

---

# Untersuchung initialer Schritte der Peptidfaltung mit Ultrakurzzeitspektroskopie

Helmut Satzger

---



München 2004



---

# **Untersuchung initialer Schritte der Peptidfaltung mit Ultrakurzzeitspektroskopie**

**Helmut Satzger**

---

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

vorgelegt von  
Helmut Satzger  
aus Oberstaufen

München, den 09. Juli 2004

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Zinth  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Joachim Rädler  
Tag der mündlichen Prüfung: 16.08.2004

# Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit liefert neue Beiträge zu zwei wichtigen biophysikalischen Fragestellungen der Peptid-/Proteinfaltung:

**1. Welchen Einfluss hat das Lösungsmittel auf die initiale Konformationsdynamik?** Das Molekül Azobenzol dient dazu, gezielt in einem ringförmigen Oktapeptid getriebene Konformationsänderungen auszulösen. Azobenzol isomerisiert nach Lichtanregung innerhalb weniger Pikosekunden. Es werden neue Ergebnisse zum Isomerisierungsmechanismus präsentiert, die wichtige Hintergrundinformationen zum Verständnis der Moleküldynamik liefern. Durch die Isomerisation ändert sich die „Länge“ des Azobenzols um fast den Faktor zwei, wodurch in den Azobenzol-Peptiden konformationelle Umorganisationen ausgelöst werden. Bereits früher durchgeführte Messungen an DMSO-löslichen Azobenzol-Peptiden zeigten, dass kinetische Prozesse, die mit Zeitkonstanten von  $\sim 10$  ps und  $\sim 100$  ps ablaufen, der Bewegung des Peptid-Teils zugeordnet werden können. Die hier präsentierten Ergebnisse an Azobenzol-Peptiden, die in Wasser löslich sind zeigen, dass Prozesse auf Zeitskalen  $>5$  ps in Wasser um den Faktor 1.5–2 beschleunigt ablaufen. Man sieht in diesen ultraschnellen Kinetiken echte Umorganisationen des Peptid-Rückgrats, deren Geschwindigkeit durch die Viskosität des Lösungsmittels bestimmt sind.

**2. Wie schnell ist die Kontaktbildung in Peptiden?** Für ein Verständnis der Proteinfaltung ist wichtig zu wissen, wie lange es dauert, bis zwei (räumlich entfernte) Aminosäuren innerhalb eines Peptids einen Kontakt ausbilden. Zur Bestimmung dieser Kontaktbildungsrate werden Experimente an Xanthon-Peptiden präsentiert, die zwei Marker-Moleküle enthalten. Messungen ergeben, dass der durch einen kurzen Lichtimpuls angeregte Donor Xanthon innerhalb weniger Pikosekunden einen langlebigen Triplett-Zustand besetzt. Weiterhin wird gezeigt, dass bei direktem Kontakt zum Akzeptor Naphthalin ein Triplett-Triplett-Energietransfer innerhalb  $\leq 1$  ps stattfindet. Das System Xanthon/Naphthalin bildet somit ein ideales Paar von Marker-Molekülen. In den hier untersuchten Peptiden sind Donor und Akzeptor durch zwei (bzw. sechs) Aminosäuren voneinander getrennt und man findet für alle Peptide zwei Zeitkonstanten für die Kontaktbildung. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Peptide im Gleichgewicht in zwei Sub-Ensembles vorliegen: etwa ein Viertel der Peptide befinden sich in einer eher kompakten Form, von der aus eine Kontaktbildung mit  $\tau \approx 250$  ps erfolgen kann, der Rest der Peptide ist in einer eher gestreckten Konformation und die Kontaktbildung erfolgt mit einer Zeitkonstanten im Bereich 6–14 ns.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzfassung</b>	<b>iii</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>xiii</b>
<b>1 Proteinfaltung — Peptidfaltung</b>	<b>1</b>
1.1 Begriffsklärung . . . . .	1
1.2 Was bedeutet Protein-/Peptidfaltung? . . . . .	3
1.3 Beschreibung der Proteinfaltung — Faltungstrichter . . . . .	4
1.4 Zeitskalen und Untersuchungsmethoden . . . . .	6
1.5 Ultraschnelle Prozesse . . . . .	6
1.6 Kinetische Theorie der Proteinfaltung . . . . .	9
1.6.1 Der Zugang nach van't Hoff und Arrhenius . . . . .	10
1.6.2 Theorie des Übergangszustandes (TST) . . . . .	10
1.6.3 Kramers Theorie . . . . .	11
1.7 In dieser Arbeit untersuchte Systeme . . . . .	11
1.7.1 Getriebene Konformationsänderungen in Azopeptiden . . . . .	12
1.7.2 Kontaktbildung in frei beweglichen Xanthonpeptiden . . . . .	13
1.8 Aufbau dieser Arbeit . . . . .	14
<b>2 Experiment</b>	<b>15</b>
2.1 Transiente Absorptionsmessungen . . . . .	15
2.1.1 Das fs-Lasersystem . . . . .	15
2.1.2 Erzeugung der benötigten fs-Anreg-Lichtimpulse . . . . .	17
2.1.3 Erzeugung der Abtast-Lichtimpulse — Weißlicht . . . . .	20
2.1.4 Der Messplatz . . . . .	23
2.1.5 Die Messung transienter Absorptionsänderungen . . . . .	27
2.1.6 Datenaufbereitung . . . . .	28
2.1.7 Zusätzliche Effekte bei UV-Anregung — solvatisiertes Elektron . . . . .	29
2.2 Fluoreszenzmessungen . . . . .	29
<b>3 Methoden</b>	<b>31</b>
3.1 Simulation transienter Absorptions-Daten . . . . .	31
3.2 Globaler Fit mit exponentiellen Zeitkonstanten . . . . .	36
3.3 Zur Singularwertzerlegung . . . . .	39

3.3.1	Einführung . . . . .	40
3.3.2	Approximation . . . . .	46
3.3.3	Gestörte Matrizen . . . . .	49
3.3.4	Anwendung auf zeitaufgelöste Spektroskopie . . . . .	53
3.3.5	Beispiel: Simulierte Messdaten mit Rauschen . . . . .	57
3.4	Visualisierung komplexer Absorptionsdynamiken — LDAC . . . . .	61
<b>4</b>	<b>Der Photoschalter Azobenzol</b>	<b>71</b>
4.1	Grundlegende Eigenschaften . . . . .	72
4.2	Isomerisierungsmechanismus . . . . .	75
4.3	Transiente Absorptions-Experimente an Azobenzol . . . . .	78
4.3.1	$n\pi^*$ -Anregung von <i>trans</i> - und <i>cis</i> -Azobenzol . . . . .	79
4.3.2	$\pi\pi^*$ -Anregung von <i>trans</i> -Azobenzol . . . . .	81
4.3.3	$\pi\pi^*$ -Anregung von <i>cis</i> -Azobenzol . . . . .	83
4.4	Fluoreszenzmessungen an Azobenzol in DMSO nach $n\pi^*$ -Anregung . . . . .	85
4.5	Diskussion (I) — Emission aus dem Franck-Condon-Bereich ( $n\pi^*$ ) . . . . .	88
4.6	Energieschema für Azobenzol . . . . .	92
4.7	Diskussion (II) — $\pi\pi^*$ -Anregung und Isomerisierung im $S_1$ . . . . .	93
4.7.1	<i>trans</i> → <i>cis</i> Photoreaktion . . . . .	94
4.7.2	<i>cis</i> → <i>trans</i> Photoreaktion . . . . .	96
4.7.3	Isomerisierungs-Mechanismus nach $\pi\pi^*$ -Anregung . . . . .	99
<b>5</b>	<b>Beobachtung gezielt ausgelöster Konformationsänderungen in Azopeptiden</b>	<b>103</b>
5.1	Biologische Vorlage für die Azopeptide — Thioredoxin Reduktase . . . . .	105
5.2	Synthese und Eigenschaften der Azopeptide . . . . .	107
5.3	Beobachtung getriebener Konformationsdynamik in Azopeptiden . . . . .	110
5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der DMSO löslichen Azopeptide . . . . .	114
5.4.1	Azopeptide mit dem Schaltermolekül APB . . . . .	114
5.4.2	Azopeptide mit dem Schaltermolekül AMPB . . . . .	116
5.4.3	Molekulardynamik-Simulationen . . . . .	117
5.5	Transiente Absorption der wasserlöslichen Azopeptide . . . . .	117
5.5.1	Monozyklisches Azopeptid cAMPB(H <sub>2</sub> O) . . . . .	120
5.5.2	Bizyklisches Azopeptid bcAMPB(H <sub>2</sub> O) . . . . .	123
5.6	Diskussion: Einfluß des Lösungsmittels auf die Konformationsdynamik . . . . .	126
<b>6</b>	<b>Die Markermoleküle Xanthon und Naphthalin</b>	<b>131</b>
6.1	Eigenschaften . . . . .	131
6.1.1	Xanthon . . . . .	131
6.1.2	Was ist der tiefliegendste Triplett-Zustand von Xanthon? . . . . .	134
6.1.3	Naphthalin . . . . .	137
6.2	Transiente Absorption von Xanthon in Ethanol . . . . .	139
6.3	Transiente Absorption von Xanthonsäure in Ethanol . . . . .	141

6.4	Quenching des Xanthon-Triplett durch 1-Methyl Naphthalin . . . . .	142
6.5	Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen . . . . .	145
6.6	Diskussion . . . . .	145
6.6.1	Dynamik des Intersystem crossing in Xanthon . . . . .	146
6.6.2	Kinetik des Triplett-Quenchings — Dynamischer und statischer Grenzfall . . . . .	147
6.6.3	Kinetik des Triplett-Quenchings — mittlere Quencher-Konzentration	149
6.6.4	Kinetik des Triplett-Quenchings — Anomalie bei 3 M . . . . .	149
6.6.5	Mechanismus des Quenching — Energietransfer vs. Elektrontransfer	150
6.6.6	Quench-Mechanismus — Verzweigung vs. sequentielles Modell .	151
6.6.7	Dynamik des ultraschnellen Quenching . . . . .	153
6.6.8	Zusammenfassung . . . . .	154
<b>7</b>	<b>Beobachtung der Kontaktbildung in Xanthonpeptiden</b>	<b>157</b>
7.1	Realisierung der Experimente . . . . .	158
7.2	Ableitung der Kontaktbildungsrate aus der Diffusionsgleichung . . . . .	159
7.3	Ergebnisse der ns-Laser Flash Experimente . . . . .	165
7.4	Referenz-Systeme . . . . .	168
7.4.1	Xanthonsäure in Wasser . . . . .	169
7.4.2	Xanthonpeptide M06 und M07 in Wasser . . . . .	170
7.4.3	Vergleich der Referenz-Systeme . . . . .	172
7.5	Kontaktbildung in Xanthonpeptiden . . . . .	173
7.6	Diskussion . . . . .	174
7.6.1	Kontaktbildung im ns-Zeitbereich . . . . .	177
7.6.2	Schnelle Kontaktbildung im Sub-ns Zeitbereich . . . . .	179
7.6.3	Welche Bedeutung hat die schnelle Zeitkonstante der Kontaktbildung? . . . . .	181
7.6.4	Der präexponentielle Faktor — Tempolimit der Proteinfaltung . .	183
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>185</b>
<b>A</b>	<b>340 nm-Anregung von <i>trans</i>-Azobenzol in Ethanol</b>	<b>189</b>
<b>B</b>	<b>Photoschaltbare Bioaktivität von bcAMBP(H<sub>2</sub>O)</b>	<b>191</b>
<b>C</b>	<b>Intersystem crossing — El Sayed Regeln</b>	<b>193</b>
<b>D</b>	<b>Xanthon in Ethanol (266 nm Anregung)</b>	<b>195</b>
<b>E</b>	<b>Quenching des Xanthon-Triplett durch 1-MN</b>	<b>196</b>
<b>F</b>	<b>Xanthonpeptide: Referenz-Systeme</b>	<b>201</b>
<b>G</b>	<b>Kontaktbildung in Xanthonpeptiden</b>	<b>203</b>

<b>H Natürliche Aminosäuren</b>	<b>207</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>212</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>231</b>
<b>Publikationen</b>	<b>233</b>
<b>Danksagung</b>	<b>235</b>
<b>Index</b>	<b>239</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Prinzip der Proteinfaltung . . . . .	3
1.2	Proteinfaltung: Faltungstrichter . . . . .	5
1.3	Zeitskalen in der Proteinfaltung . . . . .	7
1.4	Proteinfaltung: Untersuchungsmethoden und zugängliche Zeitskalen . . .	8
1.5	Vorgänge auf der Zeitskala fs–ns . . . . .	8
1.6	Prinzip der Transition-State Theory . . . . .	10
1.7	Azopeptide: Idee . . . . .	13
1.8	Xanthonpeptide: Idee . . . . .	14
2.1	Schematischer Aufbau des fs-Lasersystems . . . . .	16
2.2	Aufbau der fs-Experimente mit 266 nm Lichtimpulsen (THG) . . . . .	18
2.3	Erzeugung von Anregungs-Lichtimpulsen bei einer Zentralwellenlänge von 480 nm (NOPA) . . . . .	19
2.4	Aufbau der fs-Experimente mit 480 nm Lichtimpulsen (CaF <sub>2</sub> -NOPA) . . .	20
2.5	Aufbau der fs-Experimente mit 340 nm Lichtimpulsen (SHG aus NOPA)	21
2.6	Erzeugung eines Superkontinuums . . . . .	21
2.7	Superkontinuum erzeugt in Saphir und CaF <sub>2</sub> . . . . .	23
2.8	Stabiles Single-Filament Superkontinuum . . . . .	23
2.9	Instabiles Multi-Filament Superkontinuum . . . . .	24
2.10	Aufbau des Dispersions-minimierten Experiments . . . . .	26
2.11	Probenstand . . . . .	27
2.12	Solvatisiertes Elektron in Wasser und Ethanol . . . . .	29
2.13	Aufbau des Fluoreszenz Experiments . . . . .	30
3.1	IDL-Dialog: Synthetische Daten (I) . . . . .	34
3.2	IDL-Dialog: Synthetische Daten (II) . . . . .	35
3.3	SVD: Beispiel Bildbearbeitung . . . . .	47
3.4	Anwendung der SVD zur besten Approximation . . . . .	48
3.5	Der Einfluß von Rauschen auf kleine Singularwerte. . . . .	53
3.6	Simulierte Kinetiken und Amplitudenspektren . . . . .	57
3.7	SVD-Test: Rekonstruierte Daten-Matrix (I) . . . . .	59
3.8	SVD-Test: Rekonstruierte Daten-Matrix (II) . . . . .	59
3.9	SVD-Test: Rekonstruierte Daten-Matrix (III) . . . . .	60
3.10	Abseparation von zufälligem Rauschen durch SVD . . . . .	60
3.11	LDAC: Das Prinzip . . . . .	63
3.12	LDAC: Synthetische Rohdaten und komplettes LDAC-Signal . . . . .	65

---

3.13	LDAC: Glätten des LDAC-Signals . . . . .	66
3.14	LDAC: LDAC-Signal von synthetischen Daten mit Rauschen . . . . .	67
3.15	LDAC: Visualisierung eines dynamischen Stokes-Shifts . . . . .	70
4.1	Räumliche Struktur von Azobenzol . . . . .	73
4.2	Absorptionsspektrum von Azobenzol in DMSO . . . . .	73
4.3	Umbelichten von Azobenzol . . . . .	74
4.4	Isomerisierungsmechanismus von Azobenzol: Inversion und Rotation . . . . .	76
4.5	Berechnete Potentialflächen . . . . .	77
4.6	Azobenzol in DMSO: $n\pi^*$ -Anregung von <i>trans</i> -Azobenzol bei 480 nm . . . . .	80
4.7	Azobenzol in DMSO: $n\pi^*$ -Anregung von <i>cis</i> -Azobenzol bei 480 nm . . . . .	81
4.8	Azobenzol in Ethanol: $\pi\pi^*$ -Anregung von <i>trans</i> -Azobenzol bei 266 nm . . . . .	82
4.9	Azobenzol in Ethanol: $\pi\pi^*$ -Anregung von <i>cis</i> -Azobenzol bei 266 nm . . . . .	84
4.10	Absorptions- und Emissionsspektren von Azobenzol . . . . .	87
4.11	Azobenzol: Vergleich von transienter Absorption und stationärer Emission . . . . .	89
4.12	Azobenzol: Schema der Potentialflächen . . . . .	91
4.13	Energieschema für Azobenzol: Vgl. von Theorie und Experiment . . . . .	93
4.14	Kinetische Prozesse nach $\pi\pi^*$ -Anregung von <i>trans</i> -Azobenzol . . . . .	96
4.15	Kinetische Prozesse nach $\pi\pi^*$ -Anregung von <i>cis</i> -Azobenzol . . . . .	98
5.1	Azobenzol zur Steuerung des Helix-Gehalts in einem kurzen Peptid . . . . .	104
5.2	Prinzipielle Idee der Experimente an den Azopeptiden . . . . .	104
5.3	Struktur der Thioredoxin Reduktase aus E. Coli. . . . .	106
5.4	Das aktive Zentrum der TrxR . . . . .	106
5.5	Schaltermoleküle APB und AMPB: Strukturformel und Absorptionsspektrum . . . . .	107
5.6	Entwicklung der Azopeptide . . . . .	110
5.7	NMR-Strukturen der Azopeptide in DMSO und Wasser . . . . .	111
5.8	Absorptions- und Differenzspektren der wasserlöslichen Azopeptide . . . . .	112
5.9	Schematische Darstellung der <i>cis</i> → <i>trans</i> -Reaktion im Azopeptid . . . . .	113
5.10	Vergleich der Isomerisierungs-Geschwindigkeit für Azobenzol, IAPB und cAPB . . . . .	115
5.11	Vergleich der Grundzustands-Relaxation für Azobenzol, IAPB und cAPB . . . . .	116
5.12	DMSO-lösliche Azopeptide: Absorptions- und Differenzspektren . . . . .	117
5.13	DMSO-lösliche AMPB-Peptide: Transiente Spektren . . . . .	118
5.14	DMSO-lösliche AMPB-Peptide: Amplitudenspektren . . . . .	119
5.15	Transiente Absorption von <i>trans</i> -cAMPB(H <sub>2</sub> O) . . . . .	121
5.16	Transiente Absorption von <i>cis</i> -cAMPB(H <sub>2</sub> O). . . . .	122
5.17	Einfluss des Lösungsmittels auf Peptid-Kinetik . . . . .	123
5.18	Transiente Absorption von <i>trans</i> -bcAMPB(H <sub>2</sub> O) . . . . .	124
5.19	Transiente Absorption von <i>cis</i> -bcAMPB(H <sub>2</sub> O). . . . .	125
5.20	bcAMPB: Vergleich DMSO vs. Wasser . . . . .	126
6.1	Xanthon und Derivate . . . . .	132

---

6.2	Absorptionsspektren von Xanthon und 1-MN in Ethanol . . . . .	132
6.3	Photochemie Xanthon: Modell . . . . .	134
6.4	Der energetisch am tiefsten liegende Triplett-Zustand . . . . .	136
6.5	Naphthalin und 1-Methyl Naphthalin: Strichformeln . . . . .	137
6.6	Triplett-Spektrum von Naphthalin . . . . .	138
6.7	Naphthalin: Intermolekularer Triplett-Excimer . . . . .	139
6.8	Xanthon in Ethanol: 340 nm-Anregung . . . . .	140
6.9	Xanthonsäure: Strichformel . . . . .	141
6.10	Xanthon vs. Xanthonsäure in Ethanol . . . . .	141
6.11	Xanthon in Ethanol plus 0.6 M 1-Methyl Naphthalin . . . . .	144
6.12	Stationäre Absorption u. Emission, zeitaufgelöste Fluoreszenz . . . . .	145
6.13	Stern-Vollmer Plot für das Triplett-Quenching von Xanthon durch 1-MN .	148
6.14	Photochemie Xanthon: Modell . . . . .	152
6.15	Vergleich des Triplett-Quenching bei unterschiedlichen 1-MN Konzentra- tionen . . . . .	153
6.16	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Photochemie von Xanthon . . . . .	155
7.1	Xanthonpeptide: Prinzip der Experimente . . . . .	159
7.2	Energieschema der Marker-Moleküle . . . . .	160
7.3	Wahrscheinlichkeitsverteilungen für Gaußsche Ketten . . . . .	163
7.4	Xanthonsäure, Naphthylalanin und Xanthonpeptide: Strichformeln . . . . .	165
7.5	Ergebnis eines ns-Experimentes an Xan-(G-S) <sub>14</sub> -NAla-S-G . . . . .	166
7.6	Abhängigkeit der Kontaktrate von der Peptidlänge . . . . .	167
7.7	Abhängigkeit der Kontaktrate von der Aminosäuresequenz . . . . .	168
7.8	Absorptionsspektren der Xanthonsäure und Xanthonpeptide . . . . .	169
7.9	Xanthonsäure in Wasser: 340 nm-Anregung . . . . .	170
7.10	Referenz-Peptid M06 + M07 in Wasser . . . . .	171
7.11	Stäbchenmodell des Xanthonpeptids M01 . . . . .	174
7.12	Transiente Absorption des Xanthonpeptids M03 in Wasser . . . . .	175
7.13	M03: Kombination fs- und ns-Daten (590 nm) . . . . .	176
7.14	Vergleich der Xanthonpeptide: 558 nm – 654 nm Probe . . . . .	177
7.15	M03: Kombination fs- und ns-Daten (420 nm) . . . . .	179
7.16	Vergleich der Triplett-Absorptionsbanden für Xanthon, M03 und M06+M07	180
7.17	Interpretation der 250 ps-Zeitkonstanten für die Kontaktbildung . . . . .	182
7.18	Simulierte Wahrscheinlichkeitsverteilung $p(r)$ eines kurzen Peptids . . . . .	183
A.1	Azobenzol in Ethanol: $\pi\pi^*$ -Anregung von <i>trans</i> -Azobenzol bei 340 nm .	189
B.1	Biologische Aktivität der wasserlöslichen Azopeptide . . . . .	192
C.1	Intersystem crossing — El Sayed Regeln . . . . .	193
D.1	Xanthon in Ethanol: 266 nm-Anregung . . . . .	195
E.1	Xanthon in 6 M 1-Methyl Naphthalin . . . . .	196

## Abbildungsverzeichnis

---

E.2	Xanthon in Ethanol plus 3 M 1-Methyl Naphthalin . . . . .	197
E.3	Xanthon in Ethanol plus 0.06 M 1-Methyl Naphthalin . . . . .	198
E.4	Xanthon in Ethanol plus 0.006 M 1-Methyl Naphthalin . . . . .	199
F.1	Xanthonensäure in Wasser: 266 nm-Anregung . . . . .	201
F.2	Referenz-Peptid M06 in Wasser . . . . .	202
G.1	Kontaktbildung im Xanthonpeptid M01 . . . . .	203
G.2	Kontaktbildung im Xanthonpeptid M02 . . . . .	204
G.3	Kontaktbildung im Xanthonpeptid M02' . . . . .	205
G.4	Kontaktbildung im Xanthonpeptid M04 . . . . .	206

# Tabellenverzeichnis

2.1	Technische Daten Ti:Saphir-Oszillator . . . . .	16
2.2	Technische Daten regenerativer Ti:Saphir-Verstärker . . . . .	17
2.3	Erzeugung eines stabilen Superkontinuums . . . . .	22
2.4	Der Anreg-/Abtast Aufbau . . . . .	25
3.1	SVs und Autokorrelations-Koeffizienten für die Beispieldaten . . . . .	58
4.1	Absorptionsdaten von Azobenzol . . . . .	73
4.2	Quantenausbeuten Photoisomerisierung Azobenzol . . . . .	78
4.3	Zusammenfassung der Zeitkonstanten für Azobenzol . . . . .	89
5.1	Sequenzen der unterschiedlichen Azopeptide . . . . .	109
5.2	xAMPB(H <sub>2</sub> O): Absorptionsdaten . . . . .	112
5.3	Vergleich der ermittelten Zeitkonstanten . . . . .	127
6.1	Spektroskopische Daten für Xanthon in 3-Methylpentan . . . . .	133
6.2	Xanthon, Naphthalin und Derivate: Photochemische Daten (Singulett) . . . . .	135
6.3	Xanthon, Naphthalin und Derivate: Photochemische Daten (Triplett Zustand) . . . . .	135
6.4	Lösungsmittelabhängigkeit des Xanthon-Triplett-Zustandes . . . . .	136
6.5	Ermittelte Zeitkonstanten aus den fs-Quenchexperimenten . . . . .	148
7.1	In dieser Arbeit untersuchte Xanthonpeptide . . . . .	173
7.2	Xanthonpeptide: Vergleich mit ns- mit fs-Experimenten . . . . .	176
B.1	Redoxpotentiale von TrxR und bcAMPB(H <sub>2</sub> O) . . . . .	191
C.1	Spin-Bahn Kopplungskonstanten verschiedener Atome . . . . .	194



# 1 Proteinfaltung — Peptidfaltung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Antworten auf zwei wichtige biophysikalische Fragen zu geben:

1. Welchen Einfluss hat das Lösungsmittel auf die initialen Faltungsvorgänge in Peptiden?
2. Wie schnell ist die Kontaktbildung in kurzen, frei beweglichen Peptiden?

Bevor die zwei Modellsysteme vorgestellt werden, mit denen in dieser Arbeit Antworten auf diese beiden Fragen gefunden werden sollen, müssen zuerst einige elementare Begriffe eingeführt und erklärt werden, die zur Diskussion der Protein- bzw. Peptidfaltung nötig sind. Anschließend wird das prinzipielle Problem der Proteinfaltung umrissen und eine kurze Übersicht etablierter Untersuchungsmethoden gegeben. Das Problem der Proteinfaltung umfaßt einen Zeitbereich von Femtosekunden bis Stunden, also fast 17 Größenordnungen in der Zeit. Nach einem Blick auf die Zeitskalen von Mikrosekunden und länger folgt eine Vorstellung der für diese Arbeit interessanten ultraschnellen Prozesse im Sub-Nanosekundenbereich, bevor schließlich die Ansätze vorgestellt werden, die im Rest dieser Arbeit verwendet wurden, um die initialen Schritte der Peptidfaltung zu untersuchen. Am Ende dieses Kapitels steht eine kurze Übersicht über den Aufbau der restlichen Arbeit.

## 1.1 Begriffsklärung

Zunächst sind einige grundlegende Begriffe zu unterscheiden [Str94]:

- **Aminosäure:** Elementare Struktureinheit, bestehend aus einer Aminogruppe, einer Carboxylgruppe, einem Wasserstoffatom und einem „Rest“ R, alle gebunden an ein C<sub>α</sub>-Kohlenstoffatom. In der Seitenkette R unterscheiden sich die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren (siehe Anhang H ab Seite 207).
- **Peptid:** Zwei beliebige Aminosäuren können stets über eine Peptidbindung chemisch miteinander verbunden werden. Dabei geht der carboxyl-terminale Rest der ersten Aminosäure mit dem amino-terminalen Rest der zweiten Aminosäure unter Abspaltung eines Wassermoleküls eine Bindung ein. Abgeleitet vom Begriff der Peptidbindung bezeichnet man kurze Aminosäuresequenzen (einige 10 Aminosäuren) als Peptid.

- **Biopolymer:** Makromoleküle, die in Lebewesen gefunden werden können. Dazu gehören Proteine, Nukleinsäuren (DNS, RNS) und Polysaccharide (lange Zuckerketten).
- **Protein:** Lange Aminosäurekette (Sequenz bestehend aus mehreren 100 Aminosäuren). Proteine bilden die elementaren Bestandteile einer Zelle (in der Nahrung als Eiweiß bezeichnet).
- **Enzym:** Komplexe Proteine, die in der Zelle produziert werden und katalytisch in spezifischen biochemischen Reaktionen eingesetzt werden.

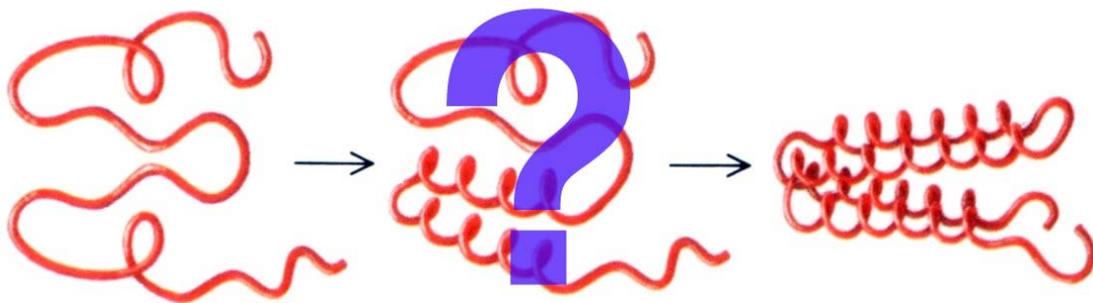
Bei den in dieser Arbeit untersuchten Bioproben handelt es sich sämtlich um Peptide, der Einfachheit halber werden die Begriffe Protein und Peptid im folgenden aber synonym behandelt. Mit dem Begriff Protein (oder Enzym) ist streng auch die dreidimensionale Struktur verknüpft: Nur in der „nativen Form“ kann das Protein seine biologische Funktion erfüllen. Zur Charakterisierung der Struktur eines Proteins werden die folgenden Begriffe verwendet [Str94]:

- **Random Coil:** Ein denaturiertes Protein, d. h. eine nicht gefaltete, unstrukturierte, lineare Aminosäurekette wird als random coil bezeichnet. Erst in geeigneten Lösungsmitteln und bei geeigneten Randbedingungen (z. B. pH-Wert, Temperatur) beginnt die random coil sich zu falten (typischerweise in einigen Sekunden oder Minuten).
- **Primärstruktur:** Sequenz der Aminosäuren und die Stellung von Disulfidbrücken, falls solche vorhanden sind.
- **Sekundärstruktur:** Geordnete räumliche Anordnung von Aminosäureresten, die in der linearen Sequenz nahe beieinander liegen, z. B.  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt oder Collagenhelix. Hier wurden auch erste Regeln für die Proteinfaltung aufgestellt. Pauling und Corey haben 1951 aufgrund experimentell ermittelter Bindungswinkel und -längen die Struktur der  $\alpha$ -Helix vorhergesagt, diese wurde dann sechs Jahre später in Myoglobin durch Röntgenstrukturanalyse bestätigt. In der  $\alpha$ -Helix bildet sich jeweils zwischen der CO-Gruppe des Restes  $n$  und der NH-Gruppe des Restes  $(n + 4)$  eine Wasserstoffbrücke aus (erstaunlicherweise treten  $\alpha$ -Helices nur rechtshändig auf).
- **Supersekundärstruktur:** In zahlreichen Proteinen findet man zwei  $\beta$ -Stränge, die durch eine  $\alpha$ -Helix getrennt sind; man nennt dies eine  $\beta\alpha\beta$ -Einheit. Supersekundärstrukturen werden als Übergang zwischen Sekundär- und Tertiärstruktur betrachtet.
- **Tertiärstruktur:** Räumliche Beziehung von Aminosäureresten, die innerhalb der linearen Sequenz weit auseinanderliegen (die Trennungslinie zwischen Sekundär- und Tertiärstruktur ist ein wenig willkürlich).

- **Quartärstruktur:** Proteine, die aus mehr als einer Polypeptidkette bestehen, zeigen eine weitere strukturelle Organisationsebene. Jede Polypeptidkette eines solchen Proteins wird als Untereinheit bezeichnet. Die Quartärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung solcher Untereinheiten und die Art ihrer Kontakte (z. B. besteht Immunglobulin G aus zwei L- und zwei H-Ketten).
- **Native Form:** Die biologisch funktionsfähige, (endgültige) dreidimensionale Konformation eines Proteins wird als seine native Form bezeichnet.

Nachdem nun die Begriffe für die verschiedenen Grade der Ordnung in einem Protein zur Verfügung stehen, folgt eine Einführung in das Problem der Proteinfaltung.

## 1.2 Was bedeutet Protein-/Peptidfaltung?



**Abbildung 1.1:** Im Faltungsprozess bildet eine zunächst ungefaltete Aminosäurekette (links) zuerst Sekundärstrukturelemente aus (mitte), bis schließlich das Protein im nativen, biologisch funktionsfähigen Zustand vorliegt (rechts). Das Fragezeichen deutet den für diese Arbeit interessanten Teil des Faltungsprozesses an — die initialen Konformationsänderungen.

Die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren können über Peptidbindungen beliebig miteinander kombiniert werden. Eine dermaßen natürlich oder künstlich hergestellte (beliebig lange) Aminosäurekette kann als random coil zunächst keine biologische Funktion erfüllen (Abb. 1.1, links). In geeigneten Lösungsmitteln und bei geeigneten Temperaturen kann die random coil in einem sogenannten Faltungsprozess Sekundär- und Tertiärstrukturen ausbilden (Abb. 1.1, mitte), so dass nach einigen Sekunden oder Minuten das voll biologisch funktionsfähige Protein im nativen Zustand vorliegt (Abb. 1.1, rechts) [Str94].

In Experimenten hat man beobachtet, dass diese Faltung reversibel sein kann: Wird eine Lösung von Proteinen im nativen Zustand zum Beispiel erhitzt (oder der pH-Wert geändert), dann „denaturiert“ das Protein, es verliert seine native Form und wird wieder zur random coil. Bei zu starker Erhitzung wird das Protein dann irgendwann irreversibel zerstört. Kühlt man die Lösung jedoch rechtzeitig wieder ab, kann das Protein seine

native Form wieder finden. Eine Schlussfolgerung aus diesen Experimenten ist, dass der native Zustand, also die exakte dreidimensionale Konformation des Proteins, bereits in der Aminosäuresequenz codiert ist. Die Untersuchung der Proteinfaltung ist damit für die Biologie essentiell, denn in der Zelle werden nur random coils erzeugt, für einen lebenden Organismus sind aber funktionierende Enzyme notwendig. Die exakte dreidimensionale Form des Enzyms ist dabei oft extrem wichtig. Eine abweichende Konformation („misfolding“) kann dazu führen, dass das Enzym seine Aufgabe nicht mehr erfüllen kann, im Falle von Prionen werden diese abweichenden Konformationen sogar als Krankheitsauslöser für BSE verantwortlich gemacht. Eine kleine Sammlung aktueller Aufsätze über das Problem der Proteinfaltung und -Missfaltung findet sich z. B. in [Smi03].

### 1.3 Beschreibung der Proteinfaltung — Faltungstrichter

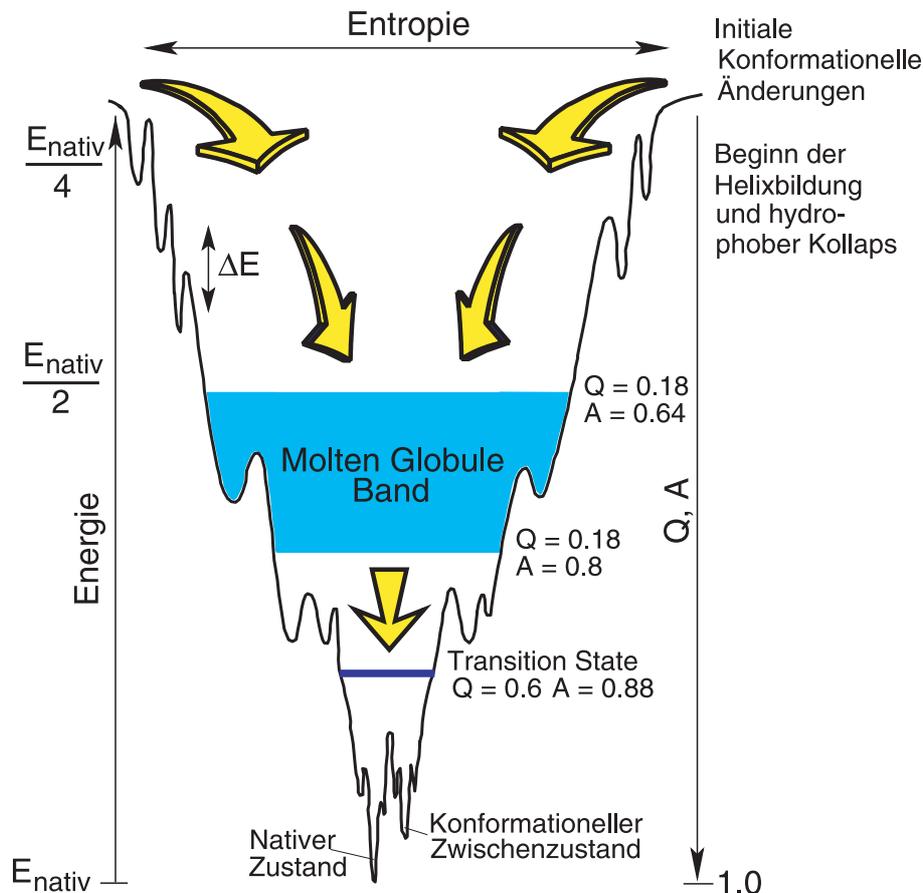
Es gibt eine Reihe von Modellen zur Beschreibung der Proteinfaltung: bekannt sind das **Nucleation-growth-Modell** (es werden einige kritische kinetische Nuklei geformt, um die herum der Rest der Struktur wächst) und das **Framework Modell** (zunächst falten sich die Sekundärstrukturelemente; diese docken dann im ratenlimitierenden Schritt zur nativen Struktur) [GGK<sup>+</sup>03].

Heutzutage sehr beliebt ist das **Modell des hydrophoben Kollaps**. Dabei beginnt der Faltungsprozess damit, dass sich in Teilen des random coil erste Sekundärstrukturelemente ausbilden und außerdem hydrophobe Aminosäurenreste nach innen und hydrophile Seitenketten nach außen (zum Lösungsmittel Wasser hin) ausgerichtet werden [Dil85, FF03]. Das Modell des hydrophoben Kollaps sagt einen Zustand voraus, der als „**molten globule**“ bezeichnet wird. In diesem Zustand ist das Protein bereits kompakt gefaltet, eine deutliche Seitenkettenpackung und eine definierte Tertiärstruktur fehlen aber noch, die meisten Bindungen sind bereits ausgebildet, müssen aber noch einmal aufgebrochen werden, um in den nativen Zustand zu gelangen [Jae91].

Sehr verbreitet ist die Veranschaulichung der Proteinfaltung über einen Faltungstrichter („folding funnel“), wie er in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt ist [BOSW95, OW04].

Die Vorstellung ist, dass das ungefaltete Protein in einen (zweidimensionalen) Trichter fällt, der durch die Entropie und Energie des Proteins aufgespannt wird. Das spitze untere Ende des Trichters hat die niedrigste Energie und die niedrigste Entropie und entspricht dem nativen Zustand des Proteins. Die random coil, das komplett ungefaltete Protein, hat eine grosse Entropie und eine höhere Energie und befindet sich am oberen Rand des Trichters. Vereinfacht gesagt werden oben in den Trichter random coils „eingefüllt“ und kommen unten im nativen Zustand heraus.

Für das Verständnis des Bildes ist wichtig, dass das Protein sich nur entlang des äußeren Trichterrandes hinunter bewegt. Wäre der Trichter glatt, dann könnte das Protein ungehindert (und schnell) in die native Form „fallen“. Der „reale“ Faltungstrichter bildet



**Abbildung 1.2:** Ein Faltungstrichter als Modell der Proteinfaltung.  $\Delta E^2$  ist ein Maß für die Rauigkeit der Energielandschaft, der  $Q$ -Wert gibt an, wieviele Bindungen im Protein bereits „richtig“ sind und  $A$  beschreibt, welcher Bruchteil der Bindungswinkel den nativen Wert hat (siehe Text). Die Abbildung basiert auf Darstellungen in [WOT95, OWLS95].

jedoch Unebenheiten aus, in denen sich das Protein verfangen kann. Dadurch wird der Beobachtung Rechnung getragen, dass Proteine in nicht nativen Konformationen gefunden wurden, die zum Teil recht lange brauchen, um wieder aus diesen lokalen Minima herauszukommen.

Abbildung 1.2 enthält zusätzlich  $Q$ - und  $A$ -Werte, die aus der Simulation eines 60 Aminosäuren langen helikalen Peptids stammen [OWLS95]. Der  $Q$ -Wert gibt an, wieviele Bindungen im Protein bereits „richtig“ sind (für  $Q = 1$  ist das Protein im nativen Zustand). Der  $A$ -Wert gibt an, welcher Bruchteil der Bindungswinkel den nativen Wert hat (für ein random coil sollte  $A \approx 0.68$  sein, im nativen Zustand ist  $A = 1$ ).

In der Abbildung 1.2 ist ebenfalls eingezeichnet, in welchem Bereich des Faltungstrichters der hydrophobe Kollaps und das „molten globule band“ liegt, außerdem auch noch der Bereich des Übergangszustands („transition state“), der weiter unten in Abschnitt 1.6 eine Rolle spielt.

Nach dieser prinzipiellen Beschreibung stellt sich als nächstes die Frage, auf welchen Zeitskalen die einzelnen Prozesse der Proteinfaltung ablaufen.

### 1.4 Zeitskalen und Untersuchungsmethoden

Abbildung 1.3 zeigt schematisch die Zeitskalen verschiedener Prozesse der Proteinfaltung. Die erste Kontaktbildung zweier Aminosäuren der random coil kann bereits im Zeitbereich von einigen Nanosekunden stattfinden [BWH<sup>+</sup>99, KFB<sup>+</sup>03]. Für ein 60 Aminosäuren langes Protein wurde für den hydrophoben Kollaps eine Zeitkonstante von ca. 60 ns gefunden [SLM03]. Im Sub-Mikrosekundenbereich findet die Ausbildung von Sekundärstruktur-Elementen statt,  $\alpha$ -Helices werden gebildet [BK99, KHE04]. Die Formung von  $\beta$ -Faltblättern dauert ca. 10 Mikrosekunden [BK99, KHE04]. Auf der Zeitskala von etlichen Mikrosekunden bis hinein in den Millisekunden-Bereich findet dann die Ausbildung der Tertiärstruktur statt [BK99, KHE04]. Für künstliche Proteine wurde der Begriff der „ultrafast folders“ begründet, so berichten Wang et al. von einem 45 Aminosäuren langen Peptid, dessen Faltungsvorgang sich mit einer Zeitkonstanten von  $\tau = 1\mu\text{s}$  beschreiben lässt [WZG04] (siehe dazu auch [YG03, KHE04]). Die schnellste Ausbildung der kompletten nativen Form natürlich vorkommender Proteine wurde im Sub-Millisekunden-Bereich berichtet, je nach Protein kann dieser Faltungsprozess jedoch auch einige Stunden dauern [BK99].

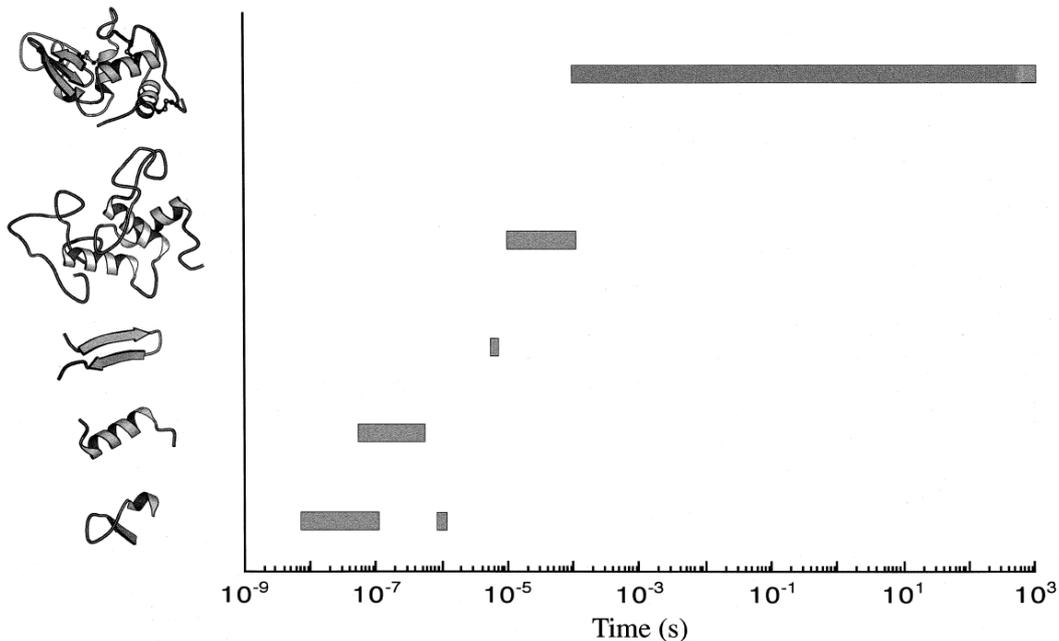
Abbildung 1.4 zeigt äquivalent dazu die diversen experimentellen Untersuchungsmethoden und die jeweils damit zugänglichen Zeitskalen. Für die Untersuchung von Prozessen, die nur wenige Nanosekunden dauern, eignen sich demnach nur noch die Laser Flash Photolyse [BWH<sup>+</sup>99, KFB<sup>+</sup>03] und Laser-induzierte Temperatursprungexperimente [HGZ<sup>+</sup>02, ZAM<sup>+</sup>03].

Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Verfahren würde an dieser Stelle zu weit führen. Interessant ist aber die Feststellung, dass mit jeder neuen Generation von Experimenten wieder ein neuer (kürzerer) Zeitbereich erschlossen werden konnte und damit verbunden die Abschätzung für die am schnellsten ablaufenden Prozesse in der Proteinfaltung stetig nach unten korrigiert werden mussten.

Die hier vorliegende Arbeit interessiert sich für die schnellsten Prozesse im Faltungsprozess eines Peptids, d. h. für den Sub-Nanosekunden Zeitbereich. Doch welche Prozesse erwartet man auf diesen Zeitskalen?

### 1.5 Ultraschnelle Prozesse

Die bisher besprochenen Faltungsprozesse beschreiben das Entstehen der langreichweitigen Ordnung im Protein. Einer der allerersten Schritte dabei ist die Kontaktbildung zweier nicht direkt benachbarter Aminosäuren als Vorstufe der Ausbildung von Sekundärstrukturelementen auf der Zeitskala einiger Nanosekunden.

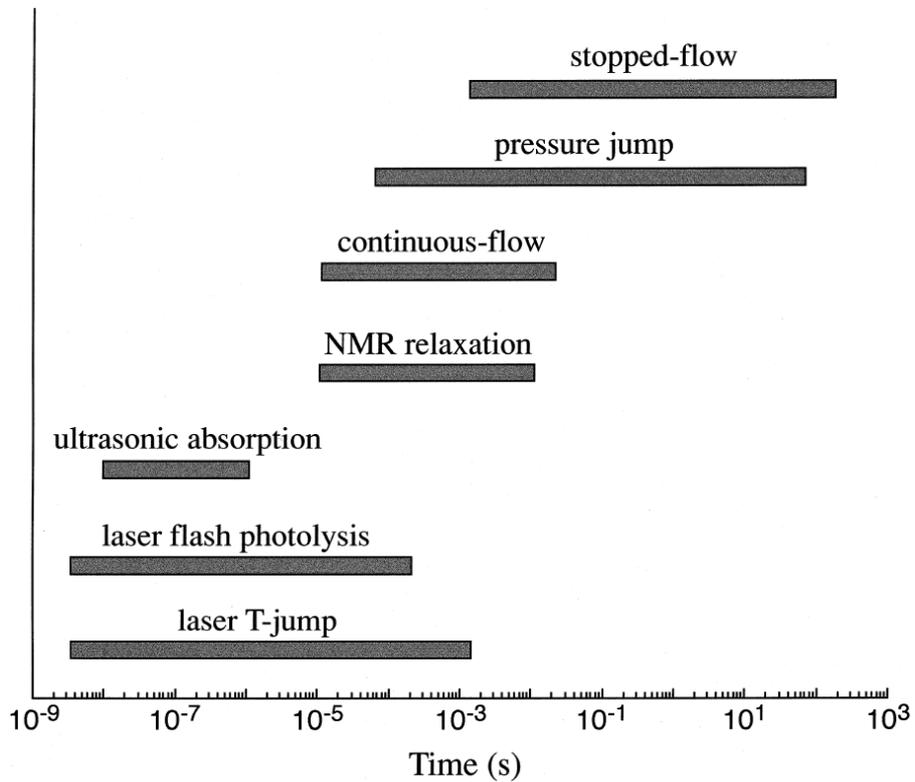


**Abbildung 1.3:** Zeitskalen in der Proteinfaltung. Links ist schematisch der Ordnungsgrad des Proteins angegeben, angefangen bei der ersten Kontaktbildung (ganz unten) über die Ausbildung von Sekundärstruktur-Elementen ( $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter) bis hin zum komplett gefalteten, nativen Protein (ganz oben). Die Abbildung ist entnommen aus [BK99].

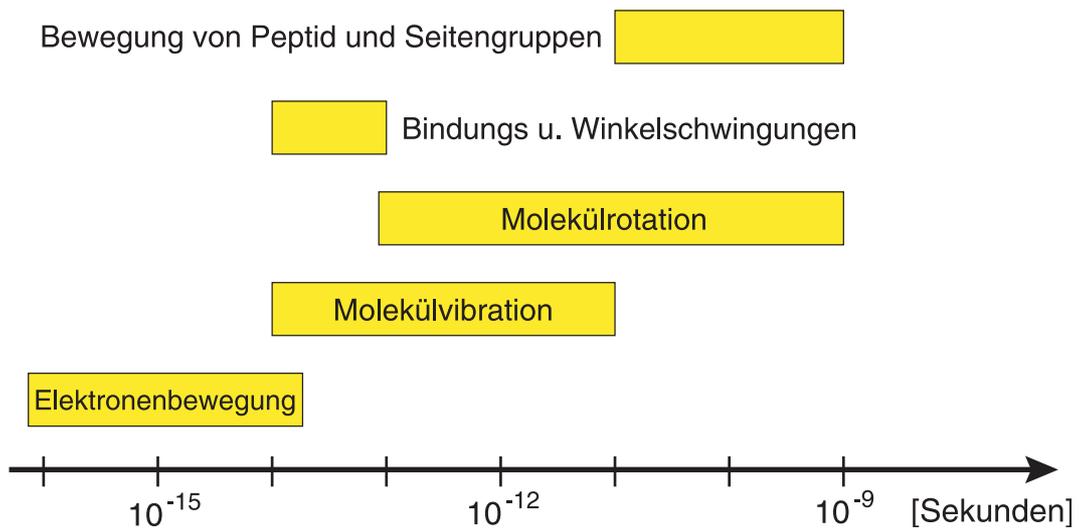
Die Proteinfaltung beginnt jedoch nicht erst mit dieser ersten Kontaktbildung. Auf der Zeitskala von einigen 10 Pikosekunden beobachtet man bereits die Bewegung von Peptid- und Seitengruppen, dazu zählen die Rotation von Seitengruppen und das Ändern von Dihedralwinkeln<sup>1</sup> [MH87]. Auf noch kürzeren Zeitskalen kommen die Prozesse der Molekülrotation (100 fs–1 ns) und Molekülvibration (10 fs–10 ps) sowie die Elektronenbewegung (0.1–10 fs) hinzu [PMH90]. Eine Zusammenfassung dieser ultraschnellen Vorgänge gibt Abbildung 1.5.

Die Erschließung dieses neuen Zeitbereichs ist seit ca. 10 Jahren durch die experimentelle Technik der Ultrakurzzeitspektroskopie möglich. Als einer der Pioniere auf diesem Gebiet wurde Ahmed Zewail 1999 für die Begründung des Forschungsgebiets der „Femtochemie“ mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet (für eine schöne Übersicht siehe z. B. [Zew00]). In der Ultrakurzzeitspektroskopie erzeugt ein wenige Femtosekunden dauernder Anregungs-Lichtimpuls eine Besetzung im elektronisch angeregten Zustand. Zeitlich verzögert dazu kann mit einem ebenfalls nur wenige Femtosekunden dauernden energetisch schwächeren Abtast-Lichtimpuls die transiente Absorption der Probe gemessen werden. Mit dieser Technik, wie sie in Kapitel 2 detailliert beschrieben wird, kann die transiente Absorption eines Moleküls im Zeitbereich von einigen Femtosekunden

<sup>1</sup>Im Peptid findet man für jede Aminosäure zwei Freiheitsgrade („Dihedralwinkel“), die die relative Lage der Aminosäuren gegeneinander beschreiben [Str94].



**Abbildung 1.4:** Zur Aufklärung der Proteinfaltung eingesetzte Untersuchungsmethoden und damit zugängliche Zeitskalen. Die Abbildung ist entnommen aus [BK99].



**Abbildung 1.5:** Vorgänge in Peptiden und Molekülen auf der fs–ns-Zeitskala. Die Daten stammen aus [MH87, PMH90].

bis zu drei Nanosekunden erfasst werden.

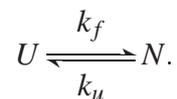
Als nächstes werden die in dieser Arbeit verwendeten Ansätze zur Untersuchung initialer Schritte der Peptidfaltung vorgestellt. Zunächst folgt hier jedoch ein kurzer Abriss kinetischer Theorien der Proteinfaltung.

## 1.6 Kinetische Theorie der Proteinfaltung

Die kinetische Theorie der Proteinfaltung ist ein eigenes großes Forschungsgebiet. Um die Experimente an den Xanthonpeptiden in Kapitel 7 in einen größeren Zusammenhang einordnen zu können, folgt hier ein kurzer Abriss [BK00].

Für die kinetische Theorie der Proteinfaltung wird zu Beginn meistens eine große Vereinfachung durchgeführt, indem nur noch zwei Bereiche des Konformationsraums unterschieden werden. Ausgehend von dem Faltungstrichter in Abbildung 1.2 werden sämtliche Konformationsvarianten, die zum nativen Zustand gehören in  $N$  („nativ“) zusammengefasst und die Gesamtheit aller anderen Konformationen in  $U$  („unfolded“). Eine recht große Zahl von Proteinen konnte experimentell diesen sog. „two-state foldern“ zugeordnet werden (siehe z. B. [SD03, HMR03, JKD<sup>+</sup>04]).

Der Übergang vom rauen Faltungstrichter zum Zwei-Zustands-Modell ist in Abbildung 1.6 angedeutet. Der Zustand  $U$  ist metastabil und durch eine Barriere der freien Enthalpie,  $\Delta G^0$ , von  $N$  getrennt. In  $\Delta G^0$  sind enthalpische ( $\Delta H^0$ ) und entropische ( $\Delta S^0$ ) Anteile zusammengefasst,  $\Delta G^0 = \Delta H^0 + T\Delta S^0$ , und es gibt eine reversible Reaktion zwischen  $U$  und  $N$  mit den Ratenkonstanten  $k_f$  („folding rate“) und  $k_u$  („unfolding rate“) [ZZ91, Zwa97]:



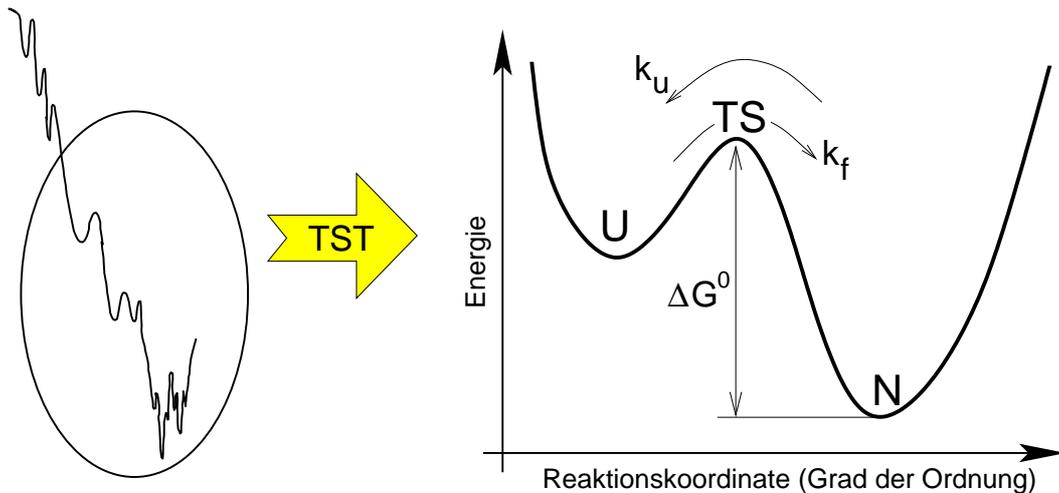
Für die Ratenkonstante ergibt sich dann [Kie04]

$$k_f = k_f^0 \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G^0}{RT}\right) = k_f^0 \cdot \exp\left(-\frac{\Delta H^0 - T\Delta S^0}{RT}\right). \quad (1.1)$$

Der Term  $k_f^0$  heisst präexponentieller Faktor, er bestimmt die maximale Reaktionsgeschwindigkeit beim Fehlen der Energiebarriere. In der Literatur über Proteinfaltung spielt der präexponentielle Faktor im Zusammenhang mit der maximalen Faltungsgeschwindigkeit der „two-state-folder“-Proteine eine große Rolle<sup>1</sup> [HHSE96, BWH<sup>+</sup>99, BK99, BK00, PTW01, CLWG03, DDM<sup>+</sup>04].

Im Folgenden sind die wichtigsten Zugänge dargestellt, diesen präexponentiellen Faktor zu ermitteln.

<sup>1</sup>Die Werte für  $k_0$  schwanken dabei zwischen  $10^6 \dots 10^8 \text{ s}^{-1}$ , siehe dazu auch die Ausführungen in Abschnitt 7.6.4 (Seite 183).



**Abbildung 1.6:** Vereinfachung in der kinetischen Theorie der Proteinfaltung: Die Gesamtheit aller ungefalteten Zustände wird in  $U$  („unfolded“) zusammengefasst. Der native Zustand  $N$  besitzt eine größere Ordnung bei kleinerer Energie und ist durch eine Barriere  $\Delta G^\ominus$  von  $U$  getrennt. Während der Faltung befindet sich das Protein kurzzeitig im Übergangszustand  $TS$  („transition state“).

### 1.6.1 Der Zugang nach van't Hoff und Arrhenius

Van't Hoff [Hof84] und Arrhenius [Arr89] fanden empirisch die Temperaturabhängigkeit von Ratenkonstanten chemischer Reaktionen. In eingeschränkten Temperaturbereichen gilt

$$k = A \cdot \exp\left(-\frac{E_A}{RT}\right).$$

Dabei ist  $A$  ein von der Temperatur unabhängiger Faktor und  $E_A$  ist die Aktivierungsenergie. Durch Vergleich mit Gl. (1.1) erhält man daraus  $\Delta H^0 = E_A - RT$  und

$$k_f^0 = A \cdot \exp\left(-\frac{E_A}{RT}\right).$$

### 1.6.2 Theorie des Übergangszustandes (TST)

Basierend auf Eyring [Eyr35] wird in der Theorie des Übergangszustandes („transition state theory“, TST) postuliert, dass in einer kleinen Umgebung des Sattelpunktes in Abb. 1.6 ein sog. Übergangszustand („transition state“, TS, siehe dazu z. B. [VMOD04]) im Gleichgewicht mit den Reaktanden steht:



Für den präexponentiellen Faktor ergibt sich dann

$$k_f^0 = \frac{k_B T}{h} \cdot \kappa \quad \text{mit } \kappa \leq 1.$$

Der Faktor  $\kappa$  heisst Transmissionsfaktor und gibt an, welcher Anteil der ungefalteten Proteine  $U$ , die den Sattelpunkt erreicht haben, sich weiter zum nativen Zustand  $N$  falten.

Meistens wird  $\kappa = 1$  gesetzt („conventional TST“). Dies vereinfacht die Datenanalyse, ist aber für Reaktionen in Lösung nur eine Näherung.

Die Theorie des Übergangszustandes wurde für die Gasphase entwickelt und ist deshalb für Reaktionen in Lösung prinzipiell nicht optimal geeignet. Besser dafür geeignet ist Kramers Theorie.

### 1.6.3 Kramers Theorie

In der Theorie nach H. A. Kramers gelangt wiederum ein Teilchen aus einem Potentialtopf über eine Barriere in einen benachbarten, energetisch tiefer liegenden Potentialtopf [Kra40]. Der Einfluss eines Lösungsmittels wird aber explizit in die Theorie integriert: die Bewegung des Teilchens ist thermisch aktiviert und durch die Lösungsmittelreibung  $\gamma$  gedämpft. Für den präexponentiellen Faktor findet man damit

$$k_f^0 = \frac{C}{\gamma}$$

mit einer Konstanten  $C$ , die von der jeweiligen Reaktion abhängig ist.

In einem ausführlichen Übersichtsartikel geben Hänggi et al. auch die zwei entscheidenden Annahmen in Kramers Theorie an [HTB90]:

- **Starke Kopplung:** Ein thermodynamisches Gleichgewicht muss stets für alle Freiheitsgrade gegeben sein. Alle Effekte, die auf einer Abweichung vom thermodynamischen Gleichgewicht beruhen, werden vernachlässigt.
- **Punkt ohne Widerkehr:** Jede Trajektorie überquert den Sattelpunkt höchstens einmal.

## 1.7 In dieser Arbeit untersuchte Systeme

Wie oben in Abschnitt 1.4 dargelegt, geht die meiste Literatur zur Proteinfaltung davon aus, dass die schnellsten relevanten Faltungsprozesse wie der Kontakt zweier entfernter Aminosäuren innerhalb einiger Nanosekunden ablaufen. Die Ausführungen in Abschnitt 1.5 legen jedoch nahe, dass konformationelle Änderungen im Peptid bereits im Sub-Nanosekunden Zeitbereich ablaufen. Ein Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es deshalb, weitere Untersuchungen in diesem Zeitbereich durchzuführen.

Das Problem bei der Erschliessung jedes neuen Zeitbereichs ist doppelt: Die Apparaturfunktion des Experiments muss kurz genug sein und außerdem müssen geeignete Systeme gefunden werden, die im relevanten Zeitbereich klar erkennbare Dynamiken zeigen.

Das in dieser Arbeit verwendete experimentelle Verfahren ist die Ultrakurzzeit-Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich. Sie erlaubt es, den Zeitbereich von einigen Femtosekunden bis hinaus zu vier Nanosekunden zu untersuchen. Die Apparatefunktion ist dabei ca. 100 fs. Mit dieser Technik kann der kürzest zugängliche Zeitbereich um ca. zwei Größenordnungen nach unten in den Bereich weniger Pikosekunden verschoben werden.

Es ist klar, dass in diesem Zeitbereich langreichweitige Ordnung keine Rolle spielen wird, sondern dass hier kurzlebige Änderungen ablaufen. Die untersuchten Proben können also aus relativ kurzen Aminosäuresequenzen bestehen. Kleine Peptide haben ausserdem den Vorteil, dass sie sich in heutigen Computersimulationen bereits relativ gut theoretisch untersuchen lassen (im Falle der Azopeptide wurde dies in einer zu dieser Arbeit parallel durchgeführten Dissertation von H. Carstens ausführlich gezeigt, siehe [Car04]).

In der hier vorliegenden Arbeit werden zwei sehr unterschiedliche Modellsysteme eingesetzt. Im ersten dienen geeignete Schaltermoleküle dazu, gezielt getriebene Faltungsdynamiken in einem kleinen, ringförmigen Peptid auszulösen. Im zweiten Modellsystem geht es darum, den Zeitpunkt der Kontaktbildung in einem kurzen linearen, frei beweglichen Peptid zu bestimmen, ohne es zu stören.

Es folgt eine kurze Vorstellung der zwei Systeme.

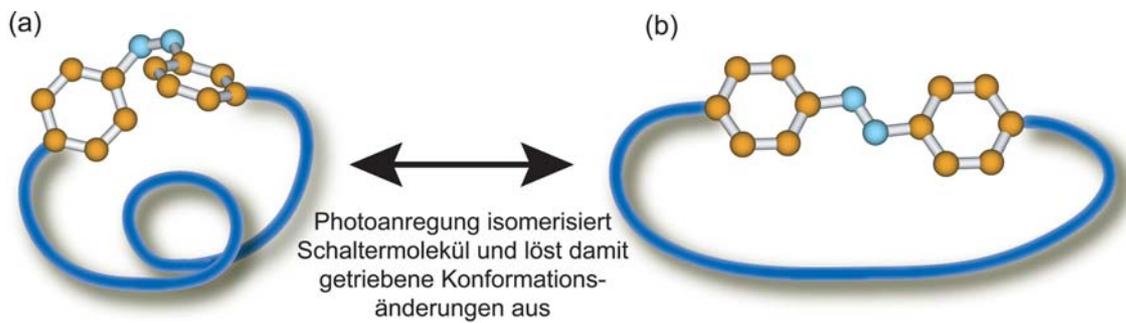
### 1.7.1 Getriebene Konformationsänderungen in Azopeptiden

Die sog. Azopeptide bieten ein Modellsystem, in dem durch Photoanregung gezielt innerhalb weniger Pikosekunden getriebene Konformationsänderungen beobachtet werden können.

Die zugrundeliegende Idee ist in Abbildung 1.7 dargestellt. Ausgangspunkt ist das Schaltermolekül Azobenzol, das in der Abbildung durch ein vereinfachtes Stäbchenmodell stilisiert wurde. Die Photochemie von Azobenzol wird später in einem eigenen Kapitel ausführlich beschrieben, an dieser Stelle wichtig ist die Erkenntnis, dass das Molekül durch Licht innerhalb weniger Pikosekunden reversibel von der *cis*-Form (links im Bild) in die *trans*-Form (rechts) „geschaltet“ werden kann und dabei seine Länge um den Faktor zwei ändert.

In einem aufwändigen Verfahren kann Azobenzol in eine Pseudo-Aminosäure eingebaut werden, ohne seine Eigenschaften zu verlieren. Die Azobenzol Pseudo-Aminosäure kann nun mit natürlichen Aminosäuren verbunden und daraus ein Peptid-Ring geformt werden: es entsteht das Azobenzol-Peptid, kurz Azopeptid. In der Nomenklatur dieser Arbeit spricht man vom Photoschalter (die Azobenzol Pseudo-Aminosäure) und dem Peptid-Teil (in der Abbildung schematisch als Schlauch dargestellt).

Durch die Besonderheiten des Azobenzols können die Azopeptide nahezu beliebig oft zwischen der *trans*- und *cis*-Form hin- und hergeschaltet werden. Der Peptid-Teil hat in der *trans*-Form eine deutlich andere dreidimensionale Struktur als in der *cis*-Form, beim Übergang zwischen den beiden Formen müssen also konformationelle Änderungen im Peptid-Teil ablaufen, die (indirekt) mit den Mitteln der Ultrakurzzeitspektroskopie beobachtet werden können.



**Abbildung 1.7:** Azopeptide sind ein ringförmige Modellpeptide, in denen Azobenzol als Schaltermolekül integriert ist. Durch Photoanregung kann das Azobenzol reversibel zwischen der *cis*-Form (a) und der *trans*-Form (b) hin- und hergeschaltet werden und dadurch getriebene Konformationsänderungen im Peptid-Teil (als Schlauch dargestellt) auslösen.

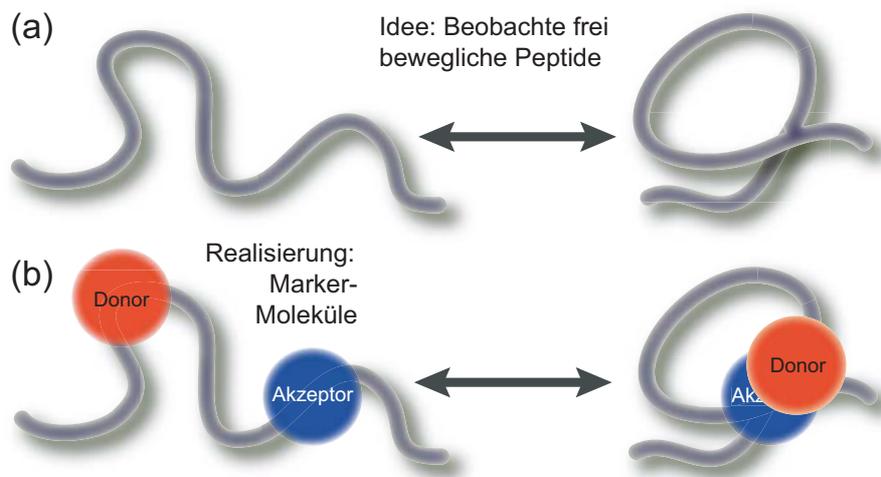
Beim Modellsystem der Azopeptide wird also durch den Anregungs-Lichtimpuls eine gezielte Änderung im Peptid-Teil ausgelöst und diese Änderungen werden spektroskopisch durch den Abtast-Lichtimpuls verfolgt.

### 1.7.2 Kontaktbildung in frei beweglichen Xanthonpeptiden

Im zweiten Modellsystem der Xanthonpeptide wird ein ganz anderer Ansatz verfolgt: Hier wird durch den Anregungs-Lichtimpuls nicht das Peptid beeinflusst, sondern nur ein beliebiges Peptid markiert, dessen weitere Bewegung dann spektroskopisch durch den Abtast-Lichtimpuls verfolgt wird.

Das zugrundeliegende Prinzip zeigt Abbildung 1.8. Im Zentrum des Interesses steht ein möglichst flexibles, frei bewegliches Peptid, das von sich aus keine spezielle Konformation realisiert hat (Abb. 1.8a). Untersucht werden soll die Fragestellung, wie schnell zwei beliebige Teile dieses Peptids in Kontakt kommen (dabei bewege sich das Peptid beispielsweise ständig zwischen den beiden in Abb. 1.8a links und rechts dargestellten Formen hin und her).

Die experimentelle Realisierung ist in Abb. 1.8b dargestellt: Zwei unterschiedliche Marker-Moleküle werden in das Peptid eingebaut, ein Donor (Xanthon) und ein Akzeptor (Naphthalin). Die Beobachtung startet mit der Markierung des Donors: durch den Anregungs-Lichtimpuls geht das Xanthon-Molekül innerhalb weniger Pikosekunden in einen Triplett-Zustand, in dem es mehrere Mikrosekunden lang verweilt. Das Peptid wird dadurch nicht gestört und bewegt sich weiter frei in Lösung. Irgendwann kommen Donor und Akzeptor in direkten Kontakt. Wenn dies geschieht, findet ein Triplett-Triplett-Energietransfer vom Donor zum Akzeptor statt, der spektroskopisch beobachtet werden kann. Aus diesen Untersuchungen kann die Kontaktbildungsrate für ein Peptid mit einer spezifischen Aminosäuresequenz ermittelt werden.



**Abbildung 1.8:** Xanthonpeptide. (a) Untersucht werden soll die Kontaktbildungsrate eines frei beweglichen Peptids. (b) In der experimentellen Umsetzung werden Markermoleküle in das Peptid integriert. Der Zeitpunkt des direkten Kontakts zwischen Donor und Akzeptor kann mit Ultrakurzzeitspektroskopie beobachtet werden.

### 1.8 Aufbau dieser Arbeit

Nachdem das Prinzip der beiden Methoden, mit denen die initialen Schritte der Peptidfaltung in dieser Arbeit untersucht werden sollen kurz dargestellt wurde, gibt die folgende Liste eine Übersicht über den Rest dieser Arbeit:

- Die später präsentierten experimentellen Ergebnisse wurden mit spektroskopischen Methoden gewonnen. Kapitel 2 (**Experiment**) beschreibt die Technik der durchgeführten Experimente.
- Spektroskopische Untersuchungen sind prinzipiell immer indirekt und es ist oft nicht leicht, abgesicherte Erkenntnisse aus den gemessenen Daten zu extrahieren. Das Kapitel 3 (**Methoden**) beschreibt verschiedene Ansätze, wie sich dieser Prozess eventuell vereinfachen oder verbessern lässt, bzw. wie sich das Vertrauen in die extrahierten Informationen vergrößern lässt.
- Wie oben bereits kurz beschrieben, sollen zwei sehr unterschiedliche Arten von Experimenten Antworten auf die Eingangs gestellten beiden Fragen liefern. Ein Verständnis der biophysikalisch interessanten Experimente erfordert jedoch detaillierte Voruntersuchungen. Die beiden Kapitel 4 (Azobenzol) und 6 (Xanthon) beschäftigen sich deshalb eingehend mit der Photochemie und der **Molekülphysik** der Referenz-Systeme.
- Den **biophysikalisch** interessanten Fragestellungen widmen sich dann schließlich die Kapitel 5 (Azopeptide) und 7 (Xanthonpeptide).

## 2 Experiment

Für diese Arbeit wurden **transiente Absorptions-Experimente** mit Anregungs-Lichtimpulsen bei einer Zentralwellenlänge von 266 nm, 340 nm und 480 nm in Kombination mit einer spektral breitbandigen Detektion durchgeführt. Abschnitt 2.1 beschreibt Aufbau und Durchführung der Experimente sowie die Datenaufbereitung. Bei Anregung im ultravioletten Spektralbereich treten zum Teil (für diese Arbeit) **störende Effekte** durch zusätzliche Signale eines solvatisierten Elektrons auf (Abschnitt 2.1.7).

Ergänzende Informationen zu Azobenzol wurden durch **stationäre Fluoreszenzmessungen** gewonnen. Abschnitt 2.2 gibt eine Beschreibung des dazu benötigten experimentellen Aufbaus.

### 2.1 Transiente Absorptionsmessungen

Der größte Teil der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurde mit zeitaufgelöster transienter Absorptions-Spektroskopie gesammelt. Die folgenden Aspekte werden in den nächsten Abschnitten behandelt:

- Das **grundlegende Lasersystem** stellt intensive, kurze Lichtimpulse bei einer Zentralwellenlänge von 800 nm zur Verfügung (Abschnitt 2.1.1).
- Durch **nichtlineare optische Prozesse** werden Anregungs-Lichtimpulse bei einer Zentralwellenlänge von 266 nm, 340 nm oder 480 nm erzeugt (Abschnitt 2.1.2).
- Ebenfalls durch nichtlineare optische Prozesse werden die Lichtimpulse des **Abtast-Kontinuums** erzeugt (Abschnitt 2.1.3).
- Am **Probenort** wird mit einem Abtast-Lichtimpuls die durch den Anregungs-Lichtimpuls induzierte transiente Absorption der Probe bestimmt (Abschnitt 2.1.4).
- Der prinzipielle Ablauf eines Experiments incl. **Datenaufbereitung** ist in den Abschnitten 2.1.5 und 2.1.6 beschrieben.

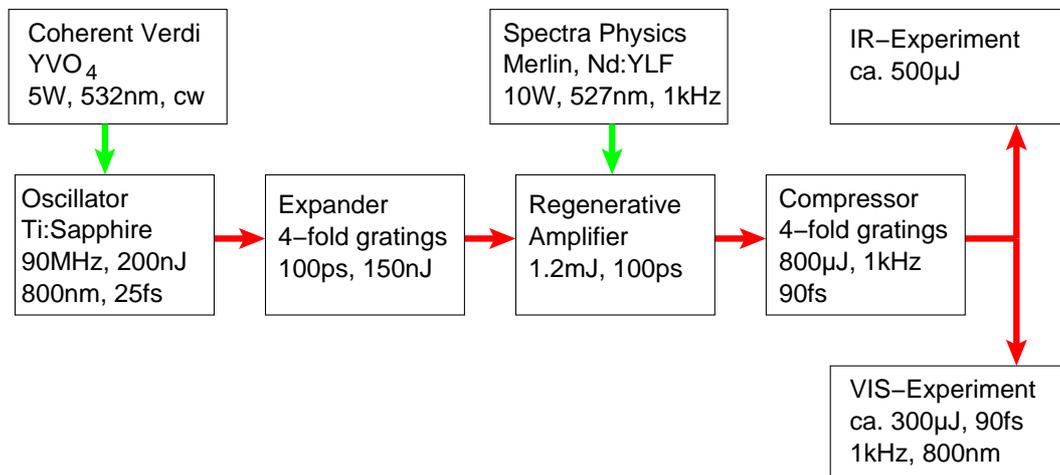
#### 2.1.1 Das fs-Lasersystem

Für alle zeitaufgelösten transienten Absorptionsmessungen wurde ein am Lehrstuhl für BioMolekulare Optik entwickeltes Lasersystem verwendet. Der Aufbau des Lasersystems bildete einen Teil der Doktorarbeiten von S. Spörlein, I. Lutz und R. Huber [Spö01, Lut01,

## 2 Experiment

Hub02]. Dort sind sämtliche Überlegungen, die in die Konzeption und den Aufbau der Anlage eingeflossen sind, ausführlich dargelegt.

Das Lasersystem ist in Abb. 2.1 schematisch dargestellt, die technischen Details der Anlage sind in Tab. 2.1 und 2.2 zusammengefasst.



**Abbildung 2.1:** Schematischer Aufbau des fs-Lasersystems.

Technische Daten Ti:Saphir-Oszillator	
Pumplaser	Coherent, Verdi 5 W, YVO <sub>4</sub> -Festkörperlaser, 2.7 W cw, 532 nm
Zentralwellenlänge	800 nm
FWHM	46 nm
Faltungs-Geometrie	X
Resonatorlänge	1.67 m
Intra-Cavity Kompression	Prismen (SiO <sub>2</sub> )
Pulsdauer	25 fs (ext. Kompression)
Repetitionsrate	90 MHz
Pulsenergie (98% OC)	ca. 2 nJ
Strahldurchmesser	2.5 mm

**Tabelle 2.1:** Technische Daten des Ti:Saphir-Oszillators, die Daten stammen aus [Spö01, Lut01, Hub02].

Für Expander und Kompressor wurde jeweils eine 4-fach gefaltete Gitteranordnung verwendet. Dabei kommen holographisch hergestellte Gitter mit 1400 Strichen pro Millimeter auf dem Substrat ULE in Littrow-Anordnung (Gitterwinkel  $34^\circ$ ) zum Einsatz (Standard Glassubstrate wie BK7 hätten einen zu großen thermischen Ausdehnungskoeffizienten, was sich negativ auf die Stabilität des Lasersystems auswirken würde).

Technische Daten regenerativer Ti:Saphir-Verstärker	
Pumplaser	Spectra Physics, Merlin 10 W Nd:YLF, 10 mJ, 527 nm Pulsdauer: 300 ns Puls-zu-Puls Schwankung: 0.2-2% RMS
Zentralwellenlänge	800 nm
FWHM	15 nm
Resonatorlänge	2.6 m
Pulsdauer	70–90 fs
Repetitionsrate	1 kHz
Umläufe	12–15
Transmission Expander	$\approx 72\%$
Transmission Kompressor	60–75 %
Pulsenergie nach Kompressor	bis zu 1 mJ
Strahldurchmesser nach Kompressor	4 mm
Puls-zu-Puls Schwankung	0.2-2% RMS

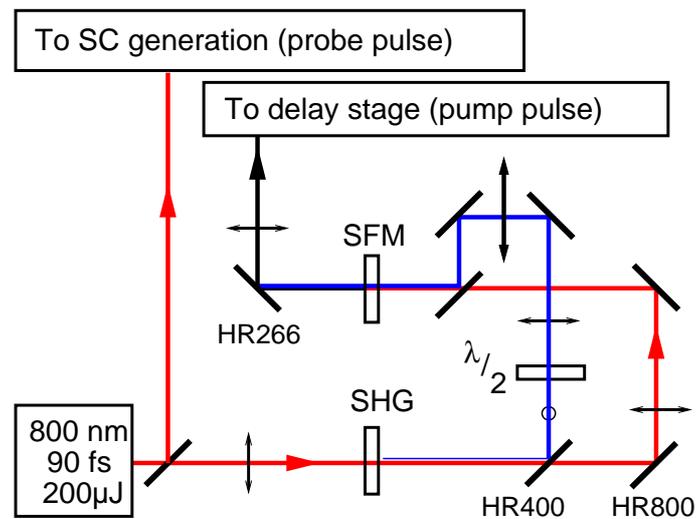
**Tabelle 2.2:** Technische Daten des des regenerativen Ti:Saphir-Verstärkers, die Daten stammen aus [Spö01, Lut01, Hub02].

### 2.1.2 Erzeugung der benötigten fs-Anreg-Lichtimpulse

Kurzpuls-Lasersysteme, die auf Titan-dotiertem Saphir als Lasermedium basieren, werden normalerweise mit einer Wellenlänge um 800 nm betrieben. Es gilt jetzt, daraus Lichtimpulse abzuleiten, die im Bereich der Absorptionsbanden der zu untersuchenden Moleküle liegen. Für die hier untersuchten Systeme waren das drei Anregungswellenlängen: 266 nm, 340 nm und 480 nm.

Der schematische Aufbau der Experimente mit **266 nm Anregung** ist in Abb. 2.2 gezeigt. Die Fundamentale des Lasers ( $\omega = 800$  nm) wird zuerst in einem BBO-Kristall (Dicke = 0.5 mm,  $\theta = 29^\circ$ ,  $\phi = 0^\circ$ ,  $p$ -coating, Typ I, Fa. MolTech) in einem nichtlinearen Prozess verdoppelt ( $2\omega = 400$  nm). Mit einem  $\lambda/2$ -Plättchen wird die Polarisation der 400 nm-Lichtimpulse angepasst, um anschließend in einem zweiten BBO-Kristall (Dicke = 0.5 mm,  $\theta = 44^\circ$ ,  $\phi = 0^\circ$ ,  $p$ -coating, Typ I, Fa. MolTech) die Summenfrequenz zu erzeugen ( $3\omega = 266$  nm).

Die Erzeugung von Anregungs-Lichtimpulsen bei 340 nm oder 480 nm ist aufwändiger und geschieht unter Ausnutzung der nichtkollinearen optisch-parametrischen Verstärkung (NOPA). Dabei wechselwirken ein energetisch schwacher Seed-Lichtimpuls und ein energiereicher Pump-Lichtimpuls in einem doppelbrechenden BBO-Kristall (2 mm dick,  $\theta = 29^\circ$ ,  $\phi = 0^\circ$ ,  $p$ -coating, Typ I, Fa. CasTech). Durch die nichtkollineare Anordnung wird erreicht, dass zum einen ein optimaler Energietransfer vom Pump-Lichtimpuls auf den Seed-Lichtimpuls stattfindet und zum anderen der Seed-Lichtimpuls spektral breitbandig verstärkt wird (der verstärkte Seed-Lichtimpuls wird dann als Signal-Lichtimpuls



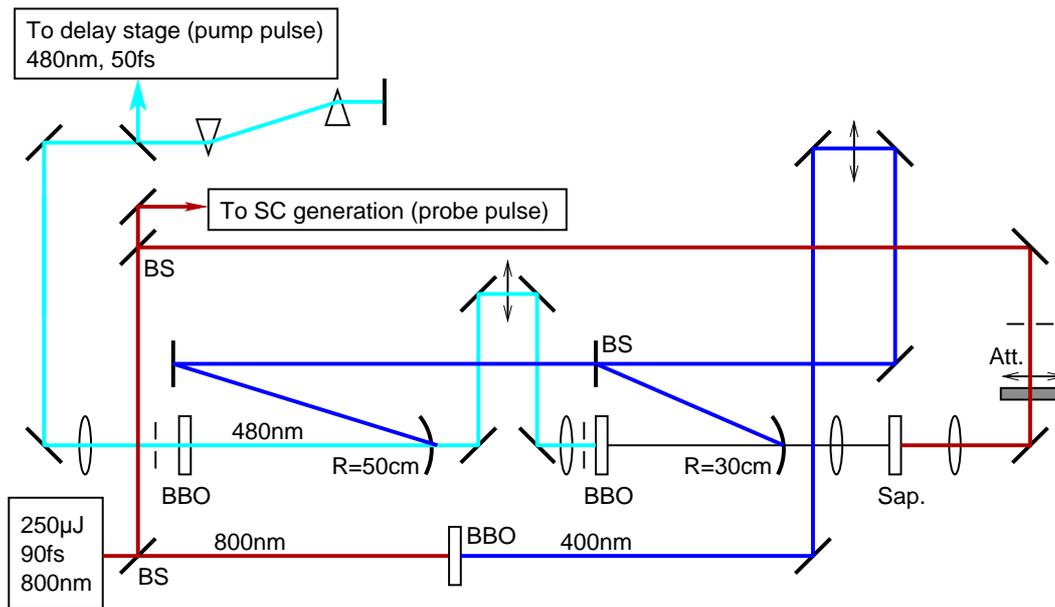
**Abbildung 2.2:** Schematischer Aufbau zur Erzeugung der Anregungslichtimpulse bei einer Zentralwellenlänge von 266 nm.

bezeichnet). Aufgrund der Impulserhaltung wird dabei im Kristall ein neuer Lichtimpuls erzeugt (Idler-Lichtimpuls: liegt der Signal-Lichtimpuls im sichtbaren Spektralbereich, so wird der Idler-Lichtimpuls im nahen Infrarot-Spektralbereich erzeugt und umgekehrt). Ausführliche Beschreibungen des NOPA-Prinzips finden sich bei [WPR97, LWP<sup>+</sup>99, RBP<sup>+</sup>00, Spö01, Lut01, Hub02]. Auf diese Weise lassen sich kurze Lichtimpulse (bis zu  $< 10$  fs Impulsdauer) mit ausreichender Energie (einige  $\mu\text{J}$ ) erzeugen, deren Zentralwellenlänge im gesamten sichtbaren und nahen Infraroten Spektralbereich frei wählbar ist (450–750 nm, 850–1700 nm, bestimmt durch das Spektrum der Seed-Lichtimpulse, der Bereich der Fundamentalwellenlänge des Lasers ist nicht zugänglich).

Zur Erzeugung von Anregungs-Lichtimpulsen im sichtbaren Spektralbereich (480 nm bzw. 680 nm) muss ein Winkel von  $6.1^\circ$  zwischen Seed- und Pump-Lichtimpuls eingestellt werden (entsprechend einem Nichtkollinearitäts-Winkel innerhalb des BBO-Kristalls von  $3.8^\circ$ ), um die Phasenanpassungsbedingung optimal zu erfüllen.

Die Effizienz des Prozesses hängt von der Intensität der Seed-Lichtimpulse ab, die Durchstimmbarkeit (Zentralwellenlänge des Signal-Lichtimpulses) ist beschränkt durch das Spektrum der Seed-Lichtimpulse. Normalerweise werden die Seed-Lichtimpulse für den NOPA-Prozess in Saphir-Plättchen erzeugt (Fa. Sappro, Dicke 2 mm, poliert, orientiert in Z-Richtung). Die Intensität des so erzeugten Spektrums nimmt im Bereich unter 500 nm rapide ab (siehe das Spektrum in Abb. 2.7 und den folgenden Abschnitt). Um dies auszugleichen werden zwei NOPA-Prozesse hintereinander geschaltet und der Signal-Lichtimpuls der ersten Stufe dient als Seed-Lichtimpuls der zweiten Stufe. Dieses Konzept wurde für einen Teil der Experimente verwendet, die mit **480 nm Anregungs-Lichtimpulsen** durchgeführt wurden, der schematische Aufbau ist dargestellt in Abb. 2.3.

Im Laufe dieser Arbeit fanden am Lehrstuhl aber auch weiterführende Entwicklungen des NOPA-Konzeptes statt. Für die hier durchgeführten Messungen waren vor allem

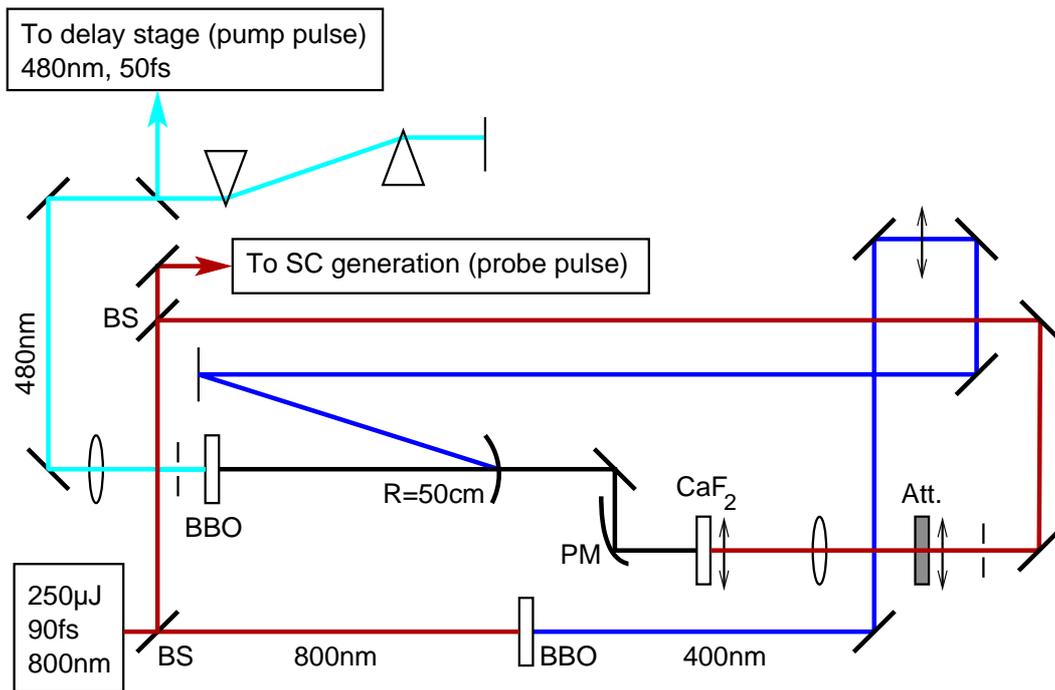


**Abbildung 2.3:** Erzeugung von Anregungs-Lichtimpulsen bei einer Zentralwellenlänge von 480 nm (NOPA).

weiterführende Arbeiten zur Weißlichterzeugung im UV-Spektralbereich relevant. Die Verwendung eines Kalziumfluorid-Plättchens (Layertech, 2 mm dick, UV-grade, super polished, RMS-Rauhigkeit  $< 0.1$  nm, Keil  $< 3^\circ$ ) erlaubt es, speziell im Bereich unter 500 nm wesentlich intensivere Seed-Lichtimpulse bereitzustellen (siehe die Spektren in Abb. 2.7 und den folgenden Abschnitt). In diesem Fall reicht bereits eine NOPA-Stufe aus, um Anregungspulse bei 480 nm mit ausreichender Intensität zu erzeugen. Das Prinzip des „Kalziumfluorid-geseedeten NOPA“ ist dargestellt in Abb. 2.4 und ausführlich beschrieben in [HSZW01, Hub02]. Durch die Verwendung von rein reflektiver Optik nach der Weißlichterzeugung (Off-Axis Parabolspiegel und Silberspiegel) wird keine zusätzliche Dispersion eingeführt und bereits bei der Erzeugung erfährt der Seed-Lichtimpuls in Kalziumfluorid weniger Dispersion als in Saphir.

Apparativ am aufwändigsten ist die Erzeugung von **Anregungs-Lichtimpulsen bei 340 nm**. Die Erzeugung von Anregungs-Lichtimpulsen mit einer Zentralwellenlänge unterhalb 450 nm ist mit dem bisher beschriebenen NOPA-Aufbau nicht möglich. Zwei Auswege bieten sich dafür an:

1. Es ist möglich, statt 400 nm Pump-Lichtimpulsen 266 nm Pump-Lichtimpulse zu verwenden. Tzankov et al. berichten von einem NOPA-Aufbau, der mit 266 nm-Lichtimpulsen gepumpt wird und Signal-Lichtimpulse im Bereich 335–480 nm liefert [TFB03]. Die Effizienz des NOPA-Prozesses geht dabei jedoch deutlich zurück, die Energie der Signal-Lichtimpulse liegt nur noch im Bereich 100–250 nJ. Für die hier durchgeführten Experimente wurden Signal-Lichtimpulse mit ca.  $1 \mu\text{J}$  benötigt (Verluste an Aluminium-Spiegeln führen dazu, dass nur etwa die Hälfte der im NO-



**Abbildung 2.4:** Aufbau der fs-Experimente mit 480 nm Lichtimpulsen (CaF<sub>2</sub>-NOPA).

PA erzeugten Energie zur Probe gelangt). Es wurde deshalb die zweite Möglichkeit gewählt:

- Die Zentralwellenlänge der Signal-Lichtimpulse wird auf 680 nm eingestellt und in einem nachgeschalteten BBO-Kristall (Dicke 50 μm,  $\phi=35^\circ$ , Typ I, *p*-coating, Fa. MolTech) wird der Signal-Lichtimpuls frequenzverdoppelt ( $2\omega = 340$  nm). Die Effizienz dieses Prozesses beträgt ca. 10%. Die so erreichte Impulsdauer ermöglichte eine Apparatfunktion (Kreuzkorrelationsbreite) von ca. 200 fs, was für die durchgeführten Experimente ausreichend war, weshalb auf eine Komprimierung der UV-Anregungs-Lichtimpulse verzichtet werden konnte. Der schematische Aufbau ist in Abb. 2.5 gezeigt.

### 2.1.3 Erzeugung der Abtast-Lichtimpulse — Weißlicht

Zeitlich versetzt zum intensiven Anreg-Lichtimpuls misst der schwächere Abtast-Lichtimpuls die transiente Absorptionsänderung der Probe. Je breiter das Spektrum des Abtast-Lichtimpulses ist, desto mehr Information erhält man über die zu untersuchende Probe. Das hier verwendete Detektionskonzept erlaubt es, einen 336 nm breiten Bereich des Spektrums in einer Messung zu erfassen (siehe folgender Abschnitt).

Die Erzeugung spektral sehr breiter Lichtimpulse ist recht einfach und in Abb. 2.6 schematisch dargestellt: Lichtimpulse aus dem Lasersystem (1–10 μJ Energie, 800 nm



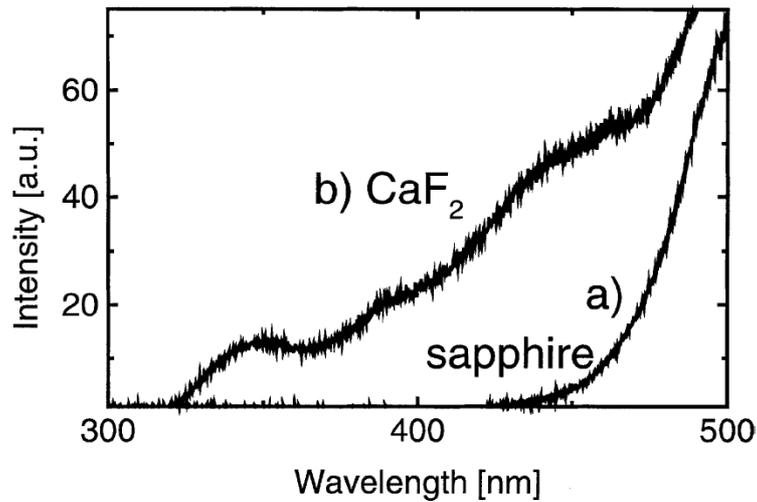
folgt nach dem in Abb. 2.6 gezeigten Schema, als Medium wurde Kalziumfluorid gewählt. Am Lehrstuhl und zum Teil auch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen zur Weißlichterzeugung (siehe [HSZW01, Spö01, Hub02]) ergaben, dass dieses Material speziell im Wellenlängenbereich  $< 500$  nm wesentlich besser geeignet ist als Saphir (siehe Abb. 2.7).

Erste Untersuchungen von S. Spörlein zur Weißlichterzeugung in Kalziumfluorid wurden an einem Lasersystem mit 20 Hz Repetitionsrate durchgeführt und zeigten ermutigende Resultate. Beim Übergang auf das neue 1 kHz-System stellte sich jedoch heraus, dass an der Oberfläche des Kalziumfluorid-Substrats Degradations-Erscheinungen auftraten, die den Prozess der Weißlichterzeugung unterbrachen. Nach einigen Sekunden beobachtet man, wie ein Single-Filament Weißlicht „aufbricht“ und zur Messung nicht mehr verwendet werden kann (vgl. das Single-Filament in Abb. 2.8 mit dem Multi-Filament in Abb. 2.9). Die Lösung des Problems wurde von R. Huber zusammen mit der Werkstatt des Lehrstuhls erarbeitet und besteht aus einer Feinmechanik **Verschiebe-Vorrichtung**. Sie erlaubt es, das Substrat unabhängig in X- und Y-Richtung zu verschieben siehe [HSZW01, Hub02]. Wird das Material auf diese Art bewegt, treffen jeweils nur ein paar Laser-Lichtimpulse auf die gleiche Stelle des Materials und man beobachtet keine Degradation mehr.

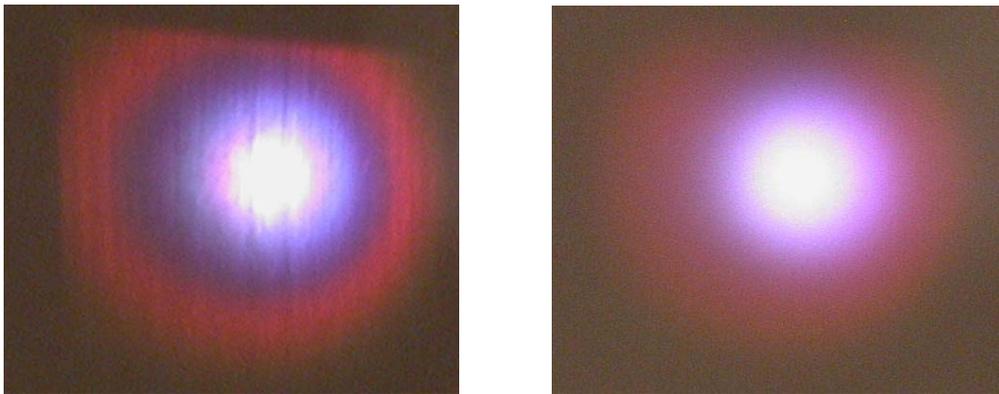
Neben der Repetitionsrate scheint die Dauer der Laser-Lichtimpulse von entscheidender Bedeutung bei der Erzeugung eines stabilen Superkontinuums in  $\text{CaF}_2$  zu sein. Das hier verwendete Lasersystem liefert Lichtimpulse mit ca. 90 fs Pulsdauer, womit die Weißlichterzeugung in jedem Fall problemlos möglich war. Typische dabei erzeugte Single-Filamente zeigt Abb. 2.8. Werden die 90 fs-Lichtimpulse jedoch künstlich gestreckt (z. B. mit 10 cm SF58-Glas auf  $\sim 300$  fs oder mit 10 cm SF55-Glas auf  $\sim 800$  fs), kann nur noch ein Multi-Filament beobachtet werden (in Abb. 2.9 gezeigt). Zur Messung kleiner Transmissionsänderungen ist nur ein stabiles Single-Filament geeignet, mit einem Multi-Filament Abtast-Lichtimpuls wären die hier durchgeführten Messungen nicht möglich gewesen. Die **Pulsdauer** ist also offensichtlich von entscheidender Bedeutung (vgl. Tab. 2.3).

Beobachtung bei der Erzeugung von kohärentem Weißlicht	
Stabiles Single-Filament	Instabiles Multi-Filament
Fixes $\text{CaF}_2$ Substrat, 20 Hz System	–
1 kHz System: $\text{CaF}_2$ Substrat bewegt (Lissajous-Form)	1 kHz System: Fixes $\text{CaF}_2$ Substrat
Pulsdauer $< 100$ fs	Pulsdauer $> 150$ fs

**Tabelle 2.3:** Beobachtungen bei der Erzeugung eines Superkontinuums.



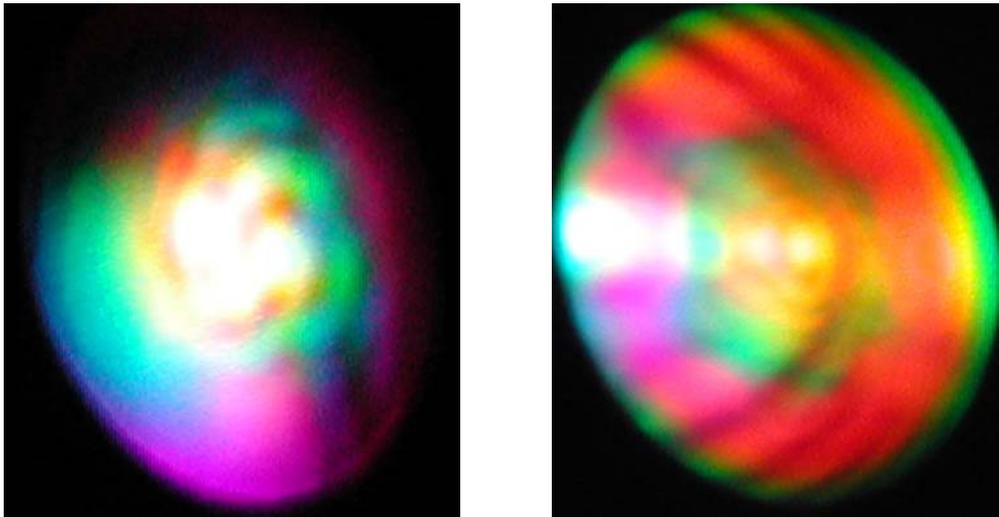
**Abbildung 2.7:** Superkontinuum erzeugt in Saphir und CaF<sub>2</sub> (die Abbildung stammt aus [HSZW01]).



**Abbildung 2.8:** Stabiles Single-Filament Superkontinuum: Langzeitstabile Abtast-Lichtimpulse mit geringen Puls-zu-Puls Schwankungen sind die Grundlage für die breitbandige und genaue Messung kleiner Absorptionsänderungen (die links sichtbaren Streifen rühren von feinen Rillen im Off-Axis Parabolspiegel her).

### 2.1.4 Der Messplatz

Der Anregungslichtimpuls mit eingestellter Zentralwellenlänge und kurzer Pulsdauer wird über einen Schrittmotor geführt (Abb. 2.10). Über eine Änderung der optischen Weglänge für den Anreg-Lichtimpuls wird die Zeitverzögerung relativ zum Abtast-Lichtimpuls eingestellt (siehe Tabelle 2.4). Die Kombination aus  $\lambda/2$ -Plättchen und Polarisator erlaubt es, die Energie der Anreg-Lichtimpulse abzuschwächen und eine feste Polarisationsrichtung einzustellen, die dann mit dem zweiten  $\lambda/2$ -Plättchen auf die gewünschte Geometrie des Experiments eingestellt werden kann. Für die meisten durchgeführten Experimente wurde der „magische Winkel“ ( $54.7^\circ$ ) zwischen Anreg- und Abtast-Lichtimpuls eingestellt, um das Signal der Rotationsdepolarisation bereits während des Experiments auszulöschen



**Abbildung 2.9:** Instabiles Multi-Filament Superkontinuum. Ästhetisch, aber Aufgrund unkontrollierbarer Intensitätsschwankungen nicht zum Abtasten kleiner Absorptionsänderungen verwendbar.

[Fle86]. Einige Experimente wurden aber auch sowohl mit paralleler als auch mit senkrechter Polarisations-Geometrie durchgeführt. In diesem Fall wird die Absorptionsänderung  $\Delta A$ , die der Messung unter magischem Winkel entspricht, aus den Messungen unter paralleler ( $\Delta A^{\parallel}$ ) und senkrechter ( $\Delta A^{\perp}$ ) Geometrie berechnet [FMR76, LJ79] (alle in dieser Arbeit enthaltene Abbildungen zeigen die entsprechenden Daten unter magischem Winkel):

$$\Delta A^{\text{mag}} = \frac{\Delta A^{\parallel} + 2 \cdot \Delta A^{\perp}}{3} \quad (2.1)$$

Die Erzeugung der Abtast-Lichtimpulse wurde im vorigen Abschnitt erläutert. Durch den Strahlteiler (BS in Abb. 2.10) werden ca. 50% des Abtast-Lichts, einstellbar durch Verschieben eines Graukeils, an der Probe vorbei in ein Referenz-Spektrometer geleitet. Der reflektierte Teil des Abtast-Lichts ist hinter dem Strahlteiler kollinear mit dem Anreg-Licht (Höhenversatz 1 cm). Über einen Off-Axis Parabolspiegel (Brennweite 75 mm) werden Anreg- und Abtast-Lichtimpuls (unter einem Winkel von  $4^\circ$ ) in die Probe fokussiert. Die Bündelradien in der Probe betragen dabei  $40\text{--}80\ \mu\text{m}$  für das Abtast-Licht (abhängig von der Wellenlänge) und  $120\text{--}200\ \mu\text{m}$  für die Anregung (je nach verwendetem Aufbau). Die Abtast-Lichtimpulse gehen horizontal durch die Probe und werden in der Diodenzeile des Signal-Spektrometers gemessen, die Anregungs-Lichtimpulse kommen schräg von unten und können geometrisch durch einen Spiegel hinter der Probe umgelenkt werden, um (i) die (nicht absorbierte) Rest-Energie der Anreg-Lichtimpulse aufzuzeichnen und (ii) Streulicht im Detektor zu vermeiden.

Das verwendete Detektor-Konzept ist eine Eigenentwicklung des Lehrstuhls: Die Spektrometer (Fa. LTi) besitzen zwei Gitter mit jeweils 600 Linien pro Millimeter, optimiert für 300 nm bzw. 500 nm (Blaze) und bilden das Abtast-Licht (Signal bzw. Referenz)

auf eine Diodenzeile mit 46 Elementen ab (Fa. Hamamatsu, Serie 4114, Frontfenster aus Quarzglas). 42 Elemente der Diodenzeile werden genutzt (bedingt durch die beschränkte Anzahl der Kanäle des Analog-Digital-Wandlers). Aus der Diodengröße, den Abbildungseigenschaften der Spektrometer und der Strichzahl der eingesetzten Gitter ergibt sich eine Wellenlängenauflösung von 8 nm pro Diodenelement. In einem einzelnen Experiment kann also ein Spektralbereich von  $42 \cdot 8 \text{ nm} = 336 \text{ nm}$  simultan abgetastet werden.

