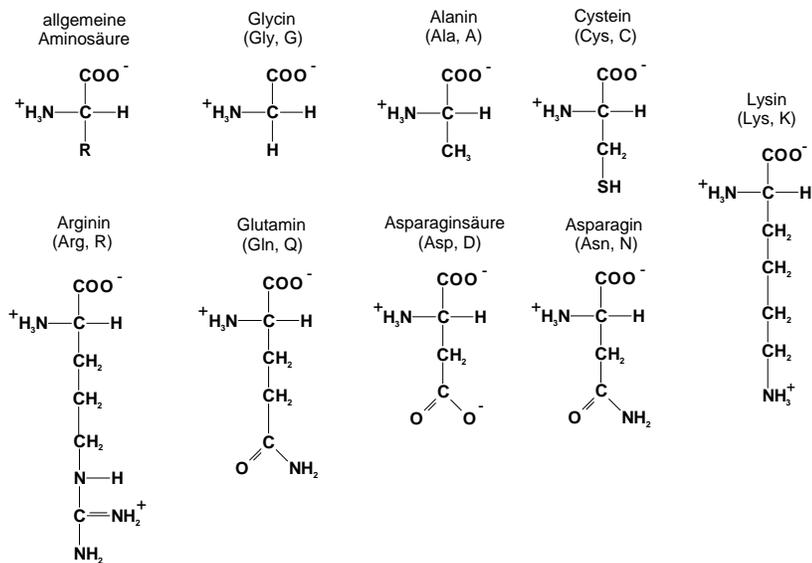


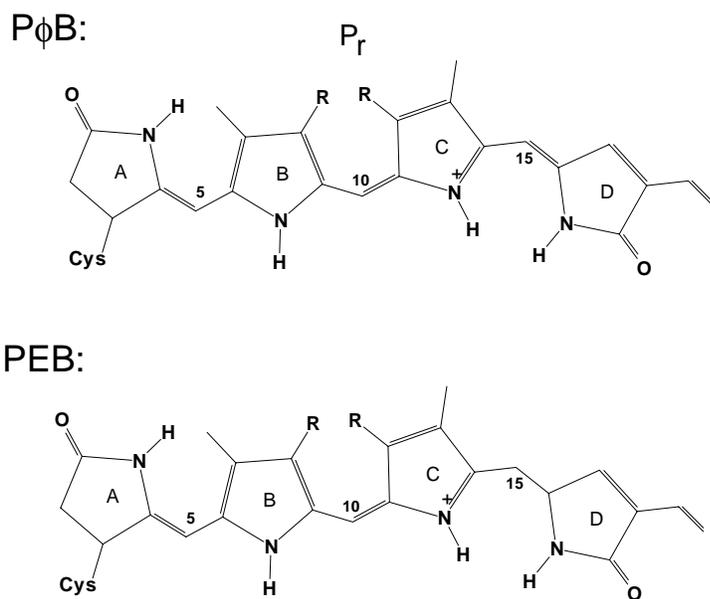
# Anhang A

## Anhang

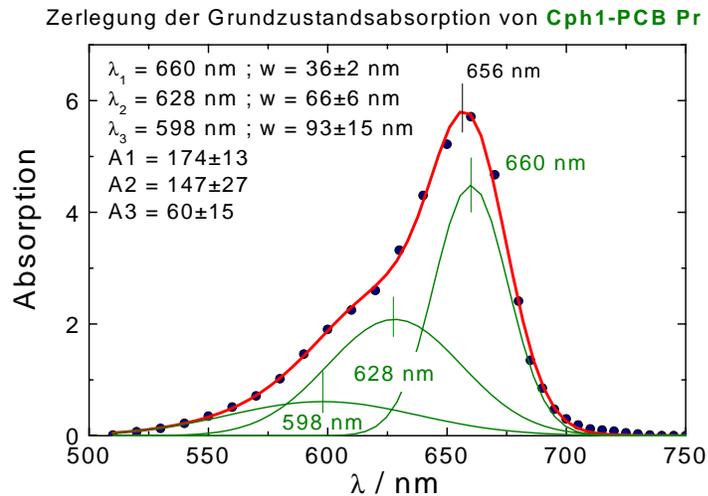
### A.1 Biologische Grundlagen



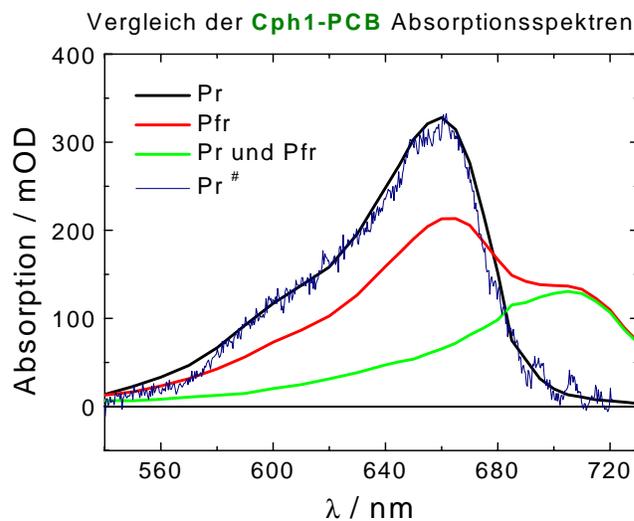
**Abbildung A.1:** Chemische Formeln ausgewählter Aminosäuren. Alle Aminosäuren weisen eine Amino- und eine Carboxylgruppe, ein Wasserstoffatom und einen Rest R an demselben Kohlenstoffatom C auf (links oben). Durch unterschiedliche Seitenketten (Reste) unterscheiden sich die 20 Aminosäuren, die in der Natur vorkommen und aus denen Proteine bestehen. Die Amino-, die Carboxylgruppe sowie das sie verbindende Kohlenstoffatom stellen die Grundeinheit der Peptidbindung dar, die das Proteingerüst bilden. Von den aufgeführten Aminosäuren (AS) weisen zwei einen geladenen Rest auf. Arginin besitzt eine positive und die Asparaginsäure (oder Aspartat) weist eine negative Ladung bei neutralem pH auf.



**Abbildung A.2:** Chromophorstrukturen von Haferphytochrom [34] in der  $P_r$  Form und Cph1-PEB. Der Unterschied der Chromophore zwischen PCB (phycocyanobilin),  $P\phi B$  (phytochromobilin) und PEB (phycoerythrobilin) besteht zum einen darin, dass in PEB die  $C_{15} = C_{16}$  Doppelbindung gesättigt ist, zum anderen darin, dass in PCB im Gegensatz zu  $P\phi B$  und PEB der Rest am Ring D eine Ethylgruppe anstelle einer Vinylgruppe ist.



**Abbildung A.3:** Zerlegung der Grundzustandsabsorption von Cph1-PCB  $P_r$  in Gaußbanden. Mit der Annahme, dass die Struktur der Grundzustandsabsorption von Cph1-PCB  $P_r$  durch vibronische Kopplung verursacht wird, kann man ermitteln, dass die Schwingungsfrequenz etwa im Bereich von 500 bis 1100  $cm^{-1}$  liegen muss. Da sowohl in den RR Daten [49] als auch in den FT-Spektren der Kinetiken (Abbildung 3.27) deutlich Banden um 800  $cm^{-1}$  zu sehen sind, habe ich die vibronische Kopplung mit 800  $cm^{-1}$  gefittet. Der resultierende Fit (bei festgehaltenen Wellenlängen) stimmt gut mit dem Absorptionsspektrum überein.

