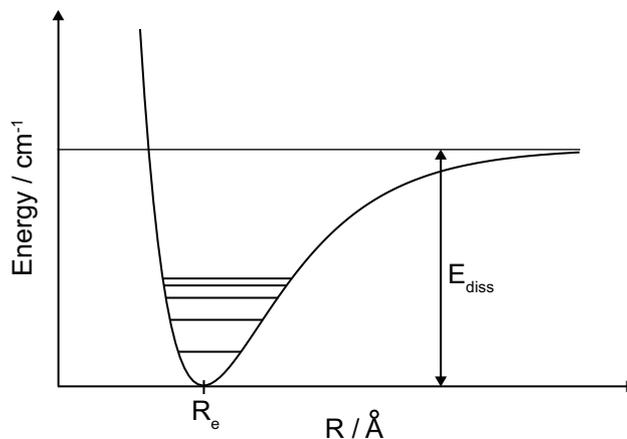


Abbildung 1.4: Morse-Potential. Dargestellt ist die Energie in Abhängigkeit des mittleren Kernabstand. R_e ist der Gleichgewichtsabstand; E_{diss} die Dissoziationsenergie.

Oszillators und besitzt die Einheit $[\text{cm}^{-1}]$.

$$a = (m_r/2E_{\text{diss}})^{1/2}\omega_e. \quad (1.5)$$

Die Lösung der Schrödingergleichung für das Morsepotential ist für Auslenkungen $R > R_e$ in geschlossener Form möglich. Man erhält für die Energierme des anharmonischen

Oszillators in guter Näherung

$$E_\nu = \hbar\omega_e\left(\nu + \frac{1}{2}\right)\left[1 - x_e\left(\nu + \frac{1}{2}\right)\right]. \quad (1.6)$$

Dabei ist $\nu = 0, 1, 2, \dots$ die Schwingungsquantenzahl. Strahlungsübergänge sind in Schritten von $\Delta\nu = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$ möglich. In dieser Gleichung beschreibt $x_e = \hbar\omega_e/4E_{\text{diss}}$ die Anharmonizitätskonstante, diese ist typischerweise in der Größenordnung 10^{-2} . Die Schwingungsfrequenz ist durch $\omega_e = 2\pi\nu_e$ gegeben. Vergleicht man den Ausdruck 1.6 mit den Energietermen des harmonischen Oszillators $E_\nu = \hbar\omega\left(\nu + \frac{1}{2}\right)$, findet sich für die Schwingungsfrequenz der Zusammenhang:

$$\omega_\nu = \omega_e\left[1 - x_e\left(\nu + \frac{1}{2}\right)\right] \quad (1.7)$$

Beim anharmonischen Oszillator nimmt die Schwingungsfrequenz ω_ν mit zunehmender Quantenzahl ν ab. Das höchste diskrete noch bindende Niveau gibt die Dissoziationsenergie E_{diss} an. Oberhalb dieses Niveaus gibt es ein Kontinuum nicht gebundener Zustände. Die Lage der Schwingungsbanden gibt Auskunft über die Kraftkonstante der Bindung und gibt Hinweise auf funktionelle Gruppen. Einige Schwingungssysteme sind in Molekülverbänden voneinander weitgehend unabhängig und sind im IR-Spektrum stets bei ähnlichen Wellenzahlen zu detektieren. Es ist also möglich charakteristische Schwingungsbanden zu identifizieren und somit Strukturaufklärung zu betreiben. Ein bekanntes Beispiel zeigt Abbildung 1.5. Dargestellt sind die Normalschwingungen von N-Methylacetamid. Der linke Teil zeigt die Amid-I Mode mit Schwingungen zwischen 1600 und 1700cm^{-1} . Den Hauptbeitrag liefert die Streckschwingung¹ der Kohlenstoff-Sauerstoff-Doppelbindung. Die Amid-II Mode bei etwa 1550cm^{-1} enthält die Kohlenstoff-Stickstoff-Streckschwingung und einen größeren Anteil an Stickstoff-Wasserstoff- Deformationsschwingungen². Die Amid-I Bande zeigt eine starke IR-Absorption (vgl. Abbildung 1.5). Durch die Wechselwirkung der C–O–Doppelbindung mit den benachbarten Molekülgruppen weist ihre Schwingungsfrequenz eine starke Abhängigkeit von der relativen Orientierung auf. Daher hat sich die Amid-I Bande als guter Strukturindikator erwiesen. Amid-I Banden besitzen im allgemeinen eine große Breite, so dass die Banden verschiedener Strukturelemente stark überlappen. In typischen Absorptionsspektren sieht man deshalb relativ breite Amid-Banden mit mehr oder weniger ausgeprägter Unterstruktur. Die Trennung der einzelnen Banden ist schwierig. Um festzustellen, welche Molekülgruppen bei einer Reaktion beteiligt sind, kann man Differenzspektren aus den Absorptionsspektren vor und nach der beobachteten Reaktion bilden. Abbildung 1.6 zeigt ein Infrarotabsorptionsspektrum von Hemithioindigo gelöst in deuteriertem Methanol und aufgenommen mit einem

¹Bewegung der Atome in Bindungsrichtung

²Bewegung der Atome bei denen sich Bindungswinkel zwischen den Atomen ändern

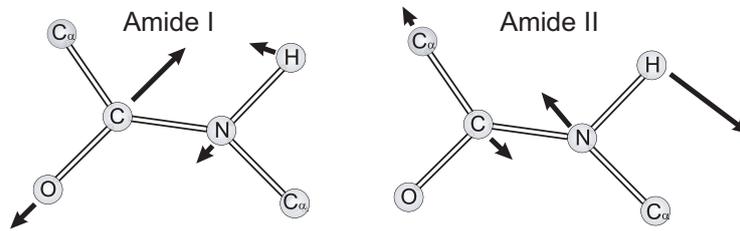


Abbildung 1.5: Normalschwingungen von N-Methylacetamid, nach [Kri86] Die Amid-I Bande wird im Wesentlichen durch die CO-Streckschwingung bestimmt. Die CN-Streckschwingung und ein größerer Anteil an NH-Deformationsschwingungen bestimmen die Amid-II Bande.

FTIR-Spektrometer³. Die schwarze Kurve in Abbildung 1.6 a) zeigt die Absorption der Probe in Z-isomerer Form. Wird das Probenvolumen mit Licht der Wellenlänge 400nm beleuchtet reagiert es mit einer Photoisomerisation, man findet nun auch E-Isomere des HTI in der Probe vor. Die blaue Kurve in Abbildung 1.6 a) zeigt die Absorption nach der Photoreaktion im photostationären Gleichgewicht. In Abbildung 1.6 b) ist die Differenz der oben beschriebenen Spektren dargestellt. Durch eine Bandenanalyse kann man die Molekülgruppen die an der Photoreaktion teilnehmen zuordnen.

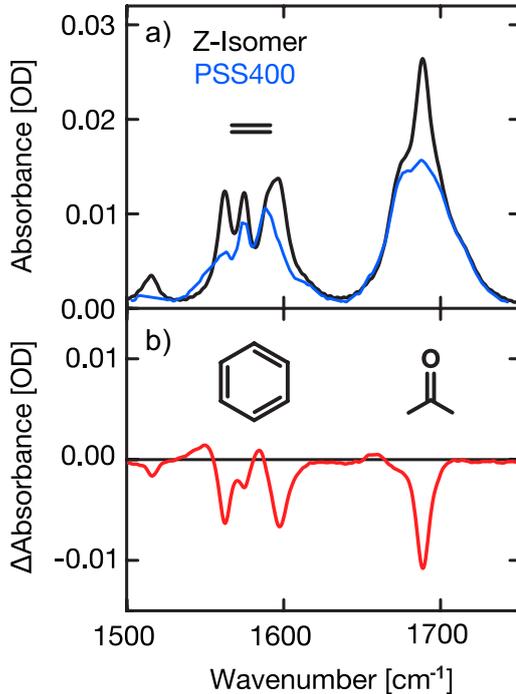


Abbildung 1.6: Absorptions- und Differenzspektrum: a) In schwarz ist das Absorptionsspektrum von HTI (Z-Isomer) dargestellt. In blau ist das Spektrum nach Beleuchtung der Probe mit 400nm im photostationären Gleichgewicht gezeigt. b) Im unteren Teilbild ist das Differenzspektrum dargestellt.

Die stationäre Absorptionsspektroskopie ist ein wichtiges Werkzeug zur Charakterisie-

³Fourier-Transform-Infrarot-Spektralphotometer

nung unbekannter Moleküle. Man erhält Information über notwendige Probenkonzentrationen und Löslichkeit, kann Reaktionsquantenausbeuten abschätzen und spektral interessante Bereiche festlegen. Da jedoch Reaktionspfade photochemischer Prozesse teilweise komplexen kinetischen Schemata folgen, sind die eben beschriebene Standardtechniken nicht ausreichend, um alle Details einer Reaktion zu erfassen. Eine Methode, die es ermöglicht die Reaktionskinetiken im Detail zu erfassen ist die zeitaufgelöste IR-Spektroskopie.

1.1.2 Zeitaufgelöstes Messen: Anreg-Abtastspektroskopie

Die zeitaufgelöste Anreg-Abtast-Spektroskopie ist ein wirkungsvolles Werkzeug, um molekulare Dynamiken zu beobachten. Wie im voran gegangenen Kapitel beschrieben, gibt der infrarote Spektralbereich Auskunft über Schwingungszustände und somit strukturelle Informationen über die untersuchten Moleküle. Mit lichtschtbaren Molekülen besteht die Möglichkeit, Reaktionen definiert durch einen ultrakurzen Lichtimpuls zu starten und

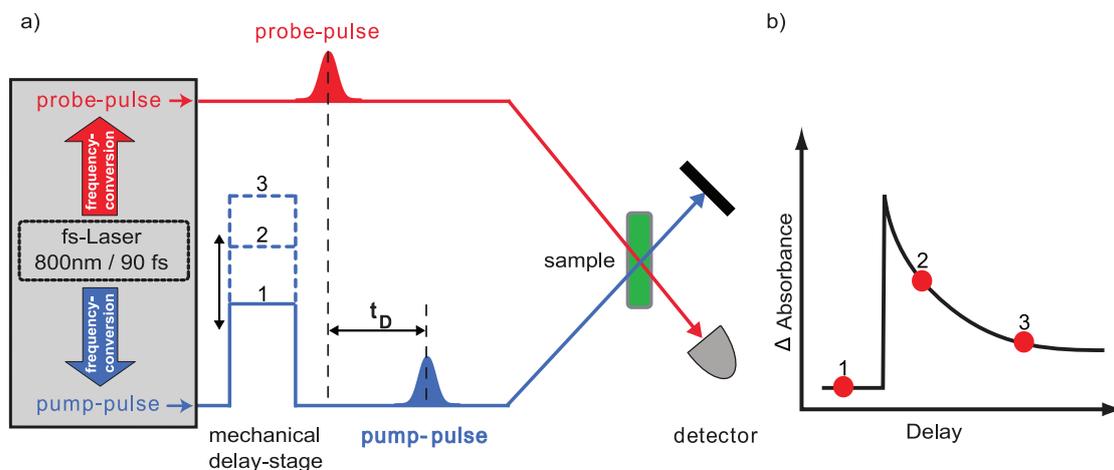


Abbildung 1.7: Prinzip der Anreg-Abtast-Spektroskopie. a) Ein Lasersystem liefert kurze Lichtimpulse, diese werden mittels nichtlinearer Prozesse in die gewünschten Wellenlängen und Spektralbereiche konvertiert. In einem optischen Zweig wird ein intensiver Anreg-Impuls (“pump”, blau dargestellt) erzeugt, der in der zu untersuchenden Probe (“sample”) eine Reaktion auslöst. Ein zweiter Zweig dient zur Erzeugung eines schwachen Abtast-Impulses (“probe”, rot dargestellt). Dieser durchläuft das angeregte Probenvolumen und wird anschließend detektiert (“detector”). b) Eine Verzögerungsstrecke (“mechanical delay-stage”) im Anregzweig ermöglicht es die Verzögerungszeit zwischen Anreg- und Abtast-Impuls einzustellen und so die Absorptionsänderung, welche der Anreg-Impuls auslöst, zeitlich zu verfolgen.

mit Hilfe eines Abtastlichtimpulses die induzierten strukturellen Änderungen zeitaufgelöst zu detektieren.

Das Prinzip der Anreg-Abtast-Spektroskopie ist schematisch in Abbildung 1.7 a) dargestellt. Ein Lasersystem liefert kurze Lichtimpulse, welche über zwei unterschiedliche Lichtwege mit einer einstellbaren Zeitdifferenz auf der zu untersuchenden Probe auftreffen. Einer der beiden Lichtimpulse dient zur Anregung der Probe (Anreg-Impuls, blau dargestellt), das bedeutet er löst einen photochemischen oder photophysikalischen Prozess aus. Der zweite Lichtimpuls (Abtast-Impuls, rot dargestellt) durchläuft die Probe nach dem Anreg-Impuls und wird detektiert. Gemessen wird die Intensität des Abtast-Impulses mit und ohne vorherige Anregung. Daraus lässt sich die durch den Anregungs-Lichtimpuls verursachte Absorptionsänderung in der Probe bestimmen. Die zeitliche Entwicklung dieser Absorptionsänderung erhält man, indem Anreg- und Abtastimpuls gegeneinander verzögert und das Experiment wiederholt wird, siehe Abbildung 1.7 b). Eine notwendige Voraussetzung für das Messprinzip ist, dass die Probe bei jedem Einzelexperiment in der Ausgangsform vorliegt. Dies kann dadurch erreicht werden, dass das Probenvolumen (z.B. durch eine Pumpe) zwischen zwei Experimenten ausgetauscht wird oder wenn das untersuchte Molekülsystem sehr schnell in seinen Ausgangszustand zurückkehrt. So findet die Reaktion stets unter gleichen Bedingungen statt, und die Kinetiken in der Probe laufen stets gleich ab. Um die verschiedenen Verzögerungen einzustellen, wird der Anreg-Impuls über eine optische Verzögerungsstrecke geführt. Realisiert wird die Verzögerung durch einen mechanischen Verschiebetisch. Über eine Spiegelanordnung auf diesem fahrbaren Tisch wird die optische Weglänge des Anregungsimpulses bis zur Probe im Vergleich zum Abfrageimpuls variiert. Die reversible Positioniergenauigkeit von einem Mikrometer ermöglicht eine Zeitauflösung von etwa drei Femtosekunden. Die eigentliche Begrenzung der Zeitauflösung wird jedoch durch die Dauer der verwendeten Lichtimpulse bestimmt, die erheblich länger ist. Die maximale Länge des Fahrweges legt die mögliche Zeitspanne fest, in der der Reaktionsverlauf verfolgt werden kann. Der zeitliche Verlauf der Transmissionsänderung, den dieses Anreg-Abtast-Experiment aufzeichnet, ermöglicht es beispielsweise Rückschlüsse über strukturelle Änderungen oder intermediäre elektronische Zustände des untersuchten Systems zu ziehen. Für die Ultrakurzzeit-Spektroskopie eignen sich Festkörper-Lasersysteme, die intensive Lichtimpulse im Femtosekunden-Bereich zur Verfügung stellen. Die hohen Intensitäten ermöglichen es mit Hilfe der nichtlinearen Optik spektral abstimmbare Lichtimpulse zu erzeugen und so die Wellenlängen auf die zu untersuchenden Moleküle anzupassen. Eine detaillierte Beschreibung des Femtosekunden-Infrarot-Experiments ist in Kapitel 2.1 zu finden.

1.2 Proteine und Peptide

Proteine sind Makromoleküle, die in allen tierischen und pflanzlichen Zellen zu finden sind. Sie erfüllen eine Vielzahl lebenswichtiger Funktionen und Aufgaben. So dient Hämoglobin zum Beispiel als Träger des Sauerstoffs in den Erythrozyten.

Aminosäuren sind die elementaren Bausteine der Proteine. Man findet 20 Arten von Aminosäuren, die sich in Größe, Gestalt, Ladung, Wasserstoffbindefähigkeit und chemischer Reaktivität ihrer Seitenketten R unterscheiden. Dieser Satz aus 20 L-Aminosäuren bildet das fundamentale Alphabet der Proteine. Sie werden mit einem 1-Buchstaben-Code oder einem 3-Buchstabencode abgekürzt (siehe Tabelle A.1). Aminosäuren werden durch Peptidbindungen (auch Amidbindungen) zu Polypeptidketten verbunden. Abbildung 1.8 zeigt die Bildung eines Dipeptids unter Abspaltung von Wasser. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite der Hydrolyse. Zur Biosynthese von Peptidverbindungen ist daher ein beträchtlicher Energieaufwand notwendig.

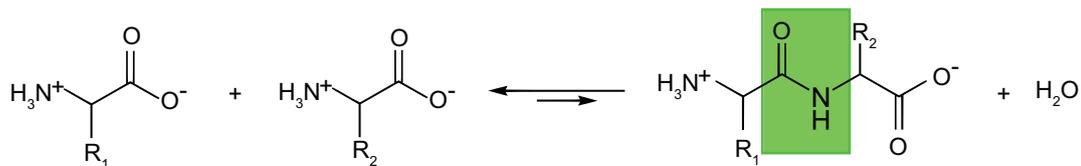


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung einer Peptidbindung, auch Amidbindung genannt, unter Abspaltung von Wasser. Das Dipeptid hat an einem Ende eine α -Aminogruppe und am anderen eine α -Carboxylgruppe. Dies ergibt eine definierte Richtung der Peptidketten. R_1 und R_2 stehen für die unterschiedlichen Seitenketten die kovalent an das C_α -Atom gebunden sind.

Ein kleines Protein wird als Peptid bezeichnet. Ab einer Anzahl von etwa 100 verknüpften Aminosäuren spricht man von einem Protein, darunter von einem Peptid.

Einen etwas detaillierteren Einblick in die Struktur von Proteinen bietet Abbildung 1.8. Röntgenkristallographische Untersuchungen zeigen, dass die Peptideinheit (in Abbildung 1.8 grün hinterlegt) starr und planar ist - daher auch die Bezeichnung Peptidplättchen [Str94, Cor53]. Die Bindungen beiderseits der starren Peptideinheit haben die Möglichkeit zur Rotation. Die Rotationswinkel ψ und ϕ sind in Abbildung 1.9 dargestellt.

Polypeptidketten haben eine bestimmte Richtung, da ihre Bausteine unterschiedliche Enden besitzen. Das Aminoende gilt vereinbarungsgemäß als Anfang einer Peptidkette. Die Abfolge der Aminosäuren wird als Primärstruktur des Proteins bezeichnet. Die Konformation der Hauptkette ist durch die Definition der beiden Winkel ψ und ϕ für jeden Rest der Kette vollständig festgelegt. Bestimmte Kombinationen der Winkel sind wegen sterischer Behinderung nicht möglich. Die erlaubten Bereiche kann man in einem

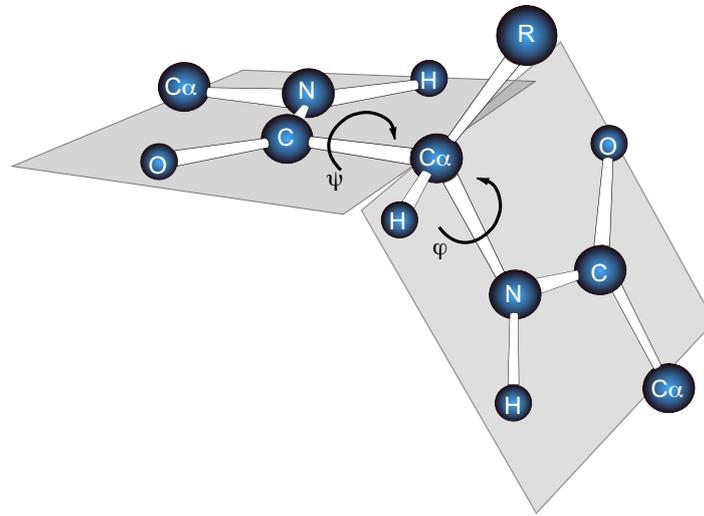


Abbildung 1.9: Definition der Rotationswinkel. ψ beschreibt die Rotation um die C–C α Einfachbindung, φ die Rotation um die C α –N Einfachbindung. Ist die Polypeptidkette vollständig gestreckt, betragen die Winkel ψ und φ 180°.

Ramachandran-Plot (vgl. Abbildung 1.10) darstellen und somit die Sekundärstruktur vorhersagen.

Die Sekundärstruktur gibt die räumliche Anordnung der Polypeptidkette an. Beispiele für Sekundärstrukturelemente sind die α -Helix, und das β -Faltblatt. Die α -Helix ist eine wendeltreppenartige gewundene stabförmige Struktur einer Polypeptidkette. Die α -Helix wird durch Wasserstoffbrücken zwischen den CO- und NH-Gruppen der selben Polypeptidketten stabilisiert. Zwei oder mehrere solcher α -Helices können wie bei einem Seil

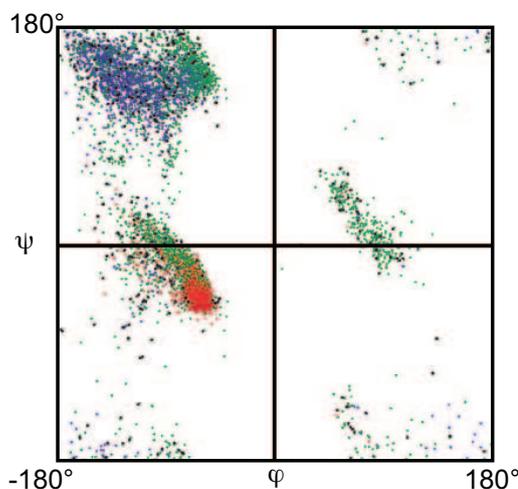


Abbildung 1.10: Ramachandran-Plot der Winkel ψ und φ von hochauflösenden Proteinstrukturen (Auflösung besser als 0.1 nm) aus der Proteindatenbank PDB. Die Farben kodieren die bekannten Sekundärstrukturelemente α -Helix (rot), β -Faltblatt (blau) und Ketten und andere Strukturen (grün). Winkel die sterisch und damit energetisch sehr ungünstig sind treten nicht auf und liegen in den weißen Bereichen. Abbildung entnommen aus [Sim05].

verdrillt sein. Die Polypeptidketten im β -Faltblatt liegen dagegen in nahezu gestreckter Form vor und bilden plattenförmige Strukturen. Dabei wird die β -Faltblatt-Struktur durch Wasserstoffbrücken zwischen CO- und NH-Gruppen verschiedener Polypeptidstränge stabilisiert. Benachbarte Stränge können in einem β -Faltblatt dieselbe Richtung besitzen (*parallele β -Faltblatt-Struktur*) oder entgegengesetzt verlaufen (*antiparallele β -Faltblatt-Struktur*) (vgl. Abbildung 1.11). Die Seitenketten gegenüberliegender Aminosäuren zeigen in die gleiche Richtung und können so in Wechselwirkung miteinander treten.

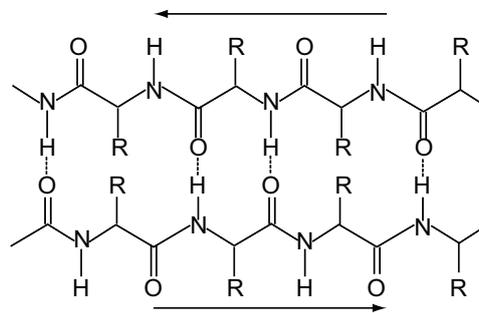


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung eines antiparallelen Faltblatts. Die benachbarten Stränge sind in entgegengesetzten Richtungen orientiert. Zwischen den NH- und CO-Gruppen der beiden Stränge bilden sich Wasserstoffbrücken (gestrichelte Linien) und stabilisieren diese Struktur. Die Seitenketten sind mit R angegeben und ragen zu beiden Seiten aus der Faltblattebene heraus.

Die Tertiärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung der Sekundärstrukturelemente zueinander oder auch die räumliche Beziehung zwischen weit entfernten Aminosäureresten innerhalb einer linearen Sequenz. Proteine die aus mehreren Polypeptidketten bestehen, zeigen eine sogenannte Quartärstruktur. Diese beschreibt die räumliche Anordnung der Untereinheiten und die Art ihrer Kontakte. Die Berührungsstellen der Untereinheiten sind für die Proteinfunktionalität von besonderer Bedeutung.

Beispiel für eine Proteinfunktionalität: PDZ-Domäne

Im folgenden Abschnitt wird eine Proteindomäne vorgestellt, die zu den Proteininteraktionsdomänen (PID) zählt. Sie enthält Strukturen, die auch die Grundlage eines der untersuchten Peptidsysteme (vgl. 5.2) bilden. Diese vermitteln eine Vielzahl von Protein-Protein Wechselwirkungen [Don97]. Die hier betrachtete PDZ-Domäne wurde erstmals 1991 im *post synaptic density Protein* (PSD95/SAP90), im *septate junction protein Disc-large* aus *Drosophila melanogaster* und im *tight junction protein Zonula occludentes-1*

identifiziert. Die Anfangsbuchstaben dieser Systeme bilden das Akronym PDZ. Polypeptide, die solche PDZ-Domänen besitzen, spielen zum Beispiel eine wichtige Rolle bei Signaltransduktionswegen in Zellen. Die meisten bekannten mittels PDZ-Domänen vermittelten Proteininteraktionen funktionieren über das Erkennen kurzer C-terminaler Peptidmotive [Kim95]. Alternativ dazu werden auch interne Motive, unabhängig vom C-terminalen Rest, erkannt. Eine der am Besten untersuchten internen Erkennungsmotive liegt im PDZ-PDZ Heterodimer der PDZ-Domäne der neuronalen NO-Synthase (nNOS) mit PSD-95 in Neuronen oder mit Syntrophin in Muskelzellen vor (Abbildung 1.12). Die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) in Säugetiermuskelzellen wird durch die neuronale NO-Synthase katalysiert. Die Assoziation von Syntrophin mit nNOS koppelt die NO-Produktion mit der Muskelkontraktion und sorgt so für eine gesteigerte Durchblutung bei erhöhter Stoffwechselbelastung. Diese PDZ-PDZ Interaktion unterscheidet sich von der

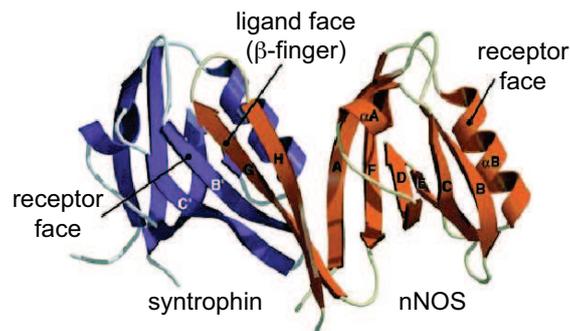


Abbildung 1.12: Darstellung des Heterodimers zwischen Syntrophin (lila) und nNOS (orange). Die nNOS-Domäne hat eine Rezeptorfläche (Peptidbindungstasche) und einen Rezeptorligand (β -Finger). Der nNOS β -Finger bindet an die Bindungstasche der Syntrophin PDZ-Domäne. Abbildung leicht geändert entnommen aus ([Hil99]).

kanonischen PDZ-Peptid Interaktion, welche sich des C-terminalen Rests bedient. Damit diese hier vorgestellte Interaktion erfolgt, muss der β -Finger (Reste 101-127) der PDZ-Domäne von nNOS in die Bindungstasche des Syntrophin andocken. Dieser wegen seiner Form als Hairpin bezeichnete Teil aus ca. 30 Aminosäuren, bindet an die gleiche Stelle wie ein Ligand mit C-terminalem Erkennungsmotiv. Nur wenn der β -Finger seine kompakte Struktur und beide PDZ Partner ihre native Tertiärstruktur besitzen, kann es zur Bindung kommen. Untersuchungen von [Har01] zeigen, dass sowohl die Konsensussequenz des nNOS Pseudopeptids (HLETTFTG) wie auch der Turn (T-112 bis T-116) entscheidend für die Bildung der Bindung sind. Das bedeutet, dass nicht nur die Reste eine wichtige Rolle spielen, sondern auch die exakte räumliche Struktur des β -Fingers. In der Arbeit von Wang et al. [Wan00] ist die Sekundärstruktur des β -Finger Peptids

vorgestellt worden. Ausführliche NMR-Untersuchungen zeigen direkte NOEs⁴ zwischen Protonen im Peptidrückgrat. Dies weist darauf hin, dass die beiden β -Stränge einen antiparallelen β -Finger bilden. Diese Sequenz (siehe Abbildung 1.13) dient als Vorlage zu dem in dieser Arbeit eingehend untersuchten System, welches in Kapitel 4 diskutiert wird.

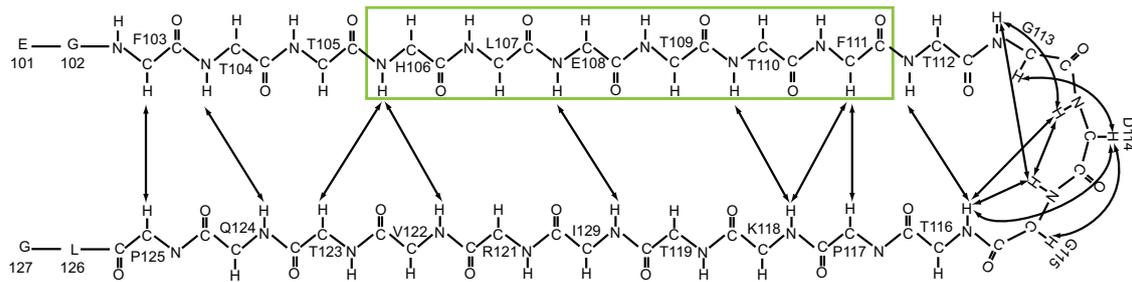


Abbildung 1.13: β -Finger Peptidsequenz von nNOS mit dem für die interne Erkennung wichtigen Strang (grüner Rahmen) und mit den direkten NOEs zwischen den Protonen (schwarze Pfeile). Abbildung leicht modifiziert entnommen aus [Wan00].

1.3 Stoffsysteme

Diese Arbeit zeigt die biophysikalische Anwendbarkeit einer neuen Molekülklasse als ultraschnelle Photoschalter in Chromopeptiden. An dieser Stelle folgt ein Überblick der untersuchten Molekül- und Chromopeptidsysteme.

Die chemische Struktur der untersuchten Verbindungsklasse setzt sich aus den zwei Molekülteilen Stilben und Thioindigo zusammen (Abbildung 1.14). C_{α} In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Derivate der Hemistilben-Hemithioindigo-Mischverbindung (hemi = halb, Hemithioindigo: HTI) untersucht.

Kapitel 3 zeigt die Grundlagen der photoinduzierten *Z/E*-Isomerisierung von Hemithioindigo am Beispiel der in Abbildung 1.15 dargestellten HTI-basierten ω -Aminosäure.

In Kapitel 4 wird der Einfluss verschiedener Substitutionen an der para-Position des Stilbenteils behandelt. Es werden drei Substanzen mit unterschiedlichen Substitutionen (R = H, CN, OMe) untersucht. Die Substituenten sind in para-Position des Stilbenteils angebracht. An der 5-Position des Thioindigo befindet sich im Unterschied zu der HTI-basierten ω -Aminosäure eine Methylgruppe (vgl. Abbildung 1.16).

⁴„Nuclear Overhauser effect“ [Ane65] : Transfer von Spinpolarisation von einer Population auf eine andere nach Relaxation in einem NMR Experiment. NOEs werden durch den Raum vermittelt. Man erhält Abstandsinformationen, aus denen die dreidimensionale Struktur rekonstruiert werden kann.

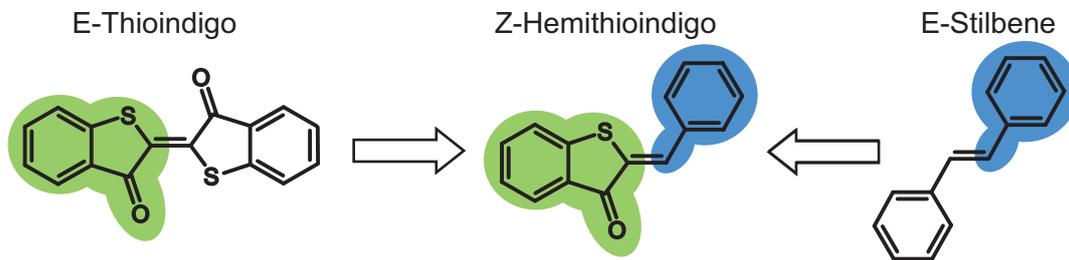


Abbildung 1.14: Schematische Darstellung der molekularen Strukturen von E-Thioindigo, Z-Hemithioindigo und E-Stilben. Gezeigt sind die thermodynamisch stabileren Isomere. Farblich markiert sind die molekularen Bestandteile von Hemithioindigo. Diese Kennzeichnung hat keinen Bezug zur Synthese der Verbindung.

In Kapitel 5 werden zwei verschiedene HTI-basierte ω -Aminosäuren in Kombination mit zwei verschiedenen Peptidsystemen untersucht. Abbildung 1.17 a) zeigt das Z-Isomer des para-HTI Photoschalters. Die para-Position des Stilbenteils ist grün markiert. Einer CH_2 -Gruppe folgt die Schutzgruppe NHBoc. Der meta HTI-Photoschalter ist in Abbildung 1.17 c) dargestellt. Die meta-Position ist blau markiert und einer CH_2 -Gruppe folgt der Rest $\text{R}_2 = \text{NH}_2 + \text{Cl}$. Abbildung 1.17 b) und d) zeigt die para- und meta HTI-basierten ω -Aminosäuren mit den jeweiligen Peptidsystemen. Die para Position ist grün markiert. Das para Modellpeptidsystem ist ein lineares System. Das meta Peptidsystem ist zyklisch

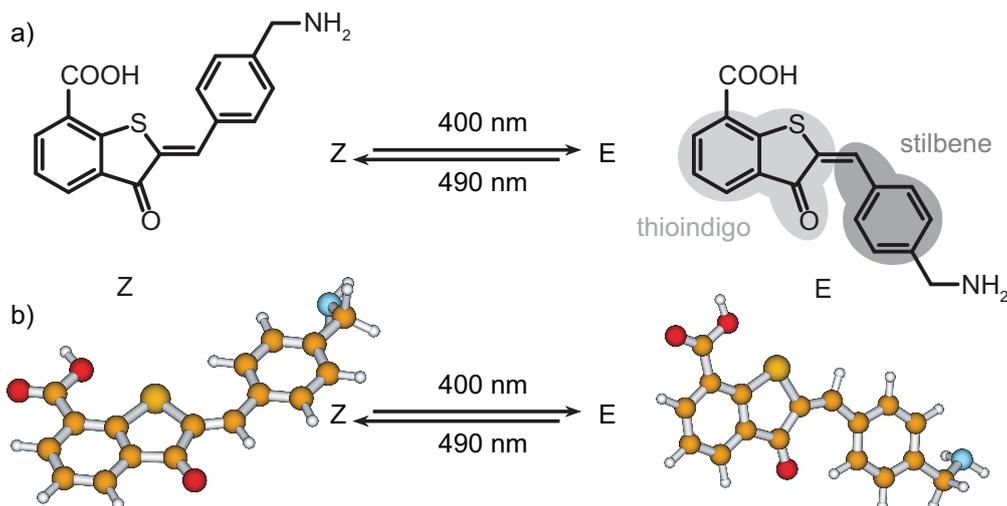


Abbildung 1.15: Chemische Strukturen des Z- und E-Isomers der HTI-basierten ω -Aminosäure. a: Der Indigoteil (hellgrau) und der Stilbenteil (dunkelgrau) sind farblich hinterlegt. b: Darstellung der mit quantenmechanischen Methoden (Gaussian 98, DFT [Fri98]) optimierten Grundzustandsstrukturen.

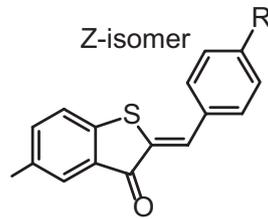


Abbildung 1.16: Schematische Darstellung des substituierten Z- und E-Isomers. Die Substituenten (R = H, CN, OMe) sind in para-Position im Stilbenteil des HTI angebracht.

aufgebaut und ist der in Kapitel 1.2 vorgestellten PDZ-Domäne nachempfunden. Die für die interne Erkennung biologisch relevante Peptidsequenz ist gelb hinterlegt.

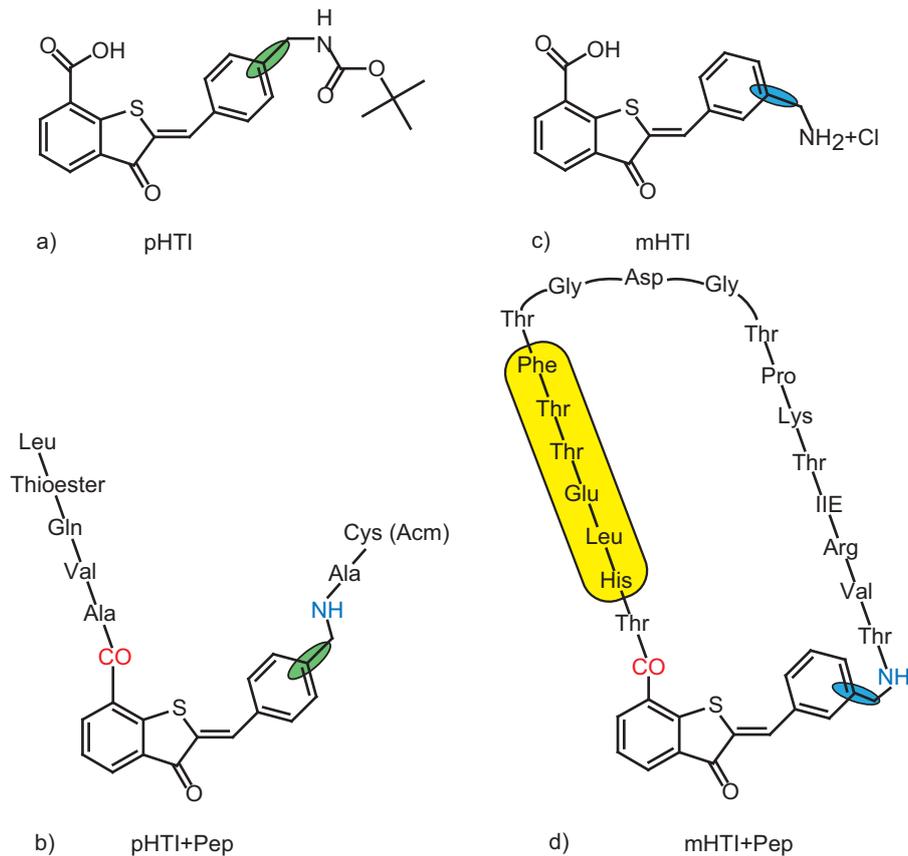


Abbildung 1.17: Schematische Darstellung der Strukturen des para und meta-Systems. a: Para-HTI (pHTI) Schalter mit der Schutzgruppe (NH-Boc). b: Lineares Peptidsystem. Die Aminosäuren sind in para Position (grün markiert) des Phenylrings im Stilbenteil angebracht. c: Meta-HTI (mHTI) Schalter mit (NH₂ + Cl) Gruppe. d: Zyklisches Peptidsystem. Die Aminosäuren sind in meta Position (blau markiert) des Phenylrings im Stilbenteil angebracht. Dieses System ist der in Kapitel 1.2 vorgestellten PDZ-Domäne nachempfunden. Die biologisch relevante Aminosäuresequenz ist gelb hinterlegt.

Kapitel 2

Experimentelle Verfahren

Dieses Kapitel stellt die verwendeten Instrumente und Verfahren zur experimentellen Untersuchung der Proben vor. Das wichtigste der eingesetzten Werkzeuge ist ein Femtosekunden-Infrarot-Spektrometer. Ausgehend vom Laseroszillator über die Verstärkung der Laserimpulse in einem regenerativen Verstärker bis zur parametrischen Erzeugung der Anregungs- und Abtastimpulse wird auf die Funktionsweise und die Parameter dieses Messinstruments eingegangen. Weiterhin wird die Erfassung der mit dem Femtosekunden-Infrarot-Spektrometer gewonnenen Daten diskutiert.

Die Präparation der untersuchten Proben ist ausschlaggebend für die Qualität und die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse. Die Vorbereitung der Proben, sowie ihre Charakterisierung vor der eigentlichen zeitaufgelösten Messung wird in Abschnitt 2.2 beschrieben. Hier findet sich auch die Vorgehensweise zur Justage der IR-Messapparatur und die Ermittlung der Apparatefunktion. Sie ist für die Gewinnung des eigentlichen Messsignals und die Auswertung der Daten wichtig, die im abschließenden Abschnitt dieses Kapitels diskutiert werden.

2.1 Femtosekunden-Infrarot-Spektrometer

Den Aufbau des Femtosekunden-Infrarot-Spektrometers zeigt Abbildung 2.1. Das in dieser Arbeit verwendete Spektrometer lässt sich schematisch in vier Blöcke unterteilen. Das zentrale Lasersystem (Abbildung 2.1 I) ist eine kommerzielle Komplettlösung der Firma Spectra Physics bestehend aus einem Oszillator und einem regenerativen Verstärker. Es liefert kurze Lichtimpulse (~ 70 fs) bei einer Zentralwellenlänge von 800 nm. Die mittlere Ausgangsleistung beträgt 3.5 W bei einer Wiederholrate von 1 kHz. Das Lasersystem versorgt zwei unabhängige Experimente. Ein Anreg-Abtast-Experiment im UV und sichtbaren Spektralbereich und das Femtosekunden-Infrarot-Spektrometer. Für das Femtosekunden-Infrarot-Spektrometer werden 800 mW verwendet. Ein Teil der Leistung wird für eine mehrstufige Frequenzkonversion zur Erzeugung abstimmbarer Abfrageimpulse im mittleren infraroten Spektralbereich (Abbildung 2.1 II) verwendet. Diese be-

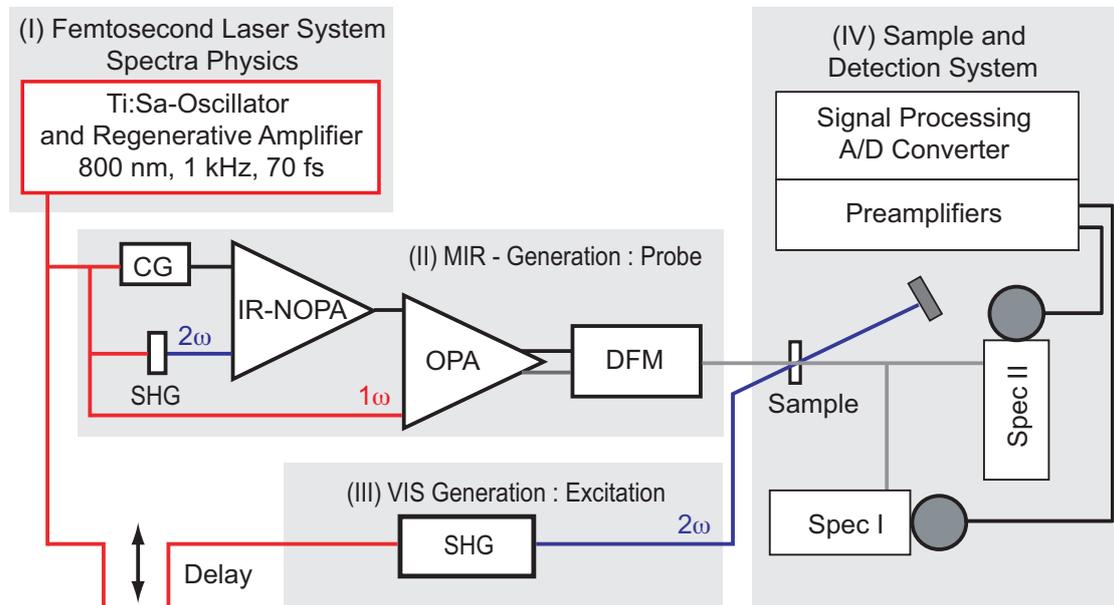


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau des Femtosekunden-Infrarot-Spektrometers. (I) Femtosekunden-Lasersystem der Firma *Spectra Physics*. (II) Mehrstufige Frequenzkonversion zur Erzeugung der Abtast-Impulse. (III) Erzeugung der 2. Harmonischen der Laserfundamentalen zur Nutzung als Anreg-Impuls; Delay: Variable Verzögerungsstrecke. (IV) Räumliche Überlagerung von Anreg- und Abtast-Impuls in der Probe und anschließende räumliche Aufteilung zur frequenz aufgelösten Detektion; Konversion der Signale der Vielkanal-Detektoren in einem Analog-Digital-Wandler. Bild nach [Sch08]

steht aus einer Weißlicht-Erzeugung (continuum generation, „CG“) und einer Frequenzverdopplung gefolgt von zwei optisch parametrischen Verstärkerstufen (optical parametric amplifier, OPA) und einer Differenz-Frequenz-Erzeugung (difference frequency mixing, DFM). Ein weiterer Anteil dient zur Erzeugung von Lichtimpulsen der gewünschten Anregungswellenlänge von 400 nm durch Frequenzverdopplung (SHG). Die Anregimpulse werden über eine variable Verzögerungsstrecke (Delay) geführt. Anreg- und Abtastimpulse werden im Probenvolumen räumlich überlagert. Eine Vielkanal-Detektion ermöglicht ein spektral breitbandiges Erfassen der Abtast-Lichtimpulse. Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Komponenten kurz beschrieben.

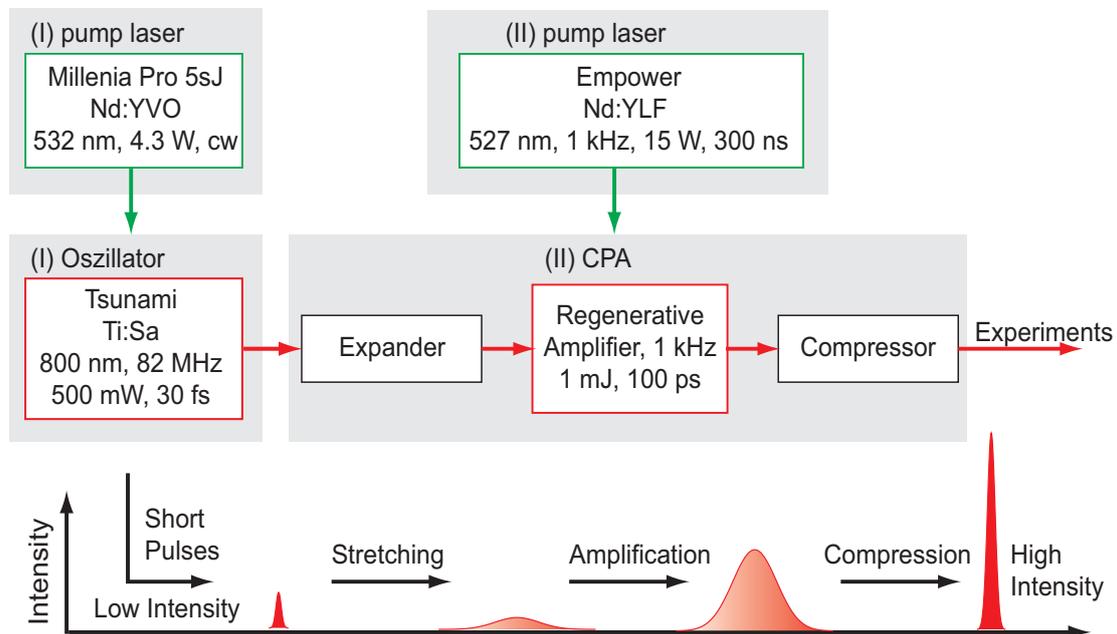


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des kommerziellen Ti:Saphir-Lasersystems der Firma *Spectra Physics* bestehend aus vier Komponenten. (I) Oszillator mit dem cw (Dauerstrich) Pump-laser. (II) Regenerativer Verstärker bestehend aus einem zeitlichen Pulsstreckler (Expander), dem eigentlichen regenerativen Verstärker und einem Pulscompressor (Compressor). Elemente zur Ein- und Auskopplung der Impulse in den Oszillator sind nicht dargestellt. Im unteren Teil ist die Intensitätsverteilung der Impulse vom Oszillator bis zum Ausgang des Verstärkers schematisch dargestellt. Bild nach [Sch08].

