

**Stationäre und transiente
UV-Spektroskopie an Cytochrom c
und Porphyrin-Modellsystemen**

Inaugural Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Dennis Löwenich
aus Neuss

Oktober 2007

Aus dem Institut für Physikalische Chemie I
Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karl Kleinermanns

Koreferent: Prof. Dr. Rainer Weinkauff

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2007

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	5
2. Experimentelle Grundlagen	8
2.1. Stationäre UV/VIS-Absorptionsspektroskopie	8
2.1.1. Grundlagen	8
2.1.2. Das UV/VIS-Spektrometer	9
2.2. Fluoreszenzspektroskopie	10
2.2.1. Grundlagen	10
2.2.2. Die Fluoreszenzapparatur	12
2.2.3. Emissions- und Anregungsspektren	14
2.3. Transiente UV/VIS-Spektroskopie	16
2.3.1. Experimenteller Aufbau des ns-Transientenspektrometers	16
2.3.2. Grundlagen	19
2.3.3. Der Nd: YAG-Laser	25
3. Cytochrome und Porphyrine	28
3.1. Cytochrome und ihre biochemische Bedeutung	28
3.2. Porphyrine	30
4. Titration von Cytochrom c	33
5. Untersuchungen an den Systemen Cyt c /Au und Cyt c / Ag	36
5.1. Cyt c / Au	36
5.2. Cyt c / Ag	39

6. Untersuchungen an Porphyrin-Modellsystemen	42
6.1. Tetraphenylporphyrin (TPP)	42
6.2. Tetra(carboxyphenyl)porphyrin (TCPP) und Tetra(hydroxyphenyl)porphyrin (THPP)	47
7. Fluoreszenz von Cytochrom c	53
7.1. Abstract	53
7.2. Introduction	54
7.3. Experimental and theoretical methods	55
7.4. Results and discussion	55
7.5. Conclusions	63
8. Photoreduktion von Cytochrom c	64
8.1. Abstract	64
8.2. Introduction	65
8.3. Experimental and theoretical methods	66
8.4. Results and discussion	68
8.4.1. <i>Stationary Spectroscopy of Cyt c</i>	68
8.4.2. <i>Femtosecond measurements</i>	69
8.4.3. <i>Nanosecond measurements</i>	78
8.4.4. <i>Temperature-dependent stationary absorption spectra</i>	81
8.4.5. <i>Quasistationary measurements of Cyt c photoreduction</i>	82
8.5. Conclusions	86

9. Zusammenfassung	87
Literaturverzeichnis	89
Abbildungsverzeichnis	92
Liste der verwendeten Symbole und Abkürzungen	98
Danksagung	101
Erklärung	103

1 Einleitung

Cytochrom c (Cyt c) ist ein Protein, das in der Atmungskette eine wichtige Funktion als Elektronentransporter übernimmt [1]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei wichtige spektroskopische Eigenschaften dieses Moleküls untersucht. Zum einen die Lichtemission bei UV-Anregung in Abhängigkeit vom pH-Wert und somit dem Faltungsgrad des Proteins, zum anderen die Reduktion des zentralen Eisenatoms durch optische Anregung gefolgt von Elektronenübertragung und ihre Abhängigkeit von Größen wie Anregungswellenlänge und Temperatur.

Die Proteinfaltung ist ein Forschungsgebiet, das in den letzten Jahren großes Interesse auf sich gezogen hat [2]. Da jedoch diese Biopolymere sehr groß sind, sind quantenchemische Berechnungen und spektroskopische Messungen nicht leicht durchzuführen. Aus diesem Grund ist es notwendig, allgemeine Prinzipien der Proteinfaltung von einfacheren Modellsystemen zu erkunden, um sie auf noch komplexere Moleküle übertragen zu können [3]. Cyt c ist zur Untersuchung von Faltungsmechanismen ein ideales Modellsystem, da es sich durch Zugabe von Säuren bzw. Basen vollständig entfalten und rückfalten kann, ohne dass dabei seine Struktur zerstört wird. Darüber hinaus bleibt während der Entfaltung das zentrale Porphyrinsystem aufgrund seiner kovalenten Bindungen zum Proteingerüst in seiner Position erhalten [4]. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Cyt c ist, dass es eines der strukturell bestuntersuchten Proteine ist, sowohl im kristallinen Zustand als auch in Lösung [5-8].

Eine beliebte Methode zur Untersuchung der Faltungsmechanismen von Cyt c ist die Fluoreszenzspektroskopie [8-11]. Die Fluoreszenz der einzigen Tryptophan-Seitenkette (Trp-59) wird bei pH 7 im gefalteten Zustand fast vollständig durch Löschen unterdrückt, bei niedrigen pH-Werten entfaltet sich das Protein und die Fluoreszenz steigt stark an. Frühere Arbeiten zu diesem Thema zeigten eine bimodale Fluoreszenz bei niedrigen pH-Werten und außerdem eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums während der Entfaltung [9,11], was beides nie erklärt werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Ursprung der Fluoreszenzmaxima von Cyt c bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Mit Hilfe der Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie soll gezeigt werden, dass verschiedene Chromophore zur UV-Emission beitragen.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Untersuchung des Elektronentransfers im Cyt c. Cyt c diente in früheren Untersuchungen ebenfalls als Modellsystem zur Untersuchung von biochemischen Elektronentransferprozessen [12], jedoch wurde der detaillierte Mechanismus dieses Elektronentransports bislang noch nicht aufgeklärt. Verschiedene Arbeiten beschäftigen sich mit der Untersuchung der Photoreduktion von Häm-Proteinen und Metallo-

porphyrinen durch Breitbandbestrahlung. Dabei wurden zum einen externe Elektronendonatoren verwendet [13-15], andererseits gibt es auch Arbeiten, die sich mit Photoreduktion in Abwesenheit externer Donatoren beschäftigen [16-18].

Die Wellenlängenabhängigkeit der Photoreduktion wurde erstmalig von Gu et. al. untersucht [19]. Jedoch wurde in dieser Arbeit die Effizienz der Photoreduktion nur bei einer einzigen Wellenlänge (254 nm) im UV-Bereich gemessen, in welchem die aromatischen Aminosäuren absorbieren und somit konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Photoreduktionseffizienz dem Verlauf der optischen Absorption der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin folgt. Einige Arbeiten [16,20] legen die Vermutung nahe, dass die axialen Liganden des Porphyrin-Eisenatoms für den Elektronentransfer verantwortlich sind, andere Arbeiten untersuchen den Einfluss der aromatischen Aminosäuren [7,21]. Nach dieser Theorie geht man davon aus, dass durch UV-Anregung ein Elektron vom Tryptophan an das Porphyrinsystem übertragen wird [7].

Negrerie et. al. beobachteten eine transiente Absorption im Subpikosekunden-Bereich nach Anregung mit 530 nm und führten diese auf Relaxationsprozesse mit ultraschneller interner Konversion sowie Schwingungsabkühlung zurück [22]. In der vorliegenden Arbeit wird der photoinduzierte Elektronentransfer im Cyt c über eine extreme Zeitskala vom Femtosekunden- bis zum Mikrosekundenbereich sowie stationär über einige Minuten untersucht, um nähere Informationen über den Transfermechanismus zu erhalten. Zwei denkbare Mechanismen werden gegenübergestellt, zum einen die direkte Photoreduktion aus dem elektronisch angeregten Zustand und zum anderen die thermische Reduktion aus einem schwingungsmäßig heißen elektronischen Grundzustand nach schneller interner Konversion. Außerdem werden Reduktionsraten im Femtosekunden- und Nanosekundenbereich sowie in quasistationären Experimenten bestimmt und dabei eine Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge untersucht.

Zum besseren Verständnis erhaltener Ergebnisse ist es sinnvoll, Untersuchungen an einfacheren Modellsystemen durchzuführen. Während Cyt c bereits als Modellsystem für komplexere Proteine fungiert, können auch die im Cyt c enthaltenen Chromophore, insbesondere das Tryptophan und das Porphyrinsystem, separat untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb das transiente Absorptionsverhalten verschiedener Porphyrin-Modellsysteme untersucht. Außerdem wurde untersucht, ob die erhaltenen Ergebnisse der Photoreduktion auch auf Cyt c/Nanopartikel-Komplexe übertragen werden können. Diese Komplexe wurden hergestellt und ihr zeitliches Absorptionsverhalten bei verschiedenen Anregungswellenlängen untersucht.

2 Experimentelle Grundlagen

2.1. Stationäre UV/VIS-Spektroskopie

2.1.1. Grundlagen

Die Lichtquanten im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich sind so energiereich, dass damit die äußersten Elektronen eines Moleküls, die Valenzelektronen, auf ein höheres Energieniveau angeregt werden können. Die Molekülelektronen absorbieren dabei die Lichtquanten des ultravioletten oder sichtbaren Lichtes. Je nachdem welche Elektronen an diesem Prozess beteiligt sind, unterscheidet man zwischen verschiedenen Arten von Übergängen. Man kann die Valenzelektronen von Verbindungen in σ - und in π -Elektronen einteilen, je nachdem ob die Elektronen aus einem σ - oder einem π -Orbital stammen. Außerdem gibt es bei Heteroatomen zusätzlich noch die nichtbindenden Elektronen der freien Elektronenpaare, die n-Elektronen. Durch Absorption von Lichtquanten entsprechender Energie gehen die Elektronen in ein nichtbindendes Orbital über, das durch einen hochgestellten Stern dargestellt wird. Moleküle mit Doppelbindungen absorbieren vergleichsweise langwellig, ihre Absorptionen kommen durch Anregung der Elektronen im höchsten besetzten π -Orbital (HOMO) in das tiefste nicht besetzte π^* -Orbital (LUMO) zustande. Man spricht hier von einem $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang. Die Absorptionen von Verbindungen, die nur σ -Elektronen enthalten, liegen in der Regel unterhalb von 200 nm [23].

Das System, das für die beobachtete Absorption verantwortlich ist, wird als *Chromophor* bezeichnet. Befinden sich mehrere Chromophore im Molekül, so beeinflusst ihre gegenseitige Stellung im Molekül das Absorptionsverhalten. Wenn die Chromophore örtlich voneinander getrennt sind, erhält man in der Regel ein Absorptionsspektrum, das sich additiv aus den Banden der Chromophore zusammensetzt. Bei großer räumlicher Nähe dagegen treten langwellige (bathochrome) Verschiebungen und Extinktionserhöhungen auf. Die Konjugation von π -Elektronen enthaltenden Gruppen führt zu einer Delokalisierung der π -Elektronen. Wenn sich die Orbitale von zwei oder mehr π -Bindungen überlappen, wird der Abstand der Energieniveaus reduziert und es tritt eine langwellige Verschiebung im Absorptionsspektrum auf. Je größer das konjugierte π -System ist, umso langwelliger liegt das Absorptionsmaximum.

Die Aufgabe der Absorptionsspektroskopie ist es, zu bestimmen, wie viel Licht einer definierten Wellenlänge von einer Probe absorbiert bzw. hindurchgelassen wird. Es wird also das Verhältnis der Intensität des einfallenden Lichts I_0 und der Intensität des von der Probe transmittierten Lichts I bestimmt.

Die Schwächung des Lichtstroms dI ist dabei proportional zur durchlaufenen Schichtdicke dx und zur Konzentration c der Probe, der Proportionalitätsfaktor α wird als Extinktionskoeffizient bezeichnet (Lambert-Beersches-Gesetz):

$$dI = -\alpha(\lambda) \cdot c \cdot I \cdot dx \quad (1)$$

Durch Integration und Logarithmieren in dekadischer Form folgt mit ϵ als molarem dekadischem Extinktionskoeffizienten:

$$\log \frac{I_0}{I} = A(\lambda) = \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot x \quad (2)$$

Dieser Ausdruck wird auch als Absorption $A(\lambda)$ bezeichnet. Sowohl die Absorption als auch der molare dekadische Extinktionskoeffizient sind wellenlängenabhängig [24].

2.1.2. Das UV/VIS-Spektrometer

Zur Aufnahme der stationären UV/VIS-Spektren wurde ein kommerzielles Gerät der Firma Varian, das Cary 100, verwendet. Sein Aufbau lässt sich folgendermaßen skizzieren:

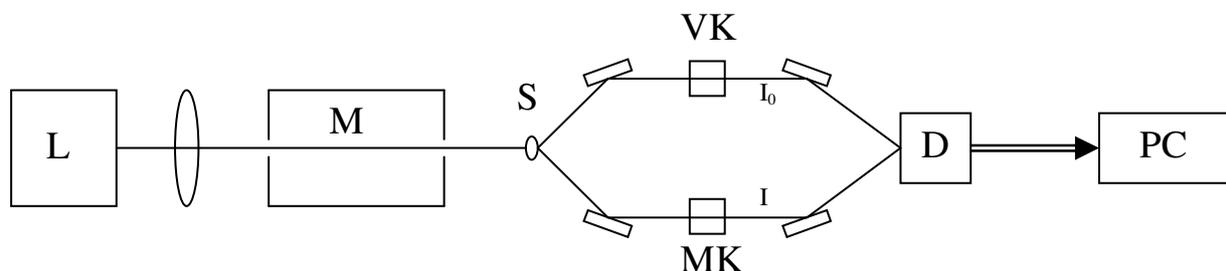


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau eines Zweistrahl-UV/VIS-Spektrometers

Die einzelnen Bauteile sind eine Lichtquelle (L), ein Monochromator (M), ein Strahlteiler (rotierender Spiegel, S), eine Messküvette (MK) sowie eine Vergleichsküvette (VK) und schließlich ein Detektor (D) und ein Personalcomputer (PC).

Aus der von der Lichtquelle erzeugten Strahlung wird zunächst mittels eines Monochromators eine Wellenlänge selektiert, die Strahlung wird anschließend über einen rotierenden Spiegel sowohl zur Messküvette als auch zur Vergleichsküvette gelenkt. Die Strahlungsimpulse werden über einen Gitterspiegel rekombiniert, der einen der Strahlen reflektiert, den anderen zum Detektor überträgt. Der Strahl durch die Messküvette liefert das Signal für die Intensität I , der Strahl durch die Vergleichsküvette das Signal für die Intensität I_0 .

Das Messsignal eines Zweistrahlphotometers ist weitgehend frei von einer Drift der Quelle und des Detektors, ohne dass teure Quellen und elektronische Bauteile erforderlich sind [25].

Als Lichtquellen dienen im Spektrometer zwei Lampen. Zum einen eine Halogen-Wolfram-Glühlampe für den sichtbaren Spektralbereich und zum anderen eine Deuteriumlampe für den ultravioletten Bereich. Der Lampenwechsel erfolgt bei 350-365 nm.

2.2. *Fluoreszenzspektroskopie*

2.2.1. Grundlagen

Ein Elektronenzustand, in dem sich alle Elektronenspins im gepaarten Zustand befinden, wird als Singulettzustand (S) bezeichnet. Wird ein Elektron in einem Molekül in ein höheres Niveau angeregt, ist sowohl ein Singulettzustand als auch ein Triplettzustand (T) möglich. Im Singulettzustand bleiben die Spins des angeregten Elektrons und dem im Grundzustand verbliebenen Elektrons weiterhin gepaart, dagegen sind die Spins der beiden Elektronen im Triplettzustand ungepaart.

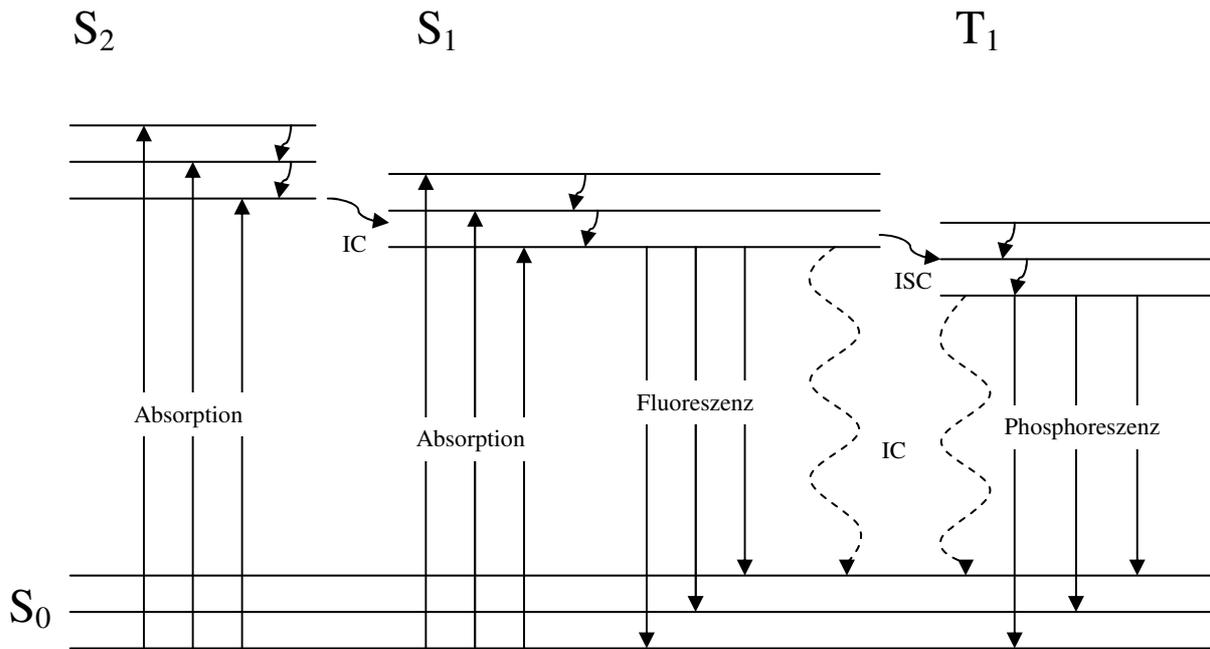


Abbildung 2.2: Jablonski-Termschema eines fluoreszierenden Moleküls

Abbildung 2.2 zeigt ein Jablonski-Termschema für fluoreszierende Moleküle. Bei Raumtemperatur befinden sich in der Regel alle Moleküle im elektronischen Grundzustand S_0 . Durch Strahlungsabsorption kann das Molekül in verschiedene Schwingungszustände eines elektronisch angeregten Niveaus im Singulettzustand (S_n) überführt werden. Eine direkte Anregung in den Tripletzustand tritt nicht in nennenswertem Maß auf.

Nach der elektronischen Anregung sind mehrere Prozesse möglich. Zum einen kann das Molekül unter Abgabe eines Photons wieder in den Grundzustand zurückkehren, diese Prozesse werden als Fluoreszenz (in der Regel vom S_1 -Zustand aus) bzw. Phosphoreszenz (vom T_1 -Zustand aus) bezeichnet. Diese sind im Termschema durch vertikale nach unten gerichtete Pfeile dargestellt. Andere strahlungslose Deaktivierungsprozesse werden durch gewellte Pfeile dargestellt. Hier sind die Interne Umwandlung (*Internal Conversion*; *IC*) in einen energieärmeren Zustand (s. Kapitel 2.3), das *Intersystem Crossing* (*ISC*) von einem Singulett- in einen Tripletzustand (s. Kapitel 2.3) sowie die Schwingungsrelaxation, bei der überschüssige Schwingungsenergie durch Zusammenstöße der Moleküle untereinander oder mit dem Lösungsmittel verloren geht, zu nennen. Da die Schwingungsrelaxation so schnell und effizient ist, dass die durchschnittliche Lebensdauer eines schwingungsangeregten Moleküls sehr viel kürzer als die Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustandes ist, kann man in der Regel nur den Übergang aus dem niedrigsten Schwingungsniveaus eines angeregten Zustandes beo-

bachten, das Molekül kann jedoch in jedes Schwingungsniveau des Grundzustandes zurückkehren.

Fluoreszenz erfolgt meist als $\pi\pi^*$ -Übergang, denn diese Arten von Übergängen besitzen kürzere mittlere Lebensdauern als $n\pi^*$ -Übergänge, von daher ist es weniger wahrscheinlich, dass mit der Fluoreszenz konkurrierende Deaktivierungsprozesse wie ISC oder IC auftreten [25], wenn die Fluoreszenz intensiv ist. Eine intensive Fluoreszenz zeigen Moleküle mit funktionellen aromatischen Gruppen; die meisten nichtsubstituierten aromatischen Kohlenwasserstoffe fluoreszieren in Lösung.

2.2.2. Das Fluoreszenzspektrometer

Zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren wurde ein kommerzielles Gerät der Firma Jobin Yvon, der Fluoromax-3, verwendet. Sein Aufbau lässt sich folgendermaßen skizzieren:

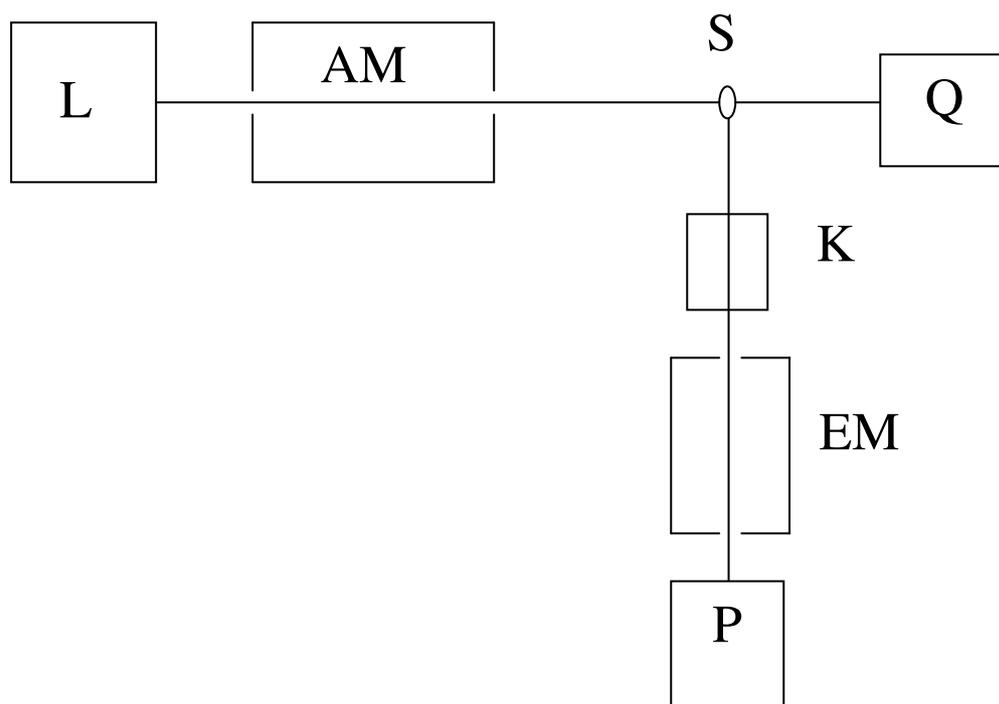


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers

Die einzelnen Bauteile sind eine Lichtquelle (L), ein Anregungsmonochromator (AM), ein Strahlteiler (S), eine Küvette (K) ein Quantenzähler (Q), ein Emissionsmonochromator (EM) sowie ein Photomultiplier (P).

Die zu untersuchende Substanz wird mit einer Lichtquelle angeregt und die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts als Funktion der Anregungs- und Emissionswellenlänge bestimmt. Man muss somit, im Gegensatz zur Absorptionsspektroskopie, bei dieser Technik zwei Wellenlängen betrachten, zum einen die Anregungswellenlänge λ_{ex} (excitation wavelength) und zum anderen die Emissionswellenlänge λ_{em} (emission wavelength). Zur Selektion der beiden Wellenlängen werden somit auch anders als in der Absorptionsspektroskopie zwei Monochromatoren benötigt. Als Strahlungsquellen können in der Fluoreszenzspektroskopie prinzipiell die gleichen Lampen wie in der Absorptionsspektroskopie verwendet werden. Bei der im verwendeten Gerät enthaltenen Lichtquelle handelt es sich um eine Xenonlampe, die weitgehend kontinuierliches Licht liefert. Die mit der Wellenlänge variierende Intensität der Anregungsstrahlung wird elektronisch kompensiert. Dazu wird ein Teil des Anregungslichts zu einem Quantenzähler geleitet, der die Intensität ermittelt. Durch das restliche Licht wird die Probe angeregt. Als Quantenzähler wird eine Si-Photodiode eingesetzt.

Das in sämtliche Raumrichtungen emittierte Fluoreszenzlicht wird unter einem 90° -Winkel zum einfallenden Anregungslichtstrahl detektiert, dabei sollte der Abstand zwischen Probenküvette und Detektor möglichst klein sein. Durch Variation der Spaltbreiten an den beiden Monochromatoren lässt sich die Auflösung beeinflussen. Durch eine große Spaltbreite erzielt man eine hohe Nachweisempfindlichkeit, jedoch eine kleine Auflösung; mit kleinen Spaltbreiten erzielt man dagegen eine hohe Auflösung, jedoch eine geringere Nachweisempfindlichkeit. Üblicherweise wurde die Spaltbreite für beide Monochromatoren mit 5 bis 10 nm gewählt.

2.2.3. Emissions- und Anregungsspektren

In der Fluoreszenzspektroskopie unterscheidet man zwei prinzipielle Verfahren, die unterschiedliche Arten von Spektren liefern. Variiert man die Wellenlänge des Emissionsmonochromators und hält den Anregungsmonochromator auf einer bestimmten Wellenlänge konstant, spricht man von Emissionsspektren. Dabei handelt es sich um die „eigentlichen“ Fluoreszenzspektren. Das emittierte Licht wird hierbei als Funktion der Wellenlänge aufgenommen.

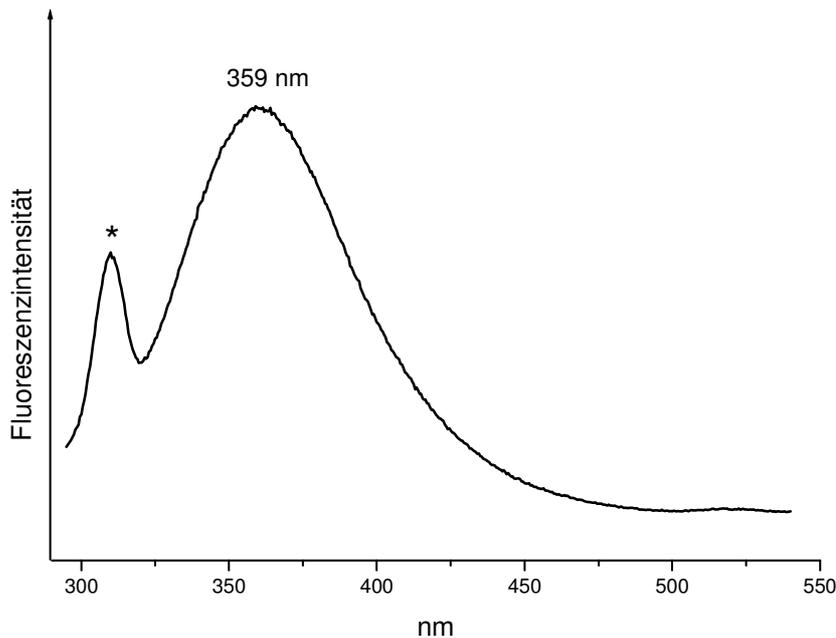


Abbildung 2.4: Fluoreszenz-Emissionsspektrum von Tryptophan in Wasser (280 nm Anregung)

Abbildung 2.4 zeigt das Fluoreszenzspektrum von Tryptophan in Wasser. Die Anregungswellenlänge beträgt 280 nm, das Emissionsmaximum liegt bei ca. 359 nm. Bei der mit einem Stern markierten Bande handelt es sich um die erste Stokes-Bande der OH-Streckschwingung des Lösungsmittels.

Im Gegensatz zum Emissionsspektrum wird zur Aufnahme der Anregungsspektren der Emissionsmonochromator auf einer bestimmten Wellenlänge konstant gehalten, dafür wird jedoch die Wellenlänge des Anregungsmonochromators variiert. In diesem Fall misst man die Emission von Licht einer definierten Wellenlänge als Funktion der Anregungswellenlänge. Mit Hilfe dieses Verfahrens erhält man zusätzliche Informationen über die Substanzstruktur, durch Vergleich mit Absorptionsspektren lässt sich zum Beispiel der für die Fluoreszenz verantwortliche Chromophor identifizieren.

Abbildung 2.5 zeigt das Anregungsspektrum von Tryptophan in Wasser. Die Emissionswellenlänge liegt bei 360 nm, dem Maximum der Emission bei 280 nm Anregung (s. Abb. 2.4) und die Anregungswellenlänge wurde zwischen 250 nm und 350 nm variiert. Das stationäre UV-Absorptionsspektrum ist zum Vergleich in Rot mit eingezeichnet, um die Qualitäten dieser Art der Fluoreszenzspektroskopie zu verdeutlichen. Die beiden abgebildeten Spektren zeigen eine gute Übereinstimmung. Lediglich tragen Anregungswellenlängen größer 300 nm zur Fluoreszenz bei 360 nm nur noch wenig oder gar nicht mehr bei.

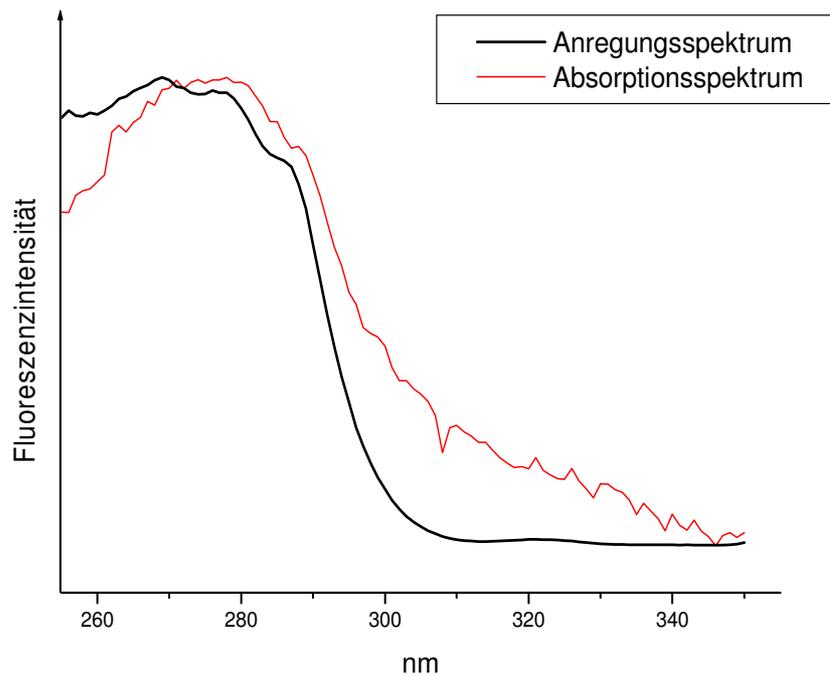


Abbildung 2.5: Fluoreszenz-Anregungsspektrum von Tryptophan in Wasser (360 nm Emission)

Bei der Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie ist es notwendig, die erhaltenen Spektren einer Korrektur zu unterwerfen, da vor allem die Lichtquelle, aber auch der Detektor und die beiden Gittermonochromatoren wellenlängenabhängig arbeiten.

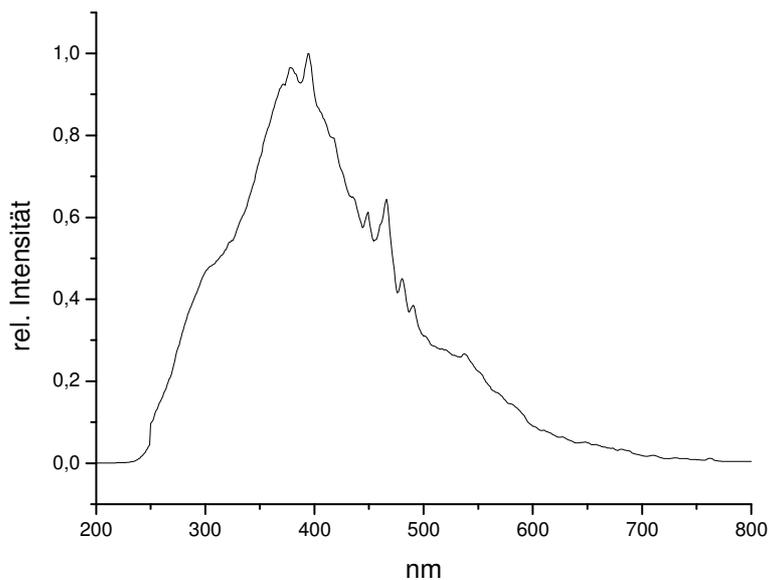


Abbildung 2.6: Charakteristik von Lampe, Monochromator und Photomultiplier im Fluoreszenzspektrometer

Die Charakteristik von Lampe, Monochromatoren und Detektor ist in Abbildung 2.6 gezeigt. Die erhaltenen Anregungsspektren müssen somit mit einem erhaltenen Faktor verknüpft werden, um zu den korrigierten Spektren zu gelangen. Wie in Abb. 2.6 zu erkennen, lässt sich die Anregungsspektroskopie sinnvoll für den Bereich zwischen etwa 255 nm und 650 nm anwenden, da für kleine Anregungswellenlängen die Lampenleistung sowie für größere Wellenlängen die Leistung des Detektors zu gering sind.

2.3. *Transiente UV/VIS-Spektroskopie*

2.3.1. Experimenteller Aufbau des Nanosekunden-Transientenspektrometers

Der schematische Aufbau des ns-Transientenspektrometers der Firma Applied Photophysics ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Das Spektrometer besteht zunächst aus zwei Lichtquellen, zum einen dem Photolyse-Laser, auf dem im Abschnitt 2.3.3 näher eingegangen wird, und zum anderen aus der Quelle des Analyselichts, einer Xenonlampe.

Die Xenonlampe ist eine 150 Watt Bogenlampe der Firma Osram. Durch den Lampenpulser wird die Lampe in der Regel im gepulsten Betrieb verwendet, aber auch kontinuierliche Bestrahlung ist möglich. Ein Lampenpuls hat eine Dauer von etwa 1,5 Millisekunden und zeigt dabei ein etwa 400 Mikrosekunden breites Plateau, innerhalb dessen die Leistung annähernd konstant ist. Abbildung 2.8 zeigt die Leistung während eines Lampenpulses schematisch. Die Plateau-Region ist mit einem roten Doppelpfeil gekennzeichnet. In diesem Zeitbereich erfolgt die Messung der transienten Absorption. Im gepulsten Betrieb arbeitet das System mit einer Frequenz von 1 Hz.

Der Lampenpulser wird durch den Spektrometer Controller gesteuert. Der Controller steuert ebenfalls die Blenden für Laser- und Lampenlicht vor der Probenkammer sowie die Hochspannung für den Photomultiplier.

Der angeschlossene Power Interlock ist eine Schutzseinheit für die Apparatur. Er verhindert ein versehentliches Zünden der Xenon-Lampe, während andere Geräte eingeschaltet sind. Da bei der Zündung der Lampe sehr hohe Ströme fließen, stellt sie eine Gefährdung für die Funktion der anderen elektronischen Bauteile dar. Der Interlock kann nur bei eingeschalteter Lampe und sämtliche anderen Geräte können nur bei betätigtem Interlock eingeschaltet werden.

