

# Kapitel 1

## Einleitung

Im Zuge der Evolution hat die Natur Proteine entwickelt, die der Zelle eine effiziente Energieumwandlung und Signaltransduktion ermöglichen. Dabei weisen die Proteine, als kleinste Werkzeuge, Besonderheiten in ihrer Reaktivität auf, die man verstehen und nutzen möchte. Funktionell fundamentale Bedeutung weisen dabei photoaktive Proteine auf <sup>1</sup>. Herausragende Beispiele sind neben Systemen der Photosynthese und Rhodopsin, das für den Sehprozess verantwortlich ist, die in dieser Arbeit untersuchten Proteine Bakteriorhodopsin, welches Sonnenlicht in ein elektrochemisches Potential umwandelt und Phytochrom, das z.B. die Ausbildung des Photosyntheseapparates steuert und als "innere Uhr" der Pflanzen fungiert. Diese Proteine binden im sichtbaren Spektralbereich stark absorbierende Moleküle, die Chromophore genannt werden und die die absorbierte Lichtenergie auf das Protein (Chromoprotein) übertragen. Dabei vollzieht sich eine Umwandlung in biochemisch nutzbare Energie, die eine direkte Folge der Wechselwirkung zwischen Chromophor und Proteinumgebung ist. Diese Wechselwirkung verhindert, dass die Lichtenergie als ungenutzte Wärme verloren geht, wie es meist im freien Chromophor in Lösung der Fall ist.

Gegenüber der Struktur des Chromophors in Lösung beobachtet man bei proteingebundenen Chromophoren eine spezifisch veränderte Gleichgewichtskonfiguration. Durch lokale Fluktuationen der Aminosäureseitenketten und der im Protein gegebenenfalls vorhandenen Wassermoleküle und Ionen ergibt sich eine neue Photochemie, deren Eigenschaften vom Protein für die jeweilige Funktion genutzt werden. Das Verständnis dieser spezifischen photophysikalischen und photoche-

---

<sup>1</sup>Glücklicherweise besteht hier die Möglichkeit, einen genau definierten Zeitnullpunkt für den Reaktionsablauf zu setzen.

mischen Prozesse ist nicht zuletzt eine wichtige Voraussetzung für die zukünftige Entwicklung synthetischer Chromoproteine.

Für das Verständnis dieser neuen Prozesse spielt die Dynamik der Primärreaktion selbst und der Einfluss der Chromophor-Protein Wechselwirkung auf die Dynamik eine zentrale Rolle. Die Primärreaktion des Bakteriorhodopsin Wildtyps (wt)<sup>2</sup> wurde in wesentlichen Zügen schon vor einiger Zeit (1985) charakterisiert [1, 2]. Die Steuerung der biologisch relevanten Isomerisierung des Retinalchromophors von all-trans nach 13-cis durch die Chromophor-Protein Wechselwirkung zeigt sich folgendermaßen: Einerseits werden mit dem Einbau des Retinalchromophors ins Protein die in Lösung möglichen Grundzustandsisomere auf nahezu einen einzigen Isomer mit der all-trans Konfiguration (99%) reduziert<sup>3</sup>. Andererseits wird die Primärreaktion des all-trans Retinalchromophors im Protein mindestens um den Faktor 3 gegenüber der entsprechenden Reaktion in Lösung [3] auf 0,5 ps beschleunigt. Die Quantenausbeute der all-trans→13-cis Reaktion steigt von 6% in Lösung auf ca. 64% im Protein an [3, 4, 5, 6]. Für die Steuerung wichtige Parameter sind geladene Aminosäuren in der Nähe des Retinalchromophors [7, 8].

Die vorliegende Arbeit knüpft an diesem Punkt an und untersucht auf einer breiten Basis von Mutationen sowie Variation des pH Wertes und der Ionenkonzentration den Einfluss unterschiedlich geladener Aminosäureseitenketten auf die Steuerung der Primärreaktion. Es wird gezeigt, dass nur eine einzige negative Ladung, die der Asparaginsäure 85, zur Kontrolle der Primärreaktion in Bakteriorhodopsin nötig ist.

Die Dynamik der Primärreaktion von bakteriellem Phytochrom ist im Gegensatz zu Bakteriorhodopsin noch nicht untersucht worden. Für verwandte Systeme wie Phytochrom aus Pflanzen wird sie in der  $P_r$  Form kontrovers diskutiert. Außerdem liegt noch keine molekulare Struktur von Phytochrom vor, so dass selbst die genaue Chromophorkonfiguration im Protein noch umstritten ist. Im Vordergrund der Untersuchungen steht die Charakterisierung der Primärreaktion. Dazu wurde neben der Primärreaktion eines biologisch funktionalen Chromophors auch die eines "geblockten" Chromophors<sup>4</sup> untersucht und weiterhin der Vergleich mit verwandten Systemen zur Charakterisierung herangezogen. Es wird ausführlich dargelegt, dass die Primärreaktion der  $P_r$  Form am besten durch eine Verteilung von Ratenkonstanten beschrieben werden kann.

---

<sup>2</sup>Der in der Natur verbreitete Typ.

<sup>3</sup>Die Angaben im Protein beziehen sich auf lichtadaptiertes Bakteriorhodopsin

<sup>4</sup>Chromophor, der aufgrund chemischer Modifikation keine Isomerisierung im Protein aufweist.

Dieser Zielsetzung folgend stellt sich die Gliederung der Arbeit folgendermaßen dar:

Zuerst werden die Chromoproteine Bakteriorhodopsin und Phytochrom in den ABSCHNITTEN 1.1 und 1.2 vorgestellt und die für das Verständnis der hier vorgestellten Ergebnisse wichtigsten Grundlagen eingeführt. Weiterführende Literatur ist dazu z.B. in [9, 10] und [11] zu finden. Daran schließt sich eine kurze Erläuterung physikalischer Grundlagen im ABSCHNITT 1.3 an.

Im KAPITEL 2 sind *Apparaturen* beschrieben, die aufgebaut wurden, um die Primärreaktionen von Bakteriorhodopsin und bakteriellem Phytochrom zu charakterisieren.

Der in ABSCHNITT 2.3.1 beschriebene **Weißlicht-Weißlicht Aufbau** sowie der in ABSCHNITT 2.3.3 beschriebene **NOPA-Weißlicht Aufbau** wurden zur Bestimmung der Primärreaktion von Bakteriorhodopsin und bakteriellem Phytochrom verwendet. Diese beiden Apparaturen weisen eine spektrale Breite des Abtastimpulses auf, die beinahe den gesamten sichtbaren Spektralbereich überdeckt. Dadurch ist die Variation der detektierten Abtastwellenlänge besonders einfach.

Die Erweiterung des NOPA-Weißlicht *Pump-Probe* Aufbaus zu einem optional umbaubaren **NOPA-NOPA-Aufbau**, der in ABSCHNITT 2.3.2 erläutert ist, ermöglichte den Zugang zu schnellen Relaxationsprozessen im  $S_1$ -Zustand sowie die Aufnahme kohärenter Wellenpaketdynamik im bakteriellen Phytochrom, bei einer *Systemresponse* von etwa 45 fs.

Damit die Optimierung und der Nachweis derart kurzer Lichtimpulse ( $<80$  fs) überhaupt sinnvoll möglich ist, wurde zur Charakterisierung der Lichtimpulse (ABSCHNITT 2.6) ein **Kerrgating-Aufbau** in den NOPA-NOPA Aufbau implementiert.

Mit den Weißlicht-Weißlicht, NOPA-Weißlicht und NOPA-NOPA Messaufbauten stehen für den sichtbaren Spektralbereich sowohl in der Anregungs- als auch in der Abtastwellenlänge variable und stabile Versuchsaufbauten zur Verfügung, die sich sehr gut für zeitaufgelöste Messungen von 20 fs bis 600 ps eignen.

In den ABSCHNITTEN 2.4.2, 2.4.3 und 2.5.3 wird dargelegt, wie der *Pump-Probe* Messaufbau mit Abtastimpulsen im **mittleren Infrarotbereich**, mit dem Ziel, Schwingungsdynamik hoch-zeitaufgelöst und breitbandig zu detektieren, voran gebracht wurde [12, 13].

Der Einfluss von Mutationen sowie Variation des pH und der Ionenkonzentration auf den Steuerungsmechanismus der Primärreaktion in *Bakteriorhodopsin* wird im ABSCHNITT 3.1.1 vorgestellt. Da bekannt ist, dass die Ladung von Aminosäuren in der direkten Umgebung der protonierten Schiff'schen Base die Photoreaktion stark beeinflusst, sind eine Reihe von **Mutanten** des positiv geladenen Arginin 82 (R82)<sup>5</sup> untersucht worden. Durch Ersetzen der positiv geladenen Aminosäure R82 mit neutralen Aminosäuren Cystein (R82C) und Glutamin (R82Q) und durch Variation der Position der positiven Ladung in R82C-Hg<sup>+</sup> wurde der direkte Einfluss der positiven Ladung der R82 auf die Primärreaktion variiert. Der indirekte Einfluss der Ladung von R82 auf die Primärreaktion über die negative Ladung der Asparaginsäure 85 (D85) wurde zusätzlich durch Variation des **pH** und der **Ionenkonzentration** untersucht. Deutliche Hinweise auf die Rolle der positiven Ladung der R82 und indirekte Hinweise auf die der negativen Ladung der Asparaginsäure 212 (D212) ergeben sich aus Messungen an der **Doppelmutante** R82A/G231C.

Zusätzlich wurde zur unterstützenden Charakterisierung der Reaktionsdynamik im wt, der Zerfall des elektronisch angeregten Zustands eines Photoproduktes (N-Intermediat) untersucht.

