

**Lichtinduzierte Primärprozesse in reversibel  
photoschaltbaren fluoreszierenden Proteinen:  
Zeitaufgelöste Spektroskopie von Padron0.9 und  
rsFastLime**

zur Erlangung des  
mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
"Doctor rerum naturalium"  
der  
**Georg-August-Universität Göttingen**  
im  
Promotionsprogramm Chemie  
der Georg-August-University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

**Arne Walter**

aus Goslar

angefertigt im  
Institut für Physikalische Chemie  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

2014

## Betreuungsausschuss

Prof. Dr. Jörg Schroeder, Abteilung Wodtke, Institut für Physikalische Chemie, Göttingen

Prof. Dr. Dirk Schwarzer, Abteilung Wodtke, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie

## Mitglieder der Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. Jörg Schroeder, Abteilung Wodtke, Institut für Physikalische Chemie, Göttingen

Korreferent: Prof. Dr. Dirk Schwarzer, Abteilung Wodtke, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie

## Weitere Mitglieder der Prüfungskommission

Prof. Dr. Guido Clever, Arbeitsgruppe Clever, Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Jörg Enderlein, Arbeitsgruppe Enderlein, Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Stefan Jakobs, Abteilung Hell, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie

Prof. Dr. Claudia Steinem, Arbeitsgruppe Steinem, Georg-August-Universität Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2014

# Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jörg Schroeder danke ich für die exzellente Betreuung, unzählige Anregungen und die beständige Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dirk Schwarzer danke ich für die Übernahme des Korreferats, tatkräftige Unterstützung beim experimentellen Aufbau und intensive fachliche Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Stefan Jakobs danke ich für die Versorgung mit großen Mengen Proteinlösung, fachlicher Unterstützung in der Handhabung derselben und interdisziplinäre Einblicke.

Herrn Prof. Dr. Stefan Hell danke ich für die teilweise Finanzierung meiner Forschungsarbeit, wodurch ich überhaupt erst in Kontakt mit fluoreszierenden Proteinen gekommen bin.

Herrn Prof. Dr. Juergen Troe und Herrn Prof. Dr. Alec Wodtke danke ich für die Aufnahme in die scheidende alte und wachsende neue Arbeitsgruppe, in denen ich mit der Untersuchung von Proteinen nur fachlich ein Sonderling war.

Natürlich gilt auch den Mitgliedern eben jener Arbeitsgruppen mein Dank. Es war und ist eine wirklich tolle Atmosphäre im zweiten Stock der physikalischen Chemie, eine spannende Mischung aus ehrlicher Begeisterung für Forschung und Wissenschaft und ebenso ehrlicher Begeisterung für Tischfußball und Ähnliches. Vielen Dank an meine Bürokollegen, die sich mit großem Langmut immer wieder die gleichen bunten Kurven ansehen und die verworrenen Erklärungsversuche dazu anhören mussten. Danke an Jessica, Inge und Reinhard, ohne deren Infrastrukturen wissenschaftliche Arbeit in den Morgenstunden effektiv nicht und sonst nur schwer möglich gewesen wäre. Ein großer Dank geht auch an die Reste der Arbeitsgruppe Troe, Lars und Elsa, deren Vorrat an Nahrungsmitteln erstaunlich ist und deren sich kaum überschneidende Kenntnisse in Sachen Computer und Orthographie eine große Hilfe waren.

Ein großer Dank auch an Dr. Martin Andresen und Dr. Tanja Brakemann vom MPI, die mich mit Protein, Gerät und Zeit unterstützt haben.

Meinen sämtlichen Bachelor-, Diplom- und Masterstudenten Harald, Martin, Robert, Marno, Steffen und schließlich Hinrich Hahn, der das Femtogeschäft zuletzt am Leben hielt, danke ich für die gute Zusammenarbeit. Der Popolski Show, Blobby Volley und Dynablaaster habt ihr überstanden, ich wünsche alles Gute und dass die Laser laufen!

Ein ebenso großer Dank geht an die fähigen Menschen in den sämtlichen Werkstätten, elektronisch, gläsern, mechanisch, an der Universität wie am MPI, die alle schnell, findig, präzise und auch noch sehr umgänglich sind.

Dank auch allen Mitgliedern und Zuhörern der Country, Western und Weihnachtsband 'Alec Wodtke and the Heartbreakers' und Dr. Tim Schäfer on his never ending mission from god, putting the band back together. Sportlicher Dank für wunderbare Stunden der Rekreation geht an den geschätzten Kollegen Dan Engelhardt, dessen american way of golf eine gekonnte Mischung aus anger, fury, rage und granny ist und in 51% aller Spiele keine Gefahr für mich darstellte, give or take 1%.

Abseits der Uni gab und gibt es natürlich auch viele Menschen, ohne die es deutlich weniger gut gewesen wäre und die durch geschaffenen Ausgleich ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Meine Eltern: Wo soll man da anfangen? Danke Hanna, danke Dieter. Dora. Und, und hier zitiere ich mich selbst: „dann eigentlich nochmal Dora“. Meine sämtlichen Brüder. TobiDanielHolgerPatzisusiNicolePhilippGordonJohannesundundund. Der 1. Golfklub Goslar e.V. - *constant rough*. Alle Freunde der 20er und 50er Jahre. Das Team aus KFS und KSF... euch allen vielen Dank, sozusagen als Zwischenbemerkung, denn es geht weiter.

## Abstract

Within this project, the photodynamics of the reversibly switchable fluorescent proteins Padron0.9 and rsFastLime after photoexcitation were investigated. *Cis/trans*-isomerization of the chromophore is an essential element of the reversible switching between a fluorescent ON- and a non-fluorescent OFF-state observed on the proteins Padron0.9 and rsFastLime. Both isomers establish an equilibrium between the chromophore's protonated and deprotonated form. The different chromophore species were isolated and selectively excited to elucidate the main reaction pathways by ultrafast pump-probe spectroscopy. Intermediate states and the corresponding spectra were identified by extensive spectral and kinetic modelling of the obtained transient data.

For both proteins, the strongly fluorescent ON-state corresponds with the deprotonated *cis*-species. After excitation, it decays monoexponentially with a lifetime of 1.16 ns and 0.9 ns for Padron0.9 and rsFastLime, respectively. The deprotonated *trans*-species of Padron0.9 decays within 1 ps, dominated by internal conversion into a hot ground state. About one third relaxes into a more stable excited state with a lifetime of 7 ps. The excited protonated *cis*-rsFastLime has a lifetime of 8 ps, mostly due to internal conversion. About 15 % relax into a more stable excited state with a lifetime of 215 ps.

Excitation of protonated *cis*-Padron0.9 is followed by a fast excited state proton transfer  $k_H = 2.0 \text{ ps}^{-1}$  to an excited *cis*-intermediate, identified by a strong H/D-isotope effect. This intermediate has a lifetime of 37 ps and relaxes to a corresponding intermediate ground state and the excited fluorescent ON-state with equal probability. The intermediate ground state is subsequently protonated within 2 ps, as shown by pump-dump-probe spectroscopy. In addition, the disturbed ground state protonation equilibrium is reestablished within 45 ps.

Excited state dynamics of protonated *trans*-rsFastLime are dominated by internal conversion to the ground state within 2.1 ps. One third of the excited molecules relax to an intermediate excited state with a lifetime of 14 ps and subsequently to a more stable excited state with a life time of 94 ps with

subsequent conversion to a *cis*-groundstate. For protonated *cis*-rsFastLime, no evidence for an excited state proton transfer was found.

Quantum yields for the photoinduced switching processes found for Padron0.9 are  $\Phi_{cis \rightarrow trans}(500 \text{ nm}) = 0.0003$  and  $\Phi_{trans \rightarrow cis}(400 \text{ nm}) = 0.02$ . The yields are too low to accurately identify the respective products. Neither rsFastLime protonated isomer's spectrum can be distinguished, so product formation may occur but cannot be assigned. For Padron0.9, the excited state proton transfer is proposed to be the first step on the inefficient isomerization path *trans*  $\rightarrow$  *cis*. Regardless of the quantum yields for isomerization, it was shown that the different ground state protonation equilibrium for Padron0.9 and rsFastLime suffice to explain the inverse switching characteristics of these structurally very similar proteins.

# Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Dynamik der reversibel schaltbaren fluoreszierenden Proteine Padron0.9 und rsFastLime unmittelbar nach Photoanregung untersucht. Der reversible Schaltprozess zwischen dem fluoreszierenden AN- und nicht fluoreszierenden AUS-Zustand der Proteine Padron0.9 und rsFastLime beinhaltet eine *cis/trans*-Isomerisierung ihres Chromophors. Beide Isomere befinden sich in einem Gleichgewicht zwischen einer protonierten und einer deprotonierten Form. Durch Femtosekunden-Pump-Probe-Spektroskopie wurden die dominanten Reaktionspfade der verschiedenen Spezies des Proteinchromophors durch selektive Anregung aufgeklärt. Durch spektrale und kinetische Modellierung der aufgenommenen transienten Daten wurden intermediäre Zustände und ihre Spektren identifiziert.

Die deprotonierte *cis*-Spezies beider Proteine wird dem stark fluoreszierenden AN-Zustand zugeordnet. Nach Anregung fällt sie monoexponentiell mit einer Lebensdauer von 1.16 ns für Padron0.9 bzw. 0.9 ns für rsFastLime in den Grundzustand zurück. Die deprotonierte *trans*-Spezies von Padron0.9 zerfällt mit einer Lebensdauer von 1 ps. Hier dominiert innere Konversion in einen heißen Grundzustand, etwa ein Drittel geht in einen stabileren angeregten Zustand mit einer Lebensdauer von 7 ps über. Die protonierte *cis*-Spezies von rsFastLime zeigt eine Lebensdauer von 8 ps, innere Konversion in den Grundzustand stellt hier den primären Reaktionsweg dar. Ein Siebtel der angeregten Moleküle wird im angeregten Zustand stabilisiert und fällt nach einer Lebensdauer von 215 ps zurück in einen protonierten Grundzustand. Nach Anregung der *cis*-Spezies von Padron0.9 erfolgt ein schneller Protonentransfer  $k_H = 2.0 \text{ ps}^{-1}$  zu einer angeregten *cis*-Spezies, der durch einen starken H/D-Isotopeneffekt identifiziert wurde. Diese intermediäre *cis*-Spezies hat eine Lebensdauer von 37 ps und relaxiert zu etwa gleichen Teilen zu der langlebigen fluoreszierenden Spezies des AN-Zustandes oder geht in einen intermediären Grundzustand über, der innerhalb von 2 ps protoniert wird. Die Geschwindigkeit dieser Protonierung und das Spektrum des intermediären Grundzustandes wurden durch Pump-Dump-Probe Spektroskopie ermittelt. Parallel zu der Reaktionskaskade im angeregten Zustand wurde die Wiederherstellung des gestörten Protonierungsgleichgewichtes im Grundzustand auf einer Zeitskala von 45 ps beobachtet. Bei

der protonierten *trans*-Spezies von rsFastLime dominiert nach einer Lebensdauer von 2.1 ps die innere Konversion in den Grundzustand. Etwa ein Drittel der angeregten Moleküle relaxieren in einen intermediären angeregten Zustand mit der Lebensdauer von 14 ps und von dort in einen mit 94 ps langlebigeren angeregten Zustand oder durch innere Konversion in einen *cis*-Grundzustand. Messungen der protonierten *cis*-Spezies bei niedrigem pH-Wert zeigten keinen Protonentransferschritt im angeregten Zustand.

Die Quantenausbeuten der photoinduzierten Schaltprozesse für Padron0.9 sind mit  $\Phi_{cis \rightarrow trans}(500 \text{ nm}) = 0.0003$  und  $\Phi_{trans \rightarrow cis}(400 \text{ nm}) = 0.02$  zu niedrig, um Schaltprodukte direkt zu identifizieren. Die protonierten Isomere von rsFastLime sind spektral nahezu identisch, so dass auch hier die Produktbildung nicht eindeutig ist. Für Padron0.9 wird der Protonentransfer im angeregten Zustand als erster Schritt auf dem ineffizienten *cis*  $\rightarrow$  *trans*-Isomerisierungspfad vorgeschlagen. Bei der protonierten *trans*-Spezies von rsFastLime steht innere Konversion in Konkurrenz mit einem sehr effizienten Isomerisierungspfad *trans*  $\rightarrow$  *cis*. Unabhängig von den Ausbeuten der einzelnen Pfade wurde gezeigt, dass das unterschiedliche Protonierungsgleichgewicht von Padron0.9 und rsFastLime im Grundzustand genügt, um das hinsichtlich der Anregungswellenlängen umgekehrte Schaltverhalten der beiden strukturell sehr ähnlichen Proteine zu erklären.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Grundlagen</b>	<b>1</b>
1.1 Fluoreszierende Proteine . . . . .	1
1.1.1 GFP . . . . .	1
1.1.1.1 Struktur . . . . .	1
1.1.1.2 Spektren . . . . .	4
1.1.1.3 Proteindynamik und Zustände . . . . .	4
1.1.2 Photoaktivierbare Proteine . . . . .	7
1.1.3 Reversibel Schaltbare Fluoreszierende Proteine . . . . .	7
1.1.4 Dronpa . . . . .	8
1.1.4.1 Spektren . . . . .	10
1.1.4.2 Proteindynamik und Zustände . . . . .	12
1.1.5 rsFastLime . . . . .	13
1.1.5.1 Spektren . . . . .	13
1.1.6 Padron . . . . .	14
1.1.6.1 Spektren . . . . .	15
1.1.6.2 Proteindynamik und Zustände . . . . .	16
1.2 Das Chromophor . . . . .	19
1.2.1 Grundzustand in Lösung . . . . .	19
1.2.2 Angeregte Zustände . . . . .	20
1.3 Chromophorumgebung . . . . .	24
1.3.1 Sterische Wechselwirkungen . . . . .	24
1.3.2 Wasserstoffbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen . . . . .	24
1.3.3 Titrationsverhalten . . . . .	25
1.4 Kinetischer Isotopeneffekt . . . . .	28
1.4.1 Primärer Isotopeneffekt . . . . .	28
1.4.1.1 Theorie des Übergangszustandes . . . . .	28
1.4.1.2 Tunneleffekt . . . . .	30
<b>2 Experimentelle Technik</b>	<b>31</b>
2.1 Experimenteller Aufbau . . . . .	31
2.1.1 Clark MXR-CPA 2001 . . . . .	31
2.1.2 NOPA . . . . .	33
2.1.3 SHG und SFG . . . . .	34

2.1.4	Weißlichtkontinuum . . . . .	35
2.1.5	Interferometer . . . . .	36
2.1.6	Pumpenkreislauf . . . . .	39
2.2	Messmethode . . . . .	41
2.2.1	Pump-Probe-Spektroskopie . . . . .	41
2.2.2	Pump-Dump-Probe-Spektroskopie . . . . .	42
2.3	Datenverarbeitung . . . . .	44
2.3.1	Datenaufnahme . . . . .	44
2.3.2	Korrekturen der Daten . . . . .	46
2.3.2.1	Kalibrierung . . . . .	46
2.3.2.2	Mittelung . . . . .	46
2.3.2.3	Zeitlicher Nullpunkt . . . . .	46
2.3.2.4	Offset-Korrektur . . . . .	47
2.3.3	Auswertung der zeitaufgelösten Daten . . . . .	48
2.3.3.1	Anpassung von transienten Signalen . . . . .	48
2.3.3.2	Zeit- und wellenlängenabhängige Modellierung der Daten . . . . .	51
2.4	Probenpräparation . . . . .	53
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>55</b>
3.1	Padron0.9 . . . . .	55
3.1.1	Grundzustände . . . . .	55
3.1.2	Angeregte Zustände von $C^-$ und $T^-$ . . . . .	60
3.1.2.1	Fluoreszenz . . . . .	60
3.1.2.2	Stimulierte Emission . . . . .	60
3.1.2.3	Transiente Spektren . . . . .	61
3.1.2.4	Aufstellen des kinetischen Modells . . . . .	63
3.1.2.5	Anpassung der Daten . . . . .	66
3.1.2.6	Ergebnisse . . . . .	68
3.1.3	Angeregte Zustände von $C^H$ bei hohem pH-Wert . . . . .	71
3.1.3.1	Transiente Spektren . . . . .	71
3.1.3.2	Aufstellen des kinetischen Modells . . . . .	72
3.1.3.3	ESPT: deuterierte Pufferlösung . . . . .	74
3.1.3.4	Anpassung der Daten . . . . .	75
3.1.3.5	Ergebnisse . . . . .	75
3.1.4	Zustand $I$ . . . . .	76
3.1.4.1	Transiente Pump-Dump-Probe-Spektren . . . . .	78
3.1.4.2	Anpassung der Daten . . . . .	80
3.1.5	Angeregte Zustände von $C^{H+}$ und $T^{H+}$ bei niedrigem pH-Wert . . . . .	80
3.1.5.1	Transiente Spektren & Ergebnis . . . . .	82

---

3.2	rsFasLime . . . . .	87
3.2.1	Grundzustände . . . . .	87
3.2.2	Angeregter Zustand von $C^-$ . . . . .	89
3.2.2.1	Fluoreszenz und stimulierte Emission . . . . .	89
3.2.2.2	Transiente Spektren . . . . .	89
3.2.2.3	Anpassung der Daten . . . . .	93
3.2.2.4	Ergebnisse . . . . .	93
3.2.3	Angeregte Zustände von $C^H$ und $T^H$ . . . . .	94
3.2.3.1	Transiente Spektren . . . . .	95
3.2.3.2	Aufstellen des kinetischen Modells für $C^H$ . . . . .	97
3.2.3.3	Ergebnisse für $C^H$ . . . . .	98
3.2.3.4	Kinetisches Modell und Ergebnisse für $T^H$ . . . . .	99
3.3	Photoisomerisierung . . . . .	103
3.4	Ausblick . . . . .	107
3.4.1	Photoschalten - Ein Photostationäres Gleichgewicht? . . . . .	107
<b>A</b>	<b>Tabellenwerke</b>	<b>113</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>129</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>135</b>



# Kapitel 1

## Grundlagen

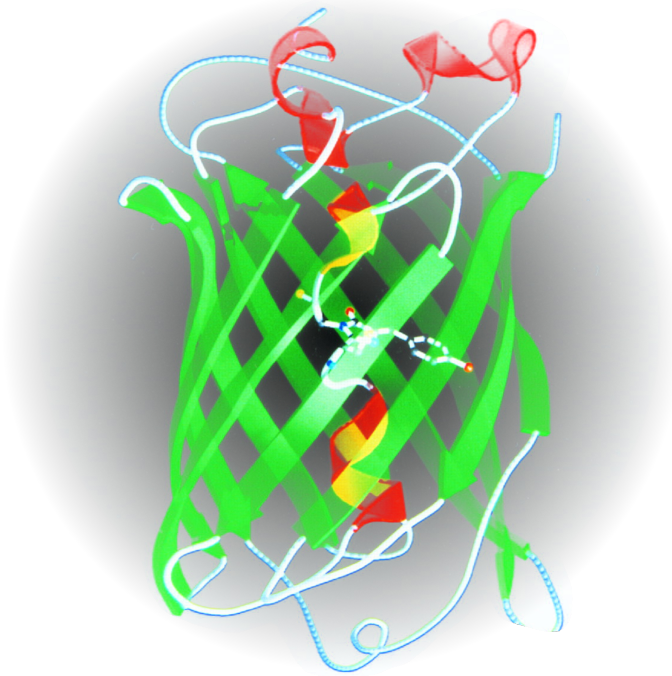
### 1.1 Fluoreszierende Proteine

#### 1.1.1 GFP

Das grün fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, GFP) der Quallenart *Aequorea victoria* wurde erstmals 1962 beschrieben [1]. In der Qualle überträgt das durch Chemilumineszenz blau emittierende Aequorin über Förster-Energietransfer Energie an GFP, das dann grün fluoresziert [2]. Die Primärstruktur von GFP wurde 1992 von Prasher et al. entschlüsselt [3], zwei Jahre darauf lösten Yang et al [4] und Ormö et al. [5] unabhängig voneinander die Kristallstruktur und ermöglichten damit Untersuchungen zum Einfluss veränderter Proteinumgebungen auf die Chromophoreigenschaften. Durch Mutation vom in der Natur vorkommende Wildtyp-GFP (*wild-type*, WT) und Verwendung ähnlicher Proteine aus anderen Quellen, wie der Koralle *Echinophyllia* oder der Seeanemone *Anemonia sulcata*, wurde seit der Entschlüsselung des GFP-Genoms eine breite Palette von fluoreszierenden Proteinen mit unterschiedlichsten spektralen und photophysikalischen Eigenschaften erstellt. GFP ist sowohl thermisch als auch pH-stabil im Bereich  $\text{pH} < 4$  oder  $> 12$  [4], bedarf keines Cofaktors zur Fluoreszenz und ist nicht toxisch, so dass es auch in lebenden Zellen eingesetzt werden kann. Die heute wohl wichtigste Funktion von GFP für die Fluoreszenzmikroskopie als DNA-Marker zur Expression in Pro- und Eukaryotischen Zellen wurde 1994, mehr als 30 Jahre nach seiner Entdeckung, von Chalfie et al. beschrieben [6].

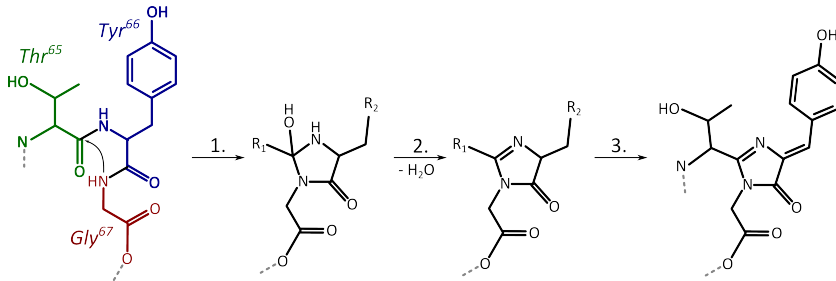
##### 1.1.1.1 Struktur

WT-GFP besteht aus 238 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 26,9 kDa, die eine kompakte  $\beta$ -Fasstruktur aus elf  $\beta$ -Faltblättern ausbilden (siehe Abb. 1.1). Das Fass ist 42 Å lang und hat einen Durchmesser von 24 Å [5].

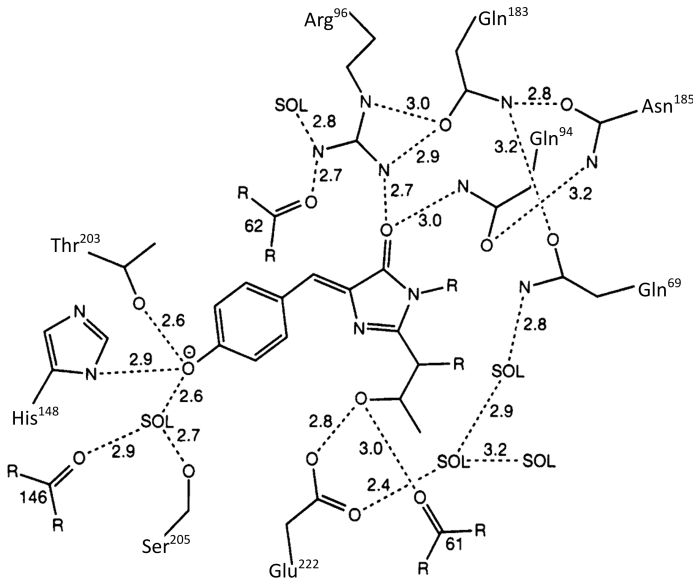


**Abb. 1.1:** Struktur des GFP nach Brejc et al. [7]  
grün:  $\beta$ -Faltblatt, rot:  $\alpha$ -Helix

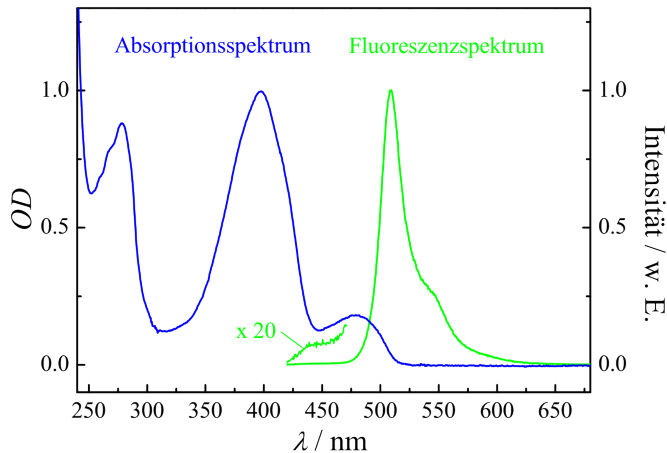
Durch das Fass läuft eine einfache  $\alpha$ -Helix mit partiellem  $3_{10}$ -Charakter, die in der Mitte ein 4-(*p*-Hydroxybenzyliden)-imidazolin-5-on- Chromophor aus den drei im Proteinstrang aufeinanderfolgenden Aminosäuren, *Ser*<sup>65</sup>, *Tyr*<sup>66</sup> und *Gly*<sup>67</sup> ausbildet (siehe Abb. 1.2). Das Chromophor steht etwa 60° zur Längsachse der umgebenden  $\beta$ -Fasstruktur und wird vollständig umschlossen und von der Umgebung abgeschirmt. In Abb. 1.3 sind Aminosäuren und Wassermoleküle in der näheren Umgebung des Chromophors gezeigt, die das Chromophor in einem Netzwerk von Wasserstoffbrücken stabilisieren: *His*<sup>148</sup>, *Thr*<sup>203</sup> und *Ser*<sup>205</sup> sowie ein Wassermolekül bilden Wasserstoffbrücken mit der phenolischen Hydroxylgruppe von *Tyr*<sup>66</sup>; *Arg*<sup>96</sup> und *Gln*<sup>94</sup> interagieren mit der Carbonylgruppe des Imidazolrings und *Glu*<sup>222</sup> schließlich bildet eine Wasserstoffbrücke mit der von *Ser*<sup>65</sup> stammenden Seitenkette des Chromophors.



**Abb. 1.2:** Reaktionspfad zur Bildung des Chromophors von GFP nach Reid et al. [8]  
 Reaktionsschritte: 1. Zyklisierung, 2. Dehydrierung, 3. Oxidation



**Abb. 1.3:** Umgebung und Koordination des GFP-Chromophors nach Ormö et al. [5]  
 gestrichelte Linien: Wasserstoffbrücken, Länge in Å angegeben



**Abb. 1.4:** Absorption und Emission des GFP in wässriger Phosphatpufferlösung (pH 7) nach Winkler [9]

### 1.1.1.2 Spektren

Das Absorptionsspektrum von GFP zeigt im sichtbaren Bereich zwei Absorptionsmaxima *A* bei 398 und *B* bei 478 nm [10], die dem neutralen und dem deprotonierten Chromophor zugeordnet werden, die durch Änderung des pH-Wertes ineinander überführt werden können [11]. Das Emissionsmaximum liegt bei 508 nm mit einer Schulter bei 545 nm und hat eine anregungswellenlängenabhängige Fluoreszenzquantenausbeute von 0.72-0.85 [5] bei einer Fluoreszenzlebensdauer von 3.3 ns [12].

### 1.1.1.3 Proteindynamik und Zustände

Chattoraj et al. führten 1996 Fluoreszenz-Hochkonversionsmessungen an GFP bei RT und 77 K sowie in Deuteriumoxid durch. Bei 77 K verschiebt sich die *B*-Bande von 478 nm nach 471 nm, wird schmaler und entwickelt eine deutliche Schwingungsprogression, die mit der *A*-Bande überlagert. Das Maximum der *A*-Bande verschiebt sich nicht wesentlich. Creemers et al. [13] interpretierten das stationäre RT-Absorptionsspektrum bei 478 nm als Überlagerung von zwei Zuständen *B* und *I*, wobei *I* im roten Bereich der Absorptionsbande absorbiert, eine höhere Grundzustandsenergie als *B* hat und deshalb bei 77 K nicht populiert ist. Bei 77 K zeigen die Fluoreszenzspektren



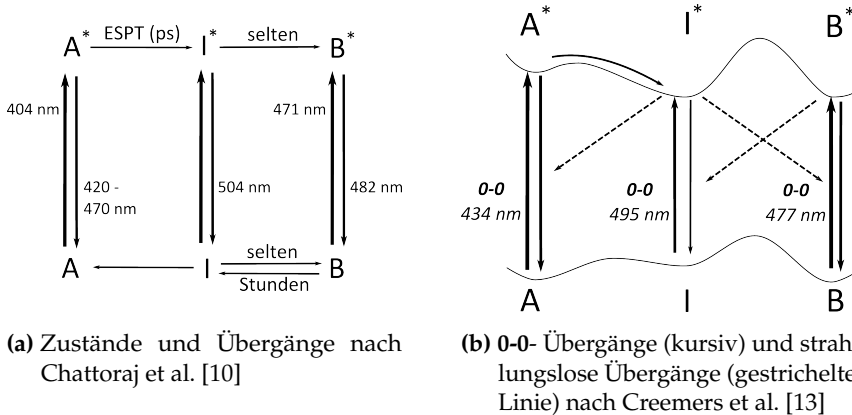
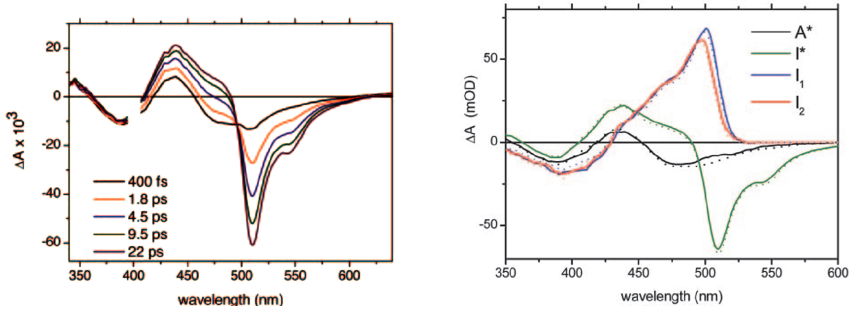


Abb. 1.5: Zustandsmodell von GFP

eine starke spektrale Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Anregung von  $B$  bei 471 nm führt zu Emission von  $B^*$  mit einem Maximum bei 482 nm. Nach Anregung von  $A$  bei 404 und 423 nm zeigt sich ebenfalls Emission mit lokalen Maxima bei 482 nm, zusätzlich tritt aber bei 504 nm eine weitere Emissionsbande auf, die Chatteraj et al. einem angeregten,  $B^*$  ähnlichen fluoreszierenden Zwischenzustand  $I^*$  zuordneten. Wiederholung der Messungen in  $D_2O$  statt  $H_2O$  änderten weder das stationäre Absorptions- noch Emissionsspektrum bei RT. Bei 77 K änderte sich das Emissionsspektrum nach Anregung von  $B$  bei 471 nm nicht, bei 404 und 423 nm allerdings zeigten sich Banden vergleichbarer Intensität bei 482 und 504 nm, sowie eine neue, breite Emission im Bereich 420-470 nm, die  $A^*$  zugeordnet wurde. Zeitaufgelöste Fluoreszenz-Hochkonversionssmessungen bei RT zeigten den Übergang  $A^* \rightarrow I^*$  nach Anregung von  $A$  bei 398 nm als einen schnellen Abfall im Bereich von 460 nm und einen korrespondierenden Anstieg bei 508 nm. In  $D_2O$  verlangsamten sich Abfall und Anstieg deutlich, bei 120 K verlangsamte sich der Prozess ebenfalls, bei 85 K verschwand diese Dynamik, was als Beleg für einen Protonentransferprozess mit einer Barriere interpretiert wurde. Mittels Lochbrennspektroskopie wurde gezeigt, dass  $A$  in  $B$  überführt werden kann und dass die Regeneration langsam vonstatten geht. Nach Anregung von  $B$  entsteht sofort das langlebige  $B^*$  mit einem Emissionsmaximum bei 508 nm bei RT. Aus diesen Beobachtungen stellten Chatteraj et al. das in Abb. 1.5a gezeigt Zustandsmodell von GFP auf.

Creemers et al. ergänzten dieses Modell, indem sie durch Lochbrennspektroskopie die 0-0-Übergänge der Spezies  $A$ ,  $I$  und  $B$  ermittelten und den Über-



(a) Transiente Spektren von GFP nach Anregung von  $A$

(b) Spektren der Grundzustände  $I_1$  und  $I_2$

Abb. 1.6: Pump-Probe und Pump-Dump-Probe Messungen an GFP [17]

gang  $I^* \rightarrow B^*$  ausschlossen. Stattdessen postulierten sie die Umwandlung von  $I^* \rightarrow A, B$  sowie von  $B^* \rightarrow I$  durch strahlungslose Prozesse [13]. Qualitative Barrieren, Umwandlung durch einen oder mehrere strahlungslose Prozesse (gestrichelte Pfeile) und die gemessenen Wellenlängen der 0-0-Übergänge (kursiv) sind in Abb. 1.5b gezeigt.

Winkler et al. beobachteten mit Pump-Probe Spektroskopie eine initiale  $I^*$ -Emission nach Anregung von  $A^*$ . Sie postulierten eine direkte  $A \rightarrow I^*$ -Anregung (*cross-well excitation*). Weiter entwickelten sie ein Modell, das die nicht-monoexponentielle Zeitabhängigkeit der Entwicklung von  $A^* \rightarrow I^*$  und eine 200 ps-Komponente in der Lebensdauer von  $A^*$  erklärte, indem sie die Bildung von schwingungsheissem  $A_h^*$  postulierte, das sukzessive mit 2  $k_r$  zum kühleren  $A_p^*$  und schließlich mit  $k_r$  zum kalten  $A_c^*$  abkühlt. Alle drei  $A^*$ -Spezies können über interne Konversion mit  $k_{ic}$  in den Grundzustand zurück fallen. Der heißen Spezies  $A_h^*$  gelingt der Protonentransferprozess über eine Barriere zu  $I^*$  dank der Überschussenergie mit  $k_h$  schnell, bei  $A_p^*$  mit  $k_p$  langsamer während der kalten Spezies  $A_c^*$  dieser Weg verschlossen bleibt [14].

Im Gegensatz dazu assoziierten Thor et al. die  $A^* \rightarrow I^*$ -Entwicklung als eine parallele Deprotonierungsreaktion zweier angeregter Zustände  $A_1^*$  und  $A_2^*$  mit den Lebensdauern 2.2 und 11 ps (12 und 69 ps deuteriert), die sie unterschiedlichen Konfigurationen der Proteinumgebung zuordneten [15] [16].

Kennis et al. [17] nahmen durch Pump-Probe Spektroskopie transiente Ab-

sorptionsspektren nach Anregung der *A*-Bande auf. Die Spektren sind in Abb. 1.6a gezeigt. Durch Entvölkerung des  $I^*$ -Zustandes in den korrespondierenden Grundzustand  $I_1$  mittels stimulierter Emission bestimmten sie das Absorptionsspektrum von  $I_1$  und zeigten eine Relaxation mit 3 ps (7 ps deuteriert) in einen intermediären Zwischenzustand  $I_2$ , der wiederum mit 400 ps (5 ns deuteriert) zu *A* relaxiert. Die Lebensdauer von  $I^*$  wurde auf 3 ns bestimmt. Die Spektren von  $I_1$  und  $I_2$  sind in Abb. 1.6b gezeigt.

### 1.1.2 Photoaktivierbare Proteine

In der Klasse der GFP-ähnlichen Proteine gibt es Vertreter, deren Fähigkeit zur Fluoreszenz durch eine induzierte Änderung verändert werden kann. GFP selbst wird durch Bestrahlung der *A*-Bande bei  $\sim 400$  nm sehr langsam von der protonierten in die deprotonierte Form überführt, diese Änderung ist über Stunden stabil [10]. Das erste speziell entwickelte photoaktivierbare fluoreszierende Protein war eine Variante des GFP, bei der durch Decarboxylierung von *Glu*<sup>222</sup> das anionische Chromophor stabilisiert wurde; die Bildung des deprotonierten Chromophors durch Anregung der *A*-Bande war irreversibel, Fluoreszenz nach Anregung der *B*-Bande wurde durch diese Aktivierung um den Faktor 100 verstärkt [18]. Für Kaede, ebenfalls ein GFP-Derivat, wurde eine Rotverschiebung von Absorptions- und Emissionsspektrum durch eine photoinduzierte  $\beta$ -Eliminierung und anschließender irreversible Vergrößerung des  $\pi$ -Elektronensystems des Chromophors gezeigt [19].

### 1.1.3 Reversibel Schaltbare Fluoreszierende Proteine

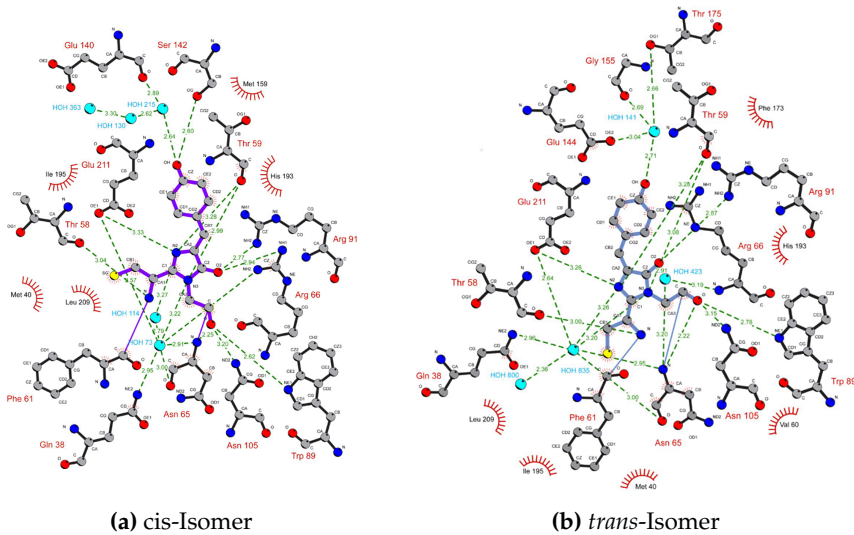
Reversibel (photo-)schaltbare fluoreszierende Proteine (*reversibly photoswitchable fluorescent proteins*, RSFPs) sind in der Regel GFP-ähnliche Proteine, die wiederholt durch Bestrahlung zwischen einem fluoreszierenden AN- (*on-state*, oft auch hell (*bright*)) und einem nicht fluoreszierenden AUS-Zustand (*off-state*, dunkel (*dark*)), geschaltet werden können. Bereits 1997 wurde von Dickson et al. bei Einzelmolekülmessungen ein Blinken (*blinking*), eine zwischen fluoreszierendem und nicht fluoreszierendem Zustand schnell hin- und herwechselnde gelb fluoreszierende GFP-Mutante beobachtet, die nach Emission von  $\sim 10^6$  Photonen gar nicht mehr fluoreszierte, aber durch Bestrahlung bei 405 nm teilweise reaktiviert werden konnte. Ohne Lichteinfluss war der dunkle Zustand über mehrere Minuten stabil [20]. Bessere

Ausbeute zeigte das im Jahr 2000 von Lukyanov et al. beschriebene fluoreszierende Protein asFP595, dessen Fluoreszenzintensität durch Bestrahlung mit grünem Licht verstärkt und durch blaues Licht geschwächt wird [21]. Andresen et al. züchteten 2005 Kristalle von asFP595. Da das Protein auch im Kristall schaltbar war, konnten so durch Röntgendiffraktometrie Kristallstrukturen von AN- und AUS-Zustand ermittelt werden, die den fluoreszierenden Zustand als *cis*-Isomer und den AUS-Zustand als *trans*-Isomer des Chromophors identifizierten. Bei den meisten GFP-ähnlichen Proteinen zeigt das *cis*-Isomer die stärkere Fluoreszenz und die Quantenausbeute bei Anregung des deprotonierten Zustandes ist deutlich höher, allerdings gibt es mit dem rot fluoreszierende Protein eqFP578f auch FPs mit *trans*-Konfiguration im AN-Zustand [22]. Es scheint, dass die Isomerisierung ein entscheidender Schritt beim Schaltvorgang ist, die Konformation allein aber nicht der entscheidende Faktor für die Fluoreszenzquantenausbeute sein kann. Beide Isomere eines Proteins erfahren unterschiedliche Stabilisierung und Wechselwirkungen durch die Proteinumgebung, was Einfluss auf das Protonierungsgleichgewicht und die Fluoreszenzlebensdauer haben kann. Die Planarität des  $\pi$ -Elektronensystems [23], Stabilisierung durch die Proteinumgebung [24] und generelle Flexibilität des Proteins in Chromophornähe [25] werden als Ursachen für hohe oder niedrige Quantenausbeuten diskutiert.

Da Isomer und Protonierungsgrad bei aktuellen Studien mehr und mehr in den Mittelpunkt rücken und die Rolle der phänomenologischen Bezeichnung der *A*- und *B*- Banden des GFP immer weiter abnimmt, wird hier eine Nomenklatur zur eindeutigen Beschreibung des Proteinchromophors eingeführt: *C* beschreibt das *cis*, *T* das *trans*-Isomer. Ein hochgestelltes *H* oder Minus (–) bezeichnet die Ladung als neutral oder anionisch, angeregte Zustände werden mit einem hochgestellten Stern (\*) versehen. Für eine bei niedrigem pH-Wert vorkommende protonierte Form wird zusätzlich ein hochgestellte Plus (+) eingeführt, um einen pH-induzierten Effekt auf die Photoeigenschaften zu unterstreichen. Wo es möglich ist, wird im Folgenden neben der jeweiligen Bezeichnung des Autors auch diese Bezeichnung angegeben.

### 1.1.4 Dronpa

Ando et al. [26] beschrieben 2004 das RSFP Dronpa, einer Mutante eines fluoreszierenden Proteins der Koralle *Pectiniidae*, deren Fluoreszenz sich durch Bestrahlung bei 490 nm nahezu vollständig ausschalten und durch Bestrahlung bei 400 nm komplett wieder herstellen lässt. Dieses Verschwinden



**Abb. 1.7:** Chromophorumgebung von Dronpa nach Andresen et al. [27]  
 Atome und Wasser sind als farbige Kugeln gezeichnet (grau: C, blau: N, rot: O / OH, türkis: H<sub>2</sub>O)  
 Bindungen sind als Striche gezeichnet (grün gestrichelt: Wasserstoffbrücken, schwarze/lila/blau: Atombindung)

und Wiederkehren der Fluoreszenz ist der Grund für den Namen Dronpa, der sich aus „dron“, einem Ninja Ausdruck für Verschwinden, und „pa“ für Photoaktivierung, zusammensetzt. Dronpa besteht aus 257 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 28.8 kD. Das Chromophor bildet sich analog zu GFP (siehe Abb. 1.2) autokatalytisch aus den Aminosäuren *Cys*<sup>62</sup>, *Tyr*<sup>63</sup> und *Gly*<sup>64</sup>. Der Proteinaufbau mit dem Chromophor in einer  $\alpha$ -Helix umgeben von einer  $\beta$ -Fass Struktur gleicht ebenfalls GFP, wobei das Fass in der Mitte zwischen zwei  $\beta$ -Faltblättern einen Spalt aufweist, der einen Lösungsmittelaustausch mit der Umgebung ermöglicht. Das Chromophor liegt bevorzugt als *cis*-Isomer vor, wobei die beiden Ringe um  $\sim 15^\circ$  verdreht sind, und wird in der Proteinumgebung u.a. durch eine Wasserstoffbrücke der *p*-Hydroxyphenolgruppe zu *Ser*<sup>142</sup> und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit *His*<sup>193</sup> stabilisiert.