Am Lehrstuhl entwickelte Vorverstärker-Impedanzwandler verstärken das Signal der Dioden und liefern es an einen 96-Kanal Analog-Digital-Wandler (Fa. Le Croy, Typ 1885F). 84 Kanäle verarbeiten die Daten von Signal- und Referenz-Spektrometer, die restlichen 12 Kanäle sind mit Kontrolldioden verknüpft, die z. B. Puls-zu-Puls Schwankungen oder Impuls-Energien messen. Der Analog-Digital-Wandler integriert die anfallenden Ladungen nur innerhalb eines Zeitfensters von ca. 800 ns (getriggert durch die Elektronik des Nd:YLF Pump-Lasers im regenerativen Verstärker). Messungen an der Probe finden jede Millisekunde statt, Streulicht (Laborbeleuchtung etc.) wird also mit einem Faktor von etwa 1:1000 unterdrückt. Die Datenübertragung zum PC, der das komplette Experiment steuert, erfolgt dann über FastBus, allerdings müssen die übertragenen Pegel erst auf PC-konforme Werte gewandelt werden. Dies geschieht durch eine am Lehrstuhl entwickelte Einsteckkarte für PC. Dieses problemangepasste Detektionskonzept wurde über mehrere Jahre optimiert, Details dazu finden sich in [Zur92, Hoc96, SWZ97].

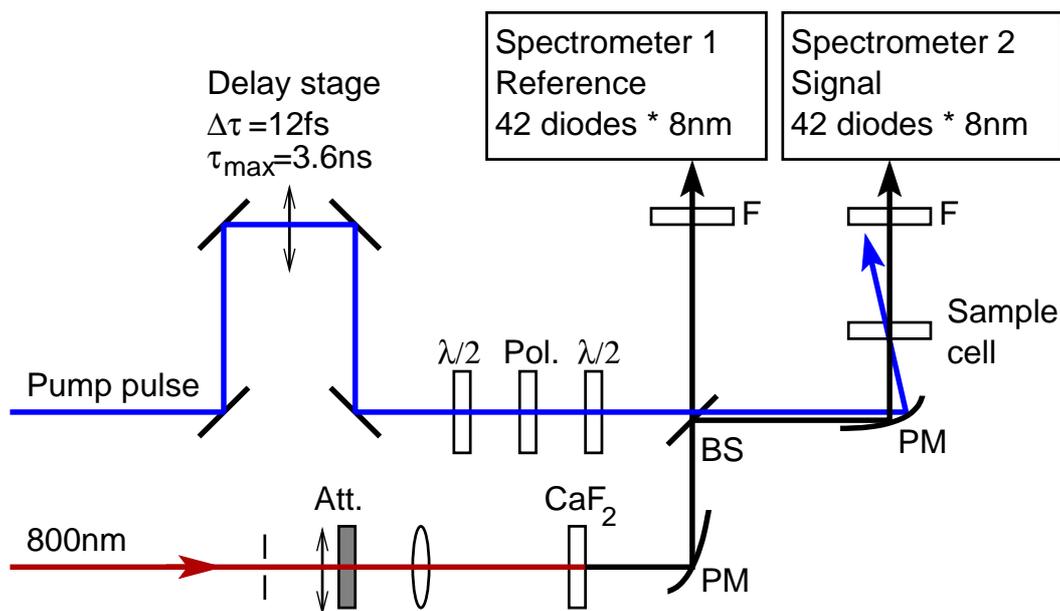
Der Anreg-/Abtast Aufbau	
Strahlführung über Schrittmotor	2-fach bzw. 4-fach gefaltet
Minimale Schrittweite	0.3 $\mu\text{m}$ (12 fs bei 4-fach Faltung)
Maximaler Lichtweg über Verzögerungsstrecke	1.2 m (3.6 ns bei 4-fach Faltung)
Wegstrecke zwischen Erzeugung des Superkontinuums und Probenort	0.25 m

**Tabelle 2.4:** Der Anreg-/Abtast Aufbau.

Alle Experimente wurden so ausgelegt, dass die Probenmenge zwischen zwei aufeinanderfolgenden Anreg-/Abtast-Lichtimpulsen komplett ausgetauscht wurde. Als Durchflußküvette kam stets eine Spezialanfertigung der Fa. Hellma (Typ-Nr. 130.199) zum Einsatz. Die Form der Küvette ist in Abb. 2.11 dargestellt: Die Küvette besteht aus Quarzglas, ist 4.5 cm hoch und 1 cm breit. In der Mitte befindet sich ein 1 mm breiter und 0.5 mm dicker Kanal, durch den die zu messende Lösung gepumpt wird. Um zusätzliche Dispersion zu minimieren beträgt die Dicke des Frontglases nur 0.3 mm. Die rückseitige Wandstärke trägt nicht zur Dispersion bei und beträgt 1.2 mm.

Die zur Verfügung stehende Probenmenge war bei den meisten durchgeführten Messungen nur 3–5 ml. Zwei Pump-Konzepte wurden dabei eingesetzt:

- Für die ersten Experimente wurde die gelöste Probe in eine Glasspritze (Fa. Hamilton) aufgezogen und mit einer **Spritzenpumpe** (Fa. TSE Technical & Scientific

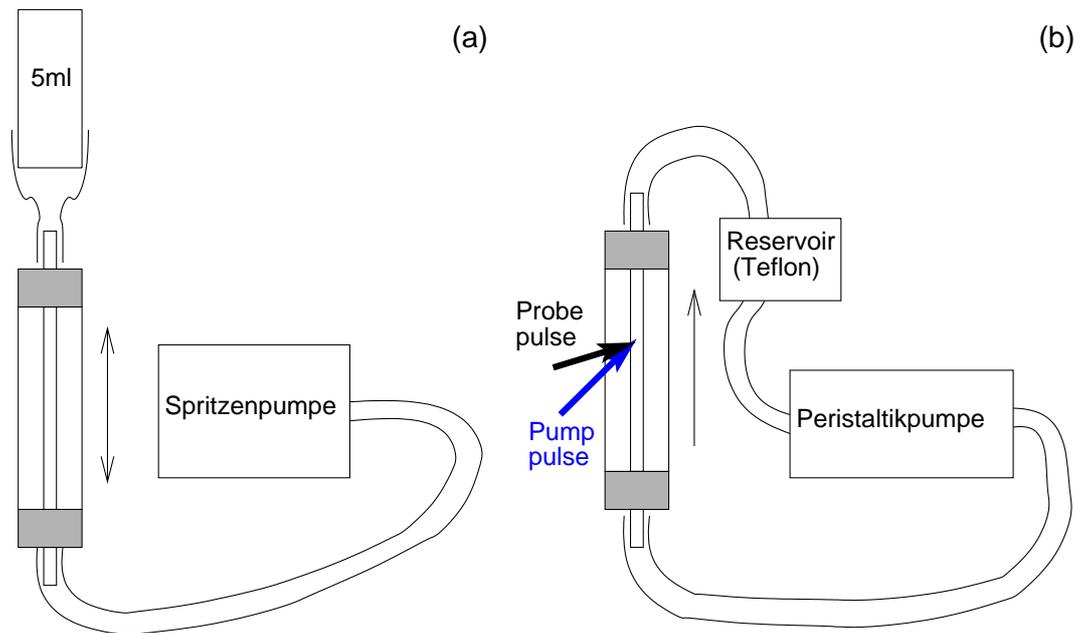


**Abbildung 2.10:** Aufbau des dispersions-minimierten Experiments. Die Brennweiten der beiden Off-Axis Parabolspiegel (PM) beträgt 75 mm, die Brennweite der Linse beträgt 100 mm. Geeignete Kantenfilter (F; Farbgläser, Fa. Schott) unterdrücken die Anregungs-Wellenlängen, die ansonsten im Spektrometer in 2.ter Ordnung die Messung verfälschen könnten.

Equipment GmbH, Typ No. 540210C, schematisch dargestellt in Abb. 2.11a) in ein Ausgleichsgefäß gepumpt (die Probe kommt dabei mit Glas, Edelstahl und Teflon in Kontakt). Dieses Konzept ist jedoch problematisch, da an den Umkehrpunkten der Proben austausch nicht gewährleistet ist. Deshalb musste ein zusätzlicher magnetischer Shutter integriert werden, der an den Umkehrpunkten die Datenaufzeichnung anhält. Leider verlängert diese Maßnahme die Messzeit um bis zu 30%.

- Der später konzipierte Probenstand benützt deshalb eine **Peristaltikpumpe** (Fa. Masterflex, Model-no. 7520-67, Abb. 2.11b). Die Probe kommt hierbei nur mit Glas und Teflon in Kontakt und wird stets in eine Richtung gepumpt. Die Bedingungen sind also für jeden Messpunkt identisch, zusätzlich wird Messzeit eingespart.

Für die Experimente an Azobenzol und an den Azopeptiden sind zusätzlich noch weitere Vorkehrungen nötig: Vor der Messung der *cis*→*trans* Isomerisierung muss durch UV-Belichtung ein photostationäres Gemisch hergestellt werden (in dem dann ca. 80–90% der Moleküle in der *cis*-Form sind; durch kontinuierliche Belichtung bleibt diese Konzentration auch während des Experiments bestehen). Dies geschieht durch ein **UV-Belichtungsmodul**. Kernstück ist eine Hg(Xe) Bogenlampe (1000W, Fa. Oriol, lamp model no. 6293, luftgekühlt, Netzteil: Oriol Universal Power Supply No. 68820), hinter deren Kollimator ein wassergekühlter Filter (UG11, 2 mm dick, Fa. Schott) den Wellenlängenbereich > 380 nm unterdrückt. Für Experimente an reinem Azobenzol werden mit einem zweiten Filter (WG305, 2 mm dick, Fa. Schott) drei intensive Spektrallinien bei 313 nm,



**Abbildung 2.11:** Probenstand: Der Kanal der Quarz Durchflußküvette ist 1 mm breit und 0.5 mm dick. Das Frontfenster ist nur 0.3 mm dick um zusätzliche Dispersion zu minimieren. (a) Die Probe wird von einer Spritzenpumpe in ein Ausgleichsgefäß gepumpt. Das Experiment läuft dann mit zwei verschiedenen Pumprichtungen (Probleme an den Umkehrpunkten). In (b) wird deshalb eine Peristaltikpumpe verwendet. Auf diese Weise kann die Probe im Kreis gepumpt werden, die Proben-Bedingungen bleiben stets gleich.

335 nm und 365 nm ausgewählt, die ein effektives belichten in die *cis*-Form erlauben. Für Experimente an den Azopeptiden ist ein anderer Filter nötig (WG320, 2 mm dick, Fa. Schott), der nur die beiden Spektrallinien bei 335 nm und 365 nm ausgewählt (Licht bei 313 nm würde hier bereits wieder eine Rückbesetzung der *trans*-Form bewirken). Der Betrieb der Lampe erzeugt jedoch erheblich Wärme und beeinflusst durch elektromagnetische Strahlung negativ das Dunkelrauschen der Detektoren [Spö01]. Es ist deshalb notwendig, die Lampe in einem separaten Raum zu betreiben. Das Licht der Lampe wird dort mit einer Linse (Brennweite 50 mm) in einen Fluid-Lichtleiter (Fa. Lumatec, Serie 300, Öffnungs-Durchmesser 3 mm, Länge 10 m) fokussiert. Am Ende des Lichtleiters stehen dann ca. 100 mW Lichtleistung zur Verfügung, konzentriert auf die relevanten Spektrallinien.

Absorptionsspektren der Proben wurden entweder mit einem Lambda 19-Spektrometer (Fa. Perkin-Elmer) oder mit einem Aspect-Spektrometer (Fa. Analytik Jena, Typ SPECORD 100S) aufgenommen.

### 2.1.5 Die Messung transienter Absorptionsänderungen

Die eigentliche Messung einer Probe wird vollständig von einem für MS-DOS (Version 6.22, Fa. Microsoft) compilierten C-Programm (compiliert mit Borland C++, Fa. Bor-

land) gesteuert, ebenfalls eine Eigenentwicklung des Lehrstuhls, begonnen ca. 1993 und seither kontinuierlich weiterentwickelt. Ist das Lasersystem justiert, der Probenkreislauf befüllt und in Gang gesetzt und der Spektrometer-Untergrund gespeichert, übernimmt der PC. Typischerweise werden für ein Experiment zu 150 aufsteigenden Verzögerungszeiten zwischen Anreg- und Abtast-Lichtimpuls Messwerte aufgezeichnet, etwa die Hälfte davon mit äquidistanter Schrittweite im Zeitbereich -1 ps bis 1 ps. Zur Messung der zweiten Hälfte des Datensatzes wird die Schrittweite exponentiell erhöht. Auf diese Weise erhält man in jeder Dekade der Verzögerungszeit gleich viele Messpunkte und kann einen Zeitbereich von 5 Größenordnungen (10 fs bis 4 ns) in vertretbarem Zeitaufwand und mit ausreichender Genauigkeit problemangepasst optimal messen.

Das Messprogramm mittelt pro Datenpunkt (feste Verzögerungszeit zwischen Anreg- und Abtast-Lichtimpuls) typischerweise 2000 Einzelmessungen. Sind alle 150 Verzögerungszeiten abgearbeitet, werden die jeweilige Verzögerungszeit in Pikosekunden, der Mittelwert der gemessenen Transmissionsänderung sowie die errechnete Standardabweichung der Transmissionsänderung im ASCII-Format abgespeichert und anschliessend zur Archivierung und weiteren Auswertung per FTP über das Netzwerk auf den Datei-Server des Lehrstuhls kopiert. Eine solche Messung wird als Scan bezeichnet und dauert ca. 14 Minuten. Da das Rauschen bei  $n$  Messungen mit  $\sqrt{n}$  abfällt werden für eine Probe ca. 8 Scans wiederholt und ausserhalb des Messprogramms gemittelt (zur Daten-Aufbereitung siehe nächsten Abschnitt). Dieses Vorgehen hat den weiteren Vorteil, dass ein langsames Verschieben der Strahllage z. B. aufgrund von Temperaturschwankungen in einer verschlechterten Datenqualität aufeinanderfolgender Scans gesehen und rechtzeitig behoben werden kann.

### 2.1.6 Datenaufbereitung

Zur Datenaufbereitung, Analyse und Visualisierung dient das am Lehrstuhl entwickelte Programmpaket Z20<sup>1</sup>, das in der Programmierumgebung IDL (Fa. Research Systems Inc., Ver. 5.4) geschrieben wurde. Mit dem Programm können die einzelnen Scans eines Experiments kontrolliert und gemittelt werden. Weiterhin können Lösungsmittel-Signale subtrahiert [LZN<sup>+</sup>02] und die Dispersion der Abtastwellenlängen untereinander korrigiert [ZK98] werden. Schließlich stehen umfangreiche Methoden zur Analyse, zum Fitten und zur Visualisierung der Daten zur Verfügung. Beschreibungen des Programms finden sich in [Spö01, Lut01, Hub02] (zur Analyse, Fit und Visualisierung siehe auch Kapitel 3 — sämtliche dort beschriebenen Methoden sind in Z20 verfügbar).

An dieser Stelle muss noch darauf hingewiesen werden, dass die Absorptionsänderung bei Experimenten zur transienten Absorption stets in mOD gemessen wird. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten unterschiedlicher Moleküle sind aber nicht direkt miteinander vergleichbar, da sie mit zum Teil sehr unterschiedlichen Bedingungen aufge-

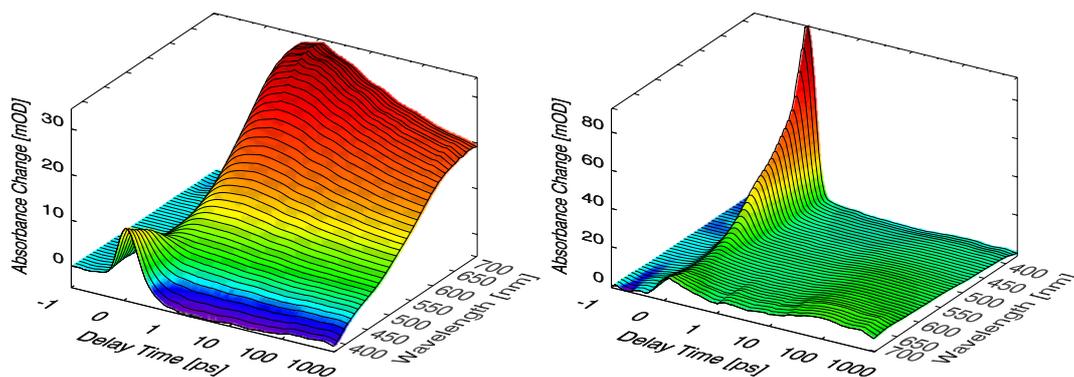
---

<sup>1</sup>Benannt nach dem Labor, in dem bisher alle Programmierer gearbeitet haben. Begonnen von S. Spörlein und I. Lutz, weiterentwickelt von Chr. Root und dem Autor (im Juni 2004 immerhin 45369 Zeilen Programmtext).

nommen wurden (z. B. mit unterschiedlicher Anregungsenergie oder anderem angeregtem Volumen).

### 2.1.7 Zusätzliche Effekte bei UV-Anregung — solvatisiertes Elektron

Andernorts ein eigenes Wissens- und Forschungsgebiet [HB62, Dor65, JSF88, MM89, TG91], zeigt sich das solvatisierte Elektron bei Anregung mit Lichtwellenlängen unterhalb 400 nm bei den hier durchgeführten Experimenten teilweise als störendes Signal, das zusätzlich zur transienten Absorption des untersuchten Moleküls auftritt und über den gesamten beobachteten Zeitbereich Signalbeiträge liefert, die sich sehr schwer (zum Teil gar nicht) aus dem erhaltenen Messsignal herausrechnen lassen (Abb. 2.12 zeigt die transiente Absorption eines solvatisierten Elektrons in Wasser und Ethanol). Abhilfe schafft hier eine Senkung der Anregungsenergie (evtl. gleichzeitig eine Vergrößerung des angeregten Volumens) oder ein zusätzliches Strecken des Anregungs-Lichtimpulses.

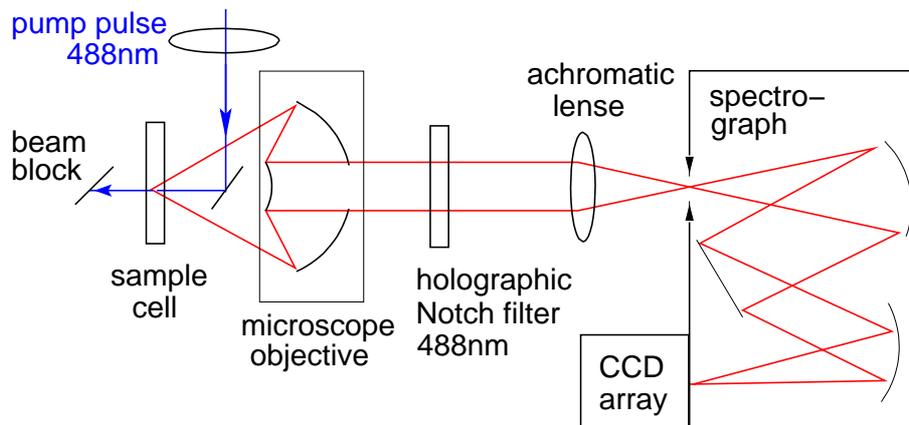


**Abbildung 2.12:** Transiente Absorption des solvatisierten Elektrons (nach Anregung mit Lichtimpulsen bei  $\lambda_{\text{pump}} = 266 \text{ nm}$ ). Links: Wasser. Rechts: Ethanol.

## 2.2 Fluoreszenzmessungen

Um weitergehende Informationen über Azobenzol zu erhalten, wurden an diesem Molekül zusätzlich Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Die Fluoreszenz-Quantenausbeute von Azobenzol ist mit  $\Phi_f = 10^{-6}$  jedoch so niedrig, dass sie mit kommerziell erhältlichen Fluoreszenz-Spektrometern nicht mehr nachweisbar ist. Diese Messungen wurden deshalb mit einer Eigenentwicklung des Lehrstuhls durchgeführt.

Der benötigte Aufbau war bereits vorhanden und ist in [Sed99] ausführlich beschrieben. Ein Schema des Experiments ist in Abb. 2.13 dargestellt: Durch einen Selbstbau-Monochromator wird die 488 nm-Linie (Dauerstrich) eines Multimode Argon-Ionen Lasers ausgewählt (Innova 310, Fa. Coherent, 10 W) und mit einer Linse (Brennweite 80 mm) auf die Probe fokussiert ( $30 \mu\text{W}$  auf ein Anregungs-Volumen mit  $130 \mu\text{m}$  Durchmesser und



**Abbildung 2.13:** Schematischer Aufbau der Fluoreszenz-Experimente.

1.0 mm Länge, als Probenstand kam ein ähnlicher Aufbau wie in Abb. 2.11b beschrieben zum Einsatz, lediglich die Durchflussküvette wurde ausgetauscht). Das emittierte Licht wird in Rückwärtsrichtung von einem Mikroskop-Spiegelobjektiv (Fa. Ealing, NA = 0.5,  $f = 13.4$  mm) aufgesammelt, um das Anregungs-Licht zu unterdrücken und möglichst viel Fluoreszenz-Licht einzusammeln. Ein holographischer Notch-Filter (Fa. Kaiser, HNSF-488.0-1.0) dient dazu, verbleibende Reste des Anregungs-Lichts zu unterdrücken. Das Fluoreszenz-Licht wird schließlich mit einer achromatischen Linse (Brennweite 90 mm) auf den Eintrittsspalt eines Spektrometers fokussiert (Fa. ISA, HR460, 150 Linien/mm). Detektiert wird die spektral aufgelöste Fluoreszenz schliesslich von einer hochauflösenden CCD-Kamera (Princeton Instruments,  $330 \times 110$  Pixel, 16 Bit Auflösung). Steuerung und Datenaufnahme übernimmt ein PC [Har99]. Zur Unterdrückung von Artefakten aufgrund kosmischer Strahlung wird jede Messung dreimal durchgeführt und anschließend für jeden Messpunkt der Median gewählt. Zur Korrektur der wellenlängenabhängigen Detektor-Empfindlichkeit wird der so gewonnene Datensatz noch mit einer Kalibrationskurve multipliziert.

## 3 Methoden

Dieses Kapitel behandelt der Reihe nach diese Themen:

- **Simulation von Daten:** Dieses Kapitel beschäftigt sich eingehend mit verschiedenen und zum Teil neuen Verfahren zur Datenanalyse. Dafür werden synthetische Daten mit definierten Eigenschaften benötigt.
- **Globales Fitten:** Die meisten photochemischen Reaktionen können durch ein Ratenmodell beschrieben werden, d. h. die transienten Absorptionsdaten können durch eine Summe von Exponentialfunktionen mit Zerfallszeiten für die einzelnen Zustände beschrieben werden. Hier geht es um die Bestimmung von Konfidenzintervallen und einen neuen Ansatz, wie der verwendete Levenberg-Marquardt-Algorithmus erweitert werden kann.
- **Singularwertzerlegung (SVD):** Die SVD stellt eine weitere analytische Methode dar, aus den experimentellen Daten Aussagen zu gewinnen. Es wird ein umfassender Überblick über Grundlagen, erweiterte Anwendung und Probleme der SVD gegeben.
- **Visualisierung von Daten:** Die rein analytische Extraktion von Aussagen über photochemische Prozesse durch globales Fitten oder SVD ist meist nicht eindeutig, deshalb wird hier eine Methode dargestellt, wie durch sehr einfache Differenzbildung und geeignete Darstellung der Rohdaten zusätzliche wertvolle Informationen über beteiligte Dynamiken gewonnen werden kann.

### 3.1 Simulation transienter Absorptions-Daten

Zur Beurteilung neuer Analysemethoden sind Datensätze mit bekannten Eigenschaften von unschätzbarem Wert. Aus diesem Grund wurde die Auswertesoftware Z20 um zwei Funktionen erweitert, die es erlauben, ausreichend komplexe Absorptionsänderungen mit vorgegebenen Eigenschaften zu erzeugen. Im nachfolgenden werden die beiden Ansätze erläutert, nach denen die künstlichen Datensätze generiert wurden.

#### Physikalischer Ansatz

Der erste Ansatz zur Erzeugung realistischer Datenmatrizen geht über die Spektren von Zwischenzuständen. Der einfachste Ansatz zur Modellierung der Einzelspektren wäre

sicherlich eine Gauß-Funktion. Reale Spektren (Grundzustandsabsorption, Emissionsspektrum) sind jedoch meist asymmetrisch. Um dem gerecht zu werden, kommen asymmetrische Gauß-Funktionen zum Einsatz (skewed Gauß), beschrieben durch

$$f_{\gamma, \lambda_0, \sigma}(x) = \exp \left( -\log(2) * \left( \frac{\log \left( 1 + 2 * \gamma * \frac{x - \lambda_0}{\sigma} \right)}{\gamma} \right)^2 \right), \quad (3.1)$$

dabei ist  $\gamma \in [-1, 1]$  ein Maß für die Asymmetrie:  $\gamma < 0$  führt zu einer Asymmetrie der rechten Flanke, die linke Flanke bleibt Gauß-förmig (umgekehrt für  $\gamma > 0$ ). Wie bei normalen Gauß-Funktionen bestimmen  $\lambda_0$  die Lage des Maximums und  $\sigma$  die Breite der Funktion.

Zur Modellierung der Zeitabhängigkeit werden gestreckte Exponentialfunktionen („stretched exponentials“) verwendet:

$$f(x) = e^{-x^\beta}, \quad (3.2)$$

dabei ist  $\beta$  ein Maß für die Streckung (zur Bedeutung gestreckter Exponentialfunktionen siehe z. B. [SSB91]).

Die synthetische Datenmatrix wird wie folgt gebildet:

$$\begin{aligned} \Delta A(\lambda_i, t_j) &= -a_1 \exp \left( - \left( \frac{t_j}{\tau_1} \right)^{\beta_1} \right) f_{\gamma_2, \lambda^s(t_j), \sigma_2}(\lambda_i) && \text{(Stim. Emiss.)} \\ &+ a_2 \exp \left( - \left( \frac{t_j}{\tau_1} \right)^{\beta_1} \right) f_{\gamma_3, \lambda_0^3, \sigma_3}(\lambda_i) && \text{(ESA)} \\ &+ a_4 \frac{k_1}{k_2 - k_1} \left[ \exp \left( - \left( \frac{t_j}{\tau_1} \right)^{\beta_1} \right) \right. && \text{(Photoprodukt)} \\ &\quad \left. - \exp \left( - \left( \frac{t_j}{\tau_2} \right)^{\beta_2} \right) \right] f_{\gamma_4, \lambda_0^4, \sigma_4}(\lambda_i) \\ &- a_1 \left[ \frac{k_1}{k_2 - k_1} \exp \left( - \left( \frac{t_j}{\tau_2} \right)^{\beta_2} \right) \right. && \text{(Grundzustand)} \\ &\quad \left. - \frac{k_2}{k_2 - k_1} e^{-\left( \frac{t_j}{\tau_1} \right)^{\beta_1}} \right] f_{\gamma_1, \lambda_0^1, \sigma_1}(\lambda_i) \end{aligned} \quad (3.3)$$

mit

$$\lambda^s(t_j) = \lambda_0^1 + \lambda_{\text{shift}} \left( 1 - \exp \left( - \frac{t_j}{\tau_{\text{shift}}} \right) \right). \quad (3.4)$$

Als einfaches Modell wird das transiente Absorptionssignal eines Moleküls somit durch folgende Eigenschaften beschrieben (vgl. Abb. 3.1):

- Grundzustandsspektrum: Asymmetrie  $\gamma_1$ , Maximum bei  $\lambda_0^1$ , Breite  $\sigma_1$ .
- Spektrum der stimulierten Emission:  $\gamma_2, \lambda_0^2, \sigma_2$ .
- Spektrum des angeregten Zustands (ESA):  $\gamma_3, \lambda_0^3, \sigma_3$ .
- Spektrum des gebildeten Photoprodukts:  $\gamma_4, \lambda_0^4, \sigma_4$ .
- Zwei Zeitkonstanten:  $\tau_1$  und  $\tau_2$ .
- Dynamischer Stokes-Shift um  $\lambda_{\text{shift}}$  mit der Zeitkonstanten  $\tau_{\text{shift}}$ .

## Mathematischer Ansatz

Ausgangspunkt ist die Darstellung der Absorptionsänderungen, die sich aus einem Ratenmodell<sup>1</sup> mit  $n$  Zuständen ergibt [HFK<sup>+</sup>90]:

$$\Delta A(\lambda_i, t_j) = \sum_{k=1}^n \int_0^\infty a_i(\lambda_i, \tau_k) e^{-\frac{t_j}{\tau_k}} K(t_j - t) dt. \quad (3.5)$$

Dabei ist  $K(t)$  die Apparatfunktion, für die normalerweise eine Gauß-Funktion mit der aus dem Experiment ermittelten Kreuzkorrelationsbreite  $\tau_{cc}$  angesetzt wird. Damit ergibt sich:

$$\Delta A(\lambda_i, t_j) = \sum_{k=1}^n a_i(\lambda_i, \tau_k) \exp\left(\frac{\tau_{cc}^2}{4\tau^2} - \frac{t_i}{\tau_j}\right) \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2} \operatorname{erf}\left(\frac{t_i}{\tau_{cc}} - \frac{\tau_{cc}}{\tau_j}\right)\right). \quad (3.6)$$

Zur Erzeugung synthetischer Daten liest man Gleichung (3.6) in Matrixform:

$$\Delta A(\lambda_i, t_j) =: (A)_{ij} = B_{\text{ampl}} \cdot C_{\text{time}}. \quad (3.7)$$

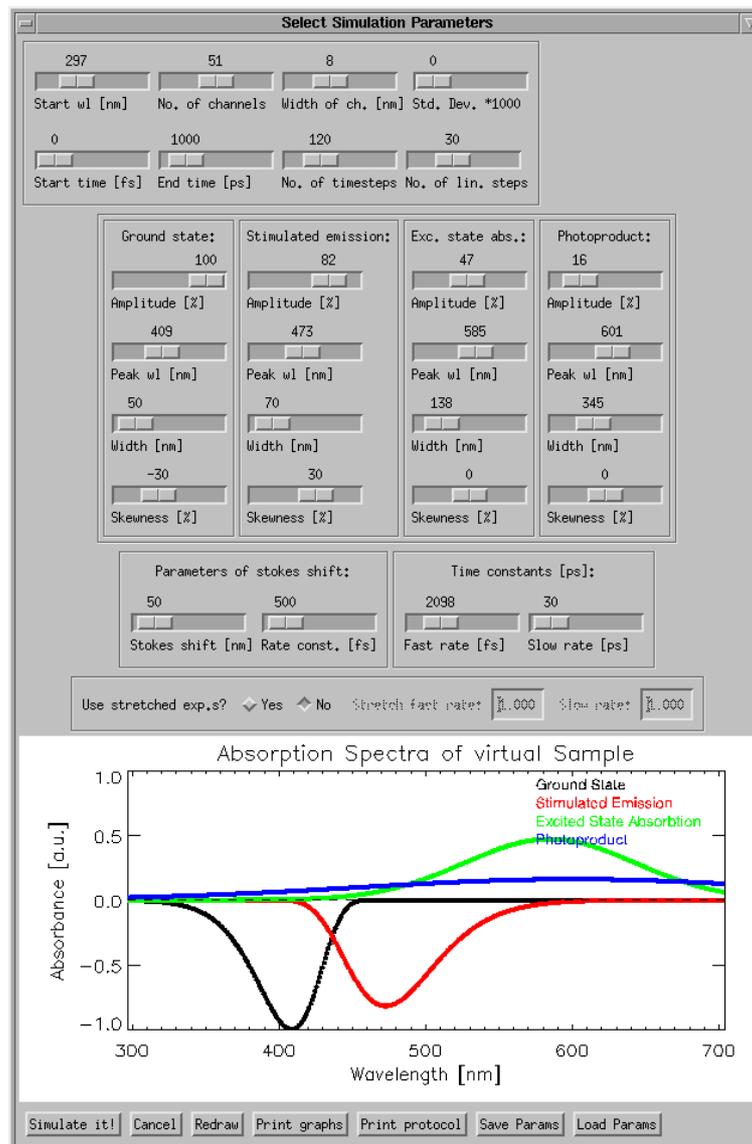
In diesem Fall müssen also Amplitudenspektren  $B_{\text{ampl}}$  und Zeitverläufe  $C_{\text{time}}$  vorgegeben werden. Die **freien Parameter** der Simulation sind somit (vgl. Abb. 3.2):

- Drei Amplitudenspektren: Diese sind jeweils die Summe zweier asymmetrischer Gauß-Funktionen — Asymmetrie  $\gamma_{1,2}$ , Lage des Maximums  $\lambda_0^{1,2}$  und Breite  $\sigma_{1,2}$ .
- Drei Zeitverläufe: Jeder Zeitverlauf ist durch die zugeordnete Zeitkonstante  $\tau_i$  bestimmt.
- Kreuzkorrelationsbreite  $\tau_{cc}$ .

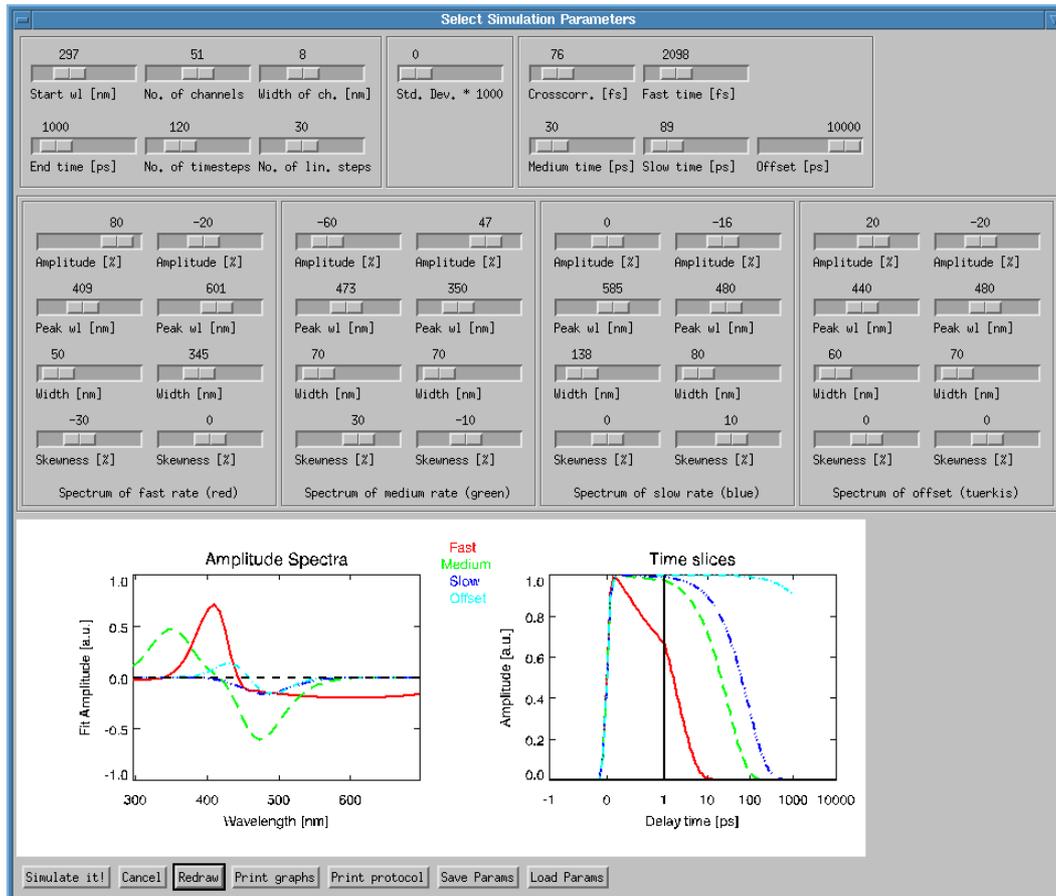
---

<sup>1</sup>Im Ratenmodell erfolgt das Verlassen eines Zustandes nach einem einfachen Exponentialgesetz (Streckungsfaktor  $\beta = 1$ ).

### 3 Methoden



**Abbildung 3.1:** IDL-Dialog: Synthetische Daten (physikalischer Ansatz). Über Schieberegler können alle wichtigen Simulations-Parameter eingestellt werden. In einer kleinen Grafik werden die Spektren von Grundzustand, angeregtem Zustand, stimulierter Emission und Photoprodukt angezeigt.



**Abbildung 3.2:** IDL-Dialog: Synthetische Daten (mathematischer Ansatz). Über Schieberegler können alle wichtigen Simulations-Parameter eingestellt werden. In einer kleinen Grafik werden die Amplitudenspektren und Zeitverläufe der vier unabhängig voneinander einstellbaren exponentiellen Prozesse angezeigt.

## Rauschen

Die Stabilität neuer Methoden zur Datenauswertung lässt sich nur an verrauschten Datensätzen beurteilen. Dazu wird eine Matrix  $R$  mit Zufallszahlen generiert und zu den unverrauschten Daten  $A$  addiert. Die Zufallszahlen werden dabei durch die IDL-Funktion `randomn` erzeugt (diese erzeugt mit der Box-Müller Methode normal verteilte (Pseudo-) Zufallszahlen). Die damit erzeugte Matrix  $R$  hat Erwartungswert null und Standardabweichung eins.  $R$  wird dann noch mit einer Zahl multipliziert, die das einzustellende Rauschen beschreibt (das Feld Std-Dev. im Dialog von Abb. 3.2 bzw. Abb. 3.1). Die Rausch-Matrix muss jetzt nur noch zu den unverrauschten Daten addiert werden:

$$\tilde{A} = A + R. \quad (3.8)$$

Auf die gleiche Weise wie  $R$  wird noch eine zweite Matrix  $F$  erzeugt (ebenfalls multipliziert mit dem Wert des Feldes Std-Dev.). Diese Matrix enthält die simulierten Fehler

(Standard-Abweichung  $\sigma$ ) jedes simulierten Messpunktes.

## 3.2 Globaler Fit mit exponentiellen Zeitkonstanten

Unter „globalem Fit“ wird in der gesamten Arbeit das Finden einer Modellfunktion gemäß Gl. (3.6) verstanden. Dabei wird ein nichtlinearer Algorithmus nach Levenberg-Marquardt [PTVF92] verwendet, um (nach einem Ratenmodell) exponentielle Zeitkonstanten und Amplitudenspektren zu ermitteln, die die experimentell ermittelten transienten Absorptionsdaten optimal beschreiben (Methode der kleinsten Quadrate, d. h. bestimmen von Parametern für die  $\chi^2$  minimal wird).

Bei beliebigen spektroskopischen Daten ist es im allgemeinen schwierig, allein durch sture Anwendung des Fit-Algorithmus zuverlässige Aussagen über die untersuchte Probe zu erhalten, denn:

- Ohne Vorwissen über die untersuchte Probe ist die **Anzahl der benötigten Zeitkonstanten** völlig unklar.
- Für den Fit-Algorithmus müssen **Startwerte** für die exponentiellen Zeitkonstanten vorgegeben werden (die Amplitudenspektren können dann draus berechnet werden). Je nach experimentellem Datensatz ist der Algorithmus manchmal sehr sensibel auf diese Startwerte, d. h. bei unglücklich gewählten Startwerten findet der Algorithmus nicht (oder nur extrem langsam) das globale Minimum der  $\chi^2$ -Hyperfläche.

Ausgehend von diesen Beobachtungen war es ein Ziel dieser Arbeit, zusätzliche Hilfestellungen zu liefern, die die Qualität des globalen Fit verbessern. Die zwei folgenden Abschnitte beschäftigen sich deshalb mit dem Thema Konfidenz-Intervall. Diese erlauben es, Fehler-Angaben zu den ermittelten Zeitkonstanten zu geben. Danach wird unter dem Stichwort „stochastisches Fitten“ ein Verfahren beschrieben, das für korrelierte Messwerte eventuell bessere Ergebnisse liefern kann.

### Bestimmung von Konfidenz-Intervallen (I) — Auswertung der Kovarianz-Matrix

Der Levenberg-Marquardt Algorithmus, der in den Numerical Recipes [PTVF92] beschrieben ist, verwendet den dimensionslosen Parameter  $\lambda$  zum Wechsel zwischen feinem Abtasten der  $\chi^2$ -Hyperfläche, um den tiefsten Punkt eines Minimums genau zu finden ( $\lambda \ll 1$ ) und dem Auffinden alternativer Senken der  $\chi^2$ -Hyperfläche, damit der Algorithmus nicht in lokalen Minima hängen bleibt ( $\lambda \gg 1$ ). Das im Algorithmus verwendete Array `covar` dient während der Iterationsschritte als Zwischenspeicher. Wenn die optimalen Zeitkonstanten  $\tau_i$  (die nichtlinearen Parameter) mit dem optimalen  $\chi^2_{\min}$  gefunden wurden, muß die Funktion `mrqmin.c` noch einmal mit  $\lambda = 0$  aufgerufen werden. Dabei wird keine Iteration mehr ausgeführt, sondern die Kovarianzmatrix  $C$  (`covar`) mit

den Varianzen und Kovarianzen gefüllt und richtig sortiert. Fix gehaltene Zeitkonstanten erhalten dabei eine Varianz von 0.0 zugeordnet.

Die Varianz-Kovarianz Matrix  $C$  ist folgendermaßen aufgebaut:

$$(C)_{ij} = \sigma_i \sigma_j. \quad (3.9)$$

Nur für den Fall unkorrelierter Parameter ist es zulässig, aus der Kovarianz-Matrix  $C$  Fehlerangaben abzulesen:

$$\begin{aligned} \tau_i^{\text{true}} &\in \left[ \tau_i - \sqrt{C_{ii}}, \tau_i + \sqrt{C_{ii}} \right] && \text{bzw.} \\ \tau_i^{\text{true}} &\in \left[ \tau_i - \sqrt{\sigma_i^2}, \tau_i + \sqrt{\sigma_i^2} \right]. \end{aligned}$$

Im Falle korrelierter Parameter (wie es meist der Fall ist) darf diese Beziehung nur als formaler Ausdruck hingeschrieben werden. Insofern kann die Kovarianzmatrix meistens höchstens als sehr grober Anhaltspunkt gelten. Aus diesem Grund wurde zur Bestimmung von Konfidenzintervallen für die in dieser Arbeit extrahierten Zeitkonstanten der im Folgenden beschriebene Ansatz verwendet.

### Bestimmung von Konfidenz-Intervallen (II) — Exhaustive Search

Die Methode des 'exhaustive Search' bedient sich selbst wieder des Levenberg-Marquardt Algorithmus. Das Vorgehen ist wie folgt [Joh83, RLH92, Hol96, SZ03]:

1. Verwende den Levenberg-Marquardt Algorithmus zur Bestimmung von  $n$  Zeitkonstanten  $\{\tau_i\}$  mit optimalen Werten  $\{\tau_i^0\}$  bei minimalem  $\chi^2 = \chi_{\min}^2$ .
2. Bestimme  $\Delta\chi^2$  mit Hilfe der „incomplete  $\Gamma$ -function“:

$$\Gamma(a, x) = \frac{\int_0^x e^{-t} t^{a-1} dt}{\int_0^\infty e^{-t} t^{a-1} dt}. \quad (3.10)$$

Dabei gilt

$$\Gamma(v/2, \Delta\chi^2/2) = 1 - p, \quad (3.11)$$

wobei  $v$  die Anzahl der Freiheitsgrade<sup>1</sup> ist und  $p$  ist das gewünschte Konfidenz-Intervall, z. B.  $p = 0.68$  oder  $p = 0.95$ <sup>2</sup>. Wenn  $p$  und  $v$  gegeben sind ist Gl. (3.11) eine implizite Gleichung für  $\Delta\chi^2$  die gelöst werden kann. Erfahrungsgemäß kann man  $\Delta\chi^2$  aber auch annähern, z. B. für Messungen, bei denen  $\sigma$  nicht bekannt ist. Im Falle der Auswerte-Software Z20 wird für solche Fälle (willkürlich) eine Abweichung von 3% gewählt:  $\Delta\chi^2 = 0.03 \cdot \chi_{\min}^2$ .

---

<sup>1</sup>dabei gilt  $v = s \cdot ch - ((ch + 1) \cdot \tau)$  und  $s$  ist die Zahl der gefitteten Zeitpunkte,  $ch$  ist die Zahl der gefitteten Kanäle und  $\tau$  ist die Zahl der zu fittenden Zeitkonstanten.

<sup>2</sup>Ein Konfidenz-Intervall mit  $p=0.68$  bedeutet, dass der wahre Wert mit 68% Wahrscheinlichkeit im ermittelten Konfidenz-Intervall liegt.

3. Ändere eine Zeitkonstante um  $\Delta\tau$  und halte diesen Parameter fest und gib die anderen  $(n - 1)$  Zeitkonstanten als variabel. Führe den Levenberg-Marquardt Algorithmus sooft aus, bis  $\chi^2$  wieder ein Minimum gefunden hat. Ist  $\chi^2 \geq \chi_{\min}^2 + \Delta\chi^2$ , dann ist  $\Delta\tau$  die Abweichung der festgehaltenen Zeitkonstanten, andernfalls vergrößere  $\Delta\tau$  und wiederhole diesen Schritt.
4. Wiederhole den vorherigen Schritt für alle Zeitkonstanten mit positiven und negativen Werten für  $\Delta\tau$ .

Diese Methode ist auch für korrelierte Parameter zulässig und kann insbesondere auch ermitteln, ob die gesuchten Fehlerbereiche asymmetrisch liegen (was im Falle exponentieller Zeitkonstanten für transiente Absorptionsdaten typisch ist).

### Erweiterung des Fit-Algorithmus — „stochastisches“ Fitten

Der hier beschriebene Algorithmus beruht auf einem Vorschlag von V. A. Mandelshtam [Man04]. Ausgangspunkt ist die Erkenntnis, dass der Levenberg-Marquardt Algorithmus sehr sensitiv auf die vorzugebenden Start-Werte der exponentiellen Zeitkonstanten reagiert und deshalb manchmal in lokalen Minima der  $\chi^2$ -Hyperfläche „hängen bleibt“ ohne das globale Minimum zu finden.

Die Idee ist jetzt, ausgehend von einem  $n$ -Tupel von Startwerten  $(\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_n)$  durch Einführung eines zufälligen Elements für jede der  $n$  Zeitkonstanten eine Verteilung zu bekommen. Aus der Breite dieser Verteilung kann man dann (hoffentlich) zusätzliches Vertrauen in die ermittelten Zeitkonstanten gewinnen.

Der zu fittende Datensatz ist die Matrix  $A$  der transienten Absorptionsänderungen  $\Delta A$ :  $A_{ij} = \Delta A(\lambda_i, t_j)$ . Jedes Element dieser Matrix stellt den Mittelwert aus typischerweise 10000 Einzelmessungen dar, zusätzlich gibt es für jeden Messpunkt noch eine Fehlerangabe (Standardabweichung  $\sigma$ ). Eine wesentliche **Motivation** des Verfahrens ist, dass die Fehler der einzelnen Messwerte korreliert sind und durch das zusätzliche zufällige Element die Qualität des Fits verbessert werden kann.

Das Verfahren besteht darin, den Globalen Fit-Algorithmus wiederholt auf stets leicht veränderte Datensätze anzuwenden. Folgende Schritte sind durchzuführen:

1. Gib ein  $n$ -Tupel von Startwerten vor:  $(\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_n)$ .
2. Bestimme ausgehend von  $A$  die zufällige Matrix  $A^s$ , indem zu jedem Element  $A_{ij}$  eine Zufallszahl  $r \in (-\sigma_{ij}, \sigma_{ij})$  hinzuaddiert wird:  $A_{ij}^s = A_{ij} + r$ .
3. Iteriere den Levenberg-Marquardt Algorithmus mit  $A^s$  solange, bis ausreichende Konvergenz erreicht wurde (z. B. bis  $\Delta\chi^2 < 10^{-3}$ ). Dies liefert ein  $n$ -Tupel von exponentiellen Zeitkonstanten  $(\tau_1^s, \tau_2^s, \dots, \tau_n^s)$ .
4. Trage die Werte der  $\tau_i^s$  in  $n$  Histogramme ein und gehe zu Schritt 1.

Aus den erstellten Diagrammen kann schließlich für jeden ermittelten Satz von Zeitkonstanten der minimale und maximale Wert, Mittelwert, Median und Varianz ermittelt werden.

Der Rechenaufwand hierbei ist natürlich groß, es muss die normalerweise schon aufwendige Levenberg-Marquardt-Iteration für jedes neue  $A^s$  wieder durchgeführt werden.

Über die Qualität des Verfahrens kann an dieser Stelle leider noch nicht sehr viel ausgesagt werden, es wurde erst gegen Ende dieser Arbeit in die Auswerte-Software Z20 implementiert und muss sich erst im Alltag bewähren. Erste Tests mit synthetischen Datensätzen waren allerdings nicht sonderlich ermutigend, die jeweils gefundenen Verteilungen waren deutlich schmaler als die Konfidenz-Intervalle, die nach der „exhaustive search“-Methode ermittelt wurden.

## 3.3 Zur Singularwertzerlegung

Die Singularwertzerlegung (Singular Value Decomposition — SVD) ist ein leistungsfähiges Werkzeug, mit dem auf recht bequeme Art wichtige Aussagen über jedwede Matrix gewonnen werden kann. Anwendungen reichen dabei von der Bildverarbeitung (siehe Seite 47) bis zur Verwendung der SVD im human genome project [ABB00]. In der Kurzzeitspektroskopie wird die SVD zur Datenanalyse verwendet [HCD78, HSHE83, HHS<sup>+</sup>85, HHL89, HH92, CB91, HLE<sup>+</sup>90, EKS<sup>+</sup>01, HSB01].

Das größte Problem für die Anwendung der SVD ist das Vorhandensein von Rauschen in den Datenmatrizen: In einem Beispiel auf Seite 53 wird gezeigt, dass im Falle von Rauschen eindeutige Aussagen eventuell gar nicht mehr gemacht werden können.

Es gibt viel Literatur über SVD, jedoch keinen zusammenhängenden Text, der alle Details aufzeigt, die zur Anwendung der SVD auf die Datenanalyse von transienten Absorptionsdaten notwendig sind. Dieses Kapitel versucht, eine Zusammenfassung aller wichtigen Aspekte zu geben:

- Die **Einführung** beschreibt elementare Eigenschaften der SVD. Dieser Abschnitt enthält viel lineare Algebra und soll hauptsächlich als kompakte Referenz dienen.
- Im Abschnitt **Approximation** wird die Leistungsfähigkeit der SVD zur verlustbehafteten Komprimierung gezeigt (ab Seite 46).
- Der Abschnitt **„gestörte Matrizen“** untersucht die SVD auf ihre Anfälligkeit gegenüber verrauschten Datensätzen. Hier sieht man die Grenzen der SVD (ab Seite 49).
- Die **Anwendung auf zeitaufgelöste Spektroskopie** veranschaulicht, wie sich die SVD zur Datenanalyse in der Praxis einsetzen läßt (ab Seite 53).
- Das **Beispiel: Simulierte Messdaten mit Rauschen** behandelt schließlich noch einmal für einen synthetischen Datensatz eine exemplarische Auswertung mittels SVD (ab Seite 57).

### 3.3.1 Einführung

Im folgenden werden  $M \times N$  Matrizen  $A$  betrachtet ( $M \geq N$ ,  $M$  Zeilen und  $N$  Spalten), die eine lineare Abbildung eines  $N$ -dimensionalen linearen Vektorraums  $K^N$  ( $\mathbb{R}^N$  oder  $\mathbb{C}^N$ ) in einen größeren  $M$ -dimensionalen Vektorraum  $K^M$  vermitteln:

$$A : K^N \rightarrow K^M, \quad \dim K^N = N, \quad \dim K^M = M, \quad (3.12)$$

$$\mathbf{v} = A \mathbf{u}, \quad \mathbf{u} \in K^N, \mathbf{v} \in K^M, \quad (3.13)$$

$$\begin{pmatrix} v_1 \\ \vdots \\ v_M \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{11} & \dots & a_{1N} \\ \vdots & & \vdots \\ \vdots & & \vdots \\ \vdots & & \vdots \\ a_{M1} & \dots & a_{MN} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} u_1 \\ \vdots \\ u_N \end{pmatrix}. \quad (3.14)$$

**Definition 1 (Zeilen- und Spaltenvektoren)** Ein Vektor  $\mathbf{v} \in K^N$ , ist ein  $N$ -elementiger Spaltenvektor,

$$\mathbf{v} = \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ \vdots \\ v_N \end{pmatrix}, \quad (3.15)$$

seine Transponierte  $\mathbf{v}^t$  ist ein  $N$ -elementiger Zeilenvektor ( $\mathbf{v}^t \in K_N$ )

$$\mathbf{v}^t = (v_1, v_2, \dots, v_N). \quad (3.16)$$

Beachte, dass für komplexwertige Vektoren und Matrizen mit  $\mathbf{v}^t$  bzw.  $A^t$  immer die komplex konjugierte Transponierte gemeint ist.

**Bemerkung 1** Die  $i$ -te Komponente von  $\mathbf{v}$  wird mit  $v_i$  bezeichnet ( $v_i = \mathbf{v} \mathbf{e}_i^t$ ) und die  $i$ -te Zeile in der  $j$ -ten Spalte von  $A$  mit  $A_{ij}$  ( $A_{ij} = \mathbf{e}_i^t A \mathbf{e}_j$ ). Mit  $\mathbf{a}_j$  wird der  $j$ -te Spaltenvektor der Matrix  $A$  bezeichnet, also  $A = (\mathbf{a}_1, \dots, \mathbf{a}_N)$ .

Matrixmultiplikation ist immer „Zeile mal Spalte“, demnach ergibt  $\mathbf{v}^t \mathbf{w} = \sum_{l=1}^N v_l w_l$  das Skalarprodukt (geschrieben als  $(\mathbf{v}, \mathbf{w}) = \mathbf{v}^t \mathbf{w} = \sum_{l=1}^N v_l w_l$ ), hingegen ergibt  $\mathbf{v} \mathbf{w}^t$  eine Matrix  $A$  (mit den Komponenten  $A_{ij} = v_i w_j$ ).

**Definition 2 (SVD, Singularwertzerlegung)** Die Singularwertzerlegung (SVD) einer  $M \times N$  Matrix  $A$  ( $M \geq N$ ) ist eine Zerlegung der Form

$$A = U S V^t. \quad (3.17)$$

$$\begin{pmatrix} a_{11} & \cdots & a_{1N} \\ \vdots & & \vdots \\ \vdots & & \vdots \\ a_{M1} & \cdots & a_{MN} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} u_{11} & \cdots & u_{1M} \\ \vdots & & \vdots \\ \vdots & & \vdots \\ u_{M1} & \cdots & u_{MM} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} s_1 & & 0 \\ & \ddots & \\ 0 & & s_N \\ & & & 0 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} v_{11} & \cdots & v_{1N} \\ \vdots & & \vdots \\ v_{N1} & \cdots & v_{NN} \end{pmatrix}^t \quad (3.18)$$

Dabei ist  $S$  eine  $M \times N$  Matrix. Die Elemente  $s_{ij}$  von  $S$  heißen Singularwerte von  $A$  und werden mit  $s_i$  bezeichnet. Die Spaltenvektoren von  $U$  und  $V$  heißen linke bzw. rechte Singularvektoren.

**Bemerkung 2 (Ist  $S$  quadratisch oder nicht?)** Die Definitionen der Singularwertzerlegung in der Literatur sind nicht eindeutig. Da es nur  $N$  Singularwerte gibt, sind auch nur  $N$  Spalten von  $U$  nötig. Damit  $U$  „schön“, also quadratisch wird, fügt man noch  $M - N$  Spaltenvektoren hinzu und hängt an  $S$  noch eine  $(M - N) \times N$  Null-Matrix an. Das kann man machen, oder man läßt die „unwichtigen“ Vektoren von  $U$  weg und hat dann  $S$  quadratisch. Beide Varianten sind in Ordnung, die Wahl wie in Definition 2 hat den Vorteil, dass man  $U$  und  $V$  direkt als Basen der jeweiligen Vektorräume lesen kann.

**Bemerkung 3 (SVD und Eigenwerte, I)** Mit  $A = USV^t$  folgt  $A^t = (USV^t)^t = VSU^t$  und damit<sup>1</sup>

$$AA^t = USV^tVSU^t = US^2U^t. \quad (3.19)$$

Da  $U$  und  $V$  unitär sind (siehe weiter unten), sind die Singularwerte also Wurzeln der Eigenwerte von  $AA^t$  (bzw. von  $A^tA$ , je nachdem welche der beiden resultierenden Matrizen kleiner ist).

**Satz 1 (Existenz der SVD)**

Jede reell- oder komplexwertige  $M \times N$  Matrix  $A$  (mit  $M \geq N$ ) besitzt eine Singularwertzerlegung [EY39, Sch07a, Sch07b].

Der Beweis des Satzes ist einfach und bringt einiges an Einsicht [Dür01]: Gesucht sind unitäre Matrizen  $U$  und  $V$ , die  $A$  „diagonalisieren“,

$$UAV = S, \quad (3.20)$$

mit einer Diagonalmatrix  $S$ . Dass solche Matrizen existieren, sieht man folgendermaßen. Sei  $(\mathbf{e}_k)$  wieder die kanonische Basis im  $\mathbb{R}^N$ . Mit  $V \mathbf{e}_k =: \mathbf{v}_k$  und  $U \mathbf{u}_k =: \mathbf{e}_k$  kann Gl. 3.20 so ausgeführt werden:

$$UAV \mathbf{e}_k = UA \mathbf{v}_k = U s_k \mathbf{u}_k = s_k \mathbf{e}_k, \quad (3.21)$$

wenn

$$A \mathbf{v}_k = s_k \mathbf{u}_k, \quad (3.22)$$

---

<sup>1</sup> $S^t = S$  gilt nur, wenn  $S$  quadratisch gewählt wurde.

wobei  $S = (s_k)$ . Also ist die Frage, ob es Orthonormalbasen  $\mathbf{u}_k$  und  $\mathbf{v}_k$  gibt, so dass 3.22 gilt. Und die gibt es: Mit der transponierten  $A^t$  sind  $A^t A$  und  $AA^t$  positive symmetrische Matrizen und damit diagonalisierbar mit positiven Eigenwerten  $\alpha_k^2$  und  $\tilde{\alpha}_k^2$  und einem orthonormalen Eigensystem  $\mathbf{v}_k$  und  $\mathbf{u}_n$ . Aber aus

$$A^t A \mathbf{v}_k = \alpha_k^2 \mathbf{v}_k, \quad (3.23)$$

folgt

$$AA^t A \mathbf{v}_k = \alpha_k^2 A \mathbf{v}_k, \quad (3.24)$$

also ist  $A \mathbf{v}_k$  Eigenvektor von  $AA^t$ , dessen Eigenwerte sind aber  $\tilde{\alpha}_k^2$  mit den Eigenvektoren  $\mathbf{u}_n$ . Eventuelles Ummumerieren liefert also  $\tilde{\alpha}_k^2 = \alpha_k^2$  und  $A \mathbf{v}_k = s_k \mathbf{u}_k$ , wobei

$$s_k^2 = (s_k \mathbf{u}_k, s_k \mathbf{u}_k) = (A \mathbf{v}_k, A \mathbf{v}_k) = (A^t A \mathbf{v}_k, \mathbf{v}_k) = \alpha_k^2 (\mathbf{v}_k, \mathbf{v}_k) = \alpha_k^2, \quad (3.25)$$

d. h.  $s_k = \alpha_k$ .

### Satz 2 (Einfache Eigenschaften der SVD)

Sei  $A$  eine  $M \times N$ -Matrix mit der Singularwertzerlegung  $A = USV^t$ . Es gelten folgende Aussagen [Ste73]:

1. Orthonormalität von  $U$  und  $V$ :

$U$  ist eine orthonormale  $M \times M$  Matrix,  $V$  eine orthonormale  $N \times N$  Matrix, d. h.  $UU^{-1} = UU^t = I_M$  und  $VV^{-1} = VV^t = I_N$  und  $I_M$  bzw.  $I_N$  ist die Einheitsmatrix in  $K^M$  bzw.  $K^N$  ( $I_{ij} = \delta_{ij}$ ).

2. Positivität der  $s_i$ :

Durch Multiplikation einzelner Spalten in  $U$  bzw.  $V$  mit Skalaren können die  $s_i$  immer positiv gemacht werden,  $s_i \geq 0$ .

3. Ordnung der Singularwerte:

Die Singularwerte  $s_i$  und  $s_j$  können vertauscht werden, wenn gleichzeitig in  $U$  und  $V$  die  $i$ -te und  $j$ -te Spalte vertauscht werden. Dadurch kann man immer erreichen, dass  $s_1 \geq s_2 \geq \dots \geq s_N \geq 0$ .

### Satz 3 (Min-/Max- Charakterisierung der Singularwerte)

Die Singularwerte der  $M \times N$  Matrix  $A$  kann man mit Hilfe der Unterräume  $V \subseteq K^N$  über eine der beiden folgenden Beziehungen ausrechnen [Ste79]:

$$s_i^2 = \min_{\dim(V)=N-i+1} \left[ \max_{\mathbf{x} \in V, \|\mathbf{x}\|_2=1} (\mathbf{x}^t (A^t A) \mathbf{x}) \right], \quad (3.26)$$

beziehungsweise

$$s_i^2 = \max_{\dim(V)=i} \left[ \min_{\mathbf{x} \in V, \|\mathbf{x}\|_2=1} (\mathbf{x}^t (A^t A) \mathbf{x}) \right]. \quad (3.27)$$

**Bemerkung 4 (Historisches zur Singularwertzerlegung)** Für den speziellen Fall quadratischer Matrizen wurde die SVD zum ersten Mal 1889 von Sylvester untersucht [Syl189]. Entdecker der Singularwertzerlegung für rechteckige Matrizen ist jedoch Schmidt, der die Zerlegung 1907 bei der Untersuchung von Integralgleichungen eingeführt hat [Sch07a, Sch07b] (als „Entwicklung willkürlicher Funktionen nach Systemen vorgeschriebener“). Später wurde von Eckart und Young gezeigt, dass jede reell- oder komplexwertige  $M \times N$ -Matrix Singularwerte besitzt [EY39]. Der mittlerweile hauptsächlich verwendete numerische Algorithmus zur Bestimmung der SVD wurde Ende der 1960er Jahre von Golub entwickelt und ist numerisch sehr stabil [GK65, GR70]. In Büchern zur linearen Algebra wird die SVD zum Teil auch als Orthogonale Normalform einer Matrix bezeichnet (siehe z. B. [Koe85]). Ausführlich dargestellt wird die SVD in den beiden Büchern von Stewart [Ste73, SS97]. Eine kurze Abhandlung über die Singularwertzerlegung findet sich z. B. auch in dem Buch von Törnig [TS88].

**Definition 3 (Kern, Bild und Rang einer Matrix)** Für eine Matrix  $A$ , die eine lineare Abbildung  $A : K^N \rightarrow K^M$  beschreibt, definiert man Kern, Bild und Rang durch [Koe85]

$$\begin{aligned}\text{Kern}(A) &= \{\mathbf{x} \in V : A\mathbf{x} = 0\}, \\ \text{Bild}(A) &= \{A\mathbf{x} : \mathbf{x} \in K^N\} \quad \text{und} \\ \text{Rang}(A) &= \dim \text{Bild}(A).\end{aligned}$$

Aus  $A = USV^t$  folgt

$$AV = USV^tV = US \tag{3.28}$$

und damit

$$\begin{aligned}A\mathbf{v}_j &= AV\mathbf{e}_j \\ &= U\mathbf{S}\mathbf{e}_j \\ &= U s_j \mathbf{e}_j \\ &= s_j U \mathbf{e}_j \\ &= s_j \mathbf{u}_j, \quad j = 1, 2, \dots, N.\end{aligned}$$

Damit wird sofort klar, dass

$$\mathbf{v}_j \in \text{Bild}(A) \quad \text{für} \quad s_j \neq 0 \quad \text{und} \tag{3.29}$$

$$\mathbf{v}_j \in \text{Kern}(A) \quad \text{für} \quad s_j = 0. \tag{3.30}$$

**Bemerkung 5 (SVD zum Lösen homogener Gleichungen)** Mit Gleichung (3.30) ergibt sich spontan die Lösung der homogenen Gleichung  $A\mathbf{x} = 0$  (die Lösung der homogenen Gleichung wird ja gerade durch  $\text{Kern}(A)$  gegeben).

Wenn also  $k$  Singularwerte von Null verschieden sind, gilt offenbar

$$\begin{aligned}\dim \text{Bild}(A) &= k \quad \text{und} \\ \dim \text{Kern}(A) &= N - k.\end{aligned}$$

**Satz 4 (Singularwerte und Rang einer Matrix)**

Hat die Matrix  $A$  genau  $k$  von Null verschiedene Singularwerte, so gilt

$$\text{Rang}(A) = k. \quad (3.31)$$

**Bemerkung 6 (Zusammenhang SVD und Eigenwertgleichung)** Die Gleichung

$$A \mathbf{v}_j = s_j \mathbf{u}_j \quad (3.32)$$

sollte man analog zu einer Eigenwertgleichung

$$A \mathbf{v}_j = E_j \mathbf{v}_j \quad (3.33)$$

lesen. Es werden alternative Basen  $U$  in  $K^M$  und  $V$  in  $K^N$  gesucht, damit die Abbildung, die durch  $A$  vermittelt wird, eine möglichst einfache Gestalt hat, nämlich der  $j$ -te Basisvektor  $\mathbf{v}_j \in K^N$  soll auf ein Vielfaches des  $j$ -ten Basisvektors  $\mathbf{u}_j \in K^M$  abgebildet werden.

**Satz 5**

Aus der Singularwertzerlegung von  $A$  kann man sofort orthonormale Basen ablesen:

1.  $\{\mathbf{v}_j : s_j = 0\}$  ist eine orthonormale Basis für Kern( $A$ )
2.  $\{\mathbf{v}_j : s_j \neq 0\}$  ist eine orthonormale Basis für das orthogonale Komplement von Kern( $A$ )
3.  $\{\mathbf{u}_j : s_j \neq 0\}$  ist eine orthonormale Basis für Bild( $A$ )
4.  $\{\mathbf{u}_j : s_j = 0\}$  ist eine orthonormale Basis für das orthogonale Komplement von Bild( $A$ )

**Definition 4 (Norm von Vektor und Matrix)** Die 2-Norm (Euklidische Norm) eines  $N$ -dimensionalen Vektors  $\mathbf{x}$  ist definiert durch [Koe85]

$$\|\mathbf{x}\|_2 = \sqrt{\mathbf{x}^t \mathbf{x}} = \sqrt{\sum_{i=1}^N x_i^2}. \quad (3.34)$$

Die 2-Norm einer Matrix  $A$  ( $L_2$ -Norm) ist definiert durch

$$\|A\|_2 = \max\left\{\frac{\|A\mathbf{x}\|_2}{\|\mathbf{x}\|_2}\right\} = \max_{\|\mathbf{x}\|_2=1} \{\|A\mathbf{x}\|_2\}. \quad (3.35)$$

Die Frobenius Norm einer Matrix  $A$  ist definiert als die euklidische Länge des aus  $A$  konstruierten  $M \cdot N$ -Komponentigen Vektors [Koe85]:

$$\|A\|_F = \sqrt{\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N a_{ij}^2}. \quad (3.36)$$

**Satz 6 (Singularwert und Matrixnorm)**

Die  $M \times N$ -Matrix  $A$  ( $M \geq N$ ) habe die Singularwertzerlegung  $A = USV^t$  mit den Singularwerten  $s_i$ . Die  $s_i$  seien in absteigender Reihenfolge sortiert ( $s_1 \geq s_2 \geq \dots \geq s_N$ ). Dann gilt [Ste73]:

$$\|A\|_2 = s_1, \tag{3.37}$$

$$\|A\|_F = \sqrt{\sum_{i=1}^N s_i^2}. \tag{3.38}$$

**Bemerkung 7** Aus dem Satz sieht man sofort, dass

$$\|A\|_2 \leq \|A\|_F \quad \forall A. \tag{3.39}$$

**Definition 5 (Moore-Penrose-Pseudoinverse)** Sei  $A$  eine  $M \times N$  Matrix. Die  $N \times M$  Matrix  $X$  heißt Moore-Penrose-Pseudoinverse, wenn sie folgende vier Bedingungen erfüllt [Koe85]:

$$(XA)^t = XA, \tag{3.40}$$

$$(AX)^t = AX, \tag{3.41}$$

$$AXA = A, \tag{3.42}$$

$$XAX = X. \tag{3.43}$$

**Satz 7 (Konstruktion der Pseudoinversen)**

Die  $M \times N$ -Matrix  $A$  ( $M \geq N$ ) habe die Singularwertzerlegung  $A = USV^t$  mit den Singularwerten  $s_i$ . Die eindeutige Moore-Penrose-Pseudoinverse von  $A$  ist gegeben durch  $A^+ = VS^+U^t$  [Ste73, Koe85]. Dabei ist

$$S^+ = \text{diag}(s_i^+) \tag{3.44}$$

und

$$s_i^+ := \begin{cases} 1/s_i & \text{für } s_i > 0 \\ 0 & \text{für } s_i = 0. \end{cases} \tag{3.45}$$

Die Moore-Penrose-Pseudoinverse  $A^+$  stellt eine Verallgemeinerung des Begriffs der inversen Matrix auf nichtinvertierbare und nichtquadratische Matrizen dar.

Mit der Pseudoinversen  $A^+$  kann man noch einmal das lineare Gleichungssystem

$$A\mathbf{x} = \mathbf{b} \tag{3.46}$$

betrachten. Wegen  $M \geq N$  ist das Gleichungssystem unterbestimmt, es gibt also keine eindeutige Lösung. Fordert man jedoch gleichzeitig, dass der (Lösungs-)Vektor  $\mathbf{x}$  minimale Länge haben soll

$$\|\mathbf{x}\|_2 \stackrel{!}{=} \min, \tag{3.47}$$

dann gibt es wieder eine eindeutige Lösung und die ist gegeben durch [Koe85]

$$\mathbf{x} = A^+ \mathbf{b} = VS^+U^t \mathbf{b}. \tag{3.48}$$

### 3.3.2 Approximation

Der Rang einer Matrix  $A$  ist gleich der Zahl der von Null verschiedenen Singularwerte  $s_i$  von  $A$ . Was bedeutet es aber, wenn eine gewisse Anzahl von Singularwerten nicht exakt Null ist, sondern einfach nur klein oder sehr klein? Was heißt kleiner Singularwert? Ab wann kann man kleine Singularwerte aus  $S$  entfernen ohne einen großen Fehler zu machen und wie groß ist dieser Fehler? Kann die Matrix  $A$  durch eine Matrix  $A_k$  aus einem  $k$ -dimensionalen Unterraum von  $K^M \times K^N$  approximiert werden?

#### Satz 8 (Approximation durch Matrix mit niedrigerem Rang)

Die Matrix  $A$  besitze die Singularwertzerlegung  $A = USV^t$  mit den absteigend sortierten Singularwerten  $\{s_i\}$  und  $\text{Rang}(A) = r$ . Dann gibt es eine beste Approximation  $A_k$  von  $A$  mit  $\text{Rang}(A_k) = k < r$  und es gilt [Ste73]:

$$A_k = \sum_{i=1}^k s_i \mathbf{u}_i \mathbf{v}_i^t, \quad (3.49)$$

$$\min_{\text{Rang}(B)=k} \|A - B\|_2 = \|A - A_k\|_2 = s_{k+1}, \quad (3.50)$$

$$\min_{\text{Rang}(B)=k} \|A - B\|_F = \|A - A_k\|_F = \sqrt{\sum_{i=k+1}^N s_i^2}. \quad (3.51)$$

**Bemerkung 8** Dieser Satz ist sehr wichtig. Er sagt nämlich nicht nur die Existenz einer Approximierenden  $A_k$  von  $A$  voraus, sondern gibt einen expliziten Ausdruck für  $A_k$  und sagt darüberhinaus präzise, wie groß der Fehler ist, der durch die Approximation gemacht wird. Die Singularwertzerlegung liefert also (ganz nebenbei) die beste Approximation der Matrix  $A$  durch eine Matrix  $A_k$  von niedrigerem Rang  $k$  und die Konstruktion dieser Matrix ist extrem simpel: Setze einfach alle auf  $s_k$  folgenden Singularwerte Null:  $s_{k+1} = \dots = s_N = 0$  und berechne  $A_k = US_k V^t$ .

**Bemerkung 9 (Keine Einschränkungen)** Beachte, dass der Satz keine Einschränkungen macht und keine Kleinerzeichen vorkommen. Der Satz gilt immer und die Aussagen sind exakt.

**Beispiel 1 (Approximation einer  $3 \times 4$  Matrix)** Betrachte folgende Matrix:

$$A = \begin{pmatrix} 4 & 2 & 3 & 1 \\ 5 & 6 & 8 & 1 \\ 5 & 9 & 12 & 10 \end{pmatrix} \quad (3.52)$$

Diese Matrix hat die Singularwerte 21.8, 5.0 und 1.9. Die Matrix  $A$  enthält also drei linear unabhängige Vektoren (alle Singularwerte sind größer Null). Wird für die Rekonstruktion

von  $A$  nur der größte Singularwert (21.8) benutzt, ergibt sich als beste Approximation

$$A_1 = \begin{pmatrix} 1.7 & 2.4 & 3.2 & 2.0 \\ 3.6 & 5.3 & 7.1 & \mathbf{4.4} \\ 6.4 & 9.3 & 12.5 & 7.8 \end{pmatrix}, \quad (3.53)$$

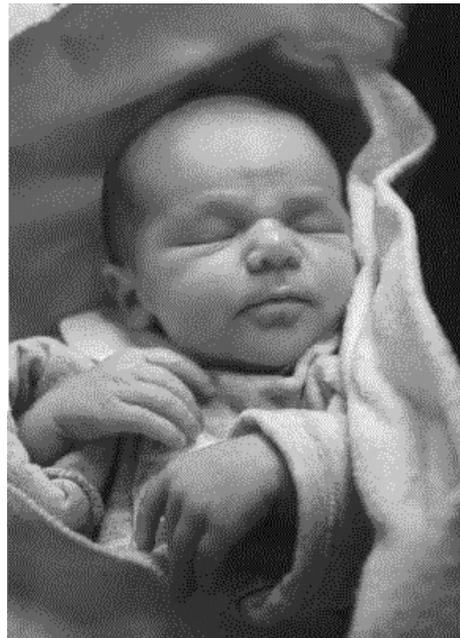
verwendet man die zwei größten Singularwerte (21.8 und 5.0), erhält man

$$A_2 = \begin{pmatrix} 2.7 & 2.6 & 3.6 & 0.4 \\ 5.6 & 5.7 & 7.7 & \mathbf{1.3} \\ 5.0 & 9.0 & 12.0 & 10.0 \end{pmatrix}. \quad (3.54)$$

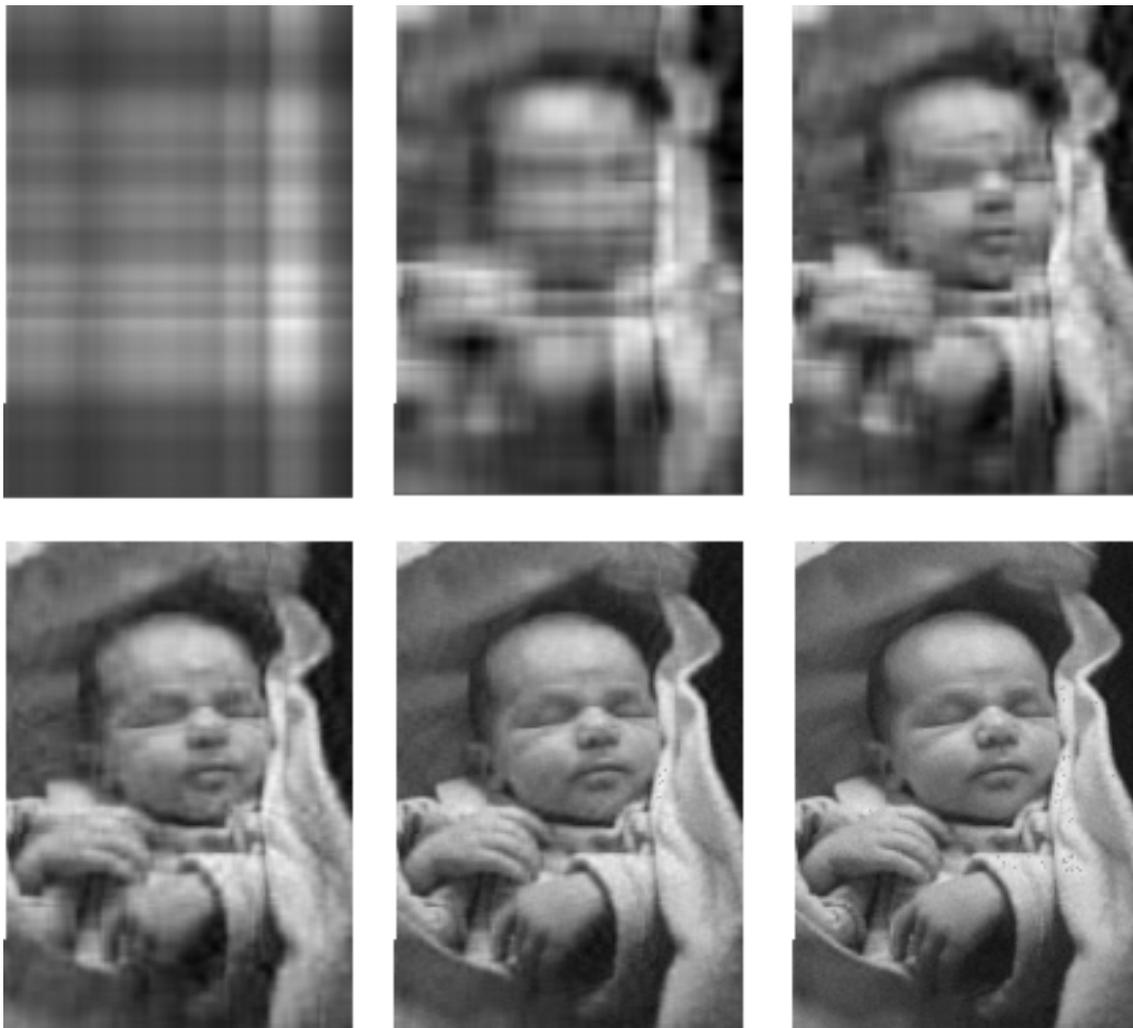
Die größte Abweichung ergibt sich in beiden Fällen für das fett gedruckte Matrixelement — in  $A_1$  eine Abweichung um 340%, in  $A_2$  immerhin noch um 30%.

Bei der Verwendung von drei Singularwerten erhält man selbstverständlich wieder die Ausgangsmatrix  $A$ , die ja drei linear unabhängige Vektoren enthielt.

Eine sehr anschauliche Anwendung der besten Approximation, die die Singularwertzerlegung liefert, liegt in der Bildbearbeitung. Hier kann die Singularwert-Zerlegung zur Reduktion der Bildgröße benutzt werden. Zur Veranschaulichung dient das nebenstehende Bild. Es besteht aus  $289 \times 408$  Pixel und wurde mit 256 Graustufen gespeichert, enthält also 115 KByte Information. Werden nur  $n$  Singularwerte zur Rekonstruktion des Bildes verwendet, müssen nur  $408 \cdot n + n + 289 \cdot n$  Byte gespeichert werden. Abb. 3.4 zeigt nun die Rekonstruktion der Bilder mit  $n = 1, 6, 11, 20, 42$  und 100 Singularwerten. Im vorliegenden Beispiel sind 20 Singularwerte bereits ausreichend, um die Bildinformation deutlich zu erkennen — das Bild benötigt dann nur noch 13 KByte Speicherplatz, was einer Reduktion um fast 90% entspricht. Je mehr Singularwerte hinzugenommen werden, desto mehr Details werden sichtbar (wie etwa auch in der Fourier-Analyse, wenn die hohen Frequenzen mit verarbeitet werden). Bei Verwendung von mehr als 100 Singularwerten ist keine signifikante Verbesserung mehr erkennbar. Selbstverständlich sind zur Bildkompression Verfahren wie JPEG besser geeignet, berücksichtigen sie doch das Sehverhalten des Auges und erreichen die Datenreduktion, indem sie größeren Bildbereichen mittlere Helligkeiten zuweisen. Es ist aber schon einigermaßen erstaunlich, dass die Singularwert-Zerlegung auf sehr einfache Weise eine solche Anwendung ermöglicht.



**Abbildung 3.3:** Als „Datenmatrix“  $A$  ein Bild mit  $289 \times 408$  Pixel (8 Bit Graustufen). Das Bild zeigt Clara Ondrusch (mit freundlicher Genehmigung der Eltern).



**Abbildung 3.4:** Die Abb. 3.3.2 wurde als  $289 \times 408$  Matrix mit der Singularwertzerlegung bearbeitet und (von links oben nach rechts unten) mit 1, 6, 11, 20, 42 und 100 Singularwerten rekonstruiert (schwarze Sprenkel sind auf Rundungsfehler zurückzuführen).

**Bemerkung 10 (Abweichung vom Mittelwert — Normalisierung)** Betrachtet man die einzelnen Bilder in Abb. 3.4 so sieht man, dass eine Rekonstruktion der Daten mit sehr wenigen Singularwerten bereits diejenigen Komponenten gut wiedergibt, die nicht weit vom Mittelwert der Ausgangsmatrix abweichen (im Beispiel mittlere Graustufen). Je weiter einzelne Komponenten der ursprünglichen Matrix aber vom Mittelwert abweichen, desto mehr Singularwerte werden benötigt, um auch diese Werte gut nachzubilden. Soll die Singularwert-Zerlegung dazu dienen, die beste Approximation zu finden, kann es hilfreich sein, die einzelnen Spaltenvektoren der Ausgangsmatrix  $A$  zu normalisieren, d. h. auf Länge 1 zu normieren:

$$\mathbf{a}_j^N = \frac{\mathbf{a}_j}{\|\mathbf{a}_j\|_2}. \quad (3.55)$$

Die Normen merkt man sich ( $N$  Stück) und bei der Rekonstruktion der Daten wird jede Komponente einfach wieder mit dem entsprechenden Norm-Faktor multipliziert. Besonders bei einer starken Variabilität der Komponenten von  $A$  lassen sich auf diese Weise zum Teil bessere Ergebnisse erzielen (Abb. 3.4 wurde ohne Normalisierung erstellt).

**Beispiel 2 (Beste Approximation einer normalisierten Matrix)** *Betrachte noch einmal die Matrix aus Beispiel 1:*

$$A = \begin{pmatrix} 4 & 2 & 3 & 1 \\ 5 & 6 & 8 & 1 \\ 5 & 9 & 12 & 10 \end{pmatrix} \quad (3.56)$$

Für die drei Zeilenvektoren der Matrix wird zuerst die Norm bestimmt (5.47723, 11.2250 und 18.7083) und dann die normalisierte Matrix berechnet. Man erhält

$$A^{norm} = \begin{pmatrix} 0.73 & 0.37 & 0.55 & 0.18 \\ 0.45 & 0.53 & 0.71 & 0.089 \\ 0.27 & 0.48 & 0.64 & 0.53 \end{pmatrix} \quad (3.57)$$

mit den Singularwerten 1.65910, 0.431228, 0.247861 und Null. Eine Rekonstruktion mit dem größten Singularwert und Multiplikation der Matrixelemente mit den entsprechenden Norm-Werten ergibt

$$A_1 = \begin{pmatrix} 2.6 & 2.5 & 3.5 & 1.5 \\ 5.5 & 5.3 & 7.3 & \mathbf{3.0} \\ 8.8 & 8.5 & 12 & 4.0 \end{pmatrix}, \quad (3.58)$$

verwendet man die zwei größten Singularwerte (1.65910 und 0.431228), erhält man

$$A_2 = \begin{pmatrix} 3.6 & 2.3 & 3.3 & 0.49 \\ 6.1 & 5.1 & 7.2 & \mathbf{2.5} \\ 4.4 & 9.5 & 12 & 9.2 \end{pmatrix}. \quad (3.59)$$

Beim Vergleich mit der Rekonstruktion ohne vorherige Normalisierung sieht man, dass bei der Approximation von  $A$  nur mit dem größten Singularwert jetzt die maximale Abweichung von 340% auf 200% geschrumpft ist — hier bringt die Normalisierung also Vorteile. Für das Beispiel sieht die Bilanz bei Verwendung von zwei Singularwerten zur Approximation aber schon anders aus: Ohne Normalisierung war der größte Fehler 30%, mit Normalisierung ist er aber 150%! Die vorherige Normalisierung bringt also wohl nur bei Verwendung von sehr wenigen Singularwerten wirklich Vorteile.

### 3.3.3 Gestörte Matrizen

Eine Matrix  $A$  mit beliebigen reellen Komponenten  $a_{ij}$  hat typischerweise maximalen Rang, d. h. alle Spaltenvektoren  $\mathbf{a}_j$  sind linear unabhängig. Dies wird in der Numerik insbesondere durch Rundungsfehler zusätzlich begünstigt.

Die Singularwertzerlegung gibt jetzt ein praktisches Instrument, um den Rang einer Matrix festzustellen. Die Singularwertzerlegung gibt aber auch ein Maß dafür zu sagen was es bedeutet, dass eine Matrix effektiv niedrigeren Rang hat (der nur durch Rundungsfehler und Rauschen verdeckt wird). Hier zeigt sich gleichzeitig die Mächtigkeit, aber auch die Grenzen der SVD.

Die weitere Diskussion geht davon aus, dass aufgrund von Rundungsfehlern und Rauschen ( $R$ ) das „wahre“  $A$  nicht bekannt ist. Zugänglich ist nur ein „verraushtes“  $\tilde{A}$ . Es gilt aber, dass

$$\tilde{A} = A + R, \quad (3.60)$$

$$\|R\| < \varepsilon. \quad (3.61)$$

Mit  $\tilde{s}_i$  werden die Singularwerte von  $\tilde{A}$  bezeichnet.

Nun gibt es zwei wichtige Fragen:

1. Welchen Rang hat das wahre  $A$  (ohne Rauschen und Rundungsfehler)?  
Dabei geht es darum, dass der Rang von  $A$  bestimmt nicht maximal sein wird. Die Frage ist also, welche der kleinen  $s_i$  können weggelassen werden, weil sie nur von  $R$  kommen?
2. Wieviele von den „gestörten“ (d. h. kleinen) Singularwerten können/müssen ernst genommen werden? Das wahre  $A$  kann dabei durchaus größtmöglichen Rang haben. Hier geht es um die entgegengesetzte Frage: Welche von den kleinen Singularwerten müssen mitgenommen werden, weil sonst das wahre  $A$  nicht mehr korrekt rekonstruiert werden kann?

Diese beiden Fragen sind von großer Bedeutung und bereiten ausreichend Probleme.

Eine erste und einfachere Frage ist jedoch, wieweit die Singularwerte von  $\tilde{A}$  und  $A$  auseinanderliegen. Hier hilft der nachfolgende

**Satz 9 (Singularwerte gestörter Matrizen)**

Wie oben sei  $\tilde{A} = A + R$ .  $A$  hat die Singularwerte  $s_i$ ,  $\tilde{A}$  hat die Singularwerte  $\tilde{s}_i$ . Es gilt [SS97]

$$|\tilde{s}_i - s_i| \leq \|R\|_2, \quad i = 1, \dots, N \quad (3.62)$$

$$\sqrt{\sum_{i=1}^N (\tilde{s}_i - s_i)^2} \leq \|R\|_F. \quad (3.63)$$

Dieser Satz gilt wieder für jedes beliebige  $R$ , es wird nicht verlangt, dass  $R$  in irgendeinem Sinne klein sein soll. Wertvoller wäre jedoch eine Aussage, in die explizit die Kleinheit von  $R$  eingeht. Die Frage ist also, ob es noch eine bessere Abschätzung gibt.

Einen Ansatz liefert der folgende

**Satz 10 (Störungsentwicklung für Singularwerte I)**

Wie oben sei  $\tilde{A} = A + R$ .  $A$  hat die Singularwerte  $s_i$ ,  $\tilde{A}$  hat die Singularwerte  $\tilde{s}_i$ . Für alle nicht entarteten Singularwerte  $s_j$  von  $A$  mit zugehörigem linken Singularvektor  $\mathbf{u}_j$  und rechtem Singularvektor  $\mathbf{v}_j$  gilt: Für  $\|R\| \rightarrow 0$  gibt es einen eindeutigen Singularwert  $\tilde{s}_j$  von  $\tilde{A}$ , so dass [SS97]

$$\tilde{s}_j = s_j + \mathbf{u}_j^t R \mathbf{v}_j + O\left(\frac{\|R\|^2}{\delta}\right) \quad \text{und} \quad \delta = \min |s_j - s_{j\pm 1}|. \quad (3.64)$$

Diese Entwicklung kann nun etwas Einblick geben, wie stark die Abweichung in den Singularwerten mit Gl. (3.63) überschätzt wird. Dazu seien die Elemente von  $R$  unabhängige Zufallsgrößen mit Erwartungswert Null und Varianz  $\varepsilon$ . Wenn die Singularwerte von  $A$  alle einfach sind und Terme zweiter Ordnung vernachlässigt werden, ist die Störung im  $i$ -ten Singularwert gleich  $\mathbf{u}_i^t R \mathbf{v}_i$ . Der Erwartungswert für die Quadratsumme der Fehler in den Singularwerten ist dann

$$\left\langle \sum_{i=1}^N (\mathbf{u}_i^t R \mathbf{v}_i)^2 \right\rangle = N\varepsilon^2, \quad (3.65)$$

wohingegen der Erwartungswert für das Quadrat der Frobeniusnorm von  $R$  gleich

$$\langle \|R\|_F^2 \rangle = MN\varepsilon^2 \quad (3.66)$$

ist. Man sieht daran, dass Gl. (3.63) dazu neigt, den (RMS-)Fehler in den Singularwerten mit einem Faktor von  $\sqrt{M}$  zu überschätzen.

Beachte aber, dass in der Abschätzung aus Gl. (3.63) für mehrfach vorkommende Singularwerte das Gleichheitszeichen gilt, sei z. B.

$$A = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}, \quad R = \begin{pmatrix} \varepsilon & \varepsilon \\ \varepsilon & \varepsilon \end{pmatrix}, \quad (3.67)$$

Dann hat  $A$  den zweifachen Singularwert 1, die Singularwerte von  $\tilde{A}$  sind 1 und  $1 + 2\varepsilon$  und

$$\sqrt{\sum_{i=1}^2 (\tilde{s}_i - s_i)^2} = 2\varepsilon = \|R\|_F. \quad (3.68)$$

Stewart hat gezeigt, dass die Störungsentwicklung in Gl. (3.64) bedeutet, dass „der Abstand eines Singularwertes von seinen Nachbarn die Sensitivität des zugehörigen Singularvektors auf Störungen kontrolliert“ [Ste84, Ste90]. Eine ähnliche Störungsentwicklung der Singularwerte gibt auch Vaccaro [Vac94].

**Satz 11 (Störungsentwicklung für Singularwerte II)**

Wie oben sei  $\tilde{A} = A + R$ .  $A$  hat die Singularwerte  $s_i$ ,  $\tilde{A}$  hat die Singularwerte  $\tilde{s}_i$ . Sei  $P$  die orthogonale Projektion in den Spaltenraum von  $A$ . Dann ist [Ste79, Ste84]

$$\tilde{s}_i^2 = (s_i^2 + \xi_i)^2 + \eta_i^2 \quad (i = 1, 2, \dots, N), \quad (3.69)$$

wobei

$$|\xi_i| \leq \|PA\| \quad (3.70)$$

und

$$\inf_{\|x\|=1} \|(I-P)A\| \leq \eta_i \leq \|(I-P)A\|. \quad (3.71)$$

Die Auswirkung dieses Satzes sieht man bei folgender Betrachtung [Ste]: Sei  $s_i = 0$ , dann ist  $(\tilde{s}_i)^2 = (\xi_i)^2 + (\eta_i)^2$ . An dieser Stelle muss man die Dimension von  $A$  einbeziehen: Mit steigendem  $N$  wird  $(\xi_i)^2$  von der Ordnung 1 sein während  $(\eta_i)^2$  die Ordnung  $N$  hat. Statt dem Singularwert 0 wird man also einen Singularwert der Ordnung  $\sqrt{N}$  finden (als „Geisterwert“ bezeichnet).

Man sieht also, dass es bei gestörten Matrizen sehr schwierig sein kann zu entscheiden, welche Singularwerte zum Rauschen gehören und welche nicht. Den Einfluß von Rauschen auf kleine Singularwerte zeigt Abb. 3.5: die dargestellte Datenmatrix wurde synthetisch erzeugt und enthält drei Basisspektren — in Abb. 3.5c sieht man, dass der Abstand des 3. Singularwertes von den übrigen noch sehr groß ist. Die Situation ändert sich, sobald etwas Rauschen hinzuaddiert wird. Abb. 3.5b zeigt eine Einzelkurve mit und ohne Rauschen, in Abb. 3.5d sieht man, dass zwar die ersten beiden Singularwerte nach wie vor groß sind, ab Ordnungsnummer 3 bis 40 sind jedoch alle Singularwerte von der gleichen Größenordnung und es ist nicht mehr möglich zu entscheiden, welche Singularwerte vernachlässigt werden dürfen. Allein durch betrachten der Singularwerte ist es also sehr schwer zu entscheiden, welche Basisvektoren zum Signal und welche zum Rauschen gehören. Dazu werden weitere Werkzeuge benötigt.

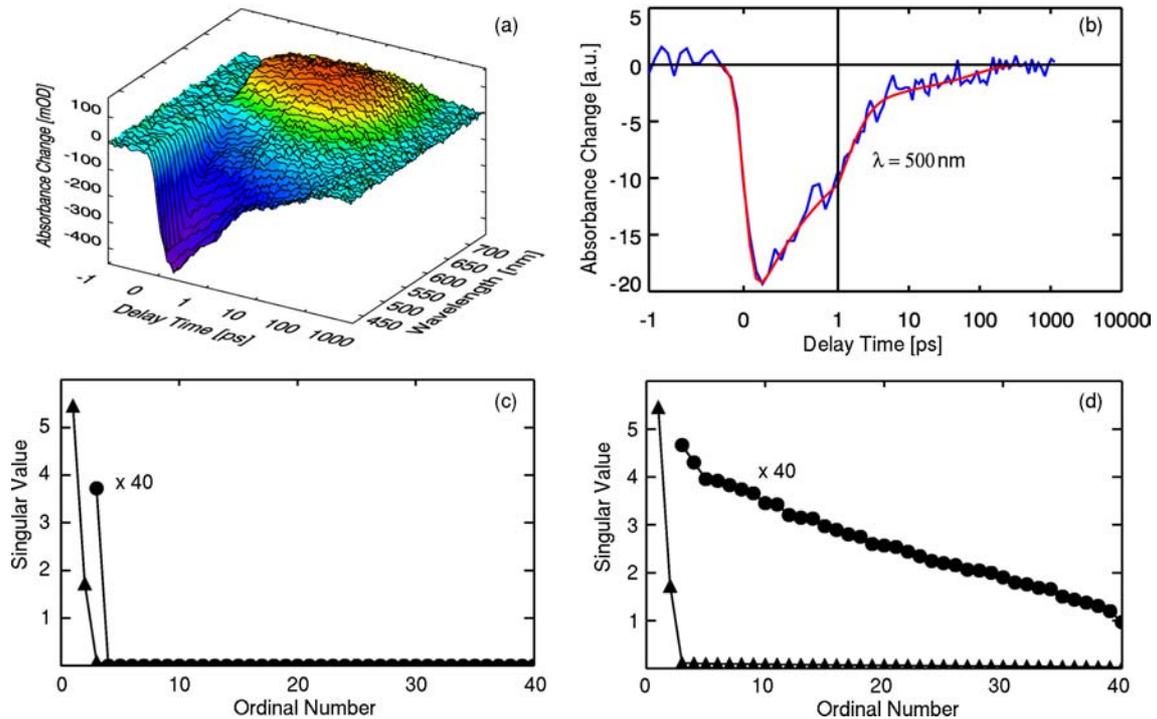
## Autokorrelations-Koeffizienten

Alle bisher gemachten Aussagen gelten allgemein für jede Matrix. In dieser Arbeit soll die Singularwert-Zerlegung natürlich auf transiente Absorptionsdaten angewandt werden und dort werden alle beobachteten Spektren glatt sein und insbesondere nur wenige Vorzeichenwechsel zeigen, d. h. nur diejenigen Spaltenvektoren von  $U$  (bzw.  $V$ ) sind glatt, welche zum Signal gehören. Starke Fluktuationen im Vorzeichen werden typischerweise nur die hinteren Spaltenvektoren von  $U$  zeigen, jene, die zum Rauschen gehören. Shrager und Hender haben vorgeschlagen, diese Fluktuationen mit einem „Autokorrelations-Koeffizienten“ abzuschätzen, den sie wie folgt berechnen [SH82]:

**Definition 6 (Autokorrelations-Koeffizient)** *Der Autokorrelations-Koeffizient des  $j$ .ten Spaltenvektors  $\mathbf{a}_j$  der  $M \times N$  Matrix  $A$  ist definiert als [SH82]*

$$C_{\mathbf{a}_j} = \sum_{l=1}^{M-1} (\mathbf{a}_j)_l (\mathbf{a}_j)_{l+1}. \quad (3.72)$$

Da  $U$  und  $V$  orthonormierte Matrizen sind, liegen die Autokorrelations-Koeffizienten zwischen 0 und 1. Werte für den Autokorrelations-Koeffizienten  $\approx 1$  beschreiben große



**Abbildung 3.5:** Der Einfluß von Rauschen auf kleine Singularwerte. (a) Simulierter Datensatz mit Rauschen. (b) Eine Einzelkurve zeigt das relative Rauschen der Daten. (c) Singularwerte der unverrauschten Daten aufgetragen gegen ihre Ordnungszahl ( $\blacktriangle$ ) und zusätzlich die Singularwerte 3...40 vergrößert ( $\bullet$ ,  $\times 40$ ). (d) Singularwerte der verrauschten Daten ( $\blacktriangle$ ). In der Vergrößerung sieht man, dass die Singularwerte 3 und 4...40 ( $\bullet$ ,  $\times 40$ ) alle die gleiche Größenordnung haben (sog. „Geisterwerte“).

Glattheit. Je mehr die Werte in den  $\mathbf{a}_j$  fluktuieren, desto kleiner und näher bei Null wird der Autokorrelations-Koeffizient sein. Allgemein kann man sagen, dass Autokorrelations-Koeffizienten  $\approx 1$  als Indiz für „Signal-Vektoren“ gewertet werden können. Sobald der Autokorrelations-Koeffizient kleiner wird als 0.5, wird der zugehörige Vektor eher zum Rauschen als zum Signal gehören [SH82].

### 3.3.4 Anwendung auf zeitaufgelöste Spektroskopie

Hier stellen sich zuerst einige Fragen: Was hat zeitaufgelöste Spektroskopie mit Singularwertzerlegung zu tun? Wo ist die lineare Abbildung? Und von wo nach wo geht die Abbildung überhaupt?

Der Zusammenhang wird folgendermaßen hergestellt. Im Experiment wird die Absorptionsänderung einer Probe gemessen und dieses Messsignal wird von vielen Parametern abhängen:

$$\Delta A = \Delta A(\text{Probe, Lösungsmittel, } t, \lambda_{\text{pump}}, \lambda_{\text{probe}}, T, \text{Experimentator, } \dots). \quad (3.73)$$

Ein gutes Experiment liegt dann vor, wenn es nicht mehr vom Experimentator oder der Mondphase abhängt (sonst wären die Experimente nicht wirklich reproduzierbar). Andere Parameter lassen sich nicht so leicht weglassen. Die Temperaturabhängigkeit wird oft wichtig sein, genauso wie z. B. die Energie von Anreg- und Abtastimpuls.

Normalerweise geht man aber davon aus, dass der Experimentator weiss, was er tut und dass er seine Sache richtig macht. Er wird also angeben, dass er die Experimente bei Raumtemperatur, Normaldruck, passend gewählter Anregungswellenlänge usw. durchgeführt hat. Im Experiment wird dann die Absorptionsänderung einer Probe in Abhängigkeit von der Abtast-Wellenlänge und der Verzögerungszeit zwischen Anreg- und Abtast-Impuls gemessen. Das Messsignal sieht damit folgendermaßen aus:

$$\Delta A(t, \lambda) : \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{R}. \quad (3.74)$$

Diese kontinuierlich verteilte Messgröße wird im Experiment aber nur auf einem Gitter ausgewertet. Im speziellen Beispiel der Vielkanaldetektion in dieser Arbeit wird die transiente Absorption bei 42 verschiedenen Abtastwellenlängen aufgezeichnet, die jeweils 8 nm auseinanderliegen. Die Verzögerungszeit wird im Bereich von -1 ps bis 4 ns mit ca. 150 Messpunkten abgedeckt. Die Situation in der Realität ist damit folgende:

$$\Delta A(t_i, \lambda_j) : T \times \Lambda \rightarrow \mathbb{Q} \quad (3.75)$$

$$\Lambda = \{\lambda_j : j = 1, \dots, N, \lambda_{j+1} - \lambda_j = \Delta\lambda\}, \quad (3.76)$$

$$T = \{t_i : i = 1, \dots, M\}. \quad (3.77)$$

Die Verbindung zur Singularwertzerlegung ist jetzt folgendermaßen: Identifiziere  $\tilde{A} = \Delta A(t_i, \lambda_j)$  als Matrix mit  $M$  Zeilen ( $t_i$ ) und  $N$  Spalten ( $\lambda_j$ ).

Die Ausgangslage ist nun:

$$\Delta A(t_i, \lambda_j) =: \tilde{A} = A + R, \quad (3.78)$$

dabei enthalte  $A$  das „reine“ Signal der Probe und in  $R$  wird das Rauschen der Messwerte zusammengefasst.  $\tilde{A}$  ist eine wohldefinierte Matrix, für die die vorhin bereits gestellten Fragen nach Rang und Approximierbarkeit gestellt werden können.

**Bemerkung 11 (Gemeinsame Zeitachse)** Um die Singularwertzerlegung anwenden zu können, ist es nur notwendig, eine Matrix  $A$  aufzuschreiben, der Algorithmus findet für jede rechteckige Anordnung von Zahlen Singularwerte. Im hier vorliegenden Fall ist es jedoch so, dass aufgrund der gechirpten Abtast-Impulse die Zeit-Nullpunkte jedes Abtast-Kanals leicht unterschiedlich liegen. Bei der Datenauswertung wird dieser Zeitversatz durch Anwendung der Sellmeier-Gleichung [ZK98] ermittelt und auch korrigiert. Jedoch hat ab diesem Zeitpunkt jeder der 42 Kanäle seine eigene Zeitachse — jeder Kanal wird quasi in einer anderen Basis dargestellt. Die Zerlegung dieser Matrix ist zwar möglich (und darin liegt eine der Gefahren der SVD), jedoch hat die Anzahl der Singularwerte nichts mit der Anzahl der beteiligten exponentiellen Prozesse zu tun. Um relevante Aussagen machen zu können, muss vor der Zerlegung eine Zeitachse gewählt werden, auf die

die Daten der anderen 41 Kanäle interpoliert werden. Erst die SVD-Analyse dieser neuen Matrix liefert sinnvolle Ergebnisse.

**Bemerkung 12 (Interpretation von Daten mit SVD?)** Der SVD- Algorithmus betreibt nur lineare Algebra, es wird insbesondere kein Modell zugrunde gelegt und auch nichts interpretiert! Nach der Zerlegung kann man versuchen,  $A$  durch eine Matrix  $A_k$  mit niedrigerem Rang zu approximieren. Das  $k$  kann nun als Anhaltspunkt dafür dienen, wieviele Raten mit einem globalen Fit-Algorithmus gesucht werden müssen; außerdem kann „reines“ Rauschen abgespalten werden und der globale Fit-Algorithmus durch Fitten eines reduzierten Datensatzes beschleunigt werden.

Zurück zum Experiment. Ohne SVD würde man die Messdaten nach Verwendung eines globalen Fit-Algorithmus unter impliziter Anwendung eines Ratenmodells folgendermaßen beschreiben (die Faltung mit der Apparatefunktion ist hier nicht relevant und wird deshalb unterdrückt):

$$\Delta A(t_i, \lambda_j) = \sum_k a_k(\lambda_j) e^{-t_k/\tau_i}. \quad (3.79)$$

Jedes der  $\tau_k$  entspricht einer Zeitkonstanten, die zu einem Zwischenzustand gehört, ein eventuell aufgebautes Photoprodukt kann durch  $\tau_k = \infty$  beschrieben werden.

Diese Gleichung kann auch sofort als Matrixgleichung gelesen werden:

$$\Delta A = D_{ampl} \cdot F_{time}^t, \quad (3.80)$$

dabei sind die Basisvektoren  $\exp(-t/\tau_i)$  in der Matrix  $F_{time}^t$  zusammengefasst und werden multipliziert mit der Amplituden-Koeffizientenmatrix  $D_{ampl}$  (dass die Matrix  $F$  hier transponiert auftaucht hat technische Gründe und sollte nicht weiter stören).

