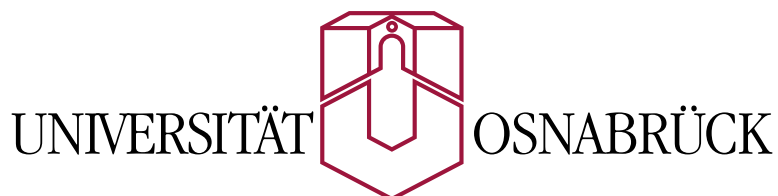


# **Tief-UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie an aromatischen Aminosäuren**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Universität Osnabrück



vorgelegt von  
**Andreas Bröermann**  
Osnabrück, Dezember 2015

Eingereicht am: ..... im Fachbereich Physik

1. Gutachter: Prof. Dr. S. Schlücker  
2. Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Steinhoff  
der Dissertation

1. Prüfer: Prof. Dr. S. Schlücker  
2. Prüfer: Prof. Dr. H.-J. Steinhoff  
3. Prüfer: .....  
4. Prüfer: .....  
im öffentlichen Promotionskolloquium

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Motivation und Zielsetzung</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>7</b>
3.1	Klassische Vorüberlegungen . . . . .	8
3.2	Quantenmechanische Behandlung des Raman-Effektes . . . . .	9
3.2.1	Störungstheorie . . . . .	10
3.2.2	Die Kramers-Heisenberg-Dirac-Relation . . . . .	13
3.3	Optische Spektroskopie an aromatischen Aminosäuren . . . . .	13
3.3.1	Lokale Symmetrie im Chromophor . . . . .	14
3.3.2	Elektronische Niveaus und UV-Absorptions-Spektren . . . . .	15
3.3.3	Normalmoden und Schwingungs-Raman-Spektren . . . . .	16
<b>4</b>	<b>Verwendete Geräte und Materialien</b>	<b>19</b>
4.1	Lichtquelle: DUV-Laser-System . . . . .	19
4.1.1	Verschiedene Optik-Sätze . . . . .	23
4.1.1.1	Wechsel von Satz B FHG auf Satz B THG . . . . .	23
4.1.1.2	Wechsel von Satz B THG auf Satz A FHG . . . . .	25
4.2	Messgerät: Dreifach-Monochromator . . . . .	26
4.3	Strahlengang . . . . .	27
4.3.1	Justage . . . . .	29
4.4	Selbst erstellte Computerprogramme . . . . .	30
<b>5</b>	<b>Probensysteme für kleine Volumina</b>	<b>37</b>
5.1	Kenntnisstand und Aufgabenstellung . . . . .	37
5.2	Frei-Fluss-System . . . . .	38
5.3	Probenschleuder . . . . .	40
5.4	Ausblick . . . . .	41
<b>6</b>	<b>Resonanz-Raman-Anregungsprofile von Phenylalanin und Tyrosin</b>	<b>44</b>
6.1	Kenntnisstand und Aufgabenstellung . . . . .	44
6.2	Geräte, Materialien und Methoden . . . . .	45

6.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	46
6.3.1	DUVR-R-Spektren und Anregungsprofil von Phenylalanin . . . . .	46
6.3.2	DUVR-R-Spektren und Anregungsprofil von Tyrosin . . . . .	49
6.3.3	DUVR-R-Spektroskopie bei hoher Auflösung und bei geringen Wellenzahlen . . . . .	52
6.4	Zusammenfassung . . . . .	54
6.5	Ausblick . . . . .	55
<b>7</b>	<b>pH-abhängige Raman-Studien an Tyrosin und Histidin</b>	<b>56</b>
7.1	Kenntnisstand und Aufgabenstellung . . . . .	56
7.2	Geräte, Materialien und Methoden . . . . .	59
7.3	Beschreibung des Algorithmus . . . . .	60
7.4	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	63
7.5	Zusammenfassung . . . . .	67
7.6	Ausblick . . . . .	67
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>68</b>
8.1	Ausblick . . . . .	70
<b>9</b>	<b>Summary and Outlook</b>	<b>72</b>
9.1	Outlook . . . . .	74
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>76</b>



# 1 Einleitung

Als Raman und Krishnan 1928 die Entdeckung „einer neuen Art von sekundärer Strahlung“ [1] vermeldeten, war dies zunächst nur ein interessanter Effekt, der nur äußerst schwer unter großem Aufwand nachzuweisen war. Die Möglichkeit, dass gestreutes Licht in seiner Wellenlänge von der des eingestrahnten Lichtes abweichen könne, wurde schon 1923 von Smekal vorhergesagt [2]. Allerdings ist die Intensität dieser sekundären Strahlung mit abweichender Wellenlänge extrem gering. Hinzu kommt, dass die feine Struktur dieser Raman-Spektren mit den damals vorherrschenden breitbandigen Lichtquellen gar nicht nachzuweisen war.

Ein wichtiges Ereignis, dass die Anwendung der Raman-Spektroskopie wesentlich vereinfachte, war die Erfindung des Lasers durch Theodore Maiman im Jahr 1960 [3]. Mit der fortschreitenden Entwicklung der Laser-Technologie standen bald immer leistungsfähigere und immer kostengünstigere Geräte zur Verfügung, die extrem schmalbandige und intensive Strahlung bereitstellen. Laser verschiedener Wellenlängen und Bauarten stellen die ideale Lichtquelle für die Raman-Spektroskopie dar.

Heute ist die Raman-Spektroskopie ein vielseitiges und mächtiges Werkzeug, um die Struktur und Dynamik einer Vielzahl von Molekülen zu untersuchen. Als schwingungsspektroskopische Technik liefert sie ähnlich wie die Infrarot(IR)-Spektroskopie Informationen über die Frequenz der Schwingungen, die im betrachteten Molekül auftreten. Während die Intensität der Schwingungs-Banden in der IR-Spektroskopie proportional zur Änderung des Dipolmomentes mit der Schwingung ist, ist sie in der Raman-Spektroskopie proportional zur Änderung der Polarisierbarkeit. Daher sind viele Banden, die in der IR-Spektroskopie nur schwach ausgeprägt sind, in der Raman-Spektroskopie besonders ausgeprägt und umgekehrt. Raman- und IR-Spektroskopie können also als komplementäre Techniken angesehen werden.

Für die Untersuchung von biologischen Systemen ist die Raman-Spektroskopie besonders interessant, da die Deformationsschwingung von Wasser bei rund  $1600\text{ cm}^{-1}$  hier nur eine geringe Intensität aufweist, während sie in der IR-Spektroskopie sehr stark ist und daher interessante Schwingungen der eigentlich zu untersuchenden Moleküle, insbesondere Peptide und Proteine, leicht verdeckt. Da sich eine Vielzahl von biologischen Prozessen in wässriger Umgebung abspielt ist die Trocknung der Probe häufig mit einer Beeinträchtigung der Funktionalität dieser Moleküle verbunden.

Ein großer Nachteil der Raman-Spektroskopie ist die im Vergleich zur IR-Spektroskopie

relativ geringe Intensität des gemessenen Signals. Durch die Verwendung von ultraviolettem (UV) Laserlicht zur Anregung kann die Intensität durch zwei Effekte verstärkt werden. Zum einen ist die Intensität des Raman-gestreuten Lichtes proportional zur vierten Potenz der Frequenz des anregenden Lichtes ( $\omega^4$ -Abhängigkeit). Außerdem können durch den Resonanz-Raman-Effekt (RR) spezifische Schwingungen des Moleküls besonders verstärkt werden, die Teil eines Chromophors sind, das eine elektronische Absorption im Frequenzbereich des eingestrahnten Laserlichts aufweist. Dieser Effekt wird in den theoretischen Grundlagen im Kapitel 3 dieser Arbeit näher erläutert.

Da der Resonanzeffekt nur das Signal derjenigen Schwingungen verstärkt, die in dem verstärkenden Chromophor lokalisiert sind, kann die UVR-R-Spektroskopie genutzt werden, nur einen kleinen Teil eines großen Moleküls, sowie die Mikroumgebung des Chromophors zu untersuchen. Im zweiten Kapitel wird diese Motivation für die durchgeführten Experimente näher erläutert.

Das Kapitel 3 stellt die theoretischen Grundlagen der Raman-Spektroskopie vor. Es werden klassische Vorüberlegungen und die Grundlagen der quantenmechanischen Behandlung des Raman-Effektes behandelt. Es wird die Störungstheorie nach Dirac sowie die Kramers-Heisenberg-Dirac-Relation (KHD) vorgestellt. Schließlich werden die Eigenschaften der aromatischen Aminosäuren aufgezeigt, durch die sich diese Moleküle besonders für die UVR-R-Spektroskopie eignen.

Im vierten Kapitel werden die Geräte vorgestellt, die für die durchgeführten Experimente verwendet wurden. Der Tief-UV-Laser und der Dreifach-Monochromator bilden die Herzstücke der experimentellen Aufbauten. Außerdem wird der Strahlengang und die Auswahl der beteiligten Komponenten erläutert und das Vorgehen bei der Justage vor den einzelnen Messungen erklärt. Der letzte Abschnitt zeigt und erläutert die wichtigsten Programme, die selbst entwickelt und zur Auswertung der gewonnenen Messergebnisse verwendet wurden.

Biologische Proben sind oft recht teuer und daher nur in begrenzten Mengen verfügbar. Daher ist es wünschenswert, mit einer möglichst geringen Probenmenge auszukommen. Aufgrund der verwendeten Strahlung im tief ultravioletten Bereich sollte bei Probenvorrichtungen auf Fenster, Linsen und andere Optiken, die typischerweise im sichtbaren Spektralbereich verwendet werden, möglichst verzichtet werden. Gleichzeitig sollten der bestrahlte Teil der Probe ständig ausgetauscht werden, um eine photochemische Schädigung der Probe zu minimieren. Geeignete Probenhalterungen für kleine Volumina, die speziell für die durchgeführten Messungen entwickelt wurden, werden in Kapitel 5 vorgestellt.

Das Kapitel 6 untersucht den Einfluss der Anregungswellenlänge auf das DUVR-R-Spektrum der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin [4]. Die Selektivität, mit der das Signal einzelner Schwingungen einer Probe gezielt verstärkt werden kann, ist ein großer Vorteil gegenüber der konventionellen Raman-Spektroskopie.

Die Abhängigkeit der DUVRR-Spektren von der Umgebung der aromatischen Aminosäuren wird in Kapitel 7 untersucht [5]. Um unterschiedliche Mikroumgebungen zu simulieren, wurden Tyrosin und Histidin bei verschiedenen pH-Werten vermessen. Außerdem wurde ein Algorithmus entwickelt, mit dem es möglich ist, anhand der DUVRR-Spektren den pH-Wert der betrachteten Seitenkette zu bestimmen. Der Algorithmus wird in diesem Kaptitel präsentiert und auf die gemessenen Spektren angewendet. Er kommt ohne Kenntnis des jeweiligen  $pK_a$ -Wertes aus. Es werden lediglich drei Referenzspektren bei bekanntem pH-Wert benötigt und Intensitätsschwankungen im Spektrum werden automatisch ausgeglichen.

Im letzten Kapitel wird im Ausblick gezeigt, wie auf Grundlage der entwickelten und getesteten Geräte und Methoden zukünftig die DUVRR-Spektroskopie zur Quantifizierung von Mikroumgebungen von gebundenen aromatischen Aminosäuren und damit zur Aufklärung der Struktur und Dynamik von Proteinen und Proteinkomplexen beitragen kann.

## 2 Motivation und Zielsetzung

Die Projekte, die in dieser Dissertation vorgestellt werden, sind von dem Ziel motiviert, die Tief-UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie als biophysikalische Technik weiterzuentwickeln. Insbesondere wurde das Ziel verfolgt, Werkzeuge zu entwickeln, die es dieser Technik ermöglichen, einen größeren Beitrag zur Aufklärung der Struktur und Dynamik von Proteinen und Proteinkomplexen zu leisten.

Die Standard-Technologie der Strukturaufklärung von Proteinen ist die Röntgen-Kristallographie. Der große Nachteil dieser Methode ist, dass das Protein als Einkristall vorliegen muss [6–8]. Diese Technik liefert lediglich ein statisches Modell des Proteins. Dieses Modell bildet häufig den Ausgangspunkt zu Spekulationen über die Dynamik des Proteins, wie z. B. enzymatische Mechanismen, oder auch die Proteinfaltung.

Ein weiteres mächtiges Werkzeug ist die Kernspinresonanz-Spektroskopie (*Nuclear magnetic resonance*, **NMR**) [9–11]. Hiermit kann sowohl die statische Struktur als auch die Dynamik von Proteinen und Peptiden untersucht werden. Insbesondere ist die NMR-Spektroskopie auch geeignet, um nur kleine Bereiche von großen Proteinen zu beobachten. Allerdings handelt es sich bei den atomaren Abständen und Winkeln, die mit dieser Methode bestimmt werden, im Allgemeinen um zeitliche Mittelwerte [11]. Außerdem wird eine lange Messzeit und eine aufwendige Isotopen-Markierung benötigt.

Auch verschiedene Methoden der optischen Spektroskopie werden zur Strukturaufklärung eingesetzt. Mittels der UV-Vis-Absorptions-Spektroskopie können z. B. Änderungen in der Konformation des Proteinrückgrats festgestellt werden [12]. Die CD-Spektroskopie (*Circular Dichroism*) ermöglicht die Untersuchung von chiralen Strukturen in Proteinen und wird deshalb zur Beobachtung von Sekundärstrukturen, besonders  $\alpha$ -Helices, eingesetzt [13, 14].

Schwingungsspektroskopische Methoden können kleine Veränderungen in Proteinen, wie die Änderung der Bindungslängen um einige Pikometer, feststellen. Die IR-Spektroskopie ist dabei meist auf Untersuchungen in  $D_2O$  beschränkt, da  $H_2O$  im interessanten Bereich eine sehr hohe IR-Absorption aufweist [15]. Im Ramanspektrum ist dieser Beitrag von Wasser nur sehr gering.

Die Raman-Spektroskopie ist somit eine vielversprechende Methode, um die oben genannten Techniken zu ergänzen [16]. Es gibt viele Aspekte, die bei der Struktur und Dynamik von Proteinen und Proteinkomplexen von Interesse sind. Oft bestimmen nur wenige kleine Regionen in einem Protein die Gesamtstruktur oder sind dafür verant-

wortlich, wie sich das Protein als Ganzes bei dynamischen Prozessen verhält. Es ist daher von besonderem Interesse, die physikalischen Gegebenheiten in diesen mikroskopischen Regionen zu erforschen. Das Ziel der Arbeiten in dieser Dissertation ist es daher, vorbereitende Techniken zu entwickeln und zu erproben, die die Eigenschaften dieser Mikroumgebungen bestimmen.

Die Resonanz-Raman-Spektroskopie ist für die Untersuchung von Mikroumgebungen besonders geeignet, da durch den Resonanzeffekt der Beitrag einzelner Schwingungen gezielt verstärkt werden kann. Da viele der Eigenschwingungen von großen Molekülen wie Proteinen in kleinen Regionen in diesem Molekül lokalisiert sind, kann somit ein kleiner Ausschnitt näher untersucht werden. Im Falle der Proteine handelt es sich bei den lokalen Untereinheiten um Aminosäuren. In dieser Arbeit wurden die *aromatischen* Aminosäuren untersucht, da diese über ein UV-Chromophor verfügen. Wenn bei der Raman-Spektroskopie Licht mit einer Wellenlänge verwendet wird, die von diesen Chromophoren absorbiert wird, tritt der Resonanz-Raman-Effekt bei Schwingungen auf, die in diesen Seitenketten lokalisiert sind.

Die Chromophore der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Histidin weisen Absorptionsbanden sowohl im tiefen UV-Bereich um  $\sim 200$  nm als auch im relativ nahen UV-Bereich um  $\sim 280$  nm auf. Wie in den Absorptionsspektren von Phe und Tyr (Abb. 3.4 auf Seite 17) zu sehen ist, ist hier die Absorption bei  $\sim 200$  nm wesentlich höher. Außerdem eignet sich der Bereich von 190 nm – 200 nm, um durch Resonanz-Raman-Spektroskopie die Schwingungen der Amidbanden im Proteinrückgrat abzufragen [17]. Die relativen Intensitäten der Amidbanden geben Aufschluss über die Sekundärstruktur des untersuchten Proteins. Es ist des Weiteren zu bedenken, dass bei höheren Wellenlängen die aromatische Aminosäure Tryptophan sehr starke Signale aufweist, die die Signale von Phenylalanin, Tyrosin und Histidin überlagern. Die Verwendung von kleineren Wellenlängen kann diese Beiträge deutlich reduzieren. Ein Laser, der eine variable Anregungswellenlänge im tiefen UV-Bereich um  $\sim 200$  nm liefert, bietet also mehrere Vorteile um sowohl das Proteinrückgrat als aromatische Seitenketten von Proteinen selektiv mittels Resonanz-Raman-Spektroskopie untersuchen zu können [17–21].

Um mit Hilfe der Tief-UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie erfolgreich zur Aufklärung von Mikroumgebungen von aromatischen Aminosäuren in Proteinen und Proteinkomplexen beizutragen, sind die folgenden Vorarbeiten notwendig:

- Es müssen Geräte ausgewählt werden, die monochromatische tief-ultraviolette Strahlung erzeugen und spektroskopisch auswerten können. Außerdem sind optische Komponenten notwendig, um die Strahlung auf die Probe zu fokussieren und im Detektor sammeln zu können.
- Zu untersuchende Proteine sind oftmals recht teuer und nur in begrenzten Mengen verfügbar. Daher müssen Möglichkeiten gefunden werden, möglichst kleine Probenvolumina zu untersuchen. Da Tief-UV-Strahlung verwendet wird, sollte der

Probenhalter ohne Fenster auskommen und die Exposition der Probe zeitlich begrenzen.

- Der Einfluss der Anregungswellenlänge auf den Resonanz-Raman-Effekt in den Seitenketten der aromatischen Aminosäuren muss untersucht werden.
- Die Sensitivität der Ramanspektren dieser Seitenketten auf ihr lokale Umgebung muss demonstriert werden.

Diese vier Punkte wurden im Rahmen dieser Arbeit behandelt und entsprechen den Kapiteln 4 bis 7. Dabei wird der Blick auf zukünftige Messungen an Proteinen und Proteinkomplexen gerichtet.

### 3 Theoretische Grundlagen

Das wichtigste Werkzeug der Experimente, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden, ist die sogenannte Raman-Spektroskopie. Bei dem Raman-Effekt handelt es sich um eine inelastische Streuung von Licht an Materie. Dieser Effekt wurde 1923 von Smekal im Zuge einer quantenmechanischen Behandlung der Dispersion von Licht in atomaren und molekularen Gasen vorhergesagt [2]. Experimentell bewiesen wurde der Raman-Effekt 1928 von Raman und Krishnan an organischen Lösemitteln [1] und von Landsberg und Mandelstam an Festkörpern [22].

Im Gegensatz zur Rayleigh-Streuung weißt das Raman-gestreute Licht eine andere Frequenz als das eingestrahlte Licht der Frequenz  $\nu_0$  auf. Die Frequenz kann dabei sowohl höher als auch niedriger sein. Bei niedrigerer Frequenz  $\nu_S$  spricht man von Stokes-Linien, bei höherer Frequenz  $\nu_{AS}$  von Anti-Stokes-Linien. Die Differenz der Frequenzen  $\Delta\nu = \nu_{AS} - \nu_0 = \nu_0 - \nu_S$  ist dabei in beiden Fällen gleich und hängt nur von der untersuchten Substanz und nicht von der verwendeten Frequenz  $\nu_0$  ab. Es zeigt sich, dass die Unterschiede der Frequenzen im Allgemeinen mit den Frequenzen identisch sind, bei denen die untersuchte Substanz Absorptionsbanden im infraroten Spektralbereich aufweisen. Damit entsprechen diese Frequenzdifferenzen den Energiedifferenzen verschiedener Rotations- oder Schwingungszustände der betrachteten Substanz. Hier und im Folgenden sollen aber nur Schwingungen und keine Rotationen der Moleküle betrachtet werden.

$$h\Delta\nu = h\nu_{\text{IR}} = \Delta E_{\text{vib}} \quad (3.1)$$

Die Stokes-Linien sind immer stärker als die Anti-Stokes-Linien, wobei das genaue Intensitätsverhältnis von der Temperatur des untersuchten Stoffes abhängt. Sowohl die Stokes- als auch die Anti-Stokes-Linien sind dabei um den Faktor  $10^3 - 10^4$  weniger intensiv als die Rayleigh Streuung. Diese geringe Intensität ist auch der Grund, warum Raman-Streuung vergleichsweise schwer nachzuweisen ist und erst fünf Jahre nach der Vorhersage durch Smekal entdeckt wurde.

Zu einer breiteren Anwendung ist die Raman-Spektroskopie erst in den letzten Jahrzehnten gekommen, da sie sehr von der Schmalbandigkeit heute verfügbarer Lasersysteme profitiert. Dadurch wurden viele Weiterentwicklungen möglich. Nicht-lineare Raman-Effekte wie SRS, CARS und Hyper-Raman seien hier als Beispiele genannt.

### 3.1 Klassische Vorüberlegungen

Der Raman-Effekt tritt auf, wenn die Polarisierbarkeit  $\alpha$  des betrachteten Moleküls sich mit den Schwingungen des Moleküls ändert. Dies soll im Folgenden anhand klassischer Überlegungen gezeigt werden.

Trifft elektromagnetische Strahlung auf ein Molekül, dann oszilliert das elektrische Feld am Ort des Moleküls mit der Frequenz  $\nu_0$  der einfallenden Strahlung

$$\vec{E}(t) = \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) . \quad (3.2)$$

Dieses oszillierende elektrische Feld induziert nun ein ebenfalls oszillierendes Dipolmoment

$$\vec{\mu}(t) = \alpha(t) \vec{E}(t) . \quad (3.3)$$

Bei der Polarisierbarkeit  $\alpha$  handelt es sich um einen Tensor zweiter Stufe. Das heißt,  $\vec{\mu}$  und  $\vec{E}$  sind im Allgemeinen nicht parallel und jede Komponente von  $\vec{E}$  kann zu jeder Komponente von  $\vec{\mu}$  beitragen. In Komponentenschreibweise:

$$\mu_\sigma(t) = \sum_\varrho \alpha_{\sigma\varrho}(t) E_\varrho(t) . \quad (3.4)$$

Wenn  $\alpha$  konstant ist, dann oszilliert  $\vec{\mu}(t)$  nur mit der Frequenz  $\nu_0$  des einfallenden elektrischen Feldes  $\vec{E}(t)$ . In dem Fall tritt kein Raman-Effekt auf und es ist nur Rayleigh-Streuung zu beobachten. Im Allgemeinen jedoch hängt  $\alpha$  von der genauen Geometrie des Moleküls ab. Da selbst im Grundzustand Schwingungen stattfinden, ändert sich  $\alpha$  mit der Frequenz dieser Schwingungen  $\nu_{\text{vib}}$ .

Wir nehmen an, dass das Molekül entlang der Normalkoordinate  $q$  um die Gleichgewichtslage  $q_0$  mit der Amplitude  $q'$  schwingt:

$$q(t) = q_0 + q' \cos(2\pi\nu_{\text{vib}} t) . \quad (3.5)$$

Dann lautet die lineare Näherung der Taylor-Reihe für die Polarisierbarkeit  $\alpha$  als Funktion von  $q$

$$\alpha(q) \approx \alpha(q_0) + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_{q_0} (q - q_0) . \quad (3.6)$$

Somit können wir  $\alpha$  als Funktion der Zeit  $t$  darstellen:

$$\alpha(t) \approx \alpha_0 + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_{q_0} (q(t) - q_0) = \alpha_0 + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_{q_0} q' \cos(2\pi\nu_{\text{vib}} t) . \quad (3.7)$$



Setzen wir dies in die Gleichung (3.3) ein, erhalten wir:

$$\begin{aligned}\vec{\mu}(t) &= \alpha(t) \vec{E}(t) = \left( \alpha_0 + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_{q_0} q' \cos(2\pi\nu_{\text{vib}}t) \right) \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \\ &= \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_{q_0} \vec{E}_0 q' \cos(2\pi(\nu_0 - \nu_{\text{vib}})t) \\ &\quad + \frac{1}{2} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_{q_0} \vec{E}_0 q' \cos(2\pi(\nu_{\text{vib}} + \nu_0)t) .\end{aligned}\quad (3.8)$$

Das schwingende Dipolmoment  $\vec{\mu}(t)$  induziert in der klassischen Betrachtung nun seinerseits ein elektromagnetisches Wechselfeld, das als Streustrahlung beobachtet wird. Die Frequenzen dieser Streustrahlung sind mit denen des Dipolmomentes identisch und besteht somit aus drei Komponenten mit den Frequenzen  $\nu_0$ ,  $\nu_{\text{vib}} - \nu_0$  und  $\nu_{\text{vib}} + \nu_0$ . Diese Komponenten können mit der Rayleigh-Streuung, der Stokes-Streuung und der Anti-Stokes-Streuung identifiziert werden.

Diese klassischen Überlegungen erklären den Raman-Effekt als Modulation des einfallenden elektrischen Feldes ( $\nu_0$ ) durch das schwingende Molekül ( $\nu_{\text{vib}}$ ). Dieser Ansatz erklärt aber z. B. nicht die unterschiedliche Intensität der Stokes- und Anti-Stokes-Linien und den für diese Arbeit besonders wichtigen Resonanz-Raman-Effekt (RR). Der RR-Effekt tritt dann auf, wenn die Energie des anregenden Photons der Energiedifferenz zu einem elektronischen Niveau des Moleküls entspricht

$$h\nu_0 = \Delta E_{\text{el}} . \quad (3.9)$$

Abbildung 3.1 fasst die besprochenen Prozesse in einer Abbildung zusammen.

### 3.2 Quantenmechanische Behandlung des Raman-Effektes

Die Vorhersage Smekals von 1923 [2] beruhten auf qualitativen quantenmechanischen Überlegungen, wonach zusätzlich zur Rayleigh-Streuung, bei der die Frequenz der gestreuten Strahlung gleich der der einfallenden Strahlung ist, auch Strahlung mit höherer und niedrigerer Frequenz in Kugelwellen ausgesandt werden sollte. Wenn die Streuzentren Atome oder Moleküle in einem Gas sind, sollte es zu Stößen zwischen den Gasteilchen und den Photonen kommen, bei denen die Gasteilchen durch „Translatiosquantenübergängen“ Energie aufnehmen oder abgeben können, wobei insgesamt Energie- und Impulserhaltung zu beachten ist.

Die Herleitung von Kramers und Heisenberg aus dem Jahre 1925 [23] beruht auf der Überlegung, dass es zu einer Interferenz zwischen den Kugelwellen des Rayleigh-Streulichts und dem abgestrahlten Licht auf Grund von Quantenübergängen der Streuzentren

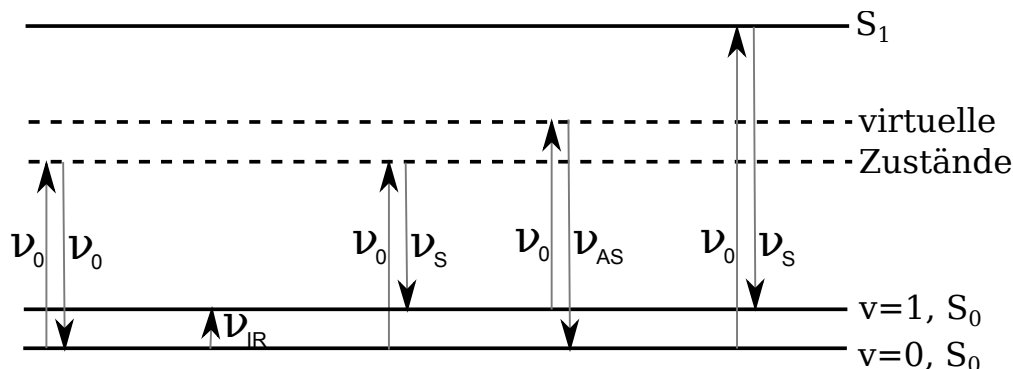


Abbildung 3.1: Beispiele für die zuvor besprochenen Prozesse. Von links nach rechts sind dies: Rayleigh-Streuung, IR-Absorption, Ramanstreuung (Stokes), Ramanstreuung (Anti-Stokes) und Resonanz-Ramanstreuung (Stokes). Die durchgezogenen Linien stellen reale Zustände des Moleküls dar, die gestrichelten Linien stellen virtuelle Zustände dar.  $S_0$  und  $S_1$  sind der elektronische Grundzustand und der erste angeregte Zustand. Die beiden unteren Zustände unterscheiden sich nicht in der Konfiguration der Elektronen, sondern lediglich in den Schwingungszuständen. Dies wird durch eine unterschiedliche Schwingungsquantenzahl ( $v = 0$  bzw.  $v = 1$ ) ausgedrückt.

kommen müsste. Mathematisch ist diese Herleitung aber noch nicht streng quantenmechanisch, sondern basiert auf dem Korrespondenzprinzip.

Die quantenmechanische Beschreibung der Streuung lieferte Dirac im Jahre 1927 [24]. Da die auftretenden Terme algebraisch nicht exakt lösbar sind, wurde die quantenmechanische Störungstheorie angewendet. Einige vorbereitende Rechnungen und Vorüberlegungen werden im Folgenden skizziert,

### 3.2.1 Störungstheorie

Das allgemeine Vorgehen bei der Anwendung der Störungstheorie ist es, den Hamilton-Operator  $H$  des betrachteten Systems zu zerlegen:

$$H = H_0 + H_1 \quad . \quad (3.10)$$

Dabei stellt  $H_0$  den Hamilton-Operator des ungestörten Systems dar. Die Störungstheorie ist für die Fälle geeignet, in denen sich das Eigenwertproblem zu  $H_0$  exakt lösen lässt. Der Term  $H_1$  stellt die Störung des Systems dar. Wenn der Hamilton-Operator zeitunabhängig ist, kann die zeitunabhängige oder auch Schrödingersche Störungstheorie angewendet werden. Hiervon ist der Fall einer zeitabhängigen Störung zu unterscheiden.

