
UV-Strahlung und DNA-Schäden — Untersuchung UV-induzierter Prozesse in Nukleinsäuren mit Femtosekunden-Infrarotspektroskopie

Wolfgang Johannes Schreier



München 2008

**UV-Strahlung und DNA-Schäden —
Untersuchung UV-induzierter Prozesse in
Nukleinsäuren mit
Femtosekunden-Infrarotspektroskopie**

Wolfgang Johannes Schreier

Dissertation
an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Wolfgang Johannes Schreier
aus Tegernsee

München, den 29.02.2008

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Zinth
Zweitgutachter: Prof. Dr. Joachim Rädler
Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2008

Meinen Eltern gewidmet

Kurzfassung

UV-Strahlung kann zu Photoschäden und Mutationen in der DNA führen, die Ausgangspunkt für eine Reihe von Krankheiten wie z.B. Hautkrebs sein können. Der häufigste durch UV-Strahlung induzierte Photoschaden beruht auf einer Verknüpfung benachbarter Thymin-Basen durch einen Zyklobutanring (CPD-Schaden). Obwohl die Bildung dieser Thymin-Dimere bereits seit 1960 bekannt ist, konnte bisher weder die Zeitskala noch der Mechanismus dieser Reaktion eindeutig geklärt werden. Thema dieser Arbeit ist deshalb die Untersuchung photophysikalischer und photochemischer Prozesse in Nukleinsäuren.

Methodik: Mit der Methode der Anreg-Abtast-Spektroskopie können ultraschnelle photoinduzierte Prozesse beobachtet werden. Das in dieser Arbeit eingesetzte Spektrometer basiert auf einem zentralen Femtosekunden-Lasersystem, dessen Lichtimpulse (800 nm, 90 fs) über nichtlineare Prozesse in die benötigten Spektralbereiche (Anregung im UV: ~ 270 nm, Abtasten im mittleren Infraroten: 3 - 10 μm) konvertiert werden können. Mit dieser Technik lässt sich die hohe Struktursensitivität der Schwingungs-Spektroskopie mit einer Zeitauflösung im Subpikosekunden-Bereich kombinieren.

Modellsysteme: Für die Untersuchung der Bildung von Thymin-Dimeren wurden zwei Thymin-Derivate ausgewählt: das einzelsträngige Thymin-Homopolymer $(\text{dT})_{18}$ und das Mononukleotid Thymidin-5'-Monophosphat (TMP). Zusätzlich wurden Experimente an dem einzelsträngigen Adenin-Homopolymer poly(A) und dem Mononukleotid Adenosin-5'-Monophosphat (AMP) durchgeführt, deren Adenin-Basen die zu Thymin komplementären Bestandteile der DNA darstellen.

Ergebnisse zur Photophysik von AMP und poly(A): Während in AMP alle Adenin-Basen nach UV-Anregung eine schnelle interne Konversion (< 1 ps) in den schwingungsangeregten Grundzustand erfahren, werden in poly(A) zusätzlich langlebige elektronische Zustände mit Lebensdauern im 100 ps- und ns-Bereich bevölkert. Das Auftreten dieser Zustände korreliert mit der Stapelung der Adenin-Basen in poly(A). Dies deutet auf die Bildung von Excimer-Zuständen hin, deren IR-Absorption in dieser Arbeit erstmals bestimmt werden konnte.

Ergebnisse zur Photochemie und Photophysik von TMP und $(\text{dT})_{18}$: Für die Aufklärung der UV-induzierten CPD-Bildung wurde zunächst in stationären Belichtungsexperimenten die charakteristische IR-Absorption von Thymin-Dimeren bestimmt. Anschließend konnte durch einen Vergleich der Messungen an TMP und $(\text{dT})_{18}$ die Bildung von Thymin-Dimeren in $(\text{dT})_{18}$ innerhalb einer Pikosekunde (10^{-12} s) nachgewiesen werden. Ebenfalls auftretende langlebige elektronische Zustände (100 ps - 1 ns) führen dagegen nicht zur Dimer-Bildung. Die Photoreaktion ist deshalb nur möglich, wenn die Anordnung zweier Basen zum Zeitpunkt der UV-Absorption bereits für eine Dimerisierung geeignet ist. Diese Interpretation lässt sich auch auf die DNA-Doppelhelix übertragen, in der erst Abweichungen von der idealen Helix-Struktur eine Dimer-Bildung erlauben. In dieser Arbeit konnte damit eine grundlegende Frage zur Photochemie von DNA-Molekülen gelöst werden, die für eine Interpretation von Schadenshäufigkeiten und Mutationsmustern im Genom von zentraler Bedeutung ist.

Abstract

Ultraviolet radiation can lead to photo-lesions and mutations in DNA, which can cause several diseases, most notably skin carcinomas. The most abundant UV-induced photo-lesions result from the formation of a cyclobutane ring between adjacent thymine bases (CPD-lesions). Although the formation of these thymine dimers has been reported in the early 1960s, until now neither the time scale of dimer formation nor the reaction mechanism has been resolved. The focus of this work is on the investigation of photophysical and photochemical processes in nucleic acids on the picosecond time scale.

Method: Pump-probe spectroscopy allows the investigation of ultrafast, photo-induced processes. The applied spectrometer is based on a central femtosecond laser system. The emitted short light pulses (800 nm, 90 fs) are converted via nonlinear processes into the required spectral regions (ultraviolet pump: ~ 270 nm, mid infrared probe: 3 - 10 μm). In this way the high-structure sensitivity of vibrational spectroscopy can be combined with a time resolution in the sub picosecond regime.

Model systems: For the investigation of thymine dimer formation, two thymine derivatives were chosen: the 18-mer all-thymine single strand (dT)₁₈ and the mononucleotide thymidine-5'-monophosphate. Additional experiments were performed on the all-adenine single strand poly(A) and the mononucleotide adenine-5'-monophosphate, as adenine is the complementary base of thymine in the DNA double helix.

Results on the photophysics of AMP and poly(A): While in AMP virtually all excited adenine bases return to the vibrationally excited ground state via a fast, internal conversion (< 1 ps), there is an additional population of long-lived, electronic states in poly(A), with lifetimes in the 100 ps- and ns-regime. The population of these states correlates with the amount of stacked bases in poly(A). This can be explained by the formation of excimer states. The IR absorption of these states could be deduced in this paper for the first time.

Results on the photochemistry and photophysics of TMP and (dT)₁₈: To resolve the UV-induced formation of CPD-lesions, the characteristic IR absorption of thymine dimers was determined from stationary irradiation experiments on (dT)₁₈. Afterward the formation of thymine dimers in (dT)₁₈ was shown to occur within one picosecond (10^{-12} s) by comparing the time resolved measurements on TMP and (dT)₁₈. Long-lived electronic states (100 ps - 1 ns) do not lead to dimer formation. Therefore, the photoreaction can only take place if the conformation of two bases at the moment of UV absorption is already suitable for dimerization. This interpretation can be transferred to the DNA double helix, in which deviations from the ideal helix structure are necessary for dimer formation. In this work a fundamental question of photochemical reactions in DNA is resolved, which is of central importance to the understanding of the frequency of damage and mutation patterns in the genome.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	vii
1 Einleitung	1
2 Nucleinsäuren: Aufbau, Funktion und Eigenschaften	13
2.1 Aufbau und Funktion von Nucleinsäuren	13
2.1.1 Molekularer Aufbau	13
2.1.2 Struktur und Funktion	15
2.2 Schäden, Mutationen und Reparatur	23
2.2.1 Schäden durch Stoffwechselprozesse und Chemikalien	24
2.2.2 Photoinduzierte Schäden	25
2.2.3 Biologische Bedeutung der Photoschäden	32
2.2.4 Reparaturmechanismen	33
2.3 Photophysik und Photochemie von Nucleinsäuren	37
2.3.1 Grundlagen zur Photophysik	38
2.3.2 Über die Photophysik von Nucleinsäuren	40
2.3.3 Photochemie und Bildung von Thymin-Dimeren	45
3 Experimentelles: Methodik, Aufbau und Messablauf	53
3.1 Prinzip der Anreg-Abtast-Spektroskopie	53
3.2 Femtosekunden-Infrarot-Spektrometer	54
3.2.1 Femtosekunden-Lasersystem	55
3.2.2 Erzeugung abstimmbarer Abtast-Impulse im MIR-Bereich	57
3.2.3 Erzeugung von Anreg-Impulsen im UV-Bereich	60
3.2.4 Messplatz und Messdatenerfassung	62
3.3 Zeitaufgelöste Messungen - Messablauf und Datenauswertung	66
3.3.1 Charakterisierung der Probenlösung	66
3.3.2 Justage der Messapparatur und Bestimmung der Apparatefunktion	66
3.3.3 Messung und Signalbildung	68
3.4 Zeitaufgelöste Messungen - Effekte und Signaturen	70
3.4.1 Zwei-Photonen-Absorption und das solvatisierte Elektron	71
3.5 Stationäre Belichtungs-Experimente und temperaturabhängige Messungen	73
4 Stationäre Charakterisierung der Modell-Systeme	75
4.1 Die Modell-Systeme und das Lösungsmittel	75
4.1.1 Thymin-Derivate: TMP und (dT) ₁₈	75
4.1.2 Adenin-Derivate: AMP und poly(A)	77
4.1.3 Wahl des Lösungsmittels	77

4.2	Stationäre Absorptionseigenschaften	78
4.2.1	AMP und poly(A): Absorptionseigenschaften	79
4.2.2	TMP und (dT) ₁₈ : Absorptionseigenschaften	81
4.3	Stationäre Belichtungsexperimente	84
4.3.1	Thymin-Derivate: IR-Signatur von Photoprodukten	84
4.3.2	Thymin-Dimere: Identifizierung und spektrale Charakterisierung	88
4.4	Zusammenfassung der wichtigsten Absorptionseigenschaften	92
5	Zeitaufgelöste Anreg-Abtast-Experimente	95
5.1	Typische Signalbeiträge	95
5.1.1	Ausbleichen und Oszillationen vor dem Zeitnullpunkt	97
5.1.2	Signale am Zeitnullpunkt	97
5.1.3	IR-Absorption angeregter Schwingungszustände	100
5.2	Zeitaufgelöste IR-Spektroskopie an AMP und poly(A)	106
5.2.1	AMP und poly(A): Zeitaufgelöste Messdaten	106
5.2.2	AMP und poly(A): Dateninterpretation	110
5.3	Zeitaufgelöste IR-Spektroskopie an TMP und (dT) ₁₈	120
5.3.1	TMP und (dT) ₁₈ : Zeitaufgelöste Messdaten	120
5.3.2	TMP und (dT) ₁₈ : Dateninterpretation	125
6	Bildung von CPD-Schäden in DNA	143
6.1	Modell für die Bildung von CPD-Schäden in (dT) ₁₈	143
6.1.1	Die Konformation bestimmt die Ausbeute	144
6.1.2	Elektronische Zustände bei der CPD-Bildung: Singulett oder Triplett?	146
6.1.3	Modell für die Bildung von Thymin-Dimeren in (dT) ₁₈	148
6.2	Relevanz der Ergebnisse an (dT) ₁₈ in Bezug auf die DNA-Doppelhelix	151
6.2.1	Strukturelle Unterschiede und Quantenausbeuten	152
6.2.2	CPD-Schäden und Konformationen in vivo	154
7	Zusammenfassung und Ausblick	157
A	Publikationen in Zusammenhang mit dieser Arbeit	163
B	Lösungsmittelkorrektur	165
C	Wärmediffusion und temperaturabhängige Spektren	167
C.1	Wärmediffusion im Anregungsvolumen	167
C.2	Temperaturabhängige Absorptionsspektren	168
D	Bestimmung der Extinktionskoeffizienten	171
E	Globale Datenanpassung	173
	Abbildungsverzeichnis	175
	Tabellenverzeichnis	179

Literaturverzeichnis	181
Glossar	215
Lebenslauf	217
Danksagung	221

1 Einleitung

*Fast alle Aspekte des Lebens sind auf molekularer Stufe organisiert;
wenn wir also die Moleküle nicht verstehen,
können wir über das Leben
nur sehr oberflächlich Bescheid wissen.*

Francis Crick

Die Erkenntnisse über die molekularen Strukturen des Lebens gehören zu den größten Errungenschaften des letzten Jahrhunderts [Atk06]. Sie erlauben Einblick in die komplexe Organisation von Zellen und stellen das Prinzip der Replikation auf eine für alle lebenden Organismen allgemein gültige Basis. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Erkenntnis, dass die Erbinformation in Form einer Nukleinsäure, der DNA („deoxyribonucleic acid“), auf molekularer Ebene gespeichert ist. Die DNA repräsentiert damit den Genotyp, der die Information für den Aufbau der anderen Funktionsträger (z.B. Proteine) bereit hält. Wie aber funktioniert diese Datenspeicherung und was sind die molekularen Eigenschaften dieser Moleküle?

Die richtige Interpretation zur Art und Weise der Informationsspeicherung wurde erst durch Strukturanalysen auf molekularer Ebene mit der Methode der Röntgenbeugung [Fri13, Lau13] möglich. Basierend auf dieser Technik haben Experimente zur Struktur von DNA-Molekülen durch Franklin und Wilkins und ihre Interpretation durch Watson und Crick entscheidend zum Verständnis der Speicherung und der Umsetzung der genetischen Information beigetragen [Fra53, Wil53, Wat53b]. Mit den in Folge durch Röntgenbeugung und Kernspinresonanzspektroskopie („nuclear magnetic resonance“, NMR) gewonnenen Strukturen von DNA-Sequenzen und -Motiven [Ber77, Far93, Ber00, Ber03b] bietet sich uns heute ein detaillierter Blick auf die statischen Eigenschaften der Erbinformation¹. Die Nukleinsäure DNA setzt sich aus vier unterschiedlichen Bausteinen, den sogenannten Nukleotiden zusammen, die zu langen Ketten polymerisieren können. In der bekannten Doppelhelix-Struktur der DNA winden sich zwei Nukleinsäure-Stränge um eine gemeinsame Achse und bilden ein langes fadenförmiges Makromolekül, in dem die Abfolge der Nuklein-Basen (Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin) die Erbinformation kodiert. Die Umsetzung der genetischen Informationen in funktionsfähige Proteine erfordert zwei Schritte. Erstens die Transkription der DNA in eine komplementäre RNA-Sequenz. Zweitens die Translation dieser Sequenz in eine Aminosäurekette (Protein) [Len61, Spe62b, Spe62a, Mat62]. Bei der Translation bilden drei aufeinander folgende Basen ein so genanntes Codon für eine von 20 verschiedenen Aminosäuren. Die Abfolge der Aminosäuren bestimmt die Eigenschaften der Proteine.

Ein wesentlicher Schritt zum Verständnis des Lebens auf molekularer Stufe ist deshalb die Erkundung der Basensequenz. Heute steht uns mit den im Rahmen des Humangenomprojekts („Human Genome Project“) durchgeführten Sequenzanalysen eine nahezu vollständige Information über das menschliche Genom zur Verfügung [Ste04, Col04]. Damit verbindet sich die

¹Viele dieser Strukturen sind in frei zugänglichen Datenbanken wie der „Protein Data Bank“ (PDB; <http://www.pdb.org/>) hinterlegt.

Hoffnung, nach und nach Teilsequenzen identifizieren zu können, die für bestimmte Merkmale und Krankheiten verantwortlich sind [Ste04]. Auf diesem Weg sind jedoch noch viele Fragen in Bezug auf die Lage der funktionsfähigen Gene² und Wechselwirkungen, die eine Umsetzung der Information bestimmen, offen. In Analogie zu einem Buch besteht das Problem darin, dass die bloße Kenntnis der Abfolge der etwa 3 Milliarden Buchstaben (DNA-Basen) noch kein Verständnis des Inhalts erlaubt. Die Menschheit ist gerade erst dabei, einzelne Zusammenhänge und Querverweise in diesem Buch des Lebens zu verstehen.

Die Nukleinsäure DNA ist in den Zellen ständig schädlichen Faktoren ausgesetzt, die zu Mutationen und damit zu einer Veränderung der genetischen Information führen können. Dazu gehören externe Umwelteinflüsse wie hochenergetische Strahlung und chemische Substanzen, aber auch Schäden während des normalen Zellstoffwechsels. Schätzungen gehen dabei von etwa 10^4 - 10^6 Schäden pro Tag und Zelle im menschlichen Körper aus. Dies macht deutlich, dass das Überleben des Organismus nur durch eine ständige Überprüfung der Erbinformation und effiziente Reparaturmechanismen gewährleistet werden kann [Sch03a]. Treten dennoch Mutationen auf, so kann dies bei der Umsetzung der Erbinformation zu funktionsunfähigen Proteinen führen. Sind diese „fehlerhaften“ Proteine für die Kontrolle des Wachstums und der Differenzierung von Zellen verantwortlich, können damit schwerwiegende Erkrankungen und erste Schritte für die Entstehung von Krebs verbunden sein [Pon01].

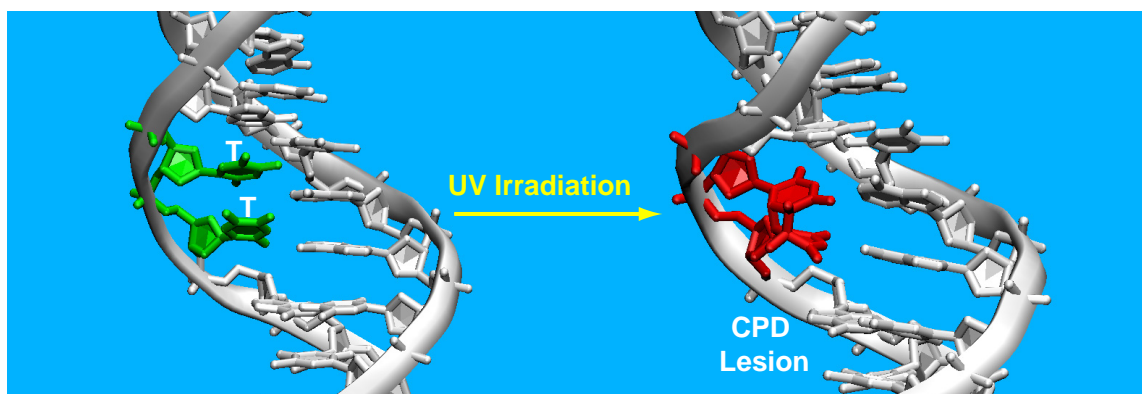


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der UV-induzierten Bildung eines Thymin-Dimers zwischen zwei benachbarten Thymin-Basen (T) in einer DNA-Doppelhelix. Diese Photoprodukte stellen in der DNA die mit Abstand am häufigsten durch UV-Strahlung induzierten Schäden dar und können zu Mutationen führen, in deren Folge es zum Beispiel zur Entstehung von Hautkrebs kommen kann. Die Molekülstrukturen wurden anhand der PDB-Einträge 1COC und 1TTD von [McA98] mit dem Programm VMD erstellt [Hum96].

Zu den gefährlichsten und allgegenwärtigen Umweltkarzinogenen gehört die solare UV-Strahlung. Sie führt zu Schäden an der DNA und anderen Zellbestandteilen und wird neben Hautkrebs [Kra97, dG01, Poo05, Nor07] zum Beispiel für die Unterdrückung von Immunreaktionen des Körpers [Cly01, Poo05] und verschiedene Augenleiden [dG03, And06] verantwortlich gemacht. Der häufigste durch UV-Strahlung induzierte Photoschaden in der DNA besteht in der Bildung von Zyklobutan-Pyrimidin-Dimeren („cyclobutane pyrimidine dimer“, CPD) [Byk98, Yoo00]. Bei diesem Schaden kommt es zur Bildung eines Zyklobutan-Rings zwischen

²Man geht heute von etwa 20000 - 25000 funktionsfähigen Genen aus.

zwei benachbarten Pyrimidin-Basen in der DNA-Doppelhelix. Eine schematische Darstellung dieser Reaktion für zwei benachbarte Thymin-Basen (T) ist in Abbildung 1.1 zu sehen.

Wie im Folgenden dargestellt, sind potentiell alle der UV-Strahlung der Sonne ausgesetzten Organismen durch diese Art von Photoschäden gefährdet. Dabei hat sich gerade für den Menschen die Gefährdung durch schädliche UV-Strahlung sowohl durch ein verändertes Freizeitverhalten als auch durch die Zerstörung der Ozonschicht und den Klimawandel stark erhöht.

UV-Strahlung, Photoschäden und Hautkrebs

Die Sonne bestimmt mit ihrer Strahlung das Klima auf der Erde und liefert neben der Wärmestrahlung auch die für die Photosynthese notwendige Lichtenergie im sichtbaren und nahinfraroten Spektralbereich. Erst Anfang des 19. Jahrhunderts konnte gezeigt werden, dass das Sonnenlicht nicht nur aus dem sichtbaren Spektrum und der Wärmestrahlung besteht, sondern auch einen zum sichtbaren Spektralbereich höherenergetischen Anteil mit Wellenlängen kleiner 400 nm besitzt. Dieser wird als UV-Strahlung bezeichnet. Bis zu diesem Zeitpunkt waren vor allem die positiven Eigenschaften des Sonnenlichts bekannt und wurden als Form einer Heliotherapie für verschiedene Krankheitsbilder eingesetzt. Zum Beispiel waren Zusammenhänge zwischen der psychischen Verfassung und Sonnenlicht bereits zu Lebzeiten des Hippokrates (ca. 460 - 370 v. Chr.) bekannt [Weh89].

Mit der Erfindung von Lichtquellen (z.B. Gasentladungslampen), die im UV-Bereich emittieren, konnten die Effekte der UV-Strahlung in medizinischen Studien näher erforscht werden [Hoc02]. Heute weiß man um die antibakterielle Wirkung und die wichtige Rolle der UV-Strahlung bei der Synthese des Vitamin D3 für den Menschen [Moa08]. Für die Synthese des Vitamins ist allerdings nur eine relativ geringe Strahlendosis notwendig [Gil07]. Zum Beispiel wird in Deutschland für die hellhäutige Bevölkerung eine Empfehlung von etwa 15 Minuten indirekter Sonneneinstrahlung auf Hände und Gesicht pro Tag ausgesprochen [ADP07]. Im Laufe des 20. Jahrhunderts wurde anhand von Tierversuchen deutlich, dass der UV-Anteil des Sonnenlichts, neben seinen heilsamen Aspekten, auch für eine Reihe von Krankheitsbildern wie Hautkrebs verantwortlich ist [Hoc02]. Als Ursache werden dafür vor allem photoinduzierte Prozesse und Schäden an der DNA diskutiert, die in diesem Spektralbereich einen Hauptabsorber für die UV-Strahlung darstellt. Der ultraviolette Spektralbereich wird basierend auf seiner biologischen Wirksamkeit in drei Bereiche unterteilt³:

- UVA (315 - 400 nm): Dieser Spektralbereich wird nur unwesentlich von der Atmosphäre absorbiert. Da die Nukleinsäure DNA in diesem Spektralbereich praktisch keine Absorption zeigt, können Schäden an der DNA nur durch die Sensibilisierung anderer Moleküle und indirekte Prozesse induziert werden.
- UVB (280 - 315 nm): Ozon und andere Bestandteile der Atmosphäre absorbieren in diesem Bereich einen Großteil der solaren Strahlung. Der Anteil der die Erdoberfläche erreicht kann jedoch direkt durch die DNA absorbiert werden und zu Photoschäden führen.

³Die hier vorgenommene Unterteilung bezieht sich auf die Vorgaben gemäß der „International Commission on Illumination“, CIE 1999.

1 Einleitung

- UVC (100 - 280 nm): Dieser Spektralbereich wird praktisch vollständig durch die Ozonschicht in der Atmosphäre absorbiert. Die DNA besitzt in diesem Bereich ein Absorptionsmaximum bei etwa 260 nm.

In Abbildung 1.2 sind die spektralen Anteile der solaren UV-Strahlung außerhalb der Erdatmosphäre und auf der Erdoberfläche, sowie deren Eindringtiefe in menschliche Haut dargestellt. Zusätzlich sind die Absorptionsspektren von DNA-Molekülen und den in der Atmosphäre vorhandenen Ozon-Molekülen gezeigt. Während der UVB-Anteil im Wesentlichen bereits in der Oberhaut absorbiert wird, kann der UVA-Anteil bis in die unteren Hautschichten (Lederhaut und Unterhaut) eindringen [You00]. Der schützende Effekt der Ozonschicht für das Leben auf

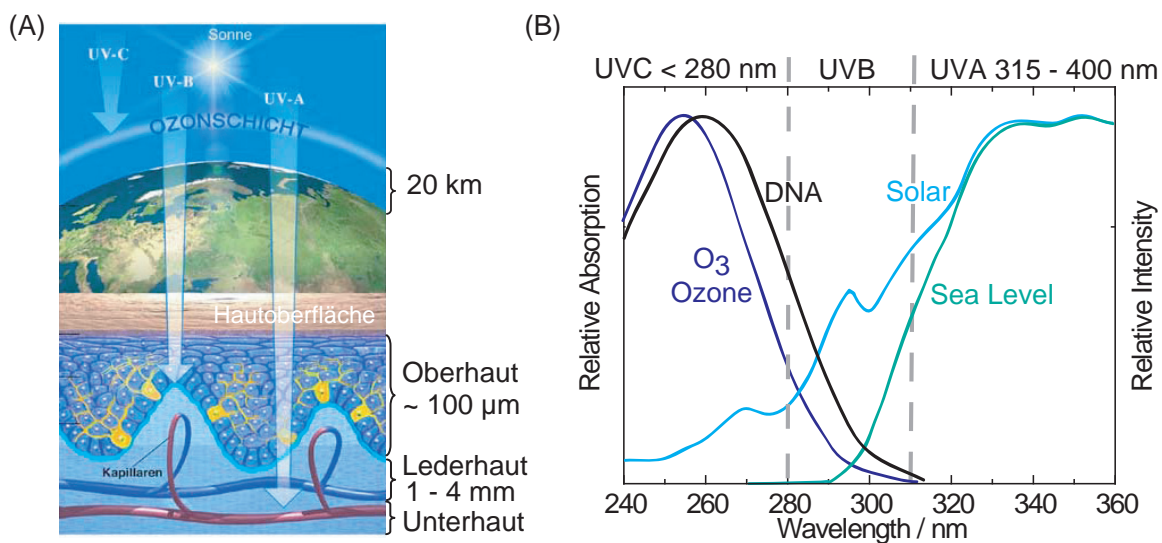


Abb. 1.2: (A) Schematische Darstellung der Eindringtiefe der solaren UV-Strahlung durch die Erdatmosphäre und die menschliche Haut. Während der UVC-Anteil der Strahlung bereits in der Ozonschicht der Atmosphäre absorbiert wird, können Teile der UVB-Strahlung und die UVA-Strahlung die Erdoberfläche erreichen. Der UVB-Anteil wird im Wesentlichen in der Oberhaut absorbiert. Dagegen kann der UVA-Anteil bis in die Unterhaut eindringen. Beide Wellenlängenbereiche können zu Schäden an der Strukturen der Hautzellen führen. (Abdruck mit freundlicher Genehmigung durch [ADP07]). (B) Darstellung der Absorptionsspektren von Ozon- (dunkelblau) und DNA-Molekülen (schwarz) im Vergleich zur Strahlungsintensität der solaren Strahlung außerhalb der Atmosphäre (hellblau) und auf der Erdoberfläche (türkis) [Tay94]. Die relativ große Übereinstimmung der spektralen Absorptionseigenschaften zwischen DNA- und Ozon-Molekülen im UVC-Bereich des Spektrums machen die Bedeutung der Ozonschicht für das Leben auf der Erde deutlich. Sie verhindert das Auftreten der UVC-Strahlung und reduziert den Anteil der UVB-Strahlung erheblich. Eine Veränderung der Ozonkonzentration in der Stratosphäre wirkt sich direkt auf den Anteil der die Erdoberfläche erreichenden UVB-Strahlung aus. Aufgrund der Absorption der DNA-Basen in diesem Bereich kann es zu direkt induzierten Schäden an der Erbinformation kommen. Der UVA-Anteil wird durch die Atmosphäre nur gering beeinflusst und kann über Sekundärprozesse zu Schäden an der DNA führen.

der Erde wird dabei beim Vergleich der Absorptionsspektren von Ozon- und DNA-Molekülen in Abbildung 1.2 B deutlich. Durch die Ozon-Moleküle wird neben dem sehr energiereichen UVC-Anteil, in dem das Absorptionsmaximum der DNA liegt, auch ein großer Anteil der UVB-Strahlung absorbiert. Dagegen wird der UVA-Bereich durch die Ozonschicht nur unwesentlich beeinflusst und kann über Sekundärprozesse (z.B. freie Radikale, Oxidationsprodukte,

Photosensibilisierung) die DNA schädigen [Gni96, Cad97, Rav01, Nis06, Mou06]. Die mit Abstand am häufigsten durch UV-Strahlung induzierten DNA-Schäden sind jedoch die bereits in Abbildung 1.1 dargestellten CPD-Schäden.

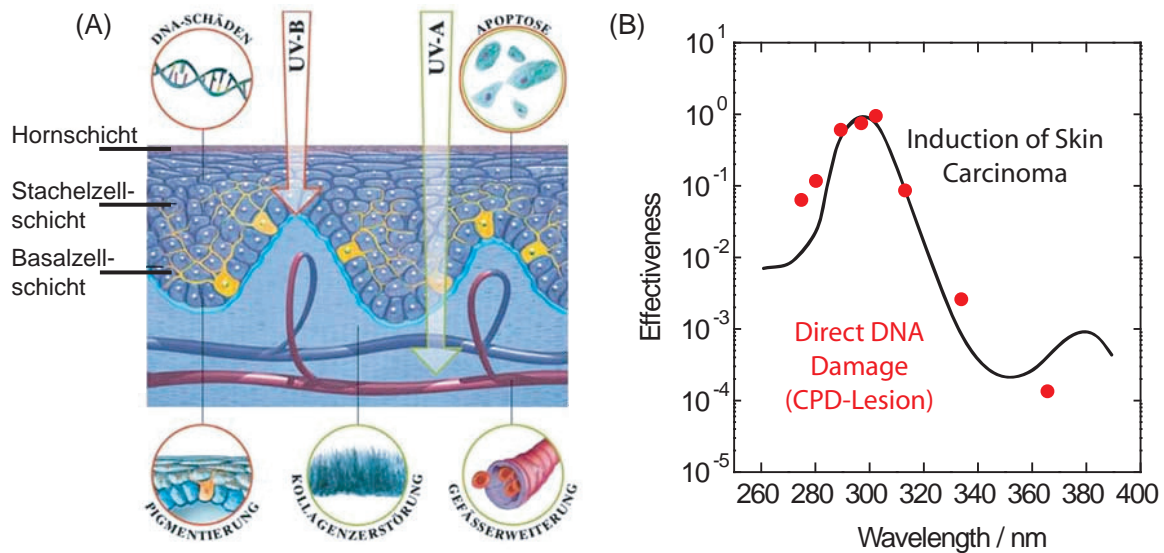


Abb. 1.3: (A) Schematische Darstellung der menschlichen Haut und die durch UV-Strahlung induzierten Prozesse. Die langwelligere UVA-Strahlung dringt tiefer in das Gewebe ein als die UVB-Strahlung. Beide Wellenlängenbereiche können zu Schäden in den Hautzellen führen. Abdruck mit freundlicher Genehmigung durch [ADP07]. (B) Vergleich der Wirkungskurve für die Bildung von Hautkarzinomen (schwarz) mit dem Wirkungsspektrum für die Bildung von CPD-Schäden (rot) in der DNA [dG94, Fre89] (nach [dG99]).

Es gibt eine ganze Reihe von Haut-Effekten, die auf die Exposition mit UV-Strahlung zurückgeführt werden können. Abbildung 1.3 A illustriert einige davon. Die Wirkungen der UV-Strahlung reichen dabei von einer offensichtlichen Hautrötung (Gefäßerweiterung), der Zerstörung von Kollagen und einer vorzeitigen Hautalterung bis zu einem Absterben und Abstoßen der betroffenen Hautzellen („Erythema solare“, Sonnenbrand)⁴. Für die Entstehung von Sonnenbrand wird vor allem die energiereiche UVB-Strahlung und damit die Bildung von CPD-Schäden verantwortlich gemacht [You98, McK04]. Etwa 10⁵ CPD-Schäden in der DNA von Epidermis-Zellen reichen, nach einer UV-Dosis von etwa 500 J/m², aus, um eine Hautrötung auszulösen [Byk98]. Ist eine Reparatur von Schäden nicht mehr in ausreichendem Maße möglich, wird in der Regel der programmierte Zelltod (Apoptose⁵) eingeleitet. Fällt dieser regulierende Mechanismus aus, können sich, als Folge der Photoschäden, Mutationen anhäufen, durch die es zur Entstehung von Krebs kommen kann [Set74, Tay94, Kra97, dG99, dG01, Nis06].

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde von Medizinern ein Zusammenhang zwischen Hautkrebs und regelmäßiger Sonnenbestrahlung vermutet und Anfang des 20. Jahrhunderts durch Tierversuche bestätigt [Fin28, Hoc02]. Hautkrebs gehört zu den häufigsten Krebsarten

⁴Erythema (griech.) = Röte, Entzündung. Dermatologischer Ausdruck für eine entzündungsbedingte Hautrötung, die durch eine Gefäßerweiterung hervorgerufen wird.

⁵Apoptosis (griech.) = der Niedergang

unter Menschen mit nordeuropäischer Abstammung und ist die bei weitem häufigste Krebsart für diese Menschen, wenn sie in subtropischen Gegenden der USA oder Australiens leben [dG03]. Dabei wird zwischen verschiedenen Hautkrebsarten unterschieden. Zu den am häufigsten auftretenden Hauttumoren gehören das Basalzellenkarzinom und Plattenepithelkarzinom⁶. Beide Tumorarten treten vorwiegend bei älteren Menschen auf und sind mit der kumulativen Strahlendosis verknüpft, der die Haut im Laufe des Lebens ausgesetzt war. Dem gegenüber entwickelt sich das wesentlich gefährlichere und oft tödlich verlaufende maligne Melanom (schwarzer Hautkrebs)⁷ häufig bereits im mittleren Lebensalter. Das Auftreten der beiden Karzinome scheint eindeutig mit einer im Laufe des Lebens zu hohen Strahlendosis im UVB-Bereich verknüpft zu sein. Dies wird in Abbildung 1.3 B eindrucksvoll durch die sehr gute Übereinstimmung der Wirkungsspektren für die Induktion von Hautkarzinomen und die direkte Schädigung der DNA (CPD-Schäden, rot) deutlich gemacht. Diese UV-induzierten Schäden können zu Mutationen führen, deren UV-Signatur in bestimmten Genen (z.B. p53) von Hautkrebspatienten mit Basalzellenkarzinom nachgewiesen werden konnte [Bes05]. Im Gegensatz dazu sind die genauen Ursachen für die Entstehung des malignen Melanoms bisher noch nicht eindeutig geklärt. Allerdings deuten auch hier Studien auf einen Zusammenhang mit den durch UVB- und UVA-Strahlung verursachten Photoschäden hin [Set93, Kra97, Bes05, Woo06]. Vor allem der UVA-Bereich wurde aufgrund seiner geringen Sonnenbrand-Wirkung in dieser Hinsicht bisher unterschätzt⁸.

Gefahren durch Freizeitverhalten und Klimawandel

Das Leben auf der Erde hat sich notwendigerweise auf die solare UV-Belastung eingestellt. Zum Beispiel besitzt unsere Haut einige aktive und passive Schutzmechanismen [Nie06, Wic07], wobei die Empfindlichkeit der Haut stark vom entsprechenden Hauttyp und der Fähigkeit zur Bräunung abhängig ist. Eine gute Zusammenfassung zu diesen Mechanismen und deren Ursachen findet sich in [Cly01, McK04, Wic07, Bre07]. Neuere Studien deuten darauf hin, dass die Bildung von CPD-Schäden und die dadurch erforderlichen Reparaturmechanismen in den Zellen auch für die Expressierung von Melanin durch Melanozyten und die Pigmentbildung, d.h. die Bräunung verantwortlich sind [Vin01]. Dabei scheint eine Genmutation für die mangelnde Bräunungsfähigkeit der rothaarigen Bevölkerungsanteile verantwortlich zu sein [Wic07]. Eine „gesunde“ Bräune durch UV-Strahlung ist nicht ohne eine vorhergehende Schädigung der DNA möglich. Vor allem die hellhäutige Bevölkerung sieht sich einer zunehmenden Rate von Hautkrebserkrankungen gegenüber, die sich in den letzten 40 Jahren mehr als verdoppelt hat. Wie lässt sich diese Entwicklung erklären?

Einen großen Anteil an dieser Entwicklung hat mit Sicherheit das Freizeitverhalten und das Ideal einer gebräunten Haut⁹, das sich mit der Entstehung von Freibädern, dem Aufkommen des Breitensports und der Einrichtung von Sonnen-, Licht- und Luftbädern um 1920 als neues

⁶Schätzungen gehen für Deutschland von etwa 100 Fällen pro 100000 Einwohner und Jahr [GEK06] für diese beiden Tumorarten aus.

⁷Etwa 14000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland [GEK06].

⁸Das Maximum im Wirkungsspektrum liegt für Sonnenbrand bei etwa 300 nm. Im langwelligen UVA-Bereich ist die Erythem-Wirksamkeit dagegen um 2-3 Größenordnungen niedriger [Prz99].

⁹Coco Chanel war die erste Modedesignerin, die gebräunte Haut als Trend und neues Schönheitsideal vermittelte [Hoc02].

Schönheitsideal durchzusetzen begann. Mit dem Sonnen- und Bade-Tourismus in den 60er Jahren wurde eine gebräunte Haut zum Symbol für Attraktivität, Erfolg und Gesundheit. Gerade junge Menschen setzen sich deshalb oft viel zu hohen Strahlendosen beim Sonnenbaden oder in Solarien aus und erreichen so bereits sehr früh das von den Hautzellen noch verkräftbare Maß an Strahlenschäden in der Haut. In diesem Zusammenhang wird gerne von einem individuellen „UV-Konto“ gesprochen, das einen Menschen sein ganzes Leben lang begleitet. Auch der unsachgemäße Einsatz von Sonnencremes stellt ein Problem dar. Da Sonnencremes in der Vergangenheit oft nur den UVB-Anteil unterdrückten, der aufgrund der hohen Schadensraten relativ schnell zu einem Sonnenbrand führt, haben sich viele einer übermäßigen Strahlungsdosis ohne entsprechenden UVA-Schutz ausgesetzt. Die Erkenntnis, dass Bräunung immer ein Zeichen für eine zuvor erfolgte Schädigung, die natürliche, individuelle Hautfarbe hingegen ein Zeichen für Gesundheit sein kann, beginnt sich erst langsam durchzusetzen.

Neben den Freizeit-Gewohnheiten und Idealen ist die steigende Anzahl an Hautkrebserkrankungen aber auch mit den durch den Menschen verursachten Umweltveränderungen verknüpft. Mitte der 1970er Jahre wurde entdeckt, dass Produkte der chemischen Industrie — vor allem die Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKW's) — zu einer Zersetzung von Ozon-Molekülen in der Stratosphäre beitragen¹⁰. Bereits damals wurde eine daraus resultierende Gefährdung für den Menschen erkannt und erste Szenarien für die Auswirkungen auf das Leben auf der Erde diskutiert [Mol74, Mau76]. Wie der Vergleich zwischen der Absorption von Ozon-Molekülen und der DNA in Abbildung 1.2 B zeigt, wirken sich Änderungen in der Konzentration der schützenden Ozon-Schicht direkt auf den Anteil der schädlichen UVB-Strahlung auf der Erdoberfläche aus. In neueren Hochrechnungen wird dabei zum Beispiel bei einer Reduktion der Ozon-Konzentration von $x\%$ mit einer Erhöhung der Hautkrebsfälle von bis zu $3x\%$ gerechnet [Sla96, dG99].

Obwohl im Laufe von gut 30 Jahren durch internationale Abkommen (Vienna Protokoll 1985, Montreal Protokoll 1987) eine deutliche Reduktion von Ozon zerstörenden Produkten erreicht wurde [Pra96], haben wir es heute mit einer in einigen Bereichen der Erde extremen Abnahme der Ozonkonzentration (Antarktis, Australien) und Zunahme schädlicher UV-Strahlung zu tun. Die Auswirkungen auf das Leben auf der Erde sind Gegenstand internationaler Forschungsaktivitäten, deren Ergebnisse zum Beispiel von den Vereinten Nationen („United Nations Environmental Programm / Environmental Assessment Panel“, UNEP / EEAP) in regelmäßigen Abständen veröffentlicht werden. Einen sehr guten Überblick zu den mit der Zerstörung der Ozonschicht verknüpften Auswirkungen auf die Umwelt geben zum Beispiel [Fah06, Auc07].

Aufgrund der vorangegangenen Zerstörung der Ozonschicht werden wir bis Mitte des 21. Jahrhunderts mit einer deutlich erhöhten Strahlung im UVB-Bereich leben müssen [Bro99, McK99, McK07]. Da die auf der Erdoberfläche auftreffende UVB-Strahlung auch von der künftigen Klimaentwicklung in Bezug auf Aerosole und die Wolkenbedeckung abhängig ist, besteht zur Zeit eine große Unsicherheit darüber, wie sich die Erholung der Ozonschicht auf die effektive UVB-Strahlenbelastung auswirkt. Zusätzlich könnte sich durch die Klimaerwärmung die Erholung der Ozonschicht deutlich verlangsamen. Diese Annahme beruht auf einem Modell, nach dem es bei der Klimaerwärmung (in der Troposphäre) zu einer Erniedrigung der Temperatur in der Stratosphäre kommt [dG03]. Dies könnte vor allem in der nördlichen

¹⁰Nobelpreis 1995 an Paul J. Crutzen, Mario J. Molina und Frank Sherwood Rowland — für ihre Arbeiten zur Chemie der Atmosphäre, insbesondere über Bildung und Abbau von Ozon.

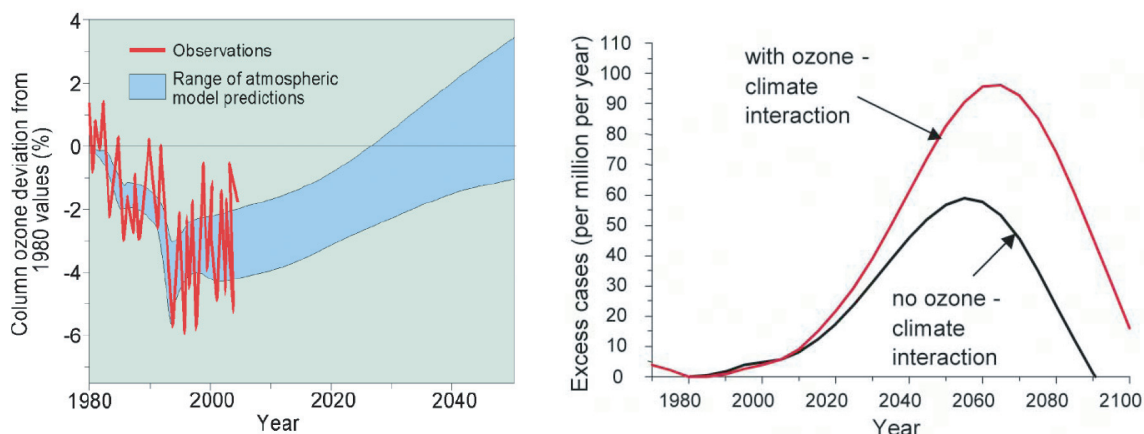


Abb. 1.4: (A) Prognose für den weiteren Verlauf der Ozon-Konzentration (60°S - 60°N) im 21. Jahrhundert. Die Angaben beziehen sich auf die beobachteten und berechneten Abweichungen zur Ozon-Konzentration von 1980 [IPC05, McK07]. (B) Prognose für die Zunahme der Hautkrebskrankungen in westlichen Nordeuropa mit und ohne verzögerte Erholung der Ozon-Schicht durch dem Klimawandel [Kel02, dG03]. Abdruck mit Erlaubnis durch „The Royal Society of Chemistry (RSC) on behalf of the European Society for Photobiology and the European Photochemistry Association“.

Hemisphäre über der Arktis zu einer Erhöhung der Effizienz der Ozon abbauenden chemischen Prozesse führen [Mue97, Shi98]. Ausführliche Darstellungen zu den bisher bekannten Zusammenhängen zwischen dem Treibhausgas Ozon in der Stratosphäre und der Klimaerwärmung finden sich auch in den im Jahr 2007 veröffentlichten „IPCC-Berichten“ („International Panel on Climate Change“, IPCC) zum Klimawandel [IPC07].

In Abbildung 1.4 A sind die bisher beobachtete Abnahme des Ozongehalts für die mittleren Breiten und der prognostizierte Verlauf bis zur Mitte des 21. Jahrhunderts dargestellt. Die Breite der Verteilung (blaue Schattierung) macht die große Unsicherheit über die weitere Entwicklung deutlich. Abbildung 1.4 B zeigt den Verlauf der durch die erhöhte UV-Strahlung zu erwartenden zusätzlichen Hautkrebskrankungen bis zum Jahr 2100. Da die Bildung von Hautkarzinomen auf eine kumulative Strahlendosis während des Lebens zurückgeführt wird, reagiert die Anzahl der zusätzlichen Krebserkrankungen zeitlich deutlich verzögert auf die Umweltveränderungen. In der Darstellung ist der prognostizierte Verlauf der zusätzlichen Hautkrebskrankungen einmal mit und einmal ohne verzögerte Erholung der Ozonschicht durch die Klimaerwärmung gezeigt.

Diese Studien machen deutlich, dass die Menschheit ein globales Experiment durchführt, dessen Ausgang noch weitgehend ungewiss ist. Dabei rücken zunehmend die Auswirkungen des Klimawandels auf die Ökosysteme in den Vordergrund. Denn neben den direkten gesundheitlichen Aspekten für den Menschen sind vor allem die noch unklaren Auswirkungen auf die Ökosysteme in den Meeren, die am Anfang der Nahrungskette stehen (z.B. Phytoplankton¹¹) eine große Bedrohung. Waren viele Ökosysteme bisher zum Teil durch eine Eisschicht vor einer zu hohen UV-Belastungen geschützt, finden sie sich nun im Rahmen der Erderwärmung und des Schmelzens des Eises zunehmend der gefährlichen UV-Strahlung ausgesetzt. Wie diese Organismen auf die veränderten Umweltbedingungen reagieren bleibt abzuwarten.

¹¹Phytoplankton ist der größte Produzent von Biomasse in den Meeren und bildet die Basis der Nahrungskette.

Ziele und Gliederung der Arbeit

Die einleitenden Abschnitte zu den durch UV-Strahlung verursachten Schäden in der DNA machen deutlich, dass der Photophysik und der Photochemie dieser Moleküle eine große Bedeutung für ein Verständnis des Lebens auf molekularer Ebene zukommt. Die genetische Information ist seit Milliarden von Jahren dieser Strahlung ausgesetzt, und es stellt sich die Frage, ob die zur Speicherung der Erbinformation verwendeten Nukleinbasen im Laufe der Evolution auf eine möglichst hohe Photostabilität hin selektiert wurden, bzw. welche Mechanismen die Natur zum Schutz vor Photoschäden verwendet. Diese Fragestellung war lange Zeit die Motivation für experimentelle Studien zur Photophysik angeregter Zustände in Nukleinsäuren, da diese Prozesse am Anfang einer Kette von Reaktionen stehen, die zu Photoschäden führen. Tatsächlich zeigen Untersuchungen an einzelnen DNA-Basen eine erstaunlich hohe Photostabilität, die bisher vor allem auf sehr schnelle elektronische Desaktivierungsprozesse im Bereich von wenigen hundert Femtosekunden ($1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$) zurückgeführt wurden [CH04a].

Experimente, die eine Zeitauflösung in diesem Zeitbereich erlauben, wurden erst durch laserbasierte Anreg-Abtast-Experimente mit kurzen Lichtimpulsen realisierbar. Grundlage dieser Spektroskopie-Technik sind kurze Lichtimpulse, die zum einen eine Photoreaktion auslösen (Anregung) und zum anderen die bei dieser Reaktion ablaufende Absorptionsänderung durch einen zweiten Lichtimpuls abtasten können (Abfrage). Basierend auf einem Femtosekunden-Lasersystem gelang es Pecourt und Mitarbeitern im Jahr 2000 erstmals, die Lebensdauer elektronisch angeregter DNA-Moleküle auf der Subpikosekunden-Zeitskala direkt zu beobachten [Pec00]. In Folge wurde eine Reihe weiterer Experimente mit zeitaufgelöster UV/Vis- und Fluoreszenz-Spektroskopie an einzelnen DNA-Bausteinen und kurzen DNA-Sequenzen durchgeführt. Eine gute Zusammenfassung der Experimente zur Photophysik von DNA-Bausteinen findet sich zum Beispiel in [CH04a]. Vor allem neuere Studien zur Photophysik von DNA-Molekülen zeigen jedoch, dass offenbar die schnelle Desaktivierung einzelner DNA-Basen alleine nicht ausreicht, um die beobachtete hohe Photostabilität von DNA-Molekülen zu erklären. Denn sowohl bei bestimmten DNA-Nukleotiden als auch bei kurzen DNA-Sequenzen und Basenpaaren wurden langlebige angeregte elektronische Zustände nachgewiesen, die an photochemischen Reaktionen beteiligt sein könnten. Die Untersuchung photochemischer Prozesse in DNA-Molekülen wird durch zwei Punkte wesentlich erschwert:

1. Die hohe Photostabilität der DNA äußert sich durch sehr geringe Quantenausbeuten für die Photoprodukte. Aus diesem Grund müssen in den zeitaufgelösten Experimenten sehr kleine Signaländerungen nachgewiesen werden, was zu sehr hohen Anforderungen in Bezug auf die Sensitivität der Experimente führt.
2. Im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich, in dem in der Vergangenheit die meisten Experimente durchgeführt wurden, überlagern sich die Absorptionen verschiedener elektronischer Zustände, die eine eindeutige Zuordnung bei der Dateninterpretation verhindern können. Zudem kann es sein, dass mögliche Photoprodukte im experimentell zugänglichen Spektralbereich nicht absorbieren und dadurch kein direkter Nachweis möglich ist.

Diese Schwierigkeiten treten auch bei der Untersuchung der Bildung von CPD-Schäden auf [CH05]. Obwohl bereits seit 1960 bekannt, konnte bis heute weder die Zeitskala der Bildung

noch der zugrunde liegende Mechanismus für diese Reaktion in der DNA nicht eindeutig geklärt werden.

In dieser Arbeit werden die photophysikalischen und photochemischen Prozesse, die zu diesen Schäden führen, erstmals mit zeitaufgelöster IR-Spektroskopie untersucht. Diese Technik verbindet die hohe Struktursensitivität der Schwingungs-Spektroskopie mit einer Zeitauflösung im Sub-Pikosekunden-Bereich. Primäres Ziel ist dabei die Aufklärung der Zeitskala, auf der die Bildung von CPD-Schäden in der DNA stattfindet, bzw. welche elektronischen Zustände daran beteiligt sind. Die Experimente werden dabei an speziellen Modell-Systemen durchgeführt, die eine eindeutige Zuordnung der ablaufenden Prozesse erlauben. Zu diesem Zweck werden Monomere, die eine detaillierte Analyse der Eigenschaften einzelner DNA-Basen ermöglichen, mit einzelsträngigen Nukleinsäureketten verglichen, und der Einfluss der Wechselwirkung zwischen benachbarten DNA-Basen analysiert. Für die Untersuchung der Bildung von CPD-Schäden wird das komplexe Makromolekül DNA auf das einzelsträngige Thymin-Oligomer (dT)₁₈ reduziert. Gleichzeitig werden die photophysikalischen Eigenschaften des Mononukleotids Thymidin-5'-Monophosphat (TMP) untersucht. Als Ergänzung zu diesen Modellsystemen werden zwei Adenin-Derivate betrachtet. Adenin ist die zu Thymin komplementäre Base in der DNA-Doppelhelix und die Experimente am Adenin-Homopolymer poly(A) und dem Adenosin-Mononukleotid AMP liefern dadurch die Grundlage für IR-Experimente an doppelsträngigen DNA-Molekülen. Die vorliegende Arbeit gliedert sich wie folgt:

Kapitel 2 erläutert die für das Verständnis der Eigenschaften und der Funktion von Nukleinsäuren notwendigen Grundlagen. Neben einem Überblick zu Aufbau und Struktur der Nukleinsäuren wird dabei auf die Umsetzung der Erbinformation in Zellen und die für Schäden und Mutationen verantwortlichen Prozesse eingegangen. Diese Ausführungen richten sich im Speziellen auf die durch UV-Strahlung induzierten Schäden und deren biologische Bedeutung. Der letzte Abschnitt gibt einen Überblick zum aktuellen Stand der Forschung über die photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften der Nukleinsäuren und die Bildung von CPD-Schäden.

Kapitel 3 erklärt das Prinzip der Anreg-Abtast-Spektroskopie und beschreibt die in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Aufbauten. Dazu gehört das auf einem Femtosekunden-Lasersystem basierende IR-Spektrometer und ein für stationäre Messungen verwendetes Fourier-Transform-IR-Spektrometer. In diesem Kapitel wird zudem auf den Messablauf, die experimentellen Parameter und die Datenauswertung eingegangen. Ein weiterer Abschnitt befasst sich mit den für Anreg-Abtast Experimente typischen Signalbeiträgen bei Anregung mit intensiven UV-Impulsen.

Kapitel 4 beschreibt die in dieser Arbeit untersuchten Moleküle und diskutiert die stationären Absorptionseigenschaften der Moleküle. Ein eigener Abschnitt widmet sich stationären Belichtungsexperimenten im UV-Bereich, mit deren Hilfe die IR-Signatur von Photoschäden nachgewiesen wird.

Kapitel 5 zeigt die Messergebnisse der zeitaufgelösten IR-Experimente. Dabei werden zunächst die in den zeitaufgelösten IR-Messungen auftretenden IR-Signaturen am Beispiel des Mononukleotids AMP untersucht und mit den Messungen am Homopolymer poly(A) verglichen. Anschließend werden die Messungen am Oligomer (dT)₁₈ und dem Monomer

TMP betrachtet. Basierend auf den Ergebnissen aus Kapitel 4 erfolgt eine Diskussion der Messergebnisse in Bezug auf die Bildung von Thymin-Dimeren. Ein weiterer Abschnitt befasst sich mit dem Nachweis der in TMP und (dT)₁₈ auftretenden elektronischen Zuständen.

Kapitel 6 stellt ein Modell für die Bildung von Thymin-Dimeren in (dT)₁₈ vor. Es folgt eine Diskussion der an den Modellsystemen gewonnenen Ergebnisse in Bezug auf ihre Relevanz für die DNA-Doppelhelix und der damit verbundenen konformationellen Einschränkungen.

Kapitel 7 gibt eine Zusammenfassung der Arbeit und der experimentellen Ergebnisse sowie einen kurzen Ausblick zu der biologischen Bedeutung der Ergebnisse und den Einsatz der zeitaufgelösten IR-Spektroskopie in Bezug auf weitere Fragestellungen.

2 Nukleinsäuren: Aufbau, Funktion und Eigenschaften

In jeder Zelle eines Organismus ist die gesamte Erbinformation in Form einer Desoxyribonukleinsäure („Deoxyribonucleic acid“, DNA)¹ gespeichert und wird den Anforderungen entsprechend umgesetzt. Schäden an diesen Molekülen bedrohen die Funktionalität der Zellen und entscheiden über das Überleben eines Organismus. Der erste Abschnitt dieses Kapitels gibt eine Einführung zu Aufbau, Struktur und Funktion dieser Makromoleküle. Im zweiten Abschnitt werden mögliche DNA-Schäden beschrieben, sowie deren Folgen und Reparatur-Mechanismen erläutert. Der letzte Abschnitt bietet einen Überblick zur Photophysik und Photochemie der Nukleinsäuren sowie eine ausführliche Beschreibung zum Stand der Forschung in Bezug auf die Bildung von CPD-Schäden zwischen Thymin-Basen.

2.1 Aufbau und Funktion von Nukleinsäuren

Lange Zeit war unklar, welche Strukturen in den Zellen für die Weitergabe der genetischen Information von der einen zur nächsten Generation verantwortlich sind. Erst Mitte des 20. Jahrhunderts konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Information nicht, wie bis dahin angenommen, in Proteinen, sondern in den relativ einfach aufgebauten Nukleinsäuren gespeichert ist [Ave95, Her52]. Nukleinsäuren sind lange unverzweigte Polymere, die sich aus vier Grundbausteinen zusammensetzen. In der DNA kodiert die Abfolge dieser Bausteine die Erbinformation. Die Anordnung der Erbinformation in einer Doppelhelix aus zwei komplementären DNA-Strängen ist sowohl für die Weitergabe der Erbinformation als auch für die Umsetzung der Information zum Aufbau von Zellstrukturen bestens geeignet. Ausführliche Darstellungen zu Aufbau und Funktionsweise der DNA und anderen Nukleinsäuren finden sich zum Beispiel in [Ber03a, Alb04, LG06].

2.1.1 Molekularer Aufbau

Die Strukturaufklärung der Nukleinsäuren beginnt im 19. Jahrhundert. 1868 konnte der Mediziner Friedrich Miescher einen Bestandteil aus den Kernen weißer Blutkörperchen isolieren [Mie71], der sich durch seinen hohen Phosphatgehalt deutlich von den bereits bekannten Proteinen unterschied. Er nannte dieses Material Nuklein². Richard Altman konnte 1889 erstmals protein-freies Material isolieren und benannte es entsprechend seiner „sauen“ Eigenschaften in

¹Während im wissenschaftlichen Sprachgebrauch meist die englische Abkürzung DNA für die Desoxyribonukleinsäure verwendet wird, ist im deutschen Sprachraum auch die Abkürzung DNS in Gebrauch.

²Nucleus (lat.) = Kern

Nucleinsäure um. In den folgenden Jahren wurden unter anderem durch Albrecht Kossel³ weitere Details der chemischen Zusammensetzung aufgeklärt. Dabei wurden die organischen Basen Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin und Uracil isoliert und als Bestandteile der Nucleinsäuren identifiziert [Kos03a, Kos03b, Asc00]. Mit der Identifizierung von zwei unterschiedlichen Zuckerkomponenten, einer D-Ribose und einer 2'-Desoxy-D-Ribose durch Phoebus Levene waren 1929 schließlich alle Komponenten der Nucleinsäuren bekannt [Lev08, Lev29]. Levene prägte den Begriff Nucleotid für die Bausteine der Nucleinsäuren, die sich aus einem Phosphat, einem Zucker und einer Base zusammensetzen.

In Abbildung 2.1 sind diese Moleküle schematisch dargestellt. Die organischen Basen lassen

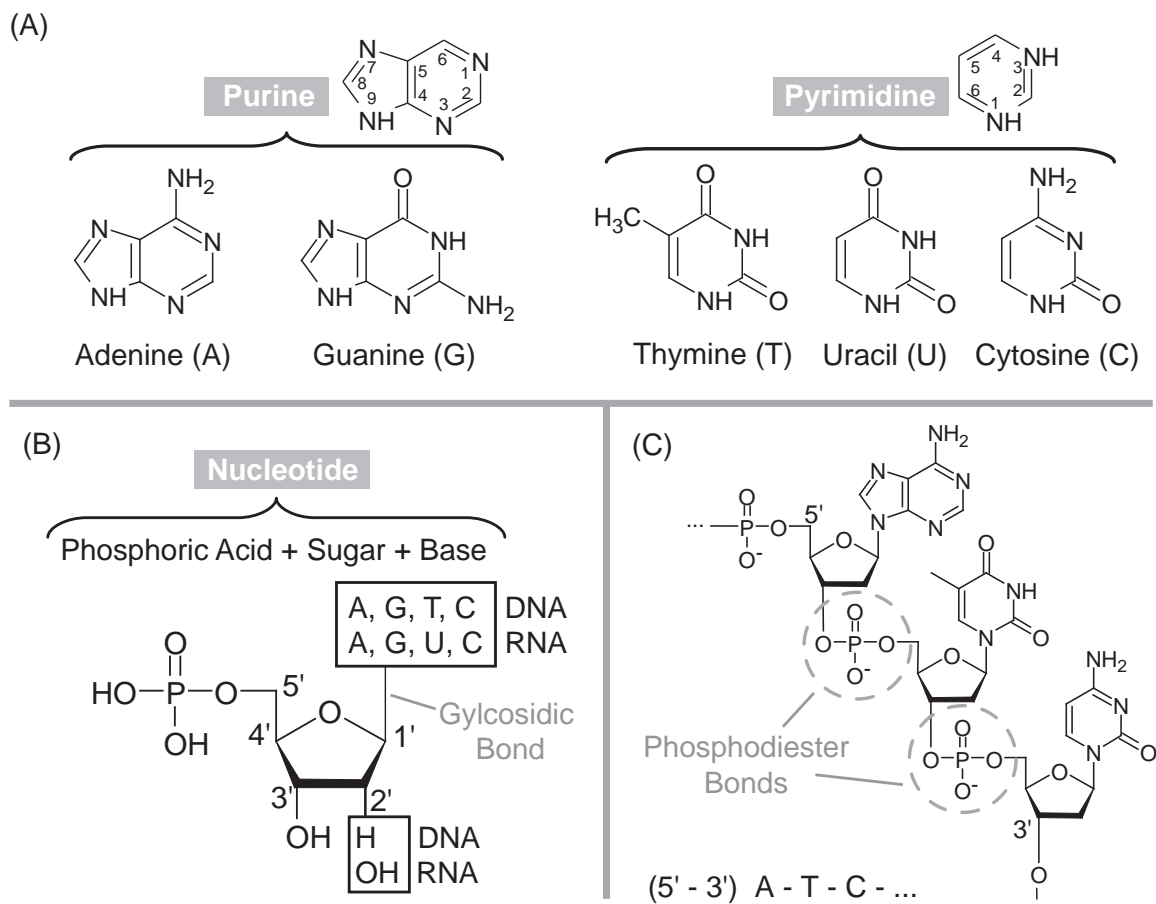


Abb. 2.1: (A) Schematische Darstellung und Einteilung der in Nucleinsäuren vorkommenden organischen Basen. (B) Nucleotide bilden die Grundbausteine der Nucleinsäuren und setzen sich aus einem Phosphat, einem Zucker und der jeweiligen Base zusammen. DNA- und RNA-Moleküle unterscheiden sich in der Form des Zuckers und der verwendeten Basen. (C) Die Verknüpfung der Nucleotide zu Polymeren erfolgt über Ester-Bindungen zwischen der 3'-Hydroxy-Gruppe des einen und der 5'-Phosphat-Gruppe des nächsten Nucleotids. Die resultierende Basensequenz wird vom 5'- zum 3'-Ende des Zuckers gelesen. Unter physiologischen Bedingungen sind die Phosphatgruppen deprotoniert und für den anionischen Charakter der Moleküle verantwortlich.

³Nobelpreis 1910 an Albrecht Kossel — in Anerkennung des Beitrages, den seine Arbeiten über Eiweißstoffe einschließlich der Nucleine für unsere Kenntnis der Chemie der Zelle geleistet haben.

sich in zwei Klassen einteilen. Adenin (A) und Guanin (G) sind Purin-Derivate, Cytosin (C), Thymin (T) und Uracil (U) gehören dagegen zur Klasse der Pyrimidine (siehe Abbildung 2.1 A)⁴. Die Basen sind im Nukleotid (siehe Abbildung 2.1 B) über das N9-Atom der Purin- oder über das N1-Atom der Pyrimidin-Basen mit dem C1'-Atom eines ringförmigen Zuckers (Pentose) verknüpft (N-Glykosid-Bindung). An das C5'-Atom des Zuckers ist im Nukleotid ein Phosphat gebunden. Unter physiologischen Bedingungen ist diese Phosphatgruppe deprotoniert und für den anionischen Charakter der Moleküle verantwortlich. Es existieren zwei Hauptgruppen von Nukleinsäuren, die sich in der Art des Zuckers und der verwendeten Basen unterscheiden. Die Ribonukleinsäure ("Ribonucleic acid", RNA) enthält eine Ribose, die Desoxy-Ribosenukleinsäure ("Deoxyribonucleic acid", DNA) eine Desoxy-Ribose als Zuckereinheit. In der Desoxy-Ribose ist die Hydroxy-Gruppe in der 2'-Stellung der Ribose durch ein Wasserstoffatom ersetzt. Während die Basen Adenin, Guanin und Cytosin sowohl in RNA als auch in DNA verwendet werden, wird Thymin nur in DNA, Uracil nur in RNA eingesetzt. Die Polymerisation der Nukleotide (siehe Abbildung 2.1 C) erfolgt über eine Ester-Bindung zwischen der 3'-Hydroxy-Gruppe des einen und der 5'-Phosphat-Gruppe des nächsten Nukleotids. Im Polymer wird die lineare Sequenz der Nukleotide allgemein durch einen Einbuchstaben-Kode, der die Basen repräsentiert, abgekürzt, und vom 5'- zum 3'-Ende bezüglich der Zuckerkomponente gelesen.

Nukleotide werden nicht nur zum Aufbau von DNA- oder RNA-Molekülen verwendet. Sie fungieren zum Beispiel auch als Energiespeicher (Adenosin-5'-Tri-Phosphat, 5'-ATP), dienen als Signalüberträger (zyklisches Adenosin-Mono-Phosphate, cAMP) oder erfüllen als Coenzyme (Coenzym A, CoA) lebensnotwendige Funktionen in der Zelle [Ber03a, Alb04]. Die speziellen Aufgaben, die von DNA- und RNA-Molekülen übernommen werden, sind eng mit ihrer dreidimensionalen Struktur verknüpft. Der Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion wird deshalb im nächsten Abschnitt näher erläutert.

2.1.2 Struktur und Funktion

Obwohl die chemische Zusammensetzung der Nukleinsäuren nach 1929 bekannt war, gab es noch keine Antwort auf die Frage, wie die genetische Information in diesen Molekülen gespeichert ist. Wie kann eine Kette von Nukleotiden die Information für den Bau eines komplexen Lebewesens kodieren?

Strukturaufklärung

Röntgenbeugungsexperimente sollten die räumliche Anordnung der Nukleotide sichtbar machen und helfen, diese Frage zu beantworten. Bereits die ersten Experimente an DNA-Fasern von Astbury und Bell [Ast38] ließen eine helikale Struktur für die DNA-Struktur erwarten. In Anlehnung an die bekannten helikalen Strukturen von Proteinen wurden zunächst Modelle diskutiert, in denen sich das Zuckerphosphatrückgrat im Zentrum einer Helix befinden sollte [Pau53]. Diese Annahme erwies sich jedoch bald als falsch. Erst Watson und Crick lieferten mit ihrem Modell einer Doppelhelix die richtige Interpretation [Wat53b, Wat02]. Ihr Modell

⁴Die vier Nukleotide der DNA werden auch als Desoxy-Adenylat, Desoxy-Guanylat, Desoxy-Cytidylat und Thymidylat bezeichnet. Für Thymin wird das Desoxy-Attribut (allgemein mit „d“ abgekürzt) meist weggelassen, da Thymin normalerweise nur in DNA auftritt.

konnte nicht nur die Beugungsstrukturen von Franklin und Gosling [Fra53] sowie Wilkins und Mitarbeitern [Wil53] erklären, sondern auch mit biochemischen Analysen von Chargaff und Mitarbeitern in Einklang gebracht werden (Chargaff'sche Regeln) [Wat53a, Bro53]. Bei Untersuchungen über die Zusammensetzung der DNA in Bezug auf die Anteile der verschiedenen Basen stellte sich nämlich heraus, dass jeweils die Basen Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin in etwa gleichen Mengenverhältnissen vorhanden sind. Die Anteile dieser beiden Paare zueinander sind jedoch für den jeweiligen Organismus spezifisch [Cha49, Cha51, Zam52].

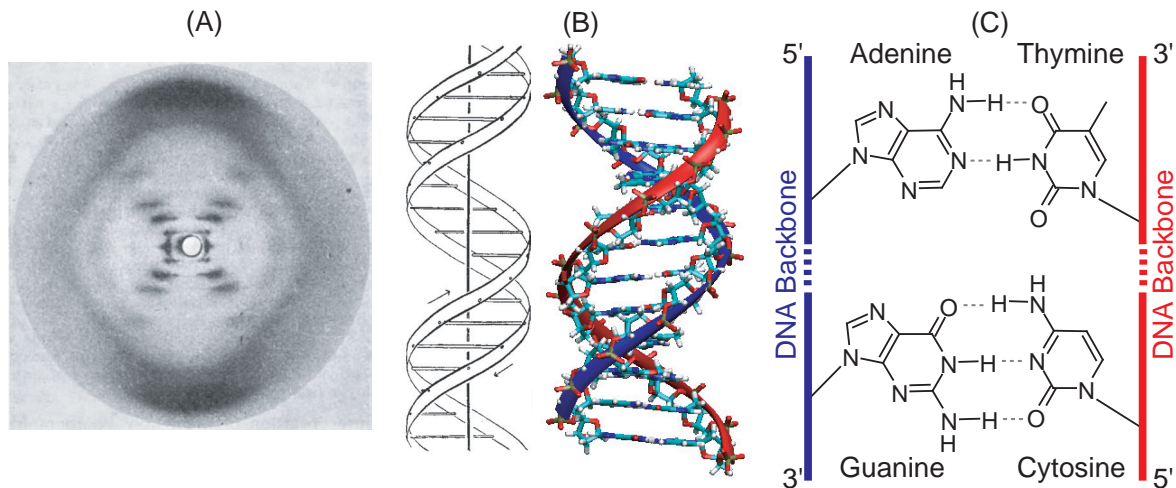
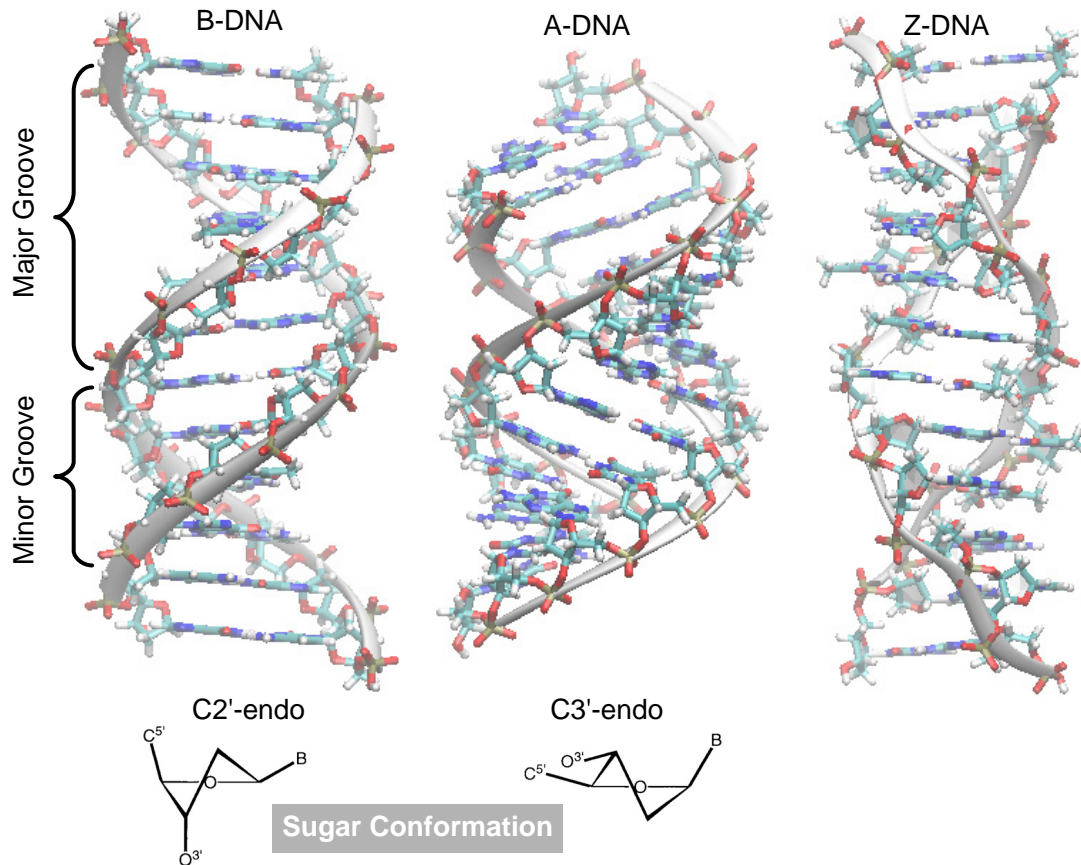


Abb. 2.2: (A) Röntgenbeugungsbild von DNA-Fasern. Das Kreuz in der Mitte ist charakteristisch für helikale Strukturen. (B) Im Doppelhelix-Modell von Watson und Crick winden sich zwei antiparallele DNA-Stränge um eine gemeinsame Achse. Die Basen zeigen ins Innere der Helix, die Zuckerphosphatgruppen liegen außen. (C) Schematische Darstellung der Basenanordnung im Doppelstrang. In der Doppelhelix paart jeweils ein Adenin mit einem Thymin (zwei Wasserstoffbrücken) und ein Guanin mit einem Cytosin (drei Wasserstoffbrücken). Diese Anordnung wird auch als Watson-Crick-Basenpaarung bezeichnet. Das Röntgenbeugungsmuster und das Doppelhelix-Modell sind den Originalarbeiten entnommen [Fra53, Wat53b]. Abdruck mit Genehmigung durch Macmillan Publishers Ltd: Nature, Copyright 1953.

Abbildung 2.2 zeigt eine Röntgenstrukturaufnahme von Franklin und Mitarbeitern an DNA-Fasern zusammen mit dem von Watson und Crick vorgeschlagenen DNA-Modell aus den Originalarbeiten von 1953 [Fra53, Wat53b]. Im Modell winden sich zwei helikale Polynukleotidstränge mit entgegengesetzter Laufrichtung um eine gemeinsame Achse. Die Purin- und Pyrimidin-Basen zeigen ins Innere der Helix, während sich das Zuckerphosphatrückgrat außen befindet. Der komplementäre Charakter der Stränge wird durch die sogenannte Watson-Crick-Paarung der Basen möglich (siehe Abbildung 2.2 C). In dieser Geometrie ist jeweils ein Adenin mit einem Thymin über zwei und ein Guanin mit einem Cytosin über drei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Die Watson-Crick-Paarung erklärt damit in erstaunlich einfacher Art und Weise die biochemischen Analysen und die nach Chargaff benannte Regel.

Die Watson-Crick-Anordnung führt zu einer gezielten Paarung der Basen im Doppelstrang. Eine Wasserstoffbrücke kann nur gebildet werden, wenn sich ein Protonen-Donor und -Akzeptor gegenüberliegen. Das führt zu einer asymmetrischen Anordnung, in der beide Basenpaare etwa den gleichen Raum einnehmen. Die Doppelhelix-Struktur ist deshalb mit jeder Basensequenz vereinbar.

Man nimmt an, dass die DNA in eukaryontischen Zellen meist in der so genannten B-Form auftritt [Alb04]. Der Durchmesser dieser Helix beträgt dabei etwa 2 nm. Benachbarte Basen sind etwa 0,34 nm voneinander entfernt und über eine helikale Windung von etwa 36° gegeneinander verdreht. Die Ganghöhe entspricht mit 3,54 nm etwa 10 Basenpaaren. In Abhängigkeit



Helixtyp	B-DNA	A-DNA	Z-DNA
Drehsinn	rechtsgängig	rechtsgängig	linksgängig
Zucker Konformation	C2'-endo	C3'-endo	C2'- / C3'-endo
Basen pro Windung	10,4	11	12
Ganghöhe	3,54 nm	2,53 nm	4,56 nm
Höhe pro Basenpaar	0,34 nm	0,23 nm	0,38 nm
Rotationswinkel	36°	33°	30°
Neigungswinkel zur Helixachse	~ 0°	~ 20°	~ 10°
Große Furche	breit und tief	eng und sehr tief	flach
Kleine Furche	eng und tief	sehr breit und flach	sehr eng und tief

Abb. 2.3: Oben: Molekülstrukturen von drei biologisch relevanten DNA-Formen (erstellt mit dem Programm VMD [Hum96]). Obwohl die B-Form die weitaus häufigste DNA-Struktur in vivo ist, werden auch den beiden anderen Formen (A- und Z-DNA) wichtige Funktionen zugeschrieben. Unten: Die Tabelle gibt einen Überblick zu den wichtigsten Strukturparameter [Ber03a].

von der Sequenz und äußeren Bedingungen sowie Wechselwirkung mit anderen Molekülen kann die doppelsträngige DNA jedoch auch deutliche Abweichungen von dieser „idealen“

Helix-Struktur aufweisen [Wan79, Arn80, Dic81a, Dic81b, Sha86, Sha89, Dic98, Bac04]. In dehydratisierten DNA-Fasern wurde zum Beispiel eine Struktur nachgewiesen (A-DNA), die sich deutlich von der zuerst von Watson und Crick modellierten Form unterscheidet [Fra53]. Abbildung 2.3 zeigt drei aus Strukturanalysen bekannte Doppelhelix-Konformationen [Ho97, Ber97a, Dau93, Wah97, Sha89, Dre81, Arn80] und gibt einen Überblick zu den wichtigsten Helixparametern [Ber03a]. In allen drei Helices liegen die Basenpaare innen und sind über Wasserstoffbrücken gepaart. Während jedoch A- und B-DNA rechtsgängige Helices bilden, ist die sogenannte Z-DNA linksgängig. Für die unterschiedliche Form sind vor allem die Zuckereinheiten verantwortlich. In der B-DNA liegt die 2'-Desoxyribose in der „C2'-endo“ in der A-DNA in der „C3'-endo“ Konformation vor. In diesen Konformationen liegt entweder das 2'-Kohlenstoffatom oder das 3'-Kohlenstoffatom des Zuckers oberhalb der Ebene, die durch die anderen vier Atome des Zuckers gebildet wird. Dagegen treten in der Z-DNA beide endo-Formen abwechselnd auf. Der daraus resultierende Zickzack-Verlauf des Rückgrats war dabei namensgebend für die Z-DNA [Ber03a]. Ein weiterer Unterschied besteht in der Anordnung der Basen. Während in B- und Z-DNA die Basen etwa senkrecht zur Helixachse stehen, sind sie in der A-DNA deutlich zur Helixachse geneigt. Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal der Helices sind auch die unterschiedlich großen Vertiefungen entlang des Strangs, die als große und kleine Furche bezeichnet werden. Da sich die glykosidischen Bindungen der Basen einander nicht gegenüber stehen (siehe Abbildung 2.2 C) hat jedes Basenpaar eine größere (große Furche) und kleinere Seite (kleine Furche). Diese Furchen sind mit potentiellen Donoren und Akzeptoren für Wasserstoffbrücken gesäumt und erlauben spezifische Wechselwirkungen mit Proteinen. Die eben vorgestellten Strukturen wurden meist unter nicht physiologischen Bedingungen, wie zum Beispiel bei der Röntgenstrukturanalysen an DNA-Fasern oder Kristallen [Sha89], gewonnen und es stellt sich die Frage, ob diese DNA-Strukturen auch *in vivo* auftreten.

Strukturen *in vivo*

Während die Doppelhelix in Bakterien meist ringförmig⁵ vorliegt, ist das Genom in höheren Organismen linear und auf mehrere DNA-Protein-Komplexe (Chromosomen) verteilt⁶ [Alb04]. In den Chromosomen ist die Doppelhelix hoch verdichtet [Kor77, McG80]. Nur auf diese Weise ist es möglich, die etwa 1 m lange DNA des Menschen in einem Zellkern von nur wenigen μm Durchmesser aufzubewahren. Bei der Kompaktierung sind so genannte Histone für die unterste Stufe der Chromosomen-Organisation verantwortlich. Die Bindung an diese Proteine erfolgt über Wasserstoffbrücken und wird durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den basischen Aminosäure-Seitenketten (positive Ladungen) der Histone und dem Phosphatrückgrat der DNA (negative Ladungen) verstärkt. Je zwei Kopien von vier Histon-Proteinen bilden ein Histon-Oktamer, um das sich eine etwa 146 Basenpaare lange Doppelhelix [Lug97, Tra97] in zwei engen Windungen⁷ wickelt. Ein entsprechender DNA-Histon-Komplex wird als Nucleosom bezeichnet und wiederholt sich etwa alle 200 Basenpaare. Diese Anord-

⁵Die Bezeichnung ringförmig bezieht sich auf die Kontinuität des Strangs, nicht auf dessen Form.

⁶In menschlichen Zellen ist das Genom (~ 3 Milliarden Basenpaare) auf 23 Chromosomenpaare verteilt.

⁷A-T-reiche Abschnitte erleichtern die Kompression der kleinen Furche, die dann die Innenseite der DNA bildet und den Histon-Molekülen zugewandt ist. Dies könnte einer der Gründe für auftretende Sequenzpräferenzen in bestimmten DNA-Abschnitten sein.

nung führt zu einem „perlschnurartigen“ Aussehen des Genoms [Alb04, LG06] auf dieser Packungsebene. Diese Strukturen sind wiederum stark gewunden und gefaltet und bilden sogenannte Chromatinfäden. Wiederholte Faltung dieser Fäden führt zu einer extrem kompakten Struktur, in der die Doppelhelix jedoch weitgehend eine B-DNA-artige Konformation behält.

Auch wenn die B-Form der DNA in den Zellen eindeutig überwiegt, wurden in Eukaryonten auch Bereiche des Genoms mit Z-DNA-Struktur nachgewiesen. Studien belegen, dass sie unter anderem durch Sequenzen mit alternierenden Pyrimidinen und Purinen (zum Beispiel dCGCGCG) begünstigt wird. Die genaue Funktion dieser Struktur war jedoch lange Zeit unklar [Ho97, Ric03]. Eine wichtige Rolle scheint die Z-DNA-Struktur bei der Umsetzung der genetischen Information (Transkription, siehe folgende Abschnitte) zu spielen. Dabei wird die Z-Form in Folge der notwendigen Entwindung ("negative supercoiling") der zuvor in B-Form vorliegenden DNA stabilisiert und blockiert in diesen Bereichen die Übersetzung der genetischen Information durch sogenannte RNA-Polymerasen [Pec85]. Man vermutet deshalb, dass Z-DNA möglicherweise die Trennung aufeinander folgender RNA-Polymerasen bewirkt und verhindert, dass es zu Konflikten bei der Reihenfolge des Ablesevorganges der Erbinformation kommt. Weitere wichtige biologische Funktionen dieser DNA-Struktur werden auf das Vorhandensein von Proteinen zurückgeführt, die diese Strukturen erkennen und daran binden können [Ric03].

Auch die A-DNA Form tritt *in vivo* auf. Zum Beispiel wurden in DNA-Protein-Komplexen A-DNA-ähnliche Strukturen [Wes92] nachgewiesen. Zudem sind Proteine (Restriktionsendonukleasen⁸) bekannt, die diese Struktur erkennen [Wah97]. Von besonderer Bedeutung scheint eine entsprechende Anordnung der Doppelhelix für bestimmte Bakterien zu sein, die einen Teil ihres Lebens in Form sogenannter Sporen verbringen können. In Sporen ist die DNA an bestimmte Proteine gebunden, die zu einer A-Form der DNA führen. Diese Anordnung erlaubt es diesen Organismen extremste Bedingungen zu überstehen [Nic00].

Die Doppelhelix kann also offensichtlich in ganz unterschiedlichen Konformationen vorliegen und gegebenenfalls an äußere Bedingungen angepasst werden [Ojh99]. Das setzt eine große Flexibilität für Makro-Moleküle voraus, von denen man eine hohe Stabilität in Bezug auf die Erbinformation erwartet.

Stabilität und Dynamik

Die statischen Strukturbilder von DNA-Molekülen verleiten dazu, sich diese Makromoleküle als rigide und steife Strukturen vorzustellen. Bei der Analyse von DNA-Strukturen zeigt sich jedoch, dass es durchaus starke lokale Abweichungen geben kann⁹. Eine detaillierte Beschreibung des Polymorphismus der DNA und ihrer Flexibilität findet sich zum Beispiel in [Can80b, Dau93].

Die Stabilität der Doppelhelix wird von mehreren Wechselwirkungen bestimmt, von denen zwei in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt sind. Die durch die Watson-Crick-Paarung erlaubten Wasserstoffbrücken (siehe Abb. 2.4 A) zwischen den Basen sind zwar als Struktur-

⁸Restriktionsendonukleasen erkennen bestimmte Basensequenzen und schneiden beide Stränge der Doppelhelix an spezifischen Stellen.

⁹Die Enthalpie-Differenzen verschiedener DNA-Konformere sind bei Raumtemperatur oft klein gegenüber der mittleren thermischen Energie (kT).

Merkmal der Doppelhelix prominent, stellen aber relativ schwache Bindungen dar¹⁰. Zu diesen relativ schwachen Wasserstoffbrücken kommen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen vorhandenen und induzierten Dipolmomenten der Basen. Die effektiven „horizontalen“ Wechselwirkungen zwischen den Strängen sind so schwach, dass sich die Basen-Paarungen reversibel lösen können. Allgemein sind dabei AT-Paare von geringerer Stabilität als GC-Paare [Tsc82]. Für die Stabilität der Doppelhelix ist deshalb ein weiterer Faktor von besonderer Bedeutung,

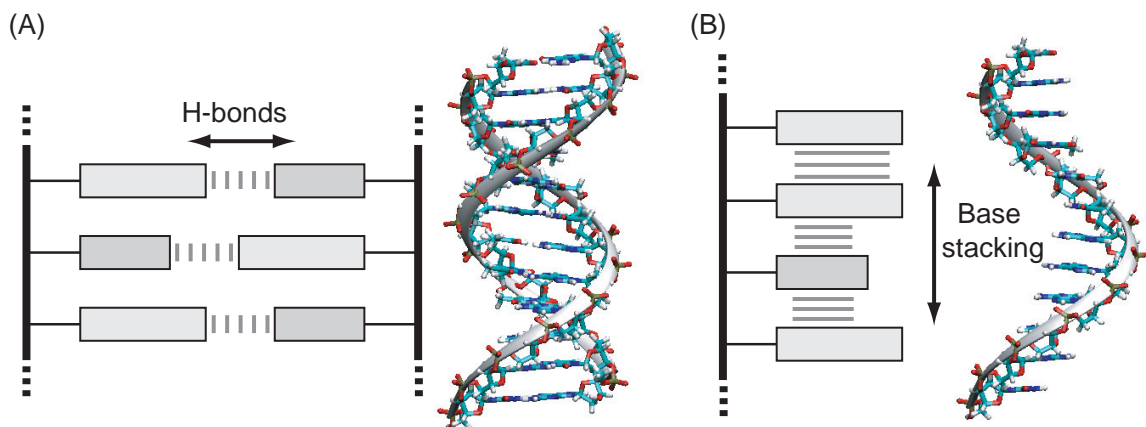


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen in Nukleinsäuren. (A) In der Watson-Crick-Basenpaarung sind Wasserstoffbrücken zwischen den Basen der beiden Stränge vorhanden. Diese „horizontalen“ Wechselwirkungen sind relativ schwach und können reversibel gelöst werden. (B) Wechselwirkungen zwischen den Basen eines Strangs führen zur Stapelung der planaren Basen. Beteiligt sind dabei sowohl elektronische Wechselwirkungen zwischen den Ringsystemen der Basen als auch hydrophobe Wechselwirkungen in wässriger Lösung.

der auf der Stapelung der Basen beruht (siehe Abb. 2.4 B) [Alh97, Luo01, Mil04, Yak06]. Die planaren Basen sind in etwa senkrecht zur Helix-Achse angeordnet. Van der Waals-Kräfte [Tsc82] zwischen den zum Teil aromatischen Ringsystemen führen zu einer Anziehung der Basen und damit zur Stapelung¹¹ [Gup78, Luo01]. Zusätzlich stabilisieren hydrophobe Wechselwirkungen¹² [Cro68] diese Anordnung.

Diese Wechselwirkungen treten auch in einzelsträngigen Nukleinsäuren auf [Buh04]. Der Anteil an helikalen Strukturen mit mehr oder weniger stark ausgebildeter Stapelung hängt dabei stark von der Basen-Sequenz, der Lösungsmittel-Umgebung [Mar01, Cui06] und der Temperatur ab. Nukleinsäuren, die hauptsächlich aus den relativ großen Purin-Basen aufgebaut sind, zeigen in wässriger Lösung zum Beispiel einen hohen Anteil gestapelter Einheiten [Can80b, Mil99].

Sowohl die Struktur von DNA als auch die Struktur der RNA wird von diesen Wechselwirkungen bestimmt. In der RNA führt jedoch die zusätzliche Hydroxy-Gruppe des Zuckers zu sterischen Einschränkungen und verhindert eine B-artige Doppelhelix [Tso66, Ber03a]. Im Gegensatz zur DNA liegt die RNA deshalb meist als Einzelstrang vor. Existieren auf dem RNA-Strang Bereiche komplementärer Basenfolgen, kann es jedoch durch Rückfaltung

¹⁰Wasserstoffbrücken sind etwa 20 - 30 mal schwächer als kovalente Bindungen.

¹¹engl.= base stacking

¹²Die Stapelung führt dazu, dass die mehr polaren Oberflächen dem umgebenden Wasser zugewandt sind.

zur Ausbildung von Watson-Crick-Paarungen innerhalb dieses Strangs kommen. In diesen Bereichen nimmt die RNA [Tin96] ebenso wie DNA-RNA-Hybride eine A-DNA-artige Struktur ein. Die Faltung erlaubt der RNA, definierte, dreidimensionale Strukturen zu bilden, die funktionelle und enzymatische Eigenschaften besitzen (zum Beispiel „ribosomale“ RNA oder „transfer“ RNA) [Alb04]. Sie ist dabei für die Umsetzung der genetischen Information von entscheidender Bedeutung.

Die DNA-Doppelhelix ist ein großes und relativ stabiles Makromolekül das in seiner Basensequenz die Erbinformation in zwei komplementären Strängen speichert. Gleichzeitig zeigen Strukturanalysen, dass die Doppelhelix ein hoch dynamisches System ist. Sie kann in verschiedenen Konformationen vorliegen und Wechselwirkungen mit Proteinen eingehen. Diese Fähigkeiten zeichnen sie für ihre Aufgabe als lesbarer Datenspeicher aus. Die Prozesse der Verdopplung der genetischen Information (Replikation) bei der Zellteilung und die zum Aufbau von Zellen notwendige Umsetzung der Information in Proteine (Transkription und Translation) sind Gegenstand des nächsten Abschnitts.

Verdopplung und Umsetzung der genetischen Information

Mit Ausnahme einiger Viren, die RNA als genetisches Material verwenden (z.B. Tabakmosaikvirus), wird die Erbinformation aller Lebewesen durch DNA-Moleküle repräsentiert. Die DNA besitzt mehrere Eigenschaften, die sie als Speichermedium für die genetische Information auszeichnen. Zum einen ist die Doppelhelix-Struktur mit jeder Basensequenz vereinbar, zum anderen legt die Basenpaarung des einen Strangs die Sequenz des anderen Strangs eindeutig fest. Dadurch kann der zweite Strang zum Beispiel als Vorlage (Matrize) bei der Replikation und bei notwendigen Reparatur-Prozessen dienen. Obwohl die Prinzipien, die der Replikation oder der Realisierung der genetischen Information zugrunde liegen, relativ einfach sind, erfordert die komplette Verdopplung des Genoms oder die abschnittsweise Umsetzung in Proteine viele Einzelschritte und den Einsatz verschiedener Enzyme. Eine detaillierte Ausführung zu diesem Thema findet sich zum Beispiel in [Ber03a, Alb04]. Die zur Replikation und Expression der genetischen Information wesentlichen Schritte werden im Folgenden kurz erläutert.

Replikation

Die Replikation der DNA bei der Zellteilung (Mitose) wird von sogenannten DNA-Polymerasen bewerkstelligt. Dazu wird die Doppelhelix mit Hilfe verschiedener Proteine lokal aufgetrennt und stabilisiert. DNA-Polymerasen binden an einen der Stränge und katalysieren den Aufbau einer zur vorliegenden Basensequenz komplementären Polynukleotidkette. Diese Enzyme sind außerordentlich spezifisch und replizieren die DNA mit einer erstaunlich geringen Fehlerquote. Zum Beispiel wird die DNA-Sequenz in Eukaryonten mit weniger als einem Fehler auf eine Milliarde korrekt eingefügter Nukleotide kopiert. Dafür sind verschiedene Korrekturmechanismen notwendig, von denen einige in Abschnitt 2.2 besprochen werden.

Transkription und Translation

Die Umsetzung der genetischen Information in ein funktionsfähiges Protein erfordert zwei Schritte. Die Transkription der DNA-Information in eine lesbare RNA-Sequenz und die Translation dieser Sequenz in eine Aminosäurekette. Die entsprechenden Prozesse sind in Abb. 2.5 skizziert. Bei dieser stark vereinfachten Darstellung werden Unterschiede zwischen Prokaryon-

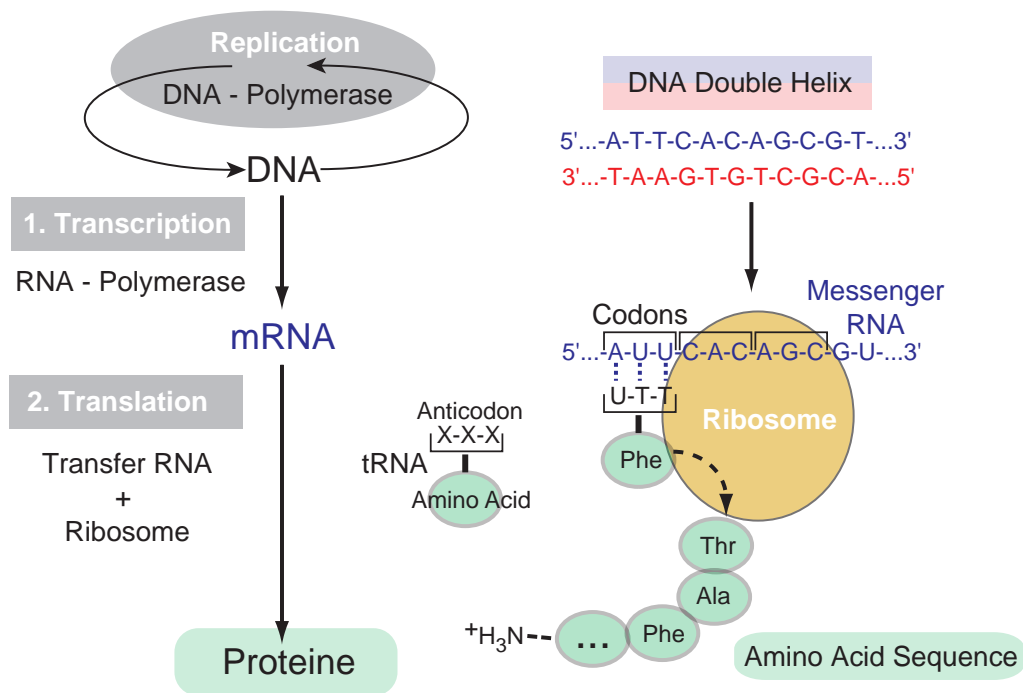


Abb. 2.5: Vereinfachte Darstellung der Realisierung der genetischen Information. DNA-Polymerasen erlauben die Replikation des Genoms. Die Umsetzung der genetischen Information in Proteine erfolgt in zwei Schritten. (1. Transkription) Zunächst wird die Sequenz der DNA, die ein Protein kodiert, in eine Messenger-RNA (mRNA) umgesetzt. (2. Translation) Die mRNA dient anschließend als Matrize für den Aufbau von Proteinen, die aus Aminosäuren aufgebaut sind. Dabei wird ein Drei-Buchstaben-Code verwendet. Ein Basen-Triplett kodiert eine von 20 verschiedenen Aminosäuren und wird als Codon bezeichnet. Transfer-RNA-Moleküle (tRNA) sind mit einer Anti-Codon-Sequenz ausgerüstet und tragen die für dieses Codon spezifische Aminosäure. Im Bild sind die Aminosäuren grün hinterlegt und mit den entsprechenden Abkürzungen symbolisiert. Die tRNA-Moleküle binden an den mRNA-Strang und geben in Ribosomen die Aminosäuren zum Aufbau des Proteins frei. In der Darstellung werden Unterschiede zwischen Eukaryonten und Prokaryonten sowie weitere Prozessierungen der mRNA vernachlässigt.

ten und Eukaryonten vernachlässigt. Während in Prokaryonten die Transkription und Translation eng miteinander verknüpft sind, finden in Eukaryonten Translation und Transkription in verschiedenen Zellkompartimenten statt. Dabei erlaubt die räumliche und zeitliche Trennung in Eukaryonten eine Regulation der Genexpression, die zur Vielfalt der eukaryontischen Formen beiträgt. Ein DNA-Abschnitt, der die Information für ein bestimmtes Protein enthält, wird durch RNA-Polymerasen in eine Boten-Ribonucleinsäure ("messenger RNA", mRNA) umgeschrieben. Dabei dient der komplementäre Basenstrang als Matrize. Anschließend wird die Information auf der mRNA in eine Abfolge von Aminosäuren übersetzt. Zur Vereinfachung werden in der Abbildung weitere Prozessierungen und Umwandlungen der Primärtranskripte zur reifen mRNA vernachlässigt. Drei aufeinanderfolgende Basen auf der mRNA bilden ein sogenanntes Codon in einem nicht überlappenden Code¹³. Diese Codons stehen für eine von

¹³Bei vier verschiedenen Basen ergeben sich in einem Drei-Buchstaben-Code 64 Kombinationsmöglichkeiten. Der genetische Code ist jedoch degeneriert, so dass verschiedene Kombinationen für mehr als nur eine von 20 zur Auswahl stehende Aminosäuren verwendet werden [Ber03a].

20 verschiedenen Aminosäuren. Die Regeln, nach denen die Umsetzung abläuft, wurden in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts entschlüsselt [Len61, Spe62b, Spe62a, Mat62]. Experimente ergaben, dass 61 der möglichen Triplets für Aminosäuren verwendet werden und drei das Kettenende und damit den Abbruch der Proteinsynthese (Stopp-Codons) beschreiben. Die für den Aufbau des Proteins nötigen Aminosäuren sind an eine bestimmte Klasse von Ribonukleinsäuren gebunden ("transfer RNA", tRNA), die das Anti-Codon zum Drei-Buchstaben-Kode der mRNA besitzen und mit der dazugehörigen Aminosäure bestückt sind. Sie binden über das Anti-Codon an die mRNA und geben die Aminosäure zum Aufbau der Polypeptidkette frei [Alb04]. Die Umgebung für diesen Prozess bieten sogenannte Ribosomen, die eine komplexe Anordnung aus ribosomaler RNA (rRNA) und vielen Proteinen darstellen.

Die Aminosäurenkette nimmt unter physiologischen Bedingungen eine definierte, dreidimensionale Struktur ein (Prozess der Proteinfaltung), in der das Protein eine bestimmte Funktion erfüllen kann. Kommt es jedoch in einem Bereich des Genoms zu einer Veränderung der Basensequenz (Mutation), kann dies zum Aufbau eines veränderten Proteins führen [Smi62]. Ein Fehler, der fatale Folgen für den Organismus haben kann.

2.2 Schäden, Mutationen und Reparatur

„We totally missed the possible role of ... repair. I later came to realize that DNA is so precious that probably many distinct repair mechanisms would exist. Nowadays one could hardly discuss mutation without considering repair at the same time.“

Francis Crick, The Double Helix: A Personal View, [Cri74]

Das Überleben eines Organismus hängt von der Stabilität seiner Erbinformation ab. Treten Mutationen¹⁴ in den Keimzellen auf, können diese zwar vererbt werden, setzen sich jedoch meist nicht weiter fort, da das betroffene Individuum entweder nicht ins fortpflanzungsfähige Alter kommt, oder seine Fortpflanzungsfähigkeit vermindert ist [NV06]. Dies führt zu einer erstaunlich hohen Stabilität der DNA innerhalb einer Spezies [Dra69, Alb04]. Dieser Stabilität des Erbgutes steht jedoch die Tatsache gegenüber, dass vor allem die somatischen Zellen¹⁵ ständig schädigenden Einflüssen ausgesetzt sind. Abbildung 2.6 gibt einen Überblick zu bekannten Faktoren, die zu Schäden in der DNA führen. Vor allem ultraviolettes Licht und ein breites Spektrum chemischer Verbindungen sind für ihre mutagene und karzinogene Wirkung bekannt. Oft bilden sich Addukte mit der DNA, die die Transkription und Replikation blockieren [Gni96]. Entfallen dadurch die Kontrollmechanismen der Zellteilung kann dies zur Entstehung schwerer Krankheiten wie Krebs führen [Pon01]. Untersucht man die Schadenshäufigkeit von Mutationsprozessen wird klar, dass ohne effiziente Reparaturmechanismen, Leben in Form von hoch differenzierten Organismen nicht möglich wäre [Hoe01, Sch03a]. Sowohl die Schadensbildung und ihre Folgen als auch die in der Natur eingesetzten Reparaturmechanismen werden im Folgenden beschrieben.

¹⁴von mutare (lat.) = ändern, tauschen; Veränderung der Abfolge der Nukleotidbausteine oder Veränderung der Chromosomenzahl.

¹⁵Körperzellen, deren genetische Information nicht an nachfolgende Generationen weitergegeben werden.