2.1.1 Femtosekunden Lasersystem

Bei der Erforschung ultraschneller Phänomene haben sich Ti:Saphir-Laser [Spe91] als leistungsfähiges und stabiles Werkzeug durchgesetzt. Sie ermöglichen es, Messungen mit einer Zeitauflösung bis in den fs-Bereich durchzuführen. Der wichtigste Vorteil von mit Ti^{3+} -Ionen dotiertem Saphir (Al_2O_3) ist seine außerordentlich hohe Fluoreszenzbandbreite [Mou86].¹

Die Absorptionsbande von Ti:Saphir liegt im Bereich von 400 nm bis 600 nm [Agg88]. Daher lassen sich Ti:Saphir-Laser sehr gut mittels frequenzverdoppelter Neodymlaser [Mag93] (Emissionswellenlänge im Bereich von 530 nm) pumpen.

Im folgenden Abschnitt werden der Laseroszillator und der daran anschließende rege-

¹Durch die Ankopplung des nicht abgeschirmten 3d-Elektrons der Ti^{3+} -Ionen an das Phononenbad des Wirtskristalls, erhält man ein homogen verbreitertes Fluoreszenzspektrum, das sich in einem Bereich von etwa $0.65 \mu\text{m}$ bis $1.0 \mu\text{m}$ erstreckt [Egg88, Spi94].

Laseroszillator	
Hersteller	Spectra Physics
Typ	Tsunami
Repetitionsrate	$f_{\text{rep}} = 82 \text{ MHz}$
Ausgangsleistung	$P = 500 \text{ mW}$
Impulsdauer	$\tau_{\text{puls}} < 30 \text{ fs}$
Zentralwellenlänge	$\lambda_{\text{c}} = 790 \text{ nm}$
Pumpleistung	$P_{\text{pump}} = 4.3 \text{ W}$
Pumpwellenlänge	$\lambda_{\text{pump}} = 532 \text{ nm}$
Regenerativer Verstärker	
Hersteller	Spectra Physics
Typ	Spitfire Pro-35F-1KXP
Repetitionsrate	$f_{\text{rep}} = 1 \text{ kHz}$
Ausgangsleistung	$P = 3.5 \text{ W}$
Impulsdauer	$\tau_{\text{puls}} \approx 70 \text{ fs}$
Zentralwellenlänge	$\lambda_{\text{c}} \approx 800 \text{ nm}$
Pumpleistung	$P_{\text{pump}} = 15 \text{ W}$
Pumpwellenlänge	$\lambda_{\text{pump}} = 527 \text{ nm}$

Tabelle 2.1: Eckdaten des kommerziellen Ti:Saphir-Lasersystems, getrennt nach Laseroszillator und regenerativem Verstärker.

nerative Verstärker kurz beschrieben. In Tabelle 2.1 sind die wichtigsten Kenndaten des verwendeten kommerziellen Lasersystems zusammengefasst.

Laseroszillator

Bei dem astigmatisch kompensierten, [Kog72] longitudinal gepumpten Laseroszillator handelt es sich um ein kommerzielles Produkt der Firma *Spectra Physics*. Der im Laseroszillator verwendete Modenkopplungsmechanismus ist die Kerr-Linsen-Modenkopplung. Hierbei wird der nichtlineare Brechungsindex von $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$ genutzt, um den Femtosekunden-Betrieb gegenüber dem cw-Betrieb zu bevorzugen [Spe91]. Um das dispersive Auseinanderlaufen des breitbandigen fs-Impulses zu vermeiden ist im Laserresonator ein Prismenkompressor realisiert [For84], mit dem die Dispersion des Resonators kontrolliert werden kann. Der Lichtimpuls läuft im Resonator als Quasi-Soliton um, hierbei hebt sich die Selbstphasenmodulation im Ti:Saphir-Kristall gerade gegen die anomale Netto-dispersion des Resonators auf. Der Laseroszillator wird mit einem frequenzverdoppelten

Nd:YVO Dauerstrichlaser (Spectra Physics, Millennia Pro 5sJ) gepumpt. Die Eckdaten des Laseroszillators sowie des Pumplasers sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Regenerativer Verstärker

Mit Hilfe einer synchronisierten Pockelszelle werden aus dem Impulszug des Laseroszillators einzelne Lichtimpulse so selektiert, dass sich eine resultierende Repetitionsrate von $f_{\text{rep}} = 1 \text{ kHz}$ ergibt.² Ein auf diese Repetitionsrate synchronisierter frequenzverdoppelter, gepulster und diodengepumpter Nd:YLF (Neodym dotiertes Yttrium-Lithium-Fluorid) Laser pumpt den an den Laseroszillator anschließenden Ti:Saphir-Verstärker. Um die Spitzenfeldstärken des verstärkten Lichtimpulses im Verstärkerkristall unterhalb der Zerstörschwelle von Ti:Al₂O₃ und aller anderen Verstärkerkomponenten halten zu können wird der Impuls mit einer Gitteranordnung auf über 100 ps gestreckt, bevor er in die Verstärkeranordnung eingekoppelt wird. Der Verstärker ist als Oszillator ausgelegt, so dass der Impuls den Verstärkerkristall mehrfach passieren kann. Sobald die maximal mögliche Verstärkung des Impulses erreicht ist, wird der Impuls wieder mit einer Pockelszelle aus dem Verstärkerresonator ausgekoppelt. Bis zur Einkopplung des nächsten Laserimpulses wird die Besetzungsinversion durch den Pumplaser wieder aufgebaut. Anschließend wird der Impuls mit einem Gitterkompressor auf eine Impulsdauer von $\approx 70 \text{ fs}$ komprimiert. Dieses Prinzip der Verstärkung von Femtosekundenimpulsen wird als *Chirped pulse Amplification* (CPA) bezeichnet, der Verstärker selbst als *regenerativer Verstärker*. Die mit dem hier beschriebenen Lasersystem generierten ultrakurzen intensiven Lichtimpulse bilden die Grundlage für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Anreg-Abfrage-Spektroskopie. Die Eckdaten des Verstärkersystems sowie des Pumplasers sind ebenfalls in Tabelle 2.1 aufgelistet.

2.1.2 Erzeugung der Impulse für das Anreg-Abtast-Experiment

Abstimmbare Impulse im mittleren Infrarot

Für das Anreg-Abtast-Experiment müssen die Lichtimpulse des zentralen Lasersystems bei 800 nm in die notwendigen Spektralbereiche konvertiert werden. Dabei werden abstimmbare Abtastimpulse im mittleren Infrarot (MIR) und Anregungsimpulse bei 400 nm erzeugt. Hierzu wird ein System eingesetzt, das aus zwei optisch parametrischen Verstärkerstufen („optical parametric amplification“, OPA) mit nachfolgender Differenzfrequenzmischung („difference frequency mixing“, DFM) besteht [Ham97, Kai00, Cer03,

²Bei der Repetitionsrate von $f_{\text{rep, Osc}} = 82 \text{ MHz}$ wird also jeder 82-tausendste Impuls selektiert.

Nib05]. Die Fundamentale des zentralen Lasersystems dient als Pumplicht für die beiden OPA-Stufen, die abstimmbare Lichtimpulse im nahinfraroten Spektralbereich (NIR) um 1400 nm und 1800 nm erzeugen. Diese generieren mittels Differenzfrequenzmischung Impulse im MIR-Bereich zwischen 3 und 10 μm .

In dieser Arbeit wird im Gegensatz zum zweistufigen OPA-System eine Kombination aus einer NOPA-Stufe („noncollinear optical parametric amplification“, NOPA) [Wil97, Rie00] und einer OPA-Stufe gefolgt von der Differenzfrequenzmischung verwendet (siehe Abbildung 2.1 Teil II). Anders als die OPA-Stufe wird die NOPA-Stufe mit der 2. Harmonischen der Laserfundamentalen betrieben. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass die erste Verstärkerstufe im sichtbaren Spektralbereich betrieben wird und somit eine einfachere Justage und Optimierung ermöglicht. Die nicht kollineare Geometrie (Winkel zwischen Seed- und Pumpimpuls ist etwa 3°) führt zu einer räumlichen Trennung der sichtbaren und nahinfraroten Lichtimpulse. So ist für die nächste Verstärkerstufe keine dichroitische Optik nötig. Das Konzept der MIR-Erzeugung wird im Folgenden kurz erläutert. Eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus und der Charakterisierung der mittelinfraroten Lichtimpulse ist in [Sch02, Sie05] zu finden.

(I) In einem nicht kollinearen optischen Verstärker (NOPA) wird der Nahinfrarotanteil eines Weißlichtkontinuums (Seed-Licht $\sim 1400\text{ nm}$) verstärkt [Pie00]. Zur Erzeugung des Weißlichtkontinuums wird ein Saphir-Substrat eingesetzt. Als Pumplicht wird die 2. Harmonische (2ω) der Laserfundamentalen benutzt. Erzeugt wird diese in einem BBO-Kristall. Der NIR-Anteil und 2ω -Anteil werden in einem weiteren BBO räumlich und zeitlich überlagert. Die Phasenanpassung (Typ I) des Verstärkungsprozesses wird durch die Variation des Kristallwinkels eingestellt. Der zeitliche Überlapp zwischen den Lichtimpulsen ist über eine Verzögerungsstrecke (D1) einzustellen. Entsprechend der Energieerhaltung entsteht bei dem Verstärkungsprozess ein weiterer Lichtimpuls im sichtbaren Spektralbereich ($\sim 560\text{ nm}$). Dieser dient zur Energieoptimierung des Konversionsprozesses. Die Aufnahme des Spektrums (Faserspektrometer; Firma Ocean Optics) erlaubt die Abstimmung der NIR-Impulse auf die nachfolgenden Prozesse.

(II) In dem zweiten Konversionsprozess (OPA) werden die NIR-Impulse aus dem vorangegangenen NOPA-Prozess mit Hilfe der Laserfundamentalen als Pump-Lichtimpuls verstärkt. Die Polarisation der Pumpimpulse ($\sim 800\text{ nm}$) wird mit einem $\lambda/2$ -Plättchen um 90° gedreht. Mittels eines dichroitischen Spiegels (DM1) werden die NIR-Impulse und die Pump-Impulse in einen BBO-Kristall überlagert. Der zeitlichen Überlapp zwischen den beiden Lichtimpulsen wird mit einer Verzögerungsstrecke (D2) eingestellt. Bei diesem Prozess werden die Lichtimpulse aus der NOPA-Stufe ($\sim 1400\text{ nm}$) verstärkt und gleichzeitig Lichtimpulse im Spektralbereich um 1800 nm erzeugt. Die Zentralwellenlängen der NIR-Impulse sind in den Bereichen zwischen 1250 – 1550 nm beziehungsweise

1650 – 2200 nm abstimmbar. Dies ist durch Variation der beiden Kristallwinkel und des zeitlichen Überlapps in der ersten und zweiten Verstärkerstufe (Verzögerungsstrecken D1, D2) möglich.

(III) Beim dritten Konversionsprozess werden die beiden NIR-Impulse aus den vorangegangenen Prozessen mittels dichroitischer Spiegel (DM2) separiert, über getrennte Lichtwege geführt und anschließend wieder räumlich überlagert. Die Verzögerungsstrecke (D3) ermöglicht die Einstellung der zeitlichen Überlagerung der beiden Impulse in einem Silberthiogallat-Kristall (AgGaS_2) für die Differenzfrequenzmischung. Für eine optimale und reproduzierbare Justage sind die beiden Verzögerungsstrecken D2 und D3 mit Piezostellelementen ansteuerbar. In [Ham00a] konnte gezeigt werden, dass durch die Optimierung des zeitlichen Überlapps der NIR-Impulse bei der Differenzfrequenzmischung eine Unterdrückung des MIR-Rauschens im Vergleich zur Laserfundamentalen erreicht wird. Die Phasen Anpassung erfolgt wieder durch Variation des Kristallwinkels. Mit den abstimmbaren NIR-Impulsen aus der OPA-Stufe sind in dem DFM-Prozess kontinuierlich abstimmbare MIR-Impulse im Spektralbereich von 3 – 10 μm ($1000 - 3000\text{cm}^{-1}$) einstellbar. Die spektrale Breite der Impulse liegt etwa bei 150cm^{-1} , die Impulsdauer zwischen 100 und 150 fs [Sch02, Sie05]. Eine Germaniumscheibe filtert noch vorhandenes Licht des in diesem Konversionsprozess eingestrahlt Lichts heraus. Die Energie der MIR-Impulse wird abgeschwächt, indem zur Abtastung der Probe der Reflex (etwa 5 %) an einem Kalziumfluorid-Keil verwendet wird.

Erzeugung der Anreg-Impulse

Die Lichtimpulse zur Auslösung der Isomerisierungsreaktion können im Vergleich zur Infraroterzeugung mit deutlich geringerem Aufwand bereitgestellt werden. Das sichtbare Absorptionsspektrum der Probe zeigt bei 400 nm eine ausreichend gute Absorption. Man nutzt deshalb die 2. Harmonische der Laserfundamentalen wie sie schon als Pumplicht in dem NOPA-Verstärkungsprozess zum Einsatz kam. In einem BBO-Kristall werden die 800 nm des Femtosekundenlasers mittels Frequenzverdopplung („second harmonic generation“, SHG) zu 400 nm konvertiert. Dazu reduziert ein Teleskop den Bündeldurchmesser vor dem BBO-Kristall. In diesem Prozess wird eine Energiekonversionseffizienz von $\sim 30\%$ erreicht.

Alternativ kann in diesem Aufbau auch ein NOPA-Prozess zur Generation breitbandiger Anreg-Impulse im sichtbaren Spektralbereich benutzt werden. Für Anregungswellenlängen im UV-Bereich besteht die Möglichkeit die 3. Harmonische der Fundamentalen im Bereich um 270 nm zu erzeugen [Sch08].

Tabelle 2.2 fasst die experimentellen Parameter des Infrarotspektrometers zusammen.

	Anreg-Impuls	Abtast-Impuls
Zentralwellenlänge	402 nm	1350–1800 cm ⁻¹
spektrale Breite (FWHM)		~ 150 cm ⁻¹
Energie	~ 1 – 2 μJ	~ 50 nJ
Bündeldurchmesser Probenort (FWHM)	~ 170 μm	~ 90 μm
Puls zu Puls Schwankung (RMS)	0.3 %	0.2 -0.3 %

Tabelle 2.2: Experimentelle Parameter des Anreg-Abtast-Experiments.

2.1.3 Messplatz und Datenerfassung

Im zeitaufgelösten Femtosekundenexperiment werden Anreg- und Abtast-Impuls am Ort der Probe räumlich überlagert. Eine mechanische Verzögerungsstrecke im Anregzweig ermöglicht die Variation der zeitlichen Abstände zwischen Anreg- und Abtast-Impuls. Aufgezeichnet wird die Absorptionsänderung der MIR-Impulse nach dem Durchlauf durch die Probe in Abhängigkeit der eingestellten Verzögerungszeit. Die nächsten Abschnitte stellen den verwendeten Probenkreislauf vor, zeigen den Strahlverlauf am Probenort und erläutern die Messdatenerfassung. Eine noch weitergehende Darstellung ist in der Arbeit [Sie05] zu finden.

Probenkreislauf

Probenkreisläufe, die in diesem Femtosekundenexperiment zum Einsatz kommen, müssen sehr hohen Anforderungen entsprechen. Die Probe muss in einem geschlossenen Kreislauf umgewälzt werden, um stets eine definierte Zusammensetzung in der Küvette zu gewährleisten. Der Kreislauf muss zudem gegen das Eindiffundieren von Wasser geschützt werden, da Wasser das Signal der Probe stark überlagern würde. Die Schichtdicke muss im Bereich einiger 100 μm definiert eingestellt werden können. Außerdem muss die Probe bei Aus- und Einbau der Küvette wieder exakt am Probenort platziert werden können. Das Fenstermaterial muss zudem eine gute Transmission im IR aufweisen und wie das übrige Küvettenmaterial resistent gegen die verwendeten Lösungsmittel sein.

Ein vollständiges zeitaufgelöstes Experiment setzt sich aus Einzelmessungen zu verschiedenen Verzögerungszeiten zusammen. Dazu ist es notwendig jedes Einzelexperiment mit noch nicht angeregter Probe zu wiederholen. Das bedeutet, dass das Probenvolumen zwischen jedem Einzelexperiment (1 kHz Takt) ausgetauscht werden muss. Die Länge des gesamten Durchflusskreislauf und der Durchmesser der Schläuche ist so gewählt, dass auch kleine Probenvolumina (< 1 ml) blasenfrei umgepumpt werden können. Der verwendete Kreislauf besteht aus zwei Küvetten, einem Vorratsgefäß und einer Schlauchpumpe

(Ismatec, Fa. Cole Porter), siehe Abbildung 2.3 a). Dies ist notwendig, da sich die Syntheseprozesse zur Herstellung der Proben oft als sehr aufwändig darstellen und nur sehr geringe Probenmengen zur Verfügung stehen. Alle Komponenten, die mit der gelösten Probe in Berührung kommen, bestehen aus chemisch inerten Materialien (Abstandhalter und Schläuche aus Teflon® (Polytetrafluorethylen), Chemraz®-Dichtungen (Perfluorelastomer), CaF₂-Fenster), siehe Abbildung 2.3 b). Das Fenstermaterial (CaF₂, $d = 2$ mm, $\varnothing = 30$ mm) hat geeignete Absorptionseigenschaften im sichtbaren sowie im infraroten Spektralbereich. Die Schichtdicke der Küvetten wird über Teflon-Scheiben ($d = 190 \mu\text{m}$) definiert. Die beiden Küvetten in dem geschlossenen Durchflusskreislauf unterscheiden sich in ihrer Anwendung. Die in Abbildung 2.3 a) links dargestellte Küvette hat eine Apertur von 10 mm und wird zur stationären Charakterisierung verwendet. Dazu werden kommerzielle Geräte (Vis-Absorption: Lambda 19, Fa. Perkin Elmer, IR-Absorption: IFS66, Fa. Bruker) eingesetzt. Die zweite Küvette besitzt einen etwa 2 mm breiten Durchflusskanal. Dieser ermöglicht den vollständigen Austausch des angeregten Probenvolumens bei der Repetitionsrate des Lasers von 1 kHz.

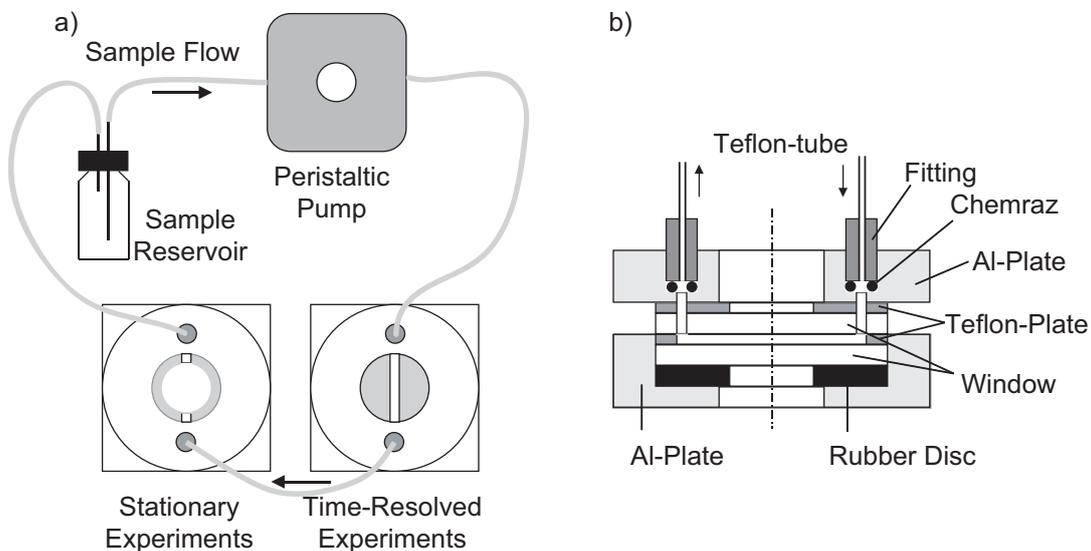


Abbildung 2.3: a) Schematische Darstellung des Probenkreislaufs. Der Kreislauf besteht aus zwei Durchflussküvetten. Die links dargestellte Küvette mit einer Apertur von 10 mm zur stationären Charakterisierung vor und nach der zeitaufgelösten Messung. In dem zeitaufgelösten Experiment kommt die zweite Küvette mit einem etwa 2 mm breiten Durchflusskanal zum Einsatz. b) Aufbau der Küvetten im Detail. Die Schichtdicken der Küvetten stellt man über eine Teflonscheibe definierter Dicke ein. Diese beträgt etwa $190 \mu\text{m}$. Abbildung nach [Kol03]

Strahlverlauf am Probenort

Der Strahlverlauf am Probenort ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Nach der Erzeugung ist der Anreg-Impuls horizontal, der Abtastimpuls vertikal polarisiert. Der Anreg-Impuls durchläuft ein Unterbrecherrad (Chopper, 500Hz) gefolgt von einem $\lambda/2$ - Plättchen und einem Polarisator (Pol.). Das $\lambda/2$ - Plättchen dient zur Kontrolle der Anregungsenergie. Mit dem Polarisator wird die Polarisation auf den magischen Winkel ($\Delta A_{\text{mag}} = 54.7^\circ$) relativ zum Abtast-Impuls eingestellt. Durch die Aufnahme von Absorptionsänderungen bei zeitaufgelösten Anreg-Abtast-Experimenten im magischen Winkel ΔA_{mag} wird die Rotationsdepolarisation vermieden [Fle86]. Eine Linse (L1) fokussiert die Anreg-Impulse auf

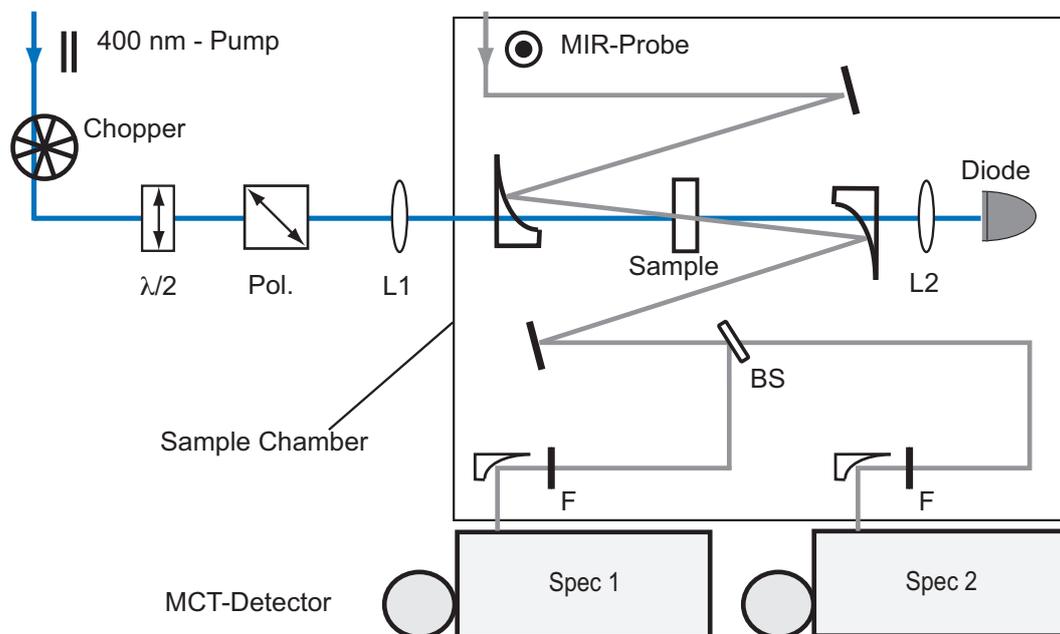


Abbildung 2.4: Schematischer Strahlverlauf im Probenraum. Die linear polarisierten Anreg-Impulse durchlaufen ein Unterbrecherrad (Chopper, 500Hz). Eine Kombination aus $\lambda/2$ - Plättchen und Polarisator (Pol.) dreht die Polarisation auf den magischen Winkel und dient zur Kontrolle der Anregungsenergie. Eine Linse (L1) fokussiert die Anregungsimpulse auf die Probe (Sample), nach Durchlaufen der Probe werden diese von einer Diode detektiert. Die Abtast-Impulse sind vertikal polarisiert. Sie werden über Parabolspiegel (30° Ablenkung) in die Probe fokussiert. Nach der Probe kollimiert ein zweiter Parabolspiegel die Abtast-Impulse. Ein Strahlteiler (BS) teilt die MIR-Impulse auf. Über Parabolspiegel (90° Ablenkung) werden die Abtastimpulse auf die Eintrittsspalte der beiden Spektrographen (Spec) abgebildet. Die optimale Anpassung der Intensität auf den MCT-Detektoren erfolgt über metallbeschichtete BaF₂-Scheiben (F). Abbildung nach [Sch08]

die Probe. Nach der Probe bildet eine weitere Linse (L2) die Pump-Impulse auf einen Detektor ab. Die Strahlführung der Anreg-Impulse durch eine Bohrung in den Parabolspiegeln, die zur Fokussierung und Kollimierung des Abtastlichts dient, ermöglicht einen relativ kleinen Winkel ($< 5^\circ$) zum Abtastlicht. Damit ist ein guter räumlicher Überlapp zwischen Anreg- und Abtast-Licht in dem Probenvolumen gewährleistet. Die vertikal polarisierten MIR-Abtast-Lichtimpulse werden mit einem Parabolspiegel (Ablenkwinkel 30°) in das Probenvolumen fokussiert. Ein weiterer Parabolspiegel kollimiert das durch die Probe transmittierte Licht. Ein Strahlteiler (einseitig antireflexbeschichtetes Geplättchen) lenkt das Abtastlicht auf zwei Spektrographen (Spec). Parabolspiegel (Ablenkwinkel 90°) bilden die MIR-Abtast-Impulse auf die Eintrittsspalte der Spektrographen (Fokallänge = 300 mm, Fa. Roper Scientific/Acton Research) ab. Um eine optimale Aussteuerung der Detektoren zu erreichen, werden die Abtast-Impulse mit metallbeschichteten BaF₂-Scheiben (Fa. Layertec) abgeschwächt. Beide Spektrographen sind mit jeweils drei Gittern (100, 150, 300 lines/mm) ausgestattet. Diese sind für verschiedene Spektralbereiche optimiert (Blazewinkel) und eine spektrale Auflösung im Bereich weniger Wellenzahlen ($\sim 3 \text{ cm}^{-1}$) ist realisierbar. Bei der Infrarot-Spektroskopie ist auch zu beachten, dass die Laborluft (Wasserdampf) im Spektralbereich zwischen $1300 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ stark absorbiert [Ham94]. Aus diesem Grund wird die MIR-Erzeugung (DFM-Prozess), der komplette Probenraum sowie die Spektrographen mit Trockenluft (Taupunkttemperatur: $\sim -60^\circ\text{C}$) gespült.

Messdatenerfassung

Die beiden Spektrographen dispergieren das Abtastlicht und bilden es jeweils auf eine Diodezeile ab. Zur Detektion des MIR-Lichts werden zwei Quecksilber-Cadmium-Tellurid (engl.: „mercury cadmium telluride“, MCT)-Detektoren (Fa. Infrared Associates Inc.) verwendet. Diese Photodioden-Zeilen besitzen je 32 quadratische Elemente mit einer Seitenlänge von 0.5 mm und einem Abstand zwischen den einzelnen Elementen von 0.1 mm. Sie werden mit flüssigem Stickstoff auf 77 K gekühlt. Die Signale der Detektorelemente werden jeweils einem Vorverstärker (MCT-3200 Preamplifier, Fa. Infrared Systems Development Corp.) zugeführt. Die so generierten analogen Signale werden mit einem 96-Kanal Analog-Digital-Wandler (1885F, Fa. Le Croy) mit einer Auflösung von 12 bit digitalisiert. Von den 96 Kanälen werden 64 von den Spektrographen belegt. Die verbleibenden Kanäle werden zur Überwachung von Intensitätsschwankungen des Lasersystems sowie der optisch parametrischen Prozesse mittels PIN-Dioden (Si, InGaAs) verwendet. Die dazu notwendige Impedanzanpassung der Photodioden auf die Eingangsimpedanz (50Ω) des A/D-Wandlers und anschließende Verstärkung erfolgt durch die in [See97]

beschriebene elektronische Schaltung. Der A/D-Wandler besitzt ein einstellbares Zeitfenster von etwa $2\ \mu\text{s}$. Nur während dieses Zeitfensters integriert er das analoge Signal. Damit werden Streulichtanteile und elektronische Störimpulse effektiv unterdrückt. Die Verstärkungsfaktoren sind so gewählt, dass die Detektoren einerseits linear betrieben werden, andererseits aber das Signal-Rausch-Verhältnis optimal eingestellt ist [Sch08]. Das vorliegende IR-Femtosekunden-Spektrometer kann relative Transmissionsänderungen in der Größenordnung von $\geq 10^{-6}$ nachweisen.

2.2 Zeitaufgelöste Messungen

Dieser Abschnitt beschreibt den Ablauf einer Femtosekunden Anreg-Abtast-Messung. Nach der ausführlichen Charakterisierung der Proben mittels stationärer Spektroskopie, bei der die Absorptionseigenschaften, die benötigten Probenkonzentrationen und Schichtdicken, die benötigte Anregungsenergie, die Anregungs- und Abtastwellenlängen sowie die geeigneten Lösungsmittel bestimmt wurden, folgt das zeitaufgelöste Infrarotexperiment.

2.2.1 Probenvorbereitung und Charakterisierung

Die Probe wird abgewogen und unter Ausschluss von Licht im jeweiligen Lösungsmittel aufgelöst. Die benötigte Menge ist aus den stationären Experimenten bekannt. Um die Konzentration der Lösung zu kontrollieren wird ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Die Konzentration hat sich als optimal erwiesen, wenn sich bei der Anregungswellenlänge eine Absorption von etwa 1 OD ergibt. In diesem Fall absorbiert die Probe 90% des Anregungslichts. Das ist jedoch nicht immer möglich. Die untersuchten Peptidproben können zum Beispiel nicht in ausreichend hoher Konzentrationen gelöst werden. Die IR-Absorption wird mit einem FTIR-Spektrometer überprüft. Dabei können mögliche Unreinheiten des Lösungsmittels ausgeschlossen und der Wassergehalt überprüft werden. Eine ausführliche Diskussion der stationären Charakterisierung der untersuchten Proben folgt in den Kapiteln 4 und 5.

2.2.2 Justage der IR-Messapparatur und Ermittlung der Apparatfunktion

Vor jeder Messung wird zunächst die Verzögerungsstrecke und die nachfolgende UV-Erzeugung justiert. Anschließend wird die Stabilität der Anreg-Impulse in Abhängigkeit von der Verzögerungsposition überprüft. Im nächsten Schritt wird der Bündeldurchmesser

der Anreg- und Abtast-Impulse bestimmt. Der Bündeldurchmesser wird mit Hilfe einer Klinge ermittelt. Dazu wird diese in der Ebene der Probe positioniert. Gemessen wird der Intensitätsverlauf in Abhängigkeit der Klappenposition, indem die Klinge mittels einer Mikrometerschraube durch das Lichtbündel geschoben wird. Dieses Vorgehen entspricht einer eindimensionalen Integration des Intensitätsprofils und erlaubt unter Annahme eines gaussförmigen Bündelprofils die Berechnung des Bündeldurchmessers. Näheres zu dieser Methode ist zum Beispiel in folgenden Artikeln nachzulesen [Arn71, Kho83, Suz75]. Mit diesem Vorgehen wurde ein Wert von $\sim 90 \mu\text{m}$ (FWHM) für den Abtast-Impuls bestimmt. Der Bündeldurchmesser für den Anreg-Impuls wird mit $\sim 180 \mu\text{m}$ (FWHM) etwa doppelt so groß eingestellt. So ist ein guter räumlicher Überlapp während der Messung gewährleistet.

Mit Hilfe der Klinge stellt man auch den räumlichen Überlapp zwischen Anreg- und Abtast-Impuls ein. Befindet sich die Rasierklinge am Probenort, fährt man sie so weit in das Abtastbündel hinein, dass nur noch etwa die Hälfte der Intensität transmittiert wird. Als nächstes justiert man das Bündel des Anreg-Impulses derart, das auch nur etwa die Hälfte der Intensität hinter der Rasierklinge gemessen wird. Diese Prozedur führt man in vertikaler und horizontaler Richtung der Bündelprofile durch und erreicht so einen guten räumlichen Überlapp.

Zur Optimierung des räumlichen Überlapps sowie zur Bestimmung des zeitlichen Nullpunktes zwischen Anreg- und Abtast-Impulsen wird ein Germaniumplättchen als Probenmaterial verwendet. Germanium besitzt eine Bandkante von $\sim 0.7 \text{ eV}$, absorbiert also Licht im gesamten sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich. Absorbiert Germanium energiereiche UV-Photonen werden freie Ladungsträger erzeugt, die im infraroten Spektralbereich absorbieren [Kah55]. Bei einer Anreg-Abtast-Messung ist die induzierte Absorptionsänderung nahe des Zeitnullpunktes maximal. Das ermöglicht die Optimierung des räumlichen Überlapps indem man das Differenzsignal maximiert. Mit Hilfe des Signalverlaufs erhält man Information über die Position des Zeitnullpunktes.

Unter der Annahme, der instantanen Absorptionsänderung durch den Anreg-Impuls, entspricht die gemessene Absorptionsänderung — für gaußförmige Lichtimpulse — der Faltung einer Stufenfunktion mit einer gaußförmigen Kreuzkorrelationsfunktion aus Anreg- und Abtast-Impuls [Jed88]. Aus dem Verlauf einer Transienten lässt sich die Apparatefunktion bestimmen (siehe Abbildung 2.5). Diese entspricht der Kreuzkorrelationsbreite und ist ein Maß für die Zeitauflösung des Experiments. Ist die Impulsdauer einer der beteiligten Impulse bekannt, berechnet sich die Impulsdauer aus folgendem Zusammenhang: $\tau_{\text{cc}}^2 = \tau_{\text{Anregung}}^2 + \tau_{\text{Abtast}}^2$. Die Impulsdauer des Abtast-Impulses beträgt $\sim 150 \text{ fs}$. Damit kann man die Impulsdauer des Anreg-Impulses zu 180 fs bestimmen. Um auch bei geringer Probenkonzentration ausreichend viele Moleküle anzuregen sind oft hohe Lei-

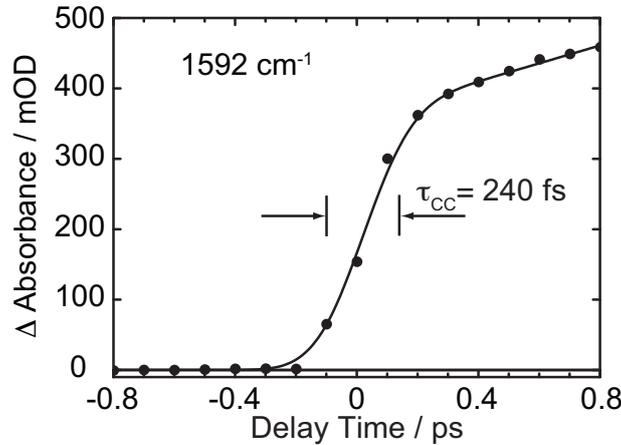


Abbildung 2.5: Bestimmung der Apparatefunktion durch eine zeitaufgelöste Messung an Germanium. Die Punkte zeigen den Verlauf der Absorptionsänderung bei 1592 cm^{-1} nach Anregung mit 400 nm . Unter der Annahme, dass die freien Ladungsträger instantan erzeugt werden, entspricht die gemessene Absorptionsänderung der Apparatefunktion. Die Datenanpassung (durchgezogene Linie) ergibt eine Kreuzkorrelationsbreite $\tau_{\text{CC}} = 240 \text{ fs}$.

stungen notwendig. Dabei ist zu beachten, dass die Spitzenintensitäten im Anreg-Impuls nicht zu hoch werden dürfen, um zum Beispiel Zwei-Photonen-Absorption zu vermeiden. Bei Anregungsenergien größer $1 \mu\text{J}$ wurde ein 10 cm dicker Quarzglasblock in den Anregzweig gestellt, die Impulsdauer durch die Gruppengeschwindigkeitsdispersion des Glasblocks verlängert und die Spitzenintensität reduziert. Mit dem Glasblock wurde die Kreuzkorrelationsbreite zu $\tau_{\text{CC}} = 300 \text{ fs}$ bestimmt. Mit diesem Wert ergibt sich die Anregungsimpulslänge zu etwa $\tau_{\text{Anregung}} = 260 \text{ fs}$.

2.2.3 Bestimmung der Absorptionsänderung

In dem zeitaufgelösten Femtosekunden Anreg-Abtast-Experiment wird die Absorptionsänderung in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit zwischen Anreg- und Abtastimpuls gemessen. Ein Messprogramm stellt anhand eines Schrittmotors die verschiedenen Verzögerungszeiten ein und koordiniert die Datenaufnahme. Gemessen wird die Energie der Abtast-Impulse. Intensitätsschwankungen des Lasers und elektronisches Rauschen vermindern die Messgenauigkeit. Um die Auswirkungen dieser Störquellen zu reduzieren werden die Einzelmessungen gemittelt. Dazu wiederholt das Messprogramm die Einzelmessung an jeder Messposition. An jeder Position die der Schrittmotor anfährt, zeichnet der Rechner für eine bestimmte Anzahl von Einzelmessungen die Energie der Abtast-Impulse ($I_{\text{Signal}}(\lambda_j, t_D)$) in Abhängigkeit der Spektrometerkanalnummer j (bzw. Wellen-

länge λ_j) und der Verzögerungszeit t_D auf. Ein auf das Lasersystem synchronisiertes Unterbrecherrad blockt jeden zweiten Anreg-Impuls. Gemessen wird also die Intensität der Abtastimpulse mit Anregung I^* und ohne Anregung I^0 . Der Dunkelstrom wird anhand einer Hintergrundmessung mit geblocktem Abtastlicht einmal mit Anreg-Impuls I_{bg}^* und einmal ohne I_{bg}^0 ermittelt. Mit diesen Werten wird das Messsignal \bar{I}_{Signal}^* und \bar{I}_{Signal}^0 korrigiert, über N Messungen summiert und der Mittelwert gebildet. Typischer Weise wird über $N = 2000$ Messungen gemittelt. Gleichung 2.3 zeigt dies exemplarisch für die Intensitätsmessung mit Anregungsimpuls.

- ⁰ : ohne Anregungsimpuls/Probe nicht angeregt
^{*} : mit Anregungsimpuls/ Probe angeregt

$$\bar{I}_{bg}^*(\lambda_j) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N I_{bg,i}^*(\lambda_j) \quad (2.1)$$

$$\bar{I}_{bg}^0(\lambda_j) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N I_{bg,i}^0(\lambda_j) \quad (2.2)$$

$$\bar{I}_{Signal}^*(\lambda_j) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [I_i^*(\lambda_j, t_D) - \bar{I}_{bg}^{(*)}(\lambda_j, t_D)] \quad (2.3)$$

Die Division der zuvor aufsummierten Intensitätswerte mit und ohne Anregung ergibt das normierte Signal

$$\bar{S}(\lambda_j, t_D) = \frac{\bar{I}_{Signal}^*(\lambda_j, t_D)}{\bar{I}_{Signal}^0(\lambda_j, t_D)} \quad (2.4)$$

An jeder Messposition (für jede Verzögerungszeit) wird dieses Signal für jeden Detektor kanal j abgespeichert. In einem Durchlauf („Scan“) werden zwischen 80 und 100 Messpunkte angefahren. Ist ein Durchlauf beendet startet automatisch der Nächste bis diese Routine von Hand abgebrochen wird. In der vorliegenden Arbeit wurden etwa 6-10 Durchläufe bei einer spektralen Position aufgenommen und gemittelt. Diese Mittelung bewirkt eine Verteilung niederperiodischer Schwankungen auf alle Verzögerungszeiten. Um die erforderliche hohe spektrale Auflösung vom etwa 2 cm^{-1} zu erreichen wurde ein Gitter mit 300 Linien pro Millimeter verwendet. Damit deckt der 32-kanalige Detektor etwa 60 cm^{-1} ab und es müssen zur Erfassung des gesamten Messbereiches von etwa $1400\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$ 5-6 Spektralbereiche aneinander gelegt werden.

2.2.4 Datenanalyse

Die wie oben beschrieben gewonnenen Daten werden nach der Messung einer Analyse unterzogen. Diese Analyse geht von einem Reaktionsmodell aus, das die zeitliche Abfolge der einzelnen Reaktions-Zwischenschritte beschreibt. Im ersten Teil dieses Abschnitts wird dieses Reaktionsmodell vorgestellt, im zweiten Teil wird die dieses Modells an die experimentell ermittelten Daten dargelegt.

Absorptionsänderungen

Zur Berechnung des Zerfallsmodells wird ein System mit $m + 1$ nicht entarteten Zuständen betrachtet. Die Besetzung des Zustands $|i\rangle$ zum Zeitpunkt t sei mit $n_i(t)$, die frequenzabhängige Absorption des Zustands i mit $\sigma_i(\nu)$ bezeichnet. Die frequenzabhängige Absorption der Probe mit der Dicke z ergibt sich also zu:

$$A(\nu, t) = \frac{z}{\ln(10)} \sum_{i=0}^m \sigma_i(\nu) n_i(t) \quad (2.5)$$

Vor der Anregung $t < 0$ befindet sich das System im Grundzustand $|0\rangle$ mit der Besetzung $n_0 = N$. Zu jedem Zeitpunkt gilt:

$$\sum_{i=0}^m n_i(t) = N \quad (2.6)$$

Daher kann die im Experiment beobachtete Absorptionsänderung wie folgt notiert werden:

$$\begin{aligned} \Delta A(\nu, t) &= \frac{z}{\ln(10)} \sum_{i=0}^m \sigma_i(\nu) n_i(t) - \sigma_0(\nu) N \\ &= \frac{z}{\ln(10)} \sum_{i=1}^m (\sigma_i(\nu) - \sigma_0(\nu)) n_i(t) \\ &= \frac{z}{\ln(10)} \sum_{i=1}^m \Delta \sigma_i(\nu) n_i(t) \end{aligned} \quad (2.7)$$

Reaktionsmodell

Um die experimentell ermittelten Daten interpretieren zu können, wird ein Reaktionsmodell mit Ratengleichungen verwendet [Hol90a, Sch95]. Diese Art der Datenanalyse basiert auf der Annahme, dass alle detektierbaren Intermediate wohldefinierte spektrale Charakteristiken aufweisen. Diese spektroskopischen Eigenschaften hängen von der Population n_i und dem Absorptionsquerschnitt $\sigma_i(\nu)$ des intermediären Zustands $|i\rangle$ bei der Abtastfrequenz ν ab. Die optische Anregung des Grundzustands $|0\rangle$ führt zu einer Populationsänderung des Intermediats $|m\rangle$ zum Zeitnullpunkt.

Die Übergangsrate vom Zustand $|i\rangle$ in den Zustand $|j\rangle$ sei durch γ_{ij} gegeben. Es gilt:

$$\gamma_{ii} = - \sum_{j=0; j \neq i}^m \gamma_{ji} \quad \text{für} \quad i = 1 \dots m \quad (2.8)$$

Definiert man den Vektor $n(t)$ mit den Elementen $n_i(t)$ ($i = 1 \dots m$), so kann die Besetzung der Zustände durch die vektorielle Differentialgleichung 2.9 beschrieben werden.

$$\frac{dn(t)}{dt} = \gamma n(t) \quad (2.9)$$

Hierbei ist γ die Matrix mit den Elementen γ_{ij} ($i, j = 1 \dots m$); n_0 ist durch Gleichung 2.6 bestimmt. Ist die $m \times m$ -Matrix γ nicht singular, besitzt sie m Eigenwerte λ_i mit den dazu gehörigen Eigenvektoren $\mathcal{E}(\lambda_i)$. In diesem Fall kann man die Matrix S definieren:

$$S = (\mathcal{E}(\lambda_1), \mathcal{E}(\lambda_2), \dots, \mathcal{E}(\lambda_m)) \quad (2.10)$$

Damit kann man die Differentialgleichung 2.9 umschreiben:

$$S^{-1} \dot{n}(t) = S^{-1} \gamma S S^{-1} n(t) \quad (2.11)$$

Hierbei ist S^{-1} die zu S inverse Matrix. Aus der linearen Algebra ist bekannt, dass

$$S^{-1} \gamma S = \Lambda = \text{diag}(\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_m) \quad (2.12)$$

gilt [Koe92]. Definiert man $D(t) = S^{-1} n(t)$, so kann Gleichung 2.9 beziehungsweise 2.11 mit der Diagonalmatrix Λ erneut umgeschrieben werden:

$$\dot{D}(t) = \Lambda D(t) \quad (2.13)$$

Diese Differentialgleichung wird durch den Ansatz

$$D_i(t) = c_i \exp\{\lambda_i t\} \quad (2.14)$$

gelöst. Die transienten Populationen $n_i(t)$ lassen sich also als Linearkombination von m Exponentialfunktionen darstellen. Die Integrationskonstanten c_i werden durch die Randbedingungen der Differentialgleichung 2.9 bestimmt. Nimmt man an, dass sich zum Zeitpunkt $t = 0$ alle durch den Pumpimpuls angeregten Moleküle im Zustand $|m\rangle$ befinden, lautet diese Randbedingung:

$$n(t = 0) = (1, 0, \dots, 0)^T \quad (2.15)$$

Die Werte c_i werden durch die Betrachtung der Definition von $D(t) = S^{-1} n(t)$ zum Zeitpunkt $t = 0$ bestimmt.

