

NIKOLAUS P. ERNSTING

Molekulare THz-Spektrometer

Femtosekunden-Spektroskopie

Nachweis, Quantifizierung und Charakterisierung von Biomolekülen haben durch neue Lasertechnologien einen rasanten Aufschwung erfahren. Mit zeit-aufgelösten Methoden, wobei mehrere Laserpulse zusammenwirken, können raum-zeitliche Prozesse hochspezifisch beobachtet werden. Bei Zeitauflösung von einigen Femtosekunden ($1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$) werden kohärente Skelettschwingungen beobachtet, die mit normalen (linearen) Methoden herausgemittelt würden. So werden niederfrequente Schwingungen über die Zeitdomäne wieder sichtbar. Sie geben Auskunft über photochemische und -physikalische Prozesse des Chromophors und der biomolekularen Matrix. Unter bestimmten Voraussetzungen kann das lokale THz-FIR-Spektrum der Matrix erhalten werden

Allgemeine Einführung in das Fachgebiet

Um die Dynamik eines Biomoleküls zu verstehen, müssen seine Bewegungen auf multiplen Zeitskalen gemessen werden. In einem Photorezeptor wird der Prozess meistens durch Isomerisierung des elektronisch angeregten Chromophors und Reorganisation seiner Wasserstoffbrücken ausgelöst. Diese und nachfolgende Strukturänderungen kann man anhand von Markerbanden im mittleren Infrarot (IR) verfolgen; letztere entsprechen *intramolekularen* Schwingungen in Seitengruppen oder in der Peptidkette. Eine andere Sicht wird durch niederfrequente elektrische Spektroskopie im ferninfraroten (FIR) und Terahertz (THz) Spektralbereich ($1\text{--}300 \text{ cm}^{-1}$) eröffnet. In diesem Fenster beobachtet man die *intermolekularen* Fluktuationen von polaren Gruppen und Solvatwasser. Die Solvathülle ist häufig auch entscheidend mit an der Photoreaktion beteiligt (»biologisches Wasser«). Doch die Breite dieser Banden, fehlende Regiospezifität, und vor allem die überwältigende Absorption von Bulk-

Internet

www.chemie.hu-berlin/ernsting

Abb. 1

Eine molekulare Sonde (hellblau, z.B. chemische Struktur links) wird in eine DNA-Doppelhelix eingebaut. Optische Anregung mit kurzen Laserpulsen (20 fs) verschiebt darin Ladung und erzeugt so ein Dipolfeld (weiß). Darauf stellt sich die wässrige Solvathülle im Verlauf von ca. 10 ps neu ein. Der Prozess wird beobachtet als zeitabhängige Rotverschiebung der Fluoreszenz. Daraus kann das lokale THz-Spektrum der Solvathülle berechnet werden. Gezeigt ist die 0,4 Å NMR-Struktur des Konstruktes.

Wasser erschweren die THz-Spektroskopie von Biomolekülen.

An dieser Stelle setzt die Forschung des Arbeitskreises an. Wir suchen ein »molekulares THz-Spektrometer«, welches zum Beispiel in der Nähe einer Protein-Oberfläche oder von Wasser-Pools kovalent gebunden wird. Der Chromophor hat zwei Funktionen gleichzeitig:

- (1) *THz-Lichtquelle*, über femtosekunden-optische Anregung eines Ladungstransfer-Zustandes,
- (2) *Detektor*, über die zeitabhängige Stokes-Verschiebung der Fluoreszenz.

Aus der Stokes-Dynamik (Abb. 2, 3) kann unter gewissen Voraussetzungen das lokale THz-Absorptionsspektrum erhalten werden. Die Positionierung

Abstract

Solvatochromic dye molecules are developed and linked into biomolecular structures, such as duplex DNA. They are also used in room-temperature ionic liquids. After optical excitation, the time-dependent Stokes shift of fluorescence is followed with high accuracy. The corresponding spectral relaxation curve is transformed into a local THz-FIR spectrum. Also, photochemical processes in Flavins and Stilbenes are being studied. Advanced transient absorption, fluorescence, and Raman techniques have been developed for the purpose.



Prof. Nikolaus P. Ernsting, PhD, im Femtosekunden-Labor.

des Chromophors im Protein geschieht zum Beispiel an Cystein über einen Thiol-Linker. In einem DNA-Oligomer kann eine Nukleobase ersetzt werden, wie in Abb. 1 gezeigt ist.