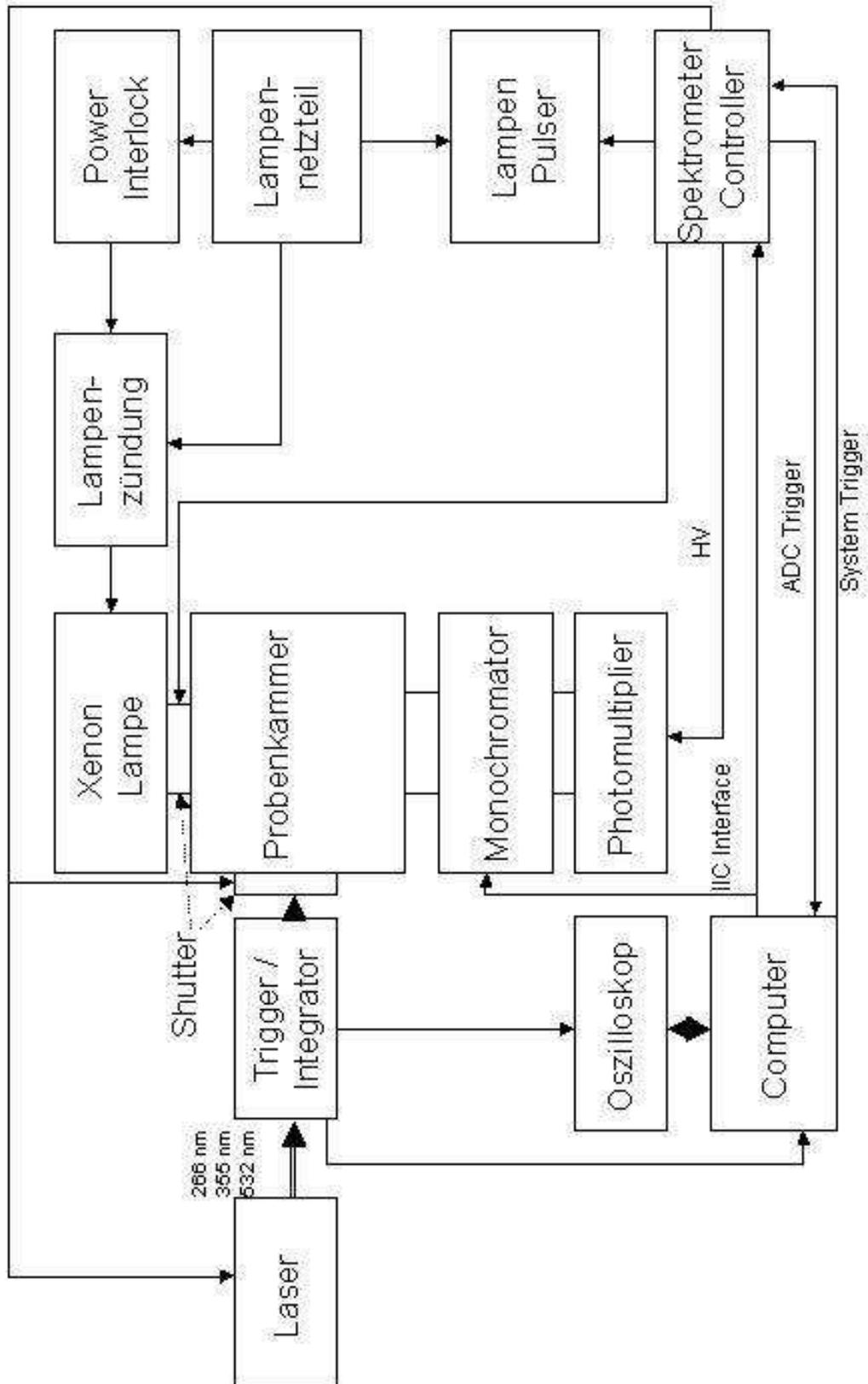


Abbildung 2.7: Schematischer Aufbau des ns-Transientenspektrometers

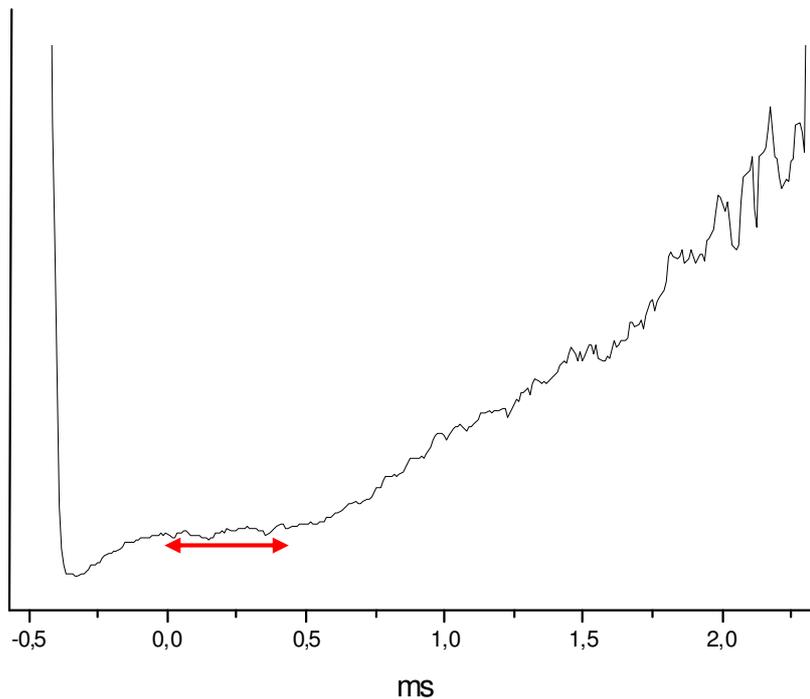


Abbildung 2.8: Zeitabhängigkeit der Energie eines Lampenpulses der Xenon-Bogenlampe

Das Licht der Xenon-Lampe wird durch eine in der Probenkammer befindliche Linse gebündelt und in die Probenküvette fokussiert. Vor und hinter der Probenküvette befinden sich Iris-Blenden, durch die der Strahldurchmesser eingestellt werden kann (üblicherweise 0,5 cm). Im rechten Winkel zum Lampenlicht trifft hier auch das Laserlicht in die Küvette, ebenfalls mit einer Blende räumlich definiert (Durchmesser 1 cm). Laser- und Lampenstrahl überlappen in der Küvette.

Die Wellenlänge des Analyselichts wird hinter der Küvette in einem Gittermonochromator selektiert. Eingangs- und Ausgangsspalt des Monochromators können variiert werden, um ein möglichst optimales Verhältnis zwischen hoher Auflösung (kleine Spaltbreite) und ausreichender Lichtintensität (große Spaltbreite) einzustellen. In der Regel wurde für Eintritts- und Austrittsspalt eine Breite zwischen 0,4 und 0,6 mm gewählt. Die Auflösung des Monochromators entspricht 4,7 nm pro mm Spaltbreite, somit liegt die spektrale Auflösung etwa zwischen 2 und 2,5 nm.

Als Detektor wird ein Photomultiplier eingesetzt, der sich hinter dem Ausgang des Monochromators befindet. Bei dem Photomultiplier handelt es sich um einen Multiplier des Typs R928 der Firma Hamamatsu. Er ist geeignet für Messungen im Wellenlängenbereich zwischen 250 und 850 nm und kann bei einer Spannung zwischen 100 und 1200 V betrieben

werden. Der Signal-Output des Photomultipliers wird von einem Oszilloskop (Agilent, 500 MHz) digitalisiert und anschließend auf den Computer zur Datenauswertung übertragen.

Als Probenküvetten werden handelsübliche Standard-Quartzküvetten der Firma Hellma (10x10x35 mm) verwendet. Durch zwei durch den Verschluss eingelassene schmale Teflonschläuche kann dabei die Probensubstanz über eine Peristaltik-Pumpe und ein 50 ml oder 100 ml Vorratsgefäß umgepumpt werden, um eine Anreicherung eines eventuell entstehenden Photoprodukts in der Küvette zu verlangsamen. Dieses Vorratsgefäß kann vor und während der Messung mit einem Gas (meist Stickstoff) gespült werden, so dass auf diese Weise die Probe mit dem gewünschten Gas gesättigt wird und andere Gase (vor allem Sauerstoff) aus der Lösung entfernt werden. Dies ist sinnvoll, um ein Triplettquenching durch Sauerstoff zu verhindern.

2.3.2. Grundlagen

Die Blitzlichtphotolyse wurde 1949 erstmals von Porter und Norris vorgestellt [26] und dient dem Nachweis und der Untersuchung von transienten Spezies. Als transiente Spezies bezeichnet man Zustände von Atomen, Molekülen oder Molekülfragmenten mit einer Lebenszeit im Submillisekundenbereich, dabei kann es sich z.B. um Absorptionen von angeregten Zuständen ($S_1 \rightarrow S_n$ oder $T_1 \rightarrow T_n$), von kurzlebigen Kationen oder von Radikalen handeln.

Die Blitzlichtphotolyse dient der Untersuchung von photochemischen Eigenschaften von Molekülen nach Bestrahlung mit Laserlicht [26,27]. Um die Eigenschaften der transienten Spezies untersuchen zu können, müssen diese zunächst erzeugt werden. Zu diesem Zweck werden die zu untersuchenden Moleküle durch eine Grundzustandsabsorption zunächst in einen Zustand gebracht, aus welchem transiente Prozesse möglich sind. Dies geschieht durch einen Laserblitz einer geeigneten Wellenlänge. Prinzipiell sind durch den Laserblitz drei hauptsächliche Prozesse denkbar:

(a) das Molekül wird durch den Laserpuls in einen elektronisch angeregten Zustand S_n gebracht, aus welchem nun weitere Prozesse wie Absorption des elektronisch angeregten Zustands (Excited State Absorption, ESA), Stimulierte Emission (SE), Intersystem Crossing (ISC) in den Triplettzustand mit anschließender Triplett-ESA oder interne Umwandlung (Internal Conversion, IC) möglich sind.

(b) das Molekül wird durch Ein- oder (sehr viel wahrscheinlicher) Mehrphotonenabsorption ionisiert. Es entstehen Molekül-Kationen und solvatisierte Elektronen, wenn Wasser das Lösungsmittel ist.

(c) die Lichtenergie ist ausreichend, um Bindungen aufzubrechen, so können transiente Spezies wie Radikale oder andere Übergangszustände sowie stabile, photochemisch erzeugte neue Produkte entstehen.

Die wichtigsten Prozesse sind im Termschema in Abbildung 2.9 veranschaulicht. Die Ionisation durch einen Zweiphotonenprozess ist in rot dargestellt, durch zwei Photonen wird das Ionisationspotential (IP) überschritten, es entsteht ein Kation. In blau ist Absorption von Photonen anderer Wellenlänge im angeregten Zustand gezeigt. Diese ist sowohl für den Singulett- (S-ESA) als auch für den Triplettzustand (T-ESA) möglich. Weitere Prozesse sind die stimulierte Emission im Singulett- (Fluoreszenz) und im Triplettzustand (Phosphoreszenz) in grün, interne Konversion in violett und ISC in orange.

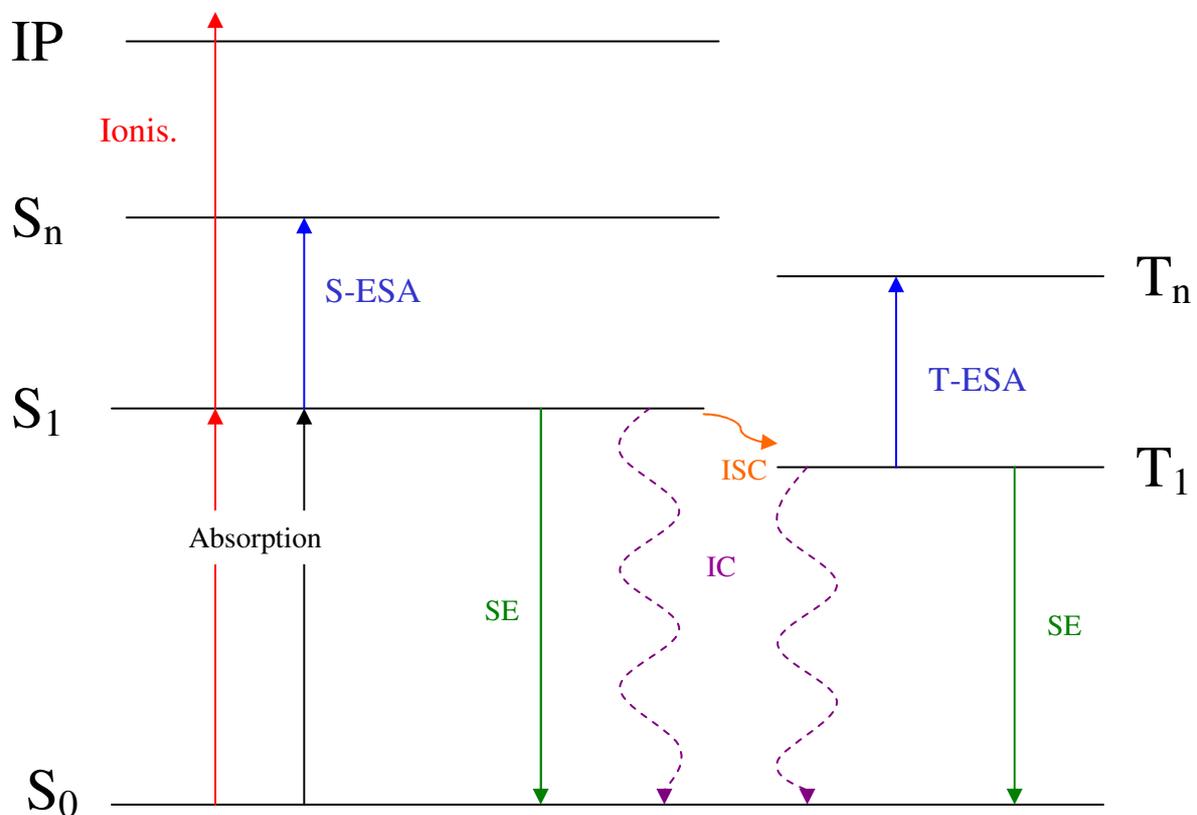


Abbildung 2.9: Termschema für mögliche Prozesse nach Laserphotolyse

Als Intersystem Crossing (ISC) bezeichnet man einen Prozess einer Spinumkehr eines angeregten Elektrons sowie einer Änderung der Multiplizität des Moleküls. Wie auch bei der internen Konversion wird die Wahrscheinlichkeit dieses Übergangs erhöht, wenn die Schwingungsniveaus der beiden Zustände überlappen [25].

Als interne Umwandlung bezeichnet man intramolekulare Prozesse, durch die ein Molekül ohne Aussendung von Photonen in einen energieärmeren Zustand übergeht. Interne Konversion ist besonders effizient, wenn zwei elektronische Niveaus durch Geometrieverzerrung nah genug zusammen liegen, so dass eine Überlappung von Schwingungsniveaus möglich ist. Konische Durchschneidungen der Potentialflächen können zu besonders schnellen internen Umwandlungen führen. In der Regel ist die interne Umwandlung durch überlappende Schwingungsniveaus wahrscheinlicher als der Energieverlust durch Fluoreszenz aus einem angeregten Zustand.

Die erzeugte transiente Spezies wird anschließend detektiert. Dies geschieht durch den Lampenpuls einer Xenon-Lampe. Dabei wird das zeitliche Verhalten der Absorption $A = f(t)$ bei einer bestimmten Wellenlänge bestimmt.

Abbildung 2.10 zeigt beispielhaft ein solches transientes Absorptionsspektrum. Bei dem abgebildeten Spektrum handelt es sich um den $T_1 \rightarrow T_n$ Übergang im Anthracen bei einer Analysewellenlänge von 420 nm. Aufgetragen wird bei dieser Art von Spektren auf der y-Achse die Differenz der Absorptionen mit und ohne Laserpuls (Δ Absorption) gegen die Zeitdifferenz zwischen Photolyse- (Laser) und Analyselicht (Lampe). Bei $t = 0$ erfolgt der Photolysepuls des Lasers mit einer Breite von etwa 15 ns. Das dadurch auftretende Streulicht macht sich durch eine negative Absorptionsdifferenz bemerkbar. Ist die Absorption nach Erzeugung einer transienten Spezies größer als ohne das Photolyselicht, so erhält man positive Werte für die Absorptionsdifferenz.

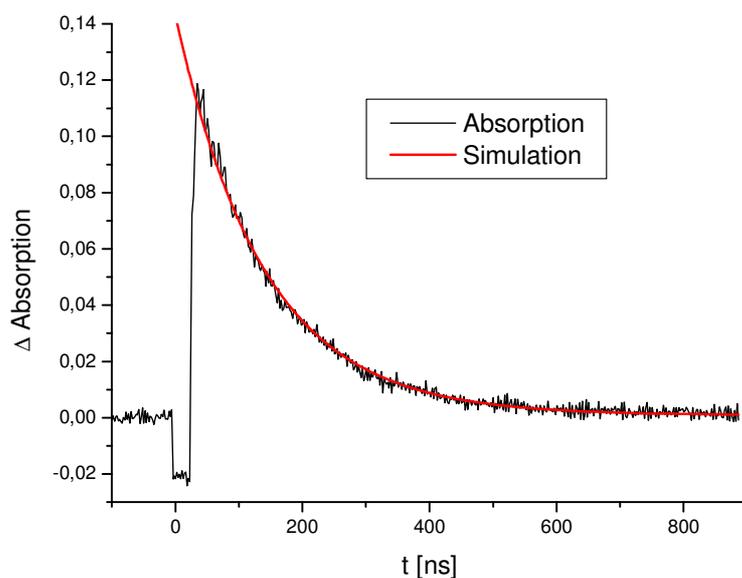


Abbildung 2.10: Zeitabhängige transiente Absorption von Anthracen bei 420 nm

Die Abklingzeit des transienten Zustandes kann bestimmt werden, indem man das erhaltene kinetische Spektrum durch einen exponentiellen Fit simuliert, so dass die Gleichung

$$f(x) = A_0 \cdot e^{-kx} + c \quad (3)$$

bestmöglich erfüllt wird. A_0 beschreibt dabei die Amplitude, c eine Verschiebung der Basislinie und k ist die Geschwindigkeitskonstante. Durch

$$k = \frac{1}{\tau} \quad (4)$$

wird die Abklingzeit τ bestimmt. Für das in Abbildung 2.10 gezeigte Beispiel liegt die Abklingzeit bei 160 ns. Multiexponentielle Anpassungen an das gemessene Zeitsignal sind mit der zur Verfügung gestellten Software ebenfalls möglich.

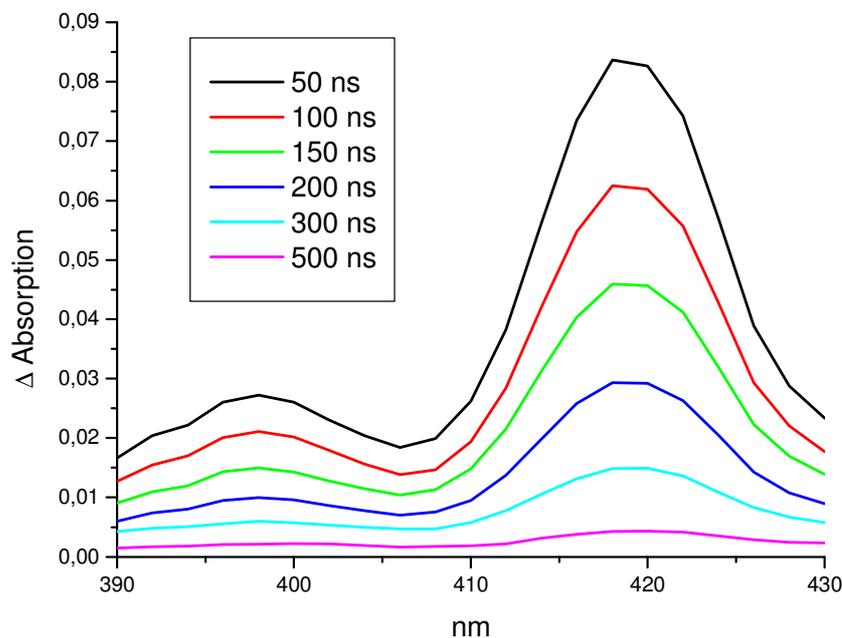


Abbildung 2.11: Wellenlängenabhängige transiente Absorption von Anthracen bei verschiedenen Zeiten

Nimmt man nun zeitabhängige Absorptionsspektren für verschiedene Wellenlängen auf, so kann man für jede beliebige Zeit nach dem Laserpuls ein entsprechendes wellenlängenabhängiges Absorptionsspektrum konstruieren. Diese sind für das Beispiel Anthracen im Be-

reich zwischen 390 nm und 430 nm für sechs verschiedene Zeiten zwischen 50 ns und 500 ns nach dem Laserpuls dargestellt.

Absorptionsdifferenzen:

Die Auswertung der Spektren erfolgt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(\frac{I_0}{I_0 - I_{Abs}}\right) = -\log\left(1 - \frac{I_{Abs}}{I_0}\right) \quad (5)$$

Dabei ist A die Absorption, I_0 die Intensität des Analyselichts („Light Level“), I ist das von einer absorbierenden Probe durchgelassene Analyselicht und I_{Abs} das von der Probe absorbierte Licht ($I_{Abs} + I = I_0$). Das absorbierte Licht I_{Abs} ist wiederum als die Differenz zwischen der Absorption mit Photolyse (I_A) und der Absorption ohne Photolyse (I_B) zu sehen:

$$A = -\log\left(1 - \frac{(I_A - I_B)}{I_0}\right) \quad (6)$$

Auf diese Weise erhält man ein Differenzspektrum zwischen transientser Absorption und Grundzustandsabsorption, da diese durch I_B gegeben ist.

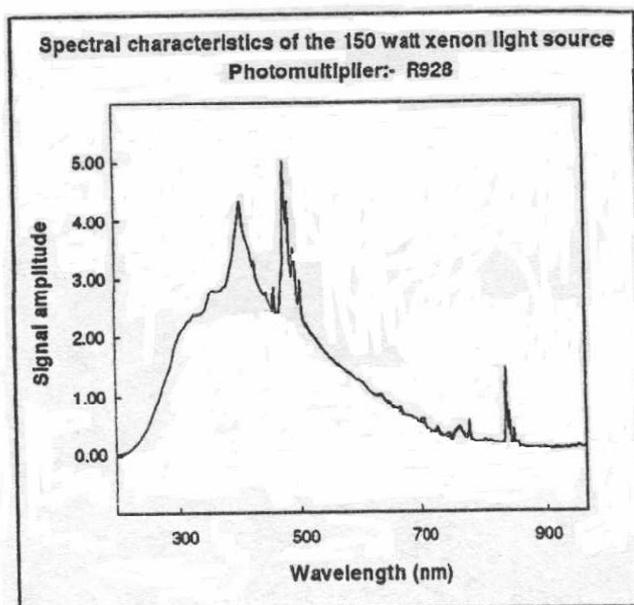


Abbildung 2.12 a: Spektrale Charakteristik von Xe-Lampe und R928-Photomultiplier im Transientenspektrometer [28]

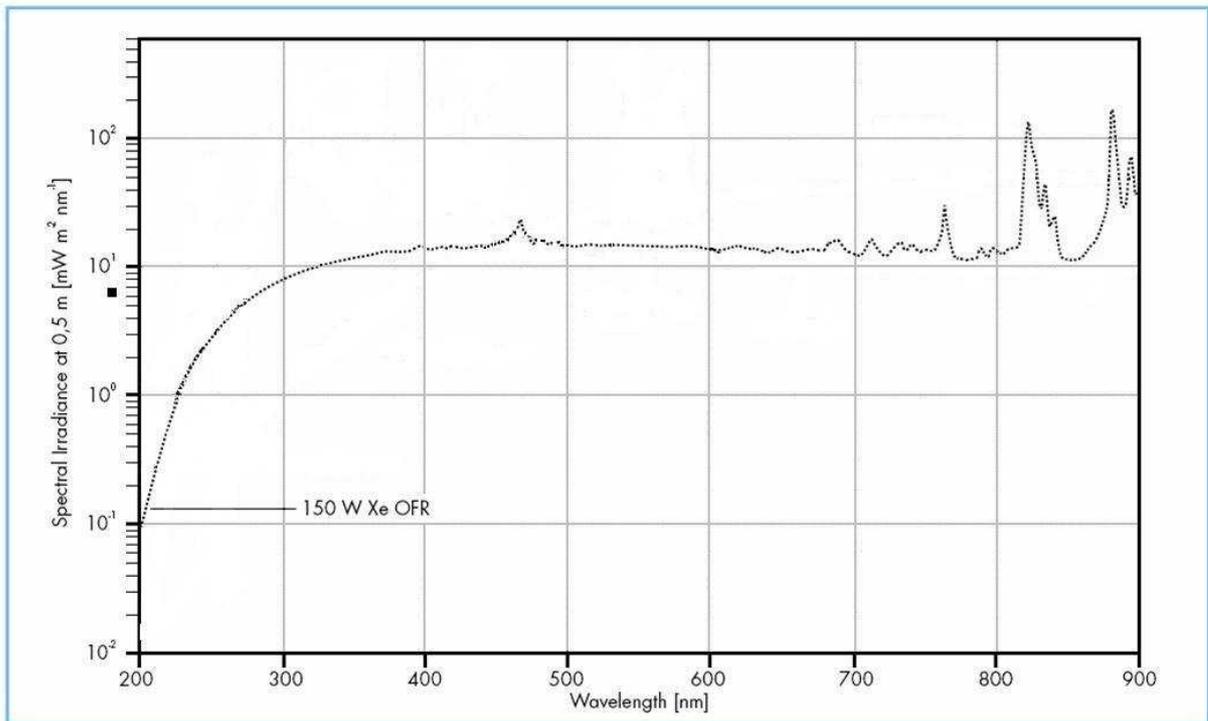


Abbildung 2.12 b: Spektrale Charakteristik einer 150 W Xe-Bogenlampe [29]

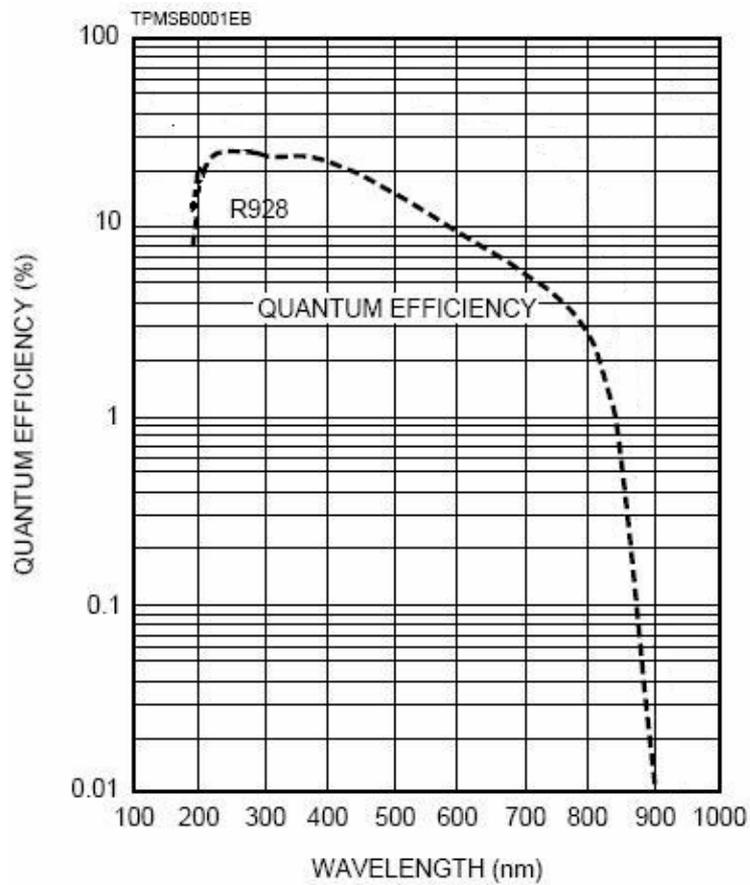


Abbildung 2.12 c: Spektrale Charakteristik eines R928 Photomultipliers [30]

Die Intensität des Analyselichts ist stark von den experimentellen Größen abhängig, in erster Linie von der Intensität der Lampe, der Durchlässigkeit des Monochromators und der Effizienz des Photomultipliers (s. Abbildung 2.12 a - 2.12 c). Da die Signalgröße des Photomultipliers direkt proportional zur einfallenden Lichtintensität ist, kann das Signal über die Hochspannung des Photomultipliers geregelt werden. Auf diese Weise erhält man für den gesamten Wellenlängenbereich ein konstantes I_0 bzw. ein konstantes Photomultipliersignal und somit eine direkt vergleichbare Messung.

Wie aus Abbildung 2.12 ersichtlich, lässt sich der Wellenlängenbereich zwischen 280 und 750 nm problemlos vermessen. Unterhalb von 280 nm ist die Intensität der Xe-Lampe zu schwach (Abbildung 2.12 b), oberhalb von 750 nm erreicht der Photomultiplier nicht die nötige Leistung (Abbildung 2.12 c).

2.3.3. Der Nd:YAG-Laser

Beim Nd:YAG-Laser handelt es sich um einen Festkörperlaser. Das aktive Medium besteht aus dotiertem Yttrium-Aluminium-Granat (YAG; $Y_3Al_5O_{12}$). Etwa 1% der Y^{3+} -Ionen sind hierbei durch Nd^{3+} ersetzt.

Um einen Lasereffekt zu erreichen, muss eine *Inversion* der Besetzung stattfinden. Eine Inversion ist nach der Boltzmann-Statistik durch thermische Anregung nicht möglich. Um diese zu erreichen, kann kein Zweiniveausystem verwendet werden. Eine Möglichkeit besteht darin, ein Molekül aus dem Grundzustand A in ein höheres Niveau B anzuregen. Dieser Vorgang wird auch als „Pumpen“ bezeichnet. Im angeregten Zustand B gibt es einen Teil seiner Energie durch strahlungslose Übergänge ab und gelangt in ein tieferes Niveau C, von dem aus es durch Abgabe eines Lichtquants wieder in den Grundzustand A gelangt. Der Übergang von B nach C muss dabei sehr schnell, der von C nach A sehr langsam stattfinden, damit das Niveau C stärker populierte ist als der Grundzustand A. An diesem System sind drei Zustände beteiligt, deshalb wird ein Laser, der so arbeitet, auch als *Dreinevelaser* bezeichnet (Abb. 2.13.).

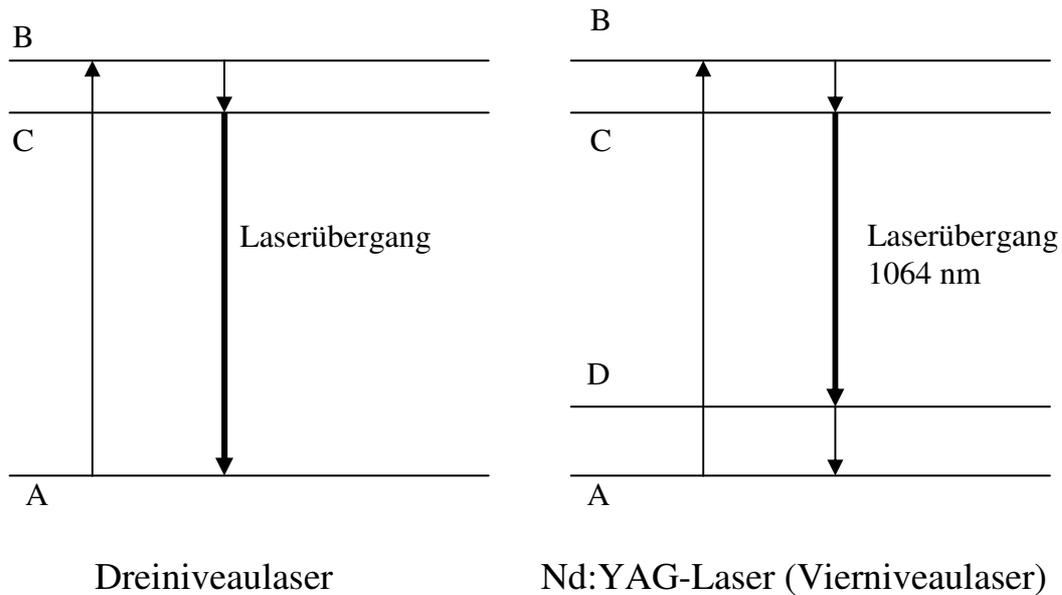


Abbildung 2.13: Termschema des Dreineiveaulasers und des Nd:YAG-Lasers

In einem Dreineiveaulaser ist eine dauerhafte Besetzungsinversion schwer zu erreichen, da sehr viele Moleküle in das Niveau B gehoben werden müssen. So ist es vorteilhafter, mit einem *Vierniveaulaser* (Abb. 2.13) zu arbeiten. Auch bei dem Nd:YAG-Laser handelt es sich um einen Vierniveaulaser. Bei dieser Laservariante findet der Laserübergang nicht in das Grundniveau statt, sondern in ein Niveau D, das von A verschieden ist. Abschließend erfolgen strahlungslose Übergänge von D nach A. Der Lasereffekt tritt beim Vierniveaulaser dann ein, wenn das Niveau C stärker besetzt ist als der Zustand D. Dies ist genau dann gewährleistet, wenn die Übergänge von C nach D ausreichend langsam und die Übergänge von D nach A schnell stattfinden.

Zum Pumpen werden bei Nd:YAG-Lasern in der Regel Blitzlampen oder Diodenlaser verwendet.

Der intensivste Laserübergang beim Nd:YAG-Laser entspricht einer Wellenlänge von 1064 nm im infraroten Spektralbereich. Durch Frequenzverdopplung sowie -verdreifachung an Kristallen können die in der Spektroskopie sehr häufig benötigten Wellenlängen von 532 nm im grünen Bereich sowie 355 nm im ultravioletten Bereich erzeugt werden. Durch Verdopplung der Zweiten Harmonischen (532 nm) ist auch die Vervierfachung der Fundamentalen (266 nm) möglich.

Laserenergien

In der folgenden Tabelle sind alle Energien der Laserpulse der verschiedenen Laser bei unterschiedlichen Wellenlängen und Frequenzen aufgeführt:

Laser	Wellenlängenbereich [nm]	Laserenergie [mJ]
Nd:YAG-Laser	1064	750-800
Nd:YAG-Laser verdoppelt	532	320-360
Nd:YAG-Laser verdreifacht	355	120-130
Nd:YAG-Laser vervierfacht	266	60-70
Nd:YAG-Laser verfünffacht	213	30-45
UV-Farbstofflaser verdoppelt	270-300	0,7-2

Tabelle 2.1: Energien der Laserpulse bei unterschiedlichen Wellenlängen

3 Cytochrome und Porphyrine

3.1. Cytochrome und ihre biochemische Bedeutung

Im Verlauf der Atmungskette werden Elektronen, die aus Intermediärprodukten des Tricarbonsäurezyklus und anderen Substraten stammen, auf molekularen Sauerstoff übertragen. Beim Sauerstoff handelt es sich um den letzten Elektronenakzeptor im Verlauf der Atmung. Dieser Prozess wird allgemein als **Elektronentransport** bezeichnet. Bei diesem Elektronentransport wird eine große Menge an freier Energie freigesetzt, die zum größten Teil in Form der phosphat-gebundenen Energie des ATP (Adenosintriphosphat) gespeichert wird [31].

Am Elektronentransport sind einige so genannte Redox-Enzyme beteiligt. Sie besitzen im Allgemeinen eine recht komplexe Struktur und auch die Redoxmechanismen beim Elektronentransfer sind kompliziert und bislang nicht vollständig aufgeklärt. Fast sämtliche Glieder der Elektronentransportkette befinden sich in der Membran der Mitochondrien und sind aus diesem Grund relativ schwer in löslicher Form zu extrahieren.

Am Elektronentransport von organischen Substraten auf elementaren Sauerstoff sind vier Klassen elektronenübertragender Redox-Enzyme beteiligt. Dabei handelt es sich um:

- a) *Pyridinabhängige Dehydrogenasen* mit NAD (Nikotinamid-adenin-dinukleotid) oder NADP (Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat) als Coenzym
- b) *Flavinabhängige Dehydrogenasen* mit FAD (Flavin-adenin-dinukleotid) oder FMN (Flavin-mononukleotid) als prosthetischer Gruppe
- c) *Eisen-Schwefel-Proteine*
- d) *Cytochrome* mit einem Eisen-Porphyrin-System als prosthetischer Gruppe

Die Cytochrome übertragen die von den Dehydrogenase-Systemen stammenden Elektronen schrittweise auf molekularen Sauerstoff. Dabei erfolgt während des Elektronentransports für sämtliche Cytochrome ein reversibler Fe(II)-Fe(III)-Valenzwechsel. Die reduzierten Formen der Cytochrome können dabei in Zellen nicht durch molekularen Sauerstoff oxidiert werden [31]. Man unterscheidet fünf verschiedene Cytochrome: die Cytochrome b, c₁, c, a und a₃, die in dieser Reihenfolge in der Atmungskette auftreten.

Die Cytochrome sind fest an die Mitochondrienmembran gebunden und daher nur schwer zu isolieren. Eine Ausnahme bildet das Cytochrom c, das in kristalliner Form gewonnen werden kann. Auch die Aminosäuresequenz des Cytochrom c konnte bestimmt werden [32].

