
Femtosekunden-Infrarotspektroskopie von UV-induzierten Photoschäden in Nukleinsäuren

Karin Haiser



München 2012

Femtosekunden-Infrarotspektroskopie von UV-induzierten Photoschäden in Nukleinsäuren

Karin Haiser

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

vorgelegt von
Karin Haiser
aus Hermannstadt

München, den 04. April 2012

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Zinth
Zweitgutachter: Prof. Dr. Regina de Vivie-Riedle
Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 2012

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung UV-induzierter Photoschäden an Nukleinsäuren. Dies beinhaltet zum einen die Isomerisierungsreaktion des (6-4)-Schadens zur Dewar-Form. Die Besonderheit dieses Schadens liegt in der Bildung durch Absorption im UV-A-Bereich. Zum anderen wird einer der häufigsten Schäden an Uracil, die Entstehung des Photohydrats, untersucht. Hierzu bieten zeitaufgelöste spektroskopische Methoden im infraroten Spektralbereich mit ihrer Struktursensitivität einen Zugang zu den Reaktionsmechanismen der Schadensbildung. Zur Photoanregung wurde ein bestehender Aufbau um zwei Stufen nichtlinearer Frequenzkonversion erweitert. Dadurch stand ein transientes Infrarot-Spektrometer mit durchstimmbaren Anregungsimpulsen im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich und Abtastimpulsen mit Wellenlängen von 3 bis 11 μm zur Verfügung.

Der Mechanismus der Dewar-Bildung: Die UV-induzierte Dewar-Bildung aus einem (6-4)-Schaden wurde an einem Thymin-Dinukleotid (T(6-4)T) untersucht. Die stationären Absorptions- und Emissionsmessungen im infraroten, ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich zeigen, dass eine Dewar-Markerbande im Schwingungsspektrum bei 1781 cm^{-1} eine direkte Identifizierung der Dewar-Bildung ermöglicht. Die zeitaufgelösten Messungen im infraroten Spektralbereich erlauben eine genaue Beobachtung der kinetischen Abläufe des photoinduzierten Isomerisierungsprozesses. Die Kombination mit weiteren zeitaufgelösten Techniken (UV/Vis, Fluoreszenz) vervollständigt das Reaktionsmodell: Die Bildung des Dewar-Isomers erfolgt im Zuge der Deaktivierung des elektronisch angeregten Zustands von T(6-4)T mit einer Zeitkonstante von 130 ps. Die Analyse zeigt weiterhin, dass die Deaktivierung über zwei elektronisch angeregte Zustände über Energiebarrieren erfolgt. Neben der 130 ps-Komponente existiert ein weiterer Singulett-Zustand mit einer Lebensdauer von 1,2 ns, der nicht zur Dewar-Bildung beiträgt. Die Beobachtung einer weiteren Kinetik mit einer Zeitkonstante von 500 ns lässt sich auf einen Triplett-Zustand zurückführen, aus dem ebenfalls kein Dewar gebildet wird.

In Experimenten an monomerem Pyrimidinon als Minimalmodell des (6-4)-Schadens konnte keine Dewar-Bildung nachgewiesen werden. Diese Beobachtung konnte in Verbindung mit quantenchemischen Analysen der Gruppe von Prof. de Vivie-Riedle erklärt werden. Die Analysen zeigen, dass das Rückgrat bei dem Isomerisierungsprozess eine entscheidende Rolle spielt und für die Schadensbildung verantwortlich ist.

Ergebnisse zum Photohydrat von Fluoro-Uridin: Im zweiten Teil dieser Arbeit wird die Analyse eines monomeren DNA-Schadens beschrieben: die UV-induzierte Hydratisierung eines Uridin-Derivats. Dazu wurde ein fluoriertes Uridin zur Analyse der Photophysik der Hydratbildung verwendet. In stationären Belichtungsexperimenten wurden die charakteristischen Signaturen der Hydratbildung bestimmt. Dadurch konnte in den zeitaufgelösten Messungen im infraroten Spektralbereich die Bildung des Photohydrats mit einer Zeitkonstante im Bereich von 1 bis 3 ps nachgewiesen werden. Ein weiterer Prozess im Nanosekundenbereich (70 ns) wird mit einem Triplett-Zustand assoziiert, der jedoch nicht an der Hydratbildung beteiligt ist.

Abstract

This thesis deals with the investigation of UV-induced photo lesions in nucleic acids. At first, the isomerization reaction of the (6-4)-lesion to the Dewar form is analysed. Surprisingly, this secondary photo damage features formation by the absorption of light in the UV-A region. In the second part of the thesis the investigation of the formation of the photohydrate, one of the main UV-induced damages of uracil, is described. In both parts, time-resolved spectroscopic methods in the infrared allow to monitor the reaction mechanisms of damage formation with structural sensitivity. For the excitation of the nucleic acids, an established setup for the generation of pump pulses was extended by two non-linear frequency conversion units. Thus, a transient infrared absorption spectrometer with tunable pump pulses in the UV and with probe pulses at wavelengths between 3 and 11 μm was available.

The mechanism of the formation of the Dewar valence isomer: The UV-induced formation of the Dewar from a (6-4)-lesion was studied in a thymine dinucleotide. Steady-state absorption (IR and UV/Vis) and emission measurements were used to characterize the Dewar form. A Dewar marker band in the vibrational spectrum at 1781 cm^{-1} allows direct quantification of the Dewar formation in the infrared spectral range. The kinetics of the photo-induced isomerization process was monitored by the time-resolved infrared measurements. The combination with further time-resolved techniques (UV/Vis, fluorescence) completes the reaction model: The formation of the Dewar isomer occurs in the course of the deactivation of the excited electronic state of T(6-4)T with a time constant of 130 ps. Furthermore the data reveal, that the deactivation takes place via two excited electronic states via energy barriers. In addition to the 130 ps component there exists a second excited singlet state with a lifetime of 1,2 ns which does not contribute to Dewar formation. The observation of further kinetics on the 500 ns time scale can be explained by a triplet state which does not show Dewar formation.

In experiments on a monomeric pyrimidinone, acting as a minimal model of the (6-4)-lesion, no formation of the Dewar isomer is detected. This finding can be explained in combination with quantum-chemical studies in the group of Prof. de Vivie-Riedle. They show that the sugar backbone eventually enables Dewar formation, thus, making the backbone the cause of severe DNA damage.

Results of the photohydration of Fluoro-Uridine: The UV-induced hydrate formation of Fluoro-Uridine was investigated as a model for photohydration. The characteristic signatures of hydration were assigned in steady-state measurements in the infrared spectral region. Thereby photohydrate formation became visible in the time-resolved measurements in the infrared with a time constant within the range of 1 to 3 ps. The data show additional absorption changes due to vibrational relaxation processes in the excited state and in the ground state on the same time scale. A further process in the nanosecond time range (70 ns) can be associated with a triplet state which, however, is not involved in hydrate formation.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	v
Abstract	vii
1. Einleitung	1
2. Der Einfluss von UV-Strahlung auf Nukleinsäuren	5
2.1. Aufbau der DNA und RNA	5
2.2. UV-induzierte DNA-Schäden	7
2.2.1. Dimer-Schäden	7
2.2.2. Monomere Schäden – das Photohydrat	12
2.3. Mutagenität von Photoschäden	14
3. Experimentelle Techniken	17
3.1. Das Prinzip der Anreg-Abtast-Spektroskopie	17
3.2. Das Femtosekunden-Infrarot-Spektrometer	18
3.2.1. Das Femtosekunden-Lasersystem	19
3.2.2. Erzeugung abstimbarer Abtastimpulse im mittleren Infraroten	21
3.2.3. Erzeugung der Anregungsimpulse im UV	23
3.2.4. Messplatz und Detektionseinheit	24
3.3. Transiente Spektroskopie im Nanosekundenbereich	27
3.3.1. Der Nanosekundenlaser	28
3.3.2. Synchronisation des Nanosekunden- mit dem Femtosekundenlaser	28
3.4. Messablauf und Datenverarbeitung	30
3.4.1. Justage des Messaufbaus und Apparatefunktion	30
3.4.2. Datenaufnahme und -verarbeitung	32
3.4.3. Datenanpassung	33
3.5. Stationäre Charakterisierung und Bestimmung der Quantenausbeute	33
4. Die Bildung des Dewar-Valenzisomers	35
4.1. Das Modellsystem	35
4.2. Stationäre Experimente zum Nachweis des Dewar-Valenzisomers	37
4.2.1. Dewar-Signatur im infraroten Spektralbereich	37
4.2.2. Absorptionseigenschaften im UV-Bereich und das Fluoreszenzspektrum	39
4.2.3. Bestimmung der Quantenausbeute der Dewar-Bildung	40
4.3. Zeitaufgelöste Experimente	41
4.3.1. Femtosekundenspektroskopie im IR: Bildung des Dewar-Valenzisomers	42
4.3.2. Zeitaufgelöste Experimente im Nanosekundenbereich	48

4.3.3.	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie	51
4.3.4.	Femtosekundenspektroskopie im UV- und sichtbaren Spektralbereich	53
4.4.	Pyrimidinon als Modellsystem	54
4.4.1.	Stationäre Spektren von Pyrimidinon	55
4.4.2.	Zeitaufgelöste Messungen an Pyrimidinon	57
4.4.3.	Diskussion der Ergebnisse der Messungen an Pyrimidinon	63
4.5.	Theoretische Berechnungen zum Reaktionsmechanismus	64
4.5.1.	Simulation der IR-Absorptionspektren	64
4.5.2.	Die Dynamik des T(6-4)T-Photoschadens und sein Reaktionsmechanismus zum Dewar-Valenzisomer	65
4.6.	Zusammenfassung der Ergebnisse und mögliches Reaktionsmodell	67
4.6.1.	Bildung des Dewar-Valenzisomers	68
4.6.2.	Photophysik von T(6-4)T	69
4.6.3.	Das Rückgrat ermöglicht die Dewar-Bildung	70
5.	Die Photohydratisierung von Fluoro-Uridin	73
5.1.	Fluoro-Uridin als Modell zur Hydratbildung	73
5.2.	Stationäre Charakterisierung von Fluoro-Uridin	74
5.2.1.	Absorptionseigenschaften im IR	74
5.2.2.	Simulation der IR-Spektren	76
5.2.3.	Absorptionseigenschaften im UV	77
5.3.	Die Bildung des Photohydrats	78
5.3.1.	Zeitaufgelöste Spektroskopie im Pikosekundenbereich	78
5.3.2.	Zeitaufgelöste Spektroskopie im Nanosekundenbereich	83
5.4.	Diskussion der Ergebnisse zur Hydratbildung	87
5.4.1.	Zeitaufgelöste Messungen an FURd	87
5.4.2.	Modell zur Photophysik von FURd	88
5.4.3.	Ausblick	89
6.	Zusammenfassung	91
A.	Lösungsmittelkorrektur	95
B.	Globale Datenanpassung	97
C.	Reaktionsquantenausbeute	101
D.	Simulation von IR-Spektren	103
	Abbildungsverzeichnis	105
	Tabellenverzeichnis	109
	Literaturverzeichnis	111
	Publikationen	125

1. Einleitung

Die Anpassung an das Sonnenlicht stellte eine der wichtigsten Aufgaben der Evolution dar. Ein dabei entwickelter grundlegender Prozess ist die Photosynthese, durch die Pflanzen und Bakterien mit Hilfe des Sonnenlichts Energie und Baustoffe für ihre Zellen gewinnen [Mat95, Mur92, Hal99, Bla02]. Die Nebenprodukte wiederum haben die Zusammensetzung der Atmosphäre und damit die für Menschen und Tiere lebenswichtige Atemluft beeinflusst.

Für viele Lebewesen von entscheidender Bedeutung ist nicht nur die energetische Nutzung des Lichts, sondern auch der mit dem Sehprozess verbundene Informationsgewinn. Das von Gegenständen gestreute Sonnenlicht wird im Auge höherer Lebewesen von Retinalproteinen absorbiert und führt so zu einer reversiblen Konformationsänderung der Sehpigmente [Wal68]. Die daraus folgende Signalkaskade setzt den Sehprozess in Gang.

Eine Grundbedingung für das Leben unter Nutzung des Sonnenlichts ist eine ausreichende Photostabilität der organischen Materie, die dem Sonnenlicht ausgesetzt ist. Zur schädigenden Wirkung, die die UV-Anteile des Sonnenlichts haben können, wurde bereits Anfang des 20. Jahrhunderts von Medizinern ein Zusammenhang zwischen Hautkrebs und regelmäßiger Sonnenbestrahlung hergestellt [Fin28, Hoc02]. Hier spielt die Schädigung des genetischen Materials eine entscheidende Rolle. Das Sonnenlicht wird von den Basen der Nukleinsäuren RNA und DNA absorbiert, die die genetische Erbinformation lebender Organismen codieren. Strukturelle Veränderungen in diesen Makromolekülen können somit zum Zelltod oder zu Mutationen führen. Die Erforschung der Krebsentstehung durch Schäden in der Erbinformation wurde im Laufe des 20. Jahrhunderts weiter vorangebracht. Im Vordergrund stand dabei die am weitesten verbreitete Krebsform bei Menschen nordeuropäischer Abstammung, die Bildung von Hautkrebs. Die Entstehung von Mutationen in Hautzellen kann auf UV-induzierte Schäden, vorangig Dimerbildungen zwischen benachbarten Basen, zurückgeführt werden [Set74, Tay94, dG99]. Die häufigsten Dimere entstehen zwischen Pyrimidin-Basen. Hierbei wird zwischen den folgenden Pyrimidin-Dimeren unterschieden: dem Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD), dem (6-4)-Photoprodukt und dem Sekundärschaden aus dem (6-4)-Photoprodukt, dem Dewar-Valenzisomer. In Nukleinsäuren können zudem UV-induzierte monomere Schäden entstehen, wie die Bildung des Photohydrats an einzelnen Nukleobasen der DNA und RNA.

Angesichts dieser Erkenntnisse ist die Untersuchung der Photochemie von Nukleinsäuren im Bezug auf die Photostabilität von zentralem Interesse. Photochemische Analysen an einzelnen Basen zeigen, dass die Lebensdauern der angeregten elektronischen Zustände oft im Bereich von wenigen hundert Femtosekunden liegt [Pec00, CH04]. Eine Eigenschaft, die die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Photoprodukten senkt. Diese schnellen Deaktivierungsprozesse weisen deshalb darauf hin, dass der evolutionäre Selektionsprozess zu extrem photostabilen molekularen Grundbausteinen des Lebens geführt hat. Die Photostabilität wird dennoch kontrovers diskutiert, da trotz der schnellen Deaktivierungsprozesse weitere langlebige Zustände in Basenpaaren und kurzen DNA-Sequenzen identifiziert wurden. In [Kwo08] wird die CPD-Bildung mit einem langlebigen Zustand in Verbindung gebracht. In anderen

Untersuchungen konnte jedoch die Beteiligung langlebiger Prozesse an einer Schadensbildung durch zeitaufgelöste spektroskopische Methoden nicht nachgewiesen werden [Sch09].

Neben der Photostabilität hat sich ein weiterer Mechanismus zum Schutz vor Zelltod und Mutationen entwickelt, die Reparatur von Photoschäden. Lebende Organismen haben eine Vielfalt an Reparatursystemen entwickelt, um Schäden in Nukleinsäuren zu erkennen und zu reparieren. Fehler in den Erkennungs- und Reparaturprozessen können dennoch zu einer veränderten Basenabfolge und damit zu Mutationen führen. Für die unterschiedlichen Photoschäden treten unterschiedliche Mutationsformen auf: CPD- und (6-4)-Schäden werden als solche zwar gut erkannt, im Replikationszyklus können sie jedoch als falsche Base identifiziert werden, was zu einer falschen Komplementärbase zur geschädigten Basen führt [Tay94, Fri04]. Der Dewar-Schaden wird dagegen seltener erkannt. Im Replikationszyklus kann die Nukleobase des Dewar-Schadens zudem nicht identifiziert werden. In diesem Fall wird als Komplementärbase mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Adenin eingebaut, was zu einer Fehlpaarung führen kann [Smi96, Lee00a]. Diese Unterschiede im Mutationspotenzial der verschiedenen Photoschäden zeigen, dass neben der Untersuchung der Entstehung von Photoprodukten auch der Einfluss von Sekundärreaktionen wie die Dewar-Isomerisierung des (6-4)-Schadens betrachtet werden muss.

Mit zeitaufgelöster Absorptionsspektroskopie im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich und zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen können elektronische Übergänge nach Photoanregung von Molekülen zeitnah verfolgt werden und Geschwindigkeiten von photophysikalischen Prozessen ermittelt werden. Im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich lassen sich Reaktionsprodukte oft nicht eindeutig identifizieren. Die nötige Struktursensitivität liefert hier der infrarote Spektralbereich. Markante Schwingungsbanden bieten einen direkten, quantitativen Zugang zu Reaktionsprodukten, die zur Aufklärung der Schadensbildung in Nukleinsäuren hinsichtlich der Reaktionsquantenausbeute, der Zeitskala der Bildung und der beteiligten elektronischen Zustände führen können.

Ziele und Gliederung dieser Arbeit

In dieser Arbeit werden die Bildung von UV-induzierten Schäden in Nukleinsäuren mit zeitaufgelösten spektroskopischen Methoden untersucht. Im Vordergrund steht dabei die transiente Absorptionsspektroskopie im infraroten Spektralbereich. In diesem Zusammenhang werden für die Messungen geeignete Modellsysteme in nativer Umgebung verwendet, die eine spektrale Nachweisbarkeit der Schadensbildung erlauben.

Die Beobachtung der Dewar-Bildung wird an einem Thymin-Dinukleotid, das bereits den (6-4)-Schaden ausbildet, durchgeführt. Zum Vergleich mit dem Dinukleotid werden zusätzlich die photophysikalischen Eigenschaften eines monomeren Pyrimidinon untersucht. Dieser Vergleich des Monomers mit einem Dinukleotid, das über die Ribosemoleküle verbrückt ist, kann Informationen über die Funktion des Rückgrates von Nukleinsäuren auf die Dewarbildung liefern.

Zur Analyse der Bildung des Photohydrats in Nukleinsäuren wird 5-Fluoro-Uridin verwendet. Diese Verbindung zeichnet sich durch eine besonders hohe Quantenausbeute der Hydratisierung aus. Dadurch können in den spektroskopischen Untersuchungen ausreichende Signaländerungen erreicht werden, die eine Identifizierung der Hydratbildung ermöglichen. Das Ziel der zeitaufgelösten Analyse von 5-Fluoro-Uridin ist die Bestimmung der Zeitskala der

Hydratbildung und die Aufklärung des bisher kontrovers diskutierten Reaktionsmechanismus zum Photohydrat.

Die Arbeit gliedert sich wie folgt: In **Kapitel 2** werden die für diese Arbeit wichtigen biologischen und biochemischen Grundlagen von UV-induzierten DNA-Schäden erläutert. Zunächst wird ein kurzer Überblick über den Aufbau der DNA und RNA gegeben. Dann folgt eine Beschreibung der häufigsten UV-induzierten DNA-Schäden. Dabei wird neben der Dimer-Bildung zwischen benachbarten DNA-Basen auch auf den monomeren Schadenstyp der Bildung von Photohydraten eingegangen. Den Abschluss dieses Kapitels bildet die Schilderung der Mutagenität der beschriebenen Photoschäden und der verschiedenen Typen von Mutationen, die durch Photoschäden auftreten können.

Kapitel 3 beinhaltet die verwendeten experimentellen Techniken zur zeitaufgelösten Spektroskopie. Zu Beginn wird die Methode der Anreg-Abtast-Spektroskopie beschrieben. Danach wird auf die verschiedenen Komponenten eines Femtosekunden-Infrarot-Spektrometers eingegangen. Dies umfasst auch die experimentellen Aufbauten zur Erzeugung abstimmbarer Femtosekunden-Impulse im ultravioletten Spektralbereich zur Verwendung als Anregungsimpulse und im infraroten Spektralbereich zum Einsatz als Abtastimpulse. An dieser Stelle wird dann auf den Messplatz und die Detektionseinheit eingegangen. Der Beschreibung des Femtosekunden-Spektrometers schließt sich die Darstellung des Aufbaus zur zeitaufgelösten Spektroskopie im Nanosekundenbereich an. Dabei wird insbesondere die Synchronisation des Nanosekundenlasers mit der Femtosekundenanlage behandelt. Im Anschluss an die Schilderung des Messablaufs und der Methode der Datenverarbeitung der zeitaufgelösten Messungen folgt die Darstellung der Vorgehensweise bei den stationären Belichtungsexperimenten.

Gegenstand des **Kapitels 4** ist die Untersuchung der photoinduzierten Reaktion eines (6-4)-Schadens zweier DNA-Basen zum Dewar-Isomer mit stationären und zeitaufgelösten spektroskopischen Methoden. Die Messungen wurden an einem Thymin-Dimer, das einen (6-4)-Schaden enthält durchgeführt. Dabei wird die Bestimmung der Dynamik der Isomerisierungsreaktion mittels verschiedenener Methoden transients Absorptionsspektroskopie mit dem Schwerpunkt auf den infraroten Spektralbereich behandelt. Basierend auf den Ergebnissen dieses Kapitels wird ein Reaktionsschema der Isomerisierungsreaktion und der weiteren photophysikalischen Eigenschaften des (6-4)-Dimers aufgestellt.

Im **Kapitel 5** werden die Messungen zur Bildung des Photohydrats an einem fluorierten Uridin behandelt. Es umfasst die Beschreibung der Absorptionseigenschaften der Hydratbildung mit deren Hilfe eine spektrale Signatur des Schadens ermittelt werden kann. Diese spektrale Signatur dient in den anschließend gezeigten zeitaufgelösten Experimenten im infraroten Spektralbereich der Identifizierung des Photohydrats. Am Ende dieses Kapitels wird das Modell zur Photophysik der Hydratbildung auf Grundlage der Untersuchungen diskutiert und ein Ausblick über weiterführende Analyseverfahren gegeben.

2. Der Einfluss von UV-Strahlung auf Nukleinsäuren

Der UV-Anteil des Sonnenlichts stellt die Hauptursache für die Entstehung von Hautkrebs dar. Dabei werden insbesondere UV-induzierte Veränderungen der DNA als Auslöser für die Bildung von Mutationen angesehen [IAR92]. Unter UV-Einwirkung kann eine Vielfalt von DNA-Schäden entstehen wie die Bildung von Dimerprodukten an benachbarten Basen oder monomere Schäden wie die Hydratbildung [Mit04, Rav01].

In diesem Kapitel wird ein kurzer Überblick über die Bildung sowie die Eigenschaften von Photoschäden gegeben. Dabei wird zunächst auf den strukturellen Aufbau der DNA und RNA eingegangen. Darauf folgt eine Beschreibung der häufigsten UV-induzierten DNA-Schäden. Zuletzt wird auf das Mutationspotenzial von Photoprodukten in DNA-Doppelsträngen eingegangen.

2.1. Aufbau der DNA und RNA

DNA und RNA sind Makromoleküle, die die genetische Erbinformation enthalten [Ave44, Wat93]. Die molekulare Struktur der DNA erkannte zunächst Phoebus Levene [Lev20, Lev38], der die grundlegende Zusammensetzung aus organischen Basen, Zucker und Phosphorsäure nachwies. Die räumliche Struktur der DNA wurde im Jahre 1953 von James Watson und Francis Crick zusammen mit Rosalind Franklin und Maurice Wilkins aufgeklärt [Fra53, Wat53]. Watson, Crick und Wilkins erhielten dafür 1962 den Nobelpreis für Medizin.

In Abbildung 2.1 ist die Nomenklatur der Bausteine der Nukleinsäuren erläutert. Die Nukleinsäuren sind Makromoleküle, die aus einzelnen Bausteinen aufgebaut werden. Die Grundbausteine der Nukleinsäuren sind die Nucleotide. Nucleotide sind Moleküle aus stick-

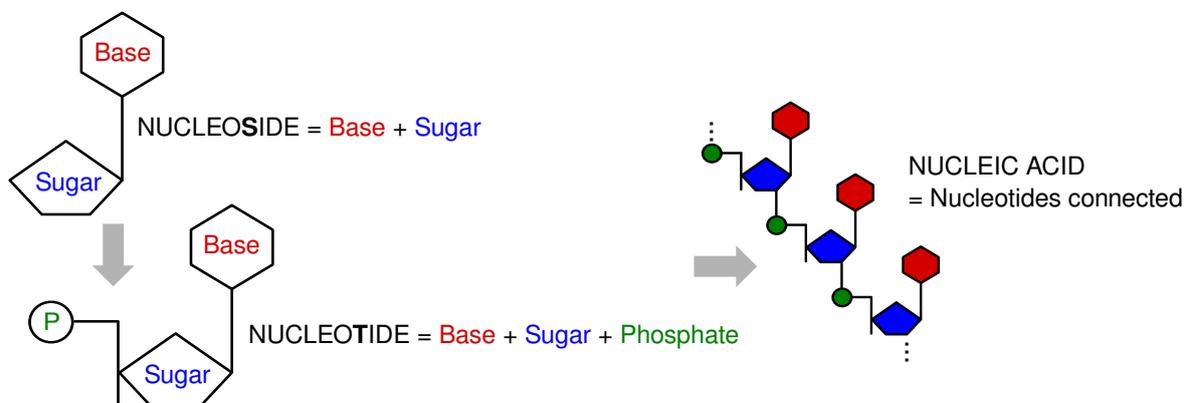


Abb. 2.1.: Die Nomenklatur der Nucleinsäure. Abbildung nach [Alb95].

2. Der Einfluss von UV-Strahlung auf Nucleinsäuren

stoffhaltigen Ringverbindungen, den Nucleobasen, die mit Zucker und Phosphat verknüpft sind. Eine Nucleobase verknüpft mit einem Zuckermolekül über eine *N*-glykosidische Bindung ohne Phosphat wird als Nucleosid bezeichnet.

Die Nucleotide unterscheiden sich in den Nucleobasen, die in Abbildung 2.2 dargestellt sind. Bei den Nucleobasen unterscheidet man zwischen den *Pyrimidinen* und den *Purinen*. Die Pyrimidine leiten sich von einem sechsgliedrigen Pyrimidinring ab. Zu den Pyrimidinen zählen Thymin (T), Cytosin (C) und Uracil (U). Die *Purine* wie Adenin (A) und Guanin (G) enthalten zwei Ringe: einen Fünfring verknüpft mit einem Sechsring.

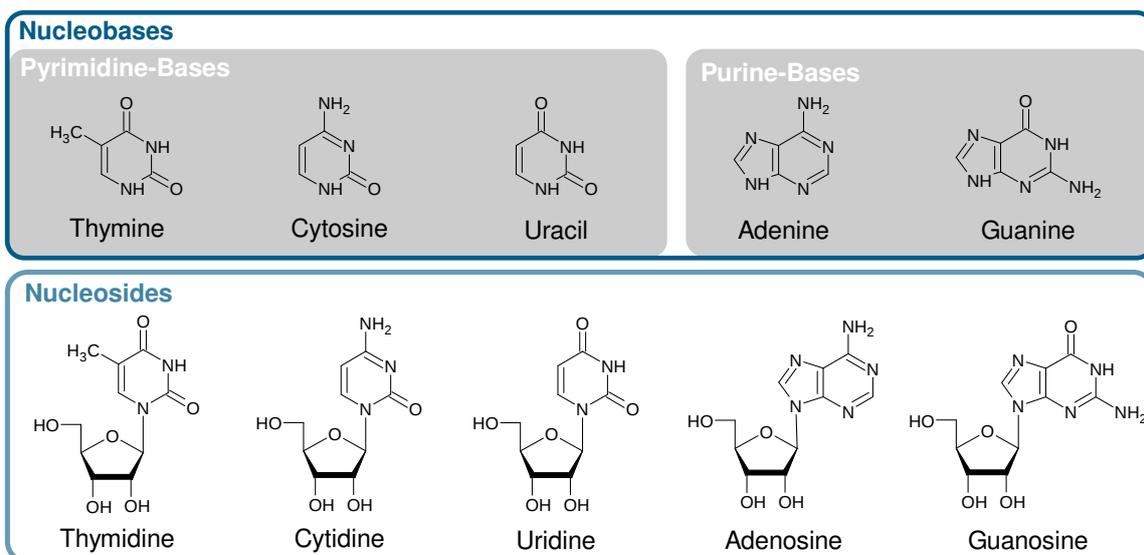


Abb. 2.2.: Die DNA und RNA setzen sich aus den verschiedenen Nucleosiden zusammen. Die Nucleoside sind Nucleobasen verknüpft mit einem Zuckermolekül.

Nucleinsäuren bilden sich durch eine Phosphodiesterbindung zwischen den 5'- und 3'-Kohlenstoffatomen der Zuckerphosphate der Nucleotide (Abbildung 2.3 a). Diese Verbindung wird daher als Zuckerphosphat-Rückgrat bezeichnet. Die lineare Sequenz der Nucleotide in einer Nucleinsäurekette wird durch den Buchstabencode der Nucleobasen abgekürzt. Bei der Aufzählung der linearen Sequenz wird mit dem Nucleotid begonnen, dessen 5'-Kohlenstoffatom frei ist, also keine Phosphodiesterbindung eingegangen ist.

Bei den Nucleinsäuren lassen sich abhängig vom Zuckertyp zwei Haupttypen unterscheiden: Die Desoxyribonucleinsäuren (DNA) mit Desoxyribose als Zucker enthalten die Basen A, G, C und T. Bei den Ribonucleinsäuren (RNA) befindet sich Ribose im Rückgrat (siehe Abbildung 2.3 a) und statt der Base T enthält die RNA die Base U.

Die RNA kommt in Zellen im Allgemeinen als einfache Polynucleotidkette vor. Im Gegensatz dazu besteht die DNA fast immer aus einem doppelsträngigen Molekül, der DNA-Doppelhelix. Die Anordnung der Doppelhelix ist in Abbildung 2.3 b gezeigt. Sie besteht aus zwei Polynucleotidketten deren Nucleobasen über Wasserstoffbindungen zusammengehalten werden. Die verschiedenen Eigenschaften der Nucleobasen führen zu einer eindeutigen Paarbildung von Adenin mit Thymin und Cytosin mit Guanin, die als Watson-Crick-Basenpaarung bezeichnet wird. Diese Basenpaarung zusammen mit der linearen Abfolge der Basen bildet die

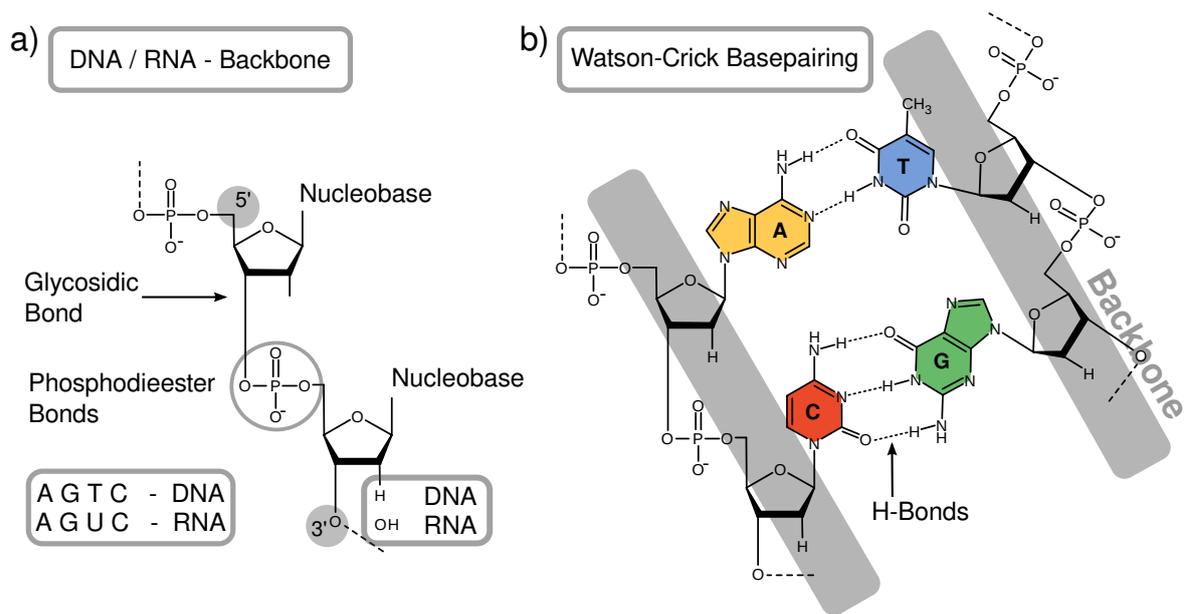


Abb. 2.3.: a) Aufbau des DNA/RNA-Rückgrates. b) Die Watson-Crick Basenpaarung in einer Doppelhelix.

Grundlage zur Speicherung der genetischen Information [Ber07].

2.2. UV-induzierte DNA-Schäden

Das Emissionsspektrum der Sonne umfasst einen Wellenlängenbereich von etwa 17 Größenordnungen. Der Bereich der kurzen Wellenlängen, Röntgen-, Gammastrahlung, hochenergetische Partikel sowie ein Teil der UV-Strahlung, wird bereits in den oberen Atmosphärenschichten gestreut oder absorbiert und erreicht deshalb die Erdoberfläche nicht. Erst ab einer Wellenlänge von 300 nm kann die Sonneneinstrahlung bis zur Erdoberfläche vordringen.

Die UV-Strahlung lässt sich in drei Bereiche einteilen: Der UV-C-Bereich (240 bis 290 nm) wird im Wesentlichen durch die atmosphärische Ozonschicht absorbiert. UV-Strahlung mit Wellenlängen im UV-B-Bereich (290 bis 320 nm) erreicht teilweise die Erdoberfläche. Wohingegen die UV-A-Strahlung (320 bis 400 nm) nur wenig von der Atmosphäre beeinflusst wird.

Da das Maximum der DNA-Absorptionsbande bei 260 nm liegt, können DNA-Photoschäden nur durch Absorption von Sonnenlicht im UV-B/C-Bereich verursacht werden [Byk98]. Im UV-A-Bereich besitzt die DNA praktisch keine Absorption. Allerdings können indirekte DNA-Schäden über photoreaktive Substanzen im UV-A-Bereich entstehen [Cad05]. Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über DNA-Photoschäden, die durch direkte UV-Absorption entstehen.

2.2.1. Dimer-Schäden

Die Reaktion von benachbarten Pyrimidin-Basen zu Dimeren liefert den dominanten Anteil der DNA-Schadensbildungen, die unter UV-B/C-Einwirkung beobachtet werden. In Abbil-

2. Der Einfluss von UV-Strahlung auf Nukleinsäuren

Abbildung 2.4 zeigt die häufigsten UV-induzierten Dimer-Schäden am Beispiel einer TpT-Sequenz, zwei Thyminide verbunden über ein Phosphat, gezeigt. Am häufigsten treten Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und (6-4)-Schäden auf. Das Dewar-Valenzisomer bildet sich durch UV-Absorption aus einem (6-4)-Schaden. Das Sporen-Photoprodukt wird ausschließlich in Sporen beobachtet, deren DNA-Struktur diese Form des Photoschadens begünstigt [Don65, Var70].

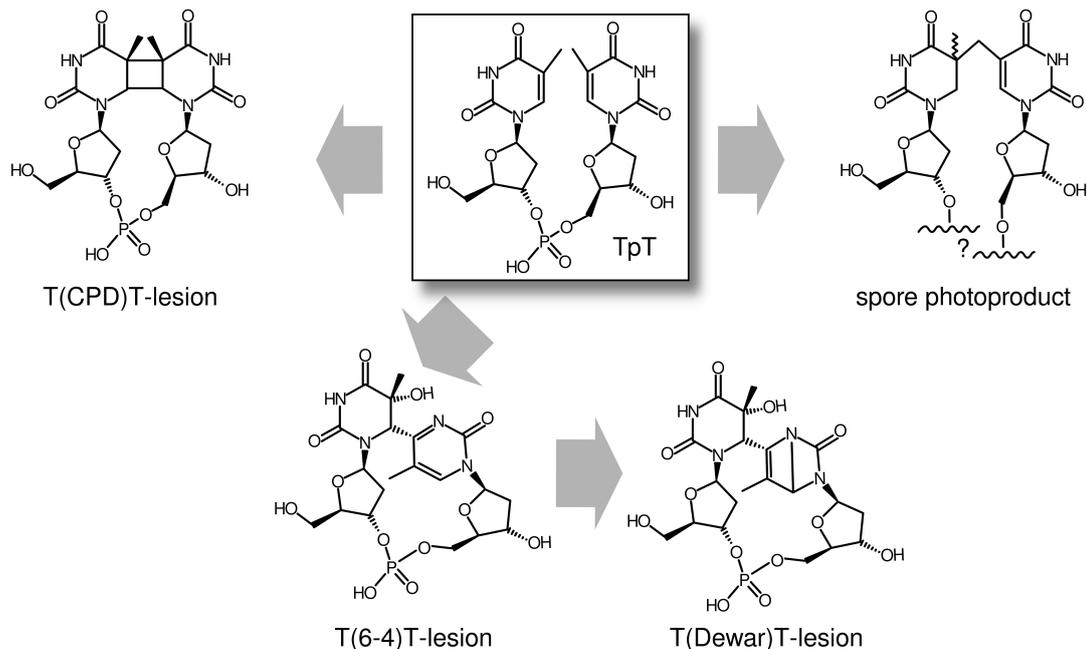


Abb. 2.4.: Die häufigsten Dimer-Schäden am Beispiel einer TpT-Sequenz in DNA.

Im folgenden Abschnitt werden die in Abbildung 2.4 gezeigten UV-induzierten Dimerisierungsreaktionen vorgestellt und deren Eigenschaften kurz beschrieben. Dabei steht die Darstellung der Dewar-Bildung im Vordergrund. Eine ausführliche Bearbeitung des Themas der CPD-Bildung findet sich in [Sch08].

CPD-Schäden

Der mit Abstand häufigste UV-Schaden ist das Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD) mit einem Anteil von 70-80 % der Gesamtmenge der UV-Schäden [Dou00b, Mit04]. Der CPD-Schaden entsteht durch eine photochemische $[2\pi+2\pi]$ -Cycloaddition zwischen den $C_5=C_6$ -Doppelbindungen zweier benachbarter Pyrimidin-Basen. Die häufigsten CPD-Dimere treten zwischen benachbarten Thyminiden auf. Eine entsprechende Reaktion ist in Abbildung 2.5 a gezeigt. Belichtungsexperimente mit UV-B-Licht an humanen Zellen ergeben folgende Reihenfolge in der Häufigkeit der Kombinationen von CPD-Dimeren: T-T > T-C > C-T > C-C [Dou01, Mou06].

Es sind verschiedene stereoisomere Formen der CPD-Bildung möglich, je nach Orientierung der Pyrimidin-Ringe. Diese sind in Abbildung 2.5 b schematisch dargestellt. Durch die sterische

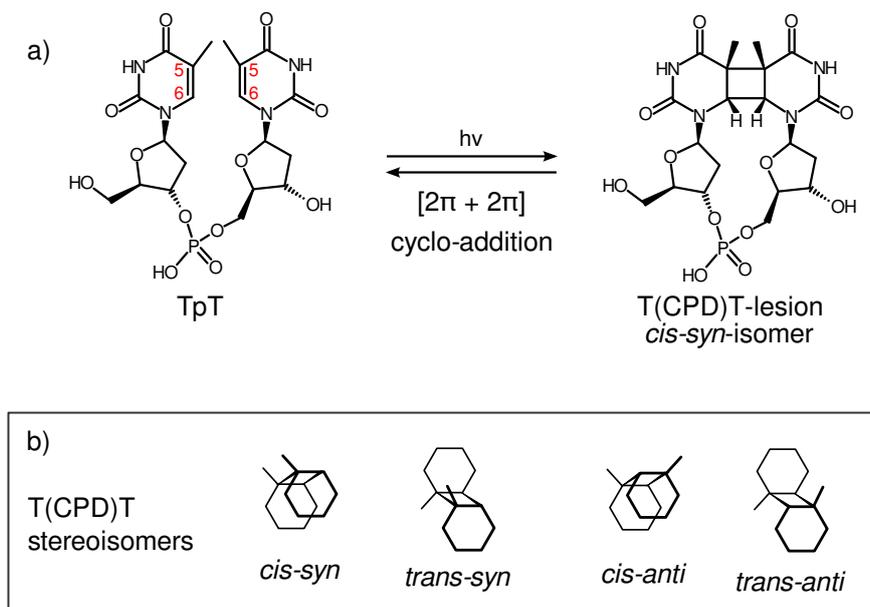


Abb. 2.5.: a) Strukturdarstellung der Bildung eines Cyclobutan-Pyrimidin-Dimers aus zwei benachbarten Thymidinen durch UV-Absorption über eine $[2\pi+2\pi]$ -Cycloaddition zwischen den $C_5=C_6$ -Doppelbindungen der jeweiligen Pyrimidinringe. b) Die verschiedenen Stereoisomere des CPD-Schadens.

Einschränkung innerhalb des DNA-Doppelstrangs tritt das *cis-syn*-Isomer am häufigsten auf [Wac64, Kha72].

Die Bildung eines UV-Schadens führt zu einer Veränderung der Struktur der Nucleinsäure. Im Bezug auf Auswirkung der CPD-Bildung auf die Stabilität von Doppelsträngen wurden Untersuchungen mittels Schmelzpunkt-Analysen, NMR oder durch theoretische Studien durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass der *cis-syn* CPD-Schaden eine relativ kleine strukturelle Veränderung in der Doppelhelix hervorruft [Tay90b, Spe97, McA98, Par02]. Die Funktion von einigen Reparaturproteinen wurde auf deren Fähigkeit zur Erkennung von destabilisierenden Faktoren der DNA-Struktur zurückgeführt. Führt ein UV-Schaden wie beim CPD-Schaden nur zu einer kleinen strukturellen Änderung kann dieser schlechter erkannt und repariert werden [Fri01, Hes97, Gun96].

Der (6-4)-Schaden

Der zweithäufigste Photoschaden nach dem CPD-Schaden ist der (6-4)-Schaden mit einem Anteil von etwa 20-30 % an der Gesamtmenge der UV-Schäden [Mit04]. Die Struktur des (6-4)-Schadens und seine Entstehung sind in Abbildung 2.6 gezeigt. Die Bildung erfolgt nach UV-Absorption wahrscheinlich über eine Paternó-Büchi-Reaktion [Büc54] zwischen der $C_5=C_6$ -Doppelbindung des einen Pyrimidins mit dem $C_4=O$ -Carbonylgruppe eines benachbarten Pyrimidins [Tay90a]. Bei der Paternó-Büchi-Reaktion bildet sich bei TpT über eine photochemische $[2\pi + 2\pi]$ -Cycloaddition ein viergliedriger Oxetan-Ring aus (siehe Abbildung 2.6 mitte) [Kle95]. Bei TpC kann aus dem (E)-imino-Tautomer des Cytosins über die $C_4=NH$ -Gruppe ein Azetidin-Ring gebildet werden. Sowohl die Oxetan-, als auch die Azetidin-

2. Der Einfluss von UV-Strahlung auf Nucleinsäuren

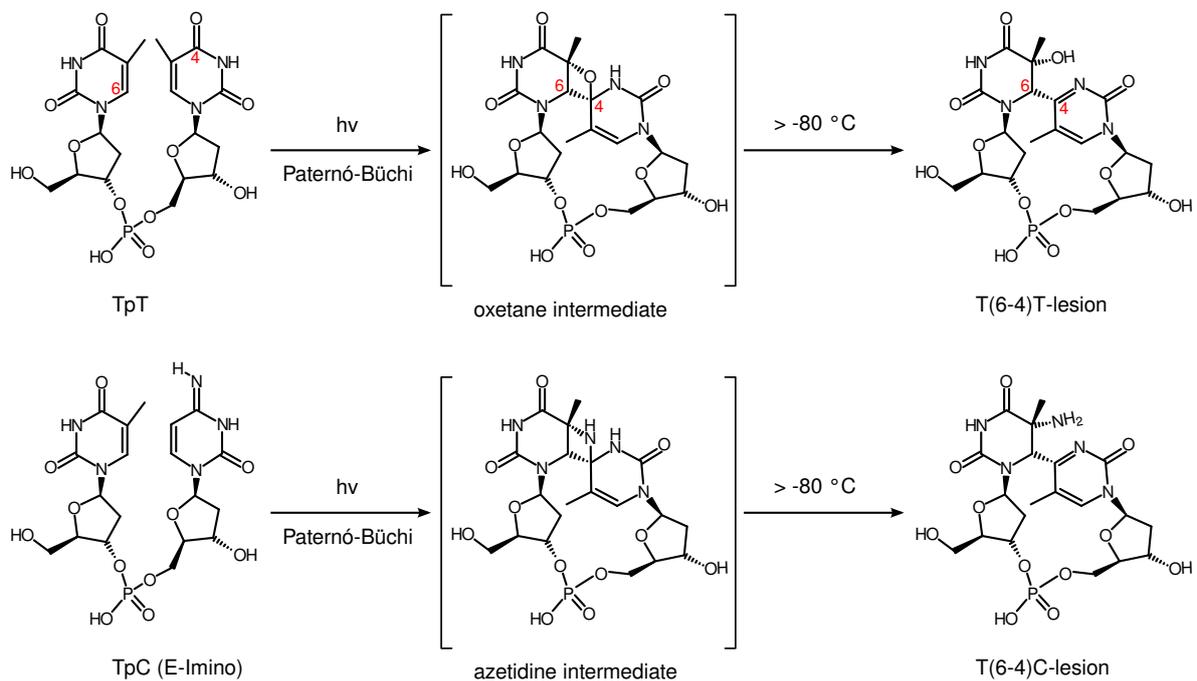


Abb. 2.6.: Die Bildung des (6-4)-Schadens über das Oxetan- bzw. das Azetidin-Intermediat. Bei TpT sind die Nummerierungen der Pyrimidinatome, die den (6-4)-Schaden bilden, eingetragen.

Formen sind oberhalb von -80°C nicht stabil und führen zu den jeweiligen (6-4)-Photoschäden [Tay94, Tay95, Rav01].

Grundsätzlich bilden alle Dipyrimidinsequenzen unter UV-Absorption einen (6-4)-Schaden aus. Durch die Geometrie des Doppelstrangs kommen jedoch die verschiedenen Kombinationen von T und C in der DNA durch sterische Hinderung mit unterschiedlicher Häufigkeit vor. Über die Methode der HPLC kombiniert mit Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) wurden die relativen Häufigkeiten der (6-4)-Bildung der unterschiedlichen Dipyrimidinsequenzen wie folgt bestimmt: $5'\text{-TC-}3' > 5'\text{-TT-}3' > 5'\text{-CC-}3' > 5'\text{-CT-}3'$ (1 : 0,2 : 0,1 : 0,01) [Dou01].

NMR-Untersuchungen zeigen, dass (6-4)-Schäden die Konformation des Doppelstrangs stark verändern [Hwa96]. Das 5'-T eines T(6-4)T-Schadens behält seine Watson-Crick Basenpaarung bei, während beim 3'-T eine Paarung zu einem Guanin nun bevorzugt ist. Aus diesem Grund wird vermutet, dass dies die Ursache für beobachtete T-C-Mutationen sein könnte [LeC91, Lee99]. Auf mögliche Mutationen bei UV-Schäden wird in einem späteren Abschnitt eingegangen.

Das Dewar-Valenzisomer

Das Dewar-Valenzisomer ist ein Sekundärprodukt aus dem (6-4)-Schaden durch Belichtung mit UV-A/B-Licht (Abbildung 2.7). Durch UV-Absorption mit Wellenlängen $> 300\text{ nm}$ bildet sich im 3'-T oder 3'-C durch eine 4π -Elektrozyclisierungsreaktion eine Doppelringstruktur aus. Das Strukturmotiv dieser zwei miteinander verbundenen Vierringe wurde erstmals von Dewar im Jahre 1867 an Benzol postuliert [Dew67]. Erst in den Achziger Jahren des

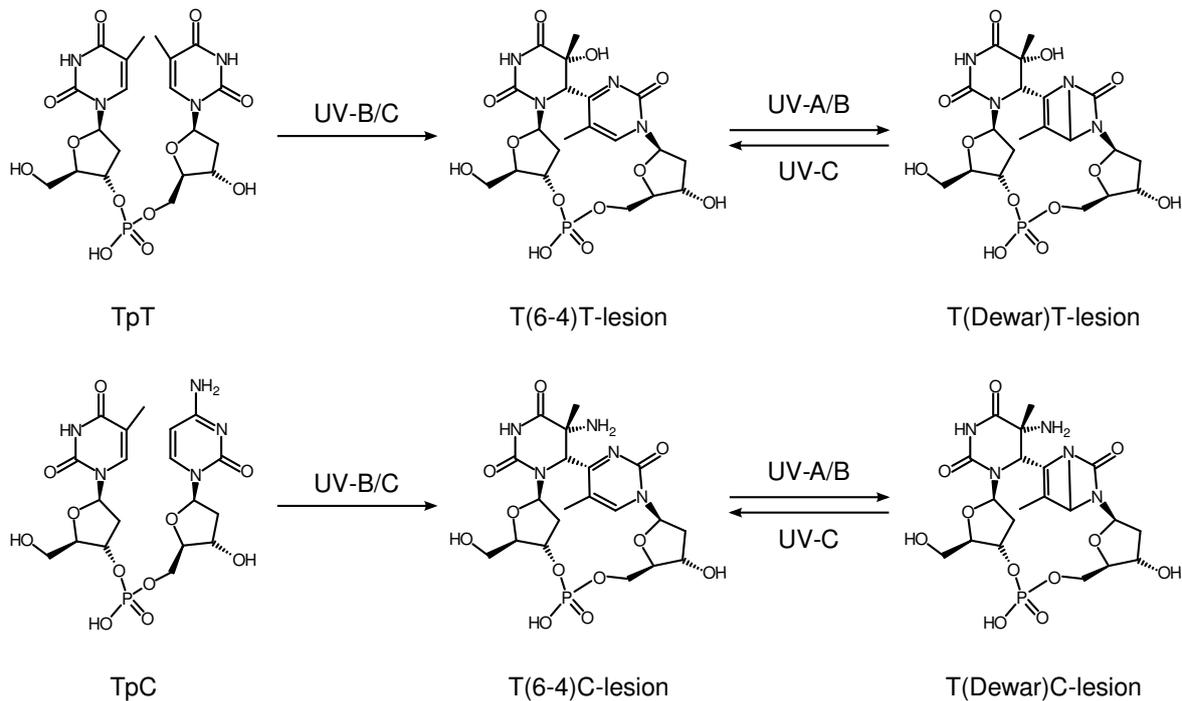


Abb. 2.7.: Bildung des Dewar-Valenzisomers aus dem (6-4)-Schaden.

darauffolgenden Jahrhunderts wurde die Dewar-Struktur dem Sekundärschaden des (6-4)-Photoprodukts anhand der charakteristischen Carbonyl-Schwingungsbande und einer markanten C-H-Kopplungskonstante des Dewar zugeordnet [Tay87].

Im Vergleich zum CPD- und (6-4)-Schaden ist über das Dewar-Isomer noch wenig bekannt. Verbreitet ist die Tatsache, dass das Dewar-Isomer hinsichtlich seiner Bildung und Auswirkungen auf den DNA-Doppelstrang eine besondere Rolle spielt. In Abbildung 2.8 sind zum Vergleich die stationären Spektren eines TpT-, eines T(6-4)T-Dimers und seines Dewar-Isomers gezeigt. Zusätzlich ist das terrestrische Sonnenspektrum im UV-Bereich eingezeichnet. Das TpT-Spektrum weist einen geringen Überlapp mit dem Sonnenspektrum auf. Durch die Bildung des T(6-4)T-Dimers entsteht eine Absorptionsbande im UV-A/B-Bereich. In diesem Bereich ist die Sonneneinstrahlung deutlich höher [May97]. Diese Eigenschaft führt dazu, dass die Bildung des Dewar-Isomers aus den T(6-4)T-Schaden deutlich begünstigt wird. Dies bestätigten Untersuchungen, bei denen CHO¹-Zellen mit simuliertem Sonnenlicht bestrahlt wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass unter diesen Bedingungen ein hoher Anteil der (6-4)-Photoprodukte in Dewar-Isomere umgewandelt wird. Zudem wurde festgestellt, dass die Reparatur des Dewar-Schadens über Exzisionsreparatur gegenüber dem (6-4)-Schaden deutlich verlangsamt ist [Per00].

Eine weitere Besonderheit des Dewar-Schadens besteht in der Auswirkung auf die Geometrie der Doppelhelix. Untersuchungen mittels NMR ergaben, dass die Änderungen von Struktur und Stabilität eines Doppelstrangs, hervorgerufen durch das Dewar-Isomer, sich stark von denen der CPD- und (6-4)-Schäden unterscheidet [Kan92, Hwa96]. Diese Eigenschaft hat Auswirkungen

¹Chinese Hamster Ovary

2. Der Einfluss von UV-Strahlung auf Nukleinsäuren

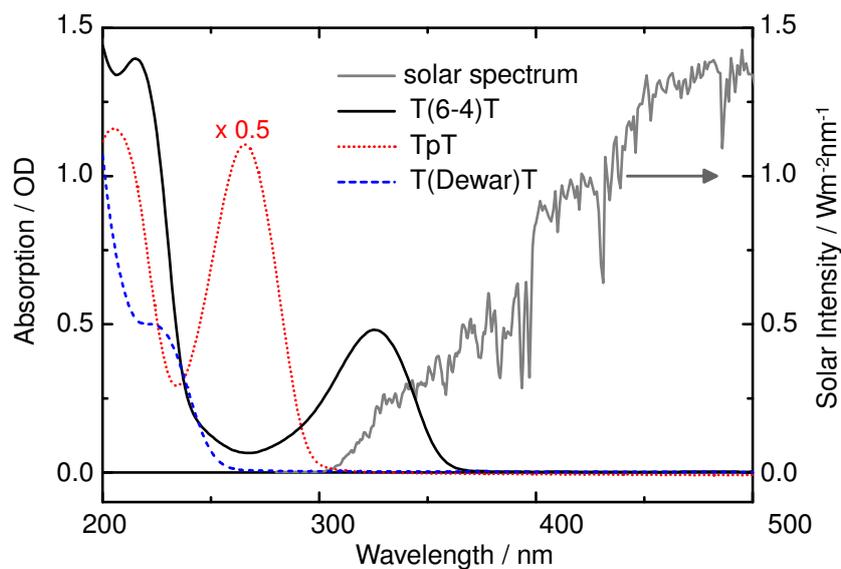


Abb. 2.8.: Vergleich der UV-Spektren von T(6-4)T, TpT und T(Dewar)T mit dem terrestrischen Sonnenspektrum.

auf die Mechanismen von DNA-Reparaturenzymen. Während des Replikationszyklus erkennen die Reparaturenzyme einen Dewar-Schaden nicht als Base, das heißt sie nehmen ihn als abasisch wahr. Der Dewar-Schaden wird deshalb als nicht instruktiv bezeichnet. Im Falle, dass eine Base durch die Reparaturenzyme nicht erkannt wird, wird bevorzugt ein Adenin eingebaut [Lee00a, Lee00b]. Dieser Vorgang wird als A-Regel („A-rule“) bezeichnet [Tay02] und führt zu einem veränderten Mutationsverhalten im Vergleich zu CPD- und (6-4)-Schäden.

Das Sporen-Photoprodukt

Das Sporen-Photoprodukt ist ein UV-induzierter DNA-Schaden, der ausschließlich in Sporen gebildet wird. Die DNA liegt in Sporen stark dehydratisiert und eng gepackt in säurelöslichen Sporenproteinen (*small acid soluble proteins* = SASPs) vor [Set88, Moh91]. Dies ermöglicht es den Sporen unter extremen Bedingungen wie Kälte, Hitze oder Trockenheit zu überleben. Die veränderte Struktur der Sporen-DNA führt dazu, dass vornehmlich das Sporen-Photoprodukt (Struktur siehe Abbildung 2.4) und weniger CPD- oder (6-4)-Schäden gebildet wird [Don65, Var70].

Der Mechanismus der Bildung des Sporen-Photoprodukts ist noch unklar. Alle bisherigen Untersuchungen die Bildung nachzuvollziehen kamen zu keinem eindeutigen Ergebnis. Es ist zudem nicht bekannt, ob das Photoprodukt zwischen benachbarten Basen eines Strangs entsteht oder ob eine Verbindung über gegenüberliegende Basen zweier Stränge möglich ist. Da die UV-Belichtung von TpT-Dinukleotiden bisher zu keiner Bildung des Sporen-Photoprodukts geführt hat, wird eine Querverbindung zwischen zwei Strängen vermutet [Dou00a].