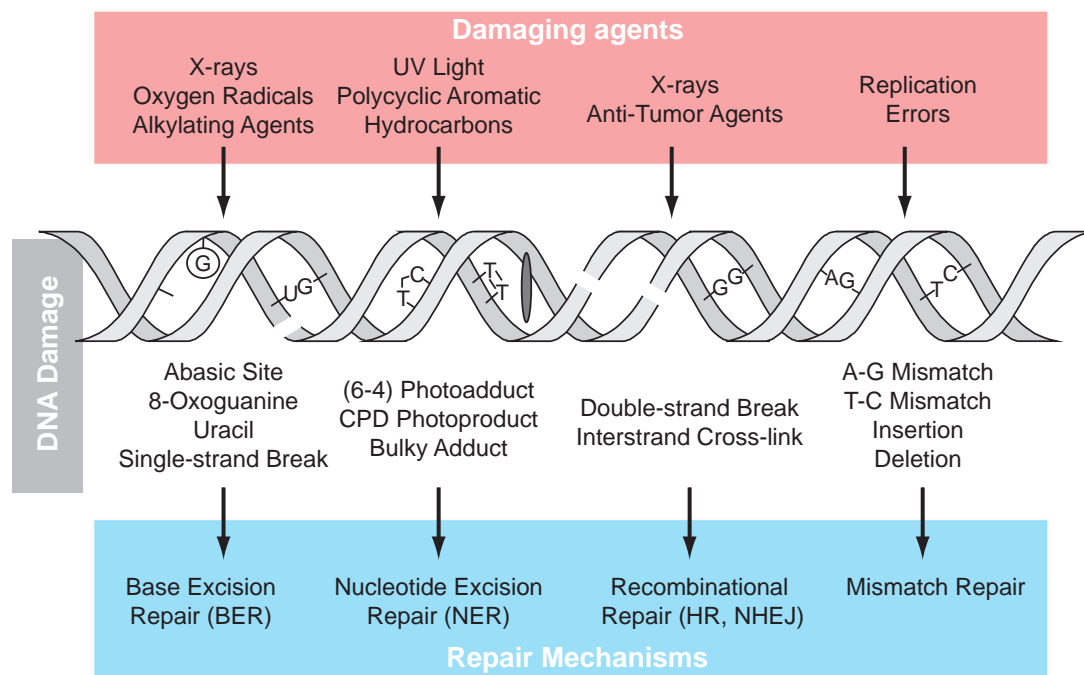


Abb. 2.6: Die Erbinformation ist einer Vielzahl schädlicher Einflüsse ausgesetzt (oben), die zu einer Reihe von DNA-Schäden führen können (mitte). Für die meisten dieser Schäden sind jedoch Reparaturmechanismen vorgesehen (unten). Details zu den Schäden und Reparaturmechanismen finden sich im Text. Abbildung nach [Hoe01].

2.2.1 Schäden durch Stoffwechselprozesse und Chemikalien

Der biologischen Stabilität der DNA steht keine entsprechende chemische Stabilität gegenüber. Einige Bindungen in der DNA sind relativ labil. Bereits bei normaler Körpertemperatur kommt es zum Beispiel zur thermischen Spaltung der N-glykosidischen Bindung (siehe Abbildung 2.1) von Purinbasen [Lin72b]. Bei diesen Depurinierungen gehen bis zu 10000 Purin-Basen [Nak98] pro Tag und Zelle des Menschen verloren. Die daraus resultierenden abasischen Stellen sind labil und können zu Einzelstrangbrüchen führen [Lin72a]. Eine ebenfalls häufig

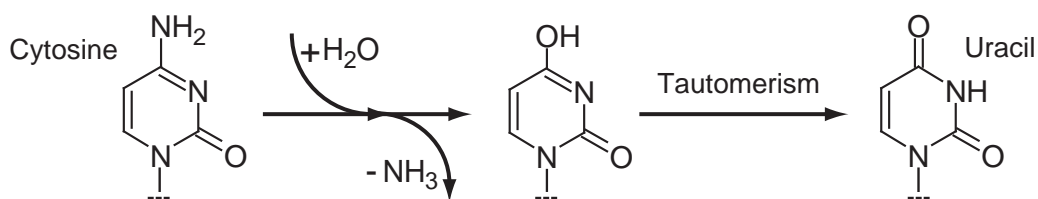


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der Desaminierung von Cytosin. Bei der hydrolytischen Reaktion kommt es zu einem Austausch der NH_2 -Gruppe der Base durch eine OH -Gruppe. Eine tautomere Umlagerung im Zwischenzustand führt schließlich zur Bildung von Uracil.

auf tretende hydrolytische Reaktion ist die „Desaminierung“ von Basen. Dieser Schaden tritt mit einer Rate von etwa 100 bis 500 mal pro Tag und Zelle auf und ist in Abbildung 2.7 für die Base Cytosin schematisch dargestellt [Fre90, Sch03a]. Bei dieser Reaktion kommt es zu einem Austausch der NH_2 -Gruppe der Basen durch eine OH -Gruppe. In Cytosin-Basen kann es nach

einer tautomeren Umlagerung¹⁶ anschließend zur Umwandlung in eine Uracil-Base kommen [Sha66]. Das entstandene Uracil führt bei der Replikation dieser Stelle durch eine DNA-Polymerase zum Einbau einer Adenin-Base in einem der Tochterstränge. Die Desaminierung von Cytosin führt dadurch zu einer Punktmutation, bei der ein CG-Basenpaar durch ein AT-Paar ersetzt wird und ist damit potentiell mutagen.

Stoffwechselprozesse

Viele Mutationen werden in der DNA durch den normalen Stoffwechsel der Zellen [Lin93] erzeugt. Dabei bilden sich in der Atmungskette neben Wasser viele reaktionsfähige Stoffwechselprodukte. Unter anderem entstehen bei der Reduktion von Sauerstoff in den Mitochondrien reaktive Sauerstoff- und Hydroxyl-Radikale, die in der DNA zu Strangbrüchen führen können [Ric88, Ame83], wenn sie nicht von Radikalfängern wie zum Beispiel Vitamin E (alpha-Tocopherol) oder Vitamin C (Ascorbat) abgefangen werden. Andere Reaktionen haben Veränderungen der Basen zur Folge, die zu Fehlpaarungen und Mutationen führen können. Es wurden bisher mehr als 100 unterschiedliche Modifikationen an DNA-Molekülen durch oxidative Prozesse identifiziert [Lin93, Bur98, Cad99, LG06].

Chemikalien

Der Mensch ist einer zunehmend großen Zahl an chemischen Substanzen ausgesetzt, deren karzinogene Wirkung nachgewiesen wurde. Bei vielen chemischen Karzinogenen handelt es sich um organische Moleküle, wie zum Beispiel polyzyklische aromatische Moleküle in Zigarettenrauch oder Autoabgasen [Sin82, Fer91, LG06]. Gemeinsam ist diesen organischen Stoffen ihr elektrophiler Charakter. Er bewirkt, dass sich diese Stoffe in elektronenreichen Zentren und damit an bestimmten Positionen der Nuklein-Basen anlagern oder zwischen den Basen-Paaren der Helix (Interkalation) anordnen. Zu besonders gefährlichen Substanzen gehören halogenhaltige Substanzen und Nitroso-Verbindungen. Diese Chemikalien bilden Addukte mit der DNA und beeinträchtigen die Replikation und Umsetzung der DNA. Bei der Replikation kann es zum Beispiel im Bereich der geschädigten DNA zu Mutationen durch Fehlstellen (Deletionen) oder dem Einbau zusätzlicher Basen (Insertionen) in den DNA-Tochtersträngen kommen [Ber03a, LG06].

2.2.2 Photoinduzierte Schäden

Stoffwechselprozesse und chemische Substanzen sind für eine Vielzahl der täglich auftretenden Schäden an der DNA verantwortlich. Ein nicht zu vernachlässigender Teil der an DNA und anderen Biomolekülen induzierten Schäden ist jedoch auf den energiereichen, ultravioletten Anteil des Sonnenlichtes (UV-Licht) zurückzuführen [Byk98, LC01]. Wie bereits in der Einleitung erläutert, kann der ultraviolette Anteil des Sonnenspektrums in drei Bereiche unterteilt werden. Die Erdatmosphäre absorbiert den extrem schädlichen UVC-Anteil (100 - 280 nm), lässt jedoch einen Teil der UVB-Strahlung (280 - 315 nm) passieren, der zusammen mit der UVA-Strahlung (315 - 400 nm) für die Entstehung von Hautkrebs verantwortlich gemacht

¹⁶Umwandlung von isomeren Formen, die sich in der Position der Wasserstoffatome und Doppelbindungen unterscheiden.

wird [Set93, dG01]. Die UV-induzierte Schadensbildung in DNA-Molekülen kann entweder direkt durch Absorption der UVB-Strahlung oder indirekt durch reaktive Spezies erfolgen [Rav01, Nis06]. Zu den indirekten Prozessen gehört zum Beispiel die kovalente Verknüpfung eines DNA-bindenden Moleküls mit der DNA [Gni96] oder oxidative Schäden, wenn die Absorption der UV-Strahlung durch Photosensibilisatoren erfolgt [Cad97]. Es können aber auch freie Radikale und andere reaktive Intermediate [Rav01] entstehen, die zu Strangbrüchen führen können. Die mit Abstand häufigsten Schäden werden jedoch direkt durch die Absorption von UVB-Strahlung erzeugt und bilden sich in Bereichen der DNA mit benachbarten Pyrimidin-Basen [Dou01]. Zwischen diesen Basen können sich Photoprodukte bilden, die durch eine kovalente Verknüpfung der beiden Pyrimidine entstehen (Dimer-Bildung). Zu diesen gehören die Bildung von Zyklobutan Pyrimidin Dimeren (CPD) und die Bildung von Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon Addukten ((6-4) Photoprodukt). Beide Photoschäden werden im Folgenden näher beschrieben und deren mögliche mutagene Wirkung diskutiert [Smi96].

Zyklobutan Pyrimidin Dimer

Die häufigsten direkt durch UVB-Strahlung in DNA gebildeten Schäden sind Zyklobutan Pyrimidin Dimere [Dou00]. Eine schematische Darstellung der Reaktion zwischen zwei Thymin-Basen bzw. zwischen zwei Cytosin-Basen ist in Abbildung 2.8 zu sehen. Bei diesen kommt es nach Absorption eines UV-Photons zu einer Addition zwischen der C5=C6 Doppelbindungen der einen und der benachbarten Pyrimidin-Base. Dabei entsteht ein Zyklobutan-Ring (Vierring). Prinzipiell sind in Polynukleotiden zwei isomere Formen möglich, in der die Basen entweder eine „*cis-syn*“ oder eine „*trans-syn*“ Konformation einnehmen. Der Anteil der *trans-syn*-Isomere ist allerdings in einzelsträngiger DNA sehr gering. In doppelsträngiger DNA wird aufgrund sterischer Einschränkungen fast ausschließlich das *cis-syn* Dimer gebildet [Fri04]. Die Ausbeuten für CPD-Schäden hängen stark von den beteiligten Pyrimidin-Basen ab. Am höchsten sind die Raten zwischen benachbarten Thymin-Basen. Dimere zwischen Cytosin und Thymin bzw. zwischen zwei Cytosin Basen werden mit geringerer Häufigkeit gebildet. Abbildung 2.9 zeigt eine Analyse zur Schadenshäufigkeit der verschiedenen Pyrimidin-Kombinationen nach UV-Belichtung von Hautzellen [Dou01]. Die relativen Verhältnisse für die unterschiedlichen Pyrimidin-Dimere ergeben sich zu: TT > TC > CT > CC, mit einem Verhältnis von 2:1:0,4:0,1 [Fri04]. Im Fall der Cytosin enthaltenden Dimer-Schäden ist, wie in Abbildung 2.8 B zu sehen, eine Folgereaktion möglich die potentiell mutagen wirken kann. In diesen Schäden ist nämlich die Rate für eine Hydrolyse und Desaminierung der Cytosin-Base, die zu einer Umwandlung in ein Uracil-Dimer führt, deutlich erhöht [Cad90, Bar95, Tu98].

Mutagene Wirkung der CPD-Schäden

Der photochemische Mechanismus der CPD-Bildung in DNA-Molekülen ist eine der zentralen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit. Während auf die photophysikalischen und photochemischen Grundlagen dieser Reaktion in Abschnitt 2.3.3 ausführlich eingegangen wird, soll im Folgenden kurz auf die möglichen mutagenen Folgen dieser Schäden eingegangen werden.

CPD-Schäden zwischen Thymin-Basen (siehe Abbildung 2.8 A) sind zunächst nicht mutagen. Sie führen jedoch, wie auch die anderen CPD-Schäden, zu einer teilweisen oder vollständigen Blockade von Polymerasen [Tho93], die für die Replikation oder die Transkription der Erbinformation in den Zellen verantwortlich sind. Werden diese Schäden nicht repariert (auf

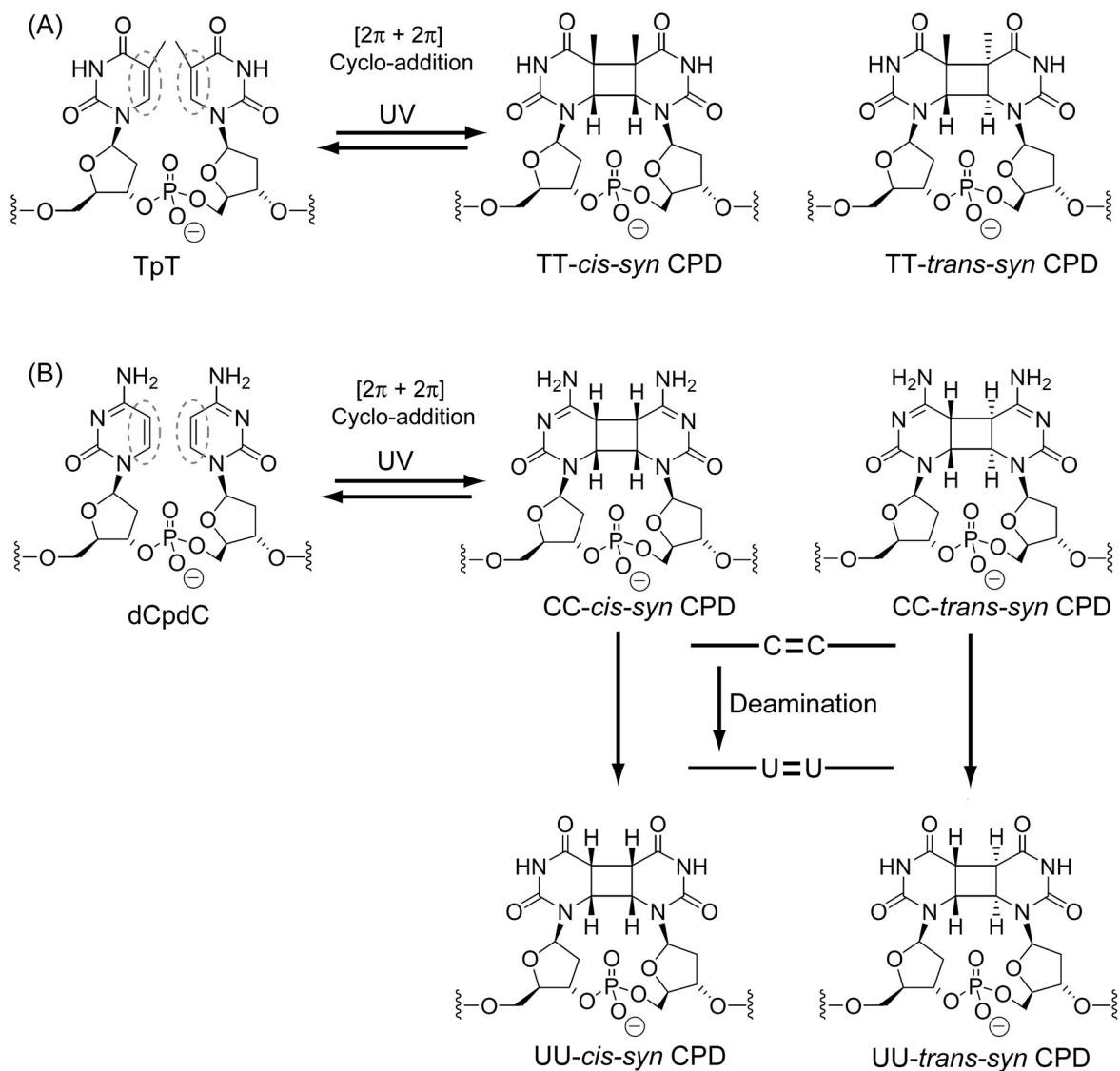


Abb. 2.8: Schematische Darstellung der photoinduzierten Bildung von Zyklobutan Pyrimidin Dimeren (CPD) zwischen Thymin-Basen (A) und Cytosin-Basen (B). Nach UV-Absorption kommt es zur Bildung eines Vierrings (Zyklobutan-Ring) im Bereich der beiden C5=C6 Doppelbindungen benachbarter Pyrimidin-Basen. In einzelsträngiger DNA kann neben dem *cis-syn* Isomer zu einem kleinen Anteil auch das *trans-syn Isomer* gebildet werden [Ben68]. In der Doppelhelix wird jedoch aufgrund sterischer Wechselwirkungen fast ausschließlich das *cis-syn* Dimer gebildet. Während die Dimere zwischen Thymin-Basen stabil sind kann es im Fall von Cytosin-Basen (B) zur Desaminierung dieser Basen und zur Bildung eines Uracil-Dimers kommen (\rightarrow Mutation).

mögliche Reparatur-Prozesse wird in Abschnitt 2.2.4 eingegangen) kann das zum Tod der Zelle (Apoptose) führen. In diesen Not-Situationen (SOS-Situation der Zelle), können diese Schäden jedoch auch durch eine „Bypass-Replikation“ prozessiert werden [Tay90, Wal95]. Dabei wird der DNA-Strang durch bestimmte Polymerasen repliziert ohne den Schaden zu beheben. An der Stelle des Schadens kann es dadurch im Tochterstrang zum Einbau nicht komplementärer Basen kommen, die zu $T \rightarrow A$ und $T \rightarrow C$ Punktmutationen führen. In vivo werden etwa 7 %

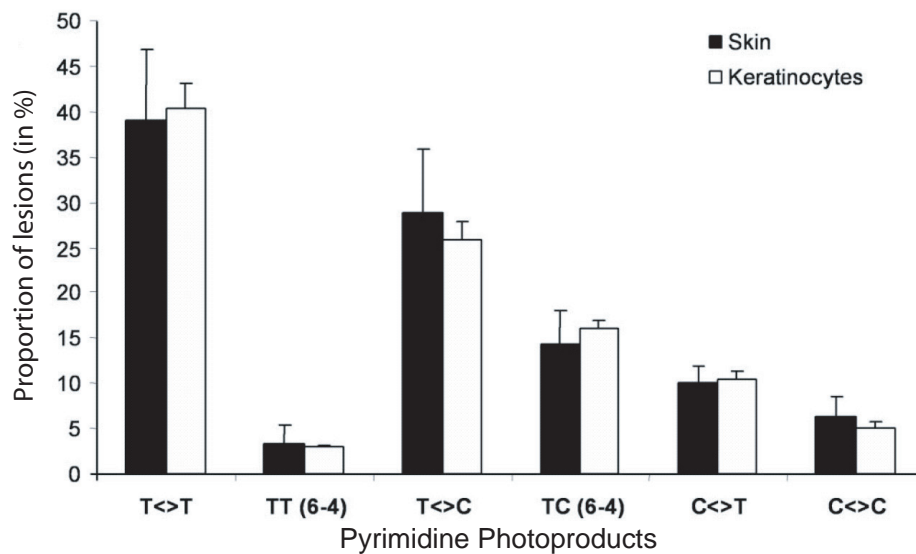


Abb. 2.9: Vergleich der prozentualen Anteile für die verschiedenen Pyrimidin-Photoprodukte in menschlicher Haut. Sowohl in Hautzellen allgemein als auch in den Keratinocyten, bestimmten Zellen in der Epidermis, zeigen sich sehr ähnliche Häufigkeiten. Übernommen aus [Mou06]. Copyright 2006 National Academy of Sciences.

dieser Fälle falsch prozessiert [Fri04]. Eine gute Zusammenfassung dieser Prozesse findet sich zum Beispiel in [Liv01].

Für die mutagene Wirkung von Dimer-Schäden, an denen Cytosin beteiligt ist, gibt es neben der gerade beschriebenen „Bypass-Replikation“ zusätzliche Fehlerquellen, die ein Hauptgrund für beobachtete C → T und CC → TT Mutationen nach UV-Belichtung sein können [Fri04]. Zwei mögliche Mutations-Wege sind in Abbildung 2.10 für ein Cytosin-Dimer skizziert. Zunächst paart Cytosin im Doppelstrang mit Guanin. Nach der Schadensbildung kann die DNA entweder repariert werden oder einen der beiden Mutations-Pfade einschlagen. Im ersten Fall spielt die in Cytosin auftretende Desaminierung die entscheidende Rolle [Tu98]. Wie bereits in Abbildung 2.8 dargestellt, kommt es in Cytosin-Dimeren zu einer beschleunigten Hydrolyse und Desaminierung, die zur Umwandlung des Cytosin-Dimeres in einen Uracil enthaltenden Dimer-Schaden (C=C → U=U) führt. Bei der Replikation dieses Abschnittes der DNA verwenden Polymerasen jetzt jedoch Adenin als komplementäre Base. Dadurch kommt es im Tochterstrang zu einer Doppelmutation (U=U:AA) in der Sequenz. Der Einsatz von Reparaturmechanismen führt anschließend zum Einbau der zu Adenin komplementären Thymin-Basen. Der zweite Mutations-Weg beruht auf der Tautomerisierung des Cytosin-Dimer-Schadens. Während das Cytosin-Dimer zunächst in seiner Amino-Form vorliegt, kann es durch eine tautomere Umlagerung in ein sogenanntes E-Imino Tautomer übergehen. Dieses Tautomer besitzt ein zu Uracil und Thymin äquivalentes Basenpaarungs-Muster und veranlasst eine Polymerase zum Einbau eines Adenins im Tochterstrang [Jia93]. Experimente deuten darauf hin, dass CPD-Schäden für den Großteil der durch UVB-Strahlung erzeugten Mutationen in Säugetierzellen verantwortlich sind [You01].

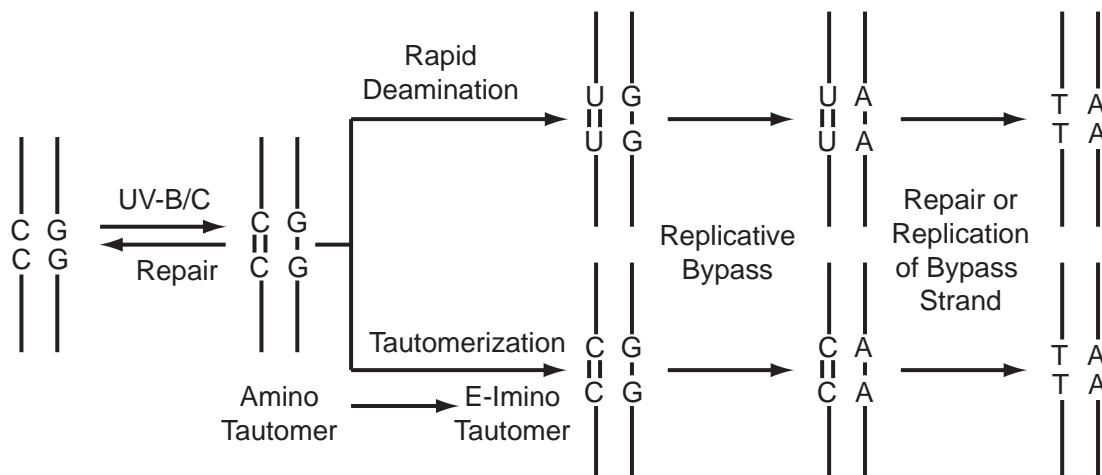


Abb. 2.10: Schematische Darstellung der Reaktionswege, die zu Mutationen nach der Bildung von Cytosin-Dimer-Schäden führen können. Sowohl die Desaminierung von Cytosin-Dimeren (C=C) als auch die Bypass-Replikation einer bestimmten tautomeren Form (E-imino Tautomer) der Cytosin-Basen können Punkt-Mutationen (C → T) und Tandem-Mutationen (CC → TT) in DNA-Sequenzen nach UV-Belichtung erklären.

(6-4) Photoaddukt

Das (6-4) Photoprodukt tritt ebenfalls bei Belichtung von DNA im UVB-Bereich auf. Eine schematische Darstellung der Reaktion zwischen zwei Thymin-Basen ist in Abbildung 2.11 gezeigt. Man nimmt an, dass bei der Reaktion zunächst eine Paterno-Büchi Reaktion stattfindet. Bei dieser handelt es sich um eine gemischte [2+2]-Zykloaddition zwischen der C5=C6 Doppelbindung der einen und der C4=O Carbonylgruppe der zweiten Pyrimidin-Base [Kle95]. Als Produkt entsteht daraus ein Oxetan, das jedoch bei Raumtemperatur nicht stabil ist und über eine Ringöffnungs-Reaktion in das (6-4) Photoprodukt zerfällt. Belichtung des (6-4) Photoprodukts mit Wellenlängen über 300 nm führt in einer sekundären Photoreaktion zum Dewar Isomer. Diese Folgereaktion ist jedoch bisher für DNA *in vivo* noch nicht ausreichend charakterisiert [Fri04]. Das liegt zum Teil auch daran, dass die Raten für diese Photoreaktion im Vergleich zu den CPD-Schäden deutlich (siehe Abbildung 2.9) geringer sind [Rav01, Dou01]. Auch sind hier die relativen Häufigkeiten stark von der Basensequenz abhängig. Für den (6-4) Schaden ergibt sich eine deutliche Bevorzugung für die 5'-TC-3' Sequenzen: TC > TT > CC > CT, mit einem Verhältnis von 1:0,2:0,1:0,01 [Fri04].

Mutagene Wirkung der (6-4) Photoaddukte

Im Gegensatz zu den Thymin-Dimer-Schäden sind die (6-4) Photoprodukte hoch mutagen. Auch diese Schäden führen zu Problemen bei der Replikation der DNA, die zu Mutationen führen können [Liv01]. Ein entsprechendes Mutations-Schema für diese Art von Schäden zwischen zwei benachbarten Thymin-Basen ist in Abbildung 2.12 gezeigt. Wird der Schaden nicht repariert, paart das 3'-Thymin dieses Schadens in einer Bypass-Replikation bevorzugt mit einem Guanin, das 5'-Thymin jedoch mit einem Adenin. Wird der Schaden jetzt repariert, ist eine T → C Punktmutation entstanden. Entsprechend wird bei einer weiteren Replikation einer der Tochterstränge diese Punktmutation besitzen. (6-4) Schäden in denen eine Cytosin-Base enthalten ist können zusätzlich über die Desaminierung des Cytosins zu C → T Mutationen

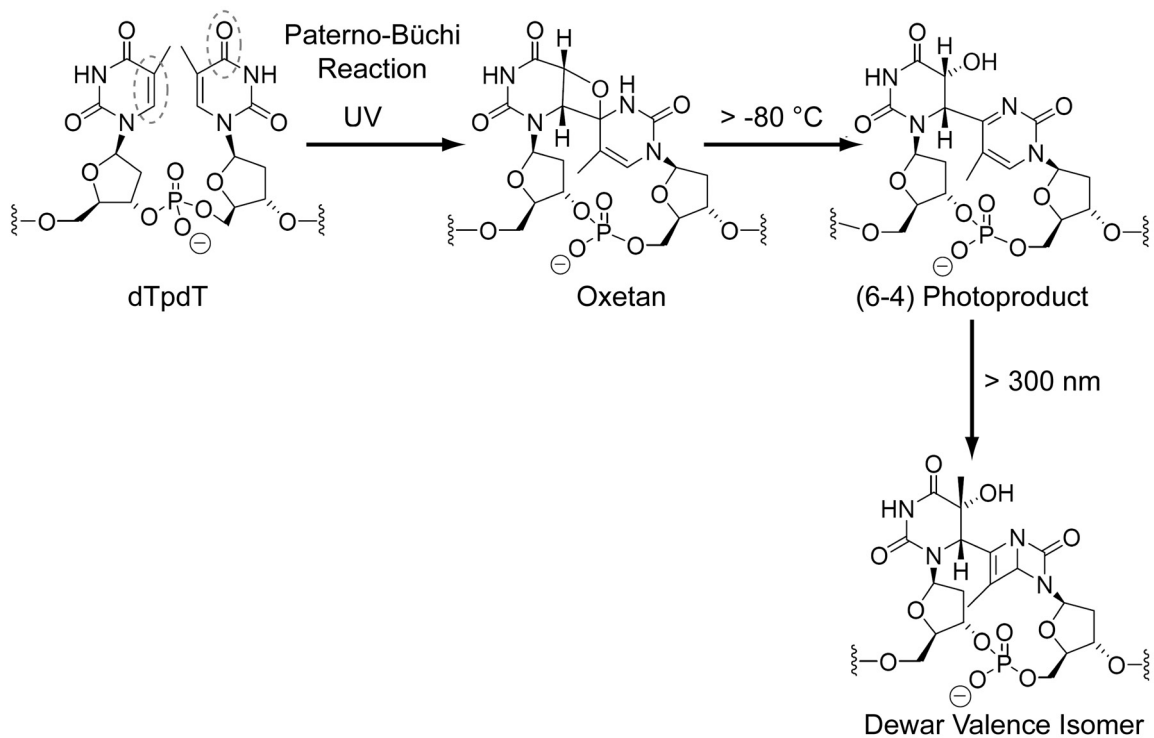


Abb. 2.11: Schematische Darstellung der durch UV-Strahlung verursachten Bildung des (6-4) Photoschadens. Die Paterno-Büchi-Reaktion zwischen Thymin-Basen führt zur Bildung eines Oxetan-Intermediats, das bei Raumtemperatur in das (6-4) Photoprodukt übergeht. Bei Belichtung dieses Produkts mit Wellenlängen größer 300 nm bildet sich daraus das Dewar Valenz Isomer.

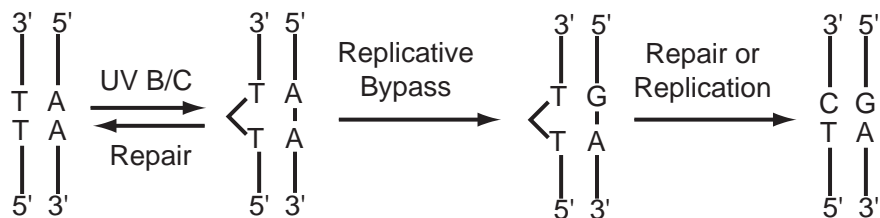


Abb. 2.12: Schematische Darstellung einer möglichen Mutation nach der Bildung von (6-4) Photoschäden. Die modifizierte Basenpaarungen im Bereich des (6-4) Photoschadens kann bei der Replikation der Doppelhelix zur Bildung von Punktmutationen (T → C) im Bereich des 3'-Thymins führen.

führen [Fri04]. Das Wissen über die genaue Struktur und mögliche Mutationswege der Dewar Schäden ist noch relativ gering [Fri04]. Bisher ist das Dewar Valenz Isomer bei der Belichtung von isolierter DNA oder von DNA in Zellen nur in CC-Sequenzen in merklichen Mengen nachgewiesen worden [Dou01]. Reparaturenzyme scheinen diese Schäden als eine abasische Stelle wahrzunehmen. Polymerasen die über diese Stelle lesen bauen bevorzugt Adenin ein und erzeugen dadurch möglicherweise eine Mutation [Lee00]. Andere Studien deuten darauf hin, dass es für den Fall eines Dewar-Schadens zwischen Thymin-Basen auch zu einer 3'-T → C Mutation kommen kann. Auch Doppelmutationen werden nicht ausgeschlossen [Smi96].

Weitere Photoschäden

Eine Besonderheit im Bezug auf Überleben unter extremen Umweltbedingungen sind Bakterien, die Sporen bilden können. Sporen sind sehr widerstandsfähige und in dieser Form inaktive „Familienmitglieder“, die auch unter ungünstigen Bedingungen überleben können. Werden *Bacillus Subtilis* Sporen mit UV-Licht bestrahlt, entstehen zwischen den Thymin-Basen der DNA anstelle der oben vorgestellten Thymin-Dimere hauptsächlich Strukturen der in Abbildung 2.13 dargestellten Form. Nach UVB-Bestrahlung kommt es zur Addition der

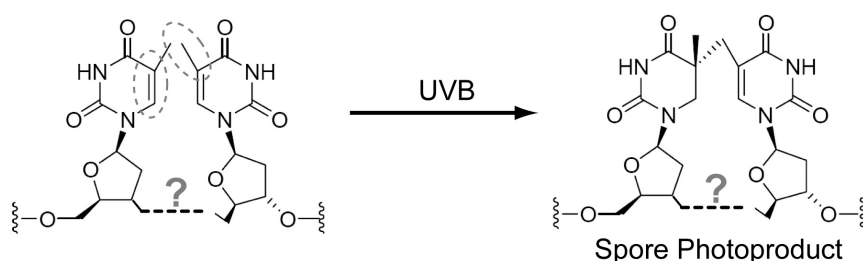


Abb. 2.13: Schematische Darstellung zur Bildung des Sporen Photoprodukts. Bei dieser Reaktion kommt es nach UV-Belichtung zu einer kovalenten Verknüpfung zwischen der Methyl-Gruppe des einen und des C5-Atoms der zweiten Thymin-Base. Diese Reaktionen werden nur in Sporen und in dehydratisierter DNA beobachtet. Der genaue Mechanismus der Reaktion ist noch wenig erforscht, dabei wird sowohl eine Bildung zwischen benachbarten Basen eines Strangs als auch eine Verknüpfung zwischen zwei Strängen diskutiert.

Methyl-Gruppe einer Thymin-Base an die C5-Position einer zweiten Thymin-Base und der Bildung eines 5,6-Dihydro-5-(α -Thyminy)Thymin [Var70, Cad92]. Über den genauen Reaktionsmechanismus ist bisher noch sehr wenig bekannt. Zum Beispiel könnte es sein, dass diese Schäden nicht zwischen benachbarten Basen in einem Strang sondern zwischen zwei Strängen gebildet werden [Fri04]. Diese sogenannten „Sporen Photoprodukte“ entstehen nur bei der Bestrahlung von Sporen oder DNA, die in hydratisierter Form vorliegt [Cad92]. In Sporen ist die DNA dicht gepackt und an bestimmte Proteine (SASP-Proteine) gebunden, die bei der Sporulation¹⁷ exprimiert werden. In dieser Form ist die DNA stark dehydratisiert und liegt in einer A-DNA-ähnlichen Konformation vor [Set92]. Offenbar hat neben der Basen-Sequenz auch die Konformation der DNA einen Einfluss auf die Art der Schäden [Des08].

UV-Strahlung führt in der DNA von Zellen zu einer ganzen Reihe unterschiedlicher Photoprodukte [Cad92]. Dazu gehören neben den bisher besprochenen Schäden an Di-Pyrimidin-Positionen in der DNA auch Pyrimidin-Hydrate einzelner Cytosin-Basen (5,6-Dihydro-6-Hydroxy-Cytosin), die über Desaminierung und Dehydratisierung zu Thymin und Uracil weiterreagieren können. Weitere Photoprodukte wurden auch zwischen Thymin- und Adenin-Basen oder zwei Adenin-Basen nachgewiesen [Poe73, Wan01]. Allerdings ist deren biologische Signifikanz noch nicht endgültig geklärt. Die biologische Bedeutung von CPD- und (6-4)-Photoschäden ist dagegen eindeutig belegt. Im nächsten Abschnitt werden deren Auswirkungen in Bezug auf die Entstehung von Krebs zusammengefasst.

¹⁷Die Sporulation beschreibt den Prozess der Sporenbildung bei Mikroorganismen wie Bakterien und Pilzen.

2.2.3 Biologische Bedeutung der Photoschäden

Vor dem Hintergrund des Klimawandels und erhöhten UV-Belastungen in der Umwelt weisen Studien über den Einfluss von UV-Strahlung auf verschiedene Ökosysteme eindeutig darauf hin, dass hohe UV-Dosen zu Veränderungen und Schäden in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen führen können [Prz99, McK03, dG03, And06, Hae07, Nor07]. Wie in der Einleitung dieser Arbeit eingehend erläutert, sind dafür zu einem großen Teil die durch UV-Strahlung induzierten Photoschäden in der DNA verantwortlich. Der Zusammenhang zwischen diesen Photoschäden und der Entstehung von Hautkrebs wird im Folgenden näher erläutert [dG99].

Bedeutung der Pyrimidin-Schäden bei der Krebsentstehung

Die Mutationen durch UVB-Strahlung werden klar durch die Bildung von CPD Schäden und (6-4) Photoaddukten dominiert. Sie beeinflussen die Replikation und Transkription der DNA und können zur Einschränkung der Funktionsfähigkeit oder Entartung von Zellen führen. Dabei haben die Cytosin enthaltenden Schäden die größte Mutationsrate, aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber hydrolytischer Desaminierung. Das Wirkungsspektrum der Photokarzinogenese wird weitgehend demjenigen der Erythem-Reaktion gleichgesetzt und zeigt deutliche Zusammenhänge zwischen der UV-Exposition und der Rate an Photoschäden. Zum Beispiel zeigt ein Vergleich des Wirkungsspektrums für die Entstehung des Plattenepithelkarzinoms mit dem Wirkungsspektrum für die Induktion von CPD-Schäden (siehe Abbildung 1.3 B) eine hohe Übereinstimmung [dG99]. Wie lassen sich die Zusammenhänge zwischen der Bildung von Pyrimidin-Dimeren und damit verbundenen Mutationen mit der Entstehung von Tumoren erklären?

Zellen haben normalerweise eine beschränkte Lebensdauer. Menschliche Bindegewebszellen teilen sich zum Beispiel maximal etwa 50-mal, andere Zellen dagegen weniger häufig. Der Prozess der Zellteilung (Mitose) wird durch stimulierende Wachstumsfaktoren ausgelöst, während andere Faktoren den Prozess der Zellteilung hemmen. Diese Wechselwirkung ermöglicht die Unterordnung von Zellen in das umgebende Gewebe. Treten Mutationen in Bereichen der DNA auf, die Kontrollmechanismen bei der Selbstregulierung des Zellwachstums und der Zellteilung kodieren, kann es zu unkontrolliertem Zellwachstum und zur Entstehung von Krebs kommen [Pon01]. Zwei Arten von Genen kodieren Proteine, die bei Wachstum oder Kontrolle der Zellteilung beteiligt sind. Proto-Onkogene begünstigen die Zellteilung. Tumorsuppressor-Anti-Onkogene hemmen die Zellteilung oder führen zum Zelltod (Apoptosis). Mutationen können jedoch zu Proteinen führen, deren Aktivität nicht mehr von der Stimulierung durch andere Wachstumsfaktoren abhängt. Es entstehen Onkogene¹⁸ die zu ungehindertem Zellwachstum und damit zur Tumorbildung führen können. Auf der anderen Seite können Mutationen in Tumorsuppressor-Genen zum Verlust ihrer Wachstumshemmenden Funktion führen [NV06]. Es sind mittlerweile eine Vielzahl an Wachstums-fördernden oder -hemmenden Genen bekannt. Eine wichtige Rolle spielt dabei offenbar das sogenannte „p53-Gen“. Es kontrolliert, ob während der DNA-Replikation Fehler aufgetreten sind. Werden Schäden entdeckt, wird der Zellzyklus unterbrochen. Der Zelle wird die Gelegenheit gegeben den Schaden zu beheben. Sind die Schäden jedoch zu groß, leitet p53 den Weg zur Apoptose ein. Mutationen in diesem Gen haben gleich zwei gefährliche Auswirkungen. Erstens werden Zellen mit DNA-Fehler nicht eliminiert und können Mutationen anhäufen. Zweitens fällt die Apoptose aus, und die

¹⁸wörtlich: Krebs-Gene

defekten Zellen können sich weiter teilen. Treten weitere Mutationen auf, können sich Zellen unter bestimmten Bedingungen aus dem Zellverband lösen und in neues Gewebe einwandern. Dort können diese „böartigen“ Zellen neue Tochtergeschwülste bilden (Metastasierung).

Der Vorgang der Krebsentstehung ist sehr komplex und wurde hier nur grob skizziert. Es sind noch viele Fragen offen, die zu einem detaillierten Verständnis aller beteiligten Schritte wichtig sind. Es ist jedoch eindeutig belegt, dass photoinduzierte DNA-Schäden bei der Entstehung von Hautkrebs eine entscheidende Rolle spielen. In diesem Zusammenhang zeigen Sequenzanalysen der p53 Tumorsuppressor-Gene [dG99, Vin01, Bes05] aus Basal- und Plattenepithelzellen von Hautkrebspatienten in etwa 30 % der Fälle Schäden auf diesem Gen. Etwa 68 % dieser Defekte sind C → T Punkt-Mutationen, die in mehr als 90 % aller Fälle im Bereich von Di-Pyrimidin-Stellen liegen. Tandem-Mutationen CC → TT ließen sich für etwa 14 % dieser Schäden nachweisen. Diese Mutationen werden als Fingerprintmutationen bezeichnet und können direkt auf den schädigenden Einfluss von UV-Strahlung zurückgeführt werden [Fri04].

2.2.4 Reparaturmechanismen

Die DNA ist einer großen Zahl an schädigenden und mutagenen Einflüssen ausgesetzt. Abschätzungen zur Schadenshäufigkeit einschließlich aller Faktoren gehen von $10^4 - 10^6$ Schäden pro Tag und Zelle aus. Bei etwa 10^{12} Zellen im menschlichen Körper müssen entsprechend täglich Schäden in einer Größenordnung von 10^{16} bis 10^{18} repariert werden [Sch03a]. Diese Abschätzung macht deutlich, dass ein Organismus effiziente Reparatur-Mechanismen besitzen muss.

Bereits bei der Replikation der Erbinformation kommt es zu tautomeren Verschiebungen und Fehlpaarungen, die jedoch meist noch während der Synthese des Strangs repariert werden. Die DNA-Polymerasen machen etwa alle 10^5 Basen einen Fehler. Erneutes „Prüfen“ der Sequenz durch „Korrekturlesen“ reduziert die Fehlerrate um einen Faktor 100. Ein weiterer Faktor 1000 wird durch ein Fehlpaarungs-Reparatursystem ("mismatch repair", MMR) möglich. Die Replikation findet dadurch in Eukaryonten mit einer Fehlerhäufigkeit von nur etwa einem Fehler auf 10^{10} Basen statt [Kun92]. Viele Reparaturmechanismen machen sich die komplementäre Information auf den beiden Strängen der Doppelhelix zu nutze. Ist nur ein Strang geschädigt kann der zweite bei der Reparatur als Matrize dienen. Neben den Korrekturmechanismen, die eine extrem niedrige Fehlerquote bei der Replikation und der Umsetzung der Erbinformation möglich machen, hat die Natur eine ganze Reihe von Mechanismen entwickelt, die auf die Beseitigung von DNA-Schäden optimiert sind. Einen guten Überblick zu den verschiedenen Reparaturmechanismen bieten [Hoe01, Sch03a]. Die für die Reparatur von photoinduzierten Schäden wichtigsten werden im Folgenden kurz erläutert.

Exzisions-Reparatur

Praktisch alle höher entwickelten Organismen besitzen die Voraussetzungen für die Exzisions-Reparatur [San96]. Dieser Mechanismus eignet sich für bestimmte DNA-Addukte und vor allem für Photoschäden in der DNA [Woo96b, Sch03a]. Bei der Reparatur werden die geschädigten Basen eines Strangs aus dem DNA-Strang „geschnitten“ und die entstandene Lücke

entsprechend der korrekten Watson-Crick Basenpaarung wieder geschlossen. Dieser Vorgang beinhaltet im Wesentlichen drei Schritte:

1. Erkennen des veränderten DNA-Abschnittes auf einem Strang und Entfernen der schadhafte Stelle durch DNA-Nukleasen.
2. Binden einer DNA-Polymerase an die Lücke und Ersetzen der fehlenden Nukleotide anhand der Information des nicht geschädigten Strangs.
3. Schließen der Bruchstellen durch DNA-Ligasen.

Während das Schließen der Lücke durch Polymerasen und Ligasen immer nach dem gleichen Muster abläuft, hängt das Entfernen des Schadens im Einzelnen von der Art des Defektes ab. Bei Schäden, die nur eine Base betreffen, wird die BER-Methode („Base excision repair“, BER) eingesetzt. Bestimmte Enzyme, die DNA-Glycolysen, erkennen veränderte Basen, die zum Beispiel durch Desaminierung oder als Oxidationsprodukte entstanden sind. Sie bilden einen Komplex mit der DNA und katalysieren die hydrolytische Entfernung des Schadens. Dabei wird die N-glykosidische Bindung zwischen dem Zucker und der Base gelöst. Neun verschiedene DNA-Glycolysen wurden beim Menschen bisher identifiziert, die jeweils eine eigene Substratspezifität aufweisen [Sch03a]. Zum Beispiel erkennt die Uracil-DNA-Glycolyase die Base Uracil als DNA-fremden Baustein. Dadurch lassen sich Punktmutationen, die durch Desaminierung von Cytosin entstehen, vermeiden¹⁹. Im Anschluss an die Entfernung der defekten Base werden AP-Endonukleasen eingesetzt. Diese erkennen abasische Fehlstellen und entfernen den betroffenen Zuckerphosphatrest durch enzymatische Spaltung des Phosphodiester-Rückgrats.

Bei größeren DNA-Defekten kommt der NER-Mechanismus („nucleotide excision repair“, NER) zum Einsatz [San96, dB00, Yam06]. Er erlaubt zum Beispiel die Reparatur von Basenschäden, die durch kovalente Bindungen der Basen mit Kohlenwasserstoffen entstehen. Die Hauptaufgabe liegt jedoch in der Beseitigung UV-induzierter Schäden wie den Pyrimidin-Dimeren. Bei dieser Reparatur ist ein Multi-Enzym-Komplex aktiv, der nicht nach einzelnen Basenaustauschpaaren sucht, sondern nach größeren Verformungen und Veränderungen in der Doppelhelix. Wird ein Defekt gefunden, wird das Phosphodiester-Rückgrat zu beiden Seiten des Schadens gespalten und ein aus etwa 10 bis 20 Nukleotiden bestehendes Fragment um die Schadens-Stelle entfernt. Die fehlenden Nukleotide werden durch eine DNA-Polymerase ersetzt und die Lücke durch eine DNA-Ligase wieder geschlossen.

Da die aus der DNA entfernten Schäden als Abbauprodukte im Urin nachweisbar sind [LC01], lassen sich im Fall von UV-induzierten Photoschäden — wie sie nach einem Sonnenbad entstehen — aus den nachgewiesenen Pyrimidin-Dimer-Schäden Rückschlüsse auf die Wirksamkeit der Reparaturprozesse schließen. Zum Beispiel ist bekannt, dass eine reduzierte Funktionsfähigkeit oder Inaktivierung der eben besprochenen Reparatur-Systeme zu einer erhöhten Mutationsrate führt und für verschiedene Krankheitsbilder verantwortlich ist [dB00]. Das wird besonders bei Xeroderma-Pigmentosum (XP)-Patienten deutlich [Sch03a], die sehr empfindlich auf Sonnenstrahlung reagieren. Normalerweise werden durch UV-Strahlung induzierte Pyrimidin-Dimere in Fibroblasten in etwa 24 Stunden entfernt. Bei XP-Patienten

¹⁹Man vermutet, dass diese Reparatur-Möglichkeit einer der Gründe für die Verwendung von Thymin statt Uracil in der DNA ist.

wird in diesem Zeitraum jedoch fast kein Dimer-Schaden entfernt. Sie leiden an einem Defekt der Exonuklease und haben dadurch ein etwa 1000-fach erhöhtes Risiko an Hautkrebs zu erkranken [LG06].

Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Doppelstrangbrüche werden in der DNA durch ionisierende Strahlung oder oxidative Reagenzien erzeugt und stellen ein großes Problem für die Zelle dar. Denn in diesem Fall steht kein intakter Strang zur Verfügung, der bei der Reparatur als Matrize verwendet werden kann. Es sind jedoch zwei Reparaturmechanismen bekannt, die diese Schäden beheben können [Sch03a]. Bei der homologen Rekombination („homologous recombination“, HR) wird die Tatsache ausgenutzt, dass die meisten Zellen einen doppelten Chromosomensatz (diploide Zellen)²⁰ und damit zwei Kopien der genetischen Information besitzen. Spezielle Rekombinations-Proteine erkennen die entsprechenden Sequenzen und nutzen das intakte Chromosom als Matrize in einem komplizierten Reparaturprozess. Bei der nicht homologen Reparatur („non-homologous end-joining“, NHEJ) werden die DNA-Enden einfach durch DNA-Ligasen wieder verbunden. Dieser Prozess ist jedoch nicht immer korrekt und es kommt oft zu einem Verlust von einem oder mehreren Nukleotiden und damit — trotz der Reparatur — zu einer bleibenden Veränderung des Genoms.

Photoinduzierte Reparaturmechanismen

Eine Besonderheit unter den Reparaturmechanismen sind lichtabhängige Prozesse [San03, Web05]. Diese Mechanismen waren wahrscheinlich bereits bei den ersten photosynthetischen Cyanobakterien (vor 2-3 Milliarden Jahren) von Bedeutung, die in einer Umgebung ohne schützende Ozonschicht [Wie02] überleben mussten. Die Reparaturenzyme werden als DNA-Photolyasen bezeichnet und konnten bisher in Pflanzen, Bakterien, Reptilien und Fischen, jedoch nicht in plazentalen Lebewesen wie dem Menschen nachgewiesen werden. Sie erkennen photoinduzierte DNA-Schäden und können diese mit Hilfe von Lichtenergie reparieren [San94, San03]. Bisher sind zwei Arten bekannt. Die CPD-Photolyasen erkennen und beheben ausschließlich CPD-Schäden, die (6-4)-Photolyasen sind speziell für die Reparatur der entsprechenden (6-4) Photoaddukte zuständig. Vor allem Strukturanalysen haben in der Vergangenheit dazu beigetragen, einige Details der Reparaturmechanismen zu entschlüsseln [Fri04], die für viele Organismen den Hauptschutzmechanismus gegen UV-induzierte Schäden darstellen.

Die CPD-Photolyase

In den letzten Jahren ist es gelungen die dreidimensionale Struktur von CPD-Photolyasen aus Bakterien zu bestimmen [Par95, Tam97, Kom01]. Photolyasen sind kugelförmige Proteine mit einem aktiven Zentrum. Sie besitzen einen nicht kovalent gebundenen FAD-Cofaktor („flavin adenine dinucleotide“, FAD) und ein zweites Coenzym, das in der Nähe der Oberfläche des Proteins als Photorezeptor wirkt. Man unterscheidet zwei Typen von Photolyasen, die sich in der Art des Photorezeptors unterscheiden. Wird an dieser Stelle ein MTHF-Molekül („5,10 Methenyl-Tetrahydrofolyl-Polyglutamat“, MTHF) eingesetzt, spricht man von

²⁰Diplous (griech.) = doppelt

einer Typ I Photolyase. Bei der Verwendung eines 8-HDF-Moleküls („8-Hydroxy-5-Deaza-Riboflavin“, 8-HDF) dagegen von einer Typ II Photolyase [San94].

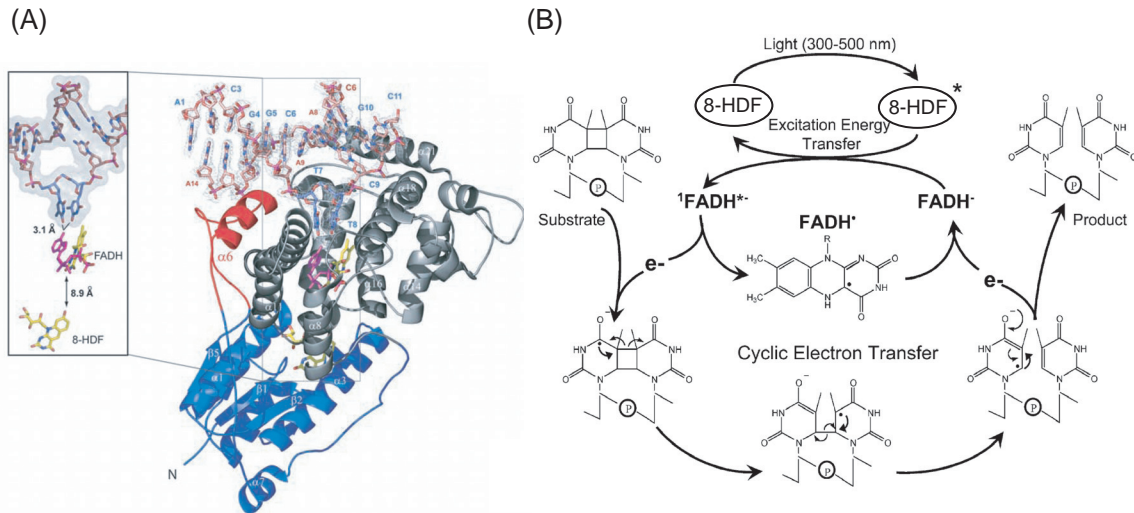


Abb. 2.14: (A) Röntgenstrukturanalyse der CPD-Photolyase. Die Abbildung zeigt einen Duplex aus einer Photolyase und einer DNA-Sequenz, die einen CPD-Schaden enthält. Übernommen aus [Mee04]. Abdruck mit Erlaubnis durch AAAS. (B) Schema zum vorgeschlagenen Reaktions-Mechanismus der lichtinduzierten CPD-Reparatur durch eine CPD-Photolyase, nach [San03]. Lichtanregung und Energietransfer führen zu einem angeregten Flavin Cofaktor (FADH^{*-}). In diesem Zustand kann ein Elektron auf den Dimer-Schaden übertragen werden, der zur Spaltung des Schadens führt. Anschließend wird das Elektron wieder auf das Flavin übertragen, das dadurch wieder in den Ausgangszustand zurückkehrt.

Abbildung 2.14 A zeigt die Molekülstruktur einer Photolyase, die einen CPD-Schaden ins aktive Zentrum aufgenommen hat [Mee04]. Untersuchungen zeigen, dass die Photolyase nach dem Binden an den Schaden eine Umstrukturierung vollzieht. Die Photolyase scheint dabei die DNA-Helix um etwa 36° zu beugen und damit den Schaden an die reaktive Stelle im Protein zu bringen [vN99]. Nach dem heutigen Stand der Forschung erfolgt die Reparatur des Schadens in mehreren Schritten [Web05]. In Abbildung 2.14 B ist ein Schema der Reparatur Schritte dargestellt [San03]. Zunächst bindet die Photolyase in ihrer aktiven Form — in dieser liegt ein reduziertes FADH^- Molekül im aktiven Zentrum vor — in einem lichtunabhängigen Schritt an den Dimer-Schaden. Absorption von UV-Licht oder Energietransfer über den zweiten Cofaktor (8-HDF), der im sichtbaren Spektralbereich absorbiert, führt den FADH^- Cofaktor in einen angeregten Zustand über $(\text{FADH}^-)^*$. Das angeregte Flavin-Molekül transferiert ein Elektron auf das Dimer und wird dabei zu einem neutralen FADH^{*-} -Radikal. Das entstandene Dimer Radikal-Anion spaltet sich in die entsprechenden Monomere und transferiert das „überschüssige“ Elektron wieder zurück auf den FADH^- -Cofaktor, der dadurch wieder in den Ausgangszustand zurückkehrt. Trotz dieser schlüssigen Darstellung des Reaktionsweges sind zur Zeit noch viele Teilaspekte hypothetischer Natur und erfordern weitere Untersuchungen [Mac03, Web05, Sch05].

Die (6-4) Photolyase

In Analogie zur CPD-Photolyase existiert auch für das (6-4) Photoaddukt eine Klasse von Reparaturproteinen, die (6-4) Photolyasen [Kim94, Zha97]. Sie besitzen eine sehr hohe Sequenzhomologie zur CPD-Photolyase, enthalten einen FAD-Cofaktor und wahrscheinlich ein Folat als zweites Coenzym. Eine EPR-Studie (Paramagnetische Elektronen Resonanz) hat gezeigt, dass auch hier das FAD in zwei lichtinduzierten Schritten zum FADH^- reduziert wird [Web02]. Es gibt jedoch noch keine Kristallstrukturen dieser Moleküle, so dass noch keine endgültigen Aussagen zu den strukturellen Anforderungen für den Elektronentransport vorliegen. Eine Modellvorstellung geht davon aus, dass der (6-4) Schaden im aktiven Zentrum des Proteins in einem ersten Schritt zurück in das Oxetan überführt wird [Kim94] und anschließend eine Retro-Paterno-Büchi Reaktion stattfindet, die wieder die Ausgangsprodukte erzeugt [Web05].

Ausblick

Sowohl die genaue Funktionsweise der CPD-Photolyase als auch der (6-4) Photolyase sind Gegenstand aktueller Forschung. Einige Arbeitsgruppen beschäftigen sich zum Beispiel mit der Synthese von Modellstrukturen, die den betreffenden Schaden besitzen und Komplexe mit den Reparaturenzymen eingehen können. Damit lassen sich Aufschlüsse über die Mechanismen der Schadens-Erkennung und die Schadens-Reparatur erhalten [Car98, Cic02, Fri04, Kun05]. Zusätzlich zu den statischen, strukturauflösenden Experimenten erhofft man sich vor allem von zeitaufgelösten Messmethoden, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, weitere Erkenntnisse über die einzelnen Teilschritte dieser Reparaturmechanismen [Mac03, Sch05].

2.3 Photophysik und Photochemie von Nukleinsäuren

In Anbetracht der strahlungsinduzierten Photoschäden in der DNA wird deutlich, dass Reparaturmechanismen unentbehrliche Bestandteile der Zellen sind, ohne die eine ausreichend hohe Stabilität der Erbinformation nicht gegeben wäre. Allerdings mussten sich diese Reparaturmechanismen im Laufe der Evolution erst entwickeln. Man geht davon aus, dass sich Leben unter den Bedingungen einer hohen UV-Strahlenbelastung nur entwickeln konnte, weil eine natürliche Selektion beim Aufbau der Strukturen des Lebens zu Molekülen führte, die sich unter diesen Bedingungen als ausreichend stabil erwiesen [Wie02]. Wie hat es die Natur geschafft die Schadensrate in dieser feindlichen Umgebung so gering zu halten, dass die Entwicklung komplexer Lebewesen möglich wurde? Eine Antwort auf diese Frage könnte in den photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften dieser Moleküle liegen. Photophysikalische Prozesse beschreiben die Absorption von Licht durch ein Molekül und die dadurch ausgelösten Prozesse, an deren Ende das Molekül wieder in seiner ursprünglichen Form vorliegt. Am Ende einer photochemischen Reaktion steht dagegen ein verändertes Molekül, das Photoprodukt. Der Übergang zwischen beiden Bereichen ist fließend [Cad90, CH04a]. Ein stark vereinfachtes Schema zur Veranschaulichung der beiden Begriffe für eine Photoreaktion ist in Abbildung 2.15 unter Verwendung von Potentialflächen gezeigt. Photochemische Prozesse beinhalten im allgemeinen mehrere Einzelschritte, von denen jedoch meist nur wenige direkt über die Absorption von Licht aktiviert werden. Die Fortschritte auf dem Gebiet der Lasertechnologie ermöglichen heute Experimente (Femtosekunden-Spektroskopie), in denen lichtinduzierte

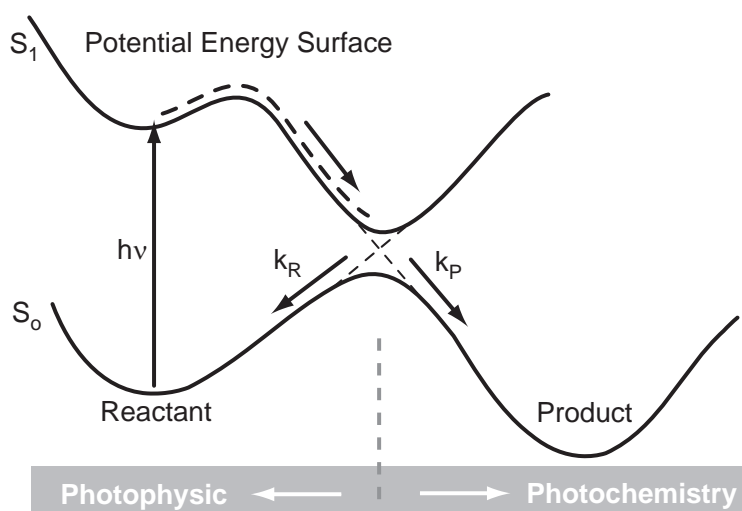


Abb. 2.15: Schematische Darstellung von Potentialflächen zur Veranschaulichung der Begriffe „Photophysik“ und „Photochemie“. In dieser stark vereinfachten Darstellung kann das System nach Lichtabsorption entweder mit der Rate k_R in den Grundzustand zurückkehren oder mit der Rate k_P ein Photoprodukt bilden. Die Abbildung orientiert sich an [Tur91].

Reaktionen in Molekülen auf einer Zeitskala von 10^{-15} Sekunden direkt beobachtet werden können [Zew00]. Zeitaufgelöste spektroskopische Verfahren haben in der Vergangenheit wesentlich zum Verständnis der Photophysik von Nukleinsäuren beigetragen. Die folgenden Abschnitte behandeln photophysikalische Grundlagen, erläutern Ergebnisse zur Photophysik von Nukleinsäuren und geben einen Überblick zum Stand der Forschung in Bezug auf die Bildung von Thymin-Dimeren.

2.3.1 Grundlagen zur Photophysik

Die Absorption von Licht durch ein Molekül führt zur Besetzung angeregter elektronischer Energieniveaus. Das Jablonski-Diagramm in Abbildung 2.16 erlaubt eine Darstellung der Lage und der möglichen Übergänge zwischen diesen Niveaus. Man unterscheidet dabei zwischen „spin-erlaubten“- und „spin-verbotenen“-Übergängen²¹, die über die beteiligten Spin-Zustände der Elektronen definiert sind (Multiplizitäten)[Woe98]. Fast alle stabilen organischen Moleküle haben eine gerade Elektronenzahl, die in den Molekülorbitalen paarweise antiparallel orientiert sind, und damit die Gesamtspinquantenzahl $S = 0$ und die Multiplizität $2S + 1 = 1$ (Singulett-Zustand) besitzen. Sind dagegen zwei Elektronen-Spins parallel orientiert, ist die Gesamtspinquantenzahl $S = 1$ und die Multiplizität $2S + 1 = 3$ (Triplett-Zustand). Übergänge zwischen Singulett- und Triplett-Zuständen sind mit einer Spin-Umkehr verbunden und durch eine Auswahlregel verboten. Das „Spinverbot“ kann jedoch zum Beispiel durch starke Spin-Bahn-Kopplung gelockert werden [Dör82, Kle95].

Zu den spin-erlaubten Übergängen gehört die Anregung aus dem Grundzustand (S_0) in einen

²¹Das Übergangsmoment für einen Wechsel zwischen verschiedenen elektronischen Zustände besteht aus drei Faktoren: dem Frank-Condon-Faktor, dem Symmetriefaktor und dem Spin- oder Multiplizitätsfaktor. Ist einer dieser Faktoren gleich Null, treten strahlungsgekoppelte Übergänge nicht, oder nur mit geringer Wahrscheinlichkeit auf, sie sind „verboten“ [Woe98].

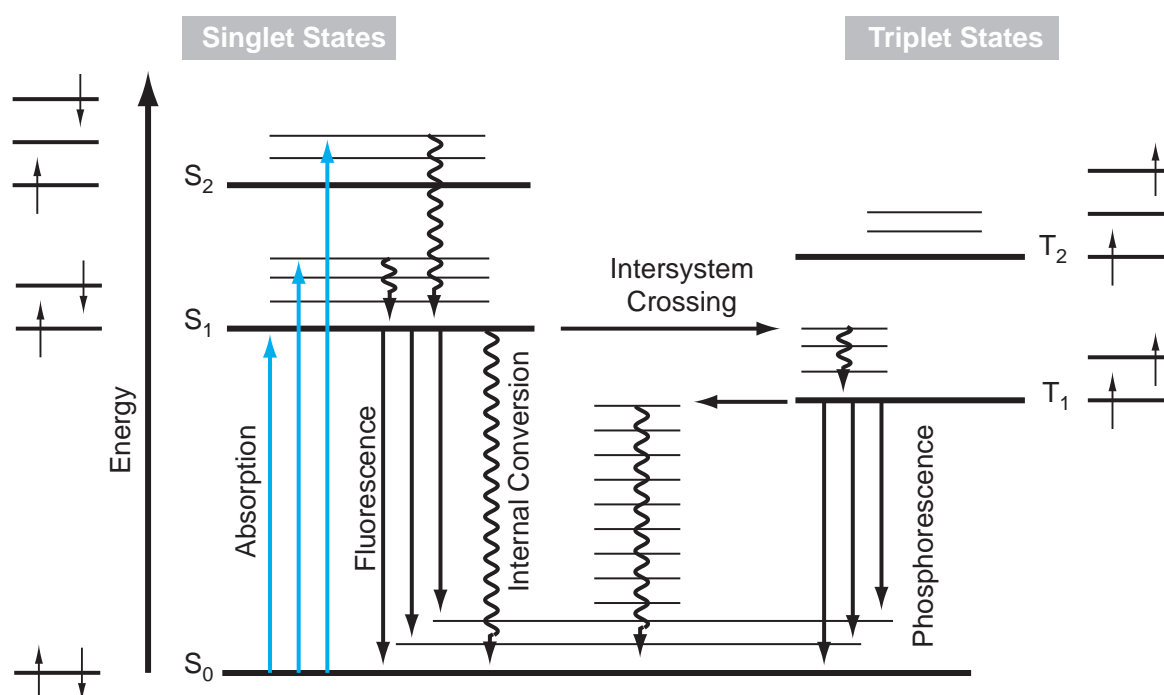


Abb. 2.16: Das Jablonski Diagramm zeigt die unteren Energie- und Schwingungsniveaus eines organischen Moleküls mit einer geraden Anzahl an Elektronen. Die entsprechenden Spin-Konfigurationen sind neben den Energieniveaus dargestellt. Durchgezogene Linien entsprechen strahlenden, wellenförmige Linien strahlungslosen Prozessen.

höher liegenden Singulett-Zustand (S_1 oder S_n). Meist werden dabei höhere Schwingungsniveaus besetzt (Frank-Condon-Prinzip) aus denen eine schnelle Schwingungsrelaxation erfolgt. Dabei kommt es zu einer intramolekularen Energie-Umverteilung im Molekül („internal vibrational relaxation“, IVR) und intermolekularer Wärmeabgabe an die Umgebung (Lösungsmittel). Dieser Vorgang wird auch als Kühlen („cooling“) eines schwingungsangeregten oder „heißen“ Zustands bezeichnet. Höhere Singulett-Zustände und Schwingungsniveaus relaxieren in der Regel sehr schnell (innerhalb von 10^{-12} Sekunden) und strahlungslos in den Schwingungsgrundzustand des S_1 -Niveaus (Kasha-Regel [Kas50]). Dieser Zustand kann entweder durch Emission von Fluoreszenzlicht in den Grundzustand übergehen oder durch strahlungslose Prozesse entvölkert werden. Zu den strahlungslosen Prozessen gehören die innere Umwandlung („internal conversion“, IC) und die Interkombination („inter system crossing“, ISC). Die innere Umwandlung beschreibt den strahlungslosen Übergang zwischen Zuständen mit identischer Spin-Multiplizität und ermöglicht den Übergang aus dem S_1 in den Grundzustand. Als Interkombination bezeichnet man strahlungslose, spin-verbotene Übergänge zwischen Singulett- und Triplett-Zuständen. Die Interkombination stellt einen Deaktivierungsweg für den S_1 -Zustand dar und führt zur Besetzung eines Triplett-Zustands, der gewöhnlich nicht durch direkte Absorption eines Photons erhalten werden kann. Aus dem Triplett-Zustand kann Phosphoreszenzlicht emittiert werden oder ein strahlungsloser Übergang in den Grundzustand erfolgen. Da jedoch auch diese Übergänge spin-verboten sind, haben Triplett-Zustände im allgemeinen wesentlich längere Lebensdauern als angeregte Singulett-Zustände [Mur93].

2.3.2 Über die Photophysik von Nukleinsäuren

Nach der Identifizierung der Bausteine der DNA wurde mit spektroskopischen Methoden (Absorptions- und Emissionstechniken) versucht, die Lage der Energieniveaus und die nach Lichtabsorption auftretenden photophysikalischen Prozesse aufzuklären. Eine ausführliche Zusammenstellung der frühen Experimente und Ergebnisse bis 1990 findet sich in [Cad90]. Die Lebensdauern der S_1 -Zustände wurden zunächst über die Bestimmung von Fluoreszenz-Quantenausbeuten abgeschätzt, nachdem Daniels und Hauswirth 1971 für Nukleinbasen in wässriger Umgebung eine sehr geringe Fluoreszenz-Quantenausbeute im Bereich von 10^{-4} [Dan71] nachweisen konnten. Über die Strickler-Berg-Beziehung [Str62] ergaben sich daraus erste Abschätzungen für die Lebensdauer der angeregten S_1 -Zustände, die in einer Größenordnung von einer Pikosekunde liegen sollten.

Eine direkte Bestimmung der Lebensdauer sollte in Folge durch zeitaufgelöste Experimente erbracht werden. Lange Zeit waren jedoch die erreichbaren Zeitauflösungen der verwendeten Apparaturen nicht ausreichend. Nikogosyan und Mitarbeitern führten als Erste Studien mit Pikosekunden-Zeitauflösung durch [Ora81, Nik82, Nik85]. Sie konnten aber zunächst nur obere Grenzen für die Lebensdauer angeben. In Zusammenarbeit mit Lindqvist und Laubeau wurden anschließend Experimente mit einer Zeitauflösung im Femtosekunden-Bereich durchgeführt [Nik96, Reu96, Reu00]. Allerdings waren auch bei diesen Experimenten eindeutige Aussagen über die genaue Lebensdauer schwierig. Trotz der erheblich verbesserten Zeitauflösung, ergaben sich durch die Verwendung sehr hoher Lichtintensitäten, dominante Beiträge durch verschiedene Prozesse, die eine komplizierte Analyse der Signal-Beiträge nötig machten²². Erst im Jahr 2000 gelang Pecourt und Mitarbeitern die erste eindeutige Bestimmung der S_1 -Lebensdauer für mehrere Nukleinbasen [Pec00]. Demnach besitzen die Nukleinbasen in Übereinstimmung mit der Abschätzung (nach Strickler-Berg) extrem kurze S_1 -Lebensdauern im Bereich von einigen 100 fs. Voraussetzung für diese Arbeit, die in Folge durch weitere Studien bestätigt werden konnte [Peo01, Gus02], waren technologische Fortschritte an den Laser- und Mess-Systemen, die eine erhebliche Reduktion der verwendeten Anregungsintensitäten ermöglichten.

Die Fortschritte auf dem Gebiet der zeitaufgelösten Mess-Methoden, insbesondere auf dem Gebiet der Anreg-Abtast-Spektroskopie und den Fluoreszenz-Techniken, haben dadurch zu einem wesentlich besseren Verständnis der angeregten Zustände der DNA-Bausteine beigetragen. Experimente an Molekularstrahlen erlauben zudem die Untersuchung isolierter und kalter Moleküle, die sich besonders gut mit quantenmechanischen Modellen erfassen lassen. Letztere zeigen jedoch auch deutlich die Grenzen der theoretischen Modelle. Zum einen lassen sich die Ergebnisse für isolierte Moleküle nicht direkt auf Systeme in Lösung übertragen, zum anderen beschränken nach wie vor Rechnerkapazitäten die Untersuchung größerer Systeme. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre werden ausführlich in [CH04a] diskutiert. Einen Bereich bilden in diesem Zusammenhang Experimente und theoretische Berechnungen an einzelnen Basen und Nukleotiden, einen anderen, Experimente an Di- und Poly-Nukleotiden sowie an DNA-Doppelsträngen. Die folgende Darstellung zum Stand der Forschung knüpft an Aussagen in [CH04a] an.

²²Bei sehr hohen Intensitäten treten Beiträge durch die Zwei-Photonen-Ionisation des Lösungsmittels (Wasser) und die Ionisierung der zu untersuchenden DNA-Moleküle in den Vordergrund.

Elektronische Zustände von Nuklein-Basen und Nukleotiden

Einzelne Nuklein-Basen und Nukleotide werden als Untersuchungsobjekte verwendet, mit der Hoffnung, das komplexe System DNA auf seine Basiseinheiten reduzieren zu können. Im Laufe der Zeit wurden an diesen Molekülen zahlreiche Experimente mit dem Ziel durchgeführt, die energetische Reihenfolge der elektronischen Zustände und deren Lebensdauern zu bestimmen [Voe63, Cal83, Cad90, Woo96a, CH04a]. Die folgenden Ergebnisse beziehen sich, soweit nicht anders vermerkt, auf Experimente bei Raumtemperatur und in wässriger Lösung.

Die DNA-Basen zeigen zwischen 240 - 290 nm intensive Absorptionsbanden, die auf $^1\pi\pi^*$ -Übergänge zurückgeführt werden [Voe63]. Bei diesen wird ein Elektron aus einem π -Orbital des Grundzustands in ein nicht bindendes π^* -Orbital angehoben [Cal83]. Die an den Hetero-Atomen (Stickstoff, Sauerstoff) lokalisierten Elektronen-Paare sind für $^1n\pi^*$ -Übergänge verantwortlich, bei denen ein Elektron aus einem nicht bindenden Hybrid-Orbital der Hetero-Atome in ein nicht bindendes π^* -Molekül-Orbital angehoben wird. Allerdings besitzen diese Übergänge in der Regel nur sehr geringe Oszillatorenstärken und sind deshalb an Nuklein-Basen bisher noch wenig charakterisiert [Cal83, Fue95, Ism02, CH04a].

Nach UV-Anregung im Bereich der starken $^1\pi\pi^*$ -Bande zeigen alle Basen und Nukleotide einen sehr schnellen und strahlungslosen Übergang in den Grundzustand. Die Lebensdauern für diese Prozesse liegen in Zeitbereichen von einigen hundert Femtosekunden [Pec00, Peo01, Gus02]. Während in Purin-Basen eindeutig die sehr schnelle Desaktivierung der angeregten Zustände dominiert, konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie [Har06] gezeigt werden, dass in Pyrimidin-Derivaten auch wesentlich langlebigere Singulett-Zustände besetzt werden, die Lebensdauern von einigen 10 bis zu einigen 100 Pikosekunden besitzen. Das Auftreten dieser Zustände, wird auf langlebige $^1n\pi^*$ -Zustände zurückgeführt, deren Besetzung stark mit dem Lösungsmittel variiert. Die Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass $^1n\pi^*$ -Zustände eine zentrale Rolle bei der Interkombination in die Triplett-Zustände spielen könnten [Har07a]. In wässriger Lösung sind die Ausbeuten für die Interkombination in Triplett-Zustände sehr gering und liegen für die Basen und Nukleotide in Bereichen von wenigen Prozent oder darunter [Cad90, Woo96a]. Die Lebensdauern der niedrigsten Triplett-Zustände liegen in wässriger Lösung im Mikrosekunden-Bereich [Cad90].

Elektronische Zustände von Poly-Nukleotiden

Vergleicht man die Ergebnisse an Einzelbasen mit Experimente an Di- und Poly-Nukleotiden zeigt sich, dass jetzt zusätzliche Wechselwirkungen zwischen den Basen berücksichtigt werden müssen. In diesen Molekülen können die Basen nicht mehr als einzelne Chromophore behandelt werden. Sie sind über das Zuckerphosphatrückgrat verknüpft und kommen sich so nahe, dass elektronische Wechselwirkungen zwischen den Basen auftreten, die zum Beispiel, wie in Abschnitt 2.1.2 gezeigt, zur Stapelung der planaren Nuklein-Basen führen können. In Doppelsträngen sind zusätzlich Wasserstoffbrücken zwischen den Basen der Stränge zu berücksichtigen. Die Aufklärung der Wechselwirkungen und der daraus resultierenden Einflüsse auf die elektronischen Zustände wurde in der Vergangenheit in einer Reihe von Experimenten untersucht [Cad90, Tin96, CH04a].

Die Absorptionsspektren der Poly-Nukleotide zeigen in Bezug auf die Lage des Absorptionsmaximums und der Bandenform eine relativ große Ähnlichkeit zu den Einzel-Basen. Allerdings

ist die molare Extinktion von Poly-Nukleotiden und DNA-Doppelsträngen im Bereich der $^1\pi\pi^*$ -Übergänge der Basen in der Regel geringer als man es bei einer Addition der Einzelbeiträge der Basen erwarten würde. Zudem ist die Absorption stark von äußeren Parametern wie zum Beispiel der Temperatur oder dem pH-Wert abhängig. Die Erniedrigung der molaren Extinktion (Hypochromie) beim Übergang von Einzel-Basen zu Nukleotid-Ketten kann durch Coulomb-Wechselwirkungen und die Anordnung der Übergangs-Dipolmomente der Basen erklärt werden und wird in [Tin60, Ric60] ausführlich diskutiert. Durch die auftretende Hypochromie lassen sich strukturelle Veränderungen, die zum Beispiel mit einer Temperaturerhöhung verknüpft sind (Denaturierung der Doppelhelix) im UV-Absorptionsspektrum nachweisen [Tin96].

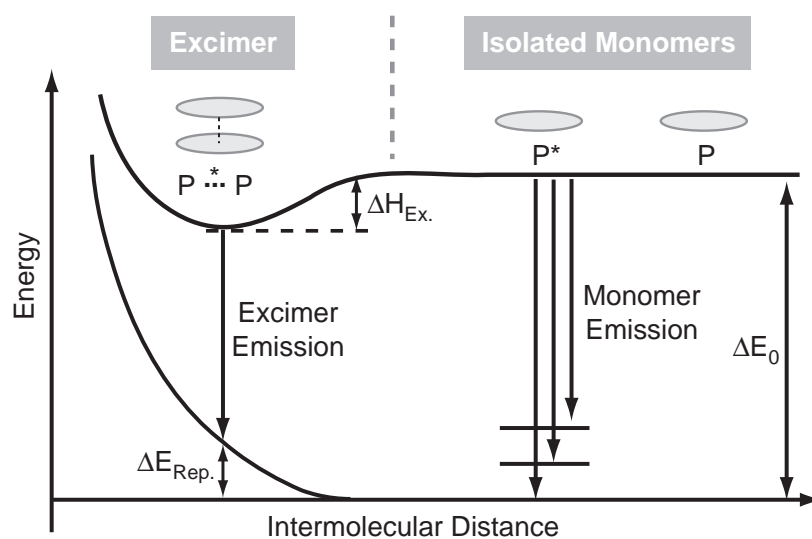


Abb. 2.17: Schematische Darstellung für die Bildung eines Excimer-Zustands zwischen zwei identischen Molekülen (P). Für große Abstände können die Moleküle als unabhängig voneinander betrachtet werden. Die Absorptions- und Emissionseigenschaften entsprechen den einzelnen Molekülen. Treffen sich die Moleküle jedoch (z.B. diffusionslimitierte Kollision) während sich eines der Moleküle noch in einem angeregten Zustand befindet, oder liegen die beiden Moleküle bei der Anregung bereits nahe beieinander, kann es durch Ladungs-Transfer („charge transfer“) oder Austausch-Wechselwirkungen („excitation exchange interaction“) zu einer Stabilisierung ($\Delta H_{Ex.}$) und einem gebundenen elektronisch angeregten Zustand kommen. Sind beide Moleküle identisch, spricht man von einem Excimer („excited dimer“) ansonsten von einem Exciplex („excited complex“). Aufgrund der Energieabsenkung des angeregten Zustands und der Abstoßung der Moleküle im Grundzustand ($\Delta E_{Rep.}$) zeichnen sich diese Zustände durch eine rotverschobene (und strukturlose) Fluoreszenz-Emission aus.

Allein aus diesen Beobachtungen lassen sich jedoch noch keine Aussagen über die nach der Absorption eines UV-Photons besetzten Zustände ableiten. In zeitaufgelösten Experimenten wurden Zustände nachgewiesen, deren Lebensdauer nahe an den Werten für einzelne Nucleotide oder Basen liegen. Man geht davon aus, dass hier die Energie von einem einzelnen Chromophor im Polymer absorbiert wurde, dessen elektronische Zustände mit denen von Einzel-Basen oder Nucleotiden vergleichbar sind. Zusätzlich wurden jedoch auch langlebige Zustände gefunden, die in den Einzel-Basen nicht auftreten [Cad90, CH04a, CH04b]. Experimente an Di- und Poly-Nucleotiden zeigen, dass die Energie nach der Licht-Absorption

nicht nur auf eine Base lokalisiert ist, sondern auch auf zwei oder mehr Basen verteilt sein kann [Cad90, Bal91]. In diesem Zusammenhang wurden Fluoreszenz-Emissionen beobachtet, die deutlich rotverschoben zu den Emissionen der Monomere liegen [Bal82, Cad90] und Zerfallszeiten in Bereichen von 100 ps bis zu einigen ns aufweisen [Mar03, CH04b, Ple00]. Als mögliche Erklärung werden in der Literatur sogenannte Exciplex- bzw. Excimer-Zustände („excited complex“ = Exciplex, zwischen zwei verschiedenen Basen, bzw. „excited dimer“ = Excimer, zwischen zwei identischen Basen) diskutiert [Eis66]. Eine stark vereinfachte Darstellung der Verhältnisse, die Excimer-Zustände beschreiben, ist in Abbildung 2.17 gegeben. In dieser ist die potentielle Energie der Moleküle (P) in Abhängigkeit von ihrer relativen Entfernung aufgetragen. Befinden sich die Moleküle in einem großen Abstand zueinander, verhalten sie sich nach Lichtanregung wie isolierte Moleküle. Nähern sich zwei Moleküle kommt es im Grundzustand ab einem bestimmten Abstand zu einer zunehmenden Abstoßung. Ist jedoch eines der Moleküle angeregt, kann es durch Ladungs-Transfer („charge transfer“) oder Austausch-Wechselwirkungen zu einer energetischen Stabilisierung und die Bildung eines angeregten Molekül-Komplexes (Excimer) kommen [Tur91]. Entsprechend der Energieabsenkung zeigen diese Zustände eine deutlich rotverschobene Fluoreszenz-Emission.

Eine ausführliche Diskussion über die Verwendung dieser Begriffe in Bezug auf Poly-Nukleotide in denen sich die beteiligten Basen in direkter Nachbarschaft zueinander liegen findet sich in [CH04a]. Auch für doppelsträngige DNA-Moleküle werden Exciton- und Excimer-ähnliche Zustände diskutiert, die eine Delokalisation der Anregungsenergie auf mehrere Basen beinhalten [Ris02, Bou03, Mar03]. In [CH05] wurden auftretende, langlebige Zustände in einzel- und doppelsträngiger DNA auf die Bildung von Excimer-Zuständen in Bereichen mit gestapelten Basen zurückgeführt. Im Gegensatz zum Fall der Einzel-Basen bilden diese Zustände in dem untersuchten Adenosin-Polymer sogar den dominanten Desaktivierungskanal.

In Doppelsträngen oder einzelnen Watson-Crick Basen-Paaren könnten auch Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basen eine wichtige Rolle bei der Desaktivierung spielen. Eine Möglichkeit wären zum Beispiel Proton-Transfer-Reaktionen [Loe63], die zu einer schnellen Desaktivierung der Energie nach UV-Absorption beitragen könnten. Allerdings konnten entsprechende Prozesse bisher nur an isolierten Modell-Basen-Paaren in der Gasphase nachgewiesen werden [Dou95]. Experimente zwischen einzel- und doppelsträngigen Poly-Nukleotid-Sequenzen in wässriger Lösung deuten jedoch eher darauf hin, dass unter den Bedingungen in Lösung vor allem die Basen-Stapelung innerhalb eines Strangs und nicht die Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Basen im Doppelstrang für den Hauptanteil der Desaktivierung verantwortlich sind [CH05].

Theoretische Beschreibung der elektronischen Zustände

Mit quantenchemischen Rechnungen wird versucht, eine Beschreibung der elektronischen Zustände und Desaktivierungs-Prozesse der Nukleinsäuren zu erhalten [Spo01, CH04a]. Bereits die Berechnung der Energiezustände isolierter Basen erweist sich jedoch als sehr komplex, da die Hetero-Atome (Stickstoff und Sauerstoff) der Basen zur Existenz verschiedener $^1\pi\pi^*$ - und $^1n\pi^*$ -Übergänge führen. Einfache Modelle und Näherungen, die sich für die Behandlung einfacher polyzyklischer Moleküle, wie zum Beispiel Benzen, eignen, können deshalb für die Behandlung der Nuklein-Basen nicht verwendet werden [Cad90]. Da angenommen wird, dass der Übergang von Basen zu Nukleotiden lediglich zu kleinen Modifikationen der rele-

vanten elektronischen Übergänge und Zustände führt, wurden die meisten Rechnungen bisher fast ausschließlich für einzelne Basen durchgeführt. Für diese gibt es mittlerweile eine gute Übereinstimmung in Bezug auf die energetische Lage der $^1\pi\pi^*$ -Zustände [CH04a]. Dagegen sind die Aussagen in Bezug auf die Lage der $^1n\pi^*$ -Zustände noch nicht eindeutig. Vor allem der Einfluss des Lösungsmittels ist dabei von großer Bedeutung, da dieses die Lage der $n\pi^*$ -Zustände stärker beeinflusst. Unter Umständen kann es dadurch sogar zu einer Vertauschung in der energetischen Reihenfolge der Zustände kommen [CH04a].

Neben der Beschreibung der energetischen Lage angeregter Zustände richtet sich ein weiterer Schwerpunkt der theoretischen Betrachtungen auf das Verständnis der zum Teil extrem schnellen und strahlungslosen Desaktivierungs-Prozesse. Strahlungslose Prozesse können immer dann mit hoher Wahrscheinlichkeit auftreten, wenn sich Potential-Hyperflächen der beteiligten Zustände nahe kommen, berühren oder schneiden. In Abbildung 2.18 ist eine ent-

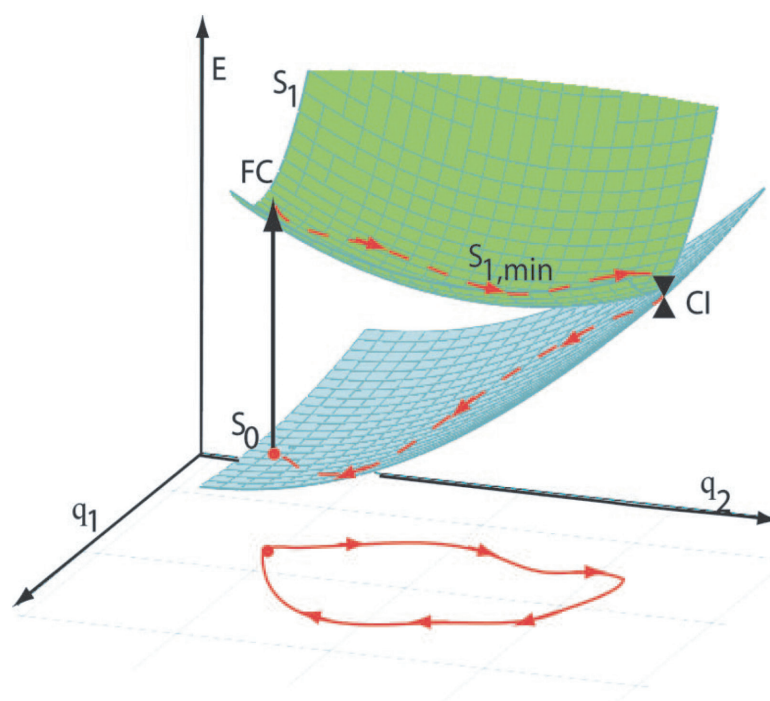


Abb. 2.18: Darstellung eines strahlungslosen Desaktivierungspfad auf einer modellhaften Potential-Landschaft. S_0 bezeichnet den elektronischen Grundzustand, S_1 den niedrigsten angeregten Zustand. Nach optischer Anregung befindet sich das System im Frank-Condon-Bereich (FC) der Energielandschaft. Von dort bewegt sich das System entlang der beiden Reaktionskoordinaten q_1 und q_2 . In der Nähe und am konischen Schnitt (CI) ist ein schneller und effizienter Übergang in den Grundzustand und die Rückkehr in den Ausgangszustand möglich. Abbildung übernommen aus [Har07a]. Copyright 2007 National Academy of Sciences.

sprechende Energielandschaft in Abhängigkeit von den beiden Reaktionskoordinaten q_1 und q_2 schematisch dargestellt. Gemäß dem Frank-Condon-Prinzip [Atk03] hat der angeregte Zustand im Franck-Codon-Bereich (FC) zunächst dieselbe Geometrie wie der Grundzustand. Erreicht das Molekül anschließend eine Geometrie, in der sich die Potentialflächen des angeregten und des Grundzustands schneiden, ist an dieser Schnittstelle („conical intersection“, CI) eine effiziente und schnelle Relaxation in den Grundzustand möglich [Kle95]. Das Auftreten konischer

Durchschneidungen ist mittlerweile allgemein akzeptiert und wird auch für die ultraschnelle Relaxation der Nukleinsäuren verantwortlich gemacht [CH04a, Per06a, Bla06, SP07]. Die Reaktionskoordinaten jedoch, entlang derer diese Stellen erreicht werden, sind weiterhin Gegenstand der Diskussion. Zum Beispiel könnten, wie im letzten Abschnitt angedeutet, Proton-Transfer-Reaktionen für die schnelle interne Konversion in Basen-Paaren verantwortlich sein. Obwohl theoretische Rechnungen [Sob04, Per06b] einen entsprechenden Mechanismus möglich erscheinen lassen, konnte dieser Reaktionsweg für Nuklein-Basen in Lösung bisher nicht nachgewiesen werden.

Resümee

Spektroskopische Untersuchungen und quantenmechanische Rechnungen konnten in der Vergangenheit einige wichtige Fragen zu den elektronischen Zuständen in DNA-Basen beantworten. Für die Photostabilität der DNA wurden lange Zeit vor allem die sehr schnellen Desaktivierungs-Prozesse der Monomere verantwortlich gemacht. In diesem Zusammenhang sollte eine schnelle Desaktivierung verhindern, dass langlebige energiereiche Zustände zu Photoschäden führen. Diese Eigenschaft wurde als wichtiges Auswahlkriterium der Natur bei der Wahl der Bausteine des Lebens gewertet. Die Ergebnisse in Poly-Nukleotiden zeigen jedoch, dass aufgrund der Wechselwirkungen benachbarter Basen andere Desaktivierungs-Kanäle auftreten als in den Monomeren. Zudem wurden vor kurzem auch in einzelnen Pyrimidin-Basen „langlebige“ Zustände (~ 100 fs) nachgewiesen, die für die Bildung von Photoprodukten von Bedeutung sein könnten. Die Aufklärung der Reaktionswege, die zu chemischen Reaktionen führen, ist deshalb von großer Bedeutung.

2.3.3 Photochemie und Bildung von Thymin-Dimeren

Während in den letzten beiden Abschnitten die photophysikalischen Aspekte der Nukleinsäuren behandelt wurden, soll in diesem Abschnitt der Stand der Forschung in Bezug auf die Bildung von Photoprodukten in der DNA im Vordergrund stehen [Cad92]. Für photochemische Reaktionen werden energiereiche (angeregte) Singulett- oder Triplett-Zustände verantwortlich gemacht²³. Die schematische Darstellung einer einfachen Photoreaktion über einen angeregten Zustand ist in Abbildung 2.19 gezeigt. Nach Lichtabsorption befindet sich das Molekül zunächst im Frank-Condon-Bereich der Potentialfläche des angeregten Zustands. Besitzt das Molekül ausreichend Energie, kann es entlang der beiden Reaktionskoordinaten q_1 und q_2 die Potentialbarriere überwinden und auf die Potentialfläche des Produkts gelangen. Dieses Bild stellt eine starke Vereinfachung dar. In der Regel sind in Photoreaktionen konkurrierende Prozesse (photophysikalische Desaktivierung) und eventuell auftretende Intermediate von Bedeutung [Tur91].

Die Wahrscheinlichkeit für mono-molekulare und vor allem bi-molekulare Reaktionen ist umso größer, je länger die Lebensdauer des angeregten Zustands ist. Aus diesem Grund sind photochemische Reaktionen aus Triplett-Zuständen häufiger als aus den relativ kurzlebigen Singulett-Zuständen. Als Kenngröße für die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion wird die

²³Bei der Bildung von Photo-Hydraten in Uracil und Cytosin wird auch eine thermische Reaktion über einen heißen Grundzustand diskutiert [Wac64].

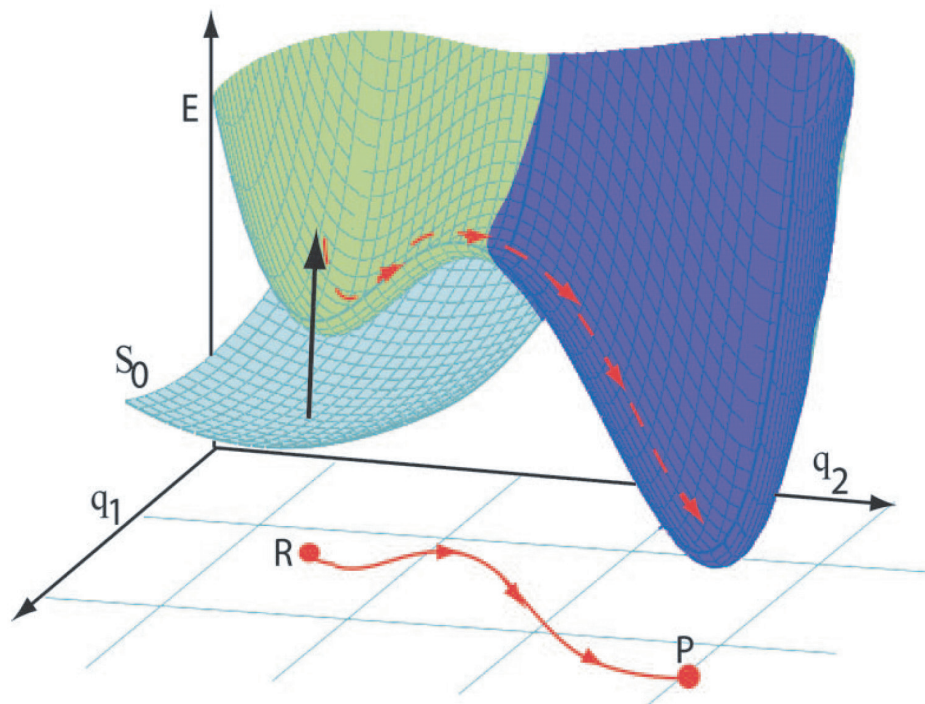


Abb. 2.19: Schematische Darstellung einer Photoreaktion auf einer modellhaften Potentialfläche. S_0 bezeichnet den elektronischen Grundzustand, S_1 den niedrigsten angeregten Zustand. Nach optischer Anregung befindet sich das System im Frank-Condon-Bereich der Energielandschaft. Von dort bewegt sich das System entlang der beiden Reaktionskoordinaten q_1 , q_2 die das Wellenpaket auf die Potentialfläche des Produktzustandes führt. Abbildung übernommen aus [Har07a]. Copyright 2007 National Academy of Sciences.

Quantenausbeute Φ angeben:

$$\Phi = \frac{\text{Anzahl der pro Zeiteinheit umgesetzten Moleküle}}{\text{Anzahl der pro Zeiteinheit absorbierten Lichtquanten}}. \quad (2.1)$$

Die Quantenausbeuten für die Bildung von Photoprodukten liegen in der DNA meist deutlich unter einem Prozent [Cad90]. Pyrimidin-Dimere zwischen benachbarten Thymin Basen sind dagegen mit Ausbeuten von etwa 1-2 Prozent die eindeutig am häufigsten durch UV-Strahlung induzierten DNA-Schäden [Dou01, Dou06, Mou06]. Ihre biologische Bedeutung wurde ausführlich in der Einleitung und in Abschnitt 2.2.3 diskutiert. Trotz zahlreicher Bemühungen [Cad90, Mar05, CH05] konnte der Bildungs-Mechanismus dieser Schäden in der DNA bisher nicht eindeutig geklärt werden.

Thymin-Dimere: Überblick zum Stand der Forschung

Photochemische Reaktionen in DNA-Molekülen wurden bereits Anfang der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts untersucht [Cad90]. Dabei wurde nach UV-Belichtung sowohl zwischen Thymin-Basen in gefrorener Lösung [Beu58, Beu60b] als auch in bakterieller DNA [Wan60] ein Photoprodukt nachgewiesen, dass als Zyklobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD) identifiziert werden konnte [Beu60a, Beu61, Wul61]. Die Bildung dieser Photoprodukte ist in Abbildung 2.20

für einzelne Thymin-Moleküle zusammen mit der UV-Absorption der entsprechenden Moleküle dargestellt. Während Thymin eine starke Absorptionsbande im Bereich 240 - 290 nm besitzt, zeigt das Photoprodukt erst für Wellenlängen kleiner 260 nm eine merkliche Absorption. Die Photoreaktion ist photo-reversibel, so dass es bei Belichtung der Dimere wieder zu einer Spaltung in die Einzel-Basen kommt [Wan60, Wan61, Set61]. Die stark unterschiedlichen Ab-

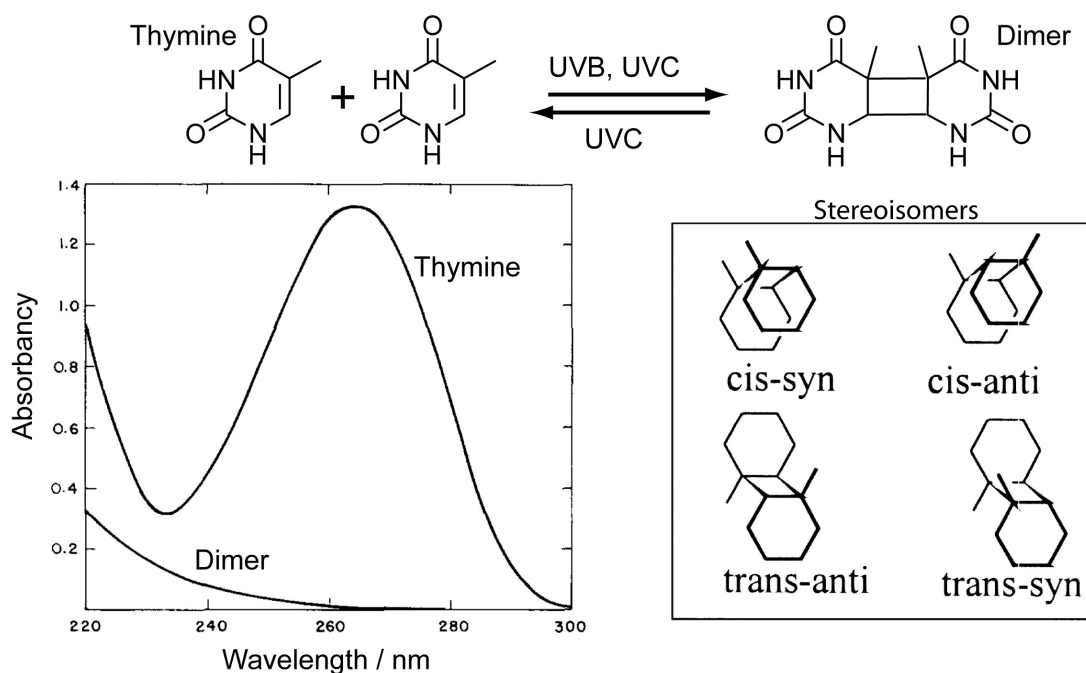


Abb. 2.20: Oben: Molekülschema zur Photoaddition zwischen Thymin-Basen. Links: Absorptionsspektren von Thymin und dem bei der Photoreaktion entstehenden Thymin-Dimer. Das Spektrum ist übernommen aus [Wul61]. Abdruck mit Erlaubnis durch Elsevier (Copyright 1961). Rechts: Bei der Bildung des Photoprodukts in Lösung können vier stereoisomere Formen gebildet werden.

sorptionsspektren der beiden Moleküle lassen sich durch den Verlust des π -Systems der C5=C6 Doppelbindung, und damit des $\pi\pi^*$ -Übergangs, bei der Dimerisierung erklären. Prinzipiell sind bei der Bildung des Zykllobutan-Rings, vier stereoisomere Formen denkbar, die in Abbildung 2.20 schematisch dargestellt sind [Wul61, Wei66]. In Di- und Poly-Nukleotiden sind die Anti-Konformationen aufgrund sterischer Einschränkungen nicht möglich [Dee63, Fri04] (siehe Abschnitt 2.2.2). Zusätzlich tritt in diesen Molekülen eine klare Bevorzugung des *cis-syn*-Isomer gegenüber dem *trans-syn*-Isomer auf, die sich zum Beispiel in den Di-Nukleotiden in einem Verhältnis von etwa 5:1 äußert [Joh64, Cad90].

Während die Quantenausbeuten für die Dimer-Bildung zwischen Thymin-Basen in Di- und Poly-Nukleotide in wässriger Lösung im Bereich von etwa 1-3 % liegt, wurde für die UV-induzierte Rückreaktion eine Quantenausbeute nahe 100 % nachgewiesen [Dee63, Joh62]. Aus diesem Grund ist die Lage des photostationären Gleichgewichts nach hohen Strahlendosen stark Wellenlängenabhängig [Dee63, Wul63]. Diese Wellenlängenabhängigkeit muss bei der Bestimmung der Quantenausbeuten berücksichtigt werden [Fri04].

