

- Blitzlichtphotolyse -

Untersuchung zu LOV-Domänen und
photochromen Systemen

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV

-Chemie und Pharmazie-

der Universität Regensburg



vorgelegt von

Roger Jan Kutta

aus Gelsenkirchen

2012

Diese Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. B. Dick

Promotionsgesuch eingereicht am:

24.02.2012

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. D. Horinek, Vorsitzender

Prof. Dr. B. Dick

Prof. Dr. A. Penzkofer

Prof. Dr. A. Slenczka

Für meine Familie

&

die Wissenschaft.

„Den Rest meines Lebens werde ich darüber nachdenken, was Licht ist!”

-Albert Einstein im Jahre 1917-

Danksagung

Zu allererst gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Bernhard Dick, für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, für die vielen fachlichen Diskussionen und Anregungen, für die vielen interessanten Fragestellungen aus unterschiedlichsten Themengebieten, für die Freiheit, eigenen Ideen nach zu gehen, für die vielen Möglichkeiten meine Ergebnisse zu präsentieren, und für die finanzielle Unterstützung während dieser Arbeit.

Herrn Dr. Uwe Kensy bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Durch sein großes Engagement sind viele experimentelle Fortschritte erst möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Alkwin Slenczka danke ich für seine stete Hilfe mit Rat und Tat bei den unterschiedlichsten Problemen.

Allen Kooperationspartnern in Berlin (Prof. Dr. Peter Hegemann), in Jülich (Dr. Ulrich Krauss), in Martinsried (Dr. Jörg Tittor), in Karlsruhe (Prof. Dr. Wagenknecht), in München (Prof. Dr. Riedle) und in Regensburg (Prof. Dr. König) danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung von diversen Proben.

Herrn Prof. Dr. Armin Buschauer und Herrn Prof. Dr. Sterner danke ich für die Möglichkeit, in ihren Radioaktivlaboren zu arbeiten. Auch bedanke ich mich für die stete Hilfsbereitschaft, die ich von ihren Mitarbeitern erfahren habe. Besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Günther Bernhardt für sein stetes Interesse an meiner Arbeit und für seine ständige Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. Anja Stromeck-Faderl danke ich herzlich für die schöne Zeit im und außerhalb des Labors, sowie für ihre große Hilfsbereitschaft bei Problemen aller Art.

Frau Madlene von Sanden-Flohe gilt mein großer Dank für die stete Unterstützung in den verschiedensten Bereichen, wodurch sie mir sehr viel Arbeit abgenommen hat.

Allen Mitarbeitern sowohl der mechanischen Werkstatt unter Leitung von Herrn Herbert Tischhöfer als auch der elektronischen Werkstatt unter Leitung von Herrn Peter Fuchs danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft und die hervorragende Zusammenarbeit.

Bei allen weiteren momentanen sowie ehemaligen Angehörigen des Lehrstuhls möchte ich mich für ihre Unterstützung und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken: Frau Gabriele Alder, Herrn PD Dr. Stephan Baeurle, Frau Nicole Berner, Frau Ulrike Berg, Herrn Dr. Gerhard Herzog, Frau Birte Höing, Frau Kathrin Magerl, Frau Martina Müller, Herrn Emanuel Peter, Herrn Dr. Dominik Pentlehner, Herrn Tobias Premke, Frau Dr. Ricarda Riechers, Herrn Dr. Andreas Schmaunz, Herrn Manuel Schneider, Frau Martha Seiler, Herrn Dr. Andreas Wenge, Frau Eva-Maria Wirths und Herrn Klaus Zier-eis sowie Herrn Prof. Dr. Hartmut Yersin und seinen Mitarbeitern.

Ich danke allen Mitgliedern des GRK 640 „Sensory Photoreceptors“, des GRK 1626 „Chemical Photocatalysis“ und des gesamten FOR 526 „Blue-Light Sensitive Photoreceptors“.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für ein Doktoranden-Stipendium.

Meinen Studienkollegen danke ich für ihre Freundschaft und alle gemeinsamen Unternehmungen und Erlebnisse während der gesamten Studienzeit in Regensburg.

Zuletzt, aber vor allem, danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, meinem Vater und meinen beiden Brüdern sowie deren Familien für ihre großartige Unterstützung, ihre Aufmunterungen und den großen Rückhalt während meines gesamten Studiums.

Inhaltsverzeichnis

1. Vorwort	1
2. Materialien und Methoden	3
2.1. 2D-transiente Absorptionsspektroskopie	4
2.1.1. Allgemeines Prinzip	5
2.1.2. Experimenteller Aufbau	9
2.1.3. Datenanalyse - Global Fit	16
2.1.4. Leistungsfähigkeit des Experiments für 2D-TA	33
2.1.5. Konventionelle Blitzlichtphotolyse	36
2.2. Quasi-Stationäre Belichtungsexperimente	39
2.2.1. Modifizierter Küvettenhalter	39
2.3. <i>Time Correlated Single Photon Counting</i>	42
2.3.1. Allgemeines Prinzip	42
2.3.2. Experimenteller Aufbau	45
2.3.3. Datenanalyse	48
2.4. Expression und Aufreinigung biologischer Proben	48
2.4.1. LOV-Proteinkonstrukte aus <i>C.r.</i>	49
3. Flavin-katalysierten Photooxidation von 4-Methoxybenzylalkohol	51
3.1. Einleitung	52
3.2. Experimentalteil	55
3.2.1. Bestimmung der Produktquantenausbeuten	56
3.3. Resultate und Diskussion	58
3.3.1. Stationäre Absorptionsspektroskopie	58
3.3.2. Photophysik des RFTA	60
3.3.3. Produktquantenausbeute in Abhängigkeit der Substartkonzentration	68

3.3.4.	Sehr schneller nicht produktiver Photozyklus	69
3.3.5.	Produktiver Photozyklus über den Triplett-Zustand	78
3.3.6.	Mechanismus der photokatalytischen MBA Oxidation	91
3.3.7.	Verbesserung des produktiven Photozyklus mittels <i>internal Heavy Atom Effect</i>	96
3.4.	Ausblick	103
4.	Photozyklus in der LOV1-Domäne aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	105
4.1.	Einleitung	106
4.2.	Experimentalteil	107
4.3.	Resultate und Diskussion	108
4.3.1.	Stationäre Absorptionsspektroskopie	108
4.3.2.	Photozyklus der LOV1-Domäne	111
5.	Einflusses der Adduktbildung auf die Signalweiterleitung in LOV-Domänen	123
5.1.	Einleitung	124
5.1.1.	Der Aktivitätstest	125
5.2.	Material und Methoden	127
5.2.1.	Molekularbiologie und Proteinreinigung	127
5.2.2.	Phosphorylierungstest	128
5.3.	Ergebnisse und Diskussion	129
5.3.1.	Bildung und Zerfall des Methylthiyladdukts im System YF1-C62G mit Methylthiol	129
5.3.2.	Phosphorylierungstest der Systeme YF1-WT, YF1-C62G und YF1-C62G + MeSH	130
6.	Der Photozyklus von Acetabulariarhodopsin1	135
6.1.	Einleitung	136
6.1.1.	Photozyklus von Bacteriorhodopsin	136
6.2.	Resultate	139
6.2.1.	<i>Multiple Sequence Alignment</i>	139
6.2.2.	Photozyklus von Acetabularia	141
6.3.	Diskussion	149
7.	Ein multichromophores Lichtsammelsystem gebunden an DNA	151
7.1.	Einleitung	152

7.2. Resultate	152
7.2.1. Mit Chromophoren markierte DNA-Stränge	153
7.2.2. Photophysikalische Untersuchungen	153
7.3. Zusammenfassung und Ausblick	159
8. Zusammenfassung	161
Anhang	167
A. Mathematische Grundlagen	169
A.1. Modifizierter LEVENBERG-MARQUARDT-Algorithmus	169
A.2. RUNGE-KUTTA-Methode	172
B. Andere Projekte	175
B.1. "Design and photoinduced surface relief grating formation of photore- sponsive azobenzene based molecular materials with ruthenium acetylides"	175
Glossar	177
Abkürzungsverzeichnis	181
Literatur	185

1. Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2006 bis Februar 2011 am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Regensburg unter Anleitung von Prof. Dr. Bernhard Dick erstellt.

Einleitend einige Hinweise bezüglich dieser Arbeit. Es wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Themengebiete bearbeitet. Aus diesem Grund schien es sinnvoll nicht eine Einleitung zu verfassen, sondern jedes Thema in den jeweiligen Kapiteln einzeln einzuführen. Des Weiteren ist darauf hingewiesen, dass für die Darstellung aller präsentierten Daten durchgehend die englische Zahlennotation mit Punkt als Dezimaltrennzeichen verwendet wurde.

Zu Beginn werden Einzelheiten zu den Materialien und Methoden dieser Arbeit gegeben. Der methodische Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in dem Aufbau und der Charakterisierung einer 2D-transienten Absorptionsspektroskopie. Zusätzlich wird von weiteren Methodenentwicklungen berichtet. Dazu gehört zum einen die Konstruktion eines modifizierten Küvettenhalters, der stationäre Belichtungsexperimente bei sehr definierten Bedingungen ermöglichte, und zum anderen der Aufbau einer *Time Correlated Single Photon Counting* (TCSPC)-Apparatur, mit der Fluoreszenzlebensdauern im ns-Bereich bestimmt werden können. Den Abschluss des Methodenteils macht die Beschreibung der Expressionsbedingungen der vermessenen biologischen Photorezeptoren.

Mit dem beschriebenen Methodenspektrum wurden vier Themengebiete bearbeitet. Anfangs wird von den Untersuchungen der flavin-katalysierten Photooxidation von 4-Methoxybenzylalkohol zum entsprechenden Aldehyd berichtet. Es konnten entscheidende Kenntnisse über den Mechanismus gewonnen werden, mit Hilfe derer eine Verbesserung der untersuchten Photokatalyse erzielt werden konnte.

Die anschließenden Themen umfassen biologische Systeme mit höherer Komplexität. Als erstes System wird das LOV1-Protein (*Light Oxygen and Voltage*) des Phototropins

aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (C.r.) betrachtet. Die Untersuchungen werden verglichen mit Messungen am Chromophor **Flavinmononukleotid** (FMN) allein in Lösung und mit einer LOV1-C52S Mutante, in der das reaktive Cystein durch ein Serin ausgetauscht wurde. Dies Ergebnisse geben einen weiteren Einblick auf den Mechanismus der Adduktbildung innerhalb von LOV-Domänen.

Weiter wurde ein Teilaspekt der Signalweiterleitung innerhalb von LOV-Domänen untersucht. Es wurde der Fragestellung nachgegangen, ob allein die Ausbildung eines Cysteinylladduktes, ohne gleichzeitige Bindung zum Proteinrückgrat, essentiell für die Weiterleitung eines Signals zur Aktivierung einer Effektordomäne ist, oder ob der mechanische Zug durch die Cysteinylladduktbildung zusätzlich erforderlich ist. Dazu wurden Aktivitätsmessungen an einem künstlichen Sensor-Effektor-Protein bestehend aus einer LOV-Domäne aus *Bacillus subtilis* (B.s.) YtvA und einer Histidinkinase des FixL aus *Bradyrhizobium japonicum* (B.j.) durchgeführt.

Das zweite biologische System basiert auf dem Chromophor Retinal. Es konnte der Photozyklus der Protonenpumpe *Acerhodopsin1* (AR1) aus *Acetabularia acetabulum* (A.a.) charakterisiert werden. Die Ergebnisse werden mit dem Photozyklus des Bacteriorhodopsins verglichen.

Abschließend wird über Lichtsammelsysteme basierend auf der DNA-Architektur berichtet. Es zeigten sich in einigen mit Chromophoren markierten DNA Proben Hinweise auf ladungstrennte Zustände, die unabhängig von der Anregungswellenlänge zwischen 350 nm und 700 nm erzeugt werden konnten. Diese Proben sind potentielle Kandidaten für die chemische Photokatalyse.

2. Materialien und Methoden

In diesem Kapitel wird auf alle in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden näher eingegangen.

Der apparative Schwerpunkt aller in dieser Arbeit präsentierten Projekte liegt in dem Aufbau eines 2D-transienten Absorptionsspektroskopie Experimentes. Die Besonderheit in diesem Experiment ist die Verwendung einer *Streak Camera (SC)* mit sehr hohem dynamischen Bereich. Details dazu sind in Abschnitt 2.1 gegeben. Zusätzlich ist im Abschnitt 2.1.5 der Aufbau einer konventionellen Blitzlichtphotolyse bei fester Wellenlänge zur Detektion dynamischer Prozesse im ms- bis s-Bereich gegeben.

Des Weiteren wurde eigens zur Durchführung von stationären Belichtungsexperimenten ein thermostatisierbarer Küvettenhalter mit eingebauten Belichtungs-*Light Emitting Diode (LED)*s geplant und konstruiert. Detaillierte Informationen dazu sind in Abschnitt 2.2 zu finden.

Für die Aufnahme von Fluoreszenzlebensdauern ist eine alte dem Lehrstuhl geschenkte TCSPC Apparatur von Herrn Dr. Kensy erneuert und wieder funktionsfähig gemacht worden. Die Einzelheiten zu dieser Apparatur sind Abschnitt 2.3 zu entnehmen.

Letztlich sind in Abschnitt 2.4 die Expressionsbedingungen aller in dieser Arbeit vermessenen biologischen Photorezeptoren zu finden.

2.1. Aufbau eines Experiments für 2D-transiente Absorptionsspektroskopie

Die *Transiente Absorption* (TA) einer Probe nach Anregung mit einem kurzen Lichtpuls, $A(t, \lambda)$, ist eine Funktion von Wellenlänge λ und Verzögerungszeit t nach der Anregung. Diese Matrix wird üblicherweise zeilenweise durch Messung von Spektren zu festen Verzögerungszeiten oder spaltenweise durch Messung von Zeitprofilen bei festen Wellenlängen gemessen. Derartige Messungen werden meist mit einem Photomultiplier mit einem aktiven Spannungsteiler durchgeführt. Dies hat den Nachteil, dass bei starken Fluoreszenzsignalen dieser Photomultiplier für mehrere Millisekunden übersteuert wird. Dies macht somit eindimensionale TA-Messungen von fluoreszierenden Proben im Spektralbereich der Fluoreszenz unmöglich. Ein weiterer Nachteil ergibt sich, wenn nur geringe Substanzmengen verfügbar sind oder die beobachtete Photoreaktion irreversibel ist, da in solchen Fällen nur eine begrenzte Zahl von Anregungszyklen erfolgen kann. Hier wäre ein Multiplex-Verfahren wünschenswert, das in jedem Anregungszyklus die gesamte Datenmatrix $A(t, \lambda)$ aufnimmt.

In dieser Arbeit wurde ein derartiges Multiplex-Verfahren mittels einer SC mit einem besonders hohem dynamischen Bereich (1:10000) für den Wellenlängenbereich 325-750 nm und den Zeitbereich 500 ns-10 ms realisiert. Der Multiplexfaktor verglichen mit einer spaltenweisen Messung der Datenmatrix beträgt bei gleichem Signal zu Rausch-Verhältnis mehr als 50. Auch sind nun aufgrund der Funktionsweise der SC fluoreszierende Proben im Spektralbereich ihrer Fluoreszenz für die TA zugänglich. Für die Auswertung der Daten wurden spezielle Algorithmen entwickelt. Diese erlauben eine Korrektur der Datenmatrix in Bereichen mit ungültigen Daten (z.B. Streulicht vom Laser an der Küvettenwand oder auch ein starkes Fluoreszenzsignal der Probe) und resultieren in so genannten *Decay Associated Difference Spectrum* (DADS). Die DADS sind Amplitudenverteilungen über Wellenlängen, denen ein dynamisches Verhalten in Form einer unimolekularen Ratenkonstante zugeschrieben wird. Aufbauend auf diesen DADS kann man eine Analyse auf der Basis spezifischer kinetischer Modelle durchzuführen. Oft sind mehrere kinetische Modelle mit den Daten vereinbar, so dass zu deren Unterscheidung zusätzliche Information (z.B. über die Spektren der Spezies) herangezogen werden muss.

2.1.1. Allgemeines Prinzip

Die transiente Absorptionsspektroskopie gehört zu den zeitaufgelösten spektroskopischen Verfahren zur Detektion der spektralen Signaturen kurzlebiger Spezies sowie deren Dynamik im sub-piko- bis hin zum ms-Bereich. Die Pioniere der zeitaufgelösten Spektroskopie sind Ronald George Wreyford Norrish und George Porter, die für ihre Entwicklung der Blitzlichtphotolyse im Jahre 1967 zusammen mit Manfred Eigen den Nobelpreis erhalten haben [NP49; Por50; Nor67; Por67].

Kurzlebige Spezies sind z.B. angeregte Zustände molekularer Einheiten oder reaktive Intermediate einer chemischen Reaktion. Das Verfahren basiert auf der Erzeugung transienter Spezies durch Photoanregung mit einem intensiven und im interessierenden Zeitbereich zeitlich sehr kurzen Lichtpuls („Pump“) und anschließender zeitabhängiger Abfrage des angeregten Probevolumens mittels eines Weisslichtpulses („Probe“). Die zeitliche Änderung der Absorption in der Probe stellt das Messsignal dar. In Abbildung 2.1 ist die transiente Absorptionsspektroskopie schematisch anhand eines typischen Jablonski-Termschema-Schemas für ein organisches Molekül dargestellt. Die TA ergibt sich präzise gesagt, durch die Messung der zeitaufgelösten transmittierten Intensitäten eines Weisslichtpulses zum einen durch die angeregte Probe (I^*) und zum anderen durch die nicht angeregte Probe (I_0). Demnach wird nicht wie üblich auf das Lösungsmittel bezogen, sondern auf die Probe vor der Anregung. Nach dem „LAMBERT-BEER’SCHEN“ Gesetz [Bee52] folgt für die Änderung der Absorption bzw. der Optische Dichte (OD) der Probe folgender funktioneller Zusammenhang:

$$\Delta A(\lambda, t) = \Delta OD(\lambda, t) = -\log \left(\frac{I^*(\lambda, t)}{I_0(\lambda, t)} \right), \quad (2.1)$$

Im Allgemeinen werden bei TA-Spektren drei Beiträge beobachtet:

Ground State Bleach (GSB): Ausbleichen des Grundzustands

Stimulated Emission (SE): Stimulierte Emission

Excited State Absorption (ESA): Absorption der angeregten Zustände

Der GSB weist dabei negative Amplituden ($\Delta OD < 0$) auf, da nach der Anregung die Population des Grundzustands abgenommen hat und somit weniger Moleküle diese speziellen Frequenzen absorbieren können als zuvor. Ebenfalls werden im Fall auftretender SE negative Amplituden beobachtet, da das transmittierte Abfragelicht im spektralen Bereich der Fluoreszenz aufgrund stimulierter Emission verstärkt wird. Die positiven

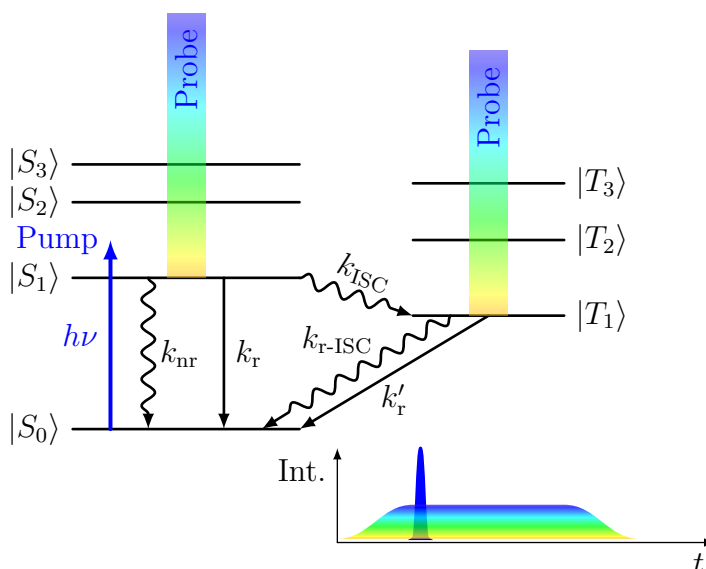


Abb. 2.1.: Schematische Darstellung der transienten Absorptionsspektroskopie anhand eines typischen JABLONSKI-Schemas für ein organisches Molekül mit einem Singulett Grundzustand $|S_0\rangle^a$. Mit einem intensiven und im interessierenden Zeitbereich zeitlich sehr kurzen Lichtpuls wird die zu untersuchende Substanz elektronisch angeregt, so dass deutlich erhöhte Konzentrationen an transienten Spezies (hier: Angeregter Singulett- und Triplett-Zustand) erzeugt werden. Dem angeregten Probevolumen wird nun ein zeitabhängiger Abfragelichtpuls überlagert, das aus einem Weisslichtkontinuum besteht, so dass die erzeugten transienten Spezies je nach Resonanzbedingung für die Singulett-Singulett- bzw. Triplett-Triplett-Übergänge Bereiche des Weisslichtkontinuums absorbieren.

^aIn diesem **Jablonski-Termschema**-Schema sind die ratenbestimmenden Schritte als Pfeile eingezeichnet, so dass k_{nr} und k_{r-ISC} die nicht strahlenden Prozesse **Internal Conversion (IC)** bzw. **Intersystem Crossing (ISC)** gefolgt von **Internal Vibrational Relaxation (IVR)** zusammenfassen. Mit k_r und k'_r werden die spinerlaubten bzw. die spinverbotenen strahlenden Prozesse gemeint.

Beiträge ($\Delta OD > 0$) in den TA-Spektren rühren alleine von der **ESA** her, da dort resonante Übergänge aus den angeregten Zuständen in energetisch höhere liegende Zustände auftreten.

Die Signatur des **GSB** kann als ein Maß dafür angesehen werden, welcher Anteil an Grundzustandsmolekülen in einem Intermediat oder einem Produkt einer photochemischen Reaktion übergegangen ist. Ein nicht vollständig zurückkehrendes **GSB**, deutet auf einen Verlustkanal innerhalb der photoinduzierten Reaktion hin.

Funktionsweise einer Streak Camera als Analysator für Lichtpulse: Zeitlich und spektral

Eine (SC) ist ein Gerät, das schnelle Lichtphänomene vermessen kann. Es gibt derzeit SC-Typen die bis in den fs-Bereich auflösen können. Eine SC liefert mit einer einzelnen Messung eine vollständige Datenmatrix, in der Intensität gegen Zeit und gegen Position bzw. Wellenlänge korreliert vorliegen. SCs bieten in Kombination mit einem Spektrograph somit ein zweidimensionales Verfahren, das simultan die Zeitabhängigkeit von unterschiedlichen Lichtkanälen messen kann. Es gibt keinerlei andere Geräte mit einer besseren Zeitauflösung als SCs, die auf direkte Weise schnelle Lichtphänomene messen können. Abbildung 2.2 zeigt schematisch die Funktionsweise einer SC. Der zu analysierende Lichtpuls wird vor dem Eintreffen in die SC mittels eines Spektrographen spektral dispergiert und anschließend über einen horizontalen Spalt und ein Linsensystem auf die Photokathode der SC in der horizontalen Ebene abgebildet. Das Zeitverhalten des Lichtpulses ist in Abbildung 2.2 mit t_1 bis t_3 gekennzeichnet. Der einfallende Lichtpuls trifft auf die Photokathode. Dort wird der Photonenpuls in eine Elektronenwolke konvertiert. Die Anzahl an erzeugten Elektronen ist dabei proportional zur Lichtintensität. Die Elektronenwolke wird anschließend durch eine Elektronenoptik beschleunigt und zwischen zwei Ablenkelektroden gegen einen *Micro-Channel Plate* (MCP) geschossen. Wird dabei im *Focus Mode* (siehe Abbildung 2.2 (A)) gearbeitet, werden die Elektronen nicht aus ihrer vertikalen Position heraus abgelenkt, sondern werden in einem horizontalen Spektrum am MCP aufintegriert. Arbeitet man jedoch im *Operate Mode* (siehe Abbildung 2.2 (B)) wird eine zeitabhängige Hochspannung an den Ablenkelektroden angelegt, die mit dem eintreffenden Lichtpuls synchronisiert ist, so dass es zu einer Ablenkung der Elektronen kommt (von oben nach unten über das MCP). Während der Ablenkung werden zu leicht unterschiedlichen Zeiten eintreffende Elektronen in leicht unterschiedlichen Winkeln in vertikaler Richtung abgelenkt und treffen somit an unterschiedlichen Orten (korreliert mit ihrem zeitlichen Eintreffen) auf das MCP. Im MCP werden die Elektronen mehrere tausend mal vervielfacht und treffen dann auf einen Phosphorschirm auf. Dort werden die Elektronen erneut in Licht umgewandelt. Der leuchtende Phosphorschirm wird letztlich von einer *Charge Coupled Device* (CCD) Kamera aufgenommen. Da die Zeitinformation des Pulses in eine vertikale Ortsauflösung und die Spektralinformation in eine horizontale Ortsauflösung konvertiert wurde, erhält man zweidimensionale Daten-Matrizen, deren Zeilen Spektren zu bestimmten Zeiten und

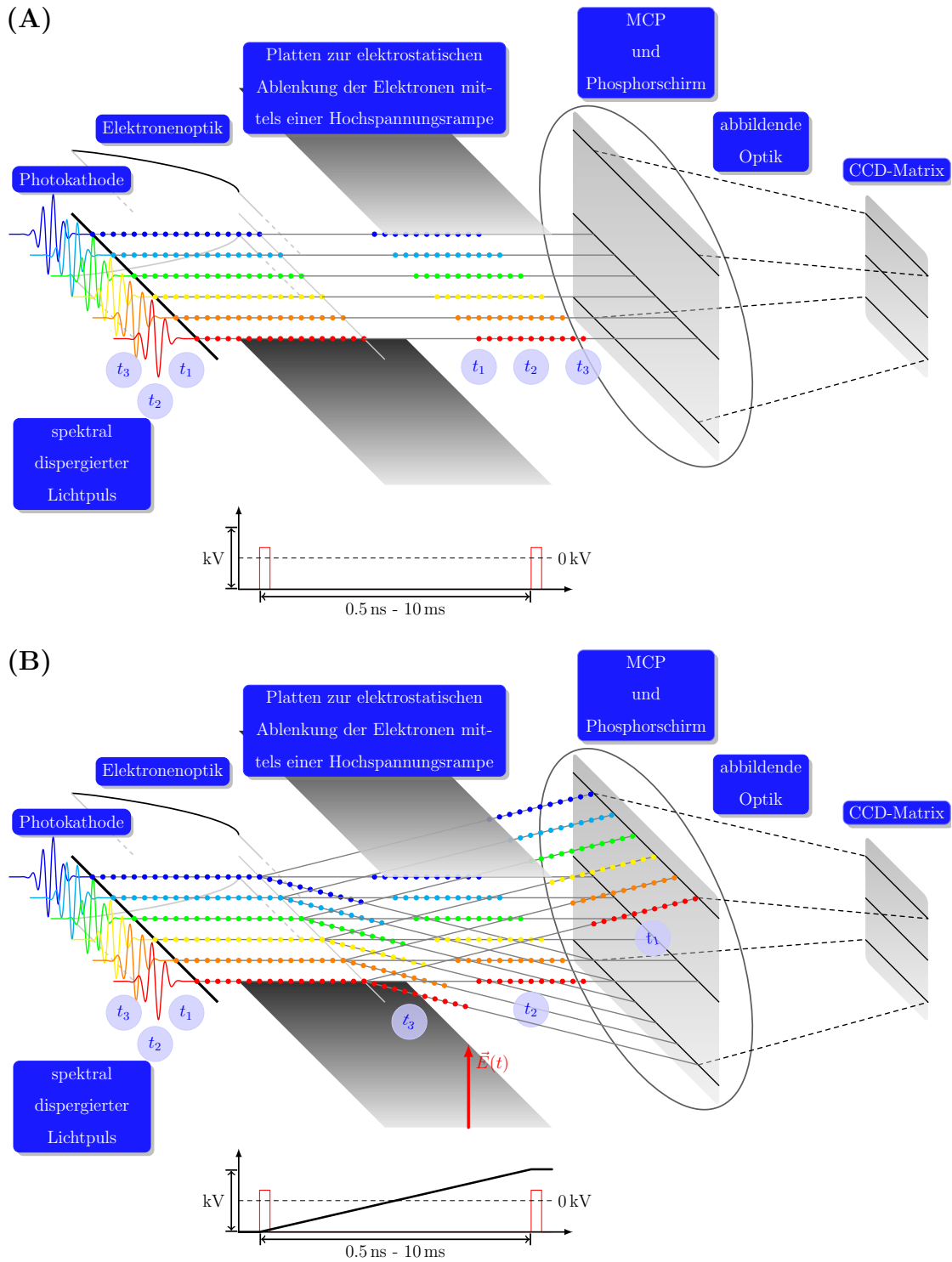


Abb. 2.2.: Operationsprinzip einer *streak camera* (SC). (A): *Focus Mode*. (B): *Operate Mode*.

deren Spalten Zeitverläufe zu bestimmten Wellenlängen enthalten.

2.1.2. Experimenteller Aufbau

Das gesamte 2D-TA-Experiment wurde in einem bei $20 \pm 3^\circ\text{C}$ temperierten Raum aufgebaut. Ein schematischer Abriss sowohl des optischen wie auch des *Personal Computer* (PC) gesteuerten Aufbaus ist Abbildung 2.3 zu entnehmen. Als Anregungsquelle dient ein *Optical Paramagnetic Oscillator* (OPO) (OPO, Continuum), der gepumpt wird von

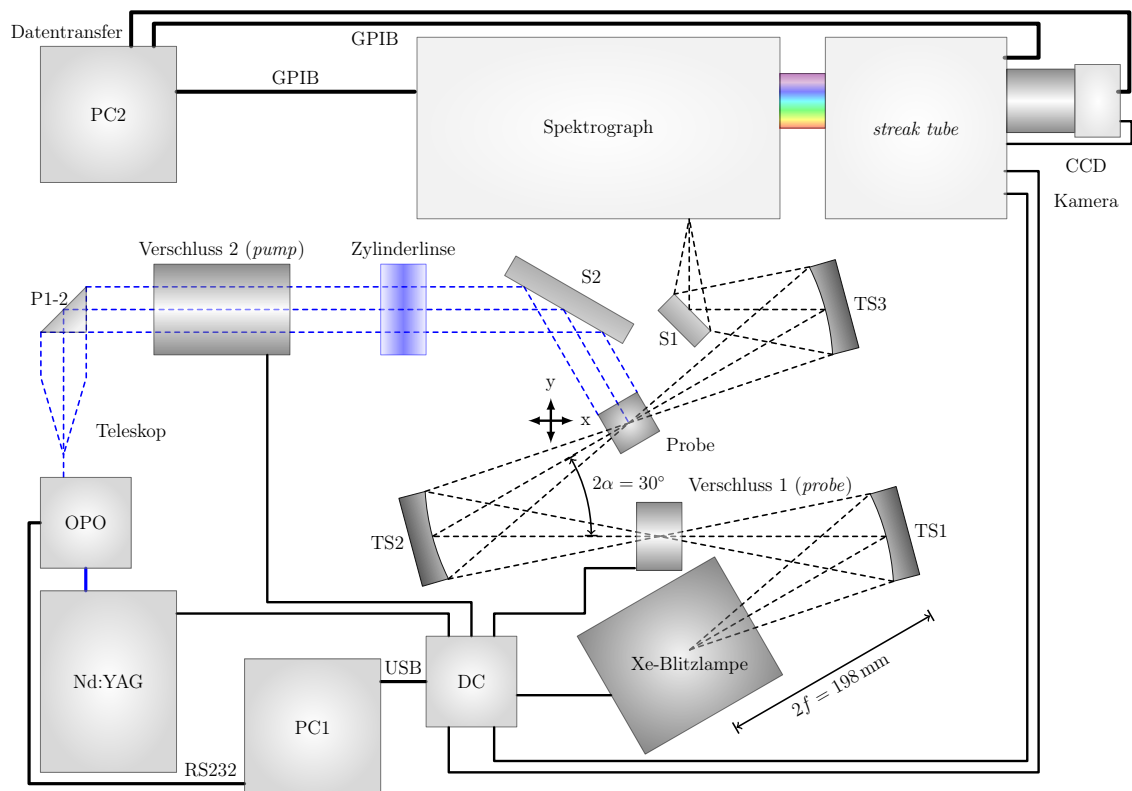


Abb. 2.3.: Experimenteller Aufbau des 2D transienten Absorptionsspektroskopie.

der *Third Harmonic Generation* (THG) eines *Neodym doped Yttrium-Aluminium-Garnet* (Nd:YAG) bei 10 Hz (Surelite II, Continuum). Der OPO ist durchstimmbar im Bereich von 430-680 nm mit Pulsenergien von 55 ± 0.5 mJ im Maximum des Durchstimmbereichs. Die Pulsenergien in den einzelnen Experimenten werden entweder mittels Verzögerung zwischen Blitzlampenpuls (Anregung des Nd:YAG-Stabes) und Triggerpuls für den *Q-Switch*, Güter-Schalter, (QS) oder mittels Herabsetzung der Blitzlampenspannung auf zwischen 5 und 10 mJ eingestellt (Die maximale Energie erhält man bei einem Delay von $\Delta t_{\text{QS}} = 190 \mu\text{s}^1$). Die Einstellung der Anregungswellenlänge erfolgt über PC2

¹ Δt_{QS} ist die Zeitdifferenz zwischen Blitzlampenpuls zur Anregung des **Nd:YAG**-Stabes und Triggerpuls für den **QS**

mittels serieller Schnittstelle ([RS-232](#)). Der Anregungspuls wird über 2 Prismen (P1-2), einem einstellbaren Linsenteleskop zur Korrektur der Divergenz des [OPOs](#) und einem Silberspiegel (S2) orthogonal zum Abfragestrahlengang auf die Probe geleitet. Zusätzlich ist ein elektronisch schaltbarer Verschluss (LS055, nmLaser) für hohe Pulsenergien in den Anregungsstrahlengang zur gezielten Auskopplung nur eines einzelnen [Laserpulses](#) eingebaut.

Als Abfragelichtquelle wird eine pulsbare 150 W Xe-Blitzlampe (MSP-05, Müller Elektronik-Optik) verwendet. Der Strahlengang für die Abfrage verläuft über eine dreifache 1 zu 1 Abbildung des Lichtbogens oberhalb der Kathodenspitze mittels torischer Spiegel (TS1-3) (siehe Abschnitt [2.1.2](#)).

Am Ort der ersten Abbildung befindet sich ein elektronisch schaltbarer Verschluss (LS6ZM, Uniblitz) zur Unterdrückung des [Continuous Wave \(CW\)](#) Anteils der Abfragelampe. Somit können empfindliche Proben - also Proben, die photochemisch entweder in einen langlebigen Zustand überführt werden können oder aber über einen Verlustkanal degeneriert werden - schonender behandelt werden. Dies wiederum ermöglicht eine Mittelung über eine größere Anzahl an Messungen.

Am Ort der zweiten Abbildung ist die Probe platziert. Als Probezellen werden Fluoreszenz-Küvetten aus Quarzglas verwendet, welche in einem eigens dafür angefertigten Küvettenhalter mit entsprechenden Blenden eingesetzt werden können. Der gesamte Küvettenhalter befindet sich auf zwei senkrecht aufeinander stehenden Verschiebetischen, was eine präzise Positionierung der Probe im Abfragestrahl für ein optimales Signal ermöglicht. Die Abfrageschichtdicke beträgt bei allen verwendeten Küvetten 10 mm. Entlang der Anregungsachse können derzeit Schichtdicken von 2 und 10 mm verwendet werden. Im Fall der Anregung über 10 mm wird der Abfragestrahlengang parallel zum Küvettenfenster, welches der Anregung zugewandt ist, durch das Anregungsvolumen geführt, um die maximale transiente Konzentration abzufragen. Durch die orthogonale Strahlführung für Anregung und Abfrage ergibt sich bei Kinetiken erster Ordnung ein Fehler von unterhalb von 1.5 %, falls die vermessene Probe eine optische Dichte von weniger als 0.5 bei der Anregungswellenlänge aufweist. Eine detailliertere Diskussion über die verschiedenen Anregungsgeometrien ist in der Dissertation von Herrn Wajih Al-Soufi zu finden [[AS91](#)].

Am Ort der dritten Abbildung erfolgt die spektrale und zeitliche Analyse des Abfragepulses mittels einer Kombination aus Spektrograph (Bruker 250is, Gitter: 100 Linien ·

mm⁻¹, Bruker Optics) und SC (C7700, Hamamatsu Photonics). Die SC besteht aus zwei Teilen. Zum einen die *streak tube*, die ein Bild auf einem Phosphorschirm erzeugt, und zum anderen eine CCD-Kamera (ORCA-CR, Hamamatsu Photonics), welche dieses Bild digitalisiert. Einstellungen sowohl am Spektrograph als auch an der SC werden über die Herstellersoftware (HPD-TA, Hamamatsu Photonics) von PC1 aus via *General Purpose Interface Bus* (GPIB) getätigt. Die SC hat Detektionsfenster von 500 ps bis zu 10 ms. In dem hier geschilderten 2D-TA Aufbau sind jedoch nur Detektionsfenster von 500 ns bis hin zu 10 ms sinnvoll, da die Photonendichte des Weißlichtpulses für Zeitbereiche kleiner 500 ns nicht mehr für ein ausreichendes Signal zu Rausch-Verhältnis führt. Das Auslesen der CCD-Kameradaten erfolgt ebenfalls über die Herstellersoftware (HPD-TA, Hamamatsu Photonics) von PC1 aus via einer RS-422A Datentransferverbindung in eine Frame Grabber Karte (PC-DIG).

Der gesamte Messablauf wird von einem eigens dafür gebauten *Delay-Controller* (DC) gesteuert, der via PC2 programmiert und gestartet wird. Das Kernstück des DC ist ein *Complex Programmable Logic Device* (CPLD)-Patterngenerator, der einen „schnellen“ Ablaufzyklus einen *First In First Out* (FIFO) mit einer Speichertiefe von 131072 Adressen ansteuert. An den Adressen kann ein 8 bit Wert geschrieben werden, der den Pegel von acht Kanäle (Ch0...Ch7) beschreibt. Die Logik ist dabei immer „low“-aktiv und startet immer mit allen Kanälen auf logisch 1. Im „schnellen“ Ablaufzyklus wird der FIFO mit einer einstellbaren Taktfrequenz f_n abgearbeitet. Die Taktfrequenz wird dabei von der Frequenz f_0 eines Referenz-Oszillators, einem Schwingquarz, abgeleitet. Diese beträgt typischerweise 80 MHz (in diesem DC beträgt sie 76.76 MHz). Die einstellbare Taktfrequenz lässt sich mittels

$$f_n = \frac{f_0}{2^{n-1}} \quad \text{mit } n = 1, 2, \dots, 8 \quad (2.2)$$

berechnen, wobei n der Teilerfaktor für die gesamte Zeitbasis darstellt. Somit sind Taktfrequenzen von 76.76 MHz bis 0.6 MHz mit entsprechenden Zeitbasen von 1.7 ms bis 218.4 ms einstellbar. Es wird typischerweise mit einer Zeitbasis von 13700 μ s und einer Auflösung von 0.1 μ s gearbeitet, was eine mehr als ausreichende zeitliche Präzision für die 2D-TA darstellt. Zusätzlich existiert ein zweiter „langsamer“ Ablaufzyklus, der mit einer kleineren Taktfrequenz $f_v = \frac{f_0}{4096} = 18.74$ kHz einen kleineren Speicher innerhalb des CPLDs abarbeitet. Die Zeitauflösung beträgt hier 53 μ s und ist für die Steuerung der trägen optischen Verschlüsse (siehe Abbildung 2.5) ausreichend. Der DC besitzt somit insgesamt neun Ausgänge, welche die in Tabelle 2.1 aufgeführten Charakteristika

aufweisen. Der DC kann prinzipiell im Einzelschuss- und Repetitionsmodus betrieben

Kanal-Nr.	Beschriftung	Impedanz	Pulsbreite	angesteuertes Gerät
Ch0	50 Ω -5	50 Ω	10.2 μ s	Nd:YAG (Blitzlampe)
Ch0	50 Ω -6	50 Ω	10.2 μ s	Nd:YAG (Q-Switch)
50 Ω -5 und 50 Ω -6 werden zusammengeführt, so dass der zeitliche Abstand Δ die Breite der Einhüllenden darstellt.				
Ch1	50 Ω -4	50 Ω	2.2 μ s	SC (GATE)
Ch2	50 Ω -3	50 Ω	2.2 μ s	SC (TRIGGER)
Ch3	50 Ω -2	50 Ω	2.2 μ s	frei
Ch4	50 Ω -1	50 Ω	2.2 μ s	frei
Ch5	TTL-3	1 M Ω	variabel	Xe-Blitzlampe
Ch6	TTL-2	1 M Ω	variabel/invertiert	Peristaltikpumpe
Ch7	TTL-1	1 M Ω	variabel/invertiert	frei
Ch8a	Aux	1 M Ω	variabel	Verschluss (<i>probe</i>)
Ch8b	Aux	1 M Ω	variabel	Verschluss (<i>pump</i>)

Tab. 2.1.: Charakteristika der neun Ausgänge am Delay-Controller.

werden. Die Repetitionsfrequenz f_r für die interne Triggerung eines einzelnen FIFO-Durchlaufs wird dabei ebenfalls von der Frequenz des Referenz-Oszillators f_0 abgeleitet. Einstellbare Werte liegen zwischen 4.6 Hz bis 1.2 MHz. Im 2D-TA Experiment wurde eine Grundfrequenz von 10 Hz für eine optimale Funktionsweise des Nd:YAG Lasers gewählt. Des Weiteren ist im Repetitionsmodus des DCs vorgesehen, dass zu der standardmäßigen FIFO-Ausgabe, die mit der konstanten Frequenz f_r ausgelöst wird, eine von maximal fünf weiteren vorprogrammierten Masken durch den Benutzer gesteuert einmal geladen und durchgeführt werden kann. So ist es möglich, während der Laser mit seiner optimalen Frequenz durchläuft, zusätzliche Triggersignale in größeren zeitlichen Abständen unabhängig von der Grundfrequenz zu generieren. Dies ermöglicht es die SC im Einzelschussmodus zu verwenden, was für TA Messungen zwingend notwendig ist. In Abbildung 2.4 ist schematisch der zeitliche Ablauf des 2D-TA Experiments dargestellt. Die komplette Steuerung erfolgt durch ein selbst geschriebenes LabView-Programm.

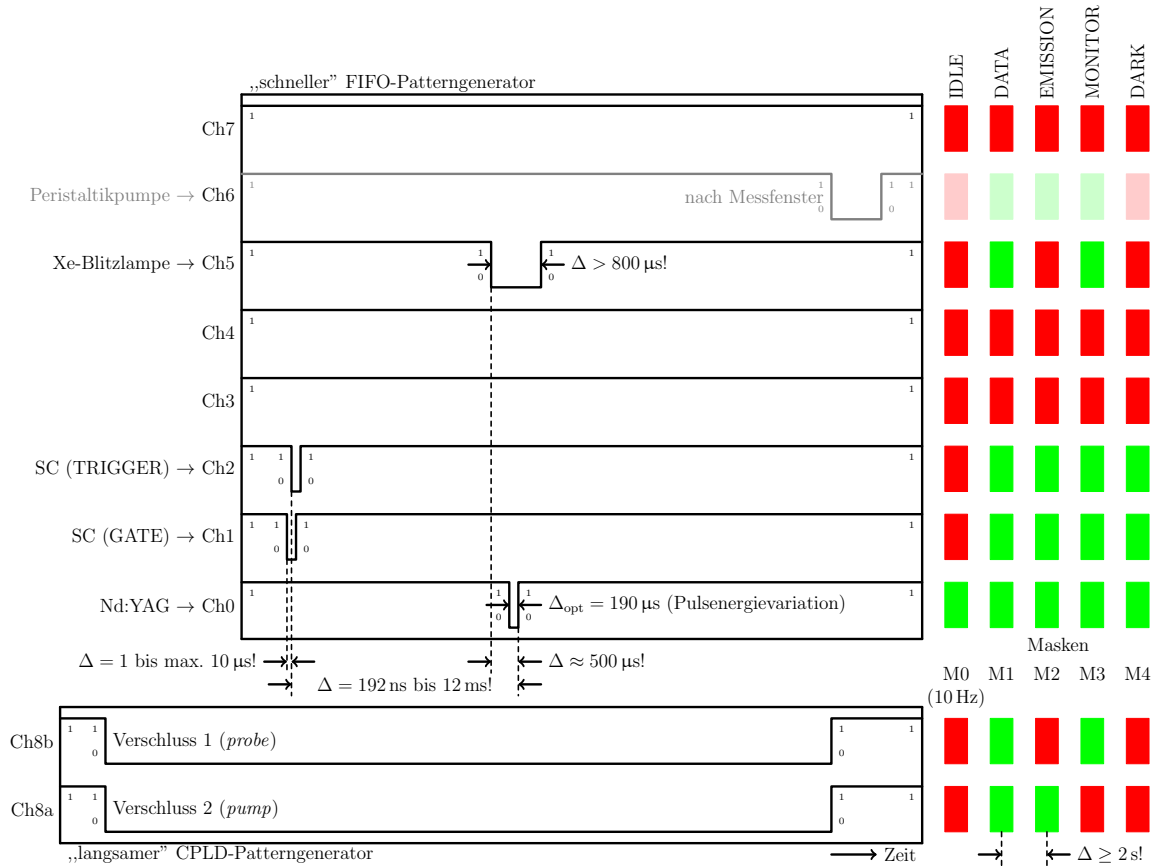


Abb. 2.4.: Schematischer zeitlicher Ablauf des 2D-TA Experiments gesteuert über den DC. Von oben nach unten sind die im DC zur Verfügung gestellten Triggerausgänge mit der entsprechenden zeitlichen Programmierung dargestellt. Ob ein programmierter Puls in einem Kanal durchgeführt wird, hängt von der entsprechenden Maskierung ab, die jeweils rechts daneben abgebildet ist (grün = aktiv; rot = inaktiv). Die Standard Maske ist M0 und wird mit 10 Hz abgerufen. In dieser Maske ist lediglich die Triggerung des Lasers aktiv. Zur Durchführung des Experiments werden nun im zeitlichen Abstand von zwei oder mehr Sekunden zusätzliche Masken eingespielt, welche die Aufnahme der vier möglichen Messungen (M1 = DATA = *pump* + *probe* + sample volume change, M3 = MONITOR = *probe* + sample volume change, M2 = EMISSION = *pump* + sample volume change und M4 = DARK = *dark current*) im Einzelschussmodus bewerkstelligen.

Folgende Punkte sind für die zeitliche Abstimmung des 2D-TA Experiments wichtig:

1. Die beiden optischen Verschlüsse sind zeitlich sehr träge und müssen daher mindestens 4 ms vor Triggerung der SC geöffnet werden. Der Aux-Ausgang generiert zwei gleich lange Pulse, dessen Pulsbreiten die Öffnungszeiten der Verschlüsse bestimmen (siehe Abbildung 2.5).
2. Die SC wird im GATE-Modus zur Minimierung des Untergrundrauschens betrie-

ben. Es ist darauf zu achten, dass das GATE 1 bis max. $10\ \mu\text{s}$ vor der Triggerung des SWEEPS geschaltet wird.

3. Die Triggerung der zu analysierenden optischen Ereignisse (*pump* und *probe*) hängt vom eingestellten Messzeitfenster der SC ab. Die Verzögerungszeiten liegen im Bereich von $145\ \text{ns}$ und $12\ \text{ms}$ und müssen aufgrund der verwendeten unterschiedlichen Kabellängen entsprechend feinjustiert werden.
4. Der zeitliche Abstand zwischen der Triggerung der Xe-Blitzlampe und dem tatsächlichen Laser-Ereignis ist optimal bei $\sim 500\ \mu\text{s}$. Bei diesen Bedingungen liegt der Laserpuls zu Beginn des zeitlichen Weißlichtplateaus der Xe-Blitzlampe.
5. Die Pulsbreite des Triggerpulses für die Xe-Blitzlampe muss bei $> 800\ \mu\text{s}$ liegen, da ansonsten der Puls nicht registriert wird.
6. Durch die Pulsbreite des Triggerpulses für den Nd:YAG Laser lässt sich die Pulsenergie für die Anregung einstellen. Der optimale Wert für maximale Energie liegt bei $190\ \mu\text{s}$.
7. Sollte eine Durchfluss-Küvette verwendet werden, welche pulswise das Probevolumen nach jeder Messung weiter drückt, sollte die Triggerung der Pumpe erst nach dem Messfenster erfolgen.

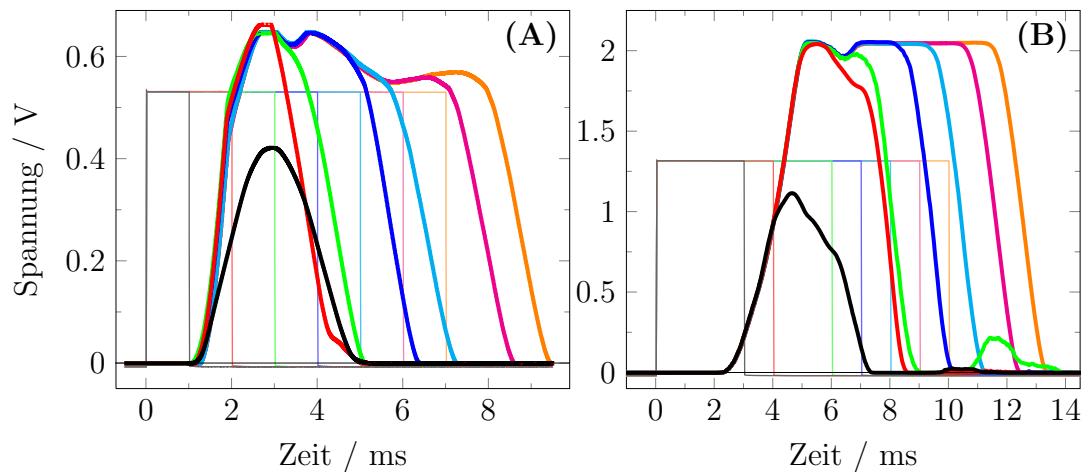


Abb. 2.5.: Öffnungszeiten der optischen Verschlüsse 1 (*probe*) (A) und 2 (*pump*) (B) in Abhängigkeit der Pulsbreite des angelegten Triggerpuls. Die Messungen der Öffnungszeiten erfolgte über die Abbildung einer Wolframlampe durch den jeweiligen Verschluss auf eine Photodiode. Das Photodiodensignal wurde von einem **Digitalspeicheroszilloskop (DSO)** (Tektronix) aufgezeichnet. Dunkle Linien: Photodiodensignal. Blasse Linien: Angelegter Triggerpuls.

Torische Spiegel für den Detektionsstrahlengang

Sphärische Hohlspiegel zeigen bei gewinkelter Strahlführung Astigmatismus als Bildfehler. Dies bedeutet, dass ein Punkt in zwei strichförmige Bilder in zwei unterschiedlichen Bildebenen abgebildet wird [Nau60]. Schleift man nun den Hohlspiegel von vornherein so, dass die Krümmungsradien in zwei senkrechten Schnitten verschieden sind (Torischer Spiegel), lassen sich unter einem bestimmten Winkel die effektiven Brennweiten wieder zur Deckung bringen. Ist f die gewünschte Brennweite, und spannen Gegenstand, Mittelpunkt des Spiegels und Objekt einen Winkel 2α auf, dann ergeben sich für die Krümmungsradien bei einer von Astigmatismus freien Abbildung $r_1 = \frac{2f}{\cos(\alpha)}$ (in der Ebene) und $r_2 = 2f \cos(\alpha)$ (senkrecht zur Ebene). Dies gilt für einen Abbildungsmaßstab nahe 1. Die in dieser Arbeit verwendeten torischen Spiegel sind nachträglich mit Aluminium bedampfte Brillenglasrohlinge der Firma Rodenstock, die uns freundlicherweise geschenkt worden sind. Die beiden Radien der torischen Spiegel betragen ca. $r_1 = 205 \text{ mm}$ und $r_2 = 191 \text{ mm}$, was in einer Brennweite f von 99 mm und einem Winkel α von 15° resultiert. Der Durchmesser eines torischen Spiegels beträgt 75 mm . Dies führt bei einer relativen Apertur (auch *f-number* genannt) von 4 des verwendeten Spektrographen zum vollständigen Ausleuchten des Gitters und bietet somit eine maximale spektrale Auflösung von besser als 3 nm über den Bereich von 300 bis 750 nm .

Berechnung der 2D transienten Absorption

Üblicherweise wird ein einzelner Datensatz der 2D-TA aus vier Bildern berechnet, die meist mit einer Frequenz von 0.5 Hz aufgenommen werden:

- Ein Bild mit Blitzlampe und Laser (\mathbf{I}^{DATA});
- ein Bild ohne einfallendes Licht (\mathbf{I}^{DARK});
- ein Bild nur mit der Blitzlampe ($\mathbf{I}^{\text{MONITOR}}$);
- und ein Bild nur mit dem Laser ($\mathbf{I}^{\text{EMISSION}}$).

Die erzeugten Daten sind meist Mittelungen über 100 individuelle Einzelmessungen im entsprechenden Zeitfenster. Die Zeitauflösung in Zeitfenstern von $\leq 1 \mu\text{s}$ wird durch die Laserpulsbreite bestimmt und beträgt etwa 15 ns . Bei Zeitfenstern $> 1 \mu\text{s}$ wird die Zeitauflösung von der SC bestimmt. Für die Berechnung der 2D-TA wird ein in der Programmiersprache C selbst geschriebenes Programm verwendet, welches über eine

LabView Benutzeroberfläche gesteuert wird. Dieses Programm sieht mehrere Möglichkeiten für die Verarbeitung der individuellen Einzelmessungen vor, je nach dem, ob Korrekturmessungen bezüglich der Emission und/oder des Hintergrunds durchgeführt wurden. Allgemein lautet die Berechnungsformel

$$\Delta \mathbf{A}(\lambda, t) = -\log \left(\frac{\sum_i^N (\mathbf{I}_i^{\text{DATA}} - \mathbf{I}_i^{\text{EMISSION}})}{\sum_i^N (\mathbf{I}_i^{\text{MONITOR}} - \mathbf{I}_i^{\text{DARK}})} \right), \quad (2.3)$$

wobei N die Gesamtzahl aller Messsequenzen darstellt. Sollen keinerlei Korrekturen erfolgen fallen $\mathbf{I}_i^{\text{DARK}}$ und $\mathbf{I}_i^{\text{EMISSION}}$ weg. Ist keine Korrektur bezüglich der Emission erwünscht, werden in der Differenz $\sum_i^N (\mathbf{I}_i^{\text{DATA}} - \mathbf{I}_i^{\text{EMISSION}})$ die Emissionsdaten durch \mathbf{I}^{DARK} ersetzt.

Weiterhin ist in dem Programm eine **Jitter**-Korrektur Routine implementiert. Diese Routine berechnet in einem gegebenen Bereich innerhalb der Datenmatrizen und ab einem gegebenen Schwellwert den Gewichtungsschwerpunkt eines dominanten Signals, wie z.B. des **Laser**pulses, nach folgender Formel:

$$\text{Gewichtungsschwerpunkt} = \text{lroundf} \left(\frac{\sum_j^m \sum_k^n j \cdot \mathbf{D}_{jk}}{\sum_j^m \sum_k^n \mathbf{D}_{jk}} \right), \quad (2.4)$$

wobei \mathbf{D}_{jk} ein Datenbereich innerhalb der gesamten Datenmatrix mit dem Zeitbereich vom Index j bis m und dem Spektralbereich vom Index k bis n ist. Basierend auf diesen Gewichtungsschwerpunkten kann dann zusätzlich eine **Jitter**-Korrektur durchgeführt werden, in dem alle Bilder entsprechend beschnitten und auf den zeitlich kürzesten Gewichtungsschwerpunkt zusammengeschoben werden.

2.1.3. Datenanalyse - Global Fit

Eine Datenmatrix zeitaufgelöster spektroskopischer Daten $\mathbf{A}(t, \lambda)$ besteht aus einer Summe von Spektren verschiedener Spezies, wobei angenommen wird, dass das Spektrum einer einzelnen Spezies $\mathbf{S}_i(\lambda)$ sich nicht mit der Zeit ändert, sondern nur dessen Gewichtungsfaktor bzw. dessen Konzentration $\mathbf{C}_i(t)$. Dies ist eine sehr gute Annahme für Messungen im Zeitbereich von einigen ns und größer, da spektrale Verschiebungen aufgrund von Lösungsmittelrelaxationen üblicherweise im fs- bis ps-Bereich beobachtet

werden. Bei einer Gesamtzahl von N beteiligten Spezies, wobei Spezies N zum einen die Ausgangsspezies (vor der Anregung) und zum anderen auch die Endspezies (bei Annahme eines reversiblen Photozyklus) sein soll, ist die Absorption des Systems zu jedem Zeitpunkt gegeben durch

$$\mathbf{A}(t, \lambda) = \sum_{i=1}^N \mathbf{C}_i(t) \mathbf{S}_i(\lambda) \quad (2.5)$$

mit der Zusatzbedingung, dass die Summe der Konzentrationen

$$\sum_{i=1}^N \mathbf{C}_i(t) = \mathbf{C}_0 \quad (2.6)$$

konstant ist (In Abbildung 2.6 ist Gleichung 2.5 in Matrixform wiedergegeben.). \mathbf{C}_0

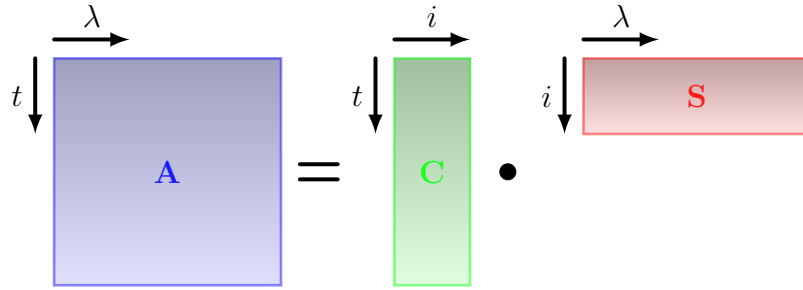


Abb. 2.6.: Graphische Representation der Gleichung 2.5 in Matrixform.

ist die Gesamtkonzentration aller Spezies und gleichzeitig die Anfangskonzentration an Spezies N vor der Anregung. Bei transienten Absorptionsmessungen ist in der Regel die Probe vor der Anregung die Referenz, so dass für die Absorptionsänderung dann

$$\begin{aligned} \Delta \mathbf{A}(t, \lambda) &= \mathbf{A}(t, \lambda) - \mathbf{A}(0, \lambda) = \sum_{i=1}^N \mathbf{C}_i(t) \mathbf{S}_i(\lambda) - \mathbf{C}_0 \mathbf{S}_N(\lambda) \\ \Delta \mathbf{A}(t, \lambda) &= \sum_{i=1}^N \tilde{\mathbf{C}}_i(t) \mathbf{S}_i(\lambda) \quad \text{mit} \quad \tilde{\mathbf{C}}_i(t) = \begin{cases} \mathbf{C}_i(t) & i \neq N \\ \mathbf{C}_N(t) - \mathbf{C}_0 & i = N \end{cases} \end{aligned} \quad (2.7)$$

gilt. Unter Verwendung von Gleichung 2.6 kann man jedoch auch

$$\begin{aligned} \Delta \mathbf{A}(t, \lambda) &= \sum_{i=1}^N \mathbf{C}_i(t) \mathbf{S}_i(\lambda) - \mathbf{C}_0 \mathbf{S}_N(\lambda) \\ &= \sum_{i=1}^N \mathbf{C}_i(t) \mathbf{S}_i(\lambda) - \sum_{i=1}^N \mathbf{C}_i(t) \mathbf{S}_N(\lambda) \\ \Delta \mathbf{A}(t, \lambda) &= \sum_{i=1}^{N-1} \mathbf{C}_i(t) \underbrace{(\mathbf{S}_i(\lambda) - \mathbf{S}_N(\lambda))}_{=\text{SADS}} \end{aligned} \quad (2.8)$$

schreiben, wobei nun der Klammerausdruck in Gleichung 2.8 das so genannten *Species Associated Difference Spectrum* (SADS) der Spezies i darstellt, und die Funktionen

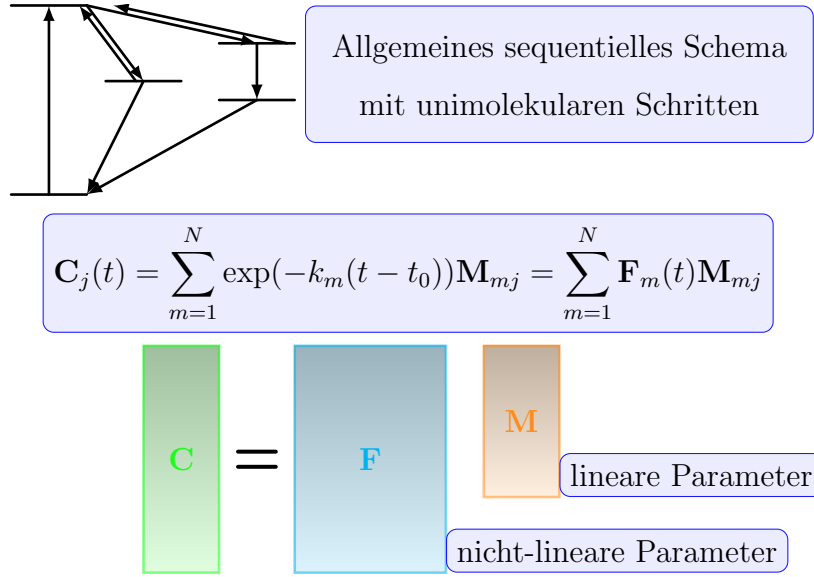


Abb. 2.7.: Beispiel eines allgemeinen sequentiellen Schemas mit unimolekularen Schritten, dessen Lösung eine Summe von exp-Funktionen ist. Zusätzlich ist eine graphische Representation der Gleichung 2.9 in Matrixform gegeben.

$\mathbf{C}_i(t)$ die Konzentrationsverläufe jeder Spezies i wiedergibt. Wird die Annahme gemacht, dass es sich nur um unimolekulare Reaktionsschritte (siehe Abbildung 2.7) handelt, so bestehen die $\mathbf{C}_i(t)$ aus einer Summe von Exponentialfunktionen (Die Herleitung hierfür ist in [Sac71] zu finden.):

$$\mathbf{C}_i(t) = \sum_{j=1}^N \exp(-k_j(t-t_0)) \mathbf{M}_{ji} = \sum_{j=1}^N \mathbf{F}_j(t) \mathbf{M}_{ji} \quad (2.9)$$

Somit tragen prinzipiell alle Ratenkonstanten zu allen Konzentrationsverläufen aller Spezies bei. Sind allgemein gesprochen N Spezies beteiligt, die sich allesamt in einander übergehen können, so sind $N(N-1)$ Ratenkonstanten möglich. Allerdings sind nur N Kombinationen dieser messbar.

Im Folgenden sei auf ein aus N konsekutiven Schritten bestehendes Reaktionsmodell näher eingegangen, in welchem die N -te Spezies den Dunkelzustand symbolisiert. In solch einem Fall gibt es dann $N-1$ Ratenkonstanten. Der Dunkelzustand sei nur mit einem kurzen Lichtpuls depopuliert, also $k_0 = \infty$, und von alleine wandelt er sich nicht um, also gilt $k_N = 0$. Durch Einsetzen eines solchen Modells in Gleichung 2.7 erhält man

$$\begin{aligned} \Delta \mathbf{A}(t, \lambda) &= \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \exp(-k_j(t-t_0)) \mathbf{M}_{ji} \mathbf{S}_i(\lambda) = \sum_{j=1}^N \exp(-k_j(t-t_0)) \underbrace{\sum_{i=1}^N \mathbf{M}_{ji} \mathbf{S}_i(\lambda)}_{=\mathbf{D}_j(\lambda)} \\ &= \sum_{j=1}^N \exp(-k_j(t-t_0)) \mathbf{D}_j(\lambda), \end{aligned} \quad (2.10)$$

wobei das $\mathbf{D}_j(\lambda)$ als das **DADS** definiert wird und eine Linearkombination aller gesuchten Speziesspektren darstellt. Dieses Spektrum beinhaltet also denjenigen Anteil der transienten Absorption, dessen Dynamik durch die Ratenkonstante k_j gegeben ist. Dabei zeigen positive Amplituden zerfallende Spezies und negative Amplituden entstehende Spezies an. Die **DADS** $\mathbf{D}_j(\lambda)$ ergeben sich durch einen multiexponentiellen globalen Fit an die Daten. Der Fit liefert ein eindeutiges Ergebnis, dessen Qualität an den Residuen (Abweichung zwischen Fitkurve und gemessenen Daten) bewertet werden kann.

Die $\mathbf{D}_j(\lambda)$ sind nun eine Linearkombination der gesuchten *Species Associated Spectra* (**SAS**) gegeben durch

$$\mathbf{D}_j(\lambda) = \sum_{i=1}^N \mathbf{M}_{ji} \mathbf{S}_i(\lambda). \quad (2.11)$$

Die Koeffizienten \mathbf{M}_{ji} spiegeln dabei den zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus wider. Mögliche Reaktionsmechanismen wären z.B. parallele Reaktionen, Zerfallssequenzen oder auch Gleichgewichtseinstellungen. Festzuhalten bleibt an dieser Stelle, dass die exakten Ratenkonstanten des vorliegenden Reaktionsmechanismus und somit auch eine exakte Zerlegung der Datenmatrix $\mathbf{A}(t, \lambda)$ in seine absoluten **SAS** und entsprechenden Konzentrationszeitprofile sich grundsätzlich nicht durch den multiexponentiellen Fit bestimmen lassen, da jede Variation der \mathbf{M}_{ji} nichts an der Summe der kleinsten Fehlerquadrate ändert. Abbildung 2.8 macht noch einmal deutlich, dass die Zerlegung der Datenmatrix $\mathbf{A}(t, \lambda)$ nicht eindeutig ist. Will man Gleichung 2.11 somit nach seinen **SAS** auflösen, so sind Zusatzannahmen zwingend erforderlich.

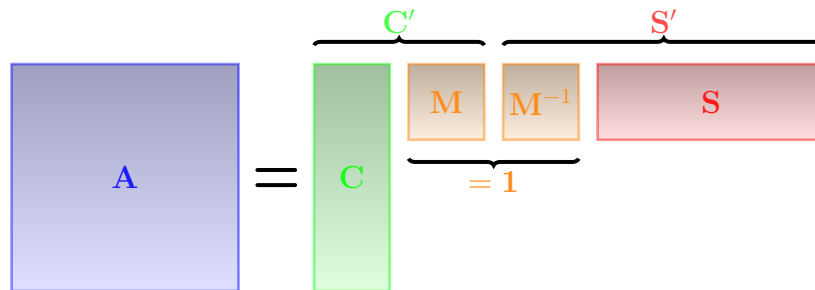


Abb. 2.8.: Die Zerlegung der Datenmatrix $\mathbf{A}(t, \lambda)$ in seine absoluten *Species Associated Spectra* (**SAS**) $\mathbf{S}(\lambda)$ und entsprechenden Konzentrationszeitprofile $\mathbf{C}(t)$ ist grundsätzlich nicht eindeutig.

Global Fit - Algorithmus

Wie in Abschnitt 2.1.3 bereits beschrieben wurde, werden im Fall der 2D-TA zweidimensionale Datensätze erhalten, welche mit Hilfe von Modellfunktionen für mögliche Interpretationen beschrieben werden sollen. Gegeben ist zum einen die Datenmatrix $\mathbf{A} \in \mathbb{R}^{m \times n}$, deren Spalten n die zeitliche und Zeilen m die wellenlängenabhängige Information beinhalten, und zum anderen eine Modellfunktionsmatrix $\mathbf{F}(\mathbf{a}) \in \mathbb{R}^{m \times k}$, welche in ihren Spalten k die jeweiligen Dynamikfunktion der entsprechenden Komponente entlang der Zeilen m enthält. Die jeweilige Dynamikfunktion hängt wiederum von entsprechenden nichtlinearen Parametern ab, die im Parametervektor \mathbf{a} vorliegen. Im Programm **GlobFit** sind derzeit Exponentialfunktionen (als Kinetikmodell) gefaltet mit einer GAUSS-Funktion (als Apparatefunktionsmodell) implementiert. Auch vorgesehen ist eine konstante Funktion, falls Datensätze vorliegen, in denen sich aufgrund von Photodegeneration die Grundlinie mit der Messzeit verändert hat. Denn dieses führt dazu, dass spektrale Änderungen bereits vor der Initiierung der zu beobachteten Photoreaktion auftreten, die eine konstante Dynamik aufweisen.

Ziel ist es die Spektrenmatrix $\mathbf{X} \in \mathbb{R}^{k \times n}$, welche in ihren Zeilen k die jeweiligen DADS der entsprechenden Komponente entlang der Spalten n beinhaltet, bei gleichzeitiger Optimierung der Parameter im Vektor \mathbf{a} zu ermitteln. Das zu minimierende Problem ist somit gegeben durch:

$$\mathbf{a}^* = \min_{\mathbf{a}} \{Y(\mathbf{a})\} \quad (2.12)$$

mit

$$Y(\mathbf{a}) = \chi^2 = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n \left(\frac{y_{ij}(\mathbf{a})}{\sigma_{ij}} \right)^2 \quad (2.13)$$

und mit

$$y_{ij}(\mathbf{a}) = (\mathbf{A} - \mathbf{A}^{\text{Modell}}(\mathbf{a}))_{ij} = \underbrace{(\mathbf{A} - \mathbf{F}(\mathbf{a})\mathbf{X})}_{=\mathbf{f}(\mathbf{a})}_{ij},$$

wobei typischerweise ein einheitlicher Fehler $\sigma_{ij} = 1.0$ angenommen wird. Die Funktion kleinster Fehlerquadrate besteht sowohl aus einem linearen als auch aus einem nichtlinearen Problem (siehe Abbildung 2.9). Eine Lösung wird in einem iterativen Verfahren erhalten. In einem Iterationszyklus wird geschachtelt bei anfänglich geschätztem \mathbf{a} das lineare Problem und das nichtlineare Problem gelöst, um die optimalen Parameter \mathbf{a} der Modellfunktionen zu erhalten. Das Lösen des linearen Problems geschieht über eine Standard-subroutine **DGELS()** aus der LAPACK-Bibliothek (LAPACK-3.1.1,

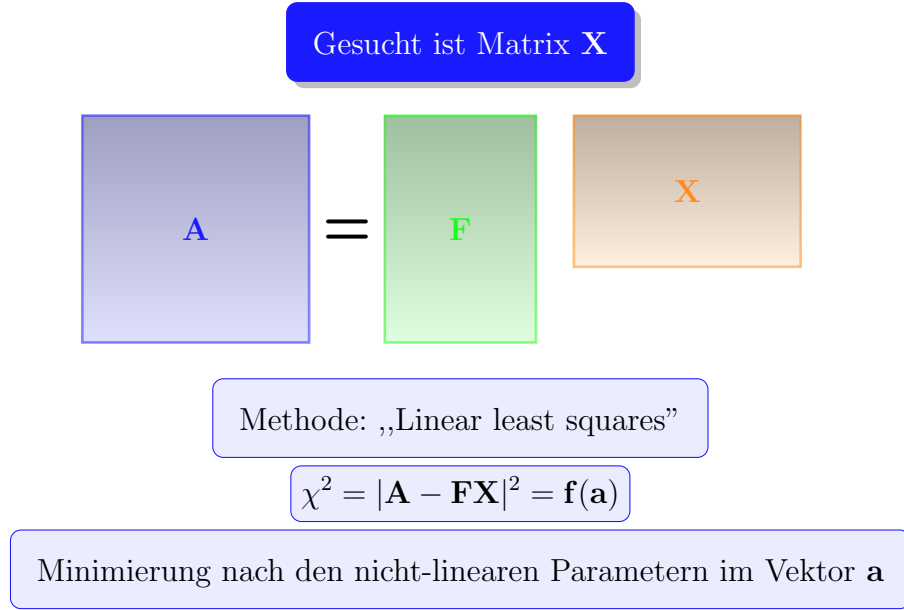


Abb. 2.9.: Lineares vs. nichtlineares Problem.

siehe auch „LAPACK User’s Guide“ [And+99]), welche das überbestimmte reelle lineare Gleichungssystem unter Verwendung einer QR- oder LQ-Faktorisierung der Matrix \mathbf{F} , welche vollen Rang hat, löst. Das nichtlineare Problem kann durch allgemeine sehr effiziente Optimierungsmethoden gelöst werden [MNT04]. Der in dieser Arbeit verwendete Algorithmus basiert auf einem gedämpften GAUSS-NEWTON Verfahren, das zuerst von LEVENBERG (1944) und später von MARQUARDT vorgeschlagen wurde [Lev44; Mar63]. Es handelt sich genau genommen um eine weitere Abwandlung des LEVENBERG-MARQUARDT-Algorithmus nach [MNT04], welcher im Allgemeinen den ursprünglichen Algorithmus in Konvergenzgeschwindigkeit und Stabilität überragt. Eine genauere Beschreibung des Algorithmus ist im Anhang A.1 zu finden.

Der komplette Optimierungszyklus des Programms **GlobFit** ist in Abbildung 2.10 schematisch dargestellt. Die Berechnung der Modellmatrix $\mathbf{D}^{\text{Modell}}$ aus der Lösungsmatrix \mathbf{X} , welche spaltenweise die DADS der k Komponenten enthält, und der Funktionsmatrix $\mathbf{F}(\mathbf{a})$ erfolgt über:

$$\mathbf{A}^{\text{Modell}}(\mathbf{a}) = \mathbf{F}(\mathbf{a})\mathbf{X}. \quad (2.14)$$

Der Gradienten-Vektor bezüglich der Parameter \mathbf{a} ist aus k Matrizen $\mathbf{G}_k(\mathbf{a})$ aufgebaut und wird numerisch nach folgender Gleichung berechnet:

$$\mathbf{G}_k(\mathbf{a}) = \frac{\mathbf{A}^{\text{Modell}}(\mathbf{a}_k + \delta) - \mathbf{A}^{\text{Modell}}(\mathbf{a}_k - \delta)}{2\delta}, \quad (2.15)$$

wobei $\mathbf{A}^{\text{Modell}}(\mathbf{a}_k \pm \delta)$ jeweils nach Gleichung 2.14 erfolgt, und δ typischerweise gleich $10.0\text{e-}10$ gewählt wird.

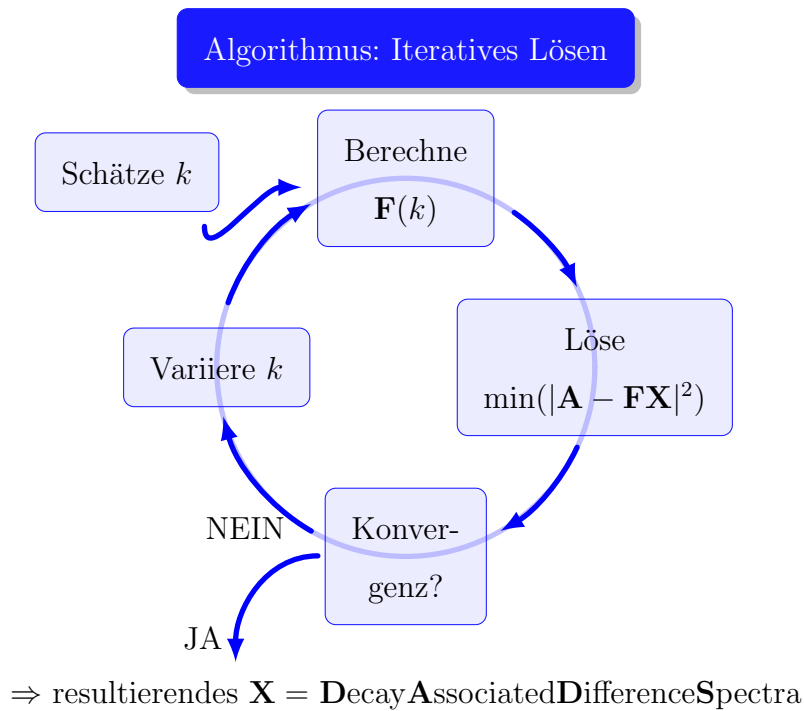


Abb. 2.10.: Schematische Darstellung des iterativen Optimierungszyklus des globalen Fit-Programms.

Exemplarische globale Analyse simulierter Datensätze

Anhand von zwei simulierten Datensätzen für eine 2D-TA wird exemplarisch die globale Datenanalyse diskutiert. Für die Simulationen wird jeweils von einem photochemischen Modellsystem bestehend aus vier Spezies ausgegangen. Es werden für dieses Modellsystem zwei unterschiedliche kinetische Modelle (Modell 1 und Modell 2) betrachtet. Beide Modelle umfassen dieselben vier Spezies (siehe Abbildung 2.12), deren Spektren durch GAUSS-Profile nach folgender allgemeiner Form beschrieben werden:

$$\text{Sp}(\lambda) = \frac{\text{Amp}}{w\sqrt{\frac{\pi}{2}}} \exp\left(-2\left(\frac{\lambda - \lambda_0}{w}\right)^2\right) \quad (2.16)$$

Dabei steht Amp für die Fläche, w für die Halbwertsbreite und λ_0 für die Lage des GAUSS-Profiles. Für eine bessere Anschaulichkeit sollen alle vier Spektren die gleiche Form haben, und die Lage der Spektren so gewählt werden, dass sie um mehr als ihre Halbwertsbreite auseinander liegen.

Die jeweiligen kinetischen Modelle sind in Abbildung 2.11 dargestellt. In beiden Modellen ist zu Beginn ausschließlich der Grundzustand (GZ) mit einer Konzentration von

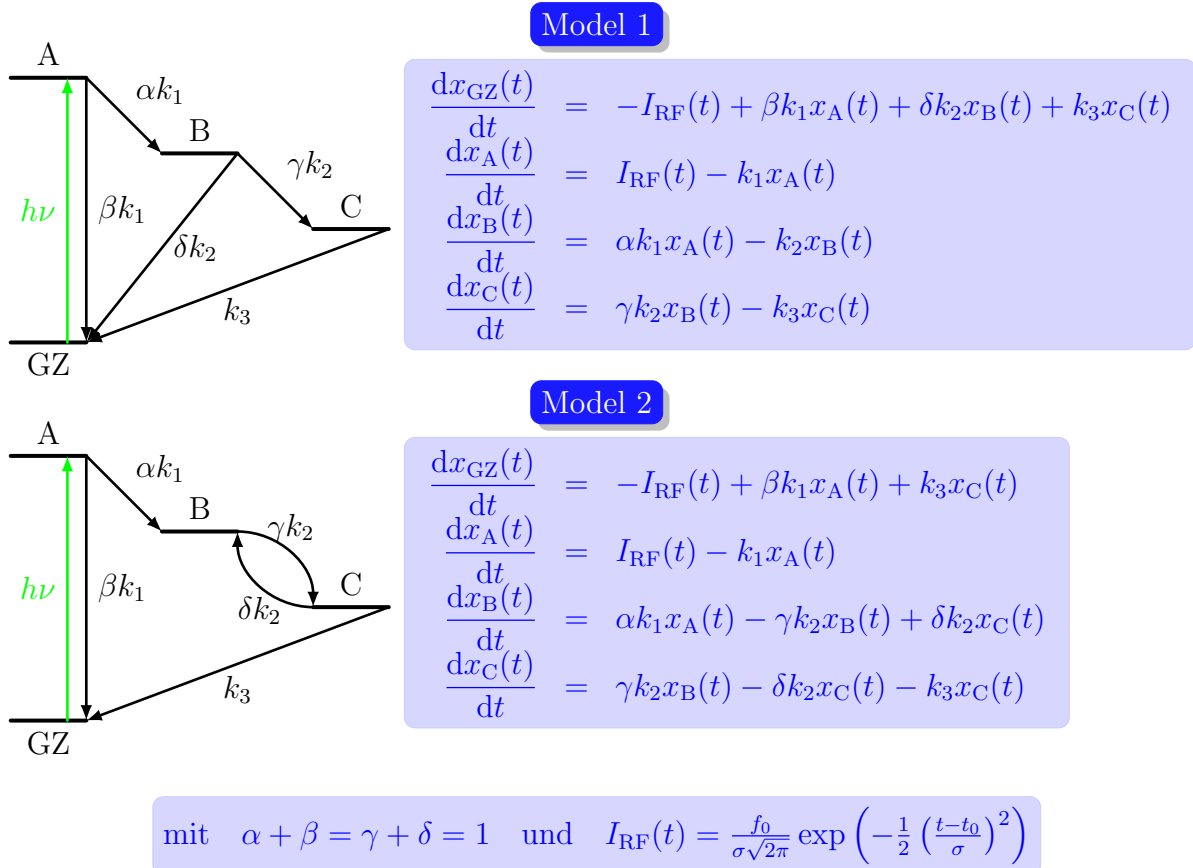


Abb. 2.11.: Schematische Darstellung des kinetischen Modells mit den entsprechenden DGL-Systeme für (Modell 1) und (Modell 2).