Für die Absorptionsänderung der Probe (vgl. Gleichung 2.7) ergibt sich also folgende Zeitabhängigkeit:

$$\Delta A(\nu, t) = \sum_{j=1}^m \Delta A_j(\nu) (SD(t))_j = \sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^m \Delta A_j(\nu) S_{ji} c_i \exp\{\lambda_i t\} \quad (2.16)$$

Unter der Annahme, dass das untersuchte System der Differentialgleichung 2.9 genügt, kann das experimentell bestimmte $\Delta A(\nu, t)$ also mit einem multiexponentiellen Modell mit m Exponenten angepasst werden. Die durch die Datenanpassung gefundenen Exponenten entsprechen λ_i , die Amplituden dem Ausdruck $f_i(\nu) = \sum_j \Delta A_j(\nu) S_{ji} c_i$. Für die Zeitkonstanten τ_i des Reaktionsmodells gilt: $\tau_i = -1/\lambda_i$. Die der Zeitkonstante τ_i zugeordnete Amplitude $f_i(\nu)$ wird als zerfallsassoziiertes Spektrum bezeichnet (DAS)³. Definiert man die Matrix $C = \text{diag}(c_1, c_2, \dots, c_m)$, so kann man die Differenzspektren $\Delta A_j(\nu)$ der intermediären Zustände $|j\rangle$ aus dem Ergebnis der Datenanpassung berechnen:

$$(\Delta A_1(\nu), \Delta A_2(\nu), \dots, \Delta A_m(\nu)) = (f_1(\nu), f_2(\nu), \dots, f_m(\nu))(SC)^{-1} \quad (2.17)$$

Die Berechnung der intermediären Spektren aus dem Ergebnis der Datenanpassung nach Gleichung 2.17 wurde in der Programmiersprache Python implementiert. Zur Berechnung der intermediären Spektren sind Annahmen über den zugrunde liegenden Ablauf des Relaxationsprozesses, also über die genaue Form der Matrix γ nötig. In der Praxis trifft man verschiedene Annahmen und stellt die daraus resultierenden transienten Spektren der Intermediate zur Diskussion. So kann die physikalische Natur des Relaxationsprozesses heuristisch untersucht werden.

Datenanpassung

Für die Datenverarbeitung in der Femtosekundenspektroskopie wurde am Lehrstuhl ein Programmpaket „Z20“ basierend auf der Programmiersprache IDL [IDL00] (Fa. Research Systems Inc., Version 5.4) entwickelt. Die wesentlichen Bestandteile zur Bearbeitung von transienten Absorptionsdaten sind in den Arbeiten [Lut01, Spö01, Sat04a] beschrieben. Erweiterungen speziell zur Auswertung zeitaufgelöster IR-Spektroskopie sind in [Sie05] kurz zusammengefasst. Wichtige Programmfunktionen sind die Mittelung der Datensätzen („Scans“) und die Korrektur des Zeitnullpunktes.

Die einzelnen Messbereiche bei verschiedenen Zentralwellenlängen können nach der Mittelung und Zeitnullpunktsskorrektur zusammengefasst werden. Das Programm Z20 ermöglicht es die Daten einzelner Transienten an einer spektralen Position oder in einem

³DAS: engl. *decay associated spectrum*

globalen⁴ Ansatz den kompletten Spektralbereich anzupassen. Die verwendete Modellfunktion wird durch die Summe von Exponentialfunktionen die mit der Kreuzkorrelationsfunktion $K(t_D - t)$ zwischen Anreg- und Abtast-Impuls gefaltet wird, beschrieben [Hol90b]:

$$\Delta A(v_{\text{probe}}, t_D) = \sum_{i=1}^n \int_0^{\infty} a_i(v_{\text{probe}}, \tau_i) \cdot \exp^{-t/\tau_i} \cdot K(t_D - t) dt \quad . \quad (2.18)$$

Für gaußförmige Lichtimpulse mit einer Kreuzkorrelationsbreite τ_{cc} lässt sich Gleichung 2.18 folgendermaßen schreiben:

$$\Delta A(v_{\text{probe}}, t_D) = \sum_{i=1}^n a_i(v_{\text{probe}}, \tau_i) \cdot \exp\left(\frac{t_{\text{cc}}^2}{4\tau_i^2} - \frac{t}{\tau_i}\right) \frac{1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t}{\tau_{\text{cc}}} - \frac{\tau_{\text{cc}}}{2\tau_i}\right)}{2} \quad . \quad (2.19)$$

In Gleichung 2.19 bezeichnet $\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x \exp^{-t^2} dt$ die Fehlerfunktion⁵. Zu jeder Zeitkonstante τ_i geben die Faktoren $a_i(v_{\text{probe}}, \tau_i)$ das Amplitudenspektrum an. Für die Datenanpassung der Zerfallszeiten τ_i dieses nichtlinearen Funktionensystems wird der Algorithmus nach Levenberg-Marquardt [Pre92] genutzt. Zur Steigerung der Berechnungseffizienz werden die Amplituden $a_i(v_{\text{probe}}, \tau_i)$ mit linearer Regression berechnet. Dieser ermittelt zu einer gegebenen Anzahl von Exponentialfunktionen die Zeitkonstanten τ_i und die dazu gehörigen Amplitudenspektren eines Ratenmodells. Dieses Vorgehen eignet sich zur Beschreibung von Ratengleichungssystemen [Zin92], die Übergänge definierter und thermisch relaxierter Zustände beschreiben [Spö01]. Diese Situation ist aber in der Praxis nicht immer der Fall. Bei Kühlvorgängen treten im Infraroten spektrale Verschiebungen auf, die sich nur unter Verwendung mehrerer Zeitkonstanten anpassen lassen. Dabei kann es zu einer Kompensation zwischen den Amplituden kommen, die zu unterschiedlichen Zeitkonstanten gehören. Dies macht eine physikalische Interpretation fraglich. Eine Diskussion dieser Problematik findet sich in [Spö01].

Die LDAC-Methode

Die Anzahl der benötigten Exponentialfunktionen bleibt ohne Kenntnis der Probe unklar. Eine Möglichkeit ist der Einsatz der Singularwertzerlegung zur Abschätzung der Zahl der Zeitkonstanten. Dabei verhindert jedoch das Rauschen der Messdaten oft klare Aussagen. Das genaue Vorgehen dazu ist in [Sat04a] zu finden. Eine zusätzliche qualitative Analyse besteht in der geeigneten Darstellung der Rohdaten. Üblicherweise werden transiente Spektren zu festen Verzögerungszeiten zwischen Anreg- und Abtast-Impuls oder der

⁴Eine Datenanpassung gleichzeitig für alle Wellenzahlen mit einer Modellfunktion.

⁵Gaußsche Fehlerfunktion; engl. *Errorfunction*

zeitliche Verlauf der Absorptionsänderung bei einzelnen Wellenlängen dargestellt. Um statische Effekte zu eliminieren und die individuellen kinetischen Komponenten herauszuarbeiten, kann die Absorptionsänderung auf der logarithmischen Zeitskala differenziert werden („logarithmically differentiated absorption changes“, LDAC). In den LDAC-Spektren zeigen sich Zerfallsprozesse durch Maxima beziehungsweise Minima bei den enthaltenen Zeitkonstanten. Dieses Verfahren ist in [Sat04a] ausführlich beschrieben. Dafür müssen die gemessenen Datenpunkte äquidistant auf der logarithmischen Zeitskala verteilt sein. Dies kann man entweder im Experiment voreinstellen oder den gemessenen Datensatz nachträglich entsprechend interpolieren. Die LDAC Darstellung hat den Vorteil, dass Prozesse auf unterschiedlichen Zeitskalen mit einem Blick erfasst werden können. Zur einfachen Veranschaulichung wird der monoexponentielle Zerfall als Prototyp diverser photochemischer Reaktionen betrachtet:

$$f(t) = \alpha \exp(-t/\tau) \quad (2.20)$$

mit der Amplitude α und der positiven Zeitkonstante τ . Den Wechsel auf die logarithmische Zeitskala kann man wie folgt darstellen: $f(t) \rightarrow f(z)$, $z = \ln t \Rightarrow t = \exp(z)$ und erhält

$$f(z) = \alpha \exp\left(\frac{-\exp(z)}{\tau}\right) \quad (2.21)$$

$$\frac{df(z)}{dz} = -\frac{\alpha}{\tau} \exp\left(z - \frac{\exp(z)}{\tau}\right) \quad (2.22)$$

$$\frac{d^2f(z)}{dz^2} = -\frac{\alpha}{\tau} \exp\left(z - \frac{\exp(z)}{\tau}\right) \times \left(1 - \frac{1}{\tau} \exp(z)\right) \quad (2.23)$$

Der so entstandene Datensatz wird in der Praxis in einer 2D-Falschfarben-Darstellung aufgetragen. Ein Extremum in der Zeitabhängigkeit des LDAC-Signals df/dz zur Zeit τ weist auf einen kinetischen Prozess mit der Zeitkonstante τ hin. Dies kann leicht an der Nullstelle der Funktion d^2f/dz^2 abgelesen werden (vgl. Gl. 2.23). Für einen exponentiellen Signalverlauf ist die Kurvenform des LDAC-Signals durch Gleichung (2.22) bestimmt. Ist z.B. die Breite des aus den Messdaten gewonnenen LDAC-Signals sehr viel größer, weist dies auf eine nicht exponentielle Kinetik hin. Eine gute Identifikation der Zeitkonstanten ist dann möglich, wenn sich die Zeitkonstanten etwa um den Faktor 5 unterscheiden. In [Sat03, Sat04a] sind dazu anschauliche Beispieldatensätze aufgeführt. Diese Art der Datendarstellung ermöglicht die Abschätzung der an der Reaktion beteiligten Zeitkonstanten und ist auch auf Kinetiken geringer Amplitude sensitiv. Die mit der LDAC-Methode abgeschätzten Zeitkonstanten können in einem zweiten Schritt als Startparameter für eine multiexponentielle Datenanpassung verwendet werden (vgl. Abschnitt 2.2.4).

Kapitel 3

Z→E-Isomerisierung von Hemithioindigo

Dieses Kapitel stellt Hemithioindigo (HTI) als ultraschnellen Photoschalter vor. Es zeigt wie die Kombination verschiedener zeitaufgelöster Experimente mit einem theoretischen Modellierungskonzept den Reaktionspfad der Z/E-Isomerisierung vollständig aufklären kann. Zunächst werden die bekannten photophysikalischen und photochemischen Prozesse dargestellt. Aufbauend auf [Ste03, Her05] werden Ergebnisse diskutiert, die zu einem grundlegenden Verständnis des kinetischen Modells der Z/E-Isomerisierung von HTI führen. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse sind auch in [Cor07] veröffentlicht.

3.1 Grundlagen der Z/E-Isomerisierung von Hemithioindigo

Das HTI-Molekül setzt sich aus Stilben und Thioindigo zusammen (siehe Abbildung 3.1). Der Thioindigoteil ist mit einer Säuregruppe, der Stilbenteil mit einer Aminogruppe ver-

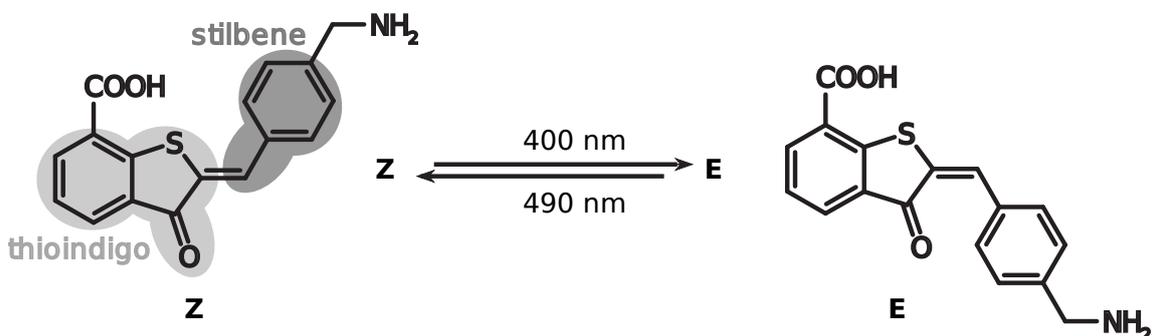


Abbildung 3.1: Chemische Strukturen des Z- und E-Isomers der HTI-basierten ω -Aminosäure. Der Thioindigoteil ist hellgrau, der Stilbenteil dunkelgrau hinterlegt. Die Wellenlängen geben die im Experiment eingesetzten Beleuchtungswellenlängen an.

bunden. Durch eine Rotation um die gemeinsame Doppelbindung kann das Molekül in den isomeren Formen Z und E vorliegen (siehe Abbildung 3.1). Die Z-Form ist thermodynamisch stabil. Die E-Form geht bei Zimmertemperatur je nach Substitution auf einer Zeitskala von Stunden thermisch in die Z-Form über. Quantenchemische Berechnungen zeigen, dass die beiden isomeren Formen im elektronischen Grundzustand eine planare Struktur aufweisen (siehe Abbildung 3.2).

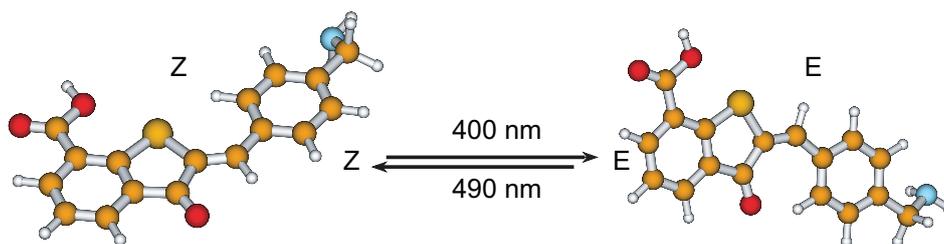


Abbildung 3.2: Die Grundzustandsstrukturen der beiden Isomere (Z und E) von Hemithioindigo wurden mit quantenchemischen Methoden optimiert (Gaussian 98, DFT [Fri98]).

Einen ersten Überblick über die spektroskopischen Eigenschaften des HTI Moleküls geben die Absorptionsspektren (Abbildung 3.3) der beiden Isomere. Das Absorptionsmaximum des Z-Isomers liegt bei 430nm, dies entspricht dem $S_0 \rightarrow S_1$ Übergang. Durch Belichtung bei 400nm werden ca. 85% des Z-Isomers in die E-Form überführt. In dem so entstandenen photostationären Gleichgewicht (PSS400) ist die Konzentration der beiden Isomere konstant. Die Konversionsrate von Z nach E ist genauso groß wie die Konversionsrate der Umkehrreaktion. Das Verhältnis dieser Konzentrationen konnte durch NMR Messungen bestimmt werden [Ste03, Her05]. Gleichung 3.1 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Konzentrationsverhältnis beider Isomere $c_Z^{\text{PSS}}/c_E^{\text{PSS}}$ mit den Extinktionskoeffizienten $\epsilon_Z(\lambda_{\text{exc}})$, $\epsilon_E(\lambda_{\text{exc}})$ bei Anregungswellenlänge λ_{exc} und den Quantenausbeuten der jeweiligen Reaktion $\phi_{\text{PC}}^{E \rightarrow Z}$, $\phi_{\text{PC}}^{Z \rightarrow E}$. Sind die Extinktionskoeffizienten und die Quantenausbeuten der beiden Photoreaktionen bekannt, kann das Spektrum des reinen E-Isomers berechnet werden.

$$\frac{c_Z^{\text{PSS}}}{c_E^{\text{PSS}}} = \frac{\phi_{\text{PC}}^{E \rightarrow Z} \cdot \epsilon_E(\lambda_{\text{exc}})}{\phi_{\text{PC}}^{Z \rightarrow E} \cdot \epsilon_Z(\lambda_{\text{exc}})} \quad (3.1)$$

In Abbildung 3.3 ist zu sehen, dass sich das Absorptionsmaximum des E-Isomers gegenüber dem Z-Isomer um etwa 30nm (460nm) in den roten Spektralbereich verschoben hat. Der untere Teil in Abbildung 3.3 zeigt die spektralen Änderungen durch den Photoschaltprozess. Bei dem Übergang von Z→E (rote Kurve Abbildung 3.3) beobachtet man eine Abnahme bei 430nm kombiniert mit einer Absorptionzunahme bei 470nm. Unter Lichtausschluss erfolgt bei Zimmertemperatur innerhalb einiger Stunden eine thermische Isomerisierung von E nach Z [Ste03, Her05]. Für die inverse Photoreaktion E→Z kann

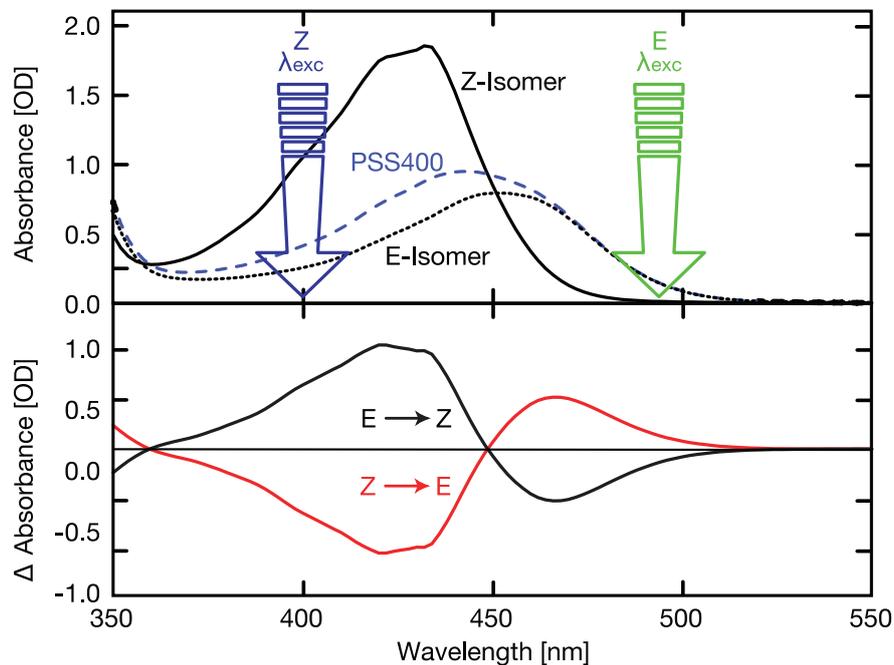


Abbildung 3.3: UV/Vis Absorptionsspektrum der HTI ω -Aminosäure in Methanol. Der obere Graph zeigt absolute Spektren des Z- und E-Isomers, sowie des photostationären Gleichgewichts PSS400. Das PSS400 Spektrum enthält ca. 85 % des E-Isomers. Die beiden Pfeile markierten die Wellenlängenbereiche, in denen die Photoreaktionen induziert werden. Im unteren Graph sind die Differenzspektren beider Schaltprozesse dargestellt. [Cor07]

das E-Isomer zusätzlich mit Licht der Wellenlänge 490 nm beleuchtet werden. In diesem Wellenlängenbereich absorbiert das Z-Isomer nicht, so dass in diesem Fall ein photostationäres Gleichgewicht PSS500 entsteht, welches zu 95 % das Z-Isomer enthält. Die Spiegelsymmetrie der beiden Kurven zeigt die Reversibilität der Photoisomerisation von HTI.

3.2 Zeitaufgelöste UV/Vis-Spektroskopie

Um die Kinetik des Isomerisierungsprozesses eingehend zu untersuchen wurden verschiedene Techniken der zeitaufgelösten Spektroskopie eingesetzt. In diesem Abschnitt werden Ergebnisse aus zeitaufgelösten Messungen an HTI im sichtbaren Spektralbereich vorgestellt. Um die zeitliche Entwicklung der Photoisomerisierung von Z nach E aufzuzeichnen wurde das PSS500 mit ultrakurzen Lichtimpulsen ($\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$) belichtet und die Absorptionsänderungen nach verschiedenen Verzögerungszeiten aufgenommen.

Abbildung 3.4 zeigt die zeitliche Entwicklung der Absorption nach Anregung bei 400 nm.

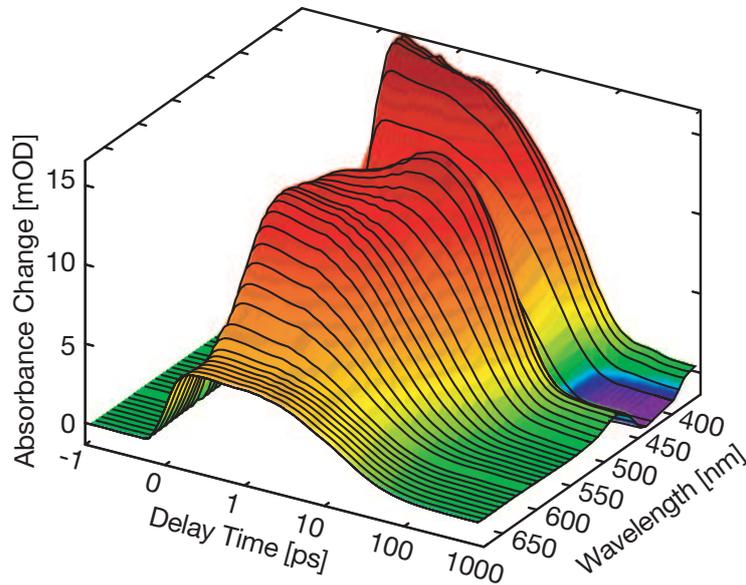


Abbildung 3.4: 3D-Transiente Spektren der photochemischen Isomerisierung der HTI ω -Aminosäuren nach Anregung mit 400 nm. Die Zeitachse zeigt zwischen -1 ps und 1 ps eine lineare Skala, Verzögerungszeiten größer 1 ps werden logarithmisch dargestellt. Die Absorptionsänderung ist in Einheiten der optischen Dichte (OD) aufgetragen. Der detektierte Wellenlängenbereich ist auf der z-Achse aufgetragen. [Cor07]

Direkt nach Photoanregung des Z-Isomers (PSS500) zeigt sich über dem gesamten beobachteten Spektralbereich eine modulierte Absorption des angeregten Zustandes (ESA: engl.: *excited state absorption*). Im Bereich um 430 nm ist diese Absorption stark reduziert und fällt im langwelligeren Spektralbereich (> 600 nm) deutlich ab. Im Zeitbereich von 10 ps sind dominante Kinetiken zu beobachten. Ab Verzögerungszeiten > 100 ps finden sich konstante Absorptionsänderungen. Sie stimmen mit dem in Abbildung 3.3 gezeigten Differenzspektrum überein und zeigen somit die Bildung des Isomerisierungsproduktes (E-Isomer).

Über eine globale Fitroutine wurde ein multiexponentielles Modell an die gemessenen Daten angepasst. Der mathematische Hintergrund dieses Verfahrens findet sich in [Sat03, Sat04a] und Kapitel 2.2. Zwei Zeitkonstanten von 4.5 ps und 33 ps sowie ein Offset, der die Produktbildung beschreibt, geben den gemessenen Datensatz gut wieder. Die lange Zeitkonstante (33 ps) wird dem Zerfall der induzierten Absorption des angeregten Zustandes zugeordnet. Sie gibt die längstmögliche Zeit für den Isomerisierungsprozess nach Photoanregung an. Der Grundzustand wird spätestens nach diesem Prozess erreicht. Die Zuordnung der kurzen 4.5 -ps-Zeitkonstante gelingt nicht eindeutig. Der damit verknüpfte Übergang könnte einer Bewegung des Moleküls auf der Potentialfläche des angeregten

Zustands entsprechen. Dabei müsste sich innerhalb weniger Pikosekunden die Fluoreszenz des Moleküls in den roten Spektralbereich verschieben. Alternativ kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Übergang auch schon zur Produktbildung beiträgt.

3.3 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Um den Mechanismus der Z->E Reaktion genauer aufzuklären, wurden weitere zeitauflösende Techniken verwendet. Die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht hier die exakte Beobachtung der zeitlichen Entwicklung der Emissionseigenschaften der HTI ω -Aminosäure. Dieses Experiment erlaubt die detaillierte Aufnahme des angereg-

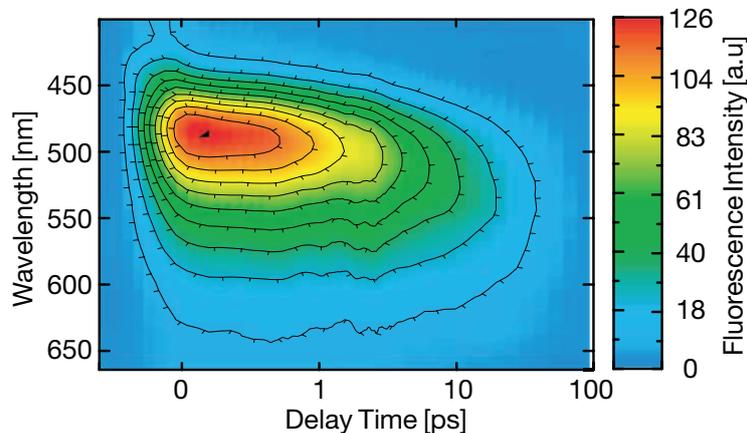


Abbildung 3.5: 2D-Transientes Fluoreszenzspektrum der Z→E Isomerisierung der HTI ω -Aminosäure. Die Zeitachse zeigt zwischen -1 ps und 1 ps eine lineare Skala, Verzögerungszeiten größer 1 ps werden logarithmisch dargestellt. Auf der Ordinate ist der detektierte Wellenlängenbereich aufgetragen.

ten Zustandes und den Wechsel des elektronischen Zustands (z.B. $S_0 \rightarrow S_1$). Die dabei verwendete Technik (transiente Fluoreszenz, Kerr-Shutter) ist in [Sch03, Sch04, Sat04a, Cor07, Hei07] nachzulesen. Wie bei der Detektion der transienten Absorption im sichtbaren Spektralbereich wurde das Z-Isomer mit ultrakurzen Lichtimpulsen ($\tau_p \approx 100$ fs) angeregt. Die Anregung erfolgte bei 387 nm und damit im gleichen elektronischen Übergang wie in Abschnitt 3.2. Die transiente Fluoreszenz wurde zu verschiedenen Verzögerungszeiten mit Hilfe eines zweiten ultrakurzen Lichtimpulses aufgenommen. Im Vergleich zur transienten Absorption gibt es in diesem Experiment ausschließlich positive Signalbeiträge. Dabei rührt ein großer Signalwert von einer intensiven Fluoreszenz her. Abbildung 3.5 zeigt die zweidimensionale Darstellung der Messergebnisse. Das Maximum der Fluoreszenz ist bei 500 nm zu sehen und verschwindet auf einer Zeitskala von einigen

10 ps (Abbildung 3.5). Eine detaillierte Datenanalyse, die wiederum von multiexponentiellen Zerfällen ausgeht [Cor08a, Cor07] ergab eine Kombination aus drei Zeitkonstanten ($\tau_0 = 0.2$ ps, $\tau_1 = 4.5$ ps, $\tau_2 = 27$ ps). Die Emission schiebt sehr schnell ($\tau_0 = 0.2$ ps) in den roten Spektralbereich. Dieses Verhalten kann eindeutig dem Verlassen des Franck-Condon-Gebietes zugeordnet werden. Die längste Zeitkonstante ($\tau_2 = 27$ ps) kann in diesem Experiment eindeutig dem Übergang in den Grundzustand zugeordnet werden. Es ist jedoch nicht klar, ob $\tau_1 = 4.5$ ps einer Bewegung im S_1 -Zustand oder einem elektronischen Zustandswechsel ($S_1 \rightarrow S_0$) entspricht.

Absorptions- und Emissionsexperimente geben deutliche Hinweise für eine theoretische Beschreibung der Photoisomerisation der HTI ω -Aminosäure. Die beiden völlig unterschiedlichen Messprinzipien liefern in guter Übereinstimmung einen Satz von drei Zeitkonstanten, welcher den Isomerisierungsprozess beschreibt.

	τ_0	τ_1	τ_2
transient UV/Vis		4.5 ps	33 ps
Fluoreszenz	0.2 ps	4.5 ps	27 ps

Tabelle 3.1: Zusammenstellung der Zeitkonstanten aus der transienten UV/Vis Spektroskopie und der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung.

Das Verlassen des Franck-Condon Gebietes kann bei $\tau_0 = 0.2$ ps beobachtet werden. Die maximale Zeitdauer für den Isomerisierungsprozess ist mit $\tau_2 = 30$ ps bestimmt worden. Die Bedeutung der Zeitkonstante $\tau_1 = 4.5$ ps ist noch immer nicht eindeutig geklärt. Das Reaktionsmodell der Z→E Isomerisierung nach Photoanregung anzugeben kann also weder durch zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie noch mit zeitaufgelösender fs-Spektroskopie vollständig aufgeklärt werden.

3.4 Stationäre IR-Charakterisierung

Durch den Einsatz zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie wird versucht ein vollständiges Reaktionsmodell der Photoisomerisierung der HTI ω -Aminosäure anzugeben [Cor07]. In diesem Abschnitt werden dazu zunächst die stationären Infrarotspektren der beiden Isomere diskutiert, bevor im nächsten Abschnitt die Ergebnisse der zeitaufgelösten Infrarotspektroskopie vorgestellt werden.

In Abbildung 3.6 sind stationäre Infrarotspektren von HTI dargestellt. Sie wurden mit einem Fourier-Transform Spektrometer (FTIR, Bruker, IFS-66) aufgenommen. Das Z-Isomer (schwarz) zeigt charakteristische Banden, die eindeutig bestimmten Teilen des

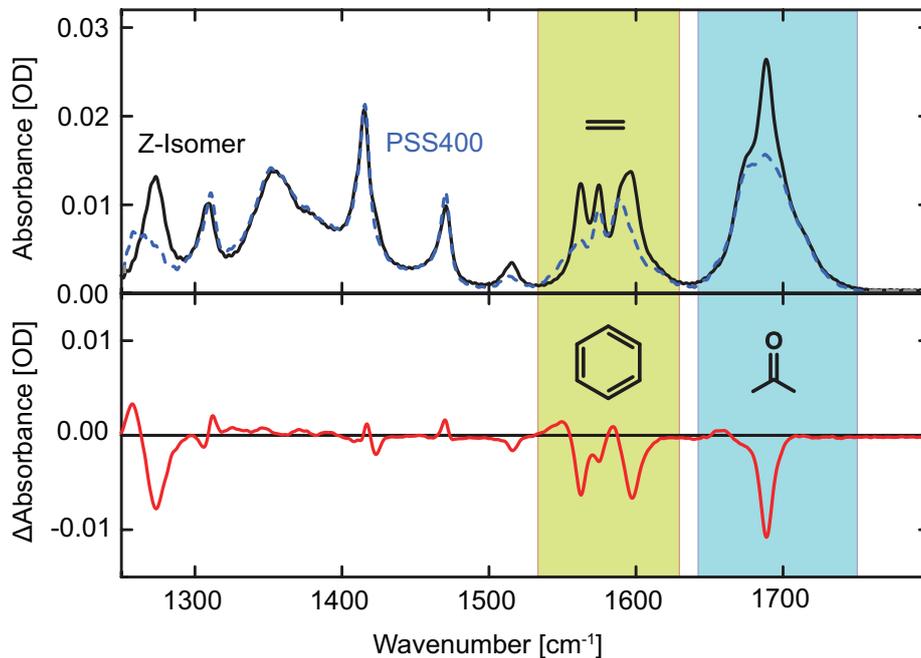


Abbildung 3.6: Stationäres Infrarotspektrum des Z-Isomers (schwarz) und des PSS400 (blau) der HTI ω -Aminosäure in Methanol- d_4 . Der untere Graph zeigt das Differenzspektrum des Schaltprozesses Z \rightarrow E.

Moleküls zugeordnet werden können. Der Bereich der Banden aromatischer und olefinischer Doppelbindungen von $1540\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$ ist in Abbildung 3.6 grün hinterlegt. Diese Banden sind ein deutlicher Hinweis auf ein stark konjugiertes Elektronensystem, wie es für die planare Geometrie des Z-Isomers zu erwarten ist. Des Weiteren ist in Abbildung 3.6 ein Bereich von $1640\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ hellblau markiert. In diesem für Carbonylgruppen typischen Wellenzahlbereich zeigen sich zwei stark überlappende Banden. Durch moleküldynamische Rechnungen konnte die breite Bande der Säuregruppe und die schmale Bande bei 1690 cm^{-1} der aromatischen Ketogruppe zugeordnet werden [Cor07].

Die Isomerisierung nach Beleuchtung mit 400 nm führt zu deutlichen Absorptionsänderungen im Infrarotspektrum. Im oberen Teil von Abbildung 3.6 ist die Absorption des PSS400 blau dargestellt. Im unteren Teil ist die spektrale Änderung durch die Z \rightarrow E Isomerisierung aufgetragen. Die IR-Oszillatorstärke ist in der E-Form signifikant reduziert, was in guter Übereinstimmung mit den Dauerstrich-Untersuchungen der sichtbaren Spektroskopie steht. Die Banden im Bereich von $1640\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ (C=O) reagieren sehr empfindlich auf elektronische Zustandswechsel und eignen sich somit als Markerbanden im zeitaufgelösten Infrarotexperiment.

3.5 Zeitaufgelöste IR-Spektroskopie

Die Markerbande der Carbonylgruppe des Thioindigos ermöglicht es die Population des Grundzustandes nach Photoanregung in seiner zeitlichen Entwicklung aufzuzeichnen. Hierzu wurde der zeitliche Verlauf der Infrarotabsorption nach Photoanregung untersucht. Abbildung 3.7 zeigt das Ergebnis des Infrarot Pump-Probe Experiments an der HTI ω -Aminosäure in Methanol-d₄. Der gemessene Spektralbereich reicht von 1620cm^{-1} bis 1750cm^{-1} , deckt also den Bereich der C=O-Markerbande (in Abbildung 3.6 hellblau hinterlegt) ab.

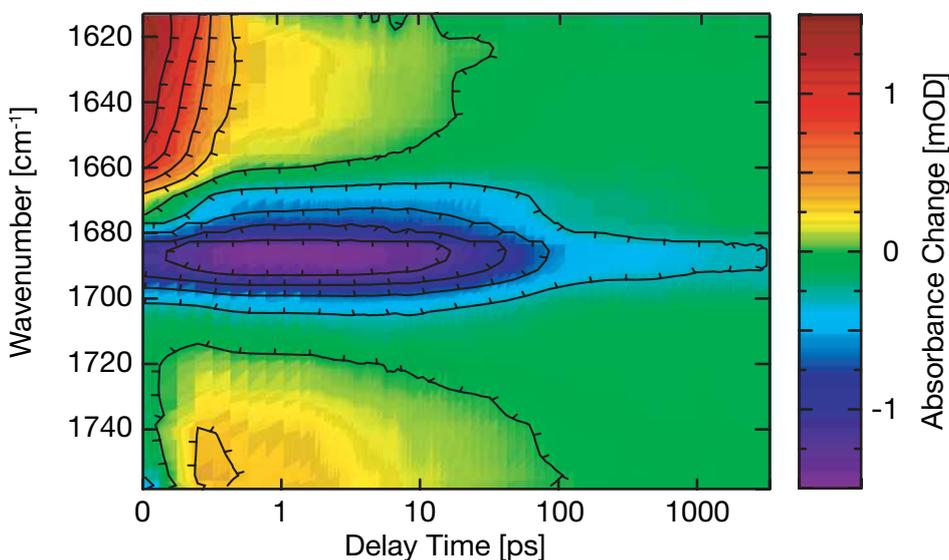


Abbildung 3.7: 2D-Transientes Infrarotspektrum der HTI ω -Aminosäure nach Anregung bei 400 nm. Z→E. Die Verzögerungszeit ist logarithmisch aufgetragen. Die Amplitude der Absorptionsänderung wird durch die Farbtabelle wiedergegeben.

Um den Zeitnullpunkt ($t < 1$ ps) dominieren Signale, welche durch die nichtlineare Wechselwirkung des intensiven Anregungslichtimpulses mit seiner Umgebung entstehen. Auf der 10–100 ps-Zeitskala sind deutliche Kinetiken zu erkennen. Der Bereich der CO-Banden zeigt eine negative Absorptionsänderung (Abbildung 3.7: Ausbleichsignale in blau) verursacht durch die Entvölkerung des Grundzustandes. Dieses Ausbleichen erholt sich im Zeitbereich von einigen 10 ps. Die Produktbildung zeigt sich in einem konstanten Offset-Signal zu späten Zeiten. Dieses Offset-Signal stimmt mit dem Differenzspektrum aus dem unteren Teil von Abbildung 3.6 überein. Die Datenanalyse zeigt für $t > 1$ ps im Bereich von etwa 1630cm^{-1} und 1745cm^{-1} ein positives Signal, welches dem starken Ausbleichsignal überlagert ist. Diese induzierte Absorption zerfällt teilweise. Im Bereich

von 10 ps sind weitere Änderungen der Signalamplitude zu beobachten. Die spektrale Signatur ändert sich hingegen kaum. Dies deutet auf Reaktionen in einem elektronisch angeregten Zustand hin. Die multiexponentielle Datenanalyse beschreibt den Datensatz mit

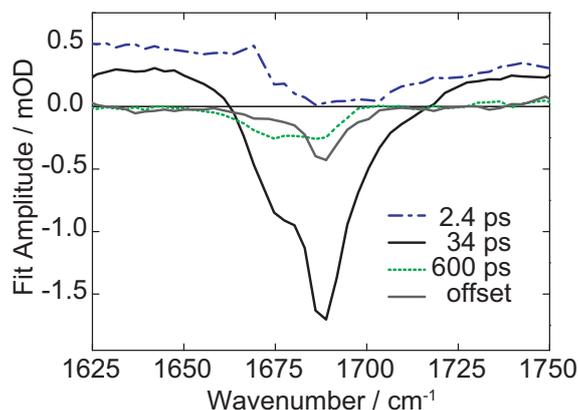


Abbildung 3.8: Zerfallsassozierte Infrarot Spektren der HTI ω -Aminosäure nach Anregung des Z-Isomers bei 400 nm.

drei Zeitkonstanten $\tau_0 = 2.4$ ps, $\tau_1 = 34$ ps und $\tau_2 = 600$ ps. Die zu diesen Zeitkonstanten gehörenden zerfallsassozierten Spektren sind in Abbildung 3.8 dargestellt. τ_0 wird Relaxations- oder Umorientierungsprozessen im S_1 -Zustand zugeordnet, da die spektral unspezifische Amplitude keinen Hinweis auf interne Konversion in den Grundzustand gibt. Das signifikant negative Signal im Bereich der CO-Schwingung (1685 cm^{-1}) zeigt das Erreichen des elektronischen Grundzustandes mit der Zeitkonstante $\tau_1 = 34$ ps. τ_2 kann als Reorientierung der Carbonylgruppe und seiner Umgebung im elektronischen Grundzustand interpretiert werden. Die Infrarotspektroskopie ist sehr sensitiv für Prozesse dieser Art. Es ist daher nicht ungewöhnlich, dass τ_2 in den Experimenten im sichtbaren Spektralbereich nicht beobachtet wurde. Die Experimente im infraroten Spektralbereich geben keinen Hinweis für einen Übergang vom angeregten Zustand in den Grundzustand im Zeitbereich weniger Pikosekunden. Der Grundzustand wird also erst im 30 ps Bereich erreicht.

3.6 Datenanalyse

Um die Natur des Isomerisierungsprozesses aufzuklären wurden die oben vorgestellten Messdaten einer detaillierten Analyse unterzogen. Die Anpassung der Daten mit drei Zeitkonstanten legt nahe, dass die Z \rightarrow E-Isomerisierung über drei intermediäre Zustände (I_1 , I_2 , I_3) abläuft. Die Grundzustände des Z- und des E-Isomers müssen bei der Betrachtung

tion des Reaktionsmodells zusätzlich noch berücksichtigt werden. Durch die große Energielücke zwischen den elektronischen Grundzuständen des Z- und des E-Isomers ist die Bevölkung der Zwischenzustände $I_1 \dots I_3$ ohne optische Anregung nicht möglich.

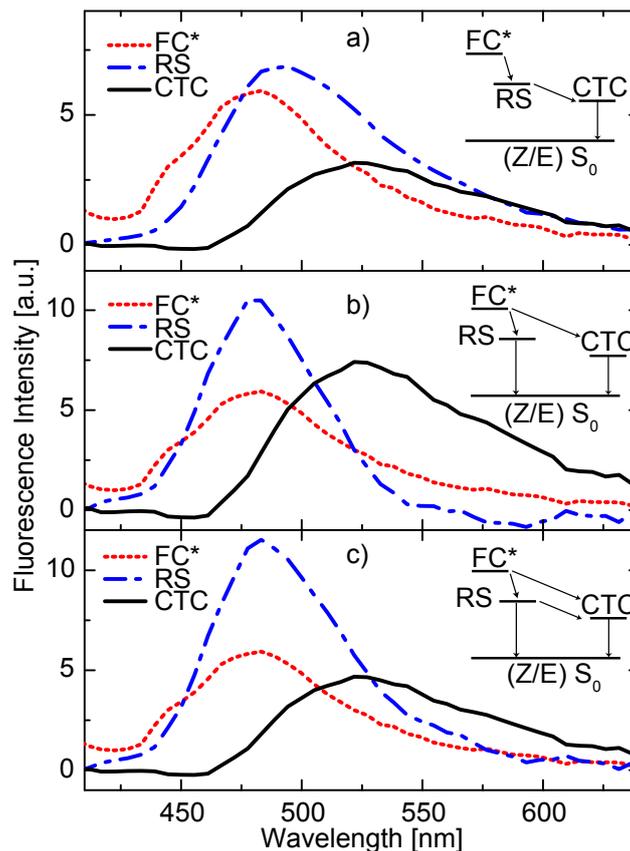


Abbildung 3.9: Berechnete Fluoreszenzspektren für verschiedene Reaktionsmodelle. a) Sequentielles Modell; b) Verzweigtes Modell; c) Gemischtes Modell; die Reaktionsmodelle sind in die zugehörigen Graphen eingezeichnet.

Bei der Anregung von HTI wird die Franck-Condon-Region (FC^* , I_1) ohne Änderung der nuklearen Konformation bevölkert. Durch die Anregung bei 400nm enthält dieser Zustand einen großen vibronischen Energieüberschuss. Zusätzlich kann eine Verschiebung der Elektronendichte auftreten, die zu partiellen Inversionen der Einfach- und Doppelbindungen führen kann. Die den beiden letztgenannten Reaktionen zugrunde liegenden Prozesse induzieren ultraschnelle Prozesse, die unmittelbar auf die Anregung folgen. Die geänderte Ladungsverteilung führt zu einer schnellen Umorientierung der Solvathülle, während die vibronische Überschussenergie Änderungen der nuklearen Konfiguration und intramolekulare Schwingungsrelaxationen initiiert. Im Folgenden werden drei mögli-

che Reaktionsschemata nach der Population der FC*-Zustands diskutiert. Die Reaktionsschemata und die daraus resultierenden Spektren sind in Abbildung 3.9 gezeigt.

3.6.1 Sequentielles Reaktionsmodell

In Abbildung 3.9 a) ist das sequentielle Reaktionsmodell sowie die transienten Spektren der dabei auftretenden Intermediate dargestellt. Das in diesem Fall aus der Datenanalyse resultierende Fluoreszenzspektrum des FC*-Zustands ist in Abbildung 3.9 a) rot eingezeichnet. Der auf die Franck-Condon-Region folgende Zustand (RS, I_2) kann als relaxiert bezeichnet werden. Das transiente Fluoreszenzspektrum dieses mit 200fs relaxierenden Intermediats ist in Abbildung 3.9 a) blau eingezeichnet. Es ist im Vergleich zum Spektrum des FC*-Zustands leicht rotverschoben, wobei die Oszillatorstärke nahezu gleich bleibt. Diese Rotverschiebung deutet auf strukturelle Änderungen entlang der Reaktionskoordinate in Verbindung mit einem Ladungstransferprozess hin [Bau92]. Quantenchemische Untersuchungen ähnlicher Systeme haben gezeigt, dass der Bereich der Potentialfläche, in dem eine Relaxation in den Grundzustand stattfindet Ladungstransfer-Charakter hat [Wal91, Mei92, Kle95, Sal80, Sal67, Sal68]. Dieser Zustand sei hier als CTC-Zustand (I_3) bezeichnet. Der Übergang in den Grundzustand findet in einer konischen Durchschneidung statt [Wal91, Mei92, Kle95, Sal80, Sal67, Sal68]. Dieser Prozess ist mit einer Zeitkonstante von 30ps verknüpft. Das sequentielle Modell bietet eine adäquate qualitative Beschreibung der nach der Photoanregung beobachteten Prozesse.

3.6.2 Verzweigte Reaktionsmodelle

Die Abbildungen 3.9 b) und c) zeigen die transienten Spektren für zwei verschiedene verzweigte Reaktionsmodelle. Im in Abbildung 3.9 b) dargestellten Reaktionsmodell findet die Verzweigung innerhalb von 200fs vom Franck-Condon-Zustand FC* aus statt. Dadurch werden die beiden Zustände RS und CTC parallel bevölkert. Von dort aus relaxieren beide Zustände direkt in den Grundzustand des Z- und E-Isomers mit den Zeitkonstanten von 4ps (RS) und 30ps (CTC). Bei der Berechnung der Spektren in Abbildung 3.9 b) wurde angenommen, dass beide Zustände gleich bevölkert werden. Das Spektrum des RS-Zustands ist relativ schmal und hat wie das Spektrum des FC*-Zustands sein Maximum bei 480nm. Die Amplitude ist etwa doppelt so groß wie die des FC*-Zustands, was auf eine Zunahme der Oszillatorstärke durch die Relaxation schließen lässt. Ein solches Verhalten kann nur schwierig erklärt werden, da durch den Übergang von der FC*-Region in den RS-Zustand Überschussenergie verloren geht. Eine solcher Relaxationsvorgang sollte sich in einer Rotverschiebung manifestieren. Das transiente Spektrum des CTC-Zustands

zeigt die erwartete Rotverschiebung. Es zeigt allerdings wie zuvor das Spektrum des RS-Zustands eine zur FC*-Region erhöhte Oszillatorstärke. Die in Abbildung 3.9 b) gezeigten Spektren beschreiben den Isomerisierungsprozess also nur unbefriedigend. Wird das Verhältnis der Bevölkerung der Zustände RS und CTC variiert ergeben sich nur noch unrealistischere transiente Spektren. Die Oszillatorstärke steigt bei dem jeweils stärker bevölkerten Zustand.

In Abbildung 3.9 c) ist ein weiteres Reaktionsmodell mit gleicher Bevölkerung der Zustände RS und CTC dargestellt. Im Gegensatz zum zuvor diskutierten Reaktionsmodell existiert hier ein Reaktionspfad zwischen dem RS- und dem CTC-Zustand. Die in Abbildung 3.9 c) gezeigten Spektren gehen von einem gleichverteilten Zerfall des RS-Zustands in den CTC-Zustand und den Grundzustand aus. Die Oszillatorstärke des CTC-Zustands ist gegenüber dem FC*-Zustand nicht erhöht, das CTC-Spektrum weist eine Rotverschiebung auf. Das Spektrum des RS-Zustands ist aber wie bereits im zuvor diskutierten Reaktionsmodell nicht rotverschoben und die Oszillatorstärke des RS-Zustands ist etwa doppelt so hoch wie die des FC*-Zustands. Dieses Verhalten ändert sich nicht signifikant, wenn die Zerfallsraten des RS-Zustands in den CTC-Zustand und in den Grundzustand variiert werden. Daher ist auch dieses Modell wie das andere (Abbildung 3.9 b)), nur schwer erklärbar. Das aus den hier diskutierten Betrachtungen schlüssigste Reaktionsmodell der Z-E-Isomerisierung der Hemithioindigo ω -Aminosäure ist also das in Abbildung 3.9 a) dargestellte sequentielle Schema.