Die Charakterisierung der lichtinduzierten Photoreaktion von *bakteriellem Phytochrom* (Cph1) ist Gegenstand der folgenden Abschnitte. Im ABSCHNITT 3.4 wird die Dynamik der Primärreaktion der **P<sub>fr</sub> Form** und im ABSCHNITT 3.3 die der **P<sub>r</sub> Form** vorgestellt. Außerdem wurde neben der Photoreaktion eines biologisch funktionalen Chromophors in Cph1 die Photoreaktion eines **”geblockten” Chromophors** in Cph1 untersucht (ABSCHNITT 3.2). Aus der kritischen Diskussion meiner Daten (ABSCHNITTE 3.3.2 und 3.3.3) unter Einbeziehung der in der Literatur veröffentlichten Daten ergibt sich in ABSCHNITT 3.3.6 ein kinetisches **Modell** für die Primärreaktion in der *P<sub>r</sub>* Form.

Zum Schluss werden im KAPITEL 4 die wichtigsten Fortschritte der vorliegenden Arbeit in einer Zusammenfassung kurz aufgeführt. Ausführlichere Zusammenfassungen finden sich am Ende der jeweiligen Kapitel und Abschnitte.

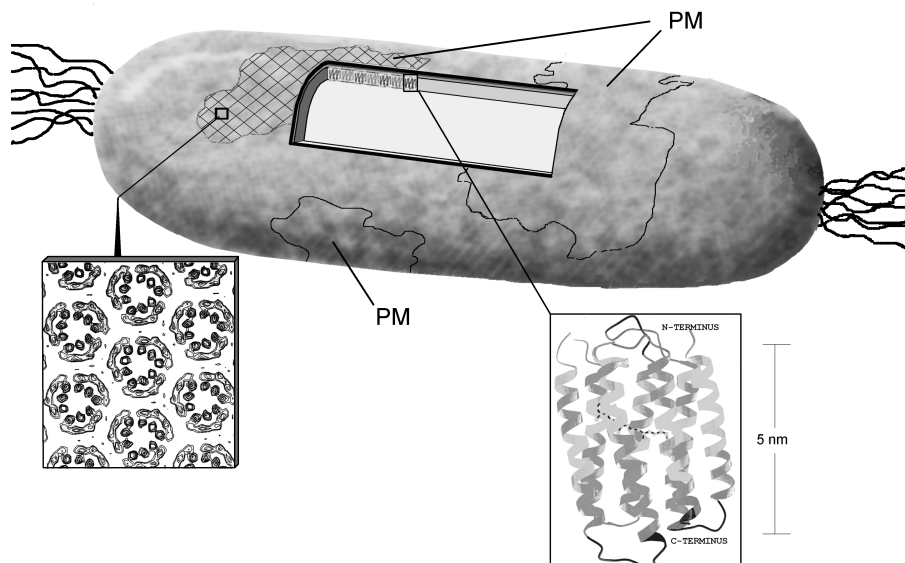
---

<sup>5</sup>Die Zahl bezeichnet die Position der betreffenden Aminosäure in der Aminosäuresequenz.

## 1.1 Die Protonenpumpe Bakteriorhodopsin

### 1.1.1 Photoinduzierte Primärreaktion

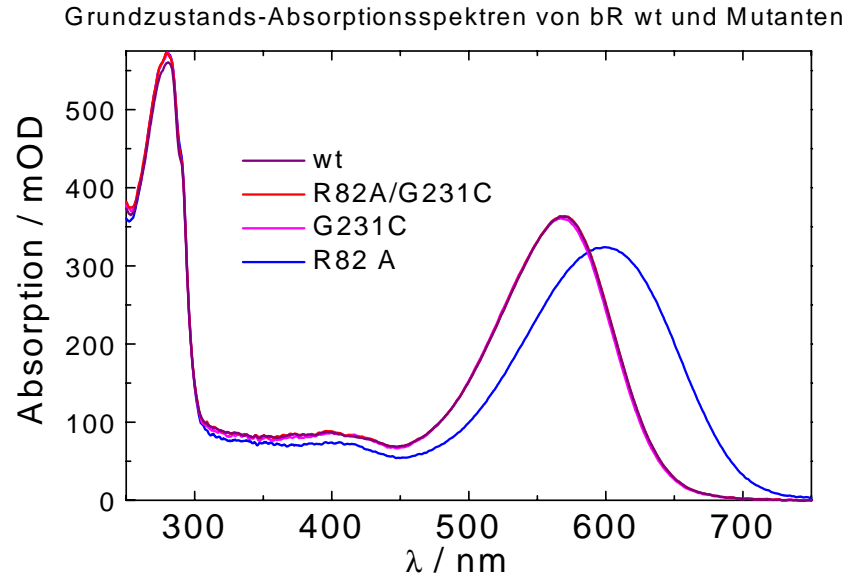
Die ultraschnelle Isomerisierung des Retinalchromophors um eine spezifische C=C Doppelbindung findet als photoinduzierte Primärreaktion in einer Reihe von biologisch wichtigen Retinalproteinen statt. Bekannte Beispiele sind die Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (bR), das Sehpigment Rhodopsin (Rh) und die Chloridpumpe Halorhodopsin (hR) [9]. Von diesen ist bR das am besten untersuchte System. Bakteriorhodopsin, dessen primäre lichtinduzierte Photoreaktion hier im Mittelpunkt der Untersuchungen steht, ist das einzige Protein in der Purpurmembran des *Halobacterium salinarium* (siehe Abbildung 1.1). Es ist ein transmembrangebundenes Protein in der Cytoplasmamembran und besitzt einen Re-



**Abbildung 1.1:** Modellbild eines *Halobacterium salinarium*. Große Flächen der Cytoplasmamembran bestehen aus der Purpurmembran (PM), deren einziges Protein Bakteriorhodopsin ist. BR liegt in der Form von Trimeren in einem hexagonalen Gitter vor. Linker Ausschnitt: Röntgendiffraktionsbild von Purpurmembranschichten [14] (Aufsicht); Rechter Ausschnitt: bR-Struktur nach [15], Seitenansicht eines bR Monomers mit dem Retinalchromophor.

tinalchromophor, der über eine protonierte Schiff'sche Base mit der Aminosäure K216<sup>6</sup> kovalent an das Protein gebunden ist [16, 17, 18]. Die primäre Photoisomerisierung von all-trans nach 13-cis startet den Photozyklus, mit dem ein

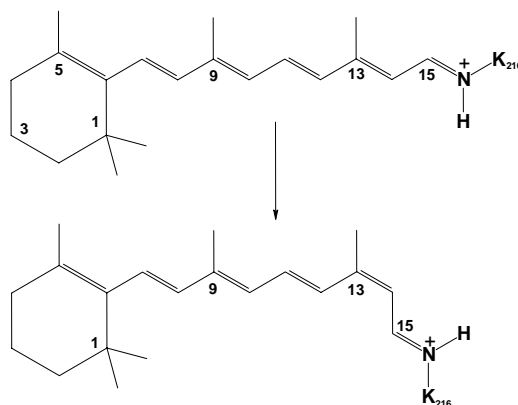
<sup>6</sup>K für Lysin, 216 ist die Nummer der Aminosäure in der Sequenz des Proteins.



**Abbildung 1.2:** Absorptionsspektren des elektronischen Grundzustandes von bR wt und Mutanten G231C, R82A/G231C und R82A bei physiologischem pH. Die Absorptionsmaxima von bR wt, G231C und R82A/G231C liegen bei etwa 570 nm (purpurne Formen), während das Absorptionsmaximum von R82A um 600 nm liegt (blaue Form).

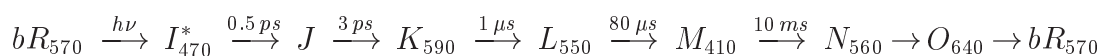
effizienter Protonentransfer über die Zellmembran einhergeht und der eine ATP Erzeugung und damit das Überleben des Bakteriums unter anaeroben Bedingungen ermöglicht. Nach der Photoanregung des elektronischen Grundzustandes  $bR_{570}$ <sup>7</sup> (siehe Abbildung 1.2), in dem der Chromophor in der all-trans Konfiguration vorliegt, wird nach 0,5 ps bzw. 3 ps (siehe [1, 2]) ein anderer elektronischer Grundzustand mit einer Quantenausbeute von ca. 64% erreicht [4, 5, 6], in dem der Chromophor in der 13-cis Konfiguration vorliegt. Relaxationsprozesse, wahrscheinlich Vibrations- und Torsionsrelaxationen [19, 20, 21, 12, 13], führen innerhalb von 3 ps zu einem K-Zustand, der für einige hundert Nanosekunden relativ stabil bleibt. Deprotonierung und die darauf folgende Protonierung des Stickstoffs der Schiff'schen Base [22, 23, 24] als ein Teil des Protonenpumpprozesses tritt im Wildtyp (wt) bR ab der  $\mu s$ - bis ms-Zeitskala auf. Die Energie, die durch die Lichtabsorption und anschließende Isomerisierung des Retinalchromophors im Protein gespeichert wird, wird über mehrere Intermediate (Zustände mit unterschiedlicher Protein- oder Chromophorstruktur) in biochemische Energie umgewandelt. Am Ende der Reaktionskaskade, die vom elektronisch angeregten Zustand  $bR_{570}^*$  aus startet, liegt nach etwa 100 ms bei physiologischem pH wieder der Ausgangszustand  $bR_{570}$  vor. Deshalb spricht man vom Photozy-

<sup>7</sup>Der Index bezeichnet das Absorptionsmaximum.