Andresen et al. [27] identifizierten durch Röntgendiffraktometrie die Kristallstruktur von Dronpa in AN- und AUS-Zustand und zeigten auch hier eine mit dem Schaltvorgang einhergehende *cis-trans*-Isomerisierung. Das Chromophor ist im *trans*-Zustand mit  $\sim 30^\circ$  deutlich stärker verdreht, die

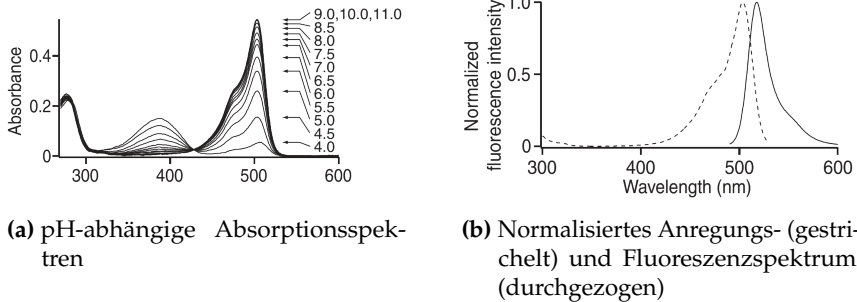


Abb. 1.8: Spektren von Dronpa nach Ando et al. [26]

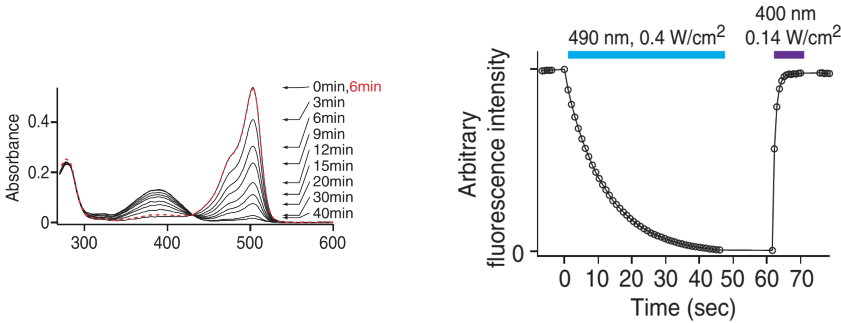
*p*-Hydroxyphenolgruppe wird nicht mehr durch die Wasserstoffbrücke zu *Ser*<sup>142</sup> stabilisiert und die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit *His*<sup>193</sup> wird durch eine  $\pi$ -Kation-Wechselwirkung zu *Arg*<sup>66</sup> ersetzt. Der *trans*-Zustand ist mit einer Halbwertszeit von  $\sim 14$  Stunden sehr stabil.

#### 1.1.4.1 Spektren

Das Absorptionsspektrum des *cis*-Isomers von Dronpa zeigt im sichtbaren Bereich zwei Absorptionsmaxima bei 390 und bei 503 nm, die durch Titration ineinander überführt werden können (siehe Abb. 1.8a). Abb. 1.8b zeigt das Fluoreszenzanregungsspektrum sowie das Emissionsspektrum von Dronpa. Das Emissionsmaximum liegt bei 518 nm mit einer Schulter bei 550 nm und hat eine Fluoreszenzquantenausbeute von  $\Phi_{F,cis} = 0.85$  ( $\Phi_{F,trans} = 0.02$ ) mit einer Fluoreszenzlebensdauer von 3.6 ns [26] [28]. Das Anregungsspektrum zeigt keinen Beitrag im Bereich  $< 400$  nm.

Die stabile *cis*-Form liegt bei neutralem pH fast ausschließlich deprotoniert vor, während die *trans*-Form fast vollständig protoniert ist. Die Änderung des Absorptionsspektrums durch Bestrahlung bei 488 nm ist in Abb. 1.9a gezeigt, die korrespondierende Änderung der Fluoreszenzintensität in Abb. 1.9b. Es ist klar zu sehen, dass das Ausschalten, also die *cis*  $\rightarrow$  *trans*-Isomerisierung, deutlich langsamer passiert als das Anschalten. Die Quantenausbeute für die Schaltvorgang wird nach Gl. 1.1 berechnet und beträgt  $\Phi_{cis \rightarrow trans}(490 \text{ nm}) = 3 \cdot 10^{-4}$  und  $\Phi_{trans \rightarrow cis}(400 \text{ nm}) = 0.36$ .

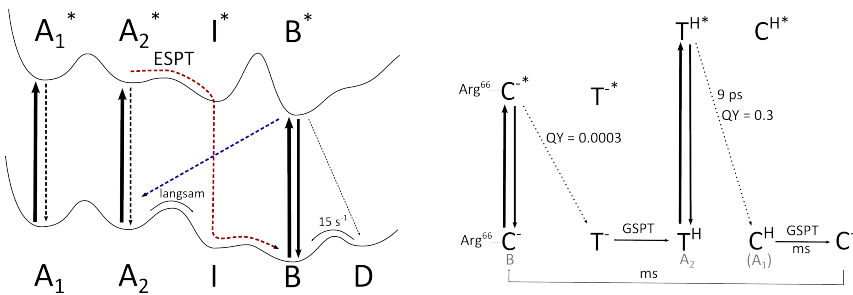
$$\Phi_{sw} = \frac{hc}{\tau_{\frac{1}{2}} \sigma(\lambda_{ex}) \lambda_{ex} I} \quad (1.1)$$



- (a) Zeitabhängige Änderung des Absorptionsspektrums durch Bestrahlung mit 488 nm (schwarz) und 400 nm (rot)
- (b) Verlauf der Fluoreszenzintensität bei Bestrahlung

Abb. 1.9: Schaltspektren von Dronpa im Ensemble nach Ando et al. [26]

$\sigma(\lambda_{ex})$  ist der Absorptionsquerschnitt des Chromophors bei Anregungswellenlänge  $\lambda_{ex}$ ,  $I$  ist die Intensität des eingestrahlenen Lichtes,  $\tau_{\frac{1}{2}}$  die gemessene Halbwertszeit des Schaltvorganges und  $h$  und  $c$  sind Planckkonstante und Lichtgeschwindigkeit.



(a) nach Habuchi et al. 2005 [28]

(b) nach Warren et al. 2013 [29]

Abb. 1.10: Zustandsmodelle von Dronpa

### 1.1.4.2 Proteindynamik und Zustände

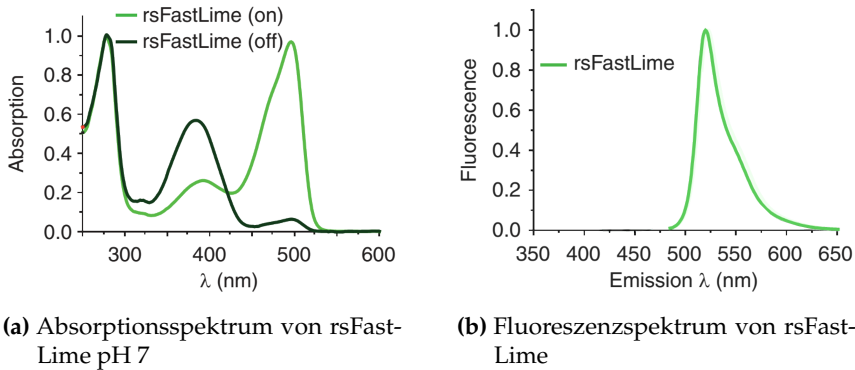
Habuchi et al. [28] zeigten einen Unterschied in der Dynamik der protonierten Form, je nach dem ob sie durch Erniedrigung des pH-Wertes oder durch Bestrahlung der deprotonierten Form bei 488 nm entstanden war: Die photogeschaltete Form  $A_2$  ( $T^H$ ) ließ sich durch Bestrahlung bei 400 nm wieder zurückschalten, die pH-induzierte protonierte Form  $A_1$  ( $C^{H+}$ ) zeigte bei Bestrahlung keine Änderung in den Absorptionsspektren. Obwohl das Fluoreszenzanregungsspektrum in Abb. 1.8b nach Anregung bei 400 nm keine Emission zeigt, nahmen Habuchi et al. für den photoaktivierten Weg  $A_2 \longrightarrow B$  ( $C^H \longrightarrow C^-$ ) analog zum GFP einen initialen ESPT an, der allerdings nicht in der fluoreszierenden Form  $B^*$  ( $C^{*-}$ ) sondern im nicht fluoreszierenden Zwischenzustand  $I^*$  endet und von dort aus strahlungslos über  $I$  nach  $B$  ( $C^-$ ) verläuft. Nach Anregung von  $B$  ( $C^-$ ) mit 488 nm fluoresziert  $B^*$  ( $C^{*-}$ ) mit einer Lebensdauer von 3.6 ns und fällt zurück in den Grundzustand; ein kleiner Teil endet in der  $A_2$  ( $C^H$ ), ein noch kleinerer in Zustand  $D$ , einem dunklen Zustand der über Sekunden zurück nach  $B$  ( $C^-$ ) konvertiert (siehe Abb. 1.10a).

Fron et al. [30] verglichen mittels Pump-Probe Spektroskopie die Dynamik der photoaktivierten Form  $A_2$  ( $C^H$ ) nach Anregung bei 405 nm in  $H_2O$  und  $D_2O$  und schlossen aufgrund der Verdoppelung einer von ihnen dem ESPT zugeordneten Zeitkonstante von 2 ps auf 4 ps auf einen kinetischen Isotopen Effekt (KIE, siehe Abschn.1.4) und somit auf einen initialen ESPT nach Anregung.

Warren et al. [29] fanden mittels FTIR und VIS-Pump-IR-Probe Spektroskopie keinen Hinweis auf einen ESPT bei Anregung von  $T^H$  ( $A_2$ ), dem Schaltprodukt der deprotonierten und von  $Arg^{66}$  stabilisierten *cis*-Spezies im Grundzustand  $C^- \cdots Arg^{66}$  ( $B$ ). Stattdessen postulierten sie eine schnelle, initiale Isomerisierung aus dem angeregten Zustand in einen protonierten *cis*-Grundzustand  $C^H$ , der anschließend langsam durch einen Grundzustands-Protonentransfer (GSPT) zu einer anionischen *cis*-Spezies  $C^-$  deprotoniert wird, die schließlich durch  $Arg^{66}$  stabilisiert wird (siehe Abb. 1.10b). Die Lebensdauer von  $T^{H*}$  wurde mit 9 ps bestimmt, die Isomerisierung steht in direkter Konkurrenz zu einer IC zurück nach  $T^H$  mit einer Ausbeute von  $\Phi_{T^{H*} \longrightarrow C^H} = 0.3$ .

Lukacs et al. [31] untersuchten mit VIS-Pump-IR-Probe Spektroskopie und fanden ebenfalls keinen Beleg für einen ESPT bei Anregung der photogeschalteten *trans*-Spezies bei 400 nm. Da sie aber auch keinen Hinweis auf eine direkte Isomerisierung fanden, schlugen sie eine Umorganisierung





**Abb. 1.11:** Stationäre Spektren von rsFastLime nach Andresen et al. [32]

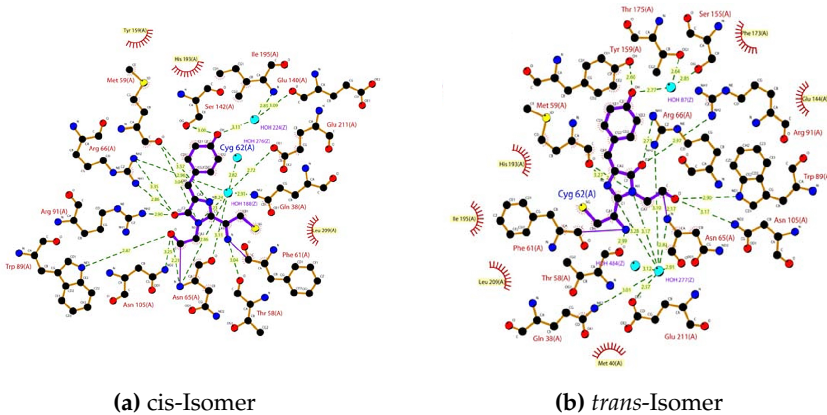
der das Chromophor stabilisierenden Wasserstoffbrücken vor, die zu einem metastabilen *trans*-Grundzustand führt, der auf einer ns-Zeitskala zum ursprünglichen *trans*-Zustand oder zum deprotonierten *cis*-Isomer  $C^-$  führt.

### 1.1.5 rsFastLime

Ausgehend von den aus Kristallstrukturen bekannten Chromophorumgebungen von Dronpa (siehe Abb. 1.7) und dem schneller isomerisierenden asFP595 vermuteten Stiel et al., dass die *cis-trans*-Isomerisierung durch die Aminosäure  $Val^{157}$  (nicht abgebildet) sterisch und durch  $Arg^{66}$  wegen der Stabilisierung des *cis*-Isomers energetisch behindern würde. Durch Ersetzen von  $Val^{157}$  mit Glycin wurde eine Beschleunigung der *cis*  $\rightarrow$  *trans*-Isomerisierung um den Faktor 50 im Ensemble im Vergleich zu Dronpa erreicht. Die Fluoreszenzquantenausbeute des Proteins Dronpa-V157G, von Stiel et al. wegen seines schnellen Photoschaltens *rsFastLime* genannt, ist mit  $\Phi_F = 0.77$  etwas geringer als bei Dronpa, dafür ist es etwa vier mal stabiler gegen Photobleichen. Wie Dronpa liegt rsFastLime im Grundzustand als *cis*-Isomer vor, die Halbwertszeit des *trans*-Isomers liegt bei etwa 8 Minuten.

#### 1.1.5.1 Spektren

Das Absorptionsspektrum von rsFastLime zeigt zwei Absorptionsbanden mit einem Maximum bei 392 nm bzw. 496 nm als *cis*- und 384 nm bzw. 496 nm als *trans*-Isomer und ist für beide Isomere in Abb. 1.11 gezeigt.

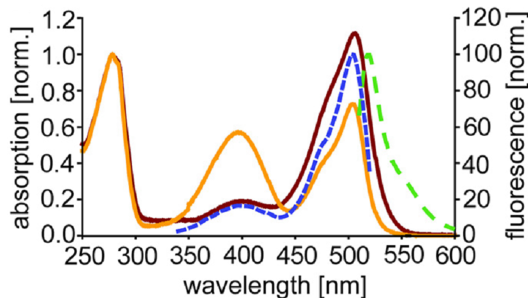


**Abb. 1.12:** Chromophorumgebung von Padron nach Brakemann et al. [23]  
 Atome und Wasser sind als farbige Kugeln gezeichnet (grau: C, blau: N, rot: O / OH, türkis: H<sub>2</sub>O)  
 Bindungen sind als Striche gezeichnet (grün gestrichelt: Wasserstoffbrücken, schwarze/lila/blau: Atombindung)

Für das *cis*-Isomer liegt bei neutralem pH ein Protonierungsgleichgewicht  $C^H \rightleftharpoons C^-$  vor, das *trans*-Isomer hingegen ist fast vollständig protoniert als  $T^H$ . Das Emissionsspektrum hat ein Maximum bei 518 nm und eine Schulter bei 550 nm. Die stationären Spektren sind im Rahmen dieser Arbeit in Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2.1 eingehender beschrieben. Zu rsFastlime gibt es bisher keine gesonderten Untersuchungen hinsichtlich der photoinduzierten Prozesse. Die Untersuchung der ultraschnellen photoinduzierten Dynamik ist Gegenstand dieser Arbeit.

### 1.1.6 Padron

Durch Substitution einer einzigen Aminosäure in rsFastLime, *Met*<sup>159</sup>, durch *Tyr* (siehe Abb. 1.12) gelang es Andresen et al. 2010 ein RSFP mit im Vergleich zu Dronpa umgekehrten Schalteigenschaften zu entwickeln [32]: Dronpa, rsFastlime und alle anderen bis dahin bekannten RSFP fluoreszieren intensiv nach Anregung der  $C^-$ -Spezies mit blauem Licht, gleichzeitig führt Bestrahlung mit dieser Wellenlänge aber mit geringer Ausbeute zum nicht-fluoreszierenden *trans*-Isomer, während Bestrahlung mit UV-Licht mit hoher Ausbeute den umgekehrten Prozess initiiert (negatives Schalten). Bei der neuen Mutante Dronpa-*Val*<sup>159</sup>*Gly*, *Met*<sup>159</sup>*Tyr* schaltet blaues Licht das



**Abb. 1.13:** Stationäre Spektren von Padron bei pH 7 nach Brakemann et al. [23]  
 orangene Linie: AN-Zustand, rote Linie: AUS-Zustand, blaue gestrichelte  
 Linie: Fluoreszenzanregungsspektrum, grüne gestrichelte Linie: Fluoreszenzspektrum

Protein mit geringer Ausbeute in den AN-Zustand und regt Proteine im AN-Zustand zur Fluoreszenz an, während UV Licht das Protein ausschaltet (positives Schalten). Da die Fluoreszenzintensität niedrig ist und der Schaltvorgang nur unvollständig führten Andresen et al. eine Reihe weitere Mutationen durch bis sie schließlich, nach sechs weiteren Substitutionen in Chromophornähe, ein positiv schaltendes, im AN-Zustand stark fluoreszierendes photostabiles Protein mit sehr geringer Fluoreszenz im AUS-Zustand (0.7 % des AN-Zustandes) erhielten. Aufgrund der umgekehrten Schalteigenschaften im Vergleich zu Dronpa nannten sie das Protein Padron. Die Fluoreszenzquantenausbeute beträgt  $\Phi_F = 0.64$ . Wie auch bei Dronpa entspricht der AN-Zustand dem *cis*-Isomer [23], das bei RT eine Halbwertszeit von etwa 2 Stunden hat und in das stabilere *trans*-Isomer übergeht. Da Padron bei niedrigen Temperaturen eine Tendenz zur Dimerisierung zeigte, entwickelten Andresen et al. eine auch bei niedrigen Temperaturen monomere Variante, Padron\*, mit sehr ähnlichen Eigenschaften [32]. In dieser Arbeit wird Padron0.9 untersucht, eine weitere Padron-Variante mit hoher Tendenz zur Kristallisation, einem mit einer Halbwertszeit von etwa 4 Stunden etwas stabilerem *cis*-Zustand, leicht schlechterer Quantenausbeute  $\Phi_F = 0.61$  und gegenüber Padron um etwa 1 nm verschobenen Absorptions- und Emissionsspektren [23].

### 1.1.6.1 Spektren

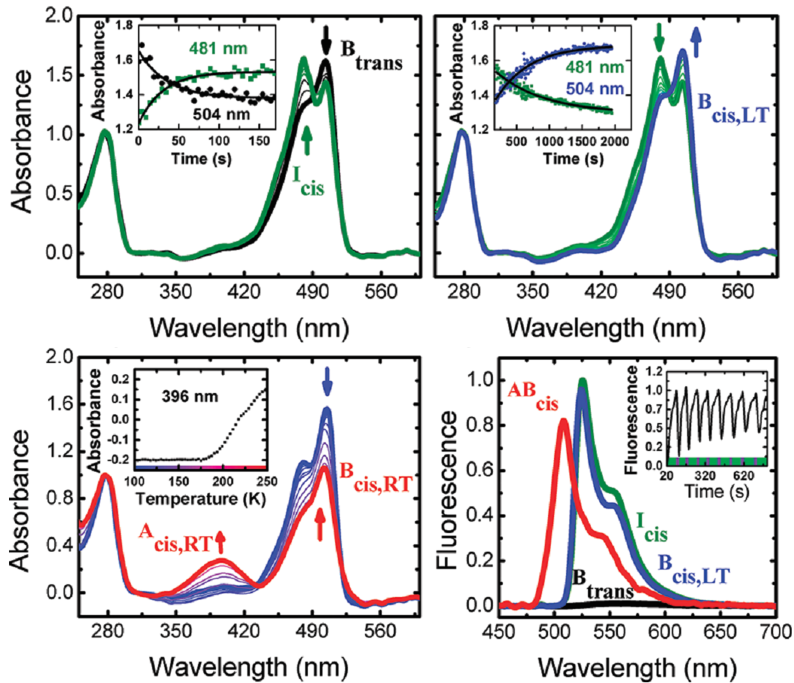
Das Absorptionsspektrum von Padron zeigt zwei Absorptionsbanden mit einem Maximum bei 396 nm bzw. 503 nm für das *cis*- Isomer und eine Ab-

sorptionsbande bei 505 nm für das *trans*-Isomer. Die Absorptionsspektren beider Isomere sind in Abb. 1.13 gezeigt. Für das *cis*-Isomer liegt bei neutralem pH wie bei rsFastLime ein Protonierungsgleichgewicht  $C^H < 0 > C^-$  vor, das *trans*-Isomer hingegen ist vollständig deprotoniert als  $T^-$ . Das Emissionsspektrum hat ein Maximum bei 522 nm und hat eine Schulter bei 550 nm. Das Fluoreszenzanregungsspektrum in Abb. 1.13 zeigt eine deutliche Fluoreszenz nach Anregung der  $C^H$ -Spezies. Die stationären Spektren sind Gegenstand dieser Arbeit und in Abschnitt 3.1.1 und 3.1.2.1 eingehender beschrieben.

### 1.1.6.2 Proteindynamik und Zustände

Kristallstrukturanalysen von Brakemann et al. [23] an Padron0.9 zeigten, dass das *trans*-Isomer durch  $Tyr^{159}$  durch eine Wasserstoffbrücke zum *p*-Hydroxyphenylring stabilisiert wird (siehe Abb. 1.12). Die Substitution dieser einen Aminosäure reichte bereits aus, das Schaltverhalten gegenüber rsFastLime umzukehren. Sie machten in direkter Chromophor Umgebung drei titrierbare Aminosäurereste von  $Glu^{144}$ ,  $His^{193}$  und  $Glu^{211}$  aus, die zur Deprotonierung des *trans*-Isomers bei neutralem pH beitragen.

Faro et al. [33] isolierten in Tieftemperatur-Röntgenexperimenten zwei fluoreszierende Zwischenzustände auf dem Reaktionsweg vom *trans*- zum *cis*-Isomer  $B_{trans} (T^-) \longrightarrow I_{cis} \longrightarrow B_{cis,LT} \longrightarrow A_{cis,RT} (C^H) \rightleftharpoons B_{cis,RT} (C^-)$ . Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren dieser Zustände sind in Abb. 1.14 gezeigt. Bemerkenswert ist die bei 100 K stattfindende Isomerisierung der *trans*-Form durch Bestrahlung bei 523 nm zu einem metastabilen fluoreszierenden Zwischenzustand  $I_{cis}$ , die mit einer Umorganisation von  $Met^{59}$  und geringfügiger Bewegung von  $Met^{93}$  und  $Ile^{195}$  einhergeht (siehe Abb. 1.12),  $Met^{93}$  ist nicht abgebildet); Faro et al. vermuteten eine leichte Deformation des  $\beta$ -Fasses bei der Isomerisierung. Die Absorption von  $I_{cis}$  hat ein Maximum bei 481 nm und zeigt Fluoreszenz bei 524 nm. Innerhalb von Minuten wandelt sich  $I_{cis}$  zu  $B_{cis,LT}$  um, einem *cis*-Isomer mit Absorptionsmaximum bei 504 nm aber ähnlicher Fluoreszenz wie  $I_{cis}$ , das auch strukturell keine Unterschiede zeigt. Die Änderung des Absorptionsspektrums führten Faro et al. auf nach der Isomerisierung geänderte elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken in  $I_{cis}$  zurück, die sich der geänderten Konformation nur langsam anpassen. Bei Temperaturen über 180 K verschiebt das Emissionsmaximum blau und es stellt sich ein Protonierungsgleichgewicht zwischen  $A_{cis,RT} (C^H)$  und  $B_{cis,RT} (C^-)$  ein. Auch der Übergang von  $B_{cis,LT}$  zu  $B_{cis,RT}$  erfolgte ohne große strukturelle Änderungen. Es zeigte sich, dass auch der  $I_{cis}$ -Zustand durch Bestrahlung



**Abb. 1.14:** Absorptionszustände im Kryo-Experiment von Faro et al. [33]  
 oben links: Umwandlung von  $B_{trans}$  zu  $I_{cis}$  durch Bestrahlung bei 523 nm  
 bei 100 K, Insert: zeitabhängige Maxima der Banden  
 oben rechts: Spontane Umwandlung von  $I_{cis}$  nach  $B_{cis,LT}$  bei 100 K, Insert:  
 zeitabhängige Maxima der Banden  
 unten links: Bildung des Protonierungsgleichgewichts  $A_{cis,RT} \rightleftharpoons B_{cis,RT}$   
 bei  $T > 180$  K  
 unten rechts: Emissionsspektren von  $B_{trans}$ ,  $I_{cis}$ ,  $B_{cis,LT}$  und  $B_{cis,RT}$ , In-  
 sert: reversible Isomerisierung zwischen  $B_{trans}$  und  $I_{cis}$  durch wechselnde  
 Bestrahlung bei 405 und 523 nm

bei 405 nm effektiv zurück in das  $B_{trans}$ -Isomer überführt werden kann (siehe Abb. 1.14 Insert unten rechts).

## 1.2 Das Chromophor

Das Chromophor von Padron0.9 und rsFastLime, ein *p*-Hydroxybenzylidenimidazolidinon (HBDI) wird, ähnlich wie bei GFP, durch Reaktion dreier benachbarter Aminosäuren (*Cys*<sup>62</sup> – *Tyr*<sup>63</sup> – *Gly*<sup>64</sup>) nach dem Reaktionsschema in Abb. 1.2 gebildet [27].

### 1.2.1 Grundzustand in Lösung

HBDI ausserhalb der Proteinumgebung liegt als *cis*-Isomer vor und isomerisiert durch UV-Bestrahlung. In Wasser hat es die  $pK_s$ -Werte 1.8 für den freien Stickstoff am Imidazolring und 8.2 für die Hydroxylgruppe. Daraus ergeben sich eine kationische, eine neutrale und eine anionische Form mit klar unterscheidbaren Absorptionsspektren mit Maxima bei 391, 368, und 425 nm in Wasser (siehe Abb. 1.15b) [34], wobei sich die Spektren von *cis*- und *trans*-Isomer zumindest in Methanol nur durch eine schwache Rotverschiebung von 4 nm unterscheiden [35]. Die Lage der Absorptionsmaxima ist stark lösungsmittelabhängig, wobei die neutrale Form nur wenig verschiebt, während Kation und stärker noch das Anion erwartungsgemäß eine negative Solvatochromie zeigen. In DMSO liegt das Absorptionsmaximum des Anions sehr weit rotverschoben bei 480 nm. Ein neutrales Zwitterion wurde nicht beobachtet, konnte aber von Dong et al. durch N-Methylierung und Titration isoliert werden; es zeigt ein Absorptionsmaximum bei 486 nm [36]. Zweiphotonen-Ionisationsmessungen an HBDI in der Gasphase zeigten für das Anion ein Gaussförmiges Spektrum mit einem Maximum bei 479 nm und 40 nm FWHM, für das Kation ein Absorptionsmaximum bei 406 nm mit 20 nm FWHM [37]. Für das neutrale Chromophor wurde ein Maximum bei 399 nm aus dem Absorptionsmaximum eines neutralen Chromophors mit positiver Seitenkette berechnet, das bei 415 nm lag [38]. Die starke Übereinstimmung der Absorptionsmaxima von HBDI in Gasphase und in GFP speziell beim Anion (vgl. Abb. 1.4) deuteten Andersen et al. als Beweis für den Schutz des Chromophors vor Solvens- und Oxidationseffekten durch die das Chromophor umgebende  $\beta$ -Fasstruktur [37].

NMR-Studien von He et al. haben einen reversible, pH-induzierte *cis trans* Isomerisierung aufgrund der Annäherung der freien Energien der Grundzustände bei niedrigen pH-Werten gezeigt. Durch photoinduzierte Überführung der Formen in das *trans*-Isomer und Messung der Regeneration des *cis*-Konformers wurden die Aktivierungsenergien für diesen Prozess ermittelt. Der Unterschied der Aktivierungsenergien für die protonierten

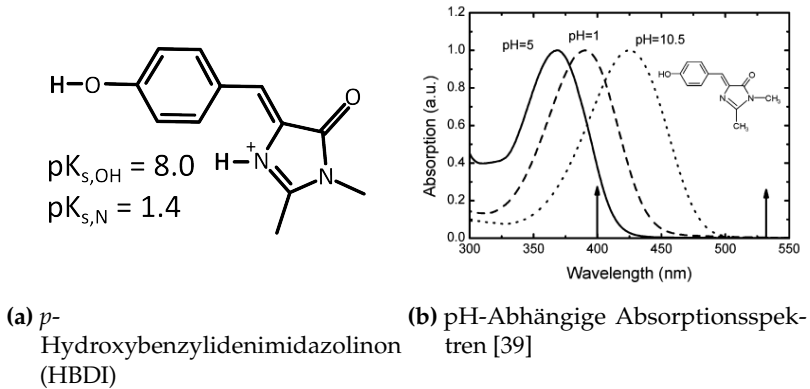


Abb. 1.15: HBDI

Spezies war mit 48.9 (Kation), 54.8 (Neutral) und 54.8 kJ/mol in  $D_2O$  gering. Verwendung anderer Lösungsmittel verlängerte die Regenerationszeit allerdings drastisch von 3-5 Minuten in  $D_2O$  auf 48 Stunden (Methanol, Isoopropanol). He et al. schlossen aus diesen Ergebnissen auf einen von jedem Protonierungsgrad aus zugänglichen, nicht planaren Übergangszustand, der eine niedrige Barriere für die Isomerisierung hat und durch Wasser stabilisiert wird [39].

## 1.2.2 Angeregte Zustände

Beide Isomere zeigen quasi keine Fluoreszenz bei Raumtemperatur ( $\Phi_F < 0.001$ ), die Quantenausbeute steigt mit sinkender Temperatur nicht linear auf das  $10^3 - 10^4$ -fache [40] [41]. Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen (Ultrafast Fluorescence Upconversion) von Addison et al. zeigten eine kürzere Lebensdauer für die neutrale im Vergleich zur anionischen Spezies in Methanol, die Konformation machte jeweils keinen Unterschied. Auch die Fluoreszenzspektren beider Isomere in Methanol ähneln sich stark mit leicht geringerer Intensität des *trans*-Isomers, sie zeigen ein Maximum bei 430 nm. Die Fluoreszenz ist kurz und fällt in Methanol und Acetonitril biexponentiell ab [35]. Mandal et al. bestimmten die Lebensdauern von Anion und neutraler Form Lösungsmittelabhängig (siehe Tab.1.1). Addison et al. schlossen aus dem identischen Verhalten beider Isomere auf eine starke Ähnlichkeit der  $S_1$ -Zustände und ihrer Dynamik.



Lösungsmittel	Form	$\tau_1$ / ps	$\tau_2$ / ps
Methanol	Neutral	0.34	1.1
	Anion	0.22	1
Acetonitril	Neutral	0.45	1.4
Wasser	Neutral	0.21	1.1
	Anion	< 0.07	0.43

**Tab. 1.1:** Lebensdauern von HBDI in verschiedenen Lösungsmitteln [42]

Usman et al. bestimmten mit ultraschneller IR-Spektroskopie eine IC-Geschwindigkeit in einen heißen Grundzustand von  $(1.2 \pm 0.2 \text{ ps})^{-1}$  für die neutrale und die anionische Form und  $(0.6 \pm 0.2 \text{ ps})^{-1}$  für das Kation, mit anschließender Schwingungskühlung mit  $(5 - 6 \text{ ps})^{-1}$ . Durch Polarisationsabhängige Messungen zeigten sie zudem, dass mit elektronischer Anregung der Winkel zwischen dem Übergangsdipolmoment  $\mu_{S_0 \rightarrow S_1}$  und der C=O-Streckschwingung ändert, was sie einem Twist zuordnen, der zu einer konischen Überschneidung zwischen  $S_1$  und  $S_0$  und somit zu einem effektiven IC-Kanal führt [43].

Vengris et al. führten umfangreiche Pump-Probe- und Pump-Dump-Probe-Messungen an *cis*-HBDI durch und fanden als Hauptprodukt der Photonenabsorption einen angeregten Zustand, der über zwei angeregte Zwischenzustände durch innere Konversion in einen heißen Grundzustand übergeht und von dort über einen Zwischengrundzustand in den ursprünglichen Grundzustand relaxiert (siehe Reaktionsschema Abb. 1.16). Die Geschwindigkeit der einzelnen Reaktionsschritte war pH-abhängig, erfolgte aber bis auf den letzten Schritt im Grundzustand  $k_{G20}$  im sub-Pikosekundenbereich. Eine multidimensionale strukturelle Umgestaltung von HBDI mit mehr als einer Reaktionskoordinate wurde als Hauptursache für die Dynamik von Grund- und angeregtem Zustand diskutiert, viskositätsabhängige Messungen zeigten einen verlangsamenden Effekt, der jedoch schwächer als erwartet ausfiel und als Hinweis auf einen volumenerhaltenden und deshalb weitgehend viskositätsunabhängigen Hula-Twist-Mechanismus interpretiert wurde [41] [34] [44].

Als Konkurrenzprodukt fanden Vengris et al. für kationische, neutrale und anionische *cis*-Spezies mit einer Ausbeute von 10-25% langlebige Photoprodukte ( $> 4 \text{ ns}$ ) mit jeweils ähnlichen spektralen Merkmalen: einem negativen

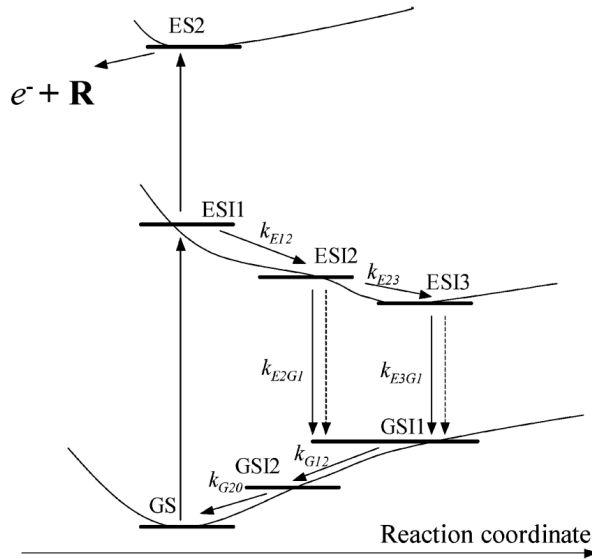
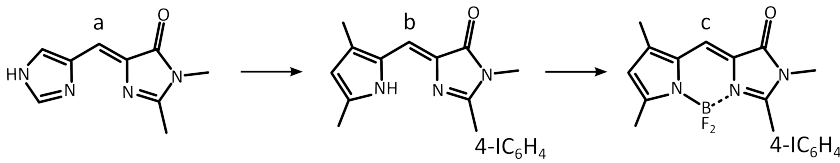


Abb. 1.16: Photodynamik von HBDI nach Vengris et al. [34]

Beitrag im Bereich der Absorption, die sie als Bleichen des Grundzustandes (*ground state bleach*, GSB) interpretierten, eine schmale positive Bande rotverschoben zum GSB und ein breiter positiver Beitrag mit einem Maximum bei 650 nm. Da die Ausbeute des Photoproduktes durch einen Dumpimpuls, der die angeregte Spezies abregt, beeinflusst wurde und die relative Ausbeute dieser Photoprodukte von der Pumpintensität abhing, postulierten sie eine Zweiphotonen-Ionisierung. Die schmale Bande wiesen sie einem HBDI-Radikal zu, die breite Bande bei 650 nm dem emittierten und anschließend solvatisierten Elektron. Das Abfallen der dem Elektron zugeschriebenen Bande bei pH 1 (400 ps) interpretierten sie als Kombination des Elektrons mit einem freien Proton; dieser Effekt war auf Radikal- und GSB-Bande nicht zu sehen und trat nur bei pH 1 auf [34].

Wu et al. zeigten für Varianten des GFP-*Tyr*<sup>66</sup>*His*-Chromophors, in die Imidazolgruppe durch eine Azolgruppe ersetzt ist, drastische Steigerungen der Fluoreszenzquantenausbeuten um drei Größenordnungen durch Einbringen einer BF<sub>2</sub>-Gruppe, die die Rotation um die Aryl-Alken-Bindung verhindern soll (Abb. 1.17) [45].

Baldridge et al. kapselten verschiedene Benzyliden-3-Methylimidazolidinone (BMI) in „octacid“ (OA) [46], einem aromatischen Container-Komplex mit



**Abb. 1.17:** Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute von GFP-Y66H-Chromophor-Analoga durch Fixierung nach Wu et al. [45]  
 a: GFP-Tyr<sup>66</sup>His-Chromophor-Analog, b:  $\Phi_F = 0.0005$ , c:  $\Phi_F = 0.86 \pm 0.2$

hydrophober Kavität. Einige Derivate zeigten einen Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute im Vergleich zu einer Referenzlösung in Benzol um bis zu einer Größenordnung. Bei den meisten Derivaten änderte sich das isomere Gleichgewicht im Grundzustand zugunsten der *trans*-Spezies. Baldridge et al. begründeten den Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute in dem effizientesten Derivat durch eine Hinderung der  $\tau$ -Torsion (siehe Abb. 1.18) durch eine Methylgruppe in *ortho*-Position und folgerten, dass sowohl Isomerisierung, als auch Torsion des Phenylrings, Wege für innere Konversion seien [47].

## 1.3 Chromophorumgebung

Das Chromophor liegt nicht isoliert vor, sondern ist in eine Proteinumgebung eingebettet, mit der es vielfältig wechselwirkt (vgl. Abb. 1.3, 1.7, 1.12). Diese Wechselwirkungen können sterischer Natur sein, Wasserstoffbrücken bilden sich zwischen Aminosäureresten und den Donor- bzw. Akzeptorstellen des Chromophors, elektrostatische Wechselwirkungen wie Ladungs-, Di- und Quadrupolwechselwirkungen ( $\pi$ -stacking) treten auf.

### 1.3.1 Sterische Wechselwirkungen

Den vielleicht wichtigsten Einfluss auf die Eigenschaften des Chromophors in RSFPs sind sterischer Natur. Isomerisierung kann nur stattfinden, wenn genügend Platz vorhanden ist. Das Platzangebot bestimmt maßgeblich die Torsion und die Beweglichkeit des Chromophors, die sich wiederum auf Fluoreszenzlebensdauer und Quantenausbeute auswirken. Die Torsion im Chromophor kann mit Rotationen um die C=C (tilt ( $\tau$ )) und C–C (twist ( $\phi$ )) Bindungen zwischen Fünf- und Sechsring beschrieben werden, gezeigt in Abb. 1.18. Brakemann et al. haben den Betrag der Summe dieser beiden Winkel zur Beschreibung der Torsion als einen wichtigen Faktor für die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$  vorgeschlagen, wobei die Ausbeute bei planaren  $\pi$ -Systemen, also kleinen Wertem, höher ist (vgl. Tab.1.2).

### 1.3.2 Wasserstoffbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen

Neben der Torsion ist die Beweglichkeit des RSFP-Chromophors eine für die Fluoreszenzquantenausbeute entscheidende Größe. Sterische Hinderungen, Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen

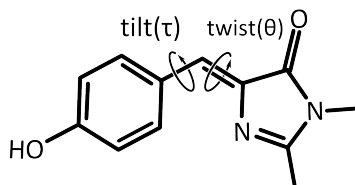


Abb. 1.18: Torsionswinkel des Chromophors von Padron0.9

	Zustand	$ \tau + \phi $	$\Phi_F$
Dronpa	$C^-$	$3.7 \pm 1.4$	0.85
	$T^-$	$20.6 \pm 5.3$	0.02
rsFastLime	$C^-$	1.6	0.77
	$T^-$	-	-
Padron0.9	$C^-$	$11.6 \pm 1.1$	0.61
	$T^-$	$22.3 \pm 2.1$	0.002
asFP595-A143S [48]	$C^-$	$10.3 \pm 1.5$	keine Angabe
	$T^-$	$14.7 \pm 2.3$	10% von $C^-$

**Tab. 1.2:** Zusammenhang zwischen dem Betrag der Summe der Winkel  $\phi$  und  $\tau$  und der Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$  für einige ausgewählte Proteine [23]

mit polaren Gruppen sowie Multipol-Wechselwirkungen wie überlagernde  $\pi$ -Elektronensysteme ( $\pi$ -stacking) können das Chromophor in einer Position fixieren. Eine solche Fixierung bedeutet nicht zwangsläufig eine höhere Fluoreszenzquantenausbeute, verringert aber statistisch die Wahrscheinlichkeit einer effizienten inneren Konversion durch eine Reduzierung der erreichbaren Molekülkonfigurationen.

Speziell elektrostatische Wechselwirkungen protonierbarer Aminosäurereste sind pH-abhängig. Ändert ein stabilisierender Aminosäurerest durch Änderung des pH-Wertes seinen Protonierungszustand, wird die aktuelle Chromophorkonfiguration energetisch ungünstiger. Ist die andere Konfiguration energetisch günstiger und die Schwelle der Isomerisierung niedrig, kann das Chromophor reagieren und isomerisieren. Ein solches Verhalten wurde von Pletnev et al. für das rot fluoreszierende Protein mKate beschrieben [49].

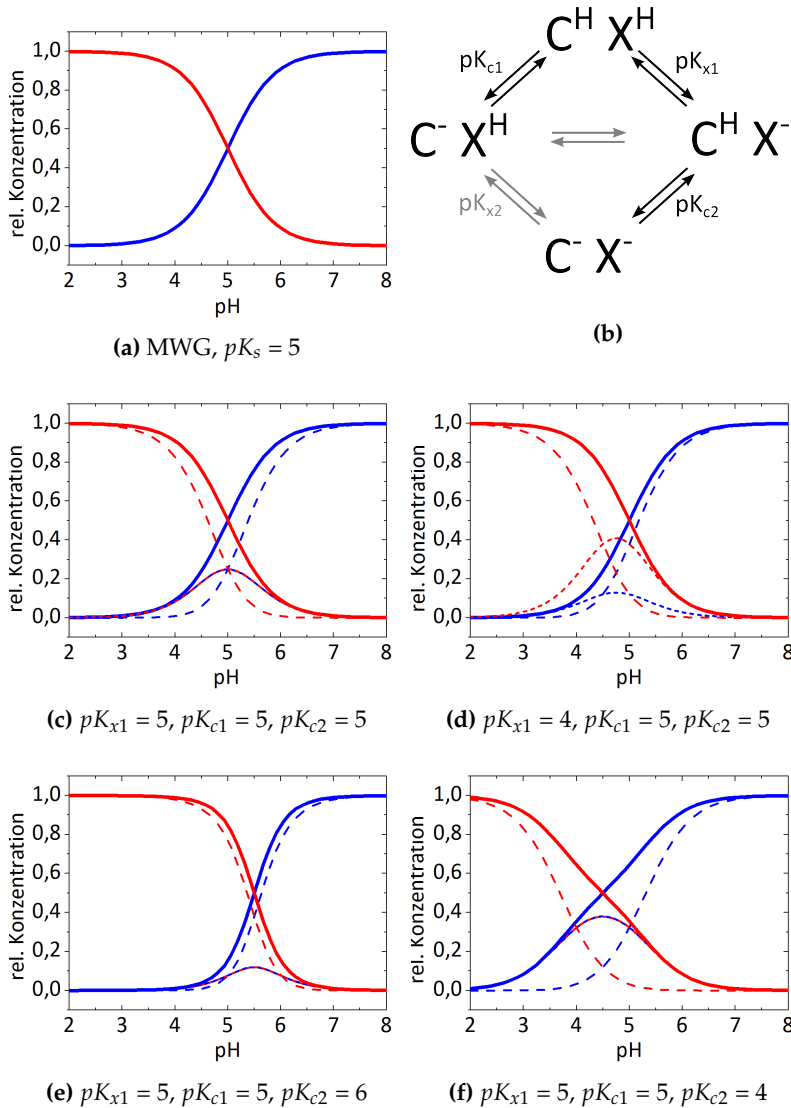
### 1.3.3 Titrationsverhalten

Durch die gleichen stabilisierenden Wechselwirkungen können Aminosäurereste Einfluss auf die Protonenaffinität des Chromophors nehmen. Ein direkter Einfluss ist die Stabilisierung des protonierten oder deprotonierten Chromophors, welche sich direkt auf den  $pK_s$ -Wert des Chromophors auswirkt.