3.7 Diskussion

Die experimentellen Ergebnisse der oben beschriebenen Messungen können in einem Reaktionsmodell zusammengefasst werden. Nach Photoanregung des Z-Isomers beobachtet die zeitaufgelöste Spektroskopie (UV/Vis, FL, IR) drei verschiedene Prozesse mit Zeitkonstanten 0.2 ps, 4 ps und 30 ps. Das Reaktionsmodell besteht somit aus drei intermediären Zuständen (FC*, RS, CTC) und jeweils den Grundzuständen des Z- und E-Isomers. Abbildung 3.10 zeigt das sequentielle Reaktionsmodell der Z→E Isomerisierung der HTI ω -Aminosäure. Nach optischer Anregung mit einem Lichtimpuls bei 400 nm erfolgt die Absorption in einen angeregten Zustand (FC*) im Franck-Condon Bereich. Dabei ändert sich das Dipolmoment des Z-Isomers. Dies bewirkt dynamische Solvationsprozesse, die unter Inversion von Einzel- und Doppelbindungscharakter in einen relaxierten Zustand RS führen. Diese molekularen Änderungen bewirken ein Schieben der Emission innerhalb von 0.2 ps in den längerwelligen Spektralbereich. Innerhalb der nächsten 4 ps ändert sich die Struktur des HTI-Moleküls. Zu beobachten ist dies an dem deutlichen Verlust der Fluoreszenzintensität. Als nächstes wird der Zustand CTC mit La-

dungstrennungscharakter erreicht. Eine Potentialbarriere trennt diesen Zustand von dem Übergangsbereich zwischen S_1 und S_0 , von dem aus die Population des Grundzustandes möglich ist. Die molekulare Struktur des HTI-Moleküls in dieser Übergangsregion ist extrem kurzlebig [Fus00, Fus04a, Fus04b]. Dieser Zustand ist somit spektroskopisch nicht sichtbar und wird mit P^* bezeichnet. Durch interne Konversion in Kombination mit einer konischen Durchschneidung kann der P^* -Zustand in den Grundzustand übergehen [Fus00, Fus04a, Fus04b].

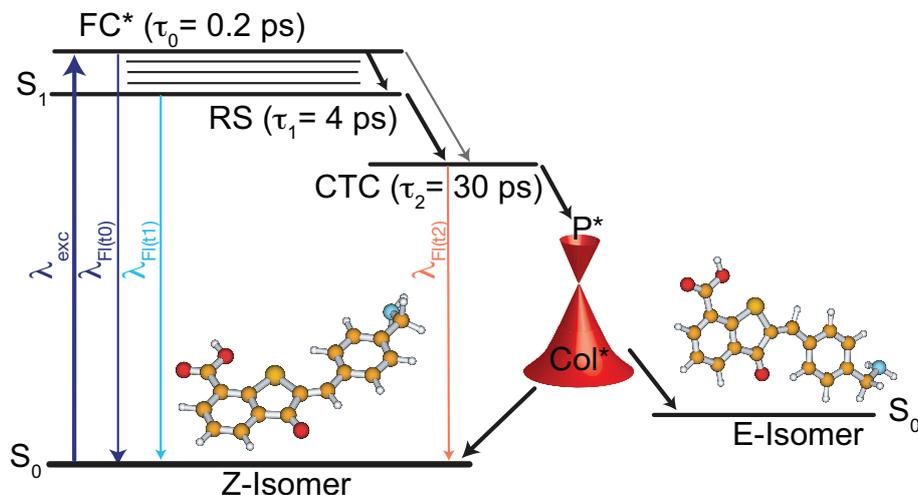


Abbildung 3.10: Reaktionsmodell der Photoisomerisierung der HTI ω -Aminosäure nach Anregung mit 400nm. Eingezeichnet sind alle Intermediate der $Z \rightarrow E$ Isomerisierung mit den im Text verwendeten Abkürzungen und den dazu gehörigen Lebensdauern. Die farbigen Emissionspfeile geben einen Anhaltspunkt der Fluoreszenzwellenlängen. Der graue dünne Pfeil gibt eine mögliche Verzweigung an. Den Hauptreaktionspfad markieren die dicken schwarzen Pfeile. In rot dargestellt ist die konische Durchschneidung (P^* und Col^*) [Cor07].

Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigen, dass die HTI-basierten ω -Aminosäuren einen schnellen Schalter darstellen. Er lässt sich im sichtbaren Spektralbereich anregen. Photoschalter dieser Art können in eine Peptidsequenz eingebaut werden. Wie in Kapitel 4 dargestellt wird, lässt sich die Funktionalität des Peptids so optisch beeinflussen. Mit den hier bereits eingesetzten experimentellen Mitteln lassen sich Änderungen in der Konformation mit hoher Zeitauflösung beobachten.

Kapitel 4

HTI Stilben Substitution

In diesem Kapitel werden Messungen vorgestellt, bei denen der Stilbenteil von Hemithioindigo mit Substituenten stark unterschiedlicher elektronischer Eigenschaften versehen wurde. Diese Experimente wurden durchgeführt um den Einfluss polarer Substituenten auf die spektroskopischen und photochemischen Eigenschaften von HTI zu untersuchen. Diese Untersuchungen sind als Ergänzung zu den systematischen Untersuchungen im sichtbaren Spektralbereich in [Cor08c, Cor08a] zu verstehen. Die wichtigsten Ergebnisse aus den Vis-Experimenten werden zusammengefasst, bevor auf die IR-Messungen eingegangen wird. Zu Beginn des Kapitels werden zwei Substituenteneffekte diskutiert, die auf die elektronische Struktur eines chemischen Systems Einfluss nehmen können.

4.1 Substituenteneffekte

4.1.1 Induktiver Effekt

Der induktive Effekt hängt mit der Fähigkeit eines Substituenten zusammen die Verteilung der Elektronen in einer σ -Bindung zu beeinflussen. Die Elektronen sind eher bei

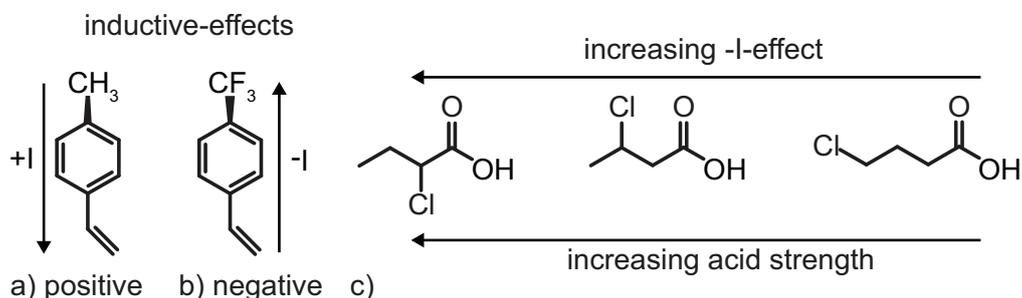


Abbildung 4.1: a, b: Veranschaulichung des induktiven Effekts; die Polarisierung der σ -Bindung ist durch Keile verdeutlicht. a: $+I$ -Effekt b: $-I$ -Effekt; c: Beispiele zur unterschiedlichen Reichweite des induktiven Effekts [Cor08a].

4.2 HTI-Chromophore

Für die Untersuchungen wurden Substituenten mit stark unterschiedlichen elektronischen Eigenschaften gewählt. Alle hier vorgestellten Substituenten sind in der para-Konfiguration mit dem HTI-Chromophor verknüpft. Mit der Methoxygruppe (OMe) wurde als Substituent eine starke Elektron-Donor Gruppe gewählt (engl. electron-donating group - EDG). Ihr ausgeprägter $+M$ -Effekt dominiert über ihren moderaten $-I$ -Effekt [Cor08a]. Als Vertreter starker Elektron-Akzeptor Gruppen (engl. electron-withdrawing group - EWG) wurde die Nitrilgruppe (CN) gewählt. Sie weist einen schwachen $-M$ -Effekt und einen starken $-I$ -Effekt auf. Die Messungen an diesen Systemen werden im Folgenden mit dem unsubstituierten HTI verglichen; in diesem Fall sitzt an der Position R_1 ein Wasserstoffatom (vgl. Abbildung 4.3).

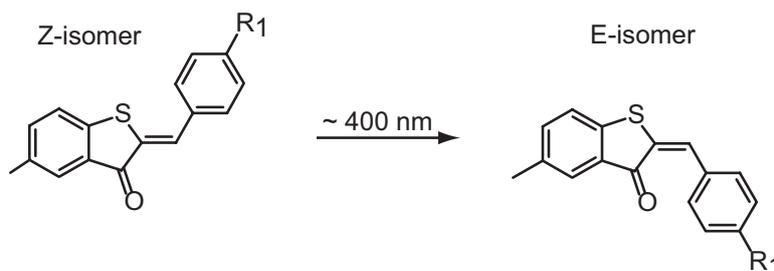


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der photoinduzierten Isomerisierung des HTI-Systems mit verschiedenen Substituenten R_1 ($R_1 = H, OMe, CN$) am Stilben in para-Konfiguration.

4.2.1 Stationäre UV/Vis-Spektren

In Abbildung 4.4 sind die UV/Vis Absorptionsspektren der para-substituierten Verbindungen sowie des unsubstituierten ($R_1 = H$) Z-Isomers abgebildet. Für die beiden substituierten Verbindungen sind die Maxima der $S_0 \rightarrow S_1$ -Absorption rotverschoben. Die Oszillatorstärke ist bei beiden substituierten Verbindungen gegenüber der unsubstituierten Verbindung erhöht. Außerdem sind die Verhältnisse der Absorptionsstärken von $S_0 \rightarrow S_1$ und $S_0 \rightarrow S_2$ verändert. Im Fall der Nitrilverbindung ist der Unterschied der Oszillatorstärke der beiden Übergänge größer. Dieser Unterschied ist bei der Methoxy-substituierten Verbindung dagegen etwas kleiner. Insgesamt lassen sich die Einflüsse der EDG- und EWG-Gruppen wie folgt zusammenfassen:

1. Die Bande $S_0 \rightarrow S_1$ sind für EDG- und EWG-Gruppen schwach rotverschoben.

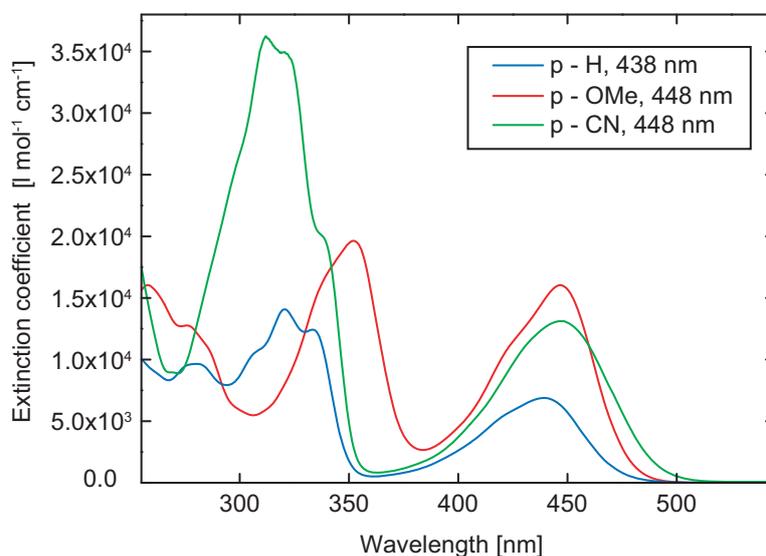


Abbildung 4.4: Absorptionsspektren der verschiedenen para-substituierten Verbindungen des HTI Z-Isomers in Dichlormethan im UV/Vis [Cor08a]. Die Wellenlänge in der Legende gibt die Position der Maxima der $S_0 \rightarrow S_1$ -Bande an.

- Die Substitution durch die Methoxy-Gruppe erhöht den Extinktionskoeffizienten bei λ_{\max} im Fall der $S_0 \rightarrow S_1$ -Bande erheblich. Die Nitril-Gruppe bewirkt eine etwas schwächere Erhöhung.
- Die $S_0 \rightarrow S_2$ -Bande scheint stärker durch EWG als durch EDG-Gruppen beeinflusst zu werden.

Die Lage der Absorptionsmaxima ist durch die Energiedifferenz zwischen dem elektronischen Grundzustand und dem Franck-Condon-Zustand bestimmt. Da sich die Absorptionsmaxima durch Substitution nur minimal verschieben, kann gefolgert werden, dass sich auch die energetische Lage des FC^* -Zustands nur wenig durch Substitution verändert. Der FC^* -Zustand des $S_0 \rightarrow S_2$ Übergangs wird hingegen signifikant durch Substitution beeinflusst.

4.2.2 Stationäre Infrarot-Charakterisierung

In Abbildung 4.5 sind die stationären Infrarotspektren der untersuchten Stilben-substituierten HTI-Chromophore mit den Differenzspektren zwischen den Z- und E-Isomeren aufgetragen. Die Infrarotspektren unterteilen sich jeweils in zwei charakteristische Bereiche. Im Bereich zwischen $1550 - 1620 \text{ cm}^{-1}$ finden sich Banden, die aromatischen oder

olefinischen Doppelbindungen zugeordnet werden können. Im Frequenzbereich von $1660 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ manifestiert sich die aromatische Ketogruppe des Thioindigos.

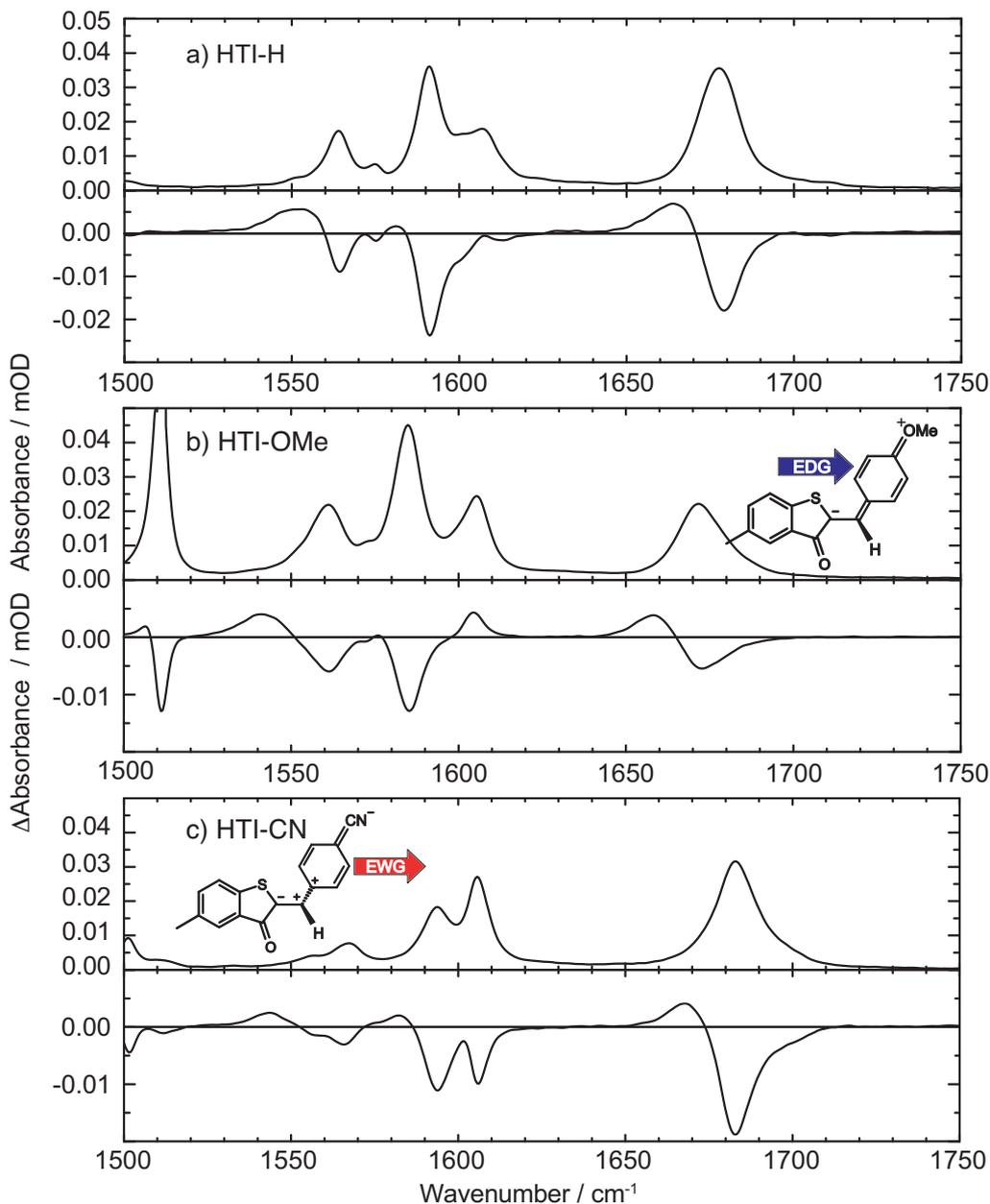


Abbildung 4.5: Stationäre Infrarotspektren der Z-Isomere der Stilben-substituierten HTI-Chromophore in Dichlormethan (jeweils oberes Teilbild) und die Differenzspektren zwischen den Z- und E-Isomeren (jeweils unteres Teilbild). a: Unsubstituiertes HTI; b: Substitution mit OMe; c: Substitution mit CN.

Die Keto-Absorptionsbande des HTI ist im Fall der Substitution mit der Methoxygruppe gegenüber dem unsubstituierten HTI-Chromophor von 1677 cm^{-1} nach 1672 cm^{-1} rotverschoben. Dies ist für eine Elektron-Donor Gruppe, die einen ausgeprägten $+M$ -Effekt aufweist nach der linearen Energiebeziehung nach Hammett ebenso zu erwarten [Jon57], wie die Blauverschiebung ($\Delta\nu = 5\text{ cm}^{-1}$) dieser Absorptionsbande im Fall der Substitution mit der Nitrilgruppe. Im letzteren Fall wird die negative Ladung am Sauerstoff-Atom zum Kohlenstoff hin verschoben. Als Folge wächst der Doppelbindungscharakter der C=O-Bindung und damit verschiebt sich auch die Absorption in den höherfrequenten Bereich [Gün96].

Im Bereich der aromatischen Doppelbindungen kann man deutlich erkennen, dass die Oszillatorstärke bei der OMe-Substitution im Vergleich zur Bande der C=O-Gruppe stark zunimmt. Außerdem deutet sich hier wieder eine leichte Rotverschiebung gegenüber dem unsubstituierten HTI an. Es ist denkbar, dass die Polarität und damit der Extinktionskoeffizient der aromatischen Doppelbindungen durch den ausgeprägten $+M$ -Effekt der Methoxygruppe zumindest teilweise erhöht wird. Durch die Substitution mit der OMe-Gruppe wird eine effektive Verschiebung negativer Ladung in Richtung dieser C=O-Bindungen induziert. Daher flacht das Potential dieser Bindung ab, was sich in der Rotverschiebung widerspiegelt. Die Banden der C=C-Doppelbindungen weisen bei der Substitution mit der Nitrilgruppe eine zum unsubstituierten HTI-Chromophor weniger stark geänderte Oszillatorstärke auf. Dies ist eine Evidenz für die kurze Reichweite des induktiven Effekts. Die Absorptionsbande der C=N-Doppelbindung liegt im Bereich der aromatischen Doppelbindungsbanden, was die Interpretation der Spektren in diesem Bereich im Fall des Nitril-Substituenten zusätzlich erschwert.

Bei allen drei Stoffsystemen ist nach der $Z \rightarrow E$ -Isomerisierung eine Rotverschiebung der aromatischen C=O festzustellen. Dies deutet auf eine Verschiebung negativer Ladung in Richtung des Thioindigos durch die Isomerisierung hin.

4.2.3 Zeitaufgelöste Vis-Spektroskopie

In [Cor08a] wurde der Einfluss der Stilben-Substitution auf die Kinetik der HTI-Photoisomerisierung systematisch untersucht. Bei der $Z \rightarrow E$ -Isomerisierung werden stets drei exponentielle Zeitkonstanten gefunden. Die erste Zeitkonstante τ_0 liegt im Bereich von 1 ps und ändert sich kaum mit der Substitution. Die Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 variieren systematisch mit der Substitution. Zu großen Verzögerungszeiten ist ein Signalrest in den zeitaufgelösten Messungen zu beobachten, der mit der Bildung des E-Isomers zusammenhängt. In Tabelle 4.1 sind die in [Cor08a] gefundenen Werte für τ_1 und τ_2 aufgeführt. Die Anzahl der zur Anpassung der Daten nötigen Zeitkonstanten ist für alle Substituen-

Substituent	τ_1	τ_2
Wasserstoff (p-H)	30 ps	216 ps
Methoxy (p-OMe)	5.2 ps	11.8 ps
Nitril (p-CN)	72 ps	2650 ps

Tabelle 4.1: Zusammenstellung der Zeitkonstanten der Vis-Dynamik der HTI-Chromophore. Die erste Zeitkonstante τ_0 liegt bei allen Soffsystem im Bereich $\tau_0 = 1$ ps. Bei der Datenanpassung wurde stets eine vierte Zeitkonstante ($\tau_3 = \infty$) verwendet, die die Produktbildung modelliert.[Cor08a]

ten gleich. Die spektralen Eigenschaften der transienten Vis-Absorptionen weisen für alle Substituenten große Ähnlichkeiten auf. Daher ist anzunehmen, dass auch das Reaktionsmodell der Z→E-Isomerisierung gleich ist.

4.2.4 Zeitaufgelöste IR-Spektroskopie

Zur Untersuchung des Einflusses der Substituenten auf die Kinetik des Isomerisierungsprozesses wurden zeitaufgelöste Infrarot-Absorptions-Experimente durchgeführt. Diese Experimente sind im Zusammenhang mit den in [Cor08a] durchgeführten Untersuchungen zur transienten Absorption der Stilben-substituierten HTI-Chromophore im sichtbaren Spektralbereich zu sehen.

Transiente Absorptionsänderungen

Einen ersten Überblick über die Messdaten geben die Abbildungen 4.6–4.8. Hier sind die transienten Absorptionsänderungen der Z→E-Isomerisierung der drei untersuchten HTI-Chromophore in Abhängigkeit der Frequenz ($1450\text{--}1725\text{ cm}^{-1}$) und der Verzögerungszeit (logarithmische Auftragung: 1 ps–3 ns) dargestellt.

An den entsprechenden Positionen, die aus den stationären Messungen bekannt sind, erkennt man Ausbleichsignale im Frequenzbereich der aromatischen Ketogruppe (C=O) des Thioindigos bei $1660\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ sowie im Bereich der C=C-Doppelbindungen bei $1550\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$. Am niederfrequenten Rand der C=C-Doppelbindungsbanden ist in allen drei Graphen eine ausgeprägte induzierte Absorption im Bereich $1530\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$ zu erkennen. Der Schwerpunkt dieser induzierten Absorption erfährt bei allen untersuchten HTI-Chromophoren mit zunehmender Verzögerungszeit eine leichte Blauverschiebung. Diese induzierte Absorption ist beim Methoxy-substituierten HTI-Chromophor (Abbildung 4.7) gegenüber dem unsubstituierten Chromophor (Abbildung 4.6) rotverschoben. Beim Nitril-substituierten Chromophor (Abbildung 4.8) ändert sich die Position nicht. Die

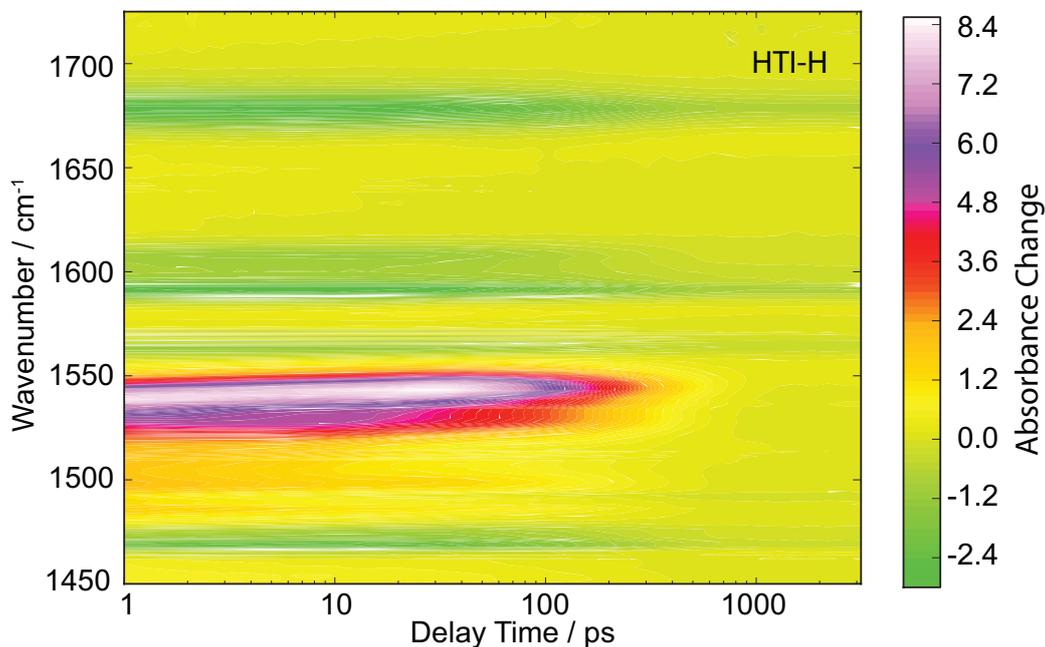


Abbildung 4.6: Transiente Absorptionsänderungen der photochemischen Isomerisierung des unsubstituierten HTI-Chromophors nach Anregung des Z-Isomers mit 400nm. Die induzierte Absorptionsänderung ist farblich kodiert dargestellt.

Zeitskalen liegen beim Methoxy-Substituierten Chromophor im Bereich zwischen 10ps bis 20ps, beim unsubstituierten Chromophor im Bereich von 20ps und von 200ps. Beim Nitril-substituierten Chromophor sind Kinetiken auf der 100ps Zeitskala zu erkennen, die Isomerisierungs-Reaktion ist aber auch nach Erreichen der maximalen Verzögerungszeit von 3 ns noch nicht abgeschlossen. Da zum Ende der Verzögerungsstrecke bereits eine deutliche Abnahme der transienten Absorptionsänderung zu beobachten ist, ist anzunehmen, dass die Isomerisierungsreaktion Kinetiken auf der Zeitskala in der Größenordnung 1–10ns zeigt.

LDAC-Auswertung

Die im Infraroten beobachteten Kinetiken sind sehr komplex. Um einen Überblick über die hierbei auftretenden Zeitkonstanten zu erhalten wurden die transienten Daten mit der LDAC-Methode (siehe Abschnitt 2.2.4 auf Seite 39) untersucht. In der Abbildung 4.9 sind die Ergebnisse der LDAC-Analyse der Infrarotmessdaten aufgetragen. Die komplexe Struktur der Kinetiken spiegelt sich in dieser Darstellung wieder. Anhand dieser LDAC-Auftragung der Daten lassen sich die Zeitskalen relevanter Kinetiken abschätzen.

Beim unsubstituierten HTI-Chromophor (vgl. Abbildung 4.9 a)) sind im Wesentlichen

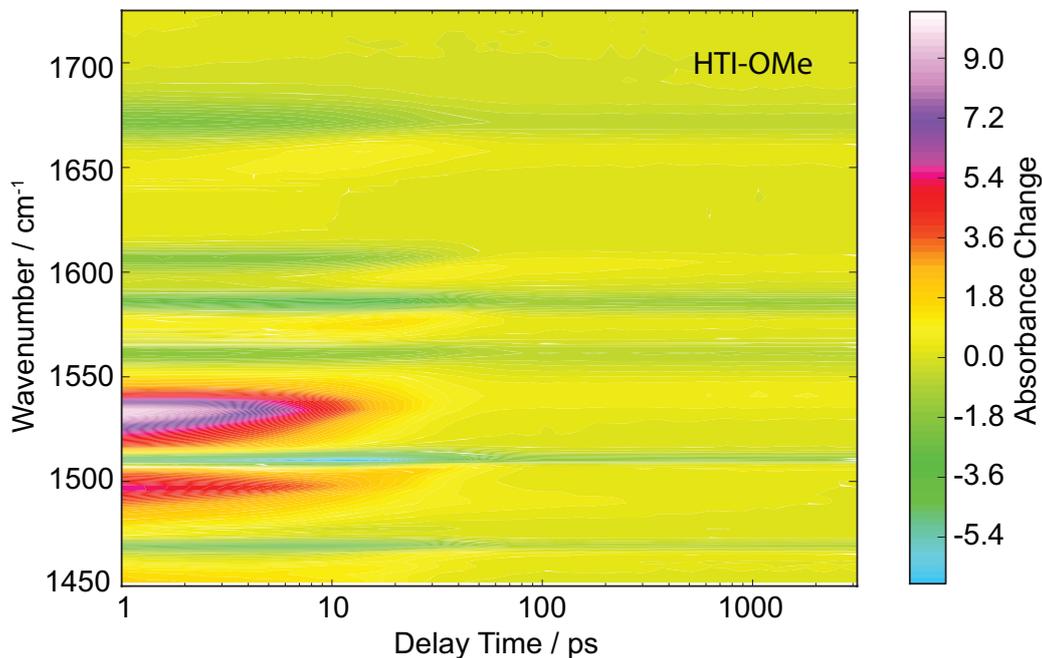


Abbildung 4.7: Transiente Absorptionsänderungen der photochemischen Isomerisierung des Methoxy-substituierten HTI-Chromophors nach Anregung des Z-Isomers mit 400 nm. Die induzierte Absorptionsänderung ist farblich kodiert dargestellt.

zwei Kinetiken zu erkennen. Im Bereich von 1545 cm^{-1} tritt ein spektral begrenztes positives LDAC-Signal auf, das sich von 1 ps bis 20 ps erstreckt. Im Bereich dieser Verzögerungszeit nimmt hier also die Absorptionsänderung zu. Etwas niederfrequenter bei 1535 cm^{-1} ist eine Abnahme der Absorptionsänderung bei Verzögerungszeiten von 1–5 ps zu beobachten. Zwischen 40 ps und 800 ps sind Kinetiken, die sich über einen größeren Spektralbereich erstrecken zu erkennen. Bei 1678 cm^{-1} , 1590 cm^{-1} und 1610 cm^{-1} sowie bei 1470 cm^{-1} nimmt die Absorptionsänderung mit einer Zeitkonstanten von etwa 200 ps ab. Das unsubstituierte HTI-Chromophor zeigt genau in diesen Frequenzbereichen Absorptionen im stationären IR-Absorptionsspektrum (vgl. Abbildung 4.5). Das LDAC-Signal zeigt hier eine größere zeitliche Lokalisation als alle anderen beim diesem Stoffsystem beobachtbaren LDAC-Signale. Im gleichen Zeitbereich tritt bei $1520\text{--}1555\text{ cm}^{-1}$ eine Abnahme der Absorptionsänderung auf. Das zugehörige LDAC-Signal erstreckt sich allerdings zwischen 10 ps und 1 ns und schließt damit zeitlich direkt an das positive Signal bei 1545 cm^{-1} an.

Das in Abbildung 4.9 b) dargestellte LDAC-Signal des Methoxy-substituierten HTI-Chromophors zeigt, dass bei diesem Stoffsystem alle relevanten Kinetiken auf der sub-100-ps-Zeitskala ablaufen. Alle Absorptionzunahmen erstrecken sich über einen Zeitbereich

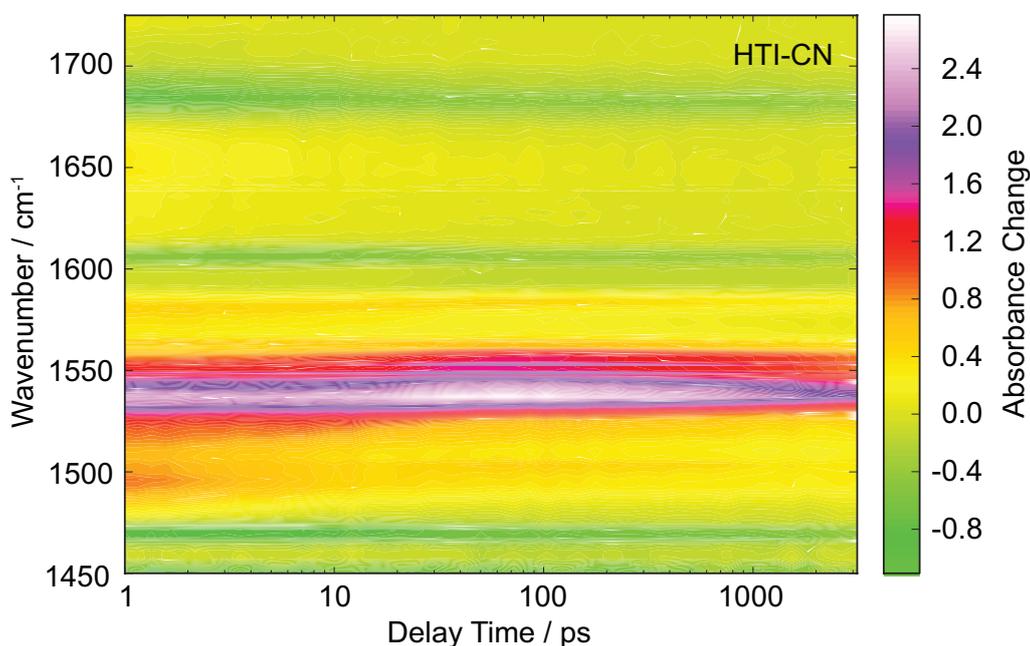


Abbildung 4.8: Transiente Absorptionsänderungen der photochemischen Isomerisierung des Nitril-substituierten HTI-Chromophors nach Anregung des Z-Isomers mit 400nm. Die induzierte Absorptionsänderung ist farblich kodiert dargestellt.

von 4–80 ps. Diese positiven LDAC-Signale sind genau dort zu beobachten, wo OMe-HTI auch im stationären Zustand Absorptionsbanden zeigt (vgl. Abbildung 4.5). Dies ist im Bereich der Amid I Bande bei 1672 cm^{-1} , im Bereich der aromatischen und olefinischen Doppelbindungen bei $1550\text{--}1615\text{ cm}^{-1}$ und bei 1510 cm^{-1} sowie bei 1470 cm^{-1} der Fall. Starke Absorptionsabnahmen treten im Bereich $1480\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$ zwischen 1 ps und 80 ps auf.

Aus Abbildung 4.9 c) zeigt sich, dass sich die Kinetiken beim Nitril-substituierten HTI bis in den ns-Bereich erstrecken. Im Bereich zwischen $1480\text{--}1560\text{ cm}^{-1}$ ist das LDAC-Signal durch eine Abnahme der Absorption dominiert. Diese Signatur erstreckt sich von 1 ps bis 10 ps bei 1490 cm^{-1} . Bei 20 ps zeigt sich ein Maximum bei 1520 cm^{-1} . Zwischen 200 ps und 3 ns ist eine breite Absorptionsabnahme zu erkennen, die sich von 1530 cm^{-1} bis 1560 cm^{-1} erstreckt. Im Bereich von 1 ps tritt bei 1650 cm^{-1} und 1450 cm^{-1} Absorptionsabnahmen und bei 1540 cm^{-1} eine Absorptionszunahme auf. Bei 1690 cm^{-1} zeigt sich eine Absorptionsabnahme, die sich von 2-20 ps erstreckt. Bei 20 ps zeigen sich im Bereich der C=C-Schwingungen sowie bei 1470 cm^{-1} zeitlich gut lokalisierte LDAC-Signale.

Sind die mit der LDAC-Methode gewonnenen Signaturen der Absorptionsänderungen zeitlich gut lokalisiert, ist davon auszugehen, dass sich die im Experiment beobachte-

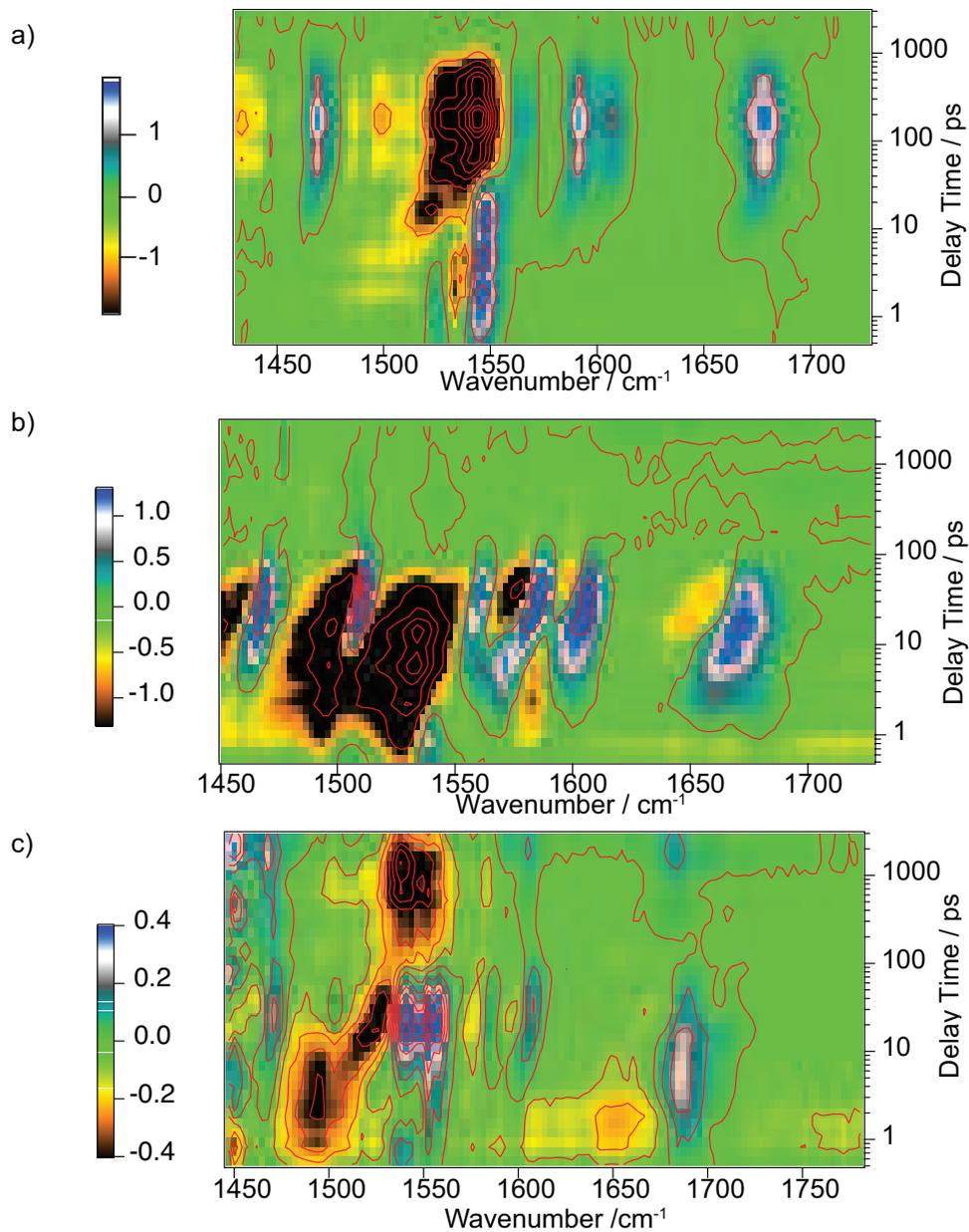


Abbildung 4.9: LDAC-Auswertung der zeitaufgelösten Infrarotmessungen an den verschiedenen HTI-Chromophoren. Die Amplitude des LDAC-Signals ist in Falschfarben-Skalierung über der Abtastfrequenz und der Verzögerungszeit aufgetragen. a: H; b: OMe; c: CN.

te Kinetik gut durch ein exponentielles Reaktionsmodell beschreiben lässt. Dies sollte etwa beim unsubstituierten HTI bei den LDAC-Signaturen im Bereich von 200ps der Fall sein. Erstreckt sich das LDAC-Signal über einen weiteren Zeitbereich ist hinge-

gen nicht zu erwarten, dass sich die Kinetik gut mit einem exponentiellen Modell beschreiben lässt. Dies ist im beim unsubstituierten HTI-Chromophor im Frequenzbereich $1520\text{--}1555\text{ cm}^{-1}$, beim OMe-HTI genauso wie beim CN-HTI bei nahezu allen LDAC-Signaturen der Fall.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass alle drei untersuchten Stoffsysteme im Bereich 1-20 ps zeitlich unscharfe LDAC-Signaturen aufweisen. Sowohl beim unsubstituierten als auch beim Methoxy-substituierten HTI-Chromophor treten im LDAC-Signal Zunahmen der Absorption zeitgleich auf (H: 200 ps, OMe: 4–80 ps). Diese Absorptionzunahmen liegen in Frequenzbereichen, in denen das jeweilige Stoffsystem auch eine signifikante stationäre Absorption aufweist. Beim Nitril-substituierten tritt eine solche Signatur hingegen nicht auf.

Multiexponentielle Datenanpassung

Die in den Abbildungen 4.6–4.8 gezeigten transienten Absorptionsänderungen wurden jeweils mit einem multiexponentiellen Reaktionsmodell angepasst. Die experimentell ermittelten Daten konnten unter Verwendung von fünf Zeitkonstanten durch das multiexponentielle Modell approximiert werden. In Tabelle 4.2 sind die gefundenen Zeitkonstanten für die drei untersuchten HTI-Chromophore aufgeführt. Zum direkten Vergleich sind auch die in der Untersuchung im sichtbaren Spektralbereich gefundenen Zeitkonstanten aus [Cor08a] aufgeführt. Die fünfte Zeitkonstante τ_5 wurde bei der Datenanpassung jeweils unendlich groß gewählt ($\tau_5 = \infty$), so dass sie die Produktbildung, also die Absorptionsdifferenz zwischen dem Z- und dem E-Isomer, beschreibt. Im Fall des unsubstituierten und des Methoxy-substituierten HTI-Chromophors wurde die Zeitkonstante τ_4 jeweils auf dem Wert $\tau_4 = 800\text{ ps}$ festgehalten.

In den Abbildungen 4.10–4.12 sind jeweils transiente Absorptionsänderungen wie sie im Experiment zu verschiedenen Verzögerungszeiten gemessen werden dargestellt. In den

Substituent	IR				Vis	
	τ_1	τ_2	τ_3	τ_4	$\tau_{1,\text{vis}}$	$\tau_{2,\text{vis}}$
Wasserstoff (p-H)	1.8 ps	18.4 ps	192.9 ps	800 ps	30 ps	216 ps
Methoxy (p-OMe)	6.1 ps	8.7 ps	16.4 ps	800 ps	5.2 ps	11.8 ps
Nitril (p-CN)	3.1 ps	23.4 ps	220 ps	2815 ps	72 ps	2650 ps

Tabelle 4.2: Zusammenstellung der Zeitkonstanten der Infrarot-Dynamik der HTI-Chromophore. Bei der Datenanpassung wurde bei allen Systemen eine fünfte Zeitkonstante ($\tau_5 = \infty$) verwendet, die die Produktbildung modelliert. Die beiden rechten Spalten beinhalten die in [Cor08a] gefundenen Zeitkonstanten des Absorptionsexperiments im sichtbaren Spektralbereich (vgl. Tabelle 4.1).