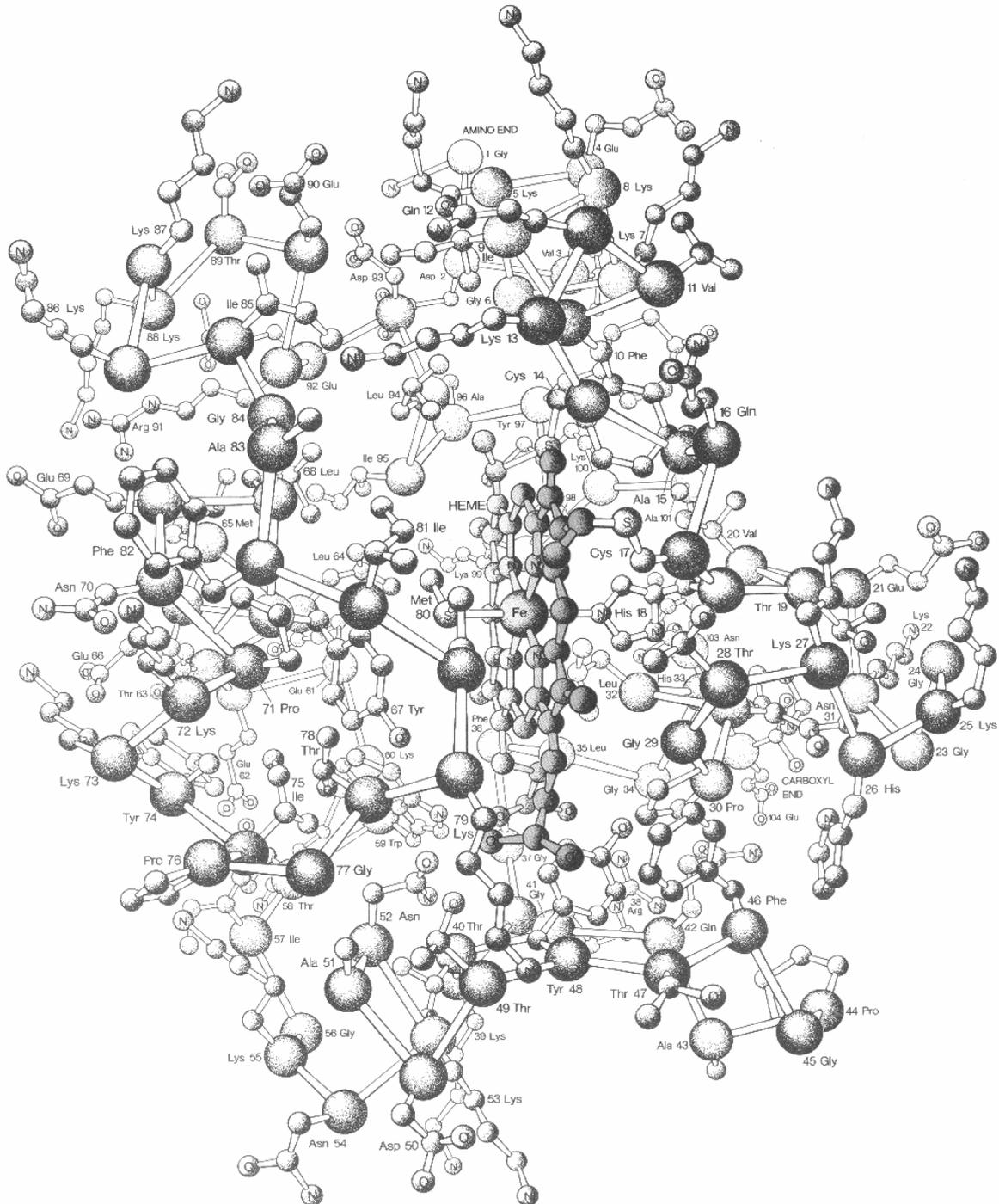


Abbildung 3.1: Struktur von Cytochrom c

Im Cytochrom c ist der Eisenporphyrin-Rest durch Thioetherbrücken zwischen dem Porphyrinring und zwei Cystein-Resten der Peptidkette kovalent mit dem Protein verbunden. Cy-

tochrom c ist das einzige verbreitete Häm-Protein mit derartigen kovalenten Bindungen, in den anderen Cytochromen oder im Hämoglobin ist der Porphyrinring nicht-kovalent gebunden. Die fünfte und sechste Koordinationsstelle des zentralen Eisenatoms sind durch die Seitenketten eines Histidin- (His18) sowie eines Methionin-Restes (Met80) besetzt, die das Molekül vor der Reaktion mit Sauerstoff oder Kohlenmonoxid schützen [31,33].

3.2. Porphyrine

Außer den Cytochromen besitzen auch einige andere biochemisch relevante Moleküle einen Porphyrinring. Dazu zählen weitere Häm-Proteine wie z.B. das Hämoglobin oder das Myoglobin oder auch die Chlorophylle in den Pflanzenzellen. Alle in diesen Biomolekülen auftretenden Porphyrinsysteme können als Derivate des Porphins (Abb. 3.2) aufgefasst werden.

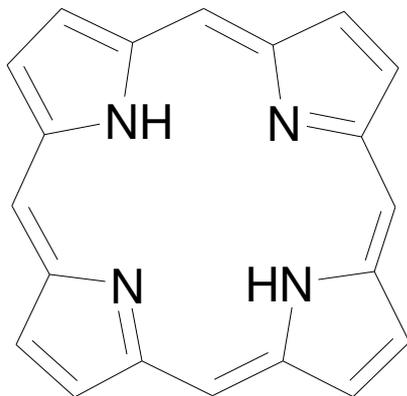


Abbildung 3.2: Strukturformel von Porphin

Das Porphin besitzt einen Tetrapyrrol-Grundkörper. Die Protoporphyrine sind die am weitesten verbreiteten Porphyrine, sie enthalten vier Methyl-, zwei Vinyl- und zwei Propionsäurereste. Von 15 möglichen Isomeren kommt jedoch nur eines in der Natur vor, das Protoporphyrin IX (Abb. 3.3). Dieses bildet den Chromophor im Hämoglobin, im Myoglobin und in fast allen Cytochromen [31].

Im Cytochrom c ist über die Doppelbindungen der Vinylgruppen das Protein an den Porphyrinring gebunden. Das Protoporphyrin bildet mit Metallionen von Eisen, Magnesium, Zink, Nickel und Kupfer Chelatkomplexe. Dabei ist das Metallion durch vier Koordinationsbindungen an das Porphyrinsystem gebunden. Chelatkomplexe des Protoporphyrins mit Eisen be-

zeichnet man als Protohäm oder einfach Häm. Die vier Stickstoffliganden des Porphyrins bilden einen ebenen quadratischen Komplex, die beiden verbleibenden Koordinationsstellen stehen senkrecht über und unter dieser Ebene des Porphyrinrings. In den Cytochromen werden diese beiden freien Koordinationsstellen durch Aminosäureseitenketten des Proteingerüsts besetzt. Da alle sechs Koordinationsstellen in den Cytochromen besetzt sind, können andere Liganden wie Sauerstoff, Kohlendioxid oder Cyanid – im Gegensatz zum Hämoglobin – nicht gebunden werden. Im Hämoglobin und im Myoglobin wechselt das Eisenatom seine Wertigkeit nicht, wenn Sauerstoff gebunden wird. Es liegt immer in der Fe(II)-Form vor. In den Cytochromen dagegen wechselt das Eisenatom reversibel seine Oxidationsstufe zwischen Fe(II) und Fe(III), da die Cytochrome als Elektronenüberträger dienen.

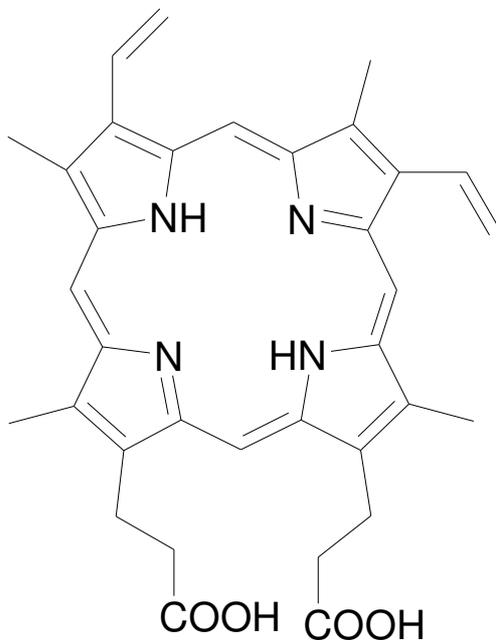


Abbildung 3.3: Strukturformel von Protoporphyrin IX

Ein gut zugängliches Modellsystem für Untersuchungen an Porphyrinen ist das Tetraphenylporphyrin (TPP; Abb. 3.4), es ist gut löslich in Chloroform und Cyclohexan. Zwei Derivate des TPP, die ebenfalls in Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden sind das Tetra(hydroxyphenyl)porphyrin (THPP; Abb. 3.5) und das Tetra(carboxyphenyl)porphyrin (TCPP; Abb. 3.5). Im Gegensatz zum TPP sind bei diesen beiden Molekülen die aromatischen Seitenketten in Parastellung mit einer Hydroxyl- bzw. einer Carboxylgruppe substituiert. Beide Moleküle sind gut löslich in Ethanol.

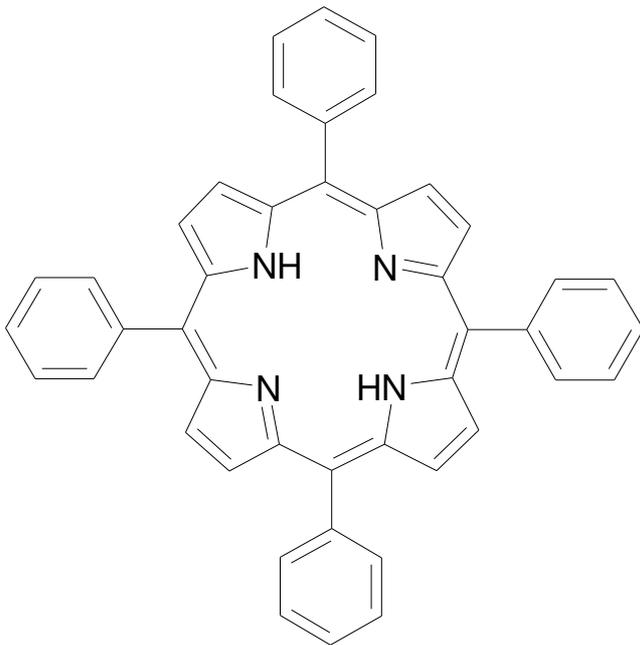


Abbildung 3.4: Strukturformel von Tetraphenylporphyrin (TPP)

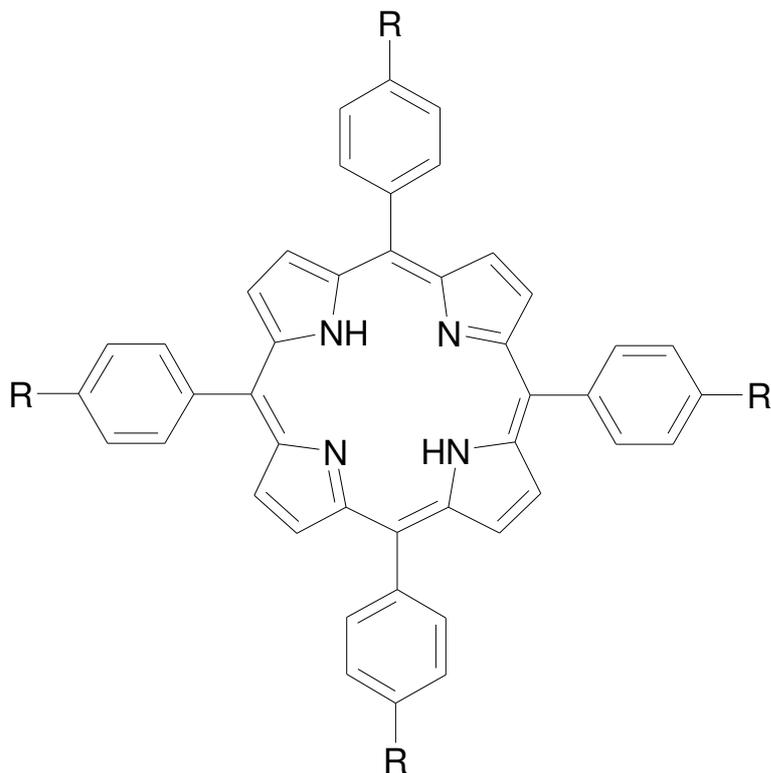


Abbildung 3.5: Strukturformel der anderen Porphyrin-Modellsysteme (THPP mit R=OH; TCPP mit R=COOH)

4 Titration von Cytochrom c

Als Vorexperiment zur Untersuchung der Proteinfaltung und der pH-Wert-abhängigen Fluoreszenz von Cytochrom c wurde eine Titrationskurve über den pH-Bereich von pH 2 bis pH 12 aufgenommen. Diese ist für eine 100 μM Lösung in Wasser in Abbildung 4.1 gezeigt. Cytochrom c löst sich in dreifach destilliertem Wasser mit einem pH-Wert von etwa 7,8 (100 μM). Die Zugabe von Salzsäure bzw. von Natronlauge zu dieser Lösung bis zu einem pH-Wert von pH 2 bzw. pH 12 ist als „Hintitration“ mit roten Dreiecken Punkten dargestellt. Auf der x-Achse ist dabei der negative dekadische Logarithmus der aus der Zugabe von HCl berechneten Hydroniumionenkonzentration aufgetragen, die y-Achse zeigt den tatsächlichen gemessenen pH-Wert. Die salzsäurehaltige Lösung mit einem pH-Wert von pH 2 wurde anschließend durch Zugabe äquivalenter Mengen an Natronlauge rücktitriert, analog wurde die natronlaugehaltige Lösung mit einem pH-Wert von pH 12 mit äquivalenten Mengen Salzsäure rücktitriert. Diese Rücktitrationen sind in Abbildung 4.1 mit blauen Punkten dargestellt.

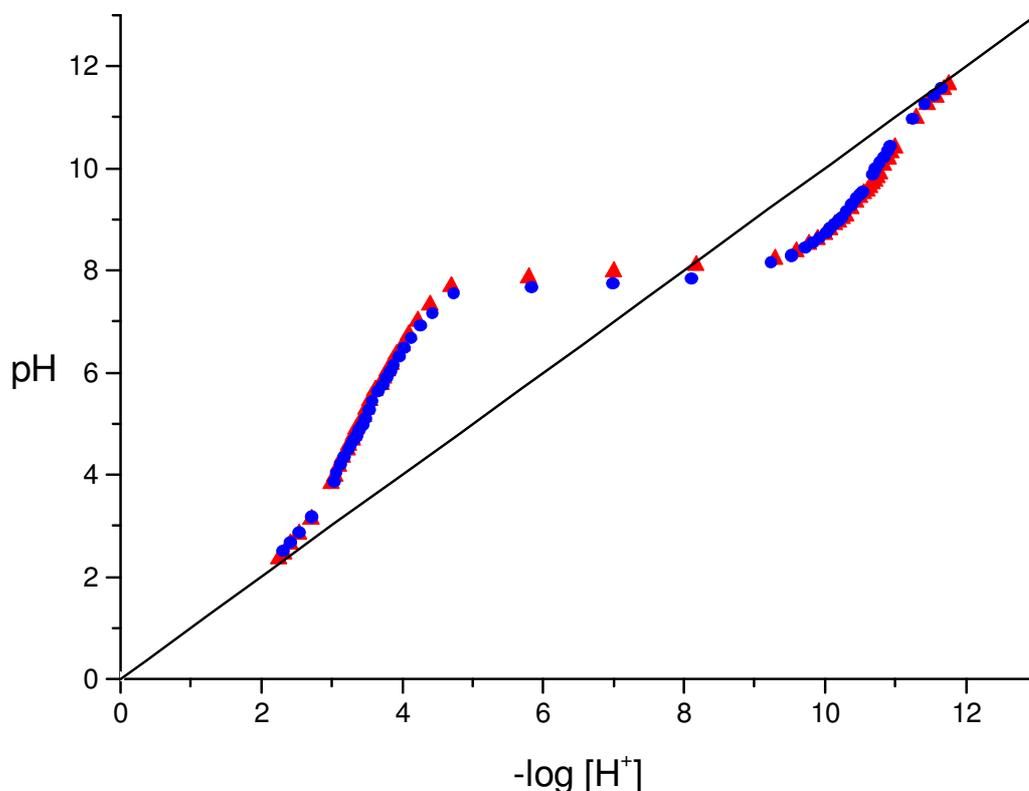


Abbildung 4.1: Titrationskurve für Hin- und Rücktitration einer 100 μM Lösung von Cyt c in Wasser

Es ist zu erkennen, dass eine Lösung von Cytochrom c über einen sehr großen Bereich ihren pH-Wert durch Zugabe von Säuren oder Basen nicht stark ändert, sie hat also einen relativ breiten Pufferbereich (pH 4-9). Dieser kommt dadurch zustande, dass die meisten basischen Aminosäuren, v.a. die 19 Lysin-Einheiten, die bei einem pH-Wert fast vollständig in der deprotonierten Form vorliegen, fast alle außen im Molekül liegen. Durch Zugabe von Säuren werden diese zunächst protoniert und die zugegebenen Hydroniumionen können nicht gemessen werden. Dadurch liegt der gemessene pH-Wert über dem berechneten „Soll-Wert“ (schwarze Gerade). Analog gilt für die Zugabe von Basen, dass diese zunächst dafür verwendet werden, protonierten Aminosäuren die Protonen zu entziehen. Dadurch wird H₂O gebildet und Hydroxid-Ionen werden ebenfalls nicht gemessen, so dass der pH-Wert niedriger liegt, als der berechnete „Sollwert“.

Ebenfalls ist an den beiden Titrationskurven zu erkennen, dass die Protonierung bzw. Deprotonierung des Proteins vollständig reversibel verlaufen, da beide Titrationskurven fast identisch sind. Dies spricht ebenfalls dafür, dass auch der Faltungs- und Entfaltungsprozess des Proteins über einen pH-Bereich von mindestens pH 2 bis pH 12 vollständig reversibel sein muss, da die Protonierung einer Entfaltung einhergeht [4].

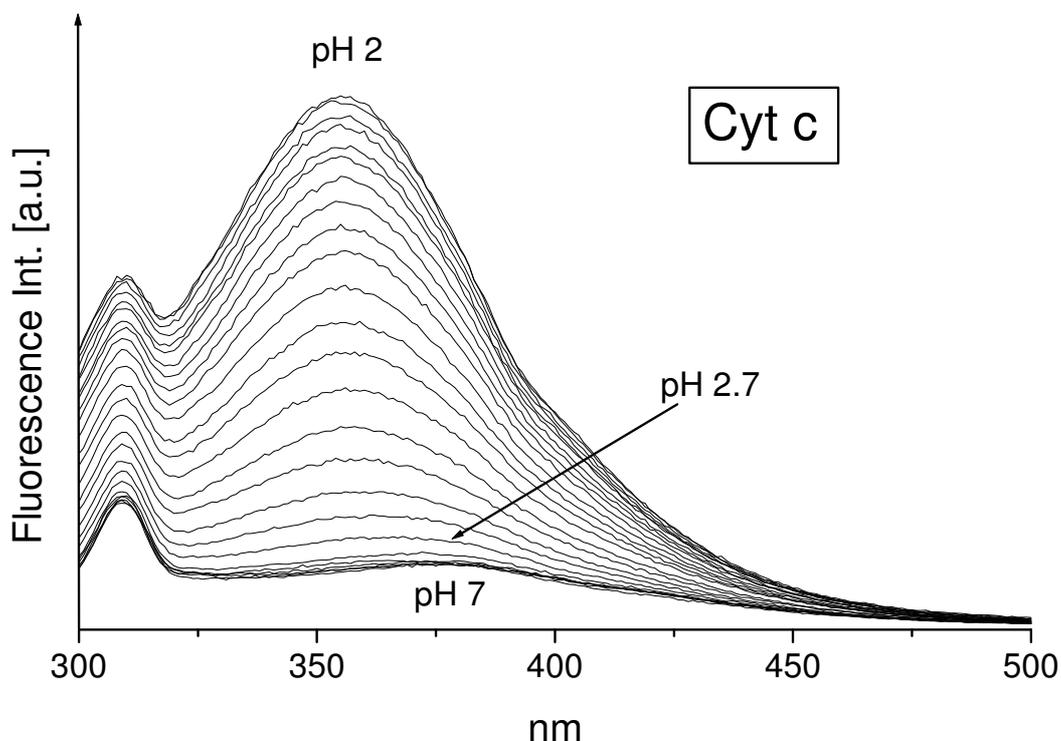


Abbildung 4.2: Fluoreszenzspektren einer 10 μ M Lösung von Cyt c in Wasser (280 nm Anregung) für verschiedene pH-Werte zwischen pH 2 und pH 7

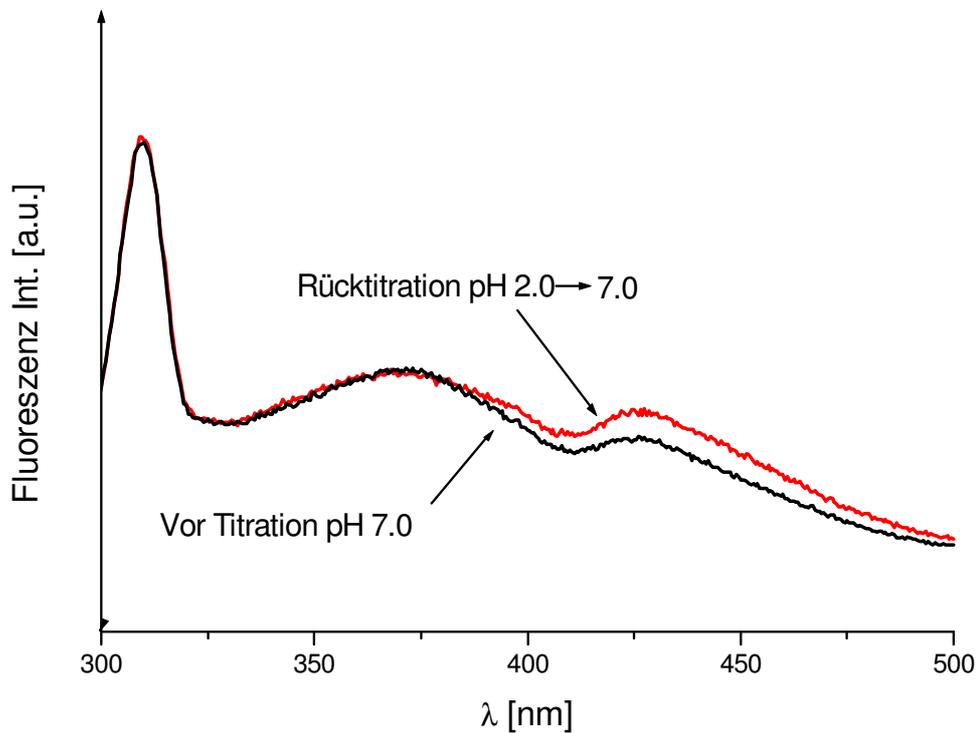


Abbildung 4.3: Fluoreszenzspektren einer 10 μM Lösung von Cyt c in Wasser (280 nm Anregung) vor der Titration sowie nach Hin- und Rücktitration, jeweils bei pH 7.

Um dies zu untermauern, wurden Fluoreszenzspektren von Cyt c bei verschiedenen pH-Werten zwischen pH 7 und pH 2 aufgenommen. Abbildung 4.2 zeigt die pH-Wert-abhängigen Fluoreszenzspektren einer 10 μM Lösung von Cyt c in Wasser nach einer Anregung mit 280, Abbildung 4.3 zeigt vergrößert das Spektrum bei pH 7 vor der Titration in schwarz. Die Bande bei etwa 310 nm ist die erste Stokes-Bande der OH-Streckschwingung des Lösungsmittels, das Minimum in der Kurve bei etwa 410 nm ist auf Selbstabsorption durch die Soret-Bande zurückzuführen.

Das in rot dargestellte Spektrum zeigt die Fluoreszenz derselben Lösung nach Zugabe von HCl bis auf pH 2 hinab und anschließender Rücktitration mit einer äquimolaren Menge Natronlauge. Beide Spektren sind in guter Übereinstimmung. Dies spricht ebenfalls dafür, dass die Faltung des Proteins vollständig reversibel im vermessenen pH-Bereich ist, da die Fluoreszenzintensität sehr stark vom Faltungsgrad des Proteins abhängt (vgl. Kapitel 7 „Porphyrin Fluorescence Dominates UV Photoemission of Folded Cytochrome c“).

5 Untersuchungen an den Systemen Cyt c/Au und Cyt c/Ag

Nanopartikel-Protein-Verbindungen sind für verschiedene biochemische oder medizinische Anwendungen von Nutzen [34-38]. Werden Proteine an Nanopartikel gebunden, ändert sich oftmals ihre Struktur und ihr biologischer Nutzen geht verloren [39]. Die Struktur von Proteinen, die an Nanopartikel gebunden wurden, wurde für verschiedene Systeme untersucht [40-41]. Die Struktur von an Gold und Silber adsorbiertem Cytochrom c hängt stark von der Oberflächenbedeckung und der Größe der Nanopartikel ab [41-43]. Durch Adsorption an den Oberflächen der Nanopartikel einer bestimmten Größe wird den Cytochrom c-Molekülen eine Struktur mit definierten Abständen der Cyt c-Moleküle untereinander sowie zwischen Cyt c und den Nanopartikeln vorgegeben [42].

Die Untersuchung der Photoreduktion von Cytochrom c soll auf die Systeme Cyt c /Au und Cyt c / Ag ausgeweitet werden, um nähere Informationen zum Mechanismus zu erhalten. Dazu wurden die Systeme Cyt c / Au sowie Cyt c / Ag hergestellt und mit Hilfe der transienten Absorptionsspektroskopie untersucht.

5.1. Cyt c/Au

Die Präparation der Au-Nanopartikel erfolgte durch Citrat-Reduktion von Tetrachloridogold-säure HAuCl_4 [42,44]. Dabei wurden 9 mg HAuCl_4 in 95 ml Wasser gelöst und zum Kochen gebracht. Zu der kochenden Lösung wurden 5 ml 1%-iger Natriumcitratlösung unter ständigem Rühren zugetropft, dabei wurde die Lösung dunkelrot-violett. Die Teilchengrößen der Au-Nanopartikel betragen nach diesem Verfahren etwa 10-20 nm [42].

Abbildung 5.1 zeigt das Absorptionsspektrum der auf diese Weise erhaltenen Lösung von Au-Nanopartikeln in rot. Es zeigt eine Absorptionsbande bei etwa 522 nm. In schwarz ist das Absorptionsspektrum einer 50 mM Lösung von Cytochrom c (oxidierte Form) in Wasser abgebildet. Es zeigt charakteristische Absorptionsbanden bei 409 nm (Soret-Bande) und 530 nm (Q-Bande). Die Kurven in grün, hellblau und dunkelblau bilden die Spektren des Systems Cyt c / Au in verschiedenen Mischungsverhältnissen ab. Je nach Mischungsverhältnis erhält man ein Absorptionsmaximum zwischen 560 und 585 nm.

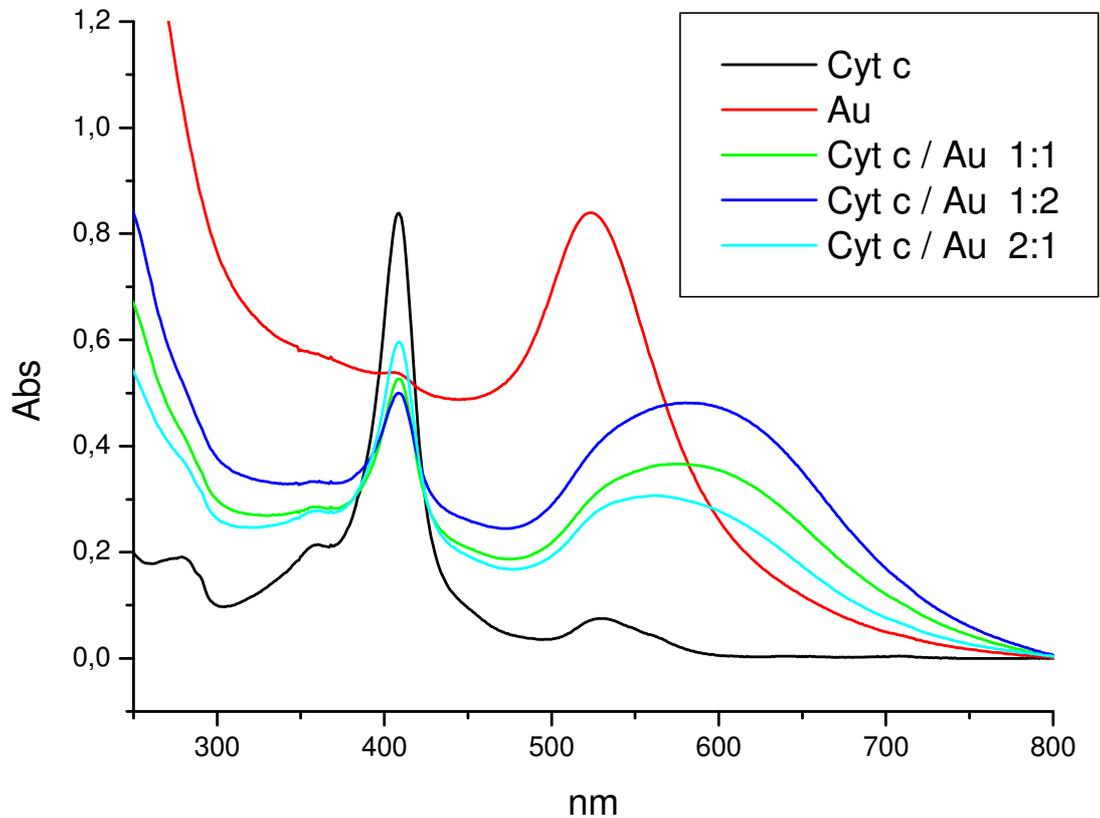


Abbildung 5.1: Absorptionsspektren von Cyt c, Au-Nanopartikeln und dem System Cyt c / Au bei verschiedenen Mischungsverhältnissen

Da das System Cyt c / Au bei Wellenlängen größer als 500 nm stark absorbiert, wurde für die Untersuchung im Nanosekunden-Transienten-Spektrometer die frequenzverdoppelte Fundamentale des Nd:YAG-Lasers (532 nm) als Anregungswellenlänge gewählt.

Abbildung 5.2 zeigt das transiente Absorptionsspektrum für das System Cyt c / Au für verschiedene Zeiten zwischen 25 ns und 250 ns nach dem Photolyselaser im Bereich zwischen 300 und 650 nm. Das Spektrum zeigt eine transiente Absorptionsbande zwischen 300 und 400 nm. Bei kleineren Wellenlängen konnte aufgrund der zu geringen Lampenintensität nicht gemessen werden. In Abbildung 5.3 ist das zeitabhängige kinetische Spektrum bei einer Analysewellenlänge von 300 nm zu sehen. Der einfach exponentielle Fit ergab eine Abklingzeit von 62 ns.

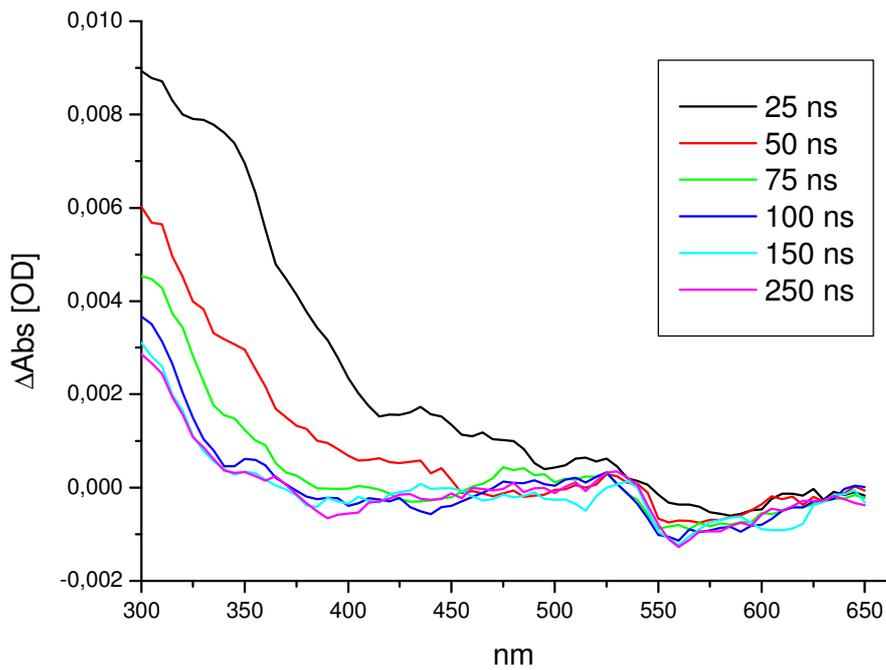


Abbildung 5.2: Transiente Absorptionsspektren von Cyt c / Au für verschiedene Zeiten (Anregungswellenlänge 532 nm)

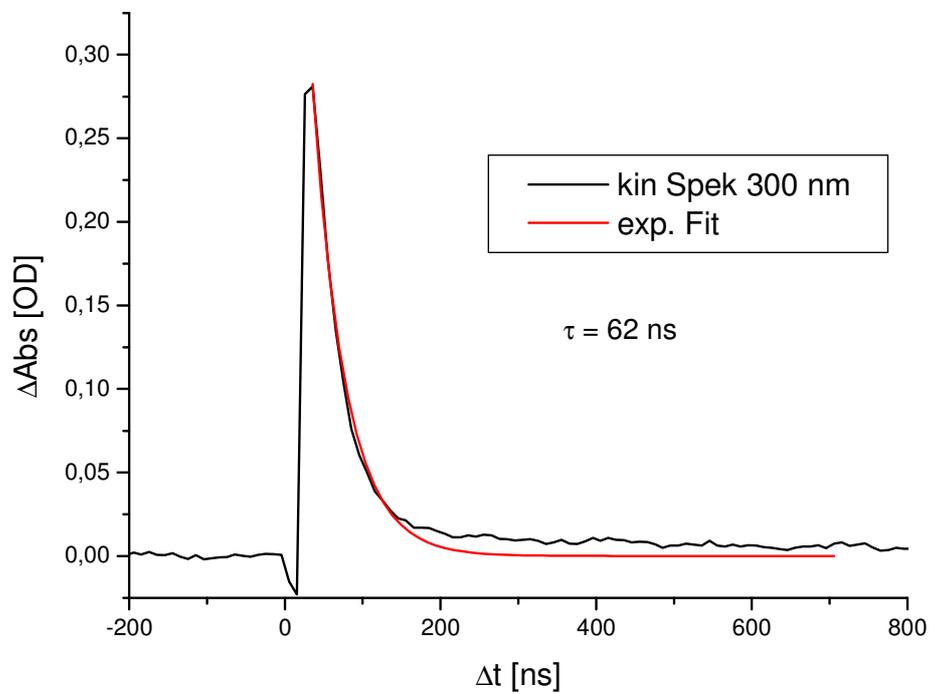


Abbildung 5.3: Zeitabhängiges Absorptionsspektrum von Cyt c / Au bei einer Analysewellenlänge von 300 nm

Wie ebenfalls in Abbildung 5.3 zu erkennen ist, geht die Absorption nach längeren Zeiten nicht ganz auf Null zurück. Dies gilt für den gesamten Zeitbereich, der mit dem Spektrometer messbar ist (400 μ s). Außerdem ist die Abklingzeit nicht davon abhängig, ob mit Stickstoff oder mit Sauerstoff gespült wurde, so dass also kein Triplettquenching durch den Sauerstoff erfolgt. Die kurze Lebenszeit kann auf ein kurzlebiges Zwischenprodukt oder Kation/Radikal zurückgeführt werden. Die erhöhte Absorption nach langen Zeiten spricht für einen Photoreaktionsprozess, der durch die Laserphotolyse ausgelöst wurde. Allerdings zeigte sich das UV-Absorptionsspektrum nach der Messung unverändert. Vermutlich ist entweder der Umsatz der Reaktion zu klein, als dass er stationär messbar wäre oder es handelt sich um eine reversible Reaktion, die im Zeitrahmen zwischen Beendigung der Transientenmessung und Aufnahme des Absorptionsspektrums (etwa 5-10 min) umgekehrt wird.

5.2. Cyt c/Ag

Zur Präparation von Ag-Nanopartikeln „ohne Chemie“ wurde eine Silberfolie in einer mit Wasser gefüllten Küvette (etwa 10 ml) für ca. 10 min mit Laserlicht der frequenzverdoppelten Fundamentalen des Nd:YAG-Lasers (532 nm, 320 mJ) bestrahlt. Dabei färbte sich die Lösung während der Bestrahlung intensiv gelb. Die Teilchengrößen der Ag-Nanopartikel betragen nach diesem Verfahren etwa 50-100 nm [45].