Dieser Effekt ist maßgeblich für die unterschiedlichen Protonierungsgleichgewichte der *cis*- bzw. *trans*-Isomere von Padron0.9 im Vergleich zu rsFastLime verantwortlich (vgl. Abb.3.1 und 3.19). Ist der stabilisierende Aminosäurerest selbst protonierbar, wird die Chromophor-Protein-Wechselwirkung komplizierter. Gayda et al. haben das Titrationsverhalten von mIrisGFP durch eine protonierbare Gruppe C in der Umgebung des Chromophors C beschrieben [50]. Die Auswirkungen solch einer titrierbaren Gruppe X auf die pH-Abhängigkeit des protonierbaren Chromophors C sind in Abb.1.19 dargestellt. Abb.1.19b zeigt das Protonierungsschema mit den vier möglichen Spezies:  $C^H X^H$  - Chromophor und Aminosäure sind protoniert,  $C^- X^H \rightleftharpoons C^- X^-$  - Chromophor oder Aminosäure ist protoniert; diese beiden Spezies stehen in einem pH-unabhängigen Gleichgewicht miteinander, und  $C^- X^-$  - Chromophor und Aminosäure sind deprotoniert. Das System ist durch die drei angegebenen Protonierungsgleichgewichte vollständig bestimmt,  $pK_{x2}$  ergibt sich aus der Gl. 1.2.

$$pK_{c1} + pK_{x2} = pK_{x1} + pK_{c2} \quad (1.2)$$

Die bloße Anwesenheit einer titrierbaren Aminosäure in unmittelbarer Umgebung ändert das titrierverhalten des Chromophors zunächst nicht (vgl. Abb.1.19a und c, durchgezogene Linien). Auch ihr pKs-Wert  $pK_{x1}$  hat keinen Einfluss; ein niedriger Wert entvölkert zwar die Spezies  $C^H X^H$  schon bei niedrigerem pH, verschiebt aber das Gleichgewicht  $C^- X^H \rightleftharpoons C^H X^-$  zugunsten der Spezies  $C^H X^-$  (vgl. Abb.1.19d, kurze Striche). Geht man aber davon aus, dass die Aminosäure X einen Einfluss auf die Protonenaffinität  $pK_c$  des Chromophores C hat und sich dieser Einfluss durch Protonierung von X ändert, also gilt  $pK_{c1} \neq pK_{c2}$ , ändert sich auch das Titrationsverhalten. Erhöht die deprotonierte Aminosäure  $X^-$  die Protonenaffinität von C, ist also  $pK_{c1} < pK_{c2}$ , erfolgt der Übergang  $C^H \longrightarrow C^-$  in einem insgesamt höheren und schmaleren pH-Bereich (vgl. Abb.1.19e). Umgekehrt wird der Übergangsbereich zu niedrigen pH hin verbreitert, wenn  $X^-$  die Protonenaffinität von  $C^H$  senkt (vgl. Abb.1.19f).



**Abb. 1.19:** Auswirkungen einer protonierenden Gruppe X in der Umgebung des Chromophors C. Rote Kurven bezeichnen protonierte, blaue deprotonierte Chromophore. Gestrichelte Linien beschreiben unterschiedliche Subspezies, durchgezogene Linien jeweils die Summe aller protonierter bzw. deprotonierter Spezies.

## 1.4 Kinetischer Isotopeneffekt

Wenn eine chemische Reaktion durch Austausch eines Atoms durch sein Isotop ihre Reaktionsgeschwindigkeit ändert, spricht man von einem kinetischen Isotopeneffekt (*kinetic isotope effect*, KIE). Hier soll nur ein grobes Bild im Hinblick auf die Größenordnung des KIEs bei Protonentransferprozesse gezeichnet werden; für eine eingehende Behandlung des Themas sei auf weiterführende Literatur von Bigeleisen (KIE) [51], Westheimer (Primärer H/D KIE) [52] und Krishtalik (Protonentransfer und Lösungsmittelleffekte) [53] verwiesen.

### 1.4.1 Primärer Isotopeneffekt

Wird eine atomare Bindung zu einem leichten Isotop gebrochen, ist die Geschwindigkeitskonstante  $k_l$  des geschwindigkeitsbestimmende Schritts meist größer als die Geschwindigkeitskonstante  $k_s$  des analogen Bindungsbruches zu dem schweren Isotop. Das Verhältnis  $\frac{k_l}{k_s}$  wird als primärer Kinetischer Isotopeneffekt (*primary kinetic isotope effect*, PKIE) bezeichnet.

#### 1.4.1.1 Theorie des Übergangszustandes

Vereinfacht lässt sich die Dissoziation einer C–H-Bindung nach Eyrings Theorie des des Übergangszustandes (*transition state theory*, TST) mit Gl.1.3 beschreiben [53] und ist in Abb. 1.20 dargestellt.



Das Edukt C–H steht im dynamischen Gleichgewicht  $K^\ddagger$  mit dem Übergangszustand  $\text{C} \cdots \text{H}^\ddagger$ . Nachdem ein bestimmter Punkt (*point of no return*) überschritten wurde, reagiert der Übergangszustand mit der Geschwindigkeit  $k^\ddagger$  zum Produkt. Die Gesamtgeschwindigkeit  $k_{ges}$  der Dissoziation kann mit Gl. 1.4 beschrieben werden.

$$k_{ges} = \kappa \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta E^\ddagger}{k_B T}\right) \quad (1.4)$$

Der Transmissionskoeffizient  $\kappa$  beschreibt tatsächlich reagierenden Anteil des Übergangszustandes,  $\Delta E^\ddagger$  ist die Energiedifferenz der Nullpunktenergien von Edukt und Übergangszustand;  $k_B$  ist die Boltzmann-,  $h$  die Planckkonstante,  $T$  beschreibt die Temperatur.



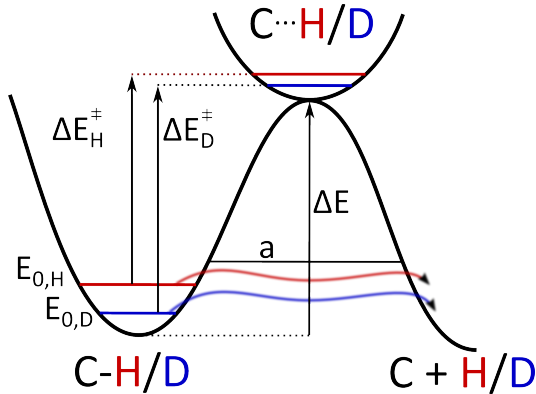


Abb. 1.20: Kinetischer Isotopeneffekt am Beispiel von Wasserstoff und Deuterium

Das Verhältnis der Geschwindigkeiten  $k_H$  und  $k_D$  wird mit Gl.1.5 beschrieben.

$$\frac{k_H}{k_D} = \exp\left(\frac{\Delta E_H^\ddagger - \Delta E_D^\ddagger}{k_B T}\right) \quad (1.5)$$

Die Nullpunktenergie der C–H- und C–D-Bindung lässt sich für den Fall eines harmonischen Oszillators nach Gl.1.6 mit  $n = 0$  berechnen.

$$E_n = \hbar \omega \left(n + \frac{1}{2}\right) \quad (1.6)$$

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (1.7)$$

$$(1.8)$$

Mit der Annahme, dass die Bindungen C–H und C–D die gleiche Kraftkonstante  $k$  haben, da unterschiedliche Isotope chemisch nahezu identisch sind, entsteht der Unterschied der Nullpunktenergien nur aus den unterschiedlichen reduzierten Massen  $\mu$ .

$$\begin{aligned} \Delta E_0 &= E_{0,H} - E_{0,D} \\ &= \frac{1}{2} \hbar \sqrt{k} \left( \sqrt{\frac{1}{\mu_H}} - \sqrt{\frac{1}{\mu_D}} \right) \end{aligned} \quad (1.9)$$

$$(1.10)$$

Setzt man in Gl.1.9 die reduzierten Massen  $\mu_H$  und  $\mu_D$  sowie die Kraftkonstante  $k = 485 \text{ N kg}^{-1}$  (entspricht einer C–H-Schwingungsfrequenz von  $\tilde{\nu} = 3000 \text{ cm}^{-1}$ ) ein, ergibt sich nach Gl.1.9 für die Edukte ein Nullpunktenergieunterschied von  $4.78 \text{ J mol}^{-1}$ . Mit der Näherung, dass die Nullpunktenergie­differenz im Übergangszustand zu vernachlässigen ist, da die Kraftkonstante  $k$  der geschwächten C · · · H-Bindung sehr viel kleiner ist als für die Edukte, ist  $\Delta E_H^\ddagger - \Delta E_D^\ddagger = \Delta E_0$ . Einsetzen in Gl.1.5 gibt einen Isotopeneffekt von  $\frac{k_H}{k_D} = 6.8$ .

### 1.4.1.2 Tunneleffekt

Für kleine Teilchen wie Protonen kann für Transferprozesse ein Tunnel-Effekt auftreten. Das Proton durchdringt dabei die Potentialbarriere, anstatt sie klassisch zu überwinden [53]. Dieser Vorgang kann nur quantenmechanisch durch den Wellencharakter des Teilchens beschrieben werden, die Wellenfunktion des Protons hat eine geringe Aufenthaltswahrscheinlichkeit jenseits der Barriere. Dieser Vorgang ist in Abb.1.20 durch diffuse Pfeile veranschaulicht. Die Tunnelwahrscheinlichkeit ist dabei von der Barrierenhöhe  $\Delta E$ , der Barrierenbreite  $a$  und von der Masse  $m$  des Teilchens abhängig. Für ein rechteckiges Potential kann sie mit Gl. 1.11 beschrieben werden. Entsprechend ist die Tunnelwahrscheinlichkeit für Wasserstoff höher als für das doppelt so schwere Deuterium.

$$G = \exp\left(-\beta \left(1 - \frac{E}{\Delta E}\right)\right) \quad (1.11)$$

$$\beta = \pi^2 a \sqrt{2 m \Delta E} / h \quad (1.12)$$

# Kapitel 2

## Experimentelle Technik

Die Photodynamik der untersuchten Proteine läuft auf einer Femto- bis Nanosekundenzeitskala ab. Um diese Prozesse zeitlich auflösen zu können, wurde ein Pump-Probe-Aufbau mit einer zeitlichen Auflösung im Femtosekundenbereich verwendet. Ein bestehender experimenteller Aufbau wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Kontinuumserzeugung und -detektion inklusive Datenaufnahme erweitert.

### 2.1 Experimenteller Aufbau

Der für Pump-Probe- und Pump-Dump-Probe-Messungen verwendete experimentelle Aufbau ist in Abb. 2.1 schematisch dargestellt. Als Laserlichtquelle dient ein Festkörper Titan:Saphir-Laser (Clark MXR-CPA 2001), aus dessen Ausgangspuls durch NOPA und/oder SHG Pump- bzw. Dumpimpulse verschiedener Wellenlängen erzeugt werden. Durch mechanische Chopper im Strahlengang kann jeder zweite Puls geblockt werden, was durch Photodioden (PD) überprüft wird. Als Probepuls wird in einem  $\text{CaF}_2$ -Kristall (SK) ein Weißlichtpuls erzeugt, der mit Pump- und wahlweise Dumpimpuls in der Messzelle überlagert wird (siehe Abschnitt 2.1.5). Die Pulse aus NOPA, SHG und dem Weißlichtkontinuum können durch Verschiebeebenen (VE) relativ zueinander verzögert werden. Die einzelnen Komponenten sind im Folgenden kurz beschrieben.

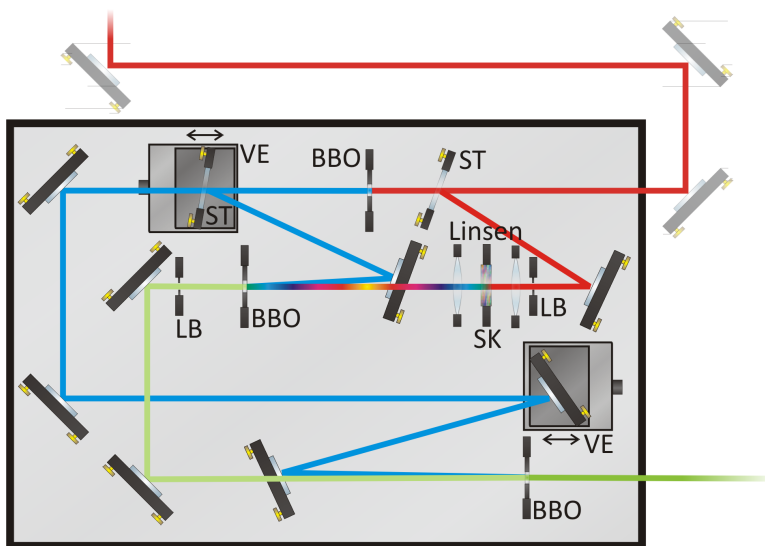
#### 2.1.1 Clark MXR-CPA 2001

Der als Laserquelle verwendete Clark MXR-CPA 2001 ist ein Festkörperlaser, der ultrakurze Pulse von etwa 120 fs Länge und 900  $\mu\text{J}$  bei einer Zentralwellenlänge von 773 nm mit einer Repetitionsrate von 1 kHz erzeugt. Der



Pulse gut geeignet. Im Resonator wird der eingehende Seedpuls verstärkt. Hierzu wird der spektral recht breite Puls über ein Gitter frequenzabhängig verzögert und der zeitlich breite Puls verstärkt (*chirped pulse amplification*, CPA), um die Zerstörung des Lasermediums durch Leistungsspitzen zu vermeiden. Anschließend wird der Puls wieder komprimiert. Als Güteschaltung im Resonator dient ein elektrooptischer Schalter (Pockelszelle) mit Polarisator, der auch die Auskopplung des Pulses aus dem Resonator steuert.

### 2.1.2 NOPA



**Abb. 2.2:** Schematischer Aufbau des nicht-kollinearen optisch-parametrischen Verstärkers (*non-collinear optical parametric amplifier*, NOPA)  
 VE: Verschiebeeinheit, BBO: Beta-Bariomboratkristall, ST: Strahlteiler, LB: Lochblende, SK: Saphirkristall

Der nicht-kollineare optisch parametrische Verstärker (*non-collinear optical parametric amplifier*, NOPA) generiert aus monochromem Licht durch einen optisch parametrischen Verstärkungsprozess Licht von durchstimmbarer Wellenlänge im sichtbaren Bereich. Der nicht parallele Verlauf der Strahlen verringert den bei kollinearen Aufbauten auftretenden Gruppengeschwindigkeitsversatz im nichtlinearen Medium und ermöglicht so die

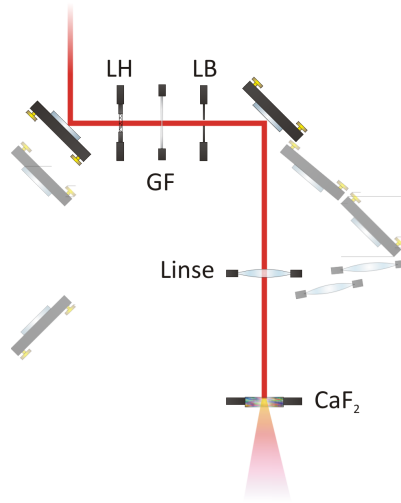
Generierung kürzerer Pulse [54]. Für eine tiefere Behandlung der zugrundeliegenden optisch nichtlinearen Prozesse sei auf weiterführende Literatur wie Lauterborn [55] oder Diels [56] verwiesen.

Der verwendete NOPA ist ein zweistufiges System, der Aufbau ist in Abb. 2.2 schematisch dargestellt. Ein geringer Teil der Fundamentalen wird durch einen Strahlteiler (ST) abgetrennt und zur Erzeugung eines Weißlichtkontinuums in einen Saphirkristall (SK) fokussiert (siehe 2.1.4). Der Hauptteil der Fundamentalen wird in einem optisch nichtlinearen Kristall (*Beta-Bariumborat*, BBO,  $8 \times 8 \times 0.7 \text{ mm}^3$ ,  $\Theta = 30^\circ$ , Typ I Phasenanpassung) zu 387 nm frequenzverdoppelt und als Pumplicht für die parametrischen Prozesse verwendet. Ein weiterer Strahlteiler (ST) teilt das Pumplicht auf. 20 % betreiben die erste Stufe, die restlichen 80 % die zweite Stufe. Weißlichtkontinuum und Pumpuls werden nun in einem weiteren BBO-Kristall ( $5 \times 5 \times 2 \text{ mm}^3$ ,  $\Theta = 32.5^\circ$ ) überlagert. Ein Pump-Photon zerfällt in ein Signal- und ein Idler-Photon. Die Geometrie des BBO und der überlagernden Pulse ist so gewählt, dass Weißlicht- und Signalpuls parallel laufen. Da die Frequenzen des Weißlichtkontinuums zeitlich aufgespreizt sind (*chirp*), kann es über eine Verschiebebühne (VE) spektral durchgestimmt werden. Es wirkt als Seedpuls und stimuliert den Zerfallprozess, in dem die Wellenlängen von Signal- und Seedpuls gleich sind. Der erzeugte Signalpuls wird nun mit den übrigen 80 % Pumpuls in dem BBO ( $5 \times 5 \times 2 \text{ mm}^3$ ,  $\Theta = 32.5^\circ$ ) der zweiten Verstärkungsstufe überlagert und fungiert hier wiederum als Seedpuls. Der schließlich resultierende Signalpuls liegt im Bereich von 460-700 nm. Die Intensität ist wellenlängenabhängig und liegt typischerweise im Bereich um 15 mW.

### 2.1.3 SHG und SFG

Die Wellenlängen 258 nm und 387 nm können separat aus der Fundamentalen erzeugt werden. Der Aufbau ist in Abb. 2.3 schematisch dargestellt. Die Fundamentale wird in einem BBO-Kristall ( $5 \times 5 \times 0.2 \text{ mm}^3$ ,  $\Theta = 29.2^\circ$ ,  $\Phi = 90^\circ$ , Typ I Phasenanpassung) frequenzverdoppelt (*second harmonic generation*, SHG), was einer Wellenlänge von 387 nm entspricht. Bei diesem Prozess dreht sich die Polarisationsrichtung der Verdoppelten um  $90^\circ$  gegenüber der Fundamentalen. Ein dielektrischer Spiegel (DS) leitet die Fundamentale auf eine Verschiebebühne (VE), der verdoppelte Anteil wird transmittiert. Die Polarisationsrichtung der Fundamentalen wird durch ein  $\lambda/2$ -Plättchen ebenfalls um  $90^\circ$  gedreht, anschließend werden die Fundamentale und der abgetrennte verdoppelte Anteil in einem weiteren BBO-Kristall ( $5 \times 5 \times 0.2 \text{ mm}^3$ ,  $\Theta = 44.3^\circ$ ,  $\Phi = 90^\circ$ , Typ I) überlagert, wobei die Summenfrequenz der beiden





**Abb. 2.4:** Schematischer Aufbau der Weisslichterzeugung  
 LH:  $\lambda/2$ -Platte, GF: Graufilter, LB: Lochblende,  $\text{CaF}_2$ -Kristall

Das als Probepuls verwendete Weißlichtkontinuum wird durch Fokussierung der Fundamentalen ( $f = 100 \text{ mm}$ ) in einen Calciumfluoridkristall ( $\text{CaF}_2$ ,  $21 \times 21 \times 4 \text{ mm}^3$ ) erzeugt. Der Kristall wird dabei kontinuierlich bewegt, um thermische Beschädigungen zu verhindern. Der schematische Aufbau der Weißlichterzeugung ist in Abb. 2.4 dargestellt. Die Intensität der Fundamentalen wird durch Graufilter (GF) und eine Lochblende (LB) eingestellt. Die Polarisationsrichtung kann über ein  $\lambda/2$ -Plättchen (LH) gewählt werden. Es wurde üblicherweise der 'magische Winkel' von  $54.7^\circ$  zwischen Pump- und Probepuls eingestellt. Das erzeugte Kontinuum ist in Abb. 2.5 gezeigt.

### 2.1.5 Interferometer

Im Interferometer werden Pump-, Probe- und gegebenenfalls ein Dump-puls in der Messzelle überlagert. Der Aufbau ist schematisch in Abb. 2.4 dargestellt. Ein Strahlteiler (ST) teilt den Probepuls in zwei Teilpulse auf. Ein Teil wird als Referenz direkt mit einem Spektrometer (Horiba CP140-1825, SM1) mit angeschlossenen Photodiodenarray (Hamamatsu NMOS S3901-256Q, 256 Pixel) detektiert. Der andere Teil wird in der Messzelle mit dem Pump- (blau) und gegebenenfalls dem Dump-puls (grün) überlagert und im Anschluss durch ein weiteres Spektrometer (SM2, baugleich zu SM1)



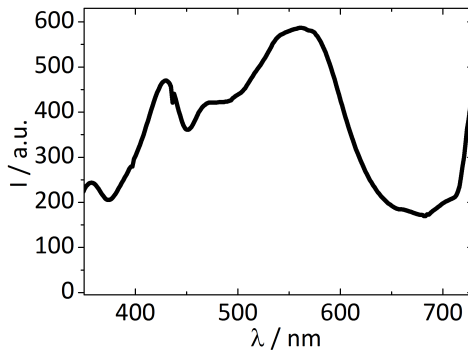
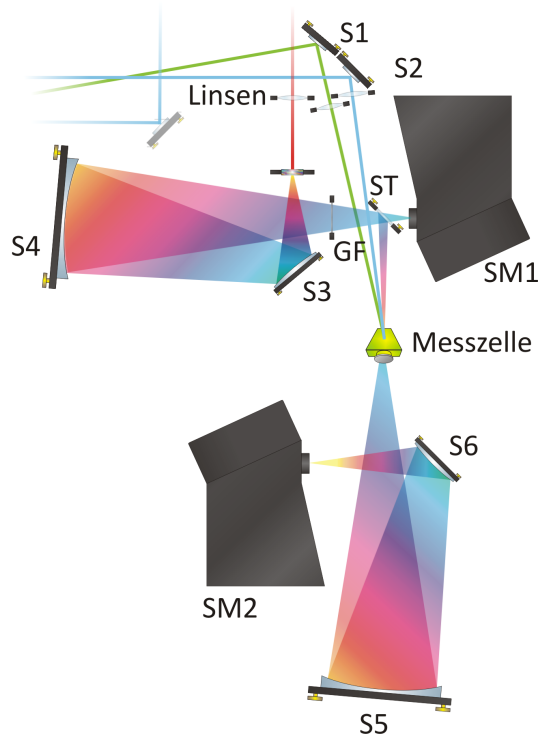


Abb. 2.5: Das erzeugte Weißlichtkontinuum

detektiert. Durch den nicht-kollinearen Aufbau können Pump- und Dumpuls nach Durchlaufen der Messzelle einfach geblockt werden. Reste der Fundamentalen, die nach Kontinuumserzeugung noch übrig sind, werden durch einen Tiefpass Kantenfilter ( $\lambda_{cutoff} = 750 \text{ nm}$  (TF)) gefiltert.

Pump- und Dumpuls werden durch einfache Planspiegel (S1, S2) und bikonvexe Quarzlinen in die Messzelle gelenkt. Als Probepuls dient das erzeugte Weißlichtkontinuum (siehe 2.1.4). Es ist divergent und spektral sehr breit. Würden hier auch Linsen zur Fokussierung verwendet, käme es wegen der Wellenlängenabhängigkeit des Brechungsindex des Linienmediums zu chromatischer Abberation, also unterschiedlichen Foki für verschiedene Wellenlängen (siehe Abb. 2.7 (a)). Um dies zu vermeiden, wird das Kontinuum durch sphärische Spiegel statt durch Linsen fokussiert. Da der Lichteinfall auf diese Spiegel nicht entlang der optischen Achse erfolgen kann, erfahren die relativ zur Tischebene parallelen (*sagittalen*) und senkrechten (*meridionalen*) Anteile des Lichtbündels einfallswinkelabhängig eine unterschiedliche Fokussierung (*Astigmatismus*, siehe Abb. 2.7 (b)), wobei die Sagittalebene (S) hier die optische Achse (OA) enthält, die Meridionalebene (M) nicht. In den Punkten  $B_M$  und  $B_S$  existieren dann keine Brennpunkte, sondern die Brennlinien der jeweils anderen Ebene. Dieser Abbildungsfehler (*Astigmatismus*) wird im Interferometer durch die Kombination eines Konvex- (S3, S5) und Konkavspiegels (S5, S6) in geeigneter Anordnung ausgeglichen.

Die verwendeten Spektrometer nutzen auf die 1. Beugungsordnung optimierte holografische Blazegitter, um das einfallende Licht aufzulösen. Der



**Abb. 2.6:** Schematischer Aufbau des Interferometers

S1,2: Planspiegel, S3,6: Konkavspiegel, S4,5: Konkavspiegel, ST: Strahlteiler, SM1,2: Spektrometer mit Diodenzeile, TF: Tiefpass-Kantenfilter

aufgelöste Wellenlängenbereich liegt zwischen 350 und 730 nm. Trotz Blazegitter auftretende Beugung 0. Ordnung wird im Gerät geblockt. Bei der Beugung 2. Ordnung ist dies nicht möglich; ein Bruchteil des Lichts kürzerer Wellenlängen ( $\lambda < 360$  nm) wird so auf die Dioden für höhere Wellenlängen gelenkt ( $\approx 650$ -720 nm). Für Messungen in diesem Bereich kann deshalb ein Hochpass Kantenfilter ( $\lambda_{cutoff} = 390$  nm) vor die Spektrometer gesetzt werden, um dies zu verhindern.

Um unerwünschtes Streu- und Fluoreszenzlicht selektiv zu verringern, wurde zusätzlich ein auf die Polarisationsrichtung des Weißlichts eingestellter Polarisator vor dem Spektrometer SM2 verwendet.

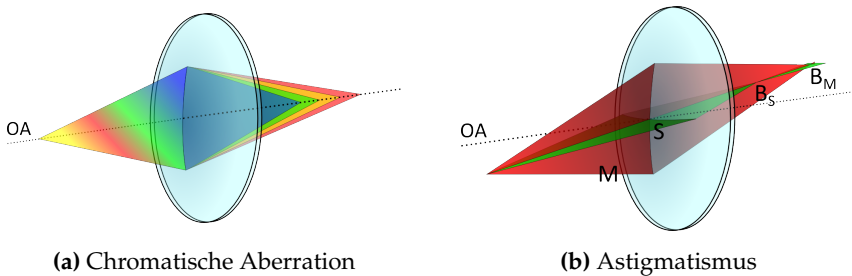


Abb. 2.7: Auftretende Abbildungsfehler

### 2.1.6 Pumpenkreislauf

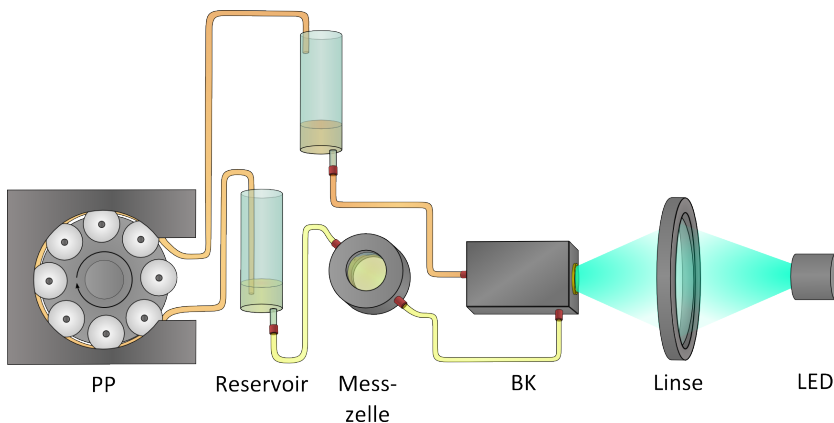


Abb. 2.8: Schematischer Aufbau des Probekreislaufs

PP: Peristaltikpumpe, BK: Bestrahlungskammer, LED: Lichtemittierende Diode

Um Ausbleichen und eine Akkumulation von Photoprodukten im Verlauf der Messung zu verhindern, wurde ein Volumen der Probelösung ( $\approx 6 \text{ mL}$ ) in einem Kreislauf so schnell durch die Messzelle gepumpt, dass die Lösung im Bereich der Überlagerung von Pump- und Probestrahl zwischen zwei Pulsen vollständig ausgetauscht wurde. Die verwendeten Proteine sind gegenüber mechanischem Stress anfällig und denaturieren leicht. Durch den verwendeten Pumpkreislauf, schematisch in Abb. 2.8 dargestellt, konnte ein konstanter Fluss mit hoher Geschwindigkeit bei minimaler mechanischer Belastung erreicht werden. Eine Peristaltikpumpe (PP) transportierte die

Proteinlösung von einem Reservoir in ein zweites Reservoir auf etwa 60 cm über der Tischoberfläche. Die Lösung floss durch eine Bestrahlungskammer (BK) und die Messzelle zurück in das erste Reservoir. Die Flussgeschwindigkeit konnte durch die Höhe des zweiten Reservoirs eingestellt werden. Innerhalb der Bestrahlungskammer war die Flussgeschwindigkeit wegen des größeren Innendurchmessers reduziert. Durch ein Glasfenster wurde die Lösung hier mit einer LED (1 W, 390 bzw. 490 nm) bestrahlt, um das Protein möglichst vollständig in das jeweils gewünschte Isomer zu überführen.

## 2.2 Messmethode

### 2.2.1 Pump-Probe-Spektroskopie

Pump-Probe-Spektroskopie ist eine Methode zur zeitaufgelösten Untersuchung intra- wie intermolekularer Phänomene. Eine Materialprobe wird durch einen kurzen Pumpimpuls der Intensität  $I_p$  angeregt. Nach einer einstellbaren Zeit  $\Delta t$  wird ihr Zustand durch einen Probepuls abgefragt. Durch Interaktion mit dem angeregten Probedeget ändert der Probepuls seine Intensität, diese Änderung wird aufgenommen. Schwankungen in Intensität und spektraler Beschaffenheit des Probepulses werden durch eine Referenzmessung der Intensität  $I_0$  vor Interaktion mit dem Probedeget kompensiert. Aus Probe- und Referenzstrahl ergibt sich die optische Dichte  $OD$  der Lösung, siehe Gl. 2.1.

$$OD = \log \frac{I}{I_0} \quad (2.1)$$

Den größten Beitrag zur optischen Dichte werden in der Regel nicht angeregte Moleküle im Grundzustand liefern. Ihr Signal ändert sich zeitlich nicht und entspricht ihrem stationären Absorptionsspektrum. Dieser Beitrag wird vom Gesamtsignal abgezogen. Betrachtet wird die durch den Pumpimpuls hervorgerufene Änderung der optischen Dichte der Probe  $\Delta OD$ , siehe Gl. 2.2. Die Zeitauflösung ergibt sich aus der Faltung der zeitabhängigen Intensitätsprofile von Pump- und Probepuls.

$$\Delta OD = \log \left( \frac{I}{I_0} \right)_{\text{gepumpt}} - \log \left( \frac{I}{I_0} \right)_{\text{ungepumpt}} \quad (2.2)$$

In dieser Arbeit wurden transparente Lösungen von fluoreszierenden Proteinen hinsichtlich ihrer Dynamik nach Anregung untersucht. Die Menge der angeregten Proteine im Probevolumen und somit die Stärke des Signals ist abhängig von der Proteinkonzentration  $c$  und der Intensität  $I_p$ . Bei isotroper Orientierung der Proteine kann durch den polarisierten Pumpimpuls zudem nur der Teil der Proteinchromophore im Probevolumen angeregt werden, dessen Übergangsdipolmoment eine Komponente parallel zur Polarisationsrichtung aufweist.

Ein aufgenommenes  $\Delta OD$ -Spektrum ist eine Superposition der Beiträge des Grund- und aller angeregten Zustände. Positive Beiträge zu  $\Delta OD$ , für die gelten muss  $I_{\text{gepumpt}} < I_{\text{ungepumpt}}$ , können ausschließlich von der Absorption

eines angeregten Zustandes kommen (*excited state absorption*). Negative Beiträge hingegen, für die gelten muss  $I_{gepumpt} > I_{ungepumpt}$ , können einerseits von stimulierter Emission des angeregten Zustandes kommen, andererseits von einer geringeren Absorption durch Moleküle im Grundzustand, der nach Anregung niedriger populiert ist (Grundzustandsbleichen, *ground state bleach*). Sofern durch die Anregung keine permanenten Produkte gebildet werden, wird  $\Delta OD(t)$  für  $t \rightarrow \infty$  gegen Null laufen.

Die Intensität des  $\Delta OD$ -Signals (Gl.2.3) hängt bei Einphotonenabsorption von der Menge des initial angeregten Proteins  $c_{ex}$  und dessen spektralen Eigenschaften im Grundzustand  $\epsilon_g(\lambda)$  und den beteiligten Zuständen  $\epsilon_i(\lambda)$ , deren zeitabhängiger Konzentration  $c_i(t)$  sowie dem Überlapp zwischen Pump- und Probepuls  $\sigma_{pp}$  ab. Die Menge des angeregten Proteins wiederum hängt mit der Proteinkonzentration  $c_0$ , Pumpintensität  $I_p$  und der Absorption bei der Pumpwellenlänge  $\epsilon_g(\lambda_p)$  zusammen.

$$\Delta OD(t, \lambda) = c_{ex} \cdot \left( c_g(t) \epsilon_g(\lambda) + \sum_i (c_i(t) \epsilon_i(\lambda)) \cdot \sigma_{pp} \right)$$

$$c_{ex} = I_{pump} c_0 \epsilon_g(\lambda_{pump}) \quad (2.3)$$

## 2.2.2 Pump-Dump-Probe-Spektroskopie

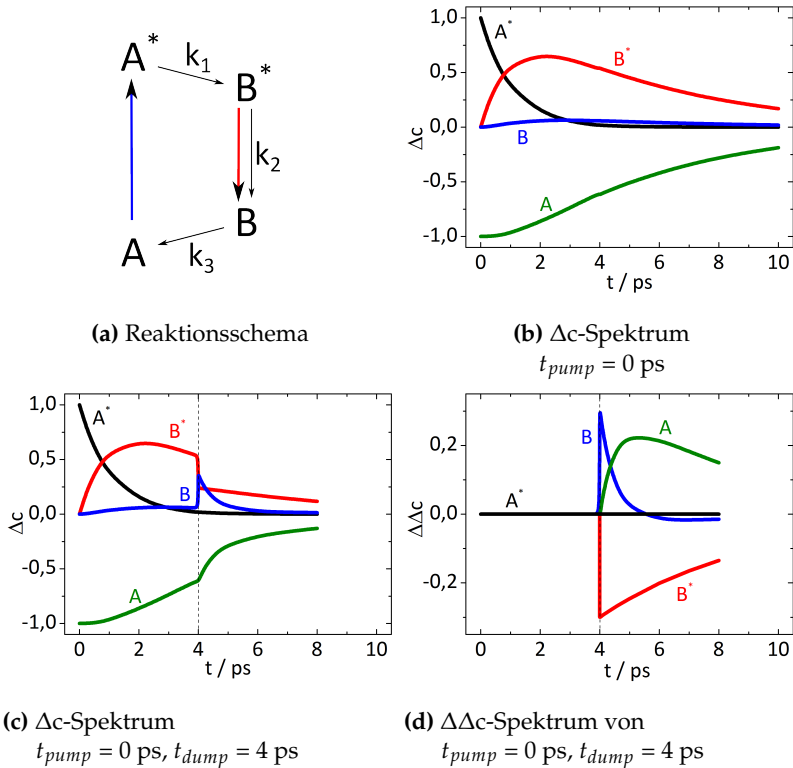
Die Pump-Dump-Probe-Spektroskopie ist ein der Pump-Probe-Spektroskopie ähnliches Dreipulsexperiment. Eine Materialprobe wird durch einen Pump-puls angeregt. Nach einer Verzögerungszeit  $\Delta t_{dump}$  wird ein zweiter intensiver Laserpuls eingestrahlt, der mit der angeregten Materialprobe interagiert, also entweder absorbiert wird, oder Emission stimuliert. So können sonst nicht oder nur schwach populierte Zustände und ihre Dynamik innerhalb einer Reaktionskaskade zugänglich gemacht werden, wie z.B. Zustand  $B$  im Reaktionsschema in Abb. 2.9b. Gilt  $k_1 > k_2 \ll k_3$  ist Zustand  $B$  nie nennenswert populiert (siehe Abb. 2.9b), sein Spektrum und die Reaktionsrate  $k_3$  kann nicht gemessen werden. Wird  $B^*$  durch einen verzögerten Puls (hier:  $\Delta t_{dump} = 4$  ps) durch stimulierte Emission nach  $B$  überführt, also geleert (engl.: *dumped*), gibt es direkt nach dem Puls eine messbare Konzentration von  $B$  (siehe Abb. 2.9c) und das Spektrum sowie Dynamik dieses Zustandes können aufgenommen werden.

Analog zur Pump-Probe-Spektroskopie kann das Pump-Dump-Spektrum nun als Differenzspektrum zwischen gedumpter und nicht-gedumpter Pump-Probe-Messung aufgetragen werden. In Abb. 2.9d ist ein Doppeldifferenzkonzentrationspektrum für die Reaktion aus Abb. 2.9a aufgetragen. Die

durch den Dumpimpuls induzierte Änderung der optischen Dichte wird, ähnlich wie bei den Pump-Probe Messungen, mit Gl.2.4 beschrieben.

$$\Delta\Delta OD = \Delta OD_{gedumpt} - \Delta OD_{ungedumpt} \quad (2.4)$$

Auch ein Pump-Dump-Probe-Spektrum ist eine Superposition der Beiträge aller durch den Dumpimpuls direkt oder indirekt beeinflussten Zustände. Positive Signale werden durch eine Dumpimpuls-induzierte Bevölkung einer absorbierenden Spezies oder Entvölkung einer angeregten Spezies im Bereich ihrer stimulierten Emission erzeugt, negative Signale durch Bleichen einer angeregten absorbierenden Spezies. Bleibende Signale werden nur generiert, wenn der Dumpimpuls direkt Einfluss auf die Erzeugung stabiler Spezies hat, entweder durch Unterstützung oder Behinderung eines durch den Pumpimpuls induzierten Bildungsprozesses oder durch einen durch den Dumpimpuls selbst induzierten Bildungsprozess, sonst wird  $\Delta\Delta OD(t)$  für  $t \rightarrow \infty$  gegen Null laufen.



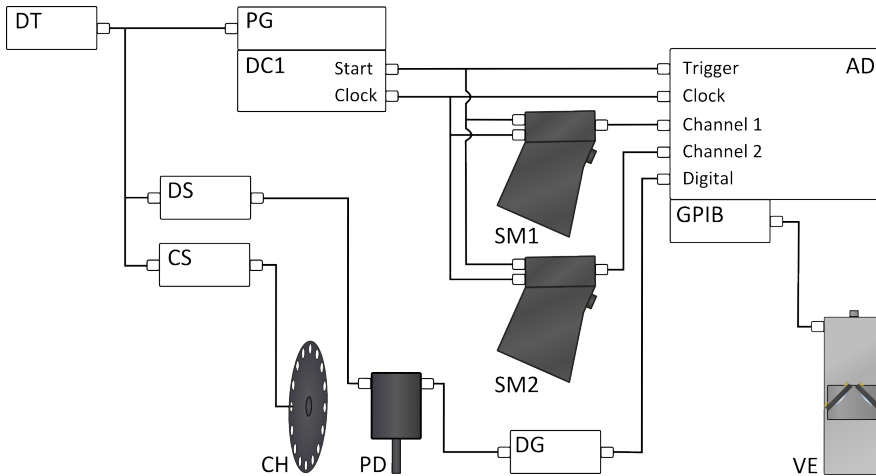
**Abb. 2.9:** Reaktionsschema und korrespondierende Differenz-Konzentrationspektren der beteiligten Spezies mit und ohne Dumppulse nach Anregung durch einen Pumpuls

## 2.3 Datenverarbeitung

### 2.3.1 Datenaufnahme

Den grundlegenden Takt des Experiments gibt der modengekoppelte Faserlaser im Clark MXR an (siehe 2.1.1). Der zeitliche Abstand der einzelnen Moden taktet die Steuerelektronik der Pockelszelle (DT, Hochfrequenztreiber DT-505), die als Güteschaltung im Resonator fungiert und die Pulse in Abständen von 1 ms auskoppelt. Dabei gibt die Steuerung ein TTL-Signal ab, das als Startsignal für alle weiteren Geräte im Experiment dient. Der elektrische Aufbau ist in Abb. 2.10 schematisch dargestellt. Das Signal aus





**Abb. 2.10:** Elektrische Steuerung und Datenaufnahme. Signaleingang: links, Signalausgang: rechts

DT: Steuerelektronik Pockelszelle, DS: Diodensteuerung, CS: Choppersteuerung, CH: Chopper, PD: Photodiode, DG: Delay-Generator, PG: Puls-Generator, DC1: Diodentreiber, SM1,2: Spektrometer mit Diodenzeile, AD: Analog/Digitalwandler, GPIB: GPIB-Karte, PVE: Verschiebeeinheit

dem Pockelszellentreiber startet den Pulsgenerator (PG, Hamamatsu C8225-01) sowie die Diodensteuerung (DS) für eine integrierende Photodiode (PD, Hamamatsu 1226-8BQ) und gibt der Choppersteuerung (CS) den Takt für den Schrittmotor im Chopper (CH) vor. Der Pulsgenerator generiert einen Startpuls, der das sequentielle Auslesen der Diodenzeile durch den Treiberschaltkreis (DC, Hamamatsu C7884) initiiert und ein Clocksignal, das den Wechsel von Pixel zu Pixel steuert. Start-, Clock- und beide Diodensignale werden von einem Analog/Digital-Wandler (AD) ausgelesen. Die Photodiode (PD) nimmt das Signal des Pumpulses hinter dem Chopper auf und speist es in einen Delaygenerator (DG, Stanford Research Systems Inc. DG535), der bei Überschreiten einer Intensitätsschwelle ein Signal an einen Digitalkanal der Messkarte sendet. Ein selbstgeschriebenes Messprogramm nimmt die Daten auf und steuert über eine GPIB-Karte (GPIB) auch die Position der Verschiebebühne (VE). Start- und das Clocksignal ermöglichen ein exaktes Auslesen und die Zuordnung der eingehenden Signale. Das Digitalsignal gibt an, ob die jeweilige Messung mit oder ohne Pumpuls erfolgte. Gespeichert wird der Mittelwert mehrerer, üblicherweise einiger hundert, aus den aufgenommenen Intensitäten berechneten  $\Delta OD$ -Signale

für jeden der 256 Pixel der Diodenzeile für einen Verzögerungszeitpunkt. Je nach Messung wird eine Reihe von Verzögerungszeiten abgefahren, wobei ein Datensatz immer mindestens aus einem Hin- und Rückweg bestehen muss, um eventuelles Photobleichen der Probe zu kompensieren.