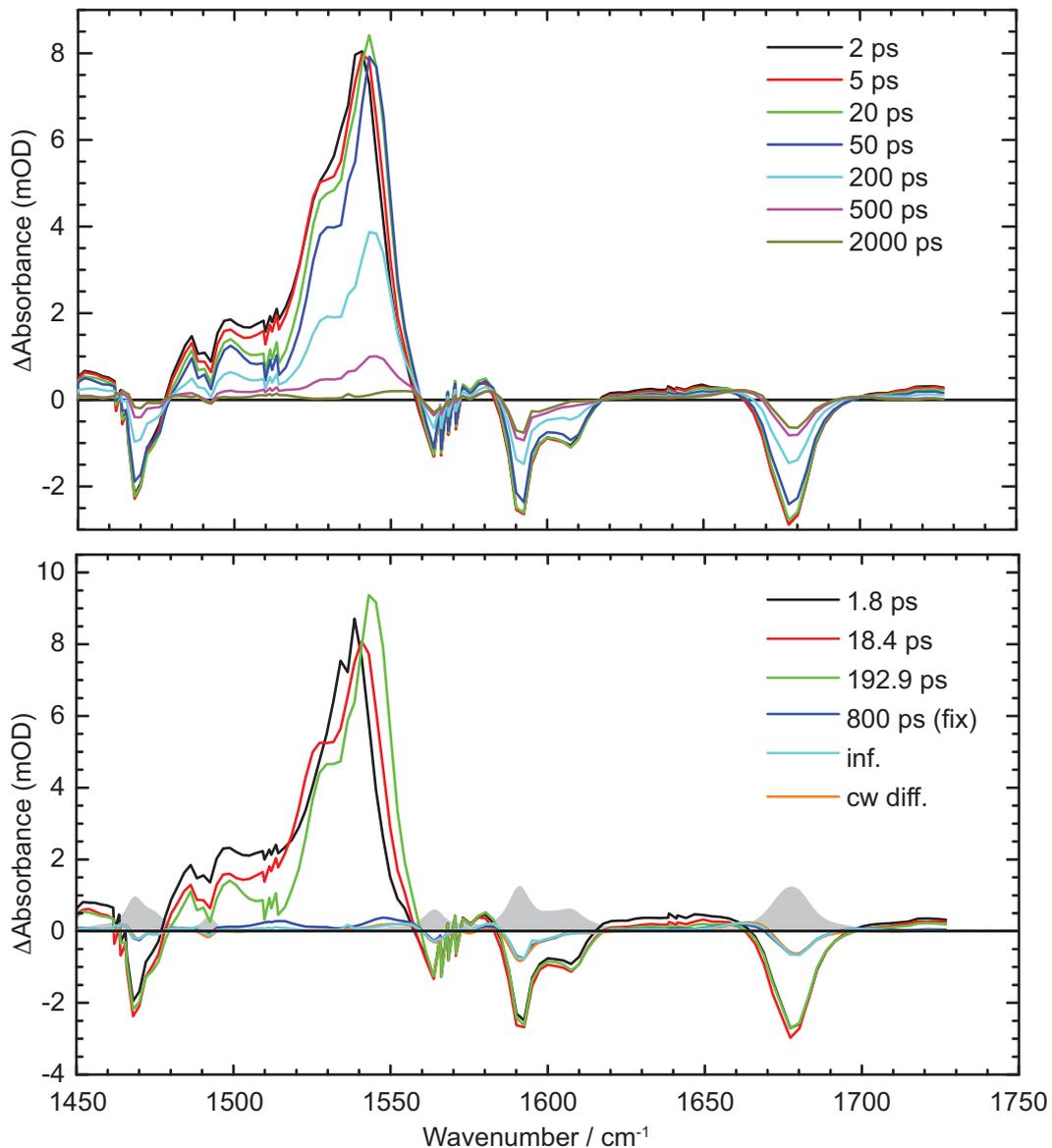


Abbildung 4.10: Daten des unsubstituierten HTI-Chromophors. Oben: Transiente Absorptionsänderungen zu den angegebenen Verzögerungszeiten. Unten: Aus den Fit-Amplituden unter Annahme eines sequentiellen Zerfalls berechnete Differenzspektren der Intermediate. Das Absorptionsspektrum des Z-Isomers ist grau hinterlegt und mit der gleichen Skalierung wie das stationäre Differenzspektrum des E-Isomers (orange) eingezeichnet (vgl. Abbildung 4.5).

unteren Hälften dieser Abbildungen sind die aus den Fit-Amplituden unter Annahme eines sequentiellen Zerfalls berechneten Differenzspektren der intermediären Zustände aufgetragen. Neben den berechneten Spektren finden sich hier auch die stationären Dif-

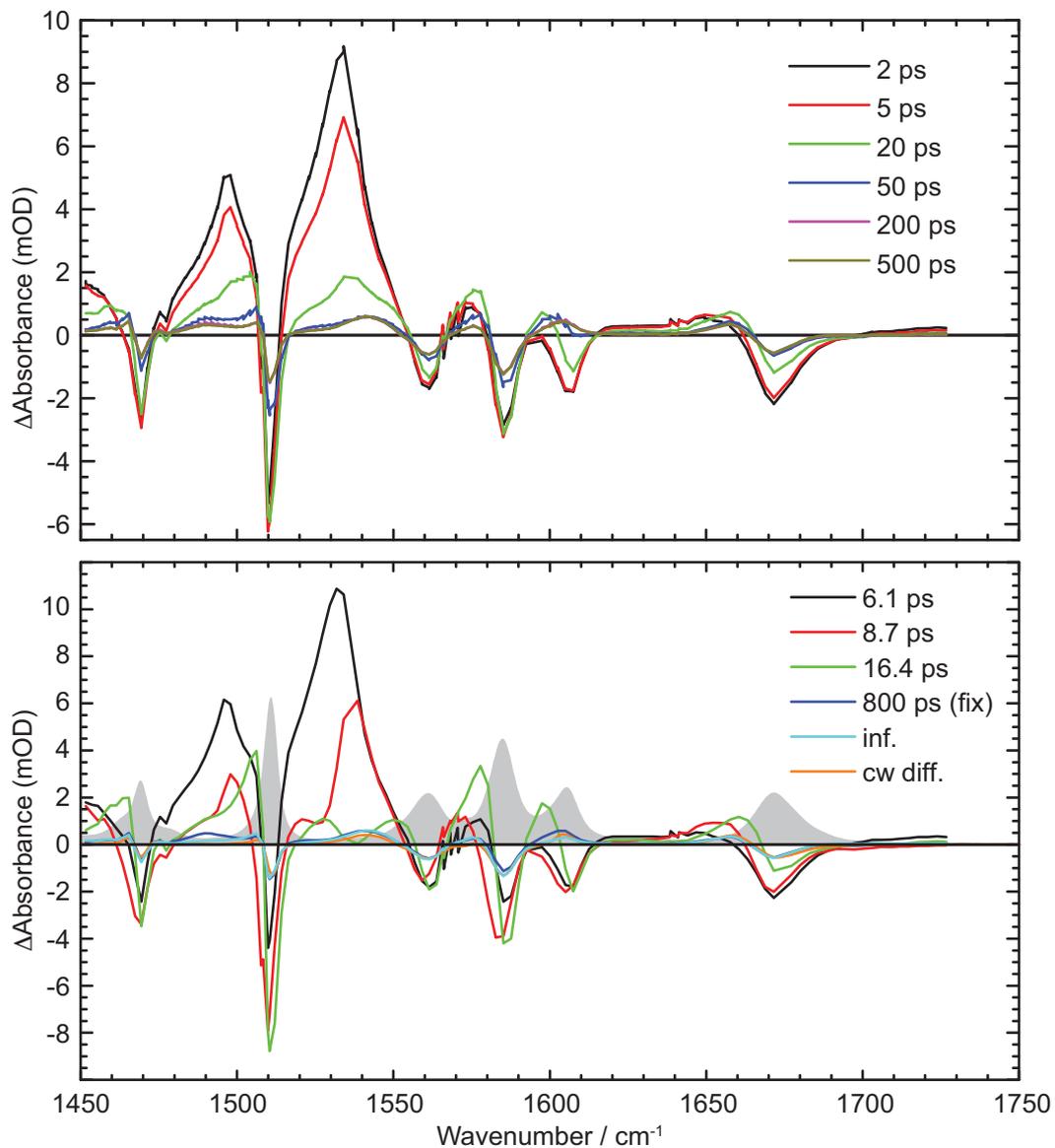


Abbildung 4.11: Daten des methoxysubstituierten HTI-Chromophors. Oben: Transiente Absorptionsänderungen zu den angegebenen Verzögerungszeiten. Unten: Aus den Fit-Amplituden unter Annahme eines sequentiellen Zerfalls berechnete Differenzspektren der Intermediate. Das Absorptionsspektrum des Z-Isomers ist grau hinterlegt und mit der gleichen Skalierung wie das stationäre Differenzspektrum des E-Isomers (orange) eingezeichnet (vgl. Abbildung 4.5).

ferenzspektren des E-Isomers sowie das Absorptionsspektrum des Z-Isomers. Die stationären Differenzspektren sind jeweils so skaliert, dass sie möglichst gut mit dem zur Zeitkonstante $\tau_5 = \infty$ gehörenden intermediären Zustand übereinstimmen. Das Absorp-

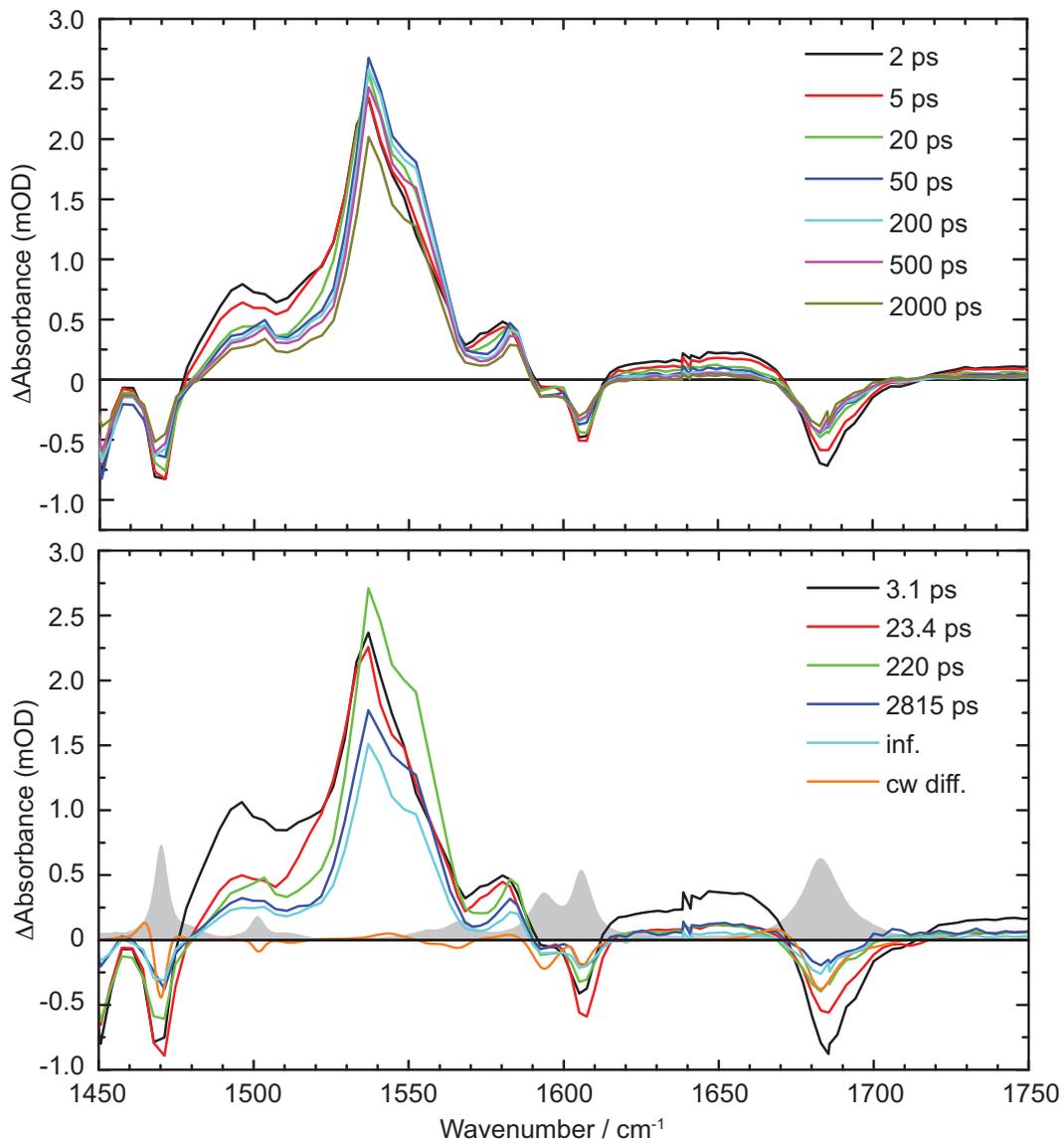


Abbildung 4.12: Daten des nitrilsubstituierten HTI-Chromophors. Oben: Transiente Absorptionsänderungen zu den angegebenen Verzögerungszeiten. Unten: Aus den Fit-Amplituden unter Annahme eines sequentiellen Zerfalls berechnete Differenzspektren der Intermediate. Das Absorptionsspektrum des Z-Isomers ist grau hinterlegt und mit der gleichen Skalierung wie das stationäre Differenzspektrum des E-Isomers (orange) eingezeichnet (vgl. Abbildung 4.5).

tionsspektrum des Z-Isomers ist bei allen drei Abbildungen mit der gleichen Skalierung wie das stationäre Differenzspektrum eingetragen (vgl. Abbildung 4.5). Die zerfallsassoziierten Spektren sind in Anhang B.1.1 dargestellt.

In den Abbildungen 4.10–4.12 treten sowohl in den Messdaten, als auch in den daraus

berechneten Differenzspektren der Intermediate Bereiche auf, in denen das Signal eine deutliche regelmäßige und spektral begrenzte Signatur aufweist (OMe: 1568cm^{-1} , 1632cm^{-1} ; H: 1512cm^{-1} , 1568cm^{-1} , 1632cm^{-1} ; CN: 1632cm^{-1}). Diese Signaturen befinden sich gerade an den Überlappbereichen der Einzelmessungen und rühren von der Verknüpfung der Messbereiche her. Sie haben keine physikalische Bedeutung.

Die zu den Zerfallszeiten τ_1 , τ_2 und τ_3 des unsubstituierten HTI-Chromophors gehörenden Differenzspektren der intermediären Zustände zeigen außerhalb des Bereichs $1480\text{--}1560\text{cm}^{-1}$ nur geringe Unterschiede (vgl. Abbildung 4.10). Innerhalb dieses Frequenzbereichs tritt eine Blauverschiebung einer ausgeprägten Bande um 1540cm^{-1} auf. Diese Blauverschiebung ist bereits in den transienten Absorptionsänderungen (Abbildung 4.10 oben) beziehungsweise in Abbildung 4.6 zu erkennen. Zwischen 1480cm^{-1} und 1520cm^{-1} zeigt sich eine Schulter, die mit τ_1 eher an ihrer niederfrequenten Seite mit τ_2 bei 1515cm^{-1} zerfällt. Die Strukturen im Bereich $1480\text{--}1560\text{cm}^{-1}$ zerfallen bis auf eine vergleichsweise schwache breite Absorptionsänderung mit der Zeitkonstanten $\tau_3 = 192.3\text{ps}$. Zeitgleich relaxiert das Ausbleichen der Banden außerhalb des Bereichs $1480\text{--}1560\text{cm}^{-1}$ bis hauptsächlich die stationäre Absorptionsdifferenz des E-Isomers sichtbar bleibt. Mit der Zeitkonstante $\tau_4 = 800\text{ps}$ zerfallen im Wesentlichen zwei schwache Banden bei 1515cm^{-1} und bei 1550cm^{-1} . Das Differenzspektrum des zur Zeitkonstanten $\tau_5 = \infty$ gehörigen Zustands und das stationäre Differenzspektrum des E-Isomers sind nahezu deckungsgleich. Da das Absorptionsspektrum des Z-Isomers die gleiche Skalierung aufweist wie das Differenzspektrum des E-Isomers sind seine Amplituden direkt mit den Amplituden der Differenzspektren der intermediären Zustände vergleichbar. Beim Vergleich der Amplituden fällt auf, dass die Ausbleichsignale der Zeitkonstanten τ_1 , τ_2 und τ_3 im Betrag etwa doppelt so groß sind wie die eingezeichnete Absorption des Z-Isomers.

Die Differenzspektren der intermediären Zustände des Methoxy-substituierten Chromophors weisen eine sehr komplexe Struktur auf (vgl. 4.11). Das zur Zeitkonstante $\tau_1 = 6.1\text{ps}$ gehörige Differenzspektrum zeigt eine breite Absorptionzunahme im Bereich zwischen 1475cm^{-1} und 1550cm^{-1} . Sie ist bei 1510cm^{-1} von einer Ausbleichbande überlagert. In allen Frequenzbereichen, in denen das Z-Isomer eine signifikante Absorption zeigt tritt in diesem intermediären Zustand ein Ausbleichen auf. Ausnahmen hiervon bilden lediglich die Bereiche unterhalb von 1464cm^{-1} und $1570\text{--}1582\text{cm}^{-1}$. Das zu $\tau_2 = 8.7\text{ps}$ gehörige Differenzspektrum zeigt, dass sich die breite induzierte Absorption bei $1475\text{--}1550\text{cm}^{-1}$ auf ihrer niederfrequenten Seite bereits signifikant abgebaut hat. Dementsprechend steigt das Ausbleichsignal bei 1510cm^{-1} an. Die Erhöhung der Signalamplituden und die Frequenzverschiebungen zwischen den einzelnen intermediären Differenzspektren im Bereich der C=C-Banden zwischen 1555cm^{-1} und 1620cm^{-1} sind in den transienten Differenzspektren nicht zu erkennen, weshalb hier davon ausgegan-

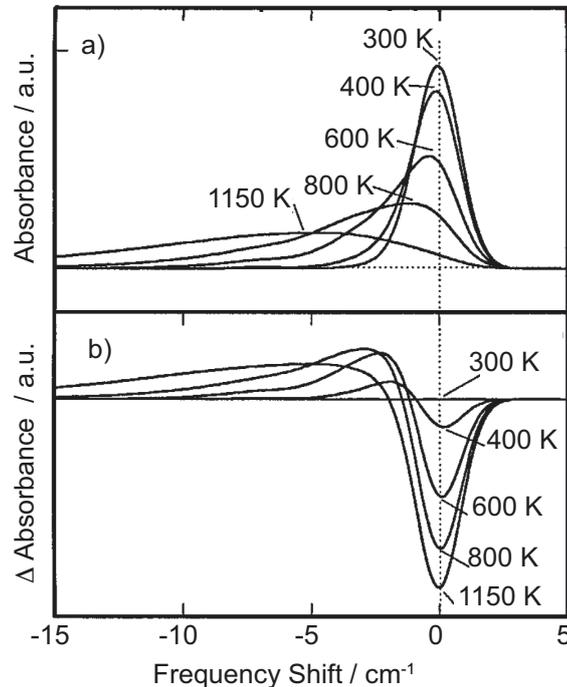


Abbildung 4.13: Simulierte Bandenform der ν_{19} -Schwingungsmode des Benzols in Abhängigkeit von der Temperatur gemäß den Anharmonizitäten in [Mas92]. a: IR-Absorption $A(T)$ in Abhängigkeit der Temperatur. b: Differenzspektren gegenüber Zimmertemperatur $\Delta A(T) = A(T) - A(300\text{K})$. Abbildung nach [Ham97].

gen wird, dass das verwendete exponentielle Modell die Kinetik in diesem Bereich nicht zufriedenstellend beschreibt. Bis auf kleine Abweichungen gibt das zur Zeitkonstante $\tau_4 = 800\text{ps}$ gehörende Differenzspektrum bereits das stationäre Differenzspektrum des E-Isomers wieder. Dies ist im Rahmen der Messgenauigkeit deckungsgleich mit dem zur Zeitkonstante $\tau_5 = \infty$ gehörigen Differenzspektrum. Wie bereits beim unsubstituierten HTI-Chromophor diskutiert sind also die Amplituden der dargestellten Differenzspektren mit der Amplitude des in Abbildung 4.11 grau hinterlegten Absorptionsspektrum des Methoxy-substituierten HTI vergleichbar. Die Ausbleichsignale zu frühen Verzögerungszeiten haben vom Betrag her etwa die gleiche Amplitude wie die Absorption des Z-Isomers.

Im Bereich der aromatischen Ketogruppe zwischen 1640cm^{-1} und 1690cm^{-1} zeigt Abbildung 4.11 eine sigmoidale Struktur, wie sie für Abkühlvorgänge typisch ist [Ham97, Sch08]. In Abbildung 4.13 ist die simulierte Bandenform der ν_{19} -Schwingungsmode des Benzols in Abhängigkeit von der Temperatur gemäß den Anharmonizitäten in [Mas92]

nach [Ham97] dargestellt. Der Vergleich der beiden Abbildungen zeigt eine gute qualitative Übereinstimmung der Kurvenformen. Daher liegt es nahe, dass diese spektrale Signatur tatsächlich von einer Abkühlung des Methoxy-substituierten HTI-Chromophors herrührt. Eine Anpassung des experimentell beobachteten Abkühlvorgangs durch die in [Ham97] dargestellte Theorie würde die Kenntnis der Anharmonizitäten der Schwingungsmode der aromatischen Ketogruppe des OMe-HTI voraussetzen. Da diese Anharmonizitäten aber nicht bekannt sind muss die Diskussion des Abkühlvorgangs qualitativ bleiben.

Bei den in Abbildung 4.12 dargestellten transienten Differenzspektren ändern sich die Bandenformen beim Nitril-substituierten HTI-Chromophor über den beobachteten Zeitbereich kaum. Wie man im Vergleich der zu den Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 gehörenden Differenzspektren der Intermediate erkennen kann ist eine deutliche Abnahme der induzierten Absorption bei $1480\text{--}1520\text{cm}^{-1}$ mit der Zerfallszeit $\tau_1 = 3.1\text{ ps}$ zu beobachten. Mit der selben Zeitkonstante zerfällt eine induzierte Absorption bei $1610\text{--}1750\text{cm}^{-1}$. Im Bereich $1535\text{--}1566\text{cm}^{-1}$ steigt die induzierte Absorption zunächst mit der Zeitkonstanten $\tau_3 = 23.4\text{ ps}$ an, bevor sie zerfällt. Das Ausbleichsignal im Bereich der aromatischen Ketogruppe (1672cm^{-1}) und die induzierte Absorption (1538cm^{-1}) ändert sich in den experimentellen Daten ab 200 ps im Vergleich zu den intermediären Spektren deutlich weniger. Deshalb ist davon auszugehen, dass das verwendete multiexponentielle Modell die Kinetik hier nur unbefriedigend beschreibt. Daher ist die physikalische Relevanz der intermediären Differenzspektren in diesen Bereichen anzuzweifeln. Der Vergleich mit dem stationären Differenzspektrum des E-Isomers zeigt deutlich, dass die Isomerisierung des Nitril-substituierten HTI-Chromophors auch bei der größten experimentell erreichbaren Verzögerungszeit von 3 ns noch nicht abgeschlossen ist. Daher kann dieses stationäre Differenzspektrum nicht so skaliert werden, dass es direkt mit den Differenzspektren der intermediären Zustände vergleichbar ist. Somit sind auch die Amplituden des in Abbildung 4.12 grau hinterlegten Absorptionsspektrums des E-Isomers von CN-HTI nicht vergleichbar.

In Abbildung 4.14 a) sind die transienten Absorptionsänderungen bei einer Abtastfrequenz von 1540cm^{-1} für alle drei untersuchten HTI-Chromophore dargestellt. Hier zeigt sich eine induzierte Absorption (ESA). Im Fall des Methoxy-Substituenten ist nach einer Verzögerungszeit von etwa 50 ps eine konstante Absorptionsänderung zu erkennen. Hier manifestiert sich die Absorptionsdifferenz zwischen dem Z- und E-Isomer (vgl. Abbildung 4.5 b) und damit der Abschluss der Photoisomerisation 50 ps nach Anregung bei 400 nm . Beim unsubstituierten HTI-Chromophor zerfällt die induzierte Absorption mit der Zeitkonstante $\tau_3 = 192.2\text{ ps}$. Auch hier sieht man zu langen Verzögerungszeiten eine konstante Absorptionsdifferenz, die den Abschluss der Photoisomerisation kennzeich-

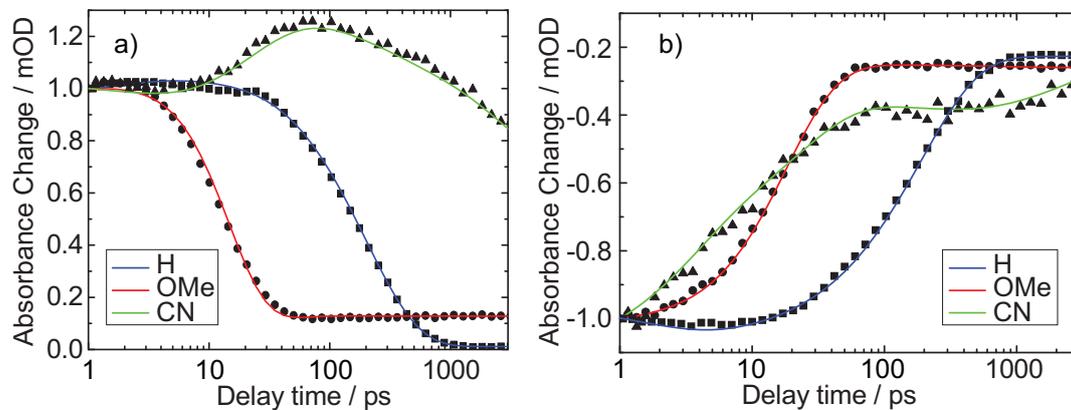


Abbildung 4.14: Vergleich der verschiedenen para-substituierten HTI-Moleküle durch zeitaufgelöste IR-Absorptionsexperimente. Es ist die Absorptionsänderung gegenüber der Verzögerungszeit bei der nachfolgend angegebenen Abtastfrequenz aufgetragen. a: $\nu_{\text{pr}} = 1540 \text{ cm}^{-1}$, b: H: $\nu_{\text{pr}} = 1677 \text{ cm}^{-1}$; OMe: $\nu_{\text{pr}} = 1671 \text{ cm}^{-1}$; CN: $\nu_{\text{pr}} = 1690 \text{ cm}^{-1}$. Die Daten (Einzelpunkte) sind zusammen mit ihren Fitfunktionen dargestellt (durchgezogene Linien) und bei der Verzögerungszeit $t_D = 1 \text{ ps}$ auf 1 beziehungsweise -1 normiert.

net. Wie bereits in den Abbildungen 4.8 und 4.12 zu erkennen war, steigt das induzierte Absorptionssignal bei der Nitril-Substitution zunächst an. Das Maximum der ESA liegt bei 80 ps , bei größeren Verzögerungszeiten nimmt die induzierte Absorption monoton ab. Auch nach der Verzögerungszeit von 1 ns ist beim CN-HTI noch eine deutliche Relaxationsdynamik zu erkennen.

Abbildung 4.14 b) zeigt die transienten Absorptionsänderungen im jeweiligen Absorptionsmaximum des aromatischen Ketons des Thioindigos. Wie bereits in Abbildung 4.14 a) ist auch hier der Abschluss der Produktbildung des OMe-HTI nach etwa 50 ps zu erkennen. Beim unsubstituierten HTI deutet sich wie bereits in Abbildung 4.14 a) Produktbildung nach etwa 1 ns an. Bei der transienten Absorption des Nitril-substituierten Systems ist zu erkennen, dass die Absorption zwischen 70 ps und 700 ps nahezu konstant bleibt, bevor sie im ns-Bereich weiter relaxiert.

4.2.5 Diskussion

Beim unsubstituierten HTI-Chromophor relaxiert die ausgeprägte Bande um 1540 cm^{-1} nahezu vollständig und auch sämtliche Ausbleichsignale gehen mit der Zeitkonstanten $\tau_3 = 192.9 \text{ ps}$ bis auf das E-Differenzspektrum zurück. Diese dominante Änderung im IR-Absorptionssignal deutet auf signifikante Strukturänderungen im Molekül, also den Isomerisierungsprozess, hin. Die IR-Zeitkonstante τ_3 ist sehr gut vergleichbar mit der

im Vis-Experiment gefundenen Zeitkonstante $\tau_{2,\text{vis}} = 216$ ps. Diese Zeitkonstante konnte dem Zerfall des CTC-Zustandes zugeordnet werden [Cor07, Cor08a], was sich mit dem hier diskutierten Ergebnis des IR-Experiments deckt. Die Isomerisierungs-Zeitkonstante war bereits im LDAC-Signal (vgl. Abbildung 4.9) als zeitlich relativ gut lokalisierte Absorptionsabnahme zu erkennen. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass sich das Signal des H-HTI zwischen 30 ps und 1 ns sehr gut durch das multiexponentielle Modell anpassen lässt (vgl. Abbildung 4.14), hier also tatsächlich ein exponentieller Signalzerfall stattfindet.

Wie beim unsubstituierten HTI gehen auch beim OMe-HTI die Ausbleichsignale mit der Relaxationszeit τ_3 nahezu bis zum E-Differenzspektrum zurück. Im Bereich $1480\text{--}1560\text{cm}^{-1}$ relaxiert die induzierte Absorption fast vollständig bis auf das E-Differenzspektrum ebenfalls mit der Zeitkonstanten $\tau_3 = 16.4$ ps. Diese Zeitkonstante ist auch hier wieder mit der Vis-Relaxationszeit $\tau_{2,\text{vis}} = 11.8$ ps des CTC-Zustandes vergleichbar. Die Isomerisierung findet beim Methoxy-substituierten HTI-Chromophor also mit τ_3 statt.

Im Bereich zwischen 1640cm^{-1} und 1690cm^{-1} findet sich, wie zuvor bereits erwähnt, die spektrale Signatur eines Abkühlvorgangs [Ham97, Sch08]. Dieser Abkühlvorgang wird im multiexponentiellen Modell mit den Zeitkonstanten $\tau_1 = 6.1$ ps und $\tau_2 = 8.7$ ps modelliert. Multiexponentielle Zerfallsmodelle können Abkühlvorgänge nicht zufriedenstellend beschreiben. Die gefundenen Zeitkonstanten können aber einen Hinweis auf die Zeitskala geben, auf der die Abgabe der durch den Pumpprozess zugeführten Energie an das Lösungsmittel stattfindet. Auf der selben Zeitskala deutet sich eine Blauverschiebung der induzierten Absorptionen an. In der Regel kommt es bei Erniedrigung der Molekültemperatur und damit der Erniedrigung der Besetzung höherer Schwingungsniveaus zu einer Blauverschiebung der Absorptionsbande [Her90].

Wie in den letzten beiden Abschnitten diskutiert wurde, findet die Abkühlung des photoangeregten Methoxy-substituierten HTI also in der selben zeitlichen Größenordnung statt, wie seine Isomerisierung. Die Zeitkonstante τ_3 könnte neben der Z→E-Isomerisierung also auch noch vom Abkühlprozess beeinflusst sein. Das Molekül relaxiert mit der Zeitkonstanten τ_3 also von einem heißen angeregten Zustand in den Grundzustand.

Die Moleküllkonzentrationen, die Schichtdicken der Probe, die Anregungsintensität sowie das Lösungsmittel wurden im Experiment bei allen drei Proben jeweils gleich gewählt. Da die Absorptionskoeffizienten bei der Anregungswellenlänge von 400 nm ähnlich sind, sind auch die durch den Pumpimpuls in der Probe deponierten Energien vergleichbar. Alle drei Systeme befinden sich direkt nach der Anregung in einem Zustand mit vibronischer Überschussenergie. Dies ermöglicht erste Bewegungen im S_1 . Sowohl beim H-HTI als auch beim CN-HTI ist in den experimentellen Daten eine Blauverschiebung der ESA-Bande um 1540cm^{-1} innerhalb 100 ps nach Anregung zu erkennen (vgl. Abbil-

dungen 4.6, 4.8, 4.10, 4.12). Diese Blauverschiebung findet also im gleichen Zeitbereich statt wie der Abkühlvorgang des OMe-HTI, dessen Signatur sich wie oben ausgeführt deutlich zeigt. Daher ist es anzunehmen, dass sich beim unsubstituierten wie beim Nitril-substituierten HTI-Chromophor bei Verzögerungszeiten 1-100 ps ein Abkühlen des elektronisch angeregten Zustands im IR-Absorptionssignal zeigt. Diese Vermutung wird auch dadurch gestützt, dass sich in diesem Zeitbereich bei allen drei Stoffsystemen zeitlich ausgedehnte LDAC-Signaturen finden (vgl. Abbildung 4.9). Dass sich die in Abbildung 4.14 dargestellten Zeitverläufe der Absorptionen in diesem Zeitbereich bei H-HTI und CN-HTI nur unbefriedigend durch das multiexponentielle Modell anpassen lassen, ist ein weiteres Indiz für einen nicht-exponentiellen Prozess wie er z.B. bei einem Abkühlvorgang vorliegt.

Wie in Abbildung 4.12 oben zu erkennen ist, ändert sich die Bandenform des IR-Absorptionssignals des Nitril-substituierten HTI im experimentell beobachteten Zeitbereich von 1 ps bis 3 ns nicht wesentlich. Es findet also weder eine vollständige Relaxation des Ausbleichsignals bei 1540 cm^{-1} noch eine Reduktion des Ausbleichsignals auf das Differenzspektrum des E-Isomers statt. Daher scheint es unwahrscheinlich, dass bei diesem Stoffsystem im Experiment bereits der Z→E-Isomerisierungsprozess sichtbar ist. Neben dem oben diskutierten Abkühlprozess könnten hier zum Isomerisierungsprozess konkurrierende Relaxationsprozesse stattfinden. Die wesentlichen Prozesse weisen, wie sich bereits bei der LDAC-Auswertung (vgl. Abbildung 4.9) angedeutet hat, offensichtlich einen nicht exponentiellen Charakter auf. Daher ist es nicht verwunderlich, dass sich die in der Vis-Auswertung gefundenen Zeitkonstanten von den Zeitkonstanten der IR-Auswertung beim CN-HTI unterscheiden.

Wie in Abschnitt 3.5 ausgeführt wurde, kann τ_4 beim unsubstituierten und beim Methoxy-substituierten HTI-Chromophor als Spannungsrelaxation der Molekülgruppen und ihrer Umgebung im elektronischen Grundzustand interpretiert werden.

In den Abbildungen 4.10, 4.11 und 4.12 sind in der unteren Bildhälfte neben den Differenzspektren der Intermediate die stationären Differenzspektren zwischen dem E- und dem Z-Isomer orange dargestellt. Die stationären Differenzspektren sind so skaliert, dass sie möglichst gut mit dem intermediären Spektrum zur Zerfallszeit $\tau_5 = \infty$ übereinstimmen. Das Amplitudenverhältnis zwischen dem eingezeichneten stationären Differenzspektrum und dem jeweils grau hinterlegten stationären Absorptionsspektrum des Z-Isomers entspricht genau dem in Abbildung 4.5. Geht man davon aus, dass die Isomerisierungsreaktion innerhalb des Beobachtungszeitraums abgeschlossen ist, entspricht das intermediäre Spektrum zur Zerfallszeit $\tau_5 = \infty$ tatsächlich genau dem stationären Differenzspektrum. Durch die gewählte Skalierung der stationären Spektren kann man nun ihre Amplituden direkt mit den Amplituden der intermediären Spektren vergleichen. Ein Ver-

gleich der Amplitude des stationären Absorptionsspektrums mit dem Ausbleichsignal des τ_1 -Intermediats erlaubt daher etwa Aussagen über die Quantenausbeute der Photoisomerisation. Betrachtungen dieser Art werden im Folgenden diskutiert.

Die Ausbleichsignale zu frühen Verzögerungszeiten weisen beim unsubstituierten HTI ein Verhältnis von ca. 2 : 1 zur Absorption des Z-Isomers auf. Bei der Methoxy-Substitution ist dieses Verhältnis etwa 1 : 1. Im Fall der Nitril-Substitution lässt sich dieses Verhältnis nicht angeben. Da der im Experiment sichtbare Relaxationsprozess hier aber bei weitem noch nicht abgeschlossen ist, ist anzunehmen, dass für das cw-Differenzspektrum eine deutlich kleinere Skalierung nötig wäre, als sie in Abbildung 4.12 gewählt wurde. Das Verhältnis der Amplituden der IR-Ausbleichsignale zur Absorption des Z-Isomers liegt also vermutlich noch über dem des unsubstituierten HTI-Chromophors.

Geht die gesamte Anzahl der durch den Pumpimpuls angeregten Moleküle vom Z-Isomer in das E-Isomer über, ist zu erwarten, dass das Verhältnis zwischen den Amplituden der Ausbleichsignale und dem stationären Absorptionsspektrum kleiner oder gleich 1 : 1 ist. Ist dieses Verhältnis hingegen größer, könnte es sein, dass ein Teil der photoangeregten Moleküle nicht isomerisieren, sondern wieder in den Grundzustand des Z-Isomers übergehen. Unter dieser Annahme würde also die gesamte Anzahl der angeregten OMe-HTI-Moleküle und etwa die Hälfte der angeregten unsubstituierten HTI-Moleküle isomerisieren. Der Anteil der isomerisierenden CN-substituierten Moleküle wäre nach obiger Abschätzung noch geringer.

Aus dem Anstieg der Relaxationszeiten von OMe-HTI über H-HTI bis zum CN-HTI wurde in [Cor07, Cor08a] gefolgert, dass die Energiebarriere die zur Isomerisierung überwunden werden muss von OMe-HTI bis CN-HTI ansteigt. Ein solcher Anstieg der Energiebarriere würde auch die hier vermuteten Isomerisierungsraten unterstützen. Auch in [Cor08a] wurde die Möglichkeit diskutiert, dass der Relaxationsprozess des Nitril-substituierten HTI-Chromophors von den anderen Chromophoren abweicht. Die hier beschriebene Vermutung unterstützt diese These. Statt der Z→E-Isomerisierung ist experimentell vermutlich die Relaxation des Moleküls in den Z-Grundzustand zu detektieren. Diese These könnte bestätigt werden, wenn die experimentell erreichbaren Zeitverzögerungen so weit in den ns-Bereich ausgedehnt würden, dass das Nitril-substituierte HTI-Chromophor innerhalb des Beobachtungszeitraums vollständig relaxieren kann.

Eine weitere Erklärung für den Unterschied der Amplitudenverhältnisse der stationären Absorptionsspektren und der Ausbleichsignale zwischen den untersuchten HTI-Chromophoren beruht auf der Besetzung von Triplett-Zuständen. Diese können durch Interkombination (ISC) aus dem angeregten Singulett-Zustand besetzt werden. Aufgrund des Spinverbotenen Übergangs weisen sie vergleichsweise lange Lebensdauern auf [Sch08].

Zusammenfassung

Die oben diskutierten Thesen sind nachfolgend zusammengefasst.

- Das unsubstituierte und das Methoxy-Substituierte HTI-Chromophor isomerisieren mit der Zeitkonstante τ_3 . (H-HTI: $\tau_3 = 192.9$ ps; OMe-HTI: $\tau_3 = 16.4$ ps) Diese Zeitkonstanten sind gut mit den Vis-Ergebnissen vergleichbar.
- Bei den drei untersuchten Stoffsystemen zeigen sich Signaturen von Abkühlvorgängen im Zeitbereich 1–100 ps. Beim Methoxy-substituierten HTI-Chromophor ist dieser Abkühlvorgang mit der Isomerisierung überlagert.
- Beim Nitril-substituierten HTI-Chromophor zeigen sich im IR-Experiment keine eindeutigen Anzeichen der Z→E-Isomerisierung.
- Durch einen Vergleich der Amplituden der Ausbleichbanden mit der cw-Absorption liegt die Vermutung nahe, dass alle photoangeregten OMe-substituierten HTI-Moleküle, etwa die Hälfte der unsubstituierten HTI-Moleküle und vermutlich weniger als die Hälfte der CN-substituierten HTI-Moleküle isomerisieren.
- Der Anteil der isomerisierenden Moleküle wird durch eine Energiebarriere bestimmt, die auch die Geschwindigkeit der Isomerisierungskinetik beeinflusst. Wie auch in [Cor07, Cor08a] vermutet, steigt die Höhe dieser Energiebarriere von OMe- über H- bis zu CN-HTI an.
- Da vermutlich nicht alle photoangeregten Moleküle tatsächlich isomerisieren, beobachtet man im transienten IR-Signal sowohl den Isomerisierungsprozess als auch eine Relaxation in den Grundzustand des Z-Isomers oder eine Besetzung von Triplett-Zuständen.
- Die Zeitkonstante τ_4 beschreibt beim OMe- und H-HTI die Spannungsrelaxation des Moleküls im elektronischen Grundzustand.

Dieses Kapitel zeigt, wie polare Substituenten in para-Position am Stilbenteil Einfluss auf die Geschwindigkeit der Z→E-Isomerisierung von HTI nehmen. In [Cor08a] ist die Substitution in para- und meta-Position sowohl am Stilben als auch am Thioindigoteil untersucht worden. Der Substituenteneffekt kann dazu genutzt werden, maßgeschneiderte HTI-Photoschalter herzustellen. Das folgende Kapitel zeigt die Verwendung zweier verschiedener HTI-Photoschalter zur Beeinflussung biologisch relevanter Modellpeptide.

Kapitel 5

Chromopeptide auf Basis der HTI ω -Aminosäure

Im Folgenden werden Untersuchungen an zwei verschiedenen Chromopeptidsystemen vorgestellt. Diese Peptidsysteme enthalten im Peptidrückgrat eine HTI ω -Aminosäure. Ziel ist es einerseits den Einfluss der Peptide auf die Isomerisierungsreaktion des HTI zu untersuchen. Andererseits sollen umgekehrt strukturelle Änderungen des Peptids durch die Isomerisierungsreaktion nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 5.1).

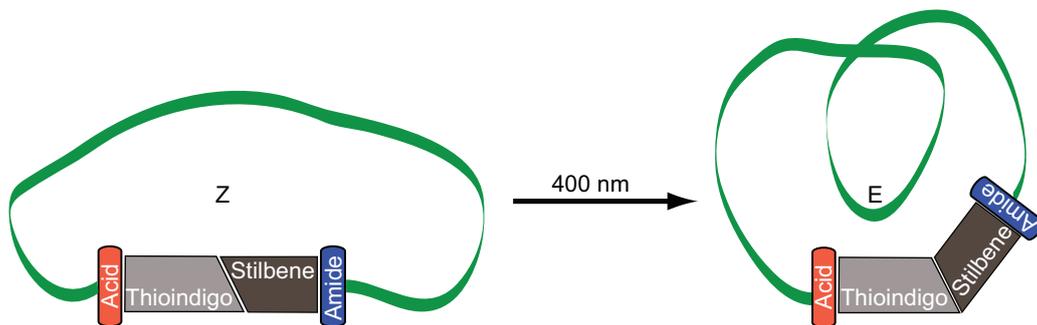


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des lichtinduzierten Faltungsprozesses der HTI-Chromopeptide. Durch Lichtanregung mit 400nm schaltet die HTI-basierte ω -Aminosäure innerhalb einiger 10ps vom Z-Isomer ins E-Isomer, was zu einer strukturellen Veränderung im angehängten Peptid führt.

Alle nachfolgend dargestellten Untersuchungen im sichtbaren und infraroten Spektralbereich wurden im deuterierten Lösungsmittel Methanol-d₄ durchgeführt. Die Absorption von Methanol-d₄ im Bereich der Amid-I-Bande ist ausreichend gering, um das Signal der Probe nicht zu überdecken. Alle stationären Infrarotspektren sind lösungsmittelkorrigiert. Dazu wurde das Spektrum des zum Lösen verwendeten Methanol-d₄ aufgenommen und vom Infrarotspektrum der gelösten Probe abgezogen. Bei den Peptidproben ist zu beobachten, dass es beim Absorptionsmaximum in der Amid-I-Bande während des Deuterierens zu einer leichten Rotverschiebung kommt. Dies ist durch den Austausch

von Protonen mit Deuteriumatomen aus dem Lösungsmittel bedingt. Dieser Austausch spielt sich auf einer Zeitskala von einigen Minuten ab. Dieser Deuterierungseffekt findet unmittelbar nach dem Lösen der Probe statt und ist zum Zeitpunkt der hier dargestellten Absorptionsexperimente vollständig abgeschlossen. Die Absorptionsspektren der hier dargestellten Peptidsysteme im sichtbaren Spektralbereich zeigen gegenüber dem reinen HTI-Photoschalter nur eine leichte Rotverschiebung und werden hier nicht explizit gezeigt.

5.1 Das lineare Peptid, para-System

Abbildung 5.2 a) zeigt die para HTI ω -Aminosäure. In para Position (grün markiert) bezogen auf den Phenylring im Stilbenteil ist eine CH_2 -Gruppe gefolgt von einer NHBoc-Schutzgruppe angebracht. Abbildung 5.2 b) zeigt den in ein lineares Peptidsystem eingebauten para Photoschalter. Die hier untersuchte HTI ω -Aminosäure unterscheidet sich von der in Kapitel 3.1 gezeigten lediglich durch die Schutzgruppe.

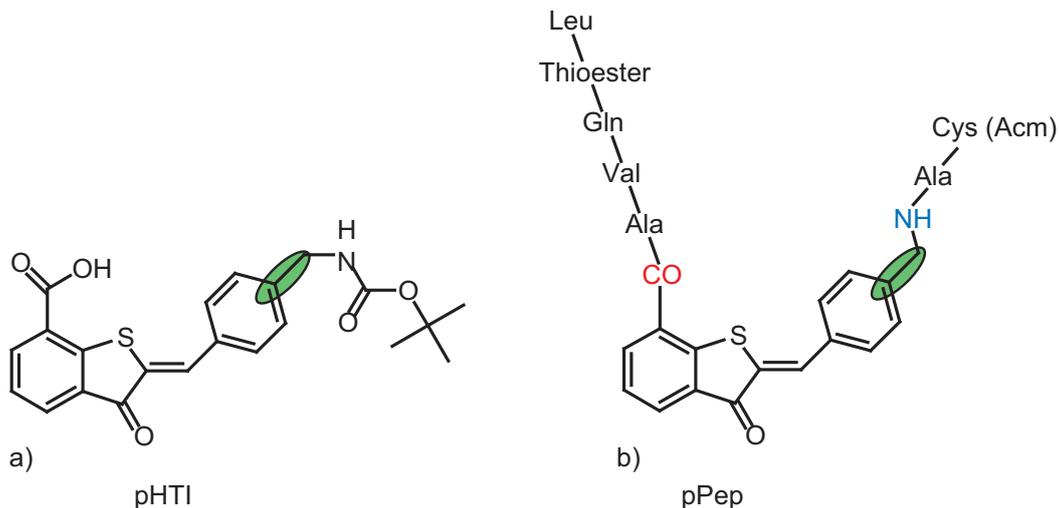


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der Struktur des para-Systems. a) Para-HTI (pHTI) Schalter mit der Schutzgruppe (NHBoc). b) Lineares Peptidsystem. Die zur Peptidbindung notwendige Gruppe ($\text{CH}_2 - \text{NH}$) ist in para Position (grün markiert) des Phenylrings im Stilbenteil angebracht.

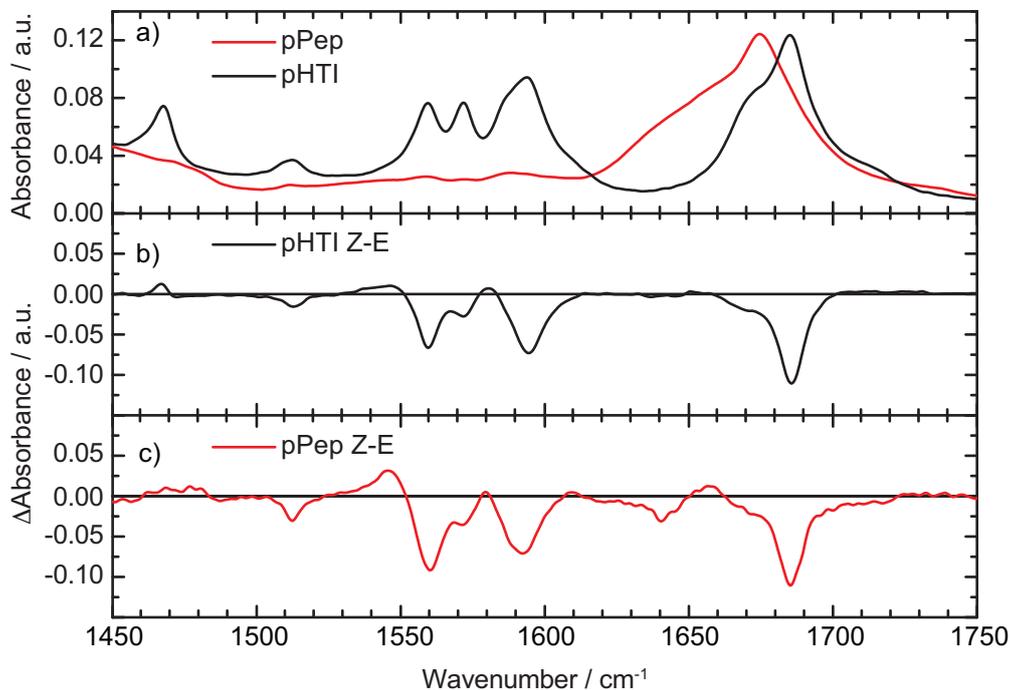


Abbildung 5.3: Stationäre Spektren des para-Systems. a: Infrarot-Absorptionsspektren der Z-Isomere; das Maximum des reinen Schalters ist auf das Maximum des Peptidspektrums normiert. b, c: Differenzspektren der Z- und E-Isomere; das Maximum der Absorptionsänderung des Peptidspektrums ist auf das Maximum der Absorptionsänderung des reinen Schalters normiert.

5.1.1 Stationäre Infrarot-Charakterisierung

Die stationären Infrarotspektren des para-Systems sind mit einem Fourier-Transform Infrarotspektrometer (FTIR, Fa. Bruker, IFs-66) aufgenommen und in Abbildung 5.3 dargestellt. Teil a) zeigt in schwarz das stationäre Spektrum des para-HTI Photoschalters und in rot das Spektrum des para-Peptidsystems.

Para-HTI Photoschalter Das stationäre Infrarotspektrum (Abbildung 5.3) des Z-Isomers zeigt Banden, die bestimmten Molekülteilen eindeutig zuzuordnen sind. Im Bereich von 1550 – 1620 cm⁻¹ finden sich Banden, welche aromatischen oder olefinischen Doppelbindungen zugeordnet werden können. Zwei stark überlappende Banden finden sich in dem für Carbonylgruppen charakteristischen Bereich 1650 – 1720 cm⁻¹. Hier überlappen die C=O-Banden der Säurefunktion, des aromatischen Ketons des Thioindigos sowie der NHBoc-Schutzgruppe.

Para-HTI Peptidsystem Die Amid-I Bande hat ihr Maximum bei 1675 cm^{-1} und eine breite Schulter bis 1625 cm^{-1} . Die sieben Aminosäuren überdecken die Absorptionsbanden des Schalters, weshalb kaum Anteile des reinen Schalters zu sehen sind. So bleibt zum Beispiel der Bereich zwischen 1500 cm^{-1} und 1625 cm^{-1} weitgehend unstrukturiert, es ist lediglich eine breite Absorption zu erkennen.