2.2.2. Monomere Schäden – das Photohydrat

Die Belichtung der UV-Bande von Pyrimidinen bei 260 nm führt in Anwesenheit von Wasser nicht nur zu Dimerisierungsreaktionen, sondern auch zur Bildung von Photohydraten. Die Struktur der Photohydrate, deren Bildung und vielfältige Eigenschaften sind in [Fis76] ausführlich beschrieben. Die Hydratisierung entsteht bei Uracil und Cytosin mit Quantenausbeuten im Prozentbereich [Wie57, Fik62, Fik65, Bro68]. Die Hydratbildung von Thymin wurde ebenfalls beobachtet, dessen Quantenausbeute liegt jedoch um 2 bis 3 Größenordnungen niedriger [Fis73].

Die Hydratreaktion von Uracil und Derivaten ist in Abbildung 2.9 durch Strukturformeln gezeigt. Für verschiedene Derivate wird üblicherweise die C₁- und C₃-Positionen substituiert. Für Uracil ist R₁ = R₂ = H und für Uridin ist R₁ eine Ribose und R₂ = H (Verbindung I). Bei der Hydratbildung findet unter UV-Absorption eine Addition einer OH-Gruppe an die C₆-Position und eines H-Atoms an die C₅-Position statt (Verbindung II). Bei Uridin und seinen Derivaten

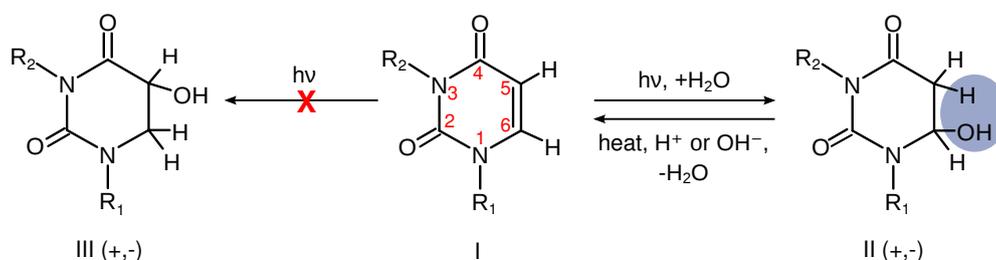


Abb. 2.9.: Bildung des Photohydrats bei Uracilderivaten. Bei Verbindung I ist bei Uracil R₁ = R₂ = H und bei Uridin ist R₁ eine Ribose und R₂ = H. Beim Photohydrat II befindet sich eine OH-Gruppe bei C₆ und ein H bei C₅. Mit (+,-) sind die Enantiomere der verschiedenen Orientierungen der OH-Gruppe relativ zur Ribose bezeichnet. Die Verbindung III (+,-) tritt nicht auf.

sind nach einer Hydratisierung zwei enantiomere Formen möglich, die sich aus der relativen Orientierung der OH-Gruppe zur Ribose ergeben. Die Reaktion bei der OH-Gruppe und H vertauscht sind (Verbindung III) wird nicht beobachtet und wurde in Vergleichsexperimenten ausgeschlossen [Wan56]. Die Hydrat-Bildung ist thermisch reversibel. Durch Änderungen der Temperatur oder des pH-Wertes lässt sich die Rückreaktion beeinflussen [Fis76].

Die Hydratbildung von Cytosinderivaten ist der entsprechenden Reaktion bei Uracilderivaten sehr ähnlich. Die Reaktion ist in Abbildung 2.10 gezeigt. Auch bei Cytosin findet eine Addition einer OH-Gruppe ausschließlich an der C₆-Position und eines H-Atoms an der C₅-Position statt (Verbindung V). Die tautomere Verbindung VI wurde zunächst ebenfalls als mögliches Produkt vorgeschlagen [Wan59], was sich aber durch Experimente widerlegen ließ. Dazu wurde gezeigt, dass durch Hinzufügen einer Seitengruppe an die N₁-Position die Produktbildung nicht verhindert wird [Wie57]. Die Hydrataddition ist bei Cytosin ebenfalls reversibel, zusätzlich kann aber eine Desaminierung zur Hydratform des Uracils stattfinden. Die Photohydrate der Cytosinderivate sind im Vergleich zu Uracilderivaten deutlich instabiler. Die Rate für die Rückreaktion unterscheidet sich für manche Derivate um 2 bis 3 Größenordnungen bei vergleichbarer Temperatur und pH-Wert [Fis76].

2. Der Einfluss von UV-Strahlung auf Nukleinsäuren

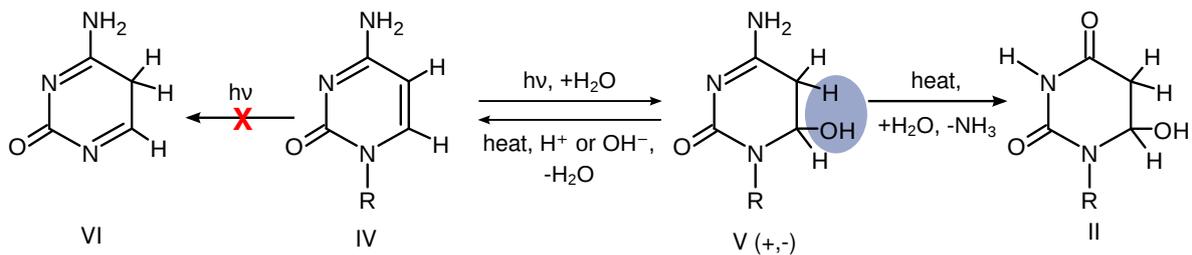


Abb. 2.10.: Bildung des Photohydrats bei Cytosinderivaten. Wie bei Uracil ist bei Cytosin ebenfalls die hydratisierte Form V möglich. Zusätzlich zur Rückreaktion findet bei Cytosin eine Desaminierung zum Photohydrat des Uracils statt. Die Bildung des Tautomers IV wurde experimentell ausgeschlossen.

2.3. Mutagenität von Photoschäden

Aus UV-induzierten Schäden können in Nukleinsäuren unterschiedliche Mutationen entstehen wenn die Schäden nicht erkannt und repariert werden. In Abbildung 2.11 ist am Beispiel einer T→C-Mutation gezeigt wie durch einen UV-Schaden in einer Base eine Veränderung der Erbinformation hervorgerufen werden kann. Die Nukleobasen sind farblich dargestellt und die schwarzen parallelen Linien symbolisieren das DNA-Rückgrat. Nach UV-Einwirkung bildet sich ein Schaden in einem der Thymine (grau eingefärbt). In diesem Beispiel verändern sich die Wasserstoff-Brückenbindungen durch den UV-Schaden zu der komplementären Base (in diesem Fall Adenin). Dadurch kann in dem nächsten Replikationsschritt eine falsche Base, nämlich ein Guanin, in den replizierten Strang eingebaut werden. Bei der zweiten Replikation wird dann das Guanin mit einem Cytosin gepaart. Durch den UV-Schaden an einem Thymin ist dadurch eine Veränderung in der Basenabfolge entstanden. Auf diese Weise können durch DNA-Schäden verschiedene Replikationsfehler entstehen, die zu verschiedenen Formen von Mutationen führen können. Im Folgenden werden einige der durch UV-Schäden verursachte Mutationen kurz skizziert.

Mutationen durch CPD-Schäden

Die CPD-Schäden besitzen ein hohes Mutationspotenzial. Insbesondere die *cis-syn*-Dimere die ein Cytosin enthalten werden für die vielfach beobachteten C→T- und CC→TT-Mutationen verantwortlich gemacht [Jia93, Cli95]. Es werden zwei Möglichkeiten diskutiert, wie durch einen CPD-Schaden ein Thymin anstelle eines Cytosins in einen DNA-Strang eingebaut werden kann. Die beiden Mutationswege sind in Abbildung 2.12 schematisch an einer CC→TT-Doppelmutation dargestellt. Ein Mutationsweg wird über die Desaminierung von Cytosin zu Uracil erklärt. Das Cytosin innerhalb eines CPD-Schadens (in Abbildung 2.12 durch C=C eingerahmt dargestellt) ist unter physiologischen Bedingungen nicht stabil und führt über eine Desaminierung zu einem Uracil anstelle des Cytosins. Bei einer anschließenden Replikation des Doppelstrangs wird der CPD-Schaden erkannt und ein sogenannter replikativer Bypass findet statt [Goo02, Fri03]. Beim replikativen Bypass hält die Polymerase den Replikationszyklus an und spezielle zusätzliche Polymerasen (*sloppy copier*, Polymerase η und Polymerase ι) sorgen dafür das über den Schaden hinweg repliziert wird [Goo02]. Durch die Desaminierung

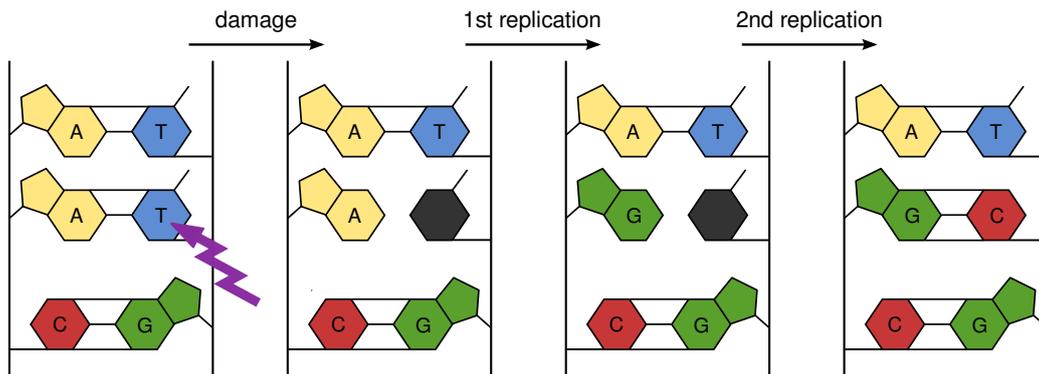


Abb. 2.11.: Schematische Illustration der Entstehung von Mutationen durch UV-Schäden. Die Nucleobasen sind farbig dargestellt. Die zwei parallelen schwarzen Linien symbolisieren das Rückgrat. Ein UV-Schaden an einer der Basen (Thymin in diesem Fall) führt zum Verlust oder Veränderung der Wasserstoff-Brückenbindung. Dadurch kann bei einer Replikation ein Guanin statt eines Adenin als Gegenbase des UV-Schadens eingesetzt werden. Die zweite Replikation führt zum Einbau eines Cytosins anstelle eines Thymins. Bild nach [SM08].

des Cytosins zum Uracil werden jedoch durch die *sloppy copier* Adenine statt Guanine beim replikativen Bypass eingebaut. Die anschließende Reparatur oder Replikation des Strangs mit dem CPD-Schaden führt nun durch die Watson-Crick-Basenpaarung zum Einbau von Thyminen an der Stelle des CPD-Schadens. Infolge der Desaminierung des CDP-Dimers und der anschließenden Fehlererkennung im replikativen Bypass ist aus einem CC-Paar ein TT-Paar entstanden.

Eine weitere Erklärung der Entstehung von C→T- und CC→TT-Mutationen ist die Tautomerisierung vom Amino-Tautomer zur *E*-imino-Form. Diese tautomere Form führt ebenfalls dazu, dass bei einem replikativen Bypass die Polymerase Adenine anstelle der Guanine einbaut und daher zu den selben Mutationen führen kann wie bei der Desaminierung [Tay94].

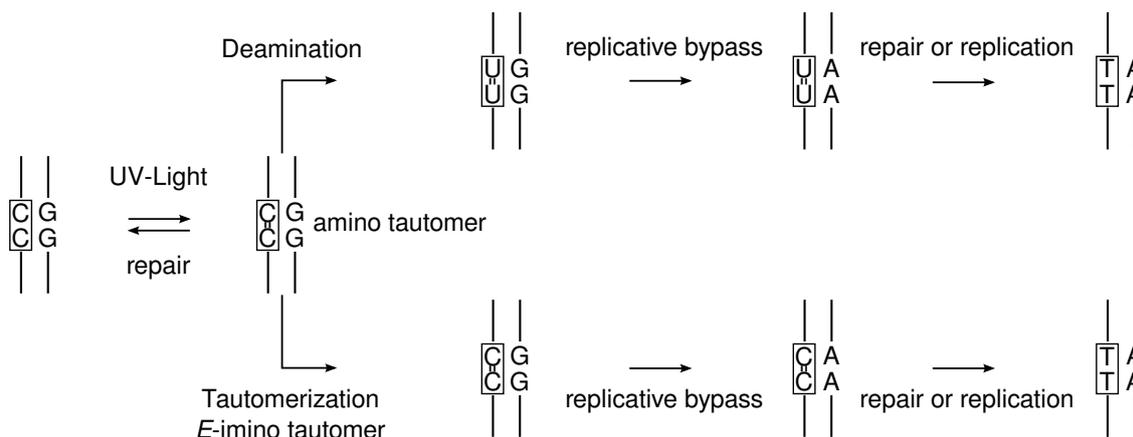


Abb. 2.12.: Die Entstehung von C→T-Mutationen erfolgt entweder durch eine Desaminierung oder über das *E*-imino-Tautomer des CPD-Schadens. In beiden Fällen führt der CPD-Schaden in einem replikativen Bypass zu einem Einbau eines T anstelle des C (Abbildung nach [Fri04] und [Sch08]).

Mutationen durch (6-4)-Schäden

Der (6-4)-Schaden stellt einen weiteren Mutationsherd dar [LeC91, Hor94]. Untersuchungen mittels NMR zeigen, dass die Bildung des (6-4)-Photoprodukts zu einer starken Verformung der Struktur der DNA führt. Hier wird die Ursache für das hohe Mutationspotenzial vermutet, das besonders bei T(6-4)T-Dimeren auftritt [Lee99]. Durch (6-4)-Schäden können T→C-Mutationen entstehen, wie in Abbildung 2.13 skizziert. Nach Ausbildung des (6-4)-Schadens durch UV-Licht wird in einer darauffolgenden Replikation mit sehr großer Wahrscheinlichkeit (85 % aus [LeC91]) das 3'-Thymin des Schadens (in Abbildung 2.13 eingerahmt) mit einem Guanin statt einem Adenin gepaart. Dies führt dazu, dass bei der anschließenden Reparatur oder Replikation das ursprüngliche 3'-Thymin durch ein Cytosin ersetzt wird und folglich zu einer T→C-Mutation.

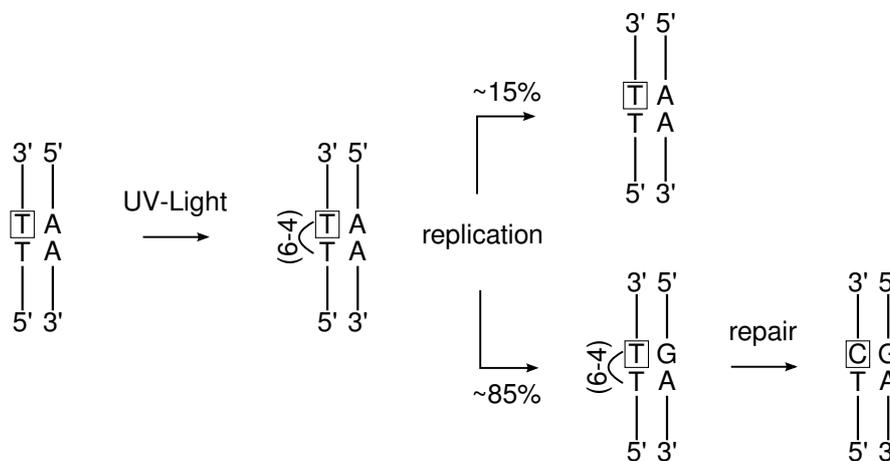


Abb. 2.13.: Die Bildung des (6-4)-Schadens ändert die Paarungseigenschaften des 3'-Thymins (eingerahmt). Es besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass dadurch ein Guanin als Basenpaar zum Thymin eingebaut wird. Dies führt zu einer TC-Mutation. Abbildung nach [Fri04].

Mutationen durch Dewar-Schäden

Das Mutationspotenzial des Dewar-Schadens wird von der bereits erwähnten A-Regel („A-rule“) [Lee00a] dominiert. Bei der A-Regel nimmt die Polymerase beim Replikationszyklus eine geschädigte Base, in diesem Fall das Dewar-Isomer, als abasisch wahr. In solchen Fällen wird durch die Polymerase vorzugsweise ein Adenin eingebaut. Die Eigenschaft des Dewar-Base wird dadurch als nicht-instruktiv bezeichnet. Dies führt dazu, dass T→C-Mutationen bei Dewar-Schäden im Vergleich zu (6-4)-Schäden weniger häufig auftreten [Smi96, Lee00a].

Die Ursache der fehlenden Instrukktivität wird in der geringen Änderung der DNA-Struktur durch den Dewar-Schaden vermutet. Im Gegensatz zum (6-4)-Schaden bleibt die Form der Doppelhelix trotz des Dewar-Isomers erhalten. Deswegen wird vermutet, dass das Dewar-Isomer weniger häufig als DNA-Schaden erkannt wird und damit weniger häufig zum Zelltod führen kann. Durch diese Eigenschaft wird das Mutationspotenzial des Dewar-Schadens gesteigert [Tay88, Tay95].

Neben der Änderung der DNA-Struktur, die durch einen Dewar-Schaden hervorgerufen wird, sind zudem die photophysikalischen Eigenschaften die zu einer Dewar-Isomerisierung führen von Bedeutung. Im Zuge dieser Arbeit wurde die Methode der zeitaufgelösten Infrarotspektroskopie auf die Anforderungen der Dewar-Bildung optimiert und für die Untersuchung der Schadensbildung in einem Modellsystem eingesetzt. Im nachfolgenden Kapitel werden die experimentellen Grundlagen dieser Technik beschrieben.

3. Experimentelle Techniken

Dieses Kapitel dient der Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Methoden. Im ersten Teil wird das Prinzip der Anreg-Abtast-Spektroskopie vorgestellt und im darauf folgenden Unterkapitel das verwendete Femtosekunden-Infrarot-Spektrometer beschrieben. Dies beinhaltet das Lasersystem und die Aufbauten zur Erzeugung der Anregungs- beziehungsweise Abtastimpulse mittels nichtlinearer Frequenzkonversion. Weitere Teile dieses Kapitels sind der Darstellung des Aufbaus zur Vielkanaldetektion sowie der Erläuterung des Messablaufs und der Vorgehensweise bei der Datenaufnahme gewidmet. Zuletzt wird die Methode zur Aufnahme der stationären Infrarotspektren und der Bestimmung von Reaktions- quantenausbeute beschrieben.

3.1. Das Prinzip der Anreg-Abtast-Spektroskopie

Die Anreg-Abtast-Spektroskopie bietet die Möglichkeit Spektroskopie mit extrem hoher Zeit- auflösung im Femtosekundenbereich zu betreiben. Bei dieser Methode wird durch einen ultrakurzen Lichtimpuls ein angeregter Zustand in der Probe erzeugt. Das Eintreffen des Anregungsimpulses ist der Startzeitpunkt für dynamische Veränderungen der Probe. Durch einen zweiten Laserimpuls, den Abtastimpuls, wird die induzierte Änderung im Spektrum ($I_{Signal}(\lambda, \tau)$) nach einer definierten Verzögerungszeit τ gemessen (siehe Abb.3.1). Ein weiterer Abtastimpuls misst ein Spektrum der Probe in einem nicht angeregten Zustand ($I_{Ref}(\lambda, \tau)$) und bildet die Referenz. Das Messsignal $S(\lambda, \tau)$ wird aus den Intensitäten der Signal- und Re- ferenzspektren nach N Laserimpulsen in Abhängigkeit der Wellenlänge und Verzögerungszeit wie folgt bestimmt:

$$S(\lambda, \tau) = \frac{\sum_{i=1}^N I_{i\,Signal}(\lambda, \tau)}{\sum_{i=1}^N I_{i\,Ref}(\lambda, \tau)}. \quad (3.1)$$

Das Messsignal entspricht der Transmissionsänderung $\Delta T(\lambda, \tau) = S(\lambda, \tau)$. Daraus erhält man mit $A(\lambda) = \ln(T(\lambda))$ die Absorptionsänderung ΔA . Die Absorptionsänderung über die Wellenlänge aufgetragen ergibt ein Differenzspektrum. Wird die zeitliche Verzögerung der Abtastimpulse zu den Anregungs-Impulsen schrittweise verändert, so erhält man aus den jeweils aufgenommenen Absorptionsänderungen den Zeitverlauf $\Delta A(\tau)$ wie in Abbildung 3.1a skizziert.

In Abbildung 3.1b ist schematisch ein Aufbau eines Anreg-Abtast-Experiments gezeigt. Eine Laserquelle liefert ultrakurze Lichtimpulse, aus denen mittels Frequenzkonversion Anregungs- und Abtastimpulse im erforderlichen Wellenlängenbereich erzeugt werden. Zur Frequenzkon- version werden Prozesse der nichtlinearen Optik ausgenutzt, durch die spektral abstimmbare Femtosekunden-Lichtimpulse erzeugt werden können [She84, Boy03]. Eine besondere Rolle nimmt hierbei der optisch parametrische Verstärkungsprozess (OPA) ein, durch den die Inten-

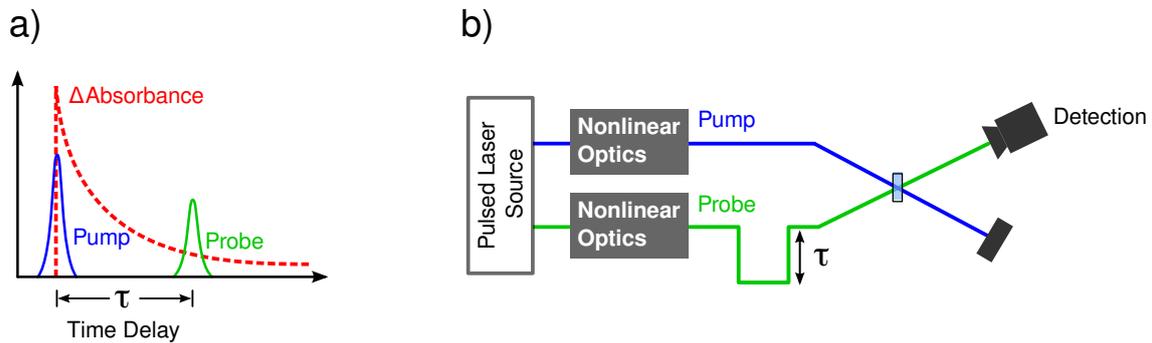


Abb. 3.1.: a) Durch Auftragen der Absorptionsänderung bei einer bestimmten Wellenzahl zu verschiedenen Verzögerungszeiten zwischen Anregungs- und Abtastimpuls erhält man einen Zeitverlauf (rot gestrichelte Linie). b) Schematische Darstellung eines Anreg-Abtast-Experiments.

sität von Lichtimpulsen mit der für ein Experiment benötigten Wellenlänge verstärkt werden kann [Cer03]. Die Zeitverzögerung zwischen Anregungs- und Abtastimpulsen wird durch eine mechanische Wegveränderung erreicht. Anregungs- und Abtastimpulse werden anschließend am Probenort überlagert. Ein Detektor misst die Absorptionsänderung, die durch die Anregung der Probe hervorgerufen wurde.

Referenzmessungen können gleichzeitig zur Messung erfolgen, indem ein Teil des Abtastimpulses abgespalten wird, welcher die Probe in einem nicht angeregten Bereich durchläuft und anschließend detektiert wird. Der Vorteil bei dieser Referenzierungsmethode ist, dass jeder Impuls zur Signalbildung beiträgt. Alternativ dazu können die Referenzsignale im Wechsel mit den Signalimpulsen aufgenommen werden, indem ein Unterbrecherrad jeden zweiten Anregungsimpuls abblockt. Das Signal wird dann aus zwei aufeinanderfolgenden Abtastimpulsen mit und ohne Anregung gebildet.

3.2. Das Femtosekunden-Infrarot-Spektrometer

In diesem Kapitel wird der Aufbau, an dem die Anreg-Abtast-Experimente durchgeführt werden, kurz beschrieben. Eine ausführliche Darstellung findet sich beispielsweise in [Sie05] und [Sch08]. Das vollständige Femtosekunden Infrarot-Spektrometer ist in Abbildung 3.2 schematisch zusammengefasst. Es setzt sich aus einem zentralen Lasersystem, den Aufbauten zur Frequenzkonversion der Anregungs- und Abtastimpulse und einer Detektionseinheit, bestehend aus Spektrometer und Detektoren, zusammen. Das kommerzielle Lasersystem liefert Impulse bei einer Zentralwellenlänge von 800 nm und einer Impulsdauer von 100 fs mit einer Repetitionsrate von 1 kHz, welche in die Zweige zur Erzeugung der Anregungsimpulse im UV und der Abtastimpulse im mittleren Infraroten Spektralbereich aufgeteilt werden.

Die Abtastimpulse im mittleren Infraroten entstehen durch eine Kombination eines nicht-kollinearen optisch parametrischen Verstärkungsprozesses (NOPA) mit einem kollinearen OPA. Den Verstärkungsprozessen gehen die Bildung der zweiten Harmonischen der Laserfundamentalen (SHG) und die Erzeugung eines Weißlichtkontinuums (CG) voraus. In den Verstärkungsprozessen werden Lichtimpulse mit Zentralwellenlängen im nahinfraroten Spek-

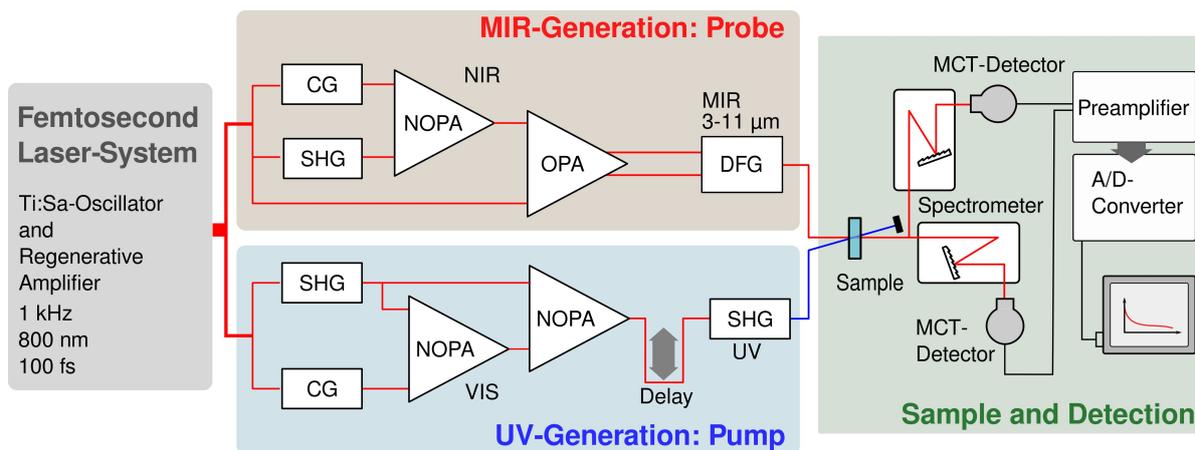


Abb. 3.2.: Aufbau des Experimentes zur Femtosekunden Infrarot-Spektroskopie im Überblick: Ein Lasersystem liefert Impulse zur mehrstufigen Frequenzkonversion in optisch parametrischen Verstärkungsprozessen, sowohl zur Erzeugung der Anregungsimpulse im mittleren Infraroten (MIR), als auch der Abtastimpulse im Ultravioletten (UV). Die entsprechenden Abkürzungen sind im Text erläutert. Mit einer variablen Verzögerungsstrecke im Anregungsweig wird der zeitliche Unterschied zwischen Anregungs- und Abtastimpulsen eingestellt. Das Abtastlicht wird nach der Probe aufgeteilt, in einem Spektrographen dispersiert und mit einer Detektorzeile frequenz aufgelöst detektiert. Die einzelnen Messsignale werden elektronisch verstärkt, in einem Analog-Digital-Wandler konvertiert und über eine Computer-Schnittstelle ausgelesen.

tralbereich (NIR) erzeugt. Diese werden dann anschließend durch die Bildung der Differenzfrequenz ins mittlere Infrarote (MIR) konvertiert.

Im Anregungsweig werden in einem zweistufigen NOPA mit anschließender Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG) Impulse im UV-Bereich generiert. In diesem Bereich, zwischen NOPA-Prozessen und SHG, befindet sich die mechanische Verzögerungsstrecke zur Einstellung des zeitlichen Abstands zwischen Anregungs- und Abtastimpulsen.

Anschließend werden Anregungs- und Abtastimpulse am Probenort überlagert. Die Abtastimpulse werden nach der Probe in Spektrometer gelenkt und dort spektral aufgetrennt. Mit Detektorzeilen aus MCT¹-Elementen wird die Absorptionsänderung, die in der Probe hervorgerufen wurde, aufgenommen und mit einer Kombination aus Vorverstärker und Analog-Digital-Wandler in einen digital auslesbaren Datensatz umgewandelt. Im Folgenden werden die wichtigsten Bestandteile des Femtosekunden Infrarot-Spektrometers kurz dargestellt.

3.2.1. Das Femtosekunden-Lasersystem

Das zentrale Lasersystem besteht aus dem kommerziellen Komplettsystem „Spitfire Pro XP“ der Firma Spectra Physics. Es ist nach dem Prinzip eines CPA² [Str85] aufgebaut und ist in Abbildung 3.3 gezeigt. Der Aufbau und dessen wichtigste Bestandteile werden hier kurz erläutert.

¹MCT = Mercury-Cadmium-Telluride

²CPA = Chirped Pulse Amplifier

3. Experimentelle Techniken

Der sogenannte Seed³-Laser, ein Titan-Saphir-Oszillator (Ti:Sa, „Tsunami“), liefert schwache Femtosekunden-Lichtimpulse bei einer Zentralwellenlänge von 800 nm und mit einer Repetitionsrate von 82 MHz. Dies wird durch Ausbilden einer Kerr-Linse im optisch aktiven Medium, einem mit Titan-Ionen dotiertem Saphir-Kristall (Ti:Sa) und passiver Modenkopplung der Fluoreszenz erreicht [Spe91]. Gepumpt wird der Oszillator mit einem Nd:YVO cw-Laser bei 532 nm („Millenia Pro“). Ti:Sa zeichnet sich durch seine breitbandigen Absorptionsübergänge im sichtbaren Spektralbereich (400 - 600 nm) und eine hohe Fluoreszenzbandbreite im nahen infraroten Spektralbereich (670 - 1000nm) aus. Letzteres ermöglicht die Erzeugung von Lichtimpulsen mit einer Impulsdauer im Femtosekundenbereich.

Die Seed-Impulse des Oszillators können im CPA zu fs-Impulsen mit sehr hoher Leistung verstärkt werden. Das CPA-Prinzip besteht im Wesentlichen aus drei Schritten. Die Impulsdauer der Seed-Impulse wird im ersten Schritt durch einen Strecker (Gitteranordnung mit positiver Gruppengeschwindigkeitsdispersion) verlängert. Dadurch wird die Spitzenintensität der Impulse gesenkt und man bleibt damit bei der nachfolgenden Verstärkung unterhalb der Zerstörschwelle des aktiven Mediums [Tre69]. Im zweiten Schritt erfolgt dann die so-

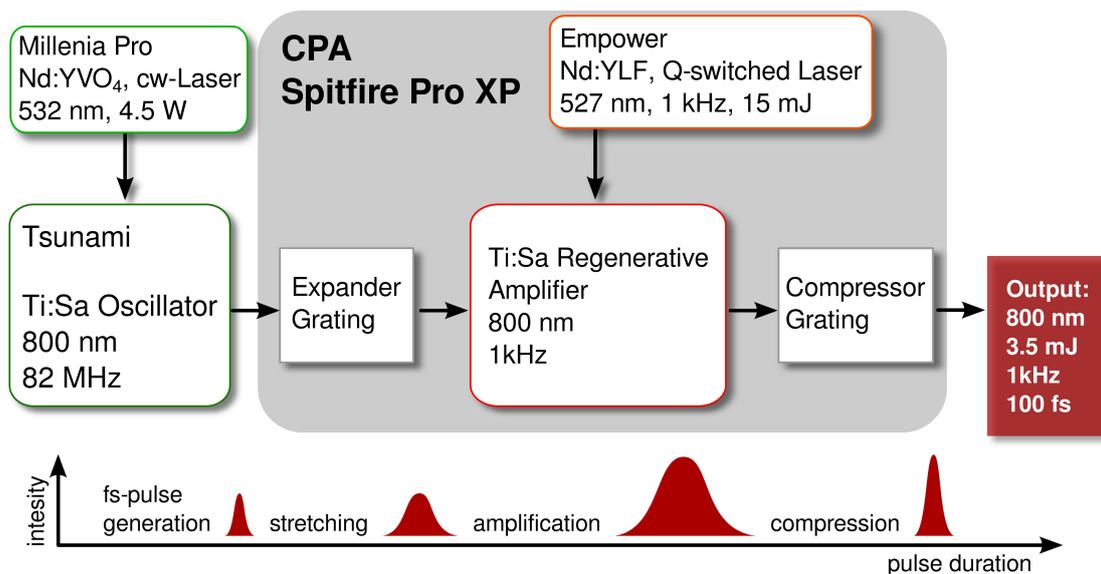


Abb. 3.3.: Schematischer Aufbau der Komponenten des kommerziellen Femtosekunden-Lasersystems. Die Femtosekunden-Impulse werden in einem Laser-Resonator (Ti:Sa-Oszillator) erzeugt, der durch einen Nd:YVO-Laser (Millenia Pro) gepumpt wird. Die Verstärkung der Femtosekunden-Impulse erfolgt in einem CPA, indem die Impulse zunächst in einer Gitteranordnung zeitlich gestreckt werden. Dann erfolgt die regenerative Verstärkung in einem Resonator, bei der ein Impuls in mehreren Umläufen die in einem Ti:Sa-Kristall deponierte Energie (Pumplaser: Empower) aufnimmt. Anschließend wird der verstärkte Impuls wieder komprimiert. Unten: Zeitlicher Intensitätsverlauf eines Impulses während des Verstärkungsvorgangs.

nannte regenerative Verstärkung bestehend aus einem Resonator und einem Ti:Sa-Kristall als aktives Medium. Ein separater gütegeschalteter Pump-Laser („Empower“) erzeugt eine Besetzungsinversion im Ti:Sa des Resonators. Nun wird durch eine Kombination aus Polarisor und Pockelszelle ein Seed-Impuls ausgewählt, in den Resonator eingekoppelt und beim

³Seed = engl. Samen

Durchgang durch den Kristall verstärkt. Nach bis zu 20 Umläufen ist die Besetzungsinversion und damit die im Resonator deponierte Energie abgebaut und der umlaufende Impuls wird wieder über eine Pockels-Zelle ausgekoppelt. Im nachfolgenden Kompressor (Gitteranordnung mit negativer Gruppengeschwindigkeitsdispersion) wird die Impulsdauer auf die Impulsdauer der Seed-Impulse komprimiert. Die Synchronisation der Pockels-Zellen mit dem Oszillator und dem Pumplaser im Hinblick auf Einkopplung, Umlaufdauer und Auskopplung der Seed-Impulse aus dem Resonator erfolgt beim Spitfire über einen „Time-Delay-Generator“. Das gesamte System liefert ultrakurze intensive Impulse (~ 100 fs) mit einer Wiederholrate von 1 kHz bei einer Zentralwellenlänge von 800 nm. In Tabelle 3.1 sind die wichtigsten technischen Parameter des zentralen Lasersystems zusammengefasst.

Parameter des zentralen Lasersystems	
Zentralwellenlänge	~ 800 nm
Repetitionsrate	1 kHz
Impulsdauer	~ 100 fs
Impulsenergie	$3.5 \mu\text{J}$
Spektrale Breite (FWHM)	15 nm
Bündeldurchmesser (1/e)	8 mm
Stabilität (rms)	0.15-0.2 %

Tabelle 3.1.: Technische Daten des kommerziellen Femtosekunden-Lasersystems

3.2.2. Erzeugung abstimmbarer Abtastimpulse im mittleren Infraroten

Zur Konversion von fs-Lichtimpulsen des zentralen Lasersystems bei 800 nm in den mittleren infraroten Spektralbereich (MIR) hat sich eine Methode etabliert, bei der aus zwei hintereinander geschalteten optisch parametrischen Verstärkungsprozessen (OPA) nahinfrarote Lichtimpulse mit leicht unterschiedlicher Wellenlänge generiert werden. Mit diesen Impulsen kann dann mittels Differenzfrequenzerzeugung in einem weiteren nichtlinearen Prozess der MIR-Spektralbereich (Wellenlänge bei 3 bis $10 \mu\text{m}$) erreicht werden [Ham97, Kai00, Cer03].

Die Erzeugung der Abtastimpulse im mittleren Infraroten ist in Abbildung 3.4 schematisch gezeigt und lässt sich in drei Abschnitte gliedern. Den ersten Abschnitt bildet eine nichtkollineare optisch parametrische Verstärkung (NOPA) [Rie00, Pie00] von Lichtimpulsen im nahinfraroten Spektralbereich (NIR, bei ~ 1400 nm) und ist folgendermaßen aufgebaut: Die Laserfundamentale bei 800 nm passiert zuerst ein Teleskop (T_1) bestehend aus einer Sammell- und einer Zerstreuungslinse, mit denen der Bündelquerschnitt reduziert wird. Danach wird ein kleiner Teil des Lichts (~ 4 %) zur Erzeugung eines Weißlichtkontinuums (WL) verwendet. Die Weißlichterzeugung erreicht man durch Fokussierung der Fundamentalen in einen 5 mm dicken Saphirkristall (Sa). Zur Anpassung des Kontinuums werden eine Modenblende (ID) und ein Graukeil (VA) eingesetzt. Mit dem Hauptteil der Laserfundamentalen wird in einem BBO-Kristall (Typ I, $\theta = 29^\circ$, Länge $500 \mu\text{m}$) die zweite Harmonische der Fundamentalen bei 400 nm erzeugt (SHG). Der Verstärkungsprozess im nahinfraroten Spektralbereich findet

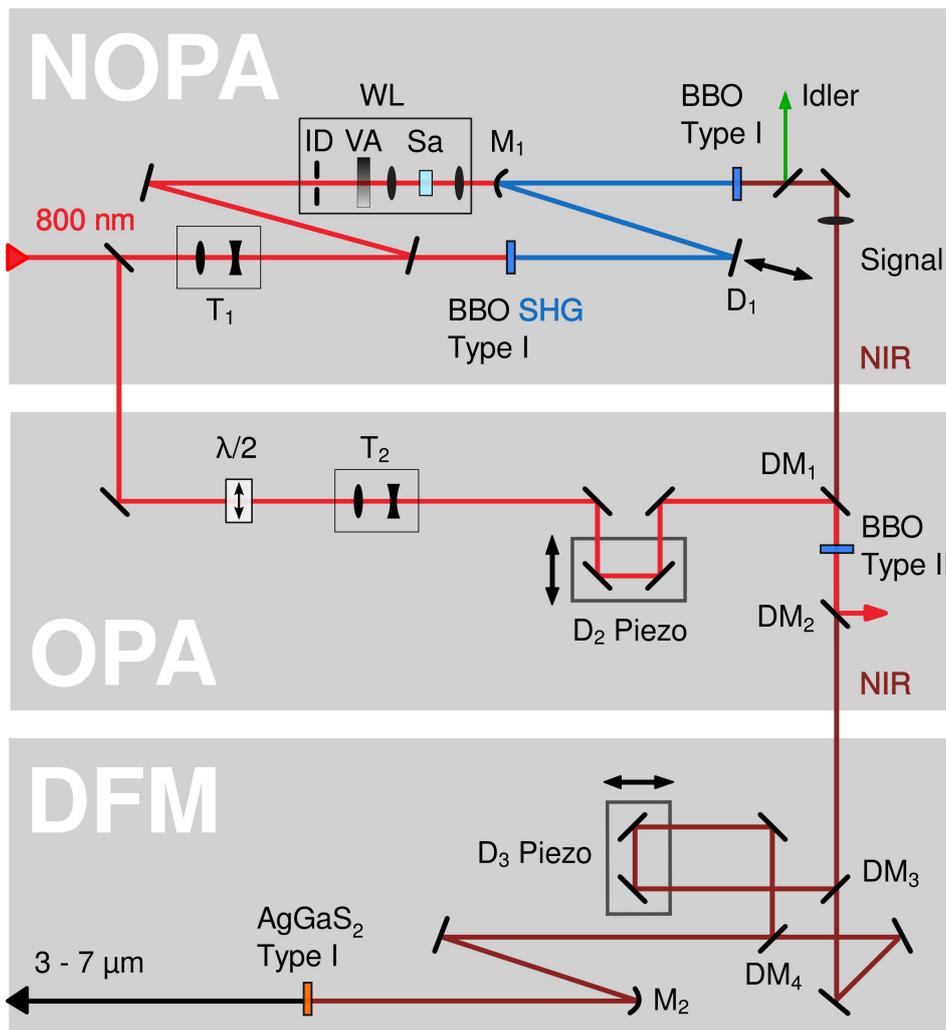


Abb. 3.4.: Schema des Aufbaus zur Erzeugung der Abtastimpulse im mittleren Infraroten Spektralbereich. Der Aufbau gliedert sich in drei Teile: In einem nichtkollinearen parametrischen Verstärkungsprozess (NOPA) und einem kollinearen parametrischen Verstärkungsprozess (OPA) werden Impulse im nahinfraroten Spektralbereich erzeugt (1200-1500 nm und 1700-2200 nm). Aus diesen erhält man durch Bildung der Differenzfrequenz (DFM) Impulse mit einer Wellenlänge im Bereich von 3 bis 11 μm . Abkürzungen:

statt, indem das Weißlichtkontinuum mit der zweiten Harmonischen in einem BBO-Kristall (Typ I, $\theta = 32,5^\circ$, Dicke 3 mm) zeitlich und räumlich überlagert und die Phasen Anpassung durch Variation des Kristallwinkels eingestellt wird. Der zeitliche Überlapp ist durch eine Verzögerungsstrecke (D_1) einstellbar. Bei diesem Prozess entsteht als dritte Komponente der Phasen Anpassung Licht im sichtbaren Spektralbereich bei etwa 560 nm (Idler). Dieses wird zur Kontrolle und Optimierung des Prozesses verwendet und wird sowohl von einem Spektrometer (Fa. Ocean Optics) als auch von einer Diode aufgenommen.

Im zweiten Abschnitt werden die nahinfraroten Lichtimpulse des vorhergehenden Prozesses in einer zweiten Stufe noch einmal verstärkt. Hierbei dienen die Impulse bei 1400 nm als Seed in einem OPA. Diese werden mit einem dichroitischen Spiegel (DM_1) mit der Fundamentalen

des Lasersystems in einem BBO-Kristall (Typ II, $\theta = 27^\circ$, Dicke 3 mm) kollinear überlagert. Zuvor wird die Polarisation der Fundamentalen durch ein $\lambda/2$ -Plättchen um 90° gedreht. Mit einem Teleskop (T_2) wird zudem der Bündelquerschnitt eingestellt. Die zeitliche Überlagerung der Impulse erfolgt wiederum durch eine Verzögerungsstrecke (D_2) im Bereich der Fundamentalen, kann aber zusätzlich durch eine Piezoverschiebeeinheit (Piezo) feinjustiert werden. Bei diesem Prozess werden nicht nur die NIR-Impulse verstärkt, sondern es entstehen durch die Phasenanpassungsbedingung Impulse im NIR bei etwa 1800 nm. Ein weiterer dichroitischen Spiegel (DM_2) dient dazu das Licht der Laserfundamentalen aus dem nachfolgenden Strahlengang zu entfernen.

Der dritte Abschnitt besteht aus der Erzeugung der Impulse im mittleren Infraroten durch Bildung der Differenzfrequenz (DFM) der Nahinfrarot-Impulse. Dies erreicht man, indem die beiden zunächst nur räumlich überlagerten NIR-Bereiche durch einen dichroitischen Spiegel (DM_3) separiert und dann sowohl zeitlich als auch räumlich in einem Silber-Thiogallat-Kristall ($AgGaS_2$) wieder miteinander überlagert werden. Dadurch entstehen Impulse im mittleren Infraroten. Eine Piezoverschiebeeinheit in der Verzögerungsstrecke D_3 ermöglicht es die NIR-Impulse mit großer Genauigkeit zu überlagern. Durch Variation sowohl des OPA-Kristallwinkels und damit der Wellenlänge der NIR-Impulse in den Bereichen von etwa 1200 bis 1700 nm und etwa 1500 bis 2200 nm, als auch des Phasenanpassungswinkels des DFM-Kristalls lassen sich abstimmbare Impulse im MIR im Bereich von 3 bis 10 μm ($1000 - 3300 \text{ cm}^{-1}$) mit einer spektralen Breite von etwa 150 cm^{-1} und einer Impulsdauer zwischen 100 und 150 fs erzeugen. Für die Verwendung der MIR-Impulse als Abtastlicht wird lediglich ein Reflex von einer Keilplatte (CaF_2) mit etwa 50 nJ Impulsenergie verwendet, da die Energie von $\sim 1 \mu\text{J}$ nach der Differenzfrequenzbildung für die Verwendung als Abtastlicht noch zu hoch ist.

Bei den Anreg-Abtast-Messungen ist ein möglichst hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis erforderlich, damit Absorptionsänderungen im Bereich von 10^{-6} OD aufgelöst werden können. Diese Sensitivität wird insbesondere durch eine optimale Justage des zeitlichen Überlapps der beteiligten Impulse im OPA- und im DFM-Prozess erreicht. In [Ham00] wurde gezeigt, dass dadurch das Rauschen der MIR-Impulse nach der DFM sogar niedriger werden kann als das Rauschen der Laserfundamentalen. Aus diesem Grund werden die Piezoverstelleneinheiten D_2 und D_3 zur Optimierung des zeitlichen Überlapps des OPA- und DFM-Prozesses eingesetzt. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreicht damit die oben genannte hohe Sensitivität, die auch in den Messungen der Reaktion des (6-4)-Schadens zum Dewar-Valenzisomer von entscheidender Bedeutung ist.

3.2.3. Erzeugung der Anregungsimpulse im UV

Zur Durchführung der Femtosekunden-Experimente am (6-4)-Dimer werden Anregungsimpulse mit Wellenlängen im Bereich von 300 bis 350 nm benötigt. Aus diesem Grund wurde ein bereits vorhandener Anregungsweig, bestehend aus einem nichtkollinearen optisch parametrischen Verstärkungsprozess, um eine zweite NOPA-Stufe erweitert. Dadurch werden Impulse im sichtbaren Spektralbereich mit ausreichend Impulsenergie für die nachfolgende Frequenzverdopplung in den UV-Bereich zur Verfügung gestellt. Mit der Erzeugung der zweiten Harmonischen dieser Impulse wird hierdurch der Bereich zwischen 200 nm und 400 nm zugänglich. In Abbildung 3.5 ist das Schema dieses Aufbaus gezeigt.

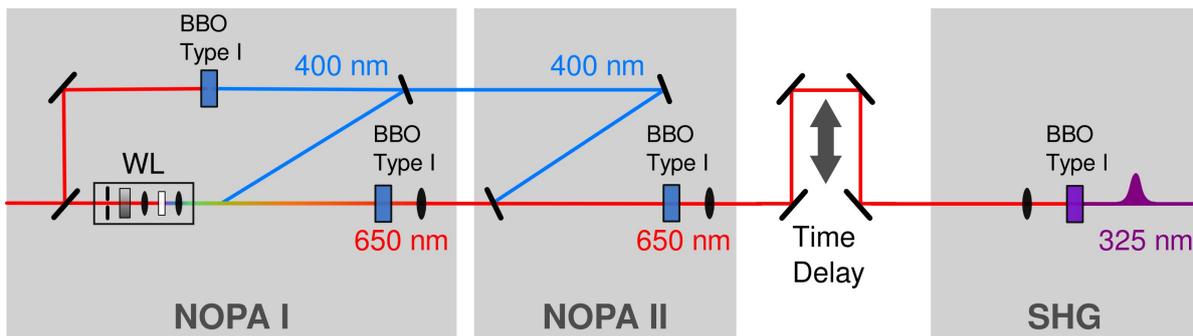


Abb. 3.5.: Aufbau zur Erzeugung der Anregungsimpulse im UV-Bereich. In zwei aufeinanderfolgenden Verstärkungsprozessen (NOPA I+II) werden Impulse im sichtbaren Spektralbereich (~ 650 nm) mit ausreichend Impulsenergie für die nachfolgende Konversion in den UV-Bereich bei 325 nm (SHG) erzeugt.

In der ersten Stufe (NOPA I) wird das Licht zunächst aufgeteilt. Ein kleiner Teil (etwa 4 %) dient der Weißlichterzeugung (WL). Mit dem Großteil des 800 nm-Lichts wird die zweite Harmonische in einem BBO-Kristall (Typ I, $\theta = 29^\circ$) erzeugt. Etwa 30 % hiervon werden als Pump-Licht für den ersten NOPA verwendet. Dazu werden Weißlicht und Pump-Licht mit geeignetem Phasenanpassungswinkel zueinander in einem BBO-Kristall (Typ I, $\theta = 32,5^\circ$) überlagert. Dadurch können Impulse bei 650 nm erzeugt werden. Diese werden im darauffolgenden identischen Prozess (NOPA II) mit dem restlichen Pumplicht ein weiteres Mal überlagert, wodurch sich eine Verstärkung der 650 nm-Impulse erreichen lässt. Das so erzeugte Licht läuft zunächst über die Verzögerungsstrecke zur Einstellung des zeitlichen Abstands zwischen Anregungs- und Abtastimpulsen und wird dann zur Frequenzverdopplung in einen BBO-Kristall fokussiert (SHG). Auf diese Weise erhält man abstimmbare UV-Impulse im Bereich zwischen 200 und 400 nm. Mit der mechanischen Verzögerungsstrecke wird der Wegunterschied und damit zeitliche Abstand eingestellt und kann im vorliegenden Aufbau bis zu 1,20 m betragen. Dies entspricht einer maximalen Verzögerungszeit von etwa 4 ns.

Das Absorptionsspektrum des in dieser Doktorarbeit untersuchten T(6-4)T-Dimers besitzt im UV eine Bande bei 325 nm. Aus diesem Grund wurde für die fs-Messungen am (6-4)-Schaden die Wellenlänge der Anregungsimpulse im oben beschriebenen Aufbau für diesen Bereich optimiert. Die Abbildung 3.6 zeigt ein solches Spektrum mit einer Zentralwellenlänge von 323 nm. Die Gaußfunktion (rote Linie), die an das Spektrum angepasst wurde, hat eine spektrale Breite von etwa 4 nm (FWHM⁴). Für die Experimente konnte eine Impulsenergie im Bereich von 450 bis 850 nJ erreicht werden.

3.2.4. Messplatz und Detektionseinheit

Nach der Erzeugung der Anregungs- und Abtastimpulse mit der jeweiligen Wellenlänge werden diese am Probenort mit definierten Bündeldurchmessern überlagert und die Abtastimpulse anschließend detektiert. In diesem Kapitel werden der Messplatz und die Detektionseinheit vorgestellt. Des Weiteren wird auf das Konzept eingegangen, das einen Austausch des Probenvolumens in der Küvette zwischen zwei aufeinanderfolgenden Laserimpulsen ermöglicht. Dazu

⁴FWHM = Full Width at Half Maximum

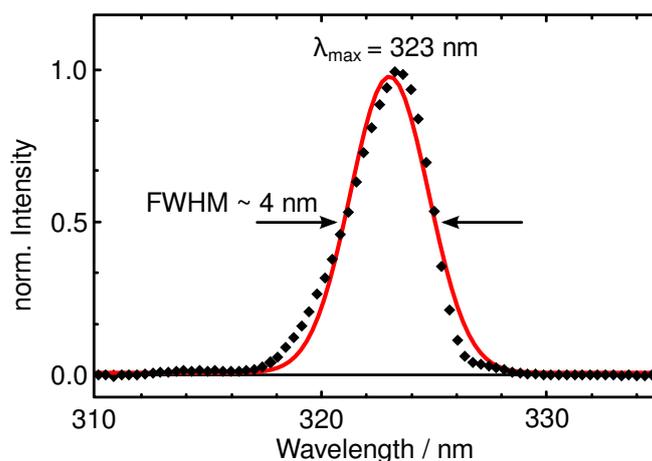


Abb. 3.6.: Spektrum der Anregungsimpulse, wie sie in den Messungen am (6-4)-Schaden verwendet werden. Die rote Linie entspricht der Anpassung einer Gaußfunktion an das Spektrum. Die Zentralwellenlänge befindet sich bei 323 nm und die spektrale Breite beträgt 4 nm.

wird ein sogenannter Probenkreislauf verwendet, der ein Umpumpen der Probenflüssigkeit ermöglicht.

Der Probenraum ist in Abbildung 3.7 dargestellt und ist wie folgt aufgebaut: Die MIR-Impulse (rote Linie) werden mittels Parabolspiegeln mit Goldbeschichtung auf den Probenort fokussiert und wieder rekollimiert. Danach teilt ein Strahlteiler, ein einseitig anti-reflexbeschichtetes BaF₂-Plättchen, die MIR-Impulse auf zwei Spektrographen auf. Das spektral aufgetrennte Licht wird dann auf die 32 Elemente der Detektorzeile des MTC-Detektors abgebildet. Mit beschichteten BaF₂-Scheiben (F) kann die Intensität der Abtastimpulse zu einer passenden Aussteuerung der Detektoren abgeschwächt werden. Durch die Verwendung von zwei IR-Detektoren kann eine polarisationsaufgelöste Messung durchgeführt werden, was jedoch nicht Teil dieser Arbeit war. Für die Messung mit zwei verschiedenen Polarisationsrichtungen werden vor dem Eintritt in die Spektrometer mittels IR-Polarisatoren (P₁ und P₂) einmal die senkrechten und einmal die parallelen Polarisationsanteile relativ zur eugung ausgewählt.

Die in der Raumluft enthaltenen Wassermoleküle absorbieren im Messbereich von 1200 bis 1800 cm⁻¹ stark [Ham94] und stören damit die Messsignale. Die gesamte Probenkammer und die Spektrometer sind deshalb abdeckbar und können mit Trockenluft gespült werden. Die Taupunkttemperatur der Trockenluft liegt bei -50°C. Dadurch wird vermieden, dass das MIR-Spektrum der Abtastimpulse von den in der Raumluft enthaltenen Wassermolekülen absorbiert und verformt wird.

