

# **Echtzeitverfolgung der ultraschnellen Strukturänderungen der Pr und Pfr Photoisomerisierungen in Phytochrom**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

eingereicht im Fachbereich Physik

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Yang Yang

aus Henan V.R. China

März 2016



## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbständig verfasst und keine unerlaubten Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass diese Arbeit in dieser oder anderer Form zuvor nicht als Prüfungsarbeit zur Begutachtung an dieser oder einer anderen Hochschule vorgelegt worden ist.

Berlin, 19. März 2016

*Yang Yang*

Erstgutachter (Betreuer):

Prof. Dr. Karsten Heyne

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Holger Dau

Disputation:

17 .10.2016

## Abstract

In order to understand photo activation processes in photo receptors and photo active molecules, the three dimensional atomically resolved structure is an indispensable fundamental. In this study, we used angle balanced polarization resolved femtosecond VIS pump - IR probe spectroscopy (Win-Pol-Fs-PPS) to characterize structural conformations of chromophores and light-induced structural changes of chromophores and photoreceptors upon excitation. This method permits direct tracking of ultrafast structural changes of the chromophore in native environment, and allows for precise determination of the relative angles between excited electronic transition dipole moments and probed transition dipole moments of the molecular vibrations of the excited states, ground states, and product states. [108] Experiments with this homebuilt setup yields dynamic and structural information simultaneously. [112] Experiments with this novel setup are performed on two systems, phytochromes and corroles, whose photoreaction mechanisms are under debate. [16][21][32][37]

Phytochromes are an important class of bilin-based photoreceptors which regulate the light signaling pathways in plants, bacteria and fungi. [1][2] Despite intense studies with various time-resolved techniques, the molecular details of the isomerization mechanisms and the involved protein control in *both* reactions have not been completely understood. Cyanobacterial phytochrome Cph1Δ2 with <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C isotope-labeled phycocyanobilin chromophore was analyzed between 1640 cm<sup>-1</sup> and 1740 cm<sup>-1</sup> in this study. For the first time, the structural isomerization processes of phytochrome have been observed in real time.

The forward Pr → Pfr photoreaction exhibits two time constants of  $4.7 \pm 1.4$  ps and  $30 \pm 5$  ps. Rotation of ring D takes place in the electronic excited state Pr\* with a time constant of  $30 \pm 5$  ps. [105] Two distinct Pr isoforms were identified by their frequencies and orientations of the C=O vibrations of ring D. Investigation of the Pfr → Pr photoreaction shows photoproduct formation occurs within the first picosecond after excitation with ~20% quantum yield. Win-Pol-Fs-PPS signals were best fitted by a bi-exponential decay with time constants of  $0.7 \pm 0.2$  ps and  $5 \pm 1$  ps. Two distinct Pfr isoforms were identified by their frequencies and distinct kinetics. [107]

Corroles as tetrapyrrolic macrocycles, are related to the porphyrins with one less meso-group in its macrocycle. Therefore corroles exhibit a smaller cavity with lower symmetry, and are able to stabilize metals in high oxidation states. [63] These advantages in comparison to other porphyrinoids favor utilization of corroles in many fields, such as catalysis, dye-sensitized solar cells, and photodynamic therapy. [24][25] The purpose of this study on corroles is to fully characterize the peculiarities of the electronic states and their photoinduced dynamics.

Hexacoordinated Al-corrole Al(tpfc)(py)<sub>2</sub> and Br<sub>8</sub>Al(tpfc)(py)<sub>2</sub> were analyzed in this work. In hexacoordinated Al(tpfc)(py)<sub>2</sub> and hexacoordinated Br<sub>8</sub>Al(tpfc)(py)<sub>2</sub> demonstrated the lifting of the degeneracy of the Q-bands caused by symmetry breaking. [108] Relative angles between the lowest singlet electronic transition dipole moments and a single vibrational transition dipole moment were determined. Experiments with electronic excitations in the Soret band were also performed. Analysis of the vibrational dynamics present pronounced cooling dynamics on a time scale of about 30 ps. A vibrational marker band for triplet formation was identified for Al(tpfc)(py)<sub>2</sub> displaying a sub-picosecond triplet formation.



## Zusammenfassung

Für ein Verständnis der photoreaktiven Abläufe in Photorezeptoren und photoaktiven Molekülen liefert die dreidimensionale atomar aufgelöste Struktur eine unverzichtbare Grundlage. In der vorliegenden Arbeit habe ich winkelbalancierte polarisationsaufgelöste Femtosekunden VIS Pump - IR Probe Spektroskopie (Win-Pol-Fs-PPS) benutzt, um die strukturelle Konformation und lichtinduzierte strukturelle Änderung von Chromophoren und Photorezeptoren nach Anregung zu charakterisieren. Diese Methode erlaubt eine direkte Verfolgung ultraschneller Strukturänderungen des Chromophors in natürlicher Umgebung und eine exakte Bestimmung der relativen Winkel zwischen angeregten elektronischen Übergangsdipolmomenten und Schwingungsübergangsdipolmomenten des angeregten Zustands, des Grundzustands und des Produktzustands.[108] Dieser selbstentwickelte Versuchsaufbau ermöglicht gleichzeitig die Messung von dynamischen und strukturellen Informationen. [112] Versuche mit diesem neuen Aufbau wurden an zwei Systemklassen, den Phytochromen und Corrolen, durchgeführt. Für beide Systeme sind die Photoreaktionsmechanismen derzeit noch umstritten. [16][21][32][37]

Phytochrome sind eine wichtige Klasse von Bilin-basierten Photorezeptoren, die die Lichtsignalwege in Pflanzen, Bakterien und Pilzen regulieren.[1][2] Trotz intensiver Untersuchungen mit verschiedenen zeitaufgelösten Techniken wurden die molekularen Details der Isomerisierung und die damit verbundene Chromophor-Protein Wechselwirkung für beide Reaktionen noch nicht vollständig verstanden. In dieser Arbeit wurde Phytochrom Cph1 $\Delta$ 2 aus Cyanobakterien mit  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$  isotopenmarkiertem Phycocyanobilin Chromophor zwischen  $1640\text{ cm}^{-1}$  und  $1740\text{ cm}^{-1}$  untersucht. Zum ersten Mal wurden die Isomerisierungsprozesse von Phytochrom in Echtzeit strukturell verfolgt.

Für die Pr  $\rightarrow$  Pfr Hinreaktion wurden zwei Zeitkonstanten von  $4,7 \pm 1,4\text{ ps}$  und  $30 \pm 5\text{ ps}$  beobachtet. Die Drehung am Ring D findet im elektronisch angeregten Pr\* Zustand mit einer Zeitkonstante von  $30 \pm 5\text{ ps}$  statt. [105] Zwei unterschiedliche Pr-Isoformen wurden durch die Frequenzpositionen und Orientierungen der C=O Doppelbindung am Ring D identifiziert. Untersuchungen der Pfr  $\rightarrow$  Pr Photoreaktion zeigen, dass sich das Photoprodukt Lumi-F innerhalb der ersten Pikosekunden nach der Anregung mit einer Quantenausbeute von  $\sim 20\%$  bildet. Die Win-Pol-Fs-PPS Signale ergaben einen bi-exponentiellen Zerfall mit Zeitkonstanten von  $\tau_1 = (0,7 \pm 0,2)\text{ ps}$  und  $\tau_2 = (5,3 \pm 1)\text{ ps}$ . Zwei unterschiedliche Pfr-Isoformen wurden durch ihre Frequenzpositionen und ihre unterschiedlichen Kinetiken identifiziert. [107]

Corrole als tetrapyrroliche Makrozyklen sind den Porphyrinen ähnlich und weisen eine Meso-Gruppe weniger in ihrem Makrozyklus auf. Daher besitzen Corrole eine kleinere Kavität mit geringerer Symmetrie und können dadurch Metalle in hohen Oxidationsstufen stabilisieren.[63] Diese Eigenschaften der Corrole können in vielen Bereichen, wie beispielsweise in der Katalyse, in Farbstoffsolarzellen und in der photodynamischen Therapie genutzt werden.[24][25] Das Ziel der vorliegenden Arbeit über Corrole ist es, eine möglichst vollständige Charakterisierung der einzigartigen Eigenschaften der elektronischen Zustände und ihrer photoinduzierten Dynamiken zu erstellen.

Ich konnte in hexakoordiniertem  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  und hexakoordiniertem  $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  die Aufhebung der Entartung der Q-Banden aufgrund der Symmetriebrechung nachweisen. [108] Relative Winkel zwischen den niedrigsten elektronischen Singulett Übergangsdipolmomenten und einem einzelnen Schwingungsübergangsdipolmoment wurden bestimmt. Außerdem wurden Experimente mit elektronischer Anregung der Soret-Bande durchgeführt. Die Analyse der Schwingungsdynamik zeigt eine ausgeprägte Kühlungsdynamik auf einer Zeitskala von etwa  $30\text{ ps}$ . Eine Schwingungs-Markerbande für die Triplett-Bildung wurde auf der Sub-Pikosekunden-Zeitskala für Aluminium Corrole  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  entdeckt.



# Abkürzungen

BBO	Beta Barium Borate, $\beta$ -BaB <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
Cph1	Cyanobacterium Phytochrom
DAS	Decay associated spectrum, Decay associated spectra
DFG	Difference frequency generation
DFT	Dichtefunktionaltheorie
ExSeAn	Exhaustive Search Analyse
FID	Free Induction Decay
Fit	Optimale Anpassung (fit)
FWHM	Halbwertsbreite (full width half maximum)
IR	Infrarot
kDa	Kilodalton
KTA	Kaliumtitanoxidarsenat, KTiOAsO <sub>4</sub>
MCT	“mercury cadmium telluride”
NMR	“nuclear magnetic resonance”
OD	Optische Dichte
OPA	Optical parametric amplification
OPG	Optical parametric generation
PΦB	Phytochromobilin
PCB	Phycocyanobilin
Pr	Rot-absorbierende Form von Phytochrom
Pfr	Fernrot-absorbierende Form von Phytochrom
SFG	Sum frequency generation
SHG	Second harmonic generation
TDM	Übergangsdipolmoment
VDM	Schwingungsübergangsdipolmoment
VIS	Sichtbar ( <i>visible</i> )
bal-Pol-fs-PPS	Winkel balancierte polarisationaufgelöste Femtosekunden VIS Pump - IR Probe-Spektroskopie
PYP	photoaktivem gelbem Protein



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract</b>	<b>iii</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>v</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>vii</b>
<b>Kapitel 1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Der Photorezeptor Phytochrom .....	7
1.1.1 Phytochrom aus Cyanobacterium Synechocystis (cph1) .....	10
1.1.2 Zielsetzung .....	12
1.2 Corrole .....	13
1.2.1 Aluminium Corrole und bromierte Aluminium Corrole .....	14
1.2.2 Zielsetzung .....	16
<b>Kapitel 2 Experimentelle Methoden</b>	<b>18</b>
2.1 Theoretische Grundlagen für die Ultrakurzzeit-spektroskopie .....	18
2.1.1 Licht-Materie Wechselwirkung .....	18
2.1.2 Die Anwendung der Nichtlinearen Prozesse .....	20
Effekte zweiter Ordnung, Frequenzmischung .....	20
Effekte dritter Ordnung .....	22
Selbstfokussierung .....	23
Selbst-Phasen-Modulation .....	24
Phasenanpassung .....	25
2.2 Polarisationsaufgelöste Femtosekunden Pump-Probe Spektroskopie .....	27
2.2.1 Femtosekunden Laserpulse .....	27
2.2.2 VIS - IR – Aufbau .....	27
Erzeugung der Anregungspulse .....	29
Erzeugung der Abtastpulse .....	32
Überlagerung der Lichtpulse in der Probe .....	33
Probekammer .....	36
2.2.3 Signaldetektion und Aufnahmen .....	36

<b>Kapitel 3 Analytische Methoden</b>	38
3.1 Korrekturen der gemessenen Werte .....	38
3.2 Analyse der gemessenen Werte.....	40
3.2.1 Schwingungsübergänge im Molekül .....	40
3.2.2 Zeitkonstanten und Simulation des Spektrums .....	44
3.3 Winkelberechnung der Übergangsdipolmomente .....	47
3.3.1 Experimentelle Berechnungen .....	47
Photoselektion .....	47
Bestimmung der Struktur und die Echtzeitverfolgung von Strukturänderungen .....	52
3.4 Weitere analytische Methoden .....	56
3.4.1 Perturbed Free Induction Decay.....	56
3.4.2 Exhaustive Search Analyse .....	58
<b>Kapitel 4 Zusammenfassung und Ausblick</b>	63
4.1 Phytochrom Cph1 $\Delta$ 2 .....	63
4.2 Corrole.....	66
<b>Anhang A - H</b>	68
<b>Literaturverzeichnis</b>	126
<b>Danksagung</b>	132

# Kapitel 1

## Einleitung

Der Fortbestand einer biologischen Zelle oder mehrzelliger Organismen hängt von ihrer Fähigkeit ab, ihre extrazelluläre Umgebung genau zu erkennen und auf diese gegebenenfalls zu reagieren. Das Licht ist hierbei ein sehr wichtiger Umgebungsfaktor und viele Organismen haben ausgereifte Photosensor-Systeme entwickelt, um dieses wahrzunehmen. Zahlreiche Wachstums- und Stoffwechselprozesse von Pilzen, Bakterien, Pflanzen bis hin zu Säugetieren werden von Licht beeinflusst und gesteuert. Das Lichtsignal wird zuerst von den Chromophoren des Photorezeptor-Proteins absorbiert und dann in chemische Energie umgewandelt. Die Chromophore spielen hier eine entscheidende Rolle für die photochemische Reaktion. Sie beeinflussen durch ihre Struktur und Chromophor-Protein-Wechselwirkung, in welchem Spektralbereich der Photorezeptor Licht absorbiert. Es gibt diverse Chromophor-Arten mit unterschiedlichen Strukturen. Eine davon ist das Tetrapyrrol, das aufgrund seiner großen Verbreitung in der Natur von vielfältiger Bedeutung ist. Strukturell werden zyklische und lineare Tetrapyrrole unterschieden.

Das Phytochrom, eine der wichtigsten Photorezeptorklassen der Pflanzen, enthält lineare Tetrapyrrole als Chromophore, um rotes Licht und dunkelrotes Licht zu absorbieren. Phytochrome haben dazu zwei stabile Konformationen: die rotes Licht absorbierende Pr-Form und die dunkelrotes Licht absorbierende Pfr-Form. Die Energie der von den Chromophoren absorbierten Photonen wird durch Pr-Pfr-Isomerisierung, eine Isomerisierung der C=C-Doppelbindung, in Signalinformationen umgewandelt. Diese ermöglicht in höheren Pflanzen eine Funktion als lichtempfindlicher Schalter, um Prozesse der Keimung, Photomorphogenese der Keimlinge, Blütenbildung und Photoperiodismus zu steuern. Analoge Prozesse kommen auch in Algen, Bakterien, Pilzen vor. [1] [2]

Obwohl diese Isomerisierungsprozesse zwischen der Pr- und Pfr-Form weit verbreitet und sehr wichtig sind, steht die Frage, wann die Isomerisierung stattfindet, heutzutage immer noch zur Diskussion. Trotz der zahlreichen strukturellen Untersuchungen, die bisher an Phytochromen vorgenommen wurden, sind die Ergebnisse sogar zum Teil widersprüchlich. Durch X-Ray und NMR Untersuchungen kann man die Struktur des Proteins für stabile Zustände ermitteln, allerdings ist eine zeitliche Verfolgung der strukturellen Dynamik bisher noch nicht möglich. [3] [4] Zeitaufgelöste *Raman* Spektroskopie und Pump-Probe Spektroskopie (VIS-VIS VIS-IR IR-IR) sind leistungsfähige Methoden um die Dynamik der Chromophore in nativer Umgebung zu charakterisieren [5] [6] [7] [8]. Durch normale zeitaufgelöste IR und Raman Untersuchungen bekommt man zwar Informationen über Strukturänderungen, um sie zu verstehen, muss man sie jedoch mit theoretischen Berechnungen im Grund- und angeregten Zustand vergleichen. Eine

Echtzeitverfolgung der Orientierungsänderung des Chromophors im elektronisch angeregten Zustand ist mit solchen Messmethoden nicht zu sehen. Außerdem ist der Grund für die niedrige Photoprodukt-Quantenausbeute des Proteins im Vergleich zu anderen Photorezeptoren, wie Rhodopsin, Bakteriorhodopsin und PYP, die auch um die C=C Doppelbindung isomerisieren, bis heute noch immer ungeklärt. Für PYP liegt z.B. die Quantenausbeute zwischen 40% und 65% [9] [10]. Für die Pr-Pfr-Isomerisierung liegt sie nur im Bereich von 7% -16% [11] [12] [13] [14]. Als Erklärung für diese niedrige Photoprodukt-Quantenausbeute wurde die Photorezeptor-Heterogenität vorgeschlagen [15] [16]. Solche Vorschläge wurden noch nicht überprüft. Um die genauen molekularen Reaktionsmechanismen für die Photoisomerisierung von Cph1Δ2 Phytochrom zu bestimmen, habe ich in dieser Doktorarbeit die Winkel balancierte polarisation aufgelöste Femtosekunden VIS Pump - IR Probe-Spektroskopie (bal-Pol-fs-PPS) angewendet.

Die in der Arbeit benutzte Winkel balancierte polarisations aufgelöste Femtosekunden VIS Pump - IR Probe-Spektroskopie (bal-Pol-fs-PPS) ist ein experimenteller Aufbau, der von Martin Linke und mir in der AG Heyne selbst entwickelt und aufgebaut wurde.[17] Der größte Unterschied im Vergleich zur normalen zeitaufgelösten IR Spektroskopie ist, dass anstatt eines einzelnen infraroten Laserpulses bei diesem Aufbau zur Abtastung zwei infrarote Laserpulse, die jeweils parallel und senkrecht zur Polarisierung des Pumpulses stehen, eingesetzt werden. Er besteht hauptsächlich aus zwei mehrstufigen OPAs (optical parametric amplifier) zur Erzeugung der Anregungs- (Pump) und Abtastpulse (Probe). Der Aufbau ist vielseitig einsetzbar. Der Pump-puls wird je nach Absorptionseigenschaft der zu untersuchenden Proben im VIS und IR Bereich angepasst. Mit zwei Probe-Pulsen erhält man nicht nur die Dynamik und die spektrale Intensitätsänderungen (  $I$  ) der zu untersuchenden Probe, sondern auch Information zur Anisotropie (  $\frac{I_{\parallel}-I_{\perp}}{I_{\parallel}+2I_{\perp}}$  ). Da die Anisotropie von den Winkeln der beteiligten Übergänge abhängig ist, kann damit die Orientierung der zu untersuchenden Absorptionsbande gut ermittelt werden. Man erhält durch die Messungen gleichzeitig die Absorptionsänderung und die Information der Struktur (Anisotropie) bei jedem Verzögerungszeitpunkt. Die Orientierungsänderung der Absorptionsbande kann damit in Echtzeit verfolgt werden. Durch Kombination der Messergebnisse mit theoretischen Berechnungen der Moleküle im Grund- und angeregten Zustand, kann man die Informationen über die Winkel zwischen dem elektronischen Übergangsdipolmoment (TDM) und dem Schwingungsübergangsdipolmoment (VDM) ermitteln. Da die Orientierungen der TDMs und VDMs fest mit der Molekülstruktur verbunden sind, geben die Winkel Auskunft über mögliche Strukturen und Strukturänderungen. Mit dieser Methode können Strukturänderungen wie die Photoisomerisierung des Chromophors in Phytochrom in Echtzeit verfolgt werden. Andere Methoden, die Auskunft über die Struktur gehen, wie NMR und X-ray liefern zur Zeit keine hochzeitaufgelöste Strukturen, insbesondere nicht in nativer Umgebung. Hinzu kommt die Problematik, dass Phytochrom-Kristalle, wie sie für X-Ray Messungen eingesetzt werden, unterschiedliche Konformationen im Vergleich zu NMR Messung zeigen. [16] Daher liegt die

Vermutung nahe, dass die Kristallpackung die Proteinstruktur beeinflusst und wahrscheinlich ebenso die Dynamik. [18]

Meine Studien an Cph1Δ2 Phytochrom lieferten neue Informationen zur Photoreaktion: Die Pr-Pfr Isomerisierung findet mit einer Zeitkonstante von  $(30 \pm 0,4)$  ps und einer Quantenausbeute von 16% statt. Die Pfr-Pr Rückisomerisierung weist eine viele kürzere Zeitkonstante von  $(0,6 \pm 0,2)$  ps und eine Quantenausbeute von ~18% auf. Die Orientierungsänderung der Chromophore ist in der Absorptionsbande der  $C_{19}=O$  Streckschwingung im elektronisch angeregten Zustand direkt verfolgbar. Der Vor- und Rückisomerisierungsprozess hat unterschiedliche Zwischenprodukte. Außerdem sieht man mit der höheren spektralen Auflösung von  $1,5 \text{ cm}^{-1}$  eine Heterogenität im Grundzustand für beide Formen Pr und Pfr. Phytochrome mit unterschiedlicher Grundzustandskonformation haben ganz unterschiedliche Dynamiken und Quantenausbeuten. Diese Informationen bieten erstmals die Möglichkeit den Einfluss der Protein- Chromophor Wechselwirkung auf die initial Photoreaktion besser zu verstehen.

Neben Phytochromen habe ich in meiner Arbeit auch Corrole untersucht. Sie sind Tetrapyrrole mit einer zyklischen Struktur und ein Analogon von Corrin, der Chromophor des Vitamin B12. Im Vergleich zu anderen strukturell ähnlichen Chromophoren wie Porphyrin und Corrin haben Corrole durch eine direkte Pyrrol-Pyrrol Bindung eine kleinere N4-Kavität und dadurch die Fähigkeit Metallatome mit höherem Oxidationszustand zu binden. Durch die unterschiedliche Zusammenstellung von Randgruppen am Ring und Liganden im inneren Makrozyklus gibt es bei Corrolen viele verschiedene Konfigurationen. Darüber hinaus sind die Anwendungsmöglichkeiten von Corrolen mannigfaltig, beispielsweise als Katalysator für den Gruppentransfer katalytischer Reaktionen [19] [20] [21] [22], als Farbstoff für Farbstoff-Solarzellen [23], und als Photorezeptor für photodynamische Therapie (PDT) [24] [25] [26] [27]. Alle Anwendungen basieren auf den photophysikalischen Eigenschaften der Tetrapyrrole, die verschiedene Absorptionsbanden in unterschiedlichen spektralen Regionen aufweisen. Für die Anwendung in der PDT werden spezielle Metalloccorrole wegen ihrer effizienten Triplettbildung eingesetzt, damit Singulett-Sauerstoff durch ISC (intersystem crossing) gebildet wird. Diese Photophysikalischen Prozesse müssen im Detail untersucht und verstanden werden, um sie optimal einzusetzen.

Bisher wurden die Corrole nicht so umfassend wie die Porphyrine untersucht, obwohl erste Schritte in Richtung des Verständnisses der Singulett-Anregungszustände von Gallium- und Aluminium-Derivaten gemacht wurden [28] [29] [30]. Die Zuordnung der Absorptionsbanden und Dynamik sowie der S→T Transfer der bromierten Aluminium Corrole und anderer Corrole sind noch unklar. Die Ergebnisse zu Triplettbildung in unbromierten Aluminium Corrolen stehen erst am Anfang der Untersuchungen. Aluminium Corrole fluoresziert mit einer Quantenausbeute von 76% stärker als alle anderen Porphyrinoide. EPR (electron paramagnetic resonance) Untersuchungen an Aluminium Corrole konnten keine Triplettbildung nachweisen [29]. Wohingegen Fluoreszenzmessungen an Aluminium Corrolen durch „Flash photolysis“ die Entstehung von Singulett-Sauerstoff zeigte [31]. Wenn Singulett-Sauerstoff sich bilden kann, muss sich ein Teil der

Aluminium Corrole in einem Triplett-Zustand befinden. Untersuchungen der bromierten Aluminium Corrole zeigen im Vergleich zu Aluminium Corrole eine geringere Fluoreszenz, aber dafür eine starke Bildung von gut sichtbaren Triplets [32]. Die Bildung des Triplets wird durch die Bromierung stark beeinflusst. Die Erhöhung der ISC-Effizienz wird also durch den Einschluß von Schweratom-Substituenten in dem Corrole erzielt. Wie der Einfluss wirkt ist wichtig für die Entwicklung eines optimalen Corrole basierten Elektronen- und Energietransfer-Komplexes.

In der vorliegenden Arbeit werden hexakoodinierte Aluminium Corrole  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  und ihre Derivate hexakoodinierte bromierte Aluminium Corrole  $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$ , mit Hilfe der Winkel balancierten polarisationsaufgelösten Femtosekunden VIS Pump - IR Probe-Spektroskopie (bal-Pol-fs-PPS) untersucht, um die photophysikalischen Eigenschaften der beiden Corrole möglichst vollständig zu erforschen und das unklare Bild der bisher bekannten Eigenschaften aufzuklären. Um eine Gesamtübersicht von den elektronischen Übergängen der Corrole zu erhalten, wird das Aluminium Corrole bei 400 nm, 450 nm, 540 nm, 580 nm, 620 nm und das bromierte Aluminium Corrole bei 400 nm, 450 nm, 590 nm, 640 nm angeregt. Beiden Proben werden im selben Spektralbereich zwischen  $1470 \text{ cm}^{-1}$  und  $1540 \text{ cm}^{-1}$ , bei der C=C Streckschwingungsbande abgetastet. Die Messergebnisse bestätigen die Bildung eines Triplettübergangs in beiden Aluminium Corrolen mit unterschiedlicher Kinetik und Quantenausbeute. Im Absorptionsspektrum konnten die elektronischen  $S_0 \rightarrow S_1$  und  $S_0 \rightarrow S_2$  Übergänge spektralen Strukturen in der Q-Bande zugeordnet werden. Die einzelnen Beiträge wurden durch bal-Pol-fs-PPS eindeutig bestimmt. Die Dynamik des Corroles nach der Anregung wird wegen ihrer Komplexität ( $\sim 5$  Zeitkonstant) mit der Lifetime Density Analyse (LDA) analysiert [33]. Fragen zur Bandenzuordnung, Dynamik, Quantenausbeute, Triplettbildung und Lebensdauer in ihrem jeweiligen Zustand werden beantwortet. Durch Vergleich der Dynamik der bromierten und unbromierten Aluminium Corrole wird der Einfluss von Schwermetallen oder Schweratom-Substituenten in dem Corrole Molekül besser verstanden.

Nähere Informationen über die zu untersuchenden Proben und die Experimentiermethode und Auswertungsmethode werden in dieser Arbeit vorgestellt. Die Messergebnisse wurden in unterschiedlichen Veröffentlichungen präsentiert.

### **Die Arbeit gliedert sich in folgende Kapitel:**

- *Kapitel 1* Einleitung und Motivation

Die Motivation der Studien wird ganz am Anfang geklärt. Der Photorezeptor Phytochrom und Aluminium Corrole werden in den Abschnitten 1.1 und 1.2 vorgestellt und die für das Verständnis der kommenden Messergebnisse wichtigsten Grundlagen werden eingeführt.

- *Kapitel 2* Experimentelle Methoden

Dieses Kapitel teilt sich in zwei Teile. Der erste Teil beschreibt die physikalischen Grundlagen, die in den vorgestellten Studien verwendet werden. Dazu gehören nichtlineare Prozesse und praktische Anwendungen. Der zweite Teil beschreibt die experimentellen Methoden und den Aufbau.

- *Kapitel 3* Auswertemethoden

Das Kapitel beschreibt die Verarbeitung und Analyse der gewonnenen Daten. Dazu gehören Fit-Methoden für Spektren, die für alle VIS Pump - IR Probe Messungen verwendet wurden. Die Überlapp-Korrektur- und Winkelberechnungs- Methoden, die nur für Winkel balancierte polarisationsaufgelöste fs Messungen genutzt wurden, werden auch vorgestellt. Zudem werden die Grundlagen des Perturbed Free Induction Decay und der Exhaustive Search Analyse, zwei weitere analytische Methoden, für spezielle Auswertungen beschrieben.

- *Kapitel 4* Zusammenfassung und Ausblick

Die wichtigsten Ergebnisse und Schlussfolgerungen werden zusammengestellt. Schließlich werden acht Veröffentlichungen angehängt.

#### Anhang A

##### **Assignment of Aluminum Corroles Absorption Bands to Electronic Transitions by Femtosecond Polarization Resolved VIS-Pump IR-Probe Spectroscopy**

Yang, Y; Jones, D; von Haimberger, T; Linke, M; Wagnert, L; Berg, A; Levanon, H; Zacarias, A; Mahammed, A; Gross, Z; Heyne, K  
JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY A 2012, 116(3), p. 1023-1029;  
DOI 10.1021/jp211970j

#### Anhang B

##### **Real-Time Tracking of Phytochrome's Orientational Changes During Pr Photoisomerization**

Yang, Y; Linke, M; von Haimberger, T; Hahn, J; Matute, R; Gonzalez, L; Schmieder, P; Heyne, K  
JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 2012, 134(3), p.1408-1411;  
DOI 10.1021/ja209413d

#### Anhang C

##### **Active and silent chromophore isoforms for phytochrome Pr photoisomerization: An alternative evolutionary strategy to optimize photoreaction quantum yields**

Yang, Y; Linke, M; von Haimberger, T; Matute, T; González, L; Schmieder, P; Heyne, K  
STRUCTURAL DYNAMICS 1 2014, 014701;  
DOI 10.1063/1.4865233

Anhang D

**Non-Bonded Interactions Drive the Sub-Picosecond Bilin Photoisomerization in the Pfr State of Phytochrome Cph1**

Yang, Y, Heyne, K, Mathies, RA, Dasgupta, J  
Chemphyschem. 2016 Feb;17(3):369-74;  
DOI: 10.1002/cphc.201501073

Anhang E

**Electronic transitions and heterogeneity of the bacteriophytochrome Pr absorption band: An angle balanced polarization resolved femtosecond VIS pump – IR probe study**

Linke, M; Yang, Y; Zienicke, B; Hammam; MAS; Haimberger, T; Zacarias, A; Inomata, K; Lamparter, T; Heyne, K  
BIOPHYSICAL JOURNAL 2013, 105(8), p. 1756-66.  
DOI 10.1016/j.bpj.2013.08.041.

Anhang F

**Conformational heterogeneity of the Pfr chromophore in plant and cyanobacterial phytochromes**

Velazquez Escobar, F; von Stetten, D; Günther-Lütken, M; Keidel, A; Michael, N; Lamparter, T; Essen, LO; Hughes, J; Gärtner, W; Yang, Y; Heyne, K; Mroginski, MA; Hildebrandt, P  
Frontiers in molecular biosciences 2 (2015). P37  
DOI:10.3389/fmolb.2015.00037

Anhang G

**Ultrafast electronic and vibrational dynamics in brominated Aluminum corroles: Energy relaxation and triplet formation**

Stensitzki, T; Yang, Y; Berg, A.; Mahammed, A; Gross, Z; Heyne K  
Structural Dynamics 3, 043210 (2016)  
DOI: 10.1063/1.4948363

Wurde bei Structural Dynamics zur Veröffentlichung eingereicht.

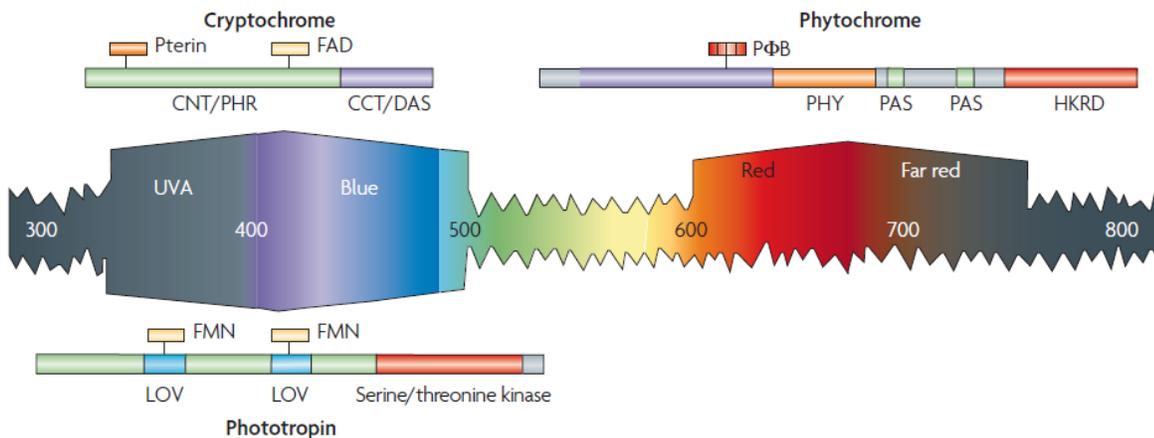
Anhang H

**Femtosecond Infrared Spectroscopy of Channelrhodopsin-1 Chromophore Isomerization**

Stensitzki, T; Yang, Y; Muders, V; Schlesinger, R; Heberle, J; Heyne, K  
Structural Dynamics 2016, 3(4): 043208  
DOI: 10.1063/1.4948338

## 1.1 Der Photorezeptor Phytochrom

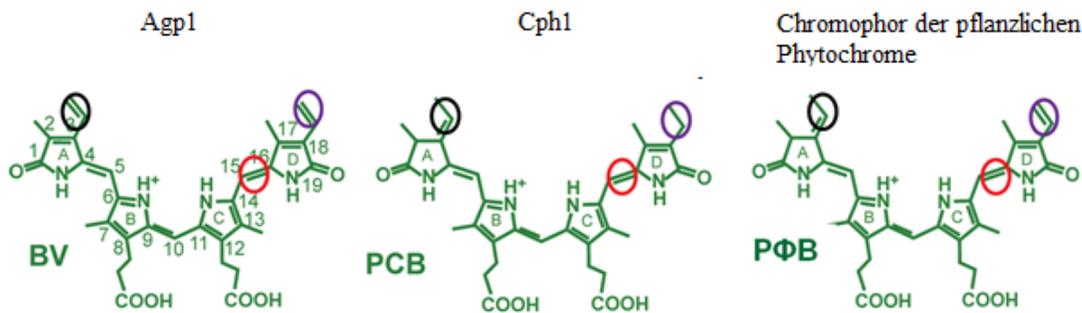
Licht ist ein dominanter Umweltfaktor für nahezu alle zellulären Organismen, der nicht nur als Energiequelle dient, sondern auch Informationen liefert. Die Licht-regulierten Prozesse beinhalten Samenkeimung, Photomorphogenese der Keimlinge, Photoperiodismus und Vermeidung von Grünschatten, wie er unter Blattdecken anzutreffen ist [34]. Als Eckpfeiler der Photomorphogenese haben Organismen ein empfindliches Wahrnehmungssystem entwickelt, welches das gesamte Spektrum des Sonnenlichts mittels Photorezeptoren abdeckt. (Abb. 1.1). Photorezeptoren bestehen aus Polypeptiden mit spezifischen Co-Faktoren (Chromophoren), die in der Lage sind, die Menge (Intensität), Qualität (Wellenlänge), Richtung und Dauer des aufgenommenen Lichts festzustellen und damit die entsprechenden Reaktionen zu triggern. Diese Fähigkeiten sind abhängig von den vorhandenen Chromophoren. Es wurden schon mindestens sieben Klassen von Photorezeptoren kategorisiert: light oxygen-voltage (LOV), xanthopsins, Phytochrome, Blaulicht-Sensoren mit Flavin-Adenin-Dinukleotid (BLUF), Cryptochrome, Rhodopsin und Ultraviolett B (UVB) [34] [35].



**Abbildung 1.1** Schematische Darstellung des sichtbaren Lichtspektrums (in nm) und der wichtigsten Familien der Pflanzen-Photorezeptoren. Proteindomäne Arrangements und verwendete Chromophore (Phytochrome, Cryptochrome und Phototropin) sind gezeigt. Die Darstellung ist der Publikation [34] entnommen.

Phytochrome dienen als lichtempfindliche Schalter für die Detektion und Verarbeitung von Licht. Durch Lichtabsorption ändert sich die Proteinstruktur, die von anderen Proteinen als Information erkannt wird. Dadurch kann die Lichtmenge, Qualität und die Periodizität des Lichtes in Pflanzen bestimmt und diese Informationen über Signalwege weitergeleitet werden, die das Pflanzenwachstum und die Entwicklung regulieren. In den 1950er Jahren wurden Phytochrome erstmals als Pflanzen Photorezeptoren entdeckt [36]. Sie sind die empfindlichsten Photorezeptoren im roten und dunkelroten Spektralbereich und nicht nur auf photosynthetische Lebewesen beschränkt, sondern kommen auch bei Pilzen und Bakterien vor [37]. Die Phytochrom Proteine

selbst können durch ihre Struktur und Funktion in zwei Bereiche unterteilt werden: der N-terminalen Sensorregion (N-Terminus), verantwortlich für die photosensorischen Eigenschaften, und der C-terminalen Regulatorregion (C-Terminus), die das Signal weiterleitet. Die Sensorregion enthält als Chromophor einen kovalent gebundenen linearen Tetrapyrrol mit zwei stabilen Konformationen: eine rotes Licht absorbierende  $P_r$ -Form und eine dunkelrotes Licht absorbierende  $P_{fr}$ -Form. Die beiden Formen können durch Absorption von Photonen der geeigneten Wellenlänge reversibel konvertiert werden. (Dieser Prozess wird mit Abb. 1.4 in Abschnitt 1.1.1 ausführlich erklärt.)

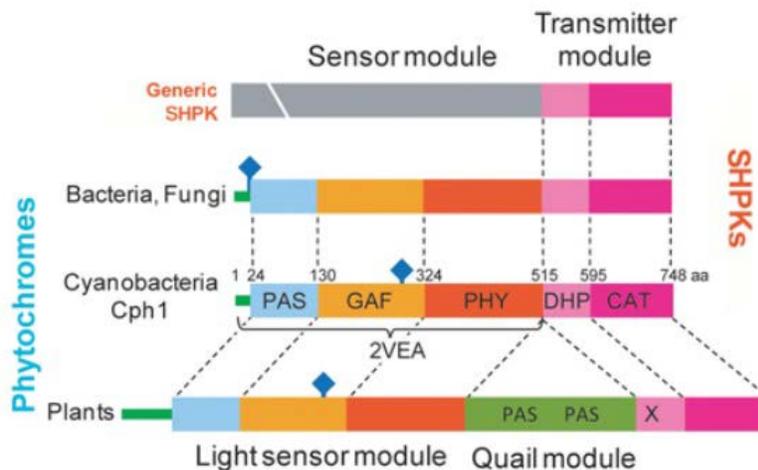


**Abbildung 1.2** Die Chromophor Strukturen von BV, PCB und PΦB im Agrobacterium, in Cyanobakterien und Pflanzen.

So wie alle anderen Photorezeptoren besteht Phytochrom auch aus einem Apoprotein und einem Chromophor. Bisher wurden drei Arten von natürlichen Phytochrom Chromophoren gefunden: Biliverdin (BV), der typische Chromophor für die Phytochrome in Bakterien und Pilzen, Phycocyanobilin (PCB), der natürliche Chromophor für Cyanobakterien und Phytochromobilin (PΦB), der natürliche Chromophor für Pflanzen-Phytochrome. Ihre Strukturen sind, wie in Abbildung 1.2 gezeigt, nicht gleich. Am Ring A trägt BV im Vergleich zu PCB und PΦB eine Vinyl- statt einer Ethyl-Seitenkette. Am Ring D trägt PCB im Vergleich zu BV und PΦB eine Ethyl- statt einer Vinyl-Seitenkette. Die Chromophore sind jeweils kovalent über eine Thioether-Bindung mit einem Cystein des Proteins verknüpft, PCB über das C3<sup>1</sup>-Atom, BV über das C3<sup>2</sup>-Atom des A Rings [38] [39] [40]. Nicht nur die Strukturen und die Anknüpfungsweise sind unterschiedlich in BV und PCB/PΦB, sie unterscheiden sich auch an den Bindungsstellen im Protein. So wie in Abb.1.3 gezeigt, wird Biliverdin (BV) kovalent an einen konservierten Cystein-Rest oberhalb der N-terminalen PAS-Domäne des Proteins gebunden. Phycocyanobilin (PCB) und Phytochromobilin (PΦB) werden kovalent an einen Cystein-Rest gebunden, der in der sogenannten cGMP Phosphodiesterase / Adenyl-Cyclase / FhlA (GAF) Domäne des C-Terminus liegt [41]. Da der einzige chemische Strukturunterschied zwischen PCB und PΦB die Seitenkette des Ring D ist, können die Chromophore in vitro oder in vivo ausgetauscht werden. Dagegen wird BV nicht als funktionaler Chromophor von Phytochromen, die mit PCB und PΦB verbunden sind, akzeptiert. Mit diesen Erkenntnissen kann man die oben beschriebenen Phytochrome noch mal klassifizieren. Phytochrom mit PCB und PΦB, die innerhalb der GAF-Domäne binden, werden als die Pflanzen-

ähnlichen Phytochrome bezeichnet. Die Phytochrome mit BV, die innerhalb der PAS-Domäne binden, werden als die Bakterio-Phytochrome bezeichnet. In dieser Arbeit habe ich die Pflanzen-ähnlichen Phytochrome Cph1 mit Chromophor PCB und die Bakterio-Phytochrome Agp1 mit Chromophor BV untersucht. Genauere Informationen werden im weiteren Abschnitt gezeigt, und die veröffentlichten Messergebnisse liegen als Anhang B, C, D, E, F vor.

Die Signalübertragung innerhalb der Phytochrome benutzt hauptsächlich das Zwei-Komponenten-Signal Paradigma, was hier aus einem Sensormodul und einem Sendermodul (transmitter Module) besteht (im vorherigen Abschnitt als N-Terminus und C-Terminus bezeichnet). Sie können auch als Sensor-Domäne und Modulator-Domäne bezeichnet werden. Eine schematische Darstellung der Domänenstruktur in verschiedenen Phytochromen ist in Abb. 1.3 gezeigt. Das Sensormodul des Phytochrom besteht aus vier Subdomänen (P1(hell blau), PAS, GAF, PHY [42]). Das Chromophor ist, so wie zuvor erläutert, an einer Domäne dieses Moduls gebunden. Fällt rotes Licht auf das Phytochrom, wird dieses durch den Chromophor absorbiert. Eine Chromophor Pr-Pfr Isomerisierung erfolgt durch eine Z-E-Isomerisierung der  $C_{15} = C_{16}$  Doppelbindung und findet innerhalb von Pikosekunden nach der Anregung statt. Dadurch wird eine Strukturänderung initiiert, die vom Chromophor auf das Modul übertragen wird. Die Weiterleitung dieses Signals führt zu einer ganzen Reihe von Veränderungen der Proteinkonformation. Das Sendermodul enthält eine CAT Domäne und eine DHP Domäne, auf die ein Phosphatrest des Phosphonhistidins unter Phosphorylierung eines Aspartatrests übertragen wird. Das von dem Sensormodul kommende Signal wird hier durch Phosphortransfer und Dissoziation der Dimer-Phytochrome weiter in die Zelle geleitet [43].



**Abbildung 1.3** Domänenstruktur von Phytochromen verschiedener Organismen. SHPK: Sensor histidine protein kinase; ♦: Chromophorbindestelle; PAS: PAS-Domäne; GAF: GAF Domäne; PHY: Phytochrom-Domäne; DHP: Histidin Phosphotransfer Domäne; CAT: katalytische ATPase Domäne. Die Darstellung ist der Publikation [44] entnommen.

Die Aufklärung der Wirkungsweise und der Signalübertragungswege der Phytochrome in der Zelle wurden sehr intensiv erforscht. Aber aufgrund der Komplexität der Mechanismen konnte noch kein vollständiges Bild aller Funktionsweisen erstellt werden. Überblicke für Cph1 und das pflanzliche Phytochrom in der Zelle findet man bei Schäfer & Bowler[45] und Rockwell [37].

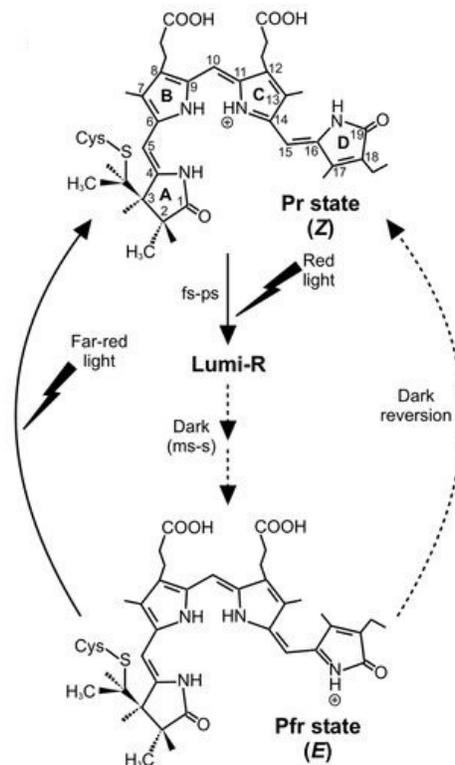
### 1.1.1 Phytochrom aus Cyanobacterium Synechocystis (Cph1)

Das Protein aus dem Cyanobacterium *Synechocystis* Stamm PCC6803 (abgekürzt als Cph1) weist eine große Ähnlichkeit zu pflanzlichen Phytochromen auf (Domänenarchitektur, Aminosäuresequenz der GAF-Domänen). Resonanz-Raman und FTIR Messungen unterstützen diese Beobachtung. Es wird als ein evolutionärer Vorläufer der pflanzlichen Phytochrome angesehen [46] [41]. Durch die Expression von Cph1 in *E. coli* ist eine Produktion großer Mengen möglich, sodass die Voraussetzung für eine erfolgreiche Untersuchung zur Strukturbestimmung gegeben ist.

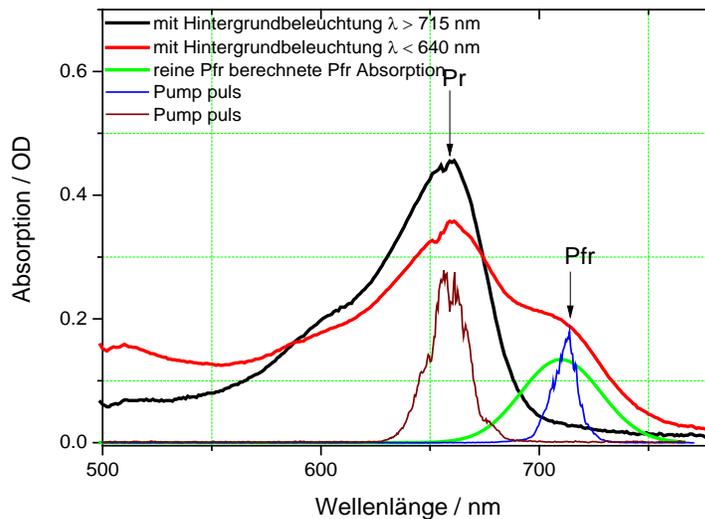
Das Protein Cph1 besteht aus 748 Aminosäuren hat einen Gewicht von 84,2 kDa. Die Aminosäuren 1 bis 514 von Cph1 mit einem Gewicht von 59 kDa bilden die photosensorische Domäne des Proteins. Diese Domäne kann als Deletionsmutante (Cph1 $\Delta$ 2) gut rekombinant in *E. coli* exprimiert werden und ergibt nach Assemblierung mit PCB ein Holoprotein mit fast identischen spektralen Eigenschaften wie das "full length" Cph1 [47] [48]. Aufgrund ihrer guten Handhabbarkeit und Verfügbarkeit wird Cph1 $\Delta$ 2 als zu untersuchende Probe für bal-Pol-fs-PPS Experimente ausgewählt.

Ein Photozyklus von Cph1 ist in Abb.1.4 dargestellt. Die Konformation des Chromophor im Grundzustand der Pr-Form entspricht einer ZZZssa (C<sub>5</sub>-Z, C<sub>10</sub>-Z, C<sub>15</sub>-Z, C<sub>5</sub>-syn, C<sub>10</sub>-syn, C<sub>15</sub>-anti,) Konformation. Eine Anregung der Pr-Form des Cph1 in der Q-Bande (500nm-750nm) führt zunächst zu einer schnellen Photoisomerisierung (3-30 ps [49] [50] [51]) der C<sub>15</sub>=C<sub>16</sub> Doppelbindung zwischen den Ringen C und D des Tetrapyrrols von 15 Z zu 15 E, begleitet durch eine Drehung des Rings D. Die Weiterleitung dieses Signals führt zu Veränderungen der Proteinkonformation, das erste Zwischenprodukt wird Lumi-R genannt. In Millisekunden bis Sekunden wird das Cph1 schließlich in die Pfr-Form überführt. Diese photoinduzierte Isomerisierung (Pr  $\rightarrow$  Pfr) nennt man *Hinreaktion*. Der Pfr-Zustand kann durch Anregung mit dunkelrotem Licht ( $\lambda \geq 715$  nm) oder durch einen langsamen dunklen Reversions-Prozess [2] regeneriert werden. Diesen Prozess (Pfr  $\rightarrow$  Pr) nennt man *Rückreaktion*. Die Absorptionsspektren des untersuchten Phytochroms Cph1 $\Delta$ 2 in Pr- und Pfr-Form sind in Abbildung 1.5 dargestellt. Das Absorptionsmaximum der Q-Banden liegt bei 660 nm für die Pr-Form, 730 nm für die Pfr-Form. Pump-Pulse, sowie in Abb. 1.5 gezeigt sind, haben die beiden Q-Banden genau am jeweiligen Maximum angeregt. Die primäre Photoisomerisierung von Phytochrom wurde photochemisch und photophysikalisch intensiv untersucht. Es ist bekannt, dass die Isomerisierung der Pr-Form Zeitkonstanten im Picosekunden Bereich liefert, gefolgt von Lumi-R Photoprodukt-Bildung mit

Quantenausbeuten im Bereich von 7% bis 16% [11] [51] [14, 52] [53] [54] [55] [56]. Verschiedene vorgeschlagen Geometrien der PCB Chromophore in Lösung wurden interpretiert mit Zeitkonstanten im Bereich von 3 ps bis 50 ps [57] [58]. Diese Quantenausbeute ist gering im Vergleich zu anderen Photorezeptoren, z. B. Rhodopsin, Bakteriorhodopsin, und PYP. Als Erklärung für diese niedrige Photoprodukt-Quantenausbeute wurde die Photorezeptor Heterogenität vorgeschlagen [15] [16]. Trotz der kinetischen Erkenntnisse aus Untersuchungen der elektronischen Zustände und der Schwingungszustände, war es schwer möglich, Chromophor-Heterogenität in Phytochromen direkt nachzuweisen oder deren Einfluss auf die Photoreaktion aufzuklären. In der letzten Zeit veröffentlichten Song et al eine NMR-Studie, mit zwei Geometrien im Pr-Grundzustand mit unterschiedlichen Orientierungen von Ring D, aber mit unbekanntem photoreaktiven Eigenschaften [16]



**Abbildung 1.4** Schematische Darstellung der Photoisomerisierung der Pr- Pfr- Formen der PCB in Cph1 Phytochrome. Cph1 im Grundzustand der Pr-Form wird nach Bestrahlung mit rotem Licht zur Pfr-Form umgewandelt. Das erste Zwischenprodukt ist Lumi-R, es wird im Femto- bis Pikosekundenbereich geformt, danach folgen noch andere Zwischenprodukte, wie Meta-Ra und Meta-Rc. Umgekehrt kann die Pfr-Form nach Absorption von dunkelrotem Licht zurück zu Pr umgewandelt werden. Die Pfr-Form kann auch im Dunkeln zu Pr konvertieren, man nennt es Dunkelreversion. Die Darstellung ist [59] entnommen.



**Abbildung 1.5** Die Absorptionsspektren mit Hintergrundbeleuchtung von Cph1Δ2. Die Pr-Form ist in schwarz dargestellt, das Gemisch aus Pr-Form und Pfr-Form ist in rot dargestellt. Das reine Spektrum der Pfr-Form (grün) wurde aus beiden Spektren errechnet. Spitzen im Spektrum bei 500 nm kommen vom Lampenwechsel im Spektrometer. Spektrale Profile der Pump-Pulse für *Hin-* und *Rückreaktion* sind in dunkelrot und blau dargestellt.

Mit unserem Aufbau können wir die Orientierungsänderung des zu untersuchenden Schwingungsdipolmoments in Echtzeit verfolgen. Sie ermöglicht uns, die oben erwähnten Fragen rund um die Photoreaktion zu beantworten und die Heterogenität der Chromophor-Strukturen, ihre Quantenausbeuten und deren Einfluss auf die Photoreaktion zu bestimmen.

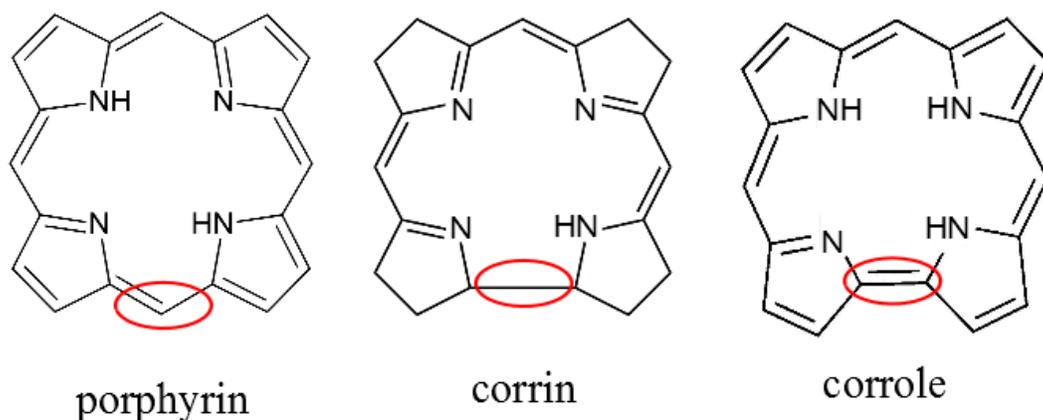
### 1.1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, eine möglichst vollständige Charakterisierung der strukturellen Änderung für die Primärreaktion von Cph1Δ2-PCB in der Pr- und der Pfr-Form zu erreichen.

Durch die ausgeführten bal-Pol-fs-PPS Messungen soll die Ringdrehung während der Isomerisierung im elektronisch angeregten Zustand direkt verfolgt und die Ausrichtung der  $\nu(\text{C}=\text{O})$  Schwingungsmoden des PCB Chromophors in den Pr-, Pr\*-, Pfr- und Pfr\*-Zuständen auf der Femtosekunden-Zeitskala bestimmt werden. Die Fragen wann die Isomerisierung stattfindet, ob Heterogenität der Chromophor-Strukturen im Cph1 Grundzustand vorliegt, und wie die Photodynamik von verschiedenen Grundzustandsstrukturen aussieht sollen endgültig beantwortet werden. Zudem wird ein Modell für die Primärreaktion mit Hilfe der theoretischen Berechnungen entwickelt und, wenn möglich, für andere Phytochrome verallgemeinert.

## 1.2 Corrole

Corrole sind eine Klasse von aromatischen organischen Molekülen. Sie sind strukturell ähnlich den bekannten Porphyrinen [60], unterscheiden sich von der Struktur des Porphyrins durch eine direkte Pyrrol-Pyrrol Bindung (Abb. 1.6), was zur Reduzierung der Symmetrie, einem kleineren Hohlraum, und der Fähigkeit Metallatome mit höheren Oxidationszuständen zu binden führt. Der Name Corrole stammt von seiner Verwandtschaft zum Corrin, dem Chromophor (als Kobalt-Komplex) von Vitamin B12. Es ist dessen aromatisches Analogon.

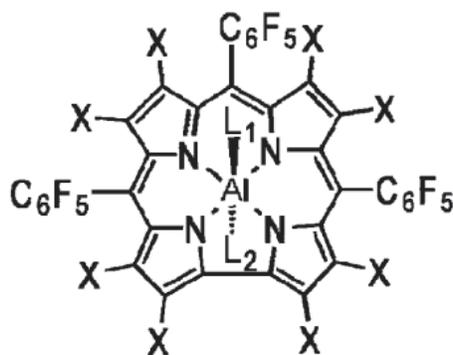


**Abbildung 1.6** Struktur des Porphyrin, Corrin und Corrole.

Eine der einzigartigen Eigenschaften der Corrole bilden die drei NH Gruppen im Zentrum des Moleküls (siehe Abb. 1.6). Es hat eine vergleichbar kleine N4-Kavität mit drei pyrrolischen Stickstoffdonoren und einem pyrrolenin- bzw. iminartigen Stickstoffatom. Corrole können daher im vollständig deprotonierten Zustand als trianionische Liganden wirken, während deprotonierte Porphyrine und Corrine als Liganden in monoanionischer und dianionischer Form vorliegen. UV / VIS-Spektroskopie-Studien von Corrolen zeigt deutliche Hinweise für ihrer Aromatizität mit einer intensiven Soret-Bande und schwächeren Q-Banden (500-600 nm) [61]. Aufgrund der aufwendigen Synthese wurden Corrole noch nicht ausreichend erforscht, obwohl sie bereits seit dem Jahr 1965 durch Johnson und Price [62] bekannt sind. Porphyrine sind häufig in der Natur zu finden, da Chlorophyll als modifiziertes Porphyrin einen Grundbaustein des Lebens darstellt. Analog dazu kommt Corrin im Vitamin B12 in der Natur vor. Aufgrund der chemischen Flexibilität wächst das Interesse, Corrole genauer zu erforschen. Im Jahr 1999 gab es zwei verschiedene Arbeitsgruppen, die ein bahnbrechendes Syntheseverfahren für Corrole berichteten: Ein Eintopfreaktionsverfahren unter Verwendung kommerziell erhältlicher Reagenzien. Diese Methode erhöht die Effizienz und die Praktikabilität der Synthese erheblich. Weiterhin entdeckte die Gruppe von Vogel unerwartete Corrole-Komplexe mit hohen Oxidationsstufen der verwendeten Metallionen. Daraus resultierten die ersten Anwendungsmöglichkeiten an Corrole als Oxidationskatalysatoren für chemische Reaktionen[63].

Da die Zusammensetzung von Randgruppen, Liganden und Ringen für Corrole sehr variabel ist, gibt es viele verschiedene Konfigurationen, die die Anwendungen von Corrole vielfältig macht [64]. Eine spezielle Anwendung liegt im Bereich des Gruppentransfers katalytischer Reaktionen, z. B. Cyclopropanylierungen [19] [20], Hydroxylierungen [21], Aziridinierungen (sowie NH-Insertion auf Carbene) [22]. Darüber hinaus werden Corrole weitgehend im Bereich der Farbstoff-Solarzellen (DSSC: Dye Sensitized Solar Cells) [23] eingesetzt, welche Sonnenenergie effizient in Strom umwandeln und vielversprechende Ergebnisse zeigen. Eine weitere gute Anwendung für Corrole ist die photodynamische Therapie (PDT). Im Vergleich mit verschiedenen Porphyrinen zeigen Corrole ausgezeichnete Wirksamkeit bei der Hemmung der Endothelien-Zellproliferation, sowie Tumorprogression und Metastasierung [24] [25]. All diese Prozesse beruhen auf den chemischen und photophysikalischen Eigenschaften der Corrole. Für Anwendungen wie PDT sind langlebige angeregte Triplett-Zustände des Corroles erforderlich, um den Singulett-Sauerstoff zu maximieren. Diese Zustände werden durch effizientes ISC (intersystem crossing) erzeugt, das durch den Einschluß von Schwermetallen oder Schweratom-Substituenten in dem Corrole Molekül erzielt wird [64]. Grundlegend für ein genaues Verständnis der reaktiven Vielfalt ist eine genaue Kenntnis der photophysikalischen Eigenschaft der Corrole.