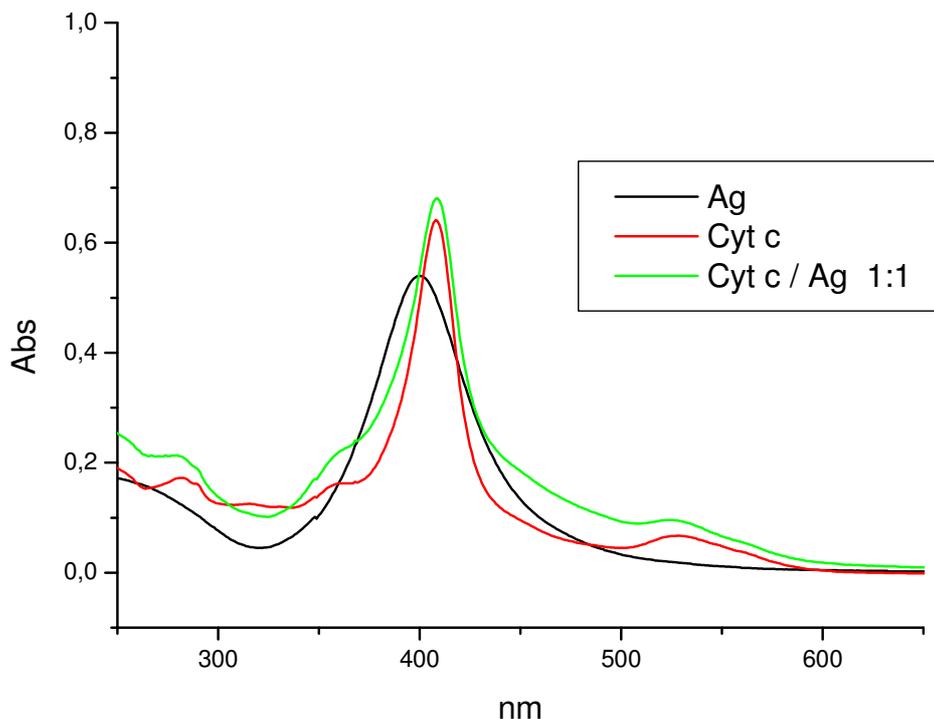


Abbildung 5.4: Absorptionsspektren von Cyt c, Ag-Nanopartikeln und dem System Cyt c / Ag

In Abbildung 5.4 ist das Absorptionsspektrum der erhaltenen Ag-Nanopartikel in wässriger Lösung in schwarz abgebildet. Es zeigt eine Absorptionsbande bei 397 nm. Das Absorptionsspektrum von Cyt c ist zum Vergleich in rot gezeigt. In grün ist das Spektrum einer Mischung der Ag-Nanopartikel-Lösung mit der Cytochrom c-Lösung zu gleichen Teilen abgebildet. Es unterscheidet sich nicht so stark vom Absorptionsspektrum des Cytochroms c, wie das Spektrum einer Mischung mit Gold, aber es ist eine deutliche Verbreiterung der Soret-Bande zu sehen.

Zur Messung der transienten Absorptionsspektren wurde die verdreifachte Fundamentale des Nd:YAG-Lasers (355 nm) verwendet, da in diesem Bereich die größte Absorption des Systems ist. Die transienten Absorptionsspektren für das System Cyt c / Ag für verschiedene Zeiten zwischen 25 ns und 250 ns nach dem Photolyselaser sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Hier ist eine transiente Absorption im Bereich von 400 bis 450 nm zu sehen. Das zeitabhängige Absorptionsspektrum bei 400 nm zeigt Abbildung 5.6. Es konnte eine Abklingzeit von 66 ns ermittelt werden.

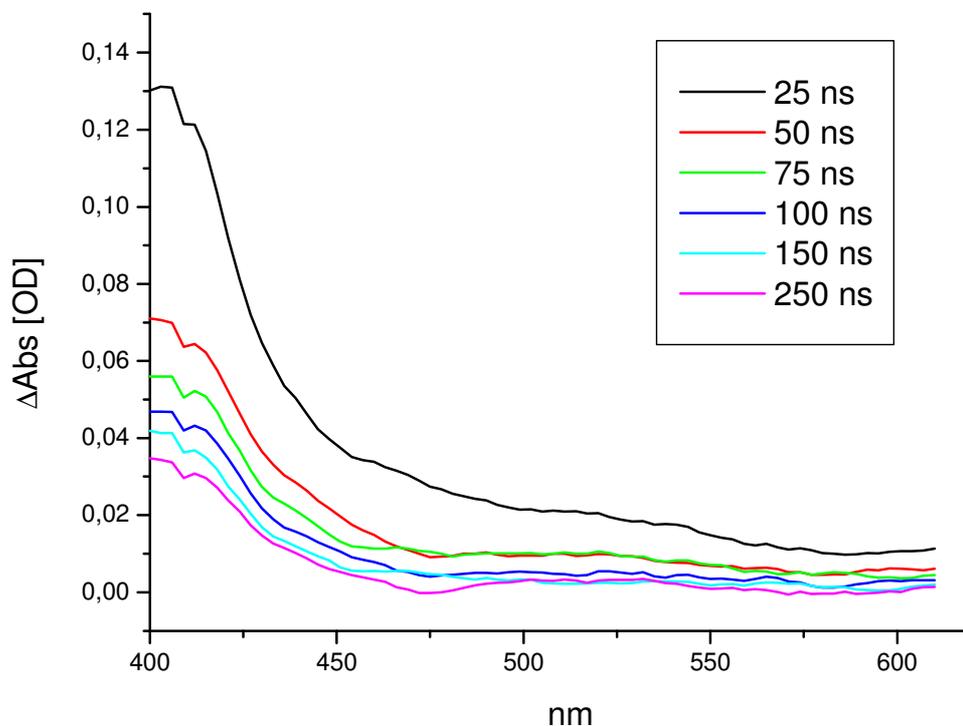


Abbildung 5.5: Transiente Absorptionsspektren von Cyt c / Ag für verschiedene Zeiten (Anregungswellenlänge 355 nm)

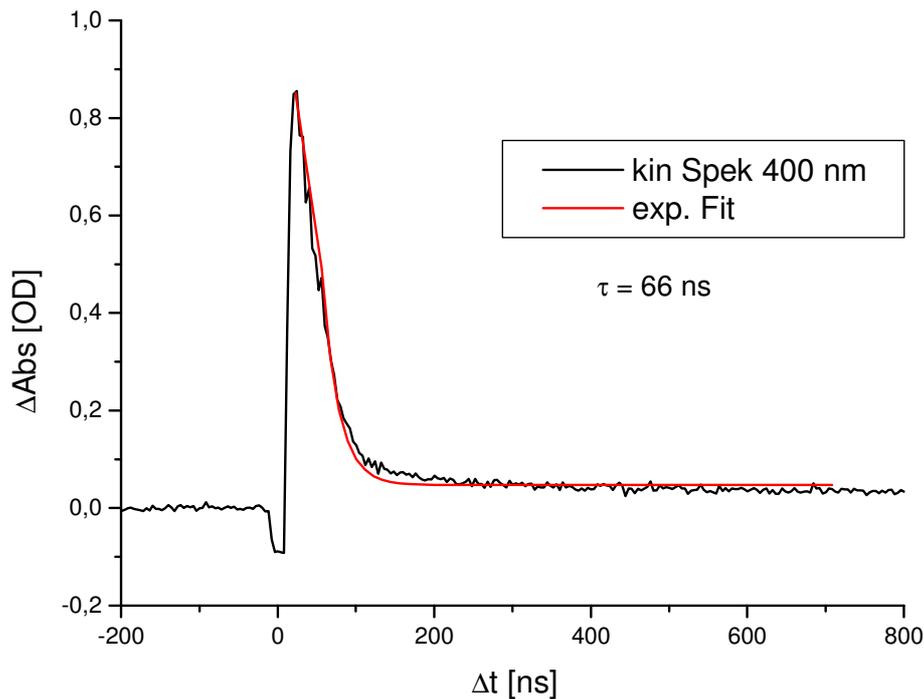


Abbildung 5.6: Zeitabhängiges Absorptionsspektrum von Cyt c / Ag bei einer Analysewellenlänge von 400 nm

Auch in diesem Fall nimmt die Absorption zu längeren Zeiten nicht den Wert Null an (bis zu 400 μs). Ebenso ist beim System Cyt c / Ag keine Sauerstoffempfindlichkeit der Abklingzeit zu sehen. Genauso wie beim System Cyt c / Au ist die transiente Absorptionsbande auch in diesem Fall vermutlich auf eine Photoreaktion zurückzuführen, aber auch bei diesem System in kein Photoprodukt UV-spektroskopisch nachweisbar.

Bei beiden untersuchten Systemen bleibt festzuhalten, dass die typische Absorptions-Doppelbande der reduzierten Form des Cytochroms c bei 520 nm und 550 nm (s. Publikation „Transient and stationary spectroscopy of Cytochrome c“, Kapitel 8) nicht zu sehen ist. Somit ist kein Elektronentransfer von den Nanopartikeln auf das Cytochrom c oder auch inter- oder intramolekularer Elektronentransfer nachweisbar.

6 Untersuchungen an Porphyrin-Modellsystemen

6.1. Tetraphenylporphyrin (TPP)

Porphyrynsysteme sind Bestandteil vieler biochemischer Proteine, so z.B. im Hämoglobin oder auch im Cytochrom c. Um nähere Informationen über das spektroskopische Verhalten von porphyrinhaltigen Proteinen zu erhalten, ist es sinnvoll, zunächst die spektroskopischen Eigenschaften der Porphyrine separiert vom Proteingerüst zu untersuchen. Eines der einfachsten Modellsysteme ist dabei das Tetraphenylporphyrin (TPP; s. Abbildung 3.4). Aufgrund der unpolaren Phenyl-Reste als Seitenketten, ist es in stark polaren Lösungsmitteln nicht löslich. Sehr gut löslich dagegen ist es in Chloroform (CHCl_3) und in Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4). Mit beiden Lösungsmitteln bildet es eine tiefrote Lösung. Das Absorptionsspektrum von in Chloroform gelöstem TPP ($10 \mu\text{M}$) ist in Abbildung 6.1 in rot gezeigt. Es hat eine sehr intensive Soret-Bande bei 410 nm sowie eine vierfach aufgesplittete Q-Bande mit Maxima bei 515 nm, 549 nm, 590 nm und 646 nm.

Bestrahlt man nun diese Lösung mit Laserlicht, so ist bereits nach kurzer Zeit ein Farbumschlag von tiefrot nach gelblich-grün zu beobachten. Dieser Farbumschlag ist sowohl bei der Verwendung von Laserlicht mit 266 nm als auch mit 355 nm zu beobachten, ebenso in beiden Lösungsmitteln, sowohl in CHCl_3 als auch in CCl_4 . Das Absorptionsspektrum von einer $10 \mu\text{M}$ Lösung von TPP in Chloroform nach einer Bestrahlungszeit von 10 min mit 266 nm (70 mJ) ist exemplarisch in Abbildung 6.1 in grün gezeigt. Man erkennt einen Rotshift der Soret-Bande nach 445 nm, außerdem verliert sie deutlich an Intensität. Die Q-Bande verliert ihre Struktur völlig und zeigt nun nur noch ein einziges Maximum bei 665 nm. Dieser Prozess ist jedoch vollständig reversibel. Lässt man die bestrahlte Lösung für 2-3 Tage stehen, ändert sie ihre Farbe zurück nach tiefrot. Das UV-Absorptionsspektrum sieht ebenfalls wieder aus wie vor der Bestrahlung.

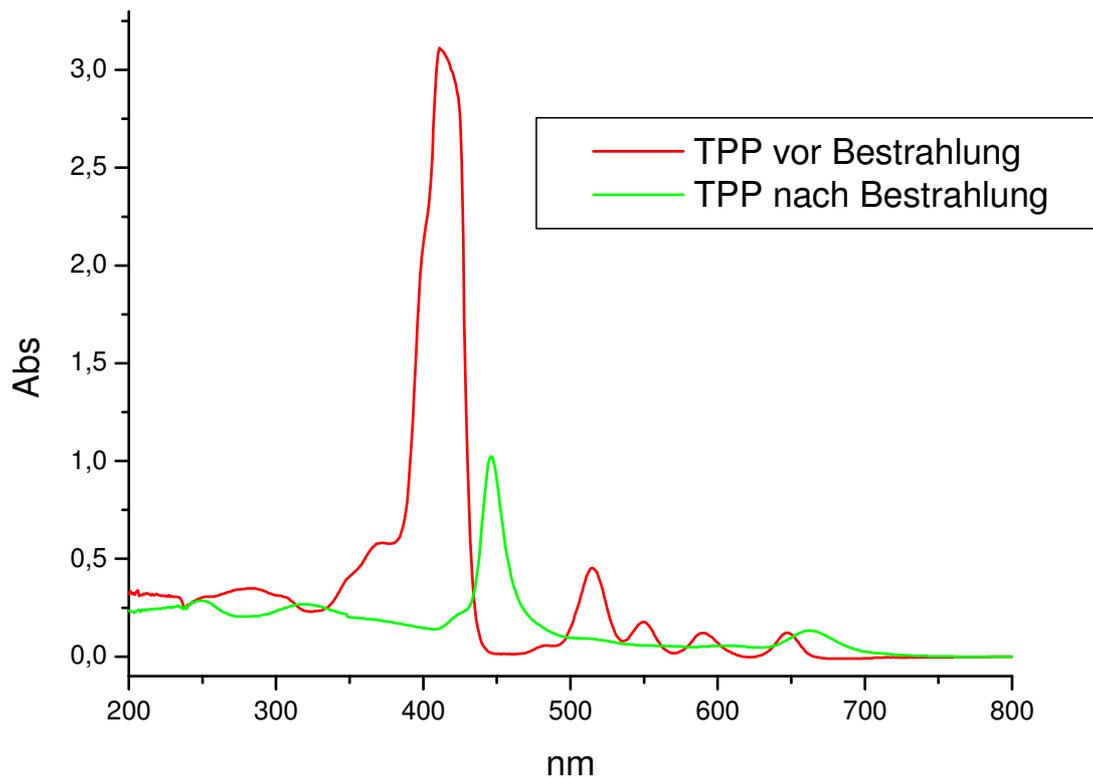
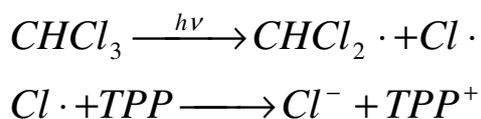


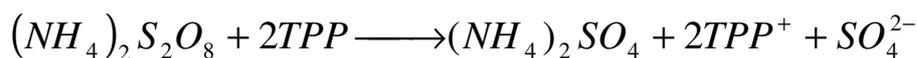
Abbildung 6.1: UV-Absorptionsspektren von TPP in Chloroform vor und nach Bestrahlung mit Laserlicht (266 nm)

Es ist bekannt, dass chlorhaltige Lösungsmittel bei Bestrahlung mit Licht dissoziieren und sehr reaktive Chlor-Radikale bilden können [46]. Diese sind wiederum in der Lage, das TPP zu oxidieren und ein relativ stabiles TPP^+ -Kation zu bilden:



Auch direkte Ionisation von TPP durch den Laser gefolgt von „Dissoziativer Anlagerung“ des Elektrons an $CHCl_3$ ist ein möglicher Mechanismus.

Um dies zu verifizieren, wurden der TPP-Lösung Oxidationsmittel zugesetzt und die anschließend erhaltenen UV-Absorptionsspektren miteinander verglichen. Als Oxidationsmittel wurde Ammoniumperoxodisulfat (APDS) gewählt. Auch bei dieser Methode erfolgte ein Umschlag der Farbe von tiefrot nach gelbgrün, da auch hier das TPP zum TPP^+ -Kation oxidiert und das APDS zum Sulfat reduziert wird:



Auch bei Verwendung von über Phosphorpentoxid (P_2O_5) getrocknetem CCl_4 anstelle von unbehandeltem CCl_4 entsteht eine grüne Lösung, ebenso bei Zugabe von P_2O_5 zu einer roten Lösung von TPP in unbehandeltem CCl_4 .

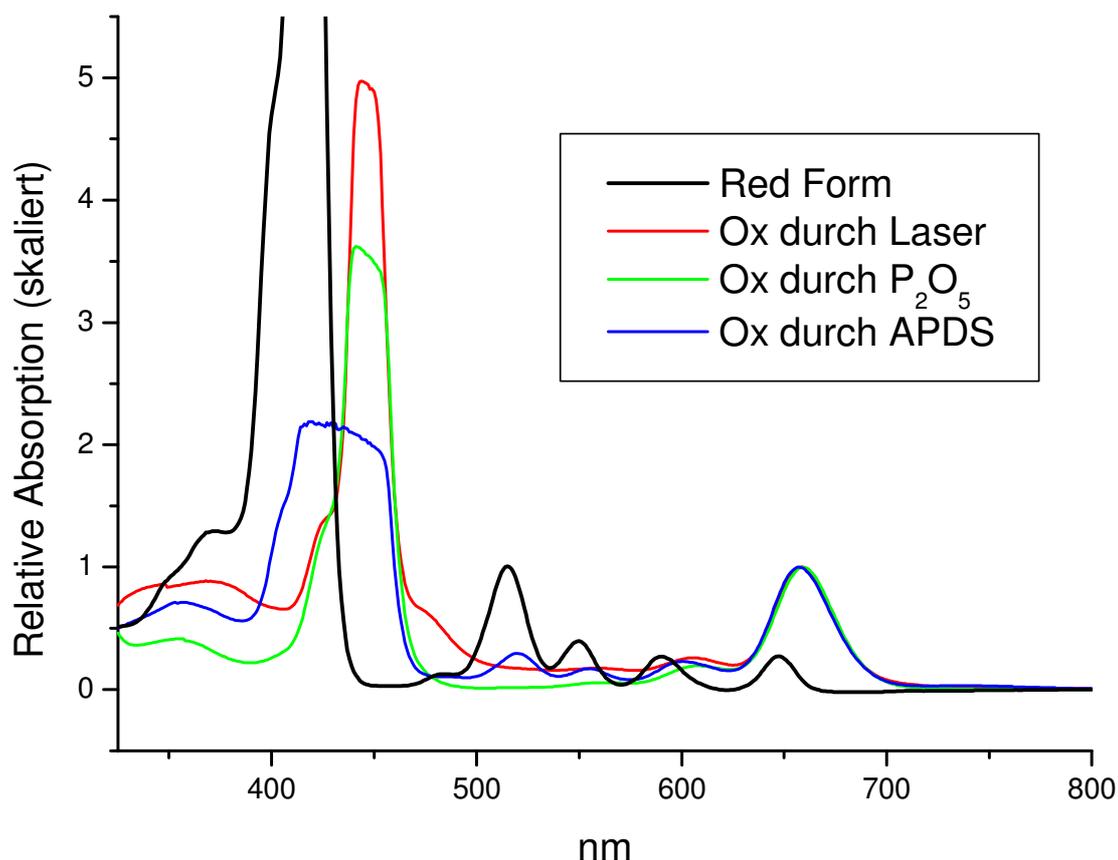


Abbildung 6.2: UV-Absorptionsspektren von TPP in Chloroform unbehandelt (schwarz), nach Laserbestrahlung (rot), nach Zugabe von P_2O_5 (grün) und nach Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APDS; blau).

Abbildung 6.2 stellt das UV-Absorptionsspektrum von TPP in schwarz dar, die Absorptionsspektren des auf verschiedene Weisen erzeugten TPP^+ -Kations sind in rot (Laser), grün (P_2O_5) und blau (APDS) abgebildet. Alle Spektren des Kations zeigen eine sehr intensive Soret-Bande bei 445 nm und eine Q-Bande bei 665 nm. Da verschiedene Konzentrationen verwendet wurden, sind alle Spektren auf die Q-Bande skaliert. Das Spektrum des reduzierten TPPs wurde auf die Bande bei 515 nm mit rel. Absorption 1 skaliert. Alle drei Spektren sind sehr ähnlich. Sie unterscheiden sich praktisch nur in der Intensität der Soret-Bande. Die Intensität der Soret-Bande befindet sich in allen Fällen bereits in der Sättigung des Gerätes, die je nach

Konzentration unterschiedlich schnell erreicht wird. Im Bereich der Q-Bande sind jedoch die Spektren nahezu identisch, was den Schluss zulässt, dass es sich in allen drei Fällen um die gleiche Spezies handeln muss, die nur – je nach Oxidationsmittel – eine etwas verschiedene Umgebung hat.

Da bei Verwendung von chlorhaltigen Lösungsmitteln ein photochemischer Prozess einsetzt, der zur Oxidation des Porphyrinsystems führt, wurde für die Aufnahme von transienten Absorptionsspektren Cyclohexan als Lösungsmittel eingesetzt. In Cyclohexan ist TPP nicht so gut löslich wie in CHCl_3 oder CCl_4 , aber nach leichtem Erwärmen und ständigem Rühren immer noch ausreichend, um transiente Absorptionsspektren aufnehmen zu können ($\approx 2 \mu\text{M}$). Lichtoxidation von TPP unter stationären Bedingungen ist mit diesem Lösungsmittel nicht feststellbar. Für die Aufnahme der transienten Spektren wurden die Messlösungen während der Messung ständig mit Stickstoff gespült.

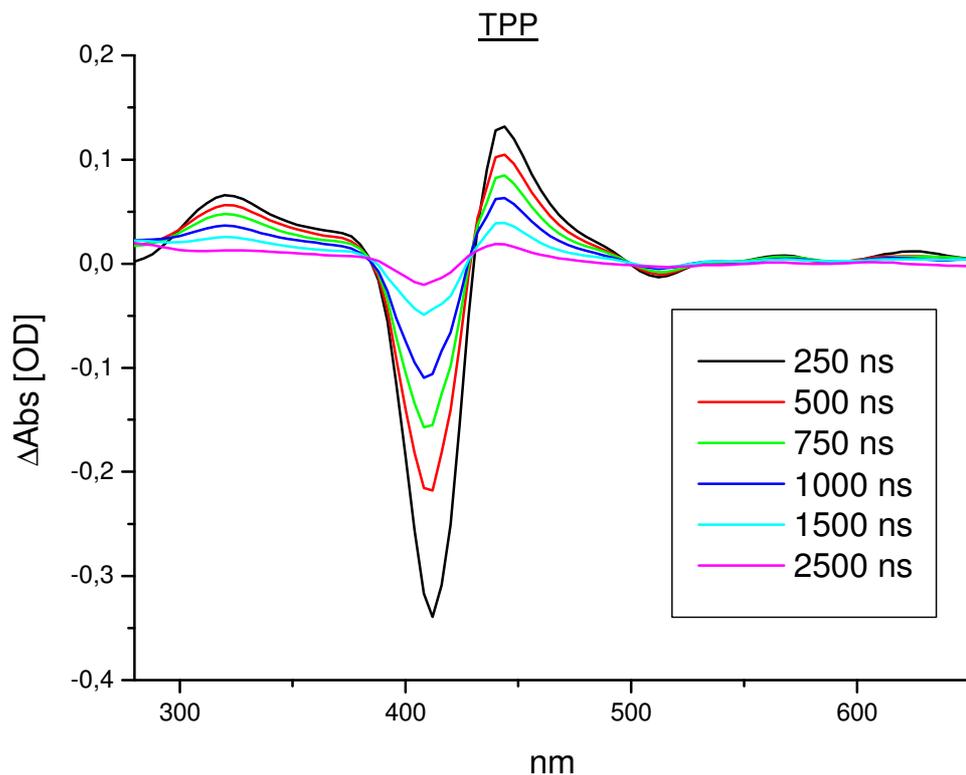


Abbildung 6.3: Transiente Absorptionsspektren von TPP für verschiedene Zeiten (Anregungswellenlänge 266 nm)

Abbildung 6.3 zeigt das transiente Absorptionsspektrum von TPP in Cyclohexan bei einer Anregungswellenlänge von 266 nm (70 mJ) zu verschiedenen Zeiten zwischen 250 ns und 2,5

μs nach dem Laserpuls. Man erkennt ein Ausbleichen der Soret-Bande bei 410 nm, was darauf zurückzuführen ist, dass durch die Laseranregung bereits Moleküle aus dem Grundzustand entfernt wurden und somit weniger Moleküle vom Lampenlicht detektiert werden können als ohne den Laserpuls. Somit erhält man eine geringere Absorption nach Laserphotolyse. Ein leichtes Ausbleichen ist auch an den Wellenlängen der Q-Banden zu sehen.

Im Bereich um 330 nm sowie im Bereich um 440 nm sind zwei transiente Absorptionsbanden zu beobachten. Der Fit einer einfach exponentiellen Abnahme (Abbildung 6.4) liefert für 330 nm eine Abklingzeit von $1,21 \pm 0,2 \mu\text{s}$, für 440 nm eine Abklingzeit von $1,34 \pm 0,2 \mu\text{s}$. Diese Zeiten sind stark vom Sauerstoff-Gehalt der Lösung abhängig. Wird die Lösung während der Messung nicht mit Stickstoff gespült, sinkt die Abklingzeit bei 440 nm auf 230 ns ab, bei Spülung mit Sauerstoff anstelle von Stickstoff sogar auf 130 ns. Diese Sauerstoffgehalt-Abhängigkeit spricht dafür, dass es sich bei den beobachteten Übergängen um Triplett-Übergänge handelt, da diese durch Sauerstoff gequencht werden, was zu einer Verringerung der Abklingzeit führt. Abbildung 6.5 zeigt das zeitliche Verhalten von TPP bei 408 nm. Durch Ausbleichen sinkt die Absorption schnell ab und erholt sich wieder mit einer Zeit von $1,43 \pm 0,2 \mu\text{s}$. Die Zeiten bei 408 nm und 440 nm stehen in sehr guter Relation, so dass davon auszugehen ist, dass diese beiden Banden voneinander abhängig sind.

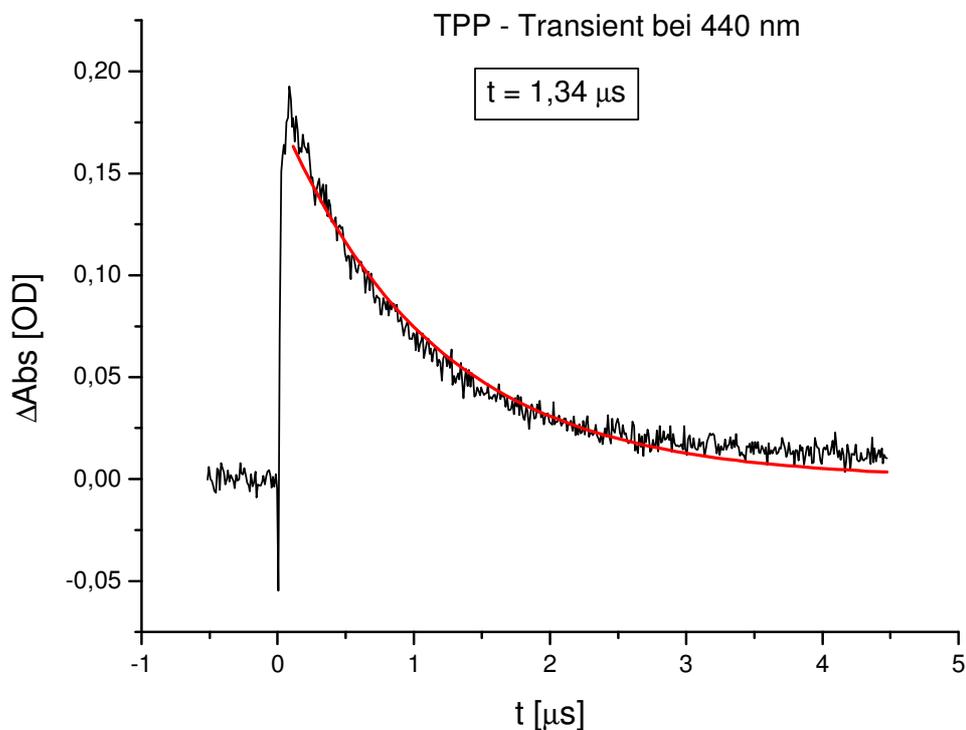


Abbildung 6.4: Zeitabhängiges Verhalten von TPP bei einer Analysewellenlänge von 440 nm und Anregung bei 266 nm

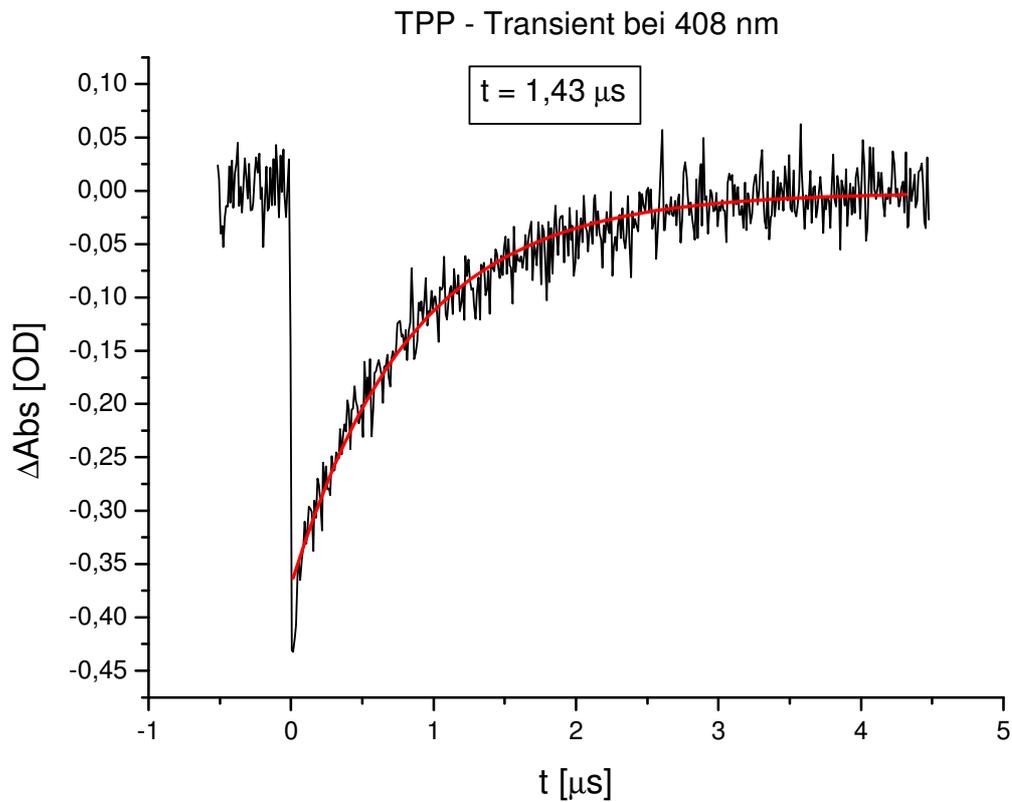


Abbildung 6.5: Zeitabhängiges Verhalten von TPP bei einer Analysewellenlänge von 408 nm und Anregung bei 266 nm

6.2. *Tetra(carboxyphenyl)porphyrin (TCPP)* *und Tetra(hydroxyphenyl)porphyrin (THPP)*

Als Modellsysteme mit polareren Seitenketten, die auch in polaren Lösungsmitteln löslich sind, wurden Tetra(carboxyphenyl)porphyrin (TCPP) und Tetra(hydroxyphenyl)porphyrin (THPP) gewählt. Beide lösen sich mit einer bräunlich-roten (TCPP) und violett-roten (THPP) Farbe gut in Ethanol und wenig in Wasser. Die Löslichkeit in Wasser ist zur Aufnahme von transienten Absorptionsspektren nicht hoch genug, so dass alle Spektren in Ethanol aufgenommen wurden.

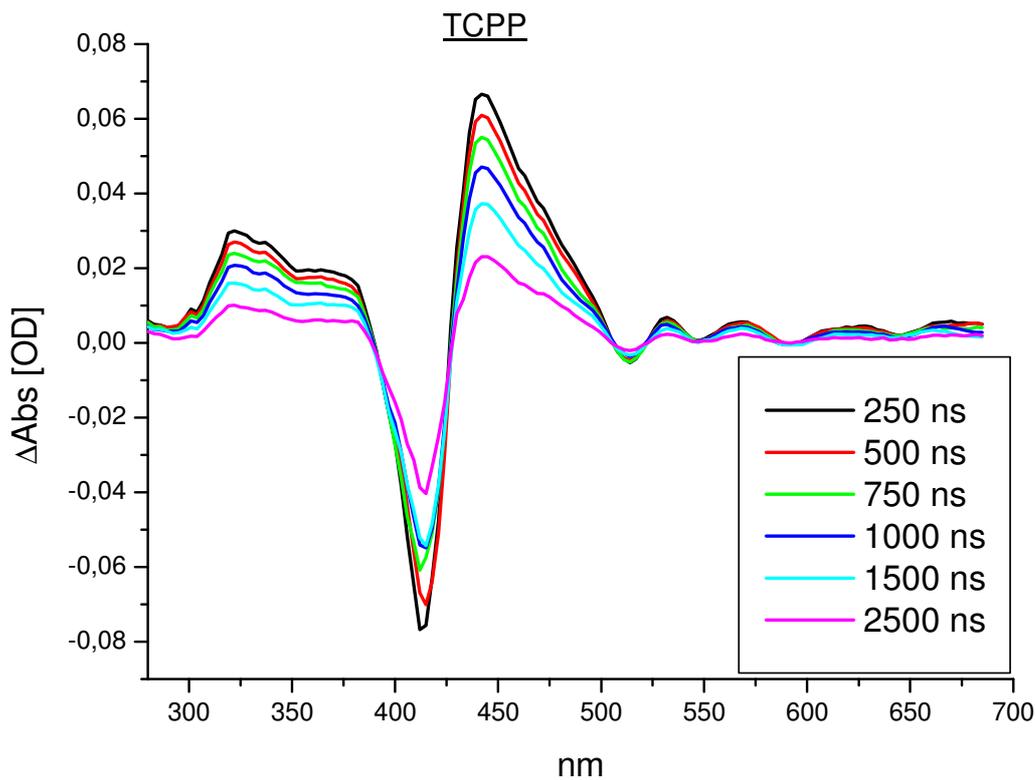


Abbildung 6.6: Transiente Absorptionsspektren von TCPP für verschiedene Zeiten (Anregungswellenlänge 266 nm)

Abbildung 6.6 zeigt die transienten Absorptionsspektren von TCPP in Ethanol bei einer Anregungswellenlänge von 266 nm zu verschiedenen Zeiten zwischen 250 ns und 2,5 μ s nach dem Laserpuls. Die Spektren sind mit denen des TPPs gut zu vergleichen. Auch hier ist ein intensives Ausbleichen bei 415 nm zu beobachten, ebenso sieht man Ausbleichen an den Wellenlängen der Q-Banden. Genauso wie beim TPP ist auch hier im Bereich um 330 nm sowie im Bereich um 440 nm eine transiente Absorption zu sehen. Der einfach exponentielle Fit liefert hier Abklingzeiten von $1,74 \pm 0,2 \mu$ s bei 330 nm sowie $1,91 \pm 0,25 \mu$ s bei 442 nm (Abbildung 6.7). Auch diese Abklingzeiten sind abhängig vom Sauerstoffgehalt der Lösung. Spülen mit Sauerstoff liefert Abklingzeiten von 80 ns bei 330 nm und 74 ns bei 442 nm, so dass man auch in diesem Fall von Triplett-Übergängen ausgehen kann. Das zeitliche Verhalten bei 408 nm ist in Abbildung 6.8 dargestellt. Das durch Ausbleichen zustande kommende Signal geht sehr viel langsamer ($4,3 \pm 1,2 \mu$ s) zurück. Der Rückgang in den Grundzustand erfolgt wahrscheinlich über andere langsamere Reaktionskanäle.