Die UV-Anregungsimpulse (violette Linie) durchlaufen zuerst eine $\lambda/2$ -Platte und einen Polarisator bevor sie mit einer Linse (L₁) auf den Probenort abgebildet werden. Mit der $\lambda/2$ -Platte lässt sich die Anregungsenergie variieren und mit dem Polarisator wird die Polarisationsrichtung der Anregungsimpulse relativ zu der der Abtastimpulse eingestellt. Die Position von L₁ bestimmt den Bündeldurchmesser der Anregungsimpulse am Probenort. Die Parabolspiegel der MIR-Abtastimpulse sind durchbohrt, sodass das Anregungslicht mithilfe eines Spiegels mit dem Abtastlicht am Probenort unter möglichst kleinem Winkel zueinander überlagert werden kann. Ein Unterbrecherrad (Chopper) sorgt dafür, dass jeder zweite Anregungsimpuls

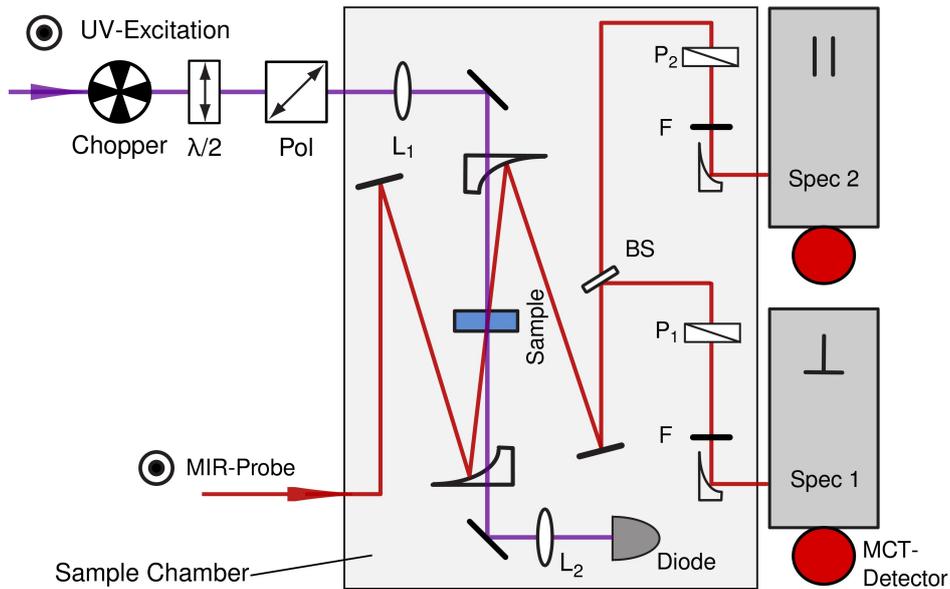


Abb. 3.7.: Schematische Darstellung des Strahlverlaufs am Probenort. Der Verlauf der Abtastimpulse ist im Bild rot eingezeichnet. Die Abtastimpulse sind senkrecht zur Tisch-Oberfläche polarisiert und werden über Parabolspiegel (Ablenkwinkel 30°) auf den Probenort fokussiert, anschließend über einen zweiten Parabolspiegel wieder kollimiert und mit einem Strahlteiler (BS) aufgeteilt. Über Paraboloiden (Ablenkwinkel 90°) 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). Für eine polarisationsaufgelöste Messung können mit IR-Polarisatoren einmal die senkrechten und einmal die parallelen Polarisations-Anteile relativ zur Anregung ausgewählt werden. Die linear polarisierten Anregungsimpulse (Verlauf in violett) durchlaufen ein Unterbrecherrad (Chopper, 500 Hz) und werden über eine Kombination aus $\lambda/2$ -Plättchen und Polarisator (Pol) in der Polarisationsenebene gedreht. Die UV-Impulse werden über eine Linse (L_1) auf die Probe fokussiert und anschließend von einer Diode detektiert.

abgeblockt wird. Aus dem Unterschied der Abtastimpulse mit und ohne Anregung wird die Absorptionsdifferenz bestimmt. Das Anregungslicht wird im Anschluß durch eine Linse (L_2) auf eine Diode zur Überwachung der Anregungsenergie fokussiert.

Der Probenkreislauf ist in Abbildung 3.8 schematisch in der Aufsicht gezeigt. Er besteht aus zwei Küvetten, die sich nur in dem Zwischenraum der Fenster unterscheiden. Die Küvette mit großer kreisförmiger Apertur wird im FTIR-Spektrometer zur Charakterisierung der Probe vor und nach einer fs-Messung verwendet. Die Küvette für die fs-Messungen besitzt einen etwa 2 mm breiten Kanal. Dies ermöglicht einen schnelleren Austausch der Probenflüssigkeit. Die Küvetten sind durch Teflonschläuche miteinander verbunden, die in ein Vorratsgefäß münden. Eine Walkpumpe sorgt für den Austausch der Probenflüssigkeit zwischen zwei Laserimpulsen.

In Abbildung 3.8 rechts ist der Querschnitt einer Probenküvette gezeigt. Zwei Fenster aus CaF_2 (oder BaF_2) mit einem Abstandhalter aus Teflon dazwischen werden mit zwei Aluminiumplatten zusammengehalten. CaF_2 und BaF_2 sind im mittleren Infraroten transparent. Die Dicke des Abstandhalters definiert die Schichtdicke der Küvette. Eine Gummischeibe und eine weitere Teflonscheibe befinden sich zur Dämpfung zwischen dem Fenstermaterial und den Aluminiumplatten. Die obere CaF_2 -Scheibe besitzt zwei Bohrungen als Zugang zum

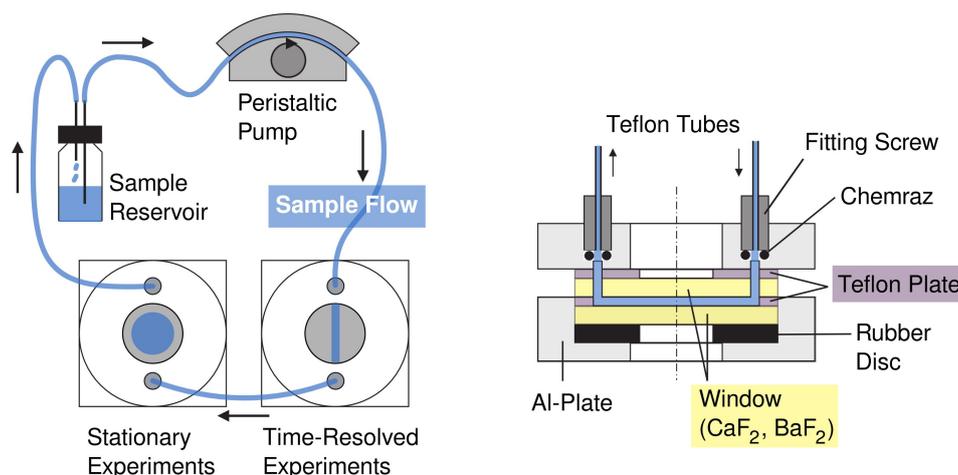


Abb. 3.8.: a) Probenkreislauf mit zwei Infrarotküvetten zur Aufnahme von stationären Absorptionsspektren (links mit großer Apertur) und für die zeitaufgelösten Messungen (rechts mit 2 mm breitem Kanal). Die Probenflüssigkeit wird mit einer Walkpumpe aus dem Vorratsgefäß in den Küvetten umgepumpt. b) Querschnitt durch eine Infrarotküvette. Die Fenster bestehen aus CaF_2 (oder BaF_2), das im MIR transparent ist. Die Schichtdicke der Probe wird von der Dicke der Teflonscheibe zwischen den CaF_2 -Fenstern bestimmt. Die weiteren Komponenten (Gummischeibe, Befestigungsschraube und Chemraz-Ring) dienen zur Abdichtung des Keislaufs.

Zwischenraum der Scheiben. Die Öffnungen der Teflonschläuche des Kreislaufs werden mit Schrauben mit den Bohröffnungen des CaF_2 -Fensters verbunden. An dieser Verbindungsstelle befinden sich Dichtungsringe aus Chemraz (Perfluorelastomer, chemisch inertes Material) zur Abdichtung des Übergangs.

Sowohl bei den Messungen zum Dewar-Schaden als auch bei den Messungen zum Photohydrat wurde BaF_2 als Fenstermaterial verwendet. Es zeigte sich, dass in CaF_2 unter UV-Anregung zusätzliche Signale im Bereich von 10 bis 100 ps auftreten. Diese Signale werden möglicherweise durch Zwei-Photonen-Absorption, Verunreinigungen im Fenstermaterial oder durch Bildung von Farbzentren verursacht [Tan01, Tsu02]. In einer Versuchsreihe mit verschiedenen Fenstermaterialien erwies sich BaF_2 als geeignet, da diese Signale hier nur in sehr abgeschwächter Form auftreten [Kub09].

3.3. Transiente Spektroskopie im Nanosekundenbereich

Bei der Transienten Spektroskopie gehen viele Fragestellungen über den Zeitbereich von wenigen Nanosekunden hinaus, der sich durch eine mechanische Verzögerung von Anregungs- und Abtastimpulsen erzielen lässt. Die Verwendung eines zweiten Lasersystems zur Anregung und eine elektronische Verzögerung der Anregungs- und Abtastimpulse ermöglichen es, transiente Spektren vom Nano- bis in den Mikrosekundenbereich aufzunehmen. Im folgenden Abschnitt wird eine kurze Beschreibung des Aufbaus und der Methode der elektronischen Verzögerung der Anregungs- und Abtastimpulse für die Experimente im Nanosekundenbereich gegeben.

3.3.1. Der Nanosekundenlaser

Bei dem Laser handelt es sich um ein Modell der Firma AOT (Advanced Optical Technology Ltd.). Es ist ein auf Nd:YVO₄-Kristallen basierendes diodengepumptes Nanosekundensystem. Das Lasersystem besteht aus einem Verstärker, in dem intensive Impulse bei 1064 nm aus einem gütegeschalteten Oszillator erzeugt werden. Sowohl der Oszillator als auch der Verstärker werden mittels AlGaAs-Dioden gepumpt und enthalten Nd:YVO₄-Kristalle als aktives Medium. Im Anschluss an die Verstärkung lassen sich durch austauschbare Module die zweite (532 nm), dritte (355 nm) und vierte Harmonische (266 nm) der Laserfundamentalen erzeugen. In Tabelle 3.2 befinden sich die wichtigsten Parameter des Lasersystems.

Parameter des Nanosekundenlasersystems	
Repetitionsrate	bis zu 25 kHz
Impulsdauer	0.7 ns FWHM bei 5 kHz 1 ns FWHM bei 25 kHz
Zentralwellenlänge	1064 nm
Impulsenergie bei 1 kHz und	
1064 nm	100 μ J
532 nm	40 μ J
355 nm	28 μ J
266 nm	8 μ J
Jitter zu externem Trigger	± 0.5 ns oder weniger

Tabelle 3.2.: Technische Daten des Nanosekundenlasersystems

3.3.2. Synchronisation des Nanosekunden- mit dem Femtosekundenlaser

Zur Durchführung eines Anreg-Abtast-Experiments muss der oben beschriebene Nanosekundenlaser mit dem Femtosekundensystem synchronisiert werden. In Abbildung 3.9 ist dies schematisch dargestellt. Eine ausführlichere Beschreibung der Synchronisation und die Charakterisierung des Aufbaus befindet sich in [Str10].

Die elektronische Steuerung des Femtosekundenlasers („Spitfire Control“) liefert den Trigger⁵ für zwei hintereinander geschaltete Verzögerungsgeneratoren. Dieses TTL-Signal bestimmt, welcher Impuls im fs-Resonator verstärkt wird. Folglich wird der Anreg-Abtast-Vorgang bei diesem Nanosekundenexperiment durch die Abtastimpulse geregelt. Jeder Anregungsimpuls wird von dem zeitlich vorhergehenden Abtast-Triggersignal ausgelöst. Im Aufbau wird im ersten Verzögerungsgenerator zusätzlich zum Triggersignal auch die Schwingung des Oszillators bei 82 MHz (clock) eingebunden. Das Oszillatorsignal fungiert als innere Uhr, wodurch der Jitter, den die Verzögerungsgeneratoren verursachen, minimiert wird [Str10]. Der Einsatz von zwei hintereinander geschalteten Verzögerungsgeneratoren ermöglicht es Absorptionsänderungen vor dem Zeitnullpunkt, das heißt wenn der Abtastimpuls zeitlich vor

⁵engl.: Auslöseimpuls

3.3. Transiente Spektroskopie im Nanosekundenbereich

dem Anregungsimpuls liegt, aufzunehmen. Außerdem hat ein einzelner Verzögerungsgenerator Schwierigkeiten ein Signal zu empfangen und es gleichzeitig weiterzugeben, wie es nahe des Zeitnullpunkts der Fall wäre. Das Hintereinanderschalten von zwei Verzögerungsgeneratoren verhindert dies.

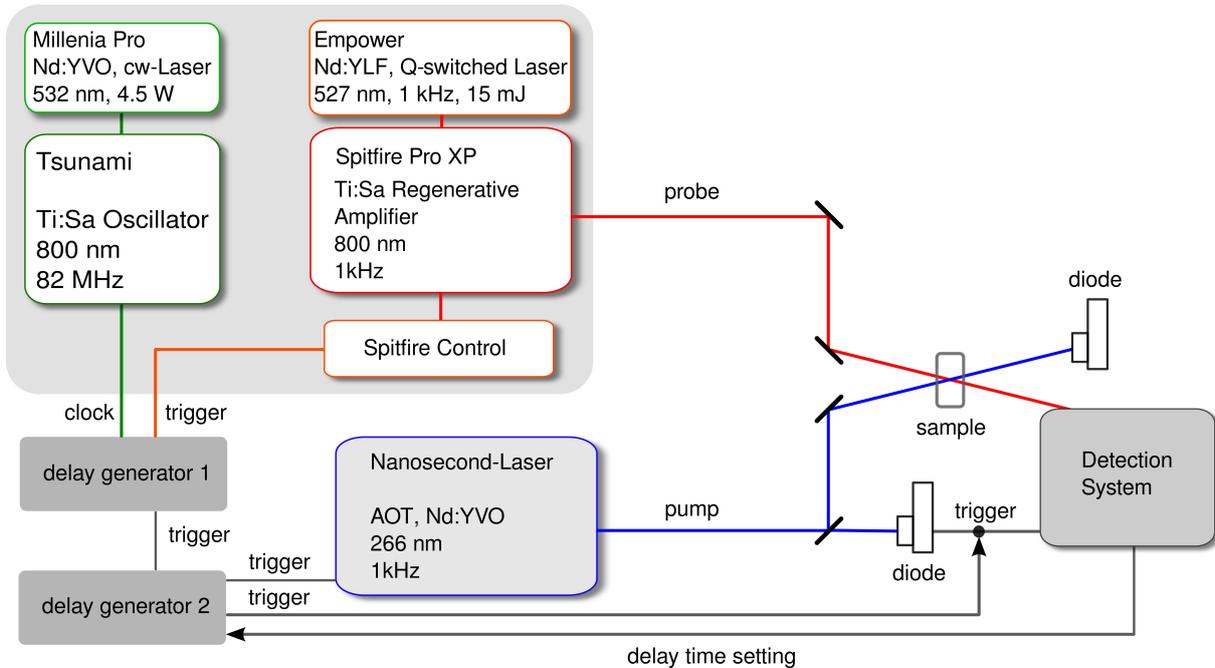


Abb. 3.9.: Schematische Darstellung des Aufbaus zur Durchführung von zeitaufgelösten Experimenten im Nano- bis Mikrosekundenbereich. Der Femtosekundenlaser liefert den Trigger für die Verzögerungsgeneratoren. Die Verzögerungszeit wird durch die Detektionselektronik gesteuert und an den zweiten Verzögerungsgenerator weitergegeben. Der Nanosekundenlaser erhält seinen Trigger vom zweiten Verzögerungsgenerator. Die Anregungsimpulse werden mit einer Diode aufgenommen, damit Messpunkte mit und ohne Anregung voneinander unterschieden werden können. Gemeinsam mit einem Signal vom zweiten Verzögerungsgenerator entsteht hieraus der Trigger für das Detektionssystem.

Der Ablauf der Signalgebung, die eine definierte zeitliche Verzögerung der Anregungs- und Abtastimpulse steuert, funktioniert wie folgt: Der erste Verzögerungsgenerator erhält sein Signal von der elektronischen Steuerung des Femtosekundenlasers und gibt es mit einer festen Verzögerung von $900 \mu\text{s}$ an den zweiten Verzögerungsgenerator weiter. Dieser stellt die eigentliche variable Verzögerungszeit zwischen den Anregungs- und Abtastimpulsen ein und wird von der Detektionselektronik mit dem zeitlich vorhergehenden Abtastimpuls gesteuert (delay time setting). Das Triggersignal wird nun zum einen an den Nanosekundenlaser zum Auslösen des Anregungsimpulses und zum anderen an die elektronische Steuerung eines Unterbrecherrades, welches jeden zweiten Anregungsimpuls abblockt, weitergegeben. Letzteres ermöglicht die Aufnahme von Spektren mit und ohne Anregung und damit die Bildung der Differenzspektren. Zur Unterscheidung zwischen Spektren mit und ohne Anregung werden die Anregungsimpulse zusätzlich von einer Diode aufgenommen. Dieses Signal wird gemeinsam mit dem Triggersignal des zweiten Verzögerungsgenerators verarbeitet und an die Detektionselektronik weitergegeben damit der Detektionsvorgang ausgelöst wird.

Die Zeitliche Auflösung der Nanosekundenanlage wird im Wesentlichen durch den Jitter der Anregungs- und Abtastimpulse zueinander und der Impulsdauer des Nanosekundenlasers bestimmt. In [Str10] wird der Aufbau genau charakterisiert und die Zeitauflösung des Experiments zu 0,6 ns bestimmt. Die maximal mögliche Messzeit beträgt 90 μ s. Sie wird durch die Repetitionsrate von 1 kHz des Lasersystems und der Notwendigkeit die Probenflüssigkeit innerhalb zwei aufeinanderfolgender Laserimpulse am Probenort auszutauschen bestimmt.

Das Auflösungsvermögen der Signalamplitude liegt bei weniger als 40 μ OD und ist bei diesem Aufbau vergleichbar mit dem Auflösungsvermögen des Femtosekundenexperiments, da die selbe Abtastimpulserzeugung und Detektionseinheit verwendet wird. Die Impuls-zu-Impuls-Schwankung des Nanosekundenlasers liegt zwar bei circa 2 %, hat aber im Gegensatz zum Abtastlicht einen geringen Einfluss auf das Amplitudenauflösungsvermögen. Das Nanosekundenexperiment ist so aufgebaut, dass sich der Messablauf und die weitere Verarbeitung der Daten nur wenig von denen eines Femtosekundenexperiments mit mechanischer Zeitverzögerung unterscheidet. Der im Folgenden beschriebene weitere Messablauf schließt das Nanosekundensystem mit ein.

3.4. Messablauf und Datenverarbeitung

Dieser Abschnitt dient der Beschreibung der Durchführung eines Femtosekunden-Experiments mit dem bisher beschriebenen experimentellen Aufbau. Es wird auf die wichtigsten Schritte wie die Justage des Messaufbaus, die Bestimmung der Apparatefunktion und die Methode der Datenaufnahme eingegangen.

3.4.1. Justage des Messaufbaus und Apparatefunktion

Der räumliche Überlapp der Anregungs- und Abtastimpulsen muss während einer Messung bei jeder Position der mechanischen Verzögerungsstrecke gewährleistet sein. Dies wird mit einer Klinge an der Überlapp-Position überprüft. Die Klinge wird jeweils in vertikaler und horizontaler Richtung so positioniert, dass die Hälfte der Intensität des Anregungsimpulses transmittiert wird. Unter Beobachtung der Transmission beim Verfahren der Verzögerungsstrecke von der Anfangs- bis zur Endposition kann die Stabilität des räumlichen Überlapps am Probenort kontrolliert werden werden.

Zusätzlich zum räumlichen Überlapp muss auch der zeitliche Überlapp und damit der zeitliche Nullpunkt der Messung genau bestimmt werden. Dies lässt sich mit einer Anreg-Abtast-Messung an einer Germanium-Platte (Dicke 200 μ m) durchführen. Germanium absorbiert im gesamten UV- und sichtbaren Spektralbereich (Bandkante bei \sim 0.7 eV). Bei Anregung durch einen UV-Impuls gelangen im Germanium Elektronen aus dem Valenzband in das Leitungsband. Die freien Ladungsträger absorbieren dadurch im infraroten Spektralbereich. Bei einer zeitaufgelösten Absorptionsmessung erhält man beim Eintreffen des Anregungsimpulses einen nahezu instantanen Signalanstieg. Anhand dieses Signals lässt sich der Zeitnullpunkt mit hoher Genauigkeit einstellen. Zusätzlich ist es möglich den räumlichen Überlapp durch Beobachtung des maximalen Differenzsignals zu optimieren. Anhand der zeitaufgelösten Messung an Germanium lässt sich auch die Apparatefunktion bestimmen. Unter der Annahme einer instantanen Erzeugung freier Ladungsträger gibt der Signalanstieg den Verlauf

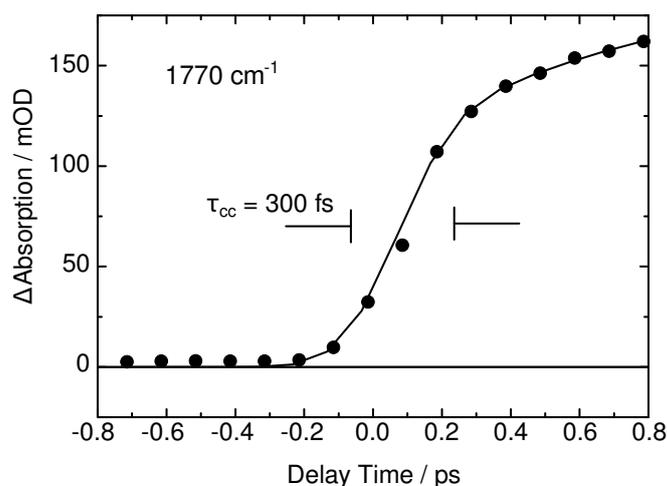


Abb. 3.10.: Ergebnis einer zeitaufgelösten Messung an Germanium. Gezeigt ist der Verlauf der Absorptionsänderung bei 1770 cm^{-1} (schwarze Punkte). Die UV-Anregungsimpulse erzeugen in Germanium freie Ladungsträger, die im Infraroten absorbieren. Unter der Annahme einer instantanen Änderung lässt sich aus dem Anstieg der Kurve die Apparatefunktion bestimmen. Die Datenanpassung (schwarze Linie) ergibt einen Wert von 300 fs für die Kreuzkorrelationsbreite.

der Apparatefunktion wieder. Der Signalanstieg setzt sich bei gaußförmigen Impulsen aus der Faltung einer Stufenfunktion mit der gaußförmigen Kreuzkorrelationsfunktion aus Anregungs- und Abtastimpuls (Apparatefunktion) zusammen. In Abbildung 3.10 ist ein solcher zeitlicher Verlauf des Signals bei 1770 cm^{-1} in Germanium gezeigt. Aus der Datenanpassung einer Stufenfunktion gefaltet mit einer Gaußfunktion erhält man die Kreuzkorrelationsbreite τ_{cc} , der Apparatefunktion. Daraus lässt sich mit

$$\tau_{cc}^2 = \tau_{Anreg}^2 + \tau_{Abtast}^2 \quad (3.2)$$

die Impulsdauer der Anregungsimpulse bestimmen, da die Impulsdauer der Abtastimpulse im Experiment aus Vorcharakterisierungen bekannt ist [Sch02, Sie05]. In den Messungen mit Anregungsimpulsen mit einer Zentralwellenlänge von 325 nm betragen die Werte der Kreuzkorrelationsbreite 200 bis 300 fs. Mit einer Impulsdauer der Abtastimpulse von etwa 150 fs erhält man für die Impulsdauer der Anregungsimpulse einen Wert von etwa 150 -250 fs.

Der Bündeldurchmesser am Probenort wird wie bei der Einstellung des räumlichen Überlapps über eine mechanisch verstellbare Klinge bestimmt. Die Klinge wird im Strahlengang des Anregungs- bzw. des Abtastlichts am Probenort in horizontaler und vertikaler Richtung in regelmäßigen Abständen von etwa 5 bis $10 \mu\text{m}$ verschoben. Die dabei aufgenommene Intensität des transmittierten Lichts wird in Abhängigkeit der Verstellpositionen der Klinge aufgetragen. Man erhält dadurch das Integral des Intensitätsverlaufs in horizontaler und vertikaler Richtung, was die Berechnung des Bündeldurchmessers am Probenort erlaubt. Der Bündeldurchmesser (FWHM⁶) der Anregungsimpulse liegt in den Messungen bei etwa $180 \mu\text{m}$, die der MIR-Abtastimpulse bei $90 \mu\text{m}$. Dies ermöglicht einen guten räumlichen Überlapp am Probenort.

⁶FWHM = Full Width Half Maximum

3.4.2. Datenaufnahme und -verarbeitung

Bei der zeitaufgelösten Infrarot-Spektroskopie wird die in der Probe erzeugte Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t_D)$ in Abhängigkeit der Wellenlänge und der Verzögerungszeit zwischen Anregungs- und Abtastimpuls gemessen. Dies erhält man, indem zunächst die Intensität der Abtastimpulse in Abhängigkeit der Wellenlänge λ und für jede Position t_D des Schrittmotors mit und ohne Anregung der Probe ermittelt wird. Dabei wird die Intensität mit Anregung mit $I_{Signal}^{mit}(\lambda, t_D)$, die Intensität ohne Anregung mit $I_{Signal}^{ohne}(\lambda, t_D)$ bezeichnet. Diese Werte erhält man durch die Verwendung des Unterbrecherrades im Anregungsweig, das jeden zweiten Impuls abblockt. Die Intensitätswerte werden über die Zahl N von Laserimpulsen gemittelt, um eine höhere Messgenauigkeit zu erreichen. Vor einer Messung werden zudem Werte für die Dunkelströme $\bar{I}_{dunkel}^{ohne}(\lambda)$ und $\bar{I}_{dunkel}^{mit}(\lambda)$ (Werte der Detektoren ohne Abtastlicht) ohne und mit Anregungslicht für jede Wellenlänge aufgenommen und wiederum über die Anzahl N gemittelt:

$$\bar{I}_{dunkel}^{ohne}(\lambda) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N I_{dunkel,i}^{ohne}(\lambda) \quad (3.3)$$

$$\bar{I}_{dunkel}^{mit}(\lambda) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N I_{dunkel,i}^{mit}(\lambda) \quad (3.4)$$

Die gemittelten Dunkelstromwerte werden dann bei der jeweiligen Wellenlänge von den Messsignalen $I_{Signal}^{mit}(\lambda, t_D)$ und $I_{Signal}^{ohne}(\lambda, t_D)$ vor der Mittelung wie folgt abgezogen.

$$\bar{I}_{Signal}^{ohne}(\lambda, t_D) = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N [I_{Signal,j}^{ohne}(\lambda, t_D) - \bar{I}_{dunkel}^{ohne}(\lambda)] \quad (3.5)$$

$$\bar{I}_{Signal}^{mit}(\lambda, t_D) = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N [I_{Signal,j}^{mit}(\lambda, t_D) - \bar{I}_{dunkel}^{mit}(\lambda)] \quad (3.6)$$

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz erhält man nun den Zusammenhang zwischen der gemessenen Intensität und der Absorptionsänderung ΔA mit

$$\bar{I}_{Signal}^{mit} = I_{Signal}^{ohne} \cdot 10^{\Delta A} \quad (3.7)$$

$$\Delta A(\lambda, t_D) = -\log \frac{I_{Signal}^{mit}(\lambda, t_D)}{I_{Signal}^{ohne}(\lambda, t_D)} = -\log \bar{S}(\lambda, t_D) \quad (3.8)$$

Der Wert $\bar{S}(\lambda, t_D)$ ist das von dem Messcomputer aufgenommene Signal. Die Darstellung in Einheiten der Absorptionsänderung wird dann von dem Messprogramm durchgeführt.

3.4.3. Datenanpassung

Nachdem mehrere Messbereiche wie oben beschrieben aufgenommen wurden, können diese zu einem einzigen Datensatz zusammengefasst werden. Hierfür und für die weitere Auswertung

der Daten steht das Auswerteprogramm Z20 basierend auf der Programmiersprache IDL (Fa. Research Systems Inc., Version 5.4) zur Verfügung [Sat04]. Es umfasst Programmfunktionen wie die Mittelung einzelner Scans und ermöglicht eine Visualisierung der Daten. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer globalen Datenanpassung, das heißt einer gleichzeitigen Anpassung der Daten über mehrere Wellenzahlen oder sogar des gesamten gemessenen Bereichs. Hierfür wird folgende Modellfunktion verwendet:

$$\Delta A(\lambda_{Abtast}, t_D) = \sum_{i=1}^N \int_0^{\infty} a_i(\lambda_{Abtast}, \tau_i) \cdot \exp^{-t/\tau_i} \cdot K(t_D - t) dt. \quad (3.9)$$

Sie besteht aus einer Summe von Exponentialfunktionen, die mit der Kreuzkorrelationsfunktion von Anregungs- und Abtastimpuls $K(t_D - t)$ gefaltet wird. Für gaußförmige Impulse und mit deren Kreuzkorrelationsbreite τ_{cc} gilt:

$$\Delta A(\lambda_{Abtast}, t_D) = \sum_{i=1}^N a_i(\lambda_{Abtast}, \tau_i) \cdot \exp\left[\frac{\tau_{cc}^2}{4\tau_i^2} - \frac{t}{\tau_i}\right] \cdot \frac{1 - \operatorname{erf}\left(\frac{t}{\tau_{cc}} - \frac{\tau_{cc}}{2\tau_i}\right)}{2}. \quad (3.10)$$

Dabei ist $\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x \exp^{-t^2} dt$ die sogenannte Fehlerfunktion (engl.: errorfunction) und die Faktoren $a_i(\lambda_{Abtast}, \tau_i)$ geben zu jeder Zeitkonstante τ_i das dazugehörige Amplitudenspektrum an. Die Datenanpassung erfolgt mit einem modifizierten Levenberg-Marquardt-Algorithmus nach der Methode der kleinsten Quadrate. Über eine Summe von Exponentialfunktionen können beispielsweise Ratengleichungssysteme angepasst werden [Zin93]. Solche Ratengleichungssysteme erhält man durch die Beschreibung von Übergängen von definierten, thermisch relaxierten Zuständen [Spö01]. In der Realität können in den Messsignalen jedoch Relaxationsvorgänge innerhalb dieser Zustände vorkommen. Insbesondere bei der zeitaufgelösten Spektroskopie im Infraroten sind im Bereich von Pikosekunden Schwingungsrelaxationen zu beobachten. Diese Signale sind nur schwer vom Reaktionssignal zu trennen, besonders wenn die Zeitkonstanten von Reaktion und Relaxation nahe beieinander liegen.

3.5. Stationäre Charakterisierung und Bestimmung der Quantenausbeute

Im Zuge eines jeden fs-Experiments ist eine ausführliche Charakterisierung der Probe im Hinblick auf die Bestimmung des zu messenden Spektralbereichs im MIR, der Anregungswellenlänge und der damit verbundenen Wahl des geeigneten Lösungsmittels, der Konzentration der Probenlösung und der Schichtdicke der Infrarotküvette notwendig. Dafür werden vor und nach einem fs-Experiment von der Probenlösung stationäre Absorptionsspektren im UV bis sichtbaren und im infraroten Spektralbereich aufgenommen. In dieser Arbeit wurden die stationären Absorptionsspektren im UV und sichtbaren Spektralbereich (200 - 800 nm) mit einem Spektrometer der Firma Perkin Elmer (Lambda 750) gemessen. Für die Aufnahme der Absorptionsspektren im Infraroten (1000 - 5000 cm^{-1}) stand ein FTIR⁷-Spektrometer (Fa. Bruker, Modell:

⁷FTIR = Fourier Transform Infra Red

3. Experimentelle Techniken

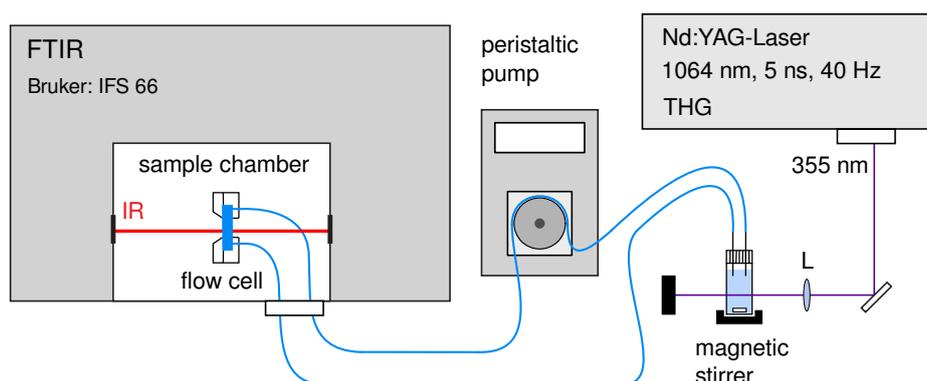


Abb. 3.11.: Aufbau zur Messung der Quantenausbeute der Bildung des Dewar-Valenzisomers. Die Aufnahme der Infrarotspektren erfolgt in einem FTIR-Spektrometer mit einer Infrarotküvette. Zur Belichtung wird die Probenlösung mit einer Walkpumpe in eine Quartzglasküvette gepumpt und mit der dritten Harmonischen eines Nd:YAG-Lasers bei 355 nm belichtet.

IFS66) zur Verfügung. Die Quantenausbeute für die Reaktion zum Dewar-Valenzisomer lässt sich sehr gut im infraroten Spektralbereich der CO-Streckschwingungen bestimmen. Bei der Bildung des Dewar-Isomers entkoppelt eine der drei CO-Banden und verschiebt sich in den gut separierten Bereich höherer Wellenzahl bei 1781 cm^{-1} . Bei dieser Markerbande kann nun die Absorptionsänderung in Abhängigkeit der Belichtungsdauer aufgenommen und daraus die Quantenausbeute für die Reaktion zum Dewar-Valenzisomer ermittelt werden. Der Aufbau hierzu ist in Abbildung 3.11 gezeigt. Die Aufnahme des Infrarotspektrums der Probe erfolgt über das oben erwähnte FTIR-Spektrometer. Dazu wird der in Abschnitt 3.2.4 beschriebene Probenkreislauf mit großer Apertur verwendet. Zur Belichtung der Probe wird die Lösung mit einer Walkpumpe (Fa. Ismatec) aus der Infrarot-Küvette in eine Quartzglasküvette gepumpt. Die Quartzküvette besitzt eine 4 mm breite und 10 mm lange Grundfläche. Dadurch lässt sich eine relativ kleine Probenmenge von 1 ml effektiv ausleuchten. Zur Belichtung wird ein Nd:YAG-Laser (NY60, Fa. Continuum) verwendet. Die Grundwellenlänge von 1064 nm mit etwa 5 ns Dauer wird laserintern zur dritten Harmonischen bei 355 nm konvertiert und mit einer Linse (L) auf die Quartzglasküvette abgebildet. Die Belichtung erfolgt mit einer Repetitionsrate von 50 Hz. Während der Belichtung wird die Probenlösung mit einem Magnetrührer umgerührt. Die Bestimmung der Anregungsenergie erfolgt im Vorfeld über eine Aktinometer-Messung, bei der ein identisches Belichtungsexperiment mit einer Substanz mit bekannter Quantenausbeute durchgeführt wird.

4. Die Bildung des Dewar-Valenzisomers

Die Rolle der Dewar-Isomerisierung des (6-4)-Schadens in DNA wird bezüglich ihrer Mutagenität bis heute intensiv diskutiert (siehe Kapitel 2). Fest steht, dass die Reaktion durch die Absorptionseigenschaften des (6-4)-Schadens im UV-A/B-Bereich einen besonderen Status einnimmt. Eine Analyse der Reaktionsdynamik der Dewar-Isomerisierung, insbesondere der Dewar-Bildung im (6-4)-Schaden in DNA, war jedoch bisher nicht bekannt.

In diesem Kapitel werden die experimentellen Ergebnisse beschrieben, die Aufschluss über die Sekundärreaktion des (6-4)-Schadens zum Dewar-Valenzisomer geben. Anhand eines Modellsystems bestehend aus einem Thymin-Dinukleotid mit einer (6-4)-Verbindung wird die Reaktion mit stationären und zeitaufgelösten spektroskopischen Methoden analysiert. Dabei werden die besonderen Absorptionseigenschaften des Dewar-Isomers im Infraroten ausgenutzt. Die Dewar-Form zeigt eine spektrale Verschiebung einer der drei C=O-Banden im Dinukleotid. Dies führt zu einer eindeutigen spektralen Signatur, die es erlaubt die Dewar-Bildung in zeitaufgelösten Messungen im infraroten Spektralbereich nachzuvollziehen.

Im Folgenden wird zunächst eine Beschreibung eines verbrückten (6-4)-Dinukleotids, das als Modellsystem eingesetzt wird, vorgenommen. Darauf folgt eine spektrale Charakterisierung, in der die Marker-Bande zur Dewar-Bildung identifiziert wird. Anhand dieser Markerbande lässt sich zunächst die Quantenausbeute der Reaktion bestimmen. Der Hauptteil des Kapitels befasst sich mit den zeitaufgelösten Experimenten auf einer Zeitskala von Piko- bis Mikrosekunden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich die Zeitkonstante der Dewar-Bildung ermitteln und der Reaktionsweg nachvollziehen. Des Weiteren werden die zeitaufgelösten Messergebnisse an der modifizierten DNA-Base 1-Methyl-2-Pyrimidinon beschrieben. Dieses Molekül besitzt ähnliche photophysikalische Eigenschaften, bildet jedoch keine nachweisbare Dewar-Form. In einem weiteren Teilkapitel werden theoretische Berechnungen zur Dewar-Bildung vorgestellt, die in der Gruppe von Prof. de Vivie-Riedle durchgeführt wurden und die experimentellen Ergebnisse vervollständigen. Den Abschluß dieses Kapitels bilden die Zusammenfassung und die Diskussion der Messergebnisse und der theoretischen Berechnungen am T(6-4)T-Dinukleotid und dem Monomer im Bezug auf die Bildung des Dewar-Isomers.

4.1. Das Modellsystem

Eine Reihe von Untersuchungen haben ergeben, dass das (6-4)-Photoprodukt von Dipyrimidinen sehr effektiv unter Einwirkung von UV-Licht in sein Dewar-Isomer umgewandelt wird [Per00, Dou01, Rav01]. Diese Photoisomerisierung führt im Molekül zu einer Strukturänderung, die im Infrarotspektrum deutlich hervortritt. Deshalb wurde in der Gruppe von Prof. Carell ein Modellsystem in Form eines Dinukleotids synthetisiert, bei dem zwei Thymidine sowohl über das Desoxiribose-Rückgrat als auch über ein (6-4)-Photoprodukt verbunden sind. In den Untersuchungen zur Dewar-Bildung wurde dieses modifizierte Dinukleotid verwendet. Die Struktur des Modellsystems ist in Abbildung 4.1 gezeigt. Die Thymidine

4. Die Bildung des Dewar-Valenzisomers

bilden über ihre jeweiligen C₄- und C_{6'}-Atome das (6-4)-Photoprodukt aus (blau gekennzeichnet) und sind am Desoxiribose-Rückgrat über eine bio-isosterische Formacetal-Verbrückung (O – CH₂ – O, gelb gekennzeichnet) anstelle der in DNA vorkommenden Phosphodiester-Verbrückung (O – PO₂ – O) verbunden. Durch Belichtung im UV-B/A-Bereich (290 bis

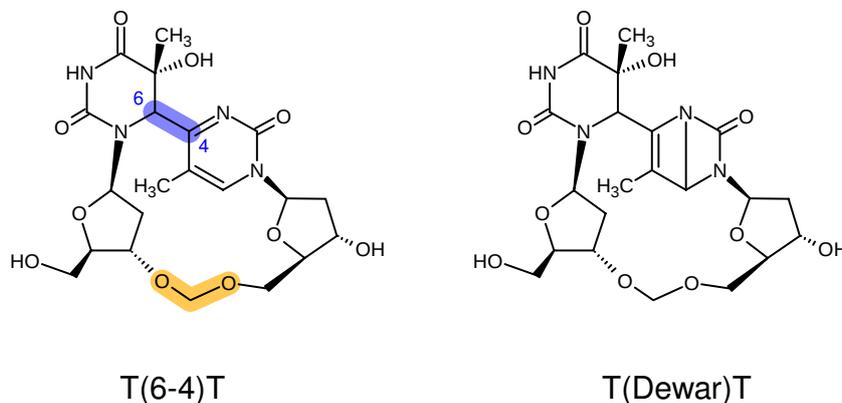


Abb. 4.1.: Strukturformeln des T(6-4)T-Dinukleotids (links) und seines Dewar-Valenzisomers (rechts). In blau ist die Bindung der Kohlenstoffatome markiert, die den (6-4)-Schaden ausbilden. Die Formacetal-Verbrückung (O-CH₂-O) im Desoxiribose-Rückgrat ist gelb unterlegt.

400 nm) entsteht das Dewar-Valenzisomer (Abbildung 4.1 rechts) in einer der Thymin-Basen in Form zweier vieratomiger Ringe. In Abbildung 4.2 ist das Ergebnis der Geometrieoptimierung nach der ONIOM(CAS(12/9):HF/6-31G*)-Methode [Fin10] des T(6-4)T-Dinukleotids und seines Dewar-Isomers gezeigt. Im Vordergrund ist jeweils das Thymin zu sehen, welches die Isomerisierungsreaktion zum Dewar-Isomer durchläuft. Im Vergleich zum Monomer ist dieses Thymin durch den (6-4)-Schaden und die Verbrückung über das Desoxiribose-Rückgrat geringfügig in seiner Planarität gestört. Ein Vergleich der Dinukleotide mit der hier verwendeten Formacetal-Verbrückung mit der nativen Phosphodiester-Verbrückung ergab eine nahezu identische Störung der Planarität bei beiden Rückgrat-Formen [Fin10]. Dies bestätigt die Vergleichbarkeit des Modellsystems mit der nativen Form. In Abbildung 4.2 rechts ist die charakteristische Doppelring-Struktur des Dewar-Isomers zu erkennen. Der Bruch des π -Systems bei dieser Isomerisierung führt zu einer deutlichen Veränderung im Schwingungsspektrum des Moleküls.

Die Wahl des Lösungsmittels

Bei der Infrarotspektroskopie spielt die Wahl des Lösungsmittels eine wichtige Rolle. Neben der Löslichkeit ist dabei entscheidend, dass sich im spektralen Messbereich der Probensubstanz keine starke Absorptionen des Lösungsmittels befinden, die eine Signalaufnahme erschweren. Bei biologisch relevanten Proben besteht zudem die Vorgabe eine möglichst native Umgebung der Probensubstanz zu gewährleisten. H₂O besitzt im für die IR-Spektroskopie relevanten Spektralbereich (1300 bis 1800 cm⁻¹) bei 1640 cm⁻¹ eine intensive Absorptionsbande der CH-Biegeschwingung [Lib94]. In diesem Bereich ist die Absorption bei der verwendeten Schichtdicke der Küvette von 90 μ m sehr hoch (Optische Dichte > 2). Bei allen experimentellen

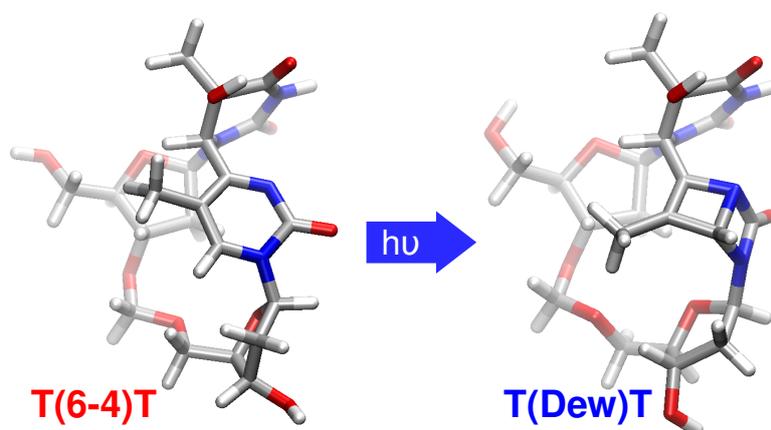


Abb. 4.2.: Dreidimensionale Ansicht des T(6-4)T-Dimers (links) und des T(Dew)T-Dimers (rechts) nach der Geometrieoptimierung [Fin10]. Im Vordergrund ist jeweils das Thymin, das zum Dewar-Isomer reagiert.

Untersuchungen, das heißt bei den stationären Aufnahmen und den zeitaufgelösten Messungen, ist die Probensubstanz deshalb in schwerem Wasser (D_2O) gelöst. Nach der Deuterierung verschiebt sich die Bande der CH-Biegeschwingung zu niedrigeren Wellenzahlen mit einem Maximum bei 1210 cm^{-1} [Mar91]. Der Messbereich von 1400 bis 1900 cm^{-1} wird dadurch spektroskopisch zugänglich.

4.2. Stationäre Experimente zum Nachweis des Dewar-Valenzisomers

In diesem Abschnitt werden die experimentellen Ergebnisse aus den stationären Messungen zur Reaktion des (6-4)-Schadens zum Dewar-Valenzisomer vorgestellt. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der charakteristischen Absorptionseigenschaft des Dewar-Isomers im infraroten Spektralbereich. Diese erlaubt einen eindeutigen Nachweis der Reaktion in den zeitaufgelösten Messungen. Zunächst werden die stationären IR-Spektren mit der Dewar-Signatur beschrieben, dann wird auf die Absorptions- und Emissionseigenschaften im UV und sichtbaren Spektralbereich eingegangen. Der letzte Abschnitt dient der Bestimmung der Quantenausbeute für die Reaktion zum Dewar-Isomer anhand der Marker-Bande im infraroten Spektralbereich.

4.2.1. Dewar-Signatur im infraroten Spektralbereich

Die charakteristischen Absorptionseigenschaften des T(6-4)T-Dimers und des daraus resultierenden T(Dew)T-Dimers im infraroten Spektralbereich bilden die Grundlage der experimentellen Untersuchungen zum Nachweis des Dewar-Valenzisomers. In Abbildung 4.3 zeigt die rote Linie das Absorptionsspektrum des oben beschriebenen T(6-4)T-Dimers mit der Formacetal-Verbrückung gelöst in D_2O . In schwarz ist das Spektrum nach Belichtung mit

4. Die Bildung des Dewar-Valenzisomers

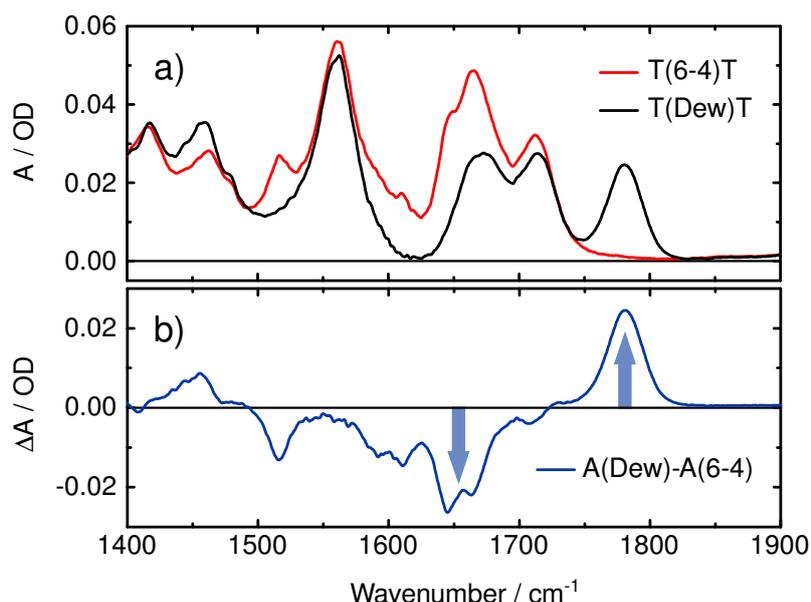


Abb. 4.3.: a) Stationäre Infrarotspektren des T(6-4)T-Dimers (rot) und des Dewar-Valenzisomers (schwarz) in D₂O. b) Differenzspektrum zwischen der Dewar-Form und dem (6-4)-Schaden.

UV-Licht bei 355 nm gezeigt. Eine Analyse der belichteten Probe mittels HPLC¹ ergab, dass darin zu 95 % das Dewar-Valenzisomer des Dimers enthalten ist. Im unteren Abschnitt ist das dazugehörige Differenzspektrum abgebildet.

Auffallend sind drei intensive Carbonyl-Banden (C=O-Schwingungen) im Bereich zwischen 1620 cm⁻¹ und 1800 cm⁻¹. Im Ausgangsspektrum des T(6-4)T-Dimers ist dieses Tripel als drei sich überlagernde Banden zu sehen. Nach Belichtung verschwindet eine dieser Banden und erscheint spektral isoliert bei 1781 cm⁻¹. Wie im Differenzspektrum in Abbildung 4.3 b am deutlichsten zu erkennen ist, äußert sich die Bildung des Dewar-Valenzisomers folglich durch eine Abnahme der Absorption bei 1645 cm⁻¹ und 1663 cm⁻¹ bei gleichzeitiger Zunahme bei 1781 cm⁻¹ (blaue Pfeile). Letzteres stellt eine eindeutige Signatur im Infraroten dar, die nicht durch andere Banden überlagert wird. Die Bande bei 1781 cm⁻¹ kann somit als Marker-Bande zur Identifikation der Dewar-Bildung angesehen werden. Die Signalabnahme bei 1516 cm⁻¹ kann dem Ausbleichen der C=C-Schwingung zugewiesen werden, die bei der Bildung T(Dew)T-Dimers und dem damit verbundenen Bruch des π-Systems entsteht. Die in den Ausgangsspektren in Abbildung 4.3 a auftretende Bande bei 1550 cm⁻¹ wird nicht T(6-4)T- oder T(Dew)T-Dimer zugeordnet, sondern resultiert aus einer Restmenge der bei der Synthese verwendeten Pufferlösung.

¹HPLC = „High-performance liquid chromatography“ oder manchmal auch „High-pressure liquid chromatography“

4.2.2. Absorptionseigenschaften im UV-Bereich und das Fluoreszenzspektrum

Neben der charakteristischen Signatur im Infraroten besitzt das T(6-4)T-Dimer auch eine besondere Absorptionseigenschaft im UV-A/B Bereich, das es von einer unverbundenen Dithymin-Sequenz unterscheidet. In Abbildung 4.4 sind die UV-Spektren des T(6-4)T-Dimers und seines Dewar-Isomers in Einheiten des Extinktionskoeffizienten gezeigt. Das Dewar-Spektrum entstand durch Belichtung der Probensubstanz, die für das T(6-4)T-Spektrum verwendet wurde. Der Extinktionskoeffizient kann mit einer Genauigkeit von etwa 10 % angegeben werden.

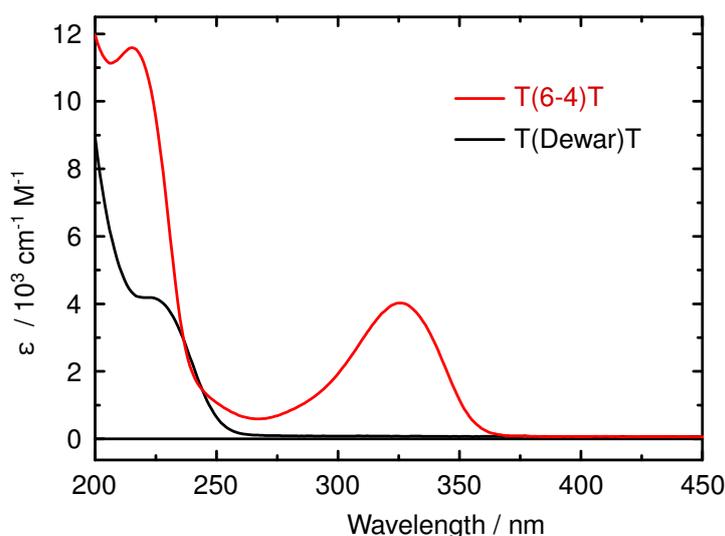


Abb. 4.4.: Stationäre Spektren des T(6-4)T-Dimers (rot) und des daraus entstandenen Dewar-Schadens (schwarz) im UV in Einheiten des Extinktionskoeffizienten. Die Werte des Extinktionskoeffizienten können mit einer Genauigkeit von 10 % angegeben werden.

Im Spektrum des T(6-4)T-Dimers tritt eine intensive Absorptionsbande mit einem Maximum bei 325 nm auf. Nach Belichtung mit UV-A/B-Licht verschwindet diese Bande. Der Sekundärschaden (das T(Dewar)T-Dimer) besitzt keine signifikante Absorption im UV-Bereich ab 250 nm. Das Verschwinden der Bande erklärt sich durch den Bruch des konjugierten π -Systems bei der Bildung des Dewar-Isomers. Das Ausbleichen der UV-Bande stellt somit einen zusätzlichen, wenn auch indirekten, Nachweis für die Bildung des Dewar-Valenzisomers dar.

In Abbildung 4.5 ist zusätzlich zum Absorptionsspektrum im UV/Vis-Bereich das Emissionsspektrum des T(6-4)T-Dimers gezeigt. Das Intensitätsmaximum des Fluoreszenzspektrums ist auf das Maximum der Bande bei 323 nm im UV-Spektrum normiert und besitzt ein Maximum bei 410 nm. Dies entspricht einer Stokes-Verschiebung von 6570 cm^{-1} . Durch Intergration des Fluoreszenzspektrums und dem Vergleich mit einem Referenzfarbstoff (Coumarin 120 in Ethanol, $\Phi_{fl}^{ref} = 98 \%$ aus [Bry08]), dessen Emission unter identischen Bedingungen aufgenommen wird, kann die Fluoreszenz-Quantenausbeute bestimmt werden. Für das T(6-4)T-Dimer erhält man einen Wert von 0.7 % bei Raumtemperatur. Über eine Analyse der Spektren nach S. Strickler und R. Berg [Str62] kann die strahlende Rate zu $k_r = 0.04 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt

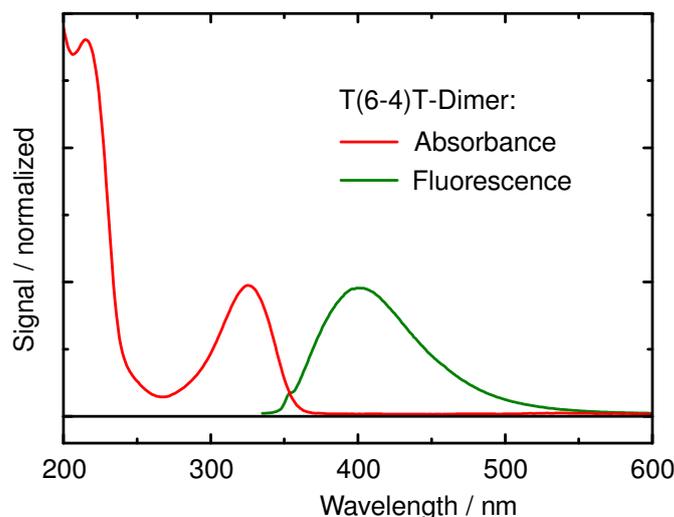


Abb. 4.5.: Vergleich des Absorptionsspektrums des T(6-4)T-Dimers (rot) mit seinem Emissionsspektrum (grün). Das Maximum des Emissionsspektrums wurde auf das Maximum des Absorptionsspektrums bei 323 nm normiert.

werden. Daraus lässt sich die Fluoreszenz-Lebensdauer von $\tau_{fl}^{(6-4)} = \Phi_{fl}^{(6-4)} / k_r \approx 175$ ps berechnen, die einen Hinweis auf die zu erwartende Größenordnung der Lebensdauer des angeregten Zustands gibt.

