
**Reaktionen von Pyrimidin-Dimeren und
Psoralen im Triplett-Kanal –
Infrarotspektroskopie von CPD-Bildung und
Photoaddition**

Julia Gontcharov



München 2021

**Reaktionen von Pyrimidin-Dimeren und
Psoralen im Triplett-Kanal –
Infrarotspektroskopie von CPD-Bildung und
Photoaddition**

Julia Gontcharov

Dissertation

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

vorgelegt von
Julia Gontcharov

München, den 11. Februar 2021

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Zinth

Zweitgutachter: Prof. Dr. Peter Gilch

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Mai 2021

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	vii
1. Einleitung	1
2. Wechselwirkungen der DNA-Basen mit UV-Strahlung	5
2.1. Aufbau und Struktur der DNA	5
2.2. Photophysik und Photochemie der DNA	8
2.2.1. Grundbegriffe der Photophysik	9
2.2.2. Pyrimidine in angeregten Zuständen	12
2.3. Photoschäden von Pyrimidinen	14
2.3.1. CPD	15
2.3.2. (6–4) und Dewar	20
2.3.3. Photohydrat	22
2.4. Photosensibilisierung der DNA	22
2.4.1. Oxidative Photosensibilisierung	23
2.4.2. Nichtoxidative Photosensibilisierung: Triplet-Photosensibilisatoren	25
2.4.3. Nichtoxidative Photosensibilisierung: Psoralene	26
3. Experimentelle Methoden	29
3.1. UV/Vis-Spektroskopie	29
3.2. Infrarotspektroskopie	30
3.3. Anrege-Abtast-Spektroskopie	30
3.3.1. Das Lasersystem	31
3.3.2. Abtastimpulse im Mittelinfraroten	32
3.3.3. Anregungsimpulse im Ultravioletten	33
3.3.4. Synchronisierung zwischen Anregungs- und Abtastimpulsen . . .	34
3.3.5. Probenort und Detektion	35
3.3.6. Datenverarbeitung	36
3.4. Handhabung der Proben	38
4. Triplet-Photosensibilisierung und CPD-Bildung in Pyrimidin-Dimeren	41
4.1. Stationäre Charakterisierung von TpC und CpT	41
4.2. Der Triplet-Photosensibilisator 2-M	46
4.3. Photosensibilisierte Belichtungsexperimente an TpC und CpT	48
4.3.1. Belichtung und Schadensbildung	48

4.3.2.	Quantenausbeute der CPD-Bildung	51
4.3.3.	Inkubation der belichteten Proben	56
4.4.	Desaminierung von TpC und CpT	59
4.4.1.	Photosensibilisierte Belichtung von TpU und UpT	60
4.4.2.	Bestimmung der Absorptionsspektren der CPD-Schäden	63
4.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	64
5.	Triplet-Dynamiken in Pyrimidin-Dimeren	67
5.1.	Triplet-Dynamiken von TpC und CpT	67
5.1.1.	Zeitaufgelöste Messungen an TpC und CpT	68
5.1.2.	Identifikation der Zustände	72
5.2.	Triplet-Photosensibilisierung von CpC	75
5.2.1.	Zeitaufgelöste Messung an CpC und 2-M	75
5.2.2.	Photosensibilisierte Belichtung von CpC	78
5.3.	Reaktionsmodell der CPD-Bildung aus dem Triplet-Zustand	79
5.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse	81
6.	Photoaddition des Psoralenderivats AMT in d(TA)-Oligomeren	83
6.1.	Wechselwirkung zwischen Psoralen und DNA	83
6.2.	Probenpräparation	85
6.3.	Stationäre Charakterisierung	87
6.4.	Infrarotspektroskopie von Nano- bis Mikrosekunden	90
6.4.1.	Messparameter	92
6.4.2.	Zeitaufgelöste Messung an AMT	93
6.4.3.	Zeitaufgelöste Messung an AMT und d(TA)-Oligomeren	94
6.5.	Reaktionsmodell der Photoaddition	98
6.6.	Zusammenfassung und Ausblick	102
7.	Zusammenfassung	105
A.	Anhang	109
	Abkürzungsverzeichnis	113
	Abbildungsverzeichnis	115
	Tabellenverzeichnis	117
	Literatur	119
	Publikationen	139

Kurzfassung

UV-induzierte Photoschäden der Desoxyribonukleinsäure (DNA) können nicht nur durch direkte Absorption der Nukleobasen im UV-B- oder UV-C-Bereich entstehen, sondern auch durch indirekte Anregung im UV-A-Bereich, in dem die Absorption der Nukleobasen vernachlässigbar ist. Photosensibilisatoren können nach UV-A-Anregung mit den Nukleobasen wechselwirken, was die Bildung von Photoschäden ermöglichen kann, indem beispielsweise ein Triplett-Triplett-Energietransfer vom Photosensibilisator auf eine Base erfolgt oder sich eine kovalente Bindung zwischen Photosensibilisator und einer Base bildet. Im UV-A-Bereich ist vor allem der Triplett-Kanal bei der Schadensbildung relevant.

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Untersuchung des Triplett-Kanals der CPD-Bildung in den Thymin und Cytosin enthaltenden Pyrimidin-Dimeren TpC und CpT mittels stationärer und zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie. Das Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD) ist einer der häufigsten UV-induzierten DNA-Schäden. Bei der Photosensibilisierung von TpC und CpT mit dem Triplett-Photosensibilisator 2-M, einem Acetophenonderivat, konnte die Bildung von CPD-Schäden aus dem Triplett-Zustand mit einer Quantenausbeute von $1,5\% \pm 0,5\%$ beobachtet werden. Spektral wurde nachgewiesen, dass in den CPD-Schäden von TpC und CpT etwa 60 h nach der Anregung eine Desaminierung von Cytosin zu Uracil erfolgt, wodurch diese besonders mutagen sind im Vergleich zum thermisch stabilen CPD in TpT. Zeitaufgelöste Messungen zu den Triplett-Dynamiken haben gezeigt, dass es zu einer Besetzung eines auf dem Thymin lokalisierten Triplett-Zustands kommt, der nach ca. 30 ns in ein Biradikal übergeht, an dem beide Basen beteiligt sind. Das Biradikal zerfällt nach ca. 100 ns überwiegend in den Grundzustand oder seltener in einen CPD-Schaden. Messungen an CpC haben bestätigt, dass der Triplett-Triplett-Energietransfer bei der Photosensibilisierung von TpC und CpT mit 2-M zunächst zu einer Besetzung eines auf dem Thymin lokalisierten Triplett-Zustands führt.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die UV-induzierte Photoaddition des Psoralenderivats AMT an die Thymin-Basen des doppelsträngigen DNA-Modellsystems $d(TA)_{20}$ mittels zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie untersucht. Durch UV-A-Anregung von AMT, das zwischen den DNA-Basen eingelagert ist, bilden sich durch Cycloaddition Monoaddukte zwischen AMT und Thymin, die strukturell ähnlich zum CPD-Schaden sind. Aus dem initial angeregten Singulett-Zustand von AMT kommt es zur Interkombination in den Triplett-Zustand, welcher nach $1\ \mu\text{s}$ bzw. $6\ \mu\text{s}$ zunächst in ein Biradikal zwischen AMT und Thymin zerfällt. Mit dem Zerfall des Biradikals nach $55\ \mu\text{s}$ erfolgt die Monoadduktbildung durch den Ringschluss der Cycloaddition. Es konnte die komplexe Kinetik der photoinduzierten Addition von AMT an $d(TA)_{20}$ aufgeklärt werden und gezeigt werden, dass die Photoaddition aus dem Triplett-Zustand von AMT erfolgt.

1. Einleitung

In der Basensequenz der Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist die genetische Information gespeichert, welche die Bauanleitung für die Proteinbiosynthese enthält und somit von enormer Bedeutung für zahlreiche biochemische Prozesse ist [Ber14, LPH07]. Veränderungen im genetischen Code können zu funktionunfähigen Proteinen führen, was negative Auswirkungen auf den Zellmetabolismus haben kann. Solche genetischen Veränderungen können unter anderem durch äußere Einflüsse, wie beispielsweise solare UV-Strahlung, hervorgerufen werden. Trotz intrinsischer Reparaturmechanismen [Sch03, Hoe01, Fri03, Yan11] und der hohen Photostabilität der Nukleobasen [Cre04] kann es zu einer Akkumulation von UV-induzierten Schäden und nachfolgend zum Zelltod (Apoptose), zu Mutationen und zur Entstehung von Krebszellen, insbesondere Hautkrebs, kommen [Bla97, Tay94, gkM01, MA05, CD18].

Ein Großteil der UV-induzierten DNA-Schäden entsteht zwischen zwei benachbarten Pyrimidin-Basen (Thymin, Cytosin) durch direkte Absorption im UV-B- oder UV-C-Bereich [RDC01, DC01]. Der häufigste Schaden ist dabei das Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD) zwischen zwei Thymin-Basen. Cytosin enthaltende CPD-Schäden sind weniger häufig, aber besonders mutagen, weil es zu einer Desaminierung von Cytosin zu Uracil kommen kann [BCL95, PS96].

Der CPD entsteht hauptsächlich aus einem initial angeregten Singulett-Zustand bei der direkten Anregung der DNA im UV-B- oder UV-C-Bereich [Sch07, Sch09]. Der Singulett-Kanal der direkten Bildung von CPD-Schäden ist mittlerweile gut verstanden [SGZ15]. Im UV-A-Bereich, in dem die Absorption der DNA-Basen vernachlässigbar gering ist, besteht zusätzlich die Möglichkeit der CPD-Bildung durch indirekte Anregung der DNA mittels nichtoxidativer Photosensibilisierung [Cad12]. So wird bei der Triplett-Photosensibilisierung ein Triplett-Zustand eines Photosensibilisators durch UV-A-Anregung seines Singulett-Zustands und anschließende Interkombination bevölkert [TRS91]. Vom angeregten Triplett-Zustand des Photosensibilisators kann ein Triplett-Triplett Energietransfer auf eine DNA-Base erfolgen. Somit ist eine gezielte Anregung von Triplett-Zuständen der Nukleobasen möglich, die ebenfalls Vorläufer von Photoschäden sein können [GWR96]. Der Triplett-Kanal ist gerade im UV-A-Bereich relevant, in dem eine direkte Anregung der Nukleobasen zu vernachlässigen ist, aber das von der Sonne emittierte UV-Spektrum eine sehr hohe Intensität auf der Erdoberfläche aufweist [SGZ15]. Zur photosensibilisierten CPD-Bildung zwischen zwei Thymin-Basen liegen einige Untersuchungen vor [LY67, Cuq11, Liu16a]. Im Hinblick auf die besonders mutagenen Cytosin enthaltenden CPD-Schäden bestehen allerdings noch offene Fragen zum Reaktionsmechanismus des Triplett-Kanals [Dou14].

Eine weitere Art der UV-A-induzierten Schadensbildung ist die kovalente Bindung photoreaktiver Moleküle an die DNA. Solche photoreaktiven Moleküle, zu denen beispielsweise die Stoffklasse der Psoralene gehört, wechselwirken mit den DNA-Basen und können durch Photoanregung an sie binden [Cim85, Bet99]. Die Photoaddition von Psoralenen erfolgt hauptsächlich an die Thymin-Basen der DNA und die entstehenden kovalenten Bindungen weisen strukturelle Ähnlichkeiten zu CPD-Schäden auf [Kan82a, SMS08]. Die gebildeten Photoaddukte können die Replikation der DNA behindern und zum Zelltod führen. Der genaue Reaktionsmechanismus dieser Photoaddition und die beteiligten reaktiven Zustände wurden bisher nicht vollständig aufgeklärt [Cim85, KKN05].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl der Triplett-Kanal der photosensibilisierten CPD-Bildung in Cytosin enthaltenden Pyrimidin-Dimeren als auch der Triplett-Kanal der Photoaddition eines Psoralenderivats an die DNA mittels stationärer und zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie untersucht. Diese Spektroskopiemethode ist besonders geeignet zur Untersuchung der Schadensbildung und der beteiligten angeregten Zustände, weil sie sensitiv gegenüber den hierbei erfolgenden molekularen Änderungen ist.

Gliederung der Arbeit

Kapitel 2 gibt einen kurzen Überblick über den Aufbau der DNA sowie die Photophysik und Photochemie angeregter Zustände der DNA-Basen, insbesondere der Triplett-Zustände der Pyrimidine. Durch die Absorption von UV-Strahlung können angeregte Zustände besetzt werden und Vorläufer von DNA-Schäden sein. Es werden einige häufige UV-induzierte Pyrimidin-Photoschäden vorgestellt, die einen großen Teil der Schädigungen der DNA ausmachen und Thema dieser Arbeit sind. Anschließend werden verschiedene Mechanismen der Photosensibilisierung präsentiert, bei denen Photosensibilisatoren in angeregten Zuständen an der Schädigung der DNA beteiligt sein können.

In Kapitel 3 werden die experimentellen Methoden beschrieben, die bei den vorgestellten Messungen verwendet wurden. Hierzu gehört das Lasersystem für die Anrege-Abtast-Messungen im Nano- bis Mikrosekundenbereich, in dem die benötigten Anregungsimpulse im Ultravioletten und Abtastimpulse im Mittelinfraroten generiert wurden. Weiterhin werden die stationären Messmethoden im UV- und IR-Bereich vorgestellt.

In Kapitel 4 und Kapitel 5 wird die UV-induzierte Bildung von CPD-Schäden aus dem Triplett-Zustand in Cytosin enthaltenden Pyrimidin-Dimeren mittels Infrarotspektroskopie untersucht. In Kapitel 4 werden die verwendeten Pyrimidin-Dimere TpC und CpT sowie der Photosensibilisator, ein Acetophenonderivat, charakterisiert. Anschließend werden die photosensibilisierten Belichtungsexperimente an TpC und CpT, die Bestimmung der Quantenausbeute der CPD-Bildung und die Desaminierung von Cytosin zu Uracil in den CPD-Schäden in einem Zeitraum von einigen Stunden nach der Anregung beschrieben. Kapitel 5 behandelt die Reaktionsdynamiken der Besetzung des Triplett-Zustands in TpC und CpT mittels Anrege-Abtast-Spektroskopie. Zusätzlich wird ein möglicher Triplett-Triplett-Energietransfer vom Photosensibilisator auf Cytosin anhand photosensibilisierter zeitaufgelöster und stationärer Messungen an CpC untersucht. Anhand der Ergebnisse der

in beiden Kapiteln gezeigten Messungen kann schließlich ein Reaktionsmodell aufgestellt werden, welches die Reaktionsdynamiken der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand für TpC und CpT vom Nanosekundenbereich bis zu einigen Stunden nach der Anregung beschreibt.

Kapitel 6 befasst sich mit einer weiteren Art der photosensibilisierten Schädigung der DNA, nämlich mit der UV-A-induzierten Photoaddition eines Psoralenderivats an die Thymin-Basen in einem doppelsträngigen DNA-Modellsystem. Die dabei gebildeten Addukte sind strukturell ähnlich zum CPD-Schaden. Zunächst werden die prinzipiellen Mechanismen der Wechselwirkung zwischen Psoralenen und der DNA beschrieben sowie die verwendeten Proben vorgestellt. Mittels zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie werden der Reaktionsmechanismus der Adduktbildung und die dabei beteiligten reaktiven Zustände untersucht.

2. Wechselwirkungen der DNA-Basen mit UV-Strahlung

Der schädigende Einfluss der UV-Strahlung auf die DNA (engl.: *deoxyribonucleic acid*; Desoxyribonukleinsäure, DNS) läuft zunächst auf molekularer Ebene ab. Erst in nachfolgenden Schritten kann es zu Schäden auf Zellebene und zum Zelltod (Apoptose) oder der Entstehung von Krebszellen kommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die photo-physikalischen und photochemischen Prozesse der Schadensentstehung ausgehend von angeregten elektronischen Zuständen der DNA-Basen untersucht. Die Anregung dieser Zustände erfolgte zumeist durch Überträgermoleküle, sogenannte Photosensibilisatoren. Das nachfolgende Kapitel gibt einen Überblick über die Struktur der DNA und deren Basen. Anschließend werden allgemeine Begriffe der Photophysik bzw. Photochemie der Nukleobasen vorgestellt. Dabei stehen die Prozesse im Vordergrund, die in Pyrimidin-Basen von Bedeutung sind. Nachfolgend wird auf häufige durch UV-Strahlung induzierte DNA-Schäden und deren Mutagenität eingegangen. Abschließend werden unterschiedliche Arten der Photosensibilisierung beschrieben.

2.1. Aufbau und Struktur der DNA

Eines der wichtigsten organischen Moleküle lebender Organismen ist die DNA, deren Bestandteile 1929 entdeckt wurden [LM29]. Zu den Bestandteilen gehören heterocyclische Nukleobasen, Phosphat und 2'-Desoxyribose (ringförmiges Zuckermolekül mit 5 C-Atomen, Pentose) (siehe Abbildung 2.1). Bei der strukturell ähnlichen RNA (engl.: *ribonucleic acid*; Ribonukleinsäure, RNS) wird Ribose verwendet, bei der die OH-Gruppe am C2'-Atom durch ein H-Atom ersetzt ist (siehe Abbildung 2.1 b).

Die Einteilung der Nukleobasen erfolgt in zwei Kategorien: die Purine Adenin (A) und Guanin (G) sowie die Pyrimidine Cytosin (C) und Thymin (T). In der RNA wird statt Thymin Uracil (U) eingebaut. Purine bestehen aus einem 6- und einem 5-Ring, während Pyrimidine nur einen 6-Ring haben. Die Verbindung aus einer Base und Desoxyribose nennt man Nukleosid (siehe Abbildung 2.1 b, oranger Kasten). Dabei entsteht eine N-glykosidische Bindung zwischen dem C1'-Atom des Zuckers und der Nukleobase. Die entsprechenden Nukleoside der Pyrimidine heißen Desoxycytidin (dC), Thymidin¹ und Desoxyuridin (dU). Nukleotide (auch Nukleosidmonophosphate oder Monomere genannt) sind die nächstgrößere Komponente und haben zusätzlich noch eine Phosphatgruppe am Zucker gebunden.

¹Da Thymin fast nur in der DNA vorkommt, wird auf die Bezeichnung „Desoxythymidin“ verzichtet.

2. Wechselwirkungen der DNA-Basen mit UV-Strahlung

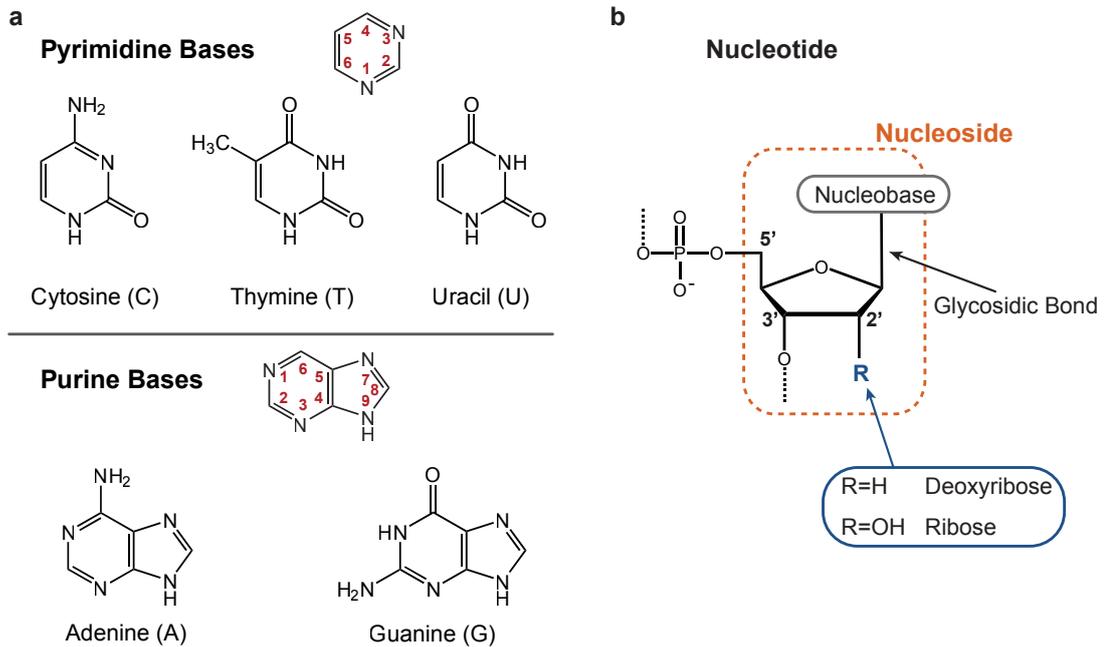


Abbildung 2.1.: (a) Strukturformeln der Pyrimidine (oben) und der Purine (unten) mit allgemeiner Nummerierung der Ringatome. (b) Schematische Darstellung eines Nukleotids und Nucleosids (oranger Kasten) für eine beliebige Nucleobase, welche über eine glycosidische Bindung mit dem Zucker verbunden ist. Die Zucker Desoxyribose und Ribose unterscheiden sich nur durch den Rest R (blauer Kasten) am C2'-Atom. Am C5'-Atom ist ein Phosphatrest gebunden.

Ein Nucleotid kann mit einem Nucleosid verbunden werden, wobei sich eine Phosphodiesterbindung zwischen dem C5'-Atom des Nucleotids und dem C3'-Atom des benachbarten Nucleosids ausbildet. Das Ergebnis ist ein Dimer, oder Dinucleosidmonophosphat. Eine Verlängerung um weitere Dinucleotide führt zu einer Polynucleotidkette. Besteht die Nucleotidkette aus bis zu 100 Basen, spricht man von einem Oligomer. Das Rückgrat (engl.: *backbone*) dieser Kette wird aus den Zuckermolekülen und den Phosphatresten gebildet. Die Position (5' oder 3'), an der die Bindung des Zuckers zum Phosphat erfolgt, definiert die Richtung der Polynucleotidkette (siehe Abbildung 2.2 a). Die Benennung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Oligomere erfolgt immer in 5' → 3' Richtung. Die Sequenz in Abbildung 2.2 a heißt somit 5'-TC-3', 5'-TpC-3' oder auch T-(3'-5')-C. Der Einfachheit halber wird in dieser Arbeit die ebenfalls geläufige Schreibweise TpC verwendet. Auf die explizite Erwähnung von „desoxy“ bei dT, dC und dU wird verzichtet. Die untersuchten Dinucleosidmonophosphate haben am jeweiligen 5'- und 3'-Ende eine OH-Gruppe statt einer Phosphatgruppe gebunden (siehe Abbildung 2.6).

1953 haben Franklin [FG53] und Wilkins [WSW53] DNA mittels Röntgenbeugung untersucht, was dazu geführt hatte, dass Watson und Crick [WC53] die dreidimensionale Struktur der DNA als Doppelhelix ausmachen konnten. Die Doppelhelix ist ein verdrehter, rechtsgängiger Doppelstrang aus zwei, über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander

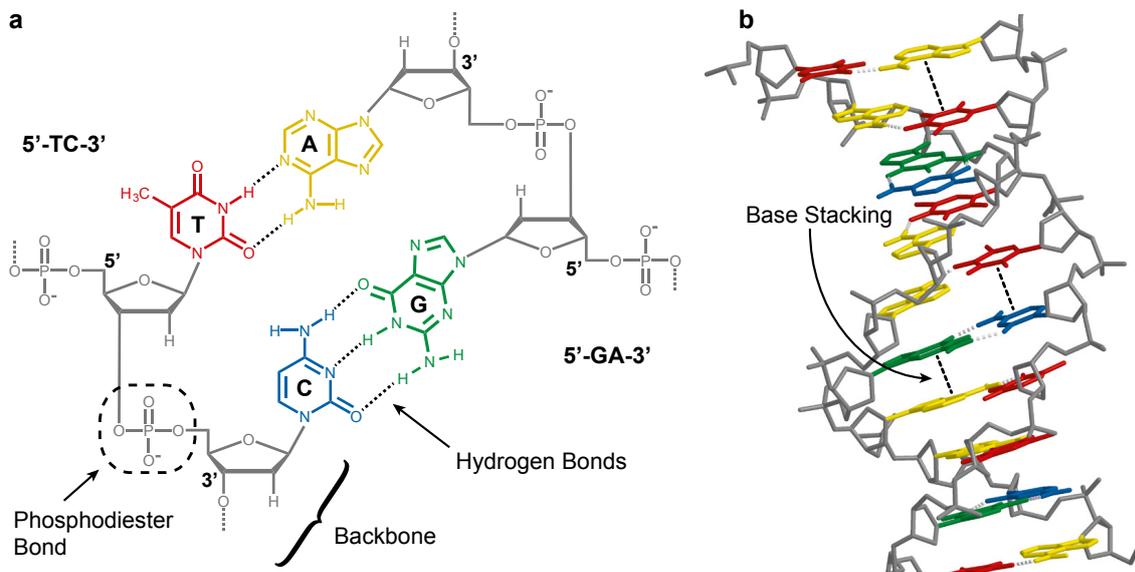


Abbildung 2.2.: (a) Watson-Crick-Basenpaarung zweier gegenläufiger DNA-Stränge. Die komplementären Basen Adenin (gelb) und Thymin (rot) und Guanin (grün) und Cytosin (blau) sind über Wasserstoffbrückenbindungen (gepunktete Linien) miteinander verbunden. Das Zucker-Phosphat-Rückgrat (Backbone, grau) ist über Phosphodiesterbindungen verknüpft. (b) Schematische Darstellung einer DNA-Doppelhelix (Farbgebung analog zu (a)) mit angedeuteter Basenstapelung (Base Stacking) zwischen benachbarten Basen eines Einzelstrangs.

verbrückten, antiparallelen Einzelsträngen. Antiparallel bedeutet, dass die Richtungen der zwei Stränge gegenläufig sind. Die Verbrückung der Nukleobasen in der DNA erfolgt nach einem vorgegebenen Muster, der komplementären Watson-Crick-Basenpaarung. Thymin (beziehungsweise Uracil) paart mit Adenin über zwei Wasserstoffbrücken, Guanin mit Cytosin über drei Wasserstoffbrücken (siehe Abbildung 2.2 a). Daher ist die Paarung zwischen Guanin und Cytosin wesentlich stabiler als zwischen Adenin und Thymin. In der Doppelhelix sind die hydrophoben Basen nach innen gerichtet und somit gewissermaßen geschützt. Das Zucker-Phosphat-Rückgrat hingegen ist aufgrund der Phosphatreste negativ geladen und hydrophil. Der hydrophile Teil richtet sich zum umgebenden Medium aus und die DNA ist dadurch wasserlöslich.

Theoretische und experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass nicht die Basenpaarung, sondern hauptsächlich die Basenstapelung (base stacking) zur Stabilität der Doppelhelix beiträgt [Alh97, Yak06]. Bei der Basenstapelung handelt es sich um die Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Ringsystemen benachbarter Basen (siehe Abbildung 2.2 b) eines Strangs. Es kommt zu einer Kombination aus Van-der-Waals-, Dipol-Dipol- und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Heterocyclen [Tin60]. Die Sterik und Stärke dieser (π - π)-Wechselwirkungen ist maßgeblich von der Basensequenz abhängig. Beispielsweise weisen die Dimere TpC und CpT eine leicht unterschiedliche Stapelung auf, weil die Abfolge der Basen sich unterscheidet [Dav78].

2. Wechselwirkungen der DNA-Basen mit UV-Strahlung

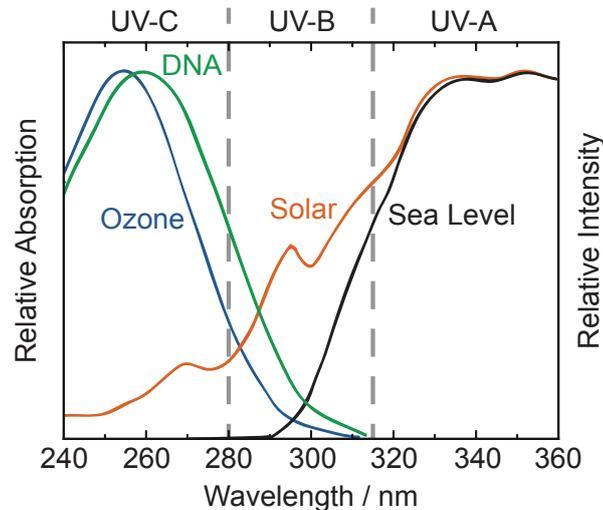


Abbildung 2.3.: Relative Intensität des Sonnenspektrums außerhalb der Erdatmosphäre (orange) und auf Meeressniveau (schwarz) verglichen mit der relativen Absorption der DNA (grün) und des Ozons O_3 (blau) im UV-Bereich. Durch das Absorptionsvermögen des Ozons wird der komplette UV-C-Anteil (100 nm bis 280 nm) und ein Großteil des UV-B-Anteils (280 nm bis 315 nm) aus dem Sonnenspektrum herausgefiltert, bevor es auf die Erdoberfläche trifft. Die höchste Intensität der UV-Sonnenstrahlung auf der Erdoberfläche ist somit im UV-A-Bereich (315 nm bis 400 nm). [Abbildung modifiziert von [Sch08], Daten entnommen aus [Tay94].]

2.2. Photophysik und Photochemie der DNA

DNA-Basen, die mit UV-Licht angeregt wurden, reagieren häufig zu unterschiedlichen Arten von Schäden. Die häufigsten UV-induzierten Schäden werden in Abschnitt 2.3 vorgestellt. Zunächst soll aber verdeutlicht werden, in welchen UV-Bereichen die DNA absorbiert. In Abbildung 2.3 sind die relativen Absorptionen der DNA (grün) und des Ozons O_3 (blau) im Vergleich zu den relativen Intensitäten des Sonnenspektrums außerhalb der Erdatmosphäre (orange) und auf Höhe des Meeresspiegels (schwarz) abgebildet. Die Absorptionsbanden der beiden ersteren weisen einen großen Überlapp auf. Durch die Ozonschicht wird der komplette UV-C-Anteil (100 nm bis 280 nm) und ein Großteil des UV-B-Anteils (280 nm bis 315 nm) des Sonnenspektrums absorbiert, bevor er die Erdoberfläche erreichen kann. Dies stellt einen Schutz für die DNA dar, deren Absorptionsmaximum bei ca. 260 nm liegt. Im UV-B-Bereich hat die DNA-Absorption noch einen gewissen Überlapp mit dem Solarspektrum auf der Erdoberfläche. Das von der Sonne emittierte UV-Spektrum hat eine sehr hohe Intensität im UV-A-Bereich (315 nm bis 400 nm). In diesem Spektralbereich absorbiert die DNA vernachlässigbar gering und die direkte Anregung der Basen spielt hier eine untergeordnete Rolle. Über die UV-Anregung von Photosensibilisatoren können die Basen aber dennoch in angeregte Zustände versetzt werden (siehe Abschnitt 2.4). Dadurch gewinnt der UV-A-Bereich mit seiner hohen Intensität enorm an Bedeutung für

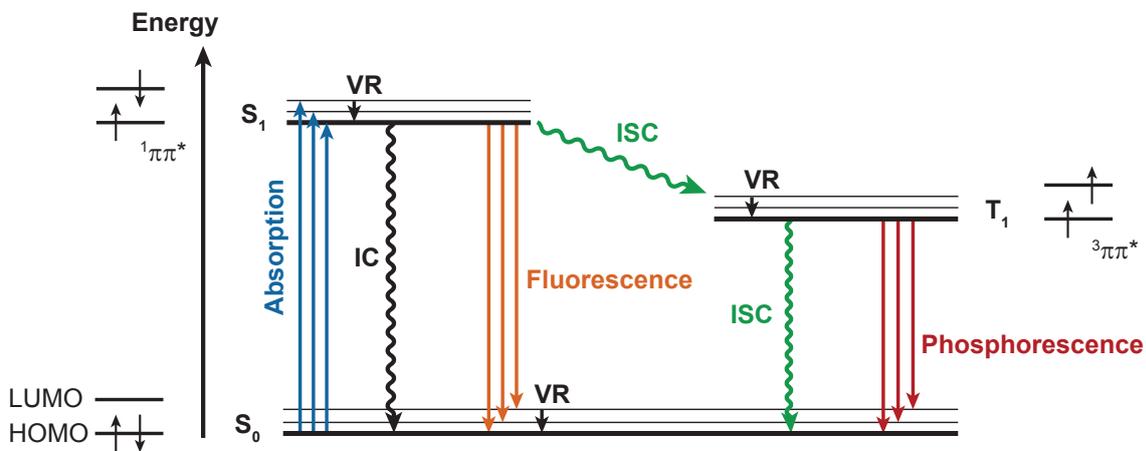


Abbildung 2.4.: Jablonski-Diagramm möglicher Übergänge zwischen Grundzustand (S_0) und niedrigstem Singulett ($S_1, {}^1\pi\pi^*$) bzw. Triplett ($T_1, {}^3\pi\pi^*$). Strahlungslose Übergänge (wellenförmige Pfeile): Interne Konversion (IC), Interkombination (ISC, grün), Schwingungsrelaxation (VR). Strahlende Übergänge (durchgezogene Pfeile): Absorption (blau), Fluoreszenz (orange) und Phosphoreszenz (rot). Dünne Linien repräsentieren die Schwingungsniveaus der jeweiligen Zustände. Die Spin-Konfigurationen der Elektronen für das HOMO- und LUMO-Orbital sind neben jedem Zustand abgebildet.

mögliche DNA-Schädigungen. Die UV-A-induzierte Schadensbildung in Pyrimidinen über Photosensibilisatoren steht daher im Fokus dieser Arbeit.

2.2.1. Grundbegriffe der Photophysik

Um die Prozesse der UV-induzierten Schädigung zu verstehen, müssen erst einige Grundbegriffe der Photophysik erläutert werden [TRS91, Ap06]. Anhand von sogenannten Jablonski-Diagrammen [Jab35] werden die verschiedenen Prozesse dargestellt, die bei elektronischen Übergängen auftreten können (siehe Abbildung 2.4). Strahlungslose Übergänge werden im Allgemeinen mit wellenförmigen Pfeilen, strahlende Übergänge mit geraden Pfeilen symbolisiert.

Durch die Absorption eines Photons kommt es zum Übergang aus dem Grundzustand in einen angeregten elektronischen Zustand. Die angeregten Zustände werden anhand der Multiplizität in Singulett und Triplett unterteilt. Im Singulett ist die Gesamtspinquanzahl $S = 0$ und im Triplett $S = 1$, d. h. in ersterem sind die Elektronenspins antiparallel und in letzterem parallel angeordnet. Für die Multiplizität $M = 2S + 1$ gilt dann im Singulett $M = 1$ und im Triplett $M = 3$. Bei „erlaubten“ elektronischen Übergängen (spinerlaubt) bleibt die Multiplizität erhalten, bei „verbotenen“ Übergängen (spinverboten) ändert sie sich. Das bedeutet auch, dass erlaubte Übergänge im Gegensatz zu den verbotenen ohne Spin-Umkehr

(Spin-Flip) erfolgen. Daher sind die Ratenkonstanten der verbotenen Übergänge einige Größenordnungen kleiner und die entsprechenden Zustände leben länger. Allerdings steigt die Wahrscheinlichkeit für die verbotenen Übergänge bei starker Spin-Bahn-Kopplung [Mar12]. (Dieser Fall wird weiter unten bei der Beschreibung der Molekülorbitale nochmal aufgegriffen.) In der Regel hat der niedrigste Triplett-Zustand aber eine längere Lebensdauer als der niedrigste Singulett-Zustand, weil die Deaktivierung des Triplett-Zustands in den Grundzustand spinverboten ist [MHC93]. Solche langlebigen angeregten Zustände sind besonders reaktiv und potentiell schädlich. Bei Triplett-Photosensibilisatoren kann deren langlebiger Triplett-Zustand DNA-Basen anregen und auf diesem Weg zu Schäden führen (siehe Unterabschnitt 2.4.2).

In Abbildung 2.4 ist der niedrigste Triplett-Zustand T_1 so abgebildet, dass er energetisch unter dem niedrigsten angeregten Singulett-Zustand S_1 liegt. Das trifft auf fast alle organischen Moleküle zu und gilt beispielsweise für die Energieniveaus im Thymin [TRS91, Lam73]. In den meisten Fällen erfolgt keine direkte Anregung eines Triplett-Zustands durch Absorption. Der Grundzustand wird nachfolgend immer als Singulett betrachtet. Obwohl das für die meisten Moleküle zutrifft, gibt es auch Ausnahmen, in denen der Grundzustand ein Triplett-Zustand ist. (Hierzu gehört etwa molekularer Sauerstoff O_2 .)

Die Deaktivierung angeregter Zustände kann über strahlende und strahlungslose Übergänge stattfinden. Zu den strahlenden Übergängen (Lumineszenz) gehören zum einen die Fluoreszenz, zum anderen die Phosphoreszenz. Bei der Fluoreszenz ändert sich die Multiplizität nicht und die Emission erfolgt aus dem Singulett. Tritt die Emission aus dem Triplett auf (die Multiplizität ändert sich), spricht man von Phosphoreszenz. Zumeist lässt sich bei der Deaktivierung von Triplett-Zuständen aber nur eine schwache Phosphoreszenz beobachten und ein Großteil läuft strahlungslos ab [Tur69]. Zu den strahlungslosen Übergängen gehört die interne Konversion (engl.: *internal conversion*, IC), bei der sich die Multiplizität nicht ändert und die daher zu den erlaubten Übergängen zählt. Strahlungslose Übergänge mit Spin-Umkehr vom Singulett in den Triplett beziehungsweise vom Triplett in den Grundzustand nennt man Interkombination (engl.: *intersystem crossing*, ISC).

Schwingungsniveaus

Absorptionsübergänge erfolgen auf einer Zeitskala von 10^{-15} s. Auf dieser Zeitskala ändert sich der Abstand der Kernkoordinaten nicht. Solche elektronischen Übergänge werden im Jablonski-Diagramm durch senkrechte Pfeile dargestellt und man nennt sie „senkrechte Übergänge“. Jeder elektronische molekulare Zustand, ob Singulett oder Triplett, wird zusätzlich in Schwingungsniveaus (Vibrationsniveaus) aufgespalten (siehe Abbildung 2.4). Beim Übergang zwischen zwei elektronischen Zuständen können unterschiedliche Schwingungsniveaus bevölkert werden. Das bedeutet, dass eine Anregung aus dem ersten Vibrationsniveau auch in einem höheren Vibrationsniveau des angeregten Zustands enden kann. Nach dem Franck-Condon-Prinzip ist die Wahrscheinlichkeit für die Bevölkung eines Schwingungsniveaus umso größer, je größer der Überlapp der

vibronischen² Wellenfunktionen zwischen Anfangs- und Endzustand ist [FD26, Con26]. Dadurch wird häufig nicht der niedrigste, sondern ein höherer Schwingungszustand im elektronischen Endzustand bevölkert. Diesen Zustand nennt man „schwingungsangeregt“. Innerhalb weniger Pikosekunden erfolgt aus diesen schwingungsangeregten Zuständen eine strahlungslose Relaxation in niedrigere Schwingungszustände (Schwingungsrelaxation; engl.: *vibrational relaxation*, VR) [SGZ15]. Wenn die überschüssige Energie durch intermolekularen Wärmetransfer an das umgebende Lösungsmittel abgegeben wird, spricht man vom „Kühlen“ (engl.: *vibrational cooling*) des heißen Zustands.

Erst nach der Entvölkerung eines schwingungsangeregten Zustands treten in der Regel die langsameren strahlenden Übergänge auf. Laut Kasha-Regel [Kas50] findet Fluoreszenz nur aus dem niedrigsten Schwingungszustand des niedrigsten angeregten elektronischen Zustands (z. B. S_1) statt. Aus höheren angeregten elektronischen Zuständen erfolgt zunächst eine schnelle strahlungslose Relaxation in den S_1 oder T_1 . Der strahlende Übergang endet in einem höheren Schwingungszustand des elektronischen Grundzustands und die Wellenlänge des emittierten Photons entspricht der Energiedifferenz zwischen den beiden Zuständen: $\lambda = h \cdot c / \Delta E$. Die Fluoreszenz ist aufgrund des Lösungsmittelleffekts rotverschoben zur Absorption und man spricht von einer Stokes-Verschiebung (engl.: *Stokes shift*).

Molekülorbitale

Bei der Betrachtung elektronischer Übergänge und angeregter Zustände sind die Molekülorbitale von besonderem Interesse, in denen sich die Valenzelektronen befinden (Grenzorbitale). Im Grundzustand wird das höchste besetzte Molekülorbital HOMO (engl.: *highest occupied molecular orbital*) genannt und das energetisch darüber liegende unterste unbesetzte Molekülorbital LUMO (engl.: *lowest unoccupied molecular orbital*). Kommt es zu einem Übergang aus dem Grundzustand in den niedrigsten angeregten Zustand, wird das LUMO-Orbital durch ein Elektron aus dem HOMO-Orbital besetzt und es gibt zwei ungepaarte Elektronen. Je nach Spinkonfiguration der Elektronen handelt es sich um einen Singulett- (antiparallele Spins) oder einen Triplett-Zustand (parallele Spins) (siehe Abbildung 2.4).

Weiterhin werden die Molekülorbitale in bindende (σ , π), nicht bindende (n) und anti-bindende (σ^* , π^*) unterteilt [Val01]. Zwischen σ -Bindungen bilden sich σ -Orbitale aus und zwischen π -Bindungen π -Orbitale. Die bindenden Orbitale besitzen eine niedrigere Gesamtenergie als die anti-bindenden. Bei der Benennung eines Übergangs wird das Anfangs- und das Endorbital berücksichtigt. Geht ein Elektron durch UV-Anregung beispielsweise aus einem π -Orbital (HOMO) in ein π^* -Orbital (LUMO) über, wird der Übergang $\pi\pi^*$ genannt. Auf Übergänge aus σ -Orbitalen wird hier nicht weiter eingegangen, da sie bei der Absorption im UV/Vis-Bereich keine Rolle spielen. Im Bereich von 200 nm bis 700 nm sind für die Nukleobasen nur $\pi\pi^*$ - und $n\pi^*$ -Übergänge von Bedeutung.

²Die Kombination aus vibratorisch und elektronisch wird vibronisch genannt.

2. Wechselwirkungen der DNA-Basen mit UV-Strahlung

Die beschriebenen Arten von Molekülorbitalen haben Auswirkungen auf die Übergangswahrscheinlichkeiten und die Interkombinationsraten. Da bei spinverbotenen Übergängen eine Spin-Umkehr notwendig ist, laufen diese Übergänge im Allgemeinen langsam und mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit ab. Allerdings steigt die Übergangswahrscheinlichkeit, wenn die Spin-Umkehr mit einer Änderung der Orbitalsymmetrie einhergeht. Mit der Regel von El-Sayed kann unter der Berücksichtigung der Molekülorbitale beurteilt werden, wie hoch die Ratenkonstante der Interkombination für bestimmte Übergänge ist und welche Übergänge überhaupt möglich sind [Els63]. Demnach hat ein Übergang eine höhere Ratenkonstante der Interkombination, wenn sich die Art des Molekülorbitals ändert. Somit laufen die Übergänge $^1n\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^*$ und $^1\pi\pi^* \rightarrow ^3n\pi^*$ schneller ab als $^1n\pi^* \rightarrow ^3n\pi^*$ und $^1\pi\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^*$.

2.2.2. Pyrimidine in angeregten Zuständen

Angeregte Zustände können Vorläufer von DNA-Schäden sein. Daher ist es wichtig, dass die überschüssige Energie ultraschnell abgegeben werden kann und der angeregte Zustand eine kurze Lebensdauer hat. Deaktivierungsprozesse sind somit intrinsische Schutzmechanismen der DNA und tragen zu ihrer Photostabilität bei, weil längeres Verweilen in angeregten Zuständen die Wahrscheinlichkeit weiterer Reaktionen erhöht. Nachfolgend wird ein Überblick der angeregten Zustände in Pyrimidinen gegeben [Mer06, SL07, Koh10].

Singulett-Zustände der Pyrimidine

Im Grundzustand befinden sich die DNA-Basen im Singulett S_0 . Durch UV-Absorption erfolgt ein Übergang in den angeregten $^1\pi\pi^*$, aus dem ein Großteil der angeregten Basen sehr schnell (einige hundert Femtosekunden [PPK00]) in den Grundzustand zerfällt. Die hohe Absorption der DNA-Basen im UV-Bereich mit einem Maximum bei ca. 260 nm ist auf $^1\pi\pi^*$ -Übergänge zurückzuführen [Voe63]. Für die Energien des niedrigsten Singulett-Zustands der Nucleobasen gilt folgende Reihenfolge [GES67, Lam73]: $C < G < T < U < A$. Die Entvölkerung des angeregten Singulett-Zustands kann zum einen in den Grundzustand erfolgen (strahlend oder strahlungslos). Zum anderen kann es eine strahlungslose Interkombination in einen anderen angeregten Zustand (z. B. $^3\pi\pi^*$ in Thymin) geben. Es kann auch zu einer Photoreaktion kommen, die zu einer Schadensbildung führen kann. Überwiegend wird der $^1\pi\pi^*$ strahlungslos entvölkert, weshalb die Nucleobasen nur geringe Fluoreszenz-Quantenausbeuten haben [DH71].

Konische Durchschneidung

Von einer konischen Durchschneidung (engl.: *conical intersection*, CI) spricht man bei einer Schnittstelle zwischen zwei (oder mehreren) Energiehyperflächen. In dem in Abbildung 2.5 betrachteten Beispiel schneiden sich die Potentialhyperflächen des $^1\pi\pi^*$ (S_1) und des Grundzustands (S_0). Nach der Anregung des Moleküls in den S_1 bewegt sich das

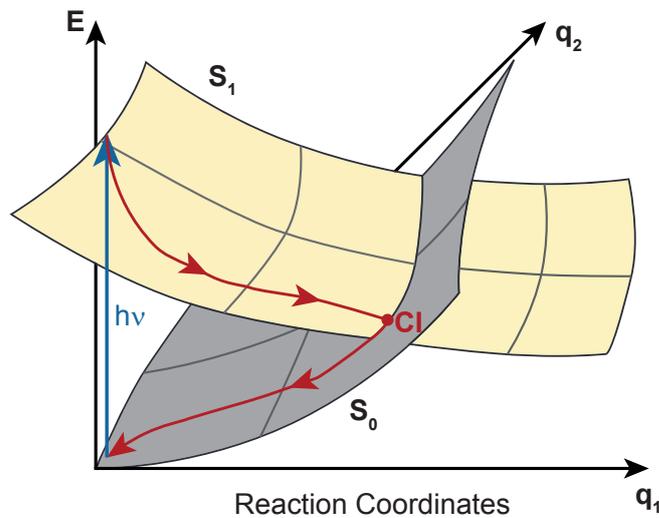


Abbildung 2.5.: Schematische Darstellung eines strahlungslosen Übergangs aus dem angeregten Singulett-Zustand S_1 (gelb) in den Grundzustand S_0 (grau) via einer konischen Durchschneidung (engl.: *conical intersection*, CI). Es sind die Potentialhyperflächen des S_1 und des S_0 als Funktion der Reaktionskoordinaten q_1 und q_2 abgebildet. Nach der Anregung (blauer Pfeil) in den S_1 wird der Pfad des Wellenpakets (rot) in den S_0 gezeigt. [Abbildung modifiziert von [Pil16].]

Wellenpaket entlang der Potentialhyperfläche des S_1 bis es zur konischen Durchschneidung mit der Potentialhyperfläche des S_0 gelangt. Ab diesem Punkt bewegt es sich auf der Potentialhyperfläche des Grundzustands weiter und der angeregte Zustand ist strahlungslos entvölkert worden. Dieser strahlungslose Übergang via konischer Durchschneidung erfolgt innerhalb 1 ps [Mid09, MK11] in höhere Schwingungsniveaus des Grundzustands („heißer Grundzustand“, engl.: *hot ground state*) mit anschließendem Schwingungskühlen [PPK00, PPK01].

Zwischenzustände

Beim Übergang aus dem $^1\pi\pi^*$ in den Grundzustand können sich in Pyrimidinen Zwischenzustände formieren, die ebenfalls durch konische Durchschneidungen bevölkert werden. Diese sogenannten „dunklen“ Zustände (engl.: *dark state*) haben geringe Oszillatorstärken und sind nicht direkt aus dem Grundzustand zugänglich, sondern nur über angeregte Zustände (zumeist über $^1\pi\pi^*$). Aufgrund ihres transienten Charakters können solche Zustände nur mit Ultrakurzzeitspektroskopie untersucht werden. Studien haben gezeigt, dass in Pyrimidinen die Entvölkerung des Singulett-Zustands in den Grundzustand über $^1n\pi^*$ -Zustände ablaufen kann. Dies wurde jeweils für Thymin [Ast09, HCK07, Pil18], Cytosin [Ism02, MS03, MMK03, Qui07] und Uracil [Mat04, HCK06] berichtet. In diesen Untersuchungen wurde auch gezeigt, dass die $^1n\pi^*$ -Zustände nicht immer energetisch unter dem $^1\pi\pi^*$ liegen und die Oszillatorstärken sich für die einzelnen Basen unterscheiden.

2. Wechselwirkungen der DNA-Basen mit UV-Strahlung

Beim Übergang aus dem Singulett- in einen Triplett-Zustand können sich aber auch $^3n\pi^*$ -Zustände bilden (siehe unten).

Triplett-Zustände der Pyrimidine

Der niedrigste Triplett-Zustand ist in allen Nukleobasen ein $^3\pi\pi^*$ [ES68]. Für dessen Energie gilt folgende Reihenfolge [Lam73, GWR96]: $T < A < G < U < C$. Somit hat Thymin den niedrigsten und Cytosin den höchsten Triplett-Zustand aller Nukleobasen. In der DNA sind die Triplett-Energien der Basen geringer als in Monomeren. Beispielsweise beträgt die Triplett-Energie von Thymin in DNA 270 kJ mol^{-1} [Bos06], während sie für TMP 310 kJ mol^{-1} beträgt (in wässriger Lösung bei Raumtemperatur) [WR96]). Für die weiteren Monomere werden folgende Werte angegeben: AMP 314 kJ mol^{-1} , GMP 317 kJ mol^{-1} , UMP 320 kJ mol^{-1} , CMP 321 kJ mol^{-1} . Da Thymin den niedrigsten Triplett hat, kann auch ein Triplett-Triplett Energietransfer (TTET) zum Thymin von einer anderen angeregten Base erfolgen, deren Triplett energetisch höher liegt.