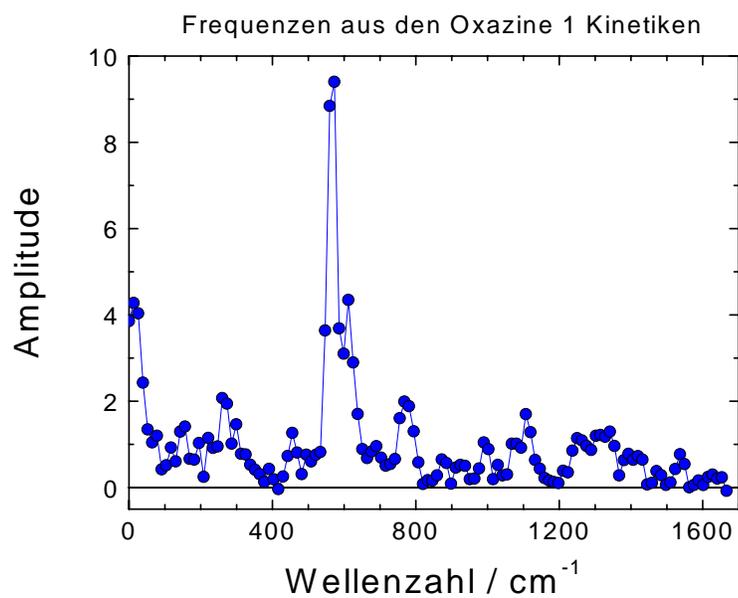


**Abbildung A.4:** Statische Absorptionsspektren von Cph1-PCB  $P_r$ ,  $P_{fr}$ , Überlagerung von  $P_r$  mit  $P_{fr}$  und  $P_r$  während der Messung. Das statische Absorptionsspektrum von Cph1-PCB  $P_r$  (schwarz) stimmt gut mit dem Absorptionsspektrum von  $P_r$  # (blau) überein, das während der *Pump-Probe* Messungen zu negativen Verzögerungszeiten aufgenommen wurde. Zum Vergleich ist noch das berechnete  $P_{fr}$  Absorptionsspektrum (grün) und eine Überlagerung der  $P_r$  und  $P_{fr}$  Form (rot) dargestellt.

## A.2 Physikalische Grundlagen

### A.2.1 Kohärente Wellenpaketdynamik

Als Wellenpaket wird eine kohärente Superposition von Eigenzuständen bezeichnet, die z.B. bei der Anregung aus dem elektronischen Grundzustand in den elektronisch angeregten Zustand entstehen kann, wenn innerhalb der spektralen Breite des Anregungsimpulses eine Reihe vibronischer Übergänge liegen. Bleibt die Kohärenz für einige hundert Femtosekunden substantiell erhalten, so kann die Bewegung des Wellenpaketes auf den Kinetiken als oszillatorisches Signal beobachtet werden. Ein ausgeprägtes oszillatorisches Signal kann z.B. in der Kinetik von Oxazine 1 in Methanol in Abbildung 2.5 beobachtet werden. Die Fouriertransformation dieses Signals weist (in Abbildung A.5) bei  $567$  und  $608\text{ cm}^{-1}$  Eigenfrequenzen auf, die nach Zuordnung von Zinth und Mitarbeiter durch eine kohärente Wellenpaketdynamik aus dem elektronisch angeregten Zustand verursacht wird [60, 108]. Es ist gut zu erkennen, dass in diesem Farbstoffmolekül in Lösung hauptsächlich zwei Frequenzen vibronisch angeregt werden, wodurch ein gut erkennbares Oszillationsmuster mit Schwebung in den Kinetiken auftritt. In den meisten Chromoproteinen tritt die Schwingungs-Dephasierung aufgrund starker Kopplung mit der Proteinumgebung schnell ein, weshalb meist nur in einer kurzen Zeitspanne  $< 1\text{ ps}$  kohärente Wellenpaketdynamik zu beobachten ist. Da in Chromoproteinen meist sehr viele vibronische Übergänge dicht beieinander liegen, ist das oszillatorische Signal oft nicht so deutlich erkennbar wie in Oxazine 1.



**Abbildung A.5:** FT-Spektrum von Oxazine 1 in Methanol. Die Eigenfrequenzen bei  $567$  und  $608 \text{ cm}^{-1}$  sind nach [60, 108] einer Wellenpaketdynamik im elektronisch angeregten Zustand zuzuordnen. Die *Systemresponse* betrug hier etwa  $44 \text{ fs}$ .

## A.2.2 Fehleranalyse der globalen Fits - *exhaustive search* Methode

Die globalen Fits wurden mit Origin 5.0 durchgeführt und alle aufgeführten  $\chi^2$ -Werte sind als reduzierte  $\chi^2$ -Werte zu verstehen:

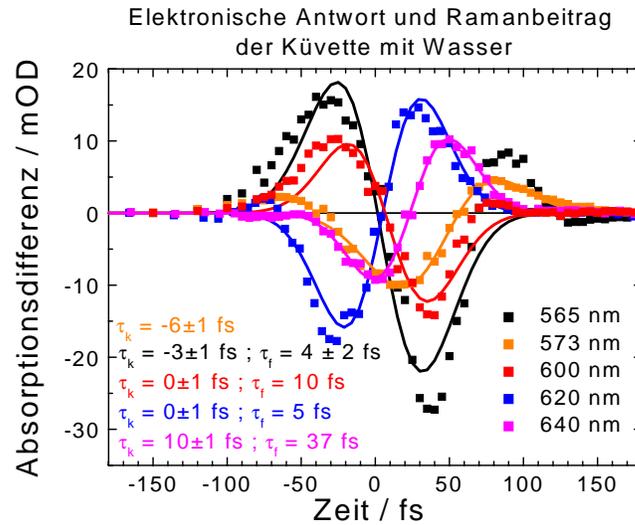
$$\chi^2 = \sum_i^N \frac{(\text{fitpunkte}_i - \text{datenpunkt}_i)^2}{N - m} \quad (\text{A.1}) \quad \begin{array}{l} m : \text{Anzahl der freien Parameter} \\ N : \text{Anzahl der Datenpunkte} \end{array}$$