4.2.3. Bestimmung der Quantenausbeute der Dewar-Bildung

Die Bestimmung der Quantenausbeute der Reaktion des T(6-4)T-Dimers zum Dewar-Isomer wurde anhand der spektral isolierten Markerbande bei 1781 cm^{-1} im Infraroten durchgeführt. Durch die spektrale Isolation im hochfrequenten Bereich bietet sie einen direkten Zugang zum Produkt. Die T(6-4)T-Dimere wurden in D_2O gelöst. Die Konzentration wurde so gewählt, dass bei Belichtung in einer Küvette von 10 mm Länge das eingestrahle UV-Licht bei 355 nm praktisch vollständig absorbiert wird ($\text{OD}(355\text{ nm}) \geq 2$). Nach mehreren Belichtungsschritten des T(6-4)T-Dimers im Abstand von 2 bis 4 min zeichnet sich die Dewar-Markerbande im IR-Spektrum bei 1781 cm^{-1} ab (siehe Abbildung 4.6a). In Abbildung 4.6b ist die Absorptionsänderung bei 1781 cm^{-1} gegen die Belichtungsdauer in Minuten aufgetragen. Die Änderung der Absorption steigt zunächst näherungsweise linear an und geht nach etwa 40 bis 50 min Belichtungsdauer in eine Sättigungskurve über. Für kleine Strahlungs Dosen und kurze Belichtungsdauern kann die Steigung der Absorptionsänderung und damit der Konzentrationsänderung der Produktmoleküle als direkt proportional zur Quantenausbeute [Fis70] angenommen werden.

$$\Phi_{Dew} \sim \frac{\Delta c_{Dew}}{\Delta t} \sim \frac{\Delta A_{Dew}}{\Delta t} \text{ für } t \rightarrow 0. \quad (4.1)$$

Die experimentellen Daten lassen sich bis zu einer Belichtungszeit von etwa 35 min durch eine lineare Funktion anpassen. Aus deren Steigung wird, wie in Anhang C geschildert, die Quantenausbeute der Dewar-Isomerisierungsreaktion mit einem Wert von etwa $8\% \pm 2\%$

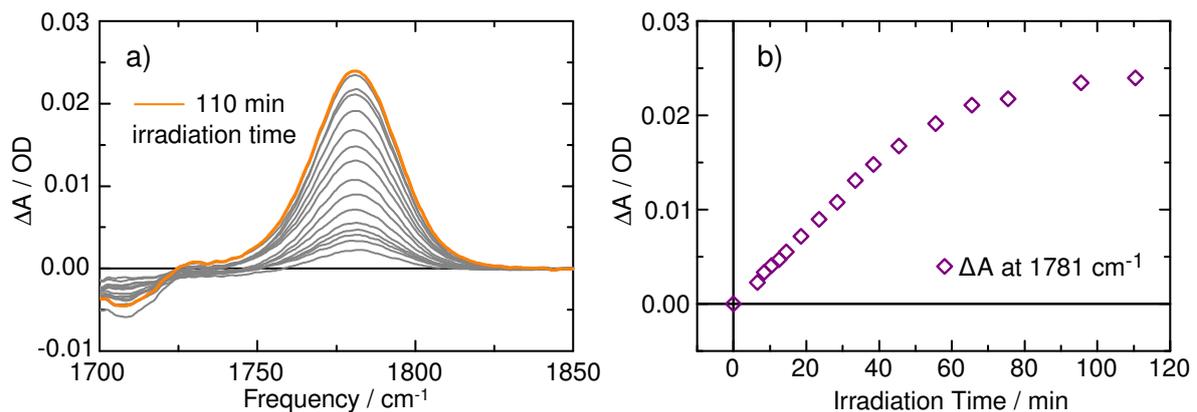


Abb. 4.6.: a) Ergebnis des Belichtungsexperiments an T(6-4)T-Dimeren in D_2O mit einer Belichtungswellenlänge bei 355 nm. Im IR-Spektrum ist unter Belichtung eine Zunahme der Absorption im Bereich der Dewar-Markerbande bei 1781 cm^{-1} zu beobachten (graue Linien). Die gelbe Linie repräsentiert das finale Spektrum nach 110 min Belichtungsdauer nach dem keine Absorptionsänderung mehr beobachtet wird. b) Absorptionsänderung bei 1781 cm^{-1} aufgetragen gegen die Belichtungszeit der Probe.

bestimmt. In der Literatur ist noch wenig über diesen Wert bekannt. In [Lem93] wurde mittels HPLC-Analyse ein Wert für die Quantenausbeute der Dewar-Bildung von 2 % gemessen. In diesem Fall wurde unter anderem ein Dinukleotid-Monophosphat (dTpdT) untersucht und die Quantenausbeute der Sekundärreaktion des T(6-4)T-Dimers zum Dewar-Isomer nach Belichtung mit UV-Licht bei 313 nm und einer Proben temperatur von $15 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ bestimmt. Bei der hier vorgestellten Messung der Quantenausbeute wurde ein Formacetal-verbrücktes T(6-4)-Dinukleotid statt eines Dinukleotid-Monophosphats verwendet. Die Anregung wurde bei einer Wellenlänge von 355 nm durchgeführt und die Belichtung fand bei Raumtemperatur ($\sim 23\text{ }^\circ\text{C}$) statt. Im Verlauf der Synthese des T(6-4)T-Dinukleotids wurde kein Einfluss der Art der Rückgrat-Verbrückung auf die Quantenausbeute festgestellt [Gla10]. Auch der Unterschied in der Anregungswellenlänge sollte keinen großen Einfluss haben, da sich diese in beiden Fällen im Bereich der (6-4)-Absorptionsbande bei 325 nm befindet. Die nachfolgenden Untersuchungen werden zeigen, dass die Reaktion zum Dewar-Isomer über eine Energiebarriere verläuft und damit eine temperaturabhängige Zeitkonstante besitzt. Daher ist es möglich, dass die Umgebungstemperatur auch die Quantenausbeute beeinflusst. Der Unterschied in der Proben temperatur in den beiden Experimenten könnte eine Erklärung für den Unterschied in der Quantenausbeute der Dewar-Bildung sein.

4.3. Zeitaufgelöste Experimente

Im folgenden Abschnitt werden die zeitaufgelösten Experimente besprochen, die über die Kinetik der Reaktion zum T(Dewar)T-Isomer Aufschluss geben. Im Vordergrund stehen die Messungen im infraroten Spektralbereich, in denen sich die Dewar-Isomerisierung durch das Auftreten einer charakteristischen Schwingungsbande nachweisen lässt. Dabei wird zunächst ein kurzer Überblick über die IR-Messungen gegeben, dann auf den Nachweis des Dewar-Isomers und die Zeitskala der Bildung eingegangen. Ein weiteres Unterkapitel befasst sich mit den

zeitaufgelösten IR-Messungen im Nanosekundenbereich, in dem zusätzliche Signaländerungen beobachtet werden. Ergänzend zu den Analysen im Infraroten werden zeitaufgelöste Experimente im UV/Vis-Bereich und Emissionsmessungen vorgestellt, die die Informationen über den photochemischen Reaktionspfad vervollständigen.

4.3.1. Femtosekundenspektroskopie im IR: Bildung des Dewar-Valenzisomers

Mit der T(6-4)T-Probensubstanz sind zwei fs-Messungen im Infraroten mit einer Anregungswellenlänge von 325 nm durchgeführt worden. Im ersten Durchgang erstreckt sich der Messbereich von etwa 1400 bis 1825 cm^{-1} und dient dazu, sich einen Überblick über den Signalverlauf im angeregten Zustand zu verschaffen. Der zweite Messdurchgang konzentriert sich spektral auf die Vorgänge im Bereich der C=O-Streck-Schwingungsbanden zwischen 1630 und 1830 cm^{-1} .

Zeitaufgelöste IR-Messung im Überblick

In Abbildung 4.7 ist das Ergebnis der zeitaufgelösten Messung am T(6-4)T-Dimer nach Anregung bei 325 nm und einer Impulsenergie von 450 nJ gezeigt. In der Konturdarstellung (Abbildung 4.7 a) ist die Absorptionsänderung in Abhängigkeit der Verzögerungszeit logarithmisch von 1 ps bis 2.2 ns und der Wellenzahl von 1450 bis 1825 cm^{-1} aufgetragen. Darunter (Abbildung 4.7 b) befinden sich einzelne transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten. Zudem ist zur Orientierung das stationäre Absorptionsspektrum des T(6-4)T-Dimers eingetragen (grau schattiert). Es heben sich zunächst drei Bereiche mit negativer Signalamplitude bei 1516 cm^{-1} , 1612 cm^{-1} und 1666 cm^{-1} hervor (gestrichelte Linien). Diese negativen Signale erholen sich im Zeitbereich von 100 bis 500 ps. Der Vergleich mit dem stationären Spektrum zeigt, dass diese Absorptionsänderungen im Wesentlichen dem Ausbleichen von Grundzustandsbanden nach Anregung entsprechen. Man beachte, dass die Bande bei 1550 cm^{-1} im grau schattierten Grundzustandsspektrum nicht zum T(6-4)T-Dimer gehört, sondern durch Reste von Pufferlösung aus der Synthese hervorgerufen wird.

Bei einem Blick auf die Zeitverläufe und das Ergebnis der globalen Datenanpassung lässt sich eine genauere Aussage über die zeitliche Entwicklung der Signale treffen. In Abbildung 4.8 sind die Zeitverläufe an den spektralen Positionen zu sehen, die in Abbildung 4.7 durch gestrichelte Linien gekennzeichnet sind. Für eine quantitative Analyse wurden die experimentellen Daten mit einer Summe von Exponentialfunktionen im gesamten spektralen Messbereich (global) angepasst (siehe Kapitel 3.4.3). Die Analyse wurde für Verzögerungszeiten größer als 1 ps mit zwei Zeitkonstanten als Vorgabe durchgeführt. Die im Bereich des Nullpunkts und innerhalb der ersten Pikosekunden auftretenden Signalbeiträge, hervorgerufen durch Relaxationsvorgänge von Schwingungsbanden nach Photoanregung, werden hier nicht berücksichtigt. Die erste Zeitkonstante beschreibt Signalbeiträge, die das Erholen des Grundzustandsausbleichens repräsentieren. Die zweite Zeitkonstante ist auf ∞ gesetzt und beschreibt das Spektrum zum Ende des zeitlichen Messbereichs. Die freie Iteration der ersten Zeitkonstante ergibt einen Wert von 136 ps und führt zu einer guten Repräsentation der Daten. Das Ergebnis der Datenanpassung mit dem Amplitudenspektrum, das mit der Zeitkonstante von 136 ps assoziiert wird, ist in Anhang B dargestellt.

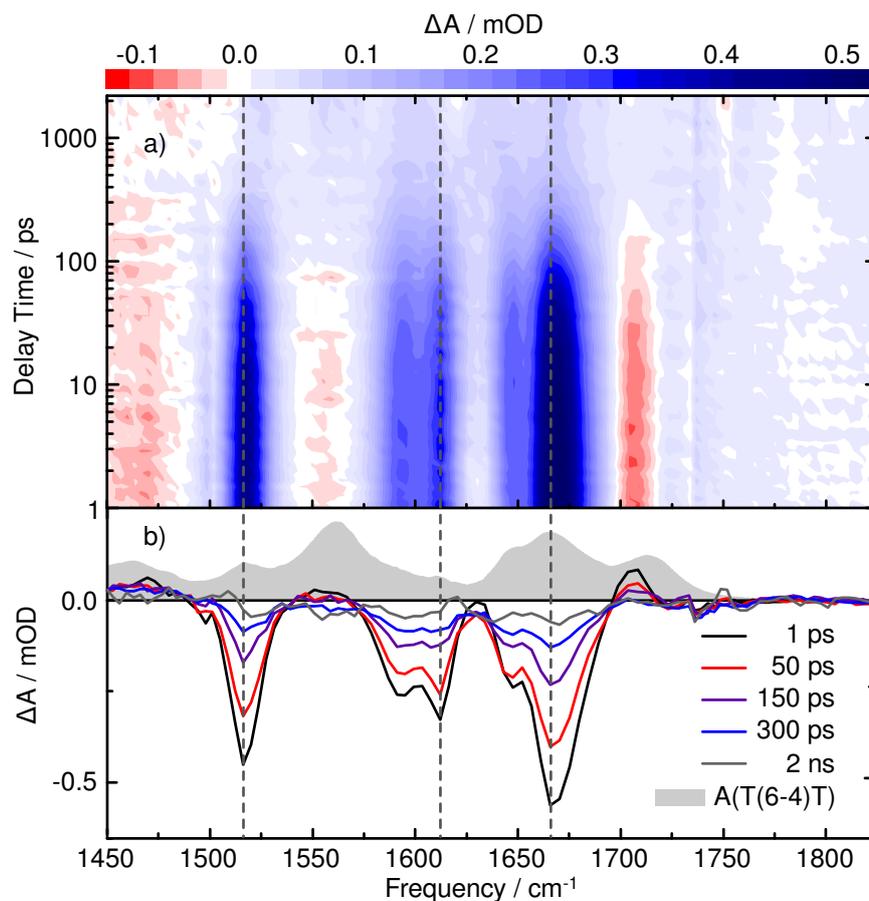


Abb. 4.7.: Zeitaufgelöste IR-Messung am T(6-4)T-Dimer im Bereich von 1450 bis 1800 cm^{-1} . a) In der Konturdarstellung werden positive Signalbeiträge rot, negative Signalbeiträge blau abgestuft. b) Transiente Spektren nach verschiedenen Verzögerungszeiten zum Anregungsimpuls. Das stationäre Absorptionsspektrum der T(6-4)T-Dimere ist grau unterlegt.

Die stationären Belichtungsexperimente zeigen, dass sich im Bereich von 1781 cm^{-1} die Bildung des Dewar-Valenzisomers in Form einer Absorptionzunahme zeigt. In der bisher beschriebenen zeitaufgelösten Messung ist in diesem Bereich nur nach einer Mittelung der Daten ein Anzeichen einer Zunahme zu erkennen. Aus diesem Grund wurde ein zweites Experiment mit verbesserter Genauigkeit und höherer Anregungsenergie durchgeführt. Dieses konzentriert sich auf den charakteristischen Bereich der C=O-Streckschwingungen bei 1625 cm^{-1} bis 1830 cm^{-1} und den Nachweis der Entstehung Dewar-Markerbande bei 1781 cm^{-1} .

Beobachtung der Dewar-Bildung

In Abbildung 4.9 ist das Ergebnis der Femtosekundenmessung am T(6-4)T-Dimer nach Anregung bei 325 nm und einer Impulsenergie von 750 nJ zu sehen. Der Spektralbereich umfasst hierbei die Entwicklung der C=O-Streckschwingungsbanden zwischen 1625 cm^{-1} und 1830 cm^{-1} . Die Messung wurde bis zu einer Verzögerungszeit von 2,1 ns durchgeführt. Die höhere Anregungsenergie wurde dabei nur auf Kosten einer schlechteren Bündelqualität des Anregungslichts erreicht. Dies führte dazu, dass der räumliche Überlapp zwischen Anreg- und

4. Die Bildung des Dewar-Valenzisomers

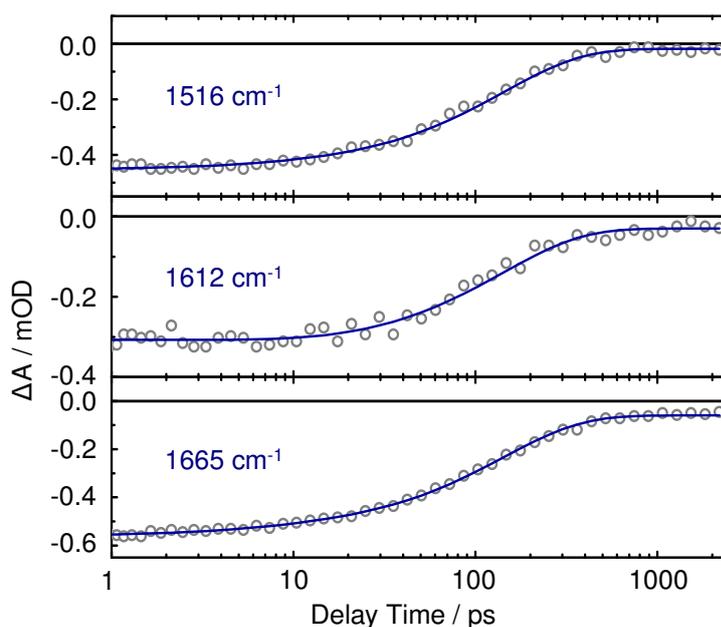


Abb. 4.8.: Zeitverläufe mit den Datenanpassungskurven aus der globalen Anpassung an den charakteristischen Positionen der Ausbleichsignale bei 1516 cm^{-1} , 1612 cm^{-1} und 1666 cm^{-1} . Die globale Datenanpassung mit einer Summe von Exponentialfunktionen gefaltet mit der Apparatefunktion liefert eine Zeitkonstante von 136 ps .

Abtastlicht durch das Verschieben der mechanischen Verzögerungsstrecke nur bis zu einer Zeitverzögerung von 600 ps vollständig aufrechterhalten werden konnte. Es zeigt sich jedoch, dass dieser zeitliche Messbereich für eine Beschreibung der Dewar-Bildung ausreichend ist.

Des Weiteren wird durch die höhere Anregungsenergie ein Signalbeitrag des Lösungsmittels sichtbar. Die bei Photoanregung der T(6-4)T-Dimere und dem Übergang in den Grundzustand wieder abgegebene Energie heizt die umgebenden Lösungsmittel-Moleküle auf. Eine Veränderung der Temperatur des Lösungsmittels führt zu einer Rotverschiebung seiner Schwingungsbanden. Da sich im spektralen Messbereich eine Kombinationsschwingung von D_2O bei etwa 1560 cm^{-1} befindet, entsteht durch das mit der Photoanregung verbundene Aufheizen ein zusätzliches Signal mit einer sigmoidalen Form, das sich über den gesamten Messbereich erstreckt. Die Messdaten lassen sich jedoch, wie in Anhang A beschrieben, auf dieses Signal korrigieren. Bei den in Abbildungen 4.9 bis 4.13 gezeigten Daten wurde diese Lösungsmittelkorrektur durchgeführt.

In der Konturdarstellung von Abbildung 4.9 a ist das Ergebnis der zeitaufgelösten Messung an T(6-4)T-Dimer bis 600 ps im gesamten spektralen Messbereich gezeigt. Damit die Signalverläufe deutlicher sichtbar werden, ist das Messergebnis in Bereiche unterschiedlicher Skalierung der Signalintensität aufgeteilt. Der Bereich von 1750 bis 1825 cm^{-1} ist in zehnfacher Spreizung dargestellt. In Abbildungsteil 4.9 b sind ausgewählte transiente Spektren von 10 bis 250 ps zu sehen. Im spektralen Bereich von 1625 bis 1700 cm^{-1} ist das in der ersten Messung bereits beschriebene Ausbleichsignal zweier Banden bei etwa 1645 cm^{-1} und 1666 cm^{-1} zu erkennen. Das Ausbleichen erholt sich mit einer Zeitkonstante im Bereich von etwa 100 bis 150 ps . Dies entspricht, wie in der ersten Messung, der Erholung des elektronischen Grundzu-

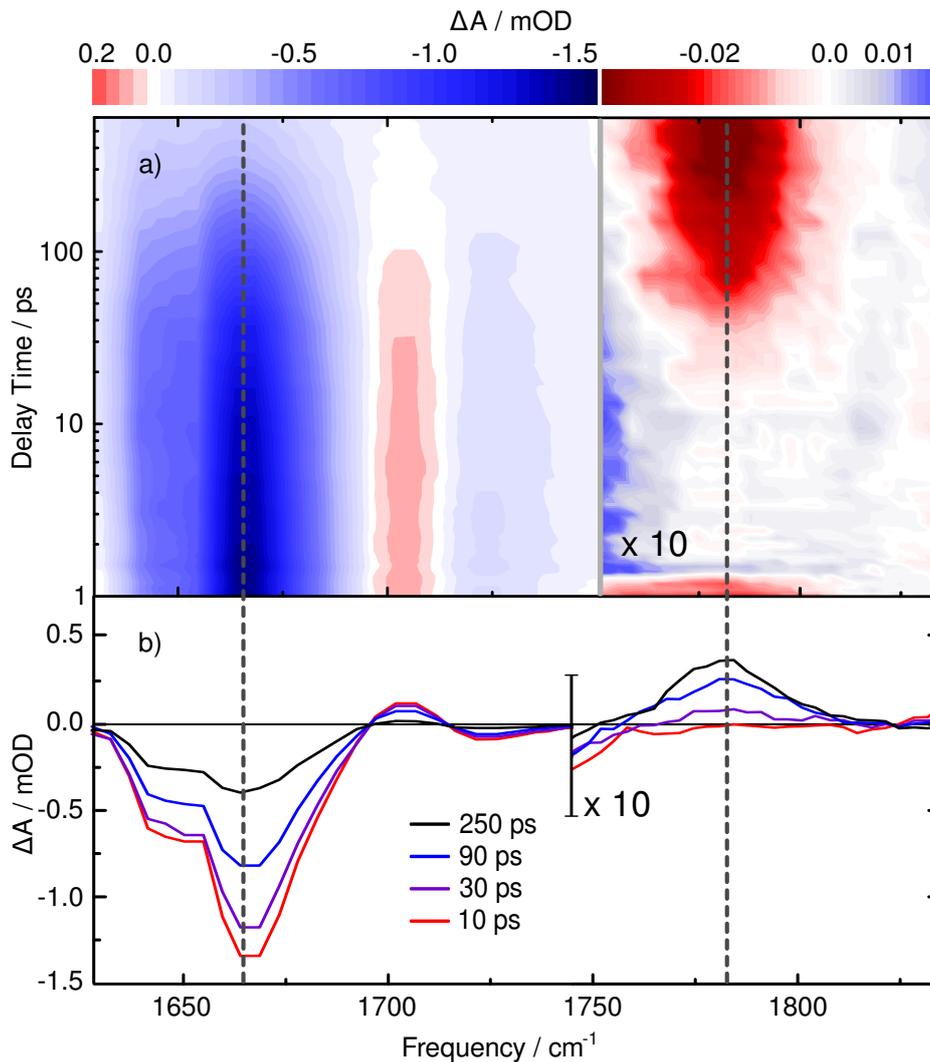


Abb. 4.9.: Konturdarstellung und transiente Spektren der Messungen an T(6-4)T-Dimeren mit Anregung bei 325 m: Links das Ausbleichsignal im Bereich der C=O-Streckschwingungen, rechts die Absorptionszunahme an der Position der Dewar-Markerbande bei 1781 cm^{-1} . Beide Signaländerungen finden auf der Zeitskala von etwa 100 ps statt.

stands. Innerhalb der ersten 250 ps nach Photoanregung bleibt das Amplitudenverhältnis der Ausbleichbanden untereinander gleich.

Im Bereich um 1780 cm^{-1} , in dem die Dewar-Markerbande erwartet wird, zeigt sich deutlich eine Absorptionszunahme. Das Maximum des Signals liegt bei 1781 cm^{-1} und entspricht damit exakt dem Maximum der Absorptionsbande im Dewar-Spektrum (Abbildung 4.3). Am zeitlichen Verlauf der Absorptionsänderung bei 1781 cm^{-1} lässt sich demnach die Bildung des Dewar-Schadens verfolgen.

Die Zeitverläufe der spektralen Positionen des Ausbleichsignals bei 1666 cm^{-1} und bei der Dewar-Markerbande bei 1781 cm^{-1} sind in Abbildung 4.10 bis 600 ps aufgetragen. Anhand des Verlaufs der Graphen ist zu erkennen, dass die Absorptionszunahme im gleichen Zeitbereich

4. Die Bildung des Dewar-Valenzisomers

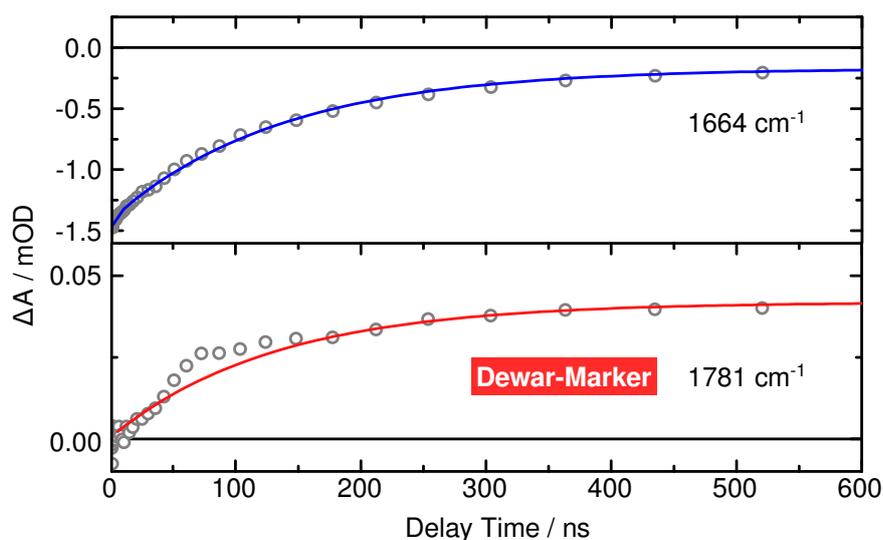


Abb. 4.10.: Zeitverläufe des Ausbleichsignals bei 1666 cm^{-1} und der Entstehung der Dewar-Markerbande bei 1781 cm^{-1} . Die Daten wurden mittels einer Summe von Exponentialfunktionen gefaltet mit der Apparatefunktion angepasst (durchgezogene Linien).

wie das Erholen des Ausbleichsignals stattfindet. Dies ist ein Beleg dafür, dass die Bildung des Dewar-Schadens über einem elektronisch angeregten Zustand des (6-4)-Schadens verläuft. Die globale Anpassung des Datensatzes wurde von 1 ps bis 2,1 ns durchgeführt, obwohl das Messsignal sich durch den anfangs beschriebenen Verlust des räumlichen Überlapps ab einer Verzögerungszeit von 600 ps verringert. Bei der Datenanpassung wurde eine Summe von Exponentialfunktionen mit vier Zeitkonstanten verwendet. Das Ergebnis ist in Anhang B in Form von Amplitudenspektren der einzelnen Zeitkonstanten gezeigt.

Die erste Zeitkonstante beträgt 3,4 ps und beschreibt Signalbeiträge in sigmoidaler Form über den gesamten spektralen Messbereich. Im Infraroten sind solche Signale mit Zeitkonstanten im Bereich von 1 ps bis 10 ps typisch für die Relaxation von schwingungsangeregten Molekülen („Cooling“). Nach Photoabsorption in den Franck-Condon-Zustand findet eine Relaxation in ein Minimum des angeregten Zustands statt. Die dabei entstandene überschüssige Energie wird auf Schwingungsmoden des Moleküls übertragen und führt zu Änderungen im Schwingungsspektrum. Diese Relaxationsvorgänge wurden bereits in ähnlichen Systemen beobachtet [Kui05, Sch08].

Die zweite Zeitkonstante repräsentiert die stärksten Signaländerungen, die mit dem Erholen der Ausbleichsignale im Zusammenhang stehen und den Zerfall des angeregten Zustands beschreiben. Die Iteration der Anpassung ergibt einen Wert von 128 ps für diesen Vorgang. Eine dritte Zeitkonstante wird für Signaländerungen im Zeitbereich von 1,2 ns benötigt. Dieser Vorgang wird durch den anfangs beschriebenen Verlust des zeitlichen Überlapps ab 600 ps beeinflusst. Das Amplitudenspektrum, das mit dieser Zeitkonstante assoziiert wird, weist jedoch auf einen Signalbeitrag hin, der nicht nur mit dem Signalarückgang durch den Verlust des zeitlichen Überlapps zusammenhängt (siehe Anhang B), sondern auch auf Änderungen des Spektrums im Bereich der C=O-Banden hinweist. Die vierte Zeitkonstante ist auf ∞ gesetzt und beschreibt das Spektrum zum Ende des zeitlichen Messbereichs.

Bestimmung der Quantenausbeute aus den zeitaufgelösten Messungen

Nachdem der zeitliche Verlauf der Dewar-Bildung beobachtet werden kann, ist es nun möglich die Quantenausbeute der Isomerisierungsreaktion aus dieser Messung zu bestimmen und sie mit dem Wert aus dem stationären Belichtungsexperiment zu vergleichen. Die Quantenausbeute ergibt sich aus dem Verhältnis der Anzahl der durch UV-Absorption gebildeten Dewar-Dimere und der Zahl der angeregten T(6-4)T-Dimere und lässt sich auch durch die jeweiligen Konzentrationen der Dimere ausdrücken

$$\Phi_{Dew} = \frac{c_{Dew}}{\eta \cdot c_{(6-4)}}. \quad (4.2)$$

Der Faktor η stellt den Anteil der tatsächlich angeregten Moleküle dar. Dieser Wert lässt sich aus dem initialen Ausbleichen der Grundzustands-Absorptionsbande bei 1666 cm^{-1} abschätzen und liegt in diesem Fall bei 1,1%. Mit der Absorptionsänderung ΔA_{fs} aus der zeitaufgelösten IR-Messung an der Stelle 1781 cm^{-1} , des aus dem stationären Spektrum bestimmten Extinktionskoeffizienten ε_{Dew} bei 1781 cm^{-1} und der Schichtdicke d der Küvette ergibt sich mit

$$\Delta A_{fs} = c_{Dew} \cdot \varepsilon_{Dew} \cdot d \quad (4.3)$$

und

$$\Phi_{Dew} = \frac{1}{\eta \cdot c_{(6-4)}} \cdot \frac{\Delta A_{fs}}{\varepsilon_{Dew} \cdot d} \quad (4.4)$$

die Quantenausbeute der Dewar-Bildung. An der spektralen Position der Dewar-Bande bei 1781 cm^{-1} besteht eine Absorptionsänderung von 0,045 mOD. Der Wert von ε_{Dew} an dieser Stelle beträgt $333 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Mit $\eta = 0,011$, $d = 90 \mu\text{m}$ und $c_{(6-4)} = 16,6 \text{ mM}$ ergibt sich eine Quantenausbeute von $\Phi_{Dew} = 6,8 \%$. Aufgrund der Messungenauigkeit bei der Bestimmung des Extinktionskoeffizienten und der Anzahl der tatsächlich angeregten Moleküle liegt der Fehler bei etwa 2%. Deshalb liegt die Quantenausbeute der Dewar-Bildung, bestimmt aus den zeitaufgelösten Daten, zwischen 5 und 9% und stimmt im Rahmen der Messgenauigkeit mit dem Wert aus dem stationären Belichtungsexperiment überein.

Absorptionsänderungen im Nanosekundenbereich

Vergleicht man die transienten Spektren der Messung bei späten Verzögerungszeiten beispielsweise bei 250 ps mit dem stationären Differenzspektrum (Abbildung 4.3) so fällt auf, dass ein Unterschied im Verhältnis der Maximalamplitude bei 1645 cm^{-1} zu der bei 1666 cm^{-1} besteht. Im transienten Spektrum ist die Absorptionsänderung bei 1666 cm^{-1} stärker als bei 1645 cm^{-1} . Im stationären Spektrum ist dieses Verhältnis umgekehrt. Zudem zeigt das stationäre Belichtungsexperiment, dass die Amplituden der Dewar-Markerbande bei 1781 cm^{-1} und die dadurch erzeugte negative Absorptionsänderung im Bereich um 1650 cm^{-1} in etwa die gleiche Größe besitzen. Dies ist in den transienten Spektren jedoch nicht der Fall. In den zeitaufgelösten Daten besteht ein Unterschied der Absorptionsänderung um den Faktor 5 bis 10 zwischen der Marker-Bande und dem Bereich um 1650 cm^{-1} . Dieser Vergleich legt nahe, dass die Dynamik der Reaktion im bisher zugänglichen Messbereich von weniger als 1 ns noch nicht abgeschlossen ist. Aus diesem Grund wurden zeitaufgelöste IR-Messungen im Nano- bis Mikrosekundenbereich an T(6-4)T-Dimeren durchgeführt.

4.3.2. Zeitaufgelöste Experimente im Nanosekundenbereich

Die zeitliche Entwicklung von T(6-4)T-Dimeren nach Anregung bei 355 nm im Nanosekundenbereich ist in Abbildung 4.11 dargestellt. Die Messung wurde im gleichen spektralen Bereich wie die Femtosekundenmessung von 1625 bis 1830 cm^{-1} durchgeführt. Die Verzögerungszeit erstreckt sich bis zu $10\text{ }\mu\text{s}$. Die Daten wurden, wie in Anhang A beschrieben auf das Lösungsmittelsignal korrigiert. In Abbildungsteil 4.11a ist das Ausbleichsignal der zwei Banden

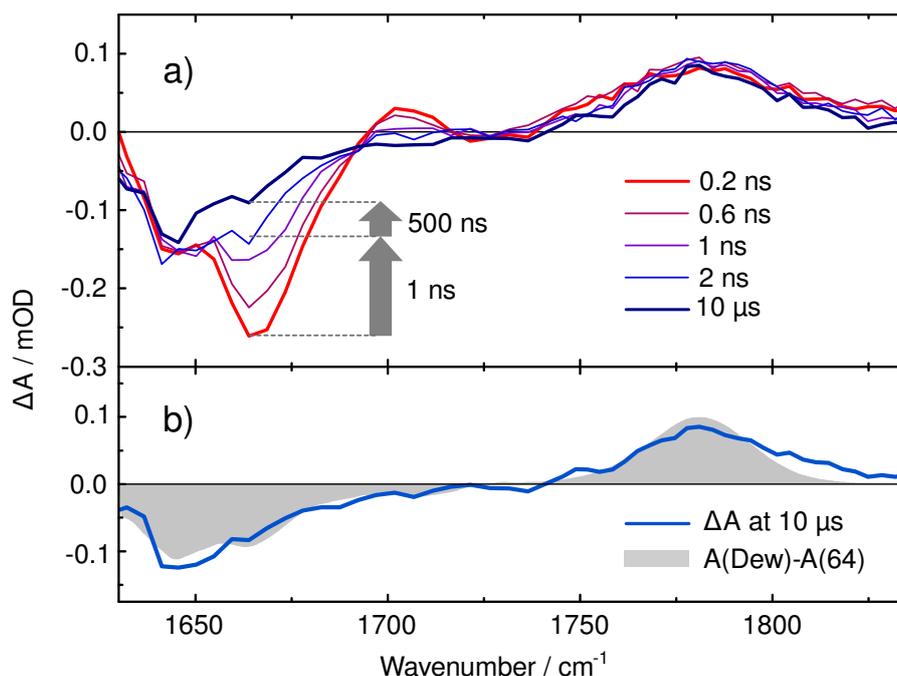


Abb. 4.11.: Zeitaufgelöste IR-Messung an T(6-4)T-Dimeren im Nano- bis Mikrosekundenbereich. a) Transiente Spektren im Bereich der C=O-Streckschwingungsbanden einschließlich der Dewar-Markerbande. b) Vergleich des transienten Spektrums bei $10\text{ }\mu\text{s}$ mit dem stationären Differenzspektrum nach Belichtung von T(6-4)T-Dimeren zum Dewar-Valenzisomer.

bei 1645 und 1666 cm^{-1} und das Signal der induzierten Absorption der Dewar-Bande bei 1781 cm^{-1} zu erkennen. Im Verlauf des transienten Spektrums bei 0.2 ps besteht eine gute Übereinstimmung mit dem entsprechenden Spektrum aus der fs-Messung.

Es werden folgende Kinetiken beobachtet: Innerhalb weniger Nanosekunden ist ein Rückgang eines Großteils des Ausbleichsignals bei 1666 cm^{-1} zu erkennen (Pfeil mit 1 ns). Mit einer kleineren Amplitude findet in diesem Bereich ein weiterer Rückgang des Ausbleichsignals innerhalb von 100 bis 1000 ns statt (Pfeil mit 500 ns). Das Verhältnis der beiden Ausbleichbanden kehrt sich dadurch um. Eine weitere Signaländerung befindet sich bei 1700 cm^{-1} . Eine positive Absorptionsänderung zu Beginn nimmt innerhalb der 1 ns Zeitkonstante auf Null ab und wird bis zum Ende des zeitlichen Messbereichs negativ. Eine Veränderung der induzierten Absorption im Bereich der Dewar-Bande ist innerhalb der Messgenauigkeit nicht zu erkennen. In Abbildung 4.11b ist zum Vergleich das transiente Spektrum bei $10\text{ }\mu\text{s}$ (gemittelt über 10 Spektren vor und nach $10\text{ }\mu\text{s}$) zusammen mit dem stationären Differenzspektrum aus dem Belichtungsexperiment von T(6-4)T-Dimeren zum Dewar-Valenzisomer (Abbildung 4.3)

aufgetragen. Das stationäre Spektrum wurde auf das transiente Spektrum skaliert. Die sehr gute Übereinstimmung der beiden Spektren zeigt, dass alle Prozesse nach $90 \mu\text{s}$ vollständig abgeschlossen sind.

Das Ergebnis der globalen Datenanpassung für die Messung im Nanosekundenbereich ist in Abbildung 4.12 gezeigt. Die größten Absorptionsänderungen finden bei 1700 cm^{-1} und in der Ausbleichbande bei 1666 cm^{-1} statt. Die Anpassung wurde von $0,5 \text{ ns}$ bis $90 \mu\text{s}$ mit vier Zeitkonstanten durchgeführt. Die erste wurde auf dem bereits ermittelten Wert von 130 ps festgehalten und dient der Beschreibung von Prozessen, die im Pikosekundenbereich stattfinden und das Signal im Bereich des Nullpunkts beeinflussen können. Die zweite Zeitkonstante wird frei iteriert und repräsentiert den Verlauf der Absorptionsänderung bei 1666 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} . Bei einem Wert von $1,3 \text{ ns}$ erhält man eine gute Übereinstimmung mit den Daten. Eine dritte Zeitkonstante, die in der Ausbleichbande bei 1666 cm^{-1} noch zusätzlich zu einem Erholen der Bande führt, hat eine sehr kleine Amplitude, wodurch die Anpassung hier mit einem großen Fehler behaftet ist. Der Wert liegt in etwa bei 500 ns . Die vierte Zeitkonstante beschreibt wiederum das transiente Spektrum am Ende des zeitlichen Messbereichs von $90 \mu\text{s}$.

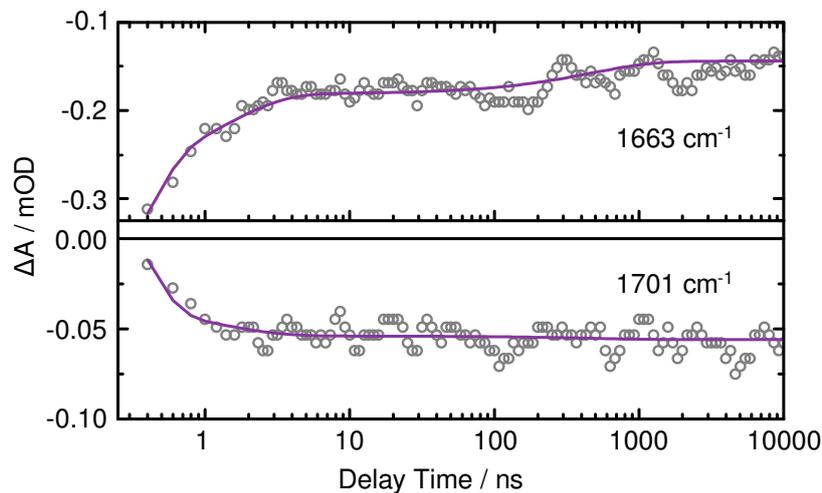


Abb. 4.12.: Zeitverläufe der Messung an T(6-4)T-Dimeren im Nanosekundenbereich an den angegebenen spektralen Positionen. Die Daten wurden mit einer Summe aus Exponentialfunktionen gefaltet mit der Apparatefunktion im Zeitbereich von $0,5 \text{ ns}$ bis $90 \mu\text{s}$ angepasst.

Die Datensätze aus den Messungen in den verschiedenen Zeitbereichen lassen sich nach der Lösungsmittelkorrektur miteinander verbinden. In Abbildung 4.13 ist oben der Zeitverlauf des Ausbleichsignals bei 1664 cm^{-1} und unten der Zeitverlauf der Absorptionzunahme bei der Dewar-Markerbande bei 1781 cm^{-1} im Zeitbereich von 10 ps bis $10 \mu\text{s}$ gezeigt. Der Übergang des Piko- in den Nanosekundenbereich ist bei 500 ps gewählt. Die Absorptionsänderungen an diesen spektralen Positionen repräsentieren die wichtigsten Erkenntnisse, die aus den zeitaufgelösten Messungen im Infraroten Spektralbereich gewonnen werden können. Es kann zunächst die Bildung der Dewar-Valenzisomers aus dem T(6-4)T-Dimer unter Photoanregung anhand der Markerbande bei 1781 cm^{-1} nachgewiesen werden. Des Weiteren ist anhand der Ausbleichsignale der Grundzustandsbanden ein Zerfall des elektronisch angeregten Zustands und eine Erholung des Grundzustands mit 128 ps zu beobachten. Die Dewar-Bildung erfolgt

4. Die Bildung des Dewar-Valenzisomers

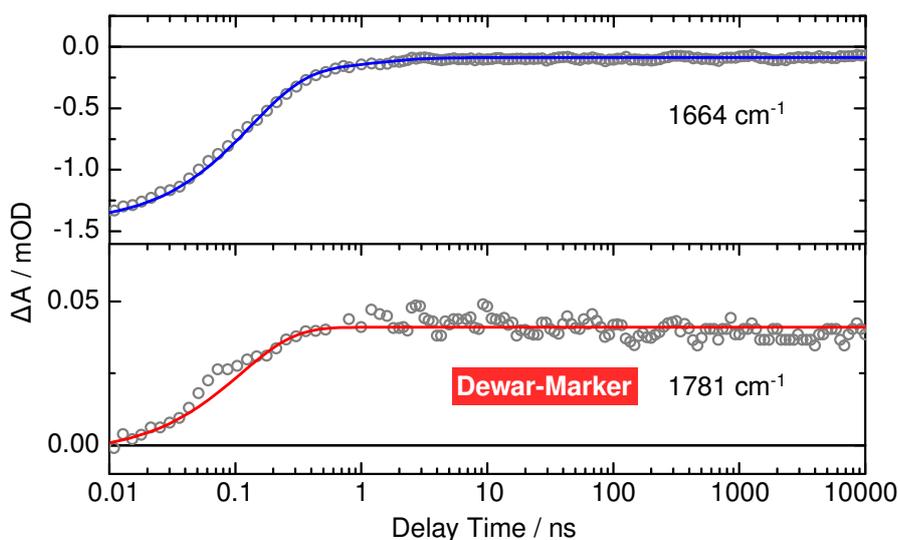


Abb. 4.13.: Zeitverläufe des C=O-Ausbleichsignals und der Dewar-Markerbande im nahezu gesamten gemessenen Zeitbereich von 10 ps bis 10 μ s. Die durchgezogene Linie entspricht der Datenanpassung mit einer Summe aus Exponentialfunktionen mit den drei Zeitkonstanten 130 ps, 1,3 ns und 500 ns.

aus dem angeregten Zustand, da sie mit diesem Vorgang zeitlich einhergeht. Die Vorgänge im Nanosekundenbereich, die vornehmlich mit einem weiteren Erholen der Grundzustandsbanden zusammenhängen, lassen sich möglicherweise mit der Besetzung eines langlebigen Triplett-Zustandes erklären. Die Ergebnisse der globalen Datenanpassungen aus den beiden zeitaufgelösten Messungen im IR sind in Tabelle 4.1 zur Übersicht eingetragen.

Zeitbereiche	τ_0	τ_1	τ_2	τ_3
fs-IR	3, 4 ps	128 ps	(1, 2 ns)	∞
ns-IR		130 ps (fest)	1, 3 ns	≈ 500 ns

Tabelle 4.1.: Übersicht über die Zeitkonstanten aus der zeitaufgelösten Messungen an T(6-4)T-Dimeren im infraroten Spektralbereich nach Anregung bei einer Wellenlänge von 325 nm.

Die Zeitkonstante von 1,2 ns liefert im fs-IR ähnliche Absorptionsänderungen wie die entsprechende Zeitkonstante von 1,3 ns aus dem ns-IR-Experiment (siehe Anhang B). Dem Spektrum ist durch den Verlust des zeitlichen Überlapps im fs-Experiment ab 600 ps jedoch auch ein Rückgang des Gesamtsignals überlagert. Die Klärung der Frage, inwieweit die Vorgänge im Nanosekundenbereich einem Triplett-Zustand zugeordnet werden können, erfordert weitere Untersuchungen. Ergänzend zu den Experimenten im IR wurden daher zeitaufgelöste Emissions- und Absorptionsmessungen im UV und sichtbaren Spektralbereich an T(6-4)T-Dimeren durchgeführt. Sie sollen das Reaktionsbild bestätigen und weitere Aufschlüsse darüber geben. Im folgenden Unterkapitel werden die zeitaufgelösten Emissionsmessungen beschrieben und die Ergebnisse angesprochen. Die Emissionsmessungen an den T(6-4)T-Dimeren wurden zudem bei verschiedenen Temperaturen der Probensubstanz durchgeführt. Ein weiteres Unterkapitel befasst sich mit den zeitaufgelösten Experimenten im

UV- und sichtbaren Spektralbereich an den T(6-4)T-Dimeren.

4.3.3. Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Mit der zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie lässt sich die Charakteristik der Emission der T(6-4)T-Dimere nach elektronischer Anregung beobachten. Daraus erhält man die Lebensdauer des angeregten Zustands und Änderungen der Emissionseigenschaften nach Photoanregung. Die Emissionsmessungen wurden zudem bei vier unterschiedlichen Temperaturen der Probenlösung durchgeführt, um die Abhängigkeit der Zeitkonstanten von der Proben temperatur zu ermitteln. Aus der Temperaturabhängigkeit lässt sich bestimmen, ob für die einzelnen Prozesse energetische Aktivierungsbarrieren existieren und deren Höhe mittels eines Arrheniusgraphen abschätzen.

Die zeitaufgelösten Emissionsmessungen wurden mit einem Aufbau bestehend aus einer Streak-Kamera zur Detektion und einem fs-Lasersystem zur Anregung durchgeführt. Das Detektionssystem besteht aus einem Cassegrain-Objektiv, das das aufgesammelte Fluoreszenzlicht auf den Eintrittspalt eines Gitterspektrographen fokussiert. In dem Spektrographen wird das Licht spektral aufgetrennt und auf die Photokathode des Streak-Kamerasystems (Hamamatsu, C5680-24 C) abgebildet. Eine ausführlichere Beschreibung des Aufbaus befindet sich in [Rys11]. Die Messungen an den T(6-4)T-Dimeren wurden für die Zeitkonstanten im Piko- und Nanosekundenbereich mit zwei Zeitfenstern durchgeführt. Die Zeitfenster haben eine Breite von 1 ns beziehungsweise 10 ns. Zur Variation der Proben temperatur wurde ein temperierbarer Küvettenhalter aus Kupfer verwendet der im Kontakt zu einem Temperierbad stand. Zusätzlich bestand ein thermischer Kontakt zwischen dem Vorratsgefäß der Probe und dem Temperierbad. Die Proben temperatur wurde direkt in der Küvette nahe des Probenortes gemessen.

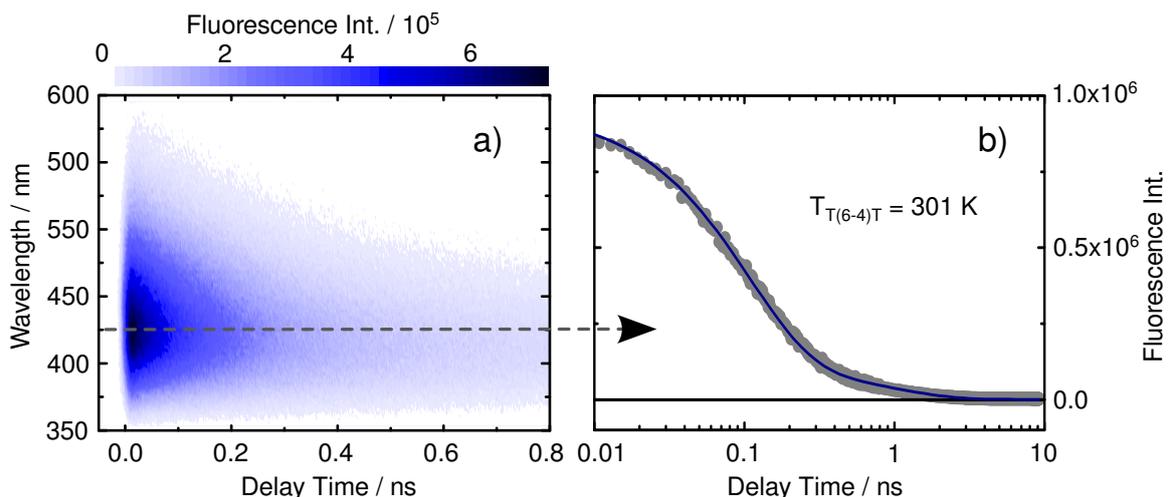


Abb. 4.14.: Daten der Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie an T(6-4)T-Dimeren bei einer Proben temperatur von 28,2°C: a) Konturdarstellung der Emission nach Photoanregung bei 325 nm. b) Zeitverlauf im Maximum der Emission bei 425 nm.

4. Die Bildung des Dewar-Valenzisomers

In Abbildung 4.14 ist das Ergebnis einer zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung an T(6-4)T-Dimeren in D₂O bei 301 K gezeigt. Die Konturdarstellung in Abbildung 4.14 a gibt einen Überblick über die Daten. Hierbei ist die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Wellenlänge und der Verzögerungszeit im Bereich von -0.1 bis 0.8 ns aufgetragen. Das Fluoreszenzspektrum besitzt ein Maximum bei 425 nm und fällt auf der Zeitskala von 100 ps ab. Eine genauere Analyse zeigt, dass sich das Maximum des Fluoreszenzspektrums nach 1 ns sich um etwa 15 nm zu niedrigeren Wellenlängen verschiebt und in diesem Zeitbereich weiter abnimmt. Dieses dynamische Verhalten stimmt qualitativ mit den bisherigen Ergebnissen aus den zeitaufgelösten Messungen im Infraroten überein. In Abbildung 4.14 b ist der Zeitverlauf der Emission bei 425 nm wiedergegeben (graue Punkte). Die Daten wurden mit einer Summe von Exponentialfunktionen, die mit der Apparatefunktion gefaltet wird, angepasst. Das Ergebnis der Anpassung wird in Abbildung 4.14 b durch die blaue durchgezogene Linie repräsentiert. Aus der Anpassung geht ein biexponentieller Zerfall der Fluoreszenz mit zwei Zeitkonstanten $\tau_1 = 106$ ps und $\tau_2 = 0,91$ ns für die Messung bei einer Proben temperatur von 301 K hervor.

Die zeitaufgelösten Emissionsmessungen wurden bei vier verschiedenen Proben temperaturen von 291 bis 334 K durchgeführt. Die dabei ermittelten Zeitkonstanten für die Abnahme der Fluoreszenz sind in Tabelle 4.2 eingetragen. Zusätzlich sind die Verhältnisse der Amplituden a_i der jeweiligen zeitlichen Komponenten zur Gesamtamplitude aufgelistet. Aus den Mittelwerten der Amplitudenverhältnisse ergibt sich eine Aufteilung von 87 % auf die kurze Komponente τ_1 und 13 % auf die langlebige Komponente τ_2 .

Temp. / K	τ_1 / ps	τ_2 / ns	$a_1/(a_1 + a_2)$	$a_2/(a_1 + a_2)$
291	137	1.24	0.87	0.13
301	106	0.91	0.88	0.12
322	86	0.60	0.87	0.13
334	64	0.50	0.85	0.15

Tabelle 4.2.: Übersicht über die Zeitkonstanten τ_i und der Amplituden a_i in Abhängigkeit der Temperatur ermittelt aus der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung von T(6-4)T.

Im zeitaufgelösten IR-Experiment stand keine direkte Temperaturerfassung der Probenlösung zur Verfügung. Die Proben temperatur wird daher anhand der Raumtemperatur von 297 °C abgeschätzt, wobei die Temperatur durch die Verwendung der Walkpumpe für den Probenaustausch leicht erhöht wird. Im IR werden Signale im Bereich von 130 ps und 1,2 ns beobachtet. Diese Werte fügen sich sehr gut in die Temperaturabhängigkeit der Emissionszeitkonstanten ein. Die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen bestätigen daher qualitativ die Zeitkonstanten, die in den IR-Experimenten gefunden werden.

Bestimmung der Barriere der elektronisch angeregten Zustände

Die Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 ermittelt in den zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen nehmen mit ansteigender Proben temperatur ab. Dies bedeutet, dass beide Vorgänge über eine Energiebarriere ablaufen. Mithilfe der Arrheniusgleichung lässt sich die Aktivierungsenergie für die jeweiligen Komponenten abschätzen. Die Arrheniusgleichung gibt eine Beziehung zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit k und der Temperatur T der Proben substanz über einen

stoßtheoretischen Ansatz an und lautet wie folgt [Arr89]:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{k_B T}}. \quad (4.5)$$

Dabei ist A ein präexponentieller Faktor (oder Häufigkeitsfaktor), $k_B = 8,617 \cdot 10^{-5} \frac{\text{eV}}{\text{K}}$ die Boltzmann-Konstante und E_A die Aktivierungsenergie, die für die Reaktion benötigt wird. Trägt man nun den Kehrwert der Temperatur gegen den natürlichen Logarithmus der Reaktionsgeschwindigkeit k auf ergibt es eine lineare Beziehung, aus deren Steigung sich der Wert für E_A bestimmen lässt.

Aus der Temperaturabhängigkeit beider Zeitkonstanten (Tabelle 4.2 werden über die Arrheniusgleichung die Werte für die Aktivierungsenergie E_A bestimmt. Die Deaktivierung erfolgt über Energiebarrieren mit einer Höhe von $E_{A,1} = 1090 \text{ cm}^{-1}$ für die Zeitkonstante τ_1 und mit $E_{A,2} = 1467 \text{ cm}^{-1}$ für die Zeitkonstante τ_2 .

4.3.4. Femtosekundenspektroskopie im UV- und sichtbaren Spektralbereich

Für ein besseres Verständnis des Isomerisierungsprozesses und der Lebensdauer der elektronisch angeregten Zustände wurden zeitaufgelöste Messungen im UV und sichtbaren Spektralbereich an T(6-4)T-Dimeren gelöst in D_2O durchgeführt. Nach Anregung mit Impulsen mit einer Zentralwellenlänge bei 325 nm wird die Absorptionsänderung zu verschiedenen Verzögerungszeiten breitbandig aufgenommen. Als Abtastlicht dient hierzu ein in CaF_2 erzeugtes Weißlichtkontinuum. Näheres zu Aufbau und Funktionsweise des Experiments findet sich beispielsweise in [Cor08].

Abbildung 4.15 enthält die Absorptionsänderung nach Anregung bei 325 nm aufgeteilt in zwei Zeitbereiche der Signaländerung, da die jeweiligen Signalamplituden sich um etwa eine Größenordnung unterscheiden. Im oberen Teil der Abbildung sind transiente Spektren zu Verzögerungszeiten ab 1 ps und bis 525 ps, im unteren ab 525 ps und bis 3.5 ns gezeigt.

Zunächst ist eine sehr breite induzierte Absorption mit einem Einschnitt bei 405 nm zu erkennen. Dieser Einschnitt verschiebt sich innerhalb weniger ps um etwa 10 nm in den langwelligen Bereich. Der Vergleich der Form des Einschnitts bei 405 nm mit dem stationären Fluoreszenzspektrum in Abbildung 4.5 zeigt, dass der Einschnitt durch die stimulierte Emission hervorgerufen wird. Die induzierte Absorption nimmt mit einer Zeitkonstante im Bereich von 150 ps über den gesamten Spektralbereich auf etwa 10% der anfänglichen Amplitude ab. Im unteren Abschnitt der Abbildung 4.15 ist zu erkennen, dass eine weitere Änderung des Signals im Zeitbereich von 1 bis 2 ns vorliegt. Diese äußert sich in einer Absorptionszunahme bei 350 bis 450 nm bei gleichzeitiger Absorptionsabnahme zwischen 500 und 700 nm. Am Ende des zeitlichen Messbereichs von 3,5 ns hat das transiente Spektrum immer noch ein breites positives Signal mit einem leicht modulierten Maximum bei 415 nm (graue Linie).

Auch bei diesem Datensatz wurde eine globale Datenanpassung wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben durchgeführt. Es wurde eine Summe von Exponentialfunktionen mit vier Zeitkonstanten im Zeitbereich von 1 ps bis 3,5 ns verwendet. Die erste Zeitkonstante wurde frei iteriert und führte zu einem Wert von $\tau_0 = 3 \text{ ps}$. Die Zeitkonstante kann als eine Relaxation nach Photoanregung in ein Minimum im angeregten Zustand interpretiert werden. Die zweite und dritte Zeitkonstante wurden basierend auf den Emissionsmessungen auf den Werten $\tau_1 = 119 \text{ ps}$

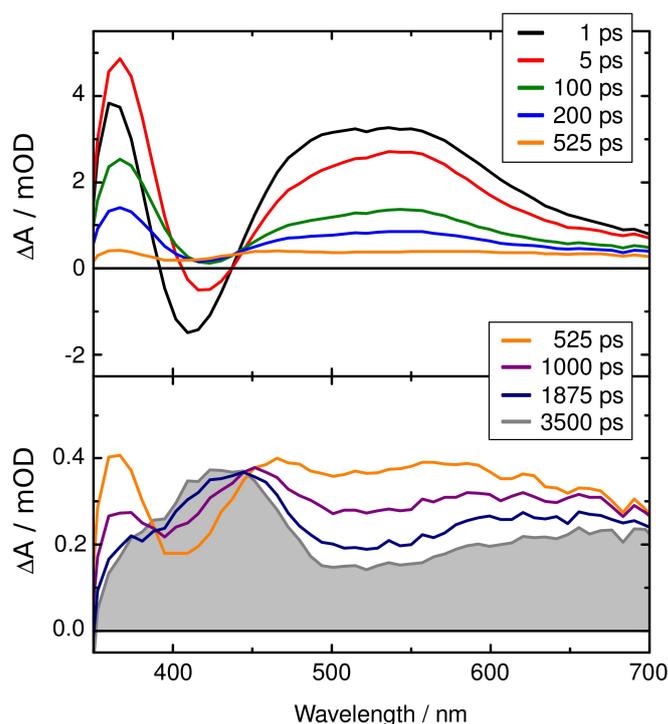


Abb. 4.15.: Ergebnis der zeitaufgelösten Messungen an T(6-4)T-Dimeren im UV- und sichtbaren Spektralbereich. Die Darstellung der transienten Spektren ist in zwei Bereiche unterschiedlicher spektraler Amplituden aufgeteilt.

und $\tau_2 = 1118$ ps festgehalten. Da sich die Proben­temperatur im Experiment direkt bestimmen ließ, wurde die Temperaturabhängigkeit der Zeitkonstanten anhand des Arrhenius-Graphen berücksichtigt. Die vierte Zeitkonstante repräsentiert das transiente Spektrum zum Ende des zeitlichen Messbereichs.