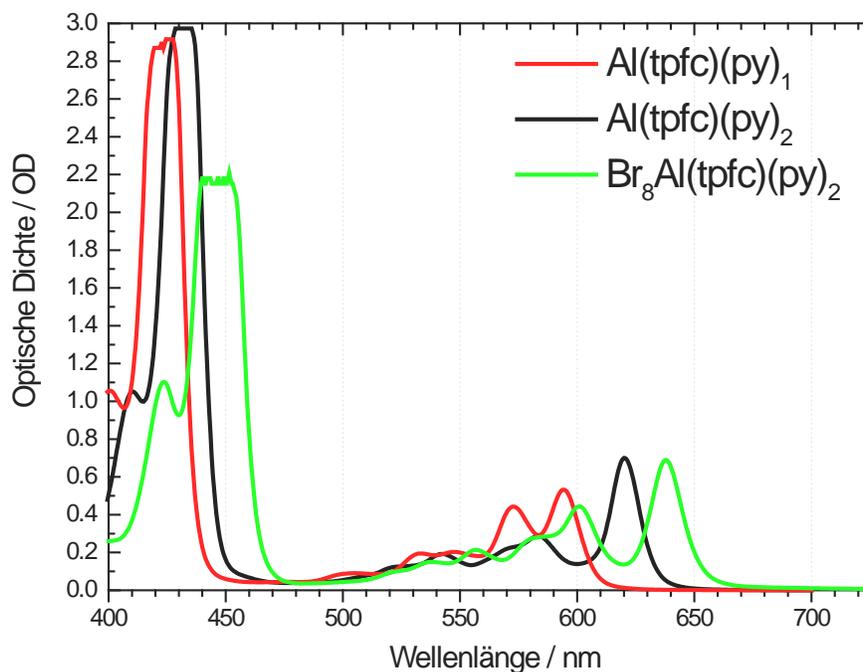
### 1.2.1 Aluminium Corrole und bromierte Aluminium Corrole



**Abbildung 1.7** L1 und L2 sind axiale Liganden.  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_1$ : L1 = pyridine, kein L2, X = H.  $\text{Al-tpfc}(\text{py})_2$ : L1 = L2 = pyridine, X = H.  $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_1$ : L1 = pyridine, kein L2, X = Br.  $\text{Al-Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$ : L1 = L2 = pyridine, X = Br [64].

Durch die Substitution der Meso-Brücke wird die Symmetrie des Makrozyklus im Vergleich zu Porphyrin reduziert. Das macht die Corrole instabil. Deshalb besitzen viele verschiedene Corrole außer Metall-Liganden zusätzlichen Liganden zur Stabilisierung. Das Aluminium Corrole hat zusätzlich zum Metall-Ligand Al(III) einen oder zwei weiteren Liganden zur Stabilisierung. Wir haben Pyridin verwendet. Es bilden sich relativ stabile hexa- und pentakoordinierte Komplexe. Ihre chemischen Strukturen sind in Abbildung 1.7 gezeigt. Der hexakoordiniert Komplex besitzt zwei

Pyridin-Liganden, der pentakoordiniert Komplex besitzt einen. Die entsprechenden Bezeichnungen lauten  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  und  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_1$ . Tpfc ist die Abkürzung für die chemische Formel der Corrole 5,10,15-tris (pentafluorophenyl). Die bromierten Aluminium Corrole werden im Folgenden mit  $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})$  bezeichnet, und  $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  und  $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_1$  stehen entsprechend für ihre hexa- und pentakoordinierten Komplexe. In Abbildung 1.8 sind die stationären Absorptionsspektren der  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_1$ ,  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  und  $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  dargestellt. Analog zu den üblichen Bezeichnungen bei Porphyrinen nennen wir die Absorptionsbanden um 600 nm Q-Band und Banden um 400 nm Soret-Band, welches abgekürzt auch B-Band genannt wird.



**Abbildung 1.8** Stationäre Absorptionsspektren der Proben. Für jede Probe wurde ein konstanter Untergrund abgezogen, gebildet aus den Werten mit  $\lambda > 700\text{nm}$ . Die Soretbande-Absorption ist deutlich größer als die Absorption der Q-Bande. Die Soret-Banden sind bei guter Absorption der Q-Bande ( $> 0,3\text{OD}$ ) gesättigt.

Die photophysikalischen Eigenschaften von Metalloporphyrinen wurden nicht so umfassend wie die der Metalloporphyrine untersucht, obwohl Fortschritte in Richtung des Verständnisses der Singulett-Anregungszustände von Gallium- und Aluminium-Derivaten gemacht wurden. Aluminium Corrole, sind fluoreszierend mit einer hohen Quantenausbeute von 0,76 und somit höher als die von Porphyrinoiden [28]. Diese Eigenschaft wird der Kombination der elektronenziehenden meso-C6F5-Substituenten, dem Aluminium, und der Planarität des Makrocyclus zugeschrieben. [29] [65] Das bromierte Aluminium Corrole, ein Derivat der Aluminium Corrole, zeigt in EPR (electron paramagnetic resonance) Untersuchungen die Bildung

gut sichtbarer Triplets [32], die bei nicht-bromierten Aluminium Corrolen nicht gefunden wurden [32] [30], obwohl die Entstehung von Singulett-Sauerstoff bei der Anregung von Al-Corrolen nachgewiesen wurde [31] [63]. Wenn Singulett-Sauerstoff sich bilden kann, muss sich ein Teil der Al-Corrole in einem Triplett-Zustand befinden. Das heißt, die Triplett-Ausbeute für nicht-bromierte Aluminium Corrole ist sehr gering, oder der entstehende Triplett relaxiert im thermischen Gleichgewicht so schnell, dass er mit dem EPR Verfahren nicht nachgewiesen werden kann. Jedoch wird die Bildung des Triplets durch die Bromierung stark beeinflusst. Diese Eigenschaften werden durch die Interaktion ihrer elektronischen Übergänge beeinflusst. Um sie besser zu verstehen, werden die Aluminium Corrole und die bromierten Aluminium Corrole mit der VIS Pump-IR Probe Spektroskopie untersucht.

Die zu untersuchende Probe erhielten wir von der Arbeitsgruppe Zeev Gross. Sie wurde in Toluol gelöst. Von Messungen an Al-Corrolen ist bekannt, dass bei niedriger Pyridinkonzentration,  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  im Gleichgewicht mit  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_1$  steht [29]. Der Verlust eines Liganden führt zu signifikanten Änderungen im Absorptionsspektrum. Es wurde berichtet, dass Gleichgewicht durch Lichtanregung gestört wird, wodurch ein Ausgleichprozess einsetzt. Der Ausgleichprozess findet auf einer Zeitskala mehrerer Nanosekunden statt, ähnlich der  $S_1$  Lebensdauer. Deshalb habe ich die  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  und  $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  Proben, die für VIS-IR Messungen verwendet werden, alle in hohen Pyridinkonzentrationen angesetzt und das Spektrum überprüft, um sicher zu stellen, dass nur hexakoordinierte Al-Corrole untersucht werden.

## 1.2.2 Zielsetzung

Ein Ziel dieser Arbeit ist durch die Untersuchung der Q-Bande und Soret Bande von hexakoordiniertem Aluminium Corrole  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  und bromiertem Aluminium Corrole  $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  die photophysikalischen Eigenschaften der beiden Corrole möglichst vollständig zu erforschen. Folgende Punkte sollen so weit wie möglich geklärt werden: Ob eine Aufspaltung des Q-Bands bei Aluminium-Corrole durch die reduzierende Symmetrie im Vergleich zu Porphyrin entsteht; ob sich ein Triplett Zustand bei Aluminium Corrole bilden kann, wenn ja, wann er sich bildet und wie sieht die Dynamik des  $S_1 \rightarrow T_1$  Transfers aus.

Ein anderes Ziel ist, den Einfluss auf die photophysikalischen Eigenschaften des Metallocorroles beim Ersetzen des Schweratoms (Brom) an der Peripherie des Makrozykluses durch Vergleichen der Messungsergebnisse von  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  und  $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  zu charakterisieren. Dies liefert wichtig Informationen für die Entwicklung eines optimalen Corrole basierten Elektronen- und Energietransfer-Komplexes.

Dazu werden bal-Pol-fs-PPS Messungen durchgeführt. Die Proben werden mit verschiedenen Laserspulen, die den Maxima der verschiedenen Absorptionsbanden der Q-Bande entsprechen, angeregt (400 nm, 450 nm, 540 nm, 580 nm, 620 nm, für  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  und 400 nm, 450 nm, 590

nm, 640 nm für  $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$ ). Die C=C Streckschwingung um  $1500 \text{ cm}^{-1}$  ( $1470\text{-}1540 \text{ cm}^{-1}$ ) wird abgetastet. Sowohl die zeitlichen und spektralen Informationen, als auch die Winkel zwischen den verschiedenen angeregten elektronischen Übergangsdipolmomenten  $\mu_{\text{el}}$  und einem einzelnen Schwingungsübergangsdipolmoment  $\mu_{\text{vib}}$  innerhalb des Corrole-Moleküls werden bestimmt. Darüber hinaus werden die Orientierungen der elektronischen Übergangsdipolmomente bestimmt, die Absorptionsbanden der Corrole zu verschiedenen elektronischen Übergangsdipolmomenten zugeordnet, der Zustand des Triplets und der Prozess zur Bildung des Triplets von  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  und  $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  charakterisiert.

# Kapitel 2

## Experimentelle Methoden

### 2.1 Theoretische Grundlagen für die Ultrakurzzeitspektroskopie

Proben, wie Phytochrom oder Corrole, können durch lichtinduzierte Anregung aus dem elektronischen Grundzustand in den angeregten Zustand überführt werden. Direkt im Anschluss an die Anregung finden verschiedene Relaxationsprozesse statt, um die Überschussenergie zu equilibrieren. Dabei können unterschiedliche Zustände besetzt werden. Zustände, wie der elektronisch initial angeregte Zustand, relaxierte elektronisch angeregte Zustände, Produkt- und Grundzustände sind im Allgemeinen mit einer Änderung der Absorption verbunden. Im Folgenden wird beschrieben, wie diese Absorptionsänderung polarisations- und zeitaufgelöst verfolgt werden kann.

#### 2.1.1 Licht-Materie Wechselwirkung

Die Wechselwirkung eines elektromagnetischen Lichtfeldes mit der Probe kann durch die elektrische Feldverschiebung  $D$  beschrieben werden. In einem dielektrischen Material bewirkt die Anwesenheit eines elektrischen Feldes  $E$ , dass die gebundenen Ladungen des Materials (Atomkerne und deren Elektronen) sich verschieben und es wird ein lokales elektrisches Dipolmoment induziert. Die elektrische Feldverschiebung  $D$  ist definiert als

$$D = \epsilon_0 E + P \quad (2.1)$$

$E$  ist das einfallende elektrische Feld und  $P$  ist die makroskopische Polarisation, als Antwort auf  $E$ . In der linearen Optik stellt sich die Polarisation als Faltung zwischen linearer Suszeptibilität  $\chi^{(1)}$  (1. Ordnung) und elektrischem Feld  $E$  dar:

$$P(r, t) = \epsilon_0 \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \chi^{(1)}(r - r', t - t') \cdot E(r', t') dt' dr' . \quad (2.2)$$

Ist  $E$  eine monochromatische, ebene Welle mit  $E(r, t) = E(k, \omega) = E_0(k, \omega) \exp(i\vec{k} \cdot \vec{r} - i\omega t)$ , wobei  $k = |\vec{k}| = \omega/c$ , dann liefert das Faltungstheorem[66]

$$\begin{aligned}
\mathcal{P}(k, \omega) &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \mathcal{P}(r, t) e^{i\omega t} dr dt \\
&= \varepsilon_0 \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \left[ \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \chi^{(1)}(r - r', t - t') \cdot dr dt \right] \cdot E(r', t') e^{i\omega t} dr' dt' \\
&= \varepsilon_0 \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \left[ \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \chi^{(1)}(r - r', t - t') \cdot e^{i\omega(t-t')} d(r - r') d(t - t') \right] \cdot \\
&\quad e^{i\omega t'} E(r', t') dr' dt' \\
&= \varepsilon_0 \left[ \int_{-\infty}^{\infty} \chi^{(1)}(r'', t'') \cdot e^{i\omega t''} dr'' dt'' \right] \cdot \left[ \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} E(r', t') e^{i\omega t'} dr' dt' \right] \\
&= \varepsilon_0 \chi^{(1)}(k, \omega) \cdot E(k, \omega)
\end{aligned}$$

die bekannte Relation

$$P(k, \omega) = \varepsilon_0 \chi^{(1)}(k, \omega) \cdot E(k, \omega). \quad (2.3)$$

Die elektrische Suszeptibilität  $\chi$  ist bei Dipol-Approximation ( $\lambda \gg d_e$ ,  $\lambda$  ist die Wellenlänge des Lichtes,  $d_e$  ist der Abstand des elektrischen Dipols) unabhängig von  $r$ , dabei sind sowohl  $\chi^{(1)}(k, \omega)$  als auch  $\varepsilon(k, \omega)$  unabhängig von  $k$ . (2.2) und (2.3) können daher vereinfacht werden zu:

$$P(\omega) = \varepsilon_0 \chi^{(1)}(\omega) \cdot E(\omega) \quad (2.4)$$

$$P(t) = \varepsilon_0 \int_{-\infty}^t \chi^{(1)}(t - t') \cdot E(t') dt' \quad (2.5)$$

Für genügend starke elektrische Felder ist dies jedoch nicht mehr gegeben. Daher kann die Polarisation  $P$  in Abhängigkeit von  $E$  in eine Reihe von Potenzen von  $E$  entwickelt werden, wobei  $\chi^{(n)}$  die Suszeptibilität  $n$ -ter Ordnung ist. Wenn  $E$  als eine Gruppe von monochromatischen, ebenen Wellen ausgedrückt werden kann

$$E(r, t) = \sum_i E(k_i, \omega), \quad (2.6)$$

dann ergibt sich für den linearen Fall die Polarisation zu

$$P(\omega) = \varepsilon_0 [P^{(1)}(\omega) + P^{(2)}(\omega) + P^{(3)}(\omega) + \dots] \quad (2.7)$$

mit

$$\begin{aligned}
P^{(1)}(\omega) &= \varepsilon_0 \chi^{(1)}(\omega) \cdot E(\omega), \\
P^{(2)}(\omega) &= \varepsilon_0 \chi^{(2)}(\omega = \omega_1 + \omega_2): E(\omega_1) E(\omega_2), \\
P^{(3)}(\omega) &= \varepsilon_0 \chi^{(3)}(\omega = \omega_1 + \omega_2 + \omega_3): E(\omega_1) E(\omega_2) E(\omega_3),
\end{aligned}
\tag{2.8}$$

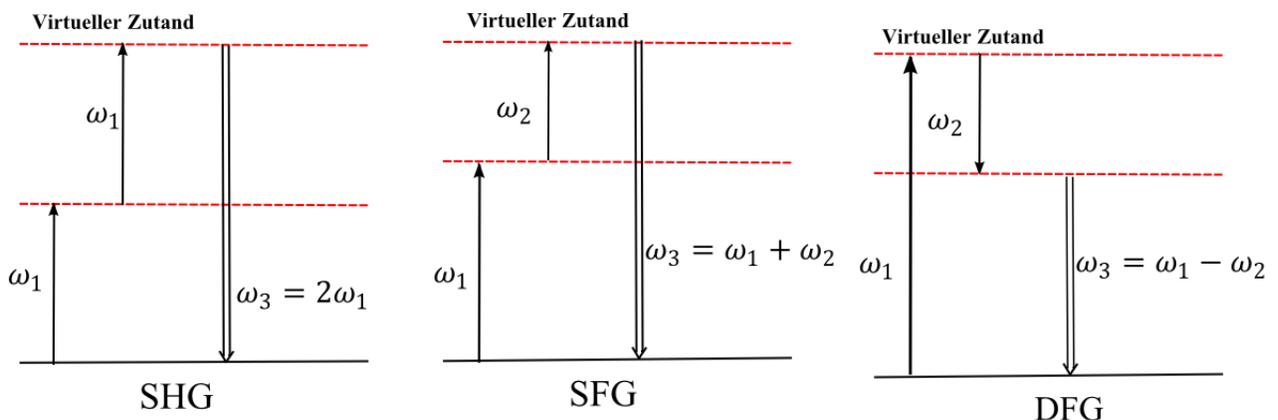
Wenn man berücksichtigt, dass das elektrische Feld  $E$  eigentlich ein Vektor ist, dann werden die linearen und nichtlinearen Suszeptibilitäten Tensoren. In Medien mit Inversionssymmetrie wie isotropen Medien, verschwinden Suszeptibilitäten geradzahlgiger Ordnung, weil die Polarisation  $P$  eine ungerade Funktion ist. D. h. bei einer Richtungsumkehr des elektrischen Feldes kehrt gleichzeitig die Richtung von  $P$  um, so verschwinden die geraden Potenzen von  $E$  in (2.7). Daher ist die Frequenzverdopplung in verlustfreien Kristallen mit Inversionssymmetrie nicht möglich und für die meisten Medien ist die niedrigste auftretende Ordnung die Nichtlinearität 3. Ordnung.

## 2.1.2 Die Anwendung der Nichtlinearen Prozesse

### Effekte zweiter Ordnung, Frequenzmischung

Nichtlineare optische Prozesse zweiter Ordnung werden in der Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG), Summenfrequenzzerzeugung (SFG) und Differenzfrequenzzerzeugung (DFG) ausgenutzt ([67] [68] [69]). Für die beiden einfallenden elektromagnetischen Felder  $E_1 e^{i\omega_1 t}$  und  $E_2 e^{i\omega_2 t}$  mit den beiden Frequenzen  $\omega_1$  und  $\omega_2$ , und mit der Polarisation 2. Ordnung  $P^{(2)}$  gilt:

$$P^{(2)} \propto E_1^2 e^{i(2\omega_1)t} + E_2^2 e^{i(2\omega_2)t} + 2E_1^2 + 2E_2^2 + 2E_1 E_2 e^{i(\omega_1 - \omega_2)t} + 2E_1 E_2 e^{i(\omega_1 + \omega_2)t}.
\tag{2.9}$$

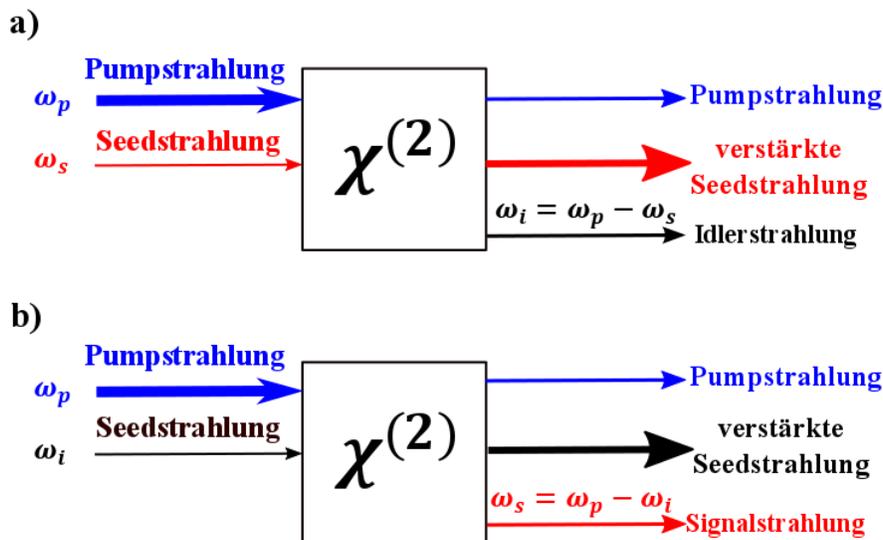


**Abbildung 2.1** Schematische Darstellung der Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG), der Summenfrequenzerzeugung (SFG) und der Differenzfrequenzerzeugung (DFG).

Dabei werden folgende neue Frequenzen erzeugt:

$2\omega_1$	SHG
$2\omega_2$	SHG
$\omega_1 + \omega_2$	SFG
$\omega_1 - \omega_2$	DFG

Diese Prozesse sind wichtig, um die gewünschten Wellenlängen in der Femtosekunden-Spektroskopie zu erzeugen; eine schematische Darstellung ist in Abbildung 2.1 gegeben.



**Abbildung 2.2** Schematische Darstellung des OPA Prozesses mit a)  $\omega_s = \omega_{seed}$ , Signalstrahlung ist die Seedstrahlung b)  $\omega_i = \omega_{seed}$ , Idlerstrahlung ist die Seedstrahlung.

Für die Pump-Probe-Experimente werden SHG, SFG und DFG verwendet. Ein weiterer wichtiger Prozess ist die optische parametrische Verstärkung (OPA) [68] [69], die der DFG ähnlich ist. Der Prozess läuft analog zu der in Abb. 2.1 dargestellten DFG. So wie in Abb. 2.2 gezeigt, schickt man in einen nichtlinearen Kristall eine intensive Welle mit der Frequenz  $\omega_p$  (Pump-Licht, analog  $\omega_1$ ) und eine schwache Signalwelle mit einer niedrigeren Frequenz  $\omega_s$  (analog  $\omega_2$ ), so kann diese verstärkt werden. Die Pumpwelle wird dabei in eine Signalwelle und eine Differenzwelle (Idler-Licht) mit der Frequenz  $\omega_i = \omega_p - \omega_s$  (analog  $\omega_3$ ) umgewandelt. In diesem optisch-parametrischen Prozess werden aus einem ankommenden Photon (Pump-Photon) mit der Frequenz  $\omega_p$  zwei Photonen mit den Frequenzen  $\omega_s$  und  $\omega_i$  erzeugt. Der Strahl mit der geringeren

Photonenenergie ( $E = \hbar\omega_i$ ) wird Idler genannt, der mit der höheren Energie ( $E = \hbar\omega_s$ ) Signal. Die Frequenz von Signal- und Idler-Licht und die Effizienz des Idler-Lichts lassen sich dabei durch die Wahl der Phasenanpassung (siehe unten) variieren. Für alle nichtlinearen Prozesse der Frequenzerzeugung gilt die Energieerhaltung, so dass kein Energieverlust bei diesem Prozess auftritt:

$$E = \sum_n E_n = \hbar \sum_n \omega_n \quad (2.10)$$

### Effekte dritter Ordnung

In Medien mit Inversionszentrum ist der niedrigste nichtlineare Term von 3. Ordnung. Für den allgemeinen Fall besteht das Feld  $E(t)$  aus mehreren unterschiedlichen Frequenzkomponenten, wodurch der Ausdruck für  $P^{(3)}$  sehr kompliziert wird. Aus diesem Grund haben wir zunächst den einfachen Fall als Beispiel gegeben, dass das angelegte Feld ein monochromatisches ist. Mit:

$$E(t) = E_0 \cos(\omega t) = \frac{1}{2} E_0 (e^{i\omega t} + e^{-i\omega t}), \quad (2.11)$$

wird die nicht-lineare Polarisation zu:

$$\begin{aligned} p^{(3)}(t) &= \epsilon_0 \chi^{(3)} (E(t))^3 \\ &= \epsilon_0 \chi^{(3)} \left[ \frac{1}{2} E_0 (e^{i\omega t} + e^{-i\omega t}) \right]^3 \\ &= \frac{1}{4} \chi^{(3)} E_0^3 \cos 3\omega t + \frac{3}{4} \chi^{(3)} E_0^3 \cos \omega t \\ &= \frac{1}{4} \chi^{(3)} E_0^3 \cos 3\omega t + \frac{3}{4} \chi^{(3)} |E_0|^2 E_0 \cos \omega t \end{aligned} \quad (2.12)$$

Die erste Komponente entspricht der Erzeugung der dritten Harmonischen (THG) [68] [69], was unter bestimmten Voraussetzungen, wie z. B. Phasenanpassung, stattfinden kann. Die zweite Komponente entspricht einer intensitätsabhängigen Polarisation des erzeugenden Feldes, was zu einem intensitätsabhängigen Brechungsindex  $n(I)$

$$n(I) = (1 + \chi)^{1/2} = \left( 1 + \chi^{(1)} + \frac{3}{4} \chi^{(3)} |E_0|^2 \right)^{1/2} \cong n_0 \left( 1 + \frac{1}{2n_0^2} \chi_{NL} \right) \quad (2.13)$$

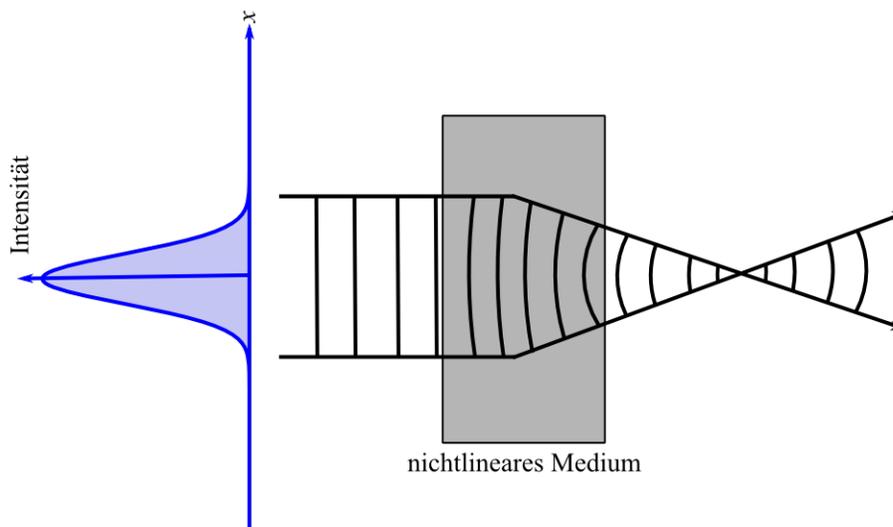
führt, wobei  $n_0 = (1 + \chi^{(1)})^{1/2}$  und  $\chi_{NL} = \frac{3}{4} \chi^{(3)} |E_0|^2$  sind [70]. Für kleine Brechungsindexänderungen  $\chi_{NL} \ll n_0^2$  vereinfacht man 2.13 zu

$$n(I) = n_0 + \frac{3\chi^{(3)}}{8n_0} |E_0|^2 = n_0 + n_2 I. \quad (2.14)$$

D. h.  $n_2$  ist proportional zu  $\chi^{(3)}$  ( $n_2 = \frac{3\chi^{(3)}}{8n_0}$ ) und mit steigender Intensität  $I$  wird der intensitätsabhängige Brechungsindex  $n$  erhöht.

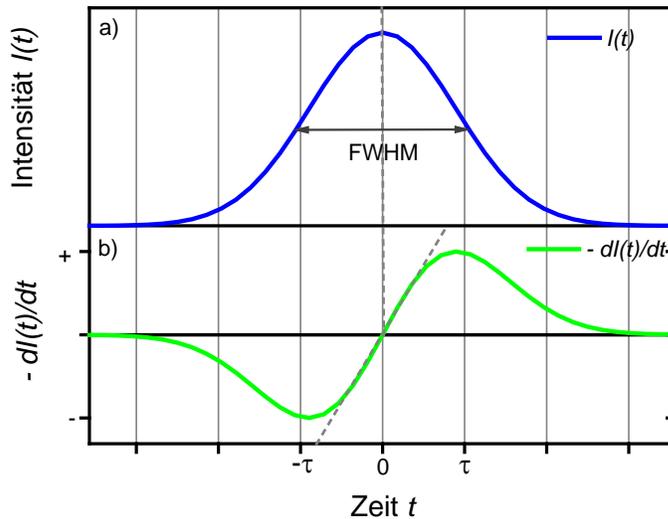
## Selbstfokussierung

Einer der Prozesse, die als Folge des intensitätsabhängigen Brechungsindex auftreten können, ist die Selbstfokussierung, welche in Abb. 2.3 dargestellt ist. Dieser Prozess kann auftreten, wenn ein Lichtstrahl mit einer ungleichmäßigen transversalen Intensitätsverteilung sich durch ein Material ausbreitet, bei dem  $n_2$  positiv ist. So wird sich der Brechungsindex  $n(r)$  im Zentrum aufgrund der Nichtlinearitäten vergrößern, während der Puls sich in den Flanken kaum ändert. Damit wird im Zentrum auch der optische Weg länger als in den Flanken, wodurch die Phasenflächen gekrümmt werden. Das Medium wirkt wie eine Linse und fokussiert den Puls, was zur weiteren Steigerung der Intensität im Zentrum führt. Falls der Fokus dabei noch im Medium liegt, werden die Lichtintensitäten bei der Fokussierung oft so hoch, dass weitere, höhere Nichtlinearitäten bis zur Zerstörung des Mediums auftreten können [70].



**Abbildung 2.3** Selbstfokussierung eines intensiven Laser-Strahls in einem nichtlinearen Medium. Die gaußförmig verteilte Intensität führt zu einem erhöhten Brechungsindex im Zentrum des Strahls.

Selbstfokussierung tritt bei allen Hochleistungslasersystemen auf, bei denen hohe Intensitäten und dicke Optiken notwendig sind. Die zerstörerische Wirkung der Selbstfokussierung kann durch überlegtes Design und Verwendung von großen Strahlquerschnitten vermieden werden. Selbstfokussierung kann als erwünschter optischer Schaltmechanismus eingesetzt werden. Beispielsweise wird sie beim so genannten „Kerr-Lense-Modelocking“ in Lasern für die Erzeugung von Lichtimpulsen im 10fs-Bereich eingesetzt.



**Abbildung 2.4** Selbstphasenmodulation. a) Intensitätsverteilung eines Gauß fs Lichtpulses. b) Die zeitliche Ableitung der Intensität dieses Pulses.  $\tau$  ist die Hälfte der Pulsdauer. Die Pulsdauer wird aus der vollen Halbwertsbreite (FWHM) bestimmt. Die zeitabhängige Frequenzänderung folgt der zeitlichen Ableitung der Intensität, und führt zu einem verbreiterten Spektrum.

### Selbst-Phasen-Modulation

In der Pump-Probe-Spektroskopie verwenden wir ultrakurze Lichtpulse (im fs-Bereich), die eine hohe Intensität aufweisen. Aus Gleichung 2.14 ergibt sich, dass dadurch der Brechungsindex örtlich variieren wird. Die Nichtlinearität des Brechungsindex wirkt über die Wellenzahl  $k = 2\pi n/\lambda$  direkt auf die Phasen des Lichtimpulses: An der Stelle  $x$  im Medium gilt

$$E(x, t) = E_0(t) \cos[\varphi(x, t)], \quad (2.15)$$

dabei ist die Phase

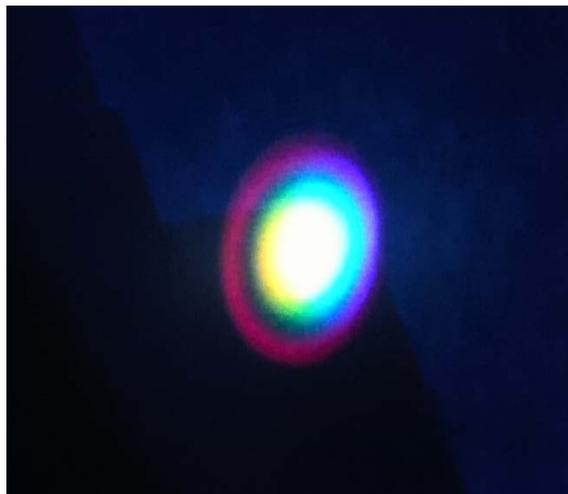
$$\varphi(x, t) = \omega_0 t - kx = \omega_0 t - 2\pi n_0 x/\lambda_0 - 2\pi n_2 I(t) x/\lambda_0. \quad (2.16)$$

Die Momentanfrequenz ergibt sich zu

$$\omega(t) = \frac{\partial \varphi(x, t)}{\partial t} = \omega_0 - \frac{2\pi n_2 x}{\lambda_0} \frac{\partial I(t)}{\partial t}, \quad (2.17)$$

d. h. die Frequenz des Lichtpulses wird zeitabhängig. Und so wie in Abb. 2.4 gezeigt gilt: Je kürzer der Lichtimpuls und je größer die Intensitätsänderung, desto größer ist die maximale Frequenzverschiebung. Da die Intensität von Null auf einen Maximalwert ansteigt und dann wieder auf Null abfällt, wird zu Beginn des Pulses die Frequenz abfallen (Rotverschiebung). Im Bereich des Maximums nimmt dann die Frequenz zu (erzeugt die blau verschobenen Frequenzen) und fällt am Ende des Lichtpulses wieder auf den Wert  $\omega_0$  ab.

Die damit zeitlich einhergehende modulierende Frequenzverbreiterung wird Selbst-Phasen-Modulation (SPM) genannt. Es gibt noch einen anderen ähnlichen Effekt, der oft als Kreuzphasenmodulation (XPM) bezeichnet wird. Bei diesem Prozess wird die Phase des kohärenten Probe-Impulses durch Interaktionen eines nicht-linearen Mediums und des Pump-Impulses modifiziert. In dieser Arbeit taucht dieser Effekt auch auf und zwar wirkt das  $\text{CaF}_2$  Probenfenster als nicht-lineares Medium.



**Abbildung 2.5** Ein Foto des Weißlichtes im pump-Aufbau.

Die Selbstfokussierung und SPM werden in dieser Arbeit zur Weißlichterzeugung ([68] [71]) verwendet. Der einfallende fs-Laserpuls wird zuerst in einem Saphir-Kristall selbstfokussiert, und durch Selbst-Phasen-Modulation ein Superkontinuum erzeugt. Weil dieses Superkontinuum im sichtbaren Spektralbereich oftmals weiß aussieht, nennt man es Weißlicht.

Das Weißlicht wird als Signal-Licht zur Erzeugung kurzer Lichtimpulse oder als Abtastimpuls verwendet. Ein Foto des Weißlichts meines Experiments ist in der Abbildung 2.5 dargestellt.

### **Phasenanpassung**

Die Effizienz der nichtlinearen Effekte ist davon abhängig, ob die Partialwellen, die von den individuellen Oszillatoren des Dielektrikums emittiert werden, konstruktiv interferieren. Induzierte

schwingende Dipole in einem Medium sind Quellen elektromagnetischer Wellen, die sich mit der Phasengeschwindigkeit ausbreiten.

$$v_{phase} = \frac{\omega}{|\vec{k}|} = \frac{c_0}{n(\omega)} \quad (2.18)$$

Wenn sich die Phasengeschwindigkeiten der eingestrahlten Welle (Grundwelle) und der erzeugten Wellen (Oberwelle) unterscheiden, tritt keine konstruktive Interferenz auf. Je größer der Unterschied der Brechungsindizes beider Wellen ist, desto kleiner ist die Kohärenzlänge  $l_c = \lambda_{Grundwelle} / (2[n_{Oberwelle} - n_{Grundwelle}])$  nach der es zur Auslöschung kommt [72].

Phasenanpassung und somit konstruktive Interferenz kann verstanden werden als Energie- und Impulserhaltung. Beide müssen erfüllt sein, wenn nichtlineare Effekte, z.B. SFG, stattfinden. Die Energieerhaltung ist gegeben durch die Beziehung

$$\sum_i h\omega_i^{in} = \sum_j h\omega_j^{out} . \quad (2.19)$$

Aus der Impulserhaltung der Photonen, die in die gleiche Richtung laufen, folgt dann

$$\sum_i \vec{k}_i^{in} = \sum_j \vec{k}_j^{out} . \quad (2.20)$$

wobei  $\vec{k}$  der Wellenvektor ist.

$$|\vec{k}| = n(\omega) \frac{\omega}{c} = \frac{\omega}{v(\omega)} = \frac{2\pi n}{\lambda} \quad (2.21)$$

Gleichung 2.20 ist die Bedingung der Phasenanpassung.

Kristalle mit verschiedenen Achsen werden für die Frequenzkonvertierung verwendet. Ein typisches Material ist  $\beta$ -Barium-Borat (BBO), das doppelbrechende Eigenschaften aufweist, d. h. der Kristall hat eine ordentliche und eine außerordentliche optische Achse mit unterschiedlichen polarisationsabhängigen Brechungsindizes. Als Folge können die Polarisationen der einfallenden Strahlen und der Kristallwinkel so gewählt werden, dass (annähernd) die Phasenanpassung ([68] [69] [72] [73]) ermöglicht wird. Damit kann der nichtlineare Effekt effizient durchgeführt werden.

## 2.2 Polarisationsaufgelöste Femtosekunden Pump-Probe Spektroskopie

### 2.2.1 Femtosekunden Laserpulse

Die Zeitskalen chemischer Reaktionen sind mit strukturellen Veränderungen der Moleküle, d. h. mit den Atombewegungen, korreliert; molekulare Schwingungen dauern typischerweise zehn bis einige hundert Femtosekunden (fs,  $1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$ ) [74]. Um solche Reaktionen verfolgen zu können, ist eine zeitliche Auflösung erforderlich, die in der gleichen Größenordnung liegt.

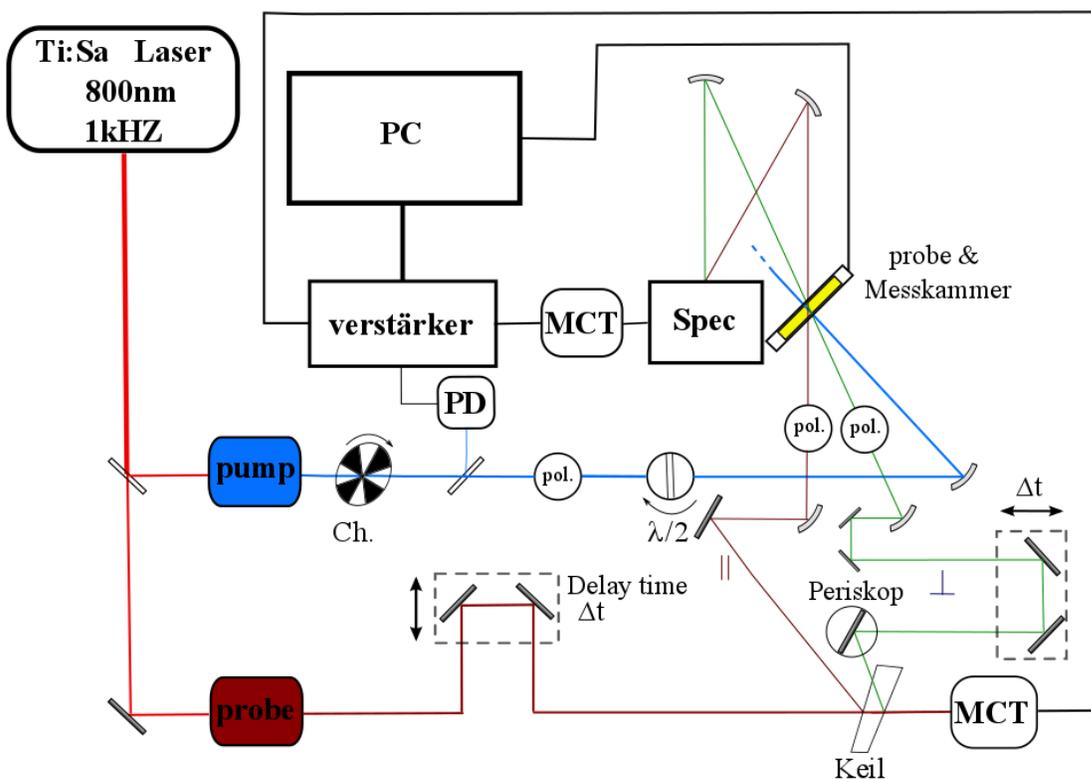
Diese wird mit ultrakurzen Laserpulsen erreicht. Als Lichtquelle dient das Ti:Saphir Lasersystem Legend USP-1 von Coherent mit regenerativem Verstärker. Es liefert Lichtimpulse bei einer Wellenlänge von  $\approx 800 \text{ nm}$ , die im Folgenden Fundamentale genannt wird. Die Fundamentale besitzt eine Pulsdauer von  $\approx 80 \text{ fs}$  und wird mit einer Frequenz von  $1088 \text{ Hz}$  wiederholt. Die Pulsenergie der Fundamentalen liegt bei ca.  $2,33 \text{ mJ}$ . Davon werden  $1,6 \text{ mJ}$  zur Erzeugung der Pumppulse genutzt und  $0,5 \text{ mJ}$  für die Probepulse. Eine Beschreibung des Aufbaus folgt in Abschnitt 2.2.2.

### 2.2.2 VIS - IR – Aufbau

Bei der bal-Pol-fs-PPS erhält man im Vergleich zur normalen fs-PPS (Femtosekunden Pump-Probe Spektroskopie) Messungen zusätzliche Informationen über die Struktur der zu untersuchenden Moleküle. Das erreicht man durch das dichroitische Verhältnis:  $D = \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}}$  (siehe Kap. 3.3), wobei  $I_{\parallel}$  und  $I_{\perp}$  die Signaländerungen von zwei Probe-Strahlen sind, die senkrecht und parallel zum Pump-Strahl polarisiert sind und die gleichzeitig detektiert werden. Die Abbildung 2.6 zeigt den schematischen Aufbau des bal-Pol-fs-PPS -Experiments. Die Generierung der Pump- und Probe-Pulse, in Abb. 2.6 als blaue und rote Boxen dargestellt, wird im Folgenden beschrieben.

Der Probe-Strahl (rot) wird nach der Erzeugung in eine Verzögerungsstrecke (Delayline) eingekoppelt, mit der die Weglänge des Probe-Strahls geändert werden kann. Auf diese Weise kann die Zeitverzögerung zwischen den Pump- und den Probepulsen bis zu  $1,8 \text{ ns}$  variiert werden. Als minimalen Schritt der Zeitverzögerung werden bei uns je nach Experiment  $20\text{-}70 \text{ fs}$  verwendet. Direkt nach der Verzögerungsstrecke trifft der Probe-Puls auf einen Keil und wird in drei Teilstrahlen aufgespalten. Der durch den Keil transmittierte Anteil, detektiert über einen MCT (Mercury-Cadmium-Tellurid) -Einzeldetektor, dient als Probe-Referenz. Einer der beiden reflektierten Anteile bleibt in der Polarisation unverändert (dunkelrot, horizontal polarisiert,

parallel zu Tischoberfläche). Die Polarisation des anderen reflektierten Anteiles wird mit einem Periskop um  $90^\circ$  gedreht (dunkelblau, vertikal polarisiert, senkrecht zur Tischoberfläche), und danach in eine kleine Verzögerungsstrecke eingekoppelt. Mit Hilfe dieser kleinen Verzögerungsstrecke werden die Weglängen der beiden reflektierten Anteile ausgeglichen. Zwei Polarisationsfilter werden danach genutzt, um die Polarisationsrichtungen der Probe-Strahlen festzulegen und zu säubern. Sowohl die beiden Probe-Strahlen, als auch der Pump-Strahl werden mit einer bestimmten Anordnung in die Messkammer (Beschreibung s. unten) fokussiert und in einem Punkt überlagert. Die durch die Probe transmittierten zwei Probe-Strahlen werden ins Spektrometer eingekoppelt und auf einen 2-zeiligen MCT-Detektor mit jeweils 32 Elementen abgebildet. Die Signaländerungen  $I_{\parallel}$  und  $I_{\perp}$  werden gleichzeitig aufgenommen.



**Abbildung 2.6** Schematische Darstellung des Aufbaus. Ch.: Chopper, PD: Photodiode, Pol: Polarisator,  $\lambda/2$ :  $\lambda/2$ -Plättchen, Spec: Spektrometer, IR Detektor (MCT).

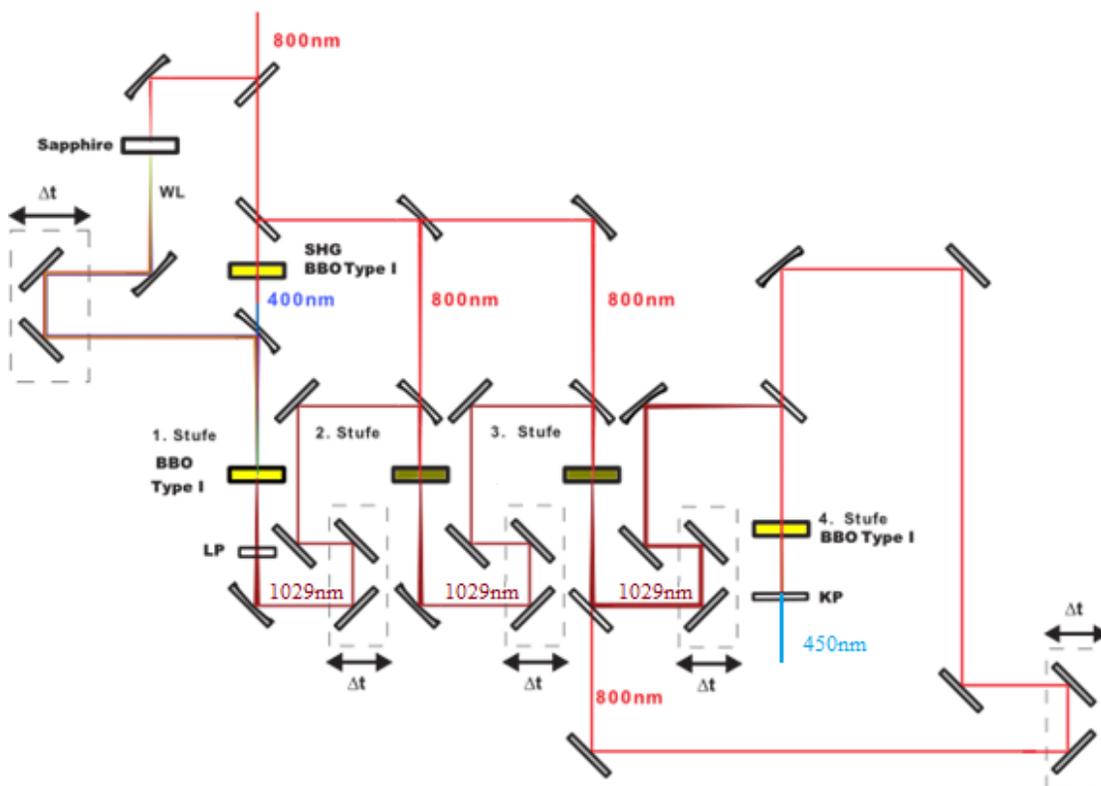
Es ist nicht vermeidbar, dass die gemessenen Absorptionsänderungen der Probesignale  $I_{\parallel}$  und  $I_{\perp}$  von dem Überlapp der drei Strahlen beeinflusst werden. Diese Einflüsse können zu verfälschten Messergebnissen führen. Um sie herauszurechnen, benötigt man eine Methode um den Überlapp des Pumpimpulses mit den Probestrahlen von  $I_{\parallel}$  und  $I_{\perp}$  zu korrigieren. In dieser Arbeit ermittle ich die Einflüsse durch Vergleichen zweier Messungen, die unter ansonsten gleichen Bedingungen außer der Polarisationsrichtung des Pump-Strahlens durchgeführt sind. Die genaue Beschreibung dieses Vorgehens liefert Signalkorrekturen, die in Abschnitt 3.1 beschrieben sind.

Der Pump-Strahl (blau) wird nach der Pump-Puls-Generierung (blaue Box) durch einen Chopper (Ch.) geschickt. Jeder zweite Pump-Puls wird durch den Chopper geblockt, d.h. der Chopper übernimmt das Ein- und Ausschalten der Pump-Pulse mit einer Frequenz von 544Hz (1088Hz/2). Der Chopper wird mit dem Triggersignal des Lasers (1088Hz) synchronisiert. Ein Neutralsichtfilter wird zur stufenlosen Abschwächung der Strahlleistung genutzt. Der Rückreflex des Neutralsichtfilters wird mit einer Photodiode (PD) gemessen, um die Pump-Stabilität zu überwachen. Analog zum Probe-Puls wird der Pump-Puls auch durch einen Polarisator (pol.) geschickt, um unerwünschte Polarisationsrichtungen zu eliminieren. Ein  $\lambda/2$ -Plättchen benutzt man nach dem Polarisator um die Pump-Polarisationsrichtung beizubehalten oder um  $90^\circ$  zu ändern. Damit kann die Messung nicht nur mit horizontaler, sondern auch mit vertikaler Pump-Polarisation (im Vergleich zur Tischoberfläche) durchgeführt werden. Bei manchen Messungen verwendet man auch einen Shutter, um den Pump-Strahl zu blockieren und damit unnötige Beleuchtung der lichtempfindlichen Proben zu vermeiden.

Der Pump-, sowie die beiden Probe-Strahlen werden durch Konkavspiegeln in die Probe fokussiert. Alle drei Strahlen müssen in der Probe räumlich dasselbe Probenvolumen treffen, und auf die maximale Änderung des Abtastsignals optimiert zu werden. Die Anordnung der drei Strahlen wird im folgenden Abschnitt beschrieben. Die zeitliche Überlagerung zwischen Pump-Strahl und den beiden Probe-Strahlen wird durch eine Eichmessung mit einem Germaniumplättchen bestimmt; daraus ergibt sich der Zeitnullpunkt der Verzögerungsstrecke (siehe unten). Der Fokus des Pumpulses ( $D \approx 500\mu m$ ) ist größer als der des Probepulses ( $D \approx 300\mu m$ ). Somit liegt das gesamte abgetastete Probenvolumen im angeregten Bereich. Die durch die Probe transmittierten Probe-Strahlen werden in das Spektrometer ((Triax 320, Jobin Yvon Horiba)) fokussiert und spektral aufgelöst auf einen 2-zeiligen MCT-Detektor mit jeweils 32 Elementen abgebildet. Das Signal wird danach verstärkt und mittels Computer aufgenommen. Der Computer wird auch verwendet, um den Chopper und die Verzögerungsstrecke zu kontrollieren.

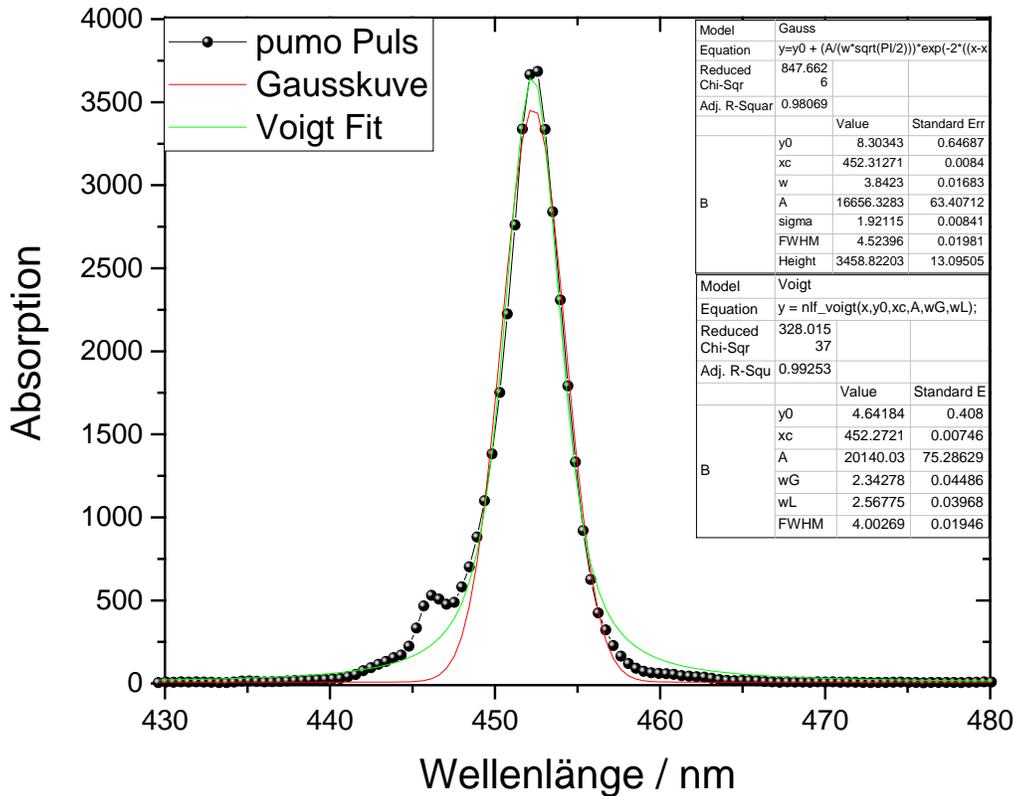
### **Erzeugung der Anregungspulse**

Zur Anregung von Carotinoiden und Phytochromen wurden Pump-Wellenlängen im Bereich von 430 - 730 nm mit Hilfe von nichtlinearen Prozessen (Kapitel 2.1) erzeugt. In dieser Arbeit wird die Erzeugung durch einen vierstufigen Aufbau erreicht. Eine schematische Darstellung des Pump Aufbaus ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Aus dem Lasersystem kommt ein stabiler Laserstrahl mit  $\lambda = 800$  nm, der in zwei Strahlenteile aufgespalten wird. Einer der beiden Strahlen wird zur Erzeugung des Weißlichts (Abb. 2.5) genutzt, das in der ersten Stufe als Seed verwendet wird. Der andere Strahl wird mehrmals aufgespalten, wobei der erste Teilstrahl zur Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG) in einem BBO-Kristall für die 1 Stufe genutzt wird. Der andere Teilstrahl wird jeweils als Pump in den Stufen 2 und 3 genutzt.



**Abbildung 2.7** Schematisch Darstellung des Pump Aufbaus, in der zweiten und dritten Stufen werden KTA oder BBO Kristalle je nach Bedarf verwendet. LP: Langpaßfilter, KP: Kurzpaßfilter, WL: Weißlicht.

Für die 1. Stufe wird der von der zweiten Harmonischen erzeugte 400 nm-Strahl als Pump Strahl benutzt. Name und Typ des zur Frequenzverdopplung genutzten Kristalls sind in Tabelle 1 gezeigt. In der ersten Stufe wird ein Idler mit  $\lambda = 1029 \text{ nm}$  erzeugt ( $\frac{1}{400} = \frac{1}{654} + \frac{1}{1029}$ ). Der erzeugte Strahl wird durch einen Langpassfilter (RG 780) geschickt, damit nur der IR-Anteil in die kommenden Stufen eingekoppelt und verstärkt wird. Die Stufen 2 und 3 sind identisch. In der Stufe 2 wird der IR-Strahl mit  $\lambda = 1029 \text{ nm}$  als Signal genutzt und verstärkt, nebenbei wurde einen Idler-Strahl mit  $\lambda = 3595 \text{ nm}$  durch einem OPA-Prozess erzeugt ( $\frac{1}{800} = \frac{1}{1029} + \frac{1}{3595}$ ). Anschließend werden beide Strahlanteile in der 3. Stufe noch mal verstärkt. Dies ist nötig, weil die Intensität des IR-Strahls mit  $\lambda = 1029 \text{ nm}$  in den ersten beiden Stufen nicht ausreicht, um genug Intensität bei 450 nm durch SFG in der 4. Stufe zu konvertieren. Nach der 3. Stufe wird der Strahlanteil der 1029 nm und der Restanteil der 800 nm jeweils durch Spiegel (HR1000-1500 nm, HR800 nm, Laseroptik GmbH) ausgekoppelt und zur Erzeugung der 450 nm in der 4. Stufe mittels SFG genutzt. Nach der Erzeugung wird der Strahl durch einen Kurzpassfilter geschickt, um alle anderen Strahlanteile bis auf den Anteil bei 450 nm herauszufiltern. Das Spektrum des erzeugten Pump-Strahls ist in Abb. 2.8 gezeigt.



**Abbildung 2.8** Spektrum des Pump-Strahls mit einer Zentralwellenlänge von 450 nm und Halbwertsbreite von 4,5 nm.

Das Spektrum des erzeugten Pump-Pulses ist in Abb. 2.8 gezeigt. Das Spektrum lässt sich gut durch eine Gauß-Funktion beschreiben. Für das *Zeit-Bandbreiten-Produkt* gilt die Ungleichung

$$\Delta\tau \cdot \Delta\nu \geq k, \quad (2.22)$$

wobei  $\Delta\nu$  die Halbwertsbreite der Frequenz mit  $\omega=2\pi\nu$  und  $\Delta\tau$  die Halbwertsbreite der Pulsdauer ist. Die Konstante  $k$  bezeichnet das *Transform Limit* oder *Fourier Limit*. [75]

Wegen der Unschärferelation wird die Dauer des Pump-Pulses das theoretische Minimum nicht unterschreiten. Man kann das Limit der Pulsdauer auch durch Halbwertsbreite der Wellenlänge  $\Delta\lambda$  und Zentralwellenlänge  $\lambda_0$  bestimmen:[76]

$$\Delta\tau \geq k \cdot \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda \cdot c} \quad (2.23)$$

Für Gaußprofile ist das *Transform Limit*  $k=0.441$ . Somit ist die zum Spektrum zugehörige kürzeste Pulslänge des Pump-Pulses aus Abb. 2.8 66 fs.

Dieser vierstufige Aufbau ist sehr vielseitig einstellbar. Man kann damit die Wellenlänge des Pump-Pulses im VIS und IR Bereich zwischen 400 nm bis 8000 nm schnell und flexibel umstellen. Beispielsweise kann man denselben Aufbau benutzen, um Pump-Pulse im Bereich von 500-1700 nm zu erzeugen. Dazu muss nur die Frequenz des Signal- oder Idler-Strahls der dritten Stufe in der vierten Stufe, z.B. durch einen BBO Kristall, verdoppelt werden. Ansonsten kann zur Erzeugung eines Pump-Pulses bei 520 nm der Aufbau in der zweiten und dritten Stufen statt mit zwei Kalium-Titanyl-Arsenat-Kristallen (KTA) mit zwei BBO Kristalle betrieben werden, um Pulse bei 1486 nm effizienter zu verstärken. Anschließend werden in der 4. Stufe diese 1486 nm Pulse und 800 nm Pulse mittels SFG zur Erzeugung der 520 nm genutzt. Zur Erzeugung eines IR Pump-Pulses z.B. bei 7000 nm ( $1428 \text{ cm}^{-1}$ ) benötigt man nur einen Silberthiogallatkristall ( $\text{AgGaS}_2$  oder AGS) *in der vierten Stufe*. Der Signal (1435 nm) und der Idler-Strahl (1806 nm) der dritten Stufe werden auf einen Punkt in dem  $\text{AgGaS}_2$  fokussiert und überlagert. Eine Differenzfrequenz wird aus diesen beiden Strahlen durch den DFG Prozess gebildet.