### 2.3.2 Korrekturen der Daten

Der Datensatz einer Messung besteht aus 256  $\Delta OD$ -Werten pro Verzögerungszeit  $\Delta t$ . Jeder der 256 Werte ist ein Mittelwert aus üblicherweise einigen hundert Einzelmessungen und direkt einem Pixel der Diodenzeile und somit einer Wellenlänge im Bereich  $\lambda_{probe} = 350 - 730$  nm zugeordnet. Jede Verzögerungszeit wird in der Regel mehrfach angefahren.

#### 2.3.2.1 Kalibrierung

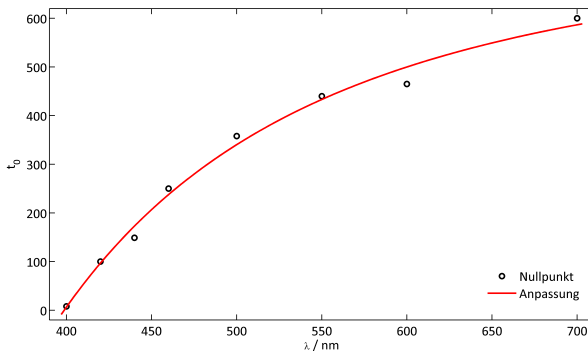
Der Aufbau der Spektrometer SM1 und SM2 (siehe 2.1.5) ist identisch. Beim Einbau der Diodenzeilen wurde anhand der charakteristischen Linien einer Quecksilberdampfampe darauf geachtet, dass beide Zeilen das Spektrum identisch abbilden. Die Zuordnung der einzelnen Pixel zu Wellenlängen erfolgte nachträglich, indem aus mehreren, eindeutig zuzuordnenden Quecksilberlinien eine lineare Kalibrierungsfunktion erstellt wurde.

#### 2.3.2.2 Mittelung

Aus allen aufgenommenen Daten einer Wellenlänge  $\lambda$  bei einem Verzögerungszeitpunkt  $\Delta t$  wurde der Mittelwert gebildet. Einzelne, stark vom Mittelwert abweichende Messpunkte wurden dabei nicht berücksichtigt. Die Schwelle zu dieser Diskriminierung wurde mit dem Dreifachen der Standardabweichung vom Mittelwert sehr hoch gewählt, dass möglichst nur Störsignale von Ereignissen, wie sich im Messfokus befindliche Partikel oder Luftblasen, entfernt wurden.

#### 2.3.2.3 Zeitlicher Nullpunkt

Das als Probepuls verwendete Weisslichtkontinuum (siehe Abschnitt 2.1.4) zeigt einen negativen Chirp. Der blaue Anteil um 350 nm interagiert mit dem Pumpuls etwa eine Pikosekunde vor dem roten Anteil um 730 nm. Um



**Abb. 2.11:** Anpassung der wellenlängenabhängigen Nullpunkte

diese zeitliche Verschiebung zu kompensieren, wurden die Zeitprofile verschiedener Wellenlängen mit einer multiexponentiellen Funktion angepasst (siehe Abschnitt 2.3.3.1) und die ermittelten Nullpunkte gegen die Wellenlänge aufgetragen. Diese Punkte wurden dann mit der Potenzfunktion in Gl. 2.5 angepasst.

$$t_0(\lambda) = a\lambda^b + c \quad (2.5)$$

#### 2.3.2.4 Offset-Korrektur

Da bei der Pump-Probe-Spektroskopie nur pumpstrahlinduzierte Änderungen aufgenommen werden, muss  $\Delta OD$  vor Eintreffen des Pumpimpulses in der Probe zur Zeit  $t_0$  gleich Null sein. Aufbaubedingt können aber durchaus Signale vor  $t_0$  aufgenommen werden: Die Diodenzeilen der Spektrometer SM1 und SM2 nehmen einfallendes Licht im gesamten Zeitraum zwischen zwei Auslesevorgängen auf. Sie unterscheiden dabei nicht, ob das Licht vor oder nach  $t_0$  einfällt. Streulicht des Pumpstrahls und Fluoreszenzlicht der zu untersuchenden Probe, das den Spalt eines Spektrometers bevorzugt trifft, erzeugt somit einen Beitrag zum Signal, der unabhängig von der Verzögerungszeit  $\Delta t$  konstant ist. Die großen konkaven Spiegel S4 und S5 (siehe Abb. 2.6) sammeln Streu- und Fluoreszenzlicht und lenken es auf den Spalt der Spektrometer. Zur Unterdrückung wurde ein Polarisator in Durchlassrichtung für den Probestrahl verwendet, der weite Teile des im magischen Winkel polarisierten Pumpstrahls und des isotropen Fluoreszenzlichtes abblockte. Das verbleibende Signal für  $t < t_0$  wurde gemittelt und

als konstantes Spektrum von dem gesamten Datensatz abgezogen.

### 2.3.3 Auswertung der zeitaufgelösten Daten

#### 2.3.3.1 Anpassung von transienten Signalen

Die Zeitauflösung des Pump-Probe-Systems ergibt sich aus der Faltung der Zeitprofile von Pump- und Probepuls. Beide Pulse können annähernd mit einem Gaußprofil beschrieben werden, das Resultat der Faltung ist wieder ein Gaußprofil (Gl. 2.6, Abb. 2.12a). Die Zeitauflösung wird mit der Pulsbreite bei halber Intensität (*full width half maximum*, FWHM) in Gl. 2.7 beschrieben.

$$g(t) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{t-t_0}{\sigma}\right)^2\right) \quad (2.6)$$

$$FWHM = 2\sqrt{2\ln(2)}\sigma \approx 2.3548 \sigma \quad (2.7)$$

Die Dynamik eines einzelnen, unimolekularen Zerfalls- oder Abregungsprozesses kann mit einer exponentiellen Zerfallsfunktion  $e(t)$  mit der Lebensdauer  $\tau$  beschrieben werden (Gl. 2.8, Abb. 2.12b).

$$e(t) = \exp\left(-\frac{t-t_0}{\tau}\right) \quad (2.8)$$

Ist dieser Prozess durch ein Ereignis (Pumppuls) zur Zeit  $t_0$  induziert, kann es vor diesem Zeitpunkt kein Signal geben. Durch Multiplikation der Funktion  $e(t)$  mit einer Step-Funktion  $\Theta(t)$  (Gl. 2.9, Abb. 2.12c), die vor dem Zeitpunkt  $t_0$  den Wert 0 und ab  $t_0$  den Wert 1 annimmt, entsteht als Signalfunktion eine exponentielle Zerfallsfunktion  $e_p(t)$ , deren Wert vor  $t_0$  gleich 0 ist (Gl. 2.10, Abb. 2.12d).

$$\Theta(t) = \mathbb{R} \rightarrow (0, 1)$$

$$t \mapsto \begin{pmatrix} 0 & : & t < t_0 \\ 1 & : & t \geq t_0 \end{pmatrix} \quad (2.9)$$

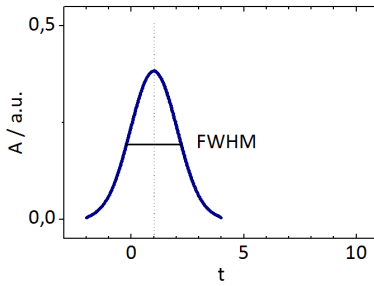
$$e_p(t) = e(t) \cdot \Theta(t) \quad (2.10)$$

Durch Faltung der Signalfunktion  $e_p(t)$  mit der Zeitauflösung des Systems  $g(t)$  entsteht die Modellfunktion  $f(t)$  (Gl. 2.11, Abb. 2.12e), die eine mono-exponentielle Dynamik mit der Lebensdauer  $\tau$  beschreibt.

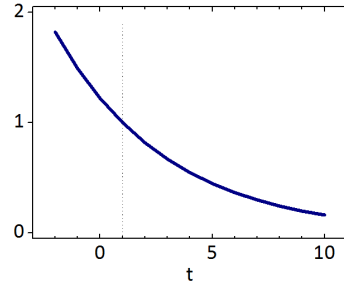
$$\begin{aligned}
 f(t) &= g(t) * e_p(t) \\
 &= \frac{1}{2} \exp \frac{\sigma^2 - 2 t \tau + 4 t_0 \tau}{2 \tau^2} \\
 &\quad \left( -1 + \sqrt{\frac{1}{\sigma^2}} \sigma + \operatorname{erfc} \left[ \frac{\sigma^2 - t \tau + 2 t_0 \tau}{\sqrt{2} \sigma \tau} \right] \right)
 \end{aligned} \tag{2.11}$$

Das aufgenommene Signal besteht meist aus einer Summe oder einer Folge von Einzelprozessen, die aufgenommenen Daten werden dann mit einer Summe  $f_M(t)$  einzelner Funktionen der Form  $f(t)$  mit unterschiedlichen Amplituden  $A_n$  und Lebensdauern  $\tau_n$  angepasst (Gl. 2.12 Abb. 2.12f).  $I_1$  beschreibt einen Gesamtoffset und ist nach der in Abschnitt 2.3.2.4 erfolgten Korrektur in der Regel obsolet.

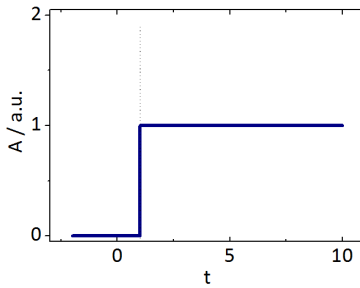
$$f_M(t) = \sum_n (A_n f_n(\tau_n, t)) + I_1 \tag{2.12}$$



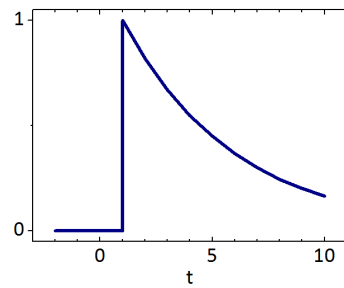
(a) Gl. 2.6



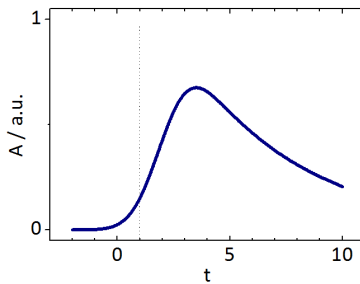
(b) Gl. 2.8



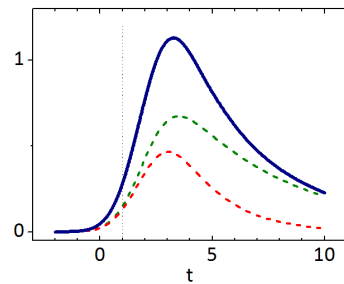
(c) Gl. 2.9



(d) Gl. 2.10



(e) Gl. 2.11



(f) Gl. 2.12

**Abb. 2.12:** Darstellung der einzelnen Schritte bei der Erstellung der Funktion zur Anpassung transientser Daten. Die gepunktete Linie markiert  $t_0$ .

### 2.3.3.2 Zeit- und wellenlängenabhängige Modellierung der Daten

Die Zusammensetzung des Signals  $\Delta OD(\lambda, t)$  ist in Gl. 2.3 beschrieben. Die Gleichung zeigt ein Problem der Modellierung: Das Signal einer Spezies  $i$  entspricht dem Produkt aus Konzentration  $c_i(t)$  und Absorption  $\epsilon_i(\lambda)$ , das System ist unterbestimmt und bietet eine beliebige Kombination der beiden Parameter als Lösung. Um eine exakte Lösung zu erhalten, müssen die Freiheitsgrade einer Anpassung reduziert werden, indem bekannte Speziesspektren, Amplitudenverhältnisse zwischen diesen Spektren und Ausbeuten bestimmter Reaktionswege festgelegt werden.

Um die Konzentration  $c_i(t)$  einer Spezies  $i$  zu ermitteln, wurde ein kinetisches Reaktionsmodell erstellt und zeitabhängig gelöst. Als Beispiel ist hier die Anregung eines Fluorophors  $A$  das mit  $k_F$  fluoresziert und mit  $k_{IC}$  interne Konversion in den Grundzustand erfährt.

$$\begin{aligned}
 A^* &\xrightarrow{k_F} A \\
 A^* &\xrightarrow{k_{IC}} A \\
 c(A^*(0)) &= -c(A(0)) = c_{ex} \\
 c(A^*(t)) &= \frac{\delta c(A^*(t))}{\delta t} = c_{ex} \exp(-(k_F + k_{IC}) t) \\
 c(A(t)) &= \frac{\delta c(A(t))}{\delta t} = -c_{ex} \exp(-(k_F + k_{IC}) t)
 \end{aligned} \tag{2.13}$$

Die beiden Geschwindigkeitskonstanten  $k_F$  und  $k_{IC}$  können nicht getrennt voneinander beobachtet werden. Die Depopulation von  $A^*$  und Repopulation von  $A$  erfolgen mit  $k_{eff} = k_F + k_{IC}$ . Ist die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$  bekannt, kann das Verhältnis von  $k_F$  zu  $k_{IC}$  nach Gl. 2.14 bestimmt werden.

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC}} \tag{2.14}$$

Jeder kinetischen Spezies wurde ein Spektrum zugeordnet, das mit einer Summe von Gauß-Funktionen (Gl. 2.15) beschrieben wurde.

$$S_i(\lambda) = \sum_{j=1}^k \frac{A_j}{\sigma_j \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2} \left(\frac{\lambda - \lambda_{c,j}}{\sigma_j}\right)^2\right) \tag{2.15}$$

$A$  ist ein Amplitudenfaktor,  $\sigma$  die Standardabweichung und  $\lambda_c$  die Zentralwellenlänge der Gauß-Funktion. Die Halbwertsbreite FWHM lässt sich mit

Gl. 2.16 aus  $\sigma$  berechnen. Die Integral der einzelnen Gauss-Funktionen ist ohne den Amplitudenfaktor  $A$  auf 1 normiert.

$$FWHM = 2\sqrt{2 \ln(2)}\sigma \approx 2.3548 \sigma \quad (2.16)$$



## 2.4 Probenpräparation

Alle verwendeten Lösungen wurden aus einer 5 mM Protein-Stammlösung in PBS Puffer hergestellt. Jeweils 50  $\mu\text{L}$  dieser konzentrierten Proteinlösung wurden in 6 mL 5 mM wässriger Pufferlösung nach Tabelle 2.1 verdünnt und sofort verwendet. Für die Messungen in deuteriertem Puffer wurde ein Carbonat-Puffer mit einer geringen Menge  $\text{H}^+$ -Ionen angesetzt. Die Verdünnung von 50  $\mu\text{L}$  wässriger Proteinlösung in 6 mL  $\text{D}_2\text{O}$  sollte zu einem D/H-Verhältnis von 100:1 führen, Protein und Pufferanteil der Stammlösung sind zu vernachlässigen. Der H/D-Austausch im Protein wurde durch Lagerung über Nacht erreicht. Die gewünschte Isomerisierung wurde durch Bestrahlung des Proteins im Pumpenkreislauf (siehe Abschnitt 2.1.6) erzeugt. Die Bestrahlung erfolgte vor jeder Messung für eine halbe Stunde und wurde während der Messung fortgeführt.

pH	Puffer	Ansatz	Anmerkung
3.5	Acetat	0.030 g $\text{CH}_3\text{COOH}$	1 M HCl auf pH 3.5
4	Citrat	0.105 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 M NaOH auf pH 4
7	PBS	0.8 g NaCl, 0.02 g KCl, 0.178 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.027 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$	nicht selbst erstellt
7	Tris	0.121 g $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	nicht selbst erstellt
10	Tricin	0.089 g $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_5$	1 M HCl auf pH 10
10.5	Phosphat	0.134 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 M HCl auf pH 10.5
10.3	Carbonat	0.0053 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$	in 10 mL $\text{D}_2\text{O}$

**Tab. 2.1:** Verwendete Puffer-Lösungen für verschiedene pH-Werte und Messungen. Die Angaben beziehen sich auf jeweils 100 mL Pufferlösung in zweifach destilliertem Wasser (*Aqua bidest*)



# Kapitel 3

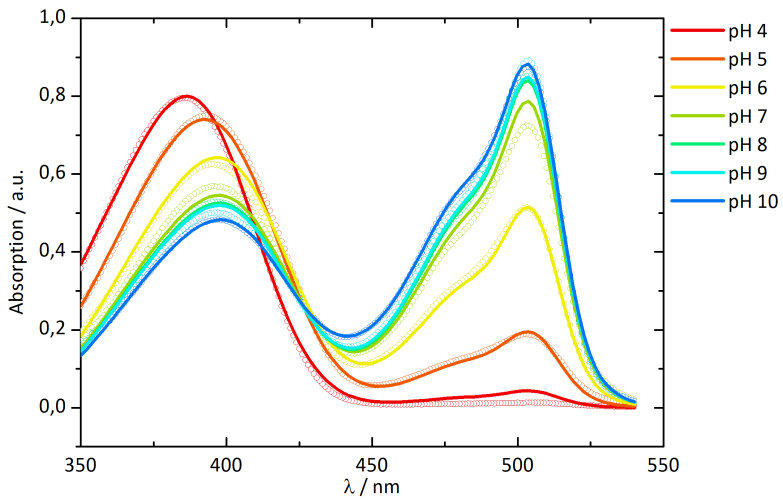
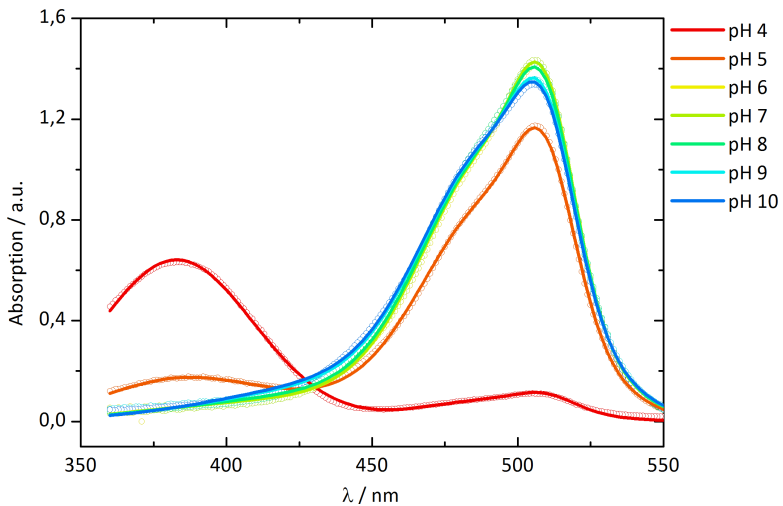
## Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Padron0.9

#### 3.1.1 Grundzustände

Das Chromophor von Padron0.9 kann *cis*- wie auch *trans*-Konfiguration annehmen, wobei das *trans*-Isomer die energetisch günstigere Form darstellt und das *cis*-Isomer bei Raumtemperatur innerhalb von Stunden in die *trans*-Form isomerisiert [32]. Die Absorptionsspektren der beiden Isomere, dargestellt in Abb. 3.1, sind stark pH-abhängig. Die Spektren zeigen jeweils zwei deutlich unterscheidbare Banden, deren Maxima für das *cis*-Isomer bei 397 und 503 nm und für das *trans*-Isomer bei 387 und 506 nm liegen und dem protonierten ( $C^H$ ,  $T^H$ ) bzw. dem deprotonierten ( $C^-$ ,  $T^-$ ) Chromophor zugeordnet werden können. Das pH-abhängige Verhalten der beiden Banden im *cis*-Spektrum (Abb. 3.1a, offene Kreise) mit einem isosbestischen Punkt bei 428 nm im Bereich pH 5-10 legt ein Protonierungsgleichgewicht zwischen  $C^H$  und  $C^-$  nahe. Bei näherer Betrachtung wird klar, dass es sich hier nicht um ein einfaches Gleichgewicht der Form  $C^H \rightleftharpoons C^-$  handeln kann: Bei pH 4 ist die  $C^-$ -Bande bei 503 nm praktisch nicht existent und wächst bei Erhöhung des pH-Wertes bis pH 8 an, während die  $C^H$ -Bande bei 397 nm zwar abnimmt, aber auch bei pH 10 noch etwa mit halber Intensität präsent ist. Das Maximum der  $C^H$ -Absorptionsbande ist bei pH < 6 signifikant blau verschoben und liegt bei pH 4 bei 385 nm. Das Absorptionsspektrum bei diesem pH durchläuft nicht den isosbestischen Punkt. Bei hohem pH-Wert > 9 verbreitert sich das  $C^-$ -Absorptionsspektrum, während die maximale Amplitude geringfügig nachlässt.

Das *trans*-Isomer (Abb. 3.1b) zeigt von pH 4 nach 6 eine schnelle und nahezu vollständige Umwandlung von  $T^H$  nach  $T^-$ . Dieser Übergang geschieht allerdings abrupter, als es bei einem einfachen Gleichgewicht  $T^H \rightleftharpoons T^-$  möglich wäre. Bei hohen pH-Werten > 6 ist zudem, wie beim *cis*-Isomer, eine

(a) *cis*-Isomer(b) *trans*-Isomer

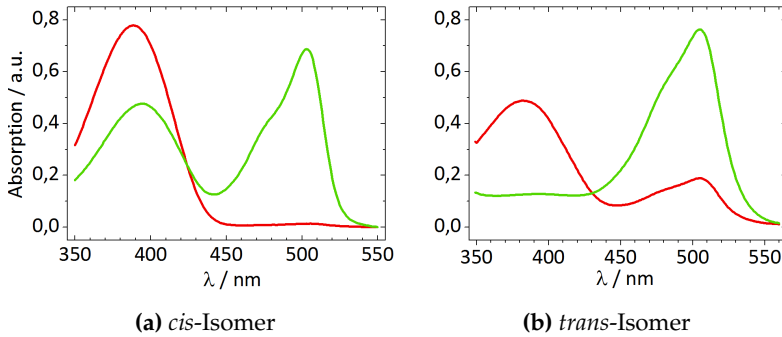
**Abb. 3.1:** pH-Abhängige Absorptionsspektren des *cis*- (a) und *trans*-Isomers (b) von Padron0.9. Gemessene Spektren sind als offene Kreise dargestellt, die durchgezogenen Linien sind Anpassungen der gemessenen Spektren nach dem Modell 3.9a. Die Spektren sind auf einen Absorptionsspeak der Proteinumgebung bei 290 nm normiert.

Verbreiterung der Absorptionsbande auf Kosten der Intensität zu beobachten.

Die Koexistenz von  $C^H$  und  $C^-$  in dem weiten pH-Bereich von pH 5-10 kann mit einer protonierenden Gruppe  $X$  in der Umgebung des Chromophors erklärt werden, die die Protonenaffinität des Chromophors beeinflusst (vgl. 1.3). Die Verbreiterung des  $C^-$ -Spektrums bei  $\text{pH} > 9$  kann dabei auf den Einfluss der  $X^-$ -Gruppe auf die spektralen Eigenschaften des Chromophors zurückgeführt werden. Dieses Modell reicht jedoch nicht aus, um auch die spektrale Blauverschiebung der  $C^H$ -Absorptionsbande bei pH-Werten  $< 5$  zu erklären. Die Ursache dieser spektralen Verschiebung kann mehrere Gründe haben. Eine Möglichkeit wäre die Existenz einer weiteren protonierenden Gruppe  $Y$ , deren Protonierung eine Stabilisierung des Grundzustands und somit eine Blauverschiebung in der Absorption des protonierten Chromophors bewirkt. Die Ähnlichkeit der  $C^H$ - und  $T^H$ -Absorptionsbanden (vgl. Abb. 3.1), die sich nur um etwa 20 % in der Amplitude unterscheiden und spektral fast identisch sind, lassen vermuten, es handele sich hier um identische Spezies, die durch eine pH-induzierte Isomerisierung gebildet wurde. Bei pH 4 läge dann, unabhängig von der Bestrahlung, das gleiche Isomer vor.

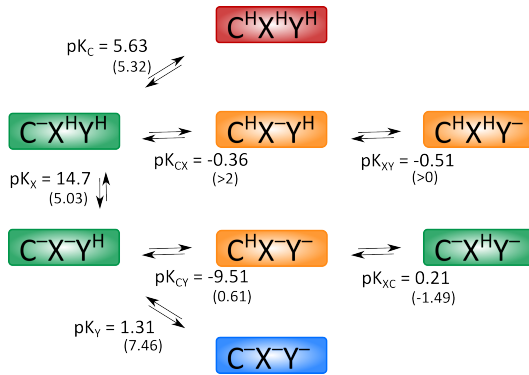
Um diese zu untersuchen, wurden zwei Proben einer Protein Pufferlösung pH 4 durch LED-Bestrahlung vollständig zum *cis*- bzw. zum *trans*-Isomer überführt (Abb. 3.2, rote Linien). Anschließend wurden die Lösungen durch Zugabe einer äquivalenten Menge einer Pufferlösung mit pH 11 neutralisiert. Die Absorptionsspektren nach Neutralisierung (Abb. 3.2, grüne Linien) haben wieder die Form des jeweiligen Isomers bei  $\text{pH} \approx 7$ . Diese Reversibilität der pH-induzierten Blauverschiebung des Absorptionsspektrums schließt eine Isomerisierung aus, nach der sich beide Spektren bei Neutralisierung hätten gleich verhalten müssen. Die Ursache für die beobachtete Blauverschiebung wird daher eine weitere protonierende Gruppe  $Y$  in der Chromophorumgebung sein. Auch die pH-abhängigen Absorptionsspektren des *trans*-Isomer kann das Modell mit nur einer protonierenden Gruppe  $X$  nicht hinreichend erklären. Der steile Übergang von  $T^H$  nach  $T^-$  zwischen pH 4 und 6 wird abgedeckt, die spektrale Verbreiterung für  $\text{pH} > 9$  verlangt nach dem Einfluss einer weiteren protonierenden Gruppe.

Eine Erweiterung des Modells in Abb. 1.19b um die Gruppe  $Y$  führt zu 8 verschiedenen Spezies (siehe Abb. 3.3). Zur Beschreibung der spektralen Entwicklung des *cis*-Isomers genügen vier verschiedene Spektren, die der Spezies  $C^H X^H Y^H$ ,  $C^- X^- Y^-$  und der spektral jeweils ununterscheidbaren deprotonierten Spezies  $C^- X^H Y^H$  /  $C^- X^- Y^H$  /  $C^- X^H Y^-$  und der protonierten Spezies  $C^H X^- Y^H$  /  $C^H X^H Y^-$  /  $C^H X^- Y^-$ . Für das *trans*-Isomer, das

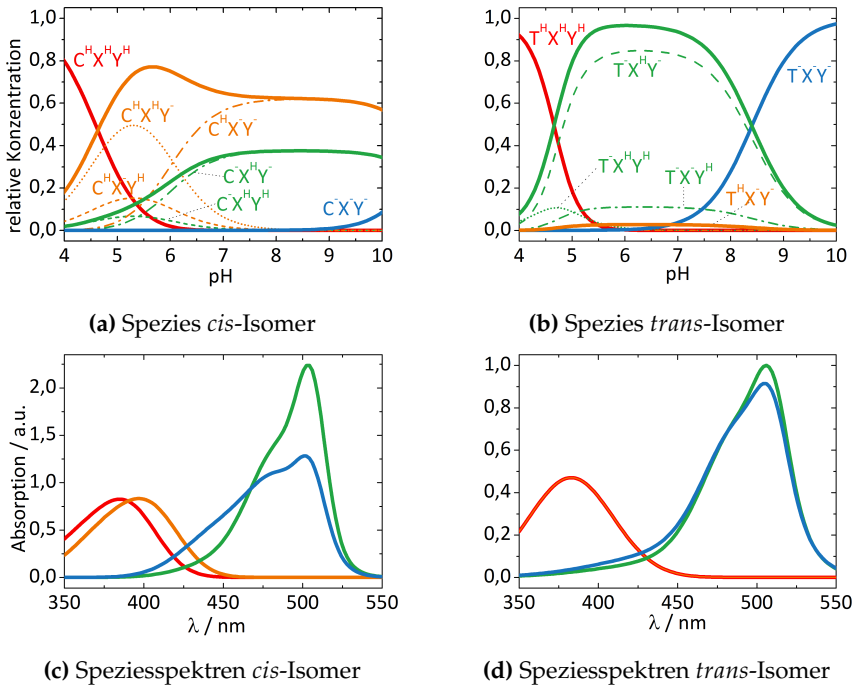


**Abb. 3.2:** Absorptionsspektren der Isomere von Padron0.9 bei pH 4 (rote Linien) und nach anschließender Änderung des pH-Wertes auf  $\approx 7$  (grüne Linien)

keine spektrale Verschiebung zeigt, genügen drei Spektren, die den spektral jeweils ununterscheidbaren protonierten Spezies  $T^H X^H Y^H$  /  $T^H X^- Y^H$  /  $T^H X^H Y^-$  /  $T^H X^- Y^-$  und den deprotonierten Spezies  $T^- X^H Y^H$  /  $T^- X^- Y^H$  /  $T^- X^H Y^-$  sowie  $T^- X^- Y^-$  zugeordnet wurden. Das Modell mit den durch Anpassung ermittelten Gleichgewichtskonstanten ist in Abb. 3.3 gezeigt, Spezies mit gleichen Spektren sind mit der gleichen Farbe unterlegt. Das Spektrum jeder Spezies wurde mit einer Summe von Gauß-Funktionen beschrieben. Die Spektren sind in Abb. 3.4c und d gezeigt, die relativen Konzentrationen der Spezies sind in Abb. 3.4a und b pH-abhängig aufgetragen. Die modellierten pH-abhängigen Absorptionsspektren sind als durchgezogene Linien in Abb. 3.1a und b gezeigt. Die bei niedrigem pH-Wert vorkommenden protonierten Spezies  $C^H X^H Y^H$  und  $T^H X^H Y^H$  werden in dieser Arbeit mit  $C^{H+}$  bzw.  $T^{H+}$  bezeichnet, die protonierten Spezies mit teilprotonierter Umgebung werden unter dem Kürzel  $C^H$  bzw.  $T^H$  zusammengefasst, alle deprotonierten Spezies mit  $C^-$  und  $T^-$ .



**Abb. 3.3:** Modell der Protonierung des Chromophors C (respektive T) von Padron0.9 mit zwei protonierenden Gruppen X und Y in unmittelbarer Umgebung. Spezies mit identischen Absorptionsspektren sind mit der gleichen Farbe unterlegt. Die pK-Werte aus der Anpassung der Absorptionsspektren für *cis*- und *trans*-Isomer (in Klammern) sind angegeben.



**Abb. 3.4:** Modell des Protonierungsgleichgewichtes von Padron0.9, pH-abhängige Konzentrationen und ihre Absorptionsspektren

### 3.1.2 Angeregte Zustände von $C^-$ und $T^-$

#### 3.1.2.1 Fluoreszenz

Nach Anregung durch Licht fluoresziert Padron0.9 grün. Die Intensität der Fluoreszenz hängt von Anregungswellenlänge, pH-Wert und der Konfiguration des Chromophors ab. Das *trans*-Isomer zeigt nahezu keine Fluoreszenz. Die pH-abhängigen Fluoreszenzspektren des *cis*-Isomers nach Anregung bei 503 (offene Kreise) und 397 nm (volle Quadrate) sind in Abb. 3.5a gezeigt. Maximale Fluoreszenzintensität wird nach Anregung bei 503 nm bei  $\text{pH} \approx 9$  erreicht. Bei niedrigerem pH-Wert sinkt die Fluoreszenzintensität. Dieser Effekt ist tendenziell mit einer geringeren relativen Konzentration der  $C^-$ -Spezies bei niedrigem pH zu erklären. Nach Anregung bei 397 nm ist die Fluoreszenzintensität insgesamt deutlich niedriger als bei 503 nm, die pH-Abhängigkeit ist jedoch ähnlich. Die Fluoreszenzausbeute sinkt ebenfalls bei niedrigerem pH, wobei die Konzentration der Spezies mit protoniertem Chromophor bei sinkendem pH tendenziell ansteigt. Abb. 3.4a zeigt jedoch für pH 7 und 9 eine ähnliche Konzentration an Spezies mit deprotoniertem und protoniertem Chromophor. Die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute muss auf andere Effekte zurückzuführen sein, wird hier aber nicht näher untersucht.

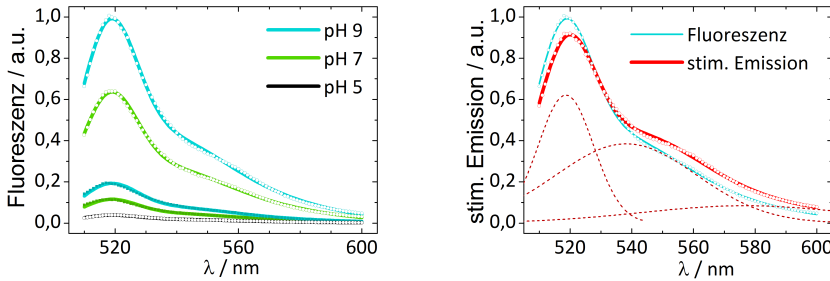
Unabhängig von der Anregungswellenlänge und dem pH-Wert, ist die Form der aufgenommenen Fluoreszenzspektren bis auf einen Amplitudenfaktor gleich und kann mit der Summe von drei Gaußkurven beschrieben werden, die Anpassung ist in Abb. 3.5a als durchgezogene Linie hinter den aufgenommenen Datenpunkten zu sehen. Die Fluoreszenzlebensdauer wurde als triexponentieller Abfall mit 39 ps, 500 ps und 3.6 ns bestimmt [65]. Die Fluoreszenzquantenausbeute ist  $\Phi_F = 0.61$  [23].

#### 3.1.2.2 Stimulierte Emission

Da die Emission bei Pump-Probe-Messungen als durch den Probestrahl stimulierte und nicht als spontane Emission aufgenommen wird, wurde das stationäre Fluoreszenzspektrum  $S_v(\lambda)$  zur Anpassung nach Gl. 3.1 in das stimulierte Emissionsspektrum  $\sigma_{em,v}(\lambda)$  umgerechnet [66].

$$\sigma_{em,v}(\lambda) = \frac{\lambda^4 E_v(\lambda)}{8 \pi n_{v,F} c_0 \tau_{rad,v} q_v} \quad (3.1)$$





(a) Fluoreszenzspektren *cis*-Isomer.  
 ○ :  $\lambda_p = 503$  nm, ■ :  $\lambda_p = 397$  nm

(b) Stimuliertes Emissionsspektrum

**Abb. 3.5:** Emissionsspektren von Padron0.9. Punkte: gemessene Daten, durchgezogene Linie: Anpassung der Daten mit einer Summe von Gaußfunktionen, gestrichelte Linie: einzelne Gaußfunktionen

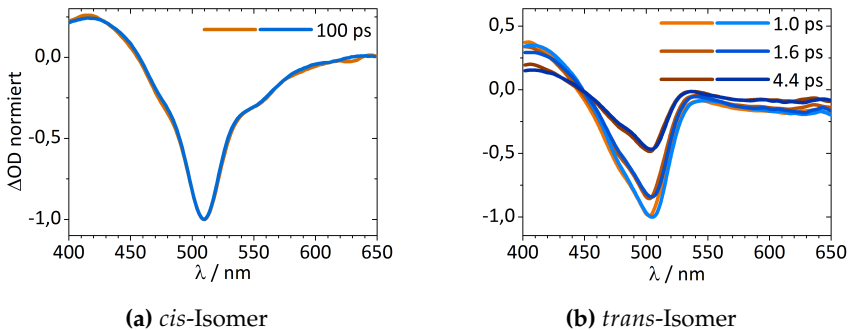
$E_v$  ist die Fluoreszenzquantenverteilung und bis auf einen Amplitudenfaktor identisch mit dem stationären Fluoreszenzspektrum  $S_v(\lambda)$ . Der Brechungsindex  $n_{v,F}$  im Bereich der Fluoreszenz wird als wellenlängenunabhängig angenommen und die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum  $c_0$ , Strahlungslebensdauer  $\tau_{rad,v}$  und die Fluoreszenzquanteneffizienz  $q_v$  sind Konstanten. Es ergibt sich Gl. 3.2 als qualitative Beschreibung der stimulierten Emission aus Gl. 3.1.

$$\sigma_{em,v}(\lambda) \propto \lambda^4 E_v(\lambda) \propto \frac{\lambda^4}{\lambda_0^4} S_v(\lambda) \quad (3.2)$$

Das gemessene Fluoreszenz- und das daraus berechnete stimulierte Emissionsspektrum ( $\lambda_0 = 530$  nm) sind in Abb. 3.5b als offene Kreise und durchgezogene Linie gezeigt. Das stimulierte Emissionsspektrum wurde analog zum Fluoreszenzspektrum mit drei Gaußfunktionen angepasst. Das resultierende Emissionsspektrum der deprotonierten *cis*-Spezie ist in Tab.A.1 beschrieben und wird im Weiteren  $C_{em}^{-*}$  genannt.

### 3.1.2.3 Transiente Spektren

Die transiente Dynamik der Zustände  $C^-$  und  $T^-$  wurde mittels Pump-Probe-Spektroskopie (siehe Abschnitt 2.2.1) bei pH 7 und 10 untersucht. Die Absorptionsspektren der einzelnen Chromophorspezies in Abb. 3.4c und d zeigen, dass bei der gewählten Anregungswellenlänge  $\lambda_p = 505$  nm



**Abb. 3.6:** Vergleich der transienten Spektren von Padron0.9,  $\lambda_p = 505$  nm, bei pH 7 (orange) und pH 10 (blau) zu verschiedenen Verzögerungszeiten

ausschließlich deprotonierte Spezies angeregt werden. Nach Abb. 3.4a und b ändert sich die Chromophorumgebung von pH 7 zu 10, so dass bei pH 7 die einfach protonierte Umgebung  $C^-X^HY^- / C^-X^-Y^H$  bzw.  $T^-X^HY^- / T^-X^-Y^H$  populiert ist, bei pH 10 aber zusätzlich etwa 10 % der deprotonierte Spezies  $C^-X^-Y^-$  vorliegt. Im Falle des *trans*-Isomers liegt das Gleichgewicht bei pH 10 sogar ausschließlich bei der vollständig deprotonierten Spezies  $T^-X^-Y^-$ .

Die zeitaufgelösten Signale bei pH 7 und 10 unterscheiden sich dennoch weder für das *cis*- noch das *trans*-Isomer nennenswert. Zur Verdeutlichung sind die transienten Spektren für einige Verzögerungszeiten in Abb. 3.6 aufeinander skaliert dargestellt. Das Spektrum von  $C^-X^-Y^-$  variiert zwar deutlich von  $C^-X^HY^- / C^-X^-Y^H$ , jedoch ist der Anteil  $C^-X^-Y^-$  bei pH 10 recht gering. Das *trans*-Isomer liegt bei pH 10 ausschließlich als  $T^-X^-Y^-$  vor, die spektralen Unterschiede zu  $T^-X^HY^- / T^-X^-Y^H$  sind hingegen nicht sehr stark. Die Ähnlichkeit der transienten Spektren bei pH 7 und 10 ist so groß, dass die Kinetik der deprotonierten Spezies der Isomere im Weiteren als identisch erachtet und nur die Messungen bei pH 10 betrachtet werden.

Die aufgenommenen transienten Spektren von  $C^-$  und  $T^-$  bei pH 10 und 505 nm Anregungswellenlänge sind in Abb. 3.7 als offene Kreise gezeigt. Die Messungen von  $C^-$  und  $T^-$  erfolgten direkt hintereinander ohne Änderung der experimentellen Parameter mit derselben Proteinlösung. Zur Überführung in das jeweilige Isomer wurde die Lösung vor und während der ersten Messung mit einer LED bei 495 nm und vor und während der zweiten Messung mit 400 nm bestrahlt. Durch dieses Vorgehen sind die

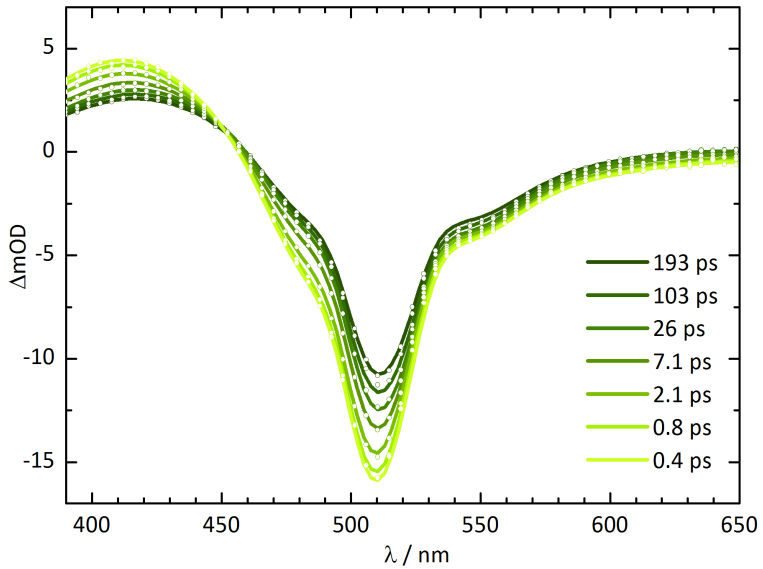
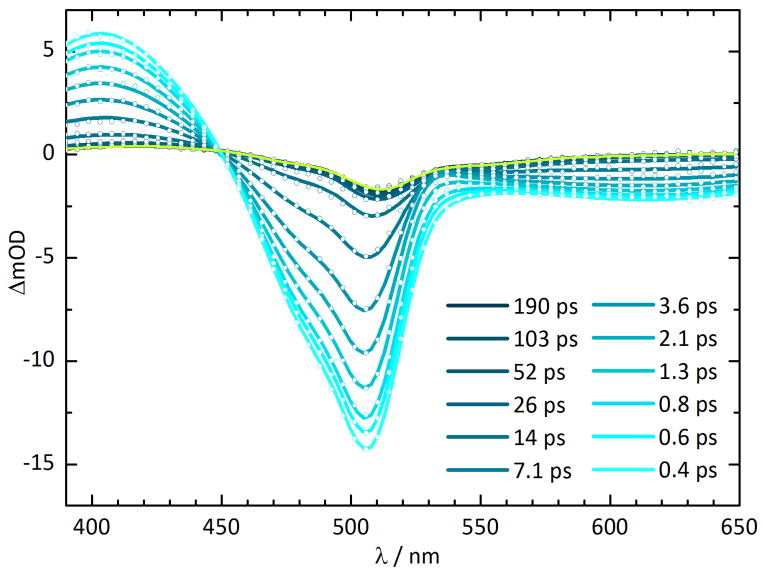
Signale der beiden Messungen direkt vergleichbar, da der Überlapp von Pump- und Probestrahl  $\sigma_{pp}$ , die Proteinkonzentration  $c_0$  und die Pumpintensität  $I_p$  gleich sind (siehe Gl. 2.3). Zu frühen Zeiten ähneln sich die Spektren der beiden Isomere. Zwischen 400 und 450 nm ist das Signal positiv, hier absorbiert ein angeregter Zustand (*excited state absorption*, ESA). Im Bereich der  $C^-$ - und  $T^-$ -Absorption zwischen 450 und 520 nm ist das Signal negativ und rührt vom gebleichten Grundzustand (*ground state bleach*, GSB) her. Für Wellenlängen  $> 520$  nm ist das Signal ebenfalls negativ und stimulierter Emission zuzuschreiben.