In Thymin könnte der niedrigste angeregte Triplett-Zustand $^3\pi\pi^*$ direkt über Interkombination aus dem $^1\pi\pi^*$ oder über einen aus dem $^1\pi\pi^*$ bevölkerten Zwischenzustand ($^1n\pi^*$, $^3n\pi^*$) besetzt werden [Ser07, HCK07, Har08, Pil18]. In Uracil könnte die Besetzung des $^3\pi\pi^*$ ebenfalls direkt aus dem $^1\pi\pi^*$ oder unter Beteiligung eines $n\pi^*$ -Zustands erfolgen [Cli07, EFM09]. In Cytosin dagegen liegt der $n\pi^*$ energetisch höher und der $^3\pi\pi^*$ wird hauptsächlich direkt durch Interkombination aus dem $^1\pi\pi^*$ besetzt [Mer05, Gon10]. Die genauen Schritte der Triplett-Bevölkerung sind, trotz vieler neuer Erkenntnisse, noch nicht vollständig geklärt.

Bei Messungen an TMP in wässriger Lösung konnte eine Wellenlängenabhängigkeit der Quantenausbeute der Interkombination in den $^3\pi\pi^*$ beobachtet werden [Ban12]. Eine hohe Quantenausbeute in Höhe von ca. 4 % wurde mit einer Belichtung bei 248 nm erzielt. Im Maximum der Absorption des TMP bei 266 nm liegt die Quantenausbeute dagegen bei 1,3 %. Zwar sind die Interkombinationsraten in die Triplett-Zustände der Pyrimidine gering, aber es ist deren lange Lebensdauer bis in den Mikrosekundenbereich [Mid09], welche die Wahrscheinlichkeit zu einer Weiterreaktion in einen Photoschaden erhöht. Für Thymin wurde in wässriger Lösung eine intrinsische Triplett-Lebensdauer von $125 \mu\text{s}$ gemessen [JW71]. Gezielte Anregungen des Triplets mit weitaus höheren Ausbeuten sind über Photosensibilisierung erreichbar, welche in Abschnitt 2.4 beschrieben wird. Einige der möglichen Photoschäden in Pyrimidinen werden nachfolgend erläutert.

2.3. Photoschäden von Pyrimidinen

Ist die DNA UV-Bestrahlung ausgesetzt, kann es trotz der zuvor genannten Abläufe zur schnellen Entvölkerung angeregter Zustände zu Schädigungen kommen [FCC04, Dou07], bei denen sich beispielsweise neue Bindungen formieren oder bestehende Bindungen brechen können. Obwohl es in den Zellen einige Reparaturmechanismen gibt [Sch03,

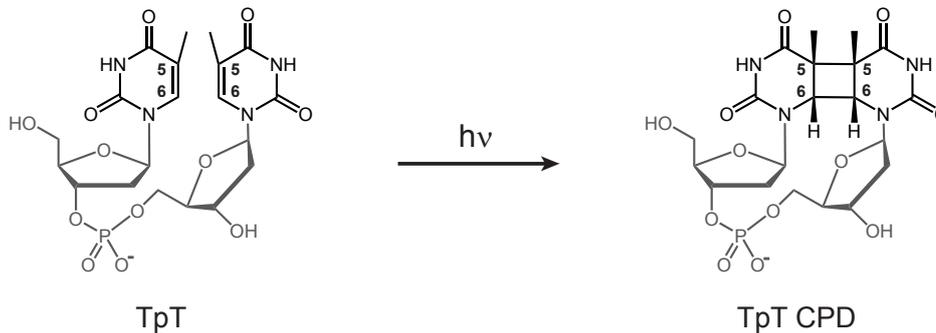


Abbildung 2.6.: Bildung eines CPD-Schadens nach UV-Absorption am Beispiel von TpT. Es erfolgt eine Cycloaddition zwischen den C5- und C6-Atomen der beiden Thyminen, wobei sich ein Cyclobutanring ausbildet. Das Zucker-Phosphat-Rückgrat ist jeweils in grau abgebildet.

[Hoe01, Fri03, Yan11], bleiben Schädigungen dennoch manchmal unrepariert und können zu Mutationen, Apoptose (programmierter Zelltod) und Krebs führen [Bla97, Tay94, gkM01, MA05, CD18]. Den Großteil der Schäden kann man zwischen Dipyrimidinen beobachten, weshalb im Folgenden ein Überblick über die Bildung und die Eigenschaften einiger Pyrimidin-Photoschäden gegeben wird.

2.3.1. CPD

Der häufigste photoinduzierte DNA-Schaden ist der CPD-Schaden (Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer) zwischen zwei Thyminen (siehe Abbildung 2.6) [Dou00], welcher 1960 als erster Dipyrimidin-Schaden entdeckt wurde [BB60, BEL08]. CPD-Schäden können zwischen allen Kombinationen von DNA-Dipyrimidinen mit sehr unterschiedlichen Häufigkeiten auftreten. In Studien an natürlicher DNA wurden die relativen CPD-Häufigkeiten bestimmt, indem verschiedene menschliche und tierische Zelltypen mit UV-A und UV-B bestrahlt wurden und anschließend die extrahierte DNA auf Schäden analysiert wurde [Mou06, DC01, Dou03]. Nach CPD-Wahrscheinlichkeit sortiert ergibt sich im UV-B-Bereich folgende Reihenfolge der untersuchten Dimere: CpC < CpT < TpC < TpT. Im UV-A-Bereich bleibt diese Reihenfolge zwar gleich, aber der relative Anteil des TpT CPD ist wesentlich höher [Mou10].

Gebildet wird ein CPD über eine Cycloaddition zwischen den C5=C6-Doppelbindungen zweier benachbarter Pyrimidine, wobei sich die π -Bindungen zu σ -Bindungen umwandeln. Wenn sich ein CPD im Doppelstrang ausbildet, kommt es zu einer sterischen Änderung der Basenkonfiguration. Obwohl bei der Cycloaddition die planare Struktur der Ringe verformt wird und dies sterisch unvorteilhaft ist, bleibt die Orbitalsymmetrie jedoch erhalten und die Reaktion kann in Übereinstimmung mit den Woodward-Hoffmann-Regeln ablaufen [WH65].

Prinzipiell kann die Reaktion zum CPD sowohl aus einem Singulett- als auch aus einem Triplett-Zustand erfolgen [EL67]. Die Bildung aus dem Triplett ist aus Experimenten

2. Wechselwirkungen der DNA-Basen mit UV-Strahlung

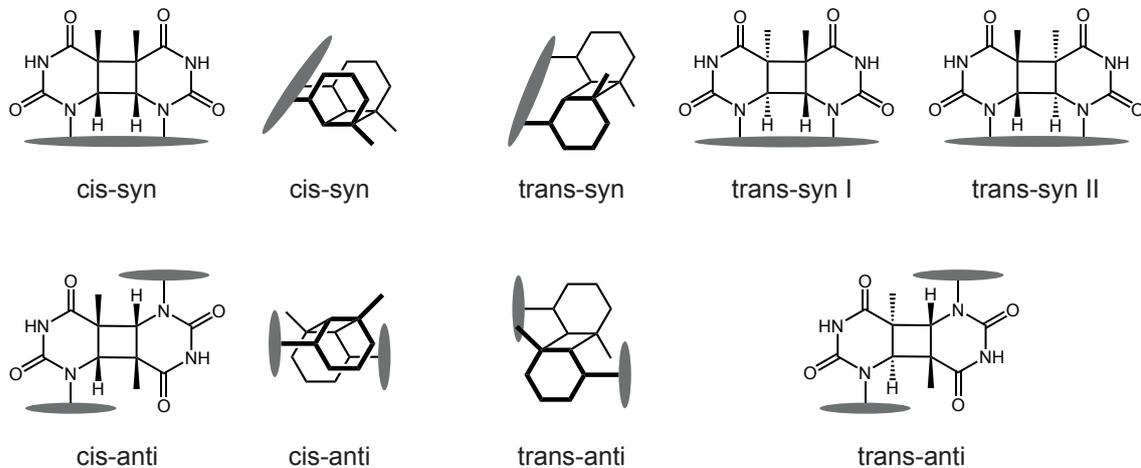


Abbildung 2.7.: CPD-Diastereomere am Beispiel von TpT: syn- (oben) und anti-Konformationen (unten) werden jeweils in cis (links) und trans (rechts) unterteilt. Bei trans-syn wird zwischen trans-syn I und trans-syn II unterschieden. Das Zucker-Phosphat-Rückgrat ist jeweils als grauer Balken dargestellt.

mit Photosensibilisatoren schon seit den 1960er Jahren bekannt [LY67]. Untersuchungen mithilfe der Ultrakurzzeitspektroskopie an TpT und an kurzen Einzelsträngen bestehend aus 18 Thyminen³ ((dT)₁₈) haben jedoch gezeigt, dass der CPD bei direkter Belichtung (266 nm) überwiegend aus einem angeregten Singulett-Zustand [Sch09] innerhalb 1 ps [Sch07] gebildet wird. Bei der kurzen Lebensdauer des Singulett-Zustands müssen beide Basen bereits zum Zeitpunkt der Anregung in einer geeigneten Orientierung relativ zueinander vorliegen, damit eine Cycloaddition erfolgen kann. Molekulare Bewegungen mit größerer Amplitude sind auf dieser Zeitskala nicht möglich. Durch die längere Lebensdauer des Triplett-Zustands haben die Basen jedoch mehr Zeit, um sich in eine geeignete Orientierung zu bewegen. Dadurch kann man für die Bildung des CPD-Schadens aus dem Triplett-Zustand im Vergleich zum Singulett höhere Quantenausbeuten beobachten. Für TpT beträgt die Quantenausbeute der CPD-Bildung aus einem angeregten Singulett-Zustand etwa 1,5 % [Sch09], während der CPD bei einer photosensibilisierten Anregung des Triplett-Zustands mit einer Quantenausbeute von 4 % gebildet wird [Liu16b].

Diastereomere des CPD-Schadens

Es existieren verschiedene Diastereomere des CPD-Schadens [WF61, WJ66], die sich in der räumlichen Anordnung der zwei beteiligten Basen zueinander unterscheiden: cis-syn, cis-anti, trans-syn und trans-anti (siehe Abbildung 2.7). Bei den verschiedenen Isomeren sind sowohl die zwei Basen in Bezug zum CPD unterschiedlich angeordnet (cis, trans) als

³Solche Modellsysteme, wie TpT und (dT)₁₈, werden häufig zur Untersuchung der photochemischen und photophysikalischen Prozesse in der DNA benutzt.



Abbildung 2.8.: Schema der Tautomerisierung vom Amino-Cytosin (links) zur selteneren E-Imino-Form (rechts).

auch die Methylgruppen am C5-Atom relativ zueinander (syn, anti). Vom trans-syn-Isomer wurden zwei verschiedene Varianten ausfindig gemacht: trans-syn-I (5'-syn, 3'-anti) und trans-syn-II (5'-anti, 3'-syn) [LY78a, KVC88, KNT93].

Je nach Isomer ändert sich die Struktur der Doppelhelix durch die Ausbildung eines CPD-Schadens in unterschiedlichem Ausmaß. Dabei zeigt sich, dass der trans-syn-I CPD eine dreimal so große Biegung der Helix bewirkt als der cis-syn CPD [WT93]. Die Bildung der anti-Konformationen ist sterisch erschwert, weil sich Interstrangbindungen ausbilden müssten [BD67]. Beim cis-syn bleibt die Basenpaarung des Thymins am 3'-Ende weiterhin bestehen, wohingegen beim trans-syn der CPD sich völlig aus der Doppelhelix hinausbiegt und keinerlei Basenpaarung zum komplementären Strang mehr vorhanden ist [FCC04]. Dadurch, dass die Biegung und demzufolge auch die Destabilisierung der helikalen Struktur beim cis-syn CPD so gering ist, finden sich im Doppelstrang überwiegend cis-syn CPD-Schäden. Durch die geringe Verformung und die damit einhergehende strukturelle Ähnlichkeit zur nativen Form der Doppelhelix, wird der cis-syn CPD von den Reparaturmechanismen der Zellen häufig überlesen [FCC04]. Der cis-syn CPD ist bei direkter Belichtung im Allgemeinen der häufigste aller CPD-Schäden [CV90]. In Studien mit Aceton als Photosensibilisator wurden allerdings vermehrt trans-anti CPD-Schäden gebildet [BEB67]. Eine mögliche Erklärung ist, dass bei der Photosensibilisierung überwiegend der Triplett als Ausgangszustand dient und im Vergleich zum Singulett eine andere Verteilung der Isomere zu beobachten ist.

Tautomerisierung des Cytosins

Eine Besonderheit des Cytosins ist, dass es in zwei verschiedenen Tautomeren vorliegen kann. Die häufigere Amino-Form ist die Grundform des Cytosins, bei der eine Aminogruppe C-NH₂ am C4-Atom gebunden ist (siehe Abbildung 2.8). Bei der selteneren E-Imino-Form hingegen ist eine Iminogruppe C=NH am C4-Atom gebunden und eine NH-Gruppe an Position 3 des Rings. Das E-Imino-Tautomer hat Auswirkungen auf die Replikation, weil es die Basenpaarung verändert. Statt Guanin, welches normalerweise mit Cytosin paart, wird im Gegenstrang ein Adenin eingebaut [JT93, Tay94]. Die E-Imino-Form des Cytosins paart somit wie Thymin beziehungsweise Uracil. Im CPD ist die tautomere Umwandlung in die E-Imino-Form wahrscheinlicher als im ungebundenen Cytosin, weil die stabilisierende

2. Wechselwirkungen der DNA-Basen mit UV-Strahlung

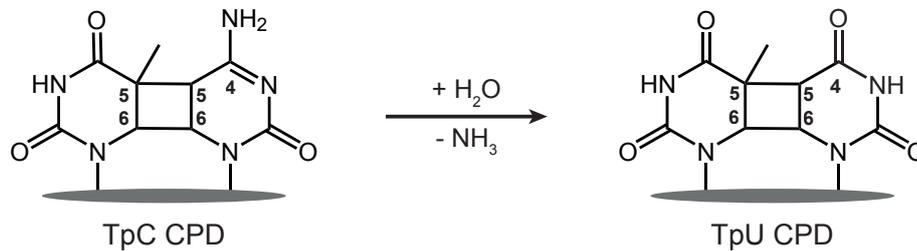


Abbildung 2.9.: Desaminierung des TpC CPD (links) zum TpU CPD (rechts) unter Abspaltung einer NH₃-Gruppe und Hydrolyse am C4-Atom.

Wirkung der C5=C6-Doppelbindung entfällt [BH68]. Mögliche mutagene Folgen des Basenpaarungsverhaltens nach einer Tautomerisierung und der nachfolgend beschriebenen Desaminierung werden weiter unten aufgezeigt.

Desaminierung des Cytosins

Eine weitere mögliche Veränderung des Cytosins ist die Desaminierung zu Uracil (siehe Abbildung 2.9), die sich sowohl spontan [SK66, FHJ65] als auch bei Bestrahlung mit UV-Licht beobachten lässt [DW62]. Bei der Desaminierung handelt es sich um die Umwandlung eines Cytosins zum Uracil über eine Hydrolyse der exocyclischen Amino-Gruppe des Cytosins am C4-Atom und die Freisetzung einer NH₃-Gruppe. Die Reaktion läuft über mehrere Zwischenzustände ab [LR93, Gra12] und ist pH- und temperaturabhängig [LN74, Lin79].

Die Desaminierung kann ebenfalls Auswirkungen auf die Replikation haben, da Cytosin gewissermaßen durch Uracil ersetzt wird und sich dadurch auch die Basenpaarung ändert. Bei 37 °C (pH = 7,4) beträgt die Desaminierungsrate von Cytosin im Doppelstrang $7 \times 10^{-13} \text{ s}^{-1}$, was einer Halbwertszeit von 30 000 Jahren entspricht [FKS90]. Im Einzelstrang dagegen ist die Rate wesentlich höher ($1 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$) und entspricht einer Halbwertszeit von 200 Jahren. Der Unterschied liegt daran, dass im Einzelstrang unter anderem die stabilisierende Wirkung der Basenpaarung und Basenstapelung fehlt [LR93].

Im CPD neigt Cytosin, bedingt durch die Sättigung der C5-C6-Bindung, weitaus öfter (sechs Größenordnungen) zu einer Desaminierung als im ungeschädigten Zustand und die Halbwertszeit liegt im Bereich einiger Stunden [PS96, TDP98]. Es wird vermutet, dass im CPD aufgrund der geringeren stabilisierenden Wirkung der Basenpaarung und Basenstapelung und aufgrund der C5-C6-Einfachbindung das C4-Atom anfälliger für eine nukleophile Reaktion ist [TDP98]. Generell wirkt sich die Konformation stark auf die Desaminierungswahrscheinlichkeit aus. Die Folge ist, dass die einzelnen Diastereomere des CPD-Schadens (siehe Abbildung 2.7) unterschiedliche Desaminierungsraten zeigen. Darauf wird in Abschnitt 4.4 näher eingegangen.

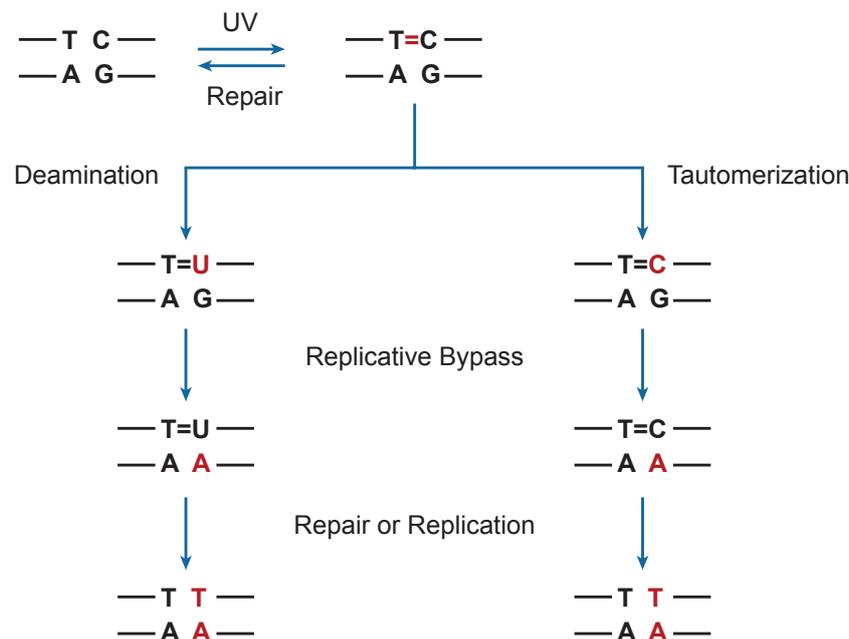


Abbildung 2.10.: Schema der Entstehung einer C → T Punktmutation am Beispiel des TpC. Nach UV-Absorption bildet sich ein CPD (T=C). Das Cytosin kann sowohl zu einem Uracil desaminieren (links) als auch in die E-Imino-Form tautomerisieren (rechts). Kommt es daraufhin zu einer Bypass-Replikation, wird im Gegenstrang Adenin statt Guanin eingebaut. Wird einer der beiden neuen Stränge repariert oder repliziert, ist das Ergebnis eine C → T Punktmutation.

Mutagenität des CPD-Schadens

Obwohl CPD-Schäden in den Zellen in vielen Fällen erfolgreich repariert werden, können Transkription und Replikation durch einen CPD behindert werden [TK93]. Bei der Replikation wird einer der zwei Stränge der DNA von dem Enzym Polymerase als Vorlage für die Synthese eines komplementären Strangs verwendet [Alb04]. Bleibt ein Schaden, wie der CPD, unrepariert, kann dies schließlich unter anderem zu Krebs führen [VR01]. Allerdings können auch bei unreparierten Schäden spezielle Polymerasen sogenannte Bypass-Replikationen ausführen [Wal95, TO90], was im Einbau nicht-komplementärer Basen resultiert (siehe Abbildung 2.10).

Cytosin enthaltende CPD-Schäden sind dabei wesentlich mutagener als ein CPD mit zwei Thyminen, weil weitere Phänomene hinzukommen, die mit Cytosin in Verbindung stehen. Nachfolgend werden zwei mögliche Mutationswege ausgehend von einem TpC CPD beschrieben. Eine schematische Darstellung dieser Mutationswege wird in Abbildung 2.10 gezeigt. Wie bereits dargelegt, kann ein Cytosin im CPD zum einen desaminieren, zum anderen tautomerisieren. Wird der CPD zunächst nicht behoben, kommt es in beiden Fällen bei einer anschließenden Bypass-Replikation des geschädigten Strangs zum Einbau eines Adenins statt Guanins im Gegenstrang. Erfolgt daraufhin eine weitere Replikation, kommt

2. Wechselwirkungen der DNA-Basen mit UV-Strahlung

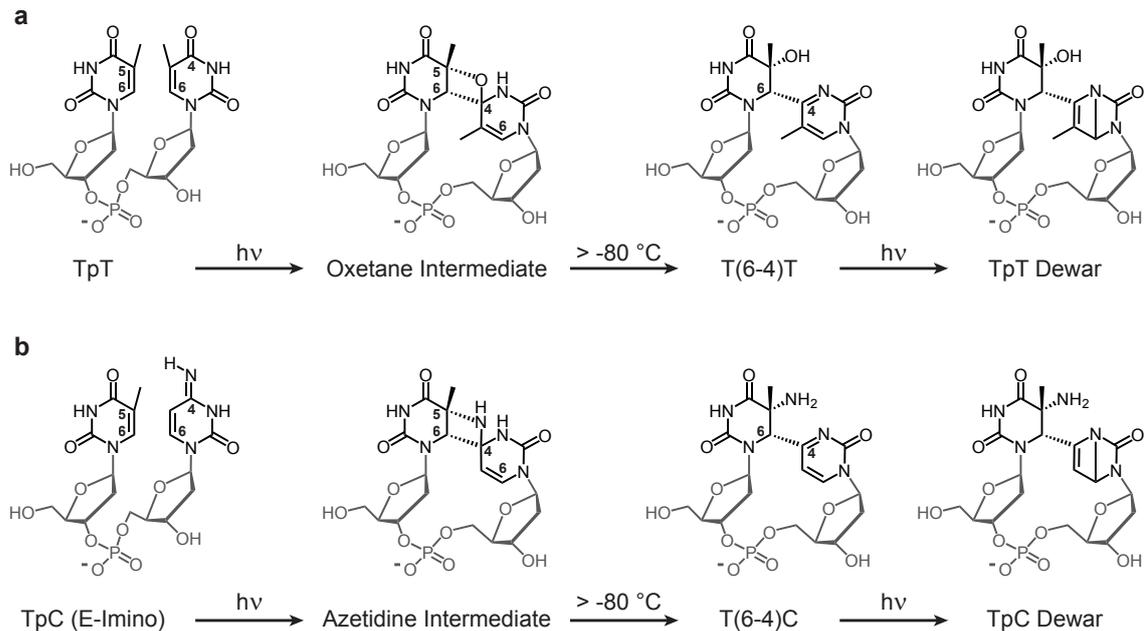


Abbildung 2.11.: (a) Für TpT erfolgt die Bildung des (6–4)-Schadens T(6–4)T über ein Oxetan-Intermediat. Die Dewar-Bildung erfolgt bei UV-Bestrahlung des T(6–4)T. (b) Für TpC in der E-Imino-Form erfolgt die Bildung des (6–4)-Schadens T(6–4)C über ein Azetidin-Intermediat. Nach UV-Absorption kann der T(6–4)C ebenfalls zum Dewar-Schaden weiterreagieren. Beide Intermediate sind thermisch instabil.

es zu einer C → T und einer G → A Punktmutation [PS96]. Dabei spielt es bereits keine Rolle mehr, welcher der beiden Stränge repliziert wird. Wenn zwei Cytosine beteiligt sind, kann es mit geringerer Wahrscheinlichkeit zu einer CC → TT Tandemmutation kommen [FCC04]. CPD-Schäden, die Cytosin enthalten, sind aufgrund ihrer hohen Mutagenität von besonderem Interesse und eines der Themen dieser Arbeit.

2.3.2. (6–4) und Dewar

Der zweithäufigste UV-Schaden ist das Pyrimidin-(6–4)-Pyrimidon-Photoprodukt (siehe Abbildung 2.11), welches kurz (6–4) genannt wird, und vermehrt bei TpC auftritt. Wie die Bezeichnung bereits suggeriert, kommt es zu einer Bindung zwischen dem C6-Atom der 5'-Base (Pyrimidin) und dem C4-Atom der 3'-Base (Pyrimidon). Der (6–4)-Schaden verformt den Strang stark und ist sehr mutagen [LHC99], obwohl er neunmal so schnell repariert wird wie der CPD [Svo93]. Bei Belichtung im UV-B-Bereich gilt für die Wahrscheinlichkeit der Bildung des (6–4)-Schadens in den verschiedenen Dipyrimidin-Kombinationen in aufsteigender Reihenfolge: CpT < CpC < TpT < TpC [DC01].

Der T(6–4)T wird innerhalb von 4 ms über ein Zwischenprodukt gebildet und somit signifikant langsamer als der TpT CPD [MM05]. Die genauen Schritte der Schadensbildung

sind noch nicht vollständig geklärt, was unter anderem daran liegt, dass der (6–4) mit geringerer Wahrscheinlichkeit gebildet wird als der CPD [Mou06, DC01, Dou03]. Es wird vermutet, dass beim (6–4) eine Paternò-Büchi-Reaktion involviert ist [BIL54], bei der sich für TpT zwischen der C5=C6-Doppelbindung der 5'-Base und der C4=O4-Carbonylgruppe der 3'-Base eine Cycloaddition ausbildet (siehe Abbildung 2.11 a). Das entstehende Zwischenprodukt ist ein Oxetan [VW68, Lab13]. Im Falle von TpC, bei dem Cytosin in der E-Imino-Form vorliegt, entsteht eine Cycloaddition zwischen der C5=C6-Doppelbindung des Thymins und der C4=NH-Gruppe des Cytosins (siehe Abbildung 2.11 b). Das Zwischenprodukt ist ein Azetidin [WV67, YEZ11]. Bei Raumtemperatur sind beide genannten Zwischenzustände instabil und reagieren weiter zum (6–4) [Tay94, Tay95]. Im T(6–4)C lagert sich die NH₂-Gruppe vom C4-Atom der 3'-Base zum C5-Atom der 5'-Base um.

Die photoinduzierte Bildung von (6–4)-Schäden ist abhängig von der einstrahlenden Wellenlänge. Bei Bestrahlung im UV-A-Bereich bilden sich keine (6–4)-Schäden [Dou03, Mou06, Ban11] aus, während man bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 310 nm eine Quantenausbeute der (6–4)-Bildung im Bereich von 10⁻³ erhält [Ban12]. Bisher konnte noch nicht eindeutig gezeigt werden, aus welchem angeregten Zustand der (6–4) gebildet wird. In Experimenten an TpT mit Aceton als Photosensibilisator konnte eine (6–4)-Bildung nicht signifikant festgestellt werden [KVC92], was gegen eine Triplett-Beteiligung sprechen würde. Quantenchemische Berechnungen zeigen allerdings verschiedene Triplett-Zustände und Singulett-Triplett-Prozesse unter Beteiligung von nπ*-Zuständen als Vorläufer des (6–4) [YZE11, Giu13].

Ein wesentlicher Unterschied zum CPD ist, dass der (6–4) bei Belichtung mit Wellenlängen über 300 nm zu einem anderen Schaden weiterreagieren kann, dem Dewar-Valenzisomer [Dew69, TC87]. Die Bildung erfolgt durch eine electrocyclische 4π-Ringschlussreaktion mit einer Zeitkonstanten von 130 ps, wesentlich schneller als die Bildung des (6–4)-Schadens selbst [Hai12b]. Kombinierte experimentelle und theoretische Studien haben ergeben, dass der Dewar größere Konformationsänderungen im Strang hervorruft als der CPD [KVC92, HKC96], was Auswirkungen auf die Basenpaarung und die Basenstapelung hat. Da es sich beim Dewar um einen Sekundärschaden handelt, kann er allerdings nur durch die Weiterreaktion von (6–4)-Schäden entstehen, sofern diese vorhanden sind. Liegen in der belichteten Probe keine (6–4)-Schäden vor, bilden sich weder bei direkter Bestrahlung im UV-A-Bereich [Dou03, Ban11] noch bei der Photosensibilisierung von TpT mit Aceton [KVC92] Dewar-Schäden aus.

Es kann sowohl beim (6–4) als auch beim Dewar-Schaden zu einer Desaminierung kommen, wenn ein Cytosin im Dimer vorliegt und Teil des Schadens ist. Aufgrund der bereits erwähnten Umlagerung der NH₂-Gruppe vom C4-Atom, kann allerdings nur ein Cytosin am 5'-Ende desaminiert werden. Daher werden bei CpT und CpC Desaminierungen im (6–4) beobachtet, beim T(6–4)C allerdings nicht [Dou07, DVC91]. Für CpT konnte festgestellt werden, dass in wässriger Lösung sowohl der (6–4)-Schaden ($2,8 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$) als auch das Dewar-Valenzisomer ($2,7 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$) signifikant geringere Ratenkonstanten der Desaminierung haben als der cis-syn CPD ($7,3 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) [DC92] und daher

2. Wechselwirkungen der DNA-Basen mit UV-Strahlung

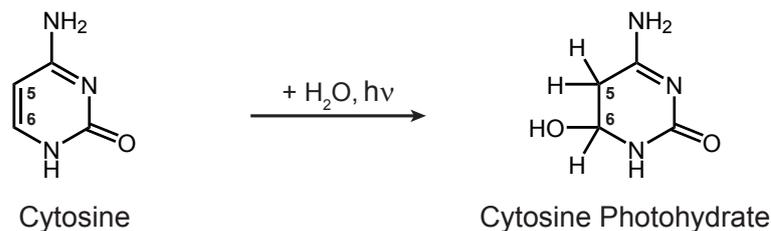


Abbildung 2.12.: Photohydratisierung am C5- und C6-Atom eines Cytosins (links) resultiert in einem hydratisierten Cytosin (6-Hydroxy-5,6-dihydrocytosin) (rechts), welches thermisch instabil ist.

stabiler sind als letzterer. Die Folgen solcher Desaminierungen sind wiederum mögliche Punktmutationen (siehe Unterabschnitt 2.3.1).

2.3.3. Photohydrat

Eine weitere Veränderung von Pyrimidin-Basen im Gegensatz zu den gezeigten Dimerisierungen ist die Bildung des Photohydrats [FJ76]. Dabei handelt es sich um einen photoinduzierten, reversiblen Vorgang, der in allen Pyrimidinen mit sehr unterschiedlichen Quantenausbeuten auftreten kann. Die geringste Quantenausbeute wird beim Thymin beobachtet (ca. 10^{-5}), während Cytosin und Uracil die höchsten Ausbeuten haben ($> 10^{-3}$) [FJ76]. Im Vergleich zu Nukleosiden nimmt die Stabilität und somit auch die Lebensdauer des Cytosin Photohydrats im Doppelstrang zu, vermutlich aufgrund von Basenstapelung [Boo89]. Bei der Hydratisierung des Cytosins (siehe Abbildung 2.12) oder Uracils erfolgt die Anlagerung einer OH-Gruppe am C6-Atom und eines H-Atoms am C5-Atom nach UV-Belichtung. Ein hydratisiertes Cytosin (6-Hydroxy-5,6-dihydrocytosin) ist thermisch instabil, mit einer Halbwertszeit im Bereich von einigen Minuten [DKJ70], und wesentlich instabiler als das Photohydrat des Uracils [LY78b]. Ein hydratisiertes Cytosin kann zurück in die Ausgangsform reagieren (Dehydratisierung) oder irreversibel zu einem hydratisierten Uracil (6-Hydroxy-5,6-dihydrouracil), welches wiederum zu Uracil desaminieren kann [WS57, Boo89, Boo90, ODo94]. Demzufolge können auch beim Photohydrat Mutationen die Folge sein.

Untersuchungen haben ergeben, dass die Bildung des Photohydrats aus dem Tripletts ausgeschlossen werden kann [GJ68, BPC72, Hai12a] und nur der Singulett als Vorläufer in Betracht kommt. Auch Experimente mit Aceton, Acetophenon und Benzophenon als Tripletts-Photosensibilisatoren haben keine Bildung des Photohydrats gezeigt [GJ68].

2.4. Photosensibilisierung der DNA

In Abbildung 2.3 wurde bereits gezeigt, dass die solare UV-Strahlung im UV-A-Bereich ihr Intensitätsmaximum hat. Da die Absorption der DNA in diesem Spektralbereich vernachlässigbar ist, ist sie gut gegen direkte UV-A-induzierte Schäden geschützt. Es gibt

allerdings Chromophore, die durch die Absorption im UV-A-Bereich in einen angeregten Zustand, zumeist in einen Triplett, versetzt werden können [Cad09]. Wird der angeregte Zustand eines Chromophors dadurch entvölkert, dass eine chemische Reaktion mit einer anderen Substanz (Substrat) erfolgt, wird der Chromophor als Photosensibilisator bezeichnet. Die chemischen Reaktionen bei der Photosensibilisierung können Schädigungen an der DNA hervorrufen [Epe11]. Einige der Photosensibilisatoren nehmen an den Reaktionen gewissermaßen als chemische Katalysatoren teil. Sie ermöglichen die Reaktionen, werden aber nicht verbraucht und liegen am Ende der Reaktion in ihrer Ursprungsform vor. Andere Photosensibilisatoren hingegen sind am Ende der Reaktion Bestandteil des Produkts.

In den Zellen gibt es natürlich vorkommende Substanzen, die als sogenannte endogene Photosensibilisatoren fungieren und Schäden an der DNA, an Proteinen und anderen Biomolekülen verursachen können. Zu den UV-A-Photosensibilisatoren, die unter anderem in Hautzellen vorkommen, zählen beispielsweise Porphyrine und Flavine [WJJ06]. Bestimmte Moleküle (engl.: *quencher of photoexcited states*, QPES) können durch die Reaktion mit den endogenen Photosensibilisatoren deren angeregten Zustand löschen und die Zelle somit schützen [WJJ04]. Dabei kehrt der Photosensibilisator in seinen Grundzustand zurück. Dieser Vorgang wird „Quenchen“ (Löschung) des angeregten Zustands genannt.

Prinzipiell werden die Arten der Photosensibilisierung nach der primären Interaktion des Photosensibilisators unterteilt [Lau86]. Zum einen können Photosensibilisatoren indirekt mit dem Substrat wechselwirken (in diesem Fall mit den DNA-Basen⁴), indem beispielsweise zunächst ein Elektron- oder Energietransfer auf einen intermediären Akzeptor stattfindet. Mögliche Schädigungen der DNA entstehen dann erst durch Sekundärprozesse. Zum anderen gibt es Substanzen, die aus dem angeregten Zustand direkt mit der DNA wechselwirken und auch kovalent an die Basen binden können (Photoaddition). In den nachfolgenden Unterabschnitten werden die unterschiedlichen Arten der Photosensibilisierung vorgestellt.

2.4.1. Oxidative Photosensibilisierung

Im Zellstoffwechsel entstehen als Nebenprodukte zahlreiche reaktive Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species*, ROS), die schädliche Reaktionen auslösen können. Zu den ROS gehören beispielsweise Hydroxid-Radikalanionen (auch Superoxid-Radikalanionen genannt) $O_2^{\bullet-}$, Hydroxyl-Radikale HO^{\bullet} , Hydroperoxid-Radikale HOO^{\bullet} , Wasserstoffperoxid H_2O_2 , Ozon O_3 und Singulett-Sauerstoff 1O_2 . Diese Substanzen werden bei verschiedenen Stoffwechselprozessen gebildet und für gewöhnlich wieder neutralisiert, so dass ein Gleichgewicht herrscht. Eine zu hohe Konzentration an ROS führt zu oxidativem Stress in den Zellen und steht in Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs [Coo03, WJJ06]. Bei der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies spielt auch die oxidative Photosensibilisierung eine entscheidende Rolle. Für die Einteilung der sauerstoffabhängigen Photosensibilisierung hat sich die Unterscheidung in Typ I und Typ II durchgesetzt, die nachfolgend kurz charakterisiert wird [Lau86, Foo91, Bap17].

⁴Wechselwirkungen mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat treten nicht auf.

2. Wechselwirkungen der DNA-Basen mit UV-Strahlung

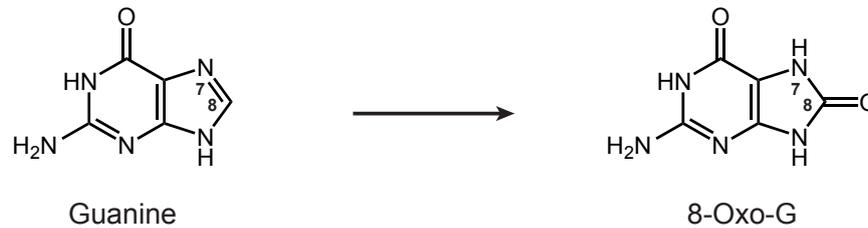


Abbildung 2.13.: Reaktion von Guanin (links) zu 8-Oxo-G (8-Oxo-7,8-dihydroguanin) (rechts) durch oxidative Photocycloaddition.

Typ I, Photooxidation durch Radikale

Die Typ I Photosensibilisierung läuft über Einzelelektronen-Oxidation ab. Dabei reagiert ein Photosensibilisator mit dem Substrat oder dem Lösungsmittel über Elektrontransfer oder die Übertragung von Wasserstoffatomen. Die verschiedenen Reaktionspfade bei dieser Art der Photosensibilisierung haben die Beteiligung von Radikalen gemein [Lau86, Cad12, Bap17].

Durch Elektrontransfer können bei der Reaktion eines angeregten Photosensibilisators mit dem Substrat Radikalanionen entstehen. Meistens fungiert der Photosensibilisator als Oxidationsmittel und wird bei der Reaktion reduziert [Foo91]. Das führt zu Radikalanionen des Photosensibilisators $P^{\bullet-}$ und Radikalkationen des Substrats $S^{\bullet+}$, was bei Nucleobasen der Fall ist. Je nach Redoxpotential gibt es aber auch den umgekehrten Fall: $P^{\bullet+}$ und $S^{\bullet-}$. Die Radikalanionen können anschließend mit molekularem Sauerstoff O_2 reagieren, wobei unter anderem Hyperoxid-Radikalanionen $O_2^{\bullet-}$ gebildet werden. Letztendlich kann es in Folgereaktionen (siehe [Lau86]) durch die Beteiligung von Radikalen zu Oxidationen kommen, die potentiell schädlich für die DNA, Aminosäuren und andere Biomoleküle sind. Bei der Typ I Photosensibilisierung kann statt einem Elektrontransfer auch ein Wasserstofftransfer vom Substrat auf den Photosensibilisator erfolgen. Dabei entstehen ungeladene Radikale, die ebenfalls mit O_2 reagieren und letztlich zu Oxidationen führen können. Durch Typ I Photosensibilisierung wird von allen Nucleobasen fast ausschließlich⁵ Guanin geschädigt, weil es das niedrigste Ionisationspotential aller Basen hat [Cad12, DC99]. Hauptsächlich entsteht dabei 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-Oxo-G) (siehe Abbildung 2.13).

Typ II, Photooxidation durch Singulett-Sauerstoff

Bei der Typ II Photosensibilisierung reagiert ein Photosensibilisator mit molekularem Sauerstoff O_2 über Energietransfer. Im Grundzustand befindet sich molekularer Sauerstoff in einem Triplett-Zustand 3O_2 . Nach der Anregung durch den Photosensibilisator liegt er als Singulett-Sauerstoff 1O_2 vor, welcher hochreaktiv ist [Lau86]. Singulett-Sauerstoff hat eine höhere Oxidationswirkung als Triplett-Sauerstoff und kann auch solche Substrate oxidieren,

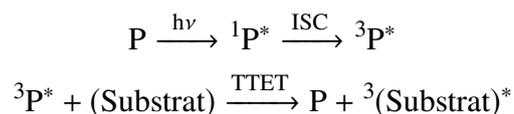
⁵Mit dem Photosensibilisator Benzophenon konnte zu einem geringen Anteil Thymin oxidiert werden [DC99].

die ansonsten unempfindlich gegenüber Oxidationen sind. Eine weitere Möglichkeit der Wechselwirkung von $^1\text{O}_2$ ist die Anbindung an das Substrat. Letztlich kann es bei diesen Reaktionen ebenso zu Schäden an der DNA, an Aminosäuren und anderen Biomolekülen kommen. Andererseits werden die reaktiven Eigenschaften des Singulett-Sauerstoffs auch gezielt bei der Zerstörung von Krebszellen eingesetzt (Photodynamische Therapie, PDT) [DC02]. Das primäre Ziel der Typ II Photosensibilisierung in der DNA ist ebenfalls Guanin, welches durch die Reaktion mit Singulett-Sauerstoff zu 8-Oxo-G reagiert [Cad06]. 8-Oxo-G ist der vorherrschende Schaden, der durch die Photooxidation mit Singulett-Sauerstoff entsteht [CT78]. Untersuchungen haben gezeigt, dass bei UV-A-Anregung von nativer DNA nichtsdestotrotz der TpT CPD der häufigere Schaden im Vergleich zum 8-Oxo-G ist [Dou03].

2.4.2. Nichtoxidative Photosensibilisierung: Triplett-Photosensibilisatoren

Im Gegensatz zur oxidativen Photosensibilisierung läuft die nichtoxidative Photosensibilisierung unabhängig von Sauerstoffspezies ab. Die wichtigste Übertragungsart der nichtoxidativen Photosensibilisierung ist der Energietransfer.

Triplett-Photosensibilisatoren sind Moleküle, die den Triplett-Zustand eines Akzeptors per Triplett-Triplett Energietransfer (TTET) anregen und dabei in den Grundzustand zurückkehren. Die überschüssige Energie wird über Stöße vom Photosensibilisator auf das Substrat übertragen. Der Triplett-Zustand des Photosensibilisators wird durch UV-Anregung seines Singulett-Zustands und anschließende Interkombination (ISC) bevölkert. Das nachfolgende Reaktionsschema fasst die Schritte der Anregung eines Photosensibilisators P und des TTET vom angeregten Photosensibilisator auf ein Substrat zusammen:



In [TRS91] werden folgende Kriterien zum Auswählen eines geeigneten Triplett-Photosensibilisators genannt: Ein Triplett-Photosensibilisator sollte eine hohe Interkombinationsrate aus dem angeregten Singulett- in den Triplett-Zustand haben und geringe Raten für die anderen Arten der Entvölkerung. Außerdem sollte der Triplett-Zustand eine lange Lebensdauer haben, damit genug Zeit für einen potentiellen TTET auf den Akzeptor zur Verfügung steht. Dadurch kann auch auf diejenigen Akzeptormoleküle ein Energietransfer erfolgen, die sich erst räumlich umorientieren müssen oder deren Distanz zum Photosensibilisator zunächst zu groß ist. Des Weiteren sollte die Triplett-Energie des Photosensibilisators größer sein als die Triplett-Energie des Akzeptors, damit die Reaktion der Photosensibilisierung exotherm ablaufen kann. Eine gezielte Anregung des Photosensibilisators ist nur dann möglich, wenn dessen Absorption bei der anregenden Wellenlänge deutlich über der des Akzeptors liegt. Bestenfalls wählt man einen Spektralbereich, in dem der Akzeptor überhaupt nicht absor-

2. Wechselwirkungen der DNA-Basen mit UV-Strahlung

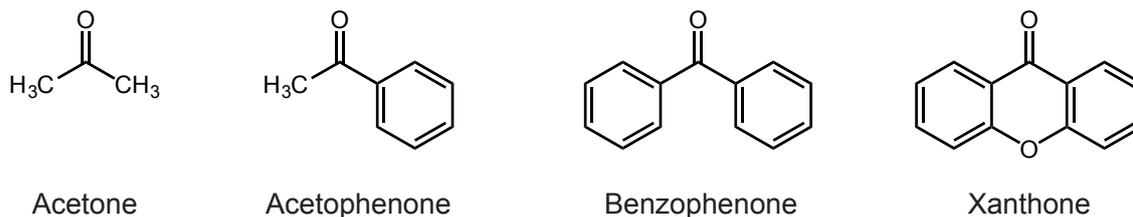


Abbildung 2.14.: Strukturformeln von den Triplet-Photosensibilisatoren Aceton, Acetophenon, Benzophenon und Xanthon.

biert. Schließlich sollte der Photosensibilisator eine geringe photochemische Reaktivität haben, um andersartige Reaktionen mit dem Akzeptor zu vermeiden.

Zu den bekanntesten Triplet-Photosensibilisatoren zählen unter anderem Aceton, Acetophenon, Benzophenon und Xanthon (siehe Abbildung 2.14). Diese Photosensibilisatoren und ihre Derivate wurden in zahlreichen Studien zur Photosensibilisierung von DNA-Basen verwendet [GJ68, GWR96, Cuq12]. Lamola und Yamane [LY67] haben festgestellt, dass bei der photosensibilisierten UV-A-Anregung von DNA mittels Acetophenon fast ausschließlich CPD-Schäden zwischen Thyminen entstehen. Dabei werden die CPD-Schäden über die angeregten Triplet-Zustände in den Thyminen gebildet. Es werden nur Thymin angeregt, da die Triplet-Energie von Acetophenon zu niedrig für die Anregung der anderen Basen ist. Mit Aceton hingegen lassen sich alle Nukleobasen über Triplet-Triplet Energietransfer anregen [GWR96]. Abhängig von der Triplet-Energie des Photosensibilisators können somit einige Photosensibilisatoren zur gezielten Anregung bestimmter DNA-Basen genutzt werden. Die photosensibilisierte Anregung des Thymin-Triplets wurde auch in der vorliegenden Arbeit untersucht. Der verwendete Photosensibilisator (2'-Methoxyacetophenon) ist ein Derivat von Acetophenon und wird in Kapitel 4 näher beschrieben.

2.4.3. Nichtoxidative Photosensibilisierung: Psoralene

Eine weitere Art der nichtoxidativen Photosensibilisierung ist die Wechselwirkung von Psoralen mit der DNA⁶ [CV90, Bet99, Cad12]. Bei der Anregung von Psoralen mit UV-A-Licht kann es zur Photoaddition, der Ausbildung kovalenter Bindungen, mit den Pyrimidin-Basen kommen.

Psoralen ist ein natürlich vorkommender Bestandteil vieler Pflanzen und äußerst photoaktiv. Es ist ein planares, hydrophobes, tricyclisches Molekül und ein lineares Isomer der Furocumarine (siehe Abbildung 2.15). Die verschiedenen Isomere der Furocumarine (auch Furanocumarine genannt) unterscheiden sich in der Position der Verknüpfung von Cumarin und Furan (siehe Psoralen und Angelicin in Abbildung 2.15) [SPM76, MCC18]. Bereits seit einigen Tausend Jahren werden Furocumarin enthaltende Pflanzen in der

⁶Es sind auch Interaktionen von Proteinen und Lipiden mit Psoralen bekannt [Gas18].

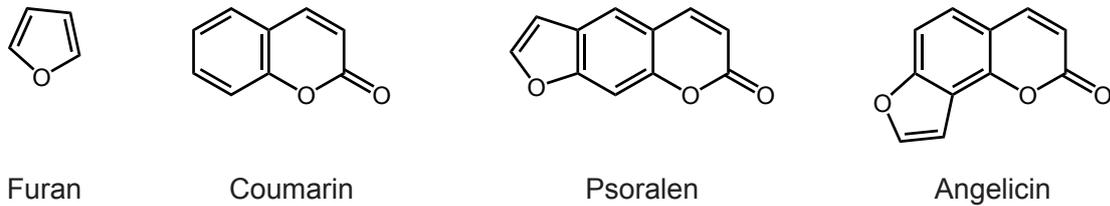


Abbildung 2.15.: Strukturformeln von Furan, Coumarin und zweier Isomere der Furocoumarine: Psoralen und Angelicin.

Behandlung von Hautkrankheiten eingesetzt. Heutzutage ist die Phototherapie mit Psoralen „PUVA“ (Psoralen + UV-A) eine in der Medizin weit verbreitete Behandlungsmethode von Hautkrankheiten wie Psoriasis oder Vitiligo [Bet99]. Im Rahmen dieser Therapie wird dem Patienten Psoralen verabreicht und die betreffende Hautstelle mit Licht im UV-A-Bereich bestrahlt.

Die Wechselwirkung des Psoralens mit der DNA erfolgt in zwei Schritten. Der erste Schritt läuft ohne Lichteinstrahlung, d. h. im Dunkeln, ab. Dabei interkaliert das hydrophobe Psoralen in die DNA, indem es sich in der Ebene zwischen zwei benachbarten Basenpaaren parallel zu den planaren Basen einlagert, überwiegend in poly(AT)-Sequenzen [ST79]. Hydrophobe Wechselwirkungen dominieren die Interkalation. Bei UV-Anregung erfolgt der zweite Schritt der Reaktion in Form einer Cycloaddition des Psoralens an die Nukleobasen, fast ausschließlich an Thymin⁷ [Bet99]. Zu einem sehr geringen Prozentsatz gibt es auch Additionen an Cytosin. Die kovalente Bindung von Psoralen an die Pyrimidine behindert die Replikation und kann zur Apoptose führen. Dadurch sollen eben jene krankhaft veränderten Zellen absterben, die symptomatisch für die behandelte Erkrankung sind. Aufgrund ihrer langfristig karzinogenen Wirkung sind diese Therapien allerdings nicht unumstritten [Ste12].

Mittlerweile wurden viele verschiedene Psoralenderivate synthetisiert, die sich unter anderem in ihrer Wasserlöslichkeit und den photosensibilisierenden Eigenschaften unterscheiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Photoaddition eines Psoralenderivats (AMT) an das DNA-Modellsystem d(TA)₂₀ untersucht. Details zum Mechanismus und dem verwendeten Derivat werden in Kapitel 6 beschrieben.

⁷In der RNA an Uracil.