In diesem Fall enthält der Term  $H_1$  explizit die Zeit  $t$  als Parameter. Dann ist die zeitabhängige oder Diracsche Störungstheorie anzuwenden [25].

Ausgangspunkt der Herleitung des Raman-Effekts nach Dirac [24] ist die relativistische Hamilton-Gleichung eines einzelnen Elektrons in einem elektrostatischem Potential  $\phi$ :

$$\vec{p}^2 - (W + e\phi)^2/c^2 + m^2c^2 = 0 \quad . \quad (3.11)$$

Das Elektron im Potential  $\phi$  soll als Modell des ungestörten Atoms dienen. Der Vektor  $\vec{p}$  ist der Impuls,  $-e$  die Ladung und  $m$  die Masse des Elektrons. Die Konstante  $c$  ist die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum. Die Energie  $W$  ist mit der ungestörten Hamilton-Funktion zu identifizieren:

$$H_0 = W = c\sqrt{m^2c^2 + \vec{p}^2} - e\phi \quad . \quad (3.12)$$

Das störende Feld der Strahlung wird durch das magnetische Vektorpotential  $\vec{\kappa}$  beschrieben, welches so gewählt wird, dass das elektrische Skalarpotential des Störfeldes Null ist. Die Rotation von  $\vec{\kappa}$  ergibt die magnetische Flussdichte  $\vec{B} = \text{rot } \vec{\kappa}$ . Die Hamilton-Gleichung des gestörten Systems lautet dann

$$\left(\vec{p} + \frac{e}{c}\vec{\kappa}\right)^2 - \frac{(W + e\phi)^2}{c^2} + m^2c^2 = 0 \quad . \quad (3.13)$$

Der ungewohnte Faktor von  $1/c$  vor dem Vektorpotential ist durch die Benutzung des Gaußschen Einheitensystems zu erklären. Die neue Hamilton-Funktion ist somit

$$H = W = c\sqrt{m^2c^2 + \left(\vec{p} + \frac{e}{c}\vec{\kappa}\right)^2} - e\phi = c\sqrt{m^2c^2 + \vec{p}^2 + \frac{2e}{c}\vec{p} \cdot \vec{\kappa} + \frac{e^2}{c^2}\vec{\kappa}^2} - e\phi \quad . \quad (3.14)$$

Durch lineare Näherung der Wurzel um  $m^2c^2 + \vec{p}^2$  und unter Vernachlässigung von relativistischen Korrekturen erhalten wir

$$H \approx c\sqrt{m^2c^2 + \vec{p}^2} - e\phi + \frac{e}{c}\dot{\vec{x}} \cdot \vec{\kappa} + \frac{e^2}{2mc^2}\vec{\kappa}^2 = H_0 + \frac{e}{c}\dot{\vec{x}} \cdot \vec{\kappa} + \frac{e^2}{2mc^2}\vec{\kappa}^2 \quad . \quad (3.15)$$

Dabei ist  $H_0$  wieder die Hamilton-Funktion des ungestörten Systems aus Gleichung (3.12) und  $\dot{\vec{x}}$  ist der Geschwindigkeitsvektor des Elektrons, der sich durch Division des Impulsvektors  $\vec{p}$  durch die Masse  $m$  ergibt.

Im nächsten Schritt betrachtet Dirac das Vektorpotential  $\kappa_r$  der Komponente  $r$  des Strahlungsfeldes. Dieses besitzt die Amplitude  $a_r$  und schwingt mit der Frequenz  $\nu_r$

der Strahlungskomponente. Die Richtung des Vektorpotentials ist dabei parallel zu der Richtung  $\vec{e}_r$  des elektrischen Vektors der jeweiligen Strahlungskomponente.

$$\kappa_r = a_r \cos(2\pi\nu_r t + \phi_{r,0}) = 2\sqrt{\frac{h\nu_r}{2\pi c\sigma_r}} \sqrt{N_r} \cos \frac{2\pi\theta_r}{h}; \quad \vec{\kappa}_r = \kappa_r \vec{e}_r; \quad |\vec{e}_r| = 1 \quad (3.16)$$

Zur Beschreibung der Schwingung wird der Phasenwinkel  $\theta_r$  herangezogen, der von der Form  $\theta_r = h\nu_r t + \theta_{r,0}$  ist. Die Größe  $\sigma_r$  bezeichnet die Strahlungsdichte je Frequenz und je Raumwinkel.  $N_r$  ist die Anzahl der Energiequanten in der Komponente  $r$ . Zu beachten ist, dass  $\theta_r$  und  $N_r$  in der quantenmechanischen Betrachtung ein Paar kanonisch konjugierter Variablen bilden. Daher werden diese Ausdrücke für die quantenmechanische Formulierung der Hamilton-Funktion durch entsprechende Terme ersetzt. Außerdem kommt noch die Gesamtenergie des Strahlungsfeldes  $\sum_r N_r h\nu_r$  hinzu und es wird über alle Komponenten  $r$  des Strahlungsfeldes summiert. Die quantenmechanische Formulierung der Hamilton-Funktion lautet somit

$$\begin{aligned} H = H_0 + \sum_r N_r h\nu_r + \frac{e\sqrt{h}}{\sqrt{2\pi c^3}} \cdot \sum_r \dot{x}_r \sqrt{\frac{\nu_r}{\sigma_r}} & \left[ \sqrt{N_r} e^{2\pi i \frac{\theta_r}{h}} + \sqrt{N_r + 1} e^{-2\pi i \frac{\theta_r}{h}} \right] \\ + \frac{e^2 h}{4\pi m c^3} \cdot \sum_{r,s} \cos \alpha_{rs} \sqrt{\frac{\nu_r \nu_s}{\sigma_r \sigma_s}} & \left[ \sqrt{N_r} e^{2\pi i \frac{\theta_r}{h}} + \sqrt{N_r + 1} e^{-2\pi i \frac{\theta_r}{h}} \right] \\ & \times \left[ \sqrt{N_s} e^{2\pi i \frac{\theta_s}{h}} + \sqrt{N_s + 1} e^{-2\pi i \frac{\theta_s}{h}} \right]. \end{aligned} \quad (3.17)$$

$x_r$  bezeichnet hier die Komponente des Vektors  $\vec{x}$  in Richtung  $\vec{e}_r$  des elektrischen Vektors und  $\alpha_{rs}$  den Winkel zwischen den elektrischen Vektor-Richtungen  $\vec{e}_r$  und  $\vec{e}_s$ :

$$x_r = \vec{x} \cdot \vec{e}_r; \quad \cos \alpha_{rs} = \vec{e}_r \cdot \vec{e}_s. \quad (3.18)$$

Die erste Zeile in Gleichung (3.17) beschreibt einfache Emissions- und Absorptionsprozesse und soll hier nicht weiter betrachtet werden. Terme die unabhängig von den Größen  $\theta_r$  und  $\theta_s$  sind tauchen nur für den Fall  $r = s$  auf und können zu der ungestörten Energie  $H_0 + \sum_r N_r h\nu_r$  addiert und ebenfalls ignoriert werden. Terme, die einen Faktor der Form  $\exp(\pm 4\pi i \theta_r / h)$  oder  $\exp(\pm 2\pi i (\theta_r + \theta_s) / h)$  enthalten, entsprechen Prozessen, bei denen zwei Lichtquanten gleichzeitig emittiert oder absorbiert werden. Solche Prozesse sind sehr selten und sollen hier ebenfalls nicht betrachtet werden.

Von Interesse sind die übrigen Terme, die einen Faktor der Form  $\exp(2\pi i (\theta_r - \theta_s) / h)$

mit  $r \neq s$  enthalten. Die Summe dieser Terme ist

$$\begin{aligned} & \frac{e^2 h}{4\pi m c^3} \sum_{r \neq s} \cos \alpha_{rs} \sqrt{\frac{\nu_r \nu_s}{\sigma_r \sigma_s}} \left[ \sqrt{N_r} \sqrt{N_s + 1} e^{2\pi i \frac{\theta_r - \theta_s}{h}} + \sqrt{N_r + 1} \sqrt{N_s} e^{-2\pi i \frac{\theta_r - \theta_s}{h}} \right] \\ &= \frac{e^2 h}{2\pi m c^3} \sum_{r \neq s} \cos \alpha_{rs} \sqrt{\frac{\nu_r \nu_s}{\sigma_r \sigma_s}} \sqrt{N_r} \sqrt{N_s + 1} e^{2\pi i \frac{\theta_r - \theta_s}{h}} \equiv H_1 . \end{aligned} \quad (3.19)$$

Diese Terme beschreiben Übergänge, bei denen Lichtquanten direkt von Zustand  $r$  zu Zustand  $s$  übergehen. Das heißt, hiermit werden Streuprozesse beschrieben. Man sieht schon an dieser Stelle, dass Prozesse mit  $\nu_r \neq \nu_s$  ebenfalls möglich sind. Es kann also zu einer Frequenzänderung des Streulichts kommen, was den Prozess der Raman-Streuung grundlegend von der Rayleigh-Streuung mit  $\nu_r = \nu_s$  unterscheidet.

Der Ausdruck  $H_1$  aus Gleichung (3.19) beschreibt demnach die Störung, die betrachtet werden soll. Da durch die Phasenwinkel  $\theta_r, \theta_s$  die Zeit  $t$  explizit enthalten ist, ist zeitabhängige Störungstheorie anzuwenden.

### 3.2.2 Die Kramers-Heisenberg-Dirac-Relation

Über die Störungstheorie gelangt man schließlich zur Kramers-Heisenberg-Dirac-Relation (KHD) [23, 24]. Auf die genaue Herleitung soll im Rahmen dieser Arbeit verzichtet werden. Die KHD-Relation für den Tensor der Übergangspolarisierbarkeit  $\alpha$  lautet

$$(\alpha_{\sigma\varrho})_{nm} = \frac{1}{h} \sum_r \left( \frac{\langle n | \mu_{\varrho} | r \rangle \langle r | \mu_{\sigma} | m \rangle}{\nu_{rm} - \nu_0 - i\Gamma_r} + \frac{\langle n | \mu_{\sigma} | r \rangle \langle r | \mu_{\varrho} | m \rangle}{\nu_{rn} + \nu_0 - i\Gamma_r} \right) . \quad (3.20)$$

$m, n$  und  $r$  bezeichnen hier den vibronischen Start-, End- und Zwischenzustand des Systems.  $\sigma$  und  $\varrho$  sind die kartesischen Koordinaten des Dipoloperators  $\mu$ .  $\Gamma$  bezeichnet die Dämpfungskonstante des jeweiligen Zustands und entspricht dem Kehrwert der Lebensdauer.

Die Summation über  $r$  bedeutet, dass alle Zustände des Systems betrachtet werden. Für den Resonanz-Raman-Effekt ist derjenige Zustand  $r$  von Bedeutung, bei dem  $\nu_{rm} \approx \nu_0$ . In diesem Fall wird der erste Summand sehr groß, so dass der zweite Summand sowie alle anderen Zustände  $r$  vernachlässigt werden können:

## 3.3 Optische Spektroskopie an aromatischen Aminosäuren

Allgemein werden bei optischer Spektroskopie Übergänge zwischen Energieniveaus indirekt durch Licht beobachtet. Die verschiedenen Niveaus können ihre Ursache z.B. in

verschiedenen Konfigurationen der Elektronen oder in verschiedenen Schwingungen des gesamten Moleküls haben. Im ersten Fall spricht man von elektronischen Niveaus. Diese können z. B. durch Absorption oder Fluoreszenz im sichtbaren oder ultravioletten Bereich beobachtet werden. Schwingungen des Moleküls lassen sich durch Absorption im infraroten Bereich oder durch Raman-Spektroskopie beobachten.

### 3.3.1 Lokale Symmetrie im Chromophor

Das Chromophor der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin entspricht dem Benzolring. Benzol hat eine sehr hohe Symmetrie und gehört zur Punktgruppe  $D_{6h}$ . Im Falle einer Substitution eines der H-Atome, wie bei Phenylalanin, oder zweier H-Atome in para-Stellung, wie bei Tyrosin, reduziert sich die Symmetrie auf die Punktgruppe  $C_{2v}$ . Die Strukturformeln der in dieser Arbeit betrachteten aromatischen Aminosäuren sind in Abb. 3.2 dargestellt.

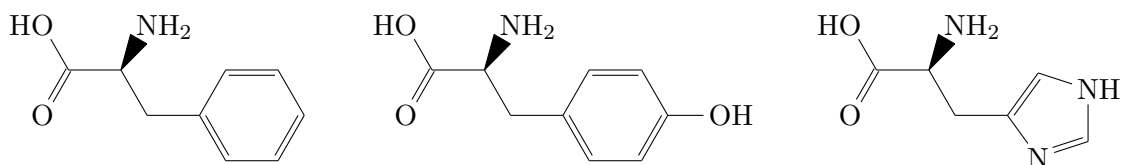


Abbildung 3.2: Von links nach rechts: Die Strukturformeln der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Histidin. Auf der rechten Seite ist jeweils die Seitenkette mit dem Chromophor zu sehen, das bei Phenylalanin und Tyrosin dem Benzolring entspricht.

Dennoch ist die Betrachtung der Symmetrien von Benzol auch für diese aromatischen Aminosäuren nützlich, und es ist üblich, die Schwingungsmoden des aromatischen Ringes nach den entsprechenden Moden von Benzol zu benennen. Die Symmetrien der einzelnen Moden werden mit den Symbolen der irreduziblen Darstellungen aus der Charaktertafel der Punktgruppe  $D_{6h}$  bezeichnet (Tabelle 3.1). Entsprechend dieser Bezeichnungen ist schnell ersichtlich, welche Symmetrien für die jeweilige Schwingung erhalten bleiben und welche gebrochen werden. Da Benzol ein Inversionszentrum hat, gilt das Ausschließungsprinzip. Das heißt, jede Mode weist entweder einer Dipolmomentänderung auf und ist damit IR-aktiv (u-Moden), oder sie hat eine Polarisierbarkeitsänderung und ist daher Raman-aktiv. Moden, die sowohl Raman- als auch IR-aktiv sind, treten nach dem Ausschließungsprinzip bei Molekülen mit Inversionszentrum nicht auf. In dieser Arbeit orientieren wir uns an der Nomenklatur der Benzolschwingungen nach Wilson [26].

Entsprechendes gilt auch für die Molekülorbitale der elektronisch angeregten Zustände, deren Symmetrie sich von dem totalsymmetrischen elektronischen Grundzustand unterscheidet.

Tabelle 3.1: Charaktertafel der Punktgruppe  $D_{6h}$  [27].

	E	2 C <sub>6</sub>	2 C <sub>3</sub>	C <sub>2</sub>	3 C' <sub>2</sub>	3 C'' <sub>2</sub>	i	2 S <sub>3</sub>	2 S <sub>6</sub>	$\sigma_h$	3 $\sigma_s$	3 $\sigma_v$
$A_{1g}$	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
$A_{2g}$	1	1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1
$B_{1g}$	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1
$B_{2g}$	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1
$E_{1g}$	2	1	-1	-2	0	0	2	1	-1	-2	0	0
$E_{2g}$	2	-1	-1	2	0	0	2	-1	-1	2	0	0
$A_{1u}$	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
$A_{2u}$	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1
$B_{1u}$	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1
$B_{2u}$	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1
$E_{1u}$	2	1	-1	-2	0	0	-2	-1	1	2	0	0
$E_{2u}$	2	-1	-1	2	0	0	-2	1	1	-2	0	0

### 3.3.2 Elektronische Niveaus und UV-Absorptions-Spektren

Die elektronischen Niveaus von organischen Molekülen wie den aromatischen Aminosäuren lassen sich durch die Molekülorbitaltheorie (MO-Theorie) beschreiben. Die Molekülorbitale ergeben sich dabei als Linearkombination der einzelnen Atomorbitale. Im elektronischen Grundzustand  $S_0$  besetzen die Elektronen die Molekülorbitale niedrigster Energie. Der erste elektronisch angeregte Zustand  $S_1$  ist dadurch gekennzeichnet, dass sich ein Elektron im niedrigsten unbesetzten Orbital (LUMO) befindet, welches vorher das höchste besetzte Orbital (HOMO) besetzt hatte. Abbildung 3.3 zeigt die Energieniveaus und die ersten drei angeregten Zustände von Benzol schematisch. Die verschiedenen elektronischen Niveaus weisen unterschiedliche Symmetrien auf. Die Symbole der entsprechenden irreduziblen Darstellungen sind in der Abbildung rechts dargestellt. Der Grundzustand von Benzol ist totalsymmetrisch und hat damit die gleiche Symmetrie wie die irreduzible Darstellung  $A_{1g}$ . Die ersten beiden angeregten Zustände weisen eine dreizählige Symmetrie entsprechend den Darstellungen  $B_{2u}$  und  $B_{1u}$  auf. Der dritte angeregte Zustand ist zweifach entartet. Die Symmetrie entspricht der irreduziblen Darstellung  $E_{1u}$ . [28]

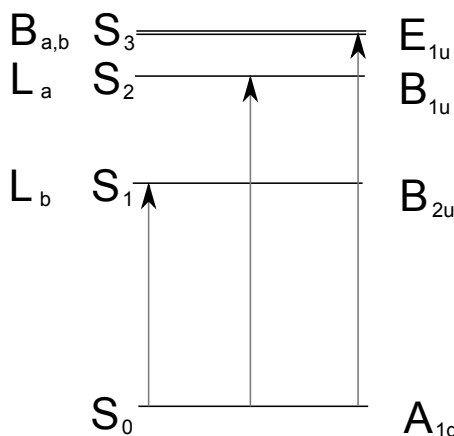


Abbildung 3.3: Elektronische Niveaus und Übergänge in Benzol. Rechts sind die Symmetrien der jeweiligen Zustände benannt. Ganz links ist die Benennung der elektronischen Zustände nach Platt [29] aufgeführt. Die Pfeile bezeichnen Übergänge aus dem totalsymmetrischen Grundzustand  $S_0$ . Die Chromophore von Phenylalanin und Tyrosin weisen die gleichen Niveaus auf, deren Energien ein wenig verschoben sind. Die Symmetrien dieser elektronischen Zustände sind entsprechend der jeweiligen Molekülstruktur degradiert.

Der Übergang von  $S_0$  nach  $S_1$  kann z. B. durch die Absorption von einem Photon ausgelöst werden. Die Energie des Photons  $h\nu$  entspricht dann der Energiedifferenz  $\Delta E$  zwischen LUMO und HOMO bzw. zwischen  $S_1$  und  $S_0$ . Die Wellenlänge  $\lambda = c/\nu = hc/\Delta E$  liegt bei organischen Molekülen häufig im UV oder sichtbaren Bereich. Benzol z. B. hat ein Absorptionsmaximum bei 200 nm – 260 nm, was einer Energiedifferenz von 4,8 eV – 6,2 eV entspricht.

Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin weisen ein Chromophor auf, das von Benzol abgeleitet ist. Die Absorptionsbande ist hier ein wenig ausgedehnter und reicht bis 270 nm (Phe) bzw. 290 nm (Tyr). Die Absorptionsspektren von Tyrosin und Phenylalanin im UV-Bereich sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

### 3.3.3 Normalmoden und Schwingungs-Raman-Spektren

Die Energiedifferenzen, die sich durch Schwingungen der Moleküle ergeben, sind wesentlich geringer als die Energiedifferenzen der elektronischen Niveaus. Die ebenen Ring-Streckschwingungen  $\nu_{8a}$  und  $\nu_{8b}$  von Tyr und Phe haben Energien von etwa 0,2 eV. Photonen dieser Energie haben eine Wellenlänge von 6250 nm bzw. eine Wellenzahl von  $1600 \text{ cm}^{-1}$  und liegen damit im mittleren Infrarot-Bereich.



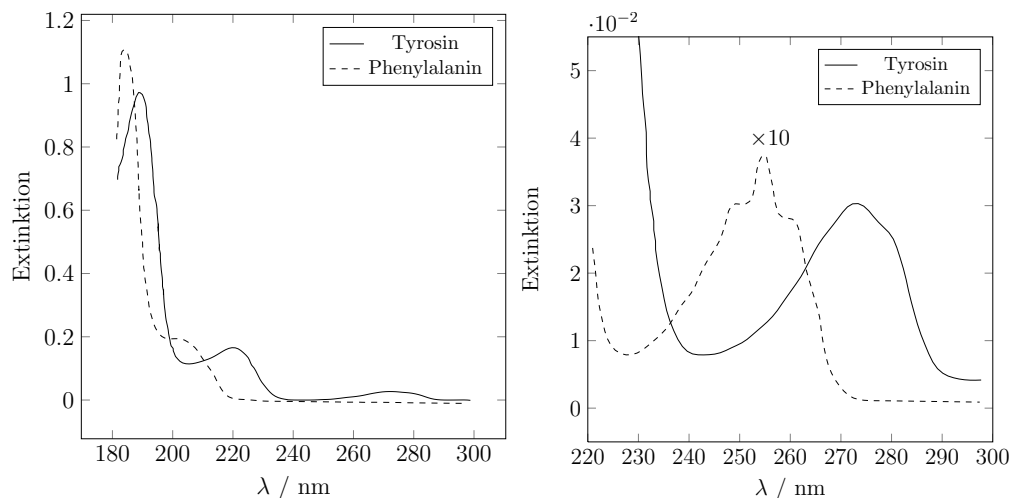


Abbildung 3.4: Absorptionsspektrum von Tyrosin und Phenylalanin. In der rechten Abbildung ist die Absorption von Phe zehnfach vergrößert dargestellt. Die Daten stammen von der Arbeitsgruppe um Spiro [30, Abbildung 2].

Entsprechend lassen sich diese Schwingungen auch durch Absorptionsspektroskopie im Infrarot-Bereich beobachten, vorausgesetzt, dass sich bei den Schwingungen das elektrische Dipolmoment  $\vec{\mu}$  ändert. Da organische Moleküle meist in wässriger Lösung vorliegen, bietet sich hier als Alternative die Raman-Spektroskopie an. Wasser absorbiert sehr stark im Infrarot-Bereich bei  $1600\text{ cm}^{-1}$  aufgrund der Biegeschwingung  $\nu_2(\text{H}_2\text{O})$ . Die Raman-Aktivität von  $\nu_2(\text{H}_2\text{O})$  ist dagegen relativ gering und daher weitaus weniger störend bei der Beobachtung der Schwingungen von organischen Molekülen. Im Falle der aromatischen Aminosäuren ist der Vorteil der Raman-Spektroskopie gegenüber der IR-Absorptionsspektroskopie noch größer, wenn als Lichtquelle ein Laser verwendet wird, dessen Wellenlänge im Absorptionsbereich der beobachteten Moleküle liegt und man sich so den RR-Effekt zunutze macht. Die Schwingungsvektoren und Symmetrien einiger Normalmoden von Benzol sind exemplarisch in Abb. 3.5 dargestellt.

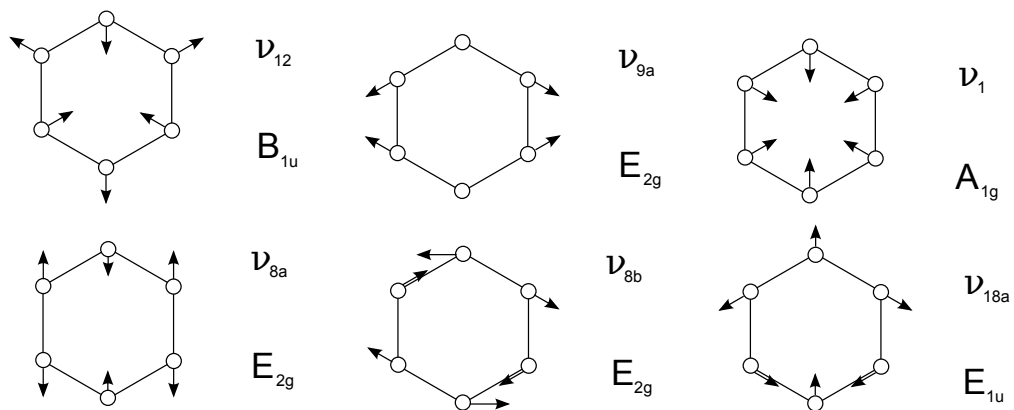


Abbildung 3.5: Die Schwingungsvektoren der Kohlenstoffatome in Benzol bzw. im Chromophor von Phenylalanin und Tyrosin für einige ausgewählte Schwingungen. Die Symmetrien sind für den Fall von Benzol jeweils unten rechts aufgeführt. Bei den aromatischen Aminosäuren ist die Symmetrie entsprechend degradiert. [26, 31–33]

## 4 Verwendete Geräte und Materialien

Grundsätzlich sind drei Komponenten notwendig, um spektroskopische Experimente durchzuführen. Diese sind:

- eine Lichtquelle, in der Licht erzeugt wird
- eine Probe, die von diesem Licht beleuchtet wird
- und ein Messgerät, mit dem das Licht nach der Wechselwirkung mit der Probe spektral untersucht wird.

Aufgrund der Eigenschaften der Probe wird das Licht verändert. Mit Hilfe des Messgeräts werden die Veränderungen erkennbar, woraus sich wiederum Schlüsse über die Eigenschaften der Probe ziehen lassen. Im einfachsten Fall kann zum Beispiel das Sonnenlicht als Lichtquelle und das menschliche Auge als spektroskopisches Messgerät dienen. Wenn es sich bei der Probe um einen farbigen Körper handelt, erkennt man dabei, dass die verschiedenen Komponenten des weißen Sonnenlichts verschieden stark gestreut werden. Aufgrund dieser Farbigkeit lassen sich Rückschlüsse auf die elektronische Struktur der Probe ziehen.

Zu diesen Komponenten kommen meist noch optische Bauteile wie Spiegel und Linsen, um das Licht von der Lichtquelle zur Probe und von der Probe zum Messgerät zu lenken. So wird der Strahlengang festgelegt. Mit diesen Hilfsmitteln wird die Messung deutlich effizienter und zum Teil erst möglich. Da die Messwerte des Messgeräts modernen Geräten meist in digitaler Form vorliegen, ist es zumeist praktikabel für die Auswertung und Darstellung geeignete Software zu verwenden.

### 4.1 Lichtquelle: DUV-Laser-System

Da das Raman-Signal sich immer um einen gewissen Energiebetrag von dem eingestrahlten Licht unterscheidet, wirkt sich die Schmalbandigkeit der Anregungsstrahlung direkt auf die Schmalbandigkeit der gemessenen Spektren aus. Es ist also von Vorteil, möglichst schmalbandige, monochromatische Strahlung zur Anregung zu verwenden. Dies kann zum Beispiel erreicht werden, indem vom Licht einer breitbandigen Lichtquelle mit einem Monochromator ein schmaler Wellenlängen-Bereich selektiert wird. Effizienter ist aber die Verwendung eines Lasers. Da Laserstrahlung sehr schmalbandig ist, ist sie ideal zur Raman-Spektroskopie geeignet.

Für einige Vorexperimente wurden verschiedene Laser bei verschiedenen Wellenlängen benutzt. Der überwiegende Teil der Messungen wurden mit dem Indigo-S-Lasersystem der Firma Coherent durchgeführt. Damit ist es möglich, viele verschiedene Wellenlängen auszuwählen. Insbesondere kann der tiefe UV-Bereich (*deep UV*, **DUV**) im Bereich um 200 nm erschlossen werden.

DUVRR-Spektroskopie wurde schon für zeitaufgelöste Anrege-Abfrage-Experimente (*pump-probe*) verwendet, bei denen die Dynamik von Konformationsänderungen in Proteinen untersucht werden. Diese Konformationsänderungen können z. B. durch Temperatur-Sprünge initiiert werden. [34–36]

Obwohl DUVRR-Spektren viele Informationen über Struktur und Dynamik liefern, ist diese Technologie in der molekularen Biophysik und biophysikalischen Chemie noch nicht sehr weit verbreitet. Ein Grund dafür sind technische Schwierigkeiten, insbesondere die Notwendigkeit geeigneter Laser-Quellen.

In der Arbeitsgruppe von Asher wurde ein frequenzverdoppelter Krypton-Ionen-Laser im Dauerstrich-Betrieb verwendet, um Tief-UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von 206,5 nm zu erzeugen [37–39]. Dieser Laser ist auf diese eine Wellenlänge beschränkt und erlaubt keine zeitaufgelösten Experimente.

Frühere Ansätze zu gepulsten Tief-UV-Laser basieren auf Nd:YAG-Lasern, die mit einem Güteschalter (Q-Switch) bei z. B. 10 Hz [40] bis 100 Hz [35, 41] Repetitionsrate betrieben werden. Die Strahlung des Nd:YAG-Lasers wird dabei mit einem Raman-Shifter in den gewünschten Wellenlängenbereich verschoben. Die Nachteile dieses Ansatzes sind ein schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis und das Auftreten von Sättigungseffekten [42, 43].