1 mol · L⁻¹ vorhanden, so dass gilt:

$$x_{GZ}(0) = 1 \quad x_A(0) = x_B(0) = x_C(0) = 0 \quad (2.17)$$

$$c_{GZ}(0) = 1 \quad c_A(0) = c_B(0) = c_C(0) = 0. \quad (2.18)$$

Die Dynamik wird in beiden Fällen durch einen kurzen Lichtpuls initiiert, der einen Anteil f_0 des GZ in die Spezies A anregt. In beiden Modellen zerfällt die Spezies A mit einem Anteil α in Spezies B und mit einem Anteil β zurück in den GZ. Die beiden Modelle unterscheiden sich ab den Prozessen ausgehend von Spezies B. In Modell 1 zerfällt Spezies B mit einem Anteil γ in Spezies C und mit einem Anteil δ zurück in den GZ. In Modell 2 dagegen besteht zwischen den Spezies B und C ein Gleichgewicht mit den jeweiligen Anteilen γ für die Reaktion von B nach C und δ für die Reaktion von C nach B. Die Spezies C zerfällt schließlich in beiden Modellen zurück in den GZ. In Abbildung 2.12 sind die eingesetzten Spektren, die zeitabhängigen Molenbrüche und die entsprechenden Parameter der vier Spezies zu finden. Die Datensätze werden gemäß Gleichung 2.5 und Addition von Rauschen mit einer Standardabweichung von 0.05 erzeugt. Zusätzlich wird das Grundzustandsspektrum von den Datenmatrizen subtrahiert,

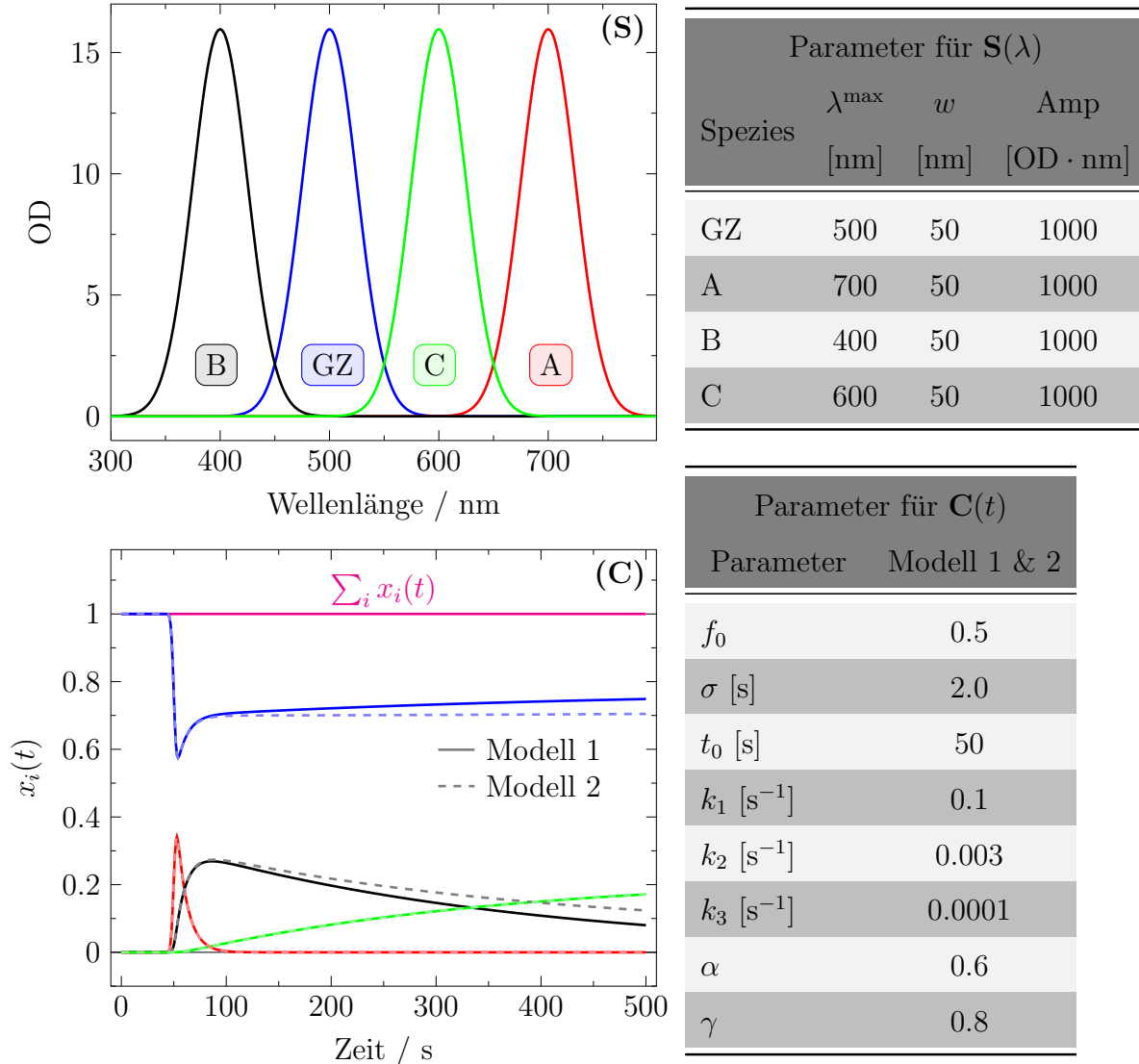


Abb. 2.12.: (S): Simulierte GAUSS-Funktionen repräsentativ für die vier Spezies GZ, A, B und C. (C): Zeitabhängige Molenbrüche $x_i(t)$ der jeweiligen Spezies simuliert entsprechend der DGL-Systeme aus Abbildung 2.11. Durchgezogene Linien gelten für Modell 1 und gestrichelte Linien für Modell 2. In den Tabellen sind die eingesetzten Parameter eingetragen.

um eine Differenzabsorption zu erhalten. Die Datensätze für die beiden Modelle sind als Falschfarbendarstellung in Abbildung 2.13 (D1) und (D2) gezeigt. Der Spektralbereich erstreckt sich von 300 bis 800 nm und der Zeitbereich von 0 bis 500 s bei einem jeweiligen Inkrement von 1.

Zu Beginn werden die beiden Datensätze global gefittet. Als Zeitfunktionen dienen einfache Exponentialfunktionen, die mit einer GAUSS-Funktion als Antwortfunktion gefaltet werden. In beiden Fällen sind mindestens drei Zeitfunktionen für eine sehr gute Beschreibung der Daten notwendig (siehe Abbildung 2.13 (R1) und (R2)). Die dazugehörigen DADS sind in Abbildung 2.13 dargestellt. In Abschnitt 2.1.3 wurde bereits

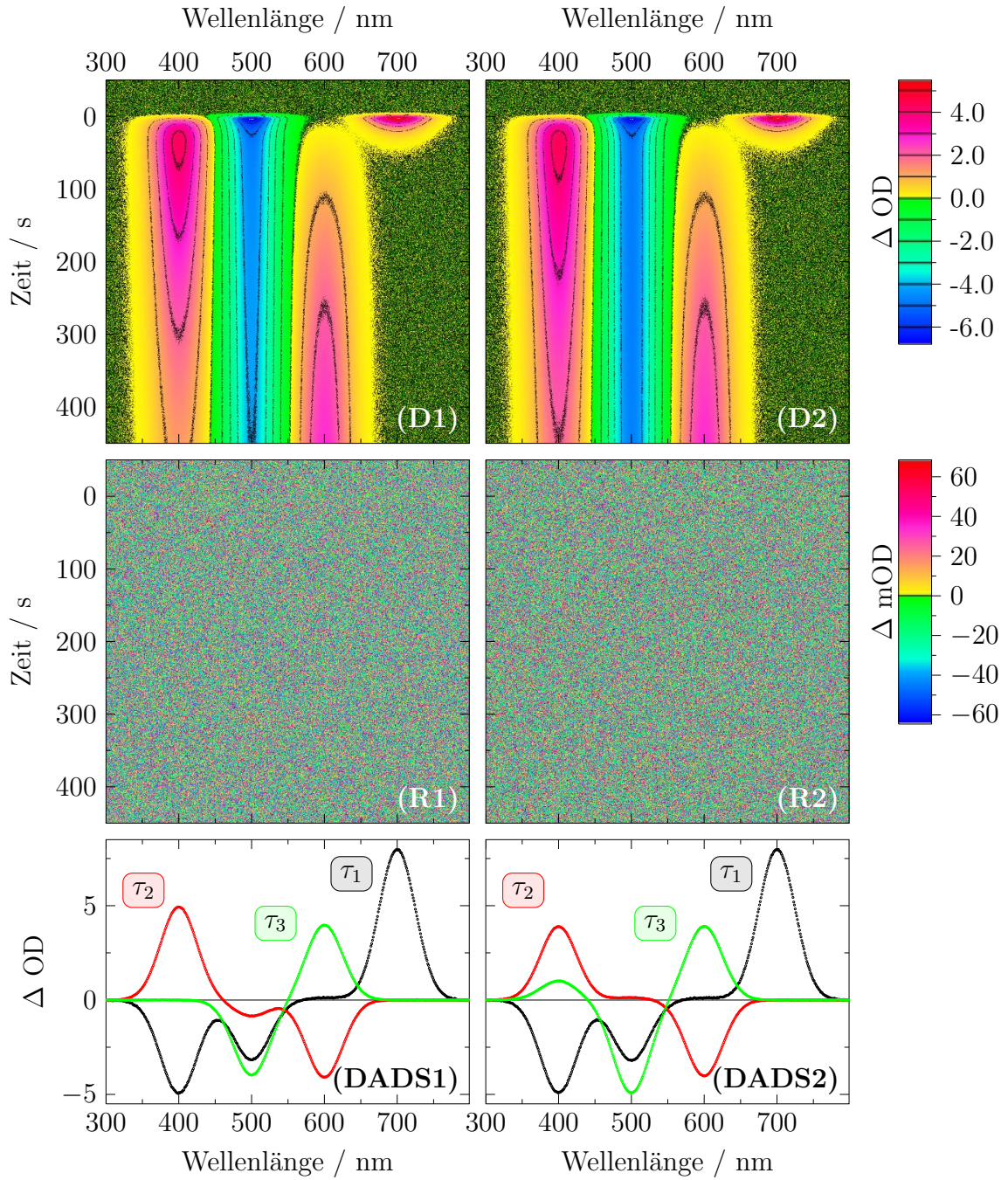


Abb. 2.13.: Falschfarbendarstellung der simulierten Datensätzen entsprechend der DGL-Systeme aus Abbildung 2.11. (R1)-(R2): Residuen nach einem globalen Fit mit drei einfachen Exponentialfunktionen gefalten mit einer GAUSS-Funktion als Antwortfunktion. (DADS1): DADS für Datensatz 1 mit $\tau_1 = 10$ s, $\tau_2 = 333$ s und $\tau_3 \gg 500$ s. (DADS2): DADS für Datensatz 2 mit $\tau_1 = 10$ s, $\tau_2 = 333$ s und $\tau_3 \gg 500$ s.

erläutert, dass die positiven Amplituden zerfallende Spezies und negative Amplituden entstehende Spezies anzeigen. Anhand der beiden gewählten Simulationen wird dies sehr deutlich veranschaulicht.

Zuerst seien die **DADS** für den Datensatz 1 betrachtet. Das **DADS** mit der kürzesten Lebensdauer von $\tau_1 = 10\text{ s}$ zeigt eine positive Bande bei 700 nm und zwei negative Banden bei 400 und 500 nm. Gemäß des gewählten Modell 1 zerfällt demnach die mit der Lichtanregung erzeugte Spezies A ($\lambda_0 = 700\text{ nm}$) mit einer Lebensdauer von 10 s zu einem Teil in Spezies B ($\lambda_0 = 400\text{ nm}$) und zu einem anderen Teil die **GZ**-Spezies ($\lambda_0 = 500\text{ nm}$). Dieser Zerfall ist vollständig, da in den weiteren **DADS** im Bereich um 700 nm keinerlei Signal mehr beobachtet wird. Im **DADS** mit $\tau_2 = 333\text{ s}$ sind eine positive Bande bei 400 nm und zwei negative Banden bei 500 und 600 nm zu erkennen. Mit einer Lebensdauer von $\tau_2 = 333\text{ s}$ zerfällt demnach die zuvor gebildete Spezies B ($\lambda_0 = 400\text{ nm}$) zu einem Teil in die **GZ**-Spezies ($\lambda_0 = 500\text{ nm}$) und zu einem Teil in Spezies C ($\lambda_0 = 600\text{ nm}$). Das **DADS**, dessen Lebensdauer viel größer als das Zeitfenster der Simulation ist, zeigt schließlich durch eine positive Bande bei 600 nm und eine negative Bande bei 500 nm den Übergang von Spezies C ($\lambda_0 = 600\text{ nm}$) ausschließlich in die **GZ**-Spezies ($\lambda_0 = 500\text{ nm}$).

Die Deutungen der **DADS** für den Datensatz 2 erfolgen analog. Modell 2 sieht bis hin zur Bildung der Spezies B die gleichen Reaktionsschritte vor. Demzufolge gilt für das **DADS** mit $\tau_1 = 10\text{ s}$ die gleiche Aussage wie in Datensatz 1. Das **DADS** mit $\tau_2 = 333\text{ s}$ aus Datensatz 2 zeigt jedoch Unterschiede im Vergleich zum entsprechenden **DADS** aus Datensatz 1. Es liegt hier neben der positiven Bande bei 400 nm nur noch eine negative Bande bei 600 nm vor. Es wird somit ersichtlich, dass die Spezies B ($\lambda_0 = 400\text{ nm}$) in diesem Fall nicht mehr zu einem Teil in die **GZ**-Spezies, sondern ausschließlich in die Spezies C ($\lambda_0 = 600\text{ nm}$) zerfällt. Das **DADS** mit $\tau \gg 500\text{ s}$ besitzt zwei positive Banden bei 400 und 600 nm und eine negative Bande bei 500 nm. Im Vergleich zum entsprechenden **DADS** aus Datensatz 1 wird hier ersichtlich, dass sowohl Spezies B ($\lambda_0 = 400\text{ nm}$) als auch Spezies C ($\lambda_0 = 600\text{ nm}$) auf der gleichen Zeitskala in die **GZ**-Spezies zerfallen. Gemäß des gewählten Modell 2 wird durch die beiden positiven Banden deutlich, dass sich Spezies B und C in einem Gleichgewicht befinden.

Im nächsten Schritt der Analyse werden entsprechend der verwendeten Modelle aus den jeweiligen **DADS** die **SAS** ermittelt. Für eine vereinfachte Analyse beider Datensätze wurden die Ratenkonstanten so gewählt, dass sie sich um einen Faktor von mehr als 30

zueinander unterscheiden. Dadurch tragen in jedem einzelnen DADS nur diejenigen SAS bei, die am jeweiligen Reaktionsschritt entweder als Edukt oder als Produkt beteiligt sind. Entsprechend der gewählten Modelle findet man folgende Beziehung zwischen den DADS D_i und den SAS S_I :

$$\begin{array}{l} \text{Modell 1:} \\ \left. \begin{array}{l} D_1 = S_A - \alpha S_B - x\beta S_{GS} \\ D_2 = \alpha S_B - \alpha\gamma S_C - x\alpha\delta S_{GS} \\ D_3 = \alpha\gamma S_C - x\alpha\gamma S_{GS} \end{array} \right\} \Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} S_A = D_1 + D_2 + D_3 + xS_{GS} \\ S_B = \frac{D_2 + D_3}{\alpha} + xS_{GS} \\ S_C = \frac{D_3}{\alpha\gamma} + xS_{GS} \end{array} \right. \quad (2.19) \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{Modell 2:} \\ \left. \begin{array}{l} D_1 = S_A - \alpha S_B - x\beta S_{GS} \\ D_2 = \alpha\gamma S_B - \alpha\gamma S_C \\ D_3 = \alpha\gamma S_C + \alpha\delta S_B - x\alpha S_{GS} \end{array} \right\} \Rightarrow \left\{ \begin{array}{l} S_A = D_1 + D_2 + D_3 + xS_{GS} \\ S_B = \frac{D_2 + D_3}{\alpha} + xS_{GS} \\ S_C = \frac{1}{\alpha} \left(-\frac{\delta}{\gamma} D_2 + D_3 \right) + xS_{GS} \end{array} \right. \quad (2.20) \end{array}$$

Das x stellt dabei einen unbekannten Anteil der GZ-Population dar, der in die Spezies A angeregt wird. Es zeigt sich, dass S_A und S_B in beiden Modellen in gleicher Weise von den jeweiligen DADS abhängen, während S_C eine unterschiedliche Abhängigkeit von den DADS aufweist. Des Weiteren zeigt sich, dass die SAS in beiden Modellen nicht eindeutig bestimmt sind. Modell 1 hat mit x , α und γ drei Unbekannte. In Modell 2 geht das Verhältnis $\frac{\delta}{\gamma}$ zusätzlich als vierte Unbekannte ein. Mit Hilfe der Beziehung $\gamma + \delta = 1$ kann dieses Verhältnis schließlich nach γ und δ aufgelöst werden. Die Unbekannten in den jeweiligen Modellen werden nun so bestimmt, dass alle SAS bei allen Wellenlängen positiv sind und jedes einzelne SAS nur ein ausgeprägtes Maximum aufweist. Wie erwartet, ergeben sich mit den für die jeweilige Simulation eingesetzten Parametern die besten SAS (siehe Abbildung 2.14). Die kleinen Abweichungen im Fall von Spezies B und C sind mit den gemachten Näherungen bei der Auswertung zu erklären. Abweichungen von den optimalen Parametern resultieren in Überschätzungen (zusätzliche positive Banden (rote Spektren)) bzw. Unterschätzungen (zusätzliche negative Banden (grüne Spektren)) der Anteile beteiligter Spezies. Wären die exakten Spektren der beteiligten Spezies im Vorfeld jedoch nicht bekannt, wie es meist der Fall ist, bliebe die Wahl eines geeigneten Modells sowie der darin enthaltenen Unbekannten, stets eine Ermessensfrage und bedürfte stets einer Überprüfung durch andere Experimente.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass hier eine Diskussion mit drastischen Vereinfachungen zur besseren Veranschaulichung geführt wurde. In der Realität können sich die Speziesspektren über den gesamten Spektralbereich erstrecken, was eine starke Über-

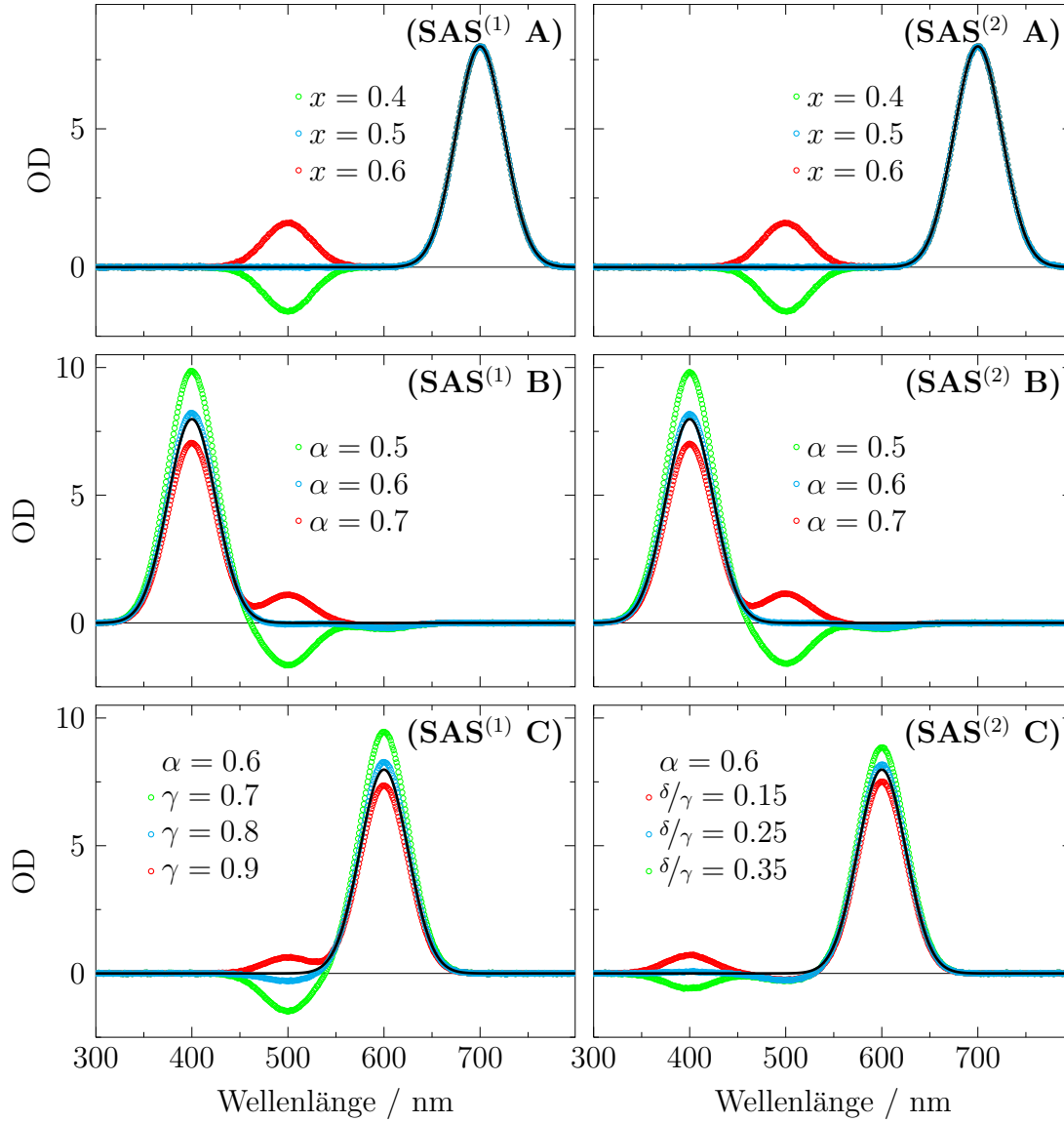


Abb. 2.14.: Exemplarische Analyse an simulierten Datensätzen entsprechend der Modelle aus Abbildung 2.11. SAS (offene Kreise) im Vergleich zu den eingesetzten Spektren für die Erzeugung der simulierten Daten (durchgezogene schwarze Linien). Mit Hilfe von $\gamma + \delta = 1$ erhält man aus dem Verhältnis $\frac{\delta}{\gamma} = 0.25$ in (SAS⁽²⁾ C) $\gamma = 0.8$ und $\delta = 0.2$.

lagerung aller beteiligten Spezies zur Folge haben kann. Auch können die jeweiligen Extinktionskoeffizienten deutlich verschieden sein, was eine weitere genaue Zuordnung beteiligter Prozesse erheblich erschwert. Und Letztlich können die jeweiligen Ratenkonstanten viel näher beieinander liegen, so dass im ungünstigsten Fall einige Intermediate aufgrund zu geringer Population nicht identifiziert werden können. All diese Faktoren lassen in den meisten Fällen eine genaue Bestimmung der beteiligten Speziesspektren sowie deren Reaktionen untereinander ohne zusätzliche Informationen aus anderen Experimenten nur bedingt zu.

Global Fit - Modifikationen für bi-molekulare Modelle

Die Modellannahme von einfachen exp-Funktionen gilt nur für eine Dynamik, die ausschließlich aus Reaktionsschritten erster Ordnung besteht. Hat man es jedoch mit Systemen zu tun, in denen bi-molekulare Reaktionsschritte vorkommen, wie z.B. die Triplett-Triplett-Annihilation, dann muss auf die explizite Lösung eines entsprechenden DGL-System für eine entsprechende Modellannahme zurückgegriffen werden. Aus diesem Grund wurde das Programm `GlobFit_Runge_Kutta` geschrieben, das die Lösung eines vom Nutzer vorgegebenen DGL-Systems nach dem RUNGE-KUTTA-Verfahren 4. Ordnung (siehe Abschnitt A.2) vorsieht. Die resultierenden k Zeitprofile werden dabei anstatt der üblichen Exponentialfunktionen in der Modellfunktionsmatrix $\mathbf{F}(\mathbf{a}) \in \mathbb{R}^{m \times k}$ eingesetzt. Zur Generierung der k Zeitprofile müssen Anfangswerte entsprechend eines Modellsystems gewählt werden. Im Falle eines photochemischen Modellsystems wird davon ausgegangen, dass zu Beginn ausschließlich der Grundzustand vorhanden ist, welcher mittels eines GAUSS-Profiles als Näherung für den anregenden Laser-Puls $I_{\text{RF}}(t)$ zum Zeitpunkt t_0 entvölkert wird.

Anhand eines simulierten Datensatzes für eine 2D-TA wird exemplarisch die globale Datenanalyse mit einem bi-molekularen Modell diskutiert. Für die Simulationen wird von einem photochemischen Modellsystem bestehend aus drei Spezies ausgegangen. Die Spektren der drei Spezies sind durch GAUSS-Profile nach Gleichung 2.16 gegeben (siehe Abbildung 2.15). Das betrachtete kinetische Modell basiert auf folgendem DGL-System:

$$\frac{dc_{\text{GZ}}(t)}{dt} = -I_{\text{RF}}(t) + \beta k_1 c_{\text{A}}(t) + k_2 c_{\text{B}}(t) + k_3 c_{\text{B}}(t)^2 \quad (2.21)$$

$$\frac{dc_{\text{A}}(t)}{dt} = I_{\text{RF}}(t) - k_1 c_{\text{A}}(t) + k_3 c_{\text{B}}(t)^2 \quad (2.22)$$

$$\frac{dc_{\text{B}}(t)}{dt} = \alpha k_1 c_{\text{A}}(t) - k_2 c_{\text{B}}(t) - 2k_3 c_{\text{B}}(t)^2 \quad (2.23)$$

$$\text{mit } I_{\text{RF}}(t) = \frac{f_0}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{t-t_0}{\sigma}\right)^2\right). \quad (2.24)$$

Zu Beginn ist ausschließlich der GZ mit einer Konzentration von $c_{\text{GZ}}(0) = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ bevölkert. Durch einen kurzen Lichtpuls werden $f_0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ des GZ in die Spezies A anregt. Spezies A zerfällt mit k_1 zu einem Teil α in Spezies B und zu einem Teil β zurück in den GZ. Das Modell sieht für den Zerfall von Spezies B zwei Prozesse vor. Zum einen zerfällt Spezies B mit k_2 zurück in den GZ. Zum anderen ist eine Reaktion zweier Spezies B mit der bi-molekularen Ratenkonstanten k_3 möglich. Die Produkte dieser bi-molekularen Reaktion sind die Spezies A und der GZ. In Abbildung 2.15 sind

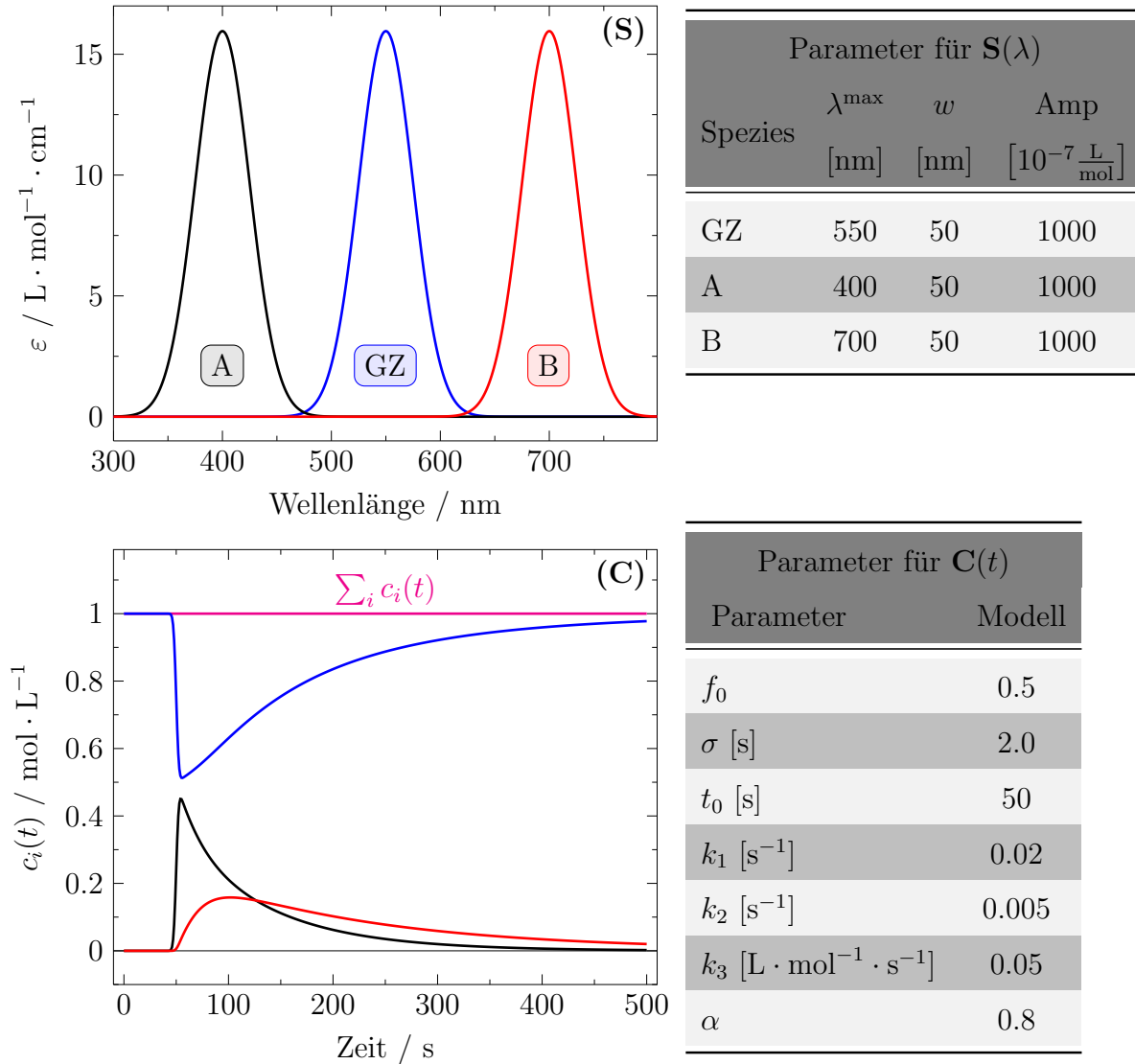


Abb. 2.15.: (S): Simulierte GAUSS-Funktionen repräsentativ für die drei Spezies GZ, A und B. (C): Konzentrationszeitprofile $c_i(t)$ der jeweiligen Spezies simuliert entsprechend des DGL-Systems aus Gleichungen 2.21 bis 2.23. In den Tabellen sind die eingesetzten Parameter eingetragen.

die eingesetzten Spektren, die Konzentrationszeitprofile und die entsprechenden Parameter der drei Spezies zu finden. In Abbildung 2.16 (A) ist die simulierte Datenmatrix nach Subtraktion des GZ-Spektrums und Addition von Rauschen mit einer Standardabweichung von 0.1 dargestellt. Die Schichtdicke der Probe soll 1 cm betragen. Bei der Durchführung des globalen Fits wurde die Ratenkonstante k_1 im DGL-System der Gleichungen 2.21-2.23 durch ihre einzelnen Summanden $k'_1 = \alpha k_1$ und $k''_1 = (1 - \alpha)k_1 = \beta k_1$ ersetzt. Aus dem globalen Fit erhält man die SADS. Sie sind in Abbildung 2.16 (S1) und (C) dargestellt. Die dazugehörigen Ratenkonstanten sind in Tabelle 2.2 zu finden. Die Residuen sind in Abbildung 2.16 (R) dargestellt. Diese Residuen bestehen aus ei-

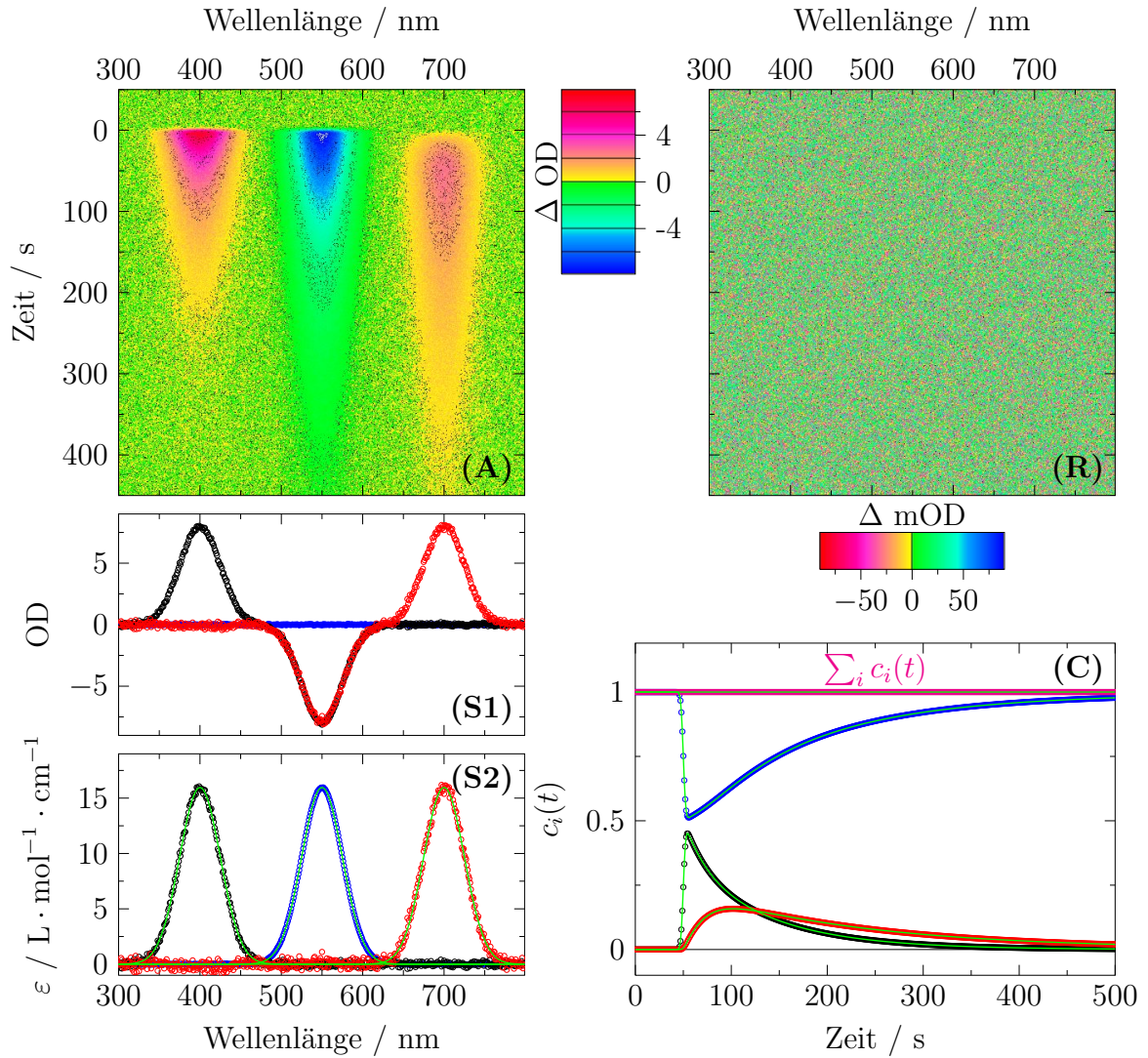


Abb. 2.16.: Analyse mit dem Programm `GlobFit_Runge_Kutta` eines simulierten Datensatzes, der nach dem DGL-System aus Gleichungen 2.21 bis 2.23 mit den entsprechenden Parametern aus Abbildung 2.15 erzeugt wurde. (A): Simulierte Datenmatrix nach Subtraktion des GZ-Spektrums und Addition von Rauschen mit einer Standardabweichung von 0.1. (R): Residuen. (S1): SADS (offene Kreise) zu den entsprechenden Konzentrationszeitprofilen in (C). (S2): SAS (offene Kreise) im Vergleich zu den eingesetzten Spektren in der Simulation (grüne Linien). (C): Konzentrationszeitprofile $c_i(t)$ (offene Kreise) im Vergleich zur eingesetzten Dynamik in der Simulation (grüne Linien).

nem einheitlichen Rauschen um Null. Der Fit beschreibt demnach die simulierten Daten sehr gut. Durch Addition von 50 % des GZ-Spektrums auf die einzelnen SADS lassen sich die SAS generieren, wie es durch den in der Simulation gewählten Faktor $f_0 = 0.5$ zu erwarten war (siehe Abbildung 2.16 (S2)). Die bi-molekulare Rate hängt von der Anfangskonzentration ab, die in diesem gewählten Modell durch den Anteil der angeregten Moleküle gegeben ist. Aus diesem Grund muss die bi-molekulare Ratenkonstante

Parameter	Sim $f_0 = 0.5 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$	Fit $f_0 = 1.0 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$	Skalierung auf GZ-Anteil mit $\frac{1}{0.5}^c$
σ [s]	2.0	1.97141 ^a	
t_0 [s]	50	50.00 ^a	
$k'_1 = \alpha k_1$ [s ⁻¹]	0.016	0.0156 ^a	
$k''_1 = (1 - \alpha)k_1$ [s ⁻¹]	0.004	0.00404 ^a	
k_1 [s ⁻¹]	0.02	0.01964 ^b	
k_2 [s ⁻¹]	0.005	0.00497 ^a	
k_3 [L · mol ⁻¹ · s ⁻¹]	0.05	0.02519 ^a	0.05038 ^a
α	0.8	0.794 ^b	

^aOptimierte Parameter

^bBerechnet aus den optimierten Parameter

^cBenutzer spezifisch optimiert, so dass die SADS keinen Anteil an GZ-Spezies mehr enthalten.

Tab. 2.2.: Optimierte Parameter aus dem globalen Fit an den simulierten Daten.

schließlich mit $\frac{1}{0.5}$ skaliert werden.

Global Fit - Modifikationen zur nicht Berücksichtigung ungültiger Datenbereiche

Manche Proben besitzen eine sehr hohe Fluoreszenzsausbeute. In solchen Fällen kann es bei Messungen der 2D-TA dazu kommen, dass das Fluoreszenzlicht auf dem Detektor ein Blooming verursacht. Dadurch wird das Fluoreszenzsignal verbreitert, und betroffene Bereiche der TA in ihrer Signalstärke verfälscht. In solchen Fällen ist eine sinnvolle Beschreibung der verfälschten Bereiche mit Exponentialfunktionen bei einem globalen Fit nicht mehr gegeben. Aus diesem Grund ist von Herrn Prof. Dick eine Methode entwickelt worden, die es erlaubt die Datenpunkte gekennzeichnete Bereiche innerhalb einer Datenmatrix nicht in der Summe der kleinsten Fehlerquadrate (χ^2 -Funktion) zu berücksichtigen. Die Problematik bei der Implementierung lag im linearen Optimierungszyklus, welcher die optimierte LAPACK Routine DGELS() verwendet. Um die Effizienz dieser Routine nicht aufgeben zu müssen, wird folgender Trick verwendet. In jedem Iterationszyklus werden die Daten in den gekennzeichneten Bereichen jeweils durch die Werte aus dem Fit ersetzt, so dass der Beitrag der markierten Daten in der χ^2 -Funktion Null ist. Durch dieses ständige Austauschen passen sich die Daten innerhalb der markierten Bereiche immer mehr den Daten außerhalb der markierten Bereiche an. Dies funktioniert

solange, wie die Bereiche so gewählt werden, dass sie sich innerhalb und somit umgeben von Originaldaten befinden.

Zu Beginn liegen noch keine Werte für den Fit vor. Damit die fehlerhaften und meist sehr intensiven Signale beim ersten Iterationszyklus im linearen Optimierungsschritt keine Berücksichtigung finden, werden in den markierten Bereichen spaltenweise die Mittelwerte aus den beiden Grenzwerten gesetzt. Jedes Element in einer Spalten eines gekennzeichneten Bereichs enthält also den Mittelwert aus dem oben und unten angrenzenden Werten der Datenmatrix.

2.1.4. Leistungsfähigkeit des Experiments für 2D-transiente Absorptionsspektroskopie

Die Leistungsfähigkeit des Experimentes für 2D-transiente Absorptionsspektroskopie lässt sich an der Messung einer mutierten [LOV1-C57G](#)-Domäne aus [C.r.](#) demonstrieren. In dieser Domäne ist das photoaktive Cystein des [LOV1](#)-Wildtyps durch ein Glycin ausgetauscht. Dies führt zu einer Verkürzung des Photozyklus, welcher nun aus dem Triplett-Zustand des Flavins direkt in den Grundzustand mit einer Zeitkonstanten von $30\text{ }\mu\text{s}$ verläuft. Dieses Protein zeigt zusätzlich eine starke Fluoreszenz. In früheren (eindimensionalen) Messungen der [TA](#) dieser Mutante war das starke Fluoreszenzsignal ein großes Problem. Es wurde ein konventioneller Photomultiplier verwendet, welcher durch das dominante Fluoreszenzsignal gesättigt wurde und demzufolge für mehrere Millisekunden keine brauchbaren Daten liefern konnte. Die Verwendung einer [SC](#) ermöglicht es nun das Fluoreszenzspektrum ohne Verlust von Daten mit zu messen. Das Fluoreszenzspektrum erscheint als eine scheinbar negative [TA](#), welche mit einer sehr großen Ratenkonstante $k = \infty$ als Apparatfunktion angefitet werden kann.

In [Abbildung 2.17](#) sind Datensätze in Falschfarbendarstellung abgebildet, die mit ansteigender Anzahl an Akkumulationszyklen N erhalten wurden. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass diese Messungen an einem Probenvolumen von nur $300\text{ }\mu\text{L}$ durchgeführt wurden. Die optische Dichte der Probe bei 450 nm (hier wurde angeregt) und bei einer Schichtdicke von 10 mm betrug 0.5 . [Abbildung 2.17 \(A\)](#) zeigt das Resultat einer Messung mit nur einem einzelnen Anregungszyklus. Die Fluoreszenz des Flavins ist deutlich

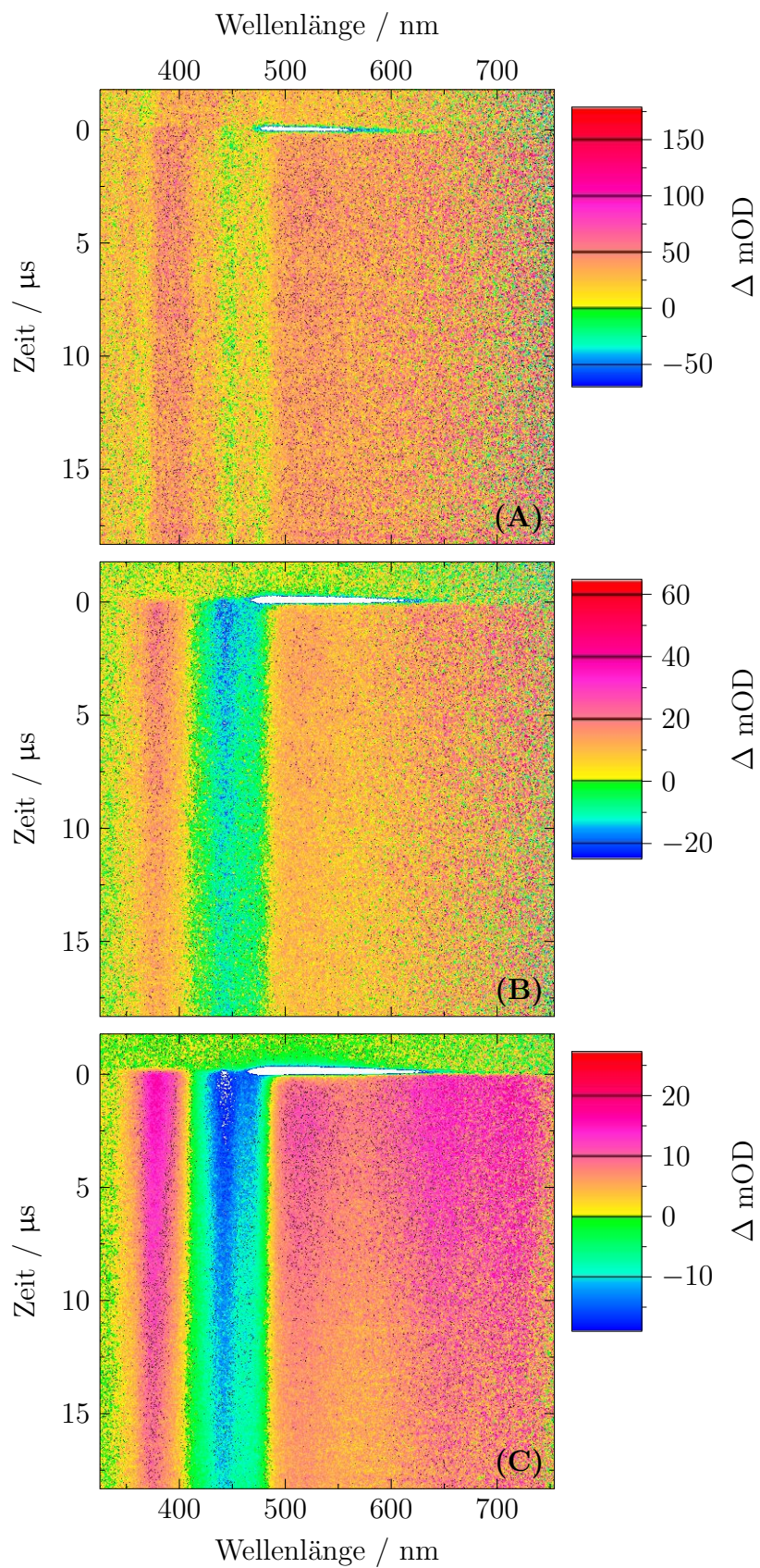


Abb. 2.17.: Rohdaten der TA von LOV1-C57G im Zeitfenster von $20 \mu\text{s}$ für die Anzahl der gemittelten Anregungszyklen $N = 1$ (A), 10 (B), und 100 (C).

an dem schmalen horizontalen Streifen zu erkennen². Mit $N = 10$ (Abbildung 2.17 (B)) kommt der GSB des Flavins durch einen grünen vertikalen Streifen um 450 nm deutlich zum Vorschein. Die rötlich-gelblichen Bereiche zu beiden Seiten des GSB verdeutlichen die TA des Triplett-Zustands. Die Akkumulation von 100 Anregungszyklen (Abbildung 2.17 (C)) führt zu einer weiteren Verbesserung des Signal zu Rausch Verhältnisses. Obwohl das Signal zu Rausch Verhältnis mit einem Anregungszyklus nur etwa 1 beträgt, ist das GSB in diesem Bild bereits zu erkennen.

Die Datensätze lassen sich sehr gut mit zwei Exponentialfunktionen global fitten. Eine Komponente ist kurzlebig mit gefitteten Lebensdauern zwischen 40 und 60 ns. Im Zeitfenster von 20 μ s entspricht dies einem Pixel. Dies bedeutet, dass die kurze Komponente zeitlich nicht aufgelöst werden konnte. Das entsprechende DADS (siehe Abbildung 2.18 (A)) zeigt langwellig von 450 nm eine breite negative Bande mit Peaks bei 495 und

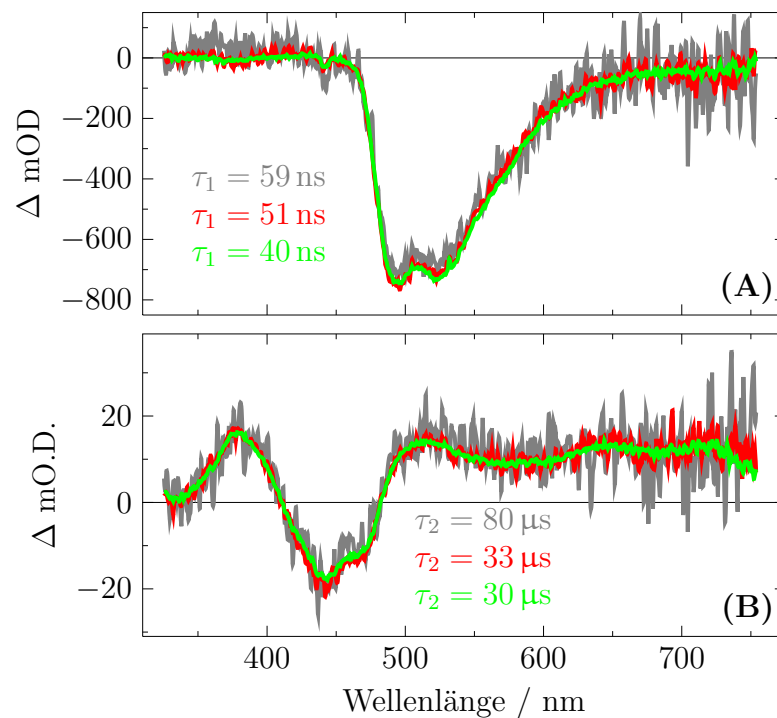


Abb. 2.18.: (A) und (B) zeigen die DADS, die aus globalen Fits an die Rohdaten (ungefiltert) mit Mittelung über $N = 1$ (grau), 10 (rot) und 100 (grün) Anregungszyklen erhalten wurden.

520 nm. Es kann der Fluoreszenz zugeordnet werden. Die zweite Komponente wird durch einem mono-exponentiellen Zerfall mit einer Lebensdauer von 30 μ s für $N = 100$ gefittet. Die Lebensdauer ist nur geringfügig länger (33 μ s), wenn nur über 10 Anregungszyklen gemittelt wird. Die Messung mit nur einem einzelnen Anregungszyklus ergibt eine viel

²Die untere Grenze der Farbskalierung wurde auf den minimalen Wert des GSB gesetzt, so dass dem Hauptanteil des Fluoreszenzsignals die Farbe weiß zugeordnet wird.

größere Lebensdauer. Bemerkenswert ist jedoch, dass die entsprechenden DADS sehr ähnlich zueinander sind für alle drei Messungen. Scheinbar ist die spektrale Information bereits mit $N = 1$ glaubwürdig, wohingegen man für die zeitliche Information etwa $N = 10$ benötigt.

Das Rauschen in diesen Spektren skaliert mit \sqrt{N} , wie es für ein Photonenrauschen zu erwarten ist. Die mittlere Anzahl an Photonen des Abfragelichts, die auf jedem Pixel eines SC-Bildes akkumuliert wird, ist proportional zu dem Produkt aus N und der Breite des Zeitfensters. Demzufolge benötigt man für eine aussagekräftige Messung innerhalb eines Zeitfensters von $20\ \mu\text{s}$ entweder $N = 10$ akkumulierte Anregungszyklen oder eine um den Faktor 10 erhöhte Intensität des Abfragelichts.

Das Experiment für 2D-TA bietet die Möglichkeit, Fluoreszenzspektren und TA-Spektren mit einer einzelnen Anregung für Zeitfenster $> 20\ \mu\text{s}$ zu messen. Bei eindimensionalen Messungen bei fester Wellenlänge werden üblicherweise 100 Anregungszyklen benötigt, um einen aussagekräftigen mono-exponentiellen Fit zu bekommen. Zudem sind Messungen bei Wellenlängen, die mit der Fluoreszenz überlappen, nicht möglich. Mit dem zweidimensionalen Aufbau kann über den gesamten sichtbaren Wellenlängenbereich gemessen werden und dabei die Zerfallscharakteristik eines Systems für all diese Wellenlängen mit weniger Anregungszyklen ermitteln werden, als man für eine einzelne eindimensionale Messung benötigen würde. Diese Vorteile liegen in der Verwendung einer speziellen SC. Diese SC hat zum einen einen viel größeren dynamischen Bereich (1:10000) verglichen zum typischen dynamischen Bereich eines Photomultipliers (1:100). Zum anderen sind die Daten hoch redundant, was das geringe Signal zu Rausch Verhältnis eines einzelnen individuellen Pixels mehr als kompensiert. Das in dieser Arbeit aufgebaute Experiment für die 2D-TA liefert demnach TA-Daten mit einem Multiplex-Faktor von mehr als 100.

2.1.5. Konventionelle Blitzlichtphotolyse bei fester Wellenlänge im ms- bis s-Bereich

Der schematische Aufbau der konventionellen Blitzlichtphotolyse bei fester Wellenlänge im ms- bis s-Bereich ist in Abbildung 2.19 dargestellt. Auch dieses Experiment wurde in einem bei $20 \pm 3^\circ\text{C}$ temperierten Raum aufgebaut. Zur Anregung wird ein OPO (OPO, Continuum) verwendet, der von der dritten Harmonischen (engl.: THG) eines

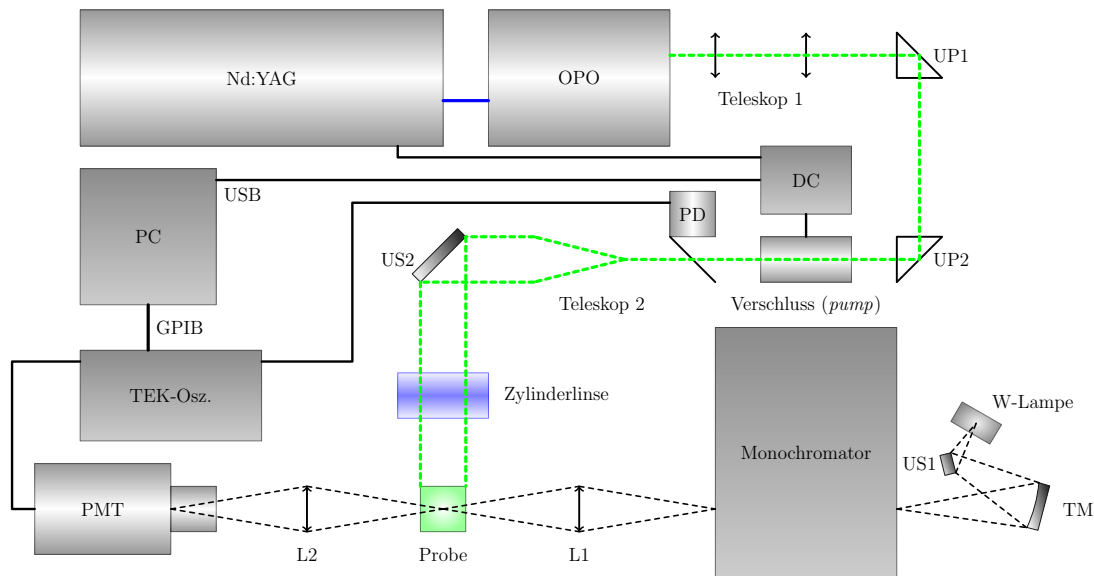


Abb. 2.19.: Experimenteller Aufbau der konventionellen Blitzlichtphotolyse bei fester Wellenlänge im ms- bis s-Bereich.

Nd:YAG bei 10 Hz (Surelite II, Continuum) gepumpt wird (Für weitere Details siehe Abschnitt 2.1.2). Der Anregungspuls wird über 2 Umlenkprismen (UP1-2), einem einstellbaren Linsenteleskop „Teleskop 1“ zur Korrektur der Divergenz des **OPOs**, einem einstellbaren Linsenteleskop „Teleskop 2“ zur Strahlaufweitung und einem Silberspiegel (US2) orthogonal zum Abfragestrahlengang auf die Probe geleitet. Der elektronisch schaltbare Verschluss für hohe Pulsenergien ist vor dem „Teleskop 2“ in den Anregungsstrahlengang zur gezielten Auskopplung nur eines einzelnen **Laserpulses** eingebaut.

Zur Abfrage wird eine Wolfram-Halogenlampe (OSRAM) verwendet. Der Strahlengang verläuft zuerst über eine 1 zu 1 Abbildung der Glühwendel mittels eines torischen Spiegels TM (siehe Abschnitt 2.1.2) in einen Monochromator (0.25 M Ebert Monochromator, Model-No.: 82-410, Gitter: $1180 \text{ Linien} \cdot \text{mm}^{-1}$, Jarrell-Ash Company) mit der Brennweite von 250 mm und einer relativen Apertur (**f-number**) von 3.6. In dieser Konfiguration ist ein vollständiges Ausleuchten des Gitters gewährleistet, was in einer maximalen spektralen Auflösung von 0.5 nm bei 100 μm Spaltbreite resultiert. Der aus dem Monochromator austretende Lichtstrahl wird dann über eine Linse L1 im Abbildungsverhältnis von 1 zu 1 auf die Probe fokussiert. Als Probezelle wird eine Fluoreszenz-Küvette aus Quarzglas verwendet, die in einem eigens dafür angefertigten Küvettenhalter mit entsprechenden Blenden platziert wird. Die Abfrageschichtdicke beträgt bei der verwendeten Küvette 10 mm. Die Anregungsschichtdicke ist 2 mm. Von der Probe ausgehend wird der Abfragestrahl erneut über eine Linse L2 im Abbildungsverhältnis von 1 zu 1

auf einen *Photo Multiplier* (PM) gegeben. Zur Unterdrückung des Anregungs- sowie des Fluoreszenzlichtes wird vor dem PM ein entsprechender Kantenfilter eingebaut. Das Spannungssignal des PM wird über ein *Digitalspeicheroszilloskop* (DSO) ausgelesen, welcher über eine *Photodiode* (PD) getriggert wird. Die PD ist nach dem Verschluss eingebaut und zeichnet einen über eine Strahlteilerplatte heraus reflektierten Teil des Laserpulses auf. Der gesamte Messablauf wird, wie beim 2D-TA Experiment (siehe Abschnitt 2.1.2), von einem eigens dafür gebauten DC gesteuert. Für eine optimale Funktionsweise des Nd:YAG Lasers wird eine Grundfrequenz von 10 Hz gewählt. Zusätzlich dazu wird vom Benutzer eine Sequenz zur Ansteuerung des Verschlusses im Takt von 2 Hz eingespielt. Gemittelt wird typischerweise über 100 Schuss.

Beschaltung des Photomultipliers

Durch den PM fließt ein Strom, der der einfallenden Lichtintensität proportional ist. An einem konstanten Widerstand R lässt sich eine Spannung U abgreifen, die nach dem Ohmschen Gesetz mit dem Stromfluss in linearem Zusammenhang steht. Diese Spannung stellt die eigentliche Messgröße dar.

In der verwendeten Schaltung wird eine analoge Offsetkompensation durchgeführt, um die volle Empfindlichkeit des DSOs zu nutzen³. Die Offsetkompensation sieht die Differenzbildung zwischen der am konstanten Widerstand abgegriffenen Spannung U und einer mittels eines Potentiometers einstellbaren Hilfsspannung U_{Hilf} vor, die anschließend invertiert wird und das Ausgangssignal U_{aus} darstellt:

$$U_{\text{aus}} = -(U - U_{\text{Hilf}}) \quad (2.25)$$

Die Hilfsspannung kann bei abgedunkeltem Photomultiplier mit dem erwähnten Potentiometer zwischen 0 und 10 V (typisch 10 V) einjustiert werden. Bei belichtetem Photomultiplier wird die Dynodenspannung bzw. die Spaltbreite des Monochromators so eingestellt, dass man eine Spannung von 0 V erhält. Somit ergibt eine Spannung von 0 V eine Transmission von 1 und eine Spannung von U_{Hilf} eine Transmission von 0. Der Wert für die transiente Differenzabsorption ($\Delta A_{\lambda}(t)$) ergibt sich in Spannungen ausgedrückt

³Bei der TA misst man eine kleine Spannungsänderung auf einem großen Spannungssignal. Bei dem eingesetzten DSO als Datenrekorder ist es leider nicht möglich gleichzeitig einen großen Offset (10 V) und eine hohe Empfindlichkeit (z.B. $0.1 \text{ V} \cdot \text{Div.}^{-1}$) einzustellen, so dass man den vertikalen Dynamischen Bereich des DSOs nicht vollständig ausnutzt.

zu:

$$\Delta A_{\lambda}(t) = -\log \left(\frac{U_{\text{Hilf}} - U^0}{U_{\text{Hilf}} - U_{\text{Signal}}(t)} \right). \quad (2.26)$$

$U_{\text{Signal}}(t)$ soll dabei die, durch eine transiente Absorption verursachte, (kleine) Spannungsänderung sein. U^0 stellt das konstante Spannungssignal vor [Laser](#)anregung dar und wird über eine Mittelung der Daten von Beginn der Datenaufnahme bis kurz vor dem [Lasersignal](#) bestimmt.

2.2. Quasi-Stationäre Belichtungsexperimente

Unter quasi-stationären Belichtungsexperimenten wird die Aufnahme einer Sequenz von Spektren bzw. die Verfolgung der optischen Dichteänderung einer Probe nach einem externen Stimulus auf einer Zeitskala > 1 s verstanden. Beim externen Stimulus handelt es sich hauptsächlich um eine definierte Belichtung der Probe. Für diese Experimente wurde ein modifizierter Küvettenhalter für die im Institut vorhandenen Spektrometer (Lambda 9a von Perkin Elmer und SPECORD S100B von Analytic Jena) mit Hilfe von Dr. Kensy entworfen und zusätzlich mit Hilfe der Feinmechanik wie auch der Elektronikwerkstatt der Fakultät Chemie und Pharmazie gebaut. Im folgenden Abschnitt [2.2.1](#) werden die besonderen Charakteristika dieses Küvettenhalters kurz wiedergegeben.

2.2.1. Modifizierter Küvettenhalter

Für die sehr reproduzierbare Aufnahme zeitaufgelöster [Ultraviolett \(UV\)](#)/[Visible \(Vis\)](#)-Absorptionsdaten im Sekunden- bis Stunden-Bereich wurde ein Küvettenhalter konstruiert, welcher die Temperatur der Probe im Bereich von -10 bis 60 °C mit einer Genauigkeit von ± 0.1 °C konstant hält und Belichtung orthogonal zum Abfragestrahl erlaubt. Abbildung [2.20 \(A\)](#) zeigt den schematischen Aufbau. Die Thermostatisierung erfolgt mithilfe eines Peltierelements. Das Peltierelement wird über einen Thermo-Kontroller gesteuert, der die Temperatur innerhalb des Küvettenhalters über einen PT100 ausliest. Das Peltierelement wird über eine externe Kühlwasserleitung gekühlt. Der Küvettenhalter wird mit Stickstoff geflutet. Der Stickstoff wird über die Quarzfenster im Abfragestrahl wieder ausgeblasen. Somit wird beim Kühlen der Probe eine Kondensation von Luftfeuchtigkeit an den optischen Komponenten (Quarzfenster und Küvette) verhindert. Zur orthogonalen Belichtung der Proben sind zwei gegenüberliegende Hochleistungs-[LEDs](#) (Luxeon III

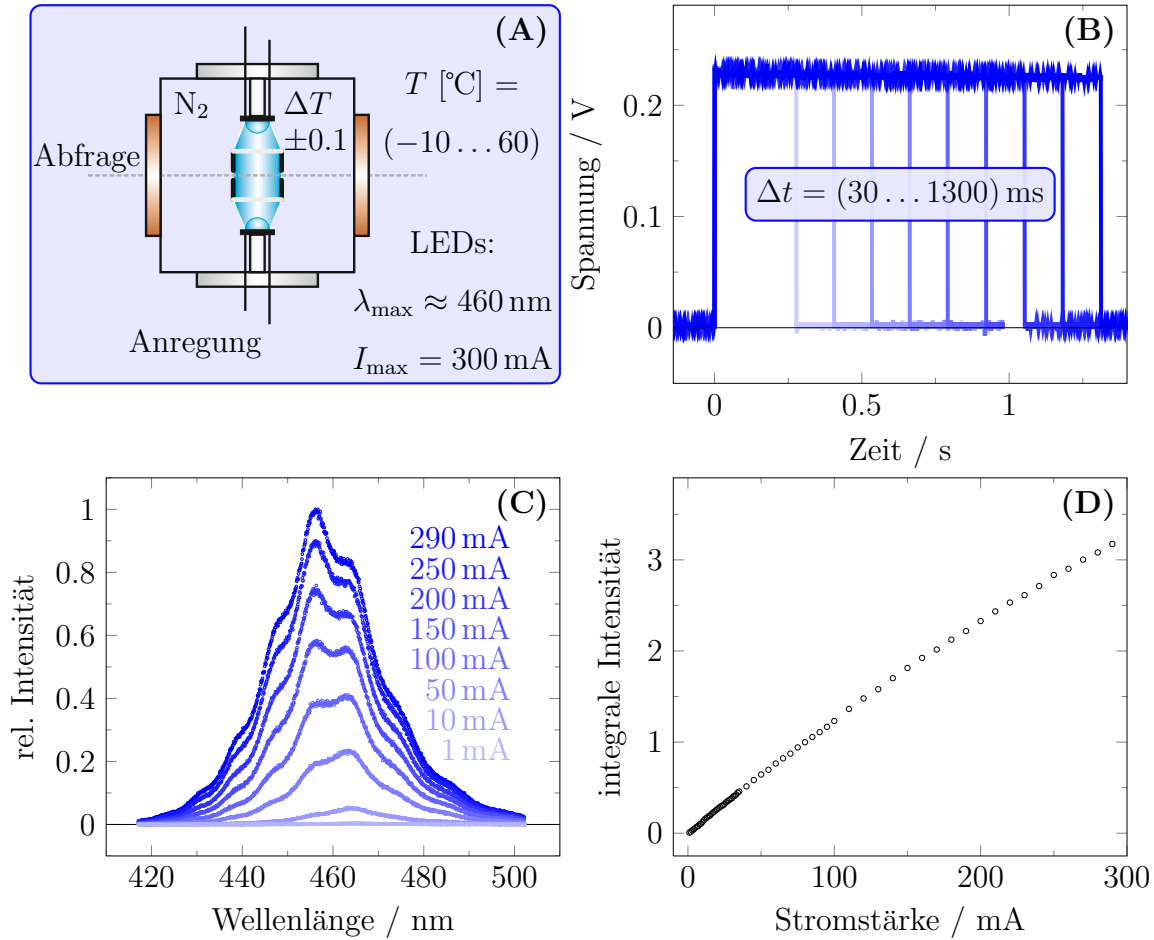


Abb. 2.20.: Charakteristika des modifizierten Küvettenhalters. **(A):** Schematischen Aufbau. **(B):** Zeitliche Profil sowie die variabel einstellbaren Pulsbreiten der Anregungs-LEDs. **(C)-** **(D):** Emissionsspektrum der LEDs in Abhängigkeit vom angelegten Strom.

Emitter LXHL-PBO9, Philips, 300 mW bei 460 nm) in einer passenden Halterung vorgesehen. Diese LEDs können in ihrer Intensität (Strombereich: 3 mA bis 300 mA) sowie in ihrer Pulsbreite (Zeitbereich: 30 ms bis 1300 ms) über einen zusätzlichen LED-Kontroller sehr reproduzierbar geregelt werden. Der LED-Kontroller sieht mehrere Möglichkeiten zur Steuerung der LEDs vor. Folgende Modi sind möglich:

Cont: Kontinuierlicher Betrieb der LEDs

Ext. Trig. 1: Triggerung über einen externen TTL Puls, wobei die Einstellungen am LED-Kontroller die Pulsbreite der LED vorgeben.

Ext. Trig. 2: Triggerung über einen externen TTL Puls, wobei die Pulsbreite des Triggerpulses die Pulsbreite der LED vorgibt.

Int. Trig.: Triggerung erfolgt manuell mit einer Pulsbreite der LED, die am LED-Kontroller eingestellt ist.

In Abbildung 2.20 (B)-(D) sind die zeitlichen wie auch die spektralen Charakteristika beispielsweise für eine blaue LED dargestellt. In Abbildung 2.20 (C)-(D) erkennt man, dass zum einen kein vollständig linearer Zusammenhang zwischen der integralen Intensität und der Stromstärke über den gesamten Strombereich besteht, und dass zum anderen das Emissionsspektrum der LED stark von der angelegten Stromstärke abhängt. Bei Experimenten mit variierenden Intensitäten muss diesen Charakteristika entsprechend Rechnung getragen werden. Bei Messungen in einem sehr engen Strombereich, z.B. bei schwachen Intensitäten, ändert sich das Emissionsspektrum hingegen kaum und die integrale Intensität steigt linear mit der Stromstärke an, was entsprechende Korrekturen nicht mehr nötig macht (siehe Abbildung 2.21 (A) und (B)). Es stehen des

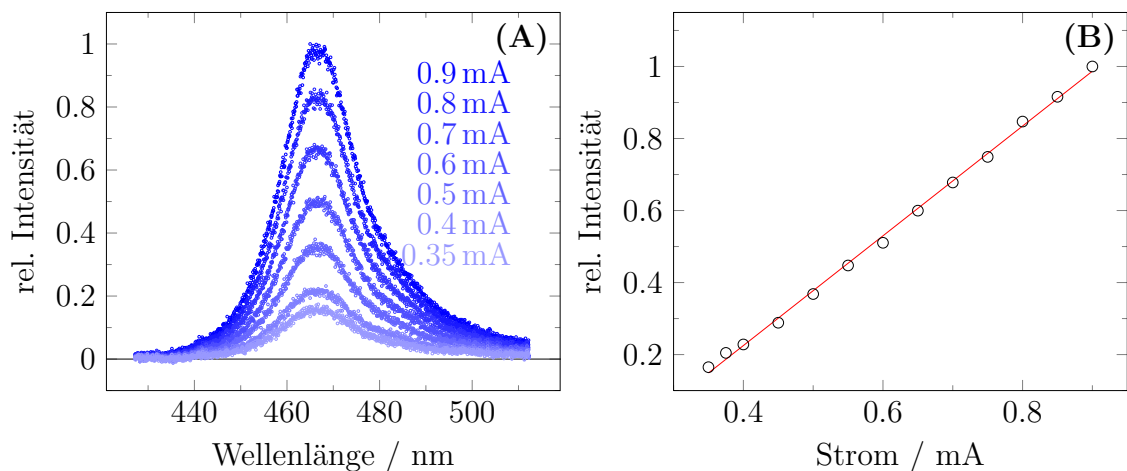


Abb. 2.21.: (A) zeigt die Emissionsspektren einer blauen LED in Abhängigkeit vom angelegten Strom bei sehr kleinen Strömen. In (B) ist der entsprechende lineare Zusammenhang zwischen der integralen Intensität und dem angelegten Strom abgebildet.

Weiteren grüne sowie rote LEDs zur Verfügung. Deren Spektren sind in Abbildung 2.22 abgebildet. Während die rote LED einen schönen linearen Zusammenhang zwischen der integralen Intensität und dem angelegten Strom zeigt und auch keinerlei Änderung im Spektrum zeigt, ist im Fall der grünen LED eine deutliche spektrale Abhängigkeit von der angelegten Stromstärke zu erkennen, so dass auch kein linearer Zusammenhang zwischen der integralen Intensität und dem angelegten Strom existiert. Diese Erkenntnisse sind in entsprechenden Experimenten stets zu berücksichtigen.

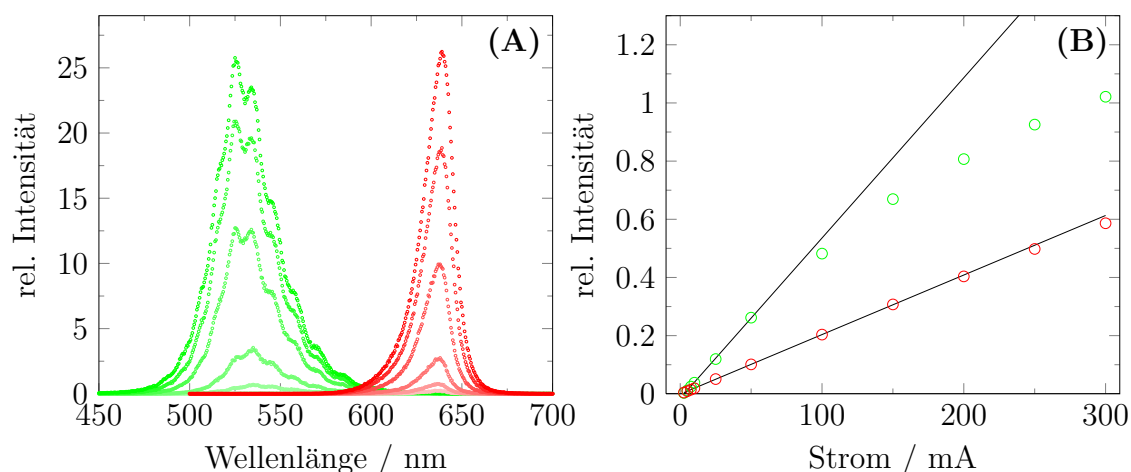


Abb. 2.22.: (A) zeigt die Emissionsspektren einer grünen und roten LED in Abhängigkeit vom angelegten Strom. In (B) sind die entsprechenden integralen Intensitäten gegen den angelegten Strom aufgetragen.

2.3. Time Correlated Single Photon Counting

Zeitkorreliertes Einzelphotonen Zählen (TCSPC) ist eine viel genutzte Technik für zeitaufgelöste Emissionsmessungen im Nano- und Subnanosekunden Zeitbereich. Die Lebensdauern angeregter Singulettzustände der meisten organischen Chromophore liegen im Bereich von einigen wenigen Nanosekunden. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Besetzung des angeregten Zustandes. Daher ist die Messung der Emissionszerfallsprofile die Methode der Wahl, um die Population eines angeregten Zustandes in verschiedenen photochemischen Reaktionen zu verfolgen.

Eine weitere wichtige Eigenschaft dieser Methode ist die hohe Sensitivität. Diese macht die Methode zu einem vorteilhaften Instrument, um die Dynamik angeregter Zustände bei nur sehr geringen Mengen an Substanz zu verfolgen. Im Extremfall kann man mit einzelnen Molekülen arbeiten, was zu einer Vielzahl an Anwendungen, z.B. in der Nanochemie und Zellbiologie, führte.

2.3.1. Allgemeines Prinzip

Ein Schema dieser Methode zusammen mit den entsprechenden Zeitdiagrammen ist in Abbildung 2.23 dargestellt. Die Probe wird durch einen kurzen Lichtpuls angeregt, welcher typischerweise von einem mode-locked Pikosekunden-Laser generiert wird. Ein kleiner Teil des Anregungslichts wird als Triggerereignis auf eine schnelle Photodiode abge-

spaltet. Die Probenemission wird durch eine abbildende Optik gesammelt und über einen Monochromator auf einen PM abgebildet. Der PM arbeitet dabei im Photonenzählmodus, was bedeutet, dass jedes einzelne detektierte Photon einen elektrischen Puls am Photomultiplierausgang erzeugt. Der Puls von der PD startet im *Time to*

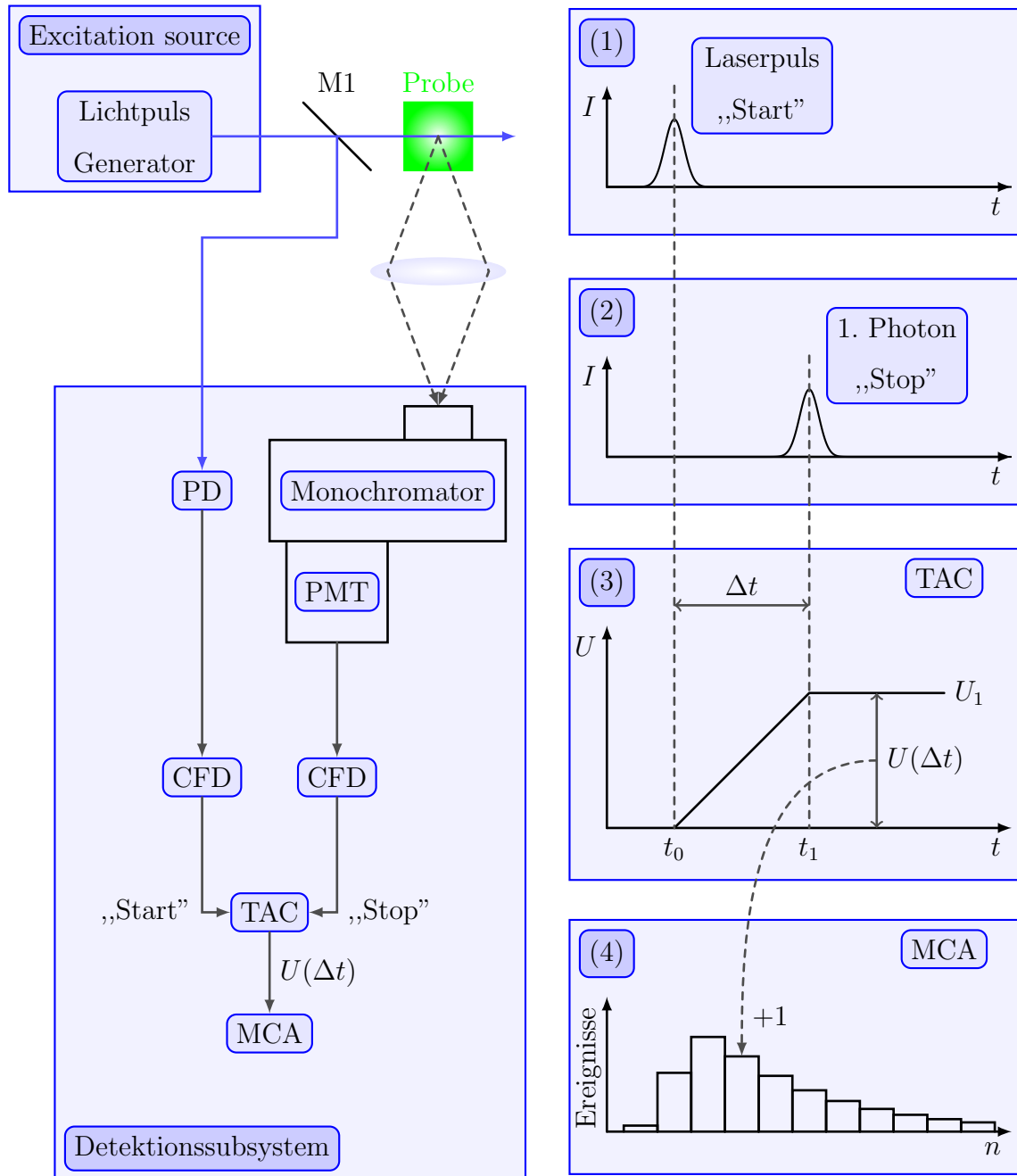


Abb. 2.23.: Ein Schema (links) und ein Zeitdiagramm (rechts) der *Time Correlated Single Photon Counting* (TCSPC) Methode. M1: Glass oder Quarz-Strahlteiler; PD: Photodiode; PMT: „Photomultiplier tube“; CFD: „constant fraction discriminator“; TAC: „time-to-amplitude converter“; MCA: „multichannel analyser“.

Amplitude Converter (TAC) ein nahezu lineares Ansteigen einer Outputspannung (Zeitdiagramm (1) und (3) in Abbildung 2.23) und wird daher „Start“-Puls genannt. Der

Emissionsphotonpuls stoppt das Ansteigen der Outputspannung und wird daher „Stop“-Puls genannt (Zeitdiagramm (2) und (3) in Abbildung 2.23). Somit ist die Outputspannung U bestimmt durch die Zeitdifferenz Δt zwischen dem Laserpuls und dem Puls, der durch das erste detektierte Emissionsphoton erzeugt wird. Für eine genaue Bestimmung des zeitlichen Eintreffens eines Photons am PM relativ zum PD-Signal werden im Allgemeinen *Constant Fraction Discriminators* (CFD) verwendet. Im *Multi Channel Analyzer* (MCA) werden die Informationen über die Zeitdifferenzen in Form einer Häufigkeitsverteilung, d.h. relative Häufigkeit als Funktion der Spannungsamplitude ausgewertet. Dazu wird das TAC-Signal zunächst mittels eines *Analog Digital Converter* (ADC) digitalisiert. Der digitale Wert wird als Index in einem Speichervektor interpretiert und das Speicherelement mit diesem Index um eins inkrementiert.

Da sowohl der TAC als auch der ADC des MCA Linearitätsfehler aufweisen können, und auch die Übertragungsfunktion des TAC durch Variation von Vorspannung (*Bias*) und Verstärkung (*Gain*) modifiziert werden kann, muss eine Zuordnung von Speicherindices zu Zeiten vorgenommen werden. Dies geschieht mit Hilfe des *Time Calibrator* (TC), welcher „Start-Stop“-Pulspaare mit exaktem zeitlichen Abstand generiert.

Es ist wichtig, das Experiment derart zu arrangieren, dass die „Stop“-Pulse in den TAC immer mit einer Verzögerung von einigen Zehnteln von Nanosekunden eingehen. Denn zum einen braucht der TAC eine gewisse Zeit bis er mit der Operation (Erzeugung der linear ansteigenden Spannung) beginnt, und zum anderen wird eine vollständige Aufnahme des Signals benötigt. Mit zuletzt genanntem meint man, dass in der Praxis der TAC schon operieren sollte bevor das allererste Emissionsphoton es erreichen kann. Dies wird durch eine künstlich eingeführte Zeitverzögerung zwischen dem PM und den TAC erreicht, indem man einige extra Meter an Kabeln einbaut. Die Länge des Kabels hängt von den physikalischen Komponenten ab, z.B. die Distanz der Lichtausbreitung nach dem Strahlteiler M1, die Totzeit des TAC und die benötigte Verzögerung für die entsprechenden Messungen.