Z→E Isomerisierung Die photoinduzierte Z→E Isomerisierung führt zu starken Änderungen im IR-Spektrum. In Abbildung 5.3 b) ist die Absorptionsänderung des reinen Photoschalters dargestellt. Die Banden der aromatischen und olefinischen Doppelbindungen sowie der Carbonylgruppen verlieren deutlich an Oszillatorstärke. Die Absorptionsabnahme im Bereich $1650 - 1720\text{ cm}^{-1}$ kann durch die Veränderungen in der Umgebung der aromatischen Ketogruppe nach der Isomerisierung erklärt werden. Wasserstoffe des Phenylrings zeigen in der E-Form Interaktionen mit der Ketogruppe. Diese Wechselwirkung kann auch die Stärke und Lage der einzelnen Schwingungsübergänge im Bereich der C=C Bindungen verändern.

Abbildung 5.3 c) zeigt die Absorptionsänderungen nach Photoisomerisation des para-Peptidsystems. Bis auf kleine Abweichungen sieht man im wesentlichen die Absorptionsänderungen des reinen Schalters. Das ist bemerkenswert, da das Infrarotspektrum des para-Peptidsystems durch die Absorptionsbanden der Aminosäuren dominiert wird. Daher kann angenommen werden, dass durch die Isomerisierung nur geringe strukturelle Änderungen im Peptidsystem induziert werden. Die gemessenen Absorptionsänderungen sind beim Peptidsystem deutlich geringer als beim reinen Photoschalter, da der Farbstoffanteil im Peptidsystem deutlich geringer ist. Die Abweichungen zum Differenzspektrum des reinen Schalters deutet auf die Wechselwirkung zwischen dem Schalter und den Aminosäuren des Peptids hin. Im Bereich von 1650 cm^{-1} manifestiert sich eine Verschiebung in der Schulter der Amid-I-Bande.

5.1.2 Zeitaufgelöste UV/Vis Spektroskopie

Abbildung 5.4 zeigt die Ergebnisse der breitbandigen transienten UV/Vis Messung des para-Systems im Überblick. Für beide Systeme sind kinetische Prozesse auf einer 10 – 30 ps Zeitskala zu finden. Zu frühen Verzögerungszeiten zeigt sich eine breite induzierte Absorption (excited state absorption, ESA), die bei 435 nm in beiden Fällen von einem Ausbleichen des Grundzustandes (ground state bleach, GSB) überlagert ist. Das Maximum der ESA liegt bei dem reinen Schalter bei etwa 560 nm. In diesem Bereich zeigen sich deutlich zwei überlappende Komponenten mit unterschiedlichen Zeitkonstanten ($\tau_1 = 6\text{ ps}$, $\tau_2 = 14\text{ ps}$). Im Peptidsystem ist das Maximum der ESA zu 530 nm leicht

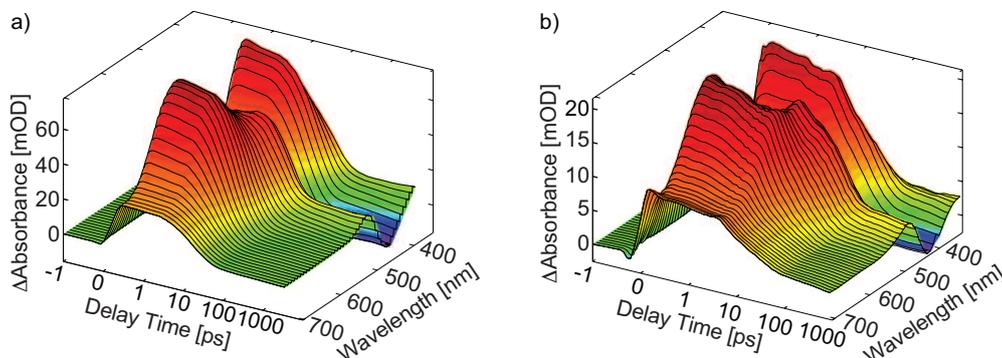


Abbildung 5.4: Transiente Absorptionsänderung des Isomerisierungsprozesses des para-Systems im UV/Vis-Spektralbereich in dreidimensionaler Darstellung. a: Z→E Isomerisierung des reinen Photoschalters (pHTI). b: Z→E Isomerisierung des para-Peptidsystems (pHTI-Pep). Die Zeitachse zwischen -1 ps und 1 ps ist linear, für $t_D > 1$ ps logarithmisch aufgetragen.

blauverschoben. Hier sind ebenfalls zwei spektral stark überlappende Komponenten mit unterschiedlichen Zeitkonstanten ($\tau_1 = 6$ ps, $\tau_2 = 24$ ps) zu beobachten. Die Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 beschreiben bei beiden Datensätzen die Z→E Isomerisierung. Es zeigen sich große Übereinstimmungen mit der in Kapitel 3.1 vorgestellten HTI ω -Aminosäure. Es ist ein analoges Reaktionsmodell, wie es in Abbildung 3.10 dargestellt ist mit entsprechend geänderten Relaxationszeiten τ_1 und τ_2 anzunehmen. Für alle Systeme findet sich eine schwache kinetische Komponente im Zeitbereich von $300 - 900$ ps. Alle Zeitkonstanten sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Z→E	τ_1	τ_2	τ_3
pHTI	6 ps	14 ps	~ 350 ps
pPep	6 ps	24 ps	~ 850 ps

Tabelle 5.1: Zusammenstellung der Zeitkonstanten des para-Systems im VIS-Spektralbereich.

Wie in Kapitel 3 diskutiert wurde, befindet sich das System direkt nach der Anregung im Franck-Condon (FC*) Zustand. Dieser wird mit ultraschnellen Prozessen auf der 100 fs Zeitskala verlassen und relaxiert in den mit RS bezeichneten Zustand. Dieser Zustand hat noch ausreichend Überschussenergie um strukturelle Änderungen im S_1 vollziehen zu können. Innerhalb weniger Pikosekunden ($\tau_1 = 6$ ps) verändert sich die Struktur des HTI-Moleküls merklich, das System befindet sich nun in einem Zustand mit Ladungstrennungscharakter (CTC-Zustand). Der Übergang in den Grundzustand und somit die Z→E Isomerisierung des Photoschalters erfolgt auf der 10 ps-Zeitskala, repräsentiert durch die Zeitkonstante τ_2 .

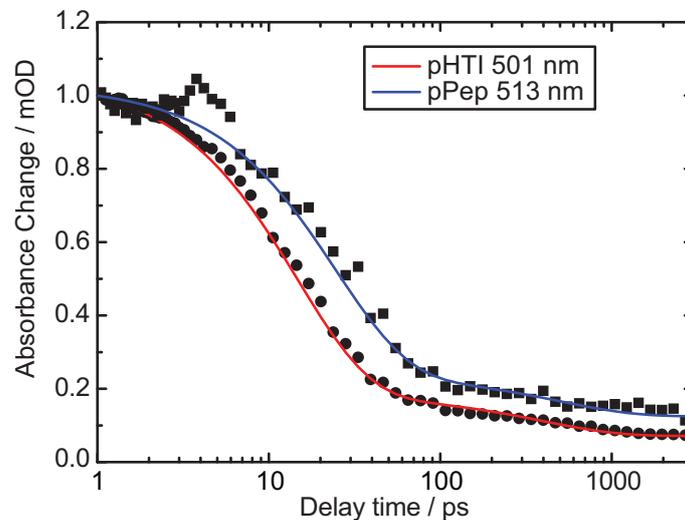


Abbildung 5.5: Vergleich des para-Schalters (pHTI, Kreise/rot) mit dem para-Peptidsystem (pPep, Quadrate/blau). Die Daten (Einzelpunkte) sind jeweils mit ihrer Fitfunktion (durchgezogene Linie) dargestellt. Die Abtastwellenlängen (para-HTI: 501 nm, para-Peptidsystem: 513 nm) sind so gewählt, dass die Amplitude der $\tau_1 = 6$ ps Komponenten weitestgehend verschwinden und so ausschließlich Produktbildung zu beobachten ist. Artefakte der Messpunkte im Zeitbereich von 5 – 8 ps sind durch einen Fehler des Verschiebetisches verursacht.

Abbildung 5.5 zeigt den direkten Vergleich der zeitabhängigen Absorptionsänderung des para-Photoschalters (pHTI, rot) mit dem para-Peptidsystem (pPep, blau). Die Zeitverläufe sind bei einer Verzögerungszeit $t_D = 1$ ps auf eine Absorptionsänderung von Eins normiert und zusammen mit ihren Fitfunktionen dargestellt. Bei den gewählten Abtastwellenlängen verschwindet die Amplitude der schnellen Kinetik (τ_1). Dadurch wird die Zeitkonstante welche die $Z \rightarrow E$ Isomerisierung beschreibt hervorgehoben. Hierdurch ist der Prozess der Produktbildung zu beobachten. In Abbildung 5.5 ist ferner zu erkennen, dass das Peptidsystem (pPep) den angeregten Zustand im Vergleich mit dem reinen para-Photoschalter (pHTI) langsamer (24 ps gegenüber 14 ps) verlässt. Bei beiden Systemen ist zu späten Zeiten zusätzlich eine erhöhte Absorption und eine langsame Komponente zu sehen. Dies kann als Spannungsrelaxation zwischen Schalter und angehängtem Peptid gedeutet werden.

Das kinetische Verhalten des HTI-Peptidsystems ist dem des reinen HTI-Photoschalters bis auf eine verzögerte Isomerisierungszeitkonstante (τ_2) sehr ähnlich. Es reproduziert das Reaktionsmodell der HTI ω -Aminosäure, welches in Kapitel 3.1 vorgestellt wurde.

5.1.3 Zeitaufgelöste IR-Spektroskopie

Transiente Absorptionsänderungen

Ein Überblick der transienten IR-Spektroskopie am para-HTI Photoschalter (pHTI) ist in Abbildung 5.6, am para-Peptidsystem (pPep) in Abbildung 5.7 gezeigt. In Abbildung 5.8 sind transiente Differenzspektren der selben Datensätze zu ausgewählten Verzögerungszeiten dargestellt. Im Bereich zwischen 1490cm^{-1} und 1540cm^{-1} ist eine induzierte Absorption zu erkennen. Diese zeigt mit zunehmender Verzögerungszeit eine Verschiebung hin zu größeren Frequenzen (Blauverschiebung). Zwischen 1550cm^{-1} und 1600cm^{-1} im Bereich der aromatischen C=C Absorptionsbanden tritt ein spektral strukturiertes Ausbleichsignal auf. Ein weiteres stärkeres Ausbleichsignal zeigt sich um 1685cm^{-1} . Beim pPep zeigen sich neben diesen Ausbleichsignalen weitere bei 1640cm^{-1} , 1670cm^{-1} und 1480cm^{-1} . Beim pHTI finden die wesentlichen Kinetiken sowohl der induzierten Absorption als auch der Ausbleichsignale auf einer 10-ps-Zeitskala statt. Lediglich das Ausbleichsignal bei 1685cm^{-1} scheint etwas langlebiger zu sein. Auch beim pPep findet sich eine deutliche Abnahme der Signalstärke auf der 10-ps-Zeitskala. Hier weisen eine niederfrequente Schulter des induzierten Absorptionssignals bei 1505cm^{-1} sowie die

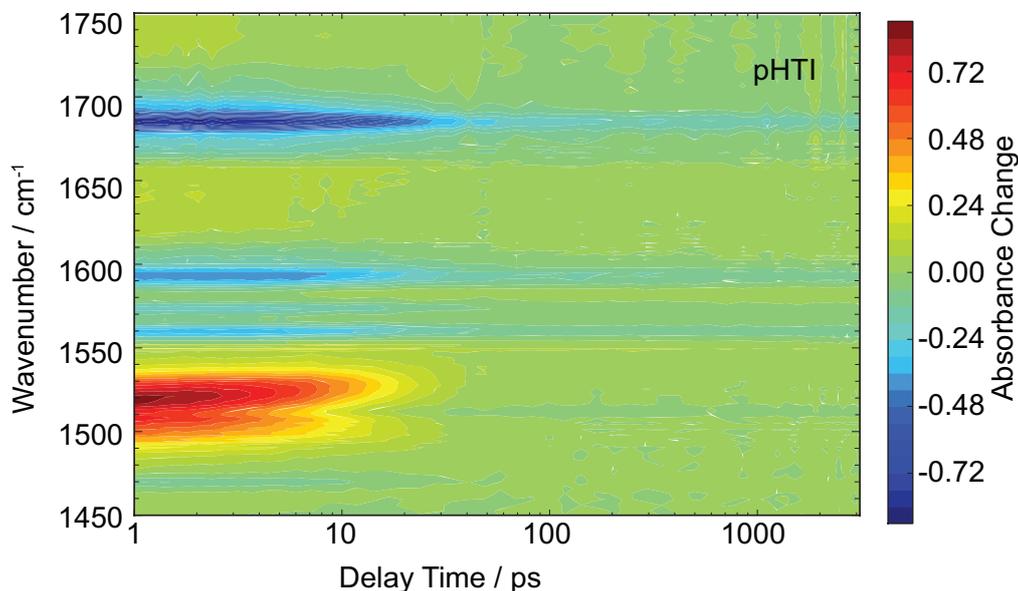


Abbildung 5.6: Transiente Absorptionsänderung der photochemischen Isomerisierung des reinen para-HTI-Photoschalters nach Anregung bei 400 nm. Die induzierte Absorptionsänderung ist in Falschfarben kodiert.

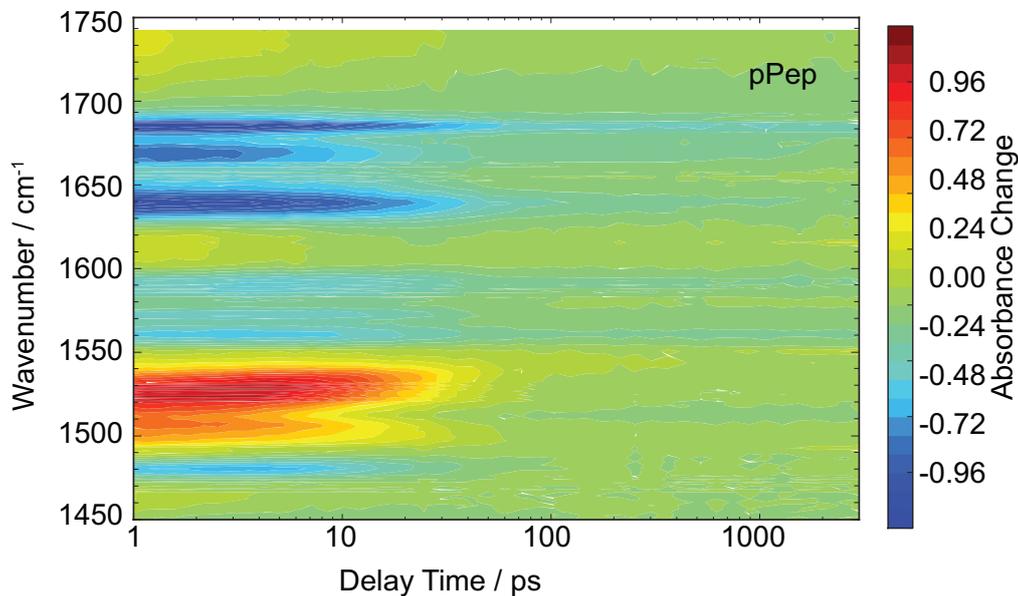


Abbildung 5.7: Transiente Absorptionsänderung der photochemischen Isomerisierung des para-HTI-Peptidsystems nach Anregung bei 400 nm. Die induzierte Absorptionsänderung ist in Falschfarben kodiert.

Ausbleichsignale bei 1480cm^{-1} und 1670cm^{-1} einen deutlichen Rückgang der Signalamplitude auf. Die ESA-Bande um 1530cm^{-1} und die Ausbleichsignale bei 1685cm^{-1} und 1640cm^{-1} zerfallen hingegen auf der 20–30 ps Skala. Alle Ausbleichsignale weisen sowohl beim pHTI als auch beim pPep Signaturen auf, die bis zum Ende der experimentell abgedeckten Verzögerungszeit also bis in den ns-Bereich hinein sichtbar bleiben. Tendenziell sind die transienten IR-Signale beim Peptidsystem länger zu beobachten als beim reinen Photoschalter.

Nach Anregung kann man an der breiten induzierten Absorption z.B. im Bereich $1480 - 1550\text{cm}^{-1}$ erkennen, dass sich das System in einem elektronisch angeregten Zustand befindet. Die starke S_1 -Bande bei 1530cm^{-1} zeigt sowohl beim pHTI als auch beim pPep eine signifikante kinetische Komponente (pHTI: ca. 10 ps; pPep: ca. 20 ps). Im Vergleich zum pHTI sind zwei zusätzliche starke Ausbleichbanden bei 1670cm^{-1} und 1640cm^{-1} im Bereich der Amid-I Bande auffällig. Die Bande bei 1685cm^{-1} , die das Ausbleichen der CO-Schwingungen zeigt, ist beim pPep etwas schmaler als beim pHTI. Die breite Schulter bei 1700cm^{-1} ist in der Peptidmessung nicht mehr vorhanden. Diese ist offensichtlich darauf zurückzuführen, dass die Säuregruppe in der Peptidbindung aufgegangen ist. Die beiden neuen Ausbleichbanden entstehen zeitgleich mit der charakteristischen CO-Farbstoffbande. Die elektronische Anregung des Photoschalters erreicht

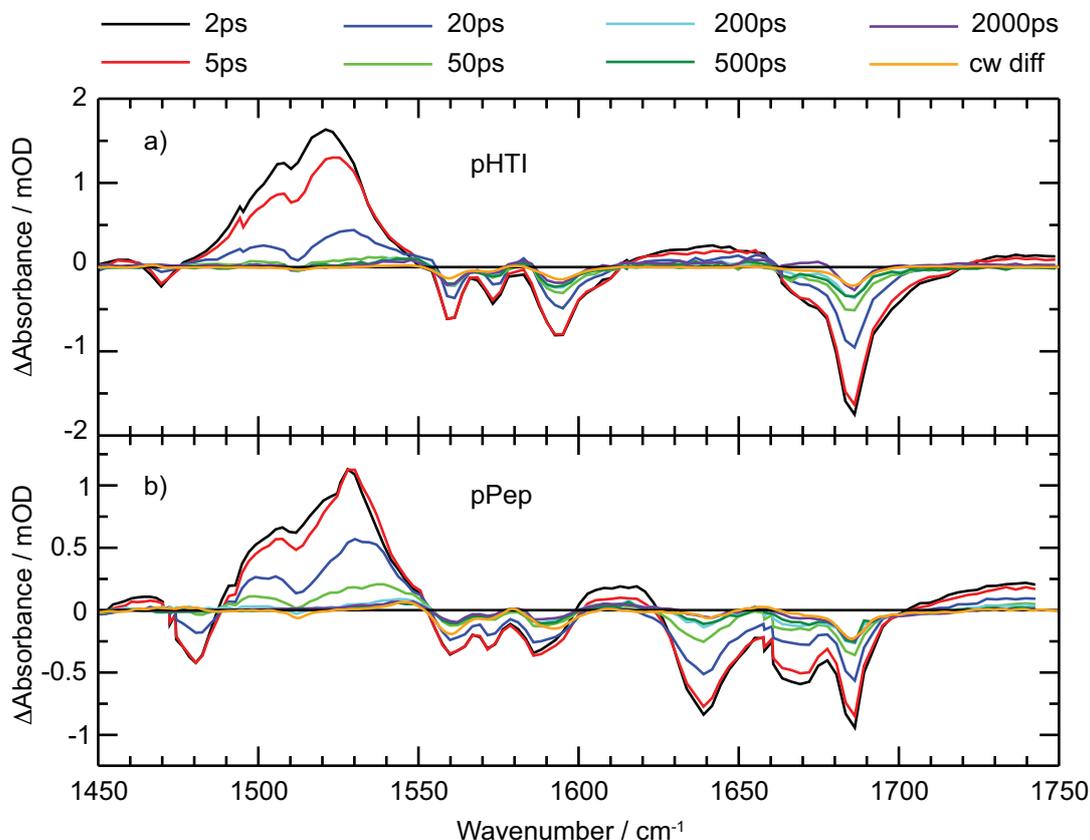


Abbildung 5.8: Transiente Differenzspektren des para-Systems zu den angegebenen Verzögerungszeiten. a: para-HTI; b: para-Peptidsystem. Das auf das transiente Differenzspektrum bei 2ns skalierte stationäre Differenzspektrum (vgl. Abbildung 5.3) ist jeweils zusätzlich orange eingezeichnet.

den Peptidteil also instantan. Da beim pHTI das transiente Spektrum zur Verzögerungszeit $t_D = 2000$ ps (violett) mit dem cw-Differenzspektrum (orange) weitgehend übereinstimmt, ist davon auszugehen, dass zu diesem Zeitpunkt die Z→E Isomerisierung bereits vollständig abgeschlossen ist. Ein Vergleich mit dem cw-Differenzspektrum (orange) des pPep zeigt nach 2000 ps noch geringe Unterschiede. Dies könnte mit langlebigen Spannungsrelaxationen des Peptids zusammenhängen.

LDAC-Auswertung

Abbildung 5.9 zeigt die LDAC-Auswertung der transienten Absorptionsmessungen am pHTI sowie am pPep. Beim pHTI zeigt sich bereits zu sehr frühen Verzögerungszeiten (1 ps) eine Abnahme der Absorption im Bereich 1510 cm^{-1} . Dieses LDAC-Signal wird

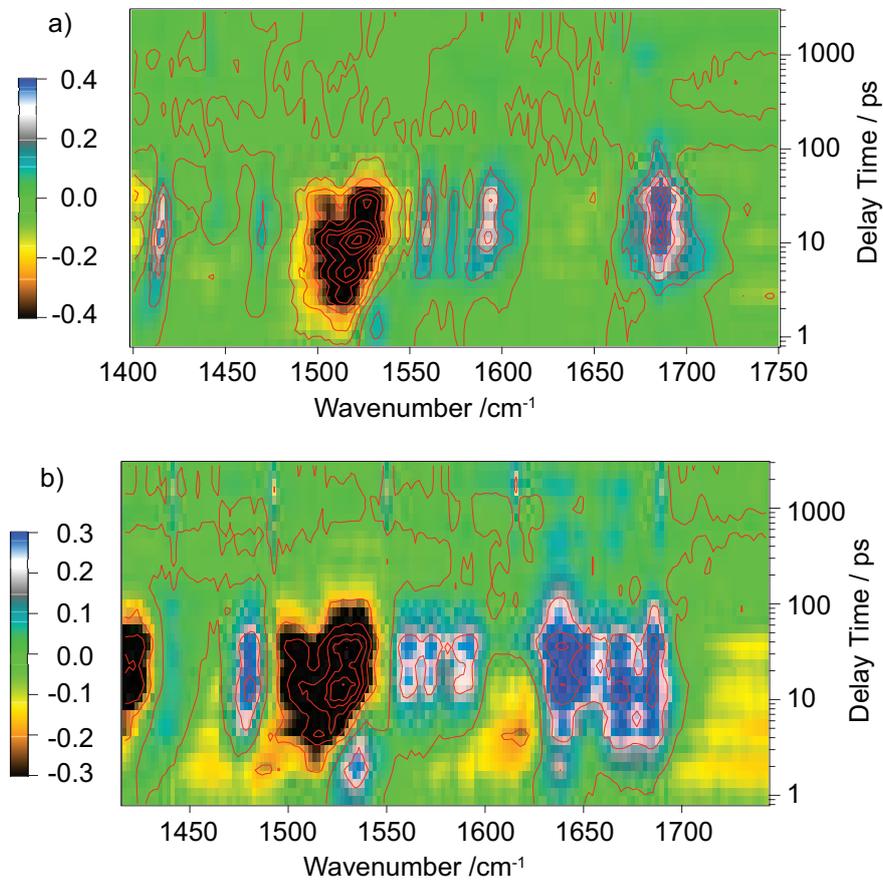


Abbildung 5.9: LDAC-Auswertung der zeitaufgelösten Infrarot-Messungen am para-HTI-Photoschalter (a) und am para-HTI-Peptidsystem (b).

bei zunehmender Verzögerungszeit spektral breiter, bis es sich bei 10 ps von 1490cm^{-1} bis 1545cm^{-1} erstreckt. Das LDAC-Signal bleibt mit dieser Breite bis 40 ps sichtbar. Im Bereich der Ausbleichsignale bei $1550\text{--}1600\text{cm}^{-1}$ und bei 1685cm^{-1} sieht man im LDAC-Signal eine Zunahme des Absorptionssignals zwischen 4 ps und 50 ps. Zu sehr frühen Verzögerungszeiten von 1–2 ps deutet sich eine Zunahme des Absorptionssignals bei 1530cm^{-1} durch eine schwache positive LDAC-Signatur an. Mit Ausnahme dieses Signals ist keines der LDAC-Signale in Abbildung 5.9 a) zeitlich gut lokalisiert, wie man es für exponentiell zerfallende Signalamplituden erwarten würde.

Die in Abbildung 5.9 b) dargestellte LDAC-Auswertung des pPep zeigt ähnliche Signale wie beim pHTI. Auch hier ist eine Abnahme der Absorption bei 1510cm^{-1} zu frühen Verzögerungszeiten (2 ps) festzustellen, die sich bis etwa 10 ps spektral verbreitert und bis 100 ps andauert. Es finden sich auch Signale, die eine Zunahme der Absorption in den Bereichen der Ausbleichbanden widerspiegeln. Im Frequenzbereich der Amid I Bande

und der Ketogruppe ($1625\text{--}1695\text{ cm}^{-1}$) erstrecken sie sich von 3–100 ps. Im Frequenzbereich der C=C-Schwingungen ($1555\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$; 10–50 ps) sowie bei 1480 cm^{-1} (4–50 ps) zeigt das LDAC-Signal eine Absorptionzunahme. Im Bereich 2 ps (1535 cm^{-1}) ist eine zeitlich gut lokalisierte Absorptionzunahme vorhanden. Bei 1460 cm^{-1} , 1490 cm^{-1} , um 1610 cm^{-1} und oberhalb von 1700 cm^{-1} zeigen sich relativ schwache Signaturen einer Absorptionzunahme zwischen 1 ps und 20 ps.

Multiexponentielle Datenanpassung

Die in den Abbildungen 5.6, 5.7 beziehungsweise 5.8 dargestellten transienten IR-Absorptionsspektren wurden mit einem multiexponentiellen Zerfallsmodell angepasst. Vier Zeitkonstanten erweisen sich als ausreichend die Daten zu beschreiben. Die vierte Zeitkonstante wird dabei stets als unendlich groß angenommen ($\tau_4 = \infty$), so dass die zugehörige Amplitude den Absorptionsunterschied zwischen dem E- und dem Z-Isomer widerspiegelt.

Bei der Anpassung der Daten mit dem multiexponentiellen Modell fällt auf, dass verschiedene Zeitkonstanten mit verschiedenen zerfallsassoziierten Amplitudenspektren die Daten in ähnlicher Qualität wiedergeben. In Abbildung 5.10 a) sind zwei solcher unterschiedlicher Anpassungsergebnisse dargestellt. Unter Annahme eines sequentiellen Zerfalls wurden daraus intermediäre Spektren berechnet. Obwohl sich die zerfallsassoziierten Amplituden teilweise um 10% bis 30% unterscheiden, weichen die Differenzspektren der Intermediate bei weitem nicht so weit voneinander ab. Dieses Verhalten wurde auch beim pPep, sowie bei den in Abschnitt 5.2 diskutierten meta-Systemen festgestellt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die gefundenen Zeitkonstanten eine relativ große Unsicherheit von etwa 25% aufweisen, die Differenzspektren der Intermediate können hingegen gut reproduziert werden.

Z→E	IR			Vis		
	τ_1	τ_2	τ_3	$\tau_{1,\text{vis}}$	$\tau_{2,\text{vis}}$	$\tau_{3,\text{vis}}$
pHTI	3.9 ps	12.3 ps	~ 500 ps	6 ps	14 ps	~ 350 ps
pPep	5.5 ps	22.9 ps	~ 550 ps	6 ps	24 ps	~ 850 ps

Tabelle 5.2: Zusammenstellung der Zeitkonstanten des para-Systems im infraroten und sichtbaren Spektralbereich.

In Tabelle 5.2 sind die bei der multiexponentiellen Datenanpassung der IR-Absorptionsdaten gefundenen Zeitkonstanten aufgelistet. Daneben sind hier auch die in der Vis-Absorptionsspektroskopie gefundenen Zeitkonstanten nochmals wiedergegeben (vgl. Tabelle 5.1). Zur Berechnung der Differenzspektren der Intermediate muss ein Zerfalls-

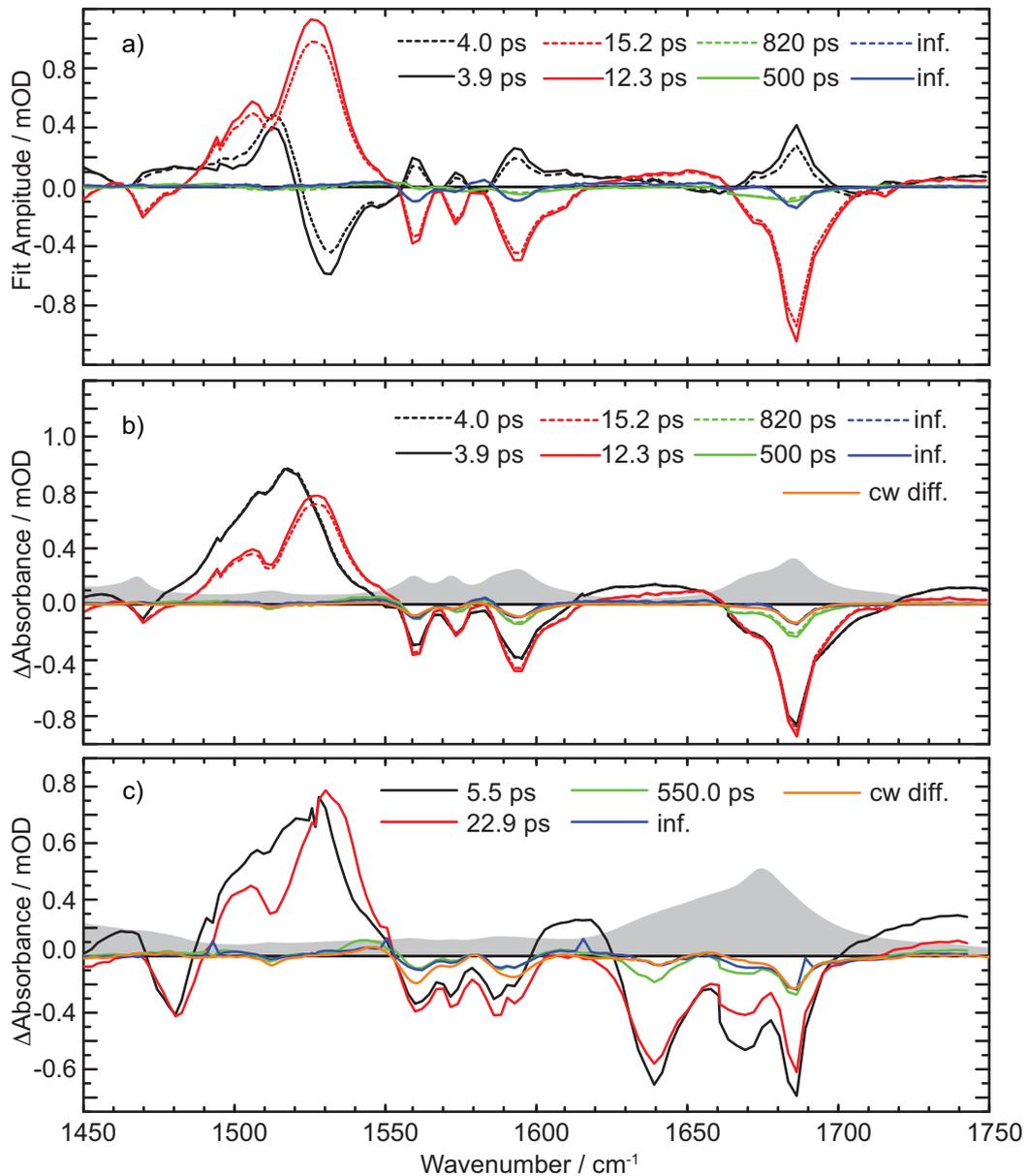


Abbildung 5.10: a: Zerfallsassoziierte IR-Spektren des pHTI aus unterschiedlichen Datenanpassungen. b: Aus a) berechnete Differenzspektren der Intermediate unter Annahme eines sequentiellen Zerfalls. Die in a) und b) durchgezogene beziehungsweise gestrichelt gezeichneten Kurven geben die Ergebnisse der Datenanpassung mit verschiedenen Startbedingungen wieder. c: Differenzspektren der Intermediate des pPep. In b) und c) sind jeweils die Absorptionsspektren des Z-Isomers grau hinterlegt; beim pHTI ist es mit der gleichen Skalierung, beim pPep zehn mal kleiner als das stationäre Differenzspektrum des E-Isomers (orange) eingezeichnet.

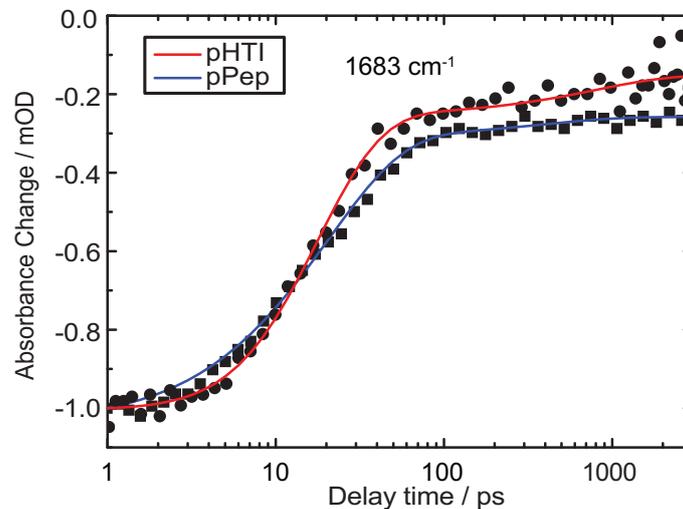


Abbildung 5.11: Vergleich des para-Schalters (pHTI, Kreise/rot) mit dem para-Peptidsystem (pPep, Quadrate/blau). Die Daten (Einzelpunkte) sind jeweils mit ihrer Fitfunktion (durchgezogene Linie) dargestellt. Die Abtastwellenlänge beträgt bei beiden Datensätzen 1683 cm^{-1} und zeigt die gut separierte para-HTI Schalterbande.

modell angenommen werden. Die in Abschnitt 3.3 diskutierten fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen zeigen, dass die $Z \rightarrow E$ -Isomerisierungsreaktion von HTI einen sequentiellen Ablauf aufweist. Davon ausgehend, dass sich der Ablauf der Isomerisierung im vorliegenden Fall nicht fundamental unterscheidet, wird das sequentielle Modell auch hier verwendet. Die unter der Annahme eines sequentiellen Zerfallsmodells berechneten Spektren der Intermediate für pHTI und pPep sind in Abbildung 5.10 b) und c) dargestellt. Neben den berechneten Spektren finden sich hier auch die stationären Differenzspektren des E-Isomers, sowie das Absorptionsspektrum des Z-Isomers. Die stationären Differenzspektren sind jeweils so skaliert, dass sie möglichst gut mit dem zur Zeitkonstante $\tau_4 = \infty$ gehörenden intermediären Zustand übereinstimmen. In Abbildung 5.10 b) ist das Absorptionsspektrum des pHTI-Z-Isomers mit der gleichen Skalierung wie das stationäre Differenzspektrum eingetragen. In Abbildung 5.10 c) ist das Absorptionsspektrum des pPep-Z-Isomers mit einer zehnfach kleineren Skalierung als das stationäre Differenzspektrum eingezeichnet. Die zerfallsassoziierten Spektren des pPep sind in Anhang B.1.2 dargestellt.

Abbildung 5.11 zeigt den direkten Vergleich der Zeitabhängigkeiten der ausbleichenden Schalterbande bei 1683 cm^{-1} im Bereich der CO-Schwingung des para-HTI Photoschalters in reiner Form (pHTI, rot) und mit angehängtem Peptidsystem (pPEP, blau). Dabei ist gut zu erkennen, dass die Zeitkonstante τ_2 im Peptidsystem leicht verlängert ist (vgl. Tabelle 5.2).

Die zu den Zerfallszeiten $\tau_1 = 3.9$ ps und $\tau_2 = 12.3$ ps gehörenden intermediären Differenzspektren des pHTI (vgl. 5.10 b) unterscheiden sich außerhalb des Bereichs $1475\text{--}1550\text{cm}^{-1}$ kaum. Nur in den Bereichen $1610\text{--}1650\text{cm}^{-1}$ und $1720\text{--}1750\text{cm}^{-1}$ zeigen sich die Relaxationen breiter unstrukturierter ESA mit τ_1 . Beim pPep zeigen sich hingegen signifikante Signalarückgänge im Bereich $1575\text{--}1750\text{cm}^{-1}$. Insbesondere das Ausbleichsignal im Bereich der Amid I Bande bei 1665cm^{-1} und die induzierten Absorptionen bei $1600\text{--}1625\text{cm}^{-1}$ und $1700\text{--}1750\text{cm}^{-1}$ zeigen Relaxationen mit τ_1 . Das Absorptionssignal in der Schulter bei 1510cm^{-1} verringert sich beim pHTI mit der Zeitkonstante τ_1 auf etwa die Hälfte des ursprünglichen Werts. Beim pPep geht es um etwa ein Drittel zurück. Das Maximum der induzierten Absorption verschiebt sich bei pHTI von 1515cm^{-1} nach 1525cm^{-1} , bei pPep von 1525cm^{-1} nach 1530cm^{-1} .

Sowohl die induzierte Absorption ($1475\text{--}1550\text{cm}^{-1}$) als auch die Ausbleichsignale zeigen beim pHTI wie auch beim pPep eine wesentliche Relaxation mit der Zerfallszeit τ_3 . Die intermediären Spektren gehen bis auf wenige Abweichungen auf das stationäre Differenzsignal des E-Isomers zurück. Mit der Zeitkonstante $\tau_3 \approx 500$ ps relaxieren beim pHTI Ausbleichsignale bei 1595cm^{-1} und im Frequenzbereich der aromatischen Keto-Gruppe bei 1685cm^{-1} mit einer niederfrequenten Schulter bis 1662cm^{-1} . Beim pPep sind es Ausbleichsignale bei der Amid I Bande bei 1638cm^{-1} sowie bei 1665cm^{-1} , die mit $\tau_3 \approx 550$ ps relaxieren. Außerdem zeigt sich bei 1542cm^{-1} auch bei einer ESA eine Relaxation mit τ_3 .

5.2 Das zyklische Peptid, meta-System

Abbildung 5.12 a) zeigt schematisch die meta HTI ω -Aminosäure. In meta Position (grün markiert) bezogen auf den Phenylring des Stilbenteils ist eine CH_2 -Gruppe gefolgt von $(\text{NH}_2 + \text{Cl})$ angebracht. Abbildung 5.12 b) zeigt ein zyklisches Peptidsystem bestehend aus 19 Aminosäuren, das mit dem Photoschalter verbunden ist. Die hier verwendete Peptidsequenz ist ein Teil der in Kapitel 1.2 vorgestellten PDZ-Domäne. Das für die interne Erkennung notwendige Peptidmotiv ist gelb hinterlegt. Die Position des Schalters wurde so gewählt, dass zum Einen das für die Erkennung wichtige Motiv erhalten bleibt und zum Anderen, dass die direkten Wechselwirkungen zwischen den Strängen des Peptids nicht unterbrochen werden und sich somit eine stabile β -Struktur ausbilden kann.

5.2.1 Stationäre Infrarot-Charakterisierung

Abbildung 5.13 a) zeigt in schwarz das stationäre Spektrum des meta-HTI Photoschalters und in rot das Spektrum des meta-Peptidsystem. Zur Aufnahme der Infrarotspektren des

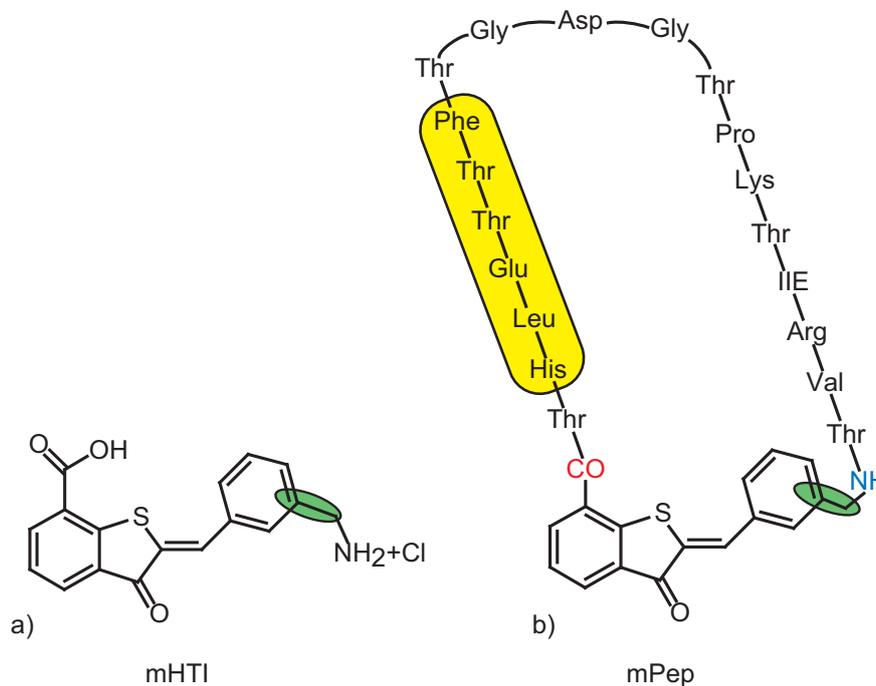


Abbildung 5.12: Schematische Darstellung der Struktur des meta-Systems. a: Meta-HTI (mHTI) Schalter mit der Gruppe ($\text{NH}_2 + \text{Cl}$). b: Zyklisches Peptidsystem. Die Aminosäuren sind in meta Position (grün markiert) des Phenylrings im Stilbenteil angebracht. Dieses System ist der in Kapitel 1.2 vorgestellten PDZ-Domäne nachempfunden. Die biologisch relevante Aminosäuresequenz ist gelb hinterlegt.

meta-Systems kam wie im Abschnitt zuvor, ein Fourier-Transform Infrarotspektrometer (FTIR, Fa. Bruker, IFs-66) zum Einsatz.

Meta-HTI Photoschalter

Das stationäre Infrarotspektrum (Abbildung 5.13) des meta-Photoschalters zeigt große Ähnlichkeit mit dem des para-HTI Photoschalters. Bei 1690cm^{-1} tritt die bereits bekannte Bande der CO-Schwingungen auf. Die Struktur der CC-Schwingungsbanden im Bereich von $1550 - 1620\text{cm}^{-1}$ zeigt eine gegenüber dem bereits diskutierten para-HTI leicht geänderte Form. Hier manifestiert sich der Einfluss der Position (para/meta) der funktionellen Gruppe auf die aromatischen und olefinischen Doppelbindungen des HTI-Photoschalters.

Meta-HTI Peptidsystem

Die Amid-I Bande hat eine vom para-Peptidsystem deutlich abweichende Form. Das Maximum der Amid-I Bande ist zu kleineren Wellenzahlen nach 1647 cm^{-1} verschoben und zeigt eine ausgeprägte Schulter zum blauen Spektralbereich hin. Diese spektrale Form ist ein Hinweis auf die β -Finger Struktur des Peptidsystems [Hop09]. Ferner zeigt sich in der Schulter der Amid-I Bande bei 1690 cm^{-1} eine schwache Signatur der CO-Bande des Photoschalters.

Z \rightarrow E Isomerisierung

Die photoinduzierte Z \rightarrow E Isomerisierung führt zu starken Änderungen im IR-Spektrum. In Abbildung 5.13 b) ist die Absorptionsänderung des reinen Photoschalters dargestellt. Es zeigen sich wieder Ähnlichkeiten mit dem para-Schalter. Die negative Schulter in

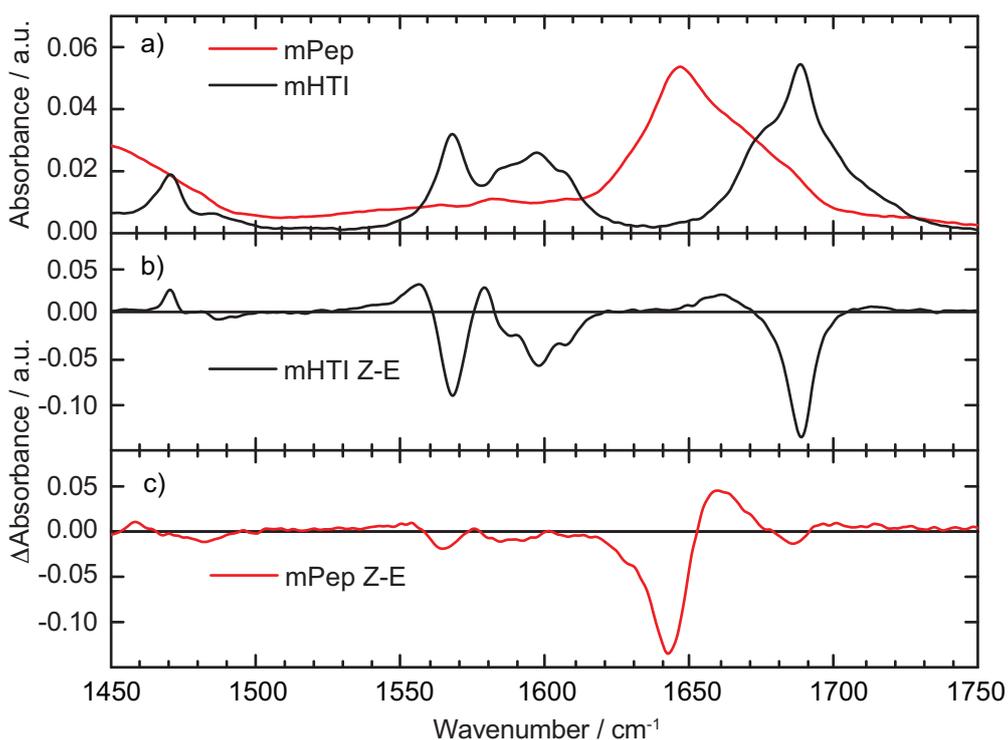


Abbildung 5.13: Stationäre Spektren des meta-Systems. a: Infrarot-Absorptionsspektren der Z-Isomere; das Maximum des reinen Schalters ist auf das Maximum des Peptidspektrums normiert. b, c: Differenzspektren der Z- und E-Isomere; das Maximum der Absorptionsänderung des Peptidspektrums ist auf das Maximum der Absorptionsänderung des reinen Schalters normiert. a-c: Schwarz: Meta-HTI; rot: Zyklisches Peptidsystem.

der Doppelbande der CO-Schwingungen fehlt, dafür zeigt sich eine induzierte Absorption in Form eines positiven Signals. Auch im Bereich der aromatischen CC-Streckschwingungen ist neben dem Ausbleichen eine induzierte Absorption zu beobachten.