Forschungsprojekte

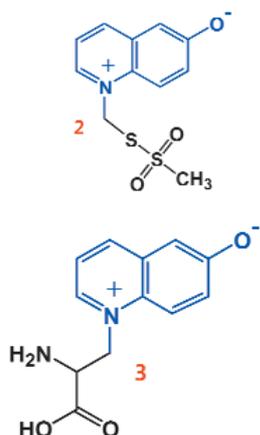
Mehrere Forschungslinien müssen zusammengeführt werden:

- (A) *Chemische Synthesen* der Sondenmoleküle, Einbau in DNA oder Peptide, photophysikalische Charakterisierung;
- (B) *NMR-Strukturbestimmung* der biomolekularen Konstrukte;
- (C) *Femtosekunden-Spektroskopie* des Fluoreszenz-Übergangs $S_1 \rightarrow S_0$.

Dazu werden aktuell folgende Projekte bearbeitet:

■ **Synthese von molekularen Sonden**

Wir suchen hauptsächlich sog. Polaritäts-Sonden, also Farbstoffe, die bei elektronischer Anregung eine große Ladungsverschiebung erfahren. In Zusammenarbeit mit Prof. R. Mahrwald werden u.a. die rechts gezeigten Sonden für Proteine synthetisiert:



Für DNA-Sonden (nicht gezeigt) wird die Gesamtstruktur mit 2D Lösungs-NMR Spektroskopie bestimmt.

■ **Lokale THz-Spektroskopie von Biomolekülen**

Die zeitabhängige Fluoreszenzverschiebung des DNA-Konstruktes in Abb. 1 ergab das lokale THz-Spektrum des Hydratwassers. Erstmals wurde auch die dynamische Solvatation durch D_2O gemessen. Durch Vergleich konnte die »spine of hydration« der kleinen Furche charakterisiert werden. Diese Arbeiten werden mit neuen Polaritäts-Sonden systematisch fortgeführt.

Andere Sonden, welche zwar spezifisch binden aber keine Polaritätssonden darstellen, zeigen stattdessen die Veränderung von Bindungsverhältnissen an.

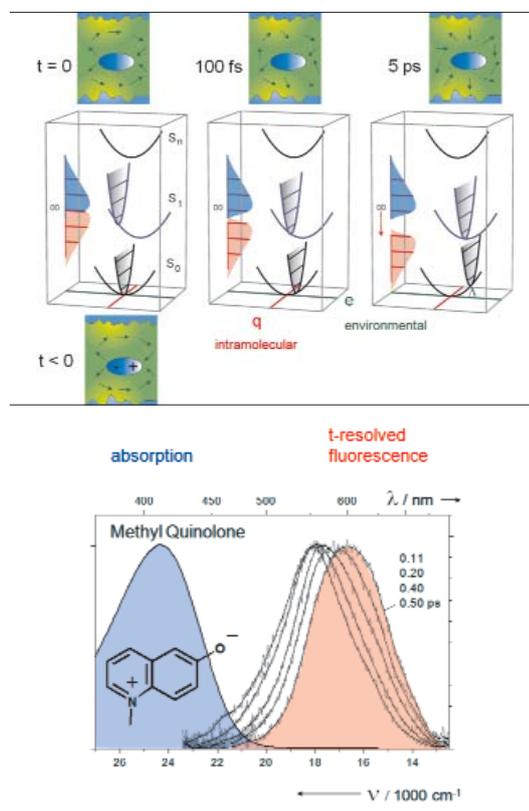
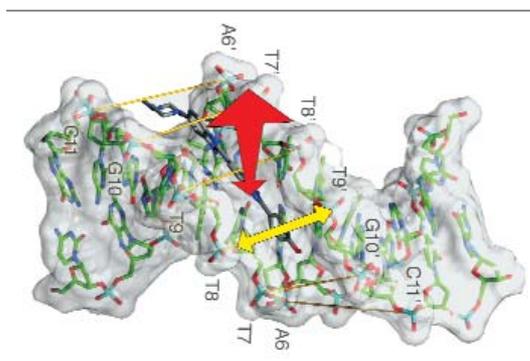


Abb. 2 Die zeitabhängige Stokes-Verschiebung der Fluoreszenz (rote Bande) gibt die Relaxation einer »Umgebungsordinate« e wieder. Es sei angenommen, dass der Chromophor im elektronischen Grundzustand S_0 zwitterionisch ist. Das Dipolmoment (Ladungsschwerpunkte $- +$) wird dann durch optische Anregung in den elektronischen Zustand S_1 plötzlich abgeschaltet. Die momentane Polarisation der Umgebung (hier: ein Lösungsmittel) ist durch grüne Pfeile angedeutet.

Abb. 3 Beispiel eines solvatochromen Farbstoffs und der zeitabhängigen Stokes-Verschiebung der Fluoreszenz (hier: in Wasser).

Abb. 4
Der Furchenbinder Hoechst 33258 bildet H-Brücken zu Thymidin >C=O im Furchenboden. Eine kohärente Oszillation der Furchenbreite (gelb) ist an den Bindungsabstand gekoppelt (rot) und wird als Frequenzmodulation der Emission beobachtet.