3. Experimentelle Methoden

Im nachfolgenden Kapitel werden die experimentellen Methoden und Aufbauten präsentiert, die für die Messungen in dieser Arbeit relevant sind. Zwei der verwendeten Methoden zur Absorptionsbestimmung sind die UV/Vis- und Infrarotspektroskopie, welche im ersten Teil kurz beschrieben werden. Anschließend wird die Anrege-Abtast-Spektroskopie, das Lasersystem und die Erzeugung der Anregungs- und Abtastimpulse erläutert. Zuletzt wird der Umgang mit den Proben und die Durchflussküvette vorgestellt.

3.1. UV/Vis-Spektroskopie

Bei Absorptionsmessungen wird die transmittierte Leistung detektiert, d. h. der Anteil des eingestrahnten Lichts, der nicht von der untersuchten Probe absorbiert wurde. Für die Transmission T gilt: $T = 10^{-A}$.

Die Absorption A ist direkt proportional zur Konzentration der Probe und kann mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$A(\lambda) = -\log(T) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d. \quad (3.1)$$

Der Extinktionskoeffizient¹ ε wird in Einheiten von $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, die Schichtdicke d in cm und die Konzentration der Probe c in $\text{M} = \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ angegeben. Die Absorption A ist einheitenlos, wird aber im Allgemeinen als OD-Wert („optische Dichte“) angegeben. Ein Wert von $\text{OD} = 1$ ergibt sich somit bei einer Transmission von 10 %: $A = -\log(0,1) = 1$.

Aufgrund der hohen Absorption der DNA-Basen im UV-Bereich eignen sich UV/Vis-Spektren gut zur Konzentrationsbestimmung der DNA-Proben und zur quantitativen Bestimmung von Probenumwandlungen. Die UV/Vis-Spektren im Rahmen dieser Arbeit wurden mit verschiedenen UV/Vis-Spektralphotometern aufgenommen (UV-1800, Shimadzu; LAMBDA 750, Perkin Elmer; UV-2600, Shimadzu). Es wurde eine Quarzglas-Küvette (10 mm×4 mm, QS, Hellma Analytics) mit einer Schichtdicke von 10 mm oder eine selbst angefertigte CaF₂-Küvette mit einer Schichtdicke von ca. 110 μm (siehe Abschnitt 3.4) benutzt. Für die Messungen in den Quarzglas-Küvetten wurde die Probenkonzentration entsprechend der Schichtdicke verdünnt, damit die Transmissionssignale vom Spektralphotometer detektiert werden konnten, was bei den dünneren Infrarot-Küvetten nicht nötig war.

¹Molarer, dekadischer Extinktionskoeffizient; wird im Rahmen dieser Arbeit synonym für Absorptionskoeffizient verwendet, da andere Prozesse, wie Streuung, keine Rolle spielen.

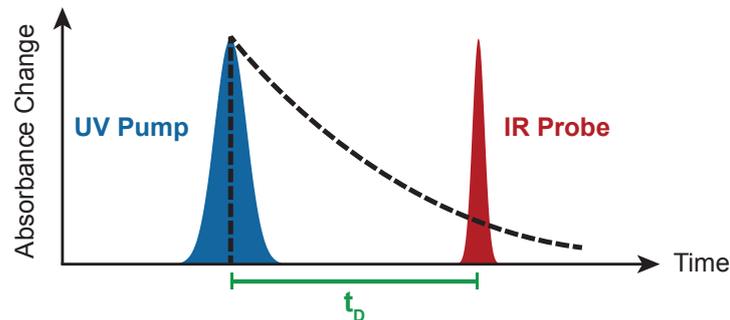


Abbildung 3.1.: Schematische Darstellung des Prinzips der Anrege-Abtast-Spektroskopie. Durch die Absorption eines UV-Anregungsimpulses (blau) werden in einer Probe Absorptionsänderungen erzeugt, die von einem IR-Abtastimpuls (rot) abgefragt werden. Das variable Einstellen der Verzögerungszeit t_D zwischen Anregungs- und Abtastimpuls ermöglicht eine zeitaufgelöste Messung.

3.2. Infrarotspektroskopie

Mit der Infrarotspektroskopie lassen sich im Gegensatz zur UV/Vis-Spektroskopie Schwingungsmoden von Molekülen beobachten und angeregte Zustände besser unterscheiden [GG03]. Dieses Verfahren ist sensitiv gegenüber molekularen Änderungen, weil jede Bindungsänderung eine Änderung der Schwingungsbanden (Oszillatorenstärke, Schwingungsfrequenz) zur Folge hat. Aufgrund dieser Sensitivität ist die Infrarotspektroskopie eine besonders geeignete Untersuchungsmethode von Photoschäden in der DNA.

Stationäre Infrarotspektren wurden nicht nur bei den Belichtungsmessungen aufgenommen, sondern auch vor und nach jeder zeitaufgelösten Messung zur Kontrolle der Intaktheit der Proben. Es wurde ein FTIR-Spektralphotometer² mit einem *Globalar* als Lichtquelle und einem DTGS-Detektor³ verwendet (IFS 66v/s, Bruker). Das gesamte Spektralphotometer, einschließlich Probenkammer, wird mit Trockenluft gespült, damit keine Signalbeiträge der starken Wasserdampfabsorption im Mittelinfraroten detektiert werden. Die für die Spektrenaufnahme benutzte Durchflussküvette wird in Abschnitt 3.4 näher beschrieben.

3.3. Anrege-Abtast-Spektroskopie

Um dynamische Vorgänge auf kurzen Zeitskalen (Nanosekunden bis Mikrosekunden) zu untersuchen, bedarf es einer zeitaufgelösten Methode wie der Anrege-Abtast-Spektroskopie. Bei diesem Verfahren wird die Probe mit einem Impuls angeregt und mit einem zweiten Impuls zeitverzögert (t_D) abgefragt (siehe Abbildung 3.1). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Anregungsimpulse im UV und Abtastimpulse im Mittelinfraroten benutzt. Eine zeitaufgelöste Untersuchung der photoinduzierten Reaktionen wird durch die variable Verzögerung

²FTIR: Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie

³DTGS: Deuteriertes Triglycinsulfat

zwischen Anregungs- und Abtastimpuls ermöglicht. Es wird jeder zweite Anregungsimpuls geblockt, um abwechselnd angeregtes und nicht angeregtes Probenvolumen abzufragen. Dadurch können Absorptionsänderungen gemessen werden, die mögliche Informationen zu angeregten Zuständen, Intermediaten und die Bildung von Photoschäden enthalten.

Die zeitaufgelösten Infrarotmessungen für diese Arbeit wurden an einem Anrege-Abtast-Aufbau durchgeführt, welcher in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt und im Folgenden näher beschrieben wird⁴.

3.3.1. Das Lasersystem

Die ultrakurzen Laserimpulse werden in einem Lasersystem durch „Verstärkung gechirpter Pulse“ (engl.: *chirped pulse amplification*, CPA, [SM85]) erzeugt (grüner Kasten in Abbildung 3.2).

Die zu verstärkenden Impulse liefert ein Titan:Saphir-Laser-Oszillator (Tsunami, Spectra Physics). Dessen aktives Lasermedium (Ti:Sa , $\text{Ti}^{3+}:\text{Al}_2\text{O}_3$) wird von einem frequenzverdoppelten Nd:YVO₄-Dauerstrichlaser⁵ ($\lambda = 532 \text{ nm}$) (Millennia 5s Js, Spectra Physics) optisch gepumpt. Es werden im Titan:Saphir über Kerr-Linsen-Modenkopplung (engl.: *Kerr-lens mode-locking*) ultrakurze Laserimpulse (Impulsdauer ca. 30 fs) mit einer Zentralwellenlänge von 800 nm, einer Repetitionsrate von 80 MHz, einer spektralen Breite von etwa 35 nm und einer Impulsenergie von ca. 5 nJ erzeugt.

Anschließend werden die Laserimpulse in einen regenerativen Verstärker (Spitfire Pro XP, Spectra Physics) eingekoppelt (Seed-Pulse), um die Impulsenergie zu erhöhen. Zuerst müssen die Impulse in einem Strecker (engl.: *stretcher*) zeitlich gestreckt werden, um das aktive Medium des Verstärkers nicht durch hohe Intensitäten zu beschädigen. Die Impulse werden zeitlich gestreckt, indem sie eine Kombination aus Gittern und Spiegeln durchlaufen und dadurch eine positive Gruppengeschwindigkeitsdispersion (engl.: *group velocity dispersion*) erfahren [Tre69]. Mit dieser Methode wird die Impulsdauer um vier Größenordnungen erhöht und die Intensität verringert. Daraufhin werden die Impulse durch Einkoppeln und mehrmaliges Durchlaufen des Titan:Saphir-Resonators verstärkt. Dies geschieht mit einer Repetitionsrate von 1 kHz. Die Besetzungsinversion im aktiven Lasermedium des Resonators wird durch optisches Pumpen mit einem frequenzverdoppelten, gepulsten Nd:YLF-Laser⁶ ($\lambda = 527 \text{ nm}$) (Empower, Spectra Physics) erzeugt. Nach dem Auskoppeln aus dem Resonator werden die verstärkten Impulse in einem Kompressor auf eine Impulsdauer von 100 fs komprimiert. Das Prinzip ist ähnlich zu dem des Streckers, mit dem Unterschied, dass eine negative Gruppengeschwindigkeitsdispersion induziert wird. Über Schrittmotoren kann der Kompressor fein eingestellt werden, um sowohl die Dauer als auch den linearen Chirp der Impulse anzupassen. Aus dem Resonator werden Impulse mit einer Impulsdauer von 100 fs, einer Zentralwellenlänge von 800 nm, einer Repetitionsrate

⁴Detaillierte Beschreibungen finden sich in [Sch08, Hai12a, Pil16].

⁵Neodym-dotierter Yttrium-Vanadat-Laser

⁶Neodym-dotierter Yttrium-Lithium-Fluorid-Laser

3. Experimentelle Methoden

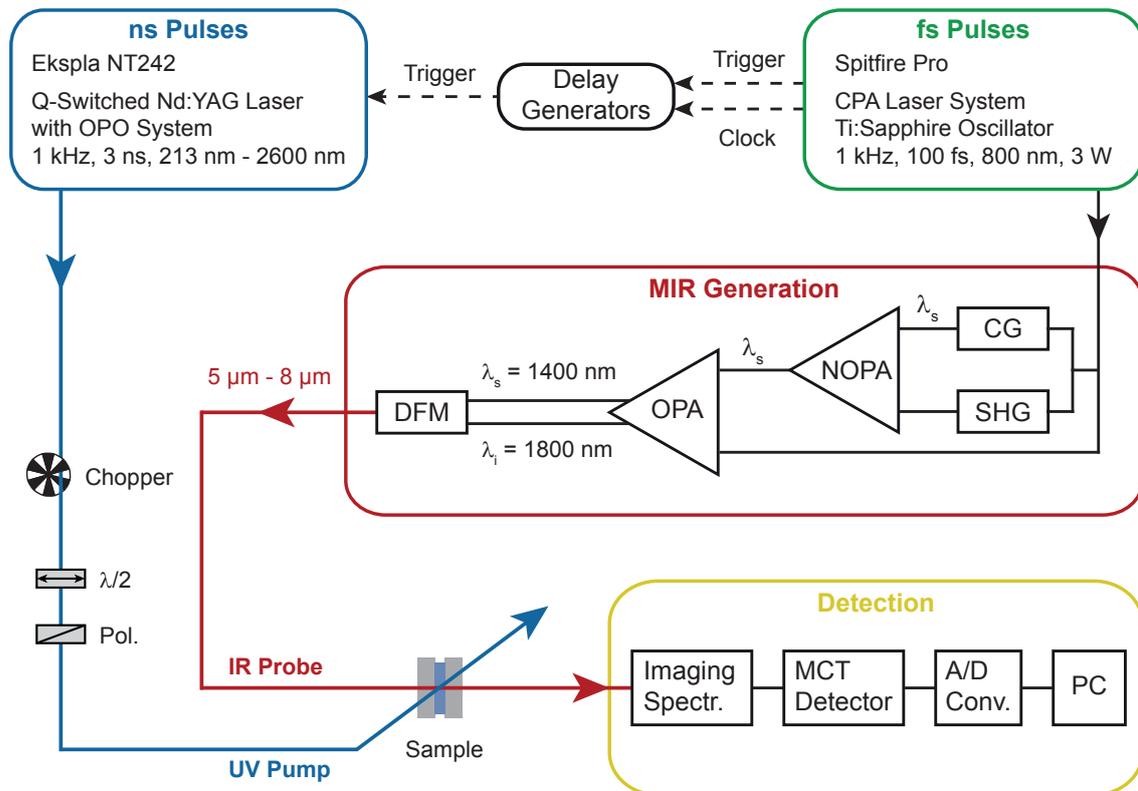


Abbildung 3.2.: Schematische Darstellung des verwendeten Anrege-Abtast-Systems. Ein Femtosekundenlasersystem (grüner Kasten) erzeugt die ultrakurzen Lichtimpulse, die in mehreren aufeinanderfolgenden parametrischen Prozessen zu den benötigten mittelinfraroten Abtastimpulsen ($5\ \mu\text{m}$ bis $8\ \mu\text{m}$, IR Probe) konvertiert werden (roter Kasten). Die ultravioletten Anregungsimpulse (UV Pump) werden in einem durchstimmbaren Nanosekundenlasersystem erzeugt (blauer Kasten) und elektronisch auf die Taktung der Abtastimpulse synchronisiert (Delay Generators). Anregungs- und Abtastimpulse werden in der Probe (Sample) zum Überlapp gebracht und die transmittierten Abtastimpulse anschließend detektiert (gelber Kasten).

von 1 kHz und einer Impulsenergie von ca. 3 mJ ausgekoppelt. Die ausgekoppelten Impulse werden über einen Strahlteiler in Anrege- und Abtast-Arm aufgespalten. Der Anrege-Arm wird bei Messungen im Pikosekundenbereich verwendet und ist nicht Gegenstand dieser Arbeit. Im Folgenden wird beschrieben, wie die Impulse zu den Abtastimpulsen ins mittlere Infrarot konvertiert werden.

3.3.2. Abtastimpulse im Mittelinfraroten

Die im CPA-Lasersystem erzeugten Laserimpulse (im Folgenden „Fundamentale“ genannt) werden mittels einer dreistufigen Frequenzkonversion zu den benötigten mittelinfraroten Abtastimpulsen konvertiert (roter Kasten in Abbildung 3.2).

Im ersten Schritt wird die Fundamentale ($\lambda = 800$ nm) über einen weiteren Strahlteiler aufgeteilt. Mit dem einen Teil wird in einem nichtlinearen BBO-Kristall (β -Bariumborat, β -BaB₂O₄, Typ I, $\Theta = 29^\circ$, Dicke 0,5 mm) die zweite Harmonische der Fundamentalen erzeugt ($\lambda = 400$ nm) (engl.: *second harmonic generation*, SHG). Der andere Teil der Fundamentalen wird in einem Saphirkristall (Dicke 5 mm) fokussiert und über Selbstphasenmodulation entsteht Weißlicht (Superkontinuum, engl.: *continuum generation*, CG). Im nachfolgenden nicht kollinearen optisch parametrischen Verstärker (engl.: *noncollinear optical parametric amplification*, NOPA) [WPR97, Rie00, CS03] werden die Weißlichtimpulse (Seed) und die Impulse aus der Frequenzverdopplung ($\lambda = 400$ nm, Pump) in einem Winkel von 4° zueinander in einem BBO-Kristall (Typ I, $\Theta = 32,5^\circ$, Dicke 2 mm) räumlich und zeitlich überlagert. Der NOPA wird von der zweiten Harmonischen gepumpt. Der Phasenanpassungswinkel des BBO-Kristalls [Boy08] wird so gewählt, dass nur der infrarote Anteil des Weißlichts (ca. 1400 nm, Signal) verstärkt wird. Bei diesem Prozess entstehen aufgrund der Energieerhaltung Impulse mit einer Wellenlänge von ca. 560 nm (Idler), mit denen die Stabilität des Prozesses kontrolliert werden kann.

Die nächste Stufe besteht aus einem optisch parametrischen Verstärker (engl.: *optical parametric amplification*, OPA) mit einem BBO-Kristall (Typ II, $\Theta = 27^\circ$, Dicke 3 mm), der von der Fundamentalen gepumpt wird. Die Fundamentale und die im NOPA verstärkten Impulse bei 1400 nm werden räumlich und zeitlich im BBO überlagert. Hierbei werden die infraroten Impulse bei 1400 nm ein weiteres Mal verstärkt. Aufgrund der Energieerhaltung entstehen bei diesem Prozess zusätzlich Impulse mit ca. 1800 nm (Idler).

Im dritten und letzten Schritt werden die Impulse bei 1400 nm und bei 1800 nm in einem Silberthiogallat-Kristall (AgGaS₂, Typ I, $\Theta = 34^\circ$, Dicke 2 mm) räumlich und zeitlich überlagert. Bei diesem Prozess wird die Differenzfrequenz (engl.: *difference frequency mixing*, DFM) zwischen diesen beiden Frequenzen erzeugt (bei 6300 nm). Das Ergebnis sind die gewünschten Abtastimpulse im Mittelinfraroten (MIR) mit einer Impulsdauer von 100 fs bis 200 fs, einer spektralen Breite von 150 cm^{-1} und einer Impulsenergie von $0,5 \mu\text{J}$ bis $1 \mu\text{J}$. Die Zentralwellenlänge des gemessenen Spektralbereichs wird von den Kristallwinkeln in der DFM, dem OPA und dem NOPA beeinflusst. Durch Verstellen der Winkel können Zentralwellenlängen in einem Bereich von $5 \mu\text{m}$ bis $8 \mu\text{m}$ eingestellt werden.

3.3.3. Anregungsimpulse im Ultravioletten

Die Anregungsimpulse werden von einem OPO-Lasersystem (OPO: optisch parametrischer Oszillator) generiert (Ekspla NT242) (blauer Kasten in Abbildung 3.2), gepumpt von einem Güte geschalteten Nd:YAG-Laser⁷ mit einer Repetitionsrate von 1 kHz und einer Impulsdauer von ca. 3 ns. Das Nanosekundensystem ist in einem Wellenlängenbereich von 213 nm bis 2600 nm durchstimmbar. Die Fundamentale (1064 nm), zweite Harmonische (532 nm) und dritte Harmonische (355 nm) (engl.: *third harmonic generation*, THG) können

⁷Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser

direkt ausgekoppelt werden. Alle anderen Wellenlängen werden über den OPO erzeugt, der aus zwei BBO-Kristallen aufgebaut ist. Je nach benötigter Wellenlänge werden die im OPO erzeugten Impulse entweder direkt benutzt (400 nm bis 2600 nm), frequenzverdoppelt (213 nm bis 299 nm) oder es wird mit der Fundamentalen die Summenfrequenz (engl.: *sum frequency generation*, SFG) gebildet (300 nm bis 399 nm).

Ein Nachteil dieser Konversionsprozesse ist deren Störungsanfälligkeit. Es konnte beispielsweise festgestellt werden, dass die Leistung bei bestimmten Wellenlängen mit der Zeit nachlässt, weil die BBO-Kristalle degradieren. Das hatte auch Auswirkungen auf die stationären Belichtungsmessungen. Die Belichtungsdauer musste bei jeder Messung an die vorhandene Leistung angepasst werden, weshalb bei einigen Experimenten teilweise über mehrere Stunden belichtet wurde (siehe Kapitel 4).

Des Weiteren sind die Strahlprofile der im OPO erzeugten Impulse divergent und elliptisch. Diesem Umstand konnte mit einem Zylinderlinsenteleskop Abhilfe geschaffen werden, um möglichst Gauß-förmige Strahlprofile mit geringer Divergenz zu erhalten, die besser in die Probe fokussiert werden können.

Bevor die Anregungsimpulse in der Probe fokussiert werden, muss die Polarisation der Impulse gedreht werden, um Messartefakte durch Reorientierungsdynamiken der Moleküle zu vermeiden. Hierfür wird der Winkel der Polarisationssebene des Anregungsimpulses mithilfe einer $\lambda/2$ -Platte und eines Polarisators variiert und auf den sogenannten „magischen Winkel“ ($54,7^\circ$, engl.: *magic angle*) in Bezug auf die Polarisationssebene des Abtastimpulses eingestellt [Lak06]. Über die $\lambda/2$ -Platte wird auch die Impulsenergie der Anregungsimpulse reguliert, die bei den Messungen im Rahmen dieser Arbeit zwischen $3,4 \mu\text{J}$ und $6 \mu\text{J}$ betragen hat.

3.3.4. Synchronisierung zwischen Anregungs- und Abtastimpulsen

Bei der Anrege-Abtast-Spektroskopie wird die angeregte Probe zu verschiedenen Verzögerungszeiten t_D nach der Anregung durch einen Anregungsimpuls von einem Abtastimpuls durchleuchtet. Hierfür müssen Anregungs- und Abtastimpuls miteinander zeitlich synchronisiert sein. Im hier beschriebenen Aufbau ermöglichen zwei elektronische Verzögerungsgeneratoren („Delay Generators“ in Abbildung 3.2) die Ansteuerung der Verzögerungszeiten. Als Taktgeber dient das CPA-Lasersystem.

In Abbildung 3.3 ist das Triggerschema für die Nanosekundenmessungen gezeigt. Das Triggersignal des Spitfire wird in eine PCI-Verzögerungskarte (BME SG05p, Bergmann Messgeräte Entwicklung KG) eingespeist, welche das Signal um etwa $t_{\text{const}} = 700 \mu\text{s}$ konstant verzögert. Zusätzlich zum Triggersignal wird noch das Signal des Oszillators (Tsunami, 80 MHz) als sogenannte „Clock“ eingespeist, was die Genauigkeit der Verzögerungskarte erhöht. Das verzögerte Signal t_{const} wird als Triggersignal an den zweiten Verzögerungsgenerator (DG535, Stanford Research Systems) weitergeleitet. Dieser Verzögerungsgenerator triggert wiederum den Nanosekundenlaser (Ekspla) mit zwei verschiedenen Triggersignalen zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 . Im Messprogramm (Mid-Infrared Spectroscopy Tool, MIST8.5) kann eine variable Verzögerungszeit t_1 eingestellt werden, nach der das

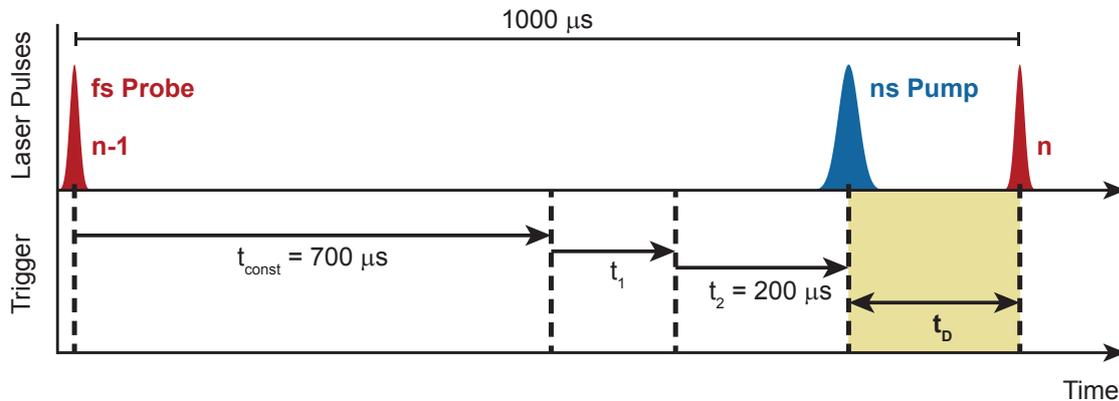


Abbildung 3.3.: Schematische Darstellung der verzögerten Abfolge der Triggersignale zwischen Anregungs- (ns Pump, blau) und Abtastimpuls (fs Probe, rot). Über zwei elektronische Verzögerungsgeneratoren wird die Verzögerungszeit t_1 so geregelt, dass für die Verzögerung t_D zwischen Anregungsimpuls und nachfolgendem Abtastimpuls (n) gilt: $t_D = 100 \mu\text{s} - t_1$. Die Verzögerungsgeneratoren werden vom vorhergehenden Abtastimpuls (n-1) getriggert. Für Details wird auf den Fließtext verwiesen. [Abbildung modifiziert von [Hof18].]

erste Triggersignal an den Ekspla ausgegeben wird. Dadurch werden im Oszillator des Ekspla die Pumpdioden eingeschaltet. Das zweite Triggersignal t_2 erfolgt nicht variabel etwa $200 \mu\text{s}$ nach t_1 und ist von den Laserparametern des Ekspla abhängig. Dieser zweite Trigger schaltet eine Pockelszelle, welche die Impulse aus dem Resonator des Ekspla auskoppelt. Diese Impulse sind die Anregungsimpulse für das Experiment und jeder Anregungsimpuls wird vom vorhergehenden Abtastimpuls getriggert. Da die Repetitionsrate des Spitfire 1 kHz beträgt, liegen die Abtastimpulse $1000 \mu\text{s}$ auseinander. Für die Verzögerungszeit t_D zwischen Anregungsimpuls und nachfolgendem Abtastimpuls gilt somit: $t_D = 1000 \mu\text{s} - t_{\text{const}} - t_1 - t_2 = 100 \mu\text{s} - t_1$. Mit dem beschriebenen Aufbau können Verzögerungszeiten t_D bis zu $100 \mu\text{s}$ generiert werden.

3.3.5. Probenort und Detektion

Nachdem die mittelinfraroten Abtastimpulse in der DFM erzeugt wurden, erfolgt mit einem Strahlteiler deren Aufspaltung in Abtast- und Referenz-Arm. Beide Strahlenbündel werden mit einem Goldparabolspiegel auf die Probe fokussiert, durchlaufen diese allerdings in einem vertikalen Abstand von etwa $700 \mu\text{m}$ zueinander. Somit gibt es zwischen Referenzimpulsen und Anregungsimpulsen keinen räumlichen Überlapp, wohingegen Abtastimpulse und Anregungsimpulse in der Küvette räumlich überlappt werden. Dadurch wird zu jedem Abtastsignal simultan ein Referenzsignal detektiert, mit dem das Rauschen des Lasers aus den Messdaten herauskorrigiert werden kann, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Die Messgenauigkeit wird zusätzlich erhöht, indem jeder zweite Anregungs-

impuls mit einem Chopper (Frequenz 500 Hz) geblockt wird. Dies hat zur Folge, dass jeder zweite Abtastimpuls ein Probenvolumen abfragt, welches zuvor nicht angeregt wurde. Zusätzlich wird die Probenlösung durch eine Küvette gepumpt, so dass zwischen zwei Abtastimpulsen (1 ms) das Probenvolumen an der Anregungsstelle ausgetauscht wurde (Details zur Durchflussküvette siehe Abschnitt 3.4). Die Anregungsimpulse werden mit einer Linse so fokussiert, dass der Bündeldurchmesser am Probenort ca. 220 μm beträgt.

Abschließend werden die Signale auf folgende Weise detektiert (gelber Kasten in Abbildung 3.2): Die transmittierten Strahlenbündel des Abtast- und Referenz-Armes werden mit einem zweiten Parabolspiegel kollimiert und mit einem weiteren Parabolspiegel auf den Eintrittsspalt eines Gitterspektrographen (Chromex 250is, Bruker) fokussiert. Es handelt sich um einen Czerny-Turner-Gitterspektrographen („Imaging Spectr.“ in Abbildung 3.2) [CT30], der beide Strahlenbündel spektral auflöst und auf jeweils eine Zeile (64 Kanäle) eines zweizeiligen, mit flüssigem Stickstoff gekühlten MCT-Detektors⁸ abbildet. Das im Spektrographen verwendete Gitter mit 110 Strichen pro Millimeter erlaubt eine spektrale Auflösung von 9,3 nm pro Kanal und eine spektrale Breite von 595 nm. In einem Gated Integrator (IR-0144, Infrared Systems Development Corporation) werden die von den Einzelkanälen des Detektors ausgegebenen Signale aufintegriert und danach in einem A/D-Wandler (Analog-Digital-Wandler) in digitale Signale umgewandelt, die vom Messprogramm am PC verarbeitet werden können.

Um einen breiteren Spektralbereich zu vermessen, als es mit dem beschriebenen Gitter möglich ist, wird bei verschiedenen Zentralwellenlängen der Abtastimpulse gemessen und dazu der Spektrograph entsprechend verstellt. Bei den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit wurden 3 oder 4 verschiedene Messbereiche kombiniert, um den zu untersuchenden Bereich von 1280 cm^{-1} bis 1750 cm^{-1} abzudecken. Die Differenz zwischen den einzelnen Zentralwellenlängen hat ca. 500 nm betragen. Die Messbereiche wurden so gewählt, dass sie jeweils einen spektralen Überlapp von etwa 60 cm^{-1} hatten, um sie im Messprogramm besser verknüpfen zu können.

Bei Messungen im Mittelinfraroten muss die starke Absorption des Wasserdampfs in der Luft vermieden werden, weil sie die Detektion der Messsignale stören würde. Daher befindet sich der gesamte Aufbau nach der Erzeugung der mittelinfraroten Impulse in einer geschlossenen Probenkammer. Die Probenkammer, einschließlich Detektor und Spektrograph, wird mit Trockenluft gespült. Zu Beginn der Messungen liegt der Taupunkt in der Probenkammer bei etwa $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.6. Datenverarbeitung

Mit der vorhergehenden Mess- und Detektionsmethode werden somit vier verschiedene Signale (gemessen über die Energien der transmittierten Impulse) in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ und der Verzögerungszeit t_D detektiert:

- Abtastimpuls mit vorheriger Anregung durch den Anregungsimpuls (I_{am})

⁸ HgCdTe, Quecksilber-Cadmium-Tellurid, engl.: *Mercury Cadmium Telluride*

- Abtastimpuls mit geblocktem Anregungsimpuls (I_{ao})
- Referenzimpuls mit ungeblocktem Anregungsimpuls (I_{rm})
- Referenzimpuls mit geblocktem Anregungsimpuls (I_{ro})

Die Transmissionen für Abtastsignal (T_{sig}) und Referenzsignal (T_{ref}) ergeben sich folgendermaßen:

$$T_{sig}(\lambda, t_D) = \frac{\sum_{i=1}^N I_{am,i}(\lambda, t_D)}{\sum_{i=1}^N I_{ao,i}(\lambda, t_D)} \quad \text{und} \quad T_{ref}(\lambda, t_D) = \frac{\sum_{i=1}^N I_{rm,i}(\lambda, t_D)}{\sum_{i=1}^N I_{ro,i}(\lambda, t_D)}. \quad (3.2)$$

Zu jedem Verzögerungszeitpunkt t_D werden $N = 2000$ Laserschüsse gemessen, um das Signal-Rausch-Verhältnis durch Mittelung zu verbessern. T_{ref} wird zum Korrigieren des eigentlichen Messsignals T_{sig} verwendet, was die Messgenauigkeit erhöht. Hiermit werden beispielsweise Schwankungen der Energie der Abtastimpulse ausgeglichen. Für die weitere Auswertung der Daten lässt sich die Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t_D)$ folgendermaßen ausdrücken:

$$\Delta A(\lambda, t_D) = -\log\left(\frac{T_{sig}(\lambda, t_D)}{T_{ref}(\lambda, t_D)}\right). \quad (3.3)$$

Mit einem speziellen Programm, geschrieben in der Programmiersprache IDL⁹, wird anschließend eine globale multiexponentielle Datenanpassung durchgeführt [Spö01, Sat04].

Die betrachteten Daten sind Absorptionsänderungen, die von Übergängen zwischen verschiedenen Zuständen herrühren, die während der lichtinduzierten Reaktion eingenommen werden. Die Besetzungsänderungen und somit die Absorptionsänderungen können durch ein Ratengleichungssystem beschrieben werden, dessen Lösung eine Summe von Exponentialfunktionen ist [ZK93]. Die verwendete Modellfunktion bei der Datenanpassung ist eine Faltung aus dieser Summe von Exponentialfunktionen und der Kreuzkorrelationsfunktion $K(t_D - t)$ zwischen Anregungs- und Abtastimpuls:

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

Wenn angenommen wird, dass Anregungsimpulse und Abtastimpulse gaußförmig sind mit einer Kreuzkorrelationsbreite τ_{cc} , lässt sich obige Gleichung 3.4 zu folgender Fitfunktion umschreiben, wobei $\text{erf}(x)$ die Fehlerfunktion (engl.: *error function*) ist:

$$\Delta A(\lambda, t_D) = \sum_{i=1}^n a_i(\lambda, \tau_i) \cdot \exp\left(\frac{\tau_{cc}^2}{4\tau_i^2} - \frac{t_D}{\tau_i}\right) \cdot \frac{1}{2} \left[1 + \text{erf}\left(\frac{t_D}{\tau_{cc}} - \frac{\tau_{cc}}{2\tau_i}\right) \right], \quad (3.5)$$

$$\text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x \exp(-t^2) dt.$$

Beim Fitten werden die Faktoren $a_i(\lambda, \tau_i)$ an die Messdaten angepasst und liefern letztendlich die entsprechenden Amplitudenspektren (engl.: *decay associated difference spectra*, DADS) für die Zeitkonstanten τ_i und die Wellenlänge des Abtastimpulses λ .

⁹Interactive Data Language

3.4. Handhabung der Proben

Messbedingungen

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (23 °C) und in normaler Sauerstoffumgebung (21 %) durchgeführt. Davon ausgenommen sind die mit Trockenluft gespülten Probenkammern und Detektoren bei den zeitaufgelösten und den stationären Infrarotmessungen. Die Proben wurden bei allen Messungen in Pufferlösungen gelöst. Die Zusammensetzungen der Puffer unterscheiden sich und werden daher zu Beginn der jeweiligen Kapitel angegeben. Als Lösungsmittel wurde immer deuteriertes Wasser D₂O (99,9 %; Merck, Sigma-Aldrich) verwendet. H₂O eignet sich nicht als Lösungsmittel im Mittelinfraroten (1250 cm⁻¹ bis 1800 cm⁻¹), da es in diesem Spektralbereich einige starke Absorptionen der OH-Biegeschwingung gibt. In D₂O hingegen sind die Schwingungen zu niedrigeren Frequenzen (< 1250 cm⁻¹) verschoben und überlagern das Messsignal nicht. Die Verwendung von D₂O als Lösungsmittel führt allerdings dazu, dass ein schneller Austausch der H- und D-Atome zwischen deuteriertem Lösungsmittel und dem Puffer beziehungsweise der gelösten Probe erfolgt, was zur Bildung von HDO führt. Die Absorption der HDO-Moleküle lässt sich aber mithilfe von Korrekturspektren aus dem gemessenen Spektrum herauskorrigieren.

Durchflussküvette

Für die Infrarotmessungen wurden selbst angefertigte¹⁰ Küvetten benutzt. Ein schematischer Querschnitt einer solchen Küvette ist in Abbildung 3.4 a zu sehen. Die Probenlösung fließt zwischen zwei CaF₂-Fenster (Dicke 2 mm, Durchmesser 30 mm) hindurch. Eines der Fenster hat zwei Bohrungen für Ein- und Austritt der Probenlösung. CaF₂ eignet sich besonders gut als Fenstermaterial, weil es eine hohe Transmission sowohl im UV als auch im Infraroten aufweist. Dies ist notwendig, um bei den Anrege-Abtast-Messungen im UV anregen und im IR abtasten zu können. Die beiden Fenster werden von einer dünnen Folie aus Teflon (PTFE, Polytetrafluorethylen) auf Abstand gehalten. Die Dicke des Abstandshalters (ca. 110 µm, wenn nicht anders angegeben) definiert die Schichtdicke der Küvette. Je nach Messung (stationär oder zeitaufgelöst) unterscheiden sich die Abstandshalter in ihrer Form (siehe Abbildung 3.4 b). Bei den stationären Küvetten wird eine Teflon-Scheibe mit großer Apertur (Durchmesser 10 mm) benutzt, was die Aufnahme von Spektren im FTIR- bzw. UV/Vis-Spektralphotometer erleichtert. Bei den zeitaufgelösten Küvetten wird eine Scheibe mit einem schmalen Kanal (Breite ca. 2 mm) benutzt, damit ein schnellerer Austausch der Probenlösung zwischen den Abtastimpulsen erfolgen kann, d. h. innerhalb 1 ms.

Über Teflon-Schläuche wird die Küvette mit dem Probenbehälter verbunden. Für die Komponenten, die mit der Probenlösung in Kontakt stehen, ist Teflon als Material sehr gut geeignet, weil es chemisch inert ist. Der vom Probenbehälter zur Küvette führende Schlauch wird an eine peristaltische Pumpe (Ismatec, Cole-Parmer) angeschlossen, die die

¹⁰Entwickelt am Lehrstuhl für BioMolekulare Optik.

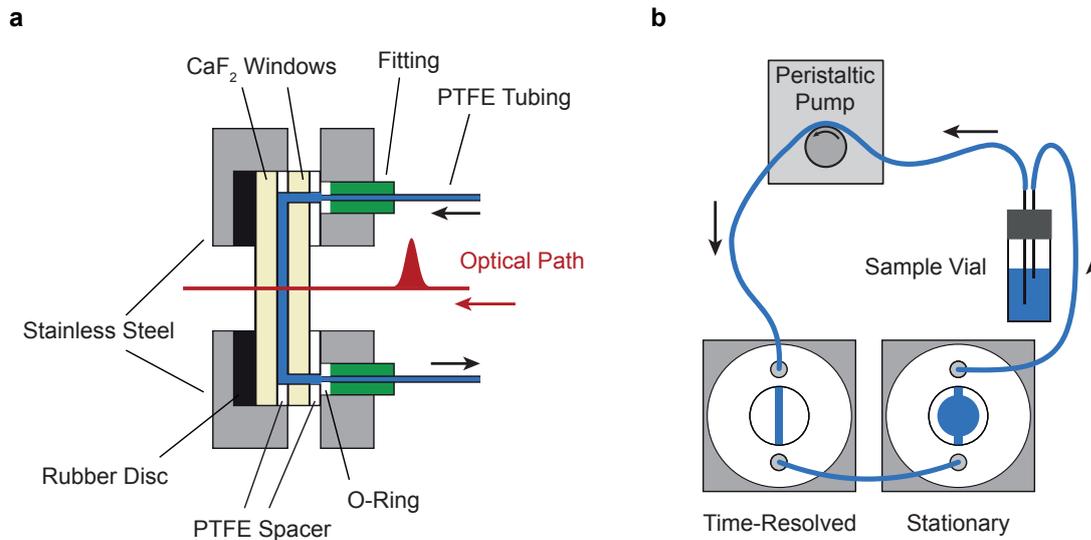


Abbildung 3.4.: (a) Schematischer Querschnitt der verwendeten Durchflussküvette. Das Probenvolumen (blau) fließt zwischen zwei CaF₂-Scheiben hindurch. (b) Skizze des Probenkreislaufs mit Probenbehälter (Sample Vial), peristaltischer Pumpe und zwei Durchflussküvetten mit unterschiedlichen Teflon-Abstandshaltern für jeweils stationäre (Stationary) und zeitaufgelöste (Time-Resolved) Experimente. [Abbildung modifiziert von [Kol03].]

Probenlösung (1,3 mL bis 3 mL) durch die Durchflussküvette pumpt. Bei den stationären Experimenten ist ein kontinuierlicher Durchfluss wichtig, um das gesamte Probenvolumen während der Messung homogen zu belichten. Bei den Anrege-Abtast-Experimenten wird durch den Austausch sichergestellt, dass zwischen zwei Abtastimpulsen das angeregte Probenvolumen ausgetauscht wird. Hierbei wurde ein Kreislauf benutzt, bei dem eine Küvette für zeitaufgelöste Messungen mit einer für stationäre Messungen verbunden war (ebenfalls über Teflon-Schläuche), um ohne Öffnen des Kreislaufs stationäre Kontrollmessungen durchführen zu können. In Abbildung 3.4 b ist ein solcher Probenkreislauf schematisch gezeigt. Als Probenbehälter wurde bei den stationären Messungen eine Quarzglas- oder Quarzküvette (siehe Seite 29) benutzt, in der die Probe bei Bedarf auch belichtet werden konnte.

4. Triplet-Photosensibilisierung und CPD-Bildung in Pyrimidin-Dimeren

Der CPD-Schaden ist der häufigste UV-induzierte Schaden in der DNA [Dou00]. Dessen Bildung zwischen zwei Thymin-Basen wurde bereits in Monomeren (TMP), Dimeren (TpT) und Oligomeren ((dT)₁₈) sowie in natürlicher DNA untersucht [Dou00, SGZ15]. Bei einer UV-C-Anregung der DNA-Basen wird der CPD-Schaden überwiegend aus dem angeregten Singulett-Zustand des Thymins gebildet [Sch09]. Im Gegensatz zu dieser direkten Anregung wird bei der Triplet-Photosensibilisierung ein Photosensibilisator im UV-A-Bereich angeregt, in dem die DNA-Basen nicht absorbieren. Vom angeregten Triplet-Zustand des Photosensibilisators kann ein Triplet-Triplet Energietransfer auf eine Thymin-Base erfolgen. Aus dem angeregten Triplet-Zustand des Thymins kann es ebenfalls zur Bildung des CPD-Schadens kommen. Diese photosensibilisierte CPD-Bildung wurde detailliert an TpT untersucht [Liu16b]. Als Photosensibilisator wurde dabei ein Derivat des Acetophenons verwendet. CPD-Schäden können allerdings nicht nur zwischen zwei Thymin-Basen, sondern auch zwischen einer Thymin- und einer Cytosin-Base entstehen. Solche CPD-Schäden sind besonders mutagen, weil es zu einer Desaminierung des Cytosins zum Uracil kommen kann (siehe Abbildung 2.9).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die photosensibilisierte Bildung von CPD-Schäden in den Pyrimidin-Dimeren TpC und CpT untersucht. In diesem Kapitel werden zunächst die stationäre Charakterisierung der Pyrimidin-Dimere und des verwendeten Photosensibilisators sowie die durchgeführten photosensibilisierten Belichtungsmessungen an TpC und CpT vorgestellt. Anschließend werden die Quantenausbeuten der CPD-Bildung aus dem Triplet-Zustand bestimmt und die Desaminierung des Cytosins in den gebildeten CPD-Schäden untersucht.

4.1. Stationäre Charakterisierung von TpC und CpT

Probenpräparation

Bei den in diesem und im nächsten Kapitel präsentierten Experimenten wurden die Dinukleosidmonophosphate TpC, CpT, TpT und CpC verwendet. Sie wurden in lyophilisierter Form kommerziell erworben (metabion international AG) und ohne Modifikationen in einer Phosphat-Pufferlösung (D₂O, 50 mM KH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄; pH = 7) gelöst. Die unterschiedlichen Konzentrationen der Probenlösungen werden bei den jeweiligen Messungen angegeben.

4. Triplett-Photosensibilisierung und CPD-Bildung in Pyrimidin-Dimeren

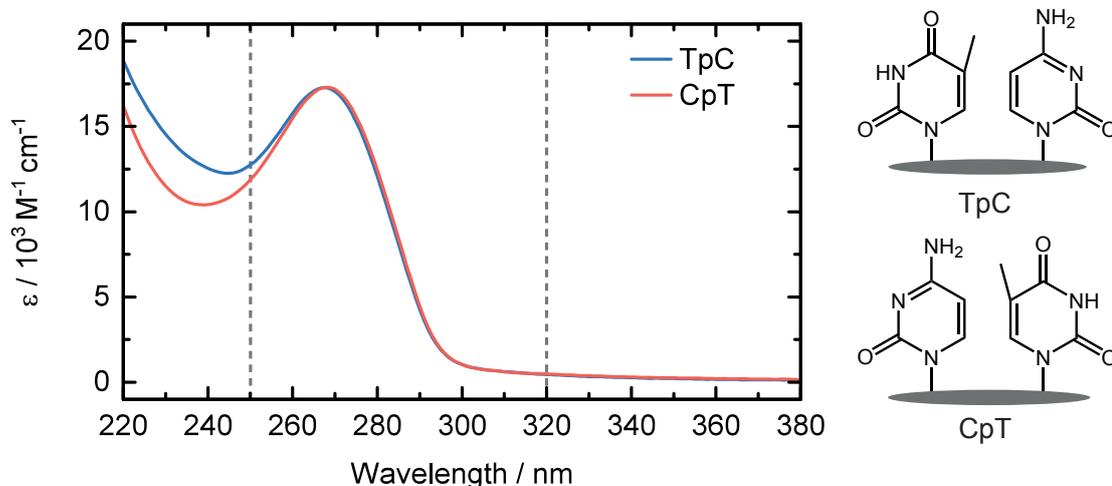


Abbildung 4.1.: Absorptionsspektren von TpC und CpT (gemessen bei $c = 2,5$ mm, $d = 110$ μm) und deren Strukturformeln (rechts). Der Extinktionskoeffizient ε ist pro Dimer angegeben. Graue Linien markieren die Anregungswellenlängen.

Die chemischen Bezeichnungen der Pyrimidin-Dimere lauten:

TpC Thymidyl-(3'-5')-2'-desoxycytidin

CpT 2'-Desoxycytidyl-(3'-5')-thymidin

TpT Thymidyl-(3'-5')-thymidin

CpC 2'-Desoxycytidyl-(3'-5')-2'-desoxycytidin

Für die Messungen mit Photosensibilisator wurde das kommerziell erworbene Acetophenonderivat 2'-Methoxyacetophenon (2-M) (Sigma-Aldrich) ebenfalls in der genannten Phosphat-Pufferlösung gelöst und mit der Probenlösung vermischt ($c(2\text{-M}) = 5$ mm). In Abschnitt 4.2 wird der Photosensibilisator 2-M näher beschrieben und es werden dessen Absorptionsspektren gezeigt. Nachfolgend wird die stationäre Charakterisierung der Pyrimidin-Dimere im UV/Vis- sowie IR-Bereich präsentiert.

UV/Vis-Bereich

In Abbildung 4.1 sind die Absorptionsspektren von TpC und CpT im UV-Bereich und deren Strukturformeln abgebildet. Der Extinktionskoeffizient ε ist pro Dimer angegeben. Dessen Bestimmung erfolgte ausgehend von den Konzentrationsangaben des Herstellers zu den lyophilisierten Proben. Bei 260 nm beträgt ε etwa $15\,770\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ für TpC und $15\,470\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ für CpT. Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit der Summe der aus der Literatur bekannten Werte der Extinktionskoeffizienten für die Monomere CMP (Cytidin-5'-monophosphat) ($7070\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) und TMP (Thymidin-5'-monophosphat) ($8560\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) bei 260 nm ($\varepsilon_{\text{TMP}} + \varepsilon_{\text{CMP}} = 15\,630\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) [CB04].

Wie bei allen Pyrimidin-Basen, ist das Absorptionsmaximum bei etwa 266 nm auf einen $^1\pi\pi^*$ -Übergang zurückzuführen. Die Quantenausbeute der Interkombination in den $^3\pi\pi^*$ -Zustand ist für TMP wellenlängenabhängig und nimmt zu kleineren Wellenlängen deutlich zu [Ban12]. So liegt die Tripletquantenausbeute bei einer Anregungswellenlänge von 250 nm etwa zwischen 3 % und 4 %. Im Wellenlängenbereich über 300 nm ist die Absorption beider Dimere zu vernachlässigen. Anhand dieser Absorptionseigenschaften wurden die Anregungswellenlängen für die jeweiligen Experimente im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt.

Die zeitaufgelösten Messungen an TpC und CpT wurden ohne Photosensibilisator mit Anregungsimpulsen bei $\lambda = 250$ nm durchgeführt, um die CPD-Bildung aus dem Triplet-Zustand zu untersuchen (siehe Kapitel 5). In allen photosensibilisierten Messungen, sowohl stationär als auch zeitaufgelöst, wurde eine Anregungswellenlänge im UV-A-Bereich bei $\lambda = 320$ nm gewählt, um eine selektive Anregung des Photosensibilisators zu erzielen. Bei dieser Wellenlänge weist der verwendete Photosensibilisator 2-M im Gegensatz zu den Dimeren eine breite Absorptionsbande auf (siehe Abbildung 4.5 a), wodurch die direkte Anregung der Dimere gering ist. Beide genannten Anregungswellenlängen sind in Abbildung 4.1 als graue Linien eingezeichnet.

IR-Bereich

Als weitere Charakterisierung wurden stationäre IR-Spektren der verwendeten Pyrimidin-Dimere aufgenommen. In Abschnitt 3.4 wurde bereits erläutert, dass von den gemessenen IR-Spektren skalierte Korrekturspektren subtrahiert werden, um die Absorption der HDO-Moleküle herauszukorrigieren. Darüber hinaus war es bei einigen der gezeigten IR-Spektren notwendig, weitere Korrekturen vorzunehmen. Teilweise konnten Spuren von Acetat spektral nachgewiesen werden, die auf die Synthese und Lyophilisation der Pyrimidin-Dimere zurückzuführen sind. Für die Korrektur wurde jeweils ein skaliertes Spektrum eines Acetat-Puffers vom Probenspektrum subtrahiert. Die Acetat-Korrektur wird in Abschnitt A.1 genauer beschrieben.

Zuordnung der Schwingungsbanden

Die Absorptionsspektren von TpC und CpT (jeweils 5 mm pro Dimer) sowie die aufeinander skalierten Spektren von TpT und CpC sind in Abbildung 4.2 im Mittelinfraroten abgebildet. In diesem Kapitel stehen zunächst die Dimere TpC und CpT im Vordergrund. In Tabelle 4.1 ist die Zuordnung ihrer Schwingungsmoden tabellarisch zusammengefasst. Bei einigen Banden gibt es geringe Unterschiede von bis zu 5 Wellenzahlen zwischen TpC und CpT. Nachfolgend werden für solche Banden jeweils beide Werte gemäß der Reihenfolge in Tabelle 4.1 angegeben (erst TpC, dann CpT). Die ebenfalls aufgeführten Schwingungsbanden der Monomere TMP und CMP ermöglichen eine Zuordnung der Banden von TpC und CpT zu einer der zwei Basen. Insbesondere im Bereich von 1600 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1} ist eine breite Überlagerung der Schwingungsbanden von Thymin und Cytosin zu beobachten.