**Abbildung 1.3:** Der Retinalchromophor in der all-trans oben und in der 13-cis Struktur unten, wie er im Protein in den elektronischen Grundzuständen  $bR_{570}$  (oben) und  $K_{590}$  (unten) vorliegt.

klus<sup>8</sup>, dessen einzelne Intermediate mit Großbuchstaben benannt sind und deren Absorptionsmaxima im sichtbaren Spektralbereich als Index angefügt werden:

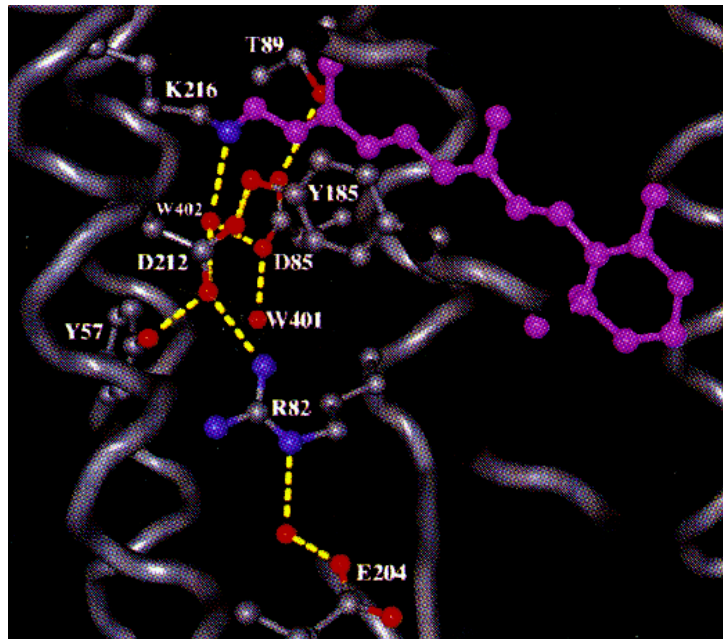


Ab dem  $\mu\text{s}$ -Zeitbereich sind die funktionellen Schritte der Energieumwandlung gut bekannt und werden zunehmend mit Strukturmotiven im Protein verknüpft [25, 26]. Der sub-ps und ps Zeitbereich, in dem die Isomerisierung vom all-trans zum 13-cis Retinalchromophor stattfindet (siehe Abbildung 1.3), ist ebenfalls untersucht worden. Auf der Basis fs-zeitaufgelöster Experimente [27, 28, 29, 30, 31, 32] wurde erneut die Frage aufgeworfen, wann die primäre Isomerisierung in bR im Vergleich zum Zerfall des angeregten Zustandes stattfindet. Diese Frage kann mit den hier vorgestellten Messungen nicht beantwortet werden<sup>9</sup> und im weiteren Verlauf wird der Zerfall der Absorption des elektronisch angeregten Zustandes (ESA) als ein signifikantes Maß für den Isomerisierungsprozess betrachtet.

Aus dem Vergleich der lichtinduzierten Isomerisierungsdynamik von bR und hR mit dem all-trans Retinal mit protonierter Schiff'schen Base in Lösung [3], kann geschlossen werden, dass die Spezifität der Isomerisierung im Protein durch die Aminosäureseitenketten, die die Bindungstasche (Abbildung 1.4) formen, bestimmt wird. Die Aminosäuren wirken dabei durch ihre unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften wie Form (Länge) und elektrische Ladung auf die Position der isomerisierenden Doppelbindung und die Rate der Isomeri-

<sup>8</sup>Photozyklus nach [1, 2]

<sup>9</sup>Sub-ps *Vis-Pump* Infrarot-*Probe* Absorptionsdifferenzmessungen [12, 13], die diese Frage beantworten sollen, sind gerade in der Testphase.



**Abbildung 1.4:** bR Bindungstasche mit Retinalchromophor, wichtigen Aminosäureseitenketten und Wassermolekülen. W401 und W402 bezeichnen Wassermoleküle. Der Retinalchromophor (violett) ist über eine Schiff'sche Base (blau: Stickstoff der Schiff'schen Base) mit dem Protein über die Aminosäure Lysin (K216) kovalent gebunden. Die Asparaginsäuren D212 und D85 sind über das Wassermolekül W402 mit dem Proton des Stickstoffs der Schiff'schen Base über Wasserstoffbrückenbindungen verbunden (siehe Abbildung A.1). Arginin 82 (R82) bildet mit D212 direkt Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die Struktur ist [33] entnommen.

sierung ein. Letztere wird durch die Zerfallszeit der ESA gemessen. Mit anderen Worten: Die Retinalbindungstasche des Proteins zwingt dem Retinalchromophor eine neue Gleichgewichtsgeometrie im Vergleich zum Chromophor in Lösung auf. Dabei wird die elektronische Potentialoberfläche und damit die Reaktivität des Chromophors geändert. Geladene Aminosäuren, die sich in und am Rand der Bindungstasche befinden, spielen dabei eine wichtige Rolle. In bR sind dies im besonderen die Aminosäureseitenketten der Asparaginsäuren in Position 85 (D85) und 212 (D212) und des Arginins in Position 82 (R82). Dies wurde zuerst von Song et al. [8] und Kobayashi et al. [7] gezeigt, die eine signifikante Verlangsamung des Zerfalls der ESA beobachteten, wenn der bR Wildtyp (wt) in die "blaue" Form überführt wird bzw. wenn geladene Aminosäuren in der Bindungstasche durch neutrale ersetzt werden. Aus diesen Experimenten wurde geschlossen, dass der Protonierungszustand der D85, der, bei vorgegebenem pH, durch den pK Wert<sup>10</sup> bestimmt ist,<sup>11</sup> bzw. die negativ geladene Form der D85, die Zerfallsrate der ESA katalysiert. Während im bR wt und in bR Proteinmutanten, die eine de-

<sup>10</sup>negative dekadische Logarithmus der Aciditätskonstante aus dem Massenwirkungsgesetz.

<sup>11</sup>Im bR wt mit 150 mM KCl liegt er bei 2,6.



protonierte D85 ("purpurne" Form) aufweisen, eine Zerfallszeit der ESA von 0,5 ps gemessen wurde, zeigen bR wt und Proteinmutanten mit protonierter D85 (blaue Form) zwei Zerfallszeiten der ESA, deren Zeitkonstanten bei 1,6 und etwa 10 ps liegen. Die Messungen, die in Abschnitt 3.1.1 vorgestellt werden, untersuchen auf weitaus breiterer Basis die katalytische Funktion der D85 für den Zerfall der ESA und somit der Isomerisierung. Dazu wurden verschiedene bR Mutanten an der Position 82 ausgewählt. Darunter befindet sich eine Doppelmutante, die ein allosterisches Verhalten aufweist. Die Charakteristiken der Einzelmutante R82A gegenüber dem wt, nämlich beschleunigte Kinetik der Deprotonierung der Schiff'schen Base, zeitlich vertauschte Reihenfolge von Protonenabgabe und Aufnahme sowie Erhöhung des pK Wertes der D85, werden in der Doppelmutante vollständig rückgängig gemacht. Dieses revertierte wt-Verhalten tritt auf, wenn zur Mutation R82A in der Bindungstasche noch eine weitere Mutation G231C eingeführt wird, die sich erstaunlicherweise auf der Proteinoberfläche der zytoplasmatischen Seite, also weit entfernt von der Bindungstasche befindet. Diese Mutations-Revertante R82A/G231C besitzt eine modifizierte Retinalbindungstasche mit einem reduzierten diffusen Gegenion zur protonierten Schiff'schen Base, das im Gegensatz zum wt (D212, D85, R82) nur noch aus D212 und D85 gebildet werden kann.

### 1.1.2 Zielsetzung

Ziel der Untersuchungen ist insbesondere die Eingrenzung der kritischen Parameter, die eine Reaktionsdynamik und Isomerisierung wie im wt ermöglichen. Dieser Satz von kritischen Parametern beinhaltet die essentielle räumliche Ladungsverteilung in der direkten Umgebung des Chromophors, die durch eine minimale Anzahl von geladenen Aminosäureseitenketten in spezifischer Position zum Chromophor realisiert wird. Da die räumliche Ladungsverteilung stark von dem pH und der Ionenkonzentration im wt sowie von der jeweiligen Mutation abhängt, wird der Zerfall der ESA auch im Hinblick auf diesen Gesichtspunkt untersucht. Im Bezug auf die Doppelmutante R82A/G231C ergeben sich insbesondere folgende Punkte:

- Weist die Doppelmutante auch auf der Zeitskala der lichtinduzierten Isomerisierung wt-Verhalten auf?
- Wird das katalytische Verhalten der D85 bestätigt?

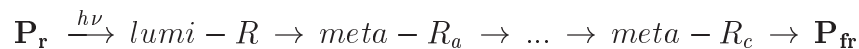
- Welche Rolle spielen die geladenen Aminosäuren D85 und D212 in der Doppelmutante?

Die Ergebnisse werden in Abschnitt 3.1.1 vorgestellt und diskutiert.

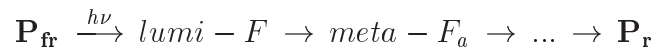
## 1.2 Der Photorezeptor Phytochrom

### 1.2.1 Pflanzliches Phytochrom

Das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen wird entscheidend durch die Wechselwirkung mit dem Umweltfaktor Sonnenlicht beeinflusst. Photosynthese ermöglicht die Umwandlung von Lichtenergie in biochemische Energie und ist die wichtigste Energiequelle für Pflanzen. Der Photorezeptor Phytochrom trägt zur optimalen Anpassung an den Standort, an den die Pflanzen gebunden sind, bei. Er spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Ausbildung des Photosyntheseapparates, der Steuerung des Blühverhaltens und in der Erkennung von Tagesrhythmen (innere Uhr). Phytochrome absorbieren Licht im hellroten (in ihrer  $P_r$  Form) und dunkelroten (in ihrer  $P_{fr}$  Form) Spektralbereich und lösen daraufhin jeweils eine Signaltransduktionskette aus, in deren Verlauf Lichtinformation in biochemische Information umgewandelt wird. Sowohl die Lage der Absorptionsbanden von  $P_r$  und  $P_{fr}$  im roten Spektralbereich, als auch die Möglichkeit, diese beiden thermisch stabilen Formen lichtinduziert ineinander zu überführen, ist ein Charakteristikum aller Phytochrome. Bei dieser Umwandlung findet nach photoinduzierter Anregung der  $P_r$  Form eine Z,E Isomerisierung<sup>12</sup> des Chromophors um die  $C_{15} = C_{16}$  Doppelbindung (siehe Abbildung 1.5) beim Übergang in das Intermediat lumi-R statt [34]. Aufgrund weiterer Relaxationsprozesse durchläuft Phytochrom mehrere Intermediate, bis es schließlich nach etwa 500 ms die  $P_{fr}$  Form ausbildet [35, 36].