Eine große Verbesserung war das Aufkommen von schmalbandigen, gütegeschalteten Ti:Saphir-Lasern. Diese Festkörper-Laser können über einen weiten Wellenlängenbereich durchgestimmt und mit Repetitionsraten von einigen kHz betrieben werden. In der Arbeitsgruppe um Spiro wurde gezeigt, dass die frequenzvervierfachte Strahlung der Ti:Sa-Fundamentalen bei  $\sim 800$  nm schmalbandige und abstimmbare Tief-UV-Laser-Strahlung im Bereich 193 nm – 210 nm liefert [36, 44]. Von Asher und seinen Mitarbeitern wurde ein ähnliches abstimmbares Laser-System bei 5 kHz Repetitionsrate beschrieben [45]. Ein wichtiger Vorteil dieser Laser-Technologie im kHz-Bereich ist die hohe Signal-Qualität, da aufgrund der hohen Repetitionsrate über viele Einzelmessungen gemittelt werden kann.

Bei dem DUV-Laser-System Indigo-S handelt es sich um ein durchstimmbares Festkörperlaser-System der Firma Coherent. Die Repetitionsrate beträgt 4 kHz bei einer Pulsbreite von 15 ns. Herzstück ist ein Titanium-Saphir-Laser (Ti:Sa), der infrarote Laserstrahlung im Bereich 770 nm – 840 nm erzeugt. Zum Pumpen des Ti:Sa-Oszillators wird ein gepulster frequenzverdoppelter Nd:YLF-Laser des Typs Evolution mit einer Wellenlänge von 527 nm verwendet. Die grobe Auswahl der Wellenlänge des Ti:Sa-Oszillators wird durch ein Prisma innerhalb der Kavität ermöglicht. Dazu wird über das Computer-

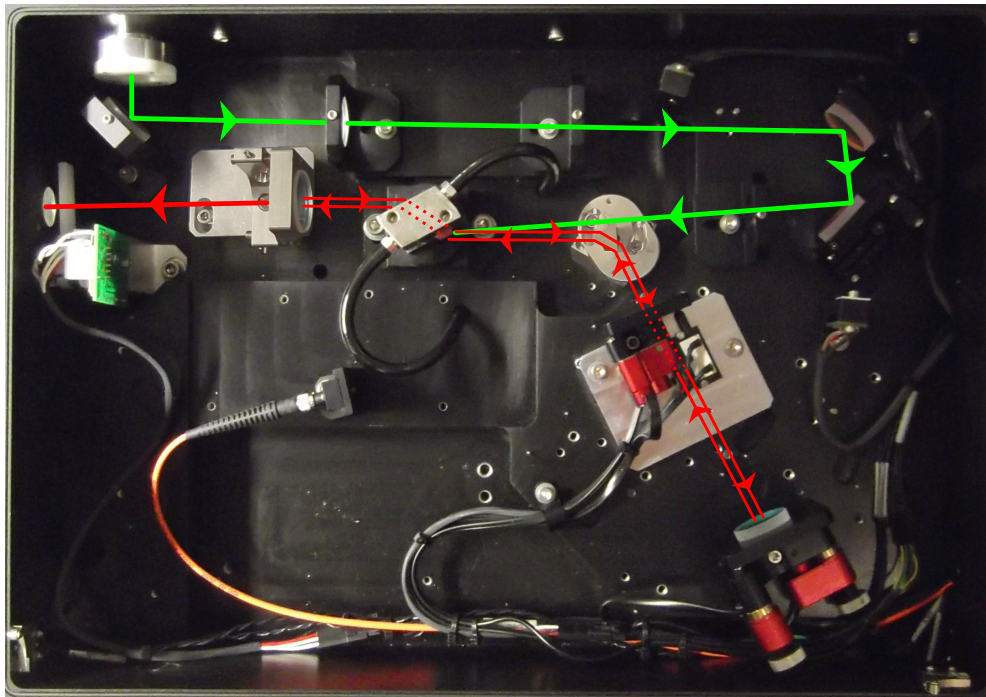


Abbildung 4.1: Die Kavität des Ti:Sa-Oszillators. Eingezeichnet sind die Strahlengänge der Pumpstrahlung (527 nm) in grün und der Ti:Sa-Strahlung (770 nm – 840 nm) in rot. Innerhalb der Kavität ist der Ti:Sa-Strahl doppelt gezeichnet. Die einzelnen Bauteile von links nach rechts entlang des Ti:Sa-Strahls sind die Verschlussblende (*shutter*), der Auskoppelspiegel, der Ti:Sa-Kristall, das Prisma, der Etalon und der hochreflektierende hintere Spiegel. Unterhalb des Ti:Sa-Kristalls befindet sich der Lichtleiter, der zum internen Spektrometer des Lasersystems führt.

Interface die horizontale Verkippung des hochreflektierenden hinteren Spiegel mittels einer motorisierten Stellschraube variiert. Die Feinjustage der Wellenlänge erfolgt mit Hilfe eines ebenfalls motorisierten Etalons. Das spektrale Profil kann durch ein eingebautes Spektrometer direkt am Rechner beobachtet werden. Die Kavität des Ti:Sa-Oszillators wird in Abb. 4.1 gezeigt.

Aus der infraroten Ti:Sa-Strahlung werden in der sogenannten *Harmonics-Box* durch Frequenzverdoppelung und Frequenzaddition die harmonischen Oberschwingungen erzeugt. Die *Harmonics-Box* ist in Abb. 4.2 zu sehen.

Im ersten Schritt wird die Ti:Sa-Strahlung frequenzverdoppelt. Dazu wird diese auf einen nichtlinearen Kristall aus Lithiumtriborat (LBO) fokussiert. Dadurch entsteht blaues Licht mit einer Wellenlänge von 385 nm – 420 nm. Dieses Licht der zweiten Harmoni-

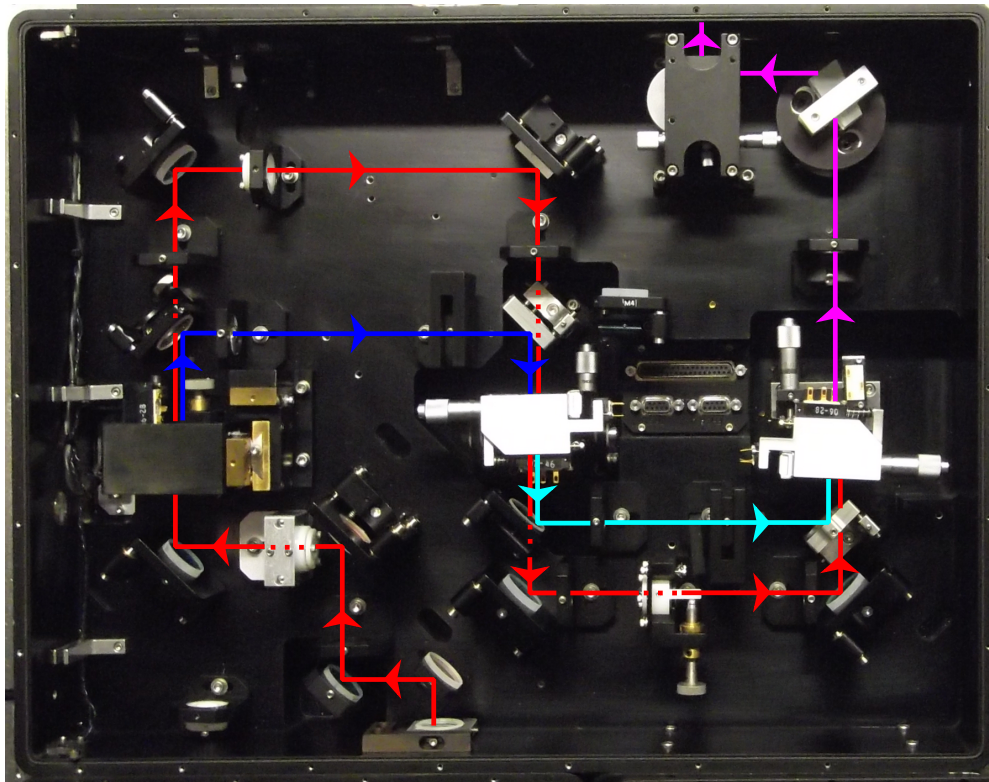


Abbildung 4.2: Die geöffnete *Harmonics-Box* des Indigo-S-Lasersystems, mit dem Optiksatz A. Eingezeichnet sind die Strahlengänge der Ti:Sa-Fundamental-Strahlung (770 nm – 840 nm) in rot, der zweiten Harmonischen (SHG, 385 – 420 nm) in blau, der dritten Harmonischen (THG, 257 – 280 nm) in cyan, und der vierten Harmonischen (FHG, 193 – 210 nm) in magenta. Die Kristalle zur Erzeugung der Harmonischen befinden sich jeweils in den großen Kästen am Anfang des jeweiligen Strahlengangs. Die  $\lambda/2$ -Verzögerungsplättchen sind auf den waagerechten Abschnitten des Fundamentalstrahls parallel zu den SHG- bzw. THG-Strahlen positioniert. Die Pellin-Broca-Prismen befinden am Ende des FHG-Strahls.

schen (*second harmonic generation*, **SHG**) wird mit einem dichroitischen Spiegel von der verbleibenden Strahlung der Fundamentalen getrennt.

Als Nächstes folgt die Erzeugung der dritten Harmonischen (*third harmonic generation*, **THG**) mit einem Beta-Bariumborat-Kristall (BBO). Hier werden die Fundamental-Strahlung und die SHG-Strahlung auf den Kristall fokussiert. Es wird die Summe der eingestrahnten Frequenzen erzeugt. Dieses Licht befindet sich im ultravioletten Spektralbereich bei einer Wellenlänge von 257 nm – 280 nm.

Um schließlich die vierte Harmonische (*fourth harmonic generation*, **FHG**) zu erzeugen, werden wieder THG- und Fundamental-Strahlung getrennt und auf einen zweiten BBO-Kristall fokussiert. Hier kommt es wieder zur Summation der Frequenzen. Das Licht der THG-Stufe liegt mit 193 nm – 210 nm im tiefen UV-Bereich. Schließlich werden die Strahlungen der verschiedenen Wellenlängen mit zwei Pellin-Broca-Prismen voneinander getrennt.

#### 4.1.1 Verschiedene Optik-Sätze

Ein Großteil der Komponenten des Indigo-Lasers und der *Harmonics-Box* können durch andere Komponenten mit abweichenden Spezifikationen ersetzt werden, um andere Wellenlängen zu verwenden. Auf den vorhergehenden Seiten wurde die Funktionsweise mit dem Optik-Satz A bei Benutzung der FHG-Strahlung beschreiben.

Um die Fundamentale oder die SHG bei einem der beiden Optik-Sätze zu benutzen, kann die jeweilige Strahlung einfach mit einem entsprechenden Spiegel aus einem zusätzlichen Ausgang der Harmonic-Box ausgekoppelt werden. Für die THG-Strahlung des Optik-Satzes A ist das direkte Auskoppeln nicht vorgesehen. Die einfachste Möglichkeit zum Erhalt der THG-Strahlung ist eine Drehung der Pellin-Broca-Prismen, so dass die THG statt der FHG-Strahlung ausgekoppelt wird. Um eine höhere Leistung zu erhalten, sollte der FHG-Kristall entfernt werden. Dies hat natürlich den Nachteil, dass die Strahlen für die Erzeugung der FHG neu justiert werden müssen, sollte diese wieder verwendet werden.

Im Optik-Satz B kann nicht so einfach zwischen der THG und der FHG gewechselt werden. Der Grund dafür ist, dass hier die FHG durch Frequenzverdoppelung der SHG-Strahlung erzeugt wird, anstatt durch Addition von THG und Fundamentaler, wie dies beim Optik-Satz A der Fall ist. Abgesehen von den einfachen Auskoppelungen sind somit drei Konfigurationen zu unterscheiden: Satz A FHG, Satz B THG und Satz B FHG. Tabelle 4.1 fasst die Bereiche der Wellenlängen und Leistungen der verschiedenen Konfigurationen laut Spezifikationen des Herstellers zusammen.

Um von einer Konfiguration zu einer anderen zu wechseln, sollte möglichst systematisch vorgegangen werden. So können Leistung und Strahlqualität auf einem hohen Niveau gehalten werden und die nachträgliche Justage des gesamten Aufbaus wird stark vereinfacht. Im Folgenden ist das Vorgehen für den Wechsel von Satz B FHG auf Satz B THG sowie von Satz B THG auf Satz A FHG exemplarisch beschrieben.

##### 4.1.1.1 Wechsel von Satz B FHG auf Satz B THG

Die Konfiguration für die FHG im Satz B war die Konfiguration, in der das Laser-System geliefert wurde. Hier ist die Position des THG-Kristalls noch leer und die FHG wird

Tabelle 4.1: Wellenlängenbereiche und maximale Leistungen der Optik-Sätze A und B des Indigo-Lasers laut Spezifikationen [46].

Optik-Satz	Fundamentale	SHG	THG	FHG
A	770 – 840 nm	385 – 420 nm	257 – 280 nm	193 – 210 nm
	1 – 1,4 W	150 – 350 mW	20 – 65 mW	1 – 8 mW
B	840 – 900 nm	420 – 450 nm	280 – 300 nm	210 – 225 nm
	1,1 – 1,4 W	200 – 350 mW	25 – 45 mW	7 – 12 mW

durch Frequenzverdoppelung der SHG-Strahlung erzeugt. Da die Fundamentale einzig zur Erzeugung der SHG-Strahlung genutzt wird ist der Strahlengang der Fundamentalen hinter dem SHG-Kristall blockiert.

Der erste Schritt besteht darin, bei ausgeschaltetem Laser diese Blockade zu entfernen. Gegebenenfalls wird ein  $\lambda/2$ -Verzögerungsplättchen in den IR-Strahl parallel zum SHG Strahl eingesetzt. Dieses Verzögerungsplättchen dreht die Polarisation der Fundamentalen um  $90^\circ$  und ermöglicht so die Erzeugung der THG. An die spätere Position des THG-Kristalls und in Verlängerung dahinter werden Lochblenden eingesetzt. Diese Lochblenden haben eine dunkle und eine vergoldete Seite. Es ist wichtig, die vergoldete Seite in Richtung der einfallenden Strahlung einzusetzen.

Nun wird der Laser eingeschaltet. Dabei wird aus Sicherheitsgründen der kleinstmögliche Strom gewählt, bei dem noch eine stabile Laserstrahlung erzeugt wird. Zusätzlich wird der Laser mit einem OD-Filter abgeschwächt. Sowohl der Fundamentalstrahl als auch der SHG-Strahl werden mit den Spiegeln hinter dem SHG-Kristall so eingestellt, dass beide Lochblenden getroffen werden. Der jeweils andere Strahl wird dabei blockiert. Für die Justage der Fundamentalen sollte eine IR-Kamera verwendet werden, um mit geringer Intensität auszukommen.

Nach dieser Justage wird der Laser ausgeschaltet und die beiden Lochblenden entfernt. Nun wird der THG-Kristall eingesetzt, wobei hier auf die korrekte Ausrichtung zu achten ist. Ein „T“ wie *Top* markiert die Oberseite des Kristalls. Hinter dem THG-Kristall befinden jetzt sich noch zwei Spiegel, die die SHG-Strahlung zum FHG leiten. Diese werden durch THG-Spiegel ersetzt und der FHG-Kristall wird entfernt.

Nun wird der Laser wieder eingeschaltet. Ein Stück Detektorpapier (siehe Kapitel 4.3.1) wird direkt vor die Pellin-Broca-Prismen platziert. Der Winkel des THG-Kristalls wird so lange variiert, bis auf dem Detektor-Papier ein heller Punkt erscheint. An Stelle des Papier wird ein Leistungsmesskopf gesetzt und nun werden alle Stellschrauben so justiert,



dass eine maximale Leistung an THG-Strahlung erhalten wird. Dazu gehören der Winkel des THG-Kristalls, die Translation des THG-Kristalls senkrecht zum Laserstrahl und die beteiligten Spiegel.

Schließlich wird ein  $\lambda/2$ -Verzögerungsplättchen für die THG-Strahlung in den Strahlengang platziert. Dadurch wird die Polarisierung der THG-Strahlung um  $90^\circ$  gedreht, wodurch sie dann parallel zur Einfallsebene der Pellin-Broca-Prismen ist. Das minimiert die Verluste durch Reflexion an der Prismenoberfläche. Im letzten Schritt wird der Leistungsmesskopf an den Ausgang des Lasers platziert und die Pellin-Broca-Prismen werden so eingestellt, dass die THG-Strahlung den Laser verlässt und hier maximale Leistung aufweist. Um diesen Schritt schneller durchzuführen, empfiehlt es sich, die korrekte Stellung der PB-Prismen zu markieren.

#### 4.1.1.2 Wechsel von Satz B THG auf Satz A FHG

Die Konfiguration im Optik-Satz A ist diejenige, mit der alle in dieser Arbeit vorgestellten Experimente durchgeführt wurden. Als Vorbereitung für den Wechsel von Optik-Satz B auf Satz A wird der Laser auf die gerade noch zugängliche Wellenlänge von 840 nm gefahren.

Als erstes werden die beiden Spiegel, die die Kavität des Ti:Sa-Lasers bilden, ausgetauscht. Begonnen wird bei ausgeschaltetem Laser mit dem hinteren hochreflektierenden Spiegel. Der Laser wird wieder eingeschaltet und die Ausrichtung des hochreflektierenden Spiegels wird auf maximale Leistung der Fundamentalstrahlung hinter dem Auskoppelspiegel optimiert. Danach wird der Laser wieder ausgeschaltet und der Auskoppelspiegel wird ausgetauscht. Nun wird der Laser wieder eingeschaltet und die Ausrichtung des Auskoppelspiegels so optimiert, dass das interne Spektrometer ein möglichst schmales Profil bei der eingestellten Wellenlänge von 840 nm anzeigt. Schließlich wird abermals die Verkipfung des hochreflektierenden Spiegels auf Leistung hinter dem Auskoppelspiegel optimiert.

Im folgenden Schritt werden der SHG-Kristall und die SHG-Spiegel ausgetauscht. Der SHG-Kristall wird auf Leistung der SHG-Strahlung optimiert. Danach werden Lochblenden an die Stelle des THG-Kristalls und in Verlängerung dahinter gesetzt. Die Justage der Fundamental- und der SHG-Strahlung erfolgt nacheinander analog zum Vorgehen beim zuvor beschriebenen Wechsel auf das Optik-Satz B THG.

Nun werden der Kristall und die Spiegel für die THG-Strahlung des Sets A eingesetzt. Es folgt die Justage dieser Komponenten auf maximale THG-Leistung vor den Pellin-Broca-Prismen. Das  $\lambda/2$ -Verzögerungsplättchen für die THG-Strahlung wird entfernt.

Jetzt muss nur noch die FHG-Strahlung erzeugt werden. Dafür wird der Laser ausgeschaltet und Lochblenden werden an die Position des FHG-Kristalls und in Verlängerung dahinter gesetzt. Bei geblockter IR-Strahlung wird die THG durch die Lochblenden jus-

tiert. Danach ist die THG-Strahlung zu blockieren. Die IR-Spiegel und ein  $\lambda/2$ -Verzögerungsplättchen für die Fundamentalstrahlung werden eingesetzt und so justiert, dass die Fundamentale nun durch beide Lochblenden fällt.

Schließlich wird der Laser ausgeschaltet, alle Blockaden und Lochblenden entfernt und der FHG-Kristall eingesetzt. Der Laser wird ein letztes Mal eingeschaltet und der Winkel des FHG-Kristalls wird variiert, bis auf einer Detektorkarte vor den PB-Prismen ein zusätzlicher Lichtpunkt auftaucht. Die PB-Prismen werden so gedreht, dass diese FHG-Strahlung den Laser durch den Ausgang verlässt. Als letztes werden alle Stufen noch einmal auf maximale FHG-Leistung optimiert.

## 4.2 Messgerät: Dreifach-Monochromator

Bei dem Monochromator handelt es sich um ein Trivista TR777 der Firma S&I (Spectroscopy & Imaging GmbH). Es handelt sich um einen Dreifach-Monochromator. Jede der drei Stufen hat eine Brennweite von 750 mm und besitzt drei verschiedene Gitter, die jeweils mit positiver oder negativer Dispersion verwendet werden können.

Das Spektrometer hat eine Apertur von  $f/9,8$ . Das entspricht einem Öffnungswinkel von  $\alpha = 2 \arcsin \frac{1}{2 \cdot 9,8} \approx 5,8^\circ$ . Somit werden die Gitter des Spektrometers komplett ausgeleuchtet, wenn das gesammelte Licht in einem Lichtkegel mit einem Öffnungswinkel von  $5,8^\circ$  in den Eingangsspalt einfällt.

Je nachdem, ob die Gitter der einzelnen Stufen mit positiver oder negativer Dispersion verwendet werden, lässt sich das Spektrometer in verschiedenen Modi betreiben. Im additiven Modus werden alle Stufen auf positive Dispersion gestellt. Dadurch wird eine wesentlich höhere spektrale Auflösung erreicht. Im subtraktiven Modus wird die zweite Stufe mit negativer Dispersion betrieben. Das heißt, das Licht, das in der ersten Stufe getrennt wurde, wird hier wieder zusammengeführt und nur die dritte Stufe trägt tatsächlich zur spektralen Auflösung bei. Der Vorteil dieser Betriebsart ist, dass die ersten beiden Stufen einerseits als Bandpassfilter arbeiten, und darüber hinaus unerwünschtes Streulicht unterdrückt wird. Dadurch kann z. B. sehr nah an die Rayleigh-Linie herangefahren werden.

Außerdem haben wir das Spektrometer in einem zweistufigen Modus als Doppelmonochromator betrieben. Hierbei handelt es sich um einen additiven Modus der zweiten und dritten Spektrometer-Stufe. Die erste Stufe wird nicht benutzt, statt dessen wird das zu untersuchende Licht direkt in die zweite Stufe geleitet. Der Vorteil ist, dass weniger Licht auf dem Weg zum Detektor verloren geht. Die spektrale Auflösung liegt zwischen der Auflösung der beiden zuvor besprochenen Modi. Die etwas schlechtere Streulichtunterdrückung wird durch eine höhere Lichtausbeute mehr als ausgeglichen. Da dieser Modus von der Software des Spektrometers nicht vorgesehen ist, werden die Wellenzahlen so

berechnet, als ob alles drei Stufen im additiven Modus verwendet würden. Dieser Fehler wird beim Nachbearbeiten der Spektren korrigiert. Siehe hierzu die Beschreibung der Funktion `DoubleModeCorrention.m` in Kapitel 4.4.

Der Detektor in der dritten Stufe besteht aus einem Bildverstärker und einer CCD. Der Bildverstärker ist vor allem nötig, da die CCD im DUV-Bereich nicht sehr empfindlich ist und bei der Verstärkung das Licht in sichtbares Licht umgewandelt wird. Zunächst wird das einfallende Licht mit einer Photo-Kathode in ein Signal von Elektronen umgewandelt. Die herausgeschlagenen Elektronen werden in einer Mikrokanalplatte vervielfacht und fallen danach auf einen fluoreszierenden Schirm, der schließlich sichtbares Licht emittiert, das von der CCD detektiert wird. Das Bild auf der CCD wird über eine Kamera-Steuerung ausgelesen und auf einem Computer gespeichert. Durch Beschaltung der Photo-Kathode ist es möglich, den Bildverstärker nur in einem bestimmten zeitlichen Fenster zu aktivieren (*gating*). Hierzu wird die Photo-Kathode mit dem Güteschalter des gepulsten Lasers gekoppelt. Der Bildverstärker ist dann nur in dem zeitlichen Fenster aktiv, wenn auch tatsächlich das Streulicht eines Laser-Pulses gemessen werden kann. Bei einer Repetitionsrate von 4 kHz kommt es alle 250  $\mu\text{s}$  zu einem Puls. Um Verluste aufgrund der Ungenauigkeit in der Regelmäßigkeit der Laser-Pulse (*jitter*) zu vermeiden, ist es ratsam das zeitliche Fenster für den Bildverstärker etwas länger als die Pulsweite von 15 ns zu wählen. In unseren Experimenten hat sich ein zeitliches Fenster von 30 ns bewährt. Durch diese Maßnahme wird das mögliche Auftreten von Signalen, die nicht von dem gepulsten Laser-Licht herrühren, um einen Faktor von  $\frac{250 \mu\text{s}}{30 \text{ ns}} \approx 8300$  reduziert. Das Auftreten von kosmischen Spikes kann so leider nicht verhindert werden, da diese ungehindert direkt auf die CCD treffen.

Ebenfalls in der dritten Stufe befindet sich ein zweiter Ausgang, an den ein zweiter Detektor, wie z. B. eine Photodiode, angebracht werden kann. Wir haben diesen Ausgang als Eingang für einen Justage-Laser verwendet. Für die Justage wird der Spalt am Ausgang zur CCD verschlossen und statt dessen der Spalt vor dem Justage-Laser geöffnet. Die optischen Gitter in allen drei Stufen werden auf nullte Ordnung gestellt, d. h. sie fungieren in diesem Fall als einfache Spiegel. Der Justage-Laser ist ein einfacher HeNe-Laser mit nur geringer Leistung. Er wurde so positioniert und ausgerichtet, dass er alle Spalte, Gitter und Spiegel möglichst mittig trifft. Am Ende verlässt der Strahl das Spektrometer durch den Eingang der ersten Stufe. Die Justage (siehe Kapitel 4.3.1) der Experimente wird so wesentlich vereinfacht.

### 4.3 Strahlengang

In den ersten Vorexperimenten wurden Spiegel verwendet, die für die DUV-Laser-Linie von Excimer-Lasern bei 193 nm optimiert sind. Da wir für unsere Experimente aber mehrere Wellenlängen verwenden wollten, haben wir Spiegel aus verschiedenen Materialien

im Wellenlängenbereich von 193 nm – 200 nm vermessen. Neben den für die 193 nm-Linie optimierten Excimer-Spiegeln wurden Spiegel aus unbeschichtetem Aluminium und unbeschichtetem Silber untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Der aufgetragene Wirkungsgrad errechnet sich aus dem Quotienten der Laserleistung vor und hinter dem jeweiligen Spiegel. Beide Leistungen wurden direkt nacheinander mit dem selben Leistungsmesskopf gemessen.

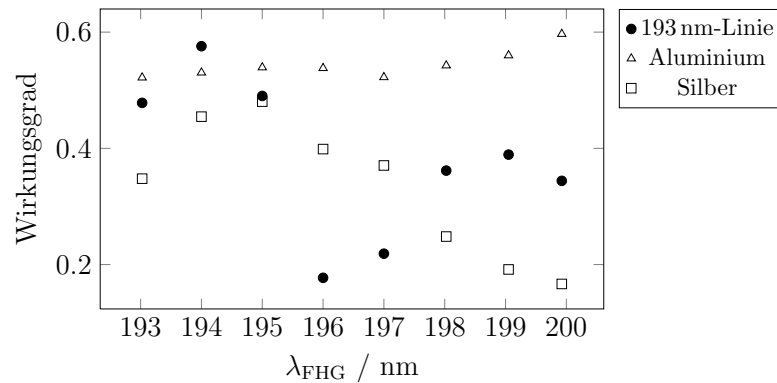


Abbildung 4.3: Wirkungsgrad der verschiedenen Spiegel.

Sowohl die Excimer-Spiegel, als auch die Silber-Spiegel weisen in dem betrachteten Bereich eine Effizienz auf, die sehr stark von der Wellenlänge abhängt. Der Excimer-Spiegel hat eine maximale Effizienz von 56 % bei 194 nm und ein Minimum von 19 % bei 196 nm. Die Effizienz des Silber-Spiegels beträgt maximal 48 % bei 195 nm und mindestens 17 % bei 200 nm. Demgegenüber ist die Effizienz der Aluminium-Spiegel wesentlich gleichmäßiger und liegt durchgängig im Bereich von 52 % – 60 %.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass Excimer-Spiegel nur bei einer Wellenlänge im Bereich um 194 nm die beste Wahl sind. Überraschend war, dass die Aluminium-Spiegel auch bei 193 nm effizienter sind als die Excimer-Spiegel, die für gerade diese Wellenlänge gezielt produziert wurden. Da der Unterschied bei 194 nm mit 56 % gegenüber 53 % nur gering ist, wurden in allen hier beschriebenen Experimenten durchgängig unbeschichtete Aluminium-Spiegel verwendet.

Für die Fokussierung von sichtbarem Licht werden in unserem Labor üblicherweise Linsen aus dem Borosilikat-Kronglas BK7 verwendet. Dieses ist im UV-Bereich unter 350 nm aber nicht mehr durchlässig. Daher wurden zum Fokussieren der Strahlung im 200 nm-Bereich unbeschichtete Linsen aus DUV-optimiertem Silizium (*UV-fused silica*) verwendet.

### 4.3.1 Justage

Vor jedem Experiment wurde der Strahlengang justiert, um die Ausbeute und damit die Qualität der Spektren zu maximieren. Dabei haben sich der Justage-Laser (siehe Kapitel 4.2) und fluoreszierende Detektorkarten als besonders hilfreich erwiesen.

Die Detektorkarten konnten aus Büromaterialien sehr leicht selbst hergestellt werden. Als Basis dienten Pappkarten, die mit einem Loch versehen waren. Wenn der Laserstrahl durch das Loch fällt, kann ein Reflex in der Nähe des ursprünglichen Strahls so sehr einfach entdeckt werden. Der verwendete UV-Laser ist auf Pappkarten ohne weiteres über ein blaues Fluoreszenzsignal der Pappkarte zu beobachten. Um die Empfindlichkeit zu steigern, wurden die Karten mit Textmarkern angemalt. Dabei wurden für Vorder- und Rückseite verschiedene Farben verwendet, so dass anhand der Farbe der Fluoreszenz sehr schnell zu erkennen ist, von welcher Seite UV-Licht auf die Karte trifft.