Zum Beispiel bindet der Farbstoff Hoechst 33258 in der kleinen Furche in T-reichen Regionen (Abb. 4). Dazu werden H-Brücken der Imidazolgruppen zu Thymidin >C=O im Furchenboden gebildet, was die Fluoreszenz des Farbstoffs verschiebt. Wir beobachten Oszillationen dieser Verschiebung bei 30 cm^{-1} und 58 cm^{-1} . Durch Moleküldynamik-Simulationen kann die 30 cm^{-1} Mode einer Atmungsbewegung der kleinen Furche zugeordnet werden; dabei bewegt sich der Ligand auf und nieder.

■ THz-Spektroskopie von Ionischen Flüssigkeiten

Ionische Flüssigkeiten, bestehend aus den molekularen Kationen und Anionen der Abb. 5, können wegen ihrer Leitfähigkeit nicht mit Mikrowellen- und klassischer THz-FIR-Spektroskopie untersucht werden. Mit der Polaritätssonde Coumarin 153 dagegen erhalten wir die gezeigten spektralen Relaxationskurven; sie entsprechen dem THz-FIR-Spektrum. Verschiedene Simulationen aus der Literatur sind zum Vergleich angeführt (Zusammenarbeit mit Prof. M. Maroncelli, Penn State University, und Humboldt-Forschungspreisträger an der Humboldt-Universität zu Berlin).

■ Breitband-optische Methoden für die Femtosekunden-Spektroskopie

Fluoreszenz: Die gesamte Emissionsbande muss in Form und Lage auf $\pm 5\text{ cm}^{-1}$ genau bestimmt wer-

den, mit einer Zeitauflösung $\leq 80\text{ fs}$. Für die Formtreue ist die gleichzeitige Beobachtung bei allen relevanten Wellenlängen notwendig. Wir haben die weltweit einzige Anlage mit diesen Eigenschaften entwickelt. In einem nichtlinear-optischen Kristall wird die Summenfrequenz von jeder Fluoreszenzkomponente mit einem kurzen $1.3\text{ }\mu\text{m}$ Torpuls gebildet. Letzterer wird räumlich gekippt, um die geforderte Zeitauflösung zu erreichen. Die Steigerung der Empfindlichkeit ist das Ziel aktueller methodischer Arbeiten.

Absorption: Mehrere Anregungswellenlängen stehen zur Verfügung. Ein transientes Spektrum im Bereich $270\text{--}900\text{ nm}$ wird in 1 s zu $25\text{ }\mu\text{OD}$ gemessen; die Zeitauflösung beträgt 60 fs (fwhm) im Sichtbaren und 120 fs im UV.

Raman: Mit Femtosekunden-stimulierter Raman-Streuung (FSRS) kann man Raman-Spektren des elektronisch angeregten Zustandes im Bereich $50\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ messen, zum Beispiel während einer Photoreaktion. Die Zeitauflösung beträgt typisch 50 fs ; trotzdem werden die natürlichen Linienbreiten beobachtet. Wir haben einen der weltweit drei FSRS-Spektrographen für die nachfolgenden Aufgaben entwickelt.

■ Transiente Absorption- und Raman-Spektroskopie von Flavinen und Stilbenen

Flavine bilden den Chromophor in einer Reihe von Photoenzymen und biologischen Photorezeptoren. Sie besitzen mehrere Redox- und Protonierungszustände und sind deshalb an verschiedenen komplexen Mechanismen beteiligt. Um zu deren Klärung beizutragen, wird die Femtosekunden-Spektroskopie zunächst in Lösung untersucht. Ergebnisse der transienten Absorption, Fluoreszenz und Raman-Streuung sollen zu einer konsistenten, genauen Interpretation (Elektron-Transfer, Solvation, Proto-

nierungsreaktionen) führen. Die Untersuchung von Flavoproteinen ist vorgesehen.

Stilben ist das Textbuch-Beispiel für photochemische *trans-cis*-Isomerisierung. Erstaunlicherweise sind Aktivierungsprozesse und Reaktionspfade im elektronisch angeregten S_1 Zustand noch nicht konsistent geklärt. Dazu werden einerseits die erwähnten spektroskopischen Methoden eingesetzt. Andererseits verfolgen wir eine breite chemische Variation (Methyl-Substitution, Verbrückungen, verschiedene Lösungsmittel). Zudem werden *ab initio* quantenchemische Rechnungen zur Charakterisierung des Reaktionspfades von Stilben durchgeführt.