4. Triplett-Photosensibilisierung und CPD-Bildung in Pyrimidin-Dimeren

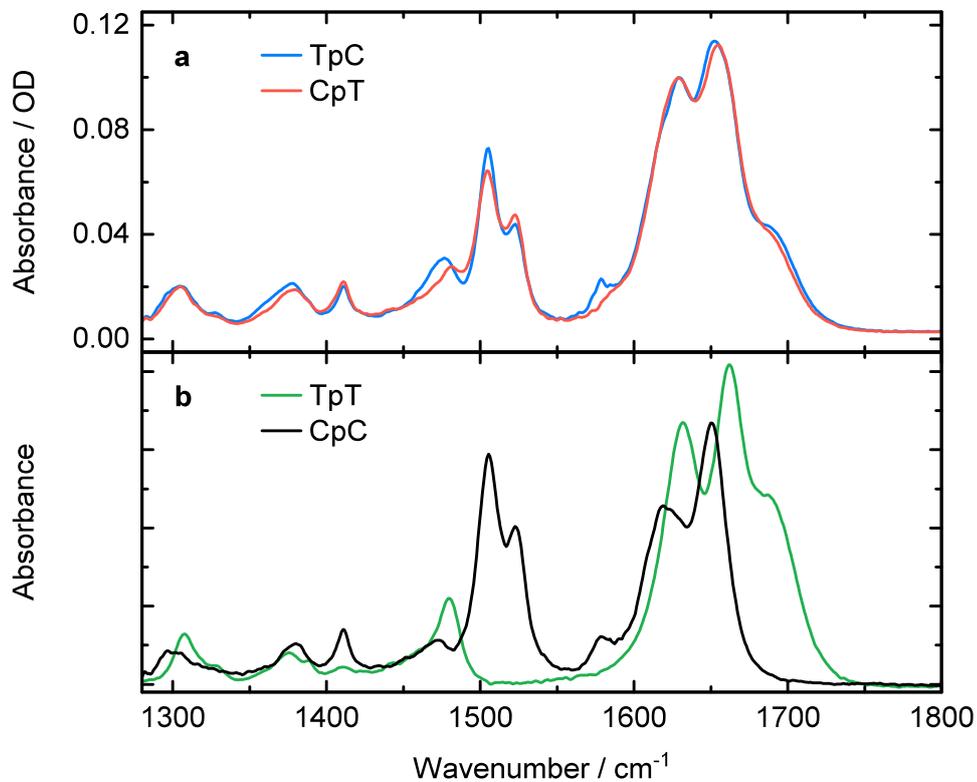


Abbildung 4.2.: (a) Absorptionsspektren von TpC und CpT, jeweils 5 mm pro Dimer. (b) Absorptionsspektren von TpT und CpC.

Tabelle 4.1.: Zuordnung der Schwingungsmoden für TpC und CpT in D₂O mit Vergleichswerten für TMP und CMP [PJT11, BSG03].

TpC / CpT	Wellenzahl [cm ⁻¹]		Bandenzuordnung
	TMP	CMP	
1476 / 1481	1480	–	C4-C5
1505	–	1504	N3=C4-N4
1522	–	1524	planare Ringschwingung
1579 / 1583	–	1583	uneindeutige Kombination
1619	–	1614	N3=C4-C5=C6
1630 / 1629	1629	–	C5=C6, planare Ringschwingung
1652 / 1655	–	1651	C2=O2
1663	1663	–	C4=O4
1690 / 1689	1690	–	C2=O2

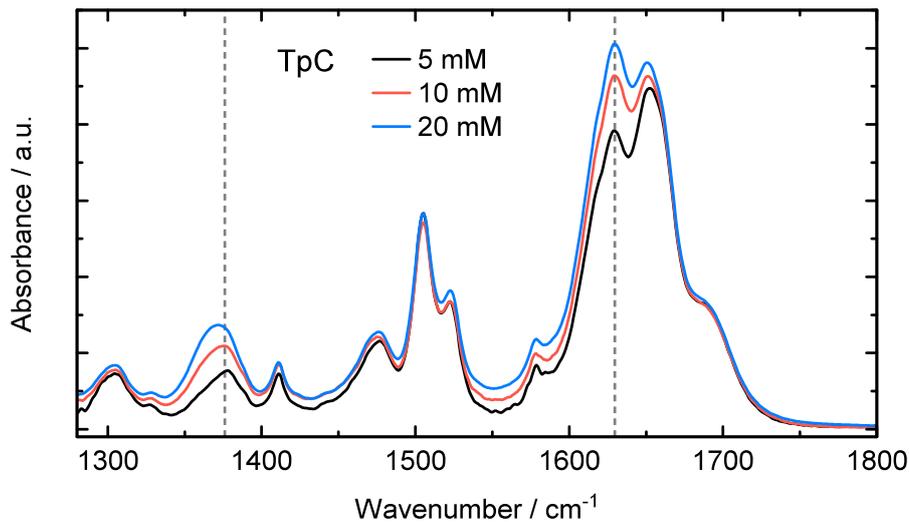


Abbildung 4.3.: Skalierte Absorptionsspektren von TpC bei verschiedenen Konzentrationen. Mit zunehmender Konzentration zeigen sich Aggregationseffekte bei 1370 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} (graue Linien).

Die Zuordnung der Schwingungsbanden beschränkt sich auf den Bereich zwischen ca. 1480 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} , in dem die Schwingungen ausgeprägter und eindeutiger zuzuordnen sind als im niederfrequenten Bereich zwischen 1300 cm^{-1} und 1500 cm^{-1} [PJT11, BSG03, LGT87]. Unterhalb von 1500 cm^{-1} sind die Zuordnungen in der Literatur mehrdeutig, da die Schwingungsmoden stark delocalisiert sind. In diesem Bereich treten überwiegend Schwingungen der Desoxyribosen auf, welche sehr sensitiv gegenüber Konformationsänderungen sind. Der Bereich zwischen 1480 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} ist hingegen von Schwingungen der Basen geprägt.

Die Bande bei $1476\text{ cm}^{-1}/1481\text{ cm}^{-1}$ ist auf eine C4-C5-Schwingung des Thymins zurückzuführen. Im Bereich zwischen 1505 cm^{-1} und 1619 cm^{-1} sind Banden von Cytosin zu beobachten, die durch verschiedene C-N- und Ringschwingungen hervorgerufen werden. Die sehr schwache Bande bei 1580 cm^{-1} lässt sich nicht eindeutig einer Schwingung zuordnen [PJT11]. Eine durch Ringschwingungen des Thymins hervorgerufene Bande befindet sich bei $1630\text{ cm}^{-1}/1629\text{ cm}^{-1}$ und eine C2=O2-Streckschwingung des Cytosins bei $1652\text{ cm}^{-1}/1655\text{ cm}^{-1}$. Carbonyl-Streckschwingungen des Thymins bewirken die Bande bei 1663 cm^{-1} (C4=O4) und die Schulter bei $1690\text{ cm}^{-1}/1689\text{ cm}^{-1}$ (C2=O2).

Aggregationseffekte

Konzentrationsabhängige Messungen haben gezeigt, dass es bei TpC zu Aggregationseffekten kommen kann, die zu Veränderungen in den Absorptionsspektren führen. In Abbildung 4.3 sind skalierte Spektren von TpC bei den Konzentrationen 5 mM, 10 mM und 20 mM (jeweils pro Dimer) abgebildet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Spektren

4. Triplet-Photosensibilisierung und CPD-Bildung in Pyrimidin-Dimeren

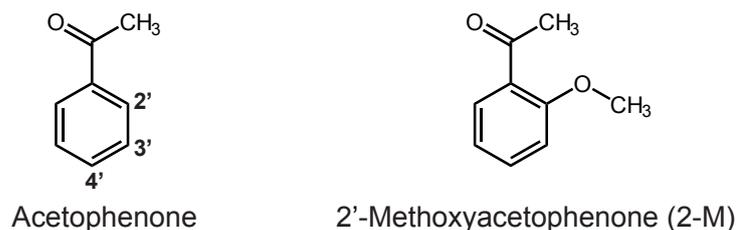


Abbildung 4.4.: Strukturformel des Photosensibilisators 2'-Methoxyacetophenon (2-M, rechts), eines Derivats von Acetophenon (links).

bei 5 mm und 10 mm auf das Spektrum bei 20 mm skaliert. Die Skalierung erfolgte im Rahmen der Dosiergenauigkeit (Fehler < 10 %) anhand der Konzentrationen. Insbesondere bei 1370 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} sind Veränderungen zu beobachten. Bei 1370 cm^{-1} ist zu erkennen, dass sich die Bande mit steigender Konzentration zu niedrigeren Wellenzahlen verschiebt. Mit zunehmender Konzentration kommt es zudem zu einer Umkehr des relativen Amplitudenverhältnisses der zwei Banden bei 1640 cm^{-1} und 1660 cm^{-1} (siehe Abbildung 4.3). Bei den photosensibilisierten Messungen an TpC und CpT wurden Konzentrationen von 10 mm pro Dimer verwendet, um einen ausreichend hohen Triplet-Triplet Energietransfer vom Photosensibilisator auf die Dimere zu ermöglichen. Die beschriebenen Aggregationseffekte werden somit auch in den Spektren der nachfolgend präsentierten Messungen beobachtet.

4.2. Der Triplet-Photosensibilisator 2-M

Das Prinzip der Photosensibilisierung wurde bereits in Abschnitt 2.4 beschrieben. Dabei wurde auch auf Triplet-Photosensibilisatoren näher eingegangen, mit denen die Anregung des Triplet-Zustands von Akzeptormolekülen über Triplet-Triplet Energietransfer möglich ist. Dieses Verfahren ist von besonderer Bedeutung für die Experimente zur photosensibilisierten CPD-Bildung in Pyrimidin-Dimeren, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. In diesem Abschnitt wird der bei den Messungen verwendete Photosensibilisator, welcher ein Derivat des Acetophenons ist, näher beschrieben und sowohl im UV/Vis- als auch im IR-Bereich charakterisiert.

Insbesondere bei zeitaufgelösten photosensibilisierten Messungen an DNA-Proben sollte der Photosensibilisator eine hohe Absorption im UV-A-Bereich aufweisen, in dem die Nucleobasen im Wesentlichen nicht absorbieren. In der Dissertation von L. Liu wurden die Eigenschaften verschiedener Acetophenonderivate¹ untersucht [Liu16a], um einen geeigneten Photosensibilisator für stationäre und zeitaufgelöste Experimente an Pyrimidin-Dimeren auszuwählen. Von den Derivaten, bei denen ein Triplet-Triplet Energietransfer auf TpT beobachtet wurde, hat sich 2'-Methoxyacetophenon (2-M) als effizientester Triplet-

¹2'-Hydroxyacetophenon, 4'-Hydroxyacetophenon, 2'-Methoxyacetophenon, 3'-Methoxyacetophenon, 4'-Methoxyacetophenon

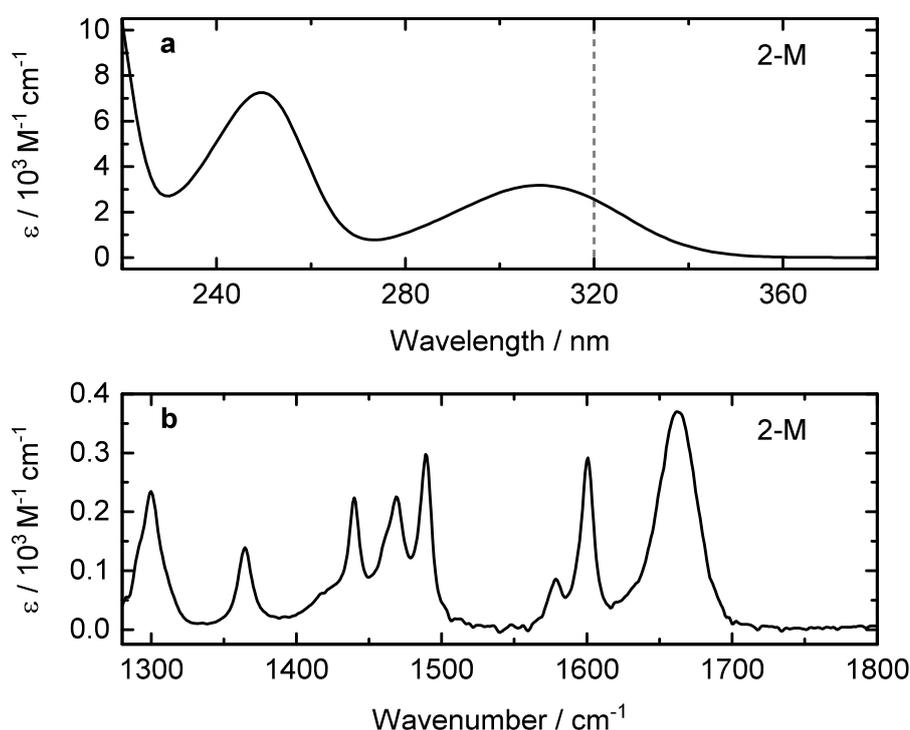


Abbildung 4.5.: Absorptionsspektren von 2'-Methoxyacetophenon (2-M) im UV/Vis-Bereich (a) und IR-Bereich (b). Die graue Linie in (a) markiert die Anregungswellenlänge bei den photosensibilisierten Messungen.

Photosensibilisator für die Photosensibilisierung von DNA-Basen erwiesen. Für Details wird auf folgende Veröffentlichungen verwiesen: [Liu15, Liu16b, Liu16a].

Die Strukturformeln von Acetophenon und 2-M sind in Abbildung 4.4 gezeigt. In Abbildung 4.5 sind die Absorptionsspektren von 2-M im UV/Vis- und IR-Bereich abgebildet. Zur Zuordnung der Schwingungsmoden im IR-Bereich wird auf [Liu16a] verwiesen. Im Vergleich zu Acetophenon zeichnet sich 2-M durch eine höhere Absorption im UV-A-Bereich aus. Bei 320 nm ist der Extinktionskoeffizient von 2-M $\epsilon = 2560 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ etwa zwei Größenordnungen größer als der Extinktionskoeffizient von TpT ($\epsilon = 10 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pro Base). Dadurch ist eine gezielte Anregung von 2-M bei einer Wellenlänge von 320 nm möglich (graue Linie in Abbildung 4.5). Zudem weist 2-M eine gute Wasserlöslichkeit auf, was für Messungen unter physiologischen Bedingungen essentiell ist.

Zeitaufgelöste Experimente haben gezeigt, dass nach UV-Anregung zunächst der angeregte Singulett-Zustand bevölkert wird, aus dem eine Interkombination in den Triplet-Zustand erfolgen kann [Liu15]. Bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm hat 2-M eine hohe Quantenausbeute der Interkombination von $\Phi_{ISC} = 97 \%$. Der Triplet-Zustand wird mit einer Zeitkonstanten von 680 ps bevölkert und hat eine Lebensdauer von 400 ns. Die relativ lange Lebensdauer des angeregten Triplet-Zustands erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein angeregtes 2-M in ausreichend kleiner Distanz zu einem Akzeptormolekül für einen

Triplet-Triplet-Energietransfer befindet, auch wenn zuvor erst eine räumliche Umordnung der Moleküle stattfinden muss. Da der Triplet-Triplet-Energietransfer Diffusion zwischen Donor und Akzeptor hin zu kleinen Abständen erfordert, ist dessen Quantenausbeute zudem von der Konzentration der Akzeptormoleküle abhängig [Liu16a].

Ein weiteres wichtiges Kriterium ist die Triplet-Energie des Photosensibilisators, die für einen Triplet-Triplet-Energietransfer höher sein muss als die Triplet-Energie des Akzeptors. Die zuvor genannten Untersuchungen zur photosensibilisierten CPD-Bildung wurden mit 2-M als Photosensibilisator und TpT als Akzeptor durchgeführt (siehe [Liu16b, Liu16a, Liu15]). Da Thymin die niedrigste Triplet-Energie von allen DNA-Basen hat (siehe Unterabschnitt 2.2.2) [Lam73, GWR96], kann 2-M für eine effiziente Triplet-Photosensibilisierung von Thymin eingesetzt werden.

Die nachfolgend präsentierten photosensibilisierten Belichtungsexperimente an den Pyrimidin-Dimeren TpC und CpT zeigen, dass 2-M auch für die Photosensibilisierung von TpC und CpT geeignet ist. Aufgrund der Triplet-Energien der beiden Basen wird angenommen, dass es auch bei TpC und CpT zu einem Triplet-Triplet-Energietransfer von 2-M auf das Thymin und nicht auf das Cytosin kommt. Die Reaktionskinetiken der Anregung des Triplet-Zustands von TpC und CpT wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht und werden in Kapitel 5 präsentiert. Für die Auswertung der stationären Messungen sind die detaillierten Reaktionskinetiken zunächst irrelevant.

4.3. Photosensibilisierte Belichtungsexperimente an TpC und CpT

Basierend auf den Experimenten zur Triplet-Photosensibilisierung des Dinukleosidmonophosphats TpT mit dem Photosensibilisator 2-M [Liu16b, Liu16a] wurde im Rahmen dieser Arbeit die UV-induzierte Photosensibilisierung von TpC und CpT untersucht. TpC und CpT enthalten jeweils die Nukleobase mit der höchsten (Cytosin) und der niedrigsten Triplet-Energie (Thymin) (siehe Unterabschnitt 2.2.2). Die Studien an TpT haben gezeigt, dass es zu einer Anregung des Triplet-Zustands von Thymin aufgrund eines Triplet-Triplet-Energietransfers vom angeregten 2-M kommt. Aus diesem angeregten Triplet des Thymins bildet sich in TpT mit einer Quantenausbeute von 4 % ein CPD-Schaden (siehe Abbildung 2.6). In den im Folgenden präsentierten stationären Messungen wurde die Bildung von CPD-Schäden in TpC und CpT nach deren Photosensibilisierung mit 2-M untersucht.

4.3.1. Belichtung und Schadensbildung

Bei den hier vorgestellten Experimenten an TpC und CpT ist der Triplet-Triplet-Energietransfer vom Photosensibilisator 2-M essentiell für die Anregung der Dimere. In Abschnitt 2.4 wurde beschrieben, dass es durch molekularen Sauerstoff O₂ zum Quenchen

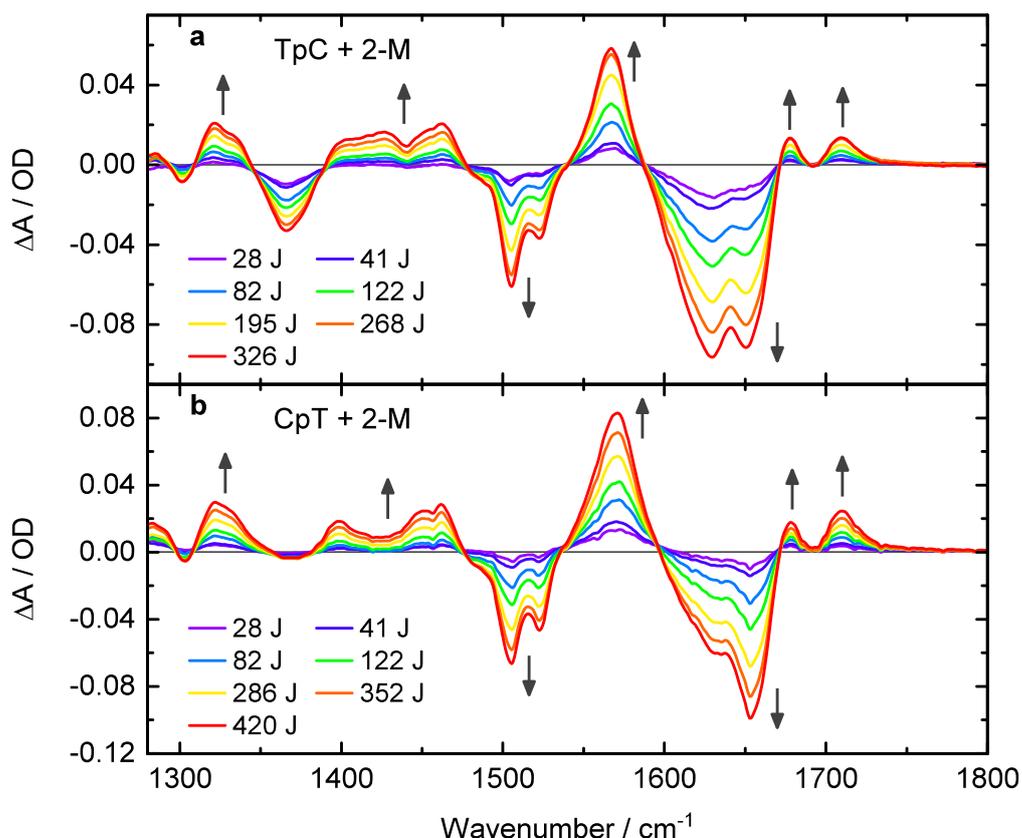


Abbildung 4.6.: Absorptionsdifferenzspektren der photosensibilisierten Belichtung von TpC (a) und CpT (b) (jeweils $c = 10$ mm pro Dimer, $c(2-M) = 5$ mm, Anregungswellenlänge $\lambda = 320$ nm) in Abhängigkeit von der Belichtungs-dosis. Absorptionsszu- und abnahmen sind mit Pfeilen markiert.

des Triplett-Zustands eines Photosensibilisators kommen kann [TRS91]. Ein potentielles Quenchen des Triplett-Zustands von 2-M durch Sauerstoff wurde im Rahmen der Untersuchungen zur Photosensibilisierung von TpT überprüft [Liu16b, Liu16a]. Dabei wurde sowohl bei normaler Sauerstoffumgebung ($c(\text{O}_2) = 21\%$) als auch bei einer um den Faktor 3 geringeren Sauerstoffkonzentration gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktionsquantenausbeute der photosensibilisierten CPD-Bildung in TpT nicht von der Sauerstoffkonzentration beeinflusst wird. Daher wurden die photosensibilisierten Belichtungsexperimente an TpC und CpT bei normaler Sauerstoffumgebung durchgeführt.

Bei den nachfolgend gezeigten Messungen wurde jeweils eine Lösung ($V = 1,3$ mL) mit TpC bzw. CpT ($c = 10$ mm pro Dimer) und 2-M ($c = 5$ mm) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 320$ nm mit einer Belichtungs-dosis von bis zu 326 J bzw. 420 J belichtet. Es wurde ein Probenkreislauf verwendet, welcher in Abschnitt 3.4 bereits vorgestellt wurde. Die Probe wurde durch eine Durchflussküvette (Schichtdicke $d = 100$ μm) und eine Quarzglasküvette ($d = 1$ cm) mit einer peristaltischen Pumpe kontinuierlich gepumpt. Die Belichtung der Probenlösung erfolgte in der Quarzglasküvette, da bei deren Schichtdicke von $d = 1$ cm

4. Triplet-Photosensibilisierung und CPD-Bildung in Pyrimidin-Dimeren

Tabelle 4.2.: Belichtungsdauer und zugehörige Belichtungsdosis der photosensibilisierten Belichtungsmessungen an TpC und CpT.

TpC		CpT	
Dauer [min]	Dosis [J]	Dauer [min]	Dosis [J]
20	28	30	28
30	41	45	41
60	82	90	82
90	122	135	122
145	195	180	286
200	268	225	352
245	326	270	420

effektiv die gesamte eingestrahlte Leistung P_0 von der Probe absorbiert wird. In der Durchflussküvette wurden die IR-Spektren aufgenommen.

Die Absorptionsdifferenzspektren dieser Belichtungsmessungen wurden bestimmt, indem von jedem Absorptionsspektrum jeweils das Spektrum vor der Belichtung subtrahiert wurde. In Abbildung 4.6 sind diese Absorptionsdifferenzspektren in Abhängigkeit von der Belichtungsdosis abgebildet. Die Unterschiede in den Belichtungsdosen zwischen TpC und CpT sind auf Leistungsänderungen zurückzuführen, die bei den weiteren Auswertungen berücksichtigt wurden. In Tabelle 4.2 sind die Belichtungsdosen mit den zugehörigen Belichtungsdauern aufgeführt. In den Absorptionsdifferenzspektren in Abbildung 4.6 sind die relevanten Bandenzu- und abnahmen mit Pfeilen markiert. Zwischen 1475 cm^{-1} und 1530 cm^{-1} sowie zwischen 1600 cm^{-1} und 1680 cm^{-1} ist das Ausbleichen der Grundzustandsbanden von Thymin und Cytosin zu erkennen (siehe Tabelle 4.1 für die Zuordnung der Schwingungsbanden). Um 1370 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} weisen die Ausbleichsbanden von TpC und CpT Unterschiede auf. Diese Unterschiede sind auf die zuvor diskutierten Aggregationseffekte (siehe Abbildung 4.3) von TpC bei der verwendeten Konzentration von 10 mM zurückzuführen. Bei CpT wurden keine derartigen Aggregationseffekte beobachtet. Die Gründe dafür wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Im Laufe der Belichtung ist die Bildung der charakteristischen CPD-Markerbanden im Fingerprint-Bereich zwischen 1300 cm^{-1} und 1500 cm^{-1} zu beobachten. Diese Markerbanden sind bereits von den Untersuchungen an TpT und $(dT)_{18}$ bekannt und befinden sich bei 1320 cm^{-1} , 1402 cm^{-1} und 1465 cm^{-1} [Sch07, Liu16b]. Auch die Zunahme der zwei Banden im Bereich der Carbonyl-Streckschwingungen bei 1678 cm^{-1} und 1710 cm^{-1} ist bei der Belichtung von TpC und CpT vorhanden.

Zusätzlich zu den bekannten CPD-Markerbanden zeigt sich in den Belichtungsspektren von TpC und CpT die Bildung einer weiteren Produktbande um 1570 cm^{-1} , die als Indiz für die Bildung von CPD-Schäden gewertet werden kann. Bei der Bildung des CPD-Schadens zwischen zwei Pyrimidinen kommt es zu einer Cycloaddition zwischen den $C5=C6$ -

Doppelbindungen der beiden Basen (siehe Abbildung 2.6). Durch die Cycloaddition ändert sich das konjugierte π -System der Pyrimidinringe, was bei Cytosin-Basen Auswirkungen auf die C4=N3-Doppelbindung hat. Quantenchemische Berechnungen, die von Dr. Wolfgang Schreier mit der Computerchemie-Software *gaussian 03* [M J04] durchgeführt wurden (Details siehe [Gon19]), haben gezeigt, dass sich die Produktbande um 1570 cm^{-1} einer Schwingungsbande dieser Bindung zuordnen lässt.

4.3.2. Quantenausbeute der CPD-Bildung

Von den Untersuchungen an TpT ist bekannt, dass die Quantenausbeute der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand des Thymins bei dessen direkter Anregung bei 4 % liegt [Liu16b]. Die Abschätzung der Reaktionsquantenausbeute für die photosensibilisierte CPD-Bildung in TpC und CpT (siehe Belichtungsdaten in Abbildung 4.6) wird im Folgenden erklärt.

Reaktionsquantenausbeute

Die Reaktionsquantenausbeute Φ wird als das Verhältnis aus der Anzahl der umgesetzten Moleküle pro Zeiteinheit N_U und der Anzahl der absorbierten Photonen pro Zeiteinheit N_{Ph} formuliert: $\Phi = N_U/N_{Ph}$. Die Zahl der absorbierten Photonen N_{Ph} wird aus der Belichtungsleistung P_0 bei der einstrahlenden Wellenlänge λ und der Energie eines Photons E_{Photon} bei ebendieser Wellenlänge berechnet, wobei $h = 6,6261 \times 10^{-34}\text{ J s}$ das Planck'sche Wirkungsquantum und $c = 3 \times 10^8\text{ m/s}$ die Lichtgeschwindigkeit ist:

$$N_{Ph} = \frac{P_0}{E_{\text{Photon}}} = \frac{P_0 \cdot \lambda}{h \cdot c} \quad \text{mit} \quad E_{\text{Photon}} = \frac{h \cdot c}{\lambda}. \quad (4.1)$$

Die Zahl der pro Zeiteinheit umgesetzten Moleküle N_U in der Lösung ist:

$$N_U = V \cdot N_A \cdot \frac{\Delta c}{\Delta t} = V \cdot N_A \cdot \frac{\Delta A}{d \cdot \Delta \varepsilon \cdot \Delta t}, \quad (4.2)$$

wobei V das Probenvolumen, $N_A = 6,0221 \times 10^{23}\text{ mol}^{-1}$ die Avogadro-Konstante und $\Delta c/\Delta t$ die Konzentrationsänderung des Photoprodukts pro Zeiteinheit ist, die sich mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} \quad (4.3)$$

auch in Abhängigkeit von der Absorptionsänderung pro Zeiteinheit $\Delta A/\Delta t$ ausdrücken lässt. $\Delta \varepsilon$ ist die Differenz der Extinktionskoeffizienten zwischen Ausgangsmolekül und dem geschädigten Molekül und d die Schichtdicke der Küvette. Für die Reaktionsquantenausbeute Φ gilt somit:

$$\Phi = \frac{N_U}{N_{Ph}} = \frac{h \cdot c}{P_0 \cdot \lambda} \cdot V \cdot N_A \cdot \frac{\Delta A}{d \cdot \Delta \varepsilon \cdot \Delta t}. \quad (4.4)$$

Diese Gleichung gilt allerdings nur für den Fall, dass die eingestrahlte Laserleistung P_0 konstant ist. Anhand der Daten in Tabelle 4.2 ist zu sehen, dass bei den Belichtungsmessungen an TpC und CpT P_0 nur bei niedrigen Belichtungs Dosen (bis 122 J) konstant war.

4. Triplett-Photosensibilisierung und CPD-Bildung in Pyrimidin-Dimeren

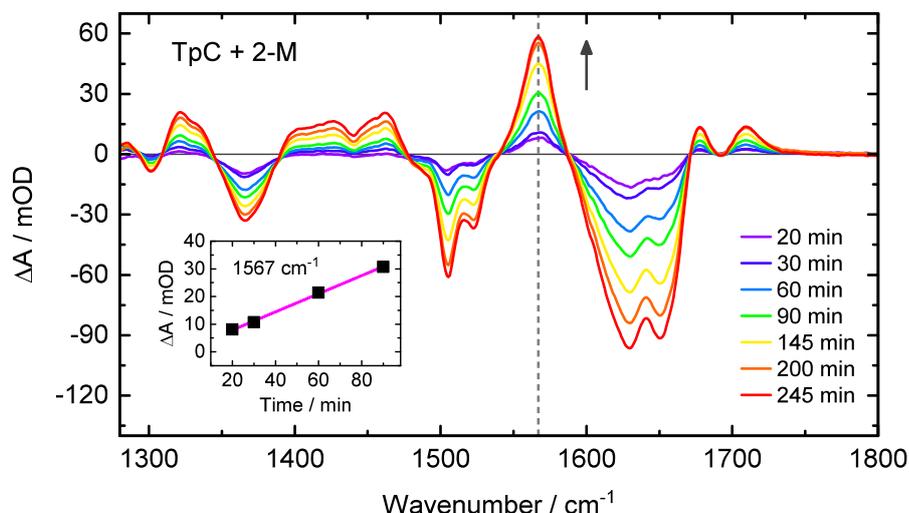


Abbildung 4.7.: Absorptionsdifferenzspektren zu verschiedenen Belichtungszeiten (am Beispiel von TpC; CpT analog) werden zur Bestimmung der Quantenausbeute benutzt. Mit zunehmender Belichtungsdauer nimmt die charakteristische CPD-Bande bei 1567 cm^{-1} zu. Die Werte der Absorptionsdifferenz sind gegen die Belichtungsdauer aufgetragen (siehe Inset).

Dies wurde bei der Abschätzung der Reaktionsquantenausbeute berücksichtigt, indem jeweils nur die ersten vier Messpunkte verwendet wurden. Daher kann Gleichung 4.4 auch im vorliegenden Fall angewendet werden. Für die Berechnung von Φ müssen schließlich die noch unbekannt Parameter $\Delta A / \Delta t$ und $\Delta \varepsilon$ mithilfe der Belichtungsdaten bestimmt werden.

Bestimmung der Quantenausbeute

Die Vorgehensweise zur Abschätzung der Quantenausbeute der CPD-Bildung wird im Folgenden am Beispiel von TpC erläutert. Zunächst erfolgt die Bestimmung des Wertes für $\Delta A / \Delta t$ anhand der Absorptionsdifferenzspektren der photosensibilisierten Belichtungsmessung an TpC (siehe Abbildung 4.6 a).

Mit zunehmender Belichtungsdauer t steigt die Anzahl der gebildeten Photoprodukte. Demzufolge nehmen die Absorptionsbanden der Photoprodukte zu, während die Grundzustandsbanden ausbleichen. Für die Berechnung von $\Delta A / \Delta t$ wird eine Produktbande gewählt, die sich möglichst nicht mit anderen Absorptionsbanden überlagert. Wie in Abbildung 4.7 zu sehen ist, bildet sich bei TpC mit steigender Belichtungsdauer eine Bande um 1570 cm^{-1} aus, die charakteristisch für den CPD in TpC und CpT ist (siehe Unterabschnitt 4.3.1).

In der Einfügung (Inset) in Abbildung 4.7 wird das Auftragen der Werte der Absorptionsänderungen ΔA bei 1567 cm^{-1} gegen die jeweiligen Belichtungsauern Δt gezeigt (die entsprechenden Belichtungs Dosen sind in Tabelle 4.2 aufgeführt). Bei geringen Belichtungsauern und konstanter eingestrahelter Laserleistung kann für die Berechnung von $\Delta A / \Delta t$ ein linearer Verlauf angenommen werden. Eine entsprechende Anpassung der Daten ist im

Tabelle 4.3.: Gesamtquantenausbeute der photosensibilisierten CPD-Bildung Φ (nach Gleichung 4.4) für TpC und CpT sowie die verwendeten Werte für die eingestrahlte Laserleistung P_0 bei $\lambda = 320$ nm, die Steigung $\Delta A/\Delta t$ der linearen Absorptionszunahme bei 1567 cm^{-1} und die Differenz der Extinktionskoeffizienten $\Delta\varepsilon$ bei 1567 cm^{-1} . Es sind die Werte von P_0 bei geringen Belichtungs Dosen (bis 122 J, siehe Tabelle 4.2) angegeben, bei denen die Laserleistung konstant war. Für Details wird auf den Fließtext verwiesen.

	Φ [%]	P_0 [mW]	$\Delta A/\Delta t$ [s^{-1}]	$\Delta\varepsilon$ [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
TpC	1,0	22,5	$5,5 \times 10^{-6}$	1216
CpT	1,2	15,2	$4,8 \times 10^{-6}$	1242

Inset in Abbildung 4.7 gezeigt. An die aufgetragenen Punkte wird eine Gerade angepasst, deren Steigung den Wert für $\Delta A/\Delta t$ liefert.

Für die Bestimmung der Reaktionsquantenausbeute Φ wird zudem der Wert für $\Delta\varepsilon$ benötigt. Die Änderung des Extinktionskoeffizienten $\Delta\varepsilon$ ist die Differenz der Extinktionskoeffizienten des Photoprodukts (hier CPD) und des Edukts (hier TpC bzw. CpT) bei der Wellenzahl der Produktbande (1567 cm^{-1}): $\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{CPD}} - \varepsilon_{\text{Edukt}}$.

Da vor der Belichtung nur die Ausgangssubstanz vorliegt und noch keine umgesetzten Moleküle (Photoprodukte) vorhanden sind, entspricht $\varepsilon_{\text{Edukt}}$ dem Extinktionskoeffizienten des Grundzustands ε_{GZ} von TpC bzw. CpT. Nach dem Gesetz von Lambert-Beer (Gleichung 4.3) ist die Änderung des Extinktionskoeffizienten $\Delta\varepsilon$ direkt proportional zur Absorptionsänderung ΔA . Durch Normierung kann aus ΔA daher $\Delta\varepsilon$ bestimmt werden.

Zunächst wird hierzu die Absorption vor der Belichtung $A_{\text{GZ}}(\lambda)$ in $\varepsilon_{\text{GZ}}(\lambda)$ umgerechnet (Schichtdicke $d = 100$ μm und Konzentration $c = 10$ mM). Anschließend wird das Absorptionsdifferenzspektrum (ΔA) nach 145 min Belichtung auf die Grundzustandsbande (ε_{GZ}) von Cytosin bei 1505 cm^{-1} skaliert. Bei der gewählten Belichtungsdauer sind die Absorptionsänderungen aufgrund der CPD-Bildung bereits deutlich ausgeprägt und ermöglichen eine genaue Anpassung. Das skalierte Absorptionsdifferenzspektrum entspricht schließlich der gesuchten Änderung des Extinktionskoeffizienten $\Delta\varepsilon$. Eine genaue Beschreibung der Bestimmung von $\Delta\varepsilon$ findet sich in Abschnitt A.2. Für die Berechnung der Quantenausbeute der CPD-Bildung wird der Wert von $\Delta\varepsilon$ bei der Wellenzahl der charakteristischen CPD-Bande bei 1567 cm^{-1} verwendet.

In Tabelle 4.3 sind die Werte der eingestrahlten Laserleistung P_0 bei der Anregungswellenlänge von $\lambda = 320$ nm sowie von $\Delta A/\Delta t$ und $\Delta\varepsilon$ bei 1567 cm^{-1} für TpC und CpT aufgeführt. Es sind die Werte von P_0 bei geringen Belichtungs Dosen (bis 122 J, siehe Tabelle 4.2) angegeben, bei denen die Laserleistung konstant war. Damit ist es möglich, die Reaktionsquantenausbeute Φ mit Gleichung 4.4 zu berechnen. Wie bereits in Unterabschnitt 4.3.1 ausgeführt, wird im Wesentlichen die gesamte eingestrahlte Leistung P_0 von der Probe absorbiert. Bei den photosensibilisierten Belichtungsmessungen wurde die Probenlösung ($V = 1,3$ mL) in einer Küvette mit der Schichtdicke $d = 1$ cm belichtet und

4. Triplett-Photosensibilisierung und CPD-Bildung in Pyrimidin-Dimeren

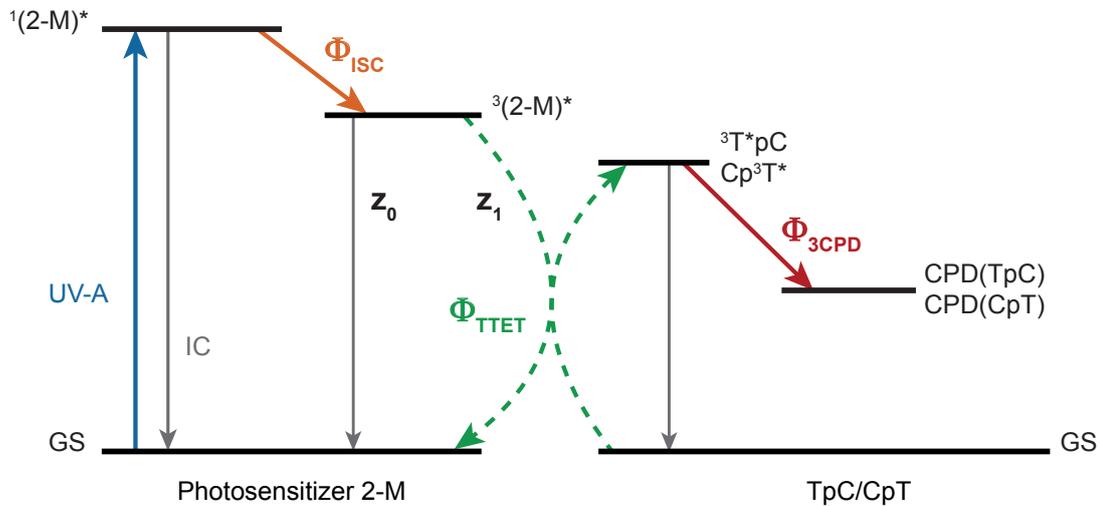


Abbildung 4.8.: Ratenmodell der photosensibilisierten CPD-Bildung über den Triplett-Zustand von TpC bzw. CpT nach UV-Anregung des Photosensibilisators 2-M (blauer Pfeil). Die Interkombination aus dem angeregten Singulett-Zustand $^1(2-M)^*$ in den angeregten Triplett $^3(2-M)^*$ erfolgt mit der Quantenausbeute Φ_{ISC} (grün). Die Quantenausbeute des Triplett-Triplett Energietransfers Φ_{TTET} (orange) ist abhängig von der Zerfallsrate z_0 des Triplets in den Grundzustand (GS) und der Rate z_1 des TTET. Φ_{3CPD} (rot) ist die Quantenausbeute der CPD-Bildung aus dem Triplett des Dimers ($^3T^*pC$ bzw. Cp^3T^*). Das Produkt aus Φ_{ISC} , Φ_{TTET} und Φ_{3CPD} ergibt die Gesamtquantenausbeute der Reaktion.

die Reflexionsverluste von ca. 5 %, die an der ersten Glasoberfläche der Küvette auftreten, wurden vernachlässigt.

Mit den genannten Werten kann schließlich die Reaktionsquantenausbeute Φ gemäß Gleichung 4.4 berechnet werden. Φ entspricht der Gesamtquantenausbeute der CPD-Bildung nach UV-Anregung des Photosensibilisators und liegt bei 1,0 % für TpC und 1,2 % für CpT (siehe Tabelle 4.3). Um hingegen die Quantenausbeute der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand des Dimers zu erhalten, müssen noch zusätzliche Faktoren berücksichtigt werden. Die weitere Vorgehensweise und das zugrunde gelegte Ratenmodell der CPD-Bildung werden im folgenden Unterabschnitt erläutert.

Ratenmodell der photosensibilisierten CPD-Bildung

In Abbildung 4.8 ist das Ratenmodell der photosensibilisierten CPD-Bildung über den Triplett-Zustand von TpC bzw. CpT nach UV-Anregung des Photosensibilisators 2-M gezeigt. Die zuvor bestimmte Reaktionsquantenausbeute Φ gemäß Gleichung 4.4 entspricht der Gesamtquantenausbeute der CPD-Bildung Φ_{ges} und setzt sich folgendermaßen zusammen:

$$\Phi_{ges} = \Phi_{ISC} \cdot \Phi_{TTET} \cdot \Phi_{3CPD} \cdot \quad (4.5)$$

Tabelle 4.4.: Quantenausbeuten der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand $\Phi_{3\text{CPD}}$ von TpC und CpT (jeweils $c = 10 \text{ mm}$ pro Dimer) für jeweils zwei unterschiedliche Werte der Quantenausbeute des Triplett-Triplett Energietransfers Φ_{TTET} und der bimolekularen Ratenkonstante κ (siehe Gleichung 4.5 und Gleichung 4.6).

	$\Phi_{3\text{CPD}}$ [%]	Φ_{TTET} [%]	κ [$10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
TpC	1,2	86,5	1,6
	1,3	76,2	0,8
CpT	1,5	86,5	1,6
	1,7	76,2	0,8

Φ_{ISC} ist die Quantenausbeute der Interkombination des Photosensibilisators, Φ_{TTET} die Quantenausbeute des Triplett-Triplett Energietransfers und $\Phi_{3\text{CPD}}$ die Quantenausbeute² der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand (siehe Abbildung 4.8).

Aus Experimenten am Photosensibilisator 2-M (siehe [Liu15, Liu16a]) ist bekannt, dass die Interkombination aus dem angeregten Singulett-Zustand $^1(2\text{-M})^*$ in den angeregten Triplett-Zustand $^3(2\text{-M})^*$ mit einer Quantenausbeute von $\Phi_{\text{ISC}} = 97 \%$ abläuft. Für die Quantenausbeute des Triplett-Triplett Energietransfers Φ_{TTET} gilt:

$$\Phi_{\text{TTET}} = \frac{z_1(c)}{z_1(c) + z_0}, \quad (4.6)$$

wobei $z_0 = 1/\tau_0$ die Zerfallsrate von 2-M aus dem Triplett-Zustand in den Grundzustand ist (siehe Abbildung 4.8). Für 2-M beträgt die Lebensdauer des Triplett-Zustands $\tau_0 = 400 \text{ ns}$, wenn keine Quencher in der Lösung vorhanden sind, welche den Triplett-Zustand löschen könnten. $z_1 = \kappa \cdot c(\text{Akzeptor})$ beschreibt die Rate des Triplett-Triplett Energietransfers vom angeregten Triplett-Zustand des 2-M auf ein Akzeptormolekül (hier TpC bzw. CpT) und ist abhängig von der Konzentration der Pyrimidin-Dimere in der Lösung [Liu16b, Liu16a]. κ ist eine bimolekulare Ratenkonstante und hängt von der Diffusion des Photosensibilisators und der Akzeptormoleküle ab [Wel59]. Messungen an 2-M ($c = 5 \text{ mM}$) mit verschiedenen Konzentrationen von TpT haben ergeben, dass κ einen Wert von $1,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ aufweist [Liu16b, Liu16a]. Da die hier untersuchten Dimere TpC und CpT sehr ähnlich zu TpT sind, für das in [Liu16b, Liu16a] eine detaillierte Behandlung zur bimolekularen Ratenkonstante durchgeführt wurde, wird hier auf eine detaillierte Behandlung verzichtet. Im Rahmen dieser Arbeit hat die Konzentration von 2-M in allen photosensibilisierten Messungen ebenfalls $c(2\text{-M}) = 5 \text{ mM}$ betragen.

Für TpC und CpT (jeweils $c = 10 \text{ mm}$ pro Dimer) sind die genauen Werte von κ nicht bekannt und werden daher geschätzt. Die erste Abschätzung erfolgt unter der Annahme,

²Bei $\Phi_{3\text{CPD}}$ handelt es sich genau genommen nicht um eine Quantenausbeute, sondern um eine Effizienz, da sie nicht auf die Zahl der absorbierten Photonen bezogen ist. Dies hat keine Auswirkungen auf die Argumentation.

dass κ genauso groß ist wie bei TpT: $\kappa = 1,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Bei der zweiten Abschätzung wird angenommen, dass κ halb so groß ist wie bei TpT ($\kappa = 0,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), weil bei TpC und CpT jeweils nur eine Thymin-Base pro Dimer als Akzeptor zur Verfügung steht und Cytosin nicht als Akzeptor des Triplett-Triplett Energietransfers in Betracht gezogen wird, weil es die höchste Triplett-Energie aller DNA-Basen hat (siehe Unterabschnitt 2.2.2).

In Tabelle 4.4 sind daher sowohl für TpC als auch für CpT jeweils zwei verschiedene Werte für κ , Φ_{TET} und die Quantenausbeute der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand³ $\Phi_{3\text{CPD}}$ angegeben. Die erhaltenen Werte für $\Phi_{3\text{CPD}}$ liegen zwischen 1 % und 2 %. Im Folgenden wird eine mittlere Quantenausbeute der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand von $1,5 \% \pm 0,5 \%$ angenommen. Die Quantenausbeuten der zwei Pyrimidin-Dimere TpC und CpT, welche jeweils aus nur einer Thymin-Base bestehen, liegen somit deutlich unter den 4 %, die für TpT bestimmt wurden [Liu16b]. In der Literatur wird von photosensibilisierten Experimenten an natürlicher DNA berichtet [Dou14], bei denen die relativen Verhältnisse der CPD-Schäden aller Pyrimidin-Dimere bestimmt wurden. Dabei zeigt sich bei den Cytosin enthaltenden Pyrimidin-Dimeren ebenfalls eine im Vergleich zu TpT reduzierte Quantenausbeute der Bildung von CPD-Schäden.

4.3.3. Inkubation der belichteten Proben

Unmittelbar nach den photosensibilisierten Belichtungsmessungen wurden die Probenlösungen von TpC und CpT jeweils für 83 h im mit Trockenluft gespülten Probenraum des FTIR-Spektralphotometers ohne Lichtexposition belassen. Dieser Zeitraum wird nachfolgend als „Inkubation“ bezeichnet. Während der Inkubation wurden die relative Luftfeuchtigkeit und die Temperatur in der Probenkammer kontinuierlich mit einem Sensor⁴ gemessen und die Werte aufgezeichnet. Sowohl die Luftfeuchtigkeit (0 %) als auch die Temperatur (27 °C) waren über den gesamten Zeitraum stabil. Im Abstand von jeweils 30 min wurden automatisiert Absorptionsspektren von den belichteten Proben aufgenommen.

In Abbildung 4.9 sind die Absorptionsdifferenzspektren zu verschiedenen Inkubationszeiten für TpC und CpT abgebildet. Die Spektren wurden bestimmt, indem von jedem Absorptionsspektrum der Inkubation ($A(t_i)$) jeweils das Spektrum vor der Belichtung ($A(t = 0)$) subtrahiert wurde: $\Delta A(t_i) = A(t_i) - A(t = 0)$. Im Laufe der Inkubation sind im Bereich um 1570 cm^{-1} und bei 1620 cm^{-1} Absorptionsabnahmen und zwischen 1680 cm^{-1} und 1720 cm^{-1} Absorptionzunahmen zu beobachten. Bei 1640 cm^{-1} und 1370 cm^{-1} unterscheiden sich die Spektren von TpC und CpT, was auf die zuvor beschriebenen Aggregationseffekte zurückzuführen ist (siehe Abbildung 4.3). Dies wird im Folgenden außer Acht gelassen, da angenommen wird, dass diese Effekte für die CPD-Bildung nicht relevant sind.

Sowohl bei TpC als auch bei CpT erfolgt die Abnahme der Bande um 1570 cm^{-1} auf einer Zeitskala von mehreren Stunden. In den photosensibilisierten Belichtungsmessun-

³Es sind die korrigierten Werte zu [Gon19] angegeben.