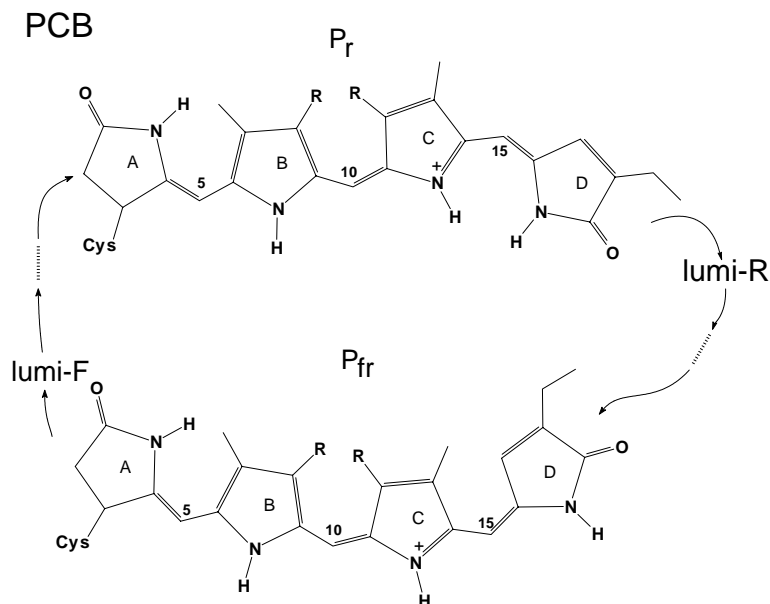


Wird die  $P_{fr}$  Form angeregt, tritt eine E,Z Isomerisierung [34] beim Übergang zu lumi-F auf. Nachfolgende Relaxationsschritte führen über mehrere Intermediate nach etwa 20 ms zur  $P_r$  Form zurück. Beide Photoreaktionen haben nur den Anfangs- und Endzustand  $P_r$  bzw.  $P_{fr}$  gemeinsam, d.h. die Intermediate,




---

<sup>12</sup>analog: trans-cis.



**Abbildung 1.5:** Skizze der Chromophore von Haferphytochrom und eventuell Cph1-PCB nach [34]. Durch Absorption von rotem (red) Licht in der  $P_r$  Form und dunkelrotem (far red) Licht in der  $P_{fr}$  Form isomerisiert der Chromophor um die  $C_{15} = C_{16}$  Doppelbindung und gelangt über mehrere Intermediate zur  $P_{fr}$  bzw.  $P_r$  Form.

die in den beiden Reaktionen durchlaufen werden, sind verschieden. Die  $P_{fr}$  Form unterscheidet sich von der  $P_r$  Form nicht nur in der Chromophor- und Proteinstruktur, sondern auch in der biologischen Funktionalität. So weist in Pflanzen die  $P_{fr}$  Form eine 2 bis 2,5 mal höhere Phosphorylierungsrate für PKS1<sup>13</sup> auf als die  $P_r$  Form [37]. Die Fülle biologischer Funktionen, an denen Phytochrom beteiligt ist, soll zum Teil dadurch bedingt sein, dass Phytochrome mit unterschiedlichen Proteinstrukturen und Aminosäuresequenzen auftreten. So ist Phytochrom nicht die Bezeichnung für ein Protein mit eindeutiger Aminosäuresequenz, sondern die Bezeichnung für eine Familie von "Phytochromproteinen", die nach Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenz und ihres photochemischen Verhaltens in Gruppen (phyA, phyB, phyC usw.) eingeteilt werden [38, 11]. Eines der am besten untersuchten pflanzlichen Phytochrome ist das Haferphytochrom, das dem Typ phyA zugeordnet wird und in der  $P_r$  Form eine Heterogenität des Grundzustandes aus mindestens zwei Gruppen phyA' und phyA'' (wahrscheinlich verschiedene Proteinstrukturen) aufweist [39, 40, 41].

In der Literatur veröffentlichte Messungen im Zeitbereich der Primärreaktion von Haferphytochrom  $P_r$  werden kontrovers interpretiert: Mathies und Mitarbei-

<sup>13</sup>phytochrome kinase substrate 1

ter [42] gehen davon aus, dass eine einzige Ratenkonstante die Primärreaktion treffend beschreibt. Hermann und Mitarbeiter [43] sehen Anzeichen für zwei Ratenkonstanten mit unterschiedlichen elektronisch angeregten Zuständen, während Holzwarth und Mitarbeiter [44] die Primärreaktion mit einer Verteilung von Ratenkonstanten beschreiben.

### 1.2.2 Phytochrom aus *Cyanobacterium Synechocystis* (Cph1)

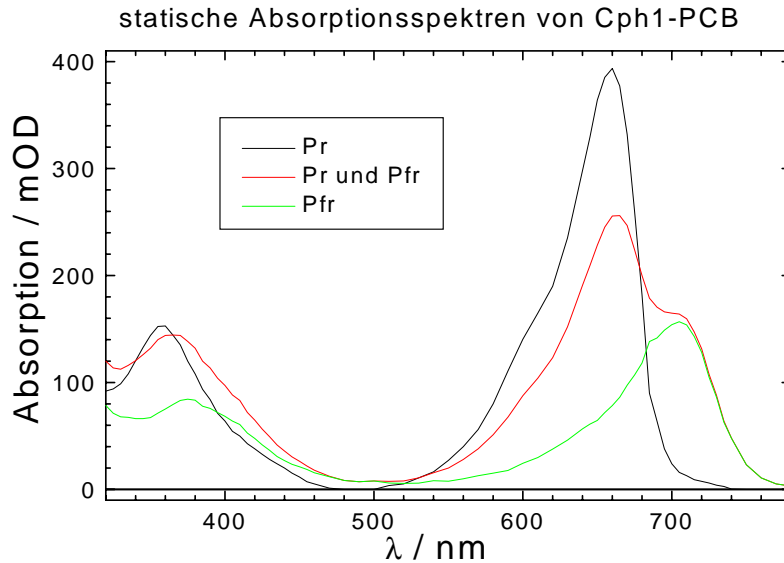
Neue Impulse für die Erforschung der Phytochrome erwartet man durch die Entdeckung und Gewinnung des Apoproteins von Phytochrom aus dem *Cyanobacterium Synechocystis* Stamm PCC6803 (abgekürzt als Cph1) [45]. Einerseits stellt das Cph1-Phytochrom einen evolutionären Vorläufer der pflanzlichen Phytochrome dar, andererseits ist durch die Expression von Cph1 in *E. coli* eine Produktion großer Mengen möglich, so dass die Voraussetzung für eine erfolgreiche Kristallisation zur Strukturbestimmung gegeben ist.

Das Protein Cph1 besteht aus 748 Aminosäuren (AS) mit einem Gewicht von 84,2 kDa<sup>14</sup>, bildet Dimere aus und tritt in Cyanobakterien in Verbindung mit dem Chromophor Phycocyanobilin (PCB) auf [46], der kovalent über die Thiolgruppe des Cysteins C259 an das Protein gebunden ist. Das im Bakterium vorliegende Protein Cph1-PCB phosphoryliert Rcp1<sup>15</sup> aus seiner  $P_r$  Form heraus, weshalb davon ausgegangen wird, dass in Cph1-PCB die biochemisch aktivere Form  $P_r$  und nicht  $P_{fr}$  ist [47]. Die für Phytochrome typischen Absorptionsspektren der  $P_r$  und  $P_{fr}$  Formen sind in Abbildung 1.6 dargestellt, wobei eine Verschiebung der Absorptionsmaxima in Cph1-PCB gegenüber Cph1-P $\phi$ B (P $\phi$ B ist der native Chromophor der pflanzlichen Phytochrome) von etwa 10 nm zu beobachten ist. Der Extinktionskoeffizient von Cph1-PCB  $P_r$  ist etwas geringer als in pflanzlichen Phytochromen und beträgt im Absorptionsmaximum bei 656 nm  $85 \cdot 10^3 M^{-1} cm^{-1}$  [48].

Mit zeitaufgelöster Absorptionsdifferenzspektroskopie im  $\mu s$ -Zeitbereich wurde die Photoreaktion von Cph1-PCB untersucht [49], um zu entscheiden, ob Cph1-PCB ein gutes Modellsystem für die meisten bekannten Phytochrome darstellt. Es wurde eine große Ähnlichkeit mit der Photoreaktion von Haferphytochrom nachgewiesen. Resonanz-Raman und FT-IR Messungen unterstützen diese Beobachtung [50, 49]. Bei tiefen Temperaturen treten im frühen Ablauf der Photoreaktion allerdings Unterschiede zwischen Haferphytochrom  $P_r$  und Cph1-PCB

<sup>14</sup>Im Vergleich bR: 248 AS ; 26,5 kDa

<sup>15</sup>*response regulator for cyanobacterial phytochrome.*



**Abbildung 1.6:** Die statischen Absorptionsspektren von Cph1-PCB sind hier in der  $P_r$ -Form (schwarz) und als Gemisch von  $P_r$ -Form und  $P_{fr}$ -Form (rot) dargestellt. Das reine Spektrum der  $P_{fr}$ -Form (grün) wurde aus beiden Spektren errechnet. Die Hauptabsorptionsbanden um 660 nm und 704 nm, jeweils mit Schultern, und die Soret-Bande um 360 nm sind gut zu sehen.