Mechanismen der Dimer-Bildung

Aufgrund seiner biologischen Bedeutung in Bezug auf DNA-Schäden und Mutationen wurde bald nach der Identifizierung dieser Photoprodukte versucht, die Photochemie der Reaktion zu entschlüsseln. Ausführliche Darstellungen zu ähnlichen photochemischen Reaktionen finden sich zum Beispiel in [Woo69, Bec91, Tur91, Woe98]. Bei der Reaktion handelt es sich um eine [2 + 2]-Zykloaddition²⁴, die nach Orbital-Symmetrie-Regeln (Woodward-Hoffmann-Regeln [Hof68]) photochemisch erlaubt aber thermisch verboten ist²⁵. In Abbildung 2.21 ist das Ergeb-

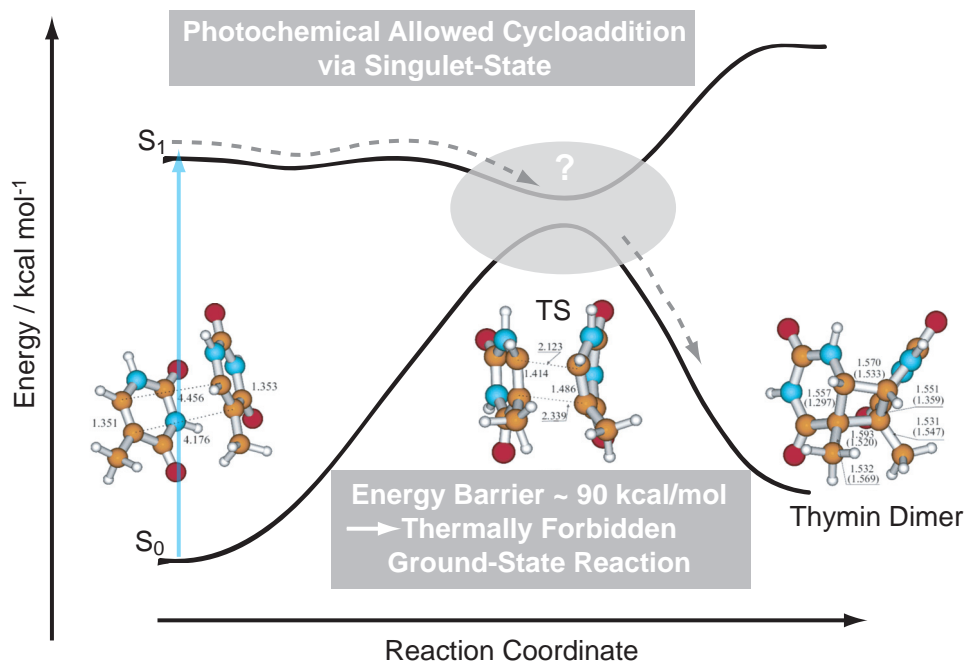


Abb. 2.21: Energieschema für die thermische und photochemische Zykloaddition zwischen zwei Thymin-Basen. Die Darstellung gibt die Ergebnisse aus einer Studie mit Dichtefunktional-Theorie für einen Reaktionsverlauf über Singulett-Zustände wieder [Zha06]. Neben dem Energieschema sind Molekülstrukturen des Ausgangszustands und Endprodukts (Thymin-Dimer) sowie eines postulierten Zwischenzustands (TS) abgebildet. Während eine Reaktion über den angeregten Singulett-Zustand nur mit einer kleinen Energiebarriere verknüpft ist, liegt zwischen Ausgangs-Zustand und dem Produkt auf der Grundzustands-Potentialfläche eine hohe Energiebarriere. Damit ist die Bildung von Thymin-Dimeren thermisch „verboten“. Die Molekülstrukturen sind [Zha06] entnommen. Abdruck mit Erlaubnis durch American Chemical Society, Copyright (2006).

nis einer theoretischen Studie (mit Dichtefunktional-Theorie, DFT) zur CPD-Bildung zwischen Thymin-Basen schematisch dargestellt [Zha06]. Die Abbildung zeigt, dass der Übergang in das Produkt auf der Grundzustands-Potentialfläche über einen Zwischenzustand („transition state“, TS) mit einer hohen thermischen Barriere verbunden und damit thermisch „verboten“ ist. Dagegen ist eine Reaktion über einen angeregten Singulett-Zustand lediglich mit einer kleinen Barriere verbunden und die Reaktion damit photochemisch erlaubt. In [Zha06] wird auch ein möglicher Reaktionsweg über Triplett-Zustände untersucht. Dieser soll über mehrere

²⁴[n + n] bezieht sich auf die Anzahl n der Atome, der jeweiligen Gruppe, die an der Zykloaddition beteiligt sind.

²⁵Eine Bildung von Thymin-Dimeren über einen thermisch angeregten Grundzustand wird durch eine sehr hohe Energiebarriere zwischen beiden Zuständen verhindert [Dur02].

Zwischenzustände ablaufen und ist mit der Bildung eines Bi-Radikals verknüpft. Allerdings erlauben diese Rechnungen — deren Energieschema auf Grundzustandsgeometrien beruht — keine Aussagen über den genauen Reaktionsverlauf auf der angeregten Potentialfläche und vor allem dem Übergangsbereich (z.B. Bildung von Excimer-Zuständen, oder das Auftreten einer konischen Durchschneidung). In der Abbildung ist dieser Bereich deshalb grau hinterlegt und mit einem Fragezeichen versehen.

Allgemein können die zu einem Zyklobutan-Ring führenden Reaktionen, sowohl über einen Singulett-Zustand als auch über einen Triplett-Zustand ablaufen. Im ersten Fall ist zum Beispiel die Bildung eines Excimer- oder Exciplex-Zustands zwischen einem angeregten Singulett-Zustand und einem weiteren Molekül im Grundzustand denkbar. Aus diesem kann die Bildung der beiden Sigma-Bindungen des Zyklobutan-Rings synchron erfolgen, und zu einer Stereospezifität der Produkte führen. Ist dagegen ein Triplett-Zustand für die Reaktion verantwortlich, ist eine Spin-Umkehr beim Übergang in den Grundzustand des Zykloaddukts notwendig. Die Reaktion verläuft dann in der Regel über ein Bi-Radikal mit größeren geometrischen Freiheiten, und ist nicht stereospezifisch [Woe98]. Die Stereoselektivität einer Reaktion kann deshalb Hinweise auf den Reaktionsmechanismus liefern. Allerdings wird die Geometrie der Addukte auch durch die äußeren Bedingungen, wie zum Beispiel die Fixierung der Moleküle in Kristallen oder die Anordnung in einem Polymer, bestimmt. Die Ergebnisse aus experimentellen Studien zur Dimerbildung zwischen Thymin-Molekülen liefern, in Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen, Hinweise sowohl für einen Singulett- als auch für einen Triplett-Mechanismus.

Hinweise für Triplett-Mechanismus: Bei der Belichtung von Thymin-Molekülen in Lösung konnten alle vier stereoisomeren Formen nachgewiesen werden [Wag70, Fis70, Whi71, Joh62]. Man geht bei diesen Experimenten davon aus, dass nach Photoanregung ein kleiner Teil der Moleküle (< 1 %) durch Interkombination in den Triplett-Zustand übergeht. Trifft eines dieser Moleküle, während der Lebensdauer des Triplett-Zustands, unter geeigneter räumlicher Geometrie auf ein Molekül im Grundzustand, kann es zur Photoreaktion kommen. Experimente mit Triplett-Sensibilisatoren und -Löschern zeigen [Lam66, Whi71], dass die Rate der Produktbildung mit der Konzentration dieser Moleküle variiert und bestätigen den Triplett-Mechanismus. Die aus den Experimenten bestimmten Ausbeuten sind diffusionslimitiert und deuten auf ein metastabiles Intermediat hin, das entweder zum Dimer führt oder wieder in die Einzel-Basen zerfällt. Diskutiert werden in diesem Zusammenhang sowohl Excimer-Zustände als auch ein 1,4-Di-Radikal-Zustand, wie er in anderen Zykloadditionen beobachtet wurde [Wag69, Bec91].

Hinweise für Singulett-Mechanismus: Die Verhältnisse ändern sich, wenn konzentrierte Thymin-Lösungen verwendet werden [Wan61, Wag70]. In hohen Konzentrationen führen Van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Chromophoren zur Bildung von Pyrimidin-Aggregaten. Man nimmt an, dass unter diesen Bedingungen die Basen zum Teil gestapelt vorliegen und neben einem Triplett auch ein angeregter Singulett-Zustand oder ein Singulett-Excimer für die Dimerisierung verantwortlich sein kann [Cad90]. In diesem Zusammenhang deuten auch Experimente an Thymin-Basen in gefrorener Lösung [Eis67] auf einen dominanten Singulett-Mechanismus hin. In diesen Experimenten bilden Thymin-Moleküle Mikrokristalle [Ger61], in denen die Moleküle parallel und für die Dimerisierungs-Reaktion passend angeordnet sind.

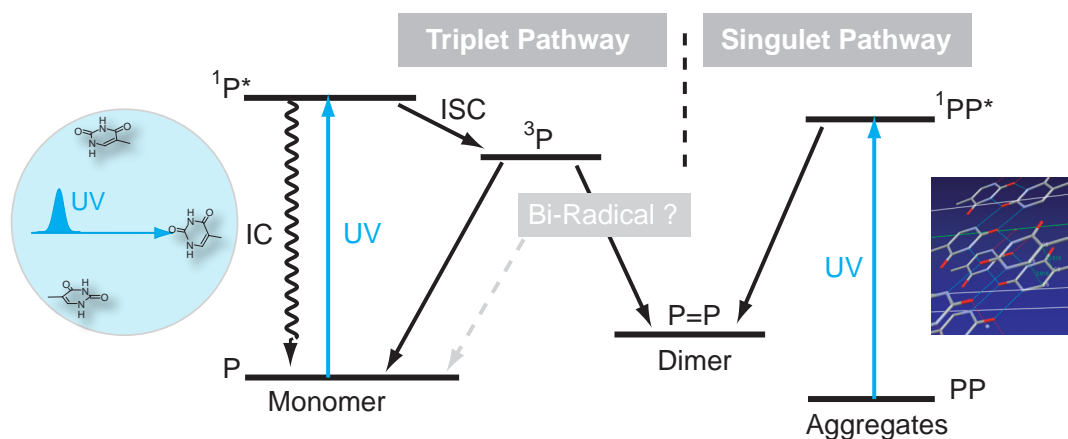


Abb. 2.22: Schematische Darstellung eines Reaktionsschemas für die Dimerisierung zwischen Pyrimidin-Basen (P). Die aus der Literatur bekannten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Thymin-Basen, je nachdem ob sie bei der Anregung isoliert (Monomer) vorliegen oder ein Aggregat mit anderen Thymin-Basen bilden, entweder über einen Triplett-Zustand (möglicherweise mit einem Bi-Radikal als Zwischenzustand) oder direkt über einen Singulett-Zustand gebildet werden.

Sowohl Triplett- als auch Singulett-Zustände werden demnach, wie in Abbildung 2.22 dargestellt, für die Photoreaktion zwischen einzelnen Thymin-Molekülen diskutiert. Während die Bildung von Pyrimidin-Dimeren (P=P) zwischen einzelnen Pyrimidin-Basen in Lösung diffusionslimitiert ist, und deshalb nur ein langlebiger Triplett-Zustand für die Photoreaktion verantwortlich sein kann, wird für die Bildung der CPD-Schäden in Thymin-Aggregaten eine schnelle Reaktion über einen Singulett-Zustand vorgeschlagen. Allerdings steht auch für Thymin-Aggregate eine direkte Beobachtung der Reaktion und der Reaktions-Geschwindigkeit noch aus. Zudem lassen sich die aus den oben beschriebenen Experimenten erhaltenen Ergebnisse nicht auf die Verhältnisse in einem DNA-Einzelstrang oder in einer DNA-Doppelhelix übertragen. In diesen Systemen können die Basen weder als isoliert noch als völlig unabhängig voneinander betrachtet werden.

Dimer-Bildung in DNA-Modellsystemen

Viele Studien haben sich in der Vergangenheit vor allem mit den Quantenausbeuten der Reaktion in DNA beschäftigt [Rah66, Cad90, Dou06]. Die Ausbeuten für die Bildung von Thymin-Dimeren zwischen benachbarten Thymin-Basen liegen in DNA ebenso wie in Thymin-Poly-Nukleotiden im Bereich von wenigen Prozent [Wul63, Mit84, Cad90, Dou00, Dou06]. In Bezug auf die möglichen Reaktionsmechanismen ist bisher lediglich bekannt, dass auch in der DNA-Doppelhelix eine Bildung von Thymin-Dimeren über einen Triplett-Mechanismus möglich ist. Dies konnte eindeutig durch den Einsatz von Triplett-Sensibilisatoren (z.B. Acetophenon, Aceton) [Mei72, Lam67] gezeigt werden. Allerdings schließen diese Ergebnisse einen weiteren Reaktionsweg über einen Singulett-Zustand bei direkter UV-Absorption durch die Thymin-Basen nicht aus.

Vor kurzem wurden zwei Studien veröffentlicht, in denen die CPD-Bildung zwischen Thymin-Basen in Thymin-Oligomeren mit zeitaufgelösten, spektroskopischen Methoden untersucht wurde:

- In einem Experiment wurde mit Laser-Flash-Photolyse die Bildung von CPD- und (6-4)-Photoschäden untersucht [Mar05]. Die Bildung von Zyklobutan-Dimeren konnte in diesem Experiment jedoch nicht zeitlich aufgelöst werden. Sie erfolgt offenbar innerhalb der Zeitauflösung des Experiments von etwa 200 ns. Gleichzeitig war nach 200 ns die Anzahl der bevölkerten Triplett-Zustände um eine Größenordnung niedriger als bei der Vergleichssubstanz TMP (Thymin-5'-Monophosphat), das unter gleichen Bedingungen untersucht wurde. Die Reaktion könnte demnach über einen Triplett-Zustand ablaufen, bei dem alle gebildeten Triplett-Zustände mit einer Ausbeute nahe 100 % innerhalb von 200 ns das Photoprodukt bilden. Allerdings könnte die reduzierte Triplett-Ausbeute auch auf ein Löschen der Interkombination durch die Wechselwirkungen im Strang zurückzuführen sein, und die Schädigung über einen Singulett-Mechanismus ablaufen [Wil76].
- In einer anderen Studie wurde zeitaufgelöste UV/Vis-Spektroskopie, mit einer Zeitauflösung im hundert Femtosekunden-Bereich, für die Bestimmung elektronischer Zustände in Poly-Nukleotiden verwendet [CH05]. In diesem Fall verhinderten jedoch die Absorptionseigenschaften des Dimers im ultravioletten Spektralbereich eine eindeutige Aussage zur Zeitskala der Bildung und des Bildungs-Mechanismus. Ein möglicherweise nach UV-Absorption erzeugtes Thymin-Dimer besitzt wie in Abbildung 2.20 gezeigt im Wellenlängenbereich kleiner 250 nm keine Absorptionsbande, die der Bildung eines Dimer-Schadens eindeutig zugewiesen werden könnte.

In keiner der beiden Studien konnte ein eindeutiger Nachweis für die Kinetik oder den Bildungs-Mechanismus der Photoreaktion geführt werden. Ein Experiment, das in der Lage sein soll die CPD-Reaktion zeitaufgelöst zu verfolgen, muss demnach eine hohe Zeitauflösung mit einer hohen Struktursensitivität vereinen. Die zeitaufgelöste Schwingungsspektroskopie stellt eine mögliche Antwort auf dieses Problem dar. Infrarot- und Raman-Spektroskopie werden seit vielen Jahren erfolgreich als struktursensitive Methoden eingesetzt. Sie bieten Zugang zu einzelnen Schwingungsmoden, die spezifisch für das Molekül und dessen Struktur sind [Sch95, Stu97]. Zum Beispiel lassen sich die vier Stereoisomere der Thymin-Dimere im infraroten Spektralbereich eindeutig unterscheiden [Wei66].

In der Literatur finden sich zahlreiche Studien, die sich mit den Zuordnung der Schwingungsbanden in DNA befassen [Les92, Aid96, Tsu97, Zha98, Szc00, Ban03, Leeb, Leea]. Bei der Untersuchung von DNA- und RNA-Molekülen im infraroten Spektralbereich ist der Bereich zwischen 1800 und 800 cm^{-1} , der sich in mehrere Bereiche einteilen lässt, von besonderem Interesse [Tai92, Ban03]:

- **$1800 - 1500\text{ cm}^{-1}$** : Absorptionen in diesem Bereich sind auf Streck-Schwingungen von Doppelbindungen der Basen (C=C, C=N, C=O) zurückzuführen. Sie reagieren sehr sensitiv auf Wasserstoffbrücken, Basen-Paarung und -Stapelung[Ban03].
- **$1500 - 1250\text{ cm}^{-1}$** : Dieser Bereich umfasst Schwingungsmoden der Basen, die mit Schwingungsmoden der Zucker-Komponenten koppeln. Er ist sensitiv auf die Anordnung der Basen relativ zur Zuckerkomponente (*syn*-, *anti*-Konformation der N-Glycosidischen Bindung) und der Zucker-Konformation (C2'-endo, C3'-endo Konformation) [Let87, Tsu97].

- **1250 – 800 cm^{-1}** : In diesem Bereich liegen Schwingungsmoden der Zucker- und Phosphat-Gruppen sowie des Phosphodiester-Rückgrats. Sie können als Marker-Banden für die DNA-Konformation (A, B, Z-DNA) dienen [Ada86].

Diese Einteilung zeigt, dass die IR-Spektroskopie ein breites Spektrum für den strukturspezifischen Nachweis von Konformationen bietet. In den letzten Jahren konnte der infrarote Spektralbereich auch für zeitaufgelöste Experimente genutzt werden [Sto92]. Fortschritte in der Lasertechnologie ermöglichen heute die Erzeugung extrem kurzer Lichtimpulse im infraroten Spektralbereich. Mit der Methode der Anreg-Abtast-Spektroskopie ist damit auch im infraroten Spektralbereich eine Zeitauflösung im Femtosekundenbereich möglich [Nib05, Kui05, Kui06, Kui07]. In dieser Arbeit wurde diese Technik optimiert und für die Untersuchung der Schadens-Bildung in einem DNA-Modellsystem eingesetzt. Im nächsten Kapitel werden die experimentellen Grundlagen dieser Technik detailliert beschrieben.

3 Experimentelles: Methodik, Aufbau und Messablauf

Viele photophysikalische und photochemische Prozesse in der Molekülphysik spielen sich auf Zeitskalen im sub-Nanosekunden Bereich ab ($1 \text{ ns} = 10^{-9} \text{ s}$). Zum Beispiel konnten in Nukleinbasen nach UV-Anregung sehr schnelle interne Konversionsprozesse nachgewiesen werden, die auf einer Zeitskala von wenigen hundert Femtosekunden ($1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$) ablaufen. Da auf dieser Zeitskala auch Schwingungsbewegungen von Atomkernen stattfinden, stellt sie die untere Grenze für die Zeitdauer chemischer Reaktionen dar. Möchte man diese extrem schnellen Prozesse direkt verfolgen, benötigt man entsprechend eine Messmethode, die eine Zeitauflösung im Femtosekunden-Bereich erlaubt.

Dieser Zeitbereich lässt sich mit dem sogenannten Anreg-Abtast-Verfahren erschließen. Basierend auf der Erzeugung kurzer Lichtimpulse konnte das Gebiet der Ultrakurzzeit-Spektroskopie begründet und durch Fortschritte in der Lasertechnologie [Ste99] die Femtosekundenspektroskopie etabliert werden [Zew00]. Im nächsten Abschnitt wird das dieser Technik zugrunde liegende Prinzip kurz erläutert. Abschnitt 3.2 gibt einen Überblick zu dem in dieser Arbeit verwendeten Femtosekunden-Infrarot-Spektrometer. Dabei wird sowohl der experimentelle Aufbau vorgestellt als auch auf den Messablauf und die Datenverarbeitung eingegangen. Den Abschluss bildet eine kurze Beschreibung der für die stationären Belichtungs-Experimente im infraroten Spektralbereich verwendeten Apparatur. Begriffe der nichtlinearen Optik werden in diesem Kapitel entsprechend den Ausführungen in [She84, Boy92, Cer03] verwendet.

3.1 Prinzip der Anreg-Abtast-Spektroskopie

Das Prinzip der Anreg-Abtast-Spektroskopie ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt. Eine Lichtquelle (Kurzpuls-Laser) liefert kurze Lichtimpulse, die über zwei separate Lichtwege auf die zu untersuchende Probe geleitet werden. Einer der beiden Lichtimpulse dient zur Anregung der Probe (Anreg-Impuls) und löst einen photophysikalischen oder photochemischen Prozess aus. Der andere Lichtimpuls (Abtast-Impuls) wird nach Durchlaufen der Probe detektiert. Aus der Messung der Intensität des Abtast-Impulses mit und ohne vorheriger Anregung lässt sich die durch die Anregung verursachte Absorptionsänderung bestimmen. Die zeitliche Entwicklung dieser Absorptionsänderung, und damit der Ablauf einer photochemischen oder photophysikalischen Reaktion, wird durch die Variation des zeitlichen Abstands der beiden Lichtimpulse ermöglicht (siehe Abbildung 3.1 B). Dazu wird einer der Lichtimpulse — in diesem Fall der Anreg-Impuls — über einen variablen Weg (Verzögerungsstrecke) geführt und aus Umweg und Lichtgeschwindigkeit der Laufzeitunterschied der beiden Lichtimpulse an der Probe berechnet. Eine heute technisch einfach zu realisierende Positioniergenauigkeit von einem Mikrometer ermöglicht entsprechend eine Zeitauflösung von etwa drei Femtose-

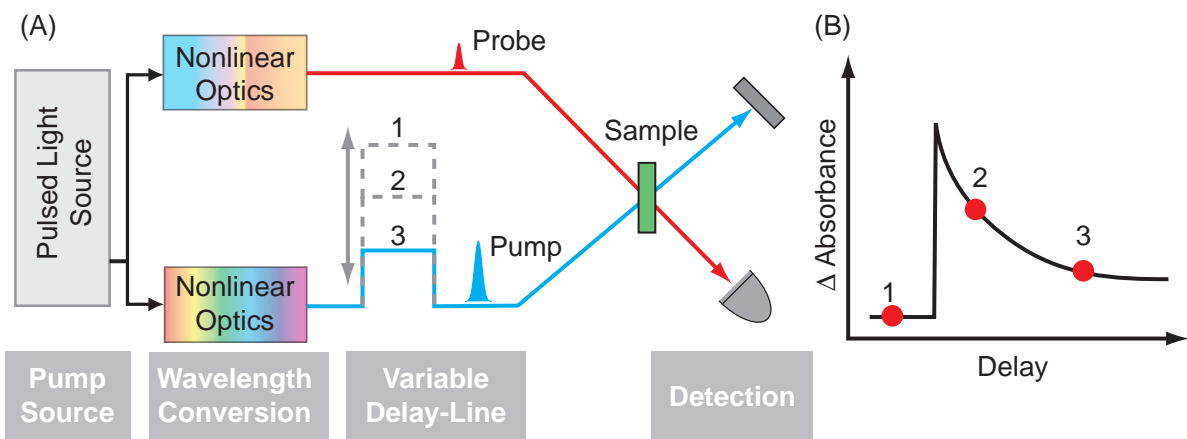


Abb. 3.1: Prinzip der Anreg-Abtast-Spektroskopie. (A) Ein Lasersystem liefert kurze Lichtimpulse, die über nichtlineare Prozesse in verschiedene Spektralbereiche konvertiert werden. In einem Zweig wird dabei ein intensiver Anregungs-Impuls („Pump“, blau) erzeugt, der in der Probe („Sample“) eine Reaktion auslöst. Im anderen Zweig wird ein schwacher Abtast-Impuls („Probe“, rot) erzeugt, der ebenfalls das Anregungsvolumen durchläuft und anschließend detektiert wird. (B) Über eine Verzögerungsstrecke (Delay) kann die Zeitdifferenz zwischen Anreg- und Abtast-Impulsen variiert und die Absorptionsänderung der Probe in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit verfolgt werden.

kunden. Die Zeitauflösung des Systems wird deshalb in der Regel durch die Impulsdauern der verwendeten Anreg- und Abtast-Impulse begrenzt. Eine Erhöhung der Zeitauflösung ist deshalb oft mit der Erzeugung möglichst kurzer Lichtimpulse verknüpft. Heute haben sich in der Ultrakurzzeit-Spektroskopie Festkörper-Laser etabliert, die Lichtimpulse mit Impulsdauern im Femtosekunden-Bereich liefern. Mit diesen intensiven Femtosekunden-Lasersystemen lassen sich Effekte der nichtlinearen Optik nutzen [She84, Boy92], die die Erzeugung spektral abstimmbarer und an die jeweilige Fragestellung angepasster Lichtimpulse ermöglichen. Ein guter Überblick zur Theorie der nichtlinearen Prozesse und der experimentellen Umsetzung findet sich in [Cer03].

3.2 Femtosekunden-Infrarot-Spektrometer

Der Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten Femtosekunden-Infrarot-Spektrometers ist in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt. Er besteht aus einem zentralen Lasersystem (I), das kurze Lichtimpulse (~ 100 Femtosekunden) bei einer Zentralwellenlänge um 800 nm liefert. Die Ausgangs-Leistung von etwa 700 mW bei einer Repetitions-Rate von 1 kHz wird auf zwei Experimente aufgeteilt. Etwa 250 mW werden in einem Anreg-Abtast-Experiment im UV und sichtbaren Spektralbereich verwendet, etwa 450 mW stehen für das Femtosekunden-Infrarot-Spektrometer zur Verfügung. In diesem wird ein Teil der Ausgangsleistung in einer mehrstufigen Frequenzkonversion für die Erzeugung abstimmbarer Abfrage-Impulse im mittleren infraroten Spektralbereich (MIR) verwendet (II). Diese basiert auf einer Weißlicht-Erzeugung („continuum generation“, CG) in Kombination mit zwei optisch parametrischen Verstärkern („optical parametric amplifier“, OPA) und einer Differenz-Frequenz-Erzeugung („differenz frequency mixing“, DFM). Für die Anregung wird das Licht des zentralen Lasersystems über

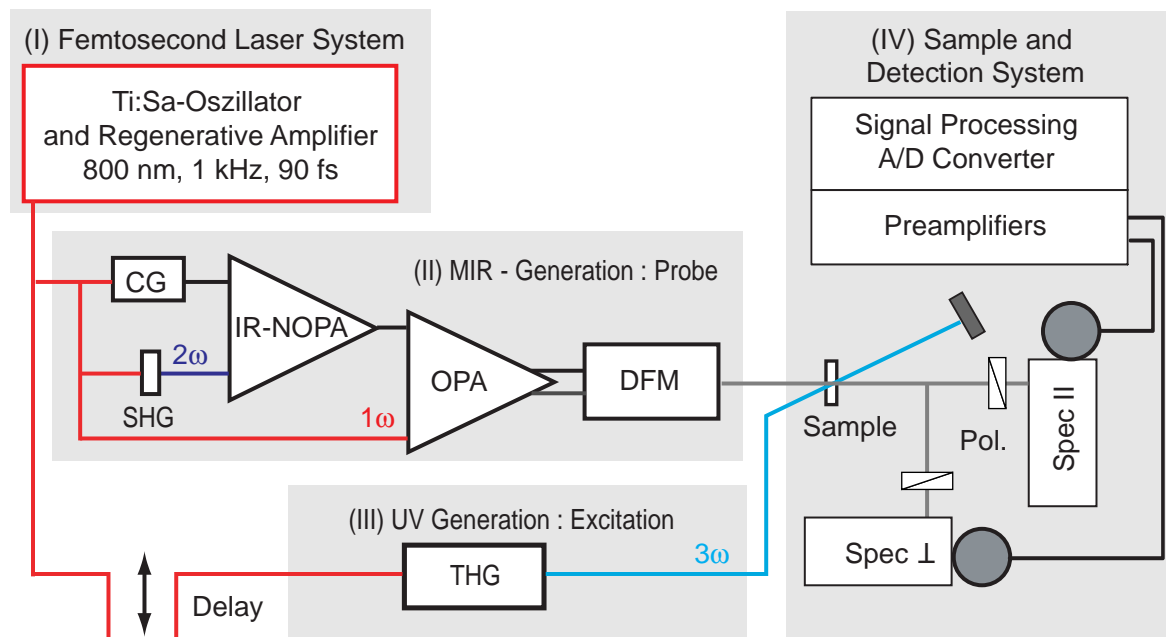


Abb. 3.2: Blockschema des Femtosekunden-Infrarot-Spektrometers. (I) Als Quelle für kurze Lichtimpulse dient ein zentrales Femtosekunden-Lasersystem. (II) Die Erzeugung der Abtast-Impulse erfolgt in einer mehrstufigen Frequenzkonversion. Die in der Abbildung verwendeten Abkürzungen sind im Text erklärt. (III) Für die Anregung werden Lichtimpulse im UV-Bereich bei der 3. Harmonischen des Lasersystems erzeugt. Der zeitliche Abstand zwischen Anreg- und Abtast-Impulsen wird über eine variable Verzögerungsstrecke (Delay) im Anregungs-Zweig eingestellt. (IV) Die Abtast-Impulse werden nach der Probe geteilt, in Spektrographen dispergiert und frequenz aufgelöst detektiert. Die Detektion beruht auf einer Vielkanal-Detektion, in der die einzelnen Mess-Signale in einem Analog-Digital-Wandler konvertiert und über eine Computer-Schnittstelle ausgelesen werden.

eine variable Verzögerungsstrecke geführt und in den UV-Bereich („third harmonic generation“, THG) konvertiert (III). Anreg- und Abtast-Impuls werden in der Probe räumlich überlagert und anschließend detektiert (IV). Für die Abtast-Impulse steht dabei eine Vielkanal-Detektion zur Verfügung, die es erlaubt, in einer einzelnen Messung einen breiten Spektralbereich abzudecken. Die einzelnen Bestandteile des Anreg-Abtast-Experiments werden im Folgenden kurz beschrieben.

3.2.1 Femtosekunden-Lasersystem

Das zentrale Femtosekunden-Lasersystem wurde von Mitarbeitern des BMO entwickelt und aufgebaut. Es besteht aus einem Laseroszillator (I) mit nachfolgendem regenerativem Verstärker (II) und wird in [Lut01, Spö01, Hub02] detailliert beschrieben. An dieser Stelle wird deshalb nur das der Erzeugung kurzer und intensiver Lichtimpulse zugrunde liegende Konzept kurz skizziert und anhand der Abbildung 3.3 erläutert.

Im Laseroszillator wird ein Titan:Saphir-Kristall als aktives Medium verwendet¹ und

¹Mit Titanionen dotierte Saphir-Kristalle (Ti:Saphir) haben sich als Lasermedium für Ultrakurzpulslaser etabliert [Bac98].

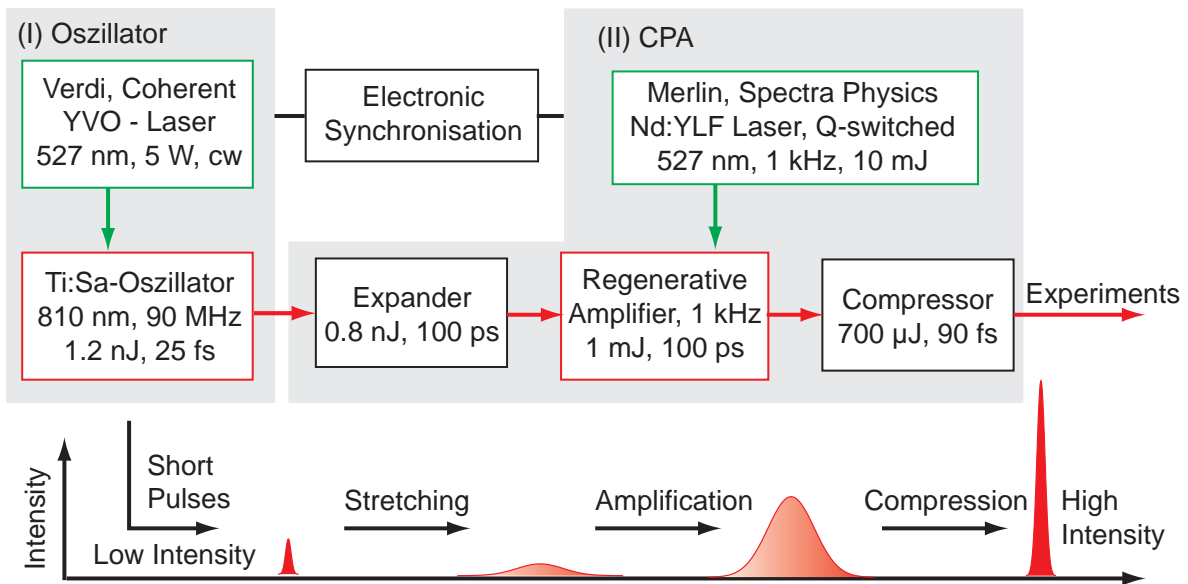


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des zentralen Femtosekunden-Lasersystems. Oben: (I) In einem Laser-Resonator werden kurze fs-Lichtimpulse mit einer Repetitionsrate von 90 MHz erzeugt. (II) Einzelne Impulse werden anschließend in einem optischen Verstärker („chirped pulse amplification“, CPA) in der Intensität weiter verstärkt. Über eine elektronische Synchronisation erfolgt die Auswahl der Oszillator-Impulse und die Abstimmung auf die Repetitionsrate des Verstärkers (1 kHz). Unten: Schematische Darstellung des zeitlichen Intensitäts-Verlaufs der Impulse. Die Impulse aus dem Oszillator werden vor der Verstärkung zunächst in einer Gitteranordnung zeitlich gestreckt und anschließend wieder komprimiert. Auf diese Weise werden zu hohe Intensitäten und damit Schäden an den Optiken im Verstärkungsprozess vermieden.

durch einen kommerziellen Festkörperlaser (Verdi V-5, Fa. Coherent) kontinuierlich gepumpt. Lasertätigkeit erfolgt bei einer Wellenlänge um 800 nm. Die Erzeugung kurzer Oszillator-Impulse wird durch die Kopplung der Resonator-Moden über die sogenannte „Kerr-Linsen-Modenkopplung“ ermöglicht [Spe91]. Am Ausgang des Ti:Saphir-Oszillators stehen Lichtimpulse mit einer Zentralwellenlänge von 810 nm, einer Repetitionsrate von 90 MHz und einer Impulsdauer im Bereich von etwa 25 fs zur Verfügung [Lut01].

Da die Impulsenergie mit 1-2 nJ für die geplanten Konversionsprozesse und Experimente noch zu gering ist, werden die Lichtimpulse in einem CPA-Verstärker-System („chirped pulse amplification“, CPA) [Str85] weiter verstärkt und dabei die Energie einzelner Oszillator-Impulse um 6 Größenordnungen erhöht. Allerdings liegt die Zerstörschwelle der optischen Komponenten im Verstärker weit unterhalb der Leistungsdichte für direkt verstärkte Oszillator-Impulse. Aus diesem Grund werden die Oszillator-Impulse vor dem Verstärkungsprozess in einer Gitteranordnung [Tre69] (Expander) durch Einführen positiver Gruppengeschwindigkeits-Dispersion (GVD) um 3 Größenordnungen zeitlich gestreckt und zu hohe Spitzenintensitäten bei der nachfolgenden Verstärkung vermieden. Der regenerative Verstärker besteht aus einem Resonator mit einem weiteren Ti:Saphir-Kristall als aktivem Medium. In diesem deponiert ein gütegeschalteter frequenzverdoppelter Nd:YLF-Laser (Merlin, Fa. Spectra Physics) seine Energie mit einer Repetitionsrate von 1 kHz und erzeugt eine Besetzungsinversion. Aus dem Impuls-Zug der gestreckten Oszillator-Impulse wird nun über eine „optische Weiche“

(Kombination aus Polarisator und Pockelszelle) ein Impuls ausgewählt und in den Verstärker eingekoppelt. Dabei stimmt eine elektronische Synchronisation die Repetitionsrate von Oszillator und Verstärker ab. Nach etwa 15-20 Umläufen im Resonator hat der Impuls die im Ti:Saphir deponierte Energie abgebaut. Der verstärkte Impuls wird aus dem Resonator ausgekoppelt und in einer zweiten Gitteranordnung (Kompressor) mit negativer Gruppengeschwindigkeits-Dispersion wieder zeitlich komprimiert. Das System liefert kurze (~ 90 fs) und intensive Lichtimpulse ($\sim 0,7$ mJ, 1 kHz Repetitionsrate) bei einer Zentralwellenlänge von etwa 810 nm. Die relevanten Parameter des Lasersystems sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Parameter des zentralen Lasersystems	
Zentralwellenlänge	810 nm
Spektrale Breite (FWHM)	15 nm
Impulsdauer	90 fs
Impulsenergie	$\sim 700 \mu\text{J}$
Repetitionsrate	1 kHz
Bündeldurchmesser (FWHM)	~ 4 mm
Stabilität (RMS)	0,3 - 0,5 %

Tabelle 3.1: Technische Daten des zentralen Femtosekunden-Lasersystems.

3.2.2 Erzeugung abstimmbarer Abtast-Impulse im MIR-Bereich

In den Anreg-Abtast-Experimenten soll die Absorptionsänderung der Moleküle im mittleren infraroten Spektralbereich (MIR) untersucht werden. Dazu müssen die Lichtimpulse des zentralen Lasersystems bei 800 nm in diesen Spektralbereich konvertiert werden. In der Praxis hat sich für entsprechende Lasersysteme ein Konzept etabliert, das auf der Verwendung von zwei optisch parametrischen Verstärker-Stufen („optical parametric amplifier“, OPA) in Kombination mit einer sogenannten Differenzfrequenz-Mischung („difference frequency mixing“, DFM) basiert [Ham97a, Kai00, Cer03, Nib05]. Dabei werden die beiden OPA-Stufen mit der Fundamentalen des Laser-Systems als Pump-Lichtquelle betrieben und abstimmbare Lichtimpulse im nahinfraroten Spektralbereich (NIR) um 1400 und 1800 nm erzeugt. Die Bildung der Differenzfrequenz (DFM) liefert schließlich Impulse im MIR-Bereich zwischen 3 und $10 \mu\text{m}$.

In dieser Arbeit wurde ein ähnliches Konzept verwendet und in Bezug auf das Signal zu Rausch Verhältnis optimiert. Dabei wird im Gegensatz zum zweistufigen OPA-Aufbau eine Kombination aus einer NOPA-Stufe („noncollinear optical parametric amplifier“) [Wil97, Rie00], die mit der 2. Harmonischen des Lasersystems betrieben wird, und einer OPA-Stufe eingesetzt. Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass die erste Stufe mit Lichtimpulsen im sichtbaren Spektralbereich betrieben wird und eine einfache Justage und Optimierung des Verstärkungsprozesses erlaubt. Zudem führt die nichtkollineare Geometrie (Winkel zwischen Seed- und Pump-Impuls $\sim 3^\circ$) zu einer räumlichen Trennung der sichtbaren und nahinfraroten Lichtimpulse für den nächsten Verstärkungsprozess ohne dichroitische Optik. Eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus und der Charakterisierung der mittelinfraroten Lichtimpulse findet

sich in [Sch02, Sie05]. Das Konzept der MIR-Erzeugung ist in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt und wird im Folgenden kurz erläutert.

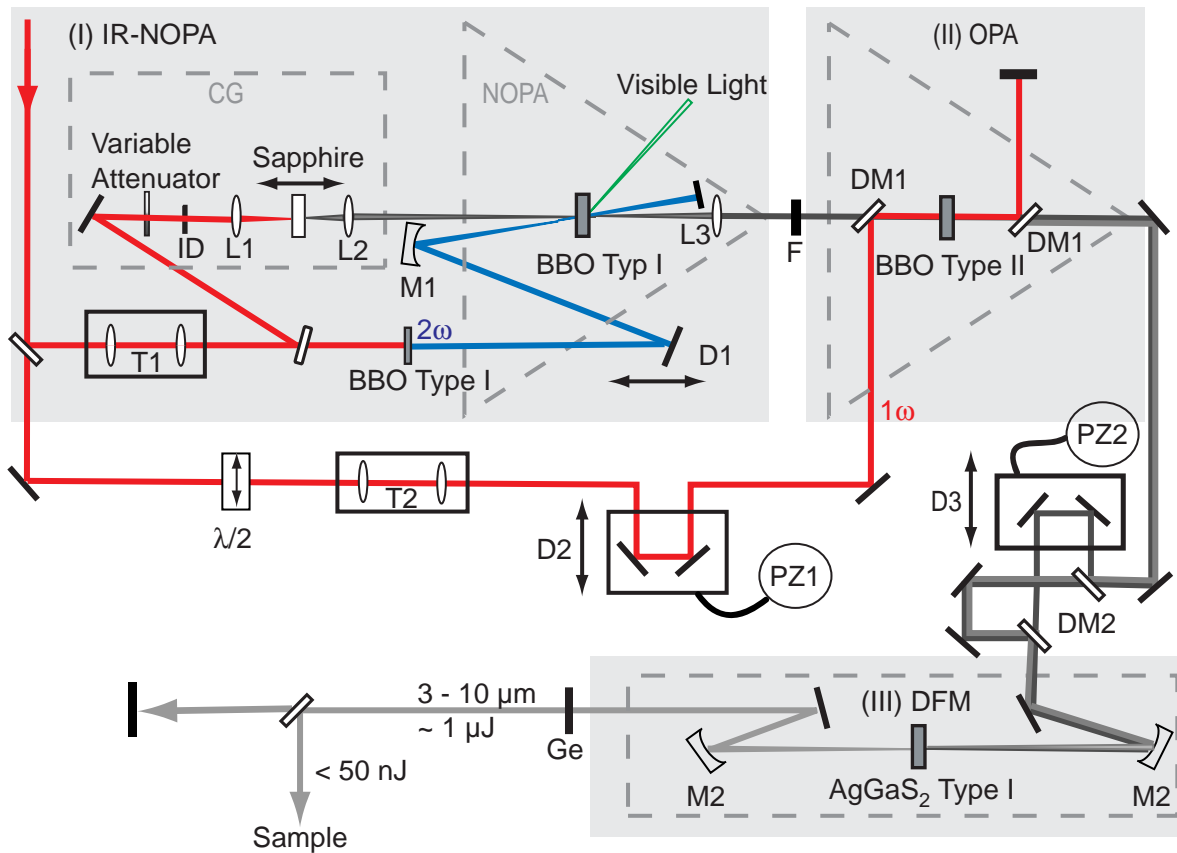


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Erzeugung abstimmbarer Abtast-Impulse im mittleren infraroten Spektralbereich (MIR). Die Erzeugung basiert auf einer dreistufigen Frequenz-Konversion. (I) In einem nicht kollinearen optischen Verstärker (NOPA) wird der nahinfrarote (NIR) Anteil (~ 1400 nm) eines Weißlichtkontinuums (CG) verstärkt. Als Pump-Licht für diesen Prozess dient die zweite Harmonische (~ 405 nm). (II) In der zweiten Stufe (OPA) wird das NIR-Licht mit Hilfe der Fundamentalen (~ 810 nm) weiter verstärkt und ein zweiter NIR-Lichtimpuls (~ 1800 nm) erzeugt. (III) Die beiden NIR-Impulsen werden zeitlich und räumlich in einem weiteren nichtlinearen Kristall überlagert und die Differenz-Frequenz im MIR gebildet. Abkürzungen - T: Teleskop, L: Linse, ID: Irisblende, DM: Dichroitischer Spiegel, D: Verzögerungsstrecke, PZ: Piezo-Stellelement, BBO: β -Barium-Borat, AgGaS₂: Silberthiagolat, Ge: antireflexbeschichtetes Germanium-Substrat.

(I) In der ersten Stufe wird der nahinfrarote Anteil eines Weißlichtkontinuums (Seed-Licht, ~ 1400 nm) in einem nichtkollinearen optisch parametrischen Prozess verstärkt („noncollinear optical parametric amplification“, NOPA) [Pie00]. Das Weißlichtkontinuum wird dabei in einem 5 mm dicken Saphir-Substrat erzeugt und mit der zweiten Harmonischen des Lasersystems in einem BBO-Kristall (Dicke = 2 mm, $\Theta = 32,5^\circ$, Typ I) räumlich und zeitlich überlagert. Die Erzeugung der 2. Harmonischen erfolgt ebenfalls in einem BBO-Kristall (Dicke = $500 \mu\text{m}$, $\Theta = 29^\circ$, Typ I). Während die Phasen Anpassung (Typ I) des Verstärkungsprozesses durch Variation des Kristallwinkels erfolgt, wird der zeitliche Überlapp zwischen den Lichtimpulsen über eine Verzögerungsstrecke (D1) erreicht. Bei der Verstärkung entsteht entsprechend der Energie-Erhaltung ein weiterer Lichtimpuls im sichtbaren Spektralbereich (~ 560 nm), der

detektiert und für die Optimierung des Konversionsprozesses verwendet wird. Neben der Energie-Optimierung erlaubt die gleichzeitige Bestimmung des sichtbaren Spektrums mit einem Faserspektrometer (Fa. Ocean Optics) die Kontrolle der Abstimmung der NIR-Impulse für die nachfolgenden Prozesse.

(II) In der zweiten Stufe werden die aus dem NOPA-Prozess gewonnenen NIR-Impulse in einem zweiten optisch parametrischen Prozess (OPA) verstärkt. Diesmal wird als Pump-Licht die Fundamentale des Lasersystems (810 nm) eingesetzt und über einen dichroitischen Spiegel (DM) kollinear mit den NIR-Impulsen der ersten Stufe in einem BBO-Kristall (Dicke = 3 mm, $\Theta = 27^\circ$, Typ II) überlagert. Für die Phasenanpassung (Typ II) wird die Polarisation der Fundamentalen mit einem $\lambda/2$ -Plättchen um 90° gedreht. Im Verstärkungsprozess wird der NIR-Impuls aus der ersten Stufe (~ 1400 nm) weiter verstärkt und gleichzeitig — entsprechend der Energieerhaltung — ein Lichtimpuls im Spektralbereich um 1800 nm erzeugt. Durch Variation der Kristallwinkel und des zeitlichen Überlapps in der ersten und zweiten Stufe (Verzögerungsstrecken D1 und D2) können die Zentralwellenlängen der NIR-Impulse in einem Bereich zwischen 1250 - 1550 nm bzw. 1650 - 2200 nm abgestimmt werden.

(III) Mit diesen Impulsen wird nun in der dritten Stufe die Differenz-Frequenz erzeugt. Für diesen Prozess ist eine sehr gute Optimierung des räumlichen und zeitlichen Überlapps im DFM-Kristall notwendig. Dazu werden die beiden nahinfraroten Lichtimpulse zunächst über dichroitische Spiegel (DM) separiert, entlang verschiedener Verzögerungsstrecken geleitet und anschließend wieder zusammengeführt. Die Verzögerungsstrecke D3 erlaubt die zeitliche Überlagerung der beiden NIR-Anteile in einem Silberthiogolat-Kristall (AgGaS_2 , Dicke = 2 mm, $\Theta=34^\circ$, Typ I) der für die Bildung der Differenz-Frequenz verwendet wird. Die Phasenanpassung erfolgt durch Variation des Kristallwinkels und erlaubt mit den abstimmbaren NIR-Impulsen aus der zweiten Stufe die Erzeugung kontinuierlich abstimmbarer Lichtimpulse zwischen 3 und 10 μm ($1000 - 3300 \text{ cm}^{-1}$). Die Impulse besitzen eine spektrale Breite von etwa 150 cm^{-1} und Impulsdauern zwischen 100 und 150 fs [Sch02, Sie05]. Die Impulsenergie von etwa 1 μJ ist für die Verwendung als Abtast-Licht allerdings noch zu hoch. Aus diesem Grund wird für das Anreg-Abtast-Experiment nur ein Reflex der MIR-Impulse an einer Kalziumfluorid-Scheibe (CaF_2 , Keilplatte) mit einer Energie kleiner 50 nJ verwendet.

Optimierung der IR-Erzeugung

Für die in dieser Arbeit notwendige hohe Sensitivität wurde die MIR-Erzeugung in Hinblick auf das Signal zu Rausch-Verhältnis optimiert und in den Verzögerungsstrecken D2 und D3 Piezo-Stellelemente (Fa. Piezosysteme Jena) eingebaut, die eine optimale Justage der nichtlinearen Prozesse erlauben. Der auf diese Weise exakt und reproduzierbar einstellbare zeitliche Überlapp ist von entscheidender Bedeutung. So konnte in [Ham00] gezeigt werden, dass durch eine Optimierung des zeitlichen Überlapps der nahinfraroten Lichtimpulse im DFM-Prozess eine Unterdrückung des MIR-Rauschens im Vergleich zur Fundamentalen des Lasersystems möglich ist. Mit der Erweiterung durch die Piezoelemente konnten in dieser Arbeit die Puls zu Puls-Schwankungen des zentralen Lasers im Vergleich zu den daraus erzeugten MIR-Impulsen reproduzierbar um einen Faktor zwei unterschritten und eine wesentliche Verbesserung der Sensitivität der Anlage erreicht werden.

3.2.3 Erzeugung von Anreg-Impulsen im UV-Bereich

Mit den Anregungs-Impulsen sollen in den zu untersuchenden Molekülen Prozesse ausgelöst werden, die auch in der DNA von Organismen unter UV-Strahlung der Sonne stattfinden. Obwohl die Sonnenstrahlung auf der Erdoberfläche nur geringe Anteile im Wellenlängenbereich unter 300 nm besitzen, wird in Laborexperimenten in der Regel eine Strahlung im Bereich um 260 nm benutzt, da in diesem Bereich die Absorptionsmaxima der Nukleinsäuren liegen. Zu Beginn dieser Arbeit waren optische Aufbauten nur für die Erzeugung der 2. Harmonischen (~ 405 nm) und für die Erzeugung abstimmbarer Lichtimpulse im sichtbaren Spektralbereich (NOPA) vorhanden. Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb einen weiteren optischen Aufbau zu realisieren, der kurze Lichtimpulse im Bereich der Absorptionsmaxima der Nukleinsäuren liefert. Dabei sollte der Aufbau möglichst kompakt sein, damit er in den bestehenden Aufbau integriert werden konnte. Eine schematische Darstellung des realisierten Konzepts, das auf der Erzeugung der 3. Harmonischen der Fundamentalen im Bereich um 270 nm beruht, ist in Abbildung 3.5 schematisch gezeigt.

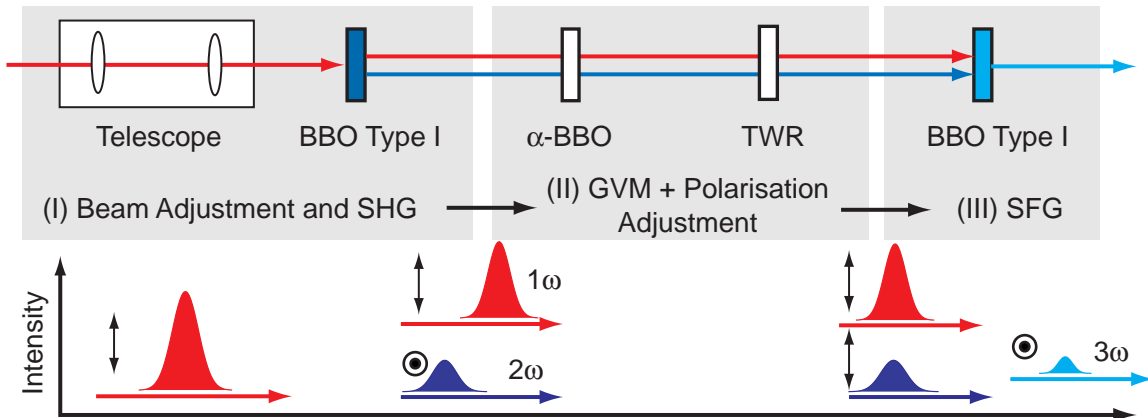


Abb. 3.5: Schematische Darstellung der Erzeugung von Anregungs-Impulsen im UV-Bereich bei der 3. Harmonischen. Oben: Elemente der UV-Erzeugung. (I) Anpassen der Bündelparameter mit einem Teleskop für eine effiziente Frequenz-Verdopplung (SHG) in einem BBO-Kristall. (II) Korrektur des Laufzeit-Unterschieds („group velocity mismatch“, GVM) zwischen den Lichtimpulsen bei 1ω und 2ω in einem α -BBO-Kristall und Drehung der Polarisation mit einer Zwei-Wellenlängen-Verzögerungsplatte (TWR). (III) Summenfrequenz-Erzeugung (SFG) zwischen 1ω und 2ω in einem BBO-Kristall. Unten: Schematische Darstellung der in den einzelnen Prozessen vorliegenden Impuls-Intensitäten und Polarisationen.

(I) Zunächst wird der Bündeldurchmesser der Fundamentalen (~ 4 mm, FWHM) mit einem Teleskop um einen Faktor 3 reduziert und anschließend in einem nichtlinearen Kristall (BBO, Dicke = 0,5 mm, $\Theta = 29^\circ$, Typ I) die 2. Harmonische erzeugt („second harmonic generation“, SHG). Aus den daraus resultierenden 400 nm Impulsen (Konversion-Effizienz $\sim 30\%$) und dem Rest der Fundamentalen wird in einem weiteren nichtlinearen Prozess (III) die Summenfrequenz („sum frequency generation“, SFG) gebildet. Dabei sind zwei Punkte zu beachten: (i) Die für die beiden Wellenlängen unterschiedliche Dispersion und die Laufzeit-Unterschiede in den Materialien. (ii) Bei der Frequenz-Verdopplung der Fundamentalen entsteht die 2. Harmonische in dem nichtlinearen Kristall (Phasen Anpassung Typ I) mit einer zur Fundamentalen um 90° gedrehten Polarisation. Da bei der Summenfrequenz-Bildung

die beteiligten Lichtimpulse die gleiche Polarisation besitzen sollen (Typ I-Prozess erlaubt im verwendeten BBO-Kristall eine Fall höhere Konversions-Effizienz [Dmi91]), muss einer der beiden Impulse in seiner Polarisationsebene um 90° gedreht werden. Dies wird über eine Zwei-Wellenlängen-Verzögerungsplatte („two wavelength retardation plate“, TWR) erreicht (Pegasus Optik, Dicke = 0,58 mm), die eine Phasenverschiebung von λ für den 800 nm Anteil (1ω) und eine Phasenverschiebung von $\lambda/2$ für den 400 nm Anteil (2ω) bewirkt. Die Laufzeitunterschiede der beiden Wellenlängen werden über einen α -BBO-Kristall kompensiert, dessen Dicke (1,3 mm) auf die Gruppengeschwindigkeits-Unterschiede in den beiden BBO-Kristallen und der TWR-Platte angepasst ist. Dabei erfolgte die Berechnung der notwendigen Dicke mit den Angaben zu den wellenlängen- und polarisationsabhängigen Brechungsindizes im Programmpaket SNLO [Sch03b]. Die Summenfrequenz-Erzeugung (III) erfolgt schließlich in einem weiteren nichtlinearen Kristall (BBO, Dicke = 1 mm, $\Theta=44^\circ$, Typ I) durch Anpassung des Kristallwinkels. Bei einer Eingangsenergie von etwa $100 \mu\text{J}$ sind dabei Energien bis $5 \mu\text{J}$ bei der 3. Harmonischen ($\sim 270 \text{ nm}$) realisierbar. Gegenüber anderen Konzepten [Cer03], bei der eine Auftrennung der nach der SHG-Erzeugung vorliegenden Impulse erfolgt, hat dieser Aufbau den Vorteil, dass er sehr kompakt ist und nur minimale Justage-Arbeiten erfordert.

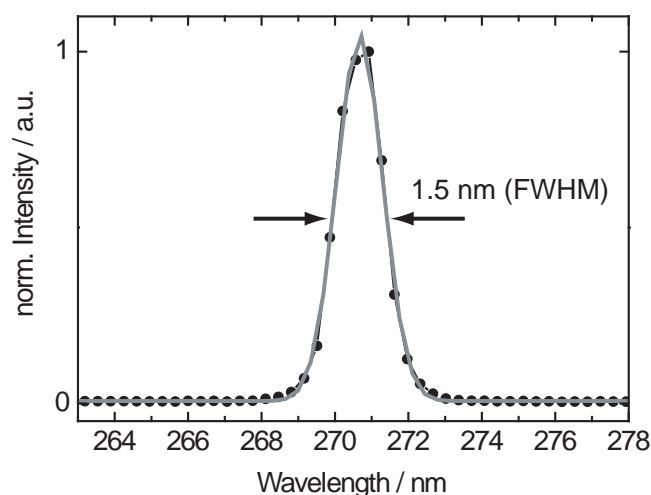


Abb. 3.6: Typisches Spektrum der Anregungs-Impulse bei der 3. Harmonischen des Lasersystems. Die graue Linie repräsentiert eine Anpassung des Spektrums mit einer Gaußfunktion.

Die Impulsdauer der resultierenden UV-Impulse konnte mit dem vorhandenen Autokorrelator-Aufbau nicht bestimmt werden. Allerdings lässt sich aus der spektralen Breite eine untere Grenze für die Impulsdauer angeben. In Abbildung 3.6 ist das Spektrum der auf diese Weise erzeugten UV-Impulse gezeigt, das mit einem Faser-Spektrographen (Fa. Ocean Optics) aufgezeichnet wurde. Die Impulse besitzen eine Zentralwellenlänge um 270 nm mit einer spektralen Breite von etwa 1,5 nm (FWHM). Unter der Annahme eines gaußförmig bandbreitebegrenzten UV-Impulses ergibt sich im Fourier-Limit [Die96] ($\Delta\nu \cdot \Delta t = 0.441$) eine untere Grenze der Impulsdauer von etwa 70 fs. Ein Vergleich der Apparate-Funktion (300 - 400 fs) mit den Impulsdauern der Abtast-Impulse ($\sim 150 \text{ fs}$) im nächsten Abschnitt spricht für eine Impulsdauer der Anreg-Impulse von etwa 250 bis 300 fs am Probenort. Die deutliche Verlängerung gegenüber dem Fourier-Limit lässt sich dabei durch die Materialdispersion während der Erzeugung (BBO-Kristalle, TWR) und den optischen Komponenten nach der UV-Erzeugung (Quarzlinse,

$\lambda/2$ -Plättchen, Polarisator) erklären.

3.2.4 Messplatz und Messdatenerfassung

Im Experiment werden Anreg- und Abtast-Impuls in der Probe räumlich überlagert und der zeitliche Abstand zwischen den beiden Impulsen durch eine Verzögerungsstrecke im Anregungs-Zweig variiert. Bei einem maximalen Wegunterschied von 1,2 m lassen sich Zeitunterschiede von bis zu ~ 4 ns realisieren. Aufgezeichnet wird die Intensität der Abtast-Impulse nach der Probe in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit. Die beiden nächsten Abschnitte geben einen Überblick zum verwendeten Küvetten-Design, dem Strahlverlauf am Probenort und der Messdatenerfassung. Ausführliche Darstellungen dazu finden sich auch in [Sie05].

Probenkreislauf und Küvetten-Design

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente stellen hohe Anforderungen an die Probenkreisläufe und die Küvetten, in denen die Proben während der Messung gehalten werden. Zum einen muss das bei der Messung angeregte Probenvolumen zwischen je zwei aufeinander folgenden Anreg-Impulsen mit einer Rate von einem kHz ausgetauscht werden. Zum anderen stehen für die Messungen aus Kostengründen oft nur sehr geringe Probenmengen (~ 1 ml) zur Verfügung. Zudem sollte das verwendete Fenstermaterial über einen sehr großen Spektralbereich transparent (200 nm - $10 \mu\text{m}$), UV-beständig und möglichst nicht hygroskopisch sein.

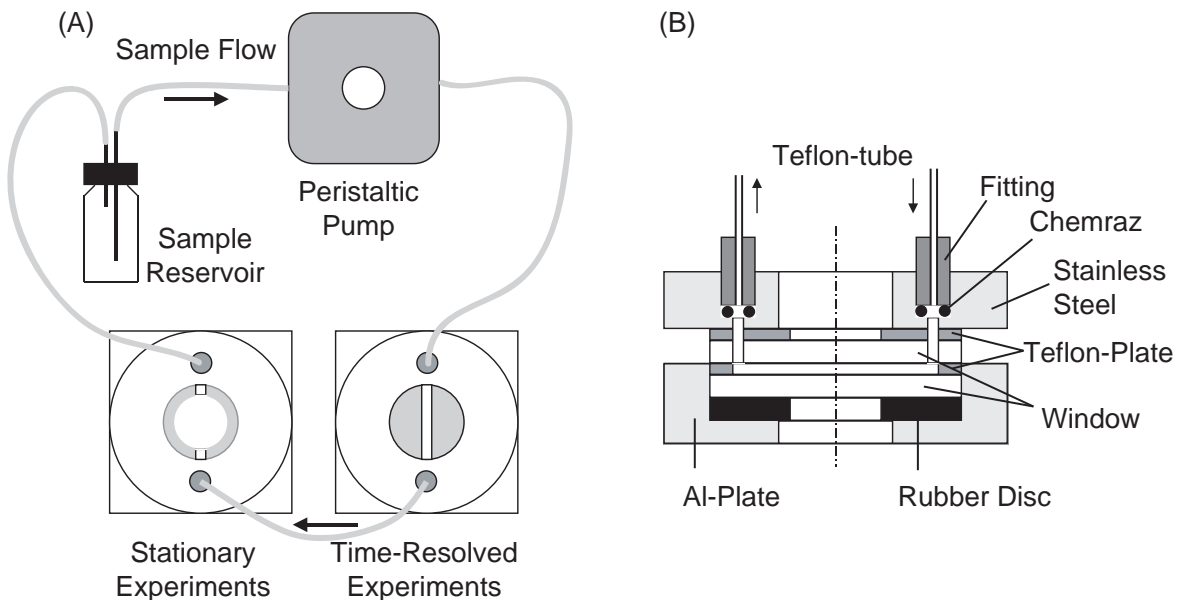


Abb. 3.7: (A) Schematische Darstellung des in den zeitaufgelösten und stationären Messungen verwendeten Probenkreislaufs. Die „Dauerstrich-Küvette“ besitzt eine Apertur von 10 mm und wird für die Charakterisierung der Proben vor und nach den zeitaufgelösten Messungen verwendet. In den zeitaufgelösten Experimenten wird die zweite Durchfluss-Küvette mit einer Kanalbreite von ~ 2 mm eingesetzt. (B) Aufbau der Küvetten im Detail. Die Schichtdicke wird durch Teflon-Scheiben definiert und beträgt etwa $90 \mu\text{m}$. Abbildung nach [Kol03].

Der in den zeitaufgelösten Messungen verwendete Proben-Kreislauf ist in Abbildung 3.7 A schematisch dargestellt. Er besteht aus zwei Durchfluss-Küvetten, einem Vorratsgefäß und einer Schlauchpumpe (Ismatec, Fa. Cole Porter). Das Küvetten-Design wurde am Lehrstuhl für BioMolekulare Optik (BMO) entwickelt und ist auf die Anforderungen zeitaufgelöster Messungen optimiert. Dabei sind die Kreisläufe auch für Probenmengen kleiner 1 ml geeignet. Der Aufbau der Küvetten ist in Abbildung 3.7 B dargestellt. Alle Komponenten, die mit der Probe in Berührung kommen, bestehen aus chemisch inerten Materialien (Edelstahl-Schrauben, Abstandshalter und Schläuche aus Teflon, Chemraz (Perfluorelastomer)-Dichtungen, CaF_2 - und BaF_2 -Fenster). Es wurden zwei Durchfluss-Küvetten verwendet, deren Schichtdicken über Teflon-Scheiben (Dicke = $90 \mu\text{m}$) definiert ist. Eine besitzt eine große Apertur (Durchmesser = 10 mm), die den Einsatz dieser Küvette für die CW-Charakterisierung der Probenlösung in kommerziellen Geräten (UV-Absorption: $\lambda 19$, Fa. Perkin Elmer, IR-Absorption: IFS66, Fa. Bruker) ermöglicht, und wird als „Dauerstrich-Küvette“ bezeichnet. Die Zweite besitzt eine Teflonscheibe mit einem etwa 2 mm breiten Kanal, in dem die Probenlösung geführt wird. Sie wird in den zeitaufgelösten Messungen verwendet und ermöglicht den vollständigen Austausch des angeregten Volumens bei der Repetitionsrate des Lasers von 1 kHz.

Als Fenstermaterial werden in der Regel Kalziumfluorid-Scheiben (CaF_2 , Dicke = 2 mm, Durchmesser = 30 mm) eingesetzt, die aufgrund ihrer Absorptionseigenschaften sowohl für den UV-Bereich, als auch für den IR-Bereich geeignet sind. Bei der Anregung mit UV-Impulsen lieferte das zur Verfügung stehende CaF_2 -Material in den zeitaufgelösten Messungen jedoch Signalbeiträge im infraroten Spektralbereich auf der 10 - 100 ps-Zeitskala, die möglicherweise durch Zwei-Photonen-Absorption, Verunreinigungen im Fenstermaterial oder die Bildung von Farbzentren verursacht werden [Tan, Tsu02]. In einer Messreihe mit verschiedenen Fenstermaterialien (CaF_2 , NaCl , BaF_2) erwies sich stattdessen Bariumfluorid (BaF_2 , Dicke = 3 mm, Durchmesser = 30 mm) als geeignetes Fenstermaterial und wurde für den Aufbau der Mess-Küvette im Anreg-Abtast-Experiment verwendet. Seine hygroskopischen Eigenschaften machen allerdings den Austausch der BaF_2 -Fenster nach etwa 5 Stunden Messzeit erforderlich. Als Alternative zu den Küvetten stand auch ein Jet zu Verfügung. In diesem wird die Probenlösung zwischen zwei Edelstahldrähten geführt und dadurch störende Fenster-Effekte vermieden [Lai06, Kol07]. Zum Zeitpunkt der Messungen war dieses System jedoch noch nicht für Probenmengen von 1 ml konzipiert und wurde nur für einen Vergleich der Messergebnisse am reinen Lösungsmittel D_2O mit und ohne Fenstermaterial verwendet.

Strahlverlauf am Probenort

Die Anreg- und Abtast-Impulse sind nach ihrer Erzeugung senkrecht zur Tischoberfläche polarisiert. Das kann im Anreg-Abtast-Experiment zu zeitabhängigen Beiträgen führen, die auf die Reorientierung der Moleküle nach der Anregung zurückzuführen sind (siehe Ausführung in Abschnitt 3.3.3). Aus diesem Grund wird in den zeitaufgelösten Experimenten die Absorptionsänderung in der Probe polarisationsaufgelöst bestimmt und der zur Anregung senkrechte bzw. parallele Anteil der Polarisation des Abtast-Impulses separat detektiert. Der Strahlverlauf am Probenort ist in Abbildung 3.8 schematisch dargestellt.

Mit einem Unterbrecher-Rad (Frequenz = 500 Hz) wird jeder zweite Anregungs-Impuls geblockt. Die Polarisation der Anreg-Impulse wird über eine Kombination aus $\lambda/2$ -Plättchen und Polarisator definiert und um 45° gegenüber der Polarisations-Ebene der Abtast-Impulse

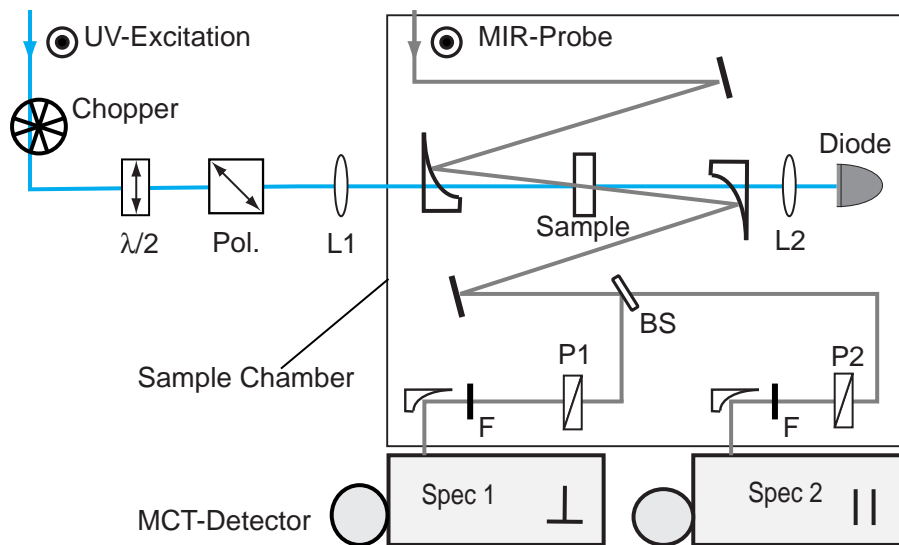


Abb. 3.8: Skizze zum Strahlverlauf am Probenort. Die linear polarisierten Anreg-Impulse durchlaufen ein Unterbrecherrad (Chopper, 500 Hz) und werden über eine Kombination aus $\lambda/2$ -Plättchen und Polarisator (Pol.) um 45° in der Polarisationssebene gedreht. Diese UV-Impulse werden über eine Linse (L1) auf die Probe fokussiert und anschließend von einer Diode detektiert. Die Abtast-Impulse sind senkrecht zur Tisch-Oberfläche polarisiert und werden über Parabolspiegel (30° Ablenkwinkel) auf die Probe fokussiert. Anschließend werden sie über einen zweiten Paraboloiden wieder kollimiert und mit einem Strahlteiler (BS) aufgeteilt. Die beiden Teile der MIR-Impulse durchlaufen jeweils einen Infrarot-Polarisator (P), der einmal die senkrechten und einmal die parallelen Polarisations-Anteile relativ zur Anregung auswählt. Über Paraboloiden (90° Ablenkwinkel) werden die MIR-Impulse auf die Eintritts-Spalte von zwei Spektrographen (Spec) abgebildet. Die Anpassung der Intensität auf die MCT-Detektoren erfolgt über metallbeschichtete BaF_2 -Scheiben (F).

gedreht. Anschließend werden die UV-Impulse mit einer Linse auf die Probe fokussiert und danach mit einer weiteren Linse auf einen Detektor abgebildet. Die Strahlführung der Anreg-Impulse durch ein Loch in den Parabolspiegeln, die zur Fokussierung und Kollimierung der Abtast-Impulse dienen, ermöglicht einen relativ kleinen Winkel ($< 5^\circ$) und einen guten räumlichen Überlapp zwischen den Anreg- und Abtast-Impulsen. Die Abtast-Impulse sind senkrecht zur Tischoberfläche polarisiert und werden über einen Parabolspiegel (30° Ablenkwinkel) auf die Probe fokussiert. Das Abtasten erfolgt also mit einer Polarisation, die um 45° gegen die Polarisation des Anreg-Impulses gedreht ist. Nach der Probe wird der Abtast-Impuls über einen zweiten Parabolspiegel wieder kollimiert und mit einem Strahlteiler (einseitig antireflexbeschichtetes Ge-Plättchen) aufgeteilt. Über eine Polarisations-Optik (Infrarot-Polarisatoren, Modell P03, Fa. InfraSpecs) wird nun in einem Zweig der zur Anregung senkrechte Anteil und im anderen Zweig der dazu parallele Anteil ausgewählt. Anschließend werden die Abtast-Impulse mit Hilfe von metallbeschichteten BaF_2 -Scheiben (Fa. Layertec) abgeschwächt und über Paraboloiden (90° Ablenkwinkel) auf die Eintritts-Spalte von Spektrographen (Fokallänge = 300 mm, Fa. Roper Scientific/Acton Research) fokussiert. Da die Laborluft (Wasserdampf) im Spektralbereich zwischen $1300 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ stark absorbiert [Ham94], befindet sich die Erzeugung der MIR-Impulse (DFM-Prozess) und der gesamte Probenraum in einem mit Trockenluft (Taupunkttemperatur: $\sim -70^\circ\text{C}$) gespülten Kasten. Auch die Spektrographen werden mit Trockenluft gespült. Die Spektrographen sind mit jeweils 3 Gittern (100, 150, 300 l/mm)

ausgestattet, die für verschiedene Spektralbereiche optimiert sind (Blazewinkel) und spektrale Auflösungen im Bereich weniger Wellenzahlen ($\sim 3 \text{ cm}^{-1}$) ermöglichen.

Messdatenerfassung

Die Abtast-Impulse werden in den zwei Spektrographen spektral dispergiert und auf Dioden-Zeilen abgebildet. Für die IR-Detektion stehen zwei Quecksilber-Cadmium-Tellurid („mercury cadmium telluride“, MCT)-Detektoren (32-elementige Diodenarrays, Fa. Infrared Associates Inc.) mit nachgeschalteten Verstärkern (MCT-3200 Preamplifier, Fa. Infrared Systems Development Corp.) zur Verfügung. Die Photodioden-Zeilen besitzen 32 quadratische Elemente mit je 0,5 mm Seitenlänge und einem Abstand von 0,1 mm zwischen den Elementen. Sie werden mit flüssigem Stickstoff auf 77 K gekühlt.

Die Signale aus den Vorverstärkern werden in einem 96-Kanal Analog-Digital-Wandler (1885F, Fa. Le Croy) mit einer Auflösung von 12 Bit digitalisiert. 64 der Kanäle werden durch die beiden Diodenarrays belegt, die restlichen Kanäle stehen für Kontrolldioden zur Verfügung und erlauben die Überwachung der Intensitäts-Schwankungen des Lasersystems und der optisch parametrischen Prozesse. Zu diesem Zweck werden PIN-Photodioden (Silizium, InGaAs) für den sichtbaren und nahinfraroten Spektralbereich eingesetzt. Die Anpassung der hohen Ausgangs-Impedanz der Photodioden auf die 50Ω Eingangs-Impedanz des A/D-Wandlers sowie die Signalverstärkung erfolgt über die in [See97] beschriebenen Verstärkerschaltungen. Der A/D-Wandler besitzt ein einstellbares Zeitfenster für die Datenaufnahme ($\sim 2 \mu\text{s}$), die von der elektronischen Synchronisation des regenerativen Verstärkers gesteuert wird. Bei der Detektion eines Lichtimpulses am Verstärkerausgang wird der auftretende Stromimpuls nur während dieses Zeitfensters im A/D-Wandler integriert. Auf diese Weise werden Streulichtanteile und elektronische Störimpulse effektiv unterdrückt. Details zur Hardware-Schnittstelle finden sich in [Zur92, Hoc96].

Optimierung der Detektionselektronik

In dieser Arbeit sollen relative Transmissionsänderungen in der Größenordnung von 10^{-5} und kleiner nachgewiesen werden. Dies erfordert eine sehr hohe Sensitivität der Messelektronik. Eine wesentliche Verbesserung der Sensitivität des Experiments konnte dabei durch eine Modifikation der Vorverstärker-Elektronik für die MCT-Detektoren erreicht werden. In der Grundeinstellung waren die Verstärkungsfaktoren (~ 100) sehr hoch und für stationäre Messungen mit sehr geringen Lichtintensitäten ausgelegt. Das führte dazu, dass die MIR-Impulse vor der Detektion stark abgeschwächt werden mussten ($\sim 1 \%$) damit eine Sättigung des A/D-Wandlers vermieden wurde. Der optimale Dynamikbereich der IR-Detektion kann dabei durch die Verwendung von Infrarot-Abschwächern (Metal-beschichtete BaF_2 -Scheiben, Fa. Layertec) erreicht werden, die in den Strahlengang vor den Spektrometern eingesetzt werden können und eine maximale Aussteuerung der Elemente erlauben. Da bei der elektronischen Verstärkung auch das elektronische Rauschen verstärkt wird, sollte eine Reduzierung des Verstärkungsfaktors — unter Berücksichtigung der Linearitätsgrenze der Detektoren — zu einer Verbesserung des Signal- zu Rausch-Verhältnisses führen. In dieser Arbeit wurden die Verstärkungsfaktoren der Vorverstärker soweit wie möglich reduziert und zusätzlich die Signale aus den Vorverstärkern nochmals über eine selbstgebaute Spannungsteilung (Faktor 0,2) abgeschwächt. Auf diese Weise konnte, je nach Aussteuerung der Kanäle, nochmals ein

Faktor 2-3 im Signal zu Rausch-Verhalten gewonnen werden. Diese Modifikationen und die damit verbundene Erhöhung der Sensitivität waren für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen von entscheidender Bedeutung.

3.3 Zeitaufgelöste Messungen - Messablauf und Datenauswertung

In diesem Abschnitt wird der Ablauf einer Anreg-Abtast-Messung beschrieben. Eine Übersicht zu den experimentellen Parametern der in dieser Arbeit beschriebenen Anreg-Abtast-Experimente gibt Tabelle 3.2.

Anreg-Abtast-Experiment:	Anreg-Impuls	Abtast-Impuls
Zentralwellenlänge	270 - 272 nm	1300 - 1800 cm^{-1}
spektrale Breite (FWHM)	~ 1,5 nm	~ 150 cm^{-1}
Energie	~ 1,2 μJ	< 50 nJ
Bündeldurchmesser Probenort (FWHM)	~ 170 μm	~ 90 μm
Puls zu Puls Schwankung (RMS)	< 0,5 %	0,15 - 0,3 %

Tabelle 3.2: Experimentelle Parameter der Anreg-Abtast-Experimente im Überblick.

3.3.1 Charakterisierung der Probenlösung

Eine spektrale Charakterisierung der Probenlösung wird vor und nach jeder zeitaufgelösten Messung vorgenommen. Die UV-Absorption der Moleküle wird mit einem kommerziellen Absorptions-Spektrometer (Lambda 19, Fa. Perkin Elmer) bestimmt. Für die Bestimmung der IR-Absorption wird ein kommerzielles FTIR-Spektrometer (IFS66, Fa. Bruker) verwendet. Da in beiden Messungen der gleiche Probenkreislauf wie in der zeitaufgelösten Messung benutzt wird, lassen sich Veränderungen der Probe während der Messungen (z.B. die Anreicherung von Photoprodukten) feststellen, ohne dass die Gefahr einer möglichen Kontamination bei der Benutzung einer neuen Küvette besteht. Die Konzentrationen der Probenlösungen liegen zwischen 5 und 10 mM. Eine ausführliche Beschreibung und Diskussion der stationären Charakterisierung der untersuchten Moleküle erfolgt im nächsten Kapitel.

3.3.2 Justage der Messapparatur und Bestimmung der Apparatfunktion

Da die Erzeugung der Anreg-Impulse im UV-Bereich erst nach der Verzögerungsstrecke erfolgt, wird vor jeder Messung zunächst die Justage der Verzögerungsstrecke und die Stabilität der UV-Erzeugung in Abhängigkeit von der Verzögerungsposition überprüft. Anschließend wird der Bündeldurchmesser der Anreg- und Abtast-Impulse bestimmt und gegebenenfalls angepasst. Für die Bestimmung der Bündeldurchmesser wird dabei das Bündelprofil am Probenort mit einer positionierbaren Rasierklinge abgetastet und die Intensität der transmittierten Strahlung

in Abhängigkeit von der Position der Rasierklinge aufgezeichnet. Diese Prozedur entspricht einer eindimensionalen Integration des Intensitäts-Profiles und erlaubt die Berechnung des Bündeldurchmessers. Details zu dieser Methode finden sich z.B. in [Arn71, Suz75, Kho83]. Für die Charakterisierung steht zusätzlich eine auf einem CCD-Chip basierende Kamera-Einheit zu Verfügung. Diese kann anstelle der Probe in den Probenraum eingesetzt werden und ermöglicht, über eine am Lehrstuhl entwickelte Bündelprofil-Analyse-Software (basierend auf dem Programmpaket Labview 7.0 [Jam04]), die Analyse der Bündel-Parameter im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich. Die Bündelquerschnitte (FWHM) der Anreg-Impulse sind mit etwa $170 \mu\text{m}$ fast doppelt so groß wie die der Abtast-Impulse mit etwa $90 \mu\text{m}$ und gewährleisten einen guten räumlichen Überlapp in den Messungen.

Die Bestimmung des räumlichen und zeitlichen Überlapps zwischen Anreg- und Abtast-Impuls erfolgt durch die Verwendung von Germanium- oder Silizium-Plättchen als Probenmaterial. Diese Halbleiter-Materialien absorbieren entsprechend ihrer Bandkante (Si: $\sim 1,1 \text{ eV}$, Ge: $\sim 0,7 \text{ eV}$) im gesamten sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich. Bei der Absorption energiereicher UV-Photonen kommt es zur Erzeugung freier Ladungsträger, die auch im infraroten Spektralbereich absorbieren [Kah55]. Im Experiment ist die durch die Anregung induzierte Absorptionsänderung nahe dem Zeitnullpunkt maximal und erlaubt sowohl die Optimierung des räumlichen Überlapps (Justage auf maximales Differenzsignal), als auch die Bestimmung des Zeitnullpunkts (Auswertung des Signalverlaufs in einer transienten Messung).

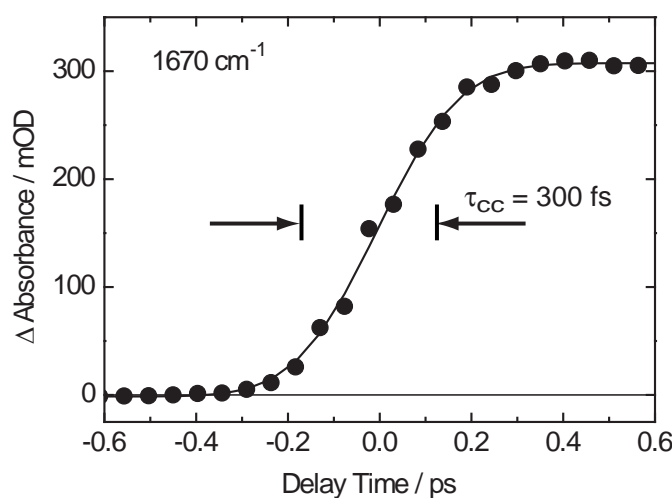


Abb. 3.9: Bestimmung der Apparatefunktion durch eine zeitaufgelöste Messung an Silizium. Die Punkte zeigen den Zeitverlauf der Absorptionsänderung bei 1670 cm^{-1} nach UV-Anregung. Bei der Annahme einer instantan mit der Erzeugung von freien Ladungsträger in Silizium auftretenden Absorption entspricht der gemessene Verlauf der Apparatefunktion. Die Datenanpassung (durchgezogene Linie) ergibt eine Kreuzkorrelationsbreite von $\tau_{cc} = 300 \text{ fs}$.

Aus dem Signalverlauf einer transienten Messung lässt sich auch die Apparatefunktion bestimmen. Unter der Annahme, dass die Absorptionsänderung instantan mit dem Anreg-Impuls auftritt, entspricht die gemessene Absorptionsänderung — für gaußförmige Lichtimpulse — der Faltung einer Stufenfunktion mit einer gaußförmigen Kreuzkorrelationsfunktion aus Anreg- und Abtast-Impuls [Jed88]. Eine entsprechende Messung an Silizium ist in Abbildung 3.9 gezeigt. Die Kreuzkorrelationsbreite entspricht der Apparatefunktion und ist ein Maß für das

Auflösungsvermögen des IR-Spektrometers. Daraus kann bei bekannter Impulsdauer eines der beteiligten Impulse auf die Impulsdauer des jeweils anderen geschlossen werden [Jed88]: $\tau_{cc}^2 = \tau_{Anregung}^2 + \tau_{Abtast}^2$. Die Kreuzkorrelationsbreite lag bei den zeitaufgelösten Messungen zwischen 300 und 400 fs. Mit einer Impulsdauer der Abtast-Impulse [Sch02, Sie05] im Bereich von 150 fs ergibt sich daraus eine Impulsdauer von etwa 250 - 300 fs für die Anreg-Impulse.

3.3.3 Messung und Signalbildung

Das Ziel der zeitaufgelösten Messungen ist die Bestimmung der Absorptionsänderung in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit zwischen Anreg- und Abtast-Impuls. In der Messung wird die Datenaufnahme von einem PC gesteuert, der über die Schrittmotorposition den zeitlichen Abstand zwischen Anreg- und Abfrage-Impuls bestimmt. An jedem Messpunkt wird die Intensität der Abtast-Impulse registriert. Da die Messungen mit Schwankungen in der Laserintensität und elektronischem Rauschen behaftet sind, kann die Messgenauigkeit durch eine Mittelung über viele Einzel-Messungen erhöht werden. Aus diesem Grund liest der Rechner an jeder Position die Intensität des Abtast-Impulses $I_{signal}(\lambda_i, t_D)$ für eine bestimmte Anzahl an Einzel-Messungen in Abhängigkeit von der Kanalnummer i (bzw. der Wellenlänge λ_i) und dem Verzögerungszeitpunkt t_D aus. Dabei wird bei der Messung jeder zweite Anregungs-Impuls mit einem auf die Repetitionsrate des Lasersystems synchronisierten Unterbrecherrad geblockt (siehe Abbildung 3.8). Auf diese Weise wird jeweils abwechselnd eine Messung mit (I^+) und eine ohne Anregung (I^-) durchgeführt. Zur Korrektur des Dunkelstroms wird der Abfrage-Impuls vor der Messreihe geblockt, und der Dunkelstrom mit (I_{dunkel}^+) und ohne Anreg-Impuls (I_{dunkel}^-) aufgenommen. Diese Werte werden ebenfalls über eine frei wählbare Anzahl von Laserimpulsen gemittelt ($\bar{I}_{dunkel}^{(+,-)}$). Die gemessenen Intensitäten $I_i^{(+,-)}(\lambda, t_D)$ für den Laser-Impuls i werden durch Subtraktion des Dunkelstroms $I_{dunkel}(\lambda)$ korrigiert und über die Anzahl der gewählten Messungen N summiert: $\bar{I}_{signal}^{(+,-)}(\lambda, t_D) = \sum_{i=1}^N [I_i^{(+,-)}(\lambda, t_D) - \bar{I}_{dunkel}^{(+,-)}(\lambda)]$. Division dieser Größen mit (\bar{I}_{signal}^+) und ohne (\bar{I}_{signal}^-) Anregung ergibt das normierte Signal, das an jedem Messpunkt aufgezeichnet wird:

$$\bar{S}(\lambda, t_D) = \frac{\bar{I}^+(\lambda, t_D)}{\bar{I}^-(\lambda, t_D)}. \quad (3.1)$$

Diese Messwerte werden in einer Datei für jede Verzögerungszeit abgespeichert. Ist ein Durchlauf („Scan“) beendet, beginnt die Messroutine automatisch einen neuen Durchlauf bis die Messreihe abgebrochen wird. In den Messungen an den Nukleinsäuren wurden typischerweise 2000 Laserimpulse an 100 - 150 Messpositionen gemittelt und einzelne Messdurchläufe zwischen 3 und 5 mal wiederholt. Die Mittelung mehrerer „Scans“ bewirkt dabei eine Verteilung niederperiodischer Schwankungen auf alle Verzögerungspositionen. Zusätzlich zu den Messdaten der 64 Abtast-Kanäle wurden die Daten mehrerer Kontroll-Dioden aufgezeichnet. Dabei ist vor allem die Kontrolle der Anregungsenergie von Bedeutung. Sie gibt sowohl Hinweise auf die Stabilität des Lasersystems als auch auf eventuelle Unregelmäßigkeiten in der Probe — wie zum Beispiel das Auftreten einer Luftblase im Anregungsvolumen oder starke Laser-Schwankungen — die bei der Datenbearbeitung und Auswertung berücksichtigt werden müssen.

Datenverarbeitung

Die weitere Auswertung der transienten IR-Messdaten erfolgt mit einem am Lehrstuhl entwickelten Programmpaket „Z20“, das auf der Programmiersprache IDL [IDL00] (Fa. Research Systems Inc., Ver. 5.4) basiert und dessen wesentliche Bestandteile in [Lut01, Spö01, Sat04] beschrieben sind. Zunächst für die Femtosekundenspektroskopie im sichtbaren Spektralbereich konzipiert, wurde das Programm im Laufe der Zeit auf die Bedürfnisse der zeitaufgelösten IR-Spektroskopie angepasst und erweitert [Sie05]. Das Programm erlaubt die Mittelung einzelner Datensätze („Scans“) und eine Korrektur des Zeitnullpunkts anhand von Fit-Routinen, die der Materialdispersion im Strahlengang (Fenstermaterialien, Kristalle, Ge-Plättchen) Rechnung tragen (Sellmeier-Koeffizienten) [Sie05]. Die einzelnen Datenfiles (Scans) zu einer Messreihe werden in das Programm geladen und gemittelt. Aus den daraus resultierenden Datensätzen $\overline{S}_{final}(\lambda, t_D)$ wird mit $A = -\log T$ und $T^{(+,-)} = \frac{I^{(+,-)}}{I_0}$ die Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t_D)$ bestimmt:

$$\Delta A(\lambda, t_D) = -\log \frac{T^+(\lambda, t_D)}{T^-(\lambda, t_D)} = -\log \overline{S}(\lambda, t_D) \quad (3.2)$$

Bei einer Mittelung über 10000 Messwerte wurde in den Experimenten eine Auflösung von Absorptionsänderungen im Bereich von $\sim 10 \mu\text{OD}$ und kleiner erreicht.

Da die Anreg-Abtast-Experimente mit linear polarisierten Lichtimpulsen durchgeführt werden, müssen bei der Auswertung der Daten Anisotropie-Effekte berücksichtigt werden. Die Anisotropie der Moleküle bewirkt, dass durch den linear polarisierten Anregungs-Impuls bevorzugt Moleküle angeregt werden, deren Übergangs-Dipolmoment parallel zur Polarisatonebene der Anreg-Impulse liegt. Ein linear polarisierter Abtast-Impuls sieht deshalb, je nach Stellung des für die Absorption des Abtast-Impulses verantwortlichen Übergangs-Moments, eine unterschiedliche Absorption, die sich mit der Orientierung der Moleküle ändert. Durch Rotationsdiffusion verlieren die angeregten Moleküle in der Lösung ihre Ausrichtung und die Absorption wird isotrop. Charakteristische Zeiten τ_r für diesen Prozess lassen sich mit Hilfe des Koeffizienten für die Rotationsdiffusion D_r eines sphärischen Moleküls abschätzen ($\tau_r = \frac{1}{6D_r}$). Sie sind abhängig von der Größe der Moleküle und sollten für die in dieser Arbeit untersuchten Moleküle typischerweise zwischen 10 und einigen 100 ps liegen [Fle76].

Eine Möglichkeit die Reorientierungs-Dynamiken zu vermeiden besteht darin, die Messungen unter dem sogenannten „magischen Winkel“ durchzuführen, da für diesen Winkel — 54.7° zwischen Anreg- und Abtast-Polarisation — keine Reorientierungseffekte auftreten [Fle76]. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Messungen polarisationsaufgelöst, das heißt, die Absorptionsänderung mit paralleler ($\Delta A_{||}$) und senkrechter Polarisation (ΔA_{\perp}) gegenüber dem Anreg-Impuls, separat durchzuführen. Aus diesen Beiträgen lässt sich das Signal für eine isotrope Verteilung der Moleküle ohne Reorientierungseffekte berechnen:

$$\Delta A_{iso} = \frac{1}{3} \cdot (\Delta A_{||} + 2 \cdot \Delta A_{\perp}). \quad (3.3)$$

Alle in den nächsten Kapiteln vorgestellten zeitaufgelösten Daten wurden gemäß Gleichung 3.3 aus den Beiträgen für parallele und senkrechte Polarisation bestimmt.

Datenanpassung

Nachdem einzelne Messbereiche wie oben beschrieben gemittelt und korrigiert wurden, können sie zu neuen Datensätzen kombiniert werden, in denen mehrere Messbereiche zusammengefasst sind. Für diese Datensätze stehen umfangreiche Methoden zur Analyse und Visualisierung zur Verfügung [Sat04]. Das Auswerteprogramm Z20 besitzt sowohl die Möglichkeit einzelne Zeitverläufe an einer Spektralposition als auch ganze Datensätze in einem globalen Ansatz, d.h. für alle Wellenzahlen gleichzeitig, mit einer Modellfunktion anzupassen. Für eine entsprechende Datenanpassung wird in dieser Arbeit eine Summe von Exponentialfunktionen, die mit der Kreuzkorrelationsfunktion ($K(t_D - t)$) zwischen Anreg- und Abtast-Impuls gefaltet werden, verwendet [Hol90]:

$$\Delta A(\lambda_{probe}, t_D) = \sum_{i=1}^n \int_0^{\infty} a_i(\lambda_{probe}, \tau_i) \cdot \exp^{-t/\tau_i} \cdot K(t_D - t) dt. \quad (3.4)$$

Für gaußförmige Lichtimpulse mit einer Kreuzkorrelationsbreite τ_{cc} lässt sich Gleichung 3.4 auch schreiben als:

$$\Delta A(\lambda_{probe}, t_D) = \sum_{i=1}^n a_i(\lambda_{probe}, \tau_i) \cdot \exp\left(\frac{t_{cc}^2}{4\tau_i^2} - \frac{t}{\tau_i}\right) \frac{1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t}{\tau_{cc}} - \frac{\tau_{cc}}{2\tau_i}\right)}{2}. \quad (3.5)$$

In der Gleichung 3.5 bezeichnet $\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\infty} \exp^{-t^2} dt$ die sogenannte „Errorfunktion“ und die Gewichtsfaktoren $a_i(\lambda_{probe}, \tau_i)$ bilden das Amplitudenspektrum zur Zeitkonstante τ_i . Im Auswerte-Programm wird für die Datenanpassung ein Levenberg-Marquardt Algorithmus [Pre92] benutzt, der versucht, die experimentellen Daten — mit einer vorgegebenen Anzahl an Exponentialfunktionen — über die Methode der kleinsten Quadrate anzupassen.

Eine Datenanpassung über eine Summe von Exponentialfunktionen eignet sich zum Beispiel zur Beschreibung von Raten-Gleichungs-Systemen [Zin92], in denen Übergänge zwischen definierten und thermisch relaxierten Zuständen auftreten [Spö01]. Dies ist jedoch bei den betrachteten Systemen, bei denen zum Beispiel die Reaktionszeiten unter den Relaxationszeiten liegen können, nicht immer der Fall. Bei der Beschreibung von Kühlvorgängen im infraroten Spektralbereich treten zudem spektrale Verschiebungen auf, die sich bei der Anpassung der Zeitverläufe nur durch die Verwendung mehrerer exponentieller Zeitkonstanten wiedergeben lassen. Die physikalische Aussage dieser Zeitkonstanten, deren Amplituden sich zum Teil kompensieren, ist jedoch fraglich. Aus diesem Grund ist diese Art der Datenanpassung unter bestimmten Umständen nur als erste Näherung zu sehen, die Zeitskalen von Reaktionen ermitteln und Amplituden berechnen kann. Eine Diskussion dieser Problematik findet sich auch in [Spö01].

3.4 Zeitaufgelöste Messungen - Effekte und Signaturen

Die zeitaufgelöste Spektroskopie mit kurzen Anreg- und Abtast-Impulsen führt zu Signalbeiträgen, die nicht nur durch die Wechselwirkung mit den zu untersuchenden Molekülen

hervorgerufen werden. Im Bereich des Zeitnullpunkts treten mehrere Effekte auf, die bei der Auswertung korrigiert oder in der Interpretation berücksichtigt werden müssen. Eine ausführliche Diskussion der in vielen Experimenten dieser Art zu berücksichtigenden Effekte (z.B. Kreuzphasen-Modulation) findet sich in [Lor02, Wyn95]. Hier soll deshalb nur ein Beitrag eingehend diskutiert werden, der bei der Anregung mit intensiven UV-Impulsen auftreten kann und die ausführliche Diskussion in [Sie05] zu den Effekten in zeitaufgelösten IR-Messungen ergänzt.

3.4.1 Zwei-Photonen-Absorption und das solvatisierte Elektron

In Messungen an DNA- und RNA-Bausteinen wird oft Wasser oder im Fall der IR-Spektroskopie schweres Wasser als Lösungsmittel verwendet. Bei niedrigen Lichtintensitäten sind H_2O und D_2O für Wellenlängen größer 190 nm praktisch transparent. Bei der Verwendung von intensiven Laserimpulsen im UVB-Bereich ($\lambda = 266$ nm, Photonenenergie $E \approx 4,7$ eV) ist es jedoch möglich, die Lösungsmittel-Moleküle über eine Zwei-Photonen-Absorption („two photon absorption“, TPA) zu ionisieren. Die Ionisation von Wasser-Molekülen wird durch zwei Dinge begünstigt. Erstens zeigt Wasser im ultravioletten Spektralbereich einen hohen Absorptionsquerschnitt für TPA. Zweitens ist die Quantenausbeute für die Ionisierung nach TPA hoch. In [Bar00] wird eine Ionisations-Wahrscheinlichkeit von 50 % bei einer Zwei-Photonen-Anregung mit 9,3 eV für Wasser angegeben. Bei der Ionisation der Moleküle (Ionisationsschwelle $E_{ion} \sim 6,5$ eV) kann ein Elektron in Lösung übergehen und durch eine Solvathülle (4 - 6 Wassermoleküle) stabilisiert werden. Diese Spezies wird als solvatisiertes Elektron bezeichnet.

Die Bildung des solvatisierten Elektrons ist seit langem bekannt [Har62] und wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht [Nik83, Reu96, Ass00, And00, Tha04, Bir06]. Spektroskopisch zeigt sich das solvatisierte Elektron durch eine breite strukturlose Absorption um 720 nm [Har62]. Bei dessen Bildung werden jedoch mehrere Zwischenzustände bevölkert, die eine völlig andere spektrale Signatur aufweisen. Die folgende kurze Darstellung zum Stand der Forschung auf diesem Gebiet bezieht sich auf Angaben in [Lae00] für das Lösungsmittel D_2O .

Nach der Zwei-Photonen-Ionisation eines D_2O -Moleküls wird eine Reihe von Zwischenzuständen bevölkert. Das erste Intermediat wird in [Lae00] einem Komplex aus D_2O -Molekülen und dem Elektron zugeordnet [$h\nu + 2\text{D}_2\text{O} \rightarrow \text{D}_3\text{O}^+ + \text{OD}:e^-$]. Der genaue Charakter dieses Intermediats ($\text{OD}:e^-$ Komplex) ist dabei jedoch noch weitgehend unklar. Bekannt ist dagegen, dass dieser Zustand eine sehr hohe Extinktion ($\epsilon \sim 50000 - 100000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) im mittleren infraroten Spektralbereich besitzt und mit einer Zeitkonstante im Bereich von 100 - 200 fs in einen zweiten Zwischenzustand übergeht. Das Absorptionsmaximum dieses zweiten Intermediats liegt im NIR-Spektralbereich ($\sim 2 \mu\text{m}$) und sein Zerfall wird mit etwa 200 fs angegeben. In einem weiteren Schritt ($\tau \sim 550$ fs) bildet sich schließlich das solvatisierte Elektron mit der breiten Absorptionsbande um 720 nm.

In den Studien von Laenen und Mitarbeitern [Lae00, Lae01] wurde die Signatur des ersten Intermediats in einem Spektralbereich zwischen 1800 und 7000 cm^{-1} bestimmt. Entsprechend dem sehr hohen Extinktions-Koeffizienten zeigt sich dieses Intermediat in den zeitaufgelösten IR-Messungen als eine starke Absorptionsänderung nahe dem Zeitnullpunkt, die auf einer Zeitskala von 100 - 200 fs zerfällt. Allerdings liegen aus dieser Arbeitsgruppe keine Messungen für Wellenzahlen kleiner 1800 cm^{-1} vor, die sich mit den hier durchgeführten Messungen zwischen 1800 und 1300 cm^{-1} direkt vergleichen lassen. Aussagen über das Verhalten dieser

Spezies im Bereich kleiner 1800 cm^{-1} erlauben jedoch IR-Messungen in [And00]. In dieser Arbeit wurde die Absorptionsänderung bei der Injektion von Elektronen ins Lösungsmittel über einen Charge-Transfer-Prozess (Ferrocyanid) zwischen 1300 und 3500 cm^{-1} beobachtet. Auch bei diesem Prozess wurde im Rahmen der experimentellen Zeitauflösung eine schnelle Absorptionzunahme am Zeitnullpunkt beobachtet, deren Zerfall mit einer von der Wellenzahl unabhängigen Zerfallszeit von etwa 180 fs angepasst werden konnte. Abschätzungen zum Extinktionskoeffizienten dieses Zustands lassen auch hier Werte im Bereich von $50000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ und größer erwarten.

Diese Experimente zeigen, dass bei der Bildung des solvatisierten Elektrons Intermediate auftreten, die einen sehr hohen Extinktionskoeffizienten im mittleren Infrarotbereich besitzen. Bei ausreichend hohen Anregungs-Intensitäten sollten diese auch in den zeitaufgelösten Experimenten dieser Arbeit auftreten.

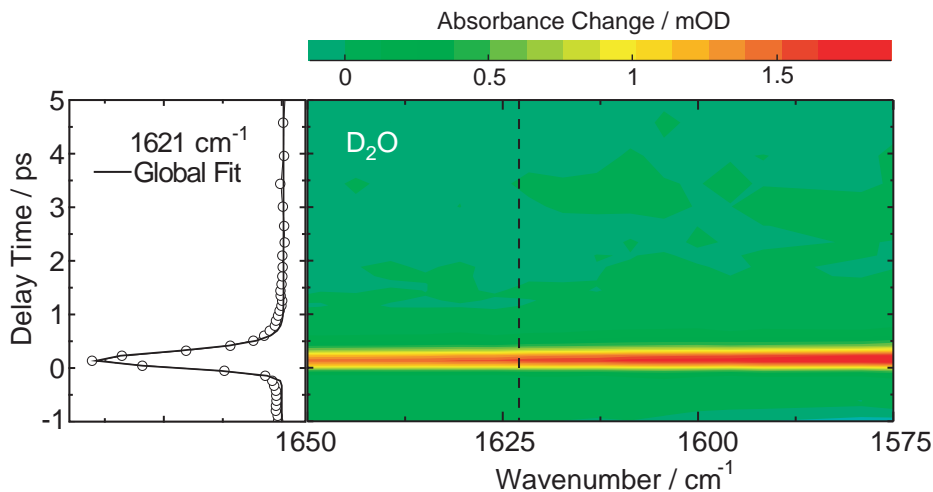


Abb. 3.10: Zeitaufgelöste IR-Messung am Lösungsmittel D_2O . Rechts: Konturdarstellung. Links: Zeitverlauf bei 1621 cm^{-1} (Kreise) und Datenanpassung (durchgezogene Linie) nach einer globalen Datenanalyse.