In Abbildung 5.13 c) ist das Differenzspektrum der Z-E-Isomerisierung des Peptidsystems dargestellt. Hier zeigen sich erhebliche Unterschiede zum para-Peptidsystem. Die Signaturen des Farbstoffs sind bis auf kleine Ausbleichanteile nahezu nicht zu erkennen. Eine schwache Absorptionsabnahme findet man bei 1690 cm^{-1} sowie im Bereich der CC-Schwingungen. Im Bereich der Amid-I Bande ist im meta-Peptidsystem eine ausgeprägte Absorptionsänderung zu beobachten. Bei 1642 cm^{-1} ist starkes Ausbleichen und bei 1660 cm^{-1} induzierte Absorption zu erkennen. Diese signifikante im Absorptionsbereich der Aminosäuren beobachtete Signaländerung deutet auf erhebliche strukturelle Änderungen des Peptids durch die Z→E Isomerisierung des Photoschalters hin. Diese Absorptionsänderungen dominieren das Differenzspektrum des meta-Peptidsystems. Sie werden durch den Übergang der im Z-Isomer vorliegenden β -Struktur zu einer Peptidstruktur, die sich deutlich von der β -Struktur unterscheidet, hervorgerufen.

5.2.2 Zeitaufgelöste UV/Vis Spektroskopie

In Abbildung 5.14 sind die Ergebnisse der breitbandigen transienten UV/Vis Messung des meta-Systems im Überblick dargestellt. Wie bereits beim para-System finden sich große Ähnlichkeit mit der in Kapitel 3.1 diskutierten HTI ω -Aminosäure. Direkt nach Anregung zeigt sich eine breite spektral modulierte induzierte Absorption (ESA). Im langwelligeren Spektralbereich $> 600\text{ nm}$ fällt das Signal deutlich ab. Das Ausbleichen des Grundzustan-

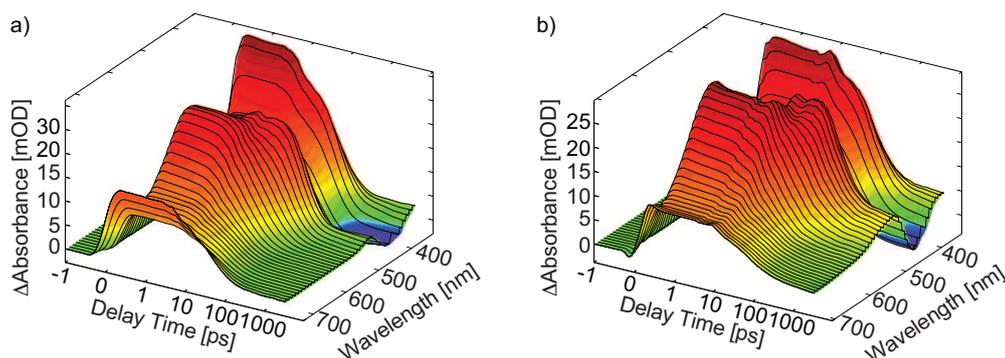


Abbildung 5.14: Zeitaufgelöste Spektren des Isomerisierungsprozesses des meta-Systems im UV/Vis-Spektralbereich in dreidimensionaler Darstellung. a: Z→E Isomerisierung des reinen Photoschalters (mHTI). b: Z→E Isomerisierung des meta-Peptidsystems (mPEP). Die Zeitachse zwischen -1 ps und 1 ps ist linear, für $t_D > 1\text{ ps}$ logarithmisch aufgetragen.

des (GSB) überlagert in beiden Systemen bei ca. 435 nm die induzierte Absorption. Ein Maximum der ESA bei etwa 540 nm zeigt im reinen Schalter sowie im Peptidsystem zwei sich überlappende Zeitkonstanten. Die transiente Signatur des Isomerisierungsprozesses läßt sich durch ein multiexponentielles Reaktionsmodell mit drei Zeitkonstanten (τ_1 , τ_2 , τ_3) anpassen. Die Zeitkonstanten sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst. Schon frühere Experimente haben gezeigt, dass die Z \rightarrow E Isomerisierung des meta-HTI Photoschalters langsamer als die des para-HTI Photoschalters ist [Cor08b]. Dies bestätigt sich auch hier.

Z \rightarrow E	τ_1	τ_2	τ_3
mHTI	6 ps	48 ps	~ 820 ps
mPEP	6 ps	65 ps	~ 550 ps

Tabelle 5.3: Zusammenstellung der Zeitkonstanten des meta-Systems im sichtbaren Spektralbereich.

Das dem Z \rightarrow E Isomerisierungsprozess zugrunde liegende Reaktionsschema des meta-Systems ist wie beim para-System analog zur HTI ω -Aminosäure (vgl. Kapitel 3.1). Der direkte Vergleich der zeitabhängigen Absorptionsänderung des meta-Photoschalters

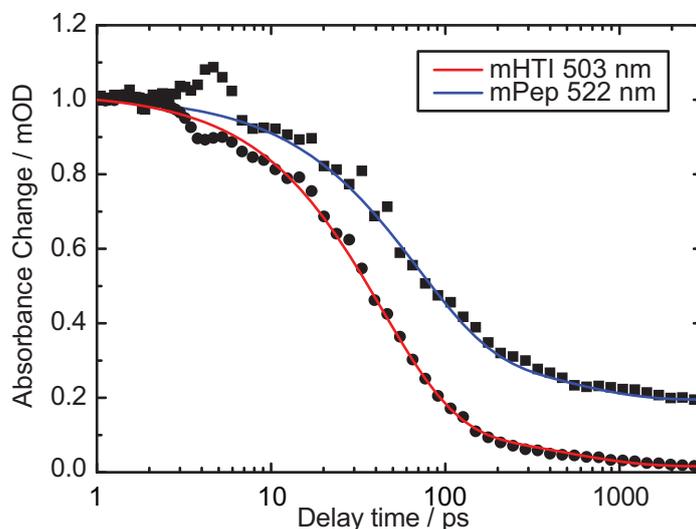


Abbildung 5.15: Vergleich des meta-Schalters (mHTI, Kreise/rot) mit dem meta-Peptidsystem (mPep, Quadrate/blau). Die Daten (Einzelpunkte) sind jeweils mit ihrer Fitfunktion (durchgezogene Linie) dargestellt. Die Abtastwellenlängen (meta-HTI: 503 nm, meta-Peptidsystem: 522 nm) sind so gewählt, dass die Amplitude der $\tau_1 = 6$ ps Komponenten weitestgehend verschwinden. Artefakte der Messpunkte im Zeitbereich von 5 – 8 ps sind durch einen Fehler des Verschiebetisches verursacht.

(mHTI, rot) mit dem meta-Peptidsystem (mPep, blau) ist in Abbildung 5.15 dargestellt. Die Absorptionsänderung der Zeitverläufe wurden bei einer Verzögerungszeit $t_D = 1$ ps auf Eins normiert und sind zusammen mit ihren Fitfunktionen aufgetragen. Die Abtastwellenlängen λ_{pr} sind jeweils so gewählt, dass die Amplitude der schnellen Kinetik (τ_1) vernachlässigbar ist. So wird die den Z→E Isomerisierungsprozess beschreibende Zeitkonstante τ_2 , hervorgehoben. Wie bereits beim para-System beobachtet, verlässt das Peptidsystem (m-Pep) den angeregten Zustand langsamer im Vergleich zum reinen Photoschalter (m-HTI). Das Peptidsystem zeigt zu späten Verzögerungszeiten eine erhöhte Absorption bei 522 nm. Da beim Peptidsystem in keinem der Isomerisierungszustände des HTI eine signifikante Absorption bei 522 nm auftritt kann dieses Signal als Spannung zwischen Schalter und angehängtem Peptid gedeutet werden, die auch nach einigen ns noch nicht vollständig relaxiert ist.

5.2.3 Zeitaufgelöste IR-Spektroskopie

Transiente Absorptionsänderungen

Einen Überblick der transienten IR-Spektroskopie am meta-HTI Photoschalter (mHTI) ist in Abbildung 5.16, am meta-Peptidsystem (mPep) in Abbildung 5.17 gezeigt. In Abbildung 5.18 sind transiente Differenzspektren der selben Datensätze zu ausgewählten

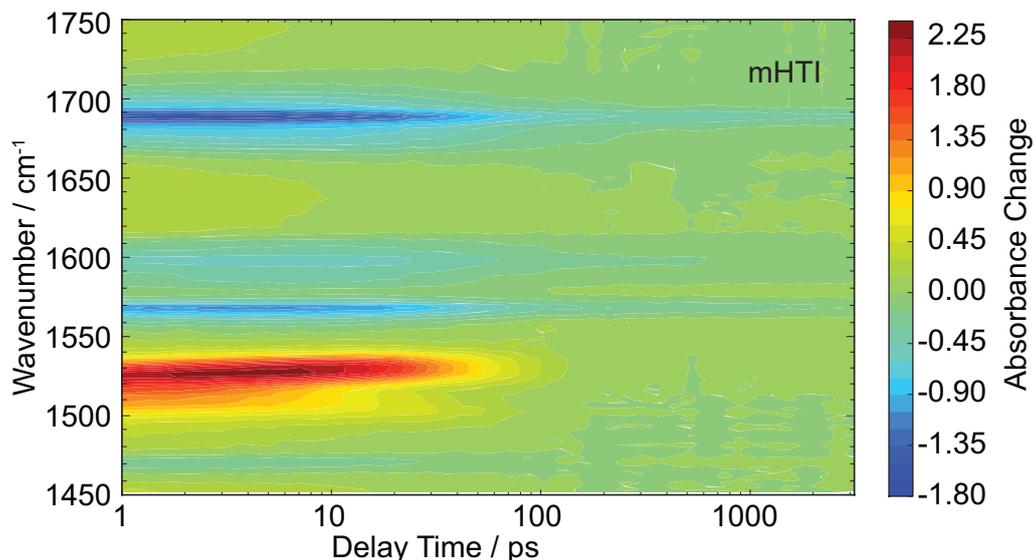


Abbildung 5.16: Transiente Absorptionsänderung der photochemischen Isomerisierung des reinen meta-HTI-Photoschalters nach Anregung bei 400 nm. Die induzierte Absorptionsänderung ist in Falschfarben kodiert.

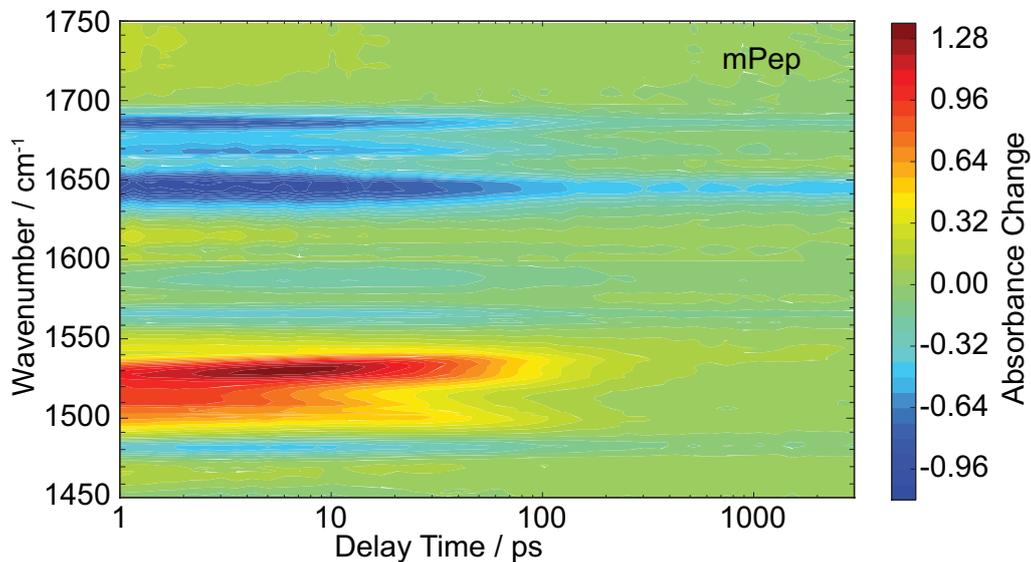


Abbildung 5.17: Transiente Absorptionsänderung der photochemischen Isomerisierung des meta-HTI-Peptidsystems nach Anregung bei 400 nm. Die induzierte Absorptionsänderung ist in Falschfarben kodiert.

Verzögerungszeiten dargestellt. Im Bereich zwischen 1495 cm^{-1} und 1540 cm^{-1} ist eine induzierte Absorption zu erkennen. Diese zeigt, wie bereits beim para-System, die Tendenz zu größeren Frequenzen (Blauverschiebung) mit zunehmender Verzögerungszeit. Zwischen 1550 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} im Bereich der aromatischen C=C Absorptionsbanden tritt ein spektral strukturiertes Ausbleichsignal auf. Ein weiteres stärkeres Ausbleichsignal zeigt sich um 1685 cm^{-1} . Beim mPep zeigen sich zusätzlich weitere Ausbleichsignale bei 1480 cm^{-1} , 1645 cm^{-1} und 1670 cm^{-1} . Beim mHTI finden die wesentlichen Kinetiken sowohl der induzierten Absorption als auch der Ausbleichsignale auf der 30-ps-Zeitskala statt. Lediglich eine niederfrequente Schulter bei 1505 cm^{-1} scheint etwas kurzlebiger ($\sim 10\text{ ps}$) zu sein. Beim mPep findet man ebenfalls eine Signalabnahme auf der 30-ps-Zeitskala, hier jedoch bei den Ausbleichsignalen bei 1670 cm^{-1} und 1685 cm^{-1} sowie in der niederfrequenten Schulter der ESA bei 1505 cm^{-1} . Das Maximum der ESA bei 1530 cm^{-1} und das Ausbleichen im Bereich der Amid I Bande bei 1645 cm^{-1} sowie die Ausbleichsignale der C=C-Schwingungen relaxieren auf der 80-ps-Zeitskala. Die beobachteten Signale der meta-Systeme sind langlebiger als die Signale der para-Systeme (vgl. Abbildungen 5.6, 5.7, 5.8). Wie im Fall der para-Systeme sind die IR-Signale beim Peptidsystem tendenziell länger zu beobachten als beim reinen Photoschalter.

Wie bereits bei den para-Systemen diskutiert, ist an der breiten Absorption im Bereich $1480\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$ zu erkennen, dass sich die Systeme in einem elektronisch angeregten

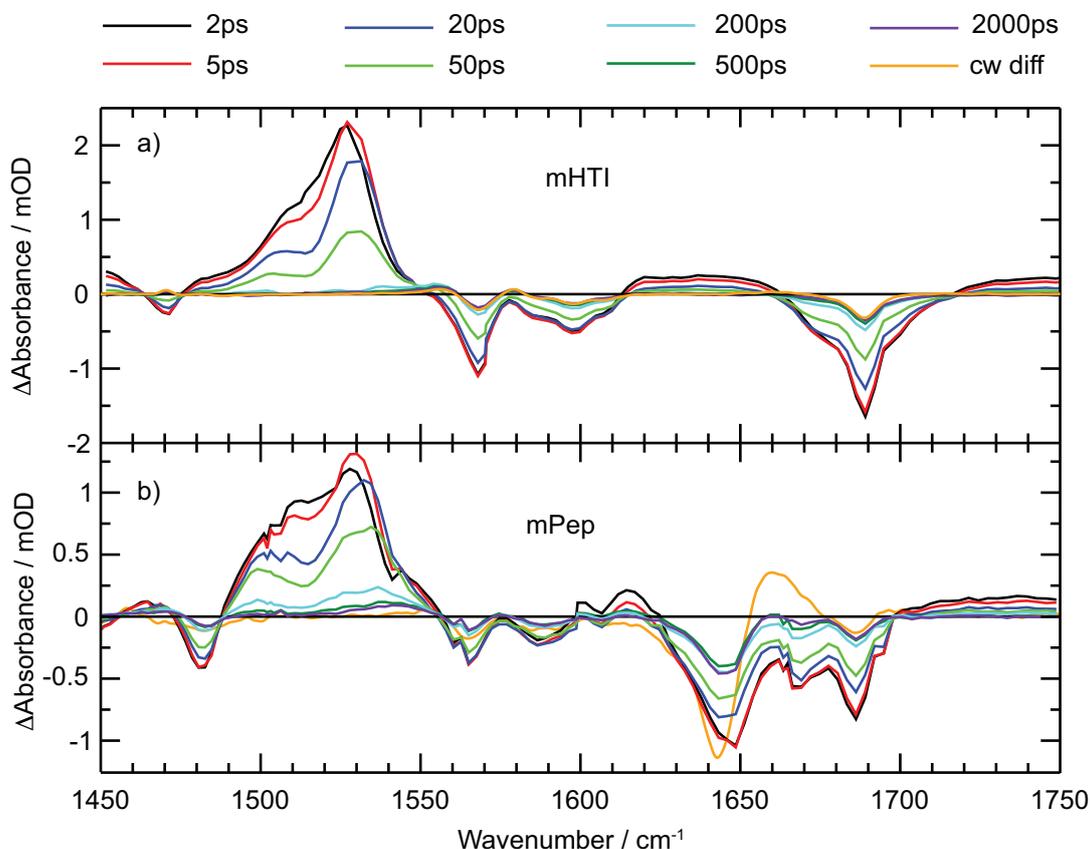


Abbildung 5.18: Transiente Differenzspektren des meta-Systems zu den angegebenen Verzögerungszeiten. a: meta-HTI; b: meta-Peptidsystem. Das stationäre Differenzspektrum (vgl. Abbildung 5.13) ist zusätzlich jeweils in orange eingezeichnet.

Zustand (S_1) befinden. Auch hier zeigen sich die Ausbleichbanden des Peptidsystems (1645 cm^{-1} , 1670 cm^{-1}) zeitgleich mit der charakteristischen Farbstoffbande (CO) bei 1685 cm^{-1} . Die elektronische Anregung erreicht also auch beim mPep die zum IR-Absorptionssignal beitragenden Peptidteile instantan. Das transiente Spektrum zur Verzögerungszeit $t_D = 2\text{ ns}$ ist beim mHTI deckungsgleich mit dem cw-Differenzspektrum, die $Z \rightarrow E$ -Isomerisierung ist zu diesem Zeitpunkt also bereits vollständig abgeschlossen. Beim mPep weicht das Signal bei $t_D = 2\text{ ns}$ im Bereich der Amid I Bande ($1610\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$) deutlich vom cw-Differenzspektrum ab. Offensichtlich laufen beim zyklischen Peptid langsame Strukturänderungen ab, die deutlich oberhalb der Verzögerungszeit liegen, die mit dem verwendeten experimentellen Aufbau erreichbar sind. Die Lebensdauer der Strukturrelaxationen des zyklischen Peptids liegt also offensichtlich deutlich oberhalb der experimentell maximal erreichbaren Verzögerungszeit.

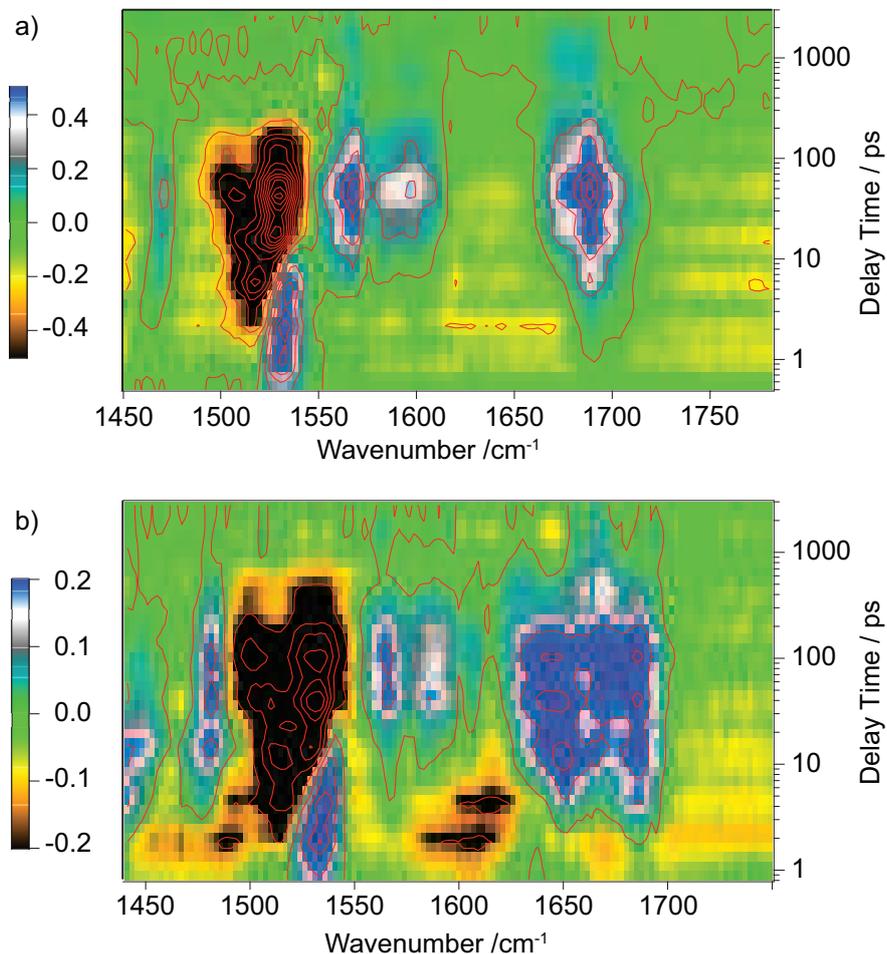


Abbildung 5.19: LDAC-Auswertung der zeitaufgelösten Infrarot-Messungen am meta-HTI-Photoschalter (a) und am meta-HTI-Peptidsystem (b).

LDAC-Auswertung

Abbildung 5.19 zeigt die LDAC-Auswertung der transienten Absorptionsmessungen am mHTI sowie am mPep. Beim mHTI und beim mPep zeigt sich zu sehr frühen Verzögerungszeiten eine Zunahme der Absorption bei 1530 cm^{-1} . Sie erstreckt sich von 1–10 ps. Beim mPep ist in diesem Zeitbereich bei $1450\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ sowie bei $1575\text{--}1625\text{ cm}^{-1}$ eine Signalzunahme zu verzeichnen. Eine zunächst bei 2 ps (1515 cm^{-1}) spektral gut lokalisierte starke Signalabnahme weitet sich bei beiden Systemen auf den Bereich $1490\text{--}1545\text{ cm}^{-1}$ aus. Beim mHTI geschieht dies nach 20 ps, beim mPep nach 30 ps. Die LDAC-Signatur dieser Signalabnahme bleibt beim mHTI bis 200 ps, beim mPep bis 600 ps sichtbar. Signalabnahmen sind sowohl beim mHTI als auch beim mPep dort zu verzeichnen,

wo in den transienten Differenzspektren Ausbleichsignalen auftreten. Beim mHTI ist dies bei 1570cm^{-1} (10–100 ps) und 1600cm^{-1} (20–100 ps) sowie im Frequenzbereich zwischen 1670cm^{-1} und 1700cm^{-1} (5–200 ps). Beim mPep zeigt sich eine spektral breite und zeitlich von 5 ps bis 400 ps ausgedehnte Signalabnahme zwischen 1625cm^{-1} und 1700cm^{-1} . Im Bereich der C=C-Schwingungsbanden (1565cm^{-1} , 1690cm^{-1}) zeigen sich beim mPep LDAC-Signale einer Absorptionsabnahme von 30 ps bis 200 ps. Außerdem ist bei 1480cm^{-1} eine Absorptionsabnahme von 10 ps bis 200 ps sichtbar.

Das LDAC-Signal des mHTI bei 1600cm^{-1} ist als einziges der hier beschriebenen LDAC-Signale zeitlich lokalisiert. Alle anderen in Abbildung 5.19 sind zeitlich ausgedehnt, was auf eine nichtexponentielle Charakteristik der zugrunde liegenden Zerfallsprozesse hindeutet.

Multiexponentielle Datenanpassung

Im Folgenden sind die Ergebnisse der zeitaufgelösten IR-Spektroskopie am meta-System zusammengefasst. Das kinetische Verhalten der meta-Systeme ist dem der para-Systeme qualitativ sehr ähnlich (vgl. 5.1.3). Wie sich bereits bei der stationären IR-Charakterisierung abzeichnet, sind die Absorptionsänderungen im Bereich der Aminosäuren auch bei den zeitaufgelösten Messungen am Peptidsystem signifikant. Wie in den vorhergehend diskutierten Messungen kann die Dynamik auch hier mit vier Zeitkonstanten gut modelliert werden. Die vierte Zeitkonstante wurde hier wie bereits bei den para-Systemen als unendlich groß angenommen $\tau_4 = \infty$, sie beschreibt die Absorptionsdifferenz zwischen den E- und Z-isomeren Formen der Probe.

Z→E	IR			Vis		
	τ_1	τ_2	τ_3	$\tau_{1,\text{vis}}$	$\tau_{2,\text{vis}}$	$\tau_{3,\text{vis}}$
mHTI	3.5 ps	46.7 ps	821.9 ps	6 ps	48 ps	~ 820 ps
mPep	2.8 ps	53.4 ps	650 ps	6 ps	65 ps	~ 550 ps

Tabelle 5.4: Zusammenstellung der Zeitkonstanten des meta-Systems im infraroten und sichtbaren Spektralbereich.

In Tabelle 5.4 sind die bei der multiexponentiellen Datenanpassung der IR-Absorptionsdaten gefundenen Zeitkonstanten aufgetragen. Daneben sind hier die in der Vis-Absorptionsspektroskopie gefundenen Zeitkonstanten nochmals wiedergegeben (vgl. Tabelle 5.3). Wie bei den para-Systemen wurde zur Berechnung der intermediären Differenzspektren ein sequentielles Zerfallsmodell angenommen. Die berechneten Differenzspektren der Intermediate sind in Abbildung 5.20 a) und b) dargestellt. Neben den berechneten Spektren

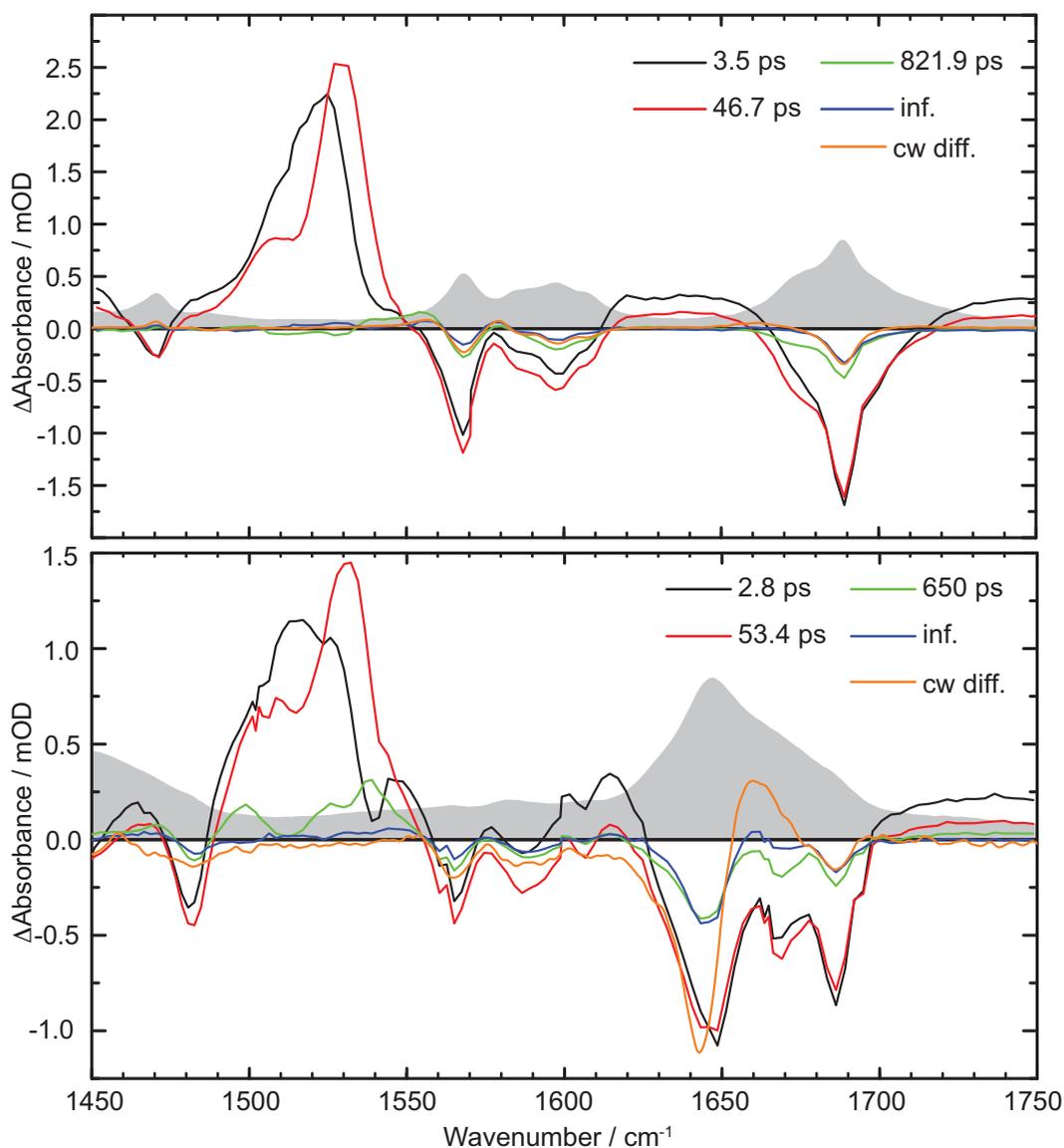


Abbildung 5.20: Differenzspektren der Intermediate berechnet unter Annahme eines sequentiellen Zerfalls. a: mHTI; b: mPep. Die Absorptionsspektren des Z-Isomers sind jeweils grau hinterlegt. Beim mHTI ist es mit der gleichen Skalierung, beim mPep zehn mal kleiner skaliert als das stationäre Differenzspektrum des E-Isomers (orange) eingezeichnet.

finden sich hier auch die stationären Differenzspektren des E-Isomers sowie das Absorptionsspektrum des Z-Isomers. Das stationäre Differenzspektrum des mHTI ist so skaliert, dass es möglichst gut mit dem zur Zeitkonstante $\tau_4 = \infty$ gehörenden intermediären Zustand übereinstimmt. Beim mPep ist das stationäre Differenzspektrum auf die CO-

Schalterbande bei 1670cm^{-1} zur Zeitkonstante τ_4 skaliert. In Abbildung 5.20 a) ist das Absorptionsspektrum des mHTI-Z-Isomers mit der gleichen Skalierung wie das stationäre Differenzspektrum eingetragen. In Abbildung 5.20 b) ist das Absorptionsspektrum des mPep-Z-Isomers mit einer zehnfach kleineren Skalierung als das stationäre Differenzspektrum eingezeichnet. Die zerfallsassoziierten Spektren des mHTI und des mPep sind im Anhang B.1.2 aufgeführt.

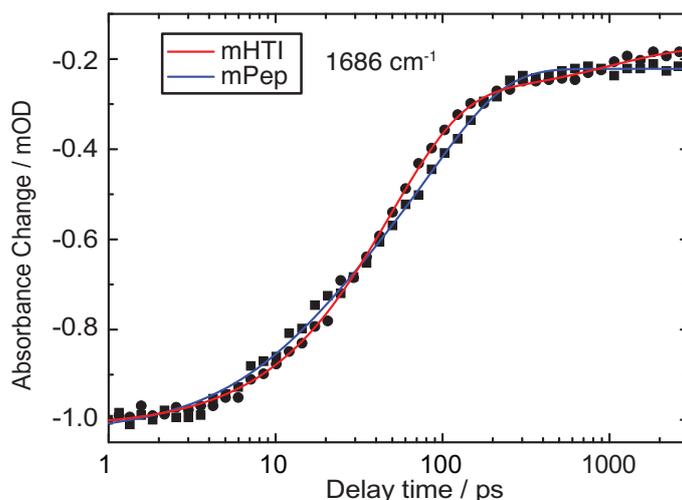


Abbildung 5.21: Vergleich des meta-Schalters (mHTI, Kreise/rot) mit dem meta-Peptidsystem (mPep, Quadrate/blau). Die Daten (Einzelpunkte) sind jeweils mit ihrer Fitfunktion (durchgezogene Linie) dargestellt. Die Abtastwellenlänge beträgt bei beiden Datensätzen 1686 cm^{-1} und zeigt die gut separierte meta-HTI Schalterbande.

Abbildung 5.21 zeigt den direkten Vergleich der ausbleichenden Schalterbande im Bereich der CO-Schwingung (1686 cm^{-1}) des meta-HTI Photoschalters in reiner Form (mHTI, rot) und mit angehängtem Peptidsystem (mPep, blau). Hier erkennt man, dass sich die Zeitkonstante $\tau_2 = 46.7\text{ ps}$ des mHTI Photoschalters auf $\tau_2 = 53.4\text{ ps}$ leicht verzögert. Die zu den Zerfallszeiten $\tau_1 = 3.5\text{ ps}$ und $\tau_2 = 46.7\text{ ps}$ gehörenden intermediären Differenzspektren des mHTI (vgl. 5.20 a) unterscheiden sich im Bereich der Ausbleichsignale der aromatischen Ketobande bei 1690 cm^{-1} sowie bei 1470 cm^{-1} nicht wesentlich. Daneben kommt es außerhalb des ESA-Bereichs ($1480\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$) zu einer spektral weitgehend unstrukturierten, nahezu konstanten Absorptionsabnahme mit τ_1 . Beim mPep ist innerhalb der Ausbleichbanden ($1625\text{--}1695\text{ cm}^{-1}$) nur im Bereich der Amid I Bande bei 1670 cm^{-1} eine Zunahme des Ausbleichsignals mit τ_1 zu verzeichnen. In den Bereichen $1450\text{--}1465\text{ cm}^{-1}$, $1546\text{--}1625\text{ cm}^{-1}$ und $1700\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ ist wieder eine nahezu konstante, spektral weitgehend unstrukturierte Zunahme der Absorption zu erkennen. Das Absorptionssignal in der Schulter bei 1510 cm^{-1} verringert sich beim mHTI mit der Zeit-

konstante τ_1 auf etwa zwei Drittel des ursprünglichen Werts. Beim mPep geht es um etwa ein Drittel zurück. Das Maximum der induzierten Absorption verschiebt sich bei mHTI und bei mPep von 1525 cm^{-1} nach 1530 cm^{-1} .

Sowohl die induzierte Absorption ($1475\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$) als auch die Ausbleichsignale zeigen beim mHTI und beim mPep eine wesentliche Relaxation mit der Zerfallszeit τ_3 . Die intermediären Spektren gehen bis auf wenige Abweichungen auf das intermediäre Differenzspektrum zur Zerfallszeit $\tau_4 = \infty$ zurück. Mit der Zeitkonstante $\tau_3 = 821\text{ ps}$ relaxieren beim mHTI Ausbleichsignale bei 1568 cm^{-1} , 1597 cm^{-1} und im Frequenzbereich der aromatischen Ketogruppe bei 1690 cm^{-1} mit einer niederfrequenten Schulter bis 1675 cm^{-1} . Außerdem relaxiert beim mHTI ein breites ESA-Signal bei 1550 cm^{-1} mit τ_3 . Beim mPep ist es das Ausbleichsignal der Amid I Bande (1667 cm^{-1}), das mit $\tau_3 = 650\text{ ps}$ relaxiert. Bei 1500 cm^{-1} und 1538 cm^{-1} mit einer Schulter bei 1526 cm^{-1} zeigen sich außerdem auch Relaxationen einer ESA mit τ_3 .

5.3 Diskussion

Z \rightarrow E-Isomerisierung

Die in diesem Kapitel diskutierten Spektren und Kinetiken des para-HTI und des meta-HTI-Photoschalters bestätigen die bekannten Modelle der Isomerisierungsreaktionen von HTI-Molekülen (vgl. Kapitel 1). In beiden Fällen sind drei Kinetiken zu beobachten. Die Relaxationszeiten, die bei den im IR durchgeführten multiexponentiellen Signalanalysen gewonnenen wurden, stimmen im Rahmen ihrer Unsicherheiten sehr gut mit den im Vis-Experiment gefundenen Zeiten überein (vgl. Tabellen 5.2, 5.4).

Die Zeitkonstante τ_1 ist mit der Bildung des CTC-Zustands assoziiert. Bei 1510 cm^{-1} zeigt sich bei allen Systemen eine mit τ_1 verknüpfte Bande. Diese Bande ist ein Hinweis auf Veränderungen des Elektronensystems des Schalters und damit der Bildung des CTC-Zustands. Ein weiterer Hinweis auf Änderungen des elektronischen Systems und damit des Vibrationspotentials im S_1 -Zustand ist die beobachtete Blauverschiebung der starken ESA-Banden von etwa 1520 cm^{-1} nach 1530 cm^{-1} . Jedes der untersuchten Systeme zeigt sehr breite, spektral unstrukturierte und mit τ_1 verknüpfte Signallückgänge. Diese Signallückgänge können Relaxations- oder Umorientierungsprozessen der Moleküle im angeregten Zustand zugeordnet werden, da die spektral unspezifische Amplitude keinen Hinweis auf interne Konversion in den Grundzustand gibt. Die Zeitkonstante τ_1 liegt bei allen Systemen im Bereich 3–6 ps.

Mit der Relaxationszeit τ_2 zeigen sowohl die ESA bei $1475\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$, als auch sämtliche Ausbleichsignale einen signifikanten Signallückgang. Dies ist ein direkter Hin-

weis auf starke Änderungen der Molekülkonfiguration, also auf die eigentliche Z→E-Isomerisierung und den Übergang in den elektronischen Grundzustand. Durch die Relaxation des S_1 - in den S_0 -Zustand verschwinden die Schwingungszustände der aromatischen C=C-Bindungen mit Banden bei $1475\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$, die ESA verschwindet dort. Die Schwingungsbanden des S_0 -Zustands des E-Isomers werden im IR-Absorptionsexperiment detektierbar, wodurch die Ausbleichsignale im Wesentlichen auf die Differenzsignale des E-Isomers relaxieren.

Wie bereits in früheren Arbeiten beschrieben wurde [Cor08a, Cor09], sind die τ_2 -Relaxationszeiten beim para-System kleiner als beim meta-HTI Photoschalter. Dies ist auf unterschiedliche Einflüsse auf das Elektronensystem der aromatischen C=C-Bindungen des HTI zurückzuführen.

Nach der Z→E-Isomerisierung zeigen sich bei den Molekülsystemen noch Relaxationen mit τ_3 . Sie befinden sich durchweg in Spektralbereichen, in denen die untersuchten Stoffsysteme auch eine signifikante stationäre IR-Absorption zeigen. Eine mögliche Interpretation hiervon ist die Relaxation langlebiger Triplett-Zustände, die durch Interkombination (ISC) aus dem angeregten Singulett-Zustand besetzt werden können. Alternativ könnten hier Strukturrelaxation der Molekülgruppen und ihrer Umgebung im elektronischen Grundzustand (S_0) zum IR-Signal beitragen.

Peptidsysteme

Bei den zeitaufgelösten IR-Absorptionsmessungen der Peptidsysteme ist neben der Dynamik der Schalter auch der Einfluss der anhängenden Peptide auf die Kinetik der Isomerisierungsreaktion deutlich zu erkennen. Die Banden der Aminosäuren sind hierbei mit den gleichen Zeitkonstanten verknüpft wie die Banden der HTI-Photoschalter. Es ist besonders bemerkenswert, dass nach Anregung bei 400 nm die Ausbleichsignale im Bereich der Amid I Bande zeitgleich mit dem Ausbleichen der Schalterbanden auftreten. Hierfür gibt es mehrere Erklärungsansätze. Durch die Anregung des Photoschalters scheinen die Elektronensysteme der Aminosäuren instantan verändert zu werden. Sowohl beim pPep als auch beim mPep ist das Ausbleichen der Amid I Bande etwa in der gleichen Größenordnung wie das Ausbleichen der C=O Bande bei 1685 cm^{-1} . Dies kann als experimenteller Hinweis gewertet werden, dass bei beiden Peptidsystemen etwa die gleiche Anzahl von Amid I Schwingungen ausbleichen. Da aber das Peptid des mPep deutlich (etwa $3\times$) mehr Aminosäuren aufweist, ist davon auszugehen, dass gerade die Aminosäuren in unmittelbarer Nähe des Schalters zum instantanen Ausbleichsignal beitragen.

Die Signale der Photoschalter zeigen jeweils eine breite Bande ($\sim 1650\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$), die dem Ausbleichsignal der aromatischen Ketogruppe (1685 cm^{-1}) überlagert ist. Diese rührt von der C=O-Bande der Säurefunktion her. Der hochfrequente Ausläufer dieser

Bande ist bei den Peptidsystemen nicht mehr detektierbar. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die C=O-Bindung der Säurefunktion durch die Peptidbindung modifiziert wird. Dass diese breite Bande bei den Photoschaltern instantan nach der Anregung sichtbar ist, zeigt, dass die elektronische Anregung tatsächlich eine Reichweite bis in die Peptidbindung hinein aufweist.

Die Hauptänderung des Signals mit τ_1 findet bei den Peptidsystemen, wie bereits bei den Photoschaltern, im Bereich $1475\text{--}1550\text{cm}^{-1}$ statt. Diese Änderung des IR-Absorptionssignals wird oben mit Veränderungen des elektronischen Systems des Schalters im S_1 und damit der Bildung des CTC-Zustandes erklärt. Da aber die Peptidbanden im Bereich $1625\text{--}1675\text{cm}^{-1}$ mit τ_1 kaum geändert werden, scheint diese Veränderung im Elektronensystem des Schalters kaum Einflüsse auf die Aminosäuren in unmittelbarer Nähe des Schalters zu haben. Lediglich bei 1670cm^{-1} deutet sich bei beiden Peptidsystemen ein Rückgang des Ausbleichsignals mit τ_1 an. Auf dieser Frequenzposition könnte die durch die Peptidbindung modifizierte C=O-Bindung der Säuregruppe Absorption zeigen. Der Signalarückgang mit τ_1 würde sich dann aus der unmittelbaren Nähe zum Schalter und damit der Modifikation der Bindung durch Veränderung im elektronischen System des Schalters erklären.

Sowohl im para- als auch im meta-System ist die Zeitkonstante τ_2 bei den Peptidsystemen größer als bei den reinen Schalterssystemen. Dies kann, wie in Kapitel 4 und in [Cor08a, Cor08b] diskutiert wird, durch das Verhalten des Hemithioindigo bei Substitution erklärt werden. Durch die Bindung an das Peptid wird die Elektronendichte im Photoschalter beeinflusst. Dabei wird die Barriere zwischen dem CTC-Zustand und dem Übergangszustand beziehungsweise der konischen Durchschneidung, also die Potentiallandschaft des Photoschalters, beeinflusst. Daher läuft die Isomerisierungsreaktion mit unterschiedlichen Substituenten unterschiedlich schnell ab. Da die Relaxationszeit τ_1 nahezu unabhängig davon ist, ob ein Peptid an den Photoschalter gebunden ist, kann man schlussfolgern, dass sich die Änderung der Elektronendichte durch die Peptidbindung nicht auf die Bildung des CTC-Zustands auswirkt. Durch die Bindung an die langkettigen Peptide könnte es auch zu sterischen Wechselwirkungen kommen, die die Isomerisierungsreaktion behindern. Dies würde ebenfalls zu einer Verlangsamung der Zeitkonstante τ_2 führen.

Mit der Zeitkonstante τ_2 läuft die eigentliche Isomerisierungsreaktion ab, die HTI-Photoschalter befinden sich danach im Grundzustand des E-Isomers. Sowohl bei den reinen Schaltermolekülen, als auch bei den Peptidsystemen sind Signalanteile, die mit τ_3 relaxieren, nachzuweisen. Wie bereits oben diskutiert sind diese Signalanteile langlebigen Tripletzuständen oder Strukturrelaxationen der Molekülgruppen und ihrer Umgebung im elektronischen Grundzustand (S_0) zuzuordnen. Diese Umorientierungen betreffen auch

die an den Photoschalter gebundenen Peptide. Bei den Peptidsystemen ist eine deutliche zeitliche Ausdehnung der LDAC-Signale im Bereich der Amid I Bande und der aromatischen Ketogruppe im Vergleich zu den reinen Photoschaltern festzustellen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Kinetik der Isomerisierungsreaktionen bei den Peptidsystemen deutlich von einem multiexponentiellen Verhalten abweicht. Durch die Verbindung mit den Peptidsystemen wird die Isomerisierungsreaktion offensichtlich deutlich komplexer. Die Zeitkonstanten aus der multiexponentiellen Datenanpassung sollten aber die Zeitskala, auf der die Kinetiken ablaufen, dennoch gut wiedergeben.

Die Signalunterschiede zwischen dem mit τ_3 verknüpften Intermediat und dem intermediären $\tau_4 = \infty$ Differenzspektrum sind beim zyklischen mPep deutlich größer als beim pPep. Verspannungen zwischen dem relativ kurzen linearen pPep und dem Photoschalter relaxieren offensichtlich auf der selben Zeitskala auf der auch die Isomerisierungsreaktion stattfindet. Mit der Zeitkonstante τ_3 relaxieren beim pPep sowohl die Signale des Schalters wie auch die des Peptids. Da das mit τ_4 assoziierte intermediäre Differenzspektrum sehr gut mit dem stationären Differenzspektrum des E-Isomers übereinstimmt, kann davon ausgegangen werden, dass die photoinduzierte Isomerisierungsreaktion innerhalb des Beobachtungszeitraums von 3 ns beim pPep vollständig abgeschlossen ist.

Im Fall des meta-Peptidsystems muss der Photoschalter durch seine Isomerisierung die Morphologie eines starren und strukturierten Peptids ändern. Wie aus den Vis-Messungen (Abschnitt 5.2.2; Abbildung 5.14) abzulesen ist, befindet sich das HTI-Schaltermolekül nach der Relaxationszeit τ_2 bereits im Grundzustand des E-Isomers. Eine deutliche induzierte Absorption zu Verzögerungszeiten im ns-Bereich deutet aber darauf hin, dass das Schaltermolekül noch nicht vollständig relaxiert ist. Auch in den IR-Daten ist bei den zu τ_3 und τ_4 gehörigen intermediären Differenzspektren noch ein deutlicher Unterschied zum stationären Differenzspektrum des E-Isomers zu erkennen. Insbesondere das Ausbleichsignal der Amid I Bande unterscheidet sich vom cw-Differenzspektrum. Die spektrale Position dieses Signals befindet sich zur experimentell maximal einstellbaren Verzögerungszeit ($\tau = 3$ ns) bei 1645 cm^{-1} , wohingegen sich das Extremum des stationären Ausbleichsignals etwas niederfrequenter bei 1642 cm^{-1} findet. Diese Blauverschiebung gegenüber dem stationären Fall deutet auf leichte Verspannungen des Moleküls im Bereich der Aminosäuren hin. Zur vollständigen Relaxation des mPep müssen noch weitere Reaktionen ablaufen um zum statischen Verhalten des Moleküls zu gelangen. Untersuchungen an Azo-Chromopeptiden [Ren06] haben gezeigt, dass ausgeprägte Strukturänderungen nach einer stark getriebenen Phase im Pikosekundenbereich allosterisch ablaufen. Die Teile des Peptids passen sich geänderten Schaltergeometrien auf der Mikrosekunden-Zeitskala nur schrittweise an. Erst nach diesen langsamen Änderungen der Peptidstruktur liegt das Peptid in seiner endgültigen geänderten Struktur vor. Der Vergleich mit den Un-

tersuchungen an Azo-Chromopeptiden legt die Vermutung nahe, dass sich das Peptid auch im Fall des zyklischen meta-Peptidsystems allosterisch seiner Endform annähert. Es ist anzunehmen, dass die allosterische Relaxation des Peptids analog zu den Untersuchungen an Azo-Chromopeptiden auf der Mikrosekunden-Zeitskala ablaufen.