$P_r$  auf. Das photochemische Verhalten von Cph1-PCB  $P_r$  ist dort eher mit Phytochromen des Typs phyB vergleichbar<sup>16</sup> [51]. Dies lässt den Schluss zu, dass Cph1-PCB auf jeden Fall ab dem  $\mu s$ -Zeitbereich bei Zimmertemperatur ein gutes Modellsystem für Phytochrome darstellt. Wenn analoges Verhalten im ps und sub-ps Zeitbereich beobachtet werden kann, dann ist Cph1-PCB ein ideales Modellsystem für die Photoreaktion pflanzlicher Phytochrome. Es besteht dann einerseits die Möglichkeit am evolutionären Vorläufer der pflanzlichen Phytochrome die Photoreaktion zu studieren und andererseits ist durch die vereinfachte Gewinnung des Proteins die Möglichkeit gegeben, Cph1-Mutanten zu untersuchen, die genaueren Aufschluss auf den Mechanismus der Chromophor-Protein Wechselwirkung geben können.

Weitere Einblicke in die Chromophor-Protein Wechselwirkung können modifizierte Chromophore liefern. Das Protein Cph1-PEB, das gegenüber Cph1-PCB einen in der Chromophorstruktur der  $P_r$  Form ähnlichen aber modifizierten Chromophor Phycoerythrobilin (PEB) aufweist (siehe Abbildung A.2) [52], zeigt eine drastisch veränderte Photoreaktion. Aufgrund einer gesättigten  $C_{15}-C_{16}$  Einfachbindung tritt in Cph1-PEB keine Isomerisierung nach Lichtanregung auf<sup>17</sup> und es

<sup>16</sup>Der Typ phyB zeigt keine Photoreaktion bei tiefen Temperaturen

<sup>17</sup>Man spricht auch vom "geblockten" Chromophor.

werden keine Photoprodukte gebildet. Da sich Cph1-PEB und Cph1-PCB nur in der Chromophorstruktur unterscheiden, sollte die Primärreaktion von Cph1-PEB alle Charakteristiken der Primärreaktion von Cph1-PCB aufweisen, die nicht mit der Isomerisierung verknüpft sind.

### 1.2.3 Zielsetzung

Ziel der Untersuchungen ist eine möglichst vollständige Charakterisierung und Entwicklung eines Modells für die Primärreaktion von Cph1-PCB in der  $P_r$  und der  $P_{fr}$  Form sowie der Vergleich dieser Primärreaktionen mit denen in Haferphytochrom. Dazu wird insbesondere die Primärreaktion der  $P_r$  Form kritisch untersucht, da diese in Haferphytochrom kontrovers diskutiert wird. Mit Hilfe des modifizierten Chromophors PEB werden Anteile der Reaktionsdynamik, die zur Isomerisierung in Cph1-PCB  $P_r$  gehören, identifiziert.

## 1.3 Ultrakurzzeitspektroskopische Grundlagen

### 1.3.1 *Pump-Probe* Spektroskopie

Chromoproteine, wie bR oder Phytochrom, können lichtinduziert angeregt werden und wandeln die Lichtenergie in biochemisch nutzbare Formen um. Dabei werden die Moleküle aus dem elektronischen Grundzustand in den angeregten Zustand überführt, von denen im Zuge der Photoreaktion ein Teil der Moleküle verschiedene elektronische Grundzustände (Intermediate) durchläuft. Sowohl die Besetzung des elektronisch angeregten Zustands, als auch die der verschiedenen Intermediate sind im allgemeinen mit einer Änderung der Absorption verbunden. Im Folgenden wird beschrieben, wie diese Absorptionsänderung im Kleinsignalfall und einer optisch dünnen Probe zeitaufgelöst verfolgt werden kann. Mit einem Anregungsimpuls werden Chromoproteine angeregt (*Pump*) und zeitversetzt dazu tastet ein viel leistungsschwächerer Abtastimpuls (*Probe*) die Moleküle ab. Typische Wellenlängenbereiche, die mit dieser Spektroskopiemethode untersucht werden, sind der sichtbare Spektralbereich und der nahe Infrarotbereich von 400 nm bis 900 nm (VIS) und der Bereich im mittleren Infrarot um einige  $\mu\text{m}$  (IR).

### 1.3.1.1 Inkohärentes Bild

Ist die Zeitaufösung des *Pump-Probe* Experiments im sichtbaren Spektralbereich (VIS-VIS) deutlich länger als die elektronischen Dephasierungszeiten (kleiner 30 fs)<sup>18</sup>, so kann die gemessene Dynamik in einem inkohärenten Bild interpretiert werden:

Die Absorption eines Photons aus dem Anregungsimpuls regt das Molekül an und führt zur Besetzung eines neuen Zustandes. Der Abtastimpuls fragt den Zustand des Moleküls in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit zwischen den beiden Lichtimpulsen ab.

Die Messgröße ist die Änderung des Intensitätsverhältnisses  $\frac{I_S}{I_R}$  (Transmission), die der Abtastimpuls erfährt, wenn er einerseits durch ein Probevolumen mit angeregten ( $I_S$ ) und andererseits durch das gleiche Probevolumen ohne angeregte Moleküle ( $I_R$ ) geschickt wird. Um eine Messgröße zu erhalten, die proportional zur Konzentration der abgetasteten molekularen Spezies ist, wird von der Transmission der negative dekadische Logarithmus gebildet und man erhält die Absorption  $\Delta A(\lambda, t)$  (in Formel 1.1).

$$\begin{aligned}
 I_S(\lambda, \Delta t) &= I_{0S} 10^{-[\epsilon(\lambda)(c-c_A(\Delta t))d + \sum_i \epsilon_i(\lambda)c_i(\Delta t)d]} && \text{mit } \sum_i c_i(\Delta t) = c_A(\Delta t) \\
 I_R(\lambda) &= I_{0S} 10^{-\epsilon(\lambda)cd} && \text{und } d_S = d_R = d \text{ und} \\
 \Rightarrow \Delta A(\lambda, \Delta t) &= \sum_i [\epsilon_i(\lambda) - \epsilon(\lambda)] c_i(\Delta t)d && (1.1) \quad I_{0S} = I_{0R}
 \end{aligned}$$

Dabei bezeichnet  $\epsilon$  den Extinktionskoeffizienten der Moleküle im Ausgangszustand (elektronischer Grundzustand) und  $c$  deren Konzentration. Der Wert  $c_A$  repräsentiert die Gesamtkonzentration der angeregten Moleküle,  $\epsilon_i$  den Extinktionskoeffizienten und  $c_i$  die zugehörige Konzentration der Moleküle im Zustand  $i$ .

In dem *Pump-Probe* Aufbau können in den Absorptionsdifferenz-Signalen folgende Beiträge nach Anregung beobachtet werden:

- Bleichsignal : negative Absorption durch Verringerung der Konzentration im Grundzustand, was zu einer Erhöhung der transmittierten Photonen im Abtastimpuls führt.
- Stimulierte Emission (SE) : negative Absorption durch Erhöhung der transmittierten Photonen im Abtastimpuls.

---

<sup>18</sup>Bei den von uns untersuchten Systemen.

- Absorption des angeregten Zustandes (ESA) : positive Absorption durch Verringerung der Photonen im Abtastimpuls.
- Absorption eines Intermediats : positives Signal durch Verringerung der Photonen im Abtastimpuls.

### 1.3.1.2 Licht-Materie Wechselwirkung

Die Wechselwirkung eines elektromagnetischen Lichtfeldes mit der Probe wird durch die vom Feld induzierte Polarisation  $\vec{P}(t)$  beschrieben. Entwickelt man  $\vec{P}(t)$  nach dem Feld  $\vec{E}(t)$  und betrachtet deren Fouriertransformierte ( $\tilde{P}(\omega)$  und  $\tilde{E}(\omega)$ ), so ergibt sich:

$$\begin{aligned}\tilde{P}(\omega) &= \epsilon_0 \sum_i \chi^{(i)}(\omega) \tilde{E}(\omega)^i \\ &= \epsilon_0 \chi^{(1)}(\omega) \tilde{E}(\omega) + \epsilon_0 \chi^{(2)}(\omega) \tilde{E}^2(\omega) + \epsilon_0 \chi^{(3)}(\omega) \tilde{E}^3(\omega) + \dots\end{aligned}$$

Der Entwicklungskoeffizient ist die optische Suszeptibilität  $\chi^{(i)}$ , die einen Tensor i.ter Stufe darstellt<sup>19</sup>. Die Polarisation stellt sich in der Zeitabhängigkeit als Faltung zwischen optischer Suszeptibilität und elektromagnetischem Feld dar (hier 1. Ordnung):

$$\vec{P}^{(1)}(t) = \epsilon_0 \int_{-\infty}^t dt' \chi^{(1)}(t') \vec{E}(t - t') \quad (1.2)$$

Die obere Grenze t trägt der Tatsache Rechnung, dass die Polarisationsantwort auf das Feld kausal sein muss. Für nicht dispersive Medien ist die Antwort des Mediums auf das elektromagnetische Feld instantan, also gedächtnislos<sup>20</sup>. Wenn im Folgenden nichts anderes erwähnt wird, wird diese Näherung vorausgesetzt.

Die lineare Absorption ist im Feld des Abtastimpulses proportional zum Imaginärteil der Polarisation erster Ordnung  $\vec{P}^{(1)}(t)$  und es gilt nach [53]:

$$\Delta A(\omega, \Delta t) \propto \omega \frac{\Im\{\tilde{E}^*(\omega) \tilde{P}^{(1)}(\omega, \Delta t)\}}{|\tilde{E}(\omega)|^2} \quad (1.3)$$

Dabei sind  $\tilde{E}(\omega)$  und  $\tilde{P}^{(1)}(\omega)$  die Fouriertransformierten des elektromagnetischen Feldes  $\vec{E}(t)$  und der Polarisation erster Ordnung  $\vec{P}^{(1)}(t)$  und  $\Delta t$  die Zeitverzögerung zwischen Anregungsimpuls und Abtastimpuls.