Hier zeigt das *cis*-Isomer eine deutliche Bandenstruktur, während das Signal des *trans*-Isomers sehr breit und strukturlos ist und auf der roten Flanke des GSB um 530 nm schnell abfällt, während die Emission für  $\lambda > 550$  nm keinen entsprechend schnellen Abfall zeigt. Wie für den AN-Zustand erwartet, führt die Anregung von  $C^-$  zu einem langlebigen angeregten Zustand  $C^{-*}$ , während das Signal des AUS-Zustands  $T^-$  nach einigen Pikosekunden fast verschwunden ist. Eine langlebige Komponente bleibt allerdings auch in dieser Messung bestehen, die dem transienten  $C^-$ -Signal bei  $\Delta t > 100$  ps sehr ähnelt. Zur Verdeutlichung ist das entsprechende  $C^-$ -Signal skaliert als grüne Kurve auf die transienten Spektren von  $T^-$  in Abb. 3.7b gelegt. Das transiente Spektrum von  $C^-$  fällt nicht monoexponentiell ab, sondern zeigt zu frühen Zeiten hauptsächlich im Bereich von 400 - 520 nm eine schnelle Komponente, ähnlich wie  $T^-$ .

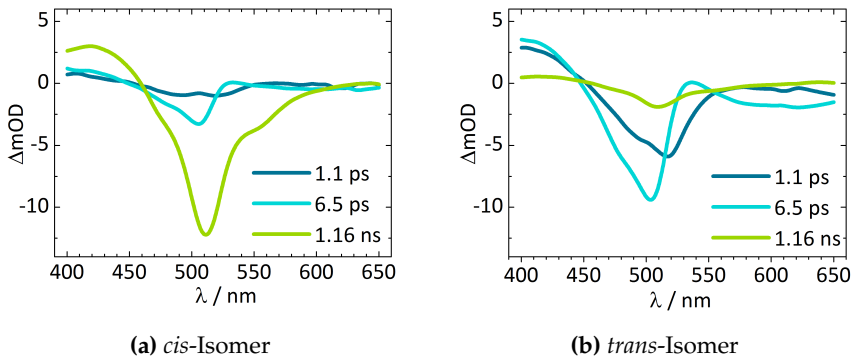
Beide Spektren wurden wellenlängenabhängig mit einem triexponentiellen Abfall mit den Zeitkonstanten  $\tau_1 = (1.1 \pm 0.2)$  ps,  $\tau_2 = (6.5 \pm 0.7)$  ps und  $\tau_3 = (1.16 \pm 0.3)$  ns angepasst. Die wellenlängenabhängigen Amplituden der Anpassung sind in Abb. 3.8 gezeigt. Es fällt auf, dass die schnellen Beiträge in Abb. 3.8b, die die  $T^-$ -Messung dominieren, mit ähnlicher Form und Verhältnis zueinander auch in Abb. 3.8a zu sehen sind, während die langlebige Komponente, die die  $C^-$ -Messung dominiert, wie erwartet zu einem geringen Teil in Abb. 3.8b auftaucht. Diese Verteilung deutet darauf hin, dass der Isomerisierungsprozess durch die LED-Einstrahlung nicht vollständig war und jede Messung noch einen kleinen Beitrag des jeweils anderen, unerwünschten, Isomers enthält.

### 3.1.2.4 Aufstellen des kinetischen Modells

Das der *cis*-Spezies zugeordnete Signal fällt monoexponentiell mit  $\tau_3 = 1.16$  ns ab. Diese Zeitkonstante kann direkt dem angeregten Zustand  $C^{-*}$  zugeordnet werden, der monoexponentiell mit  $k_C = \tau_3^{-1}$  in den Grundzustand

(a) *cis*-Isomer Padron0.9(b) *trans*-Isomer Padron0.9. Die grüne Linie zeigt das skalierte Spektrum aus a bei  $\Delta t = 193$  ps.

**Abb. 3.7:** Transiente Spektren von Padron0.9 bei pH 10 nach Anregung bei 505 nm bei verschiedenen Verzögerungszeiten.  $\circ$  : aufgenommenen Daten,  $/$  : Anpassung durch das kinetische Modell in Fig.3.9a.



**Abb. 3.8:** Amplitudenspektren der exponentiellen Anpassung der transienten Daten von Padron0.9 bei pH 10 nach Anregung bei 505 nm.

$C^-$  zurückfällt. Die Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  beschreiben die Dynamik des *trans*-Isomers nach Anregung von  $T^-$ . Die Fluoreszenzdauer von Padron0.9 wurde von Fron et al. [65] durch TCSPC als triexponentiell mit den Zeitkonstanten 39 ps, 500 ps und 3.6 ns bestimmt. Die längste Zeitkonstante wurde der Lebensdauer des initial angeregten Zustandes  $C^{*-}$  zugeschrieben, die schnelleren nicht näher definierten Relaxationsprozessen im angeregten Zustand. Die Pump-Probe Messungen zeigen weder eine schnelle 39 ps-Komponente, noch 500 ps oder 3.6 ns, sondern fallen monoexponentiell ab. Da das betrachtete Zeitfenster allerdings auf  $\sim 200$  ps beschränkt ist, kann sich die gemessene Lebensdauer von  $\tau_3 = 1.16$  ns aus etwa 30 % einer 500 ps und 70 % einer 3.6 ns-Komponente zusammensetzen.

Das Signal der *trans*-Spezies fällt biexponentiell mit  $\tau_1 = 1.1$  ps und  $\tau_2 = 6.5$  ps ab. Die Emission für  $\lambda > 550$  nm fällt weitestgehend monoexponentiell mit  $\tau_2$  ab, während die Absorption des angeregten Zustandes und das Bleichen des Grundzustandes biexponentiell mit  $\tau_1$  und  $\tau_2$  abfallen. Für große Verzögerungen  $\Delta t > 20$  ps verschwindet das transiente Signal vollständig. Das Amplitudenspektrum von  $\tau_2$  in Abb. 3.8b im Bereich von 450 - 520 nm ähnelt dem Absorptionsspektrum von  $T^-$  (vgl. Abb. 3.4d). Das Amplitudenspektrum von  $\tau_1$  zeigt eine ähnliche Struktur, ist aber breiter und  $\sim 20$  nm rotverschoben, mit dem Maximum an der Kante des  $T^-$ -Spektrums bei 520 nm. Fron et al. haben in Pump-Probe Messungen für das *trans*-Isomer ebenfalls eine biexponentielle Dynamik mit ähnlichen Zeitkonstanten von 0.7 und 5.2 ps festgestellt. In einem Fluoreszenz-Hochkonversionsexperiment konnten sie die 5.2 ps, nicht aber die 0.7 ps Komponente messen, was die Bildung eines emittierenden Zustandes auf dieser Zeitskala ausschließt. Fron

et al. schlugen stattdessen die Bildung eines heißen Grundzustandes oder eines anderen angeregten Zustandes vor.

Ein heisser Grundzustand  $T_h^-$  würde entsprechend rotverschoben zum Spektrum vom relaxierten Grundzustand  $T^-$  absorbieren, die Population von  $T_h^-$  aus  $T^{-*}$  mit  $k_{IC_1}$  ist ausserdem konsistent mit dem Amplitudenspektrum der Zeitkonstante  $\tau_1$  in Abb. 3.8b und beschreibt den schmalbandigen Abfall des Signals bei 520 nm gut. Da das gesamte Signal letztlich komplett verschwindet, muss  $T_h^-$  mit  $k_{c_2}$  zu  $T^-$  abkühlen. Diese Abkühlung muss langsamer stattfinden als die Population durch die interne Konversion, da  $T_h^-$  sonst nie nennenswert populierte wäre. Die innere Konversion  $k_{IC_1}$  kann nicht der einzige Reaktionskanal für  $T^{-*}$  sein. Die transiente Absorption bei 400 nm zeigt beide Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$ , die Emission nur das langsamere  $\tau_2$ . Ein Teil der angeregten Moleküle muss also in Konkurrenz mit der internen Konversion  $k_{IC_1}$  von  $T^{-*}$  mit  $k_{c_1}$  in einen anderen, langlebigeren angeregten Zustand  $T_r^{-*}$  relaxieren, der sich spektral im Bereich der transienten Absorption, nicht aber im Bereich der Emission von  $T^{-*}$  unterscheidet und die Lebensdauer  $\tau_2$  hat. Die Reaktion von  $T_r^{-*}$  nach  $T^-$  erfordert die Reorganisation der mit  $k_{c_1}$  erfolgten Änderung im angeregten Zustand, weshalb eine Reaktionskaskade mit initialer Entvölkerung durch interne Konversion mit  $k_{IC_2}$  nach  $T_{r,h}^-$  oder  $T_r^-$  und anschließender Relaxation zu  $T^-$  anzunehmen ist. Da der gebleichte Grundzustand  $T^-$  ebenfalls mit  $\tau_2$  repopuliert wird, muss die Depopulation von  $T_r^{-*}$  hier der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein, was dazu führt, dass  $T_{r,h}^-$  und  $T_r^-$  nie nennenswert populierte werden.

Diese Überlegungen sind in dem kinetischen Modell in Abb. 3.9a zusammengefasst. Die farbig unterlegten Zustände repräsentieren die tatsächlich populierte Zustände, die dicken Pfeile die relevanten Reaktionswege. Die grau unterlegten Zustände und gestrichelten Reaktionswege sind nur der Vollständigkeit halber angegeben und werden in dem Modell nicht berücksichtigt. Die Abkühlung des heißen Grundzustandes wurde zur Reduzierung der Anpassungsparameter stark vereinfacht durch den Übergang eines heißen in einen kalten Zustand beschrieben.

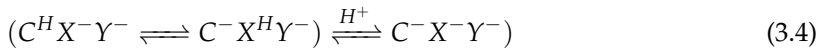
### 3.1.2.5 Anpassung der Daten

Die transienten Spektren des *cis*- und *trans*-Isomers (Abb. 3.7a und b) wurden simultan global mit dem kinetischen Modell in Abb. 3.9a angepasst. Beide Datensätze wurden als Mischung aus dem jeweils erwünschten und einem geringen Anteil unerwünschten Isomer behandelt. Die gemessenen Signale

sind die Summe der Beiträge beider Isomere nach Gl.2.3. Überlapp  $\sigma_{pp}$  und Pumpintensität  $I_{pump}$  und die Proteinkonzentration  $c_{Prot}$  sind bei beiden Messungen identisch, was zu Gl.3.3 führt.

$$\Delta OD(\lambda, t) = I_{pump} \sigma_{pp} c_{Protein} \sum_i c_i \epsilon_i(\lambda_p) \sum_j (c_{i,j}(t) S_{i,j}(\lambda)) \quad (3.3)$$

Jede Grundzustandspezies mit der anteiligen Konzentration  $c_i$ ,  $\sum_i c_i = 1$ , die bei  $\lambda_p = 505$  nm absorbiert ( $\epsilon_i(505 \text{ nm}) \neq 0$ ), trägt mit den an ihrer Reaktionsdynamik beteiligten Spezies  $j$  mit den relativen Konzentrationen  $c_{i,j}$  und den Spektren  $S_{i,j}$  zum Signal bei, wobei gilt  $\sum_j c_{i,j} = 1$ . Die beteiligten Grundzustandspezies bei pH 10 und der Anregungswellenlänge  $\lambda_p = 505$  nm sind für das *trans*-Isomer  $T^-X^-Y^-$ , die Spezies des *cis*-Isomer liegen im Gleichgewicht (Gl. 3.4) vor.



Die Gesamtkonzentration aller beteiligten Spezies ist konstant (Gl. 3.5). Mit der Annahme, dass sich die beiden *cis*-Spezies kinetisch identisch verhalten, können sie für diesen pH-Wert als eine Spezies  $C_{pH10}^-$  beschrieben werden. Analog wird  $T^-X^-Y^-$  als  $T_{pH10}^-$  und  $C^H X^- Y^-$  als  $C_{pH10}^H$  bezeichnet. Da die Isomere reversibel ineinander umgewandelt werden, gilt für die Konzentration Gl.3.9.

$$\sum_i c_i = c_{T^-X^-Y^-} + c_{C^H X^- Y^-} + c_{C^- X^H Y^-} + c_{C^- X^- Y^-} = 1 \quad (3.5)$$

$$c_{cis} = c_{C^H X^- Y^-} + c_{C^- X^H Y^-} + c_{C^- X^- Y^-} \quad (3.6)$$

$$c_{trans} = c_{T^-X^-Y^-} \quad (3.7)$$

$$c_{C_{pH10}^-} = c_{cis} - c_{C_{pH10}^H} \quad (3.8)$$

$$c_{T_{pH10}^-} = 1 - c_{cis} \quad (3.9)$$

Da der pH-Wert während der Messung konstant ist, sind die Konzentrationsverhältnisse der Spezies  $C_{pH10}^-$  und  $C_{pH10}^H$  zueinander ebenfalls konstant und aus der Anpassung der *cis*-Absorptionsspektren bekannt (siehe Abb. 3.4a). Das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten  $C_{pH10}^H$  und  $T_{pH10}^-$  bei  $\lambda_p = 505$  nm kann aus den Speziesspektren in Abb. 3.4c und d berechnet werden. Aus diesen Überlegungen ergibt sich Gl. 3.10, die zur gemeinsamen Anpassung beider Datensätze verwendet wurde. Die relativen Konzentrationen  $c_i(t)$  der nach Anregung bevölkerten Spezies entstammen dem kinetischen Modell aus Abb. 3.9a. Alle konstanten Parameter wurden zu einem gemeinsamen

Amplitudenfaktor  $A$  zusammengefasst.

$$\Delta OD(\lambda, t) = A \cdot \left( \frac{\epsilon_{T_{pH10}^-}(505 \text{ nm})}{\epsilon_{C_{pH10}^-}(505 \text{ nm})} \sum_i (c_i(t) S_i(\lambda)) + c_{cis} \cdot \left( 1 - \frac{c_{C_{pH10}^H}}{c_{C_{pH10}^-}} \right) \sum_j (c_j(t) S_j(\lambda)) \right) \quad (3.10)$$

Zur spektralen Beschreibung der Grundzustände wurden die bekannten Spektren der Spezies  $C_{pH10}^-$  und  $T_{pH10}^-$  verwendet. Der angeregte Zustand  $C^{-*}$  wurde als Überlagerung des bekannten stimulierten Emissionsspektrums  $C_e^{-*}m$  mit Absorptionsbanden beschrieben, die mit drei Gaußfunktionen modelliert wurden. Die angeregten Zustände  $T^{-*}$  und  $T_r^{-*}$  wurden mit jeweils drei Gaußfunktionen beschrieben, jeweils zwei Absorptions- und eine breite Emissionsbande. Der heiße Grundzustand  $T_h^-$  wurde aus drei Absorptionsbanden modelliert.

### 3.1.2.6 Ergebnisse

Die resultierenden Geschwindigkeitskoeffizienten sind im Modell in Abb. 3.9a angegeben. Die Entwicklung der Konzentrationen der einzelnen Spezies ist in Abb. 3.9b gezeigt. Die Spektren der einzelnen Spezies sind in Abb. 3.9c zu sehen.

Die Relaxation im angeregten Zustand erfolgt schnell und hat nur geringe spektrale Auswirkungen. Der Grundzustand ist nach  $\sim 20$  ps wieder repopuliert. Größere strukturelle Änderungen des Chromophors und der Umgebung, wie Isomerisierung oder ein ESPT, können daher ausgeschlossen werden. Im beobachteten Zeitrahmen ist eine Umorganisation der stabilisierenden Wasserstoffbrücken oder eine geringfügige Umlagerung des Chromophors wahrscheinlich.

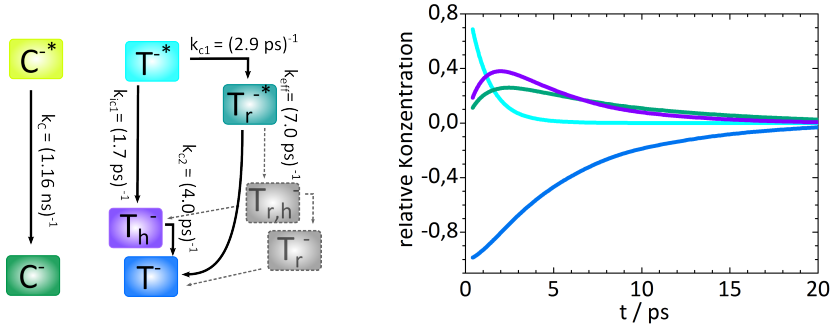
Die Proteinlösung in Abb. 3.7a bestand nach Gl. 3.10 zu 76 % aus dem *cis*- und zu 24 % aus dem *trans*-Isomer, in Abb. 3.7b zu 12 % aus dem *cis*- und zu 88 % aus dem *trans*-Isomer.

Im Rahmen der Messungen wurde keine Isomerisierung  $T^- \longrightarrow C^-$  durch Anregung beobachtet. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Interpretation von Fron et al., die eine schnelle und quantitative Isomerisierung nach Anregung der  $T^-$ -Spezies vorgeschlagen haben [65], deckt sich aber mit



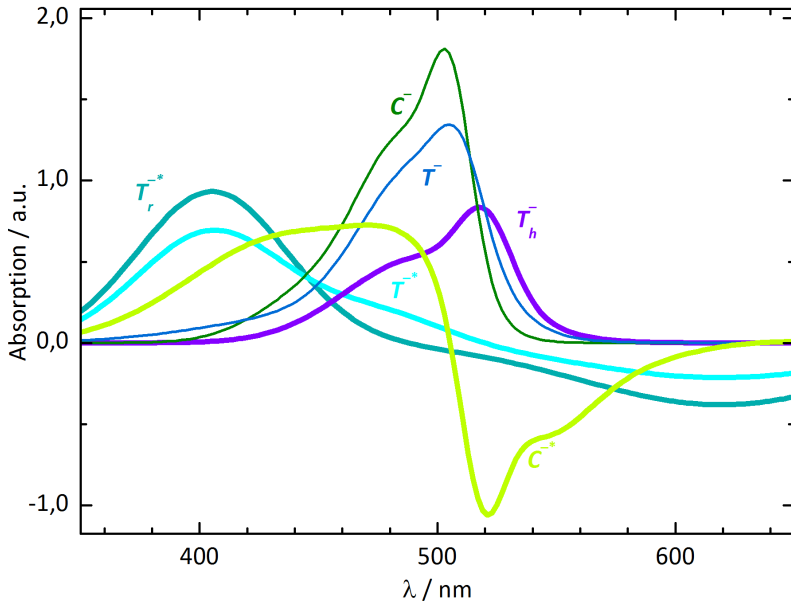
---

der aus den Schaltzyklen von Padron0.9 ermittelten Quantenausbeute des Schaltvorgangs  $\Phi_{trans \rightarrow cis}(503 \text{ nm}) = 0.0003$ .



(a) Kinetisches Modell zur Anpassung der Daten in Fig.3.7

(b) Konzentrationsverlauf der Spezies aus a



(c) Spektren der beteiligten Spezies

**Abb. 3.9:** Modell der photoinduzierten Dynamik von Padron0.9 nach Anregung der  $C^-$ - und  $T^-$ -Spezies bei  $\lambda_p = 505$  nm, zeitabhängige Konzentrationen der beteiligten Spezies und ihre Absorptionsspektren

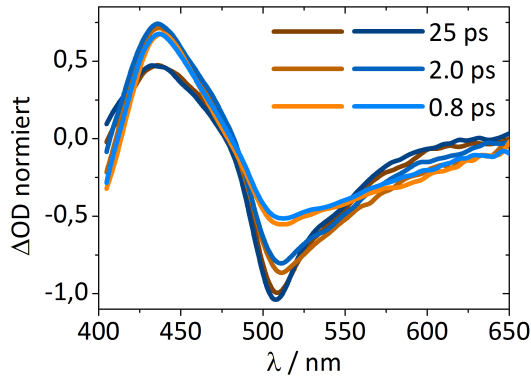
### 3.1.3 Angeregte Zustände von $C^H$ bei hohem pH-Wert

Die transiente Dynamik des Zustands  $C^H$  wurde mittels Pump-Probe Spektroskopie durch Anregung bei  $\lambda_p = 387$  nm bei pH 7 und 10 untersucht. Das *trans*-Isomer wurde in diesem pH-Bereich nicht weiter berücksichtigt, da sein Protonierungsgleichgewicht so stark nach  $T^-$  verschoben ist, dass keine Spezies  $T^H$  existiert (vgl. Abb. 3.1b und 3.4d) und entsprechend keine Daten aufgenommen werden konnten. Nach Abb. 3.4a liegt bei pH 10 ausschließlich die Spezies  $C^H X^- Y^-$  vor, bei pH 7 zu 90 %, die übrigen 10 % sind den doppelt protonierten Spezies  $C^H X^H Y^-$  und  $C^H X^- Y^H$  zugeordnet. Die transienten Spektren in Abb. 3.10 bei pH 7 und 10 zeigen nur geringe Abweichungen, die aus der geringfügig anderen Zusammensetzung stammen können. Im weiteren Verlauf der Auswertung wurden nur die Messung bei pH 10 betrachtet.

#### 3.1.3.1 Transiente Spektren

Die aufgenommenen transienten Spektren von  $C^H$  bei pH 10 und 387 nm Anregungswellenlänge sind in Abb. 3.11a als offene Kreise gezeigt. Das frühe Spektrum 0.5 ps nach Anregung zeigt ein ausgeprägtes Grundzustandsbleichen im Bereich der  $C^H$ -Absorption, überlagert mit Absorption des angeregten Zustands mit einem Maximum bei 445 nm. Das breite negative Signal für Wellenlängen  $\lambda > 490$  nm kann stimulierter Emission des angeregten Zustands zugeordnet werden. Diese Emission ist zunächst breit, flach und ohne ausgeprägte Struktur, entwickelt sich aber innerhalb von einigen Pikosekunden zu einem schmalen, markanten Spektrum mit klar erkennbarer Bandenstruktur, die ein Maximum bei 515 nm und eine Schulter bei 550 nm zeigt. Das späte Spektrum bei  $\Delta t > 100$  ps ähnelt stark dem transienten Spektrum der  $C^-$ -Spezies, das zum Vergleich als grüne, gestrichelte Linie skaliert und um -3 mOD verschoben in Abb. 3.11a gezeigt ist.

Die Spektren in Abb. 3.11a wurde wellenlängenabhängig mit einem triexponentiellen Abfall mit den Zeitkonstanten  $\tau_1 = (1.6 \pm 0.3)$  ps,  $\tau_2 = (26 \pm 5)$  ps und  $\tau_3 = 1.16$  ns angepasst. Die wellenlängenabhängigen Amplituden der Anpassung sind in Abb. 3.12a dargestellt.  $\tau_3$  wurde fixiert und entspricht der Lebensdauer von  $C^{-*}$  (siehe 3.1.3.2).



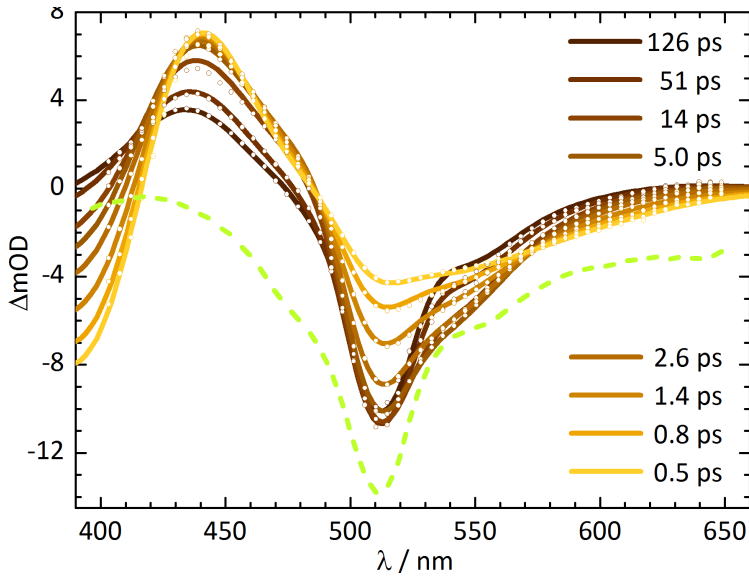
**Abb. 3.10:** Vergleich der transienten Spektren von Padron0.9, *cis*-Isomer,  $\lambda_p = 387$  nm, bei pH 7 (orange) und pH 10 (blau) zu verschiedenen Verzögerungszeiten

### 3.1.3.2 Aufstellen des kinetischen Modells

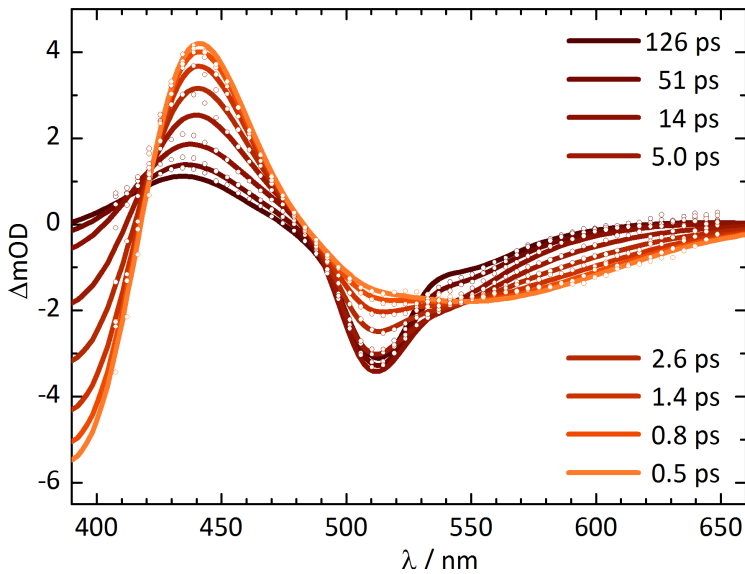
Die starke Ähnlichkeit der transienten Spektren von  $C^H$  und  $C^-$  bei großer Verzögerung lässt vermuten, dass sich  $C^H$  nach Anregung in Richtung  $C^{-*}$  verändert. Auch die Fluoreszenzspektren für Anregung von  $C^H$  und  $C^-$  sind identisch, mit einer deutlich geringeren Fluoreszenzquantenausbeute für  $C^H$ . Dies ist ein starker Beleg dafür, dass der emittierende Zustand in beiden Fällen  $C^{-*}$  sein wird. Nach Anregung der  $C^H$ -Spezies muss also ein Protonentransfer im angeregten Zustand (*excited state proton transfer*, ESPT)  $C^{H*} \longrightarrow C^{-*}$  erfolgen. Zur Verifizierung des ESPT wurde eine weitere Messung in deuterierter Pufferlösung durchgeführt, siehe Abschnitt 3.1.3.3.

Die spektrale Evolution der stimulierten Emission passiert biexponentiell mit  $\tau_1$  und  $\tau_2$  (vgl. Abb. 3.12a).  $\tau_1$  entspricht dem initialen schnellen Anwachsen der Emission mit einem Maximum bei 510 nm,  $\tau_2$  einer langsameren Modulation auf der roten Flanke des schnell gewachsenen Spektrums, die zu dem finalen Emissionsspektrum führt. Diese Modulation wird durch ein Intermediat im Reaktionsweg  $C^{H*} \longrightarrow C_i^{-*} \longrightarrow C^{-*}$  des ESPT dargestellt, das schon stark den Charakter von  $C^{-*}$  hat.

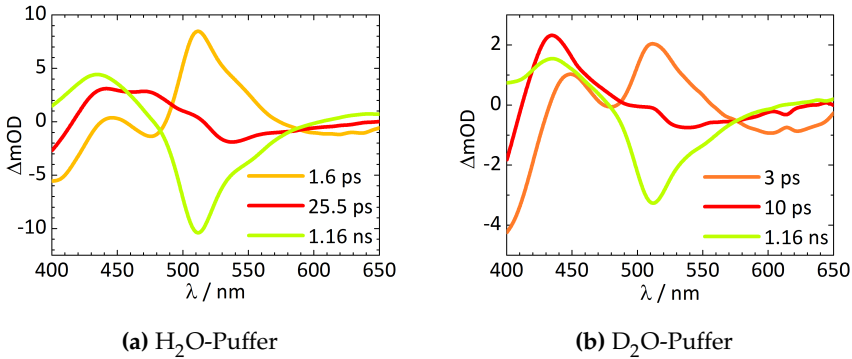
Die Lebensdauer  $\tau_1$  dominiert darüber hinaus die Grundzustandsrepopulation von  $C^H$ . Dies deutet auf eine mit dem ESPT konkurrierende innere Konversion des initial angeregten Zustandes  $C^{H*} \longrightarrow C^H$  in den Grundzustand hin. Fron et al. haben nach Anregung der  $C^H$ -Spezies eine Zeitkonstante von 1 ps beobachtet, die sie ebenfalls einem mit interner Konversion

(a) H<sub>2</sub>O-Puffer

Die grüne Linie zeigt das skalierte Spektrum aus 3.7a bei  $\Delta t = 193$  ps.

(b) D<sub>2</sub>O-Puffer

**Abb. 3.11:** Transiente Spektren des *cis*-Isomers von Padron0.9 bei pH 10 nach Anregung bei 387 nm bei verschiedenen Verzögerungszeiten.  $\circ$  : aufgenommenen Daten,  $/$  : Anpassung durch das kinetische Modell in Fig.3.13a.



**Abb. 3.12:** Amplitudenspektren der exponentiellen Anpassung der transienten Daten des *cis*-Isomers von Padron0.9 bei pH 10 nach Anregung bei 387 nm.

konkurrierenden ESPT zugeschrieben haben [65]. Auch für GFP wurde eine analoge Konkurrenzreaktion beobachtet [14].

Die Tatsache, dass das transiente  $C^H$ -Spektrum für  $\Delta t > 100$  ps weniger dem Spektrum der  $C^{-*}$ -Spezies als dem transienten  $C^-$ -Spektrum ähnelt, das sich aus dem Spektrum von  $C^{-*}$  und dem Grundzustandsbleichen von  $C^-$  zusammensetzt, deutet auf einen weiteren Protonentransfer im Grundzustand  $C^- \rightarrow C^H$  hin, der zu einem Bleichen der  $C^-$  Spezies führt. Emission in diesem Bereich kann wegen der gleichen Fluoreszenzspektren bei Anregung von  $C^H$  und  $C^-$  für späte Zeiten ausgeschlossen werden. Die Amplitudenspektren der der Spezies  $C^{-*}$  zugeordneten Lebensdauer  $\tau_3 = 1.16$  ns in Abb. 3.12a und Abb. 3.8a ähneln sich ebenfalls stark. Die jeweils negative Amplitude im Bereich der  $C^-$ -Absorption lässt auf eine Repopulation des Grundzustandes  $C^{-*} \rightarrow C^-$  mit  $k_C = \tau_3^{-1}$  schließen. Diese Überlegungen sind in dem kinetischen Modell in Abb. 3.13a zusammengefasst.

### 3.1.3.3 ESPT: deuterierte Pufferlösung

Um den postulierten initialen ESPT zu verifizieren, wurde die Messung noch einmal in deuterierter Pufferlösung wiederholt. Durch H/D-Austausch konnte eine Deuterierung des Proteinchromophors von  $> 98\%$  erreicht werden. Aufgrund des kinetischen H/D-Isotopeneffektes verlangsamten sich Protonentransferprozesse signifikant (siehe Abschnitt 1.4). Die transienten Spektren sind in Abb. 3.11b dargestellt. Der Vergleich mit den nicht deuterierten Spektren in Abb. 3.11a zeigt deutliche Unterschiede. Kurz nach

Anregung ist das Verhältnis des Signals des gebleichten Grundzustands bei 400 nm zu der Absorption des angeregten Zustands bei 445 nm in beiden Messungen beinahe identisch. In deuterierter Pufferlösung entwickelt sich in der Folge aber deutlich weniger stimulierte Emission.

Die spektrale Evolution wurde triexponentiell mit  $\tau_3 = 1.16$  ns, der Lebensdauer der  $C^-$ -Spezies, angepasst und ergab die Zeitkonstanten  $\tau_1 = (3.0 \pm 0.5)$  ps und  $\tau_2 = (15 \pm 5)$  ps. Die wellenlängenabhängigen Amplituden dieser Zeitkonstanten sind in Abb. 3.12b dargestellt. Auch hier dominiert die Zeitkonstante  $\tau_1$  das Anwachsen der stimulierten Emission und die Grundzustandsrepopulation. Allerdings ist  $\tau_1$  fast doppelt so groß wie in der undeutierten Messung und im Verhältnis stärker im Bereich der Repopulation des Grundzustandes vertreten. Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme einer Konkurrenzreaktion zwischen ESPT und IC bei der Depopulation von  $C^{H*}$ ; die Deuterierung des Chromophors verlangsamt den Protonen- (bzw. Deuteronen-)transfer, während die Geschwindigkeit der internen Konversion nicht beeinflusst wird. Entsprechend wird durch Deuterierung die Quantenausbeute der Fluoreszenz nach Anregung bei 400 nm verringert.

#### 3.1.3.4 Anpassung der Daten

Die transienten Spektren in wässriger und deuterierter Pufferlösung (Abb. 3.11a und b) wurden global mit dem kinetischen Modell in Abb. 3.13a angepasst. Dabei wurden die bereits in 3.1.1 und 3.1.2 bestimmten Spektren der Spezies  $C^H$ ,  $C^-$  und  $C^{-*}$  sowie die in 3.1.3.2 postulierten Zustände  $C^{H*}$  und  $C_i^{-*}$  verwendet. Zusätzlich wurde der Zustand I (siehe Abb. 3.13a) eingeführt. Spektren, Amplituden und Geschwindigkeitskonstanten, die keinen Protonentransfer beschreiben, wurden als nicht deuterierungsabhängig angesehen und für beide Messungen simultan angepasst. Ein Amplitudenfaktor in der Anpassung korrigierte die unterschiedlichen Konzentrationen der beiden Proteinlösungen. Der Faktor  $x = 0.75$  in Abb. 3.13a setzt mit dem vereinfachten Grundzustandsgleichgewicht  $C^H \rightleftharpoons C^-$  das korrekte Verhältnis zwischen protoniertem und deprotoniertem Chromophor bei pH 10, wobei  $k_g$  die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung beschreibt.

#### 3.1.3.5 Ergebnisse

Die resultierenden Geschwindigkeitskoeffizienten aus der Anpassung sind im Modell in Abb. 3.13a angegeben. Die Entwicklung der Konzentration

nen der einzelnen Spezies ist in Abb. 3.13b dargestellt, die Spektren der einzelnen Spezies schließlich sind in Abb. 3.13c zu sehen. Der KIE für den ESPT ist  $k_H/k_D = 4.5$ . Nach Anregung der  $C^H$ -Spezies erfolgt für 70 % der Moleküle in  $C^{H*}$  ein ESPT nach  $C_i^{-*}$  (deutert: 35 %). Insgesamt 36 % aller Moleküle enden im fluoreszierenden  $C^-$ -Zustand (deutert: 18 %), während 34 % im  $I$ -Zustand enden (deutert: 17 %). Von Brakemann et al. aufgenommene Fluoreszenzanregungsspektren zeigen bei pH 7 relative Fluoreszenzintensität von  $\frac{I_{FC^-}}{I_{FCH}} = 17\%$  [23]. Unter Berücksichtigung der Absorptionskoeffizienten und der relativen Konzentration der Spezies ergibt Gl.3.11 mit  $\frac{\epsilon_{C^H}}{\epsilon_{C^-}} = 0.4$  aus Abb. 3.4c und  $\frac{c_{C^H}}{c_{C^-}} = 1.54$  aus Abb. 3.4a die relative Fluoreszenzquantenausbeute  $\frac{\Phi_{C^-}}{\Phi_{C^H}} = 28\%$ , was im Hinblick auf die unterschiedlichen pH-Werte der Messungen und der Komplexität des Modells eine gute Übereinstimmung mit den aus dem Modell ermittelten 36 % ist.

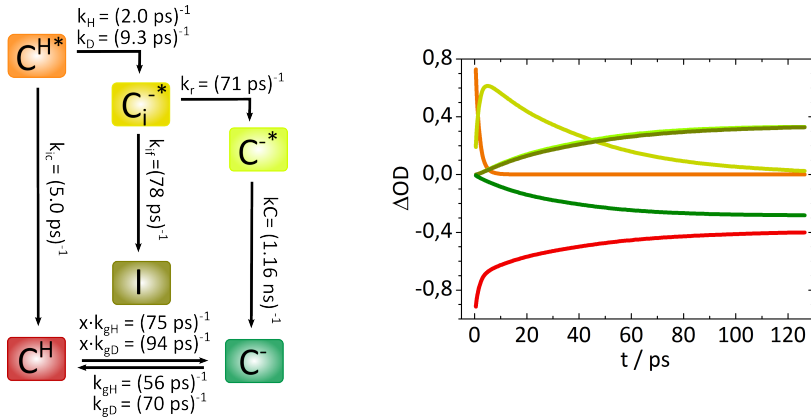
$$\frac{\Phi_{C^-}}{\Phi_{C^H}} = \frac{\frac{I_{FC^-}}{\epsilon_{C^-} c_{C^-}(pH7)}}{\frac{I_{FCH}}{\epsilon_{C^H} c_{C^H}(pH7)}} \quad (3.11)$$

Die Anregung der  $C^H$ -Spezies bei 387 nm führt bei Padron0.9 zu einer im Vergleich zur Bestrahlung mit 500 nm recht effizienten *cis*  $\rightarrow$  *trans*-Isomerisierung. Die Quantenausbeute dieses Schaltprozesses wurde mit  $\Phi_{cis \rightarrow trans}(387) = 0.02$  bestimmt. Innerhalb der betrachteten Zeitskala gibt es keine Hinweise auf die Bildung der  $T^-$ -Spezies nach Anregung von  $C^H$ . Da die Spektren von  $T^-$  und  $C^-$  sich ähneln und nur 2 % *trans*-Isomer als Ausbeute erwartet werden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob das Signal des *trans*-Isomers einfach überlagert wird oder tatsächlich noch keine Isomerisierung stattgefunden hat. Ist sie noch nicht erfolgt, sind nach dem verwendeten Modell die einzigen Zustände, aus denen  $T^-$  gebildet werden kann,  $C^{H*}$ ,  $C_i^{-*}$  und  $I$ ; für den angeregten Zustand  $C^{-*}$  ist keine so effiziente Isomerisierung bekannt.

### 3.1.4 Zustand $I$

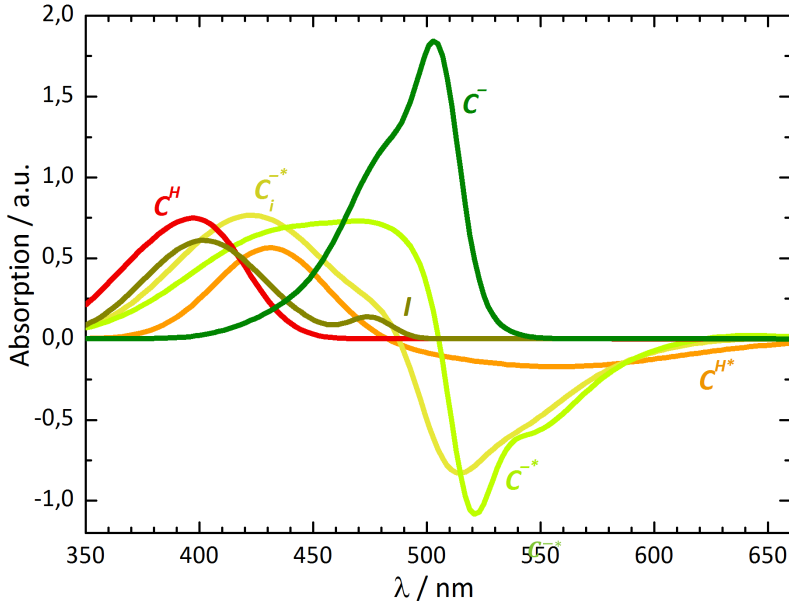
Zustand  $I$  wurde eingeführt, weil die transienten Spektren bei langen Verzögerungszeiten um 430 nm eine deutlich höhere transiente Absorption zeigten, als durch den bekannten, zu dieser Zeit hauptsächlich populierten, Zustand  $C^{-*}$  zu erklären gewesen wäre. Das aus der Anpassung erhaltene Absorptionsspektrum von  $I$  in Abb. 3.13c zeigt eine starke Absorptionsbande mit einem Maximum bei 402 nm sowie eine äußerst schwache Bande um





(a) Kinetisches Modell zur Anpassung der Daten in Fig.3.11

(b) Konzentrationsverlauf der Spezies aus a



(c) Spektren der Spezies aus a

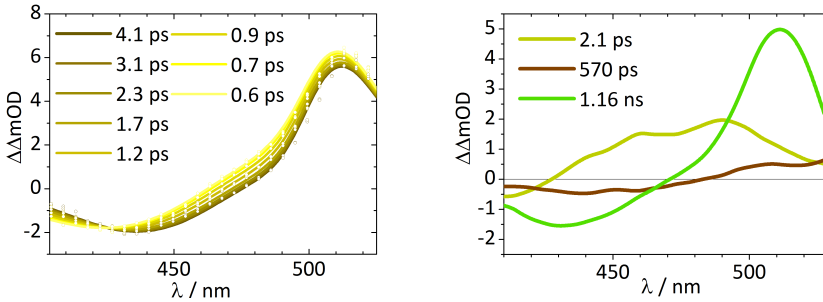
**Abb. 3.13:** Modell der photoinduzierten Dynamik von Padron0.9 nach Anregung der  $CH$ -Spezies durch  $\lambda_p = 387 \text{ nm}$ , zeitabhängige Konzentrationen der beteiligten Spezies und ihre Absorptionsspektren

475 nm und ähnelt so stark einem Grundzustandsspektrum mit größtenteils protoniertem Chromophor. Die Bevölkerung einer Spezies im Grundzustand deckt sich auch mit den Fluoreszenz-Hochkonversionsuntersuchungen von Fron et al., die nach dem ESPT keine anwachsende stimulierte Emission bei Entvölkerung von  $C_i^*$  zeigten [65]. Nach dem kinetischen Modell enden etwa 34 % der angeregten  $C^H$  Moleküle in dem Zustand  $I$ . Angesichts der niedrigen Quantenausbeute für den Schaltprozess von  $\Phi_{cis \rightarrow trans} = 0.02$  hat  $I$ , ebenso wie  $C_i^{-*}$ , vermutlich noch *cis*-Konformation. Ein protonierter Grundzustand kann nicht direkt durch IC aus der nach dem ESPT populierte deprotonieren Spezies  $C_i^{-*}$  gebildet werden, sondern bedarf eines Protonierungsschrittes  $C_i^- \rightarrow I$ . Für GFP wurde von Kennis et al. nach Anregung der *A*-Bande ( $C^H$ ) und erfolgtem ESPT ein intermediärer Grundzustand beschrieben, dessen Spektrum dem der deprotonierten *B*-Spezies ( $C^-$ ) ähnelte (siehe Abb. 1.6b), innerhalb von Pikosekunden relaxierte und dann mit einer Lebensdauer von 400 ps protoniert wurde [17]. Da  $I$  für Padron0.9 mit gutem Ergebnis als direktes Reaktionsprodukt von  $C_i^{-*}$  beschrieben werden kann, muss ein solcher Protonierungsschritt deutlich schneller als der Übergang von  $C_i^{-*}$  nach  $C_i^-$  sein.