In Abbildung 4.16 sind Zeitverläufe mit den Datenanpassungskurven an einzelnen spektralen Positionen gezeigt. Die Anpassung gibt den Verlauf der Absorptionänderungen gut wieder und liefert damit eine Bestätigung der Beobachtungen aus den zeitaufgelösten Messungen im IR und den Emissionsmessungen. Die langlebige positive Signalkomponente zum Ende des zeitlichen Messbereichs deutet auf die Beteiligung eines weiteren Zustands hin. Zur weiteren Analyse der Photophysik des Dewar bildenden Chromophors im T(6-4)T-Dimer wurden verschiedene zeitaufgelöste Messungen an der monomeren Base Pyrimidinon durchgeführt.

4.4. Pyrimidinon als Modellsystem

Zur weiteren Aufklärung der photophysikalischen Eigenschaften des (6-4)-Schadens und der Bildung des Dewar-Valenzisomers wurde das Minimalmodell eines (6-4)-Schadens untersucht und die verschiedenen experimentellen Methoden auf ein modifiziertes Pyrimidin angewendet. Die Ergebnisse sind im folgenden Unterkapitel zusammengefasst und umfassen stationäre und zeitaufgelöste Messungen im UV und infraroten Spektralbereich. Im letzten Abschnitt werden die photophysikalischen Gemeinsamkeiten und Unterschiede des Monomers gegenüber

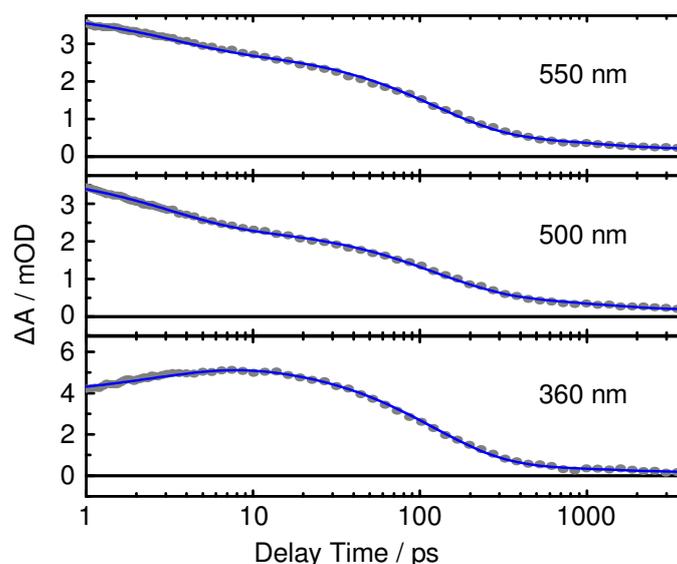


Abb. 4.16.: Zeitverläufe von T(6-4)T-Dimeren nach Anregung bei 325 nm bei den angegebenen spektralen Positionen. Die Daten wurden mit einer Summe von Exponentialfunktionen ab dem zeitlichen Nullpunkt angepasst.

dem (6-4)-Dimer beleuchtet. Da in dieser Arbeit die Vergleichbarkeit der Messungen an Pyrimidinon mit den entsprechenden Untersuchungen des T(6-4)T-Dimers im Vordergrund steht, werden hauptsächlich zeitaufgelöste Messungen im IR und UV/Vis zur Beschreibung der photophysikalischen Eigenschaften verwendet. Eine umfassende Analyse von Pyrimidinon, die die zeitaufgelöste Absorptions- und Fluoreszenzmessungen im UV/Vis in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Gilch beschreibt, befindet sich in [Rys11].

4.4.1. Stationäre Spektren von Pyrimidinon

Zur Untersuchung der photophysikalischen Eigenschaften des Chromophors im (6-4)-Dimer, das das Dewar-Isomer ausbildet, wurden zunächst stationäre Spektren von 1-Methyl-2(1H)-Pyrimidinon (1M2P, Ausschnitt in Abbildung 4.17) in D_2O aufgenommen. Das Absorptionsspektrum im UV und sichtbaren Spektralbereich von 1M2P weist eine Bande mit Zentralwellenlänge bei 302 nm auf (Abbildung 4.17, rote Linie). Durch Anregung bei 302 nm erhält man das Fluoreszenzspektrum (grüne Linie) mit einem Maximum bei 360 nm. Die Stokes-Verschiebung liegt bei 5300 cm^{-1} .

Eine intensive Belichtung der Bande bei 302 nm führt zu einer Abnahme der Absorption. Dies bedeutet, dass die Pyrimidin-Ringstruktur unter Belichtung verändert wird. In Arbeiten von Lapinsky et al. [Lap03] wurde 1M2P in einer Argon-Matrix untersucht und keine Dewar-Isomerisierung nachgewiesen, jedoch die Bildung von Isocyanaten nach einer Ringöffnungsreaktion beobachtet. Welche Änderungen in Lösung auftreten ist bisher nicht untersucht worden. Da das Dewar-Isomer im TT-Dimer im IR eindeutig anhand einer Marker-Bande identifiziert werden kann, wurden auch für das Monomer 1M2P in D_2O Infrarotspektren nach Belichtung der UV-Bande bei 302 nm aufgenommen. Diese sind in Abbildung 4.18

4. Die Bildung des Dewar-Valenzisomers

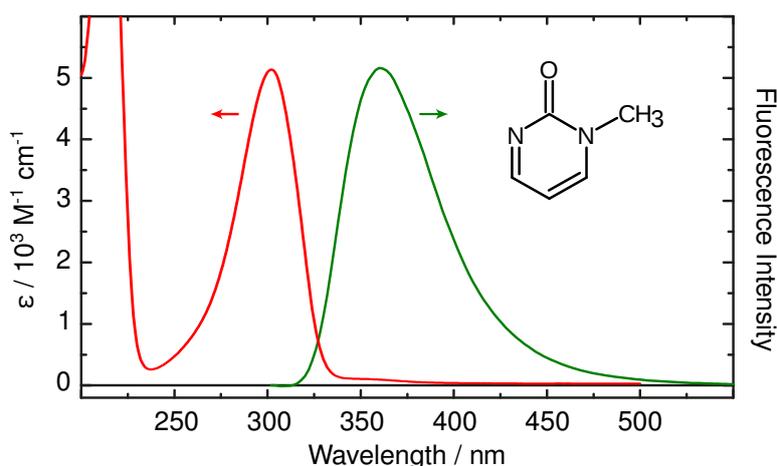


Abb. 4.17.: Absorptionsspektrum (in Einheiten des Extinktionskoeffizienten, rot) und Fluoreszenzspektrum (grün) von 1-Methyl-2(1H)-Pyrimidinon gelöst in D₂O mit der Strukturformel des Moleküls.

gezeigt. Im Ausgangsspektrum von 1M2P sind ausgeprägte Absorptionsbanden im Bereich von 1550 bis 1650 cm⁻¹ zu erkennen. Die intensivste Bande bei 1648 cm⁻¹ kann der Carbonyl-Streckschwingung (C=O) zugeordnet werden. Die beiden Banden bei 1550 und 1595 cm⁻¹ sind mit C-C-Streckschwingungen in der Pyrimidin-Ringstruktur verknüpft. Zwei weitere Banden bei 1389 und 1410 cm⁻¹ befinden sich im Bereich von C-H-Biegeschwingungen.

Zur weiteren Charakterisierung im IR wurde an 1M2P in D₂O ein stationäres Belichtungsexperiment mit einer zentralen Anregungswellenlänge bei 266 nm durchgeführt (siehe dazu Abschnitt 3.5). Das IR-Spektrum nach der Belichtung ist in Abbildung 4.18 (schwarze Linie) gezeigt. Zu einer genaueren Analyse der Veränderung ist zusätzlich die Differenz der Spektren vor und nach Belichtung in blau abgebildet. Es sind Absorptionsänderungen in nahezu allen Banden meist in Form einer Abnahme der Intensität zu beobachten. Lediglich die Bande bei 1410 cm⁻¹ verschiebt sich unter Belichtung um 9 cm⁻¹. Im Bereich von 1766 cm⁻¹ ist eine kleine Absorptionszunahme zu erkennen. Der Vergleich mit dem Spektrum des T(Dewar)T-Dimers lässt vermuten, dass im Monomer 1M2P ebenfalls eine Dewar-Bildung jedoch mit einer viel geringeren Quantenausbeute beobachtet wird. Eine Abschätzung der Quantenausbeute bezüglich dieser Bande ergab einen Wert unterhalb von 0.1%. In einer Analyse der Reaktionsprodukte dieses Belichtungsexperimentes per HPLC konnte jedoch kein Dewar-Isomer nachgewiesen werden.

In [Nis80] wurde in einem ähnlichen System, einem 1,4,6-Trimethyl-Pyrimidin-2-on, unter Variation der Substituenten und des Lösungsmittels die Dewar-Isomerisierung bei Raumtemperatur untersucht. Bei dieser Verbindung in Wasser gelöst wurde ebenfalls keine quantitativ nachweisbare Menge an Dewar-Isomeren gefunden. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass im monomeren Pyrimidinon in D₂O unter den verwendeten Belichtungsbedingungen praktisch keine Dewar-Bildung stattfindet.

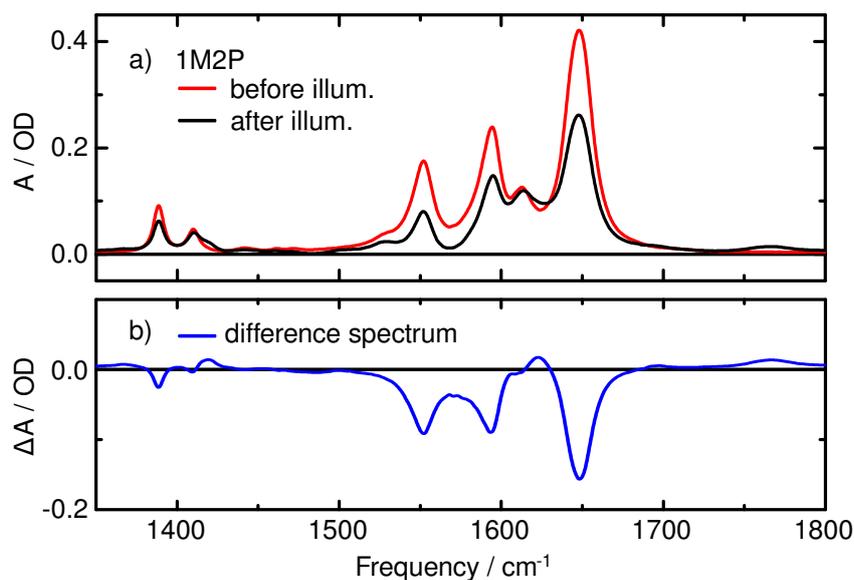


Abb. 4.18.: IR-Absorptionsspektrum von 1-Methyl-2(1H)-Pyrimidinon gelöst in D₂O vor und nach Belichtung mit 266 nm mit dem Differenzspektrum nach Belichtung.

4.4.2. Zeitaufgelöste Messungen an Pyrimidinon

Obwohl im monomeren Pyrimidinon keine signifikante Dewar-Bildung nachgewiesen wurde, kann es ähnliche photophysikalischen Eigenschaften wie das T(6-4)T-Dimer besitzen. Daher wurde es als Modellsystem des T(6-4)T-Dimers im Hinblick auf das Verhalten nach Photoanregung untersucht. Zur Analyse dieser Eigenschaften wurden zeitaufgelöste Messungen an 1M2P in D₂O durchgeführt.

Zeitaufgelöste Messungen im IR-Bereich

Für die zeitaufgelöste Messungen an 1M2P in D₂O wurde als Anregungswellenlänge die dritte Harmonische der Laserfundamentalen bei 266 nm mit einer Impulsennergie von 1 μ J gewählt. Der zur Messung verwendete Aufbau unterscheidet sich abgesehen von der Anregungswellenlänge nicht von dem der bisher geschilderten IR-Messungen. In Abbildung 4.19 ist das Ergebnis der fs-Messung an 1M2P im Überblick gezeigt. Abbildungsteil a) enthält die Konturdarstellung des Messbereichs von 1400 bis 1700 cm^{-1} im Zeitbereich von 1 ps bis 3,1 ns. Im Spektralbereich von 1525 bis 1700 cm^{-1} sind negative Absorptionsänderungen an drei spektralen Positionen zu beobachten, die auf der Zeitskala von etwa 500 ps zurückgehen. Bei 1436 cm^{-1} ist nach 1 ps eine positive Absorptionsänderung zu sehen, die sich innerhalb weniger Pikosekunden um 7 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen verschiebt und im gleichen Zeitbereich wie die negativen Signale nahezu vollständig verschwindet.

In Abbildungsteil b sind transiente Absorptionsänderungen nach Verzögerungszeiten von 1 ps bis zu 3,1 ns gezeigt. Zusätzlich ist das stationäre Absorptionsspektrum von 1M2P abgebildet (grau schattiert). Die gestrichelten Linien markieren die Positionen größter Absorptionsänderungen bei 1443, 1550, 1595 und 1648 cm^{-1} . Die negativen Signale der letzten

4. Die Bildung des Dewar-Valenzisomers

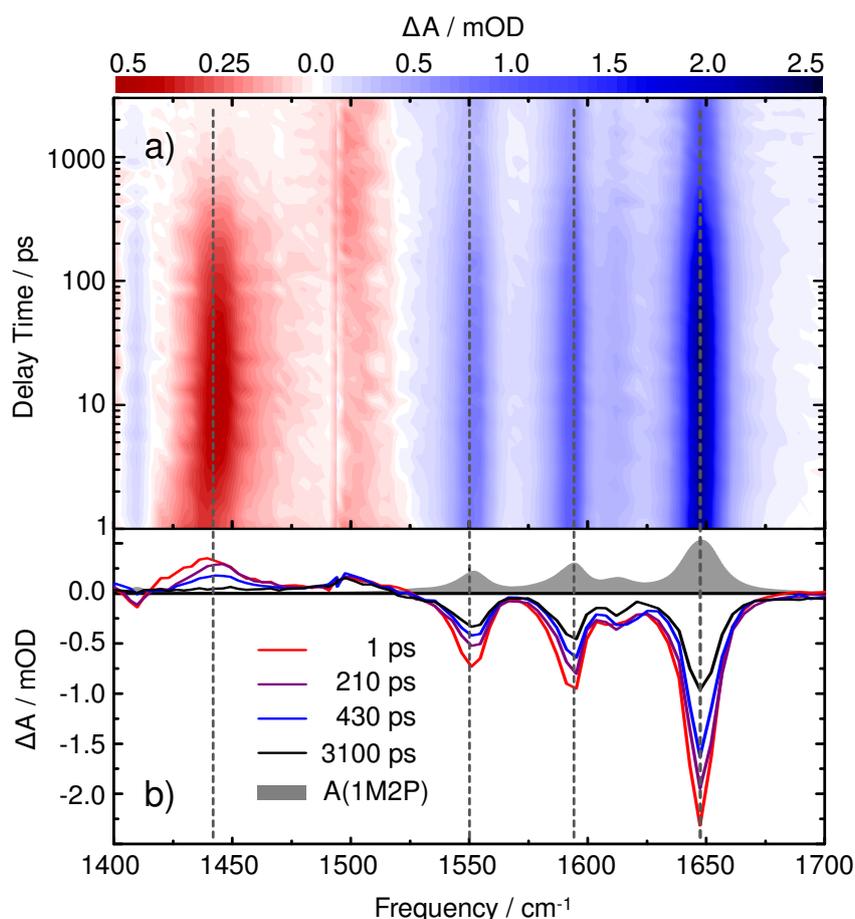


Abb. 4.19.: Ergebnis der zeitaufgelösten IR-Messungen an 1M2P in D_2O . a) Konturdarstellung der Daten erhalten nach Anregung bei 266 nm. Für eine positive Absorptionsänderung wurden doppelt so viele Skalierungsschritte verwendet als für eine negative. b) Transiente Spektren zu den angegebenen Verzögerungszeiten im Vergleich mit dem stationären IR-Spektrum von 1M2P (grau schattiert).

drei Positionen entsprechen dem Ausbleichen der Grundzustandsbanden in diesem Bereich. Dies zeigt der Vergleich mit dem stationären Absorptionsspektrum. Die Ausbleichsignale erholen sich innerhalb mehrerer hundert Pikosekunden (~ 400 ps) bis am Ende des zeitlichen Messbereichs weniger als die Hälfte der ursprünglichen Signalamplitude übrig bleibt.

Im Anschluss an die fs-Messung im IR wurden zeitaufgelöste Messungen im Nanosekundenbereich mit möglichst identischen Parametern und im gleichen Messbereich durchgeführt. Die Anregungsenergie von $1 \mu J$ lieferte das in Abschnitt 3.3 beschriebene Nanosekunden-Lasersystem mit einer Zentralwellenlänge bei 266 nm. Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 4.20 durch transiente Spektren zu verschiedenen Verzögerungszeiten dargestellt. Abbildung 4.21 zeigt die dazugehörigen Zeitverläufe. Wie in der fs-Messung sind hier ebenfalls die starken Ausbleichsignale der C=O- (1648 cm^{-1}) und C-C-Streckschwingungsbanden (1550 und 1595 cm^{-1}) zu erkennen. Auch das positive Signal bei 1443 cm^{-1} einer induzierten Absorption ist im transienten Spektrum nach 1 ns zu sehen.

Auf der Nanosekundenzeitskala werden die folgenden zeitlichen Veränderungen beobachtet:

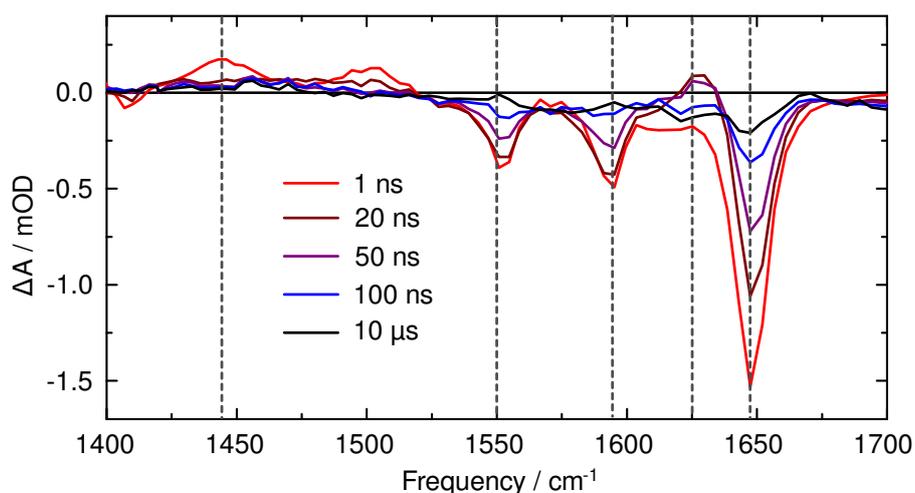


Abb. 4.20.: Transiente Spektren der Messung von 1M2P in D_2O im Nanosekunden-Zeitbereich zu den angegebenen Verzögerungszeiten nach Anregung bei 266 nm.

Zunächst verschwinden die Ausbleichbanden und die induzierte Absorption bei 1443 cm^{-1} im Zeitbereich von 1 ns. Dies entspricht, innerhalb der zeitliche Auflösung von 0.5 ns, der Dynamik aus dem fs-Experiment mit der Zeitkonstanten von etwa 400 ps. Anschließend ist eine weitere Entwicklung auf der Zeitskala von etwa 50 ns zu beobachten, die hauptsächlich aus dem weiteren Erholen der Ausbleichsignale besteht. Abweichungen von diesem Verhalten findet man in der Nähe von 1625 cm^{-1} . An dieser spektralen Position nimmt die Absorption innerhalb von 20 ns zu und gelangt in den Bereich positiver Absorptionsänderung, um dann mit der gleichen Zeitkonstante wie die Ausbleichsignale wieder in einen Bereich negativer Absorptionsänderung zu gelangen. Mehrere Mikrosekunden nach Anregung bleibt eine kleine Absorptionsänderung stehen, die (innerhalb der Messgenauigkeit) qualitativ dem Verlauf des stationären Differenzspektrums (Abbildung 4.18 b) entspricht.

Die Kinetik der spektralen Absorptionsänderungen lässt sich durch einen genauen Blick auf die Zeitverläufe erschließen. Abbildung 4.21 a zeigt die Zeitverläufe aus der Messung im Pikosekundenbereich an den in der Konturdarstellung durch gestrichelte Linien markierte Spektralpositionen. Die ersten vier Zeitverläufe repräsentieren das Erholen der Ausbleichsignale von 1M2P bei 1648, 1625, 1595 und 1550 cm^{-1} , während im unteren Bild der Zerfall der induzierten Absorption bei 1443 cm^{-1} wiedergegeben ist. Es sind vor allem im Bereich der Ausbleichsignale starke Absorptionsänderungen nach 1 ps zu beobachten, die innerhalb von mehreren hundert Pikosekunden auf etwas weniger als die Hälfte abnehmen. Das Signal der induzierten Absorption ist in etwa spiegelsymmetrisch zu den Ausbleichsignalen, was bedeutet, dass auch hier die selben molekularen Prozesse zugrunde liegen.

In Abbildung 4.21 b befinden sich die Zeitverläufe aus der Nanosekundenmessung an den in Abbildung 4.20 markierten Positionen. Zu Beginn nach 1 ns ist in allen Zeitverläufe noch ein Teil der Dynamik der Pikosekundenmessung zu erkennen. Die Ausbleichsignale bei 1648, 1625 und 1595 cm^{-1} zerfallen dann endgültig auf der Zeitskala von etwa 50 ns, während das induzierte Absorptionssignal bei 1443 cm^{-1} schon nach 3 ns praktisch vollständig abgebaut ist. Der Verlauf der Transiente bei 1625 cm^{-1} weicht von den anderen Spektralbereichen

4. Die Bildung des Dewar-Valenzisomers

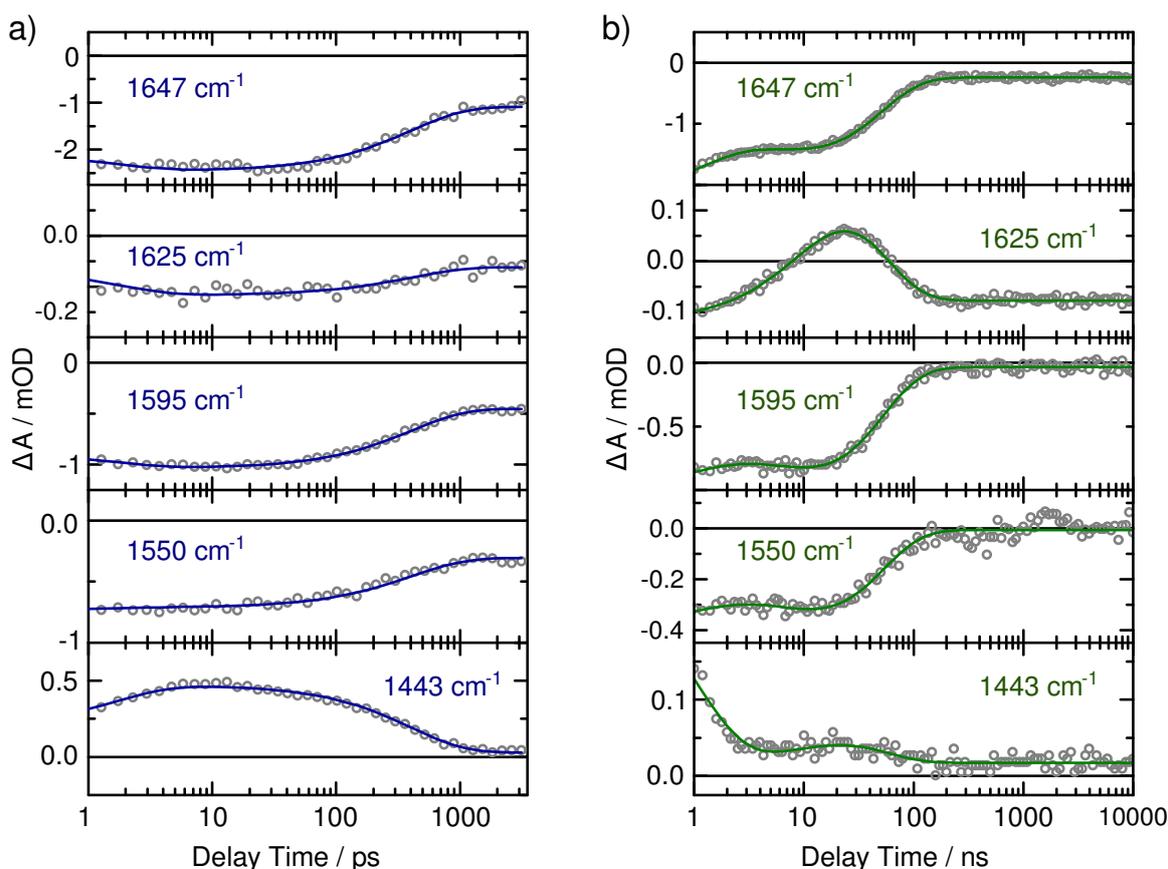


Abb. 4.21.: Zeitverläufe aus den Messungen an 1M2P im IR im a) Pikosekundenbereich und im b) Nanosekundenbereich. Die Daten wurden mittels einer Summe von Exponentialfunktionen gefaltet mit der Apparatefunktion angepasst (durchgezogene Linien).

deutlich ab. Hier ist zunächst eine Zunahme der Absorptionsänderung mit 10 ns und einer nachfolgenden Abnahme mit circa 50 ns zu sehen.

Beide Datensätze, das heißt sowohl die Femto- als auch die Nanosekunden-Messdaten, wurden mit dem multiexponentiellen Modell (beschrieben in 3.4.3) angepasst. Das Ergebnis dieser Anpassung ist in Abbildung 4.21 als durchgezogene Linien gezeigt. Tabelle 4.3 gibt eine Übersicht der dabei ermittelten Zeitkonstanten. Aus dem fs-Experiment geht eine Zeitkonstante von 404 ps hervor, die anhand der Ausbleichsignale dem Zerfall des angeregten Zustands zugeordnet werden kann. Diese Prozesse finden sich in der ns-Messung zu Beginn des zeitlichen Messbereichs wieder. Die Änderungen, die hierbei mit der Zeitkonstante von 1 ns verbunden sind gleichen den entsprechenden Signalen im fs-Experiment nach 404 ps. Die Abweichung der beiden Zeitkonstanten wird durch das begrenzte Auflösungsvermögen des Nanosekundenexperiments verursacht. Die Zeitkonstante von 12 ns beschreibt einen Signalanstieg, der nur bei 1625 cm^{-1} beobachtet wird. Im Nanosekundenbereich finden weitere Prozesse statt, die zu einem Erholen der Ausbleichsignale und einer weiteren Abnahme der induzierten Absorption führen. Diese werden durch die Zeitkonstante von 40 ns beschrieben.

	τ_0	τ_1	τ_2	τ_3
fs-IR	1.7 ps	404 ps	∞	-
ns-IR	-	(1 ns)	12 ns	40 ns

Tabelle 4.3.: Übersicht über die Zeitkonstanten aus den zeitaufgelösten Messungen an 1M2P in D₂O nach Anregung bei 266 nm. Die Zeitkonstante von 1 ns aus dem ns-Experiment entspricht innerhalb der zeitlichen Auflösung den Absorptionsänderungen im fs-Experiment mit 404 ps.

Zeitaufgelöste Messungen im UV/Vis-Bereich

Die Möglichkeit eines weiteren Vergleichs des photophysikalischen Verhaltens zwischen dem Monomer 1M2P und dem T(6-4)T-Dimer bietet die zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie im UV und sichtbaren Spektralbereich, welche in der Gruppe von Prof. Gilch durchgeführt wurde. Die Ergebnisse dieser Messung sind in der Abbildung 4.22 durch einzelne transiente Spektren wiedergegeben.

Im Bereich von 320 bis 410 nm ist ein negativer Signalbeitrag mit einem Minimum bei 370 nm zu sehen. Aus dem Vergleich mit dem Fluoreszenzspektrum der Probe in Abbildung 4.17 lässt sich dieser Bereich der stimulierten Emission des Moleküls zuordnen. Ab 410 nm bis zum Ende des Messbereichs bei 650 nm ist ausnahmslos eine positive Absorptionsänderung zu erkennen. Dies entspricht der Absorption in elektronisch angeregte Zustände (ESA²). Das Spektrum der ESA besitzt ein Maximum bei 460 nm. Innerhalb von mehreren hundert

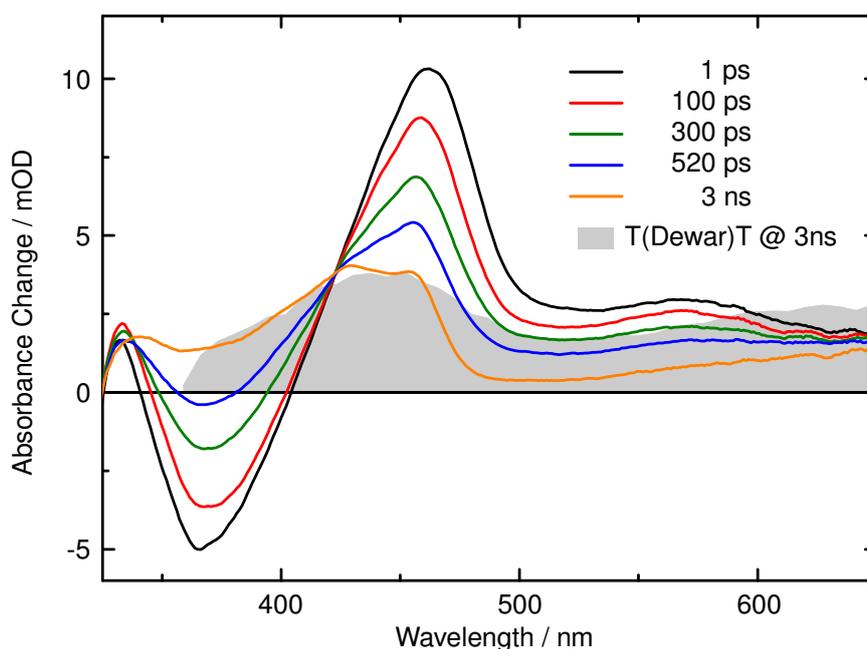


Abb. 4.22.: Transiente Spektren der Messung von 1M2P in H₂O nach Anregung bei 320 nm zu den angegebenen Verzögerungszeiten bis 3 ns mit dem transienten Spektrum des T(6-4)T-Dimers nach 3 ns zum Vergleich (grau schattiert).

²ESA = Excited State Absorption

4. Die Bildung des Dewar-Valenzisomers

Pikosekunden nimmt die ESA auf weniger als die Hälfte der Intensität des Ausgangssignals ab. Dabei verändert sich auch die Form des Signals zu einem Verlauf mit einem breiteren leicht modulierten Maximum bei circa 440 nm.

Aus der globalen Datenanpassung mit einer Summe aus Exponentialfunktionen erhält man für den Zeitbereich bis 3,5 ns zwei Zeitkonstanten bei 1,1 ps und 410 ps. Die Zeitkonstante bei 1,1 ps beschreibt die Verschiebung des stimulierten Emissionssignals von 340 nach 380 nm. Die längere Zeitkonstante von 410 ps ist mit einer Abnahme der stimulierten Emission und der induzierten Absorption (ESA) verbunden. Die Form des transienten Spektrums nach 3 ns (gelb) zeigt ein ähnliches Verhalten wie das transiente Spektrum des T(6-4)T-Dimers nach gleicher Verzögerungszeit (grau schattiert). Zeitaufgelöste Messungen auf der Nano- bis Mikrosekunden-Zeitskala bei 635 nm zeigen, dass dieses Signal mit etwa 100 ns weiter zerfällt. Eine Verringerung der Konzentration um eine Größenordnung führt zu einer Verlängerung der Zeitkonstanten. Die Datenanpassung ergibt 60 ns bei 50 mM und 360 ns bei 5 mM.

Die Zeitkonstante von 60 ns entspricht der Zerfallszeit von 40 ns aus dem IR-Experiment (die Konzentration bei der IR-Messung betrug 64 mM). Diese Kinetik kann einem Zerfall eines elektronisch angeregten Zustands zugeordnet werden. Die Konzentrationsabhängigkeit weist darauf hin, dass es sich hierbei um den Zerfall eines Triplett-Zustandes handelt. Die vergleichsweise kurze Lebensdauer des Triplett-Zustandes kann durch ein Selbstlöschen durch Moleküle im Grundzustand erklärt werden. Dies führt mit zunehmender Konzentration zu einer höheren Zerfallsrate.

Zeitaufgelöste Emissionsmessungen

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus den zeitaufgelösten Messungen im Infraroten wurden in der Gruppe von Prof. Gilch zeitaufgelöste Emissionsmessungen an 1M2P in Abhängigkeit der Proben temperatur durchgeführt. Es wird ein monoexponentieller Zerfall des Fluoreszenzsignals beobachtet. Eine zusätzliche Komponente geringer Intensität kann auf Verunreinigung zurückgeführt werden. Durch die Emissionsmessung lässt sich der Zerfall des angeregten Zustands festlegen. Die dabei ermittelten Zeitkonstanten in Abhängigkeit der Temperatur sind in Tabelle 4.4 eingetragen.

Temp. / K	τ_{S_1} / ps
291	450
313	290
328	210
338	160

Tabelle 4.4.: Übersicht über die Zeitkonstanten τ_{S_1} in Abhängigkeit der Temperatur ermittelt aus der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung von 1M2P.

Wie beim T(6-4)T-Dimer wird eine Abnahme der S_1 -Lebensdauer mit steigender Temperatur beobachtet. Dies bedeutet, dass auch bei 1M2P die Deaktivierung des elektronisch angeregten Zustands über eine Energiebarriere stattfindet.

4.4.3. Diskussion der Ergebnisse der Messungen an Pyrimidinon

In den zeitaufgelösten Infrarot-Messungen werden zwei zeitliche Komponenten beobachtet, die der Deaktivierung des angeregten Zustands mit 400 ps und 40 ns zugeordnet werden. Die zeitaufgelösten Messungen im UV/Vis-Bereich bestätigen diese Zeitkonstanten. Beide Messungen weisen darauf hin, dass mit 400 ps der Zerfall eine interne Konversion in den Grundzustand beobachtet wird und die langlebige Komponente mit einem Triplett-Zustand in Verbindung gebracht werden kann. Die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen bestätigen den S_1 -Zerfall mit 400 ps und liefern genaue temperaturabhängige Werte für die S_1 -Lebensdauer.

Basierend auf den Ergebnissen der zeitaufgelösten Messungen an 1M2P kann ein Reaktionsmodell aufgestellt werden. Dieses ist in Abbildung 4.23 gezeigt. Durch Photoanregung findet ein Übergang in einen elektronisch angeregten Zustand statt. Die Deaktivierung des S_1 führt über interne Konversion in den Grundzustand und in einen Triplett-Zustand.

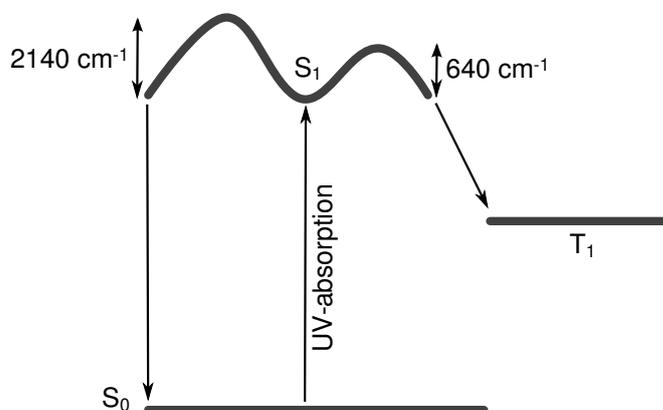


Abb. 4.23.: Reaktionsmodell von 1M2P. Nach Photoanregung findet die Deaktivierung des S_1 über interne Konversion und einen Übergang in einen Triplett-Zustand statt. Abbildung nach [Rys11].

Mit diesem Modell kann ein Maß für die Ausbeute der Triplett-Bildung aus dem Verhältnis der initialen Absorptionsänderung $\Delta A(t = 0) = -2,35$ mOD und dem remanenten Ausbleichsignal nach Beendigung des 400 ps-Prozesses $\Delta A'_{\infty} = -1,15$ mOD an der spektralen Position von 1647 cm^{-1} erhalten werden. Daraus ergibt sich ein Wert für die Triplett-Quantenausbeute ϕ_T von 0,49. Dieser Wert kann zur Eichung der Ergebnisse aus den temperaturabhängigen zeitaufgelösten Emissionsmessungen verwendet werden. Damit erhält man temperaturabhängige Reaktionsraten für die interne Konversion und Triplett-Bildung. Über einen Arrhenius-Graphen lassen sich dann die Höhen der jeweiligen Energiebarrieren ermitteln. Diese sind in Abbildung 4.23 eingetragen und ergeben 2140 cm^{-1} für die interne Konversion und 640 cm^{-1} für die Triplett-Bildung.

Die zeitaufgelösten Experimente an 1M2P weisen Gemeinsamkeiten und signifikante Unterschiede zwischen dem monomeren Pyrimidinon und dem T(6-4)T-Dimer auf. Beide Verbindungen zeigen ein langlebiges photophysikalisches Deaktivierungsverhalten über Energiebarrieren. Bei beiden Verbindungen werden langlebige Prozesse im Nanosekundenbereich beobachtet. Im Falle von Pyrimidinon lässt sich der 50 ns-Prozess dem Zerfall eines Triplett-Zustandes zuordnen. Die spektrale Ähnlichkeit im UV-Spektrum zum T(6-4)T-Dimer

deutet auch hier auf eine Triplett-Beteiligung hin. Der Unterschied besteht in der Reaktivität zum Dewar-Valenzisomer. Während die Isomerisierungsreaktion im Dimer zweifelsfrei nachgewiesen werden kann und die Dewar-Bildung auf der 100 ps-Zeitskala abläuft, wird in 1M2P bei Raumtemperatur keine Dewar-Form beobachtet. Die Dimer-Struktur mit ihrer Formacetal-Verbrückung und der (6-4)-Verbindung scheint die Reaktivität zum Dewar-Valenzisomer entscheidend zu beeinflussen. Für ein vertiefendes Verständnis des Reaktionsmechanismus in Verbindung mit den strukturellen Änderungen wurden quantenchemischen Berechnungen in der Gruppe von Prof. de Vivie-Riedle durchgeführt. Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst.

4.5. Theoretische Berechnungen zum Reaktionsmechanismus

Die Reaktion zum Dewar-Valenzisomer wurde auch durch ausführliche theoretische Berechnungen überprüft. Im Vordergrund stand der Vergleich zwischen dem verbrückten T(6-4)T-Dinukleoid (Abschnitte 4.1 bis 4.3) und einer monomeren, modifizierten DNA-Base 5-Methyl-2-Pyrimidinon (5M2P). Die Berechnungen bestätigen zum einen die experimentellen Ergebnisse zur Dewar-Isomerisierung aus den experimentellen Untersuchungen. Sie liefern zum anderen eine molekulare Erklärung dafür, dass ausschließlich im verbrückten (6-4)-Dimer eine Dewar-Bildung beobachtet werden kann. Die theoretischen Berechnungen wurden von Benjamin Fingerhut aus der Arbeitsgruppe von Prof. de Vivie-Riedle durchgeführt. Im folgenden Kapitel werden die wichtigsten Erkenntnisse aus dieser Analyse erläutert. Eine ausführlichere Darstellung ist in [Fin10] nachzulesen.

4.5.1. Simulation der IR-Absorptionspektren

Zum Vergleich mit den experimentell ermittelten Daten wurden zunächst die stationären IR-Spektren des T(6-4)T-Dinukleoids und des dazugehörigen Dewar-Isomers simuliert. In Abbildung 4.24 a sind die berechneten Spektren des T(6-4)T-Dimers (rot) und des Dewar-Schadens (schwarz) und darunter die Differenz der beiden Spektren gezeigt. Sie wurden unter Berücksichtigung eines Lösungsmittel-Kontinuum Modells erstellt. Abbildung 4.24 b zeigt im Vergleich die experimentell bestimmten stationären Spektren mit dem dazugehörigen Differenzspektrum. Die Ergebnisse weisen eine sehr gute Übereinstimmung auf. Insbesondere der Verlauf der drei intensiven Carbonyl-Banden zwischen 1600 und 1720 cm^{-1} wird in den berechneten Spektren sehr gut wiedergegeben. Auch die Reaktion zum Dewar-Isomer äußert sich durch die Entkopplung der Carbonyl-Banden und die Verschiebung einer dieser Banden in den spektral isolierten Bereich von 1780 cm^{-1} . In den Differenzspektren ist ein sehr ähnlicher Verlauf mit einer starken Absorptionsabnahme zwischen 1600 und 1720 cm^{-1} und einer ebenso starken Zunahme bei 1780 cm^{-1} (Bildung der Dewar-Markerbande) zu erkennen.

Zur Bestimmung eines möglichen Beitrages eines Triplettzustandes wurde zudem das Triplettpektrum des T(6-4)T-Dimers simuliert. Es entspricht in Abbildung 4.25 a der blauen Linie und besitzt Absorptionsbanden im Bereich von 1600 bis 1730 cm^{-1} . In Abbildung 4.25 b sind Differenzspektren mit unterschiedlichem Triplettanteil gezeigt. Eine Beteiligung des

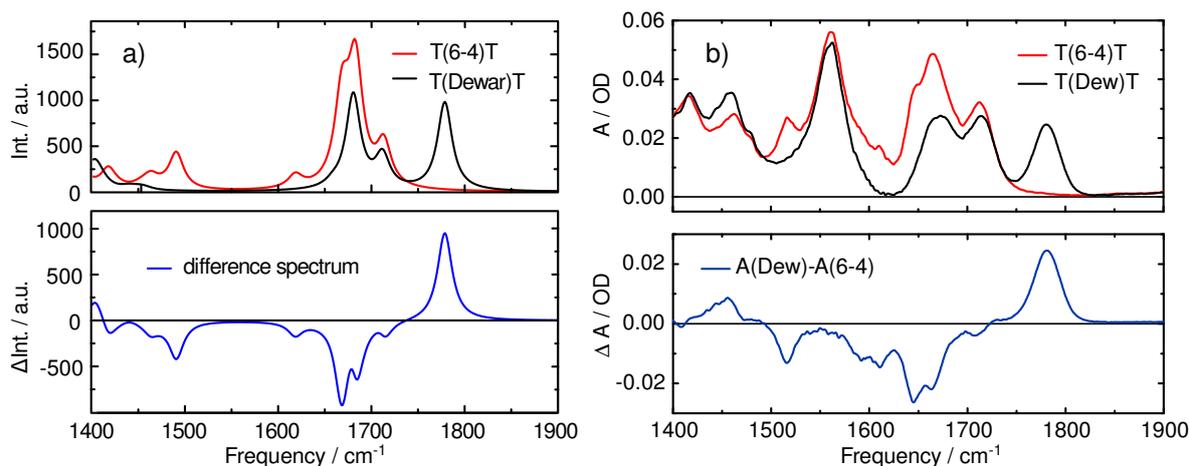


Abb. 4.24.: a) Simulierte IR-Spektren und b) experimentelle IR-Spektren des T(6-4)T-Dimers (rot) und des Dewar-Schadens (schwarz). Das dazugehörige Differenzspektrum ist unten in blau abgebildet. In den Berechnungen wurde ein B3LYP Skalierungsfaktor von 0.9614 und eine Lorentz-Linienbreite von 9.5 cm^{-1} verwendet. Die Abbildung der theoretischen Berechnungen erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Prof. de Vivie-Riedle und Dr. B. Fingerhut.

Triplettzustandes führt folglich zu einer Modulation des Absorptionssignals, die das Amplitudenverhältnis der Ausbleichsignale bei 1645 und 1666 cm^{-1} beeinflusst. Entsprechende Änderungen werden in den experimentellen Ergebnissen im Zeitbereich von Nanosekunden bis Mikrosekunden beobachtet (siehe Abbildung 4.25 c). Aus diesen Daten geht hervor, dass sich das Ausbleichsignal bei 1666 cm^{-1} mit zwei Zeitkonstanten (1 ns und 500 ns) erholt (siehe Abschnitt 4.3.2). Jedoch lassen sich diese Änderungen nicht eindeutig der Bildung beziehungsweise dem Zerfall des Triplett-Zustandes zuordnen. Die Bildung des Triplett-Zustands müsste sich durch eine Zunahme der Absorption im Bereich der ihm zugeordneten Bande bei 1666 cm^{-1} äußern. Da sich diesem Spektralbereich auch intensivere Absorptionsbanden des T(6-4)T-Grundzustands befinden (4.25 a rote Linie), die einen solchen Prozess überlagern ist eine eindeutige Identifikation des Triplett-Zustandes aus den IR-Daten nicht möglich.

4.5.2. Die Dynamik des T(6-4)T-Photoschadens und sein Reaktionsmechanismus zum Dewar-Valenzisomer

Im folgenden Abschnitt werden die theoretischen Erkenntnisse der Dynamik des T(6-4)T-Dimers nach Photoanregung und der Mechanismus der Isomerisierungsreaktion zum Dewar-Schaden beschrieben. Im Vordergrund steht hierbei der Vergleich des T(6-4)T-Dimers mit dem Monomer und die Klärung der Frage, warum nur im verbrückten Dimer eine Dewar-Isomerisierung beobachtet wird. Diese dynamischen Simulationen basieren auf einer on-the-fly ONIOM (CAS(12/9):HF) Moleküldynamik mit dem Basissatz 6-31G*. Die theoretischen Grundlagen hierzu werden in [Fin10] geliefert. Die Berechnungen wurden an dem identischen Formacetal-verbrückten T(6-4)T-Dimer, das in allen experimentellen Messungen verwendet wurde, und an der monomeren Base 5-Methyl-2-Pyrimidinon (5M2P) durchgeführt.

4. Die Bildung des Dewar-Valenzisomers

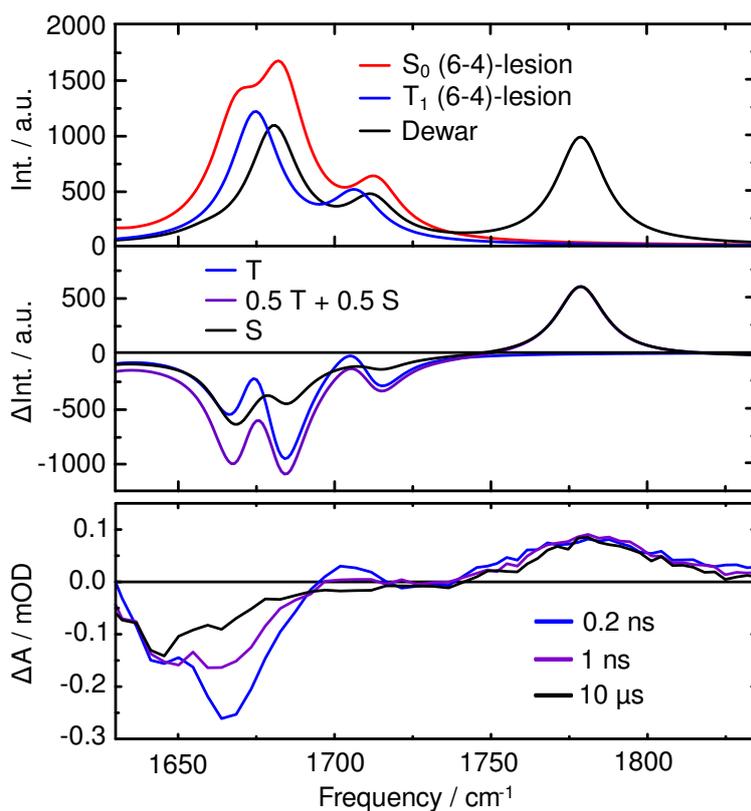


Abb. 4.25.: a) Simuliertes IR-Triplett-Spektrum des T(6-4)T-Dimers (blau) mit den Singulett-Spektren des T(6-4)T-Dimers (rot) und des dazugehörigen Dewar-Isomers (schwarz). b) Simulierte Differenzspektren unter Berücksichtigung verschiedener Triplett-Anteile. Die Abbildung der theoretischen Berechnungen erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Prof. de Vivie-Riedle und Dr. B. Fingerhut. c) Differenzspektren aus den zeitaufgelösten Messungen im Nanosekundenbereich nach verschiedenen Verzögerungszeiten. Der Vergleich mit den simulierten Spektren zeigt, dass die Signalmodulation im Bereich von 1620 bis 1700 cm^{-1} durch einen Triplett-Anteil erklärt werden kann.

Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen dem T(6-4)T-Dimer und dem Monomer 5M2P werden anhand des Reaktionsschemas in Abbildung 4.26 erklärt. Beide Verbindungen zeigen ein langsames photophysikalisches Deaktivierungsverhalten. Bei beiden führt die Photoanregung zu einer Bevölkung des $\pi - \pi^*$ -Zustands. Die Fluoreszenz erfolgt aus diesem relaxierten $\pi - \pi^*$ -Zustand in den Grundzustand (F1). Bei 5M2P beträgt die Emissionsenergie 2.95 eV ($\lambda = 420 \text{ nm}$), was einer guten Übereinstimmung mit dem experimentellen Wert von $\lambda = 380 \text{ nm}$ entspricht. In beiden Verbindungen findet sich ein zusätzlicher Deaktivierungskanal über ein Inter-System-Crossing (ISC) in einen Triplett-Zustand.

Der größte Unterschied zwischen dem T(6-4)T-Dimers und dem Monomer 5M2P besteht in der Reaktivität zum Valenz-Isomer. In 5M2P ist keine Dewar-Bildung aus dem ersten optisch zugänglichen Zustand möglich. Die Deaktivierung von 5M2P führt über einen niederenergetischen Saum konischer Durchschneidungen ($\text{CoIn}^{5M2P}(S_0/S_1, \text{min})$) mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit über interne Konversion in den Grundzustand. In der geometrischen Struktur dieser $\text{CoIn}^{5M2P}(S_0/S_1, \text{min})$ lässt sich der entscheidende Unterschied zum verbrückten Dimer erkennen. Die CoIn^{5M2P} wird nämlich über eine *out-of-plane*-Bewegung des N_3 -Atoms

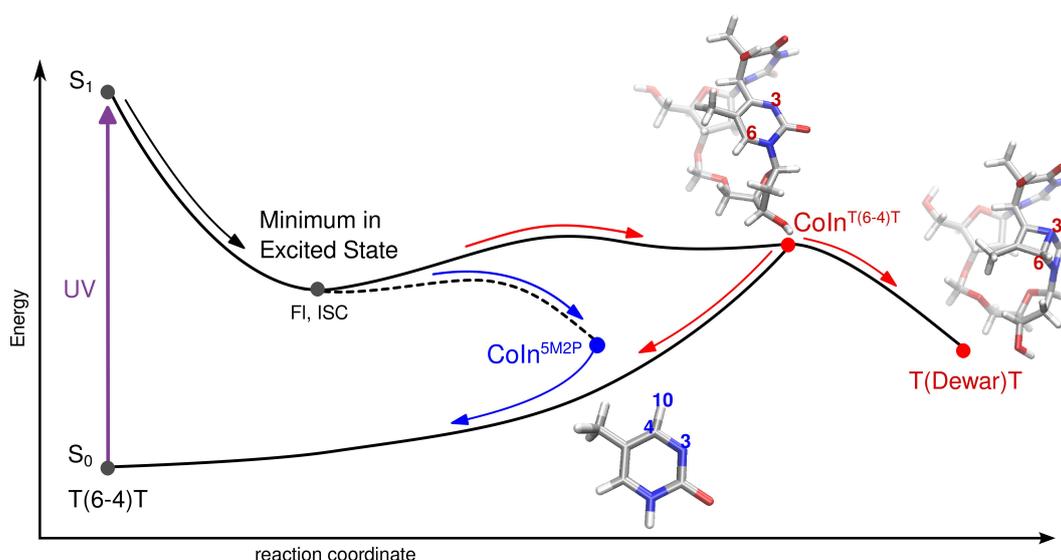


Abb. 4.26.: Reaktionsschema des photochemischen Isomerisierung von T(6-4)T zum T(Dewar)T und die Deaktivierung von T(6-4)T nach quantenchemischen Berechnungen. Zum Vergleich ist der Verlauf der Relaxation des Monomers 5M2P gezeigt. In den jeweiligen Strukturbildern sind die Positionen der Atome markiert, die die unterschiedlichen Geometrien von Monomer und Dimer im angeregten Zustand ausmachen.

kombiniert mit einer $sp^2 \rightarrow sp^3$ -Hybridisierung des C_4 -Atoms gebildet. Das H_{10} -Atom am C_4 nimmt dadurch eine *out-of-plane*-Position ein, was einer Torsionsbewegung entspricht. Die bei dieser Torsionsbewegung beteiligten Atome sind im Molekülschema von 5M2P in Abbildung 4.26 blau beschriftet. Diese Bewegungen erfolgen auf dem Weg zur $CoIn^{5M2P}(S_0/S_1, min)$.

Die Analyse der am niedrigsten lokalisierten konischen Durchschneidung des T(6-4)T-Dimers ($CoIn^{T(6-4)T}(S_0/S_1, min)$) zeigt, dass hier eine andere geometrische Struktur vorliegt. Die *out-of-plane*-Bewegung wird dabei vom N_3 - und C_6 -Atom durchgeführt. Die beteiligten Atome sind rot beschriftet. Diese Geometrie wird durch die Zucker-Formacetal-Verbrückung verursacht. Das Rückgrat im Dinukleotid verhindert die $sp^2 \rightarrow sp^3$ -Hybridisierung des C_4 -Atoms und führt dazu, dass die $CoIn^{T(6-4)T}(S_0/S_1, min)$ erreicht werden kann. Dadurch wird zusätzlich zur internen Konversion in den Grundzustand ein weiterer Reaktionskanal geöffnet, der zur Dewar-Isomerisierung vom T(6-4)T zum T(Dew)T führt. Die theoretischen Berechnungen geben somit einen entscheidenden Hinweis darauf, warum die Dewar-Isomerisierung bei Raumtemperatur ausschließlich in einer verbrückten Dimer-Form stattfinden kann: Das Rückgrat verändert die Topologie der elektronischen Anregung dahingehend, dass eine Dewar-Reaktion erst möglich gemacht wird.

4.6. Zusammenfassung der Ergebnisse und mögliches Reaktionsmodell

Die Ergebnisse bezüglich der photophysikalischen Eigenschaften des T(6-4)T-Dimers und der Bildung seines Dewar-Valenzisomers basierend auf den in diesem Kapitel beschriebenen

4. Die Bildung des Dewar-Valenzisomers

experimentellen Untersuchungen und quantenchemischen Berechnungen werden im Folgenden zusammengefasst. Anhand dieser werden mögliche Reaktionsmodelle für das T(6-4)T-Dimer vorgeschlagen.

4.6.1. Bildung des Dewar-Valenzisomers

In den zeitaufgelösten Messungen im Infraroten kann die Bildung des Dewar-Valenzisomers aus dem T(6-4)T-Schaden in Echtzeit verfolgt werden. In den transienten IR-Spektren ist die Dewar-Bildung anhand einer charakteristischen Verschiebung einer Carbonyl-Schwingungsbande hin zu 1781 cm^{-1} sichtbar. Da sich in diesem spektralen Bereich keine weiteren Absorptionsbanden befinden, lässt sich die Dewar-Bildung eindeutig identifizieren. In Abbildung 4.27 sind diese Erkenntnisse aus den zeitaufgelösten Messungen bezüglich der Dewar-Bildung anhand des Potentialenergie-Schemas gezeigt.