Zusammenfassung

Die oben diskutierten Thesen sind nachfolgend zusammengefasst.

- Die elektronische Anregung des HTI erreicht die Aminosäuren in unmittelbarer Nähe des Schaltermoleküls instantan.
- Mit der Zeitkonstante τ_1 (3–6 ps) relaxiert das Schaltermolekül im angeregten S_1 -Zustand und bildet den CTC-Zustand. Dies ist unabhängig davon ob es mit einem Peptid verbunden ist.
- Die Isomerisierung des HTI-Photoschalters findet mit der Zeitkonstante τ_2 (pHTI: 12.3 ps; pPep: 22.9; mHTI: 46.7 ps; mPep: 53.4) statt.
- Die Isomerisierung der Peptidsysteme ist stets langsamer als die der reinen Photoschalter. Dies könnte sowohl auf Änderungen der Elektronendichte des HTI als auch auf sterische Wechselwirkungen der Peptidteile des Moleküls zurückzuführen sein.
- Die reinen Schalter-Systeme, sowie das lineare para-Peptidsystem zeigen direkt nach der Isomerisierung eine langlebige Signalkomponente. Diese relaxiert innerhalb des Beobachtungszeitraums mit τ_3 (pHTI: 500 ps; pPep: 550; mHTI: 822 ps) vollständig. Sie kann entweder der Relaxation langlebiger Triplett-Zustände oder Strukturrelaxationen der Moleküle zugeordnet werden.
- Das zyklische meta-Peptidsystem zeigt auch bei der maximal einstellbaren Verzögerungszeit noch deutliche Abweichungen vom stationären Differenzsignal. Dies deutet auf allosterische Strukturänderungen auf der Mikrosekunden-Zeitskala in Analogie zu Azo-Chromopeptiden hin.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der zeitaufgelösten Untersuchung von Hemithioindigo (HTI) im infraroten Spektralbereich. Das photochrome Hemithioindigo kann im Zeitbereich von etwa 10ps eine lichtinduzierte Z→E Isomerisierung ausführen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese ultraschnellen Photoreaktionen des Hemithioindigo vor dem Hintergrund biophysikalischer Anwendungen untersucht. Der Schwerpunkt der Untersuchungen liegt auf dem infraroten Spektralbereich. Hier lagen bislang kaum spektroskopische Daten zu Hemithioindigo vor. Der experimentelle Zugang gelingt durch zeit- und frequenz aufgelöste Anreg- Abtastspektroskopie, sowie weiterer Techniken zur stationären Charakterisierung der untersuchten Stoffsysteme. Ferner wurden zeitaufgelöste Daten aus der Absorptionsspektroskopie im sichtbaren Spektralbereich und aus der Fluoreszenzspektroskopie verwendet. Mit Hilfe dieser Techniken konnten wichtige Informationen zur strukturellen Dynamik des Isomerisierungsprozesses von Hemithioindigo und Hemithioindigo-Chromopeptiden gewonnen und ein tieferes Verständnis des Z→E-Isomerisierungsprozesses erhalten werden.

Das aus [Cor07] bekannte Modell der Isomerisierungskinetik von HTI-Schaltermolekülen kann durch transiente Absorptionsexperimente im IR gestützt werden. Nach optischer Anregung mit einem Lichtimpuls bei 400nm erfolgt die Absorption in einen angeregten Zustand (FC*) im Franck-Condon Bereich. Dabei ändert sich das Dipolmoment des Z-Isomers. Dies bewirkt zunächst dynamische Solvatationsprozesse, die auf der Zeitskala von Femtosekunden unter Inversion von Einzel- und Doppelbindungscharakter in einen relaxierten Zustand RS führen. Dieser rein elektronische Relaxationsprozess kann nur im sichtbaren, nicht aber im infraroten Spektralbereich beobachtet werden. Als nächstes wird der Zustand CTC mit Ladungstrennungscharakter erreicht. Der Übergang in den CTC-Zustand kann durch signifikante Änderungen des IR-Spektrums des angeregten Zustands beobachtet werden. Eine Potentialbarriere trennt diesen Zustand von dem Übergangsbereich zwischen S_1 und S_0 , von dem aus die Population des Grundzustands möglich ist. Dieses sequentielle Reaktionsschema des Z→E-Isomerisierungsprozesses bildete die Grundlage für die Auswertung der IR-Daten zum Substituenteneinfluss und bei den untersuchten HTI-Chromopeptid-Systemen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Substituenten am Stilbenteil des Hemithioindigo im IR untersucht. Die verschiedenen Substituenten beeinflussen das Elektronensystem des Photoschalters und damit die Kinetik des Isomerisierungsprozesses. Diese Untersuchungen wurden in Ergänzung zu den in [Cor08c, Cor08a] beschriebenen

nen transienten Absorptionsexperimenten durchgeführt. Als Substituenten wurden Gruppen mit starken Elektronen-Donor- (OMe-HTI) und Elektronen-Akzeptor-Eigenschaften (CN-HTI) in para-Position am Stilbenteil des Hemithioindigo verwendet. Ferner wurde das unsubstituierte HTI-Chromophor (H-HTI) untersucht. In den stationären Vis-Daten zeigt sich, dass das Absorptionsspektrum und damit die energetische Lage des Franck-Condon Zustands FC* durch die Substitution weitgehend unbeeinflusst bleibt. Die Substitution hat aber einen deutlichen Einfluss auf die stationären Infrarotspektren. So können die Auswirkungen effektiver Ladungsverschiebungen in der Struktur des Hemithioindigo-Moleküls durch die verschiedenen Substituenten beobachtet werden. In der zeitaufgelösten IR-Spektroskopie des photoinduzierten Z→E-Isomerisierungsprozesses zeigt sich, dass die Kinetiken für die verschiedenen Substitutionen stark unterschiedlich sind. Die Isomerisierung findet beim H-HTI mit $\tau_3 = 192.9$ ps, beim OMe-HTI mit $\tau_3 = 16.4$ ps statt. Diese Ergebnisse sind gut mit den Vis-Experimenten vergleichbar. Der Abschluss der Isomerisierungsreaktion des CN-HTI kann innerhalb des experimentell zugänglichen Beobachtungszeitraums (ca. 3 ns) noch nicht beobachtet werden. Bei allen drei Stoffsystemen zeigen sich Signaturen von Abkühlvorgängen im Zeitbereich 1–10 ps. Beim OMe-HTI ist dieser Abkühlvorgang der Isomerisierung überlagert. Durch ein Vergleich der Amplituden der Ausbleichbanden mit der cw-Absorption kann die Quantenausbeute der Isomerisierungsreaktionen abgeschätzt werden. Es zeigt sich, dass nahezu alle OMe-HTI, etwa die Hälfte der H-HTI und vermutlich weniger als die Hälfte der photoangeregten CN-HTI-Moleküle tatsächlich vom Z- in den E-isomeren Zustand übergehen. Die Energiebarriere, die die Geschwindigkeit der Isomerisierungskinetik bestimmt, steigt von OMe- über H- bis zu CN-HTI an. Auch dies ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den zeitaufgelösten Vis-Experimenten. Im transienten IR-Signal beobachtet man sowohl den Isomerisierungsprozess als auch eine Relaxation in den Grundzustand des Z-Isomers oder eine Besetzung von Triplett-Zuständen. Nach der eigentlichen Isomerisierung beobachtet man beim OMe- und beim H-HTI Strukturrelaxationen des Moleküls im elektronischen Grundzustand. Alternativ könnten diese IR-Signale auch ein Hinweis auf die Relaxation langlebiger Triplett-Zustände sein. Die gefundenen Ergebnisse zum Einfluss von Substituenten auf die Isomerisierungsreaktion von HTI können dazu genutzt werden, Photoschalter zur Beeinflussung der Struktur biologisch relevanter Peptide maßzuschneidern.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen an zwei verschiedenen Chromopeptidsystemen vorgestellt. Zum einen wurde der Hemithioindigo-Photoschalter in ein lineares Peptidsystem, zum anderen in ein zyklisches Peptidsystem eingebaut. Das zyklische Peptid ist ein Modellsystem für eine β -Hairpin Peptidstruktur. Die Aminosäuren des linearen Peptidsystems waren in para-, die des zyklischen Peptidsystems in meta Position

an den Stilbenteil des HTI angebracht. Parallel zu den Chromopeptiden wurden die entsprechenden reinen Photoschalter mit stationärer und zeitaufgelöster Spektroskopie im sichtbaren und infraroten Spektralbereich untersucht. Die in diesem Abschnitt der Arbeit diskutierten Spektren und Kinetiken des Hemithioindigo Photoschalters bestätigen die bekannten Modelle der Reaktionen von Hemithioindigo-Molekülen. Die Schaltermoleküle relaxieren mit der Zeitkonstante τ_1 (3–6 ps) im angeregten S_1 -Zustand und bilden den CTC-Zustand. Dies ist unabhängig davon, ob sie mit einem Peptid verbunden sind. Ferner ist aus den transienten IR-Daten abzulesen, dass die elektronische Anregung des HTI die Aminosäuren der Peptidsysteme in unmittelbarer Nähe des Schaltermoleküls instantan erreicht. Die Isomerisierung der para-Systeme läuft schneller ab (pHTI: 12.3 ps, pPep: 22.9 ps) als die der meta-Systeme (mHTI: 46.7 ps, mPep: 53.4 ps)). Ferner ist zu beobachten, dass die Isomerisierung der Peptidsysteme stets langsamer ist als die der reinen Photoschalter. Dies kann sowohl auf Änderungen der Elektronendichte des HTI, als auch auf sterische Wechselwirkungen der Peptidteile des Moleküls zurückgeführt werden. Die reinen Schaltersysteme sowie das lineare para-Peptidsystem zeigen direkt nach der Isomerisierung nur mehr kleine Verspannungen im Molekül. Diese relaxieren innerhalb des Beobachtungszeitraums vollständig. Das zyklische meta-Peptidsystem zeigt auch bei der maximal einstellbaren Verzögerungszeit zwischen Anreg- und Abtastimpuls noch deutliche Abweichungen vom stationären IR-Differenzsignal. Analog zu Untersuchungen an Azo-Chromopeptiden werden allosterische Strukturänderungen auf der Mikrosekunden-Zeitskala vermutet.

Alle zeitaufgelösten Daten wurden mit multiexponentiellen Modellen angepasst. Diese Art der Anpassung gibt sicherlich einen guten Überblick über die Dynamik der untersuchten Proben. Die transienten Infrarotspektren der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Stoffsysteme zeigen aber an verschiedenen Stellen deutlich, dass multiexponentielle Zerfallsschemata nicht immer zur Beschreibung der Kinetiken ausreichen, wie es etwa bei den Untersuchungen zu den verschiedenen Substituenten auftretenden Abkühlvorgängen der Fall ist. Dies wird auch an den LDAC-Auswertungen der zeitaufgelösten Infrarotdaten deutlich. In Zukunft könnte sich hier ein interessanter Ansatz für eine detailliertere Beschreibung schneller Reaktionen von Biopolymeren ergeben.

Anhang A

Glossar

A.1 Buchstabencode der Aminosäuren

Aminosäure	Ein-Buchstaben-Code	Drei-Buchstaben-Code
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Aspartat	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamat	E	Glu
Glutamin	Q	Gln
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

Tabelle A.1: Ein- bzw. Zwei-Buchstaben-Code der Aminosäuren.

Anhang B

Messdaten und Zwischenergebnisse

In diesem Anhang-Kapitel werden Graphen von Messdaten und Zwischenergebnissen dargestellt, die keinen Eingang in den Hauptteil der vorliegenden Arbeit gefunden haben, aber für die Diskussion zukünftiger ähnlich gearteter Messungen möglicherweise wertvoll sind.

B.1 Zerfallsassoziierte Spektren

B.1.1 HTI Stilben Substitution

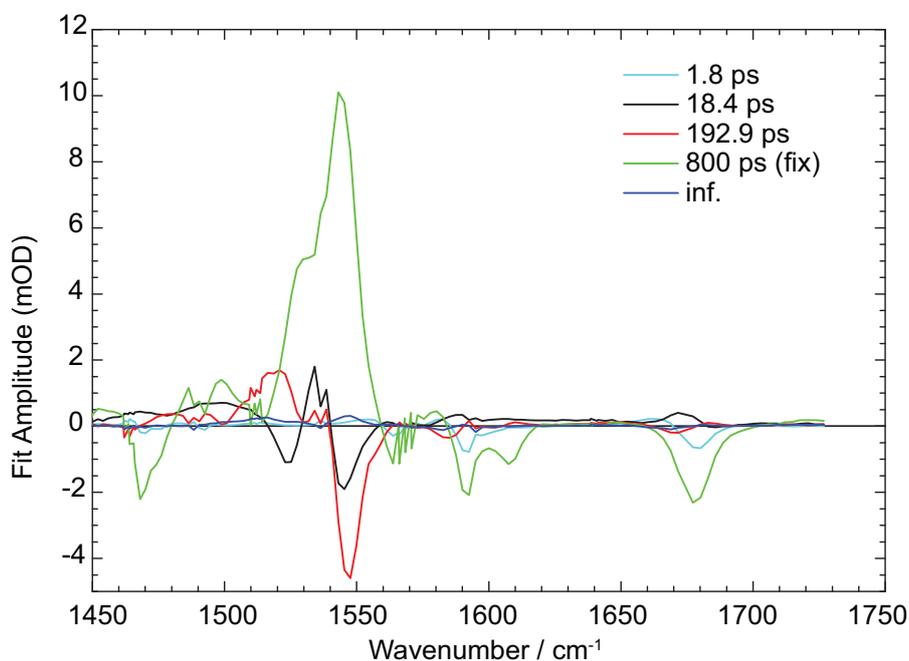


Abbildung B.1: Zerfallsassoziierte Spektren der Absorptionsänderung zu den angegebenen exponentiellen Zerfallszeiten des unsubstituierten HTI-Chromophors.

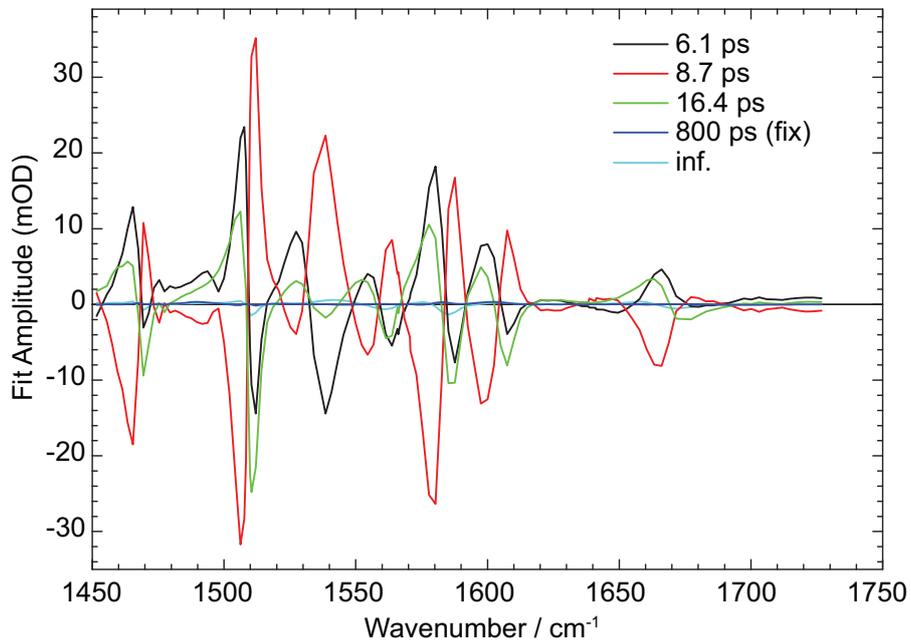


Abbildung B.2: Zerfallsassoziierte Spektren der Absorptionsänderung zu den angegebenen exponentiellen Zerfallszeiten des Methoxy-substituierten HTI-Chromophors.

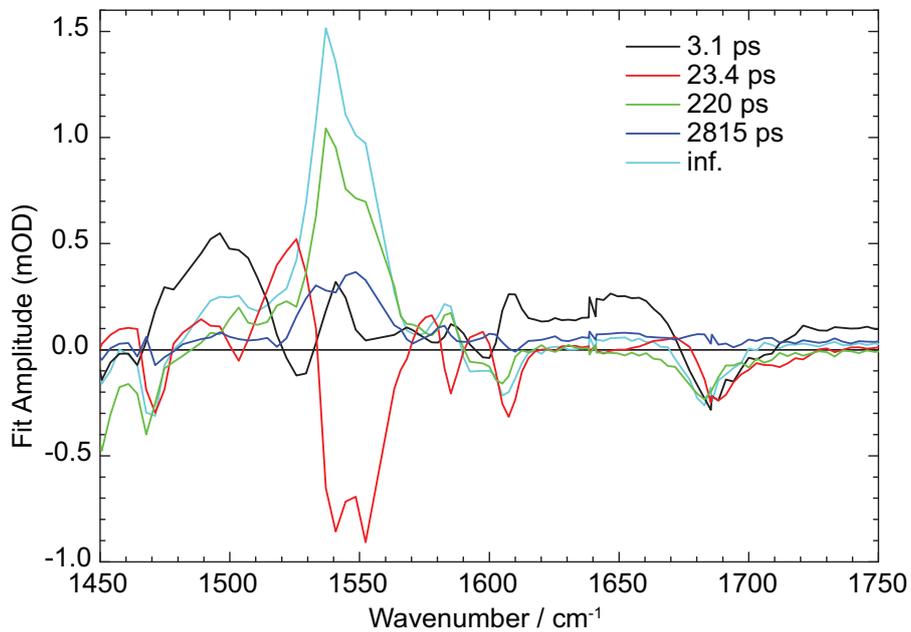


Abbildung B.3: Zerfallsassoziierte Spektren der Absorptionsänderung zu den angegebenen exponentiellen Zerfallszeiten des Nitril-substituierten HTI-Chromophors.

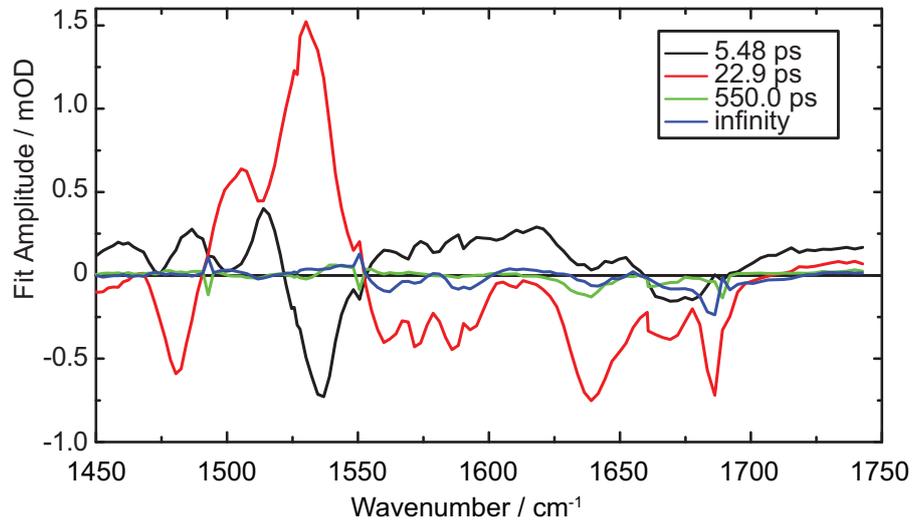
B.1.2 Chromopeptide auf Basis der HTI ω -Aminosäure

Abbildung B.4: Zerfallsassoziierte Spektren der Absorptionsänderung zu den angegebenen exponentiellen Zerfallszeiten des linearen para-Peptidsystems.

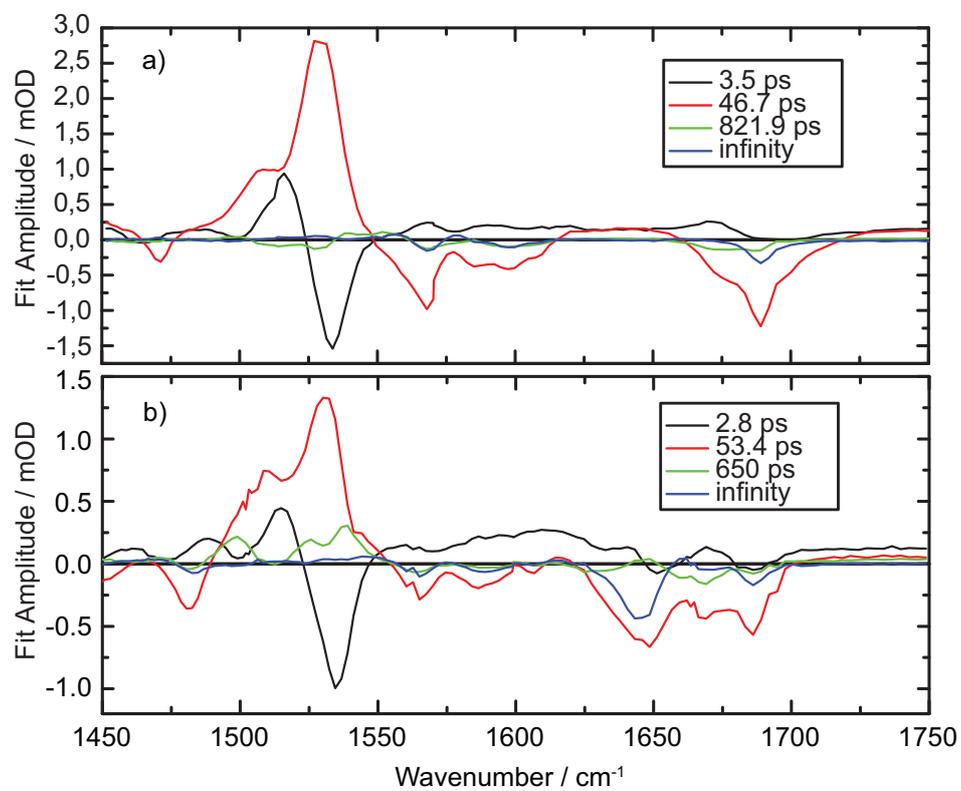


Abbildung B.5: Zerfallsassoziierte Spektren der Absorptionsänderung zu den angegebenen exponentiellen Zerfallszeiten des meta-HTI (a) und des meta-Peptidsystems (b).

Literaturverzeichnis

- [Agg88] R. L. AGGARWAL, A. SANCHEZ, M. M. STUPPI, R. E. FAHEY, A. J. STRAUSS, W. R. RAPOPORT, C. P. KHATTAK. *Residual Infrared Absorption in As-Grown and Annealed Crystals of Ti:Al₂O₃*. IEEE Journal of Quantum Electronics 24(6):1003–1008, 1988.
- [Ane65] F. A. ANET, A. J. R. BOURN. *Nuclear Magnetic Resonance Spectral Assignments from Nuclear Overhauser Effects*. Journal of the American Chemical Society 87:5250, 1965.
- [Arn71] J. A. ARNAUD, W. M. HUBBARD, MANDEVIL.GD, B. D. CLAVIERE, E. A. FRANKE, J. M. FRANKE. *Technique for Fast Measurement of Gaussian Laser Beam Parameters*. Appl. Optics 10(12):2775–2776, 1971. Letter APPL OPT.
- [Bau92] W. BAUMANN, H. BISCHOF, J. C. FROHLING, C. BRITTINGER, W. RETTIG, K. ROTKIEWICZ. *Considerations on the dipole moment of molecules forming the twisted intramolecular charge transfer state*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 64:49–72, 1992.
- [Bie99] O. BIERI, T. KIEFHABER. *Elementary Steps in Protein Folding*. Biological Chemistry 380:923–929, 1999.
- [Bre03a] J. BREDENBECK, J. HELBING, R. BEHRENDT, C. RENNER, L. MORODER, J. WACHTVEITL, P. HAMM. *Transient 2D-IR spectroscopy: Snapshots of the non-equilibrium ensemble during the picosecond conformational transition of a small peptide*. The Journal of Physical Chemistry B 107:8654–8660, 2003.
- [Bre03b] J. BREDENBECK, J. HELBING, A. SIEG, T. SCHRADER, W. ZINTH, C. RENNER, R. BEHRENDT, L. MORODER, J. WACHTVEITL, P. HAMM. *Picosecond conformational transition and equilibration of a cyclic peptide*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:6452–6457+10580, 2003.
- [Cer03] G. CERULLO, S. DE SILVESTRI. *Ultrafast optical parametric amplifiers*. Rev. Sci. Instrum. 74(1):1–18, 2003. Review REV SCI INSTR Part 1.
- [Cor53] C. COREY, L. PAULING. *Fundamental Dimensions of Polypeptide Chains*. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 141:10–20, 1953.

- [Cor07] T. CORDES, B. HEINZ, N. REGNER, C. HOPPMANN, T. SCHRADER, W. SUMMERER, K. RÜCK-BRAUN, W. ZINTH. *Photochemical Z→E Isomerization of Hemithioindigo/Hemistilbene ω -amino-acid*. ChemPhysChem 8:1713–1721, 2007.
- [Cor08a] T. CORDES. *Ultrakurzzeitspektroskopie von Hemithioindigo und biophysikalisch relevante Derivaten*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, 2008.
- [Cor08b] T. CORDES, T. SCHADENDORF, B. PRIEWISCH, K. RÜCK-BRAUN, W. ZINTH. *The Hammett-Relationship and Reactions in the Excited Electronic State: Hemithioindigo Z/E-Photoisomerization*. The Journal of Physical Chemistry A 112:581–588, 2008.
- [Cor08c] T. CORDES, T. SCHADENDORF, K. RÜCK-BRAUN, W. ZINTH. *Chemical Control of Hemithioindigo Photoisomerization - Substituent Effects on Different Molecular Parts*. Chemical Physics Letters Eingereicht, 2008.
- [Cor09] T. CORDES, C. ELSNER, T. T. HERZOG, C. HOPPMANN, T. SCHADENDORF, W. SUMMERER, K. RÜCK-BRAUN, W. ZINTH. *Ultrafast Hemithioindigo-based peptide-switches*. Chemical Physics 358:103–11, 2009.
- [Don97] H. DONG, R. J. O'BRIEN, E. T. FUNG, P. F. LANAHAN, A. A. WORLEY, R. L. HUNGANIR. *GRIP: a synyptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors*. Nature 386:279, 1997.
- [Egg88] J. M. EGGLESTON, L. G. DE SHAZER, K. W. KANGAS. *Characteristics and Kinetics of Laser-Pumped Ti:Sapphire Oscillators*. IEEE Journal of Quantum Electronics 24(6):1009–1015, 1988.
- [Fie07] B. FIERZ, H. SATZGER, C. ROOT, P. GILCH, W. ZINTH, T. KIEFHABER. *Loop formation in unfolded polypeptide chains on the picoseconds to microseconds time scale*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:2163–2168, 2007.
- [Fle86] G. R. FLEMING. *Chemical Applications of Ultrafast Spectroscopy*. Oxford University Press, New York, 1986.
- [For84] R. L. FORK, O. E. MARTINEZ, J. P. GORDON. *Negative dispersion using pairs of prisms*. Optics Letters 9(5):150–152, 1984.

- [Fri98] M. J. FRISCH, G. W. TRUCKS, H. B. SCHLEGEL, G. E. SCUSERIA, M. A. ROBB, J. R. CHEESEMAN, V. G. ZAKRZEWSKI, J. A. MONTGOMERY, JR., R. E. STRATMANN, J. C. BURANT, S. DAPPRICH, J. M. MILLAM, A. D. DANIELS, K. N. KUDIN, M. C. STRAIN, O. FARKAS, J. TOMASI, V. BARONE, M. COSSI, R. CAMMI, B. MENNUCCI, C. POMELLI, C. ADAMO, S. CLIFFORD, J. OCHTERSKI, G. A. PETERSSON, P. Y. AYALA, Q. CUI, K. MOROKUMA, D. K. MALICK, A. D. RABUCK, K. RAGHAVACHARI, J. B. FORESMAN, J. CIOSLOWSKI, J. V. ORTIZ, A. G. BABOUL, B. B. STEFANOV, G. LIU, A. LIASHENKO, P. PISKORZ, I. KOMAROMI, R. GOMPERTS, R. L. MARTIN, D. J. FOX, T. KEITH, M. A. AL-LAHAM, C. Y. PENG, A. NANAYAKKARA, C. GONZALEZ, M. CHALLACOMBE, P. M. W. GILL, B. JOHNSON, W. CHEN, M. W. WONG, J. L. ANDRES, C. GONZALEZ, M. HEAD-GORDON, E. S. REPLOGLE, J. A. POPLE. *Gaussian 98, Revision A.7*, 1998.
- [Fus00] W. FUSS, Y. HAAS, S. ZILBERG. *Twin states and conical intersections in linear polyenes*. *Chemical Physics* 259:273–295, 2000.
- [Fus04a] W. FUSS, C. KOSMIDIS, W. E. SCHMID, S. A. TRUSHIN. *The lifetime of the perpendicular minimum of cis-stilbene observed by dissociative intense-laser field ionization*. *Chemical Physics Letters* 385:423–430, 2004.
- [Fus04b] W. FUSS, C. KOSMIDIS, W. E. SCHMID, S. A. TRUSHIN. *The photochemical cis-trans isomerization of free stilbene molecules follows a hula-twist pathway*. *Angewandte Chemie-International Edition Engl.* 43:4178–4182, 2004.
- [Gia03] S. GIANNI, N. R. GUYDOSH, F. KHAN, T. D. CALDAS, U. MAYOR, G. W. N. WHITE, M. L. DEMARCO, V. DAGGETT, A. R. FERSHT. *Unifying features in protein-folding mechanisms*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 23:13286–13291, 2003.
- [Gün96] H. GÜNZLER, H. M. HEISE. *IR-Spektroskopie*. VCH, Weinheim, 1996.
- [Ham94] P. HAMM. *Femtosekunden Infrarotspektroskopie an bakteriellen Reaktionszentren von Rhodobacter sphaeroides*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1994.
- [Ham97] P. HAMM, S. M. OHLIN, W. ZINTH. *Vibrational cooling after ultrafast photoisomerization of azobenzene measured by femtosecond infrared spectroscopy*. *J. Chem. Phys.* 106(2):519–529, 1997. Article J CHEM PHYS.

- [Ham00a] P. HAMM, R. A. KAINDL, J. STENGER. *Noise suppression in femtosecond mid-infrared light sources*. Opt. Lett. 25(24):1798–1800, 2000. Article OPTICS LETTERS.
- [Ham00b] P. HAMM, M. LIM, W. DEGRADO, R. HOCHSTRASSER. *Pump/probe self heterodyned 2D spectroscopy of vibrational transitions of a small globular peptide*. The Journal of Chemical Physics 112:1907–1916, 2000.
- [Har01] B. Z. HARRIS, B. J. HILLIER, A. L. WENDELL. *Energetic Determinants of Internal Motif Recognition by PDZ Domains*. Biochemistry 40:5921–5930, 2001.
- [Hei07] B. HEINZ, S. MALKMUS, S. LAIMGRUBER, S. DIETRICH, C. SCHULZ, K. RUECK-BRAUN, M. BRAUN, W. ZINTH, P. GILCH. *Comparing a Photoinduced Pericyclic Ring Opening and Closure: Differences in the Excited State Pathways*. The Journal of the American Chemical Society 129:8577–8584, 2007.
- [Her90] G. HERZBERG. *Molecular Spectra and Molecular Structure: Infrared and Raman of Polyatomic Molecules*. Krieger Publishing Company, 1990.
- [Her05] S. HERRE, W. STEINLE, K. RÜCK-BRAUN. *Synthesis of Photoswitchable Hemithioindigo-Based omega-Amino Acids and Application in Boc-based Peptide Assembly*. Synthesis Seiten 3297–3300, 2005.
- [Hil99] B. J. HILLER, K. S. CHRISTOPHERSON, P. K. E., D. S. BREDDT, W. A. LIM. *Unexpected Mode of PDZ Domain Scaffolding Revealed by Structure of nNOS-Syntrophin Complex*. Science 284:812, 1999.
- [Hol90a] W. HOLZAPFEL, U. FINKELE, W. KAISER, D. OESTERHELT, H. SCHEER, H. U. STILZ, W. ZINTH. *Initial Electron-Transfer in the Reaction Center from Rhodobacter-Sphaeroides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5168–5172, 1990.
- [Hol90b] W. HOLZAPFEL, U. FINKELE, W. KAISER, D. OESTERHELT, H. SCHEER, H. U. STILZ, W. ZINTH. *Initial Electron-Transfer in the Reaction Center from Rhodobacter-Sphaeroides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(13):5168–5172, 1990. Article PROC NAT ACAD SCI USA.
- [Hop09] C. HOPPMANN, S. SEEDORFF, A. RICHTER, H. FABIAN, P. SCHMIEDER, K. RÜCK-BRAUN, M. BEYERMANN. *Light-Directed Protein Binding of a*

- Biologically Relevant β -Sheet*. Angewandte Chemie International Edition 48:6636–6639, 2009.
- [IDL00] IDL. *Interactive Data Language (version 5.4, Research Systems Inc., Boulder, CO)*, 2000.
- [Jed88] T. M. JEDJU, L. J. ROTHENBERG. *Tunable femtosecond radiation in the mid-infrared for time-resolved absorption in semiconductors*. Appl. Opt. 27(3):615–618, February 1988.
- [Jon57] R. N. JONES, W. F. FORBES, W. A. MUELLER. *The Infrared Carbonyl Stretching Bands of Ring Substituted Acetophenones*. Can. J. Chem. , 1957.
- [Kah55] A. H. KAHN. *Theory of the Infrared Absorption of Carriers in Germanium and Silicon*. Phys. Review 97(6):1647–1652, 1955. Article PHYS REV.
- [Kai00] R. A. KAINDL, M. WURM, K. REIMANN, P. HAMM, A. M. WEINER, M. WOERNER. *Generation, shaping, and characterization of intense femtosecond pulses tunable from 3 to 20 μm* . J. Opt. Soc. Am. B-Opt. Phys. 17(12):2086–2094, 2000. Article J OPT SOC AM B-OPT PHYSICS.
- [Kho83] J. M. KHOSROFIAN, B. A. GARETZ. *Measurement of a Gaussian Laser-Beam Diameter through the Direct Inversion of Knife-Edge Data*. Appl. Optics 22(21):3406–3410, 1983. Article APPL OPT.
- [Kim95] E. KIM, M. NIETHAMMER, A. ROTHSCHILD, Y. N. JAN, M. SHENG. *Clustering of Shaker-type K^+ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinase*. Nature 378:85, 1995.
- [Kle95] M. KLESSINGER, J. MICHL. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*, Band 3. VCH-Weinheim, Weinheim, 1995.
- [Koe92] M. KOECHNER. *Lineare Algebra und analytische Geometrie*. Springer-Verlag, Berlin, 1992.
- [Kog72] H. W. KOGENLNIK, E. P. IPPEN, A. DIENES, C. V. SHANK. *Astigmatically Compensated Cavities for CW Dye Lasers*. IEEE Journal of Quantum Electronics 8(3):373–379, 1972.
- [Kol03] F. O. KOLLER. *Zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie an Azobenzolderivaten im Zeitbereich von Pikosekunden*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, 2003.

- [Kri86] S. KRIMM, J. BANDEKAR. *Vibrational Spectroscopy and Conformation of Peptides, Polypeptides, and Proteins*. Advances in Protein Chemistry 38:181–364, 1986.
- [Kub04] J. KUBELKA, J. HOFRICHTER, W. A. EATON. *The protein folding speed limit*. Current Opinions in Structural Biology 1:76–88, 2004.
- [Lut01] I. LUTZ. *Vielkanal Femtosekundenspektroskopie der Primärreaktionen von archaebakteriellen Retinalproteinen im sichtbaren Spektralbereich*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, 2001.
- [Mag93] V. MAGNI, G. CERULLO, S. DE SILVESTRI, O. SVELTO, L. J. QIAN, M. DANAILOV. *Intracavity frequency doubling of a cw high-power TEM₀₀ Nd:YLF laser*. Optics Letters 18(24):2111–2113, 1993.
- [Mas92] P. E. MASLEN, N. C. HANDY, R. D. AMOS, D. JAYATILAKA. *Higher Analytic Derivatives. 4. Anharmonic Effects in the Benzene Spectrum*. J. Chem. Phys. 97(6):4233–4254, 1992. Article J CHEM PHYS.
- [McC87] J. A. MCCAMMON, S. C. HARVEY. *Dynamics of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press, Cambridge, 1987.
- [Mei92] H. MEIER. *The Photochemistry of Stilbenoid Compounds and their Role in Materials Technology*. Angewandte Chemie International Edition Engl. 31:1399–1420, 1992.
- [Mou86] P. F. MOULTON. *Spectroscopic and laser characteristics of Ti:Al₂O₃*. Journal of the Optical Society of America B 3(1):125–132, 1986.
- [Nib05] E. T. J. NIBBERING, H. FIDDER, E. PINES. *ULTRAFAST CHEMISTRY: Using Time-Resolved Vibrational Spectroscopy for Interrogation of Structural Dynamics..* AnnuRevPhysChem 56(1):337–367, 2005. Review AnnuRevPhysChem.
- [Pie00] J. PIEL, M. BEUTTER, E. RIEDLE. *20-50-fs pulses tunable across the near infrared from a blue-pumped noncollinear parametric amplifier*. Opt. Lett. 25(3):180–182, 2000. Article OPTICS LETTERS.
- [Pre92] W. PRESS, S. TEUKOLSKY, W. VETTERLING, B. FLANNERY. *Numerical recipes in C: The art of scientific computing*. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.

- [Ren06] C. RENNER, L. MORODER. *Azobenzene as Conformational Switch in Model Peptides*. ChemBioChem 7:868–878, 2006.
- [Rie00] E. RIEDLE, M. BEUTTER, S. LOCHBRUNNER, J. PIEL, S. SCHENKL, S. SPORLEIN, W. ZINTH. *Generation of 10 to 50 fs pulses tunable through all of the visible and the NIR*. Appl. Phys. B-Lasers Opt. 71(3):457–465, 2000. Article APPL PHYS B-LASERS OPT.
- [Sal67] J. SALTIEL. *Perdeuteriostilbene. Role of Phantom States in Cis-Trans Photoisomerization of Stilbenes*. The Journal of the American Chemical Society 89:1036–1037, 1967.
- [Sal68] J. SALTIEL. *Perdeuteriostilbene. Triplet and Singlet Paths for Stilbene Photoisomerization*. The Journal of the American Chemical Society 90:6394–6400, 1968.
- [Sal80] J. SALTIEL, J. L. CHARLTON. *Rearrangements in Ground and Excited States*, Seite 25. VCH, 1980.
- [Sat03] H. SATZGER, W. ZINTH. *Visualization of transient absorption dynamics - towards a qualitative view of complex reaction kinetics*. Chemical Physics 295:287–295, 2003.
- [Sat04a] H. SATZGER. *Untersuchung initialer Schritte der Peptidfaltung mit Ultrakurzzeitspektroskopie*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2004.
- [Sat04b] H. SATZGER, C. ROOT, C. RENNER, R. BEHRENDT, L. MORODER, J. WACHTVEITL, W. ZINTH. *Picosecond dynamics in water soluble azobenzene-peptides*. Chemical Physics Letters 396:191–197, 2004.
- [Sch95] S. SCHMIDT, T. ARLT, P. HAMM, H. HUBER, T. NAGELE, J. WACHTVEITL, W. ZINTH, M. MEYER, H. SCHEER. *Primary Electron-Transfer Dynamics in Modified Bacterial Reaction Centers Containing Pheophytin-a Instead of Bacteriopheophytin-A*. Spectrochimica Acta Part a 51:1565–1578, 1995.
- [Sch02] W. J. SCHREIER. *Aufbau eines Systems zur Untersuchung von fs-IR-Absorptionsänderungen in Chromopeptiden*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2002.

- [Sch03] B. SCHMIDT, S. LAIMGRUBER, W. ZINTH, P. GILCH. *A broadband Kerr shutter for femtosecond fluorescence spectroscopy*. Applied Physics B 76:809–814, 2003.
- [Sch04] B. SCHMIDT, C. SOBOTTA, S. MALKMUS, S. LAIMGRUBER, M. BRAUN, W. ZINTH, P. GILCH. *Femtosecond Fluorescence and Absorption Dynamics of an Azobenzene with a Strong Push-Pull Substitution*. The Journal of Physical Chemistry A 108:4399–4404, 2004.
- [Sch07] T. E. SCHRADER, W. J. SCHREIER, T. CORDES, F. O. KOLLER, G. BABITZKI, R. DENSCHLAG, C. RENNER, M. LOEWENECK, S. L. DONG, L. MORODER, P. TAVAN, W. ZINTH. *Light-triggered β -Hairpin Folding and Unfolding*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:15729–15734, 2007.
- [Sch08] W. J. SCHREIER, F. O. KOLLER, T. E. SCHRADER, M. BRAUN, W. ZINTH. *IR-Characterization of the excited state in Lumazin: An Isotope labeling approach, in preparation*, 2008.
- [See97] M. SEEL, E. WILDERMUTH, W. ZINTH. *A multichannel detection system for application in ultrafast spectroscopy*. Meas. Sci. Technol. 8(4):449–452, 1997. Article MEAS SCI TECHNOL.
- [Sie05] A. SIEG. *Femtosekundenspektroskopie im mittleren Infraroten: Energiere-laxation in para-Nitroanilin und Konformationsdynamik von Azobenzolpepti-den*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, 2005.
- [Sim05] G. E. SIMS, I. G. CHOI, S. H. KIM. *Protein conformational space in higher order $\Phi - \Psi$ maps.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:618–621, 2005.
- [Spe91] D. E. SPENCE, P. N. KEAN, W. SIBBETT. *60-fsec pulse generation from a self-mode-locked Ti:sapphire laser*. Optics Letters 16(1):42–44, 1991.
- [Spi94] C. SPIELMANN, P. F. CURLEY, T. BRABEC, F. KRAUSZ. *Ultrabroadband Femtosecond Lasers*. IEEE Journal of Quantum Electronics 30(4):1100–1114, 1994.
- [Spö02] S. SPÖRLEIN, H. CARSTENS, H. SATZGER, C. RENNER, R. BEHRENDT, L. MORODER, P. TAVAN, W. ZINTH, J. WACHTVEITL. *Ultrafast spectroscopy reveals subnanosecond peptide conformational dynamics and validates molecular dynamics simulation*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99:7998–8002, 2002.

- [Spö01] S. SPÖRLEIN. *Femtosekunden-Spektroskopie schnellster Strukturänderungen in Peptid-Chromophor-Komplexen*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, 2001.
- [Ste03] W. STEINLE, K. RÜCK-BRAUN. *Synthesis and Characterization of Novel Hemithioindigo Chromophores*. *Organic Letters* 5:141–144, 2003.
- [Str94] L. STRYER. *Biochemie*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg Berlin New York, 1994.
- [Suz75] Y. SUZAKI, A. TACHIBANA. *Measurement of μM Sized Radius of Gaussian Laser-Beam Using Scanning Knife-Edge*. *Appl. Optics* 14(12):2809–2810, 1975. Letter APPL OPT.
- [Wac04] J. WACHTVEITL, S. SPÖRLEIN, H. SATZGER, B. FONROBERT, C. RENNER, R. BEHRENDT, D. OESTERHELT, L. MORODER, W. ZINTH. *Ultrafast conformational dynamics in cyclic azobenzene peptides of increased flexibility*. *Biophysical Journal* 86:2350–2362, 2004.
- [Wal91] D. H. WALDECK. *Photoisomerization dynamics of stilbenes*. *Chemical Reviews* 91:415–436, 1991.
- [Wan00] P. WANG, Q. ZHANG, H. TOCHIO, J. FAN, M. ZHANG. *Formation of a native-like β -hairpin finger structure of a peptide from the extended PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase in aqueous solution*. *Eur. J. Biochem.* 267:3116–3122, 2000.
- [Wil97] T. WILHELM, J. PIEL, E. RIEDLE. *Sub-20-fs pulses tunable across the visible from a blue-pumped single-pass noncollinear parametric converter*. *Opt. Lett.* 22(19):1494–1496, 1997. Article OPTICS LETTERS.
- [Zin92] W. ZINTH, W. KAISER. *Ultrafast Coherent Spectroscopy*. In W. KAISER, Herausgeber, *Ultrashort Laser Pulses- Generation and Applications*, Band 60 von *Topics in Applied Physics*, Seiten 236–277. Springer-Verlag, 2. Auflage, 1992.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei:

Prof. Dr. Wolfgang Zinth für die freundliche Aufnahme an seinen Lehrstuhl und in seine Arbeitsgruppe, die mir die Durchführung dieser interessanten Arbeit ermöglichte. Vielen Dank für die intensiven Diskussionsrunden und die große Unterstützung.

Prof. Dr. Peter Gilch für die Übernahme des Zweitgutachtens und seine Bereitschaft für meine Verteidigung dieser Arbeit aus Düsseldorf nach München anzureisen.

Prof. Dr. Karola Rück-Braun und Prof. Dr. Martin Engelhard und den Mitarbeitern Christian Hoppmann und Jörg Sauermaun für die vielen interessanten Proben.

Dr. Thorben Cordes für die zahlreichen Projektideen und wertvollen Diskussionen für die vorliegende Arbeit.

Karin Haiser für die tatkräftige Unterstützung im Labor, bei Tag sowie in vielen langen Labornächten.

Dr. Wolfgang Schreier für seine ausdauernde Geduld im Labor und für seinen motivierenden Ansporn das Signal im Labor immer noch etwas besser hinzubekommen.

Teja Herzog für die akribisch durchgeführten Messungen an den HTI-Chromopeptidsystemen im sichtbaren Spektralbereich.

Den Büro- und Laborgenossen Karin Haiser, Teja Herzog, Andi Deeg, Bert Pilles, Dr. Florian Koller, Markus Huber, Dr. Tobias Schrader, Michael Brandl, Julia Kubon, Sebastian Pregl, Martha Brennich, Halina Strzalka für das gute Arbeitsklima.

Dem ganzen Lehrstuhl darunter vor allem Florian Lederer, Dr. Björn Heinz, Dr. Cord Elsner, Andrea und Dr. Stefan Malkmus, Dr. Stefan Laimgruber, Thomas Schmieerer, Gerald Ryseck, Evelyn Plötz (und allen die ich vergessen habe ...) für die tolle Atmosphäre am Lehrstuhl und darüber hinaus.

Den Lehrstuhlsekretärinnen Alexandra Michaelis und Frau Widmann-Diermeier die mir nicht nur durch den Büroschungel, sondern mit Rat und Tat durch Alltag am Lehrstuhl geholfen haben.

Der Werkstatteern Rudi Schwarz, Alfons Stork und Christian Hausmann, die stets schnell und effektiv bei praktischen Problemen aller Art hilfreich zur Stelle waren.

Karl-Heinz Mantel für die fachkundige Hilfe, wenn die Computer mal wieder Probleme machten.

Meinen Schwiegereltern Margitta und Johann Brodschelm für das Oma und Opa sein während des Zusammenschreibens.

Meinen Eltern Brunhilde und Paul Regner für ihre jahrelange Unterstützung und Hilfe und für das Oma und Opa sein während des Zusammenschreibens der Doktorarbeit.

Meinem Mann Andi für die Hilfe bei der Berechnung der zerfallsassoziierten Spektren und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Dafür dass er immer für mich da ist.

Meinem Sohn Jakob dafür dass er viel Spaß mit seinen Großeltern hatte, so dass ich diese Zeit zum Zusammenschreiben meiner Dissertation nutzen konnte.