Eine optimale Justage ist erreicht, wenn ein Maximum des Streulichts von der Probe gesammelt und innerhalb der Apertur von  $f/9,8$  des Spektrometers auf den Eintrittspalt fokussiert wird.

Bei Experimenten mit dem Frei-Fluss-System (siehe Kapitel 5.2) wird zunächst mit Hilfe des Justage-Lasers das Zentrum der Sammellinse auf die optische Achse des Spektrometers gebracht. Der UV-Strahl des Indigo-Lasers wird mit den Spiegeln und der Fokussierlinse so eingestellt, dass der Fokus des UV-Strahls genau dort liegt, wo sich der UV-Strahl und der Justage-Strahl kreuzen. Danach wird der Flüssigkeitsstrahl genau in diesen Kreuzungspunkt positioniert. Jetzt sollte mit der Detektorkarte gesammeltes Streulicht in der Nähe des Eingangsspalts des Spektrometers nachzuweisen sein. Die Sammellinse wird nun durch Translation in allen drei Raumrichtungen so positioniert, dass das gesammelte Streulicht genau auf den Eingangspalt fokussiert wird. Dazu wird die fluoreszierende Detektorkarte direkt vor den Spalt gehalten. Auf der Detektorkarte sind das gesammelte UV-Streulicht als Fluoreszenz und der rote Justage-Strahl gleichzeitig sichtbar. Um den Spalt zu treffen, müssen diese beiden verschiedenfarbigen Punkte zur Deckung gebracht werden. Durch kleine Variationen der Position des Flüssigkeitsstrahls, der Fokussierlinse und der Spiegel wird jetzt noch einmal die Intensität der gesammelten Streustrahlung am Eingangspalt maximiert. Nun wird der Justage-Laser ausgeschaltet und das Spektrometer auf DUV-Spektroskopie umgestellt.

In einem letzten Justage-Schritt wird anhand des vom Spektrometer gemessenen Raman-Spektrums optimiert. Dazu bietet sich die intensive OH-Streckschwingung von Wasser im Bereich von  $3200\text{ cm}^{-1}$  –  $3600\text{ cm}^{-1}$  an. Hier ist schon ein deutliches Signal bei einer Belichtungszeit von nur einer Sekunde zu beobachten. Alle Komponenten werden nun noch ein letztes mal so justiert, dass einerseits das Raman-Signal möglichst groß ist, andererseits das Rauschen abseits der Wasserbande möglichst klein ist. Nun kann mit der eigentlichen Messung begonnen werden. Dazu wird das Wasser durch die eigentli-

che Probe in wässriger Lösung ersetzt und das Spektrometer auf den interessierenden Wellenzahlbereich gefahren.

Bei Messungen mit der sogenannten Probenschleuder (siehe Kapitel 5.3) muss etwas anders vorgegangen werden, um einen optimal justierten Strahlengang zu erreichen. Zunächst wird neben der Sammellinse auch das obere Spiegelprisma auf die optische Achse des Spektrometers gebracht. Das ist dann der Fall, wenn der Justage-Laser das Loch des oberen Prismas trifft. In der Praxis kann dies schlecht direkt eingesehen werden. Es ist aber deutlich sichtbar, dass das Loch getroffen wird, wenn das rote Streulicht im Glaskörper des Prismas maximale Intensität aufweist. Für den nächsten Schritt wird der Justage-Laser geblockt, da dieses Streulicht die weitere Optimierung erschwert.

Mittels der letzten beiden Spiegeln wird der UV-Strahl des Indigo-Lasers so ausgerichtet, dass das Loch des oberen Prismas getroffen und vollständig durchquert wird. Trifft der UV-Strahl auf die Wände des Loches, ist dies an einer weißen Fluoreszenz des Glaskörpers erkennbar. Ziel in diesem Justage-Schritt ist es also, die Intensität dieser Fluoreszenz zu minimieren. Die Fokussierlinse wird so eingestellt, dass der Fokus des UV-Strahls einige Millimeter hinter dem unteren Prisma liegt. Nun wird die Probenschleuder so positioniert, dass die Rille in diesem Fokus liegt.

Die letzten beiden Schritte sind analog zum Vorgehen beim Frei-Fluss-System. Zunächst wird die Intensität und Fokussierung des gesammelten Streulichts auf den Eingangsspalt des Spektrometer optimiert. Danach erfolgt die letzte Optimierung anhand der Wasserbande bei  $3200\text{ cm}^{-1}$  –  $3600\text{ cm}^{-1}$ .

## 4.4 Selbst erstellte Computerprogramme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere kleine Programme geschrieben, um die Auswertung der Messergebnisse zu vereinfachen oder zum Teil erst zu ermöglichen. Als Programmiersprache wurde GNU Octave verwendet. Dabei handelt es sich um eine freie Skriptsprache, die fast vollständig kompatibel zu Matlab ist.

Bei den entwickelten Programmen handelt es sich um kleinere Funktionen, die zum Teil aufeinander aufbauen. Häufig wiederkehrende Aufgaben, wie das Auslesen von Spektren, Abziehen des Hintergrundspektrums, Mittelwertbildung und die Elimination von Spikes werden so automatisiert. Einzelne Funktionen erfüllen spezielle Aufgaben, wie das Zusammenführen von Spektren aus mehreren Wellenzahlbereichen oder die Ermittlung eines pH-Wertes.

Die Funktion `tr777.m` vereinfacht den Import der Dateien, die von der Software des Trivista TR777-Spektrometers erzeugt werden. Die Dateien, die das TR777 ausgibt, bestehen aus vier Spalten. Werden diese Dateien eingelesen, speichert GNU Octave die Daten in einer  $n \times 4$ -Matrix. Für den Fall, dass mehrere Einzelbilder (*frames*) aufge-

nommen wurden, ist  $n = w \cdot l$ , wobei  $w$  die Anzahl der Einzelbilder und  $l$  die Anzahl der Pixel pro Einzelbild entlang der Wellenzahl-Achse ist. Die erste Spalte enthält die Wellenzahl-Positionen in  $\text{cm}^{-1}$ , die dritte Spalte die Nummer des aktuellen Einzelbildes und die vierte Spalte die Intensität. Die zweite Spalte wurde bei unseren Anwendungen nicht benutzt. Die Intensität wird in Zähleinheiten (*counts*) angegeben, das heißt in registrierten Ereignissen der Kamera-Pixel an dieser Wellenzahl-Position. Der Wert für die Intensität kann zwischen 0 und 65 535 betragen.

Die Funktion `tr777` verarbeitet diese  $n \times 4$ -Matrix und gibt die Daten in einem Format aus, welches für die weitere Verarbeitung in Octave geeigneter ist. So ist es sinnvoller, die Wellenzahlen und die Intensitäten voneinander zu trennen. Daher besitzt `tr777` zwei Ausgabe-Variablen. Die Intensitäten werden in einer Matrix der Größe  $l \times w$  dargestellt. So können die Einzelbilder leichter übereinander aufgetragen oder Mittelwerte gebildet werden. Die Wellenzahlen werden in einem Spaltenvektor der Länge  $l$  ausgegeben.

`tr777.m`

```

1 function [matrix,wn] = tr777(invec)
2     mywidth=max(invec(:,3));
3     mysize=size(invec);
4     mylength=mysize(1)/mywidth;
5     wn=invec(1:mylength,1);
6     matrix=zeros(mylength,mywidth);
7     for i=1:mywidth;
8         matrix(:,i)=invec(1+(i-1)*mylength:i*mylength,4);
9     end
10 end

```

Da sich gezeigt hat, dass die ursprüngliche  $n \times 4$ -Matrix im Normalfall nicht weiter verwendet wird, habe ich die Funktion `load777` geschrieben. Diese Funktion lädt die angegebene Datei und gibt direkt das Ergebnis von `tr777` aus.

`load777.m`

```

1 function [matrix,wn] = load777(fname)
2     temp=load(fname);
3     [matrix,wn]=tr777(temp);
4 end

```

Bei größeren Projekten mit vielen Dateien wurde auch dieses Vorgehen zu mühsam. Das Skript `loadAll777` liest alle Dateien mit der Endung `.txt` im aktuellen Verzeichnis ein und erzeugt mehrere Variablen mit Hilfe von `load777`. Die Variablenamen leiten sich dabei von den Dateinamen ab.

`loadAll777.m`

```

1 a=dir('*.txt');
2 for k=1:length(a)
3     myname=a(k).name;

```

```

4   eval([' ' repmat(myname, ' .txt', '') ' , ' repmat(myname, ' .txt', 'Wn') ' ] ...
5   = load777(' ' myname ' ');'])
6 end
7 clear a;
8 clear k;
9 clear myname;

```

Die gemessenen Spektren weisen häufig eng begrenzte Bereiche sehr hoher Intensität auf, die nicht zum eigentlichen Spektrum gehören. Diese Peaks oder Spikes entstehen durch kosmische Strahlung, die auf einige oder einzelne Pixel der empfindlichen CCD-Kamera trifft. Dabei handelt es sich fast ausschließlich um Myonen mit relativistischer Geschwindigkeit, die in der oberen Atmosphäre entstehen. Leicht radioaktive Materialien im Labor sind in der Regel nur eine zweitrangige Quelle für Spikes. [47]

Die Funktion `removePeaks` versucht, diese kosmischen Spikes zu erkennen und zu entfernen. Für jedes Pixel des Spektrums wird der Mittelwert und die Standardabweichung der  $n$  benachbarten Pixel berechnet. Falls das Signal des Pixels um mehr als das  $a$ -fache der Standardabweichung vom Mittelwert abweicht, wird ein unerwünschter Spike angenommen und das Signal an dieser Stelle durch den zuvor berechneten Mittelwert ersetzt.

Die Standardwerte von  $n = 10$  und  $a = 2$  lieferten für unsere Anwendungen befriedigende Resultate, das heißt, dass einerseits die meisten unerwünschten Peaks erkannt wurden, andererseits aber kein echtes Signal fälschlicherweise entfernt wurde. Kritisch waren unerwünschte Spikes an der Flanke eines starken Signals. Diese blieben häufig unerkannt.

`removePeaks.m`

```

1  function outVec = removePeaks(inVec, nVal, accVar)
2  %removePeaks creates outVec where the peaks of inVec are removed
3      if nargin<3
4          accVar=2;
5      end
6      if nargin<2
7          nVal=10;
8      end
9      meanVal=0;
10     stdVal=0;
11     outVec=inVec;
12     mysize=size(inVec);
13     for l=1:mysize(2)
14         for k=1:mysize(1)
15             meanVal=mean(inVec((max(1,k-nVal):(min(k+nVal,mysize(1))),l)));
16             stdVal=std(inVec(max(1,k-nVal):min(k+nVal,mysize(1)),l));
17             if (inVec(k,l) > meanVal+accVar*stdVal) ...
18                 | (inVec(k,l) < meanVal-accVar*stdVal)
19                 outVec(k,l)=meanVal;

```



```

20     end
21     end
22     end
23 end

```

Die Funktion `removeOutlier` ist mit `removePeaks` fast identisch. Hier wird nach Ausreißern nicht entlang der benachbarten Wellenzahlen gesucht, sondern dieselbe Wellenzahlposition in mehreren Einzelbildern verglichen. Da es hier keine Flanken gibt, ist dieses Verfahren wesentlich sicherer und zuverlässiger, allerdings lässt es sich nur anwenden, wenn mehrere Einzelbilder desselben Spektralbereichs aufgenommen wurden.

`removeOutlier.m`

```

1  function outVec = removeOutlier(inVec, accVar)
2  %removeOutlier creates outVec where the peaks of inVec are removed
3  if nargin<2
4      accVar=2;
5  end
6  meanVal=0;
7  stdVal=0;
8  outVec=inVec;
9  mysize=size(inVec);
10 for l=1:mysize(1)
11     for k=1:mysize(2)
12         meanVal=mean(inVec(l,:));
13         stdVal=std(inVec(l,:));
14         if (inVec(l,k) > meanVal+accVar*stdVal) ...
15             | (inVec(l,k) < meanVal-accVar*stdVal)
16             outVec(l,k)=mean(inVec(l,[1:k-1,k+1:mysize(2)]));
17     end
18 end
19 end
20 end

```

Schließlich habe ich noch die Funktion `manualSpikeRemover` geschrieben. Unerwünschte Spikes, die mit keiner der anderen Methoden automatisch entfernt werden konnten, können hiermit nach Augenmaß per Anklicken korrigiert werden.

`manualSpikeRemover.m`

```

1  function z = manualSpikeRemover(x,n)
2  clf %Get figure
3  hold on
4  plot(x,'b'); %Plot spectrum in blue
5  [xx,yy] = ginput(n); %Get corrected coordinates n times
6  z=x;
7  z(round(xx))=yy;
8  plot(z,'r'); %Plot new spectrum in red
9  hold off
10 end

```

Die Funktion `process777` fasst einige Standardprozeduren zur Signalverarbeitung zusammen, die ohne Gefahr der Zerstörung von Messwerten durchgeführt werden können. Wenn vom gemessenen Spektrum und vom Hintergrund jeweils mehrere Einzelbilder aufgenommen wurden, sind diese Maßnahmen häufig schon ausreichend. Als erstes werden unerwünschte Spikes aus den einzelnen Hintergrundspektren entfernt. Der Hintergrund wird danach über alle Einzelspektren gemittelt und von den einzelnen des Signalspektren subtrahiert. Daraufhin werden auch hieraus wieder unerwünschte Spikes entfernt. Wenn das Ergebnis keine weiteren Fehler aufweist, dann wurde in den meisten Fällen danach von Hand über die Einzelbilder der so bearbeiteten Signalmatrix gemittelt.

#### `process777.m`

```
1 function outmatr = process777(signmatr, backmatr)
2     mysize=size(signmatr);
3     outmatr=((removeOutlier(signmatr - ...
4                 repmat(mean(removeOutlier(backmatr)'),mysize(2),1)'))');
5 end
```

Die Funktion `DoubleModeCorrention` wird auf den Vektor der Wellenzahlen angewendet. Mit den beiden optionalen Parametern kann der Wellenzahlbereich um einen beliebigen Faktor gestreckt, sowie um einen vertikalen Versatz (*Offset*) verschoben werden. Die Standardwerte strecken den Wellenzahlbereich um den Faktor 1,66. Das ist genau die Korrektur, die nötig ist, wenn das Spektrometer mit nur zwei der drei Stufen benutzt wurde.

#### `DoubleModeCorrention.m`

```
1 function out = DoubleModeCorrention(in, fact, offset)
2     if nargin<3
3         offset=0;
4     end
5     if nargin<2
6         fact=1.66;
7     end
8     out = fact*(in-mean(in))+mean(in) + offset;
9 end
```

Wenn ein größerer Wellenzahlbereich untersucht werden soll, als das Spektrometer mit nur einer Messung aufnehmen kann, müssen zwei oder mehrere Spektren nacheinander aufgenommen werden. Die Funktion `gluespec` „klebt“ zwei gegebene Spektren aneinander. Im Überlappungsbereich wird ein gewichteter Mittelwert aus beiden gegebenen Spektren berechnet. Die Gewichtung erfolgt mittels eines linearen Gradienten.

#### `gluespec.m`

```
1 function [xout,yout] = gluespec(x1,y1,x2,y2)
2 % Glue the spectra [x1,y1] and [x2,y2] together to one spectrum consisting
3 % of both. All four arguments have to be vectors.
4 % In the overlap region the contributions of both spectra vary along
```

```

5 % a linear gradient.
6 % x-values of the overlap correspond to those of the left spectrum
7 % (right spectrum part is interpolated).
8     if min(x2) < min(x1)
9         temp=x1;
10        x1=x2;
11        x2=temp;
12        temp=y1;
13        y1=y2;
14        y2=temp;
15    end
16    %Now, min(x1) < min(x2)
17    overlap = x1>min(x2);
18    gradient = linspace(0,1,sum(overlap))';
19    xout=[x1(x1<min(x2)); x1(overlap); x2(x2>max(x1))];
20    yout=[y1(x1<min(x2));
21          (1-gradient).*y1(overlap) + (gradient).*interp1(x2,y2,x1(overlap));
22          y2(x2>max(x1))];
23 end

```

Die Funktion **normal01** normiert die Intensität des gegebenen Spektrums auf einen Intensitätsbereich zwischen 0 und 1. Diese Funktion wird auch Autoskalierung genannt. Mittels optionaler Argumente können auch andere Extremwerte für die Intensitäten angegeben werden. Mit dem vierten Argument kann der Bereich eingeschränkt werden, in dem die Intensitäten für die Normierung berücksichtigt werden sollen.

**normal01.m**

```

1 function outVec = normal01(inVec,maxVal,minVal,range)
2 %Normalize inVec to be between maxVal and minVal inside the given range.
3     if nargin<4
4         range=true(size(inVec,1),1);
5     end
6     if nargin<3
7         minVal=0;
8     end
9     if nargin<2
10        maxVal=1;
11    end
12    mysize=size(inVec);
13    outVec=zeros(mysize);
14    for k=1:mysize(2)
15        outVec(:,k) = (inVec(:,k)-min(inVec(range,k))) * (maxVal-minVal) ...
16                      / (max(inVec(range,k))-min(inVec(range,k))) + minVal;
17    end
18 end

```

Die Funktion **between** ist für die Benutzung des letzten Parameters in **normal01** vorgesehen. Diese Funktion erleichtert die Auswahl eines Wellenzahlbereiches, der zwischen zwei bestimmten Werten liegt.

**between.m**

```

1 function [bool_out] = between(lb, in, ub)
2     bool_out = ((lb < in) & (in < ub));
3 end

```

Als letztes möchte ich die Funktion **pHMix2** vorstellen. Die Argumente dieser Funktion sind eine Matrix aus drei Referenzspektren, eine Liste von drei zugehörigen pH-Werten und eine Matrix aus  $n$  gemessenen Spektren. Als Rückgabewert liefert **pHMix2** eine Liste von errechneten  $n$  pH-Werten, die den  $n$  Spektren entsprechen. Der mathematische Hintergrund für diesen Algorithmus wird in Kapitel 7.3 besprochen.

**pHMix2.m**

```

1 % Ref = Three known reference spectra dim(n x 3). Please sort by pH.
2 % pHRef = The pH values of the three reference spectra dim(1 x 3).
3 % Mix = Array of m mixture spectra dim(n x m)
4 %
5 % pHMix = calculated pH values of the mixed spectra
6 %
7 % usage:
8 %      pHMix=pHMix2(Ref, pHRef, Mix)
9
10 function pHMix=pHMix2(Ref, pHRef, Mix)
11     options = optimset('MaxIter',100000,'MaxFunEvals',1e7,'TolX',1e-14,...
12                       'TolFun',1e-14);
13     nSpec = size(Mix,2);
14     pHMix = zeros(1, nSpec);
15
16     %Fitte das mittlere Ref-Spektrum aus den beiden äußeren.
17     refkoeff = fminsearch(@(x) sum((x(1)*Ref(:,1) + x(2)*Ref(:,3) ...
18                                     - Ref(:,2)).^2), [0.5; 0.5]);
19
20     aan=refkoeff(1);
21     bbn=refkoeff(2);
22
23     cHa=10^(-pHRef(1));
24     cHn=10^(-pHRef(2));
25     cHb=10^(-pHRef(3));
26
27     for i=1:nSpec
28         mixkoeff = fminsearch(@(x) sum((x(1)*Ref(:,1) + x(2)*Ref(:,3) ...
29                                     - Mix(:,i)).^2), [.5;.5]);
30         aa=mixkoeff(1);
31         bb=mixkoeff(2);
32
33         pHMix(i) = -1*log10((aa*bbn*cHa*cHb - aa*bbn*cHa*cHn ...
34                             - aan*bb*cHa*cHb + aan*bb*cHb*cHn) ...
35                             / (aa*bbn*cHb - aa*bbn*cHn - aan*bb*cHa + aan*bb*cHn));
36     end
37 end

```

## 5 Probensysteme für kleine Volumina

Die untersuchten Aminosäuren wurden in wässriger Lösung gemessen. Im Vergleich zu Feststoffen liegt hier eine um mehrere Größenordnungen geringere Konzentration vor. Solange nur einfache Aminosäuren untersucht werden, stellt die Menge und damit das Probenvolumen kein großes Problem dar, da die Substanzen kostengünstig in relativ hoher Reinheit ( $\geq 99\%$ ) erworben werden können. Viele Proteine oder auch isotopenmarkierte Aminosäuren sind aber nur in geringen Mengen verfügbar. Aus diesem Grund wurden Probenhalterungssysteme gesucht, die mit möglichst kleinen Probenvolumina auskommen. Eine zusätzliche Bedingung war, dass das belichtete Probenvolumen im Fokus des Laserstrahls regelmäßig ausgetauscht werden soll, um ein Ausbleichen der Probe möglichst zu verhindern. Außerdem sollte ohne Fenster gearbeitet werden, um den störenden Einfluss des Fenstermaterials zu vermeiden.

### 5.1 Kenntnisstand und Aufgabenstellung

Ein großes Problem, insbesondere bei der Verwendung von ultraviolettem Licht als anregender Strahlung, ist die Schädigung der Probe durch die länger andauernde Bestrahlung mit hoher Intensität. Um das zu verhindern, werden bei Anregung mit sichtbarem oder nah-ultraviolettem Licht oft Fluss-Zellen mit Fenstern [48] oder rotierende Küvetten [49, 50] verwendet, die sicherstellen, dass die Probe im Fokus des Laserstrahls regelmäßig ausgetauscht wird.

Die rotierenden Küvetten-Systeme bestehen aus einer zylindrischen Quarz-Zelle, die in z. B. zwei Kammern unterteilt ist. In diese Kammern wird die zu untersuchende Probe oder gegebenenfalls eine Referenz gefüllt. Mit einer Blende kann dann bestimmt werden, welche der beiden Kammern beleuchtet und damit gemessen werden soll. Die Küvette wird um die vertikale Achse rotiert. Dadurch wird die Probe an den Rand der Küvette beschleunigt. Der Laserstrahl kommt in dieser Anordnung von unten und wird an den Rand der Küvette, also dort, wo sich die Probe befindet, fokussiert. Das Streulicht wird  $90^\circ$  dazu waagrecht von einer Linse gesammelt und auf den Spalt des Spektrometers fokussiert. Abbildung 5.1 zeigt ein solches System, wie es in unserer Arbeitsgruppe verwendet wird.

Bei UV-Licht tritt das Problem auf, dass die Streuung von der Wand der Küvette häufig zu einem störenden Beitrag führt [17] und das Fenstermaterial die Strahlung zusätzlich

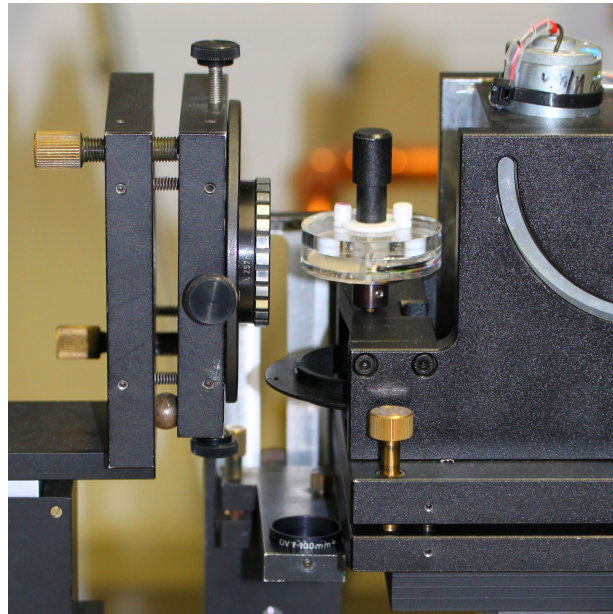


Abbildung 5.1: Das in unserer Arbeitsgruppe verwendete rotierende Küvetten-System.

abschwächt [51]. Daher ist es oft besser, die Messung in einem fensterlosem freien Fluss durchzuführen. Nachteil dieser Systeme ist, dass üblicherweise relativ große Probenvolumina benötigt werden.

In der einfachsten Form wird die Probe direkt mit einer Schlauchpumpe in den Fokusbereich befördert, mit einem Trichter aufgefangen, und direkt wieder der Pumpe zugeführt. Allerdings kann die Schlauchpumpe konstruktionsbedingt keinen konstanten Druck erzeugen, stattdessen steigt der Druck periodisch an und fällt wieder ab. Bei dieser einfachen Konstruktion führt das dazu, dass sich auch die Flussgeschwindigkeit im Fokusbereich periodisch ändert.

Eine Möglichkeit, diese Pulse deutlich abzuschwächen, ist es, den Druck auf die Austrittsdüse nicht direkt mit der Pumpe zu erzeugen. Stattdessen, kann man mit der Pumpe ein höher gelegene Reservoir befüllen. Dieses erzeugt durch die Schwerkraft der Flüssigkeitssäule einen konstanten Druck auf die Austrittsdüse. [48]

## 5.2 Frei-Fluss-System

Um ein geeignetes Fluss-System zur Messung unserer Proben herzustellen, wurde zunächst versucht, mit einer vorhandenen Schlauchpumpe der Firma Medorex vom Typ

TB und verschiedenen Schläuchen mit  $\sim 7$  mm Außendurchmesser das Fluss-System aus der Arbeitsgruppe von R. Mathies [48] nachzubauen. Die Arbeiten an diesem System wurden zusammen mit Nils Priesnitz durchgeführt. Der große Vorteil dieses Systems ist es, dass der Druck an der Austrittsdüse nicht direkt von der Pumpe erzeugt wird, sondern aus der potentiellen Energie im Schwerfeld entsteht, wodurch es kaum zu konstruktionsbedingten Pulsen im Fluss kommt.

In unserer Implementierung stellte der Trichter, der die Probe auffängt, gleichzeitig das untere Reservoir dar. Von hier wurde die Probe von der Schlauchpumpe in das obere Reservoir befördert. Das obere Reservoir war nach oben offen, dort herrschte also lediglich der gewöhnliche Luftdruck der Umgebung. Von dort führte ein Schlauch zur Austrittsdüse. Die Austrittsgeschwindigkeit an der Düse ergibt sich aus der Länge dieses Abschnittes. Ein oberes Limit der Geschwindigkeit ergibt sich dabei aus dem freien Fall der Flüssigkeit:  $v \leq \sqrt{2gh}$ . In der Praxis wurden allerdings nur geringere Geschwindigkeiten erreicht. Als Düse diente ein Messingrohr (Innendurchmesser 2 mm, Außendurchmesser 3 mm), das auf der Austrittsseite platt gedrückt wurde, um einen Strahl mit rechteckigem Profil ( $\sim 1 \times 4$  mm) zu erzeugen. An dieser Düse wurden seitlich Drähte befestigt, damit der Flüssigkeitsstrahl das rechteckige Profil beibehält.

Da das System auch für zeitaufgelöste Pump-Probe-Experimente zur Verfügung stehen sollte, war eine Geschwindigkeit von 1 m/s im Fokalebereich vorgesehen. Dieser Wert ergibt sich, wenn man die angenommene Größe des Laser-Fokus von 250  $\mu\text{m}$  mit der Repetitionsrate des Lasers von 4 kHz multipliziert. Um diese Geschwindigkeit zu erreichen, war ein Abstand vom oberen Reservoir zur Austrittsdüse von  $\sim 80$  cm erforderlich. Auch mit dünneren Schläuchen waren so keine Probenvolumina unter 10 ml möglich.

Um geringere Probenvolumina zu ermöglichen, wurden die Schläuche auf ein Minimum gekürzt; das Reservoir wurde direkt an die Austrittsdüse montiert. Um dennoch eine hinreichend hohe Flussgeschwindigkeit zu erreichen, wurde das offene Reservoir verschlossen, sodass sich dort ein Druck aufbauen kann. Es dient nun also als Druckausgleichsbehälter. Dadurch sind die Pulse immer noch deutlich abgemildert, verglichen mit einer Austrittsdüse, die direkt an die Pumpe angeschlossen wird.

Schließlich wurde auch auf das rechteckige Profil des Flüssigkeitsstrahls verzichtet. In der Endversion wurde als Austrittsdüse eine Injektionsnadel (Außendurchmesser 0,8 mm Innendurchmesser  $\sim 0,6$  mm) verwendet. Diese wurde auf  $\sim 1$  cm gerade abgeschnitten und entgratet. So entstand ein Flüssigkeitsstrahl mit stabilem zylindrischem Profil. Diese vereinfachte Konstruktion war wesentlich leichter einzustellen und bei Bedarf zu ersetzen.

Die Version des Frei-Fluss-Systems, die letztlich verwendet wurde, ist in Abb.5.2 dargestellt. Bis auf den Trichter waren alle Komponenten, die mit der Probe in Kontakt kamen, aus Verbrauchsmaterial gebaut, das in großen Mengen zur Verfügung stand. Dabei wurde lediglich der Schlauch extra angeschafft, die anderen Komponenten waren bereits im chemischen Labor vorhanden. Dadurch konnten diese Komponenten schnell

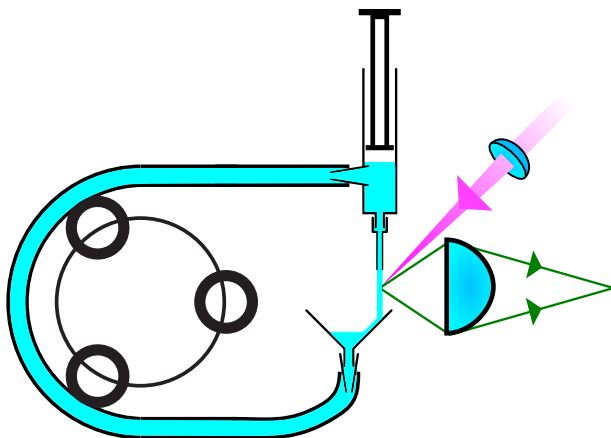


Abbildung 5.2: Aufbau des Frei-Fluss-Systems.

und kostengünstig ausgetauscht werden, wenn sich die Reste einer Probe schlecht entfernen ließen.