Um den vermuteten elektronischen Grundzustand  $C_i^-$  der angeregten Spezies  $C_i^{-*}$  zu untersuchen, wurde eine Pump-Dump-Probe-Messung durchgeführt. Angeregt wurde bei  $\lambda_p = 387$  nm, mit 40 ps Verzögerung erfolgte die Einstrahlung eines Dumpulses bei  $\lambda_d = 560$  nm mit hoher Intensität ( $I_d \approx 4 I_p$ ), um die Population des angeregten Zustands  $C_i^{-*}$  mittels stimulierter Emission möglichst effektiv in den Grundzustand zu überführen. Anschließend wurde mit variabler Verzögerung das transiente Spektrum mit dem Weißlicht-Probespektrum aufgenommen (siehe Abschnitt 2.2.2). Die Verzögerung von 40 ps nach Anregung ist ein Kompromiss;  $C^H$  sollte vollständig depopuliert, das Protonierungsgleichgewicht  $C^H \rightleftharpoons C^-$  im Grundzustand weitestgehend eingestellt aber  $C_i^{-*}$  immer noch ausreichend bevölkert sein. Dem kinetischen Modell nach verteilen sich die Konzentrationen der vorliegenden Spezies nach 40 ps wie folgt:  $c_{C^H}(40 \text{ ps}) = 0$ ,  $c_{C_i^{-*}}(40 \text{ ps}) = 0.25$ ,  $c_{C^-}(40 \text{ ps}) = 0.24$ ,  $c_{C^H}(40 \text{ ps}) = -0.49$ ,  $c_I(40 \text{ ps}) = 0.22$  und  $c_{C^-}(40 \text{ ps}) = -0.21$ . Abb. 3.14a zeigt die gemessenen transienten Pump-Dump-Probe-Spektren als offene Kreise.

### 3.1.4.1 Transiente Pump-Dump-Probe-Spektren

Die Daten wurden triexponentiell mit  $\tau_1 = (2.1 \pm 0.2)$  ps,  $\tau_2 = (570 \pm 200)$  ps und  $\tau_3 = 1.16$  ns angepasst, wobei die letzte Zeitkonstante als Le-



(a) transiente Spektren, Dumppulse bei  $t = 0$  ps,  $\circ$  : aufgenommene Daten,  $/$  : Anpassung durch das kinetische Modell in Fig.3.15a

(b) Amplitudenspektrum der triexponentiellen Anpassung von a

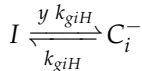
**Abb. 3.14:** Pump-Dump-Probe-Spektroskopie an Padron0.9 mit  $\lambda_p = 387$  nm und  $\lambda_d = 560$  nm,  $\Delta t_d = 40$  ps

bensdauer des angeregten Zustandes  $C^{-*}$  festgesetzt wurde. Die wellenlängenabhängigen Amplituden der einzelnen Zeitkonstanten sind in Abb. 3.14b dargestellt. Das transiente Spektrum wird von  $\tau_3$  dominiert. Das Amplitudenspektrum zeigt eine breite negative Komponente von 410 bis 470 nm mit einem Minimum bei 430 nm und eine positive Komponente für  $\lambda > 470$  nm. Das Spektrum der Zeitkonstanten  $\tau_3$  ist eine Superposition aller langlebigen, durch den Dumppulse veränderten, Zustände. Durch Einstrahlung bei 560 nm sollen die Zustände  $C_i^{-*}$  und  $C^{-*}$  in ihre korrespondierenden Grundzustände  $C_i^-$  und  $C^-$  überführt werden, wobei für  $C_i^-$  ein schneller GSPT vermutet und für  $C^-$  ein langsames Protonierungsgleichgewicht mit  $C^H$  postuliert wurde. Die 570 ps Komponente hat eine vergleichsweise geringe Amplitude. Sie hat einen negativen Beitrag für  $\lambda < 480$  nm und ist für größere Wellenlängen positiv. Eine entsprechende Zeitkonstante wurde in den bisherigen Messungen nicht beobachtet. Da sich das Spektrum über den gesamten gemessenen Wellenlängenbereich inklusive der Emission erstreckt, kann es sich hier um einen Relaxationsprozess im angeregten Zustand handeln. Fron et al. berichteten von einer schwachen 500 ps Komponente der Fluoreszenzlebensdauer [65], die hier bisher nicht bestätigt werden konnte (siehe Abschn. 3.1.2.1). Die schnelle Zeitkonstante  $\tau_1$  zeigt ein breites, im Bereich von 430 - 530 nm positives Spektrum mit einem Maximum bei 490 nm und einer Schulter bei 460 nm. Für  $\lambda < 430$  nm ist der Beitrag negativ, das Minimum ist bis 410 nm noch nicht erreicht. Da der GSPT für  $C^H \rightleftharpoons C^-$  deutlich langsamer ist, kann diese schnelle Komponente entweder ein GSPT

bzw. die Einstellung eines Protonierungsgleichgewichtes  $I \rightleftharpoons C_i^-$ , oder eine schnelle Relaxation einer der Grundzustandspezies sein. Der negative Beitrag im Amplitudenspektrum von  $\tau_1$  im Bereich um 400 nm, also dort, wo  $I$  absorbiert, deutet stark auf den GSPT zu  $I$  hin. Die Relaxation einer deprotonierten Spezies im Grundzustand sollte das Spektrum in diesem Bereich nicht verändern.

### 3.1.4.2 Anpassung der Daten

Das Aufstellen eines kinetischen Modells für ein Pump-Dump-Probe-Experiment ist deutlich komplexer als für ein vergleichbares Pump-Probe-Experiment. Deshalb werden nur die ersten 4 ps ( $2 \tau_1$ ) betrachtet und die langsameren Prozesse, wie die Entvölkerung von  $C_i^{-*}$  ( $\tau_{C_i^{-*}} = (k_r + k_{if})^{-1} = 37$  ps) und  $C^{-*}$  ( $\tau_{C_i^-} = (k_C)^{-1} = 1.16$  ns) sowie die Einstellung des Grundzustandsgleichgewichtes ( $\tau_{CH \rightleftharpoons C^-} = (xk_{gH} + k_{gH})^{-1} = 32$  ps) nicht berücksichtigt. Für die schnelle Komponente wurde ein Protonierungsgleichgewicht

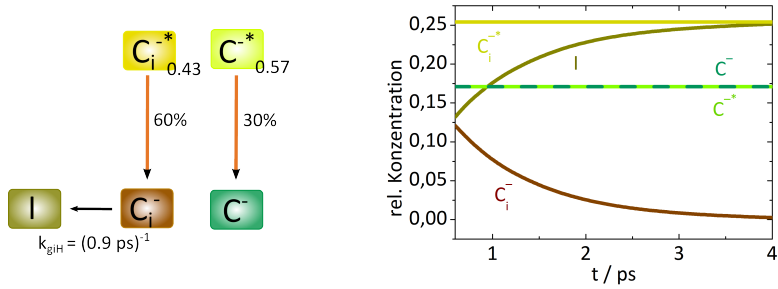


angenommen. Die Anpassung ergab ein extrem zur protonierten Seite verschobenes Gleichgewicht mit  $y \approx 0$ .

Mit diesen Annahmen ergibt sich das kinetische Modell in Abb. 3.15a, mit dem die Daten in Abb. 3.14a angepasst wurden. Die bekannten Spektren und Amplitudenverhältnisse von  $C_i^{-*}$ ,  $C^{-*}$ ,  $C^-$  und  $I$  wurden verwendet. Der Konzentrationsverlauf von  $I$  und  $C_i^-$  sowie die Spektren, insbesondere das angepasste Spektrum von  $C_i^-$ , ist in Abb. 3.15b und c dargestellt, wobei  $C^{-*}$  und  $C_i^{-*}$  negative Vorzeichen haben.

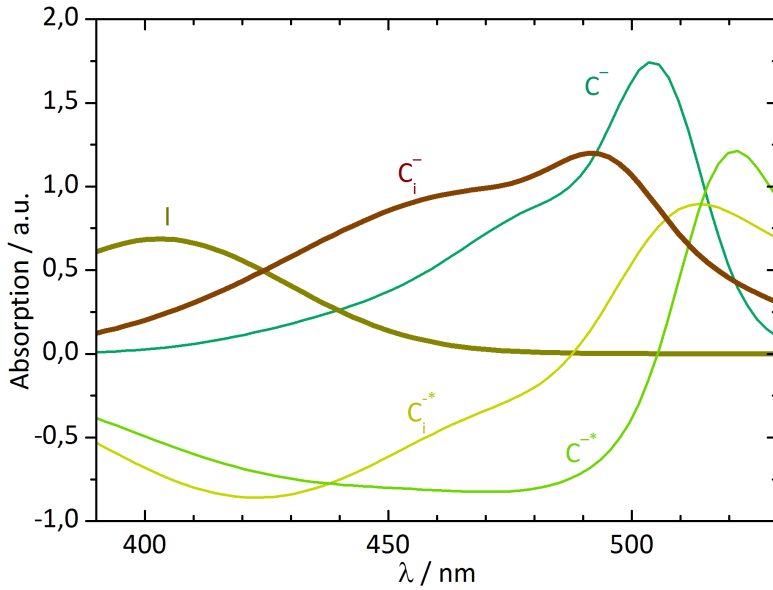
### 3.1.5 Angeregte Zustände von $C^{H+}$ und $T^{H+}$ bei niedrigem pH-Wert

Die transiente Dynamik der Zustände  $C^{H+}$  und  $T^{H+}$  wurden mittels Pump-Probe-Spektroskopie durch Anregung bei  $\lambda_p = 387$  nm bei pH 4 untersucht. Nach Abb. 3.4a und b liegt für das *cis*-Isomer bei pH 4 eine Mischung von 80 %  $C^H X^H Y^H$ , 15 %  $C^H X^H Y^-$  und 5 %  $C^H X^- Y^H$  vor, während das *trans*-Isomer in der protonierten Form ausschließlich als  $T^H X^H Y^H$  vorliegt. Beide Messungen wurden direkt nacheinander mit der gleichen Proteinlösung



(a) Kinetisches Modell zur Anpassung der Daten in Fig.3.14a

(b) Konzentrationsverlauf der Spezies aus a



(c) Spektren der Spezies aus a

**Abb. 3.15:** Modell der photoinduzierten Dynamik von Padron0.9 nach Anregung der C<sup>H</sup>-Spezies durch  $\lambda_p = 387 \text{ nm}$  und Dumpen durch  $\lambda_d = 560 \text{ nm}$  40 ps nach Anregung, zeitabhängige Konzentrationen der beteiligten Spezies und ihre Absorptionsspektren

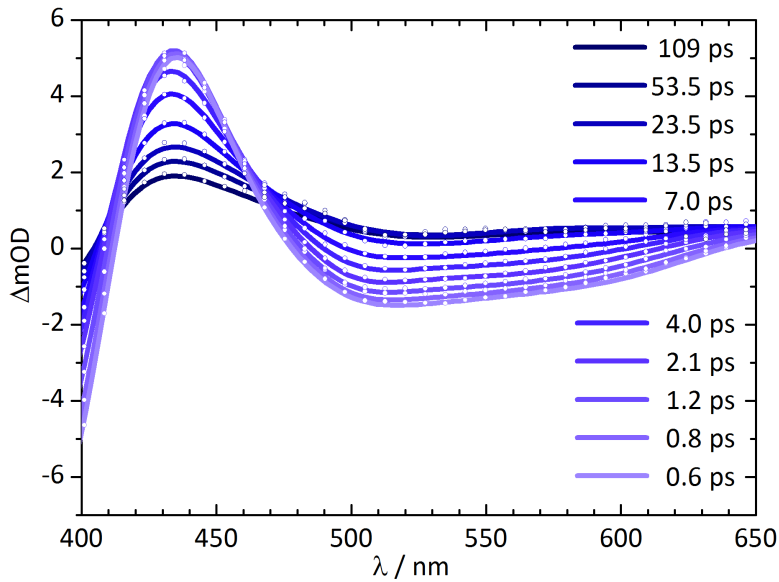
und ohne Variation der experimentellen Parameter durchgeführt. Zwischen den Messungen wurde die LED-Bestrahlung von 490 nach 400 nm geändert.

### 3.1.5.1 Transiente Spektren & Ergebnis

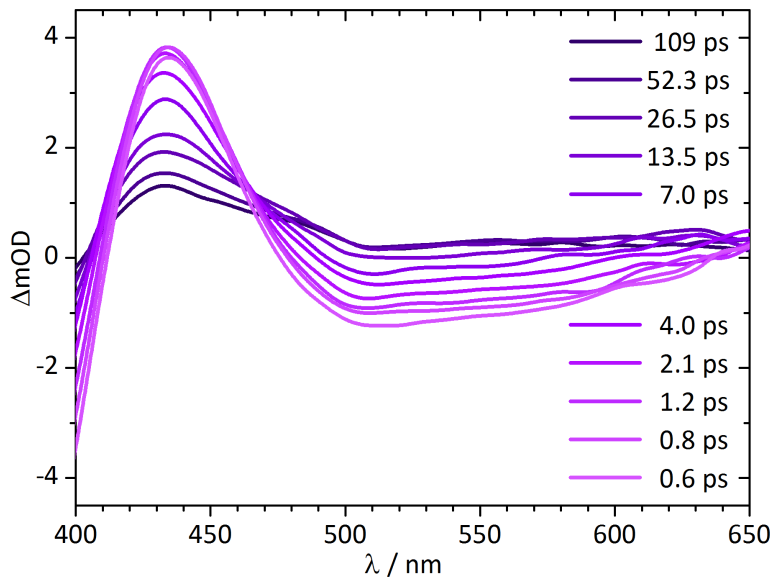
Die aufgenommenen transienten Spektren von  $C^{H+}$  und  $T^{H+}$  bei pH 4 und 387 nm Anregungswellenlänge sind in Abb. 3.16a und b gezeigt. Die Ähnlichkeit beider Spektren ist bemerkenswert, wobei das Signal des *cis*-Isomers um den Faktor 1.3 intensiver ist. Die frühen Spektren 0.6 ps nach Anregung zeigen ein ausgeprägtes Grundzustandsbleichen im Bereich der  $C^H X^H Y^H$ - bzw.  $T^H X^H Y^H$ -Absorption, überlagert mit Absorption des angeregten Zustands mit einem Maximum bei 430 nm. Das breite negative Signal für Wellenlängen  $\lambda > 480$  nm kann stimulierter Emission des angeregten Zustands zugeordnet werden und fällt innerhalb weniger Pikosekunden ab. Für Verzögerungszeiten  $\Delta t > 7$  ps zeigt das gesamte transiente Spektrum  $\Delta OD > 0$ , abgesehen vom gebleichten Grundzustand, der auch nach 109 ps noch nicht vollständig repopuliert ist.

Die zeitliche Entwicklung der beiden Spektren kann für jede Wellenlänge mit einem triexponentiellen Abfall mit den Zeitkonstanten  $\tau_1 = (0.9 \pm 0.1)$  ps,  $\tau_2 = (8.7 \pm 1.5)$  ps und  $\tau_3 = (240 \pm 50)$  ps angepasst werden. Die wellenlängenabhängigen Amplituden dieser Anpassung sind in Abb. 3.17a und 3.17b gezeigt. Bemerkenswert ist, dass es im Vergleich zu den transienten Spektren der  $C^H$ -Spezies bei pH 7 oder 10 keinen ESPT zu geben scheint. Während die Spektren zu frühen Zeiten der  $C^{H*}$ -Spezies aus Abb. 3.13c ähneln, entwickelt sich hier kein definiertes Emissionsspektrum. Die anfängliche, breite Emission verschwindet und geht in einen oder mehrere Zustände mit sehr breiter Absorption über. Das gesamte Spektrum entwickelt sich triexponentiell, auch der Grundzustand wird mit drei Zeitkonstanten repopuliert, was zusammen mit der relativ geringen spektralen Änderung auf eine Abfolge von Umorganisationen der Chromophorumgebung hindeutet, die letztlich wieder zum Ausgangszustand führt. Während bei  $C^{H+}$  eine Mischung verschiedener Zustände vorliegt, gibt es bei den herrschenden Bedingungen nur eine *trans*-Spezies. Die Interpretation der gemessenen Spektren als Summe der Beiträge von Spezies mit unterschiedlichen Umgebungen nach Abb. 3.3 scheidet demnach aufgrund der starken Ähnlichkeit der transienten Spektren der *cis*- und *trans*-Spezies aus.

Winkler et al. [14] berichteten nach Anregung der A-Bande von GFP mit UV-Licht von einem schnellen, multiexponentiellen Abfall, aber auch einer langlebigen Komponente mit einer Lebensdauer um 200 ps. Sie postulierten



(a) *cis*-Isomer.  $\circ$  : aufgenommene Daten,  $/$  : Anpassung durch das kinetische Modell in Fig.3.18a



(b) *trans*-Isomer, aufgenommene Daten

**Abb. 3.16:** Transiente Spektren von Padron0.9 bei pH 4 nach Anregung bei 387 nm bei verschiedenen Verzögerungszeiten

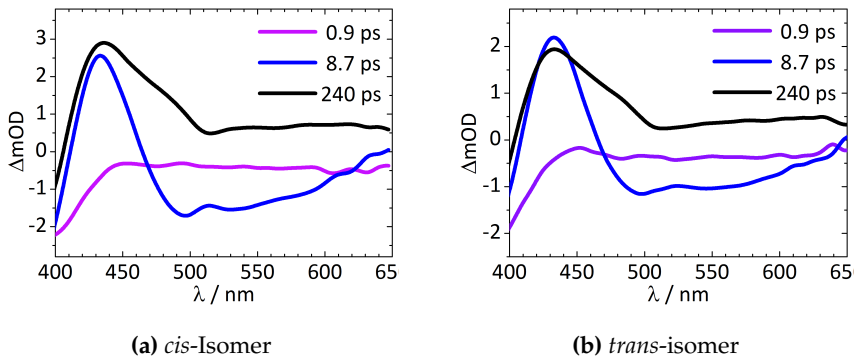
einen ESPT über eine Barriere in Konkurrenz mit IC aus einem schwingungsheißen angeregten Zustand. Nach Abkühlen sollte die Barriere für den ESPT zu hoch sein und der kalte angeregte Zustand langsam via IC in den Grundzustand übergehen. Ein ähnliches Modell eines schwingungsheißen Zustandes  $C^{H+*}$ , der allerdings nie die Barriere für einen ESPT überwindet, abkühlt und in einem langlebigen angeregten Zustand verbleibt, könnte die hier gezeigten Spezies ebenso erklären wie ein Modell mehrerer konsekutiver angeregter Spezies. Auf eine entsprechende Modellierung wurde hier jedoch verzichtet, da es keine weiteren Hinweise gibt, das Modell sehr komplex und eine Anpassung vermutlich nicht belastbar wäre.

Für das isolierte GFP-Chromophor *p*-HBDI (siehe Abschnitt 1.2) postulierten Vengris et al. die Bildung eines langlebigen Radikals und solvatisierten Elektrons durch Zweiphotonen-Absorption mit ähnlichen spektralen Eigenschaften [34]; einer zum GSB rotverschobenen Absorptionsbande, die sie dem Radikal zuordneten, sowie einer breiten Absorptionsbande des Elektrons im Bereich von 650 nm. Die im betrachteten Zeitfenster von 100 ps nicht abklingende, schmale Absorptionsbande bei 430 nm, sowie die breite Absorptionsbande auf dem gesamten Wellenlängenbereich  $\lambda > 500$  nm, die bis 650 nm ansteigt, können also zu einem Radikal und einem freien Elektron gehören. Das gesamte Spektrum wäre dann eine Überlagerung der Anregungsprodukte von Ein- und Zweiphotonenabsorption.

Die Ähnlichkeit der hier gezeigten Spektren für späte Zeiten und den Befunden von Vengris et al. ist groß, so dass eine Anpassung der Daten an ein entsprechendes Modell versucht wurde. Wird durch einen Zweiphotonen-Prozess ein Radikal und ein freies Elektron erzeugt, können sie entweder mit  $k_{rek}$  rekombinieren oder das Elektron diffundiert mit  $k_{diff}$  vom Radikal weg. Der Kehrwert der Summe der Geschwindigkeiten wird der langen Lebensdauer  $\tau_3 = (k_{diff} + k_{rek})^{-1}$  zugeordnet. Die schnelle Zeitkonstante  $\tau_1$  wird die Depopulation der initial angeregten Spezies  $C^{H+*}$  durch innere Konversion nach  $C^{H+}$  mit  $k_{ic}$  und einer Relaxation im angeregten Zustand mit  $k_r$  nach  $C_r^{H+*}$  beschreiben,  $\tau_2$  schließlich wird dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt  $k_{ic2} = \tau_2^{-1}$  der Depopulation von  $C_r^{H+*}$  und Repopulation von  $C^{H+}$  zugeordnet. Das entsprechende kinetische Modell mit den ermittelten Geschwindigkeitskonstanten ist in Abb. 3.18a dargestellt. Der zeitliche Verlauf der Konzentration der beteiligten Spezies, sowie ihre Spektren sind in Abb. 3.18b und 3.18c abgebildet. Die Anpassung der Daten für Abb. 3.16a sind dort als durchgezogene Linien enthalten.

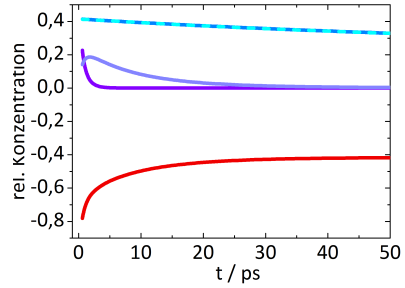
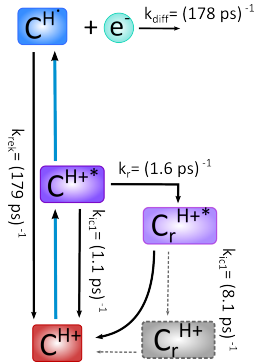
Unabhängig vom gewählten Modell lassen die starke Ähnlichkeit der transienten Spektren und auch die spektrale Ähnlichkeit der Grundzustände  $C^{H+}$





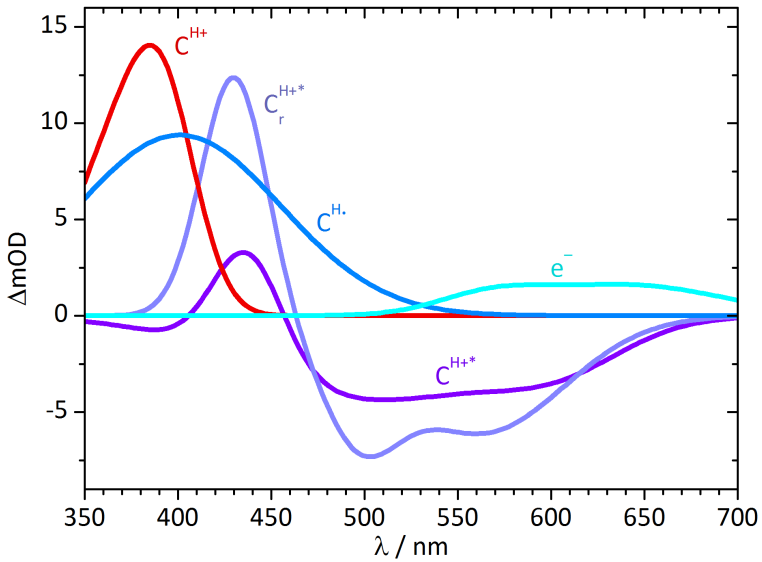
**Abb. 3.17:** Amplitudenspektren der exponentiellen Anpassung der transienten Daten von Padron0.9 bei pH 4 nach Anregung bei 387 nm.

und  $T^{H^+}$  (siehe Abb. 3.4c und d) vermuten, dass sich die Strukturen des *cis*- und *trans*-Chromophors bei niedrigen pH-Werten annähern. Allerdings bleiben geringe spektrale Unterschiede, namentlich die unterschiedlichen Amplituden sowohl der Grundzustand- als auch der transienten Spektren, sowie die in Abb. 3.2 gezeigte Tatsache, dass sich die beiden Isomere durch Absenken und erneutes anheben des pH-Wertes nicht ineinander überführen lassen. Dies belegt eindeutig, dass es sich bei  $C^{H^+}$  und  $T^{H^+}$  um verschiedene Spezies handelt.



(a) Kinetisches Modell zur Anpassung der Daten in Fig.3.16

(b) Konzentrationsverlauf der Spezies aus a



(c) Spektren der Spezies aus a

**Abb. 3.18:** Modell der photoinduzierten Dynamik von Padron0.9 nach Anregung der  $C^H+$ -Spezies durch  $\lambda_p = 387 \text{ nm}$ , zeitabhängige Konzentrationen der beteiligten Spezies und ihre Absorptionsspektren

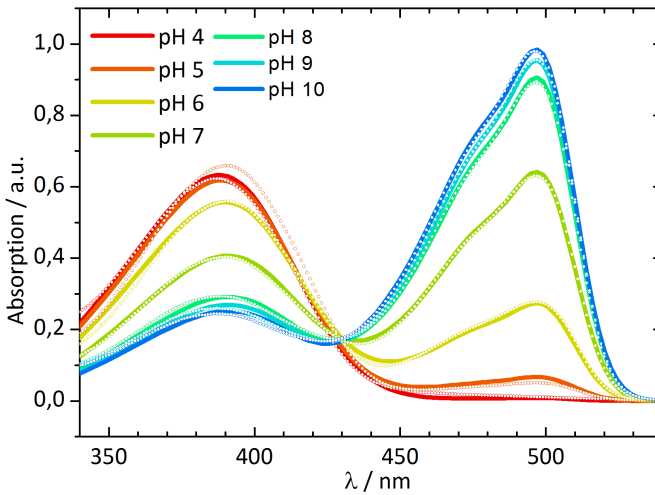
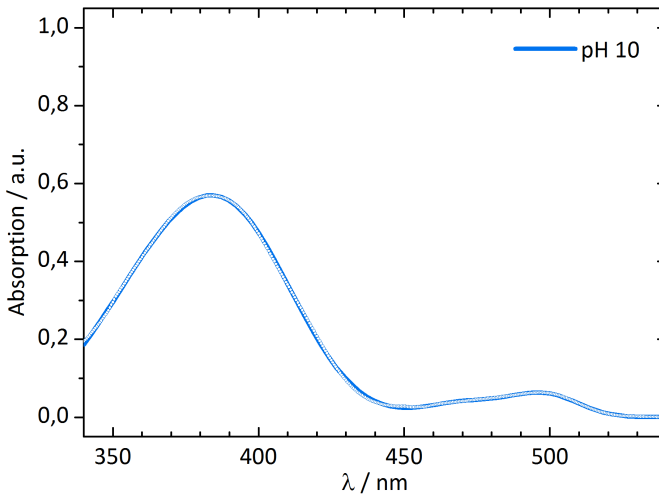
## 3.2 rsFastLime

### 3.2.1 Grundzustände

Das Chromophor von rsFastlime ist identisch mit dem von Padron0.9 und kann entsprechend *cis*- und *trans*-Konfiguration annehmen, wobei hier das *cis*-Isomer die stabilere Konfiguration darstellt und das *trans*-Isomer innerhalb von Minuten in die *cis*-Form isomerisiert. Analog zu Padron0.9 sind die Absorptionsspektren, dargestellt in Abb. 3.19, stark pH-abhängig und zeigen die typischen Banden des protonierten ( $C^H$ ) und deprotonierten ( $C^-$ ) Chromophors, deren Maxima für das *cis*-Isomer bei 391 und 496 nm liegen. Das Maximum des protonierten *trans*-Isomer liegt bei 384 nm. Ob die in Abb. 3.19b gezeigte Absorption mit dem Maximum bei 496 nm tatsächlich vom *trans*- oder von verbleibendem *cis*-Isomer stammt, ist unklar. Die pH-abhängigen Absorptionsspektren des *cis*-Isomers zeigen im Bereich von pH 5-10 ein Protonierungsgleichgewicht zwischen  $C^H$  und  $C^-$  mit einem isobestischen Punkt bei 430 nm. Wie bei Padron0.9 bleibt die  $C^H$ -Bande auch bei hohen pH-Werten bestehen und das Absorptionsmaximum verschiebt bei  $\text{pH} < 5$  blau.

Für das *trans*-Isomer wurde nur ein Absorptionsspektrum bei pH 10 (siehe Abb. 3.19b) aufgenommen, da die Messung aufgrund der schnellen Rückisomerisierung schwierig ist und weitere Spektren für die folgende Auswertung nicht relevant sind. Selbst bei pH 10 existiert vornehmlich die protonierte Spezies  $T^H$ .

Die pH-abhängigen Absorptionsspektren des *cis*-Isomers in Abb. 3.19a wurden analog zu Padron0.9 mit zwei protonierenden Gruppen X und Y in unmittelbarer Chromophorumgebung angepasst. Das Modell mit den ermittelten Gleichgewichtskonstanten ist in Abb. 3.20 dargestellt. Spezies mit gleichen Spektren sind mit der gleichen Farbe unterlegt. Die Spektren der einzelnen Spezies wurden mit einer Summe von Gauß-Funktionen angepasst und sind in Abb. 3.21b dargestellt, die relativen Konzentrationen der Spezies sind in Abb. 3.21a pH-abhängig aufgetragen. Die modellierten pH-abhängigen Absorptionsspektren sind als durchgezogene Linien in Abb. 3.19a gezeigt. Das *trans*-Absorptionsspektrum wurde mit einer Summe von Gauß-Funktionen angepasst (Abb. 3.19b, durchgezogene Linie). Mit den Annahmen, dass die Isomerisierung vollständig war und die Absorptionsbande bei 496 nm tatsächlich der  $T^-$ -Spezies zuzuordnen ist und dass die Verhältnisse der Absorptionsmaxima von protonierter und unprotonierter Spezies bei beiden Isomeren gleich sind (Gl. 3.12), wurde das Spektrum der

(a) *cis*-Isomer(b) *trans*-Isomer

**Abb. 3.19:** pH-abhängige Absorptionsspektren von rsFastlime. Gemessene Spektren sind als offene Kreise dargestellt, die durchgezogenen Linien sind Anpassungen der gemessenen Spektren nach dem Modell 3.9a. Die Spektren sind auf einen Absorptionsspeak der Proteinumgebung bei 290 nm normiert.

$T^H$ -Spezies errechnet, es wird in Abb.3.21c gezeigt.

$$\frac{\epsilon_{max}(T^-)}{\epsilon_{max}(C^-)} = \frac{\epsilon_{max}(T^H)}{\epsilon_{max}(C^H)} \quad (3.12)$$

Bei pH 10 liegt *trans*-rsFastlime demnach immer noch zu 95% in der protonierten Form vor.

## 3.2.2 Angeregter Zustand von $C^-$

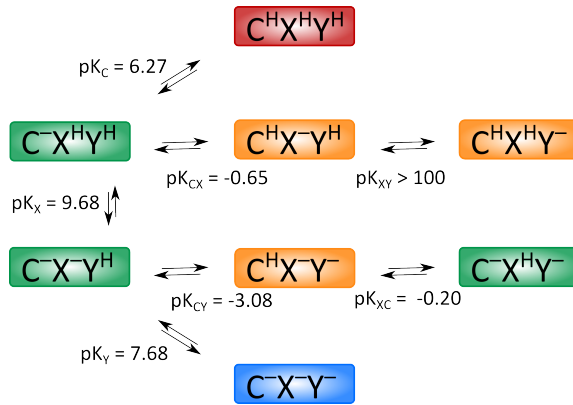
### 3.2.2.1 Fluoreszenz und stimulierte Emission

Im Gegensatz zu Padron0.9 emittiert rsFastlime nahezu ausschließlich nach Anregung der deprotonierten *cis*-Spezies  $C^-$ . Das Fluoreszenzspektrum bei pH 7 und Anregung bei 500 nm ist in Abb. 3.22 als blaue Kreise dargestellt und kann durch die Summe dreier Gaußkurven beschrieben werden (blaue Linie). Aus dem Fluoreszenzspektrum wurde nach Gl. 3.2 das stimulierte Emissionsspektrum berechnet. Es ist in Abb. 3.22 als rote Kreise dargestellt und wurde ebenfalls mit drei Gaußkurven angepasst (rote Linie). Das resultierende Emissionsspektrum der deprotonierten *cis*-Spezies ist in Tab.A.6 beschrieben und wird im Weiteren  $C_{em}^{-*}$  genannt.

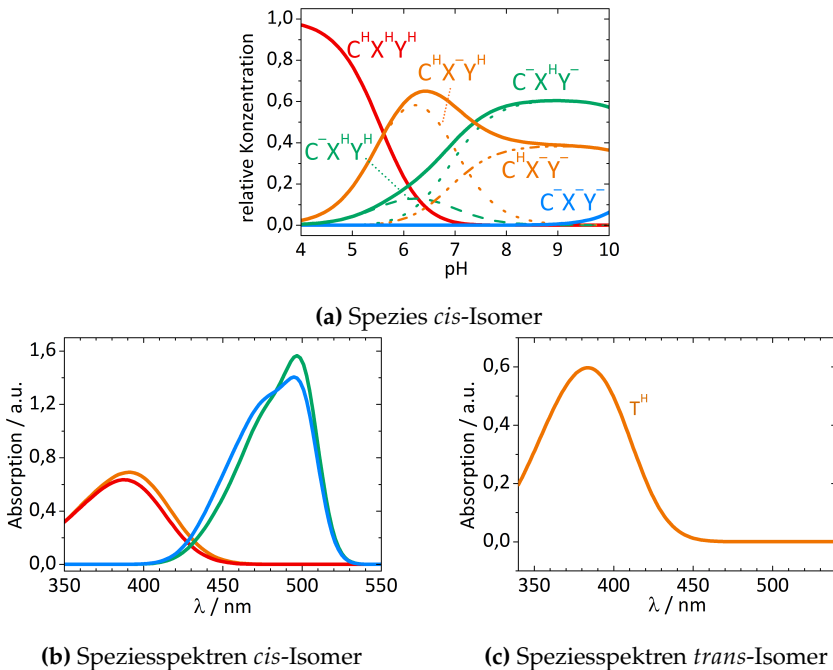
### 3.2.2.2 Transiente Spektren

Die transiente Dynamik des Zustands  $C^-$  wurde mittels Pump-Probe-Spektroskopie bei pH 7 untersucht. Nach Abb. 3.21b und 3.21c werden bei der gewählten Anregungswellenlänge von  $\lambda_p = 500$  nm ausschließlich deprotonierte Spezies angeregt. Nach Abb. 3.21a handelt es sich bei dem *cis*-Isomer um eine Mischung von 80 %  $C^- X^H Y^-$  und 20 %  $C^- X^H Y^H$ . Das Absorptionsspektrum des *trans*-Isomers in Abb. 3.19b zeigt selbst bei hohem pH-Wert nur eine geringe Absorption im Bereich um 500 nm. Ob es sich dabei tatsächlich um  $T^-$  oder Reste von  $C^-$  im dynamischen Gleichgewicht handelt, ist unklar.

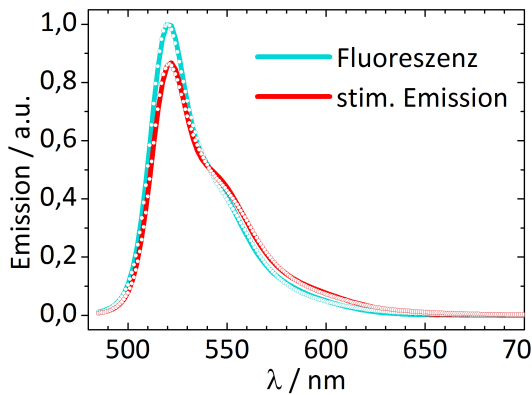
Die transienten Spektren für  $C^-$  und  $T^-$  zu verschiedenen Verzögerungszeiten bei pH 7 und  $\lambda_p = 500$  nm sind in Abb. 3.23a und b als offene Kreise dargestellt. Die beiden Messungen erfolgten direkt hintereinander ohne Änderung der experimentellen Parameter mit derselben Proteinlösung. Zur Überführung in das jeweils erwünschte Isomer wurde die Lösung vor und während der ersten Messungen mit einer LED bei 400 nm und vor und



**Abb. 3.20:** Modell der Protonierung des Chromophors C von rsFastlime mit zwei protonierenden Gruppen X und Y in unmittelbarer Umgebung. Spezies mit identischen Absorptionsspektren sind mit der gleichen Farbe unterlegt. Die pK-Werte aus der Anpassung der Absorptionsspektren für das *cis*-Isomer sind angegeben.



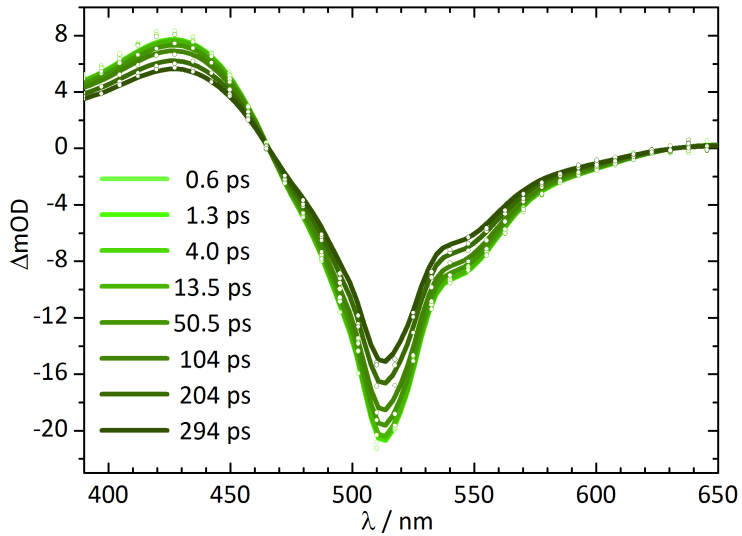
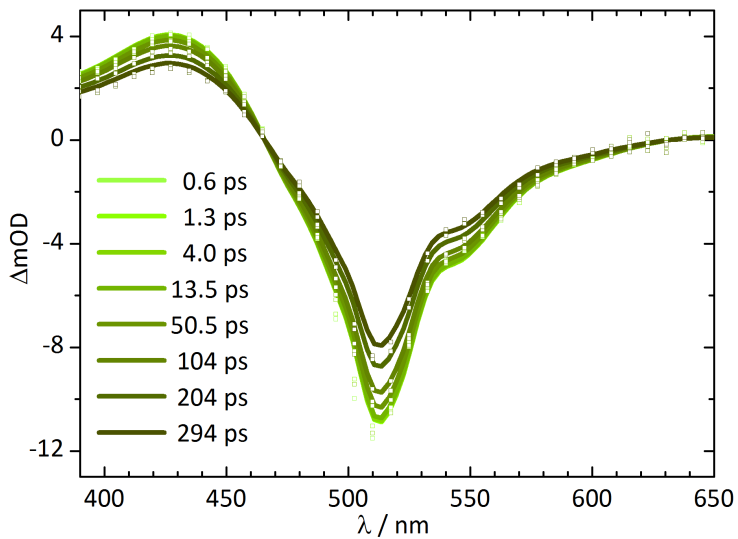
**Abb. 3.21:** Modell des Protonierungsgleichgewichtes von rsFastlime, pH-abhängige Konzentrationen und ihre Absorptionsspektren



**Abb. 3.22:** Fluoreszenz- und stimuliertes Emissionsspektrum nach Gl. 3.2,  $\lambda_p = 500$  nm, pH 7

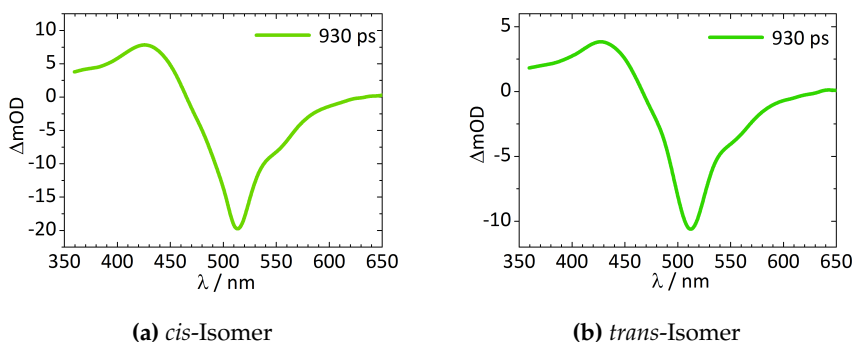
während der zweiten Messung bei 495 nm bestrahlt. Die Spektren sind also bezüglich Pumpintensität, Konzentration und Überlapp direkt vergleichbar (siehe 2.3).

Es fällt auf, dass beide Messungen nahezu identische Signale zeigen, die zweite Messung in Abb. 3.23a gegenüber der ersten in Abb. 3.23b aber etwa 45 % an Intensität eingebüßt hat. Die Spektren zeigen transiente Absorption im Bereich 390 - 460 nm, überlagert von einem gebleichten Grundzustand im Bereich der  $C^-$ -Absorption und einer ausgeprägten stimulierten Emission im Bereich 520 - 630 nm mit deutlicher Schulter bei 550 nm. Die Signale beider Messungen fallen monoexponentiell mit  $\tau = (0.9 \pm 0.1)$  ns ab, die wellenlängenabhängigen Amplituden der exponentiellen Anpassung sind in Abb. 3.24a und b gezeigt. Die praktisch identischen Spektren und der Abfall der Intensität durch Bestrahlung bei 495 nm zeigen, dass beide aufgenommenen Datensätze der  $C^-$ -Spezies zugeordnet werden müssen. Es ist mit dem verwendeten Aufbau nicht gelungen, das *cis*-Isomer vollständig in die instabile *trans*-Form zu überführen. Die Daten legen vielmehr eine Umwandlung von 45 % nahe. Die 45 % Protein in *trans*-Konformation liegen hauptsächlich protoniert vor und tragen offenbar nicht zum Signal bei. Die gemessene Zeitkonstante für den monoexponentiellen Abfall der Spektrenintensität kann somit direkt dem angeregten Zustand  $C^{*-}$  zugeordnet werden, der mit  $k_C = \tau^{-1}$  in den Grundzustand  $C^-$  zurückfällt.