Die Standardabweichungen, die sich aus den Origin-Fits ergeben, werden aus der Varianz-Kovarianz-Matrix am Punkt des optimalen Fits berechnet und ergeben stets symmetrische Standardabweichungen. Die hier zugrunde liegende Annahme, dass die  $\chi^2$ -Fläche im Punkt des optimalen Fits zur Berechnung der Standardabweichung gut linear genähert werden kann, muss nicht stimmen. Möchte man die Nichtlinearität der  $\chi^2$ -Fläche mit einbeziehen, so kann man die *exhaustive search* Analyse verwenden, die alle möglichen Korrelationen zwischen den Parametern berücksichtigt [109]. Ausgehend vom optimalen Fitresultat wird der gesuchte Parameter (z.B. die Zerfallszeit) um einen geringen Anteil verringert oder vergrößert. Daraufhin wird dieser Wert festgehalten und eine neue Fitroutine gestartet, die eine erneute Minimierung der übrigen Parameter durchführt. Der Wert der Zerfallszeit wird nun so lange verändert, bis das resultierende  $\chi_{min}^2$  signifikant schlechter geworden ist als das  $\chi_{MIN}^2$  des optimalen Fits. Die Spanne, in der die Zerfallszeit hierbei variiert wurde, gibt den Vertrauensbereich an, der nun auch asymmetrisch um den optimalen Wert liegen kann. Die Signifikanz der Abweichung von  $\chi_{MIN}^2$  ergibt sich aus der Fisher-Verteilung (F-Verteilung) und dem Verhältnis  $\frac{\chi_{min}^2}{\chi_{MIN}^2}$ . Für eine gegebene Zahl von Freiheitsgraden, die sich aus der Anzahl der Datenpunkte minus Anzahl der Fitparameter ergibt und einem vorgegebenem Vertrauensbereich, den wir zu 95% gewählt haben, kann ein Faktor F bestimmt werden<sup>1</sup>, um den sich  $\chi_{min}^2$  gegenüber  $\chi_{MIN}^2$  ändern kann, bevor die Änderung signifikant wird. Mit der *exhaustive search* Methode ergeben sich zuverlässigere Vertrauensbereiche der Fitresultate.

---

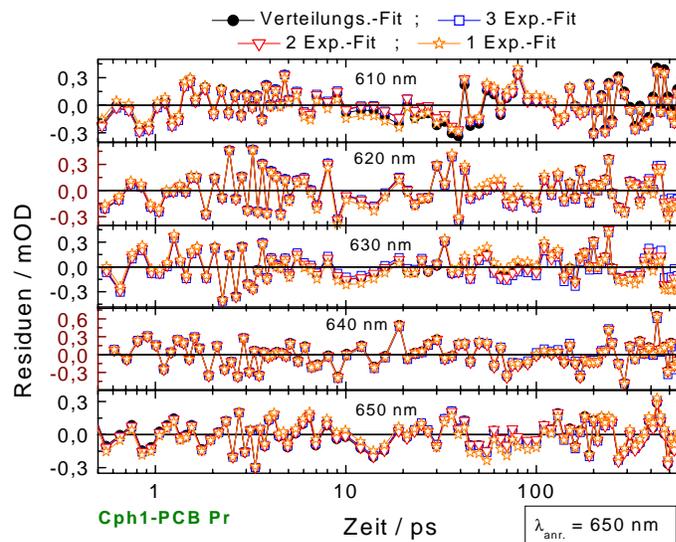
<sup>1</sup>z.B. tabelliert in Bronstein · Semendjajew, Taschenbuch der Mathematik



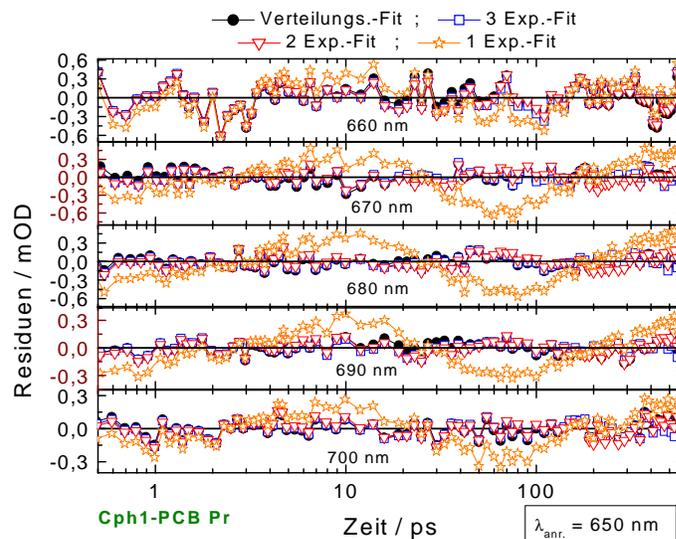


**Abbildung A.7:** Hier ist die Antwort der mit Wasser gefüllten Küvette auf die Störung der Anregung im *Pump-Probe*-Experiment (Quadrate) und der Fit (Linien) zu sehen (vgl. Abbildung 2.21). Die Abtastimpulse weisen alle nahezu keinen Chirp auf, so dass die Signale gut durch den Fit (Formel 2.15) repräsentiert werden. Für die verschiedenen Wellenlängen sind die Zeitnullpunkte aus den Kerrgatingmessungen mit  $\tau_k$  und die Zeitnullpunkte aus den Fits mit  $\tau_f$  aufgeführt. Nimmt man den Mittelwert beider Nullpunkte als echten Nullpunkt, so beträgt die maximal Abweichung  $\pm 15$  fs.

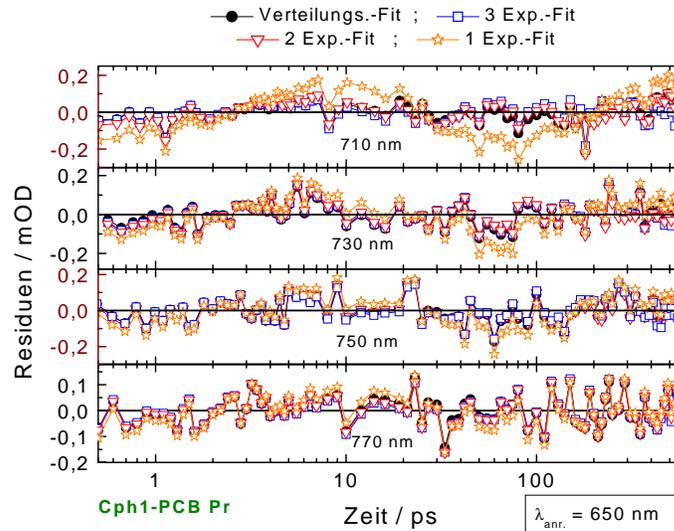
### A.3 Ergänzungen zur Auswertung



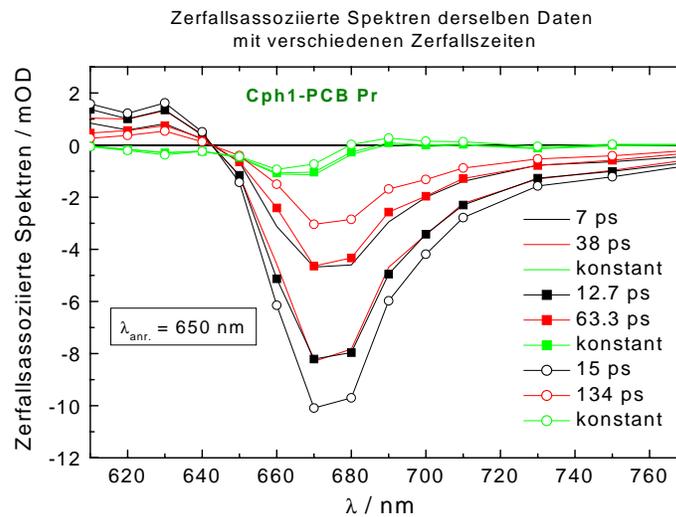
**Abbildung A.8:** Residuen der Fits mit verschiedenen Fitfunktionen. An den Residuen sind die Abtastwellenlängen aufgeführt. Die Anregungswellenlänge der Cph1-PCB -Probe betrug 650nm.