Als Druckausgleichsbehälter wurde eine 6 ml-Spritze verwendet. Daher konnte auch die Kanüle, die als Austrittsdüse diente, direkt angeschlossen werden. Das Volumen für den Druckausgleich konnte mit dem Spritzenkolben eingestellt werden. Für die Zufuhr der Probe aus der Pumpe wurde ein Loch in die seitliche Wand der Spritze gestochen.

Als Adapter, mit dem der Schlauch mit der Spritze sowie dem Trichter verbunden wurde, diente der kegelförmige Mittelteil von Pipettierspitzen (100  $\mu$ l). Das Anfangs- und das Endstück wurden mit einem Skalpell abgetrennt, so dass auf beiden Seiten ein geeigneter Durchmesser zu Stande kam. Wichtiges Hilfsmittel, um diesen Adapter von innen durch das Loch in der Spritzenwand zu führen, war ein gebogener Draht mit einem Knoten in der Mitte.

Der verwendete Schlauch hatte einen Innendurchmesser von 1 mm und einen Außendurchmesser von 3 mm. Das minimale Volumen, um einen stabilen laminaren Fluss zu gewährleisten, betrug 1 ml. Meistens wurde ein etwas höheres Volumen verwendet, um eine Verdunstung der Probe auszugleichen, und einen stabilen Fluss auch am Ende des Experiments zu gewährleisten.

### 5.3 Probenschleuder

Um das benötigte Probenvolumen noch weiter zu verringern, wurde überlegt, wie man den gesamten Kreislauf der Flüssigkeit auf möglichst kurzer Strecke zusammenfassen kann. Dieser Gedanke ist bei rotierenden Küvetten bereits verwirklicht. Für die Anwen-



dung im Tief-UV sollte aber zumindest der Teil der Probe, der vom Laser belichtet wird, nicht von Glas bedeckt sein.

Als Lösung wurde zusammen mit Christoph Herrmann die sogenannte Probenschleuder entwickelt. Der schematische Aufbau dieser Vorrichtung ist in Abb. 5.3 dargestellt. Abbildung 5.4 zeigt die gefertigte Probenschleuder im Betrieb.

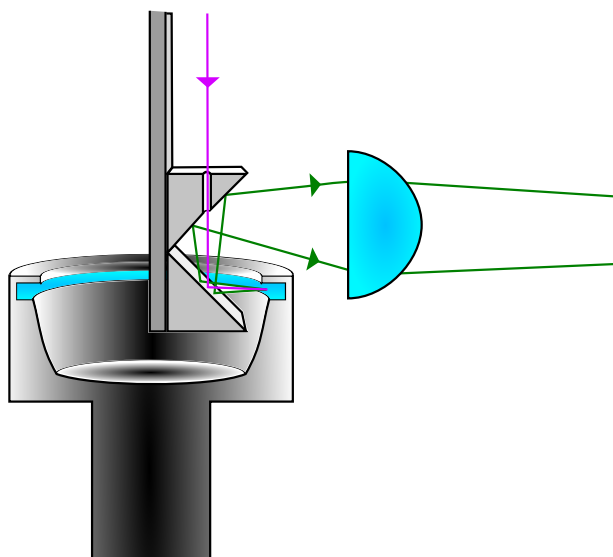


Abbildung 5.3: Aufbau der Probenschleuder.

Bei dieser Probenhalterung handelt es sich im Prinzip um eine rotierende Küvette, bei der die Innenseite des kreisenden Flüssigkeitsringes offen liegt. Sowohl die Belichtung mit dem Laser als auch das Sammeln der von der Probe gestreuten Strahlung geschieht von der Innenseite aus. Dazu wird ein System von zwei verspiegelten Prismen verwendet, wobei das obere Prisma durchbohrt ist. Der Laserstrahl fällt durch das Loch des oberen Prismas und wird am unteren Prisma reflektiert, sodass er auf die Probe fällt. Ein großer Teil des Streulichts, das von der Probe emittiert wird, wird von beiden Prismen reflektiert und dann von einer Sammellinse auf den Eintrittsspalt des Spektrometers fokussiert. Mit der Probenschleuder können Probenvolumina von nur 100  $\mu\text{l}$  untersucht werden.

## 5.4 Ausblick

Bei langen Messdauern, die bis zu mehrere Stunden betragen können, verdunstet ein beträchtlicher Teil der Probe, insbesondere das Lösemittel. Im Falle von biologischen Proben ist dies meistens Wasser, aber auch andere Lösemittel, wie Ethanol, oder weitere

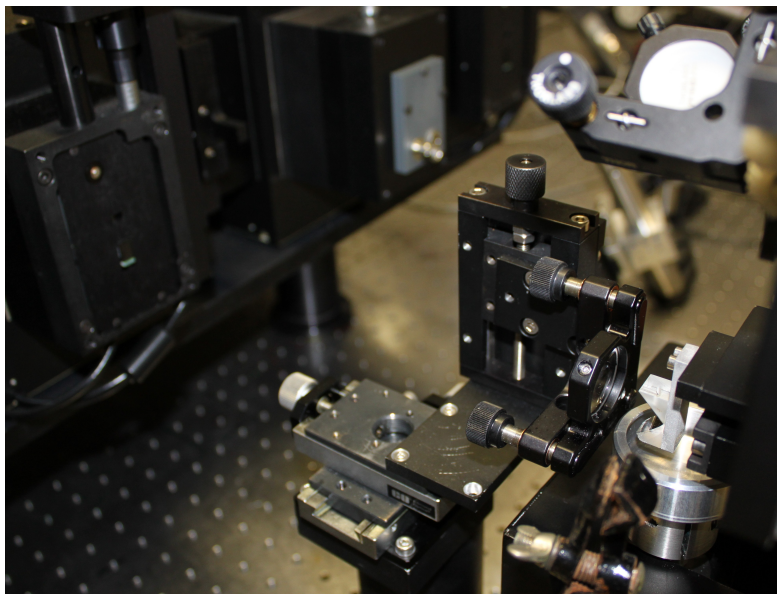


Abbildung 5.4: Die Probenschleuder im Betrieb. Links im Hintergrund der Eingangsspalt des Spektrometers, auf den fokussiert wird.

Zusätze können davon betroffen sein. Wenn die eigentliche Probe nicht verdunstet oder sich nicht anderweitig verbraucht, wäre es eine Verschwendung, die ganze Mischung aus Probe und Lösemittel auszutauschen.

Stattdessen wurde eine Vorrichtung zum automatischen Nachtropfen des Lösemittels konstruiert. Für Wasser wurden auch erste Tests durchgeführt. Die Vorrichtung besteht aus einer Spritzenpumpe, an der ein Schlauch befestigt ist, dessen anderes Ende sich über der Probenschleuder befindet. Aufgrund vorheriger Messungen wird abgeschätzt, wie schnell das Lösemittel verdunstet und entsprechend in regelmäßigen Zeitabständen ein weiterer Tropfen des Lösemittels in die Probenschleuder gegeben.

Eine weitere Verbesserung wäre es, den Anteil des Wassers in der Probe direkt zu messen und über einen Regelkreis den Wasseranteil konstant zu halten. Da die OH-Biegeschwingung von Wasser bei  $1600\text{ cm}^{-1}$  häufig durch Raman-Signale der organischen Probe verdeckt wird, würden sich die viel intensiveren Wasserbanden der OH-Streckschwingungen im Bereich  $3200\text{ cm}^{-1}$  –  $3600\text{ cm}^{-1}$  zur Bestimmung der Wassermenge anbieten. Da gleichzeitig die Signale der organischen Probe, üblicherweise im Bereich von etwa  $800\text{ cm}^{-1}$  –  $1800\text{ cm}^{-1}$  gemessen werden sollen, müsste das Spektrometer so modifiziert werden, dass beide Spektralbereiche gleichzeitig beobachtet werden können.

Ein zweistufiges Spektrometer, das eine gleichzeitige Messung in diesen beiden spektralen

Bereichen ermöglicht, wurde in der Arbeitsgruppe um Asher entwickelt und publiziert [45]. Bei diesem Spektrometer ist die erste Stufe so konfiguriert, dass der spektrale Bereich von  $800\text{ cm}^{-1}$ – $1800\text{ cm}^{-1}$  wie üblich durch einen Spalt von der ersten Stufe in die zweite Stufe fällt. An die Position, wo der Bereich der Wasserbanden von  $3200\text{ cm}^{-1}$ – $3600\text{ cm}^{-1}$  normalerweise auf die Trennwand zwischen den Stufen fällt, wurde ein Spiegel positioniert, der diesen Anteil der Strahlung umlenkt. Über einen weiteren Spiegel und eine Linse wird dieses Licht auf einen zweiten Detektor projiziert. Asher und seine Mitarbeiter verwenden dieses zusätzliche Spektrum, um die Temperatur der Probe anhand der Form und Wellenzahl-Position des Wasser-Signals zu bestimmen.

Für zukünftig Temperatur-Sprung-Experimente wäre diese zusätzliche Information auch für unsere Arbeitsgruppe von Interesse. Gleichzeitig könnte über die Gesamt-Intensität des Wasser-Signals der Wassergehalt in der Probenschleuder bestimmt werden. Nach einer automatischen Auswertung könnte die Vorrichtung zum Nachtropfen des Lösemittels Wasser angesteuert werden, um damit die Konzentration der Probe konstant zu halten.

Um das Volumen der Probe noch weiter auf die Größenordnung von  $\sim 10\text{ }\mu\text{l}$  zu reduzieren hat Christoph Herrmann einen Tropfenhalter entwickelt. Hier wird auf einer hydrophoben Oberfläche ein einzelner Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit fixiert und rotiert, während am Rand gemessen wird.

## 6 Resonanz-Raman-Anregungsprofile von Phenylalanin und Tyrosin

Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, hängt die Stärke der Verstärkung aufgrund des Resonanz-Raman-Effektes (RR) von den elektronischen Übergängen des betrachteten Moleküls oder Molekülabschnitts ab. In einem Protein können somit verschiedene aromatische Aminosäuren oder auch das Proteinrückgrat durch die Wahl der Anregungswellenlänge des Lasers selektiv verstärkt werden [17–21]. Um die Selektivität der RR-Verstärkung zu demonstrieren, wurden hier die aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin (Phe) und L-Tyrosin (Tyr) in wässriger Lösung in einem Wellenlängenbereich von 195 nm – 208 nm angeregt.

### 6.1 Kenntnisstand und Aufgabenstellung

Der Einfluss der Anregungswellenlänge auf die Verstärkung der Raman-Spektren aufgrund des RR-Effektes wurde bereits von den Arbeitsgruppen um Asher [28] und Spiro [30, 44] untersucht. Die Zuordnung und Benennung der Raman-Banden wurden im Folgenden von der entsprechenden Veröffentlichung der Arbeitsgruppe Asher [28] übernommen, die wiederum auf der Nomenklatur der Benzolschwingungen nach Wilson [26] basiert.

Das Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Messungen war es, herauszufinden wie die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin bestmöglich verstärkt werden können. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte dann später diese passende Wellenlänge gewählt werden, um in Proteinen, wie z. B. SRII, möglichst ausschließlich Spektren dieser Seitenketten zu erhalten. Da Tyrosin in einigen Fällen an Wasserstoffbrückenbindungen (H-Bindungen) beteiligt ist, könnte RR-Spektroskopie hier dazu verwendet werden, die Bildung und Auflösung von H-Bindungen im Protein nachzuweisen.

Zusätzlich zu den bekannten Ergebnissen von Spiro und Asher wurden hier Spektren bei weiteren Wellenlängen aufgenommen. Dabei wurde auch gezeigt, dass die verwendeten Geräte geeignet sind, diese und weitere Messungen durchzuführen.

## 6.2 Geräte, Materialien und Methoden

Für eine genaue Beschreibung der einzelnen Geräte sei auf die entsprechenden Abschnitte in Kapitel 4 verwiesen.

Die aromatischen Aminosäuren Phe und Tyr wurden von AppliChem gekauft und ohne weitere Behandlung verwendet. Von beiden Stoffen wurden jeweils 8 mg zunächst in 10 ml Wasser aufgelöst. Danach Wasser zugefügt, bis ein Gesamtvolumen von 20 ml vorlag. Das entspricht einer Konzentration der Aminosäuren von 0,4 g/l und damit einer Stoffmengenkonzentration von 2,42 mM für Phe bzw. 2,21 mM für Tyr.

Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 6.1 dargestellt. Als Lichtquelle wurde das Laser-System Indigo der Firma Coherent verwendet, in der Abbildung rechts dargestellt. Um die photochemische Schädigung der Probe zu minimieren wurde die Austrittsleistung auf  $\sim 1 \text{ mW} - 4 \text{ mW}$  beschränkt. Bei der fest eingestellten Repetitionsrate von 4 kHz entspricht das einer Energie von  $\sim 0,25 \mu\text{J} - 1 \mu\text{J}$  je Puls. Die Anregungswellenlänge wurde im Bereich 195 nm – 208 nm variiert.

### Dreifach-Monochromator

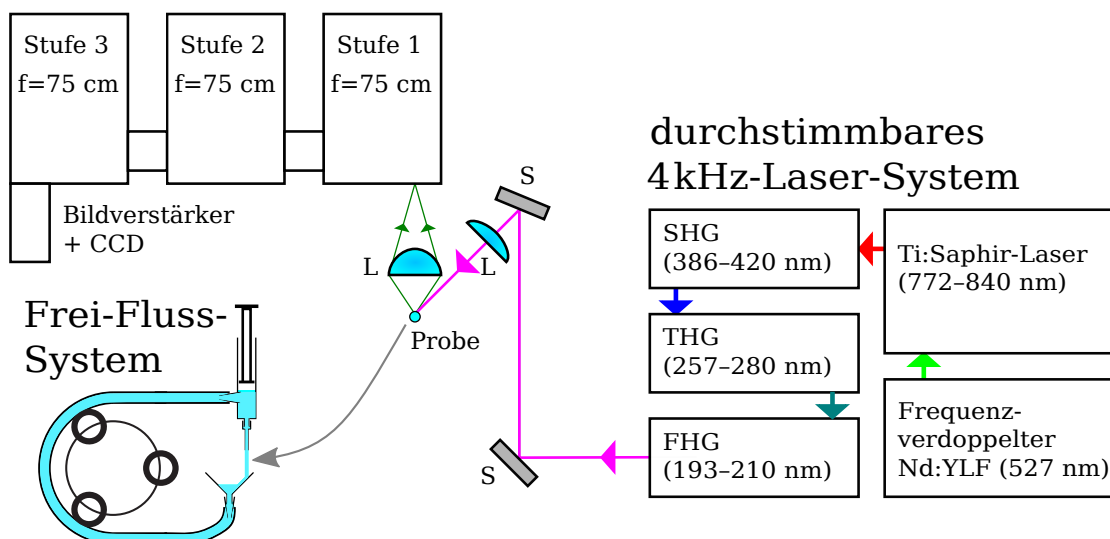


Abbildung 6.1: Experimenteller Aufbau für die DUVRR-Messung der Anregungsprofile von Phe und Tyr im freien Fluss.

Der Laserstrahl wurde mit Hilfe von vier Aluminium-Spiegeln auf die Probe gelenkt. Zwei der Spiegel sind in Abbildung 6.1 mit S bezeichnet, zwei weitere bilden zwischen diesen beiden Spiegeln ein Periskop, um den Laserstrahl von der Ebene des Lasers auf die Ebene von Probe und Spektrometer anzuheben. Es wurden zwei plankonvexe Linsen aus

synthetischem Quarzglas für UV-Anwendungen (UV fused silica) mit einem Durchmesser von  $d = 2,5\text{ cm}$  verwendet. Die Linsen sind in der Abbildung mit L bezeichnet. Die Brennweite der Linse zur Fokussierung des Laserstrahls auf die Probe betrug  $f = 10\text{ cm}$ , die Brennweite der Linse zum Sammeln des Streulichts  $f = 3,5\text{ cm}$ . Die Messungen erfolgten in einer  $135^\circ$ -Streu-Geometrie. Der Abstand der Sammellinse zum Eingangsspalt des Spektrometers betrug  $25\text{ cm}$ . Dadurch wird eine optimale Ausleuchtung des Spektrometers gewährleistet, dessen Apertur  $f/9.8$  beträgt.

Das Frei-Fluss-System ist in Abbildung 6.1 unten links skizziert und basiert auf einer peristaltischen Pumpe. Die anderen Teile bestehen aus kostengünstigen Verbrauchsmaterialien, die schnell und leicht ersetzt werden können. Eine genaue Beschreibung ist in Kapitel 5.2 zu finden. Es wurden  $1,2\text{ ml}$  Probe verwendet, um Verdunstungen während der Messung auszugleichen. So waren am Ende der Messung immer noch mehr als  $1\text{ ml}$  Flüssigkeit im Fluss-System, was einen stabilen, laminaren Fluss gewährleistete.

Die Detektion des Streulichts erfolgte mit dem Dreifach-Monochromator Trivista TR777 der Firma S&I GmbH / Princeton Instruments. Die drei Stufen haben jeweils eine Brennweite von  $75\text{ cm}$  und können wahlweise im additiven oder subtraktiven Modus verwendet werden. Der Großteil der Messungen erfolgte bei einer Spaltweite von  $300\text{ }\mu\text{m}$ . Für jedes Spektrum wurden zehn separate Messungen mit jeweils  $100\text{ s}$  Belichtungszeit durchgeführt. Diese Messungen wurden einzeln gespeichert, um eine effiziente Bearbeitung der Spektren zu ermöglichen. Diese bestand aus Subtraktion des Hintergrundes, Entfernung von Spikes und Mittelwertbildung und wurde in GNU Octave durchgeführt.

## 6.3 Ergebnisse und Diskussion

Normale Raman-Spektren, bei denen keine spezifische elektronische Resonanzverstärkung auftritt, liefern ein Signal des kompletten Moleküls. Im Falle der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe) und Tyrosin (Tyr) umfasst dies Schwingungen sowohl der aromatischen Seitengruppe als auch der  $\alpha$ -Amino-Carboxygruppe [28]. Mit Tief-UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie (*deep UV resonance Raman*, DUVRR) hingegen wird bei geeigneter Anregungswellenlänge nur das Signal der Schwingungen des aromatischen Rings verstärkt [28, 44].

### 6.3.1 DUVRR-Spektren und Anregungsprofil von Phenylalanin

Abbildung 6.2 zeigt den Wellenzahlabschnitt  $800\text{ cm}^{-1} - 1800\text{ cm}^{-1}$  des DUVRR-Spektrums von Phe in wässriger Lösung. Es wurden fünf Spektren bei Anregungswellenlängen von  $195\text{ nm}$  bis  $208\text{ nm}$  aufgenommen. Die Zuordnung und Benennung der Banden wurde aus den Arbeiten der Arbeitsgruppe Asher übernommen [28].

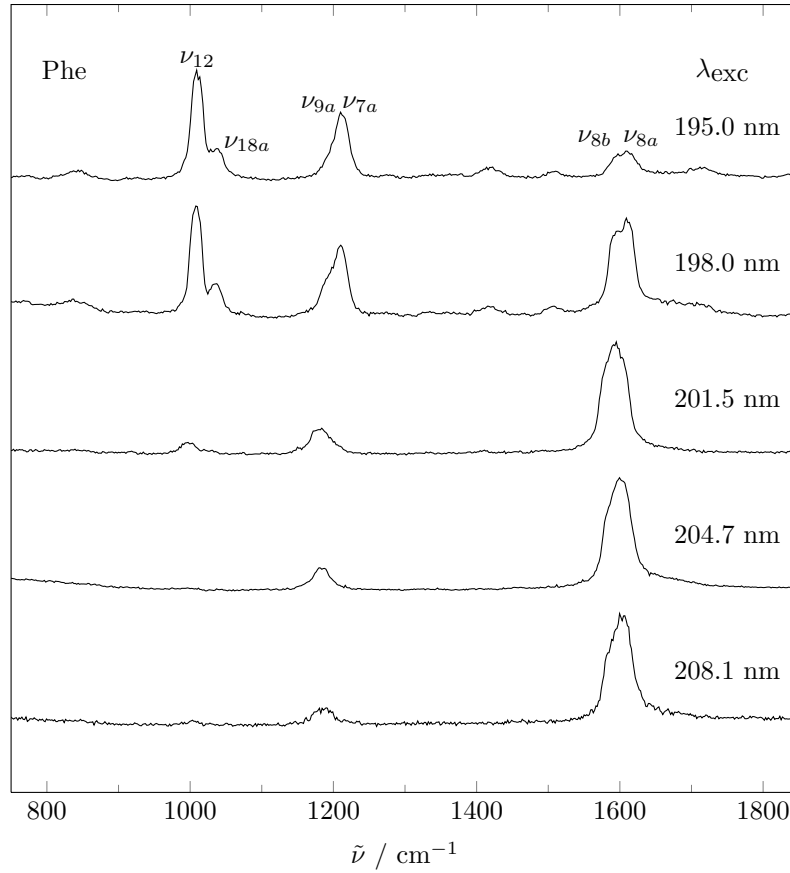


Abbildung 6.2: DUVRR-Spektren von Phe bei verschiedenen Anregungswellenlängen.

Bei einer Anregungswellenlänge von 195 nm (Abb. 6.2, oben) wird das DUVRR-Spektrum von Phe von den Beiträgen der symmetrischen Ring-Atmungsschwingung  $\nu_{12}$  bei  $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ , der ebenen C–H-Biegeschwingung  $\nu_{18a}$  bei  $\sim 1030 \text{ cm}^{-1}$ , sowie von Beiträgen der ebenen C–H-Biegeschwingung  $\nu_{9a}$  und der Phenyl–C-Streckschwingung  $\nu_{7a}$  bei  $\sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ , dominiert. Die letzten beiden Banden konnten im subtraktiven Modus und bei 300  $\mu\text{m}$  Spaltweite nicht aufgelöst werden. Mit größerer Anregungswellenlänge steigt der Beitrag der ebenen Ring-Streckschwingungen  $\nu_{8a}$  und  $\nu_{8b}$  im Bereich um  $1600 \text{ cm}^{-1}$ . Diese beiden Banden konnten hier ebenfalls nicht aufgelöst werden. Diese Zunahme ist bereits ab der Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{exc}} = 198 \text{ nm}$  deutlich zu erkennen. Bei Wellenlängen über 200 nm fallen die Signale der Banden  $\nu_{12}$ ,  $\nu_{18a}$ ,  $\nu_{9a}$  und  $\nu_{7a}$  deutlich ab. Das DUVRR-Spektrum von Phe ist für diese Anregungswellenlängen klar von den Beiträgen von  $\nu_{8a}$  und  $\nu_{8b}$  dominiert.

Um das beobachtete DUVRR-Anregungsprofil zu verstehen, wird das entsprechende UV-Absorptionsspektrum einschließlich der entsprechenden elektronischen Übergänge betrachtet. Wie allgemein üblich, wird Benzol als Referenz-Chromophor für Phy und Tyr verwendet. Das elektronische Absorptionsspektrum von Benzol im tiefen UV besteht aus der starken  $B_{a,b}$ -Bande ( ${}^1E_{1u} \leftarrow {}^1A_{1g}$ ;  $\lambda_{\max} = 184$  nm und  $\epsilon_{\max} = 60$  mM $^{-1}$ cm $^{-1}$ ) einerseits und der schwächeren  $L_a$ -Bande ( ${}^1B_{1u} \leftarrow {}^1A_{1g}$ ;  $\lambda_{\max} = 203$  nm und  $\epsilon_{\max} = 7.4$  mM $^{-1}$ cm $^{-1}$ ) andererseits [30, 52]. Bei Phe (Absorptionsspektrum in Abb. 3.4 auf Seite 17) sind sowohl die  $B_{a,b}$ -Bande als auch die  $L_a$ -Bande rotverschoben und treten bei  $\lambda_{\max} = 188$  nm ( $\epsilon_{\max} = 60.3$  mM $^{-1}$ cm $^{-1}$ ) bzw.  $\lambda_{\max} = 206$  nm ( $\epsilon_{\max} = 10.5$  mM $^{-1}$ cm $^{-1}$ ) auf [30].

Bei rein qualitativer Betrachtung der Wellenlängenabhängigkeit der DUVRR-Spektren aus Abbildung 6.2 wird klar deutlich, dass die sechs Schwingungsmoden unterschiedliche Anregungsmuster aufweisen. Zum Beispiel dominiert das Signal der Bande  $\nu_{12}$  bei  $\sim 1000$  cm $^{-1}$  das Spektrum bei einer Anregung mit  $\lambda_{\text{exc}} = 195$  nm, was auf eine starke Verstärkung durch die  $B_{a,b}$ -Übergänge hindeutet. Im Gegensatz dazu weist das Anregungsprofil der Banden  $\nu_{8a}$  und  $\nu_{8b}$  ein gegenteiliges Muster bei steigender Anregungswellenlänge auf.

Eine quantitative Analyse der DUVRR-Spektren aus Abbildung 6.2 ist in Abbildung 6.3 dargestellt. Jedes Spektrum wurde in eine Linearkombination aus den sechs dominanten Ramanbanden ( $\nu_{12}$ ,  $\nu_{18a}$ ,  $\nu_{9a}$ ,  $\nu_{7a}$ ,  $\nu_{8a}$  und  $\nu_{8b}$ , siehe Abbildung 6.2) zerlegt. Für jede einzelne Bande wurde dabei ein Pseudo-Voigt-Profil, also eine Linearkombination aus einer Gauß-Kurve und einer Lorentzkurve verwendet. Da kein interner Standard bei diesen Messungen verwendet wurde, wird eine der Phe-Banden, und zwar die Ring-Streckschwingung  $\nu_{12}$  mit  $b_{1u}$ -Symmetrie als Bezugsintensität verwendet. Auf der linken Seite werden die Banden  $\nu_{8a}$  und  $\nu_{8b}$  betrachtet, rechts  $\nu_{7a}$ ,  $\nu_{9a}$  und  $\nu_{18a}$ . Es ist jeweils das Verhältnis der betreffenden Bandenhöhe zu der Höhe der Bande  $\nu_{12}$  als Funktion der Anregungswellenlänge dargestellt.

Die Anregungsmuster können in zwei Klassen eingeteilt werden. Bei den ebenen Ring-Streckschwingungen  $\nu_{8a}$  und  $\nu_{8b}$  (Fig. 6.3, links) wird ein stetiger Anstieg der relativen Raman-Intensität beobachtet. Es sind keine Ergebnisse für Wellenlängen oberhalb von 201,5 nm dargestellt, da hier das Signal der  $\nu_{12}$ -Schwingungen zu schwach war, um ein verlässliches Intensitätsverhältnis zu erhalten. Die ebene C–H-Biegeschwingung  $\nu_{9a}$  in Abbildung 6.3 (rechts) zeigt ein ähnliches Verhalten bei insgesamt geringerer Ramanintensität gegenüber  $\nu_{8a}$  und  $\nu_{8b}$ .

Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Ergebnissen in Referenz [30]. Dort wurde festgestellt, dass diese drei Moden ein ähnliches Anregungsprofil aufweisen und nur in geringem Maße von den elektronischen  $B_{a,b}$ -Übergängen, aber stark von dem elektronischen Übergang  $L_a$  verstärkt werden. Im Gegensatz dazu bleiben die relativen Signalthöhen der Phenyl–C Streckschwingung  $\nu_{9a}$  und der ebenen C–H-Biegeschwingung  $\nu_{18a}$  (Abbil-



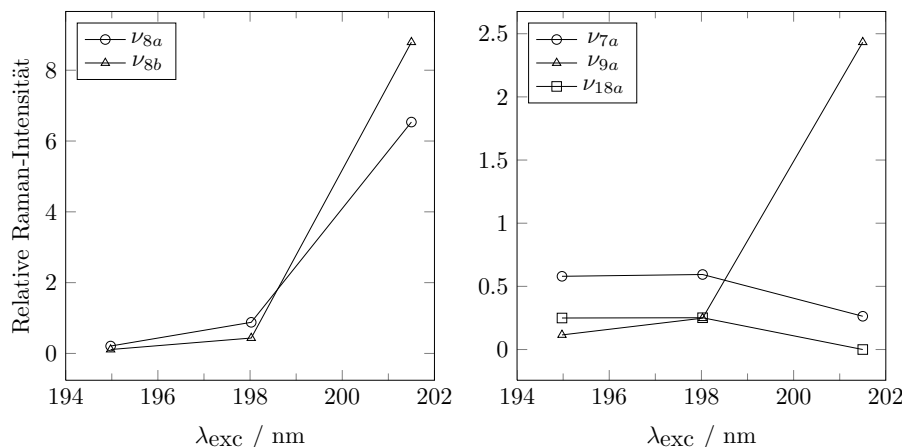


Abbildung 6.3: Die relativen Intensitäten der Banden des DUVRR-Spektrums von Phe in Bezug zur Bandenintensität der symmetrischen Ring-Streckschwingungsmode  $\nu_{12}$ .

dung 6.3, rechts) annähernd konstant. Daraus folgt, dass sich die wellenlängenabhängige Verstärkung der Schwingungen  $\nu_{9a}$  und  $\nu_{18a}$  ähnlich verhält wie die der  $\nu_{12}$ -Schwingung, welche als Referenz-Signal verwendet wird. Diese drei Moden bilden die zweite Klasse und werden nur gering von dem elektronischen Übergang  $L_a$ , aber stark von den Übergängen  $B_{a,b}$  verstärkt. Für eine genauere Analyse der DUVRR-Anregungsprofile mit einer Diskussion der A-Term- und B-Term-Beiträge sei auf die Arbeiten [44] und [30] der Arbeitsgruppe Spiro verwiesen.