Ausgewählte Publikationen

- Local THz time-domain spectroscopy of duplex DNA via fluorescence of an embedded probe, A. Dallmann, M. Pfaffe, C. Mügge, R. Mahrwald, S. A. Kovalenko, N. P. Ernstring, *J. Phys. Chem. B*, 2009, 113, 15619.
- THz Absorption Spectroscopy of a Liquid via a Polarity Probe. A Case Study of Trehalose/Water Mixtures, M. Sajadi, Y. Ajaj, I. Ioffe, H. Weingärtner, N. P. Ernstring, *Angewandte Chemie Int. Ed.* 2009, 49, 454.
- Detection of DNA-Ligand Binding Oscillations by Stokes-Shift Measurements, M. Sajadi, K. E. Furse, X.-X. Zhang, L. Dehmel, S. A. Kovalenko, S. A. Corcelli, N. P. Ernstring, *Angewandte Chemie Int. Ed.* 2011, 50, DOI: 10.1002/anie.201102942

Kooperationen

Langjähriger Vice-Sprecher des SFB 450, Mitglied des Berliner Exzellenzclusters »Unifying Concepts in Catalysis«, Principal Investigator in der beantragten Graduierten-Schule SALSA, Gastgeber eines Humboldt-Forschungspreis-trägers 2010.

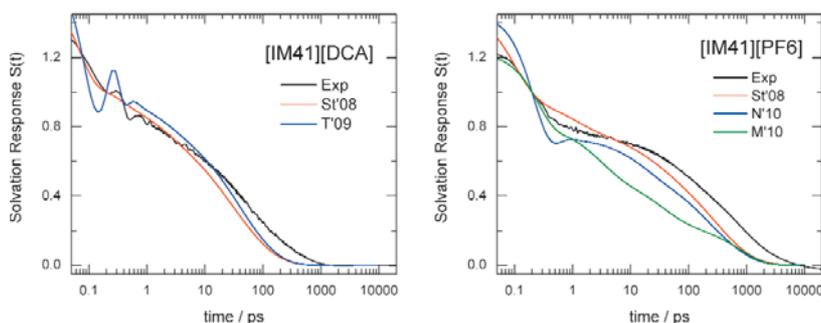
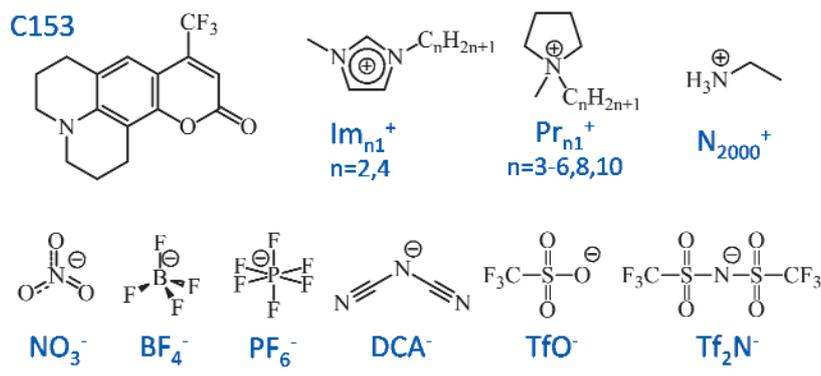


Abb. 5

Der solvatochrome Farbstoff Coumarin 153 wird als THz-FIR-Spektrometer in ionischen Flüssigkeiten verwendet. Die mittlere Fluoreszenzfrequenz $\langle \tilde{\nu} \rangle(t)$ als Funktion der Zeit liefert die gemessenen Relaxationskurven (schwarz). Diese sind mit Moleküldynamik-Simulationen verglichen. Der Vergleich führt zu Verbesserungen der theoretischen Molekülmodelle.

Prof. Nikolaus P. Ernstring, PhD

Jg. 1950, studierte Chemie in Münster und Dundee. 1976 Diplom mit Thema aus der Theoretischen Chemie (Prof. S. Peyerimhoff, Bonn). 1979 Promotion über optische Molekülspektroskopie (Prof. B. G. Gowenlock und J. Pfab, Heriot-Watt-University, Edinburgh). 1979–81 hochauflösende nichtlineare Laserspektroskopie als Postdoc bei Prof. J.C.D. Brand (University of Western Ontario, Canada). 1981–1993 wissenschaftlicher Mitarbeiter von Prof. F. P. Schäfer (Laserphysik, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen). 1992 Habilitation in Physikalischer Chemie an der Georg-August-Universität Göttingen. Seit 1993 C4-Professor für Physikalische und Theoretische Chemie an der Humboldt-Universität zu Berlin. 1998 Leibniz-Preis der Deutschen Forschungsgemeinschaft (zusammen mit Prof. K. Rademann).

Humboldt-Universität zu Berlin • Institut für Chemie

E-mail: nernst@chemie.hu-berlin.de • www.chemie.hu-berlin/ernstring