(a) *cis*-Isomer rsFastlime(b) *trans*-Isomer rsFastlime

**Abb. 3.23:** Transiente Spektren von rsFastlime bei pH 7 nach Anregung bei 505 nm bei verschiedenen Verzögerungszeiten.  $\circ$  : aufgenommene Daten,  $/$  : Anpassung durch 2-Zustandsmodell.





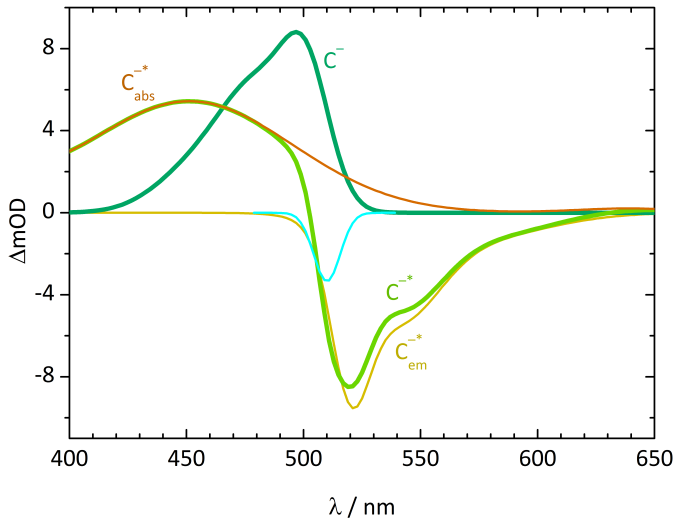
**Abb. 3.24:** Amplitudenspektren der exponentiellen Anpassung der transienten Daten von rsFastlime bei pH 7 nach Anregung bei 505 nm.

### 3.2.2.3 Anpassung der Daten

Die transienten Daten in Abb. 3.23a und b wurden simultan global mit einem einfachen kinetischen Modell mit zwei Zuständen,  $C^{-*}$  und  $C^{-}$ , und der Übergangsrate  $k_C$  angepasst. Für die Daten der partiell zum *trans*-Isomer überführten Lösung in Abb. 3.23b wurde ein Konzentrationsfaktor verwendet, der den Anteil des *cis*-Isomers und somit die Schalteffizienz in der Lösung angibt. Zur Beschreibung der Zustände wurde das aus Abb. 3.21b bekannte Spektrum der Grundzustandsspezies  $C^{-}$  verwendet.  $C^{-*}$  wurde als Überlagerung je dreier gaussförmiger Absorptionsbanden und des bekannten stimulierten Emissionsspektrums  $C_{em}^{-*}$  angepasst. Zusätzlich wurde im Überlappbereich des Absorptions- und Emissionsspektrums eine weitere Bande angepasst, die die Emission um Reabsorption des emittierten Lichtes durch Grundzustandsmoleküle bei der Messung des Fluoreszenzspektrums korrigiert.

### 3.2.2.4 Ergebnisse

Der aus der Anpassung der Daten von Abb. 3.23a mit einem Modell aus zwei Zuständen resultierende Geschwindigkeitskoeffizient ist  $k_C = (0.9 \text{ ns})^{-1}$ . Die Spektren der einzelnen Spezies, einschließlich der Korrekturbande zur Reabsorption (hellblau), sind in Abb. 3.25 zu sehen. Mit der Annahme, dass die Proteinlösung in Abb. 3.23a vollständig aus *cis*-Isomeren bestand, wurde der Anteil des *cis*-Isomers nach LED-Bestrahlung bei 490 nm auf 47 % bestimmt; 53 % der Chromophore konnten in die *trans*-Form überführt werden. Abb.



**Abb. 3.25:** Spektren der an der photoinduzierten Dynamik von rsFastlime nach Anregung der  $C^-$ -Spezies bei  $\lambda_p = 505$  nm beteiligten Spezies

3.23b zeigt das Signal des deprotonierten Anteils der verbleibenden 53 % des *cis*-Isomers.

Im Rahmen der Messungen wurde keine Isomerisierung  $C^- \longrightarrow T^-$  durch Anregung beobachtet. Die Schalteffizienz von Dronpa ist nach Anregung bei 505 nm mit  $\Phi_{cis \longrightarrow trans}(505 \text{ nm}) = 0.0003$  äusserst niedrig [28]. Die Quantenausbeute des entsprechenden Prozesses von rsFastLime wurde bisher nicht bestimmt. Die von Andresen et al. gezeigte, um Faktor 50 schnellere Schaltzeit [32] lässt einen entsprechend effizienteren Prozess vermuten, was immer noch einer Quantenausbeute von  $\Phi_{cis \longrightarrow trans} < 0.02$  entspricht. Ein Beitrag von 2 %  $T^H$  als Schaltprodukt, das spektral von dem ohnehin vorhandenen  $C^H$  praktisch nicht zu unterscheiden ist und aus einem so langlebigen Zustand wie  $C^{*-}$  stammt, ist mit diesem Experiment nicht aufzulösen.

### 3.2.3 Angeregte Zustände von $C^H$ und $T^H$

Die transiente Dynamik der Zustände  $C^H$  und  $T^H$  wurden mittels Pump-Probe-Spektroskopie durch Anregung bei  $\lambda_p = 387$  nm bei pH 7 untersucht.

Das *trans*-Isomer liegt bei diesem pH-Wert vollständig protoniert vor, während das *cis*-Isomer nach Abb. 3.21a im Gleichgewicht aus 40 %  $C^H X^- Y^H$ , 20 %  $C^H X^- Y^-$ , 35 %  $C^- X^H Y^-$  und 5 %  $C^- X^H Y^H$  vorliegt. Nach den Absorptionsspektren der einzelnen Spezies in Abb. 3.21b werden bei  $\lambda_p = 387$  nm nur die protonierten  $C^H$ -Spezies angeregt.

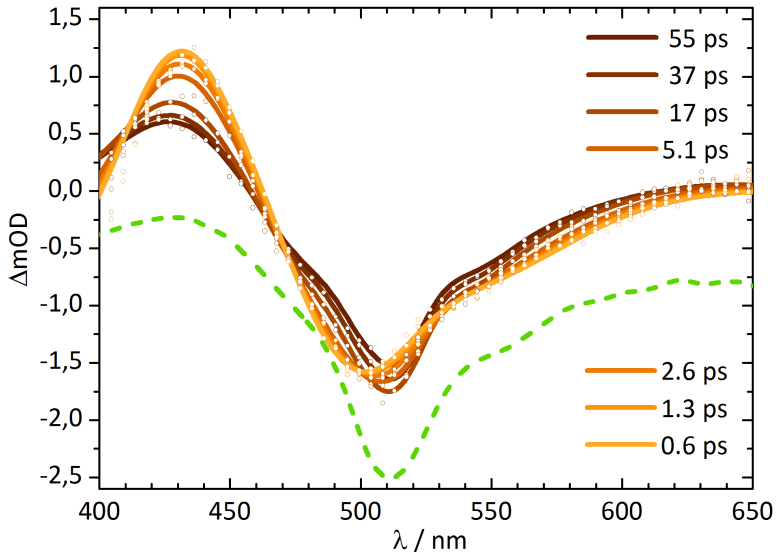
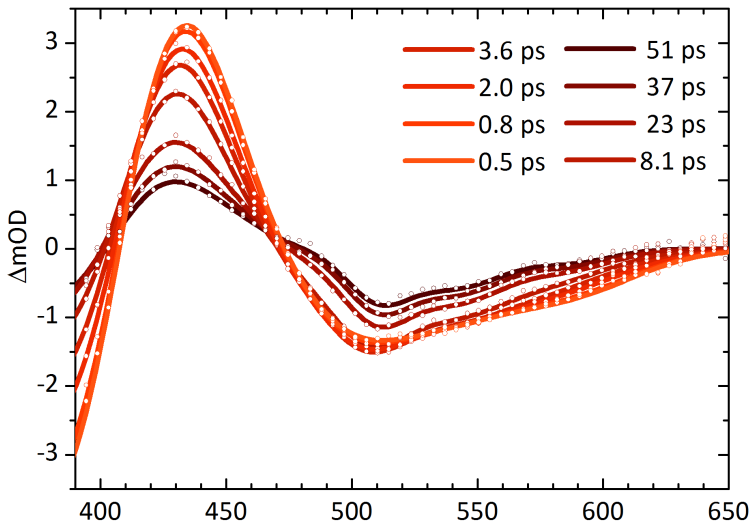
### 3.2.3.1 Transiente Spektren

Die aufgenommenen transienten Spektren von  $C^H$  und  $T^H$  bei pH 7 und 387 nm Anregungswellenlänge sind in Abb. 3.26a und b als offene Kreise dargestellt. Die Messung von  $C^H$  und  $T^H$  erfolgte direkt nacheinander ohne Änderung der experimentellen Parameter mit derselben Proteinlösung. Zur Überführung in das jeweilige Isomer wurde die Lösung vor und während der ersten Messung mit einer LED bei 400 nm und vor und während der zweiten Messung mit 495 nm bestrahlt.

Kurz nach Anregung zeigt das transiente  $C^H$ -Spektrum ein schwach negatives Signal für Wellenlängen  $< 410$  nm, das dem GSB zugeordnet werden kann. Im Bereich von 410 - 460 nm ist das Signal positiv mit einem Maximum bei 430 nm, für  $\lambda > 460$  nm wird es wieder negativ mit einem Minimum bei 500 nm und einer leichten Schulter bei 550 nm. Während der GSB und die transiente Absorption bei 430 nm im beobachteten Zeitraum stark abfallen, ändert sich die Intensität im Bereich der Emission kaum. Hier erfährt das Maximum eine Rotverschiebung um etwa 10 nm und das Signal wird insgesamt etwas schmaler, wodurch die Schulter bei 540 nm deutlicher hervortritt.

Das Spektrum wurde wellenlängenabhängig mit einem biexponentiellen Abfall mit den Zeitkonstanten  $\tau_{c1} = (6.6 \pm 0.6)$  ps und  $\tau_{c2} = (187 \pm 30)$  ps angepasst, die wellenlängenabhängigen Amplituden sind in Abb. 3.27a dargestellt.  $\tau_{c1}$  hat einen negativen Beitrag im Bereich  $\lambda < 420$  nm, was der Repopulation des gebleichten Grundzustandes zugeschrieben werden kann und zeigt positive Amplituden im Bereich der transienten Absorption um 430 nm. Außerdem ist ein negativer Beitrag bei 480 und ein positiver bei 510 nm zu sehen, was die Rotverschiebung und das Anwachsen des Emissionsmaximums beschreibt. Der Beitrag der langsamen Komponente  $\tau_{c2}$  ist positiv im Bereich  $\lambda < 460$  nm, für größere Wellenlängen ist er negativ mit einem Minimum bei 507 nm und einer Schulter bei 540 nm.

Das transiente Spektrum von  $T^H$  in Abb. 3.26 zeigt einen im Vergleich zu  $C^H$  deutlich ausgeprägteren GSB unter 410 nm, der im beobachteten Zeitbereich nicht vollständig wieder aufgefüllt wird. Im Bereich von 410 - 470 nm zeigt das Spektrum eine schnell abfallende transiente Absorption, für

(a) *cis*-Isomer rsFastlime(b) *trans*-Isomer rsFastlime

**Abb. 3.26:** Transiente Spektren von rsFastlime bei pH 7 nach Anregung bei 387 nm bei verschiedenen Verzögerungszeiten.  $\circ$  : aufgenommenen Daten,  $/$  : Anpassung durch die kinetischen Modelle in Abb. 3.28a und 3.29a

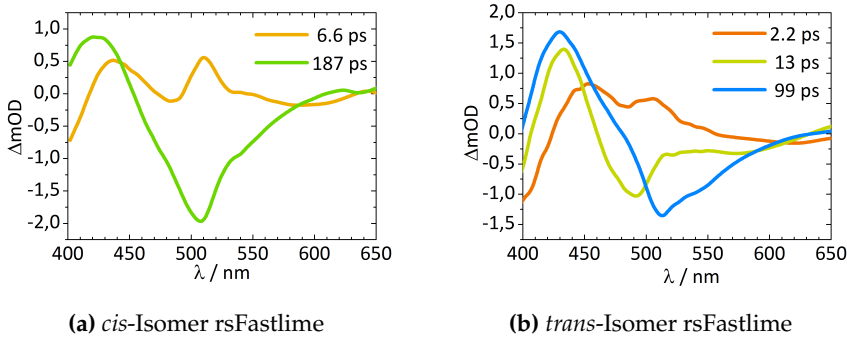


Abb. 3.27: Amplitudenspektren

Wellenlängen über 470 nm ist eine breite, langsam abfallende Emission zu sehen, die zu späteren Zeiten eine schwache Bandenstruktur entwickelt. Fron et al. beschrieben zur Anpassung der Dynamik des Photoschaltprodukts von Dronpa bei pH 8, der  $T^H$ -Spezies, fünf Zeitkonstanten: 2, 13, 90 sowie zusätzlich 4 und 700 ps [30]. Die 4 ps ordneten sie einem ESPT zu. Die transienten Spektren der  $T^H$ -Spezies von rsFastLime wurden mit sehr gutem Ergebnis mit einem triexponentiellen Abfall mit den Zeitkonstanten  $\tau_{t1} = (2.2 \pm 0.2)$  ps,  $\tau_{t2} = (13 \pm 1)$  ps und  $\tau_{t3} = (99 \pm 9)$  ps angepasst, die wellenlängenabhängigen Amplituden dieser Anpassung sind in Abb. 3.27b dargestellt. Der GSB wird biexponentiell mit den schnellen Zeitkonstanten  $\tau_{f1}$  und  $\tau_{f2}$  aufgefüllt, die transiente Absorption fällt triexponentiell ab. Die zunächst breite Emission wächst mit  $\tau_{f1}$ , fällt dann hauptsächlich auf der blauen Flanke mit  $\tau_{f2}$  ab, um schließlich mit  $\tau_{f3}$  langsam zu verschwinden.

### 3.2.3.2 Aufstellen des kinetischen Modells für $C^H$

Die frühe Dynamik nach Anregung von  $C^H$  wird durch die schnelle Depopulation des initial angeregten Zustandes  $C^{H*}$  bei gleichzeitiger Repopulation des Grundzustandes beschrieben, während sich das Emissionsspektrum mit der gleichen Zeitkonstante ändert. Neben dieser schnellen Dynamik existiert eine langlebige Komponente. Es kann von zwei konkurrierenden Prozessen aus dem angeregten Zustand  $C^{H*}$  ausgegangen werden, von denen einer innere Konversion mit  $k_{ic}$  in den Grundzustand ist, während der andere mit  $k_H$  in einen anderen angeregten Zustand führt, der dann langsam depopuliert wird. Die parallele Reaktion zweier initial angeregter Spezies, von denen eine kurz- und die andere langlebig ist, wie von Thor et al. für GFP

postuliert [15], kann die spektrale Entwicklung im Bereich der Emission nicht erklären, deren Intensität nur wenig abfällt und im Maximum sogar ansteigt.

Die Ähnlichkeit des transienten Spektrums von  $C^H$  nach 50 ps mit dem transienten Spektrum von  $C^-$  lässt eine Reaktion in Richtung  $C^{-*}$  vermuten. Der negative Beitrag zwischen 460 und 500 nm, der im transienten  $C^-$ -Spektrum von einem  $C^-$  GSB kommt, kann in diesem Fall durch ein Protonierungsgleichgewicht  $C^- \rightleftharpoons C^H$  im Grundzustand, also effektiv eine Depopulation von  $C^-$ , entstehen. Da in diesem Bereich die Lebensdauer  $\tau_{c2}$  eine negative Amplitude zeigt, wird der angeregte Zustand, der im Bereich  $\lambda > 500$  nm für den negativen Beitrag verantwortlich ist, in den *cis*-Grundzustand übergehen und ihn repopulieren. Die vorangegangenen Überlegungen wurden in dem kinetischen Modell in Abb. 3.28a zusammengefasst. Allerdings wird die spektrale Entwicklung hinreichend mit zwei Zeitkonstanten beschrieben, die der Depopulation von  $C^{H*}$  und der Depopulation des zweiten angeregten Zustandes zugeordnet werden können. Eine eigene Zeitkonstante auf eine solche Gleichgewichtseinstellung existiert nicht. Alternativ zu dem Modell mit dem Grundzustandsgleichgewicht ist eine angeregte Spezies mit breitem, gegenüber der  $C^-$ -Spezies blauverschobenem, Emissionsspektrum denkbar, das mit  $\tau_2$  in den Grundzustand übergeht.

### 3.2.3.3 Ergebnisse für $C^H$

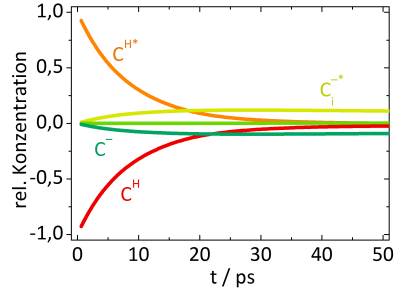
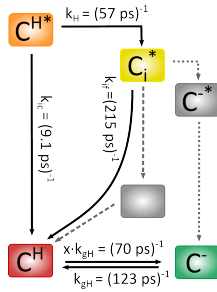
Das beste Ergebnis für die Anpassung von  $C^H$  wurde mit nur vier Zuständen erzielt; einem angeregten Zustand  $C_i^{-*}$ , der  $C^{-*}$  ähnelt, aber eine sehr viel kürzere Lebensdauer hat, und einem Grundzustands-Protonierungsgleichgewicht. Ein direkter Übergang von  $C_i^{-*}$  zu den bekannten, deprotonierten *cis*-Spezies  $C^{-*}$  oder  $C^-$  ist in diesem Modell nicht nötig, um die Daten anzupassen. Die Gleichgewichtseinstellung im Grundzustand ist hier fast genau so schnell wie die Depopulierung von  $C_i^{-*}$ . Eine Modellierung mit drei Zuständen ohne  $C^{-*}$  und Grundzustandsgleichgewicht mit  $C^-$ , bei dem der angeregte Zustand  $C_i^{-*}$  auch unterhalb von 500 nm Emission zeigt, lieferte allerdings nur geringfügig schlechtere Übereinstimmung mit den Daten. Ob  $C_i^{-*}$  zunächst in einen intermediären Grundzustand konvertiert, kann nicht ermittelt werden. Die Depopulation von  $C_i^{-*}$  scheint der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein. Bei der Modellierung ohne Grundzustandsgleichgewicht geht die Population von  $C_i^{-*}$  ausschließlich in  $C^H$  über.

Die Modellierung der Daten von  $C^H$  kommt zu keinem eindeutigen Ergebnis; beide Modelle beschreiben die Daten ähnlich gut. Die Spektren des in Abb.3.28a gezeigten Modells sind in Abb. 3.28c gezeigt, die relativen Konzentrationen in Abb.3.28b. Zweifelsfrei kann festgestellt werden, dass der primäre Prozess nach Anregung von  $C^H$  bei beiden Modellen die innere Konversion nach  $C^H$  ist. Etwa 14 % der angeregten Moleküle gehen in den angeregten Zustand  $C_i^{-*}$  mit einer Lebensdauer von über 200 ps über, der Emission im Bereich  $\lambda > 500$  nm zeigt und damit vermutlich ein intermediärer, deprotonierter *cis*-Zustand ist. Das Fluoreszenzanregungsspektrum von Dronpa zeigt keinen Beitrag im Bereich der Absorption von  $C^H$  [26], was gegen einen ESPT spricht. Allerdings führt eine Quantenausbeute von 14 % mit einer Lebensdauer von 215 ps auch nur zu etwa 1 % Emission, verglichen mit der berichteten Fluoreszenzlebensdauer von 3.6 ns für Dronpa.

### 3.2.3.4 Kinetisches Modell und Ergebnisse für $T^H$

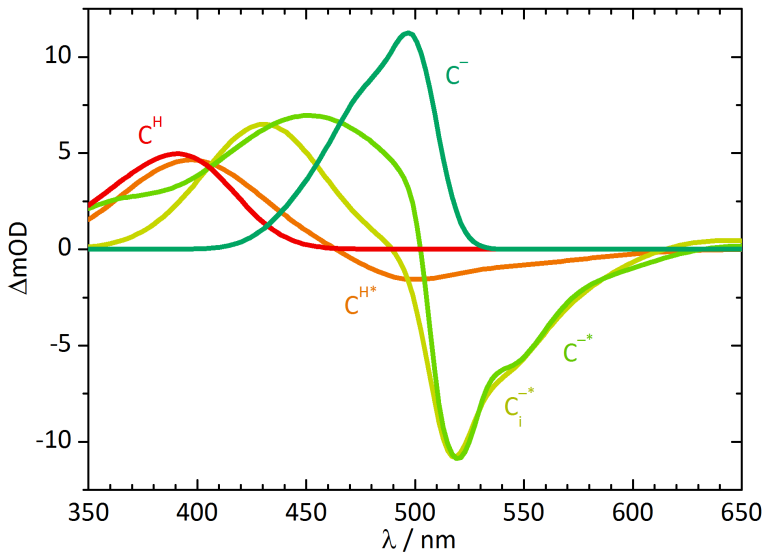
Die Quantenausbeute für den Schaltprozess  $\Phi_{trans \rightarrow cis}(400 \text{ nm})$  ist bei Dronpa sehr hoch; Ando et al. berichteten eine Quantenausbeute von 0.37 [26]. Die Quantenausbeute des entsprechenden Prozesses von rsFastLime ist unbekannt; Aufgrund der fast identischen Schaltzeit [67] wird sie ähnlich groß sein. In einer frühen Studie schlugen Fron et al., basierend auf der Verlangsamung einer der angepassten Zeitkonstanten bei Deuterierung, einen ESPT als initialen Schritt des Photoschaltprozesses vor [30]. Warren et al. beschrieben nach der Anregung von  $T^H$  eine angeregte Spezies  $T^{H*}$ , die eine Lebensdauer von 9 ps hat und mit einer Quantenausbeute von 0.3 in einen protonierten Grundzustand  $C^H$  isomerisiert [29].

Die hier beobachtete, den GSB dominierende, kurze Zeitkonstante  $\tau_{t1} = 2.2$  ps, die als Abfall auch im Bereich der transienten Absorption und als Anstieg im Bereich der Emission bei 500 - 550 nm liegt, deutet auf einen Konkurrenzprozess bei der Depopulation aus dem angeregten Zustand  $C^{H*}$  zwischen einer inneren Konversion in den Grundzustand und einem Übergang in einen anderen angeregten Zustand  $I^*$  hin, der ebenfalls im Bereich von 430 nm absorbiert und im Bereich  $\lambda > 470$  nm emittiert. Die Zeitkonstante  $\tau_{t2} = 13$  ps beschreibt die Depopulation von  $I^*$ , der negative Beitrag von  $\tau_2$  im Bereich des GSB deutet auf eine Konversion aus  $I$  in den Grundzustand  $T^H$  oder die Population des entsprechenden protonierten *cis*-Isomers  $C^H$ , die beide spektral kaum voneinander zu unterscheiden sind, hin. Hier steht der Übergang in einen Grundzustand in Konkurrenz mit einem Prozess, der in einen angeregten Zustand  $I_2^*$  führt, der schließlich mit  $\tau_{t3}$  depopuliert wird.



(a) Kinetisches Modell zur Anpassung der Daten in Fig.3.26a

(b) Konzentrationsverlauf der Spezies aus a



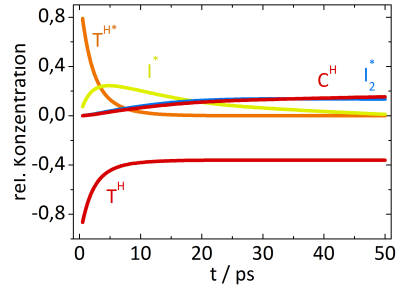
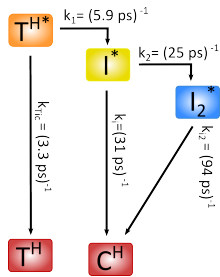
(c) Spektren der Spezies aus a

**Abb. 3.28:** Modell der an der photoinduzierten Dynamik von rsFastLime nach Anregung der  $C^H$ -Spezies durch  $\lambda_p = 387 \text{ nm}$ , zeitabhängige Konzentrationen der beteiligten Spezies und ihre Absorptionsspektren



Der negative Beitrag von  $\tau_{t2}$  um 490 nm kann der Form nach entweder der Population einer intermediären deprotonierten Grundzustandsspezies mit Absorptionsmaximum bei 490 nm zugeordnet werden, oder der Rotverschiebung der Emission beim Übergang von  $I$  nach  $I_2^*$ . Das aus diesen Überlegungen entstandene Modell ist in Abb. 3.29a dargestellt. In einem ersten Modellierungsversuch wurde die Depopulation von  $I_2^*$ , der im beobachteten Zeitrahmen nur einige Prozent des Gesamtsignals ausmacht, vernachlässigt, da der Zielzustand unbekannt war. Letztlich wurde ein Übergang nach  $C^H$  angenommen. Die Konzentrationsverläufe und die Spektren der im Modell beschriebenen Spezies sind in den Abb. 3.29b und 3.29 dargestellt. Die bei der Anpassung ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für die einzelnen Schritte sind in Abb. 3.29a angegeben.

Es zeigte sich, dass die Depopulation von  $T^{H*}$  mit  $(k_1 + k_{ic})^{-1} = 2.1$  ps zu 64 % durch die IC in den Grundzustand dominiert wird. Die übrigen 36 % gehen in den angeregten Zustand  $I^*$  über. Diese Ausbeute, die etwa der Quantenausbeute des Schaltprozesses entspricht, legt die Vermutung nahe, dass der Übergang  $T^{H*} \longrightarrow I^*$  entscheidend für die Isomerisierung ist und  $I^*$  somit entweder selbst bereits *cis*-Konformation besitzt, oder durch IC in einen *cis*-Grundzustand übergeht. Spektral erinnert  $I^*$  mit der Emission oberhalb von 500 nm bereits an eine deprotonierte *cis*-Spezies. Dieser Eindruck verstärkt sich für  $I_2^*$  mit der schmalen Emissionsbande mit einem Maximum bei 518 nm und deutlichen Schultern noch, allerdings ist die Lebensdauer mit 94 ps deutlich kürzer als von  $C^{-*}$ . Ausgehend von der Annahme, dass die Schwelle zur Isomerisierung bereits im ersten Schritt überschritten war, wurde die Depopulation der  $I_2^{-*}$ -Spezies schließlich mit den Grundzuständen  $C^H$  und  $C^-$  gekoppelt. Die Anpassung ergab, dass nur der Weg  $C_i^{-*} \longrightarrow C^H$  genutzt wird.



(a) Kinetisches Modell zur Anpassung der Daten in Fig.3.26b

(b) Konzentrationsverlauf der Spezies aus a

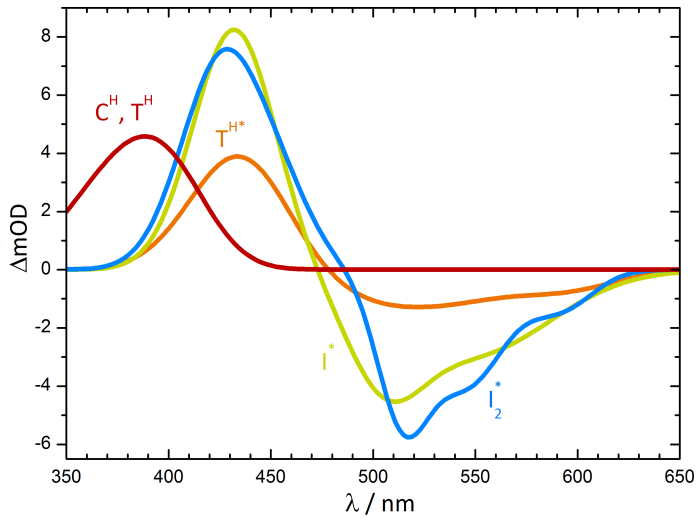


Abb. 3.29: Spektren der Spezies aus a

Abb. 3.30: Modell der photoinduzierten Dynamik von rsFastLime nach Anregung der  $T^H$ -Spezies durch  $\lambda_p = 387 \text{ nm}$ , zeitabhängige Konzentrationen der beteiligten Spezies und ihre Absorptionsspektren

### 3.3 Photoisomerisierung

Bisher wurden die initialen Prozesse nach Anregung der einzelnen Grundzustands-spezies von Padron0.9 und rsFastLime dargestellt und durch kinetische Modelle interpretiert. Die aufgestellten Modelle sind noch einmal in Abb. 3.31 gezeigt. Die Reaktionswege, über die die Photoisomerisation abläuft, sind allerdings nach wie vor weitestgehend ungeklärt. Die Isomerisierungsausbeuten bei Padron0.9 sind mit 2 % und 0.02 % zu gering, um auftretende Produkte mit den hier verwendeten Methoden zu identifizieren.

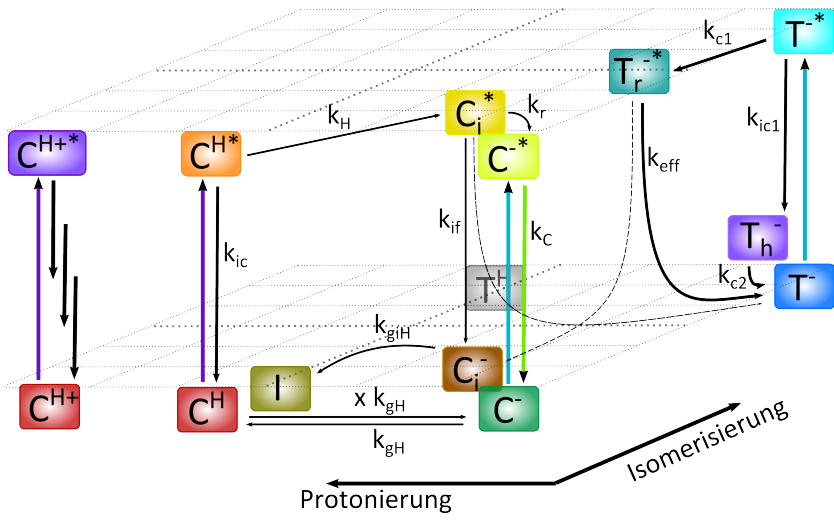
Es ist plausibel, dass der effiziente ESPT, der nach Anregung der  $C^H$ -Spezies belegt werden konnte, den ersten Schritt auf dem Isomerisierungsweg darstellt, da dieser bei der bei niedrigem pH vorliegenden, nicht schaltenden Spezies  $C^{H+}$  nicht erfolgt. Die intermediäre Spezies  $C_i^{-*}$  führt zu den Produkten  $C^{-*}$  und über  $C_i^-$  zu  $I$ . Eine photoinduzierte Isomerisierung erfolgt in der Regel aus einem elektronisch angeregten Zustand heraus und die Effizienz der Isomerisierung aus dem fluoreszierenden  $C^{-*}$  ist, wenn sie überhaupt auftritt, extrem gering. Vermutlich wird also innere Konversion über eine konische Durchschneidung mit geringer Ausbeute von  $C_i^{-*}$  in einen *trans*-Grundzustand führen.

Die *trans*  $\longrightarrow$  *cis*-Isomerisierung nach Anregung von  $T^-$  konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht beobachtet werden. Faro et al. [33] akkumulierten durch Bestrahlung von  $T^-$  bei 80 K ein Grundzustandsintermediat mit *cis*-Konfiguration, wobei die Umwandlung nur zu etwa 20 % erfolgte, was auf die Bildung eines photostationären Gleichgewichts hindeutet. Die intermediäre Spezies konnte durch Bestrahlung bei 405 nm wieder zu  $T^-$  umgewandelt werden. Das *cis*-Intermediat zeigte ein Absorptionsmaximum bei 481 nm und ging bei 100 K vollständig in den  $C^-$ -Grundzustand über, für den sich oberhalb von 180 K ein Protonierungsgleichgewicht mit  $C^H$  einstellte. Der hier gezeigte Zustand  $C_i^-$  zeigt spektral mit einem Absorptionsmaximum um 490 nm eine gewisse Ähnlichkeit mit dem von Faro gefundenen *cis*-Intermediat und ist bei RT ebenfalls nicht populiert. Vermutlich wird also innere Konversion über konische Durchschneidung mit geringer Ausbeute aus einem angeregten *trans*-Zustand zu  $C_i^-$  oder einem ähnlichen *cis*-Intermediat führen und von dort in den *cis*-Grundzustand. Diese Wege sind in Abb.3.31a als gestrichelte Linien dargestellt.

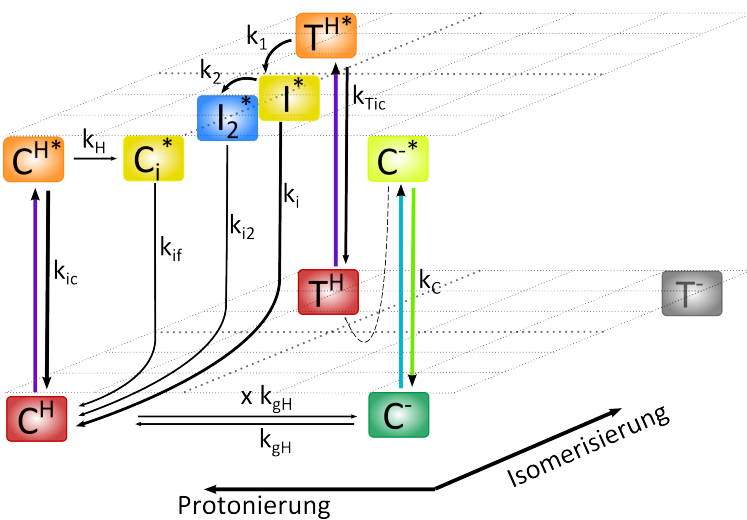
Bei rsFastLime ist die *trans*  $\longrightarrow$  *cis*-Isomerisierung deutlich effizienter, das wahrscheinliche Produkt,  $C^H$ , ist aber spektral nicht vom Edukt  $T^H$  zu unterscheiden. Der Befund der schnellen Isomerisierung nach Anregung

der  $T^H$ -Spezies deckt sich mit den Messungen von Warren et al. an Dronpa [29]. Die Quantenausbeute der *cis*  $\rightarrow$  *trans*-Isomerisierung nach Anregung von  $C^-$  ist mit 0.03 % sehr niedrig, entsprechend gibt es keine spektralen Hinweise auf Produkte. Wie bei Padron0.9 lässt sich die Entwicklung der transienten Spektren mit nur zwei Zuständen beschreiben, es scheint keine nennenswerten Umorientierungen im angeregten Zustand zu geben. Es muss also einen Reaktionsweg aus  $C^{-*}$  geben, der entweder direkt oder über Intermediate zu einem *trans*-Produkt führt. Dieser Weg ist in Abb.3.31b als gestrichelte Linien dargestellt.

Für Padron0.9 sind nach Photoanregung die Isomerisierungswege  $C^{H*} \rightarrow T$  und  $T^{-*} \rightarrow C$  notwendig, für rsFastLime müssen die Wege  $C^{-*} \rightarrow T$  und  $T^{H*} \rightarrow C$  existieren, um das beobachtete Schaltverhalten der Proteine zu erklären. Die bisherigen Untersuchungen schließen aber die jeweils anderen Reaktionswege keineswegs aus. Bekannt ist nur das Resultat: Padron0.9 wird durch Bestrahlung bei 500 nm an- und bei 400 nm ausgeschaltet, bei rsFastLime ist es umgekehrt. Bei Faros Kryoexperimenten gelang nur eine teilweise Umwandlung von  $T^-$  zu dem *cis*-Intermediat, die Bildung erfolgte im Zeitraum von einigen zehn Sekunden. Da die Absorptionsspektren der beiden Spezies ähnlich sind (das Intermediat erscheint als Schulter bei 481 nm auf der blauen Flanke der  $T^-$ -Absorption), kann die nur teilweise Umwandlung, analog zu Stilben, durch Bildung eines photostationären Gleichgewichts zwischen *cis*-Intermediat und  $T^-$  interpretiert werden, deren Anregung zumindest z.T. die Bildung der jeweils anderen Spezies zur Folge hat.



(a) Padron0.9



(b) rsFastLime

Abb. 3.31: Zusammenfassung der kinetischen Modelle zur Beschreibung der Dynamik nach Photoanregung der einzelnen Spezies. Vermutete Wege der Isomerisierung sind als gestrichelte Linien dargestellt.

	$k/\text{ps}^{-1}$		$k/\text{ps}^{-1}$
$k_C$	1160	$k_C$	900
$k_{c1}$	2.9	$k_1$	5.9
$k_{ic1}$	1.7	$k_{Tic}$	3.3
$k_{eff}$	7.0	$k_2$	25
$k_{c2}$	4.0	$k_i$	31
$k_H$	2.0	$k_{i2}$	94
$k_{ic}$	5.0	$k_H$	57
$k_r$	71	$k_{ic}$	9.1
$k_{if}$	78	$k_{if}$	215
$k_{gH}$	56	$k_{gH}$	123
$\times k_{gH}$	75	$\times k_{gH}$	70

(a) Padron0.9 (Abb. 3.31a)

(b) rsFastLime (Abb. 3.31b)

**Abb. 3.32:** Geschwindigkeitskoeffizienten der kinetischen Modelle zur Beschreibung der Dynamik nach Photoanregung der einzelnen Grundzustandsspezies

## 3.4 Ausblick

Der Austausch einer einzigen Aminosäure, *Met*<sup>159</sup>, durch *Tyr* kehrte die Schalteigenschaften von rsFastLime um und führte nach einigen weiteren Optimierungen schließlich zu Padron0.9. Über seine *p*-Hydroxyphenylgruppe stabilisiert *Tyr*<sup>159</sup> das deprotonierte *trans*-Isomer (siehe Abb.1.12). Anders als bei rsFastLime ist *trans*-Padron das stabilere Isomer, außerdem ist das Protonierungsgleichgewicht im Grundzustand komplett verschoben: Während das *cis*-Isomer für beide Proteine in einem recht ausgewogenen Gleichgewicht vorliegt, ist das Gleichgewicht bei rsFastLime weit zu  $T^H$ , bei Padron hingegen weit nach  $T^-$  verschoben (vgl. Abb. 3.1 und 3.19).

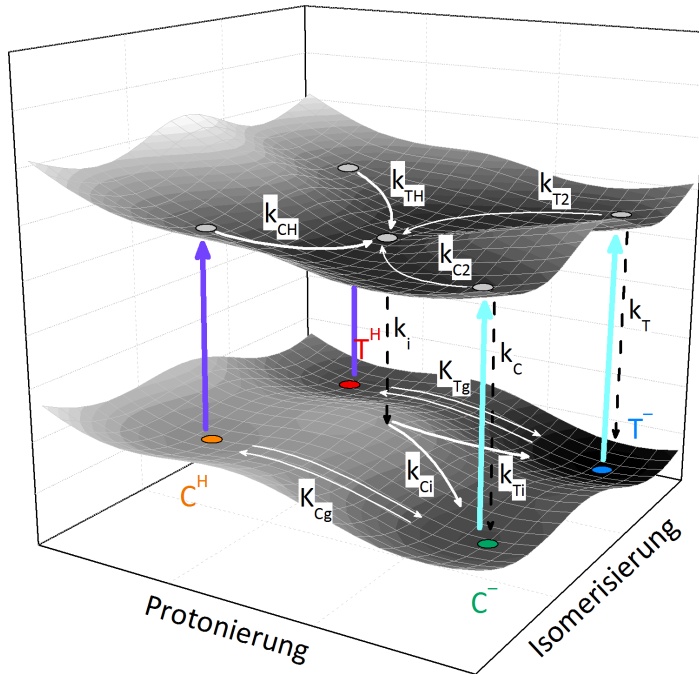
### 3.4.1 Photoschalten - Ein Photostationäres Gleichgewicht?

In einem Versuch zur qualitativen Beschreibung der Schalteigenschaften des deprotonierbaren Proteinchromophors wurde das Modell der direkten Photoisomerisierung von Stilben von Siebrand/Orlandi [68] um eine Protonierungskoordinate erweitert. Protonierte und deprotonierte Form des jeweiligen Isomers stehen in einem Gleichgewicht  $K$  zueinander, das in Gl. 3.13 für das *cis*-Isomer beschrieben wird.

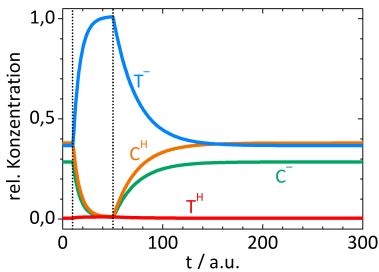
$$K_{Cg} = \frac{C^-}{C^H} = \frac{\frac{k_g x}{x+1}}{\frac{k_g}{x+1}} \quad (3.13)$$

Das die Geschwindigkeit der Einstellung des Gleichgewichtes  $K_{Cg}$  wird mit  $k_g$  beschrieben,  $x$  definiert die Lage des Gleichgewichtes. Alle initial angeregten Spezies laufen in einem angeregten Zustand zusammen, der durch innere Konversion in den Grundzustand übergeht und teils in einem Grundzustand mit *cis*- und teils mit *trans*-Konfiguration endet.

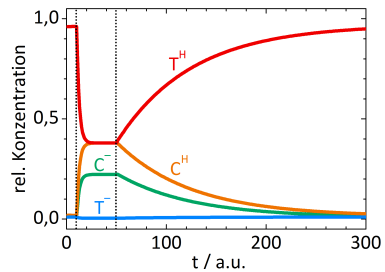
Das resultierende Modell ist in Abb. 3.33a dargestellt. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden alle gleich und um den Faktor 100 schneller als die Pumprate gewählt. Ausnahmen bildeten die Reaktionen der deprotonierten Spezies: Um den im Vergleich zur Anregung bei  $\lambda_{ex} = 400$  nm langsamen Schaltprozess bei 500 nm nachzubilden, wurden die Prozesse  $k_{C2}$  und  $k_{T2}$  im Vergleich zu den anderen Prozessen um den Faktor 10 verlangsamt und mit  $k_C$  und  $k_T$  jeweils ein Konkurrenzprozess in den Grundzustand eingeführt. Für die Schaltkurven beider Proteine wurden die gleichen Parameter verwendet. Der einzige Unterschied sind die Protonierungsgleichgewichte  $K_{Cg}$  und  $K_{Tg}$ , die für das Padron mit  $K_{Cg} = 0.75$  und  $K_{Tg} = 100$  und



(a) Modell zum Schaltvorgang von Padron0.9 und rsFastLime



(b) Padron0.9



(c) rsFastLime

**Abb. 3.33:** Allgemeines Schaltmodell und Konzentrationsverlauf der Grundzustand-spezies.  $10 < t < 50$ :  $\lambda_{ex} = 400$  nm,  $t \geq 50$ :  $\lambda_{ex} = 500$  nm



für rsFastLime mit  $K_{Cg} = 0.59$  und  $K_{Tg} = 0.01$  angepasst wurden, um die tatsächlichen Protonierungsgleichgewichte bei neutralem pH zu beschreiben. Die Absorptionsquerschnitte der einzelnen Spezies bei den jeweiligen Anregungswellenlängen wurden als gleich angenommen.