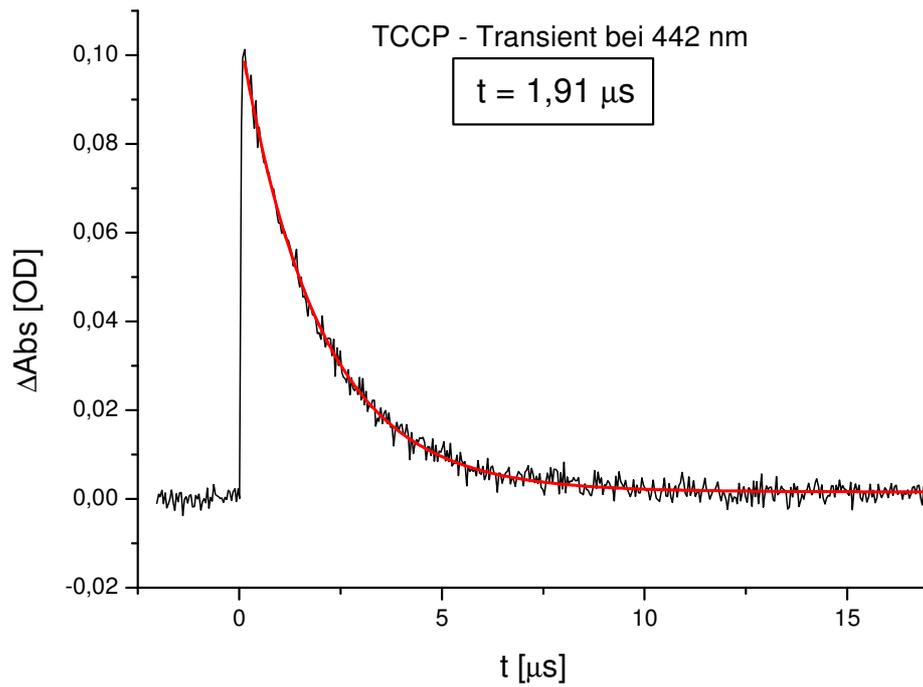


Abbildung 6.7: Zeitabhängiges Verhalten von TCCP bei einer Analysewellenlänge von 442 nm und Anregung bei 266 nm

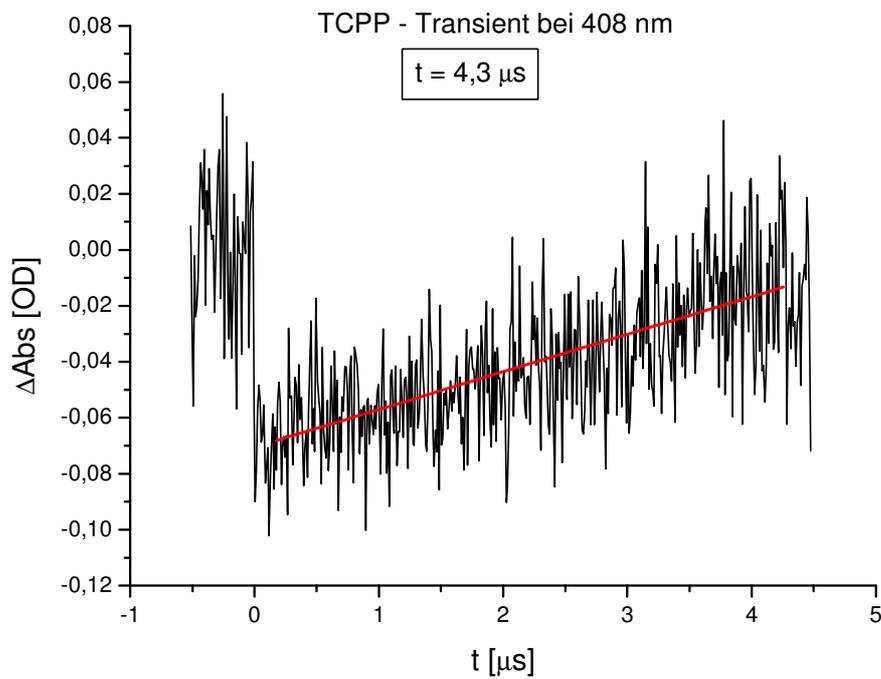


Abbildung 6.8: Zeitabhängiges Verhalten von TCPP bei einer Analysewellenlänge von 408 nm und Anregung bei 266 nm

Das dritte und letzte Porphyrin-Modellsystem ist das THPP. In Abbildung 6.9 sind die transienten Absorptionsspektren von THPP in Ethanol bei einer Anregungswellenlänge von 266 nm zu verschiedenen Zeiten zwischen 250 ns und 2,5 μ s nach dem Laserpuls abgebildet. Wie schon bei den beiden Modellsystemen zuvor erkennt man auch hier die negativen Absorptionsbanden im Bereich der Soret- und Q-Banden, die auf Ausbleichen zurückzuführen sind, sowie positive Absorptionsbanden bei etwa 350 nm sowie bei etwa 450 nm.

Die Abklingzeiten betragen bei diesem System $1,77 \pm 0,25 \mu$ s bei 350 nm sowie $2,04 \pm 0,35 \mu$ s bei 450 nm (Abbildung 6.10). Spülen mit Sauerstoff verkürzt auch bei diesem Molekül die Abklingzeiten auf unter 150 ns. Abbildung 6.11 zeigt das zeitliche Verhalten bei 415 nm. Auch hier erfolgt der Rückgang des Signals sehr viel langsamer ($6,8 \pm 2,4 \mu$ s), vermutlich über andere langsamere Reaktionskanäle.

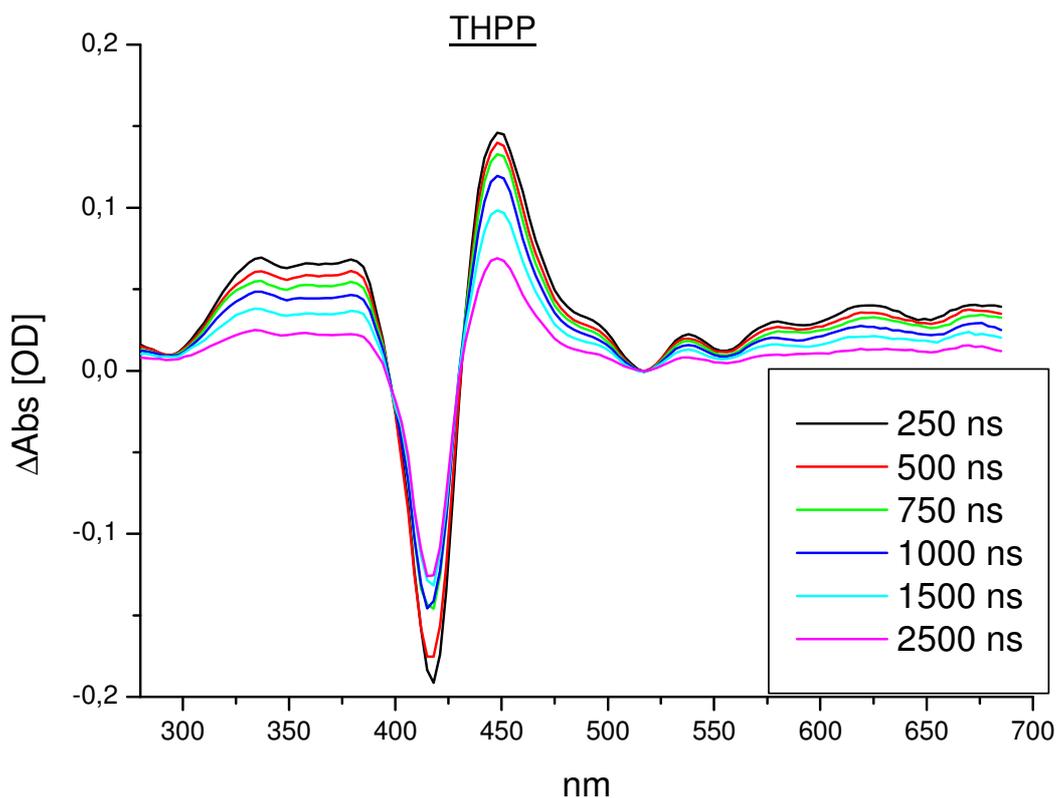


Abbildung 6.9: Transiente Absorptionsspektren von THPP für verschiedene Zeiten (Anregungswellenlänge 266 nm)

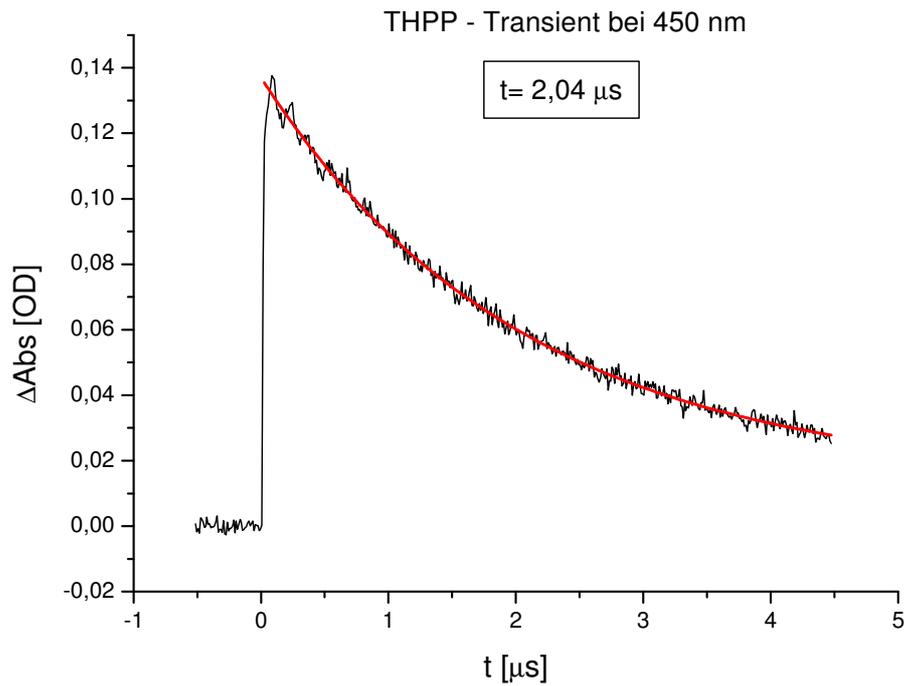


Abbildung 6.10: Zeitabhängiges Verhalten von THPP bei einer Analysewellenlänge von 450 nm und Anregung bei 266 nm

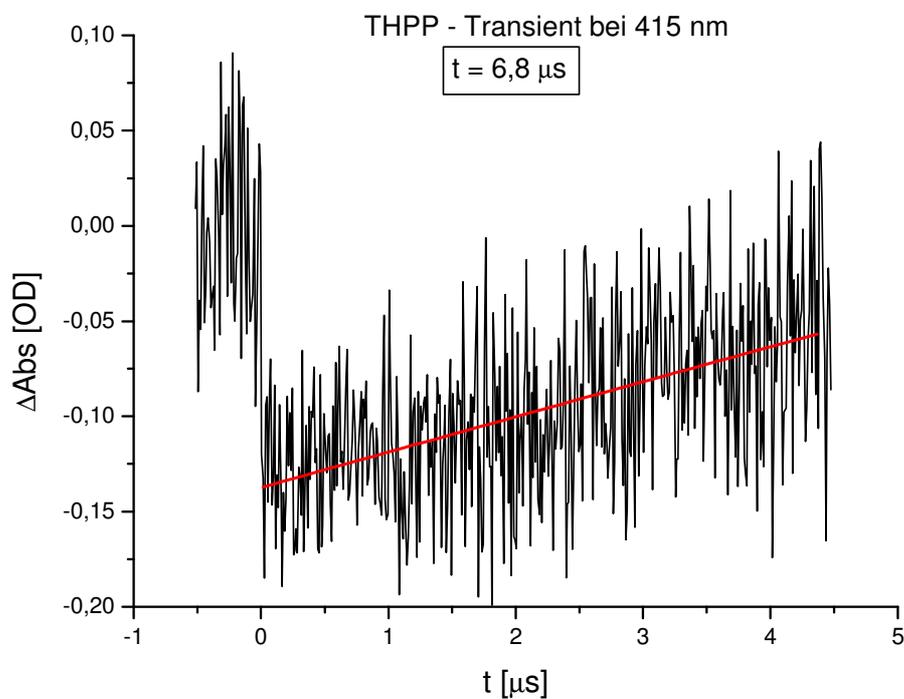


Abbildung 6.11: Zeitabhängiges Verhalten von THPP bei einer Analysewellenlänge von 415 nm und Anregung bei 266 nm

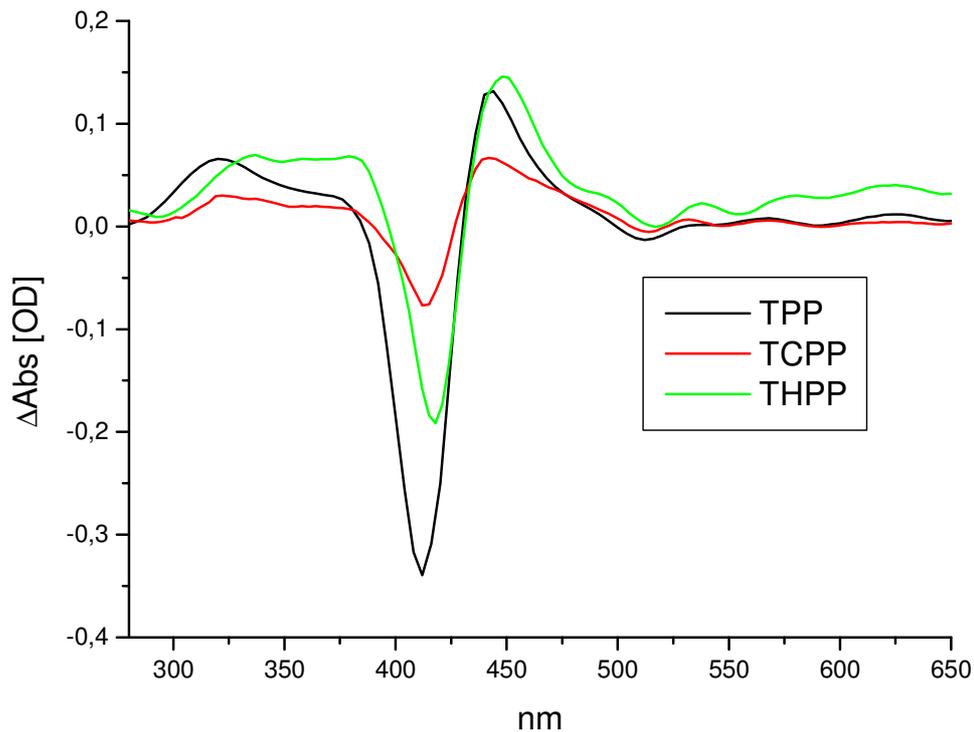


Abbildung 6.12: Transiente Absorptionsspektren von TPP, TCPP und THPP nach 250 ns nach dem Photolyaselaser (Anregungswellenlänge 266 nm)

In Abbildung 6.12 sind die transienten Absorptionsspektren der drei verschiedenen Porphyrine nach einer Zeit von 250 ns zum direkten Vergleich abgebildet. Man erkennt eine recht große Ähnlichkeit in den Spektren der drei Porphyrine, sie unterscheiden sich lediglich in der Intensität der Signale sowie leicht in der Lage der Absorptionsbanden. Alle drei Porphyrine haben jedoch ein negatives Signal bei etwa 410 nm durch Ausbleichen sowie positive Signale bei etwa 340 nm und 440 nm durch wahrscheinliche Triplett-Übergänge gemein.

7 Fluoreszenz von Cytochrom c

Porphyrin fluorescence dominates UV photoemission of folded Cytochrome c

Dennis Löwenich, Karl Kleiner

**Institute for Physical Chemistry
Heinrich-Heine-Universität
Universitätsstr. 1
D-40225 Düsseldorf, Germany**

Printed in Photochemistry and Photobiology, Nov 2007, Vol. 83, Nr. 6, 1308-12

7.1. Abstract

In this paper we reinvestigate the bimodal fluorescence of Cyt c by using excitation wavelength dependent fluorescence spectroscopy. We show that its major contributions at pH 3-7 do not arise from tryptophan (Trp-59) fluorescence as hitherto assumed. Instead different chromophores of Cyt c contribute at different pH. At pH 3-7 the porphyrine system contributes about 80 % and tryptophan about 20 % to the total fluorescence upon excitation of Cyt c at 280 nm. At pH 2 the fluorescence originates nearly completely from the tryptophan residue. Porphyrin fluorescence is still present at pH 2 but its contribution is too small for quantitative deconvolution. Our results show that the UV fluorescence of Cyt c has to be deconvoluted before it can be used to perform time-resolved measurements of the folding of this small protein.

7.2. Introduction

The problem of protein folding has attracted great interest in recent years [2]. Due to the large size of these biopolymers, quantum chemical calculations and spectroscopic measurements at sufficient resolution are nontrivial tasks. It is therefore crucial to construct general principles of protein folding based on simple model systems, such as cytochrome c (Cyt c) [3].

One of the oldest known methods of denaturing proteins is by addition of acids. The conformational state of the denatured protein has been reported from apparently fully unfolded structures to substantial remaining native structure [4]. Cyt c serves as an ideal model system for folding studies because it can be unfolded and refolded reversibly without degradation of the protein. Lowering the pH by adding HCl leads to a nearly fully unfolded conformation, typically in the vicinity of pH 2. By adding NaOH up to neutralization Cyt c completely refolds again. Goto et al. showed that at about pH 1, the protein structure changes into a compact conformation containing substantial secondary structure [4]. Furthermore, the heme prosthetic group stays intact as the protein unfolds due to the covalent linkages between the heme and the protein moiety [4].

Cyt c is one of the best characterized proteins in terms of structure, both in the crystalline state [5] and in solution [6-8]. Another advantage for using Cyt c as a model system is that the various folding intermediates present during the course of folding can be studied by changing the pH [47,48].

Some of the most commonly used methods to investigate folding and unfolding in Cyt c are NMR [49,50], circular dichroism [4,8,51,52] and fluorescence spectroscopy [8-11]. The tryptophan (Trp-59) fluorescence of Cyt c is extremely sensitive to the over-all protein conformation [9]. The fluorescence spectrum of the tryptophan residue at position 59 of native Cyt c at pH 7 is almost completely quenched by the heme group. Goto et. al. ascribed this by fluorescence energy transfer to the heme group [4,11] on the basis of the Förster theory [53,54]. At pH 2 the protein is unfolded and the Trp-59 fluorescence increases. So fluorescence spectroscopy can be used to investigate the protein folding.

Some of the fluorescence spectra recorded earlier showed a bimodal fluorescence spectrum at pH 2 with one maximum centered at about 355 nm and a second one at a wavelength > 400 nm [9,11]. The origin of these two maxima and of the shift of the maximum from 355 nm at pH 2 to 370 nm at pH 7 has never been explained. When using the Cyt c fluorescence for protein folding studies it is obviously important to explain the reason for this dual fluorescence and to determine the species from which the fluorescence arises.

In this paper we reinvestigate the bimodal fluorescence of Cyt c by using excitation wavelength dependent fluorescence spectroscopy. We will show that different chromophores of Cyt c contribute to its UV fluorescence and will identify them. We propose that unrelaxed fluorescence from the porphyrin system contributes to Cyt c fluorescence upon excitation at 280 nm.

7.3. *Experimental and theoretical methods*

Horse heart Cytochrome c was purchased from Sigma-Aldrich, and purified by a desalting column to remove possible low molecular weight compounds. The purification was controlled by Matrix Assisted Laser Desorption (MALDI) mass spectrometry. The mass spectrum essentially consists of single and multiple charged units of the Cyt c parent mass. Some smaller peaks at $m/e < 1000$ were nearly completely removed by the purification process. The fluorescence spectra obtained from the purified and unpurified sample were identical. A typical protein concentration of 1-2 μM in triply distilled water is used for all of the measurements. For absorption and fluorescence measurements 10 x 10 x 35 mm and 2 x 10 x 35 mm quartz cuvettes are used.

The porphyrin model system 5,10,15,20-Tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)porphyrin-Fe(III)-pentachloride (Fe-Por) was purchased from Porphyrin Systems and the protected amino acids Ac-Trp-OMe and Ac-Tyr-OMe were purchased from Bachem. All were used without further purification. Fe-Por and Ac-Trp-OMe were used in the same concentration (2 μM) as Cyt c. Due to the number of four tyrosine residues in Cyt c a 8 μM concentration was used for Ac-Tyr-OMe.

The absorption spectra are recorded by a Cary 100 Bio (Varian) spectrophotometer, while the fluorescence measurements were performed with a Fluoromax-3 spectrofluorometer (Jobin Yvon), both interfaced to a personal computer. The pH was measured with a HI 9025 pH meter (Hannah Instruments).

7.4. *Results and discussion*

Fig. 7.1 shows the fluorescence spectrum of 2 μM Cyt c at an excitation wavelength of 280 nm at pH 2, using a 10 mm path length cuvette (solid line). The spectrum has two apparent

intensity maxima, one at 355 nm and another one at about 410 nm. The third maximum centered at 310 nm is the first Stokes band of water (OH stretching vibration). A similar bimodal fluorescence spectrum has been observed earlier [9-11]. The dashed line in Fig. 7.1 shows the fluorescence spectrum of the same solution by using a cuvette with 2 mm path length. In this case the fluorescence spectrum shows just one maximum centered at 355 nm. The absorption spectrum of Cyt c at pH 2 shows maximum absorption at 395 nm due to the very intense Soret band of the porphyrin group. Therefore the fluorescence spectrum measured in a 10 mm path length is not a spectrum with two maxima but a broad spectrum with a minimum at 395 nm due to self absorption of the fluorescence light by the porphyrin system. Self absorption depends on the concentration of the solution and is larger at higher concentrations.

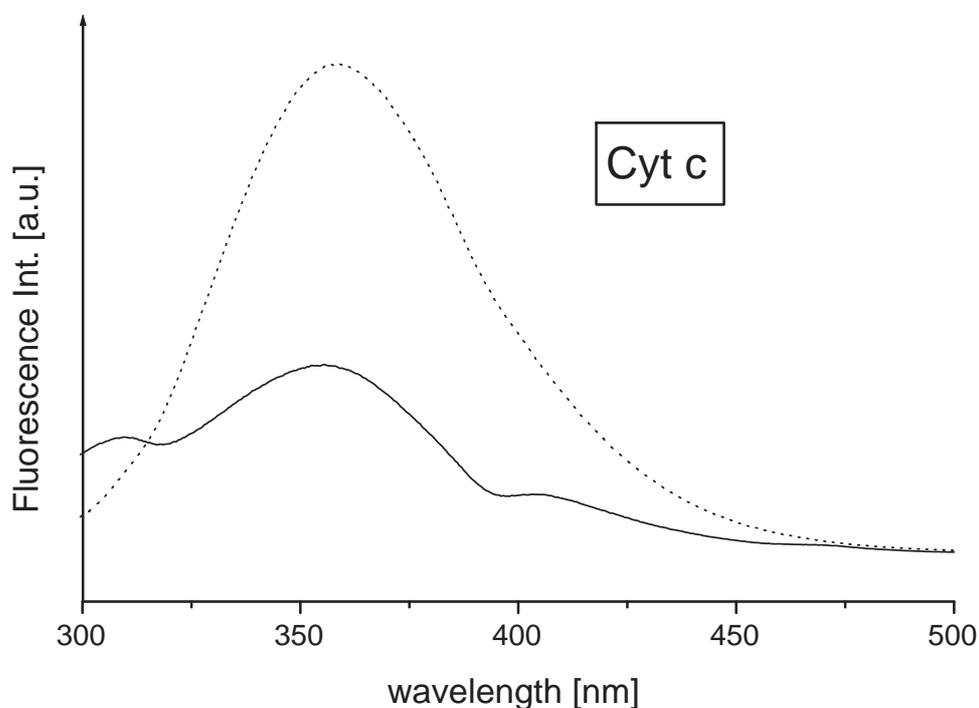


Fig. 7.1: Fluorescence spectrum of cytochrome c excited at 280 nm using a cuvette with 10 mm path length (solid line) and 2 mm path length (dashed line) at pH 2. The absorption spectrum shows self absorption arising from the Soret band at 395 nm when using the 10 mm cuvette.

The pH dependent fluorescence spectra of Cyt c, excited at the absorption maximum of tryptophan at 280 nm, are shown in Fig. 7.2a. To avoid self absorption the measurements were performed with a smaller concentration (1 μM) of Cyt c and a cuvette with 2 mm path length. The maximum centered at 310 nm is the first Stokes band of water (OH stretching

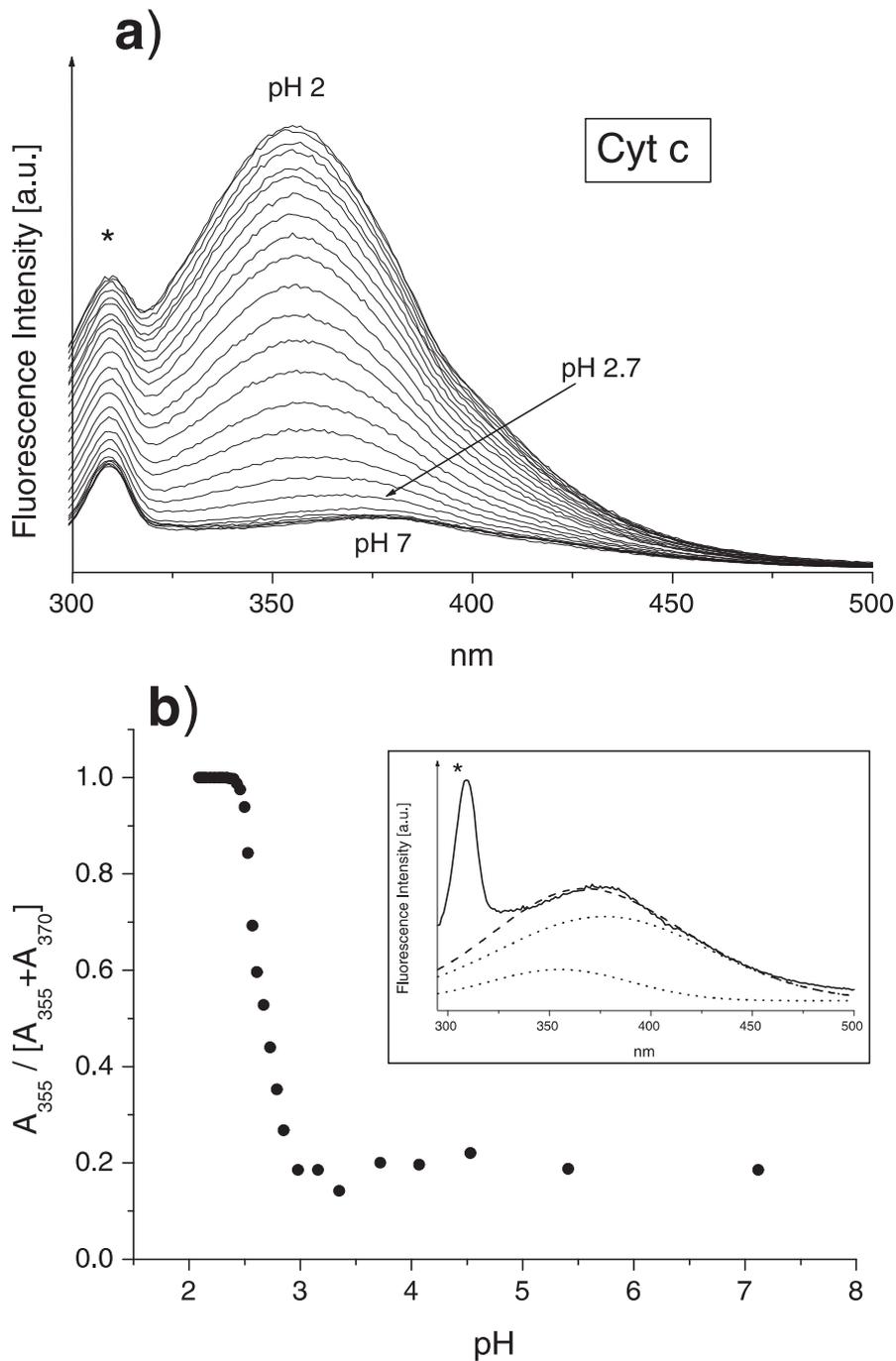


Fig.7.2: (a) Fluorescence spectrum of cytochrome c excited at 280 nm at different pH values. The emission at ≈ 310 nm is the first Stokes band of the H_2O solvent (band marked with *). The dispersed emission spectrum of Trp shows a fluorescence maximum at 355 nm at pH 2 and at 370 nm at pH 7. The increase of fluorescence intensity with decrease of pH is due to partial defolding upon protonation leading to increased Trp59 fluorescence. The defolding starts at about pH 2.7. The dispersed emission spectrum of Trp can be fitted by two Gaussian profiles centered at 355 and 370 nm. (b) The ratio of the area of the band integral of the fitted band centered at 355 nm (A_{355} relative to the total fluorescence $A_{355}+A_{370}$) as a function of pH. The ratio stays nearly constant until pH 2.7 and then increases rapidly up to nearly 100 % at pH 2.4. The inset shows the deconvolution of the fluorescence spectrum at pH 7. The experimental spectrum (solid curve), the two Gaussian profiles (dotted curves) and the sum of them (dashed curve) are shown for comparison.

vibration, band marked with *). At pH 7 the fluorescence of Cyt c has a maximum at about 370 nm. The fluorescence intensity and the peak wavelength is roughly constant for pH > 2.7. At lower pH values the intensity increases rapidly and the maximum is blue shifted. At pH 2 the fluorescence maximum is centered at 355 nm. We consider the possibility that the fluorescence maxima at 355 nm and 370 nm arise from two different species. Therefore we performed band analyses of the fluorescence spectra by fitting each spectrum to two Gaussian profiles, one centered at 355 nm and the other one centered at 370 nm. The ratio of the band integral of the 355 nm band to the sum of the band integrals of both bands is determined and plotted as a function of the pH-value in Fig. 7.2b. Between pH 7 and pH 3 the ratio is nearly constant and varies by less than 20 %. Below pH 2.7, the ratio increases rapidly and reaches 100% at pH 2.4.

This behaviour can be explained as follows. The fluorescence at 355 nm is typical for tryptophan exposed to water (1L_a emission). Obviously at pH 3 - 7 the tryptophan fluorescence is almost completely quenched. At pH < 2.7 the protein gets unfolded and the tryptophan fluorescence intensity increases dramatically. To investigate the origin of the fluorescence at 370 nm we performed several experiments which show that its major contributions do not arise from Trp-59 fluorescence as hitherto assumed [9-11].

First we excited the Soret band of Cyt c at 407 nm (pH 7) and 397 nm (pH 2) and measured the fluorescence spectra to check if the red part of the Cyt c fluorescence stems from excitation of the Soret band. We observed fluorescence with maxima at 438 nm (pH 7) and 418 nm (pH 2). However, the measurements showed very small fluorescence quantum yields and too low intensities to explain the Cyt c fluorescence at pH 7. Hence Förster energy transfer from tryptophan (donor) to the porphyrin system (acceptor) only contributes to a minor extent to the red part of the Cyt c fluorescence if at all.

We also performed fluorescence measurements of the protected amino acid Ac-Trp-OMe which serves as a model system for investigating the tryptophan fluorescence in Cyt c. Measurements of Ac-Trp-OMe in different solvents were performed: water, the less polar dioxane and a more polar aqueous salt solution of sodium propionate. The porphyrin system in Cyt c has two propionate side chains of which one is located near the tryptophan residue. Therefore we have chosen a solution of Ac-Trp-OMe in a propionate solution as a model system for the Trp residue in Cyt c. Ac-Trp-OMe in water shows a fluorescence maximum at 361 nm, while in the less polar dioxane solution the maximum is blue shifted to about 330 nm. The highly polar 1L_a state of tryptophan may be stabilized by interaction with the propionate ions, resulting in a stronger red shift of the fluorescence compared to pure water as

solvent. However, we could not observe such an effect even at the highest propionate concentration (4M).

Cioni et al. observed tryptophane phosphorescence at low temperatures (160-274 K) centered at about 410 nm [55]. We did not observe any phosphorescence in our measurements. Most likely the temperature of 298 K is too high to observe phosphorescence. Likewise, the model system Ac-Trp-OMe did not show any phosphorescence even at much higher concentrations up to 1 mM.

To investigate the origin of the dual fluorescence we performed fluorescence excitation spectroscopy. Hence, we recorded how the fluorescence intensity in a certain wavelength interval depends on the excitation wavelength. The fluorescence spectrum at pH 7 has its maximum at 370 nm (Fig. 7.2a), so we performed an excitation wavelength scan for fluorescence light centered at 370 nm with a bandwidth of 2 nm. The spectrum is shown in Fig. 7.3a (solid curve). It has four maxima at 271 nm, 285 nm, 317 nm and 332 nm. The Stokes band of the H₂O solvent contributes to the maximum centered at 332 nm.

We have chosen the Fe-Por complex described in Section 8.4.2 as model system for comparison with Cyt c fluorescence because many water soluble iron porphyrin systems, e.g. Fe protoporphyrin IX or Fe mesoporphyrin IX, tend to aggregate in aqueous solutions or show adhesion to glass surfaces even in the micro- and nanomolecular concentration range [56,57]. Our model system does not show these problems at the concentrations used in our experiments.

The dashed curve in Fig. 7.3a shows the scaled absorption spectrum of Fe-Por. It has one maximum at about 260 nm. The second maximum at 340 nm is the blue wing of the Soret band of Fe-Por, see Fig. 7.4a. The dotted curve shows the scaled absorption spectrum of Ac-Trp-OMe, with a maximum at 280 nm. The fluorescence excitation spectrum has a good correlation with the absorption spectra of the two model systems. The maxima at 271 nm and 317 nm probably derive from the porphyrin system in Cyt c and the weak shoulder at 285 nm may arise from excitation of the red wing of the tryptophan absorption. The fluorescence excitation spectrum at 420 nm (not shown here) is very similar to that at 370 nm (both measured at pH 7). Setting the detection wavelength to 420 nm eliminates any influence from the fluorescence at 355 nm, which is the major emission maximum at pH 2.

We also performed an excitation wavelength scan by observing the fluorescence light at 355 nm and pH 2. The spectrum is shown in Fig. 7.3b (solid curve). It has its maximum at about 280 nm and is very similar to the absorption spectrum of tryptophan (dashed curve in Fig. 7.3b).

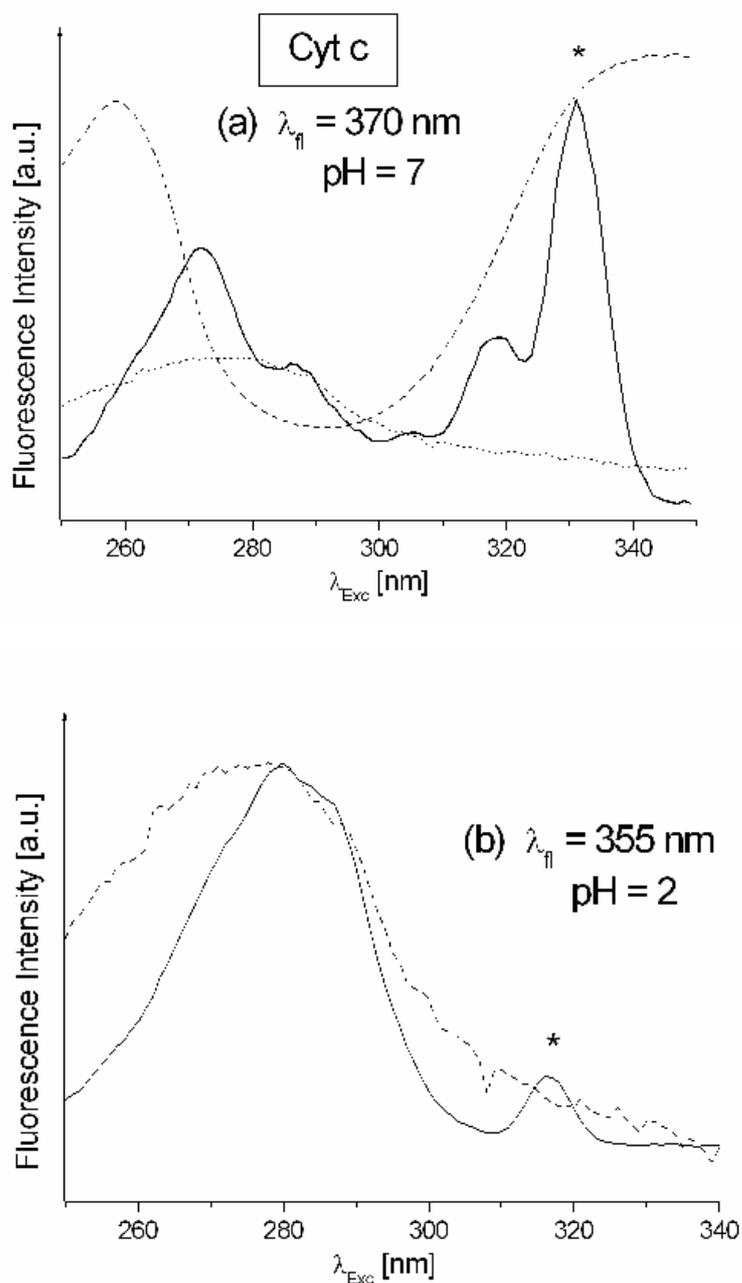
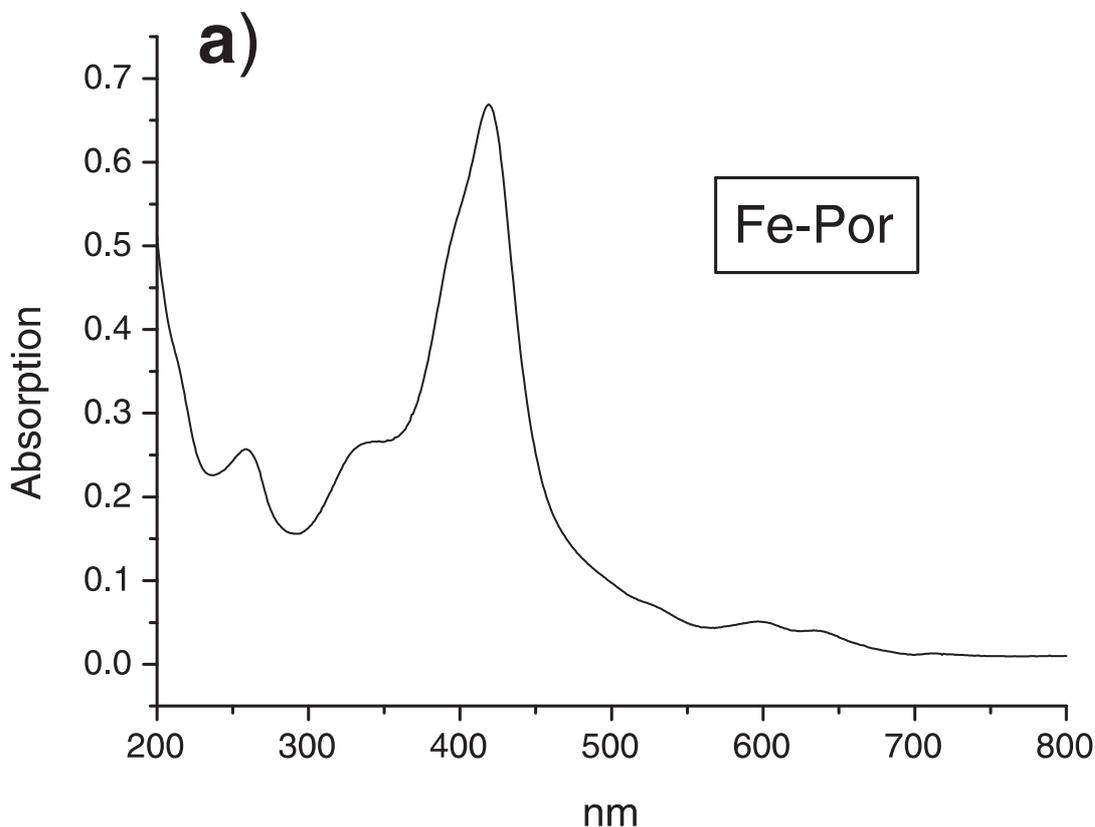


Fig. 7.3: Excitation wavelength dependent fluorescence of Cyt c for excitation at (a) 370 nm at pH 7 and (b) 355 nm at pH 2 (solid curve). The absorption spectra of the model systems Fe-Por (dashed curve) and Ac-Trp-OME (dotted curve) are shown for comparison. The fluorescence excitation spectrum at 370 nm correlates qualitatively with the Fe-Por absorption spectrum but not with the Ac-Trp-OME spectrum (Fig. 7.3a). The weak shoulder at 285 nm may arise from excitation of the red wing of the tryptophan absorption. The fluorescence excitation spectrum at 355 nm (Fig. 7.3b) correlates with the Ac-Trp-OME absorption spectrum. Note that the first Stokes band of the H_2O solvent contributes to the signal at $\approx 330 \text{ nm}$ in Fig. 7.3a. Increased emission at 355 nm in Fig. 7.3b upon excitation at $\approx 318 \text{ nm}$ results exclusively from the first Stokes band of the H_2O solvent (band marked with *).