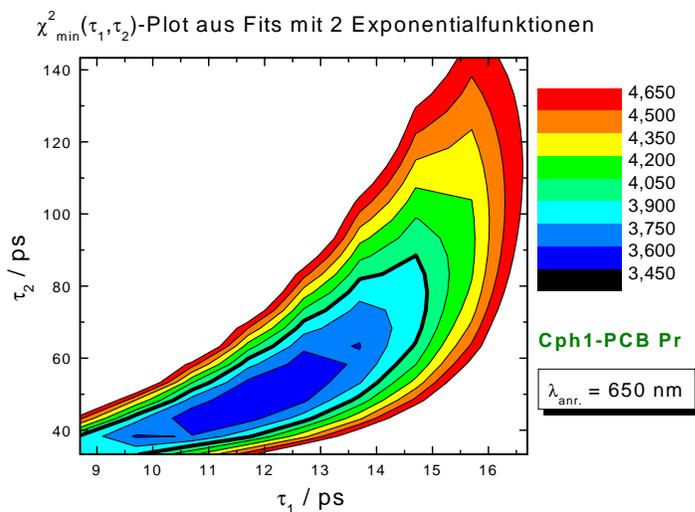
**Abbildung A.9:** Residuen der Fits mit verschiedenen Fitfunktionen. An den Residuen sind die Abtastwellenlängen aufgeführt. Die Anregungswellenlänge der Cph1-PCB -Probe betrug 650nm.



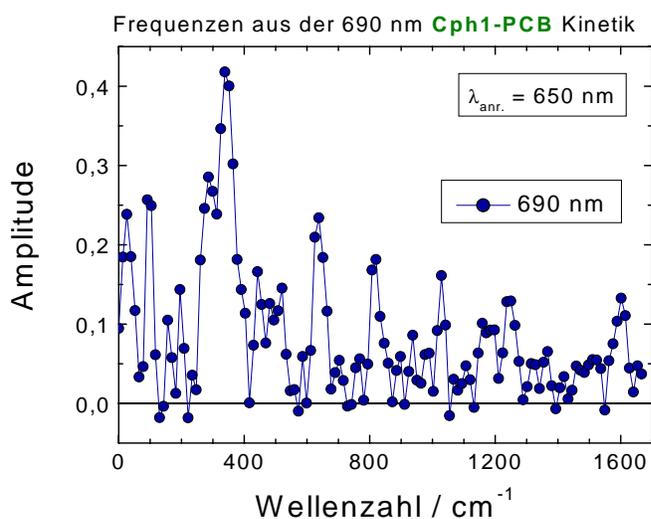
**Abbildung A.10:** Residuen der Fits mit verschiedenen Fitfunktionen. An den Residuen sind die Abtastwellenlängen aufgeführt. Die Anregungswellenlänge der Cph1-PCB -Probe betrug 650nm.



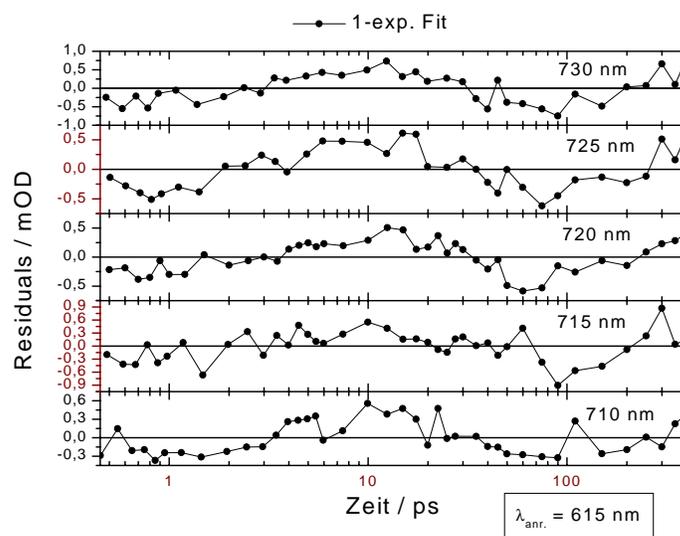
**Abbildung A.11:** Zerfallsassozierte Spektren eines 2 Exp.-Fits zu unterschiedlichen Zerfallszeitpaaren (siehe Legende). Die ZAS zeigen, dass unabhängig von den Zerfallszeiten die Spektren zu allen Zerfallszeiten identischen Verlauf aufweisen (mit Ausnahme der konstanten Komponente). Der 95% Vertrauensbereich der Amplituden der kürzeren Zerfallszeit  $A_{\tau_1} = 4,7..10$  mOD überlappt stark mit dem der längeren Zerfallszeit  $A_{\tau_2} = 3..8,2$  mOD. Die Anregungswellenlänge der Cph1-PCB -Probe betrug 650nm.



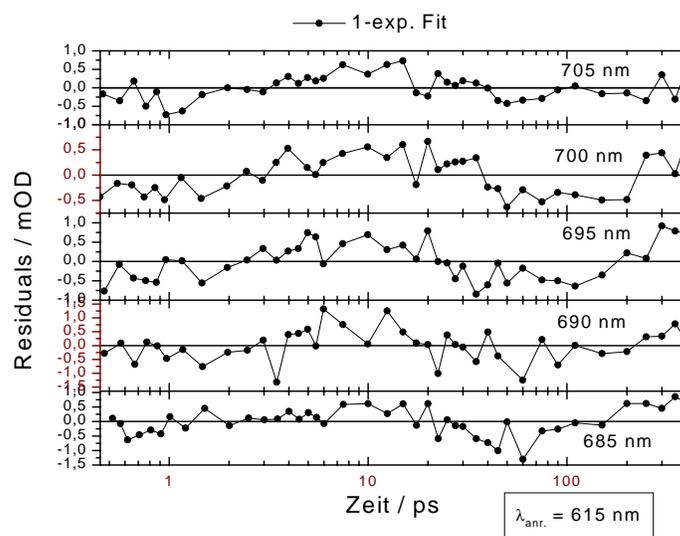
**Abbildung A.12:** Hier ist die  $\chi^2_{\min}$  Oberfläche in Abhängigkeit von den Zerfallszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  für einen 2 Exp.-Fit von Cph1-PCB  $P_r$  dargestellt. Die hier dargestellte Oberfläche ergibt sich als Summe der  $\chi^2_{\min}$ -Oberflächen aus den NOPA-Weißlicht und NOPA-NOPA Messungen. Die dick durchgezogene Linie trennt den inneren Bereich, in dem mit 95% Wahrscheinlichkeit die Zerfallszeiten liegen, von dem restlichen ab.