Nun wird die Singularwertzerlegung von  $\Delta A$  durchgeführt und liefert

$$\Delta A = USV^t, \quad (3.81)$$

was man am liebsten lesen würde als

$$\begin{aligned} US &\stackrel{?}{\sim} D_{ampl} \\ V^t &\stackrel{?}{\sim} F_{time}^t. \end{aligned}$$

Genau das geht aber nicht (dieses Problem behandelt z. B. auch [HLE<sup>+</sup>90]).

Die Lösung: Finde eine geeignete Transformationsmatrix, die die orthonormalen Matrizen  $U$  und  $V$  (bzw. besser:  $US$  und  $V$ ) in die physikalisch sinnvollen Matrizen  $D_{ampl}$  und  $F_{time}^t$  transformiert.

Wird für die Messdaten ein Ratenmodell zugrunde gelegt, dann läßt sich schreiben

$$(V^t)_{ij} = \sum_{k,l} h_{ik} e^{t_l/\tau_j}. \quad (3.82)$$

Wende also den globalen Fit-Algorithmus auf die Matrix  $V^t$  an und bestimme Basisvektoren und Amplituden. Man erhält damit (in Matrix-Form)

$$V^t = HF^t. \quad (3.83)$$

An dieser Stelle kann auch die approximative Eigenschaft der SVD eingesetzt werden: Spaltet man kleine Singularwerte ab, kann man zufälliges Rauschen unterdrücken — dies ist gleichbedeutend damit, in  $V^t$  die hinteren Spaltenvektoren Null zu setzen. Gefittet werden dann nur die Vektoren in  $V^t$ , die zum Signal beitragen.

Mit diesem Ergebnis folgt

$$\Delta A = USV^t = USHF^t = D_{ampl} \cdot F_{time}^t \quad (3.84)$$

mit der Identifikation  $D_{ampl} = USH$ .

Zusammengefasst kann man das „Rezept“ für die Datenauswertung mittels Singularwertzerlegung also folgendermaßen angeben:

1. Zusammenfassen der Messdaten in der Matrix  $\Delta A(\lambda_i, t_j)$ . Dabei müssen alle Einzelvektoren eine gemeinsame Zeitachse haben (evtl. auf eine Zeitachse interpolieren).
2. Zerlegung dieser Matrix durch SVD-Algorithmus in  $\Delta A = USV^t$ .
3. Abschätzen des Rangs von  $\Delta A$  durch Weglassen der kleinen Singularwerte (wobei „Geisterwerte“ diese Auswahl erschweren können, vgl. Abb. 3.5). Dies ist gleichbedeutend mit dem Abschätzen der Anzahl  $k$  an Zuständen im Ratenmodell bzw. der Anzahl benötigter Zeitkonstanten.
4. Globales Fitten der  $V^t$ -Matrix, d. h. Bestimmen der  $k$  Zeitkonstanten. Damit sind  $H$  und  $F_{time}^t$  bekannt.
5. Rekonstruktion der Amplitudenspektren gemäß  $D_{ampl} = USH$ .

Die Vorteile der Singularwertzerlegung sind demnach:

1. Abschätzung der Zahl der Zeitkonstanten: Die SVD hilft dabei, die Anzahl der benötigten Zeitkonstanten abzuschätzen (durch Abschätzen des Rangs von  $\Delta A$ ).
2. Einsparung an Rechenzeit: Nur die ersten  $k$  Spalten der  $V^t$ -Matrix müssen global gefittet werden. Die restlichen Spalten in  $V^t$  enthalten den abgespaltenen Rauschanteil.
3. Einsparung an Speicherplatz: Die Amplitudenspektren können anstatt durch  $M \cdot N$  Parameter bereits durch  $M \cdot k$  Parameter reproduziert werden.

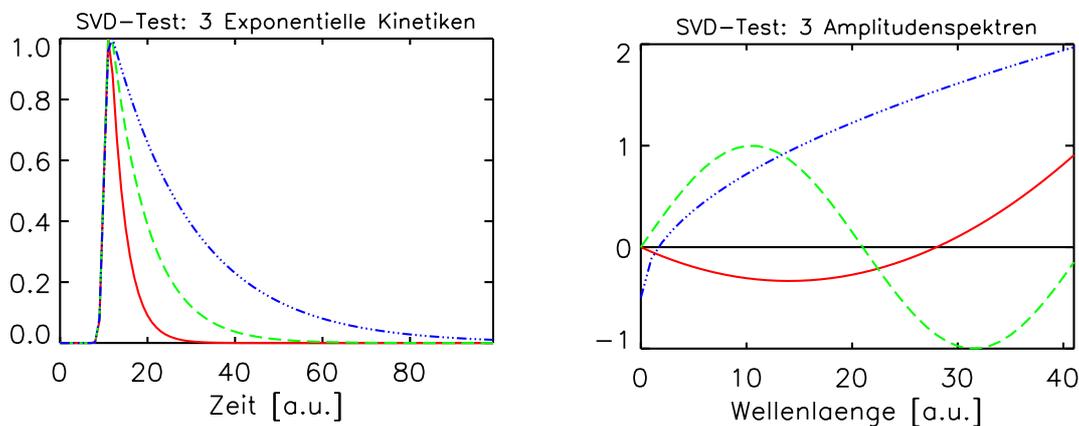
Das größte Problem der Singularwertzerlegung bleibt jedoch entscheiden zu müssen, welche Singularwerte klein genug sind, dass man sie dem Rauschen zuschreibt.

**Bemerkung 13 (Welche Matrix soll man fitten?)** Eine Anmerkung noch zur Frage: Was ist der Unterschied, wenn man nur die Basis-Zeitspektren nach SVD-Analyse fittet im Gegensatz dazu, wenn man die kompletten Daten fittet — wird der Fit bei der einen Methode besser als bei der anderen oder findet der Fit evtl. schneller das Minimum (d. h. die besten Werte für die Zeitkonstanten)? Zur Beantwortung dieser Fragen muss man zuerst feststellen, dass drei Matrizen interessant sind:  $\tilde{A}$ ,  $\tilde{A}_k$  und  $V_k^t$ . Ohne SVD-Methoden würde man einfach  $\tilde{A}$  fitten, das ist also die Referenz. Eine Möglichkeit ist,  $\tilde{A}_k$  zu fitten, d. h. eine geglättete Datenmatrix aus der zufälliges Rauschen entfernt wurde. In diesem Fall sind genau so viele freie Parameter zu bestimmen wie ohne Glättung. Der Fit wird also genauso lange dauern, nur das  $\chi^2$  wird kleiner sein, weil die Daten glatter sind. Einen Gewinn bringt aber das Fitten von  $V_k^t$ : es sind wenige, glatte Kurven zu fitten und die Anzahl der freien Parameter ist erheblich kleiner. Man kann also in der gleichen Zeit mehr Iterationen des Fit-Algorithmus laufen lassen und, da weniger Parameter frei sind, sollte die Güte des Fits steigen.

### 3.3.5 Beispiel: Simulierte Messdaten mit Rauschen

Im folgenden wird die Singularwertzerlegung exemplarisch für die Datenauswertung eines synthetischen Datensatzes eingesetzt.

Die Daten werden nach dem mathematischen Ansatz generiert (siehe Kapitel 3.1, Seite 33). Abbildung 3.6 zeigt die reinen exponentiellen Kinetiken und die zugehörigen Amplitudenspektren. Sämtliche Größen sind in diesem Fall dimensionslos: Kreuzkorrelationsbreite  $\tau_{cc} = 1.0$  und drei Zeitkonstanten von 3.5, 8.5 und 19.



**Abbildung 3.6:** Die dargestellten Kinetiken und Amplitudenspektren bilden den Ausgangspunkt für den simulierten Datensatz, zu dem noch 10% Rauschen addiert wird. Sämtliche Größen sind in diesem Fall dimensionslos: Kreuzkorrelationsbreite  $\tau_c = 1.0$  und drei Zeitkonstanten von 3.5, 8.5 und 19.

Es ist vielleicht interessant, einen kurzen Blick auf die Norm der drei Matrizen zu werfen:  $\|A\|_\infty = 44.3757$ ,  $\|R\|_\infty = 7.66172$  und  $\|\tilde{A}\|_\infty = 46.1745$ .

Der SVD-Algorithmus liefert sämtliche Singularwerte von  $\tilde{A}$ . Diese sind der Größe nach sortiert in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Die Analyse beginnt mit den größten Singularwerten. Die ersten beiden sind kein Thema:  $s_1$  und  $s_2$  sind deutlich größer als  $s_3$  und damit enthalten die Daten auf jeden Fall zwei Kinetiken.

Die Schwierigkeiten ergeben sich beim 3.ten Singularwert. Die Daten sind so konstruiert, dass drei kinetische Prozesse enthalten sind. Allerdings ist der 3.te Singularwert nicht allzuweit vom 4.ten entfernt und auch noch nicht vom 11.ten. Entweder ist man demnach gezwungen, nur 2 Singularwerte mitzunehmen, oder aber auf Nummer Sicher zu gehen und mindestens 11 Singularwerte zu verwenden. Hier zeigt sich wieder die „Anfälligkeit“ der SVD auf Rauschen.

Als eine weitere Entscheidungshilfe bieten sich die Autokorrelations-Koeffizienten für  $U$  und  $V$  an, die ebenfalls in Tabelle 3.1 aufgelistet sind.

Auch hier zeigt sich sofort, dass es an den ersten beiden Singularwerten nichts auszusetzen gibt, die Autokorrelations-Koeffizienten von jeweils gut 0.9 sprechen eine deutliche Sprache.

Interessant sind nun der 3.te und 4.te Autokorrelations-Koeffizient. Sowohl die Amplitudenspektren als auch die Kinetiken sollen glatt sein und nur wenige Nulldurchgänge zeigen. Die jeweiligen Autokorrelations-Koeffizienten von  $U$  und  $V$  können also gemeinsam betrachtet werden.

Da wären zuerst die Werte für die 3.ten Spaltenvektoren: 0.73 für  $U$  und 0.52 für  $V$ . Beide sind größer als 0.5, die die Grenze für verlässliche Autokorrelations-Koeffizienten darstellt.

Für die 4.ten Spaltenvektoren liest man 0.34 für  $U$  und 0.22 für  $V$ . Beide Werte sind deutlich kleiner als 0.5, damit gehört diese Spalte bereits zum Rauschen.

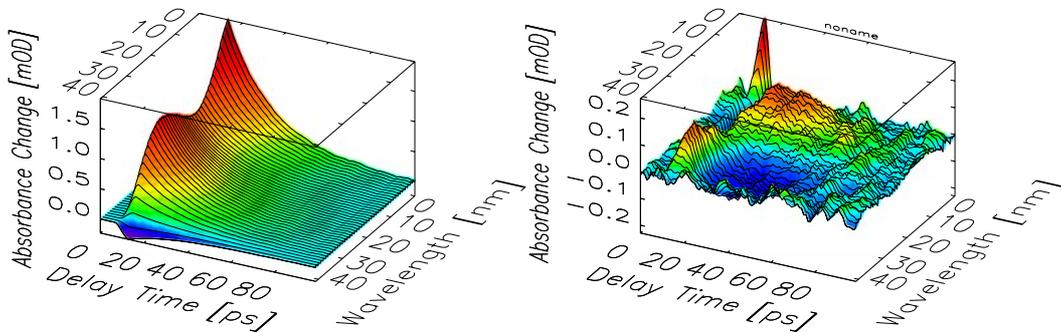
Damit sind die ersten beiden Singularwerte ganz sicher und der Dritte wurde durch die Autokorrelations-Koeffizienten bestätigt. Ein vierter kann aber fast sicher zurückgewiesen werden.

Nun zu den rekonstruierten Messdaten bzw. dem jeweiligen Residuum. Zuerst soll

Singularwerte und Autokorrelations-Koeffizienten der synthetischen Daten			
No.	Singularwert	Ak(U)	AK(V)
1	3.31599	0.955108	0.979836
2	1.55548	0.938762	0.893815
3	1.26639	0.728227	0.523722
4	1.22975	0.335243	0.220822
5	1.14379	0.322632	0.197427
6	1.10340	0.320876	0.192997
7	1.06783	0.317165	0.190312
8	1.02509	0.272049	0.188534
9	0.99857	0.256045	0.179131
11	0.98729	0.250900	0.169947
12	0.96494	0.244250	0.164235
13	0.95315	0.219545	0.162352
14	0.93949	0.216981	0.150318
15	0.89536	0.210037	0.147005
16	0.88214	0.208498	0.135799
17	0.86748	0.186131	0.135064
18	0.83744	0.185062	0.132602
20	0.82543	0.169944	0.129057
21	0.81267	0.153240	0.122537
22	0.79884	0.161788	0.122585
23	0.76688	0.143260	0.122010
⋮	⋮	⋮	⋮

**Tabelle 3.1:** Singularwerte und Autokorrelations-Koeffizienten des synth. Datensatzes aus Abb. 3.6.

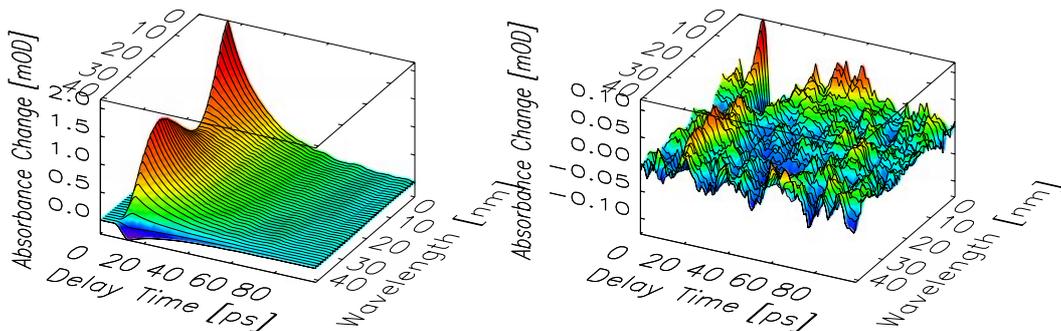
nur der größte Singularwert zur Rekonstruktion verwendet werden. Man erhält die Abbildung 3.7.



**Abbildung 3.7:** Links: Mit dem größten Singularwert rekonstruierte Daten-Matrix. Rechts: Das zugehörige Residuum zeigt noch deutliche Strukturen — weitere Singularwerte sind zur Rekonstruktion nötig.

Erstaunlich! Bereits mit nur einem Singularwert können die Daten schon fast perfekt wiedergegeben werden — für das Auge sind bereits keine großen Unterschiede zum Original mehr erkennbar. Nur im Residuum (also Datenmatrix minus rekonstruierte Matrix) sieht man, dass das abgespaltete Rauschen noch deutliche Strukturen enthält. Ein Hinweis darauf, dass die rekonstruierte Matrix noch nicht die volle Information enthält.

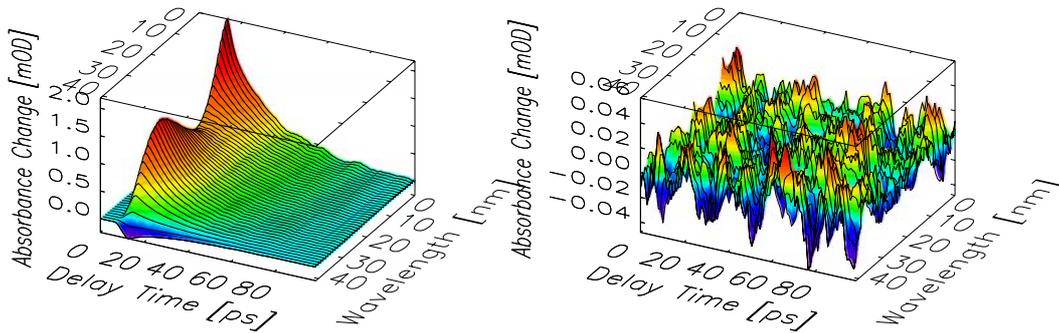
Also weiter: Nehme den 2. Singularwert hinzu und rekonstruiere die Daten damit. Man erhält Abbildung 3.8.



**Abbildung 3.8:** Links: Mit den zwei größten Singularwerten rekonstruierte Daten-Matrix. Rechts: Das zugehörige Residuum ist bereits deutlich weniger strukturiert, aber immer noch nicht „optimal“.

In den Daten ist eigentlich kein Unterschied zu vorher erkennbar, aber im Residuum sieht man, dass die verbleibenden Strukturen deutlich weniger geworden sind.

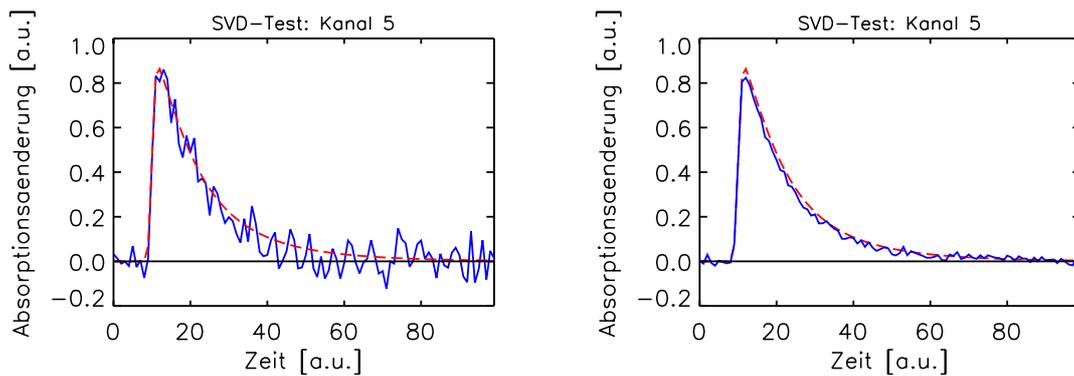
Aber das war ja nur ein Test; die Analyse hat ergeben, dass am besten drei Singularwerte zur Rekonstruktion benutzt werden sollten. Dies zeigt Abbildung 3.9.



**Abbildung 3.9:** Links: Mit den drei größten Singularwerten rekonstruierte Daten-Matrix. Rechts: Im zugehörigen Residuum sind praktisch keine Strukturen mehr zu erkennen.

Der Unterschied zur Rekonstruktion mit nur zwei Singularwerten ist minimal, einzig das zugehörige Residuum zeigt jetzt noch weniger Strukturen.

Wie gut das Abspalten von zufälligem Rauschen funktionieren kann, sieht man in Abb. 3.10. Im linken Bild ist ein einzelner ausgewählter verrauschter Kanal gezeichnet (gestrichelt die unverrauschten Daten). Im rechten Bild sieht man den selben Kanal, der aus der rekonstruierten Datenmatrix erhalten wurde, wenn 3 Singularwerte zur Rekonstruktion verwendet werden. Die Abspaltung des zufälligen Rauschens ist fast perfekt geglückt, die „SVD-geglätteten“ Daten sind von den unverrauschten praktisch nicht mehr zu unterscheiden.



**Abbildung 3.10:** Links: Ein ausgewählter Kanal macht deutlich, wie stark die Daten verrauscht sind (gestrichelt sind die unverrauschten Daten eingezeichnet). Rechts: Derselbe Kanal mit drei Singularwerten rekonstruiert: Man sieht, wie gut reines Rauschen von den Messwerten absepariert werden kann (gestrichelt wieder die unverrauschten Daten).

## 3.4 Visualisierung komplexer Absorptionsdynamiken — LDAC

Durch die Verwendung eines Superkontinuums als Abtastlicht ist es möglich, in kurzer Zeit sehr viele Daten über die untersuchte Probe zu gewinnen. Das eigentliche Problem ist nun, aus diesen großen Datenmengen physikalisch fundierte Aussagen zu extrahieren. Die allgemein eingesetzten Standardprozeduren verwenden dabei numerische Methoden um quantitative Aussagen zu erhalten und „entfernen“ sich von den Rohdaten:

- **Globale Datenanpassung** mit exponentiellen Zeitkonstanten: Nichtlineare Fits nach der Methode der kleinsten Quadrate ( $\chi^2$ -Fits) mit einer festen Zahl exponentieller Zeitkonstanten ermöglichen eine beste Beschreibung der experimentellen Daten (kleinstes  $\chi^2$ ). Aufstellen und Lösen eines Ratenmodells erlauben es dann, diese Zeitkonstanten einzelnen Prozessen zuzuordnen (siehe Abschnitt 3.2). Probleme ergeben sich dadurch, dass die Anzahl der Zeitkonstanten vorgegeben werden muss. Zudem benötigt der Algorithmus Startwerte für jede Zeitkonstante — ihre Wahl entscheidet zum Teil, ob der Algorithmus das globale  $\chi^2$ -Minimum findet, oder in einem lokalen Minimum „hängen bleibt“. Strenggenommen ist die Verwendung exponentieller Zeitkonstanten auch mit dem zugrundeliegenden Ratenmodell verknüpft. Sind in den experimentellen Daten spektrale Signaturen wie der Stokes-Shift einer Bande enthalten, werden sie vom Algorithmus evtl. nicht erkannt oder führen dazu, dass der Wert von Zeitkonstanten beeinflusst werden.
- **Singularwertzerlegung (SVD)**: Die Zerlegung in abstrakte Basisspektren ermöglicht es, zufälliges Rauschen aus den Daten zu eliminieren und die Zahl der erwarteten Zeitkonstanten abzuschätzen (siehe Abschnitt 3.3). Außerdem kann die Datenanpassung auf einen kleineren Satz von Basisspektren limitiert werden, was Rechenzeit spart. Die Singularwertzerlegung wird oft eingesetzt, um die Zahl der Zeitkonstanten abzuschätzen, die für die globale Datenanpassung benötigt werden. Die SVD ist jedoch extrem sensibel auf Rauschen — die Trennung von Singularwerten, die sicher zu den Daten gehören und denen, die sicher zum Rauschen gehören, verwischt (das Beispiel in Abbildung 3.5, Seite 53, zeigt dies sehr eindrucksvoll).

Zusätzlich zu diesen quantitativen Analysemethoden betrachtet man die Rohdaten, um ein qualitatives Gefühl für die in den Daten enthaltenen Prozesse zu erlangen. Standardmäßig werden transiente Spektren zu festen Verzögerungszeiten zwischen Anreg- und Abtast-Impuls gezeichnet. Hier ist es relativ einfach z. B. isosbestische Punkte oder das spektrale Schieben einer Bande zu sehen. Die Wahl der richtigen Transienten entscheidet, ob man eine spektrale Signatur sieht oder nicht.

Ausgehend von diesen Überlegungen war ein methodisches Ziel innerhalb dieser Arbeit, eine Technik der Visualisierung zu entwickeln die es erlaubt, eine qualitative Datenauswertung zu ermöglichen ohne sich dabei zu sehr von den Rohdaten zu entfernen.

Dabei sollen in den experimentell Daten enthaltene spektrale Signaturen sichtbar gemacht werden.

## LDAC – Die Methode

Die vorgeschlagene Methode umfaßt vier zum Teil unabhängige Schritte:

- I. Die transienten Absorptionsänderungen werden mit exponentiell anwachsenden Verzögerungszeiten aufgenommen (äquidistant auf logarithmischer Skala).
- II. Die Absorptionsänderung wird auf der logarithmischen Zeitskala differenziert („logarithmically differentiated absorption changes“ — LDAC) um statische Effekte zu eliminieren und die individuellen kinetischen Komponenten herauszuarbeiten.
- III. Das LDAC-Signal wird in einer 2D-Falschfarben-Darstellung aufgetragen und dabei evtl. für jede Verzögerungszeit auf das absolute Maximum normiert.
- IV. Der Absolutwert des LDAC-Signals wird für jeden Verzögerungszeitpunkt spektral aufsummiert um dominante kinetische Komponenten in einem zweiten Graphen zu visualisieren.

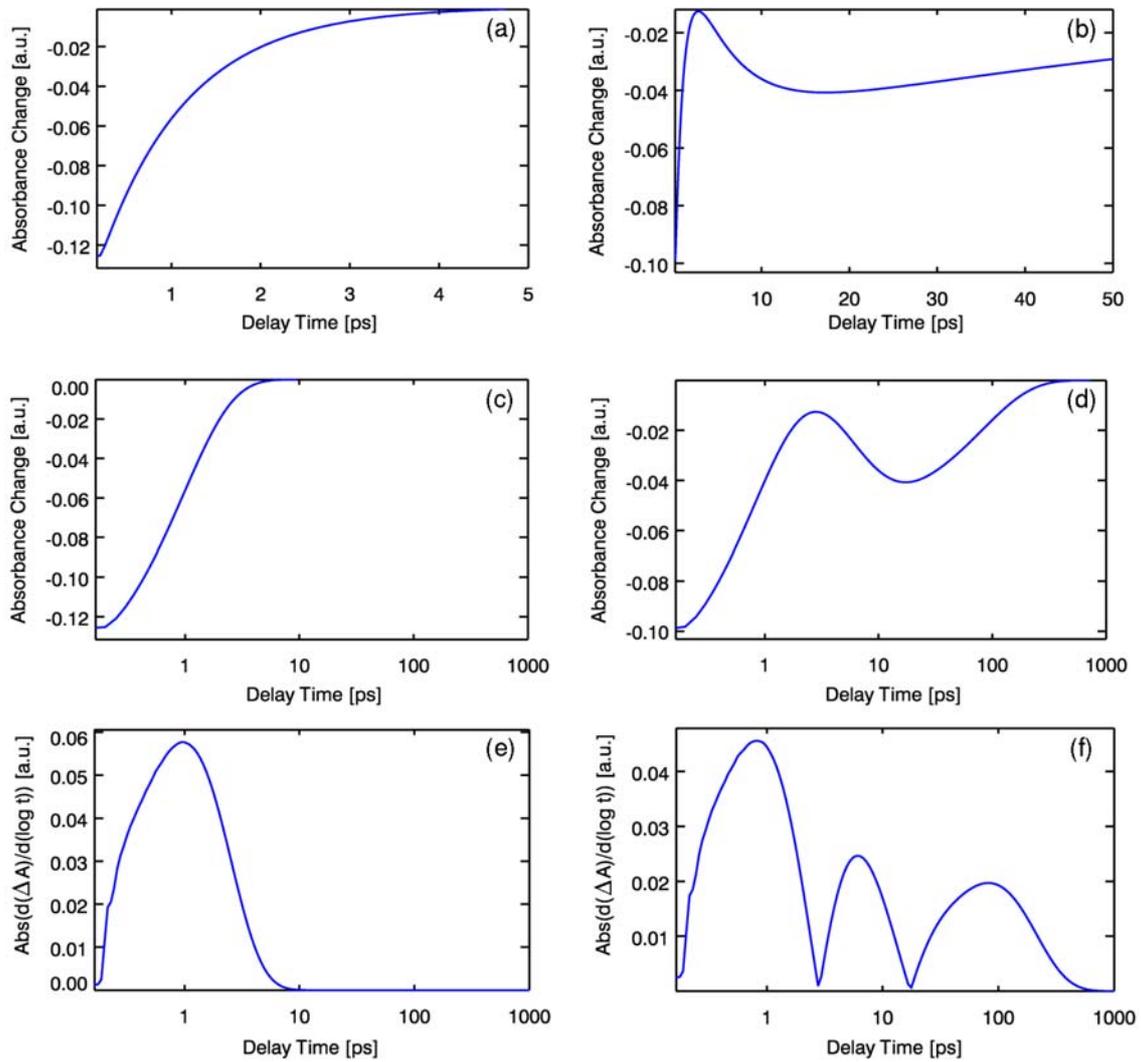
Die einzelnen Schritte werden im Folgenden erläutert und anhand von Beispielen erklärt. Dazu wurden zwei synthetische Datensätze generiert (zur Simulation siehe Kapitel 3.1, Seite 33). Beide Datensätze enthalten eine Kreuzkorrelationsbreite von 0.1 ps und eine Zeitkonstante von 1 ps, bzw. drei Zeitkonstanten von 1 ps, 5 ps und 80 ps, außerdem wurden ein bzw. drei Amplitudenspektren angenommen. Die resultierenden Datensätze, ohne Addition von Rauschen, sind als Zeitverläufe für die (synthetische) Abtast-Wellenlänge von 400 nm in Abb. 3.11 a und b dargestellt (für die kompletten Datensätze siehe Abb. 3.12a und b).

**Daten äquidistant auf logarithmische Zeitskala bringen (I).** Dies kann entweder direkt im Experiment geschehen oder der gemessene Datensatz wird hinterher entsprechend interpoliert. Bei der Interpolation muss jedoch beachtet werden, dass die Standardabweichung einzelner Datenpunkte eventuell extrem unterschiedlich sein kann (zum sog. „logarithmischen Mitteln“ siehe auch [MP91]). Wie man in Abb. 3.12a–d sieht, bringt bereits der Wechsel auf die logarithmische Zeitskala Vorteile: Prozesse, die auf unterschiedlichen Zeitskalen ablaufen, lassen sich mit einem Blick erfassen.

**Logarithmisches Differenzieren und eventuelles Glätten (II).** Die Methode basiert auf der Ableitung auf der logarithmischen Zeitskala — eine Prozedur, die in modifizierter und einfacherer Form bereits veröffentlicht wurde [Nag81].

Aus Gründen der Einfachheit erfolgt die Veranschaulichung zunächst an einem monoexponentiellen Zerfall als Prototyp diverser photochemischer Kinetiken:

$$f(t) = \alpha \cdot \exp(-t/\tau) \quad (3.85)$$



**Abbildung 3.11:** Zeitverläufe der synthetischen Datensätze aus Abb. 3.12. Gezeichnet sind Einzelkurven für die (synthetische) Abtastwellenlänge 400 nm. Beide Datensätze enthalten eine Kreuzkorrelationsbreite von 0.1 ps und eine Zeitkonstante von 1 ps (linke Spalte), bzw. drei Zeitkonstanten von 1 ps, 5 ps und 80 ps. (a) und (b) Zeitverläufe mit linearer Zeitachse, (c) und (d) mit logarithmischer Zeitachse: Prozesse, die auf unterschiedlichen Zeitskalen ablaufen, lassen sich hier in einem Bild zusammenfassen. (e) und (f) schließlich zeigen den Absolutwert der logarithmischen Ableitung. Man sieht Maxima bei 1 ps (e), bzw. bei 1 ps, 5 ps und 80 ps (f).

mit der Amplitude  $\alpha \in \mathbb{R}$  und der Zeitkonstante  $\tau > 0$ . Man beginnt mit dem Wechsel auf die logarithmische Zeitskala:  $f(t) \rightarrow f(z)$ ,  $z = \ln t \Rightarrow t = \exp(z)$  und erhält

$$f(z) = \alpha \cdot \exp(-\exp(z)/\tau) \quad \text{und} \quad \frac{df(z)}{dz} = -\frac{\alpha}{\tau} \cdot \exp(z - \exp(z)/\tau). \quad (3.86)$$

Auf der logarithmischen Zeitskala ist nun  $z = \ln \tau$  exakt der Punkt, wo die Krümmung von  $f(z)$  ihr Vorzeichen wechselt und  $|df/dz|$  ein Maximum besitzt (siehe Abb. 3.12e, f). Mit anderen Worten: Ein Maximum in der Zeitabhängigkeit des LDAC-Signals zur Zeit  $\tau$  weist auf einen kinetischen Prozess mit der Zeitkonstante  $\tau$  hin.

Im allgemeinen Fall verschiedener Zeitkonstanten ist eine klare Aufteilung kinetischer Prozesse mit ähnlichen Zeitkonstanten auf diese Weise nicht möglich, aber möglicherweise lassen sich Abweichungen von der idealen Form eines monoexponentiellen Prozesses erkennen, die auf multi-exponentielle oder nicht-exponentielle Dynamiken hinweisen.

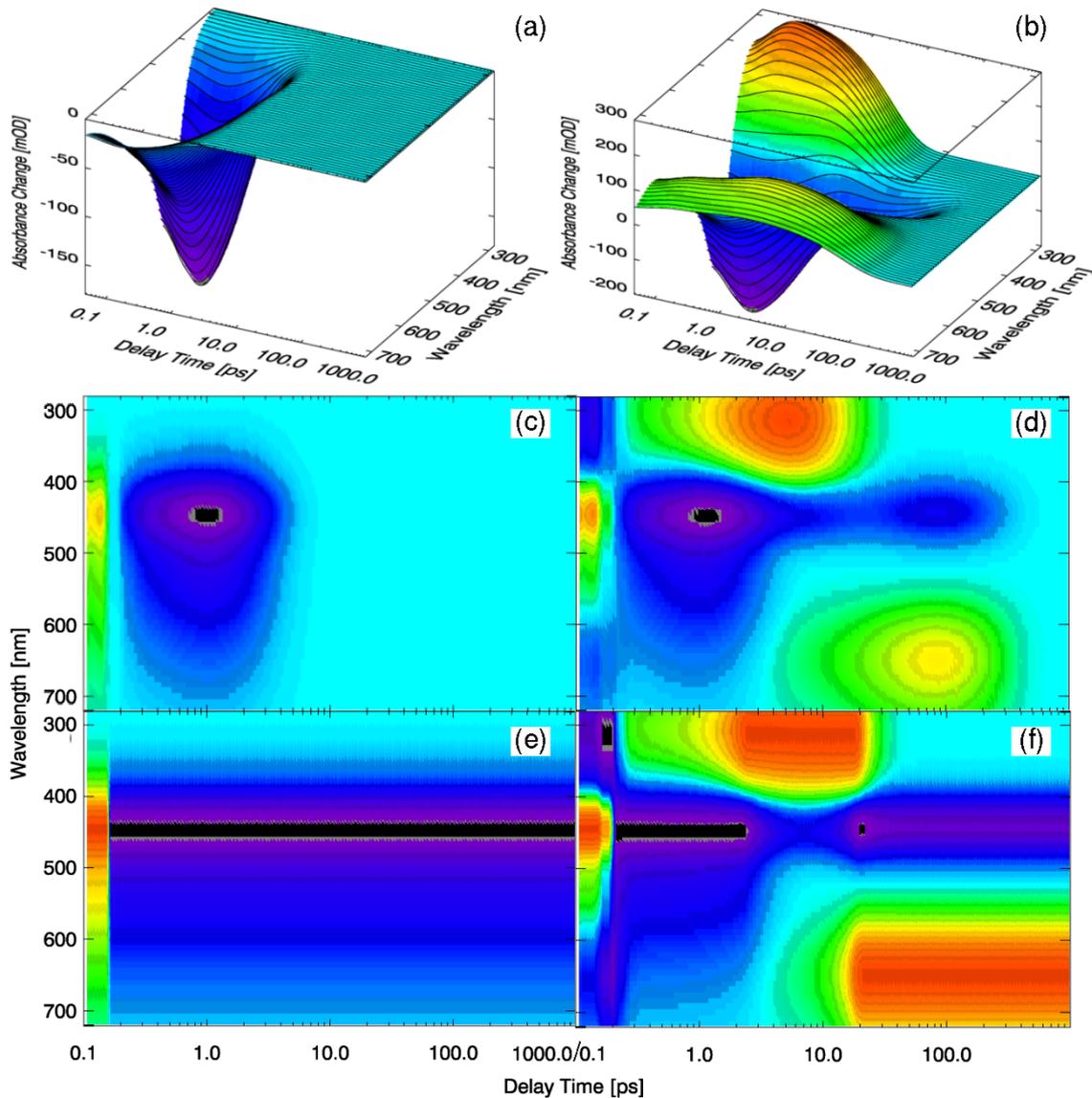
Zurück zur LDAC-Methode: auf der logarithmischen Zeitskala  $t_j \rightarrow \ln t_j =: z_j$  wird jetzt die (numerische) Ableitung bezüglich  $z$  gebildet und  $d\Delta A(\lambda, z)/dz$  in einer Falschfarben-Kodierung als zweidimensionaler Graph dargestellt. Es ist klar, dass das Bilden der Ableitung das Signal-zu-Rausch Verhältnis stark verschlechtert. Für die qualitative Datenanalyse kann dieses Problem jedoch durch ein geeignetes **Glätten der Daten** behoben werden. Hierbei sind mehrere Verfahren denkbar. Der Weg, der in dieser Arbeit gewählt wird, ist folgender: Man berechne die numerische Ableitung über den Differenzenquotienten  $(\Delta A(\lambda, z + \Delta z) - \Delta A(\lambda, z))/\Delta z$ . Da die Daten äquidistant auf der  $z$ -Achse verteilt sind, ist dieser Differenzenquotient proportional zur Differenz  $(\Delta A(\lambda, z_{i+1}) - \Delta A(\lambda, z_i))$ . Wird die Differenz jetzt für weiter voneinander entfernte Datenpunkte berechnet, also  $(\Delta A(\lambda, z_{i+n}) - \Delta A(\lambda, z_i))/(z_{i+n} - z_i)$  mit  $n > 1$ , so erhält man auf sehr einfache Art eine Glättung (in der Praxis hat sich  $n$  im Bereich 5–10 als gut brauchbar erwiesen). Dieses Verfahren der Glättung des LDAC-Signals ist anschaulich dargestellt in Abbildung 3.13.

Ist die zweidimensionale LDAC-Falschfarben-Darstellung erzeugt, ist eine weitere, einfach zu implementierende Option, **jedes Spektrum im Maximum auf eins zu normieren (III)**. Auf diese Art bleibt eine spektrale Signatur (mit einer bestimmten Zeitkonstante) solange sichtbar, wie sie die Absorptionsänderung der Probe dominiert. Abbildung 3.12 zeigt die Vorteile: Auf der linken Seite wurde ein Datensatz mit nur einer Zeitkonstante generiert — das LDAC-Signal zeigt eine spektrale Signatur, die sich über den gesamten Zeitbereich nicht ändert (die Signatur im Zeitbereich  $< 200$  fs rührt von der Apparatefunktion her, die ebenfalls sichtbar gemacht wird).

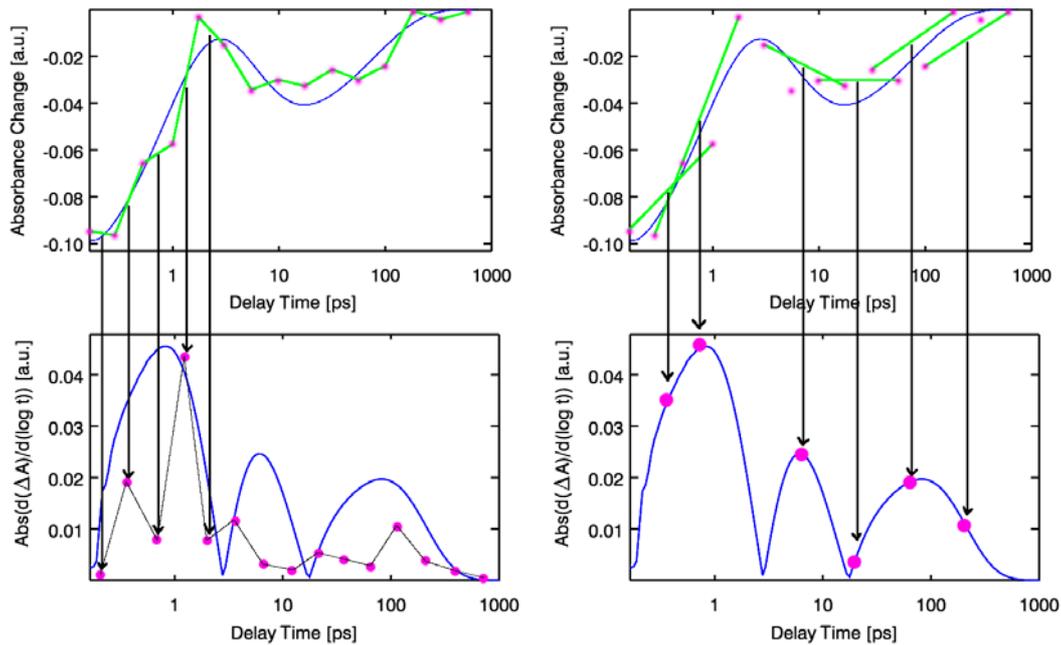
Durch Bildung des **spektralen Intergrals für jeden Zeitpunkt (IV)** erhält man einen qualitativen Eindruck über die relative Stärke der ablaufenden Prozesse. Bestimmt wird das spektrale Integral

$$I(z_j) := \int_{\{\lambda_i\}} \left| \frac{d}{dz} \Delta A(\lambda_i, z_j) \right| d\lambda. \quad (3.87)$$

Abbildung 3.15e zeigt einen auf diese Art gebildeten Graphen.



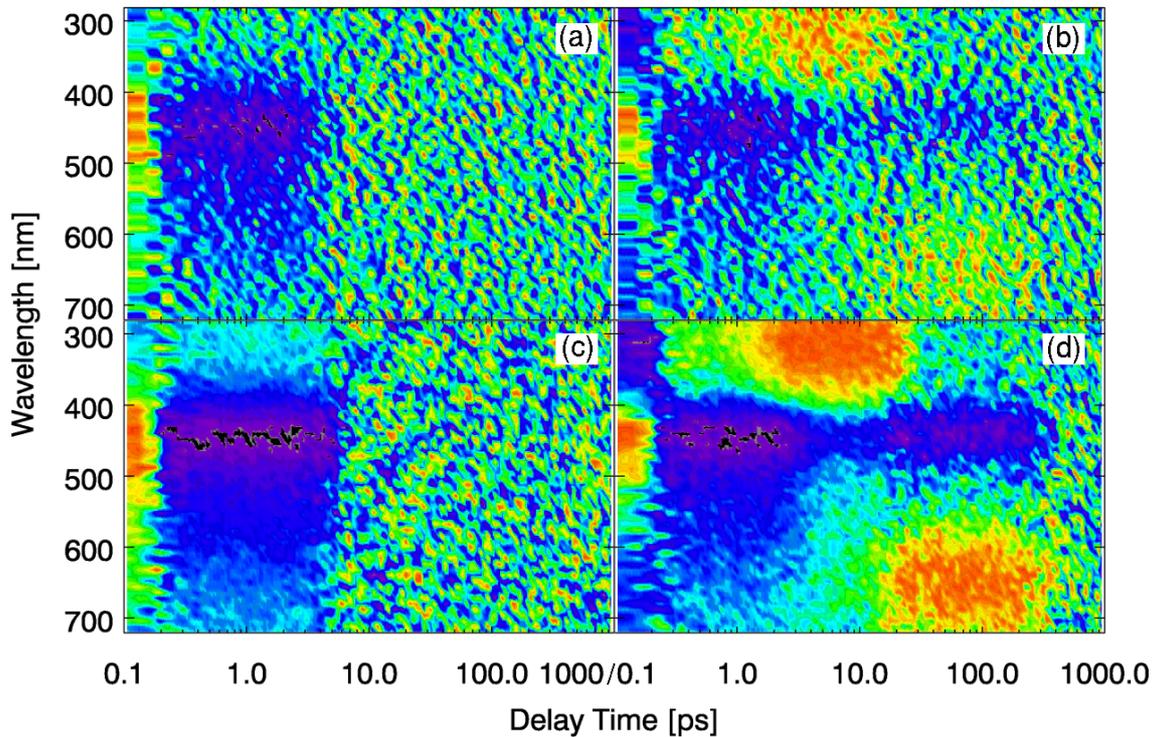
**Abbildung 3.12:** (a) und (b): 3d-Darstellungen der synthetischen Datensätze, an denen das Prinzip der LDAC-Methode erklärt wird. Für die Daten in (a) wurde eine Kreuzkorrelationsbreite von 0.1 ps und eine Zeitkonstante von 1 ps angenommen, für die Daten in (b) ebenfalls eine Kreuzkorrelationsbreite von 0.1 ps und eine schnelle Zeitkonstante von 1 ps, zusätzlich zwei weitere Zeitkonstanten von 5 ps und 80 ps. (c) und (d): Das LDAC-Signal von (a) bzw. (b). Maxima erscheinen an den Positionen der enthaltenen Zeitkonstanten. (e) und (f): Der Effekt der Normalisierung. Eine bestimmte spektrale Signatur bleibt konstant, solange sie die Absorptionsänderung dominiert.



**Abbildung 3.13:** Glätten des LDAC-Signals. In der oberen Reihe sind zweimal die Rohdaten des synthetischen Datensatzes mit drei Zeitkonstanten (1 ps, 5 ps und 80 ps) gezeichnet, jeweils mit logarithmischer Zeitachse. Wie im Text beschrieben ist die Ableitung bei äquidistanten Punkten proportional zur Differenz zweier Punkte. Links wird das Differenz-Signal zweier direkt aufeinanderfolgender Punkte gebildet ( $n = 1$ ) — bei verrauschten Rohdaten ist auch das LDAC-Signal sehr verrauscht. Deshalb wird auf der rechten Seite das LDAC-Signal für weiter voneinander entfernte Punkte berechnet ( $n = 3$ ). Es werden also nur noch mittlere Steigungen ermittelt, die weniger anfällig auf Rauschen sind ( $n = 5-10$  liefert gute Ergebnisse).

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, diese Technik der Visualisierung anzuwenden:

1. Die Analyse des spektral integrierten LDAC-Signals  $I(z)$  erlaubt die Bestimmung der dominanten kinetischen Komponenten (siehe Abb. 3.15 und die Beispiele im nächsten Abschnitt). Diese Information wird ergänzt durch das spektral aufgelöste LDAC-Signal.
2. Für spezielle Wellenlängen können die involvierten Zeitkonstanten noch detaillierter bestimmt werden (siehe Abb. 3.12e und f): Durch LDAC-Daten bei unterschiedlichen Wellenlängen können Prozesse evtl. getrennt werden und kinetische Komponenten mit kleiner Amplitude herausgearbeitet werden (diese können an isosbestischen Punkten starker Kinetiken sichtbar werden).
3. Durch Betrachtung der zweidimensionalen LDAC-Flaschfarben-Darstellung kann spektrales Verhalten sichtbar werden, das in einfachen Ratengleichungs-Modellen nicht enthalten ist, z. B. wenn spektrale Banden schieben (siehe Abb. 3.15).



**Abbildung 3.14:** LDAC-Signal verrauschter Daten, die eine bzw. drei Zeitkonstanten enthalten. Zu den synthetischen Daten aus Abb. 3.12a und b wurde 1.5% Rauschen addiert. (a) und (b) LDAC-Signal berechnet mit direkt aufeinanderfolgenden Verzögerungszeitpunkten ( $n = 1$ ). (c) und (d) geglättetes LDAC-Signal mit  $n = 10$ , wie im Text beschrieben.

## Anwendung (I) — Die zwei Beispieldatensätze

Dieser Abschnitt fasst die exemplarische Auswertung mit Hilfe der LDAC-Methode an Hand der zwei Beispiele aus Abb. 3.12 zusammen. Ausgangspunkt sind wieder die beiden synthetischen Datensätze mit einer bzw. drei Zeitkonstanten (0.1 ps Kreuzkorrelation und  $\tau = 1$  ps, bzw.  $\tau_1 = 1$  ps,  $\tau_2 = 5$  ps und  $\tau_3 = 80$  ps). Abb. 3.11a und b enthält zwei ausgewählte Zeitverläufe der beiden synthetischen Datensätze, dargestellt mit linearer Zeitachse. Die Abbildungen 3.11c und d zeigen dieselben Daten nach dem Wechsel auf die logarithmische Zeitachse — sie ist besser angepasst, um multi-exponentielle Zerfallsmuster darzustellen. In Abb. 3.11e und f schließlich sieht man den Absolutwert der logarithmischen Ableitung (LDAC-Signal) der jeweiligen Kurve. Wie aus Gl. (3.86) ersichtlich ist, gibt die Lage der Maxima dieses Graphen die Werte der enthaltenen Zeitkonstanten an.

Abbildung 3.12 fasst in der linken bzw. rechten Spalte die beiden kompletten Datensätze mit dem jeweiligen LDAC-Signal zusammen. Dieses ist als Falschfarbenbild in zwei Darstellungen zu sehen: Abb. 3.12c und d zeigen das einfache LDAC-Signal — ein Maximum oder Minimum zu einer bestimmten Verzögerungszeit zeigt eine Zeitkonstante

mit diesem Wert an. Um 0.1 ps zeigt sich der Effekt der Apparatefunktion mit einer spektralen Signatur. Im Falle einer Zeitkonstante taucht nur eine weitere spektrale Signatur im Zeitbereich um 1 ps herum auf und deutet somit auf eine Zeitkonstante von ca. 1 ps hin (Abb. 3.12c). Diese beiden Signaturen (Apparatefunktion und schnelle Zeitkonstante) sind auch rechts im Falle von drei Zeitkonstanten sichtbar, aber hier erscheinen zwei weitere spektrale Signaturen bei ca. 5 ps und ca. 100 ps (Abb. 3.12d). Abbildung 3.12e und f zeigen den Vorteil der Normierung. Für diese beiden Bilder wurden die LDAC-Spektren zu jedem Verzögerungszeitpunkt im Maximum auf eins normiert. Jetzt zeigt ein Prozess eine eindeutige spektrale Signatur die sich nicht ändert, solange er die Absorptionsänderung der Probe dominiert.

Abbildung 3.14 veranschaulicht den Einfluss von Rauschen und die Möglichkeiten der Glättung des LDAC-Signals. Zu den Datensätzen wurde in beiden Fällen 1.5% zufälliges Rauschen addiert (zur Erzeugung des Rauschens siehe Kapitel 3.1, Seite 35). Wiederum sieht man in der linken Spalte den Datensatz mit einer Zeitkonstante und in der rechten Spalte den Datensatz mit drei Zeitkonstanten. Abb. 3.14a und b enthalten das einfache LDAC-Signal (mit  $n = 1$  berechnet) der verrauschten Datensätze. Für Abb. 3.14c und d wurde jeweils die mittlere Steigung zwischen Datenpunkten berechnet, die zehn Intervalle auseinanderliegen ( $n = 10$ , vgl. Abb. 3.13). Speziell in (d) sieht man deutlich, dass damit auch schwächere Prozesse wieder sichtbar gemacht werden können, die sonst im Rauschen untergehen würden.

#### Anwendung (II) — Dynamischer Stokes Shift

Ein Vorteil der LDAC-Methode ist, dass kein spezielles Modell zugrunde gelegt werden muss<sup>1</sup>, in den Rohdaten enthaltene spektrale Signaturen werden auf einfache Weise sichtbar gemacht. Dies soll hier am Beispiel des dynamischen Stokes Shift vorgeführt werden. Dazu wurde (mit den Parametern aus Abb. 3.1, Seite 34) ein synthetischer Datensatz erzeugt. Dieser enthält zwei exponentielle Kinetiken mit  $\tau_1 = 2$  ps und  $\tau_2 = 30$  ps sowie einen dynamischen Stokes Shift um 50 nm mit einer zugeordneten Zeitkonstanten  $\tau_{\text{Stokes}} = 0.5$  ps (für eine Übersicht über die Daten siehe Abb. 3.15a). Bei einem Blick von oben auf die Rohdaten sollte die spektrale Verschiebung einer Absorptionsbande sichtbar werden (Abb. 3.15b). Obwohl die Rohdaten auf einer rein logarithmischen Zeitskala eingezeichnet sind, ist die Verschiebung jedoch praktisch nicht erkennbar.

Nun berechnet man von diesem Datensatz das auf eins normierte LDAC-Signal (Abb. 3.15c). Im normierten LDAC-Signal ist eine bestimmte spektrale Signatur sichtbar, solange sie die transiente Absorption dominiert. Im Zeitbereich ab 10 ps sieht man deshalb nur noch die Signatur der 30 ps-Zeitkonstante. Im Zeitbereich 3–7 ps sieht man die Signatur der 2 ps-Zeitkonstante und im Zeitbereich  $<2$  ps sieht man jetzt deutlich die Signatur einer spektralen Verschiebung von ca. 400 nm (bei 0.1 ps) auf ca. 450 nm (bei 2 ps — siehe dazu auch Abb. 3.15d, dort wurde nur der zeitliche Verlauf des Maximums/Minimums des

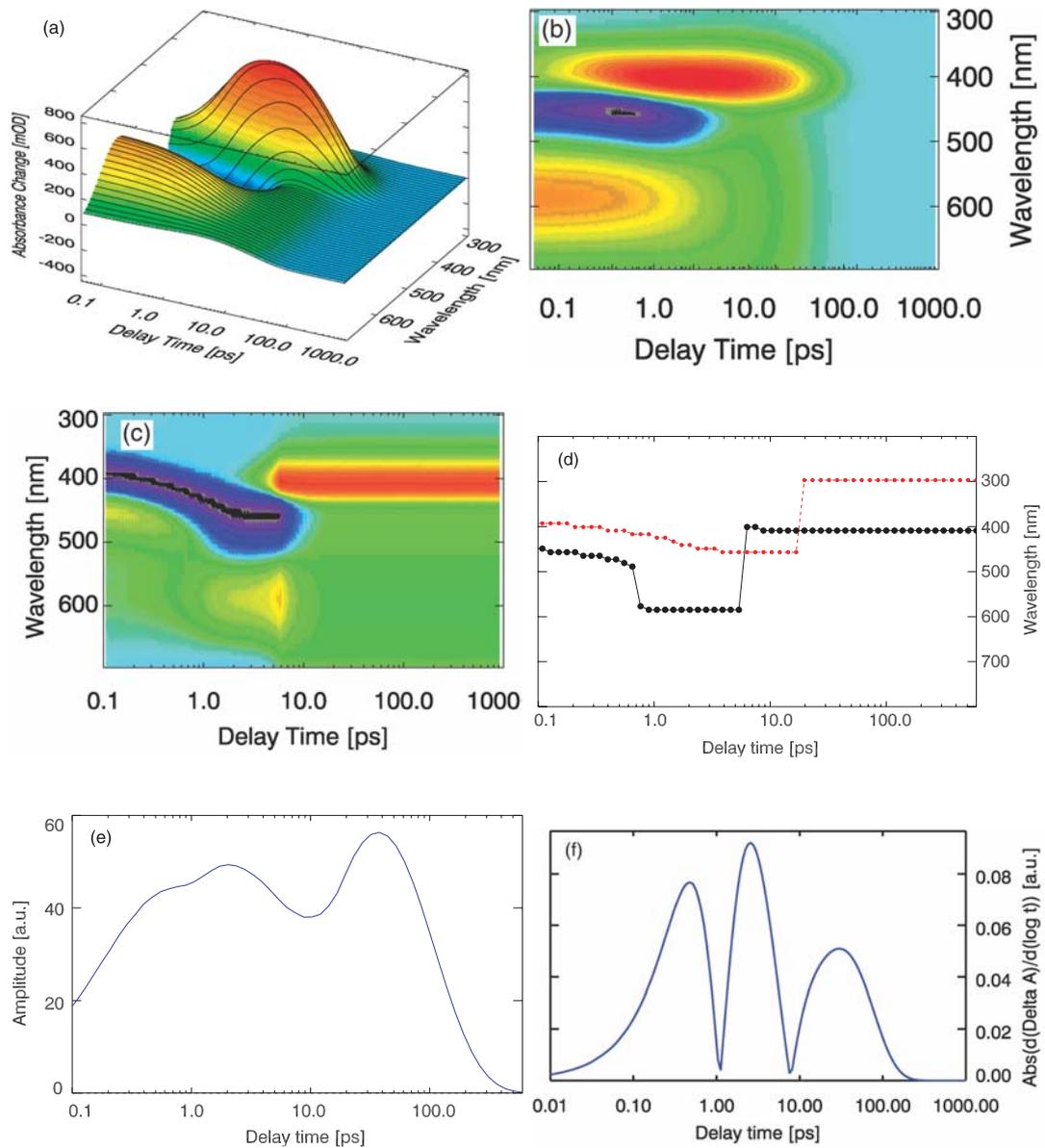
---

<sup>1</sup>Ein globaler Fit mit exponentiellen Zeitkonstanten liefert strenggenommen nur dann interpretierbare Ergebnisse, wenn die im Molekül ablaufenden dynamischen Prozesse sich mit einem Ratenmodell beschreiben lassen.

LDAC-Signals eingezeichnet). Einen Anhaltspunkt auf die Zeitkonstante des Stokes Shift gibt das spektrale Integral  $I(z)$  (Abb. 3.15e): der Stokes-Shift zeigt sich hier in der linken Schulter der 2 ps-Zeitkonstanten. Im spektralen Integral sieht man, welche dynamischen Prozesse die transiente Absorption dominieren. In diesem Fall wird demnach das spektrale Verhalten durch die 30 ps-Zeitkonstante dominiert, deren Wert aus dem Graphen in Abb. 3.15e auch eindeutig abgelesen werden kann. Die 2 ps-Zeitkonstante sieht man noch als schwaches Maximum, während die 0.5 ps-Zeitkonstante für den Stokes-Shift nicht mehr sicher extrahiert werden kann. Wären die Daten verrauscht, könnte man nur noch die 30 ps-Zeitkonstante ablesen, allerdings hätte man aufgrund der Breite von  $I(z)$  im Bereich  $<5$  ps einen Hinweis darauf, dass sich zwei Zeitkonstanten darin verbergen.

Wie oben erwähnt, kann es in diesem Fall hilfreich sein, das LDAC-Signal für einzelne Wellenlängen zu berechnen. Dies wurde in Abb. 3.15f bei 505 nm durchgeführt. Hier sieht man nun deutlich getrennt drei Maxima, aus deren Lage man die drei Zeitkonstanten mit Werten von 0.5 ps, 2 ps und 30 ps eindeutig ablesen kann.

### 3 Methoden



**Abbildung 3.15:** Simulierter Datensatz mit dynamischem Stokes-Shift um 50 nm mit einer zugeordneten Zeitkonstante von  $\tau_{\text{Stokes}} = 0.5$  ps. Außerdem enthalten die Daten zwei Kinetiken mit Zeitkonstanten von 2 ps und 30 ps. (a) 3d-Darstellung des Datensatzes. (b) Blick von oben auf die Daten. (c) Normiertes LDAC-Signal. (d) Verlauf des Minimums/Maximums des normierten LDAC-Signals. (e) Das spektrale Integral  $I(z)$ . (f) LDAC-Signal für die (synthetische) Abtastwellenlänge 505 nm.

## 4 Der Photoschalter Azobenzol

Die Untersuchungen in diesem Kapitel dienen einem genaueren Verständnis der Photochemie des Schaltermoleküls Azobenzol, das in Kapitel 5 zur gezielten Auslösung von Konformationsänderungen in einem Modellpeptid dient. Dabei wird eine besondere Eigenschaft von Azobenzol ausgenutzt: die photochemisch reversible Schaltbarkeit zwischen zwei Isomeren (*cis*- und *trans*-Form), die sich um einen Faktor zwei in der Länge unterscheiden. In den sogenannten Azoeptiden werden so gezielte Konformationsänderungen ausgelöst, deren Auswirkungen dann spektroskopisch untersucht werden können.

Azobenzol ist ein sehr prominentes Molekül, das inzwischen in viele technische Anwendungen Einzug gehalten hat. Beispielsweise in der Display-Technik (Stichwort „azobenzene polymer-stabilized liquid crystals“, siehe z. B. [Zha03]) wird ein Polymer zusammen mit Azobenzol dazu verwendet, die für eine Display-Anwendung benötigte langreichweitige Ordnung im Flüssigkristall herzustellen. Das hat den Vorteil, dass der Produktionsschritt des mechanischen Einprägens zur Flüssigkristall-Orientierung entfallen kann. Eine weitere Anwendung ist, Azobenzol in ein Elastomer einzubauen und durch die Kombination mechanischer und optischer Effekte optische Gitter auszubilden [Zha03, PMMK03]. Schließlich wurde gezeigt, dass man Azobenzol in einen Polymer-Flüssigkristall (PLC) einbauen und einen derartigen PLC-Film zur holographischen Datenspeicherung benutzen kann [IT95, IYYH03].

Für die Untersuchung der initialen Konformationsänderungen in Peptiden ist folgende Beobachtung festzuhalten: Im sichtbaren Spektralbereich zeigen Peptide keine Absorptionsbanden, für die transiente Absorptionsspektroskopie zugänglich sind nur die Absorptionsbanden des Schaltermoleküls Azobenzol. Die Beobachtung der Faltungsdynamik der Azopeptide mit Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich ist somit nur indirekt über die Beobachtung der Dynamik des Azobenzols möglich. Dabei vergleicht man die Reaktionsdynamik des freien Azobenzols in Lösung mit der Reaktionsdynamik von Azobenzol, das in einen Peptidverbund eingebaut wurde. Dies setzt ein genaues Verständnis der Dynamik des Schaltermoleküls voraus.

Der Isomerisierungsmechanismus und die genaue Photochemie von Azobenzol sind noch immer Gegenstand aktueller Forschung und sollen in diesem Kapitel tiefergehend untersucht werden. Die Gliederung dieses Kapitels ist dabei wie folgt:

- Nach einer Vorstellung des Moleküls (Abschnitt 4.1) folgt eine Einführung in die Diskussion des **Isomerisierungs-Mechanismus** (Abschnitt 4.2).
- Der nächste Abschnitt fasst die Ergebnisse der Untersuchungen mittels **transienter Absorptionsspektroskopie** zusammen, die an Azobenzol durchgeführt wurden.

Das Molekül wurde dabei in den Lösungsmitteln DMSO und Ethanol gelöst und die Isomerisierung in beide Richtungen (*cis*→*trans* und *trans*→*cis*) und für beide möglichen Anregungen gemessen (Anregung in die  $n\pi^*$ -Bande ebenso wie Anregung in die  $\pi\pi^*$ -Bande, Abschnitt 4.3).

- Um zusätzliche Informationen zu erhalten, wurden an Azobenzol in DMSO stationäre **Emissionsspektren** für beide Isomerisierungs-Richtungen nach Anregung in die  $n\pi^*$ -Bande aufgenommen (Abschnitt 4.4).
- Die Kombination dieser Experimente gibt eine Reihe neuer Erkenntnisse für die Photochemie von Azobenzol, deren **Diskussion** dieses Kapitel abschliessen (beginnend mit Abschnitt 4.5).

### 4.1 Grundlegende Eigenschaften

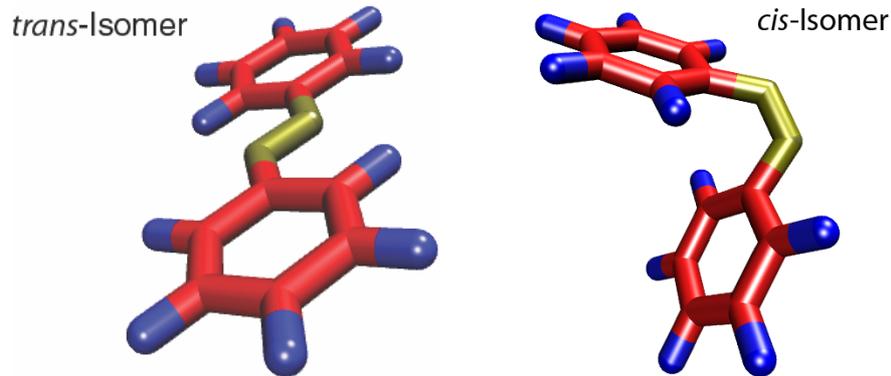
Die erstmalige Herstellung von Azobenzol (Diphenyl-Diazen,  $(C_6H_5)_2N_2$ , Masse 182.22 g/Mol) erfolgte 1832 [FR95]. Dass Azobenzol in zwei verschiedenen Isomeren auftritt, konnte erst 1937 durch Hartley nachgewiesen werden. Es war die Beobachtung, dass die Absorption einer Azobenzol-Lösung mit der Einstrahlung von Sonnenlicht zunahm. Er schreibt dazu [Har37]:

„The increases reached steady values after several days' exposure in a thermostat tank in a north-lit room [...], but was reached much more rapidly in bright sunlight — a few minutes sufficing for a M/2000 solution in a glass bottle.“

Hartley konnte zeigen, dass es sich um das *cis*-Isomer handelt und dass das (durch die Einstrahlung von Licht gebildete) photostationäre Gleichgewicht einer Azobenzol-Lösung ca. 27% *cis*-Anteil enthält [Har37].

In Abbildung 4.1 ist die räumliche Struktur der beiden Isomere des Azobenzols dargestellt. In der Literatur herrscht keine vollständige Einigkeit über die exakte Struktur der beiden Isomere. Die *trans*-Form ist entweder planar mit  $C_{2h}$ -Symmetrie [Rau73] oder leicht verdrillt mit  $C_i$ -Symmetrie, d. h. die Phenylringe sind um jeweils  $30^\circ$  aus der N=N-C-Ebene herausgedreht [THH77]. In modernen quantenchemischen Rechnungen wird meist die planare Form verwendet [CP99]. Im *cis*-Isomer steht ein Phenylring um  $53.3^\circ$  aus der N=N-C-Ebene heraus. Die Symmetrie ist entweder  $C_{2v}$  [Rau73] oder  $C_2$  [BU97] (Cattaneo und Persico rechnen mit der  $C_2$ -Symmetrie [CP99]). Der End-zu-End Abstand der beiden Phenylringe beträgt  $9.0 \text{ \AA}$  für das *trans*-Isomer und  $5.5 \text{ \AA}$  für das *cis*-Isomer.

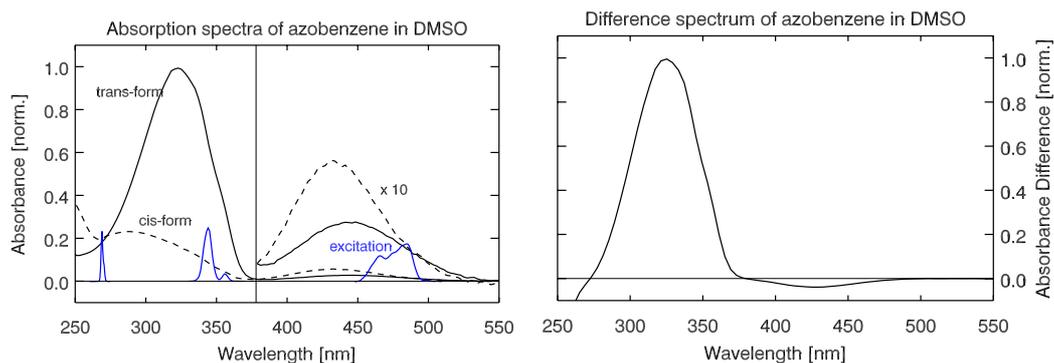
Das Absorptionsspektrum von Azobenzol in DMSO ist in Abbildung 4.2 dargestellt, Tabelle 4.1 enthält die Daten in kompakter Form: Als durchgezogene Linie ist das Spektrum des *trans*-Isomers mit Maxima bei 320 nm ( $\pi\pi^*$ -Bande) und 435 nm ( $n\pi^*$ -Bande) eingezeichnet, gestrichelt das Spektrum des *cis*-Isomers mit Maxima bei 290 nm ( $\pi\pi^*$ -Bande) und 435 nm ( $n\pi^*$ -Bande). Der rechte Teil der Abbildung 4.2 zeigt das Differenzspektrum. Daraus ist ersichtlich, dass (leicht abhängig vom Lösungsmittel) mit Licht bei



**Abbildung 4.1:** Räumliche Struktur von *trans*- (links) und *cis*-Azobenzol (rechts). Das *trans*-Isomer ist planar mit  $C_{2h}$ -Symmetrie [Rau73]. Im *cis*-Isomer steht ein Phenylring um  $53.3^\circ$  aus der N=N-C-Ebene heraus. Die Symmetrie ist entweder  $C_{2v}$  [Rau73] oder  $C_2$  [BU97]. Mit 320 nm bzw. 430 nm (abhängig vom Lösungsmittel) kann reversibel zwischen den beiden Isomeren geschaltet werden, damit einher geht eine Längenänderung von  $9.0 \text{ \AA}$  (*trans*) auf  $5.5 \text{ \AA}$  (*cis*).

Absorptionsdaten von Azobenzol						
Isomer	$n\pi^*$ -Bande			$\pi\pi^*$ -Bande		
	$\lambda_{\max}$ [nm]	FWHM [nm]	$\epsilon$ [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]	$\lambda_{\max}$ [nm]	FWHM [nm]	$\epsilon$ [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]
<i>trans</i>	320	54	23000	435	86	400
<i>cis</i>	290	100	5000	435	74	1250

**Tabelle 4.1:** Absorptionsdaten von Azobenzol.



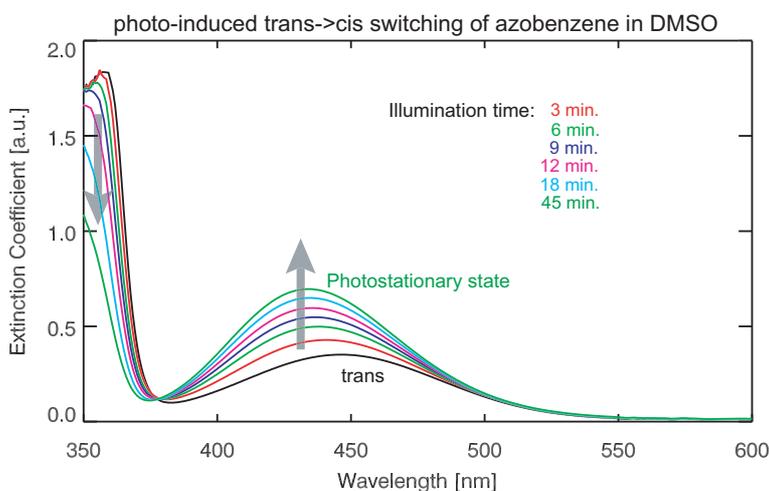
**Abbildung 4.2:** Stationäre Spektren von Azobenzol in DMSO. Links: Absorptionsspektrum. Als durchgezogene Linie ist das Spektrum des *trans*-Isomers gezeichnet mit Maxima bei 320 nm ( $\pi\pi^*$ -Bande) und 435 nm ( $n\pi^*$ -Bande), gestrichelt das Spektrum des *cis*-Isomers mit Maxima bei 290 nm ( $\pi\pi^*$ -Bande) und 435 nm ( $n\pi^*$ -Bande). Zusätzlich eingezeichnet sind drei typische Spektren der Anregungs-Lichtimpulse mit Zentralwellenlänge bei 266 nm, 340 nm und 480 nm. Rechts: Differenzspektrum (*trans* minus *cis*) Azobenzol in DMSO.

320 nm bzw. 430 nm reversibel zwischen den beiden Isomeren hin- und hergeschaltet werden kann.

Der Weg von reinem *trans*-Azobenzol zum photostationären Gleichgewicht mit ca. 80% *cis*-Anteil ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Dazu wurde eine Azobenzol-Lösung konstant mit Licht bestrahlt (durch geeignete Filter auf den Spektralbereich 305–360 nm eingeschränkt) und in regelmäßigen Abständen Absorptionsspektren aufgenommen. Nach ca. 45 Minuten konnte kein weiteres Anwachsen der  $n\pi^*$ -Bande bei 435 nm mehr beobachtet werden und die Belichtung wurde beendet<sup>1</sup>.

Der *trans*-Zustand liegt energetisch tiefer, deshalb kann *trans*-Azobenzol auch thermisch erhalten werden<sup>2</sup>. Hartley hat bereits 1938 umfangreiche Untersuchungen zur thermischen *cis* → *trans* Reaktion durchgeführt und tabelliert. Die Werte schwanken extrem zwischen 0.29 min in CCl<sub>4</sub> bei 76.6 °C und 860 h in einem H<sub>2</sub>O-NaOH-Gemisch bei 25 °C [Har38].

Aus Tabelle 4.2 ist ersichtlich, dass bei Beleuchtung in der  $n\pi^*$ -Bande die Isomerisierungs-Quantenausbeute für die *trans*→*cis*-Reaktion je nach Lösungsmittel ca. 0.3, für die *cis*→*trans*-Reaktion ca. 0.5 beträgt. Durch entsprechende Präparation des Ausgangs-Ensembles (reine *trans*-Form oder Photostationäres *cis*-Gemisch) können also mit nur einer Anregungswellenlänge beide Isomerisierungs-Reaktionen spektroskopisch untersucht werden. Dies wurde in sämtlichen hier vorgestellten Experimenten ausgenutzt.



**Abbildung 4.3:** Zeitliche Entwicklung des Absorptionsspektrums von Azobenzol in DMSO bei Belichtung mit einer Hg(Xe)-Lampe. Durch je 2 mm Dicke UG11- und WG305-Filter (Fa. Schott) wird nur der Bereich 305–360 nm des Hg-Spektrums ausgewählt. Die Rückreaktion erfolgt thermisch mit einer Zeitkonstanten von mehreren Stunden.

<sup>1</sup>Zur Präparation des photostationären Zustands wurde diese Prozedur vor allen Experimenten durchgeführt.

<sup>2</sup>In allen Experimenten an *trans*-Azobenzol wurde stets lichtgeschützt eine frische Lösung angesetzt und die Messungen im abgedunkelten Labor durchgeführt um eine unnötige Belichtung der Probe zu verhindern.

## 4.2 Isomerisierungsmechanismus

Eine vielbeachtete Frage und grundlegende Motivation für viele Untersuchungen an Azobenzol ist die Aufklärung des Isomerisierungsmechanismus. Von Interesse sind dabei drei Aspekte:

1. Welche geometrischen Änderungen durchläuft das Molekül bei der Isomerisierung?
2. Ist diese Bewegung bei Anregung in der  $\pi\pi^*$ -Bande die gleiche wie bei Anregung in der  $n\pi^*$ -Bande?
3. Wie erklärt sich der beobachtete Rückgang der Isomerisierungs-Quantenausbeute um den Faktor zwei bei  $\pi\pi^*$ -Anregung im Vergleich zu  $n\pi^*$ -Anregung?

Im Lauf der Zeit sind zwei verschiedene Isomerisierungs-Mechanismen vorgeschlagen worden. Im Jahre 1966 wurde von Curtin et al. der sog. „lateral shift mechanism“ eingeführt [CGM66], der heute als **Inversions-Bewegung** bezeichnet wird [Rau90]. Dabei wird ein Phenylring um den durch N=N-C definierten Winkel „in der Ebene“ bewegt, bis schließlich die Geometrie des *cis*-Isomers erreicht wird.

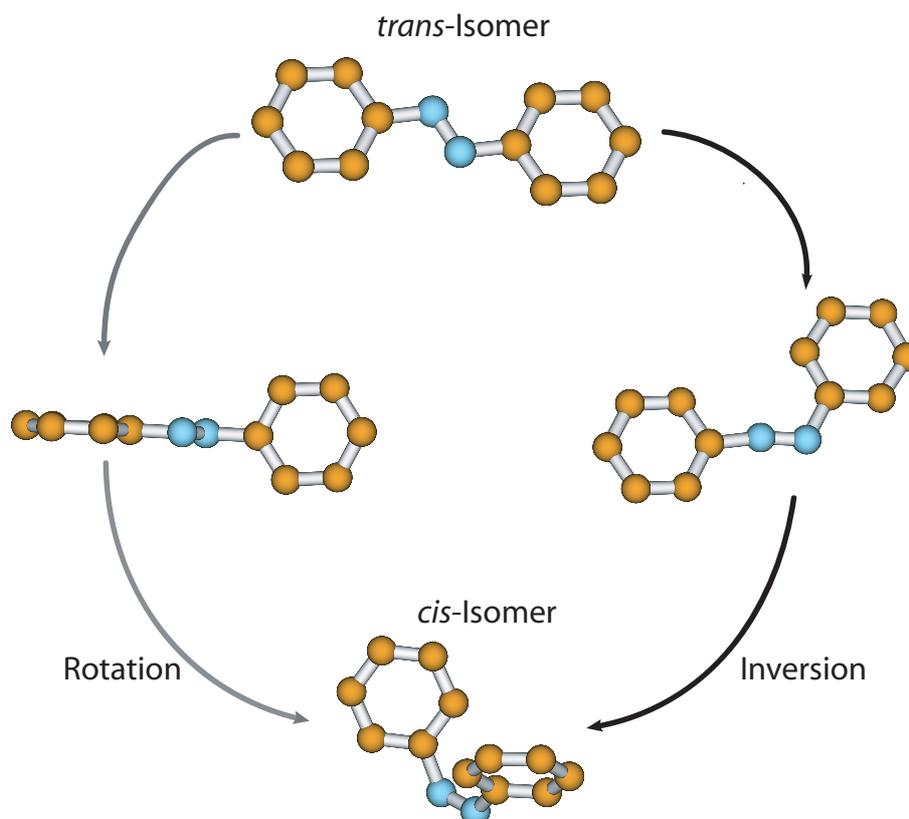
Einen alternativen Isomerisierungs-Mechanismus bietet die **Rotations-Bewegung**. Dabei rotiert einer der Phenylringe um den durch C-N=N-C definierten Torsionswinkel durch das Lösungsmittel [Rau90]. Die beiden Bewegungsformen sind in Abbildung 4.4 schematisch dargestellt.

Zur Aufklärung des Isomerisierungs-Mechanismus haben Rau et al. Experimente an einem Azobenzol-Derivat durchgeführt [RL82, Rau84, RS88]. Dabei wurde Azobenzol durch einen Kronenäther verbrückt und dadurch die Rotations-Bewegung verhindert. In ihren Experimenten konnten sie nachweisen, dass diese Moleküle zum einen auch isomerisieren können und dass zum anderen die Isomerisierungs-Quantenausbeuten für  $n\pi^*$ - und  $\pi\pi^*$ -Anregung gleich sind und außerdem gleich groß wie für freies Azobenzol. Aufgrund dieser Experimente wird die Isomerisierung von Azobenzol nach  $n\pi^*$ -Anregung durch die Inversions-Bewegung erklärt<sup>1</sup>.

Der Isomerisierungs-Mechanismus nach  $\pi\pi^*$ -Anregung muss zusätzlich das Phänomen der um den Faktor zwei reduzierten Quantenausbeute klären (vgl. Tabelle 4.2). Zur Zeit werden dafür drei verschiedene Modelle diskutiert (hier am Beispiel der *trans*→*cis*-Reaktion vorgestellt):

- **Modell 1:** Hierbei handelt es sich um das älteste Modell des ( $\pi\pi^*$ ) Isomerisierungs-Mechanismus, das auch meist in der Literatur als Ausgangspunkt einer Diskussion dient. Es fordert eine direkte Isomerisierung auf der  $S_2$ -Potentialfläche über die Rotations-Bewegung [Rau90, Rau84]. Der (im Vergleich zu  $n\pi^*$ -Anregung) neue Isomerisierungs-Mechanismus dient dabei als Erklärung für die geänderte Isomerisierungs-Quantenausbeute. Nach  $\pi\pi^*$ -Anregung durchläuft dabei der eine Teil der

<sup>1</sup>Die thermische Isomerisierung geschieht ebenfalls über eine Inversions-Bewegung [Rau90].



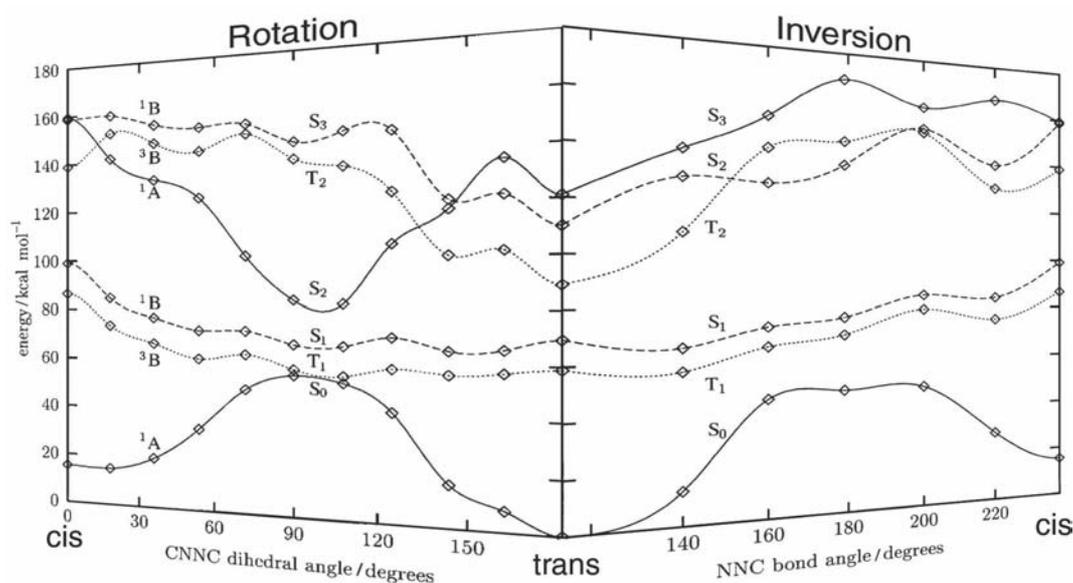
**Abbildung 4.4:** Isomerisierungsmechanismus von Azobenzol: Inversion und Rotation.

Moleküle die Isomerisierung über die Inversions-Bewegung (Quantenausbeute  $\Phi_I$ ), der andere Teil jedoch folgt der Rotations-Bewegung (Quantenausbeute  $\Phi_R < \Phi_I$ ). Das Aufteilungsverhältnis zusammen mit den unterschiedlichen (Einzel-) Quantenausbeuten der beiden Bewegungsformen erklären dann den gefundenen Unterschied der (totalen) Isomerisierungs-Quantenausbeute.

- Modell 2:** Ein sequentieller Prozess, bei dem im ersten Schritt das Molekül nach  $S_2$ -Anregung zuerst in den  $S_1$ -Zustand relaxiert und dort die eigentliche Isomerisierung über den bekannten Inversions-Mechanismus startet [LYHM96, LYM<sup>+</sup>98, FT00, FAT01, FAT02]. In diesem Modell muss eine zusätzliche Erklärung für den beobachteten Rückgang der Isomerisierungs-Quantenausbeute gegeben werden. Ein Teil der Moleküle soll dabei zu Anfang eine Rotations-Bewegung ausführen, kann die Isomerisierung jedoch nicht abschliessen, weil zuviel Energie benötigt würde, um den Phenylring komplett durch das Lösungsmittel bis in die *cis*-Form hindurch zu bewegen („rotational deactivation“). Dieser Teil der Moleküle kehrt damit komplett ohne zu isomerisieren in den *trans*-Ausgangszustand zurück und führt zum beobachteten Rückgang der Isomerisierungs-Quantenausbeute.

- Modell 3:** Dieser jüngste Ansatz fordert eine „gemischte Population.“ Durch die UV-Anregung wird nicht nur der  $S_2$ -Zustand besetzt, sondern auch die Zustände  $S_3$  und  $S_4$ , die nahezu isoenergetisch zum  $S_2$ -Zustand liegen [CP99]. Der Teil der Population in den Zuständen  $S_{3,4}$  geht dabei ohne zu isomerisieren zurück in den Grundzustand und reduziert dadurch die Isomerisierungs-Quantenausbeute, während der Teil der Population, die den  $S_2$ -Zustand besetzt, den sequentiellen Pfad ( $S_2 \rightarrow S_1$  und danach  $S_1 \rightarrow S_0$ ) aus Modell 2 geht, ohne jedoch den zusätzlichen Kanal der „rotational deactivation“ zu benötigen [SQL<sup>+</sup>03].

Bislang ist es weder durch geeignete Experimente noch durch theoretische Berechnungen möglich gewesen, die Rotations-Bewegung zu beweisen oder zu widerlegen. Quantenchemische Rechnungen zu Azobenzol und zum Isomerisierungs-Mechanismus finden sich u. a. in [MOP82, CP99, INS01, IKSI03, Dia04]. Abbildung 4.5 zeigt Ergebnisse von Rechnungen, die Cattaneo und Persico durchgeführt haben [CP99]. Die für die Diskussion verwendeten Potentialflächenbilder (Abb. 4.14 und 4.15) basieren auf Rechnungen von Monti et al. [MOP82]. Die theoretischen Rechnungen haben meist das zusätzliche Problem, dass die ermittelten Energien nicht besonders gut mit den experimentell gefundenen Werten übereinstimmen (siehe dazu Abbildung 4.13, Seite 93).



**Abbildung 4.5:** Isomerisierungsmechanismus: Berechnete Potentialflächen für Inversion und Rotation. Das Bild basiert auf zwei Diagrammen, die [CP99] entnommen wurden.

Eine Klärung des Isomerisierungs-Mechanismus ist bis jetzt noch nicht erreicht. Die für diese Arbeit an Azobenzol durchgeführten Experimente zur transienten Absorption und stationären Fluoreszenz sind leider (auch) nicht in der Lage, eine Antwort auf diese Fragen zu geben. Der Vergleich der transienten Absorptions-Daten nach  $n\pi^*$ - und  $\pi\pi^*$ -Anregung in Abschnitt 4.7.3 versucht dennoch einen neuen Beitrag für die weitere Diskussion zu geben.

Lösungs- mittel	Isomerisierungs-Quantenausbeuten				Quelle
	$\pi\pi^*$		$n\pi^*$		
	<i>trans</i> → <i>cis</i>	<i>cis</i> → <i>trans</i>	<i>trans</i> → <i>cis</i>	<i>cis</i> → <i>trans</i>	
n-Hexan	0.11	0.27	0.25	0.56	[BM79]
n-Hexan		0.44		0.55	[SGMB87]
n-Hexan	0.10	0.44	0.2	0.68	[Ste62]
n-Hexan	0.10	0.42	0.28	0.55	[RAL74]
Ethanol	0.2		0.36	0.45	[BS54]
Ethanol	0.15	0.24	0.28	0.51	[BM79]
Acetonitril	0.15	0.21	0.31	0.46	[BM79]

**Tabelle 4.2:** Quantenausbeuten für die Photoisomerisierung von Azobenzol in verschiedenen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur [Rau90].

### 4.3 Transiente Absorptions-Experimente an Azobenzol

An diesem Lehrstuhl haben sich in der Vergangenheit bereits zwei Dissertationen eingehend mit den transienten Absorptionsspektren von Azobenzol in Ethanol [Näg98] bzw. Azobenzol in DMSO [Spö01] beschäftigt. Die Anregung erfolgte in beiden Arbeiten in der langwelligen  $n\pi^*$ -Bande bei 435 nm<sup>1</sup> bzw. 480 nm<sup>2</sup>.

Folgende zeitaufgelöste transiente Absorptions-Experimente wurden an Azobenzol im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und im weiteren vorgestellt und diskutiert (gemessen wurde jeweils in einer „magischer Winkel“-Anordnung):

- $n\pi^*$ -Anregung von *trans*- und *cis*-Azobenzol in DMSO mit 480 nm-Lichtimpulsen ( $\tau_{cc} \approx 80$  fs).
- $\pi\pi^*$ -Anregung von *trans*- und *cis*-Azobenzol in Ethanol mit 266 nm-Lichtimpulsen ( $\tau_{cc} \approx 200$  fs).
- $\pi\pi^*$ -Anregung von *trans*-Azobenzol in Ethanol mit 340 nm-Lichtimpulsen ( $\tau_{cc} \approx 200$  fs).

#### Probenpräparation

Eine Lösung mit *trans*-Azobenzol wurde hergestellt, indem frisches kristallines *trans*-Azobenzol (Fa. Merck, > 98% Reinheit, > 97 % *trans*-Gehalt) ohne weitere Aufbereitung

<sup>1</sup>Arbeit von Th. Nägele,  $\tau_{cc} \approx 200$  fs, gemessen in einer „magischer Winkel“-Anordnung, d. h. mit 54.7° zwischen Anreg- und Abtast-Lichtimpulsen [Näg98].

<sup>2</sup>Arbeit von S. Spörlein,  $\tau_{cc} \approx 80$  fs, gemessen in waagrechter und senkrechter Polarisation zwischen Anreg- und Abtast-Lichtimpulsen [Spö01].

aufgelöst wurde. Zur Präparation des *cis*-Ensembles wird das UV-Belichtungsmodul (siehe Seite 26) verwendet. Nach ca. 1 h Bestrahlungsdauer im Spektralbereich 305–360 nm wird ein Ensemble erzeugt, das je nach Lösungsmittel 70–80% *cis*-Gehalt aufweist. Die Experimente werden in diesem Fall also immer an einem Gemisch durchgeführt, der verbleibende *trans*-Anteil kann aus den Absorptionsspektren ermittelt werden. Sämtliche gezeigten Spektren des *cis*-Isomers wurden um diesen verbleibenden *trans*-Anteil korrigiert.

### 4.3.1 $n\pi^*$ -Anregung von *trans*- und *cis*-Azobenzol

Die femtosekunden Absorptions-Experimente zur  $n\pi^*$ -Anregung von **Azobenzol in DM-SO** wurden mit Anregungs-Lichtimpulsen bei einer Zentralwellenlänge von 480 nm (20 nm FWHM) und mit einer Apparatefunktion von ca. 80 fs durchgeführt.

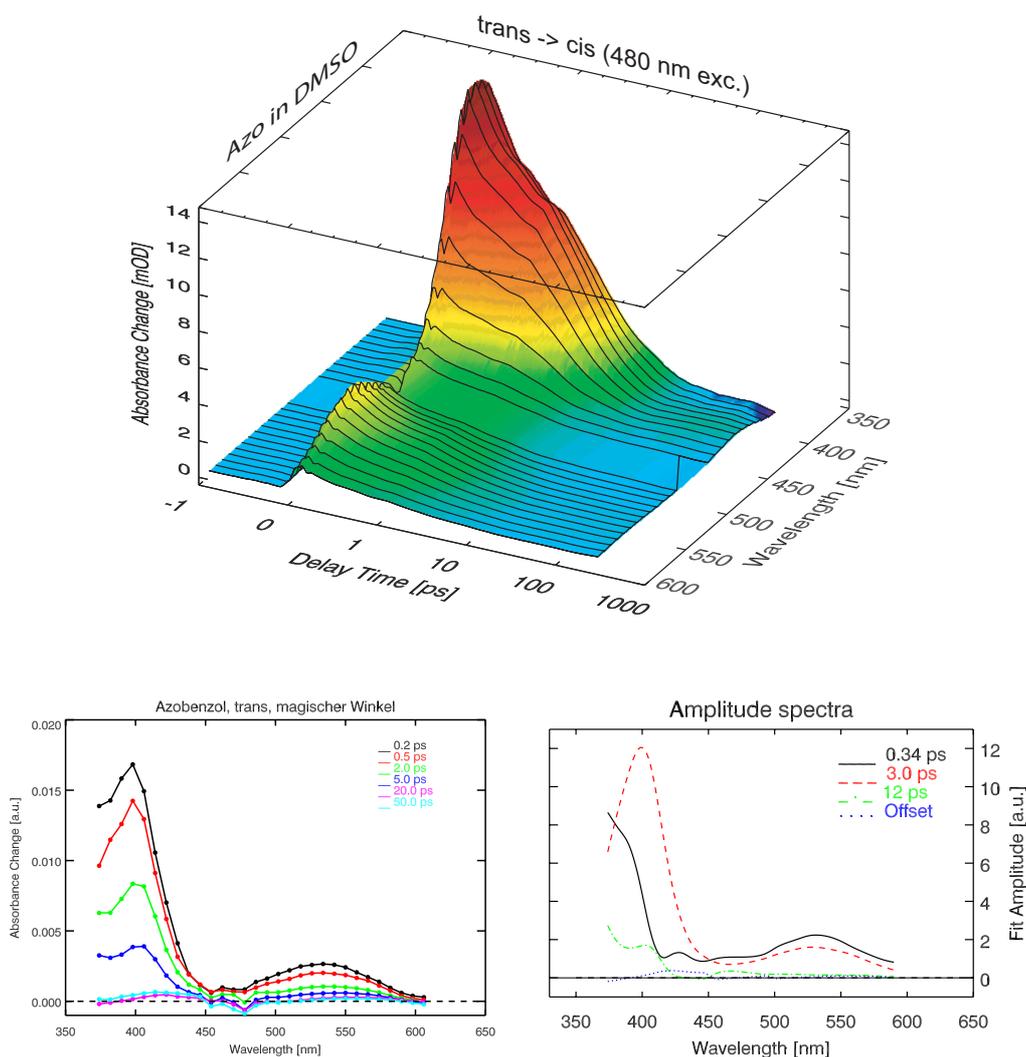
Im transienten Spektrum von *trans*-Azobenzol sieht man nach 0.2 ps zwei Maxima bei 400 nm (ca. 40 nm FWHM) und 530 nm (ca. 80 nm FWHM, siehe Abb. 4.6). Beide Absorptionsbanden zerfallen im weiteren Zeitverlauf und nach 20 ps ist fast nur noch im Bereich um 420 nm eine schwache transiente Absorption zu beobachten.

Im transienten Spektrum von *cis*-Azobenzol sieht man nach 0.2 ps zwei Maxima bei 400 nm (ca. 40 nm FWHM) und 520 nm (ca. 100 nm FWHM) sowie ein Minimum bei ca. 450 nm (siehe Abb. 4.7). Für die Bande bei 400 nm beobachtet man im Zeitbereich bis 20 ps einen Zerfall, danach ist das stationäre Differenzspektrum erreicht. Die Absorptionsbande bei 520 nm zerfällt anfangs schnell (innerhalb 2 ps), danach erfolgt ein langsamerer Abbau, bis nach 20 ps ebenfalls das stationäre Differenzspektrum erreicht ist. Das Ausbleichsignal bei 450 nm ist innerhalb der ersten 2 ps konstant, nimmt zwischen 2 ps und 5 ps etwas ab und hat ab diesem Zeitpunkt den stationären Wert erreicht.

Eine globale Anpassung an die Messdaten mit einer multi-exponentiellen Testfunktion erfordert für beide Isomere drei exponentielle Zerfälle und einen Offset, um die Bildung des Photoprodukts zu beschreiben.

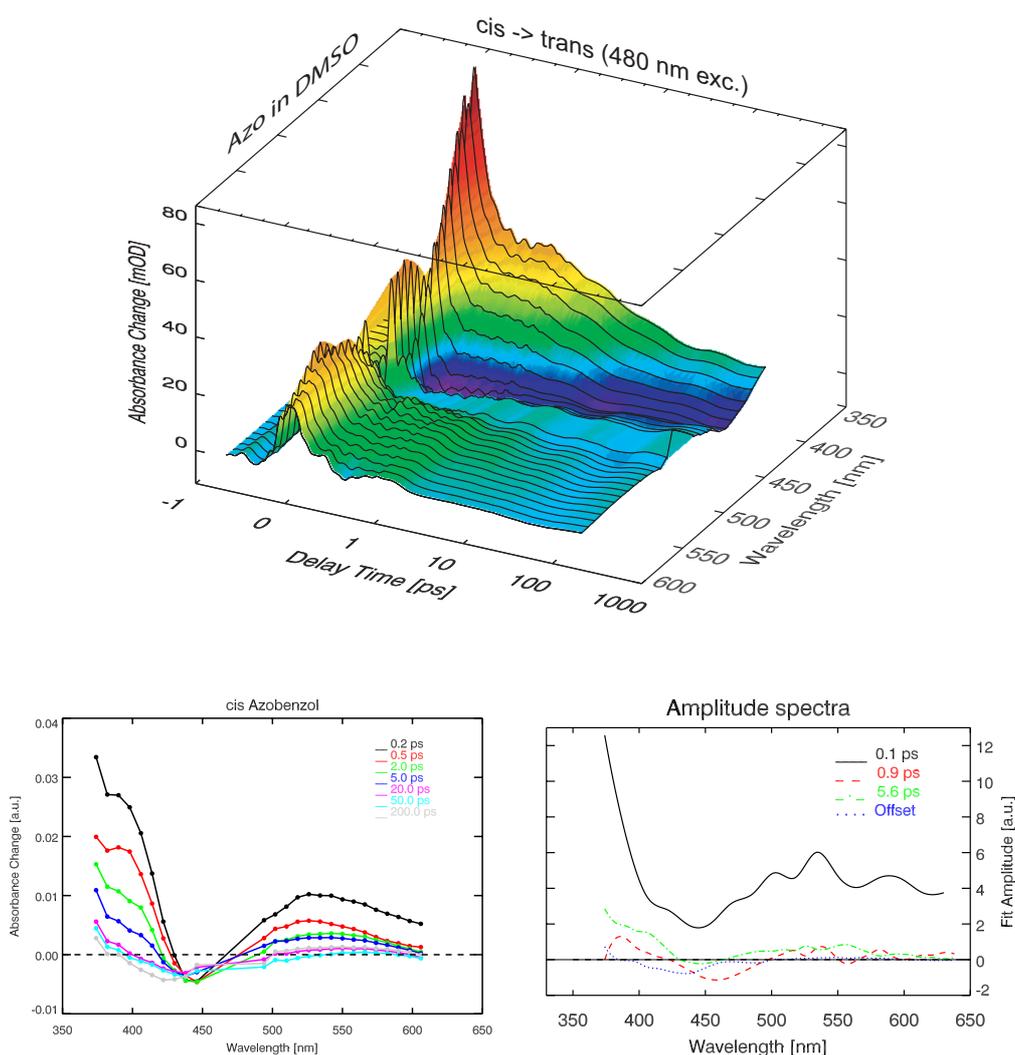
Die drei ermittelten Zeitkonstanten für *trans*-Azobenzol sind 0.34 ps, 3.0 ps und 12 ps (siehe Abb. 4.6). Das Spektrum der 0.34 ps-Komponente stellt den Zerfall einer breiten Absorptionsbande im sichtbaren Spektralbereich dar (450–650 nm), außerdem einen Zerfall im nahen UV (< 400 nm). Das Amplitudenspektrum der 3.0 ps-Komponente hat Ähnlichkeiten zum Amplitudenspektrum der 0.34 ps-Komponente: Eine scharfe Bande im UV ist vorhanden (wenn auch mindestens 30 nm rotverschoben), die breite Absorptionsbande im sichtbaren Spektralbereich ist nahezu identisch, sowohl in Form als auch in Amplitude. Das Spektrum der 12 ps-Komponente ist wesentlich schwächer und hat im roten Ausläufer der *trans*-  $\pi\pi^*$ -Absorptionsbande (< 420 nm) merkliche Amplituden.

Die globale Datenanalyse von *cis*-Azobenzol zeigt, dass der Zerfall des  $S_1$ -Zustands von einer  $\sim 0.1$  ps-Komponente dominiert wird (siehe Abb. 4.7). Die Analyse liefert noch zwei weitere Zeitkonstanten mit 0.9 ps und 5.6 ps. Das Amplitudenspektrum der dominanten 0.1 ps-Komponente hat wieder eine breite Absorptionsbande im sichtbaren Spek-



**Abbildung 4.6:** Transiente Absorption von *trans*-Azobenzol in DMSO nach  $n\pi^*$ -Anregung mit Lichtimpulsen bei 480 nm. Oben: Überblick über die Rohdaten. Unten, links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten. Rechts: Amplitudenspektren aus einem globalen Fit.

tralbereich und eine schärfere Bande im UV. Die beiden Amplitudenspektren der langsameren 0.9 ps und 5.6 ps-Komponente sind untereinander ähnlich und sind auch ähnlich zum Amplitudenspektrum der 12.0 ps-Komponente von *trans*-Azobenzol. Diese Ergebnisse stimmen bis kleine Unterschiede in den Zeitkonstanten gut mit bereits veröffentlichten Ergebnissen überein [LYM<sup>+</sup>98, NHZW97]



**Abbildung 4.7:** Transiente Absorption von *cis*-Azobenzol in DMSO nach  $\pi\pi^*$ -Anregung mit Lichtimpulsen bei 480 nm. Oben: Überblick über die Rohdaten. Unten, links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten. Rechts: Amplitudenspektren aus einem globalen Fit.

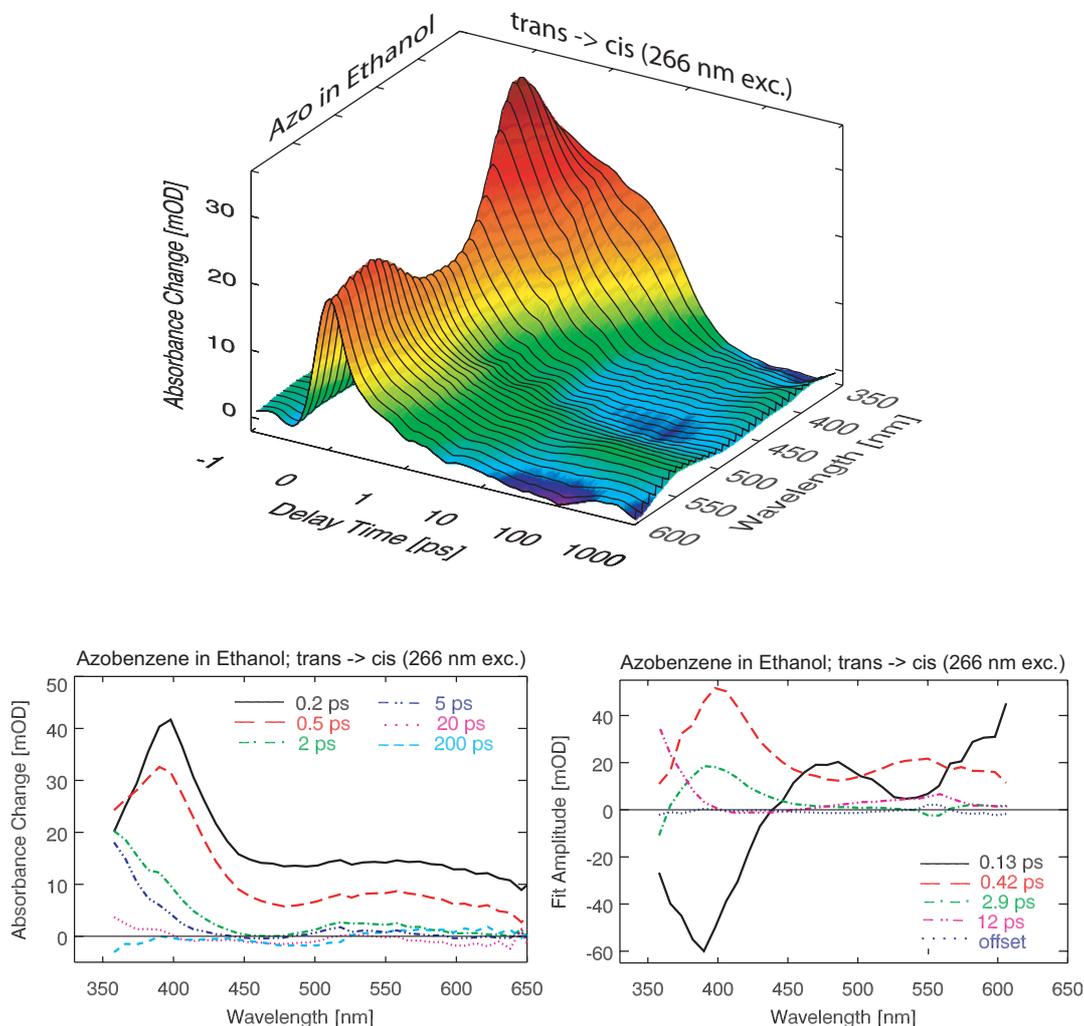
### 4.3.2 $\pi\pi^*$ -Anregung von *trans*-Azobenzol

Femtosekunden Absorptions-Experimente an *trans*-Azobenzol in Ethanol (2.2 mM) wurden mit Anregungs-Lichtimpulsen bei 266 nm (3 nm FWHM) und bei 340 nm (10 nm FWHM) mit einer Apparatefunktion von je ca. 200 fs durchgeführt.

Für einen Überblick über die zeitaufgelösten Spektren sowie transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten nach Anregung mit  $\lambda_{\text{pump}} = 266$  nm siehe Abb. 4.8. Die instantan vorhandene transiente Absorption zeigt ein ausgeprägtes Maximum bei 400 nm (80 nm FWHM) und zusätzlich ein unstrukturiertes Signal über den gesamten beobachteten Spektralbereich (450–650 nm). Innerhalb von 5 ps ist die breite Absorption

## 4 Der Photoschalter Azobenzol

verschwunden, während das Maximum bei 400 nm langsamer zerfällt und erst nach 20 ps verschwunden ist. Nach 200 ps ist das stationäre Differenzspektrum erreicht.



**Abbildung 4.8:** Transiente Absorption von *trans*-Azobenzol in Ethanol nach Anregung in der  $\pi\pi^*$ -Absorptionsbande durch Lichtimpulse bei 266 nm. Oben: Überblick über die Rohdaten. Unten, links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten. Rechts: Amplitudenspektren aus einem globalen Fit.

Für die transiente Absorption nach  $n\pi^*$ -Anregung ist bekannt (siehe oben), dass zur Beschreibung der experimentellen Daten drei exponentielle Zeitkonstanten von 0.34 ps, 3.0 ps und 12 ps nötig sind, außerdem ein Offset, der die Bildung des Metastabilen *cis*-Photoprodukts beschreibt [NHZW97, Spö01]. Diese Werte wurden deshalb als Startwerte für den globalen Fit-Algorithmus verwendet. Es zeigt sich jedoch, dass die Daten nur dann korrekt beschrieben werden konnten, wenn eine zusätzliche Zeitkonstante im 0.1 ps-Bereich verwendet wurde (dies wurde auch durch SVD- und LDAC-Methoden bekräftigt). Die ermittelten Zeitkonstanten sind 0.13 ps (-40%, +30%), 0.42 ps ( $\pm 20\%$ ), 2.9 ps (-35%,

+50%) und 12 ps ( $\pm 25\%$ ) (für die zugehörigen Amplitudenspektren siehe Abb. 4.8).

Die transiente Absorption von Azobenzol nach Anregung bei  $\lambda_{\text{pump}} = 340$  nm ist sehr ähnlich (siehe Anhang A, Seite 189).