⁴HYTELOG-USB, B+B Thermo-Technik GmbH

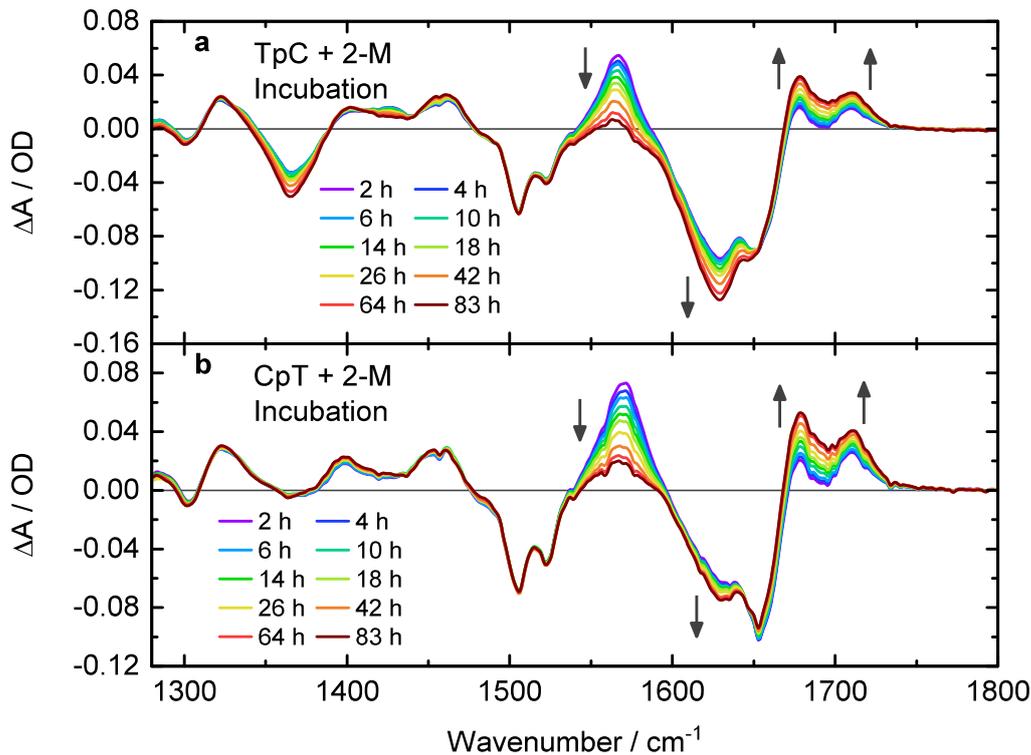


Abbildung 4.9.: Absorptionsdifferenzspektren von TpC (a) und CpT (b) zu verschiedenen Inkubationszeiten nach der photosensibilisierten Belichtung (siehe Abbildung 4.6). Subtrahiert wurde jeweils das Spektrum vor der Belichtung. Absorptionszu- und abnahmen sind mit Pfeilen markiert.

gen (siehe Abbildung 4.6) wurde diese Bande als charakteristisch für CPD-Schäden der Pyrimidin-Dimere TpC und CpT identifiziert. Sie ist auf die blauverschobene C4=N3-Schwingungsbande des Cytosins zurückzuführen. Während der Inkubation ist zwar eine Absorptionsabnahme um 1570 cm^{-1} zu beobachten, aber keine Erholung der entsprechenden C4=N3-Grundzustandsbande des Cytosins um 1500 cm^{-1} . Stattdessen nehmen die Absorptionen im Bereich der C=O-Streckschwingungen um 1700 cm^{-1} weiter zu. Diese zwei nahe beieinander liegenden Banden des CPD-Schadens hatten sich im Laufe der photosensibilisierten Belichtung gebildet. Offenbar zerfällt der CPD-Schaden nicht in die Ausgangssubstanzen, sondern es findet eine Folgereaktion des CPD-Schadens statt.

Für eine gezielte Darstellung der Absorptionsänderungen, welche sich erst nach der photosensibilisierten Belichtung (während der Inkubation) bilden, wurden Doppeldifferenzspektren der Inkubation ($\Delta\Delta A(t_i)$) bestimmt. Hierfür wurde von jedem Absorptionsdifferenzspektrum der Inkubation ($\Delta A(t_i)$) jeweils das Absorptionsdifferenzspektrum zu Beginn der Inkubation ($\Delta A(t_0)$) subtrahiert: $\Delta\Delta A(t_i) = \Delta A(t_i) - \Delta A(t_0)$. Die auf diese Weise bestimmten Doppeldifferenzspektren sind in Abbildung 4.10 abgebildet. Es ist eine Absorptionsabnahme um 1570 cm^{-1} und 1620 cm^{-1} sowie eine breite Absorptionzunahme zwischen 1680 cm^{-1} und 1720 cm^{-1} zu beobachten. Abgesehen von der Bande bei

4. Triplett-Photosensibilisierung und CPD-Bildung in Pyrimidin-Dimeren

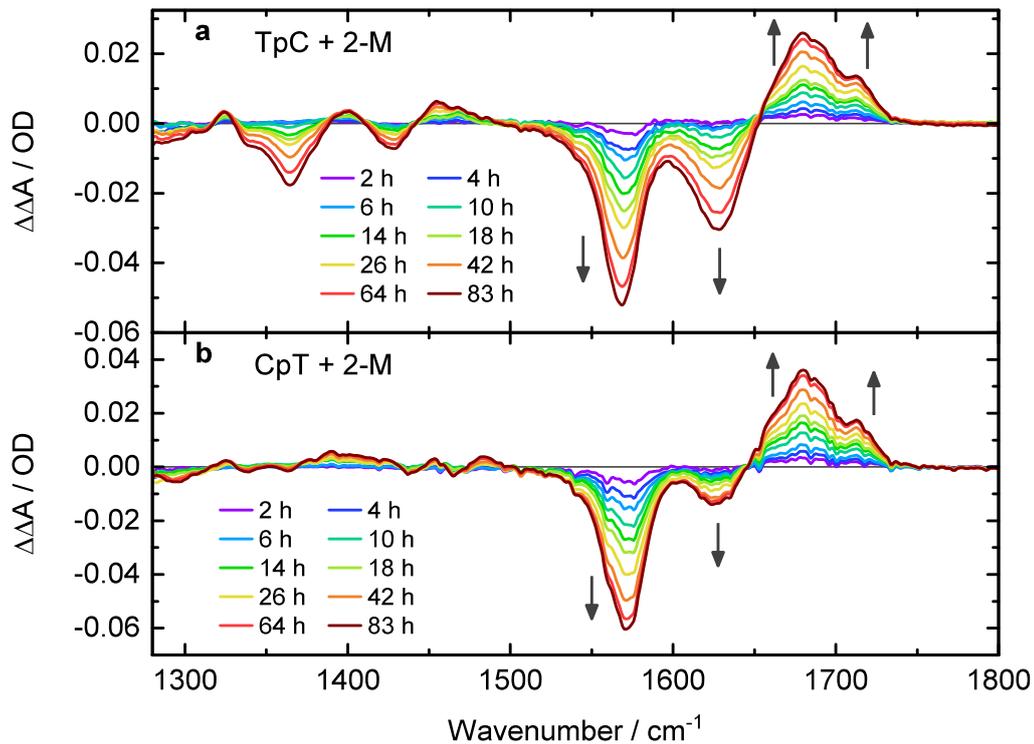


Abbildung 4.10.: Absorptionsänderungen der belichteten Proben von TpC (a) und CpT (b) zu verschiedenen Zeiten während der Inkubation nach der photosensibilisierten Belichtung. Subtrahiert wurde jeweils das Absorptionsdifferenzspektrum zu Beginn der Inkubation. Absorptionszu- und abnahmen sind mit Pfeilen markiert.

1620 cm^{-1} , die bei TpC wesentlich stärker ausgeprägt ist als bei CpT, und den bereits erwähnten Aggregationseffekten (siehe Abbildung 4.3), weisen die Spektren von TpC und CpT große Ähnlichkeiten zueinander auf.

Für eine Identifikation der Folgereaktion des CPD-Schadens ist eine genauere Analyse der Reaktionskinetiken notwendig. Hierfür wurde eine exponentielle Anpassung der Absorptionsänderungen nach der photosensibilisierten Belichtung ($\Delta A(t_i)$, siehe Abbildung 4.9) durchgeführt. Es wurde dabei ein ähnliches Verfahren angewandt wie bei der Anpassung der Daten der zeitaufgelösten Messungen (siehe Unterabschnitt 3.3.6). Eine gute Repräsentation der Daten lässt sich durch eine biexponentielle Anpassung erreichen. Die entsprechenden Zeitkonstanten liegen für TpC bei $\tau_{d1} = 12\text{ h}$ und $\tau_{d2} = 60\text{ h}$ und für CpT bei $\tau_{d1} = 13\text{ h}$ und $\tau_{d2} = 65\text{ h}$. In Abbildung 4.11 sind die Amplitudenspektren (DADS) zu den zwei Zeitkonstanten und zur unendlichen Komponente (Offset) jeweils für TpC und CpT abgebildet. Sowohl bei TpC als auch bei CpT sind die DADS der kurzen und der langen Zeitkonstanten über einen weiten Spektralbereich sehr ähnlich zueinander und unterscheiden sich (mit Ausnahme der Spektralpositionen bei 1370 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} , bei denen die Aggregationseffekte auftreten) in den Amplituden der Banden.

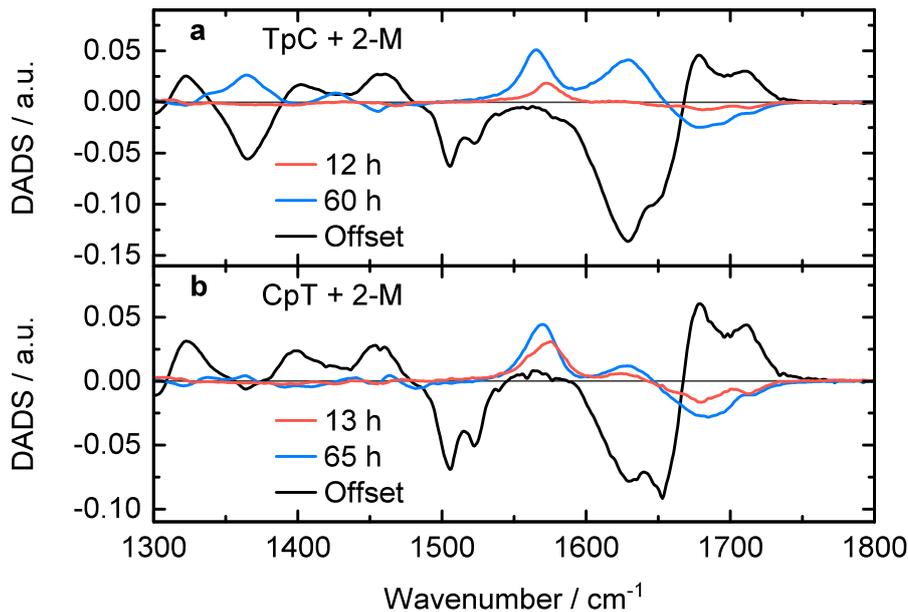


Abbildung 4.11.: Amplitudenspektren (DADS) der biexponentiellen Anpassung der Absorptionsänderungen während der Inkubation von TpC (a) und CpT (b).

4.4. Desaminierung von TpC und CpT

Im vorangehenden Abschnitt konnte anhand der Daten gezeigt werden, dass die CPD-Bande um 1570 cm^{-1} der Cytosin enthaltenden Pyrimidin-Dimere TpC und CpT instabil ist. Nach der photosensibilisierten Belichtung zerfällt diese Bande, die auf die blauverschobene $\text{C4}=\text{N3}$ -Schwingungsbande des Cytosins zurückzuführen ist, es tritt aber keine Absorptionzunahme der entsprechenden Grundzustandsbanden von Cytosin auf. Jedoch ist das weitere Ausbleichen der Bande bei 1630 cm^{-1} und eine weitere Zunahme der Absorption der zwei Banden im Bereich der Carbonyl-Streckschwingungen um 1700 cm^{-1} zu beobachten (siehe Abbildung 4.10). Während der Inkubation nach der photosensibilisierten Belichtung läuft somit eine Folgereaktion des CPD-Schadens ab. Das Verschwinden der $\text{C4}=\text{N3}$ -Schwingungsbande und die Absorptionzunahme der $\text{C}=\text{O}$ -Schwingungsbanden deuten darauf hin, dass es sich möglicherweise um eine Desaminierung von Cytosin zu Uracil handelt (siehe Abbildung 2.9).

In Unterabschnitt 2.3.1 wurde bereits beschrieben, dass Desaminierungen insbesondere im CPD-Schaden auftreten können und auf einer Zeitskala von 10 h erfolgen [LR93, PS96]. Im CPD-Schaden ist die Wahrscheinlichkeit einer Desaminierung aufgrund der gesättigten C5-C6 -Bindung des Pyrimidinrings von Cytosin höher. Handelt es sich um einen CPD-Schaden von TpC bzw. CpT, liegt nach der Desaminierung ein CPD-Schaden von TpU bzw. UpT vor (siehe Abbildung 4.13 und Abbildung 4.14) [JT93, DC92, SC66, LY78a, RB89, TDP98, KSK91].

Die biexponentielle Anpassung der Absorptionsänderungen nach der photosensibilisierten Belichtung (siehe Abbildung 4.11) lässt zudem vermuten, dass es sich bei der Folgereaktion des CPD-Schadens um keinen sequentiellen Zerfall handelt, weil sich die DADS der kurzen und der langen Zeitkonstanten sehr ähneln. Daher handelt es sich eher um gleiche Kinetiken mit unterschiedlichen Zeitkonstanten.

Unterschiedliche Zeitkonstanten werden auch für die Desaminierungen der verschiedenen Diastereomere des CPD-Schadens (siehe Abbildung 2.7) in der Literatur angegeben, wobei der cis-syn CPD schneller desaminiert als der trans-syn CPD [KSK91, DC92, LR93]. Für die Ratenkonstanten der Desaminierung von TpC und CpT werden in der Literatur Werte im Bereich von $1,4 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ bis $1,7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ für cis-syn sowie von $3,9 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ bis $1,1 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ für trans-syn angegeben, jeweils bei Raumtemperatur und in Pufferlösung [DC92, LR93]. Es kann angenommen werden, dass die im vorherigen Abschnitt präsentierten Zeitkonstanten von TpC und CpT den zwei Diastereomeren des CPD-Schadens (cis-syn und trans-syn) zuzuordnen sind. Die Zeitkonstanten von etwa 12 h und 60 h entsprechen jeweils Ratenkonstanten von $1,4 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ und von $2,8 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ und stimmen im Rahmen der Messungenauigkeiten gut mit den Literaturwerten überein. Entsprechend wird die schnellere Zeitkonstante $\tau_{d1} \approx 12 \text{ h}$ der Desaminierung von cis-syn CPD-Schäden und die langsamere Zeitkonstante $\tau_{d2} \approx 60 \text{ h}$ von trans-syn CPD-Schäden zugeordnet.

In Unterabschnitt 2.3.1 wurde bereits erläutert, dass die Bildung der anti-Konformationen im Doppelstrang sterisch erschwert ist, weshalb sich dort überwiegend cis-syn CPD-Schäden bilden [FCC04, Cuq11]. Bei der Belichtung von Oligonukleotiden wird hingegen auch die Bildung eines gewissen Anteils von trans-syn und trans-anti CPD-Schäden beobachtet [BEB67, BB68, Uml85, KSK91]. Die relativen Verhältnisse von cis-syn zu trans-syn nach der photosensibilisierten Belichtung von TpT, TpC und CpT liegen jeweils bei 7:1, 1:1 und 3:1 [Cuq11]. Aus dem Amplitudenverhältnis der in Abbildung 4.11 gezeigten DADS von TpC und CpT geht jedoch hervor, dass die langsamere Komponente (trans-syn) dominiert und die relativen Verhältnisse von cis-syn zu trans-syn für TpC und CpT bei etwa 1:5 beziehungsweise 1:2 liegen. Der scheinbare Widerspruch zu den Literaturangaben lässt sich erklären, wenn berücksichtigt wird, dass die Belichtungsexperimente aufgrund der Leistungsschwankungen des Lasersystems über 4 h gedauert haben (siehe Tabelle 4.2). In dieser Zeit konnte bereits ein Teil der schnelleren Komponente (cis-syn) desaminieren. Da die Bestimmung der Amplitudenspektren nach der photosensibilisierten Belichtung erfolgt, geht der Anteil der bereits desaminierten Komponenten nicht in die Auswertung mit ein. Eine Ermittlung der absoluten Mengenverhältnisse der Diastereomere lässt sich mit den verwendeten Methoden nicht unmittelbar erreichen und war nicht Ziel der Untersuchungen.

4.4.1. Photosensibilisierte Belichtung von TpU und UpT

Ein weiterer Nachweis für das Auftreten einer Desaminierung wird im Folgenden erläutert. Während der Inkubation der belichteten Proben von TpC und CpT kommt es zu einer Folgereaktion der CPD-Schäden von TpC und CpT (im Folgenden als T=C bzw. C=T

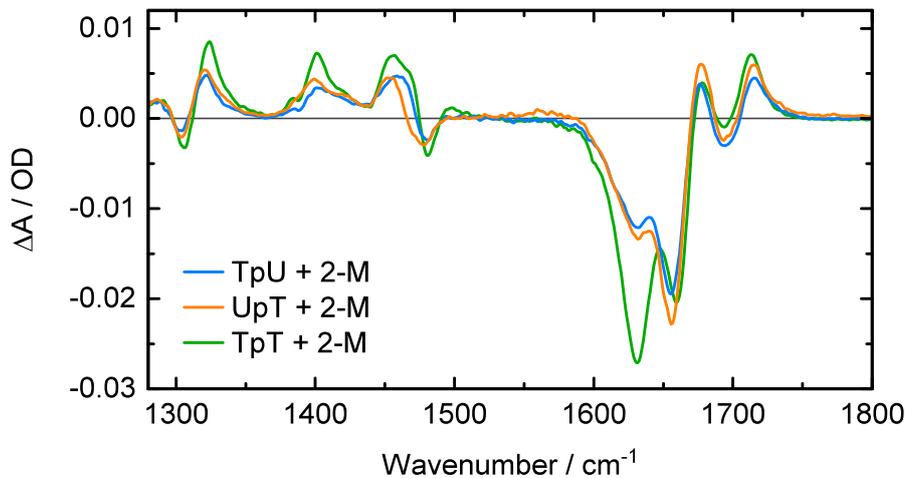


Abbildung 4.12.: Absorptionsdifferenzspektrn der photosensibilisierten Belichtung ($c(2-M) = 5 \text{ mm}$, Anregungswellenlänge $\lambda = 320 \text{ nm}$) von TpU, UpT (jeweils $c = 2,5 \text{ mm}$ pro Dimer) und TpT ($c = 2,1 \text{ mm}$ pro Dimer) mit einer Belichtungs-dosis von jeweils 40 J für TpU bzw. UpT und 48 J für TpT.

bezeichnet), bei der es sich wahrscheinlich um eine Desaminierung handelt. Wenn dies zutrifft, kann davon ausgegangen werden, dass am Ende der Inkubationszeit nach 83 h hauptsächlich die CPD-Schäden von TpU und UpT ($T=U$ bzw. $U=T$) vorliegen. Für einen eindeutigen spektralen Nachweis dieser Annahme bedarf es der Spektren von $T=U$ bzw. $U=T$. Daher wurden zunächst an TpU und an UpT photosensibilisierte Belichtungsmessungen mit 2-M als Photosensibilisator durchgeführt.

Die Dinukleosidmonophosphate TpU und UpT wurden in lyophilisierter Form kommerziell erworben (biomers.net GmbH) und ohne Modifikationen in einer Phosphat-Pufferlösung (D_2O , 50 mM KH_2PO_4 , 50 mM Na_2HPO_4 ; pH = 7) gelöst. Die chemischen Bezeichnungen der Dinukleosidmonophosphate lauten:

TpU Thymidylyl-(3'-5')-2'-desoxyuridin

UpT 2'-Desoxyuridylyl-(3'-5')-thymidin

Zusätzlich zu den Thymin-Banden kommen bei TpU und UpT noch die Schwingungsbanden von Uracil hinzu. Bezüglich der Zuordnung der Thymin-Banden wird auf Tabelle 4.1 verwiesen. Die Schwingungsbanden von Uracil werden nachfolgend anhand vom Monomer UMP (Uridin-5'-monophosphat) zugeordnet, bei dem sich drei ausgeprägte Banden im Bereich zwischen 1600 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} zeigen [PJT11, BSG03]. Die Bande bei 1617 cm^{-1} ist auf eine $C5=C6$ Schwingung zurückzuführen. Sowohl bei 1655 cm^{-1} ($C4=O4$) als auch bei 1693 cm^{-1} ($C2=O2$) befinden sich Carbonyl-Streckschwingungen. In Abbildung 4.13 c ist das skalierte Absorptionsspektrum von TpU und in Abbildung 4.14 c von UpT im Mittelinfraroten abgebildet (jeweils grau unterlegt). Die bei beiden Spektren durchgeführte Acetat-Korrektur wird in Abschnitt A.1 näher beschrieben. Es wird exemplarisch ein Absorptionsspektrum von UpT vor und nach der Acetat-Korrektur gezeigt (Abbildung A.1).

4. Triplett-Photosensibilisierung und CPD-Bildung in Pyrimidin-Dimeren

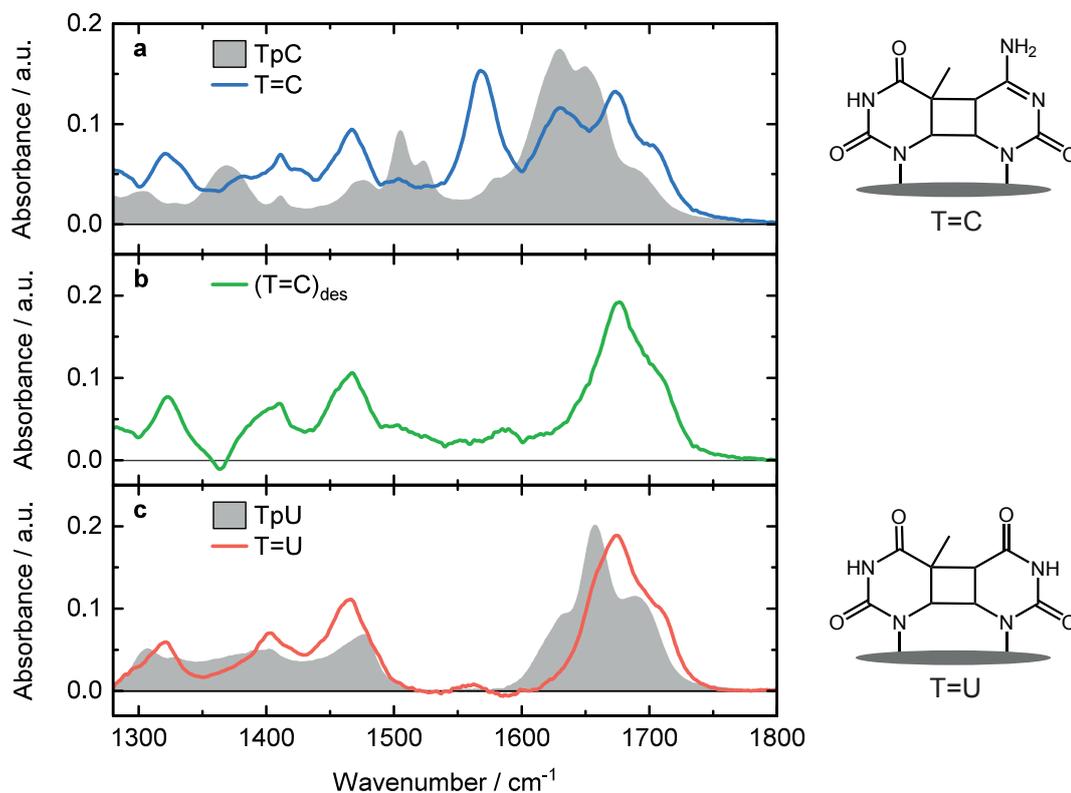


Abbildung 4.13.: Absorptionsspektren der CPD-Schäden von (a) TpC (T=C) und (c) TpU (T=U) mit den jeweiligen Strukturformeln (rechts). Grau unterlegt sind jeweils die skalierten Absorptionsspektren von TpC und TpU vor der Belichtung. (b) Absorptionsspektrum der CPD-Schäden von TpC nach der Inkubation, sogenanntes desaminiertes T=C ($(T=C)_{des}$). Artefakt bei 1550 cm^{-1} in (c) ist auf den Acetat-Puffer zurückzuführen (Details siehe Text).

Bei den Belichtungsmessungen wurde jeweils eine Lösung mit TpU beziehungsweise UpT ($c = 2,5\text{ mm}$ pro Dimer) und 2-M ($c = 5\text{ mm}$) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 320\text{ nm}$ mit einer Belichtungs-dosis von 40 J belichtet. Die in Abbildung 4.12 gezeigten Absorptionsspektren wurden bestimmt, indem vom jeweiligen Absorptionsspektrum das entsprechende Spektrum vor der Belichtung subtrahiert wurde. Ein Vergleich mit dem Absorptionsspektrum der photosensibilisierten Belichtung von TpT ($c = 2,1\text{ mm}$ pro Dimer, $c(2-M) = 5\text{ mm}$) bei einer Belichtungs-dosis von 48 J (siehe Abbildung 4.12) zeigt, dass sich bei TpU und UpT ebenfalls CPD-Banden im Fingerprint-Bereich bei 1320 cm^{-1} , 1402 cm^{-1} und 1465 cm^{-1} sowie zwischen 1680 cm^{-1} und 1720 cm^{-1} ausbilden. Die drei Absorptionsspektren sind sich, bis auf die Amplituden der zwei Banden um 1630 cm^{-1} und 1655 cm^{-1} , sehr ähnlich.

Mittels dieser Daten können die Absorptionsspektren der CPD-Schäden von TpU und UpT bestimmt werden, um sie mit den Spektren der CPD-Schäden von TpC und CpT am Ende der Inkubationszeit vergleichen zu können.

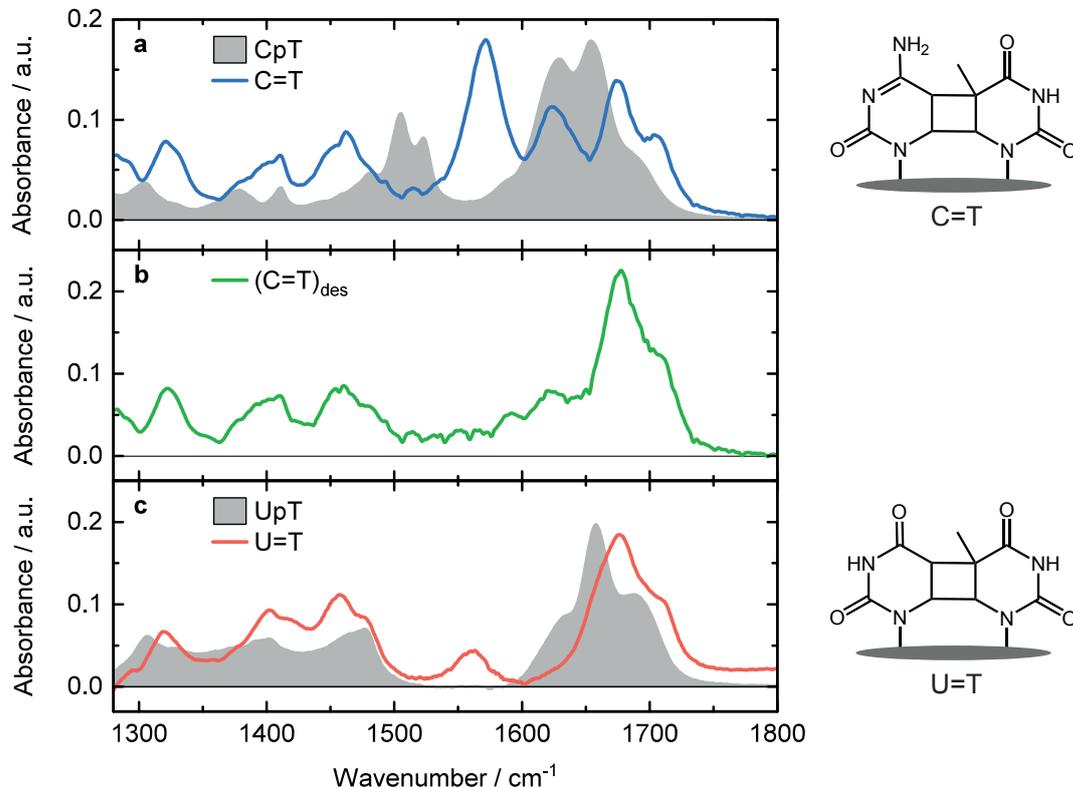


Abbildung 4.14.: Absorptionsspektren der CPD-Schäden von (a) CpT (C=T) und (c) UpT (U=T) mit den jeweiligen Strukturformeln (rechts). Grau unterlegt sind jeweils die skalierten Absorptionsspektren von CpT und UpT vor der Belichtung. (b) Absorptionsspektrum der CPD-Schäden von CpT nach der Inkubation, sogenanntes desaminiertes C=T (C=T)_{des}. Artefakt bei 1550 cm⁻¹ in (c) ist auf den Acetat-Puffer zurückzuführen (Details siehe Text).

4.4.2. Bestimmung der Absorptionsspektren der CPD-Schäden

Die Bestimmung der Absorptionsspektren der CPD-Schäden (nachfolgend als CPD-Spektren bezeichnet) von TpC bzw. CpT sowie von TpU bzw. UpT wird im Folgenden beschrieben. Zunächst werden die Grundzustandsspektren der Proben vor der Belichtung bestimmt, wenn noch keine CPD-Schäden vorhanden sind. Diese Absorptionsspektren von TpC und TpU sowie von CpT und UpT sind jeweils in Abbildung 4.13 a, c und Abbildung 4.14 a, c abgebildet (grau unterlegt). Anschließend wird jeweils ein Absorptionsspektrenunterschiedsspektrum (siehe Abbildung 4.6 für TpC bzw. CpT und Abbildung 4.12 für TpU bzw. UpT) nach längerer Belichtungsdauer auf die Ausbleichsbänder des Grundzustandsspektrums skaliert. Das skalierte Absorptionsspektrenunterschiedsspektrum wird schließlich zum jeweiligen Grundzustandsspektrum addiert. Das Ergebnis sind die in Abbildung 4.13 a, c und Abbildung 4.14 a, c gezeigten CPD-Spektren T=C bzw. T=U und C=T bzw. U=T, deren Strukturformeln jeweils neben den Spektren abgebildet sind.

Unter der Voraussetzung, dass die CPD-Schäden von TpC und CpT (T=C bzw. C=T) während der Inkubation zu T=U bzw. U=T desaminieren, liegen nach längerer Inkubationszeit gewissermaßen desaminierte CPD-Schäden vor, die nachfolgend als (T=C)_{des} bzw. (C=T)_{des} bezeichnet werden. Deren Absorptionsspektren müssten somit den Spektren der CPD-Schäden von TpU (T=U) bzw. UpT (U=T) gleichen. Analog zum eben beschriebenen Vorgehen wird für die Bestimmung der Spektren von (T=C)_{des} bzw. (C=T)_{des} jeweils das Doppeldifferenzspektrum von TpC bzw. CpT zum Ende der Inkubationszeit nach 83 h (siehe Abbildung 4.10) auf das zuvor berechnete CPD-Spektrum von T=C bzw. C=T skaliert. Das skalierte Doppeldifferenzspektrum wird anschließend zum CPD-Spektrum addiert. Die resultierenden Spektren von (T=C)_{des} bzw. (C=T)_{des} sind in Abbildung 4.13 b bzw. Abbildung 4.14 b abgebildet. Die Artefakte bei 1370 cm⁻¹ und 1640 cm⁻¹ in Abbildung 4.13 a und b sind wiederum auf die zuvor beschriebenen Aggregationseffekte zurückzuführen (siehe Abbildung 4.3). Die in den Daten von T=U und U=T auftretende kleine Absorptionsbande bei 1550 cm⁻¹, die bei U=T etwas stärker ausgeprägt ist als bei T=U (siehe Abbildung 4.13 c bzw. Abbildung 4.14 c), kann durch eine unzureichende Korrektur des Acetat-Puffers (siehe Abschnitt A.1) erklärt werden.

Die Vergleiche der Absorptionsspektren der CPD-Schäden von TpC bzw. CpT nach der Inkubation (T=C)_{des} bzw. (C=T)_{des} (siehe Abbildung 4.13 b bzw. Abbildung 4.14 b) mit den Absorptionsspektren der CPD-Schäden von TpU (T=U) bzw. UpT (U=T) (siehe Abbildung 4.13 c bzw. Abbildung 4.14 c) zeigen eine ausgeprägte Ähnlichkeit. Man kann also davon ausgehen, dass nach der Inkubation desaminierte CPD-Schäden in den Lösungen vorliegen. Somit kann eine Desaminierung des Cytosins in den CPD-Schäden von TpC und CpT nach TpU und UpT nachgewiesen werden.

4.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Kapitel wurde die photosensibilisierte Bildung von CPD-Schäden in den Pyrimidin-Dimeren TpC und CpT mittels stationärer Infrarotspektroskopie untersucht. Als Triplet-Photosensibilisator wurde das Acetophenonderivat 2-M verwendet, welches bereits für die Untersuchung der CPD-Bildung in TpT erfolgreich eingesetzt wurde ([Liu15, Liu16b]). Da die Anregung des Photosensibilisators im UV-A-Bereich erfolgt, kann eine direkte Anregung der Basen weitgehend unterdrückt werden (siehe Abbildung 2.3). Bei einer direkten Anregung von TpT im UV-C-Bereich läuft die Bildung der CPD-Schäden fast ausschließlich aus dem initial angeregten Singulett-Zustand ab [SGZ15]. Die Photosensibilisierung der Pyrimidin-Dimere ermöglicht hingegen eine selektive Anregung des Triplet-Zustands, der aufgrund eines Triplet-Triplet Energietransfers vom Photosensibilisator besetzt wird (siehe Abbildung 4.8).

Es konnte gezeigt werden, dass bei der photosensibilisierten Anregung von TpC und CpT ebenfalls die Bildung charakteristischer CPD-Markerbanden bei 1320 cm⁻¹, 1402 cm⁻¹, 1465 cm⁻¹, 1678 cm⁻¹ und 1710 cm⁻¹ zu beobachten ist. Im Gegensatz zu TpT bildet sich bei den Cytosin enthaltenden Dimeren allerdings noch eine weitere charakteristische CPD-

Bande bei 1570 cm^{-1} . Die Quantenausbeute der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand ist bei TpC und CpT niedriger als bei TpT (4 %) und liegt im Bereich von $1,5\% \pm 0,5\%$.

Während der CPD-Schaden von TpT thermisch stabil ist, treten bei TpC und CpT während der Inkubation der belichteten Proben ohne Lichteinwirkung weitere Absorptionsänderungen im Verlauf mehrerer Stunden nach der Belichtung auf. Es kommt unter anderem zu einer Abnahme der Bande bei 1570 cm^{-1} , während die CPD-Banden zwischen 1680 cm^{-1} und 1720 cm^{-1} weiter zunehmen. Eine biexponentielle Anpassung der Daten zeigt, dass diese Änderungen gut mit zwei Zeitkonstanten von etwa 12 h und 60 h beschrieben werden. Diese zwei Zeitkonstanten können den zwei Diastereomeren cis-syn und trans-syn des CPD-Schadens zugeordnet werden, wobei erstere schneller und letztere langsamer zerfallen. Dabei handelt es sich um Reaktionen in den CPD-Schäden von TpC und CpT, bei denen das Cytosin zu Uracil desaminiert.

Um die Annahme zu verifizieren, dass die während der Inkubation beobachteten Absorptionsänderungen auf eine Desaminierung des Cytosins zu Uracil in den CPD-Schäden von TpC und CpT zurückzuführen sind, wurden photosensibilisierte Belichtungsmessungen an TpU und UpT durchgeführt. Der spektrale Nachweis der Desaminierung konnte schließlich mit einem Vergleich der Absorptionsspektren der CPD-Schäden von TpU und UpT mit den Spektren der desaminierten CPD-Schäden von TpC und CpT nach der Inkubation erbracht werden.

Bekanntermaßen erfolgt bei TpT die photosensibilisierte Bildung der CPD-Schäden aus dem angeregten Triplett-Zustand von Thymin. Da Cytosin die höchste und Thymin die niedrigste Triplett-Energie aller DNA-Basen hat (siehe Unterabschnitt 2.2.2), wird angenommen, dass auch bei TpC und CpT der Triplett-Triplett Energietransfer von 2-M nur auf das Thymin erfolgt und nicht auf das Cytosin. Diese Reaktionskinetiken wurden mittels zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie untersucht und werden im nächsten Kapitel thematisiert.

5. Triplett-Dynamiken in Pyrimidin-Dimeren

Im vorhergehenden Kapitel wurde mittels stationärer Belichtungsexperimente die Bildung von CPD-Schäden aus dem angeregten Triplett-Zustand in den Pyrimidin-Dimeren TpC und CpT untersucht. Die selektive Anregung des Triplett-Zustands erfolgte dabei über einen Triplett-Triplett Energietransfer vom Photosensibilisator 2-M. Da Thymin die niedrigste und Cytosin die höchste Triplett-Energie aller DNA-Basen hat (siehe Unterabschnitt 2.2.2), wird angenommen, dass nur die Thymin-Basen von TpC und CpT am Triplett-Triplett Energietransfer beteiligt sind. Der genaue Reaktionsmechanismus und die Frage nach den beteiligten Zuständen lassen sich allerdings mit den stationären Messungen alleine nicht im Detail klären. Zur weiteren Aufklärung der Reaktionsdynamiken, die nach der Anregung des Triplett-Zustands von TpC und CpT letztlich zur CPD-Bildung führen, wurden daher Experimente mit zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie durchgeführt.

In diesem Kapitel werden zunächst die Anrege-Abtast-Messungen im Nanosekundenbereich beschrieben, die an den Cytosin enthaltenden Dimeren TpC, CpT und CpC durchgeführt wurden. Abschließend wird ein mögliches Reaktionsmodell der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand für TpC und CpT vorgestellt.

5.1. Triplett-Dynamiken von TpC und CpT

In diesem Abschnitt werden die zeitaufgelösten Messungen im Nanosekundenbereich präsentiert, die an den Cytosin enthaltenden Dinukleosidmonophosphaten TpC und CpT durchgeführt wurden. Die Anregung der Pyrimidin-Dimere erfolgte im UV-C-Bereich ohne Photosensibilisator, um die Triplett-Dynamiken von TpC und CpT ohne Überlagerung von Signalen des Photosensibilisators und des Triplett-Triplett Energietransfers zu beobachten. Für eine stationäre Charakterisierung von TpC und CpT im UV/Vis- und IR-Bereich sowie eine Zuordnung der Schwingungsbanden wird auf Abschnitt 4.1 verwiesen.

Die Absorption von Thymin und Cytosin im UV-Bereich ist im Wesentlichen auf $^1\pi\pi^*$ -Übergänge zurückzuführen [Voe63]. Nach der Absorption sind ultraschnelle Deaktivierungsprozesse des angeregten Singulett-Zustands im Bereich einiger hundert Femtosekunden bis zu Pikosekunden zu beobachten. Für eine Übersicht dieser Prozesse wird auf Unterabschnitt 2.2.2 verwiesen. Bei Nanosekundenmessungen sind diese Prozesse nicht mehr zu beobachten, weil sie schnell abgeschlossen sind. Der angeregte Singulett-Zustand $^1\pi\pi^*$ des Thymins zerfällt beispielsweise innerhalb 1 ps. Ein geringer Teil der angeregten Singulett-Zustände geht mittels Interkombination (ISC) in einen angeregten Triplett-Zustand über, der eine deutlich längere Lebensdauer bis in den Nanosekundenbereich hat

[Sch07, Pil14, Ban12]. Bei den nachfolgend präsentierten Nanosekundenmessungen ist der Triplett-Zustand von Beginn der Messungen an besetzt.

Für eine hohe Ausbeute an angeregten Triplett-Zuständen wurde in den nachfolgend vorgestellten Messungen an TpC und CpT eine Anregungswellenlänge von 250 nm gewählt, da in [Ban12] gezeigt wurde, dass die Quantenausbeute der Besetzung des Triplett-Zustands ($^3\pi\pi^*$) von TMP bei kürzeren Anregungswellenlängen zunimmt (siehe auch Unterabschnitt 2.2.2). In Übereinstimmung damit wurde in [Pil14] ebenfalls eine wellenlängenabhängige Effizienz der Interkombination beim Vergleich von Messungen an $(dT)_{18}$ mit Anregungswellenlängen von jeweils 250 nm und 266 nm gezeigt. Zudem erlaubt die Wahl einer Anregungswellenlänge von 250 nm für TpC und CpT einen Vergleich mit einer Studie zu den Triplett-Dynamiken von TpT [Liu16b], bei der ebenfalls eine Anregungswellenlänge von 250 nm verwendet wurde.

5.1.1. Zeitaufgelöste Messungen an TpC und CpT

Bei den nachfolgend gezeigten zeitaufgelösten Messungen wurde jeweils eine Lösung ($V = 2$ mL) mit TpC bzw. CpT (jeweils 5 mM pro Dimer) bei 250 nm angeregt. Die verwendeten Anregungsimpulse mit einer Anregungsenergie von $3,4 \mu\text{J}$, einer Impulsdauer von 3 ns und einem Bündeldurchmesser von ca. $170 \mu\text{m} \times 170 \mu\text{m}$ wurden in einem durchstimmbaren OPO-Lasersystem erzeugt (siehe dazu Unterabschnitt 3.3.3). Bei beiden Messungen wurden jeweils drei Messbereiche mit den Zentralwellenlängen 5900 nm, 6380 nm und 6860 nm (entspricht 1695 cm^{-1} , 1567 cm^{-1} und 1458 cm^{-1}) verknüpft, um eine spektrale Abdeckung im Mittelinfraroten von 1396 cm^{-1} bis 1782 cm^{-1} zu erhalten. Es wurde eine Durchflussküvette benutzt, um die Probenlösung zwischen zwei Anregungsimpulsen auszutauschen (siehe Abschnitt 3.4). Die maximale Verzögerungszeit zwischen Anregungsimpuls und Abtastimpuls hat $20 \mu\text{s}$ betragen.

Da die Reaktionskinetiken innerhalb der ersten Mikrosekunde abgeschlossen sind und sich keine Absorptionsänderungen im Bereich von $1 \mu\text{s}$ bis $20 \mu\text{s}$ zeigen, sind in Abbildung 5.1 und Abbildung 5.2 nur die Daten bis zu einer Verzögerungszeit von $1 \mu\text{s}$ abgebildet. Um die sigmoidalen Signaturen der Lösungsmittelerwärmung global zu korrigieren, wurden die Absorptionsänderungen im späten Mikrosekundenbereich ($> 10 \mu\text{s}$) gemittelt und von den restlichen Messwerten subtrahiert [Sch08, Pil16].

Bei den Messungen im Nano- bis Mikrosekundenbereich kann es bei Verzögerungszeiten um 100 ns zu einem Störsignal kommen. Die Störsignale werden durch eine Druckwelle und/oder eine thermische Linse erzeugt, wenn es durch die Absorption der Anregungsimpulse zu einer lokalen Erwärmung des Lösungsmittels (hier D_2O) in der Küvette kommt. Eine Erwärmung des Lösungsmittels hat Dichteänderungen zur Folge, die sich gewissermaßen wie eine Druckwelle zeitabhängig ausbreiten. Der Gradient in der Dichteverteilung führt zu einem Brechungsindexgradienten und folglich zu einer Ablenkung der mittelinfraroten Abtastimpulse. Dieser Effekt erstreckt sich über den gesamten Spektralbereich. Sobald zu späteren Verzögerungszeiten ein thermisches Gleichgewicht in der Probenlösung erreicht wird, verschwindet damit auch das Störsignal. Bei den vorliegenden Daten war dieser

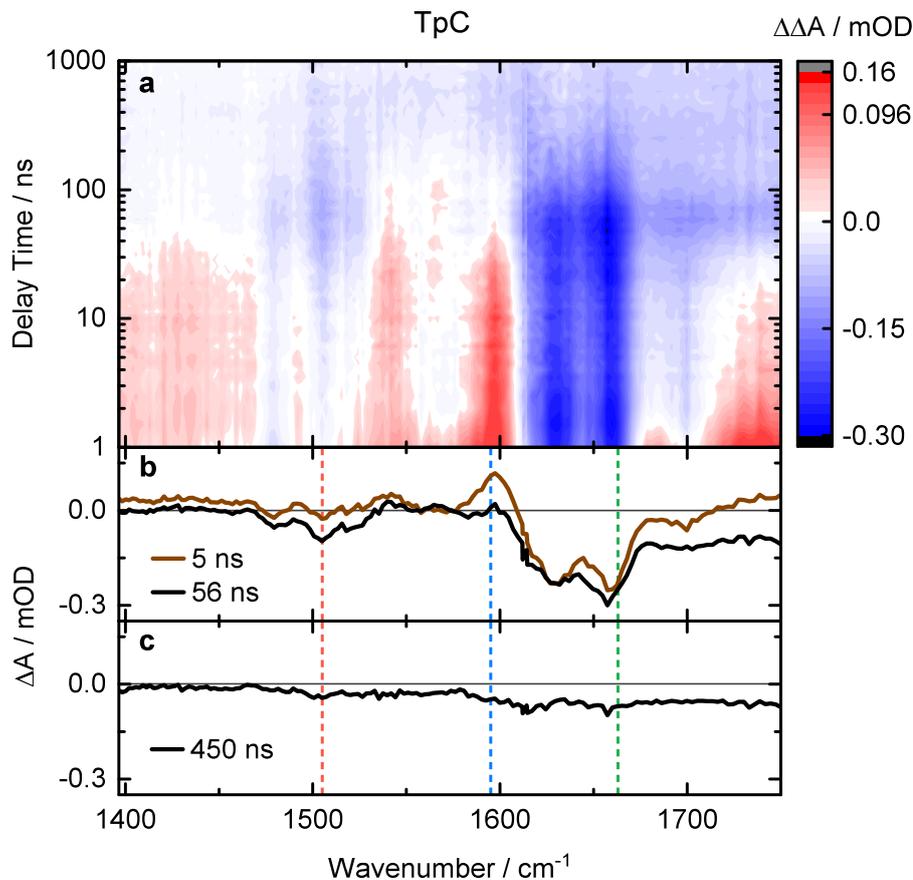


Abbildung 5.1.: (a) Konturdarstellung der Nanosekundenmessung (Anregungswellenlänge $\lambda = 250 \text{ nm}$) an TpC ($c = 5 \text{ mm}$) mit logarithmischer Zeitachse. Das Signal der Lösungsmittelerwärmung wurde subtrahiert (Details siehe Text). (b) Transiente Spektren zu den Verzögerungszeiten 5 ns und 56 ns sowie 450 ns (c). Senkrechte Linien bei 1505 cm^{-1} (rot), 1595 cm^{-1} (blau) und 1663 cm^{-1} (grün) markieren die Positionen der zeitlichen Verläufe der Absorptionsänderungen in Abbildung 5.3 a.

Effekt, in Abhängigkeit von den experimentellen Randbedingungen, unterschiedlich stark ausgeprägt und wurde nicht korrigiert.

Die Absorptionsänderungen der Nanosekundenmessungen an TpC und CpT sind jeweils in Abbildung 5.1 a und Abbildung 5.2 a als Konturdarstellung in Abhängigkeit von der Zeit (logarithmische Achse) und der Wellenzahl abgebildet. Negative Absorptionsänderungen werden in blau und positive in rot dargestellt. Da sich die Daten von TpC und CpT sehr ähneln, beziehen sich die nachfolgenden Beschreibungen auf beide Proben. Zusätzlich zu den Konturdarstellungen sind in Abbildung 5.1 b, c und Abbildung 5.2 b, c jeweils transiente Spektren zu den Verzögerungszeiten 5 ns, 56 ns und 450 ns für TpC und CpT abgebildet.