Based on the fluorescence excitation spectra and the deconvolution of the normal fluorescence spectra, we propose that the fluorescence of Cyt c at 370 nm and pH 7 derives from both the porphyrine system and the tryptophan residue. The band analysis shows that the porphyrine system contributes about 80 % and tryptophan about 20 % to the total fluorescence. At pH 2 the fluorescence originates nearly completely from the tryptophan residue. Porphyrine fluorescence is still present but its contribution is too small for deconvolution.

Tyrosine has its fluorescence maximum at 303 nm. The fluorescence of the Tyrosinate anion which exists at pH 7 to a small extent is very weak and has its maximum at 346 nm. Therefore Tyrosine and Tyrosinate do not contribute significantly to the Cyt c fluorescence upon excitation at 280 nm.

To confirm our suggestion we measured absorption (Fig. 7.4a), dispersed fluorescence (Fig. 7.4b) and fluorescence excitation (Fig. 7.4c) spectra of Fe-Por at pH 7. The absorption spectrum of a 2 μ M solution of Fe-Por shows a maximum at 260 nm, the Soret band with maxima at 340 nm and 418 nm and the Q band with maxima at 602 nm and 638 nm (Fig. 7.4a). The fluorescence spectrum of the same solution excited at 280 nm has a fluorescence maximum at 385 nm which correlates well with the fluorescence spectrum of Cyt c. The maximum at 310 nm is the Stokes band of the solvent.



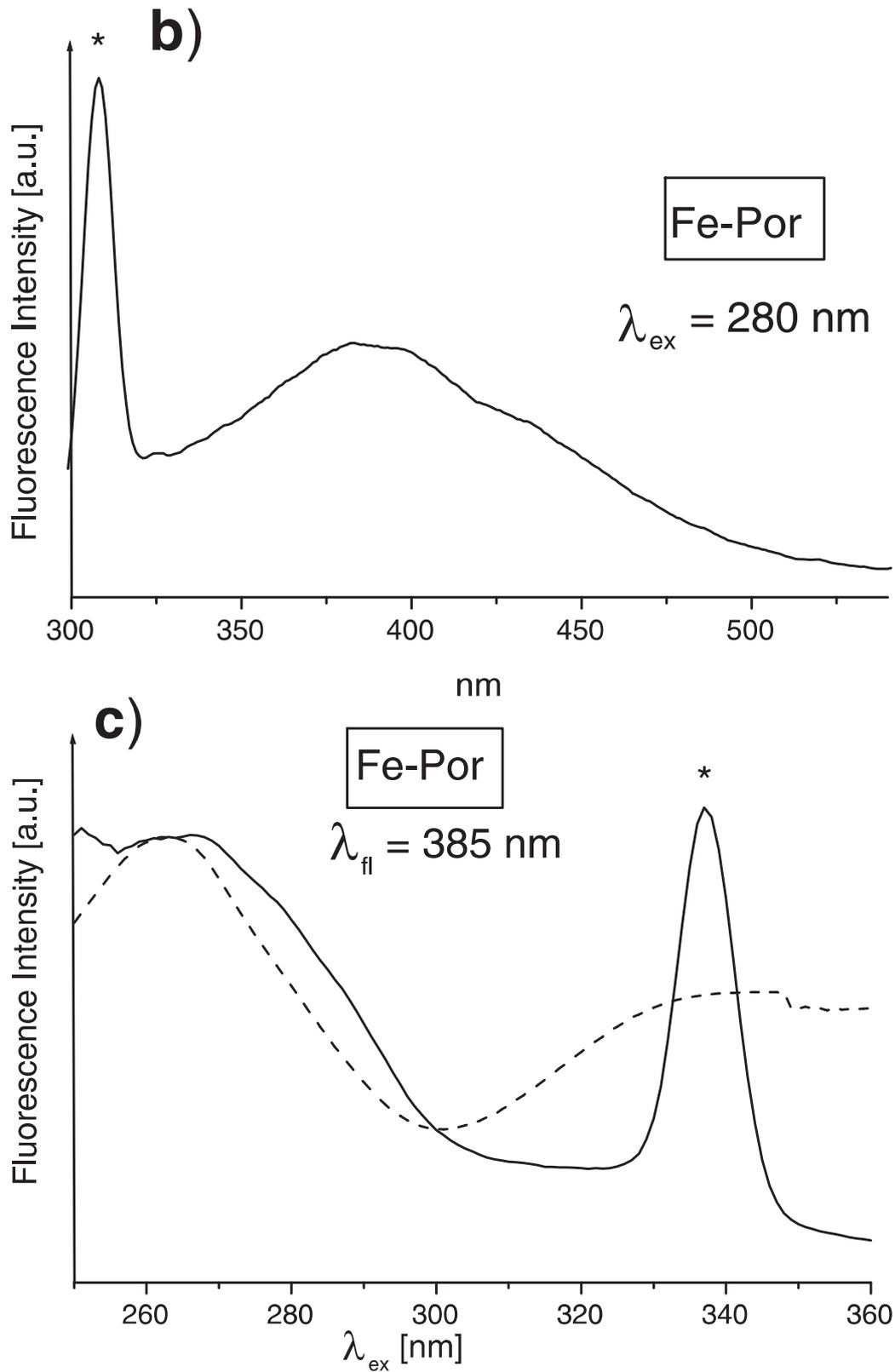


Fig. 7.4: (a) Absorption, (b) dispersed fluorescence and (c) fluorescence excitation spectra of the model system Fe-Por. (b) The excitation of Fe-Por at 280 nm leads to fluorescence with a maximum at 385 nm which correlates well with the fluorescence of Cyt c at pH 7. The emission at $\approx 310 \text{ nm}$ is the first Stokes band of the H_2O solvent (band marked with *). (c) Excitation wavelength dependent fluorescence of Fe-Por at 385 nm (solid line). The absorption spectrum of Fe-Por (dashed line) is shown for comparison. The band at $\approx 340 \text{ nm}$ is the first Stokes band of the H_2O solvent (band marked with *).

Fig. 7.4c shows the fluorescence excitation spectrum (solid line) of Fe-Por for an emission at 385 nm together with the scaled absorption spectrum of Fe-Por (dashed line). The fluorescence excitation spectrum correlates well with the absorption spectrum, so that the fluorescence centered at 385 nm obviously stems from the Fe-Por compound and not from an impurity. The band centered at 340 nm (marked with *) is the first Stokes band of the solvent.

7.5. Conclusions

Our measurements show that tryptophan (Trp-59) and porphyrin fluorescence both contribute to total fluorescence of Cyt c at an excitation wavelength of 280 nm. Their contributions depend on the pH. At pH < 3 the fluorescence originates nearly completely from the tryptophan residue while porphyrin fluorescence is very weak. At pH 3-7 porphyrin fluorescence contributes about 80 % to the total fluorescence, while tryptophan contributes about 20%. If the UV fluorescence of Cyt c is used to investigate folding and unfolding of Cyt c by time-resolved spectroscopy, it is necessary to deconvolute the contributions of porphyrin and tryptophan fluorescence.

Acknowledgements

This work is part of the Ph.D. thesis of Dennis Löwenich. The authors thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 663) for financial support.

8 Photoreduktion von Cytochrom c

Transient and stationary spectroscopy of Cytochrome c: Ultrafast internal conversion controls the photoreduction

Dennis Löwenich, Karl Kleiner

**Institute for Physical Chemistry
Heinrich-Heine-Universität
Universitätsstr. 1
D-40225 Düsseldorf, Germany**

Venugopal Karunakaran, Sergey A. Kovalenko

**Institute for Chemistry
Humboldt Universität Berlin
Brook-Taylor-Straße 2
D-12489 Berlin, Germany**

Accepted for publication in Photochemistry and Photobiology (2007)

8.1. Abstract

Photoreduction of Cytochrome c (Cyt c) has been reinvestigated using femtosecond-to-nanosecond transient absorption and stationary spectroscopy. Femtosecond spectra of oxidized Cyt c, recorded in the probe range 270-1000 nm, demonstrate similar evolution upon 266 or 403 nm excitation: an ultrafast 0.3 ps internal conversion followed by a 4 ps vibrational cooling. Late transient spectra after 20 ps, from the cold ground-state

chromophore, reveal a small but measurable signal from reduced Cyt c. The yield ϕ for $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ photoreduction is measured to be $\phi_{403}=0.016$ and $\phi_{266}=0.08$ for 403 and 266 nm excitation. These yields lead to a guess of the barrier $E_A^f=55$ kJ/mol for thermal ground-state electron transfer (ET). Nanosecond spectra initially show the typical absorption from reduced Cyt c and then exhibit temperature-dependent sub-microsecond decays ($0.5 \mu\text{s}$ at 297 K), corresponding to a barrier $E_A^b=33$ kJ/mol for the back ET reaction and a reaction energy $\Delta E=22$ kJ/mol. The nanosecond transients do not decay to zero on a second time scale, demonstrating the stability of some of the reduced Cyt c. The yields calculated from this stable reduced form agree with quasistationary reduction yields. Modest heating of Cyt c leads to its efficient thermal reduction as demonstrated by differential stationary absorption spectroscopy. In summary, our results point to ultrafast internal conversion of oxidized Cyt c upon UV or visible excitation, followed by Fe-porphyrin reduction due to thermal ground-state ET as prevailing mechanism.

8.2. Introduction

Cytochrome c (Cyt c), a hemoprotein from the mitochondrial respiratory chain, plays an important role in biological electron transport [1]. In subsequent studies Cyt c was the first component involved in mitochondrial electron transfer (ET) for which detailed structural information was available. It served as a model system to investigate the mechanisms of biological electron transport [12]. This transport has been the subject of extensive investigations, but the detailed mechanism by which Cyt c assists ET has not been completely clarified yet. Photoreduction appears to be suitable to elucidate ET pathways within a protein. Many groups have studied the photoreduction of heme proteins and metalloporphyrins by monitoring the absorption spectrum of the sample via irradiation with broadband excitation. Some groups have used external electron donors [13-15], but photoreduction of Cyt c has also been reported in the absence of foreign donors [16-18].

The wavelength dependence of the photoreduction of Cyt c was investigated first by Gu et al. [19]. They measured the photoreduction efficiency at a fixed wavelength, 254 nm, in the photon energy range where the aromatic amino acids absorb. Therefore, from their data it was not possible to conclude if the wavelength dependence of photoreduction efficiency follows the optical absorption of tryptophan and tyrosine in Cyt c, which may be superimposed by a

general energy dependence of through space or through bond tunneling ET efficiency. Gu et al. observed a decrease of the photoreduction cross-section with increasing wavelength but the photoreduction did not vanish at $\lambda > 330$ nm where the aromatic amino acids do not absorb anymore.

Bartocci and co-workers [16,20] have proposed that the heme axial ligand is responsible for the reduction of the iron atom by providing one electron and transferring it to the heme iron. Ozaki and co-workers observed that photoexcitation of the iron-ligand charge-transfer band does not induce photoreduction [58]. Other groups propose the involvement of aromatic amino acids, in particular tryptophan, in the photoreduction process [17,21]. On the basis of numerous reports on the photolysis of free tryptophan or tryptophan incorporated into proteins [17,19,59,60] some groups believe that most likely electron photoejection from tryptophan residues by UV light is the primary photochemical process [17].

Recently Negrier et al. [22] reported first sub-picosecond measurements on oxidized Cyt c. They monitored transient absorption upon 530 nm pumping and assigned major relaxation processes with ultrafast internal conversion (faster than 0.3 ps) and 4 ps vibrational cooling. These results are corroborated and developed in the present work.

In the present paper photoinduced ET in Cyt c is studied over a large time scale from femtoseconds to microseconds and minutes to elucidate the transfer mechanism and the relative importance of direct photoreduction (ET from the electronically excited state) versus thermal reduction (ET from a hot ground state after fast internal conversion). Furthermore, photoreduction yields are measured in femtosecond, nanosecond and quasistationary experiments. In the latter case Cyt c is excited at several wavelengths between 243-355 nm, and the yields were obtained via analysis of the Q- and Soret-band of the oxidized (Fe^{3+}) and reduced (Fe^{2+}) form. Our results demonstrate unambiguously that both visible and UV photoinduced reduction occurs mainly in the ground state of hot Cyt c and not in the electronically excited state, contrary to previous suggestions [17,19].

8.3. Experimental and theoretical methods

Horse heart Cyt c was purchased from Sigma-Aldrich and purified by a desalting column. The purification was controlled by MALDI mass spectrometry. The mass spectrum essentially consists of single and multiple charged units of the Cyt c parent mass. Some smaller peaks at $m/e < 1000$ were nearly removed by the purification process. The influence of purity was

checked by absorption spectroscopy for the photoreduction process, and it was found that the spectra of the purified and unpurified solution were identical.

Since oxidized Cyt c in solution experiences reduction even without light action, special care was taken to avoid contributions from the reduced form. Only a freshly prepared sample solution was used and exchanged every 2 hours of experiment. The sample absorption spectra were taken just before and immediately after the measurements and were compared to each other. From this comparison we conclude that the accumulation of the reduced form during the transient experiment was well below 1%.

The broadband transient absorption setup has been described in detail elsewhere [61-64]. Pump pulses at 780 or 800 nm were obtained from a Ti:Sa amplifier (Clark or Femtolasers). When using the Clark laser two noncollinear optical parametric amplifiers (NOPA) [65] were utilized to generate UV excitation and supercontinuum probing in the range 334-1070 nm. With the Femtolasers system, the second and third harmonics of the fundamental pulses were used to generate a probe supercontinuum between 270-690 nm and excitation at 266 and 400 nm. A sample solution in an optical flowing cell (0.3 mm thick, absorbance $A \sim 0.8$) was excited at 266 or at 400 nm (1-3 μJ , 80 Hz) and probed in the range 270-1070 nm. The pump and probe spot size at the sample are 150 μm and 100 μm , respectively. The spectrally dispersed probe was recorded with a photodiode array (512 pixels). The pump-probe cross-correlation was about 100 fs over the full spectral range. The transient absorption spectra $\Delta A(\nu, t)$ were corrected for the chirp of the supercontinuum and for the solvent signal. [61] The spectra were recorded in 6, 20, 60 and 100 fs steps with parallel and perpendicular pump-probe polarization or at magic angle.

The nanosecond transient absorption setup (Applied Photophysics) utilized the output from a frequency tripled (355 nm) or quadrupled (266 nm) pulsed Nd:YAG (Innolas) to excite the sample with 70 mJ, 15 ns, 1 Hz. The pump beam of 1 cm diameter is directed into the sample (a standard 3.5 mL cuvette) at right angle to the probe beam. Accurate measurements of absorbance changes require a high intensity pulsed xenon lamp (150 W, 1.5 ms) as a probe source. The central part of the probe pulse has a 400 μs flat plateau. For probe times $t > 400 \mu\text{s}$ the lamp was used in continuous mode. The laser pulse width together with the instrument response of photomultiplier and digitizer limit the time-resolution to 20 ns. An optical path with apertures is used to maximize the probe signal and to minimize the scattered and stray light. Behind the sample the probe light is dispersed by a grating monochromator (R928, 250-800 nm) for wavelength selection. The output signal is registered by a photomultiplier, digitized by an oscilloscope (Agilent Infinium) and collected with a spectrometer workstation

(Iyonix). Typically 20 laser pulses are used to record a kinetic trace at a selected wavelength, and 600-800 pulses are necessary to reconstruct transient spectra from the kinetics.

For quasistationary photoreduction measurements typical protein concentrations of 2 μM in triple distilled water is used. The samples are purged with dry nitrogen to remove dissolved oxygen from the solutions. The cuvettes are sealed with wax directly afterwards. The protein solutions are irradiated with laser light at different wavelengths. In the visible range a standard dye laser (Lambda Physik, FL 2002) pumped by a Nd:YAG laser (Spectra Physics, Quanta Ray Indy, 10 ns, 10 Hz) is used. UV light is generated by frequency-doubling the dye laser output. To calculate the number of absorbed photons, the laser energy is measured before and behind the sample. Complete chemical reduction ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) of Cyt c is achieved by adding an excess of sodium ascorbate (Sigma) to the sample solution. Absorption spectra of Cyt c before and after reduction are recorded with a Cary 100 (Varian) spectrophotometer. The band analysis of the spectra is accomplished with an Answer 42 program [66].

8.4. Results and discussion

8.4.1. Stationary spectroscopy of Cyt c

In order to distinguish between oxidized and reduced Cyt c, stationary absorption spectra are presented in Fig. 8.1. Here the green line shows the absorption spectrum of a freshly prepared 2 μM solution of Cyt c at pH 7.4. The iron atom is assumed to be completely oxidized under these conditions. The spectrum shows two bands in the range 350-600 nm, the Soret-band at 409 nm and the Q-band at 530 nm. Subsequently the chromophore is completely chemically reduced with sodium ascorbate, resulting in the absorption spectrum shown in black. The Soret-band of the reduced form is red-shifted by 5 nm and the Q-band splits in two bands at 520 and 550 nm. The inset shows the absorption spectra upon laser-induced reduction at 277 nm, measured at increasing irradiation times. The bands at 520 and 550 nm are used for time-resolved analysis of Cyt c photoreduction.

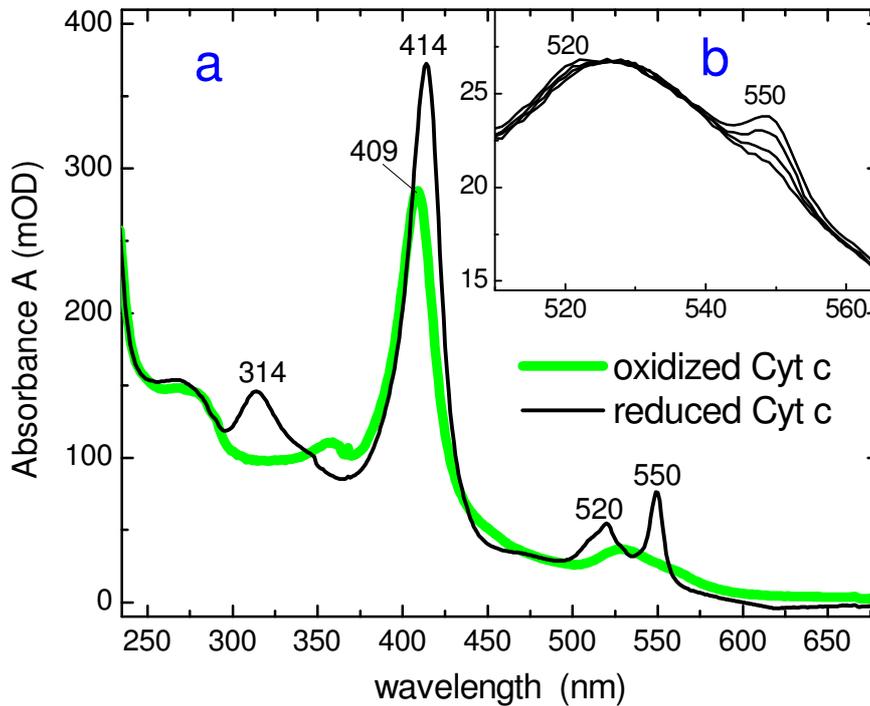


Fig. 8.1: (a) Stationary absorption spectra of completely oxidized (thick green) and completely reduced (thin black) Cyt c. The sample concentration is $2 \cdot 10^{-6}$ M. (b) Photoreduction upon laser excitation at 277 nm is seen as growing signal at 550 nm with increasing irradiation time: 0, 5, 300 and 600 s.

8.4.2. Femtosecond measurements

Fig. 8.2 shows femtosecond transient absorption spectra $\Delta A(\lambda, t)$ from neat water (thick green) and from oxidized Cyt c in water (thin black) upon excitation at 266 nm. Pump-probe delays t from 0.12 to 32 ps are indicated. Note that negative ΔA correspond to bleaching or stimulated emission while positive ΔA originate from excited-state absorption [61-64]. A broad band at 750 nm stems from solvated electrons generated in water by UV light. The water contribution has to be subtracted to isolate the spectra from Cyt c, which are shown in Fig. 8.3. The earliest spectrum at 0.12 ps (black) is dominated by bleach bands at 409 and 530 nm since the ground-state population of the porphyrin chromophore was diminished by UV excitation. This is because the aromatic amino acids and the porphyrin system absorb at 266 nm [67], so that UV excitation leads to bleaching of both the Soret- and Q-bands. Excited-state absorption is seen in the transient spectra as positive signal at 420-480 nm and below 380 nm.

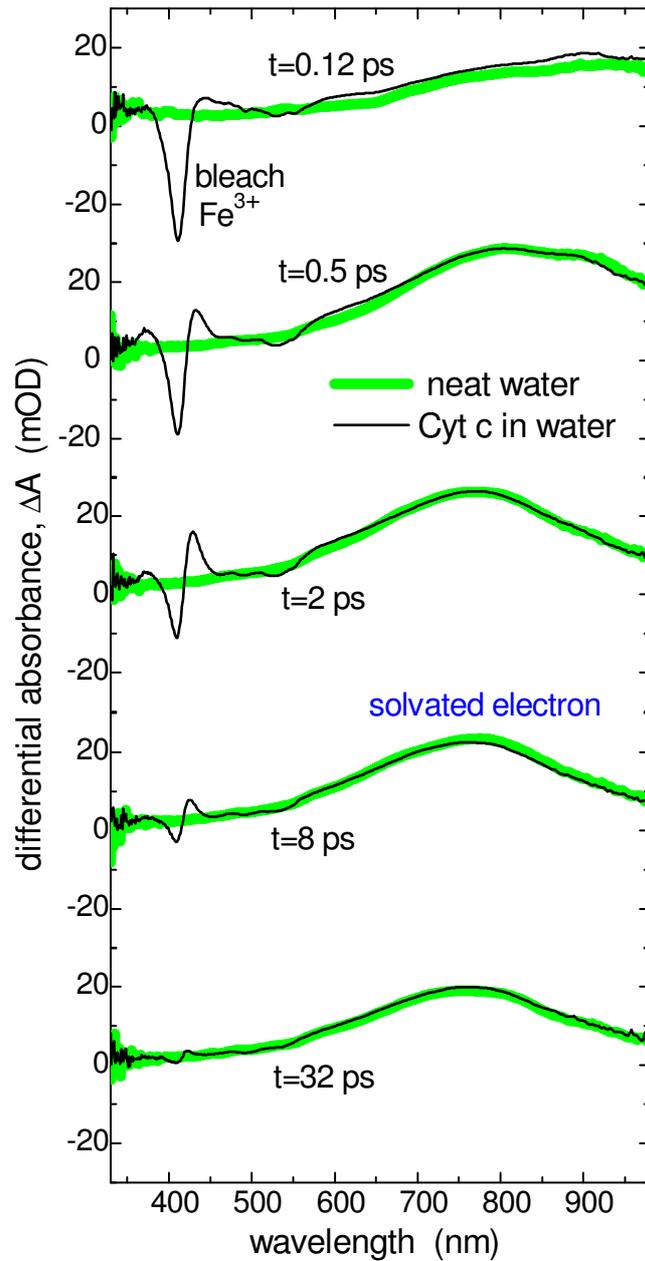


Fig. 8.2: Femtosecond transient absorption spectra $\Delta A(\lambda, t)$ in the range 340-1000 nm upon 266 nm excitation from neat water (thick green) and from oxydized Cyt c in water (thin black). Pump-probe delays t are indicated. A broad absorption band at about 750 nm stems from solvated electrons generated in water by UV excitation.

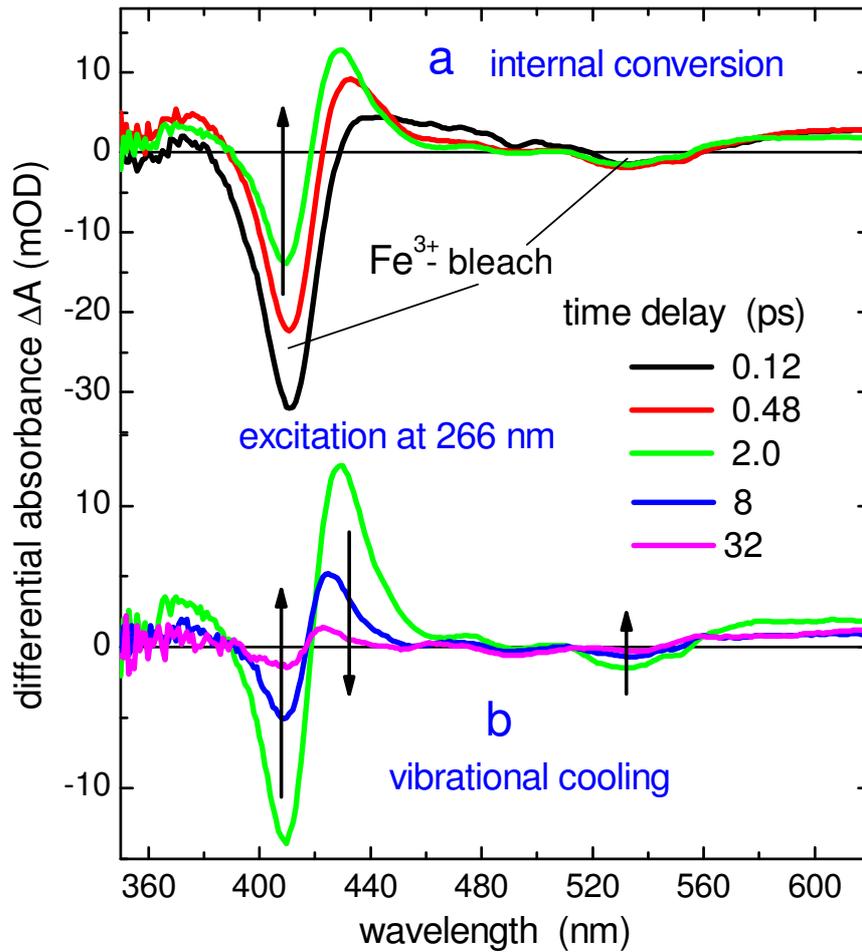


Fig. 8.3. Femtosecond transient absorption spectra $\Delta A(\lambda, t)$ of oxidized Cyt c upon 266 nm excitation. The solvent contribution to ΔA is subtracted. The signal evolution is indicated by vertical arrows. (a) The earliest spectrum at 0.12 ps (black) shows intense bleaching of the Soret band at 409 nm. The bleach signal decays with $\tau_1=0.3$ ps reflecting internal conversion to the ground electronic state. (b) Subsequent decay of the signal corresponds to vibrational cooling of the chromophore with $\tau_2=4$ ps. After 2 ps (green spectrum) the spectral shape around the Soret band is similar to the shape of the hot stationary differential spectra in Fig. 8.12a.

For comparison, Fig. 8.4 shows the transient spectra $\Delta A(\lambda, t)$ of oxidized Cyt c upon 403 nm excitation. Interestingly, the spectral evolutions upon UV and visible excitation are very similar. Only the earliest bleach signal (at 0.1 ps, black) is by an order of magnitude larger for the excitation at 403 nm (strong resonance absorption) compared to the excitation at 266 nm (low absorption). Also note a weak spectral feature at 550 nm which is seen more clearly after 2 ps. It originates from a small amount of photoreduced Cyt c as discussed below.

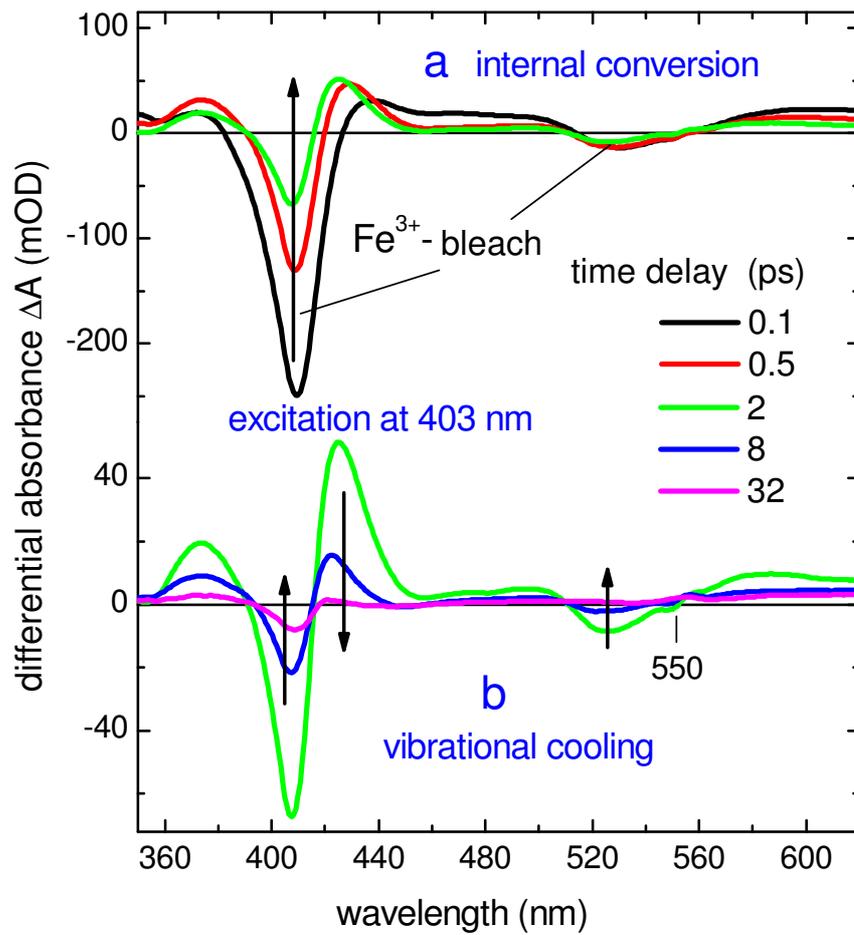


Fig. 8.4: Femtosecond transient absorption spectra $\Delta A(\lambda, t)$ of oxidized Cyt c in water upon 403 nm excitation. The evolution shows ultrafast internal conversion with subsequent ground-state vibrational cooling, similar as for 266 nm excitation in Fig. 8.3. With 403 nm excitation, the bleach band around 410 nm is ~ 10 times more intense than in Fig. 8.3 because of resonant pumping of the intense Soret band.

It can be seen from Figs. 8.3a and 8.4a that the bleach band around 409 nm decays on a sub-picosecond time scale. This decay is ascribed to internal conversion to the electronic ground state. This assignment follows from comparison with hot stationary differential spectra of oxidized Cyt c in Fig. 8.12a. Internal conversion results in a vibrationally-hot ground state which cools down on a picosecond time scale (Figs. 8.3b, 8.4b) due to interactions within the protein and with water. However until the cooling is complete, these hot transient spectra should be similar to hot stationary differential absorption spectra [62]. Indeed, the comparison shows that the shape of the transient spectra around 410 nm in Figs. 8.3b, 8.4b clearly reproduces the shape of hot stationary spectra in Fig. 8.12a.

A quantitative description of the observed evolution can be obtained with suitably chosen band integrals [62]

$$BI(\lambda_1, \lambda_2) = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \Delta A(t, \lambda) d\lambda / \lambda. \quad (7)$$

Thus to monitor internal conversion a broad integral over all bands has to be taken [BI(380,580)]. Alternatively, to characterize vibrational cooling a narrow integral BI(420,480) covering only the hot band should be used. The reason for such a choice is explained in detail in Ref. [62].

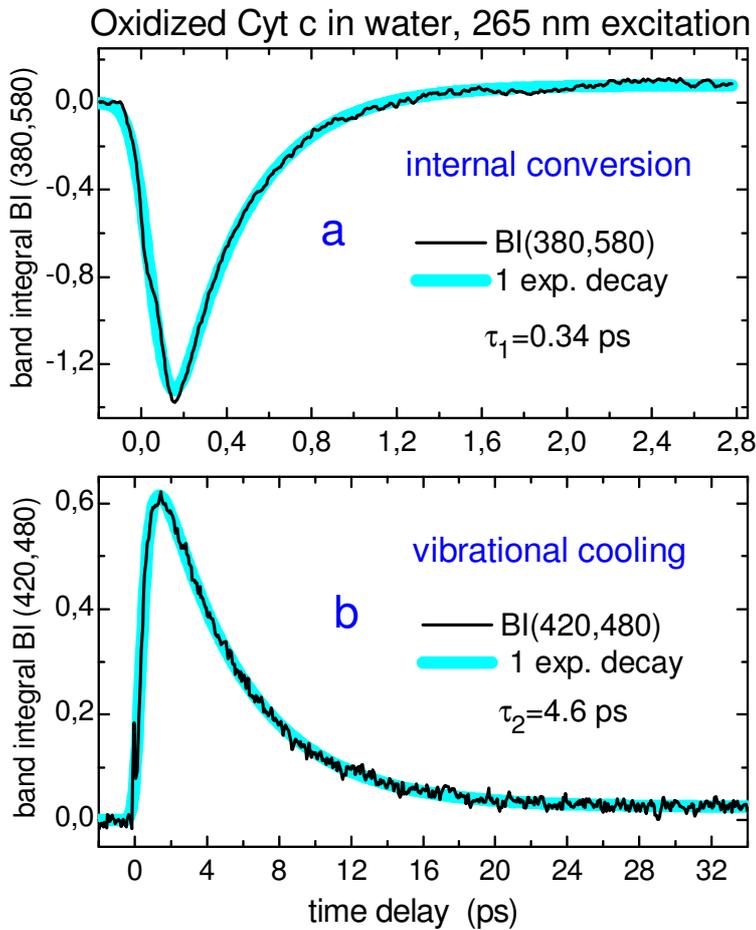


Fig. 8.5: Kinetics of internal conversion (a) and of ground-state vibrational cooling (b) in oxidized Cyt c upon 266 nm excitation, as given by band integrals $BI(\lambda_1, \lambda_2) = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \Delta A(t, \lambda) d\lambda / \lambda$. A broad integral BI(380,580) over the two bleach bands characterizes internal conversion, and narrow BI(420,480) over the red tail of the hot band reflects the cooling of the chromophore.

Briefly, heating up of a probe molecule results in a spectral shift (usually red-shift) and broadening of the corresponding absorption band, however this does not change its oscillator strength (the area under the band). Consequently a broad integral (which completely covers the absorption band) is insensitive to molecular temperature and reflects only the population dynamics. In the present case BI(380,580) mirrors internal conversion from the excited to ground electronic state. When internal conversion is finished this integral approaches zero (see Fig. 8.5a) because then the bleach and hot ground-state absorption just cancel each other in the differential transients. In contrast, the narrow integral BI(420,480) over merely the hot band is sensitive to a blue shift and band-narrowing (caused by cooling) and therefore it reflects the cooling dynamics of a molecular probe [62]. The evolutions of the two aforementioned band integrals are shown in Fig. 8.5. It follows from the fits (cyan) that internal conversion occurs with $\tau_1=0.34$ ps, and vibrational cooling proceeds with $\tau_2=4.6$ ps. (Note that similar relaxation times have been previously reported for 530 nm excitation [22].)