In Abbildung 3.10 ist eine zeitaufgelöste Messung für die in Tabelle 3.2 angegebenen Parameter am reinen Lösungsmittel D_2O gezeigt. Die Abbildung zeigt eine Konturdarstellung der experimentellen Daten zwischen 1650 und 1575 cm^{-1} und den Zeitverlauf für 1621 cm^{-1} . Am Zeitnullpunkt tritt eine starke induzierte Absorption über den gesamten Spektralbereich auf, die mit einer Zeitkonstante kleiner 200 fs zerfällt. Zu diesem Signal können sowohl das verwendete Fenstermaterial der Durchfluss-Küvetten, als auch das Lösungsmittel beitragen. Zur Klärung dieser Frage wurde eine entsprechende Messung unter Verwendung eines freilaufenden Flüssigkeitsstrahls [Lai06, Kol07] ohne Fenstermaterial durchgeführt. Auch in diesem Fall zeigt sich am Zeitnullpunkt eine entsprechende Kinetik. Das Signal ist also auf die intrinsischen Eigenschaften des Lösungsmittels zurückzuführen und könnte durch die Zwei-Photonen-Absorption der Lösungsmittel-Moleküle entstehen. Ist dies der Fall, sollte die Signalamplitude quadratisch mit der Anregungsenergie ansteigen. Tatsächlich führt eine Verdopplung der Anregungsenergie in der Messung am reinen Lösungsmittel in sehr guter Näherung zu einer Vervierfachung der Signalamplitude am Zeitnullpunkt.

Die im reinen Lösungsmittel auftretende induzierte Absorption am Zeitnullpunkt wird deshalb in Anlehnung an die Ergebnisse aus [Lae00] der Absorption eines Vorläufers des solvatisierten Elektrons zugeordnet. Eine Abschätzung zu den bei der UV-Anregung im Lösungsmittel D₂O gebildeten solvatisierten Elektronen ist mit den Angaben zum Extinktionskoeffizienten in [Lae00] und [And00] unter zwei Annahmen möglich: (i) Die starke IR-Absorption am Zeitnullpunkt wird nur durch den nach Zwei-Photonen-Ionisation erzeugten (OD:e⁻)-Komplex mit einem Extinktionskoeffizienten von 50000 M⁻¹cm⁻¹ hervorgerufen. Ist eine weitere Ursache für die Absorption verantwortlich, wird die Anzahl der erzeugten freien Elektronen überschätzt. (ii) Der (OD:e⁻)-Komplex geht gemäß den Angaben in [And00] mit einer Zeitkonstante von 180 fs in einen weiteren Zustand über, der nicht in diesem Spektralbereich absorbiert. Nach [Lae00] besitzt auch das zweite Intermediat (e⁻:(D₂O)_n) eine Absorption im MIR-Bereich. Allerdings wird für diesen eine um etwa einen Faktor 3 geringere Extinktion angegeben und deshalb in der folgenden Abschätzung vernachlässigt.

Die Abschätzung bezieht sich auf die maximale Absorptionsänderung am Zeitnullpunkt. Dabei ist zu beachten, dass die Apparatefunktion ($\tau_{cc} \sim 300$ fs) des Femtosekunden-IR-Spektrometers deutlich über der Zerfallszeit des beobachteten Zustands liegt, und deshalb die gemessene Signalamplitude durch die Faltung mit der Apparatefunktion geringer ausfällt. Entfaltet man das gemessene Signal ($A_{max} \sim 2$ mOD) ergibt sich ein um etwa einen Faktor 5 höherer Wert für die Absorptionsänderung am Zeitnullpunkt. Unter diesen Annahmen lässt sich die Signalamplitude durch eine maximale Konzentration von etwa 20 μM erzeugter Ionisationsprodukte (Elektronen) erklären. Dieser Wert stellt aufgrund der Unsicherheiten in Bezug auf Zerfallszeiten und Extinktionskoeffizienten nur eine grobe Abschätzung dar und gibt lediglich eine Größenordnung wieder. Eine detaillierte Analyse und Bestimmung der Konzentration an solvatisierten Elektronen könnte durch Experimente im nahinfraroten Bereich erfolgen, in dem der Extinktionskoeffizient des solvatisierten Elektrons mit hoher Genauigkeit bekannt ist.

Auch in den Messungen an den Nukleinsäuren ist bei den verwendeten Anregungs-Intensitäten mit einem Auftreten dieses Lösungsmittel-Effektes zu rechnen. Die beobachtete Lösungsmittel-Kinetik ist jedoch auf die ersten 200 fs nach dem Zeitnullpunkt beschränkt und liefert keine Beiträge im Pikosekunden- und Nanosekunden-Bereich.

3.5 Stationäre Belichtungs-Experimente und temperaturabhängige Messungen

Ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit beruht auf der Bestimmung der Infrarot-Absorption UV-induzierter Photoprodukte in Nukleinsäuren. Zu diesem Zweck werden die IR-Spektren der zu untersuchenden Moleküle vor und nach der Belichtung mit UV-Strahlung bestimmt. Zusätzlich ist die Auswirkung einer Temperaturerhöhung auf die IR-Absorption des Lösungsmittels und der Proben für die Dateninterpretation der zeitaufgelösten Messungen von Bedeutung. Der für diese Experimente zur Verfügung stehende Messaufbau basiert auf einer Erweiterung eines kommerziellen FTIR-Spektrometers (IFS66, Fa. Bruker) und ist in Abbildung 3.11 skizziert.

Für die Belichtungs-Experimente steht ein Nd:YAG-Laser (NY60, Fa. Continuum) zur Verfügung, der bei einer Grundfrequenz von 1064 nm Lichtimpulse von etwa 5 ns Dauer

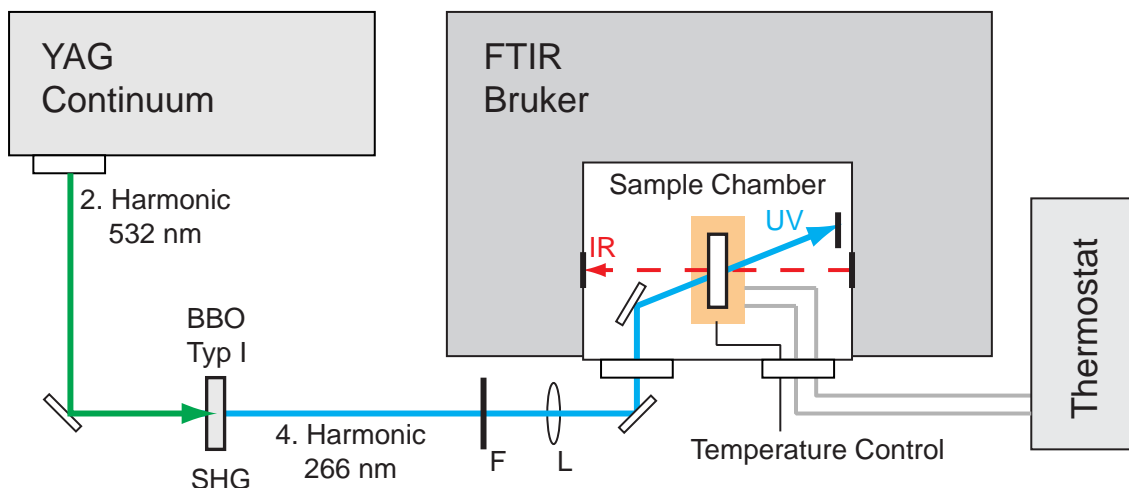


Abb. 3.11: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Durchführung von Belichtungs-Experimenten und der Bestimmung temperaturabhängiger IR-Spektren. Für die Belichtung der Proben wurde die 4. Harmonische eines YAG-Lasers bei 266 nm erzeugt und über eine Linse (L) auf die in einem FTIR-Spektrometer befindliche Probe abgebildet. Für die Bestimmung temperaturabhängiger IR-Spektren wird die Probenküvette in einen Kupferblock integriert, der mit einem Wärmebad verbunden ist. Die Temperatur-Kontrolle erfolgt über einen Temperatur-Sensor im Kupferblock.

emittiert. In einer zweistufigen Frequenzkonversion wird daraus die 4. Harmonische bei einer Wellenlänge von 266 nm erzeugt. Während die erste Stufe der Frequenzkonversion im Laser integriert ist (Verdopplung der Fundamentalen in einem nichtlinearen Kristall (KDP)), erfolgt die zweite Frequenzkonversion (SHG) der 532 nm Impulse in einem externen Kristall (BBO, Dicke = 5 mm, $\Theta = 47^\circ$, Typ I). Die UV-Strahlung (266 nm) wird über eine Linse fokussiert und durch ein Fenster auf die im FTIR befindliche Probe gelenkt. In den Experimenten werden die UV-Impulse durch entsprechende Filtergläser abgeschwächt (Energie $\sim 200 \mu\text{J}$) und auf eine Fläche von etwa 1 cm^2 am Probenort abgebildet². Die Belichtung erfolgt mit einer Repetitionsrate von 10 Hz.

Im dem Spektrometer-Aufbau sind auch temperaturstabilisierte und temperaturabhängige IR-Messungen möglich. Dabei wird ein am BMO entwickelter temperierbarer Küvettenhalter (Kupferblock) verwendet, der mit einem Temperierbad (Polystat cc3, Fa. Fisher Chemicals) verbunden ist. Eine detaillierte Beschreibung zu Aufbau und Bestandteilen dieser Anordnung findet sich in [Kol03]. Die Temperatur des Kupferblocks wird über einen Thermowiderstand bestimmt. In den temperaturabhängigen Messungen wird die Temperatur über einen Zeitraum von 30 min linear von 295 K auf 309 K erhöht und alle 4 min ein Spektrum aufgezeichnet. Der Temperatur-Unterschied zwischen dem Kupferblock und den Küvetten-Fenstern (Probe) im thermischen Gleichgewicht wurde in einem unabhängigen Experiment bestimmt und muss bei der Auswertung der Daten berücksichtigt werden. In erster Näherung ergibt sich für den betrachteten Temperaturbereich eine lineare Abhängigkeit zwischen der Temperatur des Kupferblocks und der eigentlichen Proben-temperatur, die bei der angestrebten Temperaturerhöhung von 295 auf 309 K ($\Delta T = 14^\circ\text{C}$) zu einem Unterschied von etwa 1°C führt.

²Die Energiedichte ist dabei etwa einen Faktor 20 geringer als in den zeitaufgelösten Experimenten.

4 Stationäre Charakterisierung der Modell-Systeme

In dieser Arbeit werden mit zeitaufgelöster IR-Spektroskopie photophysikalische und photochemische Prozesse in und zwischen DNA-Basen untersucht. Im Makromolekül DNA (Doppelstrang mit gemischter Basensequenz) sind jedoch viele verschiedene Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Basen und der Umgebung zu berücksichtigen [Blo00], die eine genaue Analyse und Zuordnung erschweren oder unmöglich machen. Aus diesem Grund ist eine Reduktion auf definierte Modell-Systeme notwendig, an denen zum Beispiel der Einfluss der Basen-Basen-Wechselwirkung im Detail untersucht werden kann. Im ersten Abschnitt dieses Kapitels werden die zu diesem Zweck ausgewählten Modell-Systeme vorgestellt und die Auswahlkriterien erläutert. Anschließend werden die spektroskopischen Eigenschaften dieser Moleküle bestimmt und diskutiert. In stationären Belichtungsexperimenten wird schließlich die spektrale Infrarot-Signatur von Thymin-Dimerschäden untersucht. Am Ende des Kapitels werden die wesentlichen Ergebnisse im Hinblick auf die zeitaufgelösten IR-Experimente zusammenfasst.

4.1 Die Modell-Systeme und das Lösungsmittel

In den zeitaufgelösten IR-Experimenten werden die in Abbildung 4.1 schematisch dargestellten Mononukleotide untersucht. Neben den beiden Monomeren Thymidin-5'-Monophosphat (TMP) und Adenosin-5'-Monophosphat (AMP) sind das einzelsträngige Thymin-Oligomer¹ (dT)₁₈ und das Adenin-Homopolymer poly(A) („polyadenylic acid“) dargestellt. Der Vergleich zwischen Monomeren und Homo-Polymeren ermöglicht die Unterscheidung zwischen den intrinsischen photophysikalischen Eigenschaften der Basen und Wechselwirkungen der Basen im Einzelstrang. Im Folgenden werden die ausgewählten Moleküle kurz charakterisiert und die Auswahlkriterien erläutert.

4.1.1 Thymin-Derivate: TMP und (dT)₁₈

Eines der Hauptziele dieser Arbeit ist die zeitaufgelöste Bestimmung der Bildung von CPD-Schäden („cyclobutan pyrimidine dimer“, CPD) zwischen Thymin-Basen. Zu diesem Zweck werden zwei Thymin-Derivate, ein Monomer und ein Oligomer untersucht. Das Oligo-Nukleotid (dT)₁₈ besteht aus 18 Thymidin-Nukleotiden von denen prinzipiell jede Thymin-Base nach UV-Anregung zu einem Thymin-Dimer mit einer benachbarten Base reagieren kann. In ähnlichen Systemen (poly(dT) und (dT)₂₀) wurden in der Vergangenheit die höchsten Quantenausbeuten (~ 3 %) für diese Photoreaktion in wässriger Lösung nachgewiesen [Tra69, Mar05]. Entsprechend ist auch in (dT)₁₈ mit einer ähnlich „hohen“ Ausbeute an Photoschäden zu

¹Oligo (griech.) = wenige; bezeichnet ein aus relativ wenigen Einheiten aufgebautes Molekül.

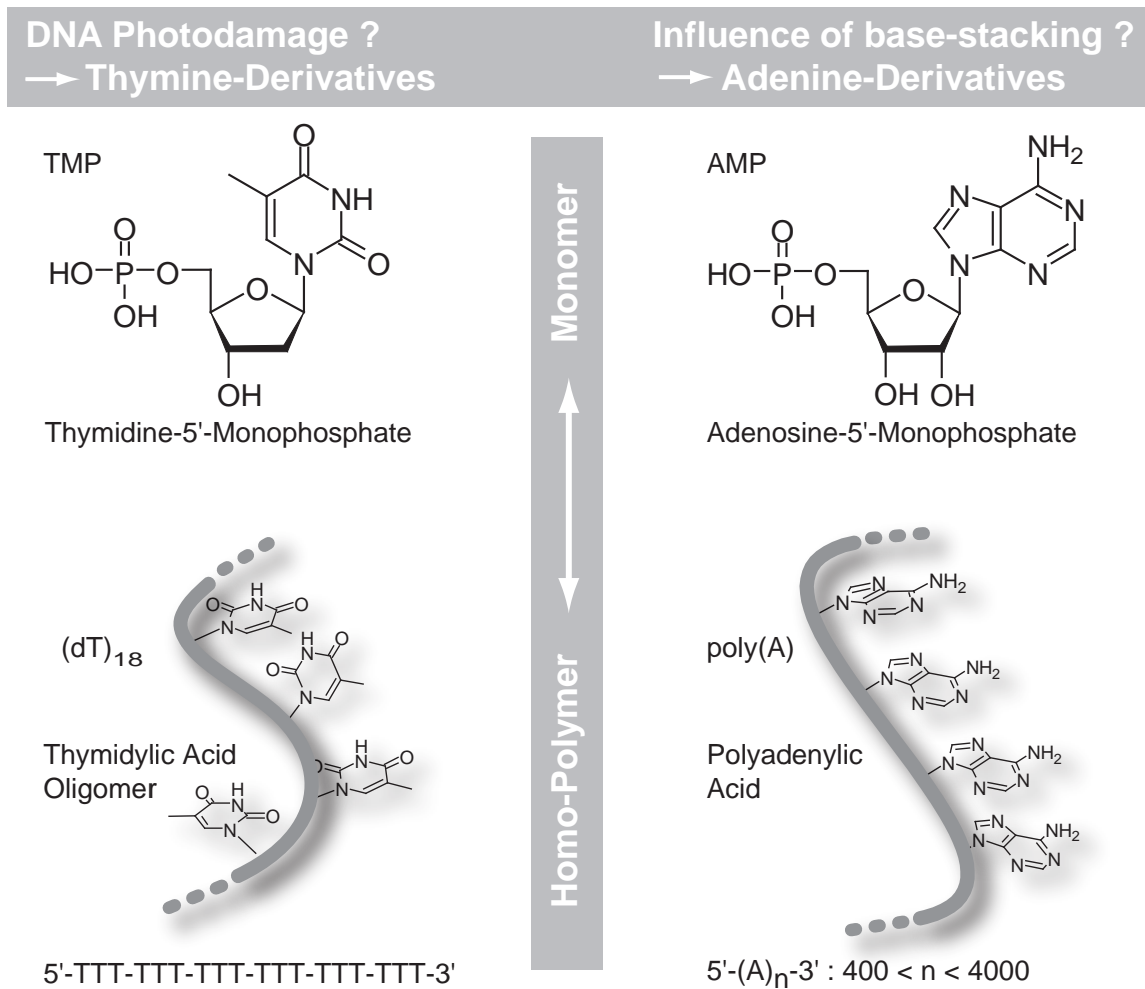


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Modell-Systeme. Die Verwendung von Monomeren und Homo-Polymeren erlaubt einen Vergleich zwischen den intrinsischen Eigenschaften der Basen mit den durch die Basen-Basen-Wechselwirkung im Strang möglichen Prozessen. An den Thymin-Derivaten TMP und (dT)₁₈ soll die Bildung von Thymin-Dimerschäden im Oligomer beobachtet werden. Das Oligomer setzt sich dabei aus 18 Thymin-Basen zusammen, die über das Zuckerphosphat-Rückgrat der DNA verknüpft sind. Ein Vergleich zwischen den RNA-Molekülen AMP und poly(A) erlaubt dagegen eine detaillierte Untersuchung der durch die Stapelung von Adenin-Basen auftretenden Zustände. Das Homopolymer poly(A) stellt ein Gemisch aus verschiedenen langen Adenin-Sequenzen dar, die einen hohen Anteil gestapelt vorliegender Basen aufweisen. Eine ausführliche Beschreibung der Auswahlkriterien findet sich im Text in den Abschnitten 4.1.1 und 4.1.2.

rechnen. Aus Studien zur Struktur von Thymin-Homopolymeren ist bekannt, dass die Thymin-Basen in wässriger Lösung nur geringe Wechselwirkungen zeigen und einen geringen Anteil gestapelt vorliegender Basen besitzen [Buh04]. Die Stränge sind sehr flexibel und nehmen eine stark ungeordnete Struktur ein [Mil99, Mar01, Joh07]. Da bei einer geringen Wechselwirkung der Basen zu erwarten ist, dass sich ein großer Anteil der Basen im Oligomer möglicherweise sehr ähnlich zum Monomer verhält, ist der direkte Vergleich mit den Eigenschaften der einzelnen Bestandteile (TMP) dabei von besonderer Bedeutung. Entsprechend werden die Experimente am Oligomer durch Messungen an TMP ergänzt, die die Untersuchung

der photophysikalischen Prozesse im Monomer und einen Vergleich mit dem Einzelstrang erlauben.

4.1.2 Adenin-Derivate: AMP und poly(A)

Adenin ist die zu Thymin komplementäre Base im DNA-Doppelstrang. Demnach bilden Experimente an beiden DNA-Bausteinen die Grundlage für künftige Untersuchungen an komplexeren doppelsträngigen DNA-Modellen. Da Adenin gleichzeitig zu den bisher am besten charakterisierten DNA-Basen zählt, soll anhand des Adenin-Derivats AMP zunächst eine Zuordnung der in den zeitaufgelösten Messungen auftretenden IR-Signaturen erfolgen. Zusätzlich sind in dieser Arbeit die photophysikalischen Prozesse im Homopolymer poly(A) von Interesse. Im Gegensatz zu den Thymin-Basen treten zwischen Adenin-Basen starke Wechselwirkungen auf [Gup78, Mil99, Luo01], die in Adenin-Homopolymeren zu einem hohen Anteil (65 - 80 %) gestapelter Basen führen [Dew79, Jol85]. Experimente mit zeitaufgelöster Absorptions- und Fluoreszenz-Spektroskopie an den Adenin-Homopolymeren poly(A) und poly(dA) konnten zeigen, dass Wechselwirkungen zwischen den Adenin-Basen die möglichen Desaktivierungspfade nach Photoanregung verändern können [CH05, Kwo06]. Diese Basen-Wechselwirkung treten auch in der DNA-Doppelhelix auf und sind deshalb von großer Relevanz. Die hier getroffene Wahl von RNA- anstatt DNA-Molekülen hat mit der Photostabilität der Moleküle zu tun. Während im Desoxy-Nukleotid poly(dA) unter UV-Belichtung die Bildung von Photoprodukten zwischen Adenin-Basen nachgewiesen werden konnte [Poe73, Cli97, Wan01], gilt das Ribo-Nukleotid poly(A) als chemisch inert gegenüber UV-Strahlung [Cli97]. Bei der Interpretation der Daten müssen entsprechend keine Photoprodukte zwischen Adenin-Basen berücksichtigt werden, die auch in der DNA-Doppelhelix nicht von Bedeutung sind.

4.1.3 Wahl des Lösungsmittels

Bei der Wahl des Lösungsmittels für die Moleküle sind einige Punkte zu beachten. So ist neben der biologischen Relevanz auch eine ausreichend hohe Löslichkeit der Moleküle wichtig. Oft entscheiden in der IR-Spektroskopie jedoch die Absorptionseigenschaften über dessen Eignung. Zum Beispiel besitzt H_2O im infraroten Spektralbereich eine starke Absorptionsbande bei etwa 1650 cm^{-1} , die einer Biege-Schwingung des Moleküls zugeordnet wird [Lib94]. Diese verursacht selbst bei Schichtdicken kleiner $10\ \mu\text{m}$ eine Absorption größer eins und macht eine Untersuchung der Proben in diesem Spektralbereich bei geplanten Schichtdicken von etwa $100\ \mu\text{m}$ unmöglich. Diese Schichtdicke ist jedoch nötig, damit bei sinnvollen Konzentrationen — im Bereich kleiner $10\ \text{mM}$ (bezogen auf die Basen) — gearbeitet werden kann und gleichzeitig eine messbare Absorption der Nukleinsäuren auftritt. Abhilfe bietet hier die Verwendung von schwerem Wasser (D_2O). In D_2O ist die oben angesprochene Schwingungsmode aufgrund des Isotopie-Effekts zu kleineren Wellenzahlen verschoben und tritt bei etwa 1210 cm^{-1} auf. Dadurch wird der hier interessierende Spektralbereich zwischen 1300 und 2000 cm^{-1} , auch bei den gewählten Schichtdicken, experimentell zugänglich [Mar91].

Für die Experimente werden die Moleküle in einer D_2O -Pufferlösung mit einem definierten pH-Wert $\text{pH} = 7$ gelöst². Bei diesem pH-Wert sind die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren

²Kaliumphosphat-Puffer (50 mM), aus Kalium-Dihydrogenphosphat (KH_2PO_4) und Di-Natrium-

deprotoniert. Entsprechend sind die Monomere in Lösung zweifach negativ geladen, während in den Polymeren durch die Verknüpfung über die Phosphatgruppen jedes Nukleotid mit nur einer negativen Ladung zur Gesamtladung beiträgt. Die Verwendung von D_2O als Lösungsmittel führt beim Auflösen der in Abbildung 4.1 gezeigten Nukleinsäuren zu einem Effekt, der bei der Bandenzuordnung im infraroten Spektralbereich berücksichtigt werden muss. Die Nuklein-Basen besitzen Wasserstoffatome in Amino- und Imino-Gruppen (NH_2 -, NH -), die sehr schnell (im Millisekundenbereich) gegen Deuteriumatome des Lösungsmittels austauschen [Blo00]. Die dadurch veränderten Massen führen zu Änderungen der Schwingungsfrequenzen [Gue96]. Während im Lösungsmittel H_2O die NH_2 - und NH - Biegeschwingungen zwischen 1700 und 1500 cm^{-1} liegen, treten die entsprechenden Schwingungsbanden der ND_2 - und ND -Gruppen im niederfrequenten Bereich zwischen 1200 und 1000 cm^{-1} auf [Leea]. Diese Verschiebungen müssen beim Vergleich mit Literaturangaben, die sich auf Ergebnisse in H_2O , Kristallen oder KBr -Matrizen beziehen in denen keine Deuterierung vorliegt, berücksichtigt werden.

4.2 Stationäre Absorptionseigenschaften

Während die Absorptions-Spektroskopie im ultravioletten Spektralbereich (UV) Informationen zu den elektronischen Übergängen und Zuständen der Nukleinsäuren liefert, gibt die Absorptions-Spektroskopie im infraroten Spektralbereich (IR) Auskunft über die in den Molekülen auftretenden Schwingungsmoden. Die Informationen, die sich aus den stationären Absorptionsspektren in beiden Spektralbereichen ergeben, sind für die Planung, Durchführung und Interpretation der im nächsten Kapitel beschriebenen zeitaufgelösten Experimente von entscheidender Bedeutung. Die Diskussion der Absorptionseigenschaften erfolgt durch den Vergleich der Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Moleküle bezogen auf eine Base. Der molare dekadische Extinktionskoeffizient ϵ ist eine von der Konzentration unabhängige Größe und bestimmt, gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz ($A = \epsilon \cdot c \cdot d$) bei bekannter Schichtdicke d und Konzentration c , die in den stationären Messungen erhaltene Absorption A .

Im betrachteten UV-Bereich ($230 - 320\text{ nm}$) wird die Absorption durch die elektronischen Übergänge der Basen bestimmt. Eine deutliche Absorption durch die Zucker- und Phosphat-Gruppen tritt erst für Wellenlängen kleiner 200 nm auf. Die angegebenen Extinktionskoeffizienten im UV-Bereich beziehen sich auf Literaturangaben und werden in Anhang D diskutiert. Im IR-Spektralbereich zwischen 1300 und 2000 cm^{-1} treten eine Reihe von Schwingungsmoden auf, die zu einem Großteil auf die Basen lokalisiert sind. Zum Teil koppeln die Schwingungsmoden der Basen jedoch auch an die Zuckerphosphat-Gruppe, was die genaue Zuordnung erheblich erschwert. Die im Folgenden gezeigten Infrarot-Absorptionsspektren der Nukleinsäuren sind auf die Lösungsmittelabsorption und den Beitrag durch HDO -Moleküle, die bei der Deuterierung der Moleküle entstehen und zu einer Absorptionsbande um 1450 cm^{-1} führen, korrigiert. Eine detaillierte Beschreibung dieser Korrektur enthält Anhang B. Die wichtigsten spektroskopischen Eigenschaften und die für die zeitaufgelösten Messungen wichtigen experimentellen Parameter im UV-Bereich sind am Ende dieses Kapitels in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Hydrogenphosphat (Na_2HPO_4).

4.2.1 AMP und poly(A): Absorptionseigenschaften

Im Folgenden werden zunächst die UV- und anschließend die IR-Absorptionseigenschaften der Adenin-Derivate AMP und poly(A) beschrieben und kurz diskutiert.

AMP und poly(A): UV-Absorption

In Abbildung 4.2 sind die Absorptionseigenschaften von AMP und poly(A) im UV-Bereich zwischen 230 und 320 nm dargestellt. In beiden Molekülen zeigt sich eine breite unstrukturierte Absorptionsbande mit einem Maximum nahe 260 nm. Beim direkten Vergleich der beiden

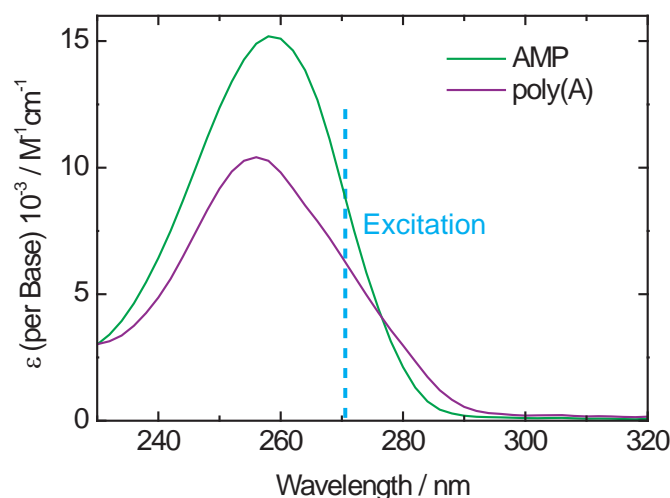


Abb. 4.2: UV-Absorptionsspektren der Adenin-Derivate AMP und poly(A) dargestellt durch den Extinktionskoeffizienten pro Base. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Position der Anregungswellenlänge in den zeitaufgelösten Anreg-Abtast-Experimenten.

Moleküle sind deutliche Unterschiede sichtbar. Zum einen ist die maximale Absorption im Monomer AMP deutlich größer, zum anderen besitzt das Homopolymer poly(A) einen Ausläufer im langwelligeren Bereich des Spektrums, der zu einer höheren Absorption für Wellenlängen größer 280 nm führt. Dabei liegen die Positionen der Absorptionsmaxima von AMP (259 nm) und poly(A) (256 nm) lediglich um 3 nm auseinander.

Die Absorptionsspektren stimmen sehr gut mit den Literaturangaben zu diesen Molekülen überein [Voe63, Cal83, Bou02]. Als Ursache für die starke Absorptionsbande um 260 nm werden für Adenin drei elektronische Übergänge diskutiert. Zwei ${}^1\pi\pi^*$ -Übergänge und ein Übergang mit ${}^1n\pi^*$ -Charakter. Eine gute Übersicht zu den theoretischen Vorhersagen in Bezug auf die Reihenfolge und die Oszillatorenstärke der Zustände findet sich zum Beispiel in [CH04a]. Obwohl sich die theoretischen Vorhersagen sowohl in Bezug auf die absoluten Energien als auch in der Reihenfolge der Übergänge zum Teil deutlich unterscheiden, ist Konsens, dass der ${}^1n\pi^*$ -Zustand nur eine sehr geringe Oszillatorenstärke besitzt und kaum zum Absorptionsspektrum beiträgt. Für die beobachtete Absorption sind die relativ nahe beieinander liegenden ${}^1\pi\pi^*$ -Übergänge ($\Delta E \sim 0,2$ eV) verantwortlich. Wie aus dem unstrukturierten Absorptionsspektrum zu erwarten, besitzt dabei einer der ${}^1\pi\pi^*$ -Übergänge eine deutlich größere Oszillatorenstärke und bestimmt im Wesentlichen die Absorption. Eine gute Darstellung zur

räumlichen Ausrichtung der Übergangsdipolmomente der $^1\pi\pi^*$ -Übergänge in Adenin findet sich zum Beispiel in [Blo00].

Der Übergang vom Monomer zum Homopolymer führt zu einer starken Erniedrigung der Absorption im Bereich des Absorptionsmaximums. Dieser Effekt wird als Hypochromie bezeichnet und wurde bereits in Kapitel 2.3.2 kurz angesprochen. Er lässt sich auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen den Übergangsdipolmomenten der Basen zurückführen [Tin60, Can80a] und wird zum Beispiel in [Blo00] sehr anschaulich erklärt. Ein Maß für die Extinktionserniedrigung ist die Hypochromizität h , die sich für ein Homopolymer mit N an der Wechselwirkung beteiligten Basen [Blo00] durch

$$h = \frac{\epsilon_{\text{Monomer}} - \epsilon_{N\text{-mer}}}{\epsilon_{\text{Monomer}}} \quad (4.1)$$

definiert. Berechnet man diesen Wert für die hier untersuchten Moleküle bei einer Wellenlänge von 256 nm, so ergibt sich eine Hypochromizität von etwa 30 %. Dieser Wert stimmt sehr gut mit den Angaben in [App66, Blo00] für die Hypochromie in Adenin Homo-Polymeren überein und ist ein Ausdruck des hohen Anteils (65 %) gestapelt vorliegender Adenin-Basen in der poly(A)-Helix [Dew79]. Der Einfluss dieser Basen-Basen-Wechselwirkung auf die elektronischen Zustände wurde kürzlich in einer theoretischen Studie mit quantenchemischen Rechnungen untersucht [San07]. Dabei konnte beim Vergleich von Adenin-Derivaten, die einzeln oder gestapelt vorliegen, sowohl die Hypochromie und leichte Blauverschiebung des Absorptionsmaximums als auch die Rotverschiebung und Ausdehnung der niederfrequenten Flanke mit der Stapelung der Basen nachvollzogen werden.

AMP und poly(A): IR-Absorption

Die Infrarot-Absorptionseigenschaften von AMP und poly(A) sind in Abbildung 4.3 zusammen mit einer schematischen Darstellung eines im Lösungsmittel D_2O deuterierten AMP-Moleküls zu sehen. In der Pufferlösung ($pH = 7$) sind die Phosphatgruppen der Mono-Nukleotide deprotoniert und tragen eine zweifach positive Ladung. Im Homopolymer trägt durch die Verknüpfung über das Phosphatrückgrat (siehe Abbildung 4.1) jede Einheit mit nur einer positiven Ladung zur Gesamtladung bei. Bei den verwendeten Konzentrationen liegen die Amino-Gruppe der Base ebenso wie die Hydroxy-Gruppen des Zuckers deuteriert vor [Leea].

Beide Moleküle zeigen in den Spektren eine starke Absorptionsbande um 1625 cm^{-1} und eine Reihe schwächerer Banden zu kleineren Wellenzahlen. Da in den zeitaufgelösten Experimenten nur die beiden hochfrequenten Moden um 1625 cm^{-1} und 1580 cm^{-1} im Detail untersucht werden, wird im Folgenden auf eine Zuordnung der niederfrequenten Moden im Fingerprint-Bereich des Spektrums verzichtet. Ausführliche Bandenzuordnungen für diesen Bereich finden sich zum Beispiel in [Bai97, Ban03]. Die Positionen der Absorptionsmaxima und die Zuordnung der Schwingungsmoden für die beiden hochfrequenten Banden sind in Tabelle 4.1 angegeben. Die beiden Schwingungsmoden um 1625 cm^{-1} und 1580 cm^{-1} sind im Wesentlichen auf den Adenin-Basen lokalisiert. Während an der intensiveren Bande Streck-schwingungen im Bereich der $C=N$ und der $C=C$ Doppelbindungen beteiligt sind, beinhaltet die Bande um 1580 cm^{-1} Schwingungsbewegungen im Bereich der $C4=C5$ Doppel- und der $C5-C6$ Einfach-Bindung [Let87, Bai97, Ban03, Leea]. Vergleicht man die IR-Spektren von

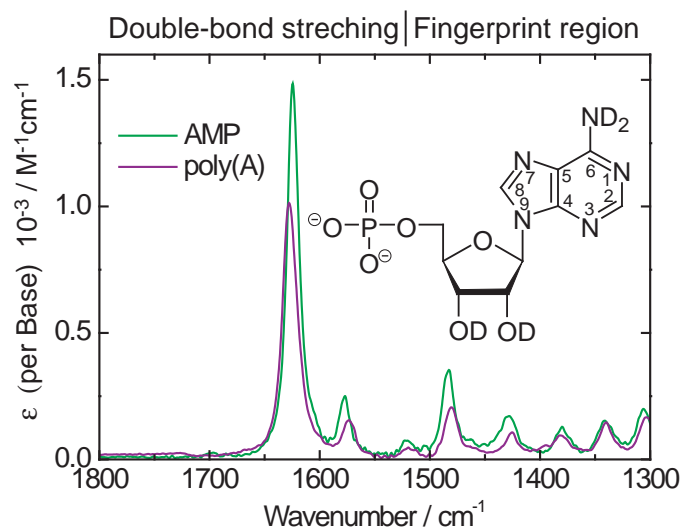


Abb. 4.3: IR-Absorptionsspektren der Adenin-Derivate AMP und poly(A), dargestellt durch den Extinktionskoeffizienten pro Base. Das Molekülschema zeigt ein AMP-Molekül das im Lösungsmittel D₂O bei pH = 7 deuteriert und protoniert vorliegt.

AMP	poly(A)	Bandenzuordnung	Referenz
1624	1628	C=N, C=C	[Ban:03, Let:87]
1577	1573	C4=C5, C5-C6	[Ban:03, Let:87]

Tabelle 4.1: Zuordnung der Schwingungsmoden für AMP und poly(A) im Bereich der Streckschwingungen zwischen 1700 und 1550 cm⁻¹.

AMP und poly(A), zeigt sich ein deutlicher Absorptionsunterschied. Zum einen ist die Absorption von poly(A) pro Base im Bereich der Doppelbindungs-Schwingungen deutlich geringer. Zum anderen zeigt sich ein Unterschied in der spektralen Position der Absorptionsmaxima. Eine Erklärung für diesen Effekt liefert ein Vergleich des IR-Spektrums von AMP mit Adenin enthaltenden Dinukleotiden in [Mae80]. Auch in den Dinukleotiden zeigt sich eine Reduktion und Verschiebung der Infrarot-Absorption, die auf Wechselwirkungen zwischen den aromatischen und zu einem Teil gestapelt vorliegenden Basen beruht. Die Wechselwirkung der Basen und hohe Ordnung der poly(A)-Helix ist demnach auch in der IR-Absorption sichtbar.

4.2.2 TMP und (dT)₁₈: Absorptionseigenschaften

Im Folgenden werden die UV- und IR-Absorptionseigenschaften der beiden Thymin-Derivate TMP und (dT)₁₈ beschrieben und diskutiert.

TMP und (dT)₁₈: UV-Absorption

Die UV-Absorptionsspektren von TMP und (dT)₁₈ sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Aufgetragen sind die Extinktionskoeffizienten pro Base zwischen 230 und 320 nm. Beide Moleküle

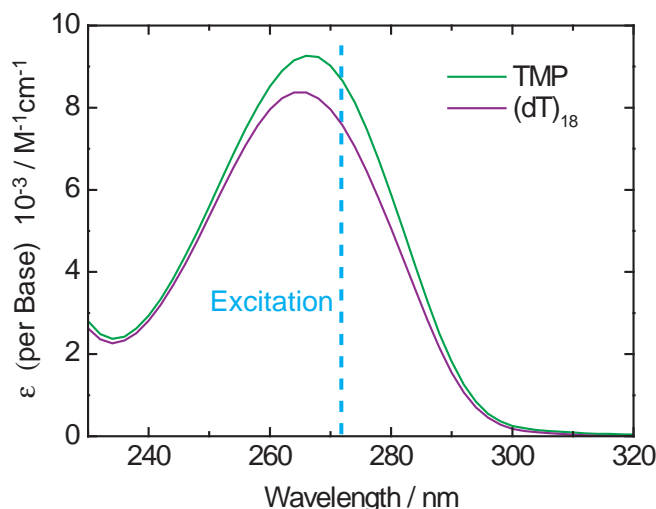


Abb. 4.4: UV-Absorptionsspektren von TMP und (dT)₁₈, dargestellt durch den Extinktionskoeffizienten pro Base. Die vertikale gestrichelte Linie markiert die Anregungs-Wellenlänge in den zeitaufgelösten Anreg-Abtast-Experimenten.

zeigen eine breite unstrukturierte Absorptionsbande mit einem Maximum der Absorption bei etwa 266 nm. In TMP liegt das Maximum bei 267 nm, in (dT)₁₈ bei 265 nm. In beiden Molekülen wird die breite Absorptionsbande in diesem Spektralbereich durch die Thymin-Basen verursacht, die einen $^1\pi\pi^*$ -Übergang mit relativ großer Oszillatorenstärke besitzen. Ein $^1n\pi^*$ -Übergang wird in der Nähe des $^1\pi\pi^*$ -Übergangs vermutet [CH04a, Gus06]. Allerdings besitzt dieser nur eine sehr geringe Oszillatorenstärke und ist in den Spektren nicht eindeutig zu identifizieren. Bei der Absorption von UV-Impulsen bei etwa 270 nm kann er vernachlässigt werden.

Der Übergang vom Monomer TMP zum Oligomer (dT)₁₈ führt zu einer Erniedrigung der Extinktion am Absorptionsmaximum von etwa 10 % (Hypochromie). Die hier beobachtete Extinktionserniedrigung ist damit deutlich geringer als beim Vergleich der Adenin-Derivate und weist auf eine wesentlich geringere Wechselwirkung zwischen den Thymin-Basen hin. Dies wird durch Experimente und quantenmechanische Rechnungen bestätigt, die für Thymin-Homopolymere geringe Wechselwirkungen zwischen den Basen und nur einen geringen Anteil gut gestapelt vorliegender Basen angeben [Mil99, Mar01].

TMP und (dT)₁₈: IR-Absorption

Die IR-Absorptionseigenschaften von TMP und (dT)₁₈ zwischen 1800 und 1300 cm^{-1} sind in Abbildung 4.5 zusammen mit einer schematischen Darstellung für ein TMP-Molekül, dass im Lösungsmittel D₂O bei pH = 7 protoniert und deuteriert vorliegt, gezeigt. Sowohl das Wasserstoffatom am N3-Stickstoffatom als auch die Wasserstoffatome der Hydroxy-Gruppe des Zuckers sind im Lösungsmittel D₂O durch Deuteriumatome ersetzt [Ban03, Leea]. In der D₂O-Pufferlösung ist die Phosphatgruppe deprotoniert und das TMP-Molekül zweifach negativ geladen [Blo00]. Im Oligomer trägt entsprechend der Verknüpfung über das Phosphat-Rückgrat

(siehe Abbildung 4.1) jede Einheit mit nur einer negativen Ladung zur Gesamtladung bei.

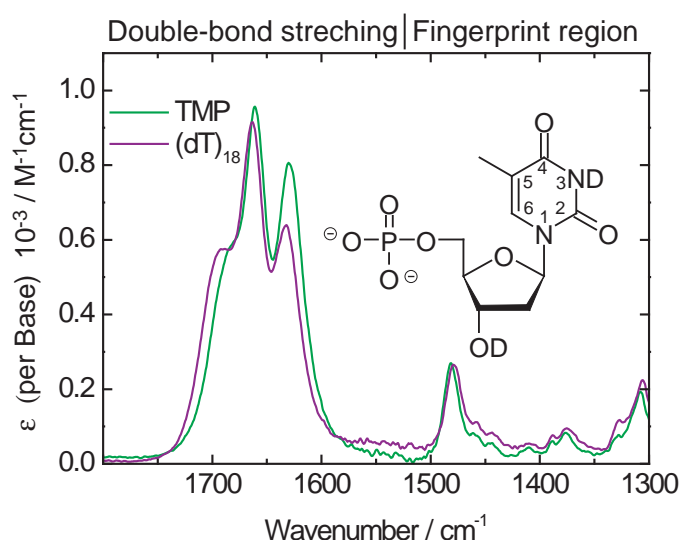


Abb. 4.5: IR-Absorptionsspektren der Thymin-Derivate TMP und (dT)₁₈, dargestellt durch den Extinktionskoeffizienten pro Base. Das Molekülschema zeigt ein deuteriertes TMP-Molekül wie es im Lösungsmittel D₂O bei pH = 7 vorliegt.

Die Positionen der Schwingungsbanden und ihre Zuordnung sind in Tabelle 4.2 zusammengestellt. Im Spektralbereich oberhalb von 1500 cm⁻¹ sind in beiden Molekülen drei Banden zu erkennen. Eine Bande zeigt sich als Schulter um 1685 cm⁻¹, zwei weitere Schwingungsbanden liegen um 1660 und 1630 cm⁻¹. Diese Absorptionsbanden werden durch Streckenschwingungen im Bereich der C2=O2, C4=O4 und C5=C6 Doppelbindungen in den Thymin-Basen hervorgerufen [Let87, Ban03]. Im Vergleich zum Monomer TMP sind im Oligomer (dT)₁₈ die Maxima dieser Absorptionsbanden in diesem Bereich zu etwas größeren Wellenzahlen verschoben. Zwischen 1500 und 1300 cm⁻¹ liegt eine Reihe schwächerer Absorptionsbanden. Eine genaue

TMP	(dT) ₁₈	Bandenzuordnung	Referenz
1681	1693	C2=O, C4=O4	[Let87]
1661	1664	C4=O4, C2=O2, C5=C6	[Let87]
1630	1632	C5=C6, C4=O4, Ringschwingung	[Let87, Ban03]
1481	1479	C4-C5, N1-C2 *	[Let87]
1376	1376	CH3 - sym., C2-N3, C5-CH3, N1-C6	[Let87]
1327	1327	HC2'H, C4'-O1', C4'-C5', C2'-endo/anti *	[Let87, Ban03]
1308	1306	CN3H Biegeschwingung, C2'-endo/anti *	[Let87, Ban03]

Tabelle 4.2: Zuordnung der Schwingungsmoden für TMP und (dT)₁₈. Atome des Zuckers sind durch einen Apostroph (') gekennzeichnet. Die Angaben für die mit einem Stern (*) versehenen Zuordnungen sind in der Literatur nicht eindeutig.

Zuordnung dieser Banden ist aufgrund ihrer stark delokalisierten Schwingungsmoden, zu denen zum Teil auch die Atome des Zuckers beitragen, schwierig. In der Literatur gibt es

dabei erhebliche Unterschiede bei der Zuordnung. Gegenstand der Diskussion ist vor allem die Bande bei 1480 cm^{-1} . Diese Bande tritt auch im Absorptionsspektrum von Thymin auf und scheint deshalb im Wesentlichen auf der Base lokalisiert zu sein. In [Aid96, Aam97] wird sie einer CH_3 -Deformations-Schwingung der Thymin-Base zugeordnet. Jedoch wurde in einer Studie mit Isotopen-Markierung an der CH_3 -Gruppe [Zha98] kein entsprechender Effekt auf die Lage dieser Absorption gefunden. Stattdessen wird eine Ring-Schwingung der Base als Ursache für diese Bande diskutiert. Diese Zuordnung deckt sich auch mit den Angaben zu deuteriertem Thymidin in [Let87]. Die Banden bei Frequenzen kleiner 1330 cm^{-1} beinhalten Schwingungsanteile der Zuckerkomponenten und sind sensitiv auf dessen Konformation (vergleiche Abschnitt 2.1.2) [Let87, Ban03].

Beim Vergleich der Absorptionseigenschaften von TMP und $(\text{dT})_{18}$ fällt auf, dass sich die beiden Moleküle vor allem im Bereich der Doppelbindungs-Schwingungen unterscheiden. Im Oligomer liegen die Absorptionsmaxima etwas höherfrequent und die Schulter um 1693 cm^{-1} ist im Gegensatz zu TMP wesentlich stärker ausgeprägt. Gleichzeitig ist die Intensität der Schwingungsbande um 1630 cm^{-1} deutlich geringer. Offenbar sind die hochfrequenten Carbonyl- und Doppelbindungs-Schwingungen Schwingungsmoden sehr sensitiv auf die Umgebung im Oligomer. Dagegen gibt es eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen den beiden Molekülen im niederfrequenten Fingerprint-Bereich zwischen 1500 und 1300 cm^{-1} . Diese Eigenschaft erlaubt einen direkten Vergleich dieses Spektralbereichs in den zeitaufgelösten Experimenten.

4.3 Stationäre Belichtungsexperimente

Im diesem Abschnitt wird die Auswirkung von UV-Strahlung auf das IR-Absorptionsspektrum mehrerer Modell-Substanzen untersucht. Dazu werden die Moleküle mit UV-Strahlung der Wellenlänge 266 nm belichtet, und die Infrarot-Absorption in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer aufgezeichnet. Eine ausführliche Beschreibung des experimentellen Aufbaus und der Messparameter findet sich in Abschnitt 3.5. Während in $(\text{dT})_{18}$ mit der Bildung von Photoschäden zu rechnen ist, sollten in dem photostabilen Adenin-Homopolymer poly(A) keine Veränderungen auftreten. Tatsächlich konnten für poly(A) im Rahmen der Messgenauigkeiten keine Absorptionsänderungen nachgewiesen werden. Dagegen sind in $(\text{dT})_{18}$ bei vergleichbaren Strahlungsdosen deutliche Veränderungen in der IR-Absorption sichtbar. Die experimentellen Ergebnisse an drei Thymin-Derivaten werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

4.3.1 Thymin-Derivate: IR-Signatur von Photoprodukten

In den Belichtungsexperimenten wird die Auswirkung von UV-Strahlung auf die IR-Absorption von $(\text{dT})_{18}$ und TMP sowie einem Thymidin-Dinukleotid (TpT) untersucht. Die Proben besitzen eine Konzentration von etwa 10 mM bezogen auf die Thymin-Basen und eine Schichtdicke von etwa $90\text{ }\mu\text{m}$. Abbildung 4.6 zeigt die IR-Absorptionsspektren in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer und die aus der Subtraktion der Ausgangs-Spektren von den Spektren nach einer bestimmten Belichtungsdauer Δt resultierenden Differenzspektren. Die Beobachtungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

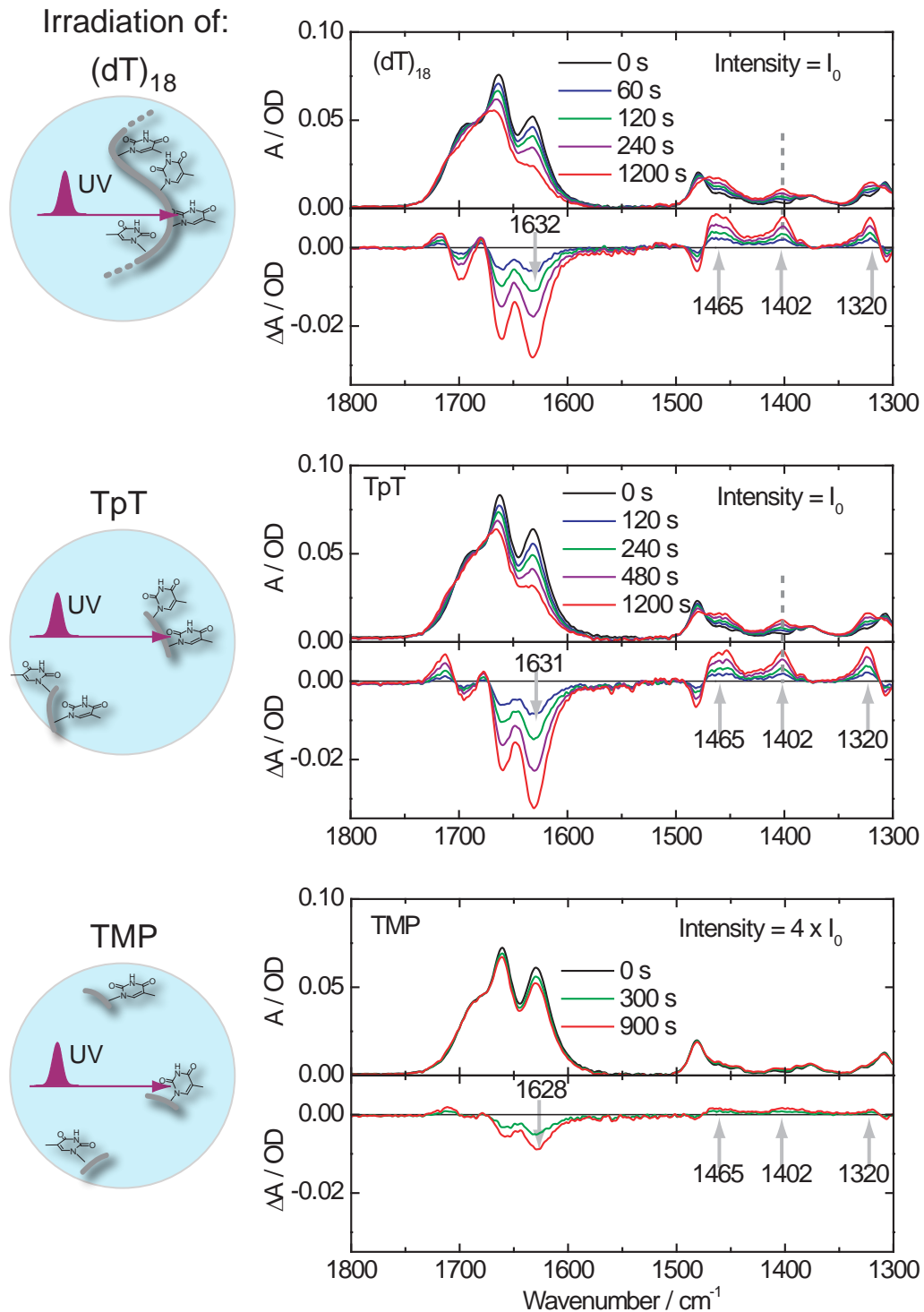


Abb. 4.6: Absorptions- und Differenz-Spektren für $(dT)_{18}$, TpT und TMP in Abhängigkeit von der Strahlungs-dosis. Die Belichtung erfolgt bei einer Wellenlänge von 266 nm mit einer Strahlungsintensität von $I_0 \sim 2 \text{ mW/cm}^2$ bzw. $4 \cdot I_0$. An allen drei Thymin-Derivaten zeigen sich spektrale Änderungen, die auf die Bildung ähnlicher Photoprodukte hinweisen. Die gestrichelt eingezeichneten Linien in den Spektren von $(dT)_{18}$ und TpT kennzeichnen die Position für die in Abbildung 4.7 dargestellten Zeitverläufe.

(i) In $(dT)_{18}$ zeigt sich bereits nach einer kurzen Belichtungsdauer von 60 s mit einer Strahlungsintensität von $I_0 = 2 \text{ mW/cm}^2$ eine deutliche Abnahme der Absorption im Bereich der hochfrequenten C=C und C=O Doppelbindungen. Am stärksten sind die Absorptionsänderungen um 1630 cm^{-1} . Dieser Spektralbereich ist mit der C5=C6 Doppelbindung verknüpft, und die Abnahme deutet auf ein Verschwinden dieser Bande hin. Zusätzlich entstehen mit zunehmender Belichtungsdauer und Strahlungsdosis neue Banden im Fingerprint-Bereich zwischen 1500 und 1300 cm^{-1} . Die Maxima dieser Banden liegen bei 1465 , 1402 und 1320 cm^{-1} .

(ii) Bei der Belichtung von TpT findet man ebenfalls deutliche Absorptionsänderungen. Die spektrale Signatur dieser Änderungen stimmt gut mit den Änderungen in $(dT)_{18}$ überein. Zudem erfolgen die Absorptionsänderungen auf einer zu $(dT)_{18}$ vergleichbaren Zeitskala.

(iii) Auch bei der Belichtung von TMP treten mit zunehmender Strahlungsdosis Absorptionsänderungen auf, die an sehr ähnlichen Spektralpositionen wie in $(dT)_{18}$ und TpT liegen. Allerdings sind die Amplituden für diese Absorptionsänderungen bei vergleichbaren Belichtungsdauern etwa einen Faktor 20 geringer.

Die Übereinstimmung in den spektralen Positionen der Absorptionsänderungen zeigen, dass in allen drei Proben durch die UV-Strahlung Photoreaktionen induziert werden, die offenbar zu denselben Photoprodukten führen. Nimmt man an, dass es sich dabei um eine bi-molekulare Photoreaktion handelt, müssen zwei Bedingungen erfüllt sein: (i) Zwei Moleküle müssen sich in der Lösung so nahe kommen, dass eine Reaktion möglich ist. (ii) Eines der Moleküle muss in einem reaktiven Zustand sein, der die Reaktion ermöglicht.

Der große Unterschied zwischen den Oligomeren $(dT)_{18}$ und TpT einerseits und dem Monomer TMP andererseits lässt sich wie folgt erklären: Wird ein TMP-Molekül angeregt, ist eine Reaktion mit einem weiteren TMP-Molekül durch die Lebensdauer des angeregten Zustands und die Wahrscheinlichkeit für einen Kontakt mit einem zweiten TMP-Molekül limitiert. Für TMP-Moleküle in Lösung sind demnach drei Mechanismen denkbar [Fis70]:

1. diffusionskontrollierte Reaktion zwischen einem Molekül im Grundzustand und einem Molekül in einem angeregten Singulett-Zustand;
2. diffusionskontrollierte Reaktion zwischen einem Molekül im Grundzustand und einem Molekül in einem angeregten Triplett-Zustand;
3. Photoreaktion in einem Aggregat aus zwei oder mehr TMP-Molekülen.

Aufgrund der geringen Konzentration ($< 0,01 \text{ M}$) und den aus zeitaufgelösten Experimenten bekannten kurzen Lebensdauern von Singulett-Zuständen ($\tau < 10^{-12} \text{ s}$) ist eine diffusionslimitierte Reaktion über einen angeregten Singulett-Zustand äußerst unwahrscheinlich. Typische Diffusionskonstanten (D) für Flüssigkeiten liegen bei Raumtemperatur etwa bei $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. Daraus ergibt sich eine Diffusionslänge ($L = (D \cdot \tau)^{1/2}$) von lediglich 10^{-11} m für die kurzlebigen Singulett-Zustände. Diese Wegstrecke — unterhalb einer atomaren Bindungslänge — steht einem mittleren Abstand von etwa $2 \cdot 10^{-7} \text{ m}$ bei einer isotropen Verteilung der Moleküle gegenüber. Entsprechend sind innerhalb der Singulett-Lebensdauer keine Stoßprozesse und Photoreaktionen zu erwarten. Die geringen Wechselwirkungen zwischen den Thymin-Basen lassen bei den verwendeten Konzentrationen zudem nur einen sehr geringen Anteil an Thymin-Aggregaten erwarten [Sol68]. Mit diesen Überlegungen und der Tatsache, dass die Rate für Thymin-Basen in Lösung durch Triplett-Löscher wie Sauerstoff beeinflusst werden kann, wird

für die zwischen TMP-Molekülen in Lösung beobachteten Photoreaktionen eine diffusionslimitierte Reaktion über einen langlebigen Triplett-Zustand (Lebensdauer im Bereich von 10^{-6} Sekunden) postuliert [Fis70]. Diese Reaktionen sind jedoch aufgrund der geringen Besetzung von Triplett-Zuständen ($\sim 1-2\%$) und dem auf etwa 4 ns beschränkten Messbereich in den zeitaufgelösten Messungen nicht von Bedeutung. Dagegen befinden sich im Oligomer $(dT)_{18}$ und dem Dinukleotid TpT einzelne Basen bereits in unmittelbarer Nähe zu den Reaktionspartnern. In diesem Fall sind die Photoreaktionen nicht mehr diffusionslimitiert und dadurch, wie in den Experimenten beobachtet, wesentlich höhere Reaktionsraten möglich. Jetzt können sowohl ein kurzlebiger Singulett- als auch ein langlebiger Triplett-Zustand als Intermediate für eine Photoreaktion dienen [Eis67].

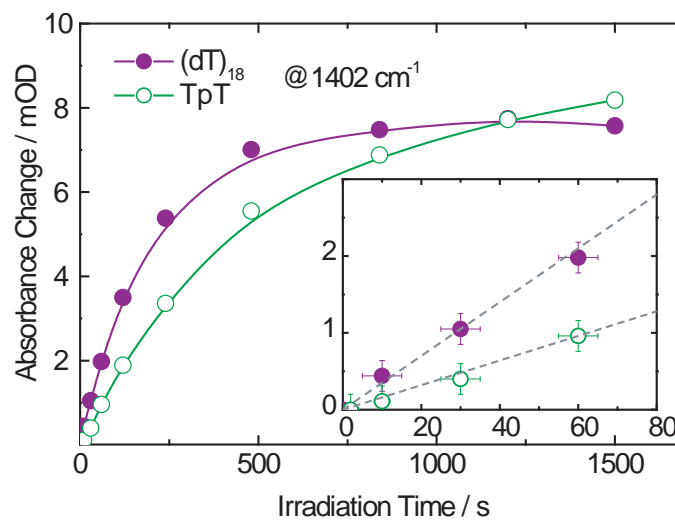


Abb. 4.7: Vergleich der Absorptionsänderungen unter UV-Belichtung für $(dT)_{18}$ und TpT bei einer Wellenzahl von 1402 cm^{-1} . Das Inset zeigt die initialen Absorptionsänderungen, deren Steigung ein Maß für die Quantenausbeute der Photoreaktion ist.

Vergleicht man die Raten zwischen TpT und $(dT)_{18}$ genauer, zeigt sich dennoch ein deutlicher Unterschied. In Abbildung 4.7 sind die Absorptionsänderungen für TpT und $(dT)_{18}$ bei einer Wellenzahl von 1402 cm^{-1} in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer aufgetragen. Nach einem zunächst steilen Anstieg tritt in $(dT)_{18}$ nach einer Belichtungsdauer von etwa 600 s eine Sättigung auf, die auf das Erreichen eines photostationären Gleichgewichts hinweist. In TpT ist die Steigung deutlich geringer und die nach 1500 s erreichte Absorptionsänderung, die noch nicht in eine Sättigung übergegangen ist, größer. Für eine Erklärung dieser Beobachtung sind zwei Punkte wichtig. Zum einen kann sich bei reversiblen Photoreaktionen ein Gleichgewicht in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge und der jeweiligen Absorptionseigenschaften einstellen. Zum anderen können sterische Einschränkungen und fehlende Partner dazu führen, dass nicht alle Thymin-Basen an einer Reaktion teilnehmen können. Zum Beispiel können in $(dT)_{18}$ nach einer Anhäufung von Photoschäden — an denen jeweils zwei Basen beteiligt sind — bei einer statistischen Verteilung im Einzelstrang nicht alle Basen an einem Photoschaden beteiligt sein [Dee63]. Da diese Einschränkung im Fall des Dinukleotids TpT wegfällt (mit der Ausnahme für Reaktionen zwischen zwei TpT-Molekülen) ist in dieser Probe wie beobachtet

mit einem höheren Anteil an Photoprodukten im stationären Gleichgewicht zu rechnen.

Ein Vergleich der Quantenausbeuten für beide Systeme ist durch den Vergleich der initialen Steigung der Absorptionsänderungen möglich. Für kleine Strahlendosen und kurze Belichtungsdauern ($t \rightarrow 0$) ist die initiale Steigung der Konzentrationsänderung (c_p) der Produkte bzw. die Absorptionsänderung (A_p) (siehe Inset in Abbildung 4.7) direkt proportional zur Quantenausbeute Φ der Photoreaktion [Dee63, Fis70]:

$$\frac{dc_p}{dt} \sim \frac{dA_p}{dt} \sim \Phi \cdot I_0 \quad \text{für } t \rightarrow 0. \quad (4.2)$$

Mit exakten Angaben zu den verwendeten Konzentrationen und den Extinktionskoeffizienten lassen sich prinzipiell, wie in [Joh62] detailliert beschrieben, die Quantenausbeute für Photoreaktionen unter UV-Belichtung berechnen. An dieser Stelle ist jedoch nur das Verhältnis der Quantenausbeute zwischen TpT und $(dT)_{18}$ von Interesse, das sich direkt aus einem Vergleich der beiden Steigungen in Abbildung 4.7 ergibt. Dabei zeigt sich, dass die Quantenausbeute der Photoreaktion in TpT etwa einen Faktor zwei geringer ist als in $(dT)_{18}$. Dieser Unterschied lässt sich in einem einfachen Modell für eine bi-molekulare Photoreaktion erklären [Dee63]. Während, abgesehen von den End-Basen des 18-mers, allen Thymin-Basen im $(dT)_{18}$ -Strang nach UV-Anregung jeweils zwei Reaktionspartner zur Verfügung stehen, ist in TpT nach UV-Anregung nur ein potentieller Reaktionspartner vorhanden. Das hier bestimmte Verhältnis der Ausbeuten (2:1) ist in sehr guter Übereinstimmung mit den Angaben in [Mar05] für die Bildung von CPD-Photoschäden in poly $(dT)_{20}$ und TpT und lässt vermuten, dass die beobachteten Absorptionsänderungen auf die Bildung dieser Photoschäden zurückzuführen sind.

4.3.2 Thymin-Dimere: Identifizierung und spektrale Charakterisierung

Die stationären Belichtungsexperimente des letzten Abschnitts haben gezeigt, dass es in $(dT)_{18}$ nach UV-Bestrahlung zu Photoreaktionen kommt, die zur Bildung eines oder mehrerer Photoprodukte führen. Sowohl die geringen Schadensraten bei der Belichtung von TMP, als auch das Verhältnis der Quantenausbeuten zwischen TpT und $(dT)_{18}$ deuten dabei auf eine bi-molekulare Photoreaktion hin. Gleichzeitig weisen die damit verbundenen starken Absorptionsänderungen im Bereich der C5=C6 Doppelbindung der Thymin-Basen auf strukturelle Veränderungen in diesem Bereich hin. Alle diese Beobachtungen ließen sich mit der Annahme einer Bildung von Thymin-Dimerschäden erklären. In diesem Fall könnten die beobachteten Absorptionsänderungen und die daraus bestimmten Differenzspektren als Nachweis für die Bildung dieses Photoprodukts in den zeitaufgelösten IR-Messungen verwendet werden. Allerdings gibt es für diese Schäden bisher keine Bandenzuordnung für den infraroten Spektralbereich. Aus diesem Grund wird für die Identifizierung und Zuordnung der beobachteten Absorptionsänderungen ein Vergleich der IR-Absorptionsspektren und der beobachteten Absorptionsänderungen mit den Spektren von Modell-Substanzen durchgeführt und obige Annahme experimentell überprüft.

Dimer-Modell-Substanzen

Die für diesen Zweck ausgewählten Moleküle und deren IR-Absorptionsspektren sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Die Spektren gehören zu zwei Photodimeren, die als Modell-Systeme für CPD-Schäden eingesetzt werden³. Die Moleküle stellen Thymidin-Dimere dar, deren Zucker

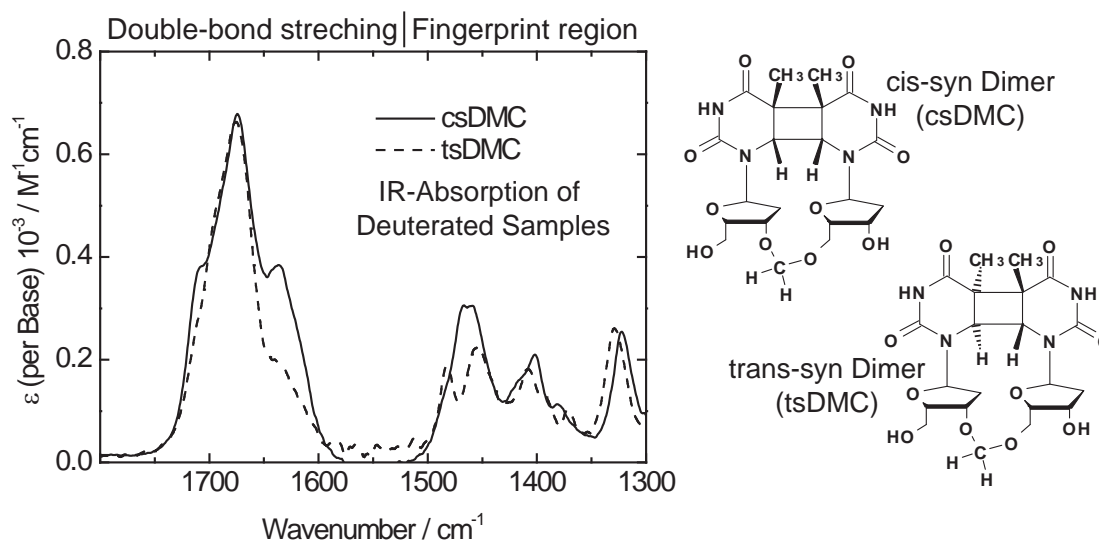


Abb. 4.8: Stationäre IR-Absorptionsspektren der schematisch dargestellten Modell-Dimere csDMC und tsDMC. Die Unsicherheit bei der Angabe der Extinktionskoeffizienten beträgt etwa 20 %. Im Lösungsmittel D_2O sind die Amino- und die Hydroxy-Gruppen der Moleküle durch Deuteriumatome ersetzt. Diese Modifikation wurde in der Darstellung nicht berücksichtigt.

über ein Formacetal ($-\text{CH}_2-$) anstelle einer Phosphodiester-Gruppe miteinander verbunden sind. Sie werden deshalb auch als „Phosphodiester-Analog“ bezeichnet. In NMR-Experimenten („nuclear magnetic resonance“, NMR)⁴ konnte gezeigt werden, dass der Ersatz des Phosphodiesters nur zu geringen strukturellen Änderungen im Vergleich zu „nativen“ Dimer-Strukturen in der DNA führt [Vea93]. Diese Modell-Dimere lassen sich gezielt in DNA-Stränge integrieren und ermöglichen zum Beispiel die Untersuchung von DNA-Protein-Wechselwirkungen (siehe Abschnitt 2.2.4 zu DNA-Photolyasen). Die hier untersuchten Moleküle sind Stereo-Isomere bezüglich der Anordnung der Basen. Die Basen befinden sich entweder in *cis-syn* oder in *trans-syn* Stellung. Entsprechend werden die Moleküle im Weiteren durch csDMC (*cis-syn*-“Dimer Model Compound“) bzw. tsDMC (*trans-syn*-“Dimer Model Compound“) abgekürzt. Sowohl das *cis-syn*- als auch das *trans-syn*-Isomer konnten in einzelsträngiger DNA nach UV-Bestrahlung zwischen Thymin-Basen nachgewiesen werden. In der DNA-Doppelhelix tritt das *trans-syn*-Isomer jedoch praktisch nicht auf [Fri04].

Die beiden Modell-Substanzen unterscheiden sich relativ deutlich in den IR-Spektren. Zum einen ist im Bereich der C=C und C=O Doppelbindungen um 1630 cm^{-1} die Absorption des *cis-syn*-Dimers deutlich ausgeprägter. Zum anderen ist die breite Absorptionsbande des *cis-syn*-

³Die Synthese dieser Moleküle wird in [But98] beschrieben und erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. T. Carell, Fakultät für Chemie und Pharmazie, LMU München.

⁴engl.: Kern-Spin-Resonanz-Tomographie

Dimers um 1480 cm^{-1} im *trans-syn*-Dimer in zwei Banden aufgespalten. Vor allem das Auftreten der ausgeprägten Schulter um 1630 cm^{-1} im csDMC-Molekül ist zunächst überraschend, da in beiden Molekülen gemäß der Zuordnung in Tabelle 4.2 keine C5=C6-Doppelbindung vorliegt. Offenbar ist dies Ausdruck der Beteiligung der C=O Doppelbindungs-Schwingungen, die in diesem Spektralbereich zur Absorption beitragen und sensitiv auf die Anordnung der Basen reagieren. In diesem Bereich zeigen sich auch beim Vergleich zwischen der Absorption von TMP, TpT und $(dT)_{18}$ deutliche Unterschiede. Die weitere Diskussion beschränkt sich aus diesem Grund auf den Vergleich der Spektren im Fingerprint-Bereich zwischen 1550 und 1300 cm^{-1} , in dem TMP, TpT und $(dT)_{18}$ sehr ähnliche Absorptionsspektren besitzen.

Spektraler Nachweis von Thymin-Dimeren

Einen direkten Vergleich zwischen den Ergebnissen aus den Belichtungsexperimenten an TpT und $(dT)_{18}$ mit den zu erwartenden Absorptionsänderungen bei der Bildung von CPD-Schäden erlauben die Spektren in Abbildung 4.9. In Abbildung 4.9 A sind die IR-Absorptionsspektren

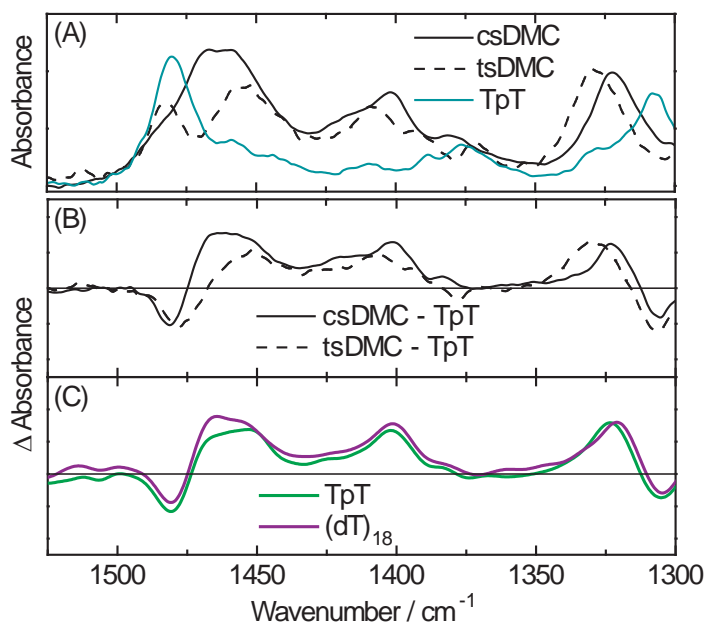


Abb. 4.9: (A) Stationäre Absorptionsspektren von TpT und den Dimer-Molekülen tsDMC und csDMC. (B) Differenzspektren zwischen den Modell-Dimeren und TpT. (C) Differenzspektren von TpT und $(dT)_{18}$ nach UV-Bestrahlung. Die sehr gute Übereinstimmung des Differenzspektrums von $(dT)_{18}$ in (C) mit der Differenz zwischen csDMC und TpT in (B) zeigt, dass bei der Belichtung von $(dT)_{18}$ im Wesentlichen das *cis-syn*-Dimer gebildet wird.

der DMC-Moleküle und des Dinukleotids TpT dargestellt. Durch Subtraktion des TpT-Spektrums (blau) von den Dimer-Spektren (csDMC = durchgezogene, tsDMC = gestrichelte Linie) ergeben sich die in Teil (B) der Abbildung gezeigten Differenzspektren. Diese Differenzspektren entsprechen den bei der Bildung von Dimeren in TpT zu erwartenden Absorptionsänderungen für den Fall, dass entweder nur *trans-syn*-Dimere oder nur *cis-syn*-Dimere gebildet werden. Diese Spektren können nun direkt mit den aus den Belichtungsexperimenten

erhaltenen Differenzspektren für TpT (grün) und (dT)₁₈ (rot) in Abbildung 4.9 C verglichen werden.

Das Differenzspektrum von (dT)₁₈ stimmt sehr gut mit dem Differenzspektrum für das *cis-syn*-Dimer überein. Dies zeigt, dass bei der UV-Bestrahlung von (dT)₁₈ im Wesentlichen nur der *cis-syn* CPD-Schaden gebildet wurde und andere Schadenstypen offenbar nur eine untergeordnete Rolle spielen. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Literaturangaben zu den relativen Ausbeuten für weitere Photoprodukte. Zum Beispiel wurde beim Vergleich der Ausbeuten für CPD-Schäden und (6-4)-Photoprodukten (siehe Abschnitt 2.2.2) bei der Belichtung von (dT)₂₀ ein Verhältnis von 10:1 gefunden [Mar05]. Belichtungsexperimente an poly(dT) ergaben sogar ein Verhältnis von etwa 50:1 [Mit84]. Vergleicht man dagegen das Differenzspektrum aus dem Belichtungsexperiment für TpT mit dem zu erwartenden Differenzspektrum für das *cis-syn*-Dimer in Abbildung 4.9 B zeigen sich kleine Abweichungen. Vor allem die Absorptionsänderung bei 1480 cm⁻¹ ist geringer als man bei der Bildung des *cis-syn*-Dimer erwarten würde. Eine Erklärung für diesen Unterschied wäre die Bildung eines höheren Anteils an *trans-syn*-Isomeren zwischen den Thymin-Basen in TpT. Tatsächlich wird in [Joh64] ein Verhältnis von etwa 5:1 für die Bildung der beiden Isomere in TpT angegeben.

Der Vergleich der Differenzspektren mit den Dimer-Modell-Molekülen zeigt, dass bei der UV-Belichtung von (dT)₁₈ im Wesentlichen nur der *cis-syn*-Dimer erzeugt wird. Entsprechend sollte sich das hier bestimmte Differenzspektrum mit der für Dimer-Schäden typischen IR-Signatur auch für den Nachweis dieser Schäden in den zeitaufgelösten Messungen eignen.

Absorptionsspektrum von Dimerschäden in (dT)₁₈

In den zeitaufgelösten Messungen soll neben einem Nachweis der Dimer-Bildung auch eine Bestimmung der Quantenausbeuten für CPD-Schäden in (dT)₁₈ erfolgen. Zu diesem Zweck müssen die bei einer bestimmten Strahlendosis auftretenden Absorptionsänderungen mit der Absorption der Thymin-Basen vor der Belichtung und der Absorption eines reinen Thymin Dimer-Spektrums verglichen werden. Dieser Vergleich kann entweder mit dem oben bestimmten IR-Spektrum für das csDMC-Molekül oder direkt mit einem aus den Belichtungsexperimenten an (dT)₁₈ bestimmten Spektrum erfolgen. Für den direkten Vergleich mit den zeitaufgelösten Messungen ist der zweite Ansatz der direkte und deshalb geeignetere Weg.

Aus Belichtungsexperimenten an Thymidin-Dinukleotiden und dem Polymer poly(dT) in wässriger Lösung ist bekannt, dass sich bei hohen Strahlungsdosen ein von der Anregungswellenlänge abhängiges photostationäres Gleichgewicht einstellt. Zum Beispiel ist nach den Angaben in [Dee63] bei einer Anregungswellenlänge von 266 nm zu erwarten, dass etwa 60-70 % der Thymin-Basen an einem Dimerschaden beteiligt sind. Bei weiterer Belichtung können dann auch nicht reversible Folgeprozesse wie die zunehmende Bildung von (6-4)-Schäden von Bedeutung werden. Das für einen Dimer-Schaden in (dT)₁₈ typische IR-Spektrum lässt sich aus den Differenzspektren gewinnen. Dazu wird zum Differenzspektrum nach einer relativ kurzen Belichtungsdauer (60 s) — auf diese Weise lassen sich Effekte durch die Anhäufung von Dimer-Schäden und ein signifikanter Anteil anderer (nicht reversibler) Photoschäden vermeiden — das bei der Belichtung ausgeblichene Grundzustandsspektrum von (dT)₁₈ addiert. In Abbildung 4.10 ist ein auf diese Weise gewonnenes Absorptionsspektrum zusammen mit dem Absorptionsspektrum von (dT)₁₈ gezeigt. Die angegebene Extinktion bezieht sich auf jeweils eine Base im Oligomer bzw. eine Base eines Dimer-Schadens in (dT)₁₈.

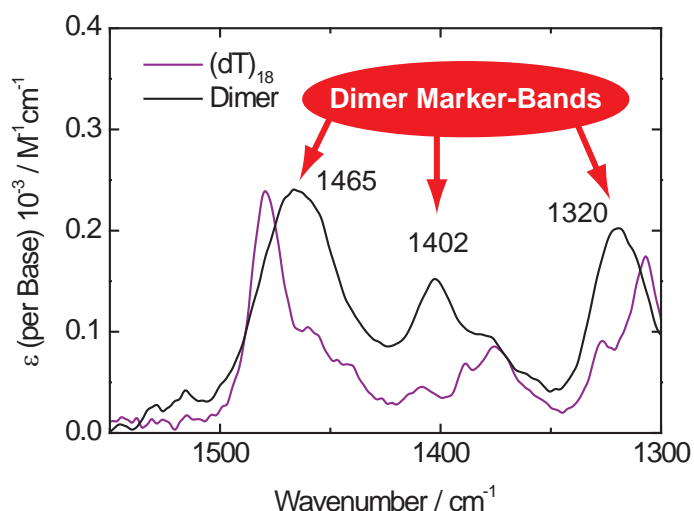


Abb. 4.10: Vergleich des Extinktionskoeffizienten pro Base für $(dT)_{18}$ (rot) und einem aus den Belichtungsexperimenten berechneten Thymin-Dimer (schwarz). Im Fingerprint-Bereich sind drei für das Thymin-Dimer charakteristische Markerbanden zu sehen.

4.4 Zusammenfassung der wichtigsten Absorptionseigenschaften

Die wichtigsten UV-Absorptionseigenschaften der im nächsten Kapitel mit zeitaufgelösten Methoden untersuchten Moleküle sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Die Tabelle enthält

Probe	M_m [g/mol]	λ_{max} [nm]	ϵ_{260} [$M^{-1}cm^{-1}$]	Konz. [mM]	A_{272} [OD]	$A_{photonen}$ [%]
AMP	347	259	15020	6,9	0,47	66
poly(A)	n.d.	257	9800	6,8	0,35	55
TMP	322	267	8560	9	0,7	80
$(dT)_{18}$	5413	265	7800	10	0,67	79

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der wichtigsten spektroskopischen Eigenschaften der untersuchten Proben. Die Extinktionskoeffizienten ϵ der Monomere sind [Cav04] entnommen. Details zu den Extinktionskoeffizient der Polymere finden sich in Anhang D. Die Angaben zur Absorption beziehen sich auf eine Schichtdicke von $\sim 90 \mu m$ und die angegebenen Konzentrationen.

neben den molekülspezifischen Angaben (Molare Masse, Position des Absorptionsmaximums, Extinktionskoeffizient) auch die in den zeitaufgelösten Experimenten verwendeten Konzentrationen und die bei einer Schichtdicke von $90 \mu m$ daraus resultierende Absorption bei der Anregungswellenlänge von 272 nm . Zusätzlich ist der Anteil der absorbierten Photonen in Prozent angegeben. Details zu den angegebenen Extinktionskoeffizienten finden sich in Anhang D.

AMP und poly(A)

Für die beobachtete Absorption im UV-Bereich mit einem Maximum bei etwa 260 nm sind $\pi\pi^*$ -Übergänge der Adenin-Basen verantwortlich. Beim Vergleich der Extinktion pro Base zwischen AMP und poly(A) zeigt sich ein starker Hypochromie-Effekt, der sich durch den hohen Anteil gestapelter Basen (65 %) in der poly(A)-Helix erklären lässt [Dew79].

Im infraroten Spektralbereich liegen zwischen 1750 und 1650 cm^{-1} zwei Absorptionsbanden, die Schwingungsmoden im Bereich der Doppelbindungen der Adenin-Basen zugeordnet werden können. Eine Auswirkung der Basen-Basen-Wechselwirkung auf die Schwingungsmoden ist auch in diesem Spektralbereich zu beobachten. Sie äußert sich in einer Abnahme der Extinktion und einer kleinen spektralen Verschiebung der poly(A)-Banden gegenüber AMP. Der mögliche Einfluss dieser Wechselwirkung auf die Besetzung elektronischer Zustände nach UV-Anregung wird im nächsten Kapitel mit zeitaufgelöster IR-Spektroskopie untersucht.

TMP und (dT)₁₈

Die breite UV-Absorption der Thymin-Derivate mit einem Maximum bei etwa 266 nm wird durch einen $\pi\pi^*$ -Übergang verursacht. Im Gegensatz zu den Adenin-Derivaten zeigt sich zwischen dem Monomer TMP und dem Oligomer (dT)₁₈ dabei jedoch kein großer Hypochromie-Effekt. Dies ist auf die geringen Wechselwirkungen zwischen den Thymin-Basen in (dT)₁₈ zurückzuführen. Da in den zeitaufgelösten Experimenten die Messungen an TMP direkt mit den Messungen an (dT)₁₈ verglichen werden sollen, werden für diese Experimente die Konzentrationen der beiden Probenlösungen so gewählt, dass die Absorption im Bereich der Anregungswellenlänge (272 nm) möglichst gleich groß ist. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass in beiden Proben in etwa der gleiche Anteil an Photonen absorbiert, und damit der etwa gleiche Anteil an Basen angeregt wird. Der Vergleich der Angaben in Tabelle 4.3 zeigt, dass dies für eine Konzentration von etwa 10 mM für (dT)₁₈ und eine Konzentration von etwa 9 mM für TMP in guter Näherung gegeben ist.

Im infraroten Spektralbereich zwischen 1800 und 1500 cm^{-1} liegen intensive Absorptionsbanden, die Schwingungsmoden im Bereich der C=C- und C=O-Doppelbindungen der Basen zugeordnet werden können. Zwischen 1500 und 1300 cm^{-1} zeigen sich schwächere Absorptionsbanden mit Einfachbindungscharakter. Ihre Zuordnung wird dadurch erschwert, dass diese Schwingungsmoden stark delokalisiert sind und Auslenkungen vieler Atome bewirken. Dennoch besitzt dieser Bereich eine hohe Substanz- und Struktur-Spezifität [Gue96]. Während im hochfrequenten Bereich der C=O und C=C Doppelbindungen deutliche Unterschiede zwischen TMP und (dT)₁₈ auftreten, zeigen die Spektren im Fingerprint-Bereich sehr ähnliche Absorptionseigenschaften. Diese Übereinstimmung sollte in den zeitaufgelösten Experimenten einen sehr guten direkten Vergleich zwischen TMP und (dT)₁₈ erlauben.

Mit stationären Belichtungsexperimenten konnte in (dT)₁₈ die Bildung von Thymin-Dimeren nachgewiesen werden. Diese Photoprodukte zeichnen sich durch charakteristische Absorptionsbanden bei 1465, 1402 und 1320 cm^{-1} im Fingerprint-Bereich des IR-Spektrums aus. Durch einen Vergleich mit Dimer-Modell-Molekülen konnte gezeigt werden, dass das Hauptprodukt bei der UV-Belichtung von (dT)₁₈ das *cis-syn*-Dimer zwischen zwei Thymin-Basen ist. Dieser Schaden ist mit dem bei weitem am häufigsten gebildeten Photoschaden in doppelsträngiger DNA [Fri04] identisch. Damit können die bei der Belichtung von (dT)₁₈ erhaltenen Differenzspektren im Folgenden als Referenzspektren für die Bildung von Thymin-Dimeren in den zeitaufgelösten IR-Messungen verwendet werden.

5 Zeitaufgelöste Anreg-Abtast-Experimente

Die stationäre Charakterisierung der DNA- und RNA-Modellsysteme des letzten Kapitels zeigt, dass im infraroten Spektralbereich eine Reihe charakteristischer Schwingungsbanden von Adenin- und Thymin-Derivaten liegen. Dieser Spektralbereich zeichnet sich durch eine hohe Struktursensitivität aus, die zum Beispiel im Fall der Thymin-Derivate den eindeutigen Nachweis von CPD-Schäden erlaubt. In diesem Kapitel stehen nun die nach UV-Anregung auftretenden photophysikalischen und photochemischen Prozesse im Vordergrund, die mit Hilfe der zeitaufgelösten IR-Spektroskopie untersucht werden. Eine detaillierte Beschreibung des Messablaufs und der experimentellen Parameter findet sich in Kapitel 3.

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels werden zunächst am Beispiel des Adenosin-5'-Monophosphats (AMP) die für DNA-Moleküle typischen Signalbeiträge der zeitaufgelösten Anreg-Abtast-Experimente diskutiert. Anschließend werden die Messungen am Monomer AMP mit Messungen am Polymer poly(A) verglichen und die Ergebnisse in Hinblick auf die Auswirkungen der Basen-Basen-Wechselwirkung im Polymer diskutiert. Der dritte Abschnitt zeigt die zeitaufgelösten IR-Messungen am Monomer Thymidin-5'-Monophosphat (TMP) und dem Oligomer (dT)₁₈. Die Messergebnisse an den beiden Thymin-Derivaten werden miteinander verglichen und in Bezug auf die auftretenden elektronischen Zustände und die Bildung von Thymin-Dimeren diskutiert.

5.1 Typische Signalbeiträge

In den zeitaufgelösten IR-Messungen treten einige Signalbeiträge auf, die für Anreg-Abtast-Experimente mit kurzen Lichtimpulsen typisch sind bzw. durch die für DNA-Basen charakteristische schnelle interne Konversion hervorgerufen werden. Diese IR-Signaturen lassen sich am Besten an einem Molekül untersuchen, über dessen photophysikalische Eigenschaften bereits viel bekannt und in dem nicht mit photochemischen Reaktionen zu rechnen ist. Dazu gehört das Molekül AMP.

In Abbildung 5.1 A sind Teile der zeitaufgelösten IR-Messungen an AMP nach UV-Anregung in Abhängigkeit von der Wellenzahl und der Verzögerungszeit dargestellt. Die Konturdarstellung umfasst einen Spektralbereich von 1670 bis 1540 cm⁻¹ und zeigt die Absorptionsänderungen für einen Zeitbereich bis 20 ps nach der Anregung. Zusätzlich sind das Grundzustands-Absorptions-Spektrum und transiente Spektren für verschiedene Verzögerungszeiten angegeben. Negative Absorptionsänderungen (Ausbleich-Signale, blau) werden durch die Entvölkerung des Grundzustands hervorgerufen. Positive Absorptionsänderungen (Induzierte Absorptionen, rot) sind auf die Absorption angeregter Zustände und möglicher Photoprodukte zurückzuführen. Die Zeitverläufe an den gestrichelt markierten Spektralpositionen sind in Abbildung 5.1 B wiedergegeben. Diese Darstellung umfasst Verzögerungszeiten zwischen -2 und +10 ps und zeigt neben den Messdaten von AMP zum Vergleich auch die Daten der bereits in Abschnitt 3.4 diskutierten Messungen am reinen Lösungsmittel.

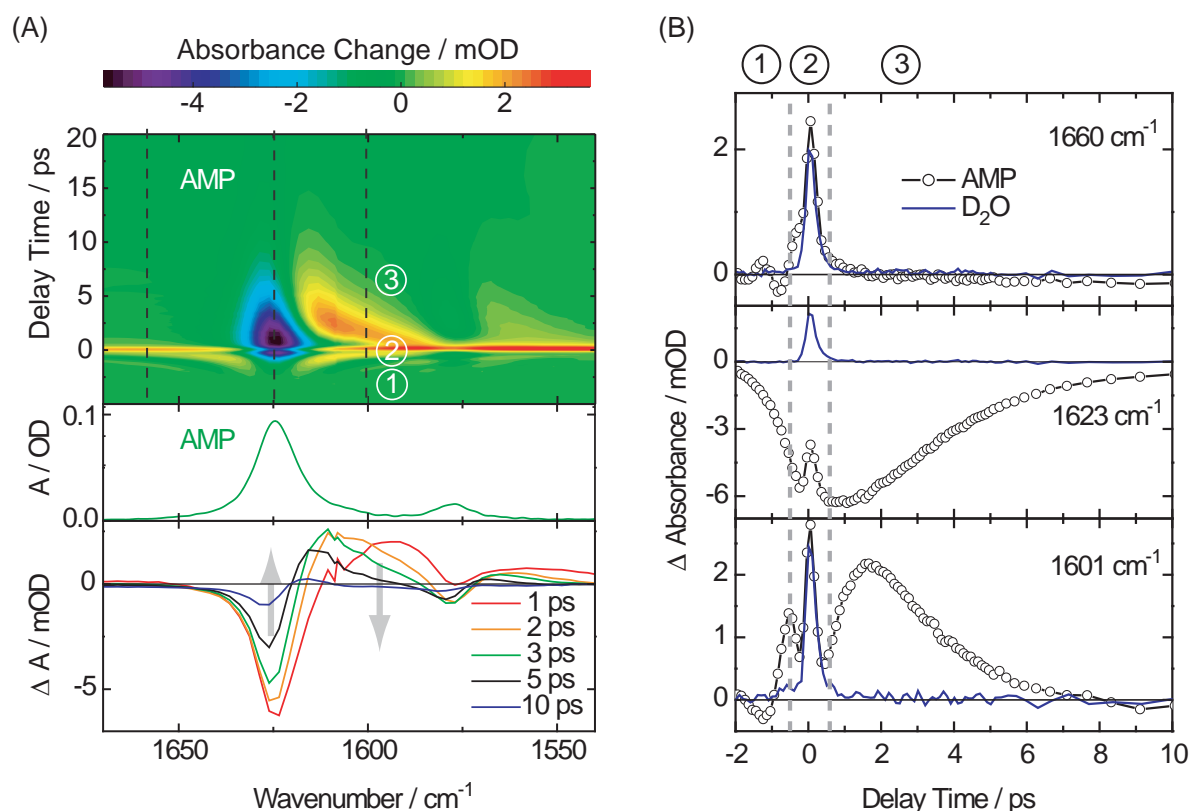


Abb. 5.1: Darstellung der zeitaufgelösten IR-Messergebnisse an Adenosin-5'-Monophosphat (AMP). (A) Konturdarstellung, Grundzustands-Absorptionsspektrum und transiente Spektren. Die in der Konturdarstellung sichtbaren Absorptionsänderungen lassen sich in drei Zeitbereiche unterteilen. (1) $t_D < 0$ ps: Negative Absorptionsänderungen (Ausbleichen) und oszillatorisches Verhalten. (2) $t_D \cong 0$ ps: Spektral breite induzierte Absorption überlagert durch Ausbleich-Signale. (3) $t_D > 0$ ps: Zerfall einer breiten induzierten Absorption ($1615 - 1580 \text{ cm}^{-1}$ und $1565 - 1540 \text{ cm}^{-1}$) und Erholung der Ausbleich-Signale. Das Maximum der induzierten Absorption verschiebt sich dabei deutlich zu größeren Wellenzahlen. (B) Zeitverläufe der Absorptionsänderungen an den in der Konturdarstellung mit gestrichelten Linien markierten Spektralpositionen. Die blaue Linie zeigt die Messergebnisse am Lösungsmittels D_2O .

Die Absorptionsänderungen lassen sich in drei Zeitbereiche einteilen, die in der Abbildung durch die Zahlen 1 bis 3 markiert sind. (1) Bereits vor dem Zeitnullpunkt (negative Verzögerungszeiten) treten negative Absorptionsänderungen an den Positionen der Grundzustandsbanden (1624 und 1577 cm^{-1}) und Oszillationen auf. (2) Am Zeitnullpunkt ist eine starke und spektral breite induzierte Absorption zu sehen, die an den Positionen der Grundzustandsbanden durch negative Beiträge moduliert wird. (3) Für Verzögerungszeiten größer 1 ps wird die Konturdarstellung durch den Zerfall einer spektral breiten induzierten Absorption zwischen 1615 und 1580 cm^{-1} sowie zwischen 1565 und 1540 cm^{-1} dominiert. Diese Beiträge schließen sich zu kleineren Wellenzahlen an die starken Ausbleich-Signale im Bereich der Grundzustandsbanden an und führen zu den in den transienten Spektren auftretenden sigmoidalen Signaturen. Während die Position des maximalen Ausbleich-Signals im Wesentlichen konstant bleibt, verschiebt sich das Maximum der induzierten Absorption zwischen einer und zehn Pikosekunden deutlich ($\sim 30 \text{ cm}^{-1}$) zu größeren Wellenzahlen. Die Reduktion des Aus-

bleichens bei 1623 cm^{-1} und der Zerfall der induzierten Absorption bei 1601 cm^{-1} erfolgen entsprechend den Zeitverläufen in Abbildung 5.1 B mit einer Zeitkonstante von etwa 3 ps. Im Folgenden werden die Ursachen für diese Absorptionsänderungen diskutiert.

5.1.1 Ausbleichen und Oszillationen vor dem Zeitnullpunkt

Das Ausbleichen und die Oszillationen vor dem Zeitnullpunkt lassen sich durch den gestörten freien Induktionszerfall („perturbed free induction decay“, PFID) erklären. Dieser Effekt tritt in spektral- und zeitaufgelösten Anreg-Abtast-Experimenten auf, in denen die Zeitauflösung und damit die Impulsdauer der infraroten Abtast-Impulse unterhalb der Phasenrelaxationszeit (T_2) der betrachteten Schwingungsmoden liegt. Detaillierte Ausführungen und eine mathematische Beschreibung zu diesem Effekt finden sich zum Beispiel in [Wyn95, Ham95]. An dieser Stelle soll nur das zugrunde liegende Prinzip kurz dargelegt werden.

Die Bandbreite der betrachteten Schwingungsübergänge liegt typischerweise in einem Bereich von etwa 20 cm^{-1} (FWHM). Entsprechend beträgt die Phasenrelaxationszeit¹ etwa 0,5 ps. Diese Zeit ist deutlich länger als die Impulsdauer ($\tau_{\text{MIR}} < 150\text{ fs}$) der bei der Messung beteiligten IR-Lichtimpulse. Für negative Verzögerungszeiten erreicht der infrarote Abtast-Impuls die Probe vor dem Anregungs-Impuls und erzeugt dort eine kohärent schwingende Polarisation. Die Felder des Abtast-Lichts und der Polarisation, die ebenfalls in Richtung des Abtast-Impulses abgestrahlt werden, interferieren und werden im Experiment spektral aufgelöst detektiert. Erreicht der Anregungs-Impuls die Probe erst nach Abklingen der kohärenten Polarisation, kann dieser den Zerfall der Polarisation nicht beeinflussen und man erwartet kein Differenzsignal. Ist jedoch die kohärente Polarisation beim Eintreffen des Anreg-Impulses noch nicht abgeklungen, kann dieser das zeitliche und spektrale Abstrahlungsverhalten der Probe verändern und beeinflusst damit die am Detektor auftreffenden elektromagnetischen Felder und gemessenen Intensitäten. Dieser Fall zeigt sich am Maximum der Grundzustandsbande ($\tilde{\nu}_0$) in Abbildung 5.1 durch eine negative Absorptionsänderung, die mit der Dephasierungszeit T_2 der Schwingungsmode abklingt. Für Wellenzahlen mit $\tilde{\nu} \neq \tilde{\nu}_0$ äußert sich der PFID dagegen durch ein oszillatorisches Verhalten.

Durch den PFID wird die maximal mögliche Zeitauflösung für die Beobachtung von Banden limitiert, die nach der Anregung ausbleichen. Bei neu entstehenden Absorptionsbanden tritt dieser Effekt dagegen nicht auf und sie können mit der maximalen Zeitauflösung des Spektrometers beobachtet werden.

5.1.2 Signale am Zeitnullpunkt

Am Zeitnullpunkt ist in Abbildung 5.1 eine starke und spektral breite Absorptionänderung zu sehen, deren Amplitude auf einer Zeitskala von wenigen hundert Femtosekunden zerfällt. Zu diesem Signal können sowohl die Absorptionsänderung der Probe als auch die für Anreg-Abtast-Experimente typischen nichtlinearen Effekte (siehe Abschnitt 3.4) beitragen. Im Folgenden werden die für die Studien an Nukleinsäuren in wässriger Lösung wesentlichen Prozesse diskutiert.

¹ $T_2 = \frac{1}{(100 \cdot \pi \cdot c \cdot \Delta\tilde{\nu})}$ mit $\Delta\tilde{\nu}$ in cm^{-1} .

Lösungsmittelbeitrag

Ein Beitrag zur Absorptionsänderung am Zeitnullpunkt ist, wie in Abschnitt 3.4.1 ausführlich diskutiert, durch das Lösungsmittel D_2O zu erwarten. Es zeigt unter den gewählten Anregungsbedingungen ebenfalls eine breite induzierte Absorption am Zeitnullpunkt, die auf die Erzeugung eines Vorläufers des solvatisierten Elektrons ($OD:e^-$) zurückgeführt werden kann [Reu96, Lae00, Tha04]. Diese Spezies bildet ein Intermediat (Zerfallszeit 100 - 200 fs) bei der Zwei-Photonen-Ionisation („Two Photon Absorption“, TPA) der Lösungsmittel-Moleküle und besitzt einen sehr hohen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon \sim 50000 - 100000 M^{-1}cm^{-1}$) im MIR-Bereich. Die Zeitverläufe der Absorptionsänderung für AMP und das reine Lösungsmittel sind in Abbildung 5.1 B für drei Spektralpositionen gezeigt. Tatsächlich ist am Zeitnullpunkt in AMP ein Signalbeitrag zu sehen, der im Rahmen der Zeitauflösung sehr ähnlich zu der Signatur im Lösungsmittel ist. Die in AMP auftretende Amplitude kann jedoch nicht alleine durch einen Beitrag des Lösungsmittels erklärt werden. Die Bildung der solvatisierten Elektronen ist ein Zwei-Photonen-Prozess und hängt damit quadratisch von der Anregungs-Intensität ab. In der AMP-Probe wird jedoch ein Großteil der Anregungs-Photonen durch die Adenin-Basen absorbiert und damit die Intensität der Anregung mit der Schicht-Tiefe deutlich verringert. Bei der verwendeten Konzentration und Schichtdicke sollte der Beitrag des Lösungsmittels um etwa einen Faktor drei geringer sein als im reinen Lösungsmittel. Da die beobachteten Absorptionsänderungen in AMP und D_2O jedoch etwa gleich groß sind, müssen weitere Prozesse bei der Interpretation berücksichtigt werden.

Photo-Ionisation von DNA-Basen

Eine Möglichkeit wäre die Photoionisation der Adenin-Basen. Auch bei diesem Prozess ist als Vorstufe zum solvatisierten Elektron ein wie in [And00] und [Lae00] beschriebener ($OD:e^-$)-Komplex zu erwarten, der wie im reinen Lösungsmittel zur Absorptionsänderung im MIR beiträgt. Da die Ionisierungsenergien für DNA-Nukleotide in einem Bereich zwischen 4,5 und 5,5 eV liegen [Fer98], können in Experimenten mit Photonen-Energien von etwa 4,7 eV (266 nm \approx 4,65 eV) sowohl Ein- als auch Zwei-Photonen-Prozesse zur Ionisation von DNA-Basen führen [CHn02, Mar06, Reu00]. Während die Ausbeute für die Ein-Photonen-Ionisation von dAMP sehr klein ist ($< 10^{-4}$) [Mar06], kann bei der Verwendung sehr hoher Anregungs-Intensitäten (20 - 200 GW/cm²) jedoch die Ionisierung der Basen über eine Zwei-Photonen-Absorption (2 x 266 nm \approx 9,3 eV) von Bedeutung werden [Reu00]. In diesem Fall wird für die Ionisation ein Zwei-Stufen-Prozess vorgeschlagen, wie er schematisch in Abbildung 5.2 dargestellt ist. Dieses Reaktionsschema orientiert sich an den Ausführungen in [Reu96, Lae00] und stellt ein einfaches Modell zur Visualisierung der Prozesse dar, das keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt. Bei der Zwei-Stufen-Absorption wird durch die Absorption des ersten UV-Photons zunächst der S_1 -Zustand der Base bevölkert. Anschließend kann ein weiteres UV-Photon absorbiert und ein hochliegender S_N -Zustand besetzt werden. Aus dem S_N -Zustand kann ein Teil entweder durch interne Konversion (IC) in den Grundzustand relaxieren (η) oder ein Elektron-Kation-Paar ($Base^+, e^-$) bilden ($\eta - 1$). Das Elektron-Kation-Paar kann anschließend entweder rekombinieren (in der Darstellung aus Übersichtgründen nicht berücksichtigt) oder in ein Elektron und das Basen-Kation dissoziieren. Für Details zu den komplexen Prozesse, die bei der Solvatisierung von Elektronen auftreten wird auf die Literatur zu diesem eigenständigen

Forschungsbereich verwiesen [Nik83, Reu96, Lae00, Bar00, Lae01, Tha04].