In den ersten 10 ns nach der Anregung sind insbesondere die Absorptionsabnahme im Bereich von 1610 cm^{-1} bis 1720 cm^{-1} und die Absorptionszunahme um 1600 cm^{-1}

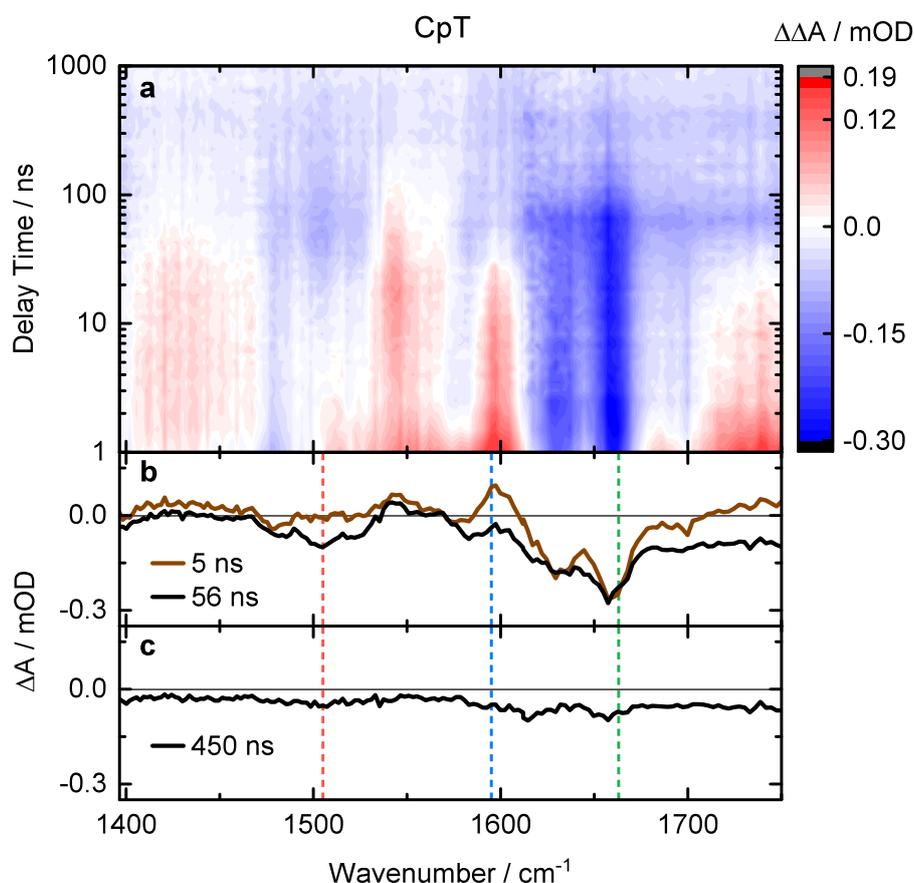


Abbildung 5.2.: (a) Konturdarstellung der Nanosekundenmessung (Anregungswellenlänge $\lambda = 250$ nm) an CpT ($c = 5$ mm) mit logarithmischer Zeitachse. Das Signal der Lösungsmittelerwärmung wurde subtrahiert (Details siehe Text). (b) Transiente Spektren zu den Verzögerungszeiten 5 ns und 56 ns sowie 450 ns (c). Senkrechte Linien bei 1505 cm^{-1} (rot), 1595 cm^{-1} (blau) und 1663 cm^{-1} (grün) markieren die Positionen der zeitlichen Verläufe der Absorptionsänderungen in Abbildung 5.3 b.

hervorzuheben. Zwischen 1610 cm^{-1} und 1720 cm^{-1} weisen sowohl Thymin als auch Cytosin Schwingungsbanden auf, die auf Carbonyl-Streckschwingungen und Ringschwingungen zurückzuführen sind (siehe Abbildung 4.2 und Tabelle 4.1 für eine Zuordnung der Schwingungsmoden von TpC und CpT). Im Bereich zwischen 1505 cm^{-1} und 1525 cm^{-1} , in dem zwei charakteristische Schwingungsbanden von Cytosin liegen, ist kein initiales Ausbleichen (Absorptionsabnahme) zu beobachten. Das transiente Spektrum bei 5 ns in Abbildung 5.1 b bzw. Abbildung 5.2 b weist somit keine Absorptionsänderungen in diesem Spektralbereich auf. Im transienten Spektrum bei 56 ns zeigt sich hingegen ein verzögertes Ausbleichen zwischen 1505 cm^{-1} und 1525 cm^{-1} . Die initiale Absorptionszunahme um 1600 cm^{-1} erstreckt sich bis ca. 50 ns nach der Anregung. Dies ist insbesondere beim Vergleich der transienten Spektren zu den Verzögerungszeiten 5 ns und 56 ns (siehe Abbildung 5.1 b und Abbildung 5.2 b) gut zu erkennen. Im Bereich um 1550 cm^{-1} nimmt die

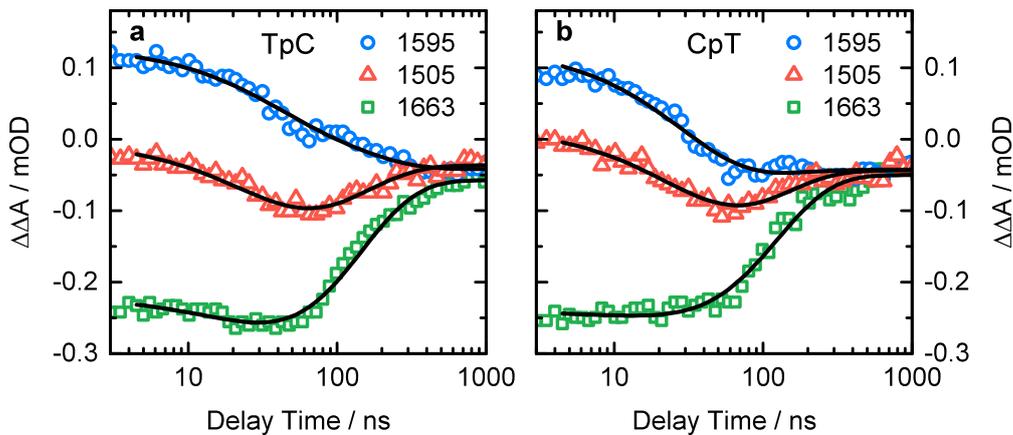


Abbildung 5.3.: Zeitliche Verläufe der Absorptionsänderungen von TpC (a) und CpT (b) bei den Wellenzahlen 1505 cm^{-1} (rot), 1595 cm^{-1} (blau) und 1663 cm^{-1} (grün). Die Anpasskurven sind jeweils als durchgezogene schwarze Linien aufgetragen.

Absorption auf einer Zeitskala von ca. 50 ns leicht zu. Etwa 100 ns nach der Anregung kommt es zum Zerfall der positiven Bande um 1550 cm^{-1} und zugleich zu einer Erholung der Grundzustandsbanden zwischen 1610 cm^{-1} und 1720 cm^{-1} . Zu späteren Verzögerungszeiten zeigen sich keine signifikanten Absorptionsänderungen (siehe transiente Spektren bei 450 ns, Abbildung 5.1 c und Abbildung 5.2 c).

In Abbildung 5.1 b, c und Abbildung 5.2 b, c markieren die senkrechten Linien bei 1505 cm^{-1} (rot), 1595 cm^{-1} (blau) und 1663 cm^{-1} (grün) die Positionen der zeitlichen Verläufe der Absorptionsänderungen, welche in Abbildung 5.3 für TpC und CpT gezeigt sind. Mithilfe dieser Darstellung lassen sich die Reaktionskinetiken bei verschiedenen Wellenzahlen direkt miteinander vergleichen und ermöglichen eine weitergehende Analyse der Daten. Dabei zeigt sich, dass bei 1595 cm^{-1} der Zerfall eines angeregten Zustands auf einer Zeitskala von etwa 30 ns zu beobachten ist. Gleichzeitig kommt es bei 1505 cm^{-1} zu einem verzögerten Ausbleichen, aber noch zu keiner Erholung des Grundzustands bei 1663 cm^{-1} . Sobald sich die Bande bei 1505 cm^{-1} auf einer Zeitskala von etwa 100 ns erholt, erholt sich auch der Grundzustand. Offenbar kommt es aus dem ersten angeregten Zustand (1595 cm^{-1}) innerhalb von 30 ns zu einer Besetzung eines zweiten angeregten Zustands (Intermediat), welcher auf einer Zeitskala von ca. 100 ns in den Grundzustand zerfällt.

Beim initialen Ausbleichen bei 1663 cm^{-1} handelt es sich um die Absorption der Carbonyl-Streckschwingungen von Thymin. Das verzögerte Ausbleichen bei 1505 cm^{-1} ist auf die Absorption von Cytosin zurückzuführen, da sich in diesem Spektralbereich keine Schwingungsbanden von Thymin befinden (siehe Abbildung 4.2 und Tabelle 4.1). Die Erholung der Grundzustandsabsorptionen von Thymin (1663 cm^{-1}) und Cytosin (1505 cm^{-1}) erfolgt zeitgleich auf einer Zeitskala von etwa 100 ns.

Die Signatur bei 1595 cm^{-1} deutet auf den Zerfall des Triplet-Zustands von Thymin hin, welcher im Bereich von 1600 cm^{-1} eine charakteristische Absorptionsbande aufweist [Pil14,

Har08]. Ein ähnliches spektrales Muster wurde auch bei der Nanosekundenmessung an TpT beobachtet [Liu16b, Gon19]. Sowohl die Besetzung des Triplett-Zustands (1595 cm^{-1}) als auch das Ausbleichen der Absorption des Thymins (1663 cm^{-1}) zeigen sich bereits zu Beginn des Messfensters. Das Ausbleichen der Grundzustandsbanden von Cytosin (1505 cm^{-1}) tritt hingegen erst ca. 30 ns nach der Anregung verzögert auf. Daher kann angenommen werden, dass es sich beim initialen Zustand, der schon bei wenigen Nanosekunden vorhanden ist, um einen auf dem Thymin lokalisierten angeregten Triplett-Zustand handelt, an dem das Cytosin nicht beteiligt ist.

Mit dem Zerfall des Triplett-Zustands nach ca. 30 ns kommt es noch zu keiner Erholung der Grundzustandsbande von Thymin bei 1663 cm^{-1} . Stattdessen tritt ein verzögertes Ausbleichen der Grundzustandsbande von Cytosin bei 1505 cm^{-1} auf. In Abbildung 5.1 a und Abbildung 5.2 a ist zudem zu erkennen, dass gleichzeitig die Absorption um 1550 cm^{-1} leicht zunimmt. Aufgrund dessen kann gefolgert werden, dass der Zerfall des Triplett-Zustands von Thymin zur Besetzung eines Zwischenzustands führt, an dem sowohl Thymin als auch Cytosin beteiligt sind. Dieser Zwischenzustand zerfällt zeitgleich zur Erholung der Grundzustandsabsorptionen von Thymin und Cytosin auf einer Zeitskala von 100 ns in den Grundzustand. Die Zuordnung dieses Intermediats und die Bestimmung der Zeitkonstanten werden im nächsten Abschnitt beschrieben.

5.1.2. Identifikation der Zustände

Sowohl für TpC (Abbildung 5.1) als auch für CpT (Abbildung 5.2) wurde jeweils eine biexponentielle Anpassung im Zeitbereich von 5 ns bis 1000 ns vorgenommen. Das multiexponentielle Modell zur Anpassung der Daten wurde bereits in Unterabschnitt 3.3.6 beschrieben. Eine gute Repräsentation der vorliegenden Daten kann durch eine multiexponentielle Anpassung mit zwei veränderlichen Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 sowie einer unendlichen Komponente (Offset), die eine konstante Absorptionsänderung darstellt, erreicht werden.

Eine globale Anpassung über den gesamten Spektralbereich lieferte aufgrund nahe beieinander liegender Zeitkonstanten und der ca. 100 ns nach der Anregung auftretenden Störsignale aufgrund einer Druckwelle bzw. einer thermischen Linse (siehe Unterabschnitt 5.1.1) keine eindeutigen Ergebnisse mit klaren Amplitudenspektren (DADS, siehe Unterabschnitt 3.3.6). Daher wurden die Zeitkonstanten zunächst nur für die Daten im Bereich von 1551 cm^{-1} bis 1702 cm^{-1} iteriert, weil dies der Spektralbereich mit den größten Signalen ist. Die mit dieser Methode erhaltenen Zeitkonstanten für TpC (30 ns und 120 ns) und CpT (30 ns und 100 ns) stimmen für beide Proben sehr gut überein. Für die weitere Anpassung der Daten im gesamten Spektralbereich von 1396 cm^{-1} bis 1782 cm^{-1} wurden die zuvor erhaltenen Zeitkonstanten als feste Parameter vorgegeben. Hiermit konnten die DADS von TpC und CpT bestimmt werden, die jeweils zusammen mit dem Offset-Spektrum in Abbildung A.3 (siehe Anhang) gezeigt sind.

Für die weitere Analyse der Daten werden die Ergebnisse von TpC und CpT mit den Ergebnissen der Untersuchungen zu den Triplett-Dynamiken von TpT verglichen [Liu16b].

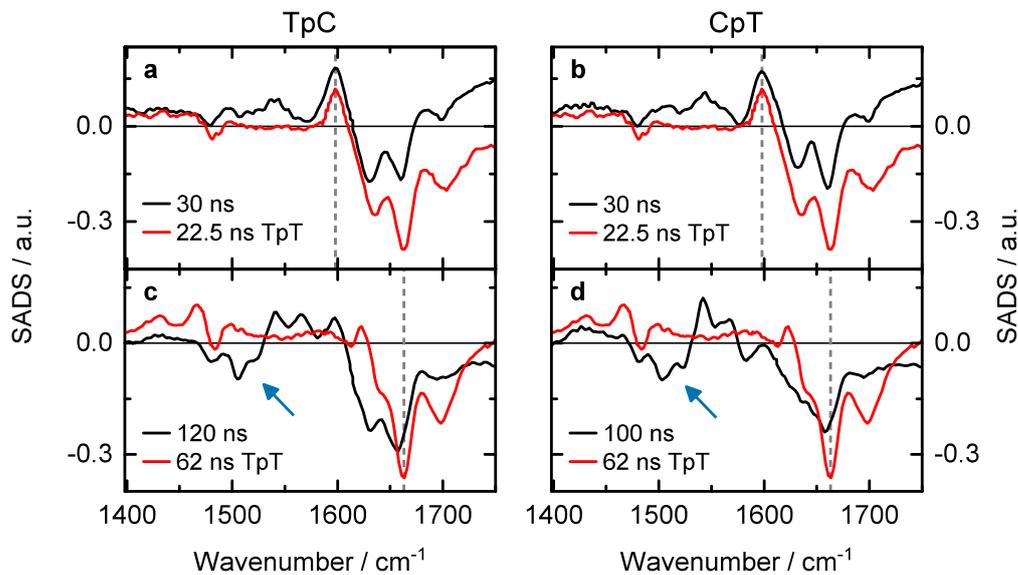


Abbildung 5.4.: SADS von TpC (a, c) und CpT (b, d) jeweils im Vergleich mit den SADS von TpT (rot; nicht skaliert) [Daten von TpT entnommen aus [Liu16b]]. Markiert sind die Absorptionsbande des Triplet-Zustands von Thymin (1595 cm^{-1}) sowie das Ausbleichen der Grundzustandsbanden von Thymin (1663 cm^{-1}) und Cytosin (1505 cm^{-1} bis 1525 cm^{-1} , blaue Pfeile).

Wie bei TpC und CpT konnte bei der Nanosekundenmessung an TpT ebenfalls ein biexponentieller Zerfall, allerdings mit leicht unterschiedlichen Zeitkonstanten von 22,5 ns und 62 ns, beobachtet werden. Die Zustandsdifferenzspektren (engl.: *species associated difference spectra*, SADS) für TpC, CpT und TpT (Daten entnommen aus [Liu16b]) sind in Abbildung 5.4 abgebildet. Eine allgemeine Beschreibung der Vorgehensweise zur Bestimmung von SADS findet sich in [Dom14].

Die SADS von TpC und CpT zur kurzen Zeitkonstanten $\tau_1 = 30\text{ ns}$ haben große Ähnlichkeiten zum SADS von TpT mit der sehr ähnlichen Zeitkonstanten von $\tau_1 = 22,5\text{ ns}$ (siehe Abbildung 5.4 a, b). So ist in allen drei Proben die positive Bande bei 1595 cm^{-1} vorhanden, die charakteristisch für den Triplet-Zustand des Thymins ist. Zusätzlich ist das Ausbleichen der Absorptionsbanden von Thymin im Bereich zwischen 1610 cm^{-1} und 1720 cm^{-1} zu erkennen. Wie bereits im vorherigen Abschnitt gezeigt, ist im Bereich zwischen 1505 cm^{-1} und 1525 cm^{-1} , in dem zwei charakteristische Schwingungsbanden von Cytosin liegen, keine Absorptionsabnahme zu beobachten. Somit ist das Cytosin an dem ersten Zustand nicht beteiligt. Die Zeitkonstante von 30 ns lässt sich daher eindeutig dem Zerfall eines Triplet-Zustands zuweisen, der auf dem Thymin lokalisiert ist.

Die SADS von TpC und CpT zu den Zeitkonstanten $\tau_2 = 120\text{ ns}$ bzw. $\tau_2 = 100\text{ ns}$ weisen einige Unterschiede zum SADS von TpT zur Zeitkonstanten $\tau_2 = 62\text{ ns}$ auf (siehe Abbildung 5.4 c, d). Bei TpC und CpT taucht ein Ausbleichen bei 1505 cm^{-1} und 1525 cm^{-1} auf, was auf die Grundzustandsbanden von Cytosin zurückzuführen ist. Gleichzeitig ist das Ausbleichen der Absorptionsbanden von Thymin bei 1663 cm^{-1} weiterhin vorhanden.

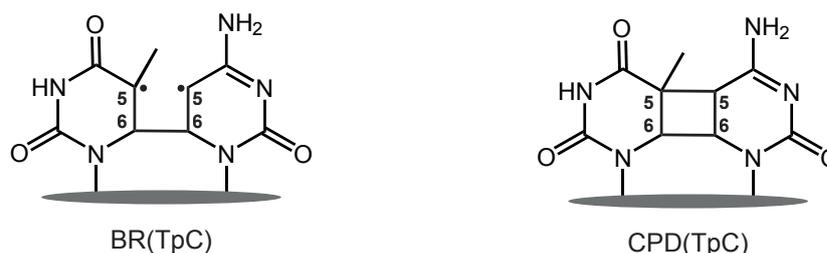


Abbildung 5.5.: Das Biradikal (BR) (links, am Beispiel von TpC) wird als Intermediat bei der Bildung des CPD-Schadens (rechts) von TpC und CpT (nicht abgebildet) postuliert. Im Biradikal ist zwischen den C6-Atomen eine Einfachbindung ausgebildet und an den C5-Atomen liegt jeweils ein Radikal vor. Durch Ringschluss kann aus dem Biradikal der CPD-Schaden (rechts) entstehen.

Daraus lässt sich schließen, dass sowohl Cytosin als auch Thymin am zweiten Zustand beteiligt sind.

Sowohl für TpT [Liu16b] als auch für das Oligomer (dT)₁₈ [Pil14] wurden die Bildung und der Zerfall eines Intermediats auf einer sehr ähnlichen Zeitskala von ca. 60 ns beobachtet. Dabei wurde postuliert, dass ein auf einer Thymin-Base lokalisierter Triplett-Zustand in ein Intermediat übergeht, an dem zwei Thymin-Basen beteiligt sind. In der weiteren Auswertung wurde das Intermediat als ein Triplett-Biradikal identifiziert.

Im Biradikal ist zwischen den C6-Atomen zweier benachbarter Pyrimidin-Basen eine Einfachbindung ausgebildet, während an den C5-Atomen jeweils ein ungepaartes Elektron vorliegt (siehe Abbildung 5.5). Die Spins der ungepaarten Elektronen sind parallel ausgerichtet (siehe Abschnitt 2.2), weshalb sich das Biradikal nach wie vor in einem Triplett-Zustand befindet. Ein solches Biradikal im Triplett-Zustand wurde bereits zuvor in der Literatur als Intermediat beim Zerfall eines lokalen Thymin-Tripletts vorhergesagt, wenn sich die Thymin-Base in unmittelbarer Nähe zu einer weiteren Thymin-Base im Grundzustand befindet [WB70, Cli10, ZE06].

Die Bildung eines Biradikal-Zustandes könnte auch die Beobachtungen an TpC und CpT erklären. Ein Triplett-Zustand, der auf einem Thymin lokalisiert ist, zerfällt über ein Intermediat, an dem Thymin und Cytosin beteiligt sind, in den Grundzustand. Beide Übergänge erfolgen auf ähnlichen Zeitskalen wie im Pyrimidin-Dimer TpT. Es wird daher postuliert, dass es sich bei dem Intermediat in TpC und CpT ebenfalls um ein Biradikal handelt, welches in Abbildung 5.5 am Beispiel von TpC abgebildet ist. Ein Vergleich der spektralen Signaturen mit quantenchemischen Berechnungen, die von Dr. Wolfgang Schreier mit der Computerchemie-Software *gaussian 03* [M J04] durchgeführt wurden (Details siehe [Gon19] und zugehörige Supporting Information), stützt dieses Reaktionsmodell.

In Abbildung 5.3 ist zu erkennen, dass gleichzeitig zum Zerfall des Biradikals die Erholung der Grundzustandsabsorptionen von Thymin und Cytosin erfolgt. Das bedeutet, dass der überwiegende Anteil der gebildeten Biradikal-Intermediate in den Grundzustand zerfällt. Durch Ringschluss ist auch die Bildung eines CPD-Schadens möglich, wenn es zwischen den zwei ungepaarten Elektronen an den C5-Atomen zu einer kovalenten

Bindung kommt (siehe Abbildung 5.5). Eine direkte Beobachtung dieser CPD-Bildung ist allerdings im Rahmen der Messgenauigkeit bei den hier vorgestellten zeitaufgelösten Messungen nicht möglich. Bei den photosensibilisierten stationären Messungen mit Anregung im UV-A-Bereich konnte gezeigt werden, dass die Quantenausbeute der CPD-Bildung aus dem Triplet-Zustand für TpC und CpT lediglich bei $1,5\% \pm 0,5\%$ liegt (siehe Unterabschnitt 4.3.2). Darauf basierend würde man für die charakteristischen Signaturen der CPD-Schäden in den zeitaufgelösten Messungen Signale im Bereich einiger μOD erwarten, die hier nicht zuverlässig auflösbar waren.

5.2. Triplet-Photosensibilisierung von CpC

In Abschnitt 5.1 wurden die zeitaufgelösten Messungen an TpC und CpT vorgestellt, wobei eine direkte Anregung der Pyrimidin-Dimere ohne Photosensibilisator erfolgte. Es konnte gezeigt werden, dass es nach der Anregung zunächst zu einer lokalen Besetzung des Triplet-Zustands von Thymin kommt. Dieser angeregte Triplet-Zustand zerfällt in ein Intermediat (Biradikal), bei dem sich der angeregte Zustand über beide Basen erstreckt (siehe Abbildung 5.5).

Es wird angenommen, dass bei den photosensibilisierten Belichtungsmessungen an TpC und CpT, die in Abschnitt 4.3 gezeigt wurden, der Triplet-Triplet Energietransfer vom Photosensibilisator 2-M nur zu einer lokalen Besetzung des Triplet-Zustands von Thymin führt. Dann würde, wie bei der direkten Anregung von TpC und CpT, die Anregung des Cytosins erst mit der Bildung eines Biradikals zwischen Thymin und Cytosin erfolgen. Ein Triplet-Triplet Energietransfer von 2-M auf Cytosin erscheint unwahrscheinlich, da Cytosin die höchste Triplet-Energie aller DNA-Basen hat (siehe Unterabschnitt 2.2.2).

Zur Verifikation dieser Annahme wurde eine photosensibilisierte Nanosekundenmessung an CpC und 2-M durchgeführt. Bei der verwendeten Anregungswellenlänge von $\lambda = 320\text{ nm}$ erfolgt lediglich eine Anregung des Photosensibilisators 2-M, da die Absorption der DNA-Basen im UV-A-Bereich vernachlässigbar ist (siehe Abbildung 2.3). Die Absorptionsspektren von CpC und 2-M im IR-Bereich sind jeweils in Abbildung 4.2 b und in Abbildung 4.5 b abgebildet. Bezüglich einer Zuordnung der Schwingungsbanden von CpC wird auf Tabelle 4.1 verwiesen. Zu den Untersuchungen am Photosensibilisator 2-M im Piko- und Nanosekundenbereich wird auf die Literatur verwiesen [Liu15, Liu16a].

5.2.1. Zeitaufgelöste Messung an CpC und 2-M

Bei der nachfolgend vorgestellten Messung wurde eine Lösung ($V = 3\text{ mL}$) mit CpC ($c = 10\text{ mM}$ pro Dimer) und 2-M ($c = 5\text{ mM}$) mit Anregungsimpulsen der Wellenlänge $\lambda = 320\text{ nm}$ angeregt. In einem durchstimmbaren OPO-Lasersystem (siehe Unterabschnitt 3.3.3) wurden die Anregungsimpulse mit einer Anregungsenergie von $6\text{ }\mu\text{J}$, einer Impulsdauer von 3 ns und einem Bündeldurchmesser von ca. $160\text{ }\mu\text{m} \times 300\text{ }\mu\text{m}$ erzeugt. Es wurden vier Messbereiche mit den Zentralwellenlängen 6000 nm , 6500 nm , 7000 nm und 7500 nm

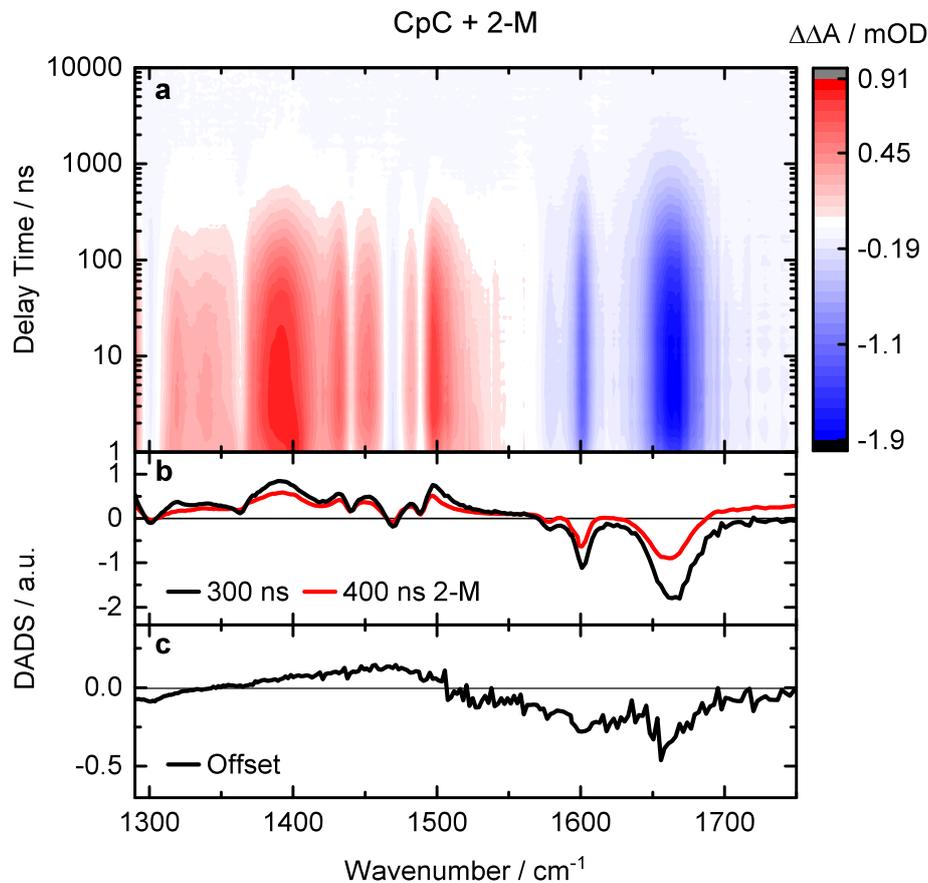


Abbildung 5.6.: (a) Konturdarstellung der Nanosekundenmessung (Anregungswellenlänge $\lambda = 320 \text{ nm}$) an CpC ($c = 10 \text{ mm}$ pro Dimer) und 2-M ($c = 5 \text{ mm}$) mit logarithmischer Zeitachse. Das Signal der Lösungsmittelerwärmung wurde subtrahiert (Details siehe Text). DADS zur Zeitkonstanten 300 ns (b) mit dem DADS für reines 2-M zur Zeitkonstanten 400 ns (rot; nicht skaliert) und Offset-Spektrum (c). [Daten für DADS von 2-M in (b) entnommen aus [Liu15].]

(entspricht 1667 cm^{-1} , 1538 cm^{-1} , 1429 cm^{-1} und 1333 cm^{-1}) verknüpft, wodurch eine spektrale Abdeckung im Bereich zwischen 1283 cm^{-1} und 1751 cm^{-1} erreicht werden konnte. Eine Durchflussküvette wurde benutzt, um die Probenlösung zwischen zwei Anregungsimpulsen auszutauschen (siehe Abschnitt 3.4). Die maximale Verzögerungszeit zwischen Anregungsimpuls und Abtastimpuls hat $20 \mu\text{s}$ betragen.

Die Absorptionsänderungen der Nanosekundenmessung an CpC und 2-M sind in Abbildung 5.6 als Konturdarstellung in Abhängigkeit von der Zeit (logarithmische Achse) und der Wellenzahl abgebildet. Negative Absorptionsänderungen werden in blau und positive in rot dargestellt. Um die sigmoidalen Signaturen der Lösungsmittelerwärmung zu entfernen, wurde eine globale Korrektur durchgeführt, wobei die Absorptionsänderungen im späten Mikrosekundenbereich ($> 14 \mu\text{s}$) gemittelt und von den restlichen Messwerten subtrahiert wurden.

Bis ca. 500 ns nach der Anregung ist ein starkes initiales Ausbleichen bei 1600 cm^{-1} und 1661 cm^{-1} sowie ein etwas schwächeres Ausbleichen bei 1300 cm^{-1} und 1470 cm^{-1} zu beobachten. Etwa auf derselben Zeitskala zeigen sich intensive positive Banden bei 1393 cm^{-1} und 1497 cm^{-1} , etwas schwächere Banden bei 1285 cm^{-1} , 1430 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} und 1480 cm^{-1} und eine breite Absorptionszunahme im Bereich von 1305 cm^{-1} bis 1340 cm^{-1} .

Zu späteren Zeiten sind nur noch schwache Änderungen zu sehen, die hauptsächlich auf eine Erwärmung des Lösungsmittels zurückzuführen sind. Die bei den zuvor beschriebenen Messungen an TpC und CpT beobachteten Artefakte einer Druckwelle bzw. thermischen Linse (siehe Unterabschnitt 5.1.1) sind bei dieser Messung nur schwach ausgeprägt.

Im Vergleich mit dem Grundzustandsspektrum von 2-M (siehe Abbildung 5.7) ist zu erkennen, dass die negativen Absorptionsänderungen auf das Ausbleichen der Grundzustandsbanden von 2-M zurückzuführen sind. Anhand der Ergebnisse der zeitaufgelösten Experimente an 2-M [Liu15] lassen sich die positiven Absorptionsänderungen der hier vorgestellten Messung an CpC und 2-M der Absorption des Triplet-Zustands von 2-M zuordnen. Für weitere Details zum Triplet-Zustand von 2-M wird auf [Liu15] und [Liu16a] verwiesen.

Zur weiteren Analyse der Daten wurde das in Unterabschnitt 3.3.6 beschriebene multiexponentielle Modell verwendet. Eine monoexponentielle Anpassung liefert eine Zeitkonstante von ca. 300 ns sowie eine unendliche Komponente (Offset), die eine konstante Absorptionsänderung darstellt. Die entsprechenden Amplitudenspektren (DADS) sind in Abbildung 5.6 b und c abgebildet. In Abbildung 5.6 b ist zusätzlich das Amplitudenspektrum zur Zeitkonstanten von 400 ns der Nanosekundenmessung an 2-M ($c = 5\text{ mm}$) abgebildet (Daten entnommen aus [Liu15]). Die DADS der zwei gegenübergestellten Messungen an CpC und 2-M sowie an reinem 2-M stimmen sehr gut überein und die Unterschiede in den Zeitkonstanten sind im Rahmen der Messgenauigkeit.

In der zeitaufgelösten Messung an CpC und 2-M zeigen sich lediglich Signaturen des Photosensibilisators 2-M und ein Zerfall des Triplet-Zustands mit einer Zeitkonstanten von 300 ns. Es gibt keinen Hinweis auf ein Quenchen des angeregten Triplet-Zustands von 2-M durch Cytosin oder eine Bildung des Triplet-Zustands von Cytosin. Im Bereich der charakteristischen Schwingungsbanden von Cytosin, beispielsweise um 1510 cm^{-1} (siehe Abbildung 4.2 b und Tabelle 4.1), sind keine Absorptionszunahmen zu sehen. Daraus lässt sich schließen, dass es keine Beteiligung der Cytosin-Basen an den beobachteten Absorptionsänderungen gibt. Bei einer vergleichbaren zeitaufgelösten Messung an TpT und 2-M, bei der die Konzentration von TpT mit $c = 9,16\text{ mm}$ pro Dimer ähnlich hoch war wie die Konzentration von CpC mit $c = 10\text{ mm}$ pro Dimer, konnte hingegen ein effizienter Triplet-Triplet-Energietransfer vom Photosensibilisator auf das Thymin beobachtet werden. Demzufolge ist die Triplet-Energie von 2-M zu niedrig, um den Triplet-Zustand von Cytosin zu besetzen. Für eine Bestätigung dieser Annahme wurde zusätzlich ein stationäres Belichtungsexperiment an einer Lösung mit CpC und 2-M durchgeführt, welches im nachfolgenden Unterabschnitt präsentiert wird.

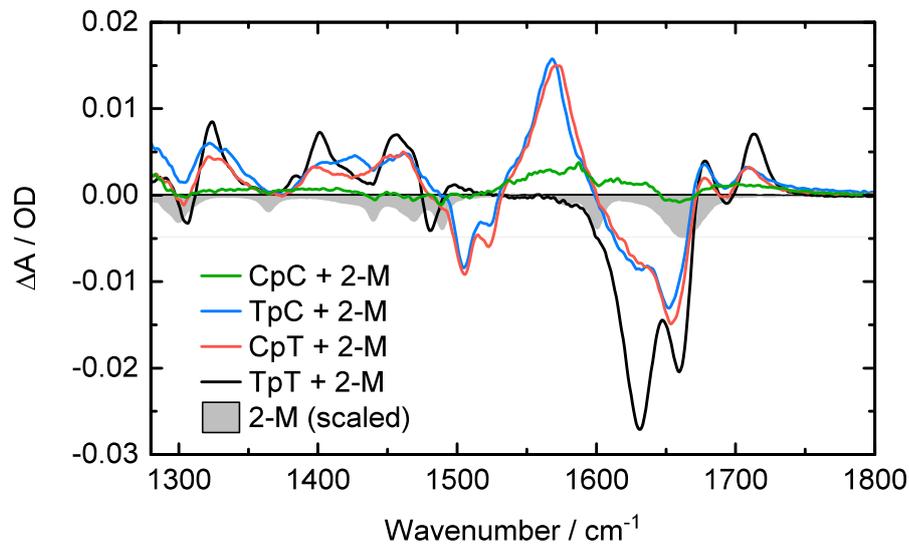


Abbildung 5.7.: Absorptionsdifferenzspektrien der photosensibilisierten Belichtung ($c(2-M) = 5 \text{ mm}$, Anregungswellenlänge $\lambda = 320 \text{ nm}$) von CpC ($c = 2,5 \text{ mm}$ pro Dimer; Belichtungs-dosis 46 J), TpC und CpT (jeweils $c = 2,5 \text{ mm}$ pro Dimer und 37 J) sowie von TpT ($c = 2,1 \text{ mm}$ pro Dimer; 48 J). Grau unterlegt ist das skalierte Absorptionsspektrum von 2-M.

5.2.2. Photosensibilisierte Belichtung von CpC

Bei der zeitaufgelösten Messung an CpC und 2-M, welche im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, konnte kein Quenchen des angeregten Triplett-Zustands von 2-M durch Cytosin und somit auch keine Anregung des Cytosins beobachtet werden. Sollte hingegen doch ein geringer Triplett-Triplett-Energietransfer von 2-M auf Cytosin erfolgen, welcher in der zeitaufgelösten Messung nicht gemessen werden kann, würde dieser nach einer gewissen Zeit zu einer Anhäufung von CPD-Schäden zwischen den Pyrimidin-Dimeren führen. Signaturen dieser CPD-Schäden wären im Verlauf einer stationären Belichtung zu beobachten.

Es wurde daher eine Messung durchgeführt, bei dem eine Lösung mit CpC ($c = 2,5 \text{ mm}$ pro Dimer) und 2-M ($c = 5 \text{ mm}$) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 320 \text{ nm}$ mit einer Belichtungs-dosis von 46 J belichtet wurde. Im Absorptionsdifferenzspektrum, welches in Abbildung 5.7 abgebildet ist, sind nur vernachlässigbare Absorptionsänderungen zu beobachten. Zum direkten Vergleich sind auch die Absorptionsdifferenzspektrien von TpC und CpT sowie von TpT gezeigt. Die photosensibilisierten (jeweils $c(2-M) = 5 \text{ mm}$) Messungen an TpC und CpT (jeweils $c = 2,5 \text{ mm}$ pro Dimer) wurden mit einer Belichtungs-dosis von jeweils 37 J und die Messung an TpT ($c = 2,1 \text{ mm}$ pro Dimer) mit einer Belichtungs-dosis von 48 J durchgeführt.

Wie aus Abschnitt 4.3 bereits bekannt, zeigt sich bei TpC, CpT und TpT das Ausbleichen der Grundzustandsbanden von Thymin und Cytosin zwischen 1475 cm^{-1} und 1530 cm^{-1} sowie zwischen 1600 cm^{-1} und 1680 cm^{-1} (siehe Abbildung 4.2 für die Grundzustands-

banden und Tabelle 4.1 für die Zuordnung der Schwingungsbanden). Es bilden sich auch die charakteristischen Markerbanden des CPD-Schadens (siehe Abbildung 2.6) im Fingerprint-Bereich bei 1320 cm^{-1} , 1402 cm^{-1} und 1465 cm^{-1} sowie zwischen 1680 cm^{-1} und 1720 cm^{-1} . Zusätzlich tritt bei TpC und CpT die für die Cytosin enthaltenden Pyrimidin-Dimere charakteristische CPD-Bande um 1570 cm^{-1} auf (siehe Unterabschnitt 4.3.1).

Bei der photosensibilisierten Belichtung von CpC sind hingegen lediglich sehr geringe negative Absorptionsänderungen und keine charakteristischen CPD-Banden festzustellen. Das schwach ausgebildete Ausbleichen um 1600 cm^{-1} und 1660 cm^{-1} ist im Wesentlichen auf das absorptionsinduzierte Degradieren des Photosensibilisators 2-M zurückzuführen, wie ein Vergleich mit dessen skaliertem Grundzustandsspektrum zeigt (grau unterlegtes Spektrum in Abbildung 5.7). Dies zeigt, dass eine mögliche CPD-Bildung zwischen den Cytosin-Basen von CpC bei der Photosensibilisierung mit 2-M wenn überhaupt, dann mit deutlich geringerer Quantenausbeute erfolgt als bei TpC und CpT.

Anhand der im vorherigen Abschnitt gezeigten zeitaufgelösten Messung an CpC und 2-M sowie der photosensibilisierten Belichtungsmessungen an den Cytosin enthaltenden Pyrimidin-Dimeren TpC, CpT und CpC kann gefolgert werden, dass kein Triplett-Triplett-Energietransfer von 2-M auf Cytosin erfolgt. Bei TpC und CpT erfolgt dieser somit jeweils nur auf das Thymin. Mit diesen Ergebnissen und unter Einbeziehung der zeitaufgelösten Messungen an TpC und CpT (siehe Unterabschnitt 5.1.1) kann ein Reaktionsmodell aufgestellt werden, welches die Bildung von CPD-Schäden aus dem angeregten Triplett-Zustand in den Pyrimidin-Dimeren TpC und CpT beschreibt. Dieses Modell wird im nächsten Abschnitt vorgestellt.

5.3. Reaktionsmodell der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand

Mit den Ergebnissen der zeitaufgelösten und stationären Messungen an den verschiedenen Pyrimidin-Dimeren, die in diesem und im vorherigen Kapitel 4 vorgestellt wurden, lässt sich das in Abbildung 5.8 gezeigte Reaktionsmodell der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand für die Cytosin enthaltenden Pyrimidin-Dimere TpC und CpT aufstellen.

Die Besetzung des Triplett-Zustands kann auf zweierlei Arten erfolgen. Entweder über eine direkte Anregung oder eine photosensibilisierte Anregung. Bei der direkten Anregung von TpC bzw. CpT im UV-C-Bereich bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 250\text{ nm}$ wird zunächst der angeregte Singulett-Zustand $^1(\text{TpC})^*$ bzw. $^1(\text{CpT})^*$ besetzt. Aus dem angeregten Singulett-Zustand kann unter anderem über interne Konversion (IC) ein Übergang in den Grundzustand (GS) oder die direkte Bildung von CPD-Schäden, wie sie von TpT bekannt ist [Sch07], erfolgen. Weitere mögliche Prozesse der ultraschnellen Entvölkerung des Singulett-Zustands wurden in Unterabschnitt 2.2.2 behandelt. Im Nanosekundenbereich sind solche ultraschnellen Prozesse bereits abgeschlossen und nicht mehr zu beobachten. Über Interkombination (ISC) kann es aus dem angeregten Singulett-Zustand auch zur

5. Triplett-Dynamiken in Pyrimidin-Dimeren

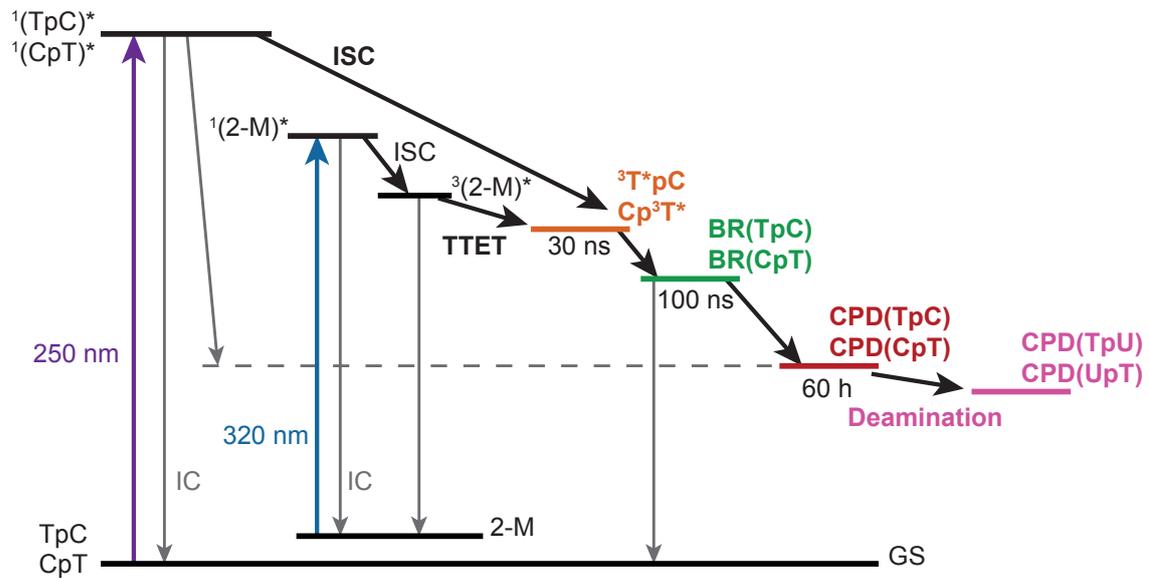


Abbildung 5.8.: Reaktionsmodell der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand für TpC und CpT. Unbeteiligte kurzlebige Zustände sind nicht gezeigt. Direkte UV-C-Anregung ($\lambda = 250$ nm) von TpC bzw. CpT oder photosensibilisierte Anregung (UV-A-Anregung des Photosensibilisators 2-M, $\lambda = 320$ nm) können zur Besetzung des lokalen Triplett-Zustands des Thymins führen ($^3T^*pC$ bzw. Cp^3T^*). Nach ca. 30 ns Bildung eines Biradikals (BR(TpC) bzw. BR(CpT)), welches nach ca. 100 ns überwiegend in den Grundzustand (GS) oder seltener in einen CPD-Schaden CPD(TpC) bzw. CPD(CpT) zerfällt. Die Desaminierung zu CPD(TpU) bzw. CPD(UpT) erfolgt nach etwa 60 h.

Besetzung eines angeregten Triplett-Zustands kommen, der auf dem Thymin lokalisiert ist ($^3T^*pC$ bzw. Cp^3T^*) und eine deutlich längere Lebensdauer bis in den Nanosekundenbereich besitzt.

Zu einer Besetzung des lokalen Triplett-Zustands von Thymin kann es auch über eine photosensibilisierte Anregung kommen. Dabei wird der Photosensibilisator 2-M im UV-A-Bereich bei einer Wellenlänge von $\lambda = 320$ nm in den Singulett-Zustand $^1(2-M)^*$ angeregt, woraus eine Interkombination in den angeregten Triplett-Zustand $^3(2-M)^*$ mit einer Quantenausbeute von 97 % erfolgt (zum Ratenmodell der Photosensibilisierung wird auf Unterabschnitt 4.3.2 verwiesen). Ein Triplett-Triplet-Energietransfer von $^3(2-M)^*$ konnte bei TpC und CpT nur auf das Thymin und nicht auf das Cytosin beobachtet werden. Somit liegt sowohl bei der direkten als auch bei der photosensibilisierten Anregung ein auf dem Thymin lokalisierter angeregter Triplett-Zustand vor.

Der lokale Triplett-Zustand des Thymins zerfällt nach ca. 30 ns in einen Zwischenzustand (Intermediat). Dabei handelt es sich um ein Biradikal (BR(TpC) bzw. BR(CpT)), bei dem der angeregte Zustand über beide Basen delocalisiert ist (siehe Abbildung 5.5). Dieses Intermediat zerfällt mit ca. 100 ns in den meisten Fällen in den Grundzustand, aber es ist auch die Bildung eines CPD-Schadens möglich (CPD(TpC) bzw. CPD(CpT)). Die Quantenausbeute der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand liegt für TpC und CpT im

Bereich von $1,5 \% \pm 0,5 \%$. Im Verlauf von 60 h wird in den CPD-Schäden von TpC und CpT eine Desaminierung des Cytosins zu Uracil beobachtet, was zu den Photoprodukten CPD(TpU) bzw. CPD(UpT) führt, die potentiell mutagen sind (siehe Unterabschnitt 2.3.1).

Das vorgestellte Reaktionsmodell bildet die Triplett-Dynamiken im Nanosekundenbereich, die CPD-Bildung aus dem angeregten Triplett-Zustand und die Desaminierung der CPD-Schäden im Verlauf einiger Stunden in den Pyrimidin-Dimeren TpC und CpT ab und liefert ein umfassendes Bild der Reaktionsdynamiken der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand für TpC und CpT.

5.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Mittels zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie wurden in diesem Kapitel zunächst die Triplett-Dynamiken der Cytosin enthaltenden Pyrimidin-Dimere TpC und CpT bei direkter Anregung ohne Photosensibilisator im UV-C-Bereich im Nanosekundenbereich untersucht. Dabei wurde eine Anregungswellenlänge ($\lambda = 250 \text{ nm}$) gewählt, bei der die Interkombination in den Triplett-Zustand relativ hoch ist.

Der bei TpC und CpT festgestellte biexponentielle Zerfall ähnelt den Reaktionskinetiken von TpT unter vergleichbaren Messbedingungen [Liu16b]. Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer Besetzung eines Triplett-Zustands kommt, der auf dem Thymin lokalisiert ist. Eine Beteiligung von Cytosin ist zunächst nicht zu beobachten. Aus dem lokalen Triplett-Zustand des Thymins erfolgt die Bildung eines Intermediats, bei dem es sich um ein Biradikal handelt und das auch bei TpT [Liu16b] und $(dT)_{18}$ [Pil14] als Zwischenzustand des Triplett-Zerfalls identifiziert werden konnte. Im Biradikal von TpC und CpT ist zwischen den C6-Atomen beider Basen eine Einfachbindung ausgebildet. Es kann zum Ringschluss und somit zur Bildung eines CPD-Schadens kommen, wenn sich auch zwischen den C5-Atomen, an denen jeweils ein Radikal vorliegt, eine kovalente Bindung bildet (siehe Abbildung 5.5). Allerdings ist die Beobachtung dieser CPD-Bildung im Rahmen der Messgenauigkeit bei den vorgestellten zeitaufgelösten Messungen nicht möglich, weil das Biradikal überwiegend in den Grundzustand zerfällt.

Zur Untersuchung der Bildung von CPD-Schäden aus dem Triplett-Zustand von TpC und CpT wurden die in Kapitel 4 präsentierten stationären Messungen durchgeführt. Dabei erfolgte die selektive Anregung des Triplett-Zustands mittels eines Triplett-Triplett-Energietransfers vom Photosensibilisator 2-M, welcher im UV-A-Bereich angeregt wurde und es wurde postuliert, dass es bei der Photosensibilisierung von TpC und CpT ebenfalls zu einer lokalen Besetzung des Triplett-Zustands von Thymin kommt und kein TTET auf das Cytosin stattfindet.

Um diese Annahme zu verifizieren, wurden sowohl eine Nanosekundenmessung als auch eine stationäre Messung an CpC und 2-M mit einer Anregung im UV-A-Bereich ($\lambda = 320 \text{ nm}$) durchgeführt und in diesem Kapitel vorgestellt. Bei keiner der beiden Messungen konnten Signaturen des Ausbleichens der Absorptionsbanden von Cytosin oder Produktbanden von CPD-Schäden beobachtet werden. In den Daten der zeitaufgelösten

5. Triplet-Dynamiken in Pyrimidin-Dimeren

Messung ist, wie in der Messung an reinem 2-M [Liu15], lediglich das Ausbleichen der Grundzustandsbanden von 2-M zu sehen. Daraus kann gefolgert werden, dass beim Triplet-Triplet Energietransfer von 2-M auf TpC bzw. CpT nur der Triplet-Zustand von Thymin angeregt wird.

Anhand dieser Ergebnisse konnte ein Reaktionsmodell für die CPD-Bildung aus dem Triplet-Zustand für TpC und CpT aufgestellt werden. Sowohl bei der direkten als auch bei der photosensibilisierten Anregung von TpC bzw. CpT bildet sich ein auf dem Thymin lokalisierter Triplet-Zustand. Nach ca. 30 ns bildet sich ein Intermediat, ein Biradikal, an dem Thymin und Cytosin beteiligt sind. Das Biradikal zerfällt nach etwa 100 ns überwiegend in den Grundzustand. Es ist auch die Bildung von CPD-Schäden möglich. In Kapitel 4 konnte gezeigt werden, dass in den CPD-Schäden von TpC und CpT im Verlauf von 60 h eine Desaminierung des Cytosins zu Uracil erfolgen kann.

Mit dem hier vorgestellten Modell können die gefundenen Reaktionskinetiken zur CPD-Bildung aus dem Triplet-Zustand vom Nanosekundenbereich bis zu einigen Stunden nach der Anregung vollständig beschrieben werden.

6. Photoaddition des Psoralenderivats AMT in d(TA)-Oligomeren

Psoralene sind natürlich vorkommende photoreaktive Moleküle, die mit der DNA wechselwirken und nach Photoanregung auch an sie binden können (siehe Unterabschnitt 2.4.3). Die kovalenten Bindungen, die bei der Photoaddition der Psoralene an die DNA-Basen, insbesondere an Thymin, entstehen, haben strukturelle Ähnlichkeiten zu CPD-Schäden (siehe Abbildung 2.6). Durch die Ausbildung solcher Bindungen kommt es zu Schäden in der DNA und zu einem möglichen Zelltod. Aufgrund dieser Eigenschaft werden Psoralene in Phototherapien eingesetzt, um bestimmte Hautkrankheiten zu behandeln (PUVA-Therapie) [Bet99, PF92]. Dabei soll eine gezielte UV-Anregung von Psoralenen, die zuvor in erkrankte Zellen eingebracht wurden, das Absterben der Zellen bewirken. Allerdings ist der genaue Reaktionsmechanismus der photoinduzierten Anbindung noch nicht vollständig bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie im Nanobis Mikrosekundenbereich die Cycloaddition eines Psoralenderivats an die Thymin-Basen eines doppelsträngigen DNA-Modellsystems untersucht. Es wurde insbesondere der Frage nachgegangen, ob Singulett- oder Triplett-Zustände des Psoralens bei der Photoaddition beteiligt sind. Zunächst wird in diesem Kapitel eine Einführung in die prinzipiellen Mechanismen der Wechselwirkung zwischen Psoralenen und der DNA sowie eine Beschreibung der verwendeten Proben und deren stationäre Charakterisierung gegeben. Anschließend werden die durchgeführten Anrege-Abtast-Messungen, deren Ergebnisse und ein mögliches Reaktionsmodell beschrieben.