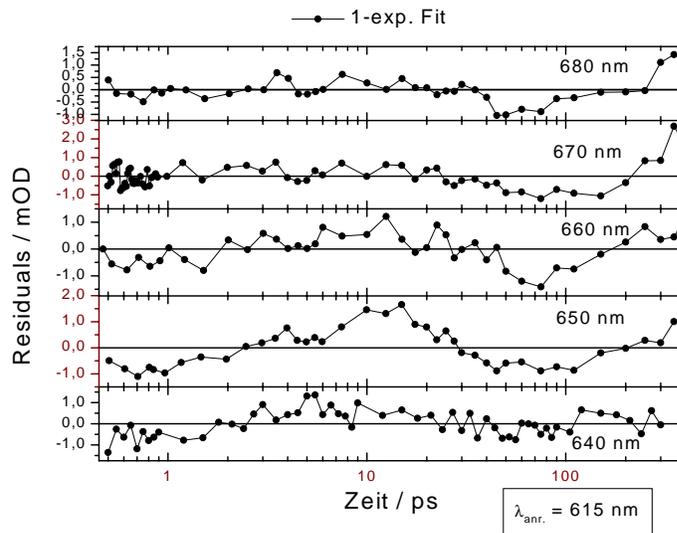
**Abbildung A.13:** Fourierspektrum des Residuums der 690 nm Kinetik von Cph1-PCB  $P_r$ . Die Zeitauflösung entspricht etwa  $760 \text{ cm}^{-1}$ . Die Bande bei  $800 \text{ cm}^{-1}$  ist eine der Markerbanden für die Isomerisierung und wird der  $C_{15}$ -HOOP (hydrogen out of plane) Biegeschwingung zugeordnet[90].



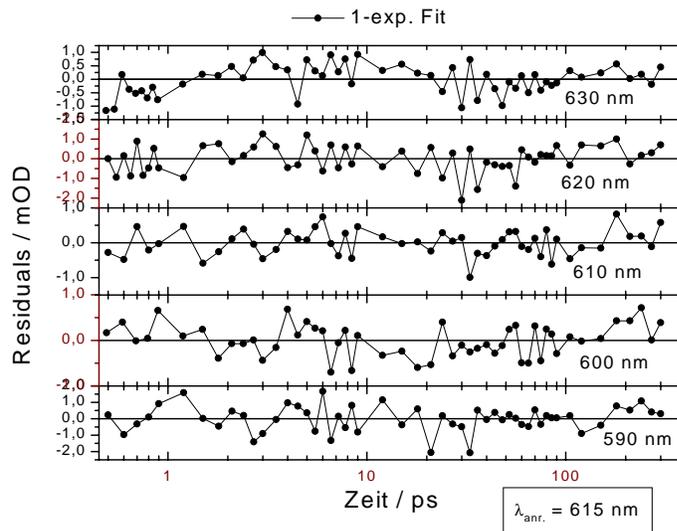
**Abbildung A.14:** Residuen des Fits mit einer Exponentialfunktion. An den Residuen sind die Abtastwellenlängen aufgeführt. Die Anregungswellenlänge der Cph1-PCB  $P_r$  Probe betrug 615nm.



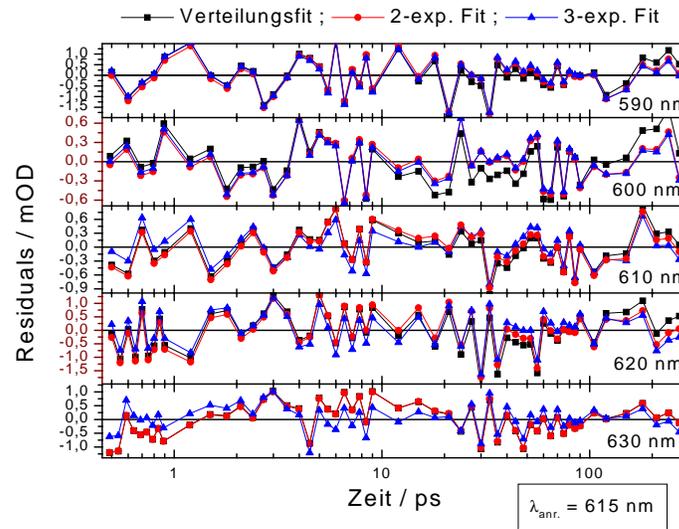
**Abbildung A.15:** Residuen des Fits mit einer Exponentialfunktion. An den Residuen sind die Abtastwellenlängen aufgeführt. Die Anregungswellenlänge der Cph1-PCB  $P_r$  Probe betrug 615nm.



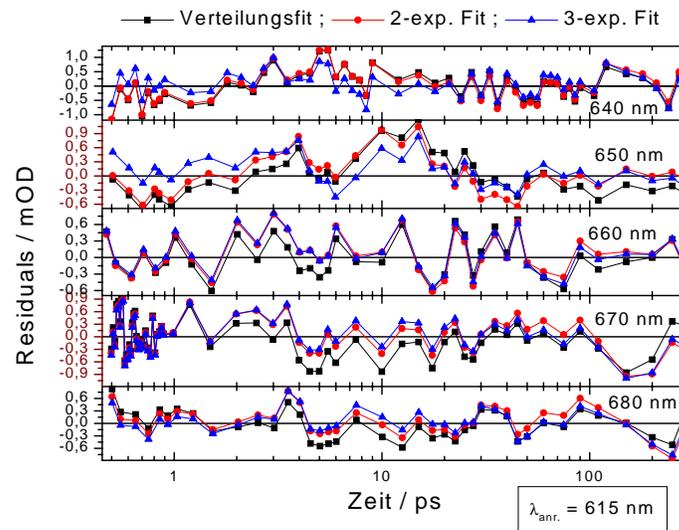
**Abbildung A.16:** Residuen des Fits mit einer Exponentialfunktion. An den Residuen sind die Abtastwellenlängen aufgeführt. Die Anregungswellenlänge der Cph1-PCB  $P_r$  Probe betrug 615nm.



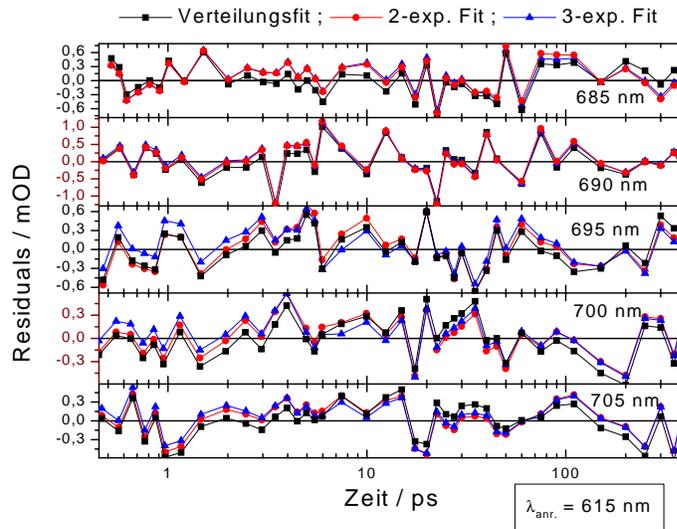
**Abbildung A.17:** Residuen des Fits mit einer Exponentialfunktion. An den Residuen sind die Abtastwellenlängen aufgeführt. Die Cph1-PCB  $P_r$  Probe wurde bei 615nm angeregt.