### 6.3.2 DUVRR-Spektren und Anregungsprofil von Tyrosin

In Abb. 6.4 sind die DUVRR-Spektren von Tyr bei Anregungswellenlängen im Bereich 195 nm – 208 nm dargestellt. Im Gegensatz zum DUVRR-Spektrum von Phe bei  $\lambda_{\text{exc}} = 195$  nm (Abb. 6.2, oben) sind die Beiträge der Ring-Streckschwingungen  $\nu_{8a}$  und  $\nu_{8b}$  um  $1600\text{ cm}^{-1}$  bei Tyr bei dieser Anregungswellenlänge schon relativ stark.

Die einzelne Bande bei  $\sim 850\text{ cm}^{-1}$  entspricht der symmetrischen Ring-Streckschwingung  $\nu_1$ . Die drei Banden um  $1200\text{ cm}^{-1}$  gehören zu der ebenen C–H-Biege- und C–Phenyl-Streckschwingung  $\nu_{9a}$  bei  $\sim 1175\text{ cm}^{-1}$ , der total-symmetrischen Streckschwingung  $\nu(a_1)$  bei  $\sim 1210\text{ cm}^{-1}$  und der C–O-Streck- und symmetrischen Ring-Deformationsschwingung  $\nu_{7a}$  bei  $\sim 1270\text{ cm}^{-1}$ . [28]

Bis auf  $\nu_{9a}$  nimmt die Intensität all dieser Banden unter  $1400\text{ cm}^{-1}$  mit höherer Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{exc}}$  ab. Wie schon bei Phe ist es zum Verständnis dieses Verstärkungsmusters nötig, das entsprechende UV-Absorptionsspektrum und die diesem zugrunde liegenden elektronischen Übergänge zu betrachten. So wie die Schwingungsmoden  $\nu_{7a}$ ,

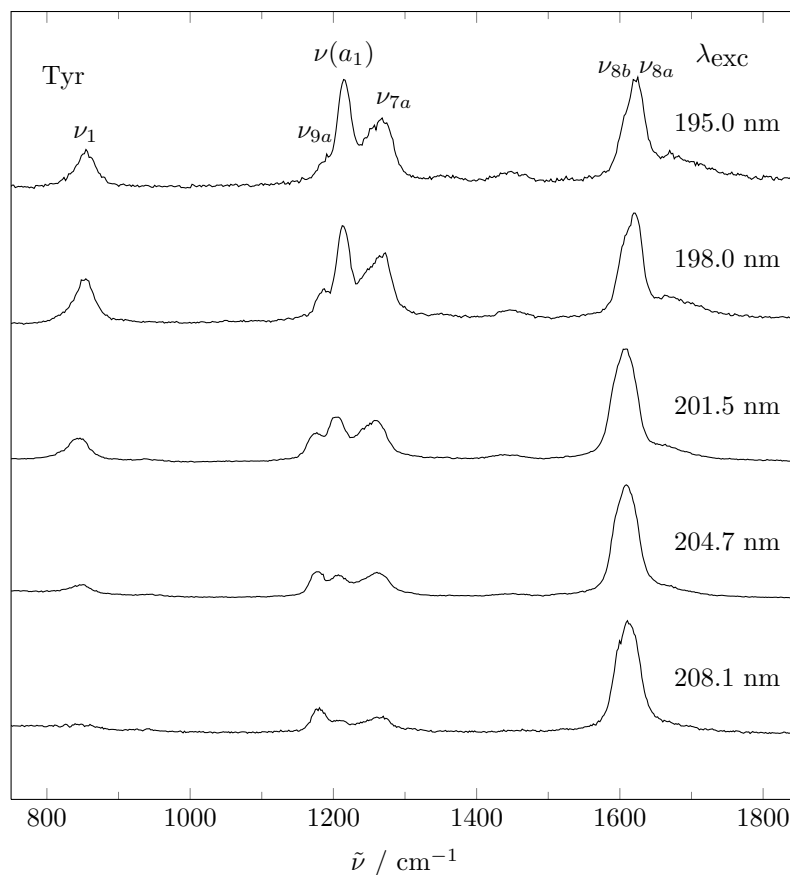


Abbildung 6.4: DUVRR-Spektren von Tyr bei verschiedenen Anregungswellenlängen.

$\nu_{18a}$  und  $\nu_{12}$  bei Phe werden bei Tyr die Moden  $\nu_{7a}$ ,  $\nu(a_1)$  und  $\nu_1$  nur gering durch den elektronischen Übergang  $L_a$  verstärkt. Demgegenüber findet eine deutliche Resonanzverstärkung durch die elektronischen Übergänge  $B_{a,b}$  statt. [30]

Da im Absorptionsspektrum von Tyr (siehe Abb. 3.4 auf Seite 17) die Maxima der elektronischen Übergänge  $B_{a,b}$  mit  $\lambda_{\max} = 193$  nm,  $\epsilon_{\max} = 46.5$  mM $^{-1}$ cm $^{-1}$  und  $L_a$  mit  $\lambda_{\max} = 223$  nm,  $\epsilon_{\max} = 8.4$  mM $^{-1}$ cm $^{-1}$  [30] gegenüber diesen Übergängen bei Phe rotverschoben sind, dehnt sich auch die Resonanzverstärkung auf längere Anregungswellenlängen aus.

In Abb. 6.5 ist eine quantitative Analyse der DUVRR-Spektren aus Abb. 6.4 dargestellt. Es werden die Höhen der einzelnen Peaks relativ zur Intensität des Signals der symmetrischen Ring-Streckschwingung  $\nu_1$  als Funktion der Laserwellenlänge aufgetragen. Die Anregungsprofile der Banden  $\nu_{8b}$  und  $\nu_{9a}$  sind monoton steigend, wie dies auch bei den

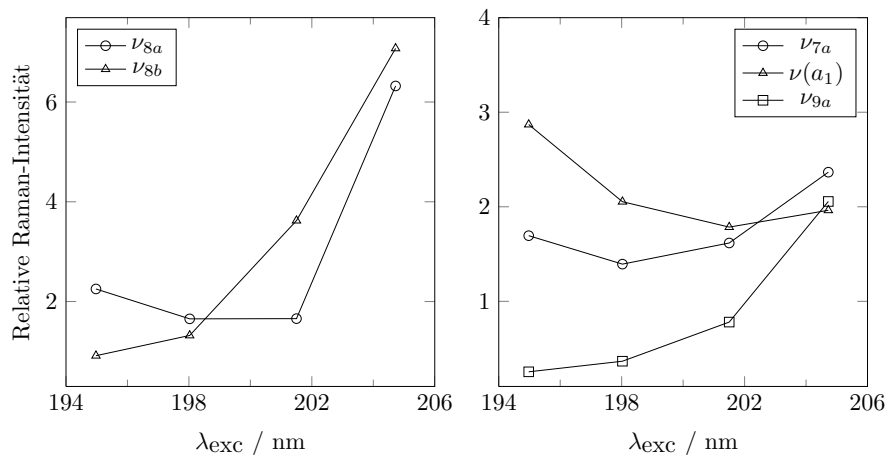


Abbildung 6.5: Die relativen Peak-Höhen des Raman-Spektrums von Tyr in Bezug zur Peak-Höhe der symmetrischen Ring-Streckschwingungsmode  $\nu_1$ .

gleichnamigen Banden bei Phe der Fall ist. Die Intensität der Bande  $\nu_{8a}$  hingegen nimmt zunächst bis 201,5 nm ab, um erst danach deutlich anzusteigen. Für 208,1 nm wird keine relative Peak-Höhe gezeigt, da das Signal von  $\nu_1$  hier zu schwach ist. Die relativen Raman-Intensitäten von  $\nu_{7a}$  und  $\nu(a_1)$  nehmen beide zunächst ab und steigen dann bei höheren Wellenlängen. Dies deutet auf einen geringen Unterschied des Anregungsmusters dieser Banden verglichen mit der Referenzbande  $\nu_1$  hin.

Auch hier können die Anregungsmuster wieder in zwei Klassen eingeteilt werden. Die Schwingungsmoden  $\nu_{7a}$ ,  $\nu(a_1)$  und  $\nu_1$  von Tyr verhalten sich ähnlich wie die Moden  $\nu_{7a}$ ,  $\nu_{18a}$  und  $\nu_{12}$  bei Phe und werden durch die elektronischen Übergänge  $B_{a,b}$  verstärkt, während kaum eine Verstärkung durch den  $L_a$ -Übergang stattfindet.

Der auffälligste Unterschied im Anregungsprofil von Tyr verglichen mit dem von Phe ist, dass bei Tyr die Schwingungsmoden  $\nu_{9a}$ ,  $\nu_{8a}$  und  $\nu_{8b}$ , nicht nur bei den höheren Anregungswellenlängen von  $\sim 198$  nm – 208 nm, sondern auch bei der niedrigen Anregungswellenlängen um  $\sim 195$  nm stark auftreten, während bei Phe diese Moden bei  $\lambda_{\text{exc}} \approx 195$  nm kaum verstärkt werden. Diese Moden bilden die zweite Klasse und scheinen bei Tyr durch beide elektronischen Übergänge, also sowohl durch den  $L_a$ -, als auch durch die  $B_{a,b}$ -Übergänge verstärkt zu werden.

Die zusätzliche Resonanzverstärkung dieser drei Schwingungsmoden durch die elektronischen  $B_{a,b}$ -Übergänge bei Tyr ist auf den Einfluss der Hydroxygruppe (-OH) in Para-Position zurückzuführen. Durch den Einfluss der Hydroxygruppe könnte es zu einer Störung der Wellenfunktion des elektronischen Zustandes  $B_a$  kommen. Dies führt möglicherweise zu einer vibronischen Mischung der gestörten Wellenfunktion von  $B_a$  mit einer der beiden Wellenfunktionen der elektronischen Zustände  $B_b$  oder  $L_a$ . [30] Auch

hier sei für eine genauere Analyse der DUVRR-Anregungsprofile auf Arbeiten der Arbeitsgruppe Spiro, insbesondere auf Referenz [30], verwiesen.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass sowohl die molekulare Symmetrie als auch die elektronischen Übergänge in Tyr sich von denen in Phe unterscheiden, da es sich bei Tyr um ein zweifach substituiertes Benzol-Derivat mit einer zusätzlichen Hydroxygruppe in Para-Position handelt. Dies führt zu einem leicht unterschiedlichem Anregungsmuster der Ringmoden von Tyr verglichen mit Phe.

### 6.3.3 DUVRR-Spektroskopie bei hoher Auflösung und bei geringen Wellenzahlen

Um die spektralen Beiträge der beiden ebenen Ring-Streckschwingungsmoden  $\nu_{8a}$  und  $\nu_{8b}$  von Tyr um  $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$  aufzulösen, wurden hochauflösende DUVRR-Spektren mit einer Laseranregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 204,7 \text{ nm}$  aufgenommen. Dazu wurde der Dreifach-Monochromator im additiven Modus betrieben; die Spaltbreite betrug  $300 \mu\text{m}$ . Durch die höhere Auflösung bedingt ist es nötig, mehrere Messungen in verschiedenen spektralen Fenstern vorzunehmen, um den gesamten interessanten spektralen Bereich abzudecken.

In Abb. 6.6 sind zwei separate Messung in unterschiedlichen spektralen Fenstern zusammengefasst. Man sieht, dass die drei Tyr-Banden um  $1200 \text{ cm}^{-1}$  und insbesondere auch die beiden Ring-Streckschwingungs-Banden bei  $1600 \text{ cm}^{-1}$  (vergleiche Abb. 6.4) jetzt aufgelöst werden. Der Bereich um  $1400 \text{ cm}^{-1}$  zwischen diesen beiden spektralen Fenstern wurde hierbei nicht erfasst. Um die symmetrische Ring-Streckschwingung  $\nu_1$  zu betrachten, wäre ein zusätzliches spektrales Fenster bei  $850 \text{ cm}^{-1}$  nötig. Für die höhere Auflösung des additiven Modus muss allerdings ein geringeres Signal-Rausch-Verhält-

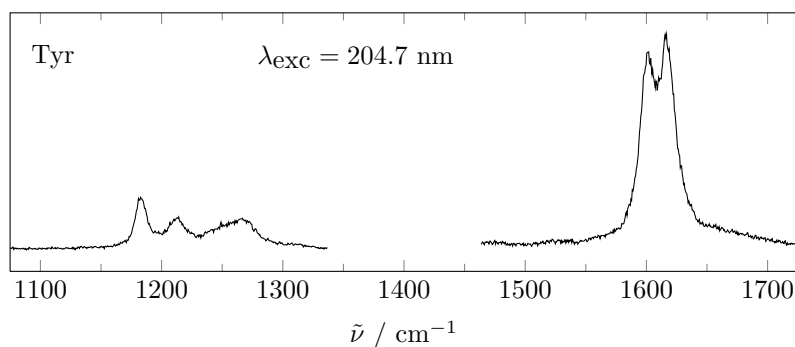


Abbildung 6.6: Hochauflöstes DUVRR-Spektrum von Tyr bei einer Laseranregungswellenlänge von  $204,7 \text{ nm}$  und dem Dreifach-Monochromator im additiven Modus.

nis in Kauf genommen werden. Wie zuvor bestand die Messung für jedes der spektralen Fenster aus 10 Einzelmessungen mit je 100 s Belichtungszeit. Für beide Fenster zusammen wurde also die doppelte Messzeit von 2000 s  $\approx$  33 min benötigt. Das Signal-Rausch-Verhältnis ist dabei im additiven Modus etwa um den Faktor 3 schlechter als im subtraktiven Modus.

Eine vergleichbare spektrale Auflösung wie in Abb. 6.6 kann im subtraktiven Modus durch eine Reduzierung der Spaltbreite von 300  $\mu$ m auf 100  $\mu$ m erreicht werden. Der Effekt verschiedener Spaltbreiten ist in Abb. 6.7 gezeigt. In diesem Fall ist das Signal-Rausch-Verhältnis geringfügig besser als im additiven Modus (vergleiche Abb. 6.6).

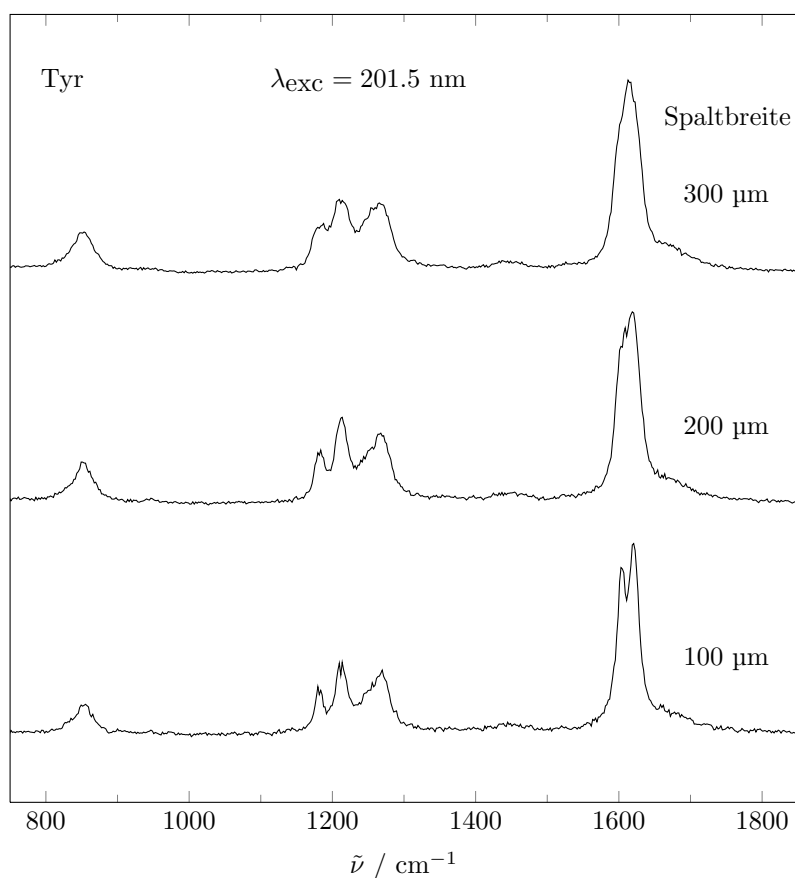


Abbildung 6.7: DUVRR-Spektren von Tyr bei  $\lambda_{\text{exc}} = 201,5$  nm und abnehmender Spaltbreite im subtraktiven Modus (vergleiche Abb. 6.4 Mitte).

Um die außergewöhnlich gute Streulichtunterdrückung des Dreifach-Monochromators zu demonstrieren, wurde ein DUVRR-Spektrum von Tyr bei niedrigen Wellenzahlen aufgenommen. Die Spaltbreite betrug  $300\text{ }\mu\text{m}$  und die Laserwellenlänge  $201,5\text{ nm}$ . Wie in Abb. 6.8 zu sehen ist, kann man mit diesem System DUVRR-Spektren bis zu  $\sim 40\text{ cm}^{-1}$  nahe der Rayleigh-Linie aufnehmen.

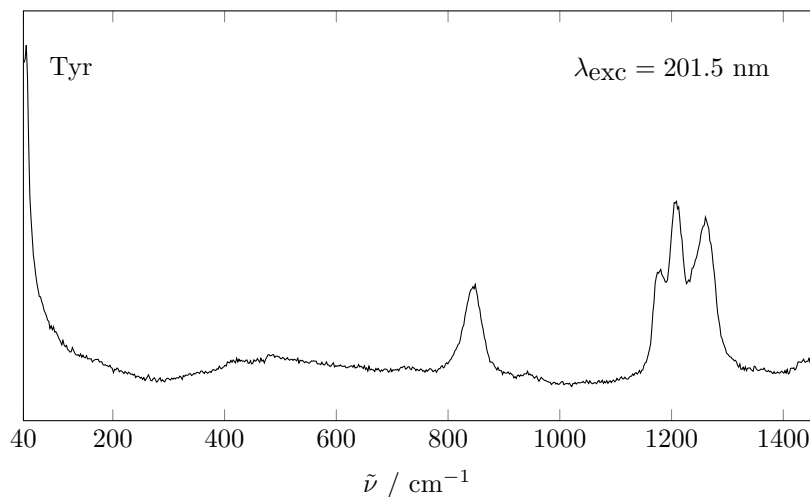


Abbildung 6.8: DUVRR-Spektrum von Tyr bei  $201,5\text{ nm}$ -Laseranregung im niedrigen Wellenzahl-Bereich.

## 6.4 Zusammenfassung

Die DUVRR-Spektren der aromatischen Aminosäuren Phe und Tyr zeigen bei Anregung im Bereich  $195\text{ nm} - 208\text{ nm}$  eine selektive Verstärkung der Schwingungen, die im aromatischen Ring lokalisiert sind. Diese spezifische Verstärkung der Ringmoden variiert systematisch als Funktion der Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{exc}}$ . So kommt es zum Beispiel zu einer extremen Verstärkung der Bande der symmetrischen Ring-Streckschwingung  $\nu_1$  von Tyr bei  $\sim 850\text{ cm}^{-1}$ , wenn mit  $\lambda_{\text{exc}} \leq 200\text{ nm}$  angeregt wird. Da diese Normalmode besonders empfindlich auf Wasserstoffbrückenbindungen und die Polarität der Mikroumgebung reagiert [53], stellen DUVRR-Messungen mit  $\lambda_{\text{exc}} \leq 200\text{ nm}$  eine vielversprechende Möglichkeit dar, die Mikroumgebung von Tyr-Seitengruppen in Proteinen und makromolekularen Proteinkomplexen schwingungsspektroskopisch zu untersuchen.

## 6.5 Ausblick

Obwohl die Streulichtunterdrückung des Dreifach-Monochromators sehr gut ist und durchgängig optische Komponenten verwendet wurden, die für die Tief-UV-Strahlung im Bereich um 200 nm optimiert sind, ist der Lichtdurchsatz des Systems insgesamt sehr gering. Die meisten biologischen Proben reagieren empfindlich auf die langen Belichtungszeiten mit der gepulsten Tief-UV-Strahlung, die notwendig sind, um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Dies trifft insbesondere auf zeitaufgelöste Experimente zu, bei denen es nötig ist, eine Serie von DUVRR-Spektren als Funktion einer Verzögerungszeit aufzunehmen. Bei den folgenden Experimenten wurden daher nur zwei der drei Spektrometer-Stufen verwendet. Dieses Vorgehen ähnelt den Ansätzen anderer Forschungsgruppen, die sich mit (Tief)-UV-Raman-Spektroskopie beschäftigen [44, 45, 54].

## 7 pH-abhängige Raman-Studien an Tyrosin und Histidin

Die Schwingungen eines Moleküls und damit auch sein Raman-Spektrum hängen von der Struktur des Moleküls ab. Wenn es sich bei dem Molekül um eine Säure oder Base nach Brønsted und Lowry handelt, werden diese abhängig vom pH-Wert Protonen aufnehmen oder abgeben und damit ihre Struktur verändern. Damit ändern sich auch die Schwingungen und das Raman-Spektrum des Moleküls. Zusammen mit dem Resonanz-Raman-Effekt ist es somit möglich, ein geeignetes Molekül als nanoskopisches pH-Meter zu verwenden.

Wenn es sich bei diesem Molekül um eine Aminosäure in einem Protein handelt, kann damit orts aufgelöst der pH-Wert an der Position der Seitengruppe dieser Aminosäure bestimmt werden. Mit dieser Information können dann Modelle über die Faltung und Funktion von Proteinen, sowie Protein-Protein- und Protein-Ligand-Wechselwirkungen überprüft werden.

### 7.1 Kenntnisstand und Aufgabenstellung

Der seitengruppen-spezifische pH-Wert kann bereits durch verschiedene experimentelle Methoden, wie NMR-, FTIR-, Fluoreszenz- und EPR-Spektroskopie bestimmt werden. Die beiden letztgenannten Methoden wenden pH-abhängige Farbstoffe bzw. Spin-Labels an.

Hintergrund der pH-Studie an den aromatischen Aminosäuren Tyr und His war es, zu untersuchen, ob sich aromatische Aminosäuren nicht nur als Sonden für Wasserstoffbrückenbindungen, sondern auch als Sonden für den lokalen pH-Wert eignen. Der pH-Wert ist eine Variable der Mikroumgebung, die aber im Gegensatz zu Wasserstoffbrückenbindungen auch leicht makroskopisch geändert werden kann.

Ziel der vorliegenden Messungen war es, eine markierungsfreie und seitengruppen-spezifische Methode zu entwickeln, um den lokalen pH-Wert mittels DUVRR-Spektroskopie zu bestimmen. Dazu wurde ein robuster Algorithmus entwickelt, der den pH-Wert anhand dreier Referenzspektren berechnet, ohne dabei auf die Kenntnis des  $pK_a$ -Wertes des jeweiligen Moleküls zurückgreifen zu müssen.



Traditionell wird der pH-Wert als Eigenschaft der Probe, bzw. des Lösemittels, als Ganzes verstanden. Der lokale pH-Wert hingegen kann von diesem makroskopischen pH-Wert abweichen. Zum Beispiel weisen die verschiedenen Zellkompartimente einer biologischen Zelle verschiedene pH-Werte je nach ihrer jeweiligen Funktion auf [55–57]. Im Fall der Proteine hängt der seitengruppen-spezifische pH-Wert von der lokalen Umgebung ab und wird von mehreren Parametern beeinflusst. Ein Schlüssel-Parameter ist die Zugänglichkeit des Solvens, die sich unterscheidet, je nachdem, ob sich die Seitengruppe in einer hydrophoben Umgebung im Inneren des Proteins befindet, oder an der Außenseite unmittelbaren Kontakt mit dem Solvens hat. Ein zweiter wichtiger Faktor ist der Einfluss von elektrisch geladenen Aminosäure-Resten in der Nähe der betrachteten Seitengruppe.

Wenn wir den lokalen pH-Wert an einer bestimmten Seitengruppe kennen, können wir Modelle über die Faltung [58, 59] und Funktion [60] von Proteinen, sowie Protein-Protein- und Protein-Ligand-Wechselwirkungen [61, 62] überprüfen. Zum Beispiel wurde für den Photorezeptor SRII des Halobakteriums *Natronomonas pharaonis* (Abbildung 7.1, links) gezeigt, dass die physiologische Regulierung des Photozyklus von einem Zusammenspiel vom lokalen pH-Wert auf der Membran-Oberfläche und dem Membran-Potential herrührt [63]. Der SRII/HtrII-Komplex ist auch ein Beispiel für den Einfluss des lokalen pH-Wertes auf die Protein-Protein-Wechselwirkung, da der Protonierungsgrad der Seitengruppe Tyr199 möglicherweise die Bildung dieses Komplexes mittels einer Wasserstoffbrückenbindung mit Asn74 auf der zweiten Transducer-Helix (grüne Helices in Abb. 7.1) beeinflusst.

Wenn wir davon ausgehen, dass der  $pK_a$ -Wert einer Aminosäure-Seitenkette sich nicht als Funktion der Mikroumgebung ändert, resultiert der Protonierungszustand aus dem *intrinsischen*  $pK_a$  und dem lokalen pH. Eine andere Möglichkeit, dieselbe Beobachtung zu beschreiben, wäre die Annahme, dass der lokale pH mit dem makroskopischen pH-Wert der Lösung identisch ist, und der Einfluss der Mikroumgebung durch den *scheinbaren*  $pK_a$ -Wert beschrieben wird [66]. Mathematisch sind beide Sichtweisen identisch, da der Protonierungsgrad allein von der Differenz  $pH - pK_a$  abhängt.

Für eine Vielzahl von Techniken wurden verschiedene pH-Marker entwickelt und etabliert. Zum Beispiel können die pH-abhängige Absorption und Fluoreszenz des grün fluoreszierenden Proteins (*green fluorescent protein*, **GFP**) verwendet werden, um ortsauflösend den pH-Wert in den verschiedenen Kompartimenten einer lebenden Zelle zu messen [55]. Zu anderen Ansätzen, die optische Techniken verwenden, gehören die Verwendung verschiedener Fluorophore [56, 57, 67] oder der Einsatz der oberflächen-verstärkten Raman-Streuung (*surface-enhanced Raman scattering*, **SERS**) an Nanopartikeln mit einem pH-sensitivem Reporter-Molekül wie z. B. 4-Mercapto-Benzoesäure (pMBA) als nanoskopische pH-Sonde [68, 69]. Eine andere Möglichkeit besteht in der EPR-Spektroskopie mit pH-sensitiven Spin-Markern [70–72]. Zu den markierungsfreien Ansätzen gehören Techniken der NMR-[73–75] und FTIR-Spektroskopie [66].

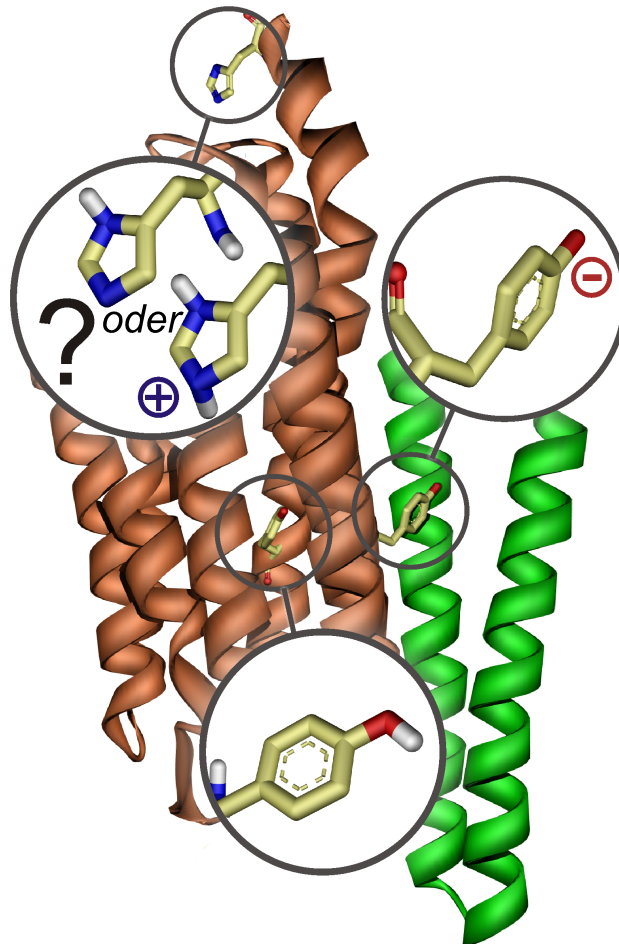


Abbildung 7.1: Einfluss des lokalen pH-Wertes auf den Protonierungszustand von Tyr- und His-Seitengruppen am Beispiel der Kristallstruktur des Photorezeptor / Transducer-Komplexes SRII / HtrII des Halobakteriums *Natronomonas pharaonis* (pdb: 1H2S, [64]) [65]. Es sollte beachtet werden, dass es sich bei den dargestellten Protonierungszuständen der Aminosäuren (in den Vergrößerungen dargestellt) nur um Beispiele handelt und dies nicht die tatsächlichen Bedingungen in diesem Protein-Komplex widerspiegelt.

Grafik angefertigt von Johann Klare [5].