Importantly, there is no apparent indication of the photoreduction bands at 520 and 550 nm in Figs. 8.3 and 8.4. Instead, we observe ultrafast internal conversion upon electronic excitation of the heme group. Therefore it seems unlikely that the chromophore attracts an electron and is reduced to an appreciable extent within its excited state lifetime. However, ground-state thermally-activated reduction may still occur on a 10 ps scale, when the chromophore is being hot. We therefore looked more carefully at late spectra after 20 ps. At that time the vibrational cooling is complete, the chromophore is cold, and small signals from the reduced form should be better visible. Fig. 8.6a displays the transient spectra averaged over a 29-59 ps range. For comparison a difference stationary spectrum $\Delta A=A(\text{Fe}^{2+}) - A(\text{Fe}^{3+})$ (reduced spectrum minus oxidized one) is shown by Fig. 8.6b. As can be seen the characteristic bands at 550, 417 and 314 nm of reduced Cyt c are clearly reproduced in the late spectra both for UV and visible excitation. The comparison results in the photoreduction yields (number of reduced molecules divided by number of photoexcited ones) $\phi_{403}=0.016$ and $\phi_{266}=0.08$ for 403 and 266 nm excitation. We calculate the yields as follows. First the 409 nm absorption in Fig. 8.1 is scaled to the bleach band intensity at 409 nm in Fig. 8.4a ($\Delta A=0.3$ at $t=0.1$ ps). Then the absorption spectrum of the reduced form is accordingly scaled with the same factor. The difference spectrum of these scaled spectra is just reproduced in Fig. 8.6b and corresponds to the expected transient spectrum for 100 % reduction. The reduction yields are obtained then from the ratio of the intensities at 554 nm in Fig. 8.6a and 550 nm in Fig. 8.6b, or similarly of the intensities at 320 nm (Fig. 8.6a) and 314 nm (Fig. 8.6b).

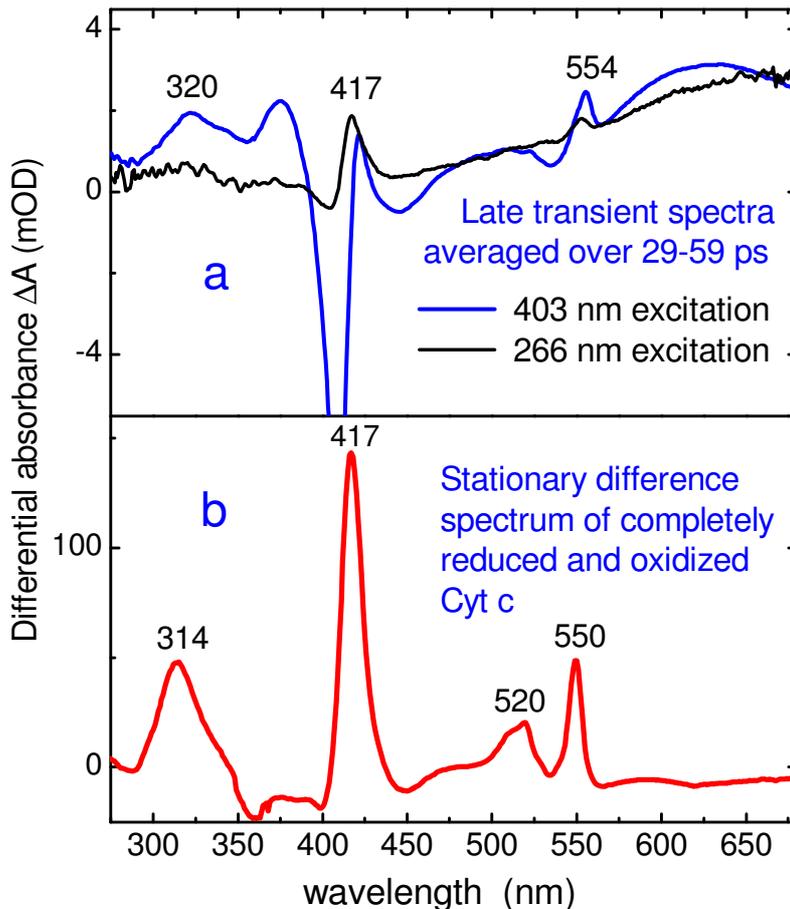


Fig. 8.6: (a) Late femtosecond spectra of oxidized Cyt c in water, averaged over a pump-probe delay 29-59 ps, for a 403 (blue) and 266 nm (black) excitation. Spectral features at 554, 417 and 320 nm indicate the presence of the reduced form, as seen from comparison with a stationary difference spectrum of completely reduced and oxidized Cyt c (b).

Thus time-averaging over the late transient spectra allows us to detect and measure the photoreduction yields. A further interesting question is whether it is possible to trace quantitatively the accumulation of the reduced form? This is an important question since in case of thermal ET one expects the development on a few picosecond scale (when the ground-state chromophore remains hot), while for the excited-state reduction the signal should appear much faster, on a sub-picosecond time scale. To handle this problem let us concentrate on the probe region 470-590 nm around the Q-band, as shown in Fig. 8.7. Here the experimental transient spectra (thick green) are fitted with lognormals (thin black) to separate the spectral features corresponding to reduced Cyt c. The fits are assumed to describe the spectral behavior related only with bleaching and vibrational cooling but not with the reduction process. The difference between the experimental spectra and fits corresponds then to the required photoreduction signal $\Delta\Delta A$. Note that $\Delta\Delta A$ in Fig. 8.7 stays nearly constant between

$t=0.1$ and 1 ps, whereas at $t=10$ ps it changes substantially. Hence the main development occurs on a picosecond time scale. This can be quantitatively seen with an integral BI(545,555) around the band peak. The evolution of this integral is shown in Fig. 8.8 for 403 and 266 nm excitation. It can be seen from the fits (cyan) that the signal develops with 5-6 ps both for visible and UV excitation, in agreement with the thermal ground-state ET mechanism. There is a fast component at 266 nm ($\tau_1=0.4$ ps) so that we cannot exclude a minor contribution of ET in the electronically excited state for the UV excitation. Generally however the two photoinduced evolutions (for 403 and 266 nm excitation) look quite similar.

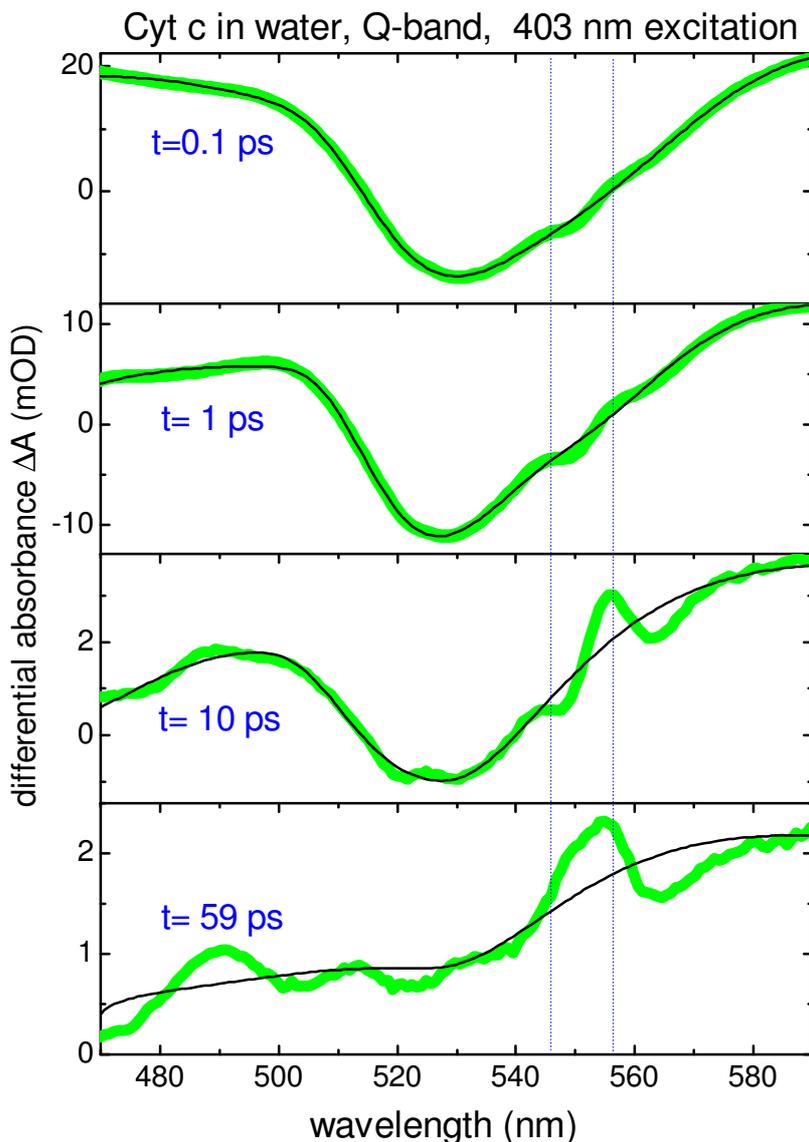


Fig. 8.7: Transient spectra (green) of oxidized Cyt c around the Q-band upon 403 nm excitation. Lognormal fits (black) are assumed to reflect the evolution due to internal conversion and cooling only, except the contribution from photoreduced Cyt c. The latter contribution is given by a difference $\Delta\Delta A$ between the experimental and fitted spectra. The behavior of $\Delta\Delta A$ can be analysed with a band integral BI(545,555) (within blue borders).

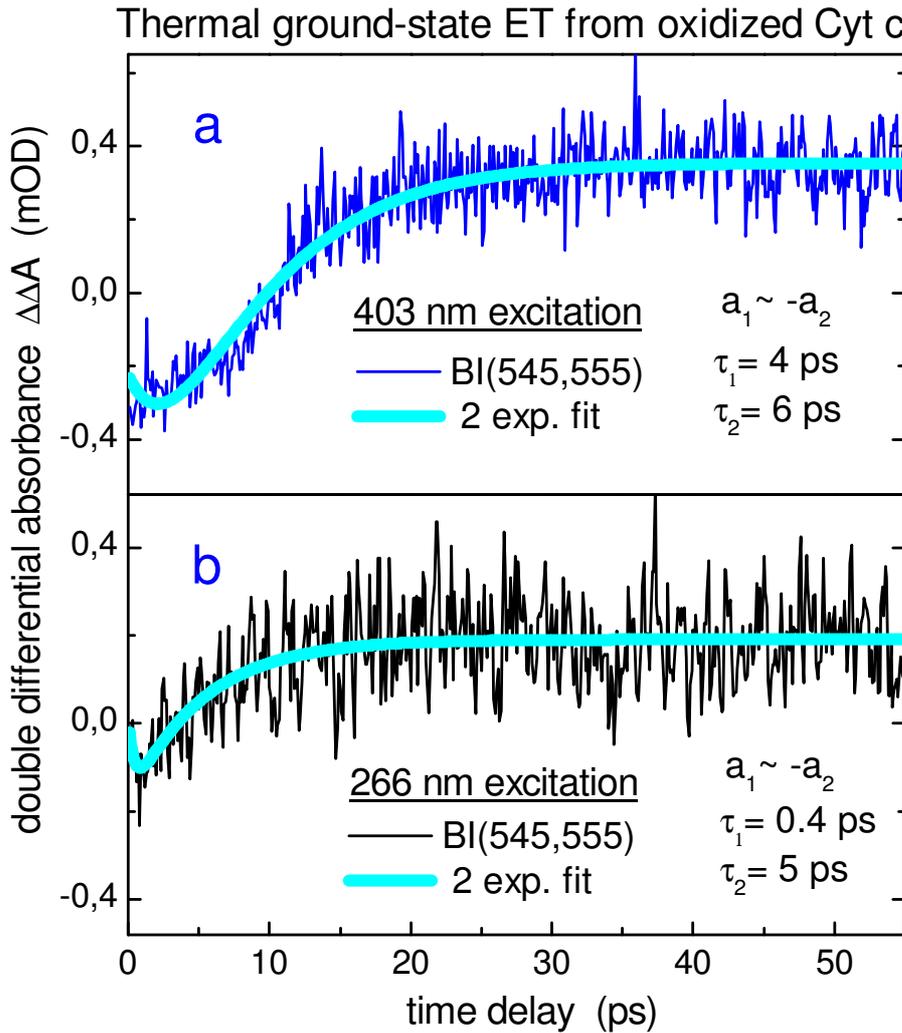


Fig. 8.8: Photoreduction of oxidized Cyt c upon 403 nm (a) and 266 nm excitation (b). The reduction process is reflected by a band integral BI(545,555) for the signal $\Delta\Delta A$ derived from Fig. 8.7. The integral signal develops on a 10 ps time scale both for UV and visible excitation, as expected for a thermal ground-state ET mechanism.

The rate of ET $k_{ET} = A \exp(-E_A^f / kT)$ depends on the chromophore temperature T and hence on the excitation wavelength, allowing to evaluate the forward reaction barrier E_A^f . Our calculations, similar as in Ref. [68], result in $T_{266}=1070$ K and $T_{403}=850$ K for 266 and 403 nm excitation. Furthermore in our case, the ET rates can be simply related to the yields, $k_{266} = \phi_{266} / \tau_2$, $k_{403} = \phi_{403} / \tau_2$, $k_{266} / k_{403} = \exp(E_A^f / kT_{403} - E_A^f / kT_{266})$, which gives $E_A^f = 55 \pm 4$ kJ/mol and $A = 9.6 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$. Notice that the obtained value for the Arrhenius factor A is typical for thermally-activated reactions.

Forward ET from the hot chromophore takes place mainly during the characteristic time τ_2 of vibrational cooling. It results in excess population of the reduced form (at ambient

temperature). This excess population should relax back on a mikrosecond time scale (assuming the back and forward barrier are similar). This prediction can be checked with nanosecond measurements.

8.4.3. Nanosecond measurements

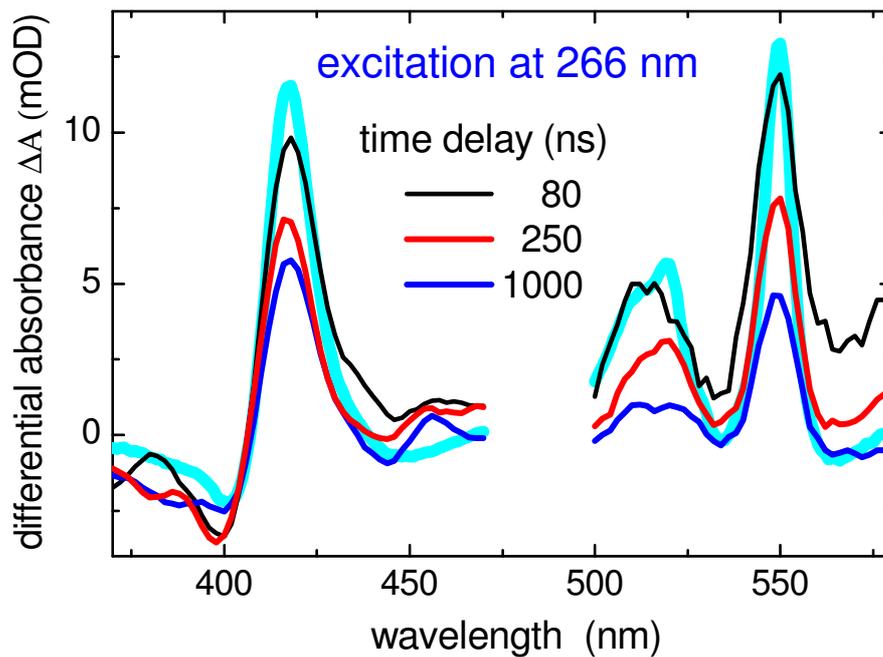


Fig. 8.9: Nanosecond transient absorption spectra of oxidized Cyt c upon excitation at 266 nm. Back ET $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ to the oxidized form is observed as decay, with $\tau_3 = 0.5 \mu\text{s}$, of the characteristic bands of reduced Cyt c at 417 and 550 nm. The differential stationary absorption spectrum of the reduced and oxidized form is shown for comparison by cyan.

Fig. 8.9 shows nanosecond transient spectra upon excitation at 266 nm. Because of its high absorption the Soret band (370-470 nm) was measured at a $1 \mu\text{M}$ concentration, while the Q-band (500-580 nm) was measured at $2 \mu\text{M}$. Within the 20 ns instrument response the transient absorption increases at 420 and 550 nm, qualitatively similar as in the femtosecond experiment. In the range 500-580 nm the peaks at 520 and 550 nm of reduced Cyt c are clearly discernible. The nanosecond spectra are in agreement with the stationary difference spectrum of the reduced and oxidized form (cyan curves in Fig. 8.9). Hence, photoreduction

clearly contributes to the nanosecond signal. The absorption decay at 550 nm can be fitted monoexponentially to a lifetime $\tau_3=495$ ns, as shown in Fig. 8.10. At 420 nm the signal decays with a similar 510 ns time constant (not shown). Both times are in close agreement and can be assigned to back ET: $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{e}^-$. At longer pump-probe delays, the signal does not go to zero up to 0.5 s, indicating that some of the reduced Cyt c remains stable. Following the procedure described in Section 8.4.5 we calculate photoreduction yields (number of reduced molecules divided by number of absorbed photons) $\phi=0.1$ at 20 ns and $\phi=0.05$ at 2 μs . The yield at 2 μs is in fair agreement with the quasistationary yield of 0.04 obtained at 266 nm with low irradiation intensities (see Fig. 8.13b). The value at 20 ns agrees reasonably well with the corresponding quantum yield of the femtosecond experiment.

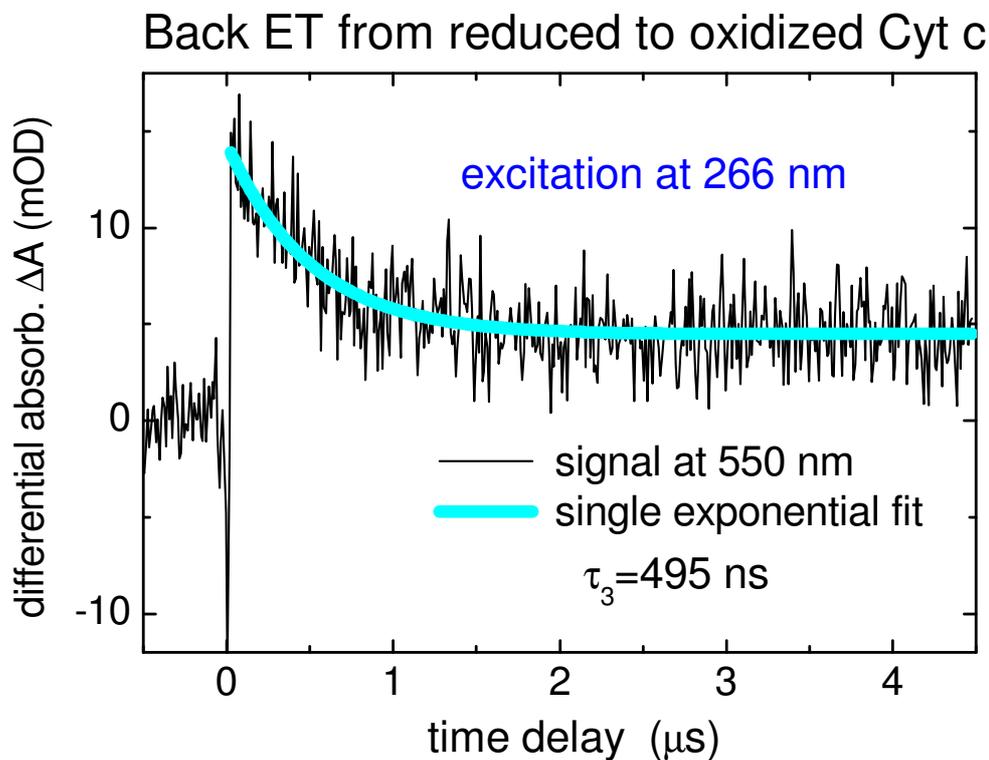


Fig. 8.10: Back ET from reduced to oxidized Cyt c upon nanosecond excitation at 266 nm at 297 K. The signal at 550 nm (Q-band) decays monoexponentially with a time constant $\tau_3=0.5$ μs . After a 2 μs delay the residual signal is constant on a second timescale, indicating a contribution from stable reduced Cyt c.

To determine an activation barrier E_A^b for back ET we performed temperature-dependent transient measurements. Fig. 8.11 shows the Arrhenius plots for the Q- and Soret band. When

using the Q-band one obtains $E_A^b=33$ kJ/mol. Together with the forward barrier $E_A^f=55$ kJ/mol from the femtosecond experiment, this gives a guess of the reaction energy $\Delta E=22$ kJ/mol. Furthermore, one can estimate the equilibrium constant at $T_a=295$ K, $K_{eq} = \exp(-\Delta E/kT_a) = 1.2 \cdot 10^{-4}$ (neglecting entropy contributions). Hence, at normal conditions (and without light action) the ET equilibrium is strongly shifted to the oxidized form of Cyt c, which explains its apparent stability. Once reduced Cyt c is produced by photoexcitation part of the electrons transfer back but not all as Fig. 8.10 shows. Therefore several reaction paths may exist for back ET with different kinetics and thermodynamic.

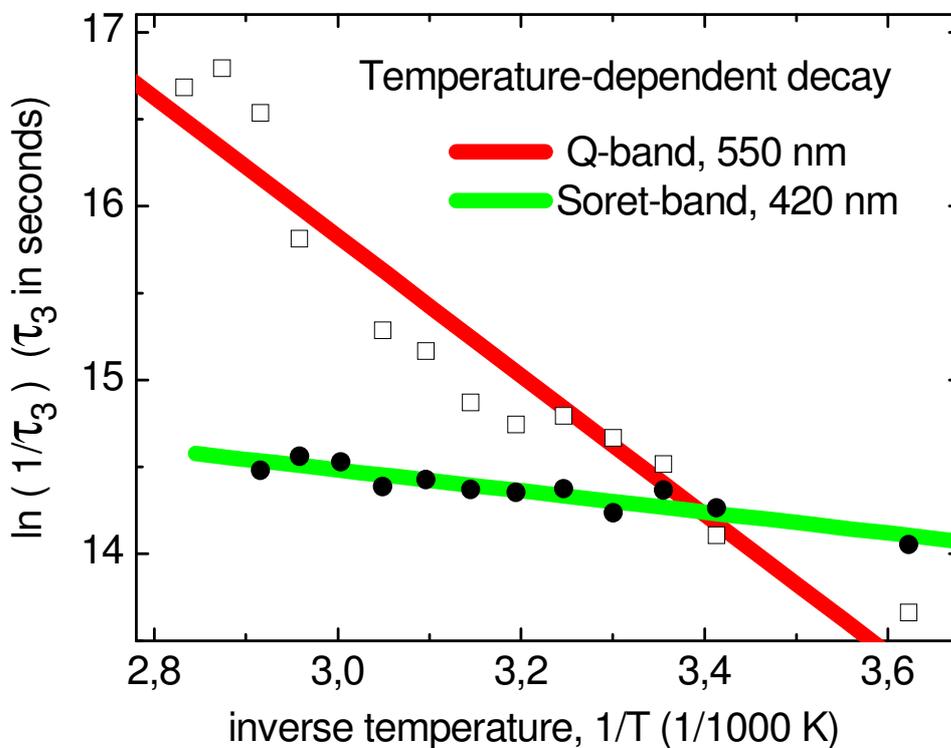


Fig. 8.11: Arrhenius plot of the back ET rate $\ln(1/\tau_3)$ (τ_3 in seconds) from reduced to oxidized Cyt c, measured with the Q-band (red) and Soret-band (green). Only the Q-band is used to determine an activation energy $E_A^b=33$ kJ/mol for thermal back ET, see text.

Coming back to Fig. 8.11, note that the Arrhenius plot for the Soret band shows only a weak temperature dependence. We varied the concentration of Cyt c in the absorbance range 0.8-0.1 at the absorption peak to check if high absorbance influences our measurements. However we consistently observed the same results. A possible reason for such anomalous behavior is discussed in the next section.

8.4.4. Temperature-dependent stationary absorption spectra

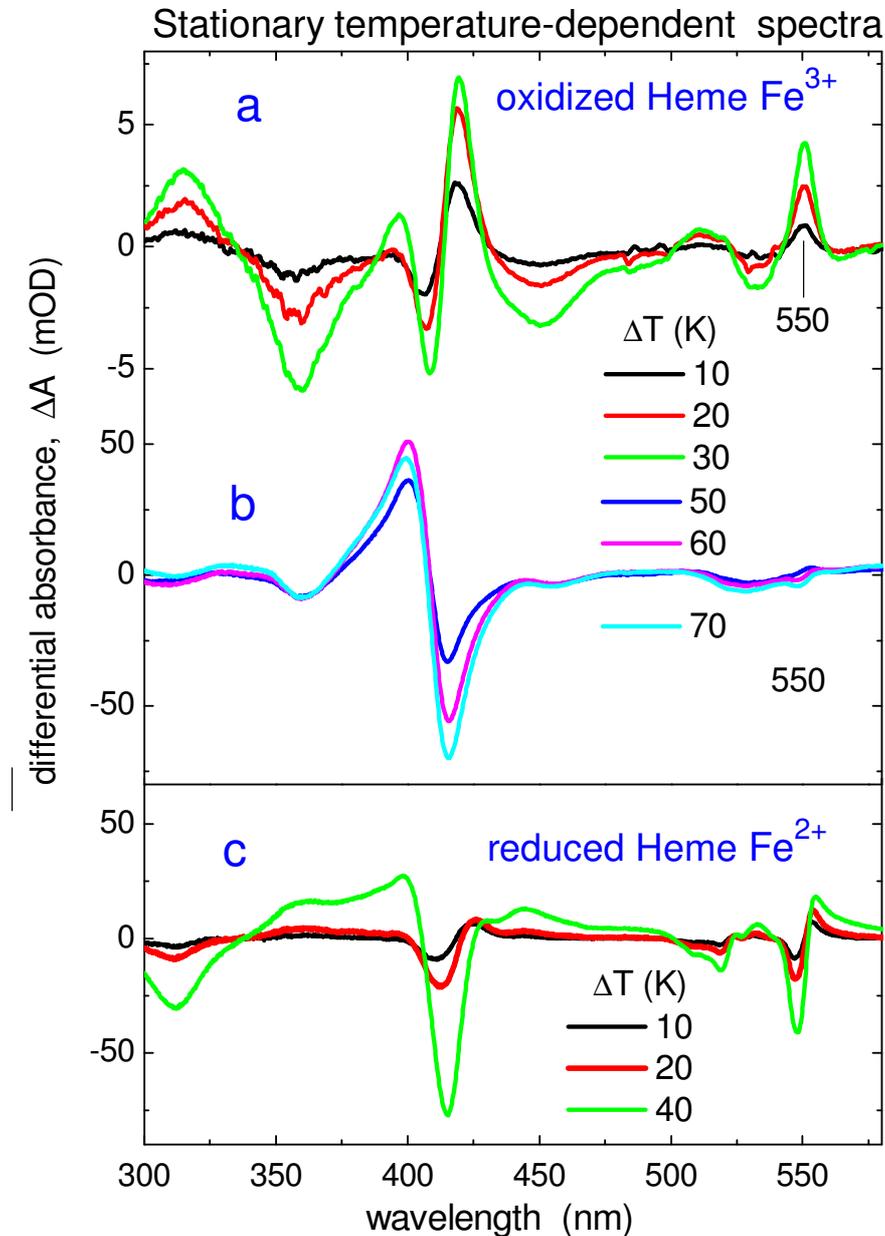


Fig. 8.12: Temperature-dependent stationary differential absorption spectra $\Delta A = A(T) - A(283)$ for oxidized Cyt c (a, b) and for reduced Cyt c (c), calculated relative to the spectrum at $T = 283$ K. At small $\Delta T = 10$ -30 K the spectra for the oxidized form (a) are similar to hot transient absorption spectra observed in femtosecond measurements (Figs. 8.3, 8.4, 8.6). At higher $\Delta T = 50$ -70 K (b) the spectra change their shape dramatically, possibly because of thermal-induced partial defolding of Cyt c.

To shine more light on the temperature dependence of the heme reduction we monitored stationary absorption spectra of oxidized and reduced Cyt c in the temperature range 283-353 K. The resulting differential spectra $\Delta A = A(T) - A(T_a)$, relative to the absorption spectrum at $T_a = 283$ K, are displayed in Fig. 8.12. At low temperature differences, $\Delta T = 10-30$ K (Fig. 8.12a), the spectra of the oxidized form show a characteristic shape with positive hump at the red tail and negative valley at the blue tail of an absorption band (because of red-shift and broadening at higher temperatures). In addition one can see a contribution from reduced Cyt c, as a growing peak at 520 nm, which means that already a modest temperature rise leads to a thermal reduction of the heme group.

At higher temperatures, $\Delta T = 50-70$ K (Fig. 8.12b), the differential spectra change dramatically. The signal around the Soret band is now completely inverted (due to a blue shift), resembling the signal from hot reduced Cyt c (Fig. 8.12c). Such anomalous behavior can be attributed to a change of heme ligation due to dissociation of histidine-18 at higher temperatures where it does not coordinate the iron atom anymore. A similar blue shift of the Soret band is observed at pH=2 where His18 is protonated so that the Fe...N(His18) interaction gets repulsive [4]. Hence, various factors influence the Soret-band which is therefore not suitable for kinetic analysis of heme reduction.

It follows from the previous discussion that femtosecond and nanosecond transient measurements strongly support a thermal ground-state reduction mechanism. In this case quasistationary reduction yields should rather depend on the total amount of absorbed energy than on specific irradiation wavelengths, i.e. excitation of the aromatic acids and porphyrin system should lead to similar results. We therefore studied the yields of Cyt c photoreduction as function of irradiation wavelength at quasistationary conditions.

8.4.5. Quasistationary measurements of Cyt c photoreduction

For accurate calculation of the stationary reduction yields, the spectra in Fig. 8.1 are analysed with the help of the program Answer 42 [66]. The Q-band is fitted by a Gaussian centered at 530 nm for the oxidized form, and accordingly by two Gaussians at 520 and 550 nm for the reduced form. A solution of oxidised Cyt c was reduced by pulsed laser light at 277 nm (1.5 mJ, 15 ns, 10 Hz) with increasing irradiation time: 0, 5, 300 and 600 s (Fig. 8.1b). To determine the absolute concentration of the reduced form the areas under the Gaussians at 520

and 550 nm are compared with the areas of the corresponding bands for completely chemically reduced Cyt c.

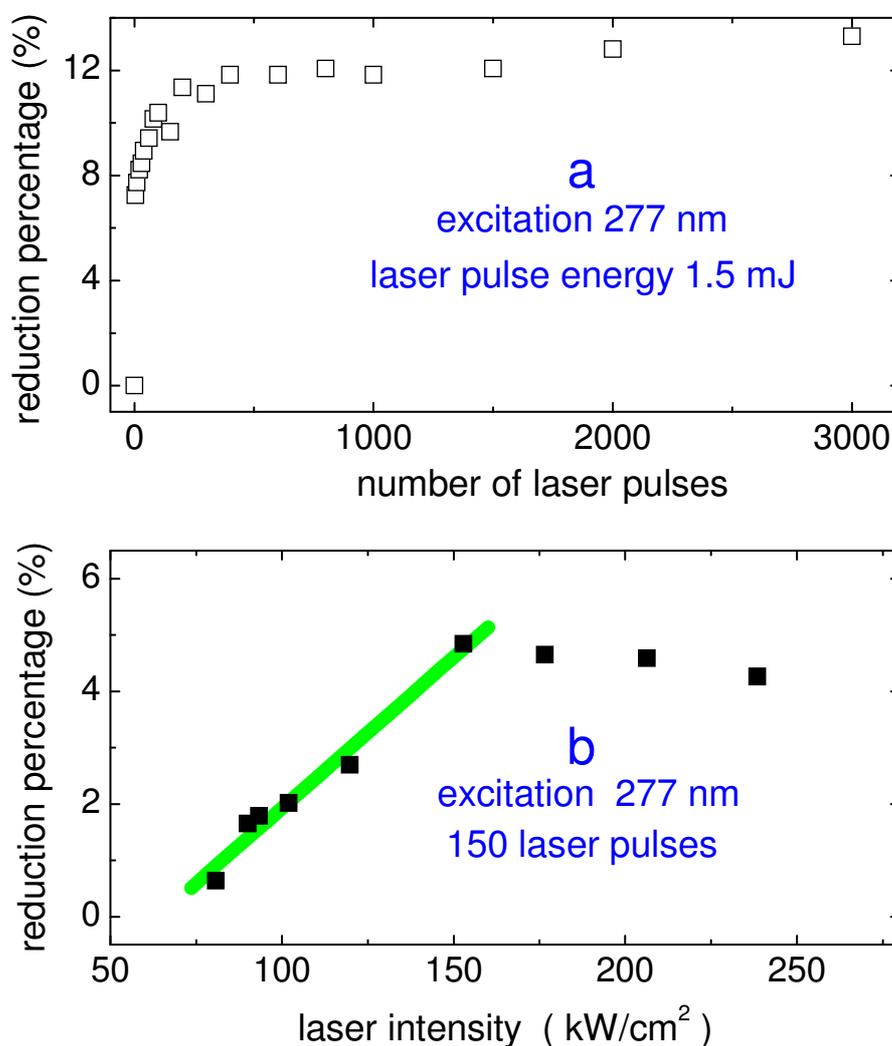


Fig. 8.13: (a) Percentage of reduced Cyt c (number of reduced molecules divided by total number of molecules) irradiated at 277nm at the indicated number of laser pulses: (a) as function of the number of laser pulses at 125 kW/cm^2 irradiation intensity; (b) as function of the irradiation intensity at 150 laser pulses, the photoreduction starts at a threshold of 60 kW/cm^2 .

The percentage of reduced Cyt c (number of reduced molecules divided by total number of molecules) is shown in Fig. 8.13a as function of the number of laser pulses (or irradiation time), measured with a 1.5 mJ pulse energy. For short irradiation (60 pulses or 6 seconds) reduction increases linearly and then shows saturation at the level of 12% reduction. This saturation may be explained by back ET to hitherto unknown positions in Cyt c which competes with the photoreduction process at higher concentration of reduced Cyt c. A similar dependence on the irradiation time has been found by Gu et al. [19]. They reached a reduction

yield of 60% by using a cw laser at 334.5 nm and less reduction at shorter excitation wavelengths. Fig. 8.13b represents the reduction percentage as function of the laser pulse energy. The irradiation time here is fixed at 150 laser pulses to preserve the linear behaviour in Fig. 8.13a. Notice that the photoreduction process has a threshold of 60 kW/cm^2 . The reduction percentage increases linearly with the irradiation intensity up to 150 kW/cm^2 and then shows again saturation behaviour.

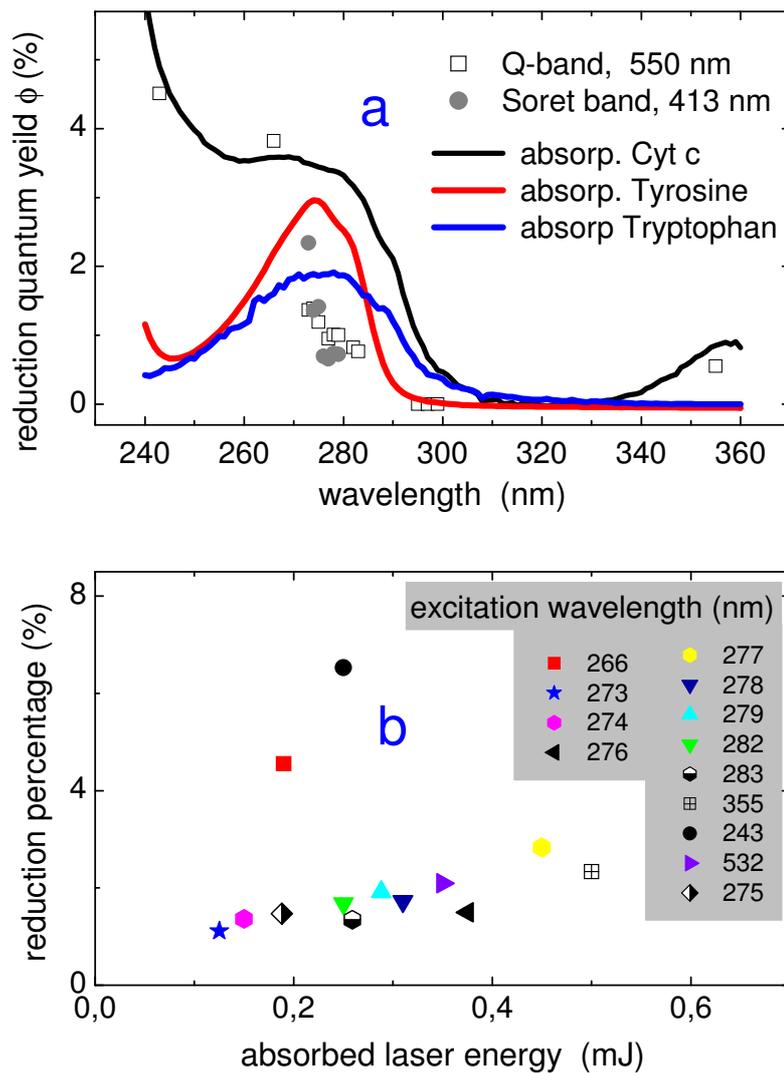


Fig. 8.14: (a) Quasistationary quantum yield ϕ (symbols) of photoreduction as function of the excitation wavelength at 1.5 mJ excitation laser pulse energy. The data are obtained from analysis of the Q- and Soret-band. Colored curves show the absorption spectra of Cyt c (black), Tyrosine (red) and Tryptophan (blue). (b) The percentage of reduced molecules obtained with 20 laser pulses increases nearly linearly with the absorbed laser energy, independent of the excitation wavelength. At $\lambda=243$ and 266 nm however the number of reduced molecules is substantially higher than expected from this plot.