Stufe	Prozess	$\lambda_p$ (nm)	$\lambda_{seed}$ (nm)	$\lambda_s$ (nm)	$\lambda_i$ (nm)	Verwendete r Kristall	Kristall Dick	Kristall Type
1	OPA	400	WL	657	1029	BBO	1mm	I
2	OPA	800	1029	1029	3595	KTA	2mm	II
3	OPA	800	1029	1029	3595	KTA	5mm	II
4	SFG	800	1029	450	1029	BBO	2mm	I

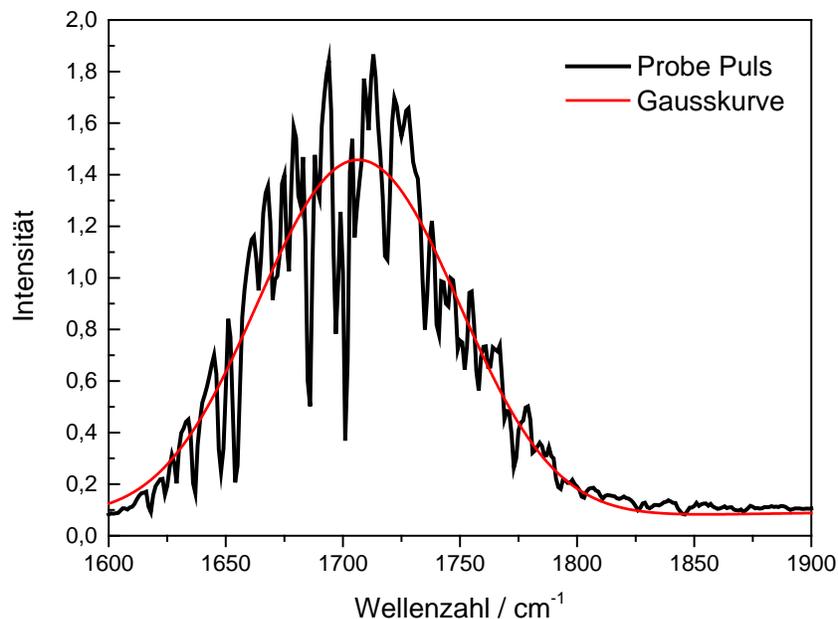
**Tabelle 2.1:** Erzeugung der Anregungspulse mit  $\lambda = 450 \text{ nm}$  im OPA.

Für die optimale Verstärkung des Aufbaus müssen sich die Strahlen aller Stufen sowohl räumlich, als auch zeitlich überlagern. Die räumliche Überlagerung wird durch Fokussierung und mit Hilfe von Spiegeln erreicht. Die zeitliche Überlagerung wird durch Veränderung der Verzögerungsstrecke erreicht. Die Winkel des Kristalls werden so eingestellt, dass die Energie des erzeugten Lichts optimiert ist. Eine ausführliche Übersicht der Prozesse, Kristalltypen und Wellenlängen für jede Stufe des Lichterzeugungsprozesses bei einer Zentralwellenlänge von 450 nm ist in Tabelle 2.1 gegeben.

### Erzeugung der Abtastpulse

Die zu dieser Arbeit geeigneten Infrarot-Abtastpulse (Probe-Puls) im Bereich von  $1500 \text{ cm}^{-1}$  bis  $1800 \text{ cm}^{-1}$  werden durch einen dreistufigen Frequenzkonversionsprozess erzeugt. Der Aufbau ist ähnlich zu dem von R. Kaindl et al. vorgestellten Aufbau [77]. Er besteht aus einem zweistufigen OPA Aufbau und einem DFG Aufbau.

Für die IR-Abtastpulse wird ein kleiner Teil des fundamentalen 800 nm-Strahls in eine Saphir-Platte fokussiert, um ein Weißlicht zu erzeugen, das danach als Seed-Strahl für den OPA in der ersten Stufe verwendet wird. Das Weißlicht wird zeitlich und räumlich mit den 800 nm Pump in einem BBO-Kristall (Typ II,  $d=4$  mm) überlagert. Signal- und Idler-Puls der ersten OPA Stufe werden in der zweiten Stufe verstärkt: Sie werden in den BBO zurückgesendet und mit einem zweiten Pump-Strahl überlagert. Die erzeugten Signal- und Idler-Pulse der zweiten Stufe werden für einen DFG-Prozess in einem AgGaS<sub>2</sub> Kristall (Silberthiogallatkristall, Typ I,  $d=1$  mm) in der dritten Stufe verwendet. Der gewünschte IR-Puls liegt im benötigten Spektralbereich von 1000 - 3500  $\text{cm}^{-1}$  und ist kontinuierlich abstimbar bei einer typischen Pulsdauer von 160 fs und einer spektralen Breite von  $\sim 100$   $\text{cm}^{-1}$  (FWHM). Ein typisches Spektrum der Abtastpulse ist in Abb. 2.9 gezeigt. Weil das Wasser in der Luft teilweise den Probe-Puls absorbiert, gibt es auf dem breiten Probe-Puls-Spektrum deutlich ein paar schmale Absorptionsbanden. Um diesen Einfluss zu minimieren, wird die Luft im Bereich der Probenkammer während der ganzen Messung getrocknet. Alle Messungen werden bei einer Luftfeuchtigkeit unter 5% ausgeführt.

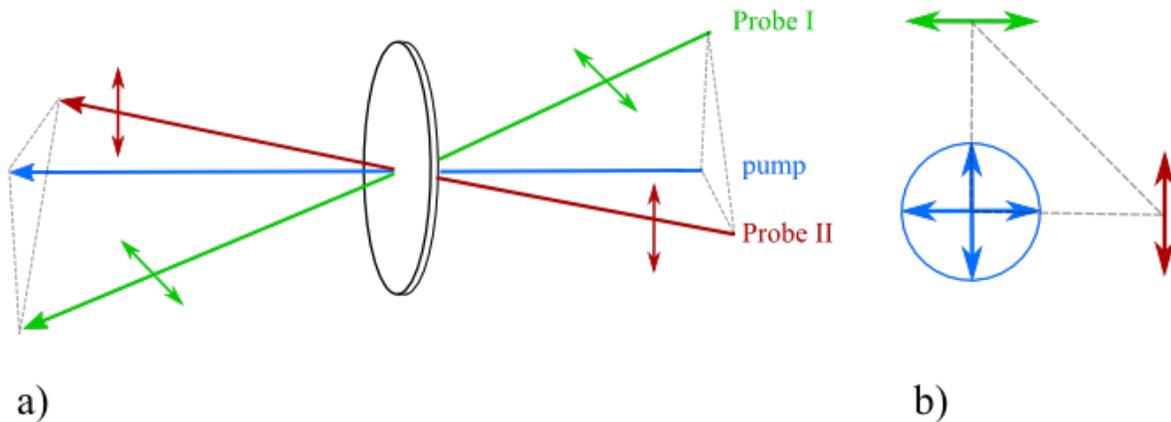


**Abbildung 2.9** Spektrum eines verwendeten Probe-Strahls mit einer spektralen Breite von  $\sim 100$   $\text{cm}^{-1}$ . Die spektralen Einbrüche kommen von H<sub>2</sub>O-Dampf-Absorption.

### Überlagerung der Lichtpulse in der Probe

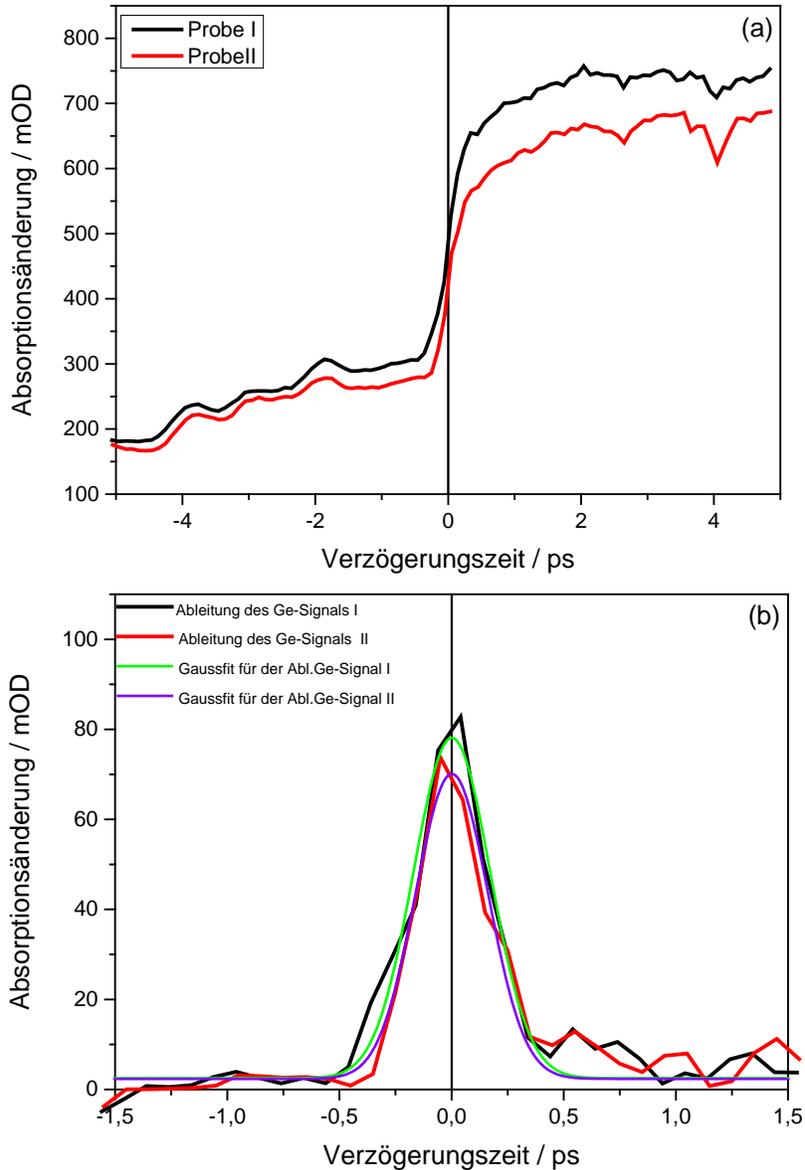
Ein Highlight des experimentellen Aufbaus ist die gleichzeitige Überlagerung der beiden linear polarisierten Probe-Strahlen, deren Polarisationsrichtungen exakt senkrecht zueinander sind, mit einem linear polarisierten Pump-Strahl. Mit diesem Aufbau kann man die Winkel zwischen dem

abgetasteten Schwingungsübergangsdipolmoment  $\mu_{vib}$  und dem angeregten elektronischen Übergangsdipolmoment  $\mu_{el}$  desselben Moleküls messen. Weiterhin kann mit Hilfe theoretischer Berechnungen die räumlich Lage der  $\mu_{vib}$  bestimmt werden (siehe Abschnitt 3.1). Dabei ist zu beachten dass kleine Abweichung der Polarisationsrichtungen direkt zu verfälschten Ergebnissen führen kann. Deshalb werden Polarisationsfilter für alle drei Strahlen eingesetzt, und die Strahlen werden danach in einer bestimmten räumlichen Zuordnung, wie in Abb. 2.10 gezeigt, überlagert.



**Abbildung 2.10** a) Schematische Darstellung der räumlichen Überlagerung zweier Probe- Strahlen mit dem Pump-Strahl. b) Räumliche Zuordnung der Strahlen. Probe I: der horizontal polarisierte Probe-Strahl, Probe II: der vertikal polarisierte Probe-Strahl. Pump: Der Pump- Strahl, dessen Polarisationsrichtung umstellbar ist.

In Abb. 2.10 a) ist eine schematische Darstellung der räumlichen Überlagerung des Pump-Strahls mit den zwei Probe-Strahlen (der Pump-Strahl in blau) gezeigt. Die Polarisationsrichtung des Pump-Strahls ist während der Messung zwischen horizontal und vertikal umstellbar. Die Probe-Strahlen, die in grün und rot dargestellt sind, sind jeweils horizontal und vertikal polarisiert. Die Strahlen überlagern sich im Probenvolumen in folgender Weise: Zuerst soll der Pump-Strahl senkrecht zur Tischebene eingestellt sein und unverändert bleiben, dann werden die Probe-Strahlen im Probenvolumen zur Überlagerung auf das vom Pump-Puls angeregte Volumen gebracht. Wenn man in Ausbreitungsrichtung des Pump-Strahls schaut, sind die Orientierungen der Probe-Strahlpolarisationen so angeordnet wie in Abb. 2.10 b) dargestellt. Der vertikal polarisierte Probe-Strahl (Probe II, rot) bleibt immer in einer horizontalen Ebene mit dem Pump-Strahl, und der horizontal polarisierte Probe Strahl I bleibt immer in einer vertikalen Ebene (Probe I, grün) mit dem Pump-Strahl. Bei dieser Anordnung ist die Polarisationsrichtung der Probe-Strahlen im Strahlverlauf immer unverändert und der Pump-Strahl immer exakt parallel bzw. senkrecht zum Probe-Strahl unabhängig davon, ob er gerade vertikal oder horizontal polarisiert ist.



**Abbildung 2.11** Ein Messergebnis eines Germaniumplättchens. (a) Die Absorptionsänderungen der Probe-Strahlen (Ge-Signals), (b) Ableitung der Ge-Signale und dazu angepasste Gausskurven. Die Halbwertsbreite (FWHM) der Gausskurven sind jeweils 360 fs und 380 fs.

Die zeitliche Überlagerung und der Zeitnullpunkt der Verzögerungsstrecke werden mit Hilfe eines Germaniumplättchens bestimmt. Dieses befindet sich in einer Probenkammer, die den in der Messung verwendeten Probekammern gleicht. Germanium besitzt bei Raumtemperatur (300 K) eine Bandlücke von  $0,67 \text{ eV} \approx 1851 \text{ nm}$  [78]. Der VIS-Pump-Strahl hat daher genug Energie, um Elektronen vom Valenzband in das Leitungsband zu bringen. Vor dem Zeitnullpunkt trifft der Probe-Puls vor dem Pump-Puls auf das Germaniumplättchen. Die Elektronen des Germaniumplättchens sind noch nicht durch den Pump-Puls in das Leitungsband gehoben worden, weshalb keine Probe-Strahlen absorbiert werden. Nach dem Zeitnullpunkt trifft der Pump-Puls vor dem Probe-Puls auf das Germaniumplättchen und ein Teil der Elektronen wurde ins Leitungsband

angeregt. Diese Elektronen im Leitungsband absorbieren IR-Licht, wodurch die IR-Absorption instantan erhöht ist. Durch das Messen der Intensitätsänderung des Germaniumplättchens werden der Zeitnullpunkt und die Zeitauflösung bestimmt.

Eine Zeitnullpunktbestimmung ist in Abb. 2.11 dargestellt. Wie in Abb. 2.11 a) gezeigt liegt die Absorptionsänderung (Ge-Signal) in sub-ps Bereich. Das ist gut an der Ableitung des Ge-Signals erkennbar. Wie in Abb. 2.11 b) gezeigt, kann die Ableitung des Germanium-Signals gut durch eine Gausskurve simuliert werden. Die Halbwertsbreite (FWHM) der Gausskurve ist die Zeit, in der das System auf die Anregung durch den Pump-Puls antwortet (system response time). Für beide Probestrahlen gibt es eine Antwortzeit von  $\sim 360$  fs. Mit dieser Auflösung können strukturelle Veränderungen der Moleküle gut verfolgt werden. Die Zeitauflösung der Experimente ist hauptsächlich durch die verschiedenen Gruppengeschwindigkeiten der Pump- und Probe-Pulse begrenzt [68] [69]. Sie ist bei allen durchgeführten Messungen unter 400 fs.

## **Probekammer**

Die Probekammer besteht aus zwei Glasscheiben (1 mm dick), die durch eine Halterung zusammengeschraubt sind. Zwischen den zwei Scheiben befindet sich ein Teflonring, der je nach Messung  $50 \mu\text{m}$  oder  $100 \mu\text{m}$  dick ist. In den Zwischenraum werden die Proben gefüllt. Die verwendeten Gläser bestehen aus Kalziumfluorid oder Bariumfluorid. Beide Materialien besitzen eine hohe Durchlässigkeit für IR- und sichtbares Licht.

Während der Messung wird die Probekammer mit Hilfe zweier Elektromotoren automatisch bewegt, um die Proben gleichmäßig zu bestrahlen und ein Erhitzen bzw. ein Zerstören der Probe zu vermeiden. Lissajous-Figuren werden als Bewegungsmuster gewählt, weil damit die Zeit bis zu einer wiederholten Beleuchtung desselben Probenvolumens maximiert wird. Mit diesem Bewegungsmuster trifft der Pump-Strahl dasselbe Probenvolumen erst wieder nach  $\sim 2$  Minuten. So kann man auch sicherstellen, dass sich die Moleküle vor der Anregung im Grundzustand befinden.

### **2.2.3 Signaldetektion und Aufnahmen**

Die beiden Probe-Strahlen werden nach dem Abtasten der Probe in das Spektrometer eingekoppelt, und auf dem zweizeiligen MCT-Detektor spektral aufgelöst abgebildet. Die spektrale Auflösung des Detektors im untersuchten Messbereich ist  $\sim 1,5 \text{ cm}^{-1}$ . Mit einem Mal können  $\sim 50 \text{ cm}^{-1}$  breite Spektren bei einem durchgeführten Experiment abgetastet werden.

Die Verzögerungszeiten werden so gewählt, dass in einem Bereich von 2 ps um den Zeitnullpunkt mit einer konstanten Schrittweite von 50 fs gemessen wird. Vor -2 ps und nach +2 ps werden die

Verzögerungszeiten nach einer logarithmischen Skala äquidistant verteilt gewählt. Für die meisten Experimente wird die Absorptionsänderung von -20 ps, und je nach Probe bis 100 ps bzw. bis hin zu 1,2 ns gemessen. Für jede Verzögerungszeit  $\Delta t$  werden die Intensität  $I$  der beide Probe-Strahlen mit Pump-Licht ( $I_{Hori}$  und  $I_{Vert}$ ) und ohne Pump Licht ( $I_{0\ Hori}$  und  $I_{0\ Vert}$ ) detektiert. Die Absorptionsänderung der optischen Dichte wird über ein mit LabView 7.1 geschriebenes Programm und folgenden Messgleichungen gemessen:

$$\Delta OD_{Hori} = -\log \frac{I_{Hori} - I_{Hin}}{I_{0\ Hori} - I_{Hin}} \times 1000 \quad (2.24)$$

$$\Delta OD_{Vert} = -\log \frac{I_{Vert} - I_{Hin}}{I_{0\ Vert} - I_{Hin}} \times 1000, \quad (2.25)$$

wobei  $I_{Hin}$  die Intensität der Hintergrundstrahlung ist; diese wird einmalig vor der Messung bei geblocktem Pump-, sowie Probe-Licht aufgenommen. Die Auflösung der Absorptionsänderung ist 0,2 mOD (ohne Mittelung), begrenzt durch die Verstärkerelektronik.

Die Messungen selbst werden mehrfach wiederholt und die endgültigen Ergebnisse werden aus mehreren Tagesmessungen mit jeweils frisch angesetzten Proben gemittelt. Der Vorteil, die Messung aus mehreren Scans zu mitteln, anstatt sie aus nur einem Scan mit einer riesigen Schusszahl durchzuführen, ist folgendermaßen begründet: 1. Manche Proben veralten schnell während der Messungen (z. B. durch Strukturänderungen der Probe oder Konzentrationsänderung durch Aggregation der Proben). Ein kurze Messung wird wenig von der Veränderungen der Probe beeinflusst. 2. Aus mehreren Scans gemittelte Messergebnisse sind nicht oder nur wenig mit den langsamen Schwankung der Pump- und Probe-Leistung zu korrelieren. Somit erhöht sich damit die Wahrscheinlichkeit, für jeden Zeitpunkt eine rauscharme Messung zu erhalten.

Für alle Experimente wird jeweils eine Eichmessung mit einem Polymerfilm durchgeführt, um das Spektrometer spektral zu eichen. Vor und nach jedem Experiment werden VIS- und IR-Absorptionsspektren von der untersuchten Probe aufgenommen. Die Aufnahme der Absorptionsspektren erfolgt ebenfalls bei Raumtemperatur. Die Auswertung der Daten und die Berechnungen der Ergebnisse werden im Kapitel 3 besprochen.

# Kapitel 3

## Analytische Methoden

### 3.1 Korrekturen der gemessenen Werte

Bei den Winkel balancierten polarisations- und zeitaufgelösten Femtosekunden VIS Pump - IR Probe Messungen werden zwei Probestrahlen mit einem Pumpstrahl überlagert. Typischerweise erhält man bei der Überlagerung des Pumpstrahls mit den zwei Abtaststrahlen eine kleine Abweichung im Strahlüberlapps zwischen dem Pump und Probestrahl im Probevolumen. Die Genauigkeit der Winkelbestimmung wird davon beeinflusst, deshalb müssen die gemessenen Signale des vertikal und des horizontal polarisierten Probestrahl korrigiert werden, um den Einfluss der unterschiedlichen Überlagerung heraus zu rechnen.

Ein Beispiel für eine Überlagerung ist in Abb. 3.1 dargestellt. Der Pump Querschnitt ist doppelt so groß, wie die Querschnitte der beiden Probestrahlen. Somit lässt sich sicherstellen, dass das abgetastete Probevolumen effektiv angeregt wird. Da einer der zwei Probestrahlen in seiner Polarisationsrichtung durch ein Periskop gedreht wurde, stehen die Profile der Probestrahlen-Querschnitte senkrecht zueinander. Die Pump-Polarisation wird durch das in Abschnitt 2.4 erwähnte  $\lambda/2$ -Plättchen nach jeder Messung gedreht, und dann wird die Messung wiederholt. Die beiden Pump-Polarisationen werden mit  $P_1$  und  $P_2$  bezeichnet, für die jeweils erste und zweite Messung.

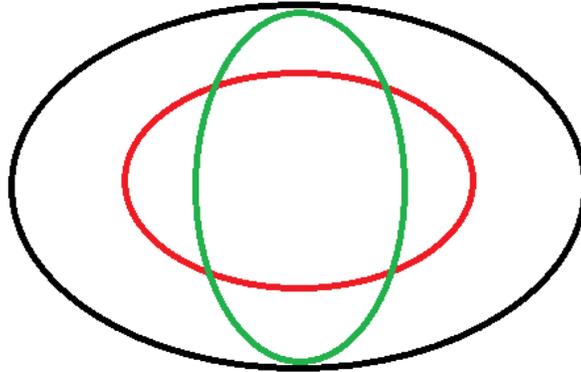
Wenn bei der ersten Messung die Polarisation des in Abbildung 3.1 rot dargestellten Probestrahls parallel zur Pump-Polarisation ( $P_{1\parallel}$ ) ist, wird sie in der zweiten Messung durch die Polarisationsänderung des Pump-Strahls senkrecht zur Pump-Polarisation ( $P_{2\perp}$ ) stehen. Dies gilt umgekehrt auch für den in grün dargestellten Probestrahl. Sie ist in der ersten Messung senkrecht ( $P_{1\perp}$ ) und in der zweiten Messung Parallel ( $P_{2\parallel}$ ) zur Pump-Polarisation. Das isotrope Signal für beide Messreihen (ISO) ist gegeben als:

$$\text{Iso}_1 = (\alpha P_{1\parallel} + 2 P_{1\perp}) / 3 \quad (3.1)$$

$$\text{Iso}_2 = \beta (P_{2\parallel} + 2 \alpha P_{2\perp}) / 3 \quad (3.2)$$

$\alpha$  bezeichnet hier den Korrekturfaktor zur Berücksichtigung der unterschiedlichen räumlichen Überlappungen der Probestrahlen mit dem Pumpstrahl und der heterogenen Überlagerung aufgrund der anisotropen Energie- und Wellenlängenverteilung innerhalb des Pump-Spots. Ein zweiter Korrekturfaktor  $\beta$  berichtigt eine Amplitudenänderung der Signale zwischen den

Messungen. Mögliche Ursachen für eine Amplitudenänderung sind Schwankung der Pumpenleistung oder kleine Konzentrationsänderungen in der untersuchten Probe.



**Abbildung 3.1** Schematische Darstellung eines räumlichen Überlapps, im Fokus der Strahlen. Der Pumpstrahlfokus (schwarz) überlagert mit den beiden Probe-Strahlfoki (grün und rot) in der Probe.

Da die Messungen unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden, sollten nach der Korrektur mit den Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$   $ISO_1$  und  $ISO_2$  identisch sein. Aus demselben Grund lassen sich auch die isotropen Signale  $ISO_3$  und  $ISO_4$  durch umformen der Terme aus Gleichungen 3.1 und 3.2 berechnen.

$$ISO_3 = (\beta \cdot P_{2\parallel} + 2 P_{1\perp}) / 3 \quad (3.3)$$

$$ISO_4 = (\alpha \cdot P_{1\parallel} + 2 \alpha \cdot \beta \cdot P_{2\perp}) / 3 \quad (3.4)$$

Die vier Gleichungen mit identischen Signalen  $iso_1, iso_2, iso_3$  und  $iso_4$  ergeben dann eine eindeutige Lösung für die parallel- und senkrecht-polarisierten Signale und die Korrekturfaktoren  $\alpha$  und  $\beta$ :

$$\alpha = [(P_{2\parallel} \cdot P_{1\perp}) / (P_{2\perp} \cdot P_{1\parallel})]^{1/2} \quad (3.5)$$

$$\beta = [(P_{1\parallel} \cdot P_{1\perp}) / (P_{2\perp} \cdot P_{2\parallel})]^{1/2} \quad (3.6)$$

$\alpha$  und  $\beta$  werden hierbei durch ein zu diesem Zwecke eigens entwickeltes Matlab Programm berechnet. Im idealen Fall sind  $\alpha$  und  $\beta = 1$ . Je weiter die Werte davon abweichen, desto schlechter war der Überlapp der drei Strahlen, bzw. desto instabiler ist das Messsystem. In unserem Setup lagen die Werte für  $\alpha$  zwischen 0,96 und 1,04, dies ist auf die unterschiedlichen Formen der Probestrahlfoki zurückzuführen. Die Werte für  $\beta$  lagen immer zwischen 1 und 1,2, was hauptsächlich die Abnahme der Pumpimpulsenergie zwischen den verschiedenen Messungen anzeigt.

Die Daten der Rohmessungen werden mit  $\alpha$  und  $\beta$  korrigiert:

$$P_{1\parallel \text{kor}} = \alpha \cdot P_{1\parallel} \quad (3.7)$$

$$P_{1\perp\text{korr}} = P_{1\perp} \quad (3.8)$$

$$P_{2\perp\text{korr}} = \alpha \cdot \beta \cdot P_{2\perp} \quad (3.9)$$

$$P_{2\parallel\text{korr}} = \beta \cdot P_{2\parallel} \quad (3.10)$$

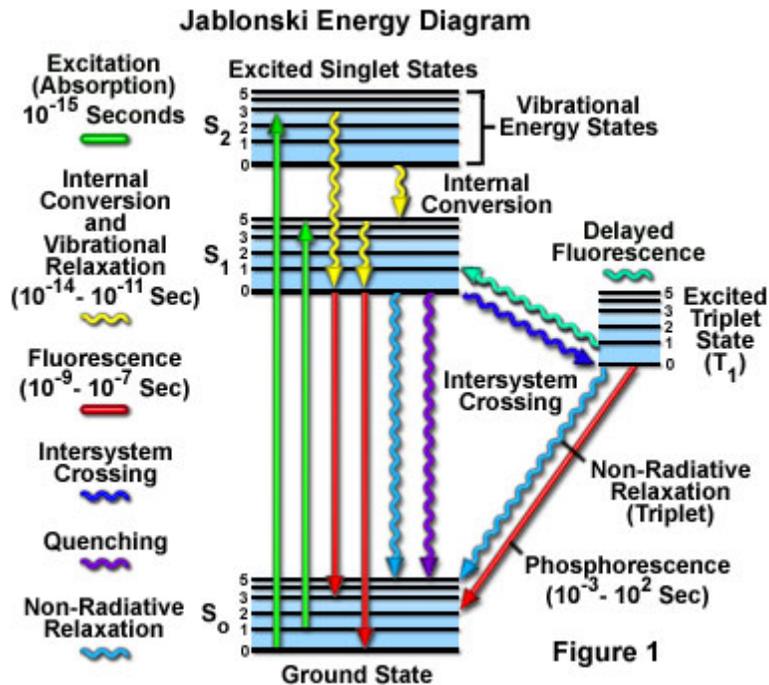
Außerdem wird bei niedriger Signalstärke die Genauigkeit des Winkels auch durch Variationen in der Pumpintensität, der Probenhomogenität und Proben-Stabilität stärker beeinflusst. Um diesen Einfluss zu minimieren, messen wir bei manchen Messungen mit 1000 Shots zu jedem Delayzeitpunkt, um dann das gemittelte Ergebnis zu benutzen. Das Messergebnis eines einzelnen Shots ist hierbei definiert als Ergebnis, das aus einem einzelnen Pump-Puls ermittelt wird.

## 3.2 Analyse der gemessenen Werte

### 3.2.1 Schwingungsübergänge im Molekül

Elektronische Übergänge von einem Ausgangszustand in einen anderen Zustand können mit Hilfe von fs-Spektroskopie beobachtet werden. Um die Messergebnisse zu verstehen, wird hier ein Jablonski-Diagramm verwendet.

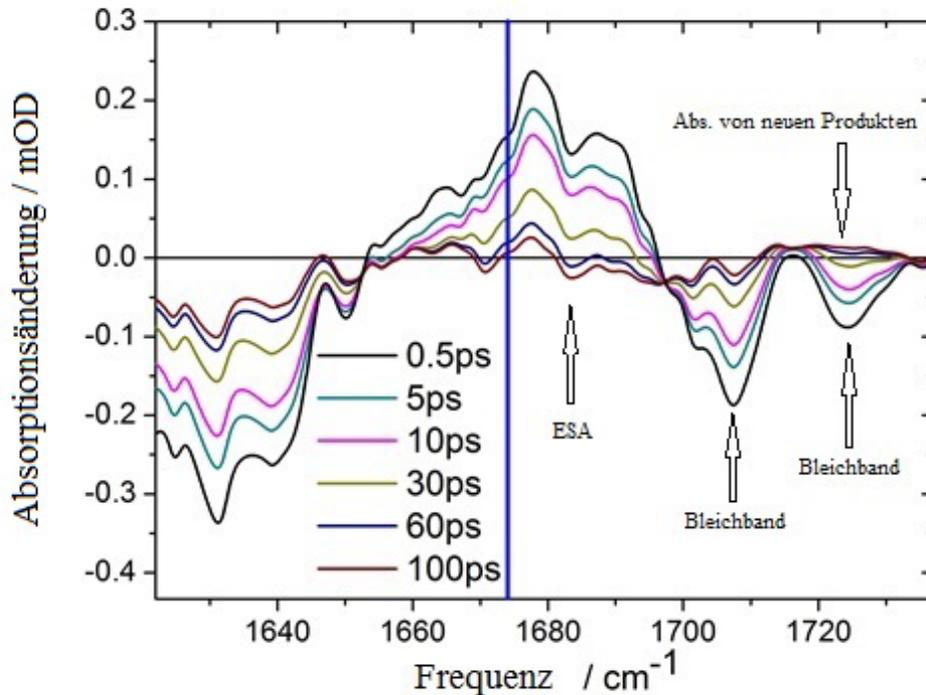
Bei elektronischer Anregungen wird davon ausgegangen, dass der Wechsel von Elektronen zwischen verschiedenen Zuständen so schnell stattfindet, dass sich der Kernabstand während der Anregung nicht ändert. Bei Anregung in einen höheren elektronisch angeregten Zustand  $S_x$  wird von der Gültigkeit der Kasha-Regel ausgegangen [79]. Die verschiedenen Energieniveaus elektronischer Zustände und deren Übergänge innerhalb eines Moleküls sind in Abb.3.2 skizziert. Nach der Absorption befindet sich das angeregte Molekül zuerst in einem heißen elektronisch angeregten Zustand. Es kann auf verschiedene Wege Energie abgeben. Es gibt verschiedene Prozesse, bei denen das angeregte Molekül in einen energetisch niedrigeren elektronischen Zustand übergehen wird. Innerhalb desselben elektronischen Zustands kann Energie durch *Schwingungsrelaxation* umverteilt werden. Dabei werden hochenergetische Schwingungen auf niederenergetische Schwingungen des Moleküls und des Lösungsmittels umverteilt. [80] Dieser Prozess führt das System in den relaxierten elektronisch angeregten Zustand über. Anschließend relaxiert es in den ersten elektronisch angeregten Singulett-Zustand  $S_1$  durch Schwingungskopplung zwischen den Schwingungsniveaus eines elektronisch höher angeregten Singulett Zustands und dem ersten Singulett-Zustand (*Internal Konversion*). Die beiden Prozesse dauern um die  $10^{-14}$  s bis  $10^{-11}$  s. Danach gelangt das Molekül meistens durch einen strahlenden Übergang (*Fluoreszenz*) zum elektronischen Grundzustand.



**Abbildung 3.2** Jablonski-Diagramm : Darstellung der Übergänge von Valenzelektronen nach Anregung.  $S_0$ : Singulett-Grundzustand;  $S_1$ : erste angeregte Singulettzustände;  $T_1$ : erste angeregte Triplettzustände,  $S_2$ : zweiter angeregte Singulettzustände [81]. Die Darstellung ist [82] entnommen.

Die Absorption geht vom abgekühlten Grundzustand aus und erreicht oftmals höher angeregte Schwingungsniveaus im elektronisch angeregten Zustand. Die Fluoreszenz beginnt umgekehrt im schwingungsrelaxierten angeregten Singulett-Zustand  $S_1$  und geht in den elektrischen Grundzustand oftmals mit angeregten Schwingungsmoden über. Durch Relaxation des Lösungsmittels oder der Umgebung sinkt die Energie des elektronisch angeregten Zustands. Deshalb gibt es eine Wellenlängenverschiebung zwischen Absorptions- und Emissionsspektrum, den man als Stokes-Verschiebung bezeichnet [83]. Wenn es einen mit  $S_1$  stark wechselwirkenden Triplettzustand  $T_1$  gibt, und dieser Triplettzustand auch energetisch ähnlich, aber tiefer als der  $S_1$  liegt, dann kann ein Anteil der Moleküle durch „*Intersystem Crossing*“ (*ISC*) in den Triplettzustand gelangen. Der Triplettzustand kann im Grunde genommen nicht in einen Singulettzustand relaxieren, da eine Spinumkehr „verboten“ ist. Bei ähnlich gelagerten Energieniveaus kann durch starke L-S- oder S-S- Kopplung, insbesondere durch Anwesenheit von schweren Atomen, der S-T-Übergang wahrscheinlicher werden (z. B.  $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$ ). Die Relaxation von  $T_1$  in der  $S_0$  Zustand dauert typischerweise länger ( $\sim 10^{-3} - 10^2$  s) und wird Phosphoreszenz genannt [84]. Der S-T-Übergang tritt bei Al-Corrole ( $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$ ) und bromiertem Al-Corrole ( $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$ ) auf. Aus diesem Grund sind diese Moleküle interessante Kandidaten für die photodynamischen Therapie (Anti-Krebs-Therapie).

Die oben erwähnten elektronischen Übergänge können mit Hilfe von Femtosekunden VIS Pump - IR Probe-Spektroskopie beobachtet werden. Um die Übergänge in Echtzeit zu verfolgen, werden die Absorptionsänderungen wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben aufgenommen. Wenn die Verzögerungszeit zwischen den Pump- und Probe-Pulsen sich verändert, wird somit für jedes Zeitintervall eine spektrale Absorptionsänderung und somit der zeitliche Verlauf der photoinduzierten Reaktion gemessen. Vier Hauptbeiträge der angeregten Moleküle lassen sich hierbei charakterisieren:



**Abbildung 3.3** Isotrope Absorptionsänderungsspektren von Pr-Phytochrom im Frequenzbereich der (C=O) Streckschwingung nach Anregung bei 660 nm, für verschiedene Verzögerungszeiten zwischen *Pump*- und *Probe*-Puls.

### (1) *Bleich-Signal*

Bei der Anregung, wird die Besetzung des Grundzustandes durch die Entvölkerung vermindert. Die Besetzungsdichte wird verringert, was zu einer verringerten Absorption führt. (Negativanteil,  $\Delta OD < 0$ ). In der Regel geschieht dies an den Positionen, an denen auch die stationären Absorptionsbanden liegen. Diese Absorptionsbanden bezeichnet man als „Bleichbande“ oder „bleach“.

### (2) *Angeregte-Zustands-Absorption (ESA)*

Durch die Anregung mit *Pump*-Pulsen findet eine Bevölkung von höher angeregten Zustände  $S_n$  statt. Die angeregten Moleküle haben dadurch neue Übergangsmöglichkeiten zu höher angeregten Zuständen  $S_{n'}$  und die Absorption steigt. Die ESA führt zu positiven Absorptionsänderungsbeiträgen ( $\Delta OD > 0$ ).

### (3) *Absorption von neuen Produkten*

Wenn die zu untersuchende Probe sich durch Anregung strukturell verändert, können die Reaktionsprodukte zu zusätzlichen Produktbanden führen. Die neu aufgetauchten Produktbanden bewirken ebenfalls eine positive Absorptionsänderung, wie bei der Bildung von Lumi-R durch die elektronische Anregung von Phytochrom in der Pr-Form.

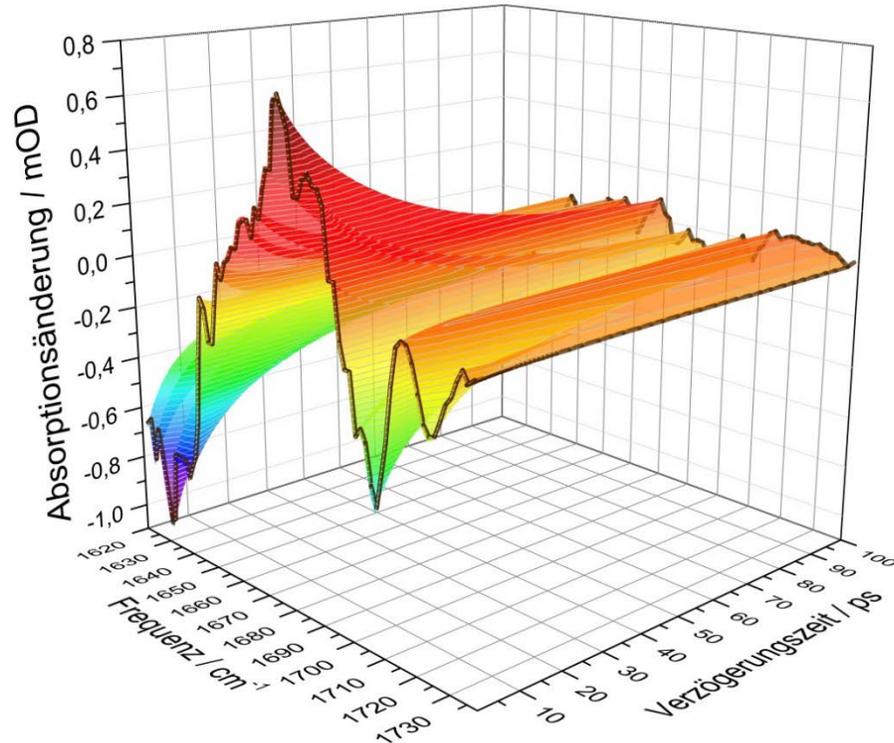


Abbildung 3.4 Isotrope Absorptionsänderungen entlang der Zeit- und der Spektral-Achse: Phytochrom Cph1 $\Delta$ 2 angeregt bei 660 nm, abgetastet von 1620  $\text{cm}^{-1}$  bis 1725  $\text{cm}^{-1}$  im Bereich von 3 bis 100 ps.

### (4) *Stimulierte Emission*

Angeregte Moleküle können vom Probe-Puls stimuliert werden und ihre Energie durch Emission freigeben. Das führt zu einem negativen Absorptionsänderungsbeitrag ( $\Delta OD < 0$ ). Dies ist sehr häufig in VIS Pump-VIS Probe Messergebnissen zu sehen. Bei VIS Pump-IR Probe Messungen ist

selten stimulierte Emission in der Schwingungsmode zu sehen, da die elektrische Anregungen meisten sehr schnell (innerhalb von wenigen 10 fs) in den Schwingungsgrundzustand bzw. eine nicht- invertierte Verteilung relaxiert.

Die gemessenen Absorptionsänderungen werden in Form einer Matrix gespeichert. Als Beispiel zeigt Abb. 3.4 die isotropen Messergebnissen  $((2 \cdot I_{\text{para}} + I_{\text{senk}})/3)$  der Phytochrom Cph1Δ2 Messung: Die X-Achse stellt die Frequenz dar, die Y-Achse den Zeitverlauf und Z-Achse die Absorptionsänderung. Zur Analyse der Daten werden die Spektren bei ausgewählten Verzögerungszeiten oder der zeitlichen Verlauf des Signals (Transienten) bei ausgewählten Wellenlängen dargestellt.

### 3.2.2 Zeitkonstanten und Simulation des Spektrums

#### “Global fit” der Transienten

Nach der Anregung in einen elektronisch angeregten Zustand relaxiert die Probe typischerweise in den Grund- oder Produktzustand auf einer ps- bis ns-Zeitskala. Die Besetzung des angeregten Zustands ändert sich im Zeitverlauf, es ändert sich zudem auch die Signalstärke. Die Lebensdauer des angeregten Zustands soll nun aus den Messdaten bestimmt werden. Wenn man davon ausgehen kann, dass sich die Form der Spektren  $A(\lambda, t)$  nur wenig oder gar nicht mit der Zeit  $t$  ändert, kann folgende Funktion gewählt werden, um die Daten zu fitten:

$$y = y_0 + \sum_1^n A_1(\lambda) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + \dots + A_n(\lambda) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_n}} \quad (3.11)$$

wobei  $\tau$  die Zerfallszeit und  $A_n(\lambda)$  die zur Zerfallszeit  $\tau_n$  assoziierte spektrale Amplitude ist. Sie wird auch als Zerfallsassoziertes Spektrum (decay associated spectra, DAS) bezeichnet. DAS stellt die spektrale Komponente dar und kann generell nicht direkt den einzelnen Spezies zugeordnet werden. Die Anzahl  $n$  der vorhandenen Zerfallskomponenten ist im Allgemein unbekannt, und lässt sich nicht direkt aus experimentelle Daten bestimmen. Diese wurde durch ausprobieren ermittelt. Fehlende Zeitkonstanten werden mit den “Regular residuals“ aus den Fitergebnissen sichtbar. Eine Analyse des Rauscheinflusses und eine alternative Methode zum Abschätzen der nötigen Komponenten, basierend auf der Ableitung des Signals nach der logarithmierten Zeit und ist in [85] gegeben.

Um den Zeitpunkt  $t=0$  treten nichtlineare Effekte auf, die durch den Pump-Strahl verursacht werden und schnell abklingen (siehe Kap 2.1.2). Daher werden zur Bestimmung der Zerfallszeiten  $\tau_n$  und für alle weiteren Fits der Transienten erst Signale ab  $t= 400$  fs genutzt.

## Simulation des Spektrums

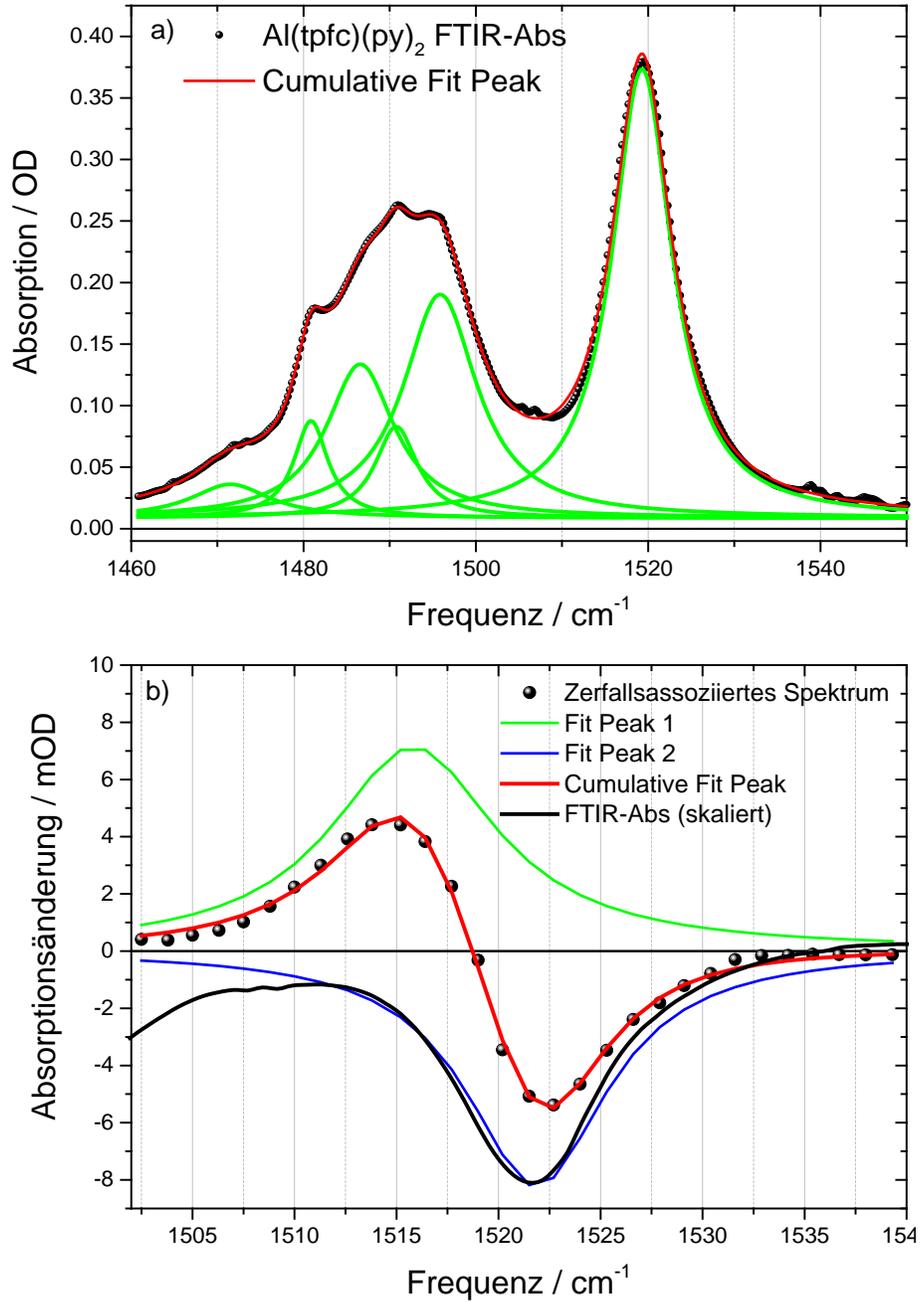
Die gemessenen transienten Absorptionsänderungen sind IR-Spektren, die durch Übergang von Absorptionsbanden des elektronischen Grundzustands (Bleichbande) und Absorptionsbanden des elektronisch angeregten Zustands (ESA) entstehen. In manchen Fällen kommen dazu auch neue Absorptionsbanden von Produkten. Wegen der Überlagerung können Anzahl, Lage und Halbwertsbreite im untersuchten Spektralbereich nicht direkt aus dem Messergebnis abgelesen werden. Das erschwert die Auswertung sehr. Mit Hilfe des stationären IR-Absorptionsspektrums kann man die Schwingungsbanden im elektronischen Grundzustand bestimmen. Danach werden die Schwingungsbanden im elektronisch angeregten Zustand durch Vergleichung des stationären IR-Absorptionsspektrums mit den aus den Experimenten gewonnenen DAS Spektren bestimmt. Alle Informationen der Schwingungsbanden sowie Position, Breite und Fläche werden durch eine Simulation ermittelt.

Der erste Schritt der spektralen Trennung ist der Hintergrundabzug (die Untergrundkorrektur der Spektren). Der Untergrund beinhaltet keine Informationen über das elektronische Übergangsdipolmoment der zu untersuchenden Probe und kann den Fit nachteilig beeinflussen. Deshalb muss er zuerst subtrahiert werden. In dieser Arbeit wird der Mittelwert der Absorptionsänderung zwischen -30 ps bis -15 ps als Untergrund des Experiments genommen und von der Absorptionsänderungen zu jeder Delayzeit nach  $t=0$  abgezogen. Als Ursache des Untergrundes sind verschiedene absolute Empfindlichkeiten der einzelnen Detektorelemente zu nennen.

Zur Identifizierung der einzelnen Beiträge zum gemessenen Spektrum werden die Parameter der Schwingungsbanden im elektronischen Grundzustand mit Hilfe des stationären IR Absorptionsspektrums bestimmt. Weil die Absorptionsbande eine natürliche Linienbreite besitzt, werden Lorentz-Profile

$$y(x) = y_0 + \sum_{i=1}^n \frac{2A_i}{\pi} \frac{\omega_i}{(x-x_{ci})^2 + \omega_i^2} \quad (3.12)$$

zur Simulation benutzt, wobei  $A_i$  der Flächeninhalt des Lorentz-Profils mit der Höhe  $H_i = 2A_i/\omega_i$ , der Halbwertsbreite  $\omega_i$  und der zentralen Lage  $x_{ci}$  der Bande ist. Die Lorentz Simulation wird mit Origin durchgeführt. Ein Beispiel ist in Abb. 3.5 a) gegeben. Dort ist das IR-Absorptionsspektrum von Al-Corrole im Bereich von  $1460 \text{ cm}^{-1} - 1550 \text{ cm}^{-1}$  (schwarze Punkte) dargestellt und die simulierten kumulativen Peaks (rote Linie) stimmen gut mit dem gemessenen Spektrum überein. Fünf Lorentz-Profile (grüne Linien) entsprechen 5 Schwingungsbanden des Al-Corrols im elektronischen Grundzustand. Die Bande bei  $1520 \text{ cm}^{-1}$  liegt im untersuchten Bereich des Pump-Probe Experimentes ( $1500 \text{ cm}^{-1} - 1540 \text{ cm}^{-1}$ ), ihre Parameter werden für die spektrale Identifizierung benutzt.



**Abbildung 3.5** Simulation von Spektren von  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  Corrole mit zwei Pyridinen als Ligand: a) Lorentz-Fit des IR-Absorptionsspektrums im Bereich von  $1460 \text{ cm}^{-1}$ - $1550 \text{ cm}^{-1}$ , b) Lorentz-Fit des zerfallsassozierten Pump-Probe Spektrums und das skalierte IR-Absorptionsspektrum.

Als Resultat aus dem letzten Schritt ist die Anzahl, Position und Halbwertsbreite der Bleichbanden im zerfallsassozierten Spektrums schon bekannt. Im Anschluss werden die Schwingungsbanden im elektronisch angeregten Zustand, die mit der Bleichbande überlagert sind, durch Lorentz-Simulation bestimmt. Das zerfallsassozierte Spektrum wird ebenso wie das stationäre IR-Absorptionsspektrum mit Origin gefittet. Dabei werden die schon ausgewerteten Parameter der Bleichbande festgehalten, die Parameter der Absorptionsbanden des elektronisch angeregten Zustands durch den Fit-Prozess bestimmt.

Abb. 3.5 b) zeigt eine Simulation des zerfallsassozierten Spektrums von Al(tpfc)(py)<sub>2</sub> Corrol. Das Spektrum lässt sich mit einer Überlagerung von zwei Lorentz-Profilen anpassen. Die resultierenden Peaks entsprechen der abgetasteten Schwingungsbande, dazu entspricht die grüne Kurve der Absorptionsbande im elektronisch angeregten Zustand, die blau Kurve der Absorptionsbande im elektronischen Grundzustand. Die Fehler der Lagen und Halbwertsbreiten der Schwingungsbanden werden durch Exhaustive Search Analyse (siehe unten) ermittelt.

### 3.3 Winkelberechnung der Übergangsdipolmomente

#### 3.3.1 Experimentelle Berechnungen

##### Photoselektion

In unseren Experimenten sind sowohl der Pump- als auch der Probe-Puls linear polarisiert. Eine isotrope Verteilung der in gelöster Form vorliegenden Moleküle wird angenommen. Die Moleküle werden bevorzugt angeregt, wenn deren elektronisches Übergangsdipolmoment  $\vec{\mu}_{el}$  parallel zur Polarisation des anregenden Lichtes (Vektor des elektrischen Feldes) ist. Wenn  $\theta$  der Winkel zwischen dem elektronischen Übergangsdipolmoment  $\vec{\mu}_{el}$  und dem anregenden elektrischen Feld  $\vec{E}$  ist, dann ist die Wahrscheinlichkeit einer Anregung  $P_{ang}$  proportional zu  $\cos^2(\theta)$ .

$$P_{ang}(\theta) \propto (\vec{\mu}_{el} \cdot \vec{E})^2 \propto \cos^2(\theta) \quad (3.13)$$

Diese Selektion von Molekülen heißt Photoselektion [83] [86] [87] [88]. Sie führt zu einer Anregung von Molekülen die vorzugsweise entlang der Pumpimpuls polarisation ausgerichtet sind. Diese Verteilung ist in Abb. 3.6 dargestellt.

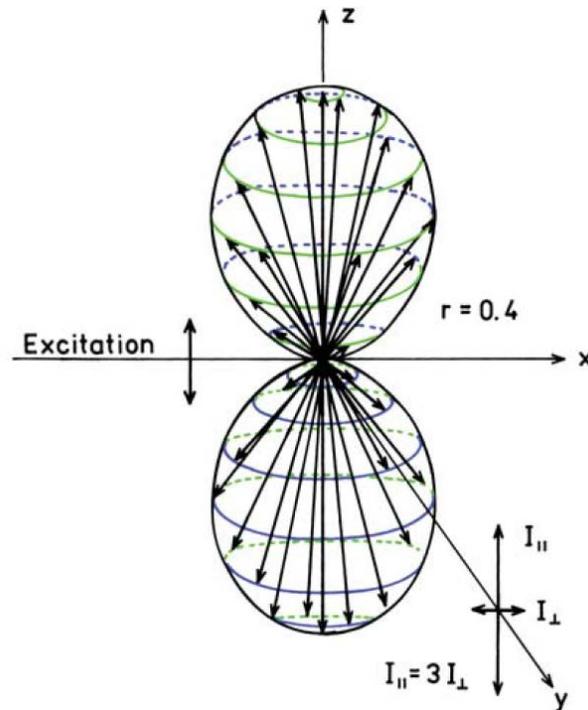


Abbildung 3.6 Photoselektion: Ausgehend von einer isotropen Probe regt ein linear polarisierter Pump-Puls entlang der z-Achse Moleküle an. Wie dargestellt hängt die Verteilung der angeregten Übergangsdipolmomente für ein Molekülensemble vom Winkel  $\theta$  zur z-Achse ab. Sind die Absorption- und die Emissionübergangsdipolmomente kollinear, so entspricht die dargestellte angeregte Verteilung auch der Verteilung der fluoreszierenden Moleküle.[83] Die Länge der Vektoren zur Oberfläche (schwarze Pfeile) entsprechen der Intensitätsverteilung der angeregten Moleküle.

Da nur ein elektronisches Übergangsdipolmoment durch die Photoselektion festgelegt wird, ist auch nur eine Achse (z-Achse), die parallel zu Polarisationsrichtung des Laserpulses verläuft, fest vorgegeben. Die angeregten Moleküle in einem isotropen verteilten Lösungsmittel besitzen von sich aus eine rotationssymmetrische Verteilung. Die Lage der ausgewählten elektronischen Übergangsdipolmomente  $\mu_{el}$  der angeregten Moleküle ist nicht bekannt und kann sich überall auf einer Kegelfläche um die z-Achse mit einem Öffnungswinkel  $\theta$  befinden. Somit bilden die elektronischen Übergangsdipolmomente der angeregten rotierenden Moleküle eine hantelförmige Verteilung, wie in Abb. 3.6 gezeigt. Werden nach Photoselektion Schwingungsübergänge abgetastet, dann kann wie in Abb. 3.7 dargestellt der relative Winkel zwischen dem elektronischen Übergangsdipolmoment  $\mu_{el}$  und verschiedenen Schwingungsübergangsdipolmomenten  $\mu_{vib}$  gemessen werden. Da die Übergangsdipolmomente fest mit der Molekülstruktur verknüpft sind, bleiben die Winkel bei gleicher Konformation immer konstant.

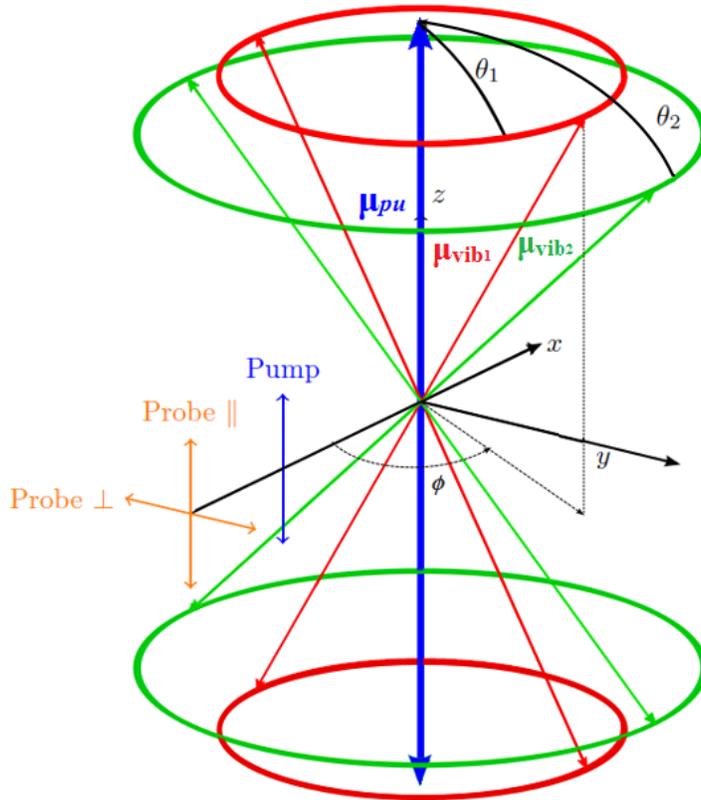


Abbildung 3.7 Photoselektion: Die zu untersuchenden Moleküle werden von einem vertikal polarisierten *Pump*-Puls (blauer Pfeil) angeregt. Die Verteilung der angeregten elektronischen Übergangsdipolmomente ist in Abb. 3.6 dargestellt. Für jedes einzelne angeregte elektronische Übergangsdipolmoment kann der Winkel zu Schwingungsübergangsdipolmomenten bestimmt werden. Die Wahrscheinlichkeit der Anregung von  $\mu_{vib}$  ist proportional zu  $\cos^2(\theta_1)$ . Die Lage eines IR angeregten Schwingungsübergangsdipolmomentes  $\mu_{vib}$  (roter Pfeil) kann sich überall auf einer Kegelfläche mit dem Öffnungswinkel  $\theta_1$  befinden. Die Lage einer weiteren Schwingungsmode mit Schwingungsübergangsdipolmoment  $\mu_{vib}$  (grüner Pfeil) der angeregten Moleküle kann sich überall auf einer Kegelfläche mit dem Öffnungswinkel  $\theta_2$  befinden. Die Probe wird zeitversetzt mit vertikal und horizontal polarisierten *Probe*-Pulsen (gelber Pfeil) abgefragt und die relativen Winkel  $\theta_1$  und  $\theta_2$  bestimmt. Dieser Winkel bleibt konstant, selbst wenn die Photoselektionsverteilung zerfällt.