Für jeden Anregungspuls darf im Maximum nur ein Photon detektiert werden. Ist diese Bedingung nicht erfüllt, werden darauf folgende Photonen nicht mehr gezählt und es kommt zu einer Aufschüttverzerrung (engl.: *pile up distortion*) innerhalb des Histogramms, welche die gemessene Lebensdauer verfälscht. Man kann zeigen, dass wenn die Photonenzählrate $< 2\%$ der Anregungsrate beträgt, in diesem Fall der Fehler einer Aufschüttverzerrung bei $< 1\%$ liegt [Bec05].

2.3.2. Experimenteller Aufbau

Abbildung 2.25 zeigt den schematischen Aufbau der TCSPC-Apparatur. In diesem Aufbau wird der Photonenpuls des *Photo Multiplier Tube* (PMT) als „Start“-Puls und der Referenzpuls der Anregungsquelle, der mit einer Delayline um die Zeit $t_{\text{Verzögerung}}$ verzögert wird, als „Stop“-Puls verwendet. Durch dieses Vertauschen des „Start-Stop“-Paars beinhaltet jede Konversion Information und somit verringert sich die Messzeit auf ein Hunderstel zur konventionellen Methodik. Dies ist auch als „reversed start-stop configuration“ bekannt und ermöglicht es mit höheren Repetitionsraten zu messen [KOK81; Bec05].

Es stehen als Anregungslichtquellen drei gepulste LEDs zur Verfügung mit Wellenlängenmaxima bei 280 nm, 370 nm und 445 nm (NanoLED, Horiba JOBIN YVON). Abbildungen 2.24 (A) und (B) zeigen die Emissionsspektren und zeitlichen Profile der drei LEDs. Die spektrale Halbwertsbreite und die zeitliche Pulsbreite sind Tabelle 2.3 zu entnehmen. Die temporalen Pulsbreiten sind als Standardabweichung der angepas-

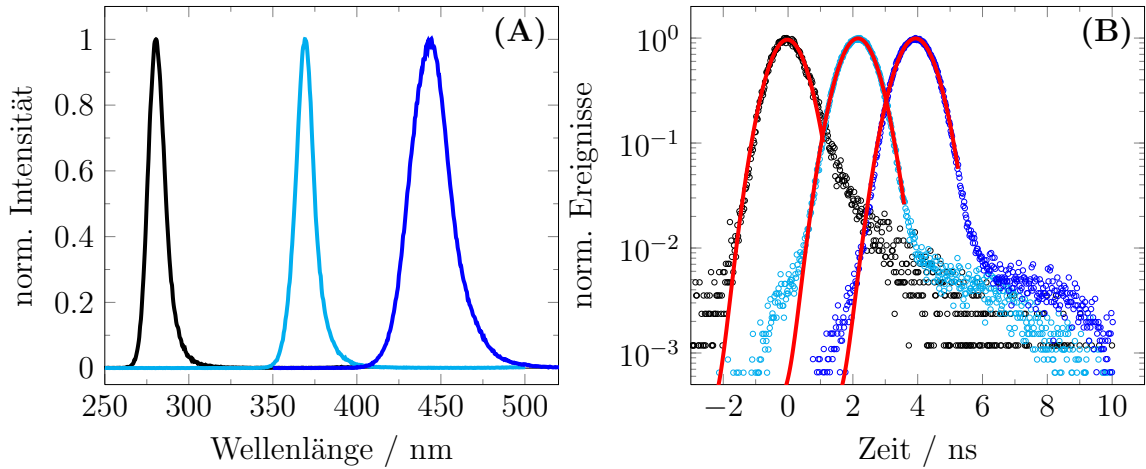


Abb. 2.24.: Spektrale und temporale Charakteristika der NanoLEDs (Horiba JOBIN YVON). **A:** Emissionsspektren von LED-280nm (Schwarz), LED-370nm (Cyan) und LED-445nm (Blau). **B:** Pulsprofile von LED-280nm (Schwarz), LED-370nm (Cyan) und LED-445nm (Blau). Die roten Linien zeigen den jeweiligen Fit mit einer Gaussfunktion an die Daten (siehe Tabelle 2.3).

sten Gaussfunktionen an die jeweiligen Datensätze angegeben. Alle LEDs können mit Pulsfrequenzen von 0 bis 1 MHz betrieben werden. Die Anregung erfolgt über eine Abbildungsoptik auf die Probe. Die Probe wird stets mit einer optischen Dichte im Bereich von 0.3 bis 0.5 bei der Anregungswellenlänge eingesetzt, um für eine optimale Konzentration an angeregten Fluorophoren im abgebildeten Detektionsvolumen zu sorgen. Die Detekti-

Typ	Δt / ns	$\Delta \lambda$ / nm
NanoLED-280	1.04	11.5
NanoLED-370	1.05	12.0
NanoLED-450	1.1	27.0

Tab. 2.3.: Spektrale und temporale Halbwertsbreiten der NanoLEDs (Horiba JOBIN YVON).

on erfolgt unter 90° zum Anregungsstrahl und bildet das von der Probe emittierte Licht über ein austauschbares Kantenfilter F1 zum Abschneiden des Anregungslichtes auf den Eintrittsspalt S1 des Monochromators ab. Die jeweils verwendeten Filter werden bei den später präsentierten Daten angeben. Die Eintrittsspalte sind über Mikrometerschrauben einstellbar. Der Austrittsspalt S2 ist fest auf 0.5 mm Breite justiert und resultiert in einer spektralen Auflösung von etwa 2 nm. Der Monochromator ist über einen Schrittmotor vom Steuerrechner steuerbar und erlaubt einen Spektralbereich von 200 bis 1030 nm in Schritten von 0.5 nm. Die Empfindlichkeit des [PMT](#) R928 macht allerdings nur die Nutzung des Intervalls von 220 bis 850 nm sinnvoll.

Der [PMT](#) kann mit einem Peltierelement auf etwa -25°C gekühlt werden. Dadurch sinkt die Dunkelzählrate⁴ auf $< 10 \text{ Ereignisse} \cdot \text{s}^{-1}$. Bei den in der Apparatur verwendeten [CFDs](#) handelt es sich um den Typ TC455. Deren Jitter liegt laut Angaben bei $< 80 \text{ ps}$.

Mit der [TCSPC](#)-Apparatur sind zwei Messmodi möglich:

Photonenzählen: Zählen von Photonen pro Zeiteinheit in Abhängigkeit von der Wellenlänge (Lumineszenzspektren)

Zeitaufgelöstes Zählen: Bestimmen der Häufigkeit von Zeitdifferenzen zwischen dem Eintreffen von Photonen und einer Zeitreferenz bei konstanter Wellenlänge (Emissionsabklingkurven)

⁴Unter der Dunkelzählrate versteht man die Anzahl der Pulse (Counts) pro Sekunde, die ohne Licht-einstrahlung erzeugt werden. Dies wird verursacht durch die thermische Emission von Elektronen aus der Photokathode und den Dynoden. Aus der Richardson Gleichung geht hervor, dass die Zahl der thermisch emittierten Elektronen proportional $T^2 \cdot \exp\left(\frac{W}{kT}\right)$ mit W = Austrittsarbeit ist.

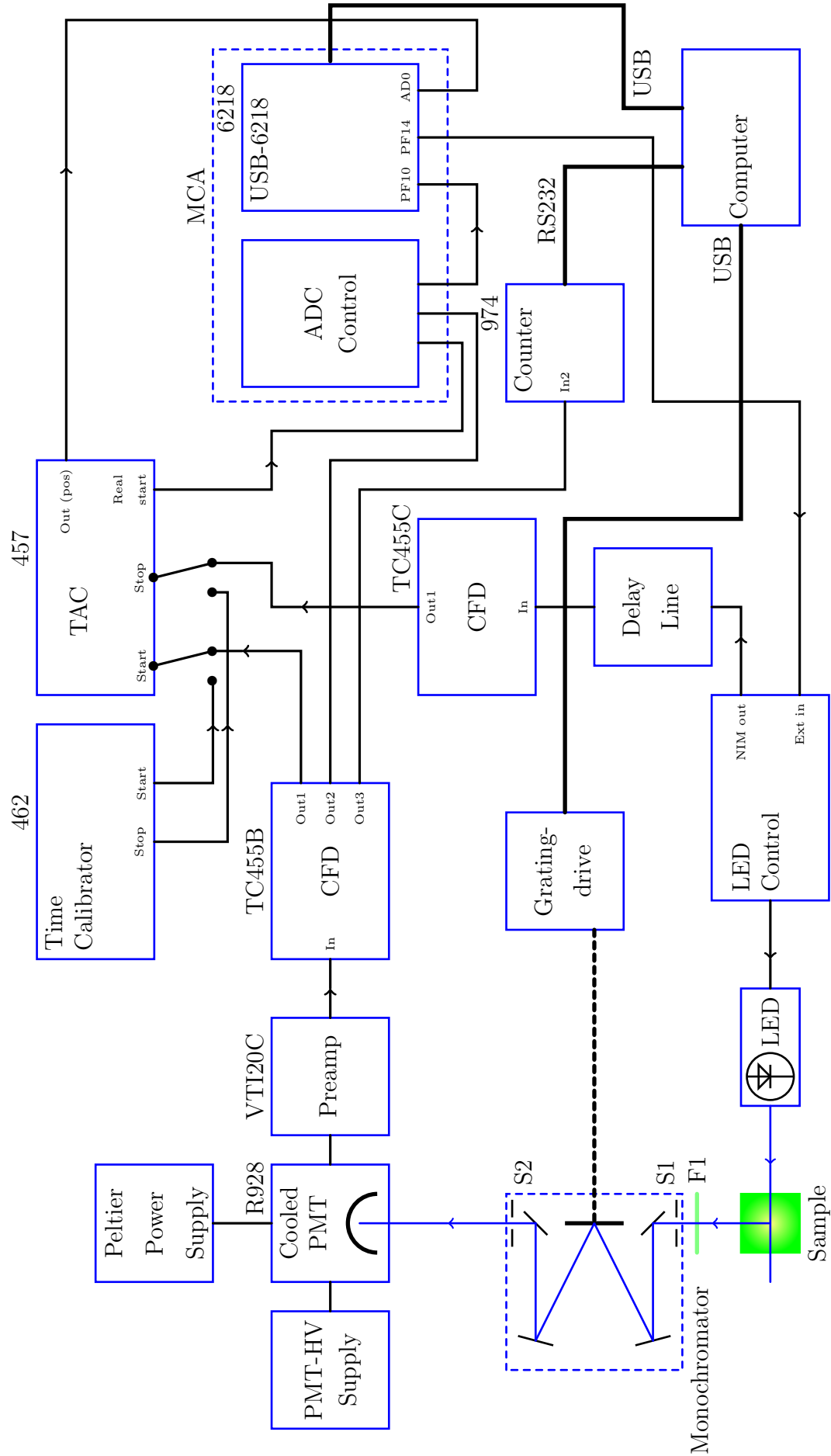


Abb. 2.25.: Schematischer Aufbau der TCSPC Apparatur.

2.3.3. Datenanalyse: Apparatefunktion und Entfaltung mit Modell-Abklingfunktion

In vielen Fällen der zeitaufgelösten Spektroskopie ist die Dauer des Anregungspulses, mit der eine Probe angeregt wird, bzw. die Apparatefunktion des Detektors gegenüber der zu bestimmenden Lebensdauer nicht zu vernachlässigen. In solchen Fällen stellen aus mathematischer Sicht die Messdaten eine Faltung zwischen der Apparatefunktion und der tatsächlichen Zeitabhängigkeit des untersuchten Systems dar. Bei der Analyse der 2D-TA Messdaten (siehe Abschnitt 2.1.3) wird z.B. die Apparatefunktion durch eine GAUSS-Funktion approximiert, so dass eine Faltung analytisch zugänglich ist. Im Fall der TCSPC-Messdaten ist ebenfalls die Apparatefunktion nicht zu vernachlässigen, da die **Full Width at Half Maximum (FWHM)** der Anregung bei ≈ 1 ns und die gemessenen Fluoreszenzlebensdauern im Bereich von $\tau = 0.5$ bis 10 ns liegen. In die Auswertung der Daten geht in diesem Fall neben der experimentellen Abklingfunktion $f_{\text{exp}}(t)$ auch die experimentelle Apparatefunktion $g(t)$ mit ein. Die Datenauswertung erfolgt mit dem von Herrn Prof. Dr. B. Dick in FORTRAN code geschriebenen Programm **MultExpFit**. Dieses Programm sieht eine Summe von N Exponentialfunktionen als Modellfunktion $f_{\text{Modell}}(t)$ vor. Aufgrund von äquidistanten Datenpunkten basiert dieses Programm auf einem sehr effizienten Algorithmus zur numerischen Berechnung des Faltungsintegrals:

$$f(t) = \int_{-\infty}^t g(t') f_{\text{Modell}}(t - t') dt' = \sum_{i=1}^N A_i \int_{-\infty}^t g(t') \exp(-k_i(t - t')) dt'. \quad (2.27)$$

Demnach werden die Parameter k_i und A_i aus gemessener Apparatefunktion $g(t)$ und geschätzten Startwerten nach der Summe der kleinsten Fehlerquadrate optimiert. Ein Beispiel einer Fluoreszenzabklingmessung an Rhodamin-6G in Ethanol ist in Abbildung 2.26 gezeigt. Die Lebensdauer wurde bestimmt auf $\tau = 4.57 \pm 0.01$ ns. Die Abbildung veranschaulicht ebenfalls eine semi-logarithmische Auftragung der Datendarstellung. Diese Darstellung macht es einfacher, die Daten visuell entsprechend eines exponentiellen Abklingens zu analysieren.

2.4. Expression und Aufreinigung biologischer Proben

In diesem Abschnitt wird ein kurzer Abriss über die Expressions- und Aufreinigungsbedingungen der biologischen Proben gegeben. Ausschließlich LOV-Proteinkonstrukte aus

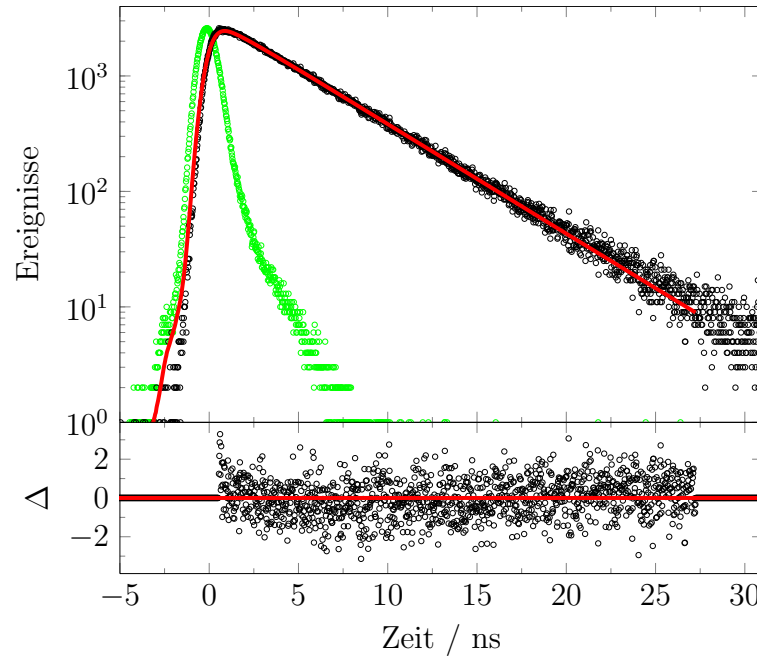


Abb. 2.26.: **Oben:** Fluoreszenzabklingkurve von Rhodamin-6G in Ethanol. Die Daten dargestellt durch schwarze offene Kreise, die Apparatfunktion durch grüne offene Kreise und der mono-exponentielle Fit durch die rote durchgezogene Linie. Die Lebensdauer ist $\tau = 4.57 \pm 0.01$ ns. **Unten:** Residuen gewichtet mit $\sqrt{N_i}$, wobei N_i die Anzahl der Ereignisse des Kanals i ist.

Chlamydomonas reinhardtii sind selbst und mit großer Unterstützung von Madelene von Sanden-Flohe produziert worden. Genaue Details hierzu sind in [Kut06; Kut+08] zu finden.

Alle anderen **LOV**-Proteinkonstrukte, das Acerhodopsin1 sowie die Kanalrhodopsine sind bei unseren Kooperationspartnern vor Ort exprimiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden. Auch die in diesem Abschnitt beschriebenen Messungen am Acerhodopsin1 sind am Max Planck Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt worden.

2.4.1. LOV-Proteinkonstrukte aus C.r.

Die verwendeten Plasmide wurden von Frau Tina Schireis, damals Institut für Biochemie der Universität Regensburg, hergestellt und unserem Lehrstuhl freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Plasmide

LOV1-wt Der vollständige *complementary Deoxyribonucleic acid* (cDNA)-clone (Genbank accession No. AJ 416557) vom *Chlamydomonas reinhardtii* *phot1* (früher *nph1* für nonphototropic hypocotyl 1 genannt) wurde bereits von Huang *et al.* [HMB02] isoliert und charakterisiert. Das Genfragment, welches die FMN bindende LOV1-Domäne (Aminosäuren 16-133) kodiert, wurde durch *Polymerase Chain Reaction* (PCR) amplifiziert und zwischen die *EcoRI* (*Escherichia coli* Restriktionsendonuclease I (GAATTC, klebrig)) und *HindIII* Schnittstellen (*Haemophilus influenzae* R_d (AAGCTT, klebrig)) des modifizierten *Escherichia coli* (*E. coli*) Expressionsvector His-p2x so eingebaut, dass das Protein 1 Methionin, 12 Histidine, 1 Glutamat und 1 Phenylalanin am N-terminalen Ende der Vektorsequenz zusätzlich inne hat.

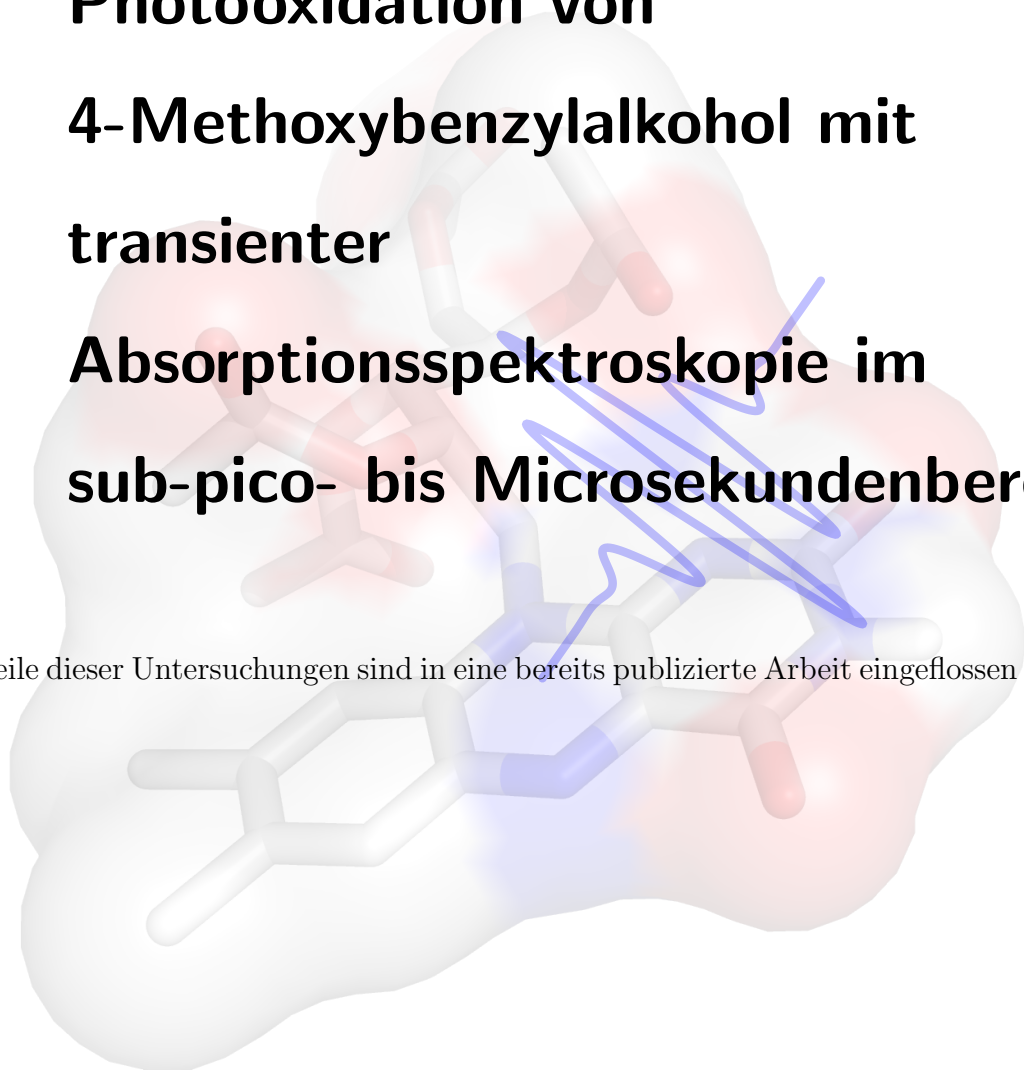
LOV1-C57G und LOV1-C57S Die Plasmide für die LOV1-C57G-Mutante (das Cystein in Position 57 ist durch ein Glycin ausgetauscht) und auch für die LOV1-C57S-Mutante (das Cystein in Position 57 ist durch ein Serin ausgetauscht) wurden durch Einführung einer Punktmutation erhalten.

Aufreinigung

Die fusionierten Proteine wurden im *Escherichia coli* Stamm BL21 exprimiert und über eine *Nickel-Nitrilotriacetic Acid* (Ni-NTA) Säule entsprechend der Anleitung vom Hersteller (Quiagen, Deutschland) gereinigt. Alle Proteine wurden nach dem Herunterwaschen von der Säule gegen einen 10 mM Phosphatpuffer mit 10 mM NaCl und 100 mM *Phenylmethansulfonylfluorid* (PMSF) (Protease-Hemmer) beim gewünschten pH-Wert dialysiert.

3. Aufklärung der flavin-katalysierten Photooxidation von 4-Methoxybenzylalkohol mit transienter Absorptionsspektroskopie im sub-pico- bis Microsekundenbereich

Teile dieser Untersuchungen sind in eine bereits publizierte Arbeit eingeflossen [[Meg+11](#)].



3.1. Einleitung

7,8-Dimethyl-10-alkylisoalloxazine werden auch als Flavine¹ bezeichnet (siehe Abbildung 3.1). Sie kommen in vielen biologischen Systemen in Form von Koenzymen oder Photorezeptoren so genannter Flavoproteine vor. Dabei sind sie an vielen biochemischen Dunkel- wie auch Photo-Reaktionen beteiligt. Die meisten redoxaktiven Koenzyme katalysieren entweder nur Ein- oder nur Zwei-Elektronenprozesse. Flavinbasierte Koenzyme nehmen dagegen sowohl an Ein- als auch an Zwei-Elektronenprozessen teil [Had+06]. Der Katalysezyklus der Flavoproteine besteht aus zwei separaten Prozessen. Im ersten Prozess werden die Reduktionsäquivalente von einem Substrat (oder Elektronendonator) aufgenommen. Im zweiten Prozess werden die Reduktionsäquivalente dann auf ein anderes Substrat (oder einen Elektronenakzeptor) übertragen. Demnach umfassen die katalysierten Reaktionen immer eine reduktive Halbreaktion, in der das Flavin reduziert wird, und eine oxidative Halbreaktion, in der das Flavin zurück oxidiert wird [PR91].

Das Riboflavin, auch bekannt als Vitamin B₂, ist ein Flavinderivat, das mit einer Ribityl-Seitenkette am N-10 des Isoalloxazins kovalent verbunden ist (siehe Nomenklatur in Abbildung 3.1). In lebenden Organismen dient es als Vorstufe in der Synthese von **Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)** und **FMN**. Das **FAD** z.B. liegt in seiner reduzierten Form (**FADH⁻**) neben einem Antennenkomplex² als primäres Koenzym in der Photolyase vor. Die Photolyase ist ein Enzym, das Schäden innerhalb von **Deoxyribonucleic acid (DNA)**-Strängen (in Form von Thymine-Dimeren) Licht induziert reparieren kann. Die Aufnahme der benötigten Energie erfolgt über die Absorption von blauem bzw. ultraviolettem Licht durch den Antennenkomplex, welcher die Anregungsenergie weiter auf das **FADH⁻** transferiert. Im angeregten Zustand ist das Redoxpotential des **FAD** herabgesetzt, so dass ein Elektron auf das Thymine-Dimer im aktiven Zentrum übergehen kann, und der **DNA**-Schaden behoben wird. Das Flavin wird anschließend durch Elektronentransfer von einem Tryptophan an der Enzymoberfläche in seinen reduzierten Zustand zurückversetzt. Die Effizienz der Reparatur hängt dabei stark vom Abstand zwischen den beteiligten Komponenten ab. Dieser Mechanismus konnte durch mehrere Modellsysteme nachgestellt werden.

¹Flavine haben in ihrer vollständig oxidierten Form eine gelbliche Farbe, wofür man ihnen ihren Namen gab (lateinisch: Flavius ≡ deutsch: gelb)

²Als Antennenkomplexe liegt entweder der Pterin-Kofaktor **Methylentetrahydrofolat (MTHF)** oder der Desazaflavin-Kofaktor **8-Hydroxy-5-Desazariboflavin (8-HDF)** vor.

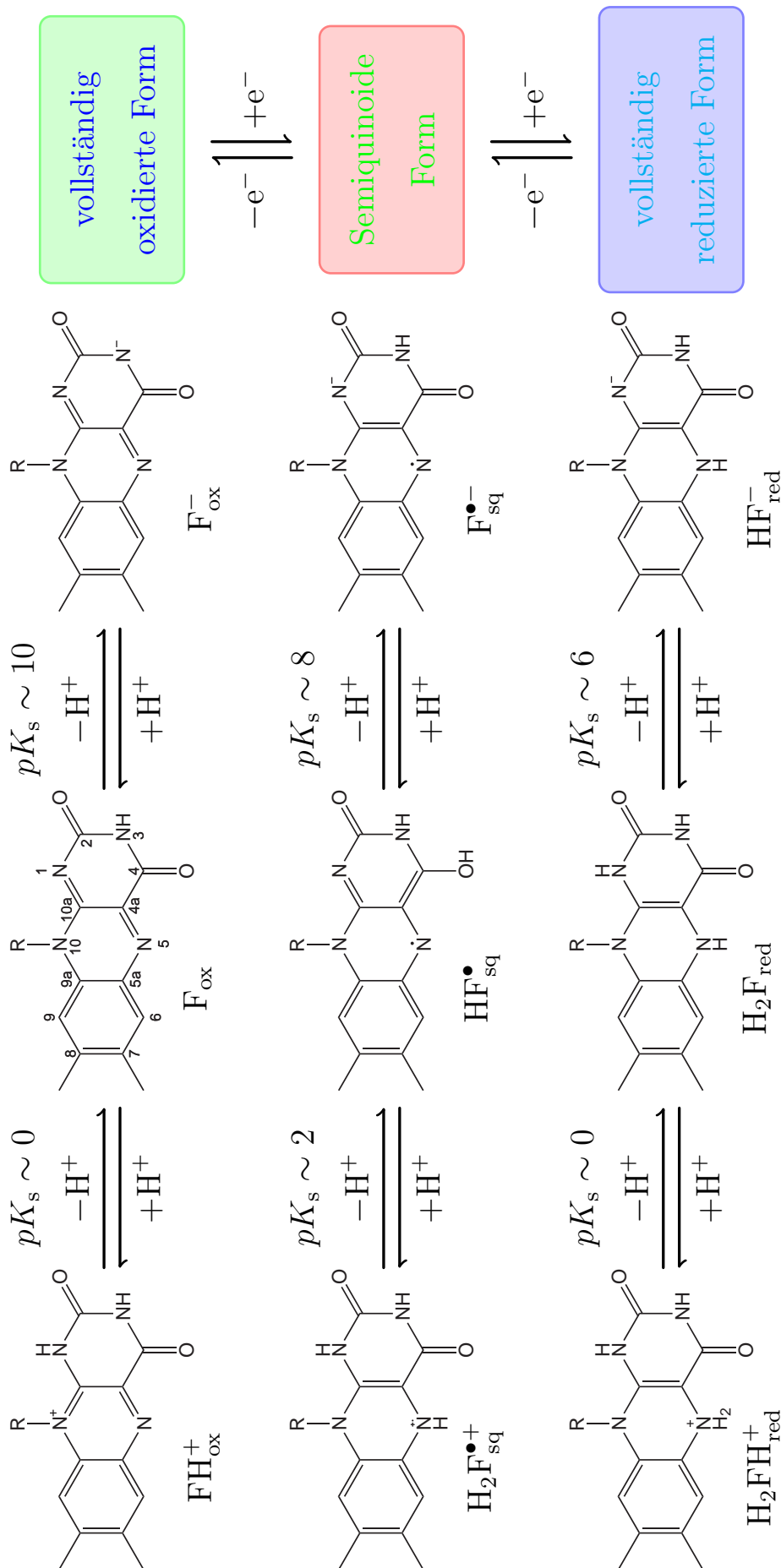


Abb. 3.1.: Redoxzustände und Säure-Base-Gleichgewichte der Flavine [Hee82]. In der Strukturformel des F_{ox} ist die Nummerierung laut IUPAC dargestellt.

Die Erkenntnisse über flavinbasierte Photoredoxsysteme in der Natur werden bereits in der chemischen Katalyse genutzt. Somit stellen Flavine aufgrund ihrer intensiven Absorption bis hin zu 500 nm und ihrer Redox Eigenschaften im angeregten Zustand einfache Photokatalysatoren dar, die einen Bereich des sichtbaren Lichtes gebrauchen. In vielen Arbeiten sind Flavin katalysierte Photooxidationen [Ton+95] im präparativen Maßstab bereits untersucht worden: Von Shinkai [Shi+87a; Shi+87b], Fukuzumi [FKT85; FK99; Fuk+01] und anderen [SEP99; Mee+03; SSK08; Sch+09]. Man hat versucht, durch heterozyklische Substratbindungsstellen oder Flavin-Übergangsmetallkomplexe die photokatalytische Effizienz und die Stabilität des Photokatalysators zu erhöhen. Die Redox Eigenschaften konnten durch Veränderung der Wasserstoffbrücken ausbildenden Gruppen des Flavinrings wie auch durch Komplexierung von Übergangsmetallen variiert werden [SHM89; Kön+01; Gra+04; Boy+05]. Fukuzumi untersuchte Scandiumkomplexe mit Flavin auf deren photophysikalische Parameter und schlug daraus einen Mechanismus für den photokatalytischen Prozess vor. Des Weiteren wurden Zink-Cyclen gebunden an Flavinen zur Photooxidation von Benzylalkohol [CVK04] verwendet. Die Synthesemöglichkeiten wurden auch auf die photokatalytische Abspaltung von Benzyl-Schutzgruppen und die Photooxidation von aktivierten Kohlenwasserstoffen durch Flavin-tetraacetat und Blaulicht erweitert [LK10].

Bis zu diesem Zeitpunkt sind auf Flavinsystemen basierende Photokatalysatoren unter der Annahme konstruiert worden, dass unmittelbare Nähe von Substrat und Flavin-Chromophor die Effizienz und die Selektivität des Photooxidationsprozesses steigert. Diese Annahme basiert zum einen auf der von Marcus beschriebenen Abstandsabhängigkeit des Elektronentransfers [Mar56] und zum anderen auf Photokatalysesystemen mit verbesserter Effizienz und Selektivität, in denen entsprechende Bindungsstellen am Chromophor vorliegen [SK06]. Die **Produktquantenausbeute (PQA)** der in dieser Arbeit untersuchten Photooxidation bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen deuten jedoch darauf hin, dass diese Annahme nicht allgemein gültig ist. Es ist daher die durch Flavin katalysierte Photooxidation von Benzylalkohol mit zeitaufgelösten spektroskopischen Methoden detailliert untersucht worden.

Es wurde konkret der Mechanismus der Photooxidation von **4-Methoxybenzylalkohol (MBA)** zum entsprechenden **4-Methoxybenzylaldehyd (MBAld)** unter Verwendung von **Riboflavintetraacetat (RFTA)** als Katalysator studiert (siehe Abbildung 3.2). Es wurden reaktive Prozesse sowohl aus dem Singulett- als auch aus dem Triplett-Zustand des

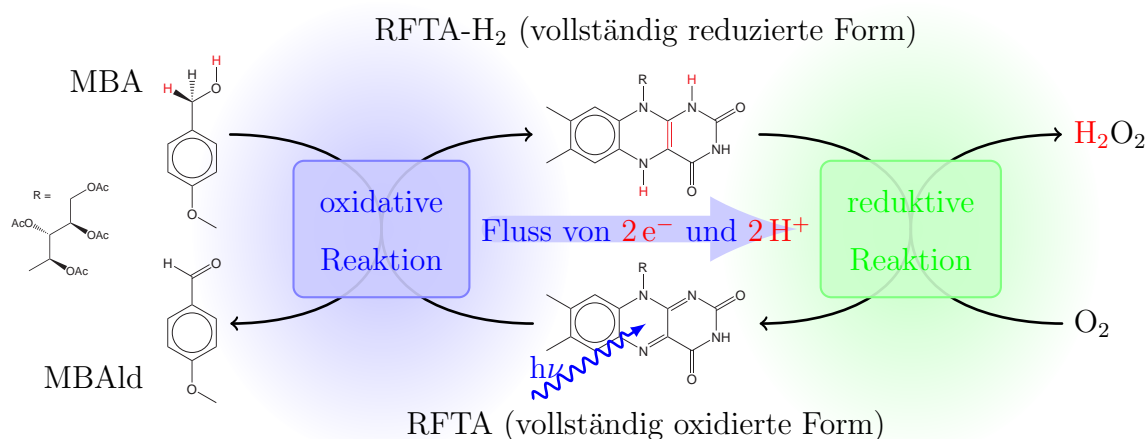


Abb. 3.2.: Schematische Darstellung der durch Flavin katalysierten Photooxidation von **4-Methoxybenzylalkohol** (MBA) zum entsprechenden **4-Methoxybenzylaldehyd** (MBAld).

RFTA beobachtet. Die Zeitskalen dieser Prozesse erstrecken sich von sub-Picosekunden bis hin zu mehreren Mikrosekunden. Die ultra-schnellen Singulett-Dynamiken wurden von Herrn Megerle aus der Gruppe von Herrn Prof. Dr. Riedle (Lehrstuhl für Bio-Molekulare Optik, Ludwig-Maximilians-Universität München) mittels der *Pump-Probe* (Femtosekunden Weisslichtpuls als *Probe*) Technik vermessen. Details zum Femtosekunden Spektrometer sind in [Meg+09] beschrieben. Die langsameren Triplett-Dynamiken wurden in dieser Arbeit mit der 2D-transienten Absorptionstechnik unter Verwendung einer *Streak Camera* (SC) und einer gepulsten Xe-Blitzlampe als Weisslichtquelle (siehe Abschnitt 2.1) durchgeführt. Die Kombination beider Verfahren ermöglichte es, die Photoreaktion des Flavinsystems detaillierter zu verstehen und so auch eine Hilfestellung zum zukünftigen strukturellen Aufbau für Photokatalysatoren mit verbesserter Leistungsfähigkeit zu geben.

3.2. Experimentalfteil

Neben **RFTA** wurde als Katalysator auch ein Flavinderivat **F-I** untersucht. Beide Substanzen wurden von Mitarbeitern aus der Gruppe von Herrn Prof. Dr. König (Lehrstuhl für Organische Chemie, Universität Regensburg) synthetisiert [Sch+09]. Abbildung 3.4 zeigt die jeweiligen Strukturformen. **MBA** und **MBAld** wurden von Aldrich (98 % Reinheit) gekauft und direkt eingesetzt. Die Lösungsmittel **Acetonitril** (AcN) (von Roth), bi-distilliertes Wasser (H₂O) und **Dimethylsulfoxid** (DMSO) (von Merck) waren von spektroskopischer Qualität. Die stationären Absorptions- und Emissionsspektren wurden

mit einem Lambda 9a Spektrometer (Perkin-Elmer) und mit einem Fluorolog FL3-22 (Horiba Jobin Yvon) bei Raumtemperatur gemessen. Aus früheren Studien [CVK04] war bereits bekannt, dass die PQA dieser Reaktion in Gegenwart von Wasser signifikant ansteigt. Die meisten Messungen wurden daher in einer 1 zu 1 Mischung aus AcN und Wasser durchgeführt.

Für die stationären und zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen wurde eine Fluoreszenzküvette (10 mm×10 mm) verwendet. Die optische Dichte der Proben wurde auf 0.5 eingestellt. Eine Verdünnungsreihe bis hin zu einer optischen Dichte von 0.05 zeigte keinerlei Unterschied in den Lebensdauern. Die Anregung der Proben erfolgte bei 450 nm.

3.2.1. Bestimmung der Produktquantenausbeuten

Die relative PQA für unterschiedliche MBA-Konzentrationen in AcN/H₂O (50:50- v/v) wurde über die schrittweise Änderung der Extinktion im Bereich von 305 bis 325 nm nach Belichtung mit Blaulichtpulsen konstanter Dauer und Intensität bestimmt. Dies war möglich, da zum einen in diesem Bereich das Produkt MBAlD eine viel stärkere Extinktion als das MBA aufweist, und zum anderen die Konzentration an RFTA bzw. iodiertes Flavinderivat (F-I) über die Belichtungszeit von 10 mal 566 ms konstant bleibt (siehe Abbildung 3.3 (A)-(C)). Die Photoanregung wurde in einer 2 mm × 10 mm Quartzküvette durchgeführt. Als Anregungsquelle dienten zwei Hochleistungs-LEDs (Luxeon III Emitter LXHL-PBO9, Philips, 300 mW bei 460 nm), welche in einem Abstand von 1 cm zu einander an den gegenüberliegenden Seiten der Küvette befestigt waren. Die Weglänge für die Abfrage der Extinktionsänderung betrug 10 mm und für die Photoanregung 2 mm. Eine am Lehrstuhl entwickelte Steuereinheit für die LEDs wurde verwendet, um Lichtpulse reproduzierbarer Länge und Intensität zu gewährleisten. Die Absorptionsspektren wurden mit einem Lambda 9a Spektrometer (Perkin-Elmer) aufgenommen. Die Temperatur innerhalb der Küvette wurde auf 20 °C thermostatisiert (siehe Abschnitte 2.2).

Für die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Messungen musste berücksichtigt werden, dass zum einen das Absorptionsspektrum eines Chromophors sich mit der Variation an eingesetztem Substrat ändert, und dass zum anderen sich die Absorptionsspektren unterschiedlicher Chromophore unterscheiden. Daher wurde jeweils das Überlappintegral zwischen dem normierten Emissionsspektrum der Anregungs-LED und dem Absorptionsspektrum des Systems vor der Belichtung gebildet. Diese Größen sind pro-

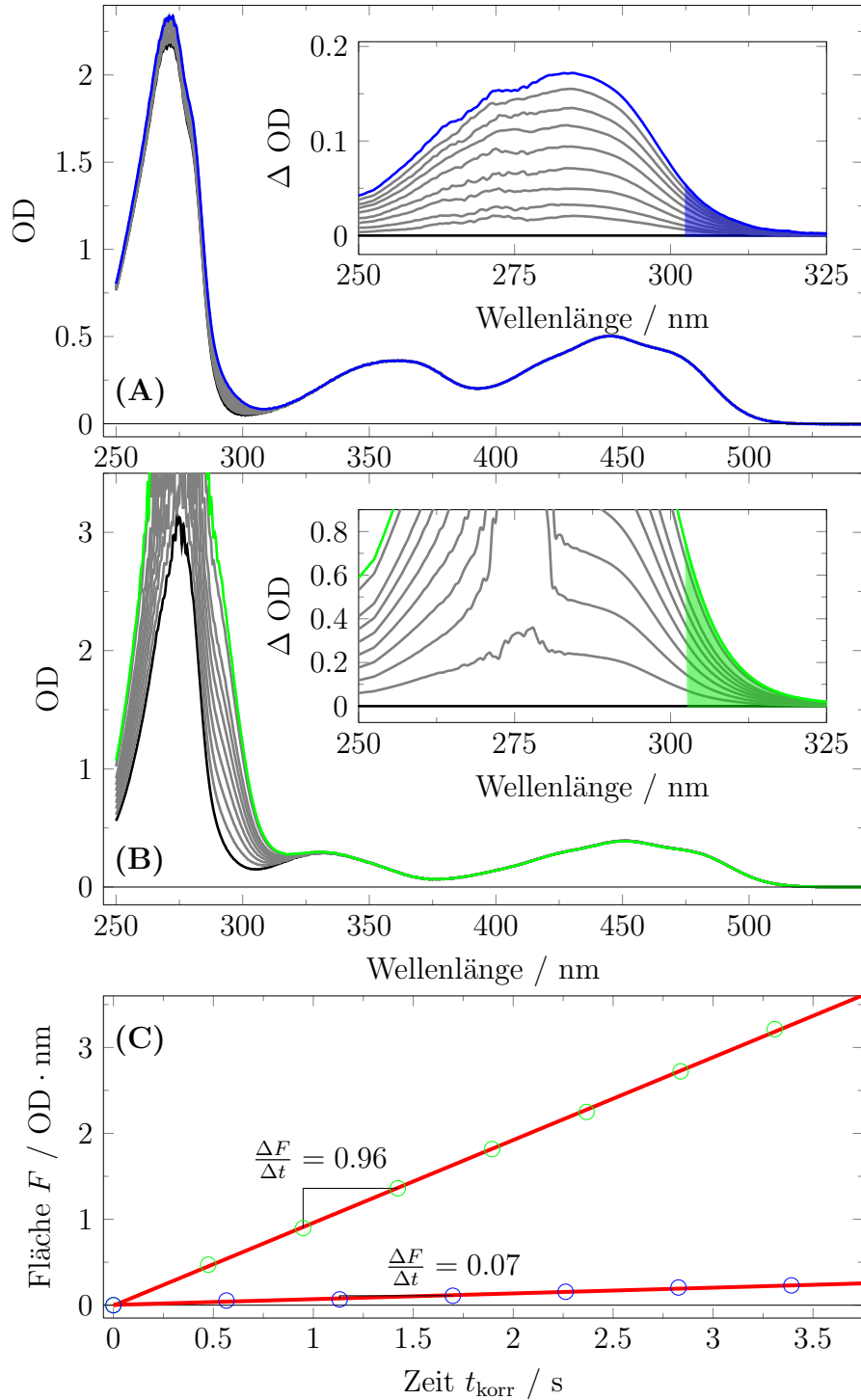


Abb. 3.3.: Bestimmung relativer Produktquantenausbeuten (PQA). Es wurde eine Sequenz von Absorptionsspektren nach Belichtung bei 460 nm mit Pulsen von 566 ms Dauer aufgenommen. Die Konzentration an MBA betrug 0.5 mM und an Katalysator RFTA (A) bzw. F-I (B) 40 μM . (C) zeigt die Änderung der Flächen unterhalb der Extinktion im Bereich von 305 bis 325 nm aufgrund von Umsatz an MBAl (siehe markierte Bereiche) gegenüber der Belichtungszeit für die Messungen (A) (blaue Linie) und (B) (grüne Linie). Es wurde auf die Anzahl absorbierter Photonen korrigiert (siehe Text). Die Steigungen $\frac{\Delta F}{\Delta t_{\text{korr}}}$ sind proportional zur PQA des jeweiligen Systems.

portional zur Anzahl absorbiertener Photonen pro Zeiteinheit Δt . Die Überlappintegrale wurden anschließend auf das größte vorkommende Überlappintegral aller Messungen i normiert, so dass i Korrekturfaktoren $f_i = \{0 \leq f_i \leq 1\}$ erzeugt werden. Die Belichtungszeiten Δt_i wurden mit $\Delta t_{\text{kor},i} = f_i \Delta t_i$ korrigiert. Schließlich wurden die integralen Extinktionsänderungen F gegen die korrigierte Belichtungszeit t_{kor} für jedes System aufgetragen. Die Steigungen $\frac{\Delta F}{\Delta t_{\text{kor}}}$ dieser Auftragungen sind proportional zur PQA des jeweiligen Systems. Im Vorfeld wurde in der Gruppe von Herrn Prof. Dr. König (Lehrstuhl für Organische Chemie, Universität Regensburg) die PQA bei 2 mM RFTA und 20 mM an MBA zu 3 % mit einer anderen Methode bestimmt [Meg+10]. Dabei erfolgte die Verfolgung des Umsatzes an MBAl nach definierter Belichtungszeit mit 20.2 mW bei 443 nm über eine quantitative Gaschromatographie. Die in dieser Arbeit bestimmten Werte der relativen PQA wurden auf den Wert von 3 % bei 20 mM an MBA skaliert, um absolute Werte zu erhalten.

3.3. Resultate und Diskussion

Die Flavin basierte Photooxidation von MBA zum MBAl wurde mit stationären und zeitaufgelösten Messungen untersucht. Die zeitaufgelösten Spektren werden verschiedenen Redox- und Protonierungszuständen der beteiligten Spezies zugeordnet. Daraus wird schließlich ein Modell für den Oxidationsmechanismus postuliert.

3.3.1. Stationäre Absorptionsspektroskopie

Die stationären Absorptions- und Emissionsspektren der oxidierten Grundzustandsformen von RFTA und F-I in AcN/H₂O (50:50-v/v) sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Man erkennt in beiden Fällen eine sehr charakteristische Form, welche sehr ähnlich ist zu bereits aus der Literatur bekannten Spektren anderer Flavinderivate [Hee82; ST96]. Beide Verbindungen zeigen drei Absorptionsbanden mit Maxima bei 446 nm, 362 nm und 268 nm im Fall von RFTA und 451 nm, 334 nm und 276 nm im Fall von F-I. Alle Banden besitzen eine hohe Extinktion in der Größenordnung von $10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, was für einen $\pi \rightarrow \pi^*$ Charakter dieser Übergänge spricht [Hee82]. Der $S_0 \rightarrow S_1$ Übergang ist in beiden Fällen leicht strukturiert und lässt drei Schwingungszustände im elektronisch angeregten S_1 -Zustand erkennen. Ein Unterschied zwischen der iodierten und der nicht iodierten

Form zeigt sich in der Aufspaltung zwischen dem S_1 - und dem S_2 -Zustand, die in **RFTA** kleiner ist als im **F-I**. Weiterhin zeigt **F-I** eine um den Faktor 1.7 höhere Extinktion für den $S_0 \rightarrow S_3$ Übergang. Die Emissionsspektren zeigen in beiden Fällen eine einzelne breite Bande mit Maxima bei 529 nm bei **RFTA** und 539 nm bei **F-I**. Abbildung 3.4

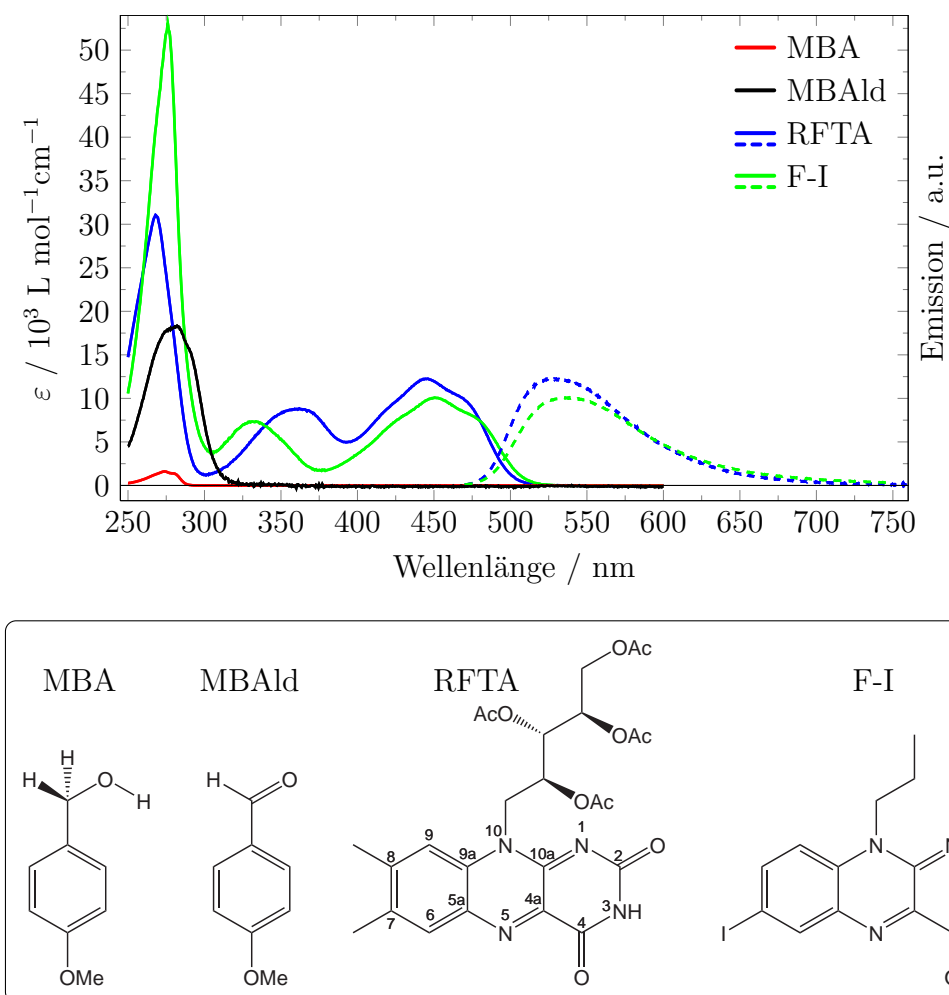


Abb. 3.4.: Stationäre Absorptionsspektren der oxidierten Formen von Riboflavintetraacetat (**RFTA**, blau) und iodiertem Flavinderivat (**F-I**, grün), 4-Methoxybenzylalkohol (**MBA**, rot) und 4-Methoxybenzylaldehyd (**MBAlD**, schwarz) gelöst in **AcN**/ H_2O (50:50- v/v). Die Emissionsspektren von **RFTA** und **F-I** sind in den entsprechenden Farben und normiert auf das jeweilige Absorptionsmaximum als gestrichelte Linie dargestellt.

zeigt weiter die Absorptionsspektren des Edukts **MBA** und des in der Photokatalyse erhaltenen Produkts **MBAlD** ebenfalls in **AcN**/ H_2O (50:50- v/v). Beide Spektren zeigen eine einzige Bande im **UV** mit Maxima bei 274 nm im Fall von **MBA** und bei 282 nm im Fall vom **MBAlD**. Das Produkt **MBAlD** hat eine um den Faktor 11 größere Extinktion im Vergleich zum Edukt **MBA**.

3.3.2. Photophysik des RFTA

Zunächst wurde die Photophysik des reinen Chromophors **RFTA** im angeregten S_1 -Zustand charakterisiert. Der Zeitbereich von einigen ps bis hin zu einigen ns wurde mittels transientser Absorption und **TCSPC** abgedeckt.

Die Dynamik des Singulett-Zustand von RFTA

In Abbildung 3.5 (A) sind die transienten Absorptionsspektren von **RFTA** in **AcN**/ H_2O (50:50- v/v) im Bereich von -1 bis 1000 ps nach der Anregung bei 480 nm ($S_0 \rightarrow S_1$ Übergang) dargestellt. Im gesamten Zeitbereich sind drei Hauptbeiträge erkennbar, die alle Übergängen im **RFTA** zuzuschreiben sind. Zwei Banden davon zeigen eine negative Änderung in der optischen Dichte. Dabei entspricht die Bande um 440 nm dem **GSB** und die Bande um 550 nm der **SE**. Diese beiden negativen Banden sind teilweise überlagert von der **ESA** des $^1\text{RFTA}^*$, die ein Maximum bei etwa 360 nm aufweist (siehe Abbildung 3.5 (B)). Bezogen auf ihre Anfangsamplitude nehmen die **ESA** und die **SE** zu etwa 15 % ab, während der **GSB** in diesem Zeitbereich sich nicht merklich verändert (siehe Abbildung 3.5 (C)). Bei Annahme, dass das $^1\text{RFTA}^*$ ausschließlich in den Grundzustand zerfällt, wäre bezogen auf die jeweilige Anfangsamplitude eine proportionale Abnahme aller spektralen Beiträge zu erwarten. Die Tatsache, dass der **GSB** langsamer zurückgeht als die **SE** und die **ESA**, deutet jedoch auf einen nicht vollständigen Übergang vom $^1\text{RFTA}^*$ in den Grundzustand hin. Der S_1 -Zustand zerfällt demnach zusätzlich in eine weitere Spezies X. Die Lebensdauer des S_1 -Zustands lässt sich durch einen mono-exponentiellen Fit an eine Zeitspur bei $\lambda = 550$ nm (**SE**-Signal) abschätzen zu $\tau = (6.7 \pm 1)$ ns. Eine genaue Bestimmung der S_1 -Lebensdauer erfolgte über Messung der Fluoreszenzlebensdauer von **RFTA** in **AcN**/ H_2O (50:50- v/v) und in **AcN**/**DMSO** (98:2- v/v) mittels **TCSPC**. Man findet in beiden Fällen einen Wert von (6.0 ± 0.02) ns, welcher sehr ähnlich zu anderen Flavinen in Lösung ist [Wei+08]. Aus den Zeitverläufen ging bereits hervor, dass der S_1 -Zustand nicht vollständig in den Grundzustand übergeht sondern zu einem gewissen Teil auch in eine Spezies X. Um einen Hinweis über das Spektrum dieser Spezies zu erhalten, wurde ein globaler exponentieller Fit an die Datenmatrix

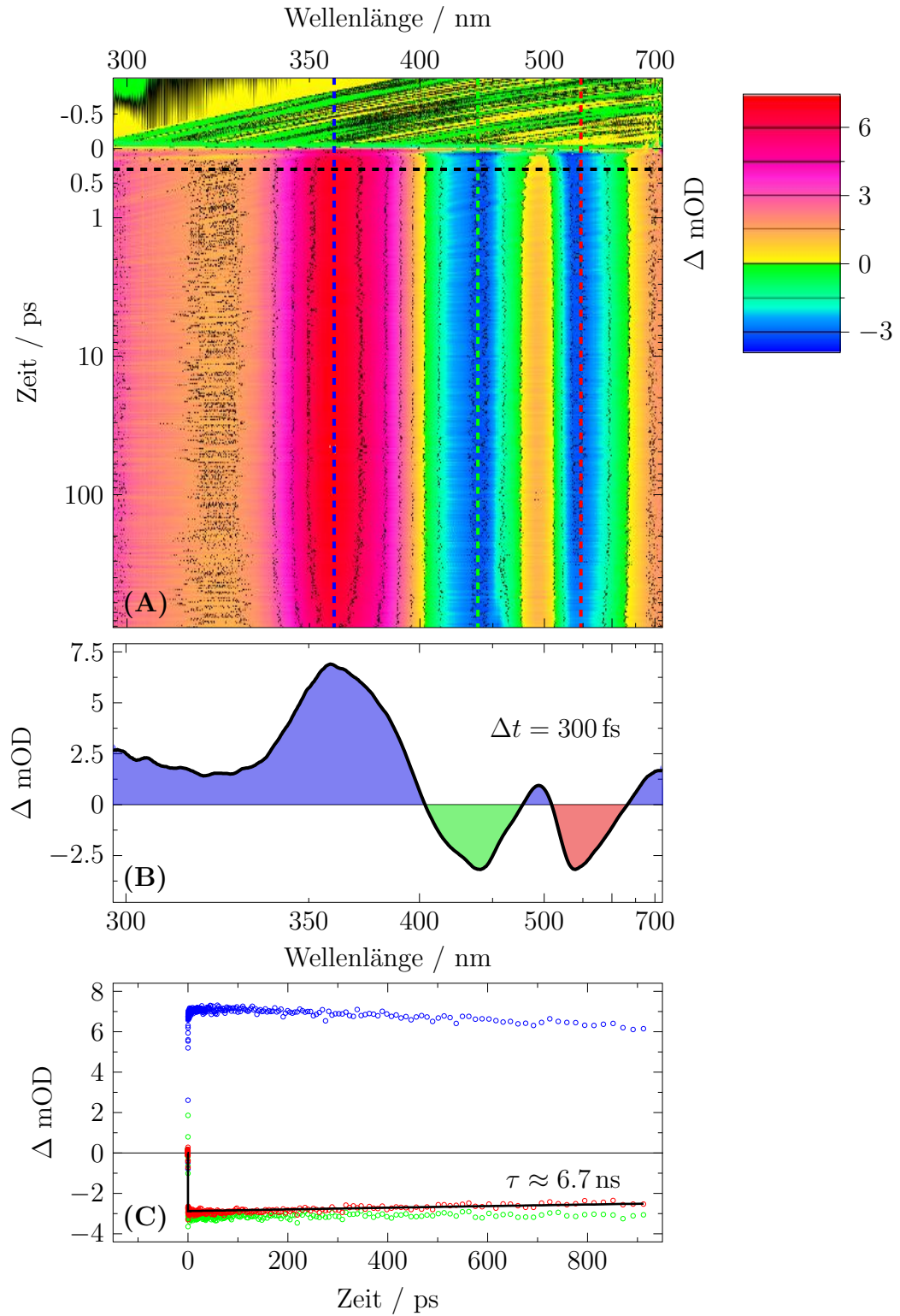


Abb. 3.5.: (A): Falschfarbendarstellung der 2D transienten Absorptionsdatenmatrix gemessen an 0.5 mM RFTA in AcN/H₂O(50:50-v/v) Lösung nach Anregung bei 480 nm. Die Verzögerungszeit ist zwischen -1 ps und 1 ps linear und zwischen 1 ps und 1000 ps logarithmisch dargestellt. (B): Spektrum bei $\Delta t = 300$ fs. (C): Zeitverläufe bei verschiedenen Wellenlängen entsprechend der gestrichelten Linien in (A).

durchgeführt³. Dabei wurde zum einen angenommen, dass der S_1 -Zustand mit der zuvor bestimmten Rate für die Fluoreszenzlebensdauer $(\tau_{\text{fl}})^{-1} = 166.4 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ zerfällt. Zum anderen wurde für die Zerfallsrate der Spezies X $k_X \ll (\tau_{\text{fl}})^{-1}$ angenommen, so dass auf der Zeitskala der Messdaten $k_X = 0$ gesetzt werden kann. Es ergaben sich die beiden in Abbildung 3.6 dargestellten DADS. Das Spektrum mit der Lebensdauer für den Zerfall

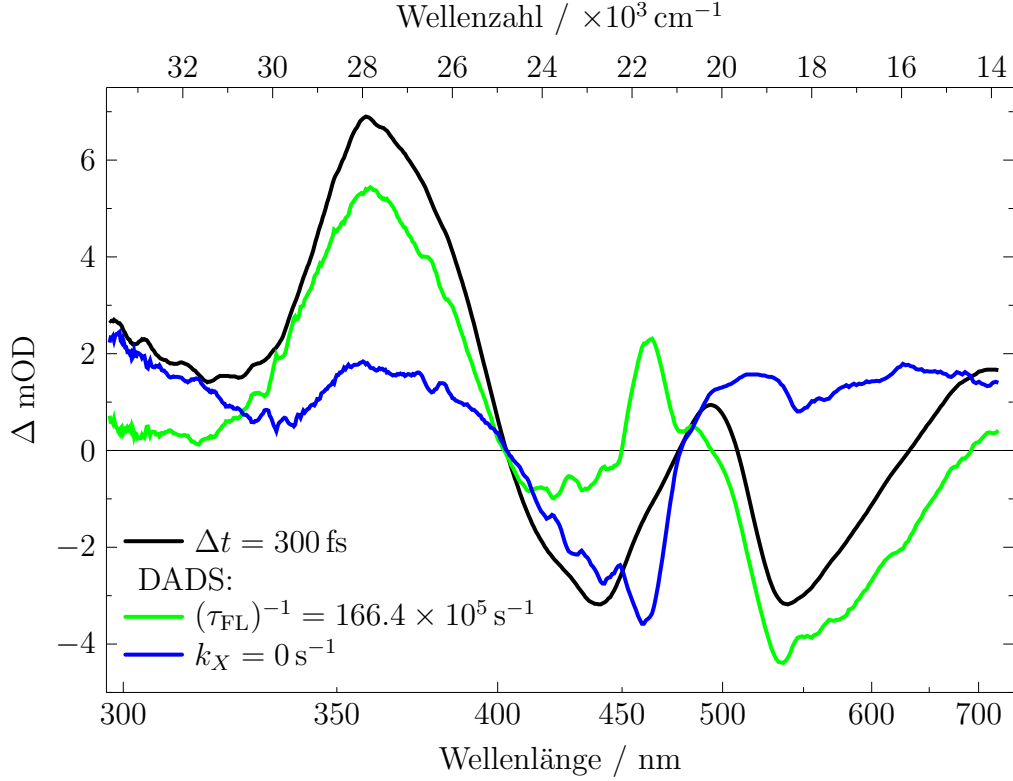


Abb. 3.6.: DADS aus dem globalen Fit. Die schwarze Linie zeigt das Spektrum bei $\Delta t = 300 \text{ fs}$ nach der Anregung.

des S_1 -Zustands (grüne Linie) hat eine hohe Ähnlichkeit mit dem Spektrum gemessen bei $t = 300 \text{ fs}$ nach der Anregung (schwarze Linie). Dennoch sind Unterschiede zu erkennen. Die negative Amplitude des GSB ist bezogen auf die positive Amplitude der ESA deutlich reduziert. Des Weiteren ist die Amplitude der SE bezogen auf die ESA weiter herabgesunken. Dies zeigt an, dass die ESA sowohl in den Grundzustand als auch in eine langwellig von 500 nm absorbierende Spezies übergeht. Die spektrale Struktur

³Für eine ausreichend gute Beschreibung der Daten waren zwei weitere Exponentialfunktionen notwendig. Eine Funktion beschreibt dabei das koherente Artefakt am Zeitnullpunkt mit $\tau \approx 10 \text{ fs}$. Eine weitere Komponente mit $\tau = 1.2 \text{ ps}$ hat nur einen kleinen Beitrag und lässt sich der Relaxation des RFTA und seiner Lösungsmittelumgebung zuschreiben. Derartige Prozesse sind bereits am System von Riboflavin in Wasser und in DMSO charakterisiert worden und liegen bei diesem System im Bereich von $0.5\text{-}0.9 \text{ ps}$ [Wei+08]. Eine detailliertere Analyse dieser Prozesse liegt nicht im Rahmen dieser Arbeit und wurde nicht weiter verfolgt.

dieser Spezies ist vom starken SE-Signal überlagert und kann daher in diesem DADS nicht beobachtet werden. Das DADS zu $k_X = 0$ (blaue Linie) besitzt hingegen eine breite Absorptionsbande im Bereich von 500 bis 700 nm mit zwei lokalen Maxima. Zudem ist ein steileres Ansteigen der Extinktion bei $\lambda < 350$ nm im Vergleich zum ersten DADS zu erkennen. Die Form der Absorptionsbande im Bereich von 500 bis 700 nm ist ähnlich zu publizierten Triplett-Spektren anderer Flavinderivate [ST96; Mel+99]. Berücksichtigt man, dass auf dieser Zeitskala die Population dieses Zustands $\leq 15\%$ der angeregten Moleküle beträgt (Die Amplitude der ESA nimmt nur zu 15 % ab), so ist eine Klärung der spektralen Charakteristika und folglich eine genaue Zuordnung dieser Spezies an dieser Stelle noch nicht möglich.

Die Dynamik des Triplett-Zustand von RFTA

Im Bereich von -1 bis 1000 ps deutete sich in der TA von RFTA bereits die Bildung des Triplett-Zustands $^3\text{RFTA}$ an. Zur Messung der genauen spektralen Signatur des Triplett-Zustands wurden daher Messungen an reinem RFTA in AcN/H₂O (50:50-v/v) mit dem SC Aufbau durchgeführt. In Abbildung 3.7 (A) ist die 2D-TA-Datenmatrix dargestellt. Neben dem starken Laser- und Fluoreszenz-Signal (weißer Bereich in Abbildung 3.7 (A)), welches die Zeitauflösung des Experimentes widerspiegelt, ist in den Daten nach der Anregung eine deutliche positive Absorption zum einen im Bereich von 300 bis 410 nm und zum anderen im Bereich von 500 bis 750 nm zu finden. Im Bereich von 410 bis 500 nm ist das GSB zu erkennen. Die in Abbildung 3.7 (B) dargestellten zeitlichen Schnitte bei 700 nm (repräsentativ für die $T_1 \rightarrow T_n$ -Absorption) und bei 435 nm (repräsentativ für das GSB) zeigen deutlich, dass die positive und die negative TA auf der gleichen Zeitskala von etwa 4 μs wieder in die Grundlinie abgeklungen sind. Aus diesem Grund wurde für die Analyse der Datenmatrix ein mono-exponentielles Modell verwendet⁴. Es wurde das in Abbildung 3.7 (C) (schwarze Linie) dargestellte DADS mit einer Lebensdauer von 1.3 μs erhalten. Dieses Spektrum besitzt deutlich unterschiedliche Charakteristika im Vergleich zum S_1 Spektrum, welches kurz nach der Anregung bei den Femtosekundenexperimenten erhalten wurde ($\Delta t = 300$ fs, graue gestrichelte Linie in Abbildung 3.7 (C)). Im Vergleich zum S_1 -Spektrum zeigt es langwellig von 500 nm ei-

⁴Der Bereich der schnellen Fluoreszenz wurde in einem Fall mit einer zusätzlichen Exponentialfunktion gefittet und in einem anderen Fall herausgeschnitten und in der Summe der kleinsten Fehlerquadrate nicht mitberücksichtigt. In beiden Fällen wurde das gleiche Resultat für die langlebige Spezies erhalten.

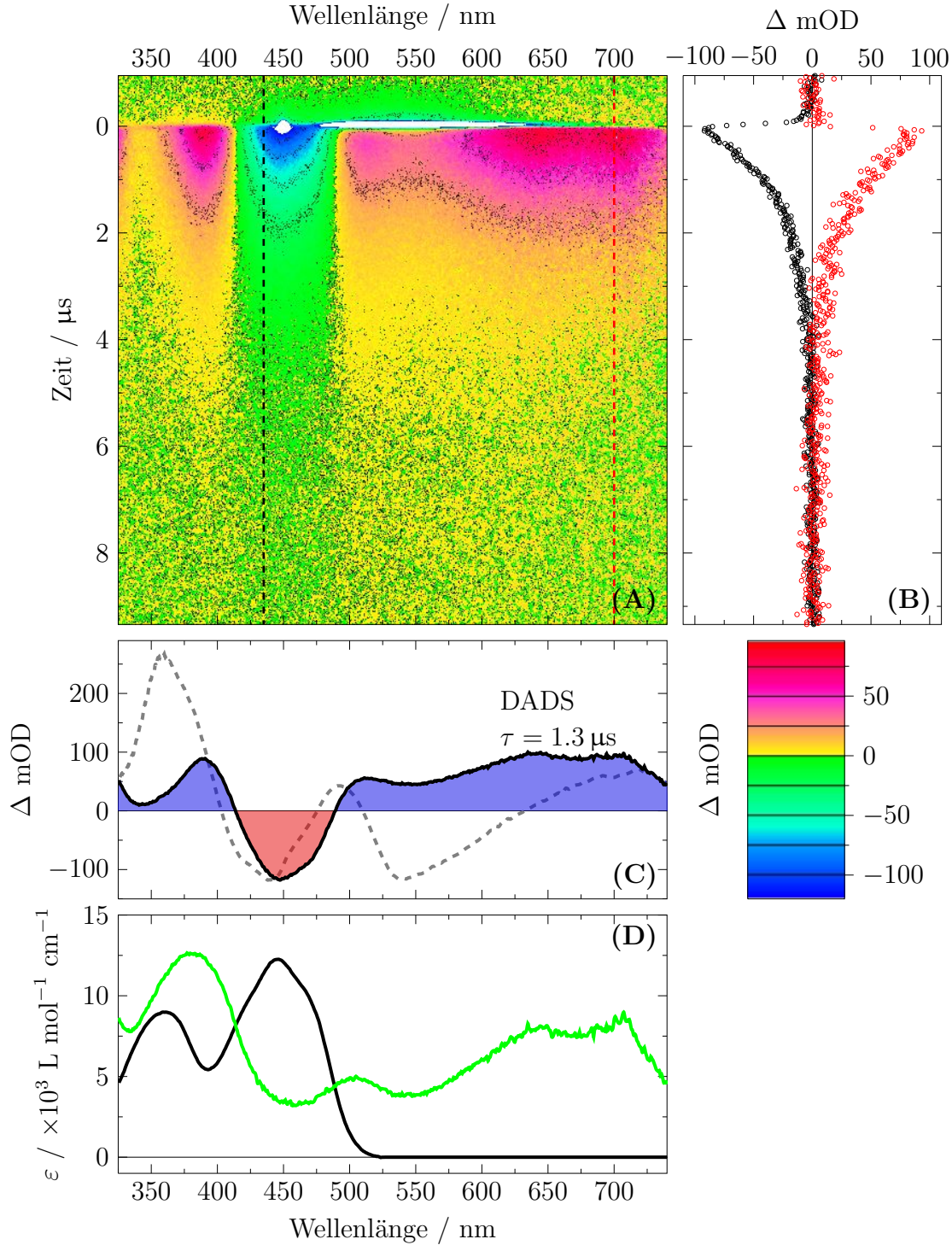


Abb. 3.7.: (A): Falschfarbendarstellung der 2D-TA-Datenmatrix gemessen an 40 μM RFTA in AcN/ H_2O (50:50-v/v) Lösung nach Anregung bei 450 nm. (B): Zeitschnitte bei verschiedenen Wellenlängen entsprechend der gestrichelten Linien in (A). (C): DADS aus dem globalen Fit. Die graue gestrichelte Linie zeigt das Spektrum bei $t = 300 \text{ fs}$ nach der Anregung aus dem Femtosekundenexperiment. (D): Triplet-Spektrum generiert durch Addition eines Bruchteils a des GZ-Spektrums (schwarze Linie) und anschließender Skalierung auf den Extinktionskoeffizienten des GZ-Spektrums. Das Spektrum mit $a = 0.375$ (grüne Linie) zeigt die größte Ähnlichkeit zu publizierten Triplet-Spektren ähnlicher Flavinderivate [ST96; Mel+99].

ne breite Absorptionsbande mit drei lokalen Maxima. Addiert man auf dieses Spektrum etwa 37.5 % des GZ-Spektrums, so erhält man eine gute Übereinstimmung mit den publizierten Triplet-Spektren ähnlicher Flavinderivate [ST96; Mel+99]. Somit kann dieses SAS dem ³RFTA zugeschrieben werden. Die lokalen Maxima liegen bei 380, 500, 645 und 704 nm. Die Ratenkonstante von $7.7 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ spiegelt das diffusionskontrollierte Löschen des Triplet-Zustands durch Sauerstoff wieder. Dieser Wert ist auch vergleichbar mit Werten, die an ähnlichen Flavinsystemen gemessen wurden [LBS04; Mar+02; Bra+04].

Nach Entgasung mittels vier Zyklen von „Freeze Pump and Thaw“⁵ (Vakuum beim abpumpen betrug $\sim 10^{-6}$ mbar) sollte die intrinsische Lebensdauer des ³RFTA gemessen werden. Allerdings wurde keine mono-exponentielle Dynamik des Triplets mehr beobachtet. In Abbildung 3.8 sind die Messergebnisse im Vergleich zur nicht entgasten Probe dargestellt. Man beobachtet ähnliche spektrale Beiträge in beiden Datensätzen. In Abbildung 3.8 (A) erkennt man eine positive Absorption in den Bereichen 300 bis 400 nm und 500 bis 750 nm und eine negative Absorption im Bereich von 410 bis 500 nm. Die Signaturen sind im Fall O₂-freier Lösung jedoch auf einem viel größeren Zeitbereich ($> 100 \mu\text{s}$) zu beobachten. Die positive Absorption im Bereich um 700 nm ist bereits nach etwa $60 \mu\text{s}$ vollständig abgeklungen. Im Bereich von 360 nm wird hingegen zuerst ein schneller Anstieg der Absorption gefolgt von einem langsameren Abfallen beobachtet. Dieses langsame Abklingen geht über das Messzeitfenster hinaus (siehe Abbildung 3.8 (C1) und (C4)). Der GSB bei 440 nm und eine positive Absorption bei 520 nm bleiben ebenfalls über das Messzeitfenster hinaus existent (siehe (C2) und (C3) in Abbildung 3.8). Die Dynamik - von der schnellen Fluoreszenz abgesehen - innerhalb der Datenmatrix lässt sich mit drei Exponentialfunktionen gut beschreiben. Die entsprechenden DADS sind in Abbildung 3.8 (D1)-(D3) (schwarze Linien) dargestellt. Es ergeben sich Lebensdauer von $\tau_1 = 12 \mu\text{s}$, $\tau_2 = 25 \mu\text{s}$ und $\tau_3 = 118 \mu\text{s}$. Das DADS mit $\tau_2 = 25 \mu\text{s}$ hat eine hohe Ähnlichkeit zum DADS, das aus einer Messungen in Anwesenheit von O₂ erhalten wurde. Es scheint sich dabei um den intrinsischen Zerfall des Triplets in den Grundzustand zu handeln. Das mit $12 \mu\text{s}$ schnellste der drei DADS zeigt drei Abweichungen im Vergleich zum DADS mit $\tau_2 = 25 \mu\text{s}$. Erstens weist die breite positive Absorptionsbande von 500 bis 750 nm hier eine konstant gleiche Amplitude auf. Zweitens ist sowohl das Maximum der positiven Absorptionsbande bei 383 nm auf 401 nm als auch das Minimum der negativen Absorptionsbande bei 444 nm auf 460 nm rot verschoben. Und drittens zeigt sich

⁵Es wurde ein Aufbau verwendet, der in der Gruppe von Herrn Prof. Dr. Yersin installiert wurde.

Details sind in der Dissertation von Herrn Dr. Rausch zu finden [Rau11].

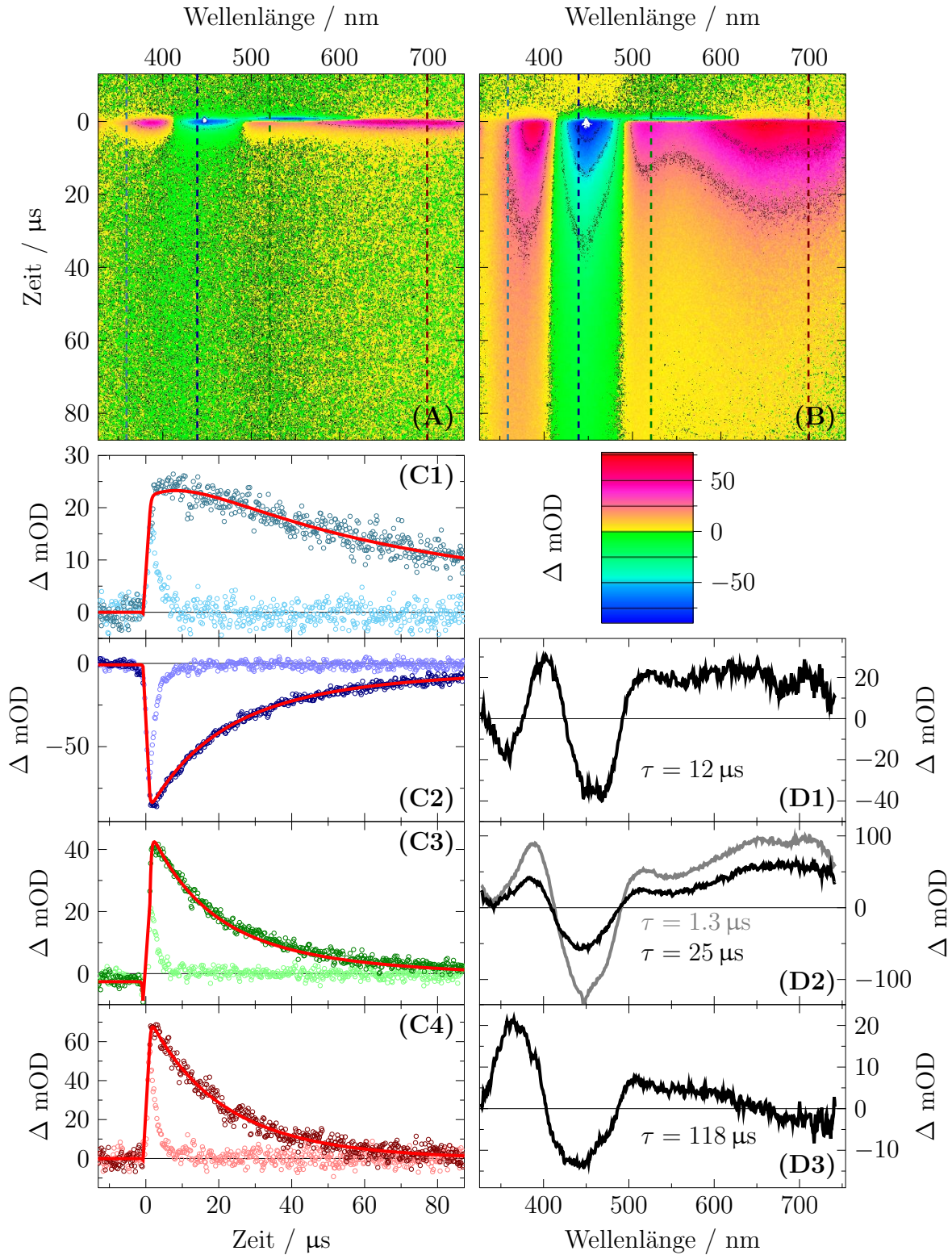


Abb. 3.8.: Falschfarbendarstellung der 2D-TA-Matrix gemessen an 40 μM RFTA in $\text{AcN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50- v/v) Lösung nach Anregung bei 450 nm im 100 μs -Fenster. (A): Nicht entgast. (B): Entgast. ((C1)-(C4)): Vergleich der Zeitschnitte bei verschiedenen Wellenlängen entsprechend der gestrichelten Linien in (A). ((D1)-(D3)): DADS aus den jeweiligen globalen Fits. Schwarze Linie: Entgast. Graue Linie: Nicht entgast.

um 350 nm eine neu auftretende negative Bande. Dieses Spektrum zeigt den Zerfall des Triplettts in eine oder mehrere neue Spezies an. Das **DADS** mit der längsten Lebensdauer von 118 μs hat eine positive Bande bei 366 nm, eine negative Bande bei 444 nm und eine weitere breite positive Bande im Bereich von 490 bis 650 nm mit einem lokalen Maximum bei 506 nm. Die breite Absorptionsbande weist nur etwa ein Drittel der Extinktion im Vergleich zur Bande bei 366 nm auf. Die vorhandenen spektralen Charakteristika lassen durch Vergleich mit Literaturdaten bereits auf die Bildung des $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ schließen [HPP79; ST96]. Bemerkenswerterweise wird das Radikalanion trotz einer wässrigen Umgebung in Form von **AcN**/ H_2O (50:50- v/v) innerhalb des Messzeitfensters von 100 μs nicht protoniert.

Eine Reaktion mit dem Lösungsmittel scheint unwahrscheinlich, und daher muss die Reduktion der $^3\text{RFTA}$ -Spezies aus einem bi-molekularen Prozess entweder mit einem weiteren $^3\text{RFTA}$ oder mit einem **RFTA** im Grundzustand heraus stattfinden. Weitere Messungen am sauerstofffreien System mit unterschiedlichen Anregungsenergien zeigten, dass das Abklingverhalten des Triplett-Zustands von seiner transienten Konzentration abhängt (siehe Abbildung 3.9), was die Annahme einer bi-molekularen Reaktion zweier $^3\text{RFTA}$ weiter bestärkt. Bei einem Elektronentransfer (eT)-Prozess zwischen zwei

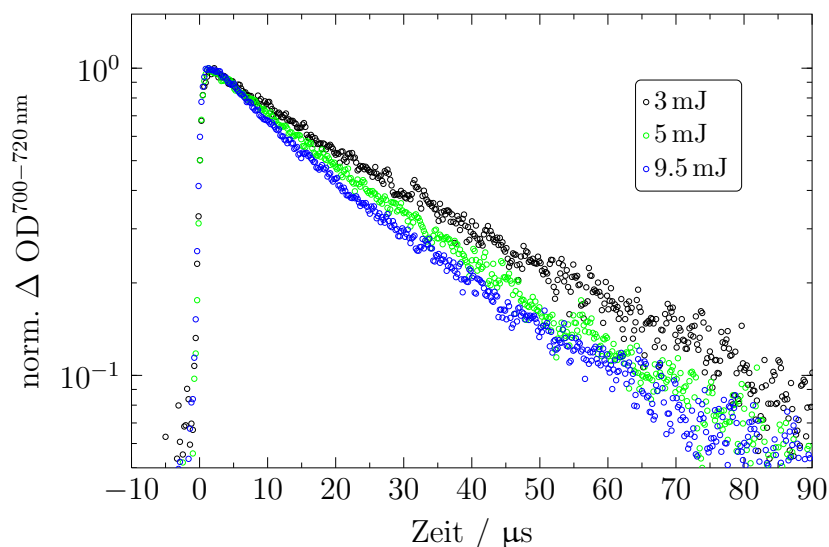


Abb. 3.9.: Messungen an 40 μM **RFTA** in entgaster **AcN**/ H_2O (50:50- v/v) Lösung nach Anregung bei 450 nm im 100 μs -Fenster für die Anregungsenergien 3, 5 und 10 mJ pro Puls. Dargestellt sind normierte Bandenintegrale im Spektralbereich von 700 bis 720 nm.