Für alle vier verschiedenen DNA-Basen konnte eine Zwei-Photo-Ionisation nachgewiesen werden, die quadratisch mit der Anregungsintensität skaliert. Dabei besitzt die Purin-Base Adenin von allen DNA-Basen die höchste Ionisations-Wahrscheinlichkeit [Reu00]. In Anbetracht dieser Ergebnisse kann eine Photoionisation von AMP-Molekülen auch bei den hier verwendeten UV-Intensitäten von etwa 15 GW/cm^2 nicht ausgeschlossen werden. Da jedoch das solvatisierte Elektron nicht im betrachteten IR-Bereich absorbiert und für das bei der Ionisation gebildete Adenin-Kation kein IR-Spektrum vorliegt, ist eine direkte Bestimmung der Ausbeute für diesen Prozess schwierig. Eine quantitative Analyse würde an dieser Stelle eine direkte Bestimmung der gebildeten solvatisierten Elektronen im sichtbaren und nahinfraroten Spektralbereich [Mar06] erfordern. Eine einfache Abschätzung zur Größenordnung erlaubt jedoch bereits ein Vergleich der Amplitude des Nullpunkt-Signals in AMP bei 1660 cm^{-1} mit dem Signal im reinen Lösungsmittel (siehe Abbildung 5.1 B). An dieser Stelle sind die Beiträge am Zeitnullpunkt etwa gleich groß. Eine Abschätzung zur Konzentration der im Lösungsmittel gebildeten solvatisierten Elektronen in Abschnitt 3.4.1 ergab eine Konzentration von etwa $20 \mu\text{M}$. Dieser Wert entspricht bei der vorliegenden AMP-Konzentration und Anregungsenergie etwa vier Prozent der angeregten AMP-Moleküle. Allerdings ist dies nur eine obere Grenze, da in dieser Abschätzung weder der Anteil des Lösungsmittels (etwa $1/3$ der Signalhöhe) noch die im nächsten Abschnitt diskutierten Beiträge zur Absorptionsänderung am Zeitnullpunkt berücksichtigt wurden.

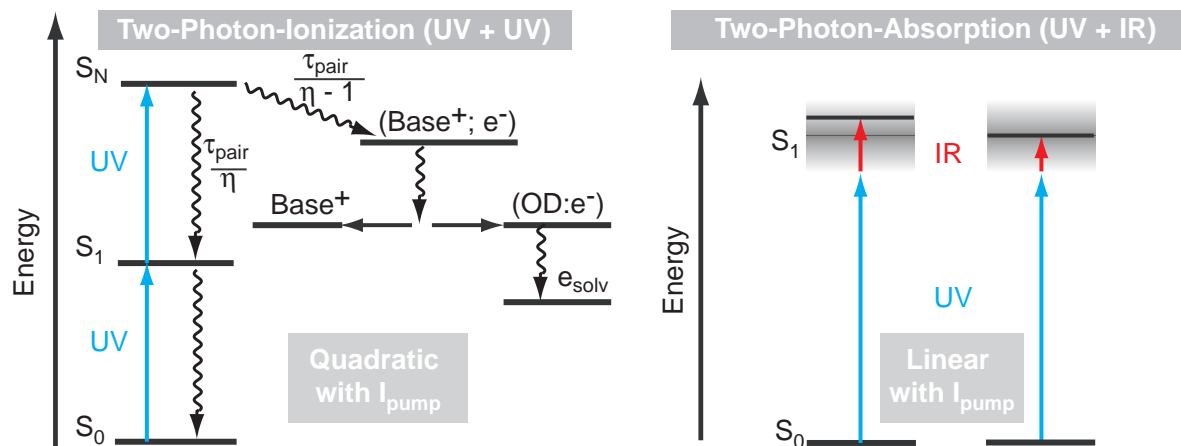


Abb. 5.2: Links: Modell zur Beschreibung der Zwei-Photonen-Ionisation von DNA-Basen. Bei der Absorption von zwei UV-Photonen wird ein energetisch hochliegender S_N -Zustand besetzt, aus dem es entweder zu einer internen Konversion oder zur Bildung eines Elektron-Kation-Paars kommen kann. Das Elektron-Kation-Paar kann anschließend entweder rekombinieren (nicht explizit eingezeichnet) oder in ein Elektron und das Basen-Kation dissoziieren. In Folge können weitere Intermediate auf dem Weg zur Bildung des solvatisierten Elektrons auftreten. Die schematische Darstellung orientiert sich an den Ausführungen in [Reu96, Lae00] und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Rechts: Schematische Darstellung einer Zwei-Photonen-Absorption, bei der es zu der gleichzeitigen Absorption eines Abtast-Photons (IR) und eines Anregungs-Photons (UV) kommt. Dieser Prozess skaliert in erster Näherung linear mit der Anregungsintensität.

Elektronische Übergänge und Zwei-Photonen-Absorption

Bei der Absorption von UV-Photonen durch die AMP-Moleküle kommt es zur Besetzung elektronisch angeregter Zustände. Besitzen diese ein anderes IR-Absorptionspektrum als der Grundzustand, so beobachtet man in den Messungen ein Ausbleichen im Bereich der Grundzustands-Absorption und eine induzierte Absorption durch die angeregten Zustände. Diese kann dem Ausbleich-Signal überlagert oder deutlich als separate induzierte Absorption sichtbar sein. Über die IR-Absorption der angeregten Zustände von Nukleinsäuren ist bisher leider relativ wenig bekannt. In der Regel ist bei der Besetzung eines antibindenden Molekülorbitals mit einer Verringerung der Kraftkonstante und damit einer Erniedrigung der Schwingungsfrequenz (Rotverschiebung) zu rechnen. Zudem kann die induzierte Absorption bei der Besetzung schwingungsangeregter Zustände sehr breit sein. Auf die IR-Absorption schwingungsangeregter Zustände wird im nächsten Abschnitt im Detail eingegangen.

Neben der Absorption eines UV-Photons ist auch eine Zwei-Photonen-Absorption denkbar, bei der es zu der gleichzeitigen Absorption eines Abtast-Photons (IR) und eines Anregungs-Photons (UV) kommt. Eine entsprechende schematische Darstellung ist in Abbildung 5.2 (rechts) gezeigt. Dieser Prozess ist bei hohen Anregungs-Intensitäten möglich, wenn die Gesamtenergie der Anreg- und Abtast-Photonen im Bereich eines elektronischen Übergangs des Moleküls (S_1) liegt [Lia94, Lor02]. Für DNA-Basen mit ihrer breiten Absorptionsbande um 260 nm (4,4 - 5,2 eV) ist dies bei einer Anregungsenergie von 4,7 eV (~ 270 nm) und einer Energie der Abtast-Impulse im Bereich zwischen 0,12 und 0,24 eV ($1000 - 2000 \text{ cm}^{-1}$) praktisch immer gegeben. Die Intensität des Abtast-Lichts ΔI_{probe} ändert sich dabei in einer Schicht der Dicke d und des Absorptionskoeffizienten γ mit der Intensität des eingestrahnten Anregungs-Lichts I_{pump} in erster Näherung gemäß [Lor02]:

$$\Delta I_{\text{probe}} = \gamma \cdot I_{\text{pump}} \cdot I_{\text{probe}} \cdot d. \quad (5.1)$$

In den transienten Messungen führt dieser Prozess zu einer positiven Absorptionsänderung über den gesamten betrachteten Spektralbereich, die linear mit der Anregungsintensität skaliert. Zeitlich ist dieses Signal auf den Überlapp zwischen Anreg- und Abtast-Impuls beschränkt und spiegelt die Apparate-Funktion des Anreg-Abtast-Spektrometers wieder.

Resümee

Eine Unterscheidung zwischen den oben genannten Beiträgen ist nicht ohne weiteres möglich, da sowohl der Zerfall der Vorstufe des solvatisierten Elektrons (siehe letzten Abschnitt) als auch die Zeitdauer der internen Konversion von angeregten AMP-Molekülen (~ 300 fs) innerhalb der Zeitauflösung der Mess-Apparatur von etwa 300 - 400 fs liegen. Im Folgenden wird deshalb auf eine weitere Analyse dieser Beiträge verzichtet und eine Analyse der Daten nur für den Zeitbereich größer 1 ps vorgenommen, in dem die oben diskutierten Nullpunkts-Effekte keine Rolle mehr spielen.

5.1.3 IR-Absorption angeregter Schwingungszustände

Für Verzögerungszeiten größer 1 ps werden die Absorptionsänderungen in Abbildung 5.1 durch Ausbleich-Signale an den Positionen der Grundzustands-Absorptionsbanden und einer induzierten Absorption geprägt, die sich zu kleineren Wellenzahlen an die Ausbleich-Signale

anschließt. Diese sigmoidalen Signaturen sind typisch für schwingungsangeregte („heiße“) Moleküle im Grundzustand und stimmen sehr gut mit den Ergebnissen in [Kui05] überein. Wie diese heißen Moleküle entstehen und wie sich die damit verbundenen Absorptionsänderungen erklären lassen, wird im Folgenden kurz erläutert [CH04a, Kui05].

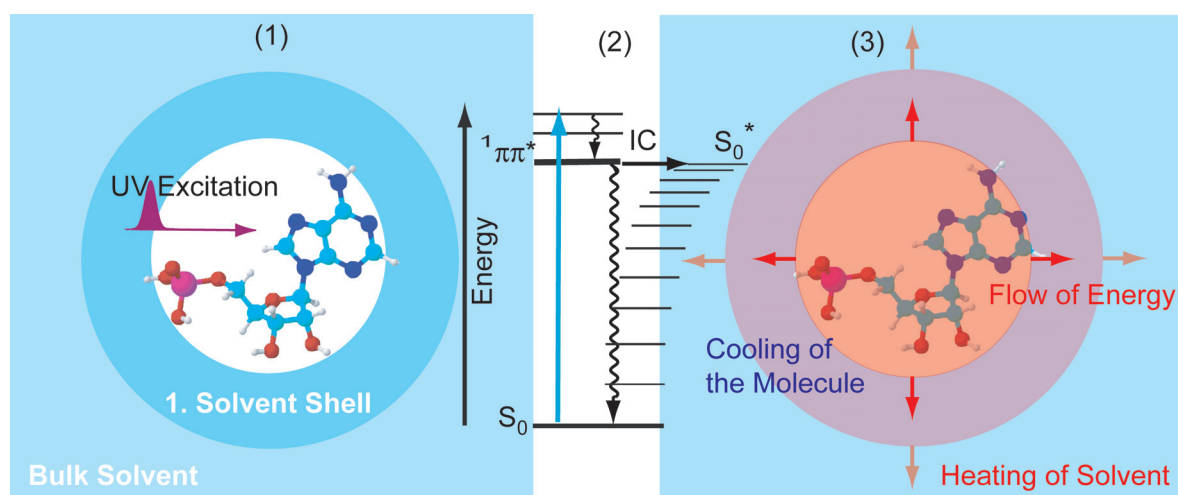


Abb. 5.3: Modellvorstellung zum Transfer von Schwingungsenergie eines heißen AMP-Moleküls an die Lösungsumgebung. Nach der Absorption eines UV-Photons (1) erfolgt eine schnelle interne Konversion (IC) und eine intramolekulare Energieumverteilung auf die Schwingungsmoden des Moleküls (2). Durch Kopplung und Wechselwirkung mit den Lösungsmittelmolekülen kommt es zur Abgabe von Schwingungsenergie („Cooling“) und einem makroskopischen Wärmetransport im Lösungsmittel.

Abbildung 5.3 zeigt eine qualitative Darstellung der ablaufenden Prozesse. (1) Bei der Anregung absorbiert ein AMP-Moleküle ein UV-Photon und geht in einen angeregten elektronischen Zustand über ($\pi\pi^*$ -Zustand). (2) Aus dem angeregten Zustand kann das Molekül über eine schnelle interne Konversion ($\tau_{IC} \sim 300$ fs) auf die Potential-Fläche des Grundzustand wechseln [CH05]. Bei diesem Prozess bleibt die im elektronisch angeregten Zustand vorhandene Energie von etwa 34000 cm^{-1} zunächst im Wesentlichen im Molekül. Sie wird in Schwingungsenergie umgewandelt und intramolekular auf die Schwingungsmoden des Moleküls umverteilt („internal vibrational relaxation“, IVR). (3) Wechselwirkungen mit den Lösungsmittel-Molekülen führen anschließend zu einer Übertragung von Schwingungsenergie an die Umgebung [Els91]. Während das AMP-Molekül abkühlt, kommt es im Gegenzug zu einer Erwärmung der Lösungsumgebung. Mit diesem qualitativen Bild lassen sich die beobachteten IR-Signale erklären.

Molekül-Temperatur und IR-Absorption

Ist der Prozess der Energieumverteilung im Molekül schneller als die Energieabgabe an das Lösungsmittel, kann eine Besetzung der Schwingungsmoden gemäß einer Boltzmannverteilung erreicht werden, bevor es zu einem signifikanten Energietransfer an das umgebende Lösungsmittel kommt [Els91, Owr94]. In diesem Fall lassen sich Werte für die zu erwartenden initialen Temperaturen der Moleküle angeben, die für DNA-Nukleoside bei etwa 1200 K liegen [Pec01].

Die bei diesen hohen Temperaturen auftretende Besetzung höherer Schwingungsniveaus (n_i) wirkt sich auf die Infrarot-Absorption der Moleküle aus. Entsprechend den Ausführungen in [Ham97b, Sch04] lässt sich die Position der Resonanzfrequenz der Schwingungsmode (ν_i) beschreiben durch:

$$\tilde{\nu}_i = \tilde{\nu}_{i,0} + n_i x_i + \sum_j x_{ij} n_j. \quad (5.2)$$

Die Resonanzfrequenz der Schwingungsbande ν_i wird durch die Schwingungsmode im vibronischen Grundzustand $\tilde{\nu}_{i,0}$, die diagonale Anharmonizität x_i bei der Besetzungszahl n_i und die Ausserdiagonal-Elemente x_{ij} bestimmt. Da sowohl die Diagonal-Elemente als auch die Ausserdiagonal-Elemente in der Regel negativ sind, führt eine Besetzung höherer Schwingungsniveaus zu einer Rotverschiebung der Absorptionsbande [Her90]. Die Auswirkung der Anharmonizitäten auf die beobachtete Absorptionsänderung im IR-Bereich ist in Abbildung 5.4 schematisch dargestellt. Während die Anharmonizität des Potentials eine Reduzierung der Energieabstände zwischen Schwingungsniveaus bewirkt, führt die anharmonische Kopplung an eine zweite Mode (q_i) bei einer Veränderung der Besetzung dieser Mode zu einer Verformung des Potentials. Da die Verformung ebenfalls zu einer Veränderung der Schwingungsenergieniveaus führt ist deshalb durch die Ausserdiagonal-Elemente auch im Schwingungsgrundzustand der betrachteten Mode ein Differenzsignal in den IR-Messungen zu erwarten. Eine Abschät-

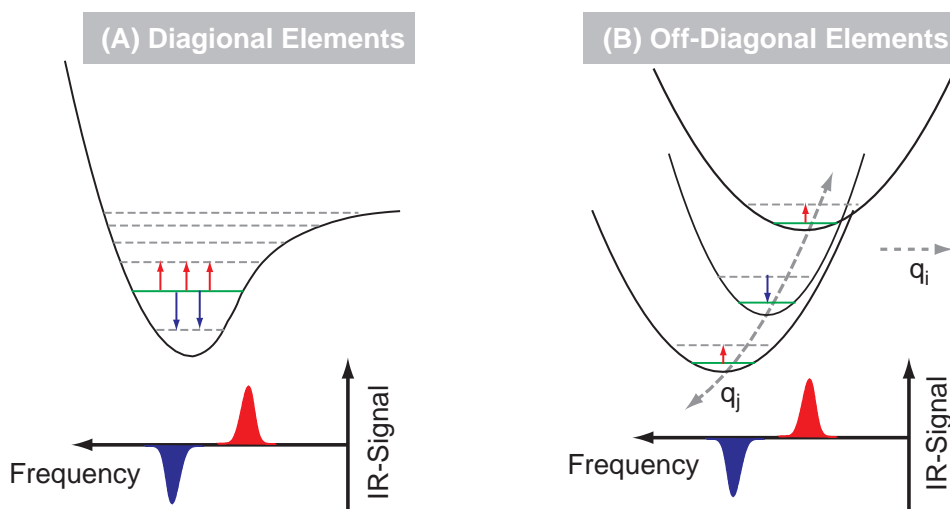


Abb. 5.4: Schematische Darstellung zur Auswirkung der Diagonal- und Ausserdiagonal-Elemente auf die gemessenen IR-Differenzsignale. Links: In einem anharmonischen Potential führt der unterschiedliche Abstand der Schwingungs-Energieniveaus zu einem Differenzsignal. Rechts: Die anharmonische Kopplung einer Mode (q_i) an eine zweite besetzte Mode (q_j) kann zu einer Veränderung des Potentials und einem Differenzsignal führen. Abbildung nach [Sie05].

zung der Besetzungszahlen für die verschiedenen Schwingungsenergieniveaus zeigt, dass für die betrachteten Moleküle selbst bei Temperaturen im Bereich von 1000 K im Wesentlichen niederfrequente Moden mit Wellenzahlen kleiner 1000 besetzt sind [Sie05]. Deshalb sind für Verschiebungen im Bereich um 1600 cm^{-1} vor allem Ausserdiagonal-Elemente, die eine anharmonische Kopplung der hochfrequenten Schwingungsmoden an niederfrequente Moden bewirken, bei der Berechnung von Schwingungsfrequenz und Bandenform von Bedeutung [Sch04].

Leider sind die entsprechenden Anharmonizitäten bisher nur für sehr wenige Moleküle bekannt. Eines dieser Moleküle ist Benzol [Mas92]. Die für dieses Molekül berechneten Absorptions-Spektren für eine Schwingungs-Bande (ν_{19}) sind in Abbildung 5.5 in Abhängigkeit von der Temperatur gezeigt. Diese Abbildung ist [Ham97b] entnommen und wurde an die Darstellung in dieser Arbeit angepasst. Sie gibt einen qualitativen Eindruck für die zu erwartenden Absorptionsänderungen bei einer Temperaturerhöhung bis 1150 K. Oben sind die temperaturabhängigen Absorptionsspektren, unten die daraus erhaltenen Differenzspektren gegenüber dem Spektrum bei Raumtemperatur zu sehen. Die Temperaturerhöhung führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu kleineren Wellenzahlen und einer deutlichen Zunahme der spektralen Breite. In den Differenzspektren zeigen sich diese Änderungen als sigmoidale Signaturen. Diese sind charakteristisch für „heiße“ Moleküle im elektronischen Grundzustand und dominieren die Absorptionsänderungen in den zeitaufgelösten Messungen an AMP zwischen 1 und 10 ps. Damit sind die transienten Spektren in Abbildung 5.1 ein Maß für die „Temperatur“ der Moleküle.

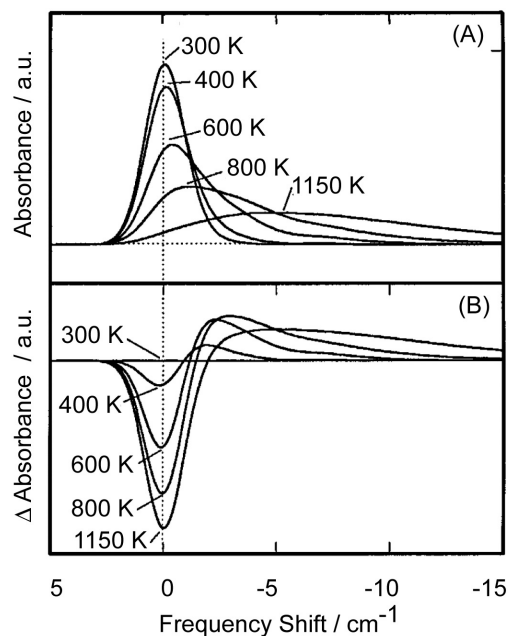


Abb. 5.5: Simulierte Bandenform der ν_{19} -Schwingungsmode des Benzols in Abhängigkeit von der Temperatur gemäß den Anharmonizitäten in [Mas92]. Die Abbildung zeigt die Verschiebung der Resonanzfrequenz relativ zum kalten Molekül (0 K). (A) Infrarot-Absorption $A(T)$ in Abhängigkeit von der Temperatur. (B) Differenz-Spektren gegenüber Raumtemperatur $\Delta A(T) = A(T) - A(300)$. Abbildung nach [Ham97b].

Die Abnahme der Molekül-Temperatur wird, wie in Abbildung 5.3 schematisch dargestellt, durch einen Energietransfer an das Lösungsmittel verursacht [Els91, Iwa97]. Dabei ist zu erwarten, dass es durch die Kopplung der Schwingungsmoden zunächst zu einem schnellen Energietransfer an die direkt benachbarten Lösungsmittel-Moleküle („first solvent shell“) kommt, und der weitere Energieübertrag durch die Wärmeleitfähigkeit des Lösungsmittels bestimmt wird [Iwa97]. Quantitative Angaben für den Zeitverlauf und die Kühlrate sind jedoch

schwierig. Das Wechselspiel zwischen der temperaturabhängigen Banden-Verbreiterung und -Verschiebung führt, selbst wenn für den eigentlichen Abkühlvorgang eine exponentielle Änderung der Temperatur angenommen wird, nicht zu einem exponentiellen Zeitverlauf der beobachteten Absorptionsänderung [Ham97b]. Zum Beispiel ist im Bereich der induzierten Absorption bei 1600 cm^{-1} in Abbildung 5.1 ein ausgeprägtes biphasisches Verhalten sichtbar und eine Anpassung über eine Summe von Exponentialfunktionen nur unter Verwendung von mindestens zwei Zeitkonstanten möglich. Eine bessere Wiedergabe der Kühlkinetik könnte das Verfolgen der Peak-Position mit der Verzögerungszeit liefern [Iwa97]. Für das weitere Verständnis der Arbeit ist diese Information jedoch nicht notwendig und wird an dieser Stelle deshalb nicht weiter ausgeführt. Aus den Zeitverläufen bei 1623 und 1601 cm^{-1} in Abbildung 5.1 B soll nur eine erste Abschätzung für die Kühlrate erfolgen. Sowohl die Wiederbesetzung des Grundzustands als auch der Zerfall der induzierten Absorption lassen sich für Verzögerungszeiten größer $1,5\text{ ps}$ gut mit einer Zeitkonstante von etwa 3 ps wiedergeben.

Dieser Wert ist in sehr guter Übereinstimmung mit den Angaben zum Abkühlverhalten von AMP im Lösungsmittel D_2O [Kui05]. Damit erfolgt das Abkühlen der Moleküle wesentlich schneller als für viele andere organische Lösungsmittel [CH04a]. Zum Beispiel werden für Azulen² in organischen Lösungsmitteln Kühlraten im Bereich von $10 - 40\text{ ps}$ angegeben [Els91, Owr94, Sch96]. Dabei wird als mögliche Erklärung für den sehr effizienten Energietransfer zwischen heißen Proben-Molekülen und dem Lösungsmittel Wasser die Kopplung über Wasserstoffbrücken diskutiert [Ter99, Pec01].

IR-Signatur der Lösungsmittelerwärmung

Bisher nicht berücksichtigt wurden die Absorptionsänderungen, die eine Erwärmung des Lösungsmittels im Anregungsvolumen hervorruft. In Abbildung 5.6 sind die Auswirkungen einer Temperaturerhöhung auf die IR-Absorption des Lösungsmittels D_2O gezeigt. Oben sind die Absorptionsspektren für drei Temperaturen (295 , 302 und 308 K), unten die resultierenden Differenzspektren gegenüber 295 K dargestellt. Die Angaben beziehen sich auf eine Schichtdicke von etwa $90\text{ }\mu\text{m}$. Das Lösungsmittel D_2O besitzt eine breite IR-Absorption-Bande um 1560 cm^{-1} (Kombination aus Biege- und Librations-Schwingung) dessen Maximum bei Temperaturerhöhung etwas abnimmt und sich zu kleineren Wellenzahlen verschiebt [Mar91]. Dies führt in den Differenzspektren zu einer sigmoidalen Absorptionsänderung. Die durch DNA-Moleküle und der beim Auflösen entstehenden HDO-Moleküle hervorgerufenen Beiträge zur Absorptionsänderung bei Erwärmung sind aufgrund der geringen Konzentrationen im Verhältnis klein und können in erster Näherung vernachlässigt werden (siehe Anhang C.2). Entsprechend kann aus den in Abbildung 5.6 gezeigten IR-Spektren mit Temperaturänderungen im Bereich von 10 K bei bekanntem Temperaturanstieg auch das in den zeitaufgelösten Experimenten zu erwartende Differenzsignal abgeschätzt werden.

Dabei ist wichtig, dass die spektrale Verschiebung und Amplitudenänderung in erster Näherung linear von der Temperatur abhängt (dies wird in Anhang C.2 bestätigt) und damit auch eine zunächst nicht homogene Temperaturverteilung im Beobachtungsfenster zu dem gleichen Differenzsignal wie eine homogene Verteilung mit derselben Wärmeenergie führt [Lia94]. Unter der Annahme, dass die gesamte von den AMP-Molekülen absorbierte Ener-

²Azulen (von span.: azul = blau) oder Cyclopentacyclohepten ist ein aromatischer Kohlenwasserstoff.

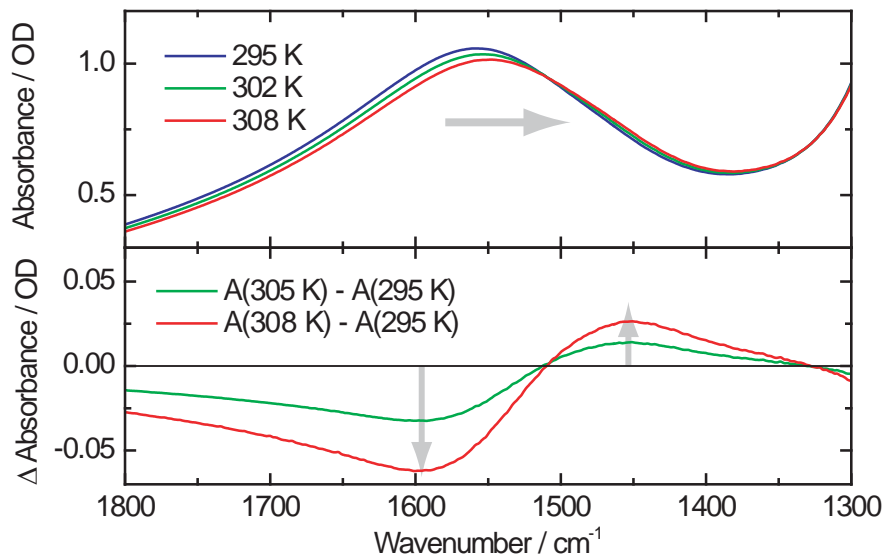


Abb. 5.6: Infrarotspektren des Lösungsmittels D_2O in Abhängigkeit von der Temperatur. Oben: Absorptions-Spektren für die angegebenen Temperaturen. Unten: Differenzspektren gegenüber 295 K. Bei Temperaturerhöhung zeigt sich eine deutliche Verschiebung und Reduktion des Absorptionsmaximums um 1560 cm^{-1} (Biege- und Librations-Schwingung), die in den Differenzspektren zu einer sigmoidalen Absorptionsänderung führt.

gie ($\Delta E_{\text{abs.}}$) an das Lösungsmittel abgegeben wird, sollte sich im Anregungsvolumen eine Temperaturerhöhung gemäß

$$\Delta T = \frac{\Delta E_{\text{abs.}}}{\rho \cdot V \cdot c_{\text{spez.}}} \quad (5.3)$$

ergeben. Mit der spezifischen Wärmekapazität ($c_{\text{spez.}} \sim 4,2\text{ J/gK}$) und Dichte ($\rho \sim 1\text{ g/cm}^3$) des Lösungsmittels ergibt sich im Anregungsvolumen ($V \sim 2 \cdot 10^{-12}\text{ m}^3$) unter den Anregungsbedingungen³ (absorbierte Energie $\Delta E_{\text{abs.}} \sim 0,45\text{ }\mu\text{J}$) eine mittlere Temperaturerhöhung von etwa 50 mK.

Obwohl die aus diesem geringen Temperaturanstieg resultierenden Absorptionsänderungen klein sind, lassen sie sich in den zeitaufgelösten IR-Experimenten nachweisen. Zum Beispiel sind sie für die negativen Signalbeiträge (Offset) nach einer Verzögerungszeit von 10 ps in den Zeitverläufen der Abbildung 5.1 B verantwortlich. Dieser Signalbeitrag entsteht mit dem Abkühlen der AMP-Moleküle und bleibt im Weiteren konstant. Eine Veränderung im Beobachtungsfenster ist erst zu erwarten, wenn die Wärme aus diesem Bereich diffundiert. Dieser Prozess wird durch die Wärmeleitung im Lösungsmittel und zu den Küvettenfenstern bestimmt und kann über die makroskopische Wärmediffusion abgeschätzt werden. Die Abschätzung in Anhang C.2 zeigt, dass damit erst auf der Millisekunden-Zeitskala zu rechnen ist. Im Beobachtungsfenster der zeitaufgelösten Messung (bis 4 ns) bleibt die Wärmemenge im betrachteten Volumen deshalb in sehr guter Näherung konstant. Aus diesem Grund kann bei der Dateninterpretation dieser Beitrag durch Differenzspektren, die auf eine Temperaturerhöhung im Millikelvin-Bereich skaliert wurden, berücksichtigt werden.

³Auf das betrachtete Volumen mit Radius $85\text{ }\mu\text{m}$ (FWHM) entfallen etwa 50 % der Gesamtenergie ($\sim 1,2\text{ }\mu\text{J}$) von der bei einer angenommenen optischen Dichte von 0,7 etwa 80 % absorbiert werden.

5.2 Zeitaufgelöste IR-Spektroskopie an AMP und poly(A)

Nach Erläuterung der in den zeitaufgelösten IR-Messungen auftretenden charakteristischen Signalbeiträgen, werden in diesem Abschnitt die zeitaufgelösten IR-Messungen am Monomer AMP und dem Polymer poly(A) besprochen. Das Augenmerk der Datenanalyse liegt dabei vor allem auf Unterschieden, die durch Wechselwirkungen zwischen den Adenin-Basen im Einzelstrang hervorgerufen werden können. Dazu werden die Messergebnisse für die beiden Adenin-Derivate zunächst einander gegenüber gestellt und anschließend im Detail diskutiert.

5.2.1 AMP und poly(A): Zeitaufgelöste Messdaten

Einen ersten Überblick über die Messdaten erlauben die Konturdarstellungen in Abbildung 5.7. Sie zeigen die zeitaufgelösten Absorptionsänderungen von AMP (links) und poly(A) (rechts) nach UV-Anregung in Abhängigkeit von der Wellenzahl (1670 cm^{-1} - 1540 cm^{-1}) und der Verzögerungszeit (logarithmische Auftragung: 1 ps - 3 ns). Zusätzlich sind die Absorptionsspektren der beiden Proben und die transienten Spektren für die angegebenen Verzögerungszeiten zu sehen. In der Konturdarstellung zeigen sich zu Beginn starke Ausbleich-Signale im Bereich der hochfrequenten Grundzustands-Absorptionsbanden (1624 cm^{-1} in AMP bzw. 1628 cm^{-1} in poly(A)). Zu kleineren Wellenzahlen schließt sich eine induzierte Absorption an, die im Bereich der niederfrequenten Absorptionsbande (1577 cm^{-1} in AMP bzw. 1572 cm^{-1} in poly(A)) moduliert ist. Während in AMP das Ausbleich-Signal im Wesentlichen zusammen mit der induzierten Absorption auf einer Zeitskala von etwa 10 ps verschwindet, ist in poly(A) bis in den Nanosekunden-Bereich ein deutliches Ausbleichen sichtbar. Die induzierte Absorption verschwindet dagegen wie in AMP auf einer Zeitskala von 10 ps. Nach dieser ersten Übersicht werden die Unterschiede in den Ausbleich-Signalen und der induzierten Absorption nun anhand der transienten Spektren in Abbildung 5.7 im Detail betrachtet.

Vergleich der transienten Spektren

Während in AMP nach 1 ps eine sehr gute Übereinstimmung zwischen dem Maximum der Ausbleich-Signale um 1624 bzw. 1577 cm^{-1} und der Grundzustandsabsorption besteht, ist das maximale Ausbleich-Signal in poly(A) (1631 cm^{-1}) gegenüber dem Maximum der Grundzustandsbande (1628 cm^{-1}) um etwa 3 cm^{-1} zu größeren Wellenzahlen verschoben. Eine ähnliche Verschiebung des Ausbleich-Signals tritt auch im Bereich der niederfrequenten Absorptionsbande (1572 cm^{-1}) von poly(A) auf. Neben der spektralen Lage zeigt sich in den transienten Spektren auch ein deutlicher Unterschied in den relativen Amplituden der Ausbleich-Signale zur Grundzustandsabsorption. Obwohl die Messungen an beiden Molekülen unter ähnlichen Anregungsbedingungen durchgeführt wurden (siehe experimentelle Parameter in den Abschnitten 3.3 und 4.4) ist nach 1 ps das maximale Ausbleich-Signal im Verhältnis zur Grundzustandsabsorption in poly(A) größer als für AMP. Während in AMP das Ausbleich-Signal zum größten Teil innerhalb der ersten 10 ps verschwindet, ist in poly(A) das Ausbleich-Signal um 1630 cm^{-1} nach 10 ps noch deutlich sichtbar. Einen detaillierten Blick auf die Absorptionsänderungen nach 100 ps und 1 ns erlauben die beiden unteren transienten Spektren, die mit einem Faktor 5

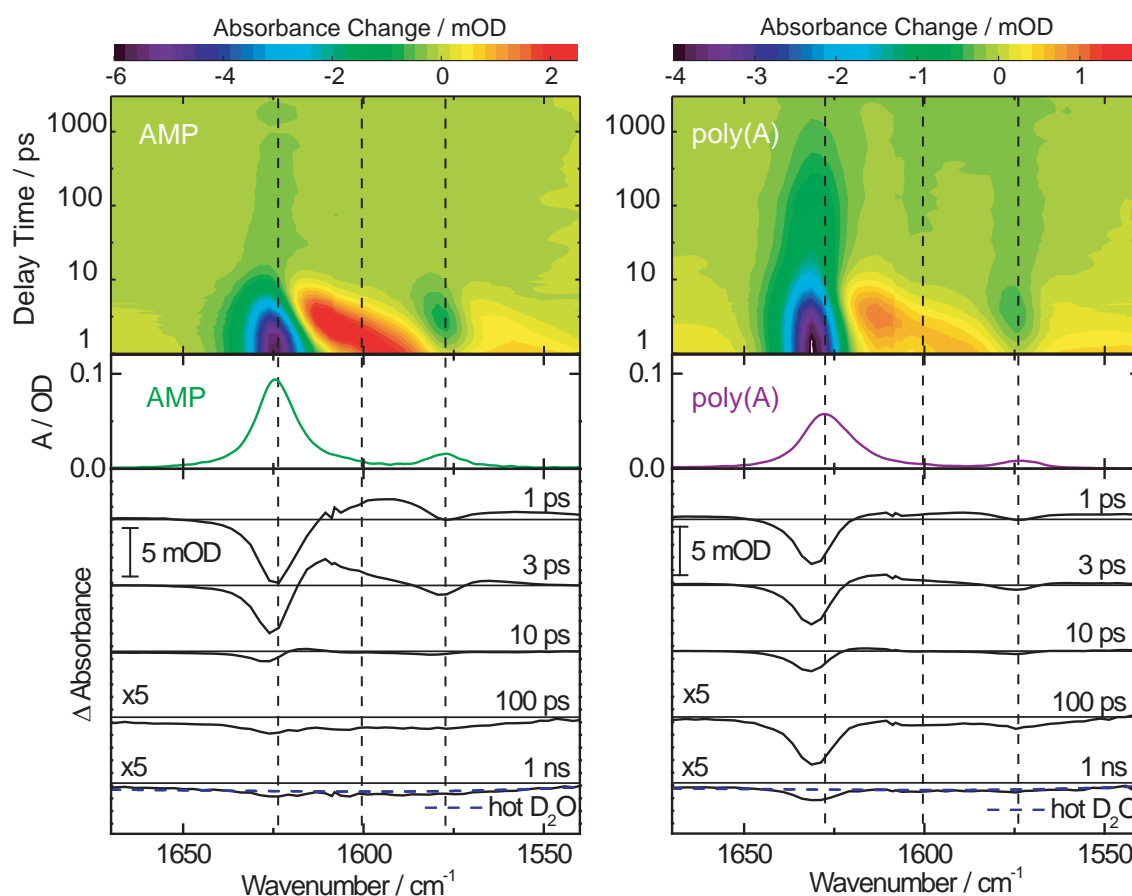


Abb. 5.7: Zeitaufgelöste IR-Messungen an den Adenin-Derivaten im Überblick. Von oben nach unten: (i) Konturdarstellung der zeitaufgelösten Absorptionsänderungen an AMP (links) und poly(A) (rechts). Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Positionen für die in Abbildung 5.8 gezeigten Zeitverläufe. (ii) Absorptionsspektrum von AMP (grün) und poly(A) (rot). (iii) Transiente Spektren für die angegebenen Verzögerungszeiten. Die transienten Spektren nach 100 ps und 1 ns sind mit einem Faktor 5 skaliert. Die blau gestrichelte Linie entspricht der zu erwartenden Absorptionsänderung des Lösungsmittels D_2O bei einer Erwärmung um etwa 35 mK für AMP bzw. 30 mK für poly(A).

gegenüber den anderen transienten Spektren skaliert sind. In AMP ist in beiden transienten Spektren ein spektral breites, bis auf eine kleine Modulation bei 1624 cm^{-1} unstrukturiertes Ausbleichen über den gesamten Spektralbereich zu sehen. Dagegen kommt es in poly(A), wie in der Konturdarstellung deutlich zu sehen, zwischen 100 ps und 1 ns zu einer weiteren Erholung des Ausbleich-Signals um 1630 cm^{-1} . Dieser Absorptionsänderung ist wie in AMP ein unstrukturierter negativer Beitrag überlagert, der sich in beiden Proben sehr gut durch eine Absorptionsänderung aufgrund der Erwärmung des Lösungsmittels D_2O von etwa 30 mK wiedergeben lässt (blau gestrichelte Linie).

Die in der Konturdarstellung der Abbildung 5.7 sichtbare induzierte Absorption zerfällt sowohl in AMP als auch in poly(A) auf einer Zeitskala von 10 ps. In dieser Zeit zeigen die transienten Spektren eine sehr ähnliche Dynamik, bei der sich das Maximum der induzierten Absorption zwischen 1 und 3 ps von Werten kleiner 1600 cm^{-1} nach etwa 1615 cm^{-1} verschiebt. Deutliche Unterschiede zeigen sich jedoch beim Vergleich der Amplitude der induzierten

Absorption im Verhältnis zum Ausbleich-Signal. Dieses Verhältnis ist in AMP wesentlich größer als in poly(A), in dem die induzierte Absorption eine deutlich geringere Amplitude als das Ausbleich-Signal besitzt.

Vergleich der Zeitverläufe

Die Dynamik der spektralen Unterschiede lässt sich durch einen Vergleich der Zeitverläufe erschließen. Abbildung 5.8 zeigt die Zeitverläufe an den in der Konturdarstellung durch gestrichelte Linien markierte Spektralpositionen. Die Zeitverläufe bei 1623 und 1577 cm^{-1} für AMP bzw. 1628 und 1572 cm^{-1} für poly(A) repräsentieren die Erholung der Ausbleich-Signale, während der Zeitverlauf bei 1601 cm^{-1} den Zerfall der induzierten Absorption wiedergibt. Neben den im vorigen Abschnitt diskutierten Signalbeiträgen am Zeitnullpunkt ist in beiden

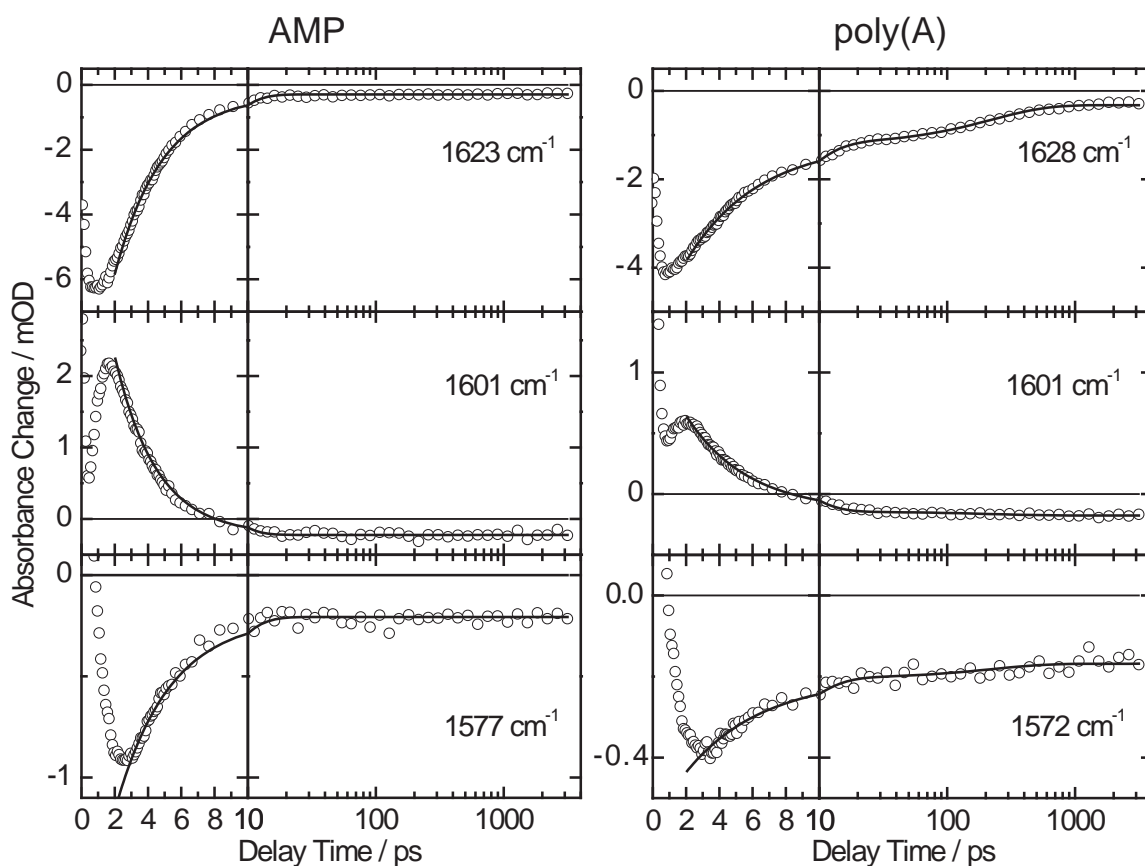


Abb. 5.8: Zeitverläufe für AMP und poly(A) an den angegebenen spektralen Positionen. Die Anpassung der Daten für Verzögerungszeiten größer 2 ps (durchgezogene Linie) erfolgt mit einer Summe von Exponentialfunktionen, die mit der Apparate-Funktion gefaltet wird. In Tabelle 5.1 sind die Fit-Parameter angegeben.

Molekülen nach 1 ps eine starke Absorptionsänderung vorhanden, die innerhalb der ersten 10 ps stark abnimmt. Dabei zeigt die Spiegelsymmetrie der Kurven, dass der Zerfall der induzierten Absorption direkt mit der Erholung der Ausbleich-Signale verknüpft ist. Zu späteren Zeiten (> 10 ps) sind in AMP im Rahmen der Messungenauigkeit keine weiteren signifikanten Ab-

sorptionsänderungen sichtbar. Dagegen zeigen sich in poly(A) weitere Absorptionsänderungen bis in den Nanosekunden-Bereich.

Für einen quantitativen Vergleich der Kinetiken wurden die experimentellen Daten mit einer Summe von Exponentialfunktionen (gefaltet mit der Apparate-Funktion) angepasst (siehe Ausführungen in Abschnitt 3.3.3). Dabei wurde zunächst eine globale Analyse der Daten für Verzögerungszeiten größer 1 ps durchgeführt (siehe Anhang E). Eine gute Repräsentation der experimentellen Daten erfordert für die Anpassung der spektralen Verschiebung der induzierten Absorption (< 10 ps) die Verwendung mehrerer Zeitkonstanten (siehe Diskussion in Abschnitt 5.1.3). Dabei ergibt die Fit-Routine nahe beieinander liegende Zeitkonstanten, deren Amplituden sich zum Teil gegenseitig kompensieren und deren physikalische Bedeutung fraglich ist. Aus diesem Grund wurden die in Abbildung 5.8 gezeigten Zeitverläufe einzeln angepasst. Nur die Zeitkonstanten für Verzögerungszeiten größer 10 ps wurden aus der globalen Analyse übernommen und in der Fitroutine festgehalten. Für das Erfassen der Kinetik im Bereich der ersten 10 ps wurde eine Zeitkonstante frei iteriert. Die Ergebnisse dieser Datenanpassung sind in der Abbildung 5.8 als durchgezogenen Linien und in Tabelle 5.1 als Fit-Parameter wiedergegeben.

Probe	$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	τ_1/ps	τ_2/ps	τ_3/ps	a_1	a_2	a_3
AMP	1623	2,9	∞	-	-11,01	-0,29	-
	1601	2,5	∞	-	5,58	-0,22	-
	1577	3,2	∞	-	-1,8	-0,2	-
poly(A)	1628	4,3	222	∞	-4,22	-0,89	-0,32
	1601	3,7	222	∞	1,3	0,03	-0,18
	1572	4,6	222	∞	-0,36	-0,04	-0,17

Tabelle 5.1: Fit-Parameter (Zeitkonstanten und Amplituden) für die Anpassung der Zeitverläufe in Abbildung 5.8. Die Fit-Funktion entspricht einer Summe von Exponentialfunktionen, die mit der Apparate-Funktion (Gauß-Funktion mit Halbwertsbreite = 350 fs (FWHM)) gefaltet werden. Die grau hinterlegten Zeitkonstanten sind aus einer globalen Datenanalyse entnommen und wurden bei der Anpassung festgehalten. Dabei berücksichtigt die „Unendlich-Zeitkonstante“ den Offset in den Zeitverläufen.

In AMP können die Zeitverläufe für Verzögerungszeiten größer 2 ps an allen drei Positionen gut durch eine mono-exponentielle Funktion mit einer Zeitkonstante von etwa 3 ps und einer konstanten Absorptionsänderung (Offset), die im Fit durch eine „Unendlich-Zeitkonstante“ berücksichtigt wird, angepasst werden. In poly(A) ist dagegen mindestens eine weitere Zeitkonstante nötig. Eine gute Anpassung der Daten ist für poly(A) mit einer Zeitkonstanten von 4 - 5 ps und einer weiteren mit etwa 220 ps möglich. Betrachtet man den Zeitverlauf bei 1628 cm^{-1} in Abbildung 5.8 für Zeiten größer 1 ns, zeigt sich eine weitere Absorptionsänderung, die mit der bi-exponentiellen Datenanpassung nicht erfasst wird. Eine etwas bessere Darstellung ist zum Beispiel mit drei Zeitkonstanten von 4 ps, 140 ps und 600 ps möglich. Allerdings wurde im Hinblick auf die Vergleichbarkeit mit Literaturangaben im nächsten Abschnitt auf diese Erweiterung verzichtet.

5.2.2 AMP und poly(A): Dateninterpretation

Adenin-Derivate gehören zu den am häufigsten untersuchten DNA-Bausteinen, und mittlerweile sind einige photophysikalische Eigenschaften dieser Moleküle bekannt. Für das in dieser Arbeit untersuchte AMP-Molekül konnte zum Beispiel mit zeitaufgelöster UV/Vis-Absorptions-Spektroskopie gezeigt werden, dass die Lebensdauer des angeregten Singulett-Zustands in AMP nur etwa 300 fs beträgt [CH05].

Während in AMP die Desaktivierung praktisch vollständig über diesen ultraschnellen Prozess abläuft, kommt es in poly(A) zur Besetzung langlebiger Zustände. Zum Beispiel zeigen Messungen an Adenin-Homopolymeren (z.B. poly(A) bzw. poly(dA)) Zerfälle angeregter Singulett-Zustände mit Lebensdauern im 100 Pikosekunden- und Nanosekunden-Bereich (1-2 ns) [Ple00, CH04a]. Diese Zustände zeichnen sich durch eine deutlich rotverschobene Fluoreszenz ($\lambda_{max} = 380 - 400$ nm) im Vergleich zur Monomer-Fluoreszenz ($\lambda_{max} = 310$ nm) aus, die erstmals 1966 durch Eisinger und Mitarbeitern in Tieftemperatur-Experimenten bestimmt wurde [Eis66]. Als Ursache wird die Bildung von Excimer-ähnlichen Zuständen zwischen benachbarten Basen [Bal82, Ple00, CH05, Kwo06] angenommen (siehe Ausführungen in Abschnitt 2.3.2). Im Folgenden werden die im letzten Abschnitt beschriebenen IR-Messungen an AMP und poly(A) in Hinblick auf diese Zuordnungen für Verzögerungszeiten größer 1 ps diskutiert.

Interpretation der Messergebnisse für AMP

Die Absorption der ultravioletten Anregungs-Photonen erfolgt, wie in Abschnitt 4.2 diskutiert, im Wesentlichen durch einen von zwei energetisch naheliegenden $^1\pi\pi^*$ -Zuständen. Aus diesem kommt es in Folge zu einer schnellen internen Konversion (IC) in den Grundzustand. Dabei wird in zeitaufgelösten Fluoreszenz-Messungen eine mögliche Beteiligung beider $^1\pi\pi^*$ -Zustände bei der Desaktivierung durch das Auftreten von zwei Zeitkonstanten (130 und 450 fs) diskutiert [Kwo06]. In den Arbeiten von Kohler und Mitarbeitern mit zeitaufgelöster UV/Vis-Spektroskopie wird dagegen für die Desaktivierung nur eine Zeitkonstante (~ 300 fs) für die Desaktivierung angegeben [CH04b]. Als Ursache für diese sehr schnelle Desaktivierung wird eine konische Durchschneidung diskutiert [Kwo06].

Da in den IR-Messungen die initiale Besetzung des $^1\pi\pi^*$ -Zustands und dessen Desaktivierung, wie in Abschnitt 5.1 diskutiert, durch die verschiedenen Signalbeiträge am Zeitnullpunkt überlagert wird, lassen sich an dieser Stelle keine weiteren Aussagen zum Desaktivierungsprozess und der möglicherweise beteiligten Zwischenzustände treffen. Die IR-Messungen zeichnen sich jedoch durch das Auftreten einer charakteristischen IR-Signatur für heiße Grundzustands-Moleküle nach IC aus. Die nach IC der angeregten AMP-Moleküle entstehenden heißen Moleküle besitzen ein zur Grundzustands-Absorption deutlich zu kleineren Wellenzahlen verschobenes und wesentlich breiteres Absorptionsspektrum. Entsprechend ist in den transienten Spektren ein Ausbleichen an den Grundzustandsbanden und eine zu kleineren Wellenzahlen verschobene induzierte Absorption zu sehen. Der Energieübertrag an das Lösungsmittel und das damit verbundene Abkühlen der Moleküle führt zu einem Verschieben der induzierten Absorption und einem Rückgang des Grundzustands-Ausbleichens.

Eine Abschätzung für die Zeitskala, auf der der Energieübertrag an das Lösungsmittel stattfindet, lässt sich aus dem zeitabhängigen Rückgang des Grundzustands-Ausbleichens erhalten.

Der Zeitverlauf bei 1623 cm^{-1} in Abbildung 5.8 ist ein Maß für die Wiederbevölkerung des Schwingungs-Grundzustands und lässt sich sehr gut mit einer mono-exponentiellen Zeitkonstante von 3 ps beschreiben. Nach dem Abklingen dieses Kühlprozesses bleibt das Signal im Rahmen der Messgenauigkeit konstant. Jedoch ist ein Offset gegenüber der Nulllinie zu erkennen. Der dominante Beitrag zu diesem Signal ist in den transienten Spektren in Abbildung 5.8 bei 100 ps und 1 ns als spektral unstrukturiertes Ausbleichen sichtbar. Diese Signatur entsteht innerhalb weniger Pikosekunden und lässt sich sehr gut durch eine Erwärmung des Lösungsmittels D_2O im Anregungsvolumen von etwa 35 mK beschreiben. Eine Temperaturänderung, die gut mit der unter den Messbedingungen zu erwartenden Temperaturerhöhung übereinstimmt. Der Beitrag der gelösten AMP-Moleküle zu diesem Differenz-Signal kann bei der gewählten Konzentration ($\sim 7\text{ mM}$) vernachlässigt werden (siehe Anhang C.2). Aufgrund der langsamen Wärmediffusion im Millisekunden-Bereich, bleibt das Differenzsignal der Temperaturerhöhung im betrachteten Zeitbereich konstant. Mögliche Ursachen für das in der Konturdarstellung und den transienten Spektren von AMP nach 1 ns vorhandene geringe zusätzliche Ausbleichen im Bereich der Grundzustands-Bande bei 1624 cm^{-1} werden im nächsten Abschnitt besprochen.

Modell zur Photophysik in AMP

Die Ergebnisse der zeitaufgelösten IR-Messungen an AMP lassen sich mit dem in Abbildung 5.9 dargestellten Modell interpretieren:

1. Absorption eines UV-Photons erfolgt durch einen $^1\pi\pi^*$ -Übergang.
2. Interne Konversion (IC) aus dem elektronisch angeregten $^1\pi\pi^*$ -Zustand ($\tau_{\text{IC}} < 300\text{ fs}$) in den schwingungs-angeregten elektronischen Grundzustand S_0^* .
3. Energieumverteilung auf die Schwingungs-Moden des Moleküls und Energieabgabe an die Lösungsumgebung. Das Abkühlen erfolgt im Lösungsmittel D_2O auf einer Zeitskala von etwa 3 ps.

Damit decken sich die zeitaufgelösten IR-Messungen mit den aus zeitaufgelöster UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenz-Spektroskopie bekannten Eigenschaften von AMP-Molekülen in wässriger Lösung [CH04b].

AMP-ähnliche Zustände in poly(A)

Die Konturdarstellungen der beiden Adenin-Derivate (Abbildung 5.7) zeigen in den ersten 10 ps sehr ähnliche spektrale Signaturen. Offenbar treten auch in poly(A) nach 1 ps heiße Adenin-Basen auf, die sich sehr ähnlich wie die Adenin-Basen in AMP verhalten. Dabei erfolgt sowohl das Verschwinden der induzierten Absorption bei 1600 cm^{-1} als auch die Erholung des Ausbleichens bei 1628 cm^{-1} in Abbildung 5.8 wie in AMP auf einer Zeitskala von wenigen Pikosekunden. Allerdings deutet die exponentielle Datenanpassung für poly(A) mit einer Zeitkonstante im Bereich von 4 ps auf eine etwas langsamere Kühlrate in poly(A) im Vergleich zu AMP hin. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied stellt die jeweilige Umgebung der Adenin-Basen in den beiden Proben dar. In AMP ist jede Adenin-Base direkt von einer Lösungsmittel-Hülle umgeben, die einen effizienten Energietransfer erlaubt. Dagegen ist in

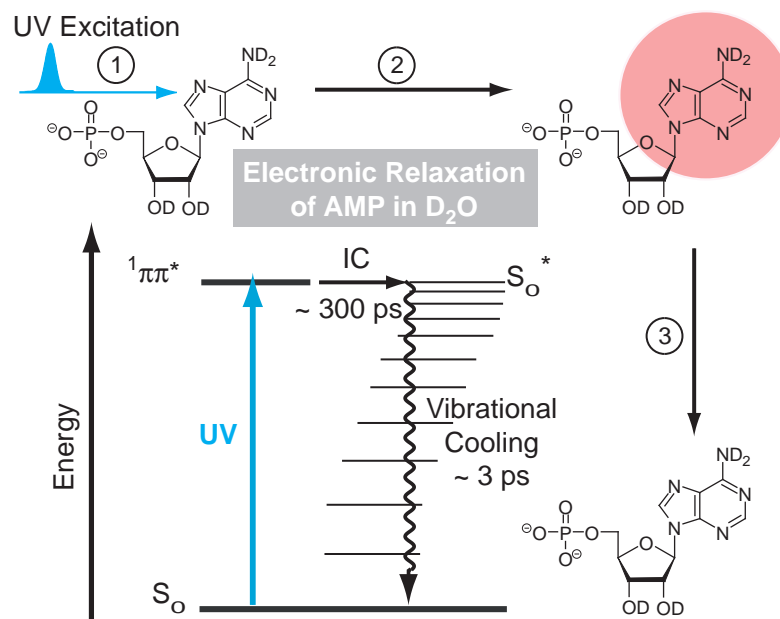


Abb. 5.9: Schematische Darstellung der in AMP nach UV-Anregung ablaufenden photophysikalischen Prozesse: (1) Die UV-Absorption erfolgt durch einen $1\pi\pi^*$ -Übergang. (2) Anschließend kommt es zu einer schnellen internen Konversion (IC) aus dem angeregten $1\pi\pi^*$ -Zustand in einen schwingungsangeregten „heißen“ Grundzustand. (3) Das Kühlen („Cooling“) erfolgt durch Energieabgabe an das Lösungsmittel D₂O auf einer Zeitskala von etwa 3 ps.

poly(A) ein großer Teil der Oberfläche durch Adenin-Basen und nicht durch Lösungsmittel-Moleküle gegeben.

Sowohl in AMP als auch in poly(A) kommt es demnach nach UV-Anregung zur Besetzung von Zuständen, die eine schnelle interne Konversion erfahren und in den zeitaufgelösten IR-Messungen durch die charakteristische IR-Signatur „heißer“ Adenin-Basen identifiziert werden können. Während in AMP jedoch praktisch alle angeregten Moleküle diesem Desaktivierungsweg folgen, weisen die Messdaten für poly(A) zusätzlich auf die Besetzung langlebiger Zustände hin.

Diskussion der langlebigen Zustände in poly(A)

Betrachtet man die Amplitude der induzierten Absorption im Verhältnis zum Maximalen Ausbleich-Signal, wird deutlich, dass in poly(A) nur ein Teil der angeregten Basen einer Desaktivierung über eine sehr schnelle IC folgt. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den UV/Vis-Experimenten von Kohler und Mitarbeitern, die zeigen, dass im Modell-System (dA)₂₀ nur etwa 35 % der angeregten Basen durch eine schnelle interne Konversion ($\tau_{IC} < 1 \text{ ps}$) in den Grundzustand übergehen [CH05]. Mehr als die Hälfte der absorbierten Anregungs-Photonen führen stattdessen zur Besetzung langlebiger Zustände mit Lebensdauern im 100 Pikosekunden. Entsprechend lange Kinetiken sind auch in den IR-Messungen sichtbar. Sie zeigen sich in den IR-Messungen in einem zum Grundzustands-Spektrum verschobenen Ausbleichen, das sich gemäß den Zeitverläufen in Abbildung 5.8 ebenfalls auf einer Zeitskala im 100 ps-Bereich erholt.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen könnte die Bildung von Excimer-ähnlichen Zustände sein, die seit langem in der Literatur diskutiert werden [Bal82, Ple00, CH05, Kwo06]. Allerdings ist bisher die IR-Absorption dieser Zustände nicht bekannt und damit eine eindeutige Identifizierung anhand der transienten Spektren zunächst nicht möglich. Aus diesem Grund werden im Folgenden auch andere Prozesse und Zustände diskutiert, die für die beobachtete IR-Signatur verantwortlich sein könnten.

Photo-Ionisation und Zwei-Photonen-Prozesse?

Wie bereits in Abschnitt 5.1.2 diskutiert, könnte es bei der UV-Anregung zur Ionisation von Adenin-Basen kommen. Die dabei gebildeten Elektron-Kation-Paare könnten auf einer 100 Pikosekunden-Zeitskala rekombinieren oder Produkte mit benachbarten Basen oder den Lösungsmittel-Molekülen bilden. Ein signifikanter Beitrag durch eine Ein-Photonen-Ionisation ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da die Quantenausbeute für die Ein-Photonen-Ionisation für das Monomer (dAMP) bzw. für das Oligomer (dA)₂₀ nur in einer Größenordnung von 0,01 bzw. 0,1 % liegt [Mar06].

Eine andere Möglichkeit wäre jedoch eine Zwei-Photonen-Ionisation der Moleküle. Dieser Prozess besitzt eine quadratische Abhängigkeit von der Anregungs-Intensität und lässt sich demnach durch eine Variation der Anregungsenergie unter sonst gleichen Anregungsbedingungen (Bündeldurchmesser, Impulsdauer) überprüfen. Das Ergebnis einer entsprechenden Messreihe ist in Abbildung 5.10 zu sehen. Dargestellt ist die normierte Signalamplitude $\Delta A/E$

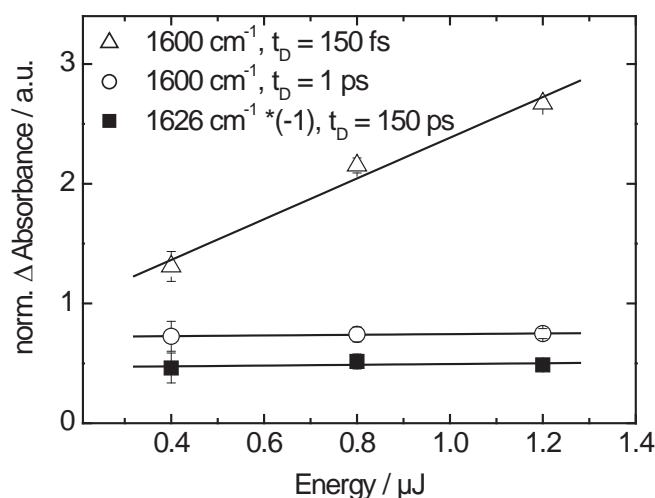


Abb. 5.10: Normierte Absorptionsänderung in Abhängigkeit von der Anregungsenergie in poly(A). Dargestellt ist die Energieabhängigkeit nahe dem Zeitnullpunkt (Dreiecke) und im Bereich der induzierten Absorption (Kreise) bei 1600 cm^{-1} , sowie die invertierten Werte im Bereich der negativen Absorptionsänderung (Quadrate) bei 1626 cm^{-1} . Die Datenanpassung erfolgt über eine lineare Fitfunktion. Eine Steigung ungleich Null weist auf eine quadratische Abhängigkeit der Absorptionsänderungen von der Anregungs-Energie und einen Zwei-Photonen-Prozess hin. Eine Steigung gleich Null kennzeichnet dagegen einen Ein-Photonen-Prozess.

in Abhängigkeit von der Anregungsenergie E . Bei den verwendeten Energien (Intensitäten) ist keine Sättigung der Übergänge zu erwarten und für einen reinen Zwei-Photonen-Prozess ergibt sich eine quadratische Abhängigkeit der Signal-Amplitude von der Anregungsenergie [Lac76]. Auf dieser Annahme basierend kann das normierte Signal ($\frac{\Delta A}{E}$) über eine lineare

Fitfunktion gemäß $S = \frac{\Delta A}{E} = a \cdot E + b$ angepasst werden. Eine Steigung mit $a \neq 0$ ist ein Nachweis für einen Zwei-Photonen-Prozess. Dagegen liefert ein reiner Ein-Photonen-Prozess einen konstanten Offset mit $b \neq 0$ und $a = 0$.

In der Abbildung 5.10 werden die normierten Signale bei einer Wellenzahl von 1600 cm^{-1} nahe dem Zeitnullpunkt (150 fs und 1 ps) und bei 1628 cm^{-1} (150 ps) miteinander verglichen. Während um den Zeitnullpunkt ein deutlicher Anteil mit positiver Steigung ($a \neq 0$) auftritt, ist die Steigung in den beiden anderen Signalverläufen in guter Näherung gleich Null. Diese Beobachtung lässt sich wie folgt erklären. Am Zeitnullpunkt tritt ein quadratischer Beitrag auf, der, wie in Abschnitt 5.1.2 diskutiert, durch die Zwei-Photonen-Ionisation des Lösungsmittels erklärt werden kann. Dagegen ist für die Absorptionsänderungen nach 1 ps im Bereich der induzierten Absorption („heiße“ Grundzustände) sowie die Erholung des Ausbleich-Signals (Besetzung der langlebigen Zustände) kein signifikanter Beitrag durch einen Zwei-Photonen-Prozess zu erkennen.

Dennoch kann im Rahmen der Messungenauigkeiten das Auftreten einer Zwei-Photonen-Ionisation im Bereich weniger Prozent nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Diese Möglichkeit wurde bereits bei der Diskussion der Nullpunkts-Signale am Beispiel AMP in Abschnitt 5.1.2 angesprochen. Eine Photoionisation könnte dabei zum Beispiel für den in den transienten Spektren nach 1 ns sichtbaren Offset im Bereich der Grundzustandsbande von AMP (1624 cm^{-1}) verantwortlich sein. Betrachtet man die Signalamplitude der transienten Spektren in Abbildung 5.7 nach Abzug des Lösungsmittel-Anteils, so ergibt sich ein zusätzliches Ausbleich-Signal von etwa $100 \mu\text{OD}$. Im Vergleich zum initialen Ausbleichen ($\approx 6,4 \text{ mOD}$) entspricht dies einem Anteil von etwa 1,5 % der angeregten AMP-Moleküle. Da im Rahmen der Messungenauigkeit keine Kinetiken mit Lebensdauern im 10 und 100 Pikosekunden-Bereich nachweisbar sind muss dieses Ausbleichen durch die Bildung von Photoprodukten oder langlebiger elektronischer Zustände verursacht werden. Leider gibt es in der Literatur bisher keine IR-Spektren für das AMP-Anion und andere mögliche Reaktions-Produkte dieser Spezies mit den Lösungsmittel-Molekülen [Cad92, Can92b, Can92a], die einen direkten Nachweis in den transienten Spektren ermöglichen würden.

Triplet-Zustände?

Eine andere mögliche Erklärung für die beobachteten Ausbleich-Signale und das damit verbundene „Fehlen“ an Grundzustands-Molekülen auf der 100 Pikosekunden- und Nanosekunden-Zeitskala beruht auf der Besetzung von Triplet-Zuständen. Diese können, wie in Abbildung 2.16 schematisch dargestellt, durch Interkombination (ISC) aus dem angeregten Singulett-Zustand besetzt werden und weisen aufgrund des „spin-verbotenen“ Übergangs in den elektronischen Grundzustand vergleichsweise lange Lebensdauern auf. Zum Beispiel wird für AMP in wässriger Lösung von einer Lebensdauer des energetisch niedrigsten Triplet-Zustands (T_0) in der Größenordnung von einer Mikrosekunde ausgegangen. Aus diesem Grund erscheint ein Beitrag auf der 100 ps-Zeitskala sehr unwahrscheinlich. Es sei denn, die Wechselwirkungen der Adenin-Basen in poly(A) führen zu einem Löschen von Triplet-Zuständen auf dieser Zeitskala. Allerdings liegen die Quantenausbeuten für die Bildung von Triplet-Zuständen in AMP weit unter einem Prozent und sind damit die niedrigsten von allen DNA-Nukleotiden [Cad92]. Basierend auf diesen Ergebnissen ist auch in poly(A) nicht mit einer signifikanten Besetzung (im Bereich von mehreren 10 %) von Triplet-Zuständen zu rechnen.

Langlebige Singulett-Zustände — Excimere

Eine Erklärung für die langlebigen Zustände in poly(A) können nach den oben durchgeführten Betrachtungen nur noch elektronische Singulett-Zustände liefern. Zum Beispiel wurden in Anreg-Abtast Experimenten im UV/Vis-Bereich bzw. mit zeitaufgelöster Fluoreszenz-Spektroskopie an poly(A) Zerfallskonstanten von 154 ps [CH04b] bzw. 180 ps [Kwo06] nachgewiesen. Auch Fluoreszenz-Zerfälle auf der Nanosekunden Zeitskala (1 - 2 ns) sind bekannt [Bal82, Ple00, CH04a]. Diese langlebigen Zustände werden auf die Bildung von Excimer-Zuständen zwischen den aromatischen Adenin-Basen zurückgeführt, bei denen es zu einer Verteilung der Anregungsenergie auf zwei eng benachbarte Basen und einem gebundenen angeregten Zustand kommt (Excimer = „excited dimer“, siehe auch Abbildung 2.17).

Da die in den IR-Messungen an poly(A) gefundenen Zerfallszeiten in der gleichen Größenordnung sind, liegt es nahe, diese Zustände auch für die beobachteten IR-Signale verantwortlich zu machen. Dabei können für die auftretenden Unterschiede in den Zeitkonstanten mehrere Ursachen verantwortlich sein. Zum Beispiel könnten die Unterschiede zwischen [CH04b] (~ 150 ps) und [Kwo06] (~ 180 ps) Ausdruck der Unsicherheiten bei der multiexponentiellen Datenanpassung sein [Ist99]. Sie können aber auch auf einen nicht exponentiellen Charakter der Desaktivierung dieser Zustände hinweisen, die durch eine Datenanpassung mit Exponentialfunktionen nur bedingt wiedergegeben werden kann. Die in dieser Arbeit bestimmte Zeitkonstante für die Erholung der Ausbleich-Signale in Abbildung 5.8 ist mit rund 220 ps größer als die oben genannten Literaturangaben. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass zum einen bei dieser Datenanpassung das Auftreten einer Kinetik im Nanosekunden-Bereich nicht berücksichtigt wurde und zum anderen Unterschiede in den Lebensdauern angeregter Zustände auch durch einen Isotopen-Effekt verursacht werden können. Während sich die Angaben in [CH04b, Kwo06] auf Messungen in H_2O beziehen, wurden die IR-Messungen dieser Arbeit im Lösungsmittel D_2O durchgeführt. Tatsächlich sind Isotopen-Effekte, die zu einer Verlängerung der beobachteten Zerfallszeiten führen, bereits aus zeitaufgelösten UV/Vis-Messungen bekannt. Zum Beispiel ergab sich bei einem direkten Vergleich zwischen $(\text{dA})_{18} \cdot (\text{dT})_{18}$ in H_2O und D_2O eine Verlängerung der Lebensdauer der beobachteten langlebigen elektronischen Zustände von 66 auf 150 ps [CH04b]. Die genaue Ursache für diesen Effekt ist jedoch noch nicht geklärt. Die folgende Betrachtung zeigt, dass es weitere Indizien für die Bildung von Excimer-ähnlichen Zuständen in poly(A) gibt.

Informationen zum Anteil der in poly(A) durch UV-Anregung besetzten langlebigen Zuständen lassen sich durch einen Vergleich der transienten Spektren von AMP und poly(A) mit dem Grundzustands-Absorptionsspektren gewinnen. Dazu werden die transienten Spektren von AMP und poly(A) nach 1 und 10 ps in Abbildung 5.11 noch einmal im Detail betrachtet. Links sind die transienten Spektren von AMP zusammen mit dem invertierten Grundzustands-Spektrum von AMP gezeigt, das den unter den Anregungsbedingungen zu erwartenden Anteil an angeregten Adenin-Basen ($\sim 7\%$) widerspiegelt (grüne Linie). Da die in AMP nach 1 ps vorliegenden heißen Grundzustands-Moleküle ein deutlich zu kleineren Wellenzahlen verschobenes Absorptions-Spektrum besitzen, sollte sich das transiente Spektrum aus einem Ausbleichen der Grundzustands-Absorption und einer induzierten Absorption im niederfrequenten Bereich der Spektren zusammensetzen. Tatsächlich lässt sich das maximale Ausbleich-Signal bei 1624 cm^{-1} sehr gut durch ein invertiertes Grundzustands-Spektrum wiedergeben, das zu kleineren Wellenzahlen durch eine positive Absorptionsänderung überlagert wird.

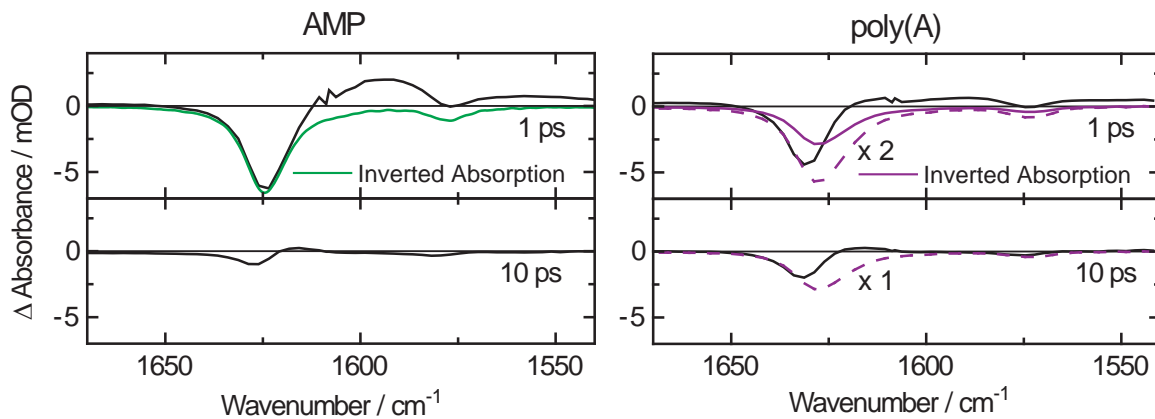


Abb. 5.11: Vergleich der transienten Spektren von AMP und poly(A) für Verzögerungszeiten von 1 und 10 ps mit der Grundzustandsabsorption. Links: Die grüne Linie entspricht dem invertierten Grundzustands-Spektrum von AMP für die unter den Anregungsbedingungen zu erwartende Anregung von etwa 7 % der Adenin-Basen. Die spektrale Form des Ausbleich-Signals nach 1 ps stimmt sehr gut mit dem invertierten Grundzustands-Spektrum überein. Rechts: Die rote Linie entspricht dem invertierten Grundzustands-Spektrum von poly(A) für eine unter den Anregungsbedingungen zu erwartende Anregung von etwa 5 % der Adenin-Basen. Die gestrichelte rote Linie ist eine Anpassung des invertierten Grundzustands-Spektrum von poly(A) an die hochfrequente Flanke der transienten Spektren nach 1 bzw. 10 ps entsprechend den angegebenen Skalierungsfaktoren. Die Unterschiede deuten darauf hin, dass bei der Anregung ein größerer Anteil an Adenin-Basen in einen angeregten Zustand übergeht, als man bei der Anregung einzelner Adenin-Basen in poly(A) erwarten würde.

Führt man die gleiche Analyse für poly(A) durch, zeigt sich ein deutlicher Unterschied. Unter der Annahme, dass sich die Adenin-Basen in poly(A) wie in AMP verhalten und die Anregung auf diese Basen lokalisiert bleibt, würde man unter den experimentellen Bedingungen für poly(A) nach 1 ps ein Ausbleichen entsprechend der roten Linie ($\sim 5\%$ der Adenin-Basen im Anregungsvolumen) in Abbildung 5.11 erwarten. Das nach 1 ps auftretende maximale Ausbleich-Signal ist jedoch deutlich größer und zu größeren Wellenzahlen (1631 cm^{-1}) verschoben. Mit einer spektralen Breite von 12 cm^{-1} (FWHM) ist es zudem etwa 30% schmaler als die Grundzustandsbande mit etwa 18 cm^{-1} (FWHM). Wie lassen sich diese Unterschiede erklären?

Eine Erklärung für ein Ausbleich-Signal das größer ist, als man für einzelne Basen erwarten würde, besteht in der Bildung von Komplexen zwischen zwei oder mehr benachbarten Basen. Besitzen diese Komplexe keine Absorption bei der betrachteten Grundzustands-Absorption, führt dies zu einem Differenzsignal, das mindestens einen Faktor 2 größer ist als man bei der Anregung einer isolierten Base erwarten würde. Eine Anpassung an das Differenzsignal sollte demnach durch eine entsprechende Skalierung des Grundzustands-Spektrums möglich sein. Die rot gestrichelten Linien in Abbildung 5.7 stellen das mit einem Faktor 2 (transientes Spektrum nach 1 ps) bzw. mit einem Faktor 1 (transientes Spektrum nach 10 ps) skalierte und invertierte Grundzustands-Spektrum der angeregten Adenin-Basen ($\sim 5\%$) dar. Mit diesen Skalierungsfaktoren ergibt sich eine sehr gute Anpassung der transienten Spektren von poly(A) in der hochfrequenten Flanke des Ausbleich-Signals. Da nach 1 ps noch Signalbeiträge durch die nach der schnellen IC entstanden heißen Moleküle berücksichtigt werden müssen und auf der

Pikosekunden-Zeitskala möglicherweise dynamische Vorgänge bei der Bildung der langlebigen Zustände auftreten (siehe Diskussion in [Kwo06]) wird für die folgende Abschätzung nur das 10 ps-Differenzspektrum verwendet. Nimmt man an, dass sich dieses Differenzspektrum nur aus einem Ausbleichen der Grundzustands-Absorption und der induzierten Absorption durch die langlebigen Zustände zusammensetzt, entspricht der Skalierungsfaktor von 1 dem eigentlich erwarteten Anteil von $\sim 5\%$ angeregter Adenin-Basen.

Mit dieser Größe lässt sich eine Abschätzung für den Anteil möglicher Excimer-Zustände durchführen. Unter der Annahme, dass bei der Bildung der langlebigen elektronisch angeregten Zustände jeweils nur zwei Basen beteiligt sind, lässt sich das Differenz-Spektrum durch Excimer-Zustände erklären, die bei etwa 50 % der ursprünglich absorbierten UV-Photonen gebildet werden. Dieser Wert ist eine obere Grenze, da möglicherweise auch mehr als zwei Basen daran beteiligt sein könnten. Er ist jedoch in guter Übereinstimmung mit anderen Abschätzungen zu den Ausbeuten für Excimer-Zustände in einzelsträngigen Adenosin-Oligomeren [CH04b, CH05]. Wie in [CH04b] diskutiert, legt dieser hohe Anteil einen direkten Zusammenhang mit dem Anteil gestapelt vorliegender Adenin-Basen in poly(A) nahe. In [Dew79] wird von einem Anteil von etwa 65 % gestapelter Adenin-Basen in poly(A) ausgegangen. Entsprechend deutet die hier durchgeführte Abschätzung darauf hin, dass ein großer Anteil der in Basen-Stapeln erfolgten Anregung zur Bildung von Excimer-Zuständen führt.

IR-Signatur der langlebigen Zustände in poly(A)

Bisher gibt es in der Literatur keine IR-Absorptionsspektren für mögliche Excimer-Zustände in Adenin-Homopolymeren. Aus diesem Grund wird im Folgenden versucht diese wichtige Information aus den zeitaufgelösten IR-Experimenten zu extrahieren. Abbildung 5.12 zeigt das aus der globalen Datenanalyse gewonnene Amplituden-Spektrum (siehe Anhang E) für den Zerfall der langlebigen Zustände mit einer Zeitkonstante von ~ 220 ps. Unter obiger Annahme

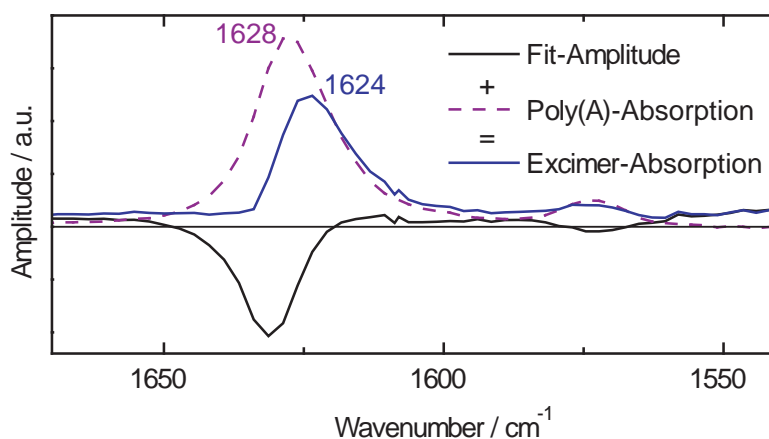


Abb. 5.12: Bestimmung der IR-Absorption der in poly(A) auftretenden langlebigen Zustände. Das IR-Spektrum dieser Zustände (blaue Linie) ergibt sich aus der Fit-Amplitude (schwarze Linie) für die langlebigen Zustände durch Addition des Grundzustands-Spektrums (rot gestrichelte Linie).

setzt sich dieses Spektrum (schwarze Linie) aus dem Ausbleichen des Grundzustands und der Absorption der Excimer-Zustände zusammen. Durch Addition des Grundzustands-Spektrums (rot gestrichelte Linie) ergibt sich daraus die Absorption der Excimer-Zustände (blaue Li-

nie). Die Absorptionsmaxima des auf diese Weise bestimmten „Excimer-Spektrums“ liegen bei 1625 cm^{-1} und 1573 cm^{-1} . Die hochfrequente Bande ist gegenüber dem Grundzustand (1628 cm^{-1}) etwas zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben. Zudem ist die spektrale Breite der hochfrequenten Bande mit etwa 14 cm^{-1} um etwa 25 % kleiner als im Grundzustand (18 cm^{-1}). Die IR-Absorption der Excimer-Zustände zeichnet sich demnach im Wesentlichen durch eine Reduktion der Oszillatoren-Stärke und eine kleine Verschiebung im Bereich der C=N- und C=C-Doppelbindungen aus.

Sowohl die Rotverschiebung als auch die geringere Breite sind nicht unerwartet. Bei der Besetzung eines anti-bindenden Molekülorbitals kommt es im Allgemeinen zu einer Erniedrigung der an der Schwingungsmode beteiligten Kraftkonstanten und damit zu einer Erniedrigung der Schwingungsfrequenz. Zum Beispiel konnte in einem Experiment an Lumazin-Molekülen die nach UV-Anregung ($\sim 400\text{ nm}$) auftretende IR-Signatur des angeregten Singulett-Zustands bestimmt und eine deutliche Rotverschiebung (in der Größenordnung von einigen 10 cm^{-1}) der Schwingungsbanden nachgewiesen werden [Sch08]. In diesem Zusammenhang könnte die relativ kleine Rotverschiebung ($\sim 4\text{ cm}^{-1}$) in poly(A) ein Hinweis auf die Verteilung der Anregungsenergie auf mehrere Adenin-Basen sein. Die geringere spektrale Breite könnte dadurch erklärt werden, dass bei der Excimer-Bildung ein Sub-Ensembles an Adenin-Basen betrachtet wird, die sich in engem Kontakt zu benachbarten Adenin-Basen befinden. Der Kontakt zu Lösungsmittel-Molekülen, der in der Regel zu einer Bandenverbreiterung führt, wird dadurch minimiert.

Modell zur Photophysik in poly(A)

Die hier durchgeführten IR-Messungen zeigen deutlich, dass die Wechselwirkungen zwischen Adenin-Basen in DNA-Einzelsträngen auch im infraroten Spektralbereich nachweisbar sind. Die Ergebnisse zur Photophysik von poly(A) lassen sich mit dem in Abbildung 5.13 dargestellten Zwei-Zustands-Modell interpretieren. In diesem Modell werden die Basen je nach ihrer Anordnung in der Helix entweder als „isoliert“ oder in Wechselwirkung mit benachbarten Adenin-Basen angesehen [Rei80]. In den „isolierten“ oder AMP-ähnlichen Basen erfolgt die Absorption eines UV-Photons, wie in Abschnitt 5.2.2 für AMP diskutiert, durch einen $^1\pi\pi^*$ -Übergang der Adenin-Base. Aus diesem ist eine schnelle IC möglich, die zur Bildung heißer Grundzustands-Basen und der für diese Zustände typischen IR-Signatur führt. In den gestapelt vorliegenden Basen kommt es dagegen zu Wechselwirkungen, die den Charakter der elektronischen Anregung und mögliche Desaktivierungspfade entscheidend beeinflussen. Dabei konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, ob die Anregung in gestapelt vorliegenden Basen auf zwei oder mehr Basen delocalisiert erfolgt (Exciton-Zustände) oder ob die Anregung zunächst auf eine Base lokalisiert ist und anschließend eine dynamische Bildung möglicher Excimer-Zustände stattfindet [Wil76]. Zum Beispiel wurden in [Kwo06] die Ergebnisse an einem Adenosin-Oligonukleotid mit einer zunächst auf einzelne Basen lokalisierten Anregung interpretiert, in deren Folge es zur dynamischen Bildung von Excimer-Zuständen kommt. Allerdings weist eine theoretische Studie zu den elektronischen Zuständen in Adenin-Multimeren darauf hin, dass sich die experimentellen Ergebnisse aus [Kwo06] auch mit einer zunächst über mehrere Basen delocalisierten Anregung erklären lassen. Die hier durchgeführten Experimente können aufgrund der am Zeitnullpunkt auftretenden Überlagerung verschiedener Beiträge keines der beiden Modelle ausschließen. In Abbildung 5.13 wird deshalb der bei der Anregung

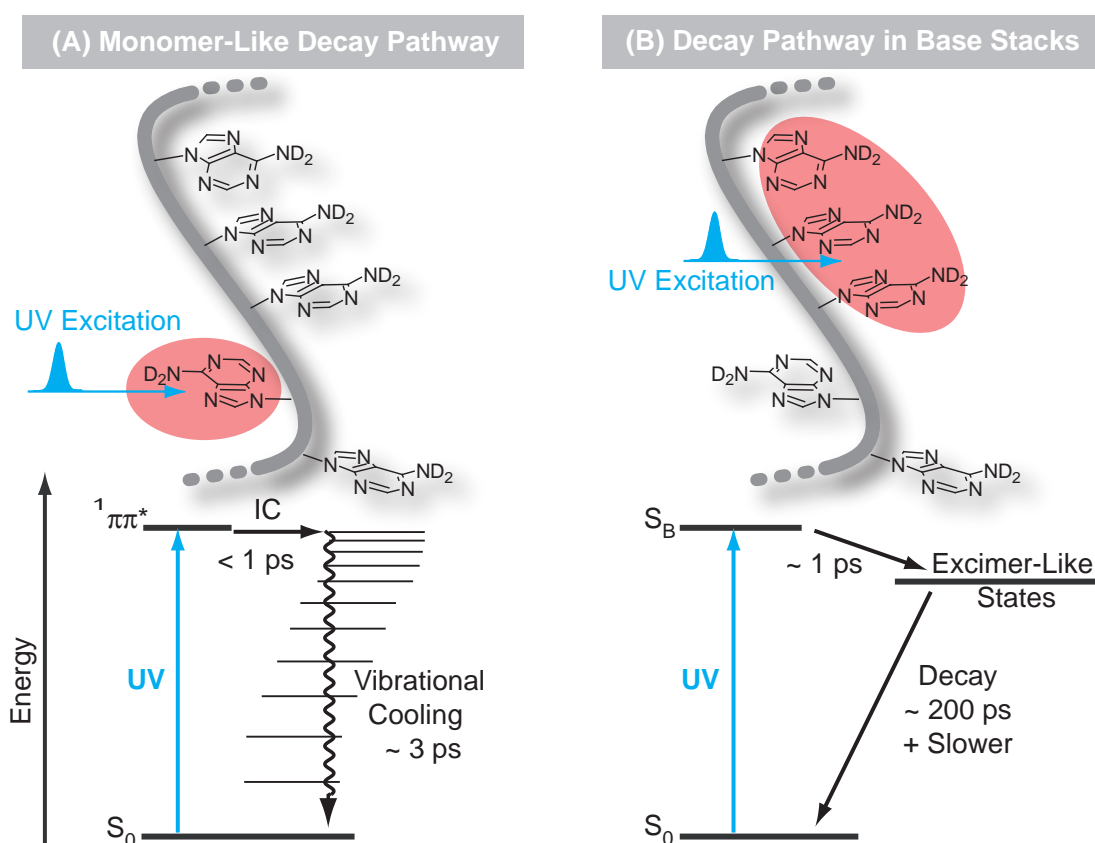


Abb. 5.13: Schematische Darstellung der nach UV-Anregung besetzten Zustände in poly(A). Die Anordnung der Basen entscheidet, ob ein langlebiger Excimer-Zustand gebildet wird oder nicht. (A) Ist die betroffene Base nicht in einer gestapelten Konformation mit benachbarten Basen oder in einer („random-coil“)-Struktur, verhält sie sich ähnlich wie eine Base in einem AMP-Molekül und wird über eine schnelle IC deaktiviert. (B) Erfolgt die Anregung dagegen in einem Bereich des Einzelstrangs in dem zwei oder mehrere Basen gestapelt und damit in großer räumlicher Nähe vorliegen, erfolgt die Anregung in einen elektronischen Zustand (S_B) der möglicherweise über mehrere Base delokalisiert ist. Aus diesem kann es zur Bildung von Excimer-Zuständen kommen. Im Molekülschema wurde die Deuterierung der Adenin-Basen im Lösungsmittel D_2O berücksichtigt.

besetzte Zustand allgemein als S_B („bright state“) gekennzeichnet, ohne explizite elektronische Zuordnung. Aus diesem Zustand kann es zur Bildung von Excimeren kommen, denen ein hoher Elektron-Transfer-Charakter zugeschrieben wird [San07]. Wie bei der Interpretation der IR-Messungen dargelegt, ist bei der Besetzung dieser Zustände offenbar der Anteil an gestapelt vorliegenden Basen ein wesentliches Kriterium. In den Basen-Stapeln werden die Adenin-Basen in engem Kontakt und parallel zueinander gehalten. Auf der einen Seite kann diese Einschränkung dazu führen, dass die für eine konische Durchschneidung nötige Strukturänderung im angeregten Zustand nicht möglich ist und eine mögliche Desaktivierung dadurch verhindert wird. Auf der anderen Seite ist durch die Wechselwirkung (elektronische Kopplung) der Basen der Übergang in einen stabilisierten Excimer-ähnlichen Zustand möglich, der mit der IC konkurriert. Über die Mechanismen, die zu der Entvölkerung der Excimer-Zustände führen, ist bisher wenig bekannt. Die Zerfallszeiten umfassen, wie in dieser Arbeit bestätigt, einen relativ großen Bereich (100 ps - 1 ns) [CH05]. Möglicherweise spielen konformationelle

Änderungen bei der komplexen Dynamik eine wichtige Rolle. Studien zur Bildung und Desaktivierung Excimer-ähnlicher Zustände in Adenosin-Oligomeren könnten zum Beispiel unter Variation der Proben temperatur erfolgen, da in diesen Experimenten der Anteil der in Stapeln vorliegenden Adenin-Basen gezielt variiert werden könnte.

Obwohl die hier diskutierten Excimer-Zuständen seit langem als mögliche Vorstufen für Photoprodukte und Schäden in der DNA diskutiert werden, konnte bei der UV-Belichtung von poly(A) keine signifikante Bildung von Photoprodukten festgestellt werden. Anders ist die Situation in dem im Folgenden betrachteten Oligonukleotid (dT)₁₈. In diesem konnte in Kapitel 4 die Bildung von CPD-Schäden in stationären Belichtungsexperimenten nachgewiesen werden.

5.3 Zeitaufgelöste IR-Spektroskopie an TMP und (dT)₁₈

Seit 1960 ist bekannt, dass UV-Strahlung für die Bildung von CPD-Schäden zwischen benachbarten Thymin-Basen in der DNA verantwortlich ist. Bisher konnte jedoch weder die Zeitskala, auf der die Photoreaktion abläuft, noch der Mechanismus eindeutig geklärt werden (siehe Diskussion in Abschnitt 2.3.3). In diesem Abschnitt soll nun die Bildung dieser Photoschäden, erstmals mit zeitaufgelöster IR-Spektroskopie im Pikosekunden-Bereich untersucht werden. Dazu werden Messungen am Monomer TMP mit Messungen am Oligomer (dT)₁₈ verglichen, in dem die Bildung von Thymin-Dimeren in Abschnitt 4.3 unter stationären Bedingungen nachgewiesen wurde.

5.3.1 TMP und (dT)₁₈: Zeitaufgelöste Messdaten

Einen ersten Überblick zu den in TMP und (dT)₁₈ auftretenden Absorptionsänderungen bieten die Konturdarstellungen in den Abbildungen 5.14 und 5.15. Während Abbildung 5.14 den Bereich zwischen 1775 und 1575 cm⁻¹ umfasst, ist in Abbildung 5.15 der Fingerprint-Bereich zwischen 1550 und 1310 cm⁻¹ dargestellt. Diese Aufteilung ermöglicht eine separate Skalierung der beiden Messbereiche, die stark unterschiedliche Signalamplituden aufweisen, und erleichtert den direkten Vergleich der Messdaten. Zusätzlich sind in den Abbildungen die Grundzustands-Absorptionsspektren der Moleküle und transiente Spektren an ausgewählten Zeitpunkten nach der Anregung abgebildet. Im Folgenden werden die Messergebnisse im Detail beschrieben und miteinander verglichen.

Vergleich der Konturdarstellungen

Die Konturdarstellungen der beiden Moleküle zeichnen sich in beiden Spektralbereichen durch sehr ähnliche transiente Signale aus. Zu Beginn zeigen sich starke negative Absorptionsänderungen (Ausbleichen) im Bereich der Grundzustands-Absorptionsbanden. Zudem sind spektral breite positive Absorptionsänderungen (induzierte Absorption) um 1750 cm⁻¹ und vor allem im Fingerprint-Bereich zwischen 1460 und 1375 cm⁻¹ deutlich sichtbar. Ein Großteil der Ausbleich-Signale und der induzierten Absorption verschwindet auf einer Zeitskala von etwa 10 ps. Zwischen 100 ps und 1 ns ist in beiden Molekülen eine weitere Erholung der

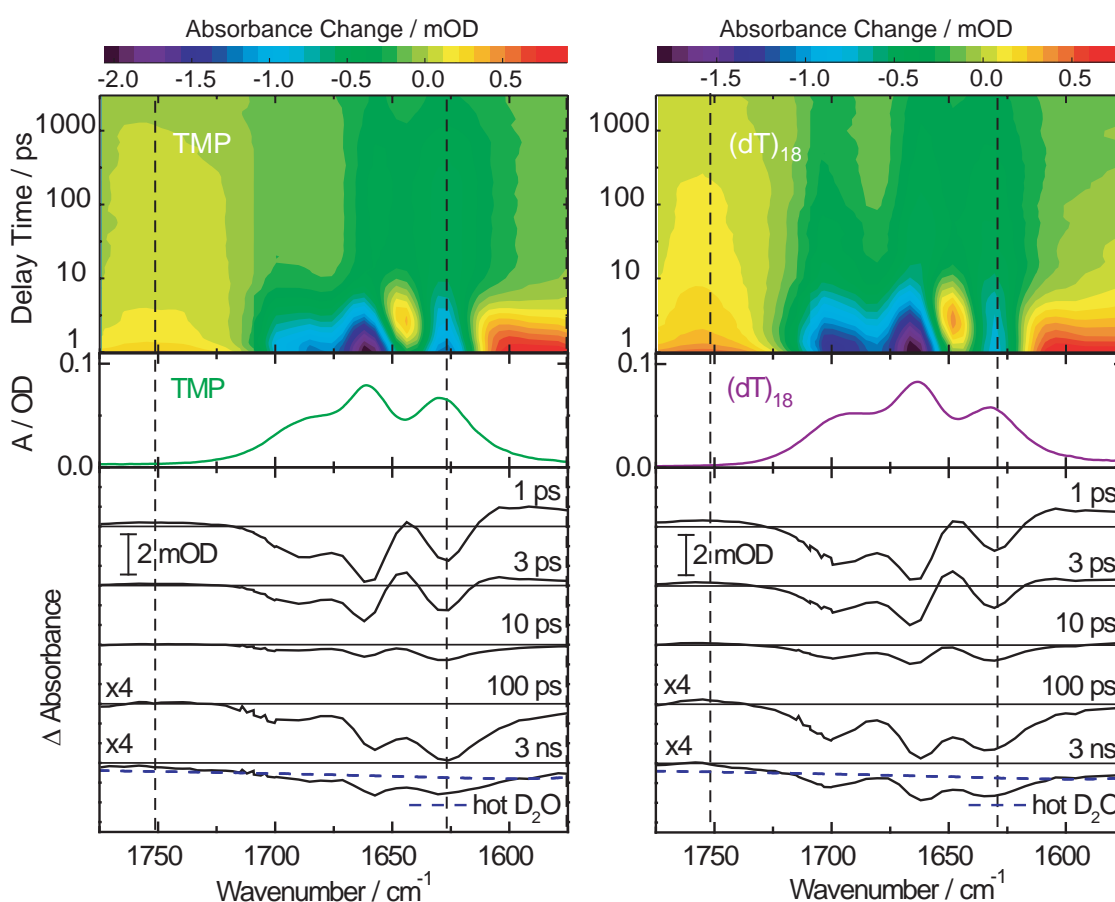


Abb. 5.14: Darstellung der zeitaufgelösten Messdaten für TMP (links) und (dT)₁₈ (rechts) im Bereich der hochfrequenten Doppelbindungs-Schwingungen. Von oben nach unten: (i) Konturdarstellung der zeitaufgelösten Absorptionsänderungen. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Positionen für die in Abbildung 5.16 dargestellten Zeitverläufe. (ii) Grundzustands-Absorptionsspektrum von TMP (grün) und (dT)₁₈ (rot). (iii) Transiente Spektren für die angegebenen Verzögerungszeiten. Die blau gestrichelte Linie entspricht der Absorptionsänderung bei einer Erwärmung des Lösungsmittels D₂O um etwa 45 mK.

Ausbleich-Signale zu sehen. Gleichzeitig kommt es auf dieser Zeitskala zu einer Reduktion der induzierten Absorption um 1750 cm⁻¹. Offenbar treten in beiden Molekülen sehr ähnliche Prozesse auf, deren spektrale Eigenschaften im nächsten Abschnitt ausführlich beschrieben werden.

Vergleich der transienten Spektren

Einen detaillierten Blick auf die spektralen Signaturen der Absorptionsänderungen erlauben die transienten Spektren in Kombination mit den Grundzustands-Spektrum in den Abbildungen 5.14 und 5.15. Eine Pikosekunde nach der Anregung sind in beiden Spektralbereichen starke Ausbleich-Signale sichtbar, deren spektrale Position (1681, 1661, 1630 und 1481 cm⁻¹ für TMP, bzw. 1693, 1664, 1632 und 1479 cm⁻¹ für (dT)₁₈) sehr gut mit den Grundzustands-Absorptionsspektren der Moleküle übereinstimmen. So lassen sich zum Beispiel die transienten

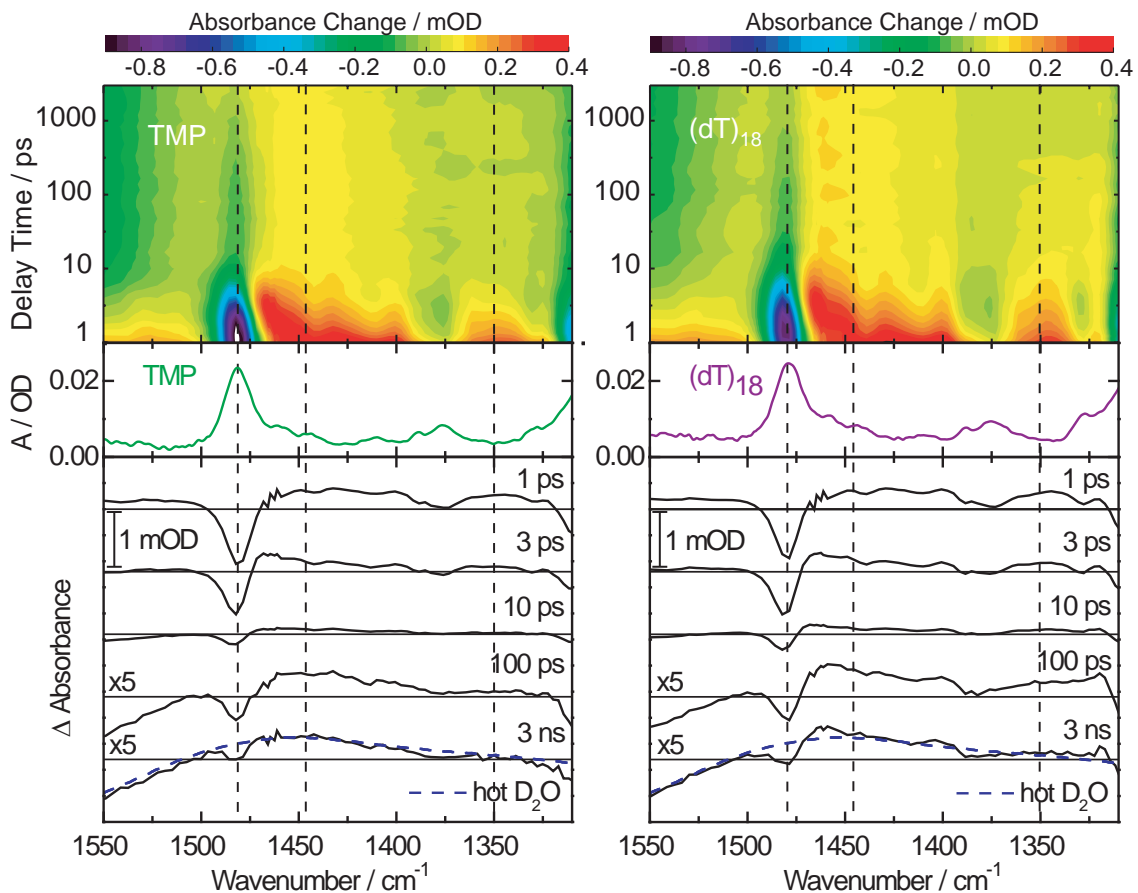


Abb. 5.15: Darstellung der zeitaufgelösten Messdaten von TMP (links) und $(dT)_{18}$ (rechts) im Fingerprint-Bereich. Von oben nach unten: (i) Konturdarstellung der spektral- und zeitaufgelösten Absorptionsänderungen. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Spektralpositionen für die in Abbildung 5.16 dargestellten Zeitverläufe. (ii) Grundzustands-Absorptionsspektrum von TMP (grün) und $(dT)_{18}$ (rot). (iii) Transiente Spektren für die angegebenen Verzögerungszeiten. Die blau gestrichelte Linie entspricht der Absorptionsänderung bei einer Erwärmung des Lösungsmittels D_2O um etwa 45 mK.