<sup>19</sup>Für Proben, die eine Inversionssymmetrie aufweisen, verschwindet  $\chi^{(2)}$ .

<sup>20</sup>Im Allgemeinen beschreibt der Imaginärteil von  $\chi(\omega)$  die Absorption und der Realteil die Dispersion, die beide eine Frequenzabhängigkeit aufweisen.



### 1.3.1.3 Kohärentes Bild

Werden *Pump-Probe* Experimente mit einer hohen fs-Zeitaufösung durchgeführt, so werden vom spektral breiten Anregungsimpuls etliche vibronische Übergänge im Molekül kohärent angeregt. Dadurch kann sich ein Wellenpaket im angeregten Zustand oder im Grundzustand<sup>21</sup> ausbilden (siehe Abschnitt A.2.1). Außerdem treten zusätzlich zu den im Abschnitt 1.3.1.1 beschriebenen Wechselwirkungen neue hinzu, die durch die induzierte Polarisierung dritter Ordnung  $\vec{P}^{(3)}(t)$  verursacht werden. Das Absorptionssignal ergibt sich für Polarisierungen, die klein gegenüber dem Abtastsignal sind, nach [54] zu

$$\Delta A(\omega, \Delta t) = -\ln(10)\omega \frac{\Im\{\tilde{E}^*(\omega)\tilde{P}^3(\omega, \Delta t)\}}{|\tilde{E}(\omega)|^2} \quad (1.4)$$

wobei die Polarisierung dritter Ordnung unter Berücksichtigung nicht instantaner Antwort auf die Lichtimpulse gegeben ist durch:

$$\vec{P}^{(3)}(t) = \int_0^\infty \int_0^\infty \int_0^\infty dt_1 dt_2 dt_3 R^{(3)}(t_3, t_2, t_1) \vec{E}_1(t-t_3) \vec{E}_1(t-t_3-t_2) \vec{E}_2(t-t_3-t_2-t_1) \quad (1.5)$$

Dabei ist  $R^{(3)}(t_3, t_2, t_1)$  die Material-Antwortfunktion, die für negative Argumente verschwindet und  $E_1$  und  $E_2$  sind die Felder des Anregungsimpulses und des Abtastimpulses. Mit der Annahme, dass die Lichtimpulse lang sind im Vergleich zur elektronischen Dephasierung<sup>22</sup>, kann die Berechnung auf eine einfache Integration reduziert werden [54]:

$$\begin{aligned} P^{(3)}(t, \Delta t) &= 2E_2(t - \Delta t) \int_0^\infty dt' R_S(t - t') E_1^*(t') E_1(t') \\ &\quad + 2E_1(t) \int_0^\infty dt' R_R(t - t') E_1^*(t') E_2(t' - \Delta t) \\ &\quad + 2E_1^*(t) \int_0^\infty dt' R_{2ph}(t - t') E_1(t') E_2(t' - \Delta t) \end{aligned} \quad (1.6)$$

Dabei stellen die drei Terme die Beiträge der sequentiellen, der Raman- und der Zwei-Photonen-Absorption dar. Die Zeitverzögerung zwischen Anregungsimpuls und Abtastimpuls ist durch  $\Delta t$  gegeben. Die Funktionen  $R_S(t - t')$ ,  $R_R(t - t')$

<sup>21</sup>z. B. durch impulsive Ramanstreuung in den Grundzustand während des Anregungsimpulses.

<sup>22</sup>etwa 10 bis 60 fs

und  $R_{2ph}(t - t')$  beschreiben die Wechselwirkung zwischen den Lichtimpulsen und der Probe. Der Anteil der Zwei-Photonen- bzw. Raman-Absorption trägt nur zum Signal bei, wenn die Spektren von Anregungsimpuls und Abtastimpuls die jeweiligen Resonanzbedingungen erfüllen.

### 1.3.2 Erzeugung von Lichtimpulsen durch nichtlineare Prozesse 2. Ordnung

Zur Betrachtung nichtlinearer optischer Effekte zerlegt man die Polarisation, die durch das elektromagnetische Feld im Medium erzeugt wird, in einen linearen Anteil  $\vec{P}_L(t)$  und einen nichtlinearen Anteil  $\vec{P}_{NL}(t) = \sum_{i=2} \vec{P}^{(i)}(t)$ . Die Wellengleichung in nichtlinearen optischen Medien ergibt sich dann aus den Maxwellgleichungen zu:

$$\nabla^2 \vec{E} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = \mu_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} (\vec{P}_L + \vec{P}_{NL}) \quad (1.7)$$

$$\text{mit } n^2 = (1 + \chi^{(1)}) \quad (1.8)$$

$$\Rightarrow \nabla^2 \vec{E} - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = \mu_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} (\vec{P}_{NL}) \quad (1.9)$$

Dabei ist  $n$  der lineare Brechungsindex,  $c$  die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und  $\mu_0$  die magnetische Permeabilität im Vakuum. Der Polarisationssterm  $\vec{P}_{NL}(t)$  ist der Quellterm der inhomogenen Wellengleichung und beschreibt den Einfluss des Mediums auf das Feld  $\vec{E}(t)$ .

Eine Vereinfachung der Differentialgleichung wird erreicht, in dem man sie auf die Koordinate der Ausbreitungsrichtung des Feldes reduziert. Einen schnellen Überblick darüber, welche Effekte durch den Polarisationssterm zweiter Ordnung entstehen, erhält man, wenn für  $P^{(2)}(t) = \chi^{(2)} E^2(t)$  ein elektromagnetisches Feld mit z.B. zwei verschiedenen Frequenzen  $\omega_1$  und  $\omega_2$  eingesetzt wird:

$$\begin{aligned} E(t) &= E_1 e^{-i\omega_1 t} + E_2 e^{-i\omega_2 t} + c.c. \\ \Rightarrow P^{(2)}(t) &= \chi^{(2)} (E_1^2 e^{-i2\omega_1 t} + E_2^2 e^{-i2\omega_2 t} + 2E_1 E_2 e^{-(\omega_1 + \omega_2)t} + \\ &\quad 2E_1 E_2^* e^{-(\omega_1 - \omega_2)t} + c.c.) + 2\chi^{(2)} (E_1 E_1^* + E_2 E_2^*) \end{aligned} \quad (1.10)$$

Es entstehen Terme, die neue Frequenzen aufweisen. Ordnet man diese und betrachtet die Fouriertransformierten, dann sieht man, dass drei Typen von Fre-

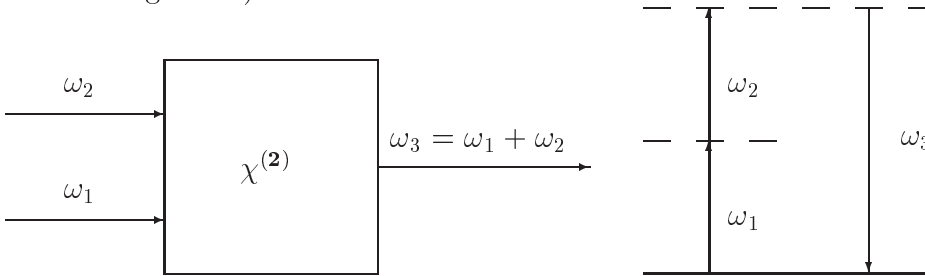
quenzenerzeugung auftreten (c.c. bedeutet komplex konjugiert)<sup>23</sup>:

$$\begin{aligned} P(2\omega_1) &= \chi^{(2)} E_1^2 & \omega_{NL} &= \omega_1 + \omega_1 \text{ (SHG)} \\ P(2\omega_2) &= \chi^{(2)} E_2^2 & \omega_{NL} &= \omega_2 + \omega_2 \text{ (SHG)} \\ P(\omega_1 + \omega_2) &= 2\chi^{(2)} E_1 E_2 & \omega_{NL} &= \omega_1 + \omega_2 \text{ (SFG)} \\ P(\omega_1 - \omega_2) &= 2\chi^{(2)} E_1 E_2^* & \omega_{NL} &= \omega_1 - \omega_2 \text{ (DFG)} \end{aligned}$$

Bei dieser parametrischen Erzeugung geht keine Energie durch Absorption verloren (Energieerhaltung). Zusätzlich ergibt sich aus der Impulserhaltung, dass für eine effiziente parametrische Erzeugung die Summe der beteiligten Wellenzahlvektoren  $\Delta\vec{k} = \sum_i \vec{k}_i$  verschwinden muss (Phasenanpassung). Da die Phasenanpassung selten für *Second Harmonic Generation* (SHG), *Sum Frequency Generation* (SFG) und *Difference Frequency Generation* (DFG) gleichzeitig erfüllt ist, treten diese Typen der parametrischen Erzeugung meist getrennt auf.

### 1.3.2.1 SHG- und SFG-Prozess

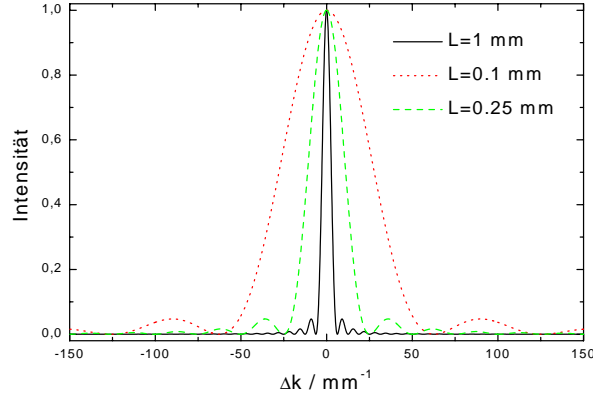
Die Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG) ist ein Spezialfall der Erzeugung der Summenfrequenz (SFG). Aus diesem Grund werden hier beide Prozesse gemeinsam dargestellt werden. Zwei niederenergetische Photonen werden durch Wechselwirkung mit dem nichtlinearen Medium über virtuelle Zustände verlustfrei in ein höherenergetisches Photon umgewandelt (schematisch in der folgenden Skizze dargestellt).