$^3\text{RFTA}$ -Spezies wäre ein Ionenpaar bestehend aus $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ und $^2\text{RFTA}^{\bullet+}$ die denkbare Folge. Beide Spezies besitzen Absorptionsbanden im sichtbaren Spektralbereich mit Extinktionskoeffizienten gleicher Größenordnung und müssten demzufolge beobachtbar

sein [ST96; LMN11]. Vom Flavin Radikalkation ist bekannt, dass die Lebensdauer in wässriger Lösung im Bereich von 10 bis 15 μs liegt. Dies liefert eine mögliche Erklärung dafür, dass in den DADS die spektralen Charakteristika des Kations im Zeitfenster von 100 μs nicht deutlich ersichtlich sind.

3.3.3. Produktquantenausbeute in Abhängigkeit der Substartkonzentration

In stationären Messungen wurde die PQA der photokatalytischen Reaktion vom MBA zum MBAlD in Abhängigkeit der Substratkonzentration untersucht. In Abbildung 3.10 ist die PQA im Konzentrationsbereich von 1 bis 500 mM dargestellt. Für einen produk-

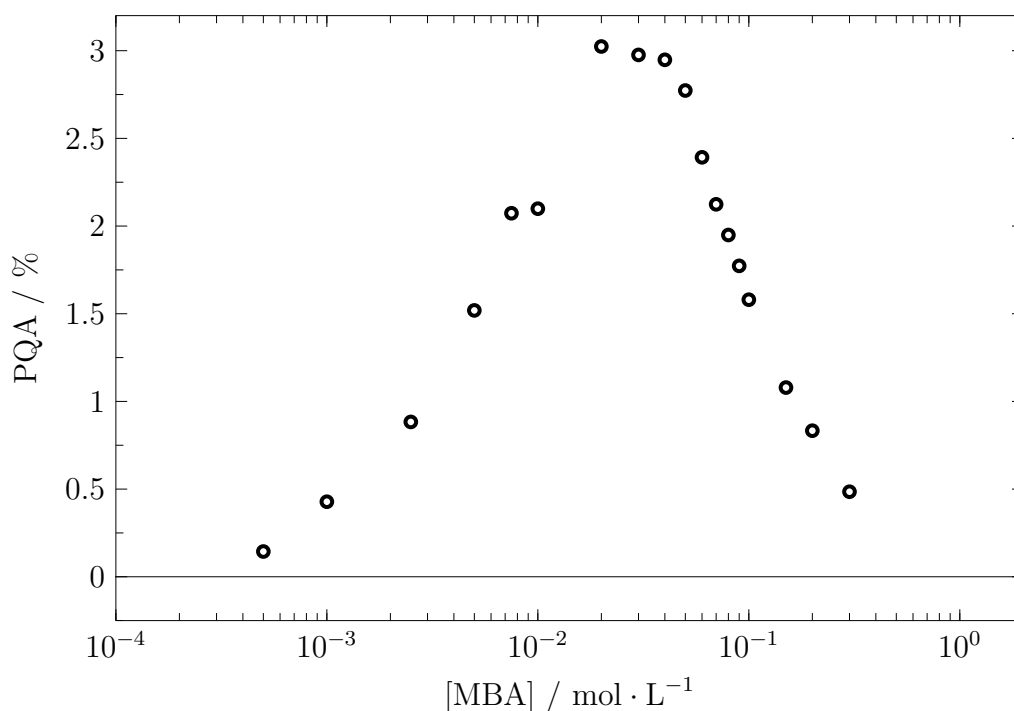


Abb. 3.10.: PQA der Bildung von MBAlD in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration an MBA. Es wurde in AcN/H₂O(50:50-v/v) gemessen und RFTA als Photokatalysator eingesetzt.

tiven Prozess aus dem Singulett würde man erwarten, dass die PQA monoton bis auf einen konstanten Wert ansteigt [FKT85; FK99; Fuk+01]. Allerdings ergibt sich in diesem System ein anderes Verhalten mit einem Maximum der PQA von 3 % bei 20 mM an MBA. Sowohl für höhere als auch für kleinere Konzentrationen fällt die PQA deutlich ab.

3.3.4. Sehr schneller nicht produktiver Photozyklus

Zu Beginn wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Konversion vom Alkohol zum Aldehyd besonders effizient wird, wenn das Substrat **MBA** mit dem Photokatalysator **RFTA** in unmittelbarem Kontakt steht. Die Untersuchungen der **PQA** widersprachen dieser Annahme jedoch bereits. In den ersten Femtosekundenexperimenten sollte dem Grund für die abfallende Effizienz der **PQA** nachgegangen werden.

Femtosekundendynamik von RFTA in reinem MBA

Der Schmelzpunkt von **MBA** liegt im Bereich von 22-25 °C. Zugabe von 2 mM **RFTA** führt aber bereits zu einer ausreichenden Schmelzpunktniedrigung, so dass bei Raumtemperatur eine hoch viskose Lösung hergestellt werden konnte. So konnten transiente Absorptionsmessungen bei Raumtemperatur in einer Durchflussküvette ohne Zugabe von Lösungsmitteln durchgeführt werden. In Abbildung 3.11 (A) sind die transienten Absorptionsspektren von **RFTA** in reinem **MBA** im Bereich von -1 bis 1000 ps nach der Anregung bei 480 nm dargestellt. Man erkennt drei Hauptbeiträge in diesen Spektren, die alle ähnlich derer aus der Messung von **RFTA** in **AcN**/H₂O (50:50-*v/v*) sind (siehe Abbildung 3.11 (A)). Auch hier können alle Banden Übergängen des **RFTA** zugeschrieben werden. Das **GSB** liegt bei 450 nm, die **SE** bei 560 nm, und die **ESA** hat ihr Maximum bei etwa 370 nm. Die kleinen Unterschiede in der Form und Lage der Banden im Vergleich zur Situation von **RFTA** in **AcN**/H₂O (50:50-*v/v*) können der höheren Polarität des **MBA** zugeschrieben werden [Rei04]. Abbildung 3.11 (A) ist weiter zu entnehmen, dass all diese Signaturen innerhalb von ca. 100 ps wieder zurück in die Grundlinie laufen. Dieses deutet auf eine vollständige Deaktivierung zurück in den Grundzustand des **RFTA**.

Die **SE** bei etwa 560 nm weist eine zusätzliche signifikant schnellere Dynamik auf als die Rückkehr des Grundzustands bei etwa 450 nm und der Zerfall der **ESA** bei etwa 370 nm. Abbildung 3.11 (B) zeigt dies deutlich am Vergleich der Schnitte bei 450 nm und 560 nm. Das schnelle Abklingen (einige ps) der **SE** geht einher mit einer erkennbaren Rotverschiebung der transienten Absorptionsbande um etwa 10 nm. Eine merkliche Grundzustandsrückkehr ist auf dieser Zeitskala jedoch nicht zu beobachten. Das transiente Spektrum des angeregten Zustands nach dem schnellen Löschen der Fluoreszenz ($\Delta t = 10$ ps) ist mit Ausnahme kleiner Verschiebungen und der fehlenden Bande

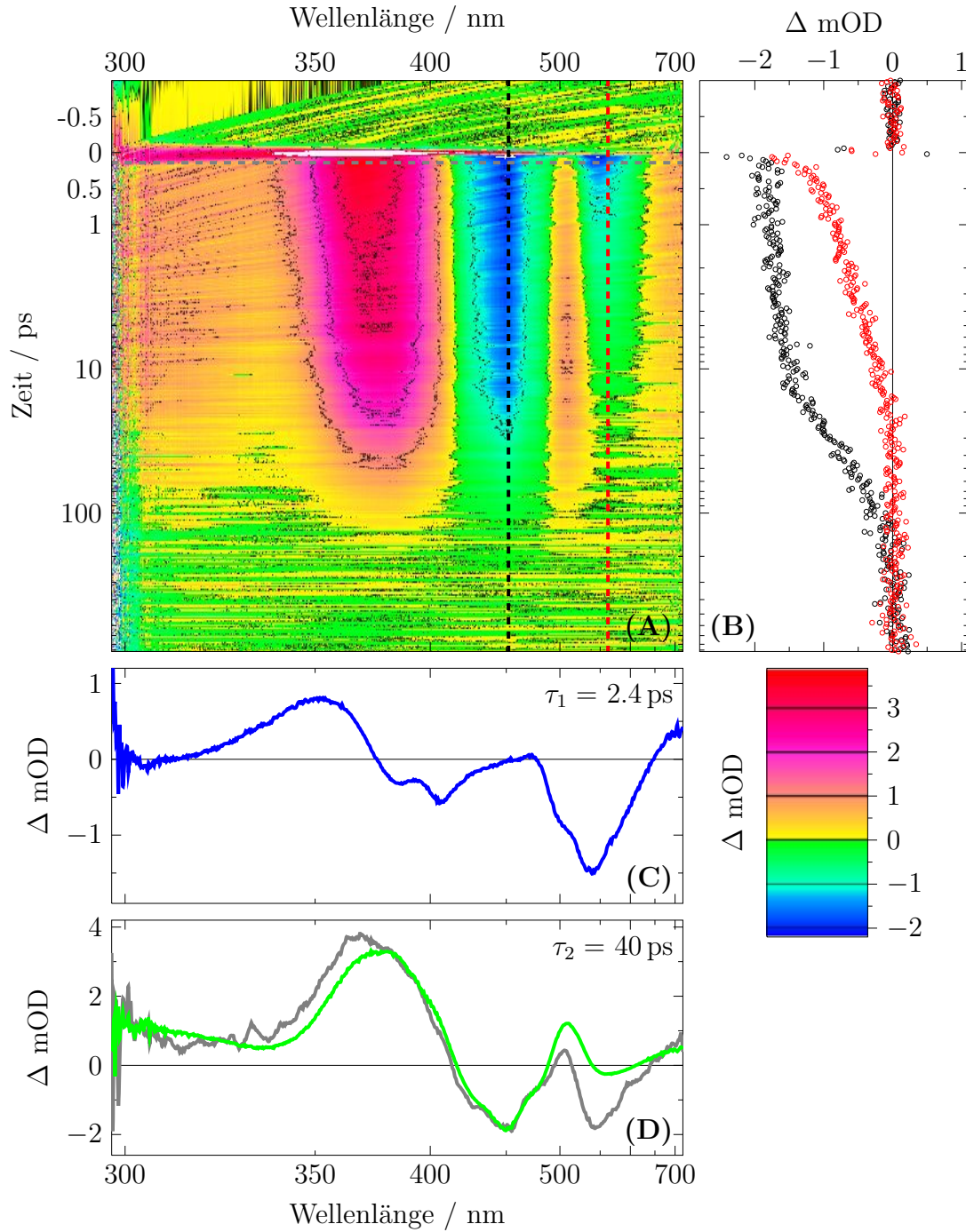


Abb. 3.11.: (A): Falschfarbendarstellung der 2D transienten Absorptionsdatenmatrix gemessen an 2 mM **RFTA** in **MBA** nach Anregung bei 480 nm. Die Verzögerungszeit ist zwischen -1 ps und 1 ps linear und zwischen 1 ps und 1000 ps logarithmisch aufgetragen. (B): Zeitschnitte bei verschiedenen Wellenlängen entsprechend der gestrichelten Linien in (A). (C-D): **DADS** aus dem globalen Fit. In **D** ist zusätzlich das transiente Absorptionsspektrum zum Zeitpunkt $\Delta t = 140 \text{ fs}$ hinterlegt (graue Linie).

der SE sehr ähnlich dem anfänglich gemessenen transienten Spektrum des S_1 -Zustands ($\Delta t = 140$ fs). Ein globaler Fit mit einem bi-exponentiellen Modell lieferte eine sehr gute Übereinstimmung mit den Daten⁶. Die resultierenden DADS mit Lebensdauern von 2.4 und 40 ps sind in Abbildung 3.11 (C) und (D) dargestellt. Die schnelle Komponente weist einen deutlichen Beitrag nur in der Bande der SE auf, nicht aber im Bereich des GSB. Letzterer ist dagegen nur in der langsamen Komponenten zu finden. Die Ähnlichkeit zum transienten Spektrum des S_1 -Zustands bei $\Delta t = 140$ fs ist mit Ausnahme der fehlenden SE auch in der langsamen Komponente zu erkennen. Eine derartige Situation kann durch einen Löschmechanismus erklärt werden, in dem ein eT zum angeregten Chromophor stattfindet. Das in Abbildung 3.12 dargestellte vereinfachte Orbitalbild illustriert diesen Deutungsversuch. Der S_1 -Zustand sei näherungsweise wiedergegeben durch die Anregung eines Elektrons aus dem *Highest Occupied Molecular Orbital* (HOMO) in das darüber liegende *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* (LUMO). Das beobachtete transiente Spektrum des S_1 -Zustandes ergibt sich dann entweder aus den Übergängen ausgehend vom einfach besetzten LUMO oder durch Anregung tiefer gelegener HOMOs in das einfach besetzte HOMO, so dass das „Loch“ weiter herabgesetzt wird. Kommt es zu einem eT vom umgebenden MBA in das halb besetzte HOMO des angeregten RFTA, werden in erster Näherung die höheren nicht besetzten Orbitale kaum beeinflusst. Daraufhin wird sich das transiente Spektrum entsprechend auch nur geringfügig ändern. Die beobachteten spektralen Signaturen stimmen auch gut mit dem bereits aus der Literatur bekannten Absorptionsspektrum des Flavinradikalanions überein [ST96]. Im Bereich um etwa 440 nm würde man eine schwache Signatur des Radikalkation ${}^2\text{MBA}^{\bullet+}$ erwarten [Bac+96; BBS97; BBS99], diese ist jedoch von dem viel stärkeren Ausbleichen des Grundzustands des RFTA überlagert und daher spektroskopisch nicht beobachtbar. Des Weiteren werden keinerlei Signale bei längeren Verzögerungszeiten beobachtet, was auf eine vollständige Rekombination schließen lässt. Im letzten Schritt kommt es somit zu einem rück-Elektronentransfer (r-eT) zurück auf das ${}^2\text{MBA}^{\bullet+}$ aus dem *Singly Occupied Molecular Orbital* (SOMO) des ${}^2\text{RFTA}^{\bullet-}$, und beide Moleküle befinden sich wieder in ihren Grundzuständen.

Offensichtlich durchläuft das RFTA in reinem MBA einen nicht produktiven Zyklus. Denn nach einem schnellen eT (2.4 ps) vom MBA in den S_1 des RFTA folgt direkt ein ebenfalls schneller r-eT, der die Reaktanten in ihre Grundzustände zurückführt.

⁶Für eine ausreichend gute Beschreibung der Daten war eine weitere Exponentialfunktion notwendig, die das koherente Artefakt am Zeitnullpunkt mit $\tau \approx 10$ fs beschreibt.

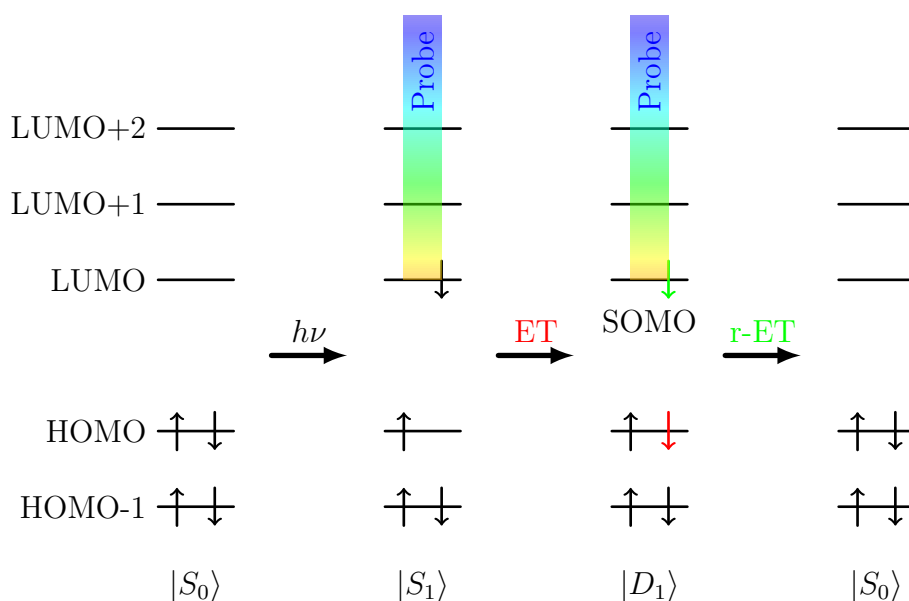


Abb. 3.12.: Vereinfachtes Orbitalbild als Deutungsversuch für die schnelle Löschung des **RFTA** S_1 -Zustands in reinem **MBA**. Nach Photoanregung ($h\nu$) wird der S_1 über einen **HOMO**^a-**LUMO**^b-Übergang gebildet. Das transiente Spektrum ergibt sich dann entweder aus den Übergängen ausgehend vom einfach besetzten **LUMO**^b oder durch Anregung tiefer gelegener **HOMO**^as in das einfach besetzte **HOMO**^a, so dass das „Loch“ weiter herabgesetzt wird. In erster Näherung seien diese Übergänge nicht beeinflusst nach einem zusätzlichen **eT** in das einfach besetzte **HOMO**^a des S_1 -Zustandes, so dass sich das transiente Spektrum kaum ändert. Schließlich kommt es zu einem **r-eT** zurück aus dem **SOMO**^c in den Grundzustand.

^a**Highest Occupied Molecular Orbital** (HOMO)

^b**Lowest Unoccupied Molecular Orbital** (LUMO)

^c**Singly Occupied Molecular Orbital** (SOMO)

Auch geht aus diesen Daten hervor, dass in reinem **MBA** als Lösungsmittel der Triplett-Zustand ³**RFTA** keinerlei Rolle spielt. Die von Riboflavin in H_2O bekannte **ISC** Rate [STM08; IPH03] von $7.37 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ liegt nämlich etwa drei Größenordnungen unterhalb der konkurrierenden Löschrates $\sim (2.4 \text{ ps})^{-1}$ für den S_1 -Zustand. Somit verhindert die schnelle Rückreaktion weitere Elektron- und Protontransferreaktionen, welche auf dem Weg vom Alkohol zum Aldehyd erforderlich wären. Dementsprechend wird selbst nach Langzeitbelichtung kein Umsatz von **MBA** zum **MBAld** beobachtet.

Lebensdauer von ¹**RFTA** in Abhängigkeit der **MBA**-Konzentration

Im nächsten Schritt wurde **AcN**/ H_2O (50:50-v/v) als Lösungsmittel verwendet, um **RFTA** und **MBA** in gewünschten Konzentrationen zu lösen. Durch die Variation der

Konzentration an **MBA** war es nun möglich, den mittleren Abstand zwischen den Reaktionspartnern einzustellen. Da **eT**-Prozesse eine starke Abstandsabhängigkeit besitzen, war eine deutliche Abnahme der entsprechenden Raten mit abnehmender Konzentration zu erwarten.

Die **TA**-Spektren des **RFTA** in Lösung im Bereich bis zu 1 ns nach der Anregung sind sehr ähnlich zu denen in reinem **MBA**. Sie enthalten die gleichen Signaturen: Die starke **ESA**-Bande um 360 nm, die negative **GSB**-Bande um 440 nm und die negative **SE**-Bande um 550 nm.

In der Abwesenheit von **MBA** erlaubte das Zeitfenster von 1 ns nur die Beobachtung des Beginn eines langsamen Zerfalls aller Signale, welcher den Zerfall des S_1 -Zustands anzeigt. Dieser ist in Abschnitt 3.3.2 bereits diskutiert worden. Mit zunehmender Zugabe von **MBA** in Konzentrationen von mehreren Hundert mM zerfallen alle Signaturen zunehmend schneller. So ist z.B. die Amplitude bei einer Verzögerung von 300 ps im Fall von 400 mM **MBA** bereits auf 50 % abgefallen bezogen auf den anfänglichen Wert direkt nach der Anregung (siehe Abbildung 3.13). Im Unterschied zu der Situation in reinem **MBA** zerfällt die **SE**-Bande nun auf der gleichen Zeitskala wie alle anderen Signaturen. Der Grund dafür ist, dass die Reaktion zwischen $^1\text{RFTA}^*$ und **MBA** einen zweistufigen Prozess darstellt, da sich die Reaktionspartner aus einer großen Entfernung durch Diffusion zuerst näher kommen müssen, bevor der **eT**-Prozess und alle weiteren Schritte aus der nahen Konfiguration heraus stattfinden können. Bei nicht extrem hohen Konzentrationen an **MBA** ($< 1\text{ M}$) ist die Rate für die Bildung eines entsprechenden Paares von $^1\text{RFTA}^*$ und **MBA** viel kleiner als die Rate erster Ordnung $^1k_{\text{eT}} = (2.4\text{ ps})^{-1}$ des **eT**-Prozess und auch als die Rate $^1k_{\text{r-eT}} = (40\text{ ps})^{-1}$ des **r-eT**-Prozess (siehe Abschnitt 3.3.4). Dies zeigt, dass der **eT** von der diffusionslimitierten Bildung des $^1\text{RFTA}^*$ -**MBA**-Paares abhängt. Dies führt wiederum zur unproduktiven Deaktivierung des $^1\text{RFTA}^*$ durch einen **eT**-Zyklus wie in reinem **MBA**. Das Fehlen jedweder Produktsignale bei langen Verzögerungszeiten für die höchsten Konzentrationen an **MBA** bestätigt dieses Modell. Diffusionskontrollierte Löschung von angeregten Zuständen kann mit einem Modell beschrieben werden, das auf SMOLUCHOWSKY zurückgeht. Die mathematische Beschreibung dieses Modells ist in [Ric85] zu finden. Es wurde daraufhin eine quantitative Modellierung an Bandintegralen über die Transienten an individuellen Wellenlängen durchgeführt. Für kleine Konzentrationen an **MBA** konnte eine gute Übereinstimmung des Diffusionsmodells mit den transienten Daten erreicht werden. Bei hohen Konzentrationen

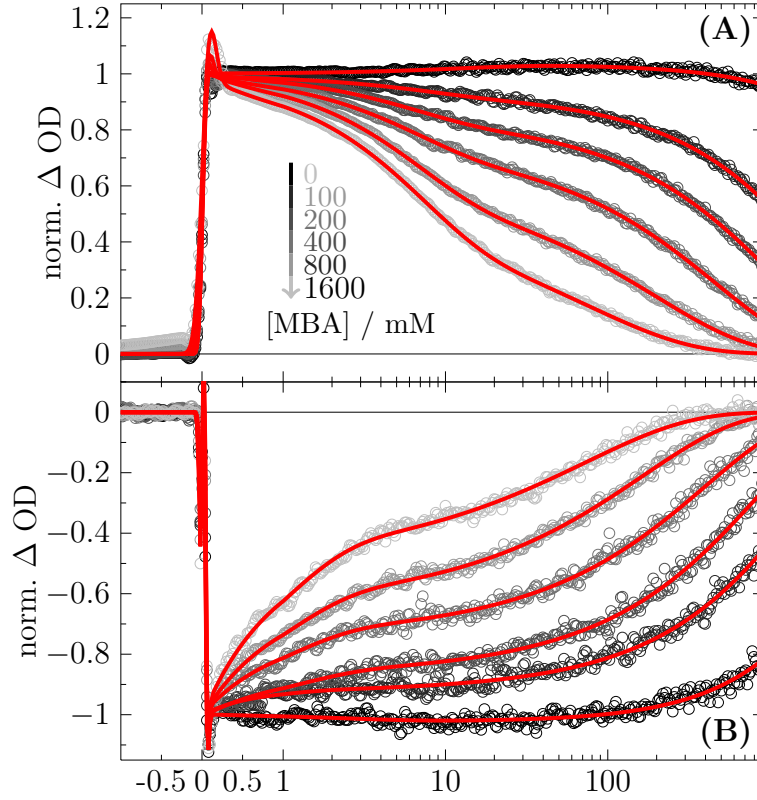


Abb. 3.13.: Zerfall der **ESA**-Bande **(A)** und der **SE**-Bande **(B)** von **RFTA** in **AcN**/**H₂O** (50:50-*v/v*) für die entsprechenden Konzentrationen an **MBA** wie in **(A)** abgebildet. Die Daten wurden normiert auf die anfängliche Amplitude nach der Photoanregung. Die Zeitschnitte wurden durch Integration über die Bande von 300 bis 409 nm für die **ESA** und über die Bande von 525 bis 625 nm für die **SE** ermittelt (offene Kreise). Die Fitfunktion entspricht dem Diffusionsmodell nach Gleichung 3.1 (rote Linien). Die Verzögerungszeit ist zwischen -1 und 1 ps linear und zwischen 1 und 1000 ps logarithmisch.

an **MBA** zeigte sich aber eine zusätzlich schnelle Komponente in der **RFTA**-Dynamik. Da die SMOLUCHOWSKI-Theorie bereits eine obere Grenze für die Reaktionsrate bei Kontakt darstellt [Sre+09], kann dies nicht aufgrund der vereinfachenden Annahmen der Diffusionsfitfunktion sein. Für eine konsistente Modellierung bei allen Konzentrationen an **MBA** wurde daher ein exponentieller Term mit einer ps-Abklingzeit zu der Fitfunktion hinzu addiert. Die Diffusionsdynamik in allen drei Hauptbanden (**ESA**, **GSB** und **SE**) konnte dadurch für eine gegebene Konzentration an **MBA** mit einem gemeinsamen Satz an Parametern beschrieben werden. Die verwendete Fitfunktion lautet

$$\begin{aligned} \Delta \text{OD}^{\text{mod}}(t) = & A_{\text{diff}} \exp \left\{ -k_{\text{fl}} t - 10^3 N_{\text{A}} 4\pi R_{\text{ww}} D [\text{MBA}]_0 \left(1 + \frac{2R_{\text{ww}}}{\sqrt{\pi D t}} \right) t \right\} \\ & + A_{\text{fast}} \exp(-k_{\text{fast}} t), \end{aligned} \quad (3.1)$$

wobei N_{A} die AVOGADRO'sche Konstante, D die Diffusionskonstante, $[\text{MBA}]_0$ die einge-

setzte Konzentration an **MBA** und R_{ww} der Wechselwirkungsradius sind. A_{diff} ist der Anteil des diffusionskontrollierten Prozesse⁷. Der Anteil der Amplitude A_{fast} nimmt mit der Konzentration an **MBA** zu (siehe Tabelle 3.1). Sie wird daher vor-assoziierten

[MBA] / [mM]	100	200	400	800	1600		
$\frac{A_{\text{fast}}}{A_{\text{diff}}}$	0.05	0.06	0.09	0.16	0.25	AcN/DMSO (98:2-v/v)	
$D / [\text{\AA}^2 \cdot \text{ns}^{-1}]$	160	130	110	100	90		
$\tau_{\text{FL}}^{\text{eff}} / [\text{ps}]$	1100	740	420	230	87		
$\frac{\Phi_{\text{ISC}}}{\Phi_{\text{ISC}}^0} / [\%]$	18	12	7.0	3.8	1.5		
$\frac{A_{\text{fast}}}{A_{\text{diff}}}$	0.07	0.17	0.32	0.57	0.95	AcN/H ₂ O (50:50-v/v)	
$D / [\text{\AA}^2 \cdot \text{ns}^{-1}]$	59	60	56	52	42		
$\tau_{\text{FL}}^{\text{eff}} / [\text{ps}]$	1400	700	310	120	45		
$\frac{\Phi_{\text{ISC}}}{\Phi_{\text{ISC}}^0} / [\%]$	23	12	5.2	2.0	0.75		

Tab. 3.1.: Resultate der Fits mit dem Diffusionsmodell an die Femtosekunden **TA**-Daten für unterschiedliche Konzentrationen an **MBA** in zwei Lösungsmittelsystemen. Der exponentielle Beitrag von vor-assoziierten Aggregaten ergibt $\tau_{\text{fast}}(\text{SE}) = 4.5 \text{ ps}$ (**eT**) und $\tau_{\text{fast}}(\text{ESA}) = 36 \text{ ps}$ (**r-eT**) in **AcN/DMSO**(98:2-v/v) und $\tau_{\text{fast}}(\text{SE}) = 0.9 \text{ ps}$ (**eT**) und $\tau_{\text{fast}}(\text{ESA}) = 6.4 \text{ ps}$ (**r-eT**) in **AcN/H₂O**(50:50-v/v). Die resultierenden Wechselwirkungsradien sind 3.8 \AA und 6.0 \AA .

RFTA-MBA-Aggregaten zugeschrieben [Sre+09; Pan+08]. Diese sind unabhängig von der Konzentration an **MBA** und liegen in der Größenordnung zu der Situation des **RFTA** in reinem **MBA**. Bei einer vergleichbaren Messreihe in **AcN/DMSO** (98:2-v/v) stehen die Lebensdauern für die vor-assoziierten **RFTA-MBA**-Aggregate sogar in sehr guter Übereinstimmung zu den Abklingzeiten für den **eT** (0.9 ps gemessen an der **SE**-Bande) und den **r-eT** (6.4 ps gemessen an der **ESA**-Bande), die in reinem **MBA** gemessen wurden. Aus dem relativen Anteil an Aggregaten bei unterschiedlichen Konzentrationen an **MBA** kann man eine Assoziationskonstante von $K = 0.6 \text{ M}^{-1}$ für den **RFTA-MBA**-Komplex in **AcN/H₂O** (50:50-v/v) berechnen. Dieser Wert ist kleiner als die schwache Assoziationskonstante um 1 M^{-1} , die für andere aromatische Moleküle ähnlicher Größe in **AcN** ermittelt wurde [CI01]. In **AcN/DMSO** (98:2-v/v) ergab sich eine um den Faktor drei kleinere Assoziationskonstante. Man kann annehmen, dass ein hydrophober Effekt die Triebkraft für die Aggregation ist. Die charakteristischen Zeiten für den **eT** (4.6 ps

⁷Die intrinsische Lebensdauer $(k_{\text{fl}})^{-1}$ des **RFTAs** steht in Konkurrenz mit der diffusionskontrollierten Reaktion mit **MBA**.

gemessen an der SE-Bande) und den r-eT (36 ps gemessen an der ESA-Bande) sind in AcN/DMSO größer als in AcN/H₂O (50:50-v/v). Eine Erklärung dafür kann die Interaktion mit den Wassermolekülen über Wasserstoffbrücken sein, die eine bevorzugte Orientierung des MBA zum RFTA innerhalb der Aggregate favorisieren.

Des Weiteren zeigt sich eine Abnahme der Diffusionskonstanten nach Zugabe von MBA. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass die Viskosität mit zunehmender Konzentration an MBA zunimmt. Die Diffusionskonstanten sind in AcN/DMSO (98:2-v/v) um den Faktor zwei größer als in AcN/H₂O (50:50-v/v). Das kann man so deuten, dass RFTA und MBA wahrscheinlich von einer Lösungsmittelschicht umgeben sind. Eine verlangsamte Diffusion des MBAs durch die letzte Lösungsmittelschicht, die das RFTA umgibt, mag ebenfalls zu diesem Effekt beisteuern [Pan+08].

Der Wechselwirkungsabstand R_{ww} ist, wie erwartet, in den jeweiligen Systemen für unterschiedliche Konzentrationen an MBA innerhalb der Genauigkeit des Experiments konstant. In AcN/DMSO (98:2-v/v) beträgt dieser 3.8 Å und in AcN/H₂O (50:50-v/v) 6 Å. Der größere Wechselwirkungsabstand steht zusätzlich im Einklang zur Deutung, dass RFTA in AcN/H₂O (50:50-v/v) mit Lösungsmittelmolekülen umgeben ist [BM80]. Interessanterweise ist der Wechselwirkungsabstand in beiden Fällen deutlich kleiner als die Summe der molekularen Radien von RFTA und MBA. Dies deutet darauf hin, dass eine spezifische Orientierung - wahrscheinlich Fläche zu Fläche der aromatischen Einheiten - für einen effizienten eT benötigt wird [BM80; All+00].

In einem weiteren Schritt wurde eine effektive Fluoreszenzlebensdauer τ_{eff} aus den normierten Integralen über die Änderung im Signal $\Delta\text{OD}(\text{SE}, t)$ im spektralen Bereich der SE-Bande über

$$\tau_{\text{fl,eff}} = \frac{1}{\Delta\text{OD}(\text{SE}, 0)} \int_{t=0}^{\infty} \Delta\text{OD}(\text{SE}, t) dt \quad (3.2)$$

bestimmt, um auf diese Weise eine mittlere Größe für die Reaktionsdynamik bei unterschiedlichen Konzentrationen an MBA in beiden Lösungsmittelgemischen zu gewinnen [BSBV05]. Man erkennt für hohe MBA-Konzentrationen das $\tau_{\text{fl,eff}}$ in AcN/DMSO (98:2-v/v) größer ist als in AcN/H₂O (50:50-v/v). Mit sinkender MBA-Konzentration wird dieser Unterschied kleiner. Für Konzentrationen unterhalb von 400 mM kehren sich die Verhältnisse um. Dies bedeutet, dass bei sehr hohen Konzentrationen an MBA der Anteil der Aggregate überwiegt, wenn Wasser vorhanden ist, und dass dadurch das ¹RFTA stärker gelöscht wird. In der verdünnten Situation ($c(\text{MBA}) < 400 \text{ mM}$) ist die

Löschung der ¹RFTA-Moleküle dann überwiegend durch die Diffusionsgeschwindigkeit bestimmt, welche in Anwesenheit von Wasser kleiner ist.

Unterhalb einer MBA-Konzentration von 100 mM kann der Beitrag der RFTA-MBA-Aggregate schließlich völlig vernachlässigt werden, so dass nur noch die Geschwindigkeit der Diffusion maßgeblich ist. Die kleinere Diffusionskonstante in wässriger Umgebung führt dann zu einer langsameren Fluoreszenzlebensdauer als es in AcN/DMSO (98:2-*v/v*) der Fall ist.

Die Abhängigkeit der ¹RFTA-Lebensdauer von der MBA-Konzentration in AcN/H₂O (50:50-*v/v*) wurde zusätzlich mit TCSPC vermessen. In Abbildung 4.3 sind die Fluoreszenzabklingkurven von RFTA in Abhängigkeit von der MBA-Konzentration im Bereich von 0-300 mM und eine STERN-VOLMER Auswertung der mono-exponentiellen Abklingzeiten dargestellt. Die STERN-VOLMER Analyse zeigt im Konzentrationsbereich von 0-250 mM ein lineares Verhalten mit einer Löschkonstanten von $k_q^{\text{RFTA}} = 3.94 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

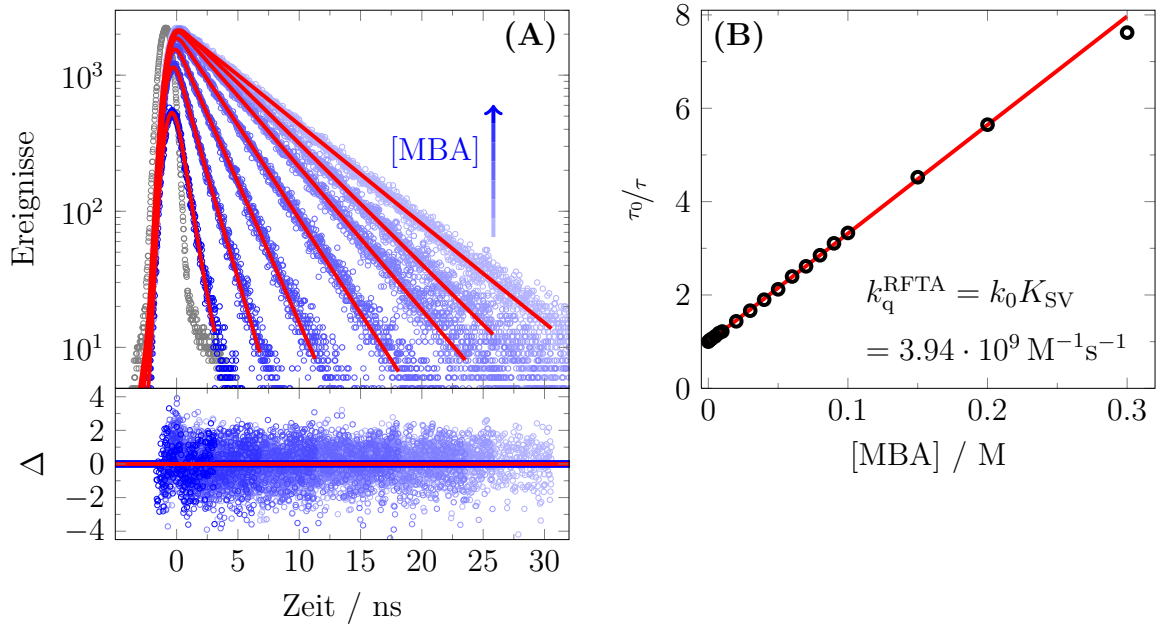


Abb. 3.14.: **A oben:** Fluoreszenzabklingkurven von RFTA in Abhängigkeit der MBA-Konzentration in AcN/H₂O (50:50-*v/v*). Die Anregung erfolgte bei 450 nm bei einer zeitlichen Halbwertsbreite von 1.1 ns. Die Abklingkurven sind dargestellt durch offene Kreise in blauer Abstufung, die Apparatefunktion durch graue offene Kreise und der mono-exponentielle Fit durch rote durchgezogene Linien. **A unten:** Residuen gewichtet mit $\sqrt{N_i}$, wobei N_i die Anzahl der Ereignisse des Kanals i ist. **B** Zeigt die Auswertung nach STERN-VOLMER für ein dynamisches Löschen eines angeregten Zustands.

3.3.5. Produktiver Photozyklus über den Triplett-Zustand

Die Bestimmung der **PQA** in Abhängigkeit der **MBA**-Konzentration zeigte, dass ein deutlicher Umsatz nur im Konzentrationsbereich von 3 bis 200 mM beobachtet wird (siehe Abbildung 3.10). Die Femtosekundenexperimente wurden bei deutlich höheren Konzentrationen an **MBA** durchgeführt. Dabei wurde für **RFTA** in drei unterschiedlichen Umgebungen (reines **MBA**, **AcN**/**H₂O** (50:50-*v/v*) und **AcN**/**DMSO** (98:2-*v/v*)) eine **eT**-Reaktion des **MBA** mit $^1\text{RFTA}^*$ gefolgt von einer schnellen Ladungsrekombination beobachtet. Diese Prozesse führen letztendlich zu keinem produktiven Umsatz des **MBA**. Es wurde daher im Folgenden durch Herabsetzung der **MBA**-Konzentration die Ausbeute dieses Verlustkanals herabgesetzt. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit eines **ISC** erhöht, und es sollte möglich werden, den Einfluss des **MBA** auf den Triplett-Zustand zu untersuchen. Das Verhältnis aus der intrinsischen Fluoreszenzlebensdauer τ_{fl}^0 und der effektiven Fluoreszenzlebensdauer mit Quenchprozess $\tau_{\text{fl}}^{\text{eff}}$ dient als ein Maß für die Quantenausbeute des **ISC**:

$$\frac{\Phi_{\text{ISC}}}{\Phi_{\text{ISC}}^0} = \frac{\frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{r}} + k_{\text{nr}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{q}}[\text{MBA}]}}{\frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{r}} + k_{\text{nr}} + k_{\text{ISC}}}} = \frac{k_{\text{r}} + k_{\text{nr}} + k_{\text{ISC}}}{k_{\text{r}} + k_{\text{nr}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{q}}[\text{MBA}]} = \frac{\tau_{\text{fl}}^{\text{eff}}}{\tau_{\text{fl}}^0} \quad (3.3)$$

Es zeigt sich, dass die Triplett-Quantenausbeute für das System in **AcN**/**H₂O** (50:50-*v/v*) größer ist als in **AcN**/**DMSO** (98:2-*v/v*) (siehe Tabelle 3.1).

Es wurden μs -Messungen bei **MBA**-Konzentrationen unterhalb von 100 mM durchgeführt. In Abbildung 3.15 sind die Daten der transienten Absorption für Konzentrationen an **MBA** von 0 bis 100 mM dargestellt. Das Signal der transienten Absorption vom $^3\text{RFTA}$ nimmt ohne **MBA** mono-exponentiell mit einer Lebensdauer von $\tau = 1.3 \mu\text{s}$ ab (siehe Abschnitt 3.3.2 und Abbildung 3.7 (C)). Mit steigender Konzentration an **MBA** werden folgende signifikante Änderungen in den Signalen beobachtet. Erstens nehmen die Anfangsamplituden des Triplett-Signals sowie des **GSB** aufgrund der bereits stattfindenden Löschung des $^1\text{RFTA}^*$ deutlich ab (siehe Abschnitt 3.3.4 und Abbildung 3.15 (A1), (B2) und (B4)). So ist z.B. die Triplett-Ausbeute bei 50 mM an **MBA** bereits auf die Hälfte abgesunken. Zweitens wird die Lebensdauer des Triplett-Zustands kürzer (siehe Abbildung 3.15 und (B4)). Drittens entstehen im gleichen Maße, wie der Triplett zerfällt, zwei neue Banden bei ca. 350 und 520 nm (siehe Abbildung 3.15 (A2)-(A4) und (B1)-(B3)). Die neu entstandenen Banden sowie der **GSB** nehmen innerhalb des Zeitfensters etwas ab, und bleiben schließlich auf einer in diesem Zeitbereich konstanten

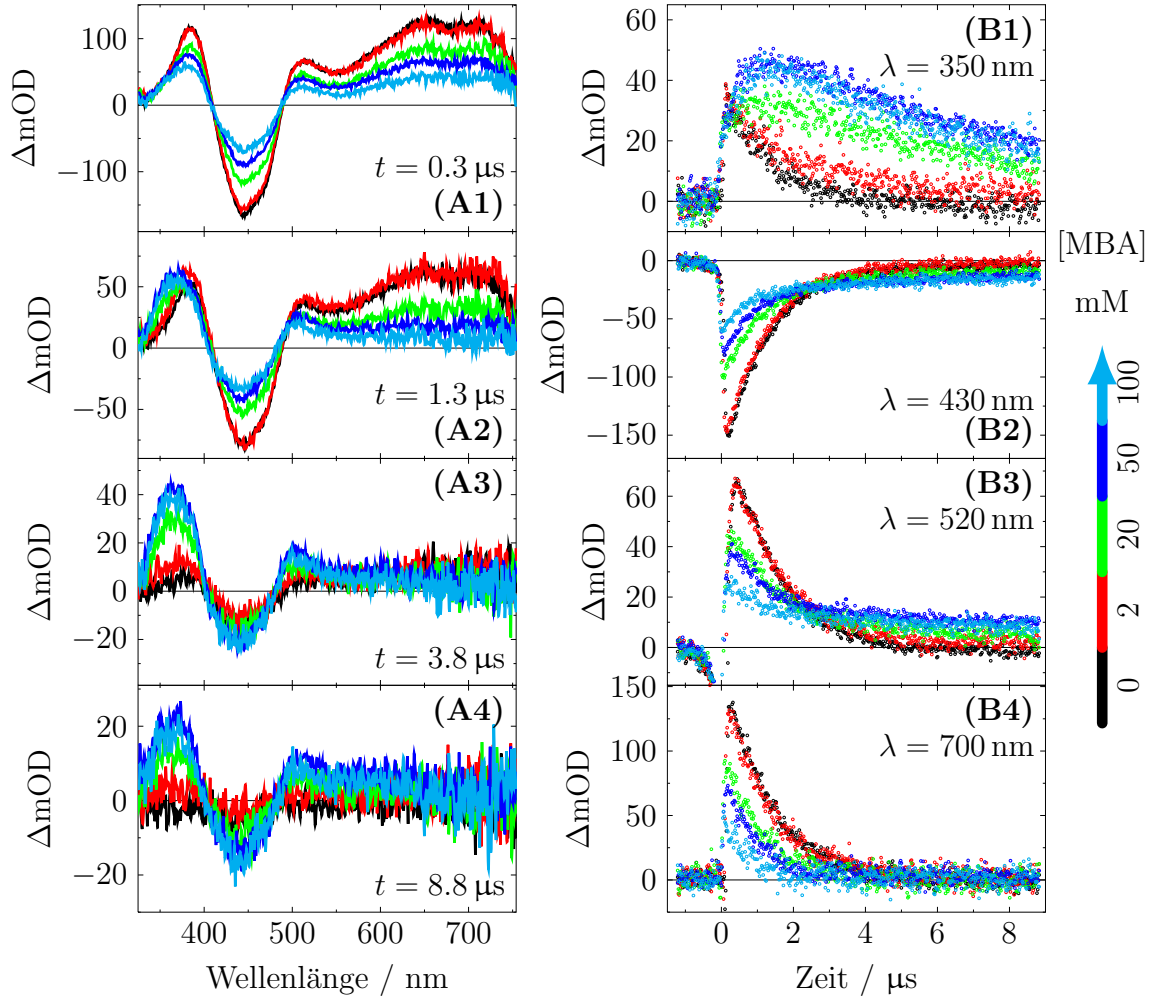


Abb. 3.15.: Resultate der 2D-TA gemessen an 40.9 μM RFTA in AcN/ H_2O (50:50-v/v) in Abhängigkeit der MBA-Konzentration nach Anregung bei 445 nm mit $E_{\text{exc}} \approx 10 \text{ mJ} \cdot \text{Puls}^{-1}$. (A1)-(A4): Spektrale Schnitte bei $t = 0.3, 1.3, 3.8$ und $8.8 \mu\text{s}$. (B1)-(B4): Zeitliche Schnitte bei $\lambda = 350, 430, 520$ und 700 nm . Die Farbkodierung gibt die eingesetzten Konzentrationen an MBA mit 0, 2, 20, 50, 100 mM wieder.

Amplitude (siehe Abbildung 3.15 (A2)-(A4) und (B1)-(B3)).

Die jeweiligen Datensätze lassen sich mit einem Modell bestehend aus drei Exponentialfunktionen und einem konstanten Term als Offset gut anpassen. Das Fluoreszenzsignal wurde beim Fit mittels der in Abschnitt 2.1.3 beschriebenen Methode nicht in der Summe der kleinsten Fehlerquadrate berücksichtigt. Anhand der transienten Absorptionsspektren von RFTA (40 μM) in Gegenwart von 50 mM an MBA in AcN/ H_2O (50:50-v/v) nach Anregung bei 445 nm (siehe Abbildung 3.16 (A)) wird im Folgenden das Ergebnis des globalen Fits diskutiert. Für diesen Datensatz ergaben sich Zeitkonstanten mit $\tau_1 = 830 \text{ ns}$, $\tau_2 = 5.7 \mu\text{s}$ und $\tau_3 = 18.7 \mu\text{s}$. Die drei DADS sind abgebildet in den Teilbildern 3.16 (C)-(E) und beinhalten die Informationen über die Dynamik aller

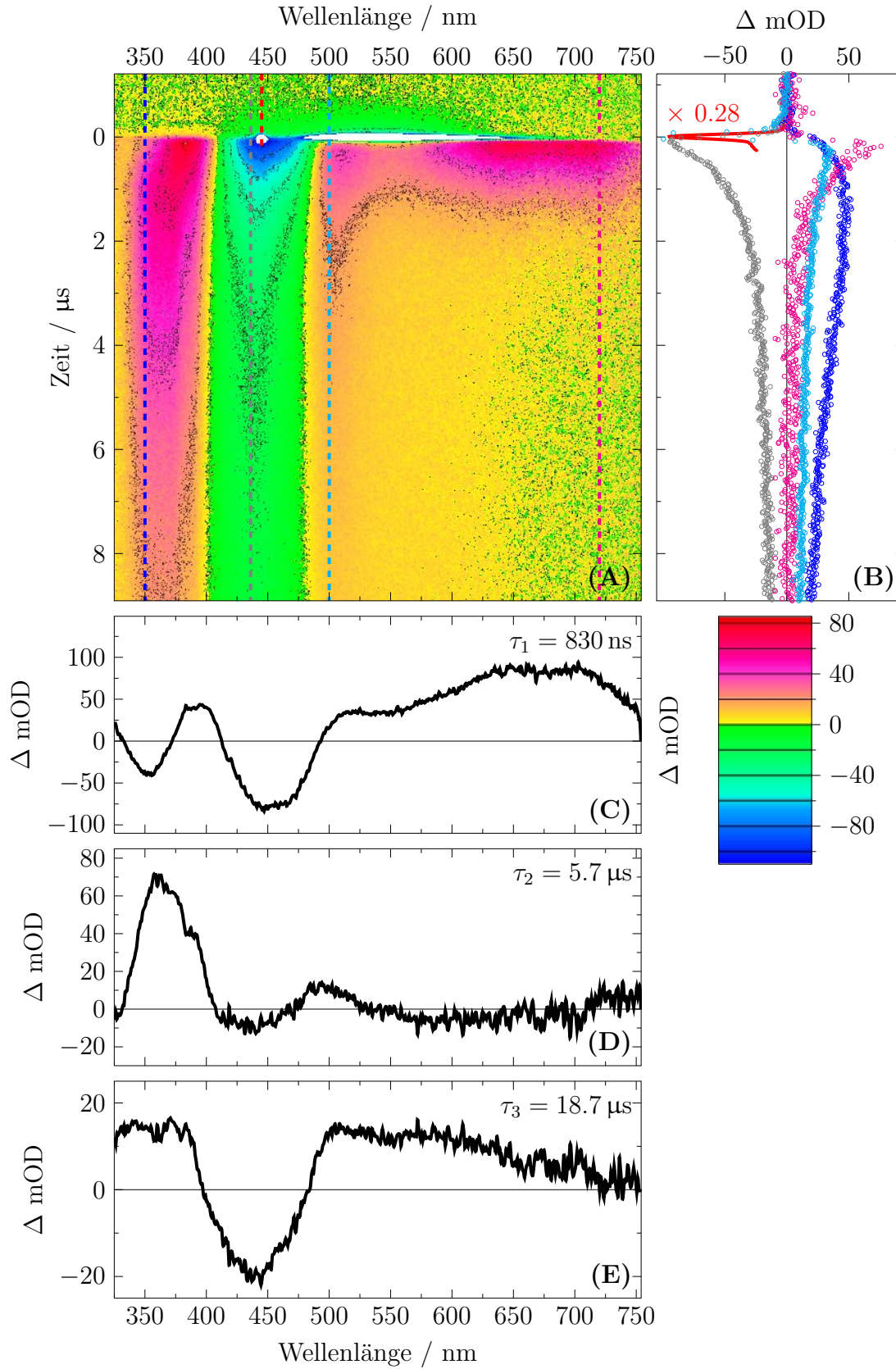


Abb. 3.16.: (A): Falschfarbendarstellung der 2D-TA-Matrix gemessen mit $40.9 \mu\text{M}$ RFTA und 50 mM MBA in AcN/ H_2O (50:50-v/v) Lösung nach Anregung bei 445 nm. (B): Zeitschnitte bei verschiedenen Wellenlängen (siehe Farbkodierung auf der Falschfarben Darstellung). (C-E): DADS aus dem globalen Fit.

transienter Spezies in diesem Datensatz.

Das **DADS** zu τ_1 (siehe Teilbild 3.16(C)) zeigt eine breite positive Bande mit drei lokalen Maxima bei 510, 710 und bei 650 nm sowie zwei negative Banden bei 350 und 450 nm. Dieses **DADS** unterscheidet sich signifikant von dem aus einer Messung an **RFTA** ohne **MBA**. Die Bande bei 450 nm in Gegenwart von **MBA** ist leicht rotverschoben und die Absorption bei 510 nm ist weniger intensiv, was dafür spricht, dass nicht nur der Grundzustand repopuliert wird. Noch deutlicher ist der Unterschied bei 350 nm. In Gegenwart von **MBA** entsteht eine neue Spezies, welche dem $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ zugeschrieben werden kann [HPP79; ST96]. Das **DADS** zeigt also einen **eT**-Prozess von **MBA** nach $^3\text{RFTA}$, was in der Bildung des $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ resultiert. Mit der dazugehörigen Zerfallsrate und der intrinsischen Triplett-Lebensdauer in Anwesenheit von Sauerstoff lässt sich daraus eine **eT**-Ratenkonstante von $^3k_{\text{eT}} = 0.9 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmen.

Das Radikalionenpaar $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ und $^2\text{MBA}^{\bullet+}$ kann auf verschiedene Weise weiter reagieren. Zum einen besteht die Möglichkeit eines erneuten **eT** zurück in den Grundzustand des Systems, zum anderen ein **Protontransfer** (PT) vom **MBA** - oder vom umgebenen H_2O - zum $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$, also die Bildung eines neutralen Radikalpaares $^2\text{RFTA-H}^{\bullet}$ und $^2\text{MBA}^{\bullet}$. Die Ratenkonstante für die Summe dieser beiden Prozesse wurde über den globalen Fit bestimmt zu $1.8 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$. Dazu gehört das **DADS** aus Teilbild 3.16(D), dessen positiver Beitrag die typische Signatur des $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ mit den Maxima bei 360 nm und 500 nm aufweist [ST96]. Die Lebensdauer des Ionenpaares von 5.5 μs ist auch im Einklang mit früheren Studien [BBS99; BBS97].

Unter der Annahme, dass das **RFTA** und das **MBA** nach dem **eT** in Kontakt bzw. in unmittelbarer Nähe zueinander sind, sollte der Zerfall des Ionenpaares nicht stark von der Substratkonzentration abhängen, wenn das Proton vom **MBA** stammt. Tatsächlich wird allerdings ein kleiner Anstieg der effektiven Lebensdauer des Ionenpaares um einen Faktor von 2 beobachtet, wenn die Konzentration an **MBA** um einen Faktor 10 von 50 mM auf 500 mM erhöht wird (siehe Tabelle 3.2). Dies spricht dafür, dass das **MBA** mit steigender Konzentration andere Orientierungen in größeren Netzwerken um das **RFTA** einnimmt, so dass der PT verlangsamt wird. Auch die Beobachtung des sehr schnellen **eT** und **r-eT** aus dem $^1\text{RFTA}$ bei sehr hohen Konzentration an **MBA** ist ein Indiz einer Aggregatbildung von **MBA** mit **RFTA**.

Das letzte **DADS** im 20 μs Zeitfenster liefert das Spektrum einer Spezies mit einer breiten Absorption zwischen 500 und 600 nm und einem Maximum bei etwa 350 nm (siehe

[MBA] / [mM]	τ_1 / [μs]	$^3k_{\text{eT}}$ / [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	τ_2 / [μs]	τ_3 / [μs]
0	1.3 ^a	–	–	–
2	1.27 ^a	$0.9 \cdot 10^7$	–	–
20	1.05 ^a	$0.7 \cdot 10^7$	6.6 ^a	$> 10^a$
50	0.83 ^a	$0.9 \cdot 10^7$	5.7 ^a	$> 10^a$
100	0.65 ^a	$0.8 \cdot 10^7$	6.3 ^a	$> 10^a$
200	0.31 ^b	$1.2 \cdot 10^7$	8.0 ^b	$> 10^b$
500	0.09 ^b	$2.1 \cdot 10^7$	11.0 ^b	$> 10^b$

^agemessen im 10 μs Zeitfenster.

^bgemessen im 20 μs Zeitfenster.

Tab. 3.2.: Resultate aus den globalen Fits an den 2D-TA-Messungen mit dem SC Aufbau für unterschiedliche Konzentrationen an MBA. $\tau_1 = (k_{\text{r-ISC}} + ^3k_{\text{eT}}[\text{MBA}])^{-1}$; $\tau_2 = (k_{\text{PT}} + ^3k_{\text{r-eT}})^{-1}$; (Modell 1) bzw. $\tau_2 = (k_{\text{PT}} + k_{\text{r-PT}} + ^3k_{\text{r-eT}})^{-1}$ (Modell 2); $\tau_3 = (k_{\text{Prod}})^{-1}$. Für [MBA] = 0 mM: $\tau_1 = (k_{\text{r-ISC}})^{-1} = (7.7 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1})^{-1}$.

Teilbild 3.16(E)), das auf der Zeitskala von 10 μs praktisch nicht zerfällt. Aus Vergleich mit der Literatur erkennt man Signaturen des neutralen protonierten Flavinradikals ²RFTA-H• in diesem DADS [ST96; Mel+99; Mül+72].

Ausgehend von diesen Daten lässt sich ein erstes Modell aufstellen, das in Abbildung 3.17 dargestellt ist. Dieses wurde im Programm GlobFit_Runge_Kutta verwendet, um SAS zu erzeugen. Das Modell geht davon aus, dass der anfänglich gebildete Triplett-Zustand mit einer Gesamtratenkonstanten k_1 abnimmt. Ein Anteil α geht dabei in das Radikalanion ²RFTA•[−] und der restliche Anteil $(1 - \alpha)$ fällt zurück in den GZ. Eine analoge Annahme wird für den Zerfall des ²RFTA•[−] gemacht. Die Gesamtratenkonstante k_2 teilt sich auf in einen Anteil β , der zur Bildung des neutralen Radikals ²RFTA-H• führt, und einen Anteil $(1 - \beta)$, der die Rückkehr in den Grundzustand umfasst. In diesem Modell wird weiter angenommen, dass das neutrale Radikal ²RFTA-H• in diesem Zeitbereich nicht merklich zerfällt, so dass $k_3 \approx 0$ gesetzt werden kann. Den Verzweigungsanteil α kann man über die Gesamtzerfallsratenkonstanten des Triplett-Zustands in Abwesenheit (k_0) und in Anwesenheit von MBA (k_1) mittels $\alpha = 1 - \frac{k_0}{k_1}$ berechnen. Für eine Konzentration an MBA von 50 mM ergibt sich ein Wert von $\alpha = 0.36$. Der Verzweigungsanteil β sowie der Anteil des ausgebleichten GZ sind hier unbekannt, da die Extinktionskoeffizienten der Intermediate nicht bekannt sind. Eine Abschätzung wurde erhalten, indem

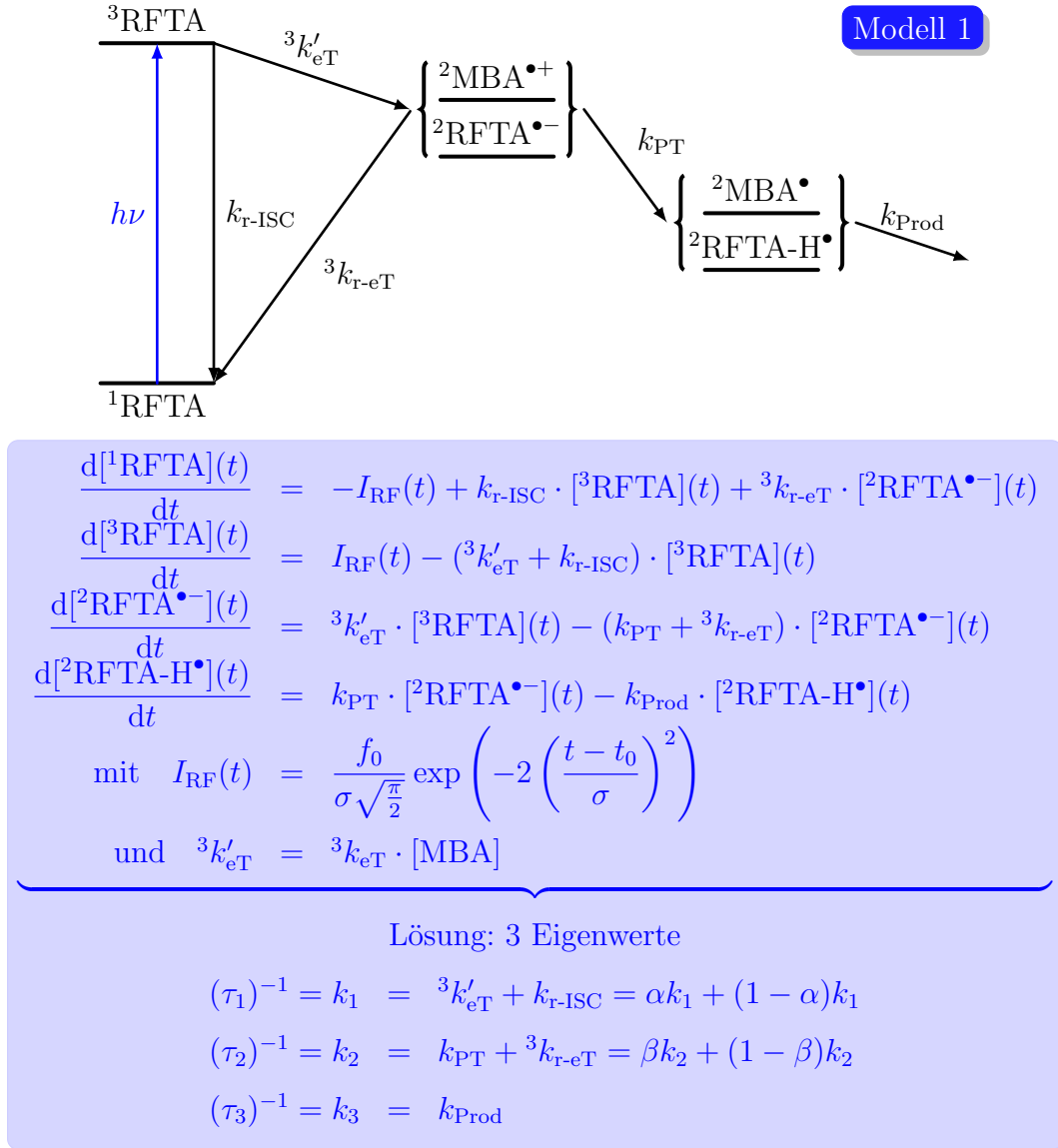


Abb. 3.17.: Schematische Darstellung für das im Text beschriebene Modell bei $\text{pH} \sim 7$ mit dem entsprechenden DGL-System. Die Lösung des DGL-Systems mit der Anfangsbedingung, dass nach Anregung nur ${}^3\text{RFTA}$ bevölkert ist, umfasst drei Eigenwerte. Diese können den Ratenkonstanten aus dem globalen Fit mit drei Exponentialfunktionen zugeordnet werden.

der Anteil des GZ-Spektrums sowie der Verzweigungsanteil β so variiert wurden, dass die resultierenden SAS weder negative Bereiche noch die Signaturen des GZ-Spektrums erkennen ließen. Im Fall des Datensatzes gemessen bei 50 mM MBA waren etwa 27 % des GZ-Spektrums zu addieren, um ein vernünftiges Triplett-Spektrum zu erhalten. Für β wurde ein Wert von etwa 0.25 gefunden, so dass die Extinktion des neutralen Radikals bei 560 nm in etwa dem Wert entspricht, der in anderen Arbeiten für andere Flavine bestimmt wurde [Mel+99; LMN11]. In Abbildung 3.18 sind die SAS aller drei intermediären RFTA-Zustände dargestellt, welche aus einem Datensatz mit 50 mM MBA erhalten wurden. Die SAS des Triplett-Zustands und des Semichinon Radikalanion stim-

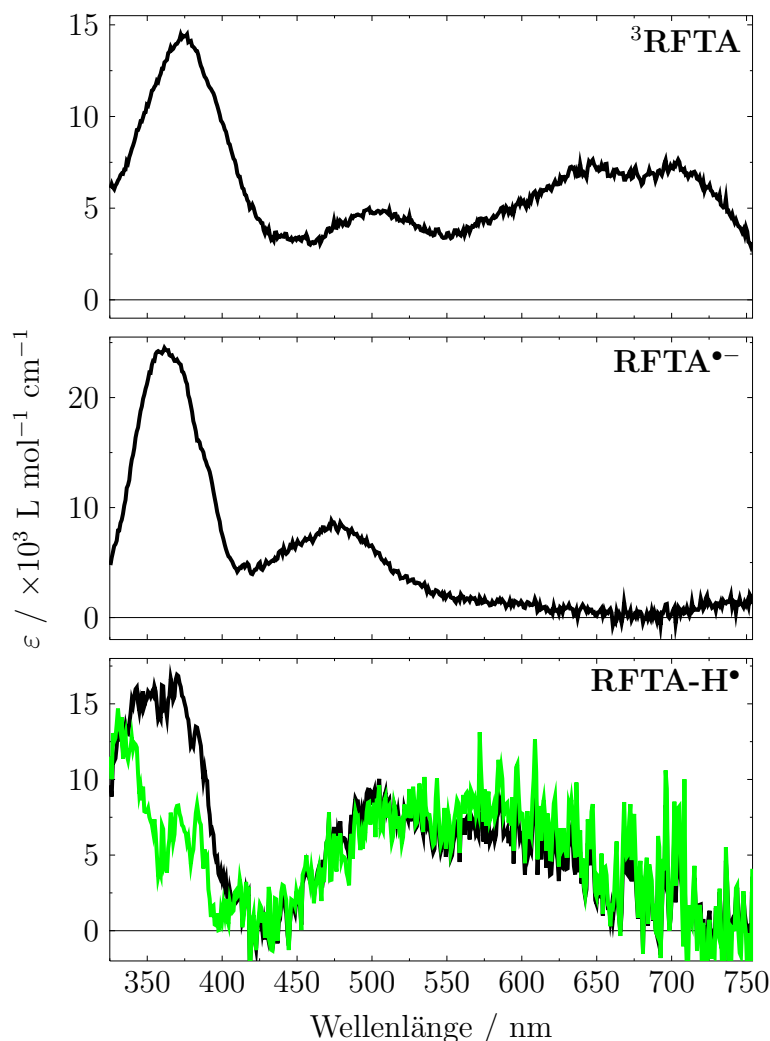


Abb. 3.18.: SAS nach Modell 1 und Modell 2 aus den Abbildungen 3.17 und 3.21 unter Verwendung des Programms `GlobFit_Runge_Kutta`. Die Spektren wurden aus einem Datensatz mit 50 mM MBA erhalten. Die Spektren des $^3\text{RFTA}$ und des $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ sind in beiden Modellen identisch. Das Spektrum des $^2\text{RFTA-H}^{\bullet}$ ist unterschiedlich in beiden Modellen (schwarze Linie: Modell 1; grüne Linie: Modell 2). Parameter für Modell 1: $\alpha = 0.36$ und $\beta = 0.25$. Parameter für Modell 2: $\alpha = 0.36$, $\beta = 0.5$, $\gamma = 0.15$ und $\delta = 0.35$. Es wurden in beiden Fällen 27 % des GZ-Spektrums hinzu addiert.

men sehr gut mit den aus der Literatur bekannten Absorptionsspektren überein [ST96]. In der Literatur besteht eine Kontroverse über die Form des Neutralradikal-Spektrums. Auf der einen Seite wurden Spektren des Neutralradikals veröffentlicht, deren UV-Bande bei etwa 360 nm liegt [Mel+99; LMN11; ST96]. Dieses Spektrum entspräche auch dem in dieser Arbeit generierten SAS des $^2\text{RFTA-H}^{\bullet-}$ basierend auf dem zuvor beschriebenen Modell. Dem gegenüber steht ein publiziertes Neutralradikal-Spektrum, dessen breite UV-Bande weiter blau verschoben bei 325 nm anstatt bei 360 nm liegt [HPP79]. Die Richtigkeit des letzteren Spektrums wird weiter unterstützt durch die Kenntnis von

Spektren, die in der Gruppe von Herrn Prof. Dick im Vorfeld gemessen wurden. Dabei wurden Flavin enthaltende Photorezeptorproteine untersucht, in denen es möglich gewesen ist, das neutrale Flavinradikal innerhalb des Proteingerüsts zu stabilisieren und in stationären Absorptionsmessungen präzise zu charakterisieren [Lan+10]. Demzufolge enthält das SAS des $^2\text{RFTA-H}^\bullet$ dieser Arbeit möglicherweise noch Anteile des $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$, was die UV-Bande bei 360 nm begründen würde.

Die Bildung der neutralen protonierten Form $^2\text{RFTA-H}^\bullet$ sollte bei saurem pH-Wert deutlich beschleunigt werden. Dadurch wird das Gleichgewicht ganz auf die Seite des $^2\text{RFTA-H}^\bullet$ verschoben, und gleichzeitig sollte das Spektrum des $^2\text{RFTA-H}^\bullet$ besser charakterisiert werden können. Es wurden daher weitere Experimente bei $\text{pH} \sim 4$ an RFTA sowohl alleine als auch nach Zugabe von 30 mM MBA durchgeführt. In Abbildung 3.19 (A) und (B) sind die Resultate dieser Messreihe dargestellt. An den Datensätzen wurden globale Fits mit Exponentialfunktionen durchgeführt, wobei jeweils das Fluoreszenzsignal in der Summe der kleinsten Fehlerquadrate nicht mit berücksichtigt wurde.

Ohne MBA unterscheidet sich die Dynamik des RFTA im sauren Milieu nicht von der im neutralen pH-Bereich. Es wird auch bei $\text{pH} \sim 4$ nur der Triplett-Zustand beobachtet, der mono-exponentiell mit $1.4 \mu\text{s}$ wieder in den Grundzustand zerfällt (Vergleiche Abbildung 3.7 (A) mit 3.19 (A)). Offensichtlich liegt bei $\text{pH} \sim 4$ immer noch der gleiche Grundzustand vor wie bei $\text{pH} \sim 7$.

Nach Zugabe von 30 mM MBA werden bei $\text{pH} \sim 4$ andere Signale beobachtet als bei $\text{pH} \sim 7$. Es werden für eine gute Beschreibung der Daten drei Exponentialfunktionen mit Lebensdauern von $\tau_1 = 700 \text{ ns}$, $\tau_2 = 7.6 \mu\text{s}$ und $\tau_3 \gg 10 \mu\text{s}$ benötigt. Die dazugehörigen DADS sind in Abbildung 3.19 (C) dargestellt. Das DADS zu τ_1 zeigt zwei breite positive Banden bei etwa 400 und 700 nm, die dem $^3\text{RFTA}$ zugeschrieben werden können, und zwei breite negative Banden bei etwa 450 und 550 nm. Es wird demnach der Zerfall des Triplett-Zustands in Spezies beobachtet, die bei 450 und 550 nm stärker absorbieren als der Triplett-Zustand. In den beiden DADS zu τ_2 und τ_3 sind die Signaturen der Spezies zu erkennen, die mit dem Zerfall des $^3\text{RFTA}$ entstehen. Das DADS zu τ_2 zeigt zum einen eine einzelne breite positive Bande bei etwa 450 nm, die dem $^2\text{MBA}^{\bullet+}$ zugeschrieben werden kann [BBS99]. Zum anderen erkennt man im DADS zu τ_3 eine breite positive Bande im Bereich von 500 und 600 nm, die dem $^2\text{RFTA-H}^\bullet$ zugeschrieben werden kann [Lan+10]. Bei $\text{pH} \sim 7$ wurde zuvor ein eT-Prozess vom MBA zum $^3\text{RFTA}$ beobachtet, der in der Bildung des $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ erkannt wurde. Grundsätzlich sollten in diesem Schritt die Signale

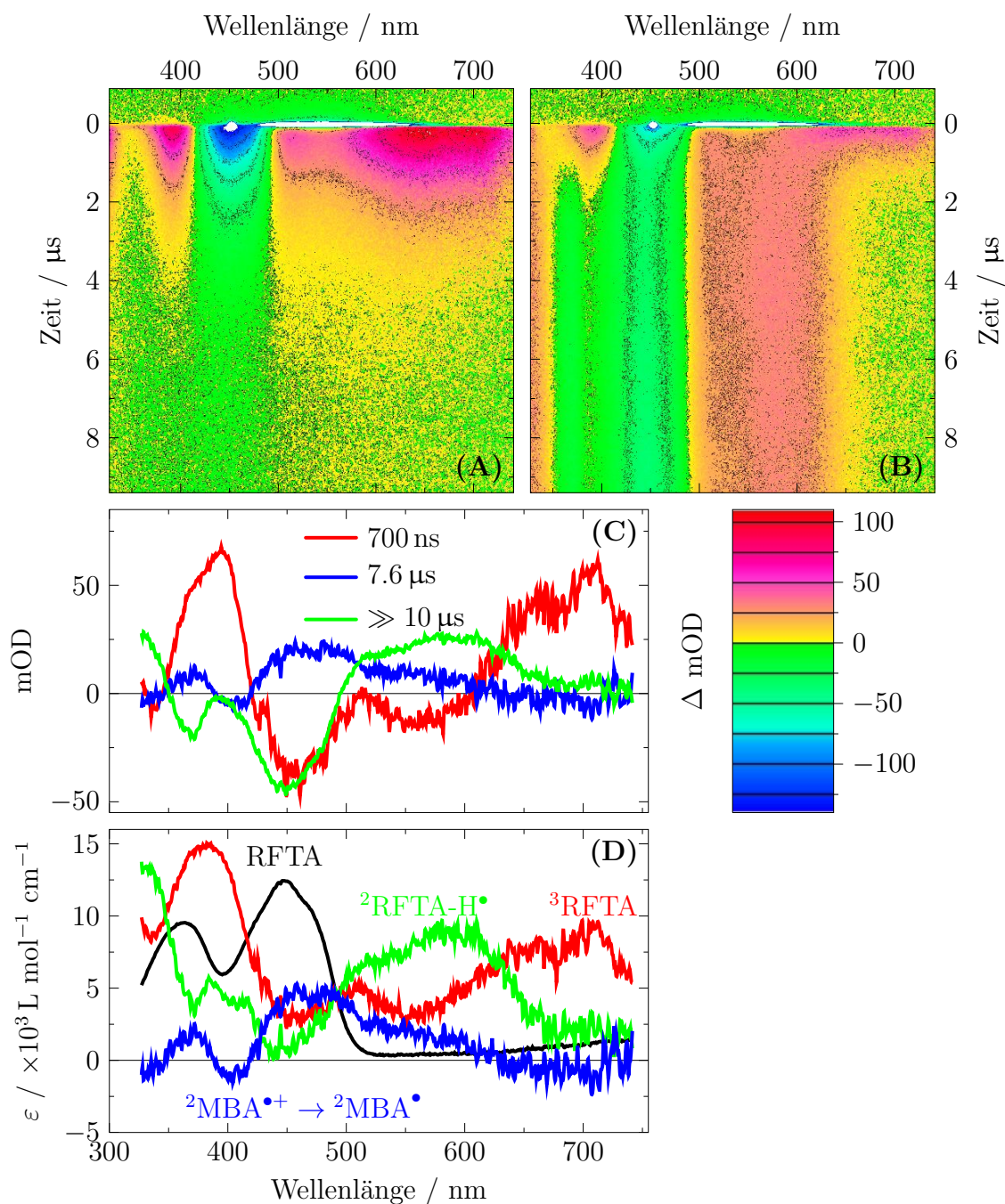
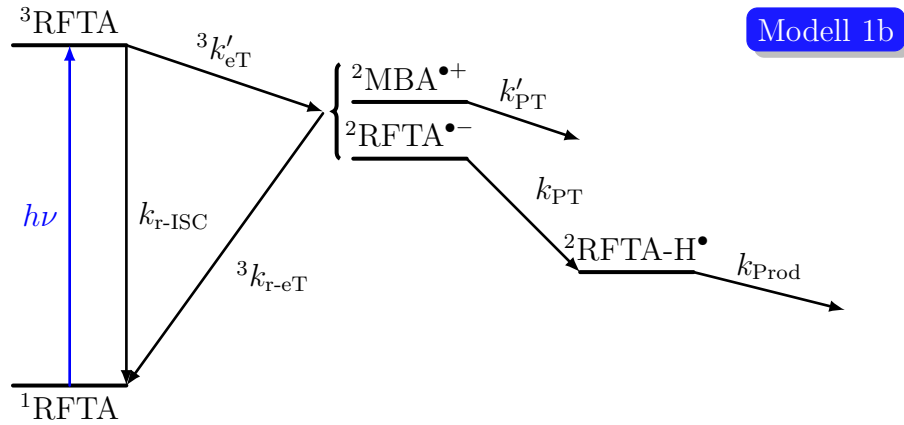


Abb. 3.19.: Falschfarbendarstellung der 2D-TA-Matrix gemessen an 40 μM RFTA in AcN/ H_2O (50:50-v/v) Lösung nach Anregung bei 450 nm. (A): Bei pH~4. (B): Bei pH~4 und Zugabe von 30 mM MBA. (C): DADS aus einem globalen Fit mit drei Exponentialfunktionen ohne Berücksichtigung des Fluoreszenzsignals in der Summe der kleinsten Fehlerquadrate. (D): SAS basierend auf dem im Text geschilderten Modell für pH~4.

sowohl des $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ als auch des $^2\text{MBA}^{\bullet+}$ beobachtet werden. Beide Radikale haben allerdings bei 450 nm eine intensive Bande und die Extinktion des $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ ist um einen Faktor von etwa 2 größer als die des $^2\text{MBA}^{\bullet+}$, so dass das $^2\text{MBA}^{\bullet+}$ vom $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ im Spektrum aus Abbildung 3.18 überlagert wird. Die Form des $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ -Spektrums wird dabei nicht merklich verändert. Bei $\text{pH} \sim 4$ ist die Situation nun anders. Die Protonenkonzentration ist etwa 100 mal größer als die Konzentration an $^2\text{MBA}^{\bullet+}$, so dass für den Protonierungsschritt gilt: $k_{\text{PT}} \gg k_{\text{eT}}$. Gleichbedeutend dazu wird das $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ nicht mehr beobachtet. Stattdessen wird nun das $^2\text{MBA}^{\bullet+}$ beobachtet, da das $^2\text{RFTA-H}^{\bullet}$ bei 450 nm eine geringere Extinktion hat als das $^2\text{MBA}^{\bullet+}$. Das $^2\text{MBA}^{\bullet+}$ zerfällt schließlich mit einer Lebensdauer von 7.6 μs , während das $^2\text{RFTA-H}^{\bullet}$ in diesem Zeitbereich nicht merklich zerfällt. Ähnliche Beobachtungen wurden zuvor auch bei $\text{pH} \sim 7$ gemacht. Die kleinen negativen Banden im DADS zu τ_2 bei 330 und 400 nm deuten darauf hin, dass das $^2\text{MBA}^{\bullet+}$ in eine Spezies zerfällt, die in diesem Wellenlängenbereich nur gering absorbiert. Das Zerfallsprodukt ist möglicherweise nach Abgabe eines Protons an die Lösungsumgebung das $^2\text{MBA}^{\bullet}$.

Zur Erzeugung von SAS aus den Datensätzen bei $\text{pH} \sim 4$ wurde das Modell 1 aus Abbildung 3.17 durch das zusätzliche Entstehen des $^2\text{MBA}^{\bullet+}$ erweitert, der parallel zum $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ aus dem $^3\text{RFTA}$ entsteht. Weiter wurde angenommen, dass der eT der ratenbestimmende Schritt ($k_{\text{PT}} \gg k_{\text{eT}}$) ist. Die SAS sind in Abbildung 3.20 (D) dargestellt. Der Verzweigungsanteil α wurde auf die gleiche Weise bestimmt, wie für die Daten bei $\text{pH} \sim 7$. Für eine Konzentration an MBA von 30 mM ergibt sich ein Wert von $\alpha = 0.48$. Alle SAS, die mit dem für $\text{pH} \sim 4$ modifizierten Modell erzeugt wurden, stimmen sehr gut überein mit den Absorptionsspektren des $^3\text{RFTA}$, des $^2\text{RFTA-H}^{\bullet}$ und des $^2\text{MBA}^{\bullet+}$ aus der Literatur [HPP79; ST96; Lan+10; BBS99]. Weil bei $\text{pH} \sim 4$ der Reaktionszyklus in einer sehr schnellen Protonierung vollständig zum $^2\text{RFTA-H}^{\bullet}$ gezwungen wird, ist es möglich gewesen, das Spektrum des $^2\text{MBA}^{\bullet+}$ zu beobachten. Zusätzlich lässt das verbesserte Signal zu Rausch Verhältnis aufgrund einer viel höheren Population des $^2\text{RFTA-H}^{\bullet}$ sogar eine Feinstruktur im Spektrum des $^2\text{RFTA-H}^{\bullet}$ mit Maxima bei 333, 384 und 417 nm erkennen.