Während der Messung werden zwei Abfragestrahlen (Probestrahlen) verwendet: Einer mit paralleler Polarisationsrichtung  $I_{\parallel}$  zum Pump-Strahl, und einer mit senkrechter Polarisationsrichtung  $I_{\perp}$  zum Pump-Strahl. Hierbei definiert man die Anisotropie  $r$  durch:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (3.14)$$

wobei  $I_{\parallel}$  und  $I_{\perp}$  die Absorptionsänderungen in  $\Delta OD$  der Abfragestrahlen sind, die durch Experimente aus den gemessenen *Probe*-Intensitäten bestimmt werden. Sie beträgt für ein Ensemble angeregter Moleküle daher im Mittel

$$r = \frac{\overline{\cos^2\theta_1 - \sin^2\theta_1 \sin^2\phi}}{\overline{\cos^2\theta_1 + 2\sin^2\theta_1 \sin^2\phi}} \quad (3.15)$$

Auf Grund der axialen Symmetrie ist

$$\overline{\sin^2\phi} = \frac{\int_0^{2\pi} \sin^2\phi d\phi}{\int_0^{2\pi} d\phi} = \frac{1}{2}. \quad (3.16)$$

Und es ist  $I_x = I_y = I_{\perp}$

Dies führt zu

$$r(t) = \frac{1}{2}(3\overline{\cos^2\theta_1(t)} - 1) = \overline{P_2(t)} \quad (3.17)$$

wobei  $P_2$  das zweite Legendre-Polynom ist. In einem isotropen Medium gilt

$$r(t) = \overline{P_2(t)} = \overline{P_2(0)}e^{-6D_r t} = r(0)e^{-6D_r t} \quad (3.18)$$

Wobei der Rotationsdiffusionskoeffizient  $D_r = \frac{kT}{8\pi R^3 \eta} = \frac{kT}{6V\eta} = \frac{1}{6T_c}$  mit der Rotationskorrelationszeit  $T_c = V\eta/kT$  verknüpft ist, so dass sich

$$r(t) = r(0)e^{-t/T_c} \quad (3.19)$$

ergibt. [89] [90] Das heißt, dass die Verteilung der elektronischen Übergangsdipolmomente mit der Zeit zerfallen und sich eine isotrope Verteilung ausprägt. Diese Reorientierung ist dabei temperatur- und viskositätsabhängig.

In Gleichung 3.13 wurde gezeigt, dass die Anisotropie vom Mittelwert  $\overline{\cos^2\theta}$  abhängig ist. Für ein einzelnes Molekül, deren elektronisches Übergangsdipolmoment parallel zu z-Achse ist, ist der Winkel  $\theta = 0$  und es ist  $\cos^2\theta = 1$  und  $r = 1$ . Allerdings ist es durch Photoselektion nicht möglich ein perfekt orientiertes Ensemble mit  $\theta = 0$  zu erhalten. Deshalb ist die Anisotropie angeregter Moleküle  $r$  immer kleiner als 1. Für ein isotrop verteiltes Ensemble ( $\overline{I_x} = \overline{I_y} = \overline{I_z}$ ) ist der Mittelwert des Winkels  $\overline{\theta} = 54,7^\circ$  (magische Winkel), es folgt  $r=0$ .

Wenn die Absorptions- und die Emissionsübergangsdipolmomente kollinear sind, ist das Übergangsdipolmoment eines Molekül mit einem Winkel  $\theta_1$  zur z-Achse gegeben (Abb. 3.6). Die Zahl der angeregten Moleküle ist proportional zur Oberfläche der Kugel  $\cos^2(\theta_1) \cdot \sin\theta_1 d\theta$ . Deshalb gilt

$$\overline{\cos^2\theta_1} = \frac{\int_0^\pi \cos^2(\theta_1) \cdot \cos^2(\theta_1) \cdot \sin\theta_1 d\theta}{\int_0^\pi \cos^2(\theta_1) \cdot \sin\theta_1 d\theta} = 3/5 \quad (3.20)$$

und  $r_{max} = 0,4$ . Wenn die Absorption und die Emission eines isotropen verteilten Ensembles bzw. vom gleichen Übergangsdipolmoment erfolgt, ergibt sich in der Regel zum Zeitpunkt  $t=0$  direkt nach Anregung die Grenz-Anisotropie  $r_{max}=0,4$  [83].

In unserem Fall wird der Winkel zwischen  $\vec{\mu}_{el}$  und  $\vec{\mu}_{vib}$  gemessen. Dieser ist konstant für ein Molekül mit fester Geometrie, das nicht isomerisiert. Der Winkel ist durch  $\theta_2$  gegeben (Abb. 3.7). Zuvor haben wir gezeigt, dass die Anisotropie abnimmt. Für den Fall, dass das Schwingungsübergangsdipolmoments  $\vec{\mu}_{vib}$  nicht parallel, sondern einen Winkel  $\theta_2$  zu  $\vec{\mu}_{el}$  bildet, dann befinden sich  $\vec{\mu}_{vib}$  auf einem Konus um die elektronischen Übergangsdipolmomente  $\vec{\mu}_{el}$  mit dem Winkel  $\theta_2$  (Abb. 3.7). Die Anisotropie ergibt sich dann aus der Grenz-Anisotropie  $r_{max} = 0,4$  und der Isotropie der achsialsymmetrischen Ausgangsverteilung  $r_1 = P_2(\theta_2)$ . Sie berechnet sich gemäß:

$$r(t=0) = r_{max} * r_1 = \frac{2}{5} P_2(\theta_2) = \frac{1}{2} (\overline{3\cos^2\theta_2} - 1). \quad (3.21)$$

Aus  $r(t=0)$  kann direkt  $\theta_2$  bestimmt werden. Eine alternative Darstellung ist mit dem dichroitischen Verhältnis möglich. Das dichroitische Verhältnis ist definiert als:

$$D = \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}}. \quad (3.22)$$

Aus 3.13 ergibt sich

$$D = \frac{1+2r}{1-r}. \quad (3.23)$$

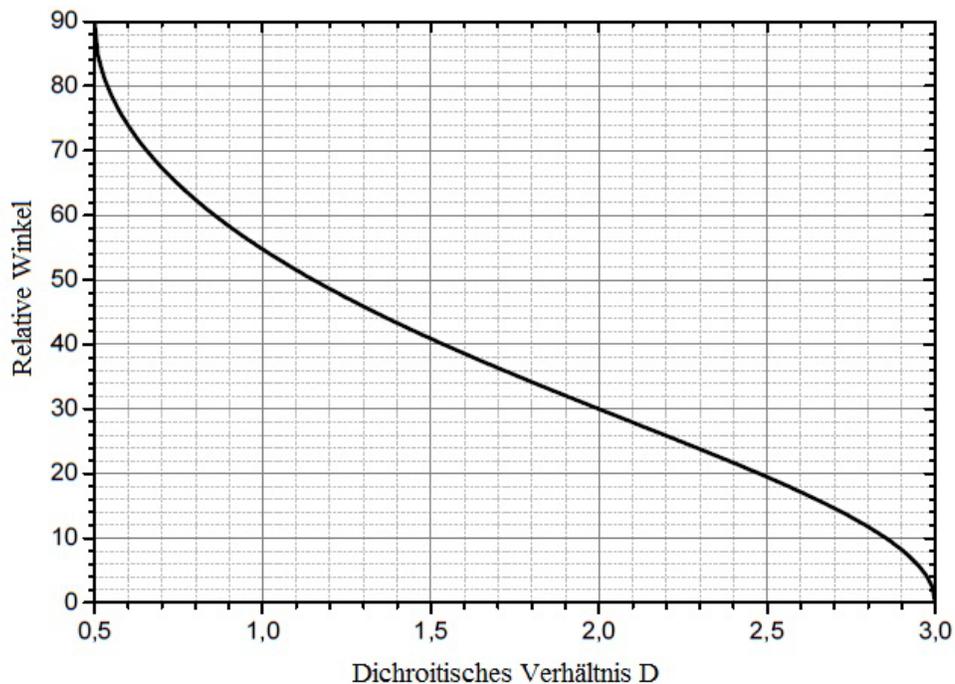
Der Winkel zwischen dem elektronischen Übergangsdipolmoment  $\vec{\mu}_{el}$  und dem Schwingungsübergangsdipolmoment  $\vec{\mu}_{vib}$  ist dann

$$D = \frac{1 + \frac{4}{5} P_2(\theta_2)}{1 - \frac{2}{5} P_2(\theta_2)} \quad (3.24)$$

$$\Leftrightarrow \cos^2\theta_2 = \frac{2D-1}{D+2} \quad (3.25)$$

$$\Leftrightarrow \theta_2 = \arccos \sqrt{\frac{2D-1}{D+2}} \quad (3.26)$$

Der Zusammenhang zwischen  $\theta_2$  und  $D$  ist in Abb 3.8 dargestellt.



**Abbildung 3.8** Relativer Winkel  $\theta_2$  in Abhängigkeit vom dichroitischen Verhältnis  $D$ . Durch die Messung des dichroitischen Verhältnisses ist eine direkte Bestimmung von  $\theta_2$  möglich.

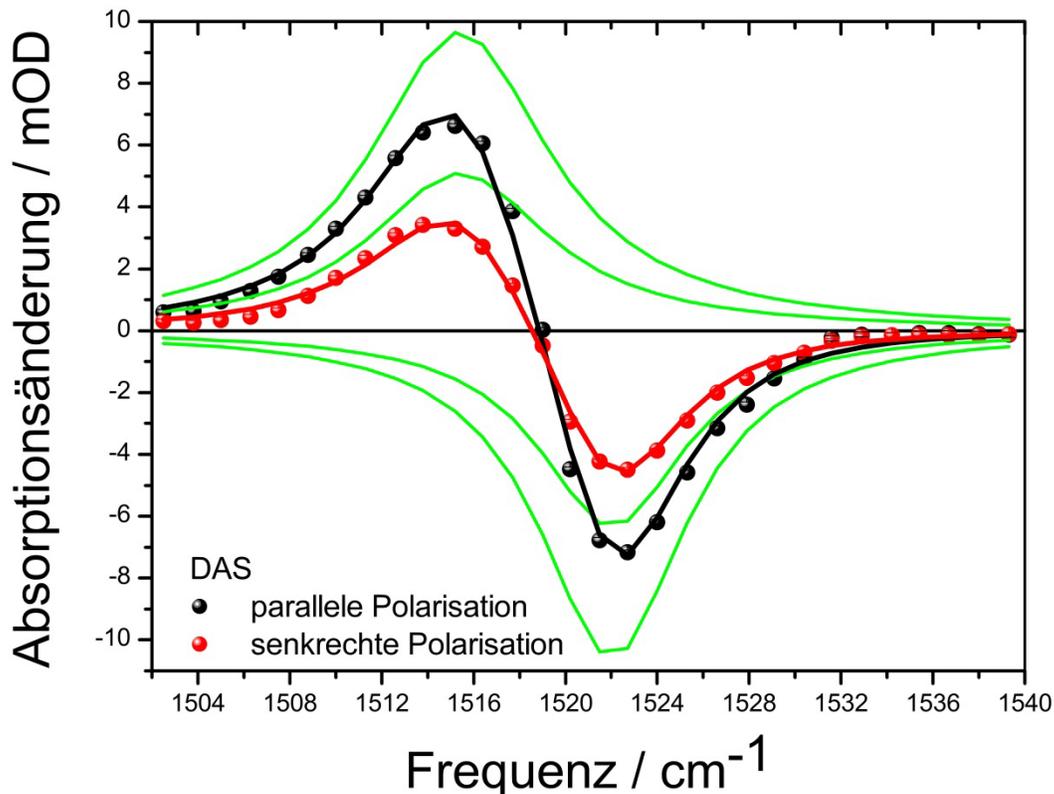
### Bestimmung der Struktur und die Echtzeitverfolgung von Strukturänderungen

Um strukturelle Informationen der zu untersuchenden Moleküle zu erhalten, sollen die dichroitischen Verhältnisse  $D$  zum oder nahe dem Zeitnullpunkt ermittelt werden, weil die verteilten angeregten Moleküle sich nach dem Zeitnullpunkt durch die Orientierungsrelaxation reorientieren. Nur zum Zeitnullpunkt ist die Verteilung der angeregten elektronischen Übergangsdipolmomente exakt bekannt. Danach findet einen Zerfall der Anisotropie mit der Rotationskorrelationszeit statt. Für die Untersuchung der molekularen Struktur benötigt man somit die zerfallsassoziierten Spektren (DAS), welche aus dem globalen Fit der Transienten, oder den PFID-Analysen (siehe Abb. 3.5) extrahiert werden. Für kleine Moleküle wie Corrole liegt die Rotationskorrelationszeit im Bereich von etwa 100 ps. Für Proteine können Rotationskorrelationszeiten im Bereich von Nanosekunden bis Mikrosekunden liegen, wenn das Molekül fest in das Protein eingebettet ist und wenig Bewegungsspielraum hat. Das ist fast immer der Fall für Chromophore in Photorezeptoren.

Als Beispiel ist hier ein gemessenes Corrol Spektrum in Abb. 3.9 dargestellt. Beide Spektren lassen sich mit einer Überlagerung von zwei Lorentz-Profilen anpassen. Für jedes polarisationsaufgelöste Spektrum erhält man durch die Simulation ein positives und ein negatives Signalband. Das negative Signal ist die Bleichbande bei  $1522 \text{ cm}^{-1}$  mit einer Breite von  $8 \text{ cm}^{-1}$ , das positive Signal bei  $1515 \text{ cm}^{-1}$  hat eine Breite von  $10 \text{ cm}^{-1}$  und wird dem elektronisch angeregten

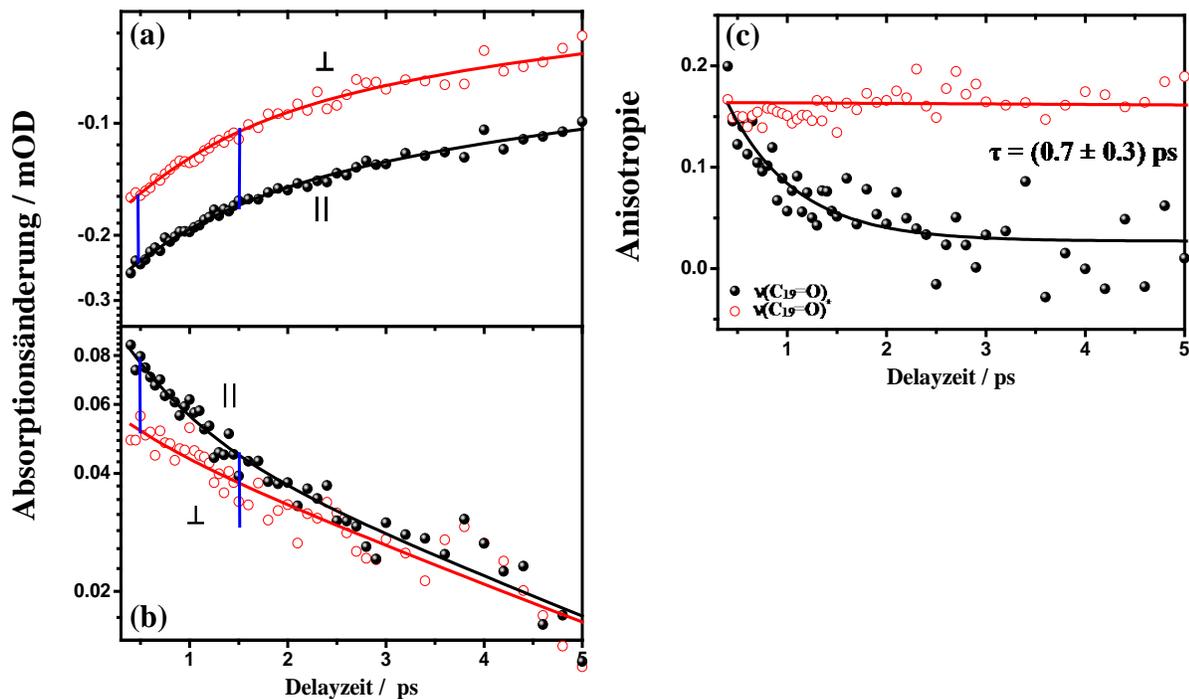
Zustand zugeordnet. Für die Strukturbestimmung sind die Flächen  $A_{\parallel}$  und  $A_{\perp}$  unterhalb der Lorentzkurven bei gleicher Position und Linienbreite entscheidend. Der relative Winkel zwischen dem  $\vec{\mu}_{el}$  und  $\vec{\mu}_{vib}$  wird wie in Gleichung 3.25 gezeigt, durch das dichroitische Winkelverhältnis

$D = \frac{A_{\parallel}}{A_{\perp}}$ ;  $\theta = \arccos \sqrt{\frac{2D-1}{D+2}}$  bestimmt. Die Fehler der Winkel werden durch eine *exhaustive search Analyse* (siehe unten) berechnet.



**Abbildung 3.9** Zerfallsassozierte Spektren (DAS) des  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  Corroles, parallel (schwarze Kreise) und senkrecht (rote Kreise) polarisiert zu Pump Puls. Anregung bei 620 nm. Beide wurden angepasst mit 2 Lorentzprofilen (grün).

Die Rotationskorrelationszeit für Makromoleküle ( $\geq 30\text{KDa}$ ) liegt im ns bis ms Bereich. [91] Die lichtinduzierte Isomerisierung des Chromophors in Phytochrom findet auf der Pikosekunden-Zeitskala statt. Daher kann man die Orientierungsrelaxation bei Messungen an Phytochrom (85KDa) ignorieren und den relativen Winkel an jedem Delayzeitpunkt (ps Bereich) berechnen. So bekommt man die Zeitentwicklung des relativen Winkels, was einer Verfolgung der Strukturänderungen in Echtzeit entspricht. Ein Beispiel ist in Abb. 3.10 gegeben.



**Abbildung 3.10** Polarisationsaufgelöste Absorptionssignale von Phytochrom Cph1 in der Pfr-Form a) Parallel (schwarze Punkte) und senkrecht (rote Kreise) polarisierte Absorptionssignale im Zentrum der Bleichbande der  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})$  Streckschwingung bei  $1709 \text{ cm}^{-1}$ ; b) Parallel (schwarze Punkte) und senkrecht (rote Kreise) polarisierte Absorptionssignale im Zentrum der ESA  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^*$  Streckschwingung bei  $1694 \text{ cm}^{-1}$ ; Simulationen für parallele (schwarze Linie) und senkrechte (rote Linie) Signale. c) Anisotropie der Bleichbande  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})$  (rote Kreise und Linie) und der ESA  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^*$  (schwarze Punkt und Linie). Die Anisotropie des angeregten Zustandes kann durch einen monoexponentiellen Zerfall von  $(0,7 \pm 0,3) \text{ ps}$  gefittet werden. [Anhang D]

In Abb. 3.10 ist die Zeitentwicklung der parallelen und senkrechten Absorptionssignale von der Bleichbande der  $\text{C}_{19}=\text{O}$  Streckschwingung (Abb. 3.10 a) und von der angeregten Zustandsbande (ESA) der  $\text{C}_{19}=\text{O}^*$  Streckschwingung (Abb. 3.10 b) des Phytochroms in Pfr-Form dargestellt. Außerdem ist für beide Banden die zeitabhängige Anisotropie in Abb. 3.10 c) dargestellt. Im Vergleich zu der konstant bleibenden Anisotropie des Bleichsignals (rote Kreise) zeigt die Anisotropie der ESA (schwarze Kreise) eine monoexponentielle Abnahme mit einer Zeitkonstanten von  $0,7 \pm 0,3 \text{ ps}$ . Die Orientierung der  $\text{C}_{19}=\text{O}$  Streckschwingung hat sich nach der Anregung im angeregten Zustand innerhalb von einer ps geändert, wobei die Orientierung der  $\text{C}_{19}=\text{O}$  Streckschwingung in dem Grundzustand konstant bleibt. Die relative Winkeländerung von  $27^\circ$  zu  $43^\circ$  des  $\vec{\mu}_{vib}^{\text{C}_{19}=\text{O}^*}$  Schwingungsübergangsdipolmomentes kann man als eine Kombination von zwei unterschiedliche Prozessen erklären: Etwa  $\sim 65\%$  der angeregten Chromophore gehen nach der Anregung in den Grundzustand zurück, die übrigen  $\sim 35\%$  der Chromophore vollführen

während der Isomerisierung eine Drehung des Ring Ds. Dabei wird im Übergangszustand des angeregten Chromophors ein relativer Winkel von  $90^\circ$  angenommen, bevor die Lumi-F Grundzustandskonformation gebildet wird. Die Isomerisierung ist nach einer Pikosekunde abgeschlossen. Die Strukturänderung am Ring D des PCB Chromophors in Cph1 $\Delta$ 2 Phytochrom ist in Abb. 3.10 c dargestellt. Anhand des Anisotropiesignales kann die Photoisomerisierung und die damit einhergehende Drehung des Ring Ds in Echtzeit verfolgt werden. Damit wird erstmals die Strukturänderung des Chromophors direkt nachgewiesen. [Anhang D]

### **Theoretische Berechnung**

Die theoretischen Berechnungen dieser Arbeit zu Al-Corrole und Cph1 Phytochrom entstanden in Kooperation mit Angelica Zacarias und Mohamed El-Amine Madjet. Eine auf der Dichtefunktionaltheorie (DFT) basierenden Methode wurde verwendet [92] [93].

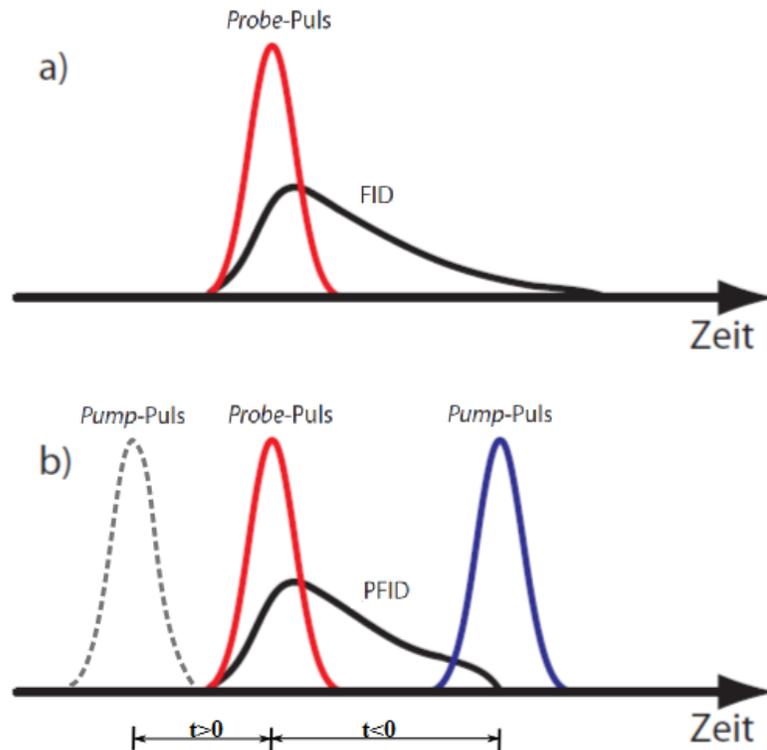
In ersten Schritten lassen sich mit DFT die atomare Struktur des Grundzustands und die elektronischen Zustände berechnen bis die Geometrie mit der minimalen Potentialenergie gefunden wird. Diese Geometrie sagt mögliche Absorptionsspektren sowie Frequenz, Stärke und Richtung der Schwingungsmoden vorher. Die Orientierungen der abzutastenden Schwingungsübergangsdipolmomente werden auf dieser Basis ermittelt.

Im nächsten Schritt wird der relative Winkel zwischen den abgetasteten Schwingungsübergangsdipolmomenten und dem angeregten elektronischen Übergangsdipolmoment durch die Messungen bestimmt.

Am Ende wird das Berechnungsergebnis mit den experimentell bestimmten relativen Winkeln zwischen den abgetasteten Schwingungsübergangsdipolmomenten und den angeregten elektronischen Übergangsdipolmomenten kombiniert, um die vorliegende Struktur der Moleküle zu überprüfen.

## 3.4 Weitere analytische Methoden

### 3.4.1 Perturbed Free Induction Decay



**Abbildung 3.11:** a) Elektrisches Feld eines eingehenden *Probe*-Pulses (rot), und die durch den *Probe*-Puls angeregte kohärente Polarisation, die Licht abstrahlt (schwarz, FID). b) Ein zeitlich nach dem *Probe*-Puls eingehender *Pump*-Puls (blau) verändert das FID-Signal (PFID). Aufgrund der zeitlichen Änderung des FID-Signals erhält das PFID-Signal eine spektrale Variation. Das PFID tritt nur bei negativer Verzögerungszeit ( $t < 0$ ) auf. [96]

Der *Perturbed Free Induction Decay* (PFID)) ist ein kohärentes Phänomen in der Femtosekunden *Pump-Probe*-Spektroskopie, das an Halbleitern [94] [95], Farbstoffen [96], Quantenpunkten [97] oder Hämoglobin [98] gut beobachtet werden kann. Es tritt im negativen Zeitbereich auf, wenn der *Probe*-Puls dem *Pump*-Puls vorausgeht. Außerdem tritt der PFID nur auf, wenn die Dauer der *Probe*-Pulse kürzer als die Dephasierungszeit  $T_{deph}$  ist. Die Dephasierungszeit  $T_{deph}$  einer Absorptionsbande ist proportional zur inversen Bandenbreite (FWHM)  $\Delta\tilde{\nu}$  [96] und es gilt:

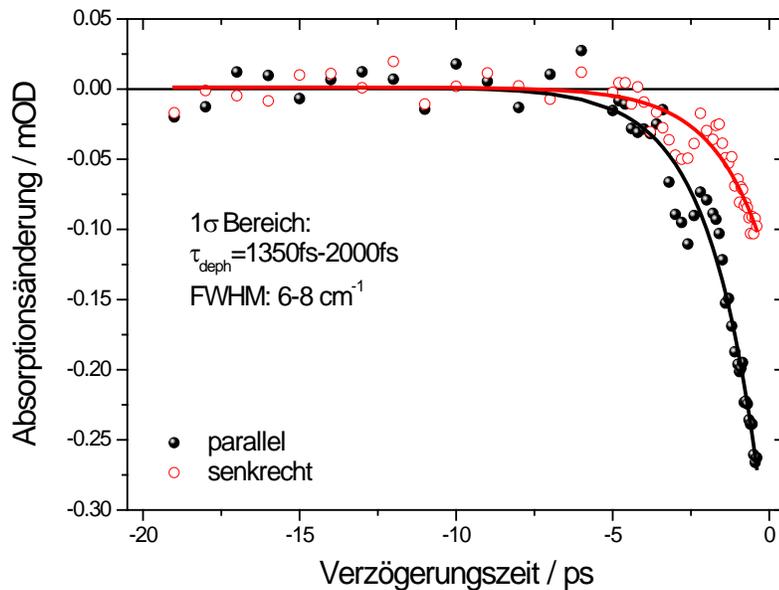
$$T_{deph} = \frac{1}{\pi c \Delta \tilde{\nu}} \quad (3.27)$$

Um den PFID zu erklären, muss man den *Free Induction Decay* (FID) zuerst erklären. Wie in Abb. 3.11 a) gezeigt, wird der IR-Probe-Puls von der Probe absorbiert, und erzeugt eine kohärente Polarisation in der Probe, welche anschließend mit ihrer eigenen Dephasierungszeit  $T_2$  zerfällt. Diese kohärente Polarisation strahlt Licht  $E_r(t)$  in der gleichen Richtung wie der Probe-Puls ab und wird daher vom Detektor mit aufgenommen. Diese Strahlung nennt man den *Free Induction Decay* (FID). Wenn der Pump-Puls die Probe zeitlich nach dem Probe-Puls erreicht ( $t < 0$ ), wird die Gesamtintensität des aufgenommenen Probe-Pulses nicht geändert. Aber der FID kann davon beeinflusst werden, da sich durch die elektronische Anregung die Resonanzenergie, Oszillatorstärke und/oder Dephasierungszeit der Probe ändern kann. Das führt zu einer Absorptionsänderung, die von dem Detektor detektiert werden kann, und die man dann PFID nennt (Abb. 3.11 b). Der PFID ist nur ein gestörter FID, des vom Probe-Puls induzierten Polarisationszerfalls. Er enthält nur spektrale Informationen der untersuchten Moleküle im Grundzustand und angeregten Zustand, aber keine Information über die reale Dynamik, wie Energielaxationsprozesse oder die photochemische Reaktion. Die Theorie der PFID Signale in der VIS-Pump-IR-Probe-Spektroskopie wird unter anderem in [96] und [99] vorgestellt. Es ist auch möglich, die PFID Signale aus dem Datensatz mittels geeigneter Medianfilter abzutrennen [98].

Die in dem PFID enthaltenen spektralen Eigenschaften der Probe kann man durch Datenanalysen ermitteln. Die Transienten im Zentrum der Bleichbande von Phytochrom Cph1 im negativen Zeitbereich sind als Beispiel in Abb. 3.12 dargestellt. Sie wurden monoexponentiell mit der Zeitkonstanten  $T_{deph} = 1620$  fs simuliert. Die Fehlerbereiche der Dephasierungszeit wurden durch ExSeAn (wie im folgenden Abschnitt erläutert) ermittelt. Der  $1\sigma$  Fehlerbereich für  $T_{deph}$  reicht in diesem Fall von 1350 fs bis 2000 fs, und der  $2\sigma$  Fehlerbereich reicht von 1160 fs bis 2260 fs. Die Halbwertsbreite der Lorentz-Linien ergibt sich durch die  $T_{deph}$  über  $\nu_{FWHM} = 1/(\pi c T_{deph})$ . [100] Das führt zu einem  $1\sigma$  Fehlerbereich von  $6 \text{ cm}^{-1}$  bis  $8 \text{ cm}^{-1}$  und einem  $2\sigma$  Fehlerbereich von  $4,8 \text{ cm}^{-1}$  bis  $9,3 \text{ cm}^{-1}$  für die Halbwertsbreite der Schwingungsbande. Die relativen Absorptionsänderungen  $A_{par}$  und  $A_{senk}$  der Probe zum Zeitnullpunkt ( $t=0$ ) können durch diese monoexponentielle Simulation konstruiert werden. Weiterhin kann man die Winkel zum Zeitnullpunkt berechnen. Um eine PFID Datenanalyse zu ermöglichen, sollte die Messpunktdichte so gewählt werden, dass zwischen -20 ps bis -350 fs ausreichend Messpunkte für die Simulation entstehen.

Der Winkel zum Zeitnullpunkt kann aus dem PFID berechnet werden. Da der PFID nur im negativen Zeitbereich auftritt, werden die Berechnung der dichroitischen Verhältnisse bzw. relativen Winkel der Bleichbande nicht von den durch die Anregung entstehende ESA Banden beeinflusst. Den Winkel der Bleichbande bestimmt man durch das dichroitische Winkel-Verhältnis  $D = \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}}$ , hier entsprechen  $I_{\parallel}$  und  $I_{\perp}$  den zerfallsassoziierten PFID Signalen am Zeitnullpunkt, der Index  $\parallel$  und  $\perp$  zeigt, wie die Polarisation des Probepulses zum Pump-Puls

orientiert ist. Aus Abb. 3.12 bestimmt man den relativen Winkel der Bleichband bei  $1709\text{ cm}^{-1}$  von Phytochrom Cph1 zu  $16^\circ$  mit einem Fehlerbereich von  $6^\circ$ - $25^\circ$ . Der Fehler der Winkel ist durch eine *exhaustive search Analyse* (siehe unten) ermittelt. Der theoretisch ermittelte relative Winkel zwischen diesem angeregten  $\mu_{el}$  und dem abgetasteten  $\mu_{vib}$  beträgt  $11,6^\circ$ . Dieser experimentell bestimmte relative Winkel stimmt mit der theoretisch ermittelten Orientierungen überein d. h. die theoretischen Aussagen über die untersuchte Struktur stimmt mit den Messergebnissen überein.



**Abbildung 3.12** Polarisationsaufgelöstes PFID-Signal im Zentrum der Bleichbande von Phytochrom Cph1  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})$  bei  $1709\text{ cm}^{-1}$ . Transienten und Simulationen für parallele (schwarze Kreise und Linie) und senkrechte (rote Kreise und Linie) Abtastpuls-Polarisationen im Bezug zur Pump-Puls Polarisationsrichtung. Der Bereich der System Response wird im Fit nicht berücksichtigt und ist nicht gezeigt.

### 3.4.2 Exhaustive Search Analyse

Die *Exhaustive Search Analyse* (ExSeAn) ist eine Analysemethode, welche die Fischer-Verteilung verwendet (F-Test), um zuverlässige Grenzen des Fehlerbereichs (z. B. 1- $\sigma$ , 2- $\sigma$ , 3- $\sigma$ ) bei mehrdimensionalen Parameterräumen abzuschätzen. Anders als beim “unidimensional search“ werden die Abhängigkeiten zwischen allen möglichen Fitparametern betrachtet, z. B. Korrelationen einzelner Parameter untereinander, oder Korrelationen zwischen zwei Parametern unter Begrenzung alle anderer Parameter [101] [102].

Die F-Verteilung ist eine kontinuierliche Wahrscheinlichkeitsverteilung. Sie ist auch als die Fisher-Snedecor Verteilung bekannt [103] [104]. Sie wird häufig verwendet beim Vergleich von statistischen Modellen, die zu einem Datensatz gefittet wurden, um das Modell zu identifizieren, das am besten zu diesen Daten passt.

Wenn beim Fitten eines Datensatzes die zwei verwendeten Fit-Modelle nur eine unterschiedliche Anzahl von frei variierbaren Fit-Parametern haben, nennt man das Modell mit mehr frei variierbaren Fit-Parametern ein Vollmodell (Model 1), und das andere ein beschränktes Modell, oder **eingebettetes Modell** (Model 2). Die Fischer-Verteilung für das Vollmodell und das eingebettete Modell, die zu demselben Datensatz gefittet werden, ergibt sich aus

$$F_{\alpha}(m, n) = F_{\alpha}(P_2 - P_1, D - P_2) = \frac{\left(\frac{RSS_2 - RSS_1}{P_2 - P_1}\right)}{\left(\frac{RSS_2}{D - P_2}\right)} \quad (3.28)$$

Wobei  $RSS_1$  und  $RSS_2$  die *Rest-Summe der Quadrate für die jeweiligen Fit-Modelle* sind.

$$RSS = \sum_{i=1}^k [f(x_i) - y_i]^2 \quad (3.29)$$

Die Summe geht von eins bis zum Index  $k=m, n$ , wobei  $m$  und  $n$  die Anzahl der Freiheitsgrade bezeichnet,  $P_1$  und  $P_2$  sind die Anzahl der jeweils frei variierbaren Fit-Parameter der Fit-Modelle und  $D$  ist die Anzahl der unabhängigen Messwerte des zu untersuchten Datensatzes. Die Werte der Vertrauensbereiche  $\alpha$  ( $0 < \alpha < 1$ ) sind in Statistik-Büchern aufgeführt. (z. B. [103])

$$P\{F > F_{\alpha}(m, n)\} = \int_{F_{\alpha}(m, n)}^{\infty} \psi(y) dy = \alpha \quad (3.30)$$

$\psi(y)$  ist die Wahrscheinlichkeitsdichte der Fischer-Verteilung  $F_{\alpha}(m, n)$ . Ein Wert  $\alpha$  von 67,5% korrespondiert zum  $1\sigma$  Bereich, 95% zum  $2\sigma$  Bereich und 99% zum  $3\sigma$  Bereich.

Gleichung 3.28 zeigt die Formel, die von uns zur ExSeAn verwendet wird. Wenn man für die Parameter einen bestimmten Vertrauensbereich  $\alpha$  festlegen möchte, sucht man zuerst den Wert von  $F_{\alpha}(P_2 - P_1, D - P_2)$  aus. Beispielweise wenn man den Vertrauensbereich nur für einen Parameter bestimmen möchte, hält man beim zweiten Fitten (eingebettetes Modell) diesen Parameter fest, und alle anderen Parameter bleiben nach wie vor frei variierbar. Dann ist  $P_2 - P_1 = 1$  (Wenn man zwei Parameter festhält ist  $P_2 - P_1 = 2$ ). Danach berechnet man die Grenzwerte des  $RSS_2$  für gewünschte  $\alpha$ -Werte mit:

$$RSS_2 = \frac{RSS_1 / P_2 - P_1}{\frac{1}{P_2 - P_1} \frac{F_{\alpha}(P_2 - P_1, D - P_2)}{D - P_2}} \quad (3.31)$$

Nun werden die Werte des festgehaltenen Fitparameters stufenweise geändert, bis die Grenzwerte (max. und min), der ausgerechneten  $RSS_2$  Werte erreicht sind. Dieser Vertrauensbereich liegt fast immer unsymmetrisch zum optimalen Fit-Ergebnis, das man aus dem ersten Fit (mit dem Vollmodell) erhält.

Ein Ablaufschema für den ExSeAn-Prozess durch Origin 8.5 lässt sich wie folgt beschreiben:

1. Alle Fit-Parameter von Origin werden mit einem passenden Fit-Modell bis zum Erreichen des minimalen reduzierten Chi-Quadrat-Werte-Ergebnisses  $\chi^2_m$  (RCS) gefittet.

Das reduzierte Chi-Quadrat  $\chi^2_m$  mit einem Fit-Modell  $Y=f(x)$  ist dabei gegeben als

$$\chi^2_m = \frac{\sum_{i=1}^n \omega_i [f(x_i) - y_i]^2}{m}, \quad (3.32)$$

wobei  $m$  die Freiheitsgrade darstellt. Für einen Datensatz mit  $D$  Datenpunkten und einem Fit-Modell mit  $P$  variierbaren Fit-Parametern, ist  $m$  gegeben als  $m = D - P$ . Wenn  $\omega_i = 1$  (no weight Fitting) ist, ergibt dies

$$m * \chi^2_m = RSS. \quad (3.33)$$

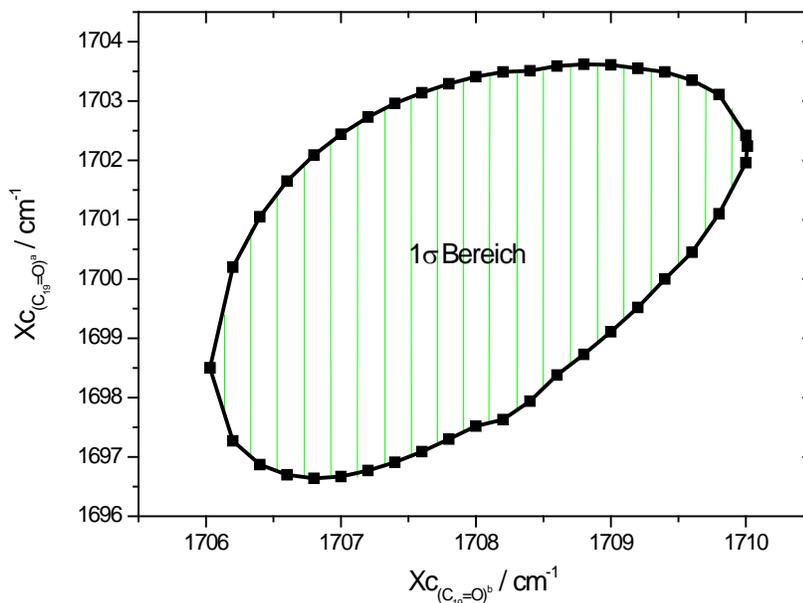
2. Man hält die zu untersuchenden Parameter fest und benutzt die Fisher-Verteilung, um die neue freiheitsgradreduzierte Chi-Quadrat-Minimierung  $\chi^2_n$  ( $n < m$ ) zu erreichen. Die reduzierte Anzahl der Freiheitsgrade ist  $n$ , bei einem oder mehreren festgehaltenen Fit-Parametern.
3. Der festgehaltene Fit-Parameter wird stufenweise geändert (erhöht oder reduziert). Das erhaltene  $RSS_2$  oder  $\chi^2_n$  wird mit dem  $RSS_1$  oder  $\chi^2_m$ , den optimalen Werten des ersten Fits, verglichen. Dies wird solange durchgeführt, bis die Chi-Quadrat-Minimierung von  $\chi^2_n$  (siehe Formel) oder der  $RSS_2$ -Wert den gewünschten Grenzwert (3.34) erreicht haben.

$$\chi^2_n = RSS_2/n = \frac{RSS_1/P_2 - P_1}{\frac{1}{P_2 - P_1} \frac{F_\alpha(P_2 - P_1, D - P_2)}{D - P_2}} / n = \frac{\chi^2_m * (D - P_1) / P_2 - P_1}{\frac{1}{P_2 - P_1} \frac{F_\alpha(P_2 - P_1, D - P_2)}{D - P_2}} / n \quad (3.34)$$

$$\chi^2_n = \frac{\chi^2_m * (D - P_1)}{1 - \frac{P_2 - P_1}{D - P_2} F_\alpha(P_2 - P_1, D - P_2)} / n \quad (3.35)$$

- Man wiederholt Schritt 3 mit stufenweiser Änderung der Fit-Parameter in die andere Richtung, um den anderen Grenzwert (Maximum oder Minimum) des Fit-Parameters zu ermitteln.

Auf diese Weise kann man jeden Vertrauensbereich in Abhängigkeit der untersuchten Parameter bestimmen, und erhält für jeden Vertrauensbereich mehrdimensionale asymmetrische Grenzflächen. In Abb.3.13 ist eine graphische Darstellung eines durch die ExSeAn bestimmten Vertrauensbereichs zu sehen. Dabei wurde anhand eines Phytochromdatensatzes aus Publikation (Anhang G) die Linienbreite des Peaks bei  $1708\text{ cm}^{-1}$  aus dem PFiD-Signal aus Abb. 3.11 zum Zeitnullpunkt bestimmt. Es wurden die Wellenzahlen der Peakpositionen soweit verschoben, bis der  $1\sigma$  Vertrauensbereich verlassen wurde. Die beiden beobachteten benachbarten Absorptionspeaks der  $\text{C}_{19}=\text{O}$  Streckschwingung in Phytochrom Cph1 $\Delta$ 2 wurden von uns zu zwei verschiedenen Grundzustandsstrettschwingungen zugeordnet. Es sollte hier getestet werden, ob die Peakpositionen bei  $1700\text{ cm}^{-1}$  und  $1708\text{ cm}^{-1}$  im Fit soweit verschoben werden können, dass sie einander überlagern, bzw. spektral überlappen. Dies könnte gegen die Existenz von zwei verschiedenen Spezies sprechen.



**Abbildung 3.13**  $1\sigma$  Vertrauensbereich der zwei Peak-Positionen. Der Graph zeigt nicht nur die Grenzwerte des Fitparameters, sondern auch die Korrelation der zwei Peak-Positionen bei Variation aller anderen Parameter.

Wie in Abb. 3.13 zu sehen ist, gibt es für jede Wellenzahlposition der  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^a$  Absorptionsbande auf der y-Achse zwei  $1\sigma$ -Grenzwerte der  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^b$  Absorptionsbande auf der x-Achse und umgekehrt. Die  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^a$  Absorptionsbande liegt um  $1700\text{ cm}^{-1}$  mit einem  $1\sigma$  Vertrauensbereich zwischen  $1696\text{ cm}^{-1}$  und  $1704\text{ cm}^{-1}$ , und die  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^b$  Absorptionsbande liegt um  $1708\text{ cm}^{-1}$

einem  $1\sigma$  Vertrauensbereich zwischen  $1706\text{ cm}^{-1}$  und  $1710\text{ cm}^{-1}$ . Jeder Punkt in Abb. 3.13 (schwarze Quadrate) stellt einen berechneten Grenzwert des Vertrauensbereichs dar. Innerhalb dieser „Grenzlinie“ liegen im  $1\sigma$ -Bereich beide Absorptionsbanden. Sie haben unterschiedliche Wellenzahlen, was die Existenz von zwei verschiedenen Absorptionsbanden unterstreicht. Mit dieser von uns verwendeten Methode können zuverlässige Fehlerbereiche von Datensätzen angegeben werden, die die Asymmetrie und mehrdimensionale Abhängigkeit der Parameter untereinander berücksichtigt.

# Kapitel 4

## Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Doktorarbeit habe ich die Winkel balancierte polarisationsaufgelöste Femtosekunden VIS Pump - IR Probe-Spektroskopie (bal-Pol-fs-PPS), selbst realisiert, charakterisiert und je nach Bedarf des Experimentes umgebaut. Diese neue Methode stellt eine alternative Methode zur traditionellen zeitaufgelösten IR Spektroskopie dar, die eine Echtzeitverfolgung von strukturellen Änderungen in Molekülen ermöglicht. Ich konnte mit dieser Methode erstmals die Orientierungsänderung des Phytochromchromophors in Echtzeit verfolgen und somit den zeitlichen Ablauf der Photoisomerisierungen der Pfr→Pr und der Pr→Pfr Reaktion exakt bestimmen. Der Aufbau und seine Parameter wurden in Kapitel 2 beschrieben. Mit diesem Aufbau habe ich im Rahmen meiner Doktorarbeit zwei verschiedene Systeme, Phytochrome und Corrole, untersucht. Die Messdaten wurden mit der in Kapitel 3 beschreibenden Methode ausgewertet. Im Folgenden werden die Ergebnisse meiner Messungen an den beiden Systemen kurz zusammengefasst.

### 4.1 Phytochrom Cph1Δ2

Zeitaufgelöste IR-Messungen an Phytochromen wurden bis jetzt kaum durchgeführt, da die IR-Signalstärken im Vergleich zu anderen Photorezeptoren, wie bR oder PYP deutlich kleiner sind. In dieser Arbeit wurden neben Messungen an Agp1 Phytochrom hauptsächlich Messungen an Cph1Δ2 Phytochrom durchgeführt. Die photoinduzierte Dynamik der beiden Primärreaktionen von Phytochrom Cph1Δ2 sind charakterisiert worden. Die Konformationsänderungen der PCB Chromophore im angeregten Zustand wurden erfolgreich in Echtzeit verfolgt und charakterisiert.

Die Pr→Pfr Photoisomerisierung in pflanzlichen Phytochromen und Cph1 wurde mit ultraschnellen sichtbaren und Raman Methoden untersucht. Es wurden stets zwei Zeitkonstanten um 3 ps und 30 ps beobachtet. Obwohl keine zwingenden Hinweise für eine Photoisomerisierung mit 3 ps vorlagen, wurde überwiegend die schnelle Zeitkonstante mit der Photoisomerisierung verknüpft. [13] Die von mir gemessenen Schwingungsdynamiken der Pr→Pfr Reaktion können sehr gut mit zwei exponentiellen Zerfällen beschrieben werden. Die Zeitkonstanten habe ich zu  $(4,7 \pm 1,4)$  ps und  $(30 \pm 5)$  ps ermittelt, die mit den veröffentlichten Werten gut übereinstimmen. Die Vertrauensbereiche wurden durch ExSeAn bestimmt. Im Gegensatz zu den Methoden die von anderen Arbeitsgruppen weltweit eingesetzt werden, ermöglicht die von mir verwendete Methode die Verfolgung von Orientierungsänderungen von Molekülgruppen. Während der Photoisomerisierung um die C<sub>14</sub>=C<sub>15</sub> Bindung im elektronisch angeregten Zustand, wird angenommen, dass sich der Ring D dreht. Da der PCB Chromophor am Ring D eine

Carbonylgruppe (C<sub>19</sub>=O) besitzt, kann die Orientierung während der Photoisomerisierung anhand dieser  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^*$  Streckschwingung im elektronisch angeregten Zustand verfolgt werden. Das Schwingungsübergangsdipolmoment von Carbonylgruppen ist in guter Näherung parallel zur C=O Doppelbindung. Nachdem die  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^*$  Streckschwingung in den Daten identifiziert wurde, konnte ich die Drehung des Ring Ds anhand der Anisotropiedaten verfolgen. Die zeitaufgelösten Anisotropiedaten der  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^*$  Streckschwingung bestätigten die Orientierungsänderung des Ring D nach Photoanregung. Ich konnte erstmals eindeutig zeigen, dass die Isomerisierung mit der langen Zeitkonstante von 30 ps stattfindet. Die Zeitkonstante um 3 ps konnte nicht mit Orientierungsänderungen verknüpft werden. Aus meinen Daten konnte ich die relativen Winkel zwischen den Schwingungsübergangsdipolmomenten  $\mu_{\text{C}_{19}=\text{O}}$ ,  $\mu_{\text{C}_1=\text{O}}$ ,  $\mu_{\text{C}_{19}=\text{O}^*}$ ,  $\mu_{\text{C}_{19}=\text{O}}^{\text{lumi-R}}$ , und dem elektronischen Übergangsdipolmoment  $\mu_{\text{vib}}$  ( S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub> ) bestimmen. Die Kombination der experimentellen Daten mit DFT-Berechnungen bestätigen die ZZZssa Geometrie des PCB Chromophors im Pr Grundzustand und die ZZEssa Geometrie im Lumi-R Grundzustand. Der Zerfall des Anisotropiesignals mit 30 ps wurde von uns durch eine 90° Drehung des Rings D im elektronisch angeregten Zustand mit anschließender Reaktion zu Lumi-R oder in den Pr-Grundzustand erklärt. Dabei trägt nur etwa ein Drittel der angeregten Chromophore zur Drehung des Chromophors bei und etwa die Hälfte davon erreicht den Produktzustand Lumi-R. Das entspricht der von mir bestimmten Gesamtquantenausbeute von etwa 16% für die Photoproduktbildung und stimmt mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen gut überein.

Ich habe in meinen Messungen eine hohe spektrale Auflösung von 1,5 cm<sup>-1</sup> verwendet, die es erlaubte spektrale Signaturen genau zu untersuchen. Aus diesen Untersuchungen, die zudem noch polarisationsaufgelöst durchgeführt wurden, konnte ich deutliche Hinweise für eine strukturelle Heterogenität der Pr-Form im Grundzustand gewinnen. Zwei PCB Geometrien PCB<sup>a</sup> und PCB<sup>b</sup> des Chromophors mit unterschiedlichen Ring-D-Orientierungen wurden anhand von zwei separierbaren  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O}^a)$  und der  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O}^b)$  Absorptionsbanden identifiziert. Die spektrale Lage dieser beiden Banden unterscheidet sich um 7 cm<sup>-1</sup>. Durch ExSeAn und PFID bestätigt sich, dass die 7 cm<sup>-1</sup> Frequenzdifferenz reproduzierbar ist und nicht durch eine Überlagerung von Signalen entsteht. Die relativen Winkel zwischen den Schwingungsübergangsdipolmomente  $\mu_{\text{C}_{19}=\text{O}^a}$ ,  $\mu_{\text{C}_{19}=\text{O}^b}$  und dem elektronischen Übergangsdipolmoment  $\mu_{\text{vib}}$  sind jeweils ~29° und ~16°. Zusätzlich zeigt sich in den Daten der Transienten, ein deutlich unterschiedliches Zeitverhalten für die  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O}^a)$  und die  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O}^b)$  Bleichbande. Ich konnte zeigen, dass Phytochrome mit der Chromophorkonformation PCB<sup>a</sup> eine Quantenausbeute von 29% haben, die zehnmal höher ist als die Quantenausbeute von PCB<sup>b</sup> mit ~3 %. Die Pr-Grundzustandsheterogenität passt gut zu der NMR-Studie von Song. [16] Durch Kombination der experimentellen Daten, DFT Berechnung und NMR-Studie lässt sich die Heterogenität erklären. Die Carbonylgruppe am Ring D mit der PCB<sup>a</sup> Konformation ist über eine Wasserstoffbrückenbindung mit His 290 verbunden. Die PCB<sup>b</sup> Konformation weist eine Ring D Orientierung auf, die auf der anderen Seite der Molekülebene liegt und keine Wasserstoffbrückenbindung eingehen kann. Dies ist die inaktive Form mit verschwindender Quantenausbeute für die Produktbildung. Durch die Wasserstoffbrückenbindung wird PCB<sup>a</sup> leicht vorgebogen. Diese Torsion führt im elektronisch angeregten Zustand zu einer

höheren potentiellen Energie und ermöglicht eine Drehung des Ring Ds an dem Histidin vorbei. Die Wasserstoffbrückenbindung wird mit der elektronischen Anregung gebrochen. Zwei Veröffentlichungen der Messergebnisse über die Pr→Pfr Hinreaktion befinden sich im Anhang B und C [105, 106].

Die Rückreaktion Pfr→Pr wurde bis jetzt seltener untersucht als die Hinreaktion. Sie wurde mit zwei Zeitkonstanten um 0.5 ps und 3 ps charakterisiert, wobei eine eindeutige Zuordnung zur Isomerisierung bis jetzt nicht möglich war. Phytochrom bietet die einmalige Gelegenheit zwei verschiedene ultraschnelle Photoreaktionen desselben Chromophors in demselben Protein zu untersuchen. Meine Messungen an Cph1Δ2 Phytochrom in der Pfr-Form ergaben eine bi-exponentielle Photoreaktion mit den Zeitkonstanten von  $\tau_1 = (0,7 \pm 0,5)$  ps und  $\tau_2 = (5,3 \pm 0,3)$  ps, wobei die Fehlerbereiche durch ExSeAn bestimmt wurden. Meine polarisationsaufgelösten Messungen zeigen sehr deutlich, dass ein Anisotropiezerfall der  $\nu(C_{19}=O)^*$  Streckschwingung des Ring Ds im elektronisch angeregten Zustand mit 0,7 ps erfolgt. Dadurch kann ich die schnelle Zeitkonstante von 0,7 ps dem Isomerisierungsprozess zuordnen. Auch für diese Photoreaktion war eine Verfolgung der Chromophorrotation in Echtzeit möglich. Die Photoreaktion im elektronisch angeregten Zustand zeigt zwei Populationen. Eine Population von etwa 65% führt keine Photoisomerisierung durch und weist eine Lebensdauer von etwa 5 ps auf. Die andere Population von etwa 35% vollführt eine Drehung des Ring D bis zum transition state mit einer Drehung von 90°. Wir gehen davon aus, dass an diesem Punkt der Übergang in den Produktzustand Lumi-F mit  $(17 \pm 7)\%$  und in den Pfr-Grundzustand über einen conical intersection erfolgt. Eine Veröffentlichung der Ergebnisse über diesen Teil des Messergebnisses liegt im Anhang D [107].

Die Heterogenität im elektronisch angeregten Zustand könnte durch eine Heterogenität im elektronischen Grundzustand induziert sein. Weitere noch unveröffentlichte Ergebnisse legen diesen Schluss und den Einfluss von Wasserstoffbrückenbindungen im Pfr-Grundzustand auf diesen Prozess nahe. Durch unsere winkelaufgelöste Abtastung der Carbonylstreckschwingungen am Ring A ( $C_1=O$ ,  $C_1=O^*$ ) und D ( $C_{19}=O$ ,  $C_{19}=O^*$ ,  $^{lumi-F}C_{19}=O$ ) konnte die ZZEsa Konformation des PCB Chromophors in der Pfr-Form bestätigt und das erste Photoprodukt Lumi-F identifiziert werden. Mit der verwendeten hohen spektralen Auflösung von  $1,5 \text{ cm}^{-1}$  konnte ich eine strukturelle Heterogenität des Phytochroms im Pfr-Grundzustand nachweisen. Es treten zwei  $\nu(C_{19}=O)$  Absorptionsbanden auf, die durch  $8 \text{ cm}^{-1}$  Frequenzdifferenz voneinander getrennt sind. Untersuchungen ergaben unterschiedliche Dynamiken der beiden Absorptionsbanden, aber ähnlich große Quantenausbeuten. Die Schwingungsübergangsdipolmoment-Orientierungen der beiden Banden wiesen ähnliche, aber dennoch unterschiedliche Winkel relativ zum elektronischen Übergangsdipolmoment auf. Dieses Verhalten wurde durch ExSeAn und PFID nachgewiesen. Eine weitere Veröffentlichung über die strukturelle Heterogenität ist derzeit in Bearbeitung. [Anhang F]

Für eine weitere Analyse der Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Chromophor ist geplant, die hier vorgestellten Pr- und Pfr- Daten mit zukünftigen Untersuchungen an unterschiedlichen Mutanten des Phytochroms zu vergleichen.

## 4.2 Corrole

Die Corrole stellen eine interessante und neue Klasse von Molekülen, ähnlich zu Porphyrinen dar. Im Gegensatz zu Porphyrinen können sie durch ihren flexibleren Makrozyklus mehr unterschiedliche Metallionen mit höheren Oxidationsstufen binden als Porphyrine. Dadurch ermöglichen Corrole neue chemische und katalytische Verfahren. Ihr Einsatz in der Chemie wächst beständig, allerdings sind photophysikalische Eigenschaften erst in Ansätzen charakterisiert. Zur Bestimmung der Photoreaktion von Corrolen habe ich eine Vielzahl von Experimenten an Corrolen mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen im Bereich der Soret und Q-Banden durchgeführt. Dazu wurde Aluminium Corrol bei 400 nm, 450 nm, 580 nm und 620 nm, und bromiertes Aluminium Corrol bei 400 nm, 450 nm, 590 nm und 640 nm angeregt. Beide Proben wurden im selben Bereich zwischen  $1470\text{ cm}^{-1}$  und  $1540\text{ cm}^{-1}$ , wo die C=C Streckschwingung des Al-Corroles absorbiert, abgetastet. Eine Gesamtübersicht der elektronischen Übergänge der Q-bande für Aluminium Corrol wurde erstellt. Hinweise auf einen Triplett-Übergang für das bromierte und unbromierte Al-Corrole wurden gefunden. [Anhang G]

Ich konnte die  $S_0 \rightarrow S_1$  und  $S_0 \rightarrow S_2$  Übergänge in der Q-Bande der Absorptionsspektren für das hexakoordinierte  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  und  $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  eindeutig zuordnen. Die Aufspaltung des Q-Bands und die Winkel zwischen einem Schwingungsübergangsdipolmoment (VTDM) und dem elektronischen Übergangsdipolmoment (TDM) wurden mit  $(53 \pm 2)^\circ$  und  $(34 \pm 2)^\circ$  für hexakoordiniertes  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  bei Anregung mit 580 nm und 620 nm bestimmt. Für hexakoordiniertes  $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  wurden Winkel von  $(51 \pm 2)^\circ$  und  $(43 \pm 2)^\circ$  bei Anregung bei 590 nm und 640 nm gemessen. Die relativen Winkel zwischen den beiden niedrigsten elektronischen Übergangsdipolmomenten (TDM) sind  $(90 \pm 8)^\circ$  und  $(94 \pm 3)^\circ$  für  $\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  und  $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$ . Eine Veröffentlichung der Ergebnisse befindet sich im Anhang D [108].

Untersuchungen der zeitaufgelösten Schwingungsdynamik zeigen eine positive Bande um  $1500\text{ cm}^{-1}$ , die man sowohl bei Anregung im Q-Band als auch im Soret-Band sieht. Diese Bande zeigt sehr wahrscheinlich Triplett-Bildung, da die Bleichbanden während des Anstiegs der neuen Bande erhalten bleiben. Diese Ergebnisse werden auch durch eine Arbeit an bromierten Aluminium Corrolen unterstützt. [31] Die Photodynamik des Aluminium Corroles wird in einer weiteren Veröffentlichung beschrieben. In dieser Arbeit wird die elektronische Dynamik mit der Schwingungsdynamik verbunden, um ein umfassendes Bild der Photoreaktion und Triplettbildung darzustellen. [Anhang G]

Die weitergehenden Messungen werden sich auf neue Corrolesysteme und Corrole-Elektronen-Transfersysteme konzentrieren. Denkbar wäre ein Donor-Akzeptor-System, das den Rücktransfer des Elektrons verhindert. Die Steuerung dieses Prozesses könnte durch Veränderung der

Anregungspulsform eingestellt werden. Ein Einsatz in der photodynamischen Therapie ist ebenso denkbar für Corrole mit hoher Singulett-Sauerstoffausbeute. Um die wichtigsten Ergebnisse und Schlussfolgerungen zusammenzustellen, werden schließlich acht Veröffentlichungen angehängt.