6.1. Wechselwirkung zwischen Psoralen und DNA

In diesem Abschnitt wird ein Überblick über die prinzipiellen Wechselwirkungsmechanismen zwischen Psoralenen und der DNA gegeben [Isa82]. Die Strukturformel von Psoralen, von dem zahlreiche Derivate existieren, ist in Abbildung 6.1 a abgebildet. Hinsichtlich der Wechselwirkungen mit der DNA unterscheiden sich einige der Derivate vom Psoralen dadurch, dass sie beispielsweise keine Bindungen zur DNA eingehen. Für andere Derivate, wie das im Rahmen dieser Arbeit verwendete AMT, trifft die nachfolgende Beschreibung im Wesentlichen zu.

Grundsätzlich können die Wechselwirkungen zwischen Psoralen und DNA in Reaktionen ohne und mit Lichteinwirkung unterteilt werden. Befindet sich Psoralen in einer Lösung mit DNA, erfolgt ohne Lichteinwirkung zunächst eine „dunkle“ Reaktion, bei der sich das planare Psoralen zwischen den Basen der DNA einlagert (interkaliert) (siehe Abbildung 6.2 a).

6. Photoaddition des Psoralenderivats AMT in d(TA)-Oligomeren

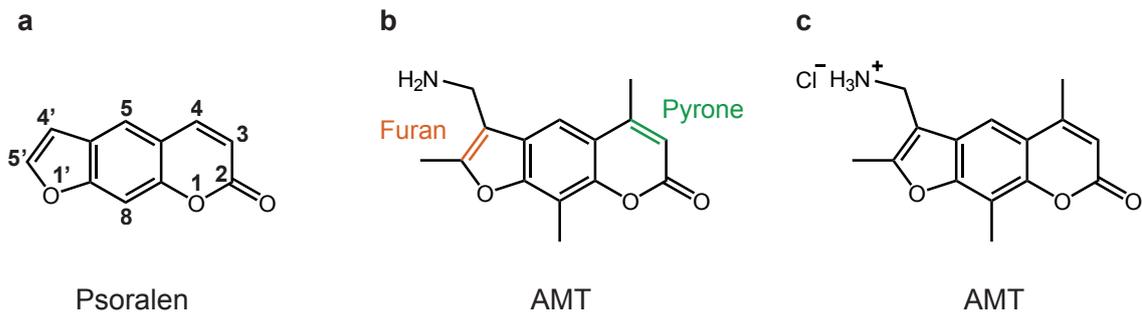


Abbildung 6.1.: Strukturformeln von Psoralen (a), des Derivats AMT (4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen) (b) und von AMT in protonierter Form mit Chloridgegenionen (Hydrochlorid-Salz) (c). Die möglichen Bindungsstellen (Furan, Pyrone) für die DNA-Basen sind in (b) farblich markiert.

Die Interkalationsaffinität von Psoralen in die DNA wird über die Dissoziationskonstante K_D ausgedrückt:

$$K_D = \frac{c_{\text{DNA}} \cdot c_{\text{Pso}}}{c_{\text{Interkalat}}} \quad (6.1)$$

K_D ist somit abhängig von den Gleichgewichtskonzentrationen der freien DNA c_{DNA} (bezogen auf die Basenpaarkonzentration), des freien Psoralens c_{Pso} und der interkalierten Komplexe $c_{\text{Interkalat}}$ [Frö16a]. Je kleiner der K_D -Wert, desto mehr Psoralene liegen interkaliert vor.

Durch Photoanregung des interkalierten Psoralens mit UV-Licht kann es zu einer Cycloaddition zwischen der Furan- (C4'=C5') oder der Pyron-Doppelbindung (C3=C4) (siehe Abbildung 6.1 b) des Psoralens und einer DNA-Base kommen (siehe Abbildung 6.2 b), wobei am häufigsten die C5=C6-Doppelbindung von Thymin beteiligt ist [Kan82b, Oro94, KKN05, SB10]. Bei dieser photoinduzierten Cycloaddition entsteht ein Monoaddukt in der

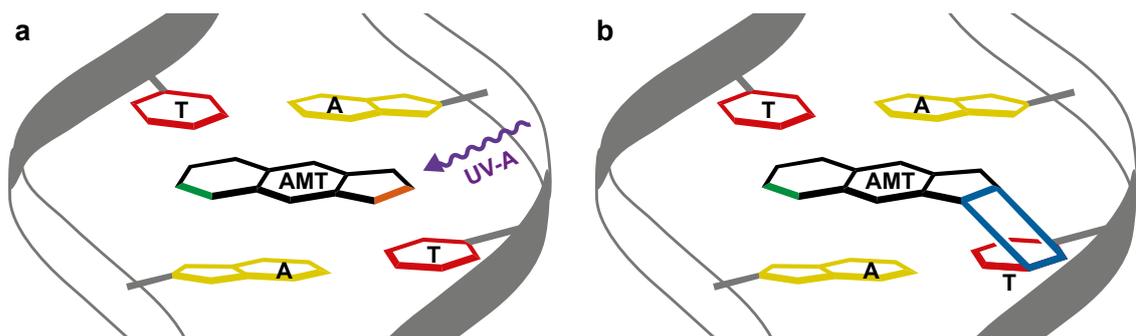


Abbildung 6.2.: Schematische Darstellung der Interkalation und Photoaddition von Psoralen im d(TA)-Doppelstrang. (a) Anregung des interkalierten Psoralenderivats AMT mit UV-A-Licht. Die Pyron- (grün) und die Furan-Doppelbindung (orange) des AMT-Moleküls sind farblich markiert. (b) Bildung eines Monoaddukts durch UV-induzierte Cycloaddition (blaue Bindung) zwischen der Furangruppe des AMT und der C5=C6-Doppelbindung des Thymin.

cis-syn Konfiguration [Kan82a, Hea84]. Die Nomenklatur ist dabei analog zu den bereits beschriebenen Diastereomeren des CPD-Schadens (siehe Abbildung 2.7). Ausgehend von der Position des Psoralens kann die Bindung zum Thymin sowohl in Richtung 3'- als auch in Richtung 5'-Ende des Strangs erfolgen. Infolgedessen existieren zwei Diastereomere des cis-syn Monoaddukts [Cim85].

Wenn das Psoralen über die Furan-Gruppe gebunden ist, kann ein weiteres UV-Photon absorbiert werden. Daraufhin ist eine zweite Photoaddition über die Pyron-Gruppe mit einer weiteren Base möglich, was zu einem Diaddukt führt. Ist das Psoralen hingegen über die Pyron-Gruppe gebunden, können keine Diaddukte gebildet werden [Spi95]. Bei einem Diaddukt ist ein Psoralen sowohl über die Furan- als auch die Pyron-Gruppe an jeweils eine benachbarte Thymin-Base gebunden. Die Ausbildung von Diaddukten führt zu einer sogenannten Vernetzung der DNA (engl.: *interstrand crosslinks*) [CV90, Hea89]. Sowohl die Di- als auch die Monoaddukte können Auswirkungen auf die Replikation der DNA haben und letztendlich zum Zelltod führen.

6.2. Probenpräparation

Psoralenderivat AMT

In Abbildung 6.1 sind die Strukturformeln der Stammverbindung Psoralen (a), von AMT (b) und vom synthetisch erhaltenen AMT in protonierter Form mit Chloridgegenionen (Hydrochlorid-Salz) (c) abgebildet. Letzteres wird der Einfachheit halber nachfolgend auch als AMT bezeichnet. Das für die nachfolgenden Messungen verwendete Psoralenderivat AMT (4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen) wurde von Sascha Fröbel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Gilch, Institut für Physikalische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, synthetisiert [Frö16a]. Für die Messungen wurde das als Hydrochlorid-Salz vorliegende AMT in D₂O gelöst. In Gegenwart von deuteriertem Wasser kommt es zu einem Austausch der Wasserstoffatome der Aminogruppe (NH₂) mit Deuteriumatomen (ND₂).

Im Vergleich zu Psoralen und vielen häufig verwendeten Derivaten, wie zum Beispiel 8-MOP (8-Methoxypsoralen) oder 5-MOP (5-Methoxypsoralen) [Vig85], besitzt AMT eine höhere Wasserlöslichkeit [Isa77, Isa82] sowie eine höhere Interkalationsaffinität unter physiologischen Bedingungen [Frö16a, Frö16b]. Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich AMT als Vertreter aus der Gruppe der Psoralene besonders gut für die Untersuchung der Photoaddition an die DNA [Joh77]. Hinsichtlich der Anbindung an die DNA konnte festgestellt werden, dass AMT im Gegensatz zu einigen anderen Psoralenderivaten keine ausgeprägte Präferenz für bestimmte Sequenzen hat [Cim85, SB10]. Für 8-MOP, 5-MOP und andere Psoralenderivate sind alternierende AT-Sequenzen hingegen Hotspots für die Bildung von Photoaddukten [SM87, BMS88].

Die Anbindung an die DNA erfolgt beim AMT vorzugsweise über die Furan-Doppelbindung (C4'=C5') (siehe Abbildung 6.1 b) [KRH84, Oro94, Hea84]. Dennoch spielt die

Ausbildung von Diaddukten bei den nachfolgend präsentierten Messungen keine Rolle. Nachdem sich nämlich ein Monoaddukt gebildet hat, muss in der DNA zunächst eine Änderung der Konformation erfolgen, bevor durch Absorption eines weiteren Photons ein Diaddukt gebildet werden kann [Joh81, Joh77]. Da die Bildung des Monoaddukts und die Konformationsänderung im Bereich von 1 μ s ablaufen, sind die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Anregungsimpulse mit einer Impulsdauer von ca. 3 ns (siehe Unterabschnitt 3.3.3) zu kurz, um eine zweite Photoaddition zu erzeugen. Darüber hinaus wurde bei den Messungen eine Durchflussküvette benutzt (siehe Abschnitt 3.4), wodurch der Austausch der Probenlösung zwischen zwei Anregungsimpulsen garantiert wird.

Bei den in den zeitaufgelösten Messungen eingesetzten Konzentrationen für AMT und das DNA-Modellsystem d(TA)₂₀ ($c(\text{AMT}) = 1,1 \text{ mM}$ und $c(\text{d(TA)}_{20}) = 6,6 \text{ mM/bp}$)¹ und der vorliegenden Dissoziationskonstanten (Gleichung 6.1) $K_D = 4,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ interkalieren etwa 90 % der AMT-Moleküle, während 10 % frei in der Lösung vorliegen [Frö16b, Die19].

Präparation der Doppelstränge und Mischen mit AMT

In den von Fröbel et al. durchgeführten Untersuchungen zur Photoaddition von AMT an die DNA wurden unter anderem Oligomere verwendet, die auch GC-Basenpaare enthalten haben. Dabei konnte ein photoinduzierter Elektrontransfer vom Guanin auf das AMT nachgewiesen werden, welcher mit einer möglichen Photoaddition konkurriert [Frö15, Frö16b]. Um gezielt nur die Photoaddition zu untersuchen, wurden daher im Rahmen dieser Arbeit d(TA)-Oligomere verwendet, die ausschließlich TA-Basenpaare enthalten.

Bei den verwendeten DNA-Strängen handelt es sich um kommerziell erworbene (IBA GmbH) Oligomere mit jeweils 40 Basen: 5'-d(TA)₂₀-3', im Folgenden abgekürzt mit d(TA)₂₀. Die lyophilisierte DNA wurde in einer Pufferlösung (66 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 3 mM KCl, pD = 7,8) in D₂O gelöst. Anschließend wurde ein „Annealing“ der Proben durchgeführt, wobei jeweils zwei Stränge gewissermaßen miteinander „verschmelzen“ werden. Dieser Vorgang ist notwendig, weil die Stränge zunächst in undefinierter Paarung vorliegen. Die 40 Basen eines Einzelstrangs sind dabei nicht unbedingt mit genau den 40 Basen des Gegenstrangs gepaart. Es können sich auch Haarnadel-Strukturen ausbilden oder mehrere Stränge liegen versetzt gegenüber. Um die Wasserstoffbrückenbindungen zu lösen, wurde die Probenlösung in einem Wasserbad schrittweise auf eine Temperatur von etwa 90 °C erhitzt und anschließend über mehrere Stunden auf Raumtemperatur abgekühlt. Durch das Erhitzen brechen die Wasserstoffbrückenbindungen auf und in der Lösung befinden sich überwiegend Einzelstränge. Das langsame Abkühlen ist entscheidend für eine gleichmäßige Ausbildung von neuen Wasserstoffbrückenbindungen. Das System sucht sich den thermodynamisch stabilsten Zustand, welcher bei der DNA der Doppelstrang ist. Abschließend wurden die beiden Lösungen aus AMT und d(TA)₂₀ gemischt und die gemischte Lösung mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,2 μ m) filtriert, um Ausfällungen und Verunreinigungen zu beseitigen.

¹bp: Konzentration pro Basenpaar

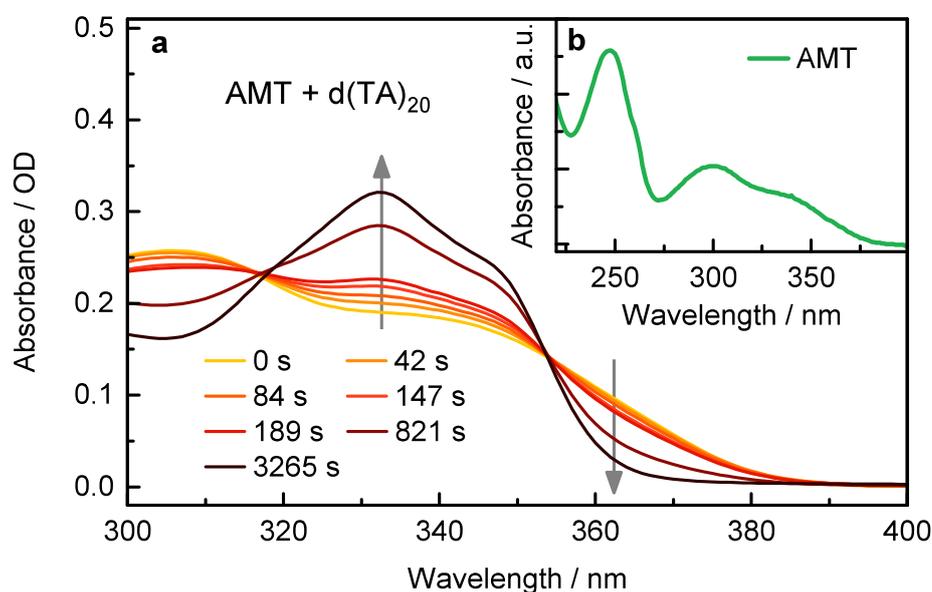


Abbildung 6.3.: (a) Absorptionsspektren nach verschiedenen Belichtungszeiten (Anregungswellenlänge $\lambda = 370$ nm) einer Lösung von AMT und $d(TA)_{20}$ ($c(AMT) = 35 \mu M$, $c(d(TA)_{20}) = 4 \text{ mM/bp}$). Die Absorptionsspektren zeigen eine Zunahme der Absorption bei ~ 330 nm (gekennzeichnet durch einen grauen Pfeil nach oben) und eine Abnahme bei ~ 360 nm (gekennzeichnet durch einen grauen Pfeil nach unten). (b) Absorptionsspektrum von AMT. [Daten in (a) entnommen aus [Die19].]

6.3. Stationäre Charakterisierung

Wie bei der Photosensibilisierung von Pyrimidin-Dimeren, welche in Kapitel 4 vorgestellt wurde, wird bei der Untersuchung der Wechselwirkung zwischen AMT und DNA ebenfalls eine Anregung im UV-A-Bereich gewählt. In diesem Spektralbereich lässt sich AMT selektiv anregen, während eine direkte Anregung der DNA vermieden wird. Durch die Photoanregung von interkaliertem AMT kann es zur Ausbildung von Monoaddukten zwischen AMT und der DNA kommen. Die Aufklärung des zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus und der beteiligten angeregten Zustände war Gegenstand dieser Arbeit. Der nachfolgende Abschnitt gibt zunächst einen Überblick über die Absorptions- und Belichtungsspektren von AMT und $d(TA)_{20}$ sowohl im UV/Vis- als auch im IR-Bereich.

UV/Vis-Bereich

In Abbildung 6.3 sind die Absorptionsspektren nach verschiedenen Belichtungszeiten einer Lösung von AMT und $d(TA)_{20}$ sowie das Absorptionsspektrum von AMT abgebildet. Das Spektrum von AMT (siehe Abbildung 6.3 b) weist drei Absorptionsmaxima (bzw.

-schultern) bei ca. 250 nm, 300 nm und 340 nm auf. Die breite Absorption zwischen 320 nm und 365 nm ist auf die Anregung des niedrigsten Singulett-Zustands S_1 zurückzuführen, bei dem es sich um einen $\pi\pi^*$ -Übergang handelt [MHS71, Cim85, TM06]. Im Rahmen dieser Arbeit ist nur dieser Wellenlängenbereich von Bedeutung, weshalb auf eine Diskussion der anderen Absorptionsbanden verzichtet wird. Details zu den Absorptionsbanden finden sich in [MHS71, Cim85, TM06].

Die Belichtungsexperimente an AMT und d(TA)₂₀ wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Gilch, Institut für Physikalische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, durchgeführt (siehe [Frö16a]). Dabei wurde eine Lösung von AMT (35 μM) und d(TA)₂₀ (4 mM/bp) mit einer Wellenlänge von $\lambda = 370$ nm belichtet ($V = 2$ mL, $d = 1$ cm, $P_0 = 1,4$ mW). Durch die Anregung der interkalierten AMT-Moleküle kann es zur Ausbildung von Monoaddukten kommen, was wiederum zu Absorptionsänderungen führt. Die Absorptionsspektren nach verschiedenen Belichtungszeiten sind in Abbildung 6.3 a abgebildet. Zu Beginn der Belichtung (0 s) ist das Spektrum von interkaliertem AMT in d(TA)₂₀ zu sehen. Mit zunehmender Belichtungsdauer (Endspektrum nach 3265 s) bilden sich immer mehr Monoaddukte und es zeigt sich eine deutliche Absorptionszunahme im Bereich von 318 nm bis 355 nm. Zugleich nimmt die Absorption unterhalb von 318 nm und oberhalb von 355 nm ab. Es ist bekannt, dass die Furanmonoaddukte zwischen 318 nm und 355 nm und die Pyronmonoaddukte unterhalb von 300 nm absorbieren [Oro94]. Im Bereich von 370 nm bis 380 nm absorbiert hingegen nur das interkalierte AMT. Die zwei isosbestischen Punkte bei 318 nm und 355 nm geben somit klare Hinweise darauf, dass es zu keinen Folgereaktionen der während der Belichtung gebildeten Monoaddukte kommt.

Die gezeigten Ergebnisse der Belichtungsexperimente sind bei der Wahl der Anregungswellenlänge zu berücksichtigen, um die Bildung von Folgeprodukten in der Probenlösung zu vermeiden. Systembedingt konnte aber nicht bei allen Messungen dieselbe Anregungswellenlänge benutzt werden. Während die Belichtung im UV/Vis-Bereich bei $\lambda = 370$ nm durchgeführt wurde, wurde bei den nachfolgend beschriebenen stationären Messungen im Infrarotbereich mit einer Wellenlänge von $\lambda = 375$ nm belichtet. Für die Anregungsimpulse in den zeitaufgelösten Messungen wurde eine Wellenlänge von $\lambda = 355$ nm benutzt, weil die Absorption von AMT bei 355 nm signifikant höher als im Bereich um 370 nm ist, was für die zeitaufgelösten Messungen relevant ist. Des Weiteren sind die Leistung und die Stabilität des verwendeten Lasersystems bei 355 nm wesentlich besser, da direkt die Impulse der dritten Harmonischen (THG) des Lasersystems (siehe Unterabschnitt 3.3.3) ausgekoppelt werden können, ohne den OPO-Prozess zu verwenden.

Im vorhergehenden Abschnitt 6.2 wurde bereits erläutert, weshalb die Bildung von Diaddukten bei den verwendeten Anregungsimpulsen mit einer Impulsdauer von ca. 3 ns außer Acht gelassen werden kann, auch wenn die Anregung (355 nm) in einem Bereich erfolgt, in dem nicht nur das interkalierte AMT absorbiert. Darüber hinaus wird bei den zeitaufgelösten Messungen eine Durchflussküvette (siehe Abschnitt 3.4) benutzt, wodurch zwischen zwei aufeinander folgenden Anregungsimpulsen ein Austausch des angeregten Probenvolumens sichergestellt wird. So ist eine Anregung von Photoaddukten unwahrscheinlich.

IR-Bereich

In Abbildung 6.4 a, b sind jeweils die Absorptionsspektren von AMT und d(TA)₂₀ im Mittelinfraroten abgebildet und in Tabelle 6.1 ist die Zuordnung der Schwingungsmoden für beide Proben tabellarisch aufgeführt.

Das Spektrum von AMT ($c = 12 \text{ mm}$) (siehe Abbildung 6.4 a), zeigt eine ausgeprägte Bande bei 1684 cm^{-1} , welche auf eine C=O-Streckschwingung zurückzuführen ist [Soc01]. Eine zweite wichtige Bande befindet sich bei 1596 cm^{-1} und lässt sich einer C=C-Streckschwingung zuordnen. CH₃-Deformationsschwingungen geringerer Amplitude sind im Fingerprint-Bereich bei 1410 cm^{-1} zu sehen.

Die Zuordnung der Schwingungsbanden für d(TA)₂₀ ($c = 6,6 \text{ mm/bp}$) (siehe Abbildung 6.4 b) erfolgt für den relevanten Bereich von 1500 cm^{-1} bis 1800 cm^{-1} , in dem die Schwingungen besonders dominant und eindeutiger zuzuordnen sind [PJT11, BSG03]. Die beiden Banden bei 1572 cm^{-1} und 1619 cm^{-1} werden durch Ringschwingungen im Adenin hervorgerufen, während die Bande bei 1641 cm^{-1} auf Ringschwingungen im Thymin zurückzuführen ist. Carbonyl-Streckschwingungen des Thymins bewirken die Banden bei 1663 cm^{-1} (C4=O4) und 1693 cm^{-1} (C2=O2). In Tabelle 6.1 sind die Banden von d(TA)₂₀ den Schwingungsmoden der Monomere TMP (Thymidin-5'-monophosphat) und AMP (Adenosin-5'-monophosphat) gegenübergestellt. Allerdings ist beim Vergleich der Schwingungsmoden von Monomeren und Oligomeren zu beachten, dass die Lage der Banden im Strang um einige Wellenzahlen geschoben sein kann. Des Weiteren ist im Strang eine Abnahme der Amplituden der Absorptionsbanden zu beobachten. Diese Abnahme basiert auf den Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der Übergangsdipolmomente gestapelter Basen und wird Hypochromie genannt [Tin60]. Vergleichende Gegenüberstellungen der Absorptionsspektren von TMP und (dT)₁₈ sowie AMP und (dA)₁₈ finden sich in [Sch08, Pil16].

Das Spektrum einer Lösung von AMT und d(TA)₂₀ ($c(\text{AMT}) = 1,1 \text{ mM}$, $c(\text{d(TA)}_{20}) = 6,6 \text{ mm/bp}$) ist in Abbildung 6.4 c abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, dass es eine große Ähnlichkeit zum Absorptionsspektrum von d(TA)₂₀ (siehe Abbildung 6.4 b) aufweist, was mit der weitaus höheren Konzentration der DNA im Vergleich zum AMT zu begründen ist. Um die Absorptionsänderungen zu untersuchen, die bei der UV-Anregung von interkalierten AMT-Molekülen auftreten, wurde eine Lösung von AMT und d(TA)₂₀ ($c(\text{AMT}) = 1,5 \text{ mM}$, $c(\text{d(TA)}_{20}) = 6,5 \text{ mm/bp}$) mit einer Wellenlänge von $\lambda = 375 \text{ nm}$ für eine Dauer von insgesamt 20 min belichtet. Die Experimente wurden von Janina Diekmann in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Gilch, Institut für Physikalische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, durchgeführt (Details siehe [Die19]). Die Absorptionsdifferenzspektren nach unterschiedlichen Belichtungszeiten wurden jeweils durch Subtraktion eines zu Beginn der Belichtung aufgenommenen Grundzustandsspektrums (ähnlich zu Abbildung 6.4 c) gewonnen und sind in Abbildung 6.4 d abgebildet.

Mit zunehmender Belichtungsdauer zeigt sich die Bildung einer scharfen Bande bei 1399 cm^{-1} und einer breiten Bande im Fingerprint-Bereich zwischen 1440 cm^{-1} bis 1470 cm^{-1} . Im höherfrequenten Bereich kommt es hingegen zum Ausbleichen von drei

Tabelle 6.1.: Zuordnung der Schwingungsmoden für AMT und d(TA)₂₀ mit Vergleichswerten für TMP und AMP [PJT11, BSG03].

Wellenzahl [cm ⁻¹]				Bandenzuordnung
AMT	d(TA) ₂₀	TMP	AMP	
1410	–	–	–	CH ₃
–	1572	–	1578	C4=C5, C5-C6, Ringschwingung
1596	–	–	–	C=C
–	1619	–	1625	C=N, C=C, Ringschwingung
–	1641	1629	–	C5=C6, Ringschwingung
–	1663	1663	–	C4=O4
1684	–	–	–	C=O
–	1693	1690	–	C2=O2

Banden. Somit werden einerseits Photoprodukte gebildet, während andererseits die Zahl der Edukte in der Lösung abnimmt. Ein Vergleich mit den Grundzustandsspektren zeigt, dass die Absorptionsabnahme bei 1595 cm⁻¹ einer AMT-Bande entspricht (siehe gestrichelte Linien in Abbildung 6.4). Bei der Doppelbande um 1650 cm⁻¹ ist das Ausbleichen von Thymin zu beobachten und bei 1693 cm⁻¹ kommt es zu einer Überlagerung einer AMT- und einer Thymin-Bande. Somit bleichen nicht nur AMT-Banden, sondern auch Thymin-Banden aus, obwohl nur AMT angeregt wurde und nicht die DNA. Diese Beobachtungen lassen sich dadurch erklären, dass es durch die Anregung von interkaliertem AMT zur Ausbildung von Photoprodukten kommt, an denen auch das Thymin beteiligt ist. Bei den gebildeten Photoprodukten handelt es sich um die zuvor beschriebenen Monoaddukte zwischen der Furangruppe des AMT und der C5=C6-Doppelbindung des Thymin (siehe Abbildung 6.2).

Anhand der stationären Messungen lässt sich somit nachweisen, dass sich bei der Belichtung von AMT, das in die DNA interkaliert ist, Monoaddukte zwischen AMT und Thymin ausbilden. Der genaue Reaktionsmechanismus und die beteiligten angeregten Zustände können jedoch nicht abgeleitet werden. Hierfür bedarf es zeitaufgelöster Messungen, welche im nachfolgenden Abschnitt präsentiert werden.

6.4. Infrarotspektroskopie von Nano- bis Mikrosekunden

Zum Reaktionsmechanismus der Cycloaddition zwischen Psoralen und der DNA wurden sowohl experimentelle² als auch quantenchemische³ Studien durchgeführt. Dennoch konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, welche angeregten Zustände bei der Bildung der Mo-

²[ST79, Cim85, Ave89, KKN05]

³[SSM08, SMS08, OE09]

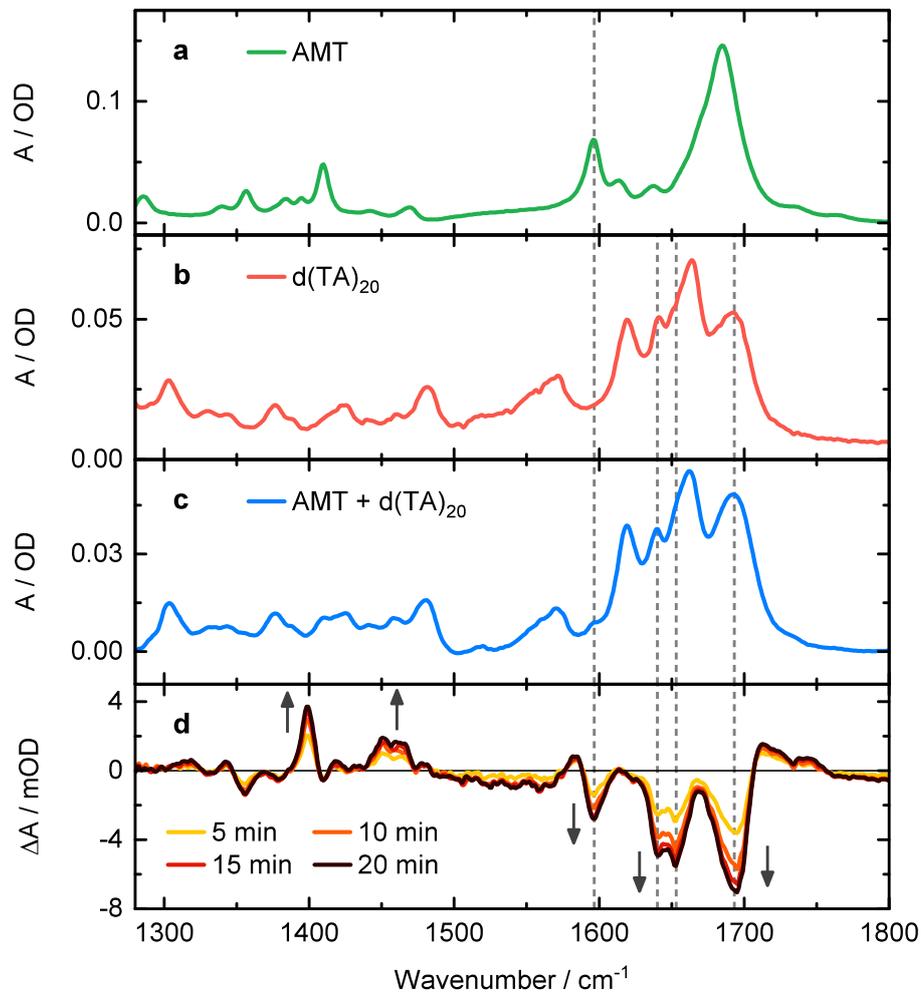


Abbildung 6.4.: Absorptionsspektren von (a) AMT (12 mm), (b) d(TA)₂₀ (6,6 mm/*bp*) und (c) AMT + d(TA)₂₀ ($c(\text{AMT}) = 1,1 \text{ mm}$, $c(\text{d(TA)}_{20}) = 6,6 \text{ mm}/bp$) sowie (d) Absorptionsdifferenzspektren nach verschiedenen Belichtungszeiten einer Lösung von AMT + d(TA)₂₀ ($c(\text{AMT}) = 1,5 \text{ mm}$, $c(\text{d(TA)}_{20}) = 6,5 \text{ mm}/bp$) (Anregungswellenlänge $\lambda = 375 \text{ nm}$). Ausbleichsbänder sind mit gestrichelten Linien, die Absorptionsszu- und abnahmen mit grauen Pfeilen markiert. [Daten in (d) entnommen aus [Die19].]

noaddukte eine Rolle spielen. Es wurden sowohl Singulett- als auch Triplett-Zustände des Psoralens als Vorläufer in Erwägung gezogen. Einige der Studien wurden an DNA-Proben durchgeführt, in denen nicht nur TA-, sondern auch GC-Sequenzen enthalten waren. Dabei konnte keine Beteiligung von Triplett-Zuständen beobachtet werden [Bea80, Sal80]. Dies lässt sich mit den Ergebnissen der zeitaufgelösten UV/Vis-Messungen im Pikosekundenbereich an AMT und DNA erklären (Fröbel et al., Arbeitsgruppe Prof. Dr. Peter Gilch [Frö15]). Die Untersuchungen haben gezeigt, dass ein photoinduzierter Elektrontransfer (PET) vom Guanin auf das AMT mit einer möglichen Photoaddition konkurriert. Aufgrund des Elektrontransfers wurde auch das Quenchen des angeregten Singulett-Zustands von AMT beobachtet, was einer Besetzung des Triplett-Zustands im Wege steht. Nachfolgemessungen von Fröbel et al. an AMT und d(TA)-Oligomeren, die ausschließlich die Basen Adenin und Thymin enthalten, konnten nachweisen, dass in Abwesenheit von GC-Basenpaaren kein PET zu beobachten ist [Frö16b]. Somit lassen sich an d(TA)-Oligomeren selektiv die Adduktbildung und die reaktiven Zustände untersuchen.

Eine weitere Beobachtung der UV/Vis-Messungen im Pikosekundenbereich war, dass bis zum Ende des Messfensters im Bereich einiger weniger Nanosekunden keine Signaturen von Photoadditionen zu sehen sind. Allerdings konnte der Zerfall des Singulett-Zustands von AMT identifiziert werden. Dies deutet auf eine Beteiligung von Triplett-Zuständen bei der Ausbildung von Monoaddukten zwischen AMT und DNA hin, weil die Bildung von Photoaddukten ansonsten schon zu Beginn des Messfensters spektral zu beobachten sein müsste.

Um diese These zu verifizieren, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Gilch zeitaufgelöste UV/Vis-Messungen an AMT und d(TA)₂₀ im Nanosekundenbereich durchgeführt [Die19]. Dabei hat sich ebenfalls der Triplett-Zustand als möglicher Vorläufer der Adduktbildung herausgestellt. Allerdings lassen sich im UV/Vis-Bereich aufgrund der Überlagerung verschiedener Banden die Signaturen der Photoaddukte in Abhängigkeit der Verzögerungszeit nur schwer identifizieren [Frö16a, Die19]. Aufgrund der charakteristischen Markerbanden der Photoprodukte im Mittelinfraroten eignet sich für die Zuordnung der in den UV/Vis-Messungen beobachteten Signaturen besonders die zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Anrege-Abtast-Messungen im Nano- bis Mikrosekundenbereich werden nachfolgend vorgestellt.

6.4.1. Messparameter

Die nachfolgend angegebenen Messparameter gelten sowohl für die Messung an AMT (Unterabschnitt 6.4.2) als auch die Messung an AMT und d(TA)₂₀ (Unterabschnitt 6.4.3). Als Anregungsimpulse wurden in allen Messungen die Impulse der dritten Harmonischen (THG) ($\lambda = 355$ nm) des in Unterabschnitt 3.3.3 erläuterten OPO-Lasersystems benutzt. Bei dieser Wellenlänge ist die Absorption der DNA zu vernachlässigen (siehe Abbildung 2.3), so dass gezielt das AMT angeregt wird. Die Anregungsimpulse⁴ hatten eine Anregungsenergie

⁴Es sind die korrigierten Werte zu [Die19] angegeben.

von 5 μJ , eine Impulsdauer von 3 ns sowie einen Bündeldurchmesser von $250\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$. Es wurden jeweils drei Messbereiche mit den Zentralwellenlängen 6000 nm, 6480 nm und 6980 nm (entspricht $1667\ \text{cm}^{-1}$, $1543\ \text{cm}^{-1}$ und $1433\ \text{cm}^{-1}$) miteinander verknüpft, um einen spektralen Bereich von $1375\ \text{cm}^{-1}$ bis $1750\ \text{cm}^{-1}$ abzudecken. Die maximale Verzögerungszeit zwischen Anregungsimpuls und Abtastimpuls hat 70 μs betragen. Eine Durchflussküvette wurde benutzt, um die Probenlösung zwischen zwei Anregungsimpulsen auszutauschen (siehe Abschnitt 3.4). Bei der Messung an AMT waren aufgrund der starken Schaumbildung der Probe beim Umpumpen durch die Durchflussküvette viele Messdurchläufe notwendig, um Spektren ohne Luftblasenartefakte zu erhalten.

6.4.2. Zeitaufgelöste Messung an AMT

In Abbildung 6.5 a ist das Ergebnis der zeitaufgelösten Messung an AMT ($c = 1,1\ \text{mm}$, $V = 3\ \text{mL}$) als Konturdarstellung in Abhängigkeit von der Zeit (logarithmische Achse) und der Wellenzahl abgebildet, wobei negative Absorptionsänderungen in blau und positive in rot dargestellt sind.

Es ist ein starkes initiales Ausbleichen bei $1684\ \text{cm}^{-1}$ und ein etwas schwächeres Ausbleichen bei $1410\ \text{cm}^{-1}$ und $1596\ \text{cm}^{-1}$ bis etwa 1 μs nach der Anregung zu beobachten. Ungefähr im selben Zeitbereich zeigt sich eine intensive positive Bande bei $1625\ \text{cm}^{-1}$ und eine breite Absorptionszunahme zwischen $1410\ \text{cm}^{-1}$ und $1596\ \text{cm}^{-1}$ sowie unter $1410\ \text{cm}^{-1}$. Ein Vergleich mit den Grundzustandsspektren in Abbildung 6.4 (siehe auch Tabelle 6.1) zeigt, dass es sich bei den negativen Absorptionsänderungen um das Ausbleichen der Grundzustandsbanden von AMT handelt. Die ausgeprägte positive Bande um $1625\ \text{cm}^{-1}$ entspricht der rotverschobenen C=O-Streckschwingung, die im Grundzustand bei $1684\ \text{cm}^{-1}$ zu sehen ist. Da die Lebensdauern von Singulett-Zuständen wesentlich kürzer sind, muss es sich um eine Signatur des Triplett-Zustands von AMT handeln. Bei einigen anderen Carbonyl-Verbindungen ist eine solche Rotverschiebung zwischen Grund- und Triplett-Zustand ebenfalls zu beobachten [SYT98, Har08]. Diese Zuordnung wird durch die quantenchemischen Berechnungen bekräftigt, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Gilch durchgeführt wurden und in [Die19] beschrieben sind. Sowohl die negative Bande bei $1684\ \text{cm}^{-1}$ als auch die positive bei $1625\ \text{cm}^{-1}$ verschwinden nach ca. 1 μs .

Das bereits in Unterabschnitt 3.3.6 beschriebene multiexponentielle Modell wurde zur weiteren Analyse der Daten verwendet. Im vorliegenden Fall erfolgte eine globale exponentielle Anpassung ab 1,5 ns. In Abbildung 6.5 b, c sind die erhaltenen Amplitudenspektren (DADS) für die Zeitkonstante bei 0,5 μs sowie die unendliche Komponente (Offset) abgebildet. Auch eine Auswertung der Daten mittels *lifetime density analysis* (LDA) (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Peter Gilch, [Die19]) hat den ermittelten Wert von 0,5 μs bestätigt. Die Zeitkonstante von 0,5 μs lässt sich auf die Erholung des Grundzustands von AMT zurückführen. Im Unendlich-Spektrum ist lediglich eine Signatur der Erwärmung des Lösungsmittels zu beobachten. Daraus kann gefolgert werden, dass die angeregten Triplett-Zustände in den Grundzustand zurückkehren und kein Photoprodukt gebildet wird.

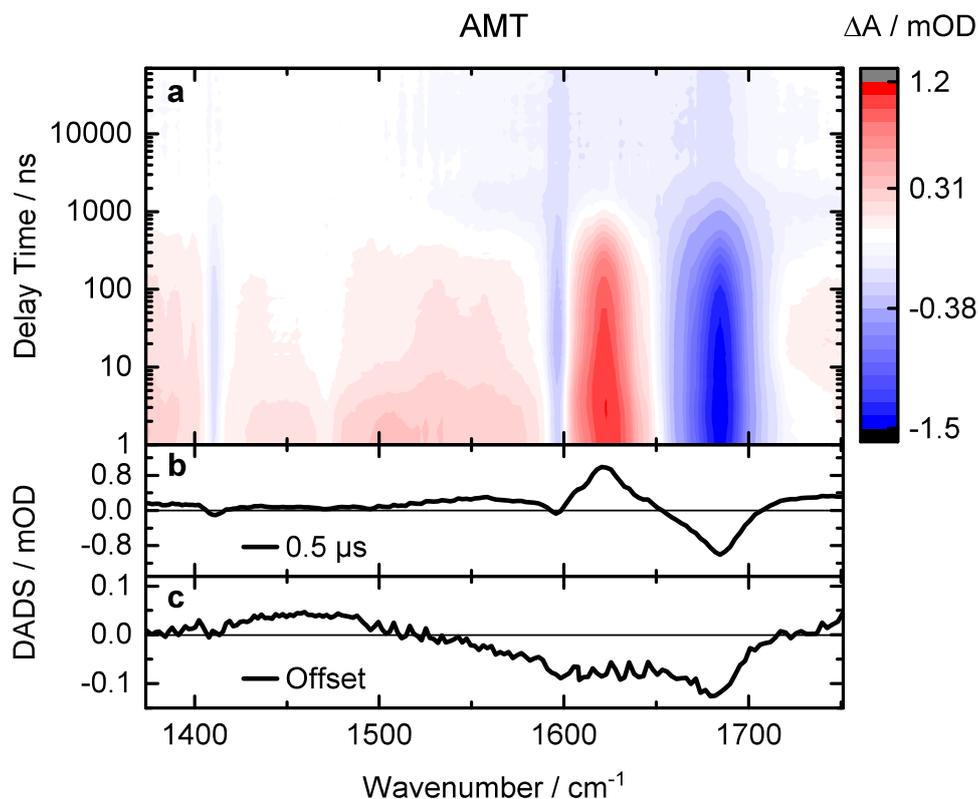


Abbildung 6.5.: (a) Konturdarstellung der Nanosekundenmessung (Anregungswellenlänge $\lambda = 355$ nm) an AMT ($c = 1,1$ mM) mit logarithmischer Zeitachse. DADS zur Zeitkonstanten $0,5 \mu\text{s}$ (b) und Offset-Spektrum (c).

In der zeitaufgelösten UV/Vis-Messung wurde festgestellt, dass sich der Grundzustand mit einer längeren Zeitkonstanten von $1 \mu\text{s}$ erholt (siehe [Die19]). Allerdings wurde die Messung im UV/Vis-Bereich mit einer wesentlich geringeren AMT-Konzentration ($0,14$ mM) durchgeführt als die hier beschriebene Messung. Bei der Messung im IR-Bereich kommt es offensichtlich aufgrund der höheren Konzentration ($1,1$ mM) zu einem Quenchen des Triplett-Zustands und demzufolge zu einer kürzeren Zeitkonstanten.

Mit den bei der Messung an AMT gewonnenen Daten können die Signaturen von freiem AMT identifiziert werden, was für die Interpretation der nachfolgend erläuterten Messung an AMT und d(TA)₂₀ von Bedeutung ist.

6.4.3. Zeitaufgelöste Messung an AMT und d(TA)-Oligomeren

In Abbildung 6.6 a ist das gemittelte Ergebnis zweier zeitaufgelöster Messungen an jeweils einer Lösung ($V = 3$ mL) mit AMT ($c = 1,1$ mM) und d(TA)₂₀ ($c = 6,6$ mM/bp) als Konturdarstellung in Abhängigkeit von der Zeit (logarithmische Achse) und der Wellenzahl abgebildet, wobei negative Absorptionsänderungen in blau und positive in rot dargestellt

sind. Die Mittelung zweier Messungen verringert Artefakte, die unter anderem durch eine Druckwelle und/oder eine thermische Linse hervorgerufen werden, welche sich im Zeitbereich um 100 ns zeigen (siehe auch Unterabschnitt 5.1.1).

Bereits zu Beginn des zeitlichen Messbereichs ist eine negative Absorptionsbande (Ausbleichen) bei 1703 cm^{-1} zu sehen. Ein Vergleich mit der zeitaufgelösten Messung an freiem AMT (siehe Abbildung 6.5) und den Grundzustandsspektren (siehe Abbildung 6.4) verdeutlicht, dass es sich um die gegenüber der reinen AMT-Probe blauverschobene Grundzustandsbande der C=O-Streckschwingung handelt, welche sich im reinen AMT bei 1684 cm^{-1} befindet. Das initiale Ausbleichen erholt sich, im Gegensatz zur Messung an AMT, erst nach einigen Mikrosekunden. Weiterhin sind schwächere Ausbleichsbanden bei 1410 cm^{-1} und 1593 cm^{-1} zu sehen, was wiederum mit den Beobachtungen der Messung an AMT übereinstimmt.

Ebenfalls ist eine intensive positive Bande um 1625 cm^{-1} zu beobachten, die auf die Bildung des Triplett-Zustands von AMT zurückzuführen ist. Bei 1640 cm^{-1} treten nach etwa $2\text{ }\mu\text{s}$ negative Absorptionsänderungen auf, welche einem verzögerten Ausbleichen entsprechen. Etwa auf derselben Zeitskala bildet sich bei 1669 cm^{-1} zusätzlich eine schmale positive Bande kleinerer Amplitude, die nach ca. $30\text{ }\mu\text{s}$ wieder zerfällt. Der Bereich unter 1410 cm^{-1} sowie zwischen 1410 cm^{-1} und 1593 cm^{-1} ist geprägt von breiten positiven Signalen, wobei bei etwa 1500 cm^{-1} die Amplitude am größten ist. Bei 1550 cm^{-1} bilden sich nach etwa $1\text{ }\mu\text{s}$ negative Absorptionsänderungen aus. Darüber hinaus ist zu sehen, dass das Signal bei 1470 cm^{-1} nach ca. $1\text{ }\mu\text{s}$ leicht zu- und bei 1425 cm^{-1} leicht abnimmt. Die positiven Absorptionsänderungen im Fingerprint-Bereich zwischen 1440 cm^{-1} bis 1470 cm^{-1} bleiben somit im Wesentlichen bis zum Ende des zeitlichen Messbereichs bestehen und deuten auf Photoprodukte hin.

Die globale multiexponentielle Anpassung der Daten erfolgte ab 10 ns mit 4 Zeitkonstanten und einer unendlichen Komponente (Offset). Die DADS für die jeweiligen Zeitkonstanten bei $0,2\text{ }\mu\text{s}$, $0,9\text{ }\mu\text{s}$, $6\text{ }\mu\text{s}$ und $55\text{ }\mu\text{s}$ sowie das Offset-Spektrum sind in Abbildung 6.6 b-f abgebildet. Da im Offset-Spektrum noch sigmoidale Signaturen vom Aufheizen des Lösungsmittels (D_2O) enthalten waren, wurde es korrigiert, indem ein skaliertes Differenzspektrum von erwärmtem D_2O subtrahiert wurde. Detaillierte Beschreibungen der Vorgehensweise finden sich in [Sch08, Pil16]. Das korrigierte Spektrum zeigt eine große Übereinstimmung mit dem stationären Differenzspektrum nach 20 min Belichtung von AMT und $d(\text{TA})_{20}$ (siehe Belichtungsdaten in Abbildung 6.4 d). Zur besseren Vergleichbarkeit wurde das Differenzspektrum in Abbildung 6.6 f auf das Offset-Spektrum skaliert. Der Vergleich der zwei Spektren zeigt, dass die Signaturen, die am Ende der zeitaufgelösten Messung noch in den Daten enthalten sind, von Photoprodukten hervorgerufen werden. Nach ca. $50\text{ }\mu\text{s}$ ist die Photoaddition im Wesentlichen abgeschlossen.

Wiederum konnten die erhaltenen Zeitkonstanten in einer Auswertung der Daten mittels *lifetime density analysis* (LDA) (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Peter Gilch, [Die19]) bestätigt werden. Für eine Zuordnung und Interpretation der DADS werden zunächst die Absorptionsänderungen von ausgewählten Wellenzahlen in Abhängigkeit von der Zeit genauer betrachtet.

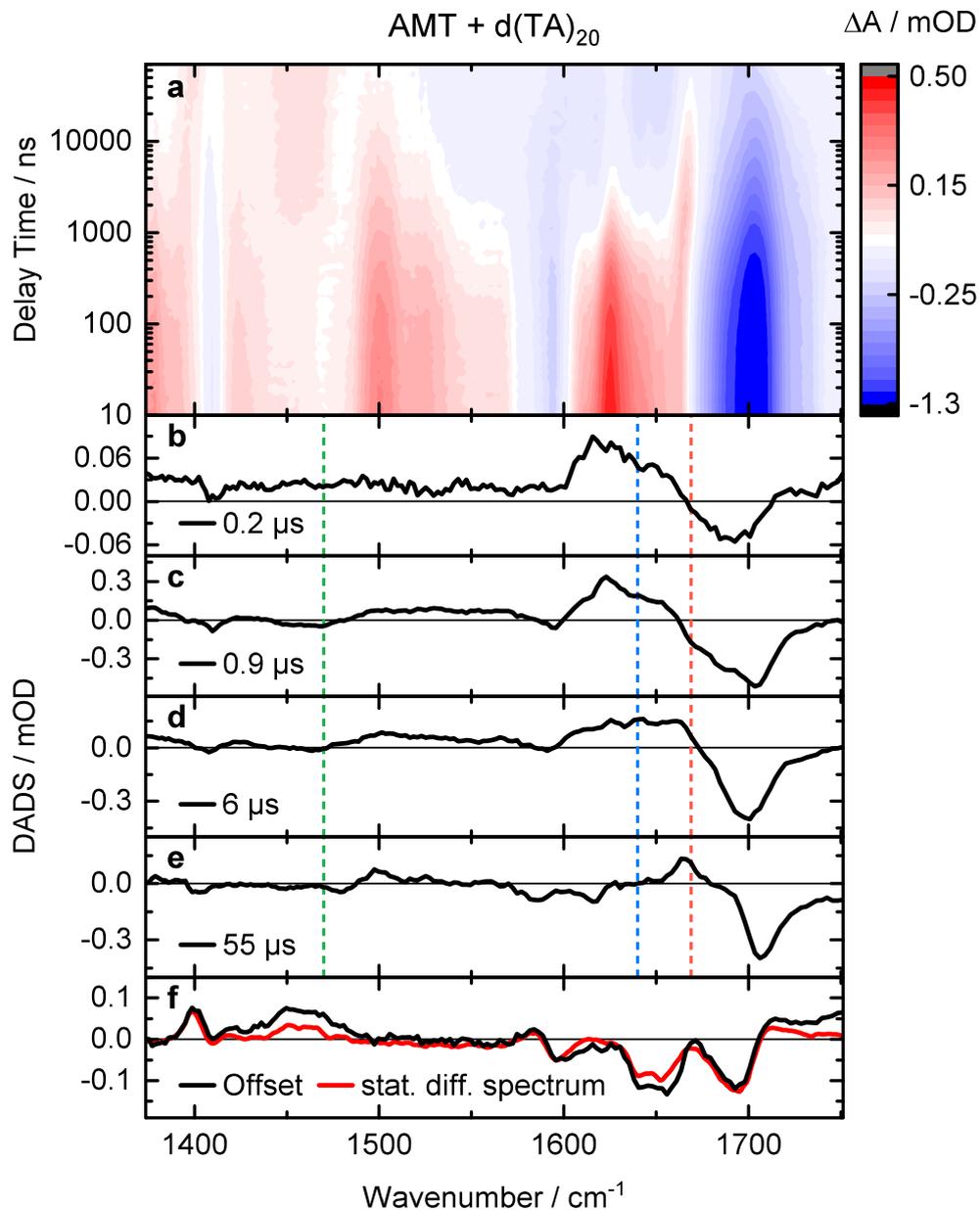


Abbildung 6.6.: (a) Konturdarstellung der Nanosekundenmessung (Anregungswellenlänge $\lambda = 355 \text{ nm}$) an AMT ($c = 1,1 \text{ mm}$) und $d(TA)_{20}$ ($c = 6,6 \text{ mm/bp}$) mit logarithmischer Zeitachse. (b) – (e) DADS zu den Zeitkonstanten $0,2 \mu\text{s}$, $0,9 \mu\text{s}$, $6 \mu\text{s}$ und $55 \mu\text{s}$. Senkrechte Linien bei 1470 cm^{-1} (grün), 1640 cm^{-1} (blau) und 1669 cm^{-1} (rot) markieren die Positionen der zeitlichen Verläufe der Absorptionsänderungen in Abbildung 6.7. (f) Das Offset-Spektrum wurde hinsichtlich der Lösungsmittelerwärmung korrigiert. Zum Vergleich ist das skalierte Differenzspektrum nach langer Belichtung aus der stationären Messung (siehe Abbildung 6.4 d) abgebildet (rot).