Diese Resultate bestätigen die Annahme, dass das Neutralradikal-Spektrum, das aus den Daten bei $\text{pH} \sim 7$ erzeugt wurde, noch deutliche Anteile des $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ -Spektrums enthält. Um diesen Anteil abschätzen zu können wurde das Modell 1 um eine Gleichgewichtssituation zwischen dem $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ und dem $^2\text{RFTA-H}^{\bullet}$ erweitert (siehe Abbil-



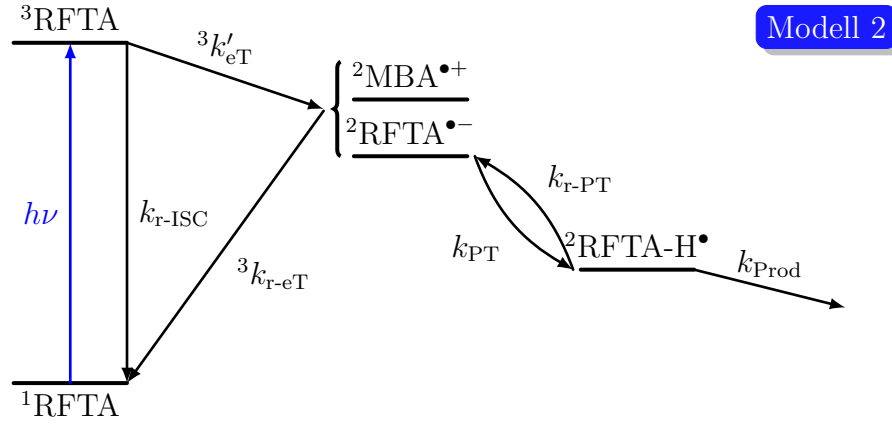
$$\begin{aligned}
 \frac{d[{}^1\text{RFTA}](t)}{dt} &= -I_{\text{RF}}(t) + k_{\text{T-ISC}} \cdot [{}^3\text{RFTA}](t) + {}^3k_{\text{r-eT}} \cdot [{}^2\text{RFTA}^{\bullet-}](t) \\
 \frac{d[{}^3\text{RFTA}](t)}{dt} &= I_{\text{RF}}(t) - ({}^3k'_{\text{eT}} + k_{\text{T-ISC}}) \cdot [{}^3\text{RFTA}](t) \\
 \frac{d[{}^2\text{RFTA}^{\bullet-}](t)}{dt} &= {}^3k'_{\text{eT}} \cdot [{}^3\text{RFTA}](t) - (k_{\text{PT}} + {}^3k_{\text{r-eT}}) \cdot [{}^2\text{RFTA}^{\bullet-}](t) \\
 \frac{d[{}^2\text{RFTA-H}^{\bullet}](t)}{dt} &= k_{\text{PT}} \cdot [{}^2\text{RFTA}^{\bullet-}](t) - k_{\text{Prod}} \cdot [{}^2\text{RFTA-H}^{\bullet}](t) \\
 \frac{d[{}^2\text{MBA}^{\bullet+}](t)}{dt} &= {}^3k'_{\text{eT}} \cdot [{}^3\text{RFTA}](t) - k'_{\text{PT}} \cdot [{}^2\text{MBA}^{\bullet+}](t) \\
 \text{mit } I_{\text{RF}}(t) &= \frac{f_0}{\sigma\sqrt{\frac{\pi}{2}}} \exp\left(-2\left(\frac{t-t_0}{\sigma}\right)^2\right), \\
 {}^3k'_{\text{eT}} &= {}^3k_{\text{eT}} \cdot [\text{MBA}], \\
 \text{und } k_{\text{PT}} &\gg {}^3k'_{\text{eT}} > {}^3k_{\text{r-eT}}.
 \end{aligned}$$

Lösung: 3 Eigenwerte

$$\begin{aligned}
 (\tau_1)^{-1} = k_1 &= {}^3k'_{\text{eT}} + k_{\text{T-ISC}} = \alpha k_1 + (1 - \alpha)k_1 \\
 (\tau_2)^{-1} = k_2 &= k'_{\text{PT}} \\
 (\tau_3)^{-1} = k_3 &= k_{\text{Prod}}
 \end{aligned}$$

Abb. 3.20.: Schematische Darstellung für das im Text beschriebene Modell bei pH~4 mit dem entsprechenden DGL-System. Die Lösung des DGL-Systems mit der Anfangsbedingung, dass nach Anregung nur ${}^3\text{RFTA}$ bevölkert ist, umfasst drei Eigenwerte. Diese können den Ratenkonstanten aus dem globalen Fit mit drei Exponentialfunktionen zugeordnet werden.

dung 3.21) und die Daten bei pH~7 daraufhin erneut analysiert. Die Spektren des ${}^3\text{RFTA}$ und des ${}^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ werden durch die Modifikation nicht verändert, da auch weiter $\alpha = 0.36$ gilt. Es konnte durch Variation der Parameter β , γ und δ ein Spektrum generiert werden, das abgesehen von einem höheren Rauschpegel nahezu identisch ist zu dem Spektrum des ${}^2\text{RFTA-H}^{\bullet}$, welches aus dem Datensatz bei pH~4 erhalten wurde. Die entsprechenden Parameter lauten $\beta = 0.5$, $\gamma = 0.15$ und $\delta = 0.35$. Im Modell 2 steckt die Annahme, dass in der betrachteten Zeitspanne das Radikalenpaar nicht auseinander



$$\begin{aligned}
 \frac{d[{}^1\text{RFTA}](t)}{dt} &= -I_{\text{RF}}(t) + k_{\text{r-ISC}} \cdot [{}^3\text{RFTA}](t) + {}^3k_{\text{r-eT}} \cdot [{}^2\text{RFTA}^{\bullet-}](t) \\
 \frac{d[{}^3\text{RFTA}](t)}{dt} &= I_{\text{RF}}(t) - ({}^3k'_{\text{eT}} + k_{\text{r-ISC}}) \cdot [{}^3\text{RFTA}](t) \\
 \frac{d[{}^2\text{RFTA}^{\bullet-}](t)}{dt} &= {}^3k'_{\text{eT}} \cdot [{}^3\text{RFTA}](t) - ({}^3k_{\text{r-eT}} + k_{\text{PT}}) \cdot [{}^2\text{RFTA}^{\bullet-}](t) \\
 &\quad + k_{\text{r-PT}} \cdot [{}^2\text{RFTA-H}^{\bullet}](t) \\
 \frac{d[{}^2\text{RFTA-H}^{\bullet}](t)}{dt} &= k_{\text{PT}} \cdot [{}^2\text{RFTA}^{\bullet-}](t) - k_{\text{r-PT}} \cdot [{}^2\text{RFTA-H}^{\bullet}](t) \\
 &\quad - k_{\text{Prod}} \cdot [{}^2\text{RFTA-H}^{\bullet}](t) \\
 \text{mit } I_{\text{RF}}(t) &= \frac{f_0}{\sigma\sqrt{\frac{\pi}{2}}} \exp\left(-2\left(\frac{t-t_0}{\sigma}\right)^2\right) \\
 \text{und } {}^3k'_{\text{eT}} &= {}^3k_{\text{eT}} \cdot [\text{MBA}],
 \end{aligned}$$

Lösung: 4 Eigenwerte

$$\begin{aligned}
 k_1 &= k_{\text{r-ISC}} + {}^3k'_{\text{eT}} = \alpha k_1 + (1 - \alpha)k_1 \\
 k'_2 &= \frac{k_2}{2} + \sqrt{\frac{k_2^2}{4} - k_{\text{r-ISC}} {}^3k'_{\text{eT}}} = \frac{k_2}{2} + k_2 \sqrt{\frac{1}{4} - \beta\delta} \\
 k''_2 &= \frac{k_2}{2} - \sqrt{\frac{k_2^2}{4} - k_{\text{r-ISC}} {}^3k'_{\text{eT}}} = \frac{k_2}{2} - k_2 \sqrt{\frac{1}{4} - \beta\delta} \\
 k_3 &= k_{\text{Prod}} \\
 \text{mit } k_2 &= {}^3k_{\text{r-eT}} + k_{\text{PT}} + k_{\text{r-PT}} = k'_2 + k''_2, \\
 \beta k_2 &= {}^3k'_{\text{r-eT}}, \\
 \gamma k_2 &= k_{\text{PT}}, \\
 \delta k_2 &= k_{\text{r-PT}}, \\
 \text{und } 1 &= \beta + \gamma + \delta.
 \end{aligned}$$

Abb. 3.21.: Schematische Darstellung für das Modell 2 mit dem entsprechenden DGL-System. Die Lösung des DGL-Systems umfasst vier Eigenwerte, die den Ratenkonstanten aus dem globalen Fit mit drei Exponentialfunktionen zugeordnet werden können.

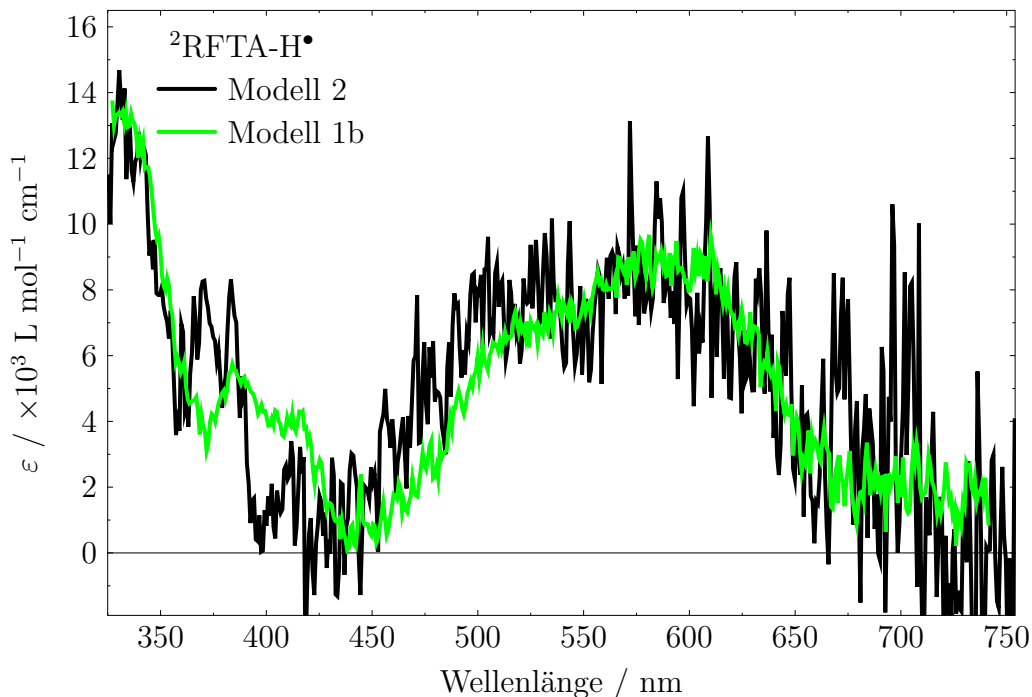


Abb. 3.22.: Vergleich des Spektrums für das $^2\text{RFTA-H}^\bullet$, das nach Modell 2 erzeugt wurde, mit dem Spektrum, das aus den Daten bei $\text{pH} \sim 4$ erzeugt wurde.

diffundiert. Unter diesen Voraussetzungen würden zwangsläufig alle Radikationenpaare in ihre GZ-Formen rekombinieren und es würde kein MBAlD entstehen, da das Gleichgewicht auf der Seite des Radikationenpaares liegt. Die PQA an MBAlD die unter diesen Bedingungen bestimmt wurde, liegt auch nur bei etwa 3 %. Dies ist konsistent mit dem hohen Anteil für die Rekombination des Radikationenpaares von $\beta = 0.5$. Daraus resultiert eine Rekombinationsrate von $^3k_{\text{r-eT}} = 1.4 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$. Gleichbedeutend kann daraus geschlossen, dass das zweite Elektron, welches für die Umsetzung von MBA zum MBAlD benötigt wird, nicht aus einem weiteren eT vom $^2\text{MBA}^{\bullet+}$ zum $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ stammen kann. Da es auf einer längeren Zeitskala dennoch zu einer Folgereaktion kommt, die schließlich in der Bildung von MBAlD resultiert, ist ein Auseinanderdiffundieren sowohl des ionischen als auch des neutralen Radikalpaares wahrscheinlich. Die Geschwindigkeit dabei sollte im ionischen Radikalpaar langsamer sein als im Neutralradikalpaar. Dieses Modell ist konsistent mit den Beobachtungen bei $\text{pH} \sim 4$. Dort wurde aufgrund einer sehr schnellen Protonierung der Reaktionszyklus vollständig zum $^2\text{RFTA-H}^\bullet$ gezwungen, und es fand keine Rekombinationsreaktion in die GZ-Formen statt.

Das neutrale $^2\text{RFTA-H}^\bullet$ wie auch GZ-Moleküle des RFTA sind potentielle Kandidaten für einen weiteren benötigten eT vom $^2\text{MBA}^{\bullet+}$ bzw. vom $^2\text{MBA}^\bullet$ nach Abgabe des Protons an das Lösungsmittel. Aber auch über eine Disproportionierung zweier $^2\text{RFTA-H}^\bullet$

Moleküle darf spekuliert werden. Diese finden auf einer langsameren Zeitskala bis in den ms Bereich statt [Hee+81] und sind in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt worden.

Lebensdauer des $^3\text{RFTA}$ in Abhängigkeit des Wasseranteils im Lösungsmittel

Frühere Studien zeigten, dass die PQA mit steigendem Wassergehalt zunimmt [CVK04]. Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, wurde das RFTA bei unterschiedlichen Wasseranteilen im Lösungsmittel AcN mittels TA-Messungen im μs -Bereich studiert. In Abbildung 3.23 sind Ergebnisse dieser Studie dargestellt. Es zeigte sich, dass die Quantenausbeute des Triplett-Zustands in AcN sich nicht von der in H_2O unterscheidet. Dies ist an der gleichen Amplitude des Triplets bei 510 nm zu erkennen, da die Extinktionskoeffizienten in diesem Spektralbereich identisch sind. Es zeigte sich zudem, dass die Lebensdauer des Triplett-Zustands mit steigendem Wassergehalt zunimmt. In reinem AcN beträgt die Lebensdauer des $^3\text{RFTA}$ 500 ns und in reinem Wasser 2.65 μs . Parallel dazu wurde die PQA bei 50 mM an MBA zu unterschiedlichen H_2O -Anteilen bestimmt. In reinem AcN wurde kein merklicher Umsatz gefunden. Der Wert von 2.3 % bei AcN/ H_2O (50:50-v/v), bei welchen die meisten spektroskopischen Messungen durchgeführt wurden, stieg bei 75 % H_2O im Lösungsmittel auf 4.5 %. Dieser Wert konnte in reinem Wasser nicht weiter erhöht werden.

Ein Grund für die Steigerung der PQA liegt somit in einer verlängerten Lebensdauer des $^3\text{RFTA}$ bei höheren Wasseranteilen, da dadurch die Wahrscheinlichkeit für reaktive Zusammenstöße des $^3\text{RFTA}$ mit dem MBA erhöht wird. Ein weiterer Grund liegt in einem verbesserten H-Brückennetzwerk des H_2O . Je mehr Protonen zur Verfügung stehen, desto schneller erfolgt eine Protonierung des $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$, welches anschließend nicht mehr rekombinieren kann (siehe Abschnitt 3.3.5). Messungen an FMN in einem Puffersystem und Zugabe von MBA zeigten, dass in einer reinen Wasser Umgebung die Sequenz von eT gefolgt von einem PT vollständig ab lief (siehe Abschnitt 4), während in AcN/ H_2O (50:50-v/v) der PT nur teilweise erfolgte.

3.3.6. Mechanismus der photokatalytischen MBA Oxidation

Aus den spektroskopischen Untersuchungen in den unterschiedlichen Zeitbereichen lässt sich nun ein detailliertes Bild des Photooxidationsmechanismus von MBA in Anwesenheit von RFTA zeichnen. Abbildung 3.24 fasst die folgende Diskussion des Photooxida-

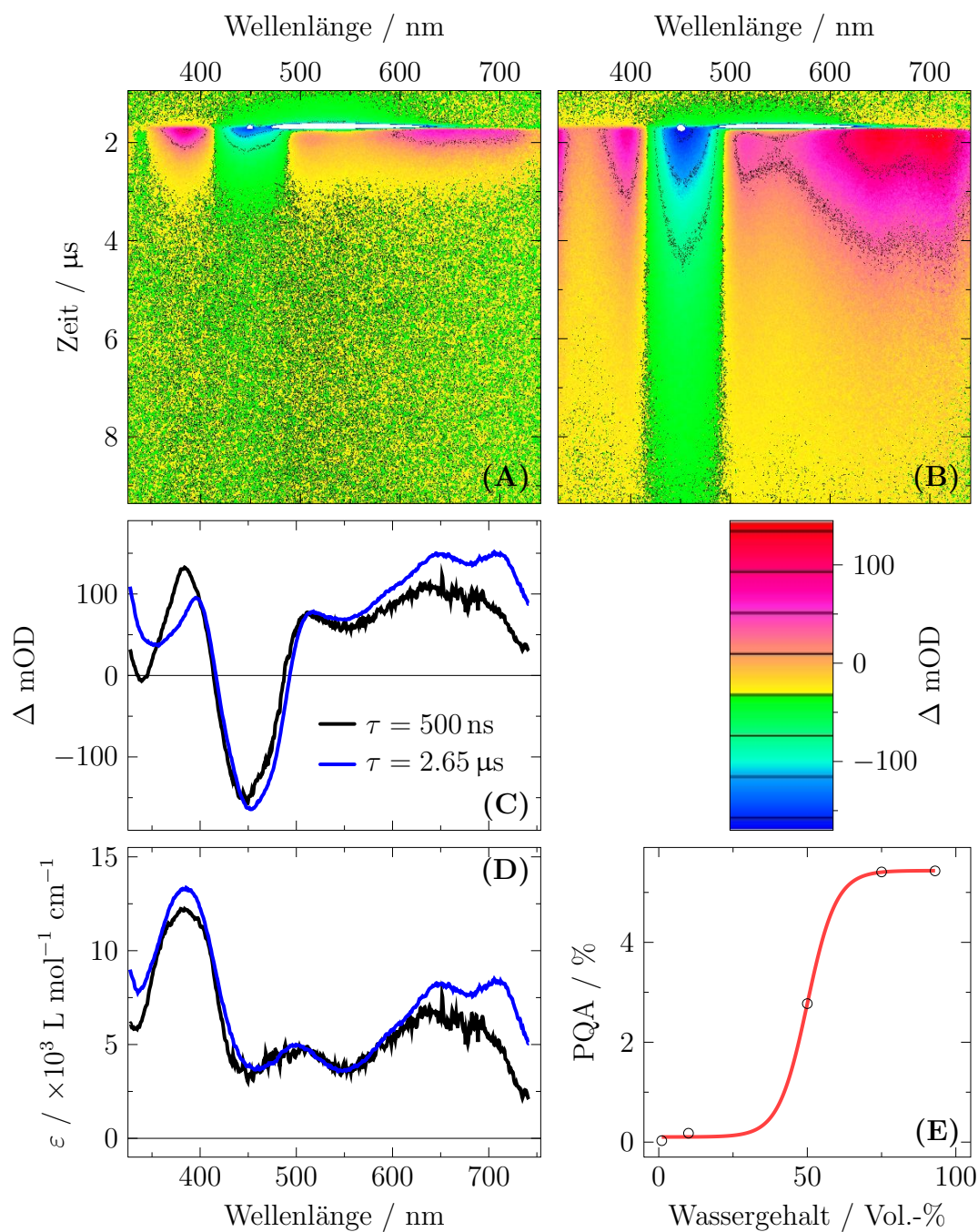


Abb. 3.23.: Vergleich der 2D-TA-Daten von RFTA in Abhängigkeit des H₂O Anteil im Lösungsmittel AcN nach Anregung bei 450 nm. (A): In AcN (B): In H₂O. (C): DADS aus den jeweiligen globalen Fits. Schwarze Linie: In AcN. Blaue Linie: In H₂O. (D): SAS durch Addition von 75 % des jeweiligen GZ-Spektrums. Schwarze Linie: In AcN. Blaue Linien: In H₂O. (E): PQA in Abhängigkeit des H₂O-Anteils bei 50 mM an MBA.

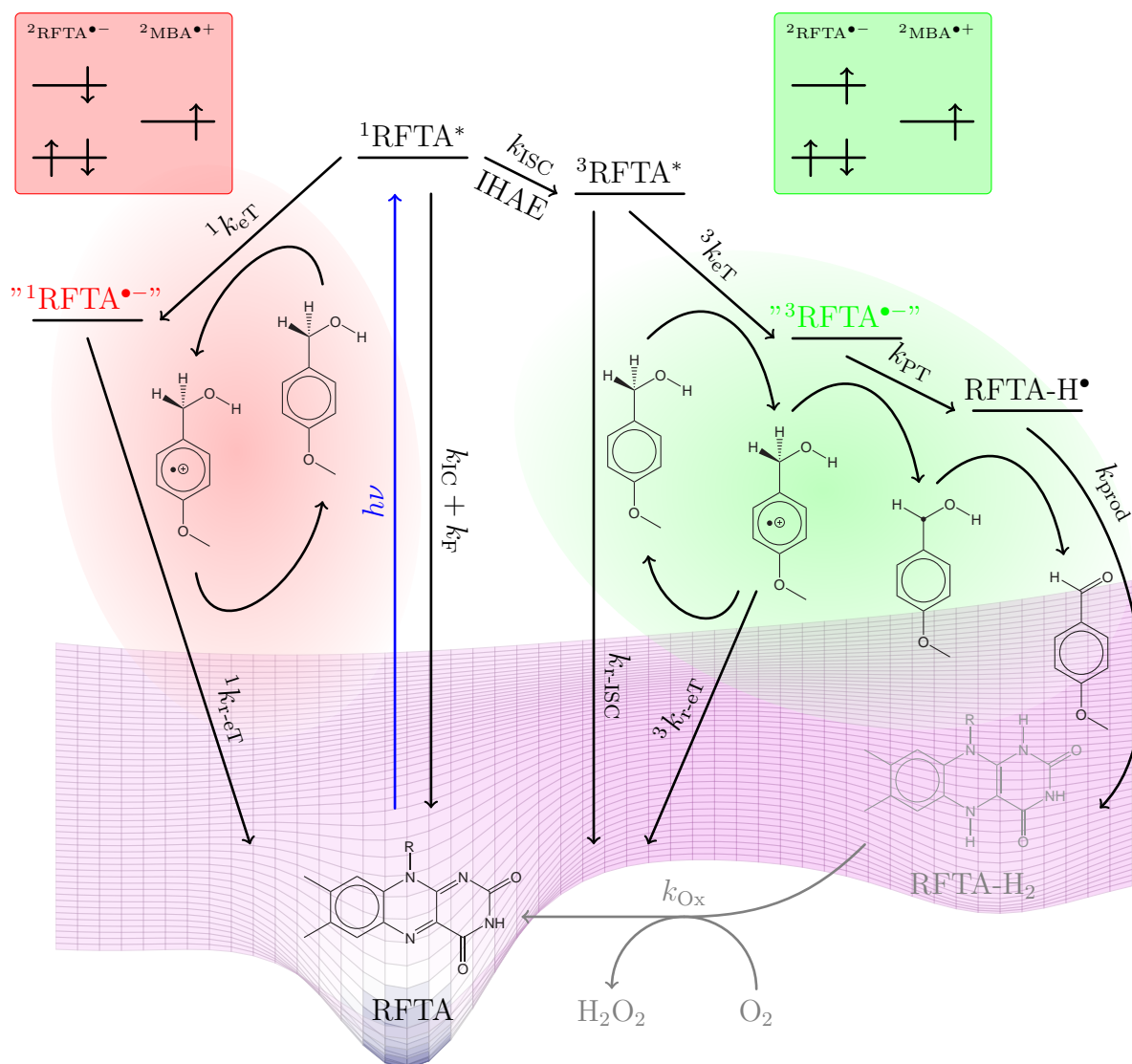


Abb. 3.24.: Schema des Oxidationsmechanismus von MBA. Der sehr schnelle nicht produktive Photozyklus über den Singulett-Zustand (links) bringt das angeregte RFTA* zurück in den Grundzustand nach einem diffusionskontrollierten eT vom MBA ($^1k_{\text{eT}}$) und einer schnellen spinerlaubten Ladungsrekombination ($^1k_{\text{r-eT}}$). Das Zusammentreffen von MBA mit einem Triplett $^3\text{RFTA}$ (rechts) kann hingegen über eine Sequenz von eT- und PT-Prozessen zur Produktbildung führen. Details sind dem Text zu entnehmen.

tionsmechanismus in einem Bild zusammen. Es sind im Wesentlichen zwei unterschiedliche Reaktionszweige zu betrachten, die mit einem eT vom MBA entweder zum Singulett $^1\text{RFTA}$ oder zum Triplett $^3\text{RFTA}$ starten. Die Reaktionsfolge aus dem Singulett-Zustand endet unproduktiv in den GZ-Formen der Reaktionspartner. Hingegen besteht die Möglichkeit produktiver Redoxreaktionen aus dem Triplett-Zustand heraus.

Das gesamte Bild wird durch die nicht triviale Abhängigkeit der PQA von der Sub-

stratkonzentration unterstützt (siehe Abschnitt 3.3.3 und Abbildung 3.25). Es zeigte sich, dass die PQA sowohl für höhere als auch für kleinere Konzentrationen an MBA deutlich abfällt. Dieses Verhalten kann nun gut mit dem aufgestellten Modell verstanden werden. Bei hohen Konzentrationen an MBA kann der $^3\text{RFTA}$ nicht ausreichend über einen ISC populierte werden, da das $^1\text{RFTA}^*$ durch das MBA schnell gelöscht wird. Bei Konzentrationen unterhalb von 25 mM an MBA wird hingegen das durch Diffusion kontrollierte Annähern von MBA und RFTA zu langsam verglichen mit der ISC-Rate des $^1\text{RFTA}^*$. Es ist somit die Balance zwischen den Zeitskalen der Diffusion durch die MBA-Konzentration und der ISC-Rate des RFTA entscheidend dafür, ob die Reaktionspartner zum richtigen Zeitpunkt zusammenkommen. Der optimale Zeitpunkt ist demnach gegeben, wenn das RFTA nicht mehr im Singulett-Zustand vorliegt, aber zugleich auch nicht aus dem Triplett-Zustand heraus relaxiert ist. Ist der eT zum $^3\text{RFTA}$ erfolgt, liegt eine Ladungstrennung in einem Spin korrelierten Radikalienpaar vor, dessen Rekombination verboten ist und daher deutlich verlangsamt wird [Ver06]. Die verlängerte Lebensdauer eines solchen Radikalienpaares erlaubt dann eine höhere Effizienz für weitere Reaktionsschritte.

Es kann versucht werden die Abhängigkeit der PQA von der Konzentration an MBA quantitativ zu modellieren. Dazu wird von den Fitresultaten ausgegangen, die aus den spektroskopischen Daten erhalten wurden. Die PQA ergibt sich aus dem Produkt der individuellen Quantenausbeuten der einzelnen produktiven Reaktionsschritte (ISC und eT):

$$\begin{aligned}\Phi_{\text{tot}} &\leq \Phi_{\text{ISC}}\Phi_{\text{eT}} \\ &= \frac{k_{\text{ISC}}}{\tau_{\text{FL}}^{-1} + {}^1k_{\text{eT}}[\text{MBA}]} \cdot \frac{{}^3k_{\text{eT}}[\text{MBA}]}{{}^3k_{\text{eT}}[\text{MBA}] + k_{\text{r-ISC}}}\end{aligned}\quad (3.4)$$

Gleichung 3.4 gibt dabei eine Abschätzung der Obergrenze für die PQA, da die Ausbeuten der weiteren Reaktionen nach Bildung der Radikalpaare nicht bekannt sind. Im Modell werden nun folgende bekannte Raten eingesetzt:

- $(\tau_{\text{FL}})^{-1} = (6.0 \text{ ns})^{-1} = 1.7 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$
(aus den TCSPC-Messungen der $^1\text{RFTA}^*$ Fluoreszenz)
- ${}^1k_{\text{eT}} = 1.3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
(aus einer linearen Regression an einem Datensatz von $\tau_{\text{FL,eff}}$ bei verschiedenen MBA-Konzentrationen)
- ${}^3k_{\text{eT}} = 1.5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

(aus den μs Zerfallsdynamiken bei verschiedenen MBA-Konzentrationen)

- $k_{\text{T-ISC}} = 7.7 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$

(aus dem Zerfall von $^3\text{RFTA}$ in Abwesenheit von MBA)

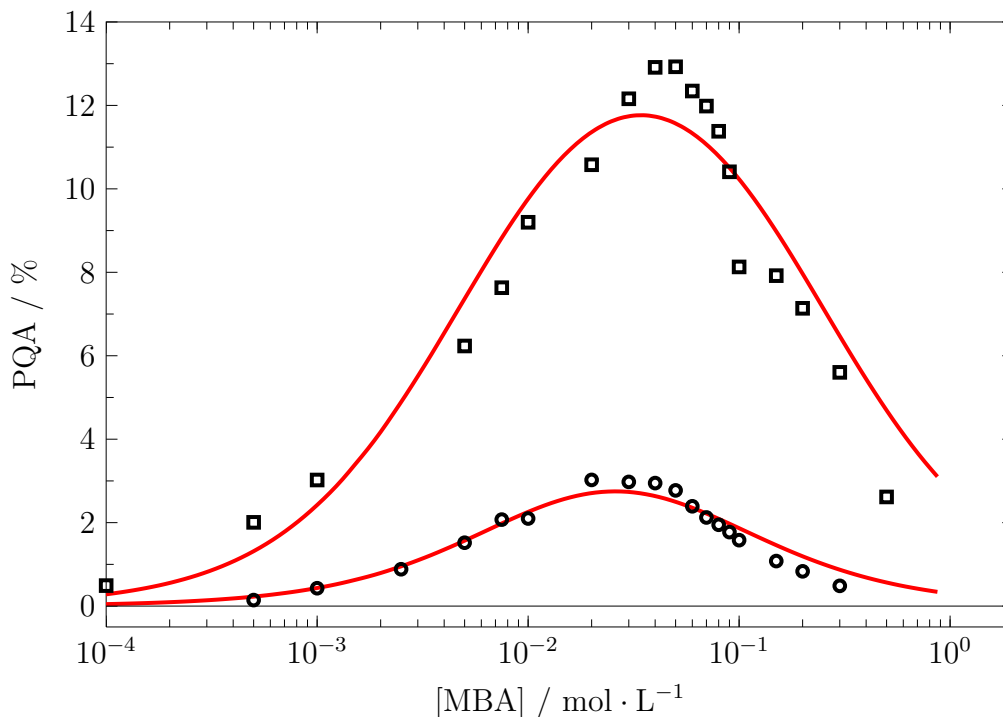


Abb. 3.25.: PQA der Bildung von MBAl_d in AcN/H₂O(50:50-*v/v*). Kreise: Im Fall von RFTA als Chromophor. Quadrate: Im Fall von F-I als Chromophor. Durchgezogene Linien stellen die Simulationen unter der Verwendung der spektroskopisch bestimmten Reaktionsraten nach Gleichung 3.4 dar. Blaue Linie für RFTA-Daten: Nur k_{ISC} wurde optimiert nach den kleinsten Fehlerquadraten. Rote Linie für F-I-Daten: Nur k_{ISC} wurde optimiert nach den kleinsten Fehlerquadraten und k_{FL} wurde mit der unteren Grenze von $1.25 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt. Grüne Linie für F-I-Daten: k_{ISC} und k_{FL} wurden optimiert nach den kleinsten Fehlerquadraten.

Die ISC-Rate k_{ISC} ist der einzige freie Parameter, welcher nicht aus den spektroskopischen Daten hervorgeht. Dieser beeinflusst allerdings nur die Amplitude, nicht aber den Kurvenverlauf der PQA in Abhängigkeit der MBA-Konzentration. Ein Fit an die experimentellen Daten liefert einen Wert von $k_{\text{ISC}} = 4.2 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$. Daraus ergibt sich weiter eine untere Grenze für die Triplettquantenausbeute von 25 % in Abwesenheit von MBA. Dieser Wert liegt in der Größenordnung der Triplettquantenausbeute von Riboflavin in Wasser zu 38 % [IPH03]. Abbildung 3.10 zeigt, dass das verwendete Modell (durchgezogene Linie) mit Abweichungen im höheren Konzentrationsbereich die gemessenen PQA-Werten (offene Kreise) wiedergibt. In dem Modell wird nicht berücksichtigt, dass mit steigender Konzentration an MBA auch die Eigenschaften des Lösungsmittels verändert

werden. Man kann erwarten, dass ein zunehmender Anteil an **MBA**-Molekülen das H-Brückennetzwerk zunehmend stört. Im gleichen Maße sollte auch die Wahrscheinlichkeit einer Protonierung des $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ herabgesetzt werden, und die Wahrscheinlichkeit einer unproduktiven Rekombination des Radikationenpaares heraufgehen. Dies ist auch im Einklang mit der Tatsache, dass trotz identischer transienter Konzentrationen an $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ gemessen bei 50 und 100 mM (siehe Abbildung 3.15 (B1)), die **PQA** um die Hälfte abnimmt. Das Modell beschreibt somit qualitativ und zu einem gewissen Grad auch quantitativ die Variation der **PQA** mit der **MBA**-Konzentration.

Im Fall von **AcN/DMSO** (98:2-*v/v*) als Lösungsmittel - also ohne Wasser - ist eine fast hundertfach kleinere **PQA** bestimmt worden. In den spektroskopischen Daten wurde beobachtet, dass der Anteil an Radikalpaaren, die in ihre **GZ**-Formen rekombinieren, deutlich abnimmt, wenn eine erhöhte Protonenkonzentration oder ein verbessertes H-Brückennetzwerk aufgrund von umgebenden H_2O -Molekülen vorliegt. Bei diesen Bedingungen nimmt auch die **PQA** deutlich zu. Eine schnelle Protonierung des $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ ist daher essentiell um eine unproduktive Rekombination des Radikalpaares $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ und $^2\text{MBA}^{\bullet+}$ zu vermeiden.

3.3.7. Verbesserung des produktiven Photozyklus mittels internal Heavy Atom Effect

In Abschnitt 3.3.6 wurde der Mechanismus der photokatalytischen **MBA** Oxidation mittels des **RFTA** diskutiert. Es fand sich, dass der produktive Photozyklus über den Triplett-Zustand des **RFTA** verläuft. Dies ist ein nicht selektiver Reaktionsschritt, der diffusionskontrolliert abläuft. Meist sind jedoch selektive Reaktionen von großem Interesse, welche Bindungsstellen am Photokatalysator erfordern. Eine Bindungsstelle im diskutierten System würde jedoch zu kürzeren Abständen zwischen dem **RFTA** und **MBA** führen. Dies wiederum hätte den Nachteil, dass das System über den schnellen nicht produktiven Zyklus, der über den $^1\text{RFTA}^*$ verläuft, gelöscht wird. Ein Ausweg dafür ist die Erhöhung der **ISC**-Rate, indem man einen *Internal Heavy Atom Effect* (**IHAE**) nutzt. Dies wurde realisiert durch die Synthese eines mit Iod substituierten Flavin-Derivat **F-I** (siehe Abbildung 3.4).

Lebensdauer von ¹F-I in Abhängigkeit der MBA-Konzentration

In einem ersten Schritt wurden die S₁-Lebensdauern von ¹F-I gelöst in AcN/H₂O(50:50-*v/v*) in Abhängigkeit der Konzentration an MBA via TCSPC vermessen. Für den Fall ohne externe Zugabe von MBA ergab sich eine deutliche Verkürzung der Lebensdauer von 6 ns auf < 0.8 ns im Vergleich zum RFTA (siehe Abbildung 3.26 (A)). Die Le-

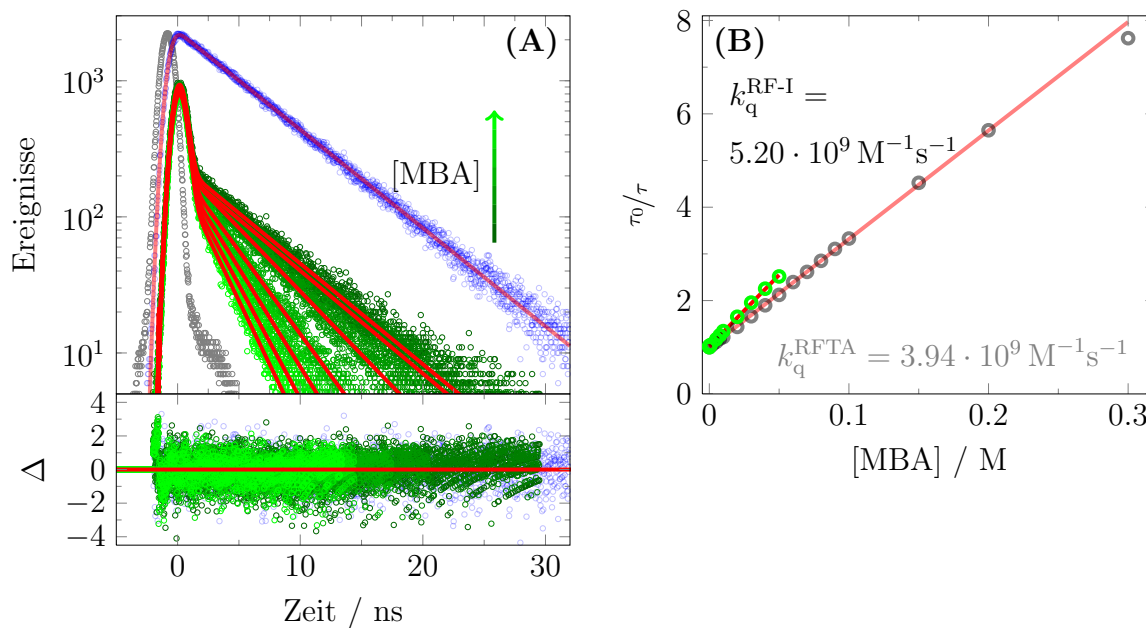


Abb. 3.26.: **A oben:** Fluoreszenzabklingkurven von ¹F-I in Abhängigkeit der MBA-Konzentration in AcN/H₂O (50:50-*v/v*). Die Anregung erfolgte bei 450 nm bei einer zeitlichen Halbwertsbreite von 1.1 ns. Die gemessenen Abklingkurven sind dargestellt durch offene Kreise in grüner Abstufung, die Apparatefunktion durch graue offene Kreise und der bi-exponentielle Fit durch die rote durchgezogene Linie. Der Datensatz für RFTA ohne MBA ist zum Vergleich als transparente blaue Punkte mit rotem mono-exponentiellen Fit mit dargestellt. **A unten:** Residuen gewichtet mit $\sqrt{N_i}$, wobei N_i die Anzahl der Ereignisse des Kanals i ist. **B** Zeigt die Auswertung nach Stern-Volmer für ein dynamisches Löschen eines angeregten Zustands. Im Falle vom ¹F-I zeigt nur die langsame Komponente ein dynamisches Löschen (grüne Punkte). Die grauen Punkte zeigen die Auswertung für RFTA als Vergleich.

bensdauer liegt unterhalb der Auflösung der verwendeten TCSPC-Apparatur, so dass der Wert von 0.8 ns nur eine obere Grenze der tatsächlichen Fluoreszenzlebensdauer des ¹F-I darstellt. Zudem war eine langsamere Komponente mit einer Lebensdauer von 5.9 ns zu erkennen. Die Amplitude dieser langsamen Komponente machte jedoch nur etwa 2 % des Gesamtsignals aus. Nach Aussagen von Herrn Robert Lechner, der zum damaligen Zeitpunkt am Institut für Organische Chemie bei Herrn Prof. Dr. B. König

arbeitete, ist diese Probe nicht wie üblich aufwendig gereinigt worden. Es kann demnach von einer Verunreinigung der Probe ausgegangen werden. Die Lebensdauer dieser Verunreinigung entspricht mit 5.9 ns genau derjenigen, die für das nicht mit Iod substituierte Flavin erhalten wurde. Es scheint sich hierbei um reines Flavin zu handeln, das während der Synthese nicht umgesetzt wurde. Unterstützt wird diese Vermutung auch durch ein ähnliches Löschverhalten dieses langsamen Beitrags nach Zugabe von MBA (siehe Abbildung 3.26 (B)). Die kleine Abweichung der bi-molekularen Löschrates von $k_q^{\text{RFTA}} = 3.94 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ auf $k_q^{\text{F-I}} = 5.20 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ kann an der leicht unterschiedlichen Struktur der beiden Flavin-Derivate liegen (siehe Abbildung 3.4).

Trotz einer nicht zu 100 % reinen Probe erkennt man deutlich, dass das F-I einen signifikant schnelleren Zerfall des Singulett-Zustands aufweist. Dies ist ein erstes Indiz dafür, dass es in diesem Derivat zu einem IHAE kommt, welcher die ISC-Rate drastisch vergrößert. Gleichmaßen sollten die Triplett-Ausbeute und letztendlich die PQA ansteigen.

Lebensdauer und Bildung des $^3\text{F-I}$ in Abhängigkeit der MBA-Konzentration

Es wurde die 2D-TA bei gleichen Anregungsenergien und gleichen Chromophorkonzentrationen sowohl für das F-I als auch für das RFTA gemessen. Dadurch sollte es möglich sein, die Triplett-Ausbeute des F-I im Vergleich zum RFTA abschätzen zu können. In Abbildung 3.27 sind die Resultate der globalen Fits an die Datensätze im Vergleich zwischen dem RFTA und dem F-I dargestellt. Es war nicht möglich im zur Verfügung stehenden Spektralbereich⁸ das Triplett-Spektrum des F-I vollständig aufzunehmen. Das Maximum der $T_1 \rightarrow T_2$ -Bande liegt bei Wellenlängen oberhalb von 750 nm und ist somit stark rotverschoben gegenüber der $T_1 \rightarrow T_2$ -Bande des $^3\text{RFTA}$. Nach Addition von etwa 85 % des GZ-Spektrums erhält man eine Abschätzung für das Spektrum des $^3\text{F-I}$. Die $T_1 \rightarrow T_3$ -Bande ($\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$) und die $T_1 \rightarrow T_4$ -Bande ($\lambda_{\text{max}} = 390 \text{ nm}$) des $^3\text{F-I}$ liegen beide rotverschoben zu den äquivalenten Banden des $^3\text{RFTA}$. Die Extinktionskoeffizienten am Maximum der $T_1 \rightarrow T_3$ -Bande und im Bereich des GSB sind für das $^3\text{F-I}$ und das $^3\text{RFTA}$ in etwa identisch. Nach Normierung der DADS auf ihr GSB lässt sich demnach abschätzen, dass die Triplettausbeute des F-I etwa 1.5 mal größer ist als die des RFTA. Durch die Einführung eines IHAE sollte nicht nur die Bildungsrate $k_{\text{ISC}}^{\text{F-I}}$ des Triplets erhöht werden, sondern auch die Zerfallsrate $k_{\text{T-ISC}}^{\text{F-I}}$. Dieses wird auch an einer

⁸Das Blitzlampenspektrum zur Abfrage reicht nur etwa bis 750 nm.

verkürzten Lebensdauer von $1.1\mu\text{s}$ beobachtet.

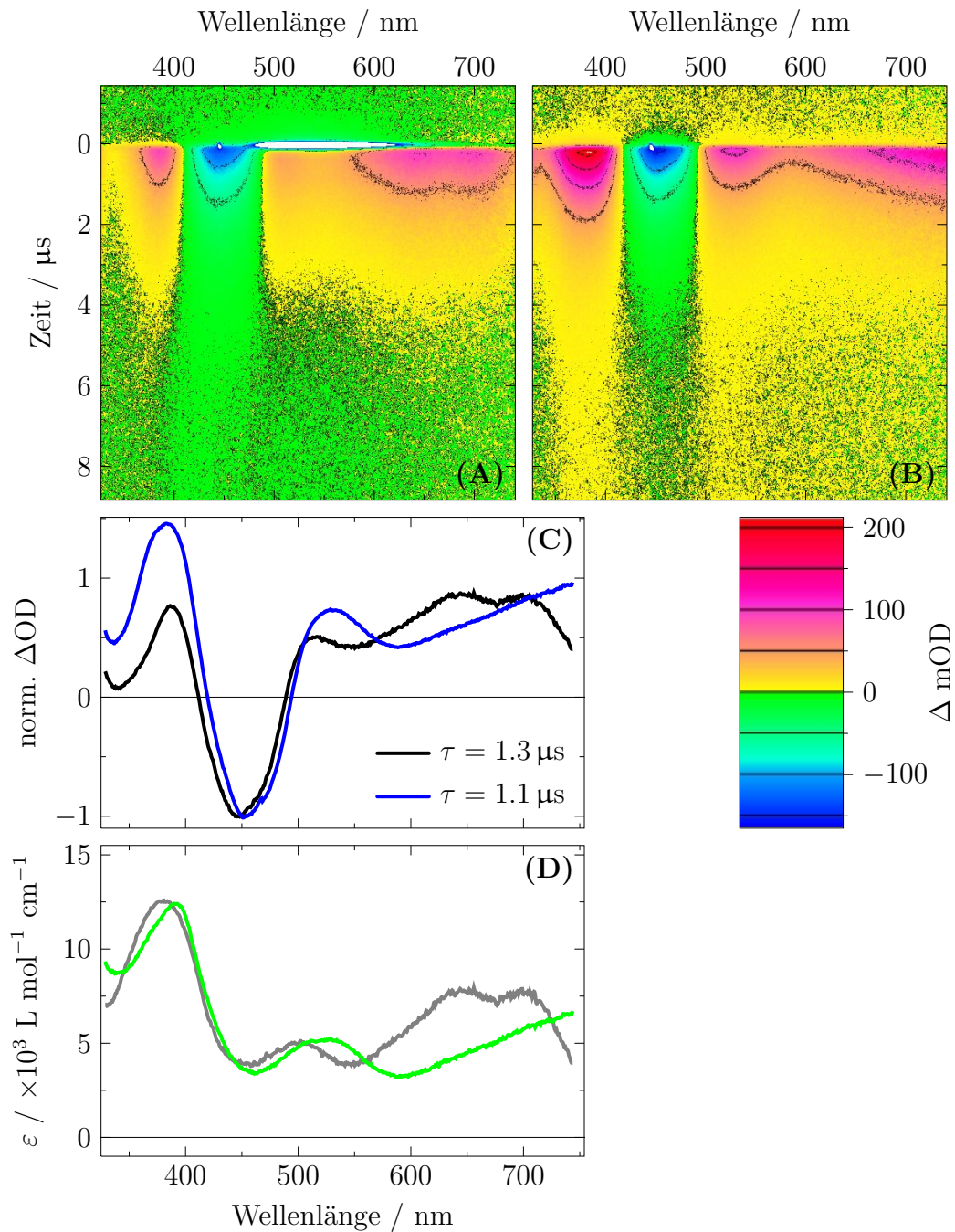


Abb. 3.27.: Vergleich der 2D-TA-Daten zwischen RFTA und F-I in AcN/ H_2O (50:50- v/v) Lösung nach Anregung bei 450 nm. (A): 40 μM RFTA (B): 40 μM F-I. (C): Auf den GSB normierte DADS aus den jeweiligen globalen Fits. Schwarze Linie: RFTA. Blaue Linie: F-I. (D): SAS durch Addition des jeweiligen GZ-Spektrums. Graue Linie: $^3\text{RFTA}$ nach Addition von 53 % des GZ. Grüne Linie: $^3\text{F-I}$ nach Addition von 85 % GZ.

Im Folgenden wurden μs -Messungen bei MBA-Konzentrationen im Bereich von 5 bis 500 mM durchgeführt. In Abbildung 3.28 sind die Daten der TA für 10 mM an MBA exemplarisch dargestellt. Alle Datensätze lassen sich in einem globalen Fit mit drei

Exponentialfunktionen beschreiben. Die **DADS** sind in analoger Weise zu den Daten an **RFTA** zu interpretieren (siehe Abschnitt 3.3.5). Ein Vergleich mit Literaturdaten ist leider nicht möglich. Dennoch sind die Signale des $^2\text{F-I}^{\bullet-}$ (**DADS** zu $\tau = 4.5 \mu\text{s}$) und des $^2\text{F-I-H}^{\bullet}$ (**DADS** zu $\tau \gg 10 \mu\text{s}$) sehr ähnlich zu denen des nicht iodierten **RFTA**. Das Spektrum des $^2\text{F-I}^{\bullet-}$ zeigt eine leichte Strukturierung in der Bande bei Maximum

$[\text{MBA}] / [\text{mM}]$	$\tau_1 / [\mu\text{s}]^a$	$^3k_{\text{eT}} / [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	$\tau_2 / [\mu\text{s}]^b$	$\tau_3 / [\mu\text{s}]$
0	1.11	—	—	—
5	0.58	$1.62 \cdot 10^8$	5.4	—
7.5	0.46	$1.70 \cdot 10^8$	4.5	$\gg 10$
10	0.38	$1.71 \cdot 10^8$	4.5	$\gg 10$
20	0.23	$1.70 \cdot 10^8$	4.9	$\gg 10$
40	0.13	$1.65 \cdot 10^8$	5.7 ^a	$\gg 10$
100	0.06 ^c	$1.49 \cdot 10^{8c}$	4.4	$\gg 10$
500	0.01 ^c	$3.28 \cdot 10^{8c}$	7.2	$\gg 10$

^aGemessen in einem $2 \mu\text{s}$ Zeitfenster.

^bGemessen in einem $10 \mu\text{s}$ Zeitfenster.

^cDiese Werte liegen innerhalb der Zeitaufösung und stellen daher nur eine obere Grenze für die Lebensdauer dar.

Tab. 3.3.: Resultate aus den globalen Fits an den 2D-**TA**-Messungen mit dem **SC** Aufbau für unterschiedliche Konzentrationen an **MBA**. $\tau_1 = (k_{\text{r-ISC}} + ^3k_{\text{eT}}[\text{MBA}])^{-1}$; $\tau_2 = (k_{\text{PT}} + ^3k_{\text{r-eT}})^{-1}$; $\tau_3 = (k_{\text{Prod}})^{-1}$. Für $[\text{MBA}] = 0 \text{ mM}$: $\tau_1 = (k_{\text{r-ISC}})^{-1} = (9.1 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1})^{-1}$.

$\lambda_{\text{max}} = 370 \text{ nm}$. Auch im Fall des **F-I** scheint der **PT** nicht vollständig abzulaufen, wie es an der Bande bei $\lambda_{\text{max}} = 370 \text{ nm}$ im **DADS** zu $\tau \gg 10 \mu\text{s}$ zu erkennen ist. Messungen im sauren pH-Bereich sollten auch hier zeigen, dass der Zyklus auf die Seite des $^2\text{F-I}^{\bullet}$ gebracht werden kann. Derartige Messungen sind im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt worden. In Tabelle 3.3 sind die Fitresultate aller Datensätze im Überblick gegeben. Es zeigt sich, dass die Rate für den **eT** vom **MBA** auf den Triplett-Zustand des **F-I** mit $^3k_{\text{eT}} = 1.7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ um den Faktor 10 größer ist als diejenige, die im System **RFTA** und **MBA** gefunden wurde.

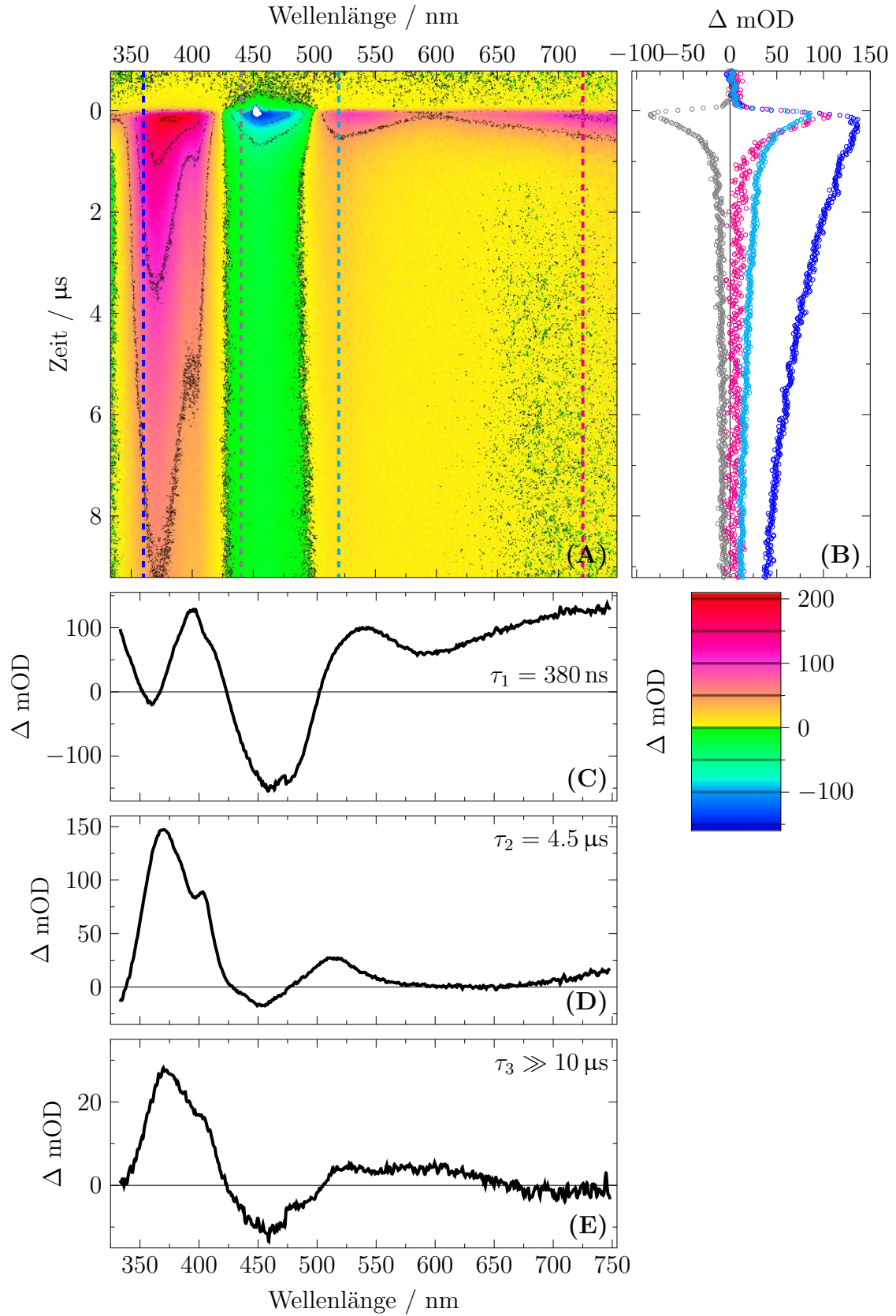


Abb. 3.28.: (A): Falschfarbendarstellung der 2D-TA-Matrix gemessen mit 40 μM F-I und 10 mM MBA in AcN/H₂O(50:50-v/v) Lösung nach Anregung bei 445 nm. (B): Zeitschnitte bei verschiedenen Wellenlängen (siehe Farbkodierung auf der Falschfarbendarstellung). (C-E): DADS aus dem globalen Fit.

Bestimmung der PQA von F-I in Abhängigkeit der MBA Konzentration

In Abbildung 3.25 ist die Abhängigkeit der PQA von der MBA-Konzentration dargestellt. Der Verlauf ist identisch zu dem des RFTA. Im Maximum ist der Umsatz im Fall von F-I jedoch etwa 4 mal so hoch wie beim RFTA. Basierend auf dem Modell für die PQA gemäß Gleichung 3.4 kann auch hier der Verlauf qualitativ wiedergegeben werden. Es wurden folgende Spektroskopische Daten verwendet:

- $(\tau_{\text{FL}})^{-1} = (0.8 \text{ ns})^{-1} = 1.25 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$
(aus den TCSPC-Messungen der ¹RFTA* Fluoreszenz; nur untere Grenze)
- $^1k_{\text{eT}} = 1.3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
(Übernommen aus den Daten an RFTA)
- $^3k_{\text{eT}} = 1.7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
(aus den μs Zerfallsdynamiken bei verschiedenen MBA-Konzentrationen)
- $k_{\text{r-ISC}} = 9.1 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$
(aus dem Zerfall von ³RFTA in Abwesenheit von MBA)

Die Rate für das ISC k_{ISC} und den eT aus dem Singulett-Zustand sind unbekannt. Die eT-Rate aus dem Singulett-Zustand kann mit dem Wert von $^1k_{\text{eT}} = 1.3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, der für RFTA gemessen wurde abgeschätzt werden. Die Fluoreszenzlebensdauer τ_{FL} stellt nur eine ober Grenze dar. In einem Fit an die Daten wurden k_{ISC} und τ_{FL} angepasst. Das Ergebnis des Fits ist in Abbildung 3.25 dargestellt. Es ergibt sich für die Fluoreszenzlebensdauer ein Wert von 450 ps. Die ISC-Rate wird zu $k_{\text{ISC}} = 3.7 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ bestimmt, was eine untere Grenze für die Triplettquantenausbeute von 17 % entspricht. Aus den spektroskopischen Daten geht bereits hervor, dass die Quantenausbeute für den Triplett-Zustand um den Faktor 1.5 größer sein sollte bei RFTA. Somit wird durch die Modellierung der PQA-Daten dieser Wert deutlich unterschätzt. Die Modellierung ist in diesem Fall rein qualitativ, wie auch die großen Abweichungen des Fits zu den Daten zeigen. Für eine bessere quantitative Beschreibung müssen die Prozesse nach dem eT zum Triplett-Zustand weiter untersucht werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination des Radikationenpaares von der Lösungsmittelumgebung abhängt. Durch schnelle Protonierung des Radikalanion ²RFTA^{•-} kann eine schnelle Rekombination verhindert werden, und die PQA weiter gesteigert werden. In weiteren Messungen unter gepufferten wässrigen Bedingungen bei unterschiedlichen pH-Werten und auch in

längeren Zeitbereichen sollte dieser Fragestellung weiter nachgegangen werden. Dieses ist im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr geschafft worden.

3.4. Ausblick

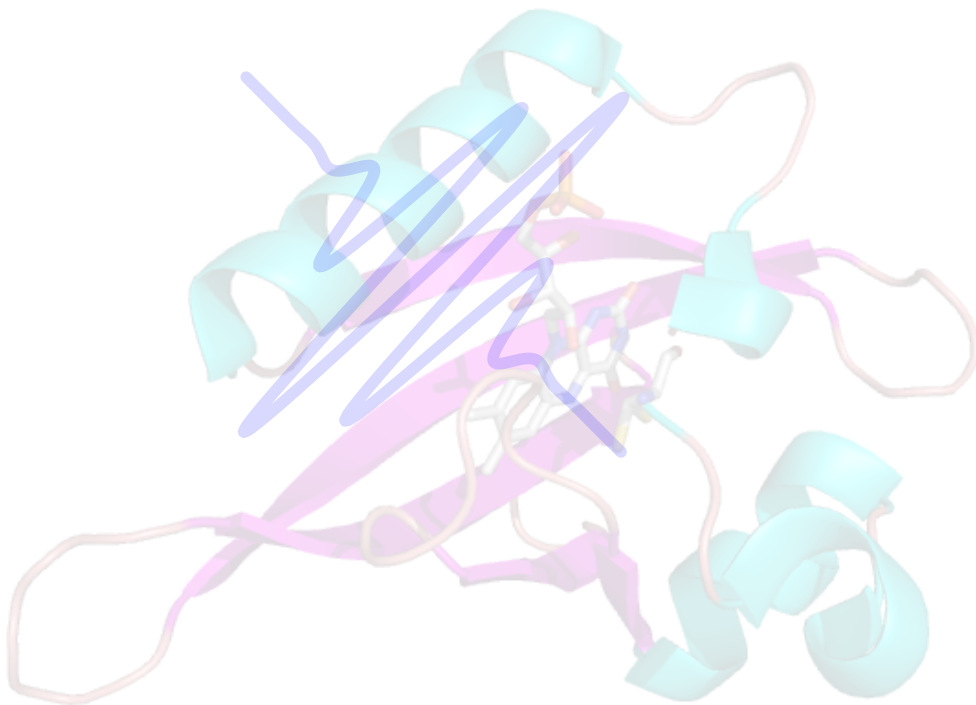
Die gewöhnlich gewählten Designvorschläge eines Photokatalysators basieren auf der Annahme, dass eine unmittelbare Nähe des redoxaktiven Chromophors und dem Substrat durch eine Bindungsstelle vorliegen sollte. Aus der mechanistischen Studie geht jedoch hervor, dass dies nicht für Flavinsysteme gilt. Diese Studie zeigt stattdessen andere Gesichtspunkte, die bei Herstellung neuer auf Flavin basierenden Photokatalysatoren mit verbesserten Produktumsatzraten wichtig sind. Ein Ansatzpunkt ist die Erhöhung der Triplettquantenausbeute durch Beschleunigung des ISC-Prozesses. Dazu kann der Schweratomeffekt durch eine geeignete Substitution am Flavinchromophor ausgenutzt werden, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde.

Es wäre auch interessant zu sehen, ob durch Substitution von sperrigen Seitengruppen am Flavin oder aber sogar durch Einsperren des Flavins in einem Käfig, wie z.B. einem Protein, das Flavin und das Substrat aufgrund von sterischer Hinderung auf Distanz gehalten werden kann. Dies führte dann ebenfalls zu einer erhöhten Triplettquantenausbeute. Eine weitere Möglichkeit bietet die Verwendung von Triplett-Sensibilisatoren [Hvi+03], welche einen schnellen ISC Prozess nach Photoanregung unterliegen und dann ihre Triplett-Energie an das Flavin transferieren können. Auf diese Weise könnte der Verlustkanal des Singulett-Zustands vollständig umgangen werden. Allerdings hätte dies gleichzeitig den Nachteil, dass man im UV-Bereich anregen müsste anstatt im gewünschten Vis-Bereich für die Photokatalyse.

Schaut man sich die allgemeinen Strukturen und vor allem die Mechanismen von natürlich vorkommenden Proteinen an, welche an Redoxreaktionen beteiligt sind, findet man dort meist viele Redoxzentren in unmittelbarer Nähe zu einander [Pag+99]. Diese Tatsache führt zu einer effizienten Trennung der induzierten Ladungen entlang einer Kette der Reaktionszentren, so dass eine Ladungsrekombination so wie andere deaktivierende Prozesse sehr stark unterdrückt werden. Die Verfolgung dieses in der Natur vorkommenden Konzeptes scheint somit viel versprechend zu sein. Für die auf Flavin basierende Photokatalyse würde dies bedeuten, dass man an das Flavingerüst zum einen sterisch abschirmt und zum anderen in einem bestimmten Abstand einen intermediären

Elektronenakzeptor einbaut, der ebenfalls eine Substratbindungsstelle besitzt. Auf diese Weise würde nach Photoanregung das Flavin zuerst den intermediären Elektronenakzeptor oxidieren. Anschließend würde der oxidierte intermediäre Elektronenakzeptor sich vom gebundenen Substrat ein Elektron zurückholen. So sollte ein unproduktiver Elektronentransfer vom Substrat zurück zum Photokatalysator deutlich verlangsamt werden gegenüber den produktiven Folgeprozessen. Wenn man die Substratbindungsstelle noch derart spezifisch für das Substrat und nicht für das Produkt macht, sollte eine weitere Steigerung der Reaktionsquantenausbeute möglich sein. Ansätze, die in diese Richtungen gehen, sind bereits schon gemacht worden. Z.B. konnte eine zehnfach höhere Produktquantenausbeute bis zu 40 % für die Photooxidation von [MBA](#) mit einem Flavinderivat erzielt werden, das kovalent an einen Zink(II)-Zyklen gebunden war [[CVK04](#)]. Es werden dennoch weitere detailliertere Untersuchungen am Flavinphotokatalysator im Hinblick auf den Reaktionsmechanismus sowie auf einer Verbesserung seiner Photostabilität benötigt. Die in dieser Arbeit erlangten Kenntnisse sollten in jedem Fall bei der Entwicklung verbesserter Photokatalysatoren helfen.

4. Photozyklus in der LOV1-Domäne aus *Chlamydomonas reinhardtii*



4.1. Einleitung

Das aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (C.r.) stammende Protein Phototropin steuert mehrere blaulichtabhängige Prozesse bei der Bildung von Keimzellen unter Stickstoffmangel (Gametogenese) [HB03]. Dessen Struktur beinhaltet zwei sich wiederholende Domänen, LOV1 und LOV2 (*Light Oxygen and Voltage*) sowie eine Serin/Threonin-Kinase Domäne. Diese LOV-Domänen enthalten in ihrer Proteintasche jeweils nicht kovalent gebunden den Chromophor FMN (*Flavinmononukleotid*), was sie zu Blaulichtphotorezeptor-Einheiten macht [Chr+99]. Der Signalzustand dieser LOV-Domänen liegt in der Ausbildung eines kovalenten Adduktes zwischen dem Schwefelatom des in unmittelbarer Nähe befindlichen Cysteins (Cys-57 in LOV1 und Cys-250 in LOV2) und dem C(4a) vom Kofaktor FMN nach Absorption von blauem Licht [Sal+00; Sal+01; CM02; Fed+03]. Das Absorptionsspektrum des Signalzustands im Photozyklus der LOV1 Domäne aus C.r. ist bereits charakterisiert worden [Kot+03; Kot03; Kut06; Kut+08]. Derzeit ist allgemein akzeptiert, dass der Triplett-Zustand des FMN ein Intermediat auf dem Weg zum Addukt ist [Kot+03; Kot03; Swa+01]. Für die Reaktionsabfolge aus dem Triplett-Zustand heraus werden in der Literatur mehrere Reaktionsmechanismen diskutiert. Mögliche Mechanismen sind ein ionischer Verlauf, ein radikalischer Verlauf und eine konzertierte Reaktion ohne definiertes Intermediat. Beim ionischen Verlauf erfolgt zuerst eine PT gefolgt von einem nukleophilen Angriff des Thiolats am C(4a) des FMN. Der radikalische Verlauf kann in einem oder zwei Schritten ablaufen. Eine Einschritt-Reaktion beinhaltet den Transfer eines H-Atoms H•, während eine Zweischnitt-Reaktion eine Sequenz von einem eT und einem PT umfasst. Beim konzertierten Verlauf schließlich entsteht simultan mit der Bindung zwischen dem Schwefel des Cysteins und dem C(4a) des Flavins auch die Bindung zwischen dem Proton des Cysteins und dem N(5) des Flavins. Eine detaillierte Diskussion zu den einzelnen Mechanismen mit entsprechenden Quellenangaben ist in der Dissertation von Herrn Dr. Kottke zu finden [Kot03].

Für den weiteren Reaktionspfad wurden bislang keine eindeutigen Intermediate auf dem Weg zum Addukt gefunden. Es gibt einige Studien die Hinweise auf mögliche Intermediate liefern. Im Vorfeld wurde in der Gruppe von Herrn Prof. Dick z.B. gezeigt, dass in einer Cys-Gly-Mutante der LOV1-Domäne aus C.r., die kein Addukt ausbilden kann, Methylthiol in die Proteintasche eindringen kann und dort photoinduziert ein Addukt mit ähnlichen spektralen Charakteristika erzeugen kann [Lan+10]. Zu große Merkapt-

ne sind sterisch gehindert für ein Eindringen in die Tasche, können jedoch das FMN zum FMNH[•] reduzieren, welches innerhalb des Proteins stabil ist. Ausgehend dieser Erkenntnisse wurde postuliert, dass die Reaktionskette vom FMN-Triplett über die Bildung eines Flavin-Cystein-Radikalpaares als Intermediat in die Bildung des Adduktes läuft. Die aktuellste Arbeit gibt erstmals Hinweise auf die Bildung der Neutralradikal-Form des FMN in den transienten Absorptionsspektren des Wildtyps LOV1 aus C.r. [Bau+11]. Die Argumentation basiert auf einem Differenzspektrum zwischen dem Triplett-Spektrum des Wildtypen und dem der LOV1-C57S Mutante. Es wird eine kleine Erhöhung in der Extinktion im Bereich von 550 und 600 nm die zusätzlich im Triplett-Spektrum des Wildtyps auftritt der Bildung des Neutralradikals zugeordnet. Die Signalhöhe liegt jedoch im Bereich der Rauschamplitude. Daher kann es auch nur als ein Hinweis angesehen werden.

In diesem Projekt wurde versucht mit Hilfe der in dieser Arbeit aufgebauten 2D-TA-Spektroskopie, potentielle Intermediate im Photozyklus der LOV1 Domäne aus C.r. zu identifizieren. Erste Experimente zeigten, dass aufgrund der Langlebigkeit des Adduktzustands ($\tau \sim 200$ s) schon nach einem Laserschuss die Probe in einer Standküvette vollkommen ausbleicht, so dass eine Aufakkumulation mit einer Repetitionsrate von typischerweise 0.5 Hz nicht möglich war. Das Verlängern der Delayzeit zwischen zwei *Light amplification by stimulated emission of radiation* (Laser)schüssen auf mehrere Minuten brachte nur mäßigen Erfolg. Auf eine weitere Verlängerung der Delayzeit wurde aufgrund von entstehenden Instabilitäten des Lasers und der Blitzlampe abgesehen. Um diese Problematik zu lösen wurde eine Durchflusssküvette als Probenkammer in das Experiment integriert. Mittels einer Peristaltikpumpe, welche schonend für Proteinproben ist, wurde die Probe in einem laminaren Strom nach jedem Schuss im Anregungsvolumen komplett ausgetauscht. Somit konnte erfolgreich über 100 Schuss gemittelt werden und jeder einzelne Schuss erfolgte an einer vollkommen unbelasteten Probe. Die Messungen am Wildtypen werden mit Messungen an den Mutanten LOV1-C57G und LOV1-C57S, sowie mit Messungen an FMN in Puffer-Lösung verglichen.

4.2. Experimentarteil

Die Expressions- und Aufreinigungsbedingungen der LOV1 Konstrukte LOV1-WT, LOV1-C57G und LOV1-C57S sind in Abschnitt 2.4 zu finden. Alle Proteine wurden vor den

Messungen mehrere Male gegen den eingesetzten Puffer dialysiert, um eventuell nicht gebundenes FMN vollständig zu entfernen. Das FMN (von Lancaster Synthesis) und das MBA (von Aldrich (98 % Reinheit)) wurden gekauft und direkt eingesetzt. In Abbildung 4.1 sind die wesentlichen Merkmale der untersuchten LOV1-Konstrukte aus C.r. sowie die Strukturformel des FMN dargestellt. Zur Herstellung der Natriumphosphat-Puffer wurde bi-distilliertes Wasser verwendet. Die benötigten Salze NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 und NaCl wurden ebenfalls gekauft (von Merck) und direkt eingesetzt. Die stationären Absorptionsspektren wurden mit einem Lambda 9a Spektrometer (Perkin-Elmer) bei Raumtemperatur 20 °C/ gemessen. Es wurde für die Belichtungsexperimente ein modifizierter Küvettenhalter verwendet, der in Abschnitt 2.2 beschrieben ist. Für die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen wurde eine Fluoreszenzküvette (2 mm × 10 mm) verwendet. Die optische Dichte der Proben wurde auf etwa 0.2 eingestellt. Die Anregung der Proben erfolgte entlang der 2 mm Schichtdicke bei 450 nm. In Abschnitt 2.3 sind Details zur TCSPC-Apparatur zu finden. Details zu den 2D-TA-Messungen sind in Abschnitt 2.1 zu finden.

4.3. Resultate und Diskussion

Es wurden einige aus der Literatur bereits bekannte Untersuchungen an der LOV1-Domäne sowie an Mutanten der LOV1-Domäne zur Verifizierung erneut ausgeführt. Die daraus resultierenden Ergebnisse bilden die Grundlagen für die in dieser Arbeit durchgeführte Studie des Photozyklus der LOV1-Domäne aus C.r..

4.3.1. Stationäre Absorptionsspektroskopie

Beim Studium der Photoreaktion innerhalb der LOV1 Domäne ist es von Vorteil, wenn neben der Wildtyp-Domäne auch Domänen untersucht werden, die sich aufgrund gezielter Mutationen in einzelnen Eigenschaften vom Wildtyp unterscheiden. Ist es z.B. möglich, durch Mutationen die Reaktionskinetik oder die Anzahl der gebildeten Intermediate zu beeinflussen, so können dadurch mechanistische Vorstellungen gewonnen werden. Aus diesem Grund wurden neben dem Wildtypen der LOV1 Domäne die zwei Mutanten LOV1-C57G und LOV1-C57S hergestellt. In den beiden Mutanten ist jeweils das Cystein an Position 57 einmal durch ein Glycin und einmal durch ein Serin aus-

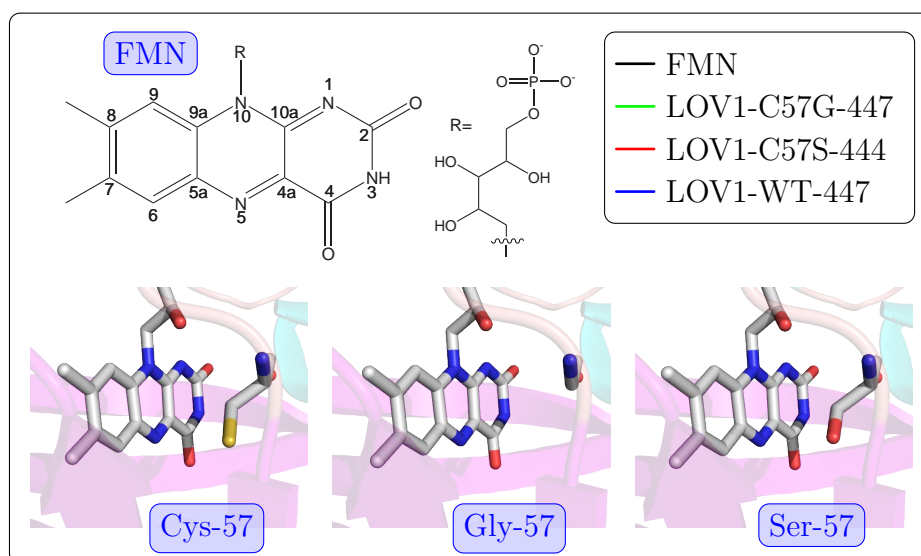
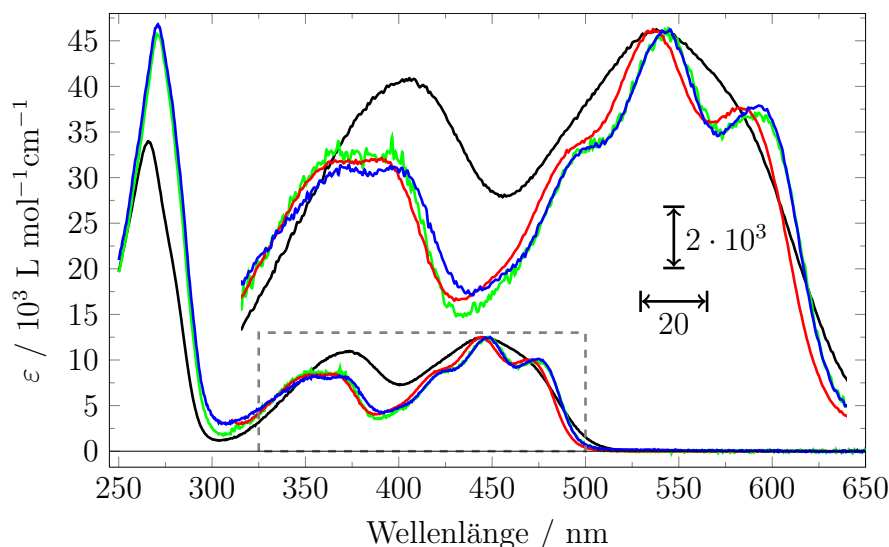


Abb. 4.1.: Vergleich der stationäre Absorptionsspektren des reinen FMN, des FMN in der LOV1-C57S Mutante, des FMN in der LOV1-C57G Mutante und des FMN im LOV1-WT. Der Kofaktor liegt in seiner oxidierten Form vor. Alle Proben sind gelöst in 10 mM Natriumphosphat-Puffer bei pH = 8.0 und 10 mM NaCl. Die Spektren der LOV-Domänen wurden auf die Extinktion des reinen FMN bei 445 nm skaliert ($\epsilon_{445 \text{ nm}} = 12500 \text{ L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ [Mac99]).

getauscht worden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es in diesen Mutanten nicht mehr zu einem kovalenten Addukt zwischen dem Schwefelatom des reaktiven Cysteins-57 und dem C(4a) vom Kofaktor FMN kommt [Hol+02]. Mit dem Fehlen des Intermediats LOV1-390 sollte der gesamte Photozyklus deutlich verkürzt werden. Anhand der Absorptionsspektren kann abgelesen werden, wie sich die Mutationen auf die Struktur der LOV Domäne auswirken. Da die Absorptionsspektren der LOV1-C57G und der LOV1-C57S Mutanten sich nicht grundlegend von dem des Wildtyps unterscheiden (siehe Abbil-

dung 4.1), kann davon ausgegangen werden, dass sich auch die Strukturen der Mutanten nicht grundlegend von der des Wildtyps unterscheiden. Daher stellen die Mutanten ein geeignetes Vergleichssystem dar, in dem die strukturellen Eigenschaften des Wildtyps erhalten bleiben.

Das Absorptionsspektrum des FMN zeigt im blauen ($\lambda_{\max} = 445 \text{ nm}$) und im nahen UV- ($\lambda_{\max} = 373 \text{ nm}$) zwei breite Banden und im UV-Bereich ($\lambda_{\max} = 266 \text{ nm}$) eine weitere um den Faktor 3 größere Bande. Diese Banden entsprechen den $S_0 \rightarrow S_1$, $S_0 \rightarrow S_2$ und $S_0 \rightarrow S_3$ Übergängen innerhalb der Isoalloxazin-Einheit. Aufgrund der hohen Extinktion in der Größenordnung von $10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ kann diesen Übergängen ein $\pi \rightarrow \pi^*$ -Charakter zugewiesen werden [Hee82].

Im Vergleich zum freien FMN im Puffer besitzt das FMN, wenn es in einer LOV-Domäne eingebaut ist, eine ausgeprägte Schwingungsfeinstruktur (siehe Abbildung 4.1). Die Feinstruktur wird vermutlich sowohl durch die unpolare Umgebung als auch durch die Einschränkung der Bewegungsfreiheit im Apoprotein verursacht. Die Feinstruktur in LOV-Domänen kann als Indikator für ein intaktes Protein hergenommen werden, da bei Denaturierung der Chromophor freigesetzt wird, und dadurch die Feinstruktur des Spektrums verloren geht [Kot03]. Im Wildtypen zeigt die $S_0 \rightarrow S_1$ -Bande zwei Absorptionsmaxima 474, 447 und eine Schulter bei 425 nm. Die Mutation des Cysteins-57 durch ein Glycin wirkt sich nicht auf diese Bande aus. Hingegen führt das Einführen eines Serins an Stelle des Cysteins-57 zu einer leichten Blauverschiebung der gesamten Absorptionsbande von 4 nm. Der $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang in den LOV-Domänen ist blauverschoben gegenüber der entsprechenden Banden des freien FMN. Im Wildtypen sind zwei Absorptionsmaxima bei 370 und 354 nm zu erkennen. In den Mutanten sind diese Maxima um etwa 3 nm blauverschoben. Die Bande im UV-Bereich bei etwa 270 nm wird überlagert von der Absorption des Apoproteins aufgrund von Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin¹. Es besteht die Konvention die Dunkelzustände nach ihrer langwelligsten Absorptionsbande zu benennen. Demnach lauten die drei Dunkelzustände LOV1-WT-

¹Gemäß der Edelhoch-Methode lässt sich bei bekannter Aminosäuresequenz der Extinktionskoeffizient eines Proteins über durchschnittliche molare Extinktionskoeffizienten für Tryptophan, Tyrosin und Cys-S-S-Cys (Cystein) bei $\lambda_{280 \text{ nm}}$ über $\epsilon_{280 \text{ nm}} = (n_{\text{Trp}} \cdot 5500 + n_{\text{Tyr}} \cdot 1490 + n_{\text{Cys-S-S-Cys}} \cdot 125) \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bestimmen [Ede67]. Für die LOV-Domänen ergibt sich mit $n_{\text{Trp}} = 1$, $n_{\text{Tyr}} = 4$ und $n_{\text{Cys-S-S-Cys}} = 0$ ein Beitrag von $11460 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Das Phenylalanin hat sein Maximum erst bei 260 nm mit $\epsilon_{260 \text{ nm}} \approx 200 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. In den LOV-Domänen liegt der Beitrag der Phenylalanine (6 Stück) bei etwa $1200 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

447, [LOV1-C57G-447](#) und [LOV1-C57S-444](#).

Es kann in guter Näherung davon ausgegangen werden, dass sich der Extinktionskoeffizient von freiem [FMN](#) ($\varepsilon_{445\text{ nm}} = 12500 \text{ L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ [[Mac99](#)]) nicht wesentlich durch den Einbau des Flavins in das Protein ändert. Aus diesem Grund wurden die Absorptionsspektren der beiden [LOV](#)-Domänen auf die Extinktion des reinen [FMN](#) bei 445 nm skaliert.

In manchen Flavoproteinen wird im Bereich von 500 bis 600 nm zusätzlich eine breite Absorptionsbande beobachtet. Diese kann entstehen, wenn das Flavin und eine azide Seitengruppe (einer Aminosäure oder eines weiteren Koenzyms) nach Protonierung in einem ladungsgetrennten Zustand vorliegen [[MG74](#)]. Da im Spektrum eine derartige Bande nicht zu beobachten ist, lässt sich daraus schließen, dass auch das reaktive Cystein-57, dessen Schwefel-Atom in einem mittleren Abstand von etwa 4.1 Å zum C(4a) des [FMN](#) vorliegt [[Fed+03](#)], im [LOV1-WT](#) protoniert vorliegt. Durch Messungen im Infrarotbereich am [LOV1-WT](#) konnte dies bestätigt werden [[AHH03](#)].