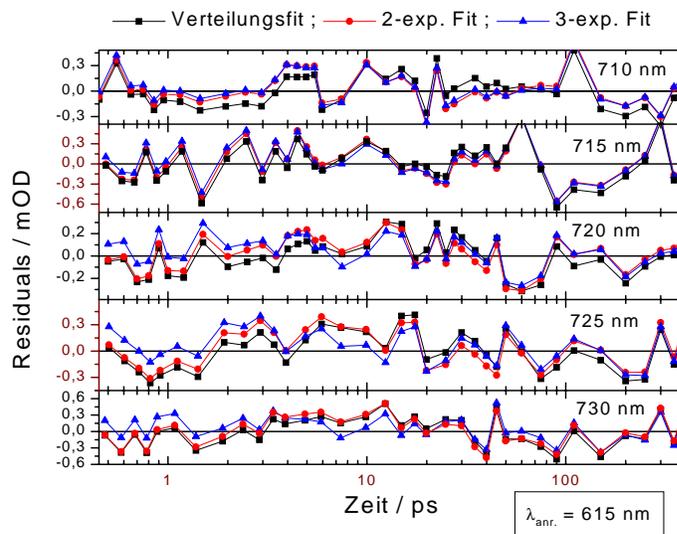
**Abbildung A.18:** Die Residuen der Fits mit zwei Exponentialfunktionen (rote Kreise), drei Exponentialfunktionen (blaue Dreiecke) und einer Verteilung von Exponentialfunktion (schwarze Quadrate) sind hier im direkten Vergleich aufgelistet. Die Abtastwellenlängen sind in den Grafiken aufgeführt und die Cph1-PCB  $P_r$  Probe wurde bei 615nm angeregt.



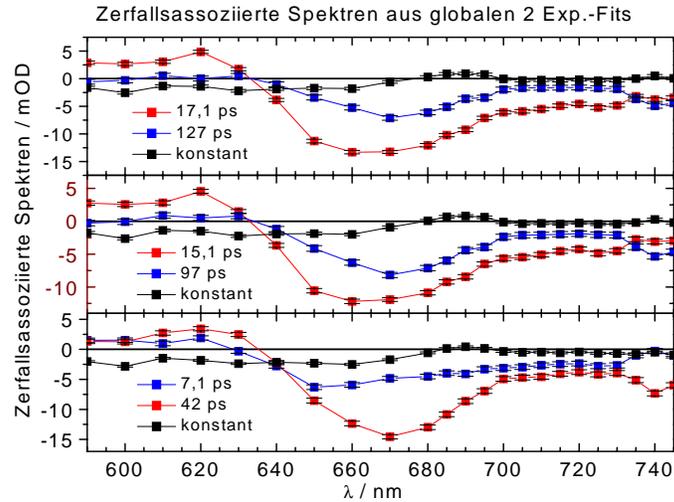
**Abbildung A.19:** Die Residuen der Fits mit zwei Exponentialfunktionen (rote Kreise), drei Exponentialfunktionen (blaue Dreiecke) und einer Verteilung von Exponentialfunktion (schwarze Quadrate) sind hier im direkten Vergleich aufgelistet. Die Abtastwellenlängen sind in den Grafiken aufgeführt und die Cph1-PCB  $P_r$  Probe wurde bei 615nm angeregt.



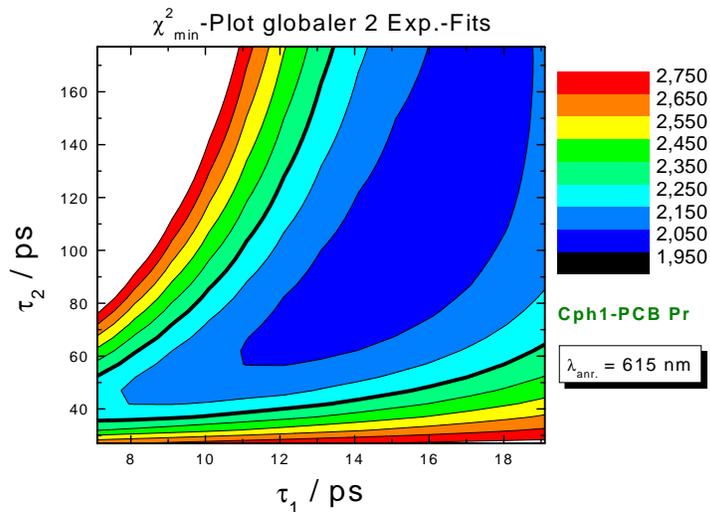
**Abbildung A.20:** Die Residuen der Fits mit zwei Exponentialfunktionen (rote Kreise), drei Exponentialfunktionen (blaue Dreiecke) und einer Verteilung von Exponentialfunktion (schwarze Quadrate) sind hier im direkten Vergleich aufgelistet. Die Abtastwellenlängen sind in den Grafiken aufgeführt und die Cph1-PCB  $P_r$  Probe wurde bei 615nm angeregt.



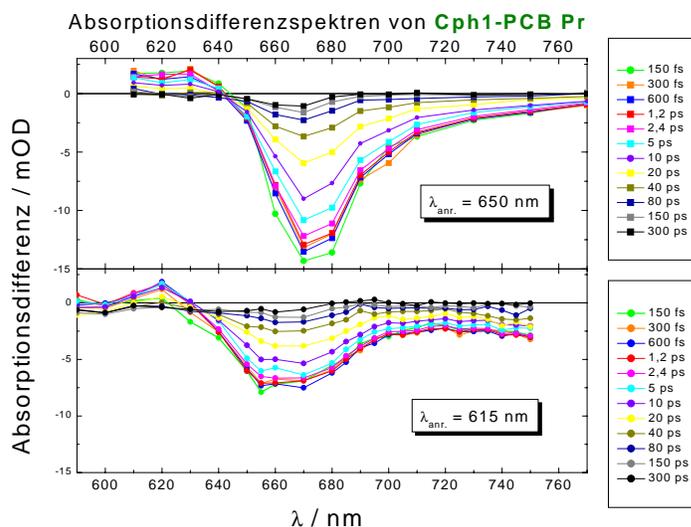
**Abbildung A.21:** Die Residuen der Fits mit zwei Exponentialfunktionen (rote Kreise), drei Exponentialfunktionen (blaue Dreiecke) und einer Verteilung von Exponentialfunktion (schwarze Quadrate) sind hier im direkten Vergleich aufgelistet. Die Abtastwellenlängen sind in den Grafiken aufgeführt und die Cph1-PCB  $P_r$  Probe wurde bei 615nm angeregt.