Ein Vergleich der aus den Daten extrahierten Zeitkonstanten für die *trans*→*cis*-Isomerisierung nach  $\pi\pi^*$ -Anregung (siehe Tabelle 4.3, Seite 89) zeigt, dass die ermittelten Zerfallszeiten für beide Anregungswellenlängen (266 nm bzw. 340 nm) innerhalb der Konfidenz-Intervalle identisch sind. Beide Messungen können also mit einem einheitlichen Satz von Zeitkonstanten (0.13 ps, 0.42 ps, 2.9 ps und 12 ps) beschrieben werden. Innerhalb der Fehlergrenzen stimmen die Werte der drei langsameren Zeitkonstanten gut mit den Zerfallszeiten überein, die nach  $n\pi^*$ -Anregung ermittelt wurden, zusätzlich stimmen die jeweiligen Amplitudenspektren gut überein (vgl. die Abb. 4.6, 4.8 und A.1 in Anhang A). Die zugeordneten Prozesse scheinen somit für  $n\pi^*$ - und  $\pi\pi^*$ -Anregung ähnlich zu sein.

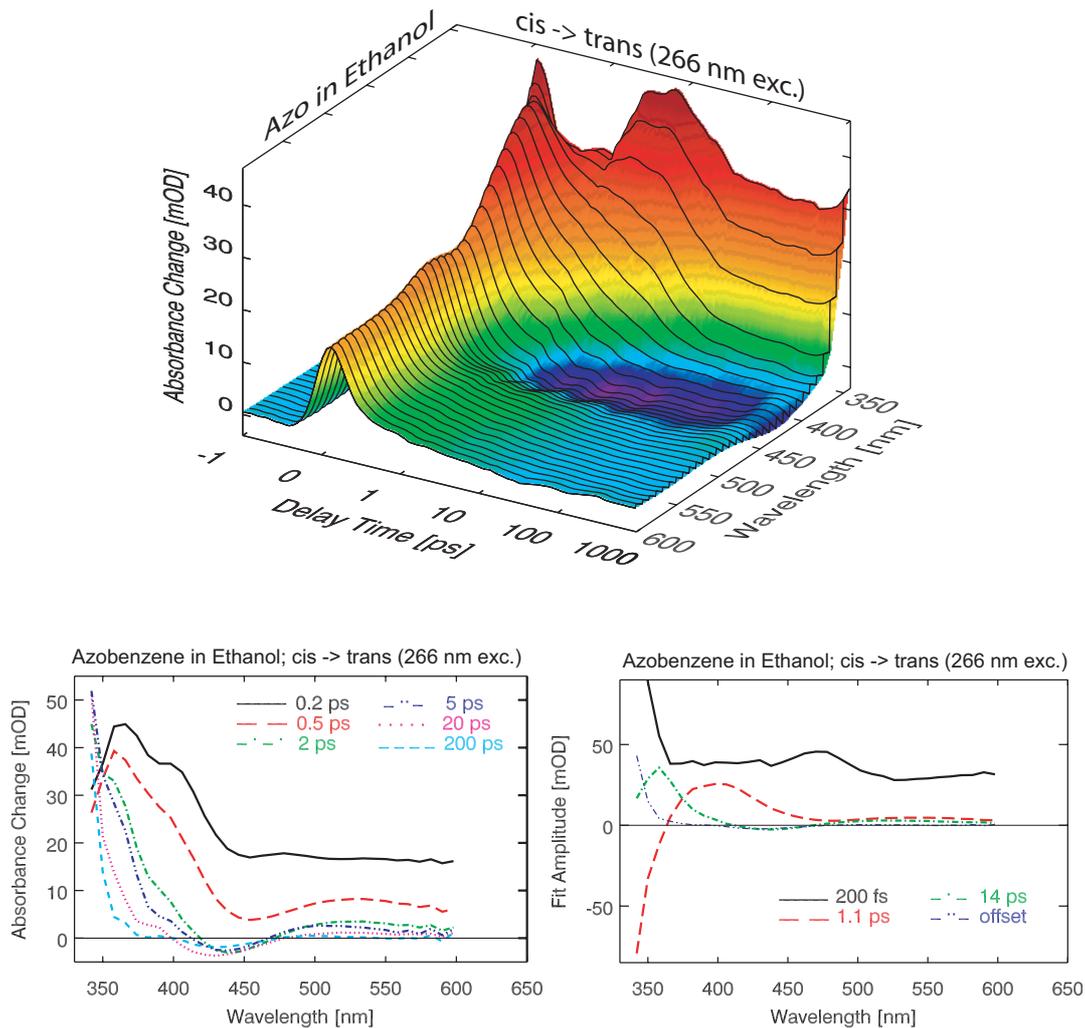
Trotzdem gibt es (im Vergleich zur Anregung in der  $n\pi^*$ -Bande) einige Unterschiede in der Dynamik, wenn *trans*-Azobenzol in der  $\pi\pi^*$ -Bande angeregt wird:

- (i) Die auffälligste Änderung ist die zusätzliche neue Zeitkonstante von 0.13 ps, die in den transienten Spektren nach  $n\pi^*$ -Anregung fehlt. Das zugehörige Amplitudenspektrum zeigt Minima bei 400 nm und 530 nm, die dem Aufbau einer transienten Absorption zugeschrieben werden können (der Zerfall dieser Absorption findet dann mit Zeitkonstanten von 0.42 ps und 2.9 ps statt).
- (ii) Es zeigt sich eine breite transiente Absorption mit Maxima bei 470 nm und 600 nm die instantan mit dem Anregungs-Impuls erscheint.
- (iii) Die relativen Intensitäten der Amplitudenspektren für die 0.42 ps- und die 2.9 ps-Komponente sind verschieden. Die spektrale Form der beiden Signale ist ähnlich, aber die 0.42 ps-Komponente ist nach  $\pi\pi^*$ -Anregung wesentlich verstärkt.
- (iv) Das Amplitudenspektrum der 12 ps-Komponente zeigt eine Verstärkung und leichte Verbreiterung gegenüber der 12 ps-Komponente nach  $n\pi^*$ -Anregung. Dieses Spektrum ist positiv im Bereich  $< 400$  nm und negativ im Bereich 400–450 nm. Eine solche spektrale Form deutet auf eine zeitabhängige Verbreiterung oder Verschiebung einer spektralen Bande hin.

### 4.3.3 $\pi\pi^*$ -Anregung von *cis*-Azobenzol

Die zeitaufgelösten Absorptionsdaten von *cis*-Azobenzol in Ethanol nach  $\pi\pi^*$ -Anregung mit 266 nm-Lichtimpulsen ebenso wie die transienten Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten enthält Abbildung 4.9.

Das erste transiente Spektrum nach 0.2 ps zeigt ein Maximum bei 380 nm (ca. 120 nm FWHM) und wieder eine breites, unstrukturiertes Signal oberhalb 450 nm. Die Dynamik der transienten Absorption ist ähnlich dem *trans*→*cis*-Fall: Das Maximum bei 380 nm



**Abbildung 4.9:** Transiente Absorption von *cis*-Azobenzol in Ethanol nach Anregung in der  $\pi\pi^*$ -Absorptionsbande durch Lichtimpulse bei 266 nm (die Daten wurden um den im photo-stationären Gleichgewicht verbleibenden *trans*-Anteil von 12% korrigiert). Oben: Überblick über die Rohdaten. Unten, links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten. Rechts: Amplitudenspektren aus einem globalen Fit.

zerfällt innerhalb etlicher Pikosekunden, verbunden mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums in den UV-Spektralbereich. Das breite Absorptionssignal im sichtbaren Spektralbereich zerfällt schneller und erreicht bald die Form des stationären Differenzspektrums.

Im Gegensatz zu *trans*-Azobenzol sind zur Beschreibung der experimentellen Daten von *cis*-Azobenzol nach  $\pi\pi^*$ -Anregung drei exponentielle Zeitkonstanten und ein Offset-Spektrum ausreichend. Die durch den globalen Fit-Algorithmus ermittelten Zeitkonstanten sind 0.2 ps ( $\pm 15\%$ ), 1.1 ps ( $\pm 20\%$ ) und 14 ps ( $\pm 20\%$ ) (für die zugehörigen Amplitudenspektren siehe Abb. 4.9).

Interessant ist auch hier wieder der Vergleich zwischen  $n\pi^*$ - und  $\pi\pi^*$ -Anregung. Ein Vergleich der Amplitudenspektren (vgl. Abb. 4.7) zeigt, dass die jeweiligen dynamischen Prozesse wieder ähnlich sind, jedoch gibt es zwei wichtige Unterschiede:

- (i) Die initiale schnelle Komponente von 0.1 ps ( $n\pi^*$ -Anregung) ist etwas verlangsamt auf 0.2 ps ( $\pi\pi^*$ -Anregung).
- (ii) Die Intensitäten und der spektrale Verlauf der Amplitudenspektren der zwei langsameren Zeitkonstanten ist unterschiedlich: die Intensität der beiden Spektren ist größer und die Banden sind breiter, dies ist gut sichtbar für die dominante  $\pi\pi^*$ -Absorptionsbande bei kurzen Wellenlängen.

Unterschiede zwischen  $n\pi^*$ - und  $\pi\pi^*$ -Anregung sind auch zu erwarten, da ursprünglich andere elektronische Zustände besetzt werden. Wenn man dies bedenkt ist es eher erstaunlich, dass die Zerfallszeiten und die zugehörigen Amplitudenspektren der nachfolgenden Prozesse ähnlich denen nach  $n\pi^*$ -Anregung sind. Ähnlichkeiten sind dann aber zu erwarten, wenn eine schnelle Relaxation vom  $\pi\pi^*$ - in den  $n\pi^*$ -Zustand erfolgt.

## 4.4 Fluoreszenzmessungen an Azobenzol in DMSO nach $n\pi^*$ -Anregung

Trotz der ausgiebigen spektroskopischen Untersuchungen an Azobenzol gab es bisher keine Experimente, die die Fluoreszenz *beider* Isomere verglichen haben. Fujino et al. [FAT01] haben das Fluoreszenz-Spektrum von *trans*-Azobenzol nach  $\pi\pi^*$ -Anregung ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) untersucht. Das Spektrum zeigt zwei Banden mit Maxima bei 390 nm und 665 nm. Die beiden Bänder wurden der direkten Emission aus dem  $S_2$ -Zustand (390 nm) und der Emission aus dem  $S_1$ -Zustand nach interner Konversion (665 nm) zugeschrieben.

Die relative Intensität der längerwelligen Bande macht dabei nur wenige Prozent aus, was an der sehr geringen Fluoreszenz-Quantenausbeute liegt. In dem Übersichtsartikel von Rau aus dem Jahr 1973 heißt es deshalb noch schlicht [Rau73]:

„Azoverbindungen emittieren nicht.“

Tatsächlich fluoresziert Azobenzol extrem schwach mit einer Fluoreszenz Quantenausbeute  $\phi_f = 10^{-6}$  [FAT01], weshalb ein extrem sensitiver Aufbau notwendig ist, um die Fluoreszenz überhaupt messen zu können (der verwendete Aufbau ist beschrieben in Kapitel 2.2, Seite 29 — siehe auch [SSR<sup>+</sup>03]). Mit diesem Aufbau war es möglich, die nachfolgend diskutierten Emissionsspektren beider Azobenzol-Isomere in DMSO nach  $n\pi^*$ -Anregung ( $\lambda_{exc} = 488$  nm) mit hoher Genauigkeit aufzunehmen. Um die extrem geringe Fluoreszenz-Quantenausbeute auszugleichen, wurden die Experimente mit sehr hohen Probenkonzentrationen durchgeführt (43 mM Azobenzol in DMSO).

Zeitgleich zu den hier durchgeführten Experimenten zur Messung der stationären Fluoreszenzspektren haben Lu et al. die Fluoreszenz von *trans*-Azobenzol in Hexan nach

$n\pi^*$ -Anregung (angeregt bei 432 nm) zeitaufgelöst mit der Technik der Fluoreszenz „up-conversion“ bei fünf ausgewählten Wellenlängen aufgenommen [LCD02]. Sie berichten eine sehr dominante Kinetik mit einer Zeitkonstanten von ca. 170 fs und eine zweite, wesentlich schwächere Kinetik mit einer Zeitkonstanten von 1–1.5 ps (Amplitudenverhältnis ca. 1:6).

### Fluoreszenz von *trans*-Azobenzol in DMSO

Um sicherzustellen, dass die Emissionsspektren von *trans*-Azobenzol sicher keinen Anteil der Emission des photostationären Gleichgewichts enthält, wurde die Lösung nur einmal durch den Probenkreislauf geleitet. Sämtliche Spektren wurden jeweils mit frisch aufgelöster Probe aufgenommen.

Nach der Anregung von *trans*-Azobenzol in DMSO bei 488 nm beobachtet man eine sehr schwache und spektral breite Emission, deren Intensität mit der des Raman-Signals des reinen Lösungsmittels DMSO vergleichbar ist. Nach Subtraktion des Lösungsmittel-Untergrundes und spektraler Korrektur (Empfindlichkeit des Spektrometers) erhält man das im oberen Teil von Abbildung 4.10 als durchgezogene Linie eingezeichnete Spektrum mit einem Maximum bei 640 nm mit einer Breite von 250 nm (FWHM). Das Spektrum besitzt einen ausgeprägten Ausläufer bis in den nahen Infraroten Spektralbereich.

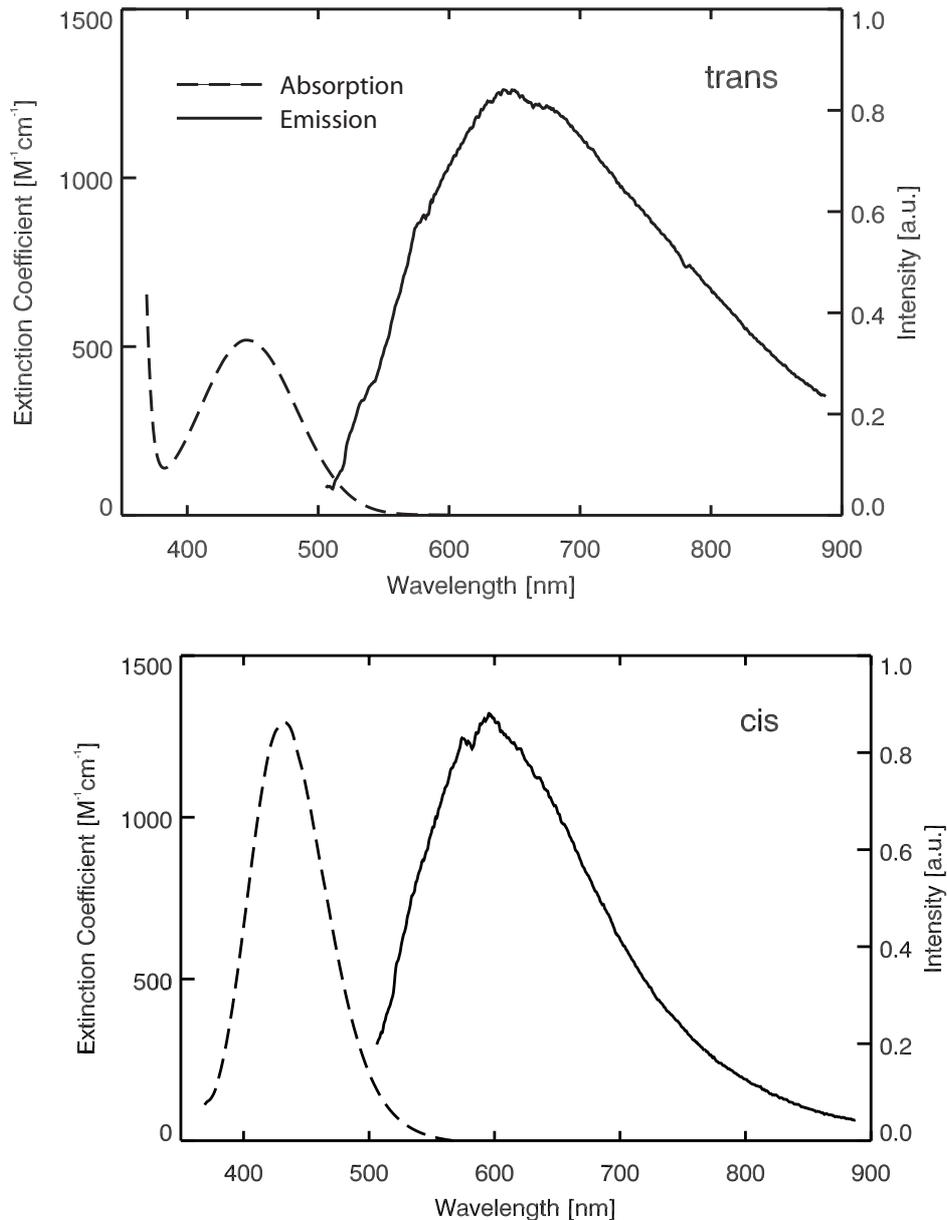
### Fluoreszenz von *cis*-Azobenzol in DMSO

Das Umbelichten ins photostationäre Gleichgewicht erfolgte mit einer Quecksilber Hochdrucklampe (siehe „UV-Belichtungsmodul“ in Abschnitt 2.1.4, Seite 26). Auch für die Messung an *cis*-Azobenzol wurde die Probe nur einmal durch den Probenkreislauf gepumpt. Die deshalb benötigten ca. 200 ml Lösung wurden mit zwei parallel geschalteten Hg(Xe)-Lampen in ca. 50 h ins photostationäre Gleichgewicht belichtet (Gesamtleistung ca. 350 mW im Wellenlängenbereich 305–380 nm). Das Erreichen des photostationären Gleichgewichts wurde durch Absorptionsspektren bestätigt. Zur Kontrolle, dass der experimentelle Aufbau während des gesamten Zeitraums der Experimente (drei Tage) identische Signale liefert, wurde direkt nach der Aufnahme der *cis*-Spektren nochmal ein Spektrum einer frischen *trans*-Lösung aufgenommen. Dies war identisch zu den am Anfang aufgenommenen Fluoreszenz-Spektren von *trans*-Azobenzol.

Das Emissionsspektrum von (reinem) *cis*-Azobenzol wurde aus dem Spektrum des photostationären Gleichgewichts berechnet, das ca. 30% *trans*-Anteil enthielt. Im unteren Teil von Abbildung 4.10 ist das so berechnete Emissionsspektrum des reinen *cis*-Isomers als durchgezogene Linie eingezeichnet (ebenfalls wieder um das Signal des reinen Lösungsmittels und die Empfindlichkeit des Spektrometers korrigiert). Es besitzt ein Maximum bei 600 nm (160 nm FWHM). Zwei wesentliche Unterschiede zum Spektrum des *trans*-Azobenzols fallen sofort auf: das Spektrum ist schmaler und der Ausläufer in den infraroten Spektralbereich fehlt.

Die relative Fluoreszenz-Quantenausbeute wurde bestimmt, indem die Fluoreszenz-Spektren für die beiden Isomere integriert wurden. Dabei erhält man für *cis*-Azobenzol

#### 4.4 Fluoreszenzmessungen an Azobenzol in DMSO nach $n\pi^*$ -Anregung



**Abbildung 4.10:** Absorptions- und Emissions-Spektren von Azobenzol (Anregungswellenlänge 488 nm). Die Absorption ist gestrichelt eingezeichnet, die Emission als durchgezogene Linie. (oben) *trans*-Azobenzol. (unten) *cis*-Azobenzol (korrigiert um den *trans*-Anteil im photostationären Gleichgewicht). Die Fluoreszenzspektren sind auf die spektrale Empfindlichkeit des verwendeten Spektrometers korrigiert. Ein entsprechend skaliertes Signal des DMSO Lösungsmittel-Untergrunds wurde abgezogen. Um den Skalierungsfaktor zu ermitteln wurde ein steigender Prozentsatz des Lösungsmittel-Untergrunds solange abgezogen, bis die Raman-Linie von DMSO bei 580 nm komplett verschwindet (in der scharfen Struktur um 580 nm ist das verbleibende Artefakt, sichtbar speziell im Emissionsspektrum von *cis*-Azobenzol).

eine etwas geringere Zahl, ca. 80% des Wertes des *trans*-Isomers.

## 4.5 Diskussion (I) — Emission aus dem Franck-Condon-Bereich ( $n\pi^*$ )

In diesem Abschnitt geht es darum, aus dem Vergleich der transienten Absorptions- und stationären Fluoreszenzspektren nach  $n\pi^*$ -Anregung Informationen über die Dynamik von Azobenzol zu gewinnen.

Die relative Fluoreszenz-Quantenausbeute (für *cis*-Azobenzol 80% des *trans*-Wertes) ermöglicht es, Informationen über die relativen Lebensdauern des fluoreszierenden Zustandes der beiden Isomere zu bekommen, wie im folgenden beschrieben.

Für  $\tau_{nr} \ll \tau_f$  ist die Fluoreszenz-Quantenausbeute  $\phi_f$  gegeben durch

$$\phi_f = \frac{\tau_{nr}}{\tau_f}. \quad (4.1)$$

Dabei ist  $\tau_{nr}$  die nicht strahlende Lebensdauer, die man aus den Zeitkonstanten der transienten Absorption erhält. Die strahlende Lebensdauer  $\tau_f$  kann mit Hilfe der Strickler-Berg Beziehung [SB62] abgeschätzt werden:

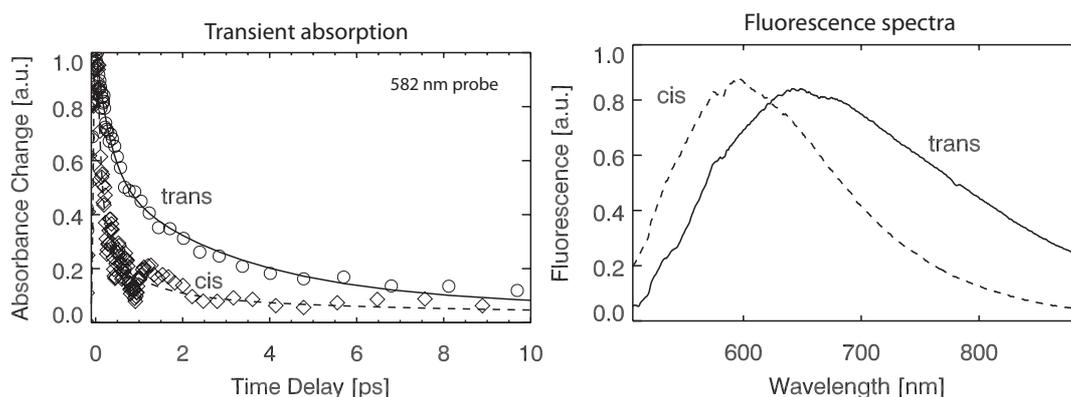
$$\tau_f^{-1} = 2.880 \cdot 10^{-9} n^2 \left\langle \tilde{\nu}_f^{-3} \right\rangle_{hv}^{-1} \int \epsilon(\tilde{\nu}) d \ln \tilde{\nu}. \quad (4.2)$$

Dieser Ausdruck gilt streng genommen nur für Moleküle mit nicht-reaktiven angeregten Zuständen. Da jedoch nur das Verhältnis der *cis*- zu *trans*-Lebensdauern von Interesse ist und die beiden Moleküle (*trans*- und *cis*-Azobenzol) spektroskopisch sehr ähnlich sind, scheint die Anwendung der Relation gerechtfertigt.

Der Mittelwert  $\langle \tilde{\nu}^{-3} \rangle$  läßt sich durch Integration der Fluoreszenz-Spektren bestimmen, der Brechungsindex  $n$  von DMSO beträgt 1.478 [LF96]. Das Integral in Gl. (4.2) umfaßt den niederenergetischsten Übergang ( $n\pi^*$ ) im Absorptionsspektrum,  $\epsilon$  ist der Extinktionskoeffizient. Die daraus ermittelten strahlenden Lebensdauern  $\tau_f$  sind 530 ns für *trans*-Azobenzol. Zum Vergleich: Fujino et al. [FAT01] untersuchten *trans*-Azobenzol und erhielten (basierend auf einer vereinfachten Version von Gl. (4.2)) einen Wert von  $\tau_f = 670$  ns. Für *cis*-Azobenzol erhält man 200 ns. Vergleicht man das Verhältnis dieser beiden Lebensdauern (2.65) mit dem Verhältnis der Fluoreszenz-Quantenausbeuten, dann muss das Verhältnis der nicht strahlenden Lebensdauern  $\tau_{nr,cis}/\tau_{nr,trans} = 0.3$  betragen.

Wie oben erwähnt erhält man die nicht strahlende Lebensdauer  $\tau_{nr}$  aus den Zeitkonstanten, die aus den Spektren der transienten Absorption extrahiert wurden.

Für die *trans*→*cis*-Richtung liefern die transienten Absorptionsspektren drei Zeitkonstanten von 0.34 ps, 3.0 ps und 12 ps (siehe auch Tabelle 4.3). Die beiden schnellen Prozesse tragen nahezu identische Amplituden über den gesamten untersuchten Spektralbereich (vgl. Abb. 4.6 und 4.7). Die Dynamik der *cis*→*trans*-Reaktion wird ebenfalls durch



**Abbildung 4.11:** Vergleich von transienter Absorption und stationärer Emission von Azobenzol in DMSO nach  $n\pi^*$ -Anregung (480 nm). Links: Transiente bei  $\lambda_{probe} = 582$  nm. *trans*: Zwei dominierende Zeitkonstanten mit  $\tau_1 = 0.34$  ps und  $\tau_2 = 3.0$  ps und gleichen Amplituden. *cis*: Ein dominanter Zerfall mit  $\tau = 0.1$  ps. Rechts: Emissionsspektren. *trans*: Maximum bei 640 nm, FWHM 250 nm. *cis*: Maximum bei 600 nm, FWHM 160 nm.

drei Zeitkonstanten beschrieben: 0.1 ps, 0.9 ps und 5.6 ps. Die Dynamik ist jedoch eindeutig dominiert von der 0.1 ps-Komponente, die 0.9 ps-Komponente ist viel schwächer und zeigt keine spektrale Ähnlichkeit mit dem Beitrag der 0.1 ps-Komponente. Für beide Richtungen ist die Dynamik auf der 10 ps-Zeitskala bedingt durch molekulare Kühlprozesse im elektronischen Grundzustand, wie frühere Ergebnisse aus der transienten Absorptionsspektroskopie [LYHM96] und Ergebnisse aus der zeitaufgelösten Schwingungs-Spektroskopie belegen [HOZ97, FT00].

<i>trans</i> → <i>cis</i>		$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	$\tau_4$
266 nm	Ethanol	0.13 ps	0.42 ps	2.9 ps	12 ps
340 nm	Ethanol	0.13 ps	0.43 ps	2.7 ps	17 ps
480 nm	DMSO	–	0.34 ps	3.0 ps	12 ps
<i>cis</i> → <i>trans</i>		$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	
266 nm	Ethanol	0.20 ps	1.1 ps	14 ps	
480 nm	DMSO	0.1 ps	0.9 ps	5.6 ps	

**Tabelle 4.3:** Zusammenfassung der Zeitkonstanten für Azobenzol.

Die Reaktionsdynamik von *cis*-Azobenzol wird also durch *eine* Zeitkonstante von 0.1 ps dominiert, welche demnach sicher dem Zerfall des elektronisch angeregten Zustands zugeschrieben werden kann. Es ist somit diese Zeitkonstante, welche als  $\tau_{nr,cis}$  in Gl. (4.1) zur Bestimmung der Fluoreszenz-Quantenausbeute  $\phi_f$  eingeht:  $\phi_f = 0.1 ps / \tau_f$ .

Für das *trans*-Isomer ist die Situation nicht so eindeutig: Hier ist die Dynamik Bi-Phasisch (0.34 ps und 3.0 ps) mit ähnlicher spektraler Signatur und Amplitude (siehe Abb. 4.6, rechts). Damit stellt sich die Frage, welche Zeitkonstante für  $\tau_{nr,trans}$  in Gl. (4.1) ein-

gesetzt werden soll. Die Quantenausbeute  $\phi_f$  ist proportional zum zeitlichen Integral des Zerfalls des angeregten Zustands. Für einen bi-exponentiellen Zerfall mit den Amplituden  $A_{1,2}$  und Zeitkonstanten  $\tau_{1,2}$  ergibt das

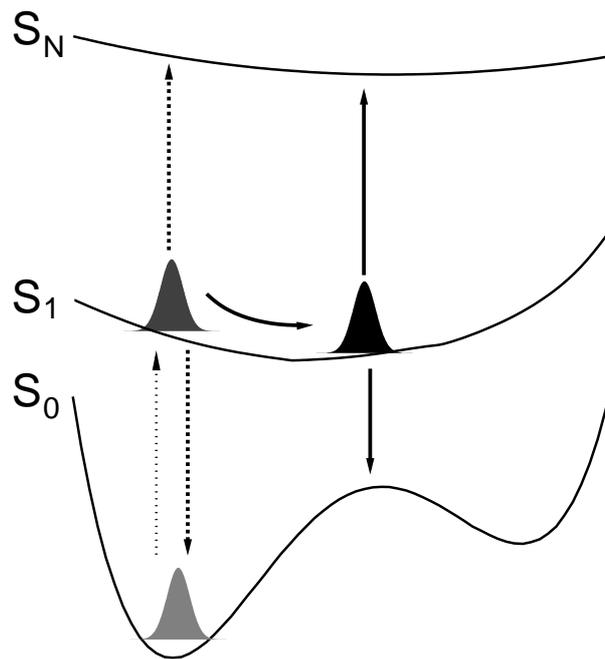
$$\phi_f = \frac{A_1 \tau_1 + A_2 \tau_2}{A_1 + A_2} \frac{1}{\tau_f}. \quad (4.3)$$

Im Falle von *trans*-Azobenzol ( $A_1 \approx A_2$ ) würde das bedeuten, dass  $\phi_f = (0.34 \text{ ps} + 3.0 \text{ ps})/2 = 1.7 \text{ ps}/\tau_f$ . Das Fluoreszenz-Spektrum des *trans*-Isomers müßte dann (wegen  $\phi_{f,cis}/\phi_{f,trans} = 0.3$ ) ca. 6 mal intensiver sein als das des *cis*-Isomers. Die im Experiment gemessenen Intensitäten sind jedoch nahezu gleich:  $\phi_{f,cis} = 0.8 \cdot \phi_{f,trans}$ .

Nimmt man hingegen nur die erste Zeitkonstante von 0.34 ps für  $\tau_{nr}$ , dann reproduziert die Analyse nach Strickler-Berg das experimentell beobachtete Verhältnis der Fluoreszenz-Intensitäten. Dies deutet offenbar darauf hin, dass nur die schnelle Zeitkonstante in der Kinetik von *trans*-Azobenzol zum Zerfall des angeregten (genauer gesagt fluoreszierenden) Zustands gehört. Allerdings muß dann die große Ähnlichkeit der Amplitudenspektren der 0.34 ps-Komponente und der 3.0 ps-Komponente erklärt werden: diese legt nahe, dass beide vom gleichen elektronischen Zustand herrühren. Dieser scheinbare Widerspruch läßt sich auflösen, wenn man annimmt, dass die Zeitkonstante von 0.34 ps die Bewegung des durch die optische Anregung gebildeten Wellenpakets aus dem Franck-Condon Bereich heraus beschreibt und dass die Fluoreszenz nur aus dem Franck-Condon-Bereich emittiert wird. Diese Zuordnung wird auch durch die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen von Fujino et al. unterstützt [FAT01]: sie ermittelten eine Zeitkonstante von 0.50 ps für die Fluoreszenz-Lebensdauer des  $S_1$ -Zustands von *trans*-Azobenzol in Hexan und fanden keine langsameren Komponenten.

Zum Verständnis der unterschiedlichen Eigenschaften der 0.34 ps-Komponente und der 3.0 ps-Komponente in Fluoreszenz- und Absorptions-Experimenten ist es hilfreich sich zu vergegenwärtigen, welche Teile der Potentialflächen für welche Beobachtung verantwortlich sind. Dazu soll das Schema in Abbildung 4.12 dienen: das Fluoreszenzspektrum spiegelt den Übergang zwischen erstem angeregten Zustand und dem elektronischen Grundzustand wider. Die transiente Absorption wiederum ist sensitiv für die Differenz zwischen dem angeregten Zustand und allen anderen Zuständen, die durch den Abtast-Impuls zugänglich sind. Für den  $n\pi^*$ -Übergang nach Anregung mit 480/488 nm zeigt das Amplitudenspektrum der 0.34 ps-Komponente keine negativen Beiträge, ein Hinweis darauf, dass der Beitrag der stimulierten Emission sehr schwach ist und das Spektrum der transienten Absorption demnach vom Übergang in höher angeregte Zustände dominiert wird. Die Potentialfläche des Grundzustandes ist steiler und stärker strukturiert als die der angeregten Zustände (siehe auch Abb. 4.14 bzw. Abb. 4.15), daher wird die Bewegung eines Wellenpakets auf der  $S_1$ -Potentialfläche stärkere Änderungen im Fluoreszenz-Signal induzieren als in der transienten Absorption (über die Franck-Condon Faktoren und die Übergangsmomente betrifft dies auch die Intensitäten).

Die Reaktionsdynamik des Azobenzol-Moleküls nach  $n\pi^*$ -Anregung läßt sich demnach folgendermassen **zusammenfassen**: Nach Anregung in die  $n\pi^*$ -Absorptionsbande



**Abbildung 4.12:** Schematische Zeichnung der Bewegung des Wellenpakets entlang der Potentialfläche des angeregten Zustands. Da die Krümmung der Potentialflächen von  $S_1$  und  $S_N$  sehr ähnlich ist, hat die Bewegung des Wellenpakets keinen großen Einfluss auf die transiente Absorption. Die Krümmung zwischen Grundzustand und erstem angeregten Zustand ist jedoch stark unterschiedlich und bewirkt bei einer Bewegung des Wellenpakets auf der  $S_1$ -Fläche eine starke Änderungen der Wellenlänge des emittierten Lichts.

„sieht“ das angeregte *cis*-Isomer ein steiles Potential in der Nähe des Franck-Condon-Bereichs, was zu einer schnellen und gerichteten Bewegung führt. Diese Bewegung bringt das Wellenpaket zur konischen Durchschneidung mit dem Grundzustand und ist verantwortlich für die effiziente Isomerisierung. Für das angeregte *trans*-Isomer ist die Potentialfläche des Franck-Condon-Bereichs flacher, weshalb die Bewegung aus dem Franck-Condon-Bereich heraus langsamer ist. Diese Bewegung ist verknüpft mit einer leichten Energieabnahme und bringt den Übergang zu einem intermediären Zustand außerhalb des im Experiment abgedeckten spektralen Fensters ( $< 350$  nm) und senkt im sichtbaren Teil des Spektrums erheblich die Wahrscheinlichkeit einer Emission in den Grundzustand. Dies wiederum erklärt, warum die Fluoreszenzmessung nur auf die schnellste Komponente sensitiv ist. Offenbar bringt die anfängliche Bewegung des Wellenpakets das Molekül in einen Bereich der  $S_1$ -Potentialfläche, von dem aus ein direkter und schneller Zugang zur konischen Durchschneidung mit dem Grundzustand nicht möglich ist. Dies führt zu der beobachteten langsamen (diffusiven) 3.0 ps-Kinetik (vgl. auch Abb. 4.14 bzw. Abb. 4.15).

Lu et al. [LCD02] berichteten kürzlich die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen an Azobenzol in Hexan. Sie beobachteten einen dominanten Zerfall von ca. 170 fs für *trans*-Azobenzol. Diese Zeitkonstante ist ähnlich zu den hier bestimmten 340 fs für *trans*-Azobenzol in DMSO. Oben wurde argumentiert, dass aufgrund der relativen Fluores-

zenzquantenausbeuten die 3 ps-Komponente der Absorptionssmessung beim Zerfall des Fluoreszenz-Signals fehlen sollte. Die Fluoreszenzspektren in [LCD02] zeigen jedoch eine langlebige Komponente. Diese hat eine etwas kürzere Zerfallszeit ( $\sim 1$  ps), außerdem ist das Verhältnis der Amplituden nur  $\sim 1:6$  im Vergleich zu den gleich starken Amplituden (1:1) der hier gezeigten Absorptionsexperimente. Das Ergebnis, dass der dominante Anteil der Fluoreszenz mit einigen 100 fs zerfällt, ist damit nicht im Widerspruch zu [LCD02] und die Interpretation, dass der schnelle Zerfall mit einer Bewegung aus dem Franck-Condon-Bereich heraus verknüpft ist, behält ihre Gültigkeit. (Anzeichen für eine biphasische Fluoreszenz zeigen sich auch in den hier gezeigten Fluoreszenzdaten: Der lange Ausläufer im roten Spektralbereich gibt Hinweise auf einen zweiten, langsameren Prozess mit schwacher Amplitude. Ein ähnliches biphasisches Verhalten wurde auch für ein Azobenzolderivat (4-Nitro-4'-(Dimethylamino)Azobenzol) beobachtet [SSM<sup>+</sup>04].

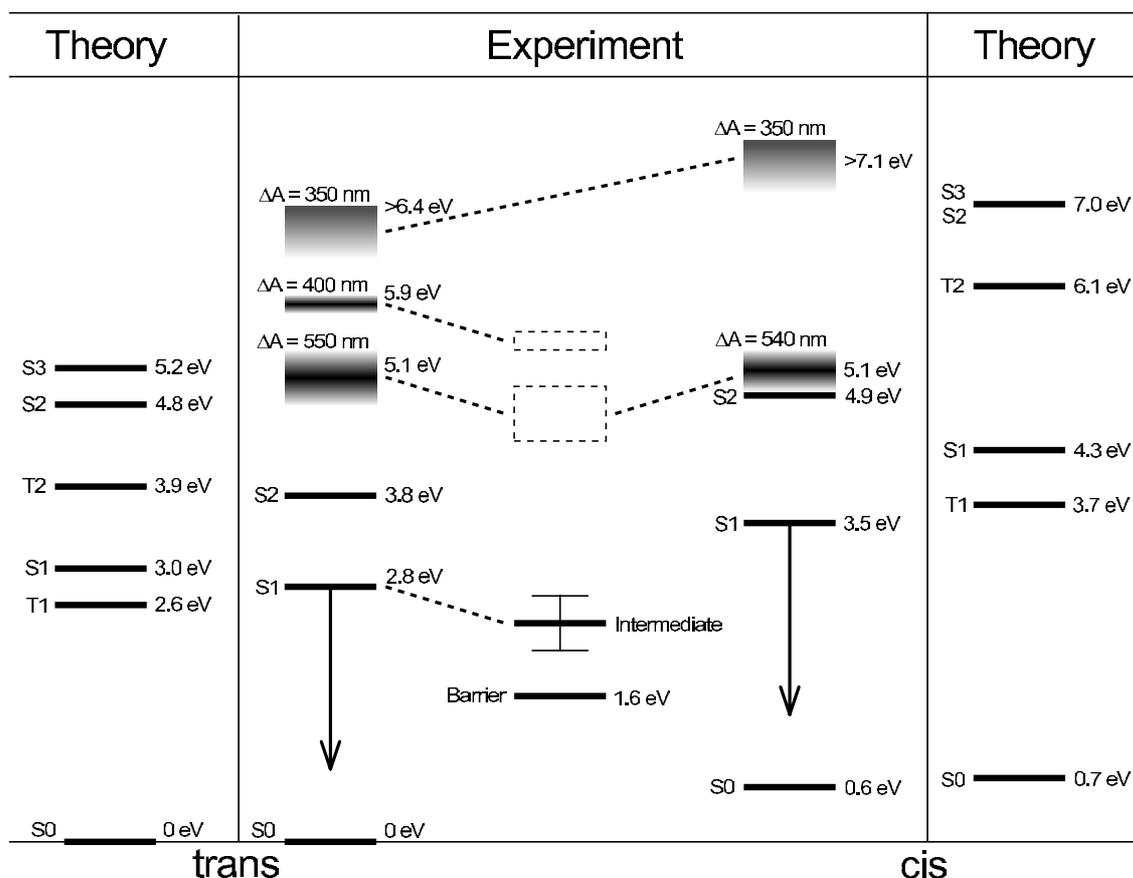
### 4.6 Energieschema für Azobenzol

Die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen von oben sollen im Folgenden zur Konstruktion eines Energieschemas für Azobenzol genutzt werden. In Abbildung 4.13 ist der Versuch gemacht, die experimentell gewonnenen Erkenntnisse kompakt in einem Bild zusammenzufassen und gleichzeitig neueren theoretischen Untersuchungen gegenüberzustellen.

Den Unterschied der Grundzustandsenergie von *cis*- und *trans*-Azobenzol erhält man über die Bildungswärme [SDCK77]: der Grundzustand des *cis*-Isomers liegt 0.6 eV über dem des *trans*-Isomers. Die Energie-Barriere zwischen den beiden Zuständen kann über die Temperaturabhängigkeit der Isomerisationsrate abgeleitet werden und beträgt  $\sim 1.6$  eV [TF67].

Die Absorptionsspektren des Grundzustandes liefern die Energien der ersten beiden angeregten Zustände ( $n\pi^*$  und  $\pi\pi^*$ ) des *trans*- und *cis*-Isomers (vgl. Abb. 4.2). Die Spektren des photo-angeregten Zustands ( $n\pi^*$ ) enthalten Informationen über höher liegende angeregte Zustände (vgl. Abb. 4.6 und 4.7): die Amplitudenspektren der schnellsten Zeitkonstante legen nahe, dass für beide Isomere höher gelegene Zustände mit Absorptionsbanden bei  $\sim 550$  nm und  $\sim 350$  nm zugänglich sind. Nach dem Zerfall der schnellsten Komponente des *trans*-Isomers bleibt ein Spektrum bestehen, das Banden bei 400 nm und  $\sim 550$  nm Banden. Natürlich legt dies nur den Abstand zwischen diesem Intermediat und höher liegenden Zuständen fest. Bezüglich der absoluten Lage dieses Intermediats lassen sich aber folgende Grenzen begründen: Es muss energetisch niedriger liegen als der primär angeregte Zustand ( $< 2.8$  eV), aber auch höher als die *trans-cis*-Barriere ( $> 1.6$  eV). Aufgrund dieser Information ist die ungefähre Lage (mit einem angedeuteten Fehlerbalken) in der Mitte von Abb. 4.13 eingezeichnet.

Beim Vergleich dieser experimentell ermittelten Energien mit quantenchemischen Rechnungen [CP99] zeigt sich, dass die Rechnungen nur die niedrigste Übergangsenergie reproduzieren können ( $S_1 \leftarrow S_0$ , siehe Abb. 4.13). Die Energien der höheren Übergänge werden normalerweise überschätzt [CP99, INS01]. Daher können die Rechnungen hier



**Abbildung 4.13:** Energieschema für Azobenzol: Vgl. von Theorie und Experiment. Die Energien im Mittelteil der Abbildung stammen aus der stationären und zeitaufgelösten Spektroskopie (die Werte für  $\Delta A$  beziehen sich auf Absorptionsbanden, die aus den jeweiligen Amplitudenspektren abgelesen werden), der chemischen Kinetik und Thermochemie. Die „theoretischen“ Energien (links und rechts) stammen aus quantenchemischen Rechnungen von Cattaneo und Persico [CP99] (vgl. Abb. 4.5). Zusätzlich sind die Zustände der drei Formen *trans*, *cis* und Intermediat miteinander korreliert.

leider nicht bei der Interpretation der transienten Spektren helfen, da es hierbei auf die genaue Lage der höherliegenden Zustände ankommt.

## 4.7 Diskussion (II) — $\pi\pi^*$ -Anregung und Isomerisierung im $S_1$

In diesem Abschnitt geht es um den Vergleich der Isomerisations-Prozesse nach  $n\pi^*$ -Anregung und nach  $\pi\pi^*$ -Anregung. Zwei Fragen sind hier von Interesse:

1. Wie in Abschnitt 4.2 dargestellt wurde, favorisierte die Literatur bisher zwei verschiedene **Isomerisierungs-Mechanismen** für Azobenzol: Nach  $n\pi^*$ -Anregung soll-

te die Isomerisierung über eine Inversionsbewegung ablaufen, nach  $\pi\pi^*$ -Anregung jedoch über eine Rotationsbewegung. Realisiert das Azobenzol-Molekül in der Natur diese zwei unterschiedlichen Bewegungen oder ist die Bewegung des Moleküls unabhängig, in welche Absorptionsbande die Anregung erfolgt?

2. Wieso ist die Isomerisierungs-**Quantenausbeute** bei  $n\pi^*$ -Anregung fast doppelt so groß wie bei  $\pi\pi^*$ -Anregung?

Im Folgenden werden diese beiden Fragen für beide Isomerisierungs-Richtungen (*trans*→*cis* und *cis*→*trans*) untersucht.

### 4.7.1 *trans*→*cis* Photoreaktion

Zu Beschreibung der Dynamik der *trans*→*cis*-Isomerisierung nach  $\pi\pi^*$ -Anregung (mit 266 nm- oder 340 nm-Lichtimpulsen) benötigt man vier exponentielle Zeitkonstanten. Eine erste wichtige Beobachtung ist, dass die extrahierten Zeitkonstanten und Amplitudenspektren eine große Ähnlichkeit zu den nach  $n\pi^*$ -Anregung ermittelten zeigen: Die Zerfallszeiten und spektrale Form der Amplitudenspektren für die 0.34 ps, 3.0 ps und 12 ps-Komponenten werden bei  $\pi\pi^*$ -Anregung quasi reproduziert (ermittelte Zeitkonstanten hier: 0.42 ps, 2.9 ps und 12 ps). Dies legt nahe, die Interpretation der molekularen Dynamik von der oben zu übernehmen (vgl. Kapitel 4.5). Das heißt, dass die beiden Zeitkonstanten von 0.42 ps und 2.9 ps zum einen die Bewegung aus dem Franck-Condon Bereich mit anschließender interner Konversion in den *cis*-Grundzustand (0.42 ps) und zum anderen zu einem Intermediat auf der  $S_1$ -Potentialfläche gehören, das eine diffusive Bewegung macht und langsamer isomerisiert (2.9 ps). Die langsame Zeitkonstante von 12 ps gehört zu einem Kühlprozess im Grundzustand, der Energie an das umgebende Lösungsmittel abgibt.

Doch trotz der großen Ähnlichkeiten gibt es einige relevante Unterschiede in der Dynamik nach  $\pi\pi^*$ -Anregung, die im Vergleich zur  $n\pi^*$ -Anregung verstanden werden müssen:

- Eine neue, zusätzliche Zeitkonstante von 0.13 ps ist nötig, um die spektroskopischen Daten richtig zu beschreiben. Diese schnelle Komponente hat ein Amplitudenspektrum mit negativen Banden bei 390 nm und 510 nm (vgl. Abb. 4.8 und Abb. A.1). Da das transiente Spektrum des  $S_1$ -Zustands in diesen Bereichen absorbiert, kann diese Komponente als Aufbau einer Population im  $S_1$ -Zustand erklärt werden. Mit der gleichen Zeitkonstante beobachtet man den Zerfall eines transienten Absorptionssignals (Maxima bei 470 nm und 600 nm). Dieses Signal erscheint instantan mit dem Anregungs-Impuls und kann daher als transiente Absorption des direkt populierte  $S_2$ -Zustands interpretiert werden (in guter Übereinstimmung mit Resultaten von Fujino et al. [FT00, FAT02]). Da die langsameren Zeitkonstanten und ihre zugehörigen Spektren im Vergleich zur  $n\pi^*$ -Anregung unverändert sind erscheint es sinnvoll, die Zeitkonstante von 0.13 ps der strahlungslosen Relaxation  $S_2 \rightarrow S_1$  zuzuordnen. Von

dort aus geschieht die weitere Isomerisierung dann mit einer ähnlichen Dynamik wie nach  $n\pi^*$ -Anregung.

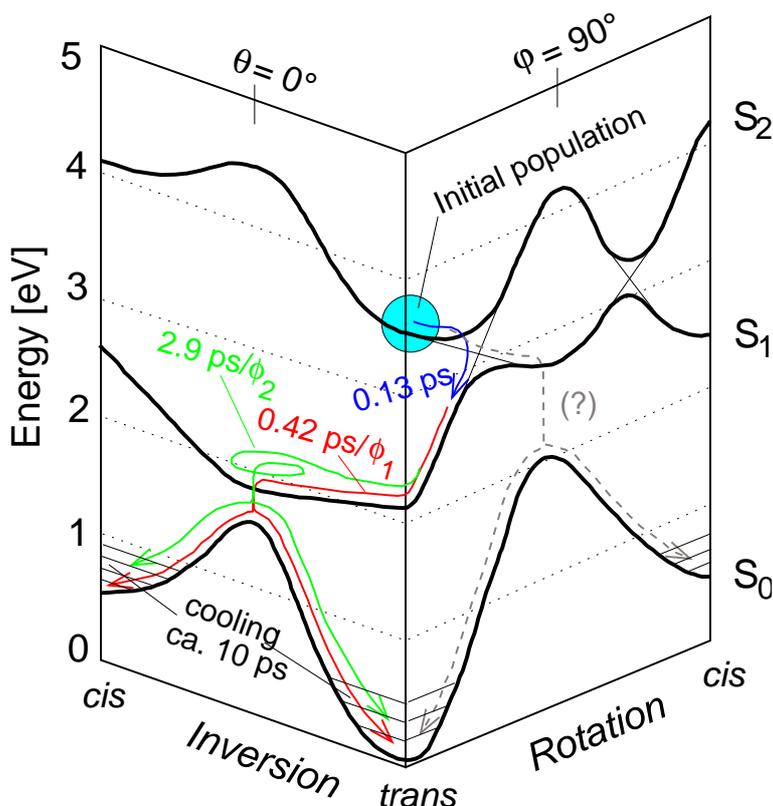
- Ein zweiter Unterschied zwischen  $n\pi^*$ - und  $\pi\pi^*$ -Anregung zeigt sich beim Vergleich der Amplitudenspektren von 0.42 ps- und 2.9 ps-Komponente. Diese beiden Zeitkonstanten sind mit einer transienten Absorption des Franck-Condon Zustands (0.42 ps,  $S_0 \rightarrow S_1$  nach  $n\pi^*$ -Anregung) und mit dem Zwischenzustand auf der  $S_1$ -Potentialfläche verbunden (2.9 ps). Zwar ist die Form der beiden Spektren unverändert, jedoch ist die Amplitude des Franck-Condon Zustands (0.42 ps) nach  $\pi\pi^*$ -Anregung erheblich verstärkt. Dies führt zu der Interpretation, dass das angeregte Molekül die  $S_1$ -Potentialfläche in einer anderen Geometrie erreicht als der  $S_0 \rightarrow S_1$  Franck-Condon Bereich und dass deshalb das Aufteilungsverhältnis zwischen schneller (0.42 ps) und langsamerer Komponente (2.9 ps) verändert ist. Wie bereits erwähnt ist der weitere Weg der Isomerisation inklusive Abkühlen unverändert, was einen weiteren Hinweis darauf gibt, dass der gleiche intermediäre Zustand populierte wird, die  $S_1$  Potentialfläche jedoch an einem leicht anderen Punkt erreicht wird.
- Ein dritter Unterschied zeigt sich im Signal des Kühlprozesses im Grundzustand (sinusförmiges Amplitudenspektrum der 12 ps-Komponente). Interessant ist besonders der Bereich  $< 370$  nm: das Signal in diesem Spektralbereich steigt mit Zeitkonstanten von 0.42 ps und 2.9 ps an und zerfällt dann mit 12 ps. Nach  $\pi\pi^*$ -Anregung ist dieses Signal verstärkt und verbreitert. Dies lässt sich durch die höhere Anregungsenergie der Photonen des UV-Anregungs-Lichtimpulses (266 nm bzw. 340 nm) im Vergleich zur Anregung im sichtbaren Spektralbereich (480 nm) erklären.

Damit ergibt sich folgende Interpretation, die schematisch in Abbildung 4.14 dargestellt ist (gezeichnet in Anlehnung an Potentialflächen die von Monti et al. berechnet wurden [MOP82]): Nach Anregung in der  $\pi\pi^*$ -Absorptionsbande ist der  $S_2$ -Zustand populierte und es beginnt eine schnelle Bewegung entlang der Rotations-Reaktionskoordinate hin zur  $S_1$ -Potentialfläche (0.13 ps), die mit viel Überschussenergie erreicht wird. Die Form der  $S_1$ -Fläche legt nahe, dass die Isomerisierung dann entlang der Inversions-Koordinate in den *cis*-Grundzustand weiterläuft. Da die  $S_1$ -Potentialfläche mit mehr Überschussenergie erreicht wird als nach  $n\pi^*$ -Anregung, gelangt ein größerer Teil der Moleküle direkt zum konischen Schnitt (0.42 ps, Isomerisierungs-Quantenausbeute  $\phi_1$ ) und weniger Moleküle folgen dem diffusiven Pfad (2.9 ps, Isomerisierungs-Quantenausbeute  $\phi_2$ ). Ordnet man diesen beiden Prozessen unterschiedliche Isomerisierungs-Quantenausbeuten ( $\phi_1$ ,  $\phi_2$ ) zu, so lässt sich damit auch der beobachtete Rückgang der (totalen) Isomerisierungs-Quantenausbeute von ca. 0.25 bei  $n\pi^*$ -Anregung auf ca. 0.12 bei  $\pi\pi^*$ -Anregung erklären.

Bei Betrachtung der Abbildung fällt auf, dass die Potentialfläche eine weitere Möglichkeit einer Aufteilung am Übergang  $S_2 \rightarrow S_1$  mit einer späteren Isomerisierung entlang der Rotations-Koordinate enthält. Die spektroskopischen Daten geben jedoch keinen Hinweis

darauf, dass dieser Weg eingenommen wird (eine wesentlich unterschiedliche Bewegung des Moleküls sollte zu anderen Amplitudenspektren führen).

Ein Argument wurde in der bisherigen Diskussion noch nicht gebracht: Wie von Schulz et al. herausgestellt wurde, sind die Zustände  $S_3$  und  $S_4$  nahezu isoenergetisch zu  $S_2$  [SQL<sup>+</sup>03] (siehe auch [CP99]). Es ist deshalb möglich, dass bei  $\pi\pi^*$ -Anregung eine Population dieser Zustände erzeugt wird, die eine direkte Bewegung (entlang der Rotations-Koordinate) zurück in den *trans*-Grundzustand macht und dadurch auch die Isomerisierungs-Quantenausbeute reduzieren würde. Darauf wird weiter unten im Abschnitt 4.7.3 („Isomerisierungs-Mechanismus“) eingegangen werden.



**Abbildung 4.14:** Schema des Isomerisierungs-Prozesses *trans* → *cis* nach Anregung in der  $\pi\pi^*$ -Bande (die Zeichnung basiert auf Rechnungen von Monti et al. [MOP82] — siehe auch [LYM<sup>+</sup>98]).

#### 4.7.2 *cis* → *trans* Photoreaktion

Im Gegensatz zur *trans* → *cis* Photo-Isomerisierung sind die Unterschiede zwischen  $n\pi^*$ - und  $\pi\pi^*$ -Anregung für die *cis* → *trans*-Richtung subtiler. Die prinzipiellen Dynamiken sind wieder ähnlich. Im Falle der  $n\pi^*$ -Anregung beschreibt eine schnelle Komponente mit einer Zeitkonstanten von 0.17 ps (Azobenzol in Ethanol, 0.1 ps für Azobenzol in DMSO)

den direkten *cis*→*trans*-Isomerisierungs-Prozess auf einer steilen Potentialfläche des angeregten  $S_1$ -Zustands (Bewegung aus dem Franck-Condon Bereich heraus und anschließende Isomerisierung). Ein sehr kleiner Teil der Moleküle macht eine diffusive Bewegung auf der  $S_1$ -Potentialfläche, bevor sie den *trans*-Grundzustand erreichen (2 ps in Ethanol, 0.9 ps in DMSO — vgl. die sehr kleinen Beiträge der jeweiligen Amplituden in Abb. 4.7, siehe auch [NHZW97]). Im Grundzustand schließlich gibt das Molekül seine Überschussenergie als Wärme an das Lösungsmittel mit einer Zeitkonstanten von ca. 10 ps ab.

Wie oben beschrieben, können die experimentellen Daten von *cis*-Azobenzol mit drei Zeitkonstanten sowohl für die  $n\pi^*$ - als auch für die  $\pi\pi^*$ -Anregung beschrieben werden. Die ermittelten Zerfallszeiten und Amplitudenspektren sind ähnlich, weshalb wieder die Interpretation übernommen wird: die initiale Isomerisierung erfolgt mit 0.2 ps, die diffusive Bewegung ist mit der 1.1 ps-Zeitkonstanten verbunden und der intramolekulare Kühlprozess findet mit 14 ps statt.

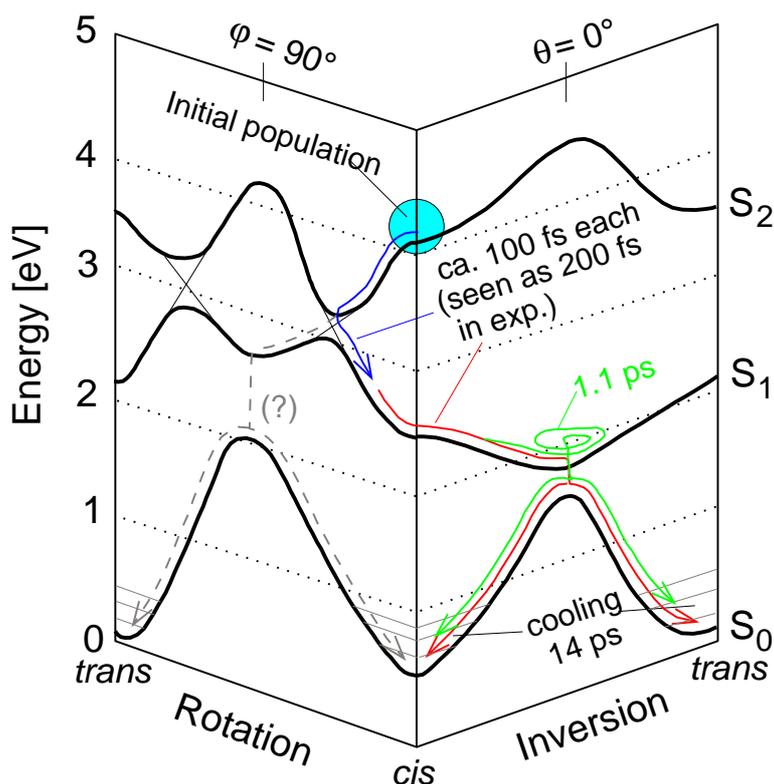
Auch wenn die ermittelten Zerfallszeiten und Amplitudenspektren ähnlich sind, gibt es doch Unterschiede:

1. Der direkte Isomerisierungs-Prozess zeigt eine etwas längere Zeitkonstante, obwohl mehr Überschuss-Energie vorhanden ist. Diese Verlangsamung kann erklärt werden, wenn ein ähnlicher sequentieller Mechanismus wie für die *trans*→*cis*-Isomerisierung nach  $\pi\pi^*$ -Anregung angenommen wird: dann geht eine initiale Relaxation  $S_2 \rightarrow S_1$  mit ca. 0.13 ps dem eigentlichen Isomerisierungs-Prozess mit 0.17 ps voraus. Da diese beiden Zeitkonstanten so eng beieinander liegen, können sie im Experiment nicht einzeln aufgelöst werden, man sieht nur eine Rate mit ca. 0.2 ps. Dies deckt sich auch mit theoretischen Arbeiten von Cattaneo und Persico, die eine ultraschnelle Isomerisierung für *cis*-Azobenzol nach  $\pi\pi^*$ -Anregung vorhersagen [CP99].
2. Weiterhin fällt auf, dass die Amplituden des 1.1 ps-Prozesses wesentlich größer sind. Nach  $n\pi^*$ -Anregung tragen die langsameren Zeitkonstanten eigentlich nicht mehr zum Signal bei (vgl. Abb. 4.7). Insbesondere ist auch der Anteil der 0.9 ps-Komponente sehr gering, was darauf hin deutet, dass die *cis*→*trans*-Isomerisierung nach  $n\pi^*$ -Anregung ein sehr gerichteter Prozess ist, bei dem die diffusive Bewegung (0.9 ps) keine große Rolle spielt. Anders nach  $\pi\pi^*$ -Anregung: Jetzt zeigt die 1.1 ps-Komponente (besonders im Bereich  $< 450$  nm) einen deutlichen Anteil am Gesamt-Signal, ein Indiz dafür, dass jetzt der diffusive Prozess wichtiger wird.
3. Der dritte Unterschied betrifft den Kühlprozess. Die Intensität des sinusförmigen Spektrums ist höher und die Bänder sind breiter als nach  $n\pi^*$ -Anregung, obwohl die Thermalisierungs-Zeiten nicht wesentlich geändert sind ( $n\pi^*$ -Anregung: 10 ps [NHZW97],  $\pi\pi^*$ -Anregung: 14 ps). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass nach  $\pi\pi^*$ -Anregung die höhere Überschuss-Energie des Anregungs-Photons schliesslich zu einem heißeren Molekül im Grundzustand führt.

Diese Interpretation ist in der schematischen Zeichnung von Abbildung 4.15 zusammengefasst und dargestellt: Nach Anregung in die  $\pi\pi^*$ -Absorptionsbande wird der  $S_2$ -

Zustand populiert und macht eine schnelle Bewegung entlang der Rotations-Reaktionskoordinate hin zur  $S_1$ -Potentialfläche ( $\approx 0.13$  ps), die mit hoher Überschuss-Energie erreicht wird. Die weitere Isomerisierung verläuft dann gerichtet entlang der Inversions-Reaktionskoordinate ( $\approx 0.17$  ps) durch die konische Durchschneidung zum *trans*-Grundzustand. Das Experiment ist nicht in der Lage, diesen sequentiellen Prozess aufzuspalten, weshalb aus den Daten nur eine Zeitkonstante von 0.2 ps extrahiert wird, die beiden Prozessen ( $S_2 \rightarrow S_1$  und  $S_1 \rightarrow S_0$ ) entspricht. Ein kleiner Teil der Moleküle (jedoch mehr als nach  $n\pi^*$ -Anregung) macht eine diffusive Bewegung auf der  $S_1$ -Potentialfläche hin zum *trans*-Grundzustand. Dort findet der intermolekulare Kühlprozess mit 14 ps statt. Wie bereits in Abb. 4.14 bietet die Energie-Landschaft auch hier die Möglichkeit einer Aufteilung am Übergang  $S_2 \rightarrow S_1$  mit einer anschließenden Isomerisierung entlang der Rotations-Koordinate. Die spektroskopischen Daten zeigen hierfür jedoch wieder keine Hinweise.

Ordnet man den beiden Prozessen „direkte Isomerisierung“ und „langsamere Isomerisierung nach diffusiver Bewegung“ wie oben unterschiedliche Isomerisierungs-Quantenausbeuten zu, so kann wie auch im *trans*→*cis*-Fall der beobachtete Rückgang der (totalen) Isomerisierungs-Quantenausbeute erklärt werden.



**Abbildung 4.15:** Schema des Isomerisierungs-Prozesses *cis*→*trans* nach Anregung in der  $\pi\pi^*$ -Bande (die Zeichnung basiert auf Rechnungen von Monti et al. [MOP82]).

Wie lassen sich nun diese Beobachtungen mit den in der Literatur diskutierten Isomerisierungs-Modellen vereinbaren?

### 4.7.3 Isomerisierungs-Mechanismus nach $\pi\pi^*$ -Anregung

Drei Modelle werden in der Literatur für die Relaxation von Azobenzol nach  $\pi\pi^*$ -Anregung diskutiert und in Abschnitt 4.2 vorgestellt worden:

- **Modell 1:** Verschiedene Mechanismen: Inversions-Bewegung bei  $n\pi^*$ -Anregung, Rotation bei  $\pi\pi^*$ -Anregung.
- **Modell 2:** Sequentieller Prozess:  $S_2 \rightarrow S_1$  und Inversion im  $S_1$ . Zusätzlich „rotational deactivation“, d. h. teilweise Rotations-Bewegung im  $S_2$ , die aber nicht vollendet werden kann und deshalb nicht zur Isomerisierung beiträgt.
- **Modell 3:** Gemischte Population: Besetzung nicht nur des  $S_2$ -Zustands, sondern auch der Zustände  $S_3$  und  $S_4$ . Aus den Zuständen  $S_{3,4}$  geht die Bewegung ohne zu isomerisieren zurück in den Grundzustand, für die Population im  $S_2$  gilt:  $S_2 \rightarrow S_1$  und dort Inversions-Bewegung.

Die folgende Diskussion soll beleuchten, inwieweit die hier gemessenen Daten mit den drei Modellen vereinbar sind.

**Zu Modell 1:** Ein gänzlich verschiedener Isomerisierungs-Mechanismus auf der  $S_2$ -Potentialfläche würde unterschiedliche Zwischenzustände und somit unterschiedliche Amplitudenspektren implizieren. Die Amplitudenspektren nach  $n\pi^*$ - und  $\pi\pi^*$ -Anregung haben jedoch eine große Ähnlichkeit, weshalb die hier beschriebenen Experimente keine Anzeichen auf einen alternativen Isomerisierungs-Mechanismus geben.

**Zu Modell 2:** Fujino et al. haben Experimente zur transienten Absorption und zur zeitaufgelösten Fluoreszenz an *trans*-Azobenzol in Hexan nach 266 nm-Anregung durchgeführt und ermittelten Lebensdauern von 0.11 ps für den  $S_2$ -Zustand und von 0.50 ps für den  $S_1$ -Zustand [FAT02].

Die hier präsentierten Daten unterstützen Modell 2 insofern als alle beobachteten Zeitkonstanten sowohl für die *trans*→*cis*- als auch für die *cis*→*trans*-Richtung unabhängig von der Anregungs-Wellenlänge ähnlich sind und jeweils das Intermediat im  $S_1$ -Zustand beobachtet wird. Die zusätzliche 0.13 ps-Zeitkonstante kann als Relaxation in den  $S_1$ -Zustand erklärt werden. Insbesondere in den Daten für die *trans*→*cis*-Reaktion legen die nahezu unveränderten Zeitkonstanten und Amplitudenspektren der für die Isomerisierung verantwortlichen 0.42 ps- und 2.9 ps-Komponenten nahe, dass die Isomerisierung auf der gleichen Potentialfläche erfolgt wie nach  $n\pi^*$ -Anregung.

Neben dem eigentlichen Isomerisierungs-Mechanismus muss das Modell natürlich auch die beobachtete Reduktion der Isomerisierungs-Quantenausbeute für *trans*-Azobenzol von 25% ( $n\pi^*$ -Anregung) auf 12% ( $\pi\pi^*$ -Anregung) erklären (bzw. 50%→25% für *cis*-Azobenzol).

Gemäß Fujino et al. hat diese Reduktion der Isomerisierungs-Quantenausbeute nach  $\pi\pi^*$ -Anregung ihren Ursprung in einem zusätzlichen strahlungslosen Übergang eines heißen Moleküls auf der  $S_1$ -Potentialfläche zurück in den *trans*-Grundzustand („rotational deactivation“).

Dieser strahlungslose Übergang würde einen zusätzlichen Reaktionskanal in das Modell integrieren. Ordnet man jedoch wie oben beschrieben den beiden Isomerisierungsprozessen (direkte Isomerisierung mit 0.42 ps, diffusive Bewegung mit 2.9 ps) unterschiedliche Quantenausbeuten zu, so ergibt sich eine alternative Erklärung des Rückgangs der Isomerisierungs-Quantenausbeute, die ohne zusätzlichen Reaktionskanal auskommt.

**Zu Modell 3:** Wie in Modell 2 findet in diesem Modell die eigentliche Isomerisierung nach einem schnellen  $S_2 \rightarrow S_1$ -Übergang (hauptsächlich) auf der  $S_1$ -Potentialfläche statt. Der Unterschied in der Isomerisierungs-Quantenausbeute wird hier durch die Einbeziehung der elektronischen Zustände  $S_3$  und  $S_4$  erklärt. Da die Zustände  $S_2$  und  $S_{3,4}$  nahezu isoenergetisch sind, soll der Anregungs-Impuls eine Population dieser drei Zustände erzeugen.

Die Bewegung aus dem  $S_2$ -Zustand heraus wurde in der Gas-Phase von Schultz et al. mit 0.17 ps gemessen und die Bewegung aus dem  $S_{3,4}$ -Zustand heraus mit 0.42 ps. Wie man in Abbildung 4.8 und Abb. A.1 sieht, zeigt das Amplitudenspektrum der 0.13 ps-Komponente den Zerfall einer breiten transienten Absorption  $S_2 \rightarrow S_N$ , überlagert mit einem sich erholenden Absorptions-Signal mit Maxima bei 390 nm und 510 nm. Diese Erholung zeigt sich nur in der schnellsten Zeikonstante (0.13 ps). Dies scheint eine Aufteilung der Molekülbewegung im  $S_2$ -Zustand zu unterstützen, wobei ein Teil der Moleküle einen Übergang auf die  $S_1$ -Potentialfläche machen (und dann isomerisieren) und der andere Teil direkt entlang der Rotations-Reaktionskoordinate zurück in den *trans*-Grundzustand geht. Die Zeitkonstanten, die durch Photoelektron-Spektroskopie für die Relaxation des  $S_{3,4}$ -Zustands und durch transiente Absorptions-Spektroskopie für die direkte Isomerisierung auf der  $S_1$ -Potentialfläche ermittelt wurden, sind exakt gleich (0.42 ps). Die hier durchgeführten Experimente sind daher nicht in der Lage zu unterscheiden, ob die  $S_{3,4}$ -Zustände durch den Anregungs-Lichtimpuls wesentlich populiert werden oder nicht.

Auch in diesem Modell wird zur Erklärung der reduzierten Isomerisierungs-Quantenausbeute ein neuer Reaktionskanal eingeführt. Das zur 0.42 ps-Komponente gehörige Amplitudenspektrum kann jedoch allein durch die wohlbekanntes  $S_1$ -Dynamik konsistent erklärt werden (und die reduzierte Isomerisierungs-Quantenausbeute durch die unterschiedlichen Quantenausbeuten der beiden  $S_1$ -Prozesse).

Dies wird auch durch folgende Beobachtung gestützt: In dieser Arbeit wurde die  $\pi\pi^*$ -Anregung sowohl mit 266 nm- als auch mit 340 nm-Lichtimpulsen durchgeführt, was zu unterschiedlichen Besetzungen der  $S_2$ - und  $S_{3,4}$ -Zustände führen sollte und somit auch zu unterschiedlicher Dynamik. Die beobachteten Amplitudenspektren und Zerfallszeiten sind jedoch für beide Anregungs-Wellenlängen extrem ähnlich.

**Zusammengefasst** kann man somit festhalten, dass die Modelle 2 und 3 beide eine Isomerisierung auf der  $S_1$ -Potentialfläche enthalten, bezüglich des Isomerisierungs-Mechanismus also übereinstimmen. Die Schwierigkeiten kommen dadurch, dass bei gleichbleibendem Isomerisierungs-Mechanismus der experimentell beobachtete Unterschied in der Isomerisierungs-Quantenausbeute erklärt werden muss. Sowohl Fujino et al. als auch Schultz et al. benötigen dazu einen zusätzlichen Reaktionskanal („rotational deactivation“ bei Fujino et al. bzw. „gemischte Population“ des  $S_2$  und  $S_{3,4}$  bei Schultz et al.).

Die hier präsentierten Daten erlauben es, ohne zusätzlichen Reaktionspfad auszukommen, wenn man den beiden Isomerisierungs-Prozessen (direkte Isomerisierung mit 0.42 ps und diffusive Bewegung mit 2.9 ps) unterschiedliche Quantenausbeuten zuordnet. Die beobachteten unterschiedlichen relativen Amplituden dieser beiden Prozesse geben dabei eine einfache Möglichkeit, das Problem der reduzierten Isomerisierungs-Quantenausbeute zu erklären. Dies hat den Vorteil, dass kein neuer Reaktionspfad in das Modell integriert werden muss.



## 5 Beobachtung gezielt ausgelöster Konformationsänderungen in Azopeptiden

Die Untersuchungen in diesem Kapitel sollen eine Antwort auf die erste der beiden in der Einleitung gestellten Fragen liefern:

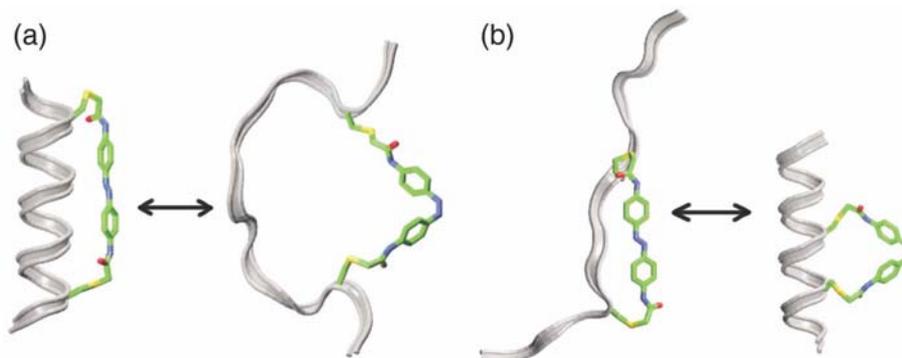
„Welchen Einfluss hat das Lösungsmittel auf die initialen Faltungsvorgänge in Peptiden?“

Zur Beantwortung dieser Frage wird in diesem Kapitel das Molekül Azobenzol in einem Peptid-Verbund zur kontrollierten Auslösung von Konformationsänderungen einzusetzen. Diese Konformationsänderungen werden durch einen kurzen Anregungs-Lichtimpuls ausgelöst und können dann mit der Technik der zeitaufgelösten transienten Absorptionsspektroskopie (indirekt) beobachtet werden.

Azobenzol ist aus zweierlei Gründen ideal, um es in Experimente zur Untersuchung der initialen Schritte der Peptidfaltung einzubeziehen. Erstens ist die reine Isomerisierung innerhalb weniger Pikosekunden abgeschlossen, der Start-Zeitpunkt einer durch Azobenzol ausgelösten Faltungsreaktion kann dadurch sehr genau definiert werden. Zweitens besitzen die beiden Isomere des Azobenzols große geometrische Unterschiede: durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung verkürzt sich die Länge des Azobenzols fast um den Faktor zwei von 9 Å (*trans*-Form) auf 5.5 Å (*cis*-Form).

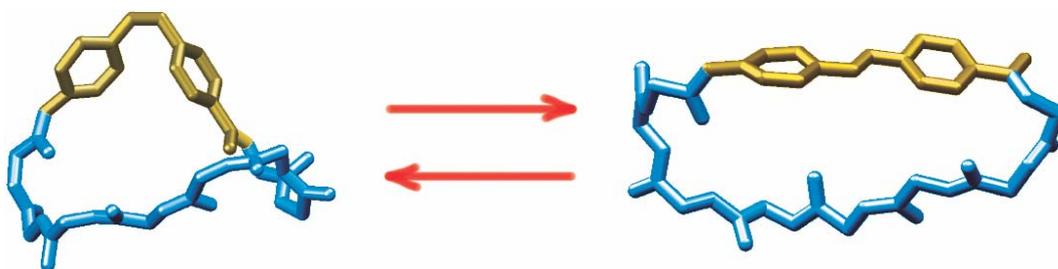
Diese beiden Eigenschaften sind dafür verantwortlich, dass es mittlerweile bereits einen zweiten Ansatz gibt, Azobenzol zur Untersuchung der Proteinfaltung einzusetzen. Kumita et al. berichten von Peptiden, in die sie Azobenzol als Photoschalter eingebaut haben; sie konnten nachweisen, dass der Helix-Anteil des Peptides stark schwankt, wenn das Azobenzol Molekül von der *trans*- in die *cis*-Form geschaltet wird [KSW00, CKWK03]. Inzwischen konnten sie ihr Linker-Molekül so modifizieren, dass es wasserlöslich wird [ZBK<sup>+</sup>03] und in ihrer jüngsten Arbeit zeigen, dass ein 16 Aminosäuren langes  $\alpha$ -helikales Peptid, das wie in Abbildung 5.1 dargestellt mit dem Azobenzol-Linkermolekül verknüpft ist, nach Anregung mit einem 7 ns dauernden Laserimpuls mit einer Zeitkonstanten von 55 ns entfaltet wird [CKWK03]. Weitere Arbeiten, die sich mit Azobenzol-Peptiden beschäftigen, finden sich in [USM<sup>+</sup>02, KYT04].

Die in diesem Kapitel untersuchten Peptide sind etwas kürzer. Sie bestehen aus einem Oktapeptid, das durch ein modifiziertes Azobenzol zu einem Ring geschlossen wurde. Die Länge des Peptid-Teils ist dabei genau so gewählt, dass in der *trans*-Form des



**Abbildung 5.1:** Azobenzol wird auch zur Untersuchung der Faltung größerer Peptide eingesetzt. Die Abbildung zeigt, wie das Molekül zur Steuerung des Helix-Gehalts in einem 16 Aminosäuren langen Peptid verwendet werden kann (die Abbildung stammt aus [FKSW02]).

Azobenzols der mögliche Konformationsraum des Peptids stark eingeschränkt ist (das Peptid ist gestreckt, siehe Abb. 5.2 rechts). Ist das Azobenzol jedoch in der *cis*-Form, dann ist der verfügbare Konformationsraum wesentlich größer und das Peptid bildet eine schleifenförmige Struktur aus (Abb. 5.2 links). Durch Einstrahlung von Licht kann im Experiment die (Ent-)Faltung gezielt ausgelöst und zeitaufgelöst beobachtet werden.



**Abbildung 5.2:** Prinzipielle Idee der Experimente an den Azopeptiden. Das Azobenzol-Molekül (golden eingefärbt) kann reversibel durch einen kurzen Lichtimpuls zwischen der *cis*- (linke Seite) und der *trans*-Form (rechte Seite) hin- und hergeschaltet werden. Der Peptid-Teil (blau eingefärbt) durchläuft dabei konformationelle Änderungen.

Die hier untersuchten Azopeptide stellen ein ideales Modellsystem zur Untersuchung initialer Schritte der Peptidfaltung dar, denn zum einen ist das System groß genug, dass eine Konformationsdynamik zu erwarten ist, zum andern ist das System aber noch klein genug, dass sowohl die experimentellen Daten noch interpretierbar sind als auch eine computergestützte Molekulardynamik-Simulation durchführbar ist und somit Theorie und Experiment vergleichbar sind [SCS<sup>+</sup>02].

Dieses Kapitel gliedert sich in folgende Abschnitte:

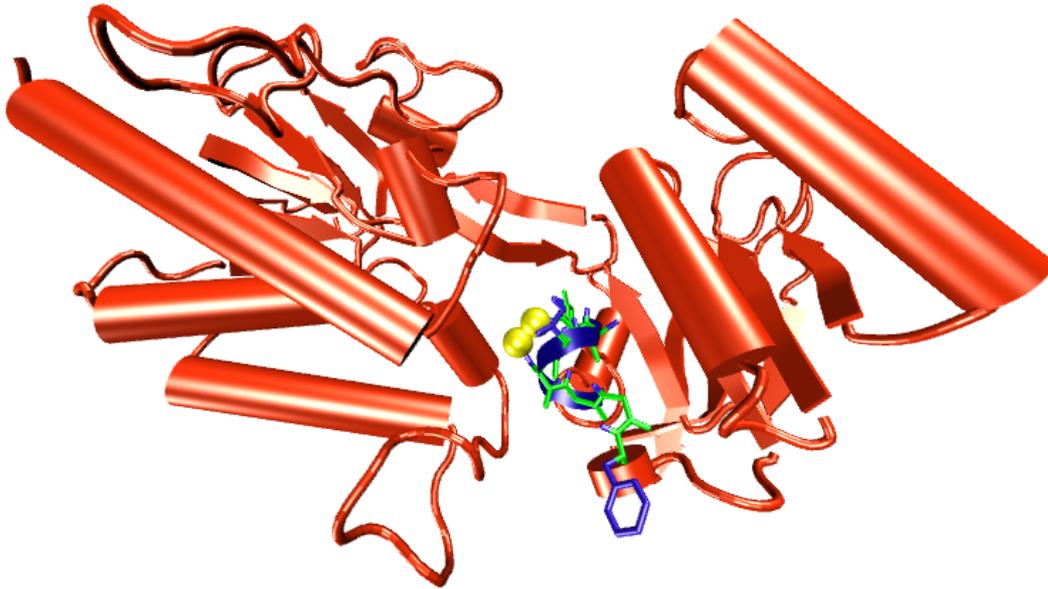
- Ein acht Aminosäuren langes Teilstück des Enzyms Thioredoxin Reduktase, das

das aktive Zentrum enthält, dient als **biophysikalisches Modellsystem** für alle im Folgenden besprochenen Azopeptide (Abschnitt 5.1).

- In aufwändigen Synthesen gelang es der Gruppe um Prof. Luis Moroder am Max-Planck Institut für Biochemie in Martinsried, zwei künstliche **Azobenzol-Aminosäuren zu synthetisieren** und diese mit dem Oktapeptid zu Azopeptiden zusammenzubauen. Im Falle der wasserlöslichen Azopeptide erlaubt der Photoschalter sogar eine Steuerung der biologischen Aktivität des Peptidteils per Licht (Abschnitt 5.2).
- Die **Beobachtung initialer Schritte der Peptidfaltung** ist bei den Azobenzolen mit den Mitteln der sichtbaren Spektroskopie indirekt möglich. Abschnitt 5.3 erklärt das Beobachtungsprinzip.
- Zum Verständnis der gemessenen Daten der wasserlöslichen Peptide ist ein Vergleich mit den DMSO-löslichen Peptiden wichtig. Abschnitt 5.4 bringt deshalb eine **Zusammenfassung** der Ergebnisse an **DMSO-löslichen Azopeptiden**.
- **Neue Ergebnisse** zu (teilweise biologisch aktiven) **wasserlöslichen Azopeptiden** werden in Abschnitt 5.5 vorgestellt.
- Den Abschluss des Kapitels bildet eine Diskussion, die den **Einfluss des Lösungsmittels** auf die Zeitskalen der Konformationsdynamik für die Azopeptide untersucht. Es zeigt sich, dass sich die Viskosität des Lösungsmittels direkt in der Geschwindigkeit der Bewegung des Peptid-Teils widerspiegelt (Abschnitt 5.6).

## 5.1 Biologische Vorlage für die Azopeptide — Thioredoxin Reduktase

Die Thioredoxin Reduktase (TrxR) gehört zur Familie der Flavoproteine, ihren Namen hat sie von ihrer Fähigkeit, oxidierte Thioredoxine (Trx) zu reduzieren. Trx sind 12 kDa schwere Enzyme, die die Redox-Umgebung in der Zelle kontrollieren [WJAM<sup>+</sup>00]. Interessant ist, dass Trx in allen Organismen vom Bakterium über Pilze bis zum Menschen stets in der gleichen Form auftritt, während TrxR zwei sehr unterschiedliche Formen entwickelt hat. Man unterscheidet im Wesentlichen zwischen dem H-TrxR und dem L-TrxR. Die „high molecular weight“ Thioredoxin Reduktase H-TrxR hat ein Gewicht von ca. 55 kDa und das kennzeichnende Motiv CXXXXC, d. h. zwei Cysteine, zwischen denen vier beliebige Aminosäuren („X“) eingebaut sein können. H-TrxR findet man in Tieren und im Menschen. Die „low molecular weight“ Thioredoxin Reduktase L-TrxR wiegt ca. 35 kDa, hat das Motiv CXXC und ist z. B. in Pilzen und Bakterien zu finden. Die Sequenzen von L-TrxR und H-TrxR sind nur zu ca. 20 % identisch (der Vergleich bezieht sich auf die Regionen, die in beiden Enzymen vorhanden sind [MP00, HMEC02]). Die TrxR besitzen ein katalytisches Zen-

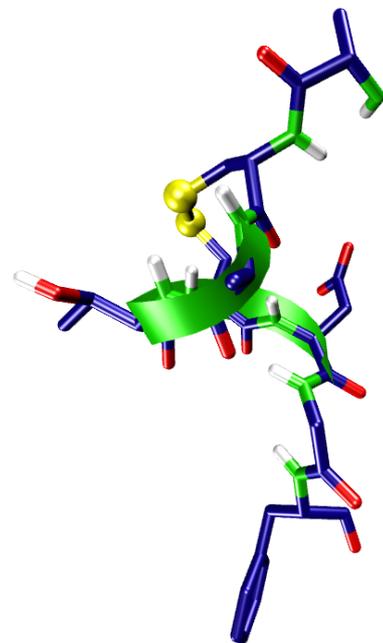


**Abbildung 5.3:** Thioredoxin Reduktase aus *Escherichia Coli* (L-TrxR, FO-Form). Wie üblich werden  $\alpha$ -Helices durch Zylinder und  $\beta$ -Faltblätter durch flache, orientierte Pfeile symbolisiert. Das aktive Zentrum ist farbig abgesetzt. Das Enzym ist sehr beweglich: Zur Reduktion von Thioredoxin muss sich die NADPH-Domäne des Enzyms (linker Bildteil) um  $67^\circ$  um die Hauptachse in die FR-Form drehen [LWJL00].

trum, das eine reversible Oxidation/Reduktion der beiden Cysteine durchführen kann und katalysieren die Reduktion von Trx durch NADPH [WJAM<sup>+</sup>00].

TrxR tritt in zwei Konformationen auf, die mit FR („Flavin Reduktion“) und FO („Flavin Oxidation“) bezeichnet werden. In Lösung kommen FR und FO zu gleichen Teilen vor. Beide Konformationen des Enzyms sind wichtig für die Vervollständigung des katalytischen Zyklus. Die FR Konformation wird benötigt zur Flavin-Reduktion durch NADPH und zur Reduktion von Trx durch das Enzym Dithiol. Die FO Konformation leistet den Elektron-Transfer vom Flavin zum Disulfid [LWJL00, WJAM<sup>+</sup>00]. In verschiedenen Arbeiten wird der TrxR eine pathophysiologische Rolle in chronischen Krankheiten wie rheumatische Arthritis oder AIDS zugesprochen [BGSM00] und das Protein gleichzeitig als Ansatzpunkt („drug target“) z. B. für die Chemotherapie [EAMM<sup>+</sup>03] oder für Malaria-Medikamente vorgeschlagen [DCMV<sup>+</sup>03].

Der folgende Abschnitt beschreibt, wie aus der Kombination des aktiven Zentrums der TrxR zusammen mit einem



**Abbildung 5.4:** Das aktive Zentrum der TrxR (Cys-Ala-Thr-Cys).

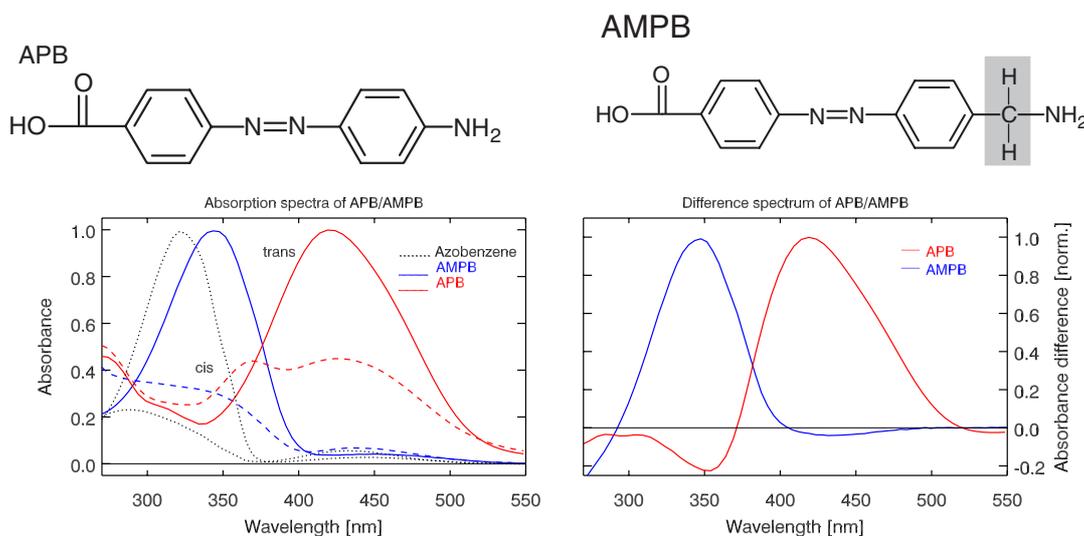
Azobenzol-Derivat die untersuchten Modellsysteme der Azopeptide entstehen.

## 5.2 Synthese und Eigenschaften der Azopeptide

Die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren (siehe Anhang H, Seite 207) lassen sich beliebig kombinieren und moderne Peptid-Synthesizer fügen vollautomatisch eine vorgegebene Aminosäuren-Sequenz zusammen. Das Schaltermolekül Azobenzol kann jedoch keine Peptidbindung ausbilden und lässt sich deshalb nicht ohne weiteres in ein Peptid einbauen. Dies gelingt erst, wenn eine Carboxy- und eine Aminogruppe an das Azobenzol angefügt werden.

In aufwändigen Arbeiten gelang es der Gruppe um Prof. Luis Moroder am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München, zwei verschiedene Azobenzol-Derivate („Azobenzolsäuren“, APB und AMPB) zu synthetisieren [BSMM99]:

- **(4-Aminophenyl)azobenzolsäure (APB)**: Durch die Aminogruppe wird das  $\pi$ -Elektronensystem des Azobenzols stark beeinflusst, so dass die  $\pi\pi^*$ -Bande um fast 100 nm rotverschoben wird,  $\pi\pi^*$ - und  $n\pi^*$ -Banden überlappen (siehe Abb. 5.5).
- **(4-Aminomethylphenyl)azobenzolsäure (AMPB)**: Durch Einbau einer zusätzlichen Methylgruppe wird das delokalisierte  $\pi$ -Elektronensystem zwischen Phenylring und Aminogruppe unterbrochen, das Absorptionsspektrum von AMPB hat die identische Form wie Azobenzol, leichte Unterschiede ergeben sich dadurch, dass die  $\pi\pi^*$ -Bande um 20 nm rotverschoben ist, die  $n\pi^*$ -Bande um etwa 5 nm (siehe Abb. 5.5).



**Abbildung 5.5:** Oben: Strichformeln der Schaltermoleküle APB und AMPB. Unten: Absorptionsspektren und stationäre Differenzspektren der Schaltermoleküle Azobenzol, APB und AMPB.

Die beiden Azobenzol-Derivate APB und AMPB können nun in eine Peptidkette eingebaut werden. Wie oben bereits erwähnt, soll das Modellpeptid das aktive Zentrum der Thioredoxin Reduktase aus *E. Coli* enthalten, das aus vier Aminosäuren besteht. Um zusammen mit der Azobenzolsäure einen photoschaltbaren Peptidring zu erhalten, muss die Peptidkette allerdings aus rein geometrischen Überlegungen heraus mindestens acht Aminosäuren lang sein, weil sonst das Azobenzol-Molekül gar nicht die *trans*-Form einnehmen kann. Aus diesem Grund wurde ein acht Aminosäuren langes Teilstück der TrxR verwendet (Aminosäuren Nr. 134-141), das das aktive Zentrum umfasst und gerade so kurz ist, dass es bei *trans*-APB (bzw. *trans*-AMPB) „gespannt“ ist. Drei verschiedene Modellpeptide wurden (in wiederum aufwändigen Synthesen) in der Gruppe um Prof. Luis Moroder hergestellt (ihre Sequenzen sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst):

- **Lineares Azopeptid (lAPB/lAMPB):** Die übliche Synthesetechnik zur Herstellung eines Peptid-Rings besteht darin, zuerst ein lineares Peptid herzustellen, das später zyklisiert wird. Auf diese Weise wurde auch von der Gruppe Moroder zuerst ein lineares Azopeptid hergestellt. In den Experimenten ist dies das Referenz-System: das Schalten des Azobenzols (*trans* oder *cis*) sollte wenig Einfluss auf das lineare Peptid haben, die Peptide lAPB bzw. lAMPB sollten demnach eine ähnliche Dynamik zeigen wie Azobenzol selbst (vgl. Abschnitt 5.4).
- **Zyklisches Azopeptid (cAPB/cAMPB):** Durch die Zyklisierung des linearen Azopeptids lAPB (lAMPB) entsteht das ringförmige Azopeptid cAPB (cAMPB), wie es schematisch in Abbildung 5.2 dargestellt ist. In diesen Peptiden kann durch die Isomerisierung des Azobenzols eine Konformationsänderung im Peptid-Teil ausgelöst werden.
- **Bizyklisches Azopeptid (bcAPB/bcAMPB):** Das aktive Zentrum der TrxR besteht, wie oben bereits erwähnt, aus dem Motiv CXXC. Die beiden Cysteine können über ihre Schwefelatome eine Disulfidbrücke ausbilden. Im System cAPB/cAMPB wird die Ausbildung dieser Disulfidbrücke durch Schutzgruppen (StBu) verhindert. Werden die beiden Cysteine jedoch oxidiert, erhält man einen zweiten Ringschluss und damit das bizyklische Azopeptid bcAPB/bcAMPB (siehe auch Abb. 5.6).

Das natürliche und deshalb biophysikalisch interessante Lösungsmittel für alle Peptide und Proteine ist natürlich Wasser. Ob und wie gut sich ein Peptid in Wasser lösen lässt, hängt jedoch sehr stark von seiner Sequenz ab. Die ersten synthetisierten Azopeptide waren aufgrund ihrer Sequenz nur in DMSO löslich.

Synthese und spektroskopische Untersuchungen zu APB und den DMSO-löslichen APB-Peptiden finden sich in [WNP<sup>+</sup>97, BSMM99, RBS<sup>+</sup>00, Spö01, SCS<sup>+</sup>02] und werden weiter unten zusammengefasst dargestellt (Abschnitt 5.4.1). Die Synthese der DMSO-löslichen AMPB-Peptide ist in [RCBM00] beschrieben, die Zusammenfassung der spektroskopischen Ergebnisse folgt in Abschnitt 5.4.2.

In Abbildung 5.6 sieht man am Beispiel der bizyklischen Azopeptide deren historische Entwicklung: Zuerst wurde bcAPB(DMSO) synthetisiert (Abb. 5.6, oben). NMR-

## 5.2 Synthese und Eigenschaften der Azopeptide

Analysen zeigten jedoch, dass hier durch den starren Chromophor und die zusätzliche Disulfidbrücke kein definierter Konformationsübergang mehr möglich ist [RBS<sup>+</sup>00]. Dieses Molekül wurde deshalb nicht mit transierender Absorptions-Spektroskopie untersucht. Der nächste Entwicklungs-Schritt war deshalb die Synthese des bcAMPB(DMSO) (Abb. 5.6, mitte). Dieses Molekül eignete sich gut für die Spektroskopie, ist aber durch die Eigenschaften des Peptid-Teils nicht wasserlöslich. Einen vorläufigen Abschluss in der Entwicklung der Azopeptide bildete deshalb die Synthese des bcAMPB(H<sub>2</sub>O) (Abb. 5.6, unten), bei dem drei Aminosäuren außerhalb des aktiven Zentrums durch Lysine ersetzt wurden und so die Wasserlöslichkeit erreicht wurde [RBHM02].

Peptid	Sequenz
Lineares aktives Zentrum der TrxR aus E. Coli.	H-Ala-Cys-Ala-Thr-Cys-Asp-Gly-Phe-OH
lAPB(DMSO)	HO-Gly-Asp-Cys(StBu)-Thr-Ala-Cys(StBu)-Ala-APB-Phe-H
cAPB(DMSO)	zyklisiert(Ala-Cys(StBu)-Ala-Thr-Cys(StBu)-Asp-Gly-Phe-APB)
lAMPB(DMSO)	HO-Gly-Asp-Cys(StBu)-Thr-Ala-Cys(StBu)-Ala-AMPB-Phe-H
cAMPB(DMSO)	zyklisiert(Ala-Cys(StBu)-Ala-Thr-Cys(StBu)-Asp-Gly-Phe-AMPB)
bcAMPB(DMSO)	zyklisiert(Ala-Cys-Ala-Thr-Cys-Asp-Gly-Phe-AMPB)
cAMPB(H <sub>2</sub> O)	zyklisiert(Lys-Ser-Ala-Thr-Ser-Asp-Lys-Lys-AMPB)
bcAMPB(H <sub>2</sub> O)	zyklisiert(Lys-Cys-Ala-Thr-Cys-Asp-Lys-Lys-AMPB)

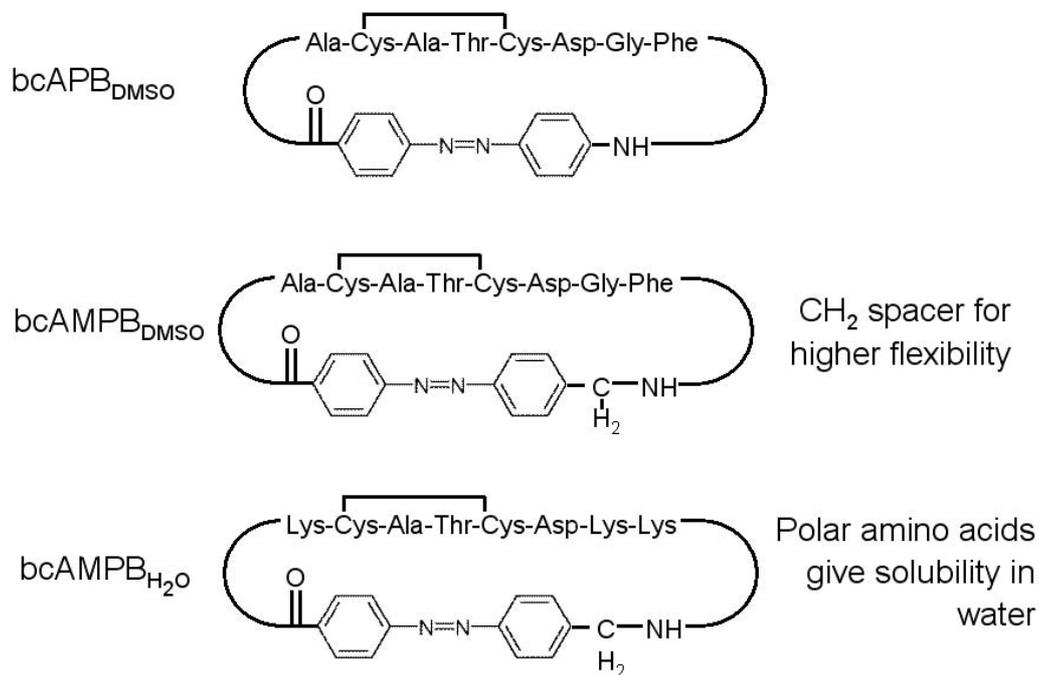
**Tabelle 5.1:** Sequenzen der unterschiedlichen Azopeptide, die in der Gruppe um Prof. Luis Moroder am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München hergestellt wurden.

Bei der Synthese des mono-zyklischen wasserlöslichen Peptids, cAMPB(H<sub>2</sub>O), wurden die beiden Cysteine durch Serine ersetzt. Dies hat den Vorteil, dass man auf die Schutzgruppen (StBu) verzichten kann.

Einen Vergleich der durch NMR-Untersuchungen [RCBM00, RBHM02] gewonnenen Strukturen von cAMPB und bcAMPB in DMSO bzw. Wasser gibt Abbildung 5.7. Man sieht, dass die *trans*- bzw. *cis*-Konformationen der Peptide in beiden Lösungsmitteln jeweils ähnlich sind, es können also wohl jeweils ähnliche intermediäre Konformationen eingenommen werden.

Die Absorptions-Spektren der mono- und bityklischen wasserlöslichen Azopeptide cAMPB(H<sub>2</sub>O) und bcAMPB(H<sub>2</sub>O) (Abb. 5.8) sind fast identisch, außerdem sehr ähnlich den Spektren der DMSO-löslichen Azopeptide. Im Spektralbereich 250–700 nm finden sich für *cis*- und *trans*-Isomer jeweils zwei Banden des Photo-Schalters ( $n\pi^*$ -Bande mit einem Absorptionsmaximum bei 430 nm und  $\pi\pi^*$ -Bande um 300 nm, vgl. Tabelle 5.2).

Es sollte noch festgehalten werden, dass das bityklische Azopeptid bcAMPB(H<sub>2</sub>O) eine photoschaltbare biologische Aktivität besitzt: *cis*-bcAMPB(H<sub>2</sub>O) zeigt deutlich mehr biologische Aktivität als *trans*-bcAMPB(H<sub>2</sub>O) (siehe Anhang B, Seite 191).



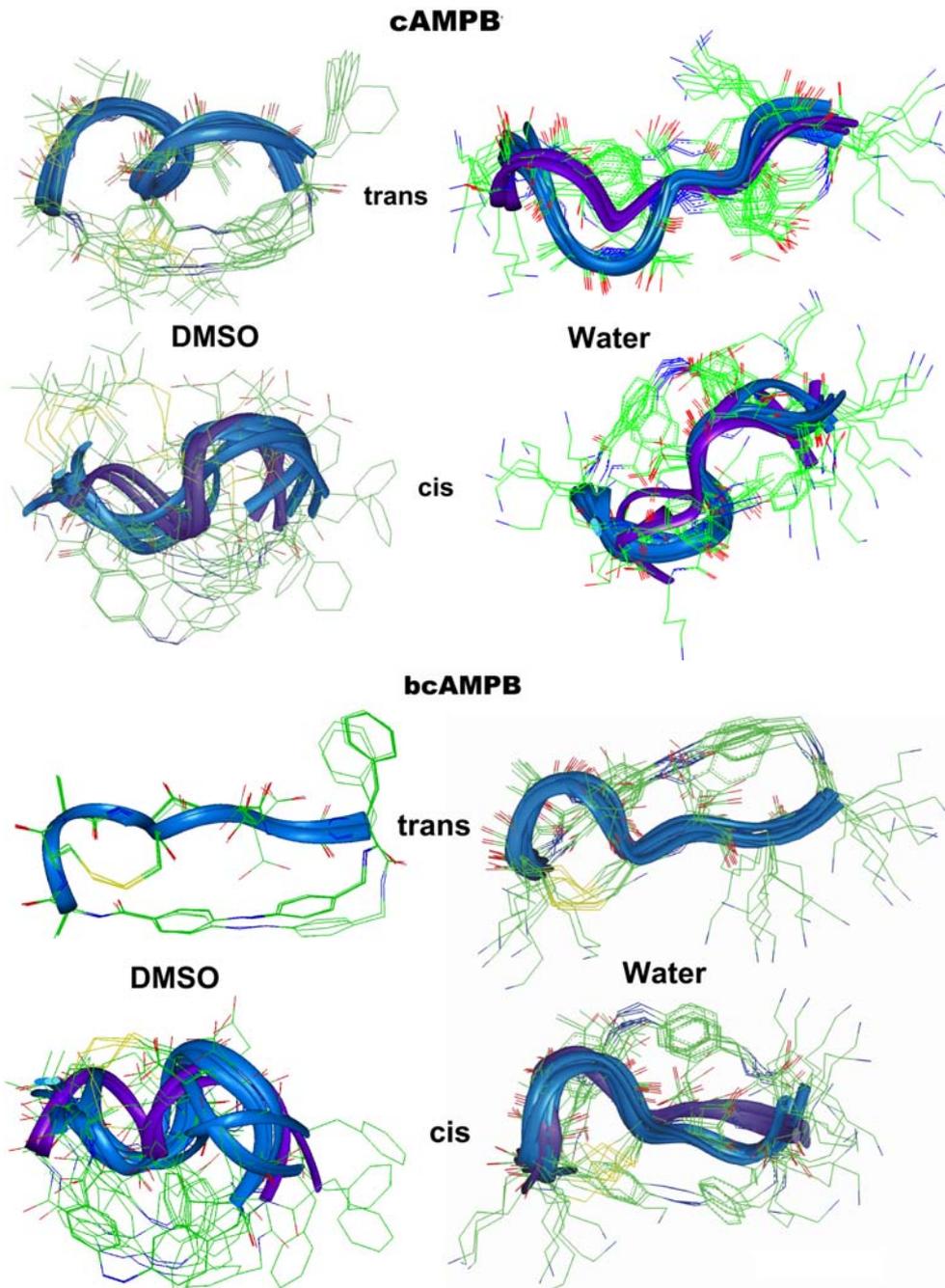
**Abbildung 5.6:** Entwicklung der Azopeptide. Oben: Bicyklisches APB-Peptid. Mitte: Bicyklisches AMPB-Peptid mit Methylspacer für erhöhte Flexibilität. Unten: Durch Substitution mit Lysin wurde die Wasserlöslichkeit des Peptides erreicht.

Nach einer Zusammenfassung der bekannten Ergebnisse, die an DMSO-löslichen Azopeptiden gewonnen wurden folgt eine Darstellung der experimentellen Ergebnisse der wasserlöslichen Azopeptide. Ein Vergleich dieser Daten mit den DMSO-löslichen Azopeptiden stellt schließlich den Einfluss der Lösungsmittel-Viskosität heraus. Es wird sich dabei zeigen, dass die schnellen Reaktionen ungeändert ablaufen, für die langsameren Zeitkonstanten jedoch eine systematische Beschleunigung zu beobachten ist.