In der Schwingungs-Raman-Spektroskopie sind die Spektren auch immer von dem Protonierungszustand des betrachteten Moleküls abhängig und bieten sich daher als intrinsische Reporter für den lokalen pH-Wert an. Zum Beispiel wurde Raman-Spektroskopie mit Laser-Anregung im sichtbaren Spektralbereich verwendet, um den  $pK_a$ -Wert bestimmter Aminosäuren wie z. B. Histidin zu bestimmen [76].

Das letztliche Ziel dieser Studie ist es, eine markierungsfreie und sensitive Methode zu entwickeln, mit der der lokale, seitengruppen-spezifische pH-Wert bestimmt werden kann. Da der Resonanz-Effekt im Tief-UV ausgenutzt wird, bieten sich die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr) und Histidin (His) als Sonden an. Von diesen sind nur die letzten beiden geeignet, da nur Tyr und His eine Seitenkette aufweisen, die abhängig vom pH protoniert oder deprotoniert vorliegt. Für die Anwendung in zukünftigen Experimenten an Proteinen wird es nötig sein, verschiedene Mutanten desselben Proteins zu vergleichen, bei denen z. B. das Tyr an der betrachteten Position durch ein Phe ersetzt wurde.

## 7.2 Geräte, Materialien und Methoden

Tyr wurde von AppliChem, His wurde von Sigma Aldrich käuflich erworben. Beide Aminosäuren wurden ohne weitere Behandlung verwendet. Der pH-Wert der wässrigen Tyr-Lösung wurde mit Natriumhydroxid (NaOH) eingestellt. Die NaOH-Konzentration lag zwischen  $633\ \mu\text{M}$  für pH 8,8 und  $3,14\ \text{mM}$  für pH 11,0. Um den pH-Wert der His-Lösung einzustellen, wurde Salzsäure (HCl) verwendet. Hierbei lag die HCl-Konzentration zwischen  $0\ \text{mM}$  bei pH 7,1 und  $4,5\ \text{mM}$  für pH 4,7. Im Fall von  $0\ \text{mM}$  HCl bei pH 7,1 wurde keine Salzsäure verwendet, das heißt die untersuchte Probe bestand nur aus His und Wasser. Die Konzentration der Aminosäuren lag in der fertigen Lösung bei  $1\ \text{mM}$  für Tyr und  $5\ \text{mM}$  im Fall von His. Die His-Konzentration wurde wegen der schwächeren Resonanz-Verstärkung höher gewählt. Bei Tyr hätte eine höhere Konzentration das Signal nicht signifikant verbessert, da es bei dieser Konzentration schon zu einer Reabsorption des Raman-gestreuten Lichts kommt. Bei beiden Aminosäuren wurden etwa  $2\ \text{ml}$  der Probe in dem Freifluss-System zirkuliert.

Zur Anregung wurde der Indigo-Laser verwendet. Die Anregungswellenlänge wurde auf  $\sim 201\ \text{nm}$  für His und  $\sim 205,5\ \text{nm}$  für Tyr eingestellt. Die Ausgangsleistung lag bei  $\sim 1\ \text{mW}$ , was bei  $4\ \text{kHz}$  Repetitionsrate einer Pulsenergie von  $\sim 250\ \text{nJ}$  entspricht. Für diese Messungen wurden nur zwei Stufen des Dreifach-Monochromators verwendet. Diese wurden im additiven Modus und jeweils mit einem Gitter mit  $3600\ \text{Linien/mm}$  betrieben.

Bei den Tyr-Proben wurden für jeden pH-Wert je drei Messungen mit jeweils  $5\ \text{min}$  Belichtungszeit und einer Breite des Eintrittsspalts von  $100\ \mu\text{m}$  durchgeführt. Im Fall der His-Messungen wurde pro pH-Wert ein Spektrum mit  $15\ \text{min}$  Belichtungszeit bei  $500\ \mu\text{m}$  Eintrittsspaltbreite aufgenommen. Die höhere Spaltbreite ist mit dem geringe-

ren Raman-Streuquerschnitt von His gegenüber Tyr begründet, führt aber zur einer geringeren Auflösung der His-Spektren. Vor der elektronischen Verarbeitung der Spektren wurden Spikes entfernt.

### 7.3 Beschreibung des Algorithmus

Im Folgenden wird der Algorithmus beschrieben und hergeleitet, mit dem die Spektren in pH-Werte umgerechnet werden. Dabei gehen wir zunächst davon aus, dass der  $pK_a$ -Wert der Probe bekannt ist. In dem Fall ergibt sich der pH-Wert einfach aus dem Konzentrationsverhältnis der protonierten Spezies (AH) zur unprotonierten Spezies ( $A^-$ ). Nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung gilt dann

$$\text{pH} = pK_a - \log_{10} \left( \frac{[\text{AH}]}{[\text{A}^-]} \right) . \quad (7.1)$$

Da jedoch die reinen Spektren von  $A^-$  und AH nur bei extremen pH-Werten auftreten, sind sie experimentell nicht immer ohne weiteres zugänglich. Zusätzlich können Skalierungsprobleme auftreten, z. B. aufgrund von Schwankungen der Laser-Leistung, Änderungen des Raman-Streuquerschnitts oder der Konzentration der Probe, oder des Extinktionskoeffizienten der Lösung.

Mit der hier vorgestellten Methode ist es nicht notwendig, die Basisspektren der reinen Spezies direkt aufzunehmen. Im Gegenzug erhöht sich allerdings der Aufwand bei der Vorbereitung: es müssen drei, statt lediglich zwei Referenzspektren bei bekanntem pH aufgenommen werden. Es kann mathematisch gezeigt werden, dass diese Methode auch die oben genannten Skalierungsprobleme löst. Quasi als Nebeneffekt ergibt es sich, dass der  $pK_a$ -Wert sich aus den Gleichungen herauskürzt. Daher ist die Kenntnis des  $pK_a$  mit dieser Methode nicht notwendig.

Zunächst nehmen wir an, dass die ungestörten, korrekt skalierten Spektren der reinen Spezies AH und  $A^-$  bekannt sind. Das Spektrum der reinen Säure AH wird im Folgenden mit  $\vec{A}$ , das der korrespondierenden reinen Base  $A^-$  mit  $\vec{B}$  bezeichnet. Für jeden pH ist das Spektrum  $\vec{m}$  der Probe dann eine Linearkombination aus diesen Basisspektren:

$$\vec{m} = \alpha \vec{A} + \beta \vec{B} . \quad (7.2)$$

Wenn wir weiter annehmen, dass die Beiträge der Basisspektren proportional zu der Konzentration der entsprechenden Spezies ist, kann der pH aus den relativen Beiträgen  $\alpha$  und  $\beta$  berechnet werden:

$$\text{pH} = pK_a - \log_{10} \left( \frac{\alpha}{\beta} \right) . \quad (7.3)$$

Im realen Experiment sind  $\vec{A}$  und  $\vec{B}$  jedoch nicht immer zugänglich. Stattdessen werden zwei experimentelle Spektren  $\vec{a}$  und  $\vec{b}$  mit bekanntem pH-Wert verwendet. Um den Fehler aufgrund von spektralem Rauschen klein zu halten, sollte der eingestellte pH für die Referenzspektren  $\vec{a}$  und  $\vec{b}$  immer noch so hoch und so niedrig wie möglich gewählt werden, damit der Unterschied zwischen den beiden Spektren möglichst groß ist. Diese Referenzspektren sind nun ebenfalls Linearkombinationen der beiden Basisspektren:

$$\vec{a} = \alpha_a \vec{A} + \beta_a \vec{B} \quad ; \quad \vec{b} = \alpha_b \vec{A} + \beta_b \vec{B} . \quad (7.4)$$

Das Spektrum  $\vec{m}$ , kann nun als Mischung dieser beiden Referenzspektren  $\vec{a}$  und  $\vec{b}$  betrachtet werden. Mit Hilfe der Gleichungen (7.4) lässt sich diese Mischung auch als Linearkombination aus den Basisspektren  $\vec{A}$  und  $\vec{B}$  darstellen:

$$\vec{m} = \bar{\alpha} \vec{a} + \bar{\beta} \vec{b} = (\bar{\alpha} \alpha_a + \bar{\beta} \alpha_b) \vec{A} + (\bar{\alpha} \beta_a + \bar{\beta} \beta_b) \vec{B} . \quad (7.5)$$

Wir erhalten dadurch einen neuen Ausdruck für die gesuchten Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$ :

$$\alpha = (\bar{\alpha} \alpha_a + \bar{\beta} \alpha_b) \quad ; \quad \beta = (\bar{\alpha} \beta_a + \bar{\beta} \beta_b) . \quad (7.6)$$

Die Terme  $\bar{\alpha}$  und  $\bar{\beta}$  lassen sich durch eine Kurvenanpassungsprozedur (Methode der kleinsten Quadrate, *least square fit*) des Spektrums  $\vec{m}$  als Linearkombination der Referenzspektren  $\vec{a}$  und  $\vec{b}$  bestimmen. Die vier anderen Parameter  $\alpha_a$ ,  $\beta_a$ ,  $\alpha_b$  und  $\beta_b$  sind Produkte je zweier Faktoren:

$$\alpha_a = \alpha'_a l_a \quad ; \quad \beta_a = \beta'_a l_a \quad ; \quad \alpha_b = \alpha'_b l_b \quad ; \quad \beta_b = \beta'_b l_b . \quad (7.7)$$

Die gestrichenen Symbole stellen der relativen Anteil der beiden Spezies dar, d. h. sie werden so gewählt, dass  $\alpha'_x + \beta'_x = 1$  gilt. Daher können sie aus der Henderson-Hasselbalch-Gleichung (7.1) mittels der bekannten pH-Werte  $\text{pH}_x$  der Referenzspektren  $\vec{x}$  berechnet werden. Hier steht  $x$  für die beiden Referenzen  $a$  und  $b$ .

$$\alpha'_x = \frac{10^{\text{p}K_a - \text{pH}_x}}{1 + 10^{\text{p}K_a - \text{pH}_x}} = \frac{[\text{H}]_x}{K_a + [\text{H}]_x} \quad ; \quad \beta'_x = \frac{1}{1 + 10^{\text{p}K_a - \text{pH}_x}} = \frac{K_a}{K_a + [\text{H}]_x} . \quad (7.8)$$

An dieser Stelle sind lediglich noch die beiden Faktoren  $l_a$  und  $l_b$  unbekannt. Diese Faktoren stellen die Skalierung der Intensität der Referenzspektren gegenüber den Basisspektren dar und beinhalten auch Schwankungen der Intensität, z. B. aufgrund der Laser-Leistung. Jetzt wird ein drittes Referenzspektrum  $\vec{n}$  eingeführt, dass bei einem mittleren, bekannten pH gemessen wird. Um den Fehler gering zu halten, sollte sich der pH möglichst in der Nähe des  $\text{p}K_a$  befinden. Dadurch wird der spektrale Unterschied zu  $\vec{a}$  und  $\vec{b}$  maximiert.

$$\vec{n} = \bar{\alpha}_n \vec{a} + \bar{\beta}_n \vec{b} = \alpha_n \vec{A} + \beta_n \vec{B} = \alpha'_n l_n \vec{A} + \beta'_n l_n \vec{B} . \quad (7.9)$$

Analog zu  $\vec{m}$  gilt auch folgender Ausdruck für  $\vec{n}$ :

$$\alpha'_n l_n = \bar{\alpha}_n \alpha'_a l_a + \bar{\beta}_n \alpha'_b l_b \quad ; \quad \beta'_n l_n = \bar{\alpha}_n \beta'_a l_a + \bar{\beta}_n \beta'_b l_b . \quad (7.10)$$

Dieses Gleichungssystem kann nun nach  $l_a$  und  $l_b$  aufgelöst werden:

$$l_a = l_n \frac{\alpha'_n \beta'_b - \alpha'_b \beta'_n}{\bar{\alpha}_n (\alpha'_a \beta'_b - \alpha'_b \beta'_a)} \quad ; \quad l_b = l_n \frac{\alpha'_n \beta'_a - \alpha'_a \beta'_n}{\bar{\beta}_n (\alpha'_b \beta'_a - \alpha'_a \beta'_b)} . \quad (7.11)$$

Wie zuvor werden die Faktoren mit Balken  $\bar{\alpha}_n$  und  $\bar{\beta}_n$  durch eine Anpassung mit der Methode der kleinsten Quadrate von  $\vec{n}$  als Linearkombination aus  $\vec{a}$  und  $\vec{b}$  bestimmt. Somit können  $l_a$  und  $l_b$  aus Gleichung (7.11) bis auf einen gemeinsamen Vorfaktor  $l_n$  bestimmt werden. Wir definieren die vollständig bestimmbaren Terme  $\lambda_x = \frac{l_x}{l_n}$  wie folgt:

$$\lambda_a = \frac{\alpha'_n \beta'_b - \alpha'_b \beta'_n}{\bar{\alpha}_n (\alpha'_a \beta'_b - \alpha'_b \beta'_a)} \quad ; \quad \lambda_b = \frac{\alpha'_n \beta'_a - \alpha'_a \beta'_n}{\bar{\beta}_n (\alpha'_b \beta'_a - \alpha'_a \beta'_b)} . \quad (7.12)$$

Wenn wir nun Gleichung (7.3) unter Benutzung der Gleichungen (7.6), (7.7) und (7.12) ausdrücken, kürzt sich der unbekannte Faktor  $l_n$  heraus:

$$\text{pH} = \text{p}K_a - \log_{10} \left( \frac{\bar{\alpha} \alpha'_a \lambda_a + \bar{\beta} \alpha'_b \lambda_b}{\bar{\alpha} \beta'_a \lambda_a + \bar{\beta} \beta'_b \lambda_b} \right) . \quad (7.13)$$

Mit den Gleichungen (7.8) und (7.12) ergibt sich daraus:

$$\begin{aligned} \text{pH} &= \text{p}K_a - \log_{10} \left( \frac{\bar{\beta} \bar{\alpha}_n [\text{H}]_b ([\text{H}]_a - [\text{H}]_n) + \bar{\alpha} \bar{\beta}_n [\text{H}]_a ([\text{H}]_n - [\text{H}]_b)}{(\bar{\beta} \bar{\alpha}_n ([\text{H}]_a - [\text{H}]_n) + \bar{\alpha} \bar{\beta}_n ([\text{H}]_n - [\text{H}]_b)) K_a} \right) \\ &= -\log_{10} \left( \frac{\bar{\beta} \bar{\alpha}_n [\text{H}]_b ([\text{H}]_a - [\text{H}]_n) + \bar{\alpha} \bar{\beta}_n [\text{H}]_a ([\text{H}]_n - [\text{H}]_b)}{\bar{\beta} \bar{\alpha}_n ([\text{H}]_a - [\text{H}]_n) + \bar{\alpha} \bar{\beta}_n ([\text{H}]_n - [\text{H}]_b)} \right) . \end{aligned} \quad (7.14)$$

Wie man sieht, wird der  $\text{p}K_a$ -Wert des Sonden-Moleküls eliminiert. Die verbleibenden Terme sind die Faktoren  $\bar{\alpha}$ ,  $\bar{\alpha}_n$ ,  $\bar{\beta}$  und  $\bar{\beta}_n$ , die sich durch die Betrachtung der Spektren  $\vec{m}$  und  $\vec{n}$  als Linearkombinationen von  $\vec{a}$  und  $\vec{b}$  mit der Methode der kleinsten Quadrate bestimmen lassen und die drei  $[\text{H}]_x$ -Konzentrationen, die aus den bekannten pH-Werten der drei Referenzspektren berechnet werden.

Rein theoretisch kann jeder Satz aus drei Spektren mit unterschiedlichen pH-Werten als Referenz verwendet werden. Um den Fehler möglichst klein zu halten, sollten sich die Spektren so viel wie möglich voneinander unterscheiden. Dafür ist es am besten, wenn sich ein Referenz-pH in der Nähe des  $\text{p}K_a$ -Wertes der Probe befindet („neutrale“ Referenz  $\vec{n}$ ), einer so niedrig wie möglich („saure“ Referenz  $\vec{a}$ ) und einer so hoch wie möglich („basische“ Referenz  $\vec{b}$ ) ist.

## 7.4 Ergebnisse und Diskussion

Von His wurden 15 Spektren bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen. Fünf dieser Spektren sind in Abb. 7.2 abgebildet. Bis auf die Entfernung von Spikes wurden die Spektren nicht weiter manipuliert. Im Unterschied zu Spektren von Caswell und Spiro [77], ist der Peak bei  $1100\text{ cm}^{-1}$ , der der Mode  $\delta(\text{R}) + \delta(\text{C}_4, \text{C}_5\text{-H})$  zugeordnet wird, bei beiden His-Spezies sichtbar, nicht nur bei  $\text{His-H}_2^+$ . Die Stärke der meisten anderen Banden ist stark von dem Protonierungszustand von His abhängig. Die Banden bei  $1165\text{ cm}^{-1}$  [ $\delta(\text{R}) + \delta(\text{N}_1\text{-H})$ ],  $1245\text{ cm}^{-1}$ ,  $1325\text{ cm}^{-1}$  [ $\delta(\text{R})$ ] und  $1580\text{ cm}^{-1}$  können nur bei His-H beobachtet werden, während die Linien bei  $1205\text{ cm}^{-1}$ ,  $1540\text{ cm}^{-1}$  [ $\delta(\text{R}) + \delta(\text{N}_1\text{-H})$ ] und  $1640\text{ cm}^{-1}$  nur bei  $\text{His-H}_2^+$  sichtbar sind. Die Peaks bei  $1275\text{ cm}^{-1}$  [ $\delta(\text{C}_2\text{-H})$ ],  $1455\text{ cm}^{-1}$  [ $\delta(\text{N}_1\text{-H})$ ] und  $1500\text{ cm}^{-1}$  [ $\delta(\text{R}) + \delta(\text{C}_2\text{-H})$ ] kommen bei beiden Spezies vor. Eine Zuordnung aller experimentell beobachteten DUVRR-Banden von His ist in Tabelle 7.1 zusammengefasst.

Wenn wir den beschriebenen Algorithmus auf diese Spektren anwenden, erhalten wir die pH-Daten, wie sie in Abb. 7.3 dargestellt sind. Aufgrund der Arbeitsweise des Algorithmus liegen die Referenzpunkte auf der Geraden der Einheitsfunktion, die hier als

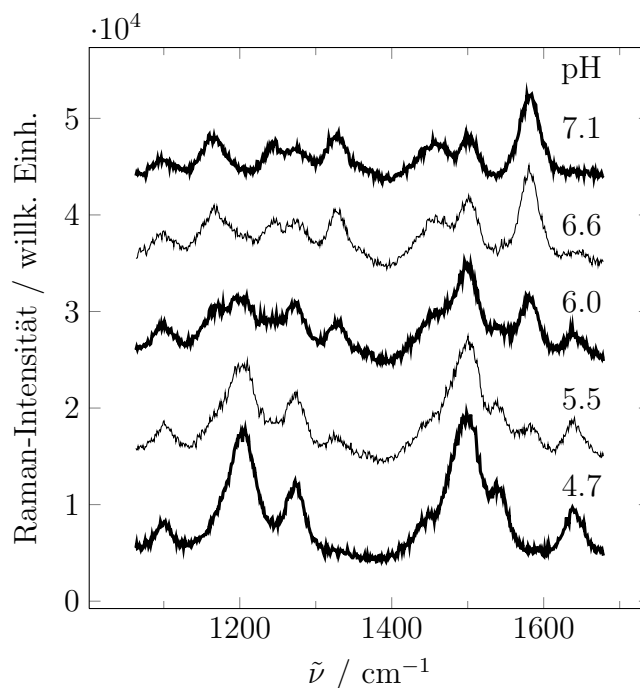


Abbildung 7.2: Fünf DUVRR-Spektren von Histidin, einschließlich der drei Referenzspektren (dicke Linien).

Tabelle 7.1: Moden-Zuordnung für Histidin.

Wellenzahl / $\text{cm}^{-1}$		Benennung der Mode
His-H	His- $\text{H}_2^+$	
1100	1100	$\delta(\text{R}) + \delta(\text{C}_4, \text{C}_5\text{-H})$
1165		$\delta(\text{R}) + \delta(\text{N}_1\text{-H})$
1245	1205	
1275	1275	$\delta(\text{C}_2\text{-H})$
1325		$\delta(\text{R})$
1455	1455	$\delta(\text{N}_1\text{-H})$
1500	1500	$\delta(\text{R}) + \delta(\text{C}_2\text{-H})$
	1540	$\delta(\text{R}) + \delta(\text{N}_1\text{-H})$
1580		
	1640	

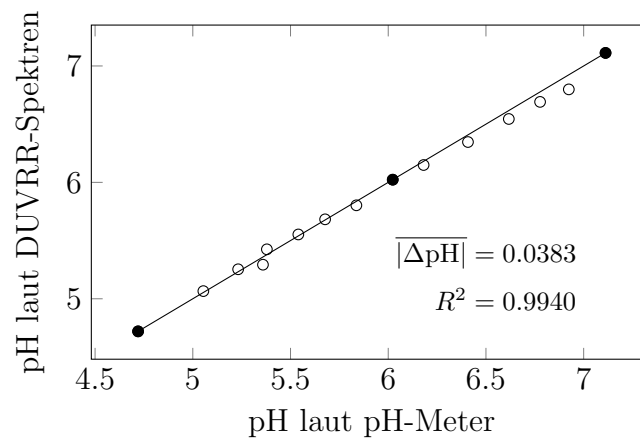


Abbildung 7.3: Anhand der Spektren berechnete pH-Werte von Histidin. Die Referenz-Spektren sind durch gefüllte Kreise markiert.



durchgezogene Linie dargestellt ist. Die anderen Datenpunkte streuen um die Einheitsfunktion herum. Die mittlere Abweichung der pH-Werte beträgt  $|\overline{\Delta\text{pH}}| = 0,04$  und das Bestimmtheitsmaß ist  $R^2 = 0,994$ .

Im Fall von Tyr wurden 11 DUVRR-Spektren bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen. Fünf dieser Spektren sind in Abb. 7.4 zu sehen. Wie bei His wurde der Algorithmus auf die Rohdaten angewendet, bei denen bis auf Entfernung von Spikes keine Bearbeitung vorgenommen wurde. Der offensichtlichste Unterschied tritt in dem Bereich der ebenen Ring-Streckschwingungen  $\nu_{8a}$  und  $\nu_{8b}$  um  $1600\text{ cm}^{-1}$  auf. Bei den anderen Banden der Ph-OH-Ringmoden sind kleinere Änderungen zu erkennen. Die Zuordnung aller Banden ist in Tabelle 7.2 aufgelistet. Die Positionen und Zuordnungen zu den beiden Tyr-Spezies steht in Einklang mit der Literatur [28, 44, 78, 79].

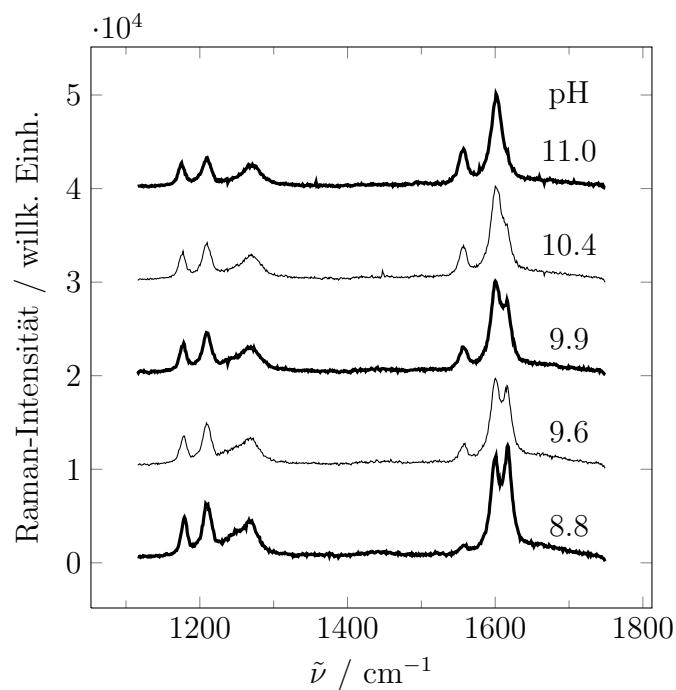


Abbildung 7.4: Fünf DUVRR-Spektren von Tyrosin, einschließlich der drei Referenzspektren (dicke Linien).

Abbildung 7.5 zeigt das Ergebnis der Anwendung des Algorithmus auf die DUVRR-Spektren von Tyr. Trotz der besseren Qualität der Spektren im Vergleich zu His ist der Unterschied zwischen den spektral bestimmten pH-Werten und denen des pH-Meters bei Tyr größer. Die mittlere Abweichung der pH-Werte ist  $|\overline{\Delta\text{pH}}| = 0,064$  und das Bestimmtheitsmaß beträgt  $R^2 = 0,980$ .

Tabelle 7.2: Moden-Zuordnung für Tyrosin.

Wellenzahl / $\text{cm}^{-1}$		Benennung der Mode	Beschreibung
Tyr-OH	Tyr-O <sup>-</sup>		
1180	1175	$\nu_{9a}$	ebene C–H-Biege- und Ph–C-Streckschwingung
1210	1210	$\nu(a_1)$	totalsymmetrische Streckschwingung
1270	1270	$\nu_{7a}$	C–O-Streckschw. und symm. Ring-Deformation
1600	1555	$\nu_{8b}$	ebene Ring-Streckschwingung
1620	1600	$\nu_{8a}$	ebene Ring-Streckschwingung

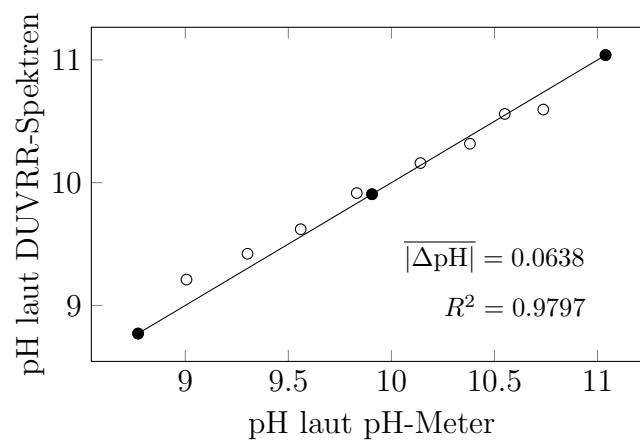


Abbildung 7.5: Anhand der Spektren berechnete pH-Werte von Tyrosin. Die Referenz-Spektren sind durch gefüllte Kreise markiert.

## 7.5 Zusammenfassung

Es wurde eine Methodik gezeigt, mit der es möglich ist, den pH-Wert der wässrigen Umgebung der aromatischen Aminosäuren His und Tyr robust zu bestimmen. Dazu werden die DUVRR-Spektren der Proben mit drei Referenzspektren verglichen und dann mittels eines Algorithmus der pH-Wert der betrachteten Probe berechnet. Bei diesem Algorithmus werden bis auf die pH-Werte der Referenzspektren keine A-priori-Informationen wie der  $pK_a$ -Wert benötigt. Der Algorithmus gleicht zudem Intensitätsschwankungen, z. B. auf Grund von Schwankungen der Laser-Leistung, aus.

## 7.6 Ausblick

Die präsentierten Messungen sind ein notwendiger und wichtiger Schritt, um später einmal die Seitenketten dieser Aminosäuren als nanoskopische pH-Sonden verwenden zu können. Zur Anwendung im Protein wird DUVRR-Differenz-Spektroskopie an ausgewählten Mutanten notwendig sein. Je nach erwartetem Bereich des pH-Wertes sollte His oder Tyr an der interessierenden Stelle eingebracht werden. Der pH kann dann bestimmt werden, indem das DUVRR-Spektrum des Wildtypen vom DUVRR-Spektrum des Mutanten subtrahiert wird.

Da die Resonanzverstärkung selektiv auf die betrachteten Seitengruppen abgestimmt werden kann, erwarten wir, dass der restliche Teil des Proteins nicht signifikant die spektralen Beiträge der aromatischen Aminosäuren stören wird. Eine weitere denkbare Erweiterung wäre das Einbringen von künstlichen Aminosäuren wie 4-Carboxyphenylalanin, die nicht in natürlichen Aminosäuren vorkommen. Bei dieser nicht-natürlichen Aminosäure ist die Hydroxy-Gruppe von Tyrosin durch eine Carboxy-Gruppe ersetzt (siehe Abb. 7.6). Mit solchen nicht-natürlichen Aminosäuren könnten weitere pH-Bereiche erschlossen und dennoch eine gute Selektivität durch die Resonanzverstärkung des Chromophors gewährleistet werden.

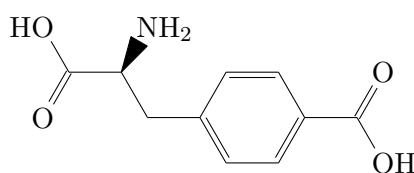


Abbildung 7.6: Die Strukturformel der künstlichen Aminosäure 4-Carboxyphenylalanin

## 8 Zusammenfassung und Ausblick

Das Thema der vorliegenden Dissertation ist die Tief-UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie an aromatischen Aminosäuren. In der Einleitung im Kapitel 1 wird auf die Raman-Spektroskopie im Allgemeinen und insbesondere auf die Resonanz-Raman-Spektroskopie im Tief-UV-Bereich genauer eingegangen.

Im zweiten Kapitel wird die Motivation für die vorgestellten Experimente näher erläutert. Es wird dargelegt, warum sich aromatische Aminosäuren in Kombination mit der Tief-UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie besonders eignen, um die Mikroumgebung an bestimmten Orten in Proteinen genauer zu untersuchen. Die Zielsetzung der Experimente ist es, geeignete Methoden zu entwickeln und zu testen, mit denen mittels der Bestimmung der Mikroumgebung die Tief-UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie bei der Strukturaufklärung von Proteinen und Protein-Komplexen beitragen kann.