4.3.2. Photozyklus der [LOV1](#)-Domäne

Der Signalzustand [LOV1-390](#)

Zur Überprüfung einer intakten [LOV1](#)-Domäne wurden Absorptionsspektren vor und nach Belichtung aufgenommen. Es zeigte sich, dass nach Belichtung für eine 1 s mit zwei [LEDs](#) bei $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$ und 300 mW Leistung das Dunkelspektrum [LOV1-447](#) nahezu vollständig verschwindet und eine neue Bande mit einem Maximum bei 390 nm entsteht (siehe Abbildung 4.2). Dieses Spektrum konnte in vielen anderen [LOV](#)-Domänen, die in Photorezeptoren anderer Organismen vorkommen, ebenfalls beobachtet werden [siehe auch Referenzen in [LG11](#)]. Es wird dem Signalzustand der [LOV](#)-Domänen ([LOV1-390](#)) zugeordnet und umfasst strukturell die Ausbildung eines kovalenten Addukts zwischen dem Schwefelatom des in unmittelbarer Nähe befindlichen Cysteins (Cys-57 in [LOV1](#) aus [C.r.](#)) und dem C(4a) des [FMN](#) sowie eine Protonierung des N(5) am [FMN](#) [[Sal+00](#); [Sal+01](#); [CM02](#); [Fed+03](#)]. Festzuhalten bleibt, dass das Absorptionsspektrum des Addukts im Bereich von 350 bis 500 nm nur eine einzige unstrukturierte Bande aufweist. Bei Wellenlängen größer 500 nm sind die Extinktionskoeffizienten sowohl des Dunkel- als auch des Lichtzustands nahezu Null.

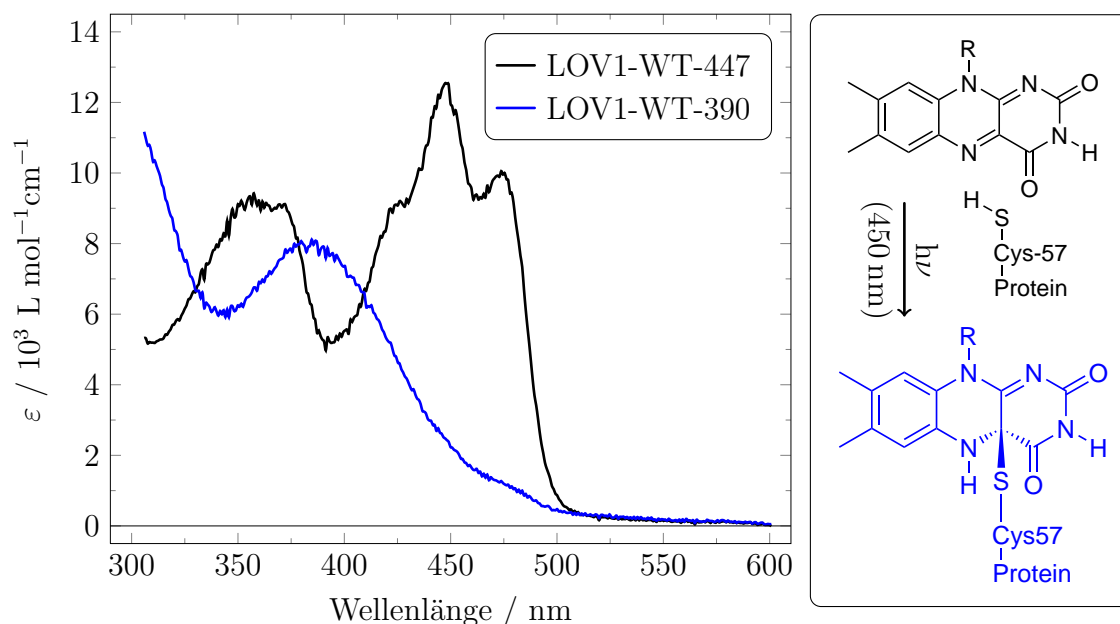


Abb. 4.2.: Vergleich der Absorptionsspektren des LOV1-WT vor und nach der Belichtung für eine 1 s mit zwei LEDs bei $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$ und 300 mW Leistung. Die Probe war gelöst in 10 mM Natriumphosphat-Puffer bei pH = 8.0 und 10 mM NaCl. Die Spektren wurden entsprechend der Extinktion des reinen FMN bei 445 nm skaliert ($\epsilon_{445 \text{ nm}} = 12500 \text{ L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ [Mac99]).

Der Zerfall des Signalzustands in die Dunkelform erfolgt vollständig auf einer Zeitskala von mehreren Minuten. Die Zerfallskinetik des LOV1-390 ist nicht mono-exponentiell, was auf ein inhomogenes System hindeutet [Kut+08]. In Arbeiten an anderen LOV-Domänen konnte eine pH-Abhängigkeit wie auch ein Deuterium-Effekt innerhalb des Addukt-Zerfalls beobachtet werden [Kot+03; ZVC09]. Dies deutet daraufhin, dass der PT vom N(5) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Dunkelreaktion ist. In den Mutanten LOV1-C57G und LOV1-C57S wird nach Belichtung bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ das Addukt nicht erzeugt, wie aus anderen Untersuchungen bereits zu erwarten war [Hol+02; Lan+10].

Der Singulett-Zustand in LOV1

Es wurde weiter der Singulett-Zustand der LOV1 Domäne untersucht. Dieser ist der erste Schritt innerhalb des Photozyklus nach Photoanregung. Mittels dem TCSPC-Verfahren wurden die Fluoreszenzlebensdauern bestimmt. Die Resultate sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Für das freie FMN als Vergleichssystem wurde eine Lebensdauer von 4.7 ns bestimmt (Literaturwert von $\tau_{\text{FL}} = (5.1 \pm 0.2) \text{ ns}$ [HPH05]). Ist das FMN in der LOV1-Domäne eingebaut, ohne dass sich nach Photoanregung ein Addukt bilden kann, wie es

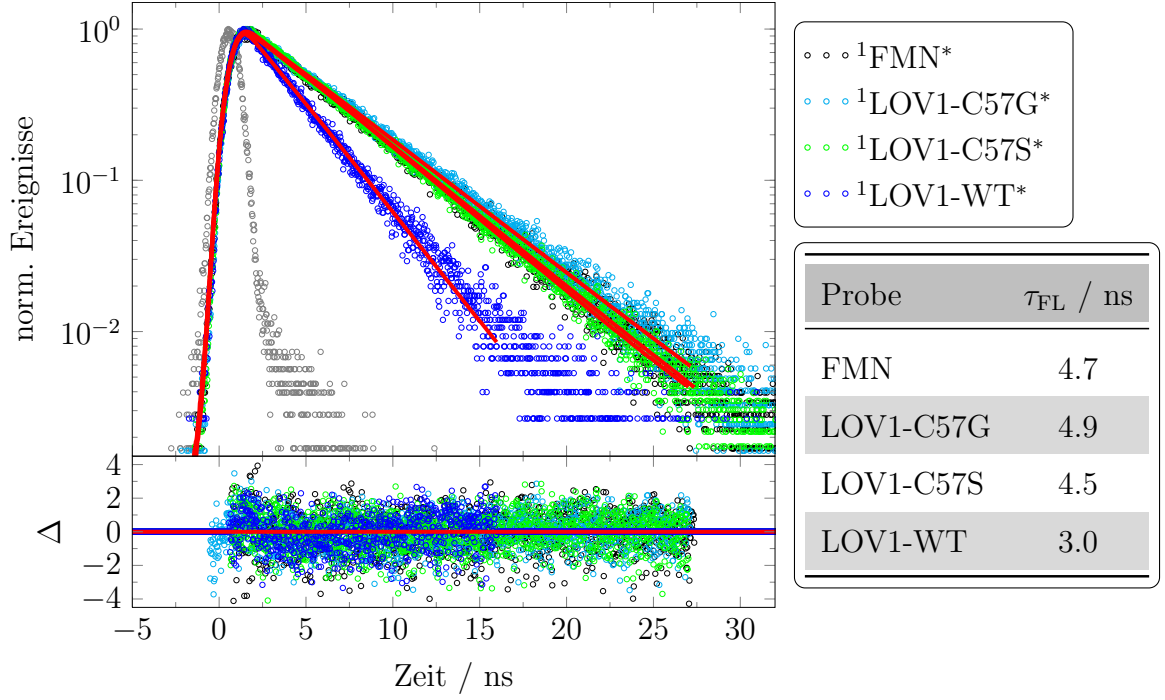


Abb. 4.3.: **Oben:** Fluoreszenzabklingkurven von FMN, LOV1-WT, LOV1-C57G und LOV1-C57S in 10 mM Natriumphosphat-Puffer mit 10 mM NaCl. Die Anregung erfolgte bei 450 nm bei einer zeitlichen Halbwertsbreite von 1.1 ns. Die Abklingkurven sind durch offene Kreise entsprechend der Legende rechts oben, die Apparatefunktion ist durch graue offene Kreise und die mono-exponentiellen Fits sind durch rote durchgezogene Linien dargestellt. Die Lebensdauern aus den Fits sind in der Tabelle unten rechts eingetragen. **Unten:** Residuen gewichtet mit $\sqrt{N_i}$, wobei N_i die Anzahl der Ereignisse des Kanals i ist.

in den Mutanten LOV1-C57G und LOV1-C57S der Fall ist, zeigen sich nur minimale Abweichungen in den Lebensdauern verglichen mit dem freien FMN. Die Fluoreszenzlebensdauern von LOV1-C57S und LOV1-C57G wurden bestimmt zu 4.5 ns (Literaturwert von $\tau_{\text{FL}} = (4.6 \pm 0.2) \text{ ns}$ [Hol+02]) und 4.9 ns. Messungen am Wildtypen zeigten, dass die Fluoreszenzlebensdauer sich auf 3 ns (Literaturwert von $\tau_{\text{FL}} = (2.9 \pm 0.2) \text{ ns}$ [Hol+02]) verkürzt, wenn das Cystein-57 innerhalb der LOV1-Domäne vorhanden ist. In der Gruppe von Herrn Prof. Dr. A. Penzkofer wurden zusätzlich die Fluoreszenzquantenausbeuten des LOV1-WT, des LOV1-C57S und des freien FMN bestimmt [Hol+02; HPH05]. Sie fanden Werte von $\Phi_{\text{FL}}^{\text{WT}} = 0.17 \pm 0.03$, $\Phi_{\text{FL}}^{\text{C57S}} = 0.30 \pm 0.01$ und $\Phi_{\text{FL}}^{\text{FMN}} = 0.23 \pm 0.02$. Aus den Lebensdauern und den Fluoreszenzquantenausbeuten lassen sich die jeweilige Lebensdauer für den radiativen Zerfall bestimmen zu $\tau_{\text{rad}}^{\text{WT}} = 17.6 \text{ ns}$, $\tau_{\text{rad}}^{\text{C57S}} = 15.0 \text{ ns}$ und $\tau_{\text{rad}}^{\text{FMN}} = 20.4 \text{ ns}$. Die Lebensdauern für den radiativen Zerfall sind im Rahmen der Messgenauigkeit alle in etwa gleich groß. Zum einen kann daraus geschlossen werden, dass die Photophysik der Mutante LOV1-C57S im Grunde der des freien FMN ent-

spricht. Zum anderen zeigt dies, dass im Wildtypen zusätzliche nicht strahlende Prozesse die Relaxation des angeregten Singulett-Zustands beschleunigen. Da im Wildtypen das Schwefelatom des Cystein-57 in etwa 4.1 Å zum C(4a) des FMN vorliegt [Fed+03], ist ein Schweratomeffekt, der die ISC-Rate erhöht, eine sehr wahrscheinliche Erklärung für den zusätzlichen Quench-Prozess [Hol+02]. Ein effizientes ISC für das LOV1-WT wurde bereits nachgewiesen [Kot+03].

Modellsystem: FMN und MBA in Lösung

Zuerst sei der freie Chromophor FMN mit und ohne Zugabe eines Elektronendonors als ein Modellsystem betrachtet. Auf diese Weise sollten Spektren von potentiellen Intermediaten charakterisiert werden können, die auch während des Photozyklus in der LOV1-Domäne auftreten können. Als Elektronendonor wurde das MBA verwendet, da es im Rahmen dieser Arbeit bereits einen effizienten eT zum Flavinderivat RFTA zeigte (siehe Abschnitt 3). In Abbildung 4.4 sind die 2D-TA-Datensätze für die Systeme FMN und FMN plus MBA dargestellt. Neben dem starken Laser- und Fluoreszenzsignal (weißer Bereich (A)), welches die Zeitauflösung des Experimentes widerspiegelt, ist in den Daten nach der Anregung eine deutliche positive Absorption zum einen im Bereich von 300 bis 410 nm und zum anderen im Bereich von 500 bis 750 nm zu finden. Im Bereich von 410 bis 500 nm ist das GSB zu erkennen. Die Daten konnten global mit einem bi-exponentiellen Modell gefittet werden. Dabei wurde der Bereich der schnellen Fluoreszenz in der Summe der kleinsten Fehlerquadrate nicht mitberücksichtigt. Es wurden die in Abbildung 4.4 (C) dargestellten DADS mit Lebensdauern von $\tau_1 = 3.1 \mu\text{s}$ (schwarze Linie) und $\tau_2 \gg 10 \mu\text{s}$ (rote Linie) erhalten. Das DADS zu $\tau_1 = 3.1 \mu\text{s}$ zeigt eine positive Bande bei 395 nm und langwellig von 500 nm eine weitere breite Absorptionsbande mit drei lokalen Maxima bei 522, 664 und 720 nm. In diesem DADS erkennt man deutlich die charakteristische Form publizierter Triplet-Spektren ähnlicher Flavinderivate [HPP79; ST96; Mel+99]. Das zweite DADS mit einer Lebensdauer, die in größer als das Messzeitfenster ist, besitzt positive Banden bei etwa 350 nm und eine breite Bande im Bereich von 500 bis 600 nm. Ein Vergleich mit der Literatur lässt diese Charakteristika dem neutralen Flavinradikal $^2\text{FMNH}^\bullet$ zuordnen [HPP79]. Für das RFTA wurde in dieser Arbeit bereits gezeigt, dass die Extinktionskoeffizienten des $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ im Bereich von 600 nm und des $^3\text{RFTA}$ im Bereich von 700 nm in etwa gleich sind (siehe Kapitel 3). Unter dieser Annahme lässt sich grob Abschätzen, dass zu etwa 2 % aus dem

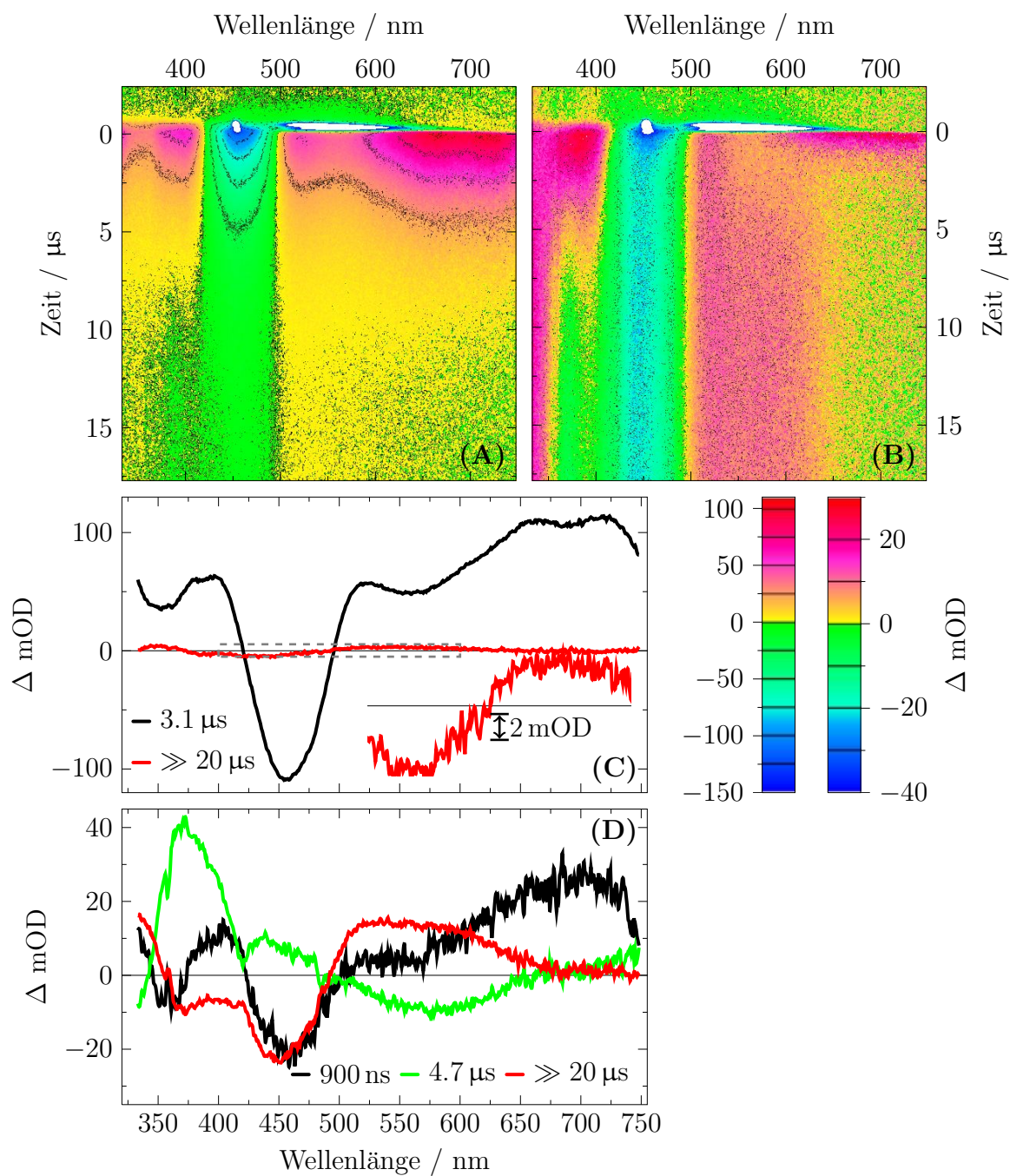


Abb. 4.4.: Vergleich der 2D-TA-Daten zwischen FMN (A) und FMN plus MBA (B) in 10 mM Natriumphosphat-Puffer mit 10 mM NaCl bei pH = 8.0 nach Anregung bei 450 nm. Die Resultate der globalen Fits mit zwei Exponentialfunktionen sind in (C) für FMN und in (D) für FMN plus MBA dargestellt.

Triplett-Zustand auch das Neutralradikal über eine Triplett-Triplett Annihilations gebildet wird. Betrachtet man nun das FMN nach Zugabe von 50 mM an MBA, zeigt sich eine veränderte Dynamik im Vergleich zum freien FMN alleine (Abbildung 4.4 (B)). Erstens ist die Amplitude des Triplett-Zustands deutlich reduziert und auch die Lebensdauer dieser Bande ist kürzer. Zweitens entstehen mit dem Zerfall der Triplett-Absorption zwei neue Banden bei etwa 370 nm und 510 nm. Und drittens zerfallen die intermediär gebildeten Banden in einem Zeitbereich von 10 μ s wieder und es entsteht eine breite Bande im Bereich von 500 bis 600 nm. Im Bereich der GZ-Absorption bei 450 nm bleibt das Signal konstant und im Bereich von 350 bis 400 nm nimmt es wieder negative Werte an. Diese Daten können in einem globalen Fit mit Exponentialfunktionen gut beschrieben werden. Daraus ergeben sich drei DADS zu $\tau_1 = 900$ ns, $\tau_2 = 4.7$ μ s und $\tau_3 \gg 20$ μ s. Diese sind in Abbildung 4.4 (D) dargestellt. Es ergibt sich ein ähnliches Bild, wie es bereits bei den Messungen an RFTA und MBA beobachtet wurde. Nach Bildung des Triplett-Zustands wird dieser im Vergleich ohne MBA gelöscht. Das DADS zu $\tau = 900$ ns zeigt eine negative Bande bei 350 nm und eine reduzierte Amplitude im Bereich von 510 nm gegenüber dem DADS, das aus dem Datensatz ohne MBA erzeugt wurde. Im DADS zu $\tau = 4.7$ μ s werden die Beiträge der Spezies, die mit dem Triplett-Zerfall entstanden sind dann deutlicher. Man erkennt eine deutlich positive Bande bei etwa 370 nm und eine zusätzliche positive Bande bei etwa 450 nm. Die Bandenform bei 370 nm deutet auf das $^2\text{FMN}^{\bullet-}$ hin. Es erfolgt demnach über einen eT vom MBA zum FMN die Bildung des Radikalionenpaares $^2\text{FMN}^{\bullet-}$ und $^2\text{MBA}^{\bullet+}$. Der Beitrag des $^2\text{MBA}^{\bullet+}$ bei etwa 450 nm wird nicht deutlich, da das Spektrum vom $^2\text{FMN}^{\bullet-}$ überlagert wird (siehe Kapitel 3). Das Radikalionenpaar zerfällt schließlich über einen PT mit 4.7 μ s und es wird das Radikalpaar $^2\text{FMNH}^{\bullet}$ und $^2\text{MBA}^{\bullet}$ gebildet. Das $^2\text{MBA}^{\bullet}$ absorbiert in diesem Spektral Bereich nicht. Das Entstehen des $^2\text{FMNH}^{\bullet}$ kann an der negativen Bande des DADS zu $\tau = 4.7$ μ s im Bereich von 500 bis 600 nm erkannt werden. Der PT ist nahezu vollständig, da man keinen merklichen Rückgang des GSB im Bereich um 450 nm beobachtet. Das letzte DADS zu $\tau \gg 20$ μ s weist schließlich die Differenz zwischen dem Neutralradikal-Spektrum und dem GZ-Spektrum auf. Dass im Fall freien FMNs nur das $^2\text{FMNH}^{\bullet}$ beobachtet wird, nicht aber andere Intermediate, die man für eine Triplett-Triplett-Annihilation erwarten würde, z.B. in Form von $^2\text{FMN}^{\bullet-}$ und $^2\text{FMN}^{\bullet+}$, lässt sich mit einer zu geringen transienten Konzentration der Intermediate gemäßen einer abgeschätzten Gesamtumsetzung von etwa 2 % begründen.

Triplett-Zerfall in LOV1

Um einen zusätzlichen Vergleich zum Photozyklus der LOV1-Domäne vornehmen zu können, wurde der verkürzte Photozyklus der Mutante LOV1-C57S untersucht. Im Vergleich zu der Messung von freiem FMN zeigten sich bei der LOV1-C57S Mutante sehr ähnliche spektrale Charakteristika eines Triplett-Spektrums und eines Neutralradikal-Spektrums des FMN. Die Signale im LOV1-C57S konnten gegenüber der Messung an freiem FMN über einen längeren Zeitbereich bis hin zu 200 μs beobachtet werden (siehe Abbildung 4.5 (B)). Der Datensatzes konnte mit zwei Exponentialfunktionen gut beschrieben werden. Es ergaben sich DADS zu $\tau_1 = 28 \mu\text{s}$ zu $\tau_2 \gg 200 \mu\text{s}$. Diese sind in Abbildung 4.5 (D) dargestellt. Das DADS mit der kürzeren Lebensdauer kann wie schon beim freien FMN dem Triplett-Zustand des FMN zugeordnet werden. Ebenfalls kann das DADS zu $\tau_2 \gg 200 \mu\text{s}$, wie beim FMN in Lösung, dem Neutralradikal des FMN zugeordnet werden. Für die LOV1-C57S Mutante wurden in früheren Arbeiten eine bi-exponentielle Kinetik mit Lebensdauer von 3 μs (25 %) und 27 μs (75 %) beobachtet [Kot+03; Bau+11]. Die Kinetik wurde mono-exponentiell sobald das Lösungsmittel zuvor entgast wurde durch Durchleiten von N_2 oder Xe. Die schnelle Komponente im Zerfall des Triplett-Zustands wurde in diesen Messungen jedoch nicht beobachtet. Stattdessen wurde ein zusätzliches Intermediat mit einer Extinktion im Bereich von 500 bis 600 nm zu einem geringen Anteil bezogen auf die Triplett-Amplitude beobachtet. Bei einer Annahme ähnlicher Extinktionskoeffizienten der beiden Spezies in ihren Maxima kann abgeschätzt werden, dass etwa 2 % der Triplett-Zustände ein Neutralradikal ausbilden. Dies ist im Einklang mit der Beobachtung aus NMR Studien an der LOV1-C450A Mutante aus *Avena sativa* (A.s.) Phototropin-1 [Eis+08], sowie aus *photochemically induced dynamic nuclear polarization* (photo-CIDNP) Studien an der LOV1-C450A Mutante aus *Avena sativa* Phototropin-1 in Lösung [Ric+05] und an der LOV1-C57S Mutante aus C.r. im Festkörper [Tha+10]. Es wurde ein eT von einem Tryptophan (Trp-W557 in LOV1-C450A und Trp-98 in LOV1-C57S) zum FMN beobachtet, welches sich in einem großen Abstand an der Oberfläche der jeweiligen LOV-Mutante befindet. Es wurde ebenfalls eine sehr geringe Effizienz beobachtet, was mit dem großen Abstand zu erklären ist.

Die Beobachtung des Neutralradikals mag in früheren spektroskopischen Arbeiten übersehen worden sein. Es bleibt jedoch der Widerspruch mit dem bi-exponentiellen Abklingverhalten des Triplett-Zustands. Die Triplett-Lebensdauer des FMN beträgt 3 μs ,

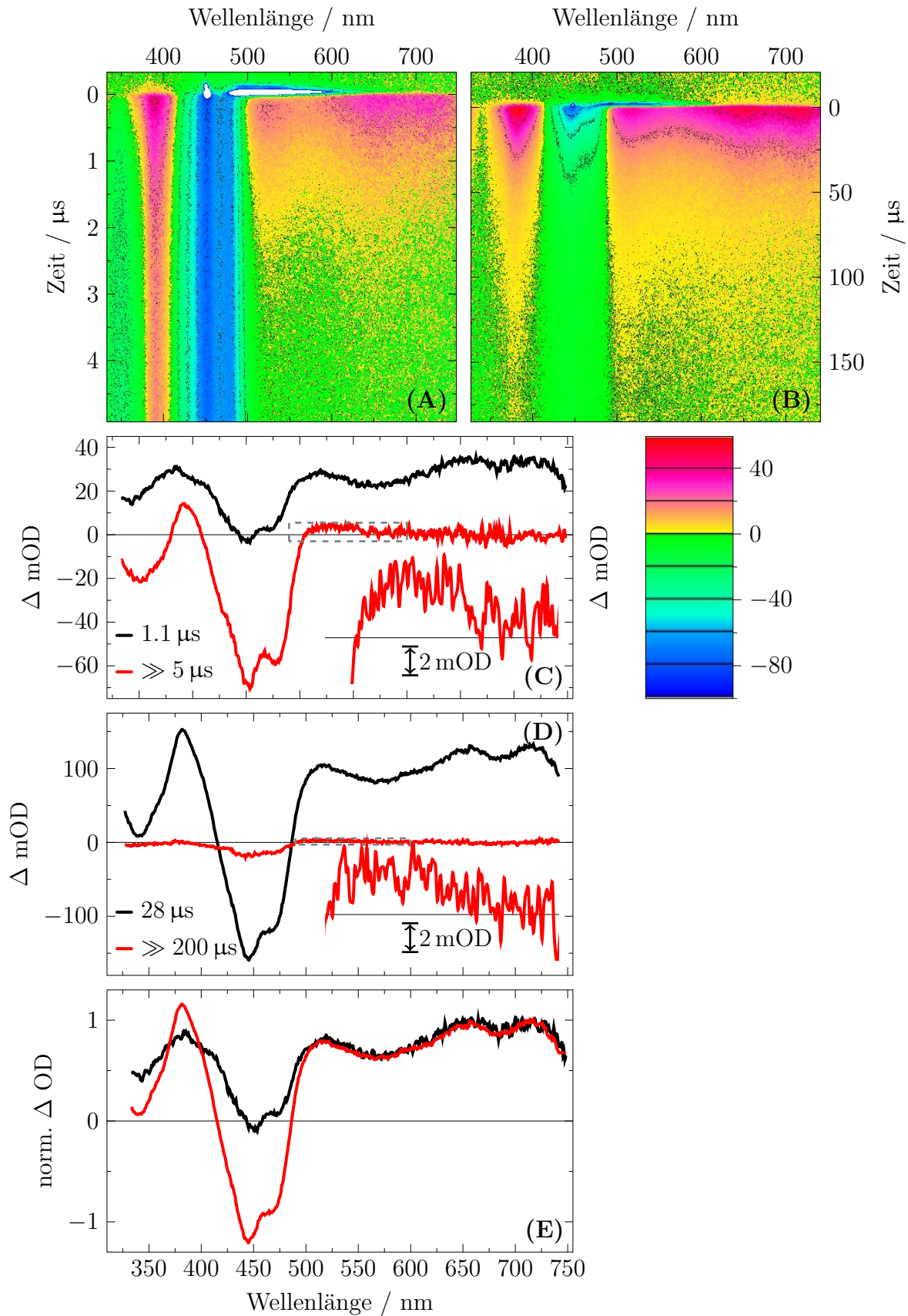


Abb. 4.5.: Vergleich der 2D-TA-Daten zwischen LOV1-WT (A) und LOV1-C52S (B) in 10 mM Natriumphosphat-Puffer mit 10 mM NaCl bei pH = 8.0 nach Anregung bei 450 nm. Resultate der globalen Fits mit zwei Exponentialfunktionen sind in (C) für LOV1-WT und in (D) für LOV1-C52S dargestellt. In (E) sind die DADS mit den jeweiligen kürzeren Lebensdauer normiert auf die Bande bei 710 nm dargestellt.

wenn es im gleichen Puffer gelöst ist wie die [LOV1-C57G](#) Mutante. Dies lässt vermuten, dass es sich bei der 3 μ s-Komponente um freies nicht gebundenes [FMN](#) handelt, das neben dem Protein mit vorliegt. Dies wird weiter unterstützt durch die Tatsache, dass diese Komponente verschwindet, sobald die Probe zuvor entgast wurde. Weiter ist auch anzunehmen, dass molekularer Sauerstoff nicht zu großen Anteilen in die Proteintasche hinein diffundiert, und dass somit die Lebensdauer von 28 μ s dem nicht durch molekularen Sauerstoff gequenchten Triplett-Zerfall widerspiegelt. Messungen an [RFTA](#) in entgaster [AcN](#)/ H_2O (50:50- v/v) Lösung zeigten neben bi-molekularen Prozessen auch eine intrinsische Lebensdauer von 25 μ s, was diese Annahme weiter unterstützt (siehe Kapitel 3).

Unter dem Hintergrund, dass in der transienten Absorption an [LOV1-C57S](#) bereits ein Neutralradikal beobachtet wurde, sollte im Wildtypen die Effizienz eines [eT](#) deutlich erhöht werden, da das Cystein-57 mit etwa 4.1 Å zum C(4a) des [FMN](#) näher dran liegt. Die transienten Absorptionsspektren sind in Abbildung 4.5 (A) dargestellt. Es werden im Vergleich zum [LOV1-C57S](#) ebenfalls die Signatur des Triplett-Zustands beobachtet. Die Lebensdauer ist im Wildtypen jedoch deutlich verkürzt, da die Signale im Bereich von 500 bis 750 nm innerhalb von 3 μ s nahezu abgeklungen sind. Im Bereich von 390 nm hat zum einen der Triplett-Zustand eine hohe Extinktion wie auch der zu erwartende Signalzustand in Form des Addukts. In diesem Bereich nimmt die Amplitude ebenfalls wie die breite Bande des Triplett-Zustands ($\lambda > 500 \text{ nm}$) binnen 3 μ s bis auf ein in diesem Zeitbereich konstantes Niveau von 14 mOD ab. Dieses konstante Signal bei 390 nm kann dem Signal-Zustand [LOV1-390](#) zugeordnet werden. Des Weiteren ist in diesen Daten zu erkennen, dass alle Signale in ihrer Intensität abnehmen oder über den Zeitbereich hinweg konstant bleiben. Es werden keine ansteigenden Signale beobachtet. Ein globaler Fit mit zwei Exponentialfunktionen lieferte eine gute Beschreibung der Dynamik. Die entsprechenden [DADS](#) zu $\tau_1 = 1.1 \mu$ s und zu $\tau_2 \gg 5 \mu$ s sind in Abbildung 4.5 (C) dargestellt. Das [DADS](#) zu $\tau_1 = 1.1 \mu$ s ist im Bereich langwelliger als 500 nm identisch zu dem Spektrum, das aus den Daten für das [LOV1-C57S](#) gewonnen wurde. Die Bandenform bei etwa 380 nm unterscheidet sich jedoch zum reinen Triplett-Spektrum. Im Wildtypen ist diese Bande zum einen breiter als im [LOV1-C57S](#). Zum anderen ist diese Bande im Wildtypen in etwa gleich intensiv zu der Bande bei 510 nm, während im [LOV1-C57S](#) diese Bande um den Faktor von etwa 1.5 intensiver ist im Vergleich zur Bande bei 510 nm. Zudem ist der [GSB](#) im Bereich von 450 nm im [DADS](#) zu $\tau_1 = 1.1 \mu$ s deutlich reduziert und gibt einen positiven Beitrag. Diesem Spektrum kann entnommen werden, dass der

Triplett-Zustand in eine Spezies zerfällt, die bei etwa 380 nm absorbiert und im Bereich des GSB kaum noch absorbiert. Die Spezies, in die der Triplett-Zustand zerfällt, kann demnach dem Addukt-Zustand zugeordnet werden. Das Addukt-Spektrum hat im Bereich von etwa 450 nm im Vergleich zur GZ-Bande nur eine sehr geringe Extinktion. Wird dies berücksichtigt und zudem die Beobachtung, dass das Signal im Bereich des GSB konstant bleibt, lässt sich daraus schließen, dass der Triplett-Zustand nahezu vollständig in das Addukt konvertiert. Das Addukt-Spektrum wird im DADS zu $\tau_2 \gg 5 \mu\text{s}$ mit einer deutlichen Bande bei 390 nm sichtbar. Es zeigt sich in diesem DADS aber noch eine zusätzliche Bande im Bereich von 500 bis 600 nm, wie schon zuvor beim LOV1-C57S. Diese Bande kann auch hier dem Neutralradikal zugeordnet werden. Vergleicht man auch hier das Amplitudenverhältnis von der Triplett- und der Neutralradikal-Bande in ihren Maxima, lässt sich daraus abschätzen, dass auch zu etwa 13 % das Neutralradikal gebildet wird. Dieser Anteil ist deutlich größer als es im LOV1-C57S beobachtet wurde. Erklärt werden kann dies durch unterschiedliche Konformere des Cystein-57 innerhalb der LOV1-Domäne. Es scheint, dass etwa 13 % der Cysteine sich in einer sterisch ungünstigen Position für eine Adduktbildung befinden, jedoch nahe genug sind für einen schnellen eT gefolgt von einem PT oder einem H-Atom-Transfer, so dass dieses Intermediat als Nebenprodukt beobachtet werden kann. Unterstützt werden kann dies durch eine theoretische Arbeit, in der Molekular Dynamik (MD)-Simulationen an der LOV2-Domäne aus *Adiantum capillus-veneris* durchgeführt und mit den Kristallstrukturdaten der LOV1-Domäne aus C.r. verglichen wurden [NS04]. Die Rechnungen ergaben, dass drei unterschiedliche Konformere des reaktiven Cysteins A, B und C vorliegen. Die Konformere A und B wandeln sich dabei auf einer ps-Zeitskala in einander um, während Konformer C, wenn es einmal gebildet ist für mehrere ns stabil bleibt. Durch die Beobachtung des Neutralradikals lässt sich schließen, dass ein radikalischer Mechanismus sehr wahrscheinlich ist. Im kurzen Zeitbereich des Triplett-Zerfalls konnte kein Signal eines anderen Intermediates beobachtet werden, so dass für die Schritte des eT und des PT oder eines H-Atom-Transfers einer Lebensdauer von $< 1 \mu\text{s}$ anzunehmen ist. Interessant wäre zu beobachten, ob das Radikalpaar, welches sich als Nebenprodukt bildet, auf einer längeren Zeitskala zum Addukt rekombiniert. Dieses wäre ein zusätzlicher Beweis für unterschiedliche Konformere des Cysteins-57, die durch eine höhere Energiebarriere von einander getrennt sind. Im Rahmen dieser Arbeit ist dies leider nicht mehr verfolgt worden.

Ausgehend von den Beobachtungen aus den transienten Absorptionsspektren der

LOV1-Domäne und der Mutante LOV1-C57S wird der in Abbildung 4.6 dargestellte Photozyklus postuliert werden. Nach Photoanregung des GZ wird der Singulett-Zustand

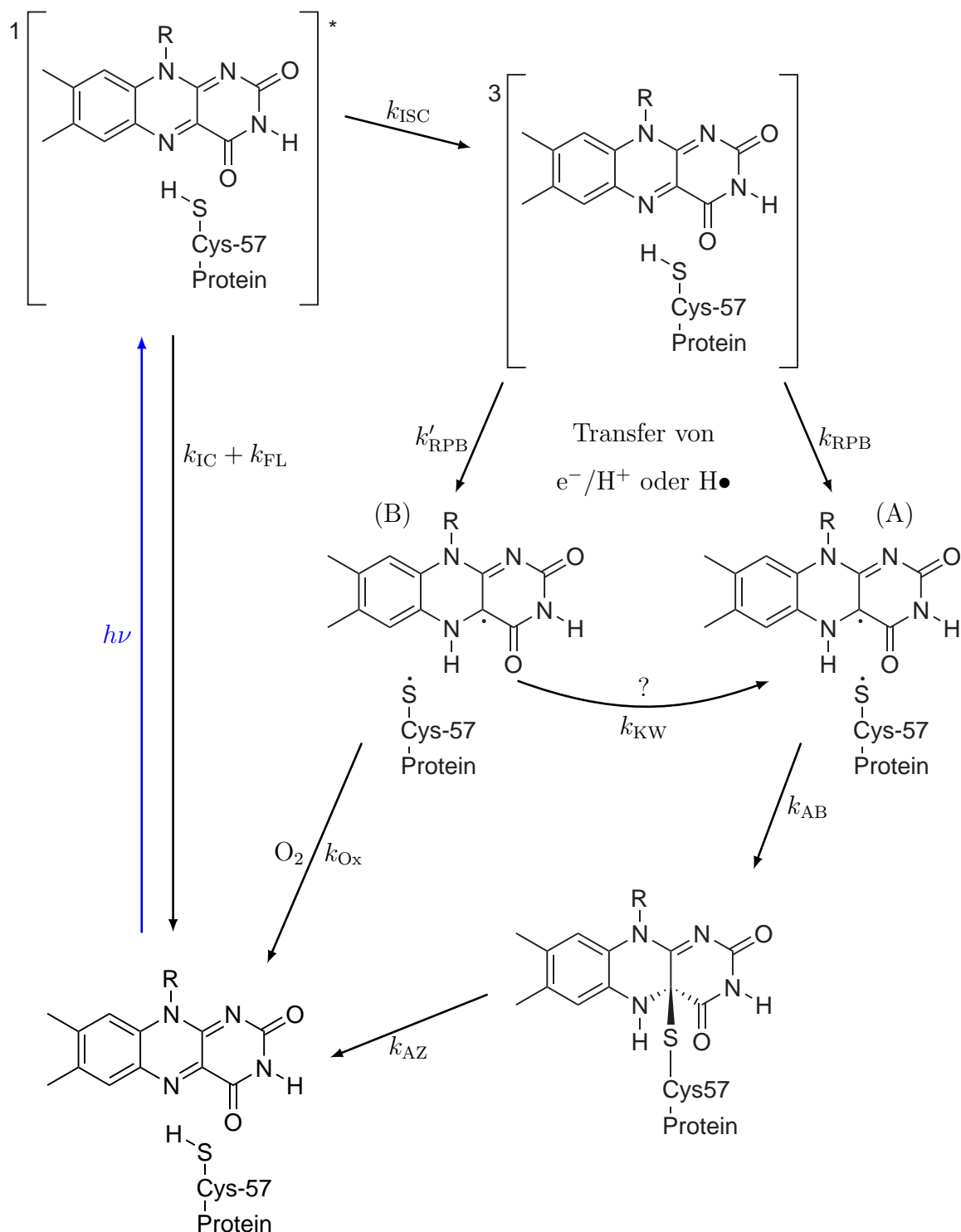


Abb. 4.6.: Postulierter Photozyklus der LOV1-Domäne aus C.r.. Die einzelnen Schritte sind im Text beschrieben.

erzeugt. Dieser zerfällt zum Teil in den GZ zurück mit $k_{IC} + k_{FL}$ und zum Teil über k_{ISC} in den Triplett-Zustand. Der Triplett-Zustand wird nahezu vollständig über Transfer-

Reaktionen eines e^- gefolgt von einem H^+ oder von einem $H\bullet$ gelöscht. Die Transfer-Reaktionen erfolgen von zwei unterschiedlichen Konformeren des Cystein-57 heraus und es entstehen zwei Radikalpaare in zwei unterschiedlichen Konformeren zu etwa 87 % (A) und 13 % (B). Das Haupt-Radikalpaar (A) bildet mit k_{AB} ($\tau = 1.1 \mu s$) vollständig die Addukt-Spezies, während das Radikalpaar (B) auf einem Zeitbereich von $> 5 \mu s$ stabil bleibt. Es kann vermutet werden, dass das Radikalpaar (B) entweder durch O_2 zurück in den GZ katalysiert wird, oder durch einen Konformationswechsel mit k_{KW} in das Radikalpaar (A) übergeht, welches wieder das Addukt bildet. Das Addukt zerfällt schließlich mit k_{AZ} in einer thermisch aktivierten Reaktion zurück in den GZ.

5. Einflusses der Adduktbildung auf die Signalweiterleitung in LOV-Domänen



5.1. Einleitung

Lebende Organismen in einer sich ständig ändernden Umgebung sind für ihr Überleben darauf angewiesen, externe Impulse empfangen und entsprechend darauf reagieren zu können. Diese Aufgabe übernehmen Proteine, die zum einen aus einer „Eingangs-“ oder Sensordomäne und zum anderen aus einer „Ausgangs-“ oder Effektordomäne aufgebaut sind [PN03]. Sensordomänen sind dabei auf Signale sensitiv, wie z.B. Absorption von Licht oder Bindung eines Liganden. Die Effektordomänen hingegen besitzen eine biologische Aktivität, welche z.B. katalytisch sein kann. Auch kann sich die Aktivität darin äussern, dass die Effektordomäne eine Affinität zur Bindung von DNA bekommt. Die Aktivität der Effektordomäne kann dabei durch die Wechselwirkung zwischen der Sensor- und Effektordomäne allosterisch reguliert werden.

Möglich *et al.* haben an einem Beispiel gezeigt, dass die Sensor- und Effektordomänen als modulare Untereinheiten betrachtet werden können. In ihrer Arbeit tauschten sie die Häm bindende PAS Sensordomäne des FixL aus *Bradyrhizobium japonicum*, welche die Aktivität ihrer Histidinkinase abhängig vom Sauerstoffgehalt reguliert [GGDH91], mit der LOV Sensordomäne aus *Bacillus subtilis* YtvA aus, welche Blaulicht gesteuert eine durch den allgemeinen Stressregulator σ^B kontrollierte Übertranskription von Promotern verursacht. Das resultierende artifizielle Fusionsprotein YF1 zeigte in vitro keine sauerstoffabhängige sondern eine blaulichtabhängige Regulierung der Kinaseaktivität in vitro. Die Aktivität wie auch die Substrataffinität blieben dabei vergleichbar zum natürlichen FixL. Des Weiteren konnten sie demonstrieren, dass der Aufbau der Linkerregion zwischen der PAS Sensor- und der Histidinkinase Effektordomäne kritisch ist für Kinaseaktivität und deren Regulierung durch Blaulicht [MAM09].

Ausgehend von dem in [MAM09] beschriebenen Aktivitätstest soll mit dieser Arbeit nun eine weitere Erkenntnis in Hinblick auf die Signalweiterleitung von einer LOV-Domäne auf eine verknüpfte Effektordomäne erzielt werden. Die Fragestellung zielt auf die Natur des unmittelbar nach Photoanregung gebildeten Signalzustands der LOV-Domäne. Dieser Signalzustand besitzt in bisher allen untersuchten LOV-Domänen eine kovalente Bindung zwischen dem C(4a) Atom am Flavon zu einem in allen LOV-Domänen konservierten Cystein [Bri07; CRM03]. Das photochemisch gebildete Cysteinyladdukt ist im Flavonringsystem leicht gewinkelt und übt einen mechanischen Zug auf das Proteinrückgrat aus [CM02; Fed+03]. In der Literatur wird auf der Basis von Kri-

stalldaten die Signalweiterleitung innerhalb einer **LOV**-Domäne diskutiert. In [CRM03] wird z.B. die Beeinflussung einer Salzbrücke zwischen einem Glutamat und einem Lysin an der Oberfläche der **LOV**-Domäne durch die Ausbildung des Cysteinyladdukts als die potentielle Strukturänderung bei der Signalweiterleitung postuliert.

In dieser Arbeit soll die Frage untersucht werden, ob allein die Ausbildung eines Cysteinyladduktes, ohne gleichzeitige Bindung zum Proteinrückgrat, essentiell für die Weiterleitung eines Signals zur Aktivierung einer Effektdomäne ist, oder ob der mechanische Zug durch die Cysteinyladduktbildung zusätzlich erforderlich ist. Zu diesem Zweck soll ausgenutzt werden, dass eine **LOV**-CG-Mutante, in der das reaktive Cystein gegen ein Glycin ausgetauscht wurde, in Gegenwart von Methylthiol eine blaulichinduzierte Photoreaktion zu einem Methylthiolylladdukt eingeht, das nicht an das Proteinrückgrat gebunden ist [Lan+10]. Verwendet man diese CG-Mutante in Gegenwart von Methylthiol statt des Wildtyps im Aktivitätstest, so sollte sich im Vergleich von Licht- und Dunkelzustand klären lassen, ob die mechanische Spannung im Lichtzustand des Wildtyps für die Signalweiterleitung wesentlich ist.

5.1.1. Der Aktivitätstest

Im Folgenden wird der Aktivitätstest nach Möglich *et al.* kurz skizziert. Dazu wird mit einer Beschreibung der einzelnen Untereinheiten YtvA und FixL, welche schließlich zu YF1 fusioniert wurden, begonnen. Abschließend wird das Reaktionschema, welches auf dem des FixL basiert, kurz eingegangen.

Bacillus subtilis YtvA

YtvA besteht N-terminal aus einer **LOV** Sensordomäne und C-terminal aus einer STAS (Sulfate Transport Antisigma factor antagonist) Effektdomäne. Beide Domänen sind verknüpft über eine α -helikale Linkersequenz, die $J\alpha$ genannt wird. Der Signalzustand der **LOV**-Domäne ist das photochemisch gebildete Cysteinyladdukt (kovalente Bindung zwischen dem C(4a) Atom am **FMN** zum Cystein 62). Die Lebensdauer dieses Addukts beträgt etwa 1 h bei Raumtemperatur. Die exakte biochemische Rolle von STAS ist bisher nicht bekannt. YtvA zeigte bislang nur blauchtgesteuert eine durch den allgemeinen Stressregulator σ^B kontrollierte Übertranskription von Promotern [Los+02; AK00; Sal+01; Akb+01].

Bradyrhizobium japonicum FixL

FixL besitzt 2 N-terminale Häm bindende **PAS** Sensordomänen als Sauerstoffsensoren. C-terminal befindet sich eine Histidinkinase Effektor-domäne, die den Phosphoakzeptor (DHp) und die katalytisch aktive Untereinheit (CA) beinhaltet. Es bildet zusammen mit dem *Response Regulator* FixJ ein Zweikomponentensystem, das die Expression von Proteinen reguliert, die an der microaeroben Atmung, am Stickstoffkreislauf und an der Stickstofffixierung beteiligt sind [Fis94; Gon+98; KM05].

Artifizielles YF1

Möglich *et al.* konstruierten das Fusionsprotein bezüglich eines auf Strukturen basierenden Sequenzvergleiches zwischen der **PAS** und der **LOV**-Sensordomäne aus YtvA und FixL. Abbildung 5.1 zeigt die schematischen Strukturen von YtvA, FixL und YF1 aus Möglich *et al.* [MAM09].

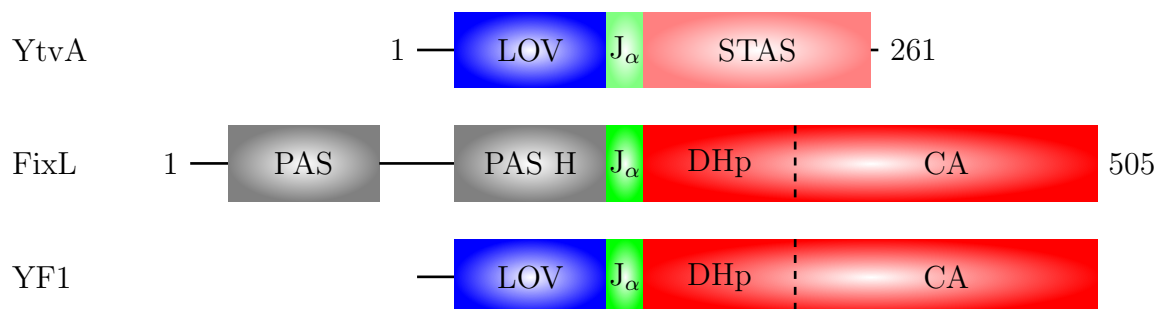


Abb. 5.1.: Schematische Strukturen von YtvA, FixL und YF1 aus Möglich *et al.* [MAM09]. YtvA umfasst N-terminal eine **LOV**-Sensor- und C-terminal eine **STAS**-Effektor-domäne, die über den Linker J_α verknüpft sind. FixL besitzt zwei **PAS**-Domänen, wobei die zweite (**PAS H**) Häm bindet, und eine Histidinkinase mit den Phosphoakzeptor- (DHp) und katalytisch aktiven (CA) Untereinheiten. Die Fusionskinase YF1 wurde durch Verlinkung der YtvA **LOV**-Domäne mit der FixL Histidinkinase über die J_α von FixL erzeugt.

Mechanismus der Phosphorylierungsreaktionen in FixL und YF1

Die Phosphorylierungsreaktion in FixL ist aufgeteilt in zwei Teilreaktionen. Zuerst unterliegt das FixL einer Autophosphorylierung am konservierten Histidin 291, welches sich innerhalb der DhP Untereinheit befindet. In einem zweiten Schritt wird das Phosphat auf einen nicht kovalent gebundenen *Response Regulator* FixJ übertragen [GGDH91;

GGGP94]. Auf einer längeren Zeitskala kommt es schließlich zu einer Hydrolyse des phosphorylierten FixJ durch Wasser.

Durch die Konstruktion des Fusionsprotein YF1 wird ein Blaualtschalter in Form einer LOV-Domäne eingebaut. Die LOV-Domäne geht durch Blaualt in ihren Signalzustand über. Dies hat eine Inhibierung der Phosphorylierungsreaktion zur Folge. Abbildung 5.2 zeigt das in [MAM09] postulierte Reaktionschema für die Phosphorylierungsreaktion im System YF1. Die Phosphorylierungsreaktion kann anhand der Menge an phos-

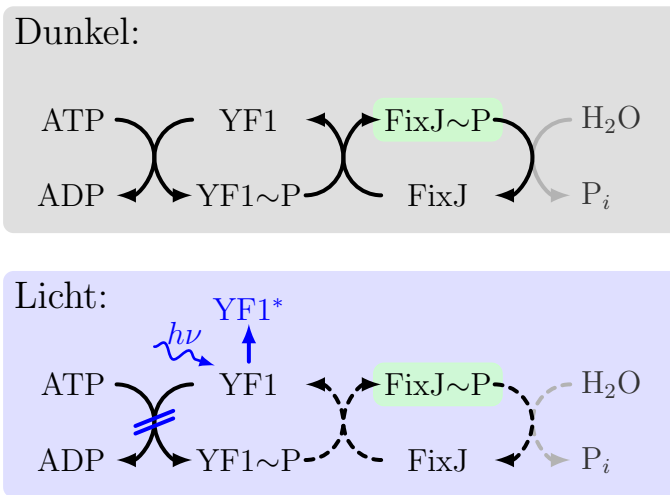


Abb. 5.2.: Reaktionsschema des Phosphorylierungstests. YF1 autophosphoryliert sich und überträgt dann das Phosphat auf den *response regulator* FixJ.

phorylierten FixJ verfolgt werden. Der Einsatz von [γ -³³P]Adenosintriphosphat (ATP) ermöglicht die Detektion über die radioaktiv Markierung des FixJ nach vorausgehender elektrophoretischer Trennung.

5.2. Material und Methoden

5.2.1. Molekularbiologie und Proteinreinigung

Diese Arbeiten wurden am Institut für Molekulare Enzym Technologie (IMET) im Forschungszentrum Jülich unter der Teilgruppenleitung von Herrn Dr. Krauss durchgeführt. Es wurden die Proteine YF1-WT, YF1-C62G und FixJ exprimiert. Das YF1-WT entspricht dem Fusionsprotein aus Abbildung 5.1. In der Variante YF1-C62G ist das Cystein-62 durch ein Gylcin mutiert. Das FixJ ist das Zielprotein im zweiten Teilschritt der Phosphorylierungsreaktion. Die Menge an phosphoryliertem FixJ dient der

Verfolgung des Reaktionsverlaufs.

Die Proben befanden sich in einem Puffer aus 10 mM Tris-HCl bei pH = 7.0 und 10 mM NaCl. Die Konzentrationsbestimmung von FixJ erfolgte über den Extinktionskoeffizienten bei 280 nm ($\varepsilon_{280\text{ nm}} = 4860\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Die YF1-Konstrukte lassen sich bei vollständiger Beladung an Chromophor FMN über dessen Extinktion bei 450 nm ($\varepsilon_{450\text{ nm}} = 12500\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmen. Die Beladung lässt sich anhand des Verhältnisses der Absorptionsbanden bei 280 nm und 450 nm bestimmen, sofern eine sehr saubere Probe vorliegt. Bei vollständiger Beladung sollte das Verhältnis bei etwa 2.9 liegen. Für die Proben lässt sich eine Beladung mit Chromophor von etwa 73 % für YF1-WT und von 64 % für YF1-C62G abschätzen.

5.2.2. Phosphorylierungstest

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) in einem Reaktionpuffer (50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 100 μM MnCl_2 , 5 mM β -Mercaptoethanol, 5 % (v/v) Ethylenglycol) durchgeführt. Das Protein wurde zuerst mit dem Reaktionpuffer vorgelegt. Die Phosphorylierungsreaktion wurde durch Zugabe des $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}/\text{MgCl}_2$ zur Reaktionsmischung gestartet. Tabelle 5.1 zeigt die Zusammensetzungen der jeweiligen Proteinmischungen. Der Reaktionsmischung wurde zu unterschiedlichen Zeiten je-

	RM1	RM2	RM3	c / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
YF1-WT	7 μL	-	-	2
YF1-C62G	-	7 μL	7 μL	2
FixJ	28.7 μL	28.7 μL	28.7 μL	50
RP	24.3 μL	24.3 μL	24.3 μL^{a}	-
$[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}/\text{MgCl}_2$	10 μL	10 μL	10 μL	629 ($\equiv 7.7\text{ }\mu\text{Ci}$)

^aZuvor wurde Methylmercaptan eingeleitet bis der Puffer einen Braunton angenommen hatte.

Tab. 5.1.: Zusammensetzung der jeweiligen Reaktionsmischungen. RM = Reaktionsmischung; RP = Reaktionpuffer.

weils 10 μL entnommen und mit 10 μL Stoppuffer (0.5 M Tris/HCl (pH 6.8), 0.2 M NaCl, 40 mM EDTA, 30 % (v/v) Glycerin, 4 % (v/v) SDS, 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol) gemischt, um die Phosphorylierungsreaktion durch Denaturierung der Proteine zu stop-

pen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte dann über *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) (Gele mit 15 % Polyacrylamid). Die Gele wurden über Nacht getrocknet und anschließend über Nacht auf einen multisensitiven Phosphorschirm gelegt (Perkin Elmer, 192×125 mm). Die Visualisierung und Quantifizierung der radioaktiven Proteine erfolgte mit einem Cyclone Plus Phosphorimager (Perkin Elmer). Die Phosphorylierungsreaktionen wurden einmal unter rotem Licht (abgedunkelter Raum wurde mit einer mit Rote-LED Alu Lichtleiste ($\lambda_{\text{max}} > 620 \text{ nm}$) beleuchtet) und ein weiteres Mal unter blauem Licht (beleuchteter Raum und auf die Reaktionsmischung leuchtete eine blaue LED (Conrad, Luxeon III Emitter LXHL-PBO9, 150 mW bei 460 nm)) durchgeführt.

5.3. Ergebnisse und Diskussion

5.3.1. Bildung und Zerfall des Methylthiyladdukts im System YF1-C62G mit Methylthiol

Es wurden UV/Vis-Spektren des YF1-C62G in einem mit Methylthiol gesättigten Puffer (10 mM Tris-HCl bei pH = 7.0 und 10 mM NaCl) vor und nach der Belichtung mit blauem Licht aufgenommen. Abbildung 5.3 zeigt deutlich ein Einbleichen der Grundzustandsbande bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ (Schwarze Linie) und ein Anwachsen der Extinktion bei $\lambda = 390 \text{ nm}$ (Blaue Linie) unmittelbar nach der Belichtung mit einem Blaulichtpuls von 0.5 s bei 450 nm. Die gebildete Spezies mit dem Maximum bei 390 nm wird dem Methylthiol-FMN-Addukt^{in Protein} zu geschrieben. Die Grundzustandsbande wächst dann im Dunkeln mit einer Lebensdauer von 108 min unter Erhalt der vier isosbestischen Punkte bei 409.5 nm, 385.5 nm, 331.5 nm und 288.5 nm wieder heraus. Daraus lässt sich folgern, dass eine Adduktbildung zwischen dem Methylthiol und dem FMN am Kohlenstoffatom C(4a) innerhalb der LOV-Domäne in YF1-C62G ebenfalls möglich ist, wie es für die LOV1-C57G-Domäne aus C.r. bereits gezeigt wurde [Lan+10].

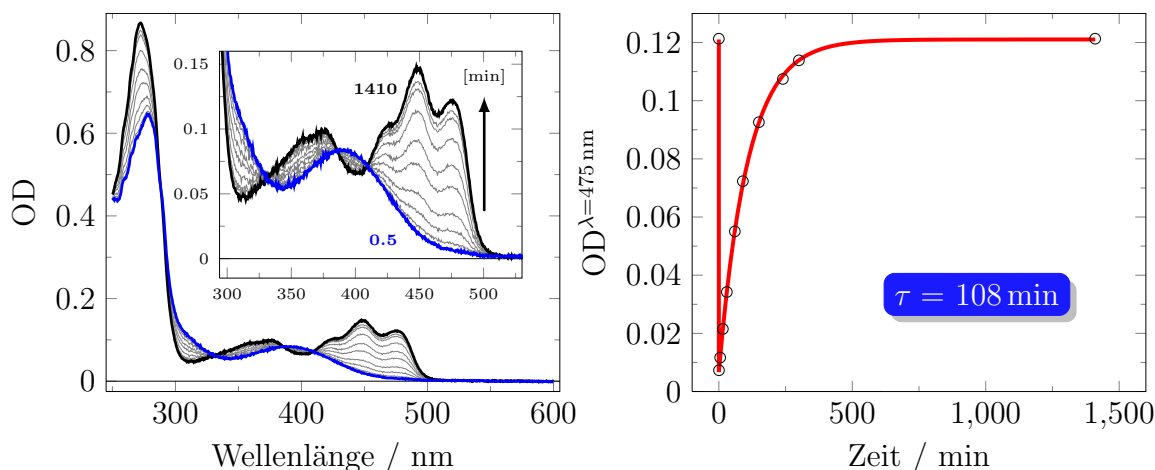


Abb. 5.3.: Photochemische Bildung und thermischer Zerfall des Methylthiol-Addukts am C(4a) vom FMN in YF1-C62G. **(A) Spektrensequenz:** Blaues Spektrum ist unmittelbar nach der Anregung mit zwei blauen LEDs bei maximaler Leistung für 0.5 s ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$) aufgenommen worden. Dieses zeigt ein Maximum bei 390 nm, und wird dem Methylthiol-FMN-Addukt^{in Protein} zu geschrieben. Die grauen Spektren zeigen den thermischen Zerfall Methylthiol-FMN-Addukt^{in Protein} in den YF1-C62G Dunkelzustand. **(B) Zeitverlauf:** Schwarze Kreise zeigen den zeitabhängigen Verlauf der Extinktion bei $\lambda = 475 \text{ nm}$. Rote Linie zeigt den monoexponentiellen Fit mit einer Lebensdauer von $\tau = 108 \text{ min}$.

5.3.2. Phosphorylierungstest der Systeme YF1-WT, YF1-C62G und YF1-C62G + MeSH

Zu Beginn wurde die Reinheit und tatsächliche molekulare Masse der einzelnen Proben über eine SDS-PAGE überprüft (siehe Abbildung 5.4 (A)). Die Bahn, auf der das FixJ aufgetragen wurde, zeigt eine intensive Bande bei der für das FixJ zu erwartenden molekularen Masse von etwa 22 kDa. Es sind neben der Hauptbande des FixJ weitere niedermolekulare Banden im Bereich von etwa 15 kDa zu erkennen. Diese sind jedoch deutlich schwächer als die Hauptbande und stören nicht bei den weiteren Experimenten. Die Kinaseproteine YF1-WT wie auch YF1-C62G zeigen jeweils eine Hauptbande bei der zu erwartenden molekularen Masse von etwa 42 kDa. Ansonsten sind sie nur geringfügig mit höhermolekularen Proteinen verunreinigt. Die Messreihe mit YF1-WT ohne Belichtung zeigte mit ansteigender Reaktionszeit eine deutliche Zunahme des Phosphorylierungsgrades der FixJ-Domäne. Dieses ist ein deutlicher Aktivitätsnachweis des Fusionsproteins YF1-WT im Dunkeln (siehe Abbildung 5.4 (B) linke Hälfte). Wurde dieses Experiment erneut durchgeführt, nun jedoch unter Belichtung, war kein ^{33}P -Signal mehr von der

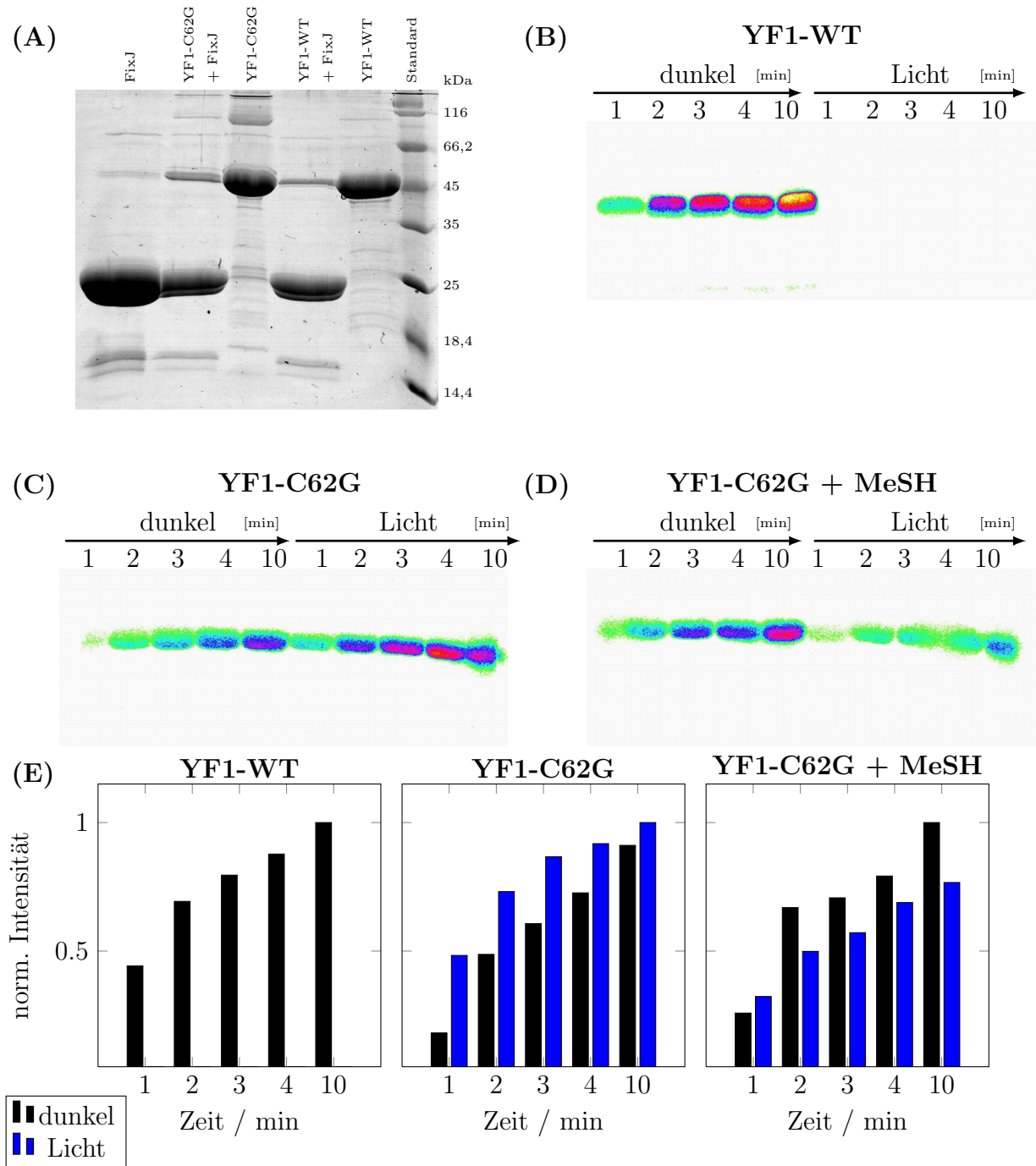


Abb. 5.4.: Ergebnisse der Phosphorylierungstests der Systeme YF1-WT, YF1-C62G und YF1-C62G/MeSH (Methylthiol). **(A):** SDS-PAGE aller Proben. In den Bahnen, in denen die Proben gemischt aufgetragen wurden, wurden die entsprechenden Mengen wie im Phosphorylierungstest eingesetzt. **(B)-(D):** Phosphorylierungsnachweise: Die Reaktionen wurden durch Zugabe von $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}/\text{MgCl}_2$ gestartet. Bei der angezeigten Zeit wurden jeweils 10 μL der Reaktionsmischung entnommen und abgestoppt. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und das an FixJ gebundene Phosphat wurde über einen Phosphorimager detektiert. **(E):** Integrale Intensität der einzelnen Banden normiert auf die jeweils intensivste Bande einer Messreihe.

FixJ-Domäne zu erkennen (siehe Abbildung 5.4 (B) rechte Hälfte). Dies zeigt, dass eine vollständige Inhibierung der Kinaseaktivität durch LOV-Domänen im Signalzustand stattgefunden hat. Dies bestätigt die Resultate für den Wildtypen aus der Arbeit von [MAM09]. Überraschend ist jedoch die Tatsache, dass die Inhibierung vollständig ist, da anfänglich die Beladung an FMN zu 73 % abgeschätzt wurde. Man hätte demnach eine Aktivität von nicht beladenem YF1-WT trotz Belichtung erwarten müssen. Es gibt zwei plausible Erklärungsmöglichkeiten für die vollständige Inhibierung. Wird zum einen die Abschätzung einer 73 %-igen Beladung als korrekt angesehen, so müssen die nicht beladenen Proteine grundsätzlich inaktiv sein. Die nicht beladene LOV-Domäne müsste demnach einen strukturellen Einfluss auf die C-terminalen Effektor-domäne haben, so dass eine vollständige Deaktivierung der Katalyseaktivität die Folge ist. Berücksichtigt man zum anderen die geringfügige Verunreinigung mit höhermolekularen Proteinen (siehe Abbildung 5.4 (A)) scheint eine Unterschätzung der Beladung durchaus denkbar. Die gleichen Aussagen bezüglich der Beladung gelten auch für die YF1-C62G Mutante.

In der Messreihe mit der Mutanten ergab sich ein anderes Bild. Im Dunkeln zeigte sich zwar wie beim Wildtyp ein Ansteigen des Phosphorylierungsgrades mit zunehmender Reaktionszeit, jedoch wurde die Aktivierung unter belichteten Bedingungen diesmal nicht inhibiert (siehe Abbildung 5.4 (C)). Es scheint sogar, als ob unter Blaulicht die Mutante YF1-C62G aktiver ist, wie man es an den Intensitäten der einzelnen Banden erkennen kann (siehe Abbildung 5.4 (E)). Dennoch zeigt dieses Ergebnis, dass durch die Mutation des für die Bildung des Signalzustands essentiellen Cysteins eine Inhibierung nicht mehr stattfindet.

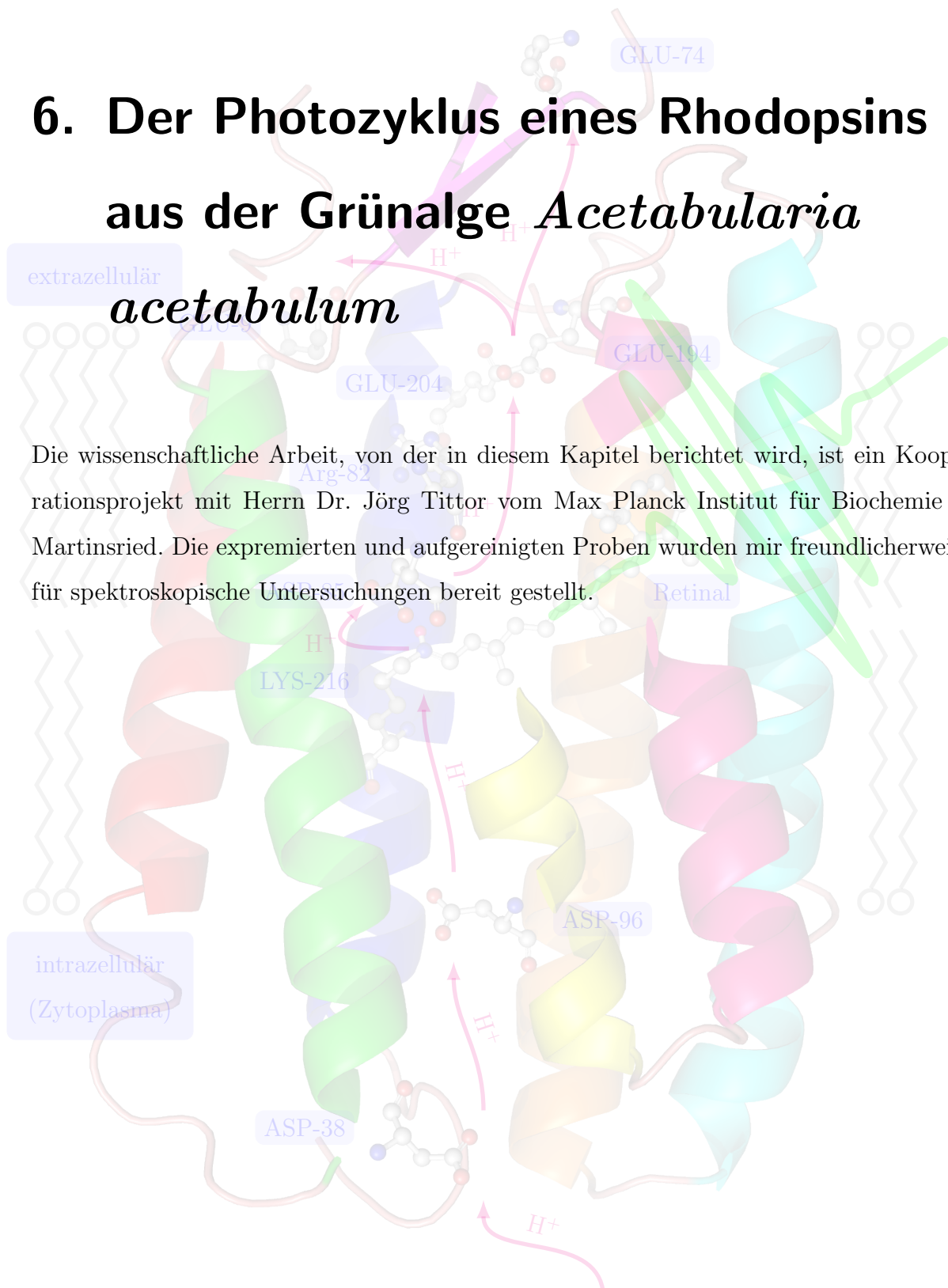
Die Messreihe mit der Mutante YF1-C62G wurde in Gegenwart von Methylthiol wiederholt. Dazu wurde der Reaktionspuffer zuvor mit Methylthiol bis zur Braunfärbung durchströmt. Auch hier zeigte sich in Dunkelheit eine Zunahme des Phosphorylierungsgrades mit der Reaktionszeit. Wurde diese Messreihe unter Blaulicht wiederholt, so dass sich ein Addukt zwischen dem Methylthiol und dem C(4a) des FMN ausbildete (siehe Abbildung 5.3), wurde weiterhin Aktivität des Kinaseproteins detektiert. Der Phosphorylierungsgrad scheint unter Blaulicht im Vergleich zur Situation im Dunkeln leicht reduziert zu sein.

Bei allen Messreihen muss ein relativ großer Fehler beim Pipettieren des kleinen Volumens an radioaktiven ATP eingeräumt werden. Gemessen an den Ergebnissen für die Mutante YF1-C62G, die im Dunkeln wie unter Blaulicht die gleiche Aktivität aufweisen

sollte, lässt sich ein Fehler von etwa 15 % bezogen auf das maximale Signal abschätzen. Berücksichtigt man diesen Fehler ist keinerlei Blaublicht induzierter Effekt auf die Aktivität im System YF1-C62G und Methylthiol zu erkennen. Trotz Ausbildung eines Addukts erfolgt demnach keine signifikante Weiterleitung eines Signal, das die Effektor-domäne inaktiviert. Daraus lässt sich folgern, dass nicht die Ausbildung eines Addukts essentiell für die Signalweiterleitung ist, sondern vielmehr der durch die Adduktbildung resultierende mechanische Zug.

6. Der Photozyklus eines Rhodopsins aus der Grünalge *Acetabularia* *acetabulum*

Die wissenschaftliche Arbeit, von der in diesem Kapitel berichtet wird, ist ein Kooperationsprojekt mit Herrn Dr. Jörg Tittor vom Max Planck Institut für Biochemie in Martinsried. Die expremierten und aufgereinigten Proben wurden mir freundlicherweise für spektroskopische Untersuchungen bereit gestellt.



6.1. Einleitung

In allen drei Domänen des Lebens (*Archaea*, *Bacteria* und *Eucaria*) kommen Retinalproteine vor. Diese werden Rhodopsine genannt und werden entsprechend ihrer elektrischen Eigenschaften in drei unterschiedliche Klassen unterteilt [Tsu+06]:

- i) **elektrisch neutrale Rhodopsine**, welche sowohl als Rezeptor im Sehprozess von Tieren als auch als Sensoren für die *Phototaxis* in Prokaryoten oder *Archaea* fungieren [GL03; SL02],
- ii) **licht-getriebene Ionenpumpen** für Protonen und Chloride, welche eine retinal-abhängige Form der Photosynthese darstellen [Ess02; Lan06; Spu06] und
- iii) **Kanalrhodopsine** aus phototaktischen Algen, welche einen passiven licht-getriebenen Fluss von Protonen und anderen Kationen durch die Zellmembran steuern [Kat+04].

Brown und Jung konnten zwei neue Rhodopsinprotein kodierende Gene in der Grünalge *Acetabularia acetabulum* (A.a.) identifizieren, welche sie 2006 unter den Namen *Acerhodopsin1* (AR1) und *Acerhodopsin2* (AR2) veröffentlichten [BJ06]. Diese Proteine weisen eine höhere Ähnlichkeit zum *Bacteriorhodopsin* (BR) auf als andere Retinalproteine aus Algen. Für AR1 wurde bereits Aktivität der Protonen-Translokation mittels elektrophysiologischen Experimenten nach funktionaler Expression in *Xenopus Oocyte* [Tsu+06] gezeigt. Mit AR1 ist somit zum ersten mal ein Ionen-transportierendes Retinalprotein in einem eukaryotischen Organismus entdeckt worden. Es besitzt zudem die Fähigkeit Photosynthese über Chlorophyll zu betreiben. Aus diesem Grund ist es sehr interessant das AR1 in seinen biochemischen und auch biophysikalischen Eigenschaften näher zu untersuchen.

6.1.1. Photozyklus von Bacteriorhodopsin

Der Organismus *Halobacterium salinarium* (H.s.) zeigt fakultative *Autotrophie*. Dies bedeutet, dass unter zunehmend anoxischen (Sauerstoff arm) Bedingungen der heterotrophe Hauptstoffwechselweg der oxidativen Phosphorylierung zum Erliegen kommt, und dass die Synthese des integralen Membranproteins BR induziert wird [OT89]. Das BR wird in bestimmte als Purpurmembran bezeichnete Areale der Zellmembran eingebaut, wo es mittels absorbierter Lichtenergie einen Protonenkonzentrationsgradienten

zwischen dem Zellinneren und -äußeren über die Membran aufbaut. Dieser wird dann zur Gewinnung und Speicherung von Energie in Form von ATP über die ATP-Synthase genutzt. Somit stellt das BR als lichtgetriebene Protonenpumpe ein Bestandteil eines einfachen Photosynthesystems dar.

Das *Halobacterium salinarium* ist ein Prokaryont, der der Ordnung extrem halophiler Archaeobakterien zugeordnet wird. Es besitzt eine stäbchenförmige Gestalt (Länge: $\sim 5 \mu\text{m}$; Breite: $\sim 0.5 \mu\text{m}$) mit vier Flagellen. Es kommt ausschließlich in Gebieten mit geringer Sauerstoffkonzentration und hoher Lichtintensität vor. Sehr wichtig für die Überlebensfähigkeit ist ebenso ein starker osmotischer Stress. Dieser wird durch eine außerordentlich hohe Konzentration an Natriumchlorid (etwa 250 g pro Liter, was mehr als das Siebenfache der Salzkonzentration im Meerwasser entspricht) hervorgerufen. H.s. ist bei einer Salzkonzentration unterhalb von drei Mol pro Liter nicht mehr lebensfähig [Sto76].

Der Photozyklus der Rhodopsine wird durch Lichtabsorption initiiert. Während dieses Zyklus wird ein Proton aus dem Zellinneren nach außen transportiert. Der vollständig im Dunkeln adaptierte Grundzustand des BR besteht aus einem Gleichgewicht zwischen den zwei Retinal-Konfigurationen „all-trans“ (B_{568}) und „13,14-dicis“ (B_{548}) im Verhältnis 1 zu 1. Nach Belichtung geht das Gleichgewicht vollständig in den Grundzustand B_{568} über. Das im Dunkeln adaptierte Gleichgewicht stellt sich dann erst binnen einigen Minuten wieder ein. Der eigentliche Photozyklus startet aus dem „all-trans“ Zustand B_{568} heraus und resultiert zu Beginn in einer Konfigurationsänderung nach 13-cis [SB82; Tsu+80]. Ausgehend von dieser photoinduzierten Isomerisierungsreaktion des Retinals folgt eine Serie von konformellen Änderungen. Die jeweiligen gebildeten Konformere besitzen alle spektral unterschiedliche Eigenschaften im sichtbaren Spektralbereich, was sich in unterschiedlichen Lagen der Absorptionsmaxima äußert. Die nach einander gebildeten Intermediate werden der Reihe nach mit J, K, L, M, N und O bezeichnet [LBS75]. In Abbildung 6.1 ist der Photozyklus des BR in vereinfachter Form dargestellt. Aus einer Vielzahl an biochemischen und spektroskopischen Untersuchungen an BR-Mutanten ging hervor, dass beim Austausch bestimmter Residuen die Reaktionskinetik teilweise enorm verändert wird. Demnach kann bestimmten Residuen bei der Protonenleitung eine Schlüsselfunktion zugesprochen werden. Andererseits ist mit Ausnahme des Lysins, das für die Bindung des Retinals über eine Schiff'sche Base verantwortlich ist, keine der identifizierten Aminosäuren für die Funktionsfähigkeit der Protonenpumpe essenti-

ell [Lan97; Sub+99]. Im Grundzustand ist die Schiff'sche Base, welche die zentrale Protonenbindestelle darstellt, protoniert. Beim Übergang vom L_{550} - zum M_{410}^{EC} -Intermediat wird dann ein Protonentransfer von der Schiff'schen Base zu seinem Gegenion Asp-85 beobachtet [Ger+89; GSH90]. Während dieses Schrittes ist zudem eine pH-abhängige

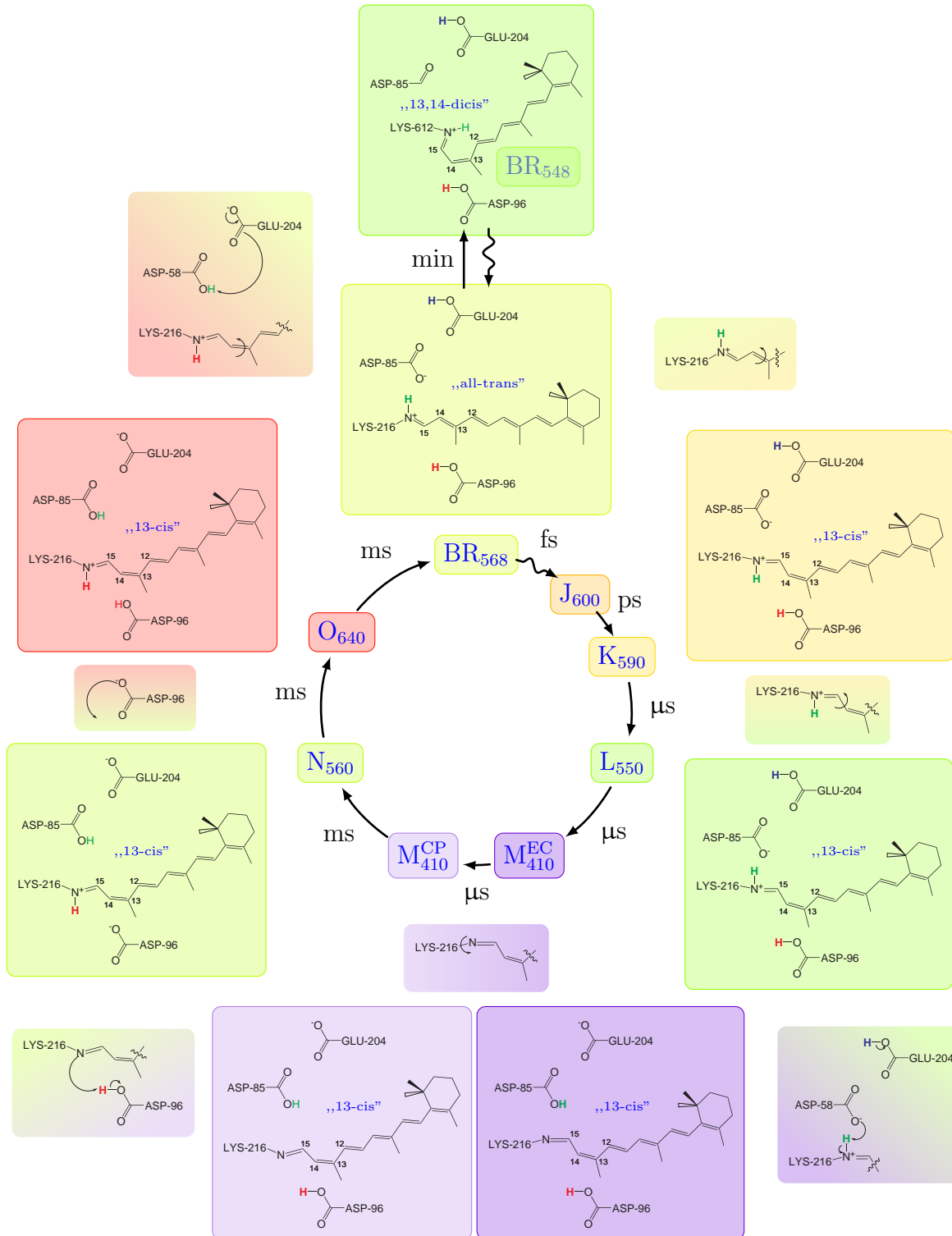


Abb. 6.1.: Schematische Darstellung des Photozyklus von *Bacteriorhodopsin* nach [HSG93; Lan06]. Die Indices sowie die Farbgebung der Intermediate geben die Lage der Absorptionsmaxima in nm wider.