### 5.3 Beobachtung getriebener Konformationsdynamik in Azopeptiden

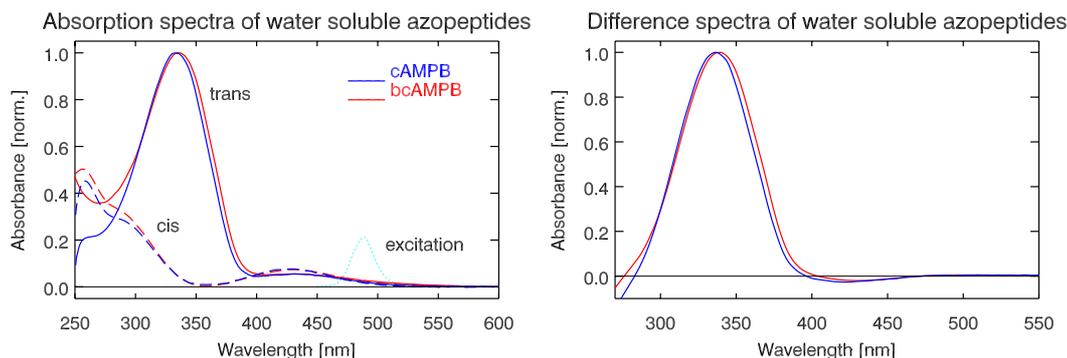
Im sichtbaren Spektralbereich absorbiert keine der 20 natürlichen Aminosäuren (Absorptionsbanden findet man erst unterhalb 300 nm). Die Dynamik von Peptiden und Proteinen kann deshalb im sichtbaren Spektralbereich nicht direkt mit spektroskopischen Mitteln untersucht werden. Zugänglich ist hier nur der Chromophor Azobenzol bzw. die Azobenzolsäure APB/AMPB.

Eine indirekte Beobachtung der Faltungsdynamik des Peptids ist jedoch trotzdem möglich: Das Experiment beginnt in der kompakten *cis*-Konformation, in der der Peptid-Teil eine schleifenförmige Konformation einnimmt (siehe Abb. 5.2 links). Nach der Iso-



**Abbildung 5.7:** Strukturen der Azopeptide in DMSO und Wasser. Die obere Hälfte zeigt die Strukturen für cAMPB, die untere Hälfte die für bcAMPB. Für die beiden Peptide sind im oberen Teil jeweils die Strukturen der *trans*-Form gezeigt (links in DMSO, rechts in Wasser), im unteren Teil jeweils die der *cis*-Form. Die Strukturen wurden mit NMR-Methoden bestimmt und stammen aus [RCBM00, RBHM02]. Die Einzelbilder stellen jeweils eine (bestmögliche) Überlagerung der 10 energieärmsten Zustände (RMSD) dar. Das Rückgrat des Peptid-Teils ist jeweils als blaues Band stilisiert.

## 5 Beobachtung gezielt ausgelöster Konformationsänderungen in Azopeptiden



**Abbildung 5.8:** Absorptions- und Differenzspektren der wasserlöslichen Azopeptide. Die Abbildung enthält in blau das Absorptions- und Differenz-Spektrum des mono-zyklischen Azopeptids cAMPB(H<sub>2</sub>O). In rot sind die entsprechenden Spektren des bi-zyklischen Peptids bcAMPB(H<sub>2</sub>O) eingezeichnet.

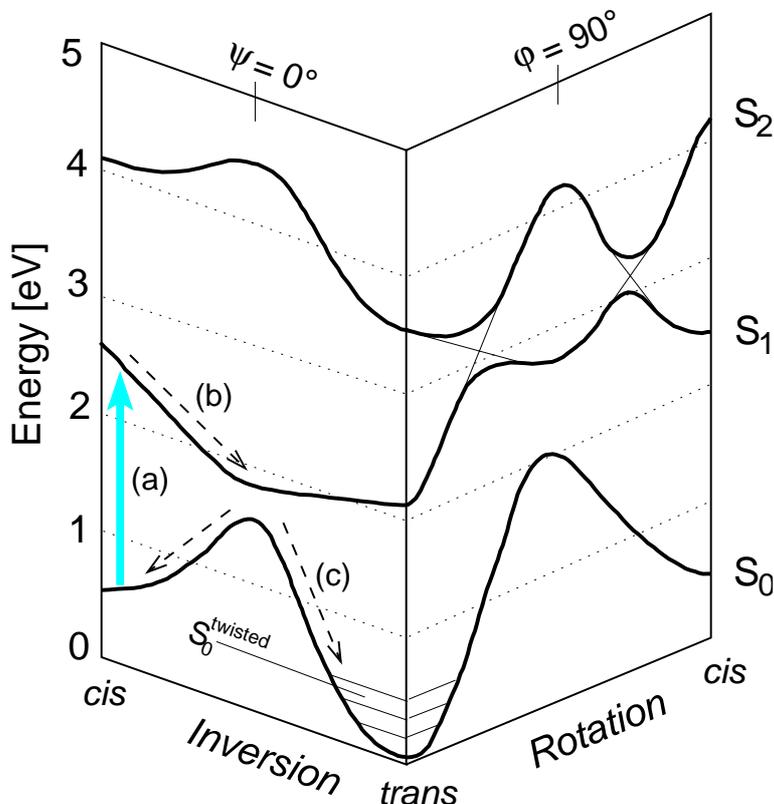
Isomer	nπ*-Bande			ππ*-Bande		
	λ <sub>max</sub> [nm]	FWHM [nm]	ε [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	λ <sub>max</sub> [nm]	FWHM [nm]	ε [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
<i>trans</i>	336	70	21000	430	100	1000
<i>cis</i>	300	45	1600	430	100	6800

**Tabelle 5.2:** Wasserlösliche AMPB-Peptide: Maximum (λ<sub>max</sub>), Halbwertsbreite (FWHM) und Extinktionskoeffizient (ε) der Absorption.

merisierung des Azobenzols wird das Peptid-Rückgrat auseinander gezogen. Die Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich ist nur in der Lage, die Dynamik des Chromophors zu verfolgen. Die wichtige Feststellung ist jetzt, dass das Azobenzol (die Azobenzolsäure APB/AMPB) erst dann seine endgültige *trans*-Form einnehmen kann, wenn auch das Peptid seine endgültige *trans*-Konformation eingenommen hat. Solange im Peptid-Teil noch Umorganisationen stattfinden, wird das Peptid noch eine Kraft auf das Azobenzol ausüben und dessen vollständige Relaxation verhindern. Es ist diese Beobachtung, die es der transienten Absorptions-Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich ermöglicht, Konformationsänderungen im Zeitbereich von Sub-Pikosekunden bis Nanosekunden zu verfolgen.

Die gleiche Argumentation gilt auch für die *trans*→*cis*-Reaktion, allerdings können hier eher konformelle Umorganisationen stattfinden, die den Chromophor gar nicht beeinflussen. Aus diesem Grund ist für die Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich bei allen Azopeptiden die *cis*→*trans*-Reaktion die interessantere. Hier kann, wie beschrieben, (indirekt) die Streckung des Peptid-Teils, d. h. eine getriebene Entfaltung, beobachtet werden. Die prinzipielle Reaktionsdynamik ist dabei für alle Azopeptide gleich, unabhängig

davon, ob das Schaltermolekül APB oder AMPB verwendet wird und unabhängig davon, ob das Lösungsmittel DMSO oder Wasser ist.



**Abbildung 5.9:** Schematischer Ablauf der *cis*→*trans*-Reaktion im Azopeptid (die Abbildung basiert auf Monti et al. [MOP82]). (a) Der Anregungs-Lichtimpuls ( $n\pi^*$ -Bande, 480 nm) erzeugt eine Besetzung im ersten elektronisch angeregten Zustand  $S_1$ . (b) Innerhalb weniger hundert Femtosekunden verlässt das Molekül den Franck-Condon Bereich und gelangt biphasisch in den Grundzustand. (c) Im Grundzustand gelangt das Peptid durch eine Reihe konformationeller Übergänge in die Gleichgewichts *trans*-Konformation.

Diese „allgemeine“ *cis*→*trans*-Reaktionsdynamik der Azopeptide wird im Folgenden beschrieben (siehe Abbildung 5.9). Der Anregungs-Lichtimpuls in der  $n\pi^*$ -Bande ( $\lambda_{\text{pump}} = 480 \text{ nm}$ ) bringt das Molekül in den ersten elektronisch angeregten Zustand  $S_1$ . Innerhalb weniger hundert Femtosekunden verlässt das Molekül den Franck-Condon Bereich. Ein großer Teil der Moleküle findet die konische Durchschneidung mit dieser initialen Bewegung und gelangt auf die Grundzustands-Potentialfläche. Die auf der  $S_1$ -Potentialfläche verbleibenden Moleküle gelangen über interne Konversion innerhalb einiger Pikosekunden in den Grundzustand. Dort wird die Schwingungsenergie des  $S_0^*$  verteilt und heizt das Peptid und umgebendes Lösungsmittel auf. Die geometrische Änderung des Chromophors zieht am Peptid. Dieser Zug ( $S_0^{\text{twisted}}$ ) zwingt das Peptid von seiner ursprünglichen *cis*-Konfiguration durch eine Reihe von konformationellen Übergängen in

die Gleichgewichts *trans*-Konformation. Ohne den Ringschluss des Peptids kann die Photoisomerisation des Chromophor keine ausgeprägten Änderung im Peptid hervorrufen; fs-Spektroskopie sollte in diesem Fall nur geringe Unterschiede zum freien Chromophor feststellen.

### 5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der DMSO löslichen Azopeptide

Die Dissertation von S. Spörlein beschäftigt sich ausführlich mit DMSO-löslichen Azopeptiden [Spö01]. Zum Verständnis der neu durchgeführten Messungen an wasserlöslichen Azopeptiden erfolgt hier eine Zusammenfassung bereits bekannter Ergebnisse. Zuerst werden die Ergebnisse der DMSO-löslichen APB-Peptide vorgestellt, danach die Ergebnisse der DMSO-löslichen AMPB-Peptide.

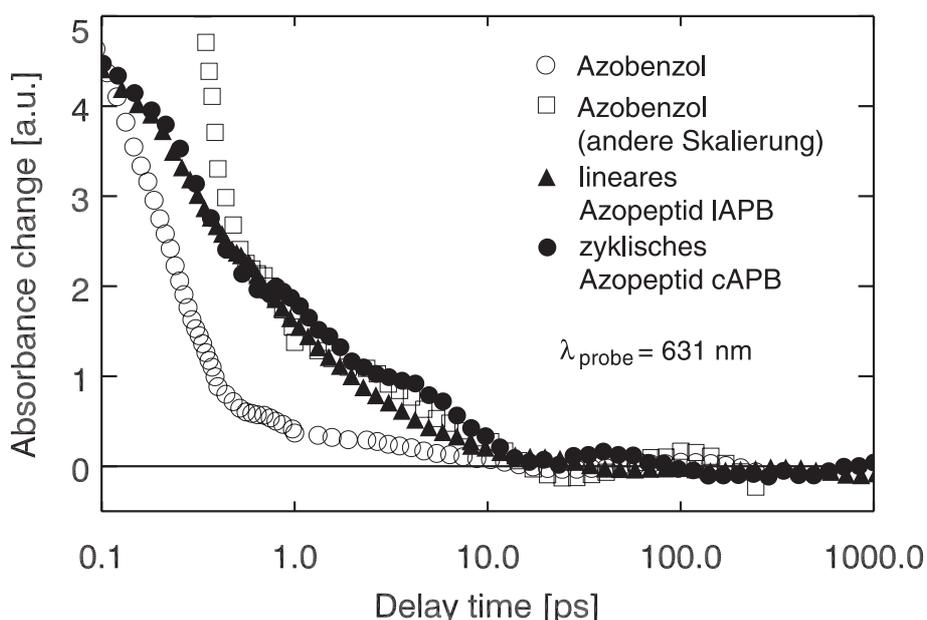
#### 5.4.1 Azopeptide mit dem Schaltermolekül APB

In der Arbeit von S. Spörlein [Spö01] wurde die transiente Absorption von sämtlichen DMSO-löslichen Azopeptiden gemessen, getrennt für waagrechte und senkrechte Polarisation (zwischen Anreg- und Abtast-Lichtimpuls). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kontroll-Experimente an lAPB und cAPB, dem linearen und mono-zyklischen APB-Peptid durchgeführt, in diesem Fall unter magischem Winkel ( $54.7^\circ$  zwischen Anreg- und Abtast-Lichtimpuls). Hierbei konnten die früheren Experimente bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Als neues System wurde im Rahmen dieser Experimente zusätzlich ein Peptid mit der Sequenz Phe-APB-Ala untersucht, das ein Synthese-Zwischenprodukt auf dem Weg von der modifizierten Azobenzolsäure (APB) zum linearen Azopeptid (lAPB) darstellt. Messungen an *trans*-Phe-APB-Ala zeigten wie erwartet sehr ähnliche transiente Spektren wie für das lineare Azopeptid lAPB (Daten nicht gezeigt). Diese Messung konnte die anderen Messungen zusätzlich bestätigen: die Isomerisierung des Schaltermoleküls Azobenzol hat im Falle einer linearen Anordnung keinen Einfluss auf das anhängende Peptid, auch die Länge des anhängenden Peptids ändert daran nichts. Das lineare Azopeptid ist demnach eine gute Referenz, die zum einen mit Azobenzol selbst und zum anderen mit den zyklisierten Peptiden verglichen werden kann.

An den APB-Peptiden wurde für die *cis*→*trans*-Isomerisierung zum ersten Mal eine **Konformationsdynamik im sub-Nanosekunden Bereich** nachgewiesen, wie im Folgenden beschrieben [SCS<sup>+</sup>02].

Die Interpretation beginnt mit einem Vergleich der Zeitverläufe von Azobenzol, linearem (lAPB) und mono-zyklischem Azopeptid (cAPB) im roten Spektralbereich bei 631 nm (siehe Abb. 5.10). Im Grundzustand zeigen sämtliche Systeme in diesem Bereich keine Absorption, hier wird also der Zerfall des angeregten Zustands und somit die Dauer der Photoisomerisierung beobachtet. Die Kinetiken des linearen (lAPB) und zyklischen

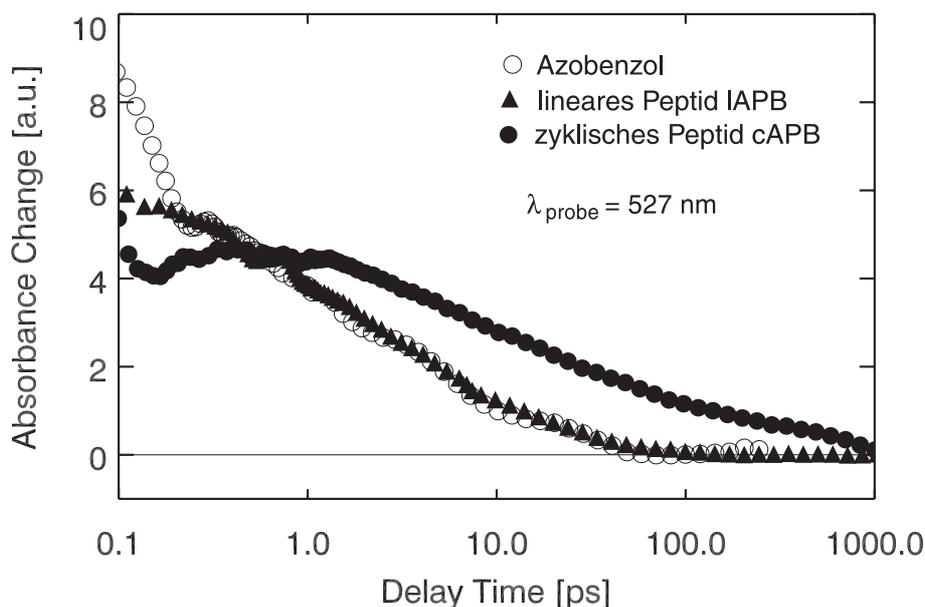


**Abbildung 5.10:** Durch Beobachtung der Transienten in einem Bereich, in dem der Grundzustand nicht absorbiert (Abtast-Wellenlänge 631 nm), wird der Zerfall des angeregten Zustands abgefragt. Eingezeichnet sind die Daten für lineares (IAPB,  $\blacktriangle$ ) und mono-zyklisches Azopeptid (cAPB,  $\bullet$ ) in DMSO. Die Daten für Azobenzol in DMSO sind in zwei unterschiedlichen Skalierungen eingezeichnet ( $\circ$ , bzw.  $\square$ ). Die Daten für IAPB und cAPB stammen aus [SCS<sup>+</sup>02], die Daten für Azobenzol aus dieser Arbeit (Abschnitt 4.3.1, Seite 79).

Azopeptids (cAPB) sind nahezu identisch. Beide Kinetiken können mit zwei Zeitkonstanten von ca. 300 fs und 3 ps modelliert werden. Für freies Azobenzol ist die Kinetik ebenfalls bi-exponentiell mit 170 fs und 2 ps, wobei die schnelle Kinetik stärker ausgeprägt ist (die Kurve für Azobenzol ist deshalb in zwei verschiedenen Skalierungen in Abb. 5.10 eingezeichnet). Man sieht somit, dass die Zerfallszeiten des angeregten Zustands durch das angehängte Peptid kaum beeinflusst werden. Die Isomerisierung des Azobenzol-Teils läuft in den Peptiden nahezu gleich ab wie im freien Chromophor.

Ganz anders ist die Situation, wenn die Transienten im roten Ausläufer der Grundzustandsabsorption verglichen werden, siehe Abb. 5.11. Die transienten Absorptionsänderungen bei 527 nm messen den  $n\pi^*$ -Übergang und können dadurch Relaxationsprozesse im *trans*-Grundzustand anzeigen. Eine zusätzliche  $\sim 10$  ps-Kinetik (Kühlprozess im Grundzustand) tritt sowohl für das freie Azobenzol als auch für das lineare Azopeptid (IAPB) auf. Im Gegensatz dazu findet man für das zyklische Azopeptid (cAPB) weitere und wesentlich langlebigere Zwischenzustände, die der weiterführenden konformationellen Relaxation des Peptids zugeordnet werden, das immer noch einen Zug auf den Chromophor ausübt. Diese Dynamik ist auch nach 1 ns noch nicht vollständig abgeschlossen.

Ähnlich wie hier können somit bei allen mono- und bi-zyklischen Azopeptiden in DMSO (und Wasser) Zeitkonstanten der *cis*→*trans*-Reaktion im 100 ps-Bereich der konformationellen Umorganisation im Peptid-Rückgrat zugeordnet werden.



**Abbildung 5.11:** Durch Beobachtung der Transienten im roten Ausläufer der  $n\pi^*$ -Bande (Abtast-Wellenlänge 527 nm) wird abgefragt, ob das Azobenzol die relaxierte *trans*-Form eingenommen hat. Eingezeichnet sind die Daten für Azobenzol ( $\circ$ ), lineares (IAPB,  $\blacktriangle$ ) und mono-zyklisches Azopeptid (cAPB,  $\bullet$ ) in DMSO. Die Daten für IAPB und cAPB stammen aus [SCS<sup>+</sup>02], die Daten für Azobenzol aus dieser Arbeit.

#### 5.4.2 Azopeptide mit dem Schaltermolekül AMPB

Durch die zusätzliche Methylgruppe ändert sich die „Länge“ des Photoschalters: 12 Å für *trans*-AMPB und 7 Å für *cis*-AMPB (im Vergleich dazu Azobenzol: 9 Å, bzw. 5,5 Å). Das Maximum der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande ist gegenüber Azobenzol (320 nm) auf 343 nm verschoben, das der  $n\pi^*$ -Bande liegt bei 450 nm (435 nm für Azobenzol). Das Anhängen des Peptid-Teils ändert daran nur wenig (vgl. Abb. 5.12), das Maximum der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande liegt jetzt bei 339 nm.

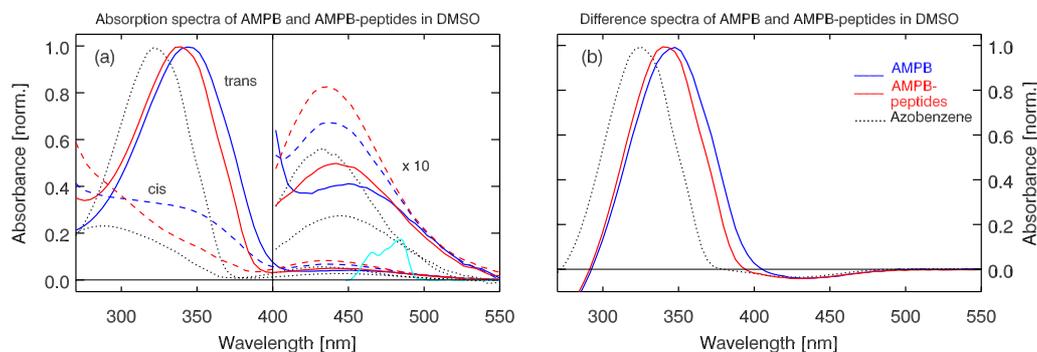
Abbildung 5.13 fasst sämtliche transiente Spektren der AMPB-Peptide in DMSO zusammen und gibt damit eine kompakte Übersicht der experimentellen Ergebnisse. In Abb. 5.14 finden sich sämtliche Zeitkonstanten und die dazu gehörigen Amplitudenspektren.

Die Isomerisierung des AMPB-Chromophors sowie die konformationellen Änderungen auf der 100 ps-Zeitskala sind wie oben für die APB-Peptide beschrieben. Ein auffälliger Unterschied ist, dass für die *trans*→*cis*-Reaktion mit einer  $\sim 10$  ps-Zeitkonstanten nicht ein Kühlprozess<sup>1</sup>, sondern noch ein langsames Verlassen der  $S_1$ -Potentialfläche verknüpft wird [WSS<sup>+</sup>04].

Die sub-ns Konformationsdynamik konnten Bredenbeck et al. mittels zeitaufgelöster Infrarot-Spektroskopie am bizeyklischen Azopeptid bcAMPB(DMSO) bestätigen und darü-

<sup>1</sup>Ein separater Kühlprozess, der ebenfalls auf der 10 ps-Zeitskala ablaufen sollte, konnte nicht aus den Daten extrahiert werden.

berhinaus zeigen, dass die Relaxation des Peptid-Teils auch nach 16 ns noch nicht vollständig abgeschlossen ist [BHS<sup>+</sup>03, BHB<sup>+</sup>03].



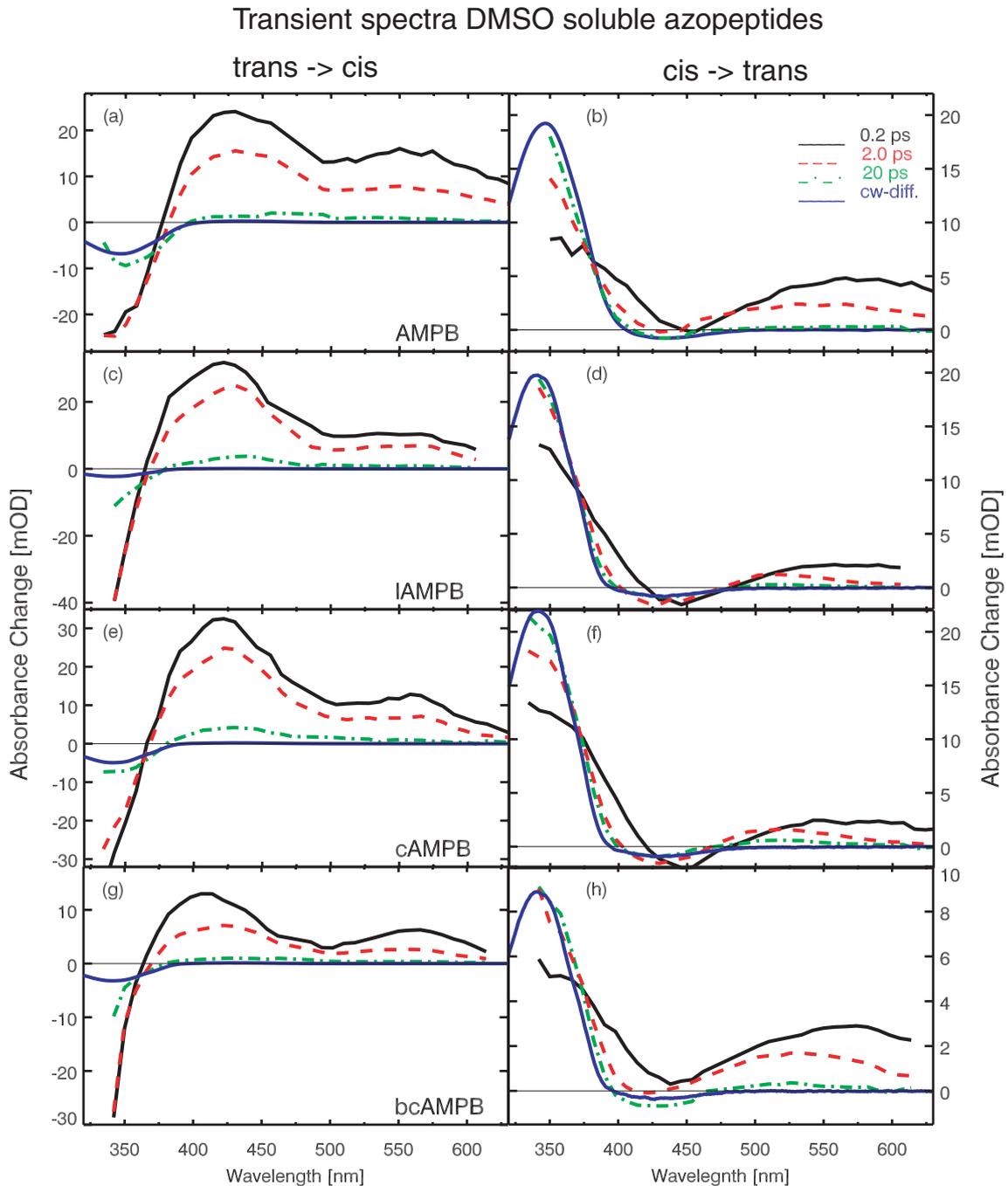
**Abbildung 5.12:** (a) Absorptionsspektren von Azobenzol, AMPB und den AMPB-Peptiden (die Spektren der unterschiedlichen AMPB-Peptide sind untereinander nahezu identisch). (b) Stationäre Differenzspektren.

### 5.4.3 Molekulardynamik-Simulationen

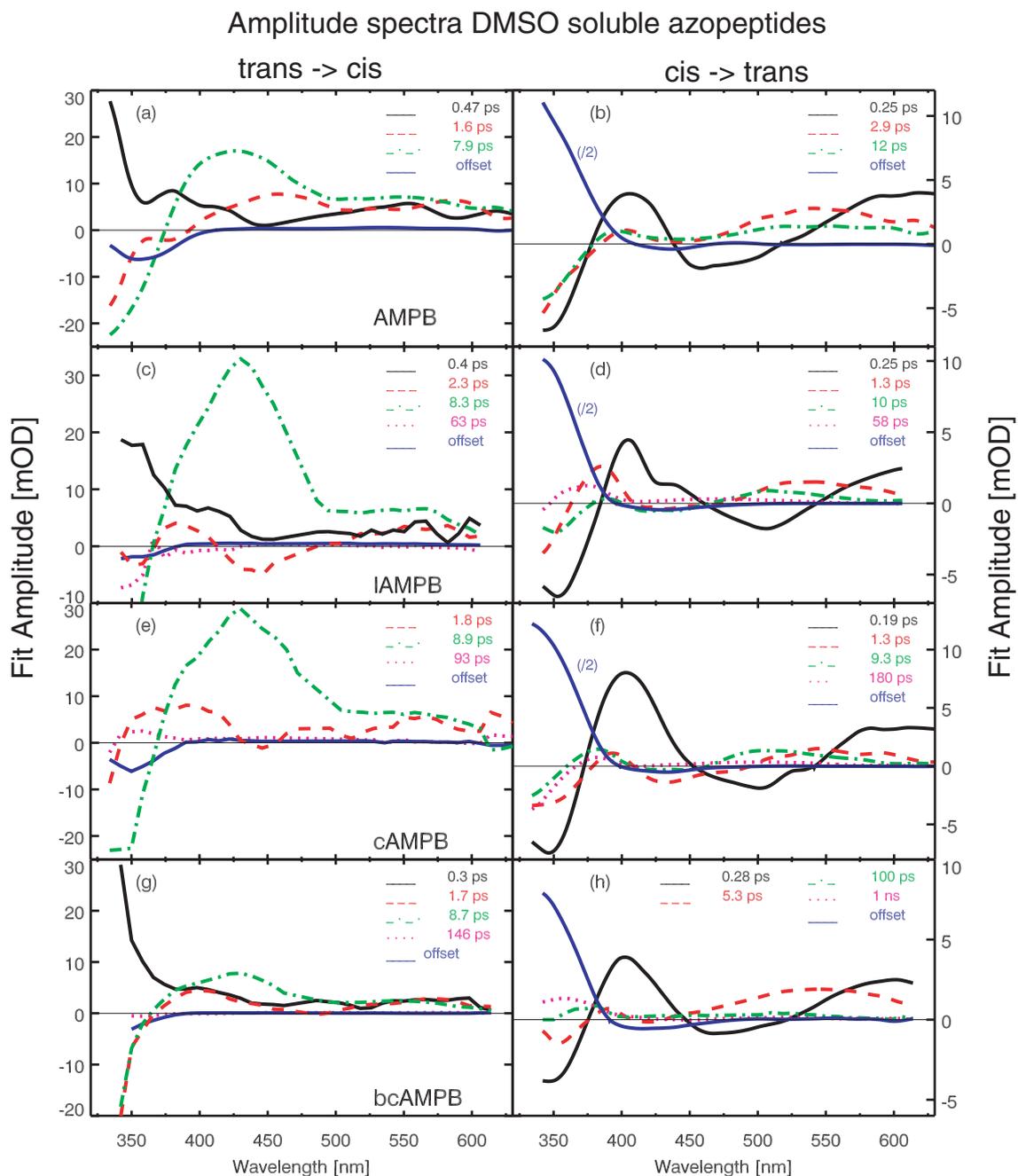
In einer parallel zu der vorliegenden Arbeit durchgeführten Dissertation wurde die (Konformations-)Dynamik der DMSO-löslichen Azopeptide in umfangreichen Molekulardynamik-Simulationen untersucht [Car04] (siehe auch [SCS<sup>+</sup>02]). Aufgrund des enormen Umfangs der Arbeit und den vielen dabei erzielten Ergebnissen sei hier nur angemerkt, dass es erstmals gelang, verlässliche Simulationen bis in den Nanosekundenbereich hinein durchzuführen. Das Modellsystem der Azopeptide zeigt hier einmal mehr seine optimale Einsatzfähigkeit: das System ist gross genug um echte Konformationsänderungen zu zeigen, gleichzeitig aber „klein genug“, um für die Simulation zugänglich zu sein. Experimentell und aus der Simulation gewonnene Erkenntnisse können verglichen werden. Wie auch schon in [SCS<sup>+</sup>02] beschrieben, wurde eine gute Übereinstimmung der theoretischen und experimentellen Ergebnisse gefunden. Umfangreiche Untersuchungen ergaben später, dass der Grad der Übereinstimmung extrem stark von der Wahl verschiedener Kraftfeld-Parameter abhängt (z. B. Kraftkonstanten, die das Azobenzol beschreiben oder auch die konkrete Modellierung des Lösungsmittels DMSO). Für die ausführliche Diskussion sei auf die Dissertation von H. Carstens verwiesen [Car04].

## 5.5 Transiente Absorption der wasserlöslichen Azopeptide

Am mono-zyklischen, cAMPB(H<sub>2</sub>O), und bi-zyklischen Azopeptid, bcAMPB(H<sub>2</sub>O), wurden transiente Absorptionsspektren mit Anregungs-Lichtimpulsen bei einer Zentralwel-



**Abbildung 5.13:** DMSO-lösliche AMPB-Peptide: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten (0.2 ps, 2 ps, 20 ps und Grundzustands-Differenzspektrum). Linke Spalte: Transiente Spektren für die *trans*→*cis*-Reaktion. (a) Chromophor AMPB, (c) lineares AMPB-Peptid IAMPB, (e) mono-zyklisches AMPB-Peptid (cAMPB), (g) bizyklisches AMPB-Peptid (bcAMPB). Rechte Spalte: Transiente Spektren für die *cis*→*trans*-Reaktion. (a) Chromophor AMPB, (c) lineares AMPB-Peptid IAMPB, (e) mono-zyklisches AMPB-Peptid (cAMPB), (g) bizyklisches AMPB-Peptid (bcAMPB).



**Abbildung 5.14:** DMSO-lösliche AMPB-Peptide: Durch globalen Fit ermittelte Zeitkonstanten und zugehörige Amplitudenspektren. Linke Spalte: Zeitkonstanten und Amplitudenspektren für die *trans*→*cis*-Reaktion. (a) Chromophor AMPB, (c) lineares AMPB-Peptid IAMPB, (e) mono-zyklisches AMPB-Peptid (cAMPB), (g) bizaiklisches AMPB-Peptid (bcAMPB). Rechte Spalte: Zeitkonstanten und Amplitudenspektren für die *cis*→*trans*-Reaktion. (a) Chromophor AMPB, (c) lineares AMPB-Peptid IAMPB, (e) mono-zyklisches AMPB-Peptid (cAMPB), (g) bizaiklisches AMPB-Peptid (bcAMPB).

Wellenlänge  $\lambda_{\text{pump}} = 480 \text{ nm}$  ( $n\pi^*$ -Bande) und einer Kreuzkorrelationsdauer  $\tau_{cc} = 80 \text{ fs}$  für die Reaktionsrichtungen  $\text{trans} \rightarrow \text{cis}$  und  $\text{cis} \rightarrow \text{trans}$  durchgeführt.

### 5.5.1 Monozyklisches Azopeptid cAMPB(H<sub>2</sub>O)

Bei den DMSO-löslichen Azopeptiden wurde das mono-zyklische cAMPB(DMSO) so synthetisiert, dass die beiden Cysteine mit Schutzgruppen (StBu) versehen wurden. Auf diese Weise wird verhindert, dass die beiden Cysteine eine Disulfid-Brücke ausbilden können [BSMM99, RBS<sup>+</sup>00, RCBM00].

Für die wasserlöslichen Azopeptide wurde hier ein etwas anderer Weg eingeschlagen und im Falle des mono-zyklischen Azopeptides cAMPB(H<sub>2</sub>O) die beiden Cysteine durch Serine ersetzt. Dies hat den Vorteil, dass die Schutzgruppen keine zusätzliche Einschränkung des Konformationsraums bedeuten [RBHM02].

#### cAMPB(H<sub>2</sub>O): $\text{trans} \rightarrow \text{cis}$ Photoreaktion

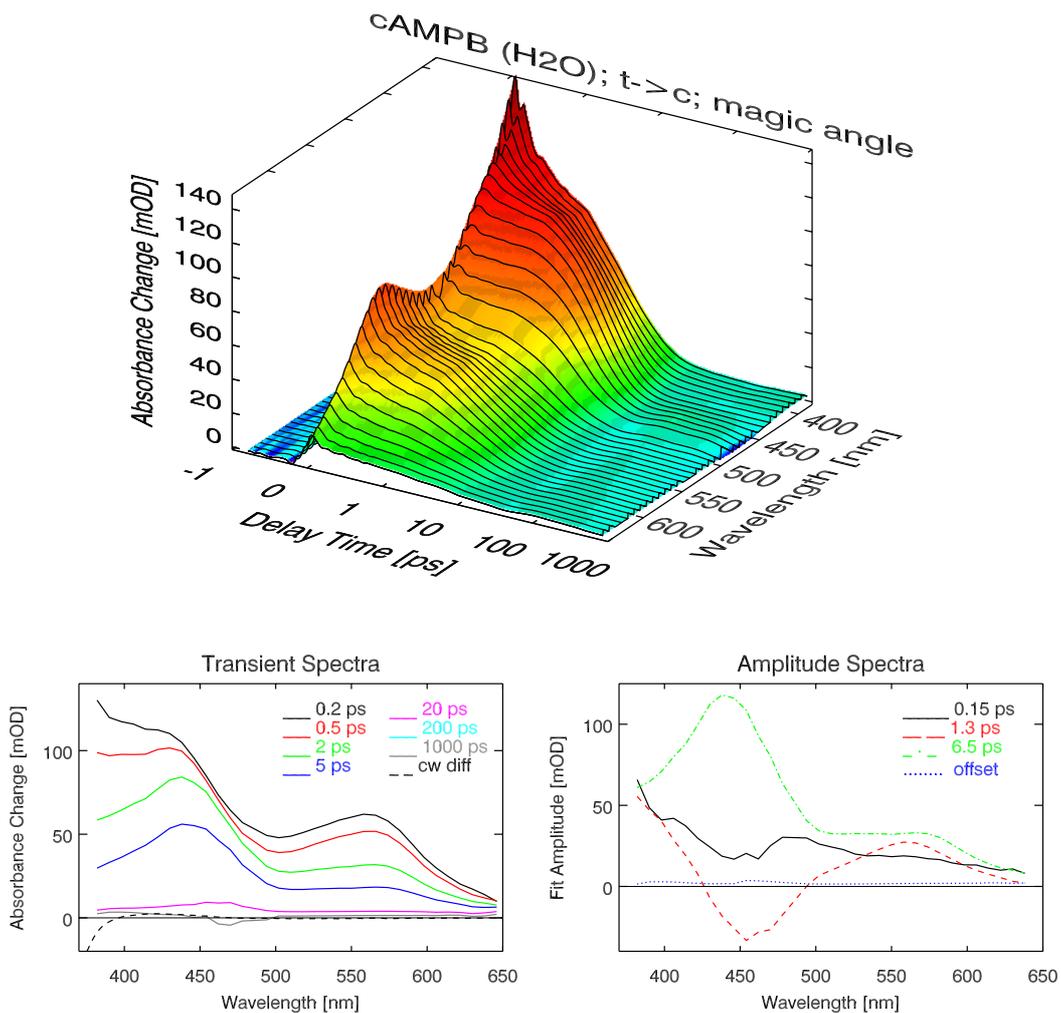
Abbildung 5.15 enthält die Rohdaten, transiente- und Amplitudenspektren von  $\text{trans}$ -cAMPB(H<sub>2</sub>O) nach  $n\pi^*$ -Anregung. Zu frühen Verzögerungszeiten findet man eine Absorptionzunahme über den gesamten beobachteten Spektralbereich mit einer breiten Bande um 560 nm. Zu kleineren Wellenlängen hin ist eine Absorptionzunahme mit einer Schulter bei ca. 430 nm zu sehen. Bei einer Verzögerungszeit von 2 ps ist diese kurzwellige Absorptionzunahme weitgehend zerfallen und die Schulter zeigt sich nun als Bande, 20 ps nach der Anregung sind die Absorptionsänderungen weitgehend verschwunden. Während dieses Zerfalls entwickelt sich die Schulter um 430 nm zur Bande und verschiebt ihre spektrale Lage dabei von 430 nm auf 460 nm. Das Maximum bei 560 nm nimmt ebenfalls ab und verschwindet nach 20 ps. Nach 200 ps ist das stationäre Differenz-Spektrum von cAMPB(H<sub>2</sub>O) erreicht.

Eine qualitative Auswertung der Daten mittels der LDAC-Methode (Abschnitt 3.4, Seite 61) zeigt, dass die kinetischen Prozesse der wasserlöslichen Peptide insgesamt die gleiche Signatur haben wie für die DMSO-löslichen Peptide, einige Teilprozesse sind in Wasser jedoch schneller (LDAC-Daten nicht gezeigt). Die Singularwertzerlegung bestätigt, dass für die Daten in beiden Lösungsmitteln die gleiche Anzahl Basis-Spektren für eine vollständige Beschreibung benötigt werden. Mit diesem Vorwissen wurden die für die DMSO-löslichen Peptide gefundenen Zeitkonstanten als Startwerte für den globalen Fit-Algorithmus genommen.

Für  $\text{trans}$ -cAMPB(H<sub>2</sub>O) wurden folgende Zeitkonstanten ermittelt: 0.15 ps ( $\pm 25\%$ ), 1.3 ps ( $\pm 15\%$ ) und 6.5 ps ( $\pm 5\%$ ) (für die zugehörigen Amplitudenspektren siehe Abb. 5.15).

#### cAMPB(H<sub>2</sub>O): $\text{cis} \rightarrow \text{trans}$ Photoreaktion

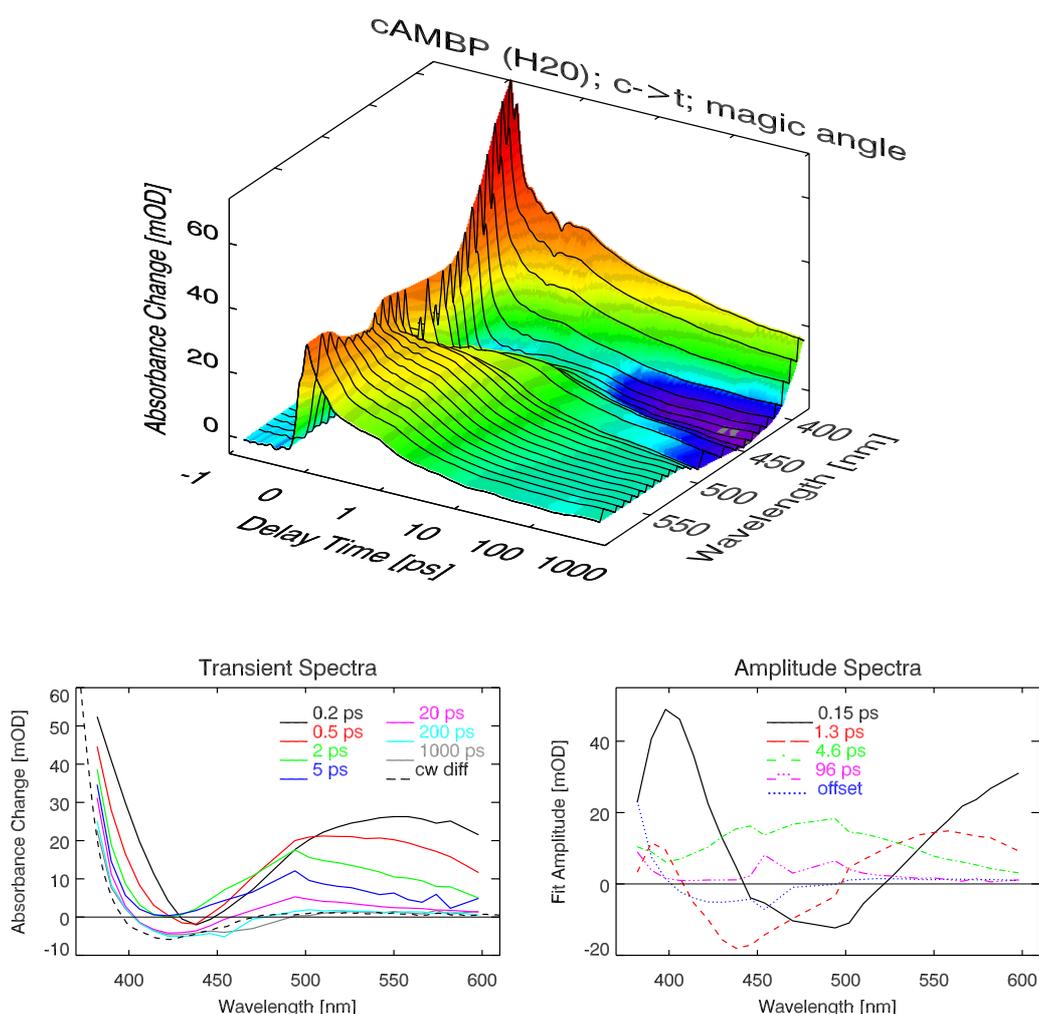
Abbildung 5.16 zeigt den kompletten Datensatz im Überblick, außerdem transiente- und Amplitudenspektren von  $\text{cis}$ -cAMPB(H<sub>2</sub>O) (die Daten sind um 12% verbleibenden  $\text{trans}$ -



**Abbildung 5.15:** Transiente Absorption von *trans*-cAMPB(H<sub>2</sub>O). Oben: Übersicht über die Rohdaten. Unten links: Transiente Spektren. Rechts: Amplitudenspektren.

Anteil im Photostationären Zustand korrigiert, siehe Kapitel 2.1.4). Das initiale transiente Spektrum besitzt ein breites Maximum bei 570 nm (ca. 160 nm FWHM), ein Ausbleichen bei 440 nm und eine stark erhöhte Absorption bei kurzen Wellenlängen. Nach 2 ps ist das Maximum bei 570 nm nach 500 nm verschoben und die Amplitude ist um einen Faktor 2 zurückgegangen. Ebenfalls nach 2 ps hat sich das Ausbleich-Signal von 440 nm auf 420 nm verschoben. Zu diesem Zeitpunkt ist keine Absorptionsabnahme zu sehen. Nach 200 ps ist die Absorptionsänderung nahe am stationären Differenz-Spektrum.

Die globale Anpassung der Modellfunktion an die Messdaten im Zeitbereich 0.2 ps bis 1000 ps liefert folgende Zeitkonstanten: 0.15 ps (-20%, +30%), 4.6 ps (-40%, +45%) und 96 ps (-45%, +80%), die zugehörigen Amplitudenspektren sind in Abb. 5.16 zusammengefasst.

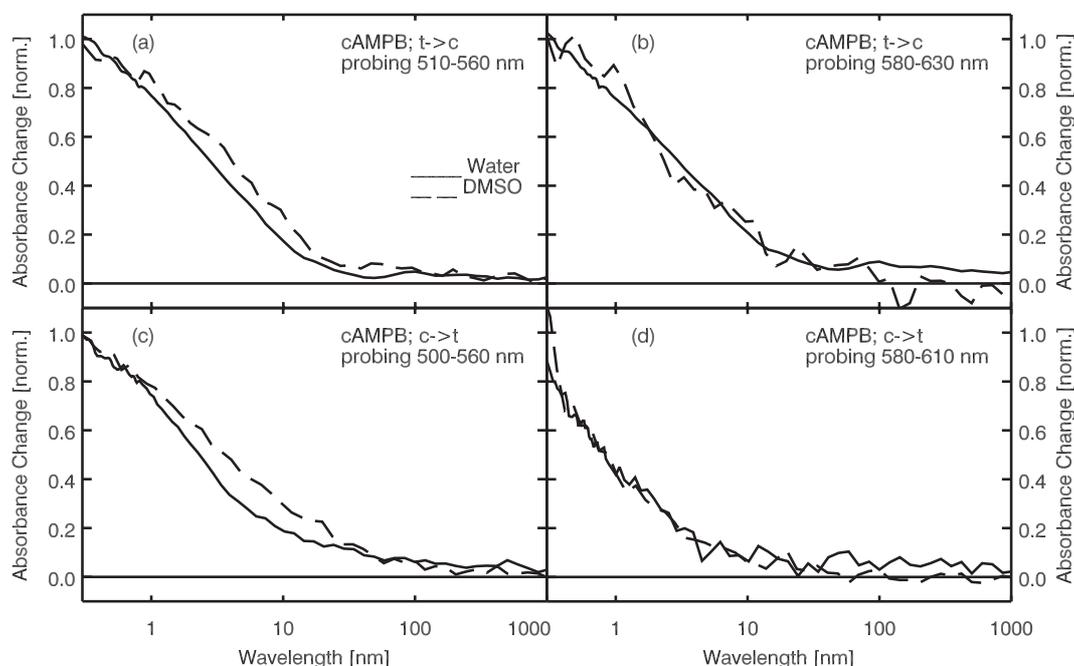


**Abbildung 5.16:** Oben: Übersicht der Rohdaten der transienten Absorption von *cis*-cAMPB(H<sub>2</sub>O). Für das reine *cis*-Spektrum mussten 10% *trans*-Anteil korrigiert werden. Unten links: Transiente Spektren. Rechts: Amplitudenspektren.

## Beschleunigte Dynamik in Wasser

Vergleicht man die gefundenen Zeitkonstanten und Amplitudenspektren der wasserlöslichen Peptide mit denen in DMSO, findet man große qualitative Ähnlichkeiten in der Form und in den relativen Intensitäten der Spektren. Es gibt jedoch einen bemerkenswerten Unterschied: In Wasser beobachtet man für die langsameren Pikosekunden-Prozesse eine Beschleunigung um einen Faktor 1.5–2. Für einen direkten Vergleich sind in Abbildung 5.17 die Absorptions-Signale für cAMPB(H<sub>2</sub>O) über zwei repräsentative Spektralbereiche gemittelt dargestellt: im Bereich 580–630 nm, außerhalb der Grundzustands-Absorption, zeigen sich Prozesse des angeregten elektronischen Zustands S<sub>1</sub> und der Zerfall des S<sub>1</sub>-Zustands (Abb. 5.17b und d). Reaktionen und Relaxation im Grundzustand sieht man im Spektralbereich 500–560 nm, im Ausläufer der  $n\pi^*$ -Bande (Abb. 5.17a und c). Der direkte

Vergleich dieser Daten zeigt, dass die Grundzustands-Prozesse in Wasser schneller sind, während es im roten Spektralbereich, in dem  $S_1$ -Prozesse dominieren, nur sehr kleine Unterschiede gibt (dies zeigt sich auch in den Werten für die extrahierten Zeitkonstanten, vgl. Tabelle 5.3).



**Abbildung 5.17:** Einfluss des Lösungsmittels auf Peptid-Kinetik. Direkter Vergleich der transienten Absorptionssignale für cAMPB in Wasser und DMSO: Im Spektralbereich 580–630 nm (b, d) sieht man Prozesse im elektronisch angeregten Zustand  $S_1$  und den Zerfall des  $S_1$ -Zustands. Im Bereich 500–560 nm (a, c) beobachtet man Reaktionen und Relaxationen im Grundzustand.

### 5.5.2 Bizyklisches Azopeptid bcAMPB( $H_2O$ )

Wie oben für das mono-zyklische Azopeptid cAMPB( $H_2O$ ) beschrieben, wurden ausgehend von der Sequenz des bcAMPB(DMSO) außerhalb des aktiven Zentrums drei Aminosäuren durch Lysine ersetzt und auf diese Weise die Wasserlöslichkeit des Peptids erreicht.

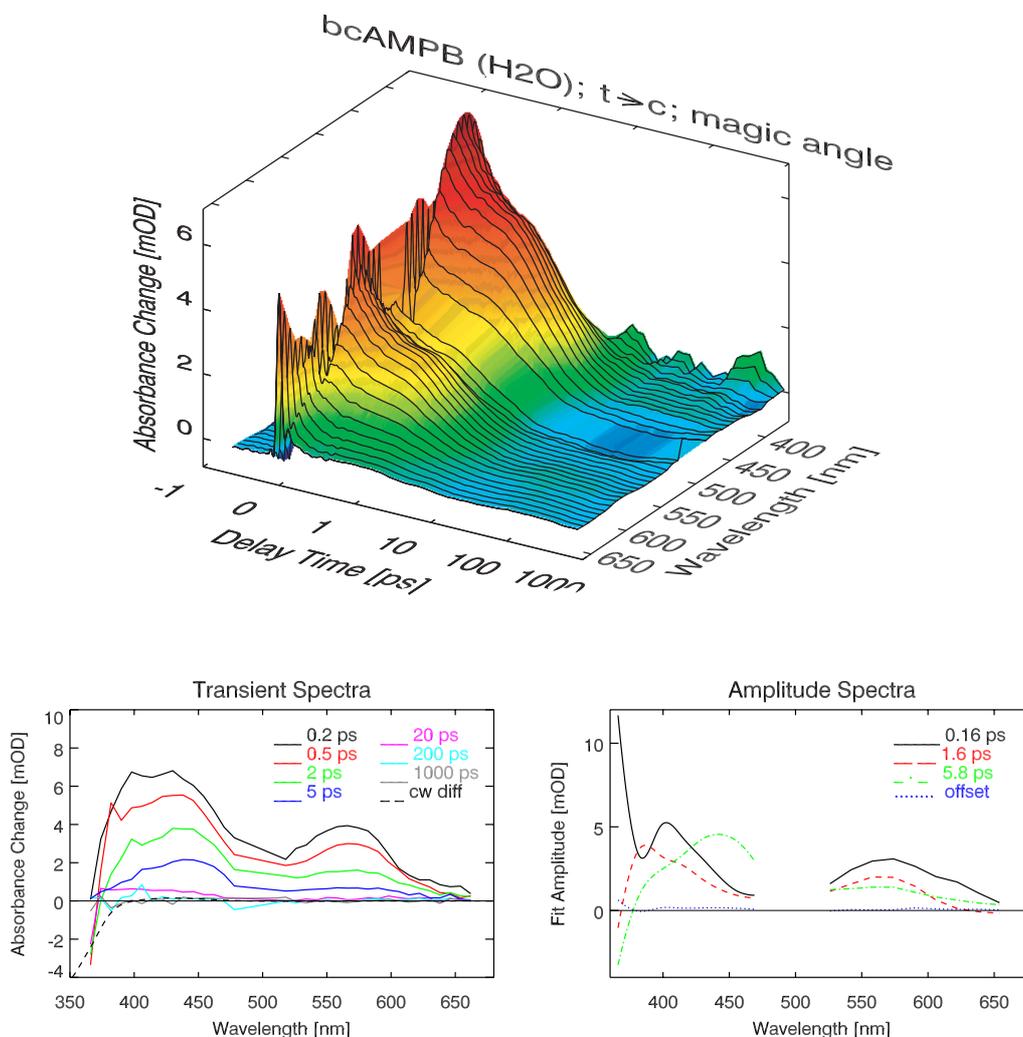
Bi-zyklisch bedeutet, dass zum einen das Peptid zusammen mit dem AMPB-Molekül zu einem Ring zyklisiert wurde und zum andern die Disulfid-Brücke zwischen den beiden Cysteinen geschlossen wurde [RBHM02].

#### bcAMPB( $H_2O$ ): *trans*→*cis* Photoreaktion

Abbildung 5.18 gibt einen Überblick über die transiente Absorption von bcAMPB( $H_2O$ ) nach  $n\pi^*$ -Anregung. Insgesamt ist das spektrale Verhalten sehr ähnlich zu cAMPB( $H_2O$ ),

## 5 Beobachtung gezielt ausgelöster Konformationsänderungen in Azopeptiden

jedoch sind die Amplituden der beobachteten Absorptionsänderungen etwa eine Größenordnung geringer als für das mono-zyklische Peptid (die Konzentration für diese Experimente war nur etwa halb so groß, außerdem wurde zur besseren Justierbarkeit der Verzögerungsstrecke im ns-Zeitbereich das Anregungs-Volumen deutlich vergrößert).



**Abbildung 5.18:** Transiente Absorption von *trans*-bcAMPB(H<sub>2</sub>O). Oben: Übersicht der Rohdaten. Unten links: Transiente Spektren. Rechts: Amplitudenspektren (der Spektralbereich um 480 nm enthält Streulicht und konnte deshalb nicht ausgewertet werden).

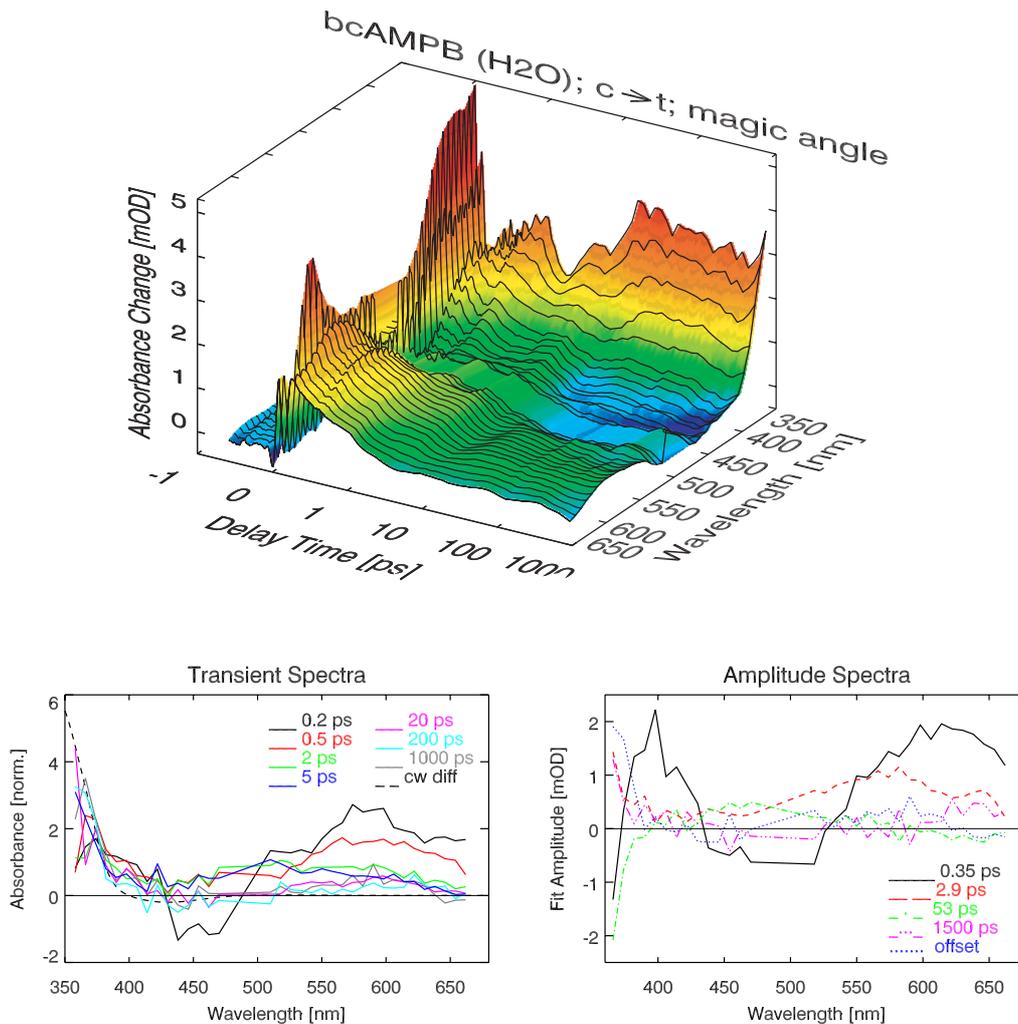
Die ermittelten Zeitkonstanten sind: 0.16 ps (-45%, +80%), 1.6 ps (-60%, +70%), 5.8 ps (-25%, +20%) und ein Offset, der die Bildung des Photoprodukts beschreibt.

### bcAMPB(H<sub>2</sub>O): *cis*→*trans* Photoreaktion

Eine instantan mit dem Anregungs-Lichtimpuls vorhandene Absorptionsänderung erscheint mit einem Maximum bei 580 nm (ca. 140 nm FWHM) und einem Minimum bei 450 nm

## 5.5 Transiente Absorption der wasserlöslichen Azopeptide

(Abb. 5.19). Nach 2 ps hat sich die Lage der breiten Absorptionsänderung von 580 nm auf 540 nm verschoben und ist nach 20 ps verschwunden. Das Ausbleich-Signal scheint die gleiche Zeitabhängigkeit zu haben wie für *cis*-cAMPB(H<sub>2</sub>O), es können jedoch keine weiteren spektralen Signaturen extrahiert werden.

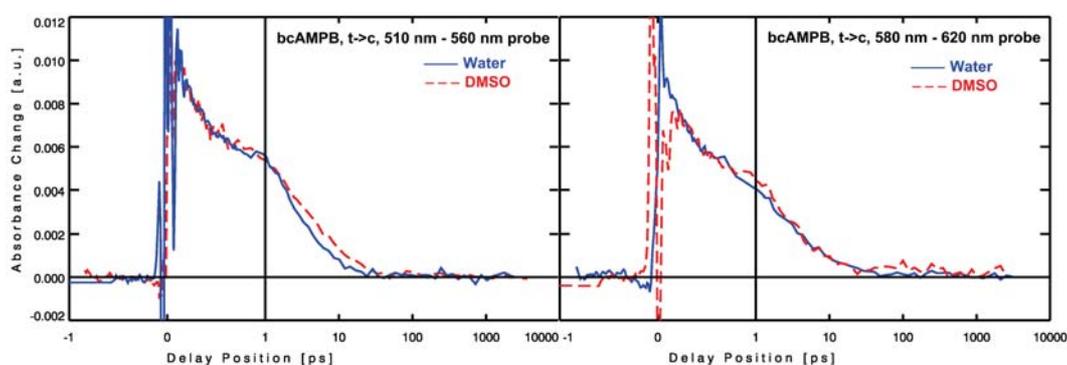


**Abbildung 5.19:** Oben: Transiente Absorption von *cis*-bcAMPB(H<sub>2</sub>O). Für das reine *cis*-Spektrum mussten 10% *trans*-Anteil korrigiert werden. Unten links: Transiente Spektren. Rechts: Amplitudenspektren.

Die ermittelten Zeitkonstanten sind: 0.35 ps (-70%, +95%), 2.9 ps (-90%, +85%), 53 ps ( $\pm 5\%$ ), 1500 ps (-90%, +85%) und ein Offset, der der Bildung des Photoprodukts entspricht. Man beachte die relativ großen Toleranzbereiche der Zeitkonstanten.

### Beschleunigte Dynamik in Wasser

Wie bereits für cAMPB durchgeführt, sind in Abbildung 5.20 Zeitverläufe für bcAMPB in DMSO und Wasser miteinander verglichen (*trans*→*cis*-Reaktion). Wie beim monozyklischen Peptid wurden die Absorptions-Signale über zwei repräsentative Spektralbereiche gemittelt: im Bereich 580–620 nm, außerhalb der Grundzustands-Absorption, sieht man Prozesse des angeregten Zustands  $S_1$  sowie dessen Zerfall. Wie auch schon bei cAMPB sind die dynamischen Prozesse im angeregten Zustand bei bcAMPB in Wasser und DMSO identisch (Abb. 5.20, rechts). Anders bei den Reaktionen und Relaxationen im Grundzustand (510–560 nm gemittelt, siehe Abb. 5.20, links), wo man (wie für cAMPB) eine Beschleunigung der dynamischen Prozesse in Wasser beobachtet (dies gilt auch für die *cis*→*trans*-Reaktion; Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5.20:** Einfluss des Lösungsmittels auf Peptid-Kinetik für das bicyklische Azopeptid bcAMPB. Die Abbildung zeigt den Zeitverlauf der transienten Absorption. Links: Der rote Ausläufer der  $n\pi^*$ -Absorptionsbande im Bereich 510–560 nm. Rechts: Ausserhalb der Grundzustandsabsorption (580–620 nm).

## 5.6 Diskussion: Einfluß des Lösungsmittels auf die Konformationsdynamik

Die zeitaufgelösten Experimente an den wasserlöslichen Azopeptiden cAMPB( $H_2O$ ) und bcAMPB( $H_2O$ ) haben gezeigt:

- (i) Die wasserlöslichen Moleküle zeigen ultraschnelle lichtinduzierte Reaktionen.
- (ii) Die beobachteten transienten Spektren besitzen eine große Ähnlichkeit zu denen, die man für DMSO-lösliche Peptide erhalten hatte.
- (iii) Dynamische Prozesse, die zu Bewegungen im elektronischen Grundzustand  $S_0$  gehören (beobachtet im grün/blauen Bereich des Spektrums bei 500–560 nm) sind in Wasser schneller.

Lösungs- mittel	Mono-zyklisches Peptid (cAMPB)							
	<i>trans</i> → <i>cis</i>				<i>cis</i> → <i>trans</i>			
	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	$\tau_4$	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	$\tau_4$
DMSO	–*	1,7 ps	9,6 ps	120 ps	190 fs	1,3 ps	9,3 ps	180 ps
Wasser	150 fs	1,3 ps	6,5 ps	–	150 fs	1,3 ps	4,6 ps	96 ps

Lösungs- mittel	Bi-zyklisches Peptid (bcAMPB)							
	<i>trans</i> → <i>cis</i>				<i>cis</i> → <i>trans</i>			
	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	–	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	$\tau_4$
DMSO	300 fs	1,6 ps	10,4 ps	–	0,28 ps	5,3 ps	100 ps	1000 ps
Wasser	160 fs	1,6 ps	5,8 ps	–	0,35 ps	2,9 ps	53 ps	1500 ps

**Tabelle 5.3:** Vergleich der ermittelten Zeitkonstanten für mono- (cAMPB) und bi-zyklisches Peptid (bcAMPB) in DMSO und Wasser (die DMSO-Daten stammen aus [Spö01], der \* bedeutet, dass die Daten eine schnelle Zeitkonstante enthalten sollten, diese aber aufgrund des starken kohärenten Artefakts nicht aus den Daten extrahiert werden konnte).

Vor der weiteren Diskussion soll hier noch einmal in aller Kürze die Interpretation für die DMSO-löslichen AMPB-Peptide wiederholt werden: Anregung in der  $n\pi^*$ -Absorptionsbande führt zu einer schnellen Bewegung aus dem Franck-Condon Bereich des  $S_1$ -Zustandes heraus mit einer Zeitkonstante von wenigen hundert Femtosekunden. Ein großer Teil der Moleküle in der *cis*→*trans*-Reaktion und ein geringerer Teil für die *trans*→*cis*-Reaktion findet die konische Durchschneidung mit dieser initialen Bewegung. Die auf der  $S_1$ -Potentialfläche verbleibenden Moleküle gelangen über interne Konversion auf der Zeitskala von einigen Pikosekunden in den Grundzustand. Für die *cis*-Azopeptide sind Absorptionsdynamiken auf der Zeitskala  $> 10$  ps Indizien für die langsameren Bewegungen des Peptid-Teils (konformationelle Änderungen). Sie tauchen bei Absorptionsexperimenten im sichtbaren Spektralbereich über den mechanischen „Zug“ auf, den das noch nicht relaxierte Peptid-Rückgrat auf den Chromophor ausübt. Für die *trans*-Azopeptide findet der Übergang in den Grundzustand erst auf der 5–10 ps Zeitskala statt, auch sind hier keine ausgeprägten Charakteristika aufgrund der Peptidbewegung sichtbar (eine Zusammenfassung der ermittelten Zeitkonstanten gibt Tabelle 5.3).

### *trans*→*cis* Photoreaktion

Die schnelle Bewegung aus dem Franck-Condon Bereich heraus auf der Sub-Pikosekunden Zeitskala trägt insgesamt nur schwach zur Absorptionsdynamik bei. Der spektrale Verlauf der zugeordneten Amplitudenspektren bleibt unverändert beim Übergang von DMSO zu Wasser. Die interne Konversion zum Grundzustand ist ein bi-exponentieller Prozess: Einer schnellen Komponente, die der Relaxation und Reorganisation auf der  $S_1$ -Potentialfläche zugeordnet wird (1.3 ps für cAMPB, 1.6 ps für bcAMPB), folgt der Übergang in den Grundzustand mit 6.5 ps (cAMPB), bzw. 5.8 ps (bcAMPB). Für die DMSO-löslichen Peptide wurde jedoch eine Zeitkonstante von ca. 10 ps für den Übergang in den

Grundzustand gefunden<sup>1</sup>. Dies legt den Schluss nahe, dass der Isomerisierungs-Prozess in Wasser etwas beschleunigt abläuft. Offenbar tritt auf der  $S_1$ -Potentialfläche eine diffusive Bewegung zur konischen Durchschneidung hin auf, die durch die Trägheit des Peptid-Teils und dessen Reibung im viskosen Lösungsmittel behindert wird.

### *cis*→*trans* Photoreaktion

Wie oben beschrieben ist die *cis*→*trans*-Isomerisierung der Azopeptide von einem ultraschnellen Reaktionspfad in den Grundzustand mit Zeitkonstanten von 200–300 fs dominiert. Dieser stark getriebene Prozess mit großer Amplitude führt direkt in den Grundzustand und ist nicht durch die Viskosität des Lösungsmittels beeinflusst (dies gilt ebenfalls für die 1.3 ps-Zeitkonstante in cAMPB(H<sub>2</sub>O)).

Ein auffälliger Unterschied ist, dass die langsameren Prozesse in Wasser doppelt so schnell sind als in DMSO. Für die *cis*→*trans*-Reaktion der APB- und AMPB-Peptide in DMSO wurde die 5–10 ps-Komponente als Schwingungs-Kühlen und initiales Rearrangement des Peptid-Teils interpretiert, die langsameren Zeitkonstanten wurden der Bewegung des Peptid-Teils zugeordnet. Die neu durchgeführten Experimente zeigen nun, dass diese Prozesse vom umgebenden Lösungsmittel abhängen: Wasser besitzt eine nur halb so große Viskosität wie DMSO, was zu einem schnelleren Rearrangement der Moleküle führen sollte.

Ein Vergleich der durch NMR-Untersuchungen gewonnenen Strukturen [RCBM00, RBHM02] legt nahe, dass die *trans*- bzw. *cis*-Konformationen der Peptide in beiden Lösungsmitteln jeweils ähnlich sind, es können also sehr ähnliche intermediäre Konformationen bei der Entfaltung eingenommen werden (vgl. die NMR-Strukturen in Abb. 5.7, Seite 111). Die ablaufenden Prozesse sollten somit ebenfalls ähnlich sein und nur durch äußere Bedingungen beeinflusst werden. Die Zeitkonstante von Prozessen, die durch Reibung dominiert sind sollte proportional zur Lösungsmittel-Viskosität sein [HTB90]. Die Beschleunigung der Prozesse auf der Pikosekunden-Zeitskala in Wasser um den Faktor zwei ist somit eine direkte Bestätigung dieser Interpretation.

### Lösungsmittelabhängige Konformationsdynamik

Die Ausführungen von oben legen nahe, dass das Lösungsmittel die beobachtete Reaktionsdynamik der Azobenzol-Peptide auf unterschiedlichen Zeitskalen beeinflusst:

1. Die Besetzung des elektronisch angeregten Zustands verursacht eine Änderung der Elektronendichte, wodurch eine Reorientierung der umgebenden Lösungsmittelmoleküle ausgelöst wird. Diese Solvatationsdynamik (in Wasser hauptsächlich Rotationsbewegungen) laufen im Zeitbereich von sub-ps ab [VJR<sup>+</sup>95] und scheinen die beobachtete Konformationsdynamik nicht zu beeinflussen.

---

<sup>1</sup>Ein Schwingungs-Kühlprozess im Grundzustand würde auf der gleichen Zeitskala auftreten und ist deshalb nicht separat sichtbar.

2. Die Isomerisierungsbewegung des Chromophors löst eine weitere Umorganisation der Lösungsmittelmoleküle aus. Hier sollte der Einfluß des Lösungsmittels umso größer sein, je kleiner die treibende Kraft ist. In der *trans*→*cis*-Reaktion erwartet man eine relativ flache  $S_1$ -Potentialfläche und beobachtet für die  $\sim 5$  ps-Zeitkonstante eine Lösungsmittelabhängigkeit: In Wasser läuft dieser Prozess mit doppelter Geschwindigkeit ab.
3. Die Wärmekapazität und Wärmeleitfähigkeit des Lösungsmittels beeinflusst die Kühlprozesse des schwingungsangeregten, heißen Chromophors. Die Wärmekapazität pro Volumen ist für Wasser 2.5-mal so groß wie für DMSO, die Wärmeleitfähigkeit um den Faktor vier [NDAR03]. Grundzustands-Kühlprozesse sollten auf der 5–10 ps Zeitskala ablaufen und die Experimente zeigen, dass die Dynamik in diesem Zeitbereich in Wasser etwa doppelt so schnell abläuft.
4. Der dominierende Effekt der konformationellen Bewegung innerhalb des Peptid-Teils ist die Reibung gegen das Lösungsmittel, das über seine Viskosität diese Bewegung behindert. Aufgrund der nur halb so großen Viskosität von Wasser (im Vergleich zu DMSO) erwartet man eine schnellere Umorganisation der Peptidbindungen. Die beobachtete Beschleunigung der Prozesse auf der 10–100 ps-Zeitskala um den Faktor zwei unterstützt diese Sichtweise.



# 6 Die Markermoleküle Xanthon und Naphthalin

In Kapitel 7 werden Xanthon und Naphthalin als Markermoleküle eingesetzt, um die Kontaktbildung in frei beweglichen, flexiblen Peptiden zu untersuchen. Grundlage dafür ist ein detailliertes Verständnis der Photochemie dieser beiden Moleküle. Dafür dienen die Untersuchungen in diesem Kapitel, das sich wie folgt gliedert:

- Zunächst werden die beiden Markermoleküle Xanthon und Naphthalin vorgestellt und ihre bekannten photochemische Eigenschaften zusammengefasst (Abschnitt 6.1).
- Abschnitt 6.2 präsentiert die Ergebnisse der transienten Absorptionsexperimente an Xanthon in Ethanol mit Anregungs-Lichtimpulsen bei  $\lambda_{\text{pump}} = 340 \text{ nm}$ .
- Für die Experimente an den Xanthonpeptiden wird nicht Xanthon, sondern Xanthonensäure als Markermolekül in das Peptid eingebaut. Als erste Referenz enthält Abschnitt 6.3 einen Vergleich von Xanthon und Xanthonensäure in Ethanol.
- Transiente Absorptionsexperimente zum Triplett-Energie-Transfer von Xanthon zu Naphthalin bei verschiedenen Akzeptor-Konzentrationen zeigen, wie der Energie-Transfer vom Donor zum Akzeptor abläuft (Abschnitt 6.4).
- Direkte Informationen über das Verlassen des elektronisch angeregten Zustands erhält man über Messungen der zeitaufgelösten Fluoreszenz (Abschnitt 6.5).
- Die Diskussion beschäftigt sich mit dem Mechanismus der Triplett-Bildung in Xanthon und dem Triplett-Triplett Energietransfer von Xanthon zu Naphthalin (Abschnitt 6.6).

## 6.1 Eigenschaften

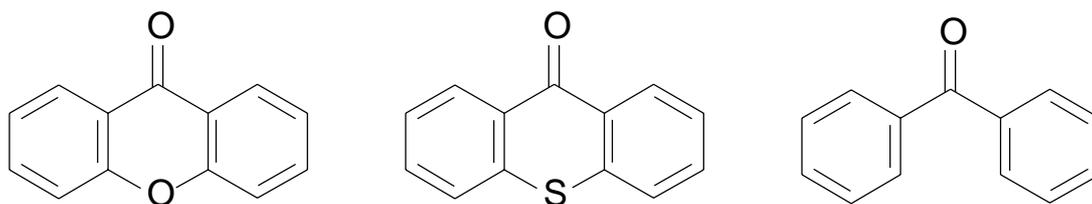
In diesem Abschnitt sind die spektroskopischen Eigenschaften von Xanthon und Naphthalin sowie deren Triplett-Zustände zusammengefasst.

### 6.1.1 Xanthon

Die aromatischen Ketone Xanthon und seine Derivate sind seit mehr als 30 Jahren Gegenstand zahlreicher photochemischer Untersuchungen und auch die medizinische Forschung

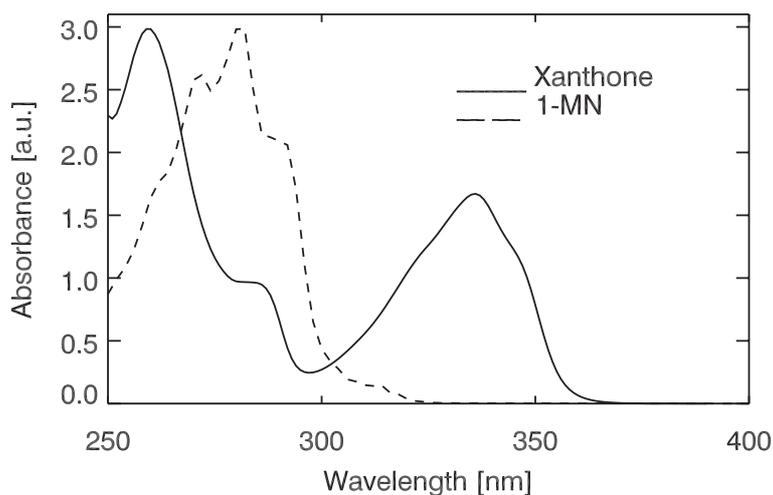
interessiert sich für diese Moleküle. Ito et al. untersuchten beispielsweise in einer kürzlich erschienen Publikation die Struktur von acht neuen Xanthonen und ihre Virus hemmende Wirkung, die Xanthone für die Krebsbekämpfung interessant machen [IIT<sup>+</sup>03]. Eine andere Anwendung geht auf Eavens et al. zurück, die vorschlugen, den Triplett-Zustand von Xanthon als „microenvironment sensor“ einzusetzen, um damit die Eigenschaften supra-molekularer Systeme zu untersuchen [EPKS99].

Xanthon besitzt eine planare Struktur, lediglich der Carbonyl Sauerstoff (das doppelt gebundene Sauerstoff-Atom) steht um 0.13 Å aus der Ebene heraus [OIO90]. Das Molekül besitzt also näherungsweise  $C_{2v}$ -Symmetrie.



**Abbildung 6.1:** Xanthon und Derivate. Links: Xanthon. Mitte: Thioxanthon (wenn S und O vertauscht werden, spricht man von Xanthion). Rechts: Benzophenon.

In Abb. 6.1 sind die Strichformeln von Xanthon und den beiden wichtigsten Xanthon-Derivaten Thioxanthon und Benzophenon zusammengefasst. Alle drei Moleküle wurden in der Literatur bereits ausführlich diskutiert und dienen oft als gegenseitige Referenz. Thioxanthon beispielsweise besitzt durch das Schwefel-Atom eine größere Spin-Bahn Kopplungskonstante (zeitaufgelöste Absorptions-Experimente von Morlet-Savary et al. [MSLJ<sup>+</sup>99] und Ley et al. [LMSJF00]). Benzophenon ist wesentlich flexibler als Xanthon (zeitaufgelöste Experimente u. a. von Damschen et al. [DMP<sup>+</sup>78] und Greene et al. [GHW79]).



**Abbildung 6.2:** Absorptionsspektren von Xanthon und 1-Methyl Naphthalin (1-MN) in Ethanol.

Pownall und Huber konnten im Absorptionsspektrum von Xanthon vier Übergänge bestimmen [PH71]: Ein  $n\pi^*$ -Übergang bei  $\sim 370$  nm, ein  $\pi\pi^*$ -Übergang bei  $\sim 340$  nm und  $\sim 283$  nm und ein Ladungstransfer-Übergang bei  $\sim 258$  nm (siehe auch Tabelle 6.1 und das Absorptionsspektrum von Xanthon in Ethanol in Abb. 6.2).

Über ein intersystem crossing (ISC) gelangt das Xanthon-Molekül nach Photoanregung in den Triplett-Zustand, von wo aus man Phosphoreszenz mit einer Lebensdauer von einigen Mikrosekunden beobachten kann. Aufgrund der langlebigen Phosphoreszenz wurde der Triplett-Zustand von Xanthon bereits 1967 von Nurmukhametov et al. [NMS67], bzw. 1971 von Pownall und Huber [PH71] untersucht.

Spektroskopische Daten für Xanthon in 3-Methylpentan				
$\nu_{\max}(298\text{ K})$ $\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\max}(298\text{ K})$ nm	Oszillatorstärke	$\epsilon_{\max}$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Zuordnung
27150	368	–	$\sim 6$	$^1\text{A}_2 \rightarrow ^1\text{A}_1$ ( $n, \pi^*$ )
29780	335	0.10	11750	$^1\text{A}_1 \rightarrow ^1\text{A}_1$ ( $\pi, \pi^*$ )
35420	282	0.02	5012	$^1\text{B}_2 \rightarrow ^1\text{A}_1$ ( $\pi, \pi^*$ )
39050	256	0.10	15140	$^1\text{A}_1 \rightarrow ^1\text{A}_1$ (CT)

**Tabelle 6.1:** Spektroskopische Daten für Xanthon in 3-Methylpentan [PH71].

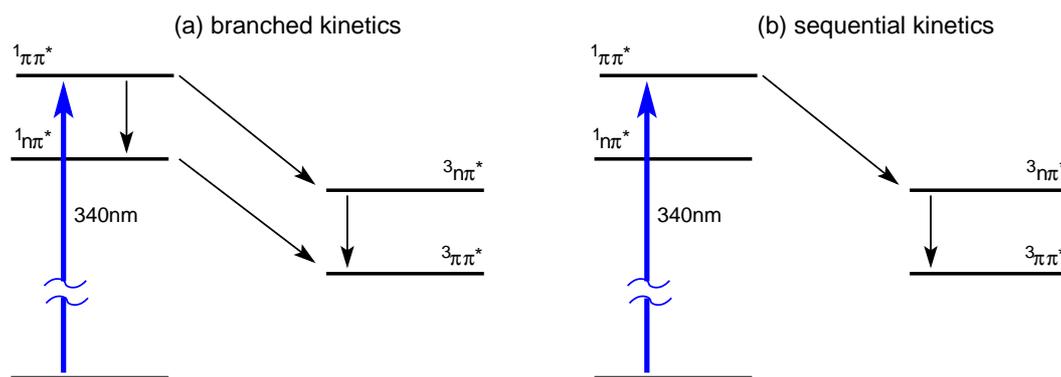
Aus dem Grundzustand heraus ist eine direkte Anregung des Xanthon-Moleküls in den Triplett-Zustand verboten. Die Anregung des Singulett  $^1n\pi^*$ -Zustandes ist Symmetrieverboten und hat (in 3-Methylpentan) einen Extinktionskoeffizienten von nur  $6\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Der einzig erlaubte Übergang im nahen UV ist damit die Anregung des Singulett  $^1\pi\pi^*$ -Zustandes mit einem Extinktionskoeffizienten von  $11750\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [PH71]. Nur dieser Zustand wird durch einen Anregungs-Lichtimpuls mit einer Zentral-Wellenlänge von 340 nm signifikant besetzt.

Damschen et al. untersuchten 1978 den Anstieg der Triplett-Triplett-Absorption (TTA) von Xanthon in Ethanol und fanden eine Anstiegszeit des Triplett-Zustandes von 8 ps (die Experimente verwendeten eine Anregung mit Lichtimpulsen bei 355 nm und Abfrage bei 533 nm) [DMP<sup>+</sup>78]. Greene et al. haben 1979 transiente Absorptionmessungen an Xanthon in Benzol durchgeführt und berichten Anstiegszeiten der TTA von  $\sim 8$  ps (bei einer Zeitauflösung von ebenfalls  $\sim 8$  ps) und schlossen daraus auf eine Lebensdauer des  $\text{S}_1$ -Zustandes von  $\sim 13$  ps [GHW79]. Bedingt durch die zur Verfügung stehende Zeitauflösung ihrer Experimente fanden sowohl Greene et al. als auch Damschen et al. mono-exponentielle Kinetiken für den Anstieg der Triplett-Absorption.

Cavaleri et al. haben 1996 fs-Absorptionsexperimente nach Anregung des  $^1\pi\pi^*$ -Zustands von Xanthon in Methanol, *n*-Butyronitril und Hexan mit Anregungs-Lichtimpulsen bei  $\lambda_{\text{pump}} = 310$  nm durchgeführt und berichten bi-exponentielle Anstiegszeiten der TTA die stark von der Lösungsmittelpolarität abhängen [CPB96]. Sie extrahierten drei charakteristische Zeiten für die Kinetik nach  $^1\pi\pi^*$ -Anregung von Xanthon in Methanol: Eine Zeitkonstante für interne Konversion  $\tau_{IC} = 0.9$  ps (2.3 ps in Hexan) und zwei Zeitkon-

stanten für das ISC:  $\tau_{ISC,1} = 1.4$  ps (0.7 ps in Hexan) und  $\tau_{ISC,2} = 4.3$  ps (10 ps in Hexan). Für die Zuordnung dieser Kinetiken zu Prozessen im Xanthon-Molekül nahmen Cavalier et al. an, dass der  $^3n\pi^*$ -Zustand spektroskopisch dunkel ist, also nicht zum Signal der transienten Absorption beiträgt, außerdem fordern sie, dass die interne Konversion im Triplett-Zustand ( $^3n\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^*$ ) schneller abläuft als alle anderen beobachteten Prozesse. Unter dieser Annahme muss die Dynamik im Xanthon-Molekül nach Photoanregung einen Verzweigungs-Mechanismus enthalten: Aus dem Singulett  $^1\pi\pi^*$ -Zustand durchläuft demnach ein Teil der Moleküle sofort einen ISC-Prozess, während der andere Teil zuerst über interne Konversion (IC)  $^1\pi\pi^* \rightarrow ^1n\pi^*$  im Singulett bleibt und erst vom energetisch tieferliegenden  $^1n\pi^*$ -Zustand über ISC in den Triplett-Zustand wechselt [CPB96] (siehe Abb. 6.3a).

Alternativ dazu ist auch ein sequentieller Prozess denkbar, bei dem die gesamte Population des Xanthon-Moleküls nach  $^1\pi\pi^*$ -Anregung zuerst über einen ISC-Prozess in den Triplett-Zustand gelangt und dort mit der langsameren Zeitkonstante in den energetisch tieferliegenden  $^3\pi\pi^*$ -Zustand wechselt. Für diese Interpretation muss man annehmen, dass der  $^3n\pi^*$ -Zustand spektroskopisch sichtbar ist (siehe Abb. 6.3b).



**Abbildung 6.3:** Zwei mögliche Modelle, die die Dynamik von Xanthon nach Photoanregung beschreiben. (a) Verzweigungs-Modell, (b) sequentielles Modell.

Die Zuordnung der gemessenen Zeitkonstanten zu molekularen Prozessen ist auch deshalb schwierig, weil bereits die ersten spektroskopischen Experimente 1967 ein anomales Verhalten der Xanthon-Phosphoreszenz beim Wechsel von polaren zu unpolaren Lösungsmitteln nachweisen konnten. Diese Beobachtung warf die Frage nach dem Charakter des energetisch tieflegendsten Triplett-Zustands von Xanthon auf.

### 6.1.2 Was ist der tieflegendste Triplett-Zustand von Xanthon?

Xanthon besitzt zwei Triplett-Zustände:  $^3\pi\pi^*$  und  $^3n\pi^*$ . Die Frage, welche Konfiguration der energetisch am tiefsten liegende Triplett-Zustand von Xanthon besitzt, wurde in der Literatur intensiv diskutiert. Ausgangspunkt hierfür waren 1967 Phosphoreszenz-Messungen bei 77 K von Nurmukhametov et al. [NMS67], bzw. 1971 von Pownall und

Photochemische Daten des Singulett-Zustands						
		$E_S$ kJ/mol	$\lambda_S$ nm	$\epsilon_S$ $M^{-1}cm^{-1}$	$\tau_S$ ns	$\Phi_{fl}$
Xanthon	n	324	370	7000	0.0006	$7 \cdot 10^{-4}$
	p			10000	0.0006	
Thioxanthon (Thioxanthen-9-on)	n				2.0	0.12
	p					
Benzophenon	n	316	379	120	0.030	$4 \cdot 10^{-6}$
	p	311	384	150	0.016	
1-Methyl Naphthalin	n	377	317		67	0.21
	p	377	317	6000	97	0.19
Naphthalin	n	385	311	5500	96	0.19
	p	384	311	5500	105	0.21

**Tabelle 6.2:** Xanthon, Naphthalin und Derivate: Photochemische Daten für den Singulett-Zustand. Die Daten sind angegeben für unpolare (n) und polare (p) Lösungsmittel. Aufgelistet sind die Energie ( $E_S$ ), das Absorptionsmaximum ( $\lambda_S$ ), der Extinktionskoeffizient ( $\epsilon_S$ ) und die Lebensdauer ( $\tau_S$ ) des Grundzustandes sowie dessen Fluoreszenz-Quantenausbeute ( $\Phi_{fl}$ ). Die Werte stammen aus [MCH93, Plö04] und dieser Arbeit.

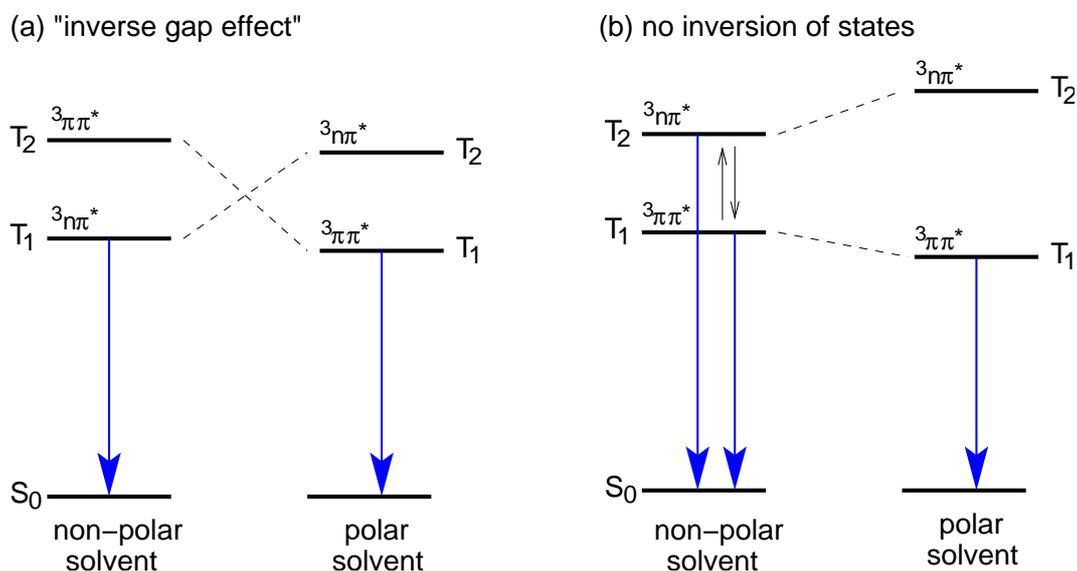
Photochemische Daten des Triplett-Zustands						
		$\Phi_{ISC}$	$E_T$ kJ/mol	$\lambda_T$ nm	$\epsilon_T$ $M^{-1}cm^{-1}$	$\tau_T$ $\mu s$
Xanthon	n	0.97	310	610	5300–9000	0.02
	p	0.97	310	606	6500	17.9
Thioxanthon (Thioxanthen-9-on)	n		265	650	30000	95
	p			650	26000	73
Benzophenon	n	1.0	287	531	10000	6.9
	p	1.0	290	526	6500	50
1-Methyl Naphthalin	n	0.58		425	6350–22000	25
	p		254	420	11000	
Naphthalin	n	0.75	253	425	32000	175
	p	0.80	255	415	40000	1800

**Tabelle 6.3:** Xanthon, Naphthalin und Derivate: Photochemische Daten für den Triplett-Zustand. Die Daten sind angegeben für unpolare (n) und polare (p) Lösungsmittel. Aufgelistet sind die Triplett-Quantenausbeute ( $\Phi_{ISC}$ ), die Energie ( $E_T$ ), das Absorptionsmaximum ( $\lambda_T$ ) sowie der Extinktionskoeffizient ( $\epsilon_T$ ) und die Lebensdauer des Triplett-Zustands ( $\tau_T$ ). Die Daten stammen aus [HC72, GW76, Sca80, BTCD84, CH86, MCH93].

Der Xanthon-Triplett Zustand			
Lösungsmittel	$\lambda_{\max}$	FWHM	$\tau_T$
Acetonitril	627 nm	67 nm	946 ns
Ethanol	610 nm	52 nm	–
Methanol	605 nm	70 nm	1770 ns
Wasser	580 nm	67 nm	11300 ns

**Tabelle 6.4:** Lösungsmittelabhängigkeit des Xanthon-Triplett-Zustandes. Die Daten für Acetonitril, Methanol und Wasser stammen aus [EPKS99], die Daten für Ethanol stammen aus Abschnitt 6.2 (siehe auch [LMSFJ00]).

Huber [PH71]. Die Experimente von Pownall und Huber konnten für Xanthon im unpolaren Lösungsmittel 3-Methylpentan eine Lebensdauer der Phosphoreszenz von 25 ms feststellen, für Xanthon im polaren Lösungsmittel Ehanol-Isopentan-Ether (5:2:2) jedoch eine wesentlich längere Lebensdauer von 150 ms (für Xanthon in einer Methanol-Wasser Mischung fanden sie sogar eine Lebensdauer von 900 ms). Pownall und Huber erklären diese Effekte mit einer Änderung des elektronischen Charakters des tiefstliegenden Triplett-Zustands. In polaren Lösungsmitteln habe dieser Zustand  $n\pi^*$ -Charakter, in unpolaren Lösungsmitteln jedoch  $\pi\pi^*$ -Charakter. Dies wurde später als „inverse gap effect“ bezeichnet (siehe Abbildung 6.4a).

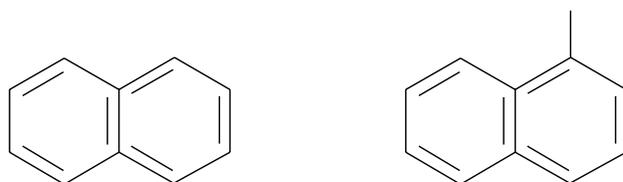


**Abbildung 6.4:** Zwei Modelle zur Erklärung der anomalen Phosphoreszenz von Xanthon. (a) „Inverse gap effect“: beim Wechsel von unpolaren zu polaren Lösungsmitteln vertauschen die beiden Triplett-Zustände ( ${}^3n\pi^*$  und  ${}^3\pi\pi^*$ ). (b) Keine Inversion der Triplett-Zustände,  $T_1 = {}^3n\pi^*$ , unabhängig von der Polarität des Lösungsmittels. In unpolaren Lösungsmitteln liegen  $T_1$  und  $T_2$  jedoch so nahe beieinander, dass durch thermische Aktivierung beide Zustände besetzt sind (in der Zeichnung durch  $\uparrow\downarrow$  angedeutet).

Im Jahre 1982 wurde von Connors und Christian eine alternative Erklärung der unterschiedlichen Phosphoreszenz-Lebensdauern gefunden [CC82]. Sie bestimmten die Phosphoreszenz-Lebensdauern von Xanthon in *n*-Hexan bei 4.2 K (115 ms) und bei 77 K (2.5 ms). Aus den Phosphoreszenz-Spektren konnten sie ferner die energetische Lage des  $T_1$ - und  $T_2$ -Zustandes bestimmen und fanden, dass die Energielücke  $\Delta E_T$  nur  $29 \text{ cm}^{-1}$  beträgt. Ihre Interpretation der Ergebnisse ist, dass die Emission aus dem energetisch tieflegendsten  $T_1$  ( $^3\pi\pi^*$ ) und aus einem thermisch besetzten  $T_2$  ( $^3n\pi^*$ ) erfolgen kann. Bei 4.2 K ist eine thermische Besetzung des  $T_2$  nicht möglich und die Emission erfolgt langsam aus dem  $T_1$ -Zustand<sup>1</sup>. Bei 77 K ist eine thermische Besetzung des  $T_2$ -Zustands möglich, von dem aus die Emission schneller abklingen kann. In polaren Lösungsmitteln ist die Energielücke zwischen  $T_1$  und  $T_2$  so groß, dass keine thermische Besetzung des  $T_2$ -Zustands möglich ist, weshalb dort eine langlebige Phosphoreszenz beobachtet wird (siehe Abbildung 6.4b).

### 6.1.3 Naphthalin

Die photochemischen Daten von Naphthalin und 1-Methyl Naphthalin (1-MN) sind in Tabelle 6.3 (Seite 135) zusammengefasst. 1-MN in Ethanol absorbiert im Spektralbereich  $< 325 \text{ nm}$  (siehe Abbildung 6.2 auf Seite 132). Das Absorptionsspektrum besitzt ein Maximum bei 280 nm, ein Nebenmaximum bei 271 nm und Schultern bei 263 nm und 290 nm. Für die Experimente zum Triplett-Triplett Energie-Transfer (TTET) weiter unten wurde statt Naphthalin 1-MN verwendet, das selbst eine Flüssigkeit bildet und den Vorteil bietet, dass sich Xanthon direkt in 1-MN löst. Zur Charakterisierung des TTET-Mechanismus wurden deshalb in den hier präsentierten Experimenten die transiente Absorption einer unterschiedlich konzentrierten Lösung aus Xanthon, Ethanol und 1-MN untersucht.

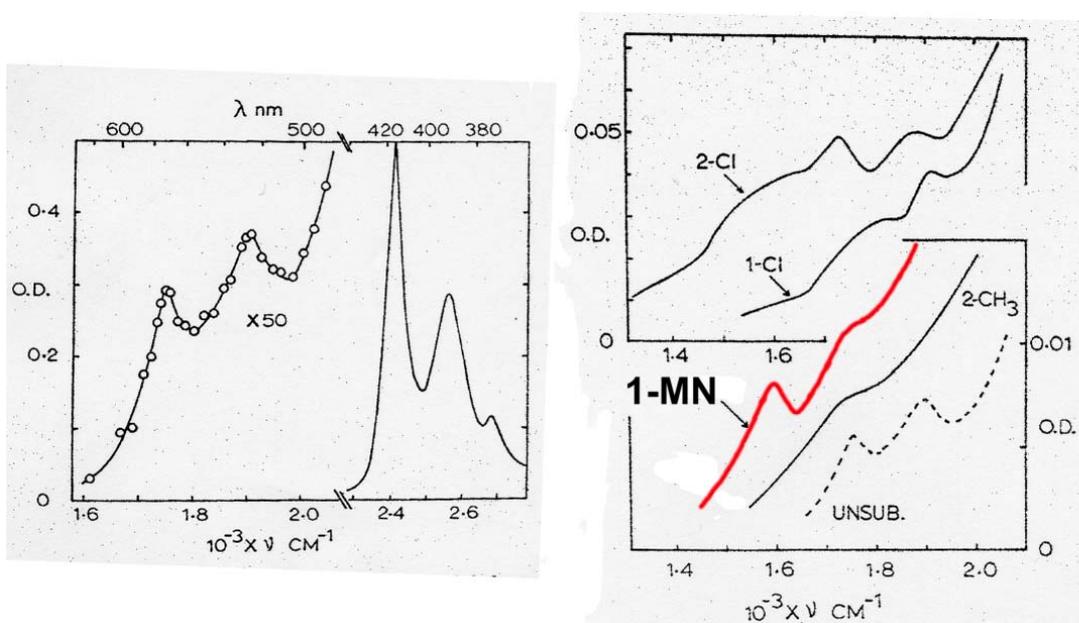


**Abbildung 6.5:** Links: Naphthalin. Rechts: 1-Methyl Naphthalin (1-MN).

Die Strichformeln von Naphthalin und 1-MN sind in Abb. 6.5 zusammengefasst. Naphthalin und 1-MN besitzen einen Triplett-Zustand, der gegenüber dem Singulett-Zustand energetisch deutlich abgesenkt ist ( $E_S$  ca. 380 kJ/M,  $E_T$  ca. 250 kJ/M). Die Lebensdauer des Triplett-Zustands beträgt etliche Mikrosekunden ( $\tau_T = 25 \mu\text{s}$  für 1-MN in un-

<sup>1</sup>Nach den El-Sayed Regeln [ES63] sind nur die Kopplungen  $^3\pi\pi^* \leftrightarrow ^1n\pi^*$  und  $^3n\pi^* \leftrightarrow ^1\pi\pi^*$  erlaubt. Unter Beachtung der bekannten Extinktionskoeffizienten ( $^1n\pi^*$ :  $6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $^1\pi\pi^*$ :  $11750 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) kann man deshalb erwarten, dass die Phosphoreszenz-Lebensdauer eines  $^3n\pi^*$ -Zustands kurz und die eines  $^3\pi\pi^*$ -Zustands lang sein wird.

polaren Lösungsmitteln und sogar  $\tau_T = 1.8$  s für Naphthalin in polaren Lösungsmitteln<sup>1</sup>. Der Triplett-Zustand von Naphthalin wurde bereits in den 1960er Jahren spektroskopisch untersucht und Melhuish konnte 1969 erstmals auch den sehr schwach absorbierenden niederenergetischen Ausläufer des Naphthalin Triplett-Spektrums ermitteln [Mel69]. Abbildung 6.6 zeigt das Triplett-Spektrum von Naphthalin zusammen mit dem niederenergetischen Ausläufer für Naphthalin, 1-MN und andere Naphthalin-Derivate. Die Absorptionsbande des Naphthalin Triplett-Zustands besitzt ein Maximum bei 422 nm und Nebenmaxima bei 580 nm, 530 nm, 390 nm und 370 nm. Die Lage des Maximums ist relativ unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel. Die Absorptionsspektren verschiedener Naphthalin-Derivate sind untereinander ebenfalls sehr ähnlich. Im roten Spektralbereich reicht das Spektrum bis über 600 nm hinaus, nimmt dabei aber sehr schnell ab.

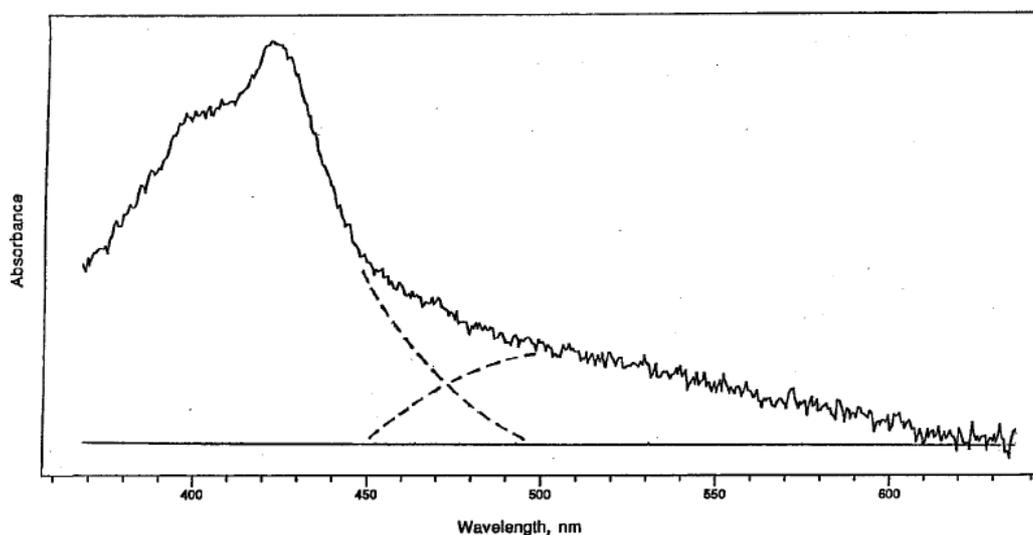


**Abbildung 6.6:** Links: Absorptionsspektrum des Triplett-Zustands von Naphthalin gelöst in PMMA ( $T=294$  K). Rechts: Der niederenergetische Teil des Triplett-Triplett Absorptionsspektrums von Naphthalin-Derivaten. Etwas dicker markiert ist das Spektrum von 1-MN (die Abbildung ist entnommen aus [Mel69]).

Neuere Messungen von Wang et al. [WKK<sup>+</sup>00] konnten nachweisen, dass der Triplett-Zustand von Naphthalin bei hohen Naphthalin-Konzentrationen einen Triplett-Excimer bildet, der das gemessene Absorptionsspektrum im roten Spektralbereich  $> 450$  nm stark beeinflusst (Abbildung 6.7). Im Experiment wurde dazu 10 mM Benzophenon in einer Toluol Lösung mit 1–4 M 1-MN mittels transientser Absorptionsspektroskopie untersucht. Die Untersuchungen von Wang et al. ergaben, dass der breite, unstrukturierte

<sup>1</sup>Die meisten Experimente zur Untersuchung des Triplett-Zustands von Naphthalin benutzen sog. „Sensibilisier“, z. B. eine Lösung von Benzophenon in Naphthalin. Benzophenon wird dabei in den Triplett-Zustand angeregt und nach einem (schnellen) Triplett-Triplett Energietransfer ist der Triplett-Zustand von Naphthalin präpariert und kann spektroskopiert werden.

Ausläufer des Absorptionsspektrums des 1-MN Triplett Zustands einem Triplett-Excimer von 1-MN zugeordnet werden muss. In unterschiedlichen Konzentrationen von 1-MN wird man demnach verschiedene Absorptionsspektren des Triplett-Zustands beobachten.



**Abbildung 6.7:** Intermolekularer Triplett-Excimer von 1-MN. Gezeigt ist das transiente Absorptionsspektrum zur Verzögerungszeit  $1 \mu\text{s}$  von Benzophenon in reinem 1-MN, angeregt bei  $355 \text{ nm}$ . Der linke Teil des Spektrums mit einem Maximum bei ca.  $420 \text{ nm}$  ist dem Triplett von Naphthalin zugeordnet, die rechte, breite Absorptionsbande ( $450\text{--}620 \text{ nm}$ ) wird dem Triplett-Excimer von Naphthalin zugeordnet (die Abbildung ist [WKK<sup>+</sup>00] entnommen).