Im Verlauf des dritten Kapitels werden die theoretischen Grundlagen der Raman-Spektroskopie erläutert. Nach einigen klassischen Vorüberlegungen werden die Grundlagen der quantenmechanischen Behandlung mittels der Störungstheorie nach Dirac vorgestellt. Schließlich wird die Kramers-Heisenberg-Dirac-Relation (KHD) gezeigt und erläutert. Die KHD-Relation bildet die Grundlage für die Erklärung des Resonanz-Raman-Effektes. Im letzten Abschnitt dieses Kapitels werden die molekularen Grundlagen erläutert, die die aromatischen Aminosäuren zu besonders geeigneten Moleküle für die (Tief-)UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie machen.

Das Kapitel 4 stellt die Geräte vor, die für die durchgeführten Experimente verwendet werden. Auf das Tief-UV-Laser-System Indigo-S und den Dreifach-Monochromator Trivista TR777 wird als Herzstücke der experimentellen Aufbauten genauer eingegangen. Außerdem wird der Strahlengang und die Auswahl der beteiligten Komponenten erläutert und das Vorgehen bei der Justage vor den einzelnen Messungen erklärt. Der letzte Abschnitt zeigt und erläutert die wichtigsten Programme, die zur Auswertung der gewonnenen Messergebnisse entwickelt und verwendet wurden.

Auf eine spezielle Gruppe von Geräten wird in Kapitel 5 eingegangen. Hier geht es um Systeme für möglichst kleine Probenvolumina. Diese Systeme wurden in unserer Arbeitsgruppe speziell für die Anwendung bei unseren Messungen entwickelt und angefertigt. Ziel war es, Probensysteme zu entwickeln und zu testen, in denen die Probenflüssigkeit ständig zyklisch ausgetauscht wird und die dabei mit einem möglichst geringen Gesamtvolumen auskommen. Der ständige Austausch ist notwendig, da es durch eine längere

Belichtung mit der verwendeten Tief-UV-Strahlung zu photochemischen Reaktionen in der Probe kommen kann, die das Ergebnis der Messungen verfälschen würden. Die Beschränkung auf kleine Probenvolumina ist deshalb von Vorteil, weil diese Vorrichtungen auch später zur Untersuchung von Proteinen und Protein-Komplexen verwendet werden sollen, die häufig recht teuer sind und nur in geringen Substanzmengen zur Verfügung stehen. Gleichzeitig sollten diese Proben auch nicht zu stark verdünnt werden, um gute Messergebnisse zu erhalten.

Die beiden Bedingungen des geringen Volumens und des zyklischen Austauschs werden von durchsichtigen rotierenden Küvetten bereits sehr gut erfüllt. Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tief-UV-Strahlung kommt als weitere Schwierigkeit hinzu, dass die meisten Fenstermaterialien unterhalb von 200 nm kaum durchlässig sind. Neben der Abnahme der Intensität besteht außerdem die Möglichkeit, dass das Fenstermaterial mit einem eigenen Ramansignal die Messung der eigentlichen Probe stört.

Für die Lösung dieser Probleme wurden zwei verschiedene Systeme entwickelt. Zum einen ein Freifluss-System mit einer Schlauchpumpe für Volumina bis mindestens 1 ml, das zu einem großen Teil aus günstigen Verbrauchsmaterialien des Chemie-Labors besteht. Das zweite System ist die sogenannte Probenschleuder. Hierbei handelt es sich im Prinzip um eine fensterlose rotierende Küvette aus Aluminium, bei der die Probe von der Innenseite sowohl beleuchtet als auch das Streulicht gesammelt wird. Mit diesem System können Probenvolumina von nur 100  $\mu$ l untersucht werden.

Ein großer Vorteil der Resonanz-Raman-Spektroskopie gegenüber der konventionellen Raman-Spektroskopie ist die Selektivität dieser Technik. Abhängig von der gewählten Wellenlänge können verschiedene Regionen sowie einzelne Schwingungen im Molekül selektiv verstärkt werden. Dadurch wird es zum Beispiel ermöglicht, im Ramanspektrum eines Proteins gezielt die Schwingungen einer Sorte von aromatischen Aminosäuren zu verstärken, um so Aufschlüsse über die Mikroumgebung dieser Aminosäuren zu erhalten. Um die Wellenlängenabhängigkeit dieser Technik zu demonstrieren werden in Kapitel 6 Anregungsprofile der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin analysiert. Die Anregungsprofile werden durch wiederholte Messungen von DUVRR-Ramanspektren dieser Aminosäuren in wässriger Lösung bei verschiedenen Laseranregungswellenlängen zwischen 195 nm und 208 nm erzeugt. Im Ergebnis zeigt sich bei beiden Aminosäuren, dass diese im gesamten Wellenlängenbereich ein DUVRR-Signal aufweisen, aber je nach Anregungswellenlänge verschiedene Schwingungen das Spektrum dominieren. Eine quantitative Analyse zeigt, dass die verschiedenen Schwingungen in zwei Klassen eingeteilt werden können, die jeweils ein eigenes Muster im Anregungsprofil aufweisen. Zu welcher Klasse eine Schwingung gehört, hängt davon ab, wie stark sie durch die elektronischen Übergänge  $B_{a,b}$  einerseits und  $L_a$  andererseits verstärkt wird.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der demonstriert werden soll, ist die Abhängigkeit der DUVRR-Spektren von der Umgebung der betrachteten Moleküle. Dafür werden in Ka-

pitel 7 die Aminosäuren Tyrosin und Histidin bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Diese beiden Aminosäuren eignen sich besonders, da sie sowohl einen aromatischen Ring aufweisen, der es erlaubt den Resonanz-Raman-Effekt im Tief-UV auszunutzen, als auch eine funktionelle Gruppe in der Seitenkette besitzen, die abhängig vom lokalen pH-Wert protoniert oder deprotoniert vorliegt. Bei beiden Aminosäuren wird festgestellt, dass die erhaltenen DUVRR-Spektren sehr stark vom pH-Wert abhängen, wenn dieser im Bereich des  $pK_a$ -Wertes der betreffenden aciden Einheit variiert wurde. Anstatt nun die pH-Abhängigkeit einzelner Banden separat zu betrachten, wird ein Algorithmus entwickelt, der in der Lage ist, aus Beiträgen des gesamten gemessenen Spektrums einen pH-Wert zu berechnen. Für die Anwendung dieses Algorithmus ist es notwendig, dass drei Referenzspektren bei bekannten pH-Werten vorliegen. Es wird gezeigt, dass mit dieser Methode nicht einmal die Kenntnis des  $pK_a$ -Wertes der betrachteten Substanz nötig ist. Des Weiteren werden Schwankungen in der Gesamtintensität der Spektren, zum Beispiel aufgrund von Intensitätsschwankungen des Lasers, mit diesem Algorithmus automatisch ausgeglichen. Um später die Seitengruppen von Aminosäuren als nanoskopische Sonde zur Bestimmung des lokalen pH-Wertes in der Mikroumgebung eines Proteins einsetzen zu können, wird es notwendig sein, DUVRR-Differenz-Spektroskopie an ausgewählten Mutanten dieses Proteins zu betreiben. An einer interessierenden Stelle könnte eine einzelne Aminosäure durch Tyrosin oder Histidin ersetzt werden. Durch den Resonanz-Effekt würden zu dem Ramanspektrum dieser Mutanten hauptsächlich Aminosäuren desselben Typs beitragen. Von diesem Spektrum würde das Spektrum des Wildtyps subtrahiert werden. Es ist zu erwarten, dass das erhaltene Differenzspektrum nur noch Informationen über die einzelne Aminosäure am Ort der Punktmutation enthält. Somit könnten Informationen über die Mikroumgebung an diesem Ort gewonnen werden, z. B. könnte mit dem entwickelten Algorithmus der lokale pH-Wert bestimmt werden.

## 8.1 Ausblick

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Erprobung verschiedener Anwendungen der Tief-UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie an aromatischen Aminosäuren. Hauptwerkzeuge sind der durchstimmbare Tief-UV-Laser und der Dreifach-Monochromator. Außerdem wurden verschiedene Probenhalterungssysteme entwickelt und getestet, um kleine Proben volumina zu untersuchen.

Die aromatischen Aminosäuren wurden in wässriger Lösung untersucht. Besonders interessant ist die Abhängigkeit der DUVRR-Spektren von der Mikroumgebung dieser Moleküle. Ein anderer Aspekt ist die Abhängigkeit der Spektren von der verwendeten Laseranregungswellenlänge, um Signale bestimmter Schwingungen selektiv zu verstärken und damit einzelne Bereiche der Moleküle gezielt spezifisch abfragen zu können. Diese

Messungen sind als Vorarbeiten anzusehen, um später mit diesen Techniken verschiedene Fragestellungen, insbesondere zur Strukturaufklärung an Proteinen und Protein-Komplexen, durchführen zu können.

Zukünftige Arbeiten mit diesem System könnten insbesondere zeitaufgelöste Anrege-Abfrage-Experimente einschließen. Durch die Verwendung eines mit 4 kHz gepulsten Laser-Systems mit 10 ns Pulsweite bieten sich insbesondere Messungen von Vorgängen auf einer Zeitskala zwischen 10 ns und 250  $\mu$ s an. Das Abstimmen des Tief-UV-Abfragelasers mit den Pulsen ein zweiten Lasers, der den Anrege-Puls liefert, würde mittels eines Verzögerungsgenerators (*delay generator*) erfolgen. Längere Zeiten könnten z. B. mit der zusätzlichen Verwendung eines Modulators zur Auswahl einzelner Pulse (*puls picker*) untersucht werden.

Auch die Probenhalterungssysteme für kleine Probenvolumina könnten weiter verbessert werden. Neben einer weiteren Verkleinerung des Probenvolumens sind verschiedene Methoden denkbar, um das Verdunsten der Probe, bzw. des Lösemittels, zu verhindern oder auszugleichen. Eine Methode zum automatischen Nachtropfen von Lösemittel würde die Anwendung eines zweiten Detektor im vorhandenen Spektrometer einschließen. Eine andere Möglichkeit wäre es, die Probe mit einer gesättigten Atmosphäre mit 100 % Luftfeuchtigkeit zu umgeben.

Neben den natürlichen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Histidin, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, würden sich für die Untersuchung von Proteinen auch künstliche Aminosäuren wie 4-Carboxyphenylalanin anbieten.

Neben dem pH-Wert sind auch weitere Parameter der Mikroumgebung von Interesse, wie z. B. die Konzentration von Ionen im Lösemittel oder die Ausbildung und Rückbildung von Wasserstoff-Brücken-Bindungen.

## 9 Summary and Outlook

The topic of this doctoral thesis is the deep UV resonance Raman (DUVRR) spectroscopy of aromatic amino acids. The introduction in chapter 1 considers Raman spectroscopy in general and especially resonance Raman spectroscopy in the deep UV spectral region.

The second chapter explains the motivation for the presented experiments. It is shown why aromatic amino acids, in combination with DUVRR spectroscopy, are particularly suited for the investigation of the microenvironment at defined sites in proteins. The purpose of the experiments is the development and testing of suitable methods that will allow DUVRR spectroscopy to contribute to the elucidation of the molecular structure of proteins and protein complexes by determination of the microenvironment.

In the course of the third chapter, the theoretical fundamentals of Raman spectroscopy are outlined. After some preliminary consideration using classical physics, the fundamentals of the quantum mechanical approach using time-dependent perturbation theory as established by Dirac are presented. Eventually, the Kramers-Heisenberg-Dirac (KHD) relation is shown and explained. The KHD relation is the basis for explaining the resonance Raman effect. The last segment of this chapter illustrates the molecular principles that render aromatic amino acids as especially suited molecules to be examined by (de-) UVR spectroscopy.

Chapter 4 presents the equipment that is employed in the performed experiments. Special attention is paid to the deep UV laser system and the triple monochromator that constitute the core modules of the experimental setup. Additionally, the optical path and the selection of the built-in components are explained, as well as the procedure of aligning these components before each experiment. The last segment shows and explains the most important programs that have been developed and applied for the evaluation of the acquired experimental data.

A special class of equipment is discussed in chapter 5, which deals with devices for handling small volumes of liquid specimens. These devices have been developed and produced in our research group specifically to be used in our measurements. It was the objective of the development to produce devices that constantly circulate the liquid sample while requiring a sample volume as small as possible. It is necessary to constantly circulate the sample because a long exposure to the deep UV radiation can cause photochemical reactions inside the sample that would distort the results of the measurements. It is desirable to require only small volumes because these devices are intended to be used



for the investigation of other samples, such as proteins and protein complexes, in later experiments. Those samples are often quite expensive and obtainable in small amounts only. At the same time, heavy dilution of the sample should be avoided in order to obtain good results from the measurements.

The two requirements of a small volume and a constant circulation are already well accomplished by transparent rotating cells. The application of deep UV radiation accounts for the additional issue that most window materials have a high opacity for wavelengths shorter than 200 nm. In addition to the decreased intensity, it is possible that the window material itself exhibits a Raman signal, which would disrupt the measurement of the actual sample.

Two different devices have been developed to overcome these issues. The first one is a circulating free-flow system that can handle sample volumes as small as 1 ml. In addition to a peristaltic pump, this system mainly consists of cheap consumables that can be replaced fast and easily. The second system has been called sample spinner by our group. In principle, the sample spinner is a rotating cell without windows that is made completely out of aluminum. The sample is located on the circumference of the spinning cell. Illumination of the sample, as well as collection of scattered light is performed from the center of the cell. This device allows for the investigation of sample volumes as small as 100  $\mu$ l.

A major advantage of resonance Raman spectroscopy compared to conventional Raman spectroscopy is the selectivity of this technique. Different sites and individual vibrational modes can be enhanced selectively by changing the excitation wavelength. For example, it is possible to enhance the vibrational signal of one species of aromatic amino acids in the resonance Raman spectrum of a protein. Hence, information about the micro-environment of these amino acids only can be obtained. In order to demonstrate the wavelength dependency of this technique, excitation profiles of the aromatic amino acids phenylalanine and tyrosine are analyzed in chapter 6. The excitation profiles are produced by repeated measurements of the DUVRR spectra of these amino acids in aqueous solution at several excitation wavelength between 195 nm and 208 nm. It is shown that both amino acids exhibit a DUVRR signal in the entire spectral excitation range, but the spectra are dominated by different vibrational modes depending on the excitation wavelength. A quantitative analysis reveals that the different vibrations can be assigned to two groups. Each of the two groups exhibits a distinct pattern in the excitation profiles. Whether a particular vibrational mode belongs to one class the other, depends on the respective enhancement of this mode by the two electronic transitions  $B_{a,b}$  and  $L_a$ .

Another important feature that is elaborated on is the dependency of the DUVRR spectra on the environment of the molecules under consideration. For this, the aromatic amino acids tyrosine and histidine are examined at different pH values in chapter 7. These two amino acids are especially suited for these experiments, since they exhibit an

aromatic ring, allowing for the utilization of the resonance Raman effect in the deep UV, as well as a moiety that is protonated or deprotonated, depending on the local pH value. It is shown that the DUVRR spectra of both amino acids depend heavily on the acidity, if the pH value varies around the  $pK_a$  value of the respective acidic moiety. Instead of investigating the pH dependency of individual Raman bands, an algorithm has been developed that is able to calculate a pH value from contributions of the total spectrum. For the application of this algorithm, three reference spectra and their corresponding pH values are needed. It is shown that the knowledge of the  $pK_a$  value is not necessary. Furthermore, variations in the total intensity of the spectrum are compensated automatically. These variations may occur e.g. due to unsteady intensity of the excitation laser or a different opacity of the sample. A prospective application of this technique is the usage of amino acid side chains as a nanoscopic probe in order to monitor the local pH value in the microenvironment of a protein. For this, it will be necessary to employ DUVRR difference spectroscopy of selected mutants of this protein. At the site of interest, a single amino acid could be replaced by tyrosine or histidine. The DUVRR spectrum of this mutant would consist mainly of contribution from amino acids of the same type, due to the resonance Raman effect. The spectrum of the wild type protein would be subtracted from this mutant spectrum. It is to be expected that the resulting difference spectrum contains only information about the single amino acid at the site of the point mutation. Hence, information about the microenvironment of this site could be obtained, e.g. the local pH value could be determined using the presented algorithm.

## 9.1 Outlook

The focus of this thesis is the testing of several applications of deep UV resonance Raman spectroscopy of aromatic amino acids. A tunable deep UV laser and a triple monochromator are the primary tools of these investigations. Different sample holding devices for small sample volumes have been developed and tested.

All aromatic amino acids have been analyzed in aqueous solution. The dependence of the DUVRR spectra on the molecular microenvironment is of special interest. Another aspect is the dependence of the spectra on the selected wavelength of the excitation laser, allowing for the selective enhancement of distinct vibrational modes. This makes it possible to selectively investigate specific sites of the molecule under consideration. The presented measurements are considered as preliminary work with the goal of establishing techniques that can later be used to address several interesting problems, especially in the field of characterization and structural clarification of proteins and protein complexes.

Future work using the experimental setup and the developed techniques could include time-resolved pump-probe experiments. The specifications of the utilized pulsed laser system with a repetition rate of 4 kHz and a pulse length of 10 ns would be especially

suited for the investigation of processes on a time scale from 10 ns to 250  $\mu$ s. A delay generator would be used for the synchronization of the deep UV probe laser and a second laser system that would provide the pump pulses. Processes of longer time scales could be studied if a pulse picker is incorporated in the experimental setup.

Several improvements of the sample holding systems for small volumes are possible. Apart from further reduction of the minimal sample volume, several methods are imaginable to either prevent or compensate for the evaporation of the sample or the solvent. A method that automatically replenishes the solvent would incorporate a second detector in the currently used spectrometer. Another possibility is to enclose the sample in a saturated atmosphere of 100 % humidity.

In extension to the naturally occurring aromatic amino acids tyrosine, phenylalanine and histidine that were subjects of this study, artificial amino acids like 4-carboxyphenylalanine would be beneficial for study of protein microenvironments.

Apart from the pH value, other parameters of the microenvironment are also of interest, e.g. the concentration of ions in the solvent or the formation and breaking hydrogen bonds.

## Literaturverzeichnis

- [1] C. V. Raman, K. S. Krishnan, *Nature* **1928**, *121*, 501–502.
- [2] A. Smekal, *Naturwissenschaften* **1923**, *11*, 873–875.
- [3] T. Maiman, *Nature* **1960**, *187*, 493–494.
- [4] A. Bröermann, S. Schlücker, *Z. Phys. Chem.* **2011**, *225*, 691–702.
- [5] A. Bröermann, H.-J. Steinhoff, S. Schlücker, *J. Mol. Struct.* **2014**, *1073*, 77–81.
- [6] R. E. Dickerson, *Annu. Rev. Biochem.* **1972**, *41*, 815–842.
- [7] B. Strandberg, R. E. Dickerson, M. G. Rossmann, *J. Mol. Biol.* **2009**, *392*, 2–32.
- [8] K. Moffat, *Acta Crystallogr. Sect. A: Found. Crystallogr.* **1998**, *54*, 833–841.
- [9] A. Mittermaier, L. E. Kay, *Science* **2006**, *312*, 224–228.
- [10] M. Billeter, *Q. Rev. Biophys.* **1992**, *25*, 325–377.
- [11] K. Wüthrich, *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1995**, *51*, 249–270.
- [12] K. Rosenheck, P. Doty, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1961**, *47*, 1775–1785.
- [13] V. P. Saxena, W. Wetlaue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1971**, *68*, 969–972.
- [14] W. Greenfield, G. D. Fasman, *Biochemistry* **1969**, *8*, 4108–4116.
- [15] S. Williams, T. P. Causgrove, R. Gilmanishin, K. S. Fang, R. H. Callender, W. H. Woodruff, R. B. Dyer, *Biochemistry* **1996**, *35*, 691–697.
- [16] S. A. Oladepo, K. Xiong, Z. Hong, S. A. Asher, J. Handen, I. K. Lednev, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2604–2628.
- [17] T. Kitagawa, *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **1992**, *58*, 1–18.
- [18] S. A. Asher, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1988**, *39*, 537–588.
- [19] S. A. Asher, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 59A–66A.

- [20] S. A. Asher, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 201A–210A.
- [21] G. Balakrishnan, C. L. Weeks, M. Ibrahim, A. V. Soldatova, T. G. Spiro, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 623–629.
- [22] L. Mandelstam, G. Landsberg, *Naturwissenschaften* **1928**, *16*, 557–558.
- [23] H. A. Kramers, W. Heisenberg, *Z. Phys. A: Hadron Nucl.* **1925**, *31*, 681–708.
- [24] P. A. M. Dirac, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1927**, 710–728.
- [25] W. Nolting, *Grundkurs Theoretische Physik, Band 5/2, Quantenmechanik – Methoden und Anwendungen*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, fünfte Auflage, **2004**.
- [26] E. B. Wilson Jr, *Phys. Rev.* **1934**, *45*, 706–714.
- [27] D. C. Harris, M. D. Bertolucci, *Symmetry and Spectroscopy: an introduction to vibrational and electronic spectroscopy*, Dover Publications, **1978**.
- [28] S. A. Asher, M. Ludwig, C. R. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *110*, 1005–1011.
- [29] J. R. Platt, *J. Chem. Phys.* **1949**, *17*, 484–495.
- [30] S. P. A. Fodor, R. A. Copeland, C. A. Grygon, T. G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5509–5518.
- [31] S. Pinchas, *Spectrochim. Acta Part A* **1972**, *28*, 801–802.
- [32] D. W. Mayo in *Characteristic Frequencies of Aromatic Compounds (Group Frequencies of Arenes)*, John Wiley & Sons, Inc., **2004**, pp. 101–140.
- [33] T. Suzuki, *Molecules* **2014**, *19*, 2410–2433.
- [34] I. K. Lednev, A. S. Karnoup, M. C. Sparrow, S. A. Asher, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4076–4077.
- [35] I. K. Lednev, A. S. Karnoup, M. C. Sparrow, S. A. Asher, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8074–8086.
- [36] G. Balakrishnan, Y. Hu, T. G. Spiro, *Appl. Spectrosc.* **2006**, *60*, 347–351.
- [37] J. S. W. Holtz, R. W. Bormett, Z. Chi, N. Cho, X. G. Chen, V. Pajcini, S. A. Asher, L. Spinelli, P. Owen, M. Arrigoni, *Appl. Spectrosc.* **1996**, *50*, 1459–1468.
- [38] Z. Chi, X. G. Chen, J. S. W. Holtz, S. A. Asher, *Biochemistry* **1998**, *37*, 2854–2864.
- [39] Z. Chi, S. A. Asher, *Biochemistry* **1999**, *38*, 8196–8203.

- [40] Y. Wang, R. Purrello, T. Jordan, T. G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6359–6368.
- [41] A. V. Mikhonin, S. V. Bykov, N. S. Myshakina, S. A. Asher, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 1928–1943.
- [42] C. Huang, G. Balakrishnan, T. G. Spiro, *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37*, 277–282.
- [43] S. P. A. Fodor, R. P. Rava, R. A. Copeland, T. G. Spiro, *J. Raman Spectrosc.* **1986**, *17*, 471–475.
- [44] G. Balakrishnan, Y. Hu, S. Brøndsted Nielsen, T. G. Spiro, *Appl. Spectrosc.* **2005**, *59*, 776–781.
- [45] S. Bykov, I. Lednev, A. Ianoul, A. Mikhonin, C. Munro, S. A. Asher, *Appl. Spectrosc.* **2005**, *59*, 1541–1552.
- [46] Coherent Inc., Indigo-S Solid-State, Tunable, Ti:Sapphire Laser, **2005**.
- [47] D. Groom, *Exp. Astron.* **2002**, *14*, 45–55.
- [48] M. J. Tauber, R. A. Mathies, X. Chen, S. E. Bradforth, *Rev. Sci. Instrum.* **2003**, *74*, 4958–4960.
- [49] W. Kiefer, H. J. Bernstein, *Appl. Spectrosc.* **1971**, *25*, 500–501.
- [50] M. Stockburger, W. Klusmann, H. Gattermann, G. Massig, R. Peters, *Biochemistry* **1979**, *18*, 4886–4900.
- [51] L. Ziegler, B. Hudson, D. Strommen, W. Peticolas, *Biopolymers* **1984**, *23*, 2067–2081.
- [52] J. R. Platt, H. B. Klevens, *Chem. Rev.* **1947**, *41*, 301–310.
- [53] A. T. Tu, *Raman Spectroscopy in Biology*, Wiley, New York, **1982**.
- [54] J. E. Kim, D. Pan, R. A. Mathies, *Biochemistry* **2003**, *42*, 5169–5175.
- [55] J. Llopis, J. M. McCaffery, A. Miyawaki, M. G. Farquhar, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 6803–6808.
- [56] X. Zhang, Y. Jiao, X. Jing, H. Wu, G. He, C. Duan, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 2522–2527.
- [57] J. Han, A. Loudet, R. Barhoumi, R. Burghardt, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1642–1643.

- [58] M. Weber, A. Prodöhl, C. Dreher, C. Becker, J. Underhaug, A. Svane, A. Malmendal, N. Nielsen, D. Otzen, D. Schneider, *J. Mol. Biol.* **2011**, *407*, 594–606.
- [59] D. Otzen, *Biophys. J.* **2002**, *83*, 2219–2230.
- [60] D. Baldwin, H. Marques, J. Pratt, *J. Inorg. Biochem.* **1986**, *27*, 245–254.
- [61] R. Mitra, Z. Zhang, E. Alexov, *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **2011**, *79*, 925–936.
- [62] D. Huang, A. D. Robison, Y. Liu, P. S. Cremer, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *38*, 74–78.
- [63] X. Jiang, M. Engelhard, K. Ataka, J. Heberle, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10808–10815.
- [64] V. Gordeliy, J. Labahn, R. Moukhametzianov, R. Efremov, J. Granzin, R. Schlesinger, G. Büldt, T. Savopol, A. Scheidig, J. Klare, M. Engelhard, *Nature* **2002**, *419*, 484–487.
- [65] J. Klare, I. Chizhov, M. Engelhard, *Results Probl. Cell Differ.* **2008**, *45*, 73.
- [66] C. Zscherp, R. Schlesinger, J. Tittor, D. Oesterhelt, J. Heberle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 5498–5503.
- [67] T. Gunnlaugsson, D. Mac Dónaill, D. Parker, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12866–12876.
- [68] S. W. Bishnoi, C. J. Rozell, C. S. Levin, M. K. Gheith, B. R. Johnson, D. H. Johnson, N. J. Halas, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1687–1692.
- [69] J. Kneipp, H. Kneipp, B. Wittig, K. Kneipp, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2819–2823.
- [70] A. Smirnov, A. Ruuge, V. Reznikov, M. Voinov, I. Grigor'ev, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8872–8873.
- [71] M. Voinov, A. Ruuge, V. Reznikov, I. Grigor'ev, A. Smirnov, *Biochemistry* **2008**, *47*, 5626–5637.
- [72] M. Voinov, I. Kirilyuk, A. Smirnov, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 3453–3460.
- [73] M. Tollinger, J. Forman-Kay, L. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5714–5717.
- [74] A. Lupták, A. R. Ferré-D'Amaré, K. Zhou, K. W. Zilm, J. A. Doudna, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8447–8452.
- [75] J. Markley, *Acc. Chem. Res.* **1975**, *8*, 70–80.

- 
- [76] K. T. Yue, M. Lee, J. Zheng, R. Callender, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1078, 296–302.
- [77] D. S. Caswell, T. G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6470–6477.
- [78] R. P. Rava, T. G. Spiro, *J. Phys. Chem.* **1985**, 89, 1856–1861.
- [79] M. Ludwig, S. A. Asher, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 1005–1011.



## Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Schlücker für das interessante Promotions-thema und für die Unterstützung und die Geduld bei der Betreuung meiner Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Steinhoff für sein offenes Ohr und seine hilfreichen Ratschläge, sowie für die Bereitschaft meine Arbeit als zweiter Gutachter zu bewerten.

Ich danke Dr. Johann Klare für das Anfertigen der Abbildung 7.1, vor Allem aber für die hilfreichen Diskussionen. Herrn Dr. Axel Hoffmann danke ich für die Betreuung meiner Arbeit in der Endphase und seine Ratschläge.

Ich möchte mich bei meiner ganzen Arbeitsgruppe in Osnabrück und Essen für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit bedanken. Besonders hervorheben möchte ich Dr. Stephan Niebling für die Einführung in die Welt der UV-Raman-Spektroskopie, Christoph Herrmann für die vielen ausführlichen Diskussionen und die gemeinsame Entwicklung der Probenschleuder, Nils Priesnitz für die Hilfe bei der Konstruktion des Freifluss-Systems und Bernd Walkenfort für die technische Unterstützung bei dem gesamten Projekt.

Nicht zu vergessen ist auch die Hilfe des Sekretariats bei allen erdenklichen Fragen und Formalitäten und die Unterstützung der feinmechanischen Werkstatt und der Elektronik-Werkstatt, ohne die die Umsetzung dieses Projektes nicht möglich gewesen wäre.

Als letztes möchte ich meiner Familie danken, die mich während der gesamten Zeit mit großer Unterstützung und viel Geduld begleitet hat.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation  
**Tief-UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie an aromatischen Aminosäuren**  
selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfs-  
mittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer  
Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Gra-  
den keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Osnabrück, den 4. Dezember, 2015

.....  
(Andreas Bröermann)