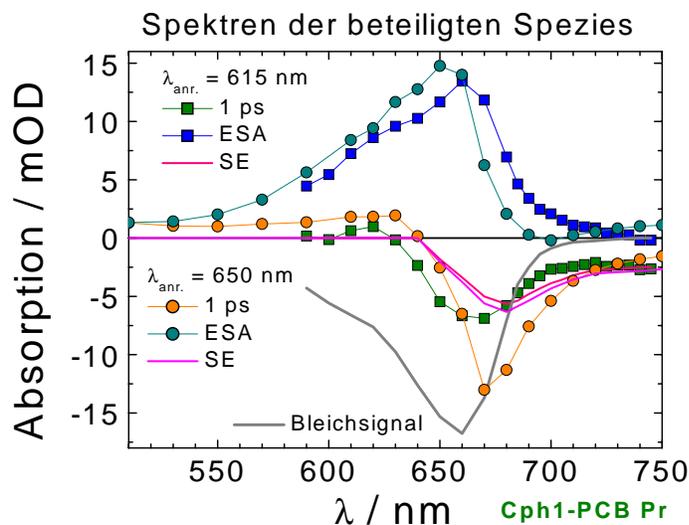
**Abbildung A.22:** Die drei aufgeführten Grafiken zeigen drei zerfallsassozierte Spektren von Cph1-PCB  $P_r$ , die aus drei verschiedenen globalen Fits mit zwei Exponentialfunktionen resultieren. Als Beispiele wurden hier drei Paare von  $\tau_1$  und  $\tau_2$  ausgewählt, die innerhalb des 95%-Bereiches liegen. Die mittlere Grafik stellt den besten Fit mit minimalem  $\chi_{min}^2$  dar. Die  $\chi_{min}^2$ -Werte ergeben sich aus Abbildung A.23.



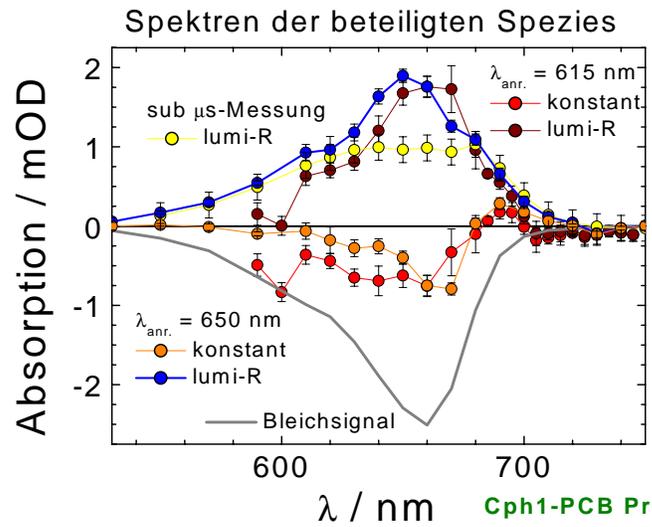
**Abbildung A.23:** In dieser Grafik ist die  $\chi_{min}^2$ -Fläche eines Fits mit zwei Exponentialfunktionen in Abhängigkeit von den Zerfallszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  dargestellt. Jeder Punkt ist das Ergebnis eines globalen Fits, bei dem mit fixierten Zerfallszeiten alle anderen Parameter (Amplituden) minimiert wurden. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Zerfallszeiten außerhalb der schwarzen Kurve liegen beträgt 5%.



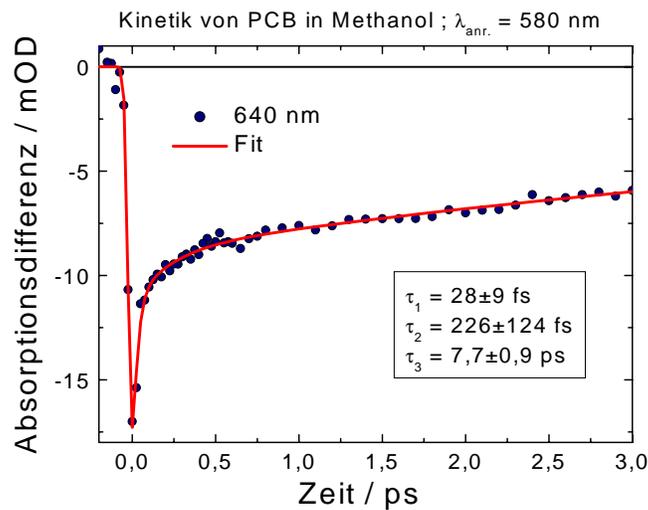
**Abbildung A.24:** Auf das berechnete Bleichsignal normierte Differenzspektren nach 650 nm Anregung oben und Differenzspektren nach 615 nm Anregung unten. Das negative Signal ist bei 615 nm Anregung um etwa 10 nm auf der höherenergetischen Seite breiter als bei 650 nm Anregung und die niederenergetische Seite fällt bei  $\lambda_{anr.} = 615 \text{ nm}$  nicht so schnell auf Null ab. Das Maximum des positiven Signals und der isosbestische Punkt sind bei  $\lambda_{anr.} = 615 \text{ nm}$  um 10 nm gegenüber  $\lambda_{anr.} = 650 \text{ nm}$  blauverschoben. Die zugehörigen Zeiten der Differenzspektren sind in den Legenden rechts angegeben.



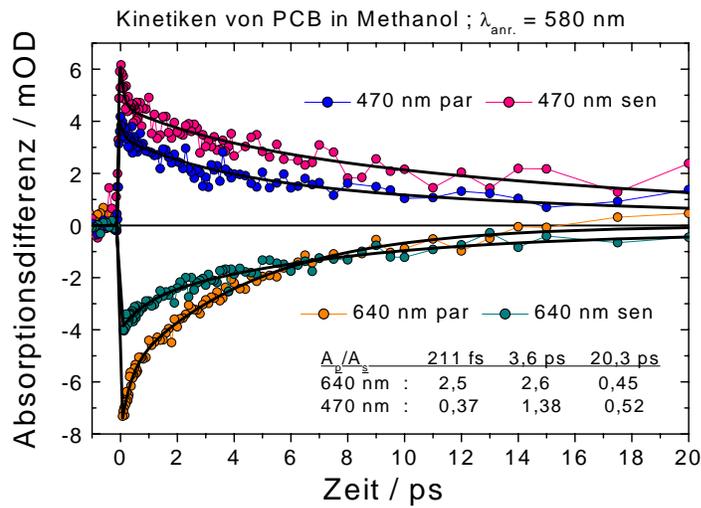
**Abbildung A.25:** Direkter Vergleich der 1 ps Differenzspektren und der daraus berechneten ESA Spektren bei unterschiedlicher Anregungswellenlänge. Die Spektren sind auf das Bleichsignal normiert worden. Das ESA Spektrum ist etwa 10 nm breiter für  $\lambda_{anr.} = 615 \text{ nm}$  als für  $\lambda_{anr.} = 650 \text{ nm}$  und zusätzlich leicht rotverschoben. Das 1 ps Differenzspektrum für  $\lambda_{anr.} = 615 \text{ nm}$  ist ebenfalls um etwa 10 nm breiter als für  $\lambda_{anr.} = 650 \text{ nm}$  und zusätzlich blauverschoben.