Fig. 8.14a displays the wavelength dependence of the photoreduction quantum yield ϕ defined as the number of reduced molecules $N_{\text{Fe}^{2+}}$ divided by the number of absorbed photons N_{abs}

$$\phi = \frac{N_{\text{Fe}^{2+}}}{N_{\text{abs}}} = \frac{c_r \cdot V_k \cdot N_A \cdot c \cdot h}{E_{\text{abs}} \cdot Z \cdot \lambda} \quad (8)$$

Here c_r is the concentration of reduced Cyt c, $V_k=3.5$ mL is the sample volume, N_A , c and h are the Avogadro constant, light velocity and Planck constant, E_{abs} is the energy absorbed by the sample per laser pulse, Z is the number of pulses and λ is the irradiation wavelength. For these measurements the laser pulse energy is 1.5 mJ and the irradiation time is 2 s (20 pulses) to ensure linear dependence of the photoreduction percentage on the number of pulses. In addition, Fig.8.14a compares the photoreduction quantum yields from the Q- and Soret-bands to the absorption spectra (curves) of oxidized Cyt c, tryptophan and tyrosine, demonstrating their contribution to the total absorption. The yields are seen to strongly correlate with the absorption spectra, indicating that photoreduction depends solely on the absorbed energy. This is quantitatively confirmed with Fig. 8.14b which shows that the number of reduced molecules indeed increases with the absorbed laser energy quite linearly for $\lambda > 270$ nm. At $\lambda = 243$ and 266 nm however a marked increase of the photoreduction efficiency occurs. At these short wavelengths we cannot exclude some contribution from direct photoreduction in the electronically excited state as pointed out in Section 8.4.2. We checked for multiphoton effects at these short wavelengths but measured consistently that the number of absorbed photons is much less than the number of molecules in the irradiated volume at our laser energies.

Generally, photoreduction of Cyt c in quasistationary experiments in the visible and near UV spectral range [16-19,21] arises mainly from thermal ground-state ET, with bulk heating probably contributing at high irradiation intensities. Indeed, we observe that upon irradiation of Cyt c with a cw Ar⁺-laser at 351 nm and 364 nm, the reduction continues after switching off the light source as expected for reduction via bulk heating [69].

8.5. Conclusions

Our results show that UV or visible excitation of oxidized Cyt c is followed by an ultrafast 0.3 ps internal conversion, resulting in a hot ground-state chromophore. The chromophore then cools down with 4 ps due to interaction with the solvent and within the protein. Fe-Porphyrin reduction via thermal ET occurs within the first 10 ps upon photoexcitation when the chromophore is still hot in its ground electronic state. Back ET from reduced to oxidized Cyt c proceeds on a sub-microsecond time scale. We determine the reaction barriers $E_A^f=55$ kJ/mol and $E_A^b=33$ kJ/mol for forward and back ET. Nanosecond measurements with UV excitation demonstrate the presence of a stable fraction of reduced Cyt c if oxygen is excluded. The corresponding reaction path has still to be clarified in future studies.

We have compared experiments in the femtosecond, nanosecond and quasistationary time domain. The power densities ranged from 10^{11} W/cm² in the femtosecond experiments to 10^5 W/cm² in the nanosecond experiments, while the energy densities per laser pulse were typically a few tens mJ/cm² in both type of experiments. All the measurements agree that ultrafast internal conversion controls the photoreduction of Cyt c via the thermal ground-state ET mechanism.

Acknowledgements

This work is part of the Ph.D. thesis of Dennis Löwenich. We thank N.P. Ernsting for experimental and financial support and for critical discussions. V. Karunakaran and S. A. Kovalenko thank A. L. Dobryakov for help in the data analysis and N.P. Ernsting for support of this work.

9 Zusammenfassung

Die fluoreszenzspektroskopischen Messungen zur Proteinfaltung konnten zeigen, dass sowohl das Tryptophan (Trp-59) als auch das Porphyrinsystem zur Gesamtfluoreszenz von Cyt c bei einer Anregung von 280 nm beitragen. Ihre Anteile hängen dabei stark vom pH-Wert ab. Bei pH-Werten kleiner als 3 stammt die Fluoreszenz fast vollständig vom Tryptophan, während bei pH 3-7 der Anteil des Tryptophans nur bei etwa 20% liegt. Etwa 80% der Fluoreszenz stammen von Porphyrinsystem. Wenn also die Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt wird, um Faltungsmechanismen von Cyt c zu untersuchen, müssen die Fluoreszenzspektren zunächst entfaltet werden, um die Anteile von Tryptophan und Porphyrin zu bestimmen.

Die Experimente zur Untersuchung des Elektronentransfers zeigen, dass die UV/VIS-Anregung von oxidiertem Cyt c von einer ultraschnellen internen Konversion (0.3 ps) gefolgt wird. Dies führt zu einem Chromophor, der sich im heißen Grundzustand befindet. Der Chromophor kühlt anschließend aufgrund von Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel und dem Protein innerhalb von 4 ps ab. Die Reduktion des Eisen-Porphyrins erfolgt innerhalb der ersten 10 ps nach der Photoanregung hauptsächlich durch thermischen Elektronentransfer. Der Elektronen-Rücktransfer von reduziertem zu oxidiertem Cyt c erfolgt auf einer Nanosekunden-Zeitskala. Es konnten Reaktionsbarrieren von 55 kJ/mol für den Elektronen-Hintransfer und 33 kJ/mol für den Elektronen-Rücktransfer ermittelt werden. Die Transientenmessungen im Nanosekundenbereich sowie die stationären UV-Messungen zeigen, dass ein bestimmter Anteil an reduziertem Cyt c über längere Zeit stabil bleibt, wenn Sauerstoff ausgeschlossen wird. Jedoch ist der genaue Reaktionsweg noch nicht klar und soll in zukünftigen Experimenten untersucht werden. Alle Experimente im Femtosekunden- und Nanosekundenbereich sowie stationäre Untersuchungen stimmen dahingehend überein, dass ultraschnelle interne Konversion die Photoreduktion von Cyt c kontrolliert und die Photoreduktion über einen thermischen Elektronentransfer im Grundzustand stattfindet.

Transiente Messungen an Porphyrin-Modellsystemen konnten für drei verschiedene Modellsysteme Triplett-Triplett-Übergänge im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich nachweisen. Dabei konnte für alle drei Modellsysteme bei Ausschluss von Sauerstoff eine Lebenszeit im unteren Mikrosekundenbereich ermittelt werden. Messungen an Cyt c / Au – und Cyt c / Ag –Komplexen zeigten keine Photoreduktion. Hier konnte eine im Nanosekundenbereich stattfindende Photoreaktion gezeigt werden.

Conclusions

Fluorescence spectroscopy measurements on protein folding show that tryptophan (Trp-59) and porphyrin fluorescence both contribute to total fluorescence of Cyt c at an excitation wavelength of 280 nm. Their contributions depend on the pH. At pH < 3 the fluorescence originates nearly completely from the tryptophan residue while porphyrin fluorescence is very weak. At pH 3-7 porphyrin fluorescence contributes about 80 % to the total fluorescence, while tryptophan contributes about 20%. If the UV fluorescence of Cyt c is used to investigate folding and unfolding of Cyt c by time-resolved spectroscopy, it is necessary to deconvolute the contributions of porphyrin and tryptophan fluorescence.

Experiments on electron transfer show that UV or visible excitation of oxidized Cyt c is followed by an ultrafast 0.3 ps internal conversion, resulting in a hot ground-state chromophore. The chromophore then cools down with 4 ps due to interaction with the solvent and within the protein. Fe-Porphyrin reduction via thermal ET occurs within the first 10 ps upon photoexcitation when the chromophore is still hot in its ground electronic state. Back ET from reduced to oxidized Cyt c proceeds on a sub-microsecond time scale. Reaction barriers of $E_A^f=55$ kJ/mol and $E_A^b=33$ kJ/mol for forward and back ET were determined. Nanosecond measurements with UV excitation demonstrate the presence of a stable fraction of reduced Cyt c if oxygen is excluded. The corresponding reaction path has still to be clarified in future studies.

Experiments in the femtosecond, nanosecond and quasistationary time domain were compared. The power densities ranged from 10^{11} W/cm² in the femtosecond experiments to 10^5 W/cm² in the nanosecond experiments, while the energy densities per laser pulse were typically a few tens mJ/cm² in both type of experiments. All the measurements agree that ultrafast internal conversion controls the photoreduction of Cyt c via the thermal ground-state ET mechanism.

Transient measurements on porphyrin model systems showed triplet transitions in the UV and visible spectral range. All three model systems showed a triplet lifetime on the low microsecond time scale. Measurements on Cyt c / Au- and Cyt c / Ag complexes did not show photoreduction. A photoreaction on the nanosecond time scale was shown.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Maldotti, R. Amadelli, C. Bartocci, V. Carassiti, E. Polo, G. Varani, *Coord. Chem. Rev.*, **125** (1993), 143
- [2] C.R. Matthews, *Annu. Rev. Biochem.*, **62** (1993), 653
- [3] S.R. Yeh, S. Han, D.L. Rousseau, *Acc. Chem. Res.*, **31** (1998), 727
- [4] Y.L. Goto, J. Calciano, A.L. Fink, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87** (1990), 573
- [5] G.W. Bushnell, G.V. Louie, G.D. Brayer, *J. Mol. Biol.*, **214** (1990), 585
- [6] A.J. Wand, D.L. DiStefano, Y. Feng, H. Roder, S.W. Englander, *Biochemistry*, **28** (1989), 195
- [7] Y. Feng, H. Roder, S.W. Englander, *Biochemistry*, **28** (1989), 186
- [8] G.A. Elöve, A.F. Chafotte, H. Roder, M.E. Goldberg, *Biochemistry*, **31** (1992), 6876
- [9] T.Y. Tsong, *J. Biol. Chem.*, **249** (1974), 1988
- [10] T.Y. Tsong, *Biochemistry*, **15** (1976), 5467
- [11] D. Hamada, Y. Kuroda, M. Kataoka, S. Aimoto, T. Yoshimura, Y. Goto, *J. Mol. Biol.*, **256** (1996), 172
- [12] W.P. Vorkink, M.A. Cusanovich, *Photochem. Photobiol.*, **19** (1974), 205
- [13] B.S. Marinov, *Photochem. Photobiol.*, **44** (1986), 665
- [14] A. Ferri, D. Patt, P. Chiozzi, M. Cattozzo, C. Bartocci, A. Maldotti, *J. Photochem. Photobiol. B*, **2** (1988), 341
- [15] V. Gerasimenko, N. Sadovnikova, B.S. Marinov, *Studia Biophysica*, **120** (1987), 123
- [16] C. Bartocci, A. Maldotti, V. Carassiti, O. Traverso, *Inorg. Chem. Acta*, **107** (1985), 5
- [17] J. Pierre, M. Bazin, P. Debey, R. Santus, *Eur. J. Biochem.*, **124** (1982), 553
- [18] C. Bartocci, A. Maldotti, G. Varani, P. Battioni, V. Carassiti, *Inorg. Chem.*, **30** (1991), 1255
- [19] Y. Gu, P. Li, T. Sage, P.M. Champion, *J. Am. Chem. Soc.*, **115** (1993), 4993
- [20] C. Bartocci, A. Maldotti, O. Traverso, C.A. Bignozzi, V. Carassiti, *Polyhedron*, **2** (1983), 97
- [21] T. Masuda, A. Minemura, K. Yamauchi, M. Kondo, *J. Radiat. Res.*, **21** (1980), 149
- [22] M. Negreterie, S. Cianetti, M.H. Vos, J.L. Martin, S.G. Kruglik, *J. Phys. Chem. B*, **110** (2006), 12766
- [23] J. Böcker, *Spektroskopie*, 1. Auflage, Vogel Buchverlag Würzburg (1997)
- [24] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie*, 2. Auflage, Wiley-VCH Verlag Weinheim (2000)

- [25] D.A. Skoog, J.J. Leary, *Instrumentelle Analytik*, 4. Auflage, Springer-Verlag Berlin (1996)
- [26] G. Porter, *Flash Photolysis and some of its applications*, Nobel Lecture (1967)
- [27] A. Fuchsbauer, Dissertation, Linz Institute für Organic Solar Cells (2005)
- [28] Applied Photophysics, *Laser Flash Photolysis Reaction Analyser User Handbook* (2002)
- [29] LOT-Oriel Group Europe, *Lamp Spectra and Irradiance* (2007)
- [30] Hamamatsu, *Photo Multiplier Tubes R928, R955* (1997)
- [31] A.L. Lehninger, *Biochemie*, 2. Auflage, Verlag Chemie Weinheim (1977)
- [32] E. Margoliash, *Hemes and Hemoproteins*, Academic Press Inc. New York (1966)
- [33] T. Kreutzig, *Kurzlehrbuch Biochemie*, 12. Auflage, Urban & Fischer Verlag München (2006)
- [34] M.E. Aubin-Tam, K. Hamad-Schifferli, *Langmuir*, **21** (2005), 12080
- [35] A. Gole, C. Dash, C. Soman, S.R. Sainkar, *Bioconjugate Chem.*, **12** (2001), 684
- [36] R. Djalali, Y.F. Chen, H. Matsui, *J. Am. Chem. Soc.*, **124** (2002), 13660
- [37] J.F. Hainfeld, R.D. Powell, *J. Histochem. Cytochem.*, **48** (2000), 471
- [38] E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43** (2005), 6042
- [39] M.E. Aubin, D.G. Morales, K. Hamad-Schifferli, *Nano Lett.*, **5** (2005), 519
- [40] I.L. Medintz, J.H. Konnert, A.R. Clapp, I. Stanish, M.E. Twigg, H. Mattousi, J.M. Mauro, J.R. Deschamps, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101** (2004), 9612
- [41] X. Jiang, J. Jiang, Y. Jin, E. Wang, S. Dong, *Biomacromolecules*, **6** (2005), 46
- [42] C.D. Keating, K.M. Kovaleski, M.J. Natan, *J. Phys. Chem. B*, **102** (1998), 9404
- [43] K.R. Brown, A.P. Fox, M.J. Natan, *J. Am. Chem. Soc.*, **118** (1996), 1154
- [44] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.*, **11** (1951), 55
- [45] R. Brause, H. Möltgen, K. Kleinermanns, *Appl. Phys. B*, **75** (2002), 711
- [46] W.H.S. Yu, M.H.J. Wijnen, *J. Chem. Phys.*, **52** (1970), 2736
- [47] S. Takahashi, S.R. Yeh, T. Das, C.K. Chan, D.S. Gottfried, D.L. Rousseau, *Nat. Struct. Biol.*, **4** (1997), 44
- [48] S.R. Yeh, S. Takahashi, B. Fan, D.L. Rousseau, *Nat. Struct. Biol.*, **4** (1997), 51
- [49] A. Miranker, S.E. Radford, M. Karplus, C.M. Dobson, *Nature*, **349** (1991), 633
- [50] G. Elöve, A.K. Bhuyan, H. Roder, *Biochemistry*, **33** (1994), 6925
- [51] W.C. Johnson Jr., *Annu Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **17** (1988), 145
- [52] K. Kuwajima, E.P. Garvey, B.E. Finn, C.R. Matthews, S. Sugai, *Biochemistry*, **30** (1991), 7693

-
- [53] T.H. Förster, *Modern Quantum Chemistry*, Academic Press New York (1965)
- [54] D. Hamada, M. Hoshino, M. Kataoka, A. Fink, Y. Goto, *Biochemistry*, **32** (1993), 10351
- [55] P. Cioni, A., Puntoni, G.B. Strambini, *Biophys. Chem.*, **46** (1993), 47
- [56] G.A. Karns, W.A. Gallagher, W.B. Elliott, *Bioorg. Chem.*, **8** (1979), 69
- [57] R. Margalit, N. Shaklai, S. Cohen, *Biochem. J.*, **209** (1983), 547
- [58] Y. Ozaki, K. Iriyama, H. Ogoshi, T. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **109** (1987), 5583
- [59] L.I. Grossweiner, *Curr. Top. Radiat. Res.*, **11** (1976), 141
- [60] R. Santus, M. Bazin, M. Aubailly, *Rev. Chem. Intermediates*, **3** (1980), 231
- [61] S.A. Kovalenko, A.L. Dobryakov, J. Ruthmann, N.P. Ernsting, *Phys. Rev. A*, **59** (1999), 2369
- [62] S.A. Kovalenko, R. Schanz, H. Hennig, N.P. Ernsting, *J. Chem. Phys.*, **115** (2001), 3256
- [63] S.A. Kovalenko, J.L. Perez Lustres, N.P. Ernsting, W. Rettig, *J. Phys. Chem. A*, **107** (2003), 10228
- [64] J.L. Perez Lustres, S.A. Kovalenko, M. Mosquera, T. Senyushkina, W. Flasche, N.P. Ernsting, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44** (2005), 5635
- [65] T. Wilhelm, J. Piel, E. Riedle, *Opt. Lett.*, **22** (1997), 1494
- [66] Answer 42, written by Daniel Spangenberg, Düsseldorf (2002)
- [67] D. Löwenich, K. Kleinermanns, unveröffentlichte Ergebnisse (2005)
- [68] E.R. Henry, W.A. Eaton, R.M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83** (1986), 8982
- [69] T. Lian, B. Locke, Y. Kholodenko, R.M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem.*, **98** (1994), 11648

Abbildungsverzeichnis

2.1: Schematischer Aufbau eines Zweistrahl-UV/VIS-Spektrometers	9
2.2: Jablonski-Termschema eines fluoreszierenden Moleküls	11
2.3: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers	12
2.4: Fluoreszenz-Emissionsspektrum von Tryptophan in Wasser (280 nm Anregung)	14
2.5: Fluoreszenz-Anregungsspektrum von Tryptophan in Wasser (360 nm Emission)	15
2.6: Charakteristik von Lampe, Monochromator und Photomultiplier im Fluoreszenzspektrometer	15
2.7: Schematischer Aufbau des ns-Transientenspektrometers	17
2.8: Zeitabhängigkeit der Energie eines Lampenpulses der Xenon-Bogenlampe	18
2.9: Termschema für mögliche Prozesse nach Laserphotolyse	20
2.10: Zeitabhängige transiente Absorption von Anthracen bei 420 nm	21
2.11: Wellenlängenabhängige transiente Absorption von Anthracen bei verschiedenen Zeiten	22
2.12 a: Spektrale Charakteristik von Xe-Lampe und R928-Photomultiplier im Transientenspektrometer	23
2.12 b: Spektrale Charakteristik einer 150 W Xe-Bogenlampe	24
2.12 c: Spektrale Charakteristik eines R928 Photomultipliers	24
2.13: Termschema des Dreiniveaulasers und des Nd:YAG-Lasers	26
3.1: Struktur von Cytochrom c	29
3.2: Strukturformel von Porphin	30
3.3: Strukturformel von Protoporphyrin IX	31
3.4: Strukturformel von Tetraphenylporphyrin (TPP)	32
3.5: Strukturformel der anderen Porphyrin-Modellsysteme (THPP mit R=OH; TCPP mit R=COOH)	32
4.1: Titrationskurve für Hin- und Rücktitration einer 100 μM Lösung von Cyt c in Wasser	33
4.2: Fluoreszenzspektren einer 10 μM Lösung von Cyt c in Wasser (280 nm Anregung) für verschiedene pH-Werte zwischen pH 2 und pH 7	34
4.3: Fluoreszenzspektren einer 10 μM Lösung von Cyt c in Wasser (280 nm Anregung) vor der Titration sowie nach Hin- und Rücktitration, jeweils bei pH 7	35

5.1: Absorptionsspektren von Cyt c, Au-Nanopartikeln und dem System Cyt c / Au bei verschiedenen Mischungsverhältnissen	37
5.2: Transiente Absorptionsspektren von Cyt c / Au für verschiedene Zeiten (Anregungswellenlänge 532 nm)	38
5.3: Zeitabhängiges Absorptionsspektrum von Cyt c / Au bei einer Analysewellenlänge von 300 nm	38
5.4: Absorptionsspektren von Cyt c, Ag-Nanopartikeln und dem System Cyt c / Ag	39
5.5: Transiente Absorptionsspektren von Cyt c / Ag für verschiedene Zeiten (Anregungswellenlänge 355 nm)	40
5.6: Zeitabhängiges Absorptionsspektrum von Cyt c / Ag bei einer Analysewellenlänge von 400 nm	41
6.1: UV-Absorptionsspektren von TPP in Chloroform vor und nach Bestrahlung mit Laserlicht (266 nm)	43
6.2: UV-Absorptionsspektren von TPP in Chloroform unbehandelt (schwarz), nach Laserbestrahlung (rot), nach Zugabe von P ₂ O ₅ (grün) und nach Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APDS; blau).	44
6.3: Transiente Absorptionsspektren von TPP für verschiedene Zeiten (Anregungswellenlänge 266 nm)	45
6.4: Zeitabhängiges Verhalten von TPP bei einer Analysewellenlänge von 440 nm und Anregung bei 266 nm	46
6.5: Zeitabhängiges Verhalten von TPP bei einer Analysewellenlänge von 408 nm und Anregung bei 266 nm	47
6.6: Transiente Absorptionsspektren von TCPP für verschiedene Zeiten (Anregungswellenlänge 266 nm)	48
6.7: Zeitabhängiges Verhalten von TCPP bei einer Analysewellenlänge von 442 nm und Anregung bei 266 nm	49
6.8: Zeitabhängiges Verhalten von TCPP bei einer Analysewellenlänge von 408 nm und Anregung bei 266 nm	49
6.9: Transiente Absorptionsspektren von THPP für verschiedene Zeiten (Anregungswellenlänge 266 nm)	50
6.10: Zeitabhängiges Verhalten von THPP bei einer Analysewellenlänge von 450 nm und Anregung bei 266 nm	51
6.11: Zeitabhängiges Verhalten von THPP bei einer Analysewellenlänge von 415 nm und Anregung bei 266 nm	51

- 6.12:** Transiente Absorptionsspektren von TPP, TCPP und THPP nach 250 ns nach dem Photolyselaser (Anregungswellenlänge 266 nm) 52
- 7.1:** Fluorescence spectrum of cytochrome c excited at 280 nm using a cuvette with 10 mm path length (solid line) and 2 mm path length (dashed line) at pH 2. The absorption spectrum shows self absorption arising from the Soret band at 395 nm when using the 10 mm cuvette. 56
- 7.2:** (a) Fluorescence spectrum of cytochrome c excited at 280 nm at different pH values. The emission at ≈ 310 nm is the first Stokes band of the H₂O solvent (band marked with *). The dispersed emission spectrum of Trp shows a fluorescence maximum at 355 nm at pH 2 and at 370 nm at pH 7. The increase of fluorescence intensity with decrease of pH is due to partial defolding upon protonation leading to increased Trp59 fluorescence. The defolding starts at about pH 2.7. The dispersed emission spectrum of Trp can be fitted by two Gaussian profiles centered at 355 and 370 nm. (b) The ratio of the area of the band integral of the fitted band centered at 355 nm (A_{355} relative to the total fluorescence $A_{355}+A_{370}$) as a function of pH. The ratio stays nearly constant until pH 2.7 and then increases rapidly up to nearly 100 % at pH 2.4. The inset shows the deconvolution of the fluorescence spectrum at pH 7. The experimental spectrum (solid curve), the two Gaussian profiles (dotted curves) and the sum of them (dashed curve) are shown for comparison. 57
- 7.3:** Excitation wavelength dependent fluorescence of Cyt c for excitation at (a) 370 nm at pH 7 and (b) 355 nm at pH 2 (solid curve). The absorption spectra of the model systems Fe-Por (dashed curve) and Ac-Trp-OMe (dotted curve) are shown for comparison. The fluorescence excitation spectrum at 370 nm correlates qualitatively with the Fe-Por absorption spectrum but not with the Ac-Trp-OMe spectrum (Fig. 7.3a) The weak shoulder at 285 nm may arise from excitation of the red wing of the tryptophan absorption. The fluorescence excitation spectrum at 355 nm (Fig. 7.3b) correlates with the Ac-Trp-OMe absorption spectrum. Note that the first Stokes band of the H₂O solvent contributes to the signal at ≈ 330 nm in Fig. 7.3a. Increased emission at 355 nm in Fig. 7.3b upon excitation at ≈ 318 nm results exclusively from the first Stokes band of the H₂O solvent (band marked with *). 60

Fig. 7.4: (a) Absorption, (b) dispersed fluorescence and (c) fluorescence excitation spectra of the model system Fe-Por. (b) The excitation of Fe-Por at 280 nm leads to fluorescence with a maximum at 385 nm which correlates well with the fluorescence of Cyt c at pH 7. The emission at ≈ 310 nm is the first Stokes band of the H₂O solvent (band marked with *). (c) Excitation wavelength dependent fluorescence of Fe-Por at 385 nm (solid line). The absorption spectrum of Fe-Por (dashed line) is shown for comparison. The band at ≈ 340 nm is the first Stokes band of the H₂O solvent (band marked with *). 62

8.1: (a) Stationary absorption spectra of completely oxidized (thick green) and completely reduced (thin black) Cyt c. The sample concentration is $2 \cdot 10^{-6}$ M. (b) Photoreduction upon laser excitation at 277 nm is seen as growing signal at 550 nm with increasing irradiation time: 0, 5, 300 and 600 s. 69

8.2: Femtosecond transient absorption spectra $\Delta A(\lambda, t)$ in the range 340-1000 nm upon 266 nm excitation from neat water (thick green) and from oxidized Cyt c in water (thin black). Pump-probe delays t are indicated. A broad absorption band at about 750 nm stems from solvated electrons generated in water by UV excitation. 70

8.3: Femtosecond transient absorption spectra $\Delta A(\lambda, t)$ of oxidized Cyt c upon 266 nm excitation. The solvent contribution to ΔA is subtracted. The signal evolution is indicated by vertical arrows. (a) The earliest spectrum at 0.12 ps (black) shows intense bleaching of the Soret band at 409 nm. The bleach signal decays with $\tau_1=0.3$ ps reflecting internal conversion to the ground electronic state. (b) Subsequent decay of the signal corresponds to vibrational cooling of the chromophore with $\tau_2=4$ ps. After 2 ps (green spectrum) the spectral shape around the Soret band is similar to the shape of the hot stationary differential spectra in Fig. 8.12a. 71

8.4: Femtosecond transient absorption spectra $\Delta A(\lambda, t)$ of oxidized Cyt c in water upon 403 nm excitation. The evolution shows ultrafast internal conversion with subsequent ground-state vibrational cooling, similar as for 266 nm excitation in Fig. 8.3. With 403 nm excitation, the bleach band around 410 nm is ~ 10 times more intense than in Fig. 8.3 because of resonant pumping of the intense Soret band. 72

8.5: Kinetics of internal conversion (a) and of ground-state vibrational cooling (b) in oxidized Cyt c upon 266 nm excitation, as given by band integrals

$$BI(\lambda_1, \lambda_2) = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \Delta A(t, \lambda) d\lambda / \lambda.$$

A broad integral BI(380,580) over the two bleach bands characterizes internal conversion, and narrow BI(420,480) over the red tail of the hot band reflects the cooling of the chromophore. 73

8.6: (a) Late femtosecond spectra of oxidized Cyt c in water, averaged over a pump-probe delay 29-59 ps, for a 403 (blue) and 266 nm (black) excitation. Spectral features at 554, 417 and 320 nm indicate the presence of the reduced form, as seen from comparison with a stationary difference spectrum of completely reduced and oxidized Cyt c (b). 75

8.7: Transient spectra (green) of oxidized Cyt c around the Q-band upon 403 nm excitation. Lognormal fits (black) are assumed to reflect the evolution due to internal conversion and cooling only, except the contribution from photo-reduced Cyt c. The latter contribution is given by a difference $\Delta\Delta A$ between the experimental and fitted spectra. The behavior of $\Delta\Delta A$ can be analysed with a band integral BI(545,555) (within blue borders). 76

8.8: Photoreduction of oxidized Cyt c upon 403 nm (a) and 266 nm excitation (b). The reduction process is reflected by a band integral BI(545,555) for the signal $\Delta\Delta A$ derived from Fig. 8.7. The integral signal develops on a 10 ps time scale both for UV and visible excitation, as expected for a thermal ground-state ET mechanism. 77

8.9: Nanosecond transient absorption spectra of oxidized Cyt c upon excitation at 266 nm. Back ET $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ to the oxidized form is observed as decay, with $\tau_3=0.5 \mu s$, of the characteristic bands of reduced Cyt c at 417 and 550 nm. The differential stationary absorption spectrum of the reduced and oxidized form is shown for comparison by cyan. 78

8.10: Back ET from reduced to oxidized Cyt c upon nanosecond excitation at 266 nm at 297 K. The signal at 550 nm (Q-band) decays monoexponentially with a time constant $\tau_3=0.5 \mu s$. After a 2 μs delay the residual signal is constant on a second timescale, indicating a contribution from stable reduced Cyt c. 79

- 8.11:** Arrhenius plot of the back ET rate $\ln(1/\tau_3)$ (τ_3 in seconds) from reduced to oxidized Cyt c, measured with the Q-band (red) and Soret-band (green). Only the Q-band is used to determine an activation energy $E_A^b=33$ kJ/mol for thermal back ET. 80
- 8.12:** Temperature-dependent stationary differential absorption spectra $\Delta A=A(T)-A(283)$ for oxidized Cyt c (a, b) and for reduced Cyt c (c), calculated relative to the spectrum at $T=283$ K. At small $\Delta T=10-30$ K the spectra for the oxidized form (a) are similar to hot transient absorption spectra observed in femtosecond measurements (Figs. 8.3, 8.4, 8.6). At higher $\Delta T=50-70$ K (b) the spectra change their shape dramatically, possibly because of thermal-induced partial unfolding of Cyt c. 81
- 8.13:** (a) Percentage of reduced Cyt c (number of reduced molecules divided by total number of molecules) irradiated at 277nm at the indicated number of laser pulses: (a) as function of the number of laser pulses at 125 kW/cm² irradiation intensity; (b) as function of the irradiation intensity at 150 laser pulses, the photoreduction starts at a threshold of 60 kW/cm². 83
- 8.14:** (a) Quasistationary quantum yield ϕ (symbols) of photoreduction as function of the excitation wavelength at 1.5 mJ excitation laser pulse energy. The data are obtained from analysis of the Q- and Soret-band. Colored curves show the absorption spectra of Cyt c (black), Tyrosine (red) and Tryptophan (blue). (b) The percentage of reduced molecules obtained with 20 laser pulses increases nearly linearly with the absorbed laser energy, independent of the excitation wavelength. At $\lambda=243$ and 266 nm however the number of reduced molecules is substantially higher than expected from this plot. 84

Verwendete Symbole und Abkürzungen

A	Absorption
a.u.	arbitrary units
Ag	Silber
APDS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Au	Gold
A_{xx}	Peakfläche bei der Wellenlänge xx
BI	Bandenintegral
c	Konzentration
c	Lichtgeschwindigkeit
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
Cyt c	Cytochrom c
e	Elementarladung
E_A	Aktivierungsenergie
E_{abs}	absorbierte Energie
ESA	Excited State Absorption
ET	Elektronentransfer
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
Fe	Eisen
Fe-Por	5,10,15,20-Tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)porphyrin-Fe(III)-pentachlorid
FMN	Flavin-mononukleotid
fs	Femtosekunde
h	Planck-Konstante
His	Histidin
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HV	Hochspannung (High Voltage)
Hz	Hertz
I	Lichtintensität
IC	Interne Konversion (Internal Conversion)
IP	Ionisationspotential
ISC	Intersystem Crossing

k	Geschwindigkeitskonstante
K	Gleichgewichtskonstante
K	Kelvin
kJ	Kilojoule
kW	Kilowatt
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
m	Masse
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption
Met	Methionin
MHz	Megahertz
min	Minute
mJ	Millijoule
MK	Messküvette
ml	Milliliter
mm	Millimeter
N	Anzahl Atome / Moleküle / Photonen
N _A	Avogadro-Konstante
NAD	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADP	Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
Nd:YAG	Neodym-YAG (Yttrium-Aluminium-Granat)
nm	Nanometer
NMR	Nukleare Magnetische Resonanz
NOPA	Noncollinear Optical Parametric Amplifier
ns	Nanosekunde
OD	Optische Dichte
ps	Pikosekunde
s	Sekunde
S	Singulettzustand
SE	Stimulierte Emission
T	Temperatur
T	Triplettzustand
t	Zeit
TCPP	Tetra(carboxyphenyl)porphyrin
THPP	Tetra(hydroxyphenyl)porphyrin

TPP	Tetraphenylporphyrin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
V	Volt
V	Volumen
VIS	Sichtbarer Spektralbereich (visible light)
VK	Vergleichsküvette
W	Watt
Z	Anzahl Laserpulse
Δ Abs	Absorptionsdifferenz
Δ T	Temperaturdifferenz
Φ	Quantenausbeute
α	Extinktionskoeffizient
ϵ	Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
λ_{em}	Emissionswellenlänge (emission wavelength)
λ_{ex}	Anregungswellenlänge (excitation wavelength)
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
μ s	Mikrosekunde

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2003 bis Juli 2007 im Institut für Physikalische Chemie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Karl Kleinermanns angefertigt.

Ohne die Unterstützung meiner Freunde und Kollegen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ihnen allen möchte ich herzlich danken.

Besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Karl Kleinermanns für die interessante Themenstellung, die intensive persönliche Betreuung und sein stetes Interesse am Verlauf der Arbeit sowie seine zahlreichen Anregungen, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre

Prof. Dr. Rainer Weinkauff für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens

Prof. Dr. Nikolaus Ernstring und Dr. Sergey Kovalenko für die fruchtbare Zusammenarbeit bei der Untersuchung des Elektronentransfers im Cytochrom c

Prof. Dr. Claus Seidel und Jr. Prof. Dr. Philipp Oesterhelt, die mir (fast) jederzeit das Fluoreszenzspektrometer zur Verfügung stellten

PD Dr. Michael Schmitt für zahlreiche Hilfestellungen und Beantwortung vieler Fragen

Dr. Thomas Häber und Matthias Busker für viele Hilfen bei Problemen mit der Apparatur und dem Laser

Michael Nispel und Kai Seefeld für die inzwischen langjährige Freundschaft, zahlreiche Hilfen beruflicher wie auch privater Natur sowie eine unendliche Anzahl von CFT-Messungen

Gernot Engler für die tolle und auch unterhaltsame Zusammenarbeit am Transientenspektrometer sowie seine stete Hilfsbereitschaft

Klaus Kelbert und Dieter Marx, die bei technischen Fragen immer mit Rat und (vor allem) Tat zur Seite standen und immer die passenden Bauteile zur Hand hatten

Rolf Linder für sein immer für meine Fragen und Probleme offenes Ohr und für seine stets aufmunternden Worte, wenn es einmal nicht so gut lief

Michael Carey von der Firma „Applied Photophysics“ für seine kompetente Einarbeitung in das Transientenspektrometer und seine gewöhnungsbedürftige Software und die umgehende Beantwortung sämtlicher Fragen, die ich per e-Mail an ihn schickte

Dem gesamten Arbeitskreis und allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Instituts der letzten Jahre für die stets freundschaftliche und angenehme Arbeitsatmosphäre

Ganz besonders

Meinen Eltern, meiner Oma und meiner Schwester Jessica für ihre ständige Anteilnahme und Unterstützung während meines gesamten Studiums und meiner Promotion

Und meiner Freundin Susanne, die immer für mich da war und es hoffentlich auch immer sein wird.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 05.10.2007

Dennis Löwenich