Aus der Lösung der reduzierten nichtlinearen Wellengleichung ergibt sich, dass die Intensität der parametrisch erzeugten Komponente  $I_{\omega_3}$  von der durchlaufenen Länge des Mediums  $L$  und der Phasenbeziehung zwischen den beteiligten Wellenzahlvektoren  $\Delta\vec{k} = \vec{k}_1 + \vec{k}_2 - \vec{k}_3$  wie folgt abhängt [55]:

$$I_3 = I_{3,max} \frac{\sin^2\left(\frac{\Delta\vec{k}L}{2}\right)}{\left(\frac{\Delta\vec{k}L}{2}\right)^2} \quad (1.11)$$

<sup>23</sup>Zusätzlich treten auch noch die negativen Frequenzen auf, die hier nicht aufgeführt sind.



**Abbildung 1.7:** Dargestellt ist die Abhängigkeit der parametrischen Intensität des erzeugten Feldes von der Wellenzahlvektordifferenz  $\Delta\vec{k}$  und der effektiven Kristalllänge  $L$ .

Hierbei wurde angenommen, dass die Intensitäten der Pumpimpulse  $I_{\omega_1}$  und  $I_{\omega_2}$  während der parametrischen Erzeugung im Kristall konstant bleiben. Die Abhängigkeit der Intensität  $I_{\omega_3}$  von der Phasenanpassung ist für verschiedene Längen des Mediums in Abbildung 1.7 dargestellt. An der Abhängigkeit ist zu erkennen, dass aufgrund des Argumentes  $\frac{\Delta\vec{k}L}{2}$  die Verstärkungsbandbreite (FWHM der Intensität) mit wachsender Kristalllänge abnimmt. Deshalb verwendet man kurze Kristalle, um die für kurze Lichtimpulse notwendige Bandbreite verstärken zu können. Die Anpassung der Phasenbeziehung für eine effiziente parametrische Erzeugung ist in doppelbrechenden nichtlinearen Medien möglich, in denen der Brechungsindex  $n$  und der Wellenzahlvektor  $k$  von der Polarisation und dem Winkel  $\theta$  zwischen Impuls und Kristallachse abhängen<sup>24</sup>. Für negativ uniaxiale Kristalle (z.B. BBO) gilt für den Brechungsindex eines außerordentlichen Strahls in Abhängigkeit vom Winkel  $\theta$ :

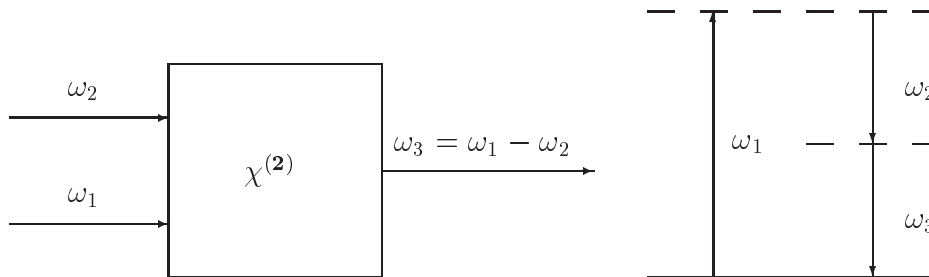
$$n(\theta) = \frac{n_o n_e}{\sqrt{n_o^2 \sin^2 \theta + n_e^2 \cos^2 \theta}} \quad (1.12)$$

Der Brechungsindex  $n$  ändert sich also in Abhängigkeit vom Winkel  $\theta$  zwischen  $n_o$  und  $n_e$ , den Brechungsindizes entlang der Kristall-Hauptachsen. Durch Einstellen des Phasenanpassungswinkels  $\theta$  kann sich somit durch konstruktive Interferenz der in Phase schwingenden atomaren Dipole eine makroskopische Polarisationswelle kohärent im nichtlinearen Medium ausbilden. Da die Polarisation der erzeugenden Lichtimpulse unterschiedlich sein kann, spricht man von Typ I Phasen-anpassung, wenn die erzeugenden Photonen ordentlich polarisiert sind und von Typ II, wenn eines der erzeugenden Photonen außerordentlich polarisiert ist.

<sup>24</sup>Dispersionsrelation:  $k^2(\omega) = \frac{\omega^2}{c^2} n^2(\omega)$

### 1.3.2.2 OPA- und DFG-Prozess

Der optisch parametrische Prozess OPA unterscheidet sich von der Differenzfrequenzerzeugung (DFG) nur durch die Intensitäten der erzeugenden elektromagnetischen Felder. Während im DFG-Prozess die beiden erzeugenden Felder (Pumpimpulse)  $I_1$  und  $I_2$  etwa dieselbe Intensität aufweisen, wird im OPA-Prozess nur mit einem starken Pumpimpuls  $I_1$  und eventuell einem schwachen *Seed*impuls  $I_2$  gearbeitet. Der DFG-Prozess soll eine maximale Intensität  $I_3$  liefern, während der OPA-Prozess beide Intensitäten  $I_2$  und  $I_3$  optimieren soll. Die nach dem OPA-Prozess verstärkt vorliegenden Intensitäten  $I_2$  und  $I_3$  werden mit *Signal* und *Idler* bezeichnet. In dieser Arbeit wird immer der höherenergetische der beiden Lichtimpulse *Signal* genannt und der niederenergetischere *Idler*.



Wird der OPA-Prozess nur mit einem erzeugenden Feld betrieben, also ohne *Seed*impuls, so startet die Zwei-Photonen-Emission aus den virtuellen Zuständen aus dem Quantenrauschen. Dies wird oft als parametrische Superfluoreszenz bezeichnet. Die Effizienz des OPA- und DFG-Prozesses ist analog zur SHG und SFG abhängig von der Wellenzahlvektordifferenz  $\Delta\vec{k}$  und von der Wechselwirkungslänge  $L$  der elektromagnetischen Felder im nichtlinearen Medium.

Limitierend für die Effizienz und die spektrale Breite der parametrischen Verstärkung, wirken sich die unterschiedlichen Gruppengeschwindigkeiten und das Auseinanderlaufen der Energieflüsse der wechselwirkenden Felder im doppelbrechenden Medium aus. Eine Möglichkeit einen Teil dieser Probleme zu umgehen, wird im Abschnitt 2.3.4 beschrieben.

### 1.3.3 Erzeugung von Lichtimpulsen durch nichtlineare Prozesse höherer Ordnung

Ganz analog zu den Betrachtungen der nichtlinearen Effekte zweiter Ordnung kann man nun die Polarisation dritter Ordnung betrachten. Mit  $\vec{E}(t) = Ee^{-i\omega t} +$

$E^*e^{i\omega t}$  ergibt die Polarisation  $\vec{P}^{(3)}(t)$  zu:

$$\vec{P}^{(3)}(t) = \chi^{(3)} E^3 e^{i3\omega t} + 3\chi^{(3)} E^2 E^* e^{-i\omega t} + c.c. \quad (1.13)$$

Die beiden schon bei monochromatischem Feld auftretenden neuen Komponenten entsprechen der Erzeugung der dritten Harmonischen (THG) und einem nichtlinearen Beitrag zur Polarisation des erzeugenden Feldes. Dieser Beitrag führt zur Erzeugung eines nichtlinearen Brechungsindex  $n_{NL}$ , der intensitätsabhängig ist:

$$n(I) = n_0 + n_{NL} = n_0 + n_2 I \quad (1.14)$$

Dabei ist  $n_2$  proportional zu  $\chi^{(3)}$  und mit steigender Intensität  $I$  wird der nun intensitätsabhängige Brechungsindex  $n$  erhöht.

### 1.3.3.1 Selbst-Phasen-Modulation (SPM)

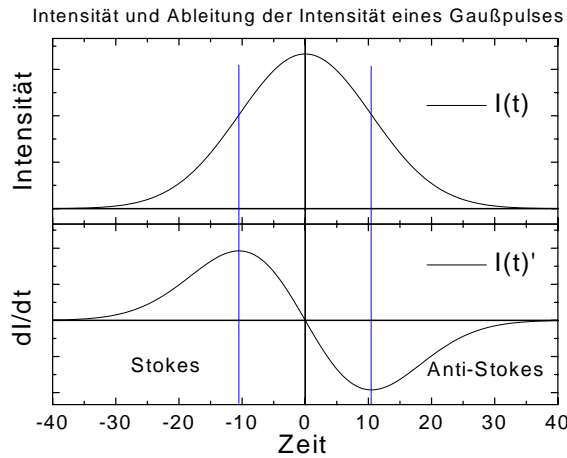
Die Lösung der reduzierten inhomogenen Wellengleichung<sup>25</sup> zeigt eine Abhängigkeit der Phase  $\phi$  von der Intensität und damit von der Zeit, wenn die Intensität zeitabhängig ist [56, 57]:

$$\begin{aligned} \phi(t) &\propto \omega_0 n_0^2 n_2 I(t) \\ \omega &= \omega_0 + \frac{\partial \phi(t)}{\partial t} \end{aligned} \quad (1.15)$$

$$\Rightarrow \Delta\omega \propto -\omega_0 n_0^2 n_2 \frac{\partial I(t)}{\partial t} \quad (1.16)$$

Für den Fall, dass das elektromagnetische Feld durch einen fs-Lichtimpuls  $I(t)$ , der z.B. als gaußförmig angenommen werden kann, gegeben ist, ergibt sich eine Änderung der Phase mit der Zeit (Formel 1.15). Das bedeutet, dass mit der zeitlichen Änderung der Intensität und somit der Phase, eine Frequenzverschiebung  $\Delta\omega = \omega_0 - \omega$  zur Fundamentalfrequenz  $\omega_0$  erzeugt wird. Je kürzer der Lichtimpuls und je größer die Intensität ist, desto größer ist die maximale Frequenzverschiebung. Der Anteil der führenden Lichtimpulsflanke erzeugt Stokes verbreiterte Frequenzen, während Anti-Stokes verbreiterte Frequenzen durch die nachfolgende Lichtimpulsflanke erzeugt werden. Diese Erzeugung neuer Frequenzen wird Selbst-Phasen-Modulation (SPM) genannt, da durch die nichtlineare Wechselwirkung die Phase zeitlich moduliert wird und somit dem Feld eine Frequenzverbreiterung aufprägt. Der SPM-Prozess kann über die Brechungsindexänderung auch in einem gleichzeitig anliegendem Abtastimpuls auftreten. Dieser

<sup>25</sup>Einige vereinfachende Näherungen werden gemacht, z.B. langsam variierende Gesamtamplitude des Feldes.