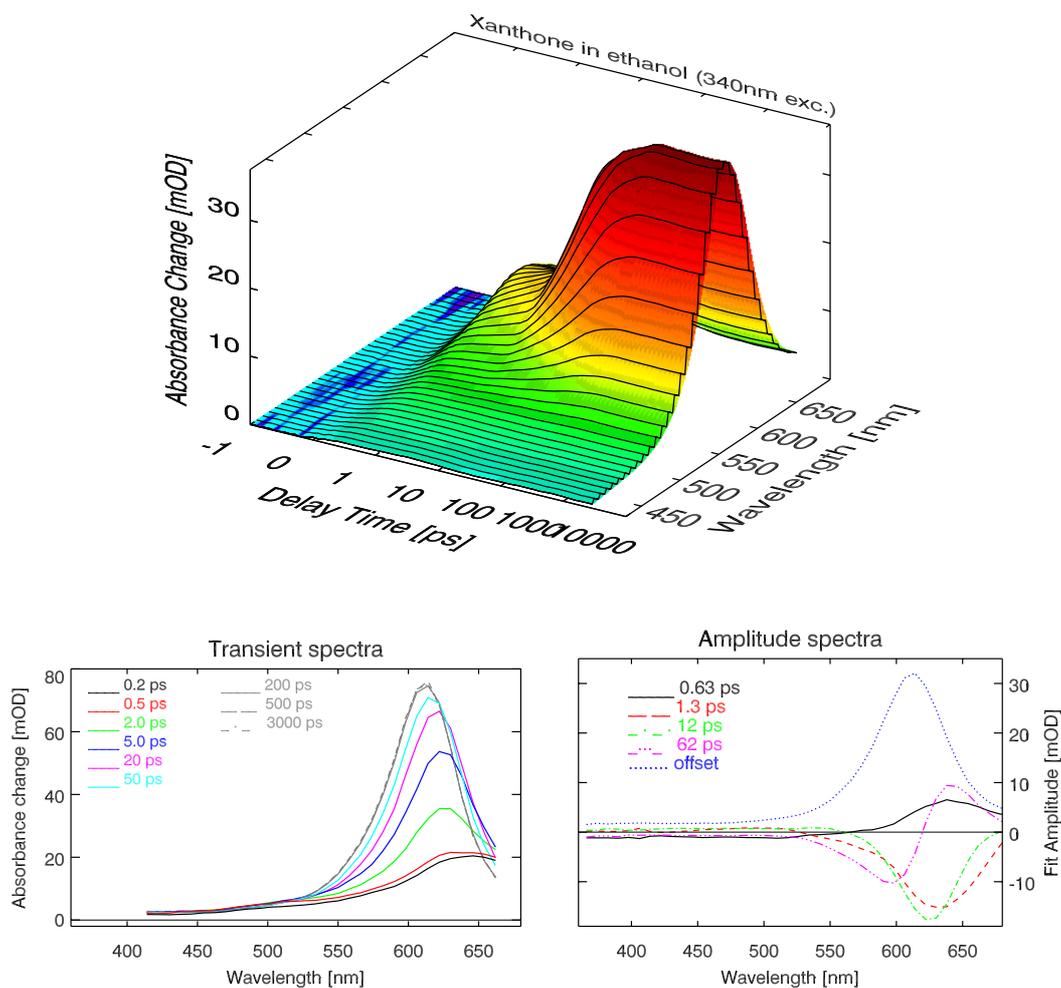
Es sollte auch noch festgehalten werden, dass Wang et al. in ihren Experimenten keinen Hinweis darauf fanden, dass sich Grundzustands-Komplexe bilden und auch ausschliessen konnten, dass Benzophenon und 1-MN einen Exciplex bilden [WKK<sup>+</sup>00].

## 6.2 Transiente Absorption von Xanthon in Ethanol

Die transiente Absorption von Xanthon in Ethanol mit Anregungs-Lichtimpulsen bei einer Zentralwellenlänge  $\lambda_{\text{pump}} = 340 \text{ nm}$  (im Maximum der  $\pi\pi^*$ -Absorptionsbande) wurden mit einem experimentellen Aufbau wie er in Abbildung 2.5 (Kapitel 2.1.2, Seite 21) beschrieben wurde, aufgenommen (Breite der Apparatefunktion ca.  $200 \text{ fs}$ ). Die verwendeten Konzentrationen betragen  $2\text{--}10 \text{ mM}$ . Da die zeitaufgelösten Fluoreszenz-Spektren aus technischen Gründen eine Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{pump}} = 270 \text{ nm}$  verwendeten, wurden, um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, ebenfalls transiente Absorptionsexperimente mit  $\lambda_{\text{pump}} = 266 \text{ nm}$  durchgeführt (siehe Anhang, Seite 195).

Die Ergebnisse der Messungen nach  $\pi\pi^*$ -Anregung ( $\lambda_{\text{pump}} = 340 \text{ nm}$ ) sind in Abbildung 6.8 zusammengefasst.

Nach der Photoanregung bildet sich instantan ein schwaches und spektral breites transientes Spektrum mit einem Maximum bei ca.  $700 \text{ nm}$ , das sich innerhalb  $\sim 1 \text{ ps}$  verändert



**Abbildung 6.8:** Xanthon in Ethanol ( $\lambda_{\text{pump}} = 340 \text{ nm}$ ). Oben: Rohdaten. Unten links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten, rechts: Amplitudenspektren nach globalem Fit mit vier Zeitkonstanten plus Offset.

und zu einer stärkeren Signatur mit einem Maximum bei 630 nm anwächst. Diese Signatur hat nach 50 ps ihre maximale Amplitude erreicht ( $\lambda_{\text{max}} = 620 \text{ nm}$ ). Nach dieser Zeit beobachtet man nur noch eine Verschiebung der Absorptionsbande in den blauen Spektralbereich auf 610 nm (50 nm FWHM). Diese Spektrale Signatur bleibt im experimentell zugänglichen Zeitbereich bis 3.5 ns konstant.

Die durch den globalen Fitalgorithmus ermittelten Zeitkonstanten im Zeitbereich  $-1 \dots 3500 \text{ ps}$  sind 0.63 ps ( $-40\%$ ,  $+60\%$ ), 1.3 ps ( $-30\%$ ,  $+45\%$ ), 12 ps ( $\pm 25\%$ ), 62 ps ( $\pm 20\%$ ) und ein Offset-Spektrum, das dem Triplet-Spektrum von Xanthon entspricht. Die beiden Zeitkonstanten von 1.3 ps und 12 ps beschreiben den Aufbau der Absorptionsbande bei 620 nm, die 62 ps-Zeitkonstante beschreibt eine Blauverschiebung zum endgültigen Spektrum des Triplet-Zustands mit dem Maximum bei 610 nm.

## 6.3 Transiente Absorption von Xanthonsäure in Ethanol

Die später interessanten Messungen an den Xanthonpeptiden finden in Wasser statt, weshalb es schön wäre, direkte Vergleichsmessungen von Xanthon gelöst in Wasser zu haben. Xanthon selbst ist in Wasser sehr schlecht löslich. Für den Einbau als Markermolekül in ein Xanthonpeptid muss das Xanthon jedoch sowieso modifiziert werden.

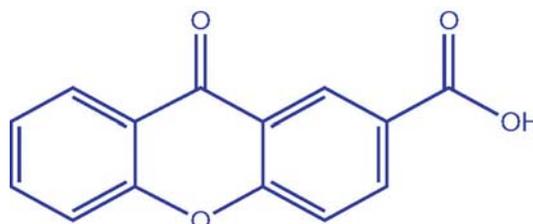


Abbildung 6.9: Xanthonsäure: Strichformel.

Dies geschieht durch Anhängen einer Carboxylgruppe (die Synthese ist beschrieben in [GL78, Fie02]). Die dabei entstehende Xanthonsäure (9-Oxoxanthen-2-Carboxylsäure) ist etwas besser wasserlöslich, leider immer noch nicht in Konzentrationen im mM-Bereich, die für die Experimente zur transienten Absorption optimal wären (das folgende Kapitel enthält auf Seite 169 Messungen an Xanthonsäure in Wasser).

In Ethanol ist Xanthonsäure etwas besser löslich. Für einen ersten Vergleich wurden deshalb transiente Absorptionsexperimente an Xanthonsäure in Ethanol durchgeführt.

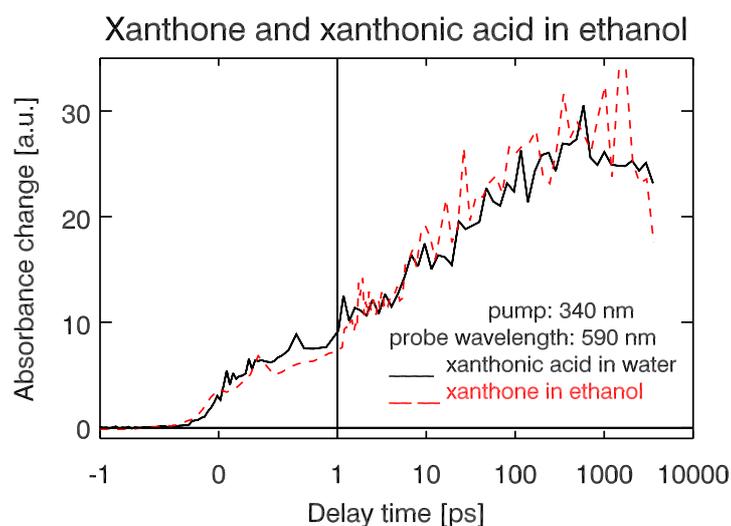


Abbildung 6.10: Xanthon und Xanthonsäure in Ethanol. Die Abbildung zeigt zwei direkt hintereinander aufgenommene Messkurven.

Die prinzipielle Kinetik von Xanthon und Xanthonsäure in Ethanol ist nach Anregung sowohl bei 266 nm als auch bei 340 nm sehr ähnlich (Daten nicht gezeigt). Für einen direkten Vergleich sind in Abbildung 6.10 die Zeitverläufe von Xanthon in Ethanol und Xanthonsäure in Ethanol nach Anregung mit Lichtimpulsen bei der Zentralwellenlänge  $\lambda_{\text{pump}} = 340$  nm eingezeichnet. Die beiden Messkurven wurden direkt hintereinander aufgenommen und sollten deshalb miteinander vergleichbar sein. Die Abbildung zeigt den

zeitlichen Verlauf der transienten Absorption bei einer Abfrage-Wellenlänge von 590 nm, im Bereich des Maximums der Triplett-Absorption von Xanthon. Die Dynamik ist jeweils sehr ähnlich (der Abfall der Kurve im Bereich  $> 1$  ns kommt von einer nicht optimal justierten Verzögerungsstrecke).

Eine Analyse der Daten ergibt, dass das dynamische Verhalten von Xanthonensäure und Xanthon in Ethanol relativ ähnlich ist. Man findet ähnliche spektrale Eigenschaften und ähnliche Zeitkonstanten. Aufgrund der schlechten Datenqualität ließ sich jedoch kein eindeutiger Satz an exponentiellen Zeitkonstanten zur Beschreibung der Daten finden: die stark verrauschten Daten lassen sich mit fast beliebigen Kombinationen von Zeitkonstanten mit ähnlicher Güte beschreiben (vergleichbare  $\chi^2$ -Werte). Die ermittelten Zeitkonstanten streuen jedoch alle um die Werte herum, die auch für Xanthon in Ethanol bestimmt wurden.

### 6.4 Quenching des Xanthon-Triplett durch 1-Methyl Naphthalin

In den Xanthonpeptiden im nächsten Kapitel dient Xanthon als Donor in einem Peptid. Das Xanthon-Molekül wird dabei in den Triplett-Zustand angeregt. Die Energie des Xanthon Triplett-Zustands soll bei Kontakt zum Akzeptormolekül übertragen werden. Als Akzeptor dient dabei Naphthylalanin, eine künstliche Aminosäure. Für die Spektroskopie relevant ist die Naphthalin-Gruppe: Xanthon kann über einen Triplett-Triplett Energie-Transfer Mechanismus (TTET, „triplet quenching“) seine Energie an das Naphthalin abgeben. Dieser Mechanismus ist wohlbekannt und wurde von Anderson et al. bereits 1974 für das Donor/Akzeptor-Paar Benzophenon und Naphthalin untersucht. Sie fanden dabei Zeitkonstanten für den TTET im Bereich 10–20 ps [JHLS74]. Scaiano et al. beschreiben in [SDAG95] das Quenchen des Xanthon-Triplett durch 1-Methyl Naphthalin in einem Zeoliten (faujasite NaY), wo der TTET im Bereich  $< 100$  ns abläuft. Das Quenchen von Benzophenon, Xanthon und Thioxanthon durch Farbstoffe in Lösung beschreiben Jockusch et al. [JTST97]. Dabei werden die Ketone durch 15 ns-Pulse angeregt und für das Quenchen von Benzophenon durch Safranin T eine Rate  $k_q = 1.1 \cdot 10^{10} \text{s}^{-1}$  (entspricht einer Zeitkonstanten von 90 ps) berichtet [JTST97].

Zwei verschiedene Arten des TTET sind denkbar: In den bisher beschriebenen Beispielen sind Donor und Akzeptor freie Moleküle in Lösung und der TTET findet bei Kontakt der beiden statt. Möglich ist jedoch auch ein intermolekularer TTET, bei dem Donor und Akzeptor chemisch miteinander verbunden sind und der TTET ohne direkten Kontakt der beiden „durch die Bindung hindurch“ stattfindet. Diesen zweiten Prozess haben Closs et al. in [CPF88] untersucht und die intermolekulare Quenchraten von 4-Benzophenon mit 2-Naphthalin (verbrückt über  $\text{CH}_2$ ) bestimmt zu  $k = 5.0 \times 10^{10} \text{s}^{-1}$  (20 ps). In [CJMP89] sind Quenchraten für größere Abstände zwischen Donor und Akzeptor aufgelistet. Weitere Untersuchungen ergaben, dass ein intermolekularer TTET nur bis über maximal acht

Bindungslängen stattfinden kann und bei weiteren Abständen zwischen Donor und Akzeptor keine Rolle mehr spielt [WK99].

Die später untersuchten Xanthonpeptide sind so ausgelegt, dass mindestens 11 Bindungen zwischen Donor und Akzeptor liegen und somit der intermolekulare TTET keine Bedeutung hat. Die beobachtete Dynamik muss also von einer Reaktion herrühren, die erst nach dem Kontakt zwischen Donor und Akzeptor abläuft.

Direkte Untersuchungen der Quenchraten von Xanthon und 1-MN wurden in der Literatur bisher noch nicht berichtet. Da die Untersuchungen zum Triplett-Triplett Energietransfer fundamental für die Analyse und das Verständnis der Experimente zur Kontaktbildung in den Xanthonpeptiden sind, wurden die Messungen zum Quenching des Triplett-Zustands von Xanthon durch Naphthalin sowohl in Basel mit Laser Flash Photolysetechnik als auch in dieser Arbeit mit transientser Absorptionsspektroskopie durchgeführt. Für die Experimente wird dabei eine feste Menge Xanthon (in den fs-Experimenten 5 mM) in einer Mischung aus Ethanol und 1-MN gelöst

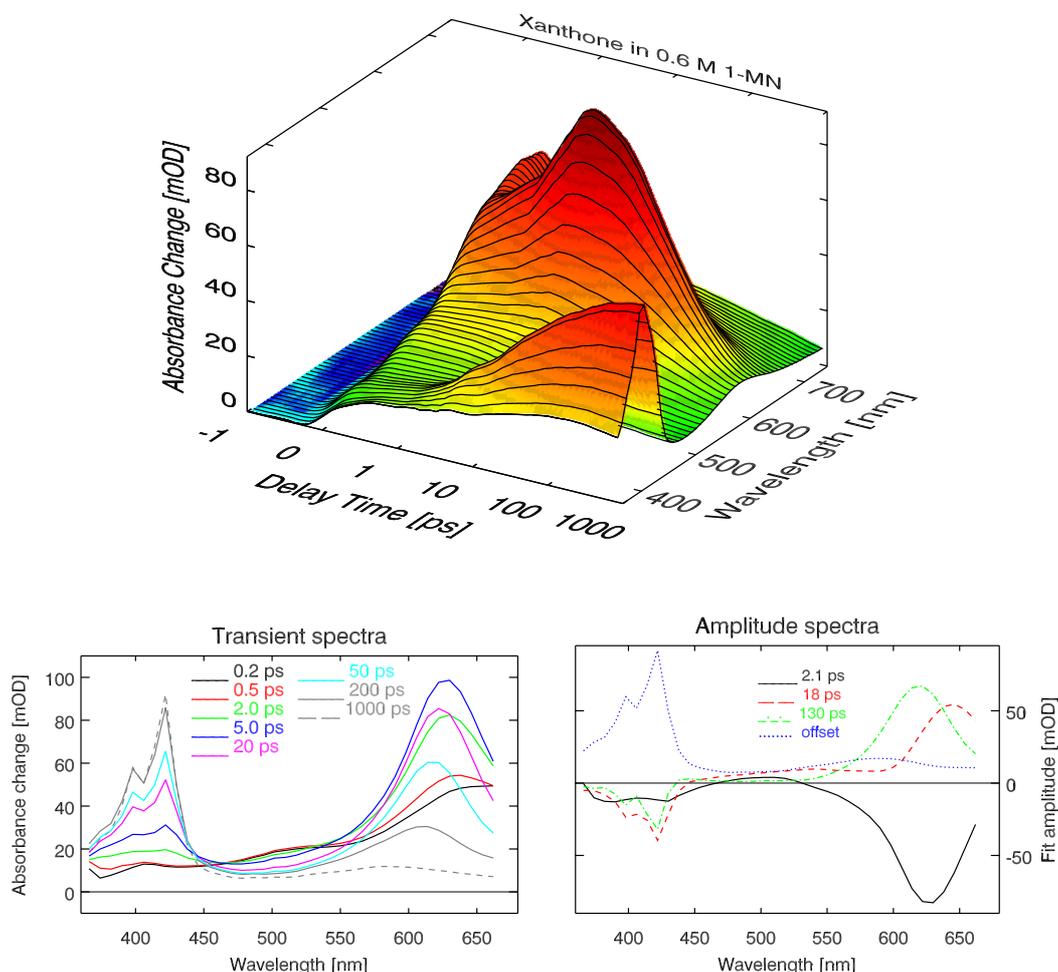
Die Laser Flash Experimente eignen sich speziell für sehr niedrige 1-MN Konzentrationen, wo man aus der Diffusionsgleichung Zeitkonstanten im Nanosekundenbereich für das Quenching abschätzt. Um einen Überlapp mit den ns-Experimenten zu gewährleisten, wurden für diese Arbeit Experimente mit folgenden 1-MN Konzentrationen durchgeführt: 0.006 M, 0.06 M, 0.6 M, 3 M und 6 M.

Sämtliche transiente Absorptionsspektren wurden mit Anregungs-Lichtimpulsen bei einer Zentralwellenlänge  $\lambda_{\text{pump}} = 340$  nm aufgenommen, die Apparatefunktion betrug dabei jeweils ca. 200 fs. Die interessanteste Messung ist die von Xanthon in Ethanol mit 0.6 M (10 Vol.-%) 1-MN, weshalb hier nur diese ausführlich vorgestellt werden soll (die Daten der anderen Experimente finden sich im Anhang ab Seite 196).

Ein Blick auf die Rohdaten (Abbildung 6.11, oben) zeigt im Zeitbereich bis 1 ps fast ausschließlich der Anstieg der Triplett-Absorption von Xanthon im Spektralbereich um 600 nm. Im weiteren Zeitverlauf sieht man das Abklingen dieser Bande und damit verbunden den Aufbau einer Absorptionsbande um 420 nm (Triplett-Zustand von 1-MN).

Das transiente Spektrum nach 0.2 ps zeigt wie erwartet die Signatur des Xanthon-Moleküls (Abbildung 6.11, unten links). Diese Signatur bei 630 nm erreicht nach ca. 5 ps ihr Maximum und klingt danach langsam ab, wobei sich das Maximum dieser Absorptionsbande von 630 nm (nach 5 ps) über 620 nm (50 ps) auf 610 nm (200 ps) verschiebt. Im Zeitbereich von 2–200 ps sieht man die Bande des Triplett-Zustands von 1-MN ansteigen. Im Zeitraum bis 1000 ps wächst lediglich das Maximum der Absorptionsbande bei 413 nm noch minimal an.

Die aus einem globalen Fit ermittelten Zeitkonstanten sind 2.1 ps (+10%, -10%), 18 ps (+20%, -20%) und 130 ps (+20%, -15%), ein Offset-Spektrum beschreibt das verbleibende Spektrum des Triplett-Zustands von 1-MN. Die Zeitkonstante von 2.1 ps beschreibt den Aufbau der Absorptionsbande des Xanthon Triplett-Zustands, hat aber zusätzlich einen kleinen Beitrag, der einen Aufbau der Absorptionsbande des 1-MN um 400 nm beschreibt. Der wesentliche Aufbau der 1-MN Absorptionsbande findet dann mit

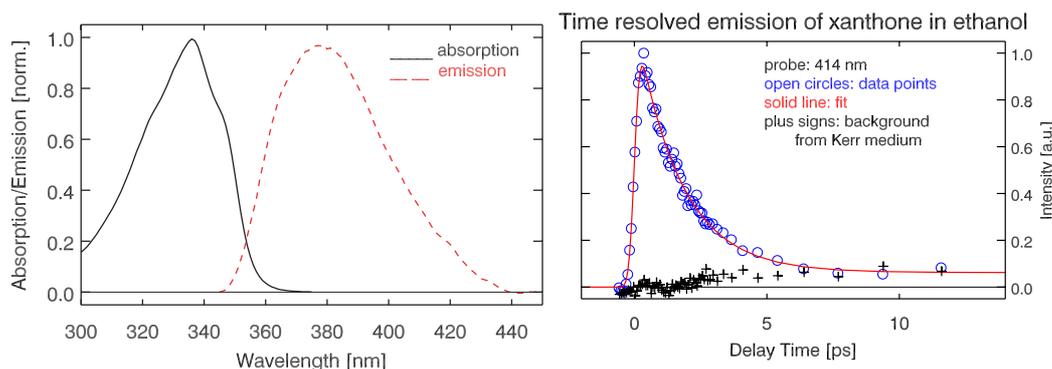


**Abbildung 6.11:** Xanthon in Ethanol unter Zugabe von 0.6 M (10 Vol.-%) 1-Methyl Naphthalin. Oben: Rohdaten aus der Messung der transienten Absorption nach  $\pi\pi^*$ -Anregung ( $\lambda_{\text{pump}} = 340 \text{ nm}$ ). Unten links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten, rechts: Amplitudenspektrum nach globalem Fit.

Zeitkonstanten von 18 ps und 130 ps statt. Auffallend ist, dass mit der 18 ps-Komponente vorwiegend ein Abbau im roten Ausläufer der Xanthon-Triplett-Absorptionsbande geschieht, während mit der langsameren 130 ps-Komponente die blaue Flanke der Xanthon-Triplett-Absorption verschwindet. Im Offset-Spektrum sieht man prominent die Absorptionsbande des 1-MN, jedoch auch eine verbleibende breite Absorption im Bereich 500–700 nm mit einem Maximum bei ca. 590 nm.

## 6.5 Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen

Die Fluoreszenz-Quantenausbeute von Xanthon in Ethanol beträgt ca.  $7 \cdot 10^{-4}$  [Plö04]. Über die Strickler-Berg Relation (Gl. 4.2, Seite 88) kann daraus eine Lebensdauer des angeregten  $^1\pi\pi^*$ -Zustands von  $\sim 1$  ps abgeschätzt werden.



**Abbildung 6.12:** Links: Stationäre Absorption u. Emission von Xanthon in Ethanol, rechts: zeitaufgelöste Fluoreszenz (Anregungs-Wellenlänge  $\lambda_{pump} = 270$  nm, Wellenlänge der Emission  $\lambda_{fl} = 414$  nm. Zusätzlich zur gemessenen Emission ( $\circ$ ) und der Fit-Funktion (durchgezogene Linie) ist das durch das Kerr-Medium verursachte Untergrund-Signal ( $+$ ) eingezeichnet (die Messungen wurden von B. Schmidt durchgeführt).

Mit einem Kerr-Shutter Aufbau konnte B. Schmidt direkt den Zerfall der Xanthon-Fluoreszenz beobachten [Sch04]. Abbildung 6.12 zeigt repräsentativ die Zeitabhängigkeit der Fluoreszenz von Xanthon in Ethanol bei 414 nm nach  $\pi\pi^*$ -Anregung (270 nm Zentralwellenlänge, Pulsdauer ca. 150 fs). Die Daten lassen sich durch eine mono-exponentielle Modellfunktion beschreiben (zusätzlich wird zur Beschreibung der Daten ein Offset Signal benötigt, das durch eine vom Gate-Lichtimpuls erzeugte schwache Emission des Kerr-Mediums verursacht wird). Die ermittelte Zeitkonstante beträgt  $\sim 1.5$  ps.

## 6.6 Diskussion

Wie oben erwähnt, konnten die ersten zeitaufgelösten Messungen von Damschen et al. [DMP<sup>+</sup>78] und Greene et al. [GHW79] aufgrund der zur Verfügung stehenden Zeitauflösung ihrer Experimente nur eine Zeitkonstante im 10 ps-Bereich für den Aufbau der Triplet Absorptionsbande von Xanthon nachweisen.

Die fs-Absorptionsexperimente von Cavaleri et al. konnten 1996 nachweisen, dass die Bildung des Triplet-Zustands bi-phasisch abläuft [CPB96]. Es stellte sich die Frage, durch welchen Reaktionsmechanismus dies geschieht.

### 6.6.1 Dynamik des Intersystem crossing in Xanthon

Im Xanthon-Molekül sind vier angeregte Zustände ( $^1\pi\pi^*$ ,  $^3\pi\pi^*$ ,  $^1n\pi^*$ , und  $^3n\pi^*$ ) energetisch durch den Anregungs-Lichtimpuls erreichbar. Allerdings besitzt nur der  $^1\pi\pi^*$ -Zustand ein merkliches Übergangsmoment mit dem Grundzustand. Die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung aus Abschnitt 6.5 liefert somit direkt die Zerfallszeit des primär angeregten  $^1\pi\pi^*$ -Zustands, der mit  $\tau \approx 1.5$  ps entleert wird. In den früheren zeitaufgelösten Absorptionsexperimenten [CPB96] konnte diese Zeitkonstante nur indirekt aus der Anstiegszeit des Triplett-Spektrums geschlossen werden.

Wenn die Zeitkonstante von 1.5 ps das Verlassen des  $^1\pi\pi^*$ -Zustands beschreibt, muss die in den transienten Absorptionsexperimenten in Abschnitt 6.2 gefundene Zeitkonstante von 0.6 ps (bzw. 0.2 ps bei 266 nm-Anregung, siehe Anhang) mit Relaxations-Prozessen im  $^1\pi\pi^*$ -Zustand verknüpft sein und nicht mit dessen Zerfall.

Für die weitere Dynamik kann der Übergang  $^1\pi\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi$  ausgeschlossen werden, da er die El-Sayed Regeln [ES63] verletzt (siehe Anhang ab Seite 193 für eine anschauliche Motivation der El-Sayed Regeln). Damit verbleiben zwei mögliche Übergänge: Interne Konversion (IC)  $^1\pi\pi^* \rightarrow ^1n\pi^*$  (Ratenkonstante  $k_{IC,1}$ ) und intersystem crossing (ISC)  $^1\pi\pi^* \rightarrow ^3n\pi^*$  (Ratenkonstante  $k_{ISC,1}$ ). Die Summe der Ratenkonstanten  $k_{IC,1} + k_{ISC,1}$  ist dabei gleich der beobachteten Ratenkonstante für den Zerfall des emittierenden Zustands ( $k_{IC,1} + k_{ISC,1} = 1/\tau_1 = (1.5 \text{ ps})^{-1}$ ). Um diesen Zerfall auf die beiden möglichen Zerfallskanäle aufzuteilen, sind zusätzliche Informationen über die beteiligten Zustände nötig.

Aus den Amplitudenspektren (Abb. 6.8) ist ersichtlich, dass mit der 1.5 ps-Komponente der Aufbau einer starken Absorptionsbande bei 610 nm verknüpft ist. Deren Lage und Form stimmen gut mit dem Triplett-Spektrum von Xanthon überein, wie es auch in der Literatur beschrieben wird (siehe Tab. 6.3 bzw. Tab. 6.4). Es scheint deswegen wahrscheinlich, dass der 1.5 ps-Prozess zumindest teilweise zur Besetzung eines Triplett-Zustand führt. Andererseits könnten die Singulett  $^1n\pi^*$ - und  $^1\pi\pi^*$ -Zustände eine sehr ähnliche spektrale Signatur besitzen, weshalb ein Beitrag, wenn nicht sogar eine Dominanz des  $^1\pi\pi^* \rightarrow ^1n\pi^*$  IC-Prozesses zunächst nicht ausgeschlossen werden kann.

Der Anstieg der Triplett-Absorption von Xanthon ist bi-phasisch. Das Amplitudenspektrum der zweiten Zeitkonstante (12 ps), die mit diesem Anstieg verknüpft ist, ist im Vergleich zum Spektrum der 1.5 ps-Komponente etwas blauverschoben und schmaler. Das Spektrum der 12 ps-Komponente beschreibt die Änderungen, die zum final besetzten Triplett-Zustand führen.

Das sigmoidale Spektrum der 62 ps-Komponente beschreibt eine Blauverschiebung der Triplett-Absorptionsbande. Einen ähnlichen Effekt haben Morlet-Savary et al. für Thioxanthon beobachtet [MSLJ<sup>+</sup>99]. Durch Untersuchungen dieser Verschiebung für Thioxanthon in diversen Lösungsmitteln konnten sie zeigen, dass die charakteristischen Zeitkonstanten für diese Verschiebung mit der dielektrischen Antwort („dielectric response“) des Lösungsmittels korreliert sind. Für Ethanol wurde eine Zeitkonstante von 72 ps gefunden, in guter Übereinstimmung mit den hier ermittelten 62 ps. Diese Zeitkonstante ist nicht mit dem Aufbau der Triplett-Absorption verknüpft, die 12 ps-Komponente beschreibt also den langsamsten Prozess des Aufbaus der Triplett-Absorption.

Eine Zuordnung dieser 12 ps-Zeitkonstante zu einem molekularen Prozess bedarf besonderer Sorgfalt, da ihre Verknüpfung zu den beobachteten Absorptionsänderungen vom Reaktionsmodell abhängt. Diese können entweder von einem Anstieg der Besetzung in der Triplett-Mannigfaltigkeit herrühren, d. h. vom Übergang  $^1n\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^*$  (Verzweigungsmodell, Abb. 6.14a), oder vom Übergang  $^3n\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^*$  (sequentiell Modell, 6.14b). Im letzteren Fall müssen die Absorptionsspektren der beiden Triplett-Zustände eine ähnliche Form besitzen, aber der Extinktionskoeffizient des  $^3\pi\pi^*$ -Zustands muss ungefähr doppelt so groß sein wie der des  $^3n\pi^*$ -Zustands. Da kein unabhängiger Zugang zu diesen Extinktionskoeffizienten möglich ist, kann aufgrund der spektroskopischen Untersuchungen an Xanthon alleine nicht zwischen dem Verzweigungs- und dem sequentiellen Modell unterschieden werden.

An dieser Stelle sind die Experimente zum Triplett-Quenching interessant.

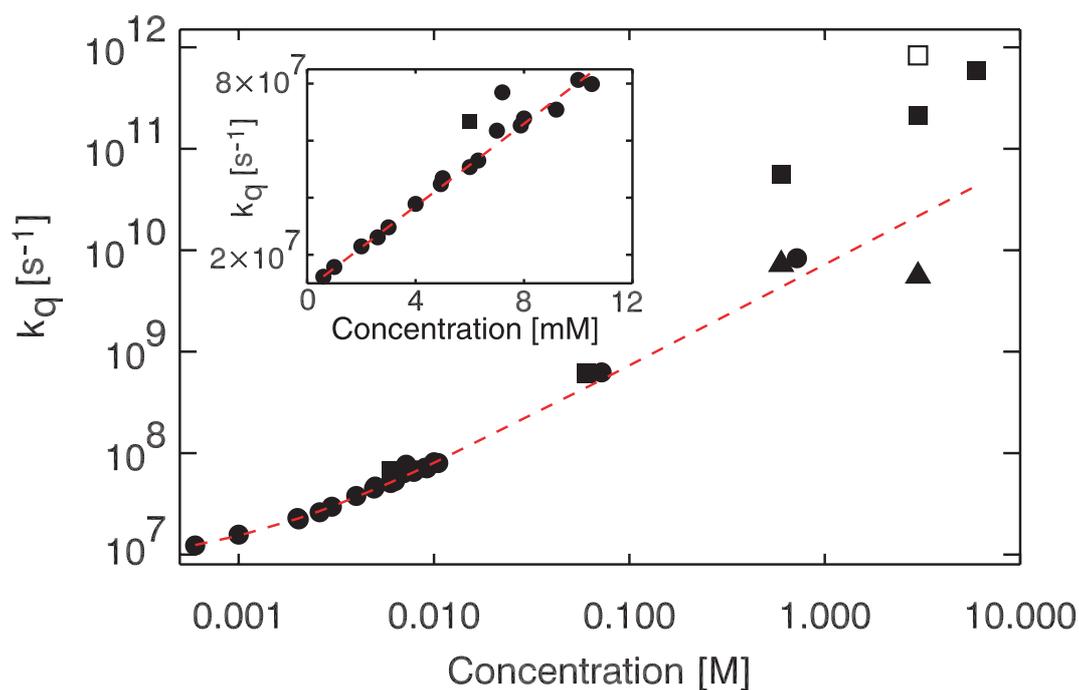
### 6.6.2 Kinetik des Triplett-Quenchings — Dynamischer und statischer Grenzfall

Für bimolekulare Quench-Experimente sind zwei Grenzfälle bekannt, bezeichnet als dynamisches und statisches Regime. Für niedrige Konzentrationen des Quenchers (**dynamischer Bereich**) sind die Kinetiken Pseudo-Erste-Ordnung und die Ratenkonstante  $k_{TT}$  ist gegeben durch [Tur78]:

$$k_{TT} = k_q[1-MN]. \quad (6.1)$$

Dieser einfache Zusammenhang wird durch eine Auftragung der gemessenen Quenchraten gegen die Konzentration von 1-MN für Konzentrationen kleiner 0.06 M bestätigt (siehe Abb. 6.13). Man beachte, dass die Abbildung sowohl Ergebnisse aus Laser-Flash Experimenten mit ns-Zeitauflösung [Fie04] (●) als auch Ergebnisse aus den hier präsentierten fs-Experimenten (■, Abschnitt 6.4 und Anhang) kombiniert. Aus den Daten erhält man durch einen linearen Fit eine bimolekulare Ratenkonstante  $k_q = 7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Einen Wert in der gleichen Größenordnung schätzt man über eine einfache Behandlung der Diffusionsgleichung nach Smoluchowski-Stokes-Einstein [MCH93] ab ( $k_D = 5.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Dies ist ein Anzeichen dafür, dass für diesen Bereich der Konzentration das Quenchen diffusionskontrolliert abläuft.

Einfache mono-exponentielle Kinetiken beobachtet man auch für Xanthon in reinem 1-MN. Dort kann die Bildung des 1-MN Triplett-Zustands mit einer Zeitkonstanten von  $\tau \approx 1.8 \text{ ps}$  beschrieben werden (siehe Tab. 6.5). In diesem **statischen Grenzfall** ist das Xanthon-Molekül bereits bei der Photoanregung von Quenchern umgeben und zur Auslösung des Quenchprozesses ist keine diffusive Bewegung mehr nötig. Das Triplett-Quenching ist in diesem Grenzfall schneller als die langsamere 12 ps-Komponente der Bildung der Absorption des Xanthon Triplett-Zustands in reinem Ethanol.



**Abbildung 6.13:** Stern-Vollmer Plot: Abhängigkeit der Ratenkonstanten  $k_q$  für den TTET von der 1-MN Konzentration. Die Abbildung enthält Daten aus ns-Experimenten (●) und fs-Experimenten (▲ für die jeweils schnellste Komponente, ■ und □ für die langsameren Komponenten; wenn nur eine Zeitkonstante das Quenching beschreibt, ist die zugehörige Rate mit ■ eingezeichnet).

Konzentration 1-MN	Ermittelte Zeitkonstanten				
0.006 M	0.3 ps	1.8 ps	10 ps	50 ps	15 ns
0.06 M	0.3 ps	1.6 ps	6.9 ps	54 ps	1.6 ns
0.6 M	–	2.1 ps	18 ps	130 ps	–
3 M	–	1.2 ps	4.7 ps	170 ps	2.8 ns
6 M	–	1.0 ps	1.7 ps	32 ps	–

**Tabelle 6.5:** In den fs-Experimenten ermittelte exponentielle Zeitkonstanten für das Triplett-Quenching von Xanthon in Ethanol durch 1-MN.

### 6.6.3 Kinetik des Triplett-Quenchings — mittlere Quencher-Konzentration

Bei einer Konzentration von 0.6 M 1-MN kann man den Übergang vom dynamischen zum statischen Regime beobachten (Abb. 6.11). Hier hinterlassen beide Grenzfälle ihre Signaturen. Die langsame Komponente von 120 ps erfüllt die Vorhersagen der Diffusionsgleichung nach Gl. (6.1), aber schnellere kinetische Beiträge mit Zeitkonstanten von 15 ps und sogar 2 ps für den Anstieg des 1-MN Triplett-Zustands stammen von einem statischen Beitrag des Quenching. Solche Übergangsbereiche besitzen eigentlich ein nicht-exponentielles kinetisches Verhalten, was sich darin widerspiegelt, dass zur Beschreibung der experimentellen Daten für jede Dekade eine Zeitkonstante benötigt wird. Derartige nicht-exponentielle Kinetiken werden häufig dann in bimolekularen Photoprozessen beobachtet, wenn einer der Reaktionspartner in hohen Konzentrationen vorliegt. Untersuchungen, die sich damit beschäftigen behandeln häufig das Quenching des angeregten Singulett-Zustands<sup>1</sup>, ein identisches Verhalten sollte jedoch auch für das Quenching des Triplett-Zustands vorherrschen.

### 6.6.4 Kinetik des Triplett-Quenchings — Anomalie bei 3 M

Die Experimente mit 3 M 1-MN weichen von dem sauberen Übergang zwischen dynamischem und statischem Verhalten ab. Auf kurzen Zeitskalen dominiert die 2 ps-Komponente die Quench-Kinetik, womit das statische Quenching der ausschließliche Mechanismus auf dieser Zeitskala ist. Höchst überraschend findet man jedoch zusätzlich zu diesem Pikosekunden-Prozess einen Beitrag zum Zerfall des Xanthon Triplett-Zustands mit einer Zeitkonstanten von  $\approx 3$  ns (siehe Tab. 6.5). Dies ist wesentlich langsamer als die 120 ps-Zeitkonstante, die für das dynamische Quenchen im Falle von 0.6 M 1-MN gefunden wurde.

Eine letztliche Erklärung dieser Anomalie kann hier nicht gegeben werden. Es wäre möglich, dass sie ihren Ursprung in der Mischungs-Thermodynamik von 1-MN mit Ethanol in Kombination mit bevorzugter Löslichkeit liegt („preferential solvation“).

Es ist bekannt, dass aromatische Kohlenwasserstoffe (wie 1-MN) und Alkohole positive Mischungs-Enthalpien  $\Delta H_m$  besitzen [OS96] und diese Enthalpie für einen Molenbruch von 0.5 maximal ist [LLL04]. Eine Konzentration von 3 M 1-MN in Ethanol entspricht einem Molenbruch von 0.3. Typische Maximum-Werte für  $\Delta H_m$  sind 1 KJ/mol [LLL04], was ungefähr gleich dem Wert  $T\Delta S_m$  für den entropischen Gewinn ist und  $\approx 1.6$  KJ/mol für ideale Lösungen ausmacht [AP02]. Die Änderung der freien Energie in der Mischung ( $\Delta G_m$ ) wird deshalb nahe bei Null sein, weshalb solche Mischungen der Separation nahe sind und man erwarten kann, dass sich mikroskopische Cluster mit einem erhöhten Anteil 1-MN und solche mit einem erhöhten Anteil Ethanol finden. Die Xanthon-Moleküle könnten dann zwischen diesen Clustern aufgeteilt werden, wobei das eher polare Xanthon-Molekül vorwiegend in Ethanol gelöst sein wird. Es gibt viele Bei-

<sup>1</sup>Für eine Übersicht incl. theoretischer Beschreibung siehe z. B. [SKS98].

spiele für eine derartige bevorzugte Löslichkeit, siehe z. B. [JH03] und darin enthaltene Referenzen.

Damit ließe sich ein Modell für die Anomalie bei 3 M 1-MN ableiten: Ein Teil der Xanthon-Moleküle befinden sich in Ethanol-Clustern, ihr Triplett-Zustand wird langsam gequencht, da die 1-MN Moleküle in die Cluster hineindiffundieren müssen. Der andere Teil der Xanthon-Moleküle ist umgeben von 1-MN Molekülen, ein schnelles statisches Quenchen ist möglich. Es handelt sich hierbei lediglich um eine Hypothese, die durch weitere Experimente überprüft werden muss.

Für die weitere Diskussion ist jedoch nur relevant, dass das Experiment mit 3 M 1-MN auf der hier interessanten Zeitskala (Pikosekunden) in Einklang mit den restlichen Experimenten ist, speziell auch mit dem an Xanthon in reinem 1-MN.

### 6.6.5 Mechanismus des Quenching — Energietransfer vs. Elektrontransfer

In reinem 1-MN ist die Bildung des 1-MN Triplett-Zustands mit einer Zeitkonstanten von 1.7 ps schneller als die langsame 12 ps-Komponente des Anstiegs der Triplett-Absorption von Xanthon in Ethanol. Ein Verständnis dieses überraschenden Ergebnisses erfordert die Diskussion des Quench-Mechanismus.

Zwei Prozesse können zum statischen Quenching beitragen: Ein Triplett-Triplett Energietransfer und ein Elektrontransfer, bei dem ein Radikalpaar erzeugt wird (1-MN Kation und Xanthon Anion). Durch Messungen der Photo-Leitfähigkeit konnten Högemann und Vauthey einen Elektrontransfer-Mechanismus für das Quenching von Triplett-Xanthon<sup>1</sup> durch 1-MN ausschliessen, während für Naphthalin-Derivate mit einem weniger positiven Oxidationspotential ein Elektrontransfer nachgewiesen wurde [HV98]. Dieses Verhalten wird durch die Energetik der Prozesse erklärt. Während die Änderung an freier Energie  $\Delta G$  für den Elektrontransfer zwischen Triplett-Xanthon und 1-MN im wesentlichen Null ist, wird er für Naphthaline mit einem geringeren Oxidationspotential negativ, wodurch ein Elektrontransfer möglich wird.

Startet man jedoch im Singulett-Zustand von Xanthon, ist die Situation anders: Die Energie des Radikalpaars ist nahezu unabhängig von seinem Spin-Zustand [SU89], die Energie des Ausgangszustands ist jedoch um den Wert der Singulett-Triplett-Aufspaltung in Xanthon höher ( $\approx 0.3$  eV [PH71]). Für den angeregten Singulett-Zustand von Xanthon wird ein Elektrontransfer deshalb mit  $\approx 0.3$  eV exergonisch. In den Experimenten von Högemann und Vauthey war aufgrund der geringen (0.1 M) Quencher-Konzentrationen ein Singulett-Elektrontransfer nicht möglich, da das ISC schneller war als ein (diffusionskontrollierter) Elektrontransfer. Für die hier durchgeführten Experimente an Xanthon in reinem 1-MN ist ein Elektrontransfer jedoch denkbar und würde einen alternativen Zerfallskanal für den angeregten Singulett-Zustand von Xanthon eröffnen.

---

<sup>1</sup>Die Experimente verwendeten eine sehr geringe Konzentration von 1-MN. Das Quenching ist demnach vollständig diffusionskontrolliert und das Xanthon-Molekül befindet sich zum Zeitpunkt des Quenching komplett im Triplett-Zustand.

Zwei Punkte sprechen jedoch gegen den Elektrontransfer:

1. Innerhalb der Vergleichbarkeit unterschiedlicher transienter Absorptionsexperimente ist die Signalhöhe der Absorptionsbande von Triplett 1-MN nach Abschluss des Quenching identisch für unterschiedliche Konzentrationen von 1-MN (dies wurde sowohl in den ns-Laserflash- [Fie04] als auch in den fs-Absorptionsexperimenten beobachtet). Das heißt, dass die Ausbeute an Triplett 1-MN keine Abhängigkeit von der Quencher-Konzentration zeigt. Da der Elektrontransfer einen konkurrierenden Zerfallskanal darstellt, würde man bei einer Realisierung des Elektrontransfer-Quenchings eine Reduzierung der Triplett-Ausbeute für hohe Quencher-Konzentrationen erwarten.
2. Die Experimente an Xanthon in reinem 1-MN konnten weder eine spektrale Signatur des Xanthon Anions noch des 1-MN Kations nachweisen, welche im Spektralbereich 550–720 nm sichtbar sein sollten [HV98]. Nach dem schnellen Zerfall des Triplett-Spektrums des Xanthon-Moleküls innerhalb 1 ps sind in diesem Spektralbereich jedoch keine langlebigen spektralen Signaturen mehr sichtbar. Daher müsste das Radikalpaar — falls es gebildet wird — in weniger als 1 ps erzeugt werden und wieder rekombinieren. Über die Marcus Theorie [Tur78] kann man aufgrund der stark unterschiedlichen freien Energien ( $-0.3$  eV für die Bildung eines Singulett Radikalpaars und  $-3.18$  eV [HV98] für dessen Rekombination) für beide Prozesse eine derart schnelle Kinetik jedoch ausschließen.

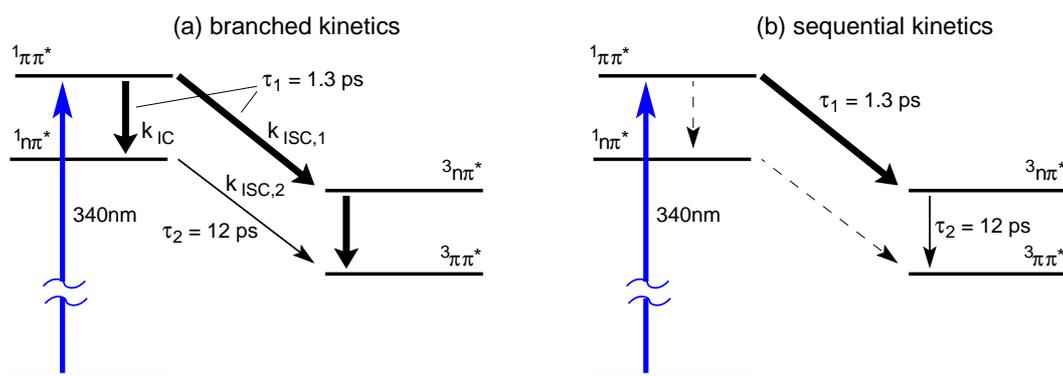
Mit diesen beiden Argumenten scheint es deshalb für die weitere Diskussion gerechtfertigt, nur den Energietransfer-Mechanismus zu berücksichtigen.

### 6.6.6 Quench-Mechanismus — Verzweigung vs. sequentielles Modell

Das Fehlen der 12 ps-Komponente in der Kinetik von Xanthon in reinem 1-MN lässt sich nur verstehen, wenn alle Xanthon-Moleküle bereits mit der schnellen Zeitkonstanten von 1.5 ps über ISC in den Triplett-Zustand gelangen. Die experimentellen Daten sind deshalb nicht mit einem Verzweigungs-Mechanismus vereinbar, wie er in Abb. 6.14a dargestellt ist. Hier würde die langsame 12 ps-Komponente von einem  $^1n\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^*$ -ISC herrühren. Ein Quenching des  $^1n\pi^*$ -Zustands durch Singulett-Singulett Energietransfer zwischen Xanthon und 1-MN ist nicht möglich, da der  $S_1$ -Zustand von 1-MN energetisch weit oberhalb dem von Xanthon liegt (vgl. Tab. 6.2). Ein Singulett-Triplett Energietransfer ist zwar energetisch möglich, aber Spin-verboden und wird deshalb zwischen unterschiedlichen Molekülen nicht mit einer solchen kurzen Zeitkonstanten stattfinden.

Aus diesem Grund kann die langsame Komponente der Bildung des Triplett-Zustands nicht der Entvölkerung des  $^1n\pi^*$ -Zustands zugeordnet werden und der Verzweigungs-Mechanismus muss ausgeschlossen werden.

Im sequentiellen Modell ist der einzige Reaktionskanal, auf dem der  $^1\pi\pi^*$ -Zustand verlassen werden kann der schnelle ISC-Prozess  $^1\pi\pi^* \rightarrow ^3n\pi^*$  (1.5 ps). Dieser Zustand



**Abbildung 6.14:** Photochemie Xanthon: Zuordnung der extrahierten Zeitkonstanten zu molekularen Prozessen. (a) Verzweigungs-Modell, (b) sequentielles Modell.

zerfällt dann langsamer (12 ps) über interne Konversion zum  $3\pi\pi^*$ -Zustand. Bereits nach dem ersten Prozess befindet sich die gesamte Besetzung in der Triplett-Mannigfaltigkeit. Hier ist von *beiden* Zuständen ( $3n\pi^*$  und  $3\pi\pi^*$ ) aus ein Triplett-Triplett-Energietransfer zu 1-MN möglich und das Verschwinden der längerlebigen Komponente im Anstieg des Xanthon Triplett-Spektrums wird zwanglos erklärt.

An dieser Stelle spielt die Konfiguration des energetisch am tiefsten liegenden Triplett-Zustands von Xanthon eine wichtige Rolle. Cavaleri et al. beobachteten einen biphasischen Anstieg des Triplett-Spektrums von Xanthon unabhängig von der Polarität des Lösungsmittels [CPB96]. Sie nehmen an, dass der „inverse gap effect“ in Xanthon realisiert ist, wonach in polaren Lösungsmitteln  $T_1 = 3\pi\pi^*$  und in unpolaren Lösungsmitteln  $T_1 = 3n\pi^*$  gelten sollte (vgl. Abschnitt 6.1.2 Abb. 6.4a). Da die El-Sayed Regeln verlangen, dass ein ISC-Prozess, der im Singulett  $1\pi\pi^*$ -Zustand beginnt, im Triplett  $3n\pi^*$ -Zustand endet, würde demnach in einem unpolaren Lösungsmittel der *niedrigste* Triplett-Zustand direkt besetzt. Nach dem sequentiellen Modell müsste dann in unpolaren Lösungsmitteln ein mono-exponentieller Anstieg der Triplett-Absorptionsbande von Xanthon beobachtet werden, im Gegensatz zu den Beobachtungen von Cavaleri et al.

Da die oben präsentierten Argumente stark für eine Realisierung des sequentiellen Modells sprechen, muss man folgern, dass in Xanthon keine Inversion der Triplett-Zustände auftritt und das Schema in Abb. 6.4b richtig ist.

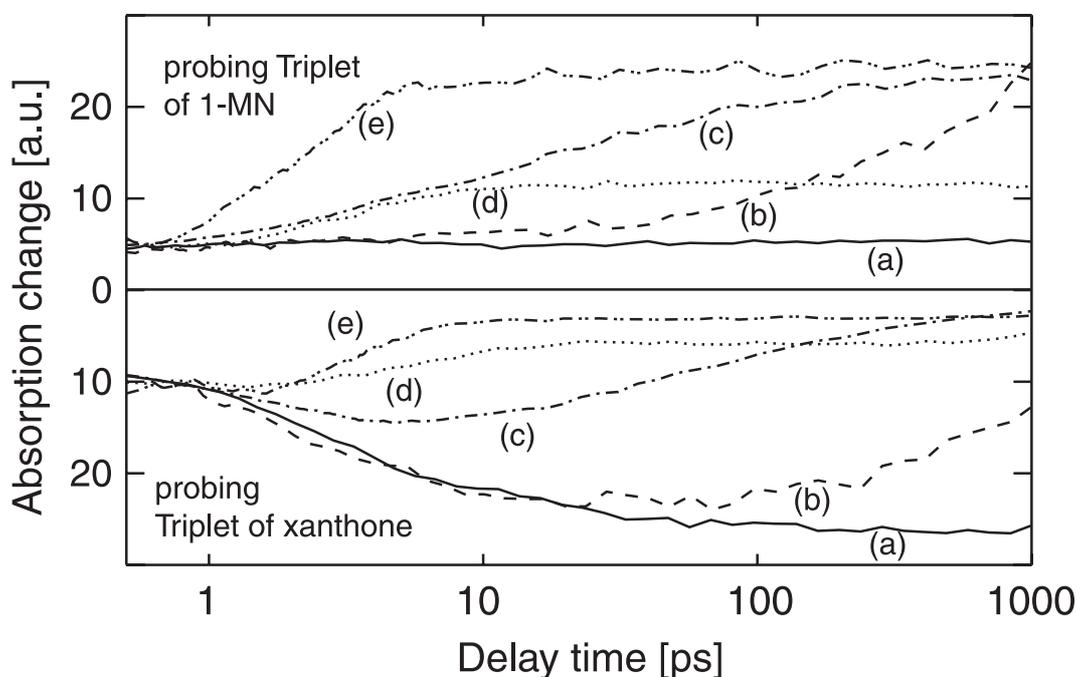
Es fällt auf, dass in dem hier vorgeschlagenen sequentiellen Modell der ISC-Prozess  $1\pi\pi^* \rightarrow 3n\pi^*$  (1.5 ps) schneller ist als die darauf folgende interne Konversion  $3n\pi^* \rightarrow 3\pi\pi^*$  (12 ps) innerhalb der Triplett-Mannigfaltigkeit. Dies wird verständlich, wenn man die physikalische Basis der El-Sayed Regeln berücksichtigt. Diese basieren darauf, dass die Änderung des Elektronen-Spins durch eine Änderung des Orbital-Drehimpulses kompensiert wird. Ein ISC-Prozess, der eine solche Kompensation beinhaltet, wird effizient sein.

Bei der internen Konversion zwischen einem Zustand mit  $3\pi\pi^*$ -Charakter und einem mit  $3n\pi^*$ -Charakter kann die Änderung des Drehimpulses im Orbital — da es sich um einen IC-Prozess handelt — nicht durch eine Änderung im Elektronen-Spin kompensiert werden. Wenn man so die El-Sayed Regeln „umkehrt“ wird plausibel, warum ein  $3n\pi^* \rightarrow$

$^3\pi\pi^*$  IC-Prozess langsamer und weniger effektiv sein kann als ein  $^1\pi\pi^* \rightarrow ^3n\pi^*$  ISC-Prozess.

### 6.6.7 Dynamik des ultraschnellen Quenching

Aus den Experimenten zum Triplett-Quenching bei verschiedenen Konzentrationen von 1-MN kann man zusätzliche Informationen über den Prozess des Quenching selbst ziehen. Hierfür ist in Abb. 6.15 das zeitliche Verhalten des Transfers für die hier gemessenen 1-MN Konzentrationen zusammengefasst. Der obere Teil der Abbildung enthält das zeitliche Verhalten der über den Spektralbereich 414–438 nm integrierten 1-MN Triplett Absorptionsbande für die verschiedenen 1-MN Konzentrationen, der untere Teil enthält analog die von 550–650 nm integrierte Triplett-Absorptionsbande von Xanthon (Absorptionzunahme nach unten aufgetragen).



**Abbildung 6.15:** Vergleich des Triplett-Quenching bei unterschiedlichen 1-MN Konzentrationen. Im oberen Teil ist der zeitliche Verlauf der 1-MN Triplett Absorptionsbande (414–438 nm) dargestellt, im unteren Bereich (gespiegelt) der Verlauf der Xanthon Triplett-Absorptionsbande (550–650 nm). Für die Messungen wurde jeweils 5 mM Xanthon in Ethanol gelöst. Die verwendeten 1-MN Konzentrationen waren (a) 0 M, (b) 0.06 M, (c) 0.6 M, (d) 3.0 M und (e) reines 1-MN.

Für sehr niedrige 1-MN Konzentrationen ( $< 0.6$  M) beobachtet man für das Quenching mono-exponentielle Kinetiken, bei denen die Quenchraten linear von der 1-MN Konzentration abhängen, wie es nach Diffusionsgleichung nach Smoluchowski-Stokes-Einstein (Gl. 6.1) auch zu erwarten ist. Für höhere Quencher-Konzentrationen ergeben sich Abweichungen vom mono-exponentiellen Verhalten des Quenching.

Bei der höchsten Konzentration 1-MN findet man schließlich wieder einen mono-exponentiellen Anstieg der 1-MN Triplet Absorption mit der gleichen Zeitkonstanten wie der schnelle Teil des Aufbaus der Xanthon Triplet-Absorption (ca. 1.5 ps). Dieses mono-exponentielle Verhalten zusammen mit der niedrigen Konzentration des Xanthon-Triplet Ausgangszustands geben einen Hinweis darauf, dass die Übergangsrates  $k_{3X \rightarrow 3(1-MN)} = 1/\tau_{3X \rightarrow 3(1-MN)}$  des Energietransfers vom Xanthon Triplet-Zustand zu 1-MN schneller ist ( $\leq 1$  ps) als die Bildung (1.5 ps) des Xanthon-Triplet selbst. Aus den Experimenten mit reinem 1-MN als Lösungsmittel lässt sich jedoch nicht entscheiden, ob diese schnelle Quenchrates durch einzelne, richtig platzierte 1-MN Moleküle verursacht wird, oder ob sie von der großen Zahl 1-MN Moleküle herrührt, die in Kontakt mit dem Triplet-Donor Xanthon sind.

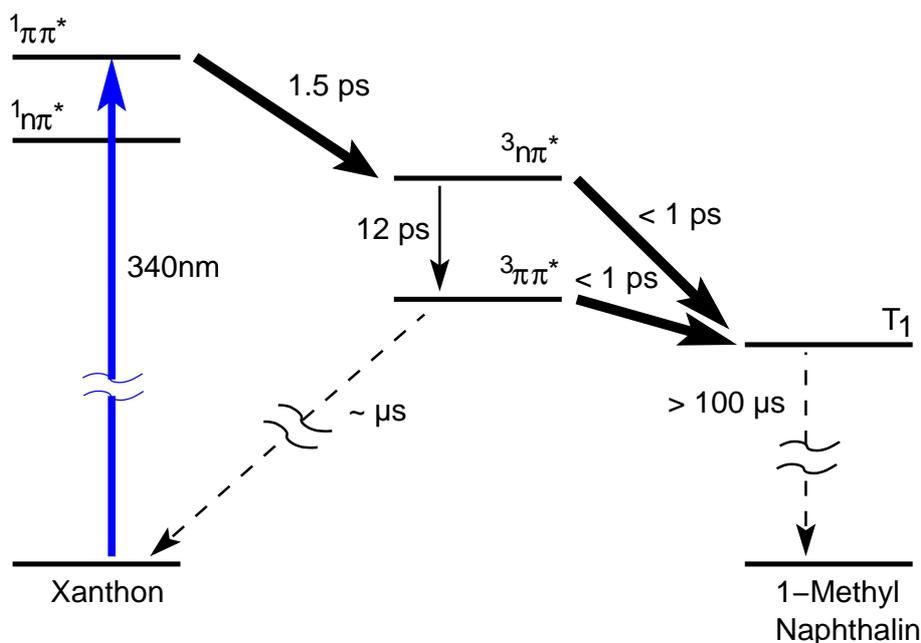
Eine Unterscheidung zwischen den beiden Szenarien ist durch die Experimente bei niedrigeren Quencher-Konzentrationen möglich. Bei niedrigerer 1-MN Konzentration sinkt die Zahl der Akzeptor-Moleküle, die das Xanthon-Molekül umgeben. Wäre die Ratenkonstante des statischen Quenching von der Zahl der umgebenden Akzeptor-Moleküle abhängig, so müsste man für die schnellste Zeitkonstante des Quenching eine Verlangsamung sehen (Abnahme der Quenchrates). Interessant sind hier die Experimente mit 0.6 M 1-MN. Der direkt mit dem Quenching verbundene Anstieg der 1-MN Triplet-Absorption lässt sich dort mit drei Zeitkonstanten beschreiben: 2 ps (relativer Anteil 30%), 15 ps (40%) und 120 ps (30%). Der 120 ps-Prozess erfüllt Gl. (6.1) und wird deshalb dem dynamischen Quenching zugeordnet. Die 15 ps-Komponente beschreibt den Übergang zwischen statischem und dynamischem Quenching-Regime. Die 2 ps-Komponente schließlich rührt rein von statischem Quenching her. Diese Zeitkonstante ist identisch mit der, die für Xanthon in reinem 1-MN beobachtet wurde, d. h. für die 10-fache Konzentration an Akzeptor-Molekülen. Mit anderen Worten: Nur die *Amplitude* des statischen Quenching nimmt mit der 1-MN Konzentration ab, nicht aber die *Ratenkonstante*. Die Ratenkonstante des statischen Quenching skaliert demnach nicht mit der Anzahl der Akzeptor-Moleküle, die in engem Kontakt zum Xanthon-Molekül stehen. Es scheint ausreichend, wenn sich ein einziges 1-MN Molekül in der Nähe des angeregten Xanthon-Moleküls im Triplet-Zustand befindet, um einen Energie-Transfer innerhalb  $\leq 1$  ps zu ermöglichen.

### 6.6.8 Zusammenfassung

Die spektral breitbandigen Untersuchungen zur transienten Absorption und Emission an Xanthon und Xanthon/1-MN Mischungen ergaben wichtige neue Erkenntnisse über das intersystem crossing in Xanthon und den Triplet-Triplet Energietransfer von Xanthon zu 1-MN.

Die Ergebnisse zur Photochemie von Xanthon und dem Triplet-Quenching durch 1-MN sind in Abbildung 6.16 zusammengefasst: Durch den Anregungs-Lichtimpuls wird der Singulett  $^1\pi\pi^*$ -Zustand von Xanthon besetzt, eine ultraschnelle Relaxation findet dort statt ( $\tau \approx 0.6$  ps). Die gesamte Population des Singulett  $^1\pi\pi^*$ -Zustands gelangt über ein (El-Sayed erlaubtes) intersystem crossing in den  $^3\pi\pi^*$  Triplet-Zustand ( $\tau \approx 1.5$  ps) und

daraufhin über interne Konversion in den energetisch am tiefsten liegenden  $^3\pi\pi^*$ -Zustand ( $\tau = 12$  ps), woraus sich der beobachtete bi-phasische Anstieg der Triplett-Absorption von Xanthon ergibt. Im  $^3\pi\pi^*$ -Zustand findet noch eine Blauverschiebung der Triplett-Absorptionsbande von Xanthon statt, die von der dielektrischen Antwort des Lösungsmittels herrührt ( $\tau = 62$  ps).



**Abbildung 6.16:** Zusammenfassung der Ergebnisse zur Photochemie von Xanthon: Der Triplett-Zustand wird über einen sequentiellen Mechanismus erreicht, der  $^3\pi\pi^*$ -Zustand ist unabhängig von der Polarität des Lösungsmittels der energetisch am tiefsten liegende Triplett-Zustand von Xanthon und bei direktem Kontakt mit 1-MN findet ein Triplett-Triplett Energietransfer innerhalb  $\leq 1$  ps statt.

Bereits wenn ein einziges 1-MN Molekül in Kontakt mit dem angeregten Triplett-Xanthon kommt, findet ein effektiver Triplett-Triplett Energietransfer innerhalb  $\leq 1$  ps statt, wobei beide Triplett-Zustände des Xanthon Moleküls von 1-MN gequench werden können. Für 1-MN Konzentrationen  $< 0.06$  M beobachtet man rein dynamisches Quenching, das die Smoluchowski-Einstein-Stokes Gleichung erfüllt, d. h. die beobachtete Ratekonstante des Quenching skaliert linear mit der Konzentration der Akzeptor-Moleküle. Eine 1-MN Konzentration von  $0.6$  M kennzeichnet den Übergang vom statischen, diffusionskontrollierten Regime zum dynamischen Regime, bei dem die 1-MN Konzentration so groß ist, dass einige Xanthon-Moleküle bereits zum Zeitpunkt der Photo-Anregung in Kontakt mit einem 1-MN Molekül sind. In diesem Fall wird bereits der  $^3n\pi^*$ -Zustand von Xanthon gequench. Am deutlichsten ist dies für Xanthon in reinem 1-MN sichtbar, wo der Triplett-Triplett Energietransfer von Xanthon zu 1-MN durch die Besetzung des  $^3n\pi^*$ -Zustand von Xanthon limitiert wird. Bei  $3$  M 1-MN beobachtet man eine Anomalie, die von bevorzugter Löslichkeit herrühren könnte.



# 7 Beobachtung der Kontaktbildung in Xanthonpeptiden

Zu den initialen Schritten der Proteinfaltung zählt sicherlich das Ausbilden von Sekundärstruktur-Elementen wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern. Sämtliche derartige Strukturelemente benötigen in einem ersten Schritt die Formation eines Kontaktes zwischen räumlich entfernten Teilen der Aminosäurekette. Für ein Verständnis dieser initialen Schritte der Proteinfaltung ist es deshalb wichtig zu wissen, wie schnell eine solche Kontaktbildung abläuft. Die biophysikalische Fragestellung in diesem Kapitel lautet deshalb:

„Wie schnell ist die Kontaktbildung in frei beweglichen Peptiden?“

Der Aufbau dieses Kapitels ist wie folgt:

- Nach einer ausführlichen **Vorstellung** der hier durchgeführten Experimente (Abschnitt 7.1) wird in
- Abschnitt 7.2 gezeigt, wie aus der **Diffusionsgleichung** eine exponentielle Zeitkonstante abgeleitet werden kann, die die Kontaktbildung in Peptiden beschreibt.
- Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente bilden eine Ergänzung und Erweiterung zu Experimenten, die ursprünglich am Biozentrum der Universität Basel in der Gruppe um Prof. Thomas Kiefhaber begonnen wurden. Abschnitt 7.3 bietet eine **Zusammenfassung der Laser-Flash Experimente**.
- Um unterscheiden zu können, welche Dynamik in den transienten Spektren von der Kontaktbildung verursacht wird, benötigt man Messungen an **Referenz-Systemen** (Donor alleine in Wasser und Peptide, die nur mit Donor bzw. nur mit Akzeptor markiert sind — Abschnitt 7.4).
- Abschnitt 7.5 enthält die **Ergebnisse** der Messungen zur Kontaktbildung in Xanthonpeptiden.
- Den Abschluss des Kapitels bildet die **Diskussion**, die die Kontaktbildung in den Xanthonpeptiden im ns- und sub-ns Zeitbereich untersucht (Abschnitt 7.6).

### 7.1 Realisierung der Experimente

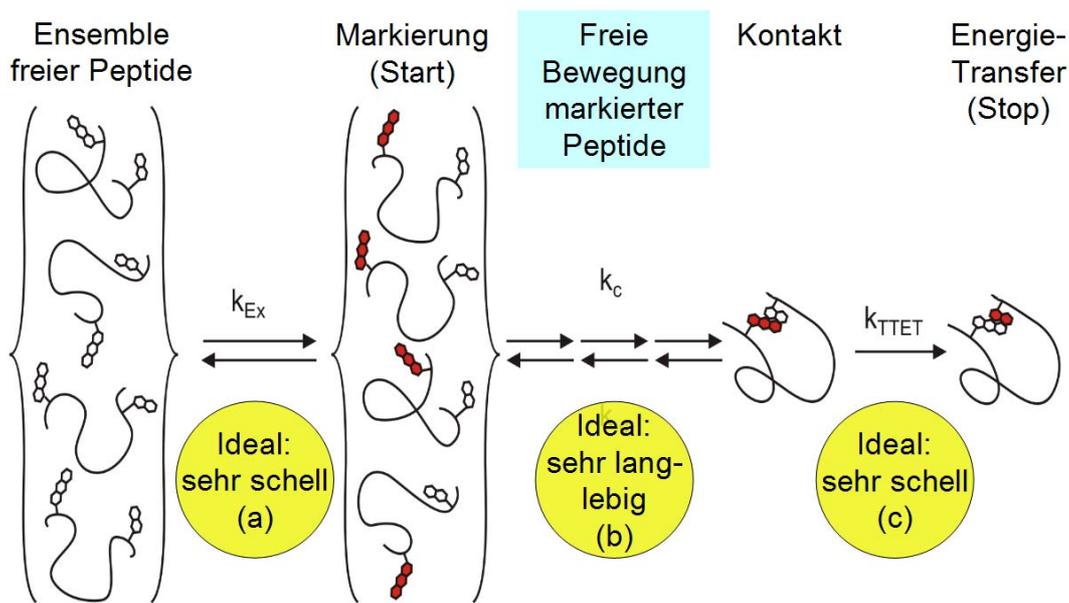
Die prinzipielle Idee eines Experiments zu diesem Themenkomplex wurde bereits in der Einleitung geschildert (siehe Seite 14). Abbildung 7.1 zeigt den Ablauf der hier durchgeführten Experimente etwas detaillierter und formuliert gleichzeitig die Anforderungen an ein ideales Donor/Akzeptor-System:

1. Ausgangspunkt bildet die Präparation eines Ensembles frei beweglicher Peptide in Lösung, die alle mit Donor und Akzeptor markiert sind. Zu einem beliebigen Zeitpunkt mag das Ensemble aus den fünf dargestellten Konformationen bestehen (siehe Abb. 7.1, „Präparation“). Wichtig ist festzuhalten, dass die Peptide über den gesamten Beobachtungszeitraum frei in Lösung beweglich sind und bleiben.
2. Durch einen kurzen Anregungs-Lichtimpuls wird der Donor markiert (Abb. 7.1, „Markierung“). Die Anforderungen an einen idealen Donor sind, dass die Markierung sehr schnell abläuft und das Peptid von dieser Markierung nicht beeinflusst wird. Die Zeitdauer der Markierung definiert in diesem Experiment die „Apparatefunktion“, denn dadurch wird der Startzeitpunkt der Beobachtung definiert.
3. Nach der Markierung setzt das Peptid seine (ungestörte) Bewegung im Lösungsmittel fort, solange, bis die beiden gekennzeichneten Teile des Peptids in Kontakt kommen (Abb. 7.1, „Kontakt“). Dies ist der eigentlich interessante Zeitbereich. In einem idealen System ist der Donor-Zustand extrem langlebig, damit das zur Verfügung stehende Zeitfenster zur Beobachtung der Kontaktbildung möglichst groß ist.
4. Nur bei direktem Kontakt zwischen Donor und Akzeptor wird die Energie vom Donor auf den Akzeptor übertragen, die Beobachtung stoppt (die Absorptionsbande des Donors verschwindet, gleichzeitig wird die des Akzeptors aufgebaut). In einem idealen System ist dieser Energietransfer wiederum sehr schnell und garantiert damit einen klar definierten Endzeitpunkt der Beobachtung.

Zusammengefasst muss ein ideales Paar von Marker-Molekülen demnach folgende Anforderungen erfüllen: Schnelle Markierung des Donors, langlebiger Donor-Zustand und nur bei direktem Kontakt mit dem Akzeptor schnellen Energietransfer vom Donor zum Akzeptor.

Das für diese Arbeit ausgewählte Paar ist Xanthon als Donor und Naphthalin als Akzeptor (in Kapitel 6 konnte gezeigt werden, dass die beiden Moleküle die Anforderungen an ein ideales System sehr gut erfüllen). Die Markierungszeit ist der Zeitraum vom Beginn der Anregung des Xanthon-Moleküls durch den Anregungs-Lichtimpuls bis zum Zeitpunkt, ab dem sich das Xanthon-Molekül im Triplett-Zustand befindet (Abb. 7.2a). Der langlebige Donor-Zustand ist der Triplett-Zustand des Xanthon (Abb. 7.2b). Der Energieübertrag von Donor zu Akzeptor ist ein Triplett-Energie-Transfer<sup>1</sup> von Xanthon zu Naphthalin (Abb. 7.2c, für Details siehe Abb. 6.16, Seite 155). Zwei Dinge sind

<sup>1</sup>Andere Ansätze in der Literatur verwenden z. B. Fluoreszenz-Quenching [HHGN02, HN03] oder Elektron-Transfer [CLWG03]. Lapidus et al. untersuchen Kontaktbildung durch Triplett Energietransfer



**Abbildung 7.1:** Prinzip der Experimente zur Kontaktbildung in Peptiden: Durch den Anregungs-Lichtimpuls wird das Donor-Molekül schnell markiert (a) und befindet sich danach im langlebigen Triplet-Zustand (b). Bei direktem Kontakt von Donor und Akzeptor endet das Experiment (c): die Energie des Donors wird schnell auf den Akzeptor übertragen.

hier noch wichtig: (i) Energietransfer vom Donor zum Akzeptor findet nur bei direktem Kontakt statt, die Energie wird nicht „durch den Raum“ übertragen (Dexter-Mechanismus [Dex53, Tur78]). (ii) Der energetisch am niedrigsten liegende Singulett-Zustand  $S_1$  des Naphthalins liegt deutlich oberhalb des  $S_1$ -Zustands des Xanthon, wodurch ein Singulett-Energie-Transfer ausgeschlossen werden kann.

## 7.2 Ableitung der Kontaktbildungsrate aus der Diffusionsgleichung

Die hier durchgeführten Experimente haben zum Ziel, die Zeitkonstante der Kontaktbildung in frei beweglichen Peptiden zu bestimmen. Wie aber kommt man dazu, diesen Prozess mit einer exponentiellen Zeitkonstante zu beschreiben?

Die folgende Darstellung zielt spezifisch auf die Bestimmung der Kontaktbildungsrate in einem Peptid ab und beruht auf einer Arbeit von Szabo et al. („First passage time approach to diffusion controlled reactions“), oftmals als „SSS-Theorie“ bezeichnet<sup>1</sup>

von Cystein zu Tryptophan [LEH00, LEH01, LSE<sup>+</sup>02, BSL<sup>+</sup>03] (diese Methode hat den Vorteil, dass die „Marker-Moleküle“ selbst Aminosäuren sind, allerdings beträgt die Zeitkonstante für den Energie-transfer ca. 100 ps).

<sup>1</sup>Weitere Ansätze zur Ableitung der Kontaktbildungsrate, Simulationen und Vergleiche mit Experimenten finden sich z. B. in [Zwa74, KW94, PTW01, WZ02, DLOY03, KJ03, Por03, Zho03, HX04, DC04].

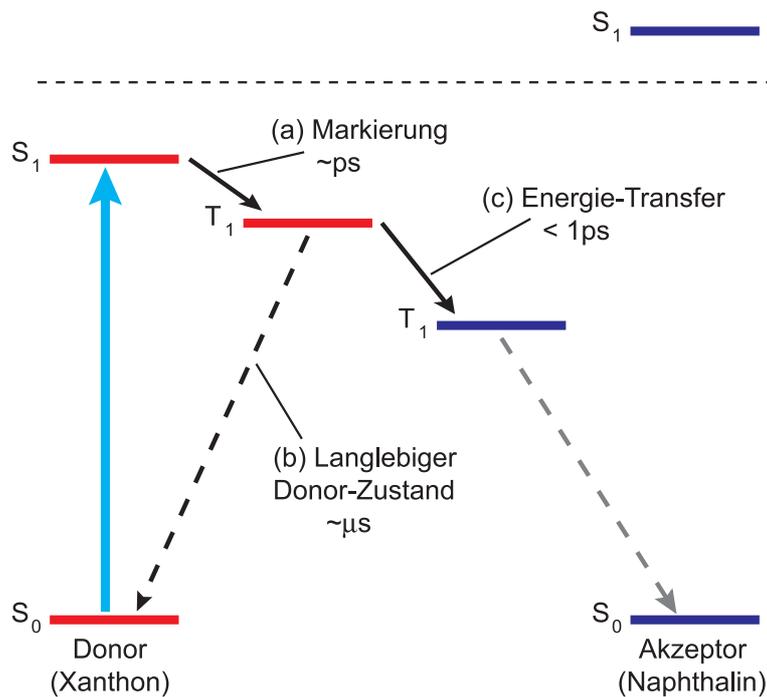


Abbildung 7.2: Energieschema der Marker-Moleküle.

[SSS80]. Ausgangspunkt ist die Diffusionsgleichung.

Gesucht ist die „mittlere“ Reaktionszeit  $\bar{\tau}$ , wobei in dieser Arbeit mit Reaktion der Triplett-Triplett Energietransfer bei direktem Kontakt von Donor und Akzeptor gemeint ist. Diese mittlere Reaktionszeit  $\bar{\tau}$  ist bestimmt durch  $s(t)$ , die Wahrscheinlichkeit dafür, dass der Energietransfer zur Zeit  $t$  noch nicht stattgefunden hat („survival probability“):

$$\bar{\tau} = \int_0^{\infty} dt s(t). \quad (7.1)$$

$s(t)$  wiederum ist folgendermaßen mit der Wahrscheinlichkeit  $p(\mathbf{r}, t)$  verknüpft, die angibt, dass das System zur Zeit  $t$  den (vektoriellen) Donor-Akzeptor Abstand  $\mathbf{r}$  besitzt:

$$s(t) = \int d\mathbf{r} p(\mathbf{r}, t). \quad (7.2)$$

Um von der mittleren Reaktionszeit  $\bar{\tau}$  zu einer Kontaktbildungsrate (bzw. zu einer exponentiellen Zeitkonstanten) zu kommen, wird angesetzt

$$s(t) \approx s_{\text{approx}}(t) = \exp(-t/\tau) \quad (7.3)$$

und  $\tau = \bar{\tau}$  identifiziert. Im Folgenden wird deshalb  $\tau$  anstatt  $\bar{\tau}$  verwendet (die Güte diese Approximation wird weiter unten untersucht).

## 7.2 Ableitung der Kontaktbildungsrate aus der Diffusionsgleichung

---

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung  $p(\mathbf{r}, t)$  erfüllt die Diffusionsgleichung nach Smoluchowski:

$$\begin{aligned}\frac{\partial}{\partial t}p(\mathbf{r}, t) &= \nabla \cdot \mathbf{j}(\mathbf{r}, t), \\ \mathbf{j}(\mathbf{r}, t) &= D[\nabla p(\mathbf{r}, t) + \beta p(\mathbf{r}, t)\nabla U(\mathbf{r})],\end{aligned}\tag{7.4}$$

mit der Diffusionskonstanten<sup>1</sup>  $D$ , einem (zunächst beliebigen) Wechselwirkungspotential  $U(\mathbf{r})$  und  $\beta = (k_B T)^{-1}$ .

Folgende Annahmen werden getroffen: (i) Es wird sphärische Symmetrie angenommen. (ii) Im Gleichgewicht soll die Boltzmann-Verteilung gelten. (iii) Bei Kontakt findet mit Wahrscheinlichkeit eins ein instantaner Energietransfer statt. (iv) Die Bewegungen innerhalb des Peptids laufen wesentlich schneller ab als die Kontaktbildung. (v) Für ein dreidimensionales Peptid (Polymer) wird ein (sphärisch symmetrisches) harmonisches Potential angenommen ( $r = |\mathbf{r}|$ ):

$$U(r) = \frac{3r^2}{2\beta L^2}.\tag{7.5}$$

Dieses Potential ist ein phänomenologischer Ansatz, der die entropische Kraft im Peptid beschreiben soll ( $U \sim Tr^2$ ). Dabei ist  $L$  der mittlere Abstand zwischen Donor und Akzeptor im Peptid ( $L^2 = \langle r^2 \rangle$ ). Das harmonische Potential ist die einfachste Darstellung der im Peptid tatsächlich auftretenden Kräfte, wenn die (mit Donor und Akzeptor markierten) Enden gegeneinander bewegt werden müssen. Bei großer Temperatur wird die Öffnung von  $U(r)$  kleiner; damit wird die Beobachtung umgesetzt, dass bei hohen Temperaturen die einzelnen Segmente des Peptids sich so schnell gegeneinander bewegen, dass große Abstände nicht mehr realisiert werden können.

Zur Lösung der Diffusionsgleichung werden noch Randbedingungen benötigt. Wenn Donor und Akzeptor sich auf den „Kontaktabstand“  $a$  genähert haben ( $r = a$ ), findet mit Wahrscheinlichkeit eins ein Energietransfer statt. Als erste Randbedingung fordert man deshalb für  $r = a$  die sogenannte Smoluchowski Randbedingung<sup>2</sup>

$$p(a, t) = 0.\tag{7.6}$$

Als zweite Randbedingung fordert man, dass im gestreckten Peptid Donor und Akzeptor den maximalen Abstand  $R$  voneinander haben (weiter dürfen sie sich nicht voneinander entfernen, sonst würde das Peptid reißen). Diese Randbedingung wird als „reflektierende Barriere“ bezeichnet und verlangt für  $r = R$ :

$$j(R, t) = 0.\tag{7.7}$$

---

<sup>1</sup>Im allgemeinsten Fall nimmt man einen vom Ort abhängigen Diffusionskoeffizienten  $D(\mathbf{r})$  an. Für die Überlegungen hier ist dies jedoch nicht nötig.

<sup>2</sup>Eine etwas allgemeinere Randbedingung lautet  $j(a, t) = \kappa p(a, t)$ , wobei die (mikroskopische) Ratenkonstante  $\kappa$  die Effektivität der Reaktion beschreibt. Im Fall der Xanthonpeptide findet die Reaktion, d. h. der Triplett-Triplett-Energietransfer sicher statt, sobald sich Donor und Akzeptor auf den Abstand  $a$  genähert haben. In diesem Fall gilt also  $\kappa \rightarrow \infty$  und man erhält die Smoluchowski Randbedingung.

Bevor die Verteilung  $s(t)$  und damit die Zeitkonstante der Kontaktbildung  $\tau$  bestimmt werden können, ist ein Zwischenschritt nötig: Zuerst wird die Kontaktbildungsrate eines einzigen Peptids berechnet, das zur Zeit  $t = 0$  den Donor-Akzeptor Abstand  $\mathbf{r}_0$  hatte. Dieses Ergebnis kann in einem zweiten Schritt dazu verwendet werden, die mittlere Kontaktbildungsrate für ein Ensemble von Peptiden zu berechnen, dessen Donor-Akzeptor Abstände zur Zeit  $t = 0$  gemäß der Gleichgewichtsverteilung  $p_{eq}(r)$  verteilt waren.

Die Lösung der Diffusionsgleichung mit den beiden Randbedingungen von oben und einer  $\delta$ -förmigen Anfangsverteilung ( $p(\mathbf{r}, 0) = \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0)$ ) ist die Greensche Funktion. Sie gibt die bedingte Wahrscheinlichkeit  $p(\mathbf{r}, t | \mathbf{r}_0, 0)$  an, dass ein Peptid, das zur Zeit  $t = 0$  den Donor-Akzeptor Abstand  $\mathbf{r}_0$  hatte, zur Zeit  $t$  einen Donor-Akzeptor Abstand  $\mathbf{r}$  hat<sup>1</sup>. Die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Peptid zur Zeit  $t$  noch keine Kontaktbildung gezeigt hat, wird mit  $s(t | \mathbf{r}_0)$  bezeichnet und ist gegeben durch

$$s(t | \mathbf{r}_0) = \int_{a \leq r \leq R} d\mathbf{r} p(\mathbf{r}, t | \mathbf{r}_0, 0). \quad (7.8)$$

Die Zeitkonstante für die Kontaktbildung ist in diesem Fall

$$\tau(\mathbf{r}_0) = \int_0^\infty dt s(t | \mathbf{r}_0). \quad (7.9)$$

Nachdem nun die Kontaktbildungsrate für ein einzelnes Peptid (bzw. eine  $\delta$ -förmige Anfangsverteilung) ermittelt wurde, kann dieses Ergebnis zur Berechnung der Kontaktbildungsrate eines Ensembles verwendet werden.

Die (bedingte) Wahrscheinlichkeit dafür, dass ein Peptid mit einem gemäß  $p_{eq}(r)$  verteilten Donor-Akzeptor Abstand zur Zeit  $t$  noch keinen Kontakt ausgebildet hat, ist<sup>2</sup>

$$\begin{aligned} s(t) &= \int_{a \leq r_0 \leq R} d\mathbf{r}_0 p_{eq}(\mathbf{r}_0) s(t | \mathbf{r}_0) \\ &= \int \int_{a \leq r_0 \leq R} d\mathbf{r} d\mathbf{r}_0 p_{eq}(\mathbf{r}_0) p(\mathbf{r}, t | \mathbf{r}_0, 0). \end{aligned} \quad (7.10)$$

Die dazugehörige Zeitkonstante für die Kontaktbildung ist dann

$$\tau = \int_{a \leq r_0 \leq R} d\mathbf{r}_0 p_{eq}(\mathbf{r}_0) \tau(\mathbf{r}_0) \quad \left( = \int_0^\infty dt s(t) \right). \quad (7.11)$$

---

<sup>1</sup>Für die (bedingte) Wahrscheinlichkeitsverteilung  $p(\mathbf{r}, t | \mathbf{r}_0, 0)$  läßt sich schreiben

$$p(\mathbf{r}, t | \mathbf{r}_0, 0) = \int d\mathbf{r}' \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \exp \{ t \mathbf{L}(\mathbf{r}') \} \delta(\mathbf{r}' - \mathbf{r}_0)$$

mit dem Diffusionsoperator

$$\mathbf{L}(\mathbf{r}) = \nabla \cdot D \nabla + \beta D \nabla \cdot (\nabla U).$$

<sup>2</sup>Dabei soll  $p_{eq}(r)$  im Intervall  $a \leq r \leq R$  auf eins normiert sein.

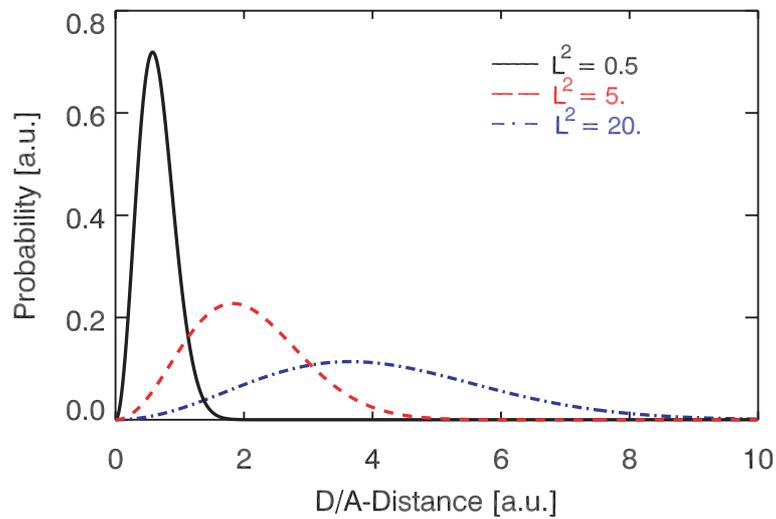
## 7.2 Ableitung der Kontaktbildungsrate aus der Diffusionsgleichung

Um die Boltzmann-Verteilung zu erfüllen, setzt man als Gleichgewichtsverteilung der Donor-Akzeptor Abstände im dreidimensionalen Fall

$$p_{eq}(r) = Cr^2 \exp[-\beta U(r)] \quad (7.12)$$

an ( $C$  ist eine Normierungskonstante). Mit dem harmonischen Potential aus Gl. (7.5) ergibt dies die (normierte) Gleichgewichtsverteilung einer sog. „Gaußschen Kette“ (vgl. Abb. 7.3):

$$p_{eq}(r) = \frac{4\pi r^2}{(2\pi L^2/3)^{3/2}} \exp(-3r^2/2L^2). \quad (7.13)$$



**Abbildung 7.3:** Normierte Wahrscheinlichkeitsverteilungen für Gaußsche Ketten, berechnet nach Gl. (7.13) für  $L^2 = 0.5, 5$  und  $20$ .

Nach einiger Mühe erhält man schließlich<sup>1</sup>

$$\tau = \int_a^R dx [Dp_{eq}(x)]^{-1} \left[ \int_x^R dy p_{eq}(y) \right]^2 \quad (7.14)$$

Für kleine Kontaktabstände  $a$  ist dann die Zeitkonstante für die Kontaktbildung eines Peptids mit der Abstandsverteilung  $p_{eq}(r)$  aus Gl. (7.13)

$$\tau = \frac{(2\pi L^2/3)^{3/2}}{4\pi D a}. \quad (7.15)$$

<sup>1</sup>Eine alternative Behandlung der Kontaktbildungsrate, ebenfalls ausgehend von der Diffusionsgleichung, geht auf Wilemski und Fixman [WF73] zurück („WF-Theory“). Im Grenzfall  $a \rightarrow 0$  stimmen beide Ansätze überein. Für einen Vergleich der beiden Zugänge siehe die Arbeit von Pastor et al. [PR96] (siehe auch [BS97]).

Im einfachsten Modell eines Peptids, bei dem Donor und Akzeptor durch  $n$  Peptidbindungen voneinander getrennt sind, können sämtliche Aminosäuren frei in alle Richtungen gegeneinander bewegt werden und man erhält (über die Zustandssumme,  $l$  ist die charakteristische Länge einer Peptidbindung,  $l \approx 4 \text{ \AA}$ )

$$L^2 = l^2 n \quad \Rightarrow \quad \tau \sim n^{3/2}. \quad (7.16)$$

Im Falle von Peptiden ist die relative Bewegung zweier Aminosäuren oft nur eingeschränkt möglich<sup>1</sup>. Zwei Erweiterungen des einfachen Modells wurden vorgeschlagen, um dies zu berücksichtigen. Der erste Vorschlag modelliert die Steifheit eines Peptids über ein sog. charakteristisches Verhältnis  $C_n$  nach Flory<sup>2</sup> [JS50, Flo69, SSS80]

$$L^2 = C_n l^2 n \quad \Rightarrow \quad \tau \sim C_n^{3/2} n^{3/2}. \quad (7.17)$$

Der zweite Vorschlag berücksichtigt, dass das ausgedehnte Volumen des Peptids ebenfalls zu einer Vergrößerung des mittleren Donor-Akzeptor Abstands führt („excluded volume effect“) [Flo53, SSS80, DE84]. Dies führt zu  $L^2 \sim n^{2\nu}$  mit  $\nu = 3/5$ . Damit erhält man

$$L^2 \sim n^{6/5} \quad \Rightarrow \quad \tau \sim n^{1.8}. \quad (7.18)$$

Diese Überlegungen zum Skalierungsverhalten des Donor-Akzeptor-Abstands im Peptid legen folgende Abhängigkeit der Zeitkonstante für die Kontaktbildung von der Anzahl der Peptidbindungen nahe:

$$\tau \sim n^{[1.5 \dots 1.8]}. \quad (7.19)$$

Wie gut ist diese Beschreibung der Kontaktbildung eines Gaußschen Peptids durch eine exponentielle Zeitkonstante? Im eindimensionalen Fall lassen sich für  $\tau$ ,  $s(t)$  und  $s_{\text{approx}}(t)$  noch analytische Ausdrücke finden und Szabo et al. stellen fest, dass die Übereinstimmung von  $s(t)$  und  $s_{\text{approx}}(t)$  ausreichend gut ist (lediglich für sehr kurze Zeiten erwartet man Abweichungen).

Im hier relevanten dreidimensionalen Fall lassen sich die gefundenen Integrale nicht mehr analytisch lösen, Szabo et al. geben für  $\tau$  jedoch eine Taylor-Entwicklung nach  $a/L$  an:

$$\left(\frac{3D}{L^2}\right) \tau = \sqrt{\frac{\pi}{6}} \left(\frac{a}{L}\right)^{-1} + (\ln 2 - 1) + \frac{\sqrt{3\pi} a}{2L} + 2 \left(\frac{a}{L}\right)^2 + O\left(\left(\frac{a}{L}\right)^3\right). \quad (7.20)$$

Durch Vergleich dieser Taylor-Entwicklung mit Ergebnissen aus der direkten numerischen Integration konnten Szabo et al. zeigen, dass bereits für  $a/L < 0.5$  die Beschreibung der Kontaktbildung durch eine exponentielle Zeitkonstante gute Ergebnisse liefert. Für kurze Peptide ist die Beschreibung durch eine einzige exponentielle Zeitkonstante  $\tau$  jedoch nicht mehr gut und man erwartet große Abweichungen.

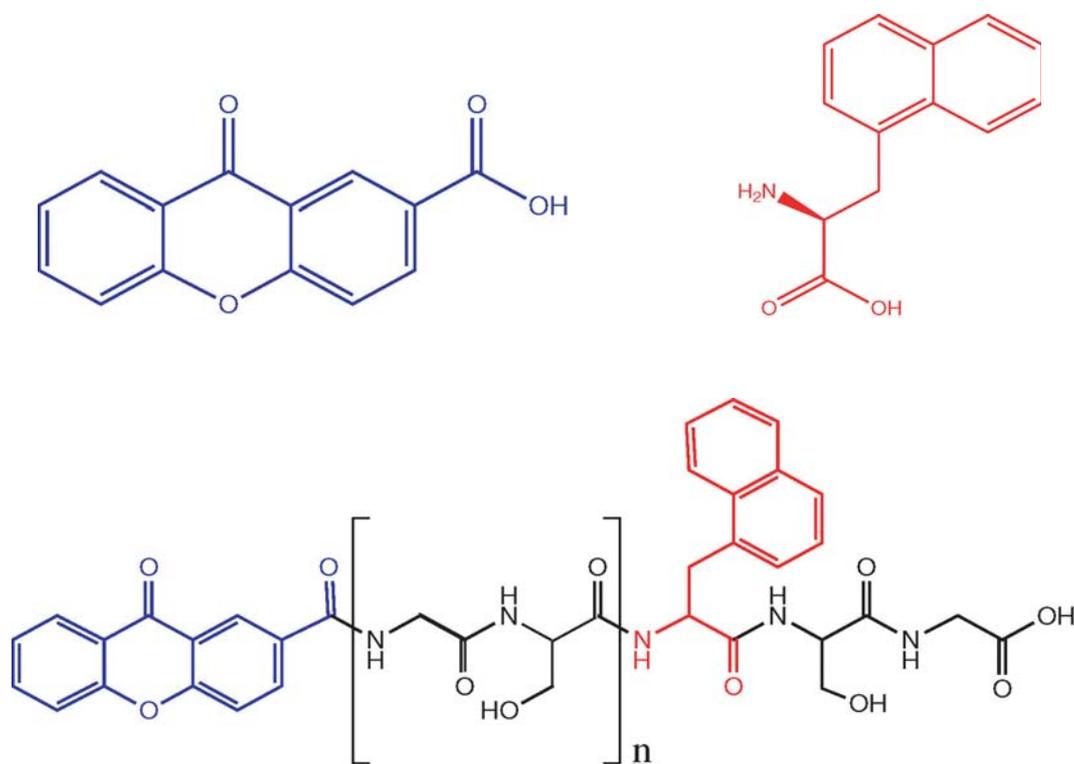
<sup>1</sup>Die erlaubten Werte der Dihedralwinkel liest man aus sog. Ramachandran-Plots ab.

<sup>2</sup>Für kurze Peptide wächst  $C_n$  mit der Kettenlänge und erreicht für lange Peptide einen Grenzwert, der mit  $C_\infty$  bezeichnet wird. Mit Ausnahme von Prolin ( $C_\infty > 100$ ) und Glycin ( $C_\infty = 2$ ) findet man für alle Aminosäuren  $C_\infty \approx 9$ . Der Grenzwert  $C_\infty$  wird dabei jeweils ab einer Peptidlänge  $>40$ – $50$  Aminosäuren erreicht [BF65, SF67, MBF67].

## 7.3 Ergebnisse der ns-Laser Flash Experimente

Die in diesem Kapitel präsentierten Ergebnisse zur Kontaktbildung in kurzen, frei beweglichen Peptiden bilden eine Erweiterung zu Untersuchungen der Gruppe um Prof. Thomas Kiefhaber am Biozentrum der Universität Basel [BWH<sup>+</sup>99, KFB<sup>+</sup>03, KFA<sup>+</sup>ss]. Dieser Abschnitt fasst die dort gewonnenen Einsichten zusammen.

In den in der Gruppe Kiefhaber durchgeführten Experimenten wird die Kontaktbildung in Peptiden untersucht, die mit dem Donor Xanthonsäure<sup>1</sup> („Xan“) und dem Akzeptor Naphthyl-Alanin („NAla“, zur Synthese siehe [Fie02]) markiert sind (Abbildung 7.4). Der Donor befindet sich dabei stets an einem Ende des Peptids, der Akzeptor ist durch 2–28 Aminosäuren vom Donor getrennt<sup>2</sup>, die Peptid-Synthese wird in der Gruppe Kiefhaber selbst durchgeführt [Fie02, KFB<sup>+</sup>03].



**Abbildung 7.4:** Strichformeln Xanthonsäure (oben links), Naphthylalanin (oben rechts) und Schema der Xanthonpeptide, die in [KFB<sup>+</sup>03] untersucht wurden (unten; die Abbildung ist entnommen aus [KFB<sup>+</sup>03]).

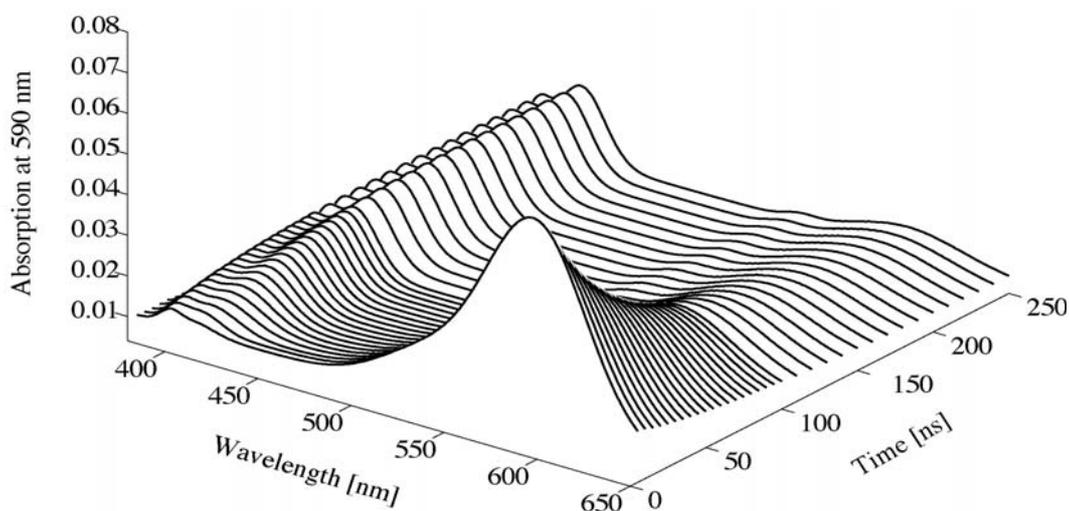
Die Laser Flash Experimente in Basel verwenden ein kommerzielles Laser-Flash Photolyse Gerät (LKS.60, Fa. Applied Photophysics). Der Triplett-Zustand des Xanthon-

<sup>1</sup>Chemische Bezeichnung 9-Oxoxanthen-2-Carboxylsäure, zur Synthese siehe [GL78, Fie02].

<sup>2</sup>Zabada et al. haben die Kontaktbildung in Di-Peptiden untersucht, ebenfalls über Triplett-Triplett Energietransfer [ZHKK04].

Moleküls wird durch einen Nd:YAG-Laser erzeugt (Zentralwellenlänge 354.6 nm, Pulsdauer 4 ns, Energie der Anregungs-Lichtimpulse 50 mJ). Für diese Experimente müssen die Lösungen zusätzlich entgast werden, um ein Triplett-Quenching durch Sauerstoff zu verhindern.

Bedingt durch die Pulsdauer des Anregungs-Lichtimpulses (4 ns) sieht man in einem typischen Spektrum „instantan“ mit den Anregungs-Lichtimpuls das Absorptionsspektrum des Triplett-Zustands von Xanthon in Wasser mit einem Maximum bei 590 nm (Abbildung 7.5). Streng korreliert mit dem Zerfall dieser spektralen Bande ist ein Anstieg der Absorptionsbande des Triplett-Zustands von Naphthalin mit einem Maximum bei 420 nm. Abbildung 7.5 enthält Ergebnisse der Messungen an einem Peptid mit der Sequenz Xan-(Gly-Ser)<sub>14</sub>-NAla-Gly-Ser, eine Analyse der Daten liefert für die Kontaktbildung der Aminosäuren an den Positionen  $i, i + 29$  im Peptid eine Zeitkonstante von  $57(\pm 3)$  ns. Wichtig ist zu bemerken, dass die in den Experimenten verwendeten Peptid-Konzentrationen ( $50\text{--}100\ \mu\text{M}$ ) so klein sind, dass das beobachtete Quenching des Triplett-Zustands nicht vom diffusionkontrollierten Kontakt zweier verschiedener Peptide stammen kann (für diesen bimolekularen Prozess schätzt man bei diesen Konzentrationen über die Diffusionsgleichung eine Zeitkonstante von  $>50\ \mu\text{s}$  ab).



**Abbildung 7.5:** Ergebnis eines ns-Experimentes an Xan-(G-S)<sub>14</sub>-NAla-S-G. Die beobachtete Dynamik kann mit einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben werden (Zeitkonstante 57 ns, die Abbildung ist entnommen aus [KFB<sup>+</sup>03]).

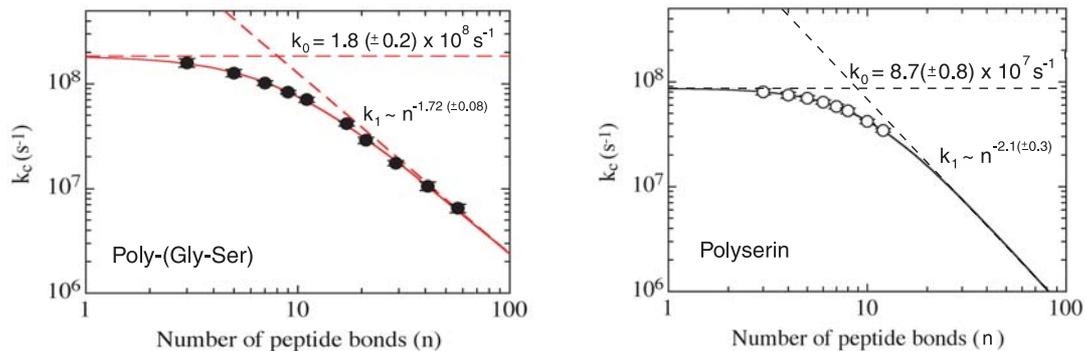
Ebenfalls untersucht wurde die Abhängigkeit der Kontaktbildungsrate von der Peptidlänge. Dazu wurden Experimente an Peptiden mit der Sequenz Xan-(Gly-Ser)<sub>N</sub>-NAla-Ser-Gly mit  $N = 2 \dots 28$  durchgeführt und damit die Zeitkonstanten für die Kontaktbildung zwischen Aminosäuren an den Positionen  $i, i + 3$  ( $N = 2$ ) bis zu  $i, i + 57$  ( $N = 28$ ) bestimmt. Trägt man die gemessene Kontaktbildungsrate  $k_C$  gegen die Anzahl der Peptid-Bindungen  $n$  zwischen Donor und Akzeptor ( $n = 2N + 1$ ) auf (Abb. 7.6), sieht man, dass für lange Peptidketten ( $n > 20$ )  $k_C \sim n^{-1.7}$  ist, in guter Übereinstimmung mit Vorhersagen

aus theoretischen Untersuchungen:  $k_C \sim n^{[-1.8\dots-1.5]}$  (siehe vorigen Abschnitt).

Die Untersuchungen an den Xanthonpeptiden ergaben weiterhin, dass diese Beziehung für kurze Peptidketten nicht mehr gilt und man stattdessen eine von der Peptidlänge unabhängige obere Schranke für die Kontaktbildungsrate ( $k_0$ ) findet. Die Daten in Abb. 7.6 lassen sich am besten durch folgende Gleichung beschreiben:

$$k_C = \frac{1}{\frac{1}{k_0} + \frac{1}{k_1 \cdot n^m}}. \quad (7.21)$$

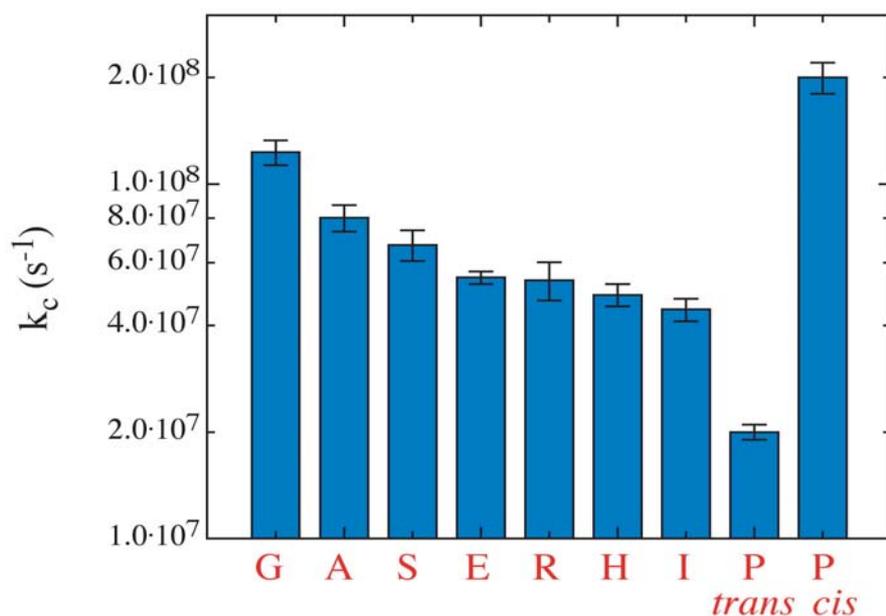
Dabei ist  $k_C$  die aus den experimentellen Daten ermittelte Kontaktbildungsrate,  $k_0$  die von der Peptidlänge unabhängige obere Grenze für die Kontaktbildung und  $k_1 \cdot n^{-m}$  stellt einen von der Peptidlänge abhängigen Anteil der Kontaktbildungsrate dar. Aus den Daten in Abb. 7.6 (links) ergeben sich für Xanthonpeptide, die die Sequenz Poly-(Gly-Ser) enthalten, folgende Werte:  $k_0 = 1.8(\pm 0.2) \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_1 = 6.7(\pm 1.6) \times 10^9 \text{ s}^{-1}$  und  $m = -1.72(\pm 0.08)$ . Für Peptide mit Polyserin (Abb. 7.6, rechts) erhält man  $k_0 = 8.7(\pm 0.8) \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_1 = 1.0(\pm 0.8) \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$  und  $m = -2.1(\pm 0.3)$ .