## **Anhang A**

### **Assignment of Aluminum Corroles Absorption Bands to Electronic Transitions by Femtosecond Polarization Resolved VIS-Pump IR-Probe Spectroscopy**

Yang, Y; Jones, D; von Haimberger, T; Linke, M; Wagnert, L; Berg, A; Levanon, H; Zacarias, A; Mahammed, A; Gross, Z; Heyne, K

JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY A 2012, 116(3), p. 1023-1029;  
DOI 10.1021/jp211970j

<http://dx.doi.org/10.1021/jp211970j>

## **Anhang B**

### **Real-Time Tracking of Phytochrome's Orientational Changes During Pr Photoisomerization**

Yang, Y; Linke, M; von Haimberger, T; Hahn, J; Matute, R; Gonzalez, L; Schmieder, P; Heyne, K

JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 2012, 134(3), p.1408-1411;

DOI 10.1021/ja209413d

<http://dx.doi.org/10.1021/ja209413d>

## **Anhang C**

### **Active and silent chromophore isoforms for phytochrome Pr photoisomerization: An alternative evolutionary strategy to optimize photoreaction quantum yields**

Yang, Y; Linke, M; von Haimberger, T; Matute, T; González, L; Schmieder, P; Heyne, K  
STRUCTURAL DYNAMICS 1 2014, 014701;  
DOI 10.1063/1.4865233

## Active and silent chromophore isoforms for phytochrome Pr photoisomerization: An alternative evolutionary strategy to optimize photoreaction quantum yields

Yang Yang,<sup>1,2</sup> Martin Linke,<sup>1</sup> Theodore von Haimberger,<sup>1</sup> Ricardo Matute,<sup>3</sup> Leticia González,<sup>4</sup> Peter Schmieder,<sup>5</sup> and Karsten Heyne<sup>1,2,a)</sup>

<sup>1</sup>Department of Physics, Freie Universität Berlin, Arnimallee 14, 14195 Berlin, Germany

<sup>2</sup>Center for Supramolecular Interactions, Takustr. 3, 14195 Berlin, Germany

<sup>3</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, UCLA, 607 Charles E. Young Drive East, Los Angeles, California 90095-1569, USA

<sup>4</sup>Universität Wien, Institut für Theoretische Chemie, Währinger Str. 17, A-1090 Wien

<sup>5</sup>Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Robert-Rössle Str. 10, 13125 Berlin, Germany

(Received 5 November 2013; accepted 11 January 2014; published online 5 February 2014)

Photoisomerization of a protein bound chromophore is the basis of light sensing of many photoreceptors. We tracked Z-to-E photoisomerization of Cph1 phytochrome chromophore PCB in the Pr form in real-time. Two different phycocyanobilin (PCB) ground state geometries with different ring D orientations have been identified. The pre-twisted and hydrogen bonded PCB<sup>a</sup> geometry exhibits a time constant of 30 ps and a quantum yield of photoproduct formation of 29%, about six times slower and ten times higher than that for the non-hydrogen bonded PCB<sup>b</sup> geometry. This new mechanism of pre-twisting the chromophore by protein-cofactor interaction optimizes yields of slow photoreactions and provides a scaffold for photoreceptor engineering. © 2014 Author(s). All article content, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

[<http://dx.doi.org/10.1063/1.4865233>]

The photochemical event that initiates light detection in vision, triggering ion transport through membranes and negative phototaxis, is a cis-to-trans or trans-to-cis isomerization of the chromophore, which is part of a photoreceptor. The process is known to occur very quickly with time constant typically between 200 fs and 3 ps for rhodopsin and photoactive yellow protein, respectively. This very fast process is accompanied with a high photoreaction quantum yield typically above 40%, because alternative reaction pathways with slower time constants have a lower probability to occur. Photoisomerization dynamics observed for the photoreceptor phytochrome in its Pr form show longer time constants and a low quantum yield of about 12%, suggesting poor optimization by nature.

Phytochromes<sup>1</sup> are a family of dimeric chromoproteins that absorb light by means of a bound bilin (or linear tetrapyrrole) chromophore, and regulate numerous photoresponses in plants, bacteria, and fungi.<sup>2–6</sup> They sense red and far-red light by means of two relatively stable conformers: a red light absorbing Pr form with ZZZssa (C<sub>5</sub>-Z, C<sub>10</sub>-Z, C<sub>15</sub>-Z, C<sub>5</sub>-syn, C<sub>10</sub>-syn, C<sub>15</sub>-anti, Figure 1) chromophore geometry<sup>3,4,7–9</sup> and a far-red light absorbing Pfr form with a ZZEssa chromophore conformation.<sup>4</sup> By photointerconversion between active and inactive forms, phytochromes act as light-regulated master switches for measuring the fluence, direction, and color of the ambient light. Light absorption by the stable Pr conformer triggers an ultrafast Z-to-E isomerization (cis-to-trans) of the C<sub>15</sub>=C<sub>16</sub> methine bridge between the C and D rings of the bilin chromophore accompanied by rotation of ring D.<sup>10–12</sup> The structural switch, initially localized at the bilin chromophore, is cascaded via intermolecular couplings to slower and widespread structural changes which finally lead to the Pfr form.<sup>10,13–15</sup> The initial quantum

<sup>a)</sup> Author to whom correspondence should be addressed. Electronic mail: karsten.heyne@fu-berlin.de

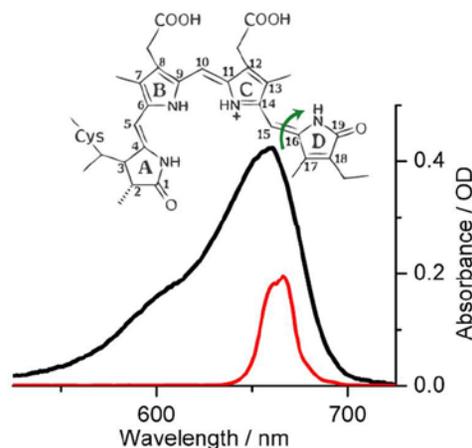


FIG. 1. PCB chromophore of Cph1Δ2 phytochrome with ZZZssa ( $C_5$ -Z,  $C_{10}$ -Z,  $C_{15}$ -Z,  $C_5$ -syn,  $C_{10}$ -syn,  $C_{15}$ -anti) geometry. Absorption spectrum of Cph1Δ2 Pr form (black line) and applied excitation pulse profile (red line).

yield determines the efficiency, of all successive reaction steps. Therefore, to design synthetic light sensing and light harvesting systems with optimized efficacy it is essential to determine the exact molecular reaction mechanism of ultrafast photoisomerization.

Unfortunately, only a few spectroscopic methods allow direct tracking of fast structural changes in biomolecules on a nanosecond time scale.<sup>16</sup> From direct and indirect methods, it is known that the chromophore in photoreceptors such as rhodopsin, bacteriorhodopsin, and photoactive yellow protein isomerize around a C=C double bond on a time scale of 0.2 to 3 ps with yields of 40% to 65%, a reaction process much faster and five to ten times more efficient in the protein than in solution.<sup>17–26</sup> The primary photoisomerization of the Pr phytochrome has been investigated by means of ultrafast electronic and vibrational spectroscopy of plant and bacterial phytochromes. From these studies, isomerization time constants in the range of 3 ps to 16 ps and 25 ps to 40 ps were reported,<sup>14,27–32</sup> followed by lumi-R photoproduct formation with quantum yields in the range of 7% to 16%.<sup>8,15,28–31</sup>

The low photoproduct quantum yield in phytochrome was proposed to result from photoreceptor heterogeneity.<sup>33,34</sup> Different geometries of phycocyanobilin (PCB) chromophores in solution were reported with time constants in the range of 3 ps to 500 ps, not detectable in phytochrome Pr photoreaction.<sup>35,36</sup> Despite the kinetic insight gained from these electronic and vibrational investigations, it was not possible to establish when the  $C_{15}=C_{16}$  double bond isomerization and ring D rotation occur, let alone determine the influence of chromophore heterogeneity in phytochromes or the structural orientation of ring D in the photoproduct lumi-R. A nuclear magnetic resonance (NMR) study by Song *et al.*<sup>34,37</sup> reported two PCB geometries in the Pr ground state Pr-I and Pr-II with different ring D orientations but unknown photoreactive properties. Although traditional femtosecond time resolved infrared and Raman spectroscopic methods provide important information on structural dynamics,<sup>8,29</sup> they are not able to track orientational changes of vibrational transition dipole moments (tdm) in real time directly.

In this study, we used polarization resolved femtosecond visible pump infrared probe (prfs VIS-IR) spectroscopy<sup>19,38</sup> to determine the frequency position and orientation of the vibrational modes on a femtosecond time scale from excitation to formation of the first photoproduct lumi-R. Prfs VIS-IR spectroscopy provides direct transient information on the relative angle between the excited electronic transition dipole moment (tdm) and the probed vibrational tdm. The tdm are fixed within the molecular scaffold of the chromophore, and their properties depend on the electronically excited state. To solely obtain signals from the chromophore's  $\nu(C=O)$  and  $\nu(C=C)$  stretching vibrations, we used the phycocyanobilin (PCB) chromophore bound to  $^{13}C/^{15}N$  labeled Cph1Δ2 protein in  $D_2O$ , shifting all  $\nu(C=O)$ ,  $\nu(C=C)$ , and  $\nu(C=N)$  stretching vibrations of the protein to longer wavelengths and all significant protein vibrations out of our spectral window of 1660–1745  $cm^{-1}$ .

Our technique allows us to directly address and answer questions concerning the timing of the chromophore isomerization and ring D rotation, the heterogeneity of chromophore structures and their photoreaction quantum yields, the ZZZssa Pr and the ZZEssa lumi-R ground state geometry (with the help of calculated structures), and the low average quantum yield of the photoreaction compared to that of other photoreceptors. The direct marker bands for Z-to-E isomerization in the  $1700\text{ cm}^{-1}$  spectral region were monitored by prfs VIS-IR spectroscopy at a spectral resolution of  $1.5\text{ cm}^{-1}$  and a time resolution better than 400 fs, sufficient to resolve sample heterogeneities and dynamics on the time scale believed to govern the  $S_1$ - $S_0$  transition.

## RESULTS AND DISCUSSION

Structural changes initiated by the photoexcitation are reflected in changes in the chromophores' vibrational spectrum. Upon excitation, isotropic transient absorption signals  $A_{\text{iso}}$  were determined by the absorption signals with parallel  $A_{\parallel}$  and perpendicular  $A_{\perp}$  polarization, with respect to the pump pulse polarization according to  $A_{\text{iso}} = (A_{\parallel} + 2A_{\perp})/3$ . All transients were best fitted by a biexponential decay of  $(4.7 \pm 1.4)$  ps and  $(30 \pm 5)$  ps.<sup>8,15,29-31</sup> The error margins represent  $1\sigma$  standard deviations as determined by exhaustive search analysis (ExSeAn).<sup>39</sup>

In Figure 2(a), the ground state recovery at  $1631\text{ cm}^{-1}$  represents signals of the PCB delocalized mode comprising the  $C_{15}=C_{16}$  methine bridge and the  $C_{17}=C_{18}$  double bond of the D ring,<sup>29</sup> superimposed with signals from  $^{13}\text{C}$  labeled carbonyl modes of the protein. Frequencies above  $1670\text{ cm}^{-1}$  originate exclusively from chromophore  $\nu(\text{C}=\text{O})$  stretching vibrations. The decay of the  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^*$  stretching vibration of ring D in the electronically excited state of Pr (Fig. 2(a)) has its maximum at  $1680\text{ cm}^{-1}$  and is red-shifted with respect to its ground state absorption.<sup>10,27,40</sup> The decay is dominated by the 30 ps time constant (80%). Two distinct bleaching signals of the  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})$  stretching vibration in the Pr ground state, at  $1701\text{ cm}^{-1}$  and  $1708\text{ cm}^{-1}$ , are presented in Figure 2(b). The  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O}^a)$  bleaching signal at  $1701\text{ cm}^{-1}$  has only a negligible 4.7 ps contribution of 5% (Fig. S3(b)),<sup>41</sup> while the  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O}^b)$  bleaching signal at  $1708\text{ cm}^{-1}$  exhibits a pronounced 4.7 ps contribution of 30%. The bleaching recovery at 100 ps is more than seven times greater for  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O}^b)$  than for  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O}^a)$ .<sup>41</sup> Since the difference between the time constants of the two bleaching bands cannot originate from overlap with

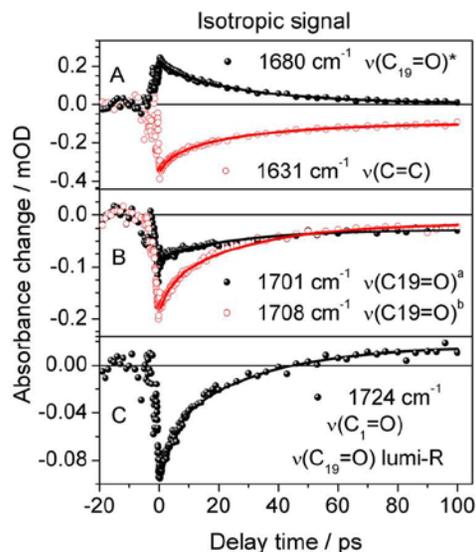


FIG. 2. Transient dynamics at frequency positions of marker bands calculated for isotropic conditions. (a) Bleaching signal of  $\nu(\text{C}_{15}=\text{C}_{16})$  and  $\nu(\text{C}_{17}=\text{C}_{18})$  stretching vibrations (open red circles), absorption of  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^*$  stretching vibration in the electronically excited state. (b) Bleaching signals of  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O}^a)$  and  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O}^b)$  stretching vibrations in the Pr state (solid and open red circles, respectively). (c) Bleaching signal of  $\nu(\text{C}_1=\text{O})$  stretching vibration and  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})$  absorption of lumi-R.

the  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^*$  vibrational band of Pr, two distinct  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})$  vibrations must exist, resulting from at least two different chromophore ground state geometries in Cph1 $\Delta$ 2.<sup>34</sup> Additional support is given by the analysis of the perturbed free induction decay (PFID) signal.<sup>41</sup> The exponential rise of the PFID signal is related to the Lorentzian line width of the absorption band as its Fourier transform.<sup>42–44</sup> The optimal fit gives a dephasing time constant of  $\tau_{\text{dep}} = 1620$  fs with a  $1\sigma$  error margin from 1350 fs to 2000 fs (Fig. S1).<sup>41</sup> This translates to a Lorentzian line width range of  $6\text{ cm}^{-1}$  to  $8\text{ cm}^{-1}$ . Given this line width the bleaching band at  $\sim 1705\text{ cm}^{-1}$  in the decay associated spectrum (DAS) at time zero (Fig. 4) cannot be explained by a single absorption band, but can well be simulated with two absorption bands at  $1701\text{ cm}^{-1}$  and  $1708\text{ cm}^{-1}$ . Exhaustive search analysis of the positions of the two absorption bands shows that their frequencies exhibit distinct values (Fig. S2).<sup>41</sup> Analysis of the polarization resolved DAS (Fig. 4) provides relative angles between the vibrational transition dipole moments of these two vibrations with the electronic transition dipole moment (tdm) of the  $S_0 \rightarrow S_1$  transition. We find distinct angles of  $29^\circ$  and  $16^\circ$  for  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^a$  and  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^b$ , respectively. The frequency position of the  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})$  vibrational band of PCB was reported to be in the spectral region of  $1696\text{ cm}^{-1}$  to  $1707\text{ cm}^{-1}$ .<sup>10,27,30,45,46</sup> In previous studies, no direct indications for two  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})$  vibrational bands had been reported.<sup>29</sup> With our higher spectral resolution of  $1.5\text{ cm}^{-1}$  and the time resolved spectroscopic method, we are able to assign two distinct vibrational bands located at  $1701\text{ cm}^{-1}$  and  $1708\text{ cm}^{-1}$ , each having a width of  $8\text{ cm}^{-1}$ . Those frequency positions are known to result from the  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})$  stretching vibration in the presence or absence of a hydrogen bond, respectively.<sup>10</sup> However, hot ground states or hot electronic excited states would contribute as positive signals with the same relative angles as the ground state or electronic excited state, respectively.<sup>47</sup> Hence, neither a hot ground state nor a hot electronic excited state contribution can account for the negative signal at  $1701\text{ cm}^{-1}$  with a relative angle of  $29^\circ$ . Additionally, careful analysis of the data show that the second bleaching band signal at  $1701\text{ cm}^{-1}$  cannot originate from overlapping of the electronic excited state signal and the ground state bleaching signal (Fig. S8).<sup>41</sup>

Thus, these findings demonstrate the heterogeneity of the chromophore structure in phytochromes<sup>12,14,34,48–51</sup> and shed new light on the analysis of phytochrome infrared spectra in the spectral region around  $1700\text{ cm}^{-1}$ .

As it turns out, the crystal structure exhibits only the hydrogen bonded chromophore geometry PCB<sup>a</sup> (Fig. 6(a)).<sup>1</sup> Thus, we modeled the second chromophore geometry (Fig. 6(b)), which exhibits a  $\nu(\text{C}^{19}=\text{O}^b)$  vibrational tdm vector more parallel to the  $\mu_{\text{el}}$  ( $16^\circ$ ), than the PCB<sup>a</sup> geometry ( $29^\circ$ ). We rotate ring D to the  $\beta$  facial chromophore side and optimized the geometry by density functional theory (DFT). In this position, the  $\text{C}_{19}=\text{O}$  group of ring D is not able to form a hydrogen bond. Calculations show a small frequency blue shift of  $1\text{ cm}^{-1}$  (Table I), while experiments provide a frequency blue shift of a  $7\text{ cm}^{-1}$ . This is due to the missing hydrogen bond of the more planar geometry PCB<sup>b</sup>.

TABLE I. Assignment of vibrational modes, their experimental frequencies  $\nu_{\text{exp}}$ , their calculated frequencies  $\nu_{\text{calc}}$ , their experimental angles  $\theta_{\text{exp}}$  relative to the excited electronic tdm,  $1\sigma$  angle error ranges, calculated angles  $\theta_{\text{calc}}$  relative to the excited electronic tdm. Chromophore geometries are given.

Vibrational mode	$\nu_{\text{exp}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\nu_{\text{calc}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\theta_{\text{exp}}$ ( $^\circ$ )	$1\sigma$ ( $^\circ$ )	$\theta_{\text{calc}}$ ( $^\circ$ )	Geom.
Pr $\mu_{\text{C}_{19}=\text{O}}^*$	1680	...	30	27–33	...	ZZZssa
Pr $\mu_{\text{C}_{19}=\text{O}}^a$	1701	1709	29	12–46	21.3	ZZZssa
Pr $\mu_{\text{C}_{19}=\text{O}}^b$	1708	1710	16	6–25 <sup>a</sup>	11.6	ZZZssa
Pr $\mu_{\text{C}_{1}=\text{O}}^*$	1715	...	60	48–72	...	ZZZssa
Pr $\mu_{\text{C}_{1}=\text{O}}$	1724	1719	43	36–50	42.4	ZZZssa
Lumi-R $\mu_{\text{C}_{19}=\text{O}}$	1718	1707	54 <sup>b</sup>	46–58	61	ZZEssa

<sup>a</sup>Error range determined by combination of a covariance method and polarization resolved perturbed free induction decay measurements.

<sup>b</sup>Lumi-R angle calculated from DAS offset contribution (Fig. S4).<sup>41</sup>

At  $1724\text{ cm}^{-1}$ , the ground state recovery of the  $\nu(\text{C}_1=\text{O})$  vibration of ring A is detected (Fig. 2(c)).<sup>10,45</sup> Here, we see the strongest contribution of the fast 4.7 ps time constant (40%). The bleaching signal is superimposed with lumi-R photoproduct absorption that arises after 40 ps.<sup>29,31</sup> Since ring A is not involved in the photoisomerization process, the fast 4.7 ps time constant is attributed to a deactivation pathway.<sup>27,29,30</sup>

Polarization resolved transients provide information on the angle between the  $S_0$ - $S_1$  electronic transition dipole moment vector ( $\mu_{\text{el}}$ ) and the probed vibrational transition dipole moment vectors ( $\mu_{\text{vib}}$ ). As depicted in Figs. 3(a)–3(c), all three bleaching bands exhibit different dichroic ratios (DRs), which are the ratios of parallel and perpendicular absorption signals ( $\text{DR} = A_{\parallel}/A_{\perp}$ ). From the dichroic ratio DR, the angle  $\theta$  between  $\mu_{\text{el}}$  and  $\mu_{\text{vib}}$  can be calculated as  $\theta = \arccos[(2\text{DR} - 1)/(\text{DR} + 2)]^{1/2}$ .

Since some of the bleaching transients are partially superimposed on vibrational bands of the electronically excited state, the angles given in Figure 3 provide only a reasonable estimate. A more precise determination can be made from the DAS at time zero. The DAS spectra at time zero for each polarization are presented in Fig. 4. These are derived by biexponential global fits of the transients, and simulated with a sum of five Lorentzian line shapes.<sup>41</sup> The time constants, positions, linewidths, and heights of  $\nu(\text{C}=\text{O})$  vibrational bands used for the polarization resolved DAS simulation were obtained by exhaustive search analysis of the complete set of measured data at isotropic polarization, including perturbed free induction decay analysis. The frequency position of the ring A  $\nu(\text{C}_1=\text{O})$  vibrational bleaching band is found at  $1724\text{ cm}^{-1}$  with a width of  $8\text{ cm}^{-1}$  (FWHM).

In the electronically excited state, absorption bands are centered at  $1715\text{ cm}^{-1}$  and  $1680\text{ cm}^{-1}$  for the  $\nu(\text{C}_1=\text{O})^*$  and  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^*$  vibrations, respectively.<sup>27,30,41</sup> The  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^*$  vibration is most strongly influenced by the electronic excitation and exhibits an absorption line width of  $27\text{ cm}^{-1}$  (FWHM) with pronounced transient signals. In contrast, the absorption band

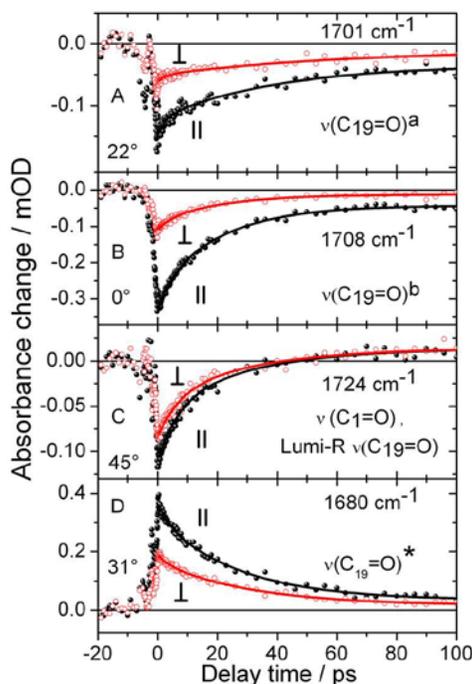


FIG. 3. Polarization resolved transients for parallel (||) and perpendicular ( $\perp$ ) probe polarization, with respect to the pump pulse polarization. Angles are calculated at a 0.5 ps delay time from the dichroic ratio DR. (a) Ring D  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})$  stretch vibration in PCB geometry a; (b) Ring D  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})$  stretch vibration in PCB geometry b; (c) Ring A  $\nu(\text{C}_1=\text{O})$  stretch vibration and Ring D  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})$  stretch vibration of lumi-R; (d) Ring D  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^*$  stretch vibration in the electronically excited state. Reproduced with permission from Yang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 1408–1411 (2012). Copyright 2012 American Chemical Society.

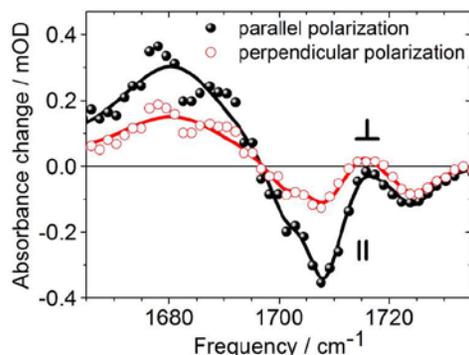


FIG. 4. Decay associated spectrum at time zero and simulation for polarizations parallel (||) and perpendicular (⊥) to the pump pulse polarization. The DAS at time zero is the sum of all DAS components. Negative peak at  $1724\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}_1=\text{O})$  stretching vibration; positive signals around  $1715\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}_1=\text{O})^*$  stretching vibration in the electronically excited state; negative peak at  $1708\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^b$  stretching vibration; shoulder at  $1701\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^a$  stretching vibration; positive peak at  $1680\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^*$  stretching vibration.

of the  $\nu(\text{C}_1=\text{O})^*$  vibration exhibits a very small signal and is located at  $1715\text{ cm}^{-1}$  with a line width of  $8\text{ cm}^{-1}$  FWHM (Fig. S3).<sup>41</sup> The  $\nu(\text{C}_1=\text{O})^*$  vibration is only detectable by its dichroic ratio, which is below one and results in a positive peak in the spectrum for perpendicular polarization at around  $1715\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 4). The small contribution of the  $\nu(\text{C}_1=\text{O})^*$  vibration to the signal is attributed to weak anharmonic coupling, which is made possible by negligible structural change in ring A during photoisomerization.<sup>29</sup>

Analysis of polarization resolved DAS spectra at time zero yields the angles between  $\mu_{\text{el}}$  and the investigated vibrational tdm (Table I). Additionally, the angle ( $\mu_{\text{el}}$ ,  $\mu_{\text{C}_{19}=\text{O}^*}$ ) between the  $S_0$ - $S_1$  tdm and the  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^*$  stretching vibrational tdm was analyzed by ExSeAn and an angle of  $30^\circ$  ( $1\sigma$  range of  $18^\circ$  to  $42^\circ$ ) was determined. Error margins given in Table I were derived by the covariance matrix method. All determined angles are compatible with the values directly deduced from the kinetic traces, except the angle ( $\mu_{\text{el}}$ ,  $\mu_{\text{C}_1=\text{O}^*}$ ), which is not observable in the transients.

The polarization resolved decay of the  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})$  vibration in both its electronically excited state and its ground state is presented in Figs. 5(a) and 5(b) on a logarithmic scale. While the two decaying polarization resolved transients of the  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^b$  bleaching band in Fig. 5(a) show identical slopes, the slopes of the two polarization resolved transients for the  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^*$  stretching band in the electronically excited state are different (Fig. 5(b)). This was interpreted as ring D orientational change in the electronic excited state to the transition state ( $90^\circ$  twist) with a time constant of 30 ps and a quantum yield of about 16%.<sup>52</sup> The time dependent dichroic ratio change (Fig. 5(c)) shows a negligible increase up to 3 ps, followed by a decrease on the time scale of tens of picoseconds. The average angle increases steadily up to 30 ps, supporting the argument that the fast time component of 4.7 ps is associated with C=C bond order reduction, a prerequisite for ring D rotation, and relaxation processes that lead to the initial ground state.<sup>27,30,31</sup>

Thus, our data support an isomerization mechanism with a single isomerization around the  $\text{C}_{15}=\text{C}_{16}$  double bond via a strongly twisted transition state.<sup>5</sup> An isomerization mechanism including an additional rotation around the  $\text{C}_{14}-\text{C}_{15}$  single bond in the electronically excited state would result in negligible dichroic ratio changes and is therefore less likely.<sup>13,15,53</sup> The initial negligible increase of the dichroic signal (Fig. 5(c)) over time, followed by a delayed dichroic signal decrease can be explained by two models: (I) Ring D rotates away from His290 to smaller twisting angles (clockwise rotation) for PCB<sup>a</sup> chromophore geometries with  $\alpha$ -facial disposition,<sup>2</sup> while the non-isomerizing PCB<sup>b</sup> chromophores with  $\beta$ -facial disposition rattle around their average orientation. The  $\alpha$ -facial disposition is defined by ring D lying on the  $\alpha$ -face of the coplanar B- and C-rings.<sup>2</sup> This implies ring D to be located on the  $\beta$ -facial side after isomerization, in contrast to the Pfr structure reported by Song *et al.*<sup>34</sup> on Cph1. (II) A

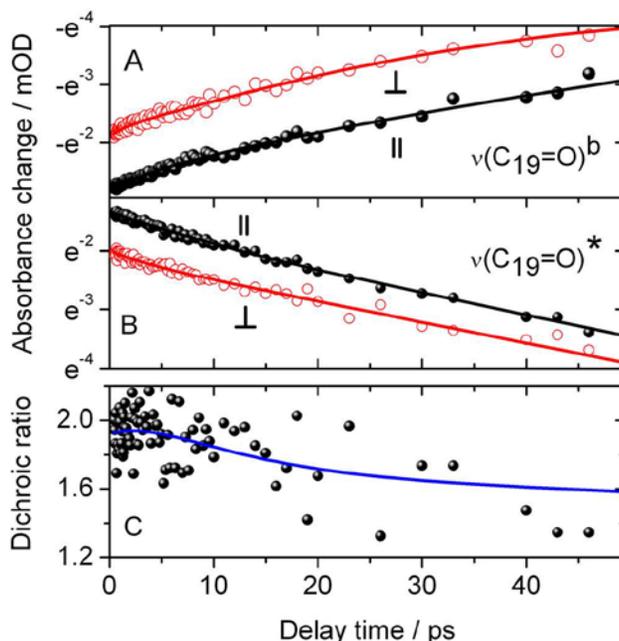


FIG. 5. Polarization resolved transient signals and simulations of the  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})$  stretching vibration. (a)  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^b$  vibration in the Pr ground state plotted on a logarithmic scale: Identical slopes for parallel (||) and perpendicular ( $\perp$ ) polarization indicate no change in dichroic behavior. (b)  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^*$  vibration in the Pr excited state plotted on a logarithmic scale: Transient for parallel polarization (||) exhibits a steeper slope than that for perpendicular ( $\perp$ ) polarization, demonstrating a change to greater angles. (c) DR calculated by the data (circles) and simulations (blue line) of the  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^*$  vibrational data presented in (b). The simulation shows a negligible increase up to 3 ps, followed by a decrease on the time scale of tens of picoseconds. Reproduced with permission from Yang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 1408–1411 (2012). Copyright 2012 American Chemical Society.

significant part of the PCB<sup>a</sup> chromophores with  $\alpha$ -facial disposition show counter-clockwise rotation of ring D, thereby slowly passing His290 resulting in a slow dichroic decrease. Another part of PCB<sup>a</sup> chromophores with  $\beta$ -facial disposition rotate clockwise to smaller twisting angles on a faster time scale, but do not isomerize, thereby increasing the dichroic ratio (Fig. 5(c)). Non-isomerizing PCB<sup>b</sup> chromophores rattle around their average orientation and decay to the ground state. This implies ring D to be located on the  $\alpha$ -facial side after isomerization, in agreement with the Pfr structure presented by Song *et al.*<sup>34</sup> on Cph1. This is the model we favor.

Combining measured relative angles for the Pr ground state (see Table I) with calculated angles, we are able to verify structural models of the chromophore in the protein binding pocket. The calculated angles of the ZZZssa structural model shown in Fig. 6 are in complete agreement with the experimentally determined ones (Table I).<sup>1,4</sup> The chromophore structures with orientation of ring D for PCB<sup>a</sup> and PCB<sup>b</sup> match very well with the Pr-II and Pr-I geometries reported by Song *et al.*,<sup>54</sup> respectively.

Lumi-R formation was estimated with a quantum yield of about 12% and an angle ( $\mu_{\text{el}}$ ,  $\mu_{\text{C}_{19}=\text{O}}$ ) of  $\pm 54^\circ$ , matching the calculated angle of  $61^\circ$  for the ZZEssa geometry shown in Fig. 6(c) (see also Figs. S4, S6, and S7).<sup>41</sup> From one relative angle alone one cannot determine whether lumi-R adopts a  $\alpha$ -facial or  $\beta$ -facial geometry of ring D. Circular dichroism (CD) experiments showed opposite rotational strengths of Pr and Pfr in the longest wavelength band, suggesting a reversal of chirality upon photoisomerization, and thus supporting model II.<sup>2,55,56</sup> But heterogeneity of Pr ground states complicate interpretation of CD spectra, since PCB<sup>a</sup> and PCB<sup>b</sup> geometries show opposite rotational strengths with a twofold calculated intensity strength for PCB<sup>a</sup> (Fig. S5).<sup>41</sup>

Using transients and difference spectra, the individual quantum yields of PCB<sup>a</sup> and PCB<sup>b</sup> geometries were determined.<sup>41</sup> The more planar PCB<sup>b</sup> geometry without hydrogen bonding

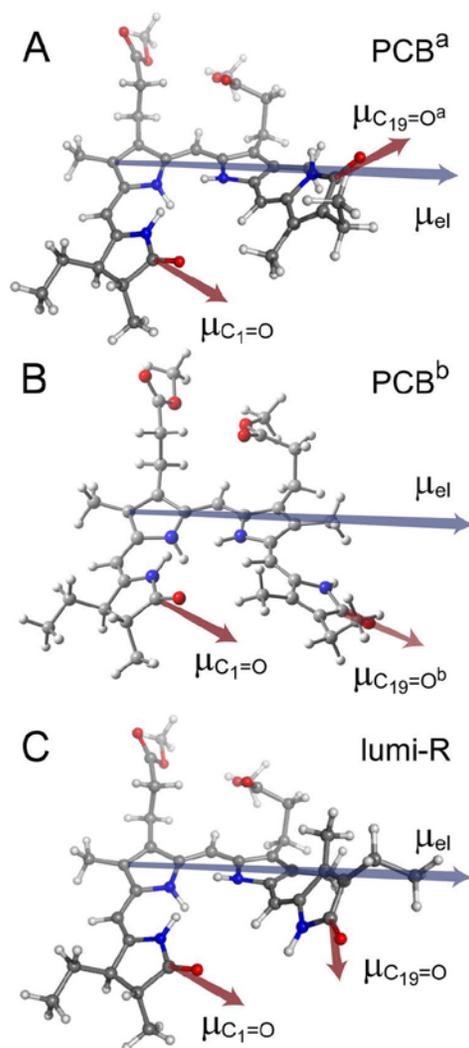


FIG. 6. Calculated PCB chromophore geometries with Pr  $S_0 \rightarrow S_1$  transition dipole moment  $\mu_{el}$  (black arrow) and vibrational tdm's of  $\nu(C_{19}=O)^a$  and  $\nu(C_1=O)$  (red arrows).  $\mu_{el}$  and  $\mu_{C_1=O}$  show negligible components in the z direction, in contrast to  $\mu_{C_{19}=O^a}$ . (a) PCB<sup>a</sup> geometry, (b) PCB<sup>b</sup> geometry, and (c) lumi-R geometry ( $\alpha$ -facial ring D position). Note, tdm arrows can point in either direction.

exhibits a ninefold lesser quantum yield of 3%, and has a twofold population as compared to the hydrogen bonded PCB<sup>a</sup> geometry with quantum yield of 29%. This indicates that pre-twisting of ring D in the electronic ground state via a single hydrogen bond increases the quantum yield for lumi-R formation significantly.

On the basis of the Cph1 crystal structure,<sup>1</sup> previously reported models,<sup>12,29,31,32</sup> and our data, we propose a detailed model for counter-clockwise Pr photoisomerization.<sup>2</sup> Photoexcitation of the chromophore to the electronically excited state  $S_1$  shifts the positive charge from ring B and ring C toward  $C_{14}=C_{15}$  methine bridge of ring D. Reduction of negative charge at ring D breaks the hydrogen bond between His290 and the ring D  $C_{19}=O$  group.<sup>12,31</sup> This enables His290 to move away and open the door for counter-clockwise rotation of ring D. Additionally, the positive charge at  $C_{14}=C_{15}$  methine bridge alters the hydrogen bond of the water between ring B and ring C, and the hydrogen bond of amino acids Asp207 and Tyr263 in the vicinity of rings C and D. Changes in the hydrogen bond network can induce displacement of Asp207 and Tyr263 reducing steric hindrance for counter-clockwise rotation of

PCB<sup>a</sup> ring D with  $\alpha$ -facial disposition.<sup>1,34</sup> Tyr176 is not directly involved in a hydrogen bond network in the Pr state, but is expected to induce steric hindrance for clockwise rotation of PCB<sup>b</sup> ring D with  $\beta$ -facial disposition.<sup>1</sup> In the electronically excited state, the double bond character of the C<sub>14</sub>=C<sub>15</sub> methine bridge is reduced, and potential energy from the distorted chromophore ring D is transformed to rotational energy. A part of the PCB<sup>a</sup> chromophores passes His290, rotate counter-clockwise to the transition state, and isomerizes, while the remaining PCB<sup>a</sup> chromophores rotate clockwise, do not overcome the potential barriers, and relax back to the ground state.

Only about 3% of the chromophores with PCB<sup>b</sup> geometry overcome the potential barrier in the electronic excited state and isomerize to lumi-R (Figs. 7(a) and 7(b), blue lines), while 97% relax back to the Pr ground state.

Whether the two Pr isoforms PCB<sup>a</sup> and PCB<sup>b</sup> undergo interconversion between the silent and the active forms can be tested by temperature dependent measurements.

Rotation of ring D to a more planar geometry is suggested by a dichroic ratio increase in the  $\nu(\text{C}_{19}=\text{O})^*$  vibrational band within the first 3 ps (Fig. 5(c)) and a fluorescence red-shift on the same timescale.<sup>31</sup> A more planar geometry between ring C and ring D reduces the strain in the C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>=C<sub>16</sub> moiety and induces dramatic changes in the C<sub>15</sub>-H hydrogen out of plane mode due to increased steric interaction between ring C and ring D within the first picoseconds, as also reported by femtosecond time resolved Raman experiments.<sup>29</sup> Intramolecular steric interactions between the C<sub>13</sub> methyl of ring C and the N-H of ring D prevent planarity of the C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>=C<sub>16</sub> moiety, resulting in a barrier in the electronic excited state (Fig. 7).<sup>14,31,32</sup> In most cases, the rotational energy of the chromophores is too low to pass the potential barrier separating the two geometries. PCB<sup>a</sup> chromophores passing His290 experience a shallow excited state potential surface allowing ring D rotation to higher distortion angles and the formation of a transition state in which ring D is twisted by 90°. The increase in distortion angle of ring D is reflected by the decrease in dichroic ratio over time (Fig. 5(c)). After passing the His290, changes in the C<sub>15</sub>-H hydrogen out of plane mode due to steric interaction between ring C and ring D are negligible.<sup>29</sup> As a result of the shallow excited state potential energy surface ring D rotation occurs on a time scale of tens of ps. From there, relaxation to the electronic ground state Pr is observed with the same time constant as lumi-R formation (30 ps).<sup>29,31,52</sup>

PCB<sup>b</sup> chromophores without a hydrogen bond to His290 exhibit a more planar geometry and lower potential energy on the excited state surface as presented in Figure 7, resulting in a lower probability for reaching the transition state and forming lumi-R. As depicted in Figure 7,

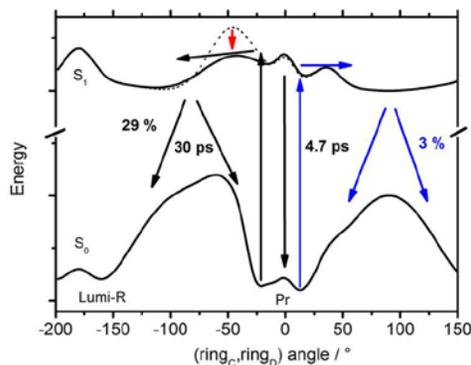


FIG. 7. Schematic potential energy surface as a function of the angle between ring C and ring D plane for model II. Reaction pathways (black arrows) and quantum yields (black numbers) of PCB<sup>a</sup>. Time constants are given for both PCB geometries. PCB<sup>b</sup> reaction pathways (blue arrows) and quantum yields (blue numbers). Excitation of PCB<sup>b</sup> (blue arrow) show small excess energies too low to overcome the barriers efficiently. After PCB<sup>a</sup> excitation to the S<sub>1</sub> state (black arrow) the hydrogen bond to His290 breaks and His290 moves away, resulting in a potential barrier reduction (red arrow). The PCB<sup>a</sup> chromophores are able to rotate counter-clockwise to the twisted transition state with a  $-90^\circ$  distortion angle. With a quantum yield of 29% the forward reaction to lumi-R occurs. Only a small fraction (3%) of the chromophores with PCB<sup>b</sup> geometry overcomes the barrier and photoisomerizes to a photoproduct.

the stronger the pre-twisting the higher the potential energy and the higher the lumi-R quantum yield.<sup>3,4</sup> Consequently, phytochromes with amino acids blocking the space needed for ring D rotation, as shown for the Cph1-Y263F mutant,<sup>60</sup> or in which ring D is fixed with additional hydrogen bonds, would exhibit a reduced quantum yield for lumi-R formation. Such observations have been reported by other groups, thus corroborating our model.<sup>27,28,53,57,60</sup>

## CONCLUSION

In Cph1 phytochrome, Pr photoisomerization and rotation of ring D occurs in the electronic excited state via a 90° twisted transition state with a time constant of  $30 \pm 5$  ps. A sixfold faster relaxation time constant of  $4.7 \pm 1.4$  ps is also present. This would normally lead to a poor quantum yield. However, heterogeneity, that is, two possible chromophore geometries PCB<sup>a</sup> and PCB<sup>b</sup>, leads to two photoreactions with differing efficiencies. We identified PCB<sup>a</sup> and PCB<sup>b</sup> geometries with distinct quantum yields of 29% and 3%, respectively. The PCB<sup>a</sup> and PCB<sup>b</sup> geometries match the Pr-II and Pr-I geometries determined by NMR studies, respectively.<sup>37</sup> PCB<sup>a</sup> (Pr-II) has a strongly pre-twisted ring D geometry induced by a hydrogen bond between ring D's carbonyl group and His290. The pre-twisting of PCB<sup>a</sup> (Pr-II) allows a higher potential energy in the electronic excited state to be reached, permitting potential barriers induced by steric hindrance to be overcome. This chromophore geometry exhibits a ninefold higher quantum yield than PCB<sup>b</sup> (Pr-I), but a sixfold longer time constant of  $30 \pm 5$  ps. The high quantum yield in combination with a long time constant is very unusual for photoreceptors.

This demonstrates an alternative evolutionary strategy to improve photoreactions. Pre-twisting of the chromophore by strong steric interactions and hydrogen bonding in the ground and electronic excited states enhance the photoreaction quantum yield by separating reaction pathways for differing geometries in the electronic excited state. This mechanism optimizes yields of slow photoreactions by large structural rearrangements and provides a scaffold for photoreceptor engineering.

## METHODS

Pump and probe pulses were generated using nonlinear optical methods. By difference frequency mixing in various steps, we obtained mid-IR pulses of 200 fs (FWHM) or shorter at a repetition rate of 1.088 kHz. Simultaneously, laser pulses of 200 fs duration at 660 nm were generated and used to photoexcite the sample in the absorption maximum of the Pr form, thus initiating the photoreaction (Fig. 1). Photoselection experiments were performed using focal pump pulse diameters of 500  $\mu\text{m}$ , sample thicknesses of 50  $\mu\text{m}$ , focal probe pulse diameters of 180  $\mu\text{m}$ , and pump pulse energies of 30 nJ. This results in excitation coefficients of below 3% and in relative signal strengths in agreement with electronic extinction coefficient of PCB ( $\sim 82\,000$  (Mcm)<sup>-1</sup>) and extinction coefficient of C=O stretching vibrations ( $\sim 2000$  (Mcm)<sup>-1</sup>). The transient absorption was simultaneously probed by two mid-IR pulses with polarizations oriented parallel and perpendicular, with respect to the pump pulse polarization at various delay times.<sup>47</sup> Probe pulses were dispersed with an imaging spectrograph and recorded with a  $2 \times 32$  element MCT array detector. We prepared the <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N labeled Cph1 $\Delta 2$  phytochrome holoprotein (non-labelled PCB chromophore) in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O solution at an optical density of 0.4 optical density at 660 nm, as described previously.<sup>9,41,43,48,51,58,59</sup> Background illumination at wavelengths longer than 715 nm ensures that the sample remains in the Pr form. The high repetition rate requires that the sample be moved across the focused laser beams with a Lissajous sample cell in order to avoid multiple excitation of a specific sample volume. For comparison, the vibrational tdm's were determined theoretically at the B3LYP/6-31G(d) level of theory. The structures of the different chromophores were obtained as described.<sup>41</sup>

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 1078, TP B3). We thank MPI-Halle and the Computing Center at the FUB (ZEDAT) for support.

- <sup>1</sup>L. O. Essen, J. Mailliet, and J. Hughes, "The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 14709–14714 (2008).
- <sup>2</sup>N. C. Rockwell, L. Shang, S. S. Martin, and J. C. Lagarias, "Distinct classes of red/far-red photochemistry within the phytochrome superfamily," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 6123–6127 (2009).
- <sup>3</sup>J. R. Wagner, J. S. Brunzelle, K. T. Forest, and R. D. Vierstra, "A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome," *Nature* **438**, 325–331 (2005).
- <sup>4</sup>J. Hughes, "Phytochrome three-dimensional structures and functions," *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 710–716 (2010).
- <sup>5</sup>N. C. Rockwell, Y. S. Su, and J. C. Lagarias, "Phytochrome structure and signaling mechanisms," *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 837–858 (2006).
- <sup>6</sup>N. C. Rockwell and J. C. Lagarias, "The structure of phytochrome: A picture is worth a thousand spectra," *Plant Cell* **18**, 4–14 (2006).
- <sup>7</sup>R. A. Matute, R. Contreras, G. Pérez-Hernández, and L. González, "The chromophore structure of the cyanobacterial phytochrome Cph1 as predicted by time-dependent density functional theory," *J. Phys. Chem. B* **112**, 16253–16256 (2008).
- <sup>8</sup>J. J. van Thor, K. L. Ronayne, and M. Towrie, "Formation of the early photoproduct Lumi-R of cyanobacterial phytochrome Cph1 observed by ultrafast mid-infrared spectroscopy," *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 126–132 (2007).
- <sup>9</sup>J. Hahn, H. M. Strauss, and P. Schmieder, "Heteronuclear NMR investigation on the structure and dynamics of the chromophore binding pocket of the cyanobacterial phytochrome Cph1," *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11170–11178 (2008).
- <sup>10</sup>H. Foersterdorf, C. Benda, W. Gartner, M. Storf, H. Scheer, and F. Siebert, "FTIR studies of phytochrome photoreactions reveal the C=O bands of the chromophore: Consequences for its protonation states, conformation, and protein interaction," *Biochemistry* **40**, 14952–14959 (2001).
- <sup>11</sup>F. Siebert, R. Grimm, W. Rudiger, G. Schmidt, and H. Scheer, "Infrared-spectroscopy of phytochrome and model pigments," *Eur. J. Biochem.* **194**, 921–928 (1990).
- <sup>12</sup>K. Heyne, J. Herbst, D. Stehlik, B. Esteban, T. Lamparter, J. Hughes, and R. Diller, "Ultrafast dynamics of phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*, reconstituted with phycocyanobilin and phycoerythrobilin," *Biophys. J.* **82**, 1004–1016 (2002).
- <sup>13</sup>J. Matysik, P. Hildebrandt, W. Schlamann, S. E. Braslavsky, and K. Schaffner, "Fourier-transform resonance Raman spectroscopy of intermediates of the phytochrome photocycle," *Biochemistry* **34**, 10497–10507 (1995).
- <sup>14</sup>V. A. Sineshchekov, "Photobiophysics and photobiochemistry of the heterogeneous phytochrome system," *Bba-Bioenergetics* **1228**, 125–164 (1995).
- <sup>15</sup>F. Andel, K. C. Hasson, F. Gai, P. A. Anfinrud, and R. A. Mathies, "Femtosecond time-resolved spectroscopy of the primary photochemistry of phytochrome," *Biospectroscopy* **3**, 421–433 (1997).
- <sup>16</sup>H. Ihee, S. Rajagopal, V. Srajer, R. Pahl, S. Anderson, M. Schmidt, F. Schotte, P. A. Anfinrud, M. Wulff, and K. Moffat, "Visualizing reaction pathways in photoactive yellow protein from nanoseconds to seconds," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 7145–7150 (2005).
- <sup>17</sup>D. Polli, P. Altoe, O. Weingart, K. M. Spillane, C. Manzoni, D. Brida, G. Tomasello, G. Orlandi, P. Kukura, R. A. Mathies, M. Garavelli, and G. Cerullo, "Conical intersection dynamics of the primary photoisomerization event in vision," *Nature* **467**, 440–443 (2010).
- <sup>18</sup>J. Herbst, K. Heyne, and R. Diller, "Femtosecond infrared spectroscopy of bacteriorhodopsin chromophore isomerization," *Science* **297**, 822–825 (2002).
- <sup>19</sup>K. Heyne, O. F. Mohammed, A. Usman, J. Dreyer, E. T. J. Nibbering, and M. A. Cusanovich, "Structural evolution of the chromophore in the primary stages of trans/cis isomerization in photoactive yellow protein," *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 18100–18106 (2005).
- <sup>20</sup>A. Usman, O. F. Mohammed, K. Heyne, J. Dreyer, and E. T. J. Nibbering, "Excited state dynamics of a PYP chromophore model system explored with ultrafast infrared spectroscopy," *Chem. Phys. Lett.* **401**, 157–163 (2005).
- <sup>21</sup>K. Heyne, J. Herbst, B. Dominguez-Herradon, U. Alexiev, and R. Diller, "Reaction control in bacteriorhodopsin: Impact of arg82 and asp85 on the fast retinal isomerization, studied in the second site revertant arg82ala/gly231cys and various purple and blue forms of bacteriorhodopsin," *J. Phys. Chem. B* **104**, 6053–6058 (2000).
- <sup>22</sup>P. Hamm, M. Zurek, T. Roschinger, H. Patzelt, D. Oesterhelt, and W. Zinth, "Femtosecond spectroscopy of the photoisomerisation of the protonated Schiff base of all-trans retinal," *Chem. Phys. Lett.* **263**, 613–621 (1996).
- <sup>23</sup>S. Schenkl, F. van Mourik, G. van der Zwan, S. Haacke, and M. Chergui, "Probing the ultrafast charge translocation of photoexcited retinal in bacteriorhodopsin," *Science* **309**, 917–920 (2005).
- <sup>24</sup>Q. Wang, R. W. Schoenlein, L. A. Peteanu, R. A. Mathies, and C. V. Shank, "Vibrationally coherent photochemistry in the femtosecond primary event of vision," *Science* **266**, 422–424 (1994).
- <sup>25</sup>J. Döbler, W. Zinth, W. Kaiser, and D. Oesterhelt, "Excited-state reaction dynamics of bacteriorhodopsin studied by femtosecond spectroscopy," *Chem. Phys. Lett.* **144**, 215–220 (1988).
- <sup>26</sup>H. Kandori, Y. Shichida, and T. Yoshizawa, "Photoisomerization in rhodopsin," *Biochemistry-Moscow+* **66**, 1197–1209 (2001).
- <sup>27</sup>K. C. Toh, E. A. Stojkovic, A. B. Rupenyan, I. H. M. van Stokkum, M. Salumbides, M.-L. Groot, K. Moffat, and J. T. M. Kennis, "Primary reactions of bacteriophytochrome observed with ultrafast mid-infrared spectroscopy," *J. Phys. Chem. A* **115**, 3778–3786 (2011).
- <sup>28</sup>K. C. Toh, E. A. Stojkovic, I. H. M. van Stokkum, K. Moffat, and J. T. M. Kennis, "Proton-transfer and hydrogen-bond interactions determine fluorescence quantum yield and photochemical efficiency of bacteriophytochrome," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 9170–9175 (2010).
- <sup>29</sup>J. Dasgupta, R. R. Frontiera, K. C. Taylor, J. C. Lagarias, and R. A. Mathies, "Ultrafast excited-state isomerization in phytochrome revealed by femtosecond stimulated Raman spectroscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 1784–1789 (2009).
- <sup>30</sup>C. Schumann, R. Gross, N. Michael, T. Lamparter, and R. Diller, "Sub-picosecond mid-infrared spectroscopy of phytochrome Agp1 from *Agrobacterium tumefaciens*," *Chemphyschem* **8**, 1657–1663 (2007).
- <sup>31</sup>M. G. Müller, I. Lindner, I. Martin, W. Gartner, and A. R. Holzwarth, "Femtosecond kinetics of photoconversion of the higher plant photoreceptor phytochrome carrying native and modified chromophores," *Biophys. J.* **94**, 4370–4382 (2008).

- <sup>32</sup>A. R. Holzwarth, E. Venuti, S. E. Braslavsky, and K. Schaffner, "The phototransformation process in phytochrome. 1. Ultrafast fluorescence component and kinetic-models for the initial Pr-]Pfr transformation steps in native phytochrome," *Biochim. Biophys. Acta* **1140**, 59–68 (1992).
- <sup>33</sup>H. Kandori, K. Yoshihara, and S. Tokutomi, "Primary process of phytochrome—Initial step of photomorphogenesis in green plants," *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10958–10959 (1992).
- <sup>34</sup>C. Song, G. Psakis, K. Langlois, J. Mailliet, W. Gärtner, J. Hughes, and J. Matysik, "Two ground state isoforms and a chromophore D-ring photoflip triggering extensive intramolecular changes in a canonical phytochrome," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 3842–3847 (2011).
- <sup>35</sup>A. H. Goller, D. Strehlow, and G. Hermann, "The excited-state chemistry of phycocyanobilin: A semiempirical study," *Chemphyschem* **6**, 1259–1268 (2005).
- <sup>36</sup>M. Bischoff, G. Hermann, S. Rentsch, D. Strehlow, S. Winter, and H. Chosrowjan, "Excited-state processes in phycocyanobilin studied by femtosecond spectroscopy," *J. Phys. Chem. B* **104**, 1810–1816 (2000).
- <sup>37</sup>C. Song, T. Rohmer, M. Tiersch, J. Zaanen, J. Hughes, and J. Matysik, "Solid-state NMR spectroscopy to probe photoactivation in canonical phytochromes," *Photochem. Photobiol.* **89**, 259–273 (2013).
- <sup>38</sup>M. Lim, T. A. Jackson, and P. A. Anfinrud, "Binding of CO to myoglobin from a heme pocket docking site to form nearly linear Fe-C-O," *Science* **269**, 962–966 (1995).
- <sup>39</sup>T. A. Roelofs, C. H. Lee, and A. R. Holzwarth, "Global target analysis of picosecond chlorophyll fluorescence kinetics from pea-chloroplasts—A new approach to the characterization of the primary processes in photosystem-II alpha-units and beta-units," *Biophys. J.* **61**, 1147–1163 (1992).
- <sup>40</sup>M. Theisen, M. Linke, M. Kerbs, H. Fidder, A. Madjet Mel, A. Zacarias, and K. Heyne, "Femtosecond polarization resolved spectroscopy: A tool for determination of the three-dimensional orientation of electronic transition dipole moments and identification of configurational isomers," *J. Chem. Phys.* **131**, 124511 (2009).
- <sup>41</sup>See supplementary material at <http://dx.doi.org/10.1063/1.4865233> for materials and methods, computational details, PFID analysis, analysis of spectral components, CD spectra, and Lumi-R quantum yield.
- <sup>42</sup>P. Hamm, "Coherent effects in femtosecond infrared-spectroscopy," *Chem. Phys.* **200**, 415–429 (1995).
- <sup>43</sup>K. Wynne and R. M. Hochstrasser, "The theory of ultrafast vibrational spectroscopy," *Chem. Phys.* **193**, 211–236 (1995).
- <sup>44</sup>P. Nuemberger, K. F. Lee, A. Bonvalet, T. Polack, M. H. Vos, A. Alexandrou, and M. Joffre, "Suppression of perturbed free-induction decay and noise in experimental ultrafast pump-probe data," *Opt. Lett.* **34**, 3226–3228 (2009).
- <sup>45</sup>J. J. van Thor, N. Fisher, and P. R. Rich, "Assignments of the Pfr-Pr FTIR difference spectrum of cyanobacterial phytochrome Cph1 using N-15 and C-13 isotopically labeled phycocyanobilin chromophore," *J. Phys. Chem. B* **109**, 20597–20604 (2005).
- <sup>46</sup>H. Foerendorf, T. Lamparter, J. Hughes, W. Gärtner, and F. Siebert, "The photoreactions of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*: A low-temperature UV-Vis and FT-IR spectroscopic study," *Photochem. Photobiol.* **71**, 655–661 (2000).
- <sup>47</sup>M. Linke, Y. Yang, B. Zienicke, M. A. S. Hammam, T. Von Haimberger, A. Zacarias, K. Inomata, T. Lamparter, and K. Heyne, "Electronic transitions and heterogeneity of the bacteriophytochrome Pr absorption band: An angle balanced polarization resolved femtosecond VIS pump-IR probe study," *Biophys. J.* **105**, 1756–1766 (2013).
- <sup>48</sup>M. H. Lim, T. A. Jackson, and P. A. Anfinrud, "Femtosecond near-IR absorbance study of photoexcited myoglobin: Dynamics of electronic and thermal relaxation," *J. Phys. Chem.-US* **100**, 12043–12051 (1996).
- <sup>49</sup>D. von Stetten, M. Gunther, P. Scheerer, D. H. Murgida, M. A. Mroginski, N. Krauss, T. Lamparter, J. Zhang, D. M. Anstrom, R. D. Vierstra, K. T. Forest, and P. Hildebrandt, "Chromophore heterogeneity and photoconversion in phytochrome crystals and solution studied by resonance Raman spectroscopy," *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **47**, 4753–4755 (2008).
- <sup>50</sup>V. Sineshchekov, A. Loskovich, N. Inagaki, and M. Takano, "Two native pools of phytochrome A in monocots: Evidence from fluorescence investigations of phytochrome mutants of rice," *Photochem. Photobiol.* **82**, 1116–1122 (2006).
- <sup>51</sup>M. Roben, J. Hahn, E. Klein, T. Lamparter, G. Psakis, J. Hughes, and P. Schmieder, "NMR spectroscopic investigation of mobility and hydrogen bonding of the chromophore in the binding pocket of phytochrome proteins," *Chemphyschem* **11**, 1248–1257 (2010).
- <sup>52</sup>K. Heyne and T. Rubin, *Messvorrichtung und Verfahren zur Untersuchung eines Probegases mittels Infrarot-Absorptionsspektroskopie* (H. GmbH, Germany, 2009).
- <sup>53</sup>A. J. Fischer and J. C. Lagarias, "Harnessing phytochrome's glowing potential," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 17334–17339 (2004).
- <sup>54</sup>K. Heyne, M. Hartmann, and K. Molkenthin, *Pulsshaper und Laser mit Pulsshaper* (F. U. Berlin, Germany, 2008).
- <sup>55</sup>B. Borucki, H. Otto, G. Rottwinkel, J. Hughes, M. P. Heyn, and T. Lamparter, "Mechanism of Cph1 phytochrome assembly from stopped-flow kinetics and circular dichroism," *Biochemistry* **42**, 13684–13697 (2003).
- <sup>56</sup>S. C. Björling, C.-F. Zhang, D. L. Farrens, P. S. Song, and D. S. Kliger, "Time-resolved circular dichroism of native oat phytochrome photointermediates," *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 4581–4588 (1992).
- <sup>57</sup>X. Yang, J. Kuk, and K. Moffat, "Conformational differences between the Pfr and Pr states in *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 15639–15644 (2009).
- <sup>58</sup>H. M. Strauss, J. Hughes, and P. Schmieder, "Heteronuclear solution-state NMR studies of the chromophore in cyanobacterial phytochrome Cph1," *Biochemistry* **44**, 8244–8250 (2005).
- <sup>59</sup>M. H. Lim, T. A. Jackson, and P. A. Anfinrud, "Modulating carbon monoxide binding affinity and kinetics in myoglobin: The roles of the distal histidine and the heme pocket docking site," *J. Biol. Inorg. Chem.* **2**, 531–536 (1997).
- <sup>60</sup>J. Mailliet, G. Psakis, K. Feilke, V. Sineshchekov, L.-O. Essen, and J. Hughes, "Spectroscopy and a high-resolution crystal structure of Tyr263 mutants of cyanobacterial phytochrome Cph1," *J. Mol. Biol.* **413**, 115–127 (2011).