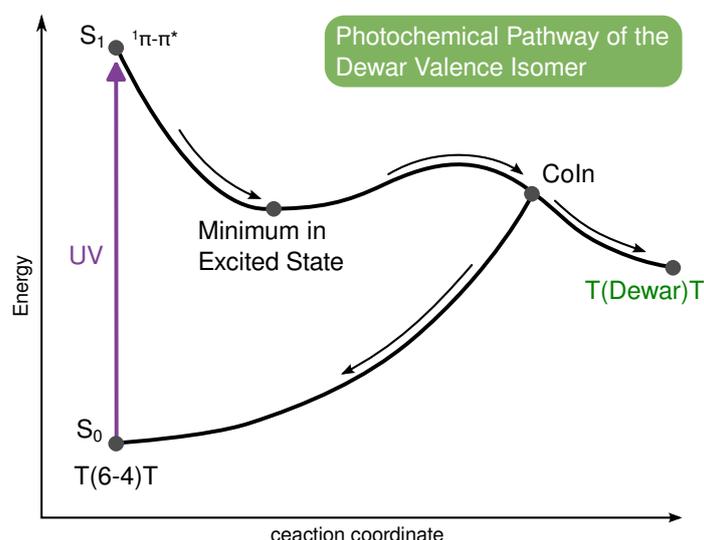


Abb. 4.27.: Potentialenergie-Schema der Bildung des Dewar-Valenzisomers von T(6-4)T. Die Isomerisierungsreaktion erfolgt über eine Aktivierungsbarriere aus einem Minimum im elektronisch angeregten Zustand mit $\pi - \pi^*$ -Charakter über eine konische Durchschneidung (CoIn) in die Dewar-Form.

Aus der Datenanpassung der zeitaufgelösten Messungen im Infraroten geht eine Zeitkonstante für die Dewar-Bildung von 130 ps hervor. Mit der gleichen Zeitkonstante wird ein teilweises Erholen der Ausbleichsignale im Carbonyl-Streckschwingungsbereich von 1625 bis 1700 cm^{-1} und damit der Zerfall des angeregten Zustands beobachtet.

Eine weitere zeitaufgelöste IR-Messung im Nano- bis Mikrosekundenbereich weist langlebige Komponente von 1,3 ns auf, die hauptsächlich mit Absorptionsänderungen im Carbonyl-bereich verbunden wird, jedoch keine Änderung im Bereich der Dewar-Bande bei 1781 cm^{-1} hervorruft. Dies zeigt, dass die Dewar-Bildung zu diesem Zeitpunkt bereits zum größten Teil abgeschlossen ist. Basierend auf diesen Ergebnissen ist anzunehmen, dass die Dewar-Bildung über einen elektronisch angeregten Singulett-Zustand über eine konische Durchschneidung

(CoIn) erfolgt. Die Quantenausbeute der Dewar-Bildung abgeschätzt aus den zeitaufgelösten IR-Daten ergibt einen Wert von $\phi_{Dewar}^{fs} = 5-8\%$.

In den zeitaufgelösten Emissionsmessungen an T(6-4)T-Dimeren wird die Zeitkonstante von 130 ps für den Zerfall des angeregten Zustands bestätigt. Zudem zeigt sich auch in diesen Messungen eine Zerfallskomponente im Bereich von 1 ns. Die Temperaturabhängigkeit dieser Zerfallskonstanten weist darauf hin, dass für eine Deaktivierung des angeregten Zustands Aktivierungsbarrieren von etwa 1000 cm^{-1} (130 ps) und 1500 cm^{-1} (1 ns) überwunden werden müssen.

Zusätzlich wurden zeitaufgelösten Messungen im UV und sichtbaren Spektralbereich an T(6-4)T-Dimeren im Pikosekundenbereich durchgeführt. Die Ergebnisse weisen ein weiteres Mal den Zerfall des elektronisch angeregten Zustands mit einer Zeitkonstante im Bereich von 130 ps nach. Zusätzlich zeigen sie, dass innerhalb weniger Pikosekunden nach Photoanregung eine Relaxation in ein Minimum des elektronisch angeregten Zustands stattfindet.

In quantenchemischen Berechnungen ist die Dynamik des T(6-4)T-Dimers nach Photoanregung analysiert worden. Es zeigt sich, dass nach Erreichen eines Minimums im angeregten Zustand mit $\pi - \pi^*$ -Charakter im Rückgrat-verbrückten T(6-4)T-Dimer eine konische Durchschneidung (CoIn) zugänglich wird, die zum einen in den elektronischen Grundzustand und zum anderen in die Dewar-Form des Dimers führt.

4.6.2. Photophysik von T(6-4)T

Die photophysikalischen Eigenschaften von T(6-4)T, die aus verschiedenen zeitaufgelösten Experimenten hervorgehen, sind in dem Zustandsdiagramm in Abbildung 4.28 zusammengefasst. Nach Photoanregung mit Wellenlängen im Bereich der Absorptionsbande bei 325 nm werden folgende Prozesse beobachtet:

Es erfolgt zunächst eine Relaxation aus dem Franck-Condon-Zustand in ein Minimum des angeregten $\pi - \pi^*$ -Zustands mit einer Zeitkonstante von 3.5 ps. Dies geht im Wesentlichen aus den zeitaufgelösten Absorptionmessungen im UV und sichtbaren Spektralbereich hervor. Die Deaktivierung des angeregten Zustands erfolgt mit zwei Zeitkonstanten von 130 ps und 1,2 ns und daher über zwei angeregte Zustände. Dies zeigen sowohl die zeitaufgelösten Infrarot-Daten als auch die Messungen im UV/Vis-Bereich in Absorption und Emission. Es kann jedoch nicht unterschieden werden ob die Zustände parallel (wie in Abbildung 4.28) oder sequenziell bevölkert werden.

Die Emissionsmessungen zeigen die Existenz von zwei fluoreszierenden Zuständen durch spektrale Unterschiede in den transienten Emissionsspektren (Fl_1 und Fl_2). Der 130 ps-Prozess trägt außerdem den größeren Anteil von etwa 87 % zum Gesamtsignal bei. Der langlebigere 1,2 ns-Zustand wird demnach mit einem kleineren Anteil von 13 % bevölkert. Das Dewar-Valenzisomer entsteht, wie bereits geschildert, aus dem angeregten Singulett-Zustand mit einer Zeitkonstanten von 130 ps und einer Quantenausbeute von 5-8 %.

In den zeitaufgelösten IR-Messungen findet sich eine weitere langlebige Komponente mit einer Zeitkonstante von etwa 500 ns. Zusätzlich weist der Vergleich mit simulierten Triplett-Spektren von T(6-4)T darauf hin, dass nach dem 1,2 ns-Prozess eine Triplett-Signatur vorhanden ist. Daher kann angenommen werden, dass bei dem Zerfall des elektronisch angeregten Zustands eine Triplett-Bildung erfolgt. Aus welchem der beiden S_1 -Zustände die Bildung erfolgt kann nicht eindeutig bestimmt werden. Die spektrale Signatur der 500 ns-Komponente

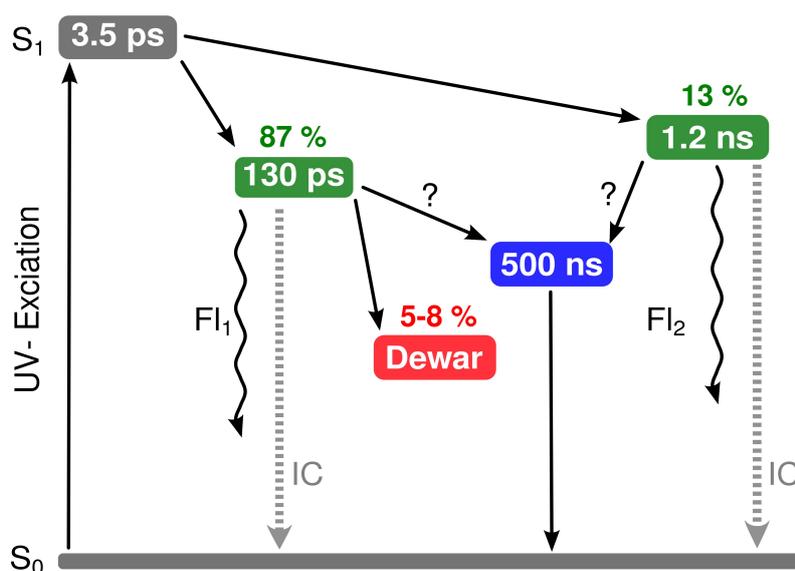


Abb. 4.28.: Reaktionsschema des T(6-4)T-Dimers nach Anregung bei 325 nm. Eine Deaktivierung des angeregten Zustands erfolgt über zwei Zustände mit unterschiedlichen Zeitkonstanten. Das Dewar-Isomer wird hauptsächlich aus dem kurzlebigeren Zustand mit 130 ps gebildet. Die spektrale IR-Signatur der 1,3 ns-Komponente und eine Beobachtung einer langlebigen Komponente mit 500 ns weisen auf die Bildung und anschließendem Zerfall eines Triplett-Zustandes hin.

weist zudem darauf hin, dass es sich um einen Übergang des Triplett-Zustands in den Grundzustand handelt. Ein weiteres Anzeichen für die Beteiligung eines Triplett-Zustandes liefern die zeitaufgelösten Messungen am Monomer Pyrimidinon im infraroten, UV und sichtbaren Spektralbereich. Das Monomer weist bis auf die fehlende Bildung des Dewar-Isomers Ähnlichkeiten in den photophysikalischen Eigenschaften auf.

4.6.3. Das Rückgrat ermöglicht die Dewar-Bildung

Die Ergebnisse aus den stationären und zeitaufgelösten Messungen zeigen deutlich, dass im T(6-4)T-Dimer durch Photoanregung der Absorptionsbande bei 325 nm eine Isomerisierungsreaktion zur Dewar-Bildung stattfindet. In den Experimenten an monomerem Pyrimidinon wird bei Raumtemperatur in Lösung praktisch keine Dewar-Bildung beobachtet (Kapitel 4.4 und [Nis80]).

In der Gruppe von Prof. Carell wurde eine weitere Verbindung auf die Dewar-Bildung hin untersucht. Es handelt sich dabei um ein T(6-4)T-Dimer mit einer Zucker Silyl-Verbrückung. Diese Verbrückung wurde chemisch durchtrennt und das dabei entstandene Dimer mit offenem Rückgrat untersucht. Die Belichtung der UV-Absorptionsbande bei 325 nm ergab wie beim Monomer keine nachweisbare Dewar-Form. In Abbildung 4.29 sind die untersuchten Verbindungen dargestellt. Der Vergleich der experimentellen Ergebnisse zur Dewar-Bildung mit den Erkenntnissen aus den quantenchemischen Berechnungen ermöglicht folgende Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der Verbindungen nach Photoanregung: Im Monomer wird eine Rehybridisierung an C₄ mit einer *out-of-plane*-Bewegung der H₁₀- und N₃-Atome beobachtet (in Abbildung rot 4.29 markiert). Diese Bewegung führt zu einer schnellen und effektiven

4.6. Zusammenfassung der Ergebnisse und mögliches Reaktionsmodell

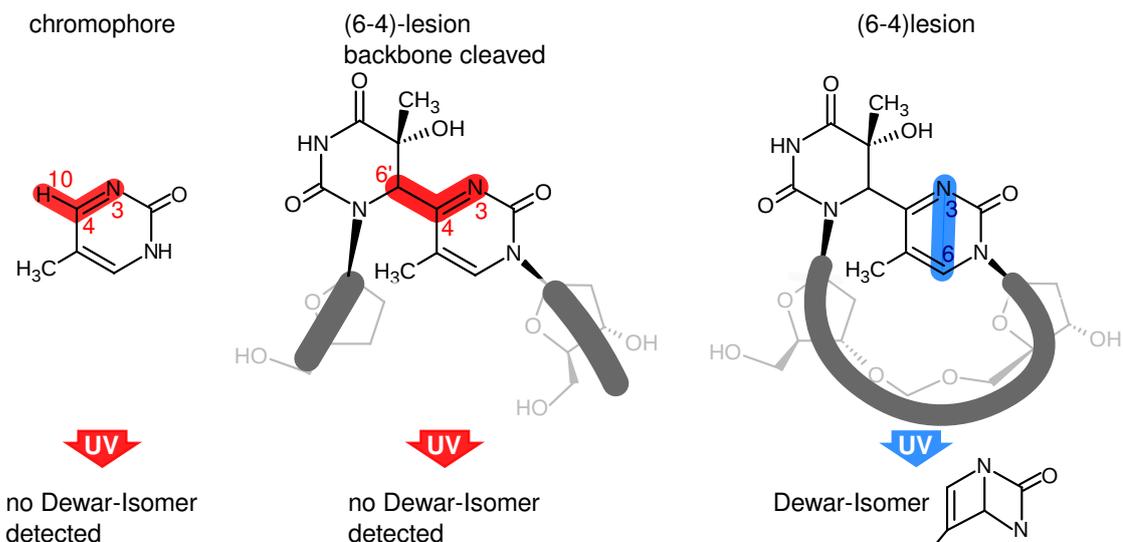


Abb. 4.29.: Schematische Darstellung der Verbindungen, die auf die Dewar-Bildung hin untersucht wurden. Das einzelne Chromophor und ein T(6-4)T-Dimer mit durchtrenntem Rückgrat (grau schraffiert) weisen keine Dewar-Bildung auf. Eine freie Bewegung der in rot gekennzeichneten Atome, insbesondere eine Rehybridisierung an C₄, ist hier möglich. Im T(6-4)T-Dimer mit intaktem Rückgrat führen die Ringspannungen zu einer Bewegung hin zu einer Dewar-Geometrie (blau gekennzeichnete Atome).

Relaxation in den Grundzustand. Im T(6-4)T-Dimer mit durchtrenntem Rückgrat (in Bildmitte) sind die selben Bewegungen der C₄-, C_{6'}- und N₃-Atome möglich, was wie im Monomer zu einer Ausgleichsbewegung direkt in den Grundzustand führt. Dies erklärt, warum auch hier keine Dewar-Form beobachtet wird.

In der Verbindung mit dem intakten Rückgrat im T(6-4)T-Dimer (im Bild links) ist die Bewegung des C_{6'}-Atoms eingeschränkt. Durch die Ringspannung verändert sich das Bewegungsmuster nach elektronischer Anregung. Eine Rehybridisierung an C₄ ist nicht mehr möglich. Dies führt zu einer *out-of-plane*-Bewegung der C₆- und N₃-Atome (blau markiert) mit Dewar-ähnlicher Geometrie und erlaubt die Bildung des Dewar-isomers mit merklicher Ausbeute. Das Rückgrat im T(6-4)T-Dimer wirkt hier als Klammer und ermöglicht erst Reaktion hin zum Dewar-Isomer.

5. Die Photohydratisierung von Fluoro-Uridin

Die Bildung des Photohydrats von Pyrimidinen wird bereits seit der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts untersucht. Eine Zusammenfassung dieser Untersuchungen findet sich in [Fis76]. Bei Uracil-Derivaten in wässriger Lösung wurde bei UV-Belichtung eine Abnahme der Absorption bei 260 nm beobachtet und eine damit verbundene Hydratbildung identifiziert. Außerdem zeigte sich, dass diese Reaktion zum größten Teil reversibel ist [Wan58]. Es folgten eingehende Untersuchungen zur Natur des Photohydrats von Pyrimidinen hinsichtlich Quantenausbeute, Einfluss des pH-Werts, Viskositäts- und Substitutionseffekten [Wan68, Bur72, Sum72]. Über den Mechanismus der Bildung des Photohydrats bei Pyrimidinen gibt es jedoch noch keine endgültige Aussage. Unter anderem wird diskutiert, ob die Bildung über einen elektronisch angeregten Zustand oder über einen vibronisch angeregten Grundzustand erfolgt. Für einen direkten Nachweis eines bestimmten Reaktionsweges hatten die bisherigen Methoden nicht die notwendige Zeitauflösung beziehungsweise Nachweispräzision.

In diesem Kapitel werden die photophysikalischen und photochemischen Prozesse nach UV-Anregung eines Uridin-Derivats mit der Methode der zeitaufgelösten IR-Spektroskopie untersucht. Eine detaillierte Beschreibung des Messablaufs und der experimentellen Parameter findet sich in Kapitel 3. Der erste Teil dieses Kapitels befasst sich mit der Beschreibung des verwendeten Modellsystems Fluoro-Uridin und seiner stationären Charakterisierung im infraroten Spektralbereich. Anschließend werden die zeitaufgelösten IR-Messungen an Fluoro-Uridin mit UV-Anregung im Zeitbereich von Pikosekunden bis Mikrosekunden beschrieben. Im letzten Abschnitt werden die Messergebnisse im Bezug auf die auftretenden elektronischen Zustände und die Bildung des Photohydrats diskutiert.

5.1. Fluoro-Uridin als Modell zur Hydratbildung

Bei der Hydratbildung haben Substitutionen an den C₁- und C₅-Positionen des Pyrimidin-Rings einen starken Einfluss auf die Quantenausbeute [Fis76]. So ist die Quantenausbeute der Hydratbildung bei Uridin oder 5-Fluoro-Uracil bei gleichem pH-Wert und Temperatur etwa doppelt so hoch wie die von Uracil. Die zeitaufgelösten Messungen zur Photohydratisierung eines Pyrimidins wurden deshalb an einem fluorierten Uridin durchgeführt, dessen Quantenausbeute um etwa ein vierfaches höher liegt als bei einem unsubstituierten Uracil [Fik65]. Die Substanz 5-Fluoro-Uridin ist kommerziell erhältlich; für die Untersuchungen wurde 5-Fluoro-Uridin von Sigma mit der Kennziffer F5130 verwendet.

Die Strukturformel von 5-Fluoro-Uridin (FUrd) ist in Abbildung 5.1 gezeigt. Durch UV-Belichtung bei 267 nm bildet sich durch Addition eines Wassermoleküls die hydratisierte Form. Bei der Addition entsteht aus der 5,6-Doppelbindung eine Einfachbindung und es lagern sich an das C₅ ein H-Atom und an das C₆ eine Hydroxygruppe an (in Abbildung 5.1 blau markiert). Die isomere Form, bei der sich die Hydroxygruppe an das C₅-Atom anlagert, tritt nicht auf.

5. Die Photohydratisierung von Fluoro-Uridin

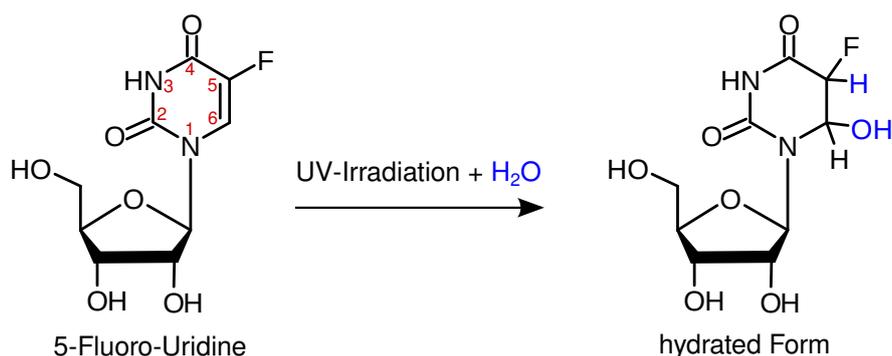


Abb. 5.1.: Strukturformel von 5-Fluoro-Uridin (FUrD). Unter Belichtung mit UV-Licht und durch Addition eines Wassermoleküls entsteht die hydratisierte Form (blau markiert).

Dies wurde durch Synthetisierung der möglichen Produkte und anschließendem Vergleich mit dem Photoprodukt festgestellt [Wan56].

Bei den Messungen zur Hydratbildung wurde Phosphatpuffer als Lösungsmittel verwendet. Die Pufferlösung bestand aus jeweils 50 mM KH_2PO_4 und Na_2HPO_4 (pH = 7) gelöst in D_2O . Die hydratisierte Form enthält daher Deuteriumatome anstatt der Wasserstoffatome und es findet ein HD-Austausch an OH- und NH-Gruppen statt. In der Abbildung befinden sich zur Vereinfachung Wasserstoffatome.

5.2. Stationäre Charakterisierung von Fluoro-Uridin

Vor den zeitaufgelösten Messungen erfolgte eine stationäre Charakterisierung der Photohydratisierung im infraroten und ultravioletten Spektralbereich. Insbesondere die Absorptionseigenschaften im Infraroten dienen der Beobachtung struktureller Änderungen die durch die Hydratisierung hervorgerufen werden. Zusätzlich wurden mit Hilfe von Methoden der Dichtefunktionaltheorie (DFT) die Infrarotspektren von FUrD und seines Hydrats simuliert. Sie unterstützen die Identifikation von Absorptionsbanden, die mit der Bildung des Hydrats in Verbindung gebracht werden. Des Weiteren wird anhand von UV-Spektren die Rückreaktion des FUrD-Hydrats gezeigt.

5.2.1. Absorptionseigenschaften im IR

In Abbildung 5.2 entspricht die schwarze Linie dem Infrarotspektrum von FUrD in Pufferlösung im Spektralbereich von 1350 bis 1775 cm^{-1} . Zwischen 1600 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} sind zwei intensive Absorptionsbanden zu erkennen, die den CO-Streckschwingungen der beiden Carbonylgruppen zugeordnet werden können. An der Position bei 1550 cm^{-1} befindet sich eine Absorptionsbande, die durch die Streckschwingung der C=C-Doppelbindung des C_5 - und C_6 -Atoms innerhalb des Pyrimidin-Rings entsteht. Im spektralen Bereich unterhalb von 1500 cm^{-1} lassen sich Absorptionsbanden nicht einfach zuordnen. Charakteristisch für diesen Bereich sind Biegeschwingungen der CH-, NH- und OH-Gruppen und Kombinationschwingungen dieser Moden [Gün03] überlagert. Im Absorptionsspektrum von FUrD ist im Bereich von etwa 1700 cm^{-1} eine zusätzliche Absorption zu erkennen, die zu einer Schulter

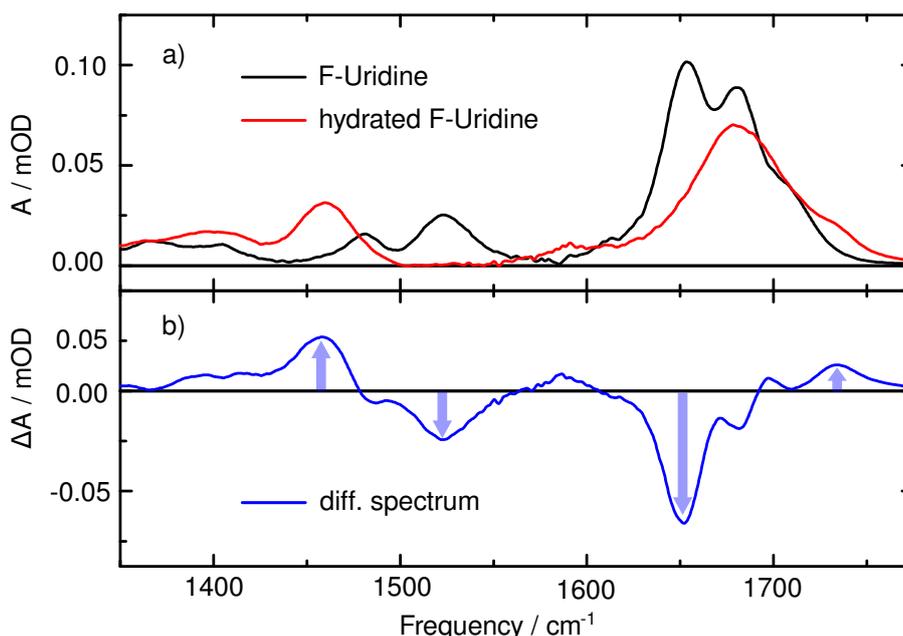


Abb. 5.2.: a) Stationäre Infrarotspektren von 5-Fluoro-Uridin vor Belichtung (rot) und nach Belichtung mit UV-Licht bei 266 nm (schwarz). b) Differenz der Infrarotspektren vor und nach Belichtung.

in der Absorptionsbande der Carbonylschwingung führt. Eine Ursache für diese zusätzliche Absorption könnten Wasserstoffbrückenbindungen mit der Lösungsumgebung sein, die zu Verschiebungen von Absorptionsmaxima und Veränderungen in deren Intensität führen können [Gün03].

Das IR-Spektrum nach Belichtung von FURd in Pufferlösung mit UV-Licht bei 266 nm ist ebenfalls in Abbildung 5.2 gezeigt. Das Spektrum des Photohydrats weist zwei wesentliche Veränderungen gegenüber dem Ausgangsspektrum auf. Diese sind im Differenzspektrum in Abbildung 5.2 b deutlich zu erkennen. Durch die Addition eines Wassermoleküls (in diesem Fall schweres Wasser) verändern sich die elektronischen Eigenschaften des Pyrimidin-Rings. Im Bereich der Carbonylschwingungen führt die Hydratisierung zu einer veränderten Position der C=O-Streckschwingungsbanden. Die Carbonylschwingung bei 1650 cm^{-1} verschiebt sich zu höheren Wellenzahlen, was sich im Differenzspektrum an dieser Position als negative Absorptionsänderung zeigt und zu einer Zunahme der Absorption im Bereich von 1700 bis 1730 cm^{-1} führt.

Eine weitere Veränderung des Spektrums durch die Hydratbildung ist im Bereich von 1400 cm^{-1} bis 1550 cm^{-1} zu beobachten. Die Absorptionsbande bei 1525 cm^{-1} verschwindet nach UV-Belichtung. Diese Bande entsteht durch die Streckschwingung der C=C Doppelbindung des C_5 - und C_6 -Atoms. Durch die Anlagerung der OH-Gruppe an das C_6 -Atom wird der Doppelbindungscharakter aufgehoben. Im Differenzspektrum ist weiterhin eine Absorptionzunahme zwischen 1375 und 1500 cm^{-1} mit einem markanten Maximum bei 1450 cm^{-1} zu erkennen, was auf eine Veränderung des Spektrums der CH- und NH-Biegeschwingungen durch die Hydratbildung zurückzuführen ist.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass nach UV-Belichtung von FURd im Infrarotspektrum

vier charakteristische Veränderungen zu beobachten sind. In Abbildung 5.2 b sind diese an den spektralen Positionen durch Pfeile markiert. Sie dienen in den zeitaufgelösten Messungen als charakteristische Signaturen der Hydratbildung.

5.2.2. Simulation der IR-Spektren

Zu einer besseren Identifikation der Absorptionsbanden von FUrD und seines Hydrats wurde eine Simulation der entsprechenden Infrarotspektren mit dem Programmpaket *Gaussian 03* zur elektronischen Strukturberechnung durchgeführt. Die Simulation der IR-Spektren wurde mit der Methode B3LYP (Becke-3-Lyp) der Dichtefunktionaltheorie mit dem Basissatz *6-31-G*** durchgeführt [Bec88, Bec93]. Da in den Messungen zu FUrD als Lösungsmittel D_2O verwendet wurde, findet im FUrD-Molekül ein H/D-Austausch statt, der Einfluss auf das Infrarotspektrum hat. Bei den Berechnungen der IR-Spektren wurde an den Positionen, an denen ein H/D-Austausch sehr wahrscheinlich ist (OH- und NH-Gruppen), ein Wasserstoff- durch ein Deuterium-Atom ersetzt. Zudem ist der Einfluss des Lösungsmittels auf das IR-Spektrum durch das polarisierbare Kontinuumsmodell (*polarizable continuum model*, PCM) berücksichtigt [Cos03]. Der Lösungsmittelleffekt durch das PCM auf die Simulation der IR-Spektren von FUrD ist in Anhang D dargestellt.

Das Ergebnis der Simulation der Infrarotspektren ist in Abbildung 5.3 b gezeigt. Es wurde ein B3LYP-Skalierungsfaktor von 0,9614 und eine Linienbreite von 15 cm^{-1} verwendet. Zum Vergleich mit den experimentell aufgenommenen Spektren von FUrD und seinem Photohydrat sind diese in Abbildung 5.3 a eingetragen. Daneben sind in Abbildungsteil 5.3 c die Struktur-

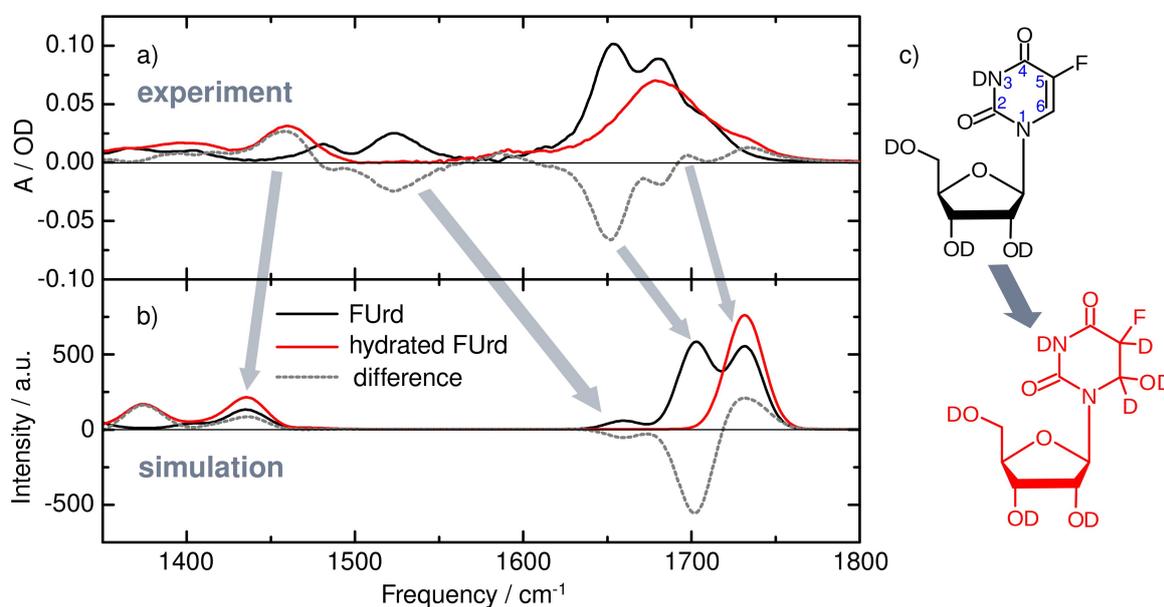


Abb. 5.3.: a) Experimentell bestimmte IR-Spektren von FUrD (schwarz) und seinem Hydrat (rot) mit der Differenz der beiden Spektren (grau gestrichelt). b) Simulierte IR-Spektren mit der gleichen Farbkodierung zum Vergleich mit dem Experiment. Bei beiden Berechnungen wurde ein B3LYP-Skalierungsfaktor von 0,9614 und eine Gauß-Linienbreite von 15 cm^{-1} angewendet. c) Strukturformeln von FUrD und der hydratisierten Form mit der Nummerierung der Atome des Pyrimidinrings.

formeln von FUrD und der hydratisierten Form dargestellt und die Nummerierung der Atome im Pyrimidin-Ring eingetragen. Die Zuordnung der charakteristischen Hydrat-Signaturen der experimentellen Spektren zu den Ergebnissen der Simulation ist durch die grauen Pfeile angedeutet.

Im Bereich der Carbonyl-Schwingungsbanden besteht eine gute Übereinstimmung zum Verlauf des experimentellen stationären Absorptionsspektrums. FUrD besitzt zwei Carbonylgruppen an der C₄- und C₂-Position, deren Schwingungsbanden sich im simulierten Spektrum an den Positionen 1771 cm⁻¹ respektive 1802 cm⁻¹ befinden. Durch die Hydratbildung verschiebt sich die C₄=O-Bande an die spektrale Position bei 1806 cm⁻¹. Dieses Verschieben der C₄-Carbonylbande wird in den experimentellen Spektren ebenfalls beobachtet und führt zu einem vergleichbaren Verlauf des Differenzspektrums.

Eine weitere Übereinstimmung findet sich in der Absorptionsbande bei 1732 cm⁻¹ im berechneten FUrD-Spektrum, die der C₅=C₆-Streckschwingung im Pyrimidin-Ring entspricht. Diese verschwindet nach der Hydratbildung auch im simulierten Spektrum. Der Verlauf im Bereich zwischen 1300 und 1500 cm⁻¹ im simulierten Spektrum ist insbesondere durch die positive Absorptionsänderung bei 1360 cm⁻¹ wiedergegeben.

5.2.3. Absorptionseigenschaften im UV

Zur Untersuchung der Absorptionseigenschaften von FUrD und seinem Hydrat wurden zusätzlich stationäre Spektren im UV-Bereich von 5-Fluoro-Uridin in D₂O aufgenommen. In Abbildung 5.4 a ist das Absorptionsspektrum FUrD im Bereich von 200 bis 400 nm (schwarze Linie) in Einheiten des Extinktionskoeffizienten dargestellt. Die Werte des Extinktionskoeffizienten wurden mittels Einwaage und anschließender Berechnung über das Lambert-Beer-Gesetz bestimmt. FUrD besitzt eine unstrukturierte Absorptionsbande mit einem Maximum bei 268 nm. Diese Absorptionsbande wird durch das Pyrimidin-Chromophor des Uracils verursacht. Durch

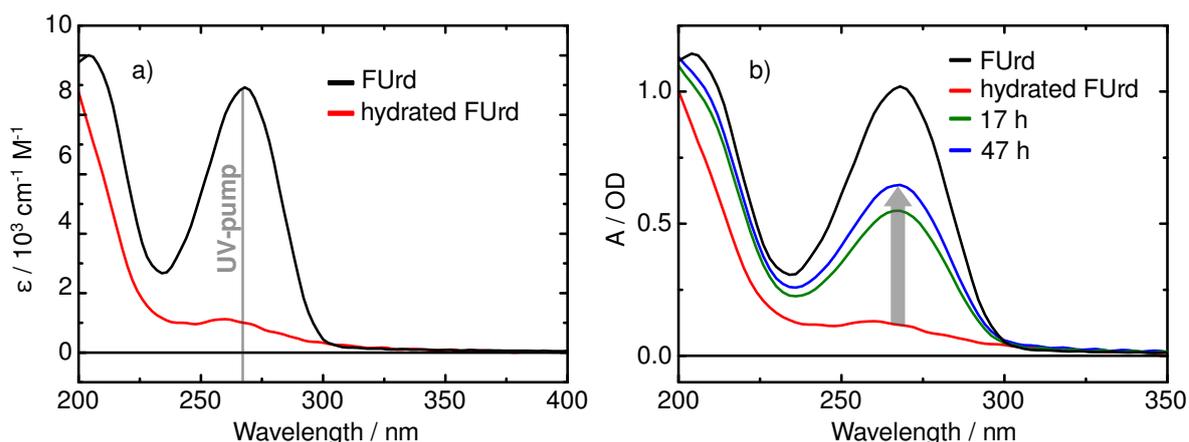


Abb. 5.4.: a) Stationäres Absorptionsspektrum von 5-Fluoro-Uridin im UV-Bereich (schwarze Linie). Nach Belichtung mit UV-Licht bei 266 nm erhält man das Spektrum des Photohydrats (rote Linie). b) Absorptionsspektrum von FUrD im UV-Bereich vor Belichtung (schwarz), nach Belichtung der Absorptionsbande bei 268 nm zum hydratisierten Molekül (rot) und nach der Wartezeit von 17 und 47 Stunden.

Belichtung von FURd gelöst in Pufferlösung mit UV-Licht bei 266 nm nimmt die Absorption in diesem Bereich ab und es entsteht das Spektrum des Photohydrats (rote Linie), dessen Absorption im Spektralbereich ab 220 nm um über 90% gegenüber der Ausgangsabsorption abnimmt.

Rückreaktion

Das Photohydrat reagiert thermisch zu seinem Ausgangsmolekül zurück. Dies ist in Abbildung 5.4 b anhand der UV-Absorptionsspektren gezeigt. Sie enthält die UV-Spektren vor und nach der Belichtung von FURd in D₂O-Pufferlösung mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 266 nm (schwarz und rot). Die grüne und blaue Linie repräsentieren die UV-Spektren, die nach einer Wartezeit von 17 und 47 Stunden nach Ende der Belichtung bei Raumtemperatur aufgenommen worden sind. Eine Abschätzung der Reaktionsgeschwindigkeit ergab einen Wert für die Zeitkonstante der Rückreaktion von etwa 12 Stunden bei einer Raumtemperatur von etwa 296 K. Die Rückreaktion zum Ausgangsmolekül ist in der Literatur bereits eingehend untersucht [Sin54, Wie57]. Dabei wurde gezeigt, dass die Rückreaktion stark von der Proben-temperatur und dem pH-Wert abhängt. Durch Temperaturerhöhung oder Senkung des pH-Wertes lässt sich die Rückreaktion beschleunigen.

5.3. Die Bildung des Photohydrats

Nach der Charakterisierung der Bildung des Photohydrats mit spektroskopischen Methoden soll mittels zeitaufgelöster IR-Spektroskopie geklärt werden, ob das Hydrat aus einem elektronisch angeregten Zustand gebildet wird oder ob die Bildung erst nach der Rückkehr in einen vibronisch angeregten Grundzustand erfolgt. Ziel ist es, den Zerfall des angeregten Zustands zu identifizieren und durch einen Vergleich mit den im IR beobachtbaren Schwingungsrelaxationsprozessen den Weg der Hydratbildung zu verfolgen.

5.3.1. Zeitaufgelöste Spektroskopie im Pikosekundenbereich

In Abbildung 5.5 a ist das Ergebnis der Femtosekundenmessung an FURd nach Anregung bei 266 nm und einer Impulsenergie von 1 μ J ab einer Verzögerungszeit von 1 ps in der Konturdarstellung gezeigt. Der Spektralbereich umfasst die Entwicklung in den Schwingungsbändern zwischen 1350 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} und den Bereich der CO-Streckschwingungen von 1600 cm^{-1} bis 1775 cm^{-1} . Die beiden Spektralbereiche sind getrennt voneinander mit unterschiedlicher Spreizung der Absorptionsänderung dargestellt. Die Messung wurde bis zu einer Verzögerungszeit von 2,8 ns durchgeführt. Bei der Auswertung der Messung wurde ein Unterschied in der Intensität der Absorptionsänderung zwischen dem Messbereich unterhalb von 1600 cm^{-1} und dem Spektralbereich oberhalb von 1600 cm^{-1} festgestellt. Dieser Skalierungsfehler ändert nichts an dem spektralen oder zeitlichen Verlauf der Absorptionsänderungen, die im Folgenden beschrieben werden.

Ergebnisse der zeitaufgelösten Messungen

Innerhalb einer Verzögerungszeit von etwa 10 ps ist der gesamte Spektralbereich geprägt von abwechselnd positiven (rot) und negativen (blau) Absorptionsänderungen, die zum Großteil innerhalb von 10 ps abklingen. Im infraroten Spektralbereich können entsprechende sigmoidale Strukturen der Schwingungsanregung im Molekül [Ham97] zugeordnet werden. Durch die UV-Anregung in den Franck-Condon-Zustand und der anschließenden Relaxation

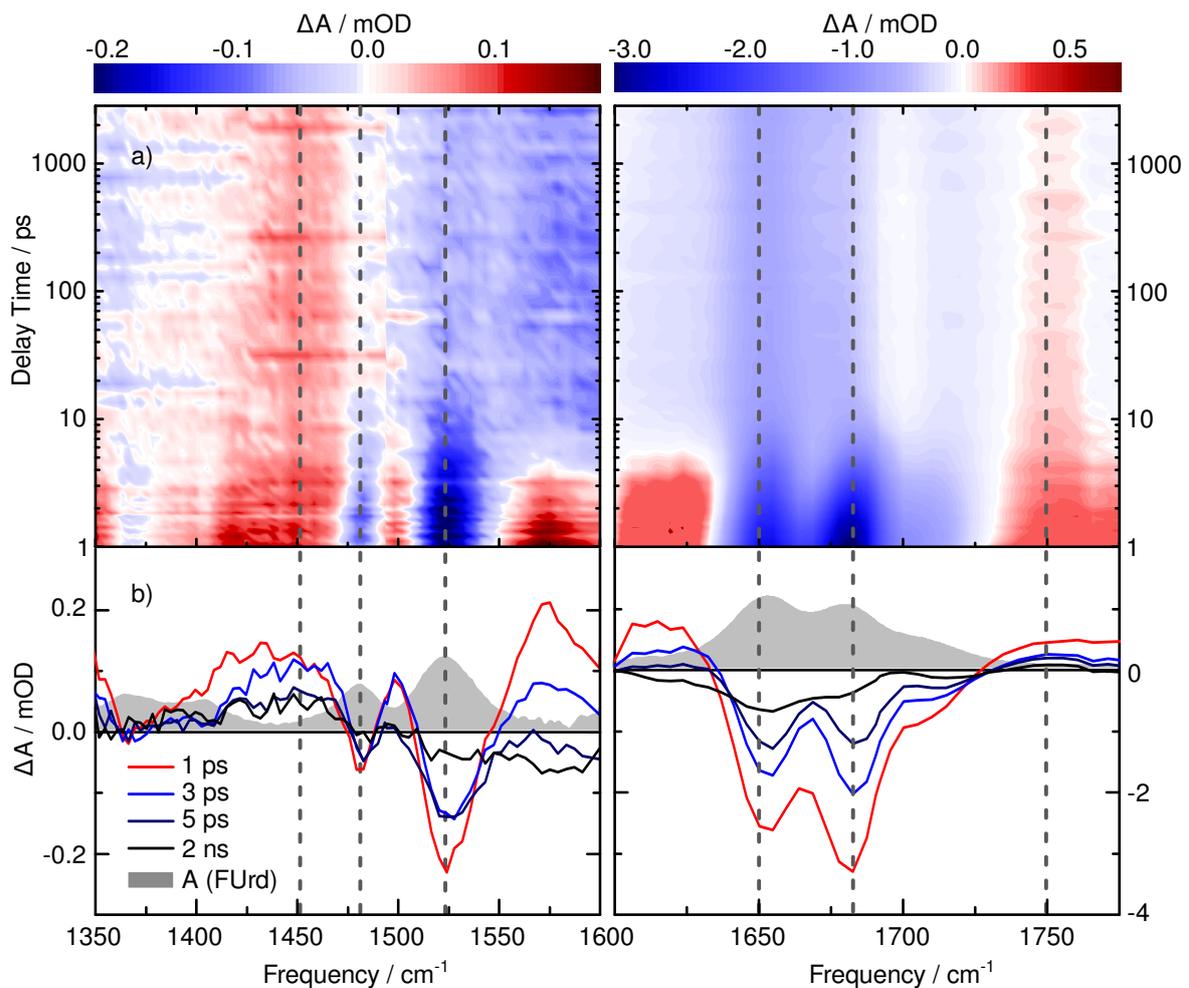


Abb. 5.5.: a) Konturdarstellung der zeitaufgelösten IR-Messung an 5-Fluorouridin im Pikosekundenbereich. b) Transiente Spektren nach den angegebenen Verzögerungszeiten. Die Messung ist zur besseren Darstellung in zwei spektrale Bereiche mit unterschiedlicher Spreizung der Absorptionsänderung aufgeteilt.

innerhalb des elektronisch angeregten Zustands wird überschüssige Energie im Molekül auf die Schwingungsmoden verteilt („internal vibrational relaxation“, IVR). Die Relaxation aus dem elektronisch angeregten Zustand über interne Konversion in den elektronischen Grundzustand führt ebenfalls zur Umwandlung der vorhandenen überschüssigen Energie in Schwingungsenergie innerhalb des Moleküls. Die Wechselwirkung mit den umgebenden Lösungsmittelmolekülen überträgt dann die Schwingungsenergie auf die Umgebung und führt zu

5. Die Photohydratisierung von Fluoro-Uridin

einer Temperaturerhöhung im Lösungsmittel [Els91]. Die Erhöhung der Lösungsmitteltemperatur entspricht etwa einigen 10 mK und äußert sich in diesem Spektralbereich durch eine Verschiebung der Lösungsmittelbande und damit durch ein breites, den gesamten Spektralbereich von 1300 cm^{-1} bis 1800 cm^{-1} überspannendes, sigmoidales Signal. Der Verlauf und die Korrektur dieses überlagerten Signals ist in Anhang A gezeigt.

Nach einer Verzögerungszeit von 10 ps ist in der Konturdarstellung zu erkennen, dass eine positive Absorptionsänderung bei 1450 cm^{-1} bis zum Ende des Zeitbereichs erhalten bleibt. Diese Absorptionsbande zeigte sich in den Belichtungsexperimenten als charakteristisch für ein Hydrat. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch im Carbonylbereich. Negative Ausbleichsignale bei 1650 cm^{-1} und 1680 cm^{-1} und eine positive induzierte Absorptionsänderung bei 1750 cm^{-1} bleiben bis in den Nanosekundenbereich bestehen. Die Bildung dieser Banden wird durch die Schwingungsrelaxationsvorgänge im Molekül während der ersten Pikosekunden überlagert.

Im Folgenden werden die spektralen Signaturen anhand von transienten Spektren im Detail betrachtet. In Abbildung 5.5 b sind einzelne transiente Spektren nach ausgewählten Verzögerungszeiten gezeigt. Zum Vergleich ist das stationäre Absorptionsspektrum von FUrD (grau schattiert) eingezeichnet. Das Ausbleichen der Grundzustandsbanden bei 1483 cm^{-1} , 1524 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} und 1683 cm^{-1} geht innerhalb von mehreren Pikosekunden zurück.

Die positiven Absorptionsänderungen nehmen ebenfalls im Bereich von mehreren Pikosekunden ab und erreichen die Form, die das transiente Spektrum nach 2 ns wie folgt zeigt: An den Positionen 1450 cm^{-1} und 1750 cm^{-1} bleiben nach 2,8 ns positive Absorptionsänderungen und an den Ausbleichbanden bei 1650 cm^{-1} und 1683 cm^{-1} negative Absorptionsänderungen bestehen. Dieses Differenzspektrum besitzt dadurch Ähnlichkeit mit dem stationären Differenzspektrum in Abbildung 5.2 b, welches die Bildung des Photohydrats repräsentiert.

Die beobachteten Kinetiken sind in Abbildung 5.6 durch Zeitverläufe an den in Abbildung 5.5 mit gestrichelten Linien markierten spektralen Positionen gezeigt. Die durchgezogene Linie repräsentiert dabei die Datenanpassung mit einer Summe aus Exponentialfunktionen, die mit der Apparatefunktion gefaltet wurde. Die Positionen der Zeitverläufe wurden so gewählt, dass sowohl der Zerfall des elektronisch angeregten Zustands verfolgt werden kann (Rückgang des Ausbleichens an den Grundzustandsbanden 1483 cm^{-1} , 1524 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} und 1683 cm^{-1}), als auch eine Bildung des Photohydrats an den spezifischen spektralen Positionen bei 1450 cm^{-1} und 1750 cm^{-1} beobachtet werden kann.

Zur globalen Datenanpassung werden zwei Zeitkonstanten für den Bereich von 0 bis 10 ps benötigt. Die Ursache hierfür liegt in der bereits erwähnten Schwingungsanregung der Moleküle beim Übergang aus dem elektronisch angeregten Zustand in den Grundzustand. Die Schwingungsrelaxation beim Abkühlen der Moleküle führt zu Bandenverschiebungen, die sich in dem verwendeten Funktionsalgorithmus nicht mit einer exponentiellen Komponente beschreiben lassen. Eine Diskussion hierzu findet sich in [Spö01]. Bei der Datenanpassung wird dennoch eine Exponentialfunktion dazu verwendet diesen Verlauf annähernd zu beschreiben. Insgesamt wurde daher eine globale Datenanpassung mit einer Summe von drei Exponentialfunktionen durchgeführt. Die ersten zwei Zeitkonstanten wurden dabei frei iteriert. Die dritte wird auf unendlich gesetzt und dient der Beschreibung des Spektrums am Ende des zeitlichen Messbereichs.

Die globale Datenanpassung führt zu einer guten Repräsentation der Zeitverläufe (Abbildung 5.6). Die freie Iteration ergab die Werte $\tau_0 = 1,2\text{ ps}$ und $\tau_1 = 3,5\text{ ps}$ für die Entwicklung während der ersten 10 ps. Die Werte dieser beiden Zeitkonstanten liegen nahe beieinander.

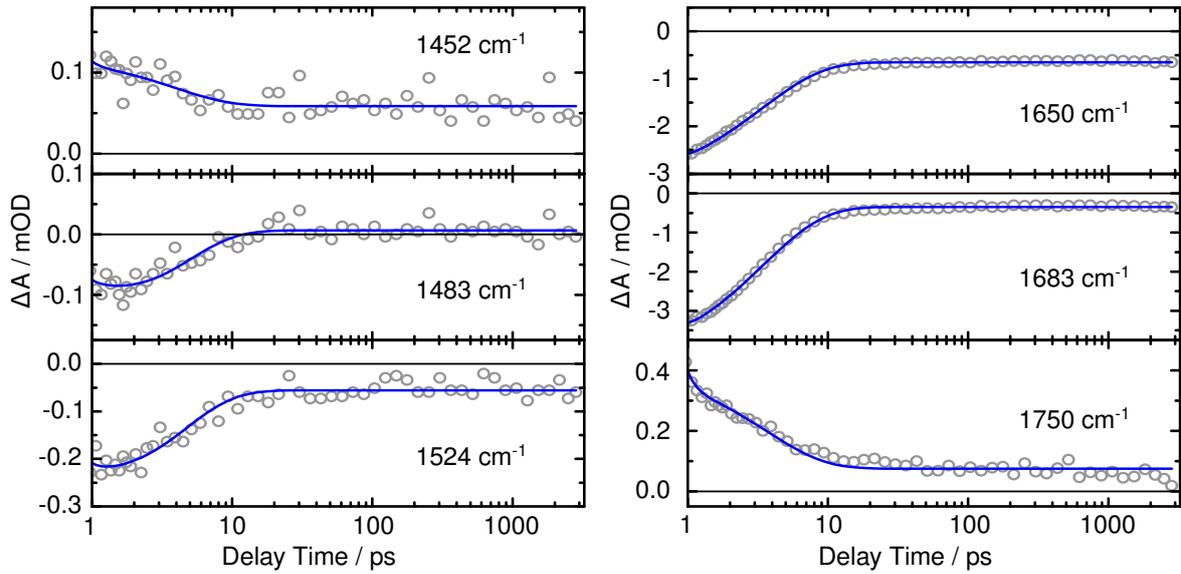


Abb. 5.6.: Zeitverläufe der Absorptionsänderungen im Pikosekundenbereich an verschiedenen spektralen Positionen. Die Daten wurden mit einer Summe von drei Exponentialfunktionen, gefaltet mit der Apparatefunktion, angepasst (durchgezogene Linien).

Dies führt bei der Datenanpassung dazu, dass die entsprechenden Amplitudenspektren sich zum Teil gegenseitig kompensieren (siehe Anhang B). Eine Zuordnung zu spezifischen Reaktionskinetiken ist deshalb nicht eindeutig. Die Zeitverläufe des Grundzustandsausbleichens bei 1650 cm^{-1} und 1683 cm^{-1} lassen lediglich eine Eingrenzung der Lebensdauer des angeregten elektronisch Zustands im Bereich von 1,0 bis 3,5 Pikosekunden zu. Die Hydratbildung, die sich am deutlichsten in der Bildung der positiven Absorptionsänderung bei 1450 cm^{-1} zeigt, findet ebenfalls in diesem Zeitbereich statt.

Abschätzung der Quantenausbeute der Hydratbildung

Aus den zeitaufgelösten Messungen kann die Quantenausbeute der Hydratbildung anhand der diesbezüglichen spektralen Signatur bei 1460 cm^{-1} abgeschätzt werden. Die Quantenausbeute ergibt sich wie in Abschnitt 4.3.1 für die Dewar-Bildung beschrieben wie folgt:

$$\Phi_{Hydrat} = \frac{1}{c_{FUr d}^*} \cdot \frac{\Delta A_{fs,1460}}{\Delta \varepsilon_{1460} \cdot d} \quad (5.1)$$

Dabei entspricht $c_{FUr d}^*$ der Konzentration der tatsächlich angeregten Moleküle und d der Schichtdicke der Küvette. Die Absorptionsänderung $\Delta A_{fs,1460}$ ergibt sich aus der zeitaufgelösten Messung an der Position bei 1460 cm^{-1} . Die Differenz der Extinktionskoeffizienten von FUr d und seinem Hydrat an der selben Position erhält man aus den entsprechenden stationären IR-Spektren. Die Bestimmung von $c_{FUr d}^*$ erfolgt durch

$$c_{FUr d}^* = \eta \cdot c_{FUr d}. \quad (5.2)$$

Die Größe $c_{FUr d}$ entspricht der Ausgangskonzentration der FUr d-Moleküle und η gibt den Anteil der angeregten Moleküle an. Den Wert für η erhält man aus dem Verhältnis der Ab-

5. Die Photohydratisierung von Fluoro-Uridin

sorptionsänderung des initialen Ausbleichens einer der Grundzustandsbanden zur Absorption des stationären Spektrums an dieser Position. Die Bestimmung dieses Wertes erfolgte an der Position 1524 cm^{-1} und ergibt einen Wert für $\eta = 0,01$. Damit ergibt sich mit $c_{FUrd} = 12\text{ mM}$ die Konzentration der tatsächlich angeregten Moleküle zu $c_{FUrd}^* = 120\text{ }\mu\text{M}$.

An der spektralen Position der Hydrat-Bande bei 1460 cm^{-1} besteht nach der Lösungsmittelkorrektur eine Absorptionsänderung von $0,02\text{ mOD}$. Der Wert von $\Delta\varepsilon_{1460}$ an dieser Position beträgt $242\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Mit $d = 90\text{ }\mu\text{m}$ ergibt sich damit eine Quantenausbeute von $\Phi_{Hydrat} = 7\%$. Aufgrund der Messungenauigkeit, insbesondere bei der Bestimmung der Anzahl der tatsächlich angeregten Moleküle, kann der Fehler auf etwa 3% abgeschätzt werden. Die Quantenausbeute der Dewar-Bildung aus den zeitaufgelösten Daten liegt entsprechend zwischen 4 und 10% . In [Fik65] wird für FURd eine Quantenausbeute von $4,7\%$ bei einem pH-Wert von $5,6$ angegeben. Dies ist innerhalb der Messgenauigkeit in Übereinstimmung mit obiger Angabe.

Weitere Prozesse im Nanosekundenbereich

In Abbildung 5.7 entspricht die blaue Linie dem transienten Spektrum zum spätesten Zeitpunkt nach Photoanregung in der Femtosekundenmessung, das heißt nach einer Verzögerungszeit von $2,8\text{ ns}$. Zum Vergleich ist das stationäre Differenzspektrum aus Abbildung 5.2 b grau schattiert eingetragen. Das stationäre Differenzspektrum wurde auf die positive Absorptionsänderung bei 1450 cm^{-1} und die negative Absorptionsänderung bei 1524 cm^{-1} skaliert. Das transiente Spektrum wurde sowohl auf das Signal, hervorgerufen durch das Aufheizen des Lösungsmittels (Anhang A), als auch den Skalierungsfehler der Messbereiche unterhalb und oberhalb von 1600 cm^{-1} korrigiert. Für letztere Korrektur wurde ein Skalierungsfaktor aus der zeitaufgelösten Messung im Nanosekundenbereich verwendet, bei der dieser Fehler nicht auftritt.

Die spektralen Positionen und das Verhältnis der Intensität der Absorptionsänderung stimmen im Bereichen von 1400 bis 1500 cm^{-1} sowohl im spektralen Verlauf, als auch in den Verhältnissen der Intensitäten der Absorptionsänderungen sehr gut mit dem stationären Differenzspektrum überein. Große Unterschiede in den Spektren bestehen jedoch im Bereich der Carbonylbanden oberhalb von 1600 cm^{-1} , die in Abbildung 5.7 mit blauen Pfeilen angedeutet sind. Auffallend ist der Unterschied im Verhältnis der Intensitäten der Absorptionsänderung in den Ausbleichbanden bei 1650 cm^{-1} und 1680 cm^{-1} zu den Absorptionsänderung bei 1450 cm^{-1} und 1524 cm^{-1} . Im Bereich über 1700 cm^{-1} stimmt der Verlauf des transienten Spektrums mit dem stationären Spektrum nicht überein. Im stationären Spektrum befindet sich ein Maximum bei 1730 cm^{-1} , im transienten Spektrum zeigen sich eine negative Absorptionsänderung unterhalb und eine positive Absorptionsänderung oberhalb dieser spektralen Position.