Abgabe eines Protons aus der Region um Glu-194 und Glu-204 an die extrazelluläre Oberfläche entdeckt worden [Ric+96; Ram+98]. Bei einem pH-Wert oberhalb von 5.8 wird das Proton binnen 1 ms in den extrazelluläre Bereich abgegeben [HD92; Zim+92; Heb+94; Ale+95], während die Abgabe bei einem pH-Wert unterhalb von 5.8 erst beim Schritt von O₆₄₀ nach BR₅₆₈ stattfindet [Ram+98]. Die Reprotonierung der Schiff'schen Base erfolgt nach einer vorangehenden Umorientierung von M₄₁₀^{EC} nach M₄₁₀^{CP} innerhalb der Reaktion von M₄₁₀^{CP} nach N₅₆₀ durch das Asp-96 [Ott+89; Ger+89]. Das Asp-96 ist in der cytoplasmatischen Proteinfläche lokalisiert und wird im darauf folgenden Reaktionsschritt von N₅₆₀ nach O₆₄₀ aus dem Cytosol heraus reprotoniert [GSH90]. Der letzte Schritt im Photozyklus von O₆₄₀ nach B₅₆₈ umfasst eine thermische Reisoomerisierung des Retinals in seine „all-trans“ Ausgangskonfiguration vor [Smi+83], während das Asp-85 erneut deprotoniert wird. Bei Raumtemperatur ist der Zyklus nach etwa 10 ms beendet.

6.2. Resultate

Im folgenden wird nach einer kurzen Diskussion einer *Multiple Sequence Alignment* (MSA) Analyse ausführlich von den in dieser Arbeit durchgeführten zeitaufgelösten Absorptionsmessungen an *Acerhodopsin1* berichtet. Basierend auf diesen Daten wird ein Modell für den Photozyklus vorgestellt und diskutiert.

6.2.1. Multiple Sequence Alignment

MSAs ermöglichen es zwei oder mehrere Proteinsequenzen in ihrer Homologie zueinander zu untersuchen [WBH05]. Konservierte Sequenzbereiche mit verschiedenen bereits bekannten Proteinen, die aus einem Sequenzvergleich resultieren, bieten es, Schlussfolgerungen über die Tertiär- und Sekundär-Struktur sowie der Funktionsweise einer neuen Proteinsequenz zu ziehen. In Abbildung 6.2 ist ein auf den Serverprogrammen *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) und *Constraint-based Multiple Alignment Tool* (COBALT) [Alt+97; Alt+05] basierender Proteinsequenzvergleich von *Acerhodopsin1* aus *Acetabularia acetabulum* (AA-AR1, DQ074124), *Sensorrhodopsin2* aus *Natronomonas pharaonis* (NP-SR2, P42196), *Halorhodopsin* aus *Halobacterium salinarium* (HS-HR, CAB3786) und *Bacteriorhodopsin* aus *Halobacterium salinarium* (HS-BR, AAA72504) dargestellt. Es wurde somit ein Proteinvergleich mit dem prokaryotischen

Prototyp einer Protonenpumpe **BR**, der Chloridpumpe **HR** und einem Sensorrhodopsin **SR2**, das an der Phototaxis von Archaeen beteiligt ist, durchgeführt. Eine hohe Konser-

AA-AR1	1	M-----SNPNPFQT-TLGTDAQ-----WVVF AV MALAAIVF	30
NP-SR2	1	-----MVG-----LTTFLWLGAI GM LVGT LA F	22
HS-HR	1	---MSITSVPGVVDAGVLGAQSA AA VRENALLSSSLWVNV AL AGIA IL VF	47
HS-BR	-13	MLELLPTAVEGV SQA QITGRP-----EWI WL ALGTALMGLGTLYF	27
*			
AA-AR1	31	SI AV Q-FRPLPLRLTYVNIAICTIAATAY YAMA VNGGDNKPTAGT---	76
NP-SR2	23	AWAGRDAGSGERR-YYVTLVGI SGIA AVAYVVMALGVGW VP VAER-----	66
HS-HR	48	VYMGRTIRPGRPLIWGATLM IPL VSIS SYL GLLSGLTVGMIEMPAGHAL	97
HS-BR	28	L VK GMGVSDPD AK FYAITTLVPAIAFTMYLS ML LG YGL TMV PF G-----	72
* * *			
AA-AR1	77	-ADERQVIY ARY IDWFTTPLL LD L VLL TNMPATMI AW IMGADIA MI AF	125
NP-SR2	67	-----TVFAP RY IDWILTTP LIV YFLG LL AGLDSREFGI VI TLNTVVMLA	111
HS-HR	98	AGEMVRSQWGRYLTWALST PM ILLALG LL ADVDLGS LFT VI AA DIG MC VT	147
HS-BR	73	-GEQNPIYW ARY ADWLFTTPLL LD L ALL VDADQGTILALV GAD GIMIGT	121
* * * * *			
AA-AR1	126	GIIG AFT --VGSYKWFYFV VC IMLAVLAWGMINP IF KEELQKH EY TGA	173
NP-SR2	112	GFAG AM V--PGIERYALFGMGA VFL GLVY LV GPMTESASQRSSGI KS L	159
HS-HR	148	GLAA MT T SALL FRWAFY AIS CAFFV VLS ALVTDWAASASSA--GTAEI	195
HS-BR	122	GLV GALT -KVYSYRFVW WA ISTAAML YIL YVLFFGFTSKAESMR PE V AST	170
* * * *			
AA-AR1	174	YTLLIY LIV LWVIYPIVWGLG-AGGHIIG-VDVEIIAMGV LD LLAKPLY	221
NP-SR2	160	YVRLRNLT VIL WAIY PF WLLGPPGV ALL T-PTVDVALIVY LD LVT KV GF	208
HS-HR	196	FDTLRVLT VVL WLGYP IV WAVGVEGLALVQSVGVTSW AYS V LD VFAKYVF	245
HS-BR	171	FKVLRNVTV VLS AYPVVWLGISEGAGIVP-LNIETLLFMV LD VSAK VGF	219
* * * * *			
AA-AR1	222	AIGVLITVEVVYGVKGQGGSLAFDCLKILKWWKLLWFQLVSIHFSLCVCR	271
NP-SR2	209	GF-IALDAA ATL -RAEHGESLAGVD TD APAVAD-----	239
HS-HR	246	AF-ILLRWV ANN ERTVAV---AGQTLGTMSSDD-----	274
HS-BR	220	GL-ILLRSRAIFGEAE AP EPSAGD--GAAATSD-----	249

Abb. 6.2.: Proteinsequenzvergleich von **AR1** aus *Acetabularia acetabulum* (AA-AR1, DQ074124), **SR2** aus *Natronomonas pharaonis* (NP-SR2, P42196), **HR** aus *Halobacterium salinarium* (HS-HR, CAB37866) und *Bacteriorhodopsin* aus *Halobacterium salinarium* (HS-BR, AAA72504) basierend auf BLAST und COBALT [Alt+97; Alt+05]. *: Aminosäuren, die zu dem H⁺-leitenden Netzwerk in **BR** beitragen laut [Lue+99a]. X: Aminosäurepositionen, die in mindestens zwei Sequenzen gleich sind. X: Aminosäurepositionen, die in allen Sequenzen gleich sind. ‡: Position des Retinal-bindenden Lysins. X: 7 Transmembran-Helices des Core-Proteins von **BR**.

vierung der Aminosäuren innerhalb der Sequenzen lässt sich global nicht finden (siehe Tabelle 6.1). Jedoch lassen sich lokal stark konservierte Bereiche finden. Somit weisen alle Rhodopsine eine hohe Ähnlichkeit in ihrer Sequenz abgesehen von den N- und C-Termini

auf. Aus Abbildung 6.2 geht hervor, dass das Lysin-218 die Retinal-Bindungsstelle in

Protein	Identität / %	Ähnlichkeit / %
BR	31	55
HR	26	46
SR2	32	48

Tab. 6.1.: Proteinsequenzvergleich von AR1 aus *Acetabularia acetabulum* (AA-AR1, DQ074124) mit SR2 aus *Natronomonas pharaonis* (NP-SR2, P42196), HR aus *Halobacterium salinarum* (HS-HR, CAB37866) und BR aus *Halobacterium salinarum* (HS-BR, AAA72504) basierend auf BLAST [Alt+97; Alt+05]. Dargestellt sind die prozentualen Identitäten und Ähnlichkeiten mit AR1.

AR1 darstellt. Man konnte in BR zeigen, dass das Aspartat-85 für die Ionenselektivität in archaellen Rhodopsinen verantwortlich ist und somit ausschließlich in Protonen translozierenden Rhodopsinen konserviert vorliegt [Lue+99a]. An entsprechender Position 89 in AR1 ist ebenfalls ein Aspartat konserviert vorhanden, während die Chloridpumpe HR an entsprechender Stelle 111 ein Threonin aufweist [RO97]. Für BR konnte auch gezeigt werden, dass durch Mutation des Aspartat-85 in ein Threonin das BR in eine Chloridpumpe umgewandelt wurde [Sas+95]. Daraus kann gefolgert werden, dass es sich bei AR1 auch um ein Protonen translozierendes Rhodopsin handelt.

Als Protonendonator bei der Reprotonierung der Schiff'schen Base zwischen Lysin-216 und dem Retinal in BR wurde das Aspartat-96 identifiziert [Lue+99b]. Auch dieses Aspartat ist in AR1 an der entsprechenden Stelle 100 konserviert, was ebenfalls darauf schließen lässt, dass es sich beim AR1 um eine Protonenpumpe handelt. Unsere Kooperationspartner am Max Planck Institut konnten mit Hilfe von Transportaktivitätsmessungen in der Tat zeigen, dass es sich bei AR1 tatsächlich um eine Protonenpumpe handelt.

6.2.2. Photozyklus von *Acetabularia*

Für sieben pH-Werte im Bereich von 4 bis 10 wurden Messungen der 2D-transienten Absorption in den vier Zeitfenstern 20 μ s, 200 μ s, 500 μ s, und 5 ms durchgeführt. In Abbildung 6.3 sind exemplarisch die Datensätze für das 5 ms Fenster bei pH = 4 und pH = 7 in einer Falschfarbendarstellung dargestellt. In den Datensätzen für pH = 4 (A) und

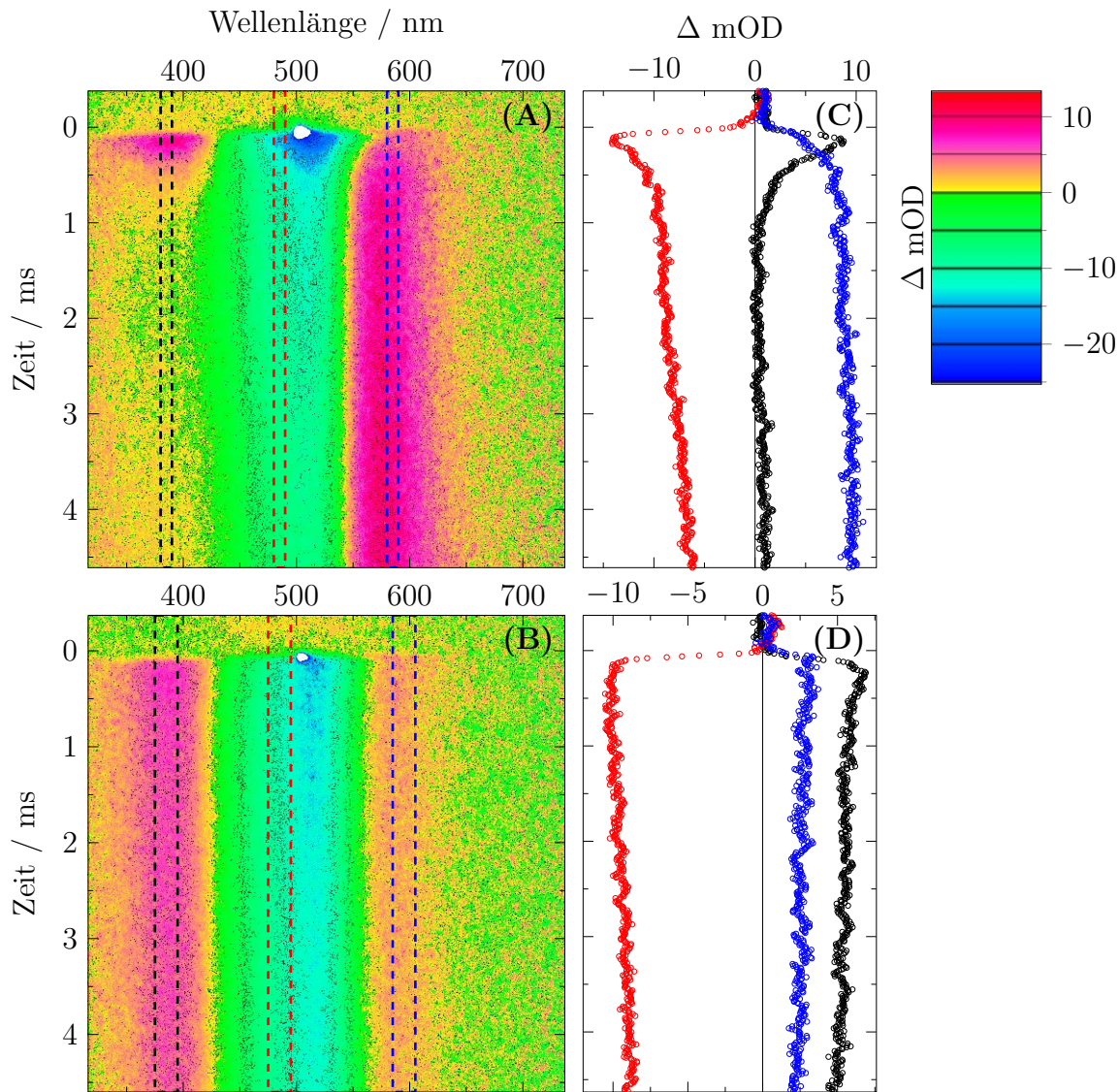


Abb. 6.3.: Falschfarbendarstellung der 2D-transienten Absorptionsdaten im 5 ms Zeitfenster für pH = 4 (A) und pH = 7 (B). Die Teilabbildungen (C) und (D) zeigen Zeitschnitte der entsprechenden Datenmatrix für die spektralen Bereiche um 400, 500, und 600 nm.

pH = 7 (B) ist jeweils ein Ausbleichen des AR1 bei 520 nm (negatives Signal, blauer Farbton) und eine transiente Absorption bei etwa 385 nm und 595 nm (positives Signal, roter Farbton) zu erkennen. Entsprechende Zeitschnitte bei etwa 385 nm, 485 nm und 595 nm sind jeweils unterhalb der Datenmatrizen dargestellt. Als erstes fällt auf, dass die transiente Absorption bei etwa 385 nm bei pH = 4 viel schneller zerfällt als bei pH = 7. Das Signal ist innerhalb von 500 μ s in der Grundlinie verschwunden, wächst dann allerdings nach etwa 4.5 ms auf eine sehr kleine Amplitude erneut an. Simultan mit dem Zerfall der Bande bei 385 nm ist die transiente Absorption bei etwa 595 nm auf eine hohe Amplitude angewachsen, die dann bis hin zu 4.5 ms weiter langsam anwächst. Bei

pH = 7 hingegen nimmt die Bande bei 385 nm binnen 500 μs nur leicht ab und bleibt dann auf einer konstant hohen Amplitude. Die Bande bei etwa 595 nm scheint dabei auch bereits mit der Anregung entstanden zu sein, allerdings in diesem Fall nur zu einem viel kleineren Anteil, welcher dann innerhalb des Zeitfensters von 4.5 ms nur sehr wenig abnimmt. Es scheint also, dass bei pH = 7 sowohl die Spezies bei 385 nm als auch die bei 595 nm beide nebeneinander zumindest bis hin zu 4.5 ms koexistieren. In Abbil-

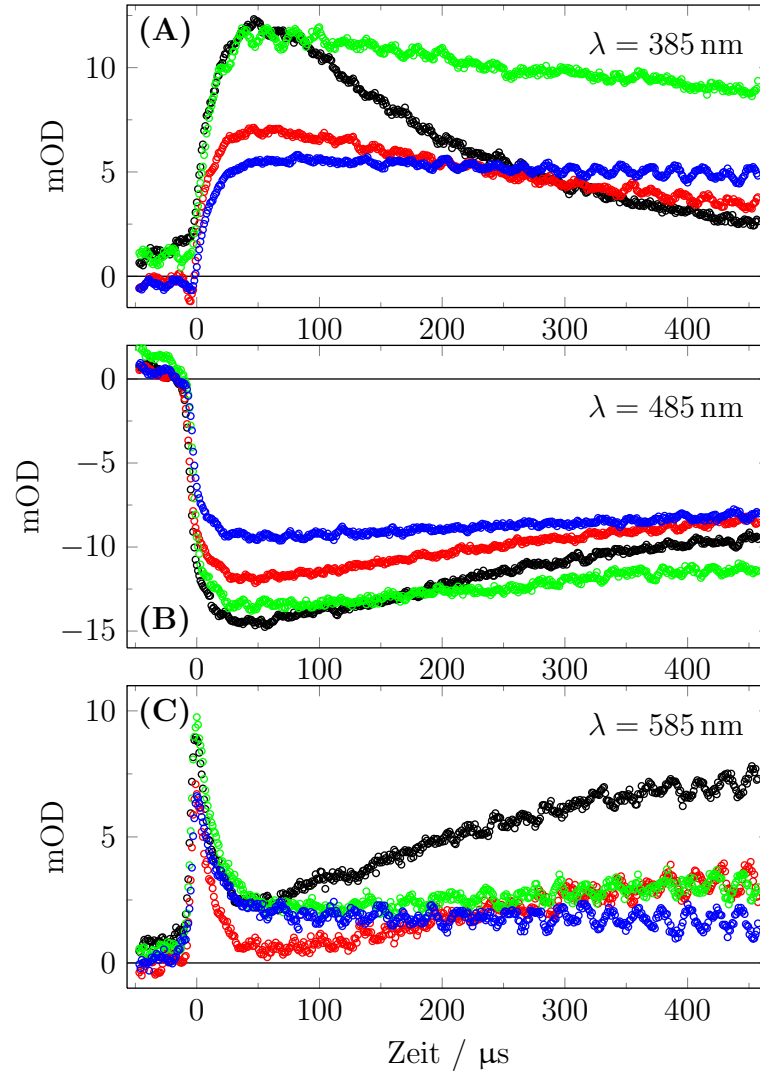


Abb. 6.4.: Zeitschnitte im 500 μs Zeitfenster bei 385 nm (A), 485 nm (B) und 585 nm (C). Die Farbenkodierung zeigt die pH-Werte: schwarz \equiv pH = 4, rot \equiv pH = 6, grün \equiv pH = 7, blau \equiv pH = 8.

dung 6.4 werden Zeitprofile für verschiedene pH-Werte miteinander verglichen, die in einem 500 μs -Fenster gemessen wurden. In Teilabbildung 6.4 (A) ist zu erkennen, dass die transiente Absorption bei 385 nm innerhalb $\sim 30 \mu\text{s}$ auf ein Maximum anwächst. Bei pH = 4 (schwarze Punkte) fällt dieses Signal innerhalb der nächsten 400 μs wieder ab. Mit steigendem pH-Wert wird dieser Zerfall stets langsamer. Weiter ist zu erken-

nen, dass bei $\text{pH} = 7$ (grüne Punkte) die Amplitude des Signals deutlich größer ist als bei $\text{pH} = 6$ (rote Punkte) und $\text{pH} = 8$ (blaue Punkte). Hier ist zu betonen, dass die optische Dichte der Probe und die Laserintensität bei allen Experimenten ähnlich war. Der pH -Wert abhängige Verlauf der Signalamplituden deutet somit darauf hin, dass die Quantenausbeute des Photozykluses sein Maximum im neutralen pH -Bereich aufweist. In Teilabbildung 6.4 (B) sind nun die Zeitschnitte bei 485 nm mit der gleichen Farbkodierung für die jeweiligen pH -Werte dargestellt. Der Hauptbeitrag dieses Signals rührt von der Rückkehr des Grundzustands her. Wie weiter unten bei der detaillierteren Auswertung mit Annahme eines Modells gezeigt werden wird, besitzen jedoch auch zwei weitere Intermediate eine merkliche Absorption bei dieser Wellenlänge. Diesen Zeitschnitten kann ferner entnommen werden, dass die Relaxation des Systems bei sauren pH -Werten ($\text{pH} = 4$ oder 6) deutlich schneller erfolgt als im neutralen bis alkalischen Bereich. Die Dynamik der transienten Absorption bei 585 nm ist bemerkenswert. Bei allen pH -Werten wird zunächst eine Spezies schnell gebildet, welche dann innerhalb der ersten 50 μs fast vollständig wieder zerfällt. Unter sauren Bedingungen ($\text{pH} = 4$ oder 6) steigt das Signal aber erneut an, was auf die Bildung eines neuen Intermediates mit Absorption in diesem Spektralbereich schließen lässt. Bei neutralen und alkalischen pH -Wert verläuft die transiente Absorption jedoch nicht durch ein Minimum, sondern fällt weiter ab bis auf ein in diesem Zeitfenster konstantes Niveau. Dieses Verhalten deutet auf einen nicht vollständigen Zerfall des ersten Intermediates in ein Gleichgewicht mit dem späteren Intermediat hin, welches ebenfalls bei $\sim 600\text{ nm}$ absorbiert. Da alle auftretenden Intermediate bei $\text{pH} = 4$ zeitlich besser voneinander separiert sind, wurden zuerst diese Datensätze mit dem Ziel einer Identifikation der beteiligten Speziesspektren analysiert. In Abbildung 6.5 (A) ist exemplarisch ein Datensatz dargestellt, der bei $\text{pH} = 4$ im 500 μs Zeitfenster gemessen wurde. Ein globaler Fit von Exponentialfunktionen an alle vier Datensätze bei $\text{pH} = 4$ ergab drei Zeitkonstanten mit $t_1 = 8\ \mu\text{s}$, $t_2 = 230\ \mu\text{s}$, und $t_3 > 25\text{ ms}$. Die dritte Zeitkonstante ist deutlich größer als das größte Zeitfenster, das mit der SC erfasst werden kann. Aus diesem Grund wurden weitere Messungen mit konventioneller Blitzlichtphotolyse durchgeführt (siehe Abschnitt 2.1.5), um den Zerfall bis hin zu 1 s zu verfolgen. Der Abbildung 6.6 sind die Daten der konventionellen Blitzlichtphotolyse zu entnehmen. Die Zerfallsdynamik des langsamsten Schritts zeigte ein bi-exponentielles Verhalten mit Zeitkonstanten von 24 ms und 140 ms. Der Wechsel zu $\text{pH} = 7.0$ resultierte in einer Verlangsamung der bi-exponentiellen Dynamik im ms-Bereich um eine Faktor von etwa 2 in beiden Lebensdauern auf 77 ms und 292 ms.

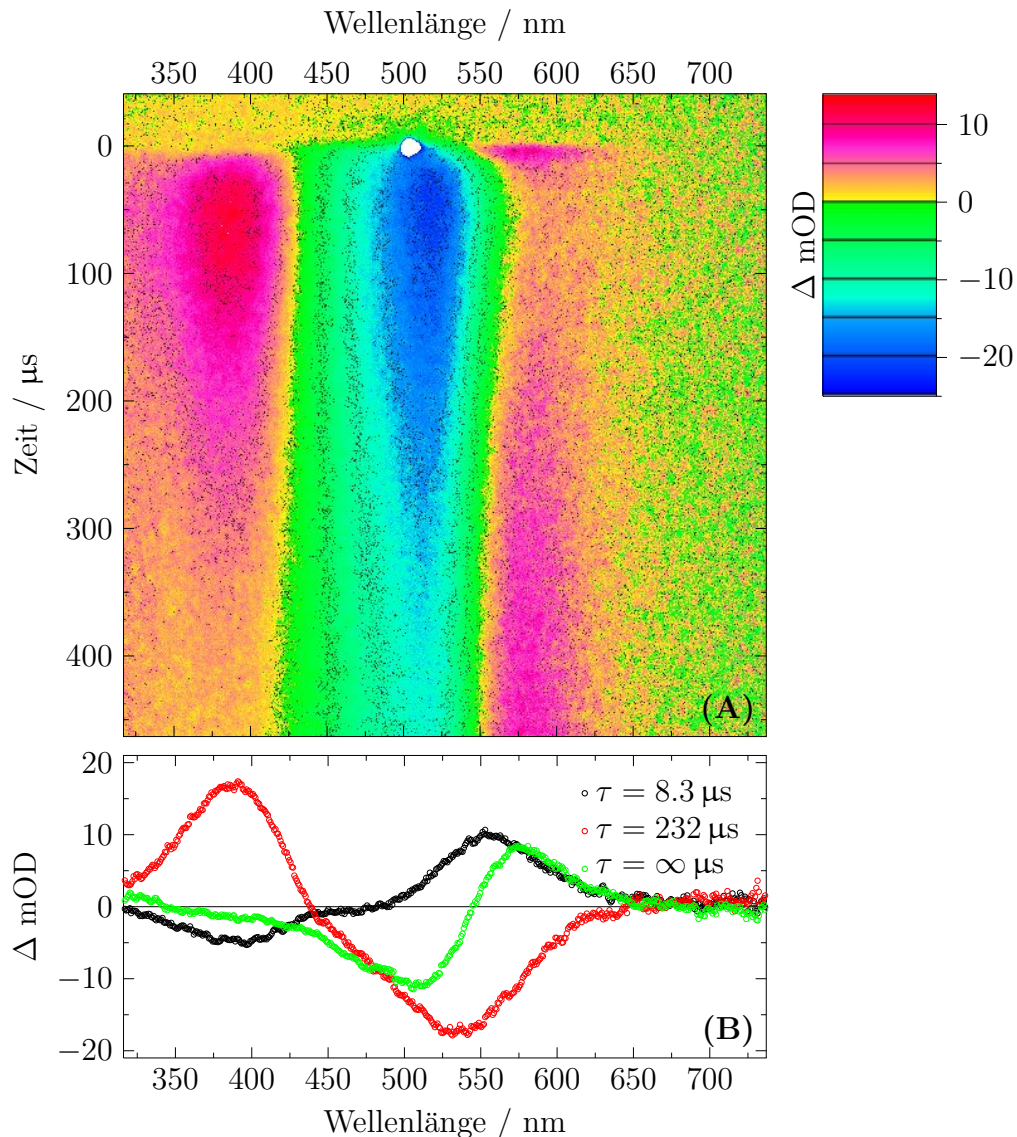


Abb. 6.5.: (A) Falschfarbendarstellung der 2D-transienten Absorptionsdaten für pH = 4 in einem 500 μs Zeitfenster. (B) Aus der globalen Analyse resultierende DADS mit den entsprechenden drei Zeitkonstanten $\tau_1 = 8 \mu s$, $\tau_2 = 230 \mu s$ und $\tau_3 > 25 \text{ ms}$.

Die drei DADS D_1 , D_2 und D_3 zu den entsprechenden drei Zerfallszeiten, die aus dem 500 μs Datensatz generiert wurden, sind in Abbildung 6.5 (B) dargestellt. Da sich die drei Zeitkonstanten um einen Faktor von mehr als 25 von einander unterscheiden, tragen in jedem einzelnen DADS nur diejenigen Speziesspektren bei, die am jeweiligen Reaktionsschritt entweder als Edukt oder als Produkt beteiligt sind. Demzufolge müssen bei drei erhaltenen Zeitkonstanten auch mindestens drei Intermediate A, B und C beteiligt sein. Basierend auf den experimentellen Befunden wird das in Abbildung 6.7 dargestellte Modell favorisiert und im Folgenden diskutiert. In dieses Modell wird die Möglichkeit eingeräumt, dass die Reaktionsschritte von A nach B und von B nach C reversible sind. Das Gleichgewicht zwischen den Spezies A und B baut sich mit den Ratenkonstanten k_1

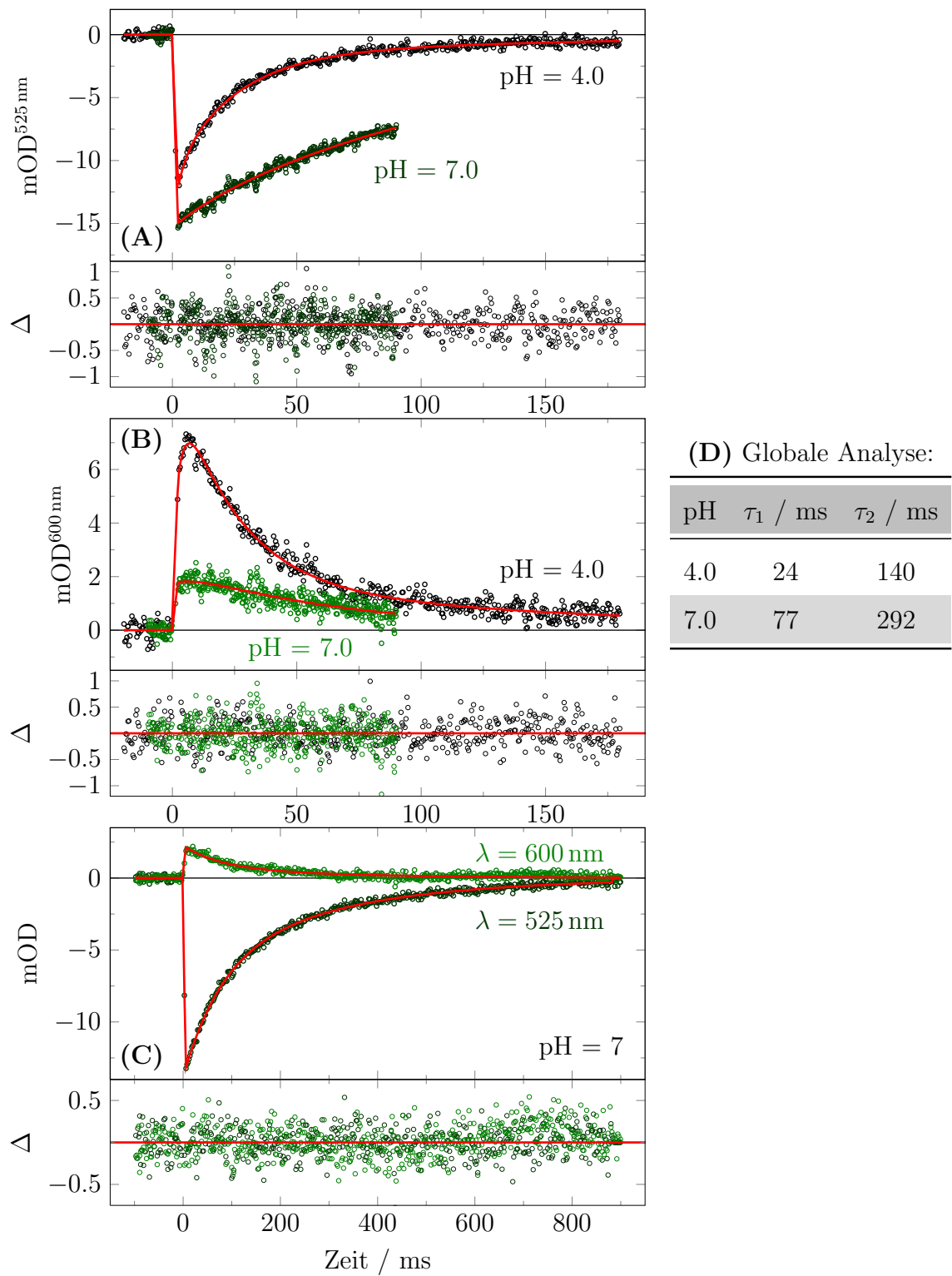


Abb. 6.6.: Ergebnisse der transienten Absorptionsmessungen bei fester Wellenlänge im 200 ms und 1 s Bereich an [AR1](#): **(A)** $\lambda = 525\text{ nm}$ für pH = 4.0 und 7.0 im 200 ms Messfenster. **(B)** $\lambda = 600\text{ nm}$ für pH = 4.0 und 7.0 im 200 ms Messfenster. **(C)** $\lambda = 600\text{ nm}$ und $\lambda = 525\text{ nm}$ für pH = 7.0 im 1 s Messfenster. **(D)** Das Ergebnis eines multi-exponentielles globalen Fits (rote Kurven) für die Datensätze beim entsprechenden pH-Wert.

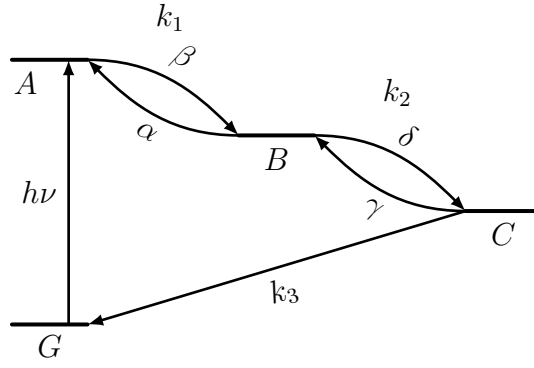


Abb. 6.7.: Reaktionsschema für die Diskussion des Photozyklus.

auf, wobei αk_1 und βk_1 die entsprechenden Ratenkonstanten für die jeweilige Hin- und Rückreaktion darstellen. Dabei gilt $\alpha + \beta = 1$. In entsprechender Weise sind dann δk_2 und γk_2 die Ratenkonstanten für die Hin- und Rückreaktion zwischen B und C, mit der entsprechenden Nebenbedingung $\delta + \gamma = 1$. In diesem Modell stehen die drei DADS mit den Speziesspektren S_j über folgende Gleichungen in Verbindung

$$D_1 = \beta(S_A - S_B) \quad (6.1)$$

$$D_2 = \delta(\alpha S_A + \beta S_B - S_C) \quad (6.2)$$

$$D_3 = \gamma(\alpha S_A + \beta S_B) + \delta S_C - x S_G, \quad (6.3)$$

wobei x einen unbekannten Anteil der Grundzustandspopulation darstellt, der in das Intermediat A angeregt wird, und S_G das Dunkelspektrum des Moleküls symbolisiert. Die Speziesspektren können nun aus den [DADS](#) über folgende Beziehungen berechnet werden:

$$S_A = D_1 + D_2 + D_3 + x S_G \quad (6.4)$$

$$S_B = S_A - \frac{D_1}{\beta} \quad (6.5)$$

$$S_C = S_A - D_1 - \frac{D_2}{\delta} \quad (6.6)$$

Die drei unbekannten x , α und β werden nun so bestimmt, dass alle Speziesspektren bei allen Wellenlängen positiv sind und jedes einzelne Speziesspektrum nur ein ausgeprägtes Maximum aufweist. Diese Bedingung konnte für $\beta = 1$ bei keinem pH-Wert erfüllt werden. Für pH = 4 konnte ein vernünftiges Spektrum der Spezies B mit einem Maximum bei 386 nm mit $\beta = 0.67$ erhalten werden. Da sich das Gleichgewicht zwischen Spezies A und B mit einer Lebensdauer von $t_1 = 8 \mu\text{s}$ einstellt, ergeben sich für die Ratenkonstanten für die jeweilige Hin- und Rückreaktion die Werte $k_{AB} = 8.3 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ und $k_{BA} = 4.2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$. Die Gleichgewichtskonstante beträgt dann $\frac{c(B)}{c(A)} = 2$. Bei pH =

4 konnte für die Spezies C ein vernünftiges Spektrum unter der Vernachlässigung der Rückreaktion zu Spezies B, also mit $\delta = 1$, erhalten werden. Die Ratenkonstante für die Hinreaktion beträgt dabei $k_{BC} = 4.3 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$. Die auf die oben geschilderte Weise erhaltenen Speziesspektren für pH = 4 sind in Abbildung 6.8 (A) dargestellt. Bei pH =

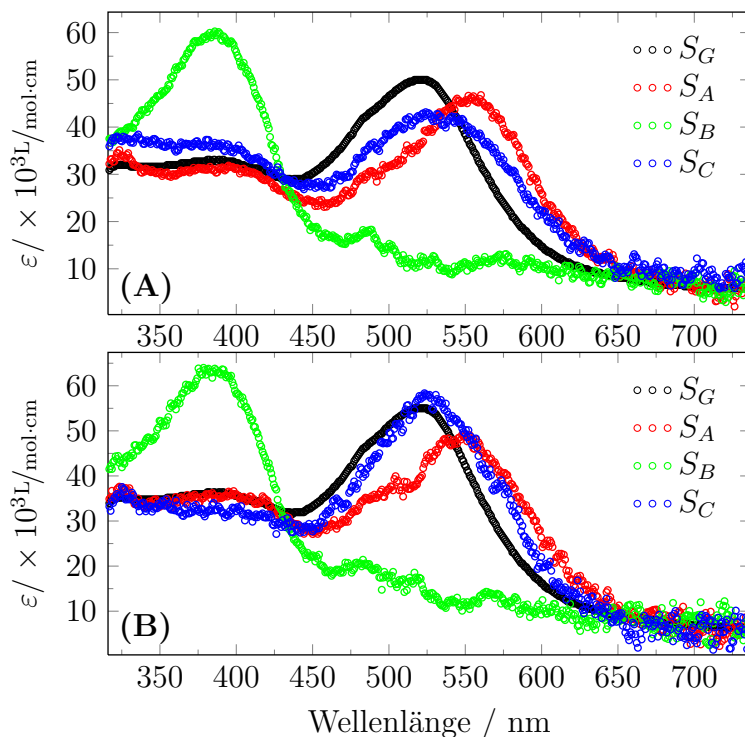


Abb. 6.8.: (A) Speziesspektren basierend auf der Analyse eines Datensatzes bei pH = 4. (B) Speziesspektren basierend auf der Analyse eines Datensatzes bei pH = 7.

7 ist das erste Gleichgewicht mehr in Richtung von Spezies A verschoben, da $\beta = 0.53$ ist und die Gleichgewichtskonstante bei $\frac{c(B)}{c(A)} = 1$ liegt. Nun liegt auch ein Gleichgewicht zwischen Spezies B und C vor, da $\delta \approx \gamma$ und somit $\frac{c(C)}{c(B)} \approx 1$ angenommen werden musste, um den Beitrag vom Spektrum der Spezies B vollständig aus dem Ergebnis für Spezies C zu entfernen. Zusätzlich ist die Ratenkonstante mit $k_{BC} \approx k_{CB} \approx 7.0 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}$ viel kleiner geworden. Die berechneten Speziesspektren für pH = 7 sind in Abbildung 6.8 (B) dargestellt.

Die Spektren des Grundzustands und der Intermediate sind durch eine einzelne Absorptionsbande charakterisiert. Die jeweiligen Maxima bei pH = 4 liegen bei 520 nm (G), 554 nm (A), 386 nm (B), und 534 nm (C). Bei pH = 7 sind die Spektren der Spezies A (548 nm) und C (525 nm) etwas blauverschoben. Die Zeitkonstante des ersten Intermediates ist durch Erhöhung des pH-Wertes von 4 nach 10 kaum beeinflusst. Die zweite Zeitkonstante hingegen wächst deutlich von 230 μs (pH 4) auf 750 μs (pH 10)

an. Aus diesem Befund kann man schließen, dass die Reaktion von B nach C einen Protonierungsschritt umfasst. Des Weiteren ist noch festzuhalten, dass die spätere Dynamik im ms-Bereich ebenfalls eine pH-Abhängigkeit aufweist und somit einen weiteren Protonierungsschritt im Photozyklus darstellt. Dieser konnte allerdings aufgrund der unzureichenden Menge an Protein nicht näher auf seine spektrale Signatur hin untersucht werden. Die späten Intermediate müssen daher noch weiter untersucht werden, um den kompletten Photozyklus zu charakterisieren.

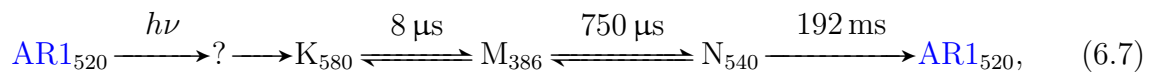
6.3. Diskussion

Die photochemischen Eigenschaften des [AR1](#) sind ähnlich denen des [BR](#), zeigen jedoch einige Unterschiede. Das Absorptionsmaximum des [AR1](#) z.B. liegt bei 520 nm und ist daher um 48 nm blauverschoben gegenüber dem des [BR](#). Eine so große Blauverschiebung ist bisher noch nie für ein Protonen pumpendes Retinalprotein beobachtet worden und sollte daher auf molekularer Basis erklärt werden. Gründe dafür mögen demnach entweder ein entlang des konjugierten π -Elektronensystems weniger verdrehter Chromophor, oder eine veränderte elektrostatische Mikroumgebung des Chromophors sein. Es bleibt jedoch zu beachten, dass das exakte Absorptionsmaximum des [AR1](#) in seiner natürlichen Umgebung, die Lipide der *Acetabularia* Membran, nicht bekannt ist. Ein weiterer Unterschied liegt im etwas kleineren Extinktionskoeffizienten im Absorptionsmaximum des [AR1](#) gegenüber dem des [BR](#), was ebenfalls auf unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen dem Retinal und dem Proteingerüst zurückzuführen ist.

Der Photozyklus des [AR1](#) kann analog zu dem des [BR](#) modelliert werden. Die Spezies A aus dem Abschnitt 6.2.2 kann dem K-Intermediat des [BR](#) aufgrund seiner Rotverschiebung bezüglich des Grundzustandes und seines Auftretens vor 500 ns zugeordnet werden. Dieses K-Intermediat wandelt sich mit einer Zeitkonstanten von 8 μ s in die mit B bezeichnete Spezies mit einem Absorptionsmaximum bei 386 nm um. Dieses Intermediat kann dem M-Intermediat des [BR](#) zugeordnet werden. Im sehr gut untersuchten Photozyklus des [BR](#) ist ein Protonierungsschritt bei der Reaktion vom M- zum N-Intermediat beteiligt [Ott+89; Ger+89]. In Entsprechender Weise wird das Intermediat, das aus dem Zerfall der M Spezies entsteht, der N-Form zugeordnet. Es zeigt sich bei dieser Konversion, dass die M- und N-Formen sich bei neutralem bis alkalischen pH-Werten nach 1 ms im Gleichgewicht befinden. Beide Intermediate zerfallen mit 192 ms in den Grundzustand.

Weitere Intermediate im Zeitbereich von 10 ms bis hin zu 1.5 s wurden spektroskopisch nicht beobachtet. Dies kann zum einen daran liegen, dass die Zeitkonstanten für das Entstehen gleich oder kleiner ist als der Zerfall, oder aber, dass diese Intermediate dem folgenden oder vorherigen spektroskopisch zu ähnlich sind. Es wird insbesondere kein dem L-Zustand des BR entsprechendes Intermediat beobachtet.

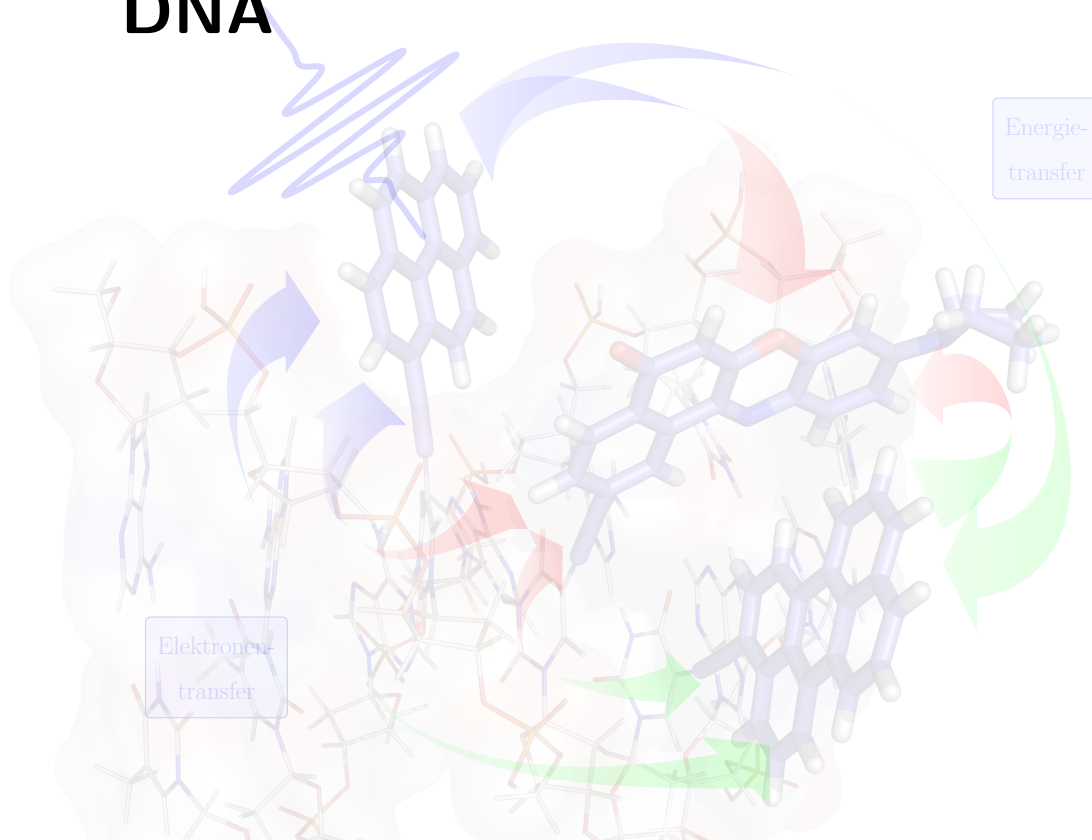
Die Zustände K und M liegen im Gleichgewicht vor. Des Weiteren bilden die Zustände M und N bei $\text{pH} > 7$ ein Gleichgewicht. Aufgrund dieser Beobachtungen kann der Photozyklus bei $\text{pH} = 7.0$ als folgende Serie von Reaktionsschritten beschrieben werden:



wobei die Entstehung des K-Zustands außerhalb der derzeitigen Zeitauflösung liegt. Es kann daher sein, dass innerhalb der Reaktionssequenz ein früheres Intermediat existiert, welches durch das „?“ gekennzeichnet ist. Der Zerfall des N-Intermediats ist der limitierende Schritt im Photozyklus und sollte daher die photostationären Eigenschaften des AR1 unter Licht-gesättigten Bedingungen bestimmen. Im Vergleich zum BR sind alle Reaktionsschritte im AR1 schneller, und das Spektrum der Dunkelform von AR1 ist blauverschoben bezüglich des Spektrums von BR.

Mittlerweile wurden in genetischen Projekten unerwarteterweise Retinalproteine in bakteriellen Organismen [GL03; Spu06] wie auch in niederen Eucaria [Spu+00; BJ06] entdeckt. Die Untersuchung derartiger Retinalproteine aus neuen Zweigen der Evolution bietet immer die Möglichkeit, neue Prinzipien der Funktionsweise zu entdecken und somit das bisherige angehäuften Wissen zu erweitern. Dieses Wissen kann eventuelle seine Anwendung in der Medizin finden. Ein sehr gutes Beispiel dafür stellt die sogenannte Optogenetik dar [Dei11]. Eine Anwendung der Optogenetik stellt z.B. die Verwendung eines genetisch modifizierten *Channelrhodopsin2* (ChR2) in Verbindung mit *Halorhodopsin* (HR) auf molekularer Ebene dar, wodurch ein vollständiges System für die multimodale, sehr schnelle, genetisch gerichtet und vollständig optische Abfrage von neuronalen Strömen in lebenden Organismen gebildet wird [Zha+07].

7. Ein multichromophores Lichtsammelsystem gebunden an DNA



7.1. Einleitung

Bei der Entwicklung künstlicher Antennensysteme zur Absorption von UV/Vis Licht konnten mit Chromophoren, die auf molekularer und supramolekularer Ebene in hierarchischer Weise organisiert wurden, bereits erste Erfolge erzielt werden [Was09; Ima04; BTH05; Fla+08; You+06; Hoe+05; Won+11; KD09]. Exakte Kontrolle über Energie- und Elektronentransferprozesse konnte durch selbst organisierende synthetische Baueinheiten mit gut definierten molekularen Geometrien, die entsprechende Distanzen zwischen den Chromophoren bieten, erreicht werden [Was09; May+09; You+06; Gan+09; KD09]. Ein gutes Beispiel für ein molekulares Gerüst mit definierten Geometrien bietet die reguläre Topologie der DNA. Sie besitzt eine doppelhelikale Struktur und weist einen typischen Stapelabstand der Basenpaare von 3.4 Å auf. In letzter Zeit sind daher viele Arbeiten in diesem Gebiet der auf DNA basierenden Organisation von π -konjugierten Chromophoren veröffentlicht worden [VW09a; MWH10; Ban+11; TWK09]. „Oligofluoride“ z.B. zeigen Emissionsfarben über den gesamten sichtbaren Bereich bei Anregung bei einer einzelnen Wellenlänge [TWK09]. Weitere Beispiele sind die Synthese einer Weißlicht emittierende DNA [VW09b], sowie der Vergleich zwischen einer kovalenten und nicht-kovalenten Chromophoranordnung innerhalb eines mit Nilrot modifizierten Nukleosids [VW10]. In diesem Kapitel wird über Substanzen berichtet, welche die Architektur der DNA für die Anordnung von drei unterschiedlichen Chromophoren nutzen. Diese decken den gesamten UV-A/Vis Absorptionsbereich ab und demonstrieren die photophysikalischen Eigenschaften eines Lichtsammelsystems.

7.2. Resultate

Zunächst sollen die mit Chromophoren markierten DNA-Stränge vorgestellt werden. Die Synthese, die Messungen der Schmelztemperaturen und die Aufnahme der stationären Absorptions- wie auch Emissionsspektren erfolgte durch Herrn Reji Varghese, der zum damaligen Zeitpunkt am Institut für Organische Chemie bei Herrn Prof. Dr. H.-A. Wagenknecht gearbeitet hatte. Die Messungen der Lebensdauern via TCSPC ist Bestandteil dieser Arbeit. Basierend auf diesen spektroskopischen Daten werden alle beobachteten Phänomene diskutiert und ein Modell für ein Lichtsammelsystem entwickelt, das z.B. für die chemische Photokatalyse genutzt werden könnte.

7.2.1. Mit Chromophoren markierte DNA-Stränge

Die verwendeten Chromophore waren das **Ethynyl-Pyren (Py)** als ein blauer Emitter, das **Ethynyl-Perylene (Pe)** als ein grüner Emitter und das **Ethynyl-Nile Rot (Nr)** als ein roter Emitter. Alle drei Chromophore wurden über eine Acetylen-Brücke an die Position 5 des 2'-Deoxyuridin verknüpft (siehe Abbildung 7.1). So sollte die gewohnte **Deoxyuridin**

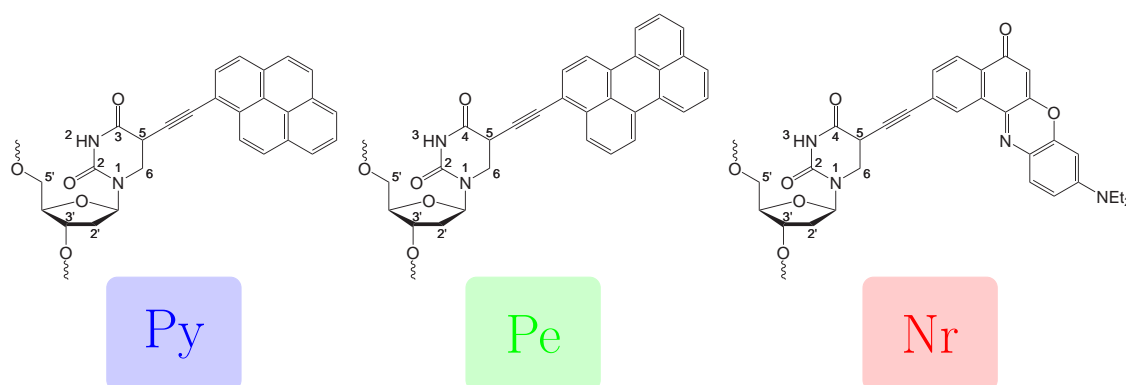


Abb. 7.1.: Strukturen der drei verwendeten Chromophor-Nukleotide **dU-Py**, **dU-Pe** und **dU-Nr**.

(dU):**Adenosin (A)**-Basenpaarung aufrecht erhalten werden. Die Phosphoramidite des 2'-Deoxyuridin mit **Py** und **Pe** waren kommerziell erhältlich. Der mit 2'-Deoxyuridin und **Nr** modifizierte **DNA**-Baustein wurde gemäß veröffentlichter Prozeduren synthetisiert [VW09b; VW10; Var+09]. **DNA-Py**, **DNA-Pe** und **DNA-Nr** enthalten jeweils nur einen der eingesetzten Chromophore als Modifikation. In **DNA-PyNr** und **DNA-PeNr** wurden **Py** und **Pe** jeweils mit **Nr** in benachbarter Position kombiniert. Schließlich wurden noch zwei Proben untersucht, in denen alle drei Chromophore zum einen direkt nebeneinander (**DNA-PyNrPe**) und zum anderen jeweils mit einem **A-Thymidin (T)**-Basenpaar voneinander getrennt (**DNA-PyAPeANr**) arrangiert waren. In Tabelle 7.1 sind die Sequenzen aller untersuchter **DNA**-Proben aufgeführt. Die Synthesen dieser **DNA**-Proben wurden von Herrn Reji Varghese durchgeführt [VW09b]. Diese Proben wurden mir freundlicherweise zur weiteren spektroskopischen Untersuchung überlassen.

7.2.2. Photophysikalische Untersuchungen

Von allen **DNA** Proben wurden stationäre **UV/Vis**-Absorption, Fluoreszenz, Schmelztemperaturen sowie Fluoreszenzlebensdauern via **TCSPC** (siehe Abschnitt 2.3) gemessen. Bei den **TCSPC**-Messungen hat sich gezeigt, dass einige Proben Anteile mit sehr

Probenname	Sequenz (3'-5') ^a	T _m / °C ^b
DNA-Py ^c	AGTCACAA(dU-Py)AACTGACG	57.4
DNA-Pe ^c	AGTCACAA(dU-Pe)AACTGACG	57.3
DNA-Nr ^c	AGTCACAA(dU-Nr)AACTGACG	57.1
DNA-PyNr	AGTCACAA(dU-Py)(dU-Nr)AACTGACG	59.0
DNA-PeNr	AGTCACAA(dU-Pe)(dU-Nr)AACTGACG	58.1
DNA-PyNrPe	AGTCACAA(dU-Py)(dU-Nr)(dU-Pe)AACTGACG	60.2
DNA-PyAPeANr	AGTCACAA(dU-Py)A(dU-Pe)A(dU-Nr)AACTGACG	55.2

^aDie Strukturen der Chromophor-Nukleotide dU-Py, dU-Pe und dU-Nr sind Abbildung 7.1 zu entnehmen.

^bGemessen bei $\lambda = 260$ nm, 20-90 °C, Interval: $0.7^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 2.5 μM DNA in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH = 7.0), 250 mM NaCl.

^cDie entsprechende unmodifizierte DNA-Duplex, die T anstatt von dU-Py, dU-Pe oder dU-Nr beinhaltet, hat einen Schmelzpunkt von T_m = 60.7 °C.

Tab. 7.1.: Sequenzen und Schmelztemperaturen T_m der DNA-Proben.

kurzen Lebensdauern besitzen. Über diese ganz schnellen Zeiten (unterhalb einer halben ns) können leider keine präzisen Aussagen gemacht werden, weil sich im verwendeten Versuchsaufbau die Unsicherheit in der genauen Position des Zeitnullpunktes besonders bemerkbar machte¹.

Bei allen mit zwei oder drei Chromophoren markierten DNA-Strängen muss ferner berücksichtigt werden, dass bei 370 nm zwar hauptsächlich Py angeregt wird, aber Pe bzw. Nr mit einer kleineren Wahrscheinlichkeit auch angeregt werden (siehe Abbildung 7.2 (B) und (C)). Für die Emissionsbeiträge lässt sich festhalten, dass bei 430 nm hauptsächlich Emission von Py, und bei 660 nm fast nur Emission von Nr detektiert wird. Aber bei 500 nm wird neben der Emission von Pe immer auch ein deutlicher Anteil an Py mitgemessen. Demzufolge konnte mit diesem Aufbau Pe nicht wirklich getrennt beobachtet werden. Nichtsdestotrotz bieten die Resultate unter den gegebenen Umständen erste Einblicke in die Photophysik der untersuchten Systeme.

Die Referenz-Duplex Systeme mit einer einfachen Modifikation DNA-Py, DNA-Pe und DNA-Nr zeigten ein charakteristisches optisches Verhalten sowohl für die Absorp-

¹Präzisere Messungen mit einer *Streak Camera* (SC) in Kombination mit einem zeitlich kürzen Laser-System (1 kHz, $\Delta t \approx 80$ fs) zur Messung zeitaufgelöster Emissionsspektren sind derzeit geplant.

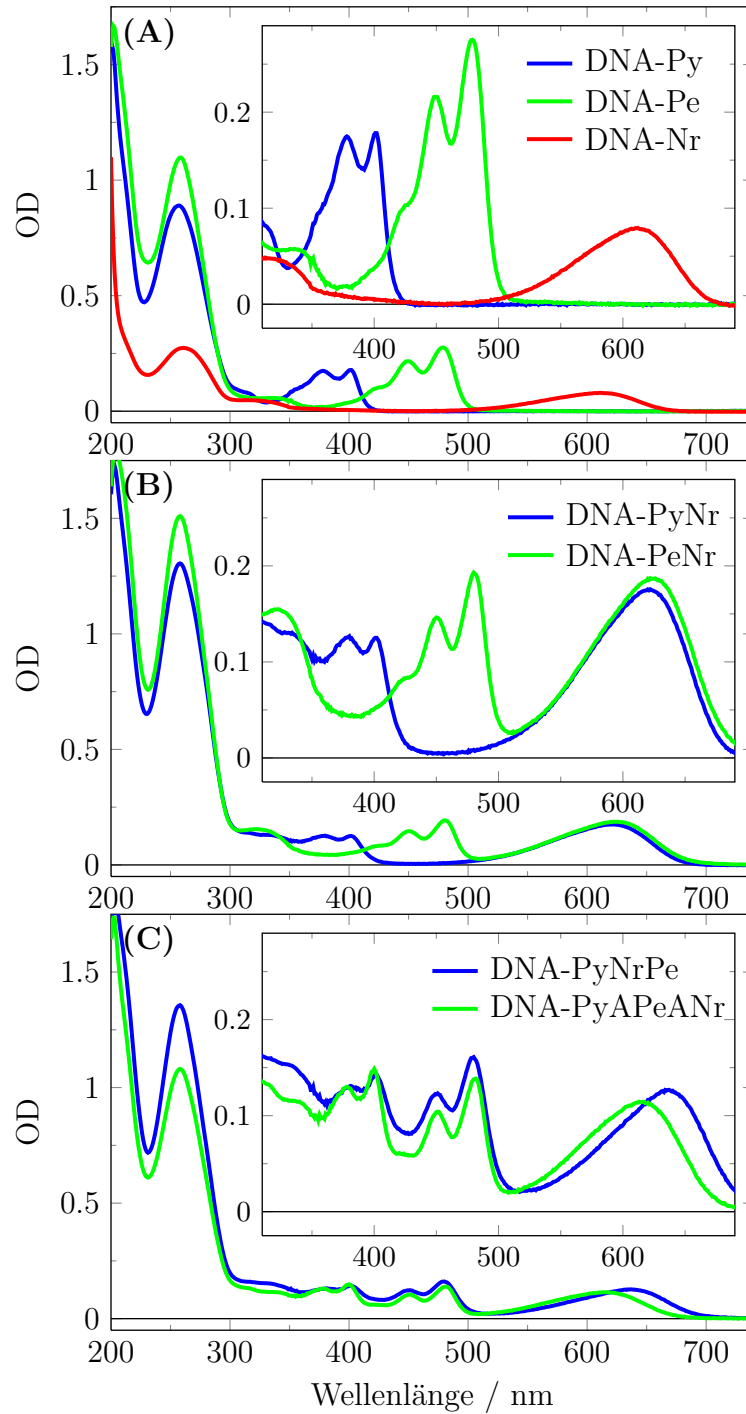


Abb. 7.2.: Absorptionsspektren der einfach markierten DNA-Proben mit 2.5 μM DNA in 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH = 7, 250 mM NaCl.

tion wie auch für die Emission der entsprechenden Chromophore. Bei Anregung der isolierten Chromophore-Nukleotide dU-Py, dU-Pe und dU-Nr in AcN bei 280 nm wurde das zu erwartende mono-exponentielle Abklingverhalten der Fluoreszenz beobachtet (siehe Tabelle 7.2). Das Abklingverhalten der Emissionen bei den jeweils einfach modifizierten DNA-Doppelstrang-Proben DNA-Py, DNA-Pe und DNA-Nr war jedoch multi-exponentiell. Ein solches Verhalten ist typisch für Chromophore, welche kovalent an

Probe	λ_{obs} / nm	τ_1 / ns	τ_2 / ns	τ_3 / ns
dU-Py ^a	390 ^c	15.8	–	–
dU-Pe ^a	440 ^c	4.2	–	–
dU-Nr ^a	620 ^c	4.6	–	–
DNA-Py ^b	450 ^d	1.2 (41 %)	3.1 (59 %)	–
DNA-Pe ^b	530 ^e	2.0 (29 %)	4.3 (71 %)	–
DNA-Nr ^b	660 ^c	1.5 (36 %)	3.6 (64 %)	–
DNA-PyNr ^b	450 ^d	0.8 (37 %)	2.2 (53 %)	6.9 (10 %)
	660 ^d	0.7 (35 %)	2.4 (59 %)	11.7 (6 %)
DNA-PeNr ^b	490 ^d	1.8 (43 %)	5.7 (57 %)	–
	660 ^d	0.8 (35 %)	3.1 (65 %)	–
DNA-PyNrPe ^b	440 ^d	0.6 (42 %)	2.1 (51 %)	10.6 (7 %)
	500 ^d	0.8 (17 %)	2.6 (70 %)	5.4 (13 %)
	660 ^d	0.2 (73 %)	3.3 (27 %)	–
DNA-PyAPeANr ^b	430 ^d	0.4 (47 %)	2.0 (43 %)	8.8 (10 %)
	490 ^d	2.3 (71 %)	4.6 (29 %)	–
	660 ^d	0.6 (52 %)	2.2 (44 %)	14.5 (4 %)

^aIn AcN.

^b2.5 μM DNA in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH = 7.0).

^c $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$.

^d $\lambda_{\text{exc}} = 370 \text{ nm}$.

^e $\lambda_{\text{exc}} = 445 \text{ nm}$.

Tab. 7.2.: Fluoreszenzlebensdauern der Nukleoside dU-Py, dU-Pe, dU-Nr und der DNA-Proben in AcN.

DNA gebunden sind. Eine plausible Erklärung dafür wäre die Existenz unterschiedlicher struktureller Konformere. Die folgende Diskussion liefert Deutungen für das Konformer mit dem schnelleren Zerfall. Die Proben DNA-PyNr und DNA-PeNr haben jeweils das dU-Nr gemeinsam. Bei Anregung von DNA-PyNr in der Absorptionsbande bei 370 nm, die für das Py typisch ist, wurde Löschung der Py-Emission und ein deutliches Ansteigen der Nr-Emission beobachtet (siehe Abbildung 7.3 (A)). Schaut man sich die kürzeste Lebensdauerkomponente der Py-Emission bei $\lambda_{\text{obs}} = 450 \text{ nm}$ an, erkennt man eine Verschiebung in den sub-ns-Bereich mit 0.8 ns (36 %). Daraus kann geschlossen werden, dass es zu einem Energietransfer von der Py- zur Nr-Einheit kommt. Bei der

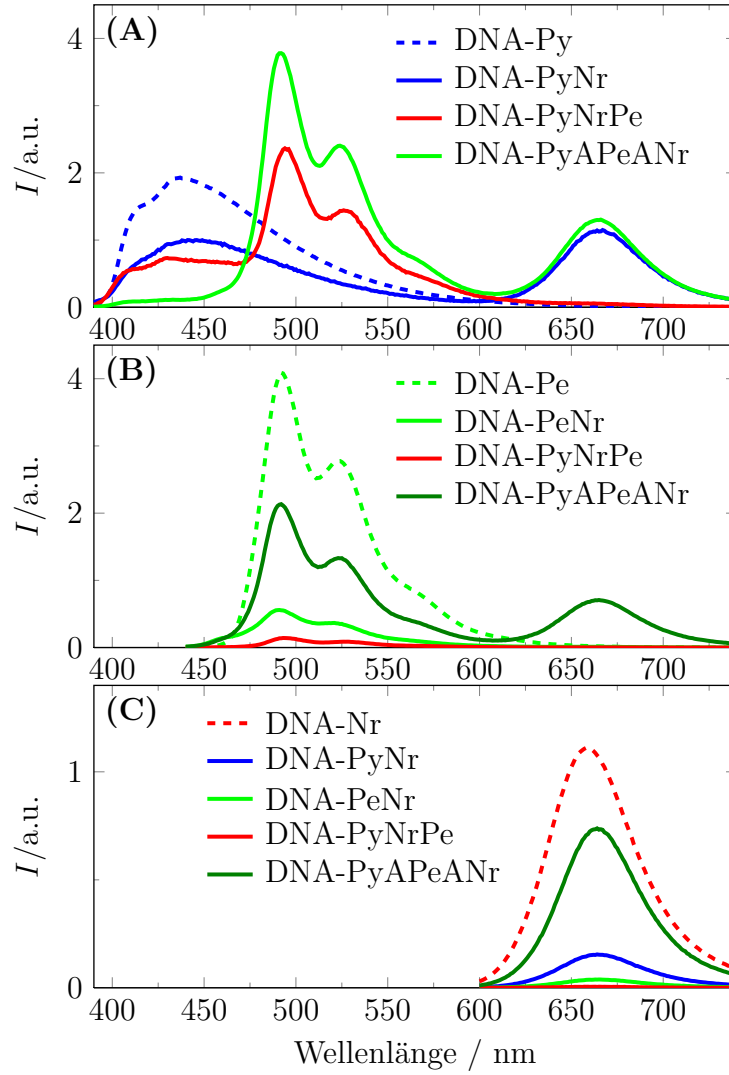


Abb. 7.3.: Fluoreszenzspektren der DNA-Proben, 2.5 μM DNA in 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH = 7, 250 mM NaCl, $\lambda_{\text{exc}} = 380$ nm (A), 430 nm (B), 590 nm (C). Alle Fluoreszenzspektren sind auf die optische Dichte bei der Anregungswellenlänge λ_{exc} korrigiert.

Untersuchung von DNA-PeNr ergab sich ein etwas anderes Bild. Wurde in diesem Fall in der Absorptionbande bei 440 nm angeregt, die für das Pe typisch ist, verkürzte sich die schnellste Komponente aus DNA-Pe mit 2.0 ns (29 %) in DNA-PeNr nur auf 1.8 ns (43 %). Eine Nr-Emission wurde ebenfalls nicht in der stationären Emission beobachtet (siehe Abbildung 7.3 (B)). Somit scheint ein Energietransfer von Pe nach Nr innerhalb von DNA-PeNr unwahrscheinlich. Die Messung der Nr-Emission von DNA-Nr zeigte keine Lebensdauer kürzer als 1.5 ns. Vergleicht man schließlich dieses Resultat mit den Beobachtungen aus den Messungen an DNA-PyNr und DNA-PeNr, zeigt sich, dass sowohl DNA-PyNr als auch DNA-PeNr beide einen sub-ns-Beitrag der Lebensdauern in der Emissionsbande bei $\lambda_{\text{obs}} = 660$ nm aufweisen, die typisch für das Nr ist: DNA-PyNr mit 0.7 ns (35 %) und DNA-PeNr mit 0.8 ns (35 %). In den stationären Fluoreszenzspek-

tren beider Duplexe wurde die **Nr**-typische Emission fast vollständig gelöscht, wenn in der Absorptionsbande des **Nr** angeregt wurde (siehe Abbildung 7.3 (C)). Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass es zu einem Elektronentransfer zwischen der **Nr**-Einheit und der **Py**-Einheit in **DNA**-PyNr bzw. der **Pe**-Einheit in **DNA**-PeNr kommt.

Ausgehend von den Beobachtungen an den doppelt modifizierten Doppelsträngen kann nun das Verhalten der dreifach modifizierten **DNA**-PyNrPe diskutiert werden. Nach Anregung bei 370 nm in die **Py**-Bande wurde in der Emissionslebensdauer der **Py**-Bande bei $\lambda_{\text{obs}} = 450$ nm ein deutlicher Beitrag einer Komponenten im sub-ns-Bereich mit 0.6 ns (42 %) gefunden. Dieser Beitrag ist größer als in **DNA**-PyNr und deutet auf einen effizienten Energietransfer zu der benachbarten **Pe**- und **Nr**-Einheit hin. Zumindest konnte eine entsprechende Emission der **Pe**-Einheit im stationären Spektrum beobachtet werden (siehe Abbildung 7.3 (A)). Der **Pe**-Fluoreszenzbeitrag bei $\lambda_{\text{obs}} = 540$ nm in **DNA**-PyNrPe, der durch den Energietransfer von der **Py**-Einheit generiert wurde, enthielt einen kleinen Beitrag einer Komponenten im sub-ns-Bereich mit 0.8 ns (17 %), welcher in **DNA**-PeNr nicht auftrat. Das stationäre Emissionsspektrum mit Anregung in der **Pe**-Bande bei 430 nm zeigt eine fast vollständige Löschung der **Pe**-Emissionsbande bei $\lambda_{\text{obs}} = 430$ nm (siehe Abbildung 7.3 (B)). Daraus kann gefolgert werden, dass ein Elektronentransfer zwischen der **Pe**-Einheit und der **Py**-Einheit sehr wahrscheinlich ist. Weiter wurde beobachtet, dass die **Nr**-Fluoreszenzlebensdauer in **DNA**-PyNrPe bei $\lambda_{\text{obs}} = 660$ nm nach Anregung der **Py**-Einheit eine dominante Komponente im sub-ns-Bereich mit 0.2 ns (73 %) aufweist. Das Auftreten dieser Komponente im sub-ns-Bereich deutet bereits auf einen Energietransfer entweder direkt von der **Py**-Einheit oder in Sequenz über die **Pe**-Einheit auf die **Nr**-Einheit hin. Der Beitrag ist in diesem Fall deutlich größer als in **DNA**-PyNr und **DNA**-PeNr. Berücksichtigt man die vollständige Löschung der **Nr**-Emission im stationären Spektrum nach Anregung in der **Py**-Bande, so kann hieraus auf einen sehr effizienten Elektronentransfer zwischen der **Nr**-Einheit sowohl mit der **Py**- als auch mit der **Pe**-Einheit geschlossen werden.

Zum Vergleich mit **DNA**-PyNrPe wurde **DNA**-PyAPeANr untersucht, das jeweils ein zusätzliches **A-T**-Basenpaar zwischen den mit Chromophor modifizierten Basenpaaren als Abstandshalter besitzt. In **DNA**-PyAPeANr ist der Abstand zwischen den Chromophoren daher um 3.4 Å größer. Auch ist die Reihenfolge im Vergleich zu **DNA**-PyNrPe anders, da die Positionen der **Pe**- und **Nr**-Einheit hier vertauscht vorliegen. Das stationäre Spektrum von **DNA**-PyAPeANr nach Anregung in der **Py**-Bande bei 380 nm zeigt sowohl für die **Pe**- als auch für die **Nr**-Einheit eine hohe Emissionsintensität (siehe

Abbildung 7.3 (A)). Dies steht im Einklang mit der zuvor gemachten Interpretation eines möglichen Energietransfers von der Py-Einheit sowohl auf die Pe-Einheit als auch auf die Nr-Einheit. Auch wird nach Anregung in der Pe-Bande bei 430 nm im Unterschied zu DNA-PeNr und DNA-PyNrPe nun eine Emission der Nr-Einheit beobachtet (siehe Abbildung 7.3 (B)). Im Weiteren zeigt sich, dass die Nr-Emission nach Anregung in der Nr-Bande im Vergleich zu DNA-PyNrPe ebenfalls nicht vollständig gelöscht wird (siehe Abbildung 7.3 (C)). Für diese Emission wird zusätzlich eine Vergrößerung der Lebensdauer sowie eine Verkleinerung der dazugehörigen Amplitude der Komponenten im sub-ns-Bereich von 0.2 ns (73 %) in DNA-PyNrPe auf 0.6 ns (52 %) in DNA-PyAPeANr beobachtet. Diese Beobachtungen unterstützen das zuvor gemachte Modell eines Elektronentransfers zwischen Pe und Py bzw. zwischen Nr und Py. Denn nun haben die Chromophore mit 6.8 Å einen vergrößerten Abstand zueinander, was eine Löschung sowohl der Pe- als auch der Nr-Emission aufgrund eines Elektronentransfers verschlechtert.

7.3. Zusammenfassung und Ausblick

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Kombination der Chromophore Pyren, Perylen und Nilrot verknüpft an DNA-Basen über eine starre Acetylenbrücke und die doppel-helikale Struktur der DNA zusammen ein Multichromophorsystem mit viel versprechenden photophysikalischen Eigenschaften darstellt. Das Absorptionsspektrum aller drei Chromophore deckt fast den gesamten UV-A/Vis-Bereich ab. Die bisherigen Daten lassen sich wie folgt deuten. Es kommt auf der einen Seite wahrscheinlich zu einer Kaskade an Energietransferprozessen von Py über Pe nach Nr und auf der anderen Seite zu einer Kaskade an Elektronentransferprozessen, was wiederum zu einer Ladungstrennung innerhalb des Systems führen sollte.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass alle postulierten Elektronentransferprozesse die Bildung von Radikalen zur Folge hätten. Diese sind jedoch bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifiziert worden. Somit bedarf es weiterer Untersuchungen zur Überprüfung der hier gemachten Deutungen. Lassen sich die Deutungen durch weitere Experimente untermauern, wie z.B. durch Identifikation der postulierten Radikale in der transienten Absorption, so hätte man ein System gefunden, in dem es unabhängig von der Anregungswellenlänge zwischen 350 nm und 700 nm letztlich immer zu einem ladungsgetrennten Zustand kommt. Sind diese ladungsgetrennten Zustände hinreichend langlebig, so

könnten sie potentiell für die chemische Photokatalyse genutzt werden. Die Substanzen DNA-PyNrPe und DNA-PyAPeANr wären demnach ein konzeptioneller Beweis für ein relativ einfaches Design von Lichtsammelsystemen basierend auf der DNA-Architektur.

8. Zusammenfassung

Die Hauptaufgabe war es eine 2D-Blitzlichphotolyse unter Verwendung einer *Streak Camera* (SC) als Detektionssystem aufzubauen, um so einen Vorteil gegenüber konventionellen eindimensionalen Verfahren zu schaffen. Bei eindimensionalen Messungen bei fester Wellenlänge werden üblicherweise 100 Anregungszyklen benötigt, um einen aussagekräftigen mono-exponentiellen Fit zu bekommen. Zudem sind Messungen bei Wellenlängen, die mit der Fluoreszenz überlappen, nicht möglich. Durch den Aufbau des Experiments für 2D-*Transiente Absorption* (TA) wurde die Möglichkeit geschaffen, Fluoreszenzspektren und TA-Spektren mit einer einzelnen Anregung für Zeitfenster $> 20 \mu\text{s}$ zu messen. Mit dem zweidimensionalen Aufbau kann über den gesamten sichtbaren Wellenlängenbereich gemessen werden und dabei die Zerfallscharakteristik eines Systems für all diese Wellenlängen mit weniger Anregungszyklen ermittelt werden, als man für eine einzelne eindimensionale Messung benötigen würde. Diese Vorteile liegen in der Verwendung einer speziellen SC. Diese SC hat zum einen einen viel größeren dynamischen Bereich (1:10000) verglichen zum typischen dynamischen Bereich eines Photomultipliers (1:100). Zum anderen sind die Daten hoch redundant, was das geringe Signal zu Rausch Verhältnis eines einzelnen individuellen Pixels mehr als kompensiert. Das in dieser Arbeit aufgebaute Experiment für die 2D-TA liefert demnach TA-Daten mit einem Multiplex-Faktor von mehr als 100. Mit Hilfe dieser 2D-TA-Experiments sowie anderer spektroskopischer Methoden wurden zwei biologische Photorezeptor Proteine und ein Photokatalyse System untersucht.

Im Photokatalyse-Projekt wurde der durch *Riboflavintetraacetat* (RFTA) katalysierte Photooxidationsmechanismus von *4-Methoxybenzylalkohol* (MBA) mit transienter Absorptionsspektroskopie in Zeitbereichen von sub-Pikosekunden bis hin zu Mikrosekunden untersucht. Die Daten zeigen zwei einander entgegenwirkende Reaktionsprozesse im Hinblick auf die *Produktquantenausbeute* (PQA). Auf der einen Seite besteht ein produktiver Prozess, der vom Triplettzustand des RFTA beginnt. Beobachtet wur-

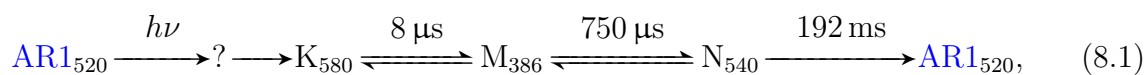
de ein Elektronentransfer vom MBA zum RFTA in der Größenordnung von einer 1 μ s. Befindet sich das System in einem protonenreichen Lösungsmittel, wie reines Wasser oder ein mit Säure versetztes Lösungsmittel-Wasser-Gemisch, dann wird ebenfalls ein vollständiger Protontransfer (PT) innerhalb der Lebensdauer für den Elektronentransfer (eT) beobachtet und das Neutralradikalpaar $^2\text{RFTA}^\bullet$ und $^2\text{MBA}^\bullet$ wird gebildet, welches im untersuchten Zeitfenster von 20 μ s nicht wieder zerfällt. Im organischen Lösungsmittel AcN und selbst in einem 1 zu 1 Gemisch aus AcN und Wasser läuft der Protonierungsschritt nicht vollständig ab. Es besteht unter diesen Bedingungen eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Rekombination des Radikationenpaares $^2\text{RFTA}^{\bullet-}$ und $^2\text{MBA}^{\bullet+}$ in seine GZ-Formen, so dass die PQA herabgesetzt wird. Auf der anderen Seite wird ein sehr schneller eT vom Singulettzustand des RFTA gefolgt von einer ebenfalls sehr schnellen Ladungsrekombination innerhalb von 50 ps beobachtet, die einen Verlustkanal darstellt. Der Verlustkanal verläuft diffusionskontrolliert und gewinnt daher erst bei Erhöhung der Substratkonzentration an Bedeutung. Denn bei Substratkonzentrationen oberhalb von 50 mM überwiegt das sehr schnelle Löschen des $^1\text{RFTA}^*$ gegenüber dem ISC-Prozess und es kommt nur noch zur verminderten Population des Triplettzustands vom RFTA. Zusätzlich wird auch noch ein merklicher Anteil an bereits assoziiert vorliegenden RFTA-MBA-Aggregaten bei sehr hohen MBA-Konzentrationen von mehreren 100 mM beobachtet, die ebenfalls einen unproduktiven Zyklus von Ladungstrennung und Rekombination eingehen innerhalb von 0.9 bis 4.5 ps je nach Lösungsumgebung. In reinem MBA als Lösungsmittel ist der Verlustkanal so dominant, dass keine deutliche Produktbildung sichtbar wird. Sind die Verhältnisse jedoch so, dass der erste eT erst nach einem ISC-Prozess des RFTA stattfindet, liegt die Ladungstrennung in einem Spin korrelierten Radikationenpaar vor, dessen Rekombination verboten ist und daher deutlich verlangsamt wird [Ver06]. Die verlängerte Lebensdauer eines solchen Radikationenpaares erlaubt dann eine höhere Effizienz für einen zweiten Reaktionsschritt, wie dem PT von $\text{MBA}^{\bullet+}$ zum $\text{RFTA}^{\bullet-}$. Für eine hohe PQA muss demnach der mittlere Abstand zwischen dem MBA und dem RFTA groß genug sein, um innerhalb der Lebensdauer des Singulettzustands des RFTA ein durch Diffusion kontrolliertes Zusammentreffen zu vermeiden. Dies wird durch Herabsetzen der Substratkonzentration erreicht. Ebenfalls wichtig ist eine protonenreiche Lösungsumgebung um das Spin korrelierte Radikationenpaar vor der Rekombination abzufangen.