## **Anhang D**

### **Non-Bonded Interactions Drive the Sub-Picosecond Bilin Photoisomerization in the Pfr State of Phytochrome Cph1**

Yang, Y, Heyne, K, Mathies, RA, Dasgupta, J

Chemphyschem. 2016 Feb;17(3):369-74;

DOI: 10.1002/cphc.201501073

<http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201501073>

## **Anhang E**

### **Electronic transitions and heterogeneity of the bacteriophytochrome Pr absorption band: An angle balanced polarization resolved femtosecond VIS pump – IR probe study**

Linke, M; Yang, Y; Zienicke, B; Hammam; MAS; Haimberger, T; Zacarias, A; Inomata, K;  
Lamparter, T; Heyne, K  
BIOPHYSICAL JOURNAL 2013, 105(8), p. 1756-66.  
DOI 10.1016/j.bpj.2013.08.041.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2013.08.041>

## **Anhang F**

### **Conformational heterogeneity of the Pfr chromophore in plant and cyanobacterial phytochromes**

Velazquez Escobar, F; von Stetten, D; Günther-Lütken, M; Keidel, A; Michael, N; Lamparter, T; Essen, LO; Hughes, J; Gärtner, W; Yang, Y; Heyne, K; Mroginski, MA; Hildebrandt, P  
Frontiers in molecular biosciences 2 (2015). P37  
DOI:10.3389/fmolb.2015.00037

This Document is Protected by copyright and was first published by Frontiers. All rights reserved. it is reproduced with permission

OPEN ACCESS

**Edited by:**

Tilo Mathes,  
Vrije Universiteit Amsterdam,  
Netherlands

**Reviewed by:**

Nathan C. Rockwell,  
University of California, Davis, USA  
Dalmar Larsen,  
University of California, Davis, USA

**\*Correspondence:**

Peter Hildebrandt,  
Institut für Chemie, Technische  
Universität Berlin, Sakr. PC14, Straße  
des 17. Juni 135, D-10623 Berlin,  
Germany  
hildebrandt@chem.tu-berlin.de

**†Present Address:**

David von Stetten,  
Structural Biology Group, European  
Synchrotron Radiation Facility,  
Grenoble, France

‡These authors have contributed  
equally to this work.

**Specialty section:**

This article was submitted to  
Biophysics,  
a section of the journal  
Frontiers in Molecular Biosciences

**Received:** 29 April 2015

**Accepted:** 22 June 2015

**Published:** 10 July 2015

**Citation:**

Velazquez Escobar F, von Stetten D,  
Günther-Lütken M, Keidel A, Michael  
N, Lamparter T, Essen L-O, Hughes J,  
Gärtner W, Yang Y, Heyne K,  
Mroginski MA and Hildebrandt P  
(2015) Conformational heterogeneity  
of the Pfr chromophore in plant and  
cyanobacterial phytochromes.  
*Front. Mol. Biosci.* 2:37.  
doi: 10.3389/fmolb.2015.00037

# Conformational heterogeneity of the Pfr chromophore in plant and cyanobacterial phytochromes

Francisco Velazquez Escobar<sup>1†</sup>, David von Stetten<sup>1†‡</sup>, Mina Günther-Lütken<sup>1</sup>, Anke Keidel<sup>1</sup>, Norbert Michael<sup>1</sup>, Tilman Lamparter<sup>2</sup>, Lars-Oliver Essen<sup>3</sup>, Jon Hughes<sup>4</sup>, Wolfgang Gärtner<sup>5</sup>, Yang Yang<sup>6</sup>, Karsten Heyne<sup>6</sup>, Maria A. Mroginski<sup>1</sup> and Peter Hildebrandt<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institut für Chemie, Technische Universität Berlin, Berlin, Germany, <sup>2</sup>Botanisches Institut, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Germany, <sup>3</sup>Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany, <sup>4</sup>Institut für Pflanzenphysiologie, Justus Liebig University, Gießen, Germany, <sup>5</sup>Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion, Mülheim, Germany, <sup>6</sup>Institut für Experimentalphysik, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

Phytochromes are biological photoreceptors that can be reversibly photoconverted between a dark and photoactivated state. The underlying reaction sequences are initiated by the photoisomerization of the tetrapyrrole cofactor, which in plant and cyanobacterial phytochromes are a phytochromobilin (PΦB) and a phycocyanobilin (PCB), respectively. The transition between the two states represents an on/off-switch of the output module activating or deactivating downstream physiological processes. In addition, the photoactivated state, i.e., Pfr in canonical phytochromes, can be thermally reverted to the dark state (Pr). The present study aimed to improve our understanding of the specific reactivity of various PΦB- and PCB-binding phytochromes in the Pfr state by analysing the cofactor structure by vibrational spectroscopic techniques. Resonance Raman (RR) spectroscopy revealed two Pfr conformers (Pfr-I and Pfr-II) forming a temperature-dependent conformational equilibrium. The two sub-states—found in all phytochromes studied, albeit with different relative contributions—differ in structural details of the C-D and A-B methine bridges. In the Pfr-I sub-state the torsion between the rings C and D is larger by ca. 10° compared to Pfr-II. This structural difference is presumably related to different hydrogen bonding interactions of ring D as revealed by time-resolved IR spectroscopic studies of the cyanobacterial phytochrome Cph1. The transitions between the two sub-states are evidently too fast (i.e., nanosecond time scale) to be resolved by NMR spectroscopy which could not detect a structural heterogeneity of the chromophore in Pfr. The implications of the present findings for the dark reversion of the Pfr state are discussed.

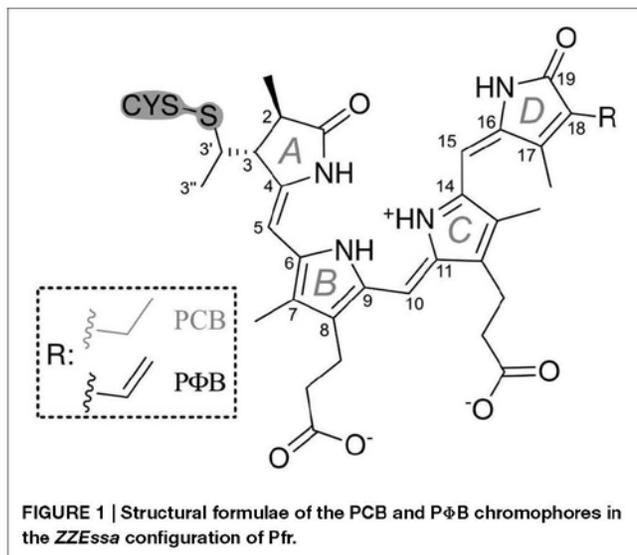
**Keywords:** phytochrome, tetrapyrrole, isomerization, structural heterogeneity, hydrogen bonding, resonance Raman spectroscopy, time-resolved IR spectroscopy, quantum chemical calculations

## Introduction

Phytochromes are ubiquitous photoreceptor in plants that utilize light as a source of information for controlling photomorphogenic processes (Quail, 1998; Schäfer and Nagy, 2006). Upon light excitation phytochromes are interconverted between the red-absorbing (Pr) and far-red absorbing state (Pfr), corresponding to a switch between physiologically inactive and active states, respectively. The light-absorbing cofactor is a linear methine-bridged tetrapyrrole, phytochromobilin (PΦB), that is covalently linked to a cysteine residue via a thioether bridge formed with the vinyl substituent of ring A (**Figure 1**) (Gärtner and Braslavsky, 2004; Rockwell et al., 2006; Rockwell and Lagarias, 2010). The primary photochemical step of the Pr → Pfr conversion is a double-bond isomerization (*Z/E*) of the *C-D* methine bridge (Rockwell et al., 2006; Rockwell and Lagarias, 2010). Subsequent steps include protein motions which eventually induce the functional relevant structural changes leading to the physiological signal. Phytochrome can therefore be regarded as a bimodal photoswitch which is based on the photoinduced conversion between the *ZZZssa* (Pr) and *ZZEssa* (Pfr) tetrapyrrole configuration. In addition to photoconversion, a unidirectional thermal pathway allowing dark reversion of Pfr to Pr is often apparent. Amongst the prokaryotic bacteriophytochromes, the resting state of the small “bathy”-type group is Pfr rather than Pr. Here dark reversion from Pr to Pfr takes place, corresponding to a thermal *E* → *Z* double bond isomerization that is initiated by a keto/enol tautomerization (Velazquez Escobar et al., 2015). It might well be that an analogous mechanism also holds for Pfr → Pr dark reversion in canonical phytochromes as suggested earlier (Lagarias and Rapoport, 1980).

Most of the knowledge in molecular phytochrome research was obtained from cyanobacterial phytochromes and bacteriophytochromes which employ phycocyanobilin (PCB) and biliverdin (BV) as chromophores, respectively (Rockwell and Lagarias, 2010). These phytochromes are more tractable than plant phytochromes and thus, the first three-dimensional (3D) structures at atomic resolution were obtained from these representatives of the superfamily (Wagner et al., 2005, 2007; Yang et al., 2007, 2008, 2009, 2011; Essen et al., 2008; Malliet et al., 2011; Bellini and Papiz, 2012; Anders et al., 2013, 2014; Takala et al., 2014). Crystallographic studies of a bacteriophytochrome also revealed the protein structural changes implicated in regulating the output module (Takala et al., 2014) that is typically a histidine kinase-like region. Only recently 3D structural data have been obtained for plant phytochromes (Song et al., 2012; Burgie et al., 2014). Otherwise, structural investigations of plant phytochromes were largely restricted to spectroscopic approaches, including nuclear magnetic resonance (NMR), transient absorption, resonance Raman (RR), and

**Abbreviations:** BV, biliverdin; PCB, phycocyanobilin; PΦB, phytochromobilin; Agp1, Cph1, Cph2, CphA, and phyA refer to the photosensor modules of the various phytochromes studied in this work; Pr and Pfr denote the red- and far-red-absorbing states, respectively; *A-B*, *B-C*, and *C-D* denote the methine bridges between the respective pyrrole rings; CD, circular dichroism; RR, resonance Raman; IR, infrared; HOOP, hydrogen out-of-plane; NH ip, N-H in-plane bending.



infrared (IR) spectroscopy (Fodor et al., 1988, 1990; Mizutani et al., 1994; Matysik et al., 1995; Kneip et al., 1997, 1999; Andel et al., 2000; Gärtner and Braslavsky, 2004; Mroginski et al., 2004, 2011a,b; Murgida et al., 2007; Rohmer et al., 2008; Schwinté et al., 2008; Dasgupta et al., 2009; Song et al., 2012, 2013). These results together with spectroscopic data and molecular modeling studies (Mroginski et al., 2011b) demonstrated extensive similarities in the overall fold and the chromophore structure in the parent states of plant, cyanobacterial, and bacteriophytochromes, although the different chromophores (PΦB vs. BV) attach to different Cys residues (Lamparter et al., 2002; Rockwell et al., 2006).

Although most spectroscopic studies on canonical phytochromes have focused on the thermally stable Pr state (Rockwell et al., 2006; Rockwell and Lagarias, 2010), important structural insight has also been obtained for the Pfr state albeit with partly conflicting conclusions. Based on NMR spectroscopy on the canonical cyanobacterial phytochrome Cph1 as well as plant phytochrome A, Matysik and co-workers demonstrated that the chromophore was held rigidly in the binding pocket of Pfr, whereas in the Pr state the chromophore was much more flexible—indeed showing two distinct substates (Song et al., 2011, 2012, 2013), as implied by fluorescence spectroscopy (Sineshchekov et al., 1998). However, time-resolved optical spectroscopies of plant phytochrome A provided evidence for a conformational heterogeneity in both the Pr and Pfr states, corresponding to two parallel photo-induced reaction pathways (Schmidt et al., 1998; Sineshchekov, 2004). Essentially, the same conclusions were derived from transient absorption spectroscopy of Cph1, covering a wide dynamic range (Kim et al., 2013, 2014a,b). A heterogeneous chromophore structure has also been demonstrated for the Pfr state of algal phytochromes on the basis of circular dichroism (CD) spectroscopy (Rockwell et al., 2014). Furthermore, a recent RR spectroscopic study on BV-binding bacteriophytochromes revealed a homogeneous chromophore structure in the Pfr state only for representatives

of the bathy-phytochromes family, whereas a temperature-dependent equilibrium between two Pfr conformers was also observed for prototypical phytochromes (Salewski et al., 2013). This structural heterogeneity was suggested to be associated with the thermal double bond isomerization preceding the Pfr → Pr dark reversion.

In this work, we have extended these studies to the Pfr state of various phytochromes that bind PΦB or PCB. We have employed RR spectroscopy that selectively probes the vibrational spectrum of the cofactor representing a characteristic fingerprint of the structure of the tetrapyrrole and its interactions with the protein environment (Mroginski et al., 2011a). To support the vibrational assignment and thus the structural analysis of the chromophore, we have used phyA adducts including different tetrapyrroles (PΦB vs. PCB) and selectively <sup>13</sup>C-labeled isotopomers of PCB. These static RR experiments were complemented by time-resolved IR spectroscopy to determine conformational distributions specifically of ring D. The main goal of this work is to explore possible structural heterogeneities of the chromophore in the Pfr state that might provide insights into the role of conformational dynamics in the thermal isomerization of the tetrapyrrole.

## Materials and Methods

### Protein Expression, Purification, and Reconstitution

PCB (and its isotopomers) and PΦB were assembled in a 5:1 molar ratio with the recombinant His-tagged 65 kDa (residues 1–595) N-terminal photosensory module of oat phyA3 apoprotein as described previously (Mozley et al., 1997; Song et al., 2012). The adduct showed absorption maxima at 650 and 715 nm for Pr and Pfr, respectively. The isotopic labeling affected neither the absorption maxima, the photochemical behavior, nor the thermal stability. Production, purification, and chromophore assembly of Cph1, Cph2, CphA, and Agp1-V249C have been described elsewhere (Landgraf et al., 2001; Essen et al., 2008; Borucki et al., 2009; Schwinté et al., 2009; Anders et al., 2011). In each case, the experiments were carried out with the photosensory module of the proteins, i.e., N-terminal PAS, GAF, and PHY domains. For the sake of simplicity, the deletion of the output module is not specifically indicated here, e.g., the notation Cph1 corresponds to the commonly used abbreviation Cph1Δ2. As long as no further modifications are specified such as Agp1-V249C, these photosensor modules are referred to as wild-type (WT) variants. RR experiments were carried out in 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA in H<sub>2</sub>O (D<sub>2</sub>O) at pH (pD) of 7.8. Protein samples were concentrated by ultrafiltration to an optical density of ca. 50 at 280 nm. Typical protein concentrations for the RR experiments were between 400 and 600 μM.

### Syntheses

<sup>13</sup>C(5)-PCB and <sup>13</sup>C(15)-PCB were synthesized according to Makhynya et al. (2007). The synthesis followed the convergent strategy by generating the right and the left half of PCB separately (Figure 1), followed by condensation of both compounds at the central C(10) position as described previously (Mroginski et al.,

2011b). Isotope content at the labeled position of the target PCB was >95% as determined by mass spectrometry.

### Resonance Raman Spectroscopy

RR spectra of the Pr state of phyA were obtained with 1064-nm excitation (Nd-YAG cw laser, line width <1 cm<sup>-1</sup>) with a Bruker RFS 100/S Fourier-transform Raman spectrometer (4 cm<sup>-1</sup> spectral resolution). All spectra were measured at -140°C using a liquid-nitrogen cooled cryostat (Linkam). The laser power was ca. 0.4 W at the sample which does not cause any laser-induced damage of the protein samples as checked by comparing the spectra obtained before and after a series of measurements. Data was accumulated for ca. 2 h for each spectrum. In all RR spectra shown in this work, the background as well as contributions from the Pr state were subtracted. For the band fitting analysis of selected spectral regions, the contribution of the apoprotein was also subtracted (see also Salewski et al., 2013; Zienicke et al., 2013).

### Time-resolved VIS Pump IR Probe Spectroscopy

Pump and probe pulses were generated using non-linear optical methods. By difference frequency mixing in various steps, we obtained mid-IR pulses of 200 fs (FWHM) or shorter at a repetition rate of 1.088 kHz. Simultaneously, 200 fs laser pulses at 710 nm were used to photoexcite the sample at the absorption maximum of the Pfr state, thus initiating the photoreaction. Photoselection experiments were performed using focal pump pulse diameters of 300 μm, sample thickness of 50 μm, focal probe pulse diameters of 150 μm, pulse energies of <100 nJ. This results in excitation efficiencies below 8%. The transient absorptions for parallel A<sub>p</sub> and perpendicular A<sub>s</sub> polarization were simultaneously probed by two mid-IR pulses with polarizations oriented parallel and perpendicular to the pump pulse polarization at various delay times. The isotropic polarized absorption A<sub>iso</sub> was calculated by A<sub>iso</sub> = (A<sub>p</sub> + 2A<sub>s</sub>)/3 at each delay time. The time-resolved data presented show isotropic polarized absorption. Probe pulses were dispersed with an imaging spectrograph at a resolution of 1.5 cm<sup>-1</sup> and recorded with a 2 × 32 element MCT array detector, resulting in transient spectra with high spectral resolution (Linke et al., 2013). The high repetition rate requires that the sample be moved across the focused laser beams with a Lissajous sample cell in order to avoid multiple excitation of a specific sample volume. The <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N labeled Cph1 phytochrome apoprotein, to which non-labeled PCB chromophore was added) was prepared in D<sub>2</sub>O solution at an optical density of 0.15–0.2 OD at 710 nm, as described previously (Hahn et al., 2008; Robben et al., 2010). Background illumination at wavelengths of ~640 nm ensured that the sample remained in the Pfr form.

### Quantum Chemical Calculations

Vibrational spectra of tetrapyrroles in the ZZEssa configuration were calculated by density functional theory (DFT) using the B3LYP functional and the 6–31G\* basis set. All spectra refer to protonated (cationic) tetrapyrroles with a chloride ion in the vicinity of the pyrrole N-H groups serving as a counterion. Further details of the computational methods are given elsewhere

(Schwinté et al., 2008). Due to the lack of a complete atomic model for a canonical phytochrome in the Pfr state, the calculations in this case refer to the chromophore *in vacuo*, thus ruling out structural interpretation (Mroginski et al., 2009). However, as shown by comparison with previous theoretical analyses of phytochromes with known 3D structures (Mroginski et al., 2011b; Salewski et al., 2013), the calculations can be used to determine the number of normal modes in specific spectral regions and to assess the character of these modes including the expected isotopic shifts. Calculated frequencies, intensities, and normal mode compositions for PΦB and the different PCB isotopomers are given in the Supplementary Material.

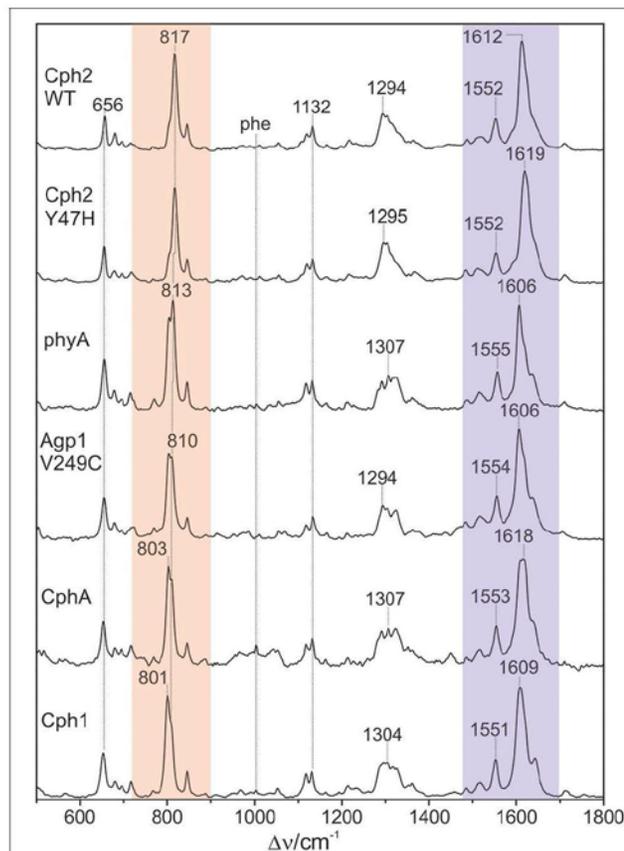
## Results

The 1064 nm excitation line is ideally suited for selectively probing the vibrational spectrum of the chromophore in the Pfr state of phytochromes. Due to its red-shift compared to the absorption maximum of the chromophore (ca. 700 nm), interference of the Raman spectrum with the chromophore fluorescence as well as unwanted photochemical reactions are avoided, whereas the energy of the excitation line is still sufficient for selective resonance enhancement of the Raman bands of the chromophore (Mroginski et al., 2011a). The only contribution of protein Raman bands refers to the Phe mode at ca. 1004  $\text{cm}^{-1}$  which, however, is only of very low intensity (Figure 2). Besides, the RR spectra exclusively display the chromophore bands of the Pfr state.

Figure 2 shows a collection of Pfr spectra obtained from various PCB-binding canonical phytochromes, including those in which PCB is the natural chromophore, i.e., Cph1, CphA, and the WT and the Y47H variant of Cph2, as well as plant phytochrome phyA which in planta binds PΦB. Furthermore, we have studied a variant of the bacterial phytochrome Agp1, Agp1-V249C, in which the natural BV attachment site was by one at position 249 to allow for binding of PCB (or PΦB, *vide infra*) (Borucki et al., 2009). In each case, the characteristic overall band pattern of Pfr is clearly visible, including two regions with prominent bands around 800 and 1600  $\text{cm}^{-1}$  originating from modes that are dominated by hydrogen-out-plane (HOOP) (orange rectangle) and C = C stretching coordinates (blue rectangle) of the methine bridges, respectively. The modes in these regions are largely localized in specific parts of the tetrapyrrole and dominated by a single internal coordinate (Mroginski et al., 2011b; Salewski et al., 2013). Thus, spectral changes of these modes in the spectra of the various phytochromes can be more easily related to specific structural changes as compared to variations of the bands in other parts of the spectra, such as between 1200 and 1400  $\text{cm}^{-1}$  where the individual modes contain comparable contributions of a large number of coordinates. We therefore restrict a more detailed analysis to the HOOP and C = C stretching regions.

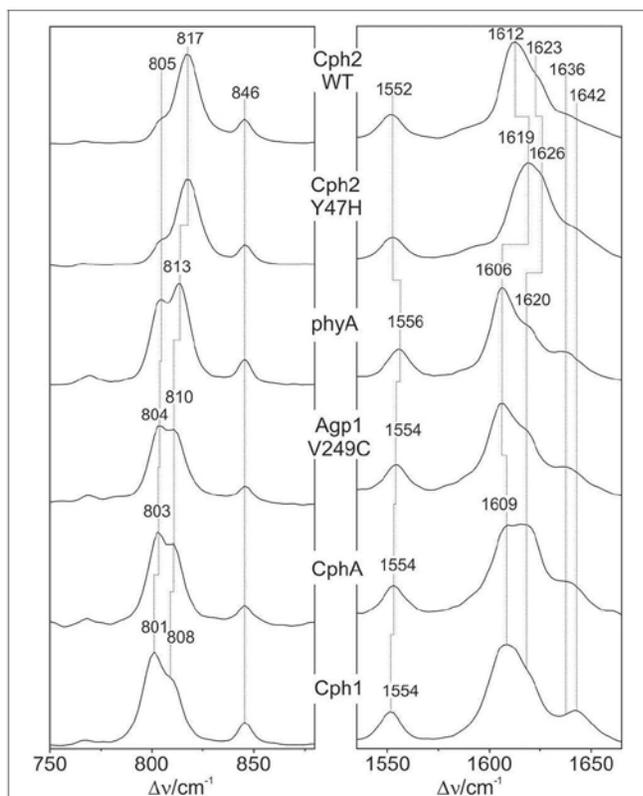
### Vibrational Analysis: Hoop Region

The Pfr states of all phytochromes display strong RR activity around 800  $\text{cm}^{-1}$  attributed to the HOOP mode of the C-D



**FIGURE 2 | Overview RR spectra of the Pfr states of various PCB-binding phytochromes.** The HOOP and C = C stretching regions are colored in pale red and violet, respectively. The spectra were measured from buffered H<sub>2</sub>O solutions (pH 7.8) with 1064 nm excitation at  $-140^{\circ}\text{C}$ . Further details are given in the text (Sections Resonance Raman Spectroscopy and Results).

methine bridge (Fodor et al., 1988; Mroginski et al., 2011b; Salewski et al., 2013). The high RR intensity was proposed to be related to the torsion of ring D with respect to the remainder of the tetrapyrrole (Fodor et al., 1988). However, the present spectra demonstrate two closely-spaced bands with different relative intensities in the various phytochromes (Figure 3). The intensity ratio of the high- to the low-frequency component varies by more than a factor of three among the different species, accompanied by frequency shifts between 5 and 10  $\text{cm}^{-1}$ . In principle, these bands might originate from two modes of the same chromophore conformer or of the same mode of two conformers. To distinguish between these possibilities we compare the RR spectra of phyA assembled with <sup>13</sup>C-labeled and non-labeled PCB (Figure 4), which shows the shift of the 804/814  $\text{cm}^{-1}$  band pair to 797/807  $\text{cm}^{-1}$  when the C(15) (C-D methine bridge) position is labeled. Neither labeling at the C(5) (A-B methine bridge) position nor D/H exchange at the pyrrole nitrogens has a significant effect on the spectrum (data not shown), ruling out the assignment of one of these bands to a HOOP mode of the A-B methine bridge or a N-H out-of-plane

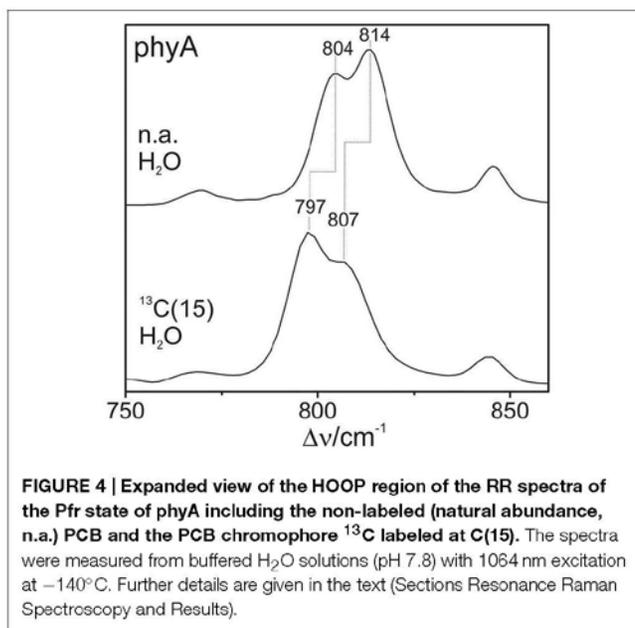


**FIGURE 3 | Expanded view of the HOOP (left) and C = C stretching region (right) of the RR spectra of the Pfr states of various phytochromes including the PCB chromophore (see Figure 2).** The spectra were measured from buffered H<sub>2</sub>O solutions (pH 7.8) with 1064 nm excitation at  $-140^{\circ}\text{C}$ . Further details are given in the text (Sections Resonance Raman Spectroscopy and Results).

deformation mode. Thus, we conclude that both bands are due to HOOP modes of the *C-D* methine bridge but originating from two different conformers. This interpretation is supported by quantum chemical calculations of the free PCB which predict only one mode of strong RR intensity in this region ( $820\text{ cm}^{-1}$ ) (Supplementary Material). This mode is dominated by the HOOP mode of the *C-D* methine bridge which is predicted to show a  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotopic shift at position C(15) of  $-8\text{ cm}^{-1}$ , similar to the experimentally determined shifts of  $-7\text{ cm}^{-1}$ .

### Vibrational Analysis: C = C Stretching Region

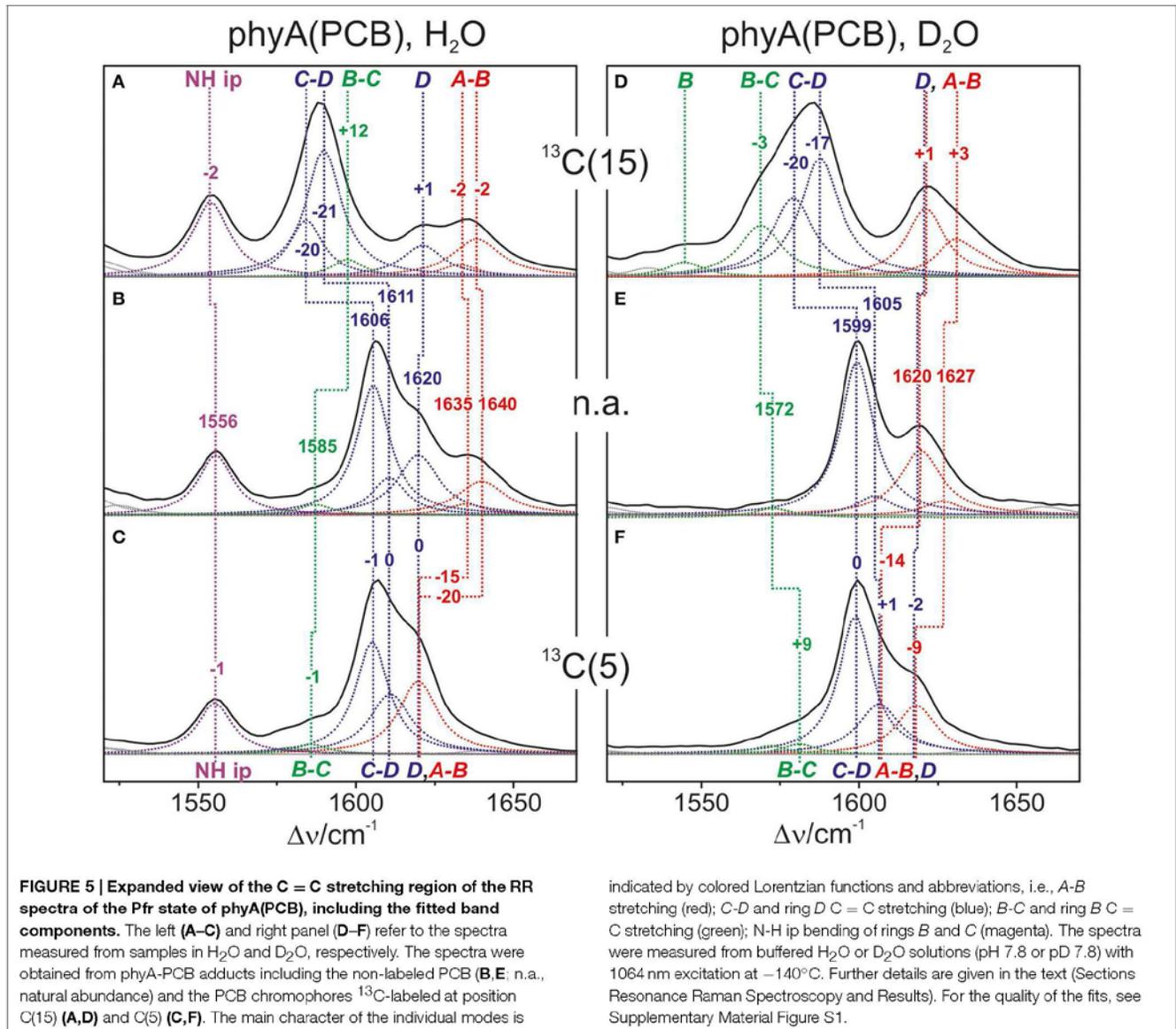
Also in the C = C stretching region we note remarkable changes between the spectra of the various PCB-binding phytochromes (Figure 3). However, the C = C stretching region is considerably more complex than the HOOP region as shown exemplarily for phyA (Figure 5). Band fitting analysis of the spectrum of the phyA adduct with non-labeled PCB required a minimum number of 7 bands in the region between  $1540$  and  $1650\text{ cm}^{-1}$  (Figure 5B; Table 1). In contrast, quantum chemical calculations predict only five fundamentals in this region, which are dominated by the C = C stretching coordinates of the *A-B*, *B-C*, and *C-D* methine bridges, the C = C stretching of ring *D*, and



**FIGURE 4 | Expanded view of the HOOP region of the RR spectra of the Pfr state of phyA including the non-labeled (natural abundance, n.a.) PCB and the PCB chromophore  $^{13}\text{C}$  labeled at C(15).** The spectra were measured from buffered H<sub>2</sub>O solutions (pH 7.8) with 1064 nm excitation at  $-140^{\circ}\text{C}$ . Further details are given in the text (Sections Resonance Raman Spectroscopy and Results).

the in-plane N-H bending coordinates of rings *B* and *C* (NH ip) (Supplementary Material). Thus, we expect distinct isotopic shifts upon comparing the RR spectra of non-labeled phyA-PCB with the PCB-adducts including specific  $^{13}\text{C}$ -labeling at the *A-B* and *C-D* methine bridges [ $^{13}\text{C}(5)$ ,  $^{13}\text{C}(15)$ , see Figure 1] and deuteration at the pyrrole nitrogens (Figure 5). Accordingly, the band at  $1556\text{ cm}^{-1}$  is readily assigned to the NH ip mode (Figure 5B) since it remains nearly unchanged upon  $^{13}\text{C}$ -labeling at C(5) and C(15) (Figures 5A,C) but disappears upon H/D exchange of the N-H groups (Figures 5D-F). In agreement with previous experimental and theoretical studies (Mroginski et al., 2011b; Salewski et al., 2013), the most intense RR band at  $1606\text{ cm}^{-1}$  (Figure 5B) of phyA-PCB is attributed to the C = C stretching of the *C-D* methine bridge. This band is accompanied by a somewhat weaker band on the high frequency side originating from the C = C stretching of ring *D*. This mode is insensitive to  $^{13}\text{C}$ -labeling at C(15) and C(5) whereas the *C-D* stretching should display a ca.  $-25\text{ cm}^{-1}$  shift upon  $^{13}\text{C}$ -labeling at C(15) as predicted by the calculations. Consequently, the invariant band at  $1620\text{ cm}^{-1}$  is attributed to the C = C stretching of ring *D* whereas—in view of the ca.  $-20\text{ cm}^{-1}$  shifts in phyA-PCB- $^{13}\text{C}(15)$ —both the  $1606$  and the  $1611\text{ cm}^{-1}$  appear to correspond to *C-D* stretching (Figures 5A,B). This assignment implies that these two modes originate from two PCB conformers that differ with respect to the structure of the *C-D* methine bridge, in line with the conclusions drawn from the analysis of the HOOP region (*vide supra*).

Above  $1620\text{ cm}^{-1}$ , the band-fitting analysis of the spectrum of non-labeled phyA-PCB (Figure 5B) reveals two further bands at  $1640\text{ cm}^{-1}$  and, with rather low intensity, at  $1635\text{ cm}^{-1}$ . Both are marginally affected by  $^{13}\text{C}$ -labeling at C(15) but shift down in the PCB- $^{13}\text{C}(5)$  adduct (Figures 5A,C) such that they coincide with the C = C stretching of ring *D* to give a band envelope centered at  $1620\text{ cm}^{-1}$ .



H/D exchange at the pyrrole nitrogens affects not only the NH ip mode but also the methine bridge modes due to the admixture of small contributions of the N-H ip coordinates of the neighboring pyrrole rings. These shifts are expected to be  $<10\text{ cm}^{-1}$  for the C-D stretching but  $10\text{--}15\text{ cm}^{-1}$  for the A-B and B-C stretching, as predicted by the present QM calculations (Supplementary Material) and observed in previous studies on the Pfr state of BV-binding phytochromes (Salewski et al., 2013). Indeed, our experimental findings accord with this (Figures 5D–F). Since the C = C stretching of ring D is not affected by D/H exchange, this band overlaps with those originating from the downshifted A-B stretchings in the spectra of the deuterated sample (Figures 5D,E). The additional downshift of the A-B stretchings upon <sup>13</sup>C-labeling at C(5) then leads to the overlap with the non-shifted C-D stretching

(Figure 5F). A summary of the assignments of the C = C stretching region is given in Table 1. Note that the correlation between modes of the non-labeled and labeled chromophore is an approximation. Each change of atomic masses (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C; D/H) affects all solutions of the vibrational eigenvalue problem and thus frequencies, intensities and character (i.e., the potential energy distribution—PED) of all modes. Although the effects are particularly strong for modes dominated by coordinates of the label site, notable changes may also be observed for other modes that cannot be predicted by intuition. One instructive example refers to the B-C stretching which is known to be IR active but exhibits only low Raman activity (Schwinté et al., 2008) such that it can hardly be identified in the RR spectra. Previous IR studies have assigned this mode to a band between  $1580\text{ and }1590\text{ cm}^{-1}$  (Schwinté et al., 2008) and thus is attributed

**TABLE 1 | Band components in the C = C stretching region of the RR spectra of the Pfr state of phyA-PCB obtained by the fitting analysis<sup>a</sup>.**

Mode <sup>b</sup>	n.a. H <sub>2</sub> O		<sup>13</sup> C(5) H <sub>2</sub> O		<sup>13</sup> C(15) H <sub>2</sub> O		n.a. D <sub>2</sub> O		<sup>13</sup> C(5) D <sub>2</sub> O		<sup>13</sup> C(15) D <sub>2</sub> O	
	$\nu/\text{cm}^{-1}$	$I_{\text{rel}}$	$\nu/\text{cm}^{-1}$	$I_{\text{rel}}$	$\nu/\text{cm}^{-1}$	$I_{\text{rel}}$	$\nu/\text{cm}^{-1}$	$I_{\text{rel}}$	$\nu/\text{cm}^{-1}$	$I_{\text{rel}}$	$\nu/\text{cm}^{-1}$	$I_{\text{rel}}$
AB	1639.9	18			1638.4	21					1630.2 <sup>d</sup>	11
	1635.0	6	1619.8 <sup>c</sup>	40	1632.9	7	1626.5 <sup>d</sup>	8	1618.1 <sup>c</sup>	27		
D <sup>c</sup>	1619.8	33			1621.1	17	1619.5	35			1621.1	28
CD	1610.5	20	1610.9	33	1584.2	32	1605.0	11	1598.8	76	1568.8	28
	1605.5	71	1605.1	62	1589.8	70	1599.4	84	1606.3	28	1587.7	48
BC			1585.7	5	1597.3	10			1581.1	6	1579.1	32
			1578.9	4					1571.9	5		
N-H ip	1555.5	33	1555.3	28	1554.0	41	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Data refer to the unlabeled (n.a.) and <sup>13</sup>C-labeled PCB bound to phyA in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O.

<sup>b</sup>The main coordinate of the modes is indicated by AB, CD, BC, and D referring to the C = C stretching of the respective methine bridges and of ring D, and by NH ip, denoting the N-H in-plane bending of the rings B and C.

<sup>c</sup>Not resolved in terms of the two AB and the D band components.

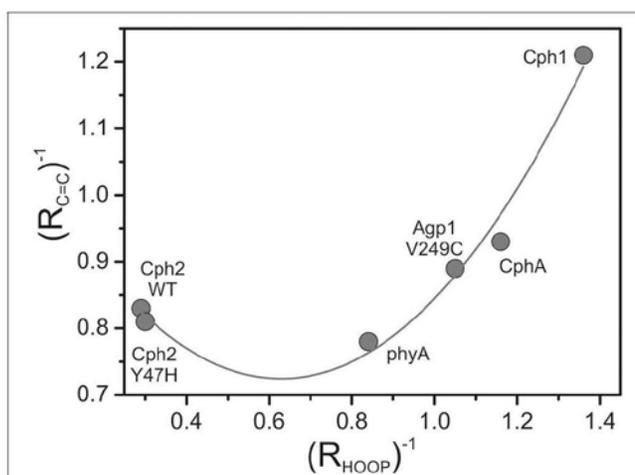
<sup>d</sup>Not resolved in terms of the two AB band components.

to the weak band at 1585 cm<sup>-1</sup> in the spectrum of phyA-PCB (Figure 5B). In the spectrum of the deuterated PCB adduct <sup>13</sup>C-labeled at position C(15) a distinct band at 1569 cm<sup>-1</sup> is observed (Figure 5D) for which the B-C stretching is the only plausible assignment. Most likely, the intensity increase is due to an altered PED, presumably by a stronger contribution of the ring B C = C stretching coordinate.

Altogether the analysis of the C = C stretching region (Figure 5; Table 1) indicates a conformational heterogeneity of the PCB chromophore associated with sub-states differing with respect to the C-D and A-B methine bridges.

### Correlated Spectral Changes

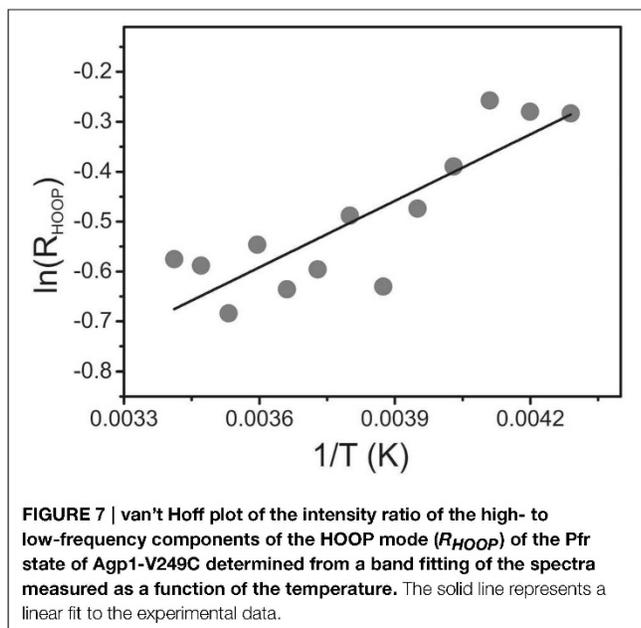
The band-fitting analyses of the RR spectra in the C = C stretching region was extended to the Pfr states of all phytochromes studied in this work reflecting different distributions among the sub-states. Due to the strong overlap with the ring D C = C stretching, the intensity determination of the two conjugate C-D stretching modes is uncertain. Thus, we will restrict the discussion to the A-B stretching modes which are somewhat separated from the other modes in this region. As already shown by the spectra in Figure 3 (right panel), the intensity ratio of the high- and low-frequency A-B stretching component is different for the Pfr states of the various phytochromes, in analogy to the changes in the HOOP region (Figure 3, left panel). In fact, the intensity ratios  $R_i$  of the HOOP and A-B stretching mode components as implied by band fitting are correlated (Figure 6), suggesting a coupling of the conformational differences at the C-D methine bridge (HOOP mode) and the A-B methine bridge (A-B stretching) that characterize the two apparent sub-states. Interestingly, a distinct coupling correlation is observed for the HOOP and C = C mode for Cph2 and its Y47H mutant compared to the other phytochromes. This is likely to be a result of the solvent exposure of the A-B ring moiety of the PCB chromophore that is caused by



**FIGURE 6 | Plot of the reciprocal intensity ratios of the high- to low-frequency components of the A-B stretching mode ( $R_{C=C}$ ) and the HOOP mode (C-D methine bridge;  $R_{HOOP}$ ), determined from the RR spectra of the Pfr states of various phytochromes by band fitting analyses. The solid line represents the fit of a parabolic function to the data points.**

the lack of a shielding PAS domain present in the other studied phytochromes (Anders et al., 2013).

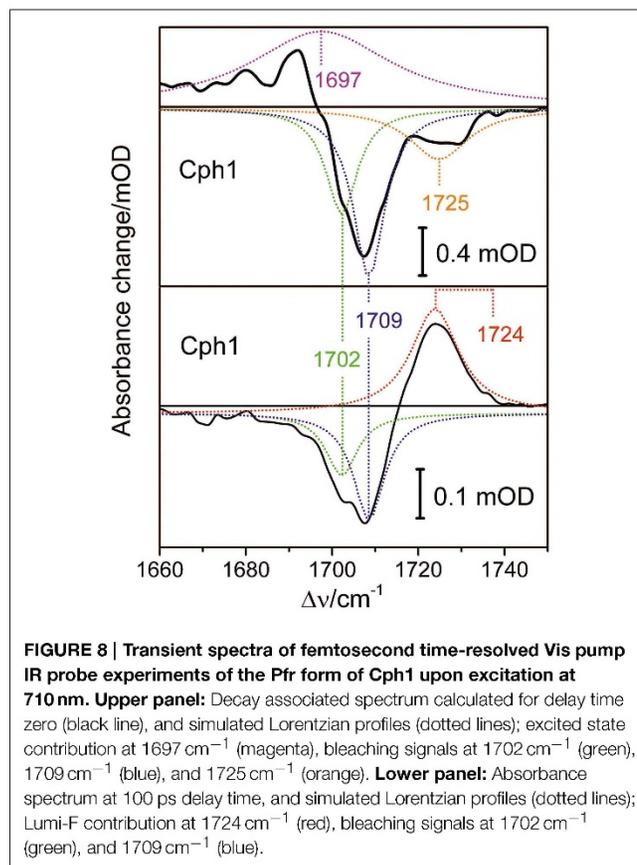
To determine the energetic difference between the two sub-states we analyzed the temperature-dependence of the sub-state distribution on the basis of the HOOP mode components. Indeed, temperature-dependent measurements in the range between 293 and 233 K reveal small spectral changes, particularly in the HOOP region. However, in many cases spectral analysis was aggravated by the interference of temperature-dependent contributions of the Pr state. Thus, we have restricted the quantitative analysis to the spectra of Agp1-V249C which included the lowest and largely temperature-independent Pr



contributions because the quantum efficiency of the Pfr to Pr photoconversion is extraordinarily low (Lamparter et al., 2002; Schumann et al., 2008). The intensity ratio of the HOOP modes of Pfr ( $R_{HOOP}$ , high- to low-frequency), proportional to the equilibrium constant between the two sub-states, can be described by the van't Hoff equation (Figure 7) leading to an enthalpy difference between the two sub-states of  $3.6 \text{ kJ} \cdot \text{M}^{-1}$ .

### Time-resolved Vibrational Analysis: C = O Stretching Region

Conformational heterogeneity of the PCB chromophore with respect to the C-D and A-B methine bridges could be reflected by carbonyl stretching absorptions of ring D and ring A. We used femtosecond time-resolved IR spectroscopy to study the carbonyl bleaching bands of the unlabeled PCB chromophore upon Pfr photoexcitation within a  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled Cph1 apoprotein. Upon excitation at 710 nm ultrafast absorption dynamics are displayed in the spectral range from  $1660 \text{ cm}^{-1}$  to  $1750 \text{ cm}^{-1}$  (Figure 8). Positive signals belong to excited state absorption, while negative (bleaching) signals around  $1708 \text{ cm}^{-1}$ , and  $1724 \text{ cm}^{-1}$  are due to C(19) = O stretching vibrations, and C(1) = O stretching vibrations, respectively (Figure 8, upper panel) (Yang et al., 2012). The C(19) = O stretching vibration bleaching signal around  $1708 \text{ cm}^{-1}$  consists of two contributions at  $1702 \text{ cm}^{-1}$  and  $1709 \text{ cm}^{-1}$  simulated with band integrals of  $-12$ , and  $-20$ , respectively (Figure 8, upper panel). The C(1) = O stretching vibration bleaching signal exhibits a double peak feature with maxima at  $1724 \text{ cm}^{-1}$ , and  $1729 \text{ cm}^{-1}$ . However, due to low signal strength this feature is simulated with a single bleaching band at  $1725 \text{ cm}^{-1}$ . At 100 ps delay time the initial Pfr photoreaction is finished and the remaining signals only consist of the negative bleaching signals and the positive photoproduct absorption signal of Lumi-F (Figure 8, lower panel). Since ring A is not involved in the primary photochemical process,

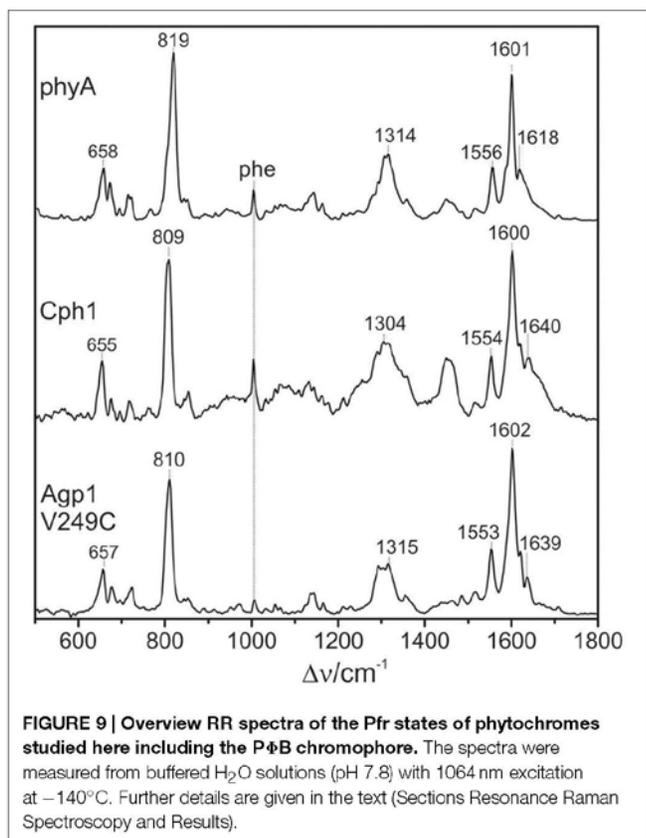


no signals of the C(1) = O stretching vibration remain after photoisomerization. The C(19) = O stretching vibration signals around  $1708 \text{ cm}^{-1}$  can be assigned to two contributions at  $1702 \text{ cm}^{-1}$  and at  $1709 \text{ cm}^{-1}$  with simulated band integrals of  $-1.8$ , and  $-3.1$ , respectively. The positive Lumi-F signal is at  $1724 \text{ cm}^{-1}$ .

The bleaching bands provide information on the ground state. The transient spectra demonstrate two closely-spaced bleaching bands of the C(19) = O stretching vibration at  $1702 \text{ cm}^{-1}$  and at  $1709 \text{ cm}^{-1}$  with relative intensity ratio of  $I_{1702}/I_{1709} = 0.6$ . This assignment implies two modes originating from two PCB conformers in the Pfr state that differ with respect to the structure of the ring D carbonyl mode, in agreement with the conclusions drawn from the analysis of the HOOP and C = C stretching regions (*vide supra*).

### Phytochromobilin-binding Phytochromes

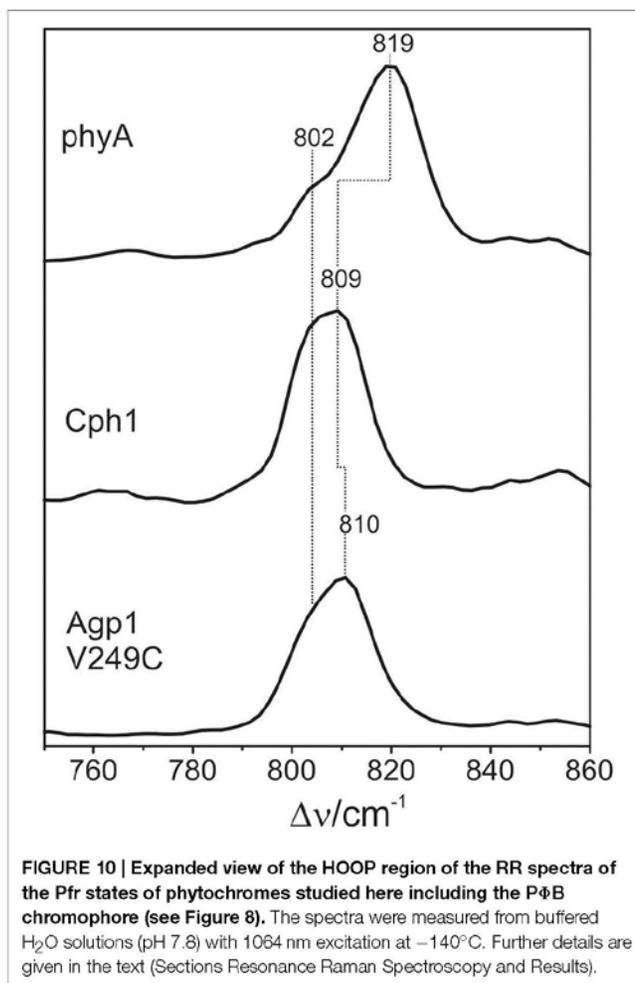
All phytochromes studied in this work are able to attach PΦB at the same site as used for PCB. Previous comparative studies of oat phyA3 already demonstrated that the different ring D substituents (Figure 1) are associated with few spectral changes (Kneip et al., 1997; Remberg et al., 1997). It was of interest to determine whether the substituent affects the conformational heterogeneity of the chromophore. Focusing on the PΦB adducts of phyA, Cph1, and Agp1-V249C (Figure 9), spectral differences between the three phytochromes are noted in the entire spectral



range including the HOOP and the C = C stretching region, as for PCB adducts.

The HOOP region displays two overlapping bands with different relative intensities in the three spectra (Figure 10). These intensity variations are accompanied by shifts predominantly of the high-frequency component. In phyA(PΦB), the latter band clearly dominates, whereas both components are of similar intensities in the spectra of Cph1(PΦB) and Agp1-V249C(PΦB). As for PCB, quantum chemical calculations predict only one Raman-active mode in this region at 825 cm<sup>-1</sup> that originates from the HOOP coordinate of the C-D methine bridge (Supplementary Material).

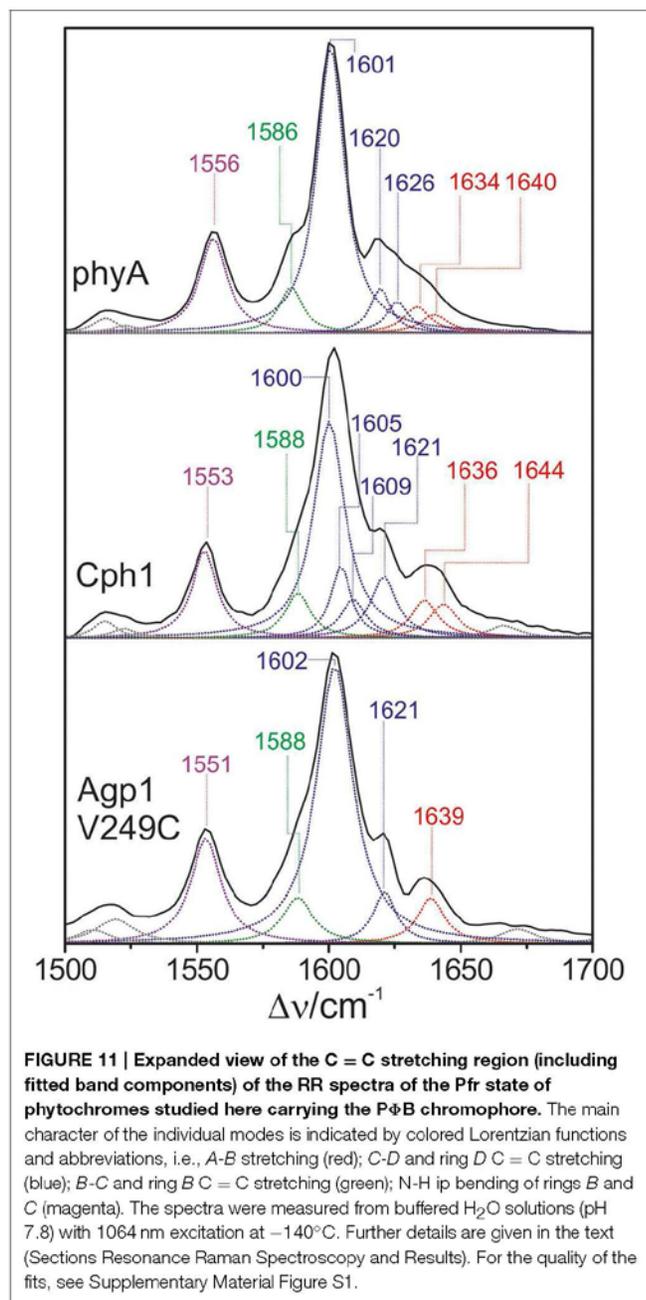
In the high-frequency region (Figure 11), the calculations predict again five modes between 1550 and 1650 cm<sup>-1</sup> with similar mode composition as for PCB, except for the C = C stretching mode of ring D (Supplementary Material). For PΦB, this mode up-shifts to higher frequencies compared to the C-D stretching mode due to the admixture of the C = C stretching coordinate of the vinyl substituent. The assignment of the individual bands in this region otherwise follows the same scheme as that for the PCB adducts (Table 1). Accordingly, the C-D stretching corresponds to the strongest band which is found at essentially the same frequency in all three proteins (ca. 1600 cm<sup>-1</sup>; Figure 11). The band at ca. 1555 cm<sup>-1</sup> is attributed to the N-H ip as it disappears upon H/D exchange (Kneip et al., 1999), whereas the weak band on the low frequency side of the C-D stretching is due to the B-C stretching, in line with previous IR spectroscopic data (Schwinté et al., 2008). On the high-frequency



side of the C-D stretching, the number of bands that are resolved by band fitting differs for the three phytochromes. In phyA and Cph1 the two bands between 1634 and 1644 cm<sup>-1</sup> are assigned to the A-B stretching in analogy to the spectra analysis of the PCB adducts (Figure 5), pointing to two sub-states with slightly different conformations of the A-B methine bridge. Thus, the remaining bands at 1620 and 1626 cm<sup>-1</sup> in phyA and at 1605, 1609, and 1621 cm<sup>-1</sup> in Cph1 (Figure 11) can in principle only be assigned to a second C-D stretching mode (in addition to the band at ca. 1600 cm<sup>-1</sup>) and to one or two ring D modes, pointing to conformational heterogeneity at the C-D bridge or ring D. In contrast, the spectrum of Agp1-V249C(PΦB) displays a different picture inasmuch as the total number of bands identified by the band-fitting analysis just agrees with the theoretically-predicted number of modes. Thus, the evident structural heterogeneity of the C-D methine bridge conformation as mirrored by the HOOP modes (Figure 10) has only marginally affects the C = C stretching region.

## Discussion

The present study has demonstrated that the Pfr states of a number of PCB- and PΦB-binding phytochromes display a



structural heterogeneity of the chromophore involving two main sub-states, differing at the A-B and C-D methine bridges. The sub-states are populated to different extents in the phytochromes studied. The underlying structural differences are probably small since they affect only a few marker bands whereas most of the conjugate modes coincide.