Die Einstellung der photostationären Gleichgewichte durch Bestrahlung bei verschiedenen Wellenlängen nach dem Modell in Abb. 3.33a ist für Padron0.9 in Abb. 3.33b und für rsFastLime in Abb. 3.33c dargestellt. Wie die Schaltzyklen zeigen, reicht dieses einfache Modell in Verbindung mit der Verschiebung des Protonierungsgleichgewichtes im *trans*-Isomer von rsFastLime zu Padron0.9 bereits aus, um qualitativ die Umkehr der Schaltrichtung zu beschreiben.

Tabelle 3.1 zeigt die Absorptionsmaxima der AN- und AUS-Zustände einiger anderer RSFPs sowie die schaltinduzierenden Wellenlängen. Es ist ein deutlicher Trend erkennbar: Bei den meisten RSFPs bestimmt die dominierende Absorptionsbande auch die Schaltrichtung. Die Ausnahmen stellen Padron, cerFP505 und rsCherry bzw. rsCherryRev dar, wo die Absorptionsmaxima für AN- und AUS-Zustand gleich sind. Padron, bzw. das sehr ähnliche Padron0.9, wurde hier bereits diskutiert. Das Protein cerFP505 zeigt beim Übergang vom AN in den AUS-Zustand einen geringfügigen Abfall in der Absorptionsbande um 494 nm und einen korrespondierenden Anstieg bei 390 nm. Der AUS-Zustand zeigt immer noch etwa 80% der Fluoreszenz des AN-Zustandes, was für ein zum fluoreszierenden Zustand verschobenes photostationäres Gleichgewicht spricht. Die beiden Proteine rsCherry und rsCherryRev zeigen, ähnlich wie die hier untersuchten Padron0.9 und rsFastLime, ein inverses Schaltverhalten hinsichtlich der Anregungswellenlängen. Da die Absorptionsspektren der AUS-Zustände von rsCherry nicht bekannt sind, kann ihr Schaltverhalten bezüglich der Protonierung nicht weiter diskutiert werden.

Das einfache Schaltmodell in Abb.3.33 würde ohne weitere Modifikationen qualitativ das Schaltverhalten der meisten in Tab. 3.1 dargestellten RSFPs reproduzieren. Zur quantitativen Beschreibung der übrigen Schaltvorgänge muss das Schaltmodell allerdings bezüglich der tatsächlichen Reaktionswege, ihrer Geschwindigkeiten und Quantenausbeuten erweitert werden.

Es scheint, als ob das Protonierungsgleichgewicht der Isomere eine entscheidende Rolle bei den Schaltprozessen der RSFPs spielt, der bisher zu wenig Beachtung geschenkt wurde. Durch pH-abhängige Messungen der Quantenausbeuten der Schaltvorgänge der einzelnen Proteine könnte der Einfluss der Protonierungsgleichgewichte geklärt werden.

<b>Protein</b>	$\lambda(Abs_{max,AN})$ / nm	$\lambda(Abs_{max,AUS})$ / nm	Schaltet bei $\lambda(Abs_{max,AN})$	Schaltet bei $\lambda(Abs_{max,AUS})$
asFP595 [69]	445	568	AUS	AN
bsDronpa [32]	460	385	AUS	AN
cerFP505 [70]	494	494 (390)*	AUS	AN*
Dronpa [26]	503	390	AUS	AN
mGeos-M [71]	500	390	AUS	AN
mTFP0.7 [72]	453	370	AUS	AN
Padron [32]	503 (396)*	505	AN*	AUS
rsCherry [73]	572	572 (450)**	AN	AUS**
rsCherryRev [73]	572	572 (450)**	AUS	AN**
rsEGFP [74]	493	396	AUS	AN
rsEGFP2 [75]	478	408	AUS	AN
rsFastLime [32]	496 (392)	384 (496)	AUS	AN
rsTagRFP [76]	567 (440)	440 (567)	AUS	AN

**Tab. 3.1:** Absorptionsmaxima  $Abs_{max}$  der AN- und AUS-Zustände einiger RSFPs und Schaltrichtung bei Bestrahlung derselben. Weitere wichtige Absorptionsbanden sind in Klammern angegeben.

\* Bestrahlung bei der angegebenen Wellenlänge schaltet das Protein

\*\* die genaue Lage der Absorptionsbanden von rsCherry und rsCherry-Rev sind nicht angegeben, Bestrahlung bei der angegebenen Wellenlänge schaltet das Protein

# Anhang



# **Anhang A**

## **Tabellenwerke**

	$\lambda_c/nm$	$\sigma/nm$	A / a.u.
$C^H X^H Y^H$	367.5	23.8	29.8
	393.1	17.6	21.8
$C^H X^H Y^-, C^H X^- Y^H$	382.0	23.8	34.3
	407.6	17.6	19.1
$C^- X^H Y^H, C^- X^- Y^H, C^- X^H Y^-$	449.2	23.6	9.43
	487.1	19.8	66.9
	505.8	8.7	28.8
$C^- X^- Y^-$	449.2	23.6	20.3
	487.1	19.8	56.0
	505.8	8.7	12.2
$T^H X^H Y^H, T^H X^H Y^-, T^H X^- Y^H$	382.8	26.4	45.8
$T^- X^H Y^H, T^- X^- Y^H, T^- X^H Y^-$	452.7	46.6	13.3
	491.9	23.5	59.2
	509.7	9.9	15.2
$T^- X^- Y^-$	452.7	46.6	20.3
	491.9	23.5	56.0
	509.7	9.9	12.2
$C_{em,pH10}^{*-}$	518.6	9.0	27.6
	538.2	22.8	43.2
	576.8	33.9	14.1

**Tab. A.1:** Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von Padron0.9 im Grundzustand (Abb. 3.4) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15)

	$\lambda_c/nm$	$\sigma/nm$	A / a.u.
$T^-$	452.7	46.6	0.263
	491.9	23.5	0.727
	509.7	9.9	0.158
$T^{-*}$	405.3	31.3	0.698
	475.2	27.7	0.163
	619.1	58.3	-0.406
$T_r^{-*}$	405.3	31.3	0.948
	475.2	27.7	0.002
	619.1	58.3	-0.722
$T_h^-$	492.6	31	0.532
	520.1	11.1	0.17
$C^-$	449.2	23.6	0.236
	487.1	19.8	0.750
	505.8	8.7	0.282
$C^{-*}$	436.1	40.4	0.850
	493.2	24.7	0.346
	518.6	9.0	-0.272
	538.2	22.8	-0.426
	576.8	33.0	-0.139
	616.4	28.7	0.032

**Tab. A.2:** Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von Padron0.9 nach Anregung von  $C^-$  und  $T^-$  durch  $\lambda_p = 505$  nm bei pH 10 (Abb. 3.9c) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15)

	$\lambda_c/nm$	$\sigma/nm$	A / a.u.
$C^-$	449.2	23.6	0.206
	487.1	19.8	0.948
	505.8	8.7	0.386
$C^H$	382.0	23.9	0.518
	407.6	17.6	0.289
$C^{-*}$	436.1	40.4	1.116
	493.2	24.7	0.446
	518.6	9.0	-0.358
	538.2	22.8	-0.561
	576.8	33.0	-0.183
	616.4	28.7	0.042
$C_i^{-*}$	422.8	33.4	1.08
	499.5	17.1	0.256
	507.3	13.1	-0.373
	527.0	26.5	-0.585
	565.6	33.9	-0.191
	619.4	28.7	0.016
$I$	402.1	26.4	0.678
	475.3	9.7	0.050

**Tab. A.3:** Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von Padron0.9 nach Anregung von  $C^H$  durch  $\lambda_p = 387$  nm bei pH 10 (Abb. 3.13c) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15)



	$\lambda_c/nm$	$\sigma/nm$	A / a.u.
$C^-$	449.1	23.55	0.117
	487.1	19.8	0.344
	505.8	8.7	0.219
$C_i^-$	470.0	39.4	0.791
	493.0	10.0	0.0791
$I$	403.0	26.3	0.385
$C^{-*}$	436.1	40.4	-0.633
	493.2	24.7	-0.147
	518.6	9.0	0.203
	538.2	22.8	0.318
	576.8	33.0	0.104
$C_i^{-*}$	422.8	33.4	-0.612
	499.5	17.1	-0.147
	507.3	13.1	0.212
	527.0	26.5	0.332
	565.6	33.9	0.108

**Tab. A.4:** Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von Padron0.9 nach Anregung von  $C^H$  durch  $\lambda_p = 387$  nm und Dumpen nach 40 ps durch  $\lambda_d = 560$  nm bei pH 10 (Abb. 3.15c) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15)

	$\lambda_c/nm$	$\sigma/nm$	A / a.u.
$C^{H+}$	367.5	23.8	0.509
	393.1	17.6	0.370
$C^{H+*}$	437.1	18.7	0.272
	506.0	66.9	-0.724
	604.6	35.3	-0.171
$C_r^{H+*}$	429.9	17.4	0.543
	496.2	20.8	-0.266
	562.2	44.4	-0.677
$C^{H\cdot}$	400.8	54.6	1.28
$e^-$	566.9	28.0	0.0636
	641.2	50.7	0.203

**Tab. A.5:** Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von Padron0.9 nach Anregung von  $C^{H+}$  durch  $\lambda_p = 387$  nm bei pH 4 (Abb. 3.16) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15)

	$\lambda_c/nm$	$\sigma/nm$	A / a.u.
$C^H X^H Y^H$	371.6	28.6	28.0
	397.0	20.5	17.1
$C^H X^H Y^-, C^H X^- Y^H$	375.7	28.6	32.5
	401.1	20.5	17.2
$C^- X^H Y^H, C^- X^- Y^H, C^- X^H Y^-$	455.9	17.9	18.0
	481.9	15.6	38.2
	501.3	10.0	25.5
$C^- X^- Y^-$	455.9	17.9	26.3
	481.9	15.6	37.5
	501.3	10.0	20.8
$T^H$	372.7	25.3	28.1
	397.9	20.0	12.5
$C_{em,pH10}^{-*}$	519.7	8.1	12.0
	539.1	18.0	18.6
	569.9	31.9	9.33

**Tab. A.6:** Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von rsFasLime im Grundzustand (Abb. 3.21) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15)

	$\lambda_c/nm$	$\sigma/nm$	A / a.u.
$C^-$	455.9	17.9	0.101
	481.9	15.6	0.215
	501.3	10.0	0.144
$C^{-*}$	357.7	22.1	0.0732
	451.3	44.3	0.604
	519.7	8.1	-0.131
	539.1	18.0	-0.204
	569.9	31.9	-0.103
	639.1	23.2	0.0123
Korrektur	510.0	5.65	-0.0474

**Tab. A.7:** Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von rsFasLime nach Anregung von  $C^-$  durch  $\lambda_p = 505$  nm bei pH 10 (Abb. 3.25) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15)

	$\lambda_c/nm$	$\sigma/nm$	A / a.u.
$C^-$	455.9	17.9	0.130
	481.9	15.6	0.274
	501.3	10.0	0.184
$C^H$	375.7	28.6	0.234
	401.1	20.5	0.124
$C^{H*}$	397.1	31.8	0.370
	494.5	20.9	-0.0581
	537.6	39.9	-0.0816
$C_i^*$	425.7	28.0	0.322
	438.9	23.8	0.126
	515.5	9.6	-0.169
	534.8	19.5	-0.262
	565.6	25.9	-0.132
	639.1	29.7	0.0360

**Tab. A.8:** Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von rsFasLime nach Anregung von  $C^H$  durch  $\lambda_p = 387$  nm bei pH 10 (Abb. 3.28c) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15)

	$\lambda_c/nm$	$\sigma/nm$	A / a.u.
$T^H, C^H$	372.7	25.3	0.206
	397.9	20.0	0.109
$T^{H*}$	435.0	24.9	0.262
	517.1	48.5	-0.156
	597.2	24.32	-0.0248
$I^*$	432.4	20.38	0.407
	506.0	16.0	-0.0843
	540.0	42.7	-0.320
$I_2^*$	427.4	21.8	0.465
	460.8	14.2	0.0381
	513.9	12.1	-0.148
	544.6	20.0	-0.220
	592.6	15.1	-0.0528

**Tab. A.9:** Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von rsFasLime nach Anregung von  $T^H$  durch  $\lambda_p = 387$  nm bei pH 10 (Abb. 3.28c) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15)

# Literaturverzeichnis

- [1] O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **1962**, 59, 223–239.
- [2] H. Morise, O. Shimomura, F. H. Johnson, J. Winant, *Biochemistry* **1974**, 13, 2656–2662.
- [3] D. Prasher, V. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier, *Gene* **1992**, 111, 229–233.
- [4] F. Yang, L. Moss, G. N. J. Phillips, *Nature Biotechnology* **1996**, 14, 1246–1251.
- [5] M. Ormö, A. Cubitt, K. Kallio, L. Gross, R. Tsien, S. J. Remington, *Science* **1996**, 273, 1392–1395.
- [6] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward, D. Prasher, *Science* **1994**, 263, 802–805.
- [7] K. Brejc, T. Sixma, P. Kitts, S. Kain, R. Tsien, M. Ormö, S. J. Remington, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 2306–2311.
- [8] B. G. Reid, G. C. Flynn, *Biochemistry* **1997**, 36, 6789–6791.
- [9] K. Winkler, Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, **2002**.
- [10] M. Chattoraj, B. King, G. Bublitz, S. Boxer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 8362–8367.
- [11] M. Kneen, J. Farinas, Y. Li, A. Verkman, *Biophysical Journal* **1998**, 74, 1591–1599.
- [12] M. Perppzzo, K. Ward, R. Thompson, W. Ward, *The Journal of Biological Chemistry* **1988**, 263, 7713–7716.
- [13] T. Creemers, A. Lock, V. Subramaniam, T. M. Jovin, S. Völker, *Nature structural biology* **1999**, 6, 557–560.
- [14] K. Winkler, J. Lindner, V. Subramaniam, T. M. Jovin, P. Vöhringer, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2002**, 4(6), 1072–1081, DOI 10.1039/b108843b.

- [15] J. J. van Thor, G. Zanetti, K. Ronayne, M. Towrie, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 16099–16108.
- [16] J. J. van Thor, K. L. Ronayne, M. Towrie, J. T. Sage, *Biophysical Journal* **2008**, *95*(4), 1902–1912, DOI 10.1529/biophysj.108.129957.
- [17] J. T. M. Kennis, D. S. Larsen, I. H. M. van Stokkum, M. Vengris, J. J. van Thor, *PNAS* **2004**, *101*, 17988–17993, DOI 10.1073/pnas.0404262102.
- [18] G. H. Patterson, *Science* **2002**, *297*(5588), 1873–1877, DOI 10.1126/science.1074952.
- [19] I. Hayashi, H. Mizuno, K. I. Tong, T. Furuta, F. Tanaka, M. Yoshimura, A. Miyawaki, M. Ikura, *Journal of Molecular Biology* **2007**, *372*(4), 918–926, DOI 10.1016/j.jmb.2007.06.037.
- [20] R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, W. E. Moerner, *Nature* **1997**, *388*, 355–358.
- [21] K. A. Lukyanov, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*(34), 25879–25882, DOI 10.1074/jbc.c000338200.
- [22] N. V. Pletneva, V. Z. Pletnev, I. I. Shemiakina, D. M. Chudakov, I. Artemyev, A. Wlodawer, Z. Dauter, S. Pletnev, *Protein Science* **2011**, *20*(7), 1265–1274, DOI 10.1002/pro.654.
- [23] T. Brakemann, G. Weber, M. Andresen, G. Groenhof, A. C. Stiel, S. Trowitzsch, C. Eggeling, H. Grubmuller, S. W. Hell, M. C. Wahl, S. Jakobs, *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*(19), 14603–14609, DOI 10.1074/jbc.M109.086314.
- [24] H. Mizuno, T. K. Mal, M. Wälchli, A. Kikuchi, T. Fukano, R. Ando, J. Jeyakanthan, J. Taka, Y. Shiro, I. Mitsuhiko, A. Miyawaki, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*(27), 9227–9232, DOI 10.1073/pnas.0709599105.
- [25] H. Mizuno, T. K. Mal, M. Wälchli, T. Fukano, M. Ikura, A. Miyawaki, *Journal of Biomolecular NMR* **2010**, *48*(4), 237–246, DOI 10.1007/s10858-010-9453-5.
- [26] R. Ando, *Science* **2004**, *306*(5700), 1370–1373, DOI 10.1126/science.1102506.
- [27] M. Andresen, A. C. Stiel, S. Trowitzsch, G. Weber, C. Eggeling, M. C. Wahl, S. W. Hell, S. Jakobs, *PNAS* **2007**, *104*, 13005–13009, DOI 10.1073/pnas.0700629104.



- [28] S. Habuchi, R. Ando, P. Dedecker, W. Verheijen, H. Mizuno, A. Miyawaki, J. Hofkens, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102(27), 9511–9516, DOI 10.1073/pnas.0500489102.
- [29] M. M. Warren, M. Kaucikas, A. Fitzpatrick, P. Champion, J. Timothy Sage, J. J. van Thor, *Nature Communications* **2013**, 4, 1461, DOI 10.1038/ncomms2460.
- [30] E. Fron, C. Flors, G. Schweitzer, S. Habuchi, H. Mizuno, R. Ando, F. C. De Schryver, A. Miyawaki, J. Hofkens, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129(16), 4870–4871, DOI 10.1021/ja069365v.
- [31] A. Lukacs, A. Haigney, R. Brust, K. Addison, M. Towrie, G. M. Greetham, G. A. Jones, A. Miyawaki, P. J. Tonge, S. R. Meech, *The Journal of Physical Chemistry B* **2013**, 117(40), 11954–11959, DOI 10.1021/jp406142g.
- [32] M. Andresen, J. Stiel, Andre C- and Fölling, D. Wenzel, A. Schönle, A. Egner, C. Eggeling, S. W. Hell, S. Jakobs, *Nature Biotechnology* **2008**, 26(9), 1035–1040, DOI 10.1038/nbt.1493.
- [33] A. Regis Faro, P. Carpentier, G. Jonasson, G. Pompidor, D. Arcizet, I. Demachy, D. Bourgeois, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133(41), 16362–16365, DOI 10.1021/ja207001y.
- [34] M. Vengris, I. H. M. van Stokkum, X. He, A. F. Bell, P. J. Tonge, R. van Grondelle, D. S. Larsen, *The Journal of Physical Chemistry A* **2004**, 108(21), 4587–4598, DOI 10.1021/jp037902h.
- [35] K. Addison, J. Conyard, T. Dixon, P. C. Bulman Page, K. M. Solntsev, S. R. Meech, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2012**, 3(16), 2298–2302, DOI 10.1021/jz3008408.
- [36] J. Dong, K. M. Solntsev, L. M. Tolbert, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128(37), 12038–12039, DOI 10.1021/ja063128a.
- [37] L. Andersen, A. Lapierre, S. Nielsen, I. Nielsen, S. Pedersen, U. Pedersen, S. Tomita, *The European Physical Journal D* **2002**, 20(3), 597–600, DOI 10.1140/epjd/e2002-00141-0.
- [38] L. Lammich, M. x. Petersen, M. B. Nielsen, L. Andersen, *Biophysical Journal* **2007**, 92(1), 201–207, DOI 10.1529/biophysj.106.093674.
- [39] X. He, A. F. Bell, P. J. Tonge, *FEBS Letters* **2003**, 549(1-3), 35–38, DOI 10.1016/s0014-5793(03)00761-0.

- [40] H. Niwa, Y. Inoue, T. Hirano, T. Matsuno, S. Kojima, M. Kubota, M. Ohashi, F. I. Tsuji, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13617–13622.
- [41] N. M. Webber, K. L. Litvinenko, S. R. Meech, *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*(33), 8036–8039, DOI 10.1021/jp011430u.
- [42] D. Mandal, T. Tahara, S. R. Meech, *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*(3), 1102–1108, DOI 10.1021/jp035816b.
- [43] A. Usman, O. F. Mohammed, E. T. J. Nibbering, J. Dong, K. M. Solntsev, L. M. Tolbert, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*(32), 11214–11215, DOI 10.1021/ja0520520.
- [44] S. L. Maddalo, M. Zimmer, *Photochem Photobiol* **2006**, *82*(2), 367–372, DOI 10.1562/2005-04-11-ra-485.
- [45] L. Wu, K. Burgess, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*(12), 4089–4096, DOI 10.1021/ja710388h.
- [46] C. L. D. Gibb, B. C. Gibb, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*(37), 11408–11409, DOI 10.1021/ja0475611.
- [47] A. Baldrige, S. R. Samanta, N. Jayaraj, V. Ramamurthy, L. M. Tolbert, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*(5), 1498–1499, DOI 10.1021/ja908870k.
- [48] M. Andresen, M. C. Wahl, A. Stiel, F. Gräter, L. V. Schäfer, S. Trowitzsch, G. Weber, C. Eggeling, H. Grubmüller, S. W. Hell, S. Jakobs, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*(37), 13070–13074, DOI 10.1073/pnas.0502772102.
- [49] S. Pletnev, D. Shcherbo, D. M. Chudakov, N. Pletneva, E. M. Merzlyak, A. Wlodawer, Z. Dauter, V. Pletnev, *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*(43), 28980–28987, DOI 10.1074/jbc.M800599200.
- [50] S. Gayda, K. Nienhaus, G. U. Nienhaus, *Biophysical Journal* **2012**, *103*(12), 2521–2531, DOI 10.1016/j.bpj.2012.11.011.
- [51] J. Bigeleisen, M. Wolfsberg, *Advance in Chemical Physics* **1958**, *1*, 15–76.
- [52] F. H. Westheimer, *Chem. Rev.* **1961**, *61*, 265–273.
- [53] L. I. Krishtalik, *Biochimica et Biophysica Acta* **2000**, *1458*, 6–27.
- [54] T. Wilhelm, J. Piel, E. Riedle, *Optics Letters* **1997**, *22*(19), 1494–1496.
- [55] W. Lauterborn, T. Kurz, *Coherent Optics: fundamentals and applications*, Springer, **2003**.

- [56] J.-C. Diels, W. Rudolph, *Ultrashort Laser Puls Phenomena*, Elsevier, **2006**.
- [57] R. Alfano, S. Shapiro, *Physical Review Letters* **1970**, *24*(11), 584–587.
- [58] A. Brodeur, S. Chin, *J. Opt. Soc. Am. B* **1999**, *16*(4), 637–650.
- [59] S. L. Chin, S. Petit, F. Borne, K. Miyazaki, *Jpn. J. Appl. Phys.* **1999**, *38*, L126–L128.
- [60] S. Kovalenko, A. Dobryakov, J. Ruthmann, N. Ernsting, *Physical Review A* **1999**, *59*(3), 2369–2384.
- [61] L. De Boni, C. Toro, F. Hernández, *Optical Society of America* **2008**.
- [62] J. B. Ashcom, R. R. Gattass, C. B. Schaffer, E. Mazur, *J.* **2006**, *23*(11), 2317–2322.
- [63] (Hrsg.: R. R. Alfano), *The Supercontinuum Laser Source*, (Hrsg.: R. R. Alfano), Springer, **2006**.
- [64] A. Zheltikov, *Physics - Uspekhi* **2006**, *49*(6), 605–628.
- [65] E. Fron, M. Van der Auweraer, J. Hofkens, P. Dedecker, *The Journal of Physical Chemistry B* **2013**, 131213083144001, DOI 10.1021/jp409654f.
- [66] J. Schmidt, A. Penzkofer, *Chemical Physics* **1989**, *133*, 297–301.
- [67] A. C. Stiel, S. Trowitzsch, G. Weber, M. Andresen, C. Eggeling, S. W. Hell, S. Jakobs, M. C. Wahl, *Biochemical Journal* **2007**, *402*(1), 35–42, DOI 10.1042/bj20061401.
- [68] G. Orlandi, W. Siebrand, *Chem. Phys. Lett.* **1975**, *30*, 352–354.
- [69] L. V. Schäfer, L. Vfer, G. Groenhof, A. R. Klingen, G. M. Ullmann, M. Boggio-Pasqua, M. A. Robb, H. Grubmüller, H.üller, *Angewandte Chemie* **2007**, *119*(4), 536–542, DOI 10.1002/ange.200602315.
- [70] A. Vogt, C. D’Angelo, F. Oswald, A. Denzel, C. H. Mazel, M. V. Matz, S. Ivanchenko, G. U. Nienhaus, J. Wiedenmann, *PLoS ONE* **2008**, *3*(11), e3766, DOI 10.1371/journal.pone.0003766.
- [71] H. Chang, M. Zhang, W. Ji, J. Chen, Y. Zhang, B. Liu, J. Lu, J. Zhang, P. Xu, T. Xu, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *109*(12), 4455–4460.
- [72] J. N. Henderson, H.-w. Ai, R. E. Campbell, S. J. Remington, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*(16), 6672–6677, DOI 10.1073/pnas.0700059104.

- [73] A. C. Stiel, M. Andresen, H. Bock, M. Hilbert, J. Schilde, A. Schönle, C. Eggeling, A. Egner, S. W. Hell, S. Jakobs, *Biophysical Journal* **2008**, *95*(6), 2989–2997, DOI 10.1529/biophysj.108.130146.
- [74] T. Grotjohann, I. Testa, M. Leutenegger, H. Bock, N. T. Urban, F. Lavoie-Cardinal, K. I. Willig, C. Eggeling, S. Jakobs, S. W. Hell, *Nature* **2011**, *478*(7368), 204–208, DOI 10.1038/nature10497.
- [75] T. Grotjohann, I. Testa, M. Reuss, T. Brakemann, C. Eggeling, S. Hell, S. Jakobs, *eLife* **2012**, 1–14, DOI 10.7554/elife.00248.001.
- [76] F. V. Subach, L. Zhang, T. W. Gadella, N. G. Gurskaya, K. A. Lukyanov, V. V. Verkhusha, *Chemistry & Biology* **2010**, *17*(7), 745–755, DOI 10.1016/j.chembiol.2010.05.022.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Struktur des GFP nach Brejc et al. [7] grün: $\beta$ -Faltblatt, rot: $\alpha$ -Helix . . . . .	2
1.2	Reaktionspfad zur Bildung des Chromophors von GFP nach Reid et al. [8] Reaktionsschritte: 1. Zyklisierung, 2. Dehydrierung, 3. Oxidation . . . . .	3
1.3	Umgebung und Koordination des GFP-Chromophors nach Ormö et al. [5] gestrichelte Linien: Wasserstoffbrücken, Länge in Å angegeben . . . . .	3
1.4	Absorption und Emission des GFP in wässriger Phosphatpufferlösung (pH 7) nach Winkler [9] . . . . .	4
1.5	Zustandsmodell von GFP . . . . .	5
1.6	Pump-Probe und Pump-Dump-Probe Messungen an GFP [17]	6
1.7	Chromophorumgebung von Dronpa nach Andresen et al. [27] Atome und Wasser sind als farbige Kugeln gezeichnet (grau: C, blau: N, rot: O / OH, türkis: H <sub>2</sub> O Bindungen sind als Striche gezeichnet (grün gestrichelt: Wasserstoffbrücken, schwarze/lila/blau: Atombindung) . . . . .	9
1.8	Spektren von Dronpa nach Ando et al. [26] . . . . .	10
1.9	Schaltenspektren von Dronpa im Ensemble nach Ando et al. [26]	11
1.10	Zustandsmodelle von Dronpa . . . . .	11
1.11	Stationäre Spektren von rsFastLime nach Andresen et al. [32]	13
1.12	Chromophorumgebung von Padron nach Brakemann et al. [23] Atome und Wasser sind als farbige Kugeln gezeichnet (grau: C, blau: N, rot: O / OH, türkis: H <sub>2</sub> O Bindungen sind als Striche gezeichnet (grün gestrichelt: Wasserstoffbrücken, schwarze/lila/blau: Atombindung) . . . . .	14
1.13	Stationäre Spektren von Padron bei pH 7 nach Brakemann et al. [23] orangene Linie: AN-Zustand, rote Linie: AUS-Zustand, blaue gestrichelte Linie: Fluoreszenzanregungsspektrum, grüne gestrichelte Linie: Fluoreszenzspektrum . . . . .	15

1.14	Absorptionszustände im Kryo-Experiment von Faro et al. [33] oben links: Umwandlung von $B_{trans}$ zu $I_{cis}$ durch Bestrahlung bei 523 nm bei 100 K, Insert: zeitabhängige Maxima der Banden oben rechts: Spontane Umwandlung von $I_{cis}$ nach $B_{cis,LT}$ bei 100 K, Insert: zeitabhängige Maxima der Banden unten links: Bildung des Protonierungsgleichgewichts $A_{cis,RT} \rightleftharpoons B_{cis,RT}$ bei $T > 180$ K unten rechts: Emissionsspektren von $B_{trans}$ , $I_{cis}$ , $B_{cis,LT}$ und $B_{cis,RT}$ , Insert: reversible Isomerisierung zwischen $B_{trans}$ und $I_{cis}$ durch wechselnde Bestrahlung bei 405 und 523 nm . . . . .	17
1.15	HBDI . . . . .	20
1.16	Photodynamik von HBDI nach Vengris et al. [34] . . . . .	22
1.17	Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute von GFP-Y66H-Chromophor-Analoga durch Fixierung nach Wu et al. [45] a: GFP-Tyr <sup>66</sup> His-Chromophor-Analog, b: $\Phi_F = 0.0005$ , c: $\Phi_F = 0.86 \pm 0.2$ . . . . .	23
1.18	Torsionswinkel des Chromophors von Padron 0.9 . . . . .	24
1.19	Auswirkungen einer protonierenden Gruppe X in der Umgebung des Chromophors C. Rote Kurven bezeichnen protonierte, blaue deprotonierte Chromophore. Gestrichelte Linien beschreiben unterschiedliche Subspezies, durchgezogene Linien jeweils die Summe aller protonierter bzw. deprotonierter Spezies. . . . .	27
1.20	Kinetischer Isotopeneffekt am Beispiel von Wasserstoff und Deuterium . . . . .	29
2.1	Schematischer Aufbau des verwendeten UV/Vis Lasersystems ST: Strahlteiler, VE: Verschiebeeinheit, PD: Photodiode, SK: Saphir/CaF <sub>2</sub> -Kristall, SM: Spektrometer . . . . .	32
2.2	Schematischer Aufbau des nicht-kollinearen optisch-parametrischen Verstärkers ( <i>non-collinear optical parametric amplifier</i> , NOPA) VE: Verschiebeeinheit, BBO: Beta-Bariomboratkristall, ST: Strahlteiler, LB: Lochblende, SK: Saphirkristall . . . . .	33
2.3	Schematischer Aufbau zur Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG) und Summenfrequenz (SFG) BBO: Beta-Bariumboratkristall, DS: Dielektrischer Spiegel, LH: $\lambda/2$ -Platte, BE: Verschiebeeinheit . . . . .	35
2.4	Schematischer Aufbau der Weisslichterzeugung LH: $\lambda/2$ -Platte, GF: Graufilter, LB: Lochblende, CaF <sub>2</sub> -Kristall . . . . .	36
2.5	Das erzeugte Weißlichtkontinuum . . . . .	37

2.6	Schematischer Aufbau des Interferometers S1,2: Planspiegel, S3,6: Konkavspiegel, S4,5: Konkavspiegel, ST: Strahlteiler, SM1,2: Spektrometer mit Diodenzeile, TF: Tiefpass-Kantenfilter	38
2.7	Auftretende Abbildungsfehler . . . . .	39
2.8	Schematischer Aufbau des Probekreislaufs PP: Peristaltikpumpe, BK: Bestrahlungskammer, LED: Lichtemittierende Diode . . . . .	39
2.9	Reaktionsschema und korrespondierende Differenz-Konzentrationspektren der beteiligten Spezies mit und ohne Dumpspuls nach Anregung durch einen Pumpspuls . . . . .	44
2.10	Elektrische Steuerung und Datenaufnahme. Signaleingang: links, Signalausgang: rechts DT: Steuerelektronik Pockelszelle, DS: Diodensteuerung, CS: Choppersteuerung, CH: Chopper, PD: Photodiode, DG: Delay-Generator, PG: Pulsgenerator, DC1: Diodentreiber, SM1,2: Spektrometer mit Diodenzeile, AD: Analog/Digitalwandler, GPIB: GPIB-Karte, PVE: Verschiebeeinheit . . . . .	45
2.11	Anpassung der wellenlängenabhängigen Nullpunkte . . . . .	47
2.12	Darstellung der einzelnen Schritte bei der Erstellung der Funktion zur Anpassung transients Daten. Die gepunktete Linie markiert $t_0$ . . . . .	50
3.1	pH-Abhängige Absorptionsspektren des <i>cis</i> - (a) und <i>trans</i> -Isomers (b) von Padron0.9. Gemessene Spektren sind als offene Kreise dargestellt, die durchgezogenen Linien sind Anpassungen der gemessenen Spektren nach dem Modell 3.9a. Die Spektren sind auf einen Absorptionsspek der Proteinumgebung bei 290 nm normiert. . . . .	56
3.2	Absorptionsspektren der Isomere von Padron0.9 bei pH 4 (rote Linien) und nach anschließender Änderung des pH-Wertes auf $\approx 7$ (grüne Linien) . . . . .	58
3.3	Modell der Protonierung des Chromophors C (respektive T) von Padron0.9 mit zwei protonierenden Gruppen X und Y in unmittelbarer Umgebung. Spezies mit identischen Absorptionsspektren sind mit der gleichen Farbe unterlegt. Die pK-Werte aus der Anpassung der Absorptionsspektren für <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Isomer (in Klammern) sind angegeben. . . . .	59
3.4	Modell des Protonierungsgleichgewichtes von Padron0.9, pH-abhängige Konzentrationen und ihre Absorptionsspektren . . . . .	59

3.5	Emissionsspektren von Padron0.9. Punkte: gemessene Daten, durchgezogene Linie: Anpassung der Daten mit einer Summe von Gaußfunktionen, gestrichelte Linie: einzelne Gaußfunktionen . . . . .	61
3.6	Vergleich der transienten Spektren von Padron0.9, $\lambda_p = 505$ nm, bei pH 7 (orange) und pH 10 (blau) zu verschiedenen Verzögerungszeiten . . . . .	62
3.7	Transiente Spektren von Padron0.9 bei pH 10 nach Anregung bei 505 nm bei verschiedenen Verzögerungszeiten. $\circ$ : aufgenommenen Daten, $/$ : Anpassung durch das kinetische Modell in Fig.3.9a. . . . .	64
3.8	Amplitudenspektren der exponentiellen Anpassung der transienten Daten von Padron0.9 bei pH 10 nach Anregung bei 505 nm. . . . .	65
3.9	Modell der photoinduzierten Dynamik von Padron0.9 nach Anregung der $C^-$ - und $T^-$ -Spezies bei $\lambda_p = 505$ nm, zeitabhängige Konzentrationen der beteiligten Spezies und ihre Absorptionsspektren . . . . .	70
3.10	Vergleich der transienten Spektren von Padron0.9, <i>cis</i> -Isomer, $\lambda_p = 387$ nm, bei pH 7 (orange) und pH 10 (blau) zu verschiedenen Verzögerungszeiten . . . . .	72
3.11	Transiente Spektren des <i>cis</i> -Isomers von Padron0.9 bei pH 10 nach Anregung bei 387 nm bei verschiedenen Verzögerungszeiten. $\circ$ : aufgenommenen Daten, $/$ : Anpassung durch das kinetische Modell in Fig.3.13a. . . . .	73
3.12	Amplitudenspektren der exponentiellen Anpassung der transienten Daten des <i>cis</i> -Isomers von Padron0.9 bei pH 10 nach Anregung bei 387 nm. . . . .	74
3.13	Modell der photoinduzierten Dynamik von Padron0.9 nach Anregung der $C^H$ -Spezies durch $\lambda_p = 387$ nm, zeitabhängige Konzentrationen der beteiligten Spezies und ihre Absorptionsspektren . . . . .	77
3.14	Pump-Dump-Probe-Spektroskopie an Padron0.9 mit $\lambda_p = 387$ nm und $\lambda_d = 560$ nm, $\Delta t_d = 40$ ps . . . . .	79
3.15	Modell der photoinduzierten Dynamik von Padron0.9 nach Anregung der $C^H$ -Spezies durch $\lambda_p = 387$ nm und Dumpen durch $\lambda_d = 560$ nm 40 ps nach Anregung, zeitabhängige Konzentrationen der beteiligten Spezies und ihre Absorptionsspektren . . . . .	81
3.16	Transiente Spektren von Padron0.9 bei pH 4 nach Anregung bei 387 nm bei verschiedenen Verzögerungszeiten . . . . .	83



3.17	Amplitudenspektren der exponentiellen Anpassung der transienten Daten von Padron0.9 bei pH 4 nach Anregung bei 387 nm. . . . .	85
3.18	Modell der photoinduzierten Dynamik von Padron0.9 nach Anregung der $C^{H+}$ -Spezies durch $\lambda_p = 387$ nm, zeitabhängige Konzentrationen der beteiligten Spezies und ihre Absorptionsspektren . . . . .	86
3.19	pH-abhängige Absorptionsspektren von rsFastlime. Gemessene Spektren sind als offene Kreise dargestellt, die durchgezogenen Linien sind Anpassungen der gemessenen Spektren nach dem Modell 3.9a. Die Spektren sind auf einen Absorptionsspeak der Proteinumgebung bei 290 nm normiert. . . . .	88
3.20	Modell der Protonierung des Chromophors C von rsFastlime mit zwei protonierenden Gruppen X und Y in unmittelbarer Umgebung. Spezies mit identischen Absorptionsspektren sind mit der gleichen Farbe unterlegt. Die pK-Werte aus der Anpassung der Absorptionsspektren für das <i>cis</i> -Isomer sind angegeben. . . . .	90
3.21	Modell des Protonierungsgleichgewichtes von rsFastlime, pH-abhängige Konzentrationen und ihre Absorptionsspektren	90
3.22	Fluoreszenz- und stimulierte Emissionsspektrum nach Gl. 3.2, $\lambda_p = 500$ nm, pH 7 . . . . .	91
3.23	Transiente Spektren von rsFastlime bei pH 7 nach Anregung bei 505 nm bei verschiedenen Verzögerungszeiten. $\circ$ : aufgenommene Daten, $/$ : Anpassung durch 2-Zustandsmodell. . . . .	92
3.24	Amplitudenspektren der exponentiellen Anpassung der transienten Daten von rsFastlime bei pH 7 nach Anregung bei 505 nm. . . . .	93
3.25	Spektren der an der photoinduzierten Dynamik von rsFastlime nach Anregung der $C^-$ -Spezies bei $\lambda_p = 505$ nm beteiligten Spezies . . . . .	94
3.26	Transiente Spektren von rsFastlime bei pH 7 nach Anregung bei 387 nm bei verschiedenen Verzögerungszeiten. $\circ$ : aufgenommenen Daten, $/$ : Anpassung durch die kinetischen Modelle in Abb. 3.28a und 3.29a . . . . .	96
3.27	Amplitudenspektren . . . . .	97
3.28	Modell der an der photoinduzierten Dynamik von rsFastLime nach Anregung der $C^H$ -Spezies durch $\lambda_p = 387$ nm, zeitabhängige Konzentrationen der beteiligten Spezies und ihre Absorptionsspektren . . . . .	100
3.29	Spektren der Spezies aus a . . . . .	102

- 
- 3.30 Modell der photoinduzierten Dynamik von rsFastLime nach Anregung der  $T^H$ -Spezies durch  $\lambda_p = 387$  nm, zeitabhängige Konzentrationen der beteiligten Spezies und ihre Absorptionsspektren . . . . . 102
- 3.31 Zusammenfassung der kinetischen Modelle zur Beschreibung der Dynamik nach Photoanregung der einzelnen Spezies. Vermutete Wege der Isomerisierung sind als gestrichelte Linien dargestellt. . . . . 105
- 3.32 Geschwindigkeitskoeffizienten der kinetischen Modelle zur Beschreibung der Dynamik nach Photoanregung der einzelnen Grundzustandsspezies . . . . . 106
- 3.33 Allgemeines Schaltmodell und Konzentrationsverlauf der Grundzustandsspezies.  $10 < t < 50$ :  $\lambda_{ex} = 400$  nm,  $t \geq 50$ :  $\lambda_{ex} = 500$  nm  
108

# Tabellenverzeichnis

1.1	Lebensdauern von HBDI in verschiedenen Lösungsmitteln [42] . . . . .	21
1.2	Zusammenhang zwischen dem Betrag der Summe der Winkel $\phi$ und $\tau$ und der Fluoreszenzquantenausbeute $\Phi_F$ für einige ausgewählte Proteine [23] . . . . .	25
2.1	Verwendete Puffer-Lösungen für verschiedene pH-Werte und Messungen. Die Angaben beziehen sich auf jeweils 100 mL Pufferlösung in zweifach destilliertem Wasser ( <i>Aqua bidest</i> ) .	53
3.1	Absorptionsmaxima $Abs_{max}$ der AN- und AUS-Zustände einiger RSFPs und Schaltrichtung bei Bestrahlung derselben. Weitere wichtige Absorptionsbanden sind in Klammern angegeben. * Bestrahlung bei der angegebenen Wellenlänge schaltet das Protein ** die genaue Lage der Absorptionsbanden von rsCherry und rsCherryRev sind nicht angegeben, Bestrahlung bei der angegebenen Wellenlänge schaltet das Protein . . . .	110
A.1	Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von Padron0.9 im Grundzustand (Abb. 3.4) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15) . . . . .	114
A.2	Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von Padron0.9 nach Anregung von $C^-$ und $T^-$ durch $\lambda_p = 505$ nm bei pH 10 (Abb. 3.9c) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15) . . .	115
A.3	Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von Padron0.9 nach Anregung von $C^H$ durch $\lambda_p = 387$ nm bei pH 10 (Abb. 3.13c) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15) . . . . .	116
A.4	Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von Padron0.9 nach Anregung von $C^H$ durch $\lambda_p = 387$ nm und Dumpen nach 40 ps durch $\lambda_d = 560$ nm bei pH 10 (Abb. 3.15c) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15) . . . . .	117
A.5	Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von Padron0.9 nach Anregung von $C^H+$ durch $\lambda_p = 387$ nm bei pH 4 (Abb. 3.16) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15) . . . . .	118

---

A.6	Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von rsFas-Lime im Grundzustand (Abb. 3.21) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15) . . . . .	119
A.7	Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von rsFas-Lime nach Anregung von $C^-$ durch $\lambda_p = 505$ nm bei pH 10 (Abb. 3.25) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15) . . . . .	120
A.8	Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von rsFas-Lime nach Anregung von $C^H$ durch $\lambda_p = 387$ nm bei pH 10 (Abb. 3.28c) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15) . . . . .	121
A.9	Parameter zur Beschreibung der Speziesspektren von rsFas-Lime nach Anregung von $T^H$ durch $\lambda_p = 387$ nm bei pH 10 (Abb. 3.28c) durch Gaussfunktionen (Gl. 2.15) . . . . .	122