Die Unterschiede in den beiden Spektren zeigen, dass die Prozesse etwa 3 ns nach Photoanregung noch nicht abgeschlossen sein können und noch weitere Entwicklungen in einem längeren Verzögerungszeitbereich zu erwarten sind. In der Literatur ist bekannt, dass nach Anregung von Uracil-Derivaten eine Spin-Inversion in einen Triplett-Zustand stattfinden kann. Experimente zeigten zudem, dass aus dem Triplett-Zustand kein Hydrat gebildet wird [Gre68]. Zur Bestätigung dieser Aussagen und für ein vollständiges Bild der zeitlichen Entwicklung der Absorptionseigenschaften von FURd wurden zeitaufgelöste IR-Messungen im Nanosekundenbereich durchgeführt.

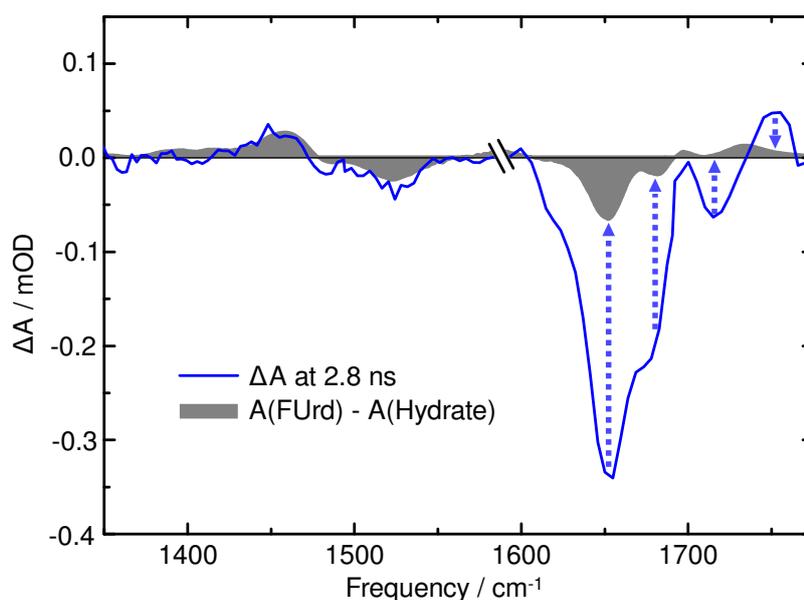


Abb. 5.7.: Vergleich des transienten Absorptionsspektrums nach 2,8 ns mit dem stationären Differenzspektrum. Das stationäre Spektrum wurde auf die Absorptionsänderungen im Bereich 1450 cm^{-1} und 1524 cm^{-1} des transienten Absorptionsspektrums skaliert. Dadurch ist zu erkennen, dass nach 2,8 ns nach der Anregung noch nicht alle Prozesse vollständig abgelaufen sind.

5.3.2. Zeitaufgelöste Spektroskopie im Nanosekundenbereich

Zur Analyse der Prozesse bei Verzögerungszeiten im Nano- bis Mikrosekundenbereich wurde eine zeitaufgelöste Messung an FUrd unter UV-Anregung durchgeführt. Dazu wurde der experimentelle Aufbau aus Kapitel 3.3, mit einer Anregungswellenlänge des Nanosekundenlasers von 266 nm und einer Anregungsenergie von $1\text{ }\mu\text{J}$ verwendet.

Ergebnisse der zeitaufgelösten Messung

Das Ergebnis der zeitaufgelösten Messung im Nanosekundenbereich an FUrd in D_2O ist in Abbildung 5.8 a als Überblick in der Konturdarstellung und in Abbildung 5.8 b anhand von einzelnen transienten Spektren gezeigt. Die Messung wurde im gleichen spektralen Bereich wie die Pikosekundenmessung von $1350\text{ bis }1775\text{ cm}^{-1}$ durchgeführt. Die Verzögerungszeit erstreckt sich bis zu $10\text{ }\mu\text{s}$.

Die wesentlichen Absorptionsänderungen finden im Bereich der CO-Streckschwingungen von 1625 cm^{-1} bis 1750 cm^{-1} statt. Dort ist ein weiteres Erholen des Grundzustandsausbleichens im Bereich von $50\text{ bis }100\text{ ns}$ zu beobachten. Des Weiteren verändert sich der spektrale Verlauf oberhalb von 1700 cm^{-1} auf der gleichen Zeitskala. Das Maximum der positiven Absorptionsänderung bei 1750 cm^{-1} geht zurück und es bildet sich ein Maximum geringerer Intensität bei 1730 cm^{-1} aus. Dieses befindet sich in einem Bereich negativer Absorptionsänderung überlagert von dem Lösungsmittelsignal hervorgerufen durch Temperaturerhöhung (siehe Anhang A). Die positive Absorptionsänderung bei 1450 cm^{-1} , die der Hydratbildung zugeschrieben werden kann, ist schon zu Beginn des zeitlichen Messbereichs vorhanden. Eine Änderung der Intensität wird innerhalb der Messgenauigkeit über die gesamte Verzögerungszeit

5. Die Photohydratisierung von Fluoro-Uridin

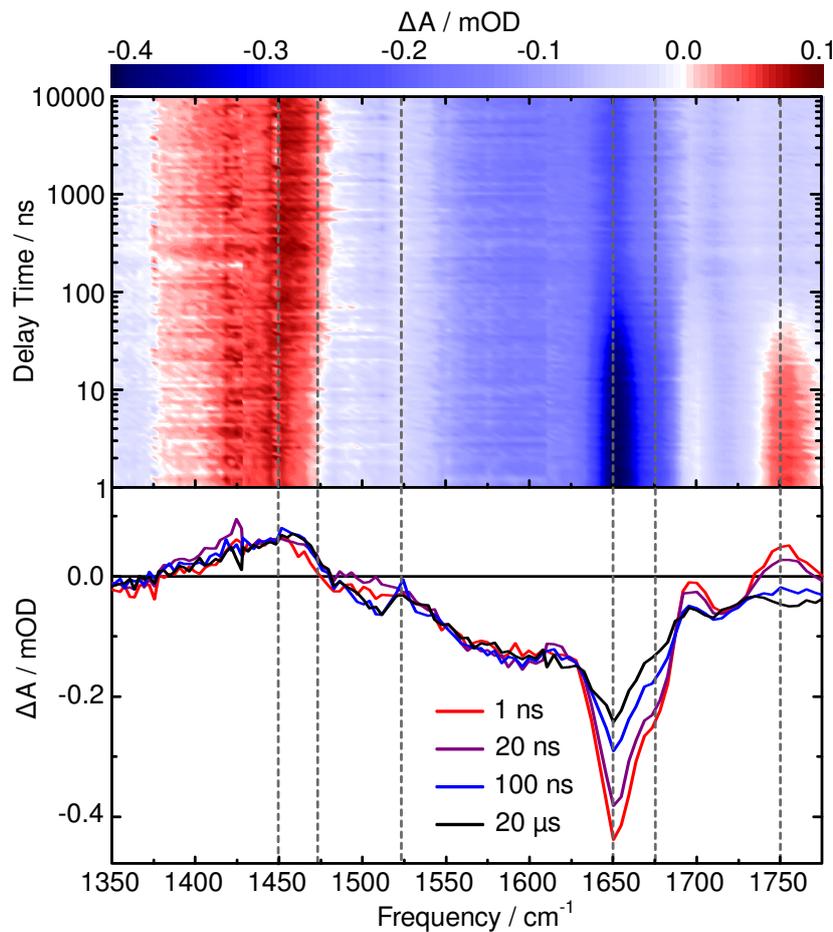


Abb. 5.8.: a) Konturdarstellung der zeitaufgelösten IR-Messung an 5-Fluorouridin im Nanosekundenbereich. b) Transiente Spektren der Messung nach den angegebenen Verzögerungszeiten.

nicht beobachtet. Es ist lediglich eine Verbreiterung der Bande bei 1476 cm^{-1} an der rechten Flanke zu erkennen.

Charakteristische Zeitverläufe der Messung im Nanosekundenbereich sind in Abbildung 5.9 gezeigt. Die spektralen Positionen entsprechen den Positionen, die in Abbildung 5.8 durch gestrichelte Linien markiert sind. Das Ergebnis der globalen Datenanpassung für die Messung im Nanosekundenbereich wird durch die durchgezogenen Linien repräsentiert. Die Anpassung wurde von 1 ns bis $10\text{ }\mu\text{s}$ mit zwei Zeitkonstanten durchgeführt. Die erste Zeitkonstante beschreibt die gesamten beobachteten Signaländerungen und wurde frei iteriert und ergibt einen Wert von 71 ns für die beobachtete Kinetik. Die zweite Zeitkonstante wird auf unendlich gesetzt. Die damit verbundene Amplitude repräsentiert die Absorptionsänderungen, die zum Ende der Verzögerungszeit nach $10\text{ }\mu\text{s}$ bestehen bleiben (siehe Anhang B).

Der Zeitverlauf bei 1450 cm^{-1} zeigt einen über den gesamten Zeitbereich konstanten positiven Wert. Diese spektrale Position entspricht der positiven Absorptionsänderung, die sowohl im stationären Spektrum als auch in der zeitaufgelösten Pikosekundenmessung beobachtet wird. Diese Bande ist ein Nachweis dafür, dass die Hydratisierung innerhalb der ersten Nanosekunde abgeschlossen ist. Der konstante Verlauf deutet zudem darauf hin, dass im Zeitbereich von

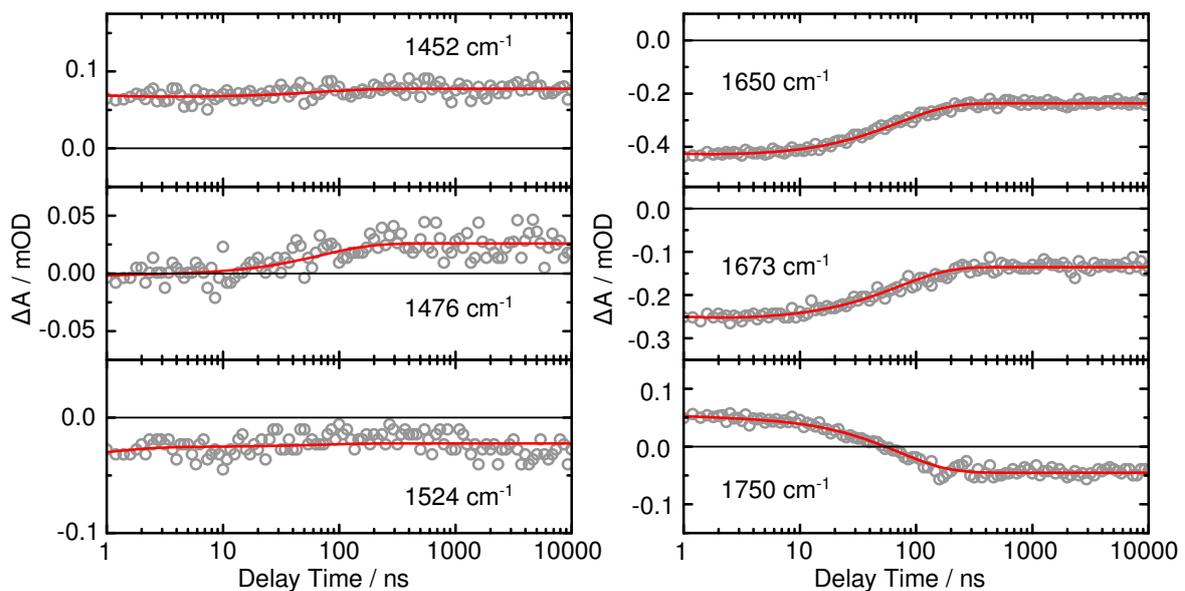


Abb. 5.9.: Zeitverläufe der Absorptionsänderungen im Nanosekundenbereich an verschiedenen spektralen Positionen. Die Daten wurden mittels einer Summe von Exponentialfunktionen gefaltet mit der Apparatfunktion angepasst (durchgezogene Linien).

Nano- bis Mikrosekunden kein weiteres Hydrat gebildet wird. Lediglich an der rechten Flanke der Bande findet eine Verbreiterung um etwa 5 cm^{-1} mit der Zeitkonstante von 71 ns statt, die im im Zeitverlauf bei 1476 cm^{-1} zu sehen ist.

Die größten Veränderungen mit einer Zeitkonstante von 71 ns befinden sich im Bereich der Carbonylbanden bei 1650 und 1673 cm^{-1} . Die Zeitverläufe zeigen hier ein weiteres Erholen des Grundzustandsausbleichens. Des Weiteren zeigt der Zeitverlauf bei 1750 cm^{-1} eine Abnahme der Absorptionsänderung, die dazu führt, dass sich bei 1730 cm^{-1} ein Maximum ausbildet. Diese Vorgänge führen zu dem Differenzspektrum nach $10\text{ }\mu\text{s}$, das in Abbildung 5.10 gezeigt ist. Das transiente Spektrum wurde auf die überlagerte Absorptionsänderung korrigiert, die durch das Aufheizen des Lösungsmittels verursacht wird (siehe Anhang A). Zusätzlich ist zum Vergleich das stationäre Differenzspektrum, das aus der UV-Belichtung von FURd (Abbildung 5.2) erhalten wurde, eingezeichnet. Das stationäre Differenzspektrum wurde auf das Maximum der Ausbleichsignatur bei 1650 cm^{-1} skaliert. Es besteht eine sehr gute Übereinstimmung der beiden Spektren. Daher kann davon ausgegangen werden, dass alle Prozesse nach einer Verzögerungszeit von $10\text{ }\mu\text{s}$ abgeschlossen sind.

Abschätzung der Quantenausbeute einer möglichen Triplett-Bildung

Für eine Zuordnung der beobachteten langlebigen Komponente wurde das Triplett-Spektrum von FURd im IR mit der gleichen Methode wie das Grundzustands- und Hydratspektrum simuliert. Die Beschreibung der Simulation und das Ergebnis sind in Anhang D dargestellt.

Das Triplett-Spektrum weist vor allem zwei charakteristische Banden auf: Eine im Carbonylbereich des Grundzustands von FURd und eine im Vergleich dazu sehr hochfrequente Bande. Bei einem Zerfall des Triplett-Zustands und einem Übergang in den Grundzustand von

5. Die Photohydratisierung von Fluoro-Uridin

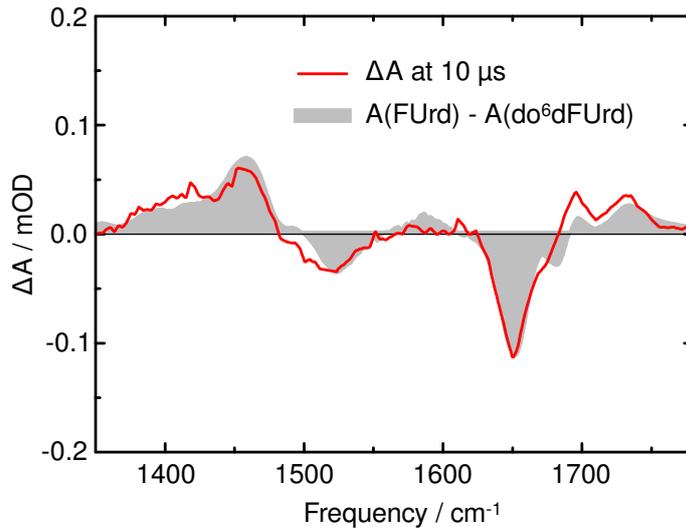


Abb. 5.10.: Vergleich des transienten Absorptionsspektrums nach $10\ \mu\text{s}$ mit dem stationären Differenzspektrum.

FUrd erwartet man daher eine Abnahme der hochfrequenten induzierten Absorption und ein Erholen des Ausbleichens im Bereich der Carbonylbanden. In der langlebigen Komponente in den experimentellen Daten wird ein solcher Vorgang beobachtet: Das Ausbleichens im Carbonylbereich bei $1650\ \text{cm}^{-1}$ erholt sich und die induzierte Absorption im hochfrequenten Bereich bei $1750\ \text{cm}^{-1}$ geht zurück. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass es sich bei der langlebigen Komponente um den Zerfall eines Triplett-Zustandes handeln könnte.

Unter dieser Annahme wird im Folgenden die Quantenausbeute Φ_T einer möglichen Triplett-Bildung anhand der experimentellen Ergebnisse abgeschätzt. Dabei gilt:

$$\Phi_T = \frac{c_T}{c_{FUrd}^*} = \frac{\text{Konzentration der Triplett-Moleküle}}{\text{Konzentration der angeregten Moleküle}} \quad (5.3)$$

Die Größe c_{FUrd}^* gibt die Konzentration der tatsächlich angeregten Moleküle an und c_{FUrd} entspricht der Konzentration der Moleküle, die nach UV-Anregung einen Triplett-Zustand einnehmen. In der Nanosekunden-Messung wurde durch UV-Anregung auch Hydrat gebildet. Dies ist anhand der Hydratsignatur bei $1460\ \text{cm}^{-1}$ zu erkennen. Für die Hydratbildung gilt die gleiche Bedingung für die Quantenausbeute:

$$\Phi_{Hydrat} = \frac{c_{Hydrat}}{\eta \cdot c_{FUrd}} \quad (5.4)$$

Ersetzt man die Größe η in den beiden Gleichungen, ergibt sich für die Quantenausbeute der Triplett-Bildung

$$\Phi_T = \frac{c_T}{c_{Hydrat}} \cdot \Phi_{Hydrat} \quad (5.5)$$

Der Wert für c_{Hydrat} lässt sich aus der Absorptionsänderung an der Position $1460\ \text{cm}^{-1}$ der Hydratsignatur mit $\Delta A_{1450} = c_{Hydrat} \cdot \Delta \varepsilon_{1450} \cdot d$ bestimmen. Für die Triplett-Konzentration kann mit der gleichen Bedingung $\Delta A_{1650} = c_T \cdot \varepsilon_{1650} \cdot d$ an der spektralen Position bei

1650 cm^{-1} , die durch einen möglichen Triplett-Zerfall hervorgerufen wird, angegeben werden. Hier kann jedoch nicht die Differenz der Extinktionskoeffizienten angegeben werden, da das Triplett-Spektrum nicht bekannt ist. Unter der Annahme, dass der Triplett-Zustand an dieser spektralen Position nicht absorbiert, stellt die Angabe der Quantenausbeute Φ_T eine Untergrenze dar.

Mit $\varepsilon_{1650} = 914\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ im Grundzustand, $\Delta\varepsilon_{1450} = 242\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ an der Position 1450 cm^{-1} von Grundzustand und Hydrat und der Schichtdicke $d = 90\text{ }\mu\text{m}$ erhält man die Werte $c_{Hydrat} = 0,026\text{ mM}$ und $c_T = 2,3\text{ }\mu\text{M}$. Für Φ_{Hydrat} wird der Wert von 7 %, aus der Pikosekunden-Messung verwendet. Dadurch ergibt die Abschätzung der Untergrenze der Triplett-Quantenausbeute einen Wert von 0,6 %. Falls im Bereich von 1650 cm^{-1} eine Triplett-Absorption vorliegt kann dieser Wert auch höher liegen. Im Folgenden wird für die Quantenausbeute des Triplets entsprechend etwa 1 % angenommen. In [Joh71] wird die Triplett-Quantenausbeute von Uracil mit 0,8 % angegeben, was mit dem Wert für FURd in guter Übereinstimmung steht.

5.4. Diskussion der Ergebnisse zur Hydratbildung

Es ist bekannt, dass sich bei dem Photohydrat von Uracil-Derivaten eine Hydroxygruppe an der C_6 -Position und ein weiteres H-Atom an der C_5 -Position des Pyrimidin-Rings befindet. Der Mechanismus der Bildung des Photohydrats wird jedoch bis heute diskutiert. Bisher wurden vier Modelle in der Literatur vorgeschlagen:

In Modell (I) von Burr und Mitarbeitern wird für die Reaktion eine Protonierung im elektronisch angeregten Singulett-Zustand als Initiator für die Hydratbildung vorgeschlagen [Bur68b, Bur68a, Bur72]. Im Modell (II) von Fisher und Johns erfolgt zuerst eine Deaktivierung des elektronisch angeregten Zustands in einen vibronisch angeregten Zustand in dem dann die Wasseraddition stattfindet. Für den vibronisch angeregten Zustand wird dabei eine zwitterionische Struktur angenommen [Fis70, Fis76]. Für das Modell (III) schlagen Garner und Scoles ähnlich wie im Modell (I) eine Bildung über einen elektronisch angeregten Singulett-Zustand vor. Diese erfolgt jedoch über ein Carbokation als Zwischenzustand welches dann zum Hydrat reagiert [Gar85, Ben85]. In [Gör91] zeigt Görner einen weiteren Reaktionsweg über eine zwitterionische Struktur im elektronisch angeregten Zustand auf (Modell(IV)). Für diese zwitterionische Struktur findet eine Ladungstrennung zwischen der C_6 -Position und dem Sauerstoff an der C_4 -Position statt.

Vor diesem Hintergrund werden im Folgenden die Ergebnisse der zeitaufgelösten Messungen von FURd im IR zusammengefasst und im Hinblick auf die verschiedenen Reaktionsmodelle diskutiert.

5.4.1. Zeitaufgelöste Messungen an FURd

In den stationären Infrarot-Spektren lässt sich die hydratisierte Form von 5-Fluorouridin anhand von charakteristischen Signaturen nachweisen. Diese Eigenschaft ermöglicht es in zeitaufgelösten IR-Messungen die Bildung des Hydrats zeitnah zu verfolgen. Diese Messungen wurden im Zeitbereich von Pikosekunden bis Mikrosekunden durchgeführt. In der globalen Datenanpassung konnten die Dynamiken der Absorptionsänderungen mit insgesamt drei

5. Die Photohydratisierung von Fluoro-Uridin

Zeitkonstanten angepasst werden. Die Werte der Zeitkonstanten sind in Tabelle 5.1 mit der Zuordnung der damit verbundenen photophysikalischen Prozesse aufgelistet.

Im Pikosekundenbereich ergaben sich Prozesse, die mit den Zeitkonstanten von $\tau_0 = 1,2$ ps und $\tau_1 = 3,5$ ps angepasst werden konnten. Im Zeitbereich von weniger als 10 ps nach Photoanregung zeigen sich im IR-Spektrum Relaxationsprozesse die aus der Umverteilung von überschüssiger Anregungsenergie in Schwingungsenergie resultieren (IVR). Die IVR kommt sowohl im elektronisch angeregten Zustand als auch nach einer Relaxation in den Grundzustand vor. Im Falle von FURd liegen die Werte der zwei Zeitkonstanten sehr eng beieinander. Eine Unterscheidung der Absorptionsänderungen im Zusammenhang mit vibronischen Relaxationsprozessen von der internen Konversion in den Grundzustand ist daher nicht möglich. Auch die Beobachtung der Hydratbildung anhand der charakteristischen Signaturen ist durch die Prozesse der IVR überlagert. Die Bildung des Photohydrats kann daher nicht eindeutig einer der beiden Zeitkonstanten zugeordnet werden. Eindeutig konnte jedoch gezeigt werden, dass die Hydratisierung in diesem Zeitbereich von wenigen Pikosekunden statt findet. Die Beobachtungen im Nanosekundenbereich zeigen zudem, dass in diesem Zeitbereich kein weiteres Hydrat hinzu kommt.

Zeitkonstante	Prozess
$\tau_0 = 1,2$ ps	IVR, Hydratbildung
$\tau_1 = 3,5$ ps	IVR, Hydratbildung
$\tau_2 = 71$ ns	Triplet-Zerfall

Tabelle 5.1.: Übersicht über die Zeitkonstanten aus der zeitaufgelösten Messungen an FURd im IR nach Anregung bei 266 nm.

In den zeitaufgelösten IR-Messungen im Nanosekundenbereich wurde eine Entwicklung mit einer Zeitkonstante von 71 ns im Bereich der Carbonylbanden um 1650 cm^{-1} und im hochfrequenten Bereich bei 1750 cm^{-1} beobachtet. Das simulierte Triplet-Spektrum von FURd im IR (siehe Anhang D) weist ebenfalls eine ähnliche Signatur mit Absorptionsbanden im Carbonylbereich mit einer hochfrequenten Bande auf. Aufgrund dieser Übereinstimmung besteht Grund zur Annahme, dass der langlebige Prozess von 71 ns mit einem Triplet-Zustand in Verbindung gebracht werden kann. Die typische Lebensdauer von Triplet-Zuständen von Uridin-Derivaten wird mit Werten im Bereich von einigen Mikrosekunden angegeben [Fis76]. Diese kann jedoch bei einer hohen Probenkonzentration oder durch die Anwesenheit von Sauerstoff erheblich herabgesetzt werden [Rys11]. Vergleicht man die gemessene Lebensdauer von 71 ns mit Untersuchungen der Triplet-Lebensdauer von Uridin in Abhängigkeit der Probenkonzentration zeigt sich, dass bei der verwendeten Konzentration von 12 mM die Verkürzung der Lebensdauer durch Selbstlöschung in den Bereich von 100 ns möglich ist [Whi72, Whi69, Joh71]. Ein eindeutiger Nachweis könnte durch konzentrationsabhängige Messungen unter Ausschluss von Sauerstoff geführt werden, was jedoch nicht Ziel dieser Arbeit war.

5.4.2. Modell zur Photophysik von FURd

Die Ergebnisse der Dateninterpretation lassen sich mit dem in Abbildung 5.11 gezeigten Schema für die photophysikalischen Prozesse von FURd beschreiben. Durch die Absorption erfolgt in FURd ein Übergang in einen elektronisch angeregten Zustand. Innerhalb des angeregten Zustands finden Relaxationsprozesse statt, die überschüssige Anregungsenergie in Schwingungsenergie im FURd-Molekül umverteilen (IVR). Aus dem angeregten Zustand relaxieren etwa 89-95 % der Basen über eine interne Konversion (IC) in den Grundzustand. Das Abkühlen der dabei entstandenen schwingungsangeregten Grundzustands-Moleküle erfolgt über eine effiziente Kopplung an die Lösungsmittelmoleküle. Sowohl die IC als auch die IVR finden auf einer Zeitskala von 1 bis 3 ps statt, die typisch ist für DNA-Moleküle [CH04, Pec01, Tow09]. Diese beiden Vorgänge können im IR experimentell nicht voneinander unterschieden werden. Die Bildung von Photohydraten findet mit einer Ausbeute von etwa 4

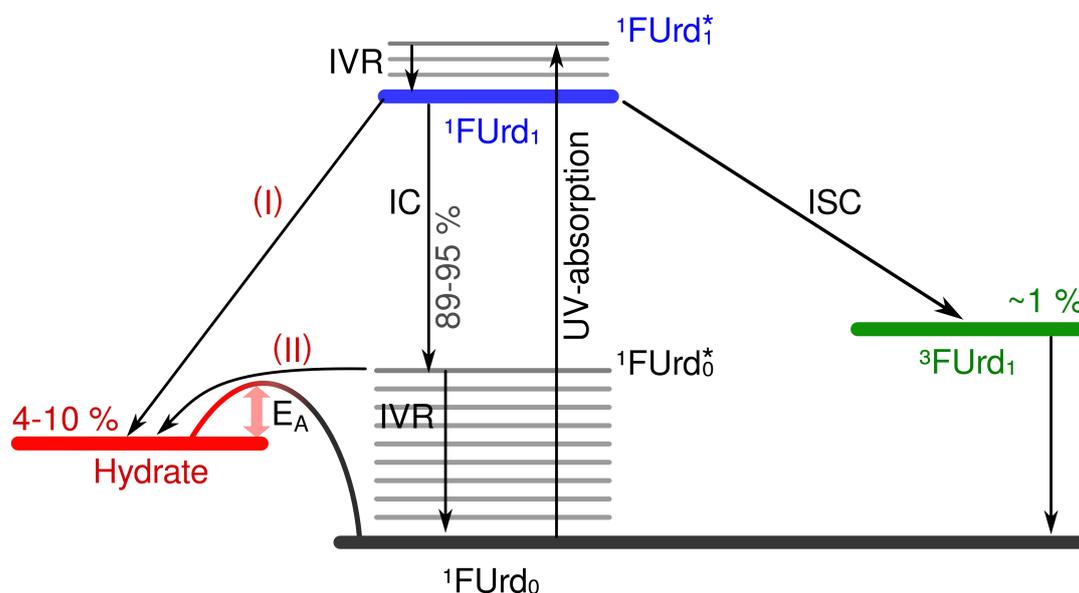


Abb. 5.11.: Reaktionsschema von FURd. Abkürzungen: IC = Internal Conversion, ISC = Inter System Crossing, IVR = Internal Vibrational Relaxation, E_A = Aktivierungsenergie für die Rückreaktion.

bis 10 % statt. Dabei kann nicht unterschieden werden, ob die Bildung aus dem elektronisch angeregten Zustand $^1\text{FURd}_1^*$ erfolgt (Weg (I) in Schema 5.11) oder ob das Photohydrat aus einem schwingungsangeregten Grundzustand $^1\text{FURd}_0^*$ gebildet wird (Reaktionsweg (II)).

Die IR-Messungen weisen bei der langlebigen Komponente Ähnlichkeit mit dem simulierten Triplett-Spektrum auf. Deshalb kann angenommen werden, dass der beobachtete langlebige Zustand einem Triplett-Zustand $^3\text{FURd}_1$ entspricht und die Beobachtungen im IR mit der Zeitkonstante von 71 ns dem Zerfall des Triplett-Zustandes in den Grundzustand $^1\text{FURd}_0$ entsprechen, der mit einer Ausbeute von etwa 1 % gebildet wird. In Übereinstimmung mit der Literatur findet sich in den Experimenten kein Hinweis für eine Hydratbildung über den Triplett-Zustand.

5.4.3. Ausblick

Eine eindeutige Unterscheidung zwischen Reaktionsweg (I) und (II) liegen die Zeitkonstanten der internen Konversion und der Relaxationsprozesse schwingungsangeregter Zustände bei FUrD zu nahe beieinander. Folgende Untersuchungen können weiteren Aufschluß über den Reaktionsmechanismus geben:

- Quantifizierung der thermischen Rückreaktion des Photohydrats zum Grundzustand: Durch die Bestimmung der Höhe der Energiebarriere E_A der Rückreaktion (Abbildung 5.11) kann eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit der Bildung des Hydrats aus einem vibronisch angeregten Zustand getroffen werden.
- Genaue Bestimmung der Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustands von FUrD: Mittels zeitaufgelöster Fluoreszenz-Spektroskopie kann die Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustands (S_1) bestimmt werden. Mit Kenntnis der S_1 -Lebensdauer kann in den Ergebnissen der IR-Messungen möglicherweise eine Unterscheidung der elektronischen von vibronischen Prozessen erreicht werden.
- Untersuchung weiterer Uridin- oder Uracil-Derivate: Über die Lebensdauern der verschiedenen Uridin- und Uracil-Derivate ist bisher wenig bekannt. Es besteht die Möglichkeit, dass beispielsweise durch geeignete Substitution die Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustands deutlich verlängert wird. Dies könnte eine spezifische Charakterisierung der einzelnen Prozesse mittels zeitaufgelöster spektroskopischer Methoden erlauben.

6. Zusammenfassung

Die Untersuchung von Photoschäden in DNA, die durch den UV-Anteil des Sonnenlichts hervorgerufen werden, sind hinsichtlich ihrer photochemischen und photophysikalischen Eigenschaften, ihres Mutationspotenzials und der Reparatursysteme Gegenstand aktueller Forschung. In der vorliegenden Arbeit wurden mit zeitaufgelösten spektroskopischen Methoden die Reaktionsmechanismen von zwei UV-induzierten Photoschäden untersucht. Der erste Teil (I) befasst sich mit der Sekundärreaktion des (6-4)-Schadens in einem Thymin-Dimer zum Dewar-Valenzisomer. Dieser UV-Schaden entsteht, im Unterschied zu anderen DNA-Schäden, durch Absorption von UV-Strahlung im UV-A-Bereich. Die Bildung des Dewar-Valenzisomers wurde im Zuge dieser Arbeit erstmals mit zeitaufgelöster Spektroskopie im infraroten Spektralbereich untersucht. Zur Photoanregung des (6-4)-Schadens im UV-A-Bereich war es notwendig den bestehenden Aufbau zur Erzeugung der Anregungsimpulse um zwei Stufen nichtlinearer Frequenzkonversion zu erweitern. Dadurch stand ein transientes Infrarot-Spektrometer mit durchstimmbaren Anregungsimpulsen im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich mit ausreichend Anregungsenergie zur Verfügung.

Der zweite Teil (II) dieser Arbeit beinhaltet die Untersuchung eines monomeren DNA-Schadens, der UV-induzierten Hydratbildung eines Uridin-Derivats. Dazu wurde ein fluoriertes Uridin mit einer besonders hohen Quantenausbeute der Hydratbildung verwendet. Diese Eigenschaft führt zu höheren Absorptionsänderungen im Zuge der Hydratbildung und erlaubt eine detailliertere Analyse der Reaktionsmechanismen.

(I) Reaktion des T(6-4)T-Dimers zum Dewar-Valenzisomer

Die Untersuchung der Isomerisierungsreaktion wurde mit verschiedenen spektroskopischen Techniken mit dem Schwerpunkt im infraroten Spektralbereich durchgeführt. Zunächst wurden die stationären Absorptions- und Emissionseigenschaften eines T(6-4)T-Dimers und des daraus gebildeten Dewar-Valenzisomers untersucht. In den stationären Belichtungsexperimenten zeigt sich bei der Isomerisierungsreaktion eine Verschiebung einer Carbonyl-Schwingungsbande in einen spektral separierten hochfrequenten Bereich bei 1781 cm^{-1} . Diese Dewar-Markerbande bietet einen direkten Zugang zur Quantifizierung der Dewar-Bildung im infraroten Spektralbereich. Auf diese Weise konnte die Quantenausbeute der Isomerisierungsreaktion zu $8\% \pm 2\%$ bestimmt werden.

Die transiente Absorption im infraroten Spektralbereich erlaubt eine genaue Beobachtung der kinetischen Abläufe des photoinduzierten Isomerisierungsprozesses: Im infraroten Spektralbereich wird eine Deaktivierung des elektronisch angeregten Zustands von T(6-4)T mit 130 ps beobachtet. Mit der gleichen Zeitkonstante erfolgt auch die Bildung des Dewar-Isomers, die an der spektralen Position der Markerbande deutlich in Erscheinung tritt. Die Quantenausbeute aus den transienten Messungen ist vergleichbar mit stationären Belichtung und liegt bei 5 - 8 %. In den transienten Infrarotspektren wird neben der Kinetik mit 130 ps eine weitere

langlebige Komponente mit 1 ns beobachtet. Transiente Messungen der UV/Vis-Absorption und der Fluoreszenz bestätigen die Zeitkonstanten von 130 ps und 1 ns als eine Deaktivierung des elektronisch angeregten Zustands. Ebenso weisen die zeitaufgelösten Emissionsmessungen einen biexponentiellen Zerfall der Fluoreszenzintensität auf, deren Zeitkonstanten in sehr guter Übereinstimmung mit den transienten Absorptionsmessungen stehen. In den Emissionsmessungen wurde eine Temperaturabhängigkeit der Zerfallskonstanten von 130 ps und 1 ns festgestellt. Dies bedeutet, dass die Deaktivierung des elektronisch angeregten Zustands über eine Energiebarriere erfolgt. Über eine Arrhenius-Auftragung konnten die jeweiligen Werte für die Aktivierungsenergie zu 1000 cm^{-1} (130 ps) und 1500 cm^{-1} (1 ns) bestimmt werden.

Eine dritte Kinetik mit einer Zeitkonstante von etwa 500 ns, die sich in den zeitaufgelösten IR-Messungen zeigt, weist nach dem Vergleich mit simulierten Triplet-Spektren von T(6-4)T auf eine Beteiligung eines Triplet-Zustandes hin, der mit dieser Zeitkonstante von 500 ns zerfällt. Da sich die spektralen Signaturen von Triplet- und Grundzustand überlagern, lässt sich nicht eindeutig bestimmen mit welcher Zeitkonstante eine Spininversion und damit die Bevölkerung eines Triplet-Zustandes stattfindet.

Zur Vertiefung des Verständnisses der photophysikalischen Eigenschaften des T(6-4)T-Dimers wurden zusätzlich Untersuchungen am monomeren Pyrimidinon (1M2P in D_2O) als Minimalmodell durchgeführt. Die Analyse dieser Eigenschaften mit verschiedenen zeitaufgelösten spektroskopischen Methoden ergab, vergleichbar zum Dimer, eine Deaktivierung des elektronisch angeregten Zustands über eine Energiebarriere mit einer Zeitkonstante von 400 ps. Zusätzlich weisen die transienten Spektren im Infraroten und UV/Vis eine weitere langlebige Komponente im Bereich von 40 ns auf, die dem Zerfall eines Triplet-Zustands zugeordnet werden kann.

Die Reaktion des T(6-4)T-Dimers zum Dewar-Valenzisomer zeigt sich in den Experimenten sehr deutlich. Im monomeren Pyrimidinon kann die Dewar-Bildung sowohl in den stationären als auch in den zeitaufgelösten Messungen nicht nachgewiesen werden. Die quantenchemischen Analysen der Geometrien des Dimers und des Monomers in der Gruppe von Prof. de Vivie-Riedle liefern eine Erklärung für diese experimentellen Beobachtungen: Sie zeigen, dass die Verbindung des Dimers über das Rückgrat einen Klammermechanismus darstellt, der einen Isomerisierungsprozess zur Dewar-Form erst ermöglicht. Das Rückgrat ist somit die Ursache für die Schadensbildung.

(II) Die Bildung des Photohydrats von Fluoro-Uridin

Ein fluoriertes Uridin (FUrd) diente im zweiten Teil dieser Arbeit als Modellsystem zur Analyse der Bildung des Photohydrats nach UV-Anregung. In den stationären IR-Spektren von FUrd konnten durch den Vergleich mit simulierten IR-Spektren und einem Belichtungsexperiment spektrale Signaturen für die Hydrat-Bildung identifiziert werden.

Die zeitliche Entwicklung der Absorptionsänderung von FUrd nach Photoanregung wurde mit transientser Infrarot-Spektroskopie im Zeitbereich von Piko- bis Mikrosekunden untersucht. Daraus ergab sich, dass die Bildung des Photohydrats von FUrd mit einer Zeitkonstante von 1 bis 3 ps stattfindet. Die Ausbeute für die Hydrat-Bildung liegt im Bereich von 4 bis 10 %. Die charakteristische spektrale Signatur des Photohydrats ist im Zeitbereich der ersten 10 ps überlagert durch Absorptionsänderungen aus Vorgängen der internen Konversion in den Grundzustand und Schwingungsrelaxationsprozessen abkühlender Moleküle im elektronisch

angeregten und im Grundzustand. Daher können diese Prozesse nicht eindeutig zugeordnet werden. Insbesondere kann nicht unterschieden werden, ob die Hydratbildung über einen elektronisch angeregten Zustand oder über einen vibronisch angeregten Grundzustand erfolgt.

Im Nanosekunden-Zeitbereich werden weitere Absorptionsänderungen im infraroten Spektralbereich beobachtet, die jedoch nicht zur Hydratbildung beitragen. Aus einem Vergleich mit simulierten Triplett-Spektren von FURd und Angaben in der Literatur kann dieser Prozess mit einer Zeitkonstante von 71 ns einem Zerfall eines Triplett-Zustandes zugeordnet werden. Eine Abschätzung zur Quantenausbeute der Triplettbildung aus den zeitaufgelösten Messungen liefert eine untere Grenze von etwa 1 %.

Mit den Untersuchungen an Fluoro-Uridin wurden erstmals zeitaufgelöste Infrarot-Messungen im Zeitbereich von Femto- bis Mikrosekunden gezeigt. Sie bilden die Grundlage für weitere Messungen zum Reaktionsmechanismus des Photohydrats.

Ausblick

Die experimentellen Ergebnisse zur Dewar-Bildung in einem Thymin-Dinukleotid zeigen deutlich die Möglichkeit der direkten und eindeutigen Identifizierung der Dewar-Form mit spektroskopischen Methoden. Sie eröffnen die Möglichkeit weiterer Untersuchungen zu dieser Schadensbildung. Mit einem qualitativen und quantitativen Nachweis des Dewars in einem Doppelstrang können spektroskopischen Methoden wichtige Erkenntnisse beispielsweise im Hinblick auf die Funktion des DNA-Rückgrats bei der Dewar-Bildung liefern.

Die zeitaufgelösten Messungen an Fluoro-Uridin geben einen Anhaltspunkt die Bildung des Photohydrats. Sie können als Orientierung für weiterführende Analysen dienen, wie der Fragestellung des Bildungsmechanismus des Hydrats über einen elektronisch angeregten Zustand oder über einen vibronisch angeregten Grundzustand. Durch die genaue Messung der Lebensdauer des angeregten Zustands mit zeitaufgelösten Emissionsmessungen an FURd und die Bestimmung der Energiebarriere der Rückreaktion des Photohydrats besteht die Aussicht auf weiteren Erkenntnisgewinn zum Reaktionsprozess. Eine andere Möglichkeit besteht in der Verwendung anderer Uridin- oder Uracil-Derivate, deren Lebensdauer des angeregten Zustands stark von vibronischen Relaxationsprozessen abweicht. Dadurch könnten die elektronischen von den vibronischen Vorgängen in zeitaufgelösten Messungen besser unterschieden werden und somit ein Reaktionspfad der Hydratbildung identifiziert werden.

A. Lösungsmittelkorrekturen

Temperatureffekt von D₂O

Im Absorptionsspektrum von D₂O befindet sich im Bereich von 1300 bis 1800 cm⁻¹ eine Absorptionsbande, die sich unter Temperaturerhöhung zu niedrigeren Wellenzahlen hin verschiebt. Dieser Effekt ist Abbildung A.1 bei drei verschiedenen Temperaturen gezeigt. Im Differenzspektrum äußert sich eine Temperaturerhöhung von D₂O durch einen sigmoidalen Verlauf mit einem Maximum bei 1450 cm⁻¹ und einem Minimum bei 1600 cm⁻¹.

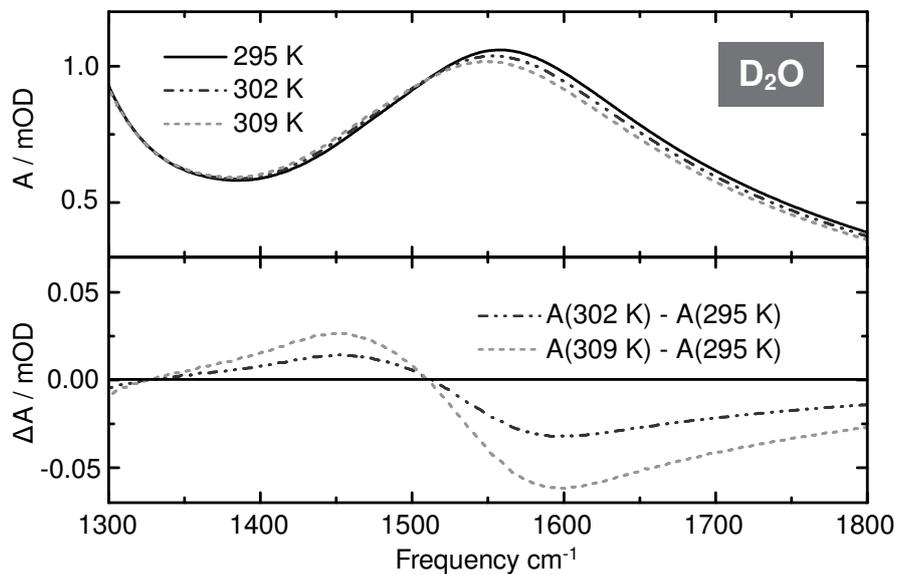


Abb. A.1.: Absorptionsspektrum von D₂O im Bereich von 1300 bis 1800 cm⁻¹ bei verschiedenen Temperaturen (oben). Durch Temperaturerhöhung verschiebt sich die Absorptionsbande zu niedrigeren Wellenzahlen. In der Differenz der Spektren unterschiedlicher Temperaturen äußert sich dies in einem sigmoidalen Verlauf des Differenzspektrums (unten).

Korrektur der zeitaufgelösten Messungen

Die Absorptionsänderungen von D_2O sind in dem in Abbildung A.1 betrachteten Temperaturbereich direkt proportional zur Temperaturänderung. Die erwarteten Absorptionsänderungen in den zeitaufgelösten Messungen lassen sich deshalb über eine lineare Skalierung dieser Differenzspektren an die transienten Spektren korrigieren. In Abbildung A.2 ist dies anhand eines transienten Spektrums von T(6-4)T in D_2O nach einer Verzögerungszeit von $10 \mu s$ gezeigt. Das

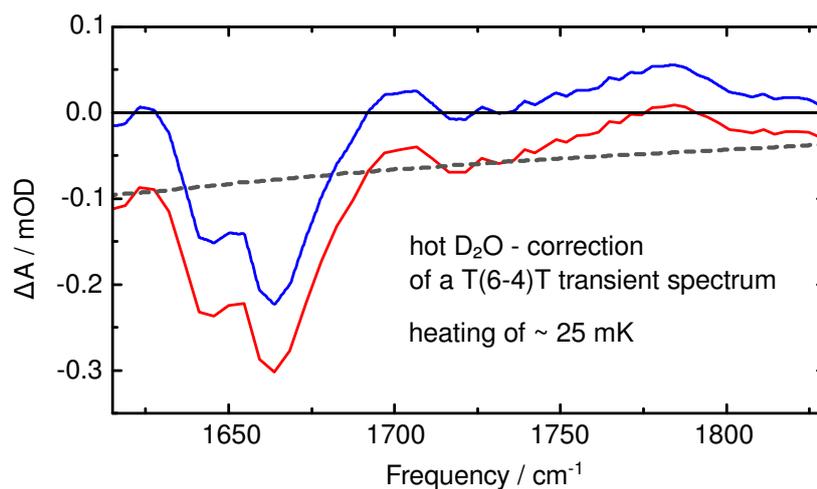


Abb. A.2.: Korrektur des Effekts durch Aufheizen des Lösungsmittels in den experimentellen Daten von T(6-4)T. Das Differenzspektrum von D_2O , das einer Temperaturerhöhung von etwa 25 mK entspricht (grau gestrichelt), wird vom transienten Spektrum von T(6-4)T (rot) subtrahiert und man erhält das korrigierte transiente Spektrum in blau.

T(6-4)T-Spektrum (rot) wird von der Absorptionsänderung durch das Aufheizen von D_2O überlagert. Das Differenzspektrum von D_2O aus Abbildung A.1 lässt sich auf das T(6-4)T-Spektrum linear skalieren (grau gestrichelt). Die Skalierung entspricht einer Temperaturänderung von etwa 25 mK. Nach Abzug des D_2O -Differenzspektrums erhält man das korrigierte transiente Spektrum von T(6-4)T (blau). Der gesamte Datensatz der zeitaufgelösten Messung an T(6-4)T ist auf diese Weise korrigiert.

B. Globale Datenanpassung

Die Datensätze der zeitaufgelösten Messungen im infraroten Spektralbereich wurden mit einer globalen Datenanalyse, die aus einer Summe von Exponentialfunktionen besteht, angepasst. Im Folgenden sind die Zerfallsassoziierten Spektren gezeigt, die zu den zeitkonstanten der jeweiligen Datenanpassung ermittelt wurden.

T(6-4)T-Dimer

Im Messbereich von 1450 cm^{-1} bis 1825 cm^{-1} :

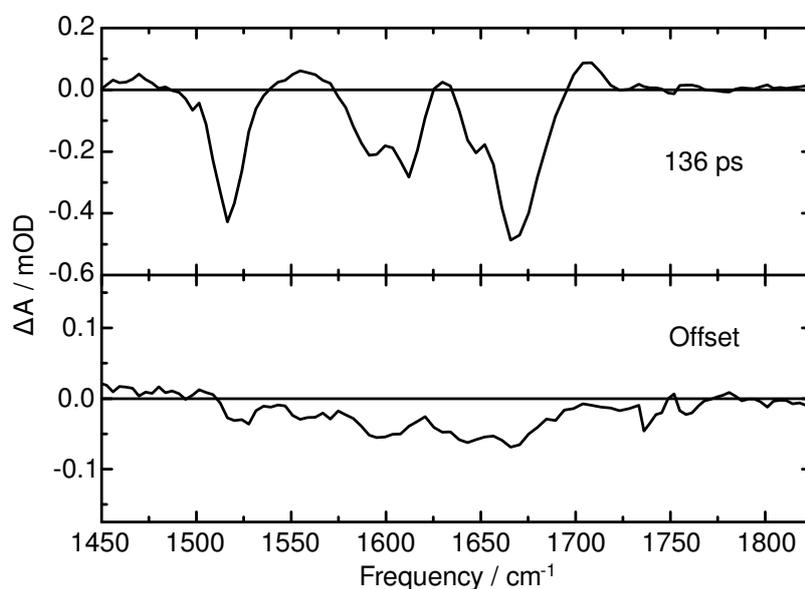


Abb. B.1.: Zerfallsassoziierte Spektren der zeitaufgelösten Messung an T(6-4)T-Dimeren mit einer Impulsenergie von 450 nJ mit den entsprechenden Zeitkonstanten der globalen Datenanpassung.

T(6-4)T-Dimer

Im Dewar-spezifischen Messbereich von 1620 cm^{-1} bis 1830 cm^{-1} :

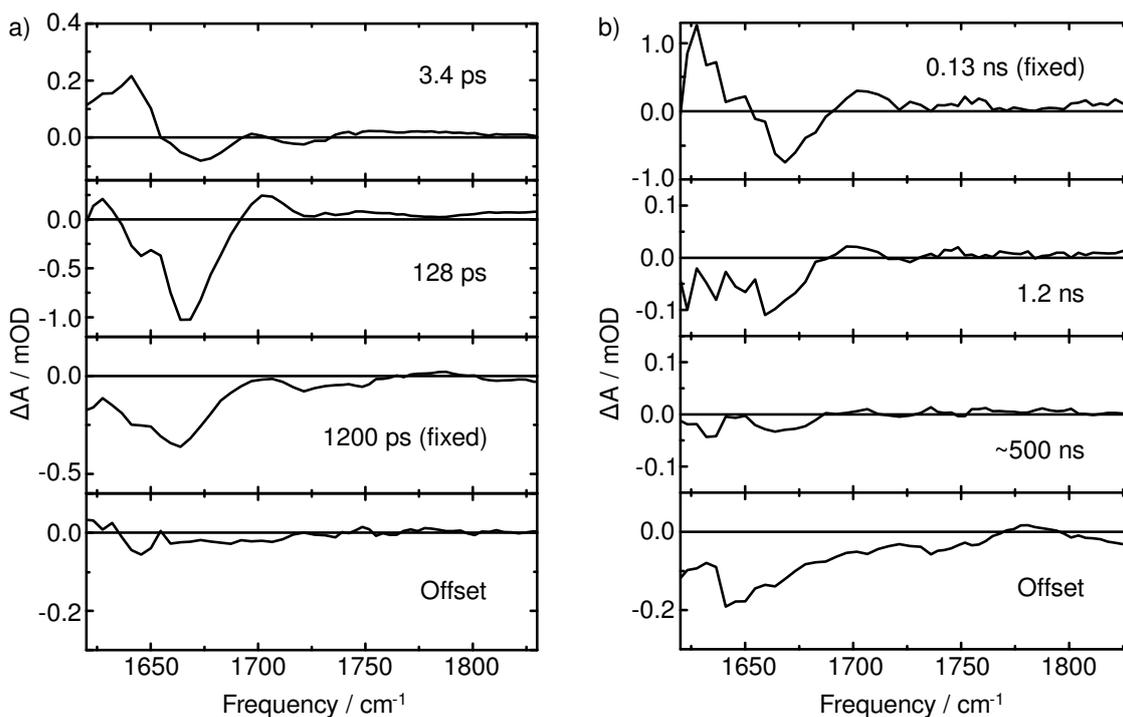
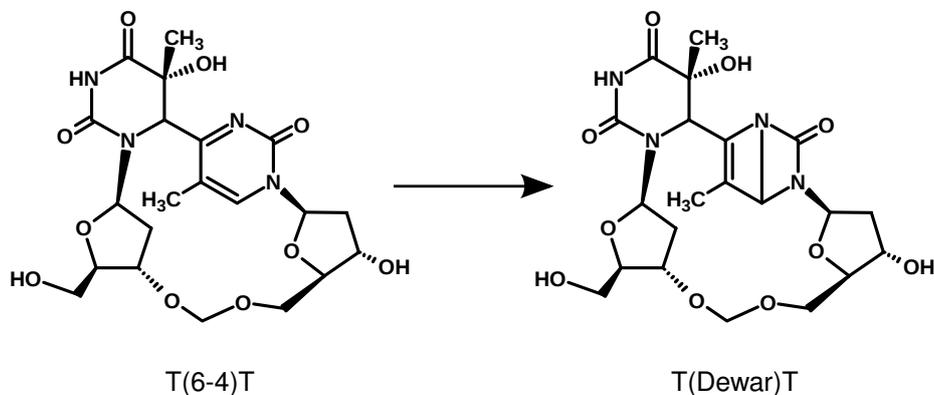


Abb. B.2.: Zerfallsassoziierte Spektren der zeitaufgelösten Messung an T(6-4)T-Dimeren mit einer Impulsenergie von 750 nJ im a) Pikosekundenbereich und b) Nanosekundenbereich mit den entsprechenden Zeitkonstanten der globalen Datenanpassung.

5-Fluoro-Uridin:

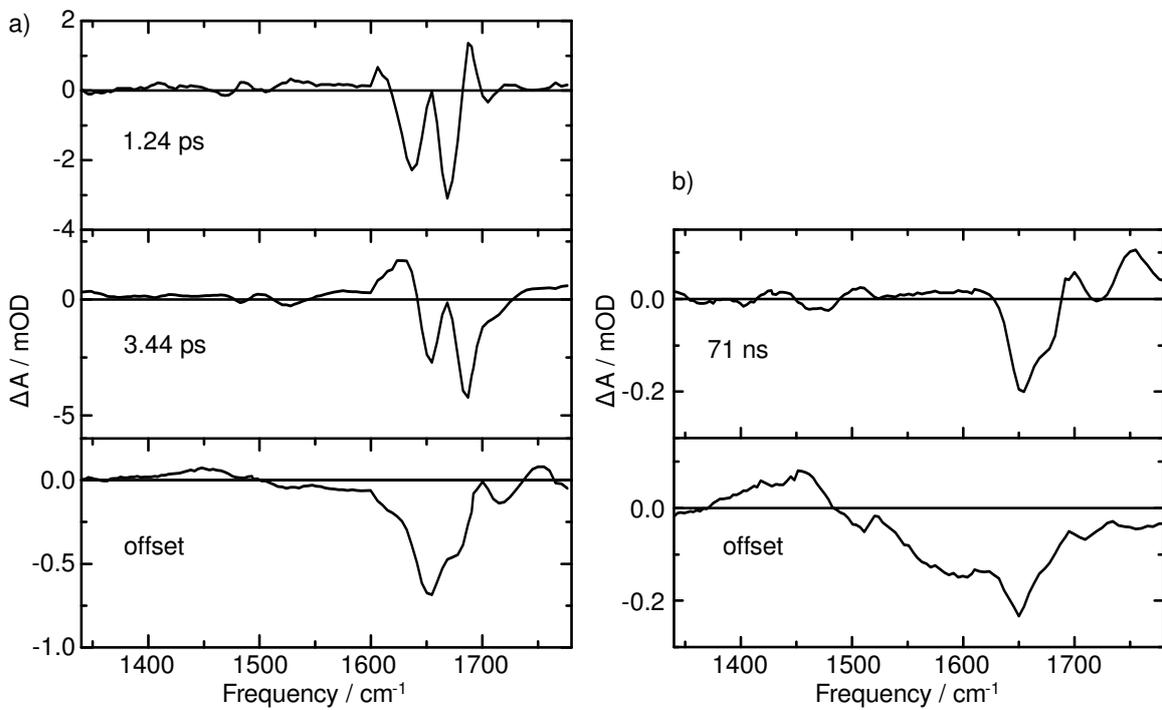
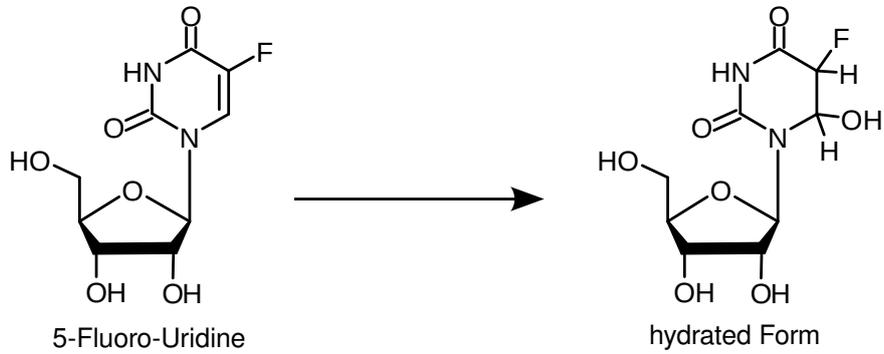


Abb. B.3.: Zerfallsassoziierte Spektren der zeitaufgelösten Messung an 5-Fluoro-Uridin im a) Pikosekundenbereich und b) Nanosekundenbereich mit den entsprechenden Zeitkonstanten der globalen Datenanpassung.