Spektren in Abbildung 5.15 nach 1 ps sehr gut durch ein invertiertes Grundzustands-Spektrum beschreiben, dem in Anschluss an die Ausbleich-Signale um 1480 cm^{-1} eine spektral breite induzierte Absorption zu kleineren Wellenzahlen überlagert ist. Nach 3 ps ist in diesem Spektralbereich eine deutliche Verschiebung der induzierten Absorption zu größeren Wellenzahlen zu erkennen. Gleichzeitig kommt es zu einer Reduktion der Ausbleich-Signale bei 1480 cm^{-1} . Zehn Pikosekunden nach der Anregung ist nur noch zwischen 1470 und 1310 ein schwacher positiver Beitrag sichtbar. Die Amplitude des Ausbleich-Signals bei 1480 cm^{-1} ist gegenüber den Werten nach 1 ps um etwa 80 % zurückgegangen.

Diese Betrachtung lässt sich auch auf den Spektralbereich zwischen 1775 und 1575 cm^{-1} übertragen. Auch hier ist nach 1 ps ein dem invertierten Grundzustands-Spektrum sehr ähnliches Ausbleichen zu erkennen. Der Beitrag einer zu kleineren Wellenzahlen verschobenen induzierten Absorption ist um 1600 cm^{-1} sichtbar. Zwischen 1700 und 1620 cm^{-1} ist sie offenbar durch das sich überlappende und breite Ausbleichen im Bereich der Grundzustandsbanden

überlagert. Nach zehn Pikosekunden ist eine deutliche Erholung der Ausbleich-Signale zu erkennen, die mit dem Zerfall der induzierten Absorption um 1600 cm^{-1} verknüpft ist. Betrachtet man in den Abbildungen 5.14 bzw. 5.15 die mit dem angegebenen Faktor multiplizierten transienten Spektren nach 100 ps und 3 ns, zeigt sich ein praktisch konstantes Differenzsignal, das durch Absorptionsänderungen im Bereich der starken Ausbleich-Signale und einer Abnahme der schwachen induzierten Absorption um 1750 cm^{-1} moduliert wird. Dieses „Untergrundsignal“ erstreckt sich über beide Spektralbereiche mit einem positiven Differenzsignal zwischen 1500 und 1350 cm^{-1} und einem negativen Beitrag an den übrigen Spektralpositionen. Im Fingerprint-Bereich (Abbildung 5.15) zeigt sich, dass dieser Signalbeitrag sehr gut durch die blau gestrichelte Linie wiedergegeben wird, die der Absorptionsänderung bei einer Erwärmung des Lösungsmittels um etwa 50 mK entspricht (siehe Anhang 5.1.3). Mit dieser Zuordnung wird deutlich, dass dieser Beitrag auch in Abbildung 5.14 einen Großteil der nach 3 ns beobachteten Absorptionsänderungen erklären kann. Dabei zeigt sich in beiden Moleküle für Wellenzahlen größer 1750 cm^{-1} eine positive Abweichung von diesem Beitrag.

Neben diesen Gemeinsamkeiten sind nach 3 ns jedoch auch deutliche Unterschiede zwischen den transienten Spektren von TMP und (dT)₁₈ sichtbar. Zum einen ist das transiente Spektrum von (dT)₁₈ zwischen 1725 und 1600 cm^{-1} deutlich stärker moduliert. Zum anderen treten in (dT)₁₈ im Fingerprint-Bereich positive Absorptionsänderungen auf (1465 , 1402 und 1320 cm^{-1}), die in TMP nicht vorhanden sind.

Vergleich der Zeitverläufe

Nach den spektralen Eigenschaften der transienten Spektren werden nun die Kinetiken der Absorptionsänderungen in den Bereichen der Ausbleich-Signale und der induzierten Absorption untersucht. Dazu sind in Abbildung 5.16 die Zeitverläufe für die in den Abbildungen 5.14 und 5.15 durch gestrichelte Linien gekennzeichneten Spektralpositionen einander gegenübergestellt. Die Datenanpassung (siehe Abschnitt 3.3.3) erfolgt über eine Summe von Exponentialfunktionen (gefaltet mit der Apparatefunktion). Dabei wurde zunächst eine globale Datenanalyse durchgeführt, deren Ergebnisse — mit Angabe der Zeitkonstanten und Fitamplituden — in Anhang E dargestellt sind. In beiden Molekülen sind drei Zeitkonstanten im Pikosekunden-Bereich und weitere Zeitkonstanten in der Größenordnung von 100 ps bzw. 1 ns notwendig. Da jedoch, wie bereits in Abschnitt 5.2.1 diskutiert, für die Beschreibung der Verschiebung der induzierten Absorption ($< 10\text{ ps}$) eine exponentielle Datenanpassung nicht geeignet ist, wurde jeder Zeitverlauf in Abbildung 5.16 einzeln angepasst. Bei dieser Datenanpassung wurde für die Wiedergabe der „schnellen“ Kinetik im Bereich kleiner 10 ps eine Zeitkonstante frei iteriert, während für Zeiten größer 10 ps die Werte aus der globalen Datenanalyse übernommen und in der Fitroutine festgehalten wurden. Die Zeitverläufe erfordern für eine gute Repräsentation der Daten mindestens 4 Zeitkonstanten, die zusammen mit den entsprechenden Fitamplituden in Tabelle 5.2 angegeben sind.

Kinetiken im Pikosekunden-Bereich

Im Folgenden werden die bei der Datenanpassung gefundenen Zeitkonstanten für TMP und (dT)₁₈ miteinander verglichen. Auf der Pikosekunden-Zeitskala lassen sich sowohl die nach einer Pikosekunde auftretenden Zerfälle der induzierten Absorption als auch die Reduktion der Ausbleich-Signale mit sehr ähnlichen Zeitkonstanten beschreiben. Dies wird zum Beispiel

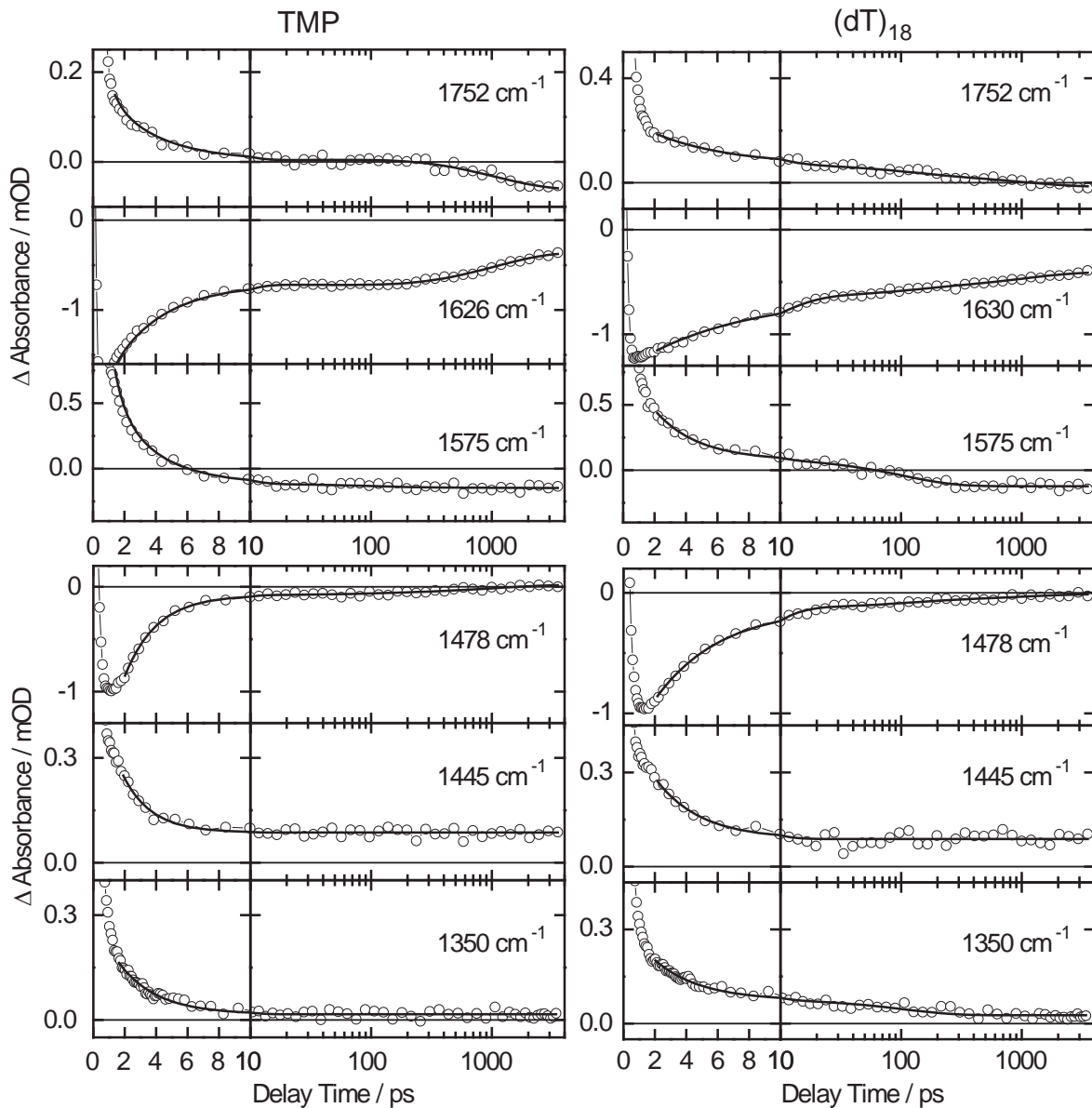


Abb. 5.16: Zeitverläufe für TMP (links) und $(dT)_{18}$ (rechts) an den angegebenen Spektralpositionen. Die Datenanpassung (durchgezogene Linien) erfolgt für Verzögerungszeiten größer 2 ps mit einer Summe von Exponentialfunktionen, die mit der Apparatefunktion gefaltet werden. In Tabelle 5.1 sind die entsprechenden Fit-Parameter angegeben.

in den für beide Thymin-Derivate nahezu spiegelsymmetrischen Signalverläufe bei 1478 und 1445 cm^{-1} deutlich. Im Fall von TMP liegen die Zeitkonstanten für die schnelle Komponente (τ_1) zwischen 1,8 und 3,1 ps. Für $(dT)_{18}$ ergeben sich Zeitkonstanten zwischen 2,8 und 3,9 ps. Eine Ausnahme bildet dabei nur der Zeitverlauf bei 1630 cm^{-1} der sich durch eine Zeitkonstante von etwa 7 ps anpassen lässt.

Probe	$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	τ_1 / ps	τ_2 / ps	τ_3 / ps	τ_4 / ps	a_1	a_2	a_3	a_4
TMP	1752	3,1	97	1073	∞	0,19	-0,013	0,077	-0,062
	1626	3,1	97	1073	∞	-1,32	0,066	-0,42	-0,36
	1575	2,1	97	∞	–	1,38	0,045	-0,15	–
	1478	2,3	97	1073	∞	-1,77	-0,004	-0,009	0,024
	1445	1,8	∞	–	–	0,49	0,086	–	–
	1350	2,5	∞	–	–	0,28	0,016	–	–
(dT) ₁₈	1752	3,3	104	1055	∞	0,18	0,04	0,048	-0,015
	1630	6,8	104	1055	∞	-0,69	-0,084	-0,16	-0,407
	1575	2,6	104	∞	–	0,79	0,22	-0,12	–
	1478	3,9	104	1055	∞	-1,23	-0,064	-0,056	-0,011
	1445	2,8	∞	–	–	0,39	0,088	–	–
	1350	2,8	104	∞	–	0,25	0,052	0,026	–

Tabelle 5.2: Fit-Parameter (Zeitkonstanten und Amplituden) für die Datenanpassung der Zeitverläufe in Abbildung 5.16. Die Fit-Funktion entspricht einer Summe von Exponentialfunktionen, die mit der Apparate-Funktion (Gauß-Funktion mit Halbwertsbreite von 350 fs (FWHM)) gefaltet werden. Die grau hinterlegten Zeitkonstanten sind einer globalen Datenanalyse entnommen und wurden in der Fit-Routine festgehalten.

Kinetiken im 100 Pikosekunden- und Nanosekunden-Bereich

In TMP lassen sich die Zeitverläufe bei 1575, 1445 und 1350 cm^{-1} mit nur einer schnellen Zeitkonstante und einem Offset („Unendlich“-Komponente) beschreiben. Dies ist in (dT)₁₈ nur bei 1445 cm^{-1} möglich. An allen anderen Spektral-Positionen sind weitere Zeitkonstanten für eine gute Beschreibung der Daten notwendig. Dabei liefern die Zeitkonstanten aus der globalen Datenanalyse (97 ps und 1073 ps für TMP, bzw. 104 ps und 1055 ps für (dT)₁₈) auch in der einzeln durchgeführten Datenanpassung eine sehr gute Repräsentation der Absorptionsänderungen.

Obwohl in beiden Proben ähnliche Zeitkonstanten auftreten unterscheiden sie sich deutlich in den Amplituden (siehe Tabelle 5.2). In TMP besitzt die 1 ns-Komponente eine im Vergleich zur 100 ps-Komponente wesentlich größere Amplitude und dominiert die Zeitverläufe bei 1752, 1626 und 1478 cm^{-1} . Dabei trägt sie insgesamt nur einen kleinen Anteil zur Reduktion des Ausbleichens bei 1626 und 1478 cm^{-1} bei. Anders ist die Situation in (dT)₁₈. Hier liegen die Amplituden der 100 ps-Komponente und 1 ns-Komponente in der gleichen Größenordnung. Beide Anteile tragen deutlich zum Zerfall der induzierten Absorption bei 1752 cm^{-1} und der Erholung des Grundzustands bei 1630 und 1478 cm^{-1} bei. Im Gegensatz dazu ist in den Zeitverläufen bei 1575 und 1350 cm^{-1} nur die 100 ps-Komponente deutlich zu erkennen. Die Unterschiede in den Zeitverläufen und den transienten Spektren sind Gegenstand des nächsten Abschnitts.

5.3.2 TMP und (dT)₁₈: Dateninterpretation

Die Beobachtung, dass die zeitaufgelösten IR-Messungen an TMP und (dT)₁₈ sehr ähnliche Absorptionsänderungen aufweisen, legt nahe, dass sich ein Großteil der angeregten Basen in (dT)₁₈ wie im Monomer TMP verhält. In Anbetracht der Ergebnisse von Crespo-Hernández

und Mitarbeitern ist dies nicht unerwartet. Sie konnten mit zeitaufgelöster UV/Vis-Absorptions-Spektroskopie zeigen, dass sowohl in TMP als auch in $(dT)_{18}$ etwa 85-90% der Basen nach UV-Anregung über eine schnelle interne Konversion (~ 700 fs) in den Grundzustand übergehen [CH05]. Zudem wurden für beide Thymin-Derivate langlebige Zustände mit Lebensdauern im 100 Pikosekunden-Bereich und für $(dT)_{18}$ auch ein Beitrag mit einer Zeitkonstante von 800 ps gefunden. Als mögliche Ursache für diese langlebigen Zustände wird für beide Moleküle die Besetzung von $^1n\pi^*$ -Zuständen diskutiert. Auf die Frage nach der Zeitskala für die Bildung von CPD-Schäden konnte jedoch in diesen Experimenten keine eindeutige Antwort gegeben werden. Die zeitaufgelösten IR-Messungen werden nun im Hinblick auf diese Frage und die aus den UV/Vis-Messungen bekannten Ergebnisse diskutiert.

IR-Absorption heißer Thymin-Basen

Die ersten Pikosekunden (< 10 ps) nach der UV-Anregung werden in beiden Molekülen durch starke Ausbleich-Signale an den Positionen der Grundzustands-Banden und eine zu kleineren Wellenzahlen verschobene induzierte Absorption dominiert. Die damit verbundenen sigmoidalen Signaturen in den transienten Spektren sind, wie in Abschnitt 5.1.3 diskutiert, charakteristisch für schwingungsangeregte (heiße) Grundzustands-Moleküle. Dabei bewirkt die Anharmonizität und die anharmonische Kopplung der hochfrequenten Schwingungsmoden an niederfrequente Moden eine spektrale Verschiebung der Infrarotabsorption, die zu den sigmoidalen Absorptionsänderungen führt. Das Verschwinden dieser Signalbeiträge ist ein Maß für den Energieübertrag an das Lösungsmittel [Sch04]. Abschätzungen zu der Kühlrate lassen sich deshalb zum Beispiel aus dem Zeitverlauf des Ausbleich-Signals bei 1478 cm^{-1} und der induzierten Absorption bei 1445 cm^{-1} in Abbildung 5.16 erhalten. Sowohl der Zerfall der induzierten Absorption als auch die Erholung des Ausbleich-Signals erfolgen mit einer Zeitkonstante von etwa 2 ps für TMP bzw. 4 ps für $(dT)_{18}$. Beide Werte stimmen damit, unter Berücksichtigung einer etwas langsameren Kühlrate in D_2O gegenüber H_2O [Mid07b], sehr gut mit den Angaben in [CH05, Kui05] überein.

Der Unterschied zwischen den Kühlraten im Monomer TMP und dem Oligomer $(dT)_{18}$ ist ähnlich groß wie zwischen den beiden Adenin-Derivaten AMP und poly(A), die in Abschnitt 5.2.1 untersucht wurden. Entsprechend stellt auch hier die unterschiedliche Umgebung der Basen eine Erklärung für das schnellere Abkühlen von TMP-Moleküle dar. Während in TMP jede Thymin-Base direkt von einer Lösungsmittel-Hülle umgeben ist, die einen effizienten Energietransfer an das Lösungsmittel erlaubt, ist in $(dT)_{18}$ ein großer Teil der Oberfläche durch weitere Thymin-Basen und nicht durch D_2O -Moleküle gegeben.

Die beim Abkühlen der heißen Moleküle an das Lösungsmittel abgegebene Schwingungs-Energie führt zu einer Erwärmung des Anregungsvolumens. Dieser Vorgang ist die Erklärung für die in den transienten Spektren nach 100 ps und 3 ns (Abbildungen 5.14 und 5.15) zu sehende Absorptionsänderung (blau gestrichelte Linie), die einer Temperaturerhöhung des Lösungsmittels von etwa 45 mK entspricht. Dieser Wert ist in sehr guter Übereinstimmung mit der unter den Anregungsbedingungen zu erwartenden Temperaturerhöhung von etwa 50 mK. Aufgrund der im Vergleich langsamen Wärmediffusion (siehe Anhang C.2) aus dem Beobachtungsvolumen (Millisekundenbereich) bleibt diese Signatur im betrachteten Zeitbereich (< 3 ns) praktisch konstant.

Eine Erklärung für das Auftreten heißer Grundzustands-Moleküle nach 1 ps bietet die

bereits in der Einleitung zu diesem Abschnitt erwähnte schnelle (< 1 ps) interne Konversion (IC) von Thymin-Basen nach UV-Anregung. Der Anteil der Basen, die dieser schnellen Desaktivierung folgen, lässt sich durch eine Analyse der Ausbleich-Signale abschätzen. Die Absorptionsänderungen im Bereich der Ausbleich-Signale spiegeln die Wiederbevölkerung des Schwingungs-Grundzustands wieder. Da das Ausbleich-Signal um 1480 cm^{-1} nur unwesentlich durch Beiträge anderer Absorptionsbanden überlagert wird, ist in diesem Bereich eine einfache Abschätzung möglich. Das Ausbleich-Signal bei 1478 cm^{-1} (Abbildung 5.16) zeigt zwischen einer und zwanzig Pikosekunden eine Reduktion, die etwa 90 % der angeregten TMP-Moleküle bzw. etwa 85 % der angeregten Thymin-Basen in (dT)₁₈ entspricht. Damit sind die hier bestimmten Ausbeuten für die IC in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus [CH05] und für die sehr ähnlichen transienten Spektren der Thymin-Derivate innerhalb der ersten 10 ps verantwortlich. Deutliche Unterschiede zeigen sich erst in den transienten Spektren nach 100 ps und 3 ns. Die dabei auftretenden Unterschiede im Fingerprint-Bereich könnten ein Hinweis auf die Bildung von Photoschäden in (dT)₁₈ sein.

Nachweis von Thymin-Dimeren

Eines der Hauptziele dieser Arbeit ist die Bestimmung der Zeitskala auf der die Bildung von Thymin-Dimeren in (dT)₁₈ abläuft. Zu diesem Zweck wurde in Kapitel 4.2 die IR-Absorption dieser Schäden bestimmt. Allerdings liegt die erwartete Quantenausbeute für diese Photoreaktion nur im Bereich weniger Prozent (2-3 %) [Mar05]. Demnach liefern über 90 % der angeregten Moleküle Signalbeiträge, die der Signatur des Photoschadens überlagert sein können. Dies trifft vor allem auf den Bereich der hochfrequenten Schwingungsbanden zwischen 1775 und 1575 cm^{-1} zu, in dem sich die Signale mehrerer Grundzustandsbanden überlagern. Da die Bildung des Zyklobutan-Rings mit einem Verschwinden der C=C Doppelbindung verknüpft ist (siehe Abschnitt 4.2) sollte es im Fall einer Bildung von Thymin-Dimeren zu einem Ausbleichen der Absorptionsbande um 1630 cm^{-1} kommen. Tatsächlich findet sich in zeitaufgelösten IR-Messungen an (dT)₁₈ ein Ausbleichen in diesem Bereich. Diese Absorptionsänderung könnte jedoch auch andere Ursachen haben. Zum einen wird dieser Bereich zu frühen Zeiten (< 10 ps) durch die Signatur der heißen Grundzustands-Moleküle überlagert, zum anderen könnte ein entsprechendes Ausbleich-Signal auch durch die Bildung anderer Photoprodukte oder langlebiger Zustände hervorgerufen werden. Diese Probleme treten im Fingerprint-Bereich zwischen 1310 und 1550 cm^{-1} nicht auf. Hier sollte sich die Bildung von Thymin-Dimeren eindeutig durch die Absorption der in Abschnitt 4.2 bestimmten Dimer-Marker-Banden (1465 , 1402 , 1320 cm^{-1}) nachweisen lassen. Aus diesem Grund wird in der weiteren Diskussion dieser Spektralbereich betrachtet.

In Abbildung 5.17 A sind die transienten Spektren von TMP und (dT)₁₈ bei einer Verzögerungszeit von 3 ns dargestellt. Dabei zeigt sich, dass die Absorptionsänderung durch die Erwärmung des Lösungsmittels in beiden Proben in guter Näherung gleich groß ist. Zwei Punkte sind dafür verantwortlich: (i) Zum einen wurde die Konzentration der Thymin-Basen so gewählt, dass die optische Dichte der Proben bei der Anregungswellenlänge und damit die Anzahl der pro Laserschuss absorbierten Photonen in etwa gleich groß ist. (ii) Zum anderen verhält sich offenbar ein Großteil der angeregten Thymin-Basen in (dT)₁₈ ähnlich wie in TMP, so dass in beiden Thymin-Derivaten die absorbierte Energie auf ähnlichen Zeitskalen an das Lösungsmittel abgegeben wird. Unterschiede zeigen sich jedoch bei 1465 , 1402 und

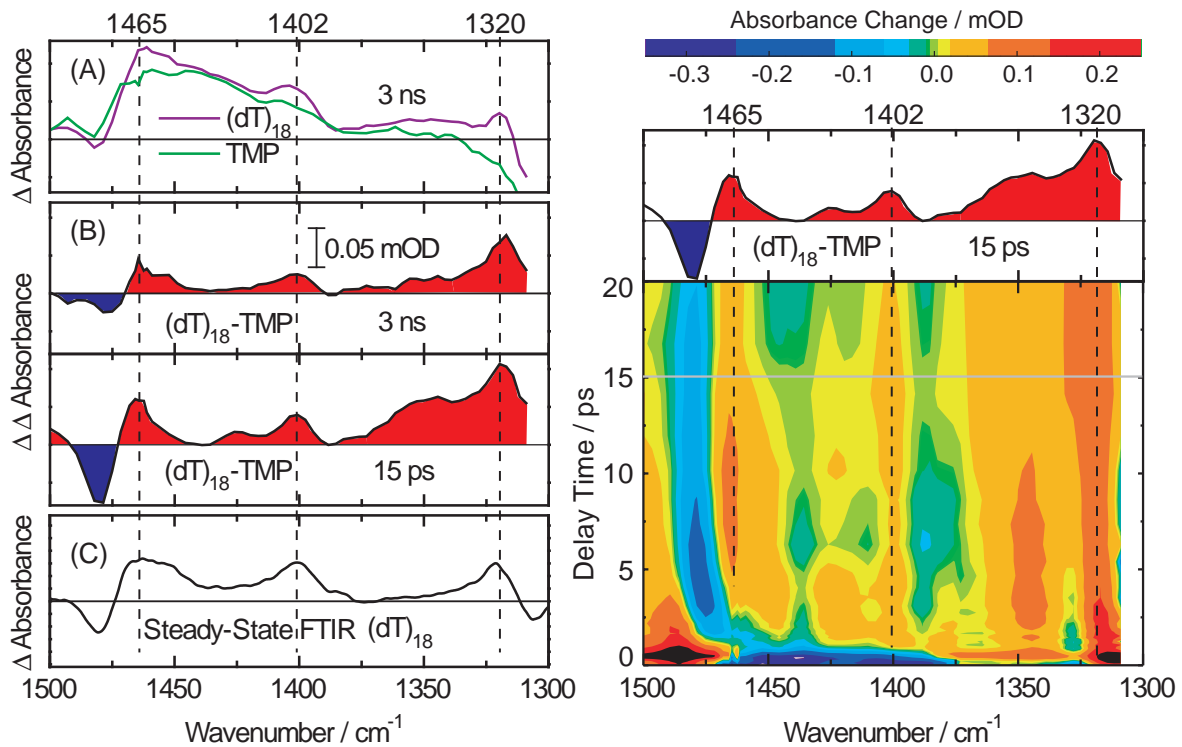


Abb. 5.17: Links: Vergleich der transienten Spektren von TMP und (dT)₁₈ mit der IR-Signatur von CPD-Schäden. (A) Transiente Spektren von TMP und (dT)₁₈ nach 3 ns. (B) Differenz-Spektren zwischen (dT)₁₈ und TMP für 3 ns und 15 ps. (C) Differenzspektrum zur Bildung von CPD-Schäden zwischen Thymin-Basen in (dT)₁₈ (siehe stationäre Belichtungs-Experimenten in Abschnitt 4.3). Rechts: Konturdarstellung der Differenz zwischen (dT)₁₈ und TMP. Das Auftreten der Dimer-Marker-Banden zwischen 1 und 20 ps zeigt, dass die Bildung von CPD-Schäden auf einer Zeitskala von einer Pikosekunde erfolgt.

1320 cm⁻¹. An diesen Spektralpositionen sind in (dT)₁₈ zusätzlich positive Absorptionsänderungen sichtbar. Da in diesem Spektralbereich die Grundzustands-Absorptionsspektren der beiden Moleküle sehr ähnlich sind, lassen sich diese spektralen Unterschiede durch eine Subtraktion des TMP-Signals vom (dT)₁₈-Signal hervorheben. Das auf diese Weise gewonnene Differenzspektrum nach 3 ns ist in Abbildung 5.17 B dargestellt. Darunter ist ein entsprechendes Differenz-Spektrum für eine Verzögerungszeit von 15 ps zu sehen. Beide können nun mit dem für die CPD-Bildung erwarteten Differenzspektrum (siehe Abbildung 5.17 C) aus den stationären Belichtungs-Experimenten (siehe Abschnitt 4.3) verglichen werden. Sowohl nach 3 ns als auch nach 15 ps stimmen die Unterschiede zwischen TMP und (dT)₁₈ sehr gut mit den Dimer-Marker-Banden überein, und zeigen eindeutig, dass Dimer-Schäden bereits 15 ps nach der UV-Anregung vorhanden sind.

Die Entwicklung dieser Banden zwischen 0 und 20 ps ist in Abbildung 5.17 in Form einer Konturdarstellung gezeigt. In dieser Darstellung wird deutlich, dass die Absorption der Dimer-Marker-Banden bei 1402 und 1320 cm⁻¹ bereits 1 ps nach dem Zeitnullpunkt auftritt. Bei der dritten Spektralposition (1465 cm⁻¹) wird die Dimer-Marker-Bande für Verzögerungszeiten kleiner 4 ps durch einen negativen Beitrag überlagert, der auf die unterschiedlichen Kühlraten von TMP und (dT)₁₈ und die Differenzbildung zurückzuführen ist. Die nach IC entstehenden

heißen Moleküle führen im Bereich der Grundzustands-Absorptionsbande um 1480 cm⁻¹ zu einer ausgeprägten sigmoidalen Signatur in den transienten Spektren von TMP und (dT)₁₈. Bei der Subtraktion ((dT)₁₈ - TMP) werden die Unterschiede im Abkühlverhalten deutlich und überlagern die positive Absorption durch das Entstehen des Dimer-Schadens bei 1465 cm⁻¹ für Verzögerungszeiten kleiner 4 ps.

Aussagen zur Bildung von CPD-Schäden für den Zeitbereich kleiner 1 ps sind sehr schwierig. In diesem Zeitbereich werden die Signale, wie in Abschnitt 5.1 diskutiert, durch die IR-Absorption der angeregten elektronischen Zustände ($\tau_{IC} \sim 700$ fs) und Lösungsmittelleffekte überlagert. Der eindeutige Nachweis der Dimer-Marker-Banden bereits 1 ps nach der UV-Anregung zeigt jedoch, dass die Dimer-Bildung extrem schnell abläuft und parallel zur internen Konversion sichtbar wird.

Bestimmung der Quantenausbeute

Neben der Bestimmung der Zeitskala, auf der die Bildung von CPD-Schäden abläuft, ist die Bestimmung der Quantenausbeute der Reaktion von ebenso großer Bedeutung. Die Quantenausbeute ergibt sich aus der Anzahl der nach UV-Absorption gebildeten Dimere, geteilt durch die Anzahl der angeregten Thymin-Basen. Unter der Annahme, dass jede angeregte Thymin-Base in (dT)₁₈ auch zu einem Dimer mit einer benachbarten Thymin-Base weiter reagieren kann — dies ist unter den verwendeten Anregungsintensitäten und Konzentrationen gewährleistet —, lässt sich die Quantenausbeute auch durch die Konzentration der Thymin-Basen (c_0) vor der Anregung und der Konzentration der gebildeten CPD-Schäden (c_{CPD}) ausdrücken:

$$\Phi_{CPD} = \frac{c_{CPD}}{\eta \cdot c_0}. \quad (5.4)$$

In Gleichung 5.4 wird der Anteil der tatsächlich angeregten Thymin-Basen durch den Faktor η berücksichtigt. Diese Größe lässt sich zum Beispiel aus dem initialen Ausbleichen der Grundzustands-Absorptionsbande bei 1480 cm⁻¹ abschätzen und liegt bei etwa 5 %. Eine Abschätzung basierend auf der Energie der Anregungsimpulse, dem Anregungsvolumen, der Absorption und der Konzentration liefert mit rund 5,2 % eine vergleichbare Größe. Mit den in den zeitaufgelösten IR-Messungen bestimmten Absorptionsänderung ΔA_{fs} und der in Abschnitt 4.3.2 für (dT)₁₈ **pro Base** bestimmten Extinktionskoeffizienten ϵ_{CPD} und $\epsilon_{(dT)_{18}}$ ergibt sich die Quantenausbeute mit

$$\Delta A_{fs} = c_{CPD} \cdot d(2\epsilon_{CPD} - 2\epsilon_{(dT)_{18}}) \quad (5.5)$$

zu:

$$\Phi_{CPD} = \frac{1}{\eta \cdot c_0} \cdot \frac{\Delta A_{fs}}{d(2\epsilon_{CPD} - 2\epsilon_{(dT)_{18}})}. \quad (5.6)$$

Bei der Aufstellung der Gleichung 5.5 wurde berücksichtigt, dass bei der Anregung eines Thymins gemäß der Gleichung $[T^* + T \rightarrow T=T]$ zwei Thymin-Basen reagieren. Für die Bestimmung der Quantenausbeute ist die Dimer-Marker-Bande um 1402 cm⁻¹ am geeignetsten, da in ihrer Nähe keine starke Grundzustands-Absorptionsbande liegt die das Signal der Thymin-Dimere überlagert.

Unter den experimentellen Bedingungen werden etwa 5 % der Thymin-Basen im Anregungsvolumen angeregt. Die in Abbildung 5.17 A bestimmte Differenz zwischen den transienten Spektren von (dT)₁₈ und TMP (ΔA_{fs}) ist ein Maß für die Absorptionsänderung aufgrund

der Dimer-Bildung und beträgt bei 1402 cm^{-1} etwa $0,025\text{ mOD}$. Daraus ergibt sich mit den Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{\text{CPD}} \sim 150\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bzw. $\epsilon_{(\text{dT})_{18}} \sim 40\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und der Ausgangskonzentration ($c_0 \sim 10\text{ mM}$) eine Quantenausbeute von $\Phi_{\text{CPD}} \cong 2,5\%$. Aufgrund der Messungenauigkeiten (Angabe der Extinktionskoeffizienten, Schichtdicke) sowie den Unsicherheiten beim Abschätzen des Anteils der angeregten Moleküle liegt die Unsicherheit bei $\pm 0,5\%$ und demnach die Quantenausbeute zwischen 2 und 3 %.

Zeitskalen der Dimer-Bildung

Obwohl die Darstellung in Abbildung 5.17 nahelegt, dass die oben bestimmte Quantenausbeute bereits eine Pikosekunde nach der Anregung vorliegt, stellt sich die Frage, ob es nach einer initialen Bildung von Thymin-Dimeren ($< 1\text{ ps}$) zu weiteren Photoreaktionen auf einer längeren Zeitskala kommt? Zum Beispiel wurde ja in Abschnitt 4.3 die Bildung von CPD-Schäden zwischen TMP-Molekülen nachgewiesen, zwischen denen die Reaktion diffusionslimitiert und bei den verwendeten Konzentrationen nur über einen langlebigen Triplett-Zustand möglich ist. Zudem sind in den Messungen an $(\text{dT})_{18}$ und TMP Absorptionsänderungen auf der 100-Pikosekunden-Zeitskala sichtbar, die möglicherweise mit der Dimer-Bildung in $(\text{dT})_{18}$ verknüpft sind. Diese Frage lässt sich durch einen Vergleich der Zeitverläufe von TMP und $(\text{dT})_{18}$ an den Positionen der Dimer-Marker-Banden untersuchen. In Abbildung 5.18 ist die Differenz der Absorptionsänderungen zwischen TMP und $(\text{dT})_{18}$ ein Maß für den Anteil der in $(\text{dT})_{18}$ gebildeten CPD-Schäden. Für die Zeitverläufe bei 1402 und 1320 cm^{-1} ist die Differenz zwischen $(\text{dT})_{18}$ entsprechend der Konturdarstellung in Abbildung 5.17 bis 1 ps nach UV-Anregung vorhanden. Bei 1465 cm^{-1} wird diese Signatur für Zeiten kleiner 4 ps — wie bereits für die Konturdarstellung in Abbildung 5.17 diskutiert — durch die unterschiedlichen Kühlzeiten der beiden Proben überlagert. Im Rahmen der Messungenauigkeit findet sich nach Abklingen der Kühlprozesse ($> 10\text{ ps}$) jedoch in keinem der Zeitverläufe eine Zunahme dieses Differenzsignals. Offenbar tragen also die in den Messdaten vor allem im Bereich zwischen 1775 und 1575 cm^{-1} sichtbaren Zerfälle von Zuständen — mit Zeitkonstanten im Bereich von 100 ps und 1 ns — nicht wesentlich zur Dimer-Bildung bei. Aufgrund der sehr guten Übereinstimmung der oben bestimmten Quantenausbeute mit den Literaturangaben ist auch auf einer noch längeren Zeitskala nicht mit einem weiteren signifikanten Beitrag zu rechnen.

Diskussion der langlebigen Zustände

Die bisherige Dateninterpretation ergab, dass etwa $85 - 90\%$ der angeregten Thymin-Basen in TMP und $(\text{dT})_{18}$ eine schnelle Desaktivierung über eine interne Konversion ($< 1\text{ ps}$) in den Grundzustand erfahren. Eine weitere Wiederbevölkerung des Grundzustands erfolgt erst auf der 100 ps - und ns -Zeitskala. Dabei ist auch nach 3 ns noch keine vollständige Erholung im Bereich der Grundzustands-Banden erreicht. Bevor der mögliche Charakter dieser langlebigen Zustände diskutiert wird, werden die nach 3 ns auftretenden transienten Spektren unter Berücksichtigung der bisher eindeutig bestimmten Signalbeiträge diskutiert. Zu diesen Signalbeiträgen gehört neben der Erwärmung des Lösungsmittels ($\Delta T \sim 50\text{ mK}$) auch die Bildung von CPD-Schäden in $(\text{dT})_{18}$. Dem „Fehlen“ von Molekülen im Grundzustand wird bei der folgenden Analyse durch ein invertiertes Grundzustands-Spektrum Rechnung getragen. Die entsprechenden Signalbeiträge für TMP und $(\text{dT})_{18}$ sind in Abbildung 5.19 dargestellt. Dabei sind in der oberen Hälfte der Graphen die einzelnen Beiträge (Lösungsmittel (blau),

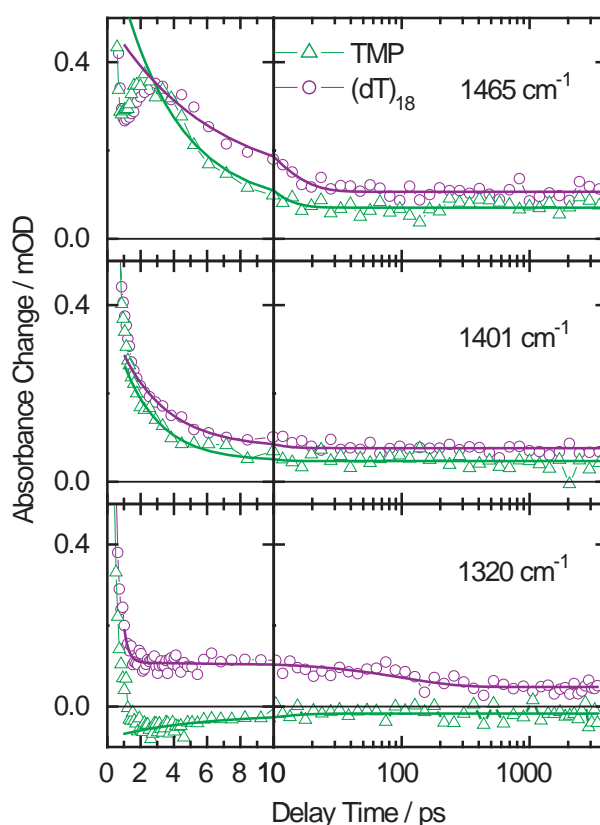


Abb. 5.18: Zeitverläufe an den angegebenen Wellenzahlen im Bereich der Dimer-Marker-Banden für TMP (grüne Kreise) und (dT)₁₈ (rote Dreiecke). Die Linien entsprechen einer Datenanpassung aus einer Summe von Exponentialfunktionen. An allen drei Spektral-Positionen ist ein deutlicher Absorptions-Unterschied zwischen TMP und (dT)₁₈ zu erkennen, der ein Maß für die Ausbeute an Dimer-Schäden darstellt. Im logarithmisch aufgetragenen Zeitbereich zwischen 10 ps und 3 ns ist keine weitere Dimer-Bildung nachweisbar.

CPD-Schäden (rot), invertierte Grundzustands-Spektren für TMP (grün) und (dT)₁₈ (violett) dargestellt. In der unteren Hälfte wird die Summe aus diesen Beiträgen (grau gestrichelte Linie) mit den transienten Spektren nach 3 ns verglichen.

Im Fingerprint-Bereich zwischen 1550 und 1310 cm^{-1} lässt sich das transiente Spektrum von TMP sehr gut durch eine Summe aus dem Signal der Lösungsmittelerwärmung und einem invertierten Grundzustands-Spektrum, das etwa 4% der ursprünglich angeregten TMP-Moleküle entspricht, wiedergeben. Eine ebenso gute Repräsentation des transienten Spektrums ist für (dT)₁₈ möglich, wenn man zum Lösungsmittel-Beitrag ein invertiertes Grundzustands-Spektrum addiert, das etwa 3% der angeregten Thymin-Basen entspricht und zusätzlich das Signal der CPD-Bildung für eine Quantenausbeute von 3% berücksichtigt. Überträgt man die im Fingerprint-Bereich erhaltenen Signalbeiträge auf den Bereich der Carbonyl-Banden zwischen 1700 und 1600 cm^{-1} , zeigt sich auch in diesem Spektralbereich eine recht gute Übereinstimmung. So ist zum Beispiel für (dT)₁₈ auch in diesem Spektralbereich die Signatur des CPD-Schadens deutlich als Modulation des transienten Spektrums nach 3 ns sichtbar. Deutliche Abweichungen ergeben sich jedoch im Bereich der langlebigen induzierten

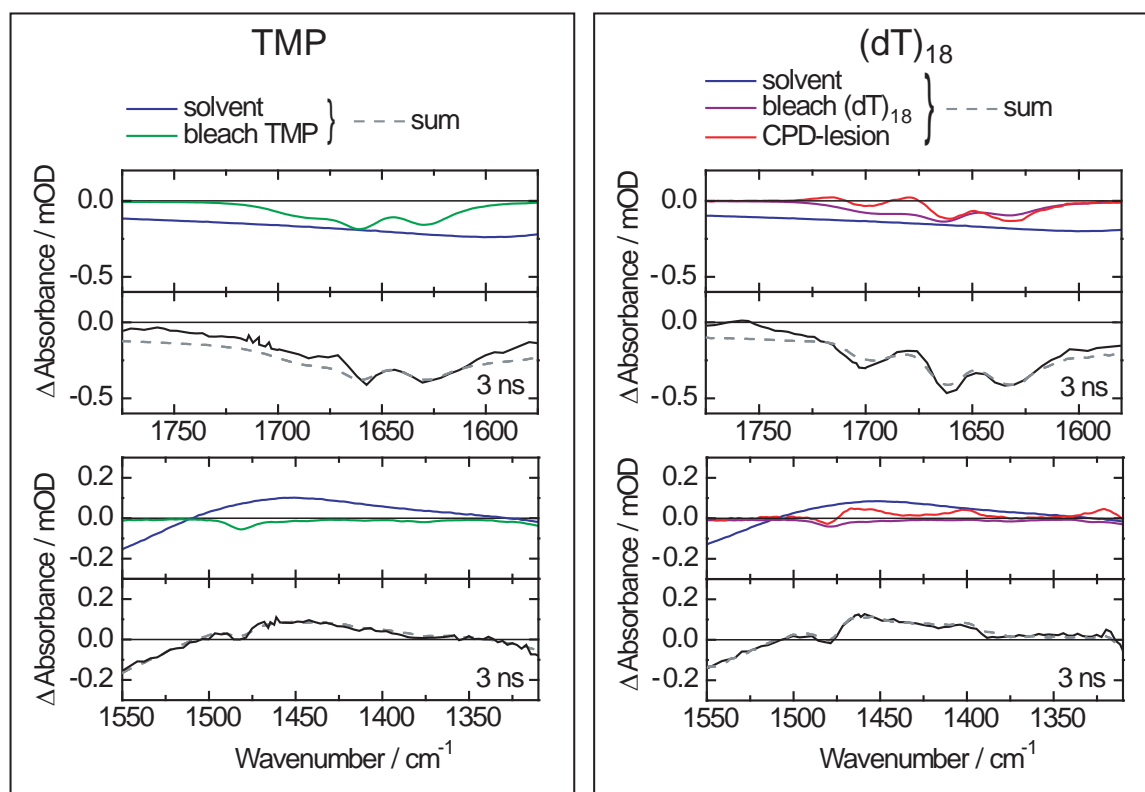


Abb. 5.19: Analyse der Signalbeiträge in den transienten Spektren nach 3 ns für TMP (links) und $(dT)_{18}$ (rechts). Beiträge durch die Erwärmung des Lösungsmittels sind blau eingezeichnet. Dem Fehlen an Grundzustands-Molekülen wird durch invertierte Grundzustands-Spektren für TMP (grün) und $(dT)_{18}$ (violett) Rechnung getragen. Die Absorptionsänderung durch die Bildung von CPD-Schäden ($\sim 3\%$) in $(dT)_{18}$ ist rot eingezeichnet. Im Fingerprint-Bereich zwischen 1550 und 1310 cm^{-1} ist im Rahmen der Messgenauigkeit eine sehr gute Anpassung der transienten Spektren mit diesen Beiträgen möglich (gestrichelte graue Linie). Dagegen zeigen sich im Bereich der Carbonyl-Schwingungen ($1775 - 1575\text{ cm}^{-1}$) kleine aber deutliche Abweichung vor allem für Wellenzahlen größer 1700 cm^{-1} .

Absorption um 1750 cm^{-1} .

Für diese Abweichungen und das „Fehlen“ an Grundzustands-Molekülen im Prozent-Bereich können langlebige elektronische Zustände oder Photoprodukte verantwortlich sein. Zu möglichen Photoprodukten zwischen Thymin-Basen gehören neben den CPD-Schäden zum Beispiel Photohydrate oder der (6-4)-Photoschaden. Allerdings ist aus der Literatur bekannt, dass die Ausbeuten für diese Reaktionen in den betrachteten Systemen weit unter einem Prozent liegen [Cad92]. Sie scheiden demnach als Begründung aus. Stattdessen werden in den nächsten Abschnitten weitere Möglichkeiten diskutiert.

Photo-Ionisation und Zwei-Photonen-Prozesse?

Wie in Abschnitt 5.1.2 für AMP diskutiert, könnte es auch bei der UV-Anregung der Thymin-Derivate zu einer Photoionisation der Basen kommen. Bei der Photoionisation von Thymin entsteht ein Thymin-Kation, das entweder mit einem Elektron in Lösung rekombinieren oder über Folgereaktionen mit den umgebenden Wassermolekülen weiter reagieren kann. Zum Beispiel ist eine Deprotonierung $[\text{Thy}^+ \rightarrow \text{Thy}^\bullet(-\text{H})]$ oder Hydratisierung $[\text{Thy}^+ \rightarrow \text{Thy}^\bullet(\text{OH})]$ der Base möglich [Ora85, Cad90]. Auch mit den bei der Ionisation entstehenden solvatisierten

Elektronen kann eine Reihe von Produkten [$e_{aq}^- + \text{Thy} \rightarrow \text{Thy}^- \xrightarrow{H_2O} \text{Produkte}$] gebildet werden [Ste92]. Bisher sind jedoch keine IR-Spektren dieser Photoprodukte bekannt, die eine eindeutige Zuordnung in den transienten Spektren erlauben würde. Dennoch lassen sich Obergrenzen für die Bildung möglicher Ionisationsprodukte angeben.

In Anbetracht der Ergebnisse aus [Mar06] scheint dabei ein signifikanter Beitrag durch eine Ein-Photonen-Ionisation äußerst unwahrscheinlich. Weder für TMP noch für das Thymin-Oligomer (dT)₂₀ wurde in Belichtungs-Experimenten mit UV-Strahlung (266 nm) eine signifikante Ein-Photonen-Ionisation beobachtet. Eine andere Möglichkeit wäre ein Zwei-Photonen-Prozess, der zur Ionisation von Thymin-Basen führt [Ora85, Reu96, Reu00]. Da die Zwei-

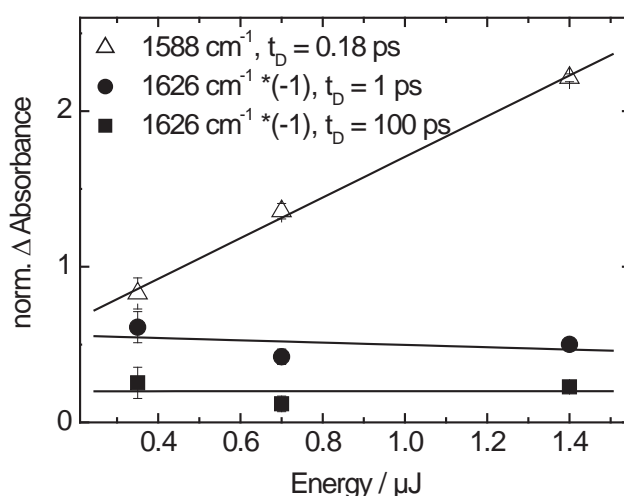


Abb. 5.20: Normierte Absorptionsänderung für (dT)₁₈ in Abhängigkeit von der Anregungsenergie. Dargestellt ist die Abhängigkeit nahe dem Zeitnullpunkt (Dreiecke) bei 1588 cm^{-1} und im Bereich der Ausbleich-Signale bei 1626 cm^{-1} nach 1 und 100 ps (Kreise und Quadrate). Die Werte bei 1626 cm^{-1} sind invertiert dargestellt. Die Datenanpassung erfolgt über eine lineare Fitfunktion. Eine Steigung ungleich Null weist auf eine quadratische Abhängigkeit der Absorptionsänderungen von der Anregungsenergie und einen Zwei-Photonen-Prozess hin. Eine Steigung gleich Null kennzeichnet dagegen einen Ein-Photonen-Prozess.

Photonen-Ionisation quadratisch mit der Anregungsintensität skaliert, lässt sich ihr Auftreten durch Variation der Anregungsintensität überprüfen. Da eine entsprechende Datenanalyse bereits für poly(A) durchgeführt wurde, wird an dieser Stelle auf eine erneute ausführliche Darstellung der Datenanpassung verzichtet und auf die Ausführungen in Abschnitt 5.2.2 verwiesen.

Für die in Abbildung 5.20 dargestellten Messergebnisse wurde die Anregungsenergie bei identischen Bündelparametern variiert (Anregungsintensität \sim Anregungsenergie) und die Absorptionsänderung in (dT)₁₈ bestimmt. Aufgetragen ist die normierte Absorptionsänderung ($\frac{\Delta A}{E}$) an zwei Spektralpositionen in Abhängigkeit von der Anregungsenergie. Während sich die normierten Absorptionsänderungen bei 1588 cm^{-1} nahe dem Zeitnullpunkt durch eine Gerade mit einer Steigung ungleich Null beschreiben lässt, ist in den beiden anderen Signalverläufen bei 1626 cm^{-1} die Steigung im Rahmen der Unsicherheiten in guter Näherung gleich Null. Diese Beobachtungen lassen sich wie folgt interpretieren.

Die quadratische Abhängigkeit des „Nullpunkt-Signals“ kann, wie in Abschnitt 5.1.2 diskutiert, durch die Zwei-Photonen-Ionisation des Lösungsmittels erklärt werden. Da das bei

diesem Prozess entstehende Intermediat auf dem Weg zum solvatisierten Elektron einen sehr hohen Extinktionskoeffizienten im MIR besitzt, ist auch bei einer geringen Ionisationsrate ein deutliches Signal zu erwarten (siehe Diskussion in Abschnitt 3.4.1). Das Fehlen eines deutlichen Zwei-Photonen-Effekts nach 1 ps und 100 ps zeigt dagegen, dass dieser Prozess für die in den transienten Spektren betrachteten Ausbleich-Signale nur eine untergeordnete Rolle spielt. Da den Pyrimidin-Basen (Thymin, Cytosin) eine im Vergleich zu den Purin-Basen (Adenin, Guanin) geringere Ionisationsrate zugeordnet wird [CH04a], ist dieses Ergebnis für $(dT)_{18}$ nicht unerwartet. Bereits in Abschnitt 5.2.2 wurde eine mögliche Photoionisation von AMP und poly(A) unter denselben Anregungsbedingungen diskutiert. Für AMP ergab sich dabei eine Ionisations-Obergrenze von etwa 1-2 % der angeregten Adenin-Basen. Da jedoch wie in [Reu00] gezeigt, die Ionisations-Wahrscheinlichkeit für Adenin doppelt so hoch ist wie für Thymin, stellt dies auch eine Obergrenze für die Thymin-Derivate dar.

Langlebige elektronische Zustände

Eine andere Erklärung für die beobachteten Kinetiken im 100 Pikosekunden- und Nanosekunden-Bereich sind langlebige elektronische Zustände, die durch Ein-Photonen-Übergänge besetzt werden. Entsprechende Singulett- und Triplett-Zustände sind Gegenstand der folgenden Betrachtung.

Singulett-Zustände Die Absorption der UV-Photonen erfolgt in den Thymin-Derivaten durch einen $^1\pi\pi^*$ -Übergang. Eine Beteiligung und direkte Besetzung eines ebenfalls auftretenden $^1n\pi^*$ -Übergangs bei der UV-Absorption kann, wie in Abschnitt 4.2 diskutiert, aufgrund des symmetrie-verbottenen Charakters und der sehr kleinen Oszillatorenstärke vernachlässigt werden. Aus dem angeregten $^1\pi\pi^*$ -Zustand kann das Molekül über eine schnelle interne Konversion in den Grundzustand übergehen. Für diesen sehr schnellen Prozess (< 1 ps) wird in theoretischen Studien an Thymin eine konische Durchschneidung des $^1\pi\pi^*$ -Zustands und des Grundzustands verantwortlich gemacht [Mer06]. Zusätzlich ist aus den bei der UV-Absorption besetzten $^1\pi\pi^*$ -Zuständen auch eine Besetzung von Singulett-Zuständen mit $n\pi^*$ -Charakter denkbar. Diese Möglichkeit wird schon seit längerer Zeit für Thymin-Basen in der Gas-Phase diskutiert und für das Auftreten langlebiger Zustände im ns-Bereich verantwortlich gemacht [CH04a, Can05]. In der Gas-Phase besitzt der $^1n\pi^*$ -Zustand gemäß quantenmechanischer Berechnungen eine niedrigere Energie als der bei der Anregung besetzte $^1\pi\pi^*$ -Zustand. Nach der Anregung in den $^1\pi\pi^*$ -Zustand kann der energetisch tiefer liegende $^1n\pi^*$ -Zustand erreicht und als Desaktivierungspfad genutzt werden [SP07].

In Lösung kann sich die energetische Reihenfolge der angeregten Zustände von DNA-Basen jedoch deutlich verändern [Gus06]. Dabei gehen theoretische Studien davon aus, dass es, wie in Abbildung 5.21 schematisch dargestellt, in Lösung zu einer deutlichen Anhebung des $^1n\pi^*$ -Zustands gegenüber den zunächst besetzten $^1\pi\pi^*$ -Zustand kommen kann [CH04a]. Für die Basen Thymin und Uracil sagen Berechnungen sogar eine Umkehrung der energetischen Reihenfolge voraus [CH04a]. Liegt der $^1n\pi^*$ -Zustand jedoch energetisch höher als der $^1\pi\pi^*$ -Zustand, ist gemäß dem einfachen Energieniveauschema eine anschließende Besetzung dieses Zustands nicht möglich. Allerdings wird in dieser Darstellung nur die energetische Lage der Niveaus an den Grundzustands-Geometrien (Frank-Condon-Bereich) betrachtet. Bewegt man sich jedoch auf der Potential-Fläche des angeregten Zustands kann sich die energetische Reihenfolgen der Energieniveaus verändern und eine Besetzung zunächst energetisch nicht

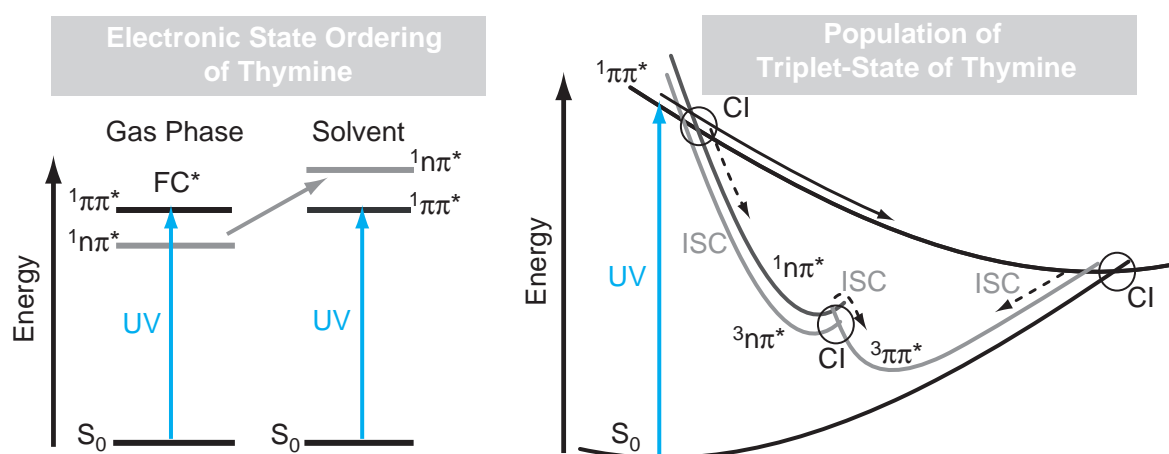


Abb. 5.21: Links: Schematische Darstellung der energetischen Reihenfolge für den $^1n\pi^*$ - und $^1\pi\pi^*$ -Zustand aus theoretischen Rechnungen. Beim Übergang von der Gas-Phase in wässrige Lösung ist für den $^1n\pi^*$ -Zustand mit einer energetischen Anhebung gegenüber dem $^1\pi\pi^*$ -Zustand zu rechnen. Dies kann zu einer Umkehrung der energetischen Reihenfolge der elektronischen Zustände im Frank-Condon-Bereich führen. Rechts: Schematische Darstellung zur Beschreibung der nach UV-Anregung auftretenden elektronischen Zustände in Thymin. Neben der Besetzung eines $^1n\pi^*$ -Zustands und der internen Konversion in den Grundzustand (S_0) über eine konische Durchschneidungen (CI) zeigt die Abbildung mögliche Übergänge (ISC) in die Triplett-Zustände ($^3n\pi$, $^3\pi\pi^*$). Die Abbildung orientiert sich an der Darstellung in [SP07].

zugänglicher Zustände nach dem Verlassen des Frank-Condon-Bereichs möglich werden [SA06, Har06]. Zum Beispiel sagen theoretische Studien für die Pyrimidin-Base Uracil eine konische Durchschneidung voraus, die einen Übergang aus dem angeregten $^1\pi\pi^*$ -Zustand in den $^1n\pi^*$ -Zustand ermöglicht [Mat04]. Auch für Thymin wird — neben der bereits erwähnten konischen Durchschneidung für einen Übergang in den elektronischen Grundzustand — eine konische Durchschneidung für einen Übergang zwischen der Potentialfläche des $^1\pi\pi^*$ -Zustands und des $^1n\pi^*$ -Zustands vorhergesagt. Beide sind in der Abbildung 5.21 (rechts) zur Lage elektronischer Übergänge in Thymin schematisch dargestellt [SP07].

In experimentellen Studien von Hare und Mitarbeitern an verschiedenen Pyrimidin-Derivaten wird das Auftreten langlebiger $^1n\pi^*$ -Zustände auf einen entsprechenden Übergang zurückgeführt [Har06, Har07a]. Auch in den zeitaufgelösten UV/Vis-Experimenten an TMP und (dT)₁₈ wird eine Besetzung von $^1n\pi^*$ -Zuständen für die auf der 100 ps-Zeitskala auftretenden Kinetiken verantwortlich gemacht [CH05]. Für TMP wurde dabei eine Zeitkonstante von etwa 130 ps für den Zerfall der $^1n\pi^*$ -Zustände angegeben. In (dT)₁₈ tritt bei der Datenanpassung der UV/Vis-Messungen eine weitere Zeitkonstante mit etwa 800 ps auf. Aufgrund der in TMP und (dT)₁₈ sehr ähnlichen Ausbeuten für die langlebigen Anteile ($\sim 10\%$), wird vermutet, dass auch im Oligomer (dT)₁₈ ein $^1n\pi^*$ -Zustand für die langlebigen Anteile verantwortlich ist.

Eine andere Erklärung für die langlebigen Zustände in (dT)₁₈ wäre die Bildung von Excimer-ähnlichen Zuständen wie in poly(A). Jedoch wurden in den zeitaufgelösten UV/Vis-Messungen beim direkten Vergleich der Messungen zwischen TMP und (dT)₁₈ keine Hinweise auf die Bildung dieser Zustände gefunden [CH05]. Tatsächlich zeigen Studien an Thymin-Oligomeren (dT)_n, dass in diesen Molekülen nur ein geringer Anteil der Basen in Stapeln angeordnet ist [Mil99], die eine Bildung von Excimer-Zuständen begünstigen könnten.

Triplett-Zustände Für TMP ist in wässriger Lösung nach UV-Anregung mit einer Triplett-Ausbeute (niedrigster Triplett-Zustand $^3\pi\pi^*$) von 1-2 % zu rechnen. Dabei wird für den niedrigsten Triplett-Zustand ($^3\pi\pi$) eine Lebensdauer im Mikrosekunden-Bereich angegeben [Cad92]. Obwohl die Bildung von Triplett-Zuständen für die Base Thymin bereits seit langem bekannt ist, und zahlreiche Experimente durchgeführt wurden, ist über den genauen Mechanismus der zur Besetzung dieser Zustände führt, noch sehr wenig bekannt. Erst in den letzten Jahren wurden weitere Anstrengungen in diese Richtung unternommen. Dabei sind theoretische Arbeiten meist auf einzelne Thymin-Basen in der Gasphase beschränkt. In Abbildung 5.21 (rechts) sind zum Beispiel die Ergebnisse einer kürzlich veröffentlichten Studie zur Berechnung der elektronischen Zustände und Übergänge für Thymin in der Gasphase dargestellt [SP07]. Neben den im vorhergehenden Abschnitt bereits angesprochenen konischen Durchschneidungen (CI) für Singulett-Singulett Übergänge aus dem $^1\pi\pi^*$ -Zustand in einen $^1n\pi^*$ -Zustand in den Grundzustand (S_0) sind Positionen für die Singulett-Triplett-Übergänge (ISC) eingezeichnet. Die Studie weist daraufhin, dass es neben einer Interkombination aus dem angeregten $^1\pi\pi^*$ -Zustand in den niedrigsten Triplett-Zustand ($^3\pi\pi^*$) auch die Möglichkeit einer Interkombination in einen $^3n\pi^*$ -Zustand gibt, der energetisch sehr nahe dem $^1n\pi^*$ -Zustand liegt. Sowohl aus dem $^3n\pi^*$ - als auch aus dem $^1n\pi^*$ -Zustand sind Übergänge in den niedrigsten Triplett-Zustand ($^3\pi\pi^*$) möglich.

Für die Besetzung von Triplett-Zuständen ($^3\pi\pi$) aus einem nach UV-Anregung besetzten $^1n\pi^*$ -Zustand gibt es bereits erste experimentelle Hinweise. Zum Beispiel wird in [Har06, Har07a] der noch nicht equilibrierte $^1n\pi^*$ -Zustand in einem Uracil-Derivat („1-Cyclohexyluracil“, CHU) und anderen Pyrimidin-Derivaten als mögliches Intermediat bei der Interkombination (ISC) in den niedrigsten Triplett-Zustand gehandelt. Dieser wird in Abhängigkeit vom gewählten Lösungsmittel mit unterschiedlich hohen Ausbeuten gebildet [Har07a]. Ein experimenteller Nachweis für diesen Mechanismus wird für TMP in wässriger Lösung jedoch durch die sehr geringen Quantenausbeuten (1-2 %) erschwert und steht noch aus.

Für größere Systeme wie Thymin-Homopolymere ist zudem noch ungeklärt in welcher Größenordnung Triplett-Zustände gebildet werden. Durch Messungen mit Laser-Flash-Photolyse konnte bisher lediglich gezeigt werden, dass der Anteil an Triplett-Zuständen in $(dT)_{20}$ nach 200 ns mindestens einen Faktor 10 geringer ist als in TMP und damit deutlich unter einem Prozent liegt [Mar05]. Allerdings schließt diese Beobachtung eine initiale Triplett-Bildung über die in der Abbildung 5.21 schematisch dargestellten Wege im Prozent-Bereich nicht vollkommen aus. Im Polymer könnte nämlich aufgrund der räumlichen Nähe zwischen den Thymin-Basen ein Großteil der zunächst vorhandenen Triplett-Zustände bereits auf der Piko- und Nanosekunden-Zeitskala gelöscht werden. Dabei könnten zum einen Triplett-Zustände als Intermediate bei der Bildung von CPD-Schäden auftreten. Zum anderen ist aus Belichtungs-Experimenten an Thymin-Basen in Lösung bekannt, dass der niedrigste Triplett-Zustand in Thymin durch Wechselwirkung mit anderen Thymin-Basen gelöscht werden kann [Fis70, Wag70].

In den zeitaufgelösten UV/Vis-Experimenten von Crespo-Hernández und Mitarbeitern konnte die Frage nach der Bildung von Triplett-Zuständen in $(dT)_{18}$ nicht beantwortet werden [CH05]. Die Zuordnung von Triplett-Zuständen wird dabei durch den spektralen Überlapp zwischen der elektronischen Absorption von Triplett-Triplett-Übergängen und $n\pi^*$ -Zuständen im UV-Bereich und durch die geringen Ausbeuten für Triplett-Zustände in wässriger Lösung erschwert [Har07a].

IR-Absorption von Singulett- und Triplett-Zuständen

In Anbetracht der Schwierigkeiten bei der Zuordnung von elektronischen Zuständen im UV/Vis-Bereich könnten die IR-Spektroskopie bei der Zuordnung der langlebigen Zustände helfen. Zum Beispiel sagen quantenmechanische Rechnungen für die IR-Absorptionsbanden der oben diskutierten $^1n\pi^*$ - und Triplett-Zustände ($^3\pi\pi$) deutlich unterschiedliche Signaturen im Bereich der hochfrequenten Schwingungsmoden zwischen 1800 und 1600 cm^{-1} voraus:

- Für den niedrigsten Triplett-Zustand in Thymin ($^3\pi\pi$) wird für die IR-Absorption der Carbonyl-Gruppe am C4-Atom der Base eine deutliche Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen (Rotverschiebung) erwartet, da diese im Triplett-Zustand einen substantiellen Einfachbindungs-Charakter erhält. Diese Vorhersage konnte in IR-Experimenten an Thymin und Thymidin im Lösungsmittel Acetonitril (Triplett-Ausbeute $\sim 20\%$) bestätigt werden [Har07b]. In diesen Experimenten wurde nach UV-Anregung eine induzierte Absorption um 1600 cm^{-1} beobachtet, die eindeutig dem Triplett-Zustand zugeordnet werden konnte. Demnach erfährt die Carbonyl-Gruppe am C4-Atom beim Übergang in den Triplett-Zustand eine Rotverschiebung der IR-Absorption um etwa 70 cm^{-1} .
- In Bezug auf die IR-Absorption der $n\pi^*$ -Zustände in Thymin ist noch relativ wenig bekannt. Erste quantenchemische Rechnungen für den $^1n\pi^*$ -Zustand in der Pyrimidin-Base Uracil lassen jedoch für die IR-Absorption der Carbonyl-Gruppe eine deutliche Verschiebung zu höheren Frequenzen (Blauverschiebung) erwarten [Mid07a]. Verschiebungen zu höheren Frequenzen in angeregten Zuständen sind zunächst unerwartet, da die Kraftkonstanten bei der Besetzung eines anti-bindenden Molekül-Orbitals in der Regel verringert werden. Gerade durch diese Sonderstellung bietet sich diese Signatur jedoch als guter Marker für diese Zustände an. In IR-Messungen an CHU (1-Cyclohexyluracil), in dem die Bildung von $^1n\pi^*$ -Zustände bereits durch Messungen im UV/Vis-Bereich postuliert wurde, konnte eine entsprechende Blauverschiebung (in der Größenordnung von 50 cm^{-1}) im Bereich der Carbonyl-Schwingungen nachgewiesen werden [Mid07a].

Unter der Annahme, dass die Ergebnisse an der Pyrimidin-Base Uracil auch auf die in der Struktur sehr ähnliche Base Thymin übertragen werden können, erfolgt im Folgenden eine Diskussion der in den IR-Messungen auftretenden langlebigen Zustände.

Hinweise für die Besetzung von $^1n\pi^*$ -Zuständen in TMP In den zeitaufgelösten IR-Messungen an TMP findet sich eine induzierte Absorption bei 1750 cm^{-1} , die im Lösungsmittel D₂O auf einer Zeitskala von 1 ns zerfällt. Dabei legt der spiegelsymmetrische Verlauf der Zeitverläufe für 1750 und 1630 cm^{-1} in Abbildung 5.15 nahe, dass der Zerfall dieses Zustands direkt zur Wiederbevölkerung des Grundzustands führt und mit einer Ausbeute von etwa 10% eingenommen wird.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung stellt nach den Ausführungen des letzten Abschnitts die Besetzung eines $^1n\pi^*$ -Zustands dar, der wie im Fall von CHU zu einer gegenüber den Carbonyl-Schwingungen deutlich blauverschobenen Absorption führt. Diese Zuordnung würde sich in Bezug auf die Quantenausbeute auch mit den UV/Vis-Messungen von Crespo-Hernández und Mitarbeitern decken [CH05]. Allerdings ist die in den IR-Messungen beobachtete Zerfallszeit für diesen Zustand mit 1 ns etwa einen Faktor 7 länger als in den UV/Vis-Experimenten. Wie lässt sich ein so großer Unterschied erklären?

Die Experimente unterscheiden sich sowohl in den verwendeten Konzentrationen der TMP-Moleküle und dem Lösungsmittel als auch in der Anregungsintensität, die in den IR-Messungen etwa einen Faktor 10 höher gewählt wurde. In Bezug auf die Anregungsintensität könnte eine erhöhte Zwei-Photonen-Absorption in den IR-Messungen zu Unterschieden führen. Eine signifikante Beteiligung eines Zwei-Photonen-Prozesses in den IR-Messungen konnte jedoch bereits ausgeschlossen werden. Auch ein Effekt aufgrund unterschiedlicher Konzentrationen (< 1 mM in UV/Vis-Experiment, ~ 10 mM in IR-Experiment) ist aufgrund der geringen Neigung von TMP zur Selbstassoziation nicht zu erwarten [Sol68]. Am wahrscheinlichsten erscheint demnach ein Isotopen-Effekt durch die unterschiedlichen Lösungsmittel. Während die UV/Vis-Messungen in H_2O durchgeführt wurden, erfolgte die Datenaufnahme für die IR-Messungen im Lösungsmittel D_2O . Unterschiedliche Lebensdauern von angeregten Zuständen in Abhängigkeit vom Lösungsmittel sind aus UV/Vis-Messungen bereits bekannt. Neben dem bereits angesprochenen Unterschied zwischen den Lebensdauern der Excimer-ähnlichen Zustände in $\text{d(AT)}_9 \cdot \text{d(AT)}_9$ [CH05], bei denen im Lösungsmittel D_2O eine Verlängerung um einen Faktor 3 gegenüber der Messung in H_2O auftritt, sind Isotopen-Effekte auch für die postulierten $^1\text{n}\pi^*$ -Zustände bekannt. In diesem Zusammenhang wurde zum Beispiel beim Vergleich von zeitaufgelösten UV/Vis-Messungen an CHU im Lösungsmittel Methanol mit entsprechenden zeitaufgelösten IR-Messungen in Methanol- d_1 ein Isotopen-Effekt beobachtet. In diesen Experimenten ergab sich für die deuterierte Probe in Methanol- d_1 eine Verlängerung der beobachteten Zerfallszeiten des postulierten $^1\text{n}\pi^*$ -Zustands um einen Faktor 5 von 100 auf 500 ps [Mid07a]. Die Desaktivierungsprozesse, die für den Zerfall dieser $\text{n}\pi^*$ -Zustände verantwortlich sind, konnten bisher noch nicht eindeutig geklärt werden [CH05]. Es ist demnach nicht auszuschließen, dass ein Isotopen-Effekt — entweder durch die Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel oder aufgrund der Deuterierung der Moleküle — die Lebensdauer beeinflusst. Zur Klärung dieser Frage sind jedoch weitere Studien nötig. UV/Vis-Messungen an TMP und $(\text{dT})_{18}$ im Lösungsmittel D_2O sind in Vorbereitung und könnten bei der Klärung dieser Frage helfen.

IR-Absorption der langlebigen Zustände in TMP Für die Interpretation zeitaufgelöster IR-Experimente an DNA-Sequenzen und Doppelsträngen ist eine genaue Kenntnis der IR-Absorption möglicher elektronischer Zustände notwendig. Aus diesem Grund wird im Folgenden die IR-Absorption der langlebigen Zustände bestimmt. Mit Ausnahme der induzierten Absorption um 1750 cm^{-1} wird die IR-Signatur in den transienten Spektren nach 100 ps im Wesentlichen durch die starken Ausbleich-Signale zwischen 1700 und 1600 cm^{-1} überdeckt. Nimmt man an, dass die in den IR-Messungen von TMP auftretenden Absorptionsänderungen auf der Nanosekunden-Zeitskala nur durch den Zerfall einer Art von elektronisch angeregten Zuständen hervorgerufen werden, lässt sich das IR-Absorptionsspektrum dieser Zustände berechnen. Dazu wird die Fitamplitude für die 1 ns-Komponente aus der globalen Datenanpassung (siehe Anhang E) verwendet. In Abbildung 5.22 ist die Fitamplitude (schwarze Linie) zusammen mit dem Grundzustands-Spektrum (grau gestrichelte Linie) abgebildet. Die Fitamplitude setzt sich unter obiger Annahme aus dem Absorptionsspektrum des langlebigen Zustands und dem Ausbleichen des Grundzustands zusammen. Die Addition der Grundzustands-Absorption zur Fitamplitude ergibt demnach das gesuchte IR-Spektrum. Dieses Spektrum besitzt eine breite Absorptionsbande mit einem Maximum um 1730 cm^{-1} , die in den transienten Spektren

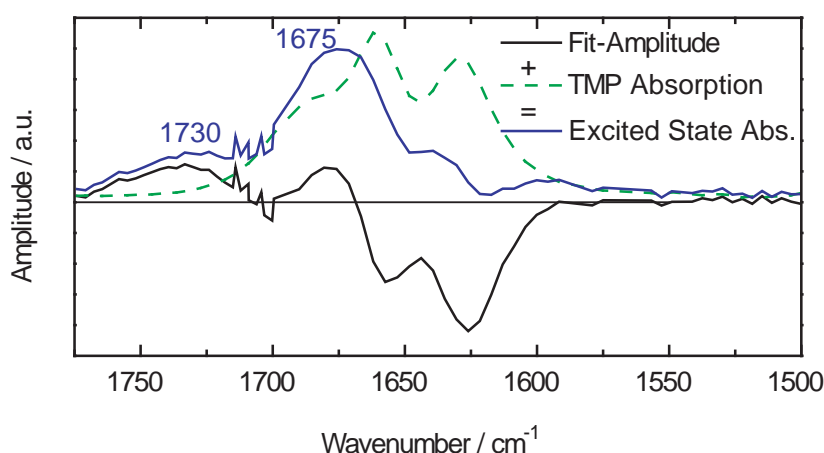


Abb. 5.22: IR-Absorption der in TMP auftretenden langlebigen Zustände. Das IR-Spektrum dieser Zustände (blau) kann aus der Fitamplitude (schwarz) für die 1 ns-Komponente und dem Grundzustands-Spektrum (grün gestrichelte Linie) berechnet werden. Das Spektrum zeigt eine Absorptions-Bande um 1730 cm^{-1} und eine breite Bande um 1675 cm^{-1} , die im Carbonyl-Bereich der Grundzustands-Absorption liegt.

für die induzierte Absorption um 1750 cm^{-1} verantwortlich ist. Zusätzlich zeigt das Spektrum eine starke Bande um 1675 cm^{-1} , die im Bereich der Carbonyl-Schwingungen des Grundzustands liegt. An diesem Spektrum kann in Zukunft mit Hilfe quantenmechanischer Rechnungen für Thymin die Zuordnung der langlebigen Zustände und die Besetzung von $^1n\pi^*$ -Zustände überprüft werden.

Hinweise auf die Besetzung von $^1n\pi^*$ -Zuständen in (dT)₁₈ Auch in (dT)₁₈ ist bei 1750 cm^{-1} der Zerfall einer induzierten Absorption zu sehen, der mit der Erholung der Grundzustands-Absorptionsbande bei 1630 cm^{-1} einhergeht. Die Zeitverläufe werden gut durch eine 100 ps- und eine 1 ns-Komponente wiedergeben. Auch in den UV/Vis-Messungen von Crespo-Hernández und Mitarbeitern wurde für (dT)₁₈ eine langsame Zeitkonstante mit etwa 800 ps [CH05] gefunden. Die sehr gute Übereinstimmung der spektralen Position der induzierten Absorption bei 1750 cm^{-1} mit den Ergebnissen an TMP sind ein eindeutiger Hinweis darauf, dass in beiden Molekülen die gleichen Zustände für diese Absorption verantwortlich sind. Wie bereits oben erwähnt, sind die Desaktivierungsmechanismen für die postulierten $^1n\pi^*$ -Zustände jedoch noch nicht endgültig geklärt [Har07a]. Der multiexponentielle Charakter in (dT)₁₈ könnte jedoch Ausdruck der lokalen Umgebung sein. Während in TMP jedes Molekül von einer Lösungsmittel-Hülle umgeben ist, befinden sich die Thymin-Basen im Polymer in einem Abstand, der eine Wechselwirkung ermöglichen, und die Desaktivierung beeinflussen könnte.

Besetzung von Triplett-Zuständen in TMP und (dT)₁₈ Im Gegensatz zu den Hinweisen auf die Besetzung von $^1n\pi^*$ -Zuständen sind in den IR-Messungen an TMP keine eindeutigen Signaturen für mögliche Triplett-Zustände ($^3n\pi^*$, $^3\pi\pi^*$) vorhanden. Dies ist aufgrund der geringen Triplett-Ausbeute von nur etwa 1-2 % nicht unerwartet [Cad92]. Leider sind keine IR-Absorptionsspektren für Triplett-Zustände von Thymin-Basen in wässriger Lö-

sung veröffentlicht, die eine direkte Zuordnung erlauben würden. Einen ersten Anhaltspunkt geben die Ergebnisse aus [Har07b]. Demnach sollte sich der niedrigste Triplet-Zustand durch eine zu den Carbonyl-Schwingungen deutlich rotverschobene Absorption zwischen 1550 und 1600 cm^{-1} auszeichnen, die auf dem Einfachbindungs-Charakter der Carbonyl-Gruppe am C4-Atom zurückzuführen ist. Allerdings beruhen diese Ergebnisse auf Messungen im Lösungsmittel Acetonitril und sind deshalb nicht ohne Weiteres auf Messungen im Lösungsmittel D_2O übertragbar. Betrachtet man die transienten Spektren für TMP im Spektralbereich zwischen 1650 und 1550 cm^{-1} , werden diese durch den spektral breiten Lösungsmittelbeitrag und die Ausbleichsignale der Doppelbindungs-Schwingungen dominiert. Eine eindeutige Zuordnung von Triplet-Zustände ist dabei nicht möglich. Entsprechend ist auch für $(\text{dT})_{18}$ eine Identifikation von Triplet-Zuständen sehr schwierig.

Da jedoch aus den Messungen von [Mar05] bekannt ist, dass der Anteil an Triplet-Zuständen in $(\text{dT})_{18}$ nach 200 ns um eine Größenordnung geringer ist als in TMP, könnten spektrale oder kinetische Unterschiede in den zeitaufgelösten IR-Messungen Hinweise auf die Besetzung von Triplet-Zuständen in den Thymin-Derivaten geben. Ein wesentlicher Unterschied zwischen TMP und $(\text{dT})_{18}$ besteht in einer deutlich sichtbaren 100 ps-Kinetik in $(\text{dT})_{18}$, die auch in Bereichen auftritt, die nicht dem oben postulierten $^1\text{n}\pi^*$ -Zustand zugeordnet werden. Dies trifft auf die Zeitverläufe von $(\text{dT})_{18}$ bei 1575 cm^{-1} und 1350 cm^{-1} (siehe Abbildung 5.16) zu und könnte ein Hinweis auf den Zerfall von Triplet-Zuständen sein. In ähnlichen Spektralpositionen konnte nämlich in Messungen an Thymidin — im Lösungsmittel Acetonitril — eindeutig die Absorption von Triplet-Zuständen nachgewiesen werden [Har07b]. Wäre diese Zuordnung richtig, könnte das Fehlen von Triplet-Zuständen nach 200 ps in den Experimenten von [Mar06] zum einen als Selbstlöschung durch benachbarte Thymin-Basen im Strang gedeutet werden. Zum anderen könnte eine Löschung von Triplet-Zuständen durch die Bildung von CPD-Schäden erfolgen.

Die hier geführte Diskussion beinhaltet jedoch Annahmen in Bezug auf die spektrale Lage der Triplet-Absorption, die noch nicht eindeutig geklärt sind und weitere Experimente erfordern. In diesem Zusammenhang ist auch die in TMP, wenn auch nur mit sehr geringer Amplitude, auftretende 100 ps-Komponente noch nicht zugeordnet. Dabei könnte auch die Besetzung von $^3\text{n}\pi^*$ -Zuständen als mögliches Intermediat bei der Bildung der niedrigsten Triplet-Zustände ($^3\pi\pi^*$) von Bedeutung sein. Vor allem die geringen Ausbeuten machen eine eindeutige Zuordnung bisher schwierig. Neben der Verwendung apolarer Lösungsmittel, die zu wesentlich höheren Triplet-Ausbeuten führen, könnten in Zukunft auch Experimente unter Zugabe von Triplet-Sensibilisatoren bei der Zuordnung dieser Zustände helfen.

Modell zur Photophysik in TMP

Die Ergebnisse der Dateninterpretation für TMP sind in guter Übereinstimmung mit den bereits bekannten Ergebnissen aus UV/Vis-Messungen [CH05] und lassen sich mit dem in Abbildung 5.23 gezeigten Schema für die in TMP ablaufenden photophysikalischen Prozesse beschreiben. Die Absorption erfolgt in TMP durch einen $^1\pi\pi^*$ -Übergang. Aus dem $^1\pi\pi^*$ -Zustand relaxieren etwa 85-90 % der Basen über eine schnelle interne Konversion ($\tau_{\text{IC}} \sim 700$ fs) in den Grundzustand. Das Abkühlen der dabei entstandenen schwingungsangeregten (heißen) Grundzustands-Moleküle erfolgt über eine effiziente Kopplung an die Lösungsmittelmoleküle (D_2O) auf einer Zeitskala von 2-3 ps. Zusätzlich werden langlebige elektronische Zustände mit

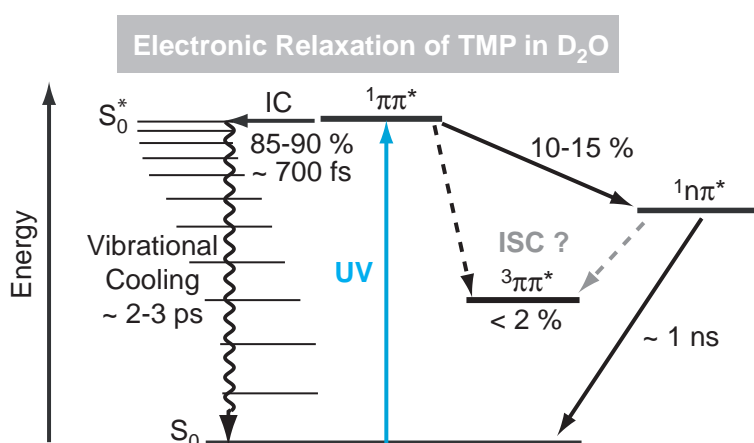


Abb. 5.23: Schematische Darstellung der in TMP ablaufenden photophysikalischen Prozesse. Die UV-Absorption erfolgt durch einen $1\pi\pi^*$ -Übergang. Anschließend kommt es in etwa 85 % der Moleküle zu einer schnellen internen Konversion (IC) in einen schwingungsangeregten „heißen“ Grundzustand. Das Kühlen („Cooling“) erfolgt durch Energie-Abgabe an das Lösungsmittel auf einer Zeitskala von etwa 2-3 ps. Einen weiteren Desaktivierungs-Pfad bildet der Übergang in einen $n\pi^*$ -Zustand der eine Lebensdauer im Bereich einiger 100 Pikosekunden besitzt. Es ist bekannt, dass in TMP eine Interkombination (ISC) in den Triplett-Zustand in einer Größenordnung von etwa 1-2 % der angeregten Thymin-Basen erfolgt. Bei der Besetzung könnte es neben einer direkten Interkombination aus dem $1\pi\pi^*$ -Zustand auch eine Besetzung des Triplett-Zustands über einen noch nicht equilibrierten $1n\pi^*$ -Zustand geben. Da diese Prozesse jedoch in den IR-Messungen nicht direkt beobachtet werden konnten, sind diese Übergänge mit einem Fragezeichen versehen.

einer Ausbeute zwischen 10 und 15 % besetzt. Die IR-Messungen lassen sich durch die Besetzung langlebiger $1n\pi^*$ -Zustände erklären, die im Lösungsmittel D_2O mit einer Zeitkonstante von einer Nanosekunde zerfallen. Da in den hier durchgeführten Messungen keine eindeutigen Aussagen über die Besetzung von Triplett-Zuständen (1-2 %) getroffen werden können, ist die Interkombination (ISC) aus dem $1\pi\pi^*$ -Zustand bzw. über einen $1n\pi^*$ -Zustand [Har07a] mit einem Fragezeichen versehen. In Zukunft könnten quantenmechanische Berechnungen zu den IR-Spektren angeregter elektronischer Zustände helfen diese Fragen eindeutig zu klären. Nur mit diesem Hintergrundwissen über die IR-Absorption lässt sich die spektrale Information der zeitaufgelösten IR-Spektroskopie voll ausnutzen und zusammen mit Experimenten im UV/Vis-Bereich zur Aufklärung der photophysikalischen und photochemischen Prozesse in DNA-Molekülen einsetzen. Für die weitere Diskussion der Prozesse die zur Dimer-Bildung in $(dT)_{18}$ führen (siehe nächstes Kapitel) dient das Modell in Abbildung 5.23 als Grundlage, da sich ein überwiegender Anteil der angeregten Thymin-Basen in $(dT)_{18}$ wie in TMP verhält.

6 Bildung von CPD-Schäden in DNA

Die Bildung von Zyklobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) stellt die häufigste durch UV-Strahlung induzierte Schädigung der DNA dar. Neben einer Reihe von Krankheitsbildern werden diese Schäden aufgrund ihrer potentiell mutagenen Wirkung auch für das Entstehen von Hautkrebs verantwortlich gemacht [Vin01]. Im letzten Kapitel konnte mit Hilfe der zeitaufgelösten IR-Spektroskopie die Bildung dieser Schäden in dem DNA-Modellsystem $(dT)_{18}$ auf einer Zeitskala von nur einer Pikosekunde nachgewiesen werden. Mit diesem Ergebnis lässt sich ein Modell für die Schadensbildung erstellen, das im Folgenden vorgestellt und in Bezug auf seine Übertragbarkeit auf die DNA-Doppelhelix diskutiert wird.

6.1 Modell für die Bildung von CPD-Schäden in $(dT)_{18}$

Die Ergebnisse der zeitaufgelösten IR-Spektroskopie an $(dT)_{18}$ zeigen, dass in diesem System CPD-Schäden zwischen Thymin-Basen innerhalb einer Pikosekunde nach UV-Anregung gebildet werden. Damit ist diese Photoreaktion wesentlich schneller als mögliche molekulare Bewegungen, die einzelne Basen in eine für die Reaktion geeignete Konformation bringen könnten. Zum Beispiel wird für die dynamische Stapelung von Thymin-Basen in Molekulardynamik-Simulationen an $(pdT)_8$ eine Zeitdauer im 10 ps-Bereich vorhergesagt [Mar01]. Das bedeutet, dass die Dimerisierungs-Reaktion nur stattfinden kann, wenn die Thymin-Basen bereits zum Zeitpunkt der Lichtabsorption in einer geeigneten Orientierung (reaktiven Konformation) vorliegen [Bec89, Rah66]. Angeregte Zustände von Thymin-Basen, deren benachbarte Basen nicht in einer für die Dimerisierung geeigneten Orientierung vorliegen, werden durch eine schnelle interne Konversion (IC) entvölkert, bevor eine Umorientierung die Dimer-Bildung ermöglicht. In Abbildung 6.1 ist die Bildung von CPD-Schäden in $(dT)_{18}$ illustriert.

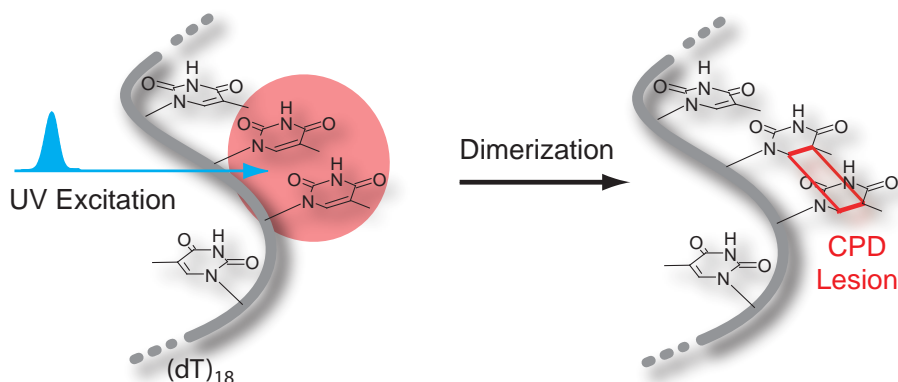


Abb. 6.1: Schematische Darstellung der CPD-Bildung in $(dT)_{18}$. Nur bei UV-Anregung einer Base, die sich zum Zeitpunkt der Lichtabsorption in einer reaktiven Anordnung mit einer zweiten Thymin-Base befindet, ist eine Dimerisierungs-Reaktion möglich.

6.1.1 Die Konformation bestimmt die Ausbeute

Da die CPD-Bildung viel schneller abläuft als mögliche konformationelle Änderungen, ist die Quantenausbeute der Reaktion gleich dem Anteil reaktiver Konformationen multipliziert mit der Wahrscheinlichkeit, dass eine entsprechende Konformation nach Lichtanregung dimerisiert [Wag83]. Beide Aspekte werden im Folgenden kurz diskutiert.

Reaktive Konformationen

Die genauen konformationellen Voraussetzungen, die eine reaktive Konformation zwischen Thymin-Basen definieren, sind bisher nicht bekannt. In Zukunft könnten möglicherweise jedoch ausführliche quantenmechanische Modellierungen der angeregten Zustände und Molekuldynamik-Simulationen bei der Klärung dieser Frage helfen [BP07, Joh07]. Einige geometrische Einschränkungen lassen sich jedoch bereits jetzt formulieren. Nur bei UV-Anregung einer Base, die sich zum Zeitpunkt der Lichtabsorption in einer reaktiven Anordnung mit einer zweiten Thymin-Base befindet ist eine Dimerisierungs-Reaktion möglich. Für die Dimerisierung muss demnach bereits vor der UV-Anregung eine starke Annäherung der Thymin-Basen vorliegen [Rah68]. Dabei müssen sich vor allem die bei der Bildung des Zyklobutan-Rings beteiligten C5=C6 Doppelbindungen nahe kommen und ein kleiner Dihedralwinkel zwischen den beiden Doppelbindungen auftreten. Da die Anordnung der Atome in den CPD-Schäden mit großer Wahrscheinlichkeit sehr ähnlich zu der ist, die auch eine Reaktion zwischen Thymin-Basen ermöglicht, wird anhand der Molekülstruktur in Abbildung 6.2 (links) die Geometrie eines CPD-Schadens zwischen zwei Thymin-Basen näher untersucht. Die Molekülstrukturen in der Abbildung wurden mit dem Programm Gaussian98

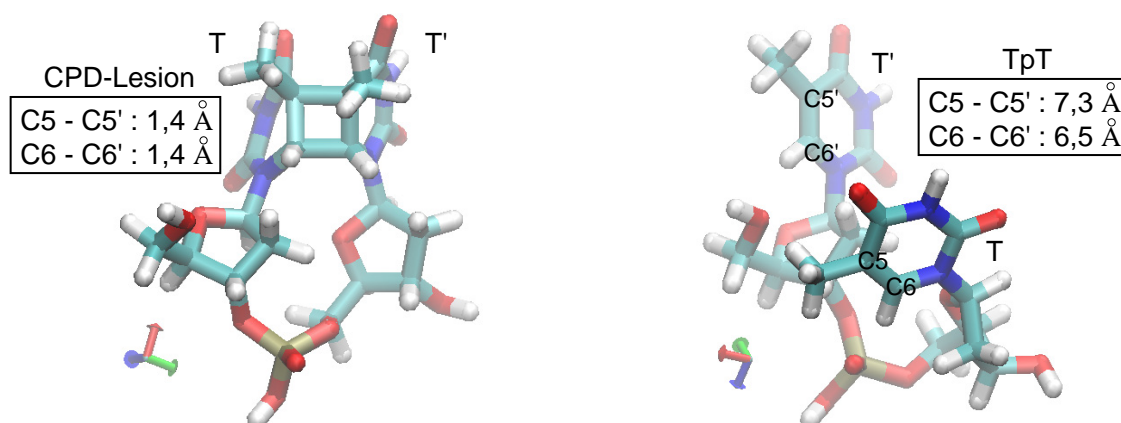


Abb. 6.2: Molekülstrukturen eines *cis-syn* CPD-Schadens (links) und eines TpT-Moleküls (rechts). Die Struktur des CPD-Schadens erlaubt Angaben zu den Geometrien, die eine reaktive Konformation zwischen zwei Thymin-Basen definieren. Demgegenüber zeigt die Struktur des TpT-Moleküls, dass die Thymin-Basen nach einer Geometrieoptimierung des Moleküls weit entfernt von einer reaktiven Konformation liegen. Erst Abweichungen von dieser Konformation erlauben eine Dimerisierungsreaktion. Die Strukturen wurden mit dem Programm Gaussian98 [Fri98] ohne Berücksichtigung des Lösungsmittels erstellt, die Darstellung erfolgte mit dem Programm VMD [Hum96].

[Fri98] erstellt. Obwohl bei der Strukturoptimierung keine Lösungsmittel-Effekte berücksich-

tigt wurden, stimmt die Struktur für den CPD-Schaden sehr gut mit den Ergebnissen aus Röntgen- und NMR-Experimenten an CPD-Schäden in einzelsträngigen Thymin-Oligomeren überein [Cad85, Hru86, Ryc88], die eine mittlere Bindungslänge von etwa 1,5-1,6 Å für den Zyklobutan-Ring angeben.

Den aus der Struktur des CPD-Schadens bestimmten Einschränkungen für eine reaktive Konformation steht die stark ungeordnete Orientierung der Basen in (dT)₁₈ gegenüber [Cam76, Mar01]. Dies wird bereits bei der Struktur von TpT in Abbildung 6.2 (rechts) deutlich. Für das Molekül TpT führt die Optimierung der Struktur zu einer Konformation, in der die Thymin-Basen relativ weit auseinander liegen. Die Bildung eines CPD-Schadens ist entsprechend nur möglich, wenn zum Zeitpunkt der UV-Absorption eine deutliche Abweichung von dieser Struktur vorliegt. In diesem Zusammenhang ist für die Anordnung der Basen in einem längeren Oligomer sowohl die Flexibilität des Phosphat-Rückgrats als auch die möglicherweise auftretende Stabilisierung von Konformationen durch intramolekulare Wasserstoffbrücken von Bedeutung [Mar01]. Generell lassen die Untersuchungen zur Struktur von Thymin-Oligomeren jedoch erwarten, dass nur ein sehr geringer Anteil der Thymin-Basen in einer potentiell reaktiven Konformation vorliegt [Joh07]. Auf die konformationellen Einschränkungen in der DNA-Doppelhelix wird in Abschnitt 6.2 gesondert eingegangen.

Wahrscheinlichkeit und Ausbeute

Ohne Kenntnis des genauen Anteils potentiell reaktiver Konformationen in (dT)₁₈ lässt sich die Wahrscheinlichkeit für eine Dimerisierungsreaktion in einer reaktiven Konformation nicht aus den Messergebnissen in Kapitel 5 ableiten. Anhaltspunkte für die Dimerisierungswahrscheinlichkeit geben jedoch Studien zur Bildung von Thymin-Dimeren in Kristallstrukturen [Lis70] und starren Matrizen [Lam68b]. Im Kristall ordnen sich die planaren Thymin-Basen bevorzugt in parallelen Schichten und Stapeln an [Ger61]. Entsprechend ist nach den Ausführungen des letzten Abschnitts zu erwarten, dass in diesen Anordnungen vermehrt reaktive Konformationen vorliegen. Tatsächlich konnten in Belichtungs-Experimenten an Thymin und 1,3-Dimethyl-Thymin (DMT) in einer KBr-Matrix Quantenausbeuten für die CPD-Bildung in der Größenordnung von einigen 10 % nachgewiesen werden [Lis70]. Ebenso wurde für Thymin in gefrorener Lösung eine Quantenausbeute nahe 100 % bestimmt [Lam68b]. In einer anderen Studie wurde die Ausbeute für die Dimerisierungsreaktion an DMT-Molekülen in gefrorenem Zustand untersucht [Lam68b]. In diesen Experimenten wurden unter UV-Belichtung zunächst DMT-Dimere erzeugt und isoliert. Anschließend wurden diese in gefrorenem Zustand bei 80 K durch erneute UV-Belichtung wieder zu einem Teil (entsprechend dem photostationären Gleichgewicht) gespalten. Bei der Bestimmung der Ausbeute für die erneute Bildung von Dimeren in den zuvor gespaltenen Molekülen wurde ein Wert nahe 100 % gefunden. Dieses Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass die bei der UV-Absorption der CPD-Schäden vorliegende relative Orientierung der DMT-Moleküle in der Matrix auch nach dem Öffnen des Zyklobutan-Rings im Wesentlichen erhalten bleibt und eine reaktive Konformation für die erneute Bildung von CPD-Schäden darstellt.

Wird auch für die reaktiven Konformationen in (dT)₁₈ eine Reaktionswahrscheinlichkeit nahe 100 % angenommen, gibt die Ausbeute der CPD-Bildung im Oligomer direkt den Anteil reaktiver Konformationen wieder. Die in den zeitaufgelösten IR-Experimenten nachgewiesene Ausbeute von 2-3 Prozent bedeutet dann, dass nur ein entsprechend geringer Anteil

von benachbarten Thymin-Paaren geeignet orientiert ist. Dies ist in Übereinstimmung mit der im letzten Abschnitt angesprochenen Beobachtung, dass Thymin-Oligomere eine stark ungeordnete Struktur und nur einen geringen Prozentsatz gestapelt vorliegender Basen besitzen [Mil99, Joh07]. Unter stationärer Belichtung ist demnach die Ausbeute von der Verweildauer der Basen in reaktiven und nicht reaktiven Geometrien abhängig.

Die Abhängigkeit der Ausbeute von der Konformation ist in Übereinstimmung mit vielen aus der Literatur bekannten Ergebnissen zur Ausbeute von CPD-Schäden [Rah68]. Zum Beispiel lässt sich damit die schnelle Sättigung der Dimer-Bildung in poly(U) und poly(dT) in glasartigen Zuständen erklären [Rah68]. In einer glasartigen Matrix bei Temperaturen von 77 K (Ethylen-Glykol-Mischung) gibt es in den Polymeren nur eine begrenzte Anzahl an reaktiven Konformationen. Aufgrund der Reversibilität der Photoreaktion stellt sich deshalb bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm nach relativ kurzer Belichtungsdauer ein photostationäres Gleichgewicht ein, das den maximalen Anteil der erreichbaren Konzentration an CPD-Schäden ($\sim 25\%$) bestimmt. Dabei ist anzunehmen, dass im gefrorenen Zustand ein bestimmter Anteil der Thymin-Basen im Oligomer gestapelt bzw. in einer reaktiven Konformation vorliegt. Wird das Experiment dagegen in wässriger Lösung bei Raumtemperatur durchgeführt, sind thermische Fluktuationen in der Anordnung der einzelnen Basen möglich. Es entstehen im Laufe der Belichtung neue, reaktive Konformationen, die weitere Dimerisierungsreaktionen erlauben und den maximalen Anteil der CPD-Schäden im photostationären Gleichgewicht auf etwa 75 % erhöhen.

6.1.2 Elektronische Zustände bei der CPD-Bildung: Singulett oder Triplett?

Die sehr schnelle Photoreaktion in $(dT)_{18}$ legt einen im Wesentlichen barrierelosen Reaktionspfad nahe, der den angeregten Zustand mit dem Produktzustand verbindet. Für die daran beteiligten elektronischen Zustände wurden in der Vergangenheit sowohl Triplett- als auch Singulett-Zustände diskutiert [Lam68a, Zha06]. Für eine ausführliche Darstellung zu diesem Thema wird auf die Angaben in Abschnitt 2.3.3 verwiesen. An dieser Stelle sind zwei Möglichkeiten zu diskutieren:

Triplett-Mechanismus: Aus Experimenten mit Triplett-Sensibilisatoren ist bekannt, dass eine CPD-Bildung über einen langlebigen Triplett-Zustand möglich ist. Zudem wird die Besetzung von Triplett-Zuständen nach UV-Anregung für die diffusionslimitierte CPD-Bildung zwischen TMP-Molekülen in Lösung verantwortlich gemacht.