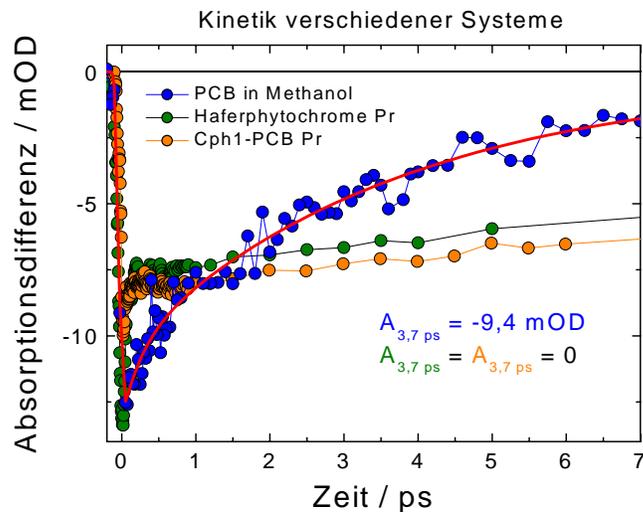
**Abbildung A.26:** Direkter Vergleich der konstanten Differenzspektren und der daraus berechneten lumi-R Spektren bei unterschiedlicher Anregungswellenlänge. Die Spektren sind auf 15% des Bleichsignals normiert worden. Das lumi-R Spektrum aus sub- $\mu$ s Messungen ergibt sich aus [95].



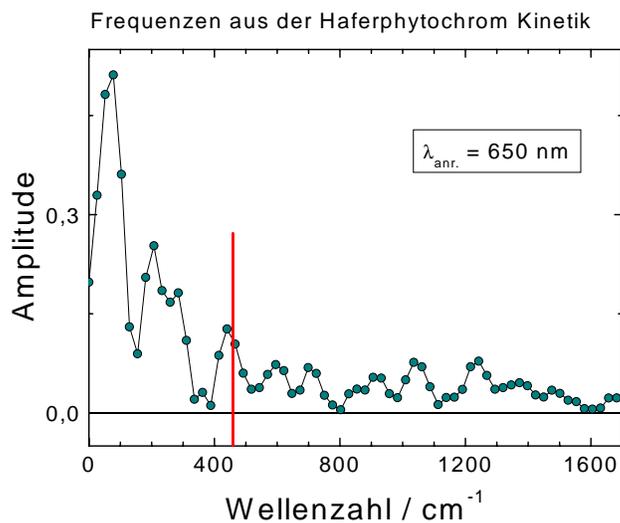
**Abbildung A.27:** Kinetik und Fit von PCB in Methanol und 0,3% TEA bei 640 nm Abtast- und 580 nm Anregungswellenlänge. Die Datenpunkte wurden bis 4 ps gefittet. Die Zerfallszeit  $\tau_3$  repräsentiert alle längeren Zerfallszeiten.



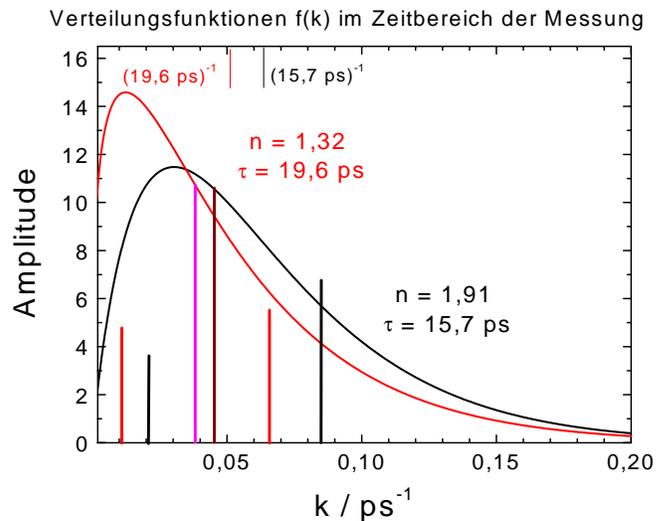
**Abbildung A.28:** Kinetik und Fit von PCB in Methanol und 0,3% TEA bei 640 und 470 nm Abtast- und 580 nm Anregungswellenlänge bei verschiedener Polarisation des Abtastimpulses. Die Bezeichnungen par und sen bedeuten, dass die Polarisation des Abtastimpulses parallel bzw. senkrecht zum Anregungsimpulses ausgerichtet war. Die im globalen Fit ermittelten Zeitkonstanten für die vier Kinetiken von 210 fs, 3,6 ps und 20 ps stimmen gut mit den Zeitkonstanten aus [71] überein.



**Abbildung A.29:** Kinetiken von: PCB in Methanol und 0,3% TEA (blau)  $\lambda_{anr.} = 580 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{abt.} = 640 \text{ nm}$ ; Cph1-PCB  $P_r$  (orange)  $\lambda_{anr.} = 615 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{abt.} = 660 \text{ nm}$ ; Haferphytochrom  $P_r$  (grün)  $\lambda_{anr.} = 645 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{abt.} = 680 \text{ nm}$ . Die Kinetiken wurden alle mit dem NOPA-NOPA Aufbau aufgenommen. Eine Zeitkonstante mit 4 ps tritt in den Kinetiken von Cph1-PCB  $P_r$  und in Haferphytochrom  $P_r$  nicht auf. In Cph1-PCB  $P_r$  liegen die Daten im Spektralbereich von 590..750 nm vor, während für Haferphytochrom hier nur Testmessungen um 680 nm durchgeführt wurden. Der deutliche Unterschied zu PCB in Lösung, der mit der 4 ps Zeitkonstante auftritt, ist gut erkennbar.



**Abbildung A.30:** FT-Spektrum aus der Haferphytochrom  $P_r$  Kinetik. Der rote Balken stellt eine Resonanz Raman Bande aus [90] dar. Die Zeitauflösung betrug etwa 50 fs. Die Peaklagen sind: 80, 205, 285 und 446  $\text{cm}^{-1}$ .



**Abbildung A.31:** Die Verteilungsfunktionen  $f(k)$  sind hier mit den Parametern dargestellt, die sich aus den optimalen Verteilungs.-Fits für Anregungswellenlängen um 650 (schwarze Linie) und 615 nm (rote Linie) ergeben. Die ermittelte Zerfallszeit des 1 Exp.-Fits ist als purpurfarbener Balken für 615 nm ( $\frac{1}{\tau_1} = \frac{1}{26,2 \text{ ps}}$ ) und als braunroter Balken für 650 nm Anregung ( $\frac{1}{\tau_1} = \frac{1}{21,3 \text{ ps}}$ ) eingezeichnet. Die beiden roten Balken geben die Zerfallszeiten eines 2 Exp.-Fits mit relativem Amplitudenverhältnis bei 670 nm und Anregung um 615 nm wieder ( $\frac{1}{15,1 \text{ ps}}$  und  $\frac{1}{97 \text{ ps}}$ ). Die beiden schwarzen Balken geben die Zerfallszeiten mit relativem Amplitudenverhältnis zueinander bei Anregung um 650 nm wieder ( $\frac{1}{11,7 \text{ ps}}$  und  $\frac{1}{48 \text{ ps}}$ ). Auch hier wurde die Abtastwellenlänge 670 nm zur Bestimmung des Amplitudenverhältnisses herangezogen. Die beiden kleinen Balken an der oberen Achse geben die Schwerpunkte der Verteilung an.