**Abbildung 7.6:** Aufgetragen sind gemessene Kontaktraten  $k_C$  gegen die Anzahl der Peptidbindungen  $n$  für Xanthonpeptide mit der Sequenz Xan-(G-S) $_N$ -NAIa-S-G ( $n = 2N + 1$ , die Abbildung ist entnommen aus [KFB<sup>+</sup>03]).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, wie sich die Kontaktbildungsrate ändert, wenn in einem ansonsten identischen Peptid jeweils eine Aminosäure ausgetauscht wird. Die Peptid-Sequenz in diesem Fall lautete Xan-S-X-S-NAIa-S-G, wobei ‘‘X’’ für eine beliebige Aminosäure steht. Mit Ausnahme von Prolin, das sich in seinen beiden Formen (*cis*- und *trans*-Isomer) offenbar sehr unterschiedlich auf die Flexibilität des Peptids auswirkt, kann man aus Abb. 7.7 entnehmen, dass die Kontaktbildungsrate im Falle von Glycin deutlich am größten ist. Peptide mit einem hohen Anteil an Glycin sollten demnach sehr flexibel sein.

Bei den Laser-Flash Photolyse Experimenten zeigte sich aber auch, dass insbesondere bei sehr kurzen Peptiden mit nur drei Peptidbindungen zwischen Donor und Akzeptor



**Abbildung 7.7:** Abhängigkeit der Kontaktrate von der Aminosäuresequenz: In die Peptid-Sequenz Xan-S-X-S-NAla-S-G wurde an Stelle des X eine von 8 verschiedenen Aminosäuren eingebaut und die Kontaktbildungsrate bestimmt. In den Werten für  $k_c$  sieht man die unterschiedliche Flexibilität der einzelnen Aminosäuren (die Abbildung ist entnommen aus [Fie02]).

bereits während der Dauer des Anregungs-Lichtimpulses (4 ns) fast die Hälfte der Peptide einen Kontakt zwischen Donor und Akzeptor bildeten. Ziel der im Folgenden vorgestellten Untersuchungen war deshalb, die Dynamik dieser kurzen Xanthonpeptide im Zeitbereich  $<4$  ns besser zu verstehen.

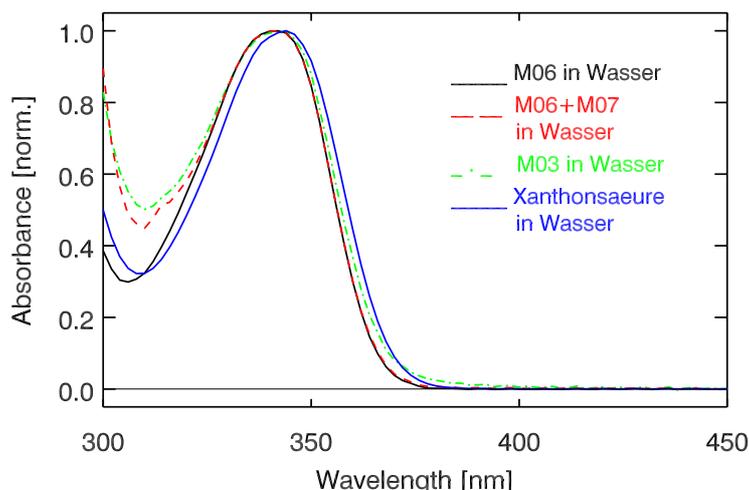
## 7.4 Referenz-Systeme

Zur Untersuchung der Kontaktbildung im Peptid müssen die Marker-Moleküle Xanthon und Naphthalin in das Peptid integriert werden. Dies geschieht durch zwei Derivate, Xanthonensäure und Naphthylalanin (vgl. Abb. 7.4).

Zur Auswertung der transienten Absorptionsspektren, die bei der Messung der Xanthonpeptide gewonnen wurden, benötigt man transiente Spektren von Referenz-Systemen:

- Die Dynamik von Xanthon in Ethanol wurde ausführlich in Kapitel 6 besprochen.
- Ebenfalls in Kapitel 6 wurde die Dynamik von Xanthon und Xanthonensäure in Ethanol verglichen.
- Abschnitt 7.4.1 behandelt die transiente Absorption von Xanthonensäure in Wasser.

- Als letztes Referenz-System dienen in Abschnitt 7.4.2 zwei Xanthonpeptide. Das Xanthonpeptid M06 enthält nur den Donor, der Akzeptor Naphthylalanin wurde durch Phenylalanin ersetzt. Das Peptid M07 enthält den Akzeptor Naphthylalanin, aber anstatt des Donors Xanthonsäure ein acetyliertes Phenylalanin. Die Mischung aus M06 plus M07 in Wasser sollte (bei einer Konzentration von jeweils ca. 1 mM) im ns-Zeitbereich keine Kontaktbildung zeigen und deshalb das beste Referenz-System sein.



**Abbildung 7.8:** Absorptionsspektren der Xanthonsäure ( $\lambda_{\max} = 344$  nm) und Xanthonpeptide ( $\lambda_{\max} = 341$  nm) in Wasser.

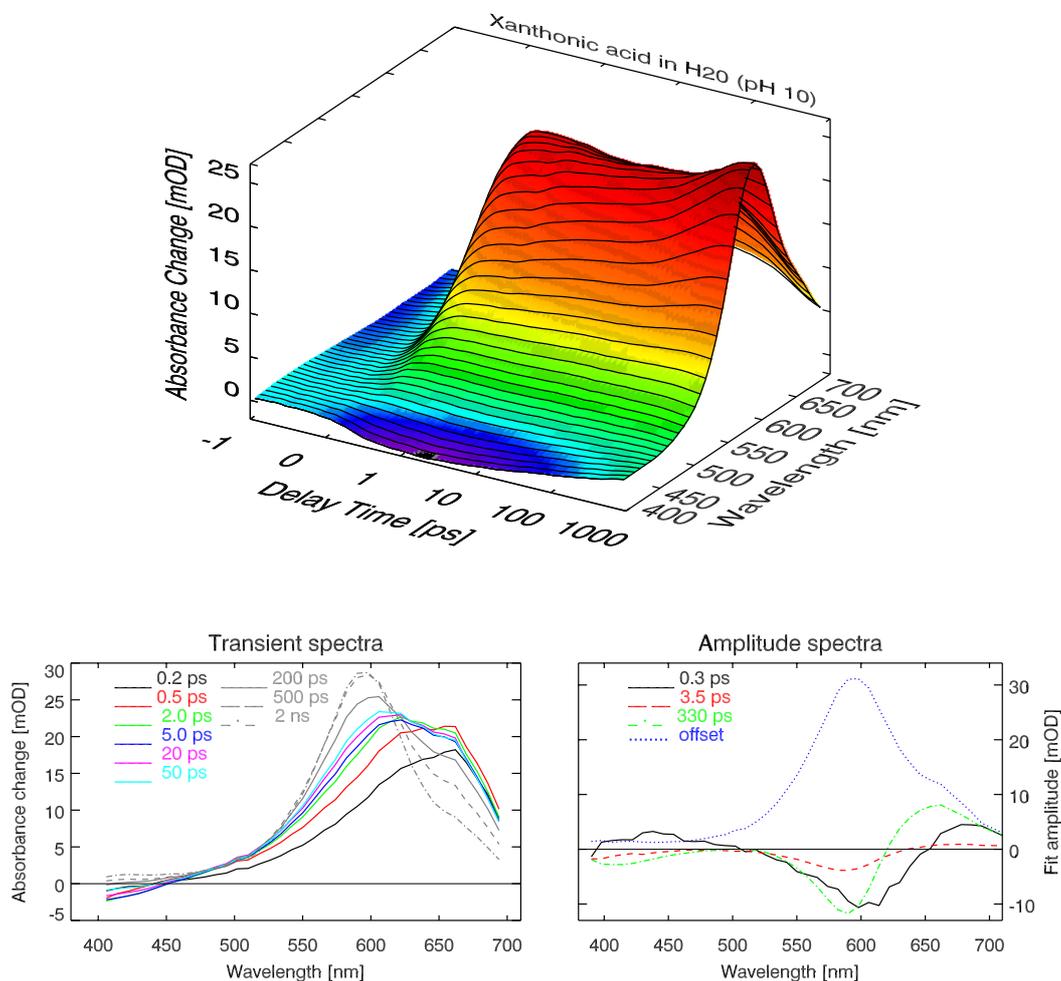
### 7.4.1 Xanthonsäure in Wasser

In Kapitel 6 wurde gezeigt, dass die Dynamik von Xanthon und Xanthonsäure in Ethanol im Rahmen der Messgenauigkeit identisch ist (vgl. Abschnitt 6.3, Seite 141). Welchen Einfluss der Wechsel von Ethanol zu Wasser als Lösungsmittel hat, zeigen Messungen an Xanthonsäure gelöst in Wasser. Xanthonsäure wurde dazu unter Rühren in warmes Wasser (pH 10 durch ca. 4 mM NaOH) gelöst und filtriert, die Konzentration betrug ca. 5 mM. Die transiente Absorption von Xanthonsäure in Wasser mit Anregungs-Lichtimpulsen bei einer Zentralwellenlänge  $\lambda_{\text{pump}} = 340$  nm wurden mit einem experimentellen Aufbau wie er in Abbildung 2.5 (Kapitel 2.1.2, Seite 21) beschrieben wurde, aufgenommen (Anhang F enthält auf Seite 201 Daten von Xanthonsäure in Wasser nach Anregung mit Lichtimpulsen bei 266 nm).

Im transienten Absorptionsspektrum von Xanthonsäure sieht man bereits nach 0.2 ps die ausgeprägte Signatur der Absorptionsbande des Xanthon Triplett-Zustands (Abb. 7.9). Im Zeitbereich bis 50 ps bleibt diese Bande bestehen, es kommt jedoch ein Aufbau einer transienten Absorption im Bereich um 600 nm hinzu. Im weiteren Zeitverlauf wächst das

## 7 Beobachtung der Kontaktbildung in Xanthonpeptiden

Absorptionsmaximum bei 590 nm (56 nm FWHM) noch leicht, damit verbunden erfolgt ein Abbau transienter Absorption im Bereich  $> 600$  nm.



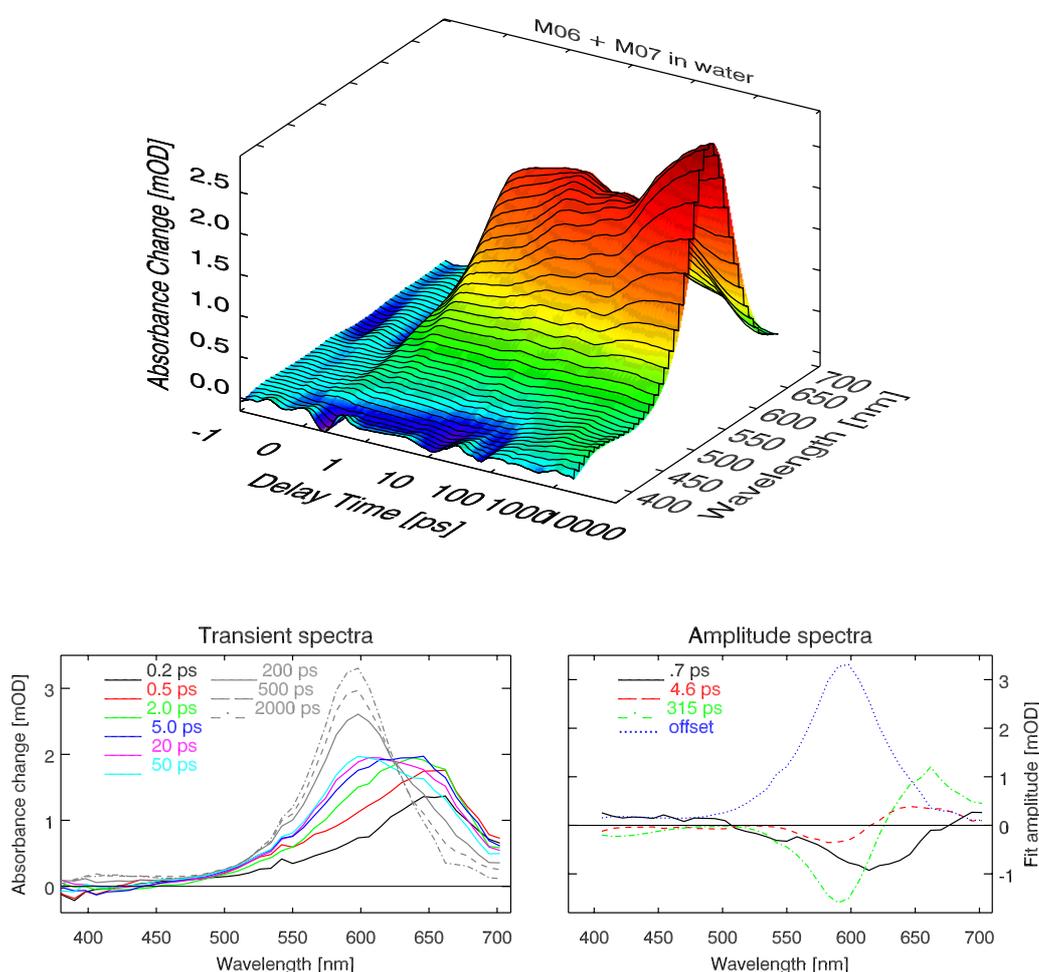
**Abbildung 7.9:** Xanthonensäure in Wasser ( $\lambda_{\text{pump}} = 340$  nm). Oben: Rohdaten. Unten links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten, rechts: Amplitudenspektren nach globalem Fit.

Die aus dem globalen Fit-Algorithmus ermittelten exponentiellen Zeitkonstanten sind 0.3 ps (-40%, +45%), 3.5 ps (-45%, +95%), 330 ps (-10%, +95%) und ein Offset-Spektrum, das dem Triplett-Zustand der Xanthonensäure in Wasser entspricht.

### 7.4.2 Xanthonpeptide M06 und M07 in Wasser

Das Xanthonpeptid M06 enthält nur den Donor Xanthonensäure, der Akzeptor Naphthylalanin wurde ist Phenylalanin ersetzt. Das Peptid M07 enthält nur den Akzeptor Naphthylalanin und anstatt des Donors Xanthonensäure ein acetyliertes Phenylalanin. Für die fs-Experimente wurde zuerst das Peptid M06 in 50  $\mu\text{l}$  DMSO gelöst, danach unter rühren

in 5 ml heißes Wasser gegeben und heiß filtriert (erreichte Konzentration ca. 1 mM). Mit dieser Lösung wurden transiente Spektren aufgenommen ( $\lambda_{\text{pump}} = 340 \text{ nm}$ , Daten siehe Anhang G, Seite 202). Nach der Messung wurde durch ein Absorptionsspektrum bestätigt, dass die Lösung ihre Absorptionseigenschaften nicht verändert hatte. Diese Lösung wurde nun noch einmal erhitzt, das Peptid M07 (ebenfalls in  $50 \mu\text{l}$  DMSO gelöst) hinzugegeben und wiederum heiß filtriert. In der fertigen Lösung sind dann die Peptide M06 und M07 jeweils in einer Konzentration von ca. 1 mM gelöst. Bei dieser Konzentration erwartet man aus der Diffusionsgleichung eine Zeitkonstante für das bimolekulare Quenching im Bereich von ca.  $5 \mu\text{s}$ , in der Naphthalin-Triplett Absorptionsbande um  $420 \text{ nm}$  sollte deshalb im ns-Zeitbereich kein spezifischer Aufbau einer transienten Absorption zu beobachten sein.



**Abbildung 7.10:** Referenz-Peptid M06 + M07 in Wasser ( $\lambda_{\text{pump}} = 340 \text{ nm}$ ). Oben: Rohdaten. Unten links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten, rechts: Amplitudenspektren nach globalem Fit.

In den transienten Spektren sieht man wie schon bei der Xanthonsäure bereits nach

0.2 ps deutlich die Signatur des Xanthon-Triplett Zustandes. Dieser ist nach ca. 2 ps voll ausgeprägt mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 640 nm, bis 20 ps verschiebt sich diese Absorptionsbande in Richtung 600 nm. Im weiteren Zeitverlauf beobachtet man bis 2 ns einen Abbau transienter Absorption im Spektralbereich  $> 630$  nm, verbunden mit einem (etwas stärkeren) Aufbau transienter Absorption um 590 nm.

Die aus dem globalen Fit extrahierten Zeitkonstanten sind 0.7 ps (-30%, +95%), 4.6 ps (-65%, +95%), 315 ps ( $\pm 20\%$ ) sowie ein Offset.

### 7.4.3 Vergleich der Referenz-Systeme

Die transienten Absorptionsspektren von Xanthonsäure in Wasser, M06 in Wasser und die Mischung M06+M07 in Wasser besitzen eine große Ähnlichkeit. Der globale Fit liefert für alle Systeme ähnliche Zeitkonstanten und Amplitudenspektren, was darauf hindeutet, dass in den einzelnen Molekülen auch ähnliche Prozesse ablaufen.

Im Detail fällt auf, dass der Aufbau der Absorptionsbande bei 590 nm in den Xanthonpeptiden M06 (bzw. M06+M07) stärker ausfällt als in der Xanthonsäure. Für die Xanthonsäure ist das spektrale Integral der 330 ps-Komponente fast Null, diese Zeitkonstante beschreibt damit eine fast reine Blauverschiebung der transienten Absorptionsbande. In den Xanthonpeptiden M06 und M06+M07 wird mit dieser Zeitkonstante mehr Absorption um 590 nm aufgebaut, als gleichzeitig im Spektralbereich  $> 630$  nm abgebaut wird.

Auffällig ist auch, dass im Spektralbereich  $< 450$  nm eine negative Absorptionsänderung beobachtet wird, die kontinuierlich über den gesamten beobachteten Zeitbereich wieder verschwindet. Zeitaufgelöste Fluoreszenz-Messungen an Xanthon in Ethanol (vgl. Abschnitt 6.5, Seite 145) ergaben, dass die Fluoreszenz mit  $\tau \approx 1.5$  ps abklingt. Die negative Absorptionsänderung im Bereich  $< 450$  nm kann demnach nicht von einer stimulierten Emission herrühren, da sie ansonsten nach einigen Pikosekunden wieder verschwunden sein müsste<sup>1</sup>.

Für die Interpretation der Experimente an den Xanthonpeptiden ist aber folgende Beobachtung wichtig: Im Spektralbereich  $< 450$  nm wird in allen Referenz-Systemen zwar eine Dynamik der transienten Absorption gesehen, deren spektrale Form ist allerdings unspezifisch und hat keinerlei Ähnlichkeit mit dem Absorptionsspektrum des Triplett-Zustands von Naphthalin (vgl. dessen Spektrum in Abb. 6.6, Seite 138).

---

<sup>1</sup>Einen Erklärungsansatz bietet eventuell das solvatisierte Elektron. Beim transienten Spektrum des solvatisierten Elektrons in Wasser (vgl. Abb. 2.12, Seite 29) wurde im Spektralbereich  $< 450$  nm ebenfalls eine negative Absorptionsänderung beobachtet. Das Verschwinden dieser Signatur im 300 ps-Zeitbereich könnte ein Hinweis auf eine Rekombination sein (Barthel et al. haben verschiedene charge-transfer-to-solvent (CTTS) Reaktionen untersucht und konnten Rekombinationszeiten  $> 200$  ps nachweisen [BMS01]). Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die transienten Spektren von Xanthonsäure in Wasser ohne Zusatz von NaOH diesen Effekt wesentlich weniger ausgeprägt zeigen (sowohl nach Anregung mit Lichtimpulsen bei 340 nm als auch bei 266 nm).

## 7.5 Kontaktbildung in Xanthonpeptiden

Fünf verschiedene Xanthonpeptide mit Donor und Akzeptor wurden von B. Fierz in Basel für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kurzzeitexperimente synthetisiert (siehe Tab. 7.1, in Abb. 7.11 sieht man in einer Cartoon-Darstellung die ungefähre dreidimensionale Struktur des Xanthonpeptids M01).

In dieser Arbeit untersuchte Xanthonpeptide			
Name	Sequenz	Masse	Kontaktrate
M01	Xan S S NAla S R G - CONH <sub>2</sub>	910.5 D	$8.0 \cdot 10^7 s^{-1}$
M02	Xan S G NAla S R G - CONH <sub>2</sub>	880.5 D	$1.6 \cdot 10^8 s^{-1}$
M02'	Xan G S NAla S R G - CONH <sub>2</sub>	880.5 D	$1.6 \cdot 10^8 s^{-1}$
M03	Xan S S NAla S R S R G - CONH <sub>2</sub>	1153.8 D	$7.0 \cdot 10^7 s^{-1}$
M04	Xan G S G S G S NAla S R G - CONH <sub>2</sub>	1441.8 D	$1.0 \cdot 10^8 s^{-1}$
M06	Xan S S F S R S R G - CONH <sub>2</sub>	1104.4 D	– (nur Xan)
M07	AC F S S NAla S R S R G - CONH <sub>2</sub>	1121.5 D	– (nur NAla)

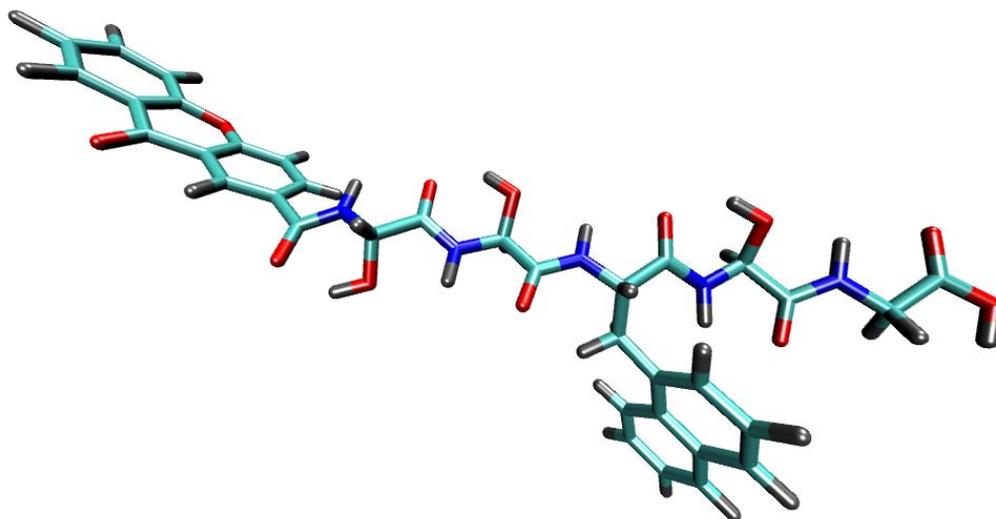
**Tabelle 7.1:** Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Xanthonpeptide.

Die Peptide wurden jeweils in 50  $\mu$ l DMSO gelöst, unter Rühren in 5 ml heisses Wasser gegeben und anschließend sofort filtriert, die Konzentrationen waren im Bereich 0.5–1 mM (bei Konzentrationen  $> 2$  mM wurde eine Agglomeration der Peptide beobachtet).

Alle Kurzzeitexperimente wurden mit Anregungs-Lichtimpulsen bei einer Zentralwellenlänge  $\lambda_{\text{pump}} = 340$  nm durchgeführt ( $\tau_{\text{cc}} \approx 200$  fs). Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden an dieser Stelle nur die Daten des Xanthonpeptids M03 besprochen, die Ergebnisse der Messungen an den Peptiden M01, M02, M02' und M04 sind sehr ähnlich und befinden sich im Anhang G (ab Seite 203).

Wie bereits bei der Xanthonsäure sieht man auch beim Peptid M03 im transienten Spektrum nach 0.2 ps bereits ausgeprägt die Signatur des Triplett-Zustands von Xanthon (Abb. 7.12). Nach 2 ps ist diese Absorptionsbande voll ausgeprägt mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 630 nm. Diese Bande verschiebt innerhalb der nächsten Pikosekunden etwas in den blauen Spektralbereich auf ca. 600 nm. Wie bei der Xanthonsäure sieht man im transienten Spektrum nach 200 ps das charakteristische Spektrum des Triplett-Zustands von Xanthon in Wasser mit einem Maximum bei 590 nm, das sich bis 500 ps noch etwas aufbaut. Im gleichen Zeitbereich wird im Spektralbereich  $> 600$  nm (stärker als der Aufbau bei 590 nm) transiente Absorption abgebaut. Bereits ab 50 ps sieht man in den transienten Spektren den Aufbau der Triplett-Absorption des Naphthalin um 420 nm. Dieser Aufbau wird im Zeitbereich bis 3.5 ns fortgesetzt, damit verbunden verschwindet transiente Absorption in der Absorptionsbande des Xanthon Triplett-Zustands bei 590 nm.

Zwei Unterschiede sind in den transienten Spektren von M03 im Vergleich zur Xanthonsäure in Wasser zu erkennen: (i) Bei Xanthonsäure in Wasser bleibt das Absorptionsmaximum bei 590 nm im Zeitbereich ab 200 ps bestehen, es findet lediglich ein Abbau



**Abbildung 7.11:** Stäbchenmodell des Xanthonpeptids M01. Links oben sieht man den Donor Xanthon, unten den Akzeptor Naphthalin (das Peptid ist gestreckt). Die Struktur der anderen Xanthonpeptide ist recht ähnlich.

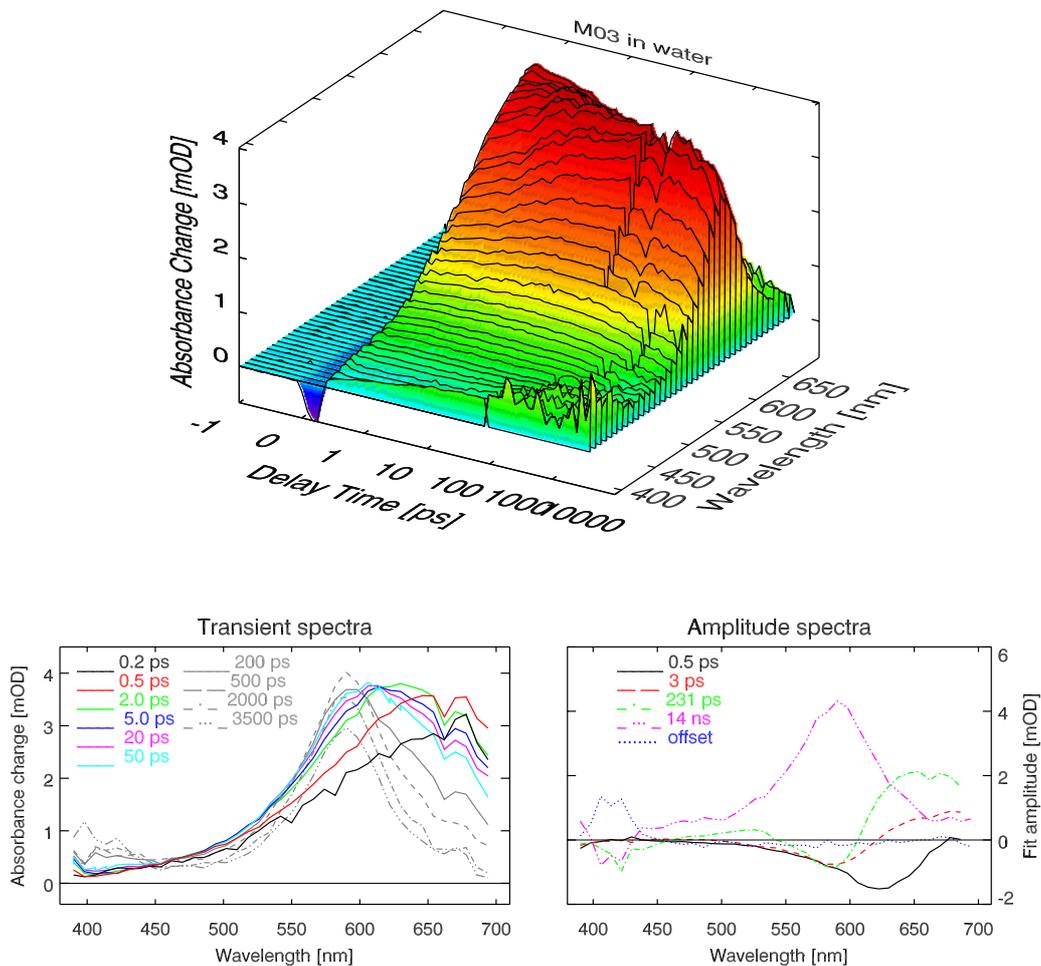
transienter Absorption im Bereich  $> 600$  nm statt (im System M06+M07 wird ab 200 ps sogar noch deutlich transiente Absorption aufgebaut). Beim Peptid M03 beobachtet man zusätzlich einen Abbau bei 590 nm, dieser ist deutlich zu sehen beim Vergleich der transienten Spektren nach 500 ps, 2000 ps und 3500 ps. Mit diesem Abbau verbunden ist (ii) ein Aufbau einer transienten Absorption im Bereich um 420 nm, der aber bereits im Zeitbereich ab 50 ps beginnt.

Aus dem globalen Fit ermittelt man exponentielle Zeitkonstanten von 0.5 ps ( $\pm 25\%$ ), 3 ps (-25%, +30%), 231 ps (-30%, +50%), 14 ns (-40%, +25%) und ein Offset-Spektrum.

## 7.6 Diskussion

Als Vorbedingung für die Interpretation der Experimente zur Kontaktbildung ist es wichtig, den Energietransfer „durch Bindungen hindurch“ auszuschliessen und sicher zu sein, dass der Energietransfer nur bei direktem Kontakt von Donor und Akzeptor stattfinden kann. Wie in Kapitel 6 (Seite 142) dargelegt, findet ein Energietransfer „durch chemische Bindungen hindurch“ nur über maximal 8 Bindungslängen statt. In den hier untersuchten Xanthonpeptiden befinden sich mindestens 11 Bindungen zwischen Donor und Akzeptor. Die beobachtete Dynamik sollte demnach ausschliesslich vom Triplett-Triplett Energietransfer nach Kontaktbildung stammen.

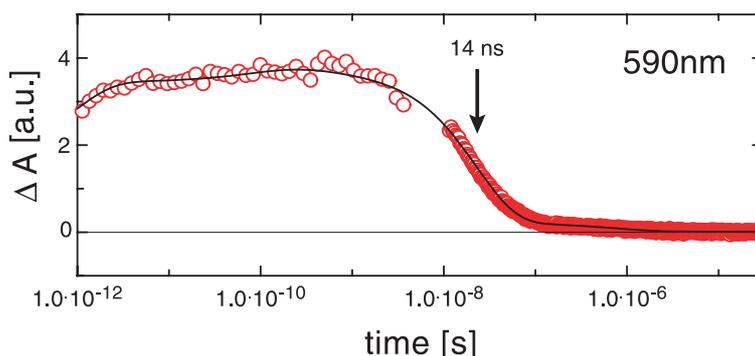
Eine erste Fragestellung ist, wie gut sich die an identischen Peptiden mit unterschiedlichen Methoden gewonnenen Ergebnisse vergleichen lassen. In den Laser-Flash



**Abbildung 7.12:** Transiente Absorption des Xanthonpeptids M03 in Wasser ( $\lambda_{\text{pump}} = 340 \text{ nm}$ ). Oben: Rohdaten. Unten links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten, rechts: Amplitudenspektren nach globalem Fit.

Photolyse Experimenten in Basel konnten der beobachteten Dynamik der Peptide stets zwei exponentielle Zeitkonstanten zugeordnet werden: eine Zeitkonstante im ns-Bereich für die Kontaktbildung und eine zweite Zeitkonstante im  $\mu\text{s}$ -Bereich für den Zerfall des Triplett-Zustandes. Es ist klar, dass in den Kurzzeitexperimenten zusätzliche Zeitkonstanten benötigt werden, die z. B. die Bildung des Triplett-Zustandes des Xanthon-Moleküls beschreiben. Als eine Konsistenz-Prüfung kann festgehalten werden, dass (innerhalb der Toleranzbereiche für die beiden Experimente) sowohl in der Laser-Flash Photolyse in Basel als auch in den hier durchgeführten Kurzzeitexperimenten die gleichen Zeitkonstanten für die Kontaktbildung im Nanosekunden-Bereich gefunden wurden (siehe Tabelle 7.2). In Abbildung 7.13 wurden die Daten aus fs- und ns-Experimenten gleichzeitig mit dem gleichen Satz exponentieller Zeitkonstanten gefittet.

Eine Motivation für die Experimente an den Xanthonpeptiden war es herauszufinden,

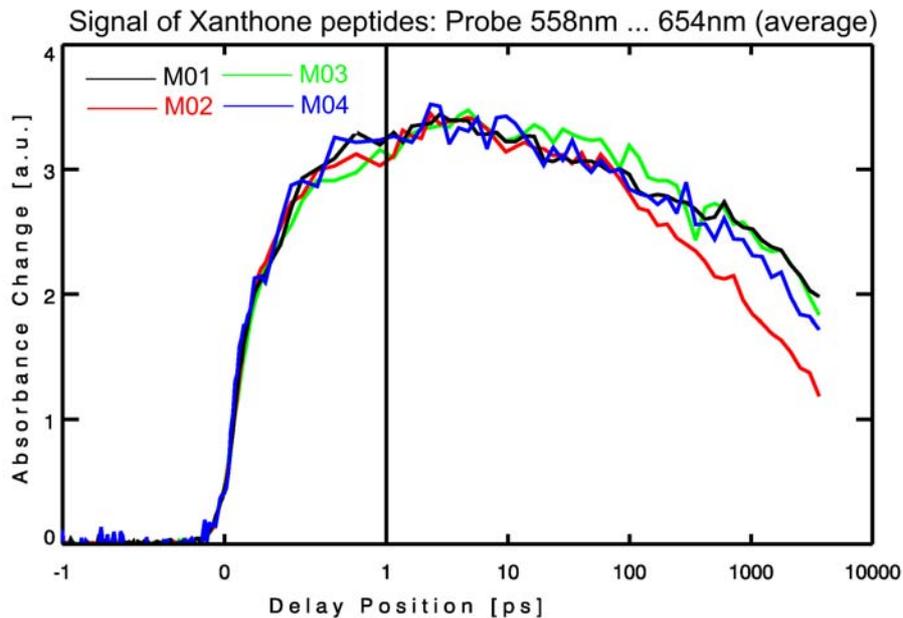


**Abbildung 7.13:** Kombination der Daten aus fs- und ns-Experimenten für das Xanthonpeptid M03. Gezeigt ist das zeitliche Verhalten des Maximums der Triplet-Absorption von Xanthon in Wasser bei der Abtast-Wellenlänge 590 nm (○ Daten, der gemeinsame Fit der Daten ist durchgezogen eingezeichnet).

Name	ns-Zeitkonstante		Zusätzliche ps-Zeitkonstanten		
	Basel	(diese Arbeit)	(nur in dieser Arbeit)		
M01	12.5 ns	(14 ns)	0.4 ps	5.6 ps	290 ps
M02	6.3 ns	(6.3 ns)	0.3 ps	2.5 ps	270 ps
M02'	6.3 ns	(6.9 ns)	0.4 ps	6.3 ps	190 ps
M03	14.0 ns	(14 ns)	0.5 ps	3 ps	230 ps
M04	10.0 ns	(11 ns)	0.4 ps	2 ps	200 ps
M06	Nur Xan		0.6 ps	3.6 ps	310 ps
M06+M07	Nur Xan bzw. nur NAla		0.7 ps	4.6 ps	315 ps

**Tabelle 7.2:** Xanthonpeptide: Vergleich der extrahierten Zeitkonstanten aus Laser-Flash Photolyse- und transienten Absorptions-Experimenten (die in Basel gemessenen Zeitkonstanten im  $\mu\text{s}$ -Bereich, die den Zerfall des Triplet-Zustands beschreiben, sind nicht aufgeführt).

ob und wenn ja welche Prozesse auf der sub-ns Zeitskala ablaufen. Man betrachte dazu zuerst den direkten Vergleich der Zeitverläufe in Abb. 7.14. Für die Abbildung wurde das zeitliche Verhalten der Absorptionsbande des Xanthon Triplet-Zustands verfolgt (integriert über den Spektralbereich 550–650 nm). Da die Lebensdauer des Triplet-Zustands von Xanthon im  $\mu\text{s}$ -Bereich liegt, muss eine Abnahme der Absorption im sub- $\mu\text{s}$ -Bereich durch einen Triplet-Triplet-Energietransfer bei direktem Kontakt von Xanthon und Naphthalin verursacht sein. Man sieht, dass im Zeitbereich ab 100 ps eine Absorptionsabnahme und damit eine für jedes Peptid leicht unterschiedliche Charakteristik der Kontaktbildung sichtbar wird. Aus der Abbildung entnimmt man für die Geschwindigkeit der Kontaktbildung  $M02 > M04 > M01$  ( $M03$ ). Das Peptid M02 zeigt die schnellste, M01 bzw. M03 die langsamste Zeiktonstante für die Kontaktbildung, in guter Übereinstimmung mit den in Basel gewonnenen Daten (vgl. Tab. 7.2).



**Abbildung 7.14:** Vergleich der Xanthonpeptide: Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Xanthon-Triplett Absorptionsbande im Wellenlängenbereich 558–654 nm (das Peptid M02' verhält sich wie M02 und wurde zur Erhöhung der Übersichtlichkeit weggelassen).

Die Kurzzeitexperimente benötigen jeweils 4 exponentielle Zeitkonstanten. Die beiden Zeitkonstanten von ca. 0.5 ps und ca. 4 ps sind von den Untersuchungen zu Xanthon in Ethanol bzw. Xanthonsäure in Wasser bekannt und beschreiben die bi-phasische Besetzung des Triplett-Zustands von Xanthon. Die weitere Diskussion geht zuerst auf die (bereits bekannte) Kontaktbildung im ns-Zeitbereich ein. Danach werden Argumente gesammelt, die die Behauptung unterstützen, dass im Peptid M03 etwa ein Viertel der Moleküle eine schnelle Kontaktbildung mit einer Zeitkonstanten von ca. 250 ps zeigen. Am Ende dieses Abschnitts wird die Bedeutung dieser schnellen Kontaktbildung diskutiert sowie die Auswirkungen der hier durchgeführten Untersuchungen auf die Bestimmung des präexponentiellen Faktors in der kinetischen Theorie der Proteinfaltung.

### 7.6.1 Kontaktbildung im ns-Zeitbereich

Aus den Amplitudenspektren in Abb. 7.12 ist deutlich ersichtlich, dass mit der 14 ns Zeitkonstante sowohl ein Abbau der Triplett-Absorption des Xanthon (positive Amplitude im Bereich 550–650 nm) als auch ein Aufbau der Triplett-Absorption des Naphthalin (negative Amplitude im Bereich 400–440 nm) verknüpft ist. Dass diese Zeitkonstante von der Kontaktbildung zweier verschiedener Peptide stammt, kann ausgeschlossen werden, denn aus der Diffusionsgleichung schätzt man bei den verwendeten Konzentrationen von ca. 1 mM eine Zeitkonstante im  $\mu$ s-Bereich für den Kontakt zweier verschiedener Peptide ab. Die extrahierte 14 ns Zeitkonstante stammt somit eindeutig von der (diffusionskontrollierten) intramolekularen Kontaktbildung zwischen Donor und Akzeptor in einem einzelnen

Xanthonpeptid.

Wie lassen sich diese Kontaktbildungsraten mit den Vorhersagen aus den Betrachtungen der Diffusionsgleichung in Abschnitt 7.2 in Einklang bringen? Dort wurde gezeigt, dass für Gaußsche Peptide<sup>1</sup> bei einem Verhältnis von Kontaktabstand<sup>2</sup>  $a$  zu mittlerem Donor-Akzeptor Abstand  $L$  von  $a/L < 0.5$  eine Beschreibung der Kontaktbildung durch eine exponentielle Zeitkonstante  $\tau_C$  ausreichend gute Ergebnisse liefert. Man erwartet  $\tau_C \sim n^m$  mit  $m = 1.5-1.8$ . Die typische Länge einer Peptid-Bindung ist  $l \approx 4 \text{ \AA}$  [LSE<sup>+</sup>02]. Im Peptid M03 sind Donor und Akzeptor durch  $n = 3$  Peptidbindungen voneinander getrennt, womit sich für  $L = \sqrt{n} \cdot l^2 \approx 7 \text{ \AA}$  ergibt. Der van der Waals Radius von Stickstoff ist  $1.5 \text{ \AA}$  [AP02],  $a = 3 \text{ \AA}$  scheint demnach eine vernünftige Wahl für den Kontaktabstand zu sein<sup>3</sup>. Für das Xanthonpeptid M03 ist demnach  $a/L \approx 3/7$ . Falls sich das Peptid Gaußsch verhält, sollte sich die exponentielle Zeitkonstante  $\tau_C$  gemäß  $\tau_C = \tau_1 \cdot n^m$  mit  $m = 1.5-1.8$  ausrechnen lassen. Der Wert für  $\tau_1$  ergibt sich aus dem Peptidlängenabhängigen Teil der Kontaktbildungsrate über  $\tau_1 = (k_1)^{-1}$  (siehe Gl. (7.21), Seite 167).

Mit den in Basel für Polyserin und Poly-(Gly-Ser) gefundenen Werten kann man unter Berücksichtigung der dort ermittelten Fehlergrenzen Intervalle für die Kontaktzeit abschätzen. Xanthonpeptide mit langen Polyserin-Sequenzen lassen sich sehr schwer synthetisieren [KFB<sup>+</sup>03], deshalb sind hier die Fehlergrenzen größer. Aus dem extrahierten Werten für  $k_1 = 1.0(\pm 0.8) \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$  aus Abb. 7.6 (rechte Seite) ergibt sich für die Kontaktzeit ein Wert von  $\tau_1 \in [56, 500] \text{ ps}$ . Für das Peptid M03 ist  $n = 3$  und mit  $m = 2.1(\pm 0.3)$  schätzt man eine Gaußsche Kontaktzeit  $\tau_{\text{Gauß}} \in [0.4, 7] \text{ ns}$  ab. Diese Werte weichen um einen Faktor von 2–35 von den gemessenen 14 ns ab.

Für Xanthonpeptide mit der Sequenz Poly-(Gly-Ser) sind die Werte besser definiert und mit  $\tau_1 \in [120, 200] \text{ ps}$  und  $m = 1.72(\pm 0.08)$  aus Abb. 7.6 (linke Seite) erhält man für die Peptide M02 und M02' ( $n = 3$ ) eine Gaußsche Kontaktzeit im Bereich  $\tau_{\text{Gauß}} \in [0.7, 1.4] \text{ ns}$ . Diese Werte weichen aber immer noch um den Faktor 5-10 von der extrahierten 6.5 ns-Zeitkonstanten ab.

Die naheliegende Erklärung für diese Abweichungen ist, dass die Annahme einer Gaußschen Kette für ein kurzes Peptid zusammenbricht. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da Aminosäuren nicht komplett frei gegeneinander beweglich sind. Im Ansatz nach Flory wird dies durch steifere Ketten modelliert, wodurch der mittlere Donor-Akzeptor Abstand  $L$  größer und die Kontaktbildungsrate kleiner wird. Bei kleinen Peptiden wird außerdem das Eigenvolumen wichtig, was zu einem anderen Skalenverhalten ( $\tau \sim n^{1.8}$ ) und ebenfalls zu langsameren Zeitkonstanten für die Kontaktbildung führt<sup>4</sup>.

---

<sup>1</sup>Gemeint sind Peptide, deren Donor-Akzeptor Abstände  $r$  im Gleichgewicht gemäß Gl. (7.13) verteilt sind, also

$$p_{eq}(r) = \frac{4\pi r^2}{(2\pi L^2/3)^{3/2}} \exp(-3r^2/2L^2).$$

<sup>2</sup>Ein Triplett-Triplett Energietransfer findet statt, wenn der Donor-Akzeptor Abstand  $r \leq a$  wird, siehe Seite 161.

<sup>3</sup>Lapidus et al. wählen  $a = 4 \text{ \AA}$  [LSE<sup>+</sup>02].

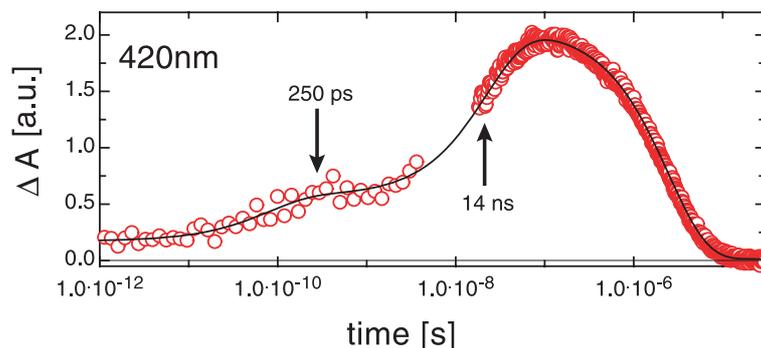
<sup>4</sup>An dieser Stelle sei betont, dass diese Verlangsamung nicht durch die Zeitdauer des Triplett-Triplett

Diese Erklärungen zusammen können aber immer noch nicht die beobachtete drastische Verlangsamung der Kontaktbildung in sehr kurzen Peptiden erklären, weshalb Krieger et al. — wie schon auf Seite 167 ausgeführt — in [KFB<sup>+</sup>03] eine von der Peptidlänge unabhängige obere Schranke für die Kontaktbildung fordern ( $k_0 \approx 10^8 \text{ s}^{-1}$ , entsprechend einer Zeitkonstanten von  $\tau_0 \approx 10 \text{ ns}$ , siehe Abschnitt 7.2). Die beobachtete Kontaktzeit  $\tau_C$  bzw. die Kontaktbildungsrate  $k_C$  wird dann nach Gl. (7.21) (Seite 167) berechnet<sup>1</sup>.

Umso erstaunlicher ist es nun, dass im Rahmen der hier durchgeführten Messungen Anzeichen auf eine Kontaktbildung mit einer Zeitkonstanten  $\tau_s \approx 250 \text{ ps}$  gefunden wurden.

### 7.6.2 Schnelle Kontaktbildung im Sub-ns Zeitbereich

In Abbildung 7.15 sind Ergebnisse der Laser-Flash und transienten Absorptions-Experimente kombiniert, diesmal wird der zeitliche Verlauf des Maximums der Absorptionsbande des Triplett-Zustands von Naphthalin bei 420 nm verfolgt. Der Abbildung ist eindeutig zu entnehmen, dass im Zeitbereich ab 50 ps eine transiente Absorption aufgebaut wird, die als Sockel bis etwa 2 ns bestehen bleibt. Erst danach erfolgt ein weiterer und stärkerer Aufbau transienter Absorption, bis nach ca. 100 ns ein Maximum erreicht wird und danach ein langsamer Abbau stattfindet.



**Abbildung 7.15:** Kombination der Daten aus fs- und ns-Experimenten für das Xanthonpeptid M03. Gezeigt ist das zeitliche Verhalten des Maximums der Triplett-Absorption von Naphthalin in Wasser bei der Abtast-Wellenlänge 420 nm (○ Daten, der gemeinsame Fit der Daten ist als durchgezogene Linie eingezeichnet).

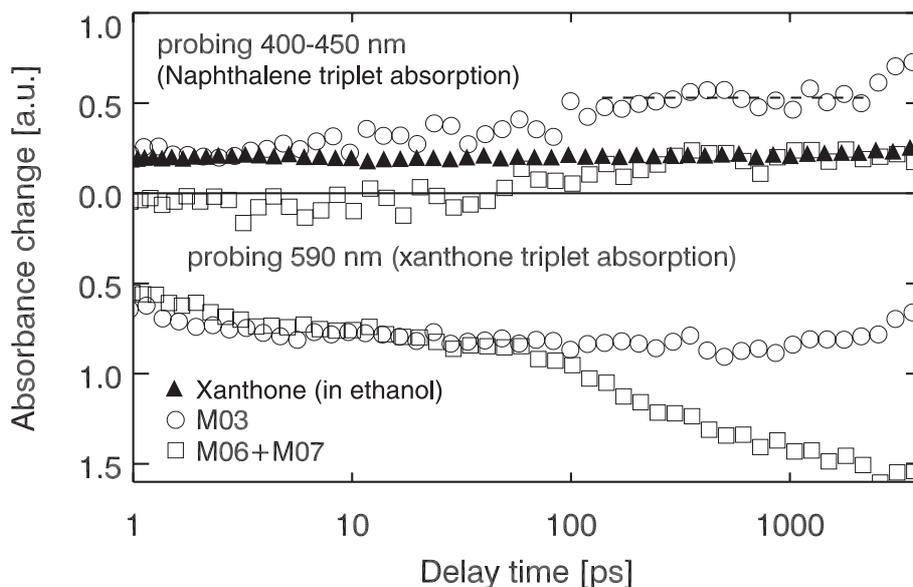
Bei den Referenz-Systemen Xanthonsäure, M06 und M06+M07 wurde im Spektralbereich  $<450 \text{ nm}$  ebenfalls ein langsames anwachsen der transienten Absorption beobachtet. Wie kann man sicher sein, dass der „Sockel“ beim Peptid M03 tatsächlich von

<sup>1</sup> Energietransfers von Xanthon zu Naphthalin beeinflusst sein kann, denn in Kapitel 6 wurde gezeigt, dass dieser Prozess mit  $\tau \sim 1 \text{ ps}$  abläuft.

$$k_C = \frac{1}{\frac{1}{k_0} + \frac{1}{k_1 \cdot n^m}}$$

einer schnellen Kontaktbildung herrührt und nicht von einer (vermuteten) Rekombination von Peptid und im Anregungsprozess freigesetztem Elektron?

Zwei Argumente sprechen dafür, dass tatsächlich eine Kontaktbildung im 100 ps-Zeitbereich stattfindet: Man betrachte dazu zuerst den oberen Teil der Abbildung 7.16, er enthält die Zeitverläufe der transienten Absorption von M03 (○) und dem Referenz-System M06+M07 (□). Zusätzlich ist die entsprechende Kurve für Xanthon in Ethanol eingezeichnet (▲, Daten aus Abb. 6.15, Seite 153). Bei Messungen von Xanthon in Ethanol beobachtet man im Spektralbereich um 420 nm eine transiente Absorption, die innerhalb weniger hundert Femtosekunden gebildet wird und dann über den gesamten Zeitbereich bis 4 ns konstant bleibt. Im Referenz-System M06+M07 (und auch beim Referenz-Peptid M06 alleine) ist die Absorption zunächst geringer (Ausbleichen der Absorption). Die transiente Absorption erreicht den Wert für Xanthon in Ethanol nach ca. 100–200 ps und bleibt danach konstant auf diesem Wert. Anders beim Peptid M03: hier ist bei 1 ps eine identische transiente Absorption zu sehen wie für Xanthon in Ethanol. Anders als bei allen Referenz-Systemen wird hier im 100 ps-Zeitbereich ein über den Wert von Xanthon in Ethanol hinausgehender Sockel der transienten Absorption aufgebaut (durch die gestrichelte Linie in Abb. 7.16 angedeutet).



**Abbildung 7.16:** Vergleich der Triplet-Absorptionsbanden für M03 (○) und M06+M07 (□). Zusätzlich eingezeichnet ist in der oberen Hälfte (Zeitverlauf der Absorptionsbande der Naphthalin Triplet-Bande) das Verhalten von Xanthon in Ethanol (▲).

Ein zweites Argument liefert der zeitliche Verlauf der transienten Absorption des Triplet-Zustands von Xanthon im Maximum der Absorptionsbande bei 590 nm für M03 (○) und M06+M07 (□, siehe den unteren Teil der Abbildung 7.16). Im Zeitbereich  $>100$  ps wird im Referenz-System M06+M07 noch transiente Absorption aufgebaut, d. h. in diesem Zeitbereich erfolgt immer noch eine Besetzung des Triplet-Zustands von Xanthon. Im Peptid M03 bleibt die transiente Absorption in diesem Zeitbereich konstant,

bevor sie für Zeiten  $>1$  ns wieder abnimmt. Wie bereits erwähnt ist die Abnahme der transienten Absorption im ns-Zeitbereich streng mit dem Aufbau der Naphthalin-Triplett Absorption verknüpft und damit leicht der Kontaktbildung zuzuordnen. Das Fehlen eines weiteren Aufbaus im Zeitbereich 100–1000 ps kann zusammen mit dem Aufbau des Sockels bei 420 nm als weiterer Hinweis auf die Kontaktbildung im 100 ps-Zeitbereich gewertet werden.

### 7.6.3 Welche Bedeutung hat die schnelle Zeitkonstante der Kontaktbildung?

Nach den Ausführungen in den vorherigen zwei Abschnitten scheint es gerechtfertigt, die Kontaktbildung in den Xanthonpeptiden mit zwei Zeitkonstanten zu beschreiben: für das hier repräsentativ diskutierte Peptid M03 findet man eine schnelle Zeitkonstante  $\tau_s = 250$  ps und eine langsamere  $\tau_l = 14$  ns. Die ns-Zeitkonstante wurde bereits in Abschnitt 7.3 besprochen (siehe auch [KFB<sup>+</sup>03]). Wodurch aber wird die schnelle Zeitkonstante verursacht?

Gemäß der Ausführungen am Ende von Abschnitt 7.6.1 würde man für ein Gaußsches Peptid, bei dem Donor und Akzeptor durch  $n = 3$  Peptidbindungen voneinander getrennt sind, eine Zeitkonstante der Kontaktbildung im Bereich von  $\tau_C \approx 1$  ns erwarten. Die gängige Argumentation würde aufgrund der erhöhten Steifigkeit kurzer Peptidketten sogar eine zusätzliche Verlangsamung fordern. Die hier gefundene schnelle Zeitkonstante von 250 ps liegt nun erstaunlicherweise fast im ursprünglichen Gaußschen Intervall von  $\tau_{\text{Gauß}} \in [0.4, 7]$  ns (siehe Abschnitt 7.6.1).

Hier lohnt es sich, nochmal zu den Ausführungen in Abschnitt 7.3 zurückzukehren, speziell zu Abbildung 7.6. Sie enthält die aus den ns-Experimenten extrahierten Kontaktbildungsrate  $k_C$ , aufgetragen gegen die Anzahl der Peptidbindungen  $n$  zwischen Donor und Akzeptor. In den Experimenten in Basel mit einer Zeitauflösung von ca. 4 ns wurde für kurze Peptide ( $n < 20$ ) das erwähnte Abknicken der Kurve beobachtet. Die gemessene Kontaktbildungsrate  $k_C$  wuchs wesentlich langsamer an, als mit dem Gaußschen Modell vorhergesagt. Zur Beschreibung der Daten benötigte man sogar eine von der Peptidlänge unabhängige obere Schranke  $k_0$ , die die maximale Kontaktbildungsrate darstellen sollte.

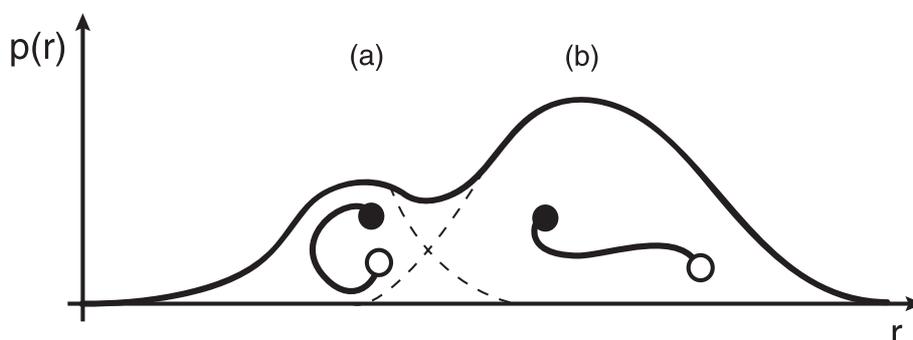
Unter Berücksichtigung der fs-Daten ist eine andere Sichtweise denkbar: die schnelle Kontaktbildung mit  $\tau_s = 250$  ps (entsprechend  $k_s = 4 \times 10^9 \text{s}^{-1}$ ) lässt sich mit dem Gaußschen Modell vereinbaren, während die langsamere Kontaktbildung  $\tau_l = 14$  ns (entsprechend  $k_s = 7 \times 10^7 \text{s}^{-1}$ ) viel zu langsam ist.

Aus der relativen Höhe des Sockels der transienten Absorption in Abb. 7.15 kann man abschätzen, dass etwa ein Viertel der Peptide einen Kontakt mit  $\tau_s = 250$  ps ausbilden. In dem einfachen Modell aus Abschnitt 7.2 müsste man demnach fordern, dass ein Viertel der Peptide sich ungehindert bewegen kann und eine „Gaußsche Dynamik“ mit  $\tau_s$  zeigt, während beim Rest beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen die Peptidbewegung behindern und über veränderte Potentiale auf die langsamere Zeitkonstante  $\tau_l$  führen.

Interessant ist an dieser Stelle ein Blick auf Abschnitt 7.2, wo die Zeitkonstante für die Kontaktbildung in einem Gaußschen Peptid ausgerechnet wurde. Mit den oben verwendeten Werten für das Peptid M03 ( $L = 7 \text{ \AA}$  und  $a = 3 \text{ \AA}$ ) kann man mit Gl. (7.15) eine „effektive Gaußsche Diffusionskonstante“ ausrechnen:

$$D_{\text{Gauß}} = \frac{(2\pi L^2/3)^{3/2}}{4\pi\tau a} = 1.4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}.$$

Mit dieser Diffusionskonstanten<sup>1</sup> kann jetzt im naiven Umkehrschluss ein mittlerer Donor-Akzeptor Abstand ausgerechnet werden, der der 250 ps-Zeitkonstanten entspräche. Nach Einsetzen der Werte erhält man  $L_{250\text{ps}} = 1.8 \text{ \AA}$ , was bedeuten würde, dass bereits zu Beginn des Experiments ein Teil der Peptide einen Kontakt zwischen Donor und Akzeptor ausbilden.

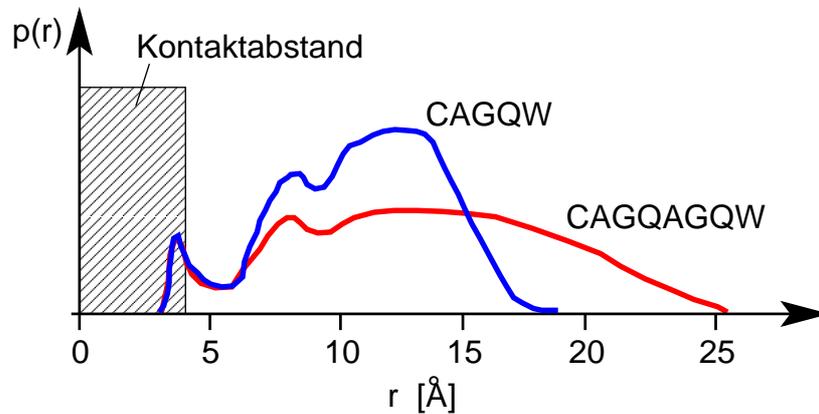


**Abbildung 7.17:** Interpretation der 250 ps-Zeitkonstanten für die Kontaktbildung. Im Gleichgewicht liegen die Peptide in zwei Sub-Ensembles vor: Etwa ein Viertel der Peptide befindet sich in dem eher schleifenförmigen Sub-Ensemble (a) und führt auf die 250 ps-Zeitkonstante für die Kontaktbildung, der Rest der Peptide ist eher gestreckt und trägt zur 14 ns-Zeitkonstanten bei (b).

Es ist klar, dass diese Rechnung nicht exakt sein kann, die Überlegungen sollten jedoch in die richtige Richtung gehen und führen zu einer Interpretation der Ergebnisse, die als Cartoon in Abbildung 7.17 zusammengefasst ist. Da die beiden Zeitkonstanten für die Kontaktbildung um einen Faktor von mehr als 50 auseinanderliegen, macht man einen „Separationsansatz“ und setzt als Gleichgewichtsverteilung der Peptide die Summe zweier Gaußscher Verteilungen an (in der Abbildung mit a und b gekennzeichnet). Die (getrennte) Behandlung der beiden Gaußschen Sub-Ensembles erfolgt dann wie in Abschnitt 7.2 beschrieben und liefert die beiden beobachteten Zeitkonstanten.

Durch Computersimulationen konnten Yeh und Hummer eine derartige Abstandsverteilung für ein Peptid nachweisen, bei dem Donor und Akzeptor durch drei Aminosäuren (5 Peptidbindungen) voneinander getrennt sind [YH02]. Abbildung 7.18 ist nach den dort erhaltenen Daten gezeichnet und enthält ebenfalls Hinweise auf ein Sub-Ensemble.

<sup>1</sup>Lapidus et al. verwenden einen zehnfach größeren Wert  $D = 1.7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  [LSE<sup>+</sup>02]. In der Literatur wird viel Aufwand betrieben, um solche effektiven Diffusionskonstanten zu ermitteln, siehe hierzu z. B. [HHSE96, RSH00, BA02, NT03, Por03].



**Abbildung 7.18:** Wahrscheinlichkeitsverteilung  $p(r)$  des Donor-Akzeptor Abstandes  $r$  für zwei kurze Peptide mit der Sequenz CAGQW, bzw. CAGQAGQW, simuliert mit einem CHARMM-Kraftfeld. Die Abbildung basiert auf Daten von Yeh und Hummer [YH02].

#### 7.6.4 Der präexponentielle Faktor — Tempolimit der Proteinfaltung

Wie bereits in der Einleitung (ab Seite 9) ausgeführt, lässt sich in der kinetischen Theorie der Proteinfaltung der Faltungsvorgang einer großen Anzahl von Proteinen mit einem Zwei-Zustands Modell beschreiben. Eine wichtige Rolle dabei spielt der präexponentielle Faktor  $k_0$ , der angibt, mit welcher Rate das Protein beim Fehlen jeglicher Energiebarrieren zwischen ungefaltetem und gefaltetem Zustand seine native Form annehmen würde.

Chang et al. schlossen aus Messungen an einem zehn Aminosäuren langen Peptid auf einen Wert von  $k_0 \approx 10^7 \text{ s}^{-1}$  [CLWG03]. Wie Krieger et al. in [KFB<sup>+</sup>03, KFA<sup>+</sup>ss] dargelegt haben, muss dieses Ergebnis nach oben korrigiert werden, denn die von Chang et al. verwendeten hohen Konzentrationen an Guanidiniumchlorid<sup>1</sup> (GdmCl) führen zu einer deutlichen Verlangsamung der Kontaktbildungsrate und damit zu einem zu niedrig angesetzten präexponentiellen Faktor. Hudgins et al. und Lapidus et al. geben ebenfalls Werte im Bereich  $k_0 \approx 10^7 \text{ s}^{-1}$  an [LEH00, HHGN02]. Die dort durchgeführten Experimente zum Triplett-Quenching von Tryptophan durch Cystein (Lapidus et al.) bzw. dem Fluoreszenz-Quenching von 2,3 diazabicyclo[2.2.2]oct-2-ene (DBO) durch Tryptophan (Hudgins et al.) sind jedoch beide nicht vollständig Diffusionskontrolliert, weshalb es schwierig ist, aus diesen Experimenten verlässliche Werte für  $k_0$  zu extrahieren<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Hohe Konzentrationen an Guanidiniumchlorid (oder Harnstoff) führen dazu, dass sich Proteine entfalten [Str94].

<sup>2</sup>Beim Quenching von Triplett-Tryptophan durch Cystein werden außerdem  $S\cdot$  Radikale gebildet und die

Die in Abschnitt 7.3 beschriebene Auswertung der ns-Experimente in Basel ergab eine von der Peptidlänge unabhängige obere Schranke für die Kontaktbildungsrate in den Xanthonpeptiden  $k_C \approx 10^8 \text{ s}^{-1}$ . Die engsten Kontakte in Proteinen findet man in den Schleifen von  $\beta$ -Faltblättern und in  $\alpha$ -Helices, dazu müssen Kontakte zwischen Aminosäuren an den Positionen  $i$  und  $i+3$  ( $\beta$ -Faltblatt) bzw.  $i$  und  $i+4$  ( $\alpha$ -Helix) ausgebildet werden. Unter der Annahme, dass die Kontaktbildung in den Xanthonpeptiden komplett diffusionskontrolliert abläuft und durch keine Energiebarrieren behindert wird, sollte die gemessene Kontaktbildungsrate  $k_C$  einen relativ guten Anhaltspunkt für den präexponentiellen Faktor  $k_0$  geben. Mit  $k_0 = k_C$  kann man dann über die Beziehung (vgl. Gl. (1.1), Seite 9)

$$k = k_0 \exp - (\Delta G^0 / RT)$$

beispielsweise Werte für die Höhe der Energiebarriere  $\Delta G^0$  im Zwei-Zustands Modell abschätzen.

Der Wert  $k_0 \approx 10^8 \text{ s}^{-1}$  wurde zunächst allein aus der Analyse der ns-Experimente gefolgert [KFB<sup>+</sup>03]. Die oben gezeigte zusätzliche schnelle Kontaktbildung mit  $\tau_s \approx 250 \text{ ps}$  bedeutet für den präexponentiellen Faktor  $k_0$  aber lediglich eine leichte Korrektur nach oben, der Wert für  $k_0$  bleibt in der gleichen Größenordnung.

Es ist allerdings anzunehmen, dass man für die Beschreibung des weiteren Faltungsweges eines Proteins auf längeren Zeitskalen kleinere Werte für den präexponentiellen Faktor wählen muss, denn die Ausbildung komplexerer Strukturen wird zusätzlich auftretende entropische und enthalpische Barrieren behindert [KFB<sup>+</sup>03]. Dies dürfte einer der Gründe sein, warum in der Literatur oft ein um den Faktor 10–100 niedrigerer Wert für  $k_0$  angegeben wird. Wang et al. untersuchten beispielsweise den Faltungsvorgang eines 47 Aminosäuren langen Peptids und folgerten daraus einen präexponentiellen Faktor  $k_0 \approx 10^6 \text{ s}^{-1}$  [WZG08], einen Wert in der gleichen Größenordnung geben auch Hagen et al. aufgrund von Experimenten an einem ähnlich großen Peptid an [HHSE96].

---

Messungen zum DBO-Quenching sind durch die kurze Fluoreszenz-Lebensdauer des DBO auf die Messung schneller Kontaktbildungen beschränkt (zu den Problemen der beiden Experimente siehe auch die Ausführungen in [KFB<sup>+</sup>03, KFA<sup>+</sup>ss]).

## 8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die initialen Schritte der Peptidfaltung mit Hilfe zweier sehr unterschiedlicher Modellsysteme untersucht: In den **Azobenzol-Peptiden** dient Azobenzol zur gezielten Auslösung konformationeller Änderungen in einem Oktapeptid. Azobenzol führt nach Lichtanregung eine reversible *trans*→*cis*-Isomerisierung durch und ändert dabei innerhalb weniger Pikosekunden seine Länge um den Faktor zwei. Diese starke und schnelle geometrische Änderung verursacht eine Konformationsdynamik in dem ringförmig mit dem Azobenzol verbundenen Peptid. Bis das Peptid seine endgültige *cis*- oder *trans*-Konformation eingenommen hat kann man im sichtbaren Spektralbereich (330–700 nm) Rückwirkungen des Peptid-Teils auf das Azobenzol beobachten, denn der Chromophor kann seine finale Form erst einnehmen, wenn das Peptid keinen Einfluss auf das Azobenzol-Molekül mehr ausübt.

Ganz anders bei den **Xanthonpeptiden**. Hier will man die Kontaktbildungsrate ermitteln. Diese gibt an wie lange kleine, frei bewegliche Peptide benötigen, bis sich diffusionskontrolliert ein Kontakt zwischen räumlich getrennten Aminosäuren ausbildet. Dazu werden die Peptide mit den Molekülen Xanthon und Naphthalin markiert. Bei Kontakt beobachtet man deutliche Änderungen in der transienten Absorption, aus denen sich die Kontaktbildungsrate extrahieren lässt.

Zur Interpretation der biophysikalisch interessanten Experimente benötigt man ein detailliertes Verständnis der Molekülphysik der spektroskopisch untersuchten Moleküle:

- Bereits seit einigen Jahren ist bekannt, dass Azobenzol sich ideal zur Auslösung getriebener Konformationsänderungen eignet. In dieser Arbeit wurde der Isomerisierungsmechanismus von Azobenzol weitergehend untersucht. Die Experimente zeigten, dass die prinzipielle Reaktionsdynamik bei  $n\pi^*$ - und  $\pi\pi^*$ -Anregung sehr ähnlich ist, was auf ähnliche Isomerisierungsmechanismen unabhängig von der elektronischen Anregung hindeutet. Aus der Kombination von Daten zur stationären Emission und zur transienten Absorption konnten außerdem neue Erkenntnisse zur Dynamik des angeregten Zustands gewonnen werden.
- Umfangreiche Untersuchungen zum Intersystem crossing von Xanthon haben ergeben, dass Xanthon bi-phasisch innerhalb weniger Pikosekunden in einen langlebigen Triplett-Zustand wechselt. Messungen zum Triplett-Triplett-Energietransfer von Xanthon zu Naphthalin bei unterschiedlichen Naphthalin-Konzentrationen ergaben, dass bei direktem Kontakt zum Akzeptor Naphthalin ein Triplett-Triplett-Energietransfer innerhalb  $\leq 1$  ps stattfindet. Die beiden Moleküle zusammen bilden

somit ein ideales Paar von Marker-Molekülen, mit denen die intramolekulare Kontaktbildung in den Xanthonpeptiden auf einer sehr kurzen Zeitskala von wenigen Pikosekunden beobachtet werden kann.

Mit diesen Vorarbeiten konnten folgende Antworten auf die biophysikalisch relevanten Fragestellungen gefunden werden:

- Mit den Azobenzol-Peptiden konnte der Einfluss des Lösungsmittels auf die Konformationsdynamik nachgewiesen werden. Dazu wurden Experimente an wasserlöslichen Azobenzol-Peptiden durchgeführt und mit bereits vorhandenen Ergebnissen, die mit DMSO-löslichen Peptiden gewonnen wurden verglichen. Es stellt sich heraus, dass die schnelle Isomerisierungsdynamik in beiden Lösungsmitteln nahezu identisch abläuft, man in den langsameren Prozessen auf einer Zeitskala  $>5$  ps jedoch eine Lösungsmittelabhängigkeit sieht. Das Lösungsmittel wirkt sich dabei auf mehreren Zeitskalen auf die beobachtete Dynamik aus. Ein Teil der Moleküle durchläuft (bei der *trans*→*cis*-Reaktion) während der Isomerisierung eine diffusive Bewegung auf einer relativ flachen  $S_1$ -Potentialfläche. Die dabei notwendige Reorientierung der Lösungsmittelmoleküle ist in Wasser einfacher als in DMSO, weshalb in Wasser eine Beschleunigung dieses Prozesses beobachtet wird. Grundzustands-Kühlprozesse auf der 5–10 ps Zeitskala werden durch die Wärmekapazität und Wärmeleitfähigkeit des Lösungsmittels beeinflusst. Beide sind in Wasser um den Faktor 2.5–4 größer und man beobachtet auf dieser Zeitskala eine Beschleunigung der Dynamik in Wasser. Auf der 10–100 ps-Zeitskala schließlich ist in der *cis*→*trans*-Reaktion eine echte Konformationsdynamik sichtbar. Diese ist durch die Lösungsmittelviskosität beeinflusst, die für DMSO doppelt so groß ist wie für Wasser und um diesen Faktor ist die Dynamik in diesem Zeitbereich in Wasser beschleunigt.
- Durch Experimente an den Xanthonpeptiden konnte nachgewiesen werden, dass die Kontaktbildung zweier in der Peptidsequenz räumlich getrennter Aminosäuren mit zwei Zeitkonstanten im sub-ns und im ns-Zeitbereich abläuft. Die Messungen ergaben, dass bei einem Peptid, bei dem sich zwischen Donor und Akzeptor zwei Aminosäuren befinden etwa ein Viertel der Moleküle in einem fast ringförmigen Sub-Ensemble vorliegen, für das eine Kontaktbildungsrate von ca.  $4 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$  ermittelt wurde, während der Rest der Moleküle in einem eher gestreckten Sub-Ensemble vorliegt, wofür eine Kontaktbildungsrate von  $\approx 10^8 \text{ s}^{-1}$  extrahiert wurde. Die Experimente legen damit einen Wert für den präexponentiellen Faktor der kinetischen Theorie der Proteinfaltung von  $k_0 \approx 10^8 \text{ s}^{-1}$  nahe.

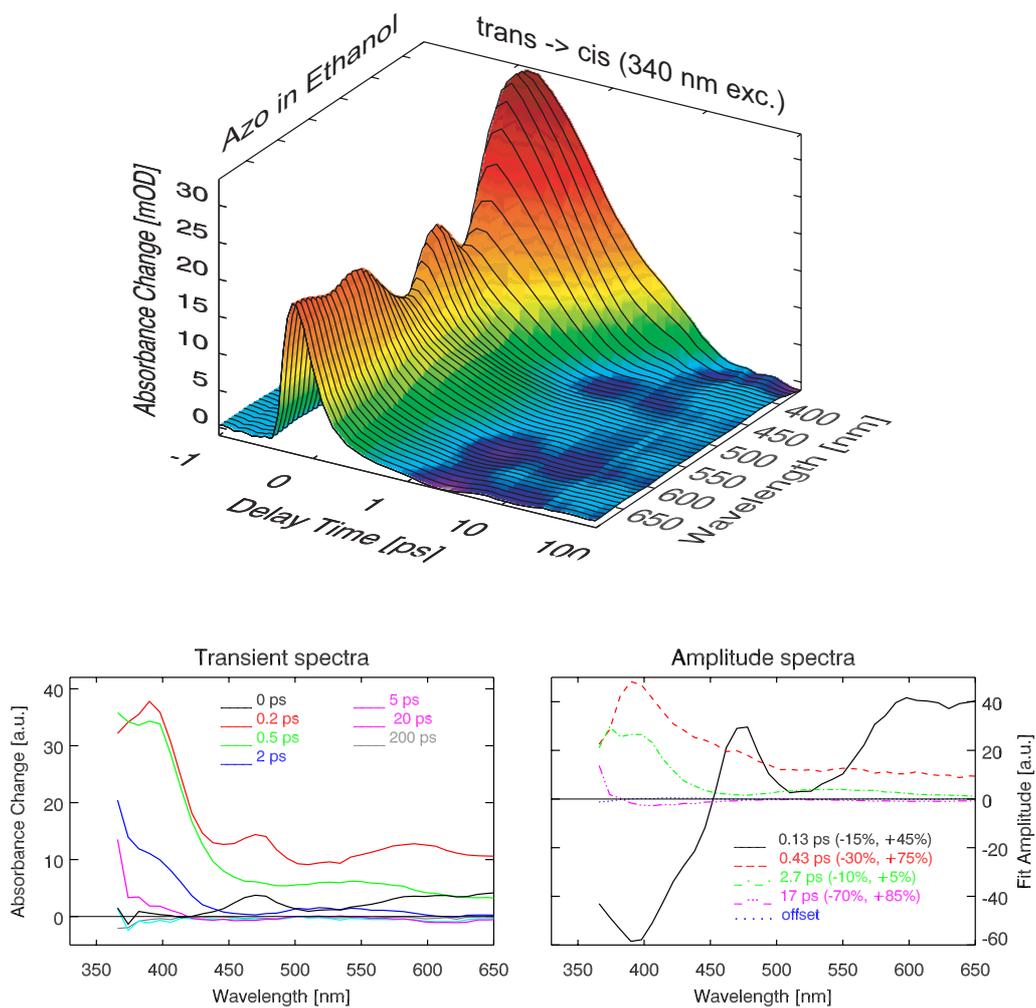
In der Summe ergeben die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente bereits ein recht gutes Bild über die Zeitskalen initialer Schritte der Peptidfaltung. Erste konformationelle Bewegungen und auch erste Kontaktbildungen ereignen sich bereits im sub-ns Zeitbereich. Die Dynamik wird dabei auf unterschiedlichen Zeitskalen vom Lösungsmittel beeinflusst.

---

Das Thema Proteinfaltung ist äußerst komplex und für ein komplettes Verständnis müssen beispielsweise dynamische Prozesse über fast 17 Größenordnungen in der Zeit beobachtet und verstanden werden. Es ist klar, dass man Erkenntnisse dazu nur durch die Kombination vieler verschiedener experimenteller Ansätze erhalten kann. Die vorliegende Arbeit hat nun zwei neue Mosaiksteine geliefert, die in das komplizierte und faszinierende Bild des Faltungsprozesses eingebaut werden können.



## A 340 nm-Anregung von *trans*-Azobenzol in Ethanol



**Abbildung A.1:** Transiente Absorption von *trans*-Azobenzol in Ethanol nach Anregung in der  $\pi\pi^*$ -Absorptionsbande durch Lichtimpulse bei 340 nm. Oben: Überblick über die Rohdaten. Unten, links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten. Rechts: Amplitudenspektren aus einem globalen Fit.



## B Photoschaltbare Bioaktivität von bcAMPB(H<sub>2</sub>O)

Eine Besonderheit des bizyklischen Azopeptids bcAMPB(H<sub>2</sub>O) ist, dass es eine photoschaltbare biologische Aktivität zeigt [CSRC<sup>+</sup>01, CCSR<sup>+</sup>02]. Diese Eigenschaft zeigt sich am Einfluss von *trans*-, bzw. *cis*-bcAMPB(H<sub>2</sub>O) auf die oxidative Rückfaltung von reduzierter und denaturierter RNase A.

Verbindung	Redoxpotential $E'_0$
TrxR aus Escherichia Coli	-250 mV
Lineares aktives Zentrum der TrxR aus E. Coli. (Aminosäuren 134–141)	-210 mV
<i>trans</i> -bcAMPB(H <sub>2</sub> O)	-200 mV
<i>cis</i> -bcAMPB(H <sub>2</sub> O)	-146 mV

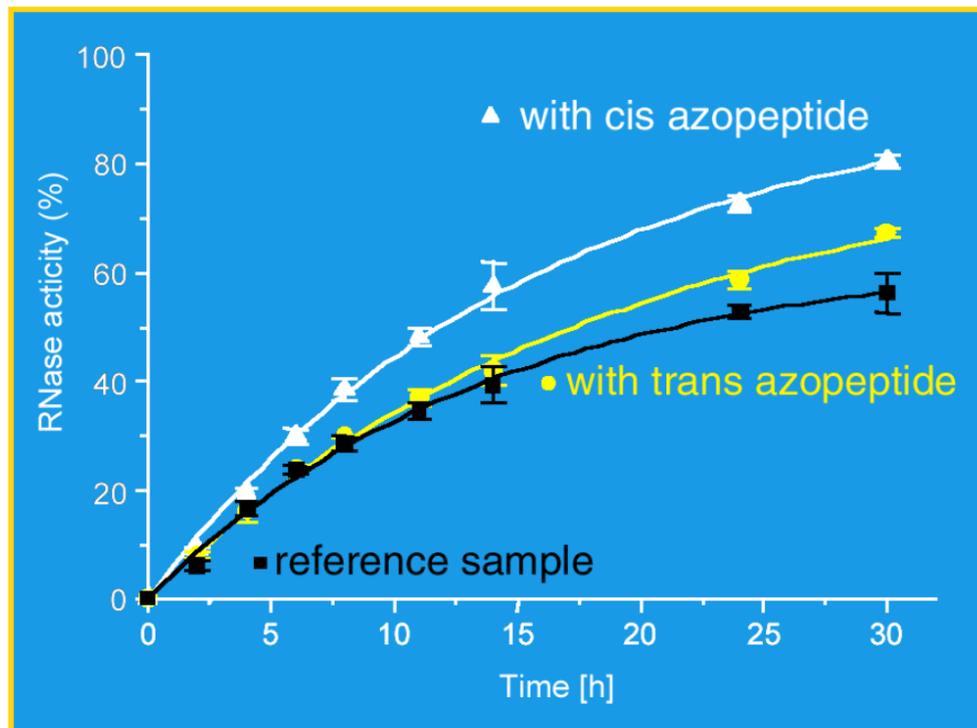
**Tabelle B.1:** Redoxpotentiale von TrxR und bcAMPB(H<sub>2</sub>O). Die Daten stammen aus [CSRC<sup>+</sup>01].

Aus Tabelle B.1 ist ersichtlich, dass das Redoxpotential von *trans*-bcAMPB(H<sub>2</sub>O) (-200 mV) fast identisch ist mit dem des natürlichen aktiven Zentrums der TrxR (-210 mV). Im Falle von *cis*-bcAMPB(H<sub>2</sub>O) ist das Redoxpotential jedoch sichtbar auf -146 mV verschoben.

Im Labor (in vitro) wird eine Mischung aus oxidiertem und reduziertem Gutathion (GSH bzw. GSSG) als (künstliches) Redoxsystem verwendet, um die natürliche Umgebung des endoplasmatischen Reticulums nachzuahmen (im allgemeinen aber mit wesentlich geringerer Effizienz als in Gegenwart von Thiol/Disulfid Oxidoreduktasen). Das Referenz-System zur Bestimmung der oxidativen Rückfaltungsrate von RNase A bildet deshalb eine Mischung aus RNase A und GSH/GSSG im Verhältnis 1:20:4. Die zeitliche Entwicklung der Ausbeute an aktiver RNase A ist für dieses Referenzsystem in Abbildung B.1 (schwarze Kurve) eingezeichnet. Wird nun ein Äquivalent GSSG durch *cis*-bcAMPB(H<sub>2</sub>O) ersetzt, steigt die initiale Aktivierungsrate der RNase A um 30%. Die Ausbeute an aktiver RNase A nach 30 h steigt dabei von 56% auf 80%, mit einer extrapolierten maximalen Ausbeute von 94% gegenüber 64% im Referenzsystem (Abb. B.1, weiße Kurve). Wird stattdessen ein Teil GSSG durch *trans*-bcAMPB(H<sub>2</sub>O) ersetzt, bleibt die initiale Rückfaltungsrate unbeeinflusst, die Effizienz des Redoxsystems ist jedoch erhöht, was zu einer extrapolierten maximalen Rückfaltung von 83% führt (Abb. B.1, gelbe Kur-

## B Photoschaltbare Bioaktivität von bcAMPB(H<sub>2</sub>O)

ve).

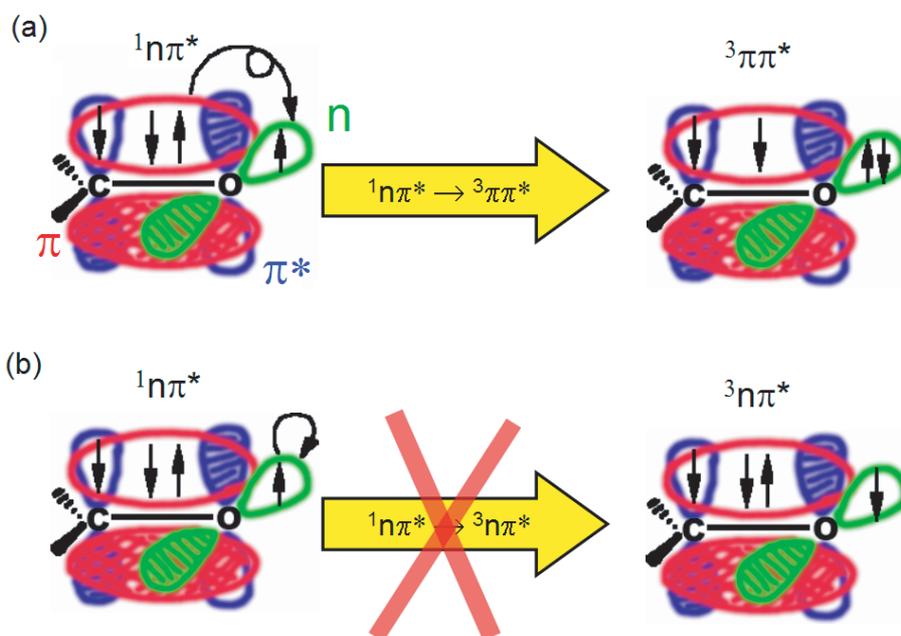


**Abbildung B.1:** Biologische Aktivität der wasserlöslichen Azopeptide. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil an zurückgefalteter RNase A gegen die Zeit. Die unterste Kurve zeigt den Zeitverlauf von RNase A bei 30°C und pH 7.4 mit Glutathion bei einem molaren Verhältnis RNase A:GSH:GSSG von 1:20:4. Für die anderen beiden Kurven wurde zusätzlich bcAMPB(H<sub>2</sub>O) zugegeben im Verhältnis RNase A:GSH:GSSG:bcAMPB(H<sub>2</sub>O) von 1:20:3:1. Durch Zugabe von *trans*-bcAMPB(H<sub>2</sub>O) bleibt insbesondere die initiale Steigung der Kurve praktisch unverändert (mittlere Kurve). Wird jedoch *cis*-bcAMPB(H<sub>2</sub>O) zugegeben, wird die initiale Aktivierungsrate um 30% gesteigert (oberste Kurve) und die extrapolierte Gesamtausbeute an rückgefalteter RNase A steigt von 64% auf 94% (die Abbildung stammt aus [CSRC<sup>+</sup>01]).

Dieses Experiment konnte sehr schön zeigen, dass es sich bei bcAMPB(H<sub>2</sub>O) tatsächlich um ein biologisch aktives System handelt, bei dem sich der Grad der Bioaktivität durch *cis/trans*-Isomerisierung des AMPB-Photoschalters steuern lässt.

## C Intersystem crossing — El Sayed Regeln

Der Wechsel vom Singulett- in den Triplett-Zustand wird als Systemübergang bzw. Intersystem Crossing (ISC) bezeichnet. Xanthon hat eine Quantenausbeute für Intersystem Crossing von 0.97 bei Zimmertemperatur [Sca80]. Für die Photochemie von Xanthon müssen vier Zustände berücksichtigt werden:  $^1n\pi^*$ ,  $^1\pi\pi^*$ ,  $^3n\pi^*$  und  $^3\pi\pi^*$ . Die Frage ist, welche Übergänge für Intersystem Crossing berücksichtigt werden müssen. Die Überlegungen in diesem Abschnitt sollen plausibel machen, wann ein Intersystem Crossing effektiv ablaufen wird.



**Abbildung C.1:** Intersystem crossing — El Sayed Regeln. Das ISC vom Singulett- in den Triplett-Zustand ist erlaubt, wenn unter Ausnutzung der Spin-Bahn Wechselwirkung ein Elektron gleichzeitig mit dem Spin-Flip in ein anderes Orbital wechselt, in (a) gezeigt am Beispiel  $^1n\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^*$ . (b) Die Situation für das ISC  $^1n\pi^* \rightarrow ^3n\pi^*$  dargestellt: Dabei müßte das Elektron den Spin-Flip ohne Orbitalwechsel machen — dieser Prozess ist nicht erlaubt.

Im Jahre 1963 wurden von El Sayed aufgrund quantenmechanischer Untersuchungen einfache Regeln aufgestellt, die zu entscheiden helfen, ob ein ISC vom Singulett- in den Triplett-Zustand erlaubt ist und damit wahrscheinlich und mit schneller Zeitkonstante abläuft oder aber verboten und damit sehr unwahrscheinlich ist [ES63]. Die grundsätzliche Beobachtung ist, dass ein Elektron beim ISC seinen Spin ändern muß. Über die

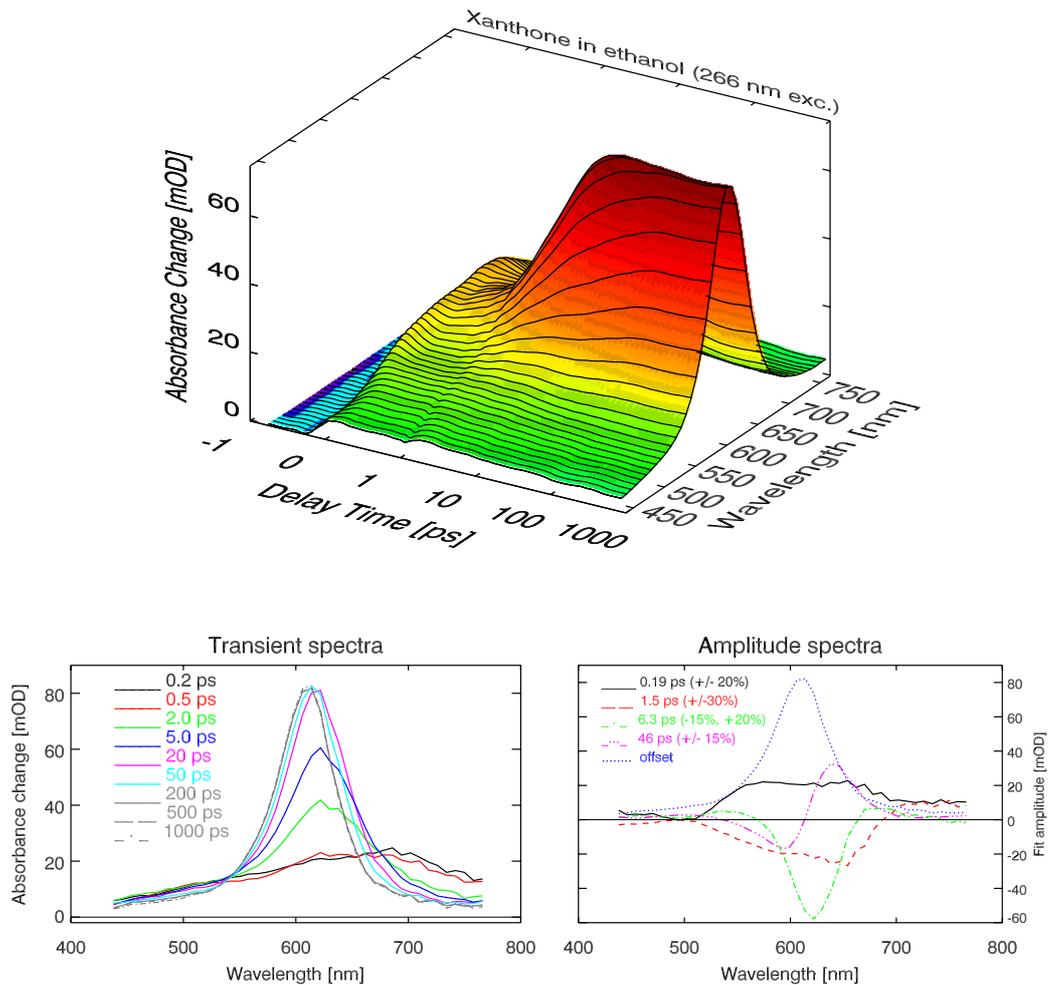
Spin-Bahn Wechselwirkung ist dies möglich, wenn das Elektron gleichzeitig mit dem Spin-Flip in ein anderes Orbital wechselt. Die Abbildung C.1 veranschaulicht dies: Ein ISC  $^1n\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^*$  ist erlaubt, weil gleichzeitig mit dem Spin-Flip ein Wechsel vom n- in das  $\pi$ -Orbital erfolgt, während der Wechsel  $^1n\pi^* \rightarrow ^3n\pi^*$  verboten ist.

Atom	Spin-Bahn		$\Delta t_{\min\text{ISC}}$
	Kopplungskonstante		
C	0.4	(33 $\text{cm}^{-1}$ )	500 fs
O	1.7	(142 $\text{cm}^{-1}$ )	120 fs
S	4.2	(351 $\text{cm}^{-1}$ )	50 fs
I	63	(5266 $\text{cm}^{-1}$ )	3 fs
Xe	117.2	(9797 $\text{cm}^{-1}$ )	1.7 fs

**Tabelle C.1:** Spin-Bahn Kopplungskonstanten verschiedener Atome. Je größer die Spin-Bahn Kopplungskonstante ist, desto leichter kann ein Elektron unter „Ausnutzung“ der Spin-Bahn Wechselwirkung ein ISC durchführen und vom Singulett- in den Triplett-Zustand wechseln.

Das ISC über die Spin-Bahn Wechselwirkung geht dabei umso leichter, je größer die Spin-Bahn Kopplungskonstante des beteiligten Atoms ist. So lässt sich aus Tabelle C.1 ableiten, dass das ISC für Thioxanthon besser (und damit schneller) ablaufen sollte als für Xanthon.

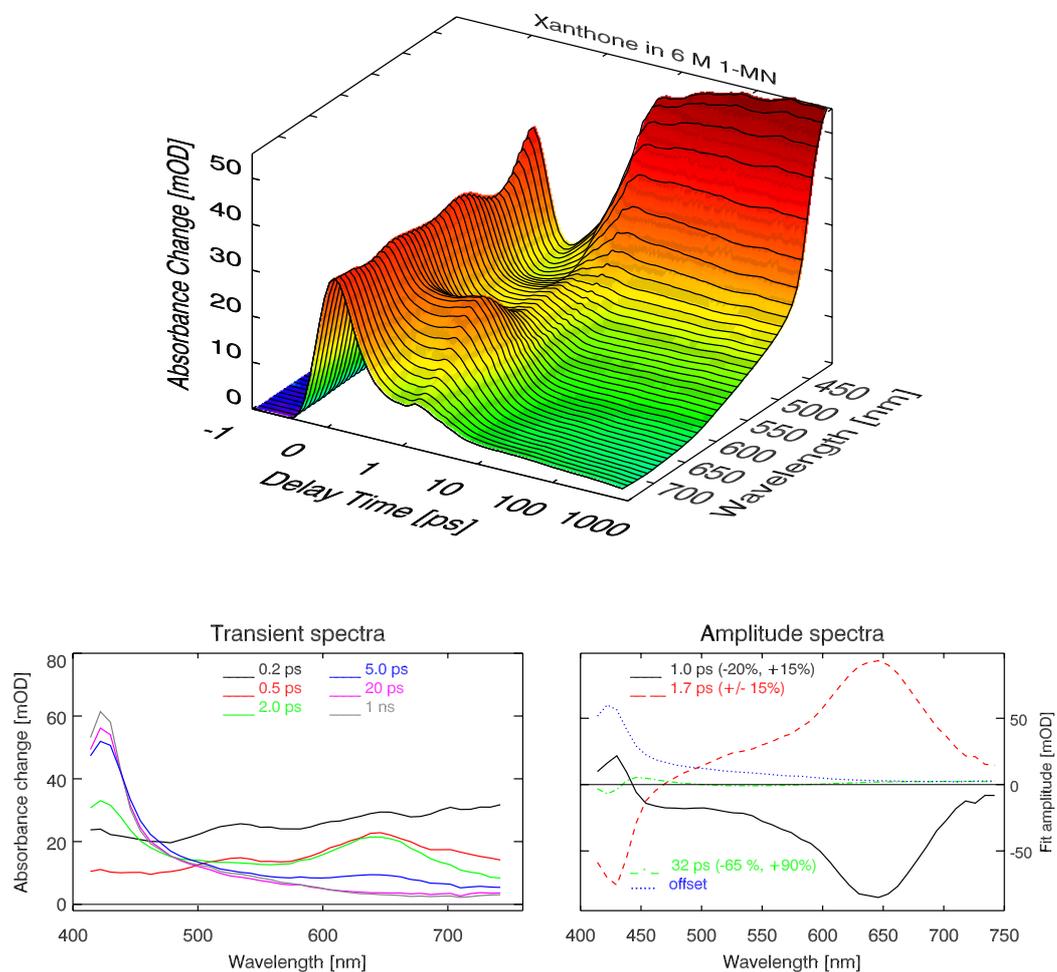
## D Xanthon in Ethanol (266 nm Anregung)



**Abbildung D.1:** Xanthon in Ethanol ( $\lambda_{\text{pump}} = 266 \text{ nm}$ ). Oben: Rohdaten. Unten links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten, rechts: Amplitudenspektren nach globalem Fit mit vier Zeitkonstanten plus Offset.

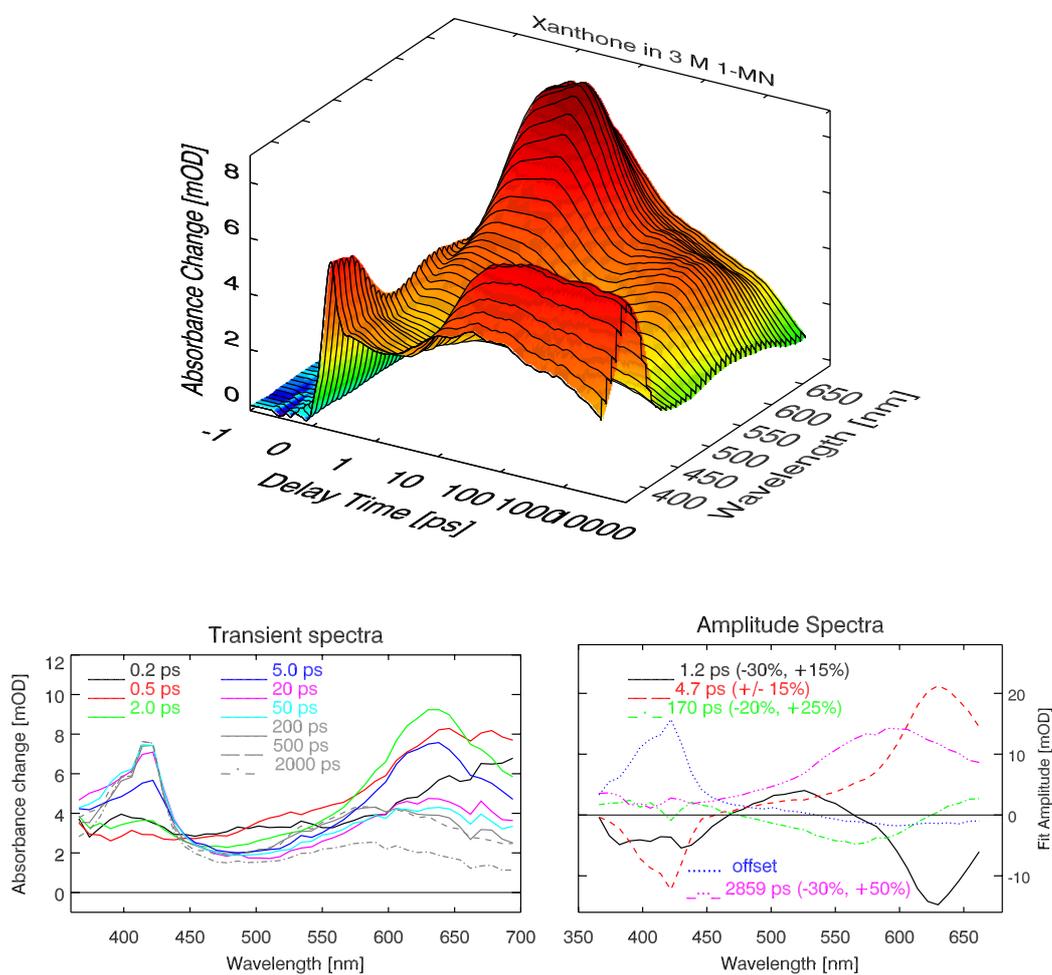
# E Quenching des Xanthon-Triplett durch 1-MN

## Xanthon in 6 M 1-Methyl Naphthalin



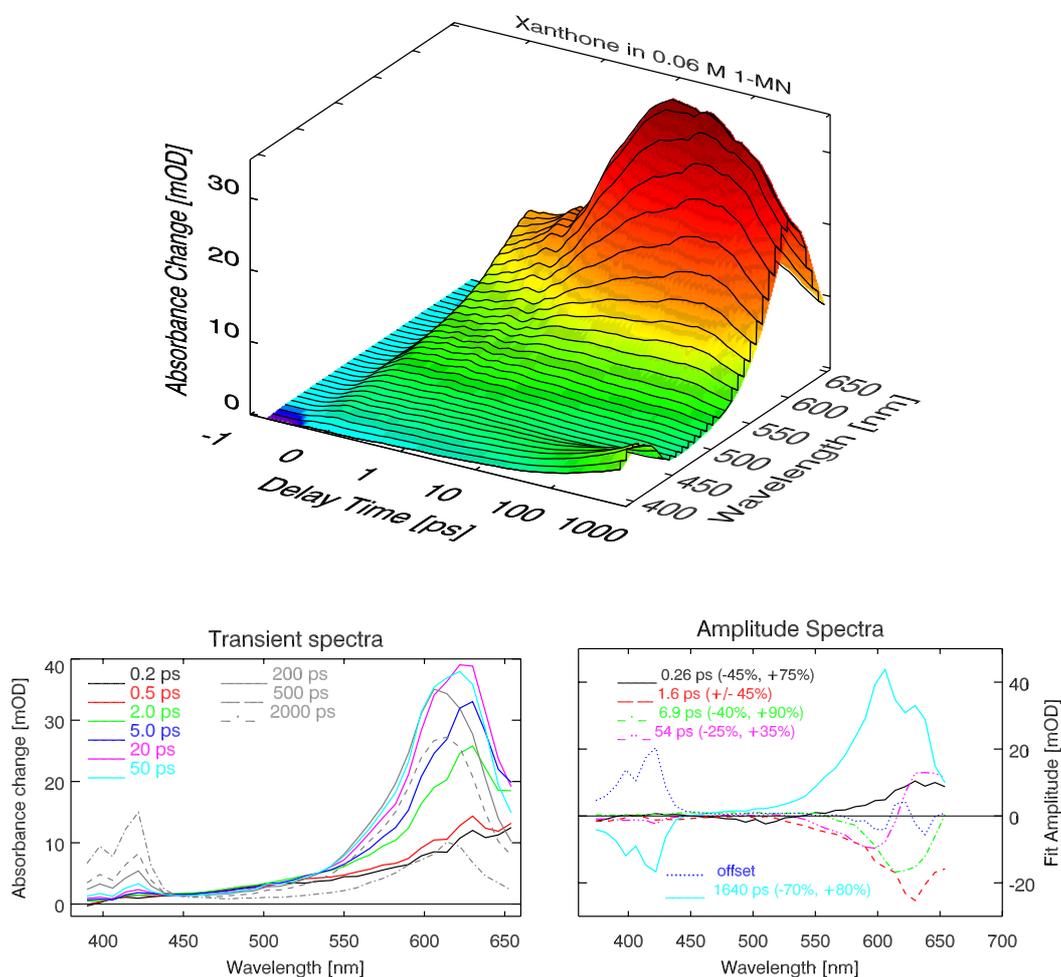
**Abbildung E.1:** Xanthon in 6 M 1-Methyl Naphthalin. Oben: Rohdaten aus der Messung der transienten Absorption von Xanthon gelöst in 1-Methyl Naphthalin nach  $\pi\pi^*$ -Anregung ( $\lambda_{\text{pump}} = 340 \text{ nm}$ ). Unten links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten, rechts: Amplitudenspektrum nach globalem Fit.

## Xanthon in 3 M 1-Methyl Naphthalin



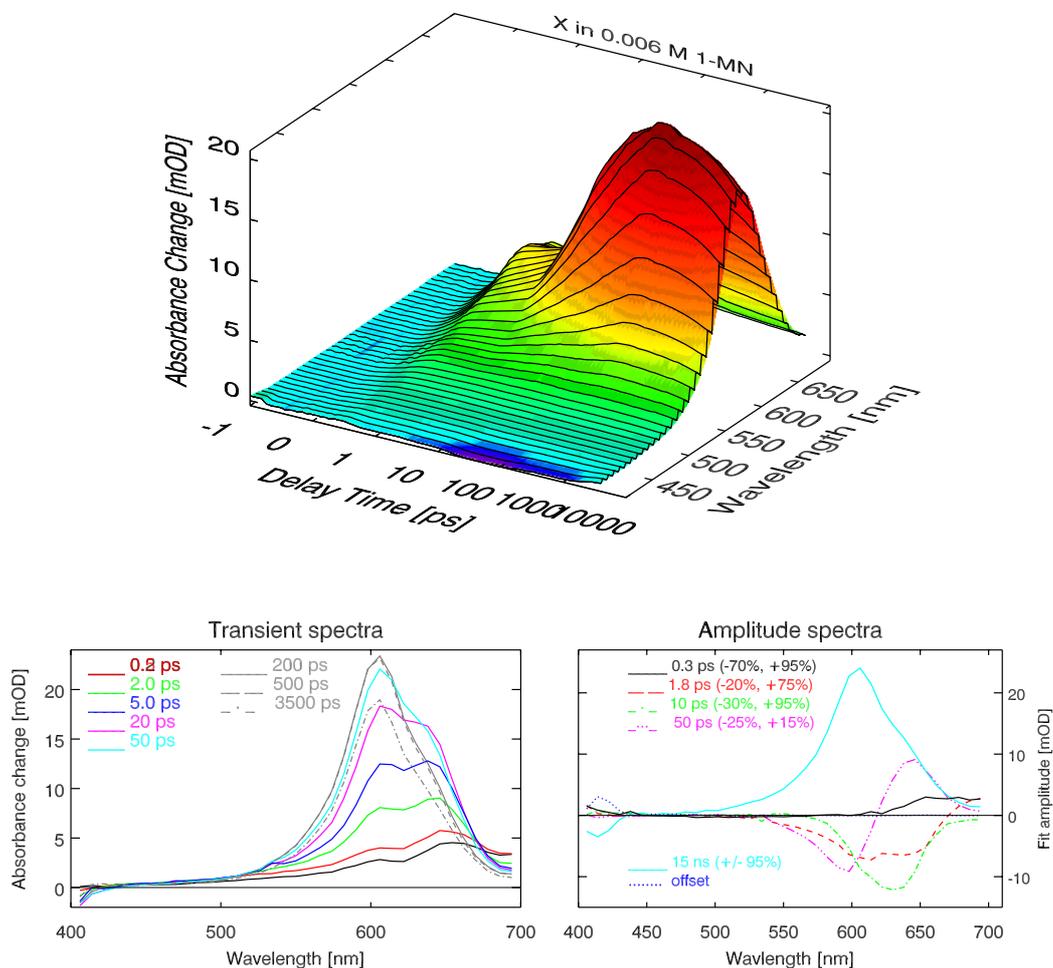
**Abbildung E.2:** Xanthon in Ethanol unter Zugabe von 3 M 1-Methyl Naphthalin. Oben: Rohdaten aus der Messung der transienten Absorption von Xanthon gelöst in 1-Methyl Naphthalin nach  $\pi\pi^*$ -Anregung ( $\lambda_{\text{pump}} = 340 \text{ nm}$ ). Unten links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten, rechts: Amplitudenspektrum nach globalem Fit.