Singulett-Mechanismus: Für passend orientierte Thymin-Basen in $(dT)_{18}$ ist kein langlebiger Triplett-Zustand für die Dimer-Bildung notwendig. Im Oligomer liegen die Thymin-Basen bereits in direkter Nachbarschaft zueinander und auch ein kurzlebiger Singulett-Zustand könnte zur Bildung von CPD-Schäden führen.

Beide Reaktionspfade sind in Abbildung 6.3 illustriert und werden im Folgenden diskutiert:

Triplett-Mechanismus Die zeitaufgelösten IR-Experimente an TMP und $(dT)_{18}$ erlauben — aufgrund noch nicht eindeutig definierter Triplett-Markerbanden — keine eindeutige Zuordnung transients Absorptionsänderungen zu Triplett-Zuständen. Entsprechend kann eine

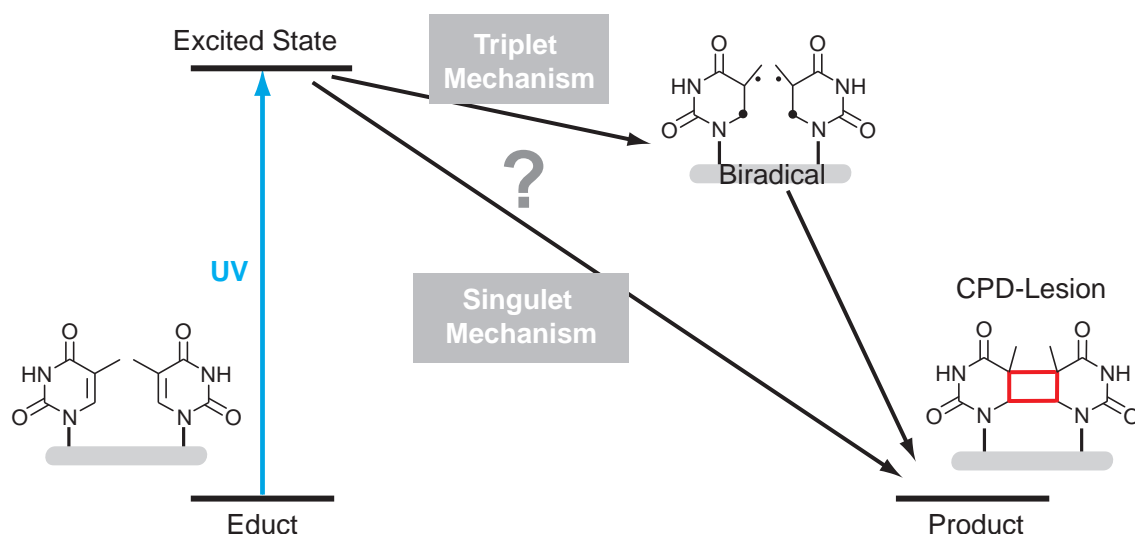


Abb. 6.3: Schematische Darstellung der photochemisch erlaubten Bildung eines CPD-Schadens zwischen Thymin-Basen. Während für die Reaktion über Triplet-Zustände das Auftreten eines intermediären Biradikals vorhergesagt wird, kann die [2 + 2]-Zykloaddition über einen Singulett-Zustand direkt (konzertiert) und damit potentiell sehr schnell ablaufen.

Besetzung von Triplet-Zuständen in (dT)₁₈ im Bereich weniger Prozent nicht ausgeschlossen werden. Allerdings lassen die experimentellen Ergebnisse eine signifikante Beteiligung von Triplet-Zuständen an der CPD-Bildung äußerst unwahrscheinlich erscheinen: (i) Zum einen lässt das Zeitfenster von 1 ps nur wenig Spielraum für einen Reaktionsverlauf über einen Triplet-Zustand. Da die Edukte und das Reaktions-Produkt bei der CPD-Bildung Singulett-Zustände sind, ist für eine Reaktion über einen Triplet-Zustand eine Spin-Umkehr notwendig. In [Zha06] wird dabei angenommen, dass die Dimerisierung über einen biradikalischen Zwischenzustand ablaufen sollte. Bei dieser Reaktion führt eine erste Sigma-Bindung zwischen den Thymin-Basen zum Biradikal, das anschließend mit der Ausbildung der zweiten Sigma-Bindung zum Zyklobutan-Ring weiter reagiert. (ii) Zum anderen erfordert die nachgewiesene Quantenausbeute von etwa 3 % CPD-Schäden, dass praktisch alle Triplet-Zustände, die eine reaktive Konformation erreichen, auch zur Dimer-Bildung beitragen. Dieser Annahmen widerspricht, dass sich in den Zeitverläufen der IR-Messungen kein Hinweis auf die Bildung von CPD-Schäden auf der 10 und 100 ps-Zeitskala findet, der mit dem postulierten Zerfall der Triplet-Zustände einhergehen würde. (iii) Ein weiteres Argument gegen die Beteiligung eines Triplet-Intermediats bei der CPD-Bildung in (dT)₁₈ liefern Experimente mit Triplet-Löschern [Lam68a]. In diesen Experimenten konnte die Ausbeute für die Bildung von CPD-Schäden unter UV-Strahlung nicht durch die Zugabe von Triplet-Löschern beeinflusst werden.

Singulett-Mechanismus Da wie in Abschnitt 2.3.3 diskutiert, eine thermisch aktivierte Reaktion ausgeschlossen werden kann, ist für die CPD-Bildung ein Mechanismus über einen angeregten Singulett-Zustand am wahrscheinlichsten. Nach den Orbital-Symmetrie-Regeln von Woodward und Hoffmann [Woo69] würde man erwarten, dass der zunächst gebildete angeregte Zustand in einen Zweifach-angeregten Zustand der beiden Basen übergeht, aus dem die

Dimerisierung im Bereich der beiden C=C Doppelbindungen stattfindet. Zum Beispiel werden in [Lam68a] Excimer-Zustände als mögliche Intermediate diskutiert. Das Fehlen von Hinweisen auf die Bildung von Excimer-Zuständen in den Messergebnissen von Crespo-Hernández und Mitarbeitern [CH05] in $(dT)_{18}$, könnte in diesem Zusammenhang auf die ultraschnelle Desaktivierung dieser Intermediate und die Bildung von CPD-Schäden zurückzuführen sein. In Anbetracht anderer bi-molekularer Photoadditionen [Sch90] und neuer theoretischer Studien scheint jedoch eine Photoreaktion über eine konische Durchschneidung, die den angeregten Zustand direkt mit dem Produkt-Grundzustand verbindet, am wahrscheinlichsten. Konische Durchschneidungen werden als sehr effiziente Reaktionswege in perizyklischen Photoreaktionen¹ gehandelt und für sehr schnell ablaufende photochemische Reaktionen verantwortlich gemacht [Ber90, Kle95, Ber96]. Zum Beispiel wird für die intermolekulare Photoaddition in Norbornadiene² in der Gasphase eine Reaktionszeit kleiner 100 fs postuliert [Fus02], die über eine konische Durchschneidung erfolgen soll.

Mit der Veröffentlichung der hier präsentierten Ergebnisse zur CPD-Bildung in $(dT)_{18}$ wurden neue theoretische Studien zur CPD-Bildung zwischen Thymin-Basen angeregt. In kürzlich veröffentlichten Arbeiten, die sich auf die in [Sch07] vorgestellten Ergebnisse beziehen, wurde für Thymin-Basen in der Gasphase eine konische Durchschneidung gefunden, die aus einem angeregten Singulett-Zustand in den Produkt-Zustand führt [BP07, Bla07]. Abbildung 6.4 zeigt zwei Darstellungen (basierend auf CASSCF-Rechnungen, „active space self-consistent field“) aus [BP07]: (A) Die thermische Reaktion auf der Grundzustandsfläche ist mit einer sehr hohen Potentialbarriere und dem Auftreten von mehreren biradikalischen Zwischenzuständen („transition state“, TS) verknüpft. Wie bereits in Abschnitt 2.3.3 diskutiert ist die Reaktion demnach thermisch „verboten“. (B) Erfolgt dagegen eine Photoanregung in einen angeregten Singulett-Zustand, ist ein barriereloser Übergang in den Produktzustand möglich. Der Übergang erfolgt im Bereich einer konischen Durchschneidung (CI). Die Topologie am konischen Schnitt wird durch Bewegungen in den Bereichen der beiden C=C Doppelbindungen beeinflusst, und besitzt große Ähnlichkeit zu der für zwei Ethylen-Moleküle vorgeschlagenen Zyклоaddition [Ber90, Cel95, Ber97b].

Allerdings basieren die Ergebnisse auf Rechnungen in der Gasphase. Die lokale Umgebung der Moleküle und die Besetzung anderer Zustände wurden dabei vernachlässigt. Einflüsse des Lösungsmittels auf die Lage der elektronischen Zustände und konkurrierende photochemische Prozesse könnten jedoch zu anderen Zerfallskanälen führen und müssen in weiteren theoretischen Studien überprüft werden. Dennoch decken sich die theoretischen Vorhersagen mit den Ergebnissen der zeitaufgelösten IR-Messungen, die ebenfalls einen barrierelosen Singulett-Mechanismus erwarten lassen.

6.1.3 Modell für die Bildung von Thymin-Dimeren in $(dT)_{18}$

Die Ergebnisse der in den letzten beiden Abschnitten durchgeführten Diskussion zur CPD-Bildung im Modellsystem $(dT)_{18}$ lassen sich mit einem eindimensionalen Energieschema interpretieren. In Abbildung 6.5 ist die Energie von zwei benachbarten Thymin-Basen im

¹Perizyklische Reaktionen sind chemische Reaktionen, bei denen die Bindungsverhältnisse durch eine konzentrierte Verschiebung von Elektronen verändert werden.

²In diesem bi-zyklischen Kohlenwasserstoff befinden sich die beteiligten C=C Doppelbindungen in einer definierten Orientierung, die eine [2 + 2]-Zyклоaddition ermöglicht.

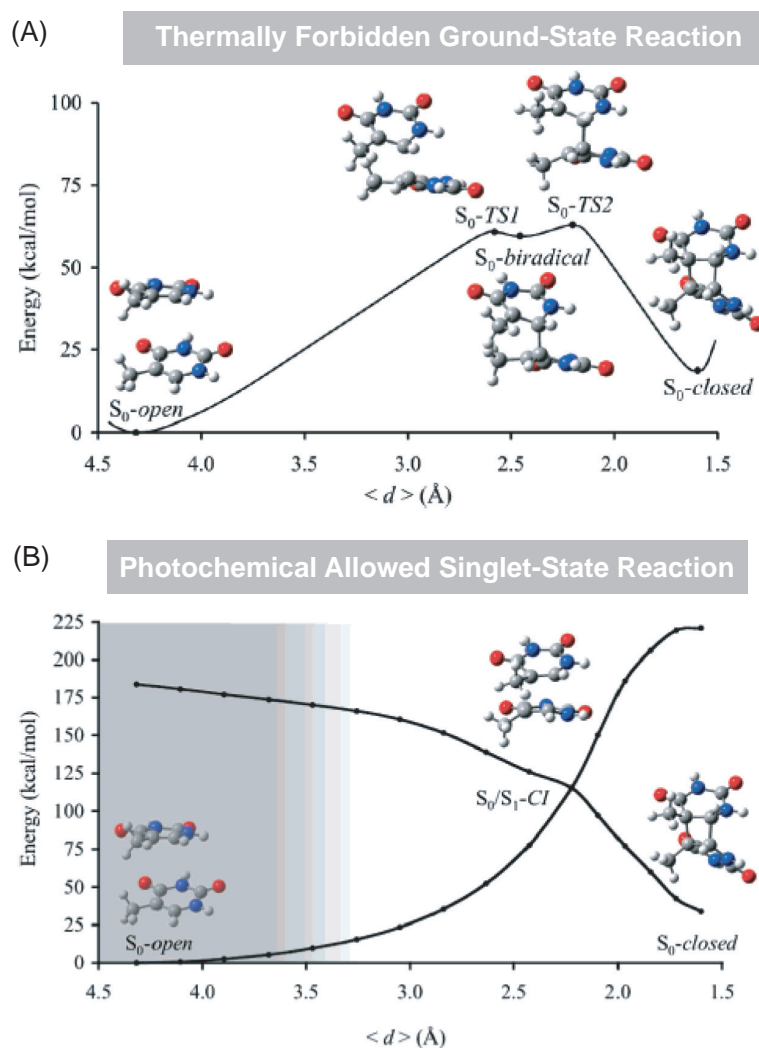


Abb. 6.4: Potentialenergie-Schema für die [2 + 2]-Zykloaddition zwischen Thymin-Basen basierend auf Rechnungen mit CASSCF [BP07]. Aufgetragen ist die Energie gegenüber dem mittleren Abstand der sich bildenden C-C Bindungen. (A) Auf der Grundzustands-Potentialfläche erfolgt die CPD-Bildung über mehrere Zwischenzustände (TS). Dieser Prozess ist mit einer hohen Aktivierungsenergie verknüpft und stellt damit eine thermisch „verbotene“ Grundzustands-Reaktion dar. (B) Für den angeregten Zustand ergibt sich dagegen eine barrierelose Potentialfläche, die den nach UV-Anregung besetzten angeregten Zustand über eine konische Durchschneidung mit dem Produktzustand des Thymin-Dimers verbindet. Abdruck mit Erlaubnis durch [BP07]. Copyright (2007) American Chemical Society.

Oligomer in Abhängigkeit von ihrer relativen Orientierung zueinander gezeigt. Dabei wird die Orientierung der Basen durch ihre C5=C6 Doppelbindung repräsentiert und ist für einige Konformationen schematisch dargestellt. Die Absorption der UV-Photonen in (dT)₁₈ erfolgt meist durch quasi „freie“ Thymin-Basen, die sich nicht in einer reaktiven Konformation mit benachbarten Thymin-Basen befinden. Diese Basen verhalten sich nach UV-Anregung wie die Thymin-Base in einem TMP-Molekül, dessen Photophysik im letzten Kapitel ausführlich diskutiert wurde. In diesen Basen erfolgt die Absorption eines UV-Photons durch Anregung in einen ¹ππ*-Zustand. Aus diesem Zustand gehen etwa 85 - 90 % der Basen durch eine schnelle

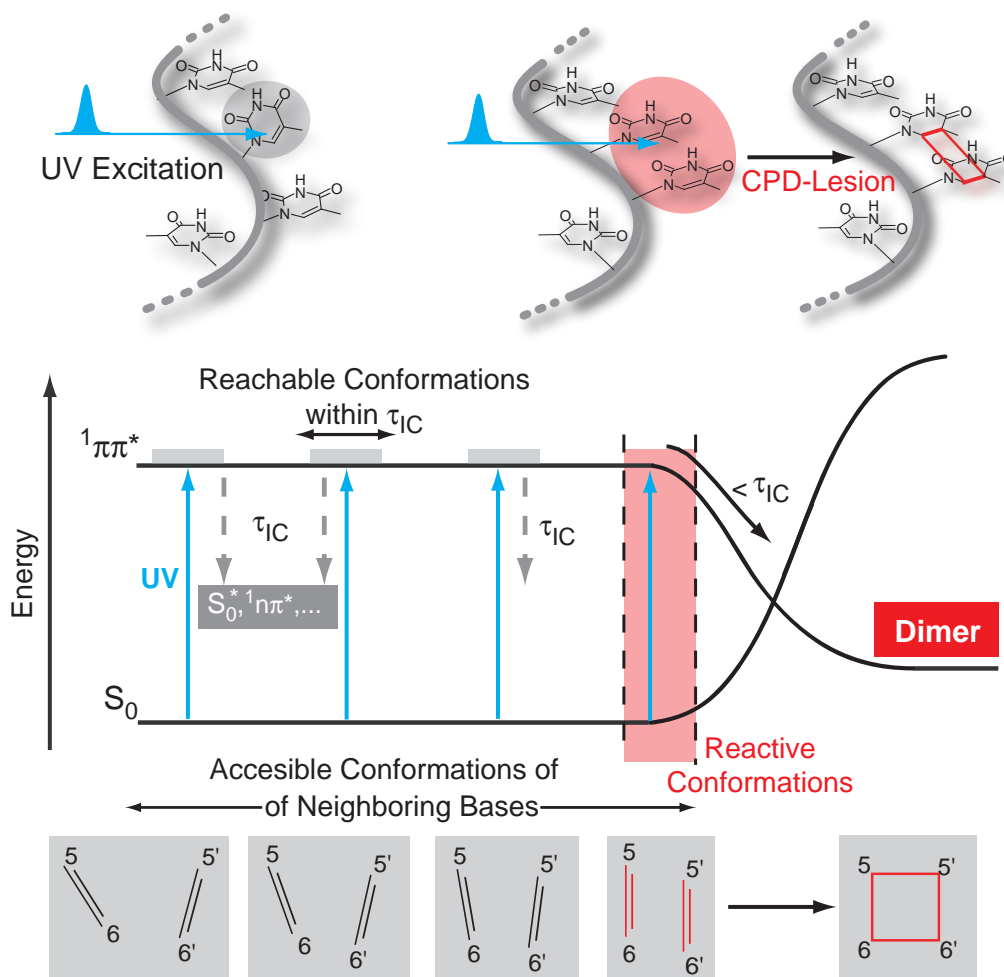


Abb. 6.5: Modell für die Bildung von CPD-Schäden im DNA-Modell-System $(dT)_{18}$. Oben: Schematische Darstellung einer $(dT)_{18}$ -Sequenz, in der die UV-Anregung einmal in einer nicht reaktiven (links) und einmal in einer reaktiven Konformation benachbarter Basen erfolgt (rechts). Unten: Schematische Darstellung der Energie benachbarter Thymin-Basen in Abhängigkeit von deren relativer Orientierung zum Zeitpunkt der Lichtabsorption. Der Großteil der Thymin-Basen befindet sich statistisch gesehen in einer für eine CPD-Bildung ungeeigneten und damit nicht reaktiven Konformation. Diese Basen verhalten sich ähnlich wie TMP-Moleküle (siehe Abbildung 5.23). Die UV-Absorption erfolgt durch einen $^1\pi\pi^*$ -Übergang. Aus diesem Zustand geht ein Großteil ($\sim 85\%$) dieser Basen mit einer $^1\pi\pi^*$ -Lebensdauer von etwa 700 fs durch interne Konversion in den Grundzustand über. Innerhalb dieser Zeit kann nach Verlassen des Frank-Condon-Bereiches ein Teil der Potentiallandschaft (grauer Balken) erreicht werden, der die Besetzung langlebiger elektronischer Zustände ($^1n\pi^*$, Triplett) mit einer Ausbeute von etwa 10% ermöglicht. Diese Desaktivierungswege sind in der Abbildung zusammengefasst und werden durch grau gestrichelte Pfeile symbolisiert. Erfolgt die Anregung jedoch in einer Thymin-Base, die sich in einer reaktiven Konformation zu einer benachbarten Thymin-Base befindet (roter Bereich), wird im Rahmen der $^1\pi\pi^*$ -Lebensdauer ein barriereloser Desaktivierungsweg zugänglich, der zur Bildung des CPD-Schadens führt.

interne Konversion (< 1 ps) in den Grundzustand über. Ein weiterer Anteil von etwa 10% besetzt dagegen sehr wahrscheinlich einen $^1n\pi^*$ -Zustand, der möglicherweise als Intermediat bei der Besetzung von Triplett-Zuständen fungiert. In der Darstellung sind diese Übergänge

zusammengefasst und als gestrichelte graue Pfeile angedeutet, die zu einer Entvölkerung des $^1\pi\pi^*$ -Zustands führen. Da in den IR-Messungen keine CPD-Bildung durch langlebige Zustände gefunden wurde, limitiert offenbar die Lebensdauer des $^1\pi\pi^*$ -Zustands die Bildung von CPD-Schäden. Der in dieser Zeit zugängliche Bereich auf der Potentialfläche des angeregten Zustands, wird durch einen grauen Balken symbolisiert. Erfolgt die Anregung dagegen in einer Base, die eine reaktive Geometrie bezüglich einer benachbarten Base besitzt (rot unterlegter Bereich), so öffnet sich innerhalb der Lebensdauer des $^1\pi\pi^*$ -Zustands ein weiterer Desaktivierungspfad, der zur Bildung eines Zyklobutan-Rings zwischen dieser und der benachbarten Base führen kann. Das experimentelle Ergebnis einer Photoreaktion, die innerhalb von 1 ps abläuft, spricht dabei für einen Singulett-Mechanismus, der Edukt und Produkt über einen praktisch barrierelosen Reaktionspfad miteinander verbindet. Die geringe Ausbeute (2 - 3 %) für die Bildung von CPD-Schaden in $(dT)_{18}$ ist dabei Ausdruck der stark ungeordneten Konformation und des im thermischen Gleichgewichts geringen Anteils reaktiver Konformationen. Dieser Zusammenhang wurde basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit vor kurzem mit Molekulardynamik-Simulationen an $(dT)_{18}$ untersucht [Joh07].

6.2 Relevanz der Ergebnisse an $(dT)_{18}$ in Bezug auf die DNA-Doppelhelix

Nach der Diskussion und Interpretation der in dieser Arbeit durchgeführten zeitaufgelösten IR-Messungen am einzelsträngigen DNA-Modell-System $(dT)_{18}$ stellt sich die Frage, ob die an diesem Modell gewonnenen Ergebnisse auch auf die DNA-Doppelhelix übertragbar sind? In Anbetracht der vielfältigen Wechselwirkungen in einem komplexen Molekül wie der DNA-Doppelhelix bedarf diese Frage einer eingehenden Betrachtung.

Bereits beim Übergang von Monomeren zu einzelsträngigen Polymeren treten zusätzliche Wechselwirkungen auf, die zu weiteren Desaktivierungswegen oder zu neuen Photoprodukten nach UV-Anregung führen können. Sehr gute Beispiele hierfür sind die in dieser Arbeit betrachteten langlebigen Excimer-ähnlichen Zustände in poly(A) bzw. die Bildung von CPD-Schäden zwischen Thymin-Basen in $(dT)_{18}$. In der DNA-Doppelhelix sind mit der Watson-Crick Basenpaarung nun zusätzlich Wasserstoff-Brücken zwischen den Basen beider Stränge vorhanden. Neben der Stabilisierung der Helix ermöglichen diese Wechselwirkungen Proton-Transfer-Prozesse zwischen den Basen, die als Desaktivierungspfade für angeregte Zustände diskutiert werden [Loe63, Sob04, Kwo07]. Die Wasserstoff-Brücken könnten auch bei der Frage nach der Lokalisation der Anregung in Bezug auf mögliche exzitonische Zustände von Bedeutung sein [Wil76, Bou02, Bou03, Lew03, Ris02, Rit07].

Trotz der stark zunehmenden Komplexität in der Doppelhelix deuten jedoch experimentelle Arbeiten darauf hin, dass die hier gewonnenen Ergebnisse am Einzelstrang auch für die DNA-Doppelhelix relevant sind. Zeitaufgelöste UV/Vis-Experimente an Adenin und Thymin enthaltenden doppelsträngigen DNA-Modell-Systemen zeigen, dass die Wasserstoffbrücken zwischen Adenin- und Thymin-Basen keinen großen Einfluss auf die Lebensdauer der beobachteten angeregten Zustände besitzen [CH05]. Diese Beobachtung lässt sich dahingehend interpretieren, dass die Besetzung und Desaktivierung der elektronischen Zustände vor allem von der Anordnung der Basen innerhalb eines Strangs bestimmt wird. In Bezug auf diese

Ergebnisse ist deshalb davon auszugehen, dass die Bildung von CPD-Schäden — bei geeigneter Anordnung der Basen — auch in doppelsträngiger DNA nicht wesentlich durch die Wasserstoff-Brücken zwischen den Basen beeinflusst wird. Unter diesen Umständen sollte die Photoreaktion ebenso schnell ablaufen wie im Modell-System $(dT)_{18}$. Allerdings werden die Wasserstoffbrücken durch ihren Einfluss auf die Konformation und Anordnung der Basen die Ausbeute der Photoreaktion beeinflussen. Entsprechend sind zwei wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit auch für die DNA-Doppelhelix relevant:

1. Die Konformation zum Zeitpunkt der Lichtabsorption bestimmt, ob ein CPD-Schaden gebildet wird oder nicht.
2. Die Ausbeute ist Ausdruck der im thermischen Gleichgewicht eingenommenen reaktiven Konformationen.

Der Zusammenhang zwischen Konformation und Quantenausbeute für CPD-Schäden sollte sich entsprechend in experimentellen Studien an der DNA-Doppelhelix widerspiegeln.

6.2.1 Strukturelle Unterschiede und Quantenausbeuten

Es ist bekannt, dass sich die Strukturen von Thymin-Einzelsträngen wie $(dT)_{18}$ und doppelsträngiger DNA mit einer gemischten Basen-Sequenz deutlich unterscheiden [Cam76, Mar01, Mil99, Blo00]. Die Doppelhelix-Struktur in der B-DNA Form führt zu einer definierten Orientierung der Basen, in der benachbarte Basen senkrecht zur Helix-Achse ausgerichtet (gestapelt) und in einer helikalen Windung von etwa 36° gegeneinander verdreht sind [Blo00] (siehe Kapitel 2.1.2). Im Gegensatz dazu nehmen die Basen im Oligomer $(dT)_{18}$ aufgrund der geringen Wechselwirkungen vielfältige Orientierungen ein, die zu einer stark ungeordneten Gesamtstruktur führen [Mil99, Mar01]. In Anbetracht dieser Unterschiede ist die Tatsache, dass die Ausbeuten bezogen auf den Anteil benachbarter Thymin-Basen in beiden Systemen in derselben Größenordnung von 1-3 % liegen [Dou01, Hos67] zunächst überraschend und wird im Folgenden näher untersucht.

Überträgt man die Ergebnisse an $(dT)_{18}$ auf die Doppelhelix, folgt daraus, dass statistisch gesehen auch in der Doppelhelix der Anteil reaktiver Konformationen gering ist. Entsprechend stellt sich auch in der Doppelhelix die Frage nach der Definition reaktiver Konformationen. Betrachtet man die strukturellen Änderungen, die in $(dT)_{18}$ mit der CPD-Bildung verbunden sind (siehe Abschnitt 6.1.1), so ist in der doppelsträngigen DNA mit einer deutlichen Verzerrung der Helix zu rechnen. Mittlerweile existieren eine ganze Reihe von Röntgen- und NMR-Analysen sowie theoretische Modelle, die sich mit der Auswirkung von CPD-Schäden auf die Doppelhelix-Struktur beschäftigen [Par02, McA98, Jin98, Mia96, Spe97, Luk06]. In diesen Arbeiten stand zunächst die Frage nach den strukturellen Merkmalen von CPD-Schäden im Vordergrund, die es Reparatur-Enzymen ermöglichen, diese Schäden zu erkennen [Par07]. Es zeigte sich, dass CPD-Schäden zu einer teilweisen Entwindung und Krümmung der Helix führen. Obwohl gerade die Krümmung der Helix als wichtiges Erkennungsmerkmal diskutiert wird, besteht in der Frage nach dem genauen Ausmaß der Krümmung noch kein Konsens. Während Röntgen-Strukturanalysen meist sehr große Werte im Bereich von etwa 30° für den Krümmungswinkel der Doppelhelix durch die CPD-Bildung angeben [Par02], liefern NMR-Daten wesentlich geringere Abweichungen zur Normalform, die in einem Bereich kleiner 10°

liegen [Kem87, McA98]. Eine ausführliche Diskussion und Deutung dieser Ergebnisse findet sich in [Luk06] und soll an dieser Stelle nicht weiter diskutiert werden. Konsens besteht jedoch weitestgehend in Bezug auf die lokalen Änderungen, die mit einem CPD-Schaden verbunden sind. Diese Erkenntnisse können für ein qualitatives Verständnis der geringen Schadensraten in der B-DNA dienen. In Abbildung 6.6 sind Ausschnitte aus DNA-Doppelhelixstrukturen mit

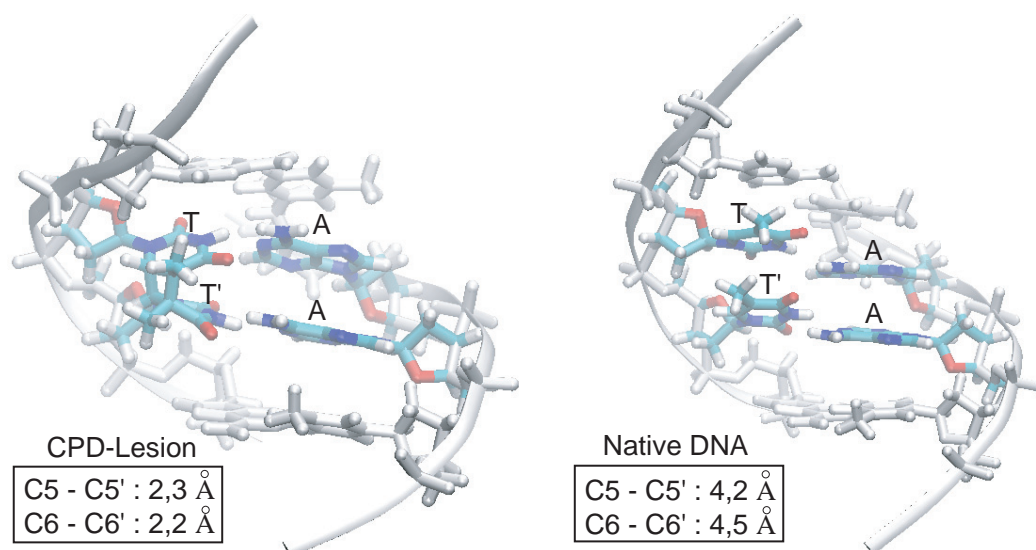


Abb. 6.6: Ausschnitte aus den Strukturen eines DNA-Dodekamers nach [McA98] mit (links) und ohne CPD-Schaden (rechts). Die Bilder zeigen die zentralen 4 Nukleotid-Segmente von der großen Furche aus betrachtet. In beiden Strukturen ist eine rechtshändige Helix zu sehen. Allerdings ist im Fall des CPD-Schadens die helikale Windung zwischen den Thymin-Basen des Schadens um etwa 10° reduziert. Die Bildung des Zyklobutan-Rings erfordert zudem eine deutliche Abweichung der Thymin-Basen von der parallelen Anordnung in der nativen Struktur. Der Verlust einer Wasserstoffbrücke zwischen der 5'-Thymin-Base und dem gegenüberliegenden Adenin führt zu einer Destabilisierung der Doppelhelix. Die Strukturen wurden aus den PDB-Einträgen („Protein Data Bank“, [Ber03b]) 1TTD (CPD-Lesion) 1COC (Native DNA) übernommen und mit dem Programm VMD dargestellt [Hum96].

und ohne Schaden dargestellt. Die Strukturen basieren auf NMR-Analysen von McAteer und Mitarbeitern an einem DNA-Dodekamer und werden ausführlich in [McA98] beschrieben. Das Dodekamer besitzt die Sequenz $d(\text{GCACGAAT}[\text{cs}]\text{TAAG})\cdot d(\text{CTTAATTCGTGC})$ und ermöglicht die Bildung von Thymin-Dimeren zwischen den durch [cs] getrennten Thymin-Basen³. Ähnlich wie in Thymin-Oligomeren sind die Änderungen im Wesentlichen auf den Bereich der den Schaden bildenden Thymin-Basen und die beiden direkt benachbarten Basen beschränkt. Die Dimerisierung zwischen den Thymin-Basen der Doppelhelix erfordert wie in $(dT)_{18}$ eine deutliche Annäherung der beiden Thymin-Basen gegenüber der Ausgangsstruktur. Dabei reduziert sich durch die Zyklobutan-Bildung der Abstand zwischen den C1 und C1'-Atomen der beiden Zucker von etwa 5 auf 3,5 Å. Der Abstand zwischen dem C5- und C5'-Atom (bzw. dem C6- und C6'-Atom) der Thymin-Basen reduziert sich von etwa 4,2 Å auf 2,3 Å (bzw. von etwa 4,5 Å auf 2,2 Å). Die helikale Windung zwischen den am CPD-Schaden beteiligten Thymin-Basen liegt im Bereich von $+20^\circ$ und ist damit etwa 10° kleiner als in der ungeschädigten DNA. Obwohl die Thymin-Basen durch die Einschränkungen des Zyklobutan-Rings

³[cs], steht für das *cis-syn*-Isomer des CPD-Schadens.

nicht mehr parallel zueinander liegen und deutlich gegenüber der ursprünglichen Anordnung verzerrt sind, bleiben die Basenpaarungen zu den gegenüberliegenden Adenin-Basen im Wesentlichen erhalten. Lediglich die Thymin-Base am 5'-Ende des Strangs ist anstatt mit zwei, nur noch über eine Wasserstoffbrücke mit der gegenüberliegenden Adenin-Base gebunden. Die dadurch hervorgerufene Destabilisierung ($\sim 1-2$ kcal/mol) der Helix-Struktur wird als wichtiges Erkennungsmerkmal für Reparatur-Proteine diskutiert, da sie das Herausdrehen des Schadens bei der Reparatur durch CPD-Photolyasen aus der Helix erleichtert [McA98, Jin98].

Dieser kleine Überblick zu den für einen CPD-Schaden charakteristischen Änderungen in der Doppelhelix zeigt, dass in der Doppelhelix eine deutliche Abweichung von der idealen B-DNA Form den CPD-Schaden charakterisiert. Erfolgt die Bildung, wie in $(dT)_{18}$ schneller als mögliche konformationelle Änderungen, so lässt sich die geringe Schadensrate als Auswirkung der hohen strukturellen Ordnung in der B-DNA verstehen. Die Einschränkung durch die Wasserstoffbrücken führt zu einer wesentlich geringeren Flexibilität in der Doppelhelix und verhindert mit der parallelen Orientierung der Basen — bei einer mittleren helikalen Windung von etwa 36° — eine zu hohe Ausbeute an CPD-Schäden [Tra69]. In Bezug auf die Schadensbildung in der DNA-Doppelhelix ist entsprechend die Bestimmung der in der DNA-Doppelhelix möglichen reaktiven Konformationen von großer Bedeutung. Dabei stellt jedoch die Komplexität des Systems nach wie vor eine große Herausforderung für Rechenkapazitäten und Methoden dar. Wie bereits in vorhergehenden Abschnitt angesprochen, sind die ersten quantenmechanischen Beschreibungen zur Photophysik der CPD-Bildung bisher meist auf einzelne Thymin-Basen in der Gasphase beschränkt [BP07, Bla07]. Ein Ziel muss deshalb sein, diese Rechnungen auf größere Systeme zu erweitern und die reaktiven Geometrien zu definieren. Zusätzlich sind weitere Moleküldynamik-Simulationen an Einzel- und Doppelsträngigen Modell-Systemen notwendig, in denen Gleichgewichtsstrukturen und die Anteile reaktiver Konformationen bestimmt werden [Joh07].

6.2.2 CPD-Schäden und Konformationen in vivo

In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele, die die Annahme, dass die Dimerisierung auf der Einnahme „ungewöhnlicher“ Doppelhelix-Strukturen basiert, stützen.

Unterschiede zwischen A- und B-Form

Ein Beispiel dafür sind die unterschiedlichen Schadensraten zwischen DNA in der A- und der B-Form, deren Konformation in Abschnitt 2.1.2 beschrieben wurde. Dabei führt der Übergang von der B-DNA in eine A-DNA zu einer Reduktion der Dimerisierungsrate um bis zu einem Faktor zwei [Bec89]. Ein sogar noch größerer Rückgang wurde zwischen Thymin-Basen bei speziellen Haarnadel-Strukturen mit A-DNA Konformation gefunden [Kun04]. Da in beiden DNA-Formen dieselben Basenpaarungen vorliegen, lässt sich dies nur über Unterschiede in den zugänglichen Konformationen für benachbarte Basen erklären. Ein wesentlicher Grund könnte in der Veränderung der Anordnung der Basen zwischen A- und B-Form liegen. Während die Basen in der B-Helix senkrecht zur Helix-Achse stehen, sind sie in der A-Helix deutlich gegenüber der Helix-Achse geneigt. Dagegen ändert sich die mittlere helikale Windung zwischen zwei Basen beim Übergang von der A-Form ($\sim 33^\circ$) in die B-Form ($\sim 36^\circ$) nur wenig. Man kann deshalb annehmen, dass Konformationen mit diesen Werten für die helikale Windung in beiden Formen nicht reaktiv sind. Vielmehr ermöglicht erst eine passende Abweichung von

diesen Werten aufgrund natürlicher Fluktuationen die Einnahme reaktiver Geometrien. Vor allem die geringere konformationelle Variabilität der A-DNA gegenüber der B-DNA könnte deshalb ein wesentlicher Grund für die größere Widerstandsfähigkeit der A-DNA gegenüber CPD-Schäden sein.

Es gibt einige Hinweise, dass die Natur die oben beschriebenen Unterschiede zwischen A- und B-DNA Konformationen bezüglich der Widerstandsfähigkeit gegenüber CPD-Schäden gezielt ausnutzt. Zum Beispiel wird die deutlich verringerte Schadensrate von CPD-Photoschäden in Sporen auf eine durch Proteine induzierte Änderung der Konformation der B-DNA zurückgeführt. In diesen Sporen liegt die DNA, an Proteine gepackt, nicht in B-DNA sondern in einer A-DNA ähnlichen Konformation vor (siehe Kapitel 2.1.2). Dadurch wird die Quantenausbeute für mögliche CPD-Schäden unter hohen UV-Strahlenbelastungen deutlich verringert. Ein anderer interessanter Aspekt betrifft RNA-Moleküle, in denen CPD-Schäden unter Beteiligung der Pyrimidin-Basen Uracil und Cytosin gebildet werden können. Auch diese liegen meist in einer A-DNA ähnlichen Konformation vor, und besitzen eine gegenüber B-DNA geringere Schadenshäufigkeit. Diese höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber UV-induzierten Mutationen könnte in der Frühphase des Lebens - als noch keine schützende Ozon-Schicht zu hohe Strahlenbelastungen verhinderte - eine entscheidende Rolle gespielt haben. In der „RNA“-Welt Theorie wird angenommen, dass sich das „Leben“ - in Form von Molekülen, die sich selbst replizieren können, zunächst auf RNA-Molekülen basierte, bevor sich die DNA als effizienter und stabiler Informationsträger etablierte.

Schadenshäufigkeiten in der B-DNA

Bei der UV-Belichtung von Zell-DNA zeigen sich auffallende Periodizitäten von Schadenshäufigkeiten (CPD-Schäden) und Mutationen, die auch als „damage hot spots“ bezeichnet werden [Mil85, Bec84]. Für diese Effekte sind Wechselwirkung der DNA mit Proteinen von Bedeutung, aber auch bestimmte Basen-Sequenzen führen zu einer erhöhten Schadensrate. Zum Beispiel kommt es bei Belichtung von DNA im Zellkern, die in den Chromosomen an Histone gebunden ist, zu einer deutlich erhöhten Schadenshäufigkeit mit einer Periodizität von etwa 10 Basen [Gal87, Peh89]. Diese Periodizität wird auf die definierte Krümmung der DNA-Doppelhelix bei ihrer Windung um die Histon-Proteine (siehe Abschnitt 2.1.2) zurückgeführt [Peh92]. Die Bildung von CPD-Schäden wird offenbar in Bereichen maximal, an denen die Krümmung zur großen Furche am größten ist. Die erhöhte Schadensbildung scheint dabei im Wesentlichen ein Ausdruck der Konformation und nicht einer erhöhten Flexibilität zu sein [Peh89]. Das Verfolgen von CPD-Schäden in DNA („UV-Photofootprinting“) kann deshalb für das Erkennen bestimmter Abweichungen von der idealen B-DNA genutzt werden [Bec84]. In diesem Zusammenhang zeigen auch poly(dA·dT) Sequenzen ein bestimmtes Schadens-Muster [Mil85, Sut00]. Auch in diesen Sequenzen kommt es zu einer Krümmung der Helix und der Einnahme einer ungewöhnlich rigiden Helix-Struktur [Koo86, Gal87, Lya91]. In dieser tritt vor allem am 3'-Ende des Thymin-Strangs eine erhöhte Schadensrate auf. Bisher ist die biologische Funktion dieser Sequenzen noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt jedoch bereits Hinweise, dass sie eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Transkription im Zellzyklus spielen könnten [Sut00].

Resümee

Das in dieser Arbeit aus den zeitaufgelösten IR-Experimenten abgeleitete Modell zur CPD-Bildung geht davon aus, dass die statische Anordnung benachbarter Thymin-Basen [Peh89, Bec89] zum Zeitpunkt der UV-Absorption und nicht die Beweglichkeit den Ausgang der Photoreaktion bestimmt [Gal87, Lya91]. Selbst eine hohe Flexibilität erlaubt es bei einer bereits erfolgten Anregung in einem Thymin-Dublet nicht, innerhalb der Lebensdauer des angeregten Zustands eine reaktive Konformation zu erreichen. Aber eine höhere Flexibilität des DNA-Rückgrats kann den Anteil der reaktiven Konformationen zum Zeitpunkt der Lichtabsorption erhöhen. Das Wissen über die Kriterien, die eine reaktive Konformation bestimmen, wird in Zukunft wesentliche Beiträge zur Identifizierung von „damage hot spots“ liefern und gleichzeitig die Zuordnung von Mutationsmustern im Genom zu bestimmten Umweltfaktoren erlauben.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Das Makromolekül DNA dient als molekularer Träger der Erbinformation. Zu den allgegenwärtigen Gefahren für das Erbgut gehört die UV-Strahlung der Sonne. Sie kann zu photochemischen Reaktionen führen, in deren Folge es zu Mutationen und schweren Erkrankungen kommen kann. Der häufigste direkt durch solare UV-Strahlung erzeugte Photoschaden beruht auf der Bildung von Zyklobutan-Pyrimidin-Dimeren („cyclobutane pyrimidin dimer“, CPD) zwischen benachbarten Pyrimidin-Basen (Thymin, Cytosin) in der DNA. In dieser Arbeit wurde die Bildung eines Thymin-Dimers erstmals mit zeitaufgelöster IR-Spektroskopie untersucht. Das dabei eingesetzte Spektrometer kombiniert die hohe Struktursensitivität der Schwingungsspektroskopie mit einer Zeitauflösung im Subpikosekunden-Bereich. Mit dieser Technik konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Thymin-Dimeren in einem Thymin-Homopolymer innerhalb einer Pikosekunde ($1 \text{ ps} = 10^{-12} \text{ s}$) abläuft und damit sehr viel schneller ist als mögliche konformationelle Änderungen. Zusätzlich wurde an zwei Adenin-Derivaten der Einfluss der für DNA-Moleküle typischen Stapelung von Basen auf die Desaktivierung und Besetzung elektronischer Zustände zwischen Adenin-Basen untersucht. Adenin ist die zu Thymin komplementäre Base in der DNA-Doppelhelix, und die Ergebnisse sind damit Grundlage für weitere zeitaufgelöste IR-Experimente an doppelsträngigen DNA-Molekülen.

Methodik: Das Anreg-Abtast-Experiment basiert auf einem Femtosekunden-Lasersystem, das kurze Lichtimpulse ($\sim 90 \text{ fs}$) mit einer Zentralwellenlänge um 800 nm und einer Repetitionsrate von 1 kHz liefert. Über mehrstufige nichtlineare Prozesse werden daraus die für die Experimente benötigten Anreg-Impulse im UV-Bereich ($\sim 270 \text{ nm}$) und abstimmbare Abtast-Impulse im mittleren infraroten Spektralbereich ($3 - 10 \mu\text{m}$) erzeugt. Die Detektion erfolgt über eine Vielkanaldetektion, die das gleichzeitige Aufzeichnen der spektralen Signaländerungen über einen Bereich von etwa 100 cm^{-1} erlaubt. Die für die Anregung der Moleküle verwendeten UV-Impulse werden durch eine Frequenzverdreifung der Laser-Fundamentalen erzeugt, die im Rahmen dieser Arbeit in einem sehr kompakten Aufbau realisiert werden konnte. Die Erzeugung der abstimmbaren MIR-Abtast-Impulse erfolgt in einer mehrstufigen Frequenzkonversion. Aufgrund der sehr hohen Anforderungen der Experimente, in denen relative Transmissionsänderungen im Bereich von 10^{-5} und kleiner nachgewiesen werden mussten, wurde in dieser Arbeit die Sensitivität des IR-Spektrometers deutlich erhöht. Dies wurde durch Modifikationen in der Detektionselektronik und einer Optimierung der IR-Erzeugung erreicht. Dabei wurde das Signal- zu Rausch-Verhältnis der Detektionselektronik um einen Faktor 3 verbessert und durch Optimierung der mehrstufigen IR-Erzeugung eine reproduzierbare Erniedrigung der Intensitätsschwankungen der MIR-Impulse ermöglicht. In den zeitaufgelösten IR-Experimenten konnten damit, bei realistischen Messdauern, Absorptionsänderungen im Bereich von $10 \mu\text{OD}$ aufgelöst werden.

Modellsysteme: Aufgrund der komplexen Wechselwirkungen im Makromolekül DNA war für die explizite Untersuchung von Reaktionen und Wechselwirkungen zwischen einzelnen DNA-Basen eine Reduktion auf möglichst gut definierte Modell-Systeme notwendig. In dieser

Arbeit wurden einzelsträngige Modellsysteme und Mononukleotide ausgewählt und zunächst mit stationärer Spektroskopie im Lösungsmittel D_2O untersucht. Zur Klärung der Frage nach der Bildung von Thymin-Dimeren wurde das Thymin-Homopolymer $(dT)_{18}$ ausgewählt, da in ähnlichen Systemen die bisher höchsten Quantenausbeuten ($\sim 3\%$) für diese Art von Photoschäden in wässriger Lösung nachgewiesen werden konnten. Die intrinsischen Eigenschaften der Thymin-Basen wurden dagegen am Mononukleotid Thymidin-5'-Monophosphat (TMP) untersucht. Während $(dT)_{18}$ eine stark ungeordnete Struktur und einen geringen Anteil gestapelt vorliegender Thymin-Basen besitzt, bildet die Stapelung von Basen in der DNA-Doppelhelix ein wichtiges Strukturmerkmal. Der Einfluss dieser Anordnung auf die elektronischen Zustände von Adenin-Basen wurde durch einen Vergleich zwischen dem Mononukleotid Adenosin-5'-Monophosphat (AMP) und dem Adenin-Homopolymer poly(A) untersucht. Poly(A) eignet sich aufgrund seines hohen Anteils gestapelt vorliegender Basen ($\sim 65\%$), der sich in den stationären Absorptionsspektren durch eine ausgeprägte Reduktion der UV-Absorption um 260 nm zeigt (Hypochromie), für eine entsprechende Studie besonders gut.

Ergebnisse zur Photophysik der Adenin-Derivate AMP und poly(A): Da über die Photophysik von AMP-Molekülen bereits relativ viel bekannt ist, konnten an dieser Probe einige der für die zeitaufgelöste IR-Spektroskopie an Nukleinsäuren typischen Signalbeiträge diskutiert und zugeordnet werden. In AMP kommt es nach UV-Anregung zu einer sehr schnellen internen Konversion ($\tau_{IC} \sim 300$ fs) in den schwingungsangeregten Grundzustand. Entsprechend lassen sich die in den IR-Messungen nach 1 ps beobachteten Absorptionsänderungen — Ausbleichen der Grundzustandsabsorption und eine zu kleineren Wellenzahlen auftretende induzierte Absorption — dem Kühlen heißer Grundzustandsmoleküle auf einer Zeitskala von etwa 3 ps zuordnen. Während in AMP praktisch alle angeregten Moleküle diesem schnellen Desaktivierungspfad folgen, konnte in poly(A), neben einer zu AMP ähnlich schnellen Desaktivierung, zusätzlich die Besetzung langlebiger elektronischer Zustände mit Lebensdauern im 100 ps- und ns-Bereich nachgewiesen werden. Der Anteil dieser Zustände kann aus den Absorptionsänderungen abgeschätzt werden und liegt in der Größenordnung der in poly(A) gestapelt vorliegenden Basen ($\sim 65\%$). Dieser Zusammenhang lässt sich durch die Bildung Excimer-ähnlicher Zustände zwischen benachbarten Adenin-Basen erklären, für die in dieser Arbeit erstmals die IR-Absorption ermittelt werden konnte.

Ergebnisse zur Photophysik und Photochemie der Thymin-Derivate TMP und $(dT)_{18}$: Vor der Durchführung der zeitaufgelösten IR-Experimente an $(dT)_{18}$ wurde zunächst in stationären Belichtungs-Experimenten die IR-Signatur von Thymin-Dimeren in $(dT)_{18}$ bestimmt. Dabei konnten drei für den Dimer-Schaden charakteristische Schwingungsbanden mit Absorptionsmaxima bei 1465, 1402 und 1320 cm^{-1} nachgewiesen werden, die als Grundlage für die Interpretation der zeitaufgelösten Experimente verwendet wurden. Im Oligomer führt die geringe Wechselwirkung der Thymin-Basen dazu, dass sich mehr als 90 % der angeregten Basen in $(dT)_{18}$ ähnlich wie im Monomer TMP verhalten. In den meisten Thymin-Basen ($\sim 85\%$) kommt es nach UV-Anregung zu einer schnellen internen Konversion ($\tau_{IC} < 1$ ps) in den Grundzustand. Ein deutlich geringerer Anteil ($\sim 10\%$) besetzt dagegen langlebige elektronische Zustände mit Lebensdauern im 100 ps- und ns-Bereich, die sehr wahrscheinlich einen $n\pi^*$ -Charakter besitzen. Während in TMP auch mit einer Besetzung ($\sim 1\text{-}2\%$) von Triplett-Zuständen (${}^3\pi\pi^*$) mit Lebensdauern im μs -Bereich zu rechnen ist, konnte die Besetzung von Triplett-Zuständen in $(dT)_{18}$ — aufgrund der bisher nicht bekannten IR-Absorption dieser Zustände im Lösungsmittel D_2O — nicht abschließend geklärt werden.

Dagegen konnte die Bildung von Thymin-Dimeren in (dT)₁₈ durch einen Vergleich mit den Ergebnissen am Monomer TMP eindeutig nachgewiesen werden. Das Auftreten der in den stationären Experimenten bestimmten Dimer-Marker-Banden in (dT)₁₈ erfolgt innerhalb einer Pikosekunde. Die Quantenausbeute liegt bei 2-3 % und es ist keine Beteiligung langlebiger elektronisch angeregter Zustände bei der Dimer-Bildung nachweisbar. Diese Ergebnisse legen eine nahezu barrierele Photoreaktion über einen Singulett-Mechanismus nahe, bei dem sehr wahrscheinlich eine konische Durchschneidung zum Produktzustand (CPD-Schaden) führt. In Anbetracht dieser extrem schnellen Photoreaktion lassen sich die geringen Ausbeuten als Ausdruck der Konformation zum Zeitpunkt der UV-Absorption interpretieren. Die UV-induzierte Bildung von Thymin-Dimeren in (dT)₁₈ ist wesentlich schneller als konformationelle Änderungen im Einzelstrang, die benachbarte Thymin-Basen in eine für die Dimerisierung geeignete Anordnung bringen könnten. Aus diesem Grund ist eine Bildung von Thymin-Dimeren nur möglich, wenn die Anordnung zweier benachbarter Basen bereits zum Zeitpunkt der UV-Absorption für eine Dimerisierung geeignet ist (reaktive Konformation). Die geringe Ausbeute von 2-3 % in (dT)₁₈ ist deshalb Ausdruck der Struktur des Homopolymers, in dem sich im statistischen Mittel nur ein sehr geringer Anteil der Thymin-Basen in einer reaktiven Konformation befindet. Die am Modellsystem (dT)₁₈ erhaltenen Ergebnisse sind auch für die DNA-Doppelhelix relevant. Auch hier bewirkt erst die Abweichung von der idealen Doppelhelixstruktur die Einnahme reaktiver Konformationen und damit die Schadensbildung.

Ausblick: Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zeigen, dass die zeitaufgelöste Schwingungsspektroskopie wesentliche Beiträge zum Verständnis der Photochemie und Photophysik von Nukleinsäuren leisten kann. Neben den Aussagen zu speziellen Photoprodukten erlaubt die hohe Spezifität der IR-Spektroskopie dabei auch Aussagen zu den bei der UV-Anregung von DNA-Molekülen auftretenden angeregten langlebigen elektronischen Zuständen (Triplet-, $n\pi^*$ -, Excimer-Zuständen), die immer wieder als mögliche Intermediate von Photoschäden diskutiert werden. In diesem Zusammenhang besteht die Hoffnung, dass es durch die Weiterentwicklung quantenchemischer Modelle und die steigenden Rechnerkapazitäten in Zukunft möglich sein wird, die IR-Spektren elektronisch angeregter Zustände zu berechnen und damit eindeutig zuordnen zu können. Dabei steht neben der Untersuchung weiterer Photoschäden die Erforschung der von der Natur eingesetzten Reparaturmechanismen (z.B. Photolyasen) im Vordergrund. Auch bei der Aufklärung dieser Prozesse sind durch die zeitaufgelöste IR-Spektroskopie neue Erkenntnisse zu erwarten.

In Zusammenhang mit der Evolution des Lebens sind sowohl Erklärungen für die experimentell nachgewiesenen Schadenshäufigkeiten („damage hot spots“) im Genom, als auch für die geringere Schadenshäufigkeit in RNA-Molekülen von großem Interesse. Dafür ist es jedoch zunächst wichtig, die geometrischen Voraussetzungen (Abstände, Dihedralwinkel), die eine reaktive Konformation auszeichnen, genau zu kennen. Zu diesem Zweck sind in Zukunft ausführliche quantenmechanische Rechnungen für die angeregten Zustände und Molekulardynamik-Simulationen, die Aussagen zu den Konformationen erlauben, notwendig.

Anhänge

A Publikationen in Zusammenhang mit dieser Arbeit

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

- W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, P. Gilch, C. E. Crespo-Hernandez, V. N. Swaminathan, T. Carell, W. Zinth und B. Kohler. Thymine dimerization in DNA is an ultrafast photoreaction. *Science*, 315(5812), 625-629 (2007).
- W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, P. Gilch, W. Zinth, B. Kohler. Thymine Dimer Formation probed by Time-Resolved Vibrational Spectroscopy. *Ultrafast Phenomena XV*. Eds.: Corkum P., Jonas D., Miller R. J. D., Weiner A. M. Springer Series in Chemical Physics 88, 522-524 (2007).
- P. Gilch, W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, W. Zinth, C. E. Crespo-Hernandez and B. Kohler. Watching DNA Get „Sunburned“. *TRVS XIII Proceedings*, 48-50 (2007).

B Lösungsmittelkorrektur

Die IR-Absorption der Modell-Substanzen wird durch zwei Beiträge überlagert. Zum einen durch die breite Absorptionsbanden des Lösungsmittels D₂O zum anderen durch die Absorption von HDO-Molekülen die beim Auflösen und der Deuterierung der DNA- und RNA-Moleküle entstehen. Diese Beiträge lassen sich in zwei Schritten korrigieren:

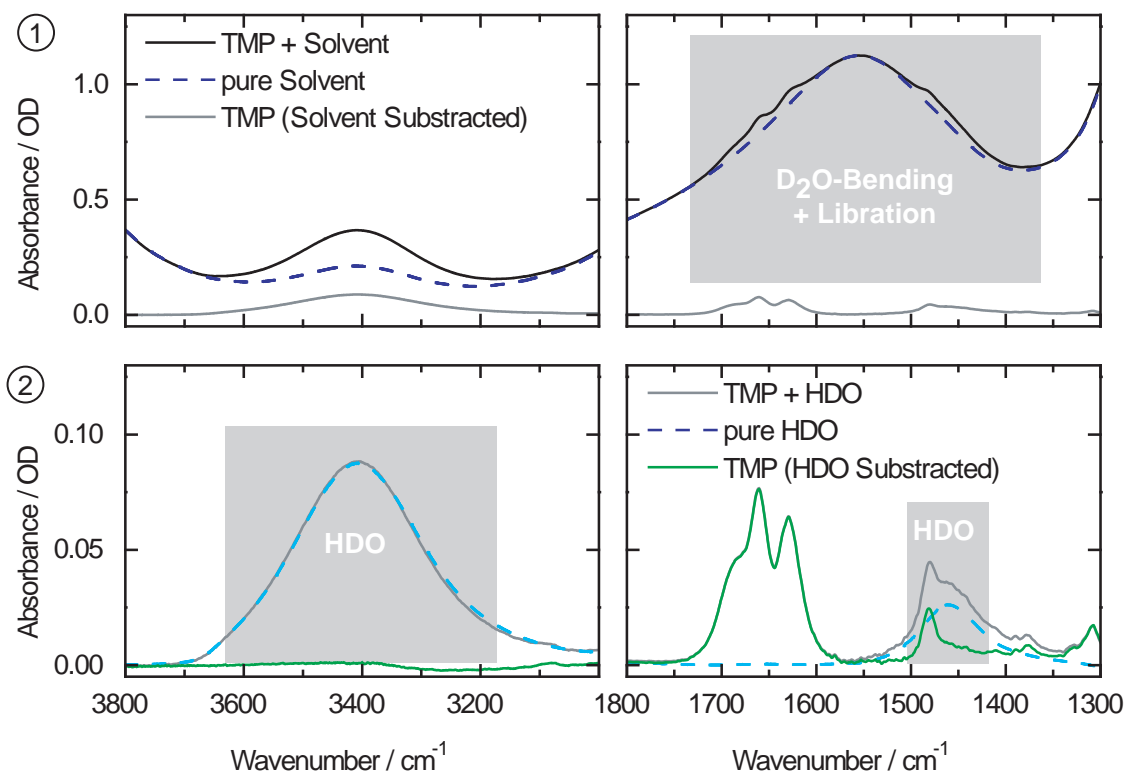


Abb. B.1: Lösungsmittel-Korrektur am Beispiel TMP. (1) Im ersten Schritt erfolgt eine Subtraktion der Lösungsmittelabsorption (D₂O-Pufferlösung, blau) von dem in der Pufferlösung vorliegenden TMP-Absorptionsspektrum (schwarz). (2) Im zweiten Schritt wird das daraus erhaltene Spektrum (grau) auf den Anteil der beim Auflösen der nicht deuterierten Probenmoleküle entstandenen HDO-Moleküle korrigiert. Dazu wird ein „reines“ HDO-Spektrum auf den Anteil der HDO-Moleküle in dem grauen Spektrum skaliert (hellblau) und subtrahiert. Daraus resultiert das korrigierte TMP-Spektrum (grün).

1. Für jede Probe wird unter identischen experimentellen Bedingungen sowohl ein Spektrum des reinen Lösungsmittels als auch der gelösten Substanz aufgenommen und anschließend der Anteil des Lösungsmittels subtrahiert. Eine entsprechende Prozedur ist in Abbildung B.1 (oben) für zwei Frequenzbereiche dargestellt. Aus der Subtraktion des reinen Lösungsmittels (D₂O-Pufferlösung, blau gestrichelte Linie) vom Ausgangsspektrum

(TMP + Lösungsmittel, schwarze Linie) erhält man das auf den Lösungsmittel-Anteil korrigierte TMP-Spektrum (graue Linie).

2. Das aus dem ersten Schritt gewonnene Spektrum enthält jedoch noch die Absorption der bei der Deuterierung der Nukleinsäuren gebildeten HDO-Moleküle. Die genaue Position der HDO-Banden hängt dabei vom Verhältnis H_2O zu D_2O ab. Bei den verwendeten Konzentrationen (~ 10 mM) liegt das Gleichgewicht eindeutig auf der Seite der deuterierten DNA-Molekülen und es tritt ein entsprechend hoher Anteil ($\sim 30 - 50$ mM) an HDO-Molekülen auf. Neben der Bande um 1450 cm^{-1} findet sich im Bereich um 3350 cm^{-1} die antisymmetrische Streckschwingung der HDO-Moleküle [Mar91, Cor05]. Diese Bande eignet sich aufgrund ihrer separaten Lage und ihrer hohen Oszillatorenstärke besonders gut zum Abschätzen des HDO-Anteiles und einer Korrektur [Mae80]. Die entsprechenden Spektren sind in Abbildung B.1 (unten) dargestellt. Für diese Korrektur wird ein aus einer separaten Messung gewonnenes HDO-Spektrum auf die maximale Absorption bei etwa 3400 cm^{-1} skaliert (hellblau gestrichelt) und von dem auf den reinen Lösungsmittelbeitrag korrigierten TMP-Spektrum (grau) aus dem ersten Schritt subtrahiert.

Diese beiden Korrekturschritte wurden bei allen in dieser Arbeit gezeigten IR-Absorptionsspektren durchgeführt.

C Wärmediffusion und temperaturabhängige Spektren

Die Temperaturabhängigkeit des Lösungsmittels führt in den zeitaufgelösten Messungen zu einem deutlichen Signalbeitrag, der die Absorptionsänderungen der DNA- und RNA-Derivate überlagert. Aus diesem Grund wurde die Temperaturabhängigkeit der Lösungsmittelabsorption und der Proben-Moleküle sowie die Wärmediffusion im Anregungsvolumen untersucht. Details zum experimentellen Aufbau für die temperaturabhängigen Experimenten finden sich in Abschnitt 3.5.

C.1 Wärmediffusion im Anregungsvolumen

In den zeitaufgelösten Messungen wird bei der UV-Absorption der Proben-Moleküle ein bestimmter Energiebetrag im Anregungsvolumen deponiert, der mit dem Zerfall der elektronisch angeregten Zustände (z.B. interne Konversion) in Wärme umgewandelt und an das Lösungsmittel abgegeben wird. Diese Temperaturerhöhung führt zu einer spektralen Verschiebung der Grundzustandsabsorptionsbanden und einer entsprechenden Absorptionsänderung in den zeitaufgelösten Messungen. Bei der Annahme, dass die spektrale Verschiebung und Amplitudenabnahme in erster Näherung linear von der Temperatur abhängt (siehe nächsten Abschnitt), führt eine nicht homogene Temperaturverteilung im Beobachtungsfenster zu dem gleichen Differenzsignal wie eine homogene Verteilung mit derselben Wärmeenergie [Lia94]. Eine weitere Veränderung im Beobachtungsfenster tritt erst auf, wenn die Wärme aus diesem Bereich diffundiert. Diese Zeitkonstante lässt sich über die Wärmediffusion im Lösungsmittel abschätzen. Die Diffusion lässt sich durch die Diffusionsgleichung

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \kappa \cdot \Delta T \quad (\text{C.1})$$

mit der Temperatur T und der Temperaturleitfähigkeit κ beschrieben [Som92]. Nimmt man für die initiale Temperatur eine Deltafunktion an (Punkt-Wärmepol), so lässt sich die Temperaturverteilung wiedergeben durch [Lia94]:

$$T(r, t) = \frac{Q}{(4\pi\kappa t)^{\frac{3}{2}}} \exp\left[-\frac{r^2}{4\kappa t}\right]. \quad (\text{C.2})$$

Die Temperatur im Abstand r vom Ursprung wird durch die Stärke der Wärmequelle $Q = E/\rho c$ und die Temperaturleitfähigkeit $\kappa = \lambda/(c \cdot \rho)$ bestimmt. Mit den Werten für die Wärmeleitfähigkeit ($\lambda = 589 \text{ mW/Km}$), Wärmekapazität ($c = 4,18 \text{ J/gK}$) und Dichte ($\rho = 0,998 \text{ g/cm}^3$) für das Lösungsmittel D_2O [Lid95, Bra96] ergibt sich eine Temperaturleitfähigkeit von:

$$\kappa_{\text{D}_2\text{O}} \cong 14,4 \frac{\text{\AA}^2}{\text{ps}}. \quad (\text{C.3})$$

Mit diesem Wert für die Temperaturleitfähigkeit lässt sich die Zeit abschätzen, in der die mittlere Diffusionslänge (Radius an dem die Temperatur auf $1/e$ abgefallen ist) die im Experiment betrachteten Dimensionen erreicht:

$$r_{(1/e)} = \sqrt{4\kappa t} \text{ bzw. } t = \frac{r^2}{4\kappa}. \quad (\text{C.4})$$

Mit einem Durchmesser des Abtast-Impulses von etwa $100 \mu\text{m}$ ergibt sich damit eine Zeitkonstante von etwa 4 ms. Im Beobachtungsfenster der zeitaufgelösten Messung (bis 4 ns) bleibt die Wärmemenge im betrachteten Volumen deshalb praktisch konstant. In den zeitaufgelösten Experimenten ist mit einer Temperaturerhöhung in einer Größenordnung von etwa 50 mK zu rechnen.

C.2 Temperaturabhängige Absorptionsspektren

Sowohl das Lösungsmittel als auch die darin gelösten Proben-Moleküle können bei einer Temperaturerhöhung zu den beobachteten Absorptionsänderungen beitragen. Beide Beiträge werden im Folgenden kurz betrachtet.

In Abbildung C.1 A ist die Absorption des Lösungsmittels für Temperaturen zwischen 295 K und 308 K dargestellt. Das Maximum der Absorption bei etwa 1560 cm^{-1} wird einer

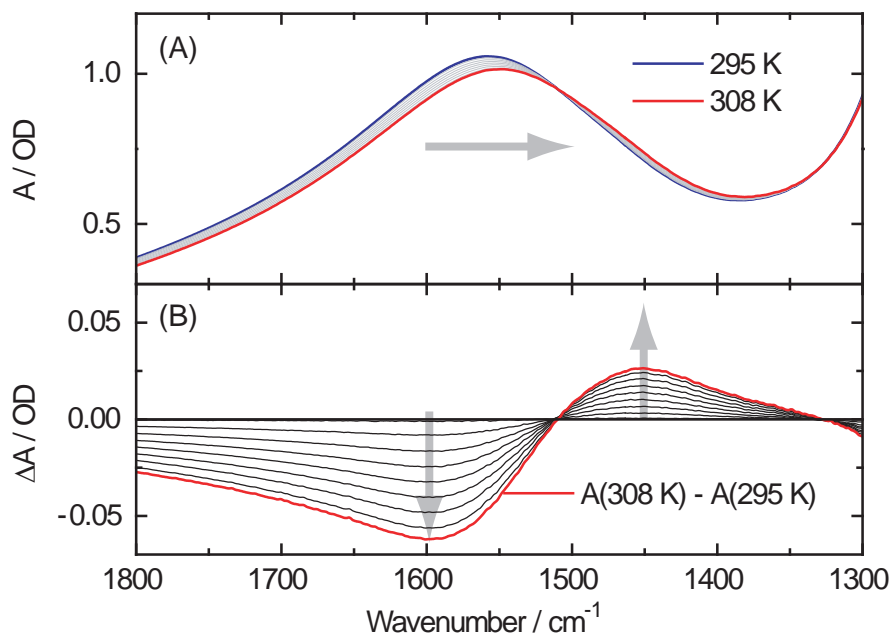


Abb. C.1: Abhängigkeit der IR-Absorption des Lösungsmittels D_2O von der Temperatur bei einer Schichtdicke von $\sim 90 \mu\text{m}$. (A) Absolutspektren zwischen 295 und 308 K. (B) Differenzspektren zur Absorption bei 295 K.

Kombinationsschwingung aus der Biege- und einer Librations-Schwingung der D_2O -Moleküle zugeordnet [Mar91], die bei Temperaturerhöhung eine Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen und eine Erniedrigung der Amplitude erfährt. Die sich daraus ergebenden Differenzspektren zum Ausgangsspektrum sind in der Abbildung 5.6 B zu sehen.

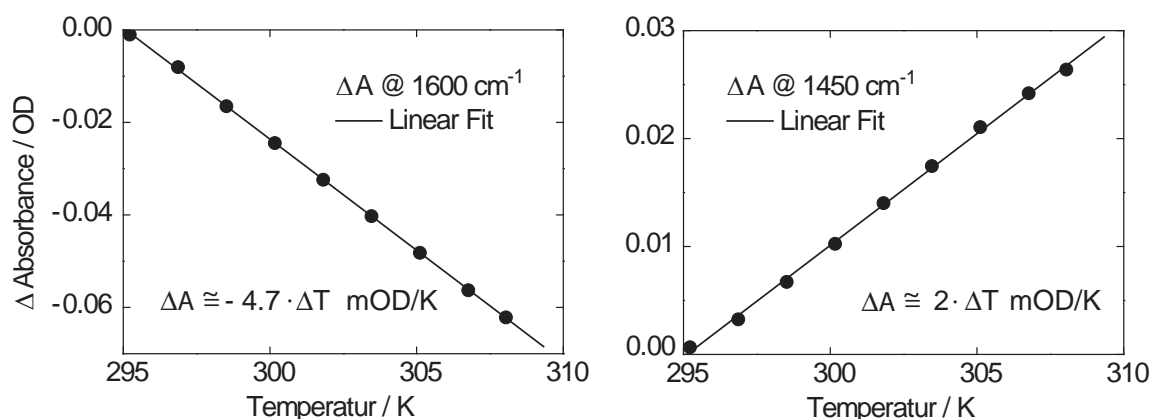


Abb. C.2: Absorptionsänderungen in Abhängigkeit von der Temperatur im Lösungsmittel D_2O bei einer Schichtdicke $d \sim 90 \mu\text{m}$.

In Abbildung 5.6 sind die Absorptionsänderungen für 1600 und 1450 cm^{-1} aufgetragen. Beide Spektralpositionen lassen sich sehr gut mit einer Geraden anpassen. Das bedeutet,

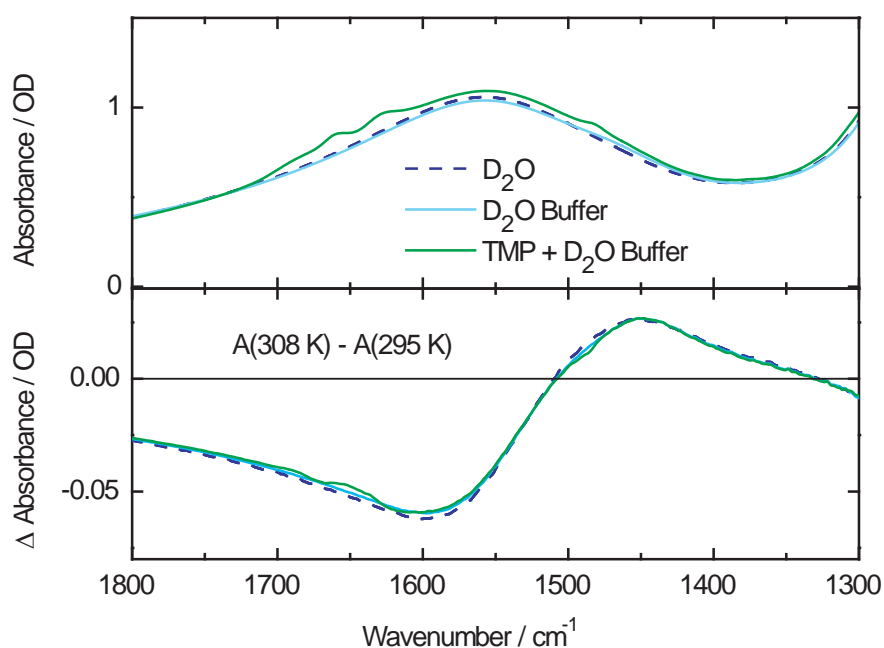


Abb. C.3: Oben: Vergleich der IR-Absorption von D_2O , der D_2O -Pufferlösung (50 mM Kaliumphosphatpuffer, $\text{pH} = 7$) und TMP (gelöst in der Pufferlösung). Unten: Differenzspektren nach einer Temperaturerhöhung von 295 auf 308 K. Es ergeben sich für alle drei „Proben“ sehr ähnliche Absorptionsänderungen. Der Beitrag der gelösten TMP-Moleküle ist bei den verwendeten Konzentrationen ($\sim 10\%$) relativ gering.

dass die Absorptionsänderungen im betrachteten Temperaturbereich direkt proportional zur Temperaturänderung sind. Die in den zeitaufgelösten Messungen zu erwartenden Absorptionsänderungen lassen sich deshalb über eine lineare Skalierung dieser Differenzspektren

erhalten. Für eine einfache Abschätzung sind in den Graphen die Steigungen der Absorptionsänderung (Schichtdicke $\sim 90 \mu\text{m}$) angegeben. Der Einfluss der gelösten Moleküle, die im thermischen Gleichgewicht neben dem Lösungsmittel ebenfalls zu den Absorptionsänderungen beitragen wird in Abbildung C.3 betrachtet. In Abbildung C.3 (oben) sind die Absolutspektren für D_2O (blau gestrichelt), die D_2O -Pufferlösung (hellblau) und TMP (gelöst in der D_2O -Pufferlösung, grün) gezeigt. Die bei einer Temperaturerhöhung von 295 auf etwa 308 K erhaltenen Absorptionsänderungen sind im unteren Teil der Abbildung zu sehen. Sie zeigen, dass bei den verwendeten Konzentrationen ($\sim 10 \text{ mM}$) die Absorptionsänderung der gelösten TMP-Moleküle im Vergleich zum Lösungsmittel vernachlässigt werden kann. Lediglich zwischen 1700 und 1620 cm^{-1} führt die temperaturabhängige Absorption der TMP-Moleküle zu sichtbaren Absorptionsunterschieden. Die relativ kleinen Abweichungen zwischen dem reinen Lösungsmittel D_2O und TMP um 1500 cm^{-1} sind dagegen vor allem auf die, beim Auflösen der Probe, entstandenen HDO-Moleküle zurückzuführen, die eine Absorptionsbande um 1450 cm^{-1} besitzen (siehe Anhang B). Dies wird beim Vergleich mit der D_2O -Pufferlösung deutlich, die ebenfalls eine bestimmte Konzentration an HDO-Molekülen aufweist, deutlich.

D Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Bei Kenntnis des wellenlängenabhängigen Extinktionskoeffizienten (ϵ_λ) und der Schichtdicke (d) lässt sich die Konzentration (c) einer gelösten Substanz aus dem Absorptionsspektrum bestimmen ($A = \epsilon \cdot d \cdot c$). Auf diese Weise lassen sich aus den Absorptionsspektren Unsicherheiten bei der Einwaage der Proben, die zum Teil nur in sehr geringen Mengen (< 1 mg) vorliegen, überprüfen. Für Nukleinsäuren sind in diesem Zusammenhang zwei Punkte wichtig. Zum einen gibt es größere Unterschiede in den Literaturangaben für die Extinktionskoeffizienten [Cav04] von DNA- und RNA-Molekülen. Zum anderen sind Extinktionskoeffizienten zwar für die meisten Monomere, aber nur für relativ wenige Nukleotid-Sequenzen bekannt. Die UV-Absorptionsspektren von AMP und poly(A) in Abschnitt 4.2 zeigen sehr deutlich, dass die Wechselwirkungen in Poly-Nukleotidsequenzen einen großen Einfluss auf die Absorption im UV-Bereich haben können. Eine ausführliche Zusammenstellung der Extinktionskoeffizienten und Methoden, mit denen sich die Extinktion für Oligo-Nukleotide abschätzen lässt, findet sich zum Beispiel in [Kal96, Cav04].

Molekül	ϵ_{260} [M ⁻¹ cm ⁻¹]	A_{260} [OD]	C_{lit} [mM]	C_{exp} [mM]
AMP	15020	0,95	6,9	7,2 ± 0,5
poly(A)	9800	0,59	6,8	7,1 ± 0,5
TMP	8560	0,69	9	9 ± 0,5
(dT) ₁₈	7800	0,71	10	> 8,3

Tabelle D.1: Vergleich der Extinktionskoeffizienten und Konzentrationen mit den bei der Einwaage bestimmten Konzentrationen. Die Extinktionskoeffizienten der Monomere sind [Cav04] entnommen. Extinktionskoeffizienten der Poly-Nukleotiden beziehen sich auf Angaben in [Kal96, Gir07, Sin62].

Die für die einzelnen Adenin- und Thymin-Derivate angegebenen Extinktionskoeffizienten beziehen sich auf Angaben in [Kal96, Cav04, Sin62, Gir07] und sind in Tabelle D.1 zusammengefasst. Die Literaturangaben für den Extinktionskoeffizienten von poly(A) an der Stelle des Absorptionsmaximums ($\lambda_{max} = 257$ nm) liegen zwischen 10000 und 10700 M⁻¹cm⁻¹ [Sin62, Gir07]. Für die Abschätzung der Konzentration wurde deshalb der Mittelwert von 10350 M⁻¹cm⁻¹ für $\lambda_{max} = 257$ nm angenommen, und anhand der gemessenen Spektren der Wert für eine Wellenlänge von 260 nm berechnet. Der Extinktionskoeffizient für (dT)₁₈ wurde anhand der Angaben für das Oligomer (T)₉ in [Kal96] abgeschätzt. Da in Thymidin-Polymeren nur eine geringe Wechselwirkung zwischen den Thymin-Basen besteht und deshalb nur ein relativ kleiner Hypochromie-Effekt zu erwarten ist, sollte die auf eine Base umgerechnete Extinktion von (T)₉ eine sehr gute Näherung für die tatsächliche Extinktion in (dT)₁₈ darstellen. In der Tabelle sind zum Vergleich, die aus der Einwaage bestimmten Konzentrationen angeben. Die Konzentrationsangaben für die Monomere und das Polymer poly(A) stimmen, im Rahmen der Messgenauigkeiten bei der Einwaage und der Schichtdicke (Schichtdicke

D Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

$\sim 90 \mu\text{m}$) gut mit den berechneten Werten überein. Lediglich für das Oligomer $(dT)_{18}$ konnte aus der Einwaage nur eine untere Grenze für die Konzentration angegeben werden. Im Fall von $(dT)_{18}$ war die Probe als Pulver in kleinen Einheiten zu etwa 1 mg in separaten Gefäßen portioniert und wurde vor dem Auflösen nicht extra abgewogen. Es zeigte sich jedoch, dass die Angaben des Herstellers in Bezug auf den tatsächlichen Inhalt immer zu gering waren.

E Globale Datenanpassung

Die experimentellen Daten lassen sich in einer globalen Datenanalyse mit einer Summe von Exponentialfunktionen anpassen. Allerdings ist bei der Interpretation Vorsicht geboten, da die frühen Zeiten (zwischen 1 ps und 10 ps) durch die Kühl-Signaturen heißer Grundzustands-Moleküle dominiert werden. Dabei kommt es zu einer spektralen Verschiebung der induzierten Absorption die nur unter Einbeziehung mehrerer exponentieller Zerfälle gut wiedergegeben werden kann. In der Fit-Routine führt diese Schwierigkeit zum Teil zu spiegelsymmetrischen Amplitudenverläufen für zeitlich nahe beieinanderliegende Zeitkonstanten und zu Kompensationseffekten. Dagegen sind die Zeitkonstanten für Verzögerungszeiten größer 10 ps — nach dem Abklingen der Kühlbeiträge — für die Dateninterpretation relevant. Im Folgenden sind die

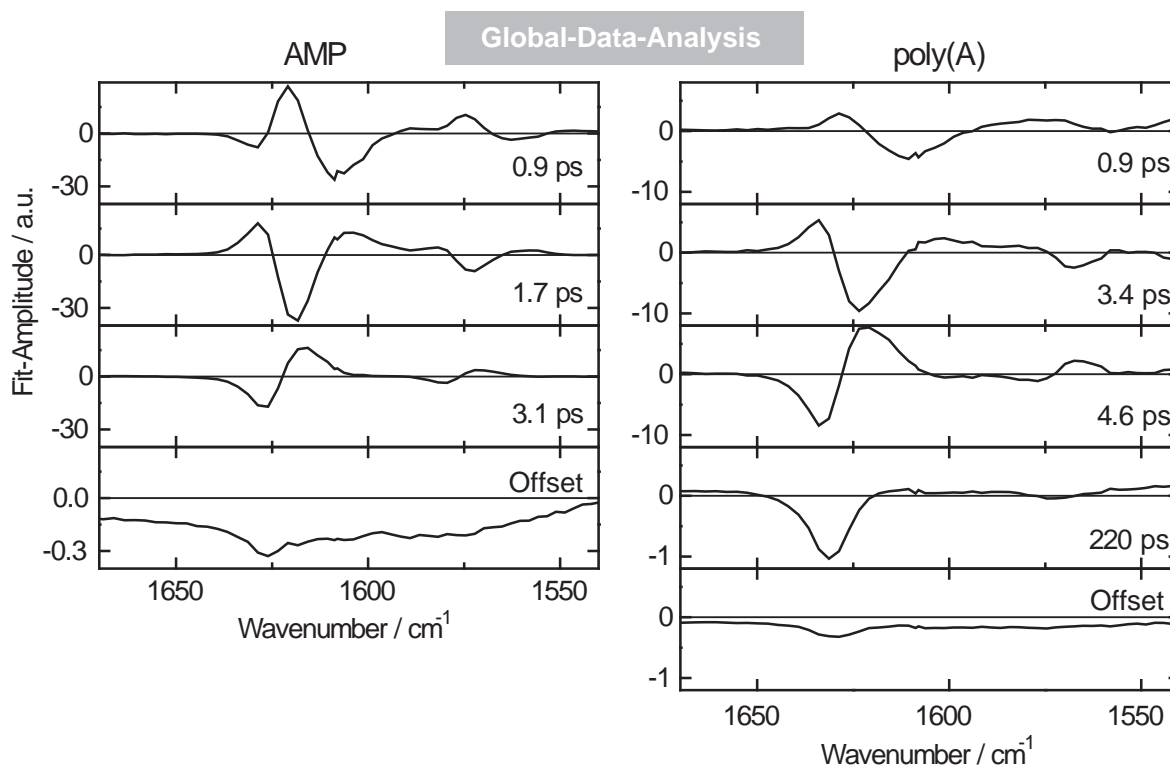


Abb. E.1: Darstellung der Fit-Amplituden für die bei der globalen Datenanalyse der Messungsergebnisse an AMP (links) und poly(A) (rechts) gefundenen Zeitkonstanten. Während die Datenanpassung an AMP für die Wiedergabe der Kinetiken nur drei Zeitkonstanten im Pikosekundenbereich erfordert (Interne Konversion, Kühlsignatur), ist für die Datenanpassung an poly(A) mindestens eine zusätzliche Zeitkonstante im 200-Pikosekundenbereich notwendig.

Zeitkonstanten und Fitamplituden für die Adenin- (Abbildung E.1) und Thymin-Derivate (E.2) aus der globalen Datenanpassung dargestellt. Die Anpassung der Daten für Verzögerungszeiten

größer 1 ps (durchgezogene Linie) erfolgte mit einer Summe von Exponentialfunktionen, die mit der Apparate-Funktion (Gauß-Funktion mit Halbwertsbreite = 350 fs (FWHM)) gefaltet werden.

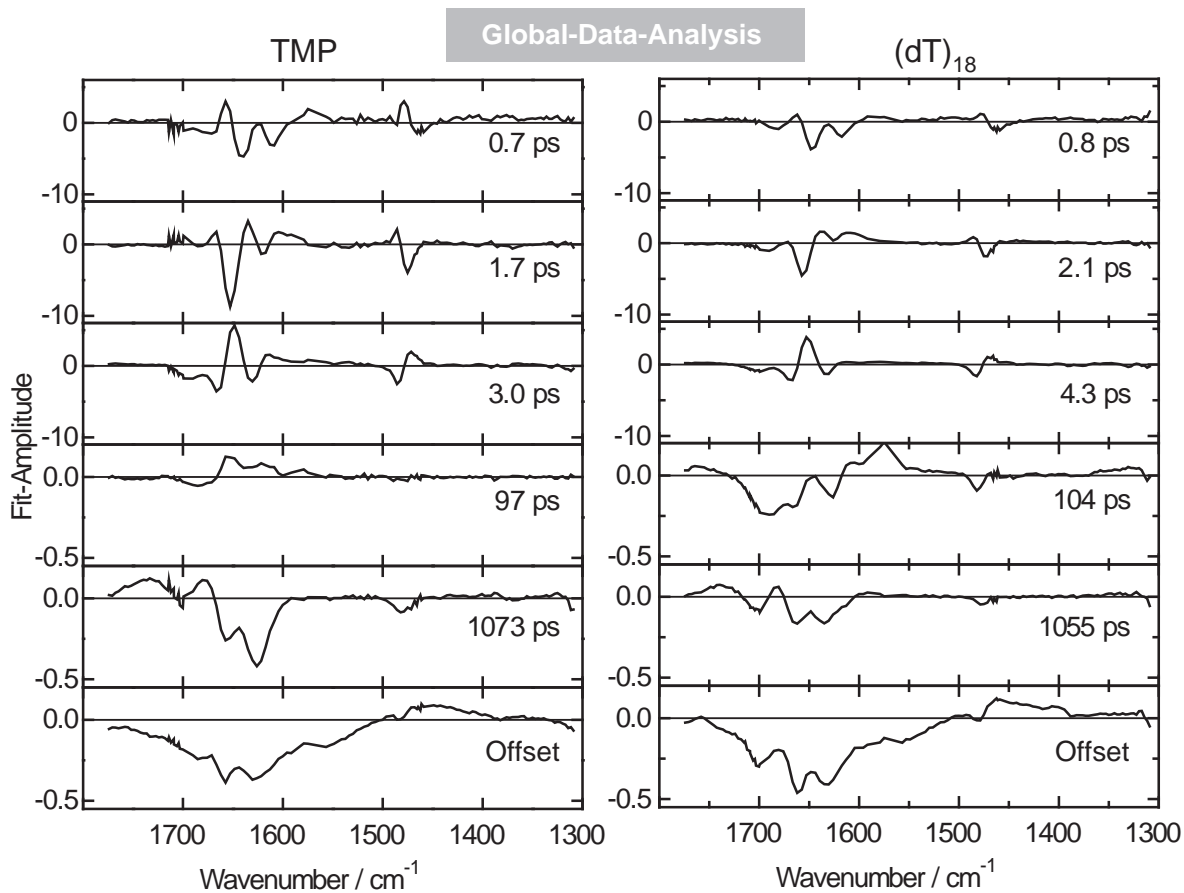


Abb. E.2: Darstellung der Fit-Amplituden für die bei der globalen Datenanalyse der Messungsergebnisse an TMP (links) und (dT)₁₈ (rechts) gefundenen Zeitkonstanten. In beiden Proben sind neben 3 Zeitkonstanten im Pikosekundenbereich (Interne Konversion, Kühlsignatur), weitere Zeitkonstanten mit etwa 100 ps, bzw. 1 ns notwendig.

Abbildungsverzeichnis

1.1	UV-induzierte Bildung eines Thymin-Dimers in der DNA-Doppelhelix	2
1.2	Absorption von UV-Strahlung in der Atmosphäre und menschlicher Haut . . .	4
1.3	UV-induzierte Prozesse in der Haut und Wirkungsspektrum für die Entstehung von Hautkrebs	5
1.4	Klimawandel: Prognosen zur Ozonkonzentration und der Hautkrebsrate . . .	8
2.1	Bausteine der Nukleinsäuren	14
2.2	Röntgenbeugung und Strukturaufklärung: Modell der DNA-Doppelhelix . . .	16
2.3	DNA-Formen: Darstellung und Strukturparameter der A-, B- und Z-DNA . . .	17
2.4	Wechselwirkungen in der DNA: Wasserstoffbrücken und Basenstapelung . . .	20
2.5	Umsetzung der genetischen Information: Transkription und Translation . . .	22
2.6	Überblick zu DNA-Schäden und Reparaturmechanismen	24
2.7	DNA-Schäden: Desaminierung von Cytosin	24
2.8	DNA-Schäden: Molekülschema zur CPD-Bildung	27
2.9	DNA-Schäden: Ausbeuten für Pyrimidin-Photoprodukte	28
2.10	DNA-Schäden: Mutationen nach Cytosin-Dimer-Schäden	29
2.11	DNA-Schäden: Molekülschemata für das (6-4) and Dewar Photoprodukt . . .	30
2.12	DNA-Schäden: Mutationen nach (6-4) Photoaddukten	30
2.13	DNA-Schäden: Molekülschema für das Spore Photoaddukt	31
2.14	Reparaturprozesse: Struktur der CPD-Photolyase und Reparaturprinzip	36
2.15	Photophysik und Photochemie: Darstellung von Potentialflächen	38
2.16	Photophysik: Jablonski-Diagramm	39
2.17	Photophysik: Excimer-Bildung	42
2.18	Photophysik: Desaktivierung über eine konische Durchschneidung	44
2.19	Photochemie: Potentialflächenmodell	46
2.20	Thymin-Dimere: Absorptionsspektrum und Molekülschema	47
2.21	Thymin-Dimere: DFT-Rechnung für thermisch verbotene Zykladdition	48
2.22	Thymin-Dimere: Reaktionsmodell für Monomer und Aggregat	50
3.1	Prinzip der Anreg-Abtast-Spektroskopie	54
3.2	Schema des Femtosekunden-Infrarot-Spektrometers	55
3.3	Schema des zentralen Femtosekunden-Lasersystems	56
3.4	Abtast-Impulse: Schema der IR-Erzeugung	58
3.5	Anreg-Impulse: Schema der UV-Erzeugung	60
3.6	Anreg-Impulse: Spektrum der UV-Impulse	61
3.7	Messplatz: Probenkreislauf und Küvetten-Design	62
3.8	Messplatz: Strahlverlauf am Probenort	64
3.9	Bestimmung der Apparatefunktion: Transiente Messung an Silizium	67

3.10	Lösungsmittelsignal: Transiente Messungen an D ₂ O	72
3.11	Stationäre IR-Messungen: Schema des Aufbaus	74
4.1	Modell-Systeme: Molekülschema für AMP, poly(A), TMP und (dT) ₁₈	76
4.2	AMP und poly(A): UV-Absorptionsspektren	79
4.3	AMP und poly(A): IR-Absorptionsspektren	81
4.4	TMP und (dT) ₁₈ : UV-Absorptionsspektren	82
4.5	TMP und (dT) ₁₈ : IR-Absorptionsspektren	83
4.6	TMP, TpT und (dT) ₁₈ : Änderung der IR-Absorption durch UV-Belichtung	85
4.7	TpT und (dT) ₁₈ : UV-induzierte Absorptionsänderung im Vergleich	87
4.8	DMC-Moleküle: IR-Absorptionsspektren	89
4.9	Identifikation der Photoschäden: Vergleich der IR-Absorptionsspektren und UV-induzierten Differenzspektren von TpT und (dT) ₁₈ mit den DMC-Molekülen	90
4.10	(dT) ₁₈ und Thymin-Dimer: IR-Absorption	92
5.1	AMP: Signalbeiträge vor und am Zeitnullpunkt	96
5.2	Energieschemata: Zwei-Photonen-Ionisation und Zwei-Photonen-Absorption	99
5.3	Schwingungsenergie: Intra- und Intermolekulare Energieumverteilung	101
5.4	IR-Anharmonizitäten: Potential-Modelle	102
5.5	IR-Absorption: Simulierte IR-Spektren in Abhängigkeit von der Temperatur	103
5.6	D ₂ O: Temperaturabhängige IR-Absorption	105
5.7	AMP und poly(A): Konturdarstellungen und transiente Spektren	107
5.8	AMP und poly(A): Zeitverläufe	108
5.9	AMP: Modell zur Beschreibung der Messergebnisse	112
5.10	poly(A): Energieabhängigkeit der Absorptionsänderungen	113
5.11	AMP und poly(A): Transiente Spektren und Grundzustands-Absorption	116
5.12	poly(A): IR-Absorption der Excimer-Zustände	117
5.13	poly(A): Modell zur Beschreibung der Messergebnisse	119
5.14	TMP und (dT) ₁₈ : Konturdarstellungen und transiente Spektren I	121
5.15	TMP und (dT) ₁₈ : Konturdarstellungen und transiente Spektren II	122
5.16	TMP und (dT) ₁₈ : Zeitverläufe	124
5.17	Thymin-Dimere: Vergleich der transienten Spektren mit Dimer-Marker-Banden	128
5.18	TMP und (dT) ₁₈ : Vergleich der Zeitverläufe im Bereich der Dimer-Marker-Banden	131
5.19	TMP und (dT) ₁₈ : Analyse der transienten Spektren nach 3 ns	132
5.20	(dT) ₁₈ : Energieabhängigkeit der Absorptionsänderungen	133
5.21	Thymin: Energetische Reihenfolge und Übergänge der elektronischen Zustände	135
5.22	TMP: IR-Absorptionsspektrum der ns-Komponente	139
5.23	TMP: Modell zur Beschreibung der Messergebnisse	141
6.1	(dT) ₁₈ : Schema zur UV-induzierten CPD-Bildung	143
6.2	CPD und TpT: Molekülstrukturen	144
6.3	Triplet- oder Singulett-Mechanismus	147
6.4	Thymin-Dimerisierung: Energieschema für die Bildung von Thymin-Dimeren in der Gasphase	149

6.5	(dT) ₁₈ : Potentialenergie-Schema für die CPD-Bildung zwischen reaktiven Thymin-Basen im Einzelstrang	150
6.6	DNA-Doppelhelix: Molekülstrukturen mit und ohne CPD-Schaden	153
B.1	Lösungsmittel-Korrektur	165
C.1	Temperaturabhängige IR-Absorption des Lösungsmittels	168
C.2	Temperaturabhängige Absorptionsänderung des Lösungsmittels	169
C.3	Temperaturinduzierte Absorptionsänderungen: Lösungsmittel vs. gelöste Probe	169
E.1	AMP und poly(A): Fit-Amplituden der globalen Datenanalyse	173
E.2	TMP und (dT) ₁₈ : Fit-Amplituden der globalen Datenanalyse	174

Tabellenverzeichnis

3.1	Technische Daten des zentralen Femtosekunden-Laser-Systems	57
3.2	Experimentelle Parameter der Anreg-Abtast-Experimente	66
4.1	AMP und poly(A): IR-Bandenzuordnung	81
4.2	TMP und (dT) ₁₈ : IR-Bandenzuordnung	83
4.3	AMP, poly(A), TMP und (dT) ₁₈ : Spektroskopische Eigenschaften	92
5.1	AMP und poly(A): Fit-Parameter	109
5.2	TMP und (dT) ₁₈ : Fit-Parameter	125
D.1	Extinktionskoeffizienten und Konzentrationen	171

Literaturverzeichnis

- [Aam97] A. AAMOUCHE, M. GHOMI, C. COULOMBEAU, L. GRAJCAR, M. H. BARON, H. JOBIC, G. BERTHIER. *Neutron inelastic scattering, optical spectroscopies, and scaled quantum mechanical force fields for analyzing the vibrational dynamics of pyrimidine nucleic acid bases. Thymine*. J. Phys. Chem. A 101(10):1808–1817, 1997.
- [Ada86] S. ADAM, J. LIQUIER, J. A. TABOURY, E. TAILLANDIER. *Right-Handed and Left-Handed Helixes of Poly[d(A-T)]·Poly[d(A-T)] Investigated by Infrared-Spectroscopy*. Biochemistry 25(11):3220–3225, 1986.
- [ADP07] ADP. *Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Prävention*. <http://www.unsererahaut.de>, 2007.
- [Aid96] M. AIDA, M. KANEKO, M. DUPUIS. *An ab initio MO study on the thymine dimer and its radical cation*. Int. J. Quantum Chem. 57(5):949–957, 1996.
- [Alb04] B. ALBERTS, A. JOHNSON, J. LEWIS, U. A. *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH, Weinheim, 4 Auflage, 2004.
- [Alh97] C. ALHAMBRA, F. J. LUQUE, F. GAGO, M. OROZCO. *Ab initio study of stacking interactions in A- and B-DNA*. J. Phys. Chem. B 101(19):3846–3853, 1997.
- [Ame83] B. N. AMES. *Dietary Carcinogens and Anticarcinogens - Oxygen Radicals and Degenerative Diseases*. Science 221(4617):1256–1264, 1983.
- [And00] N. A. ANDERSON, K. HANG, J. B. ASBURY, T. Q. LIAN. *Ultrafast mid-IR detection of the direct precursor to the presolvated electron following electron ejection from ferrocyanide*. Chem. Phys. Lett. 329(5-6):386–392, 2000.
- [And06] A. ANDRADY, P. J. AUCAMP, A. F. BAIS, C. L. BALLARE, L. O. BJORN, J. F. BORNMAN, M. CALDWELL, A. P. CULLEN, D. J. ERICKSON, F. R. DE GRUIJL, D. P. HADER, M. ILYAS, G. KULANDAIVELU, H. D. KUMAR, J. LONGSTRETH, R. L. MCKENZIE, M. NORVAL, H. H. REDHWI, R. C. SMITH, K. R. SOLOMON, B. SULZBERGER, Y. TAKIZAWA, X. Y. TANG, A. H. TERAMURA, A. TORIKAI, J. C. VAN DER LEUN, S. R. WILSON, R. C. WORREST, R. G. ZEPP. *Environmental effects of ozone depletion and its interactions with climate change: Progress report, 2005*. Photochem. Photobiol. Sci. 5(1):13–24, 2006.
- [App66] APPLEQUIST, J., V. DAMLE. *Thermodynamics of One-Stranded Helix-Coil Equilibrium in Polyadenylic Acid*. J. Am. Chem. Soc. 88(17):3895–3900, 1966.

- [Arn71] J. A. ARNAUD, W. M. HUBBARD, MANDEVIL.GD, B. D. CLAVIERE, E. A. FRANKE, J. M. FRANKE. *Technique for Fast Measurement of Gaussian Laser Beam Parameters*. Appl. Optics 10(12):2775–2776, 1971.
- [Arn80] S. ARNOTT, R. CHANDRASEKARAN, D. L. BIRDSALL, A. G. W. LESLIE, R. L. RATLIFF. *Left-Handed DNA Helices*. Nature 283(5749):743–745, 1980.
- [Asc00] A. ASCOLI. *A new splitting product of yeast nuclein*. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 31(1/2):161–164, 1900.
- [Ass00] M. ASSEL, R. LAENEN, A. LAUBEREAU. *Femtosecond solvation dynamics of solvated electrons in neat water*. Chem. Phys. Lett. 317(1-2):13–22, 2000.
- [Ast38] W. T. ASTBURY, F. O. BELL. *X-ray study of thymonucleic acid*. Nature 141:747–748, 1938.
- [Atk03] P. ATKINS. *Physikalische Chemie*. VCH, Weinheim, 2003.
- [Atk06] P. ATKINS. *Galileos Finger. Die zehn großen Ideen der Naturwissenschaft*. Klett-Cotta, 1 Auflage, 2006.
- [Auc07] P. J. AUCAMP. *Questions and answers about the effects of the depletion of the ozone layer on humans and the environment*. Photochem. Photobiol. Sci. 6(3):319–330, 2007.
- [Ave95] O. T. AVERY, C. M. MACLEOD, M. MCCARTY. *Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types - Induction of Transformation by a Deoxyribonucleic-Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III (Reprinted from Journal of Experimental Medicine, Vol 79, Pg 137-158, 1944)*. Mol. Med. 1(4):344–365, 1995.
- [Bac98] S. BACKUS, C. G. DURFEE, M. M. MURNANE, H. C. KAPTEYN. *High power ultrafast lasers*. Rev. Sci. Instrum. 69(3):1207–1223, 1998.
- [Bac04] A. BACOLLA, R. D. WELLS. *Non-B DNA conformations, genomic rearrangements, and human disease*. J. Biol. Chem. 279(46):47411–47414, 2004.
- [Bai97] L. E. BAILEY, R. NAVARRO, A. HERNANZ. *Normal coordinate analysis and vibrational spectra of adenosine*. Biospectroscopy 3(1):47–59, 1997.
- [Bal82] J. P. BALLINI, M. DANIELS, P. VIGNY. *Wavelength-Resolved Lifetime Measurements of Emissions from DNA Components and Poly rA at Room Temperature Excited with Synchrotron Radiation*. J. Lumines. 27(4):389–400, 1982.
- [Bal91] J. P. BALLINI, M. DANIELS, P. VIGNY. *Time-Resolved Fluorescence Emission and Excitation Spectroscopy of d(TA) and d(AT) Using Synchrotron Radiation*. Biophys. Chem. 39(3):253–265, 1991.
- [Ban03] M. BANYAY, M. SARKAR, A. GRASLUND. *A library of IR bands of nucleic acids in solution*. Biophys. Chem. 104(2):477–488, 2003.