C. Bestimmung der Reaktionsquantenausbeute des Dewar-Valenzisomers

Die Berechnung der Quantenausbeute der Dewar-Isomerisierung berechnet sich wie folgt. Die Quantenausbeute ist allgemein definiert als das Verhältnis der Zahl der Moleküle, die pro Zeiteinheit umbelichtet werden (N_M) und der Zahl der Photonen, die pro Zeiteinheit absorbiert werden (N_{Ph})

$$\Phi = \frac{\Delta N_M / \Delta t}{\Delta N_{Ph} / \Delta t}. \quad (\text{C.1})$$

Die Zahl der Moleküle, die pro Zeiteinheit umbelichtet werden, in diesem Fall zum Dewar-Valenzisomer umgewandelt werden, ist direkt proportional zur Konzentrationsänderung der Dewar-Isomere.

$$\frac{\Delta N_M}{\Delta t} = \frac{\Delta c_{Dew}}{\Delta t} \cdot V \cdot N_A. \quad (\text{C.2})$$

Wobei V dem Probenvolumen und N_A der Avogadro-Zahl entspricht. Den Wert für $\frac{\Delta c_{Dew}}{\Delta t}$, also die Konzentrationsänderung der Dewar-Isomere pro Zeiteinheit erhält man nun aus dem in Abschnitt 3.5 beschriebenen Belichtungsexperiment, bei dem die Änderung der Optischen Dichte gegen die Belichtungszeit aufgetragen wird. Abgeleitet aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz ergibt sich für die Absorption

$$A = d \cdot c \cdot \varepsilon \quad (\text{C.3})$$

wobei c der Konzentration und ε dem Extinktionkoeffizienten entspricht.

Im speziellen Fall Dewar-Isomerisierung wird die Markerbande bei 1781 cm^{-1} betrachtet, die den Vorteil hat, dass sie sich spektral isoliert von den übrigen Schwingungsbanden sowohl des Dewar-Isomers als auch des (6-4)-Dimers befindet. Nimmt man nun die Änderung der Absorption in Abhängigkeit der Belichtungszeit bei 1781 cm^{-1} auf, so gilt

$$\Delta A = d \cdot \Delta c_{Dew} \cdot \Delta \varepsilon_{1781}. \quad (\text{C.4})$$

Dabei gilt: $\Delta \varepsilon_{1781} = \varepsilon_{Dewar,1781} - \varepsilon_{(6-4),1781} = \varepsilon_{Dewar,1781}$, da das (6-4)-Dimer bei der Dewar-Bande (1781 cm^{-1}) keine Absorption besitzt. Den Wert für $\varepsilon_{Dewar,1781}$ erhält man aus dem finalen Belichtungsspektrum unter der Annahme, dass alle (6-4)-Dimere in das Dewar-Valenzisomer umgewandelt wurden. Dies hat eine chemische Analyse ergeben. Nach Auftragen

C. Reaktionsquantenausbeute

der Änderung der Optischen Dichte gegen die Belichtungszeit lässt sich für kleine Strahlungsdosen und Belichtungszeit eine lineare Funktion daran anpassen (siehe Abbildung C.1). Die Steigung dieser Gerade liefert einen Wert für $\frac{\Delta A}{\Delta t}$. In Gleichung C.2 lässt sich nun $\frac{\Delta c_{Dewar}}{\Delta t}$ ersetzen durch $\frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{1}{d \cdot \varepsilon_{Dewar,1781}}$.

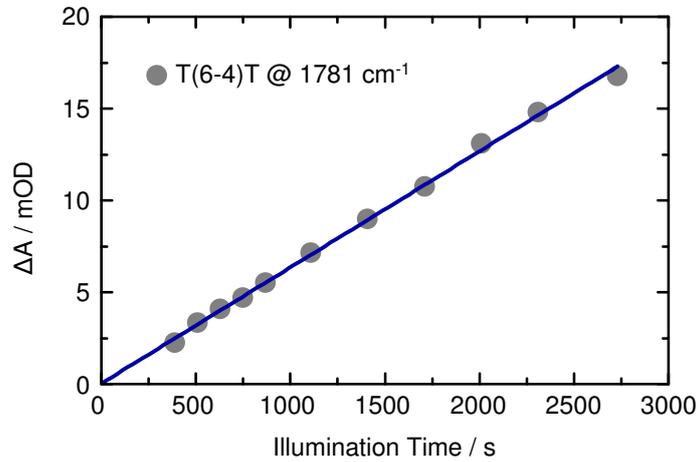


Abb. C.1.: Lineare Datenanpassung zur Bestimmung der Quantenausbeute der Dewar-Isomerisierung

Die Anzahl der absorbierten Photonen pro Zeiteinheit erhält man aus der gemessenen Belichtungsleistung (P) und der Energie eines Photons bei der verwendeten Wellenlänge ($\lambda = 355 \text{ nm}$)

$$\frac{\Delta N_{Ph}}{\Delta t} = \frac{P \cdot \lambda}{h \cdot c} \quad (\text{C.5})$$

Somit gilt für die Berechnung der Quantenausbeute anhand der Dewar-Markerbande bei 1781 cm^{-1}

$$\Phi = \frac{\Delta N_M / \Delta t}{\Delta N_{Ph} / \Delta t} = \frac{\Delta A \cdot V \cdot N_A}{\Delta t \cdot \varepsilon_{Dewar,1781} \cdot d} \cdot \frac{h \cdot c}{P \cdot \lambda} \quad (\text{C.6})$$

Der Wert für $\frac{\Delta A}{\Delta t} = 6.3 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ entspricht der Steigung der Geraden in Abbildung C.1. Für den Extinktionskoeffizienten bei 1781 cm^{-1} gilt $\varepsilon_{Dewar,1781} = 342 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ erhalten aus dem Dewar-Spektrum. Die Belichtungsleistung lässt sich durch ein separates Belichtungsexperiment, das unter exakt den gleichen Bedingungen mit einer Substanz bekannter Quantenausbeute durchgeführt wird, bestimmen. Aus dieser Aktinometermessung ergibt sich der Wert $P = 8.7 \text{ mW}$ für die Belichtungsleistung. Mit dem Probenvolumen $V = 1 \text{ ml}$, der Schichtdicke der Küvette von $d = 90 \mu\text{m}$ und den Werten für die Belichtungswellenlänge ($\lambda = 355 \text{ nm}$), das Planck'sche Wirkungsquantum ($h = 6.626 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$), die Avogadro-Konstante ($N_a = 6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) und die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum ($3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$) berechnet sich die Quantenausbeute für die Dewar-Isomerisierung zu

$$\Phi \approx 0.08 \quad (\text{C.7})$$

D. Simulation von IR-Spektren zum Photohydrat

Für die Simulation der IR-Spektren wurde das Programmpaket Gaussian03 mit dem Austausch-Korrelationsfunktional B3LYP (Becke, 3 Parameter, Lee-Yang-Parr) [Lee88, Ste94] und dem Basissatz 6-31+G** verwendet. Für die Darstellung der Spektren ist ein B3LYP Skalierungsfaktor von 0,9614 und eine Gauß-Liniebreite von 15 cm^{-1} benutzt worden.

Fluorouridin mit Lösungsmittelmodell

Der Einfluss der Lösungsumgebung auf das Infrarotspektrum eines von Fluoro-Uridin wurde mit einem Lösungsmittelkontinuum-Modell angenähert (PCM = polarizable continuum model) [Bar98, Cos03]. Der Unterschied zum Spektrum in der Gasphase ist in Abbildung D.1 gezeigt. Die Verwendung des Kontinuum-Modells führt zu einer besseren Repräsentation der experimentellen IR-Spektren.

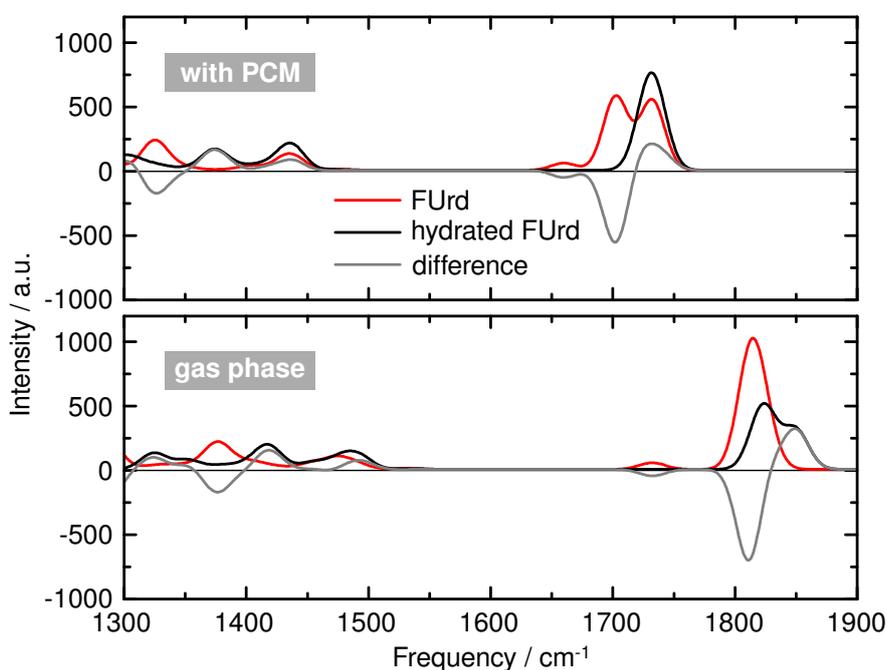


Abb. D.1.: Vergleich der simulierten IR-Spektren mit Lösungsmittelkontinuum-Modell (PCM) und in der Gasphase. Es sind jeweils die Spektren von FUrd, des FUrd-Hydrats und die Differenz der beiden Spektren gezeigt. Bei den Berechnungen wurde ein B3LYP-Skalierungsfaktor von 0,9614 und eine Gauß-Liniebreite von 15 cm^{-1} verwendet.

Simulation des Triplett-IR-Spektrums von Fluorouridin

Das Ergebnis der Simulation des Triplett-Spektrums von FUrd im infraroten Spektralbereich ist in Abbildung D.2 dargestellt. Im Carbonylschwingungsbereich von 1650 cm^{-1} bis 1800 cm^{-1} befinden sich zwei Absorptionsbanden. Eine dieser Banden ist im Vergleich zum Singulett-Spektrum zu höheren Frequenzen verschoben. Eine vergleichbare spektrale Entwicklung zeigt sich in den experimentellen Ergebnissen.

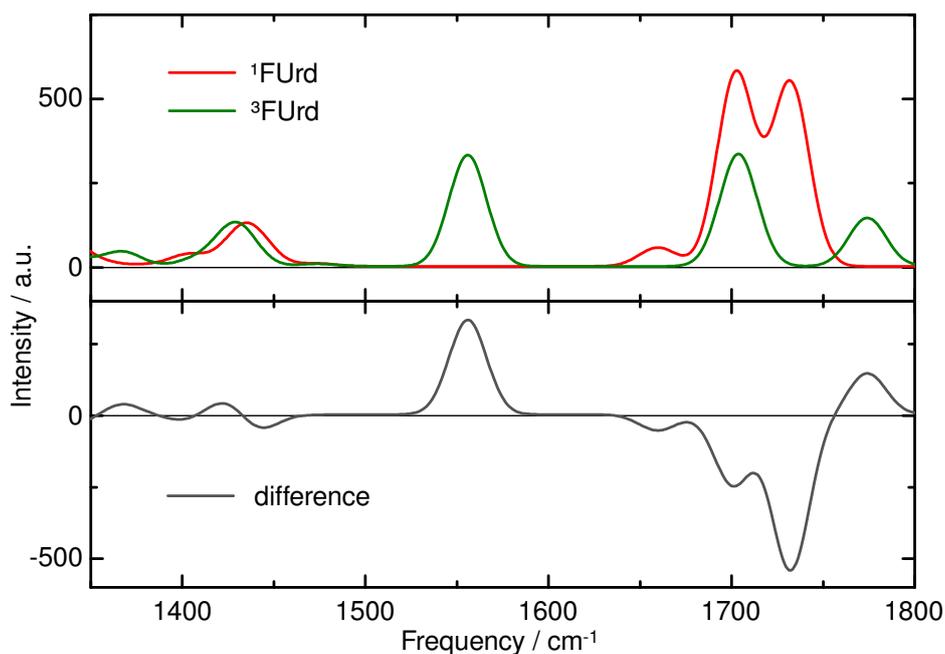


Abb. D.2.: Ergebnis der Simulation des Triplett-IR-Spektrums von Fluoro-Uridin (grün) im Vergleich mit dem Singulett-Spektrum (rot). Darunter ist die Differenz der beiden Spektren eingezeichnet. Es wurde das PCM-Lösungsmittelmodell, ein B3LYP-Skalierungsfaktor von 0,9614 und eine Gauß-Liniebreite von 15 cm^{-1} und verwendet.

Abbildungsverzeichnis

2.1.	Nomenklatur der Nukleinsäuren	5
2.2.	Bausteine der DNA und RNA	6
2.3.	Aufbau des DNA/RNA-Rückgrats und Watson-Crick Basenpaarung	7
2.4.	Dimer-Schäden an TpT-Sequenzen	8
2.5.	Bildung des T(CPD)T-Schadens	9
2.6.	Bildung des T(6-4)T-Schadens über das Oxetan-Intermediat	10
2.7.	Bildung des Dewar-Valenzisomers aus dem (6-4)-Schaden	11
2.8.	Vergleich der UV-Spektren von T(6-4)T, TpT und T(Dewar)T mit dem terrestrischen Sonnenspektrum	12
2.9.	Bildung des Photohydrats bei Uracilderivaten	13
2.10.	Bildung des Photohydrats bei Cytosinderivaten	13
2.11.	Entstehung von Mutationen durch UV-Schäden	14
2.12.	Entstehung von C→T-Mutationen durch CPD-Schäden	15
2.13.	Entstehung von T→C-Mutationen durch (6-4)-Schäden	16
3.1.	Das Prinzip der Anreg-Abtast-Spektroskopie	18
3.2.	Das Femtosekunden-Infrarot-Spektrometer	19
3.3.	Das Femtosekunden-Lasersystem	20
3.4.	Erzeugung der Abtastimpulse im mittleren infraroten Spektralbereich	22
3.5.	Erzeugung der Anregungsimpulse im ultravioletten Spektralbereich	24
3.6.	Das Spektrum der Anregungsimpulse	25
3.7.	Der Probenraum und die Detektion	26
3.8.	Der Probenkreislauf	27
3.9.	Der Aufbau der Nanosekundenanlage	29
3.10.	Bestimmung der Apparatefunktion	31
3.11.	Der Aufbau zur Bestimmung der Quantenausbeute	34
4.1.	Strukturformeln des Dewar-Modellsystems	36
4.2.	3-dimensionale Ansicht des T(6-4)T- und des T(Dew)T-Dimers	37
4.3.	Stationäre Infrarotspektren des T(6-4)T-Dimers und des Dewar-Valenzisomers	38
4.4.	UV-Spektren des T(6-4)T-Dimers und des T(Dew)T-Dimers	39
4.5.	Absorptions- und Emissionsspektrum des T(6-4)T-Dimers	40
4.6.	Bestimmung der Quantenausbeute der Dewar-Bildung	41
4.7.	Zeitaufgelöste IR-Messung an T(6-4)T-Dimeren im Überblick	43
4.8.	Zeitverläufe der IR-Messung an T(6-4)T-Dimeren	44
4.9.	Konturdarstellung und transiente Spektren: Entstehung der Dewar-Bande	45
4.10.	Zeitverläufe zur Entstehung der Dewar-Bande	46
4.11.	Transiente Spektren von T(6-4)T-Dimeren im Nanosekundenbereich	48

4.12. Zeitverläufe der IR-Messung von T(6-4)T-Dimeren im Nanosekundenbereich	49
4.13. Zeitverläufe der IR-Messung von T(6-4)T-Dimeren vom Femto- bis Nanosekundenbereich	50
4.14. Photophysik von T(6-4)T-Dimeren: Zeitaufgelöste Fluoreszenzdaten	51
4.15. Transiente Spektren der Messung an T(6-4)T-Dimeren im UV- und sichtbaren Spektralbereich	54
4.16. Zeitverläufe der Messung an T(6-4)T-Dimeren im UV- und sichtbaren Spektralbereich	55
4.17. Stationäres UV- und Fluoreszenz-Spektrum von Pyrimidinon	56
4.18. Stationäres IR-Spektrum von Pyrimidinon vor und nach Belichtung	57
4.19. Zeitaufgelöste IR-Messung an 1M2P	58
4.20. Transiente Spektren im Nanosekundenbereich von 1M2P im IR	59
4.21. Zeitverläufe der Messung an 1M2P im IR	60
4.22. Zeitaufgelöste UV/Vis-Messung an 1M2P	61
4.23. Reaktionsmodell von 1M2P	63
4.24. Simulation der IR-Spektren des T(6-4)T- und T(Dewar)T-Dimers	65
4.25. Simuliertes Tripletspektrum des T(6-4)T-Dimers	66
4.26. Schema des Reaktionspfades des T(6-4)T-Dimers und des Monomers 5M2P nach quantenchemischen Berechnungen	67
4.27. Potentialenergie-Schema der Bildung des Dewar-Valenzisomers von T(6-4)T	68
4.28. Reaktionsmodell des T(6-4)T-Dimers nach UV-Anregung	70
4.29. Das Rückgrat ermöglicht die Dewar-Bildung	71
5.1. Strukturformeln von Fluoro-Uridin und hydratisiertem Fluoro-Uridin	74
5.2. Stationäre Infrarotspektren von 5-Fluoro-Uridin vor und nach Belichtung	75
5.3. Simulierte IR-Absorptionsspektren von FURd und hydratisiertem FURd	76
5.4. Stationäres Absorptionsspektrum von 5-Fluoro-Uridin im UV-Bereich und Rückreaktion	77
5.5. Ergebnis der zeitaufgelösten IR-Messung an 5-Fluorouridin im Pikosekundenbereich	79
5.6. Zeitverläufe der Absorptionsänderungen von 5-Fluorouridin im Pikosekundenbereich	81
5.7. Vergleich des transienten Spektrums nach 2 ns mit dem stationären Differenzspektrum von FURd	83
5.8. Ergebnis der zeitaufgelösten IR-Messung an FURd im Nanosekundenbereich	84
5.9. Zeitverläufe der Absorptionsänderungen von FURd im Nanosekundenbereich	85
5.10. Vergleich des transienten Spektrums nach 10 μ s mit dem stationären Differenzspektrum von FURd	86
5.11. Modell zur Photophysik von FURd	89
A.1. Temperatureffekt von D ₂ O	95
A.2. Korrektur des Temperatureffekts von D ₂ O bei T(6-4)T	96
B.1. Dewar-Isomerisierung I: Amplituden der globalen Datenanpassung	97
B.2. Dewar-Isomerisierung II: Amplituden der globalen Datenanpassungen	98

B.3. Photohydrat: Amplituden der globalen Datenanpassungen	99
C.1. Lineare Datenanpassung zur Bestimmung der Quantenausbeute der Dewar- Isomerisierung	102
D.1. Vergleich der Simulation der IR-Spektren von Fluoro-Uridin mit und ohne Lösungsmittelkontinuum-Modell	103
D.2. Simulation des Triplett-IR-Spektrums von Fluoro-Uridin	104

Tabellenverzeichnis

3.1. Parameter des zentralen Lasersystems	21
3.2. Parameter des Nanosekundenlasersystems	28
4.1. Übersicht über die Zeitkonstanten aus der zeitaufgelösten Messungen an T(6-4)T im infraroten Spektralbereich	50
4.2. Übersicht über die Zeitkonstanten und relativen Amplituden der Emissionsmessung an T(6-4)T-Dimeren in Abhängigkeit der Temperatur	52
4.3. Übersicht über die Zeitkonstanten aus den zeitaufgelösten IR-Messungen an 1M2P	61
4.4. Übersicht über die Zeitkonstanten der Fluoreszenzmessung an 1M2P in Abhängigkeit der Temperatur	62
5.1. Übersicht über die Zeitkonstanten aus der zeitaufgelösten Messungen an FURd im infraroten Spektralbereich	88

Literaturverzeichnis

- [Alb95] B. ALBERTS, R. LEWIS, W. ROBERTS. *Molekularbiologie der Zelle (3. Auflage)*, 1995.
- [Arr89] S. ARRHENIUS. *Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren.* Z. phys. Chem. 4:226–248, 1889.
- [Ave44] O. AVERY, C. MACLEOD, M. MCCARTY. *Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types.* The Journal of experimental medicine 79(2):137, 1944.
- [Bar98] V. BARONE, M. COSSI. *Quantum calculation of molecular energies and energy gradients in solution by a conductor solvent model.* The Journal of Physical Chemistry A 102(11):1995–2001, 1998.
- [Bec88] A. BECKE. *Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior.* Physical Review A 38(6):3098, 1988.
- [Bec93] A. BECKE. *Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange.* The Journal of Chemical Physics 98:5648, 1993.
- [Ben85] R. BENSASSON. *Primary photo-processes in biology and medicine.* Number 85. Plenum Pub Corp, 1985.
- [Ber07] J. BERG, J. TYMOCZKO, L. STRYER, B. HÄCKER. *Biochemie.* Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, 2007.
- [Bla02] R. BLANKENSHIP. *Molecular mechanisms of photosynthesis.* Wiley-Blackwell, 2002.
- [Boy03] R. BOYD. *Nonlinear optics.* Academic Pr, 2003.
- [Bro68] I. BROWN, H. JOHNS. *Photochemistry of uracil. Intersystem crossing and dimerization in aqueous solution.* Photochemistry and Photobiology 8(4):273–286, 1968.
- [Bry08] N. BRYANTSEVA, I. SOKOLOVA, A. TSYRENZHAPOVA, N. SELIVANOV, V. KHILYA, Y. GARAZD. *Fluorescent characteristics of coumarin photosensitizers.* Journal of Applied Spectroscopy 75(5):700–705, 2008.
- [Bur68a] J. BURR. *Advances in the photochemistry of nucleic acid derivatives.* Advances in Photochemistry pp. 193–299, 1968.
- [Bur68b] J. BURR, B. GORDON, E. PARK. *The Mechanism of Photohydration of Uracil and N-Substituted Uracils.* Photochemistry and Photobiology 8(1):73–78, 1968.

- [Bur72] J. BURR, E. PARK, A. CHAN. *Nature of the reactive species in the photohydration of uracil and cytosine derivatives.* Journal of the American Chemical Society 94(16):5866–5872, 1972.
- [Byk98] V. BYKOV, C. JANSEN, K. HEMMINKI. *High levels of dipyrimidine dimers are induced in human skin by solar-simulating UV radiation..* Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention 7(3):199–202, 1998.
- [Büc54] G. BÜCHI, C. INMAN, E. LIPINSKY. *Light-catalyzed organic reactions. I. The reaction of carbonyl compounds with 2-methyl-2-butene in the presence of ultraviolet light.* Journal of the American Chemical Society 76(17):4327–4331, 1954.
- [Cad05] J. CADET, E. SAGE, T. DOUKI. *Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA.* Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 571(1-2):3–17, 2005.
- [Cer03] G. CERULLO, S. DE SILVESTRI. *Ultrafast optical parametric amplifiers.* Review of scientific instruments 74:1, 2003.
- [CH04] C. CRESPO-HERNÁNDEZ, B. COHEN, P. HARE, B. KOHLER. *Ultrafast excited-state dynamics in nucleic acids.* Chemical reviews 104(4):1977–2020, 2004.
- [Cli95] P. CLINGEN, C. ARLETT, L. ROZA, T. MORI, O. NIKAIDO, M. GREEN. *Induction of cyclobutane pyrimidine dimers, pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts, and Dewar valence isomers by natural sunlight in normal human mononuclear cells.* Cancer research 55(11):2245–2248, 1995.
- [Cor08] T. CORDES. *Ultrakurzzeitspektroskopie von Hemithioindigo und biophysikalisch relevanten Derivaten.* dissertation, Januar 2008.
- [Cos03] M. COSSI, N. REGA, G. SCALMANI, V. BARONE. *Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model.* Journal of computational chemistry 24(6):669–681, 2003.
- [Dew67] J. DEWAR. *On the Oxidation of Phenyl Alcohol, and a Mechanical Arrangement adapted to illustrate Structure in the Non-saturated Hydrocarbons.* Proc. Royal Soc. Edinburgh (6):82–86, 1867.
- [dG99] F. DE GRUIJL. *Skin cancer and solar UV radiation.* European Journal of Cancer 35(14):2003–2009, 1999.
- [Don65] J. DONNELLAN, R. SETLOW. *Thymine photoproducts but not thymine dimers found in ultraviolet-irradiated bacterial spores.* Science 149(3681):308, 1965.
- [Dou00a] T. DOUKI, J. CADET, & AL.. *Electrospray-mass spectrometry characterization and measurement of far-UV-induced thymine photoproducts.* Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 54(2-3):145–154, 2000.

- [Dou00b] T. DOUKI, S. SAUVAIGO, F. ODIN, J. CADET, & AL.. *Formation of the main UV-induced thymine dimeric lesions within isolated and cellular DNA as measured by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Biological Chemistry 275(16):11678, 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.
- [Els91] T. ELSAESSER, W. KAISER. *Vibrational and vibronic relaxation of large polyatomic molecules in liquids*. Annual Review of Physical Chemistry 42(1):83–107, 1991.
- [Fik62] M. FIKUS, K. WIERZCHOWSKI, D. SHUGAR. *Photochemistry of Cytosine Nucleosides Nucleotides–III. Mono- and Di-Methylamino Analogues*. Photochemistry and Photobiology 1(4):325–335, 1962.
- [Fik65] M. FIKUS, K. WIERZCHOWSKI, D. SHUGAR. *Photochemistry of 5-Fluorouracil Analogues, Glycosides and Poly-FU**. Photochemistry and Photobiology 4(3):521–536, 1965.
- [Fin28] G. FINDLAY. *Ultra-violet light and skin cancer*. The Lancet 212(5491):1070–1073, 1928.
- [Fin10] B. P. FINGERHUT. *Optimale Photochemische Energiekonversion und Umgebungseffekte in Reaktiver Moleküldynamik*. dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, November 2010.
- [Fis70] G. FISHER, H. JOHNS. *Ultraviolet photochemistry of thymine in aqueous solution*. Photochemistry and Photobiology 11(6):429–444, 1970.
- [Fis73] G. FISHER, H. JOHNS. *Thymine hydrate formed by ultraviolet and gamma irradiation of aqueous solutions*. Photochemistry and Photobiology 18(1):23–27, 1973.
- [Fis76] G. FISHER, H. JOHNS. *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*. Academic Press, New York 1:169–224, 1976.
- [Fra53] R. FRANKLIN, R. GOSLING, & AL.. *Molecular configuration in sodium thymonucleate*. Nature 171(4356):740, 1953.
- [Fri01] E. FRIEDBERG. *How nucleotide excision repair protects against cancer*. Nature Reviews Cancer 1(1):22–33, 2001.
- [Fri03] E. FRIEDBERG. *DNA damage and repair*. Nature pp. 436–439, 2003.
- [Fri04] M. FRIEDEL, M. CICHON, T. CARELL. *DNA Damage and Repair: Photochemistry*. CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology, edited by WM Horspool. F. Lenci, 2nd ed.(CRC Press LLC 2004) , 2004.

- [Gar85] A. GARNER, G. SCHOLE. *Mechanism of the Photohydration of Pyrimidines: A Flash Photolysis Study**. Photochemistry and photobiology 41(3):259–265, 1985.
- [Gla10] A. GLAS. *Strukturbiologische und mechanistische Untersuchungen zur Erkennung und Reparatur von DNA-Photoschäden*. dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2010.
- [Goo02] M. GOODMAN. *Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes*. Annual review of biochemistry 71(1):17–50, 2002.
- [Gre68] C. GREENSTOCK, H. JOHNS. *Photosensitized dimerization of pyrimidines*. Biochemical and biophysical research communications 30(1):21, 1968.
- [Gun96] D. GUNZ, M. HESS, H. NAEGELI. *Recognition of DNA adducts by human nucleotide excision repair*. Journal of Biological Chemistry 271(41):25089, 1996.
- [Gör91] H. GÖRNER. *Chromophore loss of uracil derivatives and polyuridylic acid in aqueous solution caused by 248 nm laser pulses and continuous UV irradiation: mechanism of the photohydration of pyrimidines*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 10(1-2):91–110, 1991.
- [Gün03] H. GÜNZLER, H. GREMLICH. *IR-Spektroskopie*. Wiley-VCH, 2003.
- [Hal99] D. HALL, R. KK. *Photosynthesis*, volume 3. Cambridge Univ. Press, 1999.
- [Ham94] P. HAMM. *Femtosekunden Infrarotspektroskopie an bakteriellen Reaktionszentren von Rhodobacter sphaeroides*. dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, November 1994.
- [Ham97] P. HAMM, M. LIM, R. HOCHSTRASSER. *Vibrational energy relaxation of the cyanide ion in water*. The Journal of chemical physics 107:10523, 1997.
- [Ham00] P. HAMM, R. KAINDL, J. STENGER. *Noise suppression in femtosecond mid-infrared light sources*. Opt. Lett 25(24):1798–1800, 2000.
- [Hes97] M. HESS, D. GUNZ, N. LUNEVA, N. GEACINTOV, H. NAEGELI. *Base pair conformation-dependent excision of benzo [a] pyrene diol epoxide-guanine adducts by human nucleotide excision repair enzymes*. Molecular and cellular biology 17(12):7069, 1997.
- [Hoc02] P. HOCKBERGER. *A History of Ultraviolet Photobiology for Humans, Animals and Microorganisms*. Photochemistry and photobiology 76(6):561–579, 2002.
- [Hor94] M. HORSFALL, C. LAWRENCE. *Accuracy of replication past the TC (6-4) adduct*. Journal of molecular biology 235(2):465–471, 1994.
- [Hwa96] G. HWANG, J. KIM, B. CHOI. *NMR Structural Studies of DNA Decamer Duplex Containing the Dewar Photoproduct of Thymidylyl (3' to 5') Thymidine*. European Journal of Biochemistry 235(1-2):359–365, 1996.

- [IAR92] IARC. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Solar and UV radiation* 55, 1992.
- [Jia93] N. JIANG, J. TAYLOR. *In vivo evidence that UV-induced C to 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.
- [Joh71] H. JOHNS, D. WHILLANS. *Properties of the triplet states of thymine and uracil in aqueous solution.* *Journal of the American Chemical Society* 93(6):1358–1362, 1971.
- [Kai00] R. KAINDL, M. WURM, K. REIMANN, P. HAMM, A. WEINER, M. WOERNER. *Generation, shaping, and characterization of intense femtosecond pulses tunable from 3 to 20 μm .* *JOSA B* 17(12):2086–2094, 2000.
- [Kan92] L. KAN, L. VOITURIEZ, J. CADET. *The Dewar valence isomer of the (6-4) photoadduct of thymidyl-(3'-5')-thymidine monophosphate: Formation, alkaline lability and conformations properties.* *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 12(4):339–357, 1992.
- [Kha72] M. KHATTAK, S. WANG. *The photochemical mechanism of pyrimidine cyclobutyl dimerization.* *Tetrahedron* 28(4):945–957, 1972.
- [Kle95] M. KLESSINGER, J. MICHL. *Excited states and photochemistry of organic molecules.* VCH New York, 1995.
- [Kub09] J. K. KUBON. *Untersuchung von Photoschäden der DNA und RNA mit Femtosekunden-IR-Spektroskopie.* Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Februar 2009.
- [Kui05] M. KUIMOVA, J. DYER, M. GEORGE, D. GRILLS, J. KELLY, P. MATOUSEK, A. PARKER, X. SUN, M. TOWRIE, A. 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.* *Chemical communications* (9):1182–1184, 2005.
- [Kwo08] W. KWOK, C. MA, D. PHILLIPS. *A doorway state leads to photostability or triplet photodamage in thymine DNA.* *Journal of the American Chemical Society* 130(15):5131–5139, 2008.
- [Lap03] L. LAPINSKI, H. ROSTKOWSKA, A. KHVOROSTOV, R. FAUSTO, M. NOWAK. *Photochemical Ring-Opening Reaction in 2 (1 H)-Pyrimidinones: A Matrix Isolation Study.* *The Journal of Physical Chemistry A* 107(31):5913–5919, 2003.
- [LeC91] J. LECLERC, A. BORDEN, C. LAWRENCE. *The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone (6-4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3'thymine-to-cytosine transitions in Escherichia coli.* *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(21):9685, 1991.

- [Lee88] C. LEE, W. YANG, R. PARR. *Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density*. Physical Review B 37(2):785, 1988.
- [Lee99] J. LEE, G. HWANG, B. CHOI. *Solution structure of a DNA decamer duplex containing the stable 3'T-G base pair of the pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct [(6-4) adduct]: Implications for the highly specific 3' T to C transition of the (6-4) adduct*. Proceedings of the National Academy of Sciences 96(12):6632, 1999.
- [Lee00a] J. LEE, S. BAE, B. CHOI. *The Dewar photoproduct of thymidylyl (3' to 5')-thymidine (Dewar product) exhibits mutagenic behavior in accordance with the 'A rule'*. Proceedings of the National Academy of Sciences 97(9):4591, 2000.
- [Lee00b] J. LEE, B. CHOI. *Structure of a DNA Duplex Containing a Site-Specific Dewar Isomer: Structural Influence of the 3'-T:G base pair of the Dewar product*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 33(3):268–288, 2000.
- [Lem93] D. LEMAIRE, B. RUZSICKA. *Quantum yields and secondary photoreactions of the photoproducts of dTpdT, dTpdC and dTpdU*. Photochemistry and photobiology 57(5):757–769, 1993.
- [Lev20] P. LEVENE. *Properties of the nucleotides obtained from yeast nucleic acid*. Journal of Biological Chemistry 41(4):483, 1920.
- [Lev38] P. LEVENE. *Structure of Desoxyribonucleic Acid*. Journal of Biological Chemistry 126(1):63–66, 1938.
- [Lib94] F. LIBNAU, O. KVALHEIM, A. CHRISTY, J. TOFT. *Spectra of water in the near- and mid-infrared region*. Vibrational spectroscopy 7(3):243–254, 1994.
- [Mar91] Y. MARÉCHAL. *Infrared spectra of water. I. Effect of temperature and of H/D isotopic dilution*. The Journal of chemical physics 95:5565, 1991.
- [Mat95] P. MATHIS. *Photosynthesis: From Light to Biosphere: Proceedings of the Xth International Photosynthesis Congress, Montpellier, France, 20-25 August 1995*, volume 2. Kluwer Academic Pub, 1995.
- [May97] B. MAYER. *Messung und Modellierung der spektralen UV-Bestrahlungsstärke in Garmisch-Partenkirchen*. Wiss.-Verl. Maraun, 1997.
- [McA98] K. MCATEER, Y. JING, J. KAO, J. TAYLOR, M. KENNEDY. *Solution-state structure of a DNA dodecamer duplex containing a *Cis-Syn* thymine cyclobutane dimer, the major UV photoproduct of DNA*. Journal of molecular biology 282(5):1013–1032, 1998.
- [Mit04] D. MITCHELL. *DNA Damage and Repair*. CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology, edited by WM Horspool. F. Lenci, 2nd ed.(CRC Press LLC 2004) , 2004.

- [Moh91] S. MOHR, N. SOKOLOV, C. HE, P. SETLOW. *Binding of small acid-soluble spore proteins from Bacillus subtilis changes the conformation of DNA from B to A*. Proceedings of the National Academy of Sciences 88(1):77, 1991.
- [Mou06] S. MOURET, C. BAUDOUIN, M. CHARVERON, A. FAVIER, J. CADET, T. DOUKI. *Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation*. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(37):13765, 2006.
- [Mur92] N. MURATA. *Research in Photosynthesis: Proceedings of the IXth International Congress on Photosynthesis, Nagoya, Japan, August 30-September 4, 1992*, volume 2. Kluwer Academic Publishers, 1992.
- [Nis80] T. NISHIO, A. KATO, C. KASHIMA, Y. OMOTE. *Photochemical electrocyclization of 1, 4, 6-trisubstituted pyrimidin-2-ones to 2-oxo-1, 3-diazabicyclo [2.2. 0] hex-5-enes*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 (0):607–610, 1980.
- [Par02] H. PARK, K. ZHANG, Y. REN, S. NADJI, N. SINHA, J. TAYLOR, C. KANG. *Crystal structure of a DNA decamer containing a cis-syn thymine dimer*. Proceedings of the National Academy of Sciences 99(25):15965, 2002.
- [Pec00] J. PECOURT, J. PEON, B. KOHLER. *Ultrafast internal conversion of electronically excited RNA and DNA nucleosides in water*. Journal of the American Chemical Society 122(38):9348–9349, 2000.
- [Pec01] J. PECOURT, J. PEON, B. KOHLER. *DNA excited-state dynamics: ultrafast internal conversion and vibrational cooling in a series of nucleosides*. Journal of the American Chemical Society 123(42):10370–10378, 2001.
- [Per00] D. PERDIZ, P. GRÓF, M. MEZZINA, O. NIKAIDO, E. MOUSTACCHI, E. SAGE. *Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells*. Journal of Biological Chemistry 275(35):26732–26742, 2000.
- [Pie00] J. PIEL, M. BEUTTER, E. RIEDLE. *20–50-fs pulses tunable across the near infrared from a blue-pumped noncollinear parametric amplifier*. Optics Letters 25(3):180–182, 2000.
- [Rav01] J. RAVANAT, T. DOUKI, J. CADET. *Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 63(1-3):88–102, 2001.
- [Rie00] E. RIEDLE, M. BEUTTER, S. LOCHBRUNNER, J. PIEL, S. SCHENKL, S. SPÖRLEIN, W. ZINTH. *Generation of 10 to 50 fs pulses tunable through all of the visible and the NIR*. Applied Physics B: Lasers and Optics 71(3):457–465, 2000.
- [Rys11] G. RYSECK, T. SCHMIERER, K. HAISER, W. SCHREIER, W. ZINTH, P. GILCH. *The Excited-State Decay of 1-Methyl-2(1H)-pyrimidinone is an Activated Process*. ChemPhysChem 12(10):1880–1888, 2011.

- [Sat04] H. SATZGER. *Untersuchung initialer Schritte der Peptidfaltung mit Ultrakurzzeit-spektroskopie*, 2004.
- [Sch02] W. SCHREIER. *Aufbau eines Systems zur Untersuchung von Femtosekunden infrarot Absorptionsänderungen in Chromopeptiden*. master thesis, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Juli 2002.
- [Sch08] W. J. SCHREIER. *UV-Strahlung und DNA-Schäden - Untersuchung UV-induzierter Prozesse in Nukleinsäuren mit Femtosekunden-Infrarotspektroskopie*. dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Februar 2008.
- [Sch09] W. SCHREIER, J. KUBON, N. REGNER, K. HAISER, T. SCHRADER, W. ZINTH, P. CLIVIO, P. GILCH. *Thymine dimerization in DNA model systems: cyclobutane photolysis is predominantly formed via the singlet channel*. *Journal of the American Chemical Society* 131(14):5038–5039, 2009.
- [Set74] R. SETLOW. *The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71(9):3363, 1974.
- [Set88] P. SETLOW. *Small, acid-soluble spore proteins of Bacillus species: structure, synthesis, genetics, function, and degradation*. *Annual Reviews in Microbiology* 42(1):319–338, 1988.
- [She84] Y. SHEN. *The principles of nonlinear optics*. New York, Wiley-Interscience, 1984, 575 p. 1, 1984.
- [Sie05] A. SIEG. *Femtosekundenspektroskopie im mittleren Infraroten: Energierelaxation in para-Nitroanilin und Konformationsdynamik von Azobenzolpeptiden*. dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, November 2005.
- [Sin54] R. SINSHEIMER. *The photochemistry of uridylic acid*. *Radiation Research* 1(6):505–513, 1954.
- [SM08] M. SPOTHEIM-MAURIZOT, M. MOSTAFAVI, J. BELLONI, T. DOUKI. *Radiation chemistry: from basics to applications in material and life sciences*. L'Éditeur: EDP Sciences, 2008.
- [Smi96] C. SMITH, M. WANG, N. JIANG, L. CHE, X. ZHAO, J. TAYLOR. *Mutation Spectra of M13 Vectors Containing Site-Specific Cis-Syn, Trans-Syn-I,(6-4), and Dewar Pyrimidone Photoproducts of Thymidylyl-(3' to 5')-Thymidine in Escherichia coli under SOS Conditions*. *Biochemistry* 35(13):4146–4154, 1996.
- [Spe91] D. SPENCE, P. KEAN, W. SIBBETT. *60-fsec pulse generation from a self-mode-locked Ti:sapphire laser*. *Optics Letters* 16(1):42–44, 1991.
- [Spe97] T. SPECTOR, T. CHEATHAM III, P. KOLLMAN. *Unrestrained molecular dynamics of photodamaged DNA in aqueous solution*. *Journal of the American Chemical Society* 119(30):7095–7104, 1997.

- [Spö01] S. SPÖRLEIN. *Femtosekunden-Spektroskopie schnellster Strukturänderungen in Peptid-Chromophor-Komplexen*. dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Juni 2001.
- [Ste94] P. STEPHENS, F. DEVLIN, C. CHABALOWSKI, M. FRISCH. *Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields*. The Journal of Physical Chemistry 98(45):11623–11627, 1994.
- [Str62] S. STRICKLER, R. BERG. *Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules*. The Journal of chemical physics 37(4):814, 1962.
- [Str85] D. STRICKLAND, G. MOUROU. *Compression of amplified chirped optical pulses*. Optics Communications 55(6):447–449, 1985.
- [Str10] H. S. STRZALKA. *Infrarotspektroskopie von Femtosekunden bis Mikrosekunden an Xanthon und AcAzoTrpZip2*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Januar 2010.
- [Sum72] W. SUMMERS, J. BURR. *Viscosity effects on the photohydration of pyrimidines*. The Journal of Physical Chemistry 76(22):3137–3141, 1972.
- [Tan01] K. TANIMURA. *Femtosecond time-resolved spectroscopy of the formation of self-trapped excitons in CaF₂*. Physical Review B 63(18):184303, 2001.
- [Tay87] J. TAYLOR, M. COHRS. *DNA, Light, and Dewar Pyrimidones - The Structure and Biological Significance of TpT3*. Journal of the American Chemical Society 109(9):2834–2835, 1987.
- [Tay88] J. TAYLOR, D. GARRETT, M. COHRS. *Solution-state structure of the Dewar pyrimidinone photoproduct of thymidyl-(3' to 5')-thymidine*. Biochemistry 27(19):7206–7215, 1988.
- [Tay90a] J. TAYLOR. *DNA, sunlight and skin cancer*. Journal of Chemical Education 67(10):833–841, 1990.
- [Tay90b] J. TAYLOR, D. GARRETT, I. BROCKIE, D. SVOBODA, J. TELSER. *Proton NMR assignment and melting temperature study of cis-syn and trans-syn thymine dimer containing duplexes of d (CGTATTATGC). cnddot. d (GCATAATACG)*. Biochemistry 29(37):8858–8866, 1990.
- [Tay94] J. TAYLOR. *Unraveling the molecular pathway from sunlight to skin cancer*. Accounts of chemical research 27(3):76–82, 1994.
- [Tay95] J. TAYLOR. *DNA, sunlight and skin cancer*. Pure and Applied Chemistry 67(1):183–190, 1995.
- [Tay02] J. TAYLOR. *New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 510(1-2):55–70, 2002.

- [Tow09] M. TOWRIE, G. DOORLEY, M. GEORGE, A. PARKER, S. QUINN, J. KELLY. *ps-TRIR covers all the bases—recent advances in the use of transient IR for the detection of short-lived species in nucleic acids*. *Analyst* 134(7):1265–1273, 2009.
- [Tre69] E. TREACY. *Optical pulse compression with diffraction gratings*. *Quantum Electronics, IEEE Journal of* 5(9):454–458, 1969.
- [Tsu02] T. TSUJIBAYASHI, K. TOYODA, S. SAKURAGI, M. KAMADA, M. ITOH. *Spectral profile of the two-photon absorption coefficients in CaF₂ and BaF₂*. *Applied physics letters* 80(16):2883–2885, 2002.
- [Var70] A. VARGHESE. *5-Thyminy-5, 6-dihydrothymine from DNA irradiated with ultraviolet light*. *Biochemical and biophysical research communications* 38(3):484–490, 1970.
- [Wac64] A. WACKER, H. DELLWEG, L. TRÄGER, A. KORNHAUSER, E. LODEMANN, G. TÜRCK, R. SELZER, P. CHANDRA, M. ISHIMOTO. *Organic Photochemistry of Nucleic Acids**. *Photochemistry and Photobiology* 3(4):369–394, 1964.
- [Wal68] G. WALD. *The molecular basis of visual excitation*. *Nature* 219:800–807, 1968.
- [Wan56] S. WANG, M. APICELLA, B. STONE. *Ultraviolet Irradiation of 1, 3-Dimethyluracil*. *Journal of the American Chemical Society* 78(16):4180–4180, 1956.
- [Wan58] S. WANG. *Photochemistry of Nucleic Acids and Related Compounds. I. The First Step in the Ultraviolet Irradiation of 1, 3-Dimethyluracil*, 2. *Journal of the American Chemical Society* 80(23):6196–6198, 1958.
- [Wan59] S. WANG. *Phototautomerization of Cytosine Derivatives on Ultra-violet Irradiation*. *Nature* (184):184–185, 1959.
- [Wan68] S. WANG, J. NNADI. *Mechanism for the photohydration of pyrimidines*. *Chem. Commun.(London)* (19):1160–1162, 1968.
- [Wat53] J. WATSON, F. CRICK. *Molecular structure of nucleic acids*. *Nature* 171(4356):737–738, 1953.
- [Wat93] J. WATSON, F. CRICK. *Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid*. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 269(15):1967, 1993.
- [Whi69] D. WHILLANS, M. HERBERT, J. HUNT, H. JOHNS. *Optical detection of the triplet state of uracil*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 36(6):912–918, 1969.
- [Whi72] D. WHILLANS, H. JOHNS. *Triplet state studies of the nucleoside and nucleotide derivatives of uracil and thymine*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis* 277(1):1–6, 1972.

- [Wie57] K. WIERZCHOWSKI, D. SHUGAR. *Photochemistry of cytosine nucleosides and nucleotides*. *Biochimica et Biophysica Acta* 25:355–364, 1957.
- [Zin93] W. ZINTH, W. KAISER. *Ultrafast coherent spectroscopy*. *Ultrashort Laser Pulses* pp. 235–277, 1993.

Glossar - Abkürzungsverzeichnis

AgGaS₂	Silberthiogallat Kristall
BaF₂	Bariumfluorid
BBO	β -Bariumborat Kristall
BS	engl.: beam splitter = Strahlteiler
CaF₂	Kalziumfluorid
CG	engl.: continuum generation = Weißlichterzeugung
CoIn	engl.: conical intersection = konische Durchschneidung
CPA	engl.: chirped pulse amplification
DFM	engl.: difference frequency mixing = Differenzfrequenzerzeugung
DM	engl.: dichroitic mirror = dichroitischer Spiegel
Fl	Fluoreszenz
FUrd	5-Fluoro-Uridin
FWHM	engl.: full width half maximum = Halbwertsbreite
IC	engl.: internal conversion = interne Konversion
IR	Infrarot
ISC	engl.: inter system crossing = Innere Umwandlung
IVR	engl.: internal vibrational relaxation = Interne Schwingungsrelaxation
k	die Ratenkonstante
k_B	die Boltzmannkonstante
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
SHG	engl.: second harmonic generation = Frequenzverdopplung
TpT	Thymidylyl-3-5-Thymidin
Urd	Uridin
UV	Ultraviolett
VIS	engl.: visible = sichtbar
WL	engl.: white light generation = Weißlichterzeugung

Publikationen

Diese Arbeit wurde am Lehrstuhl für BioMolekulare Optik der Fakultät für Physik federführend von Karin Haiser durchgeführt. Im Rahmen von wissenschaftlichen Zusammenarbeiten haben Dr. Benjamin Fingerhut, Teja Herzog und Gerald Ryseck zur vorliegenden Arbeit beigetragen. Inhalte und Diagramme aus deren Doktorarbeiten sind in die vorliegende Arbeit eingeflossen.

Publikationen im Zusammenhang mit dieser Arbeit:

- K. Haiser, B. P. Fingerhut, K. Heil, A. Glas, T. T. Herzog, B. M. Pilles, W. J. Schreier, W. Zinth, R. de Vivie-Riedle, and T. Carell. *Angewandte Chemie Int. Ed.* 51 (2), 408 - 411 (2012).
- B. P. Fingerhut, T. T. Herzog, G. Ryseck, K. Haiser, F. F. Graupner, K. Heil, P. Gilch, W. J. Schreier, T. Carell, R. de Vivie-Riedle, and W. Zinth. Dynamics of UV-induced DNA lesions: Dewar formation guided by pre-tension induced by the backbone. *New Journal of Physics*, submitted.
- G. Ryseck, T. Schmierer, K. Haiser, W. Schreier, W. Zinth, and P. Gilch. The Excited-State Decay of 1-Methyl-2(1H)-pyrimidinone is an Activated Process. *Chem.Phys.Chem* 12, 1880-1888 (2011).

Weitere Publikationen:

- N Regner T. T. Herzog, K. Haiser, C. Hoppmann, M. Beyermann, J. Sauermann, M. Engelhard, T. Cordes, K. Rück-Braun, and W. Zinth. Light-Switchable Hemithioindigo-Hemistilbene-Containing Peptides: Ultrafast Spectroscopy of the Z → E Isomerization of the Chromophore and the Structural Dynamics of the Peptide Moiety. *J. Phys. Chem.* accepted.
- K. Haiser, F. O. Koller, M. Huber, N. Regner, T. E. Schrader, W. J. Schreier, and W. Zinth. Nitro-Phenylalanine - A Novel Sensor for Heat Transfer in Peptides. *The Journal of Physical Chemistry A* 115, 2169-2175, (2011).
- T. Schmierer, S. Laimgruber, K. Haiser, K. Kiewisch, J. Neugebauer, and P. Gilch. Femtosecond spectroscopy on the photochemistry of ortho-nitrotoluene. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12, 15653-15664, (2010)
- W. J. Schreier, J. K. Kubon, N. Regner, K. Haiser, T. E. Schrader, W. Zinth, P. Clivio, and P. Gilch. Thymine Dimerization in DNA Model Systems: Cyclobutane Photolesion Is Predominantly Formed via the Singlet Channel. *J. of the Am. Chem. Soc.* 131 (14), 5038-5040 (2009).

- K. Haiser, F. O. Koller, M. Huber, T. E. Schrader, N. Regner, W. J. Schreier, and W. Zinth. Generation of Narrowband Ultrashort Pulses Tunable in the mid-IR and the Application to Vibrational Energy Transfer in a Modified Amino Acid. *Ultrafast Phenomena XVI*, Springer Series in Chem. Physics 92, 325-327 (2009).
- 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).

Ausgewählte Tagungsbeiträge:

- W.J. Schreier, J.K. Kubon, K. Haiser, P. Clivio, W. Zinth, and P. Gilch. Studying DNA Photodimerization in a locked Thymine Dinucleotide. Poster presentation at the Central European Conference on Photochemistry 2010 in Bad Hofgastein, Austria.
- K. Haiser, T. Cordes, T. Herzog¹, G. Zeyat, K. Rück-Braun, and W. Zinth. The Photochemistry of Chromenes Studied with Time-Resolved Infrared Spectroscopy. Talk at the XIV. International Conference on Time-Resolved Vibrational Spectroscopy 2009 in Meredith, New Hampshire.
- K. Haiser, F. O. Koller, M. Huber, T. E. Schrader, N. Regner, W. J. Schreier, and W. Zinth. Generation of Narrowband Ultrashort Pulses Tuneable in the mid-IR and the Application to Vibrational Energy Transfer in a Modified Amino Acid. Talk at the XVI. Conference on Ultrafast Phenomena 2008 in Stresa, Italy.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei:

Prof. Dr. Wolfgang Zinth für die freundliche Aufnahme am Lehrstuhl, die mir die Durchführung interessanter Projekte ermöglichte. Vielen Dank für die Unterstützung und die vielen hilfreichen Diskussionen.

Prof. Dr. Regina de Vivie-Riedle für die Übernahme des Zweitgutachtens und die damit verbundene Arbeit. Außerdem vielen Dank für die Theorie-Unterstützung im Dewar-Projekt zusammen mit Dr. Benjamin Fingerhut.

Prof. Dr. Thomas Carell und seinen Mitarbeitern Dr. Andreas Glas und Korbinian Heil für die ergebnisreiche Zusammenarbeit beim Dewar-Projekt und die Bereitschaft immer wieder neue Probe zu synthetisieren.

Prof. Dr. Peter Gilch und seinen Mitarbeitern Gerald Ryseck und Thomas Schmierer für das große Interesse und den wissenschaftlichen Austausch im Zusammenhang mit Dewar- und anderen Projekten

der DFG für die Finanzierung einer Doktorandenstelle im Rahmen des SFB 749.

Nadja Regner und Teja Herzog für die gemeinsamen Messungen und Justagen des Lasersystems, bei der die gute Laune nie fehlte.

Dr. Wolfgang Schreier für seine Unterstützung bei Labor- und Infrarotfragen, für die er stets ein offenes Ohr und viele Lösungsvorschläge hatte.

Dr. Thorben Cordes für die vielen hilfreichen Ratschläge im Forschungsalltag und dass ich am Chromen-Projekt Teil haben durfte.

den Büro- und Laborkollegen, Nadja Regner, Florian Koller, Andrea Malkmus, Michael Brandl, Teja Herzog, Thorben Cordes, Wolfgang Schreier, Julia Kubon, Martha Brennich, Dr. Tobias Schrader, Halina Strzalka, Sebastian Pregl, Benjamin Schuster, Dominik Bucher, Andreas Deeg, Bert Pilles, Lizhe Liu und Benjamin März für das gute Arbeitsklima.

dem ganzen Lehrstuhl Zinth für die sehr angenehme Atmosphäre. Besonderer Dank geht an Florian Lederer, Julian Schauseil, Florian Trommer und Franziska Graupner, an die Kollegen aus der AG-Riedle, besonders Christian Homann, für die Beratung bei NOPA, OPA und Co. und an die Gilch-Gruppe mit Björn Heinz, Thomas Schmierer, Evelyn Plötz, Benjamin Marx und Gerald Ryseck.

der Werkstatt und damit Rudi Schwarz, Alfons Storck, Christian Hausmann und Harald Hoppe für die schnelle Ausführung der Aufträge und die wirkungsvolle Beratung bei Konstruktionsfragen.

dem Lehrstuhl-Sekretariat und damit Frau Alexandra Michaelis und Frau Widmann-Diermeier für die stets freundliche Hilfe bei allen Verwaltungsangelegenheiten.

dem IT-Team Karl-Heinz Mantel und Florian Trommer für zuverlässige Bereitstellung und Pflege der Labor- und Messrechner und die vielen Auswege aus den Computerproblemen.

den Kollegen und Freunden , Andrea, Stephan und Mira Malkmus sowie Judith, Uwe, Julius und Jana Megerle für ihr Interesse und die Hilfe dabei alles in die richtige Relation zu setzen und den Blick fürs Wesentliche zu behalten.

der Familie Lederer für herzliche Aufnahme in der Familie.

meiner Familie , meinen Eltern Anna und Klaus Haiser, meinem Bruder Erhard Haiser, allen Großeltern und dem Rest der Familie für die Vorbilder, den Ansporn und den Rückhalt.

Florian , der immer für mich da ist und immer einen Rat weiß.