### Structural Differences between the Sub-states

The structural differences associated with the C-D methine bridge are reflected by the HOOP, and the C = C stretching, and the C = O stretching mode. Inspection of **Figure 3** shows

that the intensity ratio of the high- to low-frequency HOOP component decreases in the order Cph2-WT < Cph2-Y47H < phyA < Agp1-V249C < CphA < Cph1. Unfortunately, the overlap of the C = C stretching mode of the ring D with those of the C-D methine bridge hampers reliable determination of the relative intensities of the latter modes even by band-fitting analyses. This uncertainty is particularly large for the two Cph2 variants in which the PAS domain is missing and the chromophores are partially exposed to the solvent as well as for Cph1. However, the remaining phytochromes display a tendency that can even be seen in **Figure 3** inasmuch as the high frequency component of the C-D stretching increases in intensity according to phyA < Agp1-V249C < CphA. For these phytochromes, the low-frequency HOOP and the high-frequency C-D stretching component can readily be ascribed to one conformer, Pfr-I, whereas the high-frequency HOOP and the low-frequency C-D stretching component are attributed to the second conformer, Pfr-II. In view of the strong spectral similarities between phyA(PCB) and phyA(PΦB), this conclusion also holds for plant phytochrome A carrying its natural chromophore.

The coexistence of two conformers differing with respect to the HOOP and methine bridge modes is reminiscent of the results obtained for the Pfr states of BV-binding bacterial phytochromes shown previously (Salewski et al., 2013). In that case, quantum-mechanics/molecular-mechanics (QMMM) hybrid methods could be employed for a more profound analysis of spectra-structure relationships due to the availability of a well-resolved 3D structure of the bathy phytochrome PaBphP from *Pseudomonas aeruginosa* (Yang et al., 2008). The study demonstrated an inverse correlation of the HOOP frequency with the C(14)-C(15)-C(16)-N(D) dihedral angle, whereas the C = C stretching frequency was directly correlated with the N(C)-C(14)-C(15)-C(16) dihedral angle and inversely correlated with the C(15)-C(D) bond length (Salewski et al., 2013). An increase of both dihedral angles, as reflected by a downshift of the HOOP and an upshift of the C = C stretching mode, thus corresponds to an increased torsion of ring D with respect to ring C. Adopting the approximately linear relationship between the C = C stretching frequency and the dihedral angle with a slope of 0.65 degree/cm<sup>-1</sup>, as previously determined for the Pr state of phyA and Cph1 (Mroginski et al., 2011b), the torsional angle between rings C and D should be >10° larger in Pfr-I than in Pfr-II in the case of phyA.

An increased torsion of ring D with respect to ring C by about 10° permits formation of an additional hydrogen bond to ring D. Structural investigations on Cph1 demonstrated two possible hydrogen bonds on ring D between C(19) = O and Tyr263, and between N(D)-H and Asp207 (Song et al., 2013). Structural flexibility of the chromophore and ring D makes formation of one hydrogen bond more likely. Hydrogen bonds to carbonyl groups induce a red-shift of the frequency, as well as formation of hydrogen bonds to adjacent N-H groups. Thus, the conformer Pfr-I with a more twisted ring D is related with two hydrogen bonds on ring D, and conformer Pfr-II with one hydrogen bond on ring D in Cph1. This is supported by the intensity ratio Pfr-II / Pfr-I of 0.6 of the C(19) = O stretching vibrations at

room temperature. It might be that the different twist angles in Pfr-I and Pfr-II predetermine the heterogeneous excited state dynamics of the Pfr state which in turn leads to two different reaction channels to the Pr state (Kim et al., 2014a). The recent CD spectroscopic analysis of algae phytochromes (Rockwell et al., 2014) is interesting in this context. That study revealed a structural heterogeneity of the Pfr chromophore, presumably associated with the rings A and D. The authors pointed out that similar CD signatures were also found in previous work on Cph1 (Borucki et al., 2003; Rockwell et al., 2009), implying similar conformational differences.

The structural differences between the two conformers also include the A-B methine bridge. For phyA, Agp1-V249C, and CphA the low-frequency component of the A-B stretching can be related to the low-frequency component of the HOOP mode (Figure 6) and thus attributed to Pfr-I. For BV-binding proteins, the frequency of the A-B stretching was found to be directly correlated with the C(5)-C(6)-N(B) and N(B)-C(9)-C(10) bond angles (Mroginski et al., 2011b) indicating that a decrease of these bond angles accompanies the increased twist around the C-D methine bridge.

For Cph2-WT, Cph2-Y47H, and Cph1 carrying the PCB chromophore as well as for the PΦB adducts of Agp1-V249C and Cph1, the correlation of the individual marker band components and their assignment to Pfr-I and Pfr-II is not unambiguous. Thus, it cannot be ruled out that in one conformer changes of the two dihedral angles of the C-D methine bridge partially compensate each other such that the net effect on the twist between the rings C and D is small.

### Transition between the Conformational Sub-states and Chromophore Dynamics

Temperature-dependent measurements of Agp1-V249C have revealed a reaction enthalpy of 3.6 kJ.M<sup>-1</sup> for the transition from Pfr-I to Pfr-II and thus nearly a factor of 2 smaller than that determined for the same transition in the BV-binding Agp1-WT (Salewski et al., 2013). Intuitively, the reduction of the C-D methine bridge twist angle would likely be an exothermic process. However, a putative enthalpy gain due to the slight relaxation at this methine bridge may be overcompensated by concomitant structural changes which, in the case of Agp1-V249C, include a decrease of the bond angles between ring B and the neighboring methine bridges as discussed above. In addition, it might be that the decrease of the C-D methine bridge torsion additional also involves a loss of a hydrogen bond of ring D as suggested for Cph1(PCB) on the basis of time-resolved IR measurements (*vide supra*). In fact, hydrogen bond changes in the chromophore pocket might represent the energetically dominant process for the transition between Pfr-I and Pfr-II.

The present cryogenic studies do not provide any information about the kinetics of the transition but one may define a lower limit taking into account previous NMR spectroscopic results on Cph1(PCB) indicating a uniform and rigid chromophore structure (Song et al., 2013). However, conformers that interconvert faster than the magnetic relaxation times are not distinguishable. Thus, we conclude that the conformational heterogeneity detected in the static RR and time-resolved IR

experiments for the Pfr state reflects a fast conformational dynamics of the tetrapyrrole which proceeds within nanoseconds or faster. More generally, this interpretation is in line with the conceptual view of correlating structural heterogeneities derived from static experiments with structural dynamics (Ren et al., 2013). Furthermore, the present results accord with previous evidence for chromophore heterogeneity (i.e., dynamics) from time-resolved spectroscopic studies (e.g., Schmidt et al., 1998; Sineshchekov et al., 1998; Sineshchekov, 2004; Kim et al., 2014a,b). However, it contrasts with the heterogeneity of the Pr state, that is slow enough to be resolved by NMR spectroscopy and is probably caused by changes of the chromophore and its environment on a larger scale than in Pfr, perhaps by solvent redistribution within the chromophore binding site.

### Chromophore Structural Dynamics and Thermal Back Conversion

Among BV-binding bacteriophytochromes, only those with a resting Pr state show Pfr structural heterogeneity of the chromophore, proposed to be related to the capability of the chromophore to undergo a thermal isomerization and reversion to Pr (Salewski et al., 2013). It was suggested many years ago that thermal chromophore isomerization might require the transient formation of an enol form in the case of Pfr → Pr reversion in canonical phytochromes (Lagarias and Rapoport, 1980). In fact, this has recently been proven for the Pr → Pfr reversion in bathy phytochromes (Velazquez Escobar et al., 2015). However, in view of the slow Pfr → Pr dark reversion of the phytochromes studied in this work (with time constants in the order of hours), a detectable contribution of an enolic tetrapyrrole to the RR spectra is neither expected nor apparent.

Vierstra and coworkers have recently analyzed the effect of mutations in plant phytochromes on the dark reversion (Zhang et al., 2013). Although most of these experiments were based on Arabidopsis phyB, the results are likely to be relevant also for phyA and the phytochromes studied in this work since the mutations referred to conserved amino acids. As an example, the substitution of the positively-charged Arg352 (317 in oat phyA3, 254 in Cph1) by Ala slows down Pfr → Pr dark reversion, corresponding to a stabilization of the Pfr state. In view of the present results, this effect can be explained by the conformational dynamics of the A-B and C-D methine bridges. The salt bridge between Arg352 and the ring B propionate might fix that part of the chromophore to allow D-ring interactions to twist the C-D methine bridge, eventually leading to E → Z isomerization of the chromophore and the subsequent relaxation to the Pr state. Removal of the salt bridge in the Arg352Ala mutant might allow the A-B moiety to move, preventing the C-D torsion and thereby lowering the probability of E → Z isomerization. Similar explanations are possible for the effect of other substitutions in the chromophore pocket on thermal Pfr → Pr reversion.

In summary, we demonstrate that the chromophore in the Pfr states of canonical (PCB- and PΦB-binding) phytochromes displays a conformational heterogeneity associated with movements at the A-B and C-D methine bridges that may be

functional for the thermal decay of the photoactivated state of the photosensor.

## Acknowledgments

The work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB1078 (B6, C3, B3), Hu702/9; Es152/9). WG is grateful for the financial support by the Max-Planck-Gesellschaft.

## References

- Andel, F. III, Murphy, J. T., Haas, J. A., McDowell, M. T., van der Hoef, L., Lugtenburg, J., et al. (2000). Probing the photoreaction mechanism of phytochrome through the vibrational analysis of resonance raman spectra of recombinant analogs. *Biochemistry* 39, 2667–2676. doi: 10.1021/bi991688z
- Anders, K., Daminelli-Widany, G., Mroginski, M. A., von Stetten, D., and Essen, L. O. (2013). Structure of the cyanobacterial phytochrome 2 photosensor implies a tryptophan switch for phytochrome signaling. *J. Biol. Chem.* 288, 35714–35725. doi: 10.1074/jbc.M113.510461
- Anders, K., Gutt, A., Gärtner, W., and Essen, L. O. (2014). Phototransformation of the red light sensor cyanobacterial phytochrome 2 from *Synechocystis* species depends on its tongue motifs. *J. Biol. Chem.* 289, 25590–25600. doi: 10.1074/jbc.M114.562082
- Anders, K., von Stetten, D., Mailliet, J., Kiontke, S., Sineshchekov, V. A., Hildebrandt, P., et al. (2011). Spectroscopic characterisation of the red light sensitive photosensory module of Cph2 from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem. Photobiol.* 87, 160–173. doi: 10.1111/j.1751-1097.2010.00845.x
- Bellini, D., and Papiz, M. Z. (2012). Dimerization properties of the RpBphP2 chromophore-binding domain crystallized by homologue-directed mutagenesis. *Acta Cryst. D* 68, 1058–1066. doi: 10.1107/S0907444912020537
- Borucki, B., Otoo, H., Rottwinkel, G., Hughes, J., Heyn, M. P., and Lamparter, T. (2003). Mechanism of Cph1 phytochrome assembly from stopped-flow kinetics and circular dichroism. *Biochemistry* 48, 6305–6317. doi: 10.1021/bi900436v
- Borucki, B., Seibeck, S., Heyn, M. P., and Lamparter, T. (2009). Characterization of the covalent and noncovalent adducts of Agp1 phytochrome assembled with biliverdin and phycocyanobilin by circular dichroism and flash photolysis. *Biochemistry* 42, 13684–13697. doi: 10.1021/bi035511n
- Burgie, E. S., Bussell, A. N., Walker, J. M., Dubiel, K., and Vierstra, R. D. (2014). Crystal structure of the photosensing module from a red/far-red light-absorbing plant phytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 10179–10184. doi: 10.1073/pnas.1403096111
- Dasgupta, Y. J., Frontiera, R. R., Taylor, K. C., Lagarias, J. C., and Mathies, R. A. (2009). Ultrafast excited state isomerization in phytochrome revealed by femtosecond stimulated raman spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 1784–1789. doi: 10.1073/pnas.0812056106
- Essen, L. O., Hughes, J., and Mailliet, J. (2008). The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 14709–14714. doi: 10.1073/pnas.0806477105
- Fodor, S. P. A., Lagarias, J. C., and Mathies, R. A. (1988). Resonance raman spectra of the pr-form of phytochrome. *Photochem. Photobiol.* 48, 129–136. doi: 10.1111/j.1751-1097.1988.tb02797.x
- Fodor, S. P. A., Lagarias, J. C., and Mathies, R. A. (1990). Resonance raman analysis of the Pr and Pfr forms of phytochrome. *Biochemistry* 29, 11141–11146. doi: 10.1021/bi00502a018
- Gärtner, W., and Braslavsky, S. E. (2004). “The phytochromes: spectroscopy and function,” in *Photoreceptors and Light Signalling*, ed A. Batschauer (Cambridge: Royal Society of Chemistry), 136–180.
- Hahn, J., Strauss, H. M., and Schmieder, P. (2008). Heteronuclear NMR investigation on the structure and dynamics of the chromophore binding pocket of the cyanobacterial phytochrome Cph1. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 11170–11178. doi: 10.1021/ja8031086
- Kim, P. W., Rockwell, N. C., Freer, L. H., Chung, C. W., Martin, S. S., Lagarias, J. V., et al. (2013). Unraveling the primary isomerization dynamics in cyanobacterial

## Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2015.00037>

Supplementary materials include a list of the DFT-based normal mode analyses of PCB and PΦB isotopomers (frequencies, Raman, and IR intensities, normal mode compositions) and a figure illustrating the goodness of the band fitting analyses (residuals).

- phytochrome Cph1 with multipulse manipulations. *J. Phys. Chem. Lett.* 4, 2605–2609. doi: 10.1021/jz401443q
- Kim, P. W., Rockwell, N. C., Martin, S. S., Lagarias, J. V., and Larsen, D. S. (2014a). Heterogeneous photodynamics of the Pfr state in the cyanobacterial phytochrome Cph1. *Biochemistry* 53, 4601–4611. doi: 10.1021/bi5005359
- Kim, P. W., Rockwell, N. C., Martin, S. S., Lagarias, J. V., and Larsen, D. S. (2014b). Dynamic inhomogeneity in the photodynamics of cyanobacterial phytochrome Cph1. *Biochemistry* 53, 2818–2826. doi: 10.1021/bi500108s
- Kneip, C., Hildebrandt, P., Schlamann, W., Braslavsky, S. E., Mark, F., and Schaffner, K. (1999). Protonation state and structural changes of the tetrapyrrole chromophore during the Pr → Pfr phototransformation of phytochrome. A resonance raman spectroscopic study. *Biochemistry* 38, 15185–15192. doi: 10.1021/bi990688w
- Kneip, C., Mozley, D., Hildebrandt, P., Gärtner, W., Braslavsky, S. E., and Schaffner, K. (1997). Effect of chromophore exchange on the resonance raman spectra of recombinant phytochromes. *FEBS Lett.* 414, 23–26. doi: 10.1016/S0014-5793(97)00969-1
- Lagarias, J. C., and Rapoport, H. (1980). Chromopeptides from phytochrome. The structure and linkage of the Pr form of the phytochrome chromophore. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 4821–4828. doi: 10.1021/ja00534a042
- Lamparter, T., Michael, N., Mittmann, F., and Esteban, B. (2002). Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 11628–11633. doi: 10.1073/pnas.152263999
- Landgraf, F. T., Forreiter, C., Hurtado Pico, A., Lamparter, T., and Hughes, J. (2001). Recombinant holophytochrome in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 508, 459–462. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02988-X
- Linke, M., Yang, Y., Zienicke, B., Hammam, M. A., von Haimberger, T., Zacarias, A., et al. (2013). Electronic transitions and heterogeneity of the bacteriophytochrome Pr absorption band: an angle balanced polarization resolved femtosecond VIS pump-IR probe study. *Biophys. J.* 105, 1756–1766. doi: 10.1016/j.bpj.2013.08.041
- Makhynya, Y., Hussain, Z., Bauschlicher, T., Schwinte, P., Siebert, F., and Gärtner, W. (2007). Synthesis of selectively <sup>13</sup>C-labelled bilin compounds. *Eur. J. Org. Chem.* 2007, 1287–1293. doi: 10.1002/ejoc.200600677
- Malliet, J., Psakis, G., Sineshchekov, V., Essen, L. O., and Hughes, J. (2011). Spectroscopy and a high-resolution crystal structure of Tyr-263 mutants of cyanobacterial phytochrome Cph1. *J. Mol. Biol.* 413, 115–127. doi: 10.1016/j.jmb.2011.08.023
- Matysik, J., Hildebrandt, P., Schlamann, W., Braslavsky, S. E., and Schaffner, K. (1995). Fourier-Transform resonance raman spectroscopic study of the intermediate states of phytochrome. *Biochemistry* 34, 10497–10507. doi: 10.1021/bi00033a023
- Mizutani, Y., Tokutomi, S., and Kitagawa, T. (1994). Resonance Raman spectra of the intermediates in phototransformation of large phytochrome: deprotonation of the chromophore in the bleached intermediate. *Biochemistry* 33, 153–158. doi: 10.1021/bi00167a020
- Mozley, D., Remberg, A., and Gärtner, W. (1997). Large-scale generation of affinity-purified recombinant phytochrome chromopeptide. *Photochem. Photobiol.* 68, 710–715. doi: 10.1111/j.1751-1097.1997.tb03211.x
- Mroginski, M. A., Kaminski, S., von Stetten, D., Ringsdorf, S., Gärtner, W., Essen, L. O., et al. (2011b). The structure of the chromophore binding pocket in the Pr state of plant phytochrome phyA. *J. Phys. Chem. B* 115, 1220–1231. doi: 10.1021/jp108265h

## **Anhang G**

### **Ultrafast electronic and vibrational dynamics in brominated aluminum corroles: Energy relaxation and triplet formation**

T. Stensitzki, Y. Yang, A. Berg, A. Mahammed, Z. Gross, and K. Heyne

Structural Dynamics 3, 043210 (2016)

DOI: 10.1063/1.4948363

**Ultrafast electronic and vibrational dynamics in brominated aluminum corroles: Energy relaxation and triplet formation**

T. Stensitzki, Y. Yang, A. Berg, A. Mahammed, Z. Gross, and K. Heyne

Citation: *Structural Dynamics* **3**, 043210 (2016); doi: 10.1063/1.4949363

View online: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4949363>

View Table of Contents: <http://scitation.aip.org/content/aca/journal/sdy/3/4?ver=pdfcov>

Published by the American Crystallographic Association, Inc.

---

**Articles you may be interested in**

Estimation of damped oscillation associated spectra from ultrafast transient absorption spectra

*J. Chem. Phys.* **145**, 174201 (2016); 10.1063/1.4966196

Ultrafast formation of the benzoic acid triplet upon ultraviolet photolysis and its sequential photodissociation in solution

*J. Chem. Phys.* **136**, 204507 (2012); 10.1063/1.4722084

Intersubband emission and carrier dynamics in GaAs/AlGaAs tunnel-coupled quantum wells after ultrafast optical pumping

*AIP Conf. Proc.* **893**, 479 (2007); 10.1063/1.2729974

Mode-selective O–H stretching relaxation in a hydrogen bond studied by ultrafast vibrational spectroscopy

*J. Chem. Phys.* **125**, 074504 (2006); 10.1063/1.2219111

Spectrally- and time-resolved vibrational surface spectroscopy: Ultrafast hydrogen-bonding dynamics at D<sub>2</sub>O / CaF<sub>2</sub> interface

*J. Chem. Phys.* **122**, 134713 (2005); 10.1063/1.1873652

---

## Ultrafast electronic and vibrational dynamics in brominated aluminum corroles: Energy relaxation and triplet formation

T. Stensitzki,<sup>1</sup> Y. Yang,<sup>1</sup> A. Berg,<sup>2</sup> A. Mahammed,<sup>3</sup> Z. Gross,<sup>3</sup>  
 and K. Heyne<sup>1,a)</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Experimental Physics, Free University Berlin, Arnimallee 14, 14195 Berlin, Germany*

<sup>2</sup>*Institute of Chemistry, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 91904, Israel*

<sup>3</sup>*Technion-Israel Institute of Technology, Schulich Faculty of Chemistry, Haifa 32000, Israel*

(Received 17 February 2016; accepted 29 April 2016; published online 12 May 2016)

We combined femtosecond (fs) VIS pump–IR probe spectroscopy with fs VIS pump–supercontinuum probe spectroscopy to characterize the photoreaction of the hexacoordinated Al(tpfc-Br<sub>8</sub>)(py)<sub>2</sub> in a comprehensive way. Upon fs excitation at ~400 nm in the Soret band, the excitation energy relaxes with a time constant of (250 ± 80) fs to the S<sub>2</sub> and S<sub>1</sub> electronic excited states. This is evident from the rise time of the stimulated emission signal in the visible spectral range. On the same time scale, narrowing of broad infrared signals in the C=C stretching region around 1500 cm<sup>-1</sup> is observed. Energy redistribution processes are visible in the vibrational and electronic dynamics with time constants between ~2 ps and ~20 ps. Triplet formation is detected with a time constant of (95 ± 3) ps. This is tracked by the complete loss of stimulated emission. Electronic transition of the emerging triplet absorption band overlaps considerably with the singlet excited state absorption. In contrast, two well separated vibrational marker bands for triplet formation were identified at 1477 cm<sup>-1</sup> and at 1508 cm<sup>-1</sup>. These marker bands allow a precise identification of triplet dynamics in corrole systems. © 2016 Author(s). All article content, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). [<http://dx.doi.org/10.1063/1.4949363>]

### I. INTRODUCTION

Corroles are developing class of photosensitizers with significant chemical and photophysical properties and relatively unexplored potential.<sup>1,2</sup> The simple and efficient procedure of corroles synthesis combined with readily tuned physical and chemical characteristics by varying the peripheral substituents,<sup>3–6</sup> central metal,<sup>5,7</sup> and axial ligands<sup>8,9</sup> has revived substantial interest in employing these contracted porphyrinoids in various fields. Examples for application of the corroles include dye-sensitized solar cells,<sup>7,10</sup> photodynamic therapy,<sup>11–13</sup> photodynamic detection,<sup>14</sup> photodynamic inactivation of mold fungi and green algae,<sup>15,16</sup> regular and sophisticated optical imaging,<sup>17,18</sup> formation of singlet oxygen for catalysis,<sup>19–21</sup> and corrole-based electron and energy transfer systems.<sup>22–24</sup> In this context, the ability to control the corrole's parameters such as fluorescence,<sup>6,25</sup> phosphorescence,<sup>26–29</sup> and singlet oxygen quantum yield,<sup>30</sup> energy,<sup>31</sup> and lifetime of their photoexcited states<sup>26,32–34</sup> is fundamental in optimizing the corrole based photocatalysts for their specific application.<sup>35</sup> However, there are very few in-depth reports on the physical and spectroscopic features of corroles. The most striking example is vibrational spectroscopy (IR, RR, and more sophisticated methods), very well established for porphyrins<sup>36–39</sup> but very limited for corroles.<sup>40–43</sup> What is more, there is only one prior publication that focused on the ultrafast vibrational processes involved therein.<sup>44</sup> A recent study on

<sup>a)</sup> Author to whom correspondence should be addressed. Electronic mail: Karsten.heyne@fu-berlin.de

other corrole systems investigated electronic dynamics from femtoseconds to microseconds, but a separation of singlet and triplet dynamics on the short time scale remained difficult.<sup>45</sup> An improved insight into the fundamental properties of post-transition metallocorroles is hence clearly required for learning how to utilize them in potentially practical applications.

## II. RESULTS AND DISCUSSION

In this study, we investigated hexacoordinated aluminum(III) 2,3,7,8,12,13,17,18-octabromo-5,10,15-tris(pentafluorophenyl) corrole,  $\text{Al}(\text{tpfc-Br}_8)(\text{py})_2$ , upon excitation at the high energy side of the Soret band at 400 nm. The absorption spectrum exhibits a Soret band maximum at 445 nm, and two maxima in the Q band at 600 nm and 637 nm, resulting from the  $S_0 \rightarrow S_2$  transition and  $S_0 \rightarrow S_1$  transition.<sup>44</sup> Fluorescence maxima were observed at 643 nm and 704 nm, as depicted in Fig. 1. Two pyridine ligands are located above and below the corrole plane, directly interacting with the aluminum (see Fig. 1 inset).

The electronic dynamics were studied by femtosecond VIS pump–supercontinuum probe spectroscopy on a time scale from femtoseconds to 280 ps. We investigated the dynamics in a broad spectral range from 500 nm to 975 nm with a system response of  $\sim 100$  fs. Figure 2(b) presents the difference absorbance change upon photoexcitation in a 2D map. Bleaching and stimulated emission signals (negative) are shown in blue, while increased absorption due to excited state and product bands as triplet absorption are colored in red. As displayed in Fig. 2(b), the positive signal from 500 nm to 574 nm, the positive signal from 670 nm to 975 nm, as well as the negative signal from 574 nm to 670 nm appear instantaneously upon excitation. We assign the positive signal to singlet excited state absorption, and the negative signal to bleaching absorption of the ground state. On a time scale of a few hundred femtoseconds, negative signals rise at the position of the fluorescence at around 650 nm and around 710 nm (see also Fig. 3). We assign these signals to stimulated emission. On a longer time scale of 100 ps, these stimulated emission signals vanish completely, indicating the decay of the electronic excited singlet state. On the same time scale, the bleaching signal from 570 nm to 625 nm increases, due to the loss of the singlet excited state absorption in this spectral range. This is well visible in Fig. 3 for long delay times. This demonstrates the triplet formation on a time scale of 100 ps, since the bleaching signal does not recover, while the stimulated emission signal, reflecting singlet excited state population, vanishes completely.

In Fig. 3, we display the absorbance difference spectra as a function of wavelengths at different delay times. The complete loss of stimulated emission signals around 650 nm and around 710 nm is clearly visible, enabling a definite assignment of the triplet state. Around 600 nm,

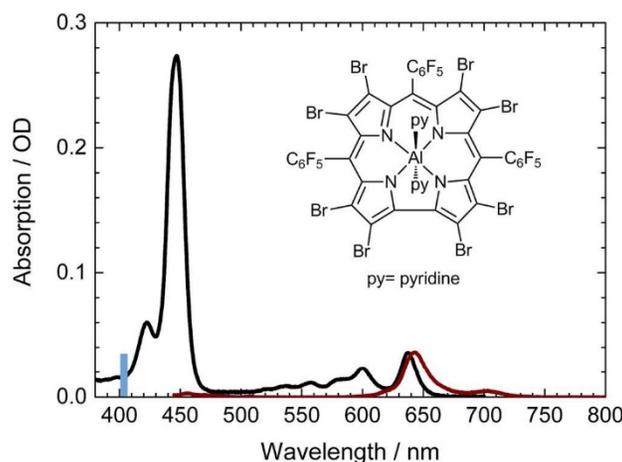


FIG. 1. Absorption spectrum (black) and emission spectrum (wine) of  $\text{Al}(\text{tpfc-Br}_8)(\text{py})_2$ ; excitation wavelength is indicated by a blue bar at 403 nm; inset: Molecular structure of  $\text{Al}(\text{tpfc-Br}_8)(\text{py})_2$ .

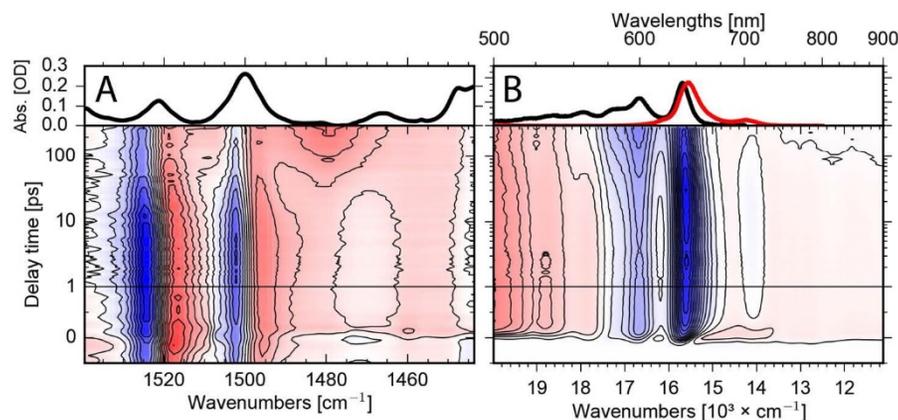


FIG. 2. A. Upper panel: Infrared absorption spectrum of  $\text{Al}(\text{tpfc-Br}_8)(\text{py})_2$  in the investigated spectral region. Lower panel: 2D map of the vibrational absorbance change upon excitation at  $\sim 400$  nm as a function of wavenumber and delay time. Negative signals (blue) indicate bleaching signals, while positive signals (red) are due to singlet excited state absorption and triplet absorption. B. Upper panel: Visible absorption spectrum of  $\text{Al}(\text{tpfc-Br}_8)(\text{py})_2$  (black line) and fluorescence signal (red line) in the investigated spectral region. Lower panel: 2D map of the absorbance change as a function of wavelengths and pump-probe delay time. Excitation at the same wavelength  $\sim 400$  nm. Positive signals (red) show excited state and triplet absorption; negative signals (blue) indicate bleaching and stimulated emission signals. The transient changes of both experiments can be compared directly.

a strong effect of the decaying singlet excited state absorption is displayed; while for wavelengths longer than  $\sim 670$  nm and for short wavelength around 500 nm, a significant positive signal remains. We attribute this remaining positive signal to triplet absorption. Triplet generation in  $\text{Br}_8\text{Al}(\text{tpfc})(\text{py})_2$  was previously observed by the time resolved EPR studies.<sup>5</sup> Importantly, the spectral shape of singlet excited state absorption and triplet absorption are strongly overlapping, and thus difficult to separate.

Transients at selected wavelengths are presented in Fig. 4. At short wavelengths around 500 nm (red line, Fig. 4), the transient absorbance change is minor, because the loss of singlet excited state signal around 100 ps is compensated by the newly generated triplet signal on the same time scale. This indicates a reaction pathway from the singlet excited state to the triplet state. Transients at 550 nm (dark yellow line) and 590 nm (green line) in Fig. 4 illustrate the increase of the negative bleaching contribution on a time scale of  $\sim 100$  ps, due to the loss of

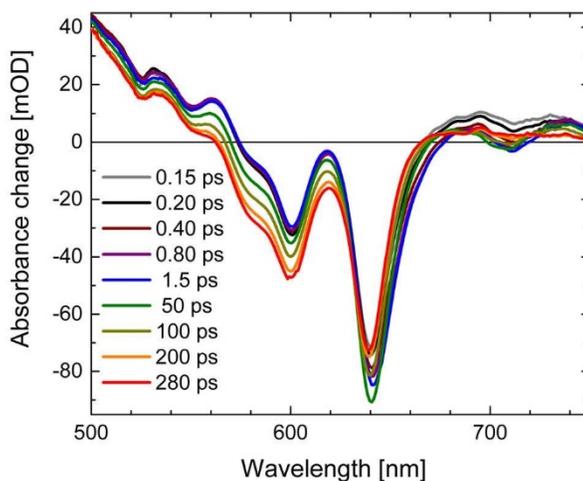


FIG. 3. Absorbance changes of  $\text{Al}(\text{tpfc-Br}_8)(\text{py})_2$  as a function of wavelength at different pump-probe delay times. Positive signals indicate increased absorption upon excitation at  $\sim 400$  nm, while negative signals are due to reduced absorption.

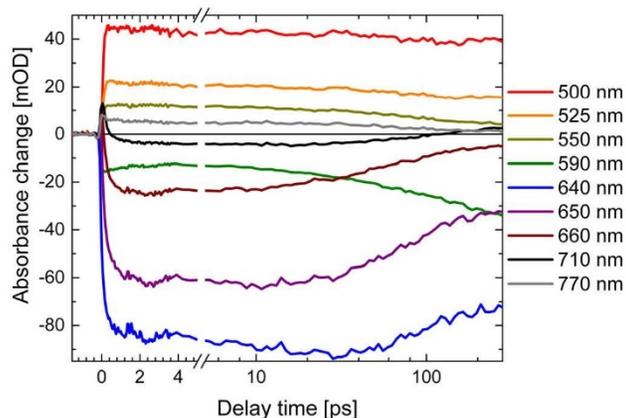


FIG. 4. Transients of the visible dataset upon excitation of  $\text{Al}(\text{tpfc-Br}_8)(\text{py})_2$  at  $\sim 400$  nm (thick solid lines). Simulations of the transients are presented by thin lines.

singlet excited state absorption. In this spectral range, the triplet absorption is smaller than the singlet excited state absorption and cannot compensate the loss of positive signal anymore. At wavelengths of 640 nm (blue line), 650 nm (purple line), 660 nm (wine line), and 710 nm (black line), the negative signal rises within a few hundred femtoseconds, stays nearly constant, and decays on a time scale of  $\sim 100$  ps. The transient at 770 nm (grey line) in Fig. 4 exhibits an instantaneous rise to a positive signal due to the singlet excited state absorption that decays on a time scale of  $\sim 100$  ps to a smaller positive signal. The remaining positive signal is not vanishing, reflecting triplet absorption.

Global simulation of the dataset with a multi exponential approach results in three relevant time constants of  $\tau_1 = (0.25 \pm 0.08)$  ps,  $\tau_2 = (6 \pm 2)$  ps,  $\tau_3 = (95 \pm 3)$  ps, and a constant  $\tau_4$ . The decay associated spectra (DAS) for these time constants are shown in Fig. 5. Here, we can use a true sequential model with a sequence of several steps. Upon excitation, the singlet excited state in the Soret band is formed instantaneously, followed by transfer to the singlet excited state of the Q band accompanied with the rise of stimulated emission with 250 fs. On the picosecond time scale, energy relaxation processes occur in the singlet excited state, followed by a complete singlet excited state decay into the triplet manifold with 95 ps. The constant component in Figure 5 reflects the difference between ground state bleaching and triplet absorption.

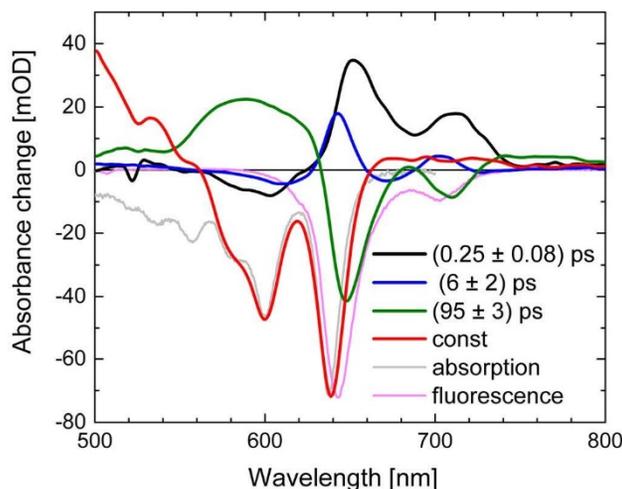


FIG. 5. Decay associated spectra (DAS) of the visible dataset upon excitation of  $\text{Al}(\text{tpfc-Br}_8)(\text{py})_2$  at  $\sim 400$  nm. Absorption (grey line) and fluorescence (pink line) are scaled and plotted for comparison.

As a result of the sequential model, the presented decay associated spectra (DAS) in Figure 5 show the decay and rise of intermediate states with the given time constants.

The DAS of  $\tau_1$  (DAS<sub>1</sub>) exhibits positive signals at the spectral positions of the fluorescence maxima, and small negative signals around 600 nm. This demonstrates that the stimulated emission rises with a time constant  $\tau_1$ , and probably small excited state absorption increases around 600 nm. The DAS<sub>2</sub> exhibits a derivative like pattern with positive/negative contributions at 609 nm (-)/643 nm (+) and 674 nm (-)/702 nm (+) and a time constant of about 6 ps (blue line Fig. 5). This can be interpreted as cooling of vibrational modes coupled to the singlet excited state absorption, resulting in spectral shifts and narrowing of the stimulated emission. Extending the global fit to five exponentials results in splitting of DAS<sub>2</sub> in two contributions. This is presented in Fig. S1 with two time constants of 2 ps and 18 ps for cooling.<sup>50</sup> DAS<sub>3</sub> has negative signals at spectral positions of the fluorescence, significant positive signals around 600 nm, and small positive signals around 500 nm and 800 nm. We assign time constant  $\tau_3$  to the singlet excited state decay and triplet formation. Positive signals indicate decay of the singlet electronic excited state signal that is not compensated by the triplet absorption, and negative signals indicate the decay of the stimulated emission signal. Note that the stimulated emission signal vanishes completely, best visible at around 700 nm.

Since the stimulated emission and the electronic absorption spectra of excited state, triplet state, and ground state provide considerable spectral overlap, we decided to investigate the vibrational marker band region around 1500 cm<sup>-1</sup> after excitation at ~400 nm.<sup>44</sup>

The absorbance change upon excitation as a function of wavenumber and delay time is presented as a 2D map in Fig. 2(a) lower panel. Observed are pronounced bleaching signals at 1501 cm<sup>-1</sup> and 1523 cm<sup>-1</sup>, matching the positions of the absorption bands in Fig. 2(a) upper panel. These bleaching signals were assigned to C=C stretching vibrations  $\nu(\text{C}=\text{C})_1$  and  $\nu(\text{C}=\text{C})_2$  at 1501 cm<sup>-1</sup> and 1523 cm<sup>-1</sup>, respectively. The bleaching band around 1470 cm<sup>-1</sup> in Fig. 2(a) is indicated by a small perturbed free induction decay signal<sup>44</sup> at delay times before time zero in Fig. 2(a). This negative signal is masked by positive contributions for all detected delay times up to 300 ps. Upon excitation, we observe strong positive signals red-shifted to the bleaching bands at 1501 cm<sup>-1</sup> and 1523 cm<sup>-1</sup> due to the vibrations in the singlet electronic excited state. We assign these vibrations to  $\nu(\text{C}=\text{C})_1^*$  and  $\nu(\text{C}=\text{C})_2^*$  vibrations in the S<sub>1</sub> electronic excited state. On a time scale of a few hundred femtoseconds, the positive bands show a significant broadening to lower energy frequencies. We assign this feature to excitation of higher low-frequency vibrational states in the S<sub>1</sub>, i.e., a hot population of the observed vibrations due to fast energy redistribution of the excess energy. A striking feature in Fig. 2(a) is the decay of the  $\nu(\text{C}=\text{C})_1^*$  and  $\nu(\text{C}=\text{C})_2^*$  signals on a time scale of 100 ps, exactly the time scale when stimulated emission signal vanishes in Fig. 2(b). Accompanied with this decay, new positive signals rise at 1480 cm<sup>-1</sup> and 1506 cm<sup>-1</sup>. We assign the decay of the  $\nu(\text{C}=\text{C})_1^*$  and  $\nu(\text{C}=\text{C})_2^*$  absorption to a decay of the singlet excited state, and the rise of the positive signals at 1480 cm<sup>-1</sup> and 1506 cm<sup>-1</sup> to triplet formation. Hence, the new emerging bands at 1480 cm<sup>-1</sup> and 1506 cm<sup>-1</sup> represent the marker bands for a triplet state in Al(tpfc-Br<sub>8</sub>)(py)<sub>2</sub>.

In Fig. 6, the absorbance difference spectra at different delay times are presented. At early delay times, no signatures indicative of the triplet marker bands are visible. The positive signal around 1540 cm<sup>-1</sup> exhibits a decay within a few picoseconds. This signal could reflect some population persisting longer in the electronic excited state of the Soret band, resulting in a strongly altered C=C stretching frequency. The early delay times from a few ps to about 30 ps are dominated by narrowing of the positive bands. The cooling effect is also visible by the spectral shift of the zero-crossings on the low energy side of the bleaching signals at 1499 cm<sup>-1</sup> and 1520 cm<sup>-1</sup>. These spectral shifts presented in Fig. S2 can be simulated with time constants of (1.4 ± 0.3) ps and (19 ± 3) ps.<sup>50</sup> This is corroborated by spectral shift of the bleaching and stimulated emission band around 650 nm (see Fig. S2) with the time constants of (1.2 ± 0.8) ps and (22 ± 2) ps.<sup>50</sup> The difference spectrum at 300 ps (red dots and line) in Fig. 6 mainly shows triplet absorption (positive signals) and bleaching bands (negative signals).

Fig. 7 presents the transients at selected wavenumbers: At 1516 cm<sup>-1</sup> (green triangles) and 1522 cm<sup>-1</sup> (yellow circles), a significant part of the dynamic changes in the sub picosecond

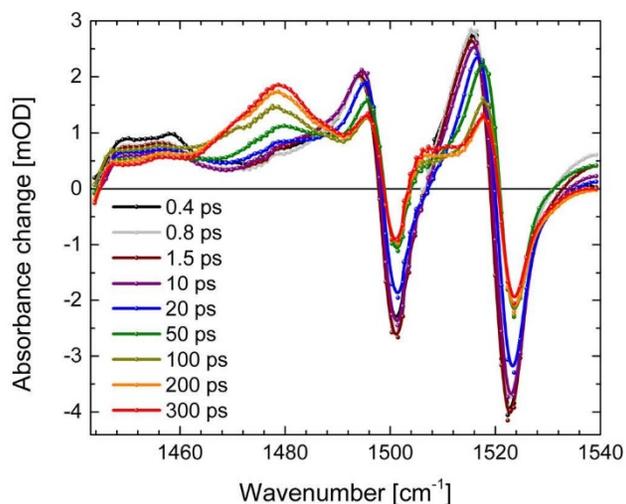


FIG. 6. Vibrational absorbance difference spectra of  $\text{Al}(\text{tpfc-Br}_8)(\text{py})_2$  as a function of wavenumber at different delay times. Positive signals are for increased absorption and negative signals for decreased absorption (bleaching bands).

time scale. On a time scale of about 20 ps positive/negative absorption pairs decay at  $1495\text{ cm}^{-1}$  (+)/ $1501\text{ cm}^{-1}$  (-) and  $1516\text{ cm}^{-1}$  (+)/ $1522\text{ cm}^{-1}$  (-). Positive absorption of the transients at  $1480\text{ cm}^{-1}$  (black dots) and  $1506\text{ cm}^{-1}$  (blue triangles) clearly increases around 100 ps, matching the triplet rise time of 95 ps in the visible data (Fig. 5).

In Fig. 8, we present DAS of the global fit of the vibrational data. We found at least five components to simulate the data. The fast component with  $(200 \pm 100)$  fs decay time reflects signal decay around  $1460\text{ cm}^{-1}$  and shifting of bands around  $1500\text{ cm}^{-1}$  and  $1520\text{ cm}^{-1}$ . Time constants of  $(2.0 \pm 0.5)$  ps and  $(18 \pm 3)$  ps show dispersive features around  $1500\text{ cm}^{-1}$  and  $1520\text{ cm}^{-1}$  reflecting cooling, narrowing, and spectral shifts of these bands. The spectral shifts of the zero-crossings are presented in Fig. S2.<sup>50</sup> Since vibrational dynamics are directly connected to its electronic dynamics, common decay times describe the same dynamics. Thus, the DAS with decay time of  $(80 \pm 8)$  ps displays the decay of the singlet excited state (positive signals) and the rise of the triplet absorption (negative signals). We obtain the same results upon analyzing the lifetime map of the vibrational data (presented in Fig. S3).<sup>50</sup>

In summary, we propose the following photoreaction scheme presented in Fig. 9. After photoexcitation, the internal conversion in the Soret band is ultrafast, and energy relaxation into

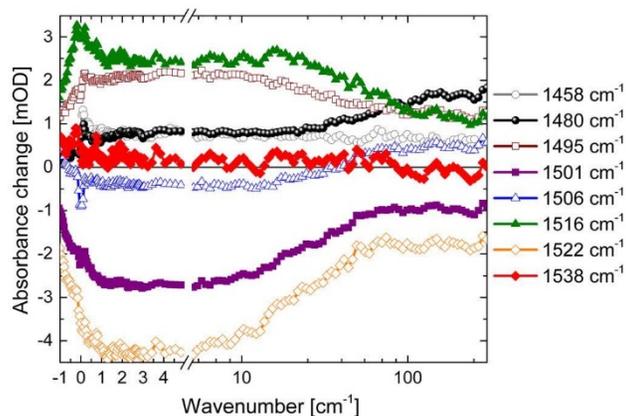


FIG. 7. Vibrational transient data at selected wavenumbers as a function of delay time upon excitation of  $\text{Al}(\text{tpfc-Br}_8)(\text{py})_2$  at  $\sim 400\text{ nm}$ .

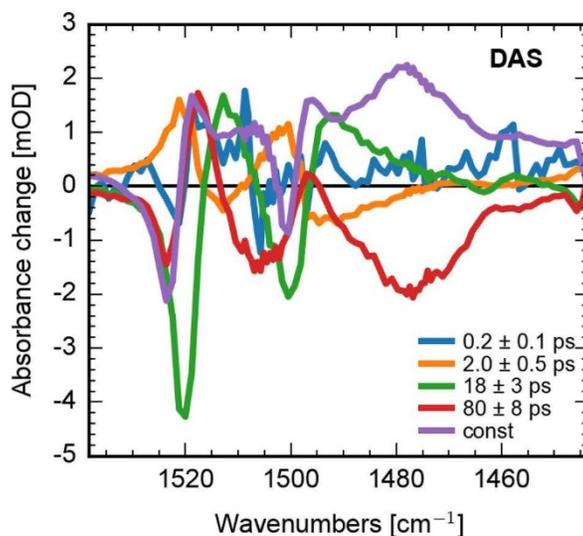


FIG. 8. Decay associated spectra of the vibrational dynamics of  $\text{Al}(\text{tpfc-Br}_8)(\text{py})_2$  upon excitation at  $\sim 400$  nm. Our true sequential model allows to interpret the spectra as spectra of intermediate states increasing/decaying with the given time constant.

the Q band occurs with a time constant of 250 fs. In the Q band, energy relaxation processes on the picosecond time scale take place (see Fig. 9). With a time constant of 95 ps all population is transferred from the singlet excited state to the triplet state. We assume that this triplet state is the  $T_1$  state, because we do not detect further relaxation processes on a time scale of 300 ps, but we cannot exclude that the populated triplet state is an excited triplet state. We conclude that 100% of the excited state population is transferred to the triplet state, since we do not observe any bleaching recovery in the 95 ps time scale, and the stimulated emission signal completely vanishes with this time constant.

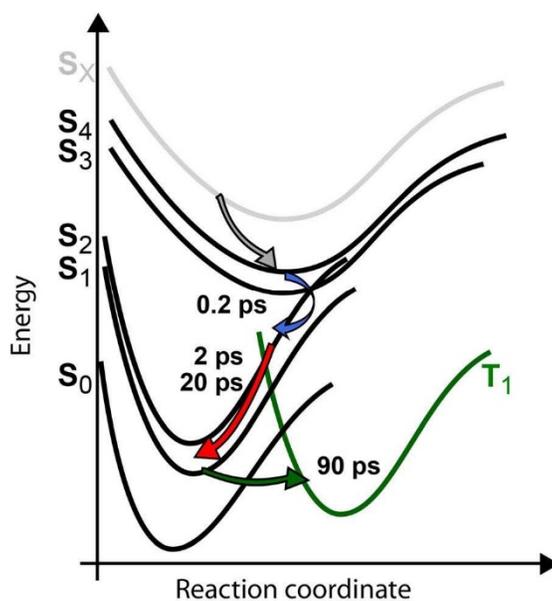


FIG. 9. Sketch of the proposed photoreaction pathways. Upon excitation, a fast relaxation to the Q band ( $S_1$ ,  $S_2$ ) with a time constant of 250 fs occurs, followed by energy redistribution processes with 2 ps and 20 ps. The complete excited population is transferred to the triplet state with a time constant of 95 ps.

### III. CONCLUSION

We present the first comprehensive analysis of the photoreaction dynamics of a brominated corrole Al(tpfc-Br<sub>8</sub>)(py)<sub>2</sub> by combining electronic and vibrational dynamics for the first time. We measured a very fast Soret to Q band transition with a time constant of 250 fs, which is fast compared to non-brominated Al(tpfc)py with a time constant of 500 fs,<sup>34</sup> and other corrole systems.<sup>32,34,45</sup> The energy redistribution processes occur on a picosecond time scale, similar to other corrole systems.<sup>32,45</sup>

Nevertheless, electronic absorption bands overlap significantly and thus prevent a clear assignment of triplet dynamics. We identified vibrational triplet marker bands at 1480 cm<sup>-1</sup> and 1506 cm<sup>-1</sup> as ideally suited for characterization of triplet formation and dynamics. In Al(tpfc-Br<sub>8</sub>)(py)<sub>2</sub> triplet generation takes place with a time constant of 95 ps, significantly faster than intersystem crossing rates reported for free-base corroles and their germanium and phosphorus complexes,<sup>32,45</sup> and with an extraordinarily high yield of about 100%. This exceptional high triplet quantum yield can be explained by the bromine atoms introducing a strong spin-orbit coupling. Hence, Al(tpfc-Br<sub>8</sub>)(py)<sub>2</sub> is a very promising candidate as a photosensitizer with an expected high singlet oxygen yield. The identification of vibrational marker bands for separation of singlet and triplet dynamic opens new strategies to investigate the triplet formation in corroles and related molecules.

### IV. METHODS

Femtosecond laser pulses were generated starting from a fundamental femtosecond laser pulse delivered by a 1 kHz Ti:Sa laser system (Coherent Legend USP, 80 fs pulses at 800 nm). The fundamental beam was split into two parts for pump and probe pulse generation. The pump pulses were generated by second harmonic generation in a BBO crystal with a pulse energy of 0.25 μJ.

Angle balanced femtosecond polarization resolved VIS pump-IR probe measurements were applied as described elsewhere.<sup>46,47</sup> In short, the mid-IR probe beam is generated by a difference frequency mixing step from near-infrared signal and idler pulses generated by 800 nm fs pulses in a BBO crystal. Two reflections of the fs mid-IR pulse are taken as probe beams with different polarizations used at the same time in the same sample volume to detect absorbance changes. The system response was about 350 fs with pump focus of about 200 μm and probe focus of about 150 μm. Absorbance changes with mid-IR polarizations parallel ( $A_{pa}$ ) and perpendicular ( $A_{pe}$ ) to the VIS pump beam polarization were detected. Isotropic absorbance changes ( $A_{iso}$ ) were calculated by  $A_{iso} = (A_{pa} + 2 A_{pe})/3$ . Here, we presented only isotropic data. In the IR dataset, we observed a rising featureless background with a delay time. This background is subtracted in the presented data. The background is probably induced by long-lasting triplet generation.

For isotropic Vis pump-supercontinuum probe measurements, we used a sapphire white light supercontinuum with polarization angle between both beams set to the magic angle (54.7°). Both beams were focused into the sample cell by a curved mirror. Behind the sample, a filter (HR-800 mirror) was used to suppress the fundamental in the supercontinuum, and the beam was focused into a prism-spectrometer (Stresing GmbH) equipped with a 512 pixel InGaAs sensor. Every second pump beam was blocked by a chopper to record excited and not excited sample volumes alternatively.<sup>48</sup> The sample was moved perpendicular to the beam direction to minimize reexcitation. The system response was better than 100 fs (typically ~80 fs). The Al(tpfc-Br<sub>8</sub>)(py)<sub>2</sub> was synthesized as reported previously.<sup>5,49</sup> Al(tpfc-Br<sub>8</sub>)(py)<sub>2</sub> samples of about 0.008 mol/l were prepared with a maximal absorption of about 1 OD in the Q-band at 640 nm in d<sub>8</sub>-toluene.

### ACKNOWLEDGMENTS

Work performed at the Technion was supported by a grant from the Israel Science Foundation. The work at the Hebrew University of Jerusalem was supported by the KAMEA Foundation (A.B.). The work performed at the Free University of Berlin was supported by the SFB 1078, TP B3.

- <sup>1</sup>I. Aviv and Z. Gross, *Chem. Commun.* **2007**, 1987.
- <sup>2</sup>C. I. M. Santos, J. F. B. Barata, M. J. F. Calvete, L. S. H. P. Vale, D. Dini, M. Meneghetti, M. G. P. M. S. Neves, M. A. F. Faustino, A. C. Tome, and J. A. S. Cavaleiro, *Curr. Org. Synth.* **11**, 29 (2014).
- <sup>3</sup>J. Vestfrid, M. Botoshansky, J. H. Palmer, A. C. Durrell, H. B. Gray, and Z. Gross, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 12899 (2011).
- <sup>4</sup>L. Wagnert, R. Rubin, A. Berg, A. Mahammed, Z. Gross, and H. Levanon, *J. Phys. Chem. B* **114**, 14303 (2010).
- <sup>5</sup>L. Wagnert, A. Berg, E. Stavitski, T. Berthold, G. Kothe, I. Goldberg, A. Mahammed, L. Simkhovich, Z. Gross, and H. Levanon, *Appl. Magn. Reson.* **30**, 591 (2006).
- <sup>6</sup>C. M. Lemon, R. L. Halbach, M. Huynh, and D. G. Nocera, *Inorg. Chem.* **54**, 2713 (2015).
- <sup>7</sup>B. J. Brennan, Y. C. Lam, P. M. Kim, X. Zhang, and G. W. Brudvig, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**(19), 12728–12734 (2015).
- <sup>8</sup>I. Aviv-Harel and Z. Gross, *Coord. Chem. Rev.* **255**, 717 (2011).
- <sup>9</sup>J. Palmer, in *Molecular Electronic Structures of Transition Metal Complexes I*, edited by D. M. P. Mingos, P. Day, and J. P. Dahl (Springer, Berlin, Heidelberg, 2012), Vol. 142, p. 49.
- <sup>10</sup>D. Walker, S. Chappel, A. Mahammed, B. S. Brunschwig, J. R. Winkler, H. B. Gray, A. Zaban, and Z. Gross, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **10**, 1259 (2006).
- <sup>11</sup>J. Y. Hwang, D. J. Lubow, J. D. Sims, H. B. Gray, A. Mahammed, Z. Gross, L. K. Medina-Kauwe, and D. L. Farkas, *J. Biomed. Opt.* **17**, 015003 (2012).
- <sup>12</sup>J. F. B. Barata, A. Zamarrón, M. G. P. M. S. Neves, M. A. F. Faustino, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, B. Röder, Á. Juarranz, and F. Sanz-Rodríguez, *Eur. J. Med. Chem.* **92**, 135 (2015).
- <sup>13</sup>J. Y. Hwang, D. J. Lubow, D. Chu, J. Sims, F. Alonso-Valenteen, H. B. Gray, Z. Gross, D. L. Farkas, and L. K. Medina-Kauwe, *J. Controlled Release* **163**, 368 (2012).
- <sup>14</sup>H. Agadjanian, J. Ma, A. Rentsendorj, V. Valluripalli, J. Y. Hwang, A. Mahammed, D. L. Farkas, H. B. Gray, Z. Gross, and L. K. Medina-Kauwe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 6105 (2009).
- <sup>15</sup>A. Preuss, I. Saltsman, A. Mahammed, M. Pfizner, I. Goldberg, Z. Gross, and B. J. Roder, *Photochem. Photobiol. B* **133**, 39 (2014).
- <sup>16</sup>J. Pohl, I. Saltsman, A. Mahammed, Z. Gross, and B. J. Roder, *Appl. Microbiol.* **118**, 305 (2015).
- <sup>17</sup>J. Y. Hwang, Z. Gross, H. B. Gray, L. K. Medina-Kauwe, and D. L. Farkas, *Proc SPIE* **7902**, 79020F (2011).
- <sup>18</sup>J. Y. Hwang, S. Wachsmann-Hogiu, V. K. Ramanujan, J. Ljubimova, Z. Gross, H. B. Gray, L. K. Medina-Kauwe, and D. L. Farkas, *Mol. Imaging Biol.* **14**, 431 (2012).
- <sup>19</sup>I. Luobeznova, M. Raizman, I. Goldberg, and Z. Gross, *Inorg. Chem.* **45**, 386 (2006).
- <sup>20</sup>J. F. B. Barata, A. L. Daniel-da-Silva, M. G. P. M. S. Neves, J. A. S. Cavaleiro, and T. Trindade, *RSC Adv.* **3**, 274 (2013).
- <sup>21</sup>L. M. Reith, M. Himmelsbach, W. Schoefberger, and G. J. Knör, *Photochem. Photobiol. A: Chem.* **218**, 247 (2011).
- <sup>22</sup>L. Flamigni and D. T. Gryko, *Chem. Soc. Rev.* **38**, 1635 (2009).
- <sup>23</sup>L. Giribabu, J. Kandhadi, R. K. Kanaparthi, and P. S. Reeta, *J. Lumin.* **145**, 357 (2014).
- <sup>24</sup>L. Giribabu, J. Kandhadi, and R. K. Kanaparthi, *J. Fluoresc.* **24**(2), 569 (2014).
- <sup>25</sup>L. Shi, H.-Y. Liu, H. Shen, J. Hu, G.-L. Zhang, H. Wang, L.-N. Ji, C.-K. Chang, and H.-F. Jiang, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **13**, 1221 (2009).
- <sup>26</sup>J. Vestfrid, I. Goldberg, and Z. Gross, *Inorg. Chem.* **53**, 10536 (2014).
- <sup>27</sup>E. Rabinovich, I. Goldberg, and Z. Gross, *Chem. Eur. J.* **17**, 12294 (2011).
- <sup>28</sup>J. H. Palmer, A. C. Durrell, Z. Gross, J. R. Winkler, and H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9230 (2010).
- <sup>29</sup>J. H. Palmer, M. W. Day, A. D. Wilson, L. M. Henling, Z. Gross, and H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 7786 (2008).
- <sup>30</sup>W. Shao, H. Wang, S. He, L. Shi, K. Peng, Y. Lin, L. Zhang, L. Ji, and H. J. Liu, *Phys. Chem. B* **116**, 14228 (2012).
- <sup>31</sup>A. Mahammed, B. Tumanskii, and Z. Gross, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **15**, 1275 (2011).
- <sup>32</sup>L. Zhang, Z.-Y. Liu, X. Zhan, L.-L. Wang, H. Wang, and H.-Y. Liu, *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, 953 (2015).
- <sup>33</sup>D. Kowalska, X. Liu, U. Tripathy, A. Mahammed, Z. Gross, S. Hirayama, and R. P. Steer, *Inorg. Chem.* **48**, 2670 (2009).
- <sup>34</sup>X. Liu, A. Mahammed, U. Tripathy, Z. Gross, and R. P. Steer, *Chem. Phys. Lett.* **459**, 113 (2008).
- <sup>35</sup>A. Mahammed and Z. Gross, *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 12370 (2015).
- <sup>36</sup>S. C. Omapinyan, *Vibrational Spectroscopy of Porphyrins, Phthalocyanines and Tetraphenyl Derivatives of Group IV-A Elements* (University of East Anglia, 1997).
- <sup>37</sup>B. M. Leu, M. Z. Zgierski, C. Bischoff, M. Li, M. Y. Hu, J. Zhao, S. W. Martin, E. E. Alp, and W. R. Scheidt, *Inorg. Chem.* **52**, 9948 (2013).
- <sup>38</sup>L. M. Proniewicz, A. Bruha, K. Nakamoto, E. Kyumo, and J. R. Kincaid, *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 7050 (1989).
- <sup>39</sup>T. Kitagawa and Y. Ozaki, in *Metal Complexes with Tetrapyrrole Ligands I*, edited by J. Buchler (Springer, Berlin, Heidelberg, 1987), Vol. 64, p. 71.
- <sup>40</sup>E. Steene, T. Wondimagegn, and A. J. Ghosh, *Inorg. Biochem.* **88**, 113 (2002).
- <sup>41</sup>V. V. Mody, M. B. Fitzpatrick, S. S. Zabaneh, R. S. Czernuszewicz, M. Gałczowski, and D. T. Gryko, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **13**, 1040 (2009).
- <sup>42</sup>I. Halvorsen, E. Steene, and A. Ghosh, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **05**, 721 (2001).
- <sup>43</sup>J. H. Wasbotten, T. Wondimagegn, and A. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8104 (2002).
- <sup>44</sup>Y. Yang, D. Jones, T. von Haimberger, M. Linke, L. Wagnert, A. Berg, H. Levanon, A. Zacarias, A. Mahammed, Z. Gross, and K. Heyne, *J. Phys. Chem. A* **116**, 1023 (2012).
- <sup>45</sup>S. S. K. Raavi, J. Yin, G. Grancini, C. Soci, S. V. Rao, G. Lanzani, and L. Giribabu, *J. Phys. Chem. C* **119**, 28691 (2015).
- <sup>46</sup>Y. Yang, M. Linke, T. von Haimberger, R. Matute, L. González, P. Schmieder, and K. Heyne, *Struct. Dyn.* **1**, 014701 (2014).
- <sup>47</sup>L. Linke, Y. Yang, B. Zienicke, M. A. S. Hammam, T. von Haimberger, A. Zacarias, K. Inomata, T. Lamparter, and K. Heyne, *Biophys. J.* **105**, 1756 (2013).
- <sup>48</sup>T. Stensitzki, V. Muters, R. Schlesinger, J. Heberle, and K. Heyne, *Front. Mol. Biosci.* **2**(41), 1 (2015).
- <sup>49</sup>A. Mahammed and Z. Gross, *J. Inorg. Biochem.* **88**, 305 (2002).
- <sup>50</sup>See supplementary material at <http://dx.doi.org/10.1063/1.4949363> for a global fit of the visible data with four exponentials, an analysis of spectral shifts of visible and infrared data, and a lifetime map of vibrational dynamics.