- [Bar95] Y. BARAK, O. COHENFIX, Z. LIVNEH. *Deamination of Cytosine-Containing Pyrimidine Photodimers in UV-Irradiated DNA - Significance for UV-Light Mutagenesis*. J. Biol. Chem. 270(41):24174–24179, 1995.
- [Bar00] D. M. BARTELS, R. A. CROWELL. *Photoionization yield vs energy in H₂O and D₂O*. J. Phys. Chem. A 104(15):3349–3355, 2000.
- [Bec84] M. M. BECKER, J. C. WANG. *Use of Light for Footprinting DNA in vivo*. Nature 309(5970):682–687, 1984.
- [Bec89] M. M. BECKER, Z. WANG. *Origin of Ultraviolet Damage in DNA*. J. Mol. Biol. 210(3):429–438, 1989.
- [Bec91] H. G. O. BECKER, H. BÖTTCHER, F. DIETZ, D. REHHOREK, G. ROEWER, K. SCHILLER, H.-J. TIMPE. *Einführung in die Photochemie*. Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1991.
- [Ben68] E. BENHUR, R. BENISHAI. *Trans-Syn Thymine Dimers in Ultraviolet-Irradiated Denatured DNA - Identification and Photoreactivability*. Biochim. Biophys. Acta. 166(1):9–15, 1968.
- [Ber77] F. C. BERNSTEIN, T. F. KOETZLE, G. J. B. WILLIAMS, E. F. MEYER, M. D. BRICE, J. R. RODGERS, O. KENNARD, T. SHIMANOUCI, M. TASUMI. *Protein Data Bank - Computer-Based Archival File for Macromolecular Structures*. J. Mol. Biol. 112(3):535–542, 1977.
- [Ber90] F. BERNARDI, S. DE, M. OLIVUCCI, M. A. ROBB. *Mechanism of Ground-State-Forbidden Photochemical Pericyclic-Reactions - Evidence for Real Conical Intersections*. J. Am. Chem. Soc. 112(5):1737–1744, 1990.
- [Ber96] F. BERNARDI, M. OLIVUCCI, M. A. ROBB. *Potential energy surface crossings in organic photochemistry*. Chem. Soc. Rev. 25(5):321–328, 1996.
- [Ber97a] H. M. BERMAN. *Crystal studies of B-DNA: The answers and the questions*. Biopolymers 44(1):23–44, 1997.
- [Ber97b] F. BERNARDI, M. OLIVUCCI, M. A. ROBB. *The role of conical intersections and excited state reaction paths in photochemical pericyclic reactions*. J. Photochem. Photobiol. A-Chem. 105(2-3):365–371, 1997.
- [Ber00] H. M. BERMAN, J. WESTBROOK, Z. FENG, G. GILLILAND, T. N. BHAT, H. WEISSIG, I. N. SHINDYALOV, P. E. BOURNE. *The Protein Data Bank*. Nucleic Acids Res. 28(1):235–242, 2000.
- [Ber03a] J. M. BERG, J. L. TYMOCZKO, L. STRYER. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 5 Auflage, 2003.
- [Ber03b] H. BERMAN, K. HENRICK, H. NAKAMURA. *Announcing the worldwide Protein Data Bank*. Nat. Struct. Biol. 10(12):980–980, 2003.

- [Bes05] A. BESARATINIA, T. W. SYNOLD, H. H. CHEN, C. CHANG, B. X. XI, A. D. RIGGS, G. P. PFEIFER. *DNA lesions induced by UV A1 and B radiation in human cells: Comparative analyses in the overall genome and in the p53 tumor suppressor gene*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(29):10058–10063, 2005.
- [Beu58] R. BEUKERS, J. YLSTRA, W. BERENDS. *The Effect of Ultraviolet Light on Some Components of the Nucleic Acids. 2. In Rapidly Frozen Solutions*. Recl. Trav. Chim. Pays-Bas-J. Roy. Neth. Chem. Soc. 77(8):729–732, 1958.
- [Beu60a] R. BEUKERS, W. BERENDS. *Isolation and Identification of the Irradiation Product of Thymine*. Biochim. Biophys. Acta. 41(3):550–551, 1960.
- [Beu60b] R. BEUKERS, J. IJLSTRA, W. BERENDS. *The Effect of Ultraviolet Light on Some Components of the Nucleic Acids. 6. The Origin of the UV Sensitivity of Deoxyribonucleic Acid*. Recl. Trav. Chim. Pays-Bas-J. Roy. Neth. Chem. Soc. 79(2):101–104, 1960.
- [Beu61] R. BEUKERS, W. BERENDS. *Effects of UV Irradiation on Nucleic Acids and Their Components*. Biochim. Biophys. Acta. 49(1):181–189, 1961.
- [Bir06] V. BIRKEDAL, E. S. Y. MADSEN, C. PETERSEN, M. JOHNSEN, A. SEEGERT, S. K. JENSEN, S. R. KEIDING, J. THOGERSEN. *Observation of a persistent infrared absorption following two photon ionization of liquid water*. Chem. Phys. 328(1-3):119–124, 2006.
- [Bla06] L. BLANCAFORT. *Excited-state potential energy surface for the photophysics of adenine*. J. Am. Chem. Soc. 128(1):210–219, 2006.
- [Bla07] L. BLANCAFORT, A. MIGANI. *Modeling thymine photodimerizations in DNA: Mechanism and correlation diagrams*. J. Am. Chem. Soc. 129(47):14540–14541, 2007.
- [Blo00] V. A. BLOOMFIELD, D. M. CROTHERS, I. TINOCO. *Nucleic Acids: Structures, Properties, and Functions*. University Science Books, Sausalito, 2000.
- [Bou02] B. BOUVIER, T. GUSTAVSSON, D. MARKOVITSI, P. MILLIE. *Dipolar coupling between electronic transitions of the DNA bases and its relevance to exciton states in double helices*. Chem. Phys. 275(1-3):75–92, 2002.
- [Bou03] B. BOUVIER, J. P. DOGNON, R. LAVERY, D. MARKOVITSI, P. MILLIE, D. ONIDAS, K. ZAKRZEWSKA. *Influence of conformational dynamics on the exciton states of DNA oligomers*. J. Phys. Chem. B 107(48):13512–13522, 2003.
- [Boy92] R. BOYD. *Nonlinear Optics*. Academic Press, San Diego, 1992.
- [BP07] M. BOGGIO-PASQUA, G. GROENHOF, L. V. SCHAFER, H. GRUBMULLER, M. A. ROBB. *Ultrafast deactivation channel for thymine dimerization*. J. Am. Chem. Soc. 129(36):10996–10997, 2007.

- [Bra96] A. BRAIBANTI, E. FISICARO, A. GHIOZZI, C. COMPARI. *Isobaric heat capacity and structure of water and heavy water in the liquid state*. *Thermochim. Acta* 286(1):51–66, 1996.
- [Bre07] M. BRENNER, V. J. HEARING. *The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin*. *Photochem. Photobiol.* 83:1–11, 2007.
- [Bro53] G. L. BROWN, M. WATSON. *Heterogeneity of Deoxyribonucleic Acids*. *Nature* 172(4373):339–342, 1953.
- [Bro99] K. S. BROWN. *The ozone layer - Burnt by the sun down under*. *Science* 285(5434):1647–1649, 1999.
- [Buh04] A. BUHOT, A. HALPERIN. *Effects of stacking on the configurations and elasticity of single-stranded nucleic acids*. *Phys. Rev. E* 70(020902):1–4, 2004.
- [Bur98] C. J. BURROWS, J. G. MULLER. *Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission*. *Chem. Rev.* 98(3):1109–1151, 1998.
- [But98] J. BUTENANDT, A. P. M. EKER, T. CARELL. *Synthesis, crystal structure, and enzymatic evaluation of a DNA-photolesion isostere*. *Chem.-Eur. J.* 4(4):642–654, 1998.
- [Byk98] V. J. BYKOV, C. T. JANSEN, K. HEMMINKI. *High levels of dipyrimidine dimers are induced in human skin by solar-simulating UV radiation*. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7(3):199–202, 1998.
- [Cad85] J. CADET, L. VOITURIEZ, F. E. HRUSKA, A. GRAND. *Crystal-Structure of the Cis-Syn Photodimer of Thymidyl (3'-5') Thymidine Cyanoethyl Ester*. *Biopolymers* 24(5):897–903, 1985.
- [Cad90] J. CADET, P. VIGNY. *The Photochemistry of Nucleic Acid in Bioorganic Photochemistry*. Seiten 1–272. John Wiley and Sons, New York, 1990.
- [Cad92] J. CADET, C. ANSELMINO, T. DOUKI, L. VOITURIEZ. *Photochemistry of Nucleic-Acids in Cells*. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* 15(4):277–298, 1992.
- [Cad97] J. CADET, M. BERGER, T. DOUKI, B. MORIN, S. RAOUL, J. L. RAVANAT, S. SPINELLI. *Effects of UV and visible radiation on DNA - Final base damage*. *Biol. Chem.* 378(11):1275–1286, 1997.
- [Cad99] J. CADET, T. DELATOUR, T. DOUKI, D. GASPARUTTO, J. P. POUGET, J. L. RAVANAT, S. SAUVAIGO. *Hydroxyl radicals and DNA base damage*. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 424(1-2):9–21, 1999.
- [Cal83] P. R. CALLIS. *Electronic States and Luminescence of Nucleic-Acid Systems*. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 34:329–357, 1983.

- [Cam76] N. CAMERMAN, J. K. FAWCETT, A. CAMERMAN. *Molecular-Structure of a Deoxyribose-Dinucleotide, Sodium Thymidyl-(5'-3')-Thymidylate-(5') Hydrate (pTpT), and a Possible Structural Model for Polythymidylate*. J. Mol. Biol. 107(4):601–621, 1976.
- [Can80a] C. CANTOR, P. SCHIMMEL. *Absorption spectroscopy*. In *Biophysical Chemistry - Part II: Techniques for the study of biological structure and function*. W. H. Freeman and Company, New York, 1980.
- [Can80b] C. CANTOR, P. SCHIMMEL. *Nucleic acid structural transitions*. In *Biophysical Chemistry - Part III: The Behaviour of Biological Macromolecules*. W. H. Freeman and Company, New York, 1980.
- [Can92a] L. P. CANDEIAS, S. STEENKEN. *Electron Adducts of Adenine Nucleosides and Nucleotides in Aqueous-Solution - Protonation at Two Carbon Sites (C2 and C8) and Intramolecular and Intermolecular Catalysis by Phosphate*. J. Phys. Chem. 96(2):937–944, 1992.
- [Can92b] L. P. CANDEIAS, S. STEENKEN. *Ionization of Purine Nucleosides and Nucleotides and Their Components by 193-nm Laser Photolysis in Aqueous-Solution - Model Studies for Oxidative Damage of DNA*. J. Am. Chem. Soc. 114(2):699–704, 1992.
- [Can05] C. CANUEL, M. MONS, F. PIUZZI, B. TARDIVEL, I. DIMICOLI, M. ELHANINE. *Excited states dynamics of DNA and RNA bases: Characterization of a stepwise deactivation pathway in the gas phase*. J. Chem. Phys. 122(7):074316, 2005.
- [Car98] T. CARELL, R. EPPLE. *Repair of UV light induced DNA lesions: A comparative study with model compounds*. Eur. J. Org. Chem. (7):1245–1258, 1998.
- [Cav04] M. J. CAVALUZZI, P. N. BORER. *Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA*. Nucleic Acids Res. 32(1):e13, 2004.
- [Cel95] P. CELANI, M. A. ROBB, M. GARAVELLI, F. BERNARDI, M. OLIVUCCI. *Geometry Optimization on a Hypersphere - Application to Finding Reaction Paths from a Conical Intersection*. Chem. Phys. Lett. 243(1-2):1–8, 1995.
- [Cer03] G. CERULLO, S. DE SILVESTRI. *Ultrafast optical parametric amplifiers*. Rev. Sci. Instrum. 74(1):1–18, 2003.
- [CH04a] C. E. CRESPO-HERNÁNDEZ, B. COHEN, B. KOHLER. *Ultrafast Excited-State Dynamics in Nucleic Acids*. Chem.Rev. 104:1977–2019, 2004.
- [CH04b] C. E. CRESPO-HERNÁNDEZ, B. KOHLER. *Influence of secondary structure on electronic energy relaxation in adenine homopolymers*. J. Phys. Chem. B 108(30):11182–11188, 2004.
- [CH05] C. E. CRESPO-HERNÁNDEZ, B. COHEN, B. KOHLER. *Base stacking controls excited-state dynamics in A-T DNA*. Nature 436(7054):1141–1144, 2005.

- [Cha49] E. CHARGAFF, E. VISCHER, R. DONIGER, C. GREEN, F. MISANI. *The Composition of the Desoxypentose Nucleic Acids of Thymus and Spleen*. J. Biol. Chem. 177(1):405–416, 1949.
- [Cha51] E. CHARGAFF. *Some Recent Studies on the Composition and Structure of Nucleic Acids*. J. Cell. Comp. Physiol. 38(3):41–59, 1951.
- [CHn02] C. E. CRESPO-HERNÁNDEZ, R. ARCE. *Photoionization of DNA and RNA bases, nucleosides and nucleotides through a combination of one- and two-photon pathways upon 266 nm nanosecond laser excitation*. Photochem. Photobiol. 76(3):259–267, 2002.
- [Cic02] M. K. CICHON, S. ARNOLD, T. CARELL. *A (6-4) photolyase model: Repair of DNA (6-4) lesions requires a reduced and deprotonated flavin*. Angew. Chem.-Int. Edit. 41(5):767–770, 2002.
- [Cli97] P. H. CLINGEN, R. J. H. DAVIES. *Quantum yields of adenine photodimerization in poly(deoxyadenylic acid) and DNA*. J. Photochem. Photobiol. B-Biol. 38(1):81–87, 1997.
- [Cly01] G. J. CLYDESDALE, G. W. DANDIE, H. K. MULLER. *Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects*. Immunol. Cell Biol. 79(6):547–568, 2001.
- [Col04] F. S. COLLINS, E. S. LANDER, J. ROGERS, R. H. WATERSTON. *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature 431(7011):931–945, 2004.
- [Cor05] S. A. CORCELLI, J. L. SKINNER. *Infrared and Raman line shapes of dilute HOD in liquid H₂O and D₂O from 10 to 90 degrees C*. J. Phys. Chem. A 109(28):6154–6165, 2005.
- [Cri74] F. CRICK. *Double Helix - a Personal View*. Nature 248(5451):766–769, 1974.
- [Cro68] D. M. CROTHERS, D. I. RATNER. *Thermodynamic Studies of a Model System for Hydrophobic Bonding*. Biochemistry 7(5):1823–1827, 1968.
- [Cui06] S. X. CUI, C. ALBRECHT, F. KUHNER, H. E. GAUB. *Weakly bound water molecules shorten single-stranded DNA*. J. Am. Chem. Soc. 128(20):6636–6639, 2006.
- [Dan71] M. DANIELS, HAUSWIRT. W. *Fluorescence of Purine and Pyrimidine Bases of Nucleic Acids in Neutral Aqueous Solution at 300 Degrees K*. Science 171(3972):675–677, 1971.
- [Dau93] M. DAUNE. *Molecular Biophysics*. Oxford University Press, Oxford, 1993.
- [dB00] J. DE BOER, J. H. J. HOEIJMAKERS. *Nucleotide excision repair and human syndromes*. Carcinogenesis 21(3):453–460, 2000.

- [Dee63] R. A. DEERING, R. B. SETLOW. *Effects of Ultraviolet Light on Thymidine Dinucleotide and Polynucleotide*. *Biochim. Biophys. Acta.* 68(4):526–534, 1963.
- [Des08] C. DESNOUS, B. R. BABU, C. MCIRIOU, J. U. O. MAYO, A. FAVRE, J. WEN-
GEL, P. CLIVIOT. *The sugar conformation governs (6-4) photoproduct formation
at the dinucleotide level* 130:30–31, 2008.
- [Dew79] T. G. DEWEY, D. H. TURNER. *Laser Temperature-Jump Study of Stacking in
Adenylic Acid Polymers*. *Biochemistry* 18(26):5757–5762, 1979.
- [dG94] F. R. DE GRUIJL, J. C. VANDERLEUN. *Estimate of the Wavelength Dependency
of Ultraviolet Carcinogenesis in Humans and Its Relevance to the Risk Assessment
of a Stratospheric Ozone Depletion*. *Health Phys.* 67(4):319–325, 1994.
- [dG99] F. R. DE GRUIJL. *Skin cancer and solar UV radiation*. *Eur. J. Cancer* 35(14):2003–
2009, 1999.
- [dG01] F. R. DE GRUIJL, H. J. VAN KRANEN, L. H. F. MULLENDERS. *UV-induced DNA
damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer*. *J. Photochem.
Photobiol. B-Biol.* 63(1-3):19–27, 2001.
- [dG03] F. R. DE GRUIJL, J. LONGSTRETH, M. NORVAL, A. P. CULLEN, H. SLAPER,
M. L. KRIPKE, Y. TAKIZAWA, J. C. VAN DER LEUN. *Health effects from stratos-
pheric ozone depletion and interactions with climate change*. *Photochem. Photobiol.
Sci.* 2(3):16–28, 2003.
- [Dic81a] R. E. DICKERSON, H. R. DREW. *Kinematic Model for B-DNA*. *Proc. Nat. Acad.
Sci. US-Biol. Sci.* 78(12):7318–7322, 1981.
- [Dic81b] R. E. DICKERSON, H. R. DREW. *Structure of a B-DNA Dodecamer .2. Influence
of Base Sequence on Helix Structure*. *J. Mol. Biol.* 149(4):761–786, 1981.
- [Dic98] R. E. DICKERSON. *DNA bending: The prevalence of kinkiness and the virtues of
normality*. *Nucleic Acids Res.* 26(8):1906–1926, 1998.
- [Die96] J. D. DIELS, W. RUDOLPH. *Ultrashort Laser Pulse Phenomena*. OPTICS AND
PHOTONICS. Academic Press., 1996.
- [Dmi91] V. G. DMITRIEV, G. G. GURZADYAN, D. N. NIKOGOSYAN. *Handbook of
nonlinear optical crystals*. Springer-Verlag, Berlin, 1991.
- [Dou95] A. DOUHAL, S. K. KIM, A. H. ZEWEIL. *Femtosecond Molecular-Dynamics of
Tautomerization in Model Base-Pairs*. *Nature* 378(6554):260–263, 1995.
- [Dou00] T. DOUKI, M. COURT, S. SAUVAIGO, F. ODIN, J. CADET. *Formation of the main
UV-induced thymine dimeric lesions within isolated and cellular DNA as measured
by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *J. Biol.
Chem.* 275(16):11678–11685, 2000.

- [Dou01] T. DOUKI, J. CADET. *Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions*. *Biochemistry* 40(8):2495–2501, 2001.
- [Dou06] T. DOUKI. *Effect of denaturation on the photochemistry of pyrimidine bases in isolated DNA*. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* 82(1):45–52, 2006.
- [Dör82] F. DÖRR. *Allgemeine Grundlagen der Photophysik und Photochemie*. In W. HOPPE, W. LOHMANN, H. MARKL, H. ZIEGLER, Herausgeber, *Biophysik*, Seiten 275–289. Springer-Verlag, Berlin, 2. Auflage, 1982.
- [Dra69] J. W. DRAKE. *Comparative Rates of Spontaneous Mutation*. *Nature* 221(5186):1132, 1969.
- [Dre81] H. R. DREW, R. M. WING, T. TAKANO, C. BROKA, S. TANAKA, K. ITAKURA, R. E. DICKERSON. *Structure of a B-DNA Dodecamer - Conformation and Dynamics .I*. *Proc. Nat. Acad. Sci. US-Biol. Sci.* 78(4):2179–2183, 1981.
- [Dur02] B. DURBEEJ, L. A. ERIKSSON. *Reaction mechanism of thymine dimer formation in DNA induced by UV light*. *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.* 152(1-3):95–101, 2002.
- [Eis66] J. EISINGER, M. GUERON, R. G. SHULMAN, T. YAMANE. *Excimer Fluorescence of Dinucleotides Polynucleotides and DNA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55(5):1015–1020, 1966.
- [Eis67] J. EISINGER, R. G. SHULMAN. *Precursor of Thymine Dimer in Ice*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58(3):895–900, 1967.
- [Els91] T. ELSAESSER, W. KAISER. *Vibrational and Vibronic Relaxation of Large Polyatomic-Molecules in Liquids*. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 42:83–107, 1991.
- [Fah06] D. FAHEY. *Twenty Questions and Answers About the Ozone Layer: 2006 Update*, <http://www.esrl.noaa.gov/csd/assessments/2006/chapters/twentyquestions.pdf>. Scientific Assessment of Ozone Depletion: 2006, World Meteorological Organization Global Ozone Research and Monitoring Project - Report No. 50, 2006.
- [Far93] E. A. FARR, B. R. SEAVEY, A. M. CONTI, W. M. WESTLER, J. L. MARKLEY. *Implementation of a Relational Database for Protein NMR Results*. *J. Cell. Biochem.* Seiten 252–252, 1993.
- [Fer91] L. R. FERGUSON, W. A. DENNY. *The Genetic Toxicology of Acridines*. *Mutat. Res.* 258(2):123–160, 1991.
- [Fer98] H. FERNANDO, G. A. PAPADANTONAKIS, N. S. KIM, P. R. LEBRETON. *Conduction-band-edge ionization thresholds of DNA components in aqueous solution*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(10):5550–5555, 1998.
- [Fin28] G. M. FINDLAY. *Ultra-violet light and skin cancer*. *Lancet* 2:1070–1073, 1928.

- [GEK06] GEKID. *Krebs in Deutschland*. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI, Saarbrücken, 5 Auflage, 2006.
- [Ger61] R. GERDIL. *Crystal Structure of Thymine Monohydrate*. Acta Cryst. 14(4):333–344, 1961.
- [Gil07] B. A. GILCHREST. *Sun protection and vitamin D: Three dimensions of obfuscation*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 103(3-5):655–663, 2007.
- [Gir07] P. GIRI, G. S. KUMAR. *Specific binding and self-structure induction to poly(A) by the cytotoxic plant alkaloid sanguinarine*. Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj. 1770(9):1419–1426, 2007.
- [Gni96] M. GNIAZDOWSKI, C. CERA. *The effects of DNA covalent adducts on in vitro transcription*. Chem. Rev. 96(2):619–634, 1996.
- [Gue96] H. GUENTZLER, H. HEISE. *IR-Spektroskopie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 3 Auflage, 1996.
- [Gup78] G. GUPTA, V. SASISEKHARAN. *Theoretical Calculations of Base-Base Interactions in Nucleic-Acids - 2. Stacking Interactions in Polynucleotides*. Nucleic Acids Res. 5(5):1655–1673, 1978.
- [Gus02] T. GUSTAVSSON, A. SHARONOV, D. ONIDAS, D. MARKOVITSI. *Adenine, deoxyadenosine and deoxyadenosine 5'-monophosphate studied by femtosecond fluorescence upconversion spectroscopy*. Chem. Phys. Lett. 356(1-2):49–54, 2002.
- [Gus06] T. GUSTAVSSON, A. BANYASZ, E. LAZZAROTTO, D. MARKOVITSI, G. SCALMANI, M. J. FRISCH, V. BARONE, R. IMPROTA. *Singlet excited-state behavior of uracil and thymine in aqueous solution: A combined experimental and computational study of 11 uracil derivatives*. J. Am. Chem. Soc. 128(2):607–619, 2006.
- [Hae07] D.-P. HAEDER, H. KUMAR, R. SMITH, R. WORREST. *Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change*. Photochem. Photobiol. Sci. 6:267–285, 2007.
- [Ham94] P. HAMM. *Femtosekunden Infrarotspektroskopie an bakteriellen Reaktionszentren von Rhodobacter sphaeroides*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1994.
- [Ham95] P. HAMM. *Coherent Effects in Femtosecond Infrared-Spectroscopy*. Chem. Phys. 200(3):415–429, 1995.
- [Ham97a] P. HAMM, M. LIM, R. M. HOCHSTRASSER. *Vibrational energy relaxation of the cyanide ion in water*. J. Chem. Phys. 107(24):10523–10531, 1997.
- [Ham97b] P. HAMM, S. M. OHLIN, W. ZINTH. *Vibrational cooling after ultrafast photoisomerization of azobenzene measured by femtosecond infrared spectroscopy*. J. Chem. Phys. 106(2):519–529, 1997.

- [Ham00] P. HAMM, R. A. KAINDL, J. STENGER. *Noise suppression in femtosecond mid-infrared light sources*. Opt. Lett. 25(24):1798–1800, 2000.
- [Har62] E. J. HART, J. W. BOAG. *Absorption Spectrum of Hydrated Electron in Water and in Aqueous Solutions*. J. Am. Chem. Soc. 84(21):4090–4095, 1962.
- [Har06] P. M. HARE, C. E. CRESPO-HERNÁNDEZ, B. KOHLER. *Solvent-dependent photophysics of 1-cyclohexyluracil: Ultrafast branching in the initial bright state leads nonradiatively to the electronic ground state and a long-lived (1)n pi state*. J. Phys. Chem. B 110(37):18641–18650, 2006.
- [Har07a] P. M. HARE, C. E. CRESPO-HERNÁNDEZ, B. KOHLER. *Internal conversion to the electronic ground state occurs via two distinct pathways for pyrimidine bases in aqueous solution*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104(2):435–440, 2007.
- [Har07b] P. M. HARE, C. MIDDLETON, K. MERTEL, J. HERBERT, B. KOHLER. *Time-resolved infrared spectroscopy of the lowest triplet state of thymine and thymidine*. Chem. Phys. In Press, Accepted Manuscript, Available online 22 November 2007, 2007.
- [Her52] A. D. HERSHEY, M. CHASE. *Independent Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage*. J. Gen. Physiol. 36(1):39–56, 1952.
- [Her90] G. HERZBERG. *Molecular Spectra and Molecular Structure: Infrared and Raman of Polyatomic Molecules*. Krieger Publishing Company, 1990.
- [Ho97] P. S. HO, B. H. M. MOOERS. *Z-DNA crystallography*. Biopolymers 44(1):65–90, 1997.
- [Hoc96] R. HOICHE. *Aufbau einer Vielkanaldetektion zur Messung transienter Absorptionsänderungen im Femtosekundenbereich und erste Anwendungen*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, 1996.
- [Hoc02] P. E. HOCKBERGER. *A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms*. Photochem. Photobiol. 76(6):561–579, 2002.
- [Hoe01] J. H. J. HOEIJMAKERS. *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer*. Nature 411(6835):366–374, 2001.
- [Hof68] R. HOFFMANN, R. B. WOODWARD. *Conservation of Orbital Symmetry*. Accounts Chem. Res. 1(1):17–22, 1968.
- [Hol90] W. HOLZAPFEL, U. FINKELE, W. KAISER, D. OESTERHELT, H. SCHEER, H. U. STILZ, W. ZINTH. *Initial Electron-Transfer in the Reaction Center from Rhodobacter-Sphaeroides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(13):5168–5172, 1990.
- [Hos67] J. L. HOSSZU, R. O. RAHN. *Thymine Dimer Formation in DNA between 25 Degrees C and 100 Degrees C*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 29(3):327–330, 1967.

- [Hru86] F. E. HRUSKA, L. VOITURIEZ, A. GRAND, J. CADET. *Molecular-Structure of the Cis-Syn Photodimer of d(TpT) (Cyanoethyl Ester)*. *Biopolymers* 25(8):1399–1417, 1986.
- [Hub02] R. HUBER. *Elektronentransfer an Farbstoff-Halbleiter-Grenzflächen*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, 2002.
- [Hum96] W. HUMPHREY, A. DALKE, K. SCHULTEN. *VMD - Visual Molecular Dynamics*. *J. Mol. Graphics*, 1996.
- [IDL00] IDL. *Interactive Data Language (version 5.4, Research Systems Inc., Boulder, CO)*, 2000.
- [IPC05] IPCC. *IPCC/TEAP Special report: Safeguarding the ozone layer and the global climate system: Issues related to hydrofluorocarbons and perfluorocarbons. Summary for policymakers*. Technischer Bericht, 2005.
- [IPC07] IPCC. *Intergovernmental Panel on Climate Change Fourth Assessment Report, Climate Change 2007: Synthesis Report, Summary for Policymakers*. Technischer Bericht, 2007.
- [Ism02] N. ISMAIL, L. BLANCAFORT, M. OLIVUCCI, B. KOHLER, M. A. ROBB. *Ultrafast decay of electronically excited singlet cytosine via π, π^* to n_o, π^* state switch*. *J. Am. Chem. Soc.* 124(24):6818–6819, 2002.
- [Ist99] A. A. ISTRATOV, O. F. VYVENKO. *Exponential analysis in physical phenomena*. *Rev. Sci. Instrum.* 70(2):1233–1257, 1999.
- [Iwa97] K. IWATA, H. HAMAGUCHI. *Microscopic mechanism of solute-solvent energy dissipation probed by picosecond time-resolved Raman spectroscopy*. *J. Phys. Chem. A* 101(4):632–637, 1997.
- [Jam04] R. JAMAL, A. HAGESTEDT. *LabVIEW. Das Grundlagenbuch. Bis Version LabVIEW 7.1*. Addison-Wesley, München, 4 Auflage, 2004.
- [Jed88] T. M. JEDJU, L. ROTHBERG. *Tunable Femtosecond Radiation in the Mid-Infrared for Time-Resolved Absorption in Semiconductors*. *Appl. Optics* 27(3):615–618, 1988.
- [Jia93] N. JIANG, J. S. TAYLOR. *In vivo Evidence That UV-Induced C- T Mutations at Dipyrimidine Sites Could Result from the Replicative Bypass of Cis-Syn Cyclobutane Dimers or Their Deamination Products*. *Biochemistry* 32(2):472–481, 1993.
- [Jin98] Y. Q. JING, J. F. L. KAO, J. S. TAYLOR. *Thermodynamic and base-pairing studies of matched and mismatched DNA dodecamer duplexes containing cis-syn, (6-4) and Dewar photoproducts of TT*. *Nucleic Acids Res.* 26(16):3845–3853, 1998.

- [Joh62] H. E. JOHNS, M. DELBRUCK, S. A. RAPAPORT. *Photochemistry of Thymine Dimers*. J. Mol. Biol. 4(2):104–114, 1962.
- [Joh64] H. E. JOHNS, M. L. PEARSON, C. W. HELLEINER, J. C. LEBLANC. *Ultraviolet Photochemistry of Thymidylyl-(3→5)-Thymidine*. J. Mol. Biol. 9(2):503–524, 1964.
- [Joh07] A. T. JOHNSON, O. WIEST. *Structure and dynamics of poly(T) single-strand DNA: Implications toward CPD formation*. J. Phys. Chem. B 111(51):14398–14404, 2007.
- [Jol85] B. JOLLES, A. LAIGLE, L. CHINSKY, P. Y. TURPIN. *The Poly dA Strand of Poly dA·Poly dT Adopts an a-Form in Solution: a UV Resonance Raman-Study*. Nucleic Acids Res. 13(6):2075–2085, 1985.
- [Kah55] A. H. KAHN. *Theory of the Infrared Absorption of Carriers in Germanium and Silicon*. Phys. Review 97(6):1647–1652, 1955.
- [Kai00] R. A. KAINDL, M. WURM, K. REIMANN, P. HAMM, A. M. WEINER, M. WOERNER. *Generation, shaping, and characterization of intense femtosecond pulses tunable from 3 to 20 μm*. J. Opt. Soc. Am. B-Opt. Phys. 17(12):2086–2094, 2000.
- [Kal96] G. KALLANSRUD, B. WARD. *A comparison of measured and calculated single- and double-stranded oligodeoxynucleotide extinction coefficients*. Anal. Biochem. 236(1):134–138, 1996.
- [Kas50] M. KASHA. *Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules*. Discuss. Faraday Soc. (9):14–19, 1950.
- [Kel02] G. KELFKENS, A. BERGMAN, F. DE GRUIJL, J. C. VAN DER LEUN, A. PIQUET, T. VAN OIJEN, W. W. C. GIESKENS, H. VAN LOVEREN, G. J. M. VELDERS, P. MARTENS, H. SLAPER. *Ozone and climate change interactions; Influence on UV levels and UV-related effects; National Programme on Global Air Pollution and Climate Change Report No. 410200112 Bilthoven, Netherlands.. Technischer Bericht*, 2002.
- [Kem87] J. KEMMINK, R. BOELENS, T. M. G. KONING, R. KAPTEIN, G. A. VANDERMAREL, J. H. VANBOOM. *Conformational-Changes in the Oligonucleotide Duplex d(GCGTTGCG)-d(CGCAACGC) Induced by Formation of a Cis-Syn Thymine Dimer - a Two-Dimensional NMR-Study*. Eur. J. Biochem. 162(1):37–43, 1987.
- [Kho83] J. M. KHOSROFIAN, B. A. GARETZ. *Measurement of a Gaussian Laser-Beam Diameter through the Direct Inversion of Knife-Edge Data*. Appl. Optics 22(21):3406–3410, 1983.
- [Kim94] S. T. KIM, K. MALHOTRA, C. A. SMITH, J. S. TAYLOR, A. SANCAR. *Characterization of (6-4)-Photoproduct DNA Photolyase*. J. Biol. Chem. 269(11):8535–8540, 1994.

- [Kle95] M. KLESSINGER, J. MICHL. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*. VCH Publishers, Inc., New York, 1995.
- [Kol03] F. O. KOLLER. *Zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie an Azobenzolderivaten im Zeitbereich von Pikosekunden*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, 2003.
- [Kol07] F. O. KOLLER. *Femtosekunden-Infrarot-Spektroskopie an Propionsäure-Dimeren und an photochromen Fulgiden und Fulgimiden*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, 2007.
- [Kom01] H. KOMORI, R. MASUI, S. KURAMITSU, S. YOKOYAMA, T. SHIBATA, Y. INOUE, K. MIKI. *Crystal structure of thermostable DNA photolyase: Pyrimidine-dimer recognition mechanism*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(24):13560–13565, 2001.
- [Koo86] H. S. KOO, H. M. WU, D. M. CROTHERS. *DNA bending at adenine-thymine tracts*. Nature 320(6062):501–506, 1986.
- [Kor77] R. D. KORNBERG. *Structure of Chromatin*. Annu. Rev. Biochem. 46:931–954, 1977.
- [Kos03a] A. KOSSEL, H. STEUDEL. *The appearance of uracil in the bodies of animals*. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 37(3):245–247, 1903.
- [Kos03b] A. KOSSEL, H. STEUDEL. *Cytosine*. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 37(4):377–380, 1903.
- [Kra97] K. H. KRAEMER. *Sunlight and skin cancer: Another link revealed*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(1):11–14, 1997.
- [Kui05] M. K. KUIMOVA, J. DYER, M. W. GEORGE, D. C. GRILLS, J. M. KELLY, P. MATOUSEK, A. W. PARKER, X. Z. SUN, M. TOWRIE, A. M. WHELAN. *Monitoring the effect of ultrafast deactivation of the electronic excited states of DNA bases and polynucleotides following 267 nm laser excitation using picosecond time-resolved infrared spectroscopy*. Chem. Commun. (9):1182–1184, 2005.
- [Kui06] M. K. KUIMOVA, A. J. COWAN, P. MATOUSEK, A. W. PARKER, X. Z. SUN, M. TOWRIE, M. W. GEORGE. *Monitoring the direct and indirect damage of DNA bases and polynucleotides by using time-resolved infrared spectroscopy*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(7):2150–2153, 2006.
- [Kui07] M. K. KUIMOVA, P. M. W. GILL, C. Y. LIN, P. MATOUSEK, M. TOWRIE, X. Z. SUN, M. W. GEORGE, A. W. PARKER. *Picosecond time-resolved infrared study of 2-aminopurine ionisation in solution*. Photochem. Photobiol. Sci. 6(9):949–955, 2007.
- [Kun92] T. A. KUNKEL. *DNA-Replication Fidelity*. J. Biol. Chem. 267(26):18251–18254, 1992.

- [Kun04] L. M. KUNDU, U. LINNE, M. MARAHIEL, T. CARELL. *RNA is more UV resistant than DNA: The formation of UV-induced DNA lesions is strongly sequence and conformation dependent.* Chem.-Eur. J. 10(22):5697–5705, 2004.
- [Kun05] L. M. KUNDU. *Investigation of UVC induced DNA Damage Formation and Photolyase Catalysed Repair of Cyclobutane Pyrimidine Dimers.* Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, 2005.
- [Kwo06] W. M. KWOK, C. S. MA, D. L. PHILLIPS. *Femtosecond time- and wavelength-resolved fluorescence and absorption spectroscopic study of the excited states of adenosine and an adenine oligomer.* J. Am. Chem. Soc. 128(36):11894–11905, 2006.
- [Kwo07] O. H. KWON, A. H. ZEWEIL. *Double proton transfer dynamics of model DNA base pairs in the condensed phase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104(21):8703–8708, 2007.
- [Lac76] U. LACHISH, A. SHAFFERMAN, G. STEIN. *Intensity Dependence in Laser Flash-Photolysis Experiments - Hydrated Electron Formation from Ferrocyanide, Tyrosine, and Tryptophan.* J. Chem. Phys. 64(10):4205–4211, 1976.
- [Lae00] R. LAENEN, T. ROTH, A. LAUBEREAU. *Novel precursors of solvated electrons in water: Evidence for a charge transfer process.* Phys. Rev. Lett. 85(1):50–53, 2000.
- [Lae01] R. LAENEN, T. ROTH. *Generation of solvated electrons in neat water: new results from femtosecond spectroscopy.* J. Mol. Struct. 598(1):37–43, 2001.
- [Lai06] S. LAIMGRUBER, H. SCHACHENMAYR, B. SCHMIDT, W. ZINTH, P. GILCH. *A femtosecond stimulated raman spectrograph for the near ultraviolet.* Appl. Phys. B-Lasers Opt. 85(4):557–564, 2006.
- [Lam66] A. A. LAMOLA, J. P. MITTAL. *Solution Photochemistry of Thymine and Uracil.* Science 154(3756):1560–1561, 1966.
- [Lam67] A. A. LAMOLA, T. YAMANE. *Sensitized Photodimerization of Thymine in DNA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58(2):443–446, 1967.
- [Lam68a] A. A. LAMOLA. *Excited State Precursors of Thymine Photodimers.* Photochem. Photobiol. 7(6):619–632, 1968.
- [Lam68b] A. A. LAMOLA, J. EISINGER. *On Mechanism of Thymine Photodimerization.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59(1):46–51, 1968.
- [Lau13] M. LAUE. *A quantitative examination of the theory for the interference appearances in X-rays.* Ann. Phys.-Berlin 41(10):989–1002, 1913.
- [LC01] F. LE CURIEUX, K. HEMMINKI. *Cyclobutane thymidine dimers are present in human urine following sun exposure: Quantitation using P-32-postlabeling and high-performance liquid chromatography.* J. Invest. Dermatol. 117(2):263–268, 2001.

- [Leea] C. LEE, M. CHO. *Vibrational dynamics of DNA. II. Deuterium exchange effects and simulated IR absorption spectra*. J. Chem. Phys. 125(11):114509.
- [Leeb] C. LEE, K. H. PARK, M. CHO. *Vibrational dynamics of DNA. I. Vibrational basis modes and couplings*. J. Chem. Phys. 125(11):114508.
- [Lee00] J. H. LEE, S. H. BAE, B. S. CHOI. *The Dewar photoproduct of thymidylyl(3'→5')-thymidine (Dewar product) exhibits mutagenic behavior in accordance with the „A rule“*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(9):4591–4596, 2000.
- [Len61] P. LENGYEL, J. F. SPEYER, S. OCHOA. *Synthetic Polynucleotides and Amino Acid Code*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47(12):1936–1942, 1961.
- [Les92] A. LES, L. ADAMOWICZ, M. J. NOWAK, L. LAPINSKI. *The Infrared-Spectra of Matrix-Isolated Uracil and Thymine - an Assignment Based on New Theoretical Calculations*. Spectroc. Acta Pt. A - Molec. Biomolec. Spectr. 48(10):1385–1395, 1992.
- [Let87] R. LETELLIER, M. GHOMI, E. TAILLANDIER. *Normal Coordinate Analysis of 2'-Deoxythymidine and 2'-Deoxyadenosine*. Eur. Biophys. J. Biophys. Lett. 14(7):423–430, 1987.
- [Lev08] P. A. LEVENE, W. A. JACOBS. *Inosinic acid*. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 41:2703–2707, 1908.
- [Lev29] P. A. LEVENE, T. MORI. *Ribodesose and xylodesose and their bearing on the structure of thyminose*. J. Biol. Chem. 83(3):803–816, 1929.
- [Lew03] J. P. LEWIS, T. E. CHEATHAM, E. B. STARIKOV, H. WANG, O. F. SANKEY. *Dynamically amorphous character of electronic states in poly(dA)-poly(dT) DNA*. J. Phys. Chem. B 107(11):2581–2587, 2003.
- [LG06] H. P. C. LOEFFLER G., PETRIDES P. E. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin, 8 Auflage, 2006.
- [Lia94] T. Q. LIAN, B. LOCKE, Y. KHOLODENKO, R. M. HOCHSTRASSER. *Energy-Flow from Solute to Solvent Probed by Femtosecond IR Spectroscopy - Malachite Green and Heme Protein Solutions*. J. Phys. Chem. 98(45):11648–11656, 1994.
- [Lib94] F. O. LIBNAU, O. M. KVALHEIM, A. A. CHRISTY, J. TOFT. *Spectra of Water in the Nearinfrared and Midinfrared Region*. Vib. Spectrosc. 7(3):243–254, 1994.
- [Lid95] D. R. LIDE. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, 76. Auflage, 1995.
- [Lin72a] T. LINDAHL, ANDERSSO.A. *Rate of Chain Breakage at Apurinic Sites in Double-Stranded Deoxyribonucleic Acid*. Biochemistry 11(19):3618–3623, 1972.
- [Lin72b] T. LINDAHL, B. NYBERG. *Rate of Depurination of Native Deoxyribonucleic Acid*. Biochemistry 11(19):3610–3618, 1972.

- [Lin93] T. LINDAHL. *Instability and Decay of the Primary Structure of DNA*. Nature 362(6422):709–715, 1993.
- [Lis70] R. LISEWSKI, WIERZCHO.KL. *Solid State Photochemistry of Thymine, Its N-Methylated Derivatives and Orotic Acids in KBr Matrices*. Photochem. Photobiol. 11(5):327–347, 1970.
- [Liv01] Z. LIVNEH. *DNA damage control by novel DNA polymerases: Translesion replication and mutagenesis*. J. Biol. Chem. 276(28):25639–25642, 2001.
- [Loe63] P. O. LOEWDIN. *Proton Tunneling in DNA and its Biological Implications*. Rev. Mod. Phys. 35(3):724–732, 1963.
- [Lor02] M. LORENC, M. ZIOLEK, R. NASKRECKI, J. KAROLCZAK, J. KUBICKI, A. MACIEJEWSKI. *Artifacts in femtosecond transient absorption spectroscopy*. Appl. Phys. B-Lasers Opt. 74(1):19–27, 2002.
- [Lug97] K. LUGER, A. W. MADER, R. K. RICHMOND, D. F. SARGENT, T. J. RICHMOND. *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 angstrom resolution*. Nature 389(6648):251–260, 1997.
- [Luk06] M. LUKIN, C. DE LOS SANTOS. *NMR structures of damaged DNA*. Chem. Rev. 106(2):607–686, 2006.
- [Luo01] R. LUO, H. S. R. GILSON, M. J. POTTER, M. K. GILSON. *The physical basis of nucleic acid base stacking in water*. Biophys. J. 80(1):140–148, 2001.
- [Lut01] I. LUTZ. *Vielkanal Femtosekundenspektroskopie der Primärreaktionen von archaebakteriellen Retinalproteinen im sichtbaren Spektralbereich*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, 2001.
- [Lya91] V. LYAMICHEV. *Unusual conformation of (dA)_n·(dT)_n-tracts as revealed by cyclobutane thymine - thymine dimer formation*. Nucleic Acids Res. 19(16):4491–4496, 1991.
- [Mac03] A. W. MACFARLANE, R. J. STANLEY. *Cis-Syn thymidine dimer repair by DNA photolyase in real time*. Biochemistry 42(28):8558–8568, 2003.
- [Mae80] A. A. MAEVSKY, B. I. SUKHORUKOV. *IR Study of Base Stacking Interactions*. Nucleic Acids Res. 8(13):3029–3042, 1980.
- [Mar91] Y. MARECHAL. *Infrared-Spectra of Water .1. Effect of Temperature and of H/D Isotopic Dilution*. J. Chem. Phys. 95(8):5565–5573, 1991.
- [Mar01] J. M. MARTINEZ, S. K. C. ELMROTH, L. KLOO. *Influence of sodium ions on the dynamics and structure of single-stranded DNA oligomers: A molecular dynamics study*. J. Am. Chem. Soc. 123(49):12279–12289, 2001.

- [Mar03] D. MARKOVITSI, A. SHARONOV, D. ONIDAS, T. GUSTAVSSON. *The effect of molecular organisation in DNA oligomers studied by femtosecond fluorescence spectroscopy*. ChemPhysChem 4(3):303–305, 2003.
- [Mar05] S. MARGUET, D. MARKOVITSI. *Time-resolved study of thymine dimer formation*. J. Am. Chem. Soc. 127(16):5780–5781, 2005.
- [Mar06] S. MARGUET, D. MARKOVITSI, F. TALBOT. *One- and two-photon ionization of DNA single and double helices studied by laser flash photolysis at 266 nm*. J. Phys. Chem. B 110(23):11037–11039, 2006.
- [Mas92] P. E. MASLEN, N. C. HANDY, R. D. AMOS, D. JAYATILAKA. *Higher Analytic Derivatives. 4. Anharmonic Effects in the Benzene Spectrum*. J. Chem. Phys. 97(6):4233–4254, 1992.
- [Mat62] J. H. MATTHAEI, O. W. JONES, R. G. MARTIN, M. W. NIRENBERG. *Characteristics and Composition of RNA Coding Units*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48(4):666–677, 1962.
- [Mat04] S. MATSIKA. *Radiationless decay of excited states of uracil through conical intersections*. J. Phys. Chem. A 108(37):7584–7590, 2004.
- [Mau76] T. H. MAUGH. *Ozone Layer - Threat from Aerosol Cans Is Real*. Science 194(4261):170–172, 1976.
- [McA98] K. MCATEER, Y. JING, J. KAO, J. S. TAYLOR, M. A. KENNEDY. *Solution-state structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-syn thymine cyclobutane dimer, the major UV photoproduct of DNA*. J. Mol. Biol. 282(5):1013–1032, 1998.
- [McG80] J. D. MCGHEE, G. FELSENFELD. *Nucleosome Structure*. Annu. Rev. Biochem. 49:1115–1156, 1980.
- [McK99] R. MCKENZIE, B. CONNER, G. BODEKER. *Increased summertime UV radiation in New Zealand in response to ozone loss*. Science 285(5434):1709–1711, 1999.
- [McK03] R. L. MCKENZIE, L. O. BJORN, A. BAIS, M. ILYASD. *Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface*. Photochem. Photobiol. Sci. 2(1):5–15, 2003.
- [McK04] A. F. MCKINLAY, J. H. BERNHARDT, A. AHLBOM, J. P. CESARINI, F. R. DE GRUIJL, M. HIETANEN, R. OWEN, D. H. SLINEY, P. SODERBERG, A. J. SWERDLOW, M. TAKI, T. S. TENFORDE, P. VECCHIA, B. VEYRET, R. MATTES, M. H. REPACHOLI, B. DIFFEY, M. A. MAINSTER, T. OKUNO, B. E. STUCK. *Guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation of wavelengths between 180 nm and 400 nm (incoherent optical radiation)*. Health Phys. 87(2):171–186, 2004.

- [McK07] R. L. MCKENZIE, P. J. AUCAMP, A. F. BAIS, L. O. BJORN, M. ILYAS. *Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface*. Photochem. Photobiol. Sci. 6(3):218–231, 2007.
- [Mee04] A. MEES, T. KLAR, P. GNAU, U. HENNECKE, A. P. M. EKER, T. CARELL, L. O. ESSEN. *Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair*. Science 306(5702):1789–1793, 2004.
- [Mei72] M. MEISTRICH, A. A. LAMOLA. *Triplet-State Sensitization of Thymine Photodimerization in Bacteriophage-T4*. J. Mol. Biol. 66(1):83–95, 1972.
- [Mer06] M. MERCHAN, R. GONZALEZ-LUQUE, T. CLIMENT, L. SERRANO-ANDRES, E. RODRIGUEZ, M. REGUERO, D. PELAEZ. *Unified model for the ultrafast decay of pyrimidine nucleobases*. J. Phys. Chem. B 110(51):26471–26476, 2006.
- [Mia96] K. MIASKIEWICZ, J. MILLER, M. COONEY, R. OSMAN. *Computational simulations of DNA distortions by a cis,syn-cyclobutane thymine dimer lesion*. J. Am. Chem. Soc. 118(38):9156–9163, 1996.
- [Mid07a] C. MIDDLETON. *Time-resolved infrared spectroscopy on CHU, personal communication*, 2007.
- [Mid07b] C. T. MIDDLETON, B. COHEN, B. KOHLER. *Solvent and solvent isotope effects on the vibrational cooling dynamics of a DNA base derivative*. J. Phys. Chem. A 111(42):10460–10467, 2007.
- [Mie71] F. MIESCHER. *Ueber die chemische Zusammensetzung von Eiterzellen*. Hoppe-Seyler's Med. Chem. Unters. Seiten 441–502, 1871.
- [Mil85] J. H. MILLER. *Mutagenic Specificity of Ultraviolet-Light*. J. Mol. Biol. 182(1):45–65, 1985.
- [Mil99] J. B. MILLS, E. VACANO, P. J. HAGERMAN. *Flexibility of single-stranded DNA: Use of gapped duplex helices to determine the persistence lengths of poly(dT) and poly(dA)*. J. Mol. Biol. 285(1):245–257, 1999.
- [Mil04] J. B. MILLS, P. J. HAGERMAN. *Origin of the intrinsic rigidity of DNA*. Nucleic Acids Res. 32(13):4055–4059, 2004.
- [Mit84] D. L. MITCHELL, J. M. CLARKSON. *Induction of Photoproducts in Synthetic Polynucleotides by Far and Near Ultraviolet-Radiation*. Photochem. Photobiol. 40(6):735–741, 1984.
- [Moa08] J. MOAN, A. C. POROJNICU, A. DAHLBACK, R. B. SETLOW. *Addressing the health benefits and risks, involving vitamin D or skin cancer, of increased sun exposure*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA Seiten 668–673, 2008.
- [Mol74] M. J. MOLINA, F. S. ROWLAND. *Stratospheric Sink for Chlorofluoromethanes - Chlorine Atomic-Catalysed Destruction of Ozone*. Nature 249(5460):810–812, 1974.

- [Mou06] S. MOURET, C. BAUDOIN, M. CHARVERON, A. FAVIER, J. CADET, T. DOUKI. *Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(37):13765–13770, 2006.
- [Mue97] R. MUELLER, P. J. CRUTZEN, J. U. GROOSS, C. BRUHL, J. M. RUSSELL, H. GERNANDT, D. S. MCKENNA, A. F. TUCK. *Severe chemical ozone loss in the Arctic during the winter of 1995-96*. Nature 389(6652):709–712, 1997.
- [Mur93] S. MUROV, I. CARMICHAEL, L. GORDON. *Handbook of Photochemistry*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1993.
- [Nak98] J. NAKAMURA, V. E. WALKER, P. B. UPTON, S. Y. CHIANG, Y. W. KOW, J. A. SWENBERG. *Highly sensitive apurinic/aprimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions*. Cancer Res. 58(2):222–225, 1998.
- [Nib05] E. T. J. NIBBERING, H. FIDDER, E. PINES. *ULTRAFast CHEMISTRY: Using Time-Resolved Vibrational Spectroscopy for Interrogation of Structural Dynamics*. AnnuRevPhysChem 56(1):337–367, 2005.
- [Nic00] W. L. NICHOLSON, N. MUNAKATA, G. HORNECK, H. J. MELOSH, P. SETLOW. *Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64(3):548–572, 2000.
- [Nie06] K. P. NIELSEN, L. ZHAO, J. J. STAMNES, K. STAMNES, J. MOAN. *The importance of the depth distribution of melanin in skin for DNA protection and other photobiological processes*. J. Photochem. Photobiol. B-Biol. 82(3):194–198, 2006.
- [Nik82] D. N. NIKOGOSYAN, D. A. ANGELOV, A. A. ORAEVSKY. *Determination of Parameters of Excited-States of DNA and RNA Bases by Laser UV Photolysis*. Photochem. Photobiol. 35(5):627–635, 1982.
- [Nik83] D. N. NIKOGOSYAN, A. A. ORAEVSKY, V. I. RUPASOV. *2-Photon Ionization and Dissociation of Liquid Water by Powerful Laser UV-Radiation*. Chem. Phys. 77(1):131–143, 1983.
- [Nik85] D. N. NIKOGOSYAN, A. A. ORAEVSKY, V. S. LETOKHOV, Z. K. ARBIEVA, E. N. DOBROV. *2-Step Picosecond UV Excitation of Polynucleotides and Energy-Transfer*. Chem. Phys. 97(1):31–42, 1985.
- [Nik96] D. N. NIKOGOSYAN, D. ANGELOV, B. SOEP, L. LINDQVIST. *Direct measurement of excited singlet-state lifetime in the homologous sequence adenine, adenosine, adenosine 5'-monophosphate and in calf thymus DNA*. Chem. Phys. Lett. 252(5-6):322–326, 1996.
- [Nis06] C. NISHIGORI. *Cellular aspects of photocarcinogenesis*. Photochem. Photobiol. Sci. 5(2):208–214, 2006.

- [Nor07] M. NORVAL, A. CULLEN, F. DE GRUIJL, J. LONGSTRETH, Y. TAKIZAWA, R. LUCAS, F. NOONAN, J. VAN DER LEUN. *The effects on human health from stratospheric ozone depletion and its interaction with climate change*. Photochem. Photobiol. Sci. 6:232–251, 2007.
- [NV06] C. NUSSLEIN-VOLHARD. *Das Werden des Lebens - Wie Gene die Entwicklung steuern*. dtv, 2006.
- [Ojh99] R. P. OJHA, M. M. DHINGRA, M. H. SARMA, M. SHIBATA, M. FARRAR, C. J. TURNER, R. H. SARMA. *DNA bending and sequence-dependent backbone conformation - NMR and computer experiments*. Eur. J. Biochem. 265(1):35–53, 1999.
- [Ora81] A. A. ORAEVSKY, A. V. SHARKOV, D. N. NIKOGOSYAN. *Picosecond Study of Electronically Excited Singlet-States of Nucleic-Acid Components*. Chem. Phys. Lett. 83(2):276–280, 1981.
- [Ora85] A. A. ORAEVSKY, D. N. NIKOGOSYAN. *Picosecond 2-Quantum Uv Photochemistry of Thymine in Aqueous-Solution*. Chem. Phys. 100(3):429–445, 1985.
- [Owr94] J. C. OWRUTSKY, D. RAFTERY, R. M. HOCHSTRASSER. *Vibrational-Relaxation Dynamics in Solutions*. Annu. Rev. Phys. Chem. 45:519–555, 1994.
- [Par95] H. W. PARK, S. T. KIM, A. SANCAR, J. DEISENHOFER. *Crystal-Structure of DNA Photolyase from Escherichia-Coli*. Science 268(5219):1866–1872, 1995.
- [Par02] H. PARK, K. J. ZHANG, Y. J. REN, S. NADJI, N. SINHA, J. S. TAYLOR, C. H. KANG. *Crystal structure of a DNA decamer containing a cis-syn thymine dimer*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(25):15965–15970, 2002.
- [Par07] C. J. PARK, J. H. LEE, B. S. CHOI. *Functional insights gained from structural analyses of DNA duplexes that contain UV-damaged photoproducts*. Photochem. Photobiol. 83(1):187–195, 2007.
- [Pau53] L. PAULING, R. B. COREY. *A Proposed Structure for the Nucleic Acids*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 39(2):84–97, 1953.
- [Pec85] L. J. PECK, J. C. WANG. *Transcriptional Block Caused by a Negative Supercoiling Induced Structural-Change in an Alternating CG Sequence*. Cell 40(1):129–137, 1985.
- [Pec00] J. M. L. PECOURT, J. PEON, B. KOHLER. *Ultrafast internal conversion of electronically excited RNA and DNA nucleosides in water*. J. Am. Chem. Soc. 122(38):9348–9349, 2000.
- [Pec01] J. M. L. PECOURT, J. PEON, B. KOHLER. *DNA excited-state dynamics: Ultrafast internal conversion and vibrational cooling in a series of nucleosides*. J. Am. Chem. Soc. 123(42):10370–10378, 2001.

- [Peh89] J. R. PEHRSON. *Thymine Dimer Formation as a Probe of the Path of DNA in and between Nucleosomes in Intact Chromatin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(23):9149–9153, 1989.
- [Peh92] J. R. PEHRSON, L. H. COHEN. *Effects of DNA Looping on Pyrimidine Dimer Formation*. Nucleic Acids Res. 20(6):1321–1324, 1992.
- [Peo01] J. PEON, A. H. ZEWAİL. *DNA/RNA nucleotides and nucleosides: direct measurement of excited-state lifetimes by femtosecond fluorescence up-conversion*. Chem. Phys. Lett. 348(3-4):255–262, 2001.
- [Per06a] S. PERUN, A. L. SOBOLEWSKI, W. DOMCKE. *Conical intersections in thymine*. J. Phys. Chem. A 110(49):13238–13244, 2006.
- [Per06b] S. PERUN, A. L. SOBOLEWSKI, W. DOMCKE. *Role of electron-driven proton-transfer processes in the excited-state deactivation adenine-thymine base pair*. J. Phys. Chem. A 110(29):9031–9038, 2006.
- [Pie00] J. PIEL, M. BEUTTER, E. RIEDLE. *20-50-fs pulses tunable across the near infrared from a blue-pumped noncollinear parametric amplifier*. Opt. Lett. 25(3):180–182, 2000.
- [Ple00] R. PLESSOW, A. BROCKHINKE, W. EIMER, K. KOHSE-HOINGHAUS. *Intrinsic time- and wavelength-resolved fluorescence of oligonucleotides: A systematic investigation using a novel picosecond laser approach*. J. Phys. Chem. B 104(15):3695–3704, 2000.
- [Poe73] D. POERSCHKE. *Specific Photoreaction in Polydeoxyadenylic Acid*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70(9):2683–2686, 1973.
- [Pon01] B. A. J. PONDER. *Cancer genetics*. Nature 411(6835):336–341, 2001.
- [Poo05] T. S. C. POON, R. S. C. BARNETSON, G. M. HALLIDAY. *Sunlight-induced immunosuppression in humans is initially because of UVB, then UVA, followed by interactive effects*. J. Invest. Dermatol. 125(4):840–846, 2005.
- [Pra96] M. PRATHER, P. MIDGLEY, F. S. ROWLAND, R. STOLARSKI. *The ozone layer: The road not taken*. Nature 381(6583):551–554, 1996.
- [Pre92] W. PRESS, S. TEUKOLSKY, W. VETTERLING, B. FLANNERY. *Numerical recipes in C: The art of scientific computing*. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.
- [Prz99] B. PRZYBILLA. *UV-B und Mensch*. Technischer Bericht, Bayerischer Klimafor- schungsverbund, 1999.
- [Rah66] R. O. RAHN. *Pyrimidine Dimers - Effect of Temperature on Photoinduction*. Science 154(3748):503–504, 1966.

- [Rah68] R. O. RAHN, J. L. HOSSZU. *Photochemistry of Polynucleotides - a Summary of Temperature Effects*. Photochem. Photobiol. 7(6):637–642, 1968.
- [Rav01] J. L. RAVANAT, T. DOUKI, J. CADET. *Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components*. J. Photochem. Photobiol. B-Biol. 63(1-3):88–102, 2001.
- [Rei80] C. REICH, I. TINOCO. *Fluorescence-Detected Circular-Dichroism of Dinucleoside Phosphates - a Study of Solution Conformations and the 2-State Model*. Biopolymers 19(4):833–848, 1980.
- [Reu96] A. REUTHER, D. N. NIKOGOSYAN, A. LAUBEREAU. *Primary photochemical processes in thymine in concentrated aqueous solution studied by femtosecond UV spectroscopy*. J. Phys. Chem. 100(13):5570–5577, 1996.
- [Reu00] A. REUTHER, H. IGLEV, R. LAENEN, A. LAUBEREAU. *Femtosecond photoionization of nucleic acid bases: electronic lifetimes and electron yields*. Chem. Phys. Lett. 325(4):360–368, 2000.
- [Ric60] A. RICH, I. TINOCO. *The Effect of Chain Length Upon Hypochromism in Nucleic Acids and Polynucleotides*. J. Am. Chem. Soc. 82(24):6409–6411, 1960.
- [Ric88] C. RICHTER, J. W. PARK, B. N. AMES. *Normal Oxidative Damage to Mitochondrial and Nuclear-DNA is Extensive*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(17):6465–6467, 1988.
- [Ric03] A. RICH, S. G. ZHANG. *Z-DNA: the long road to biological function*. Nat. Rev. Genet. 4(7):566–572, 2003.
- [Rie00] E. RIEDLE, M. BEUTTER, S. LOCHBRUNNER, J. PIEL, S. SCHENKL, S. SPORLEIN, W. ZINTH. *Generation of 10 to 50 fs pulses tunable through all of the visible and the NIR*. Appl. Phys. B-Lasers Opt. 71(3):457–465, 2000.
- [Ris02] M. RIST, H. A. WAGENKNECHT, T. FIEBIG. *Exciton and excimer formation in DNA at room temperature*. Chemphyschem 3(8):704–707, 2002.
- [Rit07] H. H. RITZE, P. HOBZA, D. NACHTIGALLOVA. *Electronic coupling in the excited electronic state of stacked DNA base homodimers*. Phys. Chem. Chem. Phys. 9(14):1672–1675, 2007.
- [Ryc88] R. E. RYCINA, J. C. WALLACE, M. SHARMA, J. L. ALDERFER. *Ultraviolet-Irradiation of Nucleic-Acids - Formation, Purification, and Solution Conformational-Analyses of Oligothymidylates Containing Cis-Syn Photodimers*. Biochemistry 27(9):3152–3163, 1988.
- [SA06] L. SERRANO-ANDRES, M. MERCHAN, A. C. BORIN. *Adenine and 2-aminopurine: Paradigms of modern theoretical photochemistry*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(23):8691–8696, 2006.

- [San94] A. SANCAR. *Structure and Function of DNA Photolyase*. *Biochemistry* 33(1):2–9, 1994.
- [San96] A. SANCAR. *DNA excision repair*. *Annu. Rev. Biochem.* 65:43–81, 1996.
- [San03] A. SANCAR. *Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors*. *Chem. Rev.* 103(6):2203–2237, 2003.
- [San07] F. SANTORO, V. BARONE, R. IMPROTA. *Influence of base stacking on excited-state behavior of polyadenine in water, based on time dependent density functional calculations*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 104(24):9931–9936, 2007.
- [Sat04] H. SATZGER. *Untersuchung initialer Schritte der Peptidfaltung mit Ultrakurzzeit-spektroskopie*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2004.
- [Sch90] N. F. SCHERER, C. SIPES, R. B. BERNSTEIN, A. H. ZEWEIL. *Real-time clocking of bimolecular reactions: Application to $H + CO_2$* . *J. Chem. Phys.* 92(9):5239–5259, 1990.
- [Sch95] B. SCHRADER. *Infrared and Raman Spectroscopy*. John Wiley and Sons Canada, Ltd., 1995.
- [Sch96] D. SCHWARZER, J. TROE, M. VOTSMEIER, M. ZEREZKE. *Collisional deactivation of vibrationally highly excited azulene in compressed liquids and supercritical fluids*. *J. Chem. Phys.* 105(8):3121–3131, 1996.
- [Sch02] W. J. SCHREIER. *Aufbau eines Systems zur Untersuchung von fs-IR-Absorptionsänderungen in Chromopeptiden*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2002.
- [Sch03a] O. D. SCHAERER. *Chemistry and biology of DNA repair*. *Angew. Chem.-Int. Edit.* 42(26):2946–2974, 2003.
- [Sch03b] K. SCHEPLER, D. LOWENTHAL, J. PIERCE. *Nonlinear Frequency Generation and Conversion: Materials, Devices, and Applications II*. *Proc. SPIE* 4972:50–57, 2003.
- [Sch04] T. SCHRADER, A. SIEG, F. KOLLER, W. SCHREIER, Q. AN, W. ZINTH, P. GILCH. *Vibrational relaxation following ultrafast internal conversion: comparing IR and Raman probing*. *Chem. Phys. Lett.* 392(4-6):358–364, 2004.
- [Sch05] E. SCHLEICHER, B. HESSLING, V. ILLARIONOVA, A. BACHER, S. WEBER, G. RICHTER, K. GERWERT. *Light-induced reactions of Escherichia coli DNA photolyase monitored by Fourier transform infrared spectroscopy*. *Febs J.* 272(8):1855–1866, 2005.
- [Sch07] W. J. SCHREIER, T. E. SCHRADER, F. O. KOLLER, P. GILCH, C. E. CRESPO-HERNÁNDEZ, V. N. SWAMINATHAN, T. CARELL, W. ZINTH, B. KOHLER. *Thymine dimerization in DNA is an ultrafast photoreaction*. *Science* 315(5812):625–629, 2007.

- [Sch08] W. J. SCHREIER, F. O. KOLLER, T. E. SCHRADER, M. BRAUN, W. ZINTH. *IR-Characterization of the excited state in Lumazin: An Isotope labeling approach.* in preparation , 2008.
- [See97] M. SEEL, E. WILDERMUTH, W. ZINTH. *A multichannel detection system for application in ultrafast spectroscopy.* Meas. Sci. Technol. 8(4):449–452, 1997.
- [Set61] R. SETLOW. *Action Spectrum for Reversal of Dimerization of Thymine Induced by Ultraviolet Light.* Biochim. Biophys. Acta. 49(1):237–238, 1961.
- [Set74] R. B. SETLOW. *Wavelengths in Sunlight Effective in Producing Skin Cancer - Theoretical Analysis.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71(9):3363–3366, 1974.
- [Set92] P. SETLOW. *I Will Survive - Protecting and Repairing Spore DNA.* J. Bacteriol. 174(9):2737–2741, 1992.
- [Set93] R. B. SETLOW, E. GRIST, K. THOMPSON, A. D. WOODHEAD. *Wavelengths Effective in Induction of Malignant-Melanoma.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(14):6666–6670, 1993.
- [Sha66] R. SHAPIRO, R. S. KLEIN. *Deamination of Cytidine and Cytosine by Acidic Buffer Solutions . Mutagenic Implications.* Biochemistry 5(7):2358–2362, 1966.
- [Sha86] Z. SHAKKED, D. RABINOVICH. *The Effect of the Base Sequence on the Fine-Structure of the DNA Double Helix.* Prog. Biophys. Mol. Biol. 47(3):159–195, 1986.
- [Sha89] Z. SHAKKED, G. GUERSTEINGUZIKEVICH, M. EISENSTEIN, F. FROLOW, D. RABINOVICH. *The Conformation of the DNA Double Helix in the Crystal is Dependent on its Environment.* Nature 342(6248):456–460, 1989.
- [She84] Y. R. SHEN. *The Principles of Nonlinear Optics.* John Wiley and Sons, New York, 1984.
- [Shi98] D. T. SHINDELL, D. RIND, P. LONERGAN. *Increased polar stratospheric ozone losses and delayed eventual recovery owing to increasing greenhouse-gas concentrations.* Nature 392(6676):589–592, 1998.
- [Sie05] A. SIEG. *Femtosekundenspektroskopie im mittleren Infraroten: Energierelaxation in para-Nitroanilin und Konformationsdynamik von Azobenzolpeptiden.* Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, 2005.
- [Sin62] M. F. SINGER, G. W. RUSHIZKY, H. A. SOBER, L. A. HEPPEL. *Spectral Properties of Adenine Oligoribonucleotides.* Biochim. Biophys. Acta. 61(3):474–477, 1962.
- [Sin82] B. SINGER, J. T. KUSMIEREK. *Chemical Mutagenesis.* Annu. Rev. Biochem. 51:655–693, 1982.

- [Sla96] H. SLAPER, G. J. M. VELDEERS, J. S. DANIEL, F. R. DEGRUIJL, J. C. VANDERLEUN. *Estimates of ozone depletion and skin cancer incidence to examine the Vienna Convention achievements*. *Nature* 384(6606):256–258, 1996.
- [Smi62] E. L. SMITH. *Nucleotide Base Coding and Amino Acid Replacements in Proteins*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48(4):677–684, 1962.
- [Smi96] C. A. SMITH, M. WANG, N. JIANG, L. CHE, X. D. ZHAO, J. S. TAYLOR. *Mutation spectra of M13 vectors containing site-specific cis-syn, trans-syn-I, (6-4), and dewar pyrimidone photoproducts of thymidyl-(3' → 5')-thymidine in Escherichia coli under SOS conditions*. *Biochemistry* 35(13):4146–4154, 1996.
- [Sob04] A. L. SOBOLEWSKI, W. DOMCKE. *Ab initio studies on the photophysics of the guanine-cytosine base pair*. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6(10):2763–2771, 2004.
- [Sol68] T. N. SOLIE, SCHELLMAJA. *Interaction of Nucleosides in Aqueous Solution*. *J. Mol. Biol.* 33(1):61–77, 1968.
- [Som92] A. SOMMERFELD. *Partielle Differentialgleichungen in der Physik: Bd 6. Vorlesungen über Theoretische Physik*. Deutsch (Harri), 6 Auflage, 1992.
- [Spö01] S. SPÖRLEIN. *Femtosekunden-Spektroskopie schnellster Strukturänderungen in Peptid-Chromophor-Komplexen*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, 2001.
- [SP07] J. J. SERRANO-PEREZ, R. GONZALEZ-LUQUE, M. MERCHAN, L. SERRANO-ANDRES. *On the intrinsic population of the lowest triplet state of thymine*. *J. Phys. Chem. B* 111(41):11880–11883, 2007.
- [Spe62a] J. F. SPEYER, C. BASILIO, S. OCHOA, P. LENGYEL. *Synthetic Polynucleotides and Amino Acid Code .4*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48(3):441–448, 1962.
- [Spe62b] J. F. SPEYER, S. OCHOA, P. LENGYEL, C. BASILIO. *Synthetic Polynucleotides and Amino Acid Code .2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48(1):63–68, 1962.
- [Spe91] D. E. SPENCE, P. N. KEAN, W. SIBBETT. *60-fsec Pulse Generation from a Self-Mode-Locked Ti-Sapphire Laser*. *Opt. Lett.* 16(1):42–44, 1991.
- [Spe97] T. I. SPECTOR, T. E. CHEATHAM, P. A. KOLLMAN. *Unrestrained molecular dynamics of photodamaged DNA in aqueous solution*. *J. Am. Chem. Soc.* 119(30):7095–7104, 1997.
- [Spo01] J. SPONER, J. LESZCZYNSKI, P. HOBZA. *Electronic properties, hydrogen bonding, stacking, and cation binding of DNA and RNA bases*. *Biopolymers* 61(1):3–31, 2001.
- [Ste92] S. STEENKEN, J. P. TELO, H. M. NOVAIS, L. P. CANDEIAS. *One-Electron-Reduction Potentials of Pyrimidine-Bases, Nucleosides, and Nucleotides in Aqueous-Solution - Consequences for DNA Redox Chemistry*. *J. Am. Chem. Soc.* 114(12):4701–4709, 1992.

- [Ste99] G. STEINMEYER, D. H. SUTTER, L. GALLMANN, N. MATUSCHEK, U. KELLER. *Frontiers in ultrashort pulse generation: Pushing the limits in linear and nonlinear optics*. Science 286(5444):1507–1512, 1999.
- [Ste04] L. D. STEIN. *Human genome - End of the beginning*. Nature 431(7011):915–916, 2004.
- [Sto92] P. O. STOUTLAND, R. B. DYER, W. H. WOODRUFF. *Ultrafast Infrared-Spectroscopy*. Science 257(5078):1913–1917, 1992.
- [Str62] S. J. STRICKLER, R. A. BERG. *Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules*. J. Chem. Phys. 37(4):814–822, 1962.
- [Str85] D. STRICKLAND, G. MOUROU. *Compression of Amplified Chirped Optical Pulses*. Opt. Commun. 56(3):219–221, 1985.
- [Stu97] B. STUART. *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. John Wiley and Sons, Ltd., 1997.
- [Sut00] B. SUTER, G. SCHNAPPAUF, F. THOMA. *Poly(dA-dT) sequences exist as rigid DNA structures in nucleosome-free yeast promoters in vivo*. Nucleic Acids Res. 28(21):4083–4089, 2000.
- [Suz75] Y. SUZAKI, A. TACHIBANA. *Measurement of μM Sized Radius of Gaussian Laser-Beam Using Scanning Knife-Edge*. Appl. Optics 14(12):2809–2810, 1975.
- [Szc00] K. SZCZEPANIAK, M. M. SZCZESNIAK, W. B. PERSON. *Raman and infrared spectra of thymine. A matrix isolation and DFT study*. J. Phys. Chem. A 104(16):3852–3863, 2000.
- [Tai92] E. TAILLANDIER, J. LIQUIER. *Infrared-Spectroscopy of DNA*. Method Enzymol. 211:307–335, 1992.
- [Tam97] T. TAMADA, K. KITADOKORO, Y. HIGUCHI, K. INAKA, A. YASUI, P. E. DE-RUITER, A. P. M. EKER, K. MIKI. *Crystal structure of DNA photolyase from Anacystis nidulans*. Nat. Struct. Biol. 4(11):887–891, 1997.
- [Tan] K. TANIMURA. *Femtosecond time-resolved spectroscopy of the formation of self-trapped excitons in CaF_2* . Phys. Rev. B 63(184303):1–4.
- [Tay90] J. S. TAYLOR, C. L. ODAY. *Cis-Syn Thymine Dimers Are Not Absolute Blocks to Replication by DNA-Polymerase-I of Escherichia-Coli In vitro*. Biochemistry 29(6):1624–1632, 1990.
- [Tay94] J. S. TAYLOR. *Unraveling the Molecular Pathway from Sunlight to Skin-Cancer*. Accounts Chem. Res. 27(3):76–82, 1994.
- [Ter99] M. TERAZIMA. *Vibrational relaxation from electronically photoexcited states in solution studied by the acoustic peak delay method: hydrogen bonding effect to betaine-30*. Chem. Phys. Lett. 305(3-4):189–196, 1999.

- [Tha04] A. THALLER, R. LAENEN, A. LAUBEREAU. *Femtosecond spectroscopy of the hydrated electron: novel features in the infrared*. Chem. Phys. Lett. 398(4-6):459–465, 2004.
- [Tho93] D. C. THOMAS, T. A. KUNKEL. *Replication of UV-Irradiated DNA in Human Cell-Extracts - Evidence for Mutagenic Bypass of Pyrimidine Dimers*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(16):7744–7748, 1993.
- [Tin60] I. TINOCO. *Hypochromism in Polynucleotides*. J. Am. Chem. Soc. 82(18):4785–4790, 1960.
- [Tin96] I. TINOCO. *Nucleic acid structures, energetics, and dynamics*. J. Phys. Chem. 100(31):13311–13322, 1996.
- [Tra69] Z. TRAMER, WIERZCHO.KL, D. SHUGAR. *Influence of Polynucleotide Secondary Structure on Thymine Photodimerization*. Acta Biochim. Pol. 16(1):83–107, 1969.
- [Tra97] A. TRAVERS, H. DREW. *DNA recognition and nucleosome organization*. Biopolymers 44(4):423–433, 1997.
- [Tre69] E. B. TREACY. *Optical Pulse Compression with Diffraction Gratings*. IEEE J. Quantum Electron. 5(9):454–458, 1969.
- [Tsc82] H. TSCHESCHE. *Der chemische Bau biologisch wichtiger Makromoleküle*. In W. HOPPE, W. LOHMANN, H. MARKL, H. ZIEGLER, Herausgeber, *Biophysik*, Seiten 22–44. Springer-Verlag, Berlin, 2 Auflage, 1982.
- [Tso66] P. O. TSO, S. A. RAPAPORT, F. J. BOLLUM. *A Comparative Study of Polydeoxyribonucleotides and Polyribonucleotides by Optical Rotatory Dispersion*. Biochemistry 5(12):4153–4170, 1966.
- [Tsu97] M. TSUBOI, M. KOMATSU, J. HOSHI, E. KAWASHIMA, T. SEKINE, Y. ISHIDO, M. P. RUSSELL, J. M. BENEVIDES, G. J. THOMAS. *Raman and infrared spectra of (2'S)-[2'-²H] thymidine: Vibrational coupling between deoxyribosyl and thymine moieties and structural implications*. J. Am. Chem. Soc. 119(8):2025–2032, 1997.
- [Tsu02] T. TSUJIBAYASHI, K. TOYODA, S. SAKURAGI, M. KAMADA, M. ITOH. *Spectral profile of the two-photon absorption coefficients in CaF₂ and BaF₂*. Appl. Phys. Lett. 80(16):2883–2885, 2002.
- [Tu98] Y. Q. TU, R. DAMMANN, G. P. PFEIFER. *Sequence and time-dependent deamination of cytosine bases in UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers in vivo*. J. Mol. Biol. 284(2):297–311, 1998.
- [Tur91] N. TURRO. *Modern Molecular Photochemistry*. University Science Books, Sausalito, 1991.
- [Var70] A. J. VARGHESE. *5-Thyminy-5,6-Dihydrothymine from DNA Irradiated with Ultraviolet Light*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38(3):484–490, 1970.

- [Vea93] J. M. VEAL, X. L. GAO, F. K. BROWN. *A Comparison of DNA Oligomer Duplexes Containing Formacetal and Phosphodiester Linkers Using Molecular-Dynamics and Quantum-Mechanics*. J. Am. Chem. Soc. 115(16):7139–7145, 1993.
- [Vin01] A. A. VINK, L. ROZA. *Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers*. J. Photochem. Photobiol. B-Biol. 65(2-3):101–104, 2001.
- [vN99] J. VAN NOORT, F. ORSINI, A. EKER, C. WYMAN, B. DE GROOTH, J. GREVE. *DNA bending by photolyase in specific and non-specific complexes studied by atomic force microscopy*. Nucleic Acids Res. 27(19):3875–3880, 1999.
- [Voe63] D. VOET, W. B. GRATZER, R. A. COX, P. DOTY. *Absorption Spectra of Nucleotides, Polynucleotides, and Nucleic Acids in the Far Ultraviolet*. Biopolymers 1(3):193–208, 1963.
- [Wac64] A. WACKER, H. DELLWEG, L. TRAGER, A. KORNHAUSER, E. LODEMANN, G. TURCK, R. SELZER, P. CHANDRA, M. ISHIMOTO. *Organic Photochemistry of Nucleic Acids*. Photochem. Photobiol. 3(4):369–394, 1964.
- [Wag69] P. J. WAGNER, D. J. BUCHECK. *A Comparison of Photodimerizations of 2-Cyclopentenone and of 2-Cyclohexenone in Acetonitrile*. J. Am. Chem. Soc. 91(18):5090–5097, 1969.
- [Wag70] P. J. WAGNER, D. J. BUCHECK. *Photodimerization of Thymine and Uracil in Acetonitrile*. J. Am. Chem. Soc. 92(1):181–185, 1970.
- [Wag83] P. J. WAGNER. *Conformational Flexibility and Photochemistry*. Acc. Chem. Res. 16(12):461–467, 1983.
- [Wah97] M. C. WAHL, M. SUNDARALINGAM. *Crystal structures of A-DNA duplexes*. Biopolymers 44(1):45–63, 1997.
- [Wal95] G. C. WALKER. *Sos-Regulated Proteins in Translesion DNA-Synthesis and Mutagenesis*. Trends Biochem.Sci. 20(10):416–420, 1995.
- [Wan60] S. Y. WANG. *Reversible Behaviour of the Ultra-Violet Irradiated Deoxyribonucleic Acid and its Apurinic Acid*. Nature 188(4753):844–846, 1960.
- [Wan61] S. Y. WANG. *Photochemical Reactions in Frozen Solutions*. Nature 190(477):690–694, 1961.
- [Wan79] A. H. J. WANG, G. J. QUIGLEY, F. J. KOLPAK, J. L. CRAWFORD, J. H. VANBOOM, G. VANDERMAREL, A. RICH. *Molecular-Structure of a Left-Handed Double Helical DNA Fragment at Atomic Resolution*. Nature 282(5740):680–686, 1979.
- [Wan01] Y. S. WANG, J. S. TAYLOR, M. L. GROSS. *Isolation and mass spectrometric characterization of dimeric adenine photoproducts in oligodeoxynucleotides*. Chem. Res. Toxicol. 14(6):738–745, 2001.

- [Wat53a] J. D. WATSON, F. H. C. CRICK. *Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid*. Nature 171(4361):964–967, 1953.
- [Wat53b] J. D. WATSON, F. H. C. CRICK. *Molecular Structure of Nucleic Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. Nature 171(4356):737–738, 1953.
- [Wat02] J. D. WATSON, M. D. *The Double Helix*. Langenscheidt-Longman, 2002.
- [Web02] S. WEBER, C. W. M. KAY, H. MOGLING, K. MOBIUS, K. HITOMI, T. TODO. *Photoactivation of the flavin cofactor in Xenopus laevis (6-4) photolyase: Observation of a transient tyrosyl radical by time-resolved electron paramagnetic resonance*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(3):1319–1322, 2002.
- [Web05] S. WEBER. *Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase*. Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg. 1707(1):1–23, 2005.
- [Weh89] T. A. WEHR, N. E. ROSENTHAL. *Seasonality and Affective-Illness*. Am. J. Psychiat. 146(7):829–839, 1989.
- [Wei66] D. WEINBLUM, H. E. JOHNS. *Isolation and Properties of Isomeric Thymine Dimers*. Biochim. Biophys. Acta. 114(3):450–459, 1966.
- [Wes92] S. A. WESTON, A. LAHM, D. SUCK. *X-Ray Structure of the DNase I-d(GGTATACC)₂ Complex at 2.3 Å Resolution*. J. Mol. Biol. 226(4):1237–1256, 1992.
- [Whi71] D. W. WHILLANS, H. E. JOHNS. *Properties of Triplet States of Thymine and Uracil in Aqueous Solution*. J. Am. Chem. Soc. 93(6):1358–1362, 1971.
- [Wic07] I. WICKELGREN. *Skin biology - A healthy tan?*. Science 315(5816):1214–1216, 2007.
- [Wie02] U. H. WIECHERT. *Earth's early atmosphere*. Science 298(5602):2341–2342, 2002.
- [Wil53] M. H. F. WILKINS, A. R. STOKES, H. R. WILSON. *Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids*. Nature 171(4356):738–740, 1953.
- [Wil76] R. W. WILSON, P. R. CALLIS. *Excitons, Energy-Transfer, and Charge Resonance in Excited Dinucleotides and Polynucleotides - Photoselection Study*. J. Phys. Chem. 80(20):2280–2288, 1976.
- [Wil97] T. WILHELM, J. PIEL, E. RIEDLE. *Sub-20-fs pulses tunable across the visible from a blue-pumped single-pass noncollinear parametric converter*. Opt. Lett. 22(19):1494–1496, 1997.
- [Woe98] D. WOEHRLER, M. TAUSCH, W.-D. STOHRER. *Photochemie*. Wiley-VCH, Weinheim, 1998.

- [Woo69] R. B. WOODWARD, R. HOFFMANN. *Conservation of Orbital Symmetry*. Angew. Chem.-Int. Edit. 8(11):781–869, 1969.
- [Woo96a] P. D. WOOD, R. W. REDMOND. *Triplet state interactions between nucleic acid bases in solution at room temperature: Intermolecular energy and electron transfer*. J. Am. Chem. Soc. 118(18):4256–4263, 1996.
- [Woo96b] R. D. WOOD. *DNA repair in eukaryotes*. Annu. Rev. Biochem. 65:135–167, 1996.
- [Woo06] S. R. WOOD, M. BERWICK, R. D. LEY, R. B. WALTER, R. B. SETLOW, G. S. TIMMINS. *UV causation of melanoma in Xiphophorus is dominated by melanin photosensitized oxidant production*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11):4111–4115, 2006.
- [Wul61] D. L. WULFF, G. FRAENKEL. *On Nature of Thymine Photoproduct*. Biochim. Biophys. Acta. 51(2):332–339, 1961.
- [Wul63] D. L. WULFF. *Kinetics of Thymine Photodimerization in DNA*. Biophys. J. 3(5):355–362, 1963.
- [Wyn95] K. WYNNE, R. M. HOCHSTRASSER. *The Theory of Ultrafast Vibrational Spectroscopy*. Chem. Phys. 193(3):211–236, 1995.
- [Yak06] P. YAKOVCHUK, E. PROTOZANOVA, M. D. FRANK-KAMENETSKII. *Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix*. Nucleic Acids Res. 34(2):564–574, 2006.
- [Yam06] M. YAMADA, M. U. UDONO, M. HORI, R. HIROSE, S. SATO, T. MORI, O. NIKAIDO. *Aged human skin removes UVB-induced pyrimidine dimers from the epidermis more slowly than younger adult skin in vivo*. Arch. Dermatol. Res. 297(7):294–302, 2006.
- [Yoo00] J. H. YOON, C. S. LEE, T. R. O’CONNOR, A. YASUI, G. P. PFEIFER. *The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight*. J. Mol. Biol. 302(4):1019–1020, 2000.
- [You98] A. R. YOUNG, C. A. CHADWICK, G. I. HARRISON, O. NIKAIDO, J. RAMSDEN, C. S. POTTEN. *The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema*. J. Invest. Dermatol. 111(6):982–988, 1998.
- [You00] A. R. YOUNG, C. A. CHADWICK, G. I. HARRISON, O. NIKAIDO, J. RAMSDEN, C. S. POTTEN. *Wavelength Dependence for DNA Photodamage in Human Skin in vivo*. Radiat. Prot. Dosim. 91(1-3):73–75, 2000.
- [You01] Y. H. YOU, D. H. LEE, J. H. YOON, S. NAKAJIMA, A. YASUI, G. P. PFEIFER. *Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells*. J. Biol. Chem. 276(48):44688–44694, 2001.

- [Zam52] S. ZAMENHOF, G. BRAWERMAN, E. CHARGAFF. *On the Desoxypentose Nucleic Acids from Several Microorganisms*. *Biochim. Biophys. Acta.* 9(4):402–405, 1952.
- [Zew00] A. H. ZEWAİL. *Femtochemistry: Atomic-scale dynamics of the chemical bond*. *J. Phys. Chem. A* 104(24):5660–5694, 2000.
- [Zha97] X. D. ZHAO, J. Q. LIU, D. S. HSU, S. Y. ZHAO, J. S. TAYLOR, A. SANCAR. *Reaction mechanism of (6-4) photolyase*. *J. Biol. Chem.* 272(51):32580–32590, 1997.
- [Zha98] S. L. ZHANG, K. H. MICHAELIAN, G. R. LOPPNOW. *Vibrational spectra and experimental assignments of thymine and nine of its isotopomers*. *J. Phys. Chem. A* 102(2):461–470, 1998.
- [Zha06] R. B. ZHANG, L. A. ERIKSSON. *A triplet mechanism for the formation of cyclobutane pyrimidine dimers in UV-irradiated DNA*. *J. Phys. Chem. B* 110(14):7556–7562, 2006.
- [Zin92] W. ZINTH, W. KAISER. *Ultrafast Coherent Spectroscopy*. In W. KAISER, Herausgeber, *Ultrashort Laser Pulses- Generation and Applications*, Band 60 von *Topics in Applied Physics*, Seiten 236–277. Springer-Verlag, 2. Auflage, 1992.
- [Zur92] M. ZUREK. *Entwicklung und Charakterisierung eines Meß-Systems zur präzisen Detektion kurzer Lichtimpulse*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, 1992.

Glossar — Abkürzungsverzeichnis

AgGaS₂	Silberthiogolat Kristall
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
BaF₂	Bariumfluorid
BBO	β -Bariumborat Kristall
BS	engl. beam splitter = Strahlteiler
CaF₂	Kalziumfluorid
CG	engl. continuum generation = Weißlichterzeugung
CHU	1-Cyclohexyluracil
CI	engl. conical intersection = konische Durchschneidung
CPA	engl. chirped pulse amplification
DFM	engl. difference frequency mixing = Differenzfrequenzerzeugung
DMC	engl. dimer model compound
(dT)₁₈	18-mer Thymin Oligonukleotid
DM	engl. dichroitic mirror = dichroitischer Spiegel
FC	Franck-Condon-Bereich
FWHM	engl. full width half maximum = Halbwertsbreite
IC	engl. internal conversion = interne Konversion
IR	Infrarot
ISC	engl. intersystem crossing = innere Umwandlung
k	die Ratenkonstante
k_B	die Boltzmannkonstante $\cong 1,38 \cdot 10^{-23}$
LASER	engl. light amplification by stimulated emission of radiation
$\lambda/2$	Lambda-Halbe-Plättchen
MIR	Mittelinfrarot
NIR	Nahinfrarot
NMR	engl. nuclear magnetic resonance = kernmagnetische Resonanz
NOPA	engl. non-collinear optical parametric amplifier = nicht-kollinearer optisch-parametrischer Verstärker
OD	engl. optical density = optische Dichte, Absorption
OPA	engl. optical parametric amplifier = optisch-parametrischer Verstärker
poly(A)	Polyadenylsäure
SHG	engl. second harmonic generation = Frequenzverdopplung
THG	engl. third harmonic generation = Frequenzverdreifachung
TMP	Thymidin-5'-Monophosphat
TpT	Thymidylyl-3-5-Thymidin
UV	Ultraviolett
VIS	engl. visible = sichtbar

Lebenslauf

Persönliche Daten

Wolfgang Johannes Schreier

geboren am 17.12.1975 in Tegernsee

ledig

Ausbildung und Tätigkeiten

9/1982 bis 8/1986	Grundschule Wall
9/1986 bis 7/1995	Gymnasium Miesbach
7/1995	Allgemeine Hochschulreife
7/1995 bis 8/1996	Zivildienst im SECA-Haus Schliersee
10/1996 bis 7/2002	Studium der Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität München
7/2001 bis 7/2002	Diplomarbeit am Physik-LS Prof. W. Zinth, LMU: „Aufbau eines Systems zur fs-Infrarot-Spektroskopie an Chromopeptiden“.
10/2002 bis 12/2002	Praktikum am Zentrum für Angewandte Energieforschung (ZAE Bayern)
1/2003 bis heute	Dissertationsstudium / Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Physik-LS Prof. W. Zinth, LMU

Mitarbeit in der Lehre

9/2001 und 9/2002	LMU-München, Betreuung des Probestudiums für Physiker
WS 2001/2002	LMU-München, Betreuung des Physikpraktikums für Mediziner
WS 2005/2006	LMU-München, Übungen zur Vorlesung PNI (Einführung in die Physik für Chemiker und Biologen)

Veröffentlichungen

- F. O. Koller, W. J. Schreier, T. E. Schrader, S. Malkmus, C. Schulz, S. Dietrich, K. Rück-Braun and M. Braun. Ultrafast Ring-Closure Reaction of Photochromic Indolylfulgimides Studied with UV-Pump-IR-Probe Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A*, 112, 210-214 (2008).
- F.O. Koller, K. Haiser, M. Huber, T.E. Schrader, N. Regner, W.J. Schreier and W. Zinth. Generation of narrowband subpicosecond mid-infrared pulses via difference frequency mixing of chirped near-infrared pulses. *Optics Lett.* 32, 22 3339-3341 (2007).
- W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, P. Gilch, W. Zinth, B. Kohler. Thymine Dimer Formation probed by Time-Resolved Vibrational Spectroscopy. *Ultrafast Phenomena XV*. Eds.: Corkum P., Jonas D., Miller R. J. D., Weiner A. M. Springer Series in Chemical Physics 88, 522-524 (2007).
- P. Gilch, W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, W. Zinth, C. E. Crespo-Hernandez and B. Kohler. Watching DNA Get „Sunburned“. *TRVS XIII Proceedings*, 48-50 (2007).
- F. O. Koller, W. J. Schreier, T. E. Schrader, S. Malkmus, S. Draxler, T. Brust, W. J. Lees and M. Braun. Time-Resolved UV/Vis-Pump IR-Probe Spectroscopy on Photochromic Indolylfulgides. *TRVS XIII Proceedings*, 144-146 (2007).
- T. E. Schrader, A. Sieg, W. J. Schreier, F. O. Koller, B. Kohler, P. Gilch and W. Zinth. Solvent Effects on Vibrational Cooling: Differences Between Cytidine and para-Nitroaniline. *TRVS XIII Proceedings*, 54-56 (2007).
- W. Zinth, T. E. Schrader, W. J. Schreier, F. O. Koller, T. Cordes, G. Babitzki, R. Denschlag, P. Tavan, M. Loeweneck, S.-L. Dong, L. Moroder, C. Renner. Ultrafast Unzipping of a Beta-Hairpin Peptide. *Ultrafast Phenomena XV*. Eds.: Corkum P., Jonas D., Miller R. J. D., Weiner A. M. Springer Series in Chemical Physics 88, 498-500 (2007).
- S. Laimgruber, H. Schachenmayr, W. J. Schreier and P. Gilch. A Femtosecond IR and Raman Look in a Nucleophilic Addition in the Electronic Ground State. *Ultrafast Phenomena XV*. Eds.: Corkum P., Jonas D., Miller D. and Weiner A. M. Springer Series in Chemical Physics 88, 264-266 (2007).
- F. O. Koller, M. Huber, T. E. Schrader, W. J. Schreier and W. Zinth. Ultrafast vibrational excitation transfer and vibrational cooling of propionic acid dimers investigated with IR-pump IR-probe spectroscopy. *Chemical Physics*, 341(1-3), 200-206 (2007).
- F. O. Koller, C. Sobotta, T. E. Schrader, T. Cordes, W. J. Schreier, A. Sieg and P. Gilch. Slower processes of the ultrafast photo-isomerization of an azobenzene observed by IR spectroscopy. *Chemical Physics*, 341(1-3), 258-266 (2007).
- S. Malkmus, F. O. Koller, S. Draxler, T. E. Schrader, W. J. Schreier, T. Brust, J. A. DiGirolamo, W. J. Lees, W. Zinth and M. Braun. All-optical operation cycle on molecular bits with 250-GHz clock-rate based on photochromic fulgides. *Advanced Functional Materials*, 17(17), 3657-3662 (2007).

-
- T. E. Schrader, W. J. Schreier, T. Cordes, F. O. Koller, G. Babitzki, R. Denschlag, C. Renner, S.-L. Dong, M. Löweneck, L. Moroder, P. Tavan and W. Zinth. Light-triggered beta-hairpin folding and unfolding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40), 15729-15734 (2007).
 - W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, P. Gilch, C. E. Crespo-Hernandez, V. N. Swaminathan, T. Carell, W. Zinth und B. Kohler. Thymine dimerization in DNA is an ultrafast photoreaction. *Science*, 315(5812), 625-629 (2007).
 - W.J. Schreier, T.E. Schrader, F. O. Koller, A. Sieg, C. Renner, L. Moroder, J. Wachtveitl and W. Zinth. Femtosecond Spectroscopy for the study of Initial Rections in Protein Foldoing. *Femtochemistry VII: Fundamental Ultrafast Processes in Chemistry, Physics and Biology*. Eds.: Castleman A.W. Jr., Kimble, M.L. Elsevier, Amsterdam 311-320 (2006).
 - S. Malkmus, F.O. Koller, B. Heinz, W.J. Schreier, T.E. Schrader, W. Zinth, C. Schulz, S. Dietrich, K. Rück-Braun, M. Braun. Ultrafast ring opening reaction of a photochromic indolyl-fulgimide. *Chemical Physics Letters*, 417(1-3), 266-271 (2006).
 - F. O. Koller, W. J. Schreier, T. E. Schrader, A. Sieg, S. Malkmus, C. Schulz, S. Dietrich, K. Rück-Braun, W. Zinth and M. Braun. Ultrafast structural dynamics of photochromic indolylfulgimides studied by vibrational spectroscopy and DFT calculations. *Journal of Physical Chemistry A*, 110(47), 12769-12776 (2006).
 - S. L. Dong, M. Loweneck, T. E. Schrader, W. J. Schreier, W. Zinth, L. Moroder and C. Renner. A photocontrolled beta-hairpin peptide. *Chemistry-a European Journal*, 12(4), 1114-1120 (2006).
 - S. Laimgruber, W. J. Schreier, T. Schrader, F. Koller, W. Zinth, P. Gilch. The photochemistry of o-nitrobenzaldehyde as seen by femtosecond vibrational spectroscopy. *Angewandte Chemie-International Edition*, 44(48), 7901-7904 (2005).
 - M. Loweneck, S. L. Dong, T. E. Schrader, W. J. Schreier, W. Zinth, L. Moroder and C. Renner. A photo-controlled beta-hairpin. *Biopolymers*, 80(4), 547-547 (2005).
 - T. Schrader, A. Sieg, F. Koller, W. Schreier, Q. An, W. Zinth, P. Gilch. Vibrational relaxation following ultrafast internal conversion: comparing IR and Raman probing. *Chemical Physics Letters*, 392(4-6), 358-364 (2004).

Ausgewählte Beiträge zu internationalen Tagungen:

- W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, P. Gilch, W. Zinth, B. Kohler. „Thymine Dimer Formation probed by Time-Resolved Vibrational Spectroscopy“. Poster presented at the Ultrafast Phenomena XV, Pacific Groove, USA (2006).
- W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, A. Sieg, R. Denschlag, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, J. Wachtveitl, P. Tavan and W. Zinth. „Initial Reaction Dynamics

in Protein Folding investigated by sub-picosecond IR-Spectroscopy.“ Poster presented at the Gordon Research Conference , Vibrational Spectroscopy: Probing Structure and Dynamics, Biddeford, USA (ME) (2006).

- W. J. Schreier, A. Sieg, T. E. Schrader, F. O. Koller and W. Zinth. „Femtosecond Infrared Spectroscopy for the Investigation of Biomolecules.“ Talk at the European Science Foundation Ultra School on „Ultrafast Processes in Photochemistry and Photobiology“, Torun, Polen (2003).

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei:

Prof. Dr. Wolfgang Zinth, der die Durchführung dieser Arbeit und die Experimente zu aktuellen und sehr interessanten Fragestellungen aus der Bio- und Molekülphysik an seinem Institut ermöglicht hat. Vielen Dank für die große Unterstützung und die engagierte Betreuung.

Prof. Dr. Bern Kohler, der während seines Forschungsaufenthalts Experimente zur Photophysik und Photochemie an DNA-Molekülen vorgeschlagen und initiiert hat. Seine Expertise auf dem Gebiet der Ultrakurzzeit-Spektroskopie an DNA-Molekülen war für das Gelingen dieser Arbeit von großer Bedeutung.

Prof. Dr. Joachim Rädler für die Übernahme des Zweitgutachtens.

PD Dr. Peter Gilch für seine zahlreichen guten Ideen und die wertvollen Diskussionen. Dies gilt sowohl in Bezug auf die hier vorliegende Arbeit als auch auf die anderen Projekte, die sich mit grundlegenden Fragestellungen zu photochemischen Reaktionen beschäftigen.

Den Kollegen im Labor Z20: Dr. Arne Sieg für seine Arbeiten am Messprogramm und die Rechner-Expertise. Tobias Schrader für die Zusammenarbeit in allen Klima-, Elektronik- und Proteinfaltungs-Problemen. Dr. Florian Koller für die Hilfe und sehr gute Zusammenarbeit in allen Labor- und Mess-Lagen. Den Diplomanden und Doktoranden Nadja Regner, Markus Huber, Karin Haiser, Michael Brandl auf der IR-Seite sowie Dr. Helmut Satzger, Dr. Christopher Root und Thorben Cordes auf der Vis-Seite für das angenehme Arbeitsklima.

Dr. Markus Braun für die guten Tipps und sein großes Engagement beim Glühwürmchen-Projekt.

Den Kollegen in den Laboren Z21 und Z18: Dr. Stefan Laimgruber für die sehr gute Zusammenarbeit am NBA-Projekt sowie Björn Heinz, Thomas Schmierer und Evelyn Plötz für die gute Labornachbarschaft. Besonderer Dank gebührt auch Dr. Constanze Sobotta, Dr. Stephan Malkmus, Thomas Brust und Simone Draxler, die immer Verständnis für die Komponenten-Austausch-Aktionen an den Lasersystemen hatten.

Der Werkstatt, die unter Rudi Schwarz, Alfons Stork und Christian Hausmann ein Garant für schnelles und unbürokratisches Erledigen aller machbaren Experimentatorenwünsche ist. Besonders erwähnenswert sind die wertvollen Design- und Verbesserungs-Vorschläge, die ein gutes Produkt noch besser machen.

Den Bürogenossen: Dr. Constanze Sobotta und Dr. Stefan Malkmus für das angenehme Büroklima und die Diskussionsbereitschaft. Florian Lederer für die Hinweise auf den Eisbach und sonstige Freizeitgestaltungen.

Der Besetzung des Sekretariats: Frau Podolski, Frau Michaelis und Frau Widmann-Diermeier für die Hilfsbereitschaft in den bürokratischen Dingen des Lebens.

Den Computer-Administratoren: Dr. Karl-Heinz Mantel, Dr. Arne Sieg, Dr. Bernhard Schmidt, Cord Elsner und Markus Breuer. Vielen Dank für die Tipps zu Unix, Windows und dem Besten aus beiden Welten.

Den restlichen Institutsmitarbeitern, die an dieser Stelle nicht einzeln erwähnt werden, ohne deren Kuchen und Gebäck jedoch das Institutsleben und die Teerunden nur halb so schmackhaft wären.

Den Korrekturlesern, Dr. Peter Gilch, Dr. Florian Koller, Dr. Robert Huber, Dr. Helmut Satzger und Christina Salat, die sich die Zeit für das Korrekturlesen kleinerer und größerer Abschnitte dieser Arbeit genommen haben.

Freunden und Komilitonen, die an den Physikertreffen teilgenommen haben und den Kontakt nicht abbrechen lassen. Insbesondere Dr. Constanze Sobotta, Karen Saucke, Dr. Christopher Root, Dr. Matthias Ammler, Dr. Jana Traupel, Dr. Sina Lohmann.

Der DFG für die Finanzierung innerhalb des SFB533 und MAP.

Meiner Familie, die mein Studium und diese Arbeit ermöglicht hat. Meinem Vater Hans Schreier, für seine stete Aufmunterung, Unterstützung und den großen Rückhalt in allen Dingen des Lebens. Meiner Mutter Adelheid Schreier, deren außergewöhnliche Courage und Lebensmut mir immer ein Vorbild sein werden. Danke für die Fürsorge und Liebe die Du Deiner Familie gegeben hast. Meinen Geschwistern Florian Schreier und Sonja Schneidt mit ihren Familien, die für Abwechslung sorgten und zugleich beispielhaft zeigen, was eine Familie ausmacht.

Meiner Freundin Christina, die mich in jeder Phase unterstützt hat und immer für mich da war. Danke Christina für Dein Verständnis und Deine Liebe.