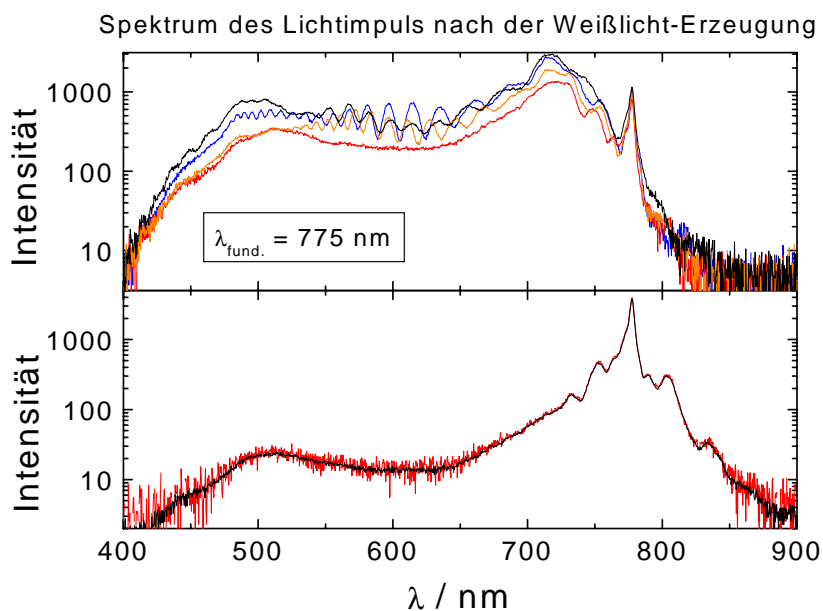


**Abbildung 1.8:** Intensität (oben) und Ableitung der Intensität (unten) eines Gaußpulses. An den Wendepunkten der Intensität, bzw. Extremwerten der Ableitung (blaue Linien) ist die Phasenänderung maximal und es werden die größten Frequenzverschiebungen erzeugt. Stokes verbreiterte Frequenzen werden von der führenden Lichtimpulsflanke und Anti-Stokes verbreiterte Frequenzen von der nachfolgenden Lichtimpulsflanke erzeugt.

Effekt wird oft als Kreuzphasenmodulation (XPM) bezeichnet und taucht in dieser Arbeit auch unter dem Begriff elektronische Antwort auf. Sowohl SPM als auch XPM sind verlustfreie Prozesse.

Die SPM wird auch als Weißlichterzeugung bezeichnet, da im sichtbaren Spektralbereich das breite Spektrum der SPM (siehe Abbildung 1.9) oftmals "weiß" aussieht. Wenn im folgenden von Weißlicht gesprochen wird, ist stets das durch Selbst-Phasen-Modulation erzeugte Superkontinuum gemeint. Das Superkontinuum wird im Allgemeinen entweder zur Erzeugung sehr kurzer Lichtimpulse oder als Abtastimpuls verwendet (siehe Abbildung 1.9).

Neben der Selbst-Phasen-Modulation treten viele weitere Effekte im nichtlinearen Medium auf. Es kann eine Filamentbildung durch Selbstfokussierung beobachtet werden, wenn  $n_2 > 0$  ist, die die Erzeugung von Weißlicht begünstigt. Zusätzlich zu vielen weiteren Prozessen ist häufig bei höherer Intensität die *Four-Photon parametric generation* (FPPG) zu sehen, die durch Interferenz gebeugter Wellenfronten verschiedener Filamente ein Modulationsmuster erzeugt, das im Fernfeld als Kreise verschiedener Wellenlängen und Radien auftritt [56].

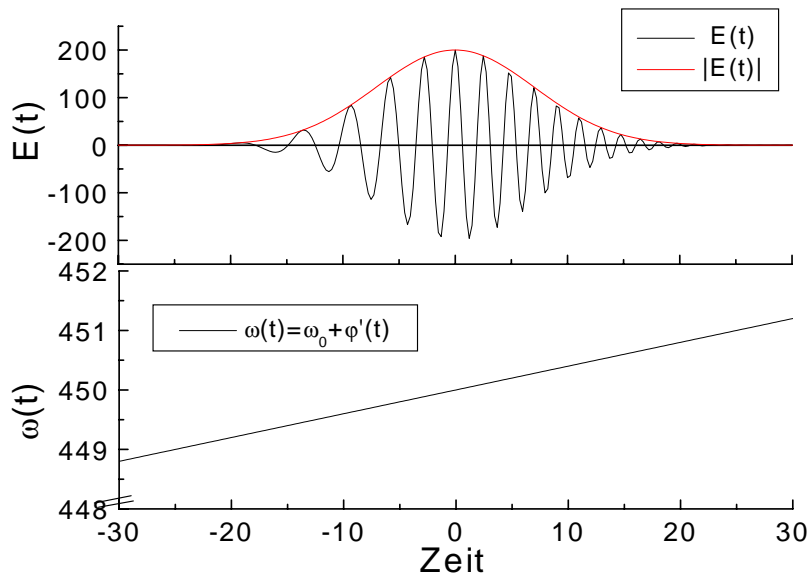


**Abbildung 1.9:** Experimentell aufgenommene Superkontinuumspektren aus SPM. In den Spektren oben ist die Fundamentale  $\lambda_{fund.} = 775 \text{ nm}$  mit Filtern abgetrennt worden. Die Spektren (oben) sind mit unterschiedlicher Fokussierung und Energie erzeugt worden. Unten ist die Fundamentale bei 775 nm mit dem zusätzlich aufgeprägtem Superkontinuum zu sehen. Das Superkontinuum wurde in einem Saphirfenster erzeugt. Von 650 bis 750 nm ist der Intensitätsabfall in etwa exponentiell. Von 500 bis 650 nm ist die Weißlichtintensität etwa konstant.



### 1.3.4 Frequenzmodulierte Lichtimpulse (*Chirp*)

Im Umgang mit fs-Lichtimpulsen, deren Halbwertsbreite (FWHM)  $\tau$  unterhalb von 70 fs liegt, treten dispersive Effekte immer stärker in den Vordergrund. Aufgrund der wachsenden spektralen Breite  $\Delta\nu$  der Lichtimpulse, die sich mit  $\Delta\nu \geq \frac{0.441}{\Delta\tau}$  ergibt<sup>26</sup>, können Ausbreitungsgeschwindigkeitsdifferenzen zwischen den höher- und niederenergetischen Anteilen des Lichtimpulses zu einer Vergrößerung der Halbwertsbreite  $\tau$  führen. Bei normaler Dispersion ( $n > 1$ ) hat die Dispersionsrelation  $k^2 = \frac{\omega^2}{c^2}n^2$  zur Folge, dass sich rotes Licht schneller ausbreitet als blaues.<sup>27</sup> Das bedeutet, dass die Momentanfrequenz  $\omega(t)$  nicht konstant ist, d.h. der Lichtimpuls einen (positiven) *Chirp* aufweist (siehe Abbildung 1.10). Führt man eine Taylorentwicklung um die Zentralfrequenz  $\omega_0$  durch, so erhält man  $\omega(t) = \omega_0 + \frac{d\omega(t)}{dt}t + \frac{1}{2}\frac{d^2\omega(t)}{dt^2}t^2 + \dots$ . Dabei beschreibt  $\gamma = \frac{d\omega(t)}{dt} = \frac{d^2\varphi(t)}{dt^2}$  den linearen *Chirp*parameter. Lichtimpulse weisen dann ihre kleinste Halbwertsbreite



**Abbildung 1.10:** Gaußförmiger Lichtimpuls mit positivem *Chirp*. Oben: Elektrisches Feld  $E(t) = \mathcal{E}(t)e^{-i(\omega_0 t + \varphi(t))} + c.c.$  (schwarz) und Einhüllende  $\mathcal{E}(t)$  (rot) eines positiv linear *gechirpten* Lichtimpulses. Unten: Frequenzverlauf in Abhängigkeit von der Zeit  $\omega(t) = \omega_0 + \frac{d\varphi(t)}{dt}$  für einen positiv linear *gechirpten* Lichtimpuls.

auf, wenn sie bandbreitenbegrenzt sind, was voraussetzt, dass sie keinen *Chirp* aufweisen. Deshalb ist die Charakterisierung des *Chirps* und dessen Kompensation ein wichtige Voraussetzung um kurze fs-Lichtimpulse zu erhalten. In Abschnitt

<sup>26</sup>Gaußförmige Lichtimpulse ohne Frequenzmodulation (*Chirp*)

<sup>27</sup> $v_{ph} = \frac{\omega}{k} = \frac{c}{n(\omega)}$

2.3.2 wird ein Prismenkompressor beschrieben, der benutzt wird um den linearen *Chirp* des Lichtimpulses zu kompensieren. Beiträge von *Chirps* höherer Ordnung sind dagegen nur sehr schwer kompensierbar und sollten von vornherein vermieden werden.