## **Anhang H**

### **Femtosecond Infrared Spectroscopy of Channelrhodopsin-1 Chromophore Isomerization**

T. Stensitzki, Y. Yang, V. Muders, R. Schlesinger, J. Heberle and K. Heyne

Structural Dynamics 2016, 3(4): 043208

DOI: 10.1063/1.4948338

## Femtosecond infrared spectroscopy of channelrhodopsin-1 chromophore isomerization

T. Stensitzki,<sup>1</sup> Y. Yang,<sup>1</sup> V. Muders,<sup>2</sup> R. Schlesinger,<sup>2</sup> J. Heberle,<sup>3</sup> and K. Heyne<sup>1,a)</sup>

<sup>1</sup>Department of Physics, Institute of Experimental Physics, Freie Universität Berlin, Arnimallee 14, 14195 Berlin, Germany

<sup>2</sup>Genetic Biophysics, Department of Physics, Freie Universität Berlin, Arnimallee 14, 14195 Berlin, Germany

<sup>3</sup>Experimental Molecular Biophysics, Department of Physics, Freie Universität Berlin, Arnimallee 14, 14195 Berlin, Germany

(Received 1 March 2016; accepted 15 April 2016; published online 29 April 2016)

Vibrational dynamics of the retinal all-*trans* to 13-*cis* photoisomerization in channelrhodopsin-1 from *Chlamydomonas augustae* (CaChR1) was investigated by femtosecond visible pump mid-IR probe spectroscopy. After photoexcitation, the transient infrared absorption of C-C stretching modes was detected. The formation of the 13-*cis* photoproduct marker band at  $1193\text{ cm}^{-1}$  was observed within the time resolution of 0.3 ps. We estimated the photoisomerization yield to  $(60 \pm 6)\%$ . We found additional time constants of  $(0.55 \pm 0.05)\text{ ps}$  and  $(6 \pm 1)\text{ ps}$ , assigned to cooling, and cooling processes with a back-reaction pathway. An additional bleaching band demonstrates the ground-state heterogeneity of retinal. © 2016 Author(s). All article content, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). [<http://dx.doi.org/10.1063/1.4948338>]

### I. INTRODUCTION

Light excitation of rhodopsins lead to various functionalities like sensing, ion pumping and channeling across the biological membrane. Channelrhodopsins (ChR) are the only light-gated ion channels in nature found so far. Originally, they are located in the eyespot of green algae to mediate phototaxis. In these days, channelrhodopsins are used in the vibrant field of optogenetics<sup>1</sup> where the protein is used to elicit action potentials in nerve cells by light. ChR have been applied to unravel neuronal connectivity<sup>2</sup> and to manipulate behavior in ChR-expressing animals like worms and rodents.<sup>3,4</sup> Due to their application in living organisms, the detailed understanding of the molecular mechanism after light excitation is of high interest.

Common to all rhodopsins, the initial step of photo-activation of channelrhodopsin involves isomerization of the retinal chromophore. Most spectroscopic analysis has been performed on channelrhodopsin-2 from *Chlamydomonas reinhardtii* (CrChR2).<sup>5</sup> Ultrafast pump-probe experiments<sup>6</sup> provided evidence for retinal isomerization and formation of the first photoproduct to take place with a time constant  $\tau$  of 400 fs. Due to the fast deactivation of the excited state, the impact of retinal isomerization on the protein surrounding was observed with a time constant of 0.5 ps by Vis-pump/mid-IR probe spectroscopy.<sup>7</sup>

Much less is known about the photoreaction of the other light-activated cation channel of *C. reinhardtii*, CrChR1, due to the difficulties in overexpression. However, channelrhodopsin-1 from related *Chlamydomonas augustae* (CaChR1) achieves high expression yields in the yeast *Pichia pastoris*.<sup>8,9</sup> Interestingly, CaChR1 comes with two distinct advantages for optogenetic application. It has a slower inactivation under sustained illumination than CrChR1 and a

<sup>a)</sup> Author to whom correspondence should be addressed. Electronic mail: Karsten.heyne@fu-berlin.de

red-shifted absorption maximum as compared to *CrChR2*. Thus, *CaChR1* can be activated with the light of longer wavelength, which is able to penetrate deeper into biological tissue.<sup>8</sup>

Like in *CrChR2*, the ground state of *CaChR1* exhibits a heterologous retinal isomer composition. Retinal extraction and analysis of the isomers by high performance liquid chromatography reveals a 70:30 ratio of all-*trans* to 13-*cis* retinal. Resonance Raman experiments of the C=C stretching modes of the retinal embedded in the functional protein confirmed that mainly all-*trans* and to a minor amount 13-*cis* retinal exists.<sup>9</sup> Recently, the heterogeneity of the ground state was again verified by UV/Vis absorption experiments with femtosecond time resolution which exhibit different photoreaction dynamics of *CaChR1* on varying the excitation wavelength.<sup>10</sup> These experiments revealed an ultrafast isomerization of the all-*trans* retinal to a hot and spectrally broad  $P_1$  photoproduct with a time constant of  $(100 \pm 50)$  fs, followed by the photoproduct relaxation with time constants of  $(500 \pm 100)$  fs and  $(5 \pm 1)$  ps.<sup>10</sup> UV/Vis absorption experiments with nanosecond time resolution showed that the appearance of a red-shifted intermediate  $P_1$  absorbing at around 560 nm arises, followed by the rise of a biphasic  $P_2$  intermediate matching the time for ion conduction of the channel.<sup>11</sup> After the decay of the  $P_2$  intermediate, only faint traces of a red-shifted intermediate ( $P_3$ -like) and a  $P_4$  intermediate have been detected.<sup>11</sup>

In this study, we focus on identification of the retinal all-*trans* photoreaction by vibrational spectroscopy. Time-resolved vibrational spectroscopy proved to be a very reliable method for characterization of photoisomerization dynamics.<sup>12,13</sup> In particular, vibrational modes of retinal chromophores in photoreceptors are well studied. Vibrational marker bands for the all-*trans*, 15-*anti* retinal around  $1163\text{ cm}^{-1}$ ,  $1200\text{ cm}^{-1}$ , and  $\sim 1240\text{ cm}^{-1}$  were assigned to mixed C-C stretching modes of the chromophore. The vibration at  $\sim 1240\text{ cm}^{-1}$  was assigned to a vibration with significant  $C_{12}$ - $C_{13}$  stretching mode character, while the vibration at  $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$  was assigned to a mode with significant  $C_{14}$ - $C_{15}$  stretching character.<sup>14</sup> In *CaChR1*, these modes were observed in FTIR-difference spectra at  $1163\text{ cm}^{-1}$ ,  $1205\text{ cm}^{-1}$ , and  $1240\text{ cm}^{-1}$ .<sup>15</sup> Upon photoisomerization, the expected photoproduct has a 13-*cis*, 15-*anti* retinal conformation. A specific vibrational marker band was reported at about  $1195\text{ cm}^{-1}$ , assigned to a vibration with a significant  $C_{14}$ - $C_{15}$  stretching component.<sup>16</sup> This marker band for a 13-*cis* photoproduct was also observed in *CaChR1* by FTIR-difference spectroscopy and, very recently, by impulsive vibrational spectroscopy,<sup>17</sup> confirming all-*trans* to 13-*cis* isomerization.<sup>15</sup> Here, we focused on the time-resolved observation of the all-*trans* marker bands at  $1200\text{ cm}^{-1}$  and  $1240\text{ cm}^{-1}$ , as well as on the 13-*cis*, 15-*anti* marker band at  $\sim 1195\text{ cm}^{-1}$ .

## II. RESULTS AND DISCUSSION

In Fig. 1, the visible absorption spectrum of *CaChR1* is plotted. We excited the sample at  $\sim 530\text{ nm}$ , where the absorption spectrum is dominated by *CaChR1* with retinal all-*trans* configuration.

For tracking the retinal photoisomerization from all-*trans* to 13-*cis* configuration around the  $C_{13}$ = $C_{14}$  double bond, we applied angle-balanced polarization-resolved femtosecond visible (VIS) pump-IR probe spectroscopy<sup>18</sup> to determine the vibrational dynamics on *CaChR1* in  $H_2O$  in the vibrational fingerprint region from  $1174\text{ cm}^{-1}$  to  $1257\text{ cm}^{-1}$  with a high spectral resolution of  $1.5\text{ cm}^{-1}$ . The spectral range around  $1200\text{ cm}^{-1}$  exhibits well-characterized vibrational marker bands for retinal all-*trans* conformation, and retinal 13-*cis* conformation. These vibrational modes are dominated by the  $C_{14}$ - $C_{15}$  stretching vibration of the retinal chromophore, the position where photoisomerization is supposed to induce strongest alterations. Since electronic spectra of stimulated emission, electronic excited state, product, and ground-state absorption overlap considerably, the vibrational marker band at  $1190\text{ cm}^{-1}$  is a very suitable tool for 13-*cis* photoproduct identification.

Upon photoexcitation at 530 nm, spectral changes in the fingerprint region are presented in Fig. 2 for selected pump-probe delay times. An instantaneous strong negative signal is observed at  $1203\text{ cm}^{-1}$ , reflecting the ground-state bleaching of the  $C_{14}$ - $C_{15}$  stretching vibration of retinal in the all-*trans* conformation. A strong positive signal is visible at  $1190\text{ cm}^{-1}$ ,

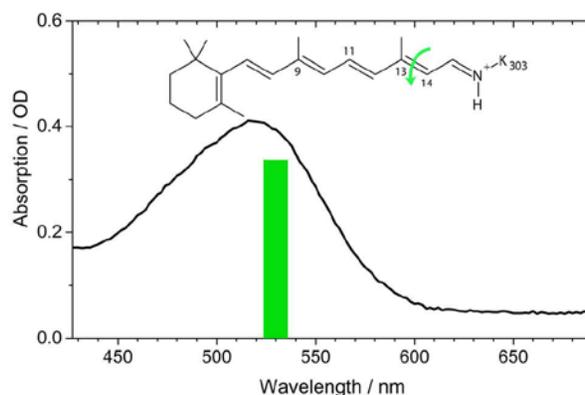


FIG. 1. Absorption spectrum of *CaChR1*. The green bar shows the excitation wavelength. Inset: Retinal all-*trans*, 15-*anti* configuration with protonated Schiff base. Green arrow indicates the photoisomerization.

representing the  $C_{14}$ - $C_{15}$  stretching vibration of the 13-*cis* conformation. At time zero, this positive signal is absent, but at a delay time of 0.35 ps the signal has reached its maximum. This points to a very fast formation of the retinal 13-*cis* photoproduct, which is faster than 0.3 ps. Upon excitation, strong mixing of the C=C double and C-C single bond vibrations takes place in the electronic excited state. Thus, we observe no strong positive signal from retinal excited state absorption in the investigated spectral region. Another significant negative signal is visible at  $1239\text{ cm}^{-1}$ , displaying the bleaching band of  $C_{12}$ - $C_{13}$  stretching vibration in the retinal all-*trans* conformation. This band is spectrally shifted in the 13-*cis* conformation, and has negligible spectral overlap with strong positive absorption bands. Hence, we can use the bleaching recovery of this band to estimate the forward quantum yield of the photoreaction. The high spectral resolution of  $1.5\text{ cm}^{-1}$  allows for identification of spectral substructures. A closer inspection of the bleaching band around  $1239\text{ cm}^{-1}$  shows that a negative shoulder in the bleaching band at around  $1230\text{ cm}^{-1}$  exists. Furthermore, we observe a broad positive feature from  $1215\text{ cm}^{-1}$  to  $1257\text{ cm}^{-1}$  at early delay times, which decays within a picosecond completely. In contrast, a remaining positive band at  $1220\text{ cm}^{-1}$  is observed in the FTIR-difference spectra at 80 K.<sup>19</sup> This could point to the trapping of a transient intermediate state at low temperatures which relaxes back to the parent all-*trans* ground state on a picosecond time scale at room

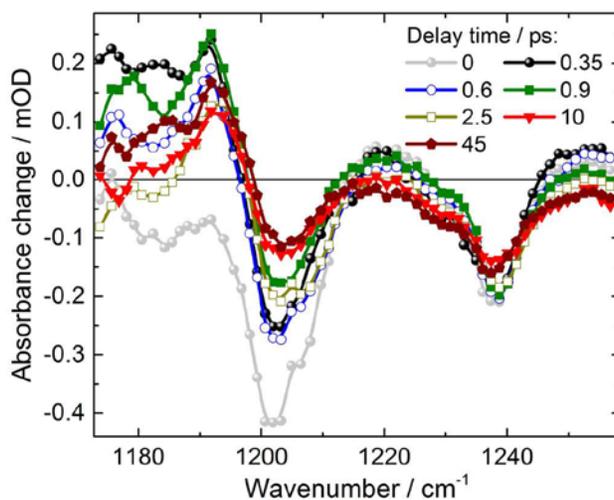


FIG. 2. Absorbance difference spectra of *CaChR1* upon excitation at 530 nm at specific pump-probe delay times. Negative signals are bleaching signals; positive signals show vibrational absorption of hot ground-states, excited states, or product bands.

temperature. The transients at selected spectral positions plotted in Fig. 3 provide information on the photoreaction dynamics. At negative delay times, i.e., when the probe pulse arrives at the sample before the pump pulse, we observe signals from the perturbed free induction decay (PFID).<sup>20</sup> This results in an exponential increase at spectral positions of the strong bleaching bands at  $1239\text{ cm}^{-1}$  and  $1203\text{ cm}^{-1}$  (plotted as red and green lines in Fig. 3), reflecting the dephasing of these vibrations. The exponential rise of the PFID signal at  $1239\text{ cm}^{-1}$  corresponds to a line width (FWHM) of  $(10 \pm 2)\text{ cm}^{-1}$ ,<sup>20</sup> matching the line width of the bleaching signal at 45 ps in Fig. 2, after completion of cooling processes. This supports the absence of a positive signal superimposed at  $1239\text{ cm}^{-1}$  for long delay times. At time zero, the pump pulse arrives and populates excited states. Within the system response of 0.3 ps (grey line in Fig. 3) the all-*trans* bleaching signal at  $1203\text{ cm}^{-1}$  (green line) appears and decays on a sub-picosecond to picosecond time scale. This bleaching recovery can reflect either repopulation of the ground state, or a blue-shift of the adjacent positive  $\text{C}_{14}\text{-C}_{15}$  stretching vibration of the 13-*cis* conformation around  $1190\text{ cm}^{-1}$ . The latter is supported by narrowing of the spectral width of the  $\text{C}_{14}\text{-C}_{15}$  stretching vibration around  $1180\text{ cm}^{-1}$ , and the blue-shift of the zero-crossing around  $1197\text{ cm}^{-1}$  for increasing delay times in Fig. 2.

The transient of the  $\text{C}_{14}\text{-C}_{15}$  stretching vibration of the 13-*cis* conformation ( $\nu(\text{C}_{14}\text{-C}_{15})^{13\text{cis}}$ ) at  $\sim 1190\text{ cm}^{-1}$  (black circles in Fig. 3) displays a positive signal, which rises within the system response of 0.3 ps. Since the band at  $1190\text{ cm}^{-1}$  is a marker band for 13-*cis* conformation, we can conclude that photoproduct formation due to all-*trans* isomerization is finished after 0.3 ps. This is in line with recent studies on electronic transitions.<sup>10</sup> The transient stays nearly constant in amplitude within the observed time window. All data are well-simulated by the sum of three exponentials.

We found decay constants of  $\tau_1 = (0.55 \pm 0.05)\text{ ps}$ ,  $\tau_2 = (6 \pm 1)\text{ ps}$ , and a decay constant  $\tau_3$  much longer than our observation time window. We assign  $\tau_3$  to the remaining and constant signal in our time window of 200 ps. The simulated curves are presented in Fig. 3 as solid lines, and at spectral positions of  $1203\text{ cm}^{-1}$  and  $1239\text{ cm}^{-1}$  simulations of the PFID are also displayed. The transient of the  $\nu(\text{C}_{14}\text{-C}_{15})^{\text{trans}}$  bleaching band at  $1203\text{ cm}^{-1}$  (green line, Fig. 3) exhibits a significant decay with 0.55 ps and 6 ps. In contrast, the transient of the  $\nu(\text{C}_{12}\text{-C}_{13})^{\text{trans}}$  bleaching band at  $1239\text{ cm}^{-1}$  shows only a small amplitude changes with a decay constant of 6 ps. The decay associated spectra (DAS) of the decay constants  $\tau_1$  ( $\text{DAS}_{\tau_1}$ ),  $\tau_2$  ( $\text{DAS}_{\tau_2}$ ), and  $\tau_3$  ( $\text{DAS}_{\tau_3}$ ) are plotted in Fig. 4.

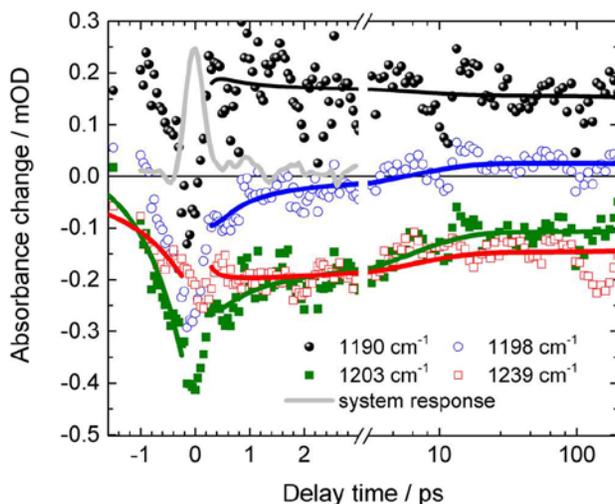


FIG. 3. Transients of  $C\alpha\text{ChR1}$  upon excitation at 530 nm for selected wavenumbers. Positive delay times: Solid lines represent simulations with a sum of three exponentials; negative delay times: Solid lines represent PFID signals at  $1203\text{ cm}^{-1}$  (green line) with a time constant of  $(0.80 \pm 0.08)\text{ ps}$ , and at  $1239\text{ cm}^{-1}$  (red line) with a time constant of  $(1 \pm 0.2)\text{ ps}$ .

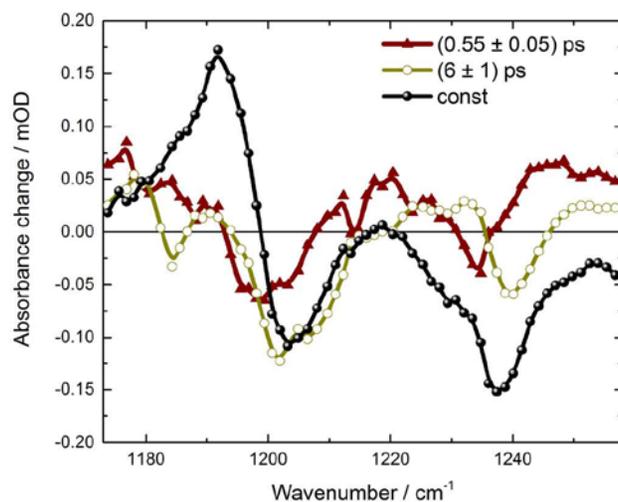


FIG. 4. Decay associated spectra of *CaChR1*. The constant  $\text{DAS}_{\tau_3}$  (black) represents the difference spectra on a time scale of hundreds of ps. The fast  $\text{DAS}_{\tau_1}$  (brown) shows dispersive features of vibrational cooling.  $\text{DAS}_{\tau_2}$  (dark yellow) exhibits dispersive features and features of the bleaching bands.

The fast component  $\text{DAS}_{\tau_1}$  exhibits a broad positive signal from  $1173\text{ cm}^{-1}$  to  $1193\text{ cm}^{-1}$ , and a negative signal with similar strength from  $1193\text{ cm}^{-1}$  to  $1208\text{ cm}^{-1}$ . The zero-crossing is exactly at the maximum of the  $\nu(\text{C}_{14}\text{-C}_{15})^{13\text{cis}}$  absorption, indicating vibrational cooling of the 13-*cis* product band. Moreover, a broad positive signal from  $1208\text{ cm}^{-1}$  to  $1258\text{ cm}^{-1}$  is visible, with a negative peak around  $1234\text{ cm}^{-1}$ . This feature could be caused by cooling of a vibration absorbing at higher wavenumbers than  $1258\text{ cm}^{-1}$ . We assign the 0.55 ps component solely to the cooling processes. The slower component  $\text{DAS}_{\tau_2}$  has also a positive component below  $1193\text{ cm}^{-1}$ , and negative contributions from  $1193\text{ cm}^{-1}$  up to  $1220\text{ cm}^{-1}$ . In contrast to the fast component  $\text{DAS}_{\tau_1}$ , the negative signal has more amplitude than the positive one. For pure vibrational cooling processes, one would expect a stronger positive signal compared to the negative signal of the same vibration, since the oscillator strength is typically increased by vibrational excitation. This could point to the cooling processes, overlapped by ground-state recovery. This is supported by the positive/negative feature at  $1228\text{ cm}^{-1}$  (+)/ $1239\text{ cm}^{-1}$  (-) in  $\text{DAS}_{\tau_2}$ . Again, a positive signal is observed at higher wavenumbers (around  $1250\text{ cm}^{-1}$ ). Moreover, the  $\text{DAS}_{\tau_2}$  has negligible contributions at  $1193\text{ cm}^{-1}$ , but strong contributions at  $1203\text{ cm}^{-1}$  indicating no increase of the 13-*cis* photoproduct, but recovery of the all-*trans* bleaching band with a decay time of 6 ps. This supports the assignment of back-reaction processes with a time constant of 6 ps. The constant signal  $\text{DAS}_{\tau_3}$  shows the clear positive/negative signature at  $1192\text{ cm}^{-1}$  (+)/ $1204\text{ cm}^{-1}$  (-) of all-*trans* to 13-*cis* photoisomerization with amplitude ratio of 3:2, similar to those observed in light-induced FTIR-difference spectra of *CaChR1* at cryogenic temperature.<sup>19</sup>

Since the  $\nu(\text{C}_{14}\text{-C}_{15})^{\text{trans}}$  bleaching band at  $1203\text{ cm}^{-1}$  is strongly masked by the  $\nu(\text{C}_{14}\text{-C}_{15})^{13\text{cis}}$  absorption, we analyzed the  $\nu(\text{C}_{12}\text{-C}_{13})^{\text{trans}}$  bleaching band at  $1239\text{ cm}^{-1}$  to estimate the quantum yield of the forward photoisomerization reaction. In Fig. 5, we present the different absorption spectrum at delay time zero (black line) together with the constant component  $\text{DAS}_{\tau_3}$  from the simulations. At  $1239\text{ cm}^{-1}$ , we see negligible contributions of non-linear spectral features, but a broad positive background at delay time zero. By subtracting the background approximated by a straight line (grey line in Fig. 5), the bleaching signal strength is calculated at time zero (green line in Fig. 5). The constant DAS in Fig. 5 (red line) shows the pure bleaching signal at  $1239\text{ cm}^{-1}$  without overlapping the positive contributions. The bleaching signal strength after the photoreaction is calculated and presented in Fig. 5 (blue line). The ratio of the two bleaching signals reveals the proportion of *CaChR1* not reacting back to the all-*trans*

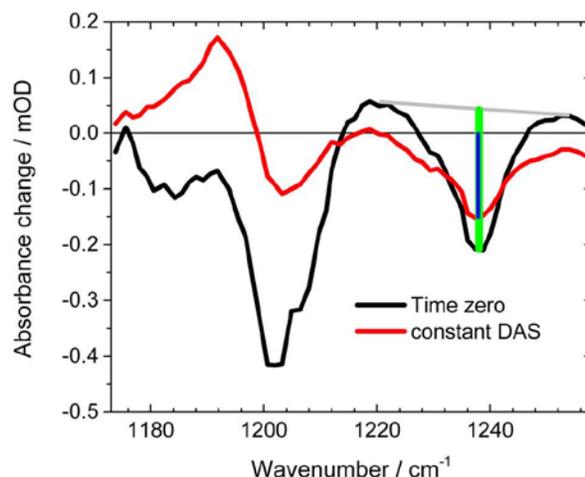


FIG. 5. Absorbance difference spectra at time zero (black line), and at long delay times represented by DAS<sub>z3</sub> (red line). At 1239 cm<sup>-1</sup> the amplitudes are taken at time zero and for long delay times, represented by the green and blue bars, respectively. Grey line: Baseline for subtraction of the positive broad background at time zero.

ground state, but undergo a forward reaction. Thus, the forward reaction quantum yield can be determined from our data to  $(0.60 \pm 0.06)$ .

Closer inspection of the spectral shape of the bleaching band at 1239 cm<sup>-1</sup> displays a shoulder at 1230 cm<sup>-1</sup>. This shoulder is visible in all difference spectra (Fig. 2) indicating an additional bleaching band. Whether this bleaching band reflects retinal ground state heterogeneity in all-*trans*, 15-*anti* conformation, i.e., due to different hydrogen bonding, or is caused by a sub-population of 13-*cis*, 15-*syn* retinal<sup>10,21</sup> of ground-state *CaChR1* will be investigated in future studies.

### III. CONCLUSION

We present the first femtosecond time-resolved IR study of the photoisomerization of channelrhodopsin-1 from *Chlamydomonas augustae* (*CaChR1*) in the vibrational fingerprint region of the C-C stretching vibrations. The vibrational dynamics of the retinal chromophore isomerization from all-*trans* to 13-*cis* was investigated by polarization-resolved VIS pump mid-IR probe spectroscopy at a high time resolution (about 300 fs). After photoexcitation at 530 nm, the transient infrared absorption was probed in a spectral region with dominant C-C stretching mode absorption. The photoproduct C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub> vibrational marker mode at 1190 cm<sup>-1</sup> that is indicative for a 13-*cis*, 15-*anti* configuration of the chromophore rises within the time resolution. Investigations in the visible spectral range reported photoisomerization time constants of 100 fs.<sup>10</sup> This is in line with our observations that provide direct evidence for the isomerization taking place faster than 0.3 ps, faster than in bacteriorhodopsin<sup>13</sup> or in channelrhodopsin-2<sup>7</sup> from *Chlamydomonas reinhardtii* (*CrChR2*). Vibrational dynamics show additional time constants of  $(0.55 \pm 0.05)$  ps and  $(6 \pm 1)$  ps, identical to those observed in ultrafast VIS pump supercontinuum probe experiments.<sup>10</sup> We assigned the 0.55 ps time constant predominantly to vibrational cooling, while the longer time constant of 6 ps probably also consists of a back-reaction pathway. We estimated the photoisomerization reaction yield by the bleaching signal of the C<sub>12</sub>-C<sub>13</sub> stretching band at 1239 cm<sup>-1</sup> to  $(60 \pm 6)\%$ , very similar to other rhodopsins. Our high spectral resolution of 1.5 cm<sup>-1</sup> allows for identification of an additional bleaching component at 1230 cm<sup>-1</sup>. This finding strongly supports ground state heterogeneity of the retinal chromophore. Further studies should be performed to assign this bleaching band to either heterogeneity of the all-*trans*, 15-*anti* retinal or to a 13-*cis*, 15-*syn* (dark-adapted) retinal conformation. Our study clearly demonstrates various different photoreaction processes in retinal photoreceptors. *CaChR1* shows a significantly faster isomerization dynamics as *CrChR2* at a high yield. Further

studies will be performed to identify the molecular origin of these differences, in order to truly understand the optimization of photoreactions in photoreceptors.

#### IV. METHODS

*CaChR1* was prepared as described previously.<sup>9,22</sup> Briefly, the truncated *CaChR1* gene (1-352 aa) was fused with a 10xHis-tag (GeneArt, Life Technologies) and was heterologously expressed in *Pichia pastoris* yeast cells. The solubilized protein was purified on a Ni-NTA column (Macherey-Nagel, Germany) and concentrated to 46 mg/ml in a buffer containing 20 mM Hepes, 100 mM NaCl, 0.05% dodecyl maltoside at pH 7.4. Two times 150  $\mu$ l of the *CaChR1* solution was placed between two CaF<sub>2</sub> windows. The spectral line-width of the femtosecond excitation pulses is sketched with the absorption spectrum of *CaChR1* in Figure 1.

Femtosecond laser pulses were generated starting from a fundamental femtosecond laser pulse delivered by a 1 kHz Ti:Sa laser system (Coherent Legend USP, 80 fs pulses at 800 nm). The fundamental beam was split into two parts for pump and probe pulse generation. The pump pulses were generated in a non-collinear optical parametric amplifier (NOPA). A sapphire white light supercontinuum was used as seed, amplified in a  $\beta$ -barium borate (BBO) crystal by frequency doubled pulses at 400 nm. We selected energies to excite the sample of about 0.4–0.5  $\mu$ J per pulse with a pump focus diameter of about 300  $\mu$ m.

Angle balanced femtosecond polarization resolved VIS pump–IR probe measurements were applied as described elsewhere.<sup>18</sup> In short, the mid-IR probe beam is generated by a difference-frequency mixing of near-infrared signal and idler pulses generated by 800 nm fs pulses in a BBO crystal. Two reflections of the fs mid-IR pulse are taken as probe beams with different polarizations used at the same time in the same sample volume to detect absorbance changes. The system response was about 300 fs (shown in Fig. 3, grey line). We measured the system response in a thin Ge plate in identical sample holders, as were used for the experiments on *CaChR1*. Absorbance changes with mid-IR polarizations parallel ( $A_{pa}$ ) and perpendicular ( $A_{pe}$ ) to the VIS pump beam polarization were detected. Isotropic absorbance changes ( $A_{iso}$ ) were calculated by  $A_{iso} = (A_{pa} + 2 A_{pe})/3$ . Here, we presented only isotropic data.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The work performed at the Free University of Berlin was supported by the SFB 1078, TP B3 to J.H. and K.H. and B4 to R.S. We are thankful to Dorothea Heinrich and Kirsten Hoffmann for excellent technical assistance.

- <sup>1</sup>K. Deisseroth, "Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience," *Nat. Neurosci.* **18**(9), 1213–1225 (2015).
- <sup>2</sup>L. Petreanu, D. Huber, A. Sobczyk, and K. Svoboda, "Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections," *Nat. Neurosci.* **10**(5), 663–668 (2007).
- <sup>3</sup>G. Nagel, M. Brauner, J. F. Liewald, N. Adeishvili, E. Bamberg, and A. Gottschalk, "Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses," *Curr. Biol.* **15**(24), 2279–2284 (2005).
- <sup>4</sup>B. R. Arenkiel, J. Peca, I. G. Davison, C. Feliciano, K. Deisseroth, G. J. Augustine, M. D. Ehlers, and G. Feng, "*In vivo* light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2," *Neuron* **54**(2), 205–218 (2007).
- <sup>5</sup>V. A. Lorenz-Fonfria and J. Heberle, "Channelrhodopsin unchained: Structure and mechanism of a light-gated cation channel," *Biochim. Biophys. Acta* **1837**(5), 626–642 (2014).
- <sup>6</sup>M. K. Verhoeven, C. Bamann, R. Blocher, U. Forster, E. Bamberg, and J. Wachtveitl, "The photocycle of channelrhodopsin-2: Ultrafast reaction dynamics and subsequent reaction steps," *Chemphyschem* **11**(14), 3113–3122 (2010).
- <sup>7</sup>M. K. Neumann-Verhoeven, K. Neumann, C. Bamann, I. Radu, J. Heberle, E. Bamberg, and J. Wachtveitl, "Ultrafast infrared spectroscopy on channelrhodopsin-2 reveals efficient energy transfer from the retinal chromophore to the protein," *J. Am. Chem. Soc.* **135**(18), 6968–6976 (2013).
- <sup>8</sup>S. Y. Hou, E. G. Govorunova, M. Ntefidou, C. E. Lane, E. N. Spudich, O. A. Sineshchekov, and J. L. Spudich, "Diversity of *Chlamydomonas* channelrhodopsins," *Photochem. Photobiol.* **88**(1), 119–128 (2012).
- <sup>9</sup>V. Muders, S. Kerruth, V. A. Lorenz-Fonfria, C. Bamann, J. Heberle, and R. Schlesinger, "Resonance Raman and FTIR spectroscopic characterization of the closed and open states of channelrhodopsin-1," *FEBS Lett.* **588**(14), 2301–2306 (2014).
- <sup>10</sup>T. Stensitzki, V. Muders, R. Schlesinger, J. Heberle, and K. Heyne, "The primary photoreaction of channelrhodopsin-1: Wavelength dependent photoreactions induced by ground-state heterogeneity," *Front. Mol. Biosci.* **2**, 41 (2015).
- <sup>11</sup>O. A. Sineshchekov, E. G. Govorunova, J. Wang, H. Li, and J. L. Spudich, "Intramolecular proton transfer in channelrhodopsins," *Biophys. J.* **104**(4), 807–817 (2013).

- <sup>12</sup>Y. Yang, K. Heyne, R. A. Mathies, and J. Dasgupta, "Non-bonded interactions drive the sub-picosecond bilin photoisomerization in the Pfr state of phytochrome Cph1," *Chemphyschem* **17**(3), 369–374 (2016).
- <sup>13</sup>J. Herbst, K. Heyne, and R. Diller, "Femtosecond infrared spectroscopy of bacteriorhodopsin chromophore isomerization," *Science* **297**(5582), 822–825 (2002).
- <sup>14</sup>I. Palings, J. A. Pardoen, E. van den Berg, C. Winkel, J. Lugtenburg, and R. A. Mathies, "Assignment of fingerprint vibrations in the resonance Raman spectra of rhodopsin, isorhodopsin, and bathorhodopsin: Implications for chromophore structure and environment," *Biochemistry* **26**(9), 2544–2556 (1987).
- <sup>15</sup>J. I. Ogren, S. Mamaev, D. Russano, H. Li, J. L. Spudich, and K. J. Rothschild, "Retinal chromophore structure and Schiff base interactions in red-shifted channelrhodopsin-1 from *Chlamydomonas augustae*," *Biochemistry* **53**(24), 3961–3970 (2014).
- <sup>16</sup>S. O. Smith, J. Lugtenburg, and R. A. Mathies, "Determination of retinal chromophore structure in bacteriorhodopsin with resonance Raman spectroscopy," *J. Membr. Biol.* **85**(2), 95–109 (1985).
- <sup>17</sup>C. Schnedermann, V. Muders, D. Ehrenberg, R. Schlesinger, P. Kukura, and J. Heberle, "Vibronic dynamics of the ultrafast all-trans to 13-cis photoisomerization of retinal in channelrhodopsin-1," *J. Am. Chem. Soc.* **138**(14), 4757–4762 (2016).
- <sup>18</sup>M. Linke, Y. Yang, B. Zienicke, M. A. Hammam, T. von Haimberger, A. Zacarias, K. Inomata, T. Lamparter, and K. Heyne, "Electronic transitions and heterogeneity of the bacteriophytochrome Pr absorption band: An angle balanced polarization resolved femtosecond VIS pump-IR probe study," *Biophys. J.* **105**(8), 1756–1766 (2013).
- <sup>19</sup>J. I. Ogren, A. Yi, S. Mamaev, H. Li, J. Lugtenburg, W. J. DeGrip, J. L. Spudich, and K. J. Rothschild, "Comparison of the structural changes occurring during the primary phototransition of two different channelrhodopsins from *Chlamydomonas* algae," *Biochemistry* **54**(2), 377–388 (2015).
- <sup>20</sup>P. Hamm, "Coherent effects in femtosecond infrared-spectroscopy," *Chem. Phys.* **200**(3), 415–429 (1995).
- <sup>21</sup>S. O. Smith, I. Palings, V. Copie, D. P. Raleigh, J. Courtin, J. A. Pardoen, J. Lugtenburg, R. A. Mathies, and R. G. Griffin, "Low-temperature solid-state <sup>13</sup>C NMR studies of the retinal chromophore in rhodopsin," *Biochemistry* **26**(6), 1606–1611 (1987).
- <sup>22</sup>V. A. Lorenz-Fonfria, V. Muders, R. Schlesinger, and J. Heberle, "Changes in the hydrogen-bonding strength of internal water molecules and cysteine residues in the conductive state of channelrhodopsin-1," *J. Chem. Phys.* **141**(22), 22D507 (2014).

# Literaturverzeichnis

1. Quail, P.H., *Phytochrome photosensory signalling networks*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002. **3**(2): p. 85-93.
2. Rockwell, N.C. and J.C. Lagarias, *A brief history of phytochromes*. ChemPhysChem, 2010. **11**(6): p. 1172-1180.
3. Cruickshank, D.W., J.R. Helliwell, and L.N. Johnson, *Time-resolved Macromolecular Crystallography: Proceedings of a Royal Society Discussion Meeting, Held on 29 and 30 January 1992*. 1992: Oxford [England]; New York: Oxford University Press.
4. Pellecchia, M., *Solution nuclear magnetic resonance spectroscopy techniques for probing intermolecular interactions*. Chemistry & biology, 2005. **12**(9): p. 961-971.
5. Pelletier, M.J., *Analytical applications of Raman spectroscopy*. 1999: Wiley-Blackwell.
6. Kudelski, A., *Analytical applications of Raman spectroscopy*. Talanta, 2008. **76**(1): p. 1-8.
7. Hamm, P. and M. Zanni, *Concepts and methods of 2D infrared spectroscopy*. 2011: Cambridge University Press.
8. Rullière, C. and R.R. Alfano, *Femtosecond laser pulses: principles and experiments*. Physics Today, 1999. **52**: p. 56. ISBN/ISSN: 0031-9228
9. Heyne, K., et al., *Structural evolution of the chromophore in the primary stages of trans/cis isomerization in photoactive yellow protein*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(51): p. 18100-18106.
10. Usman, A., et al., *Excited state dynamics of a PYP chromophore model system explored with ultrafast infrared spectroscopy*. Chemical Physics Letters, 2005. **401**(1): p. 157-163.
11. Toh, K.C., et al., *Primary Reactions of Bacteriophytochrome Observed with Ultrafast Mid-Infrared Spectroscopy*. Journal of Physical Chemistry A, 2011. **115**(16): p. 11985-11997.
12. Toh, K.C., et al., *Proton-transfer and hydrogen-bond interactions determine fluorescence quantum yield and photochemical efficiency of bacteriophytochrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(20): p. 9170-9175.
13. Dasgupta, J., et al., *Ultrafast excited-state isomerization in phytochrome revealed by femtosecond stimulated Raman spectroscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(6): p. 1784-1789.
14. Schumann, C., et al., *Sub-Picosecond Mid-Infrared Spectroscopy of Phytochrome Agp1 from Agrobacterium tumefaciens*. ChemPhysChem, 2007. **8**(11): p. 1657-1663.
15. Kandori, H., K. Yoshihara, and S. Tokutomi, *Primary process of phytochrome: initial step of photomorphogenesis in green plants*. Journal of the American Chemical Society, 1992. **114**(27): p. 10958-10959.
16. Song, C., et al., *Two ground state isoforms and a chromophore D-ring photoflip triggering extensive intramolecular changes in a canonical phytochrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(10): p. 3842-3847.
17. Linke, M., et al., *Determining the Three-Dimensional Electronic Transition Dipole Moment Orientation: Influence of an Isomeric Mixture*. Chemphyschem, 2010. **11**(6): p. 1283-1288.
18. Chen, E., et al., *Dynamics of protein and chromophore structural changes in the photocycle of photoactive yellow protein monitored by time-resolved optical rotatory dispersion*. Biochemistry, 2003. **42**(7): p. 2062-2071.
19. Saltsman, I., et al., *Synthesis, spectroscopy, and structures of new rhodium (I) and rhodium (III) corroles and catalysis thereby*. Inorganica Chimica Acta, 2004. **357**(10): p. 3038-3046.

20. Simkhovich, L., I. Goldberg, and Z. Gross, *The effects of bulky ortho-aryl substituents in corroles, tested by X-ray crystallography of the rhodium complexes and catalysis thereby*. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2002. **6**(06): p. 439-444.
21. Gross, Z., L. Simkhovich, and N. Galili, *First catalysis by corrole metal complexes: epoxidation, hydroxylation, and cyclopropanation*. Chem. Commun., 1999(7): p. 599-600.
22. Aviv, I. and Z. Gross, *Iron porphyrins catalyze the synthesis of non-protected amino acid esters from ammonia and diazoacetates*. Chem. Commun., 2006(43): p. 4477-4479.
23. Walker, D., et al., *Corrole-sensitized TiO<sub>2</sub> solar cells*. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2006. **10**(11): p. 1259-1262.
24. Aviezer, D., et al., *Porphyrin analogues as novel antagonists of fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor receptor binding that inhibit endothelial cell proliferation, tumor progression, and metastasis*. Cancer Research, 2000. **60**(11): p. 2973-2980.
25. Agadjanian, H., et al., *Specific delivery of corroles to cells via noncovalent conjugates with viral proteins*. Pharmaceutical Research, 2006. **23**(2): p. 367-377.
26. Luguay, R.J., et al., *Carboranylcorroles*. Tetrahedron Letters, 2005. **46**(32): p. 5365-5368.
27. Albrett, A.M., et al., *Corrole as a binucleating ligand: Preparation, molecular structure and density functional theory study of diboron corroles*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(10): p. 2888-2889.
28. Mahammed, A. and Z. Gross, *Aluminum corrolin, a novel chlorophyll analogue*. Journal of Inorganic biochemistry, 2002. **88**(3): p. 305-309.
29. Kowalska, D., et al., *Ground-and excited-state dynamics of aluminum and gallium corroles*. Inorganic Chemistry, 2009. **48**(6): p. 2670-2676.
30. Wagnert, L., et al., *Photoexcited triplet state properties of brominated and nonbrominated Ga(III)-corroles as studied by time-resolved electron paramagnetic resonance†*. The Journal of Physical Chemistry B, 2010. **114**(45): p. 14303-14308.
31. Stensitzki, T., *Polarisationsaufgelöste Femtosekundenspektroskopie an Aluminium-Corrolen*. Diplomarbeit, 2010. **126**: p. 56.
32. Wagnert, L., et al., *Exploring the photoexcited triplet states of aluminum and tin corroles by time-resolved Q-band EPR*. Applied Magnetic Resonance, 2006. **30**(3-4): p. 591-604.
33. Groma, G.I., et al., *Estimation of kinetic parameters from time-resolved fluorescence data: A compressed sensing approach*. Rsc Advances, 2012. **2**(30): p. 11481-11490.
34. Jiao, Y., O.S. Lau, and X.W. Deng, *Light-regulated transcriptional networks in higher plants*. Nature Reviews Genetics, 2007. **8**(3): p. 217-230.
35. Möglich, A., et al., *Structure and function of plant photoreceptors*. Annual review of plant biology, 2010. **61**: p. 21-47.
36. Butler, W., et al., *Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1959. **45**(12): p. 1703.
37. Rockwell, N.C., Y.S. Su, and J.C. Lagarias, *Phytochrome structure and signaling mechanisms*. Annual Review of Plant Biology, 2006. **57**: p. 837-858.
38. Lagarias, J.C. and H. Rapoport, *CHROMOPEPTIDES FROM PHYTOCHROME - THE STRUCTURE AND LINKAGE OF THE PR FORM OF THE PHYTOCHROME CHROMOPHORE*. Journal of the American Chemical Society, 1980. **102**(14): p. 4821-4828.
39. Hubschmann, T., et al., *Phosphorylation of proteins in the light-dependent signalling pathway of a filamentous cyanobacterium*. European Journal of Biochemistry, 2001. **268**(12): p. 3383-3389.
40. Wagner, J.R., et al., *A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome*. Nature, 2005. **438**(7066): p. 325-331.
41. Lamparter, T., *Evolution of cyanobacterial and plant phytochromes (FEBS 28707) (vol 573, pg 1, 2004)*. Febs Letters, 2004. **578**(1-2): p. 203-203.

42. Montgomery, B.L. and J.C. Lagarias, *Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light*. Trends in Plant Science, 2002. **7**(8): p. 357-366.
43. Chen, M., et al., *Regulation of phytochrome B nuclear localization through light-dependent unmasking of nuclear-localization signals*. Current Biology, 2005. **15**(7): p. 637-642.
44. Hughes, J., *Phytochrome three-dimensional structures and functions*. Biochemical Society Transactions, 2010. **38**: p. 710-716.
45. Schäfer, E. and C. Bowler, *Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants*. EMBO Reports, 2002. **3**(11): p. 1042-1048.
46. Hughes, J., et al., *A prokaryotic phytochrome*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 663-663.
47. Park, C.M., et al., *Chromophore-apoprotein interactions in Synechocystis sp PCC6803 phytochrome Cph1*. Biochemistry, 2000. **39**(21): p. 6349-6356.
48. Hahn, J., et al., *Probing protein-chromophore interactions in Cph1 phytochrome by mutagenesis*. Febs Journal, 2006. **273**(7): p. 1415-1429.
49. Heyne, K., et al., *Ultrafast dynamics of phytochrome from the cyanobacterium Synechocystis, reconstituted with phycocyanobilin and phycoerythrobilin*. Biophysical Journal, 2002. **82**(2): p. 1004-1016.
50. van Thor, J.J., K.L. Ronayne, and M. Towrie, *Formation of the early photoproduct Lumi-R of cyanobacterial phytochrome Cph1 observed by ultrafast mid-infrared spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(1): p. 126-132.
51. Dasgupta, J., et al., *Ultrafast excited-state isomerization in phytochrome revealed by femtosecond stimulated Raman spectroscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(6): p. 1784-1789.
52. Toh, K., et al., *Proton-transfer and hydrogen-bond interactions determine fluorescence quantum yield and photochemical efficiency of bacteriophytochrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(20): p. 9170-9175.
53. Dasgupta, J., et al., *Ultrafast excited-state isomerization in phytochrome revealed by femtosecond stimulated Raman spectroscopy*. PNAS, 2009. **106**(6): p. 1784-9.
54. Müller, M.G., et al., *Femtosecond kinetics of photoconversion of the higher plant photoreceptor phytochrome carrying native and modified chromophores*. Biophysical Journal, 2008. **94**(11): p. 4370-4382.
55. Holzwarth, A.R., et al., *The phototransformation process in phytochrome. I. Ultrafast fluorescence component and kinetic models for the initial P<sub>r</sub> → P<sub>fr</sub> transformation steps in native phytochrome*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1992. **1140**(1): p. 59-68.
56. Sineshchekov, V.A., *Photobiophysics and photobiochemistry of the heterogeneous phytochrome system*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1995. **1228**(2): p. 125-164.
57. Goller, A.H., D. Strehlow, and G. Hermann, *The excited-state chemistry of phycocyanobilin: a semiempirical study*. Chemphyschem, 2005. **6**(7): p. 1259-68.
58. Bischoff, M., et al., *Excited-state processes in phycocyanobilin studied by femtosecond spectroscopy*. Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(8): p. 1810-1816.
59. Heyes, D.J., et al., *Ultrafast red light activation of Synechocystis phytochrome Cph1 triggers major structural change to form the Pfr signalling-competent state*. PloS One, 2012. **7**.
60. Johnson, A. and I. Kay, *306. Corroles. Part I. Synthesis*. Journal of the Chemical Society (Resumed), 1965: p. 1620-1629.
61. Gryko, D.T. and K.E. Piechota, *Straightforward route to trans-A 2 B-corroles bearing substituents with basic nitrogen atoms*. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2002. **6**(02): p. 81-97.
62. Johnson, A. and R. Price, *331. The synthesis of derivatives of corrole (pentadehydrocorrins)*. Journal of the Chemical Society (Resumed), 1960: p. 1649-1653.
63. Vogel, E., et al., *Metallo-corroles with formally tetravalent iron*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1994. **33**(7): p. 731-735.

64. Aviv, I. and Z. Gross, *Corrole-based applications*. Chemical Communications, 2007(20): p. 1987-1999.
65. Liu, X., et al., *Photophysics of Soret-excited tetrapyrroles in solution. III. Porphyrin analogues: Aluminum and gallium corroles*. Chemical Physics Letters, 2008. **459**(1): p. 113-118.
66. Werner, D., *Funktionalanalysis*. 2006: Springer.
67. Bass, M., et al., *Optical mixing*. Physical Review Letters, 1962. **8**(1): p. 18.
68. Cerullo, G. and S. De Silvestri, *Ultrafast optical parametric amplifiers*. Review of Scientific Instruments, 2003. **74**(1): p. 1-18.
69. Paschotta, R., *Encyclopedia of laser physics and technology*. Vol. 1. 2008: Wiley-vch Berlin.
70. Alfano, R., *The supercontinuum laser source: fundamentals with updated references, 2006*. New York, Springer.
71. Fork, R., et al., *Femtosecond white-light continuum pulses*. Optics Letters, 1983. **8**(1): p. 1-3.
72. Maker, P., et al., *Effects of dispersion and focusing on the production of optical harmonics*. Physical Review Letters, 1962. **8**(1): p. 21.
73. Isaienko, O. and E. Borguet, *Generation of ultra-broadband pulses in the near-IR by non-collinear optical parametric amplification in potassium titanyl phosphate*. Optics Express, 2008. **16**(6): p. 3949-3954.
74. Ivanov, M.Y. and J.P. Marangos, *Time-resolved imaging of atomic-scale electron and nuclear dynamics*. JOURNAL OF MODERN OPTICS, 2007: 899-903.
75. Diels, J.-C. and W. Rudolph, *Ultrashort laser pulse phenomena*. 2006: Academic press.
76. Rullière, C. and R.R. Alfano, *Femtosecond laser pulses: principles and experiments*. Physics Today, 2008. **52**(7): p. 56-56.
77. Kaindl, R.A., et al., *Generation, shaping, and characterization of intense femtosecond pulses tunable from 3 to 20  $\mu\text{m}$* . JOSA B, 2000. **17**(12): p. 2086-2094.
78. Kittel, C., *Einführung in die Festkörperphysik*. 2006: Oldenbourg Verlag.
79. Schastnev, P.V. and L.N. Shchegoleva, *Molecular distortions in ionic and excited states*. 1995: CRC Press.
80. Klán, P. and J. Wirz, *Photochemistry of organic compounds: From concepts to practice*. 2009: John Wiley & Sons.
81. Jabłoński, A., *Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren*. Zeitschrift für Physik, 1935. **94**(1-2): p. 38-46.
82. <http://www.olympusmicro.com/primer/java/jablonski/jabintro/>.
83. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2013: Springer Science & Business Media.
84. Englman, R. and J. Jortner, *The energy gap law for radiationless transitions in large molecules*. Molecular Physics, 1970. **18**(2): p. 145-164.
85. Satzger, H. and W. Zinth, *Visualization of transient absorption dynamics—towards a qualitative view of complex reaction kinetics*. Chemical Physics, 2003. **295**(3): p. 287-295.
86. Albrecht, A.C., *Polarizations and Assignments of Transitions - Method of Photoselection*. Journal of Molecular Spectroscopy, 1961. **6**(1): p. 84-&.
87. Ansari, A. and A. Szabo, *Theory of photoselection by intense light pulses. Influence of reorientational dynamics and chemical kinetics on absorbance measurements*. Biophysical Journal, 1993. **64**(3): p. 838-851.
88. Magde, D., *Photoselection with intense laser pulses*. The Journal of Chemical Physics, 1978. **68**(8): p. 3717-3733.
89. Perrin, F., *Mouvement brownien d'un ellipsoïde-I. Dispersion diélectrique pour des molécules ellipsoïdales*. J. Phys. Radium, 1934. **5**(10): p. 497-511.
90. Perrin, F., *Mouvement Brownien d'un ellipsoïde (II). Rotation libre et dépolariation des fluorescences. Translation et diffusion de molécules ellipsoïdales*. J. Phys. Radium, 1936. **7**(1): p. 1-11.

91. Yao, S., J.J. Babon, and R.S. Norton, *Protein effective rotational correlation times from translational self-diffusion coefficients measured by PFG-NMR*. Biophysical Chemistry, 2008. **136**(2): p. 145-151.
92. Kohn, W. and L.J. Sham, *Self-consistent equations including exchange and correlation effects*. Physical Review, 1965. **140**(4A): p. A1133.
93. Parr, R.G. and W. Yang, *Density-functional theory of atoms and molecules*. Vol. 16. 1989: Oxford university press.
94. Fluegel, B., et al., *Femtosecond studies of coherent transients in semiconductors*. Physical Review Letters, 1987. **59**(22): p. 2588.
95. Joffre, M., et al., *Coherent effects in pump-probe spectroscopy of excitons*. Optics Letters, 1988. **13**(4): p. 276-278.
96. Hamm, P., *Coherent Effects in Femtosecond Infrared-Spectroscopy*. Chemical Physics, 1995. **200**(3): p. 415-429.
97. Guenther, T., et al., *Coherent nonlinear optical response of single quantum dots studied by ultrafast near-field spectroscopy*. Physical Review Letters, 2002. **89**(5): p. 057401.
98. Nuernberger, P., et al., *Suppression of perturbed free-induction decay and noise in experimental ultrafast pump-probe data*. Optics Letters, 2009. **34**(20): p. 3226-3228.
99. Wynne, K. and R. Hochstrasser, *The theory of ultrafast vibrational spectroscopy*. Chemical Physics, 1995. **193**(3): p. 211-236.
100. Demtröder, W., *Molekülphysik: theoretische Grundlagen und experimentelle Methoden*. 2013: Oldenbourg Verlag.
101. Johnson, M.L., *Evaluation and propagation of confidence intervals in nonlinear, asymmetrical variance spaces. Analysis of ligand-binding data*. Biophysical Journal, 1983. **44**(1): p. 101-106.
102. Roelofs, T.A., C.-H. Lee, and A.R. Holzwarth, *Global target analysis of picosecond chlorophyll fluorescence kinetics from pea chloroplasts: a new approach to the characterization of the primary processes in photosystem II  $\alpha$ - and  $\beta$ -units*. Biophysical Journal, 1992. **61**(5): p. 1147.
103. Hartung, J., B. Elpelt, and K.-H. Klösener, *Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik*. München, Wien, 1999.
104. Mood, A.M., F.A. Graybill, and D.C. Boes, *Introduction to the Theory of Statistics*. 1974, McGraw-Hill, New York.
105. Yang, Y., et al., *Real-time tracking of phytochrome's orientational changes during Pr photoisomerization*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(3): p. 1408-1411.
106. Yang, Y., et al., *Active and silent chromophore isoforms for phytochrome Pr photoisomerization: An alternative evolutionary strategy to optimize photoreaction quantum yields*. Structural Dynamics, 2014. **1**(1): p. 014701.
107. Yang, Y., et al., *Non-Bonded Interactions Drive the Sub-Picosecond Bilin Photoisomerization in the Pfr State of Phytochrome Cph1*. ChemPhysChem, 2015.
108. Yang, Y., et al., *Assignment of aluminum corroles absorption bands to electronic transitions by femtosecond polarization resolved VIS-pump IR-probe spectroscopy*. The Journal of Physical Chemistry A, 2012. **116**(3): p. 1023-1029.
109. Murakami, A. and Y. Fujita, *Regulation of photosystem stoichiometry in the photosynthetic system of the cyanophyte Synechocystis PCC 6714 in response to light-intensity*. Plant and Cell Physiology, 1991. **32**(2): p. 223-230.
110. Braun, M., et al. *Femtosecond X-ray Diffraction on DIABN Single Crystals*. in *International Conference on Ultrafast Phenomena*. 2006. Optical Society of America.
111. Herbst, J., K. Heyne, and R. Diller, *Femtosecond infrared spectroscopy of bacteriorhodopsin chromophore isomerization*. Science, 2002. **297**(5582): p. 822-825.
112. Lim, M., T.A. Jackson, and P.A. Anfinrud, *Binding of CO to myoglobin from a heme pocket docking site to form nearly linear Fe-CO*. Science, 1995. **269**(5226): p. 962-966.

113. Sineshchekov, V.A., *Fluorescence and photochemical investigations of phytochrome in higher plants*. Journal of Botany, 2010. **2010**.

## Danksagung

Zum Zeitpunkt der Beendigung dieser Dissertation, möchte Ich an alle jenen danken, die mir zum Gelingen meine Arbeit beigetragen haben.

Großen Dank an Prof. Dr. Karsten Heyne für seine Vertrauen und die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, für seine Geduld bei der Vorführung von der Messaufbau-Optimierung und der Diskussionen über Messergebnis, für seine Verständnis und Nachsicht während stressiger Phasen dieser Promotion sowie Schwangerschaftszeit und Mutterschutzzeit. Ohne seine Unterstützung hätte ich meine Arbeit nicht fertigstellen können.

Prof. Dr. Holger Dau danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Zeev Gross und Dr. Atif Mahammed danke ich für die Synthese der Corrole-Proben.

Prof. Dr. Peter Schmieder und Dr. Janina Hahn danke ich für die Bereitstellung der Phytochromproben.

Prof. Dr. Leticia González und Dr. Ricardo Matute danke ich für die theoretischen Berechnungen der Phytochrome Chromophore.

Angelica Zacarias sei für die theoretischen Berechnungen der Corrole Moleküle gedankt.

Allen meinen Mitarbeitern, die mit mir auf dem langen und steinigen Weg der Promotion zusammen waren, danke ich für ihre Unterstützung und ihre Freundschaft. Grüße gehen an Henk Fidler, Martin Linke, Till Stensitzki, Gerome Weiland, Frederik Büchau, Theo von Haimberger, Dagmar Jones, Tom Rubin, Moritz Theisen, Sven Augustin...

Danke an meine Familie, die mich immer begleitet und unterstützt haben.