Bei Untersuchung der LOV1-Domäne aus *Chlamydomonas reinhardtii* (C.r.) wurde versucht, potentielle Intermediate im Photozyklus zu identifizieren. Es wurden zudem als

Vergleichssysteme die Mutanten **LOV1-C57G** und **LOV1-C57S**, in denen eine Adduktbildung zwischen dem reaktiven Cystein-57 und dem C(4a) des Kofaktors **FMN** nicht mehr stattfindet, sowie **FMN** in Lösung untersucht. Basierend auf den spektroskopischen Messungen wird folgender Mechanismus vorgeschlagen. Nach Photoanregung des **GZ** wird der Singulettzustand erzeugt. Dieser zerfällt mit einer Lebensdauer von 2.9 ns zu einem Teil in den **GZ** zurück und zum anderen Teil in den Triplettzustand. Der Triplettzustand wird nahezu vollständig über Transfer-Reaktionen eines e^- gefolgt von einem H^+ oder von einem $H\bullet$ gelöscht. Die Transfer-Reaktionen erfolgen von zwei unterschiedlichen Konformeren des Cystein-57 heraus, und es entstehen zwei Radikalpaare in zwei unterschiedlichen Konformeren zu etwa 87 % (A) und 13 % (B). Das Haupt-Radikalpaar (A) bildet mit k_{AB} ($\tau = 1.1 \mu s$) vollständig die Addukt-Spezies, während das Radikalpaar (B) auf einem Zeitbereich von $> 5 \mu s$ stabil bleibt. Es kann vermutet werden, dass das Radikalpaar (B) entweder durch O_2 zurück in den **GZ** katalysiert wird, oder durch einen Konformationswechsel mit k_{KW} in das Radikalpaar (A) übergeht, welches wieder das Addukt bildet. Das Addukt zerfällt schließlich in einer thermisch aktivierten Reaktion zurück in den **GZ**.

Als zweites biologisches System wurde der Photozyklus des ***Acerhodopsin1* (AR1)** aus ***Acetabularia acetabulum* (A.a.)** untersucht. Es zeigte sich, dass die photochemischen Eigenschaften des **AR1** ähnlich denen des ***Bacteriorhodopsin* (BR)** sind. Sie zeigen jedoch auch einige Unterschiede. Das Absorptionsmaximum des **AR1** z.B. liegt bei 520 nm und ist daher um 48 nm blauverschoben gegenüber dem des **BR**. Eine so große Blauverschiebung ist bisher noch nie für ein Proton pumpendes Retinal-Protein beobachtet worden und sollte daher auf molekularer Basis erklärt werden. Gründe dafür mögen demnach entweder ein entlang des konjugierten π -Elektronensystems weniger verdrehter Chromophor, oder eine veränderte elektrostatische Mikroumgebung des Chromophors sein. Es bleibt jedoch zu beachten, dass das exakte Absorptionsmaximum des **AR1** in seiner natürlichen Umgebung, die Lipide der *Acetabularia* Membran, nicht bekannt ist. Ein weiterer Unterschied liegt im etwas kleineren Extinktionskoeffizienten im Absorptionsmaximum des **AR1** gegenüber dem des **BR**, was ebenfalls auf unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen dem Retinal und dem Proteingerüst zurückzuführen ist. Der Photozyklus des **AR1** kann analog zu dem des **BR** modelliert werden. Es wird zuerst eine Spezies beobachtet, die dem K Intermediat des **BR** zugeordnet werden kann, da es rotverschoben bezüglich des Grundzustandes und vor 500 ns auftritt. Dieses K-Intermediat wandelt sich mit einer Zeitkonstanten von 8 μs in eine Spezies mit einem Absorptionsma-

ximum bei 386 nm um. Dieses Intermediat kann dem M-Intermediat des BR zugeordnet werden. Im sehr gut untersuchten Photozyklus des BR ist ein Protonierungsschritt bei der Reaktion vom M- zum N-Intermediat beteiligt. In Entsprechender Weise wird das Intermediat, das aus dem Zerfall der M Spezies entsteht, der N Form zugeordnet. Es zeigt sich bei dieser Konversion, dass die M und N Formen sich bei neutralem bis alkalischen pH-Werten nach 1 ms im Gleichgewicht befinden. Beide Intermediate zerfallen mit 192 ms in den Grundzustand. Weitere Intermediate im Zeitbereich von 10 ms bis hin zu 1.5 s wurden spektroskopisch nicht beobachtet. Dies kann zum einen daran liegen, dass die Zeitkonstanten für das Entstehen gleich oder kleiner sind als der Zerfall, oder aber, dass diese Intermediate dem folgenden oder vorherigen spektroskopisch zu ähnlich sind. Es wird insbesondere kein dem L-Zustand des BR entsprechendes Intermediat beobachtet. Die Zustände K und M liegen im Gleichgewicht vor. Des Weiteren bilden die Zustände M und N bei pH > 7 ein Gleichgewicht. Aufgrund dieser Beobachtungen kann der Photozyklus bei pH = 7.0 als folgende Serie von Reaktionsschritten beschrieben werden:



wobei die Entstehung des K-Zustands außerhalb der derzeitigen Zeitauflösung liegt. Es kann daher sein, dass innerhalb der Reaktionsequenz ein früheres Intermediat existiert, welches durch das „?“ gekennzeichnet ist. Der Zerfall des N-Intermediates ist der limitierende Schritt im Photozyklus und sollte daher die photostationären Eigenschaften des AR1 unter Licht-gesättigten Bedingungen bestimmen. Im Vergleich zum BR sind alle Reaktionsschritte im AR1 schneller.

In dieser Arbeit wurden neben Projekten, in den spektroskopische Untersuchungen gefragt waren, auch Projekte bearbeitet, in denen biochemische Arbeitsweisen für einen Erkenntnisgewinn wichtig waren. So wurde zum Beispiel ein Teilaspekt der Signalweiterleitung von LOV-Domänen auf experimenteller Basis näher betrachtet. Im Detail wurde die Auswirkung eines Cysteinylladduktes, das nicht am Proteinrückgrat gebunden ist, auf die Aktivität einer C-terminalen Effektordomäne untersucht. Im Vorfeld war bekannt, dass eine LOV-CG-Mutante, in der das reaktive Cystein gegen ein Glycin ausgetauscht wurde, in Gegenwart von Methylthiol eine Blaulicht induzierte Photoreaktion zum Methylthiolylladdukt eingeht [Lan+10]. Die Signalweiterleitung wurde mit dem Aktivitätstest nach Möglich *et al.* [MAM09] verfolgt. Die hierfür benötigten Proteine YF1-WT, YF1-C62G und FixJ wurden in der Gruppe von Herrn Dr. Ulrich Krauss am Institut für Moleku-

lare Enzym Technologie (IMET) im Forschungszentrum Jülich hergestellt. Messungen der Kinaseaktivität ergaben, dass im Wildtyp unter Blaulicht die Kinase-Domäne inhiert ist, während die entsprechende inaktivierte Mutante YF1-C62G durchgehend aktiv ist. Experimente in Gegenwart von Methylthiol zeigten, dass photochemisch ein Addukt zwischen dem Methylthiol und dem FMN innerhalb der LOV-Domäne gebildet wird. Die Aktivitätsmessungen lieferten im Rahmen des Messfehlers keinen signifikanten Einfluss des Methylthiolyadduktes auf die Aktivität der C-terminalen Kinase-Domäne. Demnach kommt es trotz Ausbildung eines Adduktes zu keiner Inhibierung der Kinaseaktivität, wenn keine mechanische Verbindung zwischen dem Addukt und dem Proteinrückgrat besteht. Der mechanische Zug, der durch die Adduktbildung hervorgerufen wird, scheint somit ein essentieller Bestandteil bei der Signalweiterleitung von LOV-Domänen auf entsprechende Effektor-domänen zu sein.

Als letztes Projekt wurden Elektronentransfer und Energietransferprozesse zwischen Chromophoren untersucht, die an DNA-Stränge gebunden waren. Im Detail wurden Kombinationen der Chromophore Pyren, Perylen und Nilrot untersucht, die über eine starre Acetylenbrücke an DNA-Basen verknüpft waren. Diese Proben stellen über die doppel-helikale Struktur der DNA ein Multichromophorsystem dar, welches viel versprechende photophysikalische Eigenschaften besitzt. Das Absorptionsspektrum aller drei Chromophore deckt fast den gesamten UV-A/Vis-Bereich ab. Die bisherigen Daten lassen sich wie folgt deuten. Es kommt auf der einen Seite wahrscheinlich zu einer Kaskade an Energietransferprozessen von Py über Pe nach Nr und auf der anderen Seite zu einer Kaskade an Elektronentransferprozessen, was wiederum zu einer Ladungstrennung innerhalb des Systems führen sollte. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass alle postulierten Elektronentransferprozesse die Bildung von Radikalen zur Folge hätten. Diese sind jedoch bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifiziert worden. Somit bedarf es weiterer Untersuchungen zur Überprüfung der hier gemachten Deutungen. Lassen sich die Deutungen durch weitere Experimente untermauern, wie z.B. durch Identifikation der postulierten Radikale in der transienten Absorption, so hätte man ein System gefunden, in dem es unabhängig von der Anregungswellenlänge zwischen 350 und 700 nm letztlich immer zu einem ladungsgetrennten Zustand kommt. Sind diese ladungsgetrennten Zustände hinreichend langlebig, so könnten sie potentiell für die chemische Photokatalyse genutzt werden. Die Substanzen DNA-PyNrPe und DNA-PyAPeANr wären demnach ein konzeptioneller Beweis für ein relativ einfaches Design von Lichtsammelsystemen basierend auf der DNA-Architektur.

Anhang

Im ersten Kapitel [A](#) des Anhangs werden einige mathematische Grundlagen sowie die Implementierung der in dieser Arbeit verwendeten Verfahren gegeben.

Die Ergebnisse weiterer Projekte, die während der Anfertigung dieser Arbeit nebenbei bearbeitet wurden, sind schließlich in Kapitel [B](#) zu finden. Diese Projekte sind thematisch von der eigentlichen Fragestellung der Arbeit weiter entfernt.

A. Mathematische Grundlagen

A.1. Modifizierter Levenberg-Marquardt-Algorithmus

Die notwendige Bedingung für das Auffinden eines lokalen Minimums von $\mathbf{Y}(\mathbf{a})$, so dass \mathbf{a}^* ein stationärer Punkt ist, ist nun gegeben durch

$$Y'(\mathbf{a}^*) = 0. \quad (\text{A.1})$$

Die erste Ableitung $Y(\mathbf{a})$ kann nun in einer TAYLOR-Entwicklung geschrieben werden als

$$\begin{aligned} Y'(\mathbf{a} + \mathbf{h}) &= Y'(\mathbf{a}) + Y''(\mathbf{a})\mathbf{h} + \mathcal{O}(|\mathbf{h}|^2) \\ &\simeq Y'(\mathbf{a}) + Y''(\mathbf{a})\mathbf{h} \quad \text{für ausreichend kleines } |\mathbf{h}| \\ &= 2\mathbf{G}(\mathbf{a}) + 2\mathbf{H}(\mathbf{a})\mathbf{h} + \mathcal{O}(|\mathbf{h}|^2). \end{aligned} \quad (\text{A.2})$$

$\mathbf{G} \in \mathbb{R}^k$ stellt die Gradienten-Matrix dar. Dieser Vektor enthält die partiellen Ableitungen nach den zu optimierenden Parametern \mathbf{a} und ist definiert als

$$\frac{\partial Y}{\partial a_k}(\mathbf{a}) = 2 \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n y_{ij}(\mathbf{a}) \frac{\partial y_{ij}}{\partial a_k}(\mathbf{a}) \quad (\text{A.3})$$

$$\mathbf{G}_k(\mathbf{a}) = \frac{1}{2} \frac{\partial Y}{\partial a_k}(\mathbf{a}) = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n \mathbf{J}_{ijk}(\mathbf{a}) \mathbf{f}_{ij}(\mathbf{a}), \quad (\text{A.4})$$

wobei $\mathbf{J} \in \mathbb{R}^{m \times n \times k}$ wiederum die dreidimensionale JAKOBI-Matrix mit

$$\mathbf{J}_{ijk}(\mathbf{a}) = \frac{\partial y_{ij}}{\partial a_k}(\mathbf{a}). \quad (\text{A.5})$$

ist. Im Weiteren ist $\mathbf{H} \in \mathbb{R}^{k \times l}$ die HESSE-Matrix, welche entsprechend gegeben ist zu

$$\frac{\partial^2 Y}{\partial a_k \partial a_l}(\mathbf{a}) = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n \left(\frac{\partial y_{ij}}{\partial a_k}(\mathbf{a}) \frac{\partial y_{ij}}{\partial a_l}(\mathbf{a}) - y_{ij}(\mathbf{a}) \frac{\partial^2 y_{ij}}{\partial a_k \partial a_l}(\mathbf{a}) \right) \quad (\text{A.6})$$

$$\mathbf{H}_{kl}(\mathbf{a}) = \frac{1}{2} \frac{\partial^2 Y}{\partial a_k \partial a_l}(\mathbf{a}) = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n \mathbf{J}(\mathbf{a})_{ijk} \mathbf{J}_{ijl}(\mathbf{a}) + \left(\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n y_{ij}(\mathbf{a}) \mathbf{f}_{ij}''(\mathbf{a}) \right)_{kl} \quad (\text{A.7})$$

Der Term mit den zweiten Ableitungen $\frac{\partial^2 y_{ij}}{\partial a_k \partial a_l}(\mathbf{a})$ ist meist bei praktischen Anwendung sehr klein und kann daher vernachlässigt werden. Dies liegt an der Tatsache, dass er mit dem Term $y_{ij}(\mathbf{a})$ multipliziert wird, welcher im Fall eines guten Models den Messfehler eines jeden Punktes wiedergibt. Dieser Fehler hat für jeden Messpunkt unterschiedliche Vorzeichen und sollte im Allgemeinen nicht mit dem Model korreliert sein, so dass sich in der gesamten Summation die zweiten Ableitungen gegenseitig heraus löschen. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle mit der pseudo-HESSE-Matrix

$$\mathbf{H}_{kl}^{\text{pseudo}}(\mathbf{a}) = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n \mathbf{J}_{ijk}(\mathbf{a}) \mathbf{J}_{ijl}(\mathbf{a}) \quad (\text{A.8})$$

weiter verfahren. Setzt man nun die notwendige Bedingung aus Gleichung A.1 in Gleichung A.2 ein und stellt entsprechend um, so erhält man ein lineares Gleichungssystem nach der GAUSS-NEWTON-Methode¹:

$$\begin{aligned} \mathbf{H}(\mathbf{a}) \mathbf{h}^{\text{gn}} &= -\mathbf{G}(\mathbf{a}) \\ \sum_{l=1}^{\text{Komp}} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n \mathbf{J}_{ijk}(\mathbf{a}) \mathbf{J}_{ijl}(\mathbf{a}) \mathbf{h}_l^{\text{gn}} &= - \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n \mathbf{J}_{ijk}(\mathbf{a}) \mathbf{f}_{ij}(\mathbf{a}) \end{aligned} \quad (\text{A.9})$$

Levenberg und später Marquardt wandelten diese Bestimmungsgleichung durch folgende Modifikation um:

$$\begin{aligned} \sum_{l=1}^{\text{Komp}} \left(\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n \mathbf{J}_{ijk}(\mathbf{a}) \mathbf{J}_{ijl}(\mathbf{a}) + \mu \mathbf{I} \right) \mathbf{h}_l^{\text{lm}} &= - \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n \mathbf{J}_{ijk}(\mathbf{a}) \mathbf{f}_{ij}(\mathbf{a}) \\ \text{mit } \mathbf{I} &= \text{Einheitsmatrix und } \mu \geq 0. \end{aligned} \quad (\text{A.10})$$

Der neu eingeführte Dämpfungsparameter μ hat nun mehrere Effekte:

1. Es gilt für alle $\mu > 0$, dass die Koeffizientenmatrix definiert ist und somit wird sichergestellt, dass man \mathbf{h}^{lm} in absteigende Richtung läuft.
2. Es gilt für sehr große Werte von μ , dass $\mathbf{h}^{\text{lm}} \simeq -\frac{1}{\mu} \mathbf{G}$ ist, also zu einem kleinen Schritt in der steilsten Abstiegsrichtung führt. Dies ist gut, wenn die aktuelle Iteration weit weg von der Lösung ist.
3. Es gilt für sehr kleine μ , dass $\mathbf{h}^{\text{lm}} \simeq \mathbf{h}^{\text{gn}}$ ist. Dies ist eine gute Schrittweite in den letzten Iterationen, wenn \mathbf{a} bereits sehr nahe an \mathbf{a}^* ist. Dies führt dann auch zu einer fast quadratischen Konvergenz.

¹Die Indizierung „gn“ steht für GAUSS-NEWTON und „lm“ entsprechend für LEVENBERG-MARQUARDT.

Der Dämpfungsfaktor beeinflusst somit sowohl die Richtung als auch die Größe des Schritts. Die Wahl des anfänglichen μ -Wertes wird angepasst an die Größe der Elemente

$$\mathbf{H}_{kl}^{\text{pseudo}}(\mathbf{a}^0) = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n \mathbf{J}_{ijk}(\mathbf{a}^0) \mathbf{J}_{ijl}(\mathbf{a}^0) \quad (\text{A.11})$$

durch

$$\mu_0 = \tau \max \{a_{ii}^0\}, \quad (\text{A.12})$$

wobei $\tau = 0.001$ sich als geeigneter Skalierungsfaktor ergeben hat². Während den Iterationen wird μ entsprechend des Verstärkungsverhältnisses ρ angepasst. ρ stellt dabei das Verhältnis zwischen dem aktuellen und einem vorgeschlagenen nächsten Abstieg dar und ist gegeben durch

$$\rho = \frac{Y(\mathbf{a}) - Y(\mathbf{a} + \mathbf{h}^{\text{lm}})}{L(0) - L(\mathbf{h}^{\text{lm}})}. \quad (\text{A.13})$$

Nach einem linearen Modell gilt

$$Y(\mathbf{a} + \mathbf{h}^{\text{lm}}) \simeq L(\mathbf{h}^{\text{lm}}) \equiv L(0) + \mathbf{h}^{\text{lm}\top} \mathbf{G}(\mathbf{a}) + \frac{1}{2} \mathbf{h}^{\text{lm}\top} \mathbf{H}(\mathbf{a}) \mathbf{h}^{\text{lm}}, \quad (\text{A.14})$$

so dass bei sehr kleinen Auslenkungen von \mathbf{h}^{lm} für den Nenner gilt:

$$\begin{aligned} L(0) - L(\mathbf{h}^{\text{lm}}) &= -\frac{1}{2} \mathbf{h}^{\text{lm}\top} \mathbf{H}(\mathbf{a}) \mathbf{h}^{\text{lm}} - \mathbf{h}^{\text{lm}\top} \mathbf{G}(\mathbf{a}) \\ &= \frac{1}{2} \mathbf{h}^{\text{lm}\top} \left(\underbrace{-\mathbf{H}(\mathbf{a}) \mathbf{h}^{\text{lm}}}_{=\mathbf{G}(\mathbf{a}) + \mu \mathbf{h}^{\text{lm}}} - 2\mathbf{G}(\mathbf{a}) \right) \\ &= \frac{1}{2} \mathbf{h}^{\text{lm}\top} (\mu \mathbf{h}^{\text{lm}} - \mathbf{G}(\mathbf{a})). \end{aligned} \quad (\text{A.15})$$

Da $\mathbf{h}^{\text{lm}\top} \mathbf{h}^{\text{lm}}$ und $-\mathbf{h}^{\text{lm}\top} \mathbf{G}$ beide positiv sind, ist garantiert, dass der Nenner auch positiv ist. Eine gute Strategie für die Wahl eines neuen Dämpfungsfaktors ist nun durch

$$\mu = \begin{cases} \mu \max \left\{ \frac{1}{3}; 1 - (2\rho - 1)^3 \right\} & \nu = 2 \quad \text{falls } \rho > 0 \\ \mu\nu & \nu = 2\nu \quad \text{sonst} \end{cases} \quad (\text{A.16})$$

gegeben. Diese Strategie bietet eine höhere Konvergenzgeschwindigkeit und Stabilität [Nie99]. Der benötigte Skalierungsfaktor ν wird anfänglich auf $\nu = 2.0$ gesetzt. Ein sehr großer Wert von ρ bedeutet nun, dass $L(\mathbf{h}^{\text{lm}})$ eine gute Näherung für $Y(\mathbf{a} + \mathbf{h}^{\text{lm}})$ ist. Somit kann μ verkleinert werden, so dass der nächste LEVENBERG-MARQUARDT-Schritt näher an einen GAUSS-NEWTON-Schritt herankommt. Ist ρ hingegen klein, dann

²Der Algorithmus ist bezüglich der Wahl von τ sehr sensitiv. Als Daumenregel sollte ein kleiner Wert gewählt werden. Sollten die Startparameter \mathbf{a}^0 bereits eine gute Approximation liefern, ist $\tau = 10^{-6}$ eine gute Wahl. Ansonsten ist es besser $\tau = 10^{-3}$ oder sogar $\tau = 1.0$ zu verwenden.

ist $L(\mathbf{h}^{\text{lm}})$ eine schlechte Näherung und μ wird um das zweifache vergrößert, so dass man durch Verkleinerung der Schrittweite näher in die Richtung des steilsten Abstiegs kommt.

Die Bestimmung der neuen Schrittweite \mathbf{h}^{lm} aus dem Gleichungssystem A.10 erfolgt über die Lösung nach den kleinsten Fehlerquadraten minimaler Norm [MNT04]. Daraufhin werden die neuen Parameter

$$\mathbf{a}_{\text{neu}} = \mathbf{a} + \mathbf{h}^{\text{lm}} \quad (\text{A.17})$$

zur Erzeugung einer neuen Modellfunktionsmatrix $\mathbf{F}(\mathbf{a}_{\text{neu}})$ verwendet und der Optimierungszyklus geht in eine neue Iteration.

Die Abbruchkriterien sind schließlich wie folgt. Zuerst wird aufgrund der Bedingung für ein globales Minimum $Y'(\mathbf{a}^*) = \mathbf{G}(\mathbf{a}^*) = 0$ geschaut, dass

$$\|\mathbf{G}(\mathbf{a})\|_{\infty} \leq \varepsilon_1 \quad (\text{A.18})$$

ist, wobei ε_1 typischerweise auf 10^{-8} gesetzt wird. Als ein weiteres relevantes Abbruchkriterium wird geschaut, dass die Änderung in \mathbf{a} klein ist mit

$$\|\mathbf{a}_{\text{neu}} - \mathbf{a}\| \leq \varepsilon_2(\|\mathbf{a}\| + \varepsilon_2). \quad (\text{A.19})$$

Dieser Ausdruck liefert eine sukzessive Änderung von der relativen Schrittweite ε_2 , wenn $\|\mathbf{a}\|$ groß ist gegenüber der absoluten Schrittweite ε_2^2 , falls \mathbf{a} nahe 0 ist. Ein typischer Wert für ε_2 ist gegeben zu 10^{-8} . Zuletzt muss natürlich dafür gesorgt werden, dass die Routine abbricht, falls ε_1 zu klein gewählt wurde, so dass aufgrund von Rundungsfehlern die Bedingung aus Gleichung A.18 nicht erfüllt wird. Daher soll nach einer maximalen Anzahl an Iterationen mit

$$i \geq i_{\text{max}} \quad (\text{A.20})$$

abgebrochen werden.

A.2. Runge-Kutta-Methode

Das RUNGE-KUTTA-Verfahren 4. Ordnung ist eine spezielle explizite 4-stufige Methode zur numerischen Lösung von Anfangswertproblemen, wie sie bei gewöhnlichen DGLen auftreten. Es wurde um 1900 von Carl Runge, der 1895 zuerst ein mehrstufiges Verfahren beschrieb, und später von Martin Wilhelm Kutta, der 1901 eine allgemeine Form eines expliziten s -stufigen Verfahrens veröffentlichte, entwickelt [Run95; Kut01]. Im Folgenden

sei ein kurzer Abriss des RUNGE-KUTTA-Verfahrens gegeben: Es sei das Anfangswertproblem von n DGLen

$$y^i(x) = f(x, y^1(x), y^2(x), \dots, y^n(x)) \quad (\text{A.21})$$

mit n Anfangsbedingungen

$$y^1(x_0) = y_0^1, y^2(x_0) = y_0^2, \dots, y^n(x_0) = y_0^n \quad (\text{A.22})$$

gegeben. Sei weiter h die gewünschte Schrittweite, dann werden nach RUNGE die genäherten Werte von $y^i(x_j + h) = y^i(x_{j+1})$ für m Werte von x berechnet zu

$$\begin{aligned} k_1^i &= hf(x_j, y_j^i) \\ k_2^i &= hf\left(x_j + \frac{h}{2}, y_j^i + \frac{k_1^i}{2}\right) \\ k_3^i &= hf\left(x_j + \frac{h}{2}, y_j^i + \frac{k_2^i}{2}\right) \\ k_4^i &= hf(x_j + h, y_j^i + k_3^i) \\ y_{j+1}^i &= y_j^i + \frac{k_1^i}{6} + \frac{k_2^i}{3} + \frac{k_3^i}{3} + \frac{k_4^i}{6}. \end{aligned} \quad (\text{A.23})$$

Die jeweils nächsten Werte werden demnach in einer Rekursion berechnet und man erzielt eine Genauigkeit bei genügend glattem $f(x, y^i)$ in der Größenordnung von h^4 .

B. Andere Projekte

B.1. "Design and photoinduced surface relief grating formation of photoresponsive azobenzene based molecular materials with ruthenium acetylides"

Hierbei handelt es sich um ein kleines Nebenprojekt, das im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Rainer Winter (Universität Konstanz) entstanden ist.

Kichou N. Gherab, Rafik Gatri, Zakia Hank, Bernhard Dick, Roger-Jan Kutta,
Rainer Winter, Jérôme Luc, Bouchta Sahraoui and Jean-Luc Fillaut

Design and photoinduced surface relief grating formation of photo-responsive azobenzene based molecular materials with ruthenium acetylides

Journal of Materials Chemistry, **2010**, **20**, 2858–2864.

Abstract:

Novel photoresponsive materials based on ruthenium(II) σ -acetylides coupled to an azobenzene moiety in the main π -conjugated chain have been synthesized. The introduction of a metal acetylide fragment in the same conjugated chain as the azobenzene induces the *trans-cis-trans* isomerization of the azo unit, while the rate of the thermal *cis* \rightarrow *trans* back isomerization increases with increasing overall electron richness of these compounds. These azobenzene-containing ruthenium(II) acetylides show satisfactory processability and give rise to spin-coated uniform thin films. Formation of surface-relief gratings on their amorphous thin films and in a [Polymethylmethacrylat \(PMMA\)](#) polymer matrix using a picosecond pulsed laser at 532 nm results in instantaneous inscription: saturation of the first order diffraction efficiency and of the modulation amplitude of gratings were obtained in less than 1 s, while the orientation of these azodyes remains unchanged for up to 6 months.

Glossar

f-number

Unter der relativen Apertur (auch *f*-number genannt) wird in der Optik die Fokusslänge dividiert durch den „effektive“ Aperturdurchmesser verstanden.

Jablonski-Termschema

JABLONSKI-Termschemata sind vereinfachte Darstellungen für die Diskussion von Absorptions- und Emissionsprozessen bei der Wechselwirkung von Licht mit Materie, welche von Prof. Alexander Jablonski im Jahre 1935 zuerst eingeführt wurden. Ein typisches JABLONSKI-Termschema für ein organisches Molekül umfasst z.B. einen elektronischen Singulett Grundzustand so wie mehrere energetisch höher liegende anregbare Singulett- bzw. Triplett-Zustände, welche jeweils durch eine dicke horizontale Linie angezeigt werden. In den einzelnen elektronischen Zuständen kann ein Molekül ebenfalls in einer Vielzahl von Schwingungszuständen vorliegen, welche durch mehrere enger beieinander liegender dünner horizontaler Linien oberhalb eines elektronischen Zustands angedeutet werden. Die energetischen Abstände der Schwingungszustände sind so groß, dass sie nicht durch thermische Energie bei Raumtemperatur populiert werden können. Übergänge zwischen den Zuständen werden durch vertikale bzw. horizontale Pfeile angedeutet. Horizontale Pfeile deuten dabei auf isoenergetische Prozesse, wie das *Intersystem Crossing* (ISC) oder die *Internal Conversion* (IC). Vertikale Pfeile deuten Prozesse an, wie die Absorption, die spinerlaubte Emission (Fluoreszenz), die spinverbotene Emission (Phosphoreszenz) und die *Internal Vibrational Relaxation* (IVR).

Xenopus

Krallenfrosch.

Acetabularia acetabulum

Grünalgenart aus der Gattung *Acetabularia*/Schirmalge (lat. acetabulum = Es-

signäpfchen).

Avena sativa

Pflanzenart aus der Gattung Hafer (lat. *avena* = Hafer).

Bacillus subtilis

Bakterium aus der Gattung *Bacillus* (lat. *bacillum*/bacillus = Stäbchen /lat. *subtilis* = schlicht).

Bradyrhizobium japonicum

Bakterium aus der Gattung *Bradyrhizobium*.

Chlamydomonas reinhardtii

Grünalgenart aus der Gattung *Chlamydomonas*.

Escherichia coli

Bakterium aus der Gattung *Escherichia* (lat. *colon* = Teil des Dickdarms).

Halobacterium salinarium

Halophile Archaea aus der Gattung *Halobacterium*.

Natronomonas pharaonis

Halophile und alkaphile Archaea aus der Gattung *Natronomonas*.

Archaea

Einzelliger Organismen, der folgende typische Merkmale aufweist:

1. meist ringförmiges Chromosom in einem Nucleoid
2. kein Cytoskelett
3. keine Zellorganellen
4. kein Peptidoglycan in der Zellmembran.

Autotrophie

Der Begriff Autotrophie stammt aus den altgriechischen Begriffen „autos“, was „selbst“ bedeutet, und trophe, was „Ernährung“ bedeutet. In der Biologie wird mit Autotrophie die Fähigkeit von Lebewesen verstanden, ihre Baustoffe (und organischen Reservestoffe) ausschließlich aus anorganischen Stoffen (wie CO₂) aufzubauen. Bei Photosynthese betreibenden Primärproduzenten (insbesondere Pflanzen) ist diese vor allem zu beobachten.

Bacteria

Einzelliger Organismen, der folgende typische Merkmale aufweist:

1. meist ringförmiges Chromosom in einem Nucleoid
2. kein Cytoskelett
3. keine Zellorganellen
4. Peptidoglycan in der Zellmembran.

Blooming

Das Blooming ist ein Effekt, der bei zu stark belichteten [CCD](#)-Detektoren auftritt. Es wird die Ladungskapazität von einigen Pixel-Zellen überschritten, wodurch die überzähligen Ladungen an die Nachbarzellen weiter fließen.

Eucaria

Einzelliger oder vielzelliger Organismen, der folgende typische Merkmale aufweist:

1. mehr als ein lineares Chromosom in einem Zellkern mit Kernhülle (Nucleus)
2. Cytoskelett
3. membranumgebene Organellen, die den Zellstoffwechsel übernehmen.
4. Peptidoglycan in der Zellmembran.

Frame Grabber

Elektronische Schaltung (meist auf Computer Karte) zur Digitalisierung analoger Videosignale.

Jitter

Jitter ist der englische Begriff für „Fluktuation“ oder „Schwankung“ und wird in dieser Arbeit als die zeitliche Ungenauigkeit von periodischen Messsignalen, wie z.B. Laserpulse, verstanden.

mode-locked

mode-locking (deutsch: Modenkopplung) umschreibt die Synchronisation der im Laser schwingenden Eigenzustände (Moden) zur Erzeugung von extrem kurzen Lichtpulsen. Bei einer möglichst großen Anzahl von Moden wird eine konstante Phasenbeziehung der Moden zueinander angestrebt, so dass es zu konstruktiver

Interferenz zusammenfallender Wellenberge kommt. Dabei gilt, dass je breiter das Modenspektrum ist, desto kürze der erzeugte Laserpuls wird. Die Modenkopplung kann aktiv (z.B. elektrooptisch oder akustooptisch) oder passiv (z.B. sättigbarer Absorber) erfolgen.

Oocyte

Ein Oocyte (griechisch: Oos, Ei; Cytos, Zelle) ist die weibliche Keimzelle zweigeschlechtlicher Lebewesen, welche der generativen Vermehrung durch Oogamie dient. Sie enthält alle genetischen Anlagen des weiblichen Lebewesens, die an den Nachkommen weitergegeben werden.

Optogenetik

In der Optogenetik wird sich mit der Licht induzierten Kontrolle von genetisch modifizierten Zellen beschäftigt.

Phototaxis

Fortbewegungsrichtung von Organismen in Abhängigkeit der Belichtungsstärke.

RS-232

Recommended Standard: Standard für eine bei Computern oft vorhandene serielle Schnittstelle, die in den frühen 1960ern von einem US-amerikanischen Standardisierungskomitee eingeführt wurde.

RS-422A

Die RS-422A Schnittstelle ist eine bidirektionale serielle Schnittstelle für Datenübertragungsraten von bis zu 10^{Mbit}/s.

Abkürzungsverzeichnis

8-HDF	8- H ydroxy-5- D esazariboflavin
A	A denosin
A.a.	<i>Acetabularia acetabulum</i>
A.s.	<i>Avena sativa</i>
AcN	A cetonitril
ADC	<i>Analog Digital Converter</i>
API	Application Programming Interface
AR1	<i>Acerrhodopsin1</i>
AR2	<i>Acerrhodopsin2</i>
ATP	A denosintriphosphat
B.j.	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
B.s.	<i>Bacillus subtilis</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BR	<i>Bacteriorrhodopsin</i>
C.r.	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
cDNA	<i>complementary Deoxyribonanucleic acid</i>
CFD	<i>Constant Fraction Discriminator</i>
ChR2	<i>Channelrhodopsin2</i>
COBALT	<i>Constraint-based Multiple Alignment Tool</i>
CPLD	<i>Complex Programmable Logic Device</i>
CW	<i>Continuous Wave</i>

DADS	<i>Decay Associated Difference Spectrum</i>
DC	<i>Delay-Controller</i>
DGL	<i>Differentialgleichung</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DSO	Digitalspeicheroszilloskop
dU	Deoxyuridin
dU-Nr	Deoxyuridin-Ethynyl-Nile Rot
dU-Pe	Deoxyuridin-Ethynyl-Perylene
dU-Py	Deoxyuridin-Ethynyl-Pyren
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESA	<i>Excited State Absorption</i>
eT	Elektronentransfer
F-I	iodiertes Flavinderivat
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FIFO	<i>First In First Out</i>
FMN	Flavinmononukleotid
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i>
GPiB	<i>General Purpose Interface Bus</i>
GSB	<i>Ground State Bleach</i>
GZ	Grundzustand
H.s.	<i>Halobacterium salinarium</i>
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
HR	<i>Halorhodopsin</i>
IC	<i>Internal Conversion</i>
IHAЕ	<i>Internal Heavy Atom Effect</i>
ISC	<i>Intersystem Crossing</i>
IVR	<i>Internal Vibrational Relaxation</i>

Laser	<i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
LOV	<i>Light Oxygen and Voltage</i>
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
MBA	4-Methoxybenzylalkohol
MBAlD	4-Methoxybenzylaldehyd
MCA	<i>Multi Channel Analyzer</i>
MCP	<i>Micro-Channel Plate</i>
MD	Molekular Dynamik
MSA	<i>Multiple Sequences Alignment</i>
MTHF	Methylentetrahydrofolat
N.p.	<i>Natronomonas pharaonis</i>
Nd:YAG	<i>Neodym doped Yttrium-Aluminium-Garnet</i>
Ni-NTA	<i>Nickel-Nitrilotriacetic Acid</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
Nr	Ethynyl-Nile Rot
OD	Optische Dichte
OPO	<i>Optical Paramagnetic Oscillator</i>
PAS	<i>Per - period circadian protein, Arnt - aryl hydro-carbon receptor nuclear translocator protein, Sim - single-minded protein</i>
PC	<i>Personal Computer</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD	Photodiode
Pe	Ethynyl-Perylene
PM	<i>Photo Multiplier</i>
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid

PMT	<i>Photo Multiplier Tube</i>
PQA	P rodukt q uanten a usbeute
PT	Protontransfer
Py	Ethynyl- P iren
QS	<i>Q-Switch</i> , Güter-Schalter,
r-eT	rück-Elektronentransfer
r-ISC	rück- <i>Intersystem Crossing</i>
r-PT	rück-Protonentransfer
RFTA	R iboflavintetraacetat
SADS	<i>Species Associated Difference Spectrum</i>
SAS	<i>Species Associated Spectrum</i>
SC	<i>Streak Camera</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Poly-Acrylamid Gel Electrophoresis</i>
SE	<i>Stimulated Emission</i>
SOMO	<i>Singly Occupied Molecular Orbital</i>
SR2	<i>Sensorrhodopsin2</i>
T	Thymin
TA	<i>Transiente Absorption</i>
TAC	<i>Time to Amplitude Converter</i>
TC	<i>Time Calibrator</i>
TCSPC	<i>Time Correlated Single Photon Counting</i>
THG	<i>Third Harmonic Generation</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>
Vis	<i>Visible</i>

Literatur

Literatur zu Kapitel 2

- [AS91] Wajih Al-Soufi. „Blitzlichtphotolytische Untersuchungen von Tunneleffekten bei Wasserstoff-Umlagerungen im Triplettzustand“. Diss. Georg-August-Universität zu Göttingen, 1991 (siehe S. [10](#)).
- [And+99] E. Anderson u. a. *LAPACK Users' Guide*. Third. Philadelphia, PA: Society for Industrial und Applied Mathematics, 1999 (siehe S. [21](#)).
- [Bec05] Wolfgang Becker. *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques*. Springer Series in Chemical Physics, Vol 81. Springer-Verlag, 2005 (siehe S. [44](#), [45](#)).
- [Bee52] A. Beer. „Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten“. In: *Annalen der Physik und Chemie* 86 (1852), S. 78–88 (siehe S. [5](#)).
- [HMB02] Kaiyao Huang, Thomas Merkle und Christoph F. Beck. „Isolation and characterization of a *Chlamydomonas* gene that encodes a putative blue-light photoreceptor of the phototropin family“. In: *Physiologia Plantarum* 115 (2002), S. 613–622 (siehe S. [50](#)).
- [KOK81] Shuichi Kinoshita, Hironobu Ohta und Takashi Kushida. „Subnanosecond fluorescence-lifetime measuring system using single photon counting method with mode-locked laser excitation“. In: *Review of Scientific Instruments* 52.4 (1981), S. 572–575 (siehe S. [45](#)).
- [Kut+08] Roger J. Kutta u. a. „Blue-Light Induced Interaction of LOV Domains from *Chlamydomonas reinhardtii*“. In: *ChemBioChem* 9.12 (2008), S. 1931–1938 (siehe S. [49](#), [106](#), [112](#)).

- [Kut06] Roger-Jan Kutta. „Untersuchung zur lichtinduzierten Interaktion von LOV-Domänen“. Diplomarbeit. Universität Regensburg, 2006 (siehe S. 49, 106).
- [Lev44] K. Levenberg. „A Method for the Solution of Certain Problems in Least Squares“. In: *Quarterly of Applied Mathematics* 2 (1944), S. 164–168 (siehe S. 21).
- [MNT04] K. Madsen, H.B. Nielsen und O. Tingleff. *METHODS FOR NON-LINEAR LEAST SQUARES PROBLEMS*. Techn. Ber. Informatics und Mathematical Modelling (IMM) - Technical University of Denmark, 2004 (siehe S. 21, 172).
- [Mar63] Donald W. Marquardt. „An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters“. In: 11.2 (1963), S. 431–441 (siehe S. 21).
- [NP49] R. G. W. Norrish und G. Porter. „Chemical Reactions Produced by Very High Light Intensities“. In: *Nature* 164 (1949), S. 658–658 (siehe S. 5).
- [Nau60] Helmut Naumann. *Optik für Konstrukteure*. Hrsg. von Wilhelm Knapp. Wilhelm Knapp Verlag, 1960 (siehe S. 15).
- [Nor67] Ronald George Wreyford Norrish. „Some fast reactions in gases studied by flash photolysis and kinetic spectroscopy“. In: *Nobel Lecture*. 1967 (siehe S. 5).
- [Por50] G. Porter. „Flash Photolysis and Spectroscopy. A New Method for the Study of Free Radical Reactions“. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* 200.1061 (1950), S. 284–300 (siehe S. 5).
- [Por67] George Porter. „Flash photolysis and some of its applications“. In: *Nobel Lecture*. 1967 (siehe S. 5).
- [Sac71] William H. Sachs. „Integrated Solutions for a Generalized System of First-order Reactions.“ In: *Acta Chemica Scandinavica* 25.2 (1971), S. 762–764 (siehe S. 18).

Literatur zu Kapitel 3

- [All+00] X. Allonas u. a. „Deriving Intrinsic Parameters of Photoinduced Electron Transfer Reaction from the Transient Effect Probed by Picosecond Time-

- Resolved Fluorescence Quenching“. In: *Journal of Fluorescence* 10 (3 2000), S. 237–237 (siehe S. 76).
- [BBS97] Enrico Baciocchi, Massimo Bietti und Steen Steenken. „Base-Catalyzed C-H Deprotonation of 4-Methoxybenzyl Alcohol Radical Cations in Water: Evidence for a Carbon-to-Oxygen 1,2-H-Shift Mechanism“. In: *Journal of the American Chemical Society* 119 (1997), S. 4078–4079 (siehe S. 71, 81).
- [BBS99] Enrico Baciocchi, Massimo Bietti und Steen Steenken. „Kinetic and Product Studies on the Side-Chain Fragmentation of 1-Arylalkanol Radical Cations in Aqueous Solution: Oxygen versus Carbon Acidity“. In: *Chemistry - A European Journal* 5.6 (1999), S. 1785–1793 (siehe S. 71, 81, 85, 87).
- [BM80] S. G. Ballard und D. C. Mauzerall. „Photochemical ionogenesis in solutions of zinc octaethyl porphyrin“. In: *Journal of Chemical Physics* 72.2 (1980), S. 933–947 (siehe S. 76).
- [BSBV05] M.N. Berberan-Santos, E.N. Bodunov und B. Valeur. „Mathematical functions for the analysis of luminescence decays with underlying distributions 1. Kohlrausch decay function (stretched exponential)“. In: *Chemical Physics* 315.1-2 (2005), S. 171–182 (siehe S. 76).
- [Bac+96] Enrico Baciocchi u. a. „Side-Chain Fragmentation of Arylalkanol Radical Cations. Carbon –Carbon and Carbon–Hydrogen Bond Cleavage and the Role of α - and β -OH Groups“. In: *Journal of the American Chemical Society* 118 (1996), S. 5952–5960 (siehe S. 71).
- [Boy+05] A. S. F. Boyd u. a. „Model systems for flavoenzyme activity: a tuneable intramolecularly hydrogen bonded flavin-diamidopyridine complex“. In: *Chemical Communications* 2005 (19 2005), S. 2468–2470 (siehe S. 54).
- [Bra+04] Barbara Branchi u. a. „The Role of Aromatic Radical Cations and Benzylic Cations in the 2,4,6-Triphenylpyrylium Tetrafluoroborate Photosensitized Oxidation of Ring-Methoxylated Benzyl Alcohols in CH_2Cl_2 Solution“. In: *The Journal of Organic Chemistry* 69 (2004), S. 8874–8885 (siehe S. 65).
- [CI01] Mark S. Cubberley und Brent L. Iverson. „ ^1H NMR Investigation of Solvent Effects in Aromatic Stacking Interactions“. In: *Journal of the American Chemical Society* 123.31 (2001), S. 7560–7563 (siehe S. 75).

- [CVK04] R. Cibulka, R. Vasold und B. König. „Catalytic Photooxidation of 4-Methoxybenzyl Alcohol with a Flavin-Zinc(II)-Cyclen Complex“. In: *Chemistry - A European Journal* 10 (2004), S. 6223–6231 (siehe S. 54, 56, 91, 104).
- [FK99] S. Fukuzumi und S. Kuroda. „Photooxidation of benzyl alcohol derivatives by oxygen, catalyzed by protonated flavin analogues“. In: *Research on Chemical Intermediates* 25.8 (1999), S. 789–811 (siehe S. 54, 68).
- [FKT85] S. Fukuzumi, S. Kuroda und T. Tanaka. „Flavin Analogue-Metal Ion Complexes Acting as Efficient Photocatalysts in the Oxidation of *p*-Methylbenzyl Alcohol by Oxygen under Irradiation with Visible Light“. In: *Journal of the American Chemical Society* 107 (1985), S. 3020–3027 (siehe S. 54, 68).
- [Fuk+01] S. Fukuzumi u. a. „Efficient Catalysis of Rare-Earth Metal Ions in Photo-induced Electron-Transfer Oxidation of Benzyl Alcohols by a Flavin Analogue“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 105 (2001), S. 10501–10510 (siehe S. 54, 68).
- [Gra+04] M. Gray u. a. „Model Systems for Flavoenzyme Activity: Interplay of Hydrogen Bonding and Aromatic Stacking in Cofactor Redox Modulation“. In: *Organic Letters* 6.3 (2004), S. 385–388 (siehe S. 54).
- [HPP79] Paul F. Heelis, Barry J. Parson und Glyn O. Phillips. „The pH dependence of the reactions of flavin triplet states with amino acids: A laser flash photolysis study“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 587.3 (1979), S. 455–462 (siehe S. 67, 81, 84, 87, 114).
- [Had+06] Donat-P Hader u. a. *Flavins Photochemistry and Photobiology. Photochemistry and Photobiology*. Hrsg. von Eduardo Silva und Ana M Edwards. Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences. The Royal Society of Chemistry, 2006, S. i–328 (siehe S. 52).
- [Hee+81] P. F. Heelis u. a. „The Flavin Sensitised Photooxidation of Ascorbic Acid: A Continuous and Flash Phot Study“. In: *Photochemistry and Photobiology* 33 (1981), S. 7–13 (siehe S. 91).
- [Hee82] P. F. Heelis. „The Photophysical and Photochemical Properties of Flavins (Isoalloxazines)“. In: *Chemical Society Reviews* 11 (1982), S. 15–39 (siehe S. 53, 58, 110).

- [Hvi+03] Lene Hviid u. a. „Spin control of the lifetime of an intramolecular charge-transfer excited state“. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* 2 (10 2003), S. 995–1001 (siehe S. 103).
- [IPH03] Shafiqul D.M. Islam, Alfons Penzkofer und Peter Hegemann. „Quantum yield of triplet formation of riboflavin in aqueous solution and of flavin mononucleotide bound to the LOV1 domain of Phot1 from *Chlamydomonas reinhardtii*“. In: *Chemical Physics* 291 (2003), S. 97–114 (siehe S. 72, 95).
- [Kön+01] B. König u. a. „A Model System for Flavoenzyme Activity 2 Binding of Flavin and Modulation of Its Redox Potentials through Coordination to a Lewis-Acidic Azamacrocyclic Zinc(II) Complex“. In: *European Journal of Organic Chemistry* 2001.12 (2001), S. 2297–2303 (siehe S. 54).
- [LBS04] C. Lu, G. Bucher und W. Sander. „Photoinduced Interactions Between Oxidized and Reduced Lipoic Acid and Riboflavin (Vitamin B₂)“. In: *Chem-PhysChem* 5 (2004), S. 47–56 (siehe S. 65).
- [LK10] R. Lechner und B. König. „Oxidation and Deprotection of Primary Benzylamines by Visible Light Flavin Photocatalysis“. In: *Synthesis* 10 (2010), S. 1712–1718 (siehe S. 54).
- [LMN11] Heng Li, T.B. Melø und K. Razi Naqvi. „Triplets, radical cations and neutral semiquinone radicals of lumiflavin and riboflavin: An overhaul of previous pump-probe data and new multichannel absolute absorption spectra“. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 0 (2011), S. – (siehe S. 68, 83, 84).
- [Lan+10] K. Lanzl u. a. „Photoreaction of mutated LOV photoreceptor domains from *Chlamydomonas reinhardtii* with aliphatic mercaptans: implications for the mechanism of wild type LOV“. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 12 (2010), S. 6537–6876 (siehe S. 85, 87, 106, 112, 125, 129, 164).
- [Mar+02] Christopher B. Martin u. a. „The Photochemistry of Riboflavin Tetraacetate and Nucleosides. A Study Using Density Functional Theory, Laser Flash Photolysis, Fluorescence, UV-Vis, and Time Resolved Infrared Spectroscopy“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 106 (2002), S. 10263–10271 (siehe S. 65).

- [Mar56] R. A. Marcus. „On the Theory of Oxidation-Reduction Reactions Involving Electron Transfer. I“. In: *The Journal of Chemical Physics* 24.5 (1956), S. 966–978 (siehe S. 54).
- [Mee+03] A. Mees u. a. „Redoxactive Oligonucleotides: Synthesis and Properties of Flavocoenzyme-DNA“. In: *European Journal of Organic Chemistry* 2003.14 (2003), S. 2670–2677 (siehe S. 54).
- [Meg+09] U. Megerle u. a. „Sub-50 fs broadband absorption spectroscopy with tunable excitation: putting the analysis of ultrafast molecular dynamics on solid ground“. In: *Applied Physics B* 96 (2009), S. 215–231 (siehe S. 55).
- [Meg+10] Uwe Megerle u. a. „Laboratory apparatus for the accurate, facile and rapid determination of visible light photoreaction quantum yields“. In: *Photochem. Photobiol. Sci.* 9 (10 2010), S. – (siehe S. 58).
- [Meg+11] Uwe Megerle u. a. „Unraveling the flavin-catalyzed photooxidation of benzylic alcohol with transient absorption spectroscopy from sub-pico- to microseconds“. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 13 (2011), S. 8869–8880 (siehe S. 51).
- [Mel+99] Thor Bernt Melø u. a. „Hydrogen abstraction by triplet flavins. I: time-resolved multi-channel absorption spectra of flash-irradiated riboflavin solutions in water“. In: *Spectrochimica Acta Part A* 55 (1999), S. 2299–2307 (siehe S. 63–65, 82–84, 114).
- [Mül+72] Franz Müller u. a. „Light-Absorption Studies on Neutral Flavin Radicals“. In: *European Journal of Biochemistry* 25 (1972), S. 573–580 (siehe S. 82).
- [PR91] Graham Palmer und Jan Reedijk. „Nomenclature of electron-transfer proteins“. In: *European Journal of Biochemistry* 200.3 (1991), S. 599–611 (siehe S. 52).
- [Pag+99] Christopher C. Page u. a. „Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction“. In: *Nature* 402 (1999), S. 47–52 (siehe S. 103).
- [Pan+08] Sanjay Pant u. a. „Effect of Diffusion on the Photoinduced Reaction between a Tetra-Anionic Porphyrin and Methylviologen Cation in Methanol“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 112.24 (2008), S. 5378–5384 (siehe S. 75, 76).

- [Rau11] Andreas Rausch. „Der Einfluss von Molekülstruktur und Matrix auf die Emissionseigenschaften phosphoreszierender Übergangsmetallkomplexe für OLED-Anwendungen“. Diss. 2011 (siehe S. 65).
- [Rei04] Christian Reichardt. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. Hrsg. von Christian Reichardt. 3. Aufl. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004 (siehe S. 69).
- [Ric85] S. A. Rice. *Diffusion-limited reactions*. Hrsg. von S. A. Rice. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1985 (siehe S. 73).
- [SEP99] E. Silva, A. Edwards und D. Pacheco. „Visible light-induced photooxidation of glucose sensitized by riboflavin“. In: *The Journal of Nutritional Biochemistry* 10 (1999), S. 181–185 (siehe S. 54).
- [SHM89] S. Shinkai, G.-X. He und T. Matsuda. „Specific inhibition of flavin catalyses by a “molecular hinge”“. In: *Tetrahedron Letters* 30.43 (1989), S. 5895–5898 (siehe S. 54).
- [SK06] J. Svoboda und B. König. „Templated Photochemistry: Toward Catalysts Enhancing the Efficiency and Selectivity of Photoreactions in Homogeneous Solutions“. In: *Chemical Reviews* 106 (2006), S. 5413–5430 (siehe S. 54).
- [SSK08] J. Svoboda, H. Schmaderer und B. König. „Thiourea-Enhanced Flavin Photooxidation of Benzyl Alcohol“. In: *Chemistry - A European Journal* 14 (2008), S. 1854–1865 (siehe S. 54).
- [ST96] M. Sakai und H. Takahashi. „One-electron photoreduction of flavin mononucleotide: time-resolved resonance Raman and absorption study“. In: *Journal of Molecular Structure* 379 (1996), S. 9–18 (siehe S. 58, 63–65, 67, 68, 71, 81, 82, 84, 87, 114).
- [STM08] S. Salzmann, J. Tatchena und C. M. Marian. „The photophysics of flavins: What makes the difference between gas phase and aqueous solution?“. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 198 (2008), S. 221–231 (siehe S. 72).
- [Sch+09] H. Schmaderer u. a. „Photooxidation of Benzyl Alcohols with Immobilized Flavins“. In: *Advanced Synthesis & Catalysis* 351 (2009), S. 163–174 (siehe S. 54, 55).

- [Shi+87a] S. Shinkai u. a. „Coenzyme Models“. In: *Bioinorganic Chemistry* 15 (1987), S. 269–282 (siehe S. 54).
- [Shi+87b] S. Shinkai u. a. „“Remote Control” of Flavin Reactivities by an Intramolecular Crown Ring Serving as a Metal-Binding Site“. In: *Journal of the American Chemical Society* 109 (1987), S. 923–924 (siehe S. 54).
- [Sre+09] Paiboon Sreearunothai u. a. „Length and Time-Dependent Rates in Diffusion-Controlled Reactions with Conjugated Polymers“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 113.12 (2009), S. 2786–2795 (siehe S. 74, 75).
- [Ton+95] Weida Tong u. a. „Photooxidation of substituted benzyl alcohol by riboflavin“. In: *Journal of Molecular Structure* 333 (1995), S. 19–27 (siehe S. 54).
- [Ver06] Jan W. Verhoeven. „On the role of spin correlation in the formation, decay, and detection of long-lived, intramolecular charge-transfer states“. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 7.1 (2006), S. 40–60 (siehe S. 94, 162).
- [Wei+08] A. Weigel u. a. „Photoinduced Processes in Riboflavin: Superposition of $\pi\pi^*$ - $n\pi^*$ States by Vibronic Coupling, Transfer of Vibrational Coherence, and Population Dynamics under Solvent Control“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 112 (2008), S. 12054–12065 (siehe S. 60, 62).

Literatur zu Kapitel 4

- [AHH03] K. Ataka, P. Hegemann und J. Heberle. „Vibrational Spectroscopy of an Algal Phot-LOV1 Domain Probes the Molecular Changes Associated with Blue-Light Reception“. In: *Biophysical Journal* 84.1 (2003), S. 466–474 (siehe S. 111).
- [Bau+11] Christian Bauer u. a. „Indication for a Radical Intermediate Preceding the Signaling State in the LOV Domain Photocycle“. In: *Photochemistry and Photobiology* 87.3 (2011), S. 548–553 (siehe S. 107, 117).
- [CM02] Sean Crosson und Keith Moffat. „Photoexcited Structure of a Plant Photoreceptor Domain Reveals a Light-Driven Molecular Switch“. In: *Plant Cell* 14 (2002), S. 1067–1075 (siehe S. 106, 111, 124).

- [Chr+99] John M. Christie u. a. „LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): Binding sites for the chromophore flavin mononucleotide“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96.15 (1999), S. 8779–8783 (siehe S. [106](#)).
- [Ede67] Harold Edelhoch. „Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins*“. In: *Biochemistry* 6.7 (1967), S. 1948–1954 (siehe S. [110](#)).
- [Eis+08] Wolfgang Eisenreich u. a. „Natural Abundance Solution ¹³C NMR Studies of a Phototropin with Photoinduced Polarization“. In: *Journal of the American Chemical Society* 130.41 (2008), S. 13544–13545 (siehe S. [117](#)).
- [Fed+03] Roman Fedorov u. a. „Crystal Structures and Molecular Mechanism of a Light-Induced Signaling Switch: The Phot-LOV1 Domain from *Chlamydomonas reinhardtii*“. In: *Biophysical Journal* 84 (2003), S. 2474–2482 (siehe S. [106](#), [111](#), [114](#), [124](#)).
- [HB03] Kaiyao Huang und Christoph F. Beck. „Phototropin is the blue-light receptor that controls multiple steps in the sexual life cycle of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100.10 (2003), S. 6269–6274 (siehe S. [106](#)).
- [HPH05] W. Holzer, A. Penzkofer und P. Hegemann. „Photophysical and photochemical excitation and relaxation dynamics of LOVdomains of phot from *Chlamydomonas reinhardtii*“. In: *Journal of Luminescence* 112 (2005), S. 444–448 (siehe S. [112](#), [113](#)).
- [HPP79] Paul F. Heelis, Barry J. Parson und Glyn O. Phillips. „The pH dependence of the reactions of flavin triplet states with amino acids: A laser flash photolysis study“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 587.3 (1979), S. 455–462 (siehe S. [67](#), [81](#), [84](#), [87](#), [114](#)).
- [Hee82] P. F. Heelis. „The Photophysical and Photochemical Properties of Flavins (Isoalloxazines)“. In: *Chemical Society Reviews* 11 (1982), S. 15–39 (siehe S. [53](#), [58](#), [110](#)).

- [Hol+02] W. Holzer u. a. „Spectroscopic Characterization of Flavin Mononucleotide Bound to the LOV1 Domain of Phot1 from *Chlamydomonas reinhardtii*“. In: *Photochemistry and Photobiology* 75.5 (2002), S. 479–487 (siehe S. [109](#), [112–114](#)).
- [Kot+03] T. Kottke u. a. „Phot-LOV1: Photocycle of a Blue-Light Receptor Domain from the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*“. In: *Biophysical Journal* 84.2 (2003), S. 1192–1201 (siehe S. [106](#), [112](#), [114](#), [117](#)).
- [Kot03] Tilman Kottke. „Spektroskopische Aufklärung des Photozyklus der LOV1-Domäne eines Phot-Blaulichtrezeptors“. Diss. Fakultät IV -Chemie und Pharmazie- der Universität Regensburg, 2003 (siehe S. [106](#), [110](#)).
- [Kut+08] Roger J. Kutta u. a. „Blue-Light Induced Interaction of LOV Domains from *Chlamydomonas reinhardtii*“. In: *ChemBioChem* 9.12 (2008), S. 1931–1938 (siehe S. [49](#), [106](#), [112](#)).
- [Kut06] Roger-Jan Kutta. „Untersuchung zur lichtinduzierten Interaktion von LOV-Domänen“. Diplomarbeit. Universität Regensburg, 2006 (siehe S. [49](#), [106](#)).
- [LG11] Aba Losi und Wolfgang Gärtner. „Old Chromophores, New Photoactivation Paradigms, Trendy Applications: Flavins in Blue Light-Sensing Photoreceptors“. In: *Photochemistry and Photobiology* 87.3 (2011), S. 491–510 (siehe S. [111](#)).
- [Lan+10] K. Lanzl u. a. „Photoreaction of mutated LOV photoreceptor domains from *Chlamydomonas reinhardtii* with aliphatic mercaptans: implications for the mechanism of wild type LOV“. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 12 (2010), S. 6537–6876 (siehe S. [85](#), [87](#), [106](#), [112](#), [125](#), [129](#), [164](#)).
- [MG74] Vincent Massey und Sandro Ghisla. „ROLE OF CHARGE-TRANSFER INTERACTIONS IN FLAVOPROTEIN CATALYSIS“. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 227.1 (1974), S. 446–465 (siehe S. [111](#)).
- [Mac99] Macheroux. „Flavoprotein Protocols“. In: Hrsg. von S. K. Chapman und G. A. Reid. Bd. 131. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1999. Kap. UV-Visible Spectroscopy as a Tool to Study Flavoproteins, S. 1–7 (siehe S. [109](#), [111](#), [112](#)).

- [Mel+99] Thor Bernt Melø u. a. „Hydrogen abstraction by triplet flavins. I: time-resolved multi-channel absorption spectra of flash-irradiated riboflavin solutions in water“. In: *Spectrochimica Acta Part A* 55 (1999), S. 2299–2307 (siehe S. [63–65](#), [82–84](#), [114](#)).
- [NS04] Christian Neiss und Peter Saalfrank. „Molecular Dynamics Simulation of the LOV2 Domain from *Adiantum capillus-Weneris*“. In: *Journal of Chemical Informatical and Computational Science* 44.5 (2004), S. 1788–1793 (siehe S. [120](#)).
- [Ric+05] Gerald Richter u. a. „Photochemically Induced Dynamic Nuclear Polarization in a C450A Mutant of the LOV2 Domain of the *Avena sativa* Blue-Light Receptor Phototropin“. In: *Journal of the American Chemical Society* 127.49 (2005), S. 17245–17252 (siehe S. [117](#)).
- [ST96] M. Sakai und H. Takahashi. „One-electron photoreduction of flavin mononucleotide: time-resolved resonance Raman and absorption study“. In: *Journal of Molecular Structure* 379 (1996), S. 9–18 (siehe S. [58](#), [63–65](#), [67](#), [68](#), [71](#), [81](#), [82](#), [84](#), [87](#), [114](#)).
- [Sal+00] Michael Salomon u. a. „Photochemical and Mutational Analysis of the FMN-Binding Domains of the Plant Blue Light Receptor, Phototropin“. In: *Biochemistry* 39.31 (2000), S. 9401–9410 (siehe S. [106](#), [111](#)).
- [Sal+01] Michael Salomon u. a. „An optomechanical transducer in the blue light receptor phototropin from *Avena sativa*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98.22 (2001), S. 12357–12361 (siehe S. [106](#), [111](#), [125](#)).
- [Swa+01] Trevor E. Swartz u. a. „The Photocycle of a Flavin-binding Domain of the Blue Light Photoreceptor Phototropin“. In: *Journal of Biological Chemistry* 276.39 (2001), S. 36493–36500 (siehe S. [106](#)).
- [Tha+10] Smitha Surendran Thamarath u. a. „Solid-State Photo-CIDNP Effect Observed in Phototropin LOV1-C57S by ¹³C Magic-Angle Spinning NMR Spectroscopy“. In: *Journal of the American Chemical Society* 132.44 (2010), S. 15542–15543 (siehe S. [117](#)).

- [ZVC09] Brian D Zoltowski, Brian Vaccaro und Brian R Crane. „Mechanism-based tuning of a LOV domain photoreceptor“. In: *Nature Chemical Biology* 5 (2009), S. 827–834 (siehe S. 112).

Literatur zu Kapitel 5

- [AK00] L. Aravind und E. V. Koonin. „The STAS domain - a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists“. In: *Current Biology* 10 (2000), R53–R55 (siehe S. 125).
- [Akb+01] S. Akbar u. a. „New family of regulators in the enviromental signaling pathway which activates the general stress transcription factor sigma(B) of *Bacillus subtilis*“. In: *Journal of Bacteriology* 183.4 (2001), S. 1329–1338 (siehe S. 125).
- [Bri07] W. R. Briggs. „The LOV domain: a chromophore module servicing multiple photoreceptors“. In: *Journal of Biomedical Science* 14 (2007), S. 499–504 (siehe S. 124).
- [CM02] Sean Crosson und Keith Moffat. „Photoexcited Structure of a Plant Photoreceptor Domain Reveals a Light-Driven Molecular Switch“. In: *Plant Cell* 14 (2002), S. 1067–1075 (siehe S. 106, 111, 124).
- [CRM03] Sean Crosson, Sudarshan Rajagopal und Keith Moffat. „The LOV Domain Family: Photoresponsive Signaling Modules Coupled to Diverse Output Domains“. In: *Biochemistry* 42 (2003), S. 2–10 (siehe S. 124, 125).
- [Fed+03] Roman Fedorov u. a. „Crystal Structures and Molecular Mechanism of a Light-Induced Signaling Switch: The Phot-LOV1 Domain from *Chlamydomonas reinhardtii*“. In: *Biophysical Journal* 84 (2003), S. 2474–2482 (siehe S. 106, 111, 114, 124).
- [Fis94] H. M. Fischer. „Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia“. In: *Microbiological Reviews* 58 (1994), S. 352–386 (siehe S. 126).
- [GGDH91] M. A. Gilles-Gonzalez, G. S. Ditta und D. R. Helinski. „A haemoprotein with kinase activity encoded by oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*“. In: *Nature* 350 (1991), S. 170–172 (siehe S. 124, 126).

- [GGGP94] M. A. Gilles-Gonzalez, G. Gonzalez und M. F. Perutz. „Heme-Based Sensors, Exemplified by the Kinase FixL, Are a New Class of Heme Protein with Distinctive Ligand Binding and Autoxidation“. In: *Biochemistry* 33 (1994), S. 8067–8073 (siehe S. 127).
- [Gon+98] W. Gong u. a. „Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1998), S. 15177–15182 (siehe S. 126).
- [KM05] J. Key und K. Moffat. „Crystal structures of deoxy and CO-bound b₂-FixLH reveal details of ligand recognition and signaling“. In: *Biochemistry* 44 (2005), S. 4627–4635 (siehe S. 126).
- [Lan+10] K. Lanzl u. a. „Photoreaction of mutated LOV photoreceptor domains from *Chlamydomonas reinhardtii* with aliphatic mercaptans: implications for the mechanism of wild type LOV“. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 12 (2010), S. 6537–6876 (siehe S. 85, 87, 106, 112, 125, 129, 164).
- [Los+02] Aba Losi u. a. „First Evidence for Phototropin-Related Blue-Light Receptors in Prokaryotes“. In: *Biophysical Journal* 82.5 (2002), S. 2627–2634 (siehe S. 125).
- [MAM09] A. Möglich, R. A. Ayers und K. Moffat. „Design and Signaling Mechanism of Light-Regulated Histidine Kinases“. In: *Journal of Molecular Biology* 385.5 (2009), S. 1433–1444 (siehe S. 124, 126, 127, 132, 164).
- [PN03] T. Pawson und P. Nash. „Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains“. In: *Science* 300 (2003), S. 445–452 (siehe S. 124).
- [Sal+01] Michael Salomon u. a. „An optomechanical transducer in the blue light receptor phototropin from *Avena sativa*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98.22 (2001), S. 12357–12361 (siehe S. 106, 111, 125).

Literatur zu Kapitel 6

- [Ale+95] U. Alexiev u. a. „Rapid long-range proton diffusion along the surface of the purple membrane and delayed proton transfer into the bulk“. In: *Procee-*

- dings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (1995), S. 372–376 (siehe S. 139).
- [Alt+05] Stephen F. Altschul u. a. „Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices“. In: *FEBS Journal* 272.20 (2005), S. 5101–5109 (siehe S. 139–141).
- [Alt+97] S. F. Altschul u. a. „Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.“ In: *Nucleic Acids Research* 25.17 (1997), S. 3389–3402 (siehe S. 139–141).
- [BJ06] Leonid S. Brown und Kwang-Hwan Jung. „Bacteriorhodopsin-like proteins of eubacteria and fungi: the extent of conservation of the haloarchaeal proton-pumping mechanism“. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* 5 (2006), S. 538–546 (siehe S. 136, 150).
- [Dei11] Karl Deisseroth. „Optogenetics“. In: *Nature Methods* 8 (2011), S. 26–29 (siehe S. 150).
- [Ess02] Lars-Oliver Essen. „Halorhodopsin: light-driven ion pumping made simple?“ In: *Current Opinion in Structural Biology* 12.4 (2002), S. 516–522 (siehe S. 136).
- [GL03] Wolfgang Gärtner und Aba Losi. „Crossing the borders: archaeal rhodopsins go bacterial“. In: *TRENDS in Microbiology* 11.9 (2003), S. 405–407 (siehe S. 136, 150).
- [GSH90] Klaus Gerwert, Georg Souvignier und Benno Hess. „Simultaneous monitoring of light-induced changes in protein side-group protonation, chromophore isomerization, and backbone motion of bacteriorhodopsin by time-resolved Fourier-transform infrared spectroscopy“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (1990), S. 9774–9778 (siehe S. 138, 139).
- [Ger+89] Klaus Gerwert u. a. „Role of aspartate-96 in proton translocation by bacteriorhodopsin“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (1989), S. 4943–4947 (siehe S. 138, 139, 149).
- [HD92] Joachim Heberle und Norbert A. Dencher. „Surface-bound optical probes monitor proton translocation and surface potential changes during the bacteriorhodopsin photocycle“. In: *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America* 89 (1992), S. 5996–6000 (siehe S. 139).
- [HSG93] B. Hessling, G. Souvignier und K. Gerwert. „A model-independent approach to assigning bacteriorhodopsin’s intramolecular reactions to photocycle intermediates“. In: *Biophysical Journal* 65 (1993), S. 1929–1941 (siehe S. 138).
- [Heb+94] Joachim Heberle u. a. „Proton migration along the membrane surface and retarded surface to bulk transfer“. In: *Nature* 370 (1994), S. 379–382 (siehe S. 139).
- [Kat+04] Suneel Kateriya u. a. „„Vision“ in Single-Celled Algae“. In: *News in Physiological Sciences* 19.3 (2004), S. 133–137 (siehe S. 136).
- [LBS75] R.H. Lozier, R.A. Bogomolni und W. Stoeckenius. „Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium Halobium*“. In: *Biophysical Journal* 15.9 (1975), S. 955–962 (siehe S. 137).
- [Lan06] Janos K. Lanyi. „Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle“. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1757 (2006), S. 1012–1018 (siehe S. 136, 138).
- [Lan97] Janos K. Lanyi. „Mechanism of Ion Transport across Membranes: BACTERIORHODOPSIN AS A PROTOTYPE FOR PROTON PUMPS“. In: *The Journal of Biochemical Chemistry* 272 (1997), S. 31209–31212 (siehe S. 138).
- [Lue+99a] Hartmut Luecke u. a. „Structural Changes in Bacteriorhodopsin During Ion Transport at 2 Angstrom Resolution“. In: *Science* 286.5438 (1999), S. 255–260 (siehe S. 140, 141).
- [Lue+99b] Hartmut Luecke u. a. „Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution“. In: *Journal of Molecular Biology* 291.4 (1999), S. 899–911 (siehe S. 141).
- [OT89] D. Oesterhelt und J. Tittor. „Two pumps, one principle: light-driven ion transport in halobacteria.“ In: *Trends in Biochemical Sciences* 14.2 (1989), S. 57–61 (siehe S. 136).

- [Ott+89] Harald Otto u. a. „Aspartic acid-96 is the internal proton donor in the reprotonation of the Schiff base of bacteriorhodopsin“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (1989), S. 9228–9232 (siehe S. [139](#), [149](#)).
- [RO97] Martin Rüdiger und Dieter Oesterhelt. „Specific arginine and threonine residues control anion binding and transport in the light-driven chloride pump halorhodopsin“. In: *The EMBO Journal* 16 (1997), S. 3813–3821 (siehe S. [141](#)).
- [Ram+98] Robin Rammelsberg u. a. „Bacteriorhodopsin’s Intramolecular Proton-Release Pathway Consists of a Hydrogen-Bonded Network“. In: *Biochemistry* 37.14 (1998), S. 5001–5009 (siehe S. [139](#)).
- [Ric+96] Hans-Thomas Richter u. a. „A Linkage of the pK_a’s of asp-85 and glu-204 Forms Part of the Reprotonation Switch of Bacteriorhodopsin“. In: *Biochemistry* 35.13 (1996), S. 4054–4062 (siehe S. [139](#)).
- [SB82] Walther Stoeckenius und Roberto A. Bogomolni. „Bacteriorhodopsin and Related Pigments of Halobacteria“. In: *Annual Review of Biochemistry* 51 (1982), S. 587–616 (siehe S. [137](#)).
- [SL02] John L. Spudich und Hartmut Luecke. „Sensory rhodopsin II: functional insights from structure“. In: *Current Opinion in Structural Biology* 12.4 (2002), S. 540–546 (siehe S. [136](#)).
- [Sas+95] J Sasaki u. a. „Conversion of bacteriorhodopsin into a chloride ion pump“. In: *Science* 269.5220 (1995), S. 73–75 (siehe S. [141](#)).
- [Smi+83] Steven O. Smith u. a. „Chromophore structure in bacteriorhodopsin’s O640 photointermediate“. In: *Biochemistry* 22.26 (1983), S. 6141–6148 (siehe S. [139](#)).
- [Spu+00] John L. Spudich u. a. „RETINYLIDENE PROTEINS: Structures and Functions from Archaea to Humans“. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16.1 (2000), S. 365–392 (siehe S. [150](#)).
- [Spu06] John L. Spudich. „The multitasking microbial sensory rhodopsins“. In: *TRENDS in Microbiology* 14.11 (2006), S. 480–487 (siehe S. [136](#), [150](#)).

- [Sto76] W. Stoeckenius. „The purple membrane of salt-loving bacteria (rhodopsin powered photosynthesis) “. In: *Scientific American* 234 (1976), S. 38–46 (siehe S. 137).
- [Sub+99] Sriram Subramaniam u. a. „Protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle“. In: *Journal of Molecular Biology* 287.1 (1999), S. 145–161 (siehe S. 138).
- [Tsu+06] S. P. Tsunoda u. a. „H⁺ pumping rhodopsin from the marine alga *Acetabularia*“. In: *Biophysical Journal* 91 (2006), S. 1471–1479 (siehe S. 136).
- [Tsu+80] Motoyuki Tsuda u. a. „Light isomerizes the chromophore of bacteriorhodopsin“. In: *Nature* 287 (1980), S. 351–353 (siehe S. 137).
- [WBH05] Iain M Wallace, Gordon Blackshields und Desmond G Higgins. „Multiple sequence alignments“. In: *Current Opinion in Structural Biology* 15.3 (2005), S. 261–266 (siehe S. 139).
- [Zha+07] Feng Zhang u. a. „Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry“. In: *Nature* 446 (2007), S. 633–639 (siehe S. 150).
- [Zim+92] László Zimányi u. a. „The two consecutive M substates in the photocycle of bacteriorhodopsin are affected specifically by the D85N and D96N residue replacements“. In: *Photochemistry and Photobiology* 56.6 (1992), S. 1049–1055 (siehe S. 139).

Literatur zu Kapitel 7

- [BTH05] T. S. Balaban, H. Tamiaki und A. R. Holzwarth. „Supramolecular Dye Chemistry“. In: *Topics in Current Chemistry* 258 (2005), S. 1–38 (siehe S. 152).
- [Ban+11] Thomas J. Bandy u. a. „DNA as supramolecular scaffold for functional molecules: progress in DNA nanotechnology“. In: *Chemical Society Reviews* 40 (1 2011), S. 138–148 (siehe S. 152).
- [Fla+08] Lucia Flamigni u. a. „New and Efficient Arrays for Photoinduced Charge Separation Based on Perylene Bisimide and Corroles“. In: *Chemistry - A European Journal* 14.1 (2008), S. 169–183 (siehe S. 152).

- [Gan+09] Swapna Ganapathy u. a. „Zinc chlorins for artificial light-harvesting self-assemble into antiparallel stacks forming a microcrystalline solid-state material “. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106.28 (2009), S. 11472–11477 (siehe S. 152).
- [Hoe+05] Freek J. M. Hoeben u. a. „About Supramolecular Assemblies of π -Conjugated Systems“. In: *Chemical Reviews* 105.4 (2005), S. 1491–1546 (siehe S. 152).
- [Ima04] Hiroshi Imahori. „Giant Multiporphyrin Arrays as Artificial Light-Harvesting Antennas“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 108.20 (2004), S. 6130–6143 (siehe S. 152).
- [KD09] Challa V. Kumar und Michael. R. Duff. „DNA-Based Supramolecular Artificial Light Harvesting Complexes“. In: *Journal of the American Chemical Society* 131.44 (2009), S. 16024–16026 (siehe S. 152).
- [MWH10] Vladimir L. Malinovskii, Daniel Wenger und Robert Haner. „Nucleic acid-guided assembly of aromatic chromophores“. In: *Chemical Society Reviews* 39 (2 2010), S. 410–422 (siehe S. 152).
- [May+09] Torsten Mayr u. a. „Light Harvesting as a Simple and Versatile Way to Enhance Brightness of Luminescent Sensors“. In: *Analytical Chemistry* 81.15 (2009), S. 6541–6545 (siehe S. 152).
- [TWK09] Yin Nah Teo, James N. Wilson und Eric T. Kool. „Polyfluorophores on a DNA Backbone: A Multicolor Set of Labels Excited at One Wavelength“. In: *Journal of the American Chemical Society* 131.11 (2009), S. 3923–3933 (siehe S. 152).
- [VW09a] Reji Varghese und Hans-Achim Wagenknecht. „DNA as a supramolecular framework for the helical arrangements of chromophores: towards photoactive DNA-based nanomaterials“. In: *Chemical Communications* (19 2009), S. 2615–2624 (siehe S. 152).
- [VW09b] Reji Varghese und Hans-Achim Wagenknecht. „White-Light-Emitting DNA (WED)“. In: *Chemistry - A European Journal* 15.37 (2009), S. 9307–9310 (siehe S. 152, 153).
- [VW10] Reji Varghese und Hans-Achim Wagenknecht. „Non-covalent Versus Covalent Control of Self-Assembly and Chirality of Nile Red-modified Nucleoside

- and DNA“. In: *Chemistry - A European Journal* 16.30 (2010), S. 9040–9046 (siehe S. 152, 153).
- [Var+09] Reji Varghese u. a. „Thieme Chemistry Journal Awardees - Where Are They Now? Synthesis and Optical Properties of Nile Red Modified 2'-Deoxyuridine and 7-Deaza-2'-deoxyadenosine: Highly Emissive Solvatochromic Nucleosides“. In: *Synlett* 20 (2009), S. 3252–3257 (siehe S. 153).
- [Was09] Michael R. Wasielewski. „Self-Assembly Strategies for Integrating Light Harvesting and Charge Separation in Artificial Photosynthetic Systems“. In: *Accounts of Chemical Research* 42.12 (2009), S. 1910–1921 (siehe S. 152).
- [Won+11] Henrike Wonneberger u. a. „Double Donor-Thiophene Dendron-Perylene Monoimide: Efficient Light-Harvesting Metal-Free Chromophore for Solid-State Dye-Sensitized Solar Cells“. In: *Chemistry - An Asian Journal* 6.7 (2011), S. 1744–1747 (siehe S. 152).
- [You+06] Chang-Cheng You u. a. „Light-Harvesting Metallosupramolecular Squares Composed of Perylene Bisimide Walls and Fluorescent Antenna Dyes“. In: *Chemistry - A European Journal* 12.28 (2006), S. 7510–7519 (siehe S. 152).

Literatur zu Kapitel A

- [Kut01] Wilhelm Kutta. „Beitrag zur näherungsweisen Integration totaler Differentialgleichungen“. Diss. Technischen Hochschule München, 1901 (siehe S. 172).
- [MNT04] K. Madsen, H.B. Nielsen und O. Tingleff. *METHODS FOR NON-LINEAR LEAST SQUARES PROBLEMS*. Techn. Ber. Informatics und Mathematical Modelling (IMM) - Technical University of Denmark, 2004 (siehe S. 21, 172).
- [Nie99] Hans Bruun Nielsen. *DAMPING PARAMETER IN MARQUARDT'S METHOD*. Techn. Ber. Informatics und Mathematical Modelling (IMM) - Technical University of Denmark, 1999 (siehe S. 171).
- [Run95] C. Runge. „Ueber die numerische Auflösung von Differentialgleichungen“. In: *Mathematische Annalen* 46.2 (1895), S. 167–178 (siehe S. 172).