## Xanthon in 0.06 M 1-Methyl Naphthalin



**Abbildung E.3:** Xanthon in Ethanol unter Zugabe von 0.06 M 1-Methyl Naphthalin. Oben: Rohdaten aus der Messung der transienten Absorption von Xanthon gelöst in 1-Methyl Naphthalin nach  $\pi\pi^*$ -Anregung ( $\lambda_{\text{pump}} = 340 \text{ nm}$ ). Unten links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten, rechts: Amplitudenspektrum nach globalem Fit.

## Xanthon in 0.006 M 1-Methyl Naphthalin

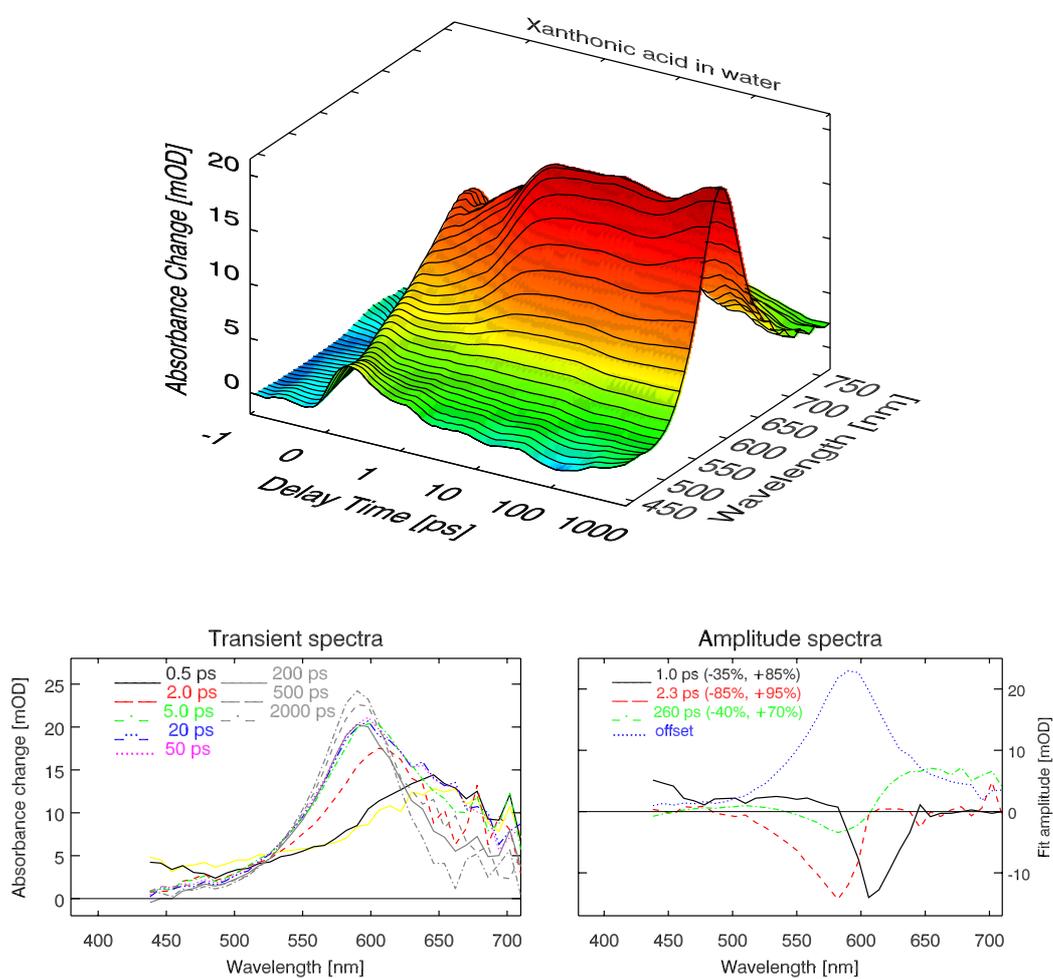


**Abbildung E.4:** Xanthon in Ethanol unter Zugabe von 0.006 M 1-Methyl Naphthalin. Oben: Rohdaten aus der Messung der transienten Absorption von Xanthon gelöst in 1-Methyl Naphthalin nach  $\pi\pi^*$ -Anregung ( $\lambda_{\text{pump}} = 340 \text{ nm}$ ). Unten links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten, rechts: Amplitudenspektrum nach globalem Fit.



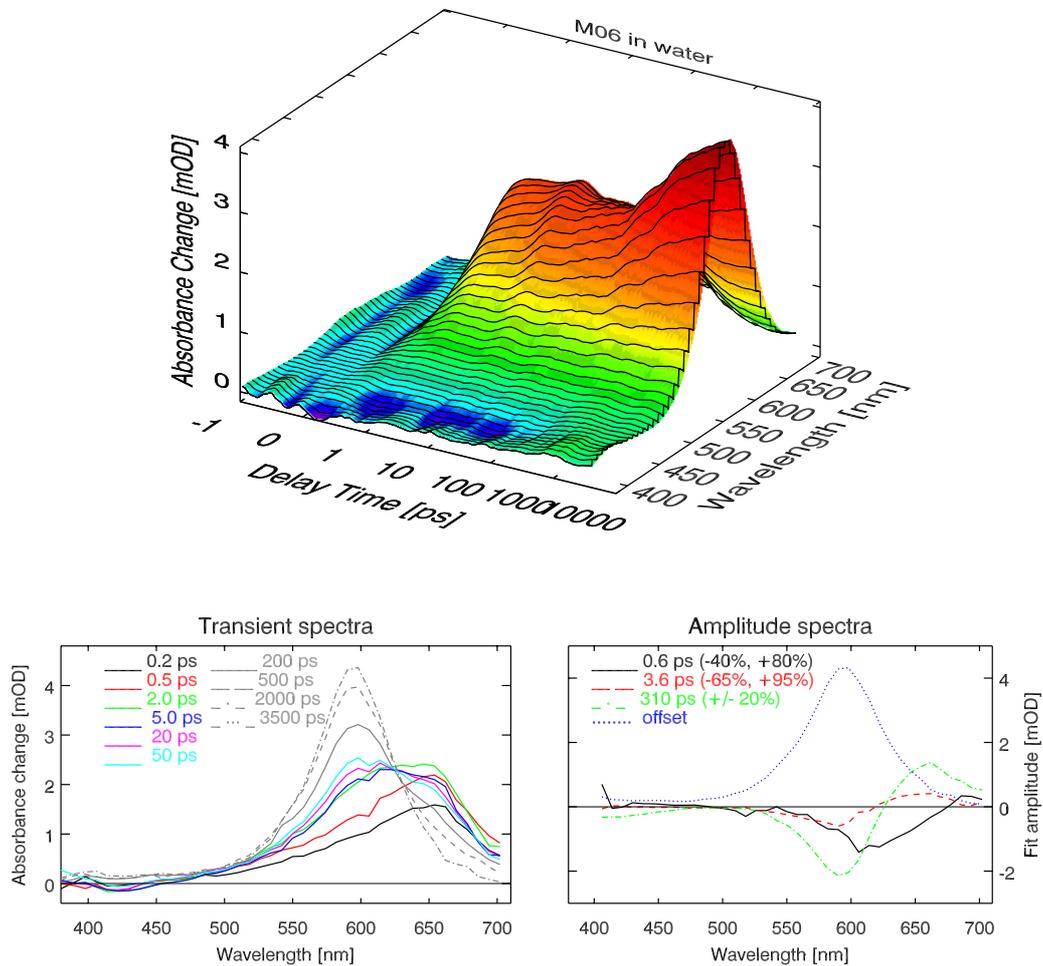
# F Xanthonpeptide: Referenz-Systeme

## Xanthonensäure in Wasser (266 nm Anregung)



**Abbildung F.1:** Xanthonensäure in Wasser ( $\lambda_{\text{pump}} = 266 \text{ nm}$ ). Oben: Rohdaten. Unten links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten, rechts: Amplitudenspektren nach globalem Fit mit vier Zeitkonstanten plus Offset.

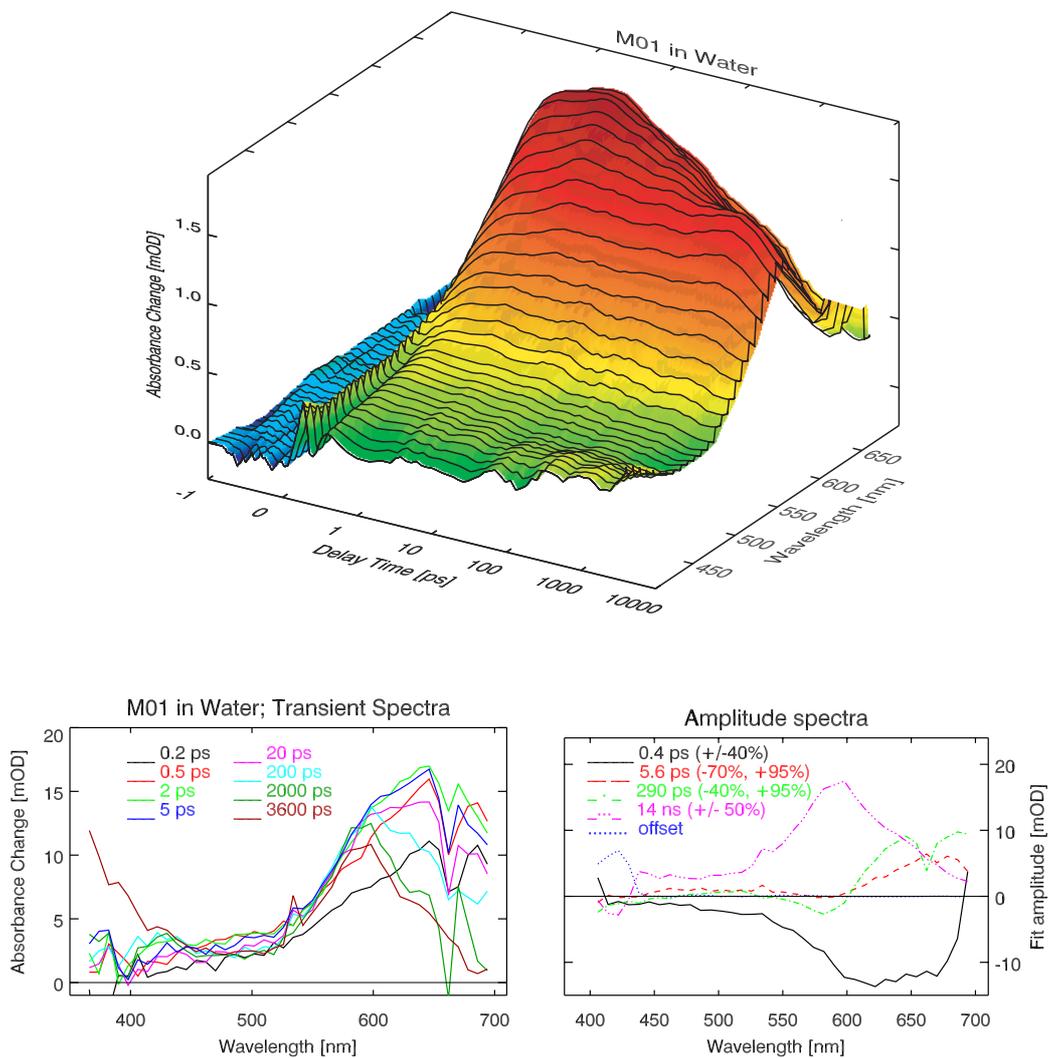
## Das Referenz-Peptid M06 in Wasser



**Abbildung F.2:** Referenz-Peptid M06 mit der Sequenz Xan-S-S-F-S-R-S-R-G-CONH<sub>2</sub> in Wasser ( $\lambda_{\text{pump}} = 340 \text{ nm}$ ). Oben: Rohdaten. Unten links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten, rechts: Amplitudenspektren nach globalem Fit.

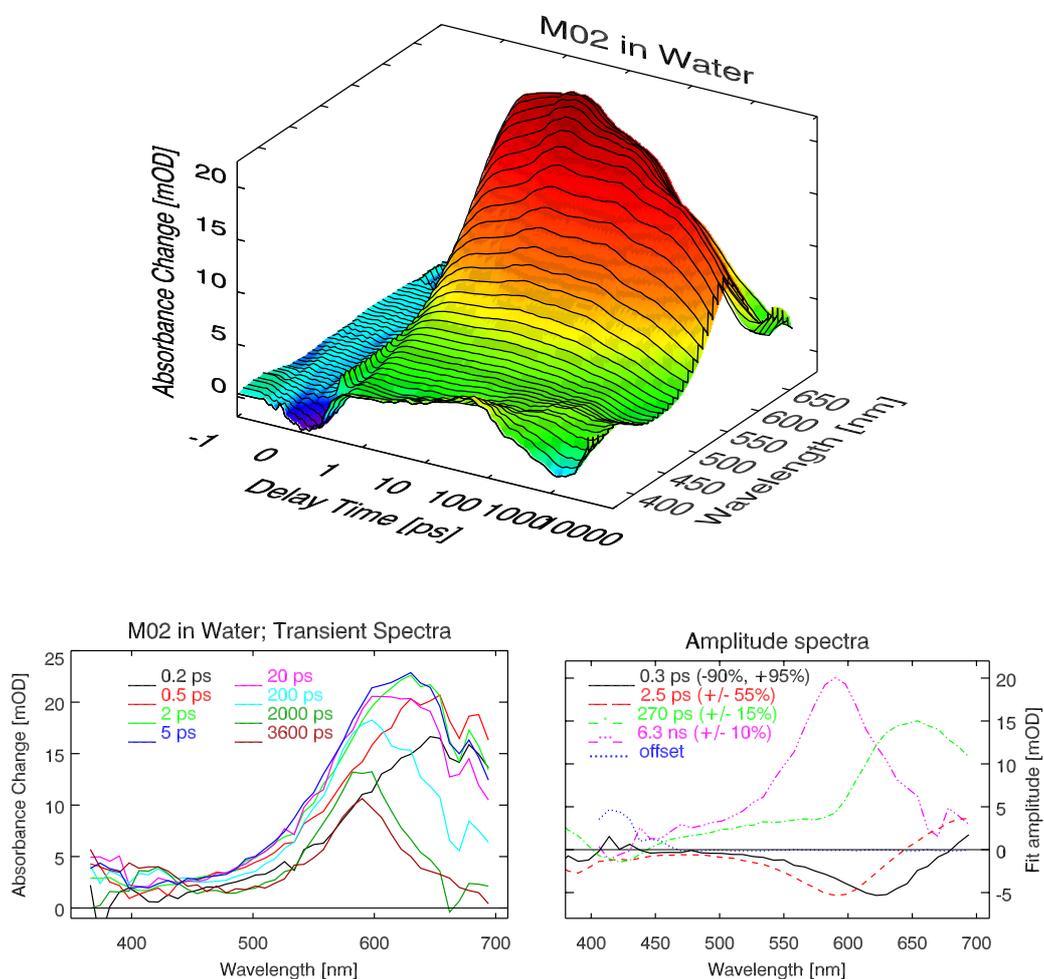
# G Kontaktbildung in Xanthonpeptiden

## Xanthonpeptid M01 in Wasser



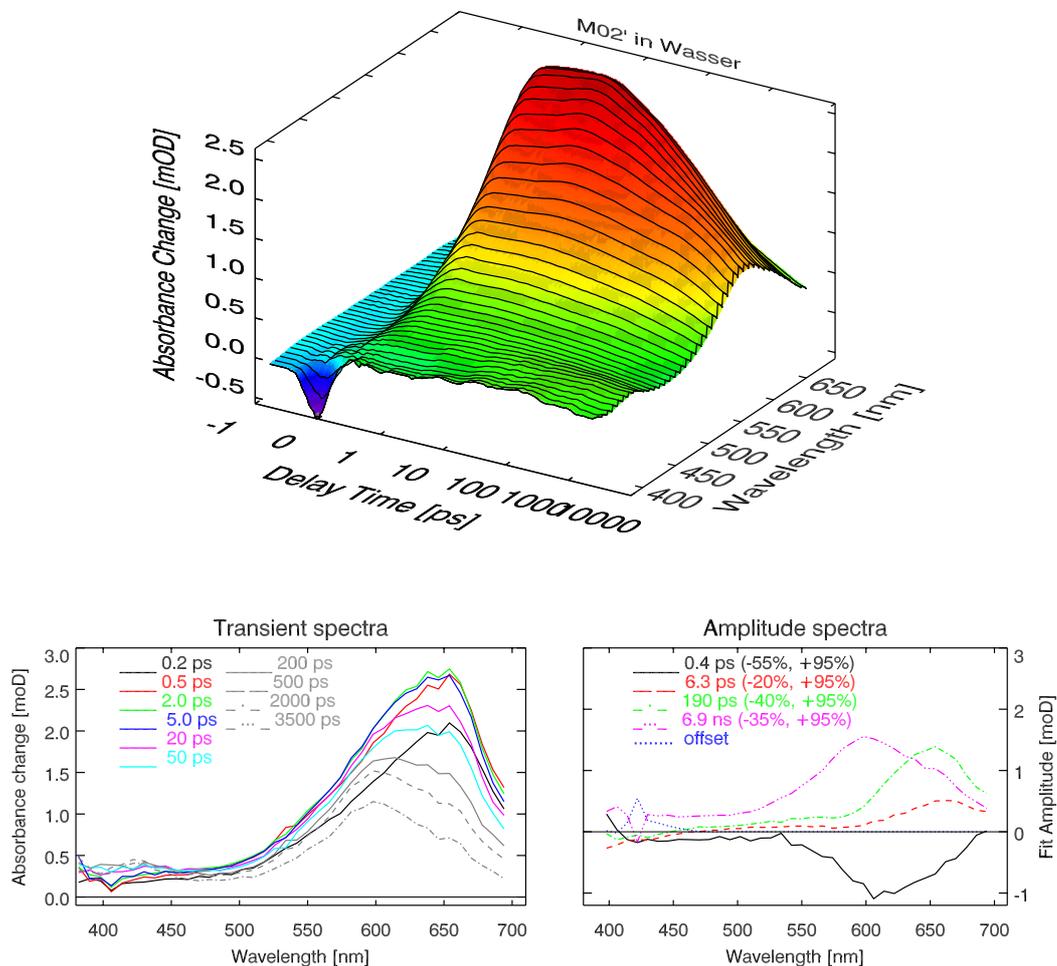
**Abbildung G.1:** Kontaktbildung im Xanthonpeptid M01 mit der Sequenz Xan-S-S-NAla-S-R-G-CONH<sub>2</sub> ( $\lambda_{\text{pump}} = 340 \text{ nm}$ ). Oben: Rohdaten. Unten links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten, rechts: Amplitudenspektren nach globalem Fit.

## Xanthonpeptid M02 in Wasser



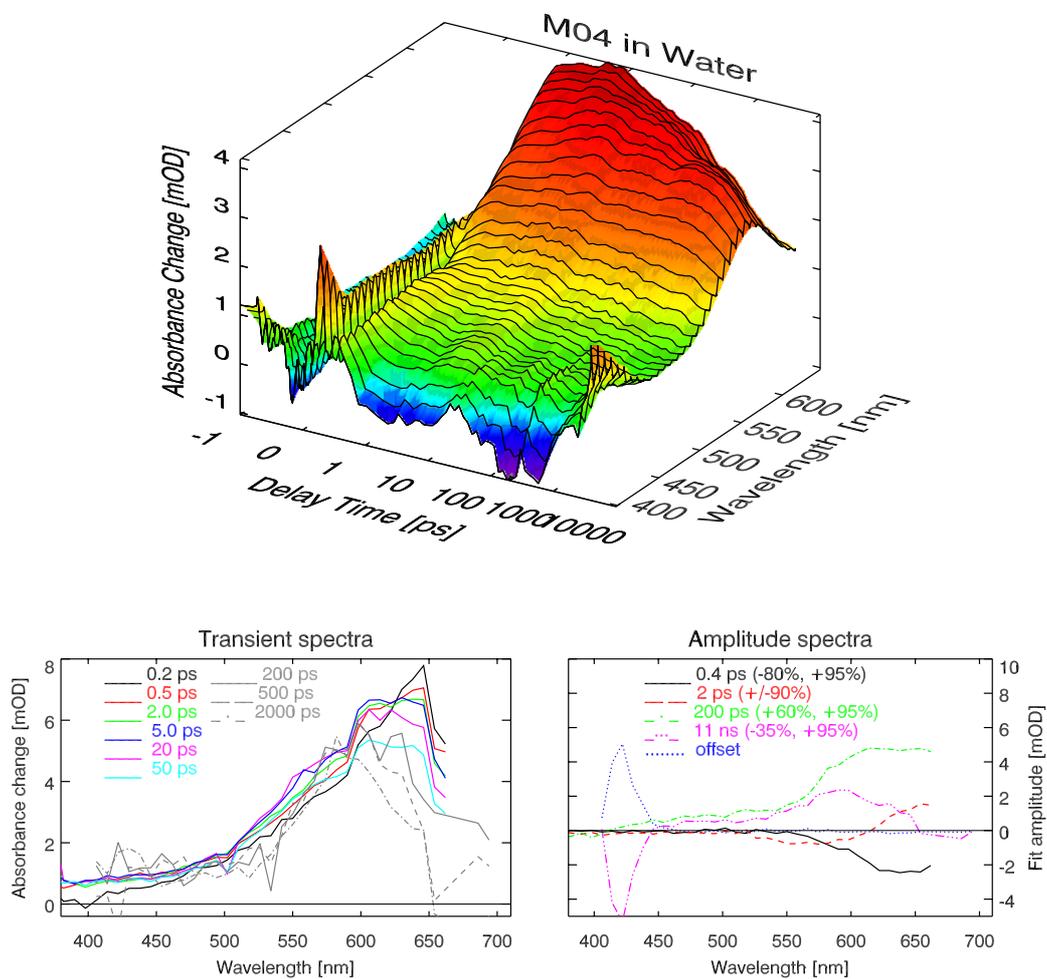
**Abbildung G.2:** Kontaktbildung im Xanthonpeptid M02 mit der Sequenz Xan-S-G-NAla-S-R-G-CONH<sub>2</sub> ( $\lambda_{\text{pump}} = 340 \text{ nm}$ ). Oben: Rohdaten. Unten links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten, rechts: Amplitudenspektren nach globalem Fit.

## Xanthonpeptid M02' in Wasser



**Abbildung G.3:** Kontaktbildung im Xanthonpeptid M02' mit der Sequenz Xan-G-S-NAla-S-R-G-CONH<sub>2</sub> ( $\lambda_{\text{pump}} = 340$  nm). Oben: Rohdaten. Unten links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten, rechts: Amplitudenspektren nach globalem Fit.

## Xanthonpeptid M04 in Wasser



**Abbildung G.4:** Kontaktbildung im Xanthonpeptid M04 mit der Sequenz Xan-G-S-G-S-G-S-NAla-S-R-G-CONH<sub>2</sub> ( $\lambda_{\text{pump}} = 340 \text{ nm}$ ). Oben: Rohdaten. Unten links: Transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten, rechts: Amplitudenspektren nach globalem Fit.

## H Natürliche Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Code	Struktur
Alanin	Ala	A	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $
Arginin	Arg	R	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{NH} \\    \\  \text{C}=\text{NH}_2^+ \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $
Asparagin	Asn	N	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{C} \\  / \quad \backslash \\  \text{H}_2\text{N} \quad \text{O}  \end{array}  $
Asparaginsäure	Asp	D	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{COO}^-  \end{array}  $
Asparagin oder Asparaginsäure	Asx	B	

## H Natürliche Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Code	Struktur
Cystein	Cys	C	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{SH}  \end{array}  $
Glutamin	Gln	Q	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{C} \\  / \quad \backslash \\  \text{H}_2\text{N} \quad \text{O}  \end{array}  $
Glutaminsäure	Glu	E	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{COO}^-  \end{array}  $
Glutamin oder Glutaminsäure	Glx	Z	
Glycin	Gly	G	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{H}  \end{array}  $
Histidin	His	H	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{C} \\  / \quad \backslash \\  \text{C} \quad \text{N}^+ \\     \quad / \quad \backslash \\  \text{HC} \quad \text{H} \quad \text{CH} \\    \\  \text{H}  \end{array}  $

Aminosäure	Abkürzung	Code	Struktur
Isoleucin	Ile	I	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{H}-\text{C}-\text{CH}_3 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $
Leucin	Leu	L	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH} \\  / \quad \backslash \\  \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3  \end{array}  $
Lysin	Lys	K	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{NH}_3^+  \end{array}  $
Methionin	Met	M	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{S} \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $

## H Natürliche Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Code	Struktur
Phenylalanin	Phe	F	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{C}_6\text{H}_5  \end{array}  $
Prolin	Pro	P	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \quad   \\  \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\  \quad   \\  \quad \text{C} \\  \quad   \\  \quad \text{H}_2  \end{array}  $
Serin	Ser	S	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\    \\  \text{H}  \end{array}  $
Threonin	Thr	T	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $
Tryptophan	Trp	W	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{C} \\  // \quad   \\  \text{HC} \quad \text{N} \\    \quad   \\  \text{H} \quad \text{C}_6\text{H}_4  \end{array}  $

Aminosäure	Abkürzung	Code	Struktur
Tyrosin	Tyr	Y	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{C}_6\text{H}_4 \\    \\  \text{OH}  \end{array}  $
Valin	Val	V	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\    \\  \text{CH} \\  / \quad \backslash \\  \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3  \end{array}  $

# Literaturverzeichnis

- [ABB00] ALTER, O. ; BROWN, P. O. ; BOTSTEIN, D.: Singular Value Decomposition for genome-wide expression data processing and modelling. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000), Nr. 18, S. 10101–10106
- [AP02] ATKINS, P.W. ; DE PAULA, J.: *Physical Chemistry, Seventh Edition.* Oxford : Oxford University Press, 2002
- [Arr89] ARRHENIUS, S.: Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. In: *Z. Phys. Chem.* 4 (1889), S. 226
- [AS70] ALFANO, R.R. ; SHAPIRO, S.L.: Observation of the self-phase modulation and small scale filaments in crystals and glasses. In: *Phys. Rev. Lett* 24 (1970), Nr. 11, S. 592–594
- [BA02] BAUMKETNER A, Hiwatari Y.: Diffusive dynamics of protein folding studied by molecular dynamics simulations of an off-lattice model. In: *Phys. Rev. E* 66 (2002), Nr. 1, S. 011905
- [BF65] BRANT, D. A. ; FLORY, P. J.: The Configuration of Random Polypeptide Chains. II. Theory. In: *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965), S. 2791–2800
- [BGSM00] BECKER, K. ; GROMER, S. ; SCHIRMER, R.H. ; MULLER, S.: Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. In: *Eur. J. Biochem.* 267 (2000), Nr. 20, S. 6118–6125
- [BH00] BELLINI, M. ; HÄNSCH, T.W.: Phase-locked white-light continuum pulses: toward a universal optical frequency-comb synthesizer. In: *Optics Letters* 25 (2000), Nr. 14, S. 1049–1051
- [BHB<sup>+</sup>03] BREDENBECK, J. ; HELBING, J. ; BEHRENDT, R. ; RENNER, C. ; MORODER, L. ; WACHTVEITL, J. ; HAMM, P.: Transient 2D-IR spectroscopy: Snapshots of the nonequilibrium ensemble during the picosecond conformational transition of a small peptide. In: *J. Phys. Chem. B* 107 (2003), Nr. 33, S. 8654–8660
- [BHS<sup>+</sup>03] BREDENBECK, J. ; HELBING, J. ; SIEG, A. ; SCHRADER, T. ; ZINTH, W. ; RENNER, C. ; BEHRENDT, R. ; MORODER, L. ; WACHTVEITL, J. ; HAMM, P.: Picosecond conformational transition and equilibration of a cyclic peptide. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003), Nr. 11, S. 6452–6457
- [BK99] BIERI, O. ; KIEFHABER, T.: Elementary Steps in Protein Folding. In: *Biol. Chem.* 380 (1999), S. 923–929

- 
- [BK00] BIERI, O. ; KIEFHABER, T.: Kinetic models in protein folding. In: PAIN, R. (Hrsg.): *Protein Folding: Frontiers in Molecular Biology*. Oxford : Oxford University Press, 2000, S. 34–64
- [BM79] BORTOLUS, P. ; MONTI, S.: Cis-trans photoisomerization of azobenzene. Solvent and triplet donors effects. In: *J. Phys. Chem.* 83 (1979), Nr. 6, S. 648–652
- [BMS01] BARTHEL, E.R. ; MARTINI, I.B. ; SCHWARTZ, B.J.: How does the solvent control electron transfer? Experimental and theoretical studies of the simplest charge transfer reaction. In: *J. Phys. Chem. B* 105 (2001), Nr. 49, S. 12230–12241
- [BOSW95] BRYNGELSON, J.D. ; ONUCHIC, J.N. ; SOCCI, N.D. ; WOLYNES, P.G.: Funnels, pathways, and the energy landscape of protein-folding — a synthesis. In: *Proteins* 21 (1995), Nr. 3, S. 167–195
- [BS54] BIRNBAUM, P.P. ; STYLE, D.W.: In: *Trans. Faraday Soc.* 50 (1954), S. 1192
- [BS97] BICOUT, D.J. ; SZABO, A.: First passage times, correlation functions, and reaction rates. In: *J CHEM PHYS* 106 (1997), Nr. 24, S. 10292–10298
- [BSL<sup>+</sup>03] BUSCAGLIA, M. ; SCHULER, B. ; LAPIDUS, L.J. ; EATON, W.A. ; HOFRICHTER, J.: Kinetics of intramolecular contact formation in a denatured protein. In: *J. Mol. Biol.* 332 (2003), Nr. 1, S. 9–12
- [BSMM99] BEHRENDT, R. ; SCHENK, M. ; MUSIOL, H.-J. ; MORODER, L.: Photomodulation of conformational states. Synthesis of cyclic peptides with backbone-azobenzene moieties. In: *J. Pept. Sci.* 5 (1999), Nr. 11, S. 519–529
- [BTCD84] BARAL-TOSH, S. ; CHATTOPADHYAY, S. K. ; DAS, P. K.: A laser flash photolysis study of paraquat reduction by photogenerated aromatic ketyl radicals and carbonyl triplets. In: *J. Phys. Chem.* 88 (1984), Nr. 7, S. 1404–1408
- [BU97] BISWAS, N. ; UMAPATHY, S.: Density Functional Calculations of Structures, Vibrational Frequencies, and Normal Modes of *trans*- and *cis*-Azobenzene. In: *J. Phys. Chem.* 101 (1997), S. 5555–5566
- [BWH<sup>+</sup>99] BIERI, O. ; WIRZ, J. ; HELLRUNG, B. ; SCHUTKOWSKI, M. ; DREWELLO, M. ; KIEFHABER, T.: The speed limit for protein folding measured by triplet-triplet energy transfer. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999), Nr. 17, S. 9597–9601
- [Car04] CARSTENS, H.: *Konformationsdynamik lichtschaltbarer Peptide: Molekulardynamiksimulationen und datengetriebene Modellbildung*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., 2004
- [CB91] CHEN, W.-G. ; BRAIMAN, M. S.: Kinetic analysis of time-resolved infrared difference spectra of the L and M intermediates of bacteriorhodopsin. In: *Photochem. Photobiol.* 54 (1991), S. 905–910
- [CC82] CONNORS, R. E. ; CHRISTIAN, W. R.: Origin of the Unusual Triplet-State Properties of Xanthone. In: *J. Phys. Chem.* 86 (1982), Nr. 9, S. 1524–1528

- [CCSR<sup>+</sup>02] CABRELE, C. ; CATTANI-SCHOLZ, A. ; RENNER, C. ; BEHRENDT, R. ; OESTERHELT, D. ; MORODER, L.: Photomodulation of the redox and folding adjuvant properties of bis(cysteinylyl) peptides. In: *Eur. J. Org. Chem.* 13 (2002), S. 2144–2150
- [CGM66] CURTIN, D. Y. ; GRUBBS, E. J. ; MCCARTHY, C. G.: . In: *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966), S. 2775–2786
- [CH86] CARMICHAEL, I. ; HUG, G.L.: Triplet-triplet absorption-spectra of organic-molecules in condensed phases. In: *J. Phys. Chem. Rev. Data* 15 (1986), Nr. 1, S. 1–250
- [CJMP89] CLOSS, G.L. ; JOHNSON, M.D. ; MILLER, J.R. ; PIOTROWIAK, P.: A connection between intramolecular long-range electron, hole, and triplet energy transfers. In: *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989), Nr. 10, S. 3751–3753
- [CKWK03] CHEN, E.F. ; KUMITA, J.R. ; WOOLLEY, G.A. ; KLIGER, D.S.: The kinetics of helix unfolding of an azobenzene cross-linked peptide probed by nanosecond time-resolved optical rotatory dispersion. In: *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003), Nr. 41, S. 12443–12449
- [CLWG03] CHANG, I.J. ; LEE, J.C. ; WINKLER, J.R. ; GRAY, H.B.: The protein-folding speed limit: Intrachain diffusion times set by electron-transfer rates in denatured Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>(His-33)-Zn-cytochrome c. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003), Nr. 7, S. 3838–3840
- [CP99] CATTANEO, P. ; PERSICO, M.: An *ab initio* study of the photochemistry of azobenzene. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 1 (1999), S. 4739–4739
- [CPB96] CAVALERI, J. J. ; PRATER, K. ; BOWMAN, R. M.: An investigation of the solvent dependence on the ultrafast intersystem crossing kinetics of xanthone. In: *Chem. Phys. Lett.* 259 (1996), S. 495–502
- [CPF88] CLOSS, G.L. ; PIOTROWIAK, J.M. ; FLEMING, G.R.: Determination of long-distance intramolecular triplet energy-transfer rates - a quantitative comparison with electron-transfer. In: *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988), Nr. 8, S. 2652–2653
- [CSRC<sup>+</sup>01] CATTANI-SCHOLZ, A. ; RENNER, C. ; CABRELE, C. ; BEHRENDT, R. ; OESTERHELT, D. ; MORODER, L.: Photoresponsive Cyclic Bis(cysteinylyl)peptides as Catalysts of Oxidative Protein Folding. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2001), Nr. 2, S. 289–292
- [DC04] DEBNATH, P. ; CHERAYIL, B.J.: Dynamics of chain closure: Approximate treatment of nonlocal interactions. In: *J. Chem. Phys.* 120 (2004), Nr. 5, S. 2482–2489
- [DCMV<sup>+</sup>03] DAVIOUD-CHARVET, E. ; MCLEISH, M.J. ; VEINE, D.M. ; GIEGEL, D. ; ARSCOTT, L.D. ; ANDRICOPULO, A.D. ; BECKER, K. ; MÜLLER, S. ; SCHIRMER, R.H. ; WILLIAMS, C.H. ; KENYON, G.L.: Mechanism-based inactivation of thio-redoxin reductase from *Plasmodium falciparum* by Mannich bases. Implication for cytotoxicity. In: *Biochem.* 42 (2003), Nr. 45, S. 13319–13330

- 
- [DDM<sup>+</sup>04] DIMITRIADIS, G. ; DRYSDALE, A. ; MYERS, J.K. ; ARORA, P. ; RADFORD, S.E. ; OAS, T.G. ; SMITH, D.A.: Microsecond folding dynamics of the F13W G29A mutant of the B domain of staphylococcal protein A by laser-induced temperature jump. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004), Nr. 11, S. 3809–3814
- [DE84] DOI, M. ; EDWARDS, S. F.: The Theory of Polymer Dynamics. Oxford : Oxford Science Publications, 1984, Kapitel 2.5, S. 24
- [Dex53] DEXTER, D. L.: . In: *J. Chem. Phys.* 21 (1953), S. 836
- [Dia04] DIAU, E. W. G.: A new trans-to-cis photoisomerization mechanism of azobenzene on the  $S_1(n,\pi^*)$  surface. In: *J. Phys. Chem. A* 108 (2004), Nr. 6, S. 950–956
- [Dil85] DILL, K. A.: Theory for the folding and stability of globular proteins. In: *Biochem.* 24 (1985), Nr. 6, S. 1501–1509
- [DLOY03] DAI, L.R. ; LIU, F. ; OU-YANG, Z.C.: Maximum-entropy calculation of the end-to-end distance distribution of force-stretched chains. In: *J. Chem. Phys.* 119 (2003), Nr. 15, S. 8124–8132
- [DMP<sup>+</sup>78] DAMSCHEN, D. E. ; MERRITT, C. D. ; PERRY, D. L. ; SCOTT, G. W. ; TALLEY, L. D.: Intersystem Crossing Kinetics of Aromatic Ketines in the Condensed Phase. In: *J. Phys. Chem.* 82 (1978), Nr. 21, S. 2268–2272
- [Dor65] DORFMAN, L. M.: The solvated electron in Organic Liquids in Solvated Electron. In: HART, E. J. (Hrsg.): *Advances in chemistry*. Washington, D.C. : American Chemical Society, 1965, S. 36
- [Dür01] DÜRR, D.: *Bohmsche Mechanik als Grundlage der Quantenmechanik*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2001. – 247–248 S
- [EAMM<sup>+</sup>03] ENGMAN, L. ; AL-MAHARIK, N. ; MCNAUGHTON, M. ; BIRMINGHAM, A. ; POWIS, G.: Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotelurium antioxidants. In: *Anti-Cancer Drugs* 14 (2003), Nr. 2, S. 153–161
- [EKS<sup>+</sup>01] ERNSTING, N. P. ; KOVLAENKO, S. A. ; SENYUSHKINA, T. ; SAAM, J. ; FARZTDINOV, V.: Wave-Packet-Assisted Decomposition of Femtosecond Transient Ultraviolet-Visible Absorption Spectra: Application to Excited-State Intramolecular Proton Transfer in Solution. In: *J. Phys. Chem. A* 105 (2001), S. 3443–3453
- [EPKS99] EVANS, C.H. ; PRUD'HOMME, N. ; KING, M. ; SCAIANO, J.C.: Calibration of the triplet-triplet absorption of xanthone as a microenvironment sensor. In: *J. Photochem. Photobiol. A* 121 (1999), Nr. 2, S. 105–110
- [ES63] EL-SAYED, M. A.: Spin-Orbit Coupling and the Radiationless Processes in Nitrogen Heterocyclics. In: *J. Chem. Phys.* 38 (1963), Nr. 12, S. 2834–2838
- [EY39] ECKART, C. ; YOUNG, G.: A Principal Axis Transformation for Non-Hermitian Matrices. In: *Bull. Am. Math. Soc.* (1939)

- [Eyr35] EYRING, H.: The activated complex in chemical reactions. In: *J. Chem. Phys.* 3 (1935), S. 107
- [FAT01] FUJINO, T. ; ARZHANSEV, S. Y. ; TAHARA, T.: Femtosecond Time-Resolved Fluorescence Study of Photoisomerization of *trans*-Azobenzene. In: *J. Phys. Chem. A* 105 (2001), S. 8123–8129
- [FAT02] FUJINO, T. ; ARZHANSEV, S. Y. ; TAHARA, T.: Femtosecond/Picosecond Time-Resolved Spectroscopy of *trans*-Azobenzene: Isomerization Mechanism Following  $S_2(\pi\pi^*) \rightarrow S_0$  Photoexcitation. In: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 75 (2002), S. 1031–1040
- [FF03] FERGUSON, N. ; FERSHT, A.R.: Early events in protein folding. In: *Curr. Op. Struct. Biol.* 13 (2003), Nr. 1, S. 75–81
- [Fie02] FIERZ, B.: *Dynamics of Intramolecular Contact Formation in Model Peptides*, Universität Basel, Schweiz, Diplomarbeit, 2002
- [Fie04] FIERZ, B. *persönliche Mitteilung*. 2004
- [FKSW02] FLINT, D. G. ; KUMITA, J. R. ; SMART, O. S. ; WOOLLEY, G. A.: Using an Azobenzene Cross-Linker to Either Increase or Decrease Peptide Helix Content upon Trans-to-Cis Photoisomerization. In: *Chem. Biol.* 9 (2002), S. 391–397
- [Fle86] FLEMING, G.R.: *Chemical Applications of Ultrafast Spectroscopy*. Oxford University Press, New York, 1986
- [Flo53] FLORY, P. J.: *Principles of Polymer Chemistry*. Ithaca : Cornell University Press, 1953
- [Flo69] FLORY, P. J.: *Statistical Mechanics of Chain Molecules*. München : Hanser Publishers, 1969
- [FMR76] FLEMING, G.R. ; MORRIS, J.M. ; ROBINSON, G.W.: Direct observation of rotational diffusion by picosecond spectroscopy. In: *Chemical Physics* 17 (1976), S. 91–100
- [FR95] FALBE, J. (Hrsg.) ; REGNITZ, M. (Hrsg.): *Römpe Chemie Lexikon*. Thieme Verlag Stuttgart, 1995
- [FT00] FUJINO, T. ; TAHARA, T.: Picosecond Time-Resolved Raman Study of *trans*-Azobenzene. In: *J. Phys. Chem. A* 104 (2000), S. 4203–4210
- [GGK<sup>+</sup>03] GIANNI, S. ; GUYDOSH, N.R. ; KHAN, F. ; CALDAS, T.D. ; MAYOR, U. ; WHITE, G.W.N. ; DEMARCO, M.L. ; DAGGETT, V. ; FERSHT, A.R.: Unifying features in protein-folding mechanisms. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003), Nr. 23, S. 13286–13291
- [GHW79] GREENE, B. I. ; HOCHSTRASSER, R. M. ; WEISMAN, R. B.: Picosecond transient spectroscopy of molecules in solution. In: *J. Chem. Phys.* 70 (1979), Nr. 3, S. 1247–1259

- 
- [GK65] GOLUB, G. H. ; KAHAN, W.: Calculating the singular values and pseudo-inverse of a matrix. In: *J. SIAM Numer. Anal., Ser. B* 2 (1965), Nr. 2, S. 205–224
- [GL78] GRAHAM, R. ; LEWIS, J. R.: Synthesis of 9-Oxoxanthen-2-carboxylic acids. In: *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1 (1978), S. 876–881
- [GR70] GOLUB, G. H. ; REINSCH, C.: Singular Value Decomposition and Least Squares Solutions. In: *Numer. Math.* 114 (1970), S. 403–420
- [GW76] GARNER, A. ; WILKINSON, F.: Laser photolysis studies of the triplet state of xanthone and its ketyl radical in fluid solution. In: *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 72 (1976), Nr. 2, S. 1010–1020
- [Har37] HARTLEY, G. S.: The Cis-form of Azobenzene. In: *Nature* 140 (1937), S. 281
- [Har38] HARTLEY, G. S.: The cis-Form of Azobenzene and the Velocity of the Thermal *cis*→*trans*-Conversion of Azobenzene and Some Derivatives. In: *J. Chem. Soc.* (1938), S. 633–642
- [Har99] HARTL, I.: *Sub-Pikosekunden-Spektroskopie der Schwingungsrelaxation von C-H-Streckschwingungen in polyatomaren Molekülen*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., 1999
- [HB62] HART, E. J. ; BOAG, J. W.: Absorption Spectrum of the Hydrated Electron in Water and in Aqueous Solutions. In: *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962), S. 4090–4095
- [HC72] HOLROYD, R. A. ; CAPELLOS, C.: Yields and reactions of lowest excited singlet and triplet states in the radiolysis of naphthalene and 1-methylnaphthalene. In: *J. Phys. Chem.* 76 (1972), Nr. 18, S. 2485–2891
- [HCD78] HO, C. N. ; CHRISTIAN, G. D. ; DAVIDSON, E. R.: Application of the Method of Rank Annihilation to Quantitative Analyses of Multicomponent Fluorescence Data from the Video Fluorometer. In: *Anal. Chem.* 50 (1978), S. 1108–1113
- [HFK<sup>+</sup>90] HOLZAPFEL, W. ; FINKELE, U. ; KAISER, W. ; OESTERHELT, D. ; SCHEER, H. ; STILZ, H. U. ; ZINTH, W.: Initial electron-transfer in the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990), S. 5168–5172
- [HGZ<sup>+</sup>02] HUANG, C.-Y. ; GETAHUN, Z. ; ZHU, Y. J. ; KLEMKE, J. W. ; DEGRADO, W. F. ; GAI, F.: Helix formation via conformation diffusion search. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002), S. 2788–2793
- [HH92] HENRY, E. R. ; HOFRICHTER, J.: Singular Value Decomposition: Application to Analysis of Experimental Data. In: *Meth. Enzymol.* 210 (1992), S. 129–192
- [HHGN02] HUDGINS, R. R. ; HUANG, F. ; GRAMLICH, G. ; NAU, W. M.: A Fluorescence-Based Method for Direct Measurement of Submicrosecond Intramolecular Contact Formation in Biopolymers: An Exploratory Study with Polypeptides. In: *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002), Nr. 4, S. 556–564

- [HHL89] HOFRICHTER, J. ; HENRY, E. R. ; LOZIER, R. H.: Photocycles of bacteriorhodopsin in light- and dark-adapted purple membrane studied by time-resolved absorption spectroscopy. In: *Biophys. J.* 56 (1989), S. 693–706
- [HHS<sup>+</sup>85] HOFRICHTER, J. ; HENRY, E. R. ; SOMMER, J. H. ; DEUTSCH, R. ; IKEDA-SAITO, M. ; YONETANI, T. ; EATON, W. A.: Nanosecond Optical Spectra of Iron-Cobalt Hybrid Hemoglobins: Geminate Recombination, Conformational Changes, and Intersubunit Communication. In: *Biochemistry* 24 (1985), S. 2667–2679
- [HHSE96] HAGEN, S.J. ; HOFRICHTER, J. ; SZABO, A. ; EATON, W.A.: Diffusion-limited contact formation in unfolded cytochrome c: Estimating the maximum rate of protein folding. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996), Nr. 21, S. 11615–11617
- [HLE<sup>+</sup>90] HUG, S. J. ; LEWIS, J. W. ; EINTERZ, C. M. ; THORGEIRSSON, T. E. ; KLIGER, D. S.: Nanosecond Photolysis of Rhodopsin: Evidence for a New, Blue-Shifted Intermediate. In: *Biochemistry* 29 (1990), S. 1475–1485
- [HMEC02] HIRT, R. P. ; MÜLLER, S. ; EMBLEY, T. M. ; COOMBS, G. H.: The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives. In: *Trends Parasitol.* 18 (2002), Nr. 7, S. 302–308
- [HMR03] HORNG, J.C. ; MOROZ, V. ; RALEIGH, D.P.: Rapid cooperative two-state folding of a miniature alpha-beta protein and design of a thermostable variant. In: *J. Mol. Biol.* 326 (2003), Nr. 4, S. 1261–1270
- [HN03] HUANG, F. ; NAU, W.M.: A conformational flexibility scale for amino acids in peptides. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003), Nr. 20, S. 2269–2272
- [Hoc96] HOCHÉ, R.: *Aufbau einer Vielkanaldetektion zur Messung transienter Absorptionsänderungen im Femtosekundenbereich und erste Anwendungen*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diplomarbeit, 1996
- [Hof84] VAN'T HOFF, J. H.: *Etudes de dynamique*. Amsterdam : Muller, 1884
- [Hol96] HOLZWARTH, A. R.: Data Analysis of Time-Resolved Measurements. In: AMESZ, J. (Hrsg.) ; HOFF, A. J. (Hrsg.): *Biophysical Techniques in Photosynthesis. Advances in Photosynthesis Research*. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1996, S. 75–92
- [HOZ97] HAMM, P. ; OHLINE, S.M. ; ZINTH, W.: Vibrational cooling after ultrafast photoisomerization of azobenzene by femtosecond infrared spectroscopy. In: *J. Chem. Phys.* 106 (1997), S. 519–529
- [HSB01] HENDLER, R. W. ; SHRAGER, R. I. ; BOSE, S.: Theory and Procedures for Finding a Correct Kinetic Model for the Bacteriorhodopsin Photocycle. In: *J. Phys. Chem. B* 105 (2001), S. 3319–3328
- [HSHE83] HOFRICHTER, J. ; SOMMER, J. H. ; HENRY, E. R. ; EATON, W. A.: Nanosecond absorption spectroscopy of hemoglobin: Elementary processes in kinetic cooperativity. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80 (1983), S. 2235–2239

- 
- [HSZW01] HUBER, R. ; SATZGER, H. ; ZINTH, W. ; WACHTVEITL, J.: Noncollinear optical parametric amplifiers with output parameters improved by the application of a white light continuum generated in CaF<sub>2</sub>. In: *Opt. Commun.* 194 (2001), S. 443–448
- [HTB90] HÄNGGI, P. ; TALKNER, P. ; BORKOVEC, M.: Reaction-rate theory - 50 years after Kramers. In: *Rev. Mod. Phys.* 62 (1990), Nr. 2, S. 251–341
- [Hub02] HUBER, R.: *Elektrontransfer an Farbstoff-Halbleiter-Grenzflächen*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., 2002
- [HV98] HÖGEMANN, C. ; VAUTHEY, E.: Investigation of the competition between electron and energy transfer in the quenching of aromatic ketones in the triplet state using picosecond transient grating spectroscopy. In: *J. Phys. Chem. A* 102 (1998), Nr. 49, S. 10051–10059
- [HX04] HX, Zhou: Polymer models of protein stability, folding, and interactions. In: *Biochemistry* 43 (2004), Nr. 8, S. 2141–2154
- [IIT<sup>+</sup>03] ITO, C. ; ITOIGAWA, M. ; TAKAKURA, T. ; RUANGRUNGSI, N. ; ENJO, F. ; TOKUDA, H. ; NISHINO, H. ; FURUKAWA, H.: Chemical constituents of *Garcinia fusca*: Structure elucidation of eight new xanthenes and their cancer chemopreventive activity. In: *J. Nat. Prod.* 66 (2003), Nr. 2, S. 200–205
- [IKSI03] IKEGAMI, T. ; KURITA, N. ; SEKINO, H. ; ISHIKAWA, Y.: Mechanism of cis-to-trans isomerization of azobenzene: Direct MD study. In: *J. Phys. Chem. A* 107 (2003), Nr. 22, S. 4555–4562
- [INS01] ISHIKAWA, T. ; NORO, T. ; SHODA, T.: Theoretical study of the photoisomerization of azobenzene. In: *J. Chem. Phys.* 115 (2001), S. 7503–7512
- [IT95] IKEDA, T. ; TSUTSUMI, O.: Optical Switching and Image Storage by Means of Azobenzene Liquid-Crystal Films. In: *Science* 268 (1995), S. 1873–1875
- [IYYH03] IKEDA, T. ; YONEYAMA, S. ; YAMAMOTO, T. ; HASEGAWA, M.: Holographic image storage in polymer azobenzene liquid crystals. In: *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 401 (2003), S. 149–159
- [Jae91] JAENICKE, R.: Protein folding - local structures, domains, subunits, and assemblies. In: *Biochem.* 30 (1991), Nr. 13, S. 3147–3161
- [JH03] JOZEFOWICZ, M. ; HELDT, J.R.: Preferential solvation of fluorenone and 4-hydroxyfluorenone in binary solvent mixtures. In: *Chem. Phys.* 294 (2003), S. 105–116
- [JHLS74] JR., R.W. A. ; HOCHSTRASSER, R.M. ; LUTZ, H. ; SCOTT, G. W.: Direct measurements of energy transfer between triplet states of molecules in liquids using picosecond pulses. In: *J. Chem. Phys.* 61 (1974), S. 2500–2506
- [JKD<sup>+</sup>04] JACOB, J. ; KRANTZ, B. ; DOTHAGER, R.S. ; THIYAGARAJAN, P. ; SOSNICK, T.R.: Early collapse is not an obligate step in protein folding. In: *J. Mol. Biol.* 338 (2004), Nr. 2, S. 369–382

- [Joh83] JOHNSON, M.L.: Evaluation and propagation of confidence-intervals in non-linear, asymmetrical variance spaces — analysis of ligand-binding data. In: *Biophys. J.* 44 (1983), Nr. 1, S. 101–106
- [JS50] JACOBSEN, H. ; STOCKMAYER, W. H.: Intramolecular reaction in polycondensations. I. The theory of linear systems. In: *J. Chem. Phys.* 18 (1950), S. 1600–1606
- [JSF88] J. SCHNITKER, T. J. R. ; FRIESNER, R.: A Priori Calculation of the Optical-Absorption Spectrum of the Hydrated Electron. In: *Phys. Rev. Lett.* 60 (1988), Nr. 5, S. 456–459
- [JTST97] JOCKUSCH, S. ; TIMPE, H.J. ; SCHNABEL, W. ; TURRO, N.J.: Photoinduced energy and electron transfer between ketone triplets and organic dyes. In: *J. Phys. Chem. A* 101 (1997), Nr. 4, S. 440–445
- [KFA<sup>+</sup>ss] KRIEGER, F. ; FIERZ, B. ; AXTHELM, F. ; JODER, K. ; MEYER, D. ; KIEFHABER, T.: Intrachain Diffusion in a Protein Loop Fragment From Carp Parvalbumin. In: *Chem. Phys.* (in press)
- [KFB<sup>+</sup>03] KRIEGER, F. ; FIERZ, B. ; BIERI, O. ; DREWELLO, M. ; KIEFHABER, T.: Dynamics of unfolded polypeptide chains as model for the earliest steps in protein folding. In: *J. Mol. Biol.* 332 (2003), Nr. 1, S. 265–274
- [KFD<sup>+</sup>85] KNOX, W.H. ; FORK, R.L. ; DOWNER, M.C. ; STOLEN, R.H. ; SHANK, C.V.: Optical pulse compression to 8 fs at a 5-kHz repetition rate. In: *Appl. Phys. Lett.* 46 (1985), S. 1120–1121
- [KHE04] KUBELKA, J. ; HOFRICHTER, J. ; EATON, W.A.: The protein folding 'speed limit'. In: *Curr. Op. Struct. Biol.* 14 (2004), Nr. 1, S. 76–88
- [Kie04] KIEFHABER, T. *persönliche Mitteilungen.* 2004
- [KJ03] KIM JH, Lee S.: Effects of chain stiffness on the quenching of an excited polymer by small quenchers. In: *J. Chem. Phys.* 119 (2003), Nr. 22, S. 11957–11970
- [Koe85] KOECHER, M.: *Lineare Algebra und analytische Geometrie.* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1985. – 199 S
- [Kra40] KRAMERS, H. A.: Brownian motion in a field of force and the diffusional model of chemical reactions. In: *Physica* 4 (1940), S. 284
- [KSW00] KUMITA, J.R. ; SMART, O.S. ; WOOLLEY, G.A.: Photo-control of helix content in a short peptide. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000), Nr. 8, S. 3803–3808
- [KW94] KARPLUS, M. ; WEAVER, D.L.: Protein-Folding Dynamics: The Diffusion-Collision Model and Experimental-Data. In: *Protein Sci.* 3 (1994), Nr. 4, S. 650–668
- [KYT04] KOMORI, K. ; YATAGAI, K. ; TATSUMA, T.: Activity regulation of tyrosinase by using photoisomerizable inhibitors. In: *J. Biotechnol.* 108 (2004), Nr. 1, S. 11–16

- 
- [LCD02] LU, Y.-C. ; CHANG, C.W. ; DIAU, E. W.-G.: Femtosecond fluorescence dynamics of *trans*-azobenzene in hexane on excitation to the  $S_1(n, \pi^*)$  state. In: *J. Chin. Chem. Soc. Taip.* 49 (2002), S. 693–701
- [LEH00] LAPIDUS, L. J. ; EATON, W. A. ; HOFRICHTER, J.: Measuring the rate of intramolecular contact formation in polypeptides. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000), Nr. 13, S. 7220–7225
- [LEH01] LAPIDUS, L.J. ; EATON, W.A. ; HOFRICHTER, J.: Dynamics of intramolecular contact formation in polypeptides: Distance dependence of quenching rates in a room-temperature glass. In: *Phys. Rev. Lett.* 87 (2001), Nr. 25, S. 258101
- [LF96] LIDE, D.R. (Hrsg.) ; FREDERIKSE, H.P.R. (Hrsg.): *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 76<sup>th</sup> edition.* Boca Raton, New York, London, Tokyo : CRC Press, 1996
- [LJ79] LESSING, H.E. ; VON JENA, A.: Continuous Picosecond Spectroscopy of Dyes. In: STITCH, M.L. (Hrsg.): *Laser Handbook.* North-Holland Publishing Company, 1979, Kapitel B6, S. 753–847
- [LLL04] LIEN, P.J. ; LIN, H.M. ; LEE, M.J.: Excess molar enthalpies for binary mixtures of ethanol plus benzene, plus cyclohexane, plus propyl acetate and 1-propanol + benzene, plus cyclohexane, plus heptane at 348.15 K. In: *Fluid Phase Equilibria* 215 (2004), S. 187–193
- [LMSFJ00] LEY, C. ; MORLET-SAVARY, F. ; FOUASSIER, J. P. ; JACQUES, P.: The spectral shape dependence of xanthone triplet-triplet absorption on solvent polarity. In: *J. Photochem. Photobiol. A* 137 (2000), S. 87–92
- [LMSJF00] LEY, C. ; MORLET-SAVARY, F. ; JACQUES, P. ; FOUASSIER, J. P.: Solvent dependence of the intersystem crossing kinetics of thioxanthone. In: *Chem. Phys.* 255 (2000), S. 335–346
- [LNM94] LUTHER, G.G. ; NEWELL, A.C. ; MOLONEY, J.V.: Short-pulse conical emission and spectral broadening in normally dispersive media. In: *OPTICS LETTERS* 19 (1994), Nr. 11, S. 789–791
- [LSE<sup>+</sup>02] LAPIDUS, L. J. ; STEINBACH, P. J. ; EATON, W. A. ; SZABO, A. ; HOFRICHTER, J.: Effects of Chain Stiffness on the Dynamics of Loop Formation in Polypeptides. Appendix: Testing a 1-Dimensional Diffusion Model for Peptide Dynamics. In: *J. Phys. Chem. B* 106 (2002), S. 11628–11640
- [Lut01] LUTZ, I.: *Vielkanal-Femtosekunden-Spektroskopie der Primärreaktionen von archaebakteriellen Retinalproteinen im sichtbaren Spektralbereich,* Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., 2001
- [LWJL00] LENNON, B. W. ; WILLIAMS JR., C. H. ; LUDWIG, M. L.: Twists in Catalysis: Alternating Conformations of Escherichia coli Thioredoxin reductase. In: *Science* 289 (2000), S. 1190–1194

- [LWP<sup>+</sup>99] LOCHBRUNNER, S. ; WILHELM, T. ; PIEL, J. ; SPÖRLEIN, S. ; RIEDLE, E.: Sub-20-fs tunable pulses in the visible and NIR by noncollinear optical parametric amplification (NOPA). In: FEJER, M.M. (Hrsg.) ; INJEYAN, H. (Hrsg.) ; KELLER, U. (Hrsg.): *OSA Trends in Optics and Photonics* Bd. 26. Washington, DC, 1999, S. 366
- [LYHM96] LEDNEV, I.K. ; YE, T. ; HESTER, R.E. ; MOORE, J.N.: Femtosecond Time-Resolved UV-Visible Absorption Spectroscopy of *trans*-Azobenzene in Solution. In: *J. Phys. Chem.* 100 (1996), S. 13338–13341
- [LYM<sup>+</sup>98] LEDNEV, I.K. ; YE, T. ; MATOUSEK, P. ; TOWRIE, M. ; FOGGI, P. ; NEUWAHL, F.V.R. ; UMAPATHY, S. ; HESTER, R.E. ; MOORE, J.N.: Femtosecond time-resolved UV-Visible absorption spectroscopy of *trans*-azobenzene: dependence on excitation wavelength. In: *Chem. Phys. Lett.* 290 (1998), S. 68–74
- [LZN<sup>+</sup>02] LORENC, M. ; ZIOLEK, M. ; NASKRECKI, R. ; KAROLCZAK, J. ; KUBICKI, J. ; MACIEJEWSKI, A.: Artifacts in femtosecond transient absorption spectroscopy. In: *Appl. Phys. B* 74 (2002), S. 19–27
- [Man04] MANDELSHTAM, V.A. *persönliche Mitteilung durch W. Zinth.* 2004
- [MBF67] MILLER, W. G. ; BRANT, D. A. ; FLORY, P. J.: Random coil configurations of polypeptide chains. In: *J. Mol. Biol.* 23 (1967), S. 67–80
- [MCH93] MUROV, S. L. (Hrsg.) ; CARMICHAEL, I. (Hrsg.) ; HUG, G. L. (Hrsg.): *Handbook of Photochemistry.* New York, Basel, Hong-Kong : Marcel Dekker, Inc., 1993
- [Mel69] MELHUISE, W. H.: Low-Energy Triplet-Triplet Transitions in Naphthalene and Some Monosubstituted Derivatives. In: *J. Chem. Phys.* 50 (1969), S. 2779
- [MH87] MCCAMMON, J. A. ; HARVEY, S. C.: *Dynamics of proteins and nucleic acids.* Cambridge : Cambridge University Press, 1987
- [MM89] M. MARONCELLI, G. R. F.: Polar Solvent Dynamics and Electron-Transfer Reactions. In: *Science* 243 (1989), S. 1674–1681
- [MOP82] MONTI, S. ; ORLANDI, G. ; PALMIERI, P.: Features of the photochemically active state surfaces of azobenzene. In: *Chemical Physics* 71 (1982), S. 87–99
- [MP91] MÜLLER, K.-H. ; PLESSER, Th.: Variance reduction by simultaneous multi-exponential analysis of data sets from different experiments. In: *Eur. Biophys. J.* 19 (1991), S. 231–240
- [MP00] MUSTACICH, D. ; POWIS, G.: Thioredoxin reductase. In: *Biochem. J.* 346 (2000), S. 1–8
- [MSLJ<sup>+</sup>99] MORLET-SAVARY, F. ; LEY, C. ; JACQUES, P. ; WIEDER, F. ; FOUASSIER, J. P.: Time dependent solvent effects on the  $T_1$ – $T_n$  absorption spectra of thioxanthone: a picosecond investigation. In: *J. Photochem. Photobiol. A* 126 (1999), S. 7–14

- 
- [Nag81] NAGLE, J. F.: Upon the optimal graphical representation of flash data from photochemical systems obeying first order kinetics. In: *Photochem. Photobiol.* 33 (1981), S. 937–939
- [Näg98] NÄGELE, T.: *Ultraschnelle Photoisomerisierung von Azobenzolen*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., 1998
- [NDAR03] NIETO-DRAGHI, C. ; AVALOS, J.B. ; ROUSSEAU, B.: Transport properties of dimethyl sulfoxide aqueous solutions. In: *J. Chem. Phys.* 119 (2003), Nr. 9, S. 4782–4789
- [NHZW97] NÄGELE, T. ; HOCHÉ, R. ; ZINTH, W. ; WACHTVEITL, J.: Femtosecond photoisomerization of cis-azobenzene. In: *Chem. Phys. Lett.* 272 (1997), S. 489–495
- [NMS67] NURMUKHAMETOV, R. N. ; MILESHINA, L. A. ; SHIGORIN, D. N.: . In: *Opt. i Spekt.* 22 (1967), S. 740
- [NT03] NADA, T. ; TERAZIMA, M.: A novel method for study of protein folding kinetics by monitoring diffusion coefficient in time domain. In: *Biophys. J.* 85 (2003), Nr. 3, S. 1876–1881
- [NYW<sup>+</sup>03] NICHOLSON, J.W. ; YAN, M.F. ; WISK, P. ; FLEMING, J. ; DIMARCELLO, F. ; MONBERG, E. ; YABLON, A. ; JORGENSEN, C. ; VENG, T.: All-fiber, octave-spanning supercontinuum. In: *Opt. Lett.* 28 (2003), Nr. 8, S. 643–645
- [OIO90] ONUMA, S. ; IIJIMA, K. ; OONISHI, I.: Structure of xanthone. In: *Acta Crystallogr. C* 46 (1990), Nr. 9, S. 1725–1727
- [OS96] OTT, J.B. ; SIPOWSKA, J.T.: Applications of calorimetry to nonelectrolyte solutions. In: *J. Chem. Eng. Data* 41 (1996), S. 987–1004
- [OW04] ONUCHIC, J. N. ; WOLYNES, P. G.: Theory of protein folding. In: *Curr. Op. Struct. Biol.* 14 (2004), Nr. 1, S. 70–75
- [OWLS95] ONUCHIC, J.N. ; WOLYNES, P.G. ; LUTHEYSCHULTEN, Z. ; SOCCI, N.D.: Toward an outline of the topography of a realistic protein-folding funnel. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), Nr. 8, S. 3626–3630
- [PH71] POWNALL, H. J. ; HUBER, J. R.: Absorption and Emission Spectra of Aromatic Ketones and Their Medium Dependence. Excited States of Xanthone. In: *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971), Nr. 24, S. 6249–6436
- [Plö04] PLÖTZ, E. *persönliche Mitteilung*. 2004
- [PMH90] PRIMAS, H. ; MÜLLER-HEROLD, U.: *Elementare Quantenchemie*. 2. Stuttgart : B. G. Teubner Verlag, 1990
- [PMMK03] PAWLIK, G. ; MITUS, A.C. ; MINIEWICZ, A. ; KAJZAR, F.: Kinetics of diffraction gratings formation in a polymer matrix containing azobenzene chromophores: Experiments and Monte Carlo simulations. In: *J. Chem. Phys.* 119 (2003), Nr. 13, S. 6789–6801

- [Por03] PORTMAN, J. J.: Non-Gaussian dynamics from a simulation of a short peptide: Loop closure rates and effective diffusion coefficients. In: *J. Chem. Phys.* 118 (2003), Nr. 5, S. 2381–2391
- [PR96] PASTOR RW, Szabo A.: Diffusion limited first contact of the ends of a polymer: Comparison of theory with simulation. In: *J. Chem. Phys.* 105 (1996), Nr. 9, S. 3878–3882
- [PTVF92] PRESS, W. H. ; TEUKOLSKY, S. A. ; VETTERLING, W. T. ; FLANNERY, B. P.: *Numerical recipes in C: The art of scientific computing*. Cambridge University Press, Cambridge, 1992
- [PTW01] PORTMAN, J. J. ; TAKADA, S. ; WOLYNES, P. G.: Microscopic theory of protein folding rates. II. Local reaction coordinates and chain dynamics. In: *J. Chem. Phys.* 114 (2001), Nr. 11, S. 5082–5096
- [RAL74] RONAYETTE, J. ; ARNAUD, R. ; LEMAIRE, J.: In: *Can. J. Chem.* 52 (1974), S. 1848–1857
- [Rau73] RAU, H.: Spektroskopische Eigenschaften organischer Azoverbindungen. In: *Angew. Chem.* 6 (1973), S. 248–258
- [Rau84] RAU, H.: Further evidence for rotation in the  $\pi, \pi^*$  and inversion in the  $n, \pi^*$  photoisomerization of azobenzenes. In: *Journal of Photochemistry* 26 (1984), S. 221–225
- [Rau90] RAU, H.: Azo Compounds. In: DÜRR, H. (Hrsg.) ; BOUAS-LAURENT, H. (Hrsg.): *Studies in Organic Chemistry, Photochromism, Molecules and Systems* Bd. 40. Elsevier-Verlag, Amsterdam, 1990, Kapitel 4, S. 165–192
- [RBHM02] RENNER, C. ; BEHRENDT, R. ; HEIM, N. ; MORODER, L.: Photomodulation of Conformational States. III. Water-Soluble Bis-Cysteinyl-Peptides with (4-Aminomethyl) phenylazobenzoic Acid as Backbone Constituent. In: *Biopolymers* 63 (2002), S. 382–393
- [RBP<sup>+</sup>00] RIEDLE, E. ; BEUTTER, M. ; PIEL, J. ; SCHENKL, S. ; SPÖRLEIN, S. ; ZINTH, W.: Generation of 10 to 50 fs pulses tunable through all of the visible and the NIR. In: *Applied Physics B* 71 (2000), S. 457–465
- [RBS<sup>+</sup>00] RENNER, C. ; BEHRENDT, R. ; SPÖRLEIN, S. ; WACHTVEITL, J. ; MORODER, L.: Photomodulation of Conformational States. I. Mono- and Bicyclic Peptides with (4-Amino)-phenylazobenzoic Acid as Backbone Constituent. In: *Biopolymers* 54 (2000), S. 489–500
- [RCBM00] RENNER, C. ; CRAMER, J. ; BEHRENDT, R. ; MORODER, L.: Photomodulation of Conformational States. II. Mono- and Bicyclic Peptides with (4-Aminomethyl)-phenylazobenzoic Acid as Backbone Constituent. In: *Biopolymers* 54 (2000), S. 501–514
- [RL82] RAU, H. ; LÜDDECKE, E.: On the rotation-inversion controversy on photoisomerization of azobenzenes. Experimental proof of inversion. In: *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982), S. 1616–1620

- 
- [RLH92] ROELOFS, T. A. ; LEE, C.-H. ; HOLZWARTH, A. R.: Global target analysis of picosecond chlorophyll fluorescence kinetics from pea chloroplasts. In: *Biophys. J.* 61 (1992), S. 1147–1163
- [RS88] RAU, H. ; SHEN, Y. Q.: Photoisomerization of sterically hindered azobenzenes. In: *J. Photochem. Photobiol. A* 42 (1988), Nr. 2–3, S. 321–327
- [RSH00] RATNER, V. ; SINEV, M. ; HAAS, E.: Determination of intramolecular distance distribution during protein folding on the millisecond timescale. In: *J. Mol. Biol.* 299 (2000), Nr. 5, S. 1363–1371
- [RSSAN95] REED, M.K. ; STEINER-SHEPARD, M.K. ; ARMAS, M.S. ; NEGUS, D.K.: Microjoule-energy ultrafast optical parametric amplifiers. In: *J. Opt. Soc. Am.* 12 (1995), Nr. 11, S. 2229 ff.
- [SB62] STRICKLER, S.J. ; BERG, R.A.: Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules. In: *J. Chem. Phys.* 37 (1962), S. 814–822
- [Sca80] SCAIANO, J. C.: Solvent effects in the photochemistry of xanthone. In: *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980), Nr. 26, S. 7747–7753
- [Sch07a] SCHMIDT, E.: Zur Theorie der linearen und nicht linearen Integralgleichungen. I. Teil: Entwicklung willkürlicher Funktionen nach Systemen vorgeschriebener. In: *Math. Ann.* 63 (1907), S. 433–476
- [Sch07b] SCHMIDT, E.: Zur Theorie der linearen und nicht linearen Integralgleichungen. Zweite Abhandlung: Auflösung der allgemeinen linearen Integralgleichung. In: *Math. Ann.* 64 (1907), S. 161–174
- [Sch04] SCHMIDT, B. *persönliche Mitteilung.* 2004
- [SCS<sup>+</sup>02] SPÖRLEIN, S. ; CARSTENS, H. ; SATZGER, H. ; RENNER, C. ; BEHRENDT, R. ; MORODER, L. ; TAVAN, P. ; ZINTH, W. ; WACHTVEITL, J.: Ultrafast spectroscopy reveals subnanosecond peptide conformational dynamics and validates molecular dynamics simulation. In: *P. Natl. Acad. Sci USA* 99 99 (2002), S. 7998–8002
- [SD03] SCHONBRUN, J. ; DILL, K.A.: Fast protein folding kinetics. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003), Nr. 22, S. 12678–12682
- [SDAG95] SCAIANO, J.C. ; DELUCAS, N.C. ; ANDRAOS, J. ; GARCIA, H.: Determination of the distance for triplet energy-transfer in the faujasite NaY. In: *Chem. Phys. Lett.* 233 (1995), Nr. 1–2, S. 5–8
- [SDCK77] SCHULZE, F.W. ; DETRIK, H.J. ; CAMENGA, H.K. ; KLINGE, H.: In: *Z. Phys. Chem. NF* 107 (1977), S. 1–19
- [Sed99] SEDLAR, T.: *Resonanz-Raman-Spektroskopie an Azobenzolen*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diplomarbeit, 1999
- [SF67] SCHIMMEL, P. R. ; FLORY, P. J.: Conformational energy and configurational statistics of poly-L-proline. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58 (1967), S. 52–59

- [SGMB87] SIAMPIRINGUE, N. ; GUYOT, C. ; MONTI, S. ; BORTOLUS, P.: In: *J. Photochem.* 37 (1987), S. 185–188
- [SH82] SHRAGER, R. I. ; HENDLER, R. W.: Titration of Individual Components in a Mixture with Resolution of Difference Spectra, pKs, and Redox Transitions. In: *Anal. Chem.* 54 (1982), S. 1147–1152
- [Shi67] SHIMIZU, F.: Frequency Broadening in Liquids by a Short Light Pulse. In: *Phys. Rev. Lett.* 19 (1967), Nr. 19, S. 1097–1100
- [SKS98] SIKORSKI, M. ; KRYSKOWIAK, E. ; STEER, R.P.: The Kinetics of Fast Fluorescence Quenching Processes. In: *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 117 (1998), S. 1–16
- [SLM03] SADQI, M. ; LAPIDUS, L.J. ; MUNOZ, V.: How fast is protein hydrophobic collapse? In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003), Nr. 21, S. 12117–12122
- [Smi03] SMITH, A.: Nature insight — protein misfolding. In: *Nature* 426 (2003), Nr. 6968, S. 883–909
- [Spö01] SPÖRLEIN, S.: *Femtosekunden-Spektroskopie schnellster Strukturänderungen in Peptid-Chromophor-Komplexen*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., 2001
- [SQL<sup>+</sup>03] SCHULTZ, Th. ; QUENNEVILLE, J. ; LEVINE, B. ; TONIOLE, A. ; MARTINEZ, T. J. ; LOCHBRUNNER, S. ; SCHMITT, M. ; SHAFFER, J. P. ; ZGIERSKI, M. Z. ; STOLOW, A.: Mechanism and Dynamics of Azobenzene Photoisomerization. In: *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003), S. 8098–8099
- [SS97] STEWART, G. W. ; SUN, Ji-Guang: *Matrix Perturbation Theory*. Academic Press, 1997
- [SSB91] SCHER, H. ; SHLESINGER, M. F. ; BENDLER, J. T.: Time-Scale Invariance in Transport and Relaxation. In: *Phys. Today* 44 (1991), Nr. 1, S. 26–34
- [SSM<sup>+</sup>04] SCHMIDT, B. ; SOBOTTA, C. ; MALKMUS, S. ; LAIMGRUBER, S. ; BRAUN, M. ; ZINTH, W. ; GILCH, P.: Femtosecond Fluorescence and Absorption Dynamics of an Azobenzene with a Strong Push-Pull Substitution. In: *J. Phys. Chem. A* 108 (2004), S. 4399–4404
- [SSR<sup>+</sup>03] SATZGER, H. ; SPÖRLEIN, S. ; ROOT, C. ; WACHTVEITL, J. ; ZINTH, W. ; GILCH, P.: Fluorescence Spectra of trans- and cis-azobenzene — Emission from the Franck-Condon state. In: *Chem. Phys. Lett.* 372 (2003), S. 216–223
- [SSS80] SZABO, A. ; SCHULTEN, K. ; SCHULTEN, Z.: First passage time approach to diffusion controlled reactions. In: *J. Chem. Phys.* 72 (1980), S. 4350–4357
- [Ste] STEWART, G. W. *Perturbation Theory for the Singular Value Decomposition*
- [Ste62] STEGEMEYER, H.: In: *J. Phys. Chem.* 66 (1962), S. 2555–2560

- 
- [Ste73] STEWART, G. W.: *Introduction to Matrix Computations*. Academic Press, 1973
- [Ste79] STEWART, G. W.: A Note on the Perturbation of Singular Values. In: *Lin. Alg. Appl.* 28 (1979), S. 213–216
- [Ste84] STEWART, G. W.: A Second Order Perturbation Expansion for Small Singular Values. In: *Lin. Alg. Appl.* 56 (1984), S. 231–235
- [Ste90] STEWART, G. W.: Stochastic Perturbation Theory. In: *SIAM Rev.* 32 (1990), Nr. 4, S. 579–610
- [Str94] STRYER, Lubert: *Biochemie*. 2. korr. Nachdruck der vierten. Spektrum Akad. Verlag, 1994
- [SU89] STEINER, U.E. ; ULRICH, T.: Magnetic Field Effects in Chemical Kinetics and Related Phenomena. In: *Chem. Rev.* 89 (1989), S. 51–146
- [SWZ97] SEEL, M. ; WILDERMUTH, E. ; ZINTH, W.: A multichannel detection system for application in ultra-fast spectroscopy. In: *Meas. Sci. Technol.* 8 (1997), S. 449–452
- [Syl89] SYLVESTER, J. J.: On the reduction of a bilinear quantic of the  $n^T H$  order to the form of a sum of  $n$  products by a double orthogonal substitution. In: *Mess. Math.* 19 (1889), S. 42–46
- [SZ03] SATZGER, H. ; ZINTH, W.: Visualization of transient absorption dynamics - towards a qualitative view of complex reaction kinetics. In: *Chem. Phys.* 295 (2003), S. 287–295
- [TF67] TALATY, E.R. ; FARGO, J.C.: In: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1967), S. 65–66
- [TFB03] TZANKOV, P. ; FIEBIG, T. ; BUCHVAROV, I.: Tunable femtosecond pulses in the near-ultraviolet from ultrabroadband parametric amplification. In: *Appl. Phys. Lett.* 82 (2003), Nr. 4, S. 517–519
- [TG91] TUTTLE, T. R. ; GOLDEN, S.: Solvated Electrons: What Is Solvated? In: *J. Phys. Chem.* 95 (1991), S. 5727–5736
- [THH77] TRAETTEBERG, M. ; HILMO, I. ; HAGEN, K.: A Gas Electron Diffraction Study of the Molecular Structure of Trans-Azobenzene. In: *J. Mol. Struct.* 39 (1977), S. 231
- [TS88] TÖRNIG, W. ; SPELLUCCI, P.: *Numerische Mathematik für Ingenieure und Physiker*. Bd. I. Second. Springer Verlag, Berlin, New York, Tokyo, 1988. – 328–334 S
- [Tur78] TURRO, N.J. (Hrsg.): *Modern Molecular Photochemistry*. Menlo Park, California : The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., 1978
- [USM<sup>+</sup>02] UENO, A. ; SHIMIZU, T. ; MIHARA, H. ; HAMASAKI, K. ; PITCHUMANI, K.: Supramolecular chemistry of cyclodextrin-peptide hybrids: Azobenzene-tagged peptides. In: *J. Incl. Phenom. Macro.* 44 (2002), Nr. 1–4, S. 49–52

- [Vac94] VACCARO, R. J.: A Second-Order Perturbation Expansion for the SVD. In: *SIAM J. Matrix Anal. Appl.* 15 (1994), Nr. 2, S. 661–671
- [VJR<sup>+</sup>95] VAJDA, S. ; JIMENEZ, R. ; ROSENTHAL, S.J. ; FIDLER, V. ; FLEMING, G.R. ; CASTNER, E.W.: Femtosecond to nanosecond solvation dynamics in pure water and inside the gamma-cyclodextrin cavity. In: *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 91 (1995), Nr. 5, S. 867–873
- [VMOD04] VU, D.M. ; MYERS, J.K. ; OAS, T.G. ; DYER, R.B.: Probing the folding and unfolding dynamics of secondary and tertiary structures in a three-helix bundle protein. In: *Biochem.* 43 (2004), Nr. 12, S. 3582–3589
- [WF73] WILEMSKI, G. ; FIXMAN, M.: General theory of diffusion-controlled reactions. In: *J. Chem. Phys.* 58 (1973), Nr. 9, S. 4009–4019
- [WJAM<sup>+</sup>00] WILLIAMS JR., C. H. ; ARSCOTT, L. D. ; MÜLLER, S. ; LENNON, B. W. ; LUDWIG, M. L. ; WANG, P.-F. ; VEINE, D. M. ; BECKER, K. ; SCHIRMER, R. H.: Thioredoxin reductase. Two modes of catalysis have evolved. In: *Eur. J. Biochem.* 267 (2000), S. 6110–6117
- [WK99] WAGNER, P.J. ; KLÁN, P.: Intramolecular triplet energy transfer in flexible molecules: Electronic, dynamic, and structural aspects. In: *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999), Nr. 41, S. 9626–9635
- [WKK<sup>+</sup>00] WANG, X.H. ; KOFRON, W.G. ; KONG, S.Q. ; RAJESH, C.S. ; MODARELLI, D.A. ; LIM, E.C.: Transient absorption probe of intermolecular triplet excimer of naphthalene in fluid solutions: Identification of the species based on comparison to the intramolecular triplet excimers of covalently-linked dimers. In: *J. Phys. Chem. A* 104 (2000), Nr. 7, S. 1461–1465
- [WNP<sup>+</sup>97] WACHTVEITL, J. ; NÄGELE, T. ; PUELL, B. ; ZINTH, W. ; KRÜGER, M. ; RUDOLPH-BÖHNER, S. ; OESTERHELT, D. ; MORODER, L.: Ultrafast Photoisomerisation of Azobenzene Compounds. In: *J. Photochem. Photobiol.* 105 (1997), S. 283–288
- [WOT95] WOLYNES, P.G. ; ONUCHIC, J.N. ; THIRUMALAI, D.: Navigating the Folding Routes. In: *Science* 267 (1995), Nr. 5204, S. 1619–1620
- [WPR97] WILHELM, T. ; PIEL, J. ; RIEDLE, E.: Sub-20-fs pulses tunable across the visible from a blue-pumped single-pass noncollinear parametric converter. In: *Optics Letters* 22 (1997), Nr. 19, S. 1494–1497
- [WSS<sup>+</sup>04] WACHTVEITL, J. ; SPÖRLEIN, S. ; SATZGER, H. ; FONROBERT, B. ; RENNER, C. ; BEHRENDT, R. ; OESTERHELT, D. ; MORODER, L. ; ZINTH, W.: Ultrafast Conformational Dynamics in Cyclic Azobenzene Peptides of Increased Flexibility. In: *Biophys. J.* 86 (2004), S. 2350–2362
- [WZ02] WANG ZS, Makarov D.: Rate of intramolecular contact formation in peptides: The loop length dependence. In: *J. Chem. Phys.* 117 (2002), Nr. 9, S. 4591–4593

- 
- [WZG08] WANG, T. ; ZHU, Y. ; GAI, F.: Folding of A Three-Helix Bundle at the Folding Speed Limit. In: *J. Phys. Chem.* 108 (108), Nr. 12, S. 3694–3697
- [WZG04] WANG, T. ; ZHU, Y.J. ; GAI, F.: Folding of a three-helix bundle at the folding speed limit. In: *J. Phys. Chem. B* 108 (2004), Nr. 12, S. 3694–3697
- [YG03] YANG, W.Y. ; GRUEBELE, M.: Folding at the speed limit. In: *Nature* 423 (2003), Nr. 6936, S. 193–197
- [YH02] YEH, In-C. ; HUMMER, G.: Peptide Loop-Closure Kinetics from Microsecond Molecular Dynamics Simulations in Explicit Solvent. In: *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002), Nr. 23, S. 6563–6568
- [ZAM<sup>+</sup>03] ZHU, Y. J. ; ALONSO, D. O. V. ; MAKI, K. ; HUANG, C.-Y. ; LAHR, S. J. ; DAGGETT, V. ; RODER, H. ; DEGRADO, W. F. ; GAI, F.: Ultrafast folding of alpha3D, a de novo designed three-helix bundle protein. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 10 (2003), S. 15486–15491
- [ZBK<sup>+</sup>03] ZHANG, Z. H. ; BURNS, D. C. ; KUMITA, J.R. ; SMART, O.S. ; WOOLLEY, G.A.: A water-soluble azobenzene cross-linker for photocontrol of peptide conformation. In: *Bioconjugate Chem.* 14 (2003), Nr. 4, S. 824–829
- [Zew00] ZEWAİL, A.H.: Femtochemistry: Atomic-Scale Dynamics of the Chemical Bond. In: *J. Phys. Chem. A* 104 (2000), S. 5560–5694
- [Zha03] ZHAO, Y.: Design and study of new azobenzene liquid crystal/polymer materials. In: *Chin. J. Polymer Sci.* 21 (2003), Nr. 6, S. 621–629
- [Zhe03] ZHELTIKOV, A.: Supercontinuum generation. In: *Appl. Phys. B* 77 (2003), Nr. 2–3, S. 143–147
- [ZHKK04] ZABADAL, M. ; HEGER, D. ; KLAN, P. ; KRIZ, Z.: Intramolecular triplet-triplet energy transfer in short flexible bichromophoric amino acids, dipeptides and carboxylic acid diester. In: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69 (2004), Nr. 4, S. 776–796
- [Zho03] ZHOU, H.X.: Theory for the rate of contact formation in a polymer chain with local conformational transitions. In: *J. Chem. Phys.* 118 (2003), Nr. 4, S. 2010–2015
- [ZK98] ZINTH, W. ; KÖRNER, H. J.: *Physik III. Optik, Quantenphänomene und Aufbau der Atome*. 3. München, Wien : Oldenbourg, 1998
- [Zur92] ZUREK, M.: *Entwicklung und Charakterisierung eines Meßsystems zur präzisen Detektion kurzer Lichtimpulse*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diplomarbeit, 1992
- [Zwa74] ZWANZIG, R.: Theoretical basis for the Rouse-Zimm model in polymer solution dynamics. In: *J. Chem. Phys.* 60 (1974), Nr. 7, S. 2717–2720
- [Zwa97] ZWANZIG, R.: Two-state models of protein folding kinetics. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), Nr. 1, S. 148–150

- [ZZ91] ZHOU, H.-X. ; ZWANZIG, R.: A rate process with an entropic barrier. In: *J. Chem. Phys.* 94 (1991), Nr. 9, S. 6147–6152

# Abkürzungen

APB	(4-Aminophenylazo)benzoesäure
AMPB	(4-(Aminomethyl)phenylazo)benzoesäure
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
Att.	Attenuator
bcAMPB	bizyklisches AMPB
BBO	$\beta$ -Barium Borat
BS	Beam-splitter
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie (Rinderwahnsinn)
cAMBP	monozyklisches AMPB
CHARMM	Chemistry at HARvard Molecular Mechanics
CT	Charge transfer
DCM	4-Dicyanmethyl-2-Methyl-6-(p-Dimethylaminostyryl)-4 <i>H</i> -pyran
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESA	Excited State Absorption
FDM	Filter Diagonalization Method
FFT	Fast Fourier Transform
FTP	File Transfer Protocol
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GODZILLA	Gründlich optimierte und zusätzlich immens leistungsfähigere URMEL Adaption
GSH	Reduziertes Glutathion
GSSG	Oxidiertes Glutathion
HR800	High reflective mirror (800 nm)
IDL	Interactive Data Language
kDA	Kilo Dalton
FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
FWHM	Full Width at Half Maximum
LDAC	Logarithmic Differentiation of Absorption Changes
1-MN	1-Methyl Naphthalin
NADP	Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat
NADPH	Reduzierte Form des NADP
NAIa	Naphthyl-Alanin
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOPA	Non-collinear optical parametric amplifier
OC	Output Coupler

## Abkürzungen

---

PLC	Polymer Liquid Crystal
PM	Parabolic mirror
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTP	<i>p</i> -Terphenyl
RMS	Root Mean Square
RMSD	Root Mean Square Deviation
SFM	Sum Frequency Mixing
SHG	Second Harmonic Generation
StBu	<i>tert</i> -Butylthio
SVD	Singular Value Decomposition
THG	Third Harmonic Generation
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxin Reductase
TST	Transition State Theory
TTA	Triplet-Triplet-Absorption
TTET	Triplet-Triplet Energie Transfer
ULE	Ultra Low Expansion
URMEL	Ultra rasanter Marquardt-Algorithmus mit externem Linearfit
UV	Ultraviolett
Xan	9-Oxoxanthen-2-Carboxylsäure („Xanthonsäure“)
WOTAN	Wonderful Optical Transient Absorption iNstrument

## Publikationen

1. R. Huber, H. Satzger, W. Zinth, J. Wachtveitl. *Noncollinear optical parametric amplifiers with output parameters improved by the application of a white light continuum generated in CaF<sub>2</sub>*.  
Opt. Commun. **194** (2001) 443–448.
2. 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. Natl. Acad. Sci USA **99** (2002) 7998–8002.
3. H. Satzger, S. Spörlein, C. Root, J. Wachtveitl, W. Zinth, P. Gilch. *Fluorescence Spectra of trans- and cis-azobenzene — Emission from the Franck-Condon state*.  
Chem. Phys. Lett. **372** (2003) 216–223.
4. H. Satzger, W. Zinth. *Visualization of transient absorption dynamics — towards a qualitative view of complex reaction kinetics*.  
Chem. Phys. **295** (2003) 287–295.
5. 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*.  
Biophys. J. **86** (2004) 2350–2362.
6. H. Satzger, C. Root, M. Braun. *Excited state dynamics of trans- and cis-azobenzene after UV excitation in the  $\pi\pi^*$  band*.  
J. Phys. Chem. A **108** (2004) 6265–6271.
7. H. Satzger, C. Root, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, J. Wachtveitl und W. Zinth. *Picosecond Dynamics in Water Soluble Azobenzene-Peptides*.  
Erscheint in Chem. Phys. Lett.
8. H. Satzger, B. Schmidt, C. Root, W. Zinth, B. Fierz, F. Krieger, T. Kiefhaber und P. Gilch. *Ultrafast Quenching of the Xanthone Triplet by Energy Transfer: New Insight into the Intersystem Crossing Kinetics*.  
Erscheint in J. Phys. Chem. A.



# Danksagung

*„Wenn ich weiter sehen konnte als andere, dann nur, weil ich auf den Schultern von Giganten stand.“*

(Sir Isaak Newton)

*„Aye Caramba!“*

(Bart Simpson)

Für mich gilt natürlich das gleiche wie für jeden anderen auch, diese Arbeit wäre ohne die Hilfe und Unterstützung von ganz vielen Menschen so nicht möglich gewesen.

Für finanzielle Unterstützung danke ich der DFG, die meine Arbeiten im Rahmen des SFB 533 gefördert hat. Vielen herzlichen Dank an Prof. Wolfgang Zinth für die Möglichkeit, bei ihm diese tolle Arbeit durchführen zu können, für die vielen spannenden Projekte, an denen ich im Lauf der Zeit mitarbeiten durfte, für die vielen Diskussionen, für die stets offene Tür. Er hat an seinem Lehrstuhl ein Umfeld geschaffen, in dem ich mich sehr wohl fühlen und dadurch voll entfalten konnte. Zu diesem produktiven Umfeld hat natürlich auch Prof. Eberhard Riedle entscheidend beigetragen — die gute Kooperation hat sich in vielen Hilfestellungen bei NOPA-Problemen und den Messungen am [2,2'-Bipyridyl]-3,3'-diol gezeigt. Nach langer Projektleitung immer noch mit Azobenzol und Azopeptiden verbunden: Prof. Josef Wachtveitl für die fortwährende Kooperation. Prof. Joachim Rädler sei herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens gedankt. Für die angenehme und sehr erfolgreiche Kooperation beim spannenden Kapitel Xanthon und Xanthonpeptide danke ich Prof. Thomas Kiefhaber. Besonderer Dank gebührt dabei natürlich Beat Fierz, der die ganzen schönen Peptide synthetisiert und die ns-Experimente durchgeführt hat (herzlichen Dank auch an Florian Krieger). Ich freue mich, dass ich erste Voruntersuchungen an den Thioacetamid-Peptiden durchführen konnte. Danke dafür an Prof. Gunter Fischer und Dirk Wildemann (die Messungen an „Substanz X“ haben Spaß gemacht). Der Gruppe um Prof. Luis Moroder vom MPI Martinsried für die absolut fantastischen Azopeptide, NMR-Untersuchungen und vieles mehr: Raymond Beherendt, Markus Schütt/Löweneck und Priv. Doz. Christian Renner. Sollte ich ein bisschen Verständnis für (mathematische) Physik haben, so verdanke ich das der fantastischen Ausbildung durch Prof. Detlef Dürr. Danke auch Roderich Tumulka. Beide haben mir u. a. geholfen, einige Verständnisprobleme mit der SVD zu überwinden und ich bin dankbar für jedes einzelne Gespräch, das wir hatten. Was wäre ich gewesen ohne Chris Root: Ich schätze mich aufs äußerste glücklich, dass er nach seiner Diplomarbeit beschlossen hat, weiter mit mir zusammenzuarbeiten. Als „*Signal and Noise*“ waren wir ein hervorragendes Team und zusammen mit unserem „*White Light Tiger*“ haben wir ja auch manch tolle Kunststücke

gemacht! In alter chinesischer Tradition sage ich: „Möge der Weg in deine Zukunft mit Rosen gepflastert sein!“ Den „Alt-Doktoranden“ Sebastian Spörlein, Robert Huber und Ingo Lutz: Sie haben uns ein tolles Lasersystem mit einem sehr robusten Verstärker aufgebaut, uns (damalige) Jung-Doktoranden gut aufgenommen und eingearbeitet und mit dem Auswerteprogramm „Z20“ eine absolute Steilvorlage gelegt. Vielen Dank an Basti auch fürs kritische Korrekturlesen. Erik Baigar für seine genialen Interpretationen der „Art of Electronics“. Den Laborkollegen von der dunklen Seite: Arne Sieg, Tobias Schrader, Wolfgang Schreier und Florian Koller, die durch die Bekämpfung von Doppelpulsen, Erdschleifen und Kühlproblemen viel zur Stabilität des Laborbetriebs beigetragen haben. Danke natürlich auch für die gute Zusammenarbeit — mit den neuen Gittern hatten wir ja endlich (zumindest zeitweise) genügend Energie für beide Experimente. Viel Erfolg für die weiteren IR-Experimente! Der Werkstatt für ihre fantastischen Arbeiten, die vielen guten Verbesserungen, die hochpräzise Feinmechanik. Ohne das große Engagement und Können von Christian Hausmann, Alfons Stork und Rudi Schwarz wären viele Experimente nicht so, nicht so schnell und nicht so gut möglich gewesen. Dank auch an Harald Hoppe für die optischen Arbeiten. Nicht zu Vergessen auch das große Engagement bei allen Festen: Weihnachtsfeier in der Werkstatt, Sommerfeste mit Rudi Schwarz am Grill. Große Macht liegt natürlich stets im Sekretariat und ich danke der guten Seite der Macht: Nicole Klemradt, Barbara Podolski und Alexandra Bekavac. Vielen Dank auch an Ines Haame, die mich damals unter Umgehung der Kausalität schneller eingestellt hat, als das bürokratisch eigentlich möglich gewesen wäre. Priv. Doz. Stefan Lochbrunner für viele Diskussionen und die vielen Infos über Kanada. Markus Braun für viel Unterstützung bei der Interpretation der „Azo  $\pi\pi^*$ -Daten“ und die zahlreichen Gespräche dabei. Die Diskussionen und das Paper schreiben mit Markus und besonders auch mit Peter Gilch haben mich viel gelehrt und es hat immer viel Spass gemacht. Von Peter habe ich am Beispiel „Jod in 1-Octen/Cyclohexan“ gelernt, dass nicht jede gute Idee und nicht alle lustigen Experimente zu sofort wissenschaftlich verwertbaren Aussagen führen müssen (dafür brachten uns die Experimente die Musik von Del Amitri näher). Peter hat außerdem sehr geholfen, dass diese Arbeit lesbarer wird und mich (nebenbei) viel über gutes und kritisches wissenschaftliches Arbeiten gelehrt. Dr. habil. Horst Pulvermacher für viele anregende Diskussionen bei Fragen zur optimalen Datenauswertung. Heiko Carstens, dem Azo-Mitstreiter von der Theorie-Seite für viele interessante Diskussionen und auch zahlreiche kleine Hilfestellungen beim Erstellen schöner Abbildungen (VMD und Illustrator). Heiko hat mir außerdem Mut gemacht, in dem er bewiesen hat, dass man auch „umfangreiche“ Doktorarbeiten zu einem Abschluss bringen kann. Andreas Weiß hat mir gezeigt: „Zwei plus zwei ergibt vier und zwar nicht nur einmal oder an einem Ort, sondern immer und überall!“ Nebenbei hat er mich in Linux und SuSE eingeführt und noch manch anderes Gutes getan. Gerald Matthias für Hilfestellungen bei theoretischen und praktischen Problemen. Den Werkstudenten: Daniel Benker und Claudia Schmidt für ihr Engagement. Jörg Krebs für Computer-, Chemie- und sonstige Hilfe. Den Bands Materialschlacht und Heaven And Hel — sie haben sich wohl jeweils am Gipfel ihres Erfolges getrennt. „Jetzt ist schon wieder was passiert.“ Stephan Malkmus hat mich mit Wolf Haas zusammengebracht. Allen meinen Freunden, in der Schlussphase besonders Thomas und Geli für die

Musen und die Literaturkritik. Der AG Riedle: Tanja Bizjak für die spontanen und sehr erholsamen Kroatien-Ausflüge und die Gespräche über das solvatisierte Elektron. Ida Kozma, Peter Baum, besonders aber Kai Stock für die Hilfe beim Aufbau des zweistufigen, frequenzverdoppelten NOPAs. Allen am BMO, die mit mir immer wieder zum Aumeister (und zurück) gelaufen sind. Den BMO-Administratoren: Durch unermüdlichen und erheblichen persönlichen Einsatz haben sie eine superbe Computer-Umgebung am BMO geschaffen (abgesehen von den defekten Mainboards, aber dafür können sie nichts, wie sie mir versichert haben). Bernhard Schmidt hat mir das Schmidt-Manöver gezeigt, außerdem vielen herzlichen Dank für die Durchführung der zeitaufgelösten Fluoreszenz-Messungen am Xanthon und die Bereitstellung der Daten. Herzlichen Dank an Steve und Edith dafür, dass ich das süße Foto von Clara für die Arbeit verwenden durfte. Matt Groening danke ich für die Simpsons und Leo Fender für den Precision Bass. Arne Sieg ganz herzlichen Dank für seinen hervorragendes Abschneiden beim -?- Tischtennisturnier. Seitdem besitzt Z20 einen tragbaren CD-Player, der zwar nie irgendwohin getragen wurde, dafür aber so manchen Labortag angenehm gemacht hat. Dem Internationalen Universitätsclub München für die netten Partys Donnerstags abends. Constanze Sobotta und Birgit Bussmann haben immer, wenn sich Anzeichen schlechter Laune zeigten, bereitwillig von ihrer Schokolade abgegeben. Was wäre ich ohne die Bewerbungsmappe, die Rossana Reho und Constanze für mich zusammengestellt haben (ich hoffe, sie hilft in Kanada). Der ZHS für die wunderbaren Trainingsmöglichkeiten, besonders im Olympia-Bad. Als Skitagsbeauftragter des BMO gilt mein herzlicher Dank Prof. Hermann Gaub, der uns zusammen mit einigen Helfern die letzten zwei Jahre jeweils ein spektakuläres Skirennen am Spitzingsee organisiert hat (inclusive funkgesteuerte Zeitnahme!). Dem Studentenwerk für stets preiswerte und qualitativ hochwertige Mahlzeiten in der Mensa — und natürlich allen BMO-Mensa-Gängern für die Geselligkeit und die Tischgespräche. Der Free Software Foundation danke ich für GNU, insbesondere für L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X, Emacs, Xfig, GIMP und Ghostscript, außerdem den Entwickler-Teams von PINE, fvwm2 und Linux. Besonderer Dank schließlich gebührt meinen Eltern: Rita und Sebastian Satzger.



# Index

- 
- A**
- Aminosäure, 1, 207
  - Autokorrelations-Koeffizienten, 52
  - Azobenzol, 71
    - $\pi\pi^*$ -Anregung mit 266 nm, 81, 83
    - $\pi\pi^*$ -Anregung mit 340 nm, 189
    - Emission aus dem Franck-Condon-Bereich, 88
    - Energieschema, 92
    - Fluoreszenz, 85, 88
    - gemischte Population, 77
    - Grundlegende Eigenschaften, 72
    - Isomerisation auf  $S_1$  Fläche, 93
    - Isomerisierung, 75
    - $n\pi^*$ -Anregung mit 480 nm, 79
    - rotational deactivation, 76
  - Azo peptide, 103
    - AMPB-Schalter, 116
    - APB-Schalter, 114
    - Beobachtungsprinzip, 110
    - DMSO lösliche, 114
    - DMSO vs.  $H_2O$ , 126
    - Molekulardynamik-Simulationen, 117
    - Synthese, 107
    - Wasserlösliche Peptide, 107, 117, 120, 123, 191
- 
- B**
- Benzophenon, 131
  - Biopolymer, 1
  - Blaze, 24
- 
- D**
- Datenanalyse
    - LDAC, 61
  - Dexter Mechanismus, 159
  - Dielectric response, 146
  - Diffusionsgleichung, 147, 161
  - Diodenarray, 24
- 
- E**
- El Sayed Regeln, 193
  - Energietransfer durch chem. Bindungen, 143, 174
  - Enzym, 1
  - Experiment, 15
- 
- F**
- Fastbus, 25
  - Femtochemie, 7
- 
- G**
- Gate-Fenster, 25
  - Globale Datenanpassung
    - stochastisches Fitten, 38
  - Globaler Fit, 33, 36
  - Guanidiniumchlorid, 183
- 
- I**
- Incomplete  $\Gamma$ -function, 37
  - Intersystem crossing, 193
  - Intrachain diffusion, 167
- 
- K**
- Kalziumfluorid-Substrat, 19
  - Konische Durchschneidung, 98
  - Kontaktbildung
    - SSS-Theorie, 160
    - WF-Theory, 163
  - Kontaktbildungsrate, 159
  - Kreuzkorrelation, 33
- 
- L**
- Lasersystem
    - Regenerativer Verstärker, 17
    - Ti:Saphir-Oszillator, 16
  - LDAC, 61
  - Littrow-Anordnung, 16
  - Logarithmic Differentiation of Absorption Changes, *siehe* LDAC
- 
- M**
- Magischer Winkel, 23, 24
  - Marcus Theorie, 151
  - Matrix
    - Approximation, 46
    - Kern, Bild und Rang, 43
    - Norm, 44
  - Molten Globule, 4
- 
- N**
- Naphthalin, 158
    - Kein Hinweis auf Exciplex, 139

- Triplett-Excimer, 139
  - NOPA, 17
    - Kalziumfluorid, 19
    - Nichtkollinearitäts-Winkel, 18
    - Saphir, 18
    - Zweistufig, 18
- 
- O**
- Orthogonale Normalform, 43
- 
- P**
- Peptid, 1
  - Peptidfaltung, 1
  - Preferential solvation, 149
  - Primärstruktur, 2
  - Protein, 1
    - Aminosäurenkette, 3
    - Peptidkette, 3
    - Random Coil, 2
    - Struktur, 2
    - Thioredoxin Reductase, 105
  - Proteinfaltung, 1
    - Kinetische Theorie, 9
    - Kramers Theorie, 11
    - Transition-State Theory (TST), 10
    - Van't Hoff und Arrhenius, 10
  - Pulserzeugung
    - Abtast-Lichtimpulse, 20
    - Anregungs-Lichtimpulse, 17
    - fs-Lasersystem, 15
    - NOPA, 17
    - SFM, 17
    - SHG, 17
    - THG, 17
    - Weisslicht, 20
  - Pumpe
    - Peristaltikpumpe, 26, 27
    - Spritzenpumpe, 25, 27
- 
- R**
- Ratenmodell, 33, 36, 55
  - Redoxpotentiale, 191
- 
- S**
- Second Harmonic Generation, 17
  - Sekundärstruktur, 2
  - Sellmeier-Gleichung, 54
  - Simulation transientser Absorptions-Daten, 31
  - Singularwertzerlegung, 39
    - Anwendungen, 39
    - Approximation einer Matrix, 46
    - Autokorrelations-Koeffizienten, 52
    - Beispiel mit synthetischen Daten, 57
    - Bildverarbeitung, 47
    - Datenauswertung, 53, 56
    - Definition, 40
    - Geisterwert, 52
    - gemeinsame Zeitachse, 54
    - Gestörte Matrizen, 49, 50
    - Historisches, 43
    - Matrixnorm, 45
    - Moore-Penrose-Pseudoinverse, 45
    - Rang einer Matrix, 43
    - Rauschen, 49
    - Störungsentwicklung, 50, 51
    - Zahlenbeispiel, 46
    - Zahlenbeispiel, normalisiert, 49
  - Skewed Gauß, 32
  - Solvatisiertes Elektron, 29, 172
  - Stretched Exponential, 32
  - Strickler-Berg Relation, 88, 145
  - Sum Frequency Mixing, 17
  - Superkontinuum, 20
  - SVD, *siehe* Singularwertzerlegung
  - Synthetische Daten
    - Mathematisches Modell, 33
    - Physikalisches Modell, 32
    - Rauschen, 35
- 
- T**
- Thioredoxin Reductase (TrxR), 105
  - Thioxanthon, 131
  - Third Harmonic Generation, 17
- 
- U**
- UV-Belichtungsmodul, 26
- 
- V**
- Visualisierung (Datenanalyse), *siehe* LDAC
- 
- W**
- Weißlicht, 20, 22
- 
- X**
- Xanthion, 131
  - Xanthon, 131, 158
    - Eigenschaften, 131
    - Extinktionskoeffizienten, 133
    - Inverse gap effect, 136
    - zeitaufgelöste Fluoreszenz, 145
  - Xanthon Peptide, 157