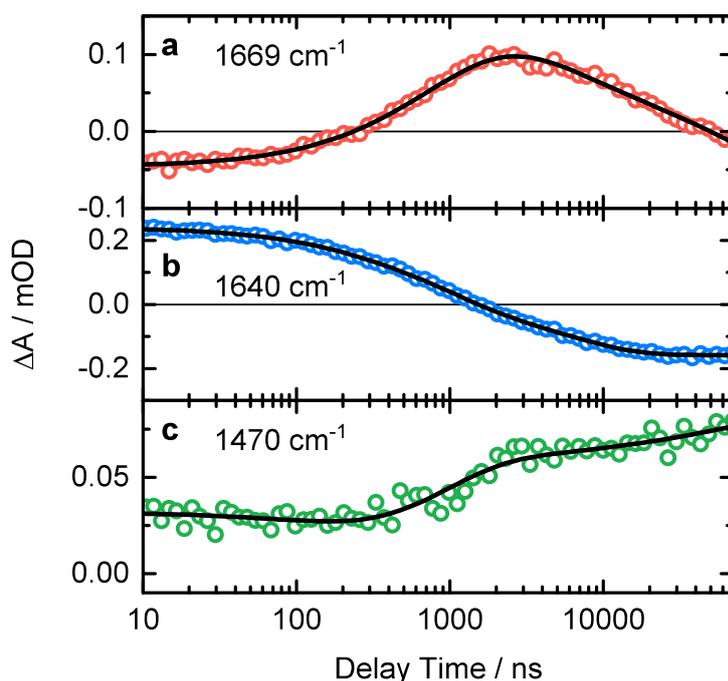


Abbildung 6.7.: Zeitliche Verläufe der Absorptionsänderungen der Messung an AMT und $d(\text{TA})_{20}$ bei 1669 cm^{-1} (a), 1640 cm^{-1} (b) und 1470 cm^{-1} (c). Die Anpasskurven sind jeweils als durchgezogene Linien aufgetragen.

In Abbildung 6.6 b–e markieren senkrechte Linien bei 1669 cm^{-1} (rot), 1640 cm^{-1} (blau) und 1470 cm^{-1} (grün) die Positionen der zeitlichen Verläufe der Absorptionsänderungen, die in Abbildung 6.7 gezeigt werden. Die Gegenüberstellung der Zeitverläufe der Absorptionsänderungen ermöglicht einen direkten Vergleich der Dynamiken bei verschiedenen Wellenzahlen. So ist bei 1669 cm^{-1} bis ca. $1,5 \mu\text{s}$ nach der Anregung eine Absorptionzunahme zu sehen, während auf derselben Zeitskala eine positive Bande bei 1640 cm^{-1} zerfällt. Ab $1,5 \mu\text{s}$ setzt sich das Ausbleichen bis ca. $10 \mu\text{s}$ nach der Anregung fort. Bei 1669 cm^{-1} ist etwa von $6 \mu\text{s}$ bis $55 \mu\text{s}$ ebenfalls ein Zerfall zu beobachten. Das Signal bei 1470 cm^{-1} ist bis ca. $1 \mu\text{s}$ auf einem annähernd konstanten Wert und zeigt anschließend eine Absorptionzunahme.

Der zeitliche Verlauf der Absorptionsänderungen bei 1669 cm^{-1} ist ein klarer Hinweis auf ein Intermediat, weil sich erst eine Bande ausbildet und anschließend wieder zerfällt. Während sich dieser Zwischenzustand bildet, ist bei 1640 cm^{-1} die Abnahme einer positiven Bande zu beobachten. Diese Abnahme ist dem Zerfall des Triplett-Zustands von AMT zuzuordnen und deutet darauf hin, dass die Bildung des Intermediats aus dem angeregten Triplett von AMT erfolgt. Eine Beteiligung der Thymin-Basen ist in den Signaturen bis etwa $1,5 \mu\text{s}$ nicht zu sehen. Nach ca. $1,5 \mu\text{s}$ zeigt sich zeitgleich zum verzögerten Ausbleichen bei 1640 cm^{-1} eine Absorptionsabnahme bei 1669 cm^{-1} . Wie ein Vergleich mit den Grundzustandsspektren in Abbildung 6.4 und der Zuordnung der Schwingungsmoden in

Tabelle 6.1 zeigt, befindet sich bei 1640 cm^{-1} eine Schwingungsbande der Thymin-Basen. Daraus folgt, dass die Thymin-Basen in den ersten $1,5\ \mu\text{s}$ nach der Anregung an der Reaktion noch nicht beteiligt sind und danach zur Bildung des Intermediats beitragen. Aus diesem Intermediat, das demzufolge aus AMT und aus Thymin besteht, bildet sich abschließend ein Photoprodukt. Darauf weist die Absorptionzunahme im Fingerprint-Bereich bei 1470 cm^{-1} hin. Auch in den stationären Belichtungsdaten (siehe Abbildung 6.4 d) ist in diesem Spektralbereich mit zunehmender Belichtungs-dosis eine breite positive Bande zu sehen. Besonders deutlich wird die Übereinstimmung beim Vergleich des Amplitudenspektrums der unendlichen Komponente (Offset) mit dem skalierten Differenzspektrum nach 20 min Belichtung aus der stationären Messung in Abbildung 6.6 f.

Im nachfolgenden Abschnitt werden die Ergebnisse interpretiert und ein Reaktionsmodell für die Photoaddition von AMT an die DNA vorgestellt.

6.5. Reaktionsmodell der Photoaddition

Die Anpassung der Daten der zeitaufgelösten Messung an AMT und $d(\text{TA})_{20}$ erfolgte mit vier Zeitkonstanten und einer unendlichen Komponente (siehe Unterabschnitt 6.4.3). Daraus lässt sich schließen, dass bei der Photoaddition von AMT an die DNA mehrere Kinetiken involviert sind. Unter Berücksichtigung der in Abbildung 6.6 b–f gezeigten DADS und der zeitlichen Verläufe der Absorptionsänderungen in Abbildung 6.7 lässt sich ein Modell der verschiedenen Reaktionsschritte aufstellen, welches in Abbildung 6.9 schematisch dargestellt ist und im Folgenden beschrieben wird.

Zerfall des Triplett-Zustands

Wie bereits in Abschnitt 6.2 erläutert, interkalieren bei den vorliegenden Messbedingungen etwa 90 % der AMT-Moleküle, während für die restlichen 10 % eine Dynamik analog zu reinem AMT zu erwarten ist. Aus der in Unterabschnitt 6.4.2 vorgestellten Messung an reinem AMT ist bekannt, dass sich ohne Interkalation und bei einer Konzentration von $c = 1,1\text{ mM}$ der Grundzustand von AMT mit einer Zeitkonstanten von $0,5\ \mu\text{s}$ erholt, was dem Zerfall des Triplett-Zustands entspricht. Diese Zeitkonstante ist kürzer als jene, welche bei der UV/Vis-Messung mit niedrigerer Konzentration ($1\ \mu\text{s}$) erhalten wurde. Mit der Konzentration von AMT nimmt das Quenchen des angeregten Triplett-Zustands zu und die Lebensdauer ab. Es kann jedoch nicht nur das Quenchen durch andere AMT-Moleküle beitragen, sondern auch das Quenchen durch Sauerstoff.

Auch wenn sich die Konzentrationen von AMT in beiden IR-Messungen gleichen (jeweils $1,1\text{ mM}$), sind bei der Messung an AMT und $d(\text{TA})_{20}$ effektiv weniger freie AMT-Moleküle in der Lösung vorhanden, weil 90 % der AMT-Moleküle interkalieren. Im Folgenden werden die AMT-Moleküle, die nicht interkalieren, als *freie* AMT-Moleküle bezeichnet, um sie von den AMT-Molekülen der Messung an reinem AMT zu unterscheiden.

Die interkalierten Moleküle sind durch ihre abgeschirmte Lage zwischen den Basenpaaren der DNA (siehe Abbildung 6.2) wenig anfällig für Quenchen durch Sauerstoff oder durch andere AMT-Moleküle. Im Vergleich zur Messung an reinem AMT dürfte für die freien AMT-Moleküle der Effekt des Quenchens durch andere AMT-Moleküle geringer und das Sauerstoff-Quenchen etwa genauso groß sein. Analog dazu wäre eine längere oder etwa genauso große Lebensdauer des Triplett-Zustands der freien AMT-Moleküle zu erwarten.

Ein Vergleich des Amplitudenspektrums von reinem AMT bei $0,5\ \mu\text{s}$ (siehe Abbildung 6.5 b) und des Amplitudenspektrums von AMT und d(TA)_{20} bei $0,2\ \mu\text{s}$ (siehe Abbildung 6.6 b) zeigt deutliche spektrale Ähnlichkeiten, was darauf schließen lässt, dass es sich in beiden Fällen um die Erholung des Grundzustands von nicht interkaliertem AMT handeln muss. Es sind allerdings sowohl bei den Amplituden als auch bei den Zeitkonstanten Unterschiede vorhanden. Die um etwa eine Größenordnung kleinere Amplitude des Spektrums bei $0,2\ \mu\text{s}$ stimmt damit überein, dass nur 10 % der AMT-Moleküle frei in der Lösung vorliegen. Die sehr kleine Amplitude hat zur Folge, dass die globale multiexponentielle Anpassung der Daten ungenauer wird und somit auch der Wert der erhaltenen Zeitkonstanten. Zusätzlich wird die Anpassung dadurch erschwert, dass das ohnehin kleine Signal von größeren Signalen überlagert wird, die auf einer ähnlichen Zeitskala zerfallen. Dies zeigt sich in den zwei relativ nahe beieinander liegenden Zeitkonstanten von $0,2\ \mu\text{s}$ und $0,9\ \mu\text{s}$ (siehe Abbildung 6.6 b, c).

Aufgrund dessen kann die ermittelte Lebensdauer von $0,2\ \mu\text{s}$ nur einen ungefähren Wert darstellen. Im Rahmen der Messgenauigkeit stimmt aber die Größenordnung mit dem Wert der Messung an reinem AMT ($0,5\ \mu\text{s}$) überein. Somit ist die Zeitkonstante von $0,2\ \mu\text{s}$ ebenfalls dem Zerfall des Triplett-Zustands der nicht interkalierten AMT-Moleküle zuzuschreiben. Dies wird zusätzlich dadurch gestützt, dass im zugehörigen Amplitudenspektrum (siehe Abbildung 6.6 b) noch keine Änderungen von DNA-Banden zu beobachten sind. In der schematischen Darstellung des Reaktionsmodells sind die freien AMT-Moleküle nicht abgebildet, da sie an der Photoaddition nicht beteiligt sind (siehe Abbildung 6.9).

Die Photoanregung ($\lambda = 355\ \text{nm}$) von interkaliertem AMT (AMT_{int}) im Grundzustand (GS) führt bekanntermaßen zur Besetzung eines angeregten Singulett-Zustands $^1(\text{AMT}_{\text{int}})^*$ (siehe Abbildung 6.9). Aus dem angeregten Singulett kann eine Interkombination (ISC) in den Triplett-Zustand $^3(\text{AMT}_{\text{int}})^*$ erfolgen oder eine interne Konversion in den Grundzustand. Untersuchungen von Fröbel et al. haben gezeigt, dass die Lebensdauer des Singulett-Zustands von freiem AMT ca. 1 ns beträgt [Frö15, Frö16b]. Bei den hier beschriebenen Messungen im Nano- bis Mikrosekundenbereich ist die Zeitauflösung nicht ausreichend, um den Zerfall des Singulett-Zustands zu beobachten. In diesen Messungen wird also im frühen Nanosekundenbereich der Triplett-Zustand gefunden.

Wie oben beschrieben, erfolgt der Zerfall des Triplett-Zustands bei reinem AMT ohne d(TA)_{20} mit einer Zeitkonstanten von $0,5\ \mu\text{s}$ (siehe Unterabschnitt 6.4.2). Im zugehörigen Amplitudenspektrum (siehe Abbildung 6.5 b) handelt es sich bei der ausgeprägten positiven Bande um $1625\ \text{cm}^{-1}$ um eine Signatur des Triplett-Zustands. Bei dieser Wellenzahl ist in den DADS der Messung an AMT und d(TA)_{20} für die ersten drei Zeitkonstanten

(0,2 μs , 0,9 μs und 6 μs , Abbildung 6.6b–d) ebenfalls eine positive Bande zu sehen. Die Zeitkonstante von 0,2 μs konnte bereits dem Zerfall des Triplett-Zustands der nicht interkalierten AMT-Moleküle zugeordnet werden (siehe oben) und wird im Folgenden nicht mehr diskutiert. Des Weiteren ist aufgrund der Analyse der zeitlichen Verläufe der Absorptionsänderungen in Abbildung 6.7 bekannt, dass insbesondere der zeitliche Verlauf bei 1640 cm^{-1} auf den Zerfall des Triplett-Zustands zwischen 1 μs und 6 μs hinweist. Daher werden die zwei Zeitkonstanten von 0,9 μs und 6 μs dem Zerfall des Triplett-Zustands der interkalierten AMT-Moleküle zugeschrieben. Wiederum ist hier sowohl die Rückkehr in den Grundzustand als auch der Übergang in einen anderen Zustand möglich.

Die Beobachtung zweier Zeitkonstanten für den Zerfall des angeregten Triplett-Zustands lässt sich mit der Existenz von Diastereomeren der Photoaddukte erklären. Ein interkaliertes Psoralen-Molekül kann je nach Lage in Richtung 3'- oder 5'-Ende des DNA-Strangs an eine Thymin-Base binden (siehe Abschnitt 6.1), was zu Diastereomeren des Photoaddukts führt [Cim85]. Auch für die Photoaddition von AMT in d(TA)-Oligomeren konnte die Bildung dieser Diastereomere gezeigt werden [Oro94]. Abhängig von der Orientierung der Moleküle zueinander können sich die Diastereomere mit unterschiedlichen Zeitkonstanten bilden. Folglich sind auch für den Zerfall des Triplett-Zustands unterschiedliche Zeitkonstanten zu erwarten. Im vorliegenden Fall könnten somit ebenfalls Diastereomere an der Photoaddition beteiligt sein, weswegen beide Zeitkonstanten von 0,9 μs und 6 μs dem Zerfall des Triplett-Zustands der interkalierten AMT-Moleküle zugeordnet werden.

Die Zeitkonstante von 6 μs ist um einen Faktor 12 größer als bei reinem AMT (0,5 μs). Dies lässt sich damit erklären, dass es sich hierbei um interkalierte Moleküle handelt und nicht um freie. Bei einem interkalierten AMT-Molekül ist das Quenchen des angeregten Triplets durch andere AMT-Moleküle weniger ausgeprägt als bei einem nicht interkalierten, weil Ersteres aufgrund der Lage zwischen den DNA-Basen gewissermaßen isoliert ist. Demnach sind für interkalierte AMT-Moleküle längere Zerfallszeiten der angeregten Triplett-Zustände möglich als für reines AMT. Zum Vergleich beträgt die intrinsische Ratenkonstante von AMT $k_0 = 5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, was einer Lebensdauer von $1/k_0 = 20 \mu\text{s}$ entspricht [Die19]. In früheren Studien wurde sogar eine intrinsische Lebensdauer von 100 μs für den niedrigsten Triplett-Zustand von AMT beobachtet [Sal80]. Die im vorliegenden Fall erhaltene lange Zeitkonstante von 6 μs für den Zerfall des Triplett-Zustands liegt somit durchaus im Bereich des Möglichen.

Bildung des Photoprodukts

Ein Teil der AMT-Moleküle im angeregten Triplett-Zustand kehrt nicht in den Grundzustand zurück, sondern bildet ein Photoprodukt mit der DNA. Im Folgenden werden die Schritte dieser Photoadduktbildung erläutert, die nach dem Zerfall des Triplett-Zustands ablaufen. Bei der Analyse der zeitlichen Verläufe der Absorptionsänderungen in Abbildung 6.7 hat sich insbesondere am zeitlichen Verlauf bei 1669 cm^{-1} gezeigt, dass bei der Photoaddition ein Intermediat beteiligt ist. Dieses Intermediat bildet sich ausgehend vom Zerfall des Triplett-Zustands von AMT und erreicht die maximale Häufigkeit im Zeitbereich weniger

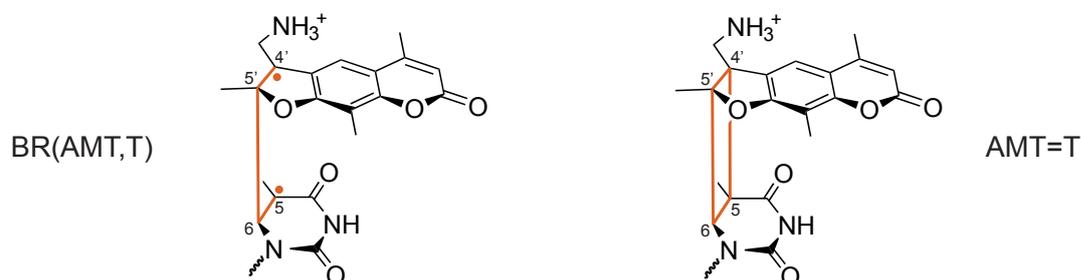


Abbildung 6.8.: Das Biradikal BR(AMT,T) (links) von AMT und Thymin tritt als Intermediat bei der Bildung des Monoaddukts (AMT)=T (rechts) auf.

Mikrosekunden. An diesem Intermediat sind offensichtlich ein AMT-Molekül und eine Thymin-Base beteiligt.

Ähnliche Kinetiken mit Intermediatbildung sind beispielsweise von der Bildung des CPD-Schadens zwischen Pyrimidin-Basen bekannt (siehe Abschnitt 5.1 und [Pil14, Liu16b, Gon19]), wenn die Schadensbildung aus dem Triplett erfolgt. Dort sind ebenfalls zunächst Intermediate zu beobachten, die schließlich zum Photoschaden führen können. Es wurde festgestellt, dass es sich bei den Intermediaten um Biradikale handelt (siehe Abbildung 5.5). Auch für die Photoaddition zwischen Thymin und der Furangruppe von Psoralen wurde in der quantenchemischen Studie von Huang und R. Zhang die Beteiligung eines Biradikals vorgeschlagen [HZ13]. Daher kann angenommen werden, dass das bei der Bildung des Photoaddukts zwischen AMT und Thymin beobachtete Intermediat ein Biradikal ist, welches mit einer Zeitkonstanten von $55 \mu\text{s}$ zerfällt (siehe Abbildung 6.6 e). Es bildet sich nach dem Zerfall des Triplett-Zustands von AMT ($0,9 \mu\text{s}$ bzw. $6 \mu\text{s}$) und ist die Vorstufe zum Photoprodukt zwischen AMT und Thymin. Im ersten Schritt der Cycloaddition wird eine Bindung vom C5'-Atom von AMT zum C6-Atom von Thymin ausgebildet. Anschließend entsteht im zweiten Schritt eine Bindung zwischen dem C4'-Atom von AMT und dem C5-Atom von Thymin, wodurch der Ringschluss letztendlich abgeschlossen ist (siehe Abbildung 6.8).

Das Biradikal zerfällt mit einer Zeitkonstanten von $55 \mu\text{s}$ und im zugehörigen Amplitudenspektrum (siehe Abbildung 6.6 e) sind keine charakteristischen Banden der Photoprodukte zu sehen. Das Amplitudenspektrum der unendlichen Zeitkonstanten (Offset, Abbildung 6.6 f) zeigt jedoch eine gute Übereinstimmung mit dem skalierten Differenzspektrum nach langer Belichtung (20 min) aus der stationären Messung.

In der schematischen Darstellung des Reaktionsmodells in Abbildung 6.9 sind die beschriebenen Schritte der photoinduzierten Monoadduktbildung zwischen AMT und Thymin mit den zugehörigen Zeitkonstanten abgebildet. Die Interpretation zum Reaktionsverlauf der Photoaddition konnte durch quantenchemische Rechnungen (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Peter Gilch, [Die19]) bekräftigt werden.

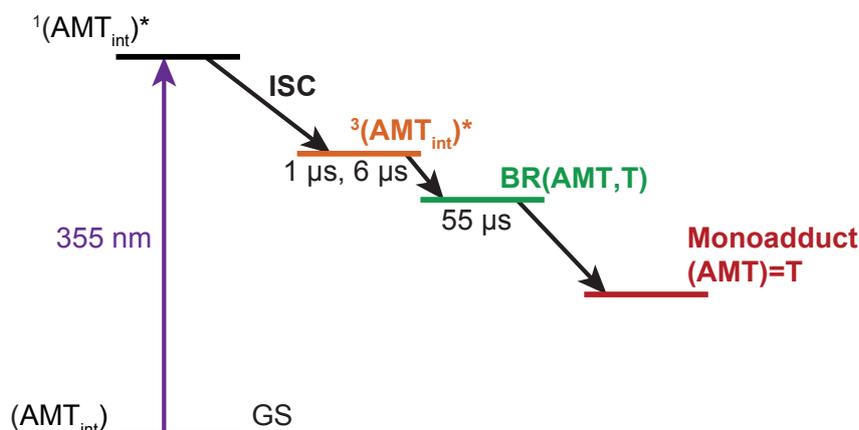


Abbildung 6.9.: Reaktionsmodell der Monoadduktbildung zwischen AMT und d(TA)₂₀. Zunächst UV-Anregung ($\lambda = 355$ nm) von interkaliertem AMT (AMT_{int}) aus dem Grundzustand (GS) in den angeregten Singulett-Zustand $^1(AMT_{int})^*$. Danach Interkombination (ISC) in den Triplett-Zustand $^3(AMT_{int})^*$ und Zerfall nach 1 μ s bzw. 6 μ s in ein Biradikal BR(AMT,T) zwischen AMT und Thymin. Nach 55 μ s Bildung des Monoaddukts (AMT)=T.

Eine Abschätzung der Quantenausbeute der Produktbildung $\Phi_P = 0,12$ (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Peter Gilch) hat ergeben, dass ein Großteil von fast 90 % der angeregten Moleküle kein Photoprodukt bildet. Wenn die Produktbildung aus dem Triplett-Zustand erfolgt, setzt sich Φ_P folgendermaßen zusammen: $\Phi_P = \Phi_T \cdot \eta_P^T$, wobei Φ_T die Triplettausbeute für interkaliertes AMT (AMT_{int}) und η_P^T die Effizienz für die Bildung des Photoprodukts aus dem Triplett-Zustand von AMT $^3(AMT_{int})^*$ ist. (Details zur Vorgehensweise finden sich in [Die19] und in der zugehörigen Supporting Information.) Aus den Ergebnissen der zeitaufgelösten IR-Messungen wurde die Triplettausbeute von interkaliertem AMT abgeleitet: $\Phi_T = 0,44$. Dieser Wert deckt sich mit der Abschätzung von Fröbel et al., wonach die Triplettausbeute von interkaliertem AMT bei ca. 20 % bis 40 % liegt und somit höher ist als die Triplettausbeute von freiem AMT [Frö16b], für die in der Literatur ein Wert in Höhe von 20 % angegeben wird [Sal80]. Mit $\Phi_T = 0,44$ und $\Phi_P = 0,12$ ergibt sich für die Effizienz der Photoproduktbildung aus dem Triplett-Zustand von AMT $\eta_P^T = 0,27$.

Die Quantenausbeute der Monoadduktbildung zwischen AMT und Thymin (12 %) ist im Vergleich zur Quantenausbeute der Bildung des CPD-Schadens aus dem Triplett-Zustand für TpT (4 % [Liu16b]) um den Faktor 3 erhöht. Verglichen mit den Werten für TpC und CpT (siehe Tabelle 4.4) liegt sie etwa um den Faktor 6 höher.

6.6. Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurde die photoinduzierte Addition des Psoralenderivats AMT im DNA-Modellsystem d(TA)₂₀ untersucht. Die Photoadduktbildung erfolgt im Falle von AMT zwischen dessen Furangruppe und einer Thymin-Base über einen Mechanismus, der bisher

noch nicht vollständig aufgeklärt war. Mittels zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie im Nano- bis Mikrosekundenbereich wurde die Reaktionskinetik aufgeklärt.

Es wurden Messungen sowohl an reinem AMT ($c = 1,1 \text{ mM}$) als auch an einer Lösung von AMT ($c = 1,1 \text{ mM}$) und $d(\text{TA})_{20}$ ($c = 6,6 \text{ mM/bp}$) durchgeführt. Mit ersterer Messung konnten die Signaturen von nicht interkaliertem AMT bestimmt werden, die für die Auswertung der Daten von AMT und $d(\text{TA})_{20}$ benötigt werden.

Bei der Anregung von freiem AMT sind keine Signaturen von Photoprodukten vorhanden und es wird lediglich der Zerfall des Triplett-Zustands mit einer Zeitkonstanten von $0,5 \mu\text{s}$ beobachtet. In der Lösung von AMT und $d(\text{TA})_{20}$ kommt es ohne Lichteinwirkung zunächst zu einer Interkalation der AMT-Moleküle. Bei den vorliegenden Messbedingungen und den verwendeten Proben interkalieren etwa 90 % der AMT-Moleküle. Eine selektive Anregung von AMT wird erreicht, indem die Photoanregung im UV-A-Bereich bei einer Wellenlänge von $\lambda = 355 \text{ nm}$ erfolgt, weil die DNA-Basen im Gegensatz zum AMT bei dieser Wellenlänge nicht absorbieren (siehe Abbildung 2.3). Die Anregung von AMT führt zu einer Besetzung des angeregten Singulett-Zustands, aus dem die Interkombination in den Triplett erfolgen kann. Für interkaliertes AMT beträgt die Triplettausbeute $\Phi_T = 0,44$.

Der Triplett-Zustand der nicht interkalierten AMT-Moleküle in der Lösung von AMT und $d(\text{TA})_{20}$ zerfällt mit einer Zeitkonstanten von $0,2 \mu\text{s}$. Die interkalierten AMT-Moleküle sind hingegen aufgrund ihrer Lage zwischen den DNA-Basen weniger anfällig für Quenchen durch andere AMT-Moleküle, was zu einer längeren Lebensdauer des Triplett-Zustands führt. Es konnte gezeigt werden, dass der Triplett mit den Zeitkonstanten von $0,9 \mu\text{s}$ und $6 \mu\text{s}$ zunächst in ein Intermediat zerfällt und sich anschließend das Photoprodukt bildet. Die kinetische Heterogenität dieses Zerfalls und die damit einhergehenden zwei Zeitkonstanten könnten auf das Vorhandensein von Diastereomeren zurückzuführen sein. Bei dem Intermediat handelt es sich um ein Biradikal, bei dem die Cycloaddition, und somit der Ringschluss zwischen AMT und Thymin im Monoaddukt, zur Hälfte ausgebildet ist (siehe Abbildung 6.8). Solch ein Zwischenzustand ist auch bei der Bildung des CPD-Schadens aus dem Triplett-Zustand von Pyrimidinen zu beobachten [Pil14, Liu16b, Gon19]. Nach $55 \mu\text{s}$ zerfällt das Biradikal letztendlich in das Photoprodukt, womit die Cycloaddition abgeschlossen wird.

Die Signaturen der Photoaddukte sind im Amplitudenspektrum der unendlichen Zeitkonstante (Offset, Abbildung 6.6 f) deutlich erkennbar, was ein Vergleich mit dem skalierten Differenzspektrum nach langer Belichtung aus der stationären Messung zeigt. Die Quantenausbeute der Produktbildung liegt bei ca. 10 %. Zwar bildet ein Großteil der angeregten AMT-Moleküle keine Monoaddukte mit der DNA, jedoch ist die Quantenausbeute der Reaktion wesentlich höher als bei der entsprechenden Reaktion der Bildung des CPD-Schadens aus dem Triplett-Zustand zwischen zwei Thyminen (4 % [Liu16b]). Das beschriebene Reaktionsmodell stimmt mit quantenchemischen Berechnungen überein, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Gilch durchgeführt wurden [Die19].

Die Monoaddukte zwischen AMT und Thymin weisen eine strukturelle Ähnlichkeit zum CPD-Schaden auf (siehe Abbildung 2.6). Beide Photoschäden werden über eine Cycloaddition gebildet. Im Vergleich zur CPD-Bildung, die überwiegend aus dem Singulett

und innerhalb der ersten Pikosekunde nach der Anregung erfolgt [Sch07, SGZ15], läuft die Photoaddition zwischen AMT und $d(TA)_{20}$ auf einer Zeitskala von $50\ \mu\text{s}$ aus dem Triplett-Zustand von AMT ab. Die hier durchgeführten Untersuchungen geben keinerlei Hinweise darauf, dass die Monoaddukte auch aus dem Singulett-Zustand von AMT gebildet werden.

Die Ergebnisse der vorgestellten Messungen tragen zum Verständnis der photoinduzierten Addition bei, lassen sich aber nur teilweise auf die Kinetiken in natürlicher DNA übertragen. Im Gegensatz zu den hier verwendeten $d(TA)$ -Oligomeren besteht natürliche DNA nicht nur aus AT-Basenpaaren, sondern auch aus Guanin und Cytosin. Untersuchungen an AMT und DNA-Modellsystemen mit AT- sowie GC-Basenpaaren haben gezeigt, dass es vom Guanin zu einem photoinduzierten Elektrontransfer kommen kann, der mit einer möglichen Ausbildung von Photoaddukten konkurriert [Frö15, Frö16b]. Guanin weist ein hohes Redoxpotential auf und ist ein starker Elektron-Donor, von dem Elektronen auf AMT übertragen werden können. Dieser Elektrontransfer führt bei interkaliertem AMT zu einem Quenchen des angeregten Singulett-Zustands, was die nachfolgende Besetzung des Triplett-Zustands und eine potentielle Photoaddition verhindert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Verwendung des DNA-Modellsystems $d(TA)_{20}$ ebenjener Elektrontransfer vermieden werden, was eine gezielte Untersuchung des Reaktionsmechanismus der Photoaddition ermöglichte.

Die photoinduzierte Bildung von Addukten mit der DNA macht Psoralene auch für phototherapeutische Einsätze interessant. Wie in der Einleitung des Kapitels bereits erwähnt, werden bei der PUVA-Therapie Psoralene in erkrankte Zellen eingebracht, wobei es zur Interkalation zwischen den Basenpaaren der DNA kommt. Mittels UV-Anregung der interkalierten Psoralene sollen Photoaddukte erzeugt und somit das Absterben der erkrankten Zellen bewirkt werden. Eine effiziente Bildung von Monoaddukten ist von großer Bedeutung für den Erfolg solcher Therapien. Da die Therapie auf natürliche DNA abzielt, wäre es wichtig, dass der Elektrontransfer zwischen Guanin und Psoralen verhindert und gleichzeitig die Monoadduktbildung aufrechterhalten wird. Dazu sollen in der Zukunft entsprechend modifizierte Psoralene entwickelt werden. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Photoaddition von AMT in $d(TA)_{20}$ könnten dazu beitragen, die Reaktionskinetiken anderer neu synthetisierter Derivate zu verstehen und geeignete Psoralenderivate für PUVA-Therapien zu entdecken.

7. Zusammenfassung

Die Intensität des UV-A-Anteils des Sonnenspektrums ist auf der Erdoberfläche sehr hoch. Der UV-C-Anteil wird hingegen aufgrund des Absorptionsvermögens der Ozonschicht vollständig und der UV-B-Anteil teilweise aus dem von der Sonne emittierten UV-Spektrum herausgefiltert, bevor er auf die Erdoberfläche trifft [SGZ15]. Im UV-A-Bereich, in dem die Einstrahlung erheblich ist, ist die Absorption der Nucleobasen und damit deren direkte Anregung vernachlässigbar gering. Hier kann eine Anregung nur über Überträgermoleküle, Photosensibilisatoren, erfolgen. Bei dieser indirekten Anregung der Nucleobasen ist vor allem der Triplett-Kanal bei der Schadensbildung relevant, während es bei der direkten Anregung im UV-B- oder UV-C-Bereich der Singulett-Kanal ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die indirekte Anregung der DNA und der Triplett-Kanal der anschließenden Schadensbildung mittels Infrarotspektroskopie untersucht.

Triplett-Photosensibilisierung von Pyrimidin-Dimeren und Triplett-Dynamiken bei der CPD-Bildung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Triplett-Photosensibilisierung der Cytosin enthaltenden Pyrimidin-Dimere TpC und CpT und deren Triplett-Dynamiken bei der CPD-Bildung mittels Infrarotspektroskopie untersucht. Bei den photosensibilisierten Messungen wurde das Acetophenonderivat 2-M als Photosensibilisator verwendet [Liu15].

Zunächst konnte gezeigt werden, dass bei der photosensibilisierten Belichtung von TpC und CpT mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 320$ nm ebenfalls charakteristische CPD-Markerbanden zu beobachten sind, wie sie von der CPD-Bildung in TpT bekannt sind [Sch07, Liu16b]. Bei den Cytosin enthaltenden Pyrimidin-Dimeren TpC und CpT bildet sich zusätzlich noch eine weitere ausgeprägte Bande bei 1570 cm^{-1} . Die Quantenausbeute der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand liegt im Bereich von $1,5\% \pm 0,5\%$ und ist niedriger als bei TpT (4 %) [Liu16b].

Bei den CPD-Schäden von TpC und CpT treten während der Inkubation der belichteten Proben ohne Lichteinwirkung weitere Absorptionsänderungen im Verlauf mehrerer Stunden nach der Belichtung auf. Es zeigt sich im Wesentlichen eine Absorptionsabnahme der charakteristischen CPD-Bande bei 1570 cm^{-1} . Bei dieser Folgereaktion der CPD-Schäden von TpC und CpT handelt es sich um eine Desaminierung von Cytosin zu Uracil, so dass letztendlich CPD-Schäden von TpU und UpT vorliegen. Die Folgereaktion lässt sich mit zwei Zeitkonstanten von etwa 12 h und 60 h beschreiben. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die zwei Diastereomere cis-syn und trans-syn des CPD-Schadens unterschiedlich schnell zerfallen.

Um die Annahme der Desaminierung zu verifizieren, wurden photosensibilisierte Belichtungsmessungen an TpU und UpT durchgeführt, wobei ebenfalls die Bildung von CPD-Schäden beobachtet wurde. Anhand eines Vergleichs der Absorptionsspektren der CPD-Schäden von TpU und UpT mit den jeweiligen Absorptionsspektren der CPD-Schäden von TpC und CpT nach der mehrstündigen Inkubation konnte eine Desaminierung eindeutig spektral nachgewiesen werden.

Zur Aufklärung der Reaktionsdynamiken bei der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand wurden zeitaufgelöste Infrarotmessungen im Nanosekundenbereich durchgeführt. Die Anregungswellenlänge ($\lambda = 250$ nm) wurde derart gewählt, dass die Interkombination aus dem initial angeregten Singulett-Zustand in den Triplett-Zustand relativ hoch ist [Ban12, Pill4, Liu16b]. Es konnte gezeigt werden, dass ein Triplett-Zustand besetzt wird, der auf dem Thymin lokalisiert ist und mit einer Zeitkonstanten von 30 ns in ein Intermediat zerfällt. Bei dem Zwischenzustand handelt es sich um ein Biradikal, bei dem der angeregte Zustand über beide Basen (Thymin und Cytosin) delokalisiert ist. In den meisten Fällen zerfällt das Biradikal mit ca. 100 ns in den Grundzustand, es ist aber auch die Bildung von CPD-Schäden möglich.

Bezüglich der Reaktionskinetiken bei der photosensibilisierten Anregung des Triplett-Zustands von TpC und CpT mittels des Photosensibilisators 2-M konnte gezeigt werden, dass ein Triplett-Triplett-Energietransfer vom Photosensibilisator jeweils auf das Thymin, aber nicht auf das Cytosin erfolgt. Hierfür wurden sowohl eine Nanosekundenmessung an CpC und 2-M (Anregung jeweils bei $\lambda = 320$ nm) als auch eine photosensibilisierte Belichtungsmessung an CpC durchgeführt. Es konnte weder ein Ausbleichen der Grundzustandsbanden von Cytosin noch die Bildung von CPD-Banden beobachtet werden.

Die experimentellen Ergebnisse liefern ein umfassendes Bild der Reaktionsdynamiken der CPD-Bildung im Triplett-Kanal für TpC und CpT. Ausgehend von einem auf dem Thymin lokalisierten Triplett-Zustand werden CPD-Schäden gebildet, die besonders mutagen sind, weil das Cytosin zu Uracil desaminieren kann.

Photoaddition des Psoralenderivats AMT in d(TA)-Oligomeren

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Reaktionsdynamiken der Photoaddition des Psoralenderivats AMT [Frö16a] an die Thymin-Basen des doppelsträngigen DNA-Modellsystems d(TA)₂₀ mittels zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie im Nano- bis Mikrosekundenbereich untersucht. Die Anregung von AMT erfolgte mit einer Wellenlänge von $\lambda = 355$ nm, bei der die Absorption der DNA vernachlässigbar gering ist.

Befindet sich das Psoralenderivat AMT in einer Lösung mit DNA, interkalieren bei den vorliegenden Messbedingungen etwa 90 % der AMT-Moleküle [Frö16b, Die19], d. h. die planaren AMT-Moleküle lagern sich zwischen den Basen der DNA ein. Durch UV-Anregung dieser interkalierten AMT-Moleküle können sich Cycloadditionen zwischen AMT und den Thymin-Basen der DNA bilden, welche strukturell ähnlich zum CPD-Schaden sind. Zunächst wurde eine Messung an reinem AMT durchgeführt, wodurch die Signaturen der nicht interkalierten AMT-Moleküle bestimmt wurden. Aus dem initial

angeregten Singulett-Zustand von AMT $^1(\text{AMT}_{\text{int}})^*$ erfolgt die Interkombination in den Triplett-Zustand $^3(\text{AMT}_{\text{int}})^*$, welcher mit einer Zeitkonstanten von $0,5 \mu\text{s}$ zerfällt.

Bei der Messung an AMT und $\text{d}(\text{TA})_{20}$ liegt die Triplettausbeute von interkaliertem AMT bei 0,44. Der Triplett-Zustand der nicht interkalierten AMT-Moleküle in der Lösung von AMT und $\text{d}(\text{TA})_{20}$ zerfällt mit einer Zeitkonstanten von $0,2 \mu\text{s}$ und der Triplett-Zustand der interkalierten AMT-Moleküle zerfällt mit $0,9 \mu\text{s}$ bzw. $6 \mu\text{s}$ zunächst in einen Zwischenzustand. Die zwei Zeitkonstanten könnten auf die Existenz von zwei Diastereomeren zurückzuführen sein. Abhängig von der Lage eines interkalierten AMT-Moleküls zwischen den DNA-Basen kann die Photoaddition an eine Thymin-Base in Richtung 3'- oder 5'-Ende des DNA-Strangs erfolgen, was zu Diastereomeren des Monoaddukts führt [Cim85]. Die Diastereomere könnten sich mit unterschiedlichen Zeitkonstanten bilden und demzufolge wären beim Zerfall des Triplett-Zustands zwei verschiedene Zeitkonstanten zu beobachten. Nach der Bildung des Intermediats ist der weitere Verlauf der Reaktionskinetik für beide Diastereomere gleich.

Bei dem Zwischenzustand, in den der Triplett-Zustand zerfällt, handelt es sich um ein Biradikal zwischen AMT und Thymin. Bei diesem ersten Schritt der Cycloaddition bildet sich zunächst die Bindung vom C5'-Atom von AMT zum C6-Atom von Thymin. Die Bildung des Monoaddukts erfolgt mit dem Zerfall des Biradikals mit einer Zeitkonstanten von $55 \mu\text{s}$, wobei eine Bindung zwischen dem C4'-Atom von AMT und dem C5-Atom von Thymin entsteht und der Ringschluss letztendlich abgeschlossen ist. Es gibt keine Hinweise darauf, dass die Monoaddukte auch aus dem Singulett-Zustand von AMT gebildet werden.

Abschätzungen (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Peter Gilch) zeigen, dass bei den vorliegenden Messbedingungen die Quantenausbeute der Photoaddition von AMT an Thymin bei ca. 10 % liegt. Ein Großteil von fast 90 % der angeregten AMT-Moleküle bildet demnach keine Photoprodukte mit der DNA. Unter Berücksichtigung der Triplettausbeute von interkaliertem AMT (0,44) ergibt sich für die Photoproduktbildung aus dem Triplett-Zustand von AMT somit eine Effizienz von 0,27.

Die experimentellen Ergebnisse tragen zum Verständnis der komplexen Kinetik der photoinduzierten Addition des Psoralenderivats AMT in $\text{d}(\text{TA})_{20}$ bei. Es konnte gezeigt werden, dass die Photoaddition von AMT an $\text{d}(\text{TA})_{20}$ aus dem Triplett-Zustand von AMT unter Beteiligung eines Biradikals erfolgt.

Das verbesserte Verständnis über die Reaktionsdynamiken von AMT könnte einen Ansatz liefern, durch gezielte Modifikationen von Psoralenderivaten effizientere Moleküle für die Phototherapie mit Psoralenen (PUVA-Therapie) herzustellen.

A. Anhang

A.1. Acetat-Korrektur

In den Absorptionsspektren der kommerziell erworbenen Pyrimidin-Dimere wurden zum Teil ausgeprägte Banden bei etwa 1410 cm^{-1} und 1550 cm^{-1} beobachtet, die nicht mit den Pyrimidin-Dimeren in Verbindung gebracht werden konnten. Ein Vergleich mit gängigen in der Synthese verwendeten Molekülen legte nahe, dass es sich um Fluoroacetat handelt. In Abbildung A.1 ist ein Absorptionsspektrum von Fluoroacetat abgebildet. Es weist im Bereich von 1400 cm^{-1} bis 1800 cm^{-1} eine ausgeprägte Bande bei 1550 cm^{-1} und eine kleinere Bande um 1410 cm^{-1} auf. Die Signaturen des Acetats lassen sich aus den Probenspektren herauskorrigieren, indem jeweils ein skaliertes Spektrum des Acetat-Puffers vom jeweiligen Probenspektrum subtrahiert wird. In Abbildung A.1 ist exemplarisch ein Spektrum von UpT ($c = 5\text{ mM}$) vor der Korrektur und nach der Korrektur (UpT corrected) gezeigt.

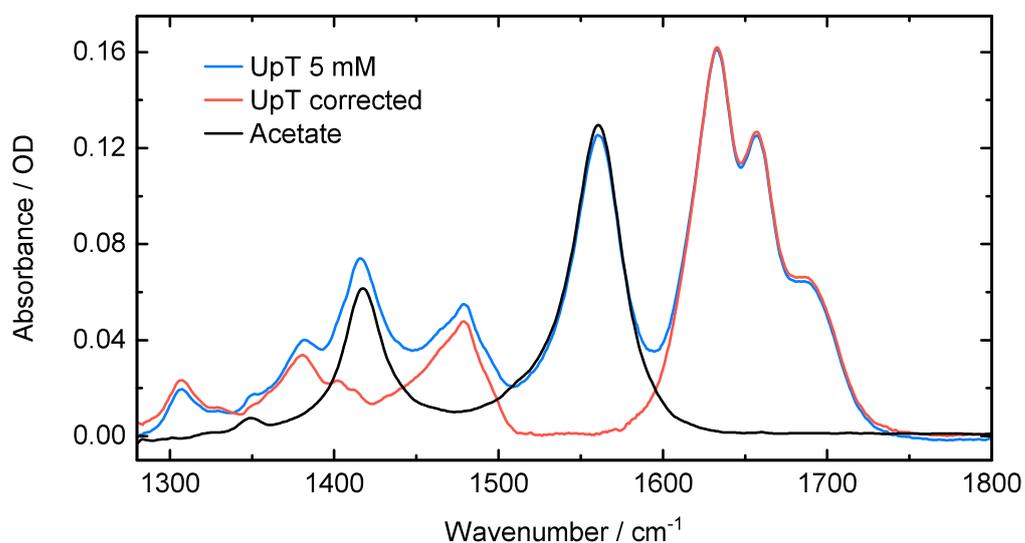


Abbildung A.1.: Absorptionsspektren des Acetat-Puffers sowie von UpT ($c = 5\text{ mM}$) vor und nach der Acetat-Korrektur (UpT corrected).

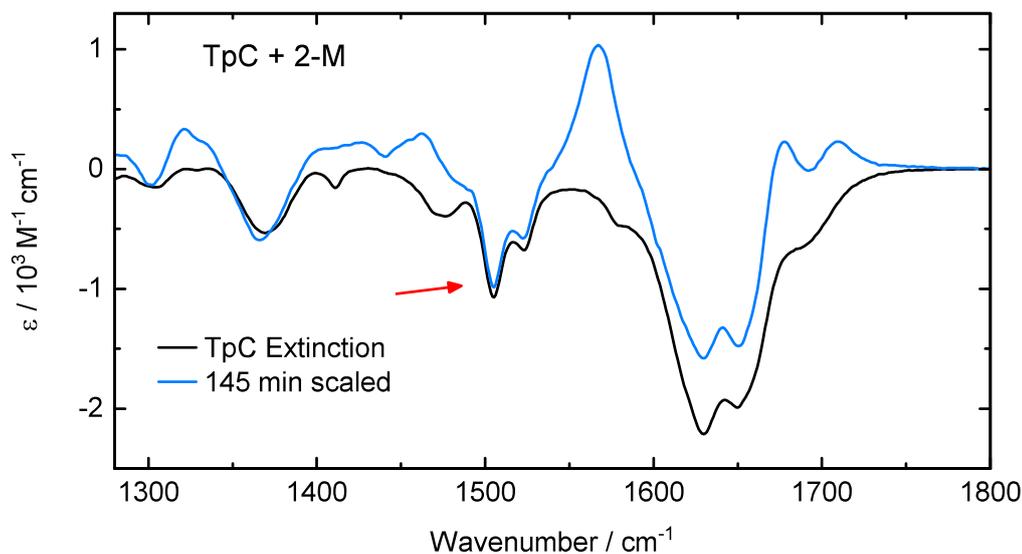


Abbildung A.2.: Bestimmung der Änderung des Extinktionskoeffizienten $\Delta\varepsilon$ am Beispiel von TpC. Das Absorptionsdifferenzspektrum nach einer Belichtungsdauer von 145 min (145 min scaled) wird an das Extinktionsspektrum des Grundzustands $\varepsilon_{GZ}(\lambda)$ (TpC Extinction) angepasst. Es wird auf die Schwingungsbande von Cytosin bei 1505 cm^{-1} skaliert (roter Pfeil).

A.2. Bestimmung der Änderung des Extinktionskoeffizienten

Bei der Bestimmung der Reaktionsquantenausbeute Φ der CPD-Bildung (siehe Unterabschnitt 4.3.2) wird unter anderem die Änderung des Extinktionskoeffizienten $\Delta\varepsilon$ benötigt, die als die Differenz aus dem Extinktionskoeffizienten des Photoprodukts (hier CPD) und des Edukts bei der Wellenzahl der Produktbande (1567 cm^{-1}) definiert ist: $\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{CPD}} - \varepsilon_{\text{Edukt}}$. Der Extinktionskoeffizient des Edukts (hier TpC bzw. CpT) entspricht dem Extinktionskoeffizienten des Grundzustands ε_{GZ} von TpC bzw. CpT und kann aus den Messdaten bestimmt werden. Hierfür wird die Absorption vor der Belichtung $A_{GZ}(\lambda)$ in den Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{GZ}(\lambda)$ gemäß dem Gesetz von Lambert-Beer (siehe Gleichung 4.3) umgerechnet (Schichtdicke d und Konzentration c sind bekannt). Ein solches Extinktionsspektrum ist in Abbildung A.2 am Beispiel von TpC abgebildet (TpC Extinction).

Anschließend bedarf es eines Absorptionsdifferenzspektrums (ΔA), bei dem bereits deutliche Absorptionsänderungen aufgrund der CPD-Bildung vorhanden sind. Im Falle von TpC wurde das Spektrum nach einer Belichtungsdauer von 145 min verwendet. Dieses Spektrum wurde an das zuvor bestimmte Extinktionsspektrum ($\varepsilon_{GZ}(\lambda)$) angepasst, indem es auf die Schwingungsbande von Cytosin bei 1505 cm^{-1} skaliert wurde (siehe roter Pfeil in Abbildung A.2). Da nach dem Gesetz von Lambert-Beer $\Delta\varepsilon$ direkt proportional zur Absorptionsänderung ΔA ist, entspricht die gesuchte Änderung des Extinktionskoeffizienten $\Delta\varepsilon$ letztlich dem skalierten Absorptionsdifferenzspektrum (145 min scaled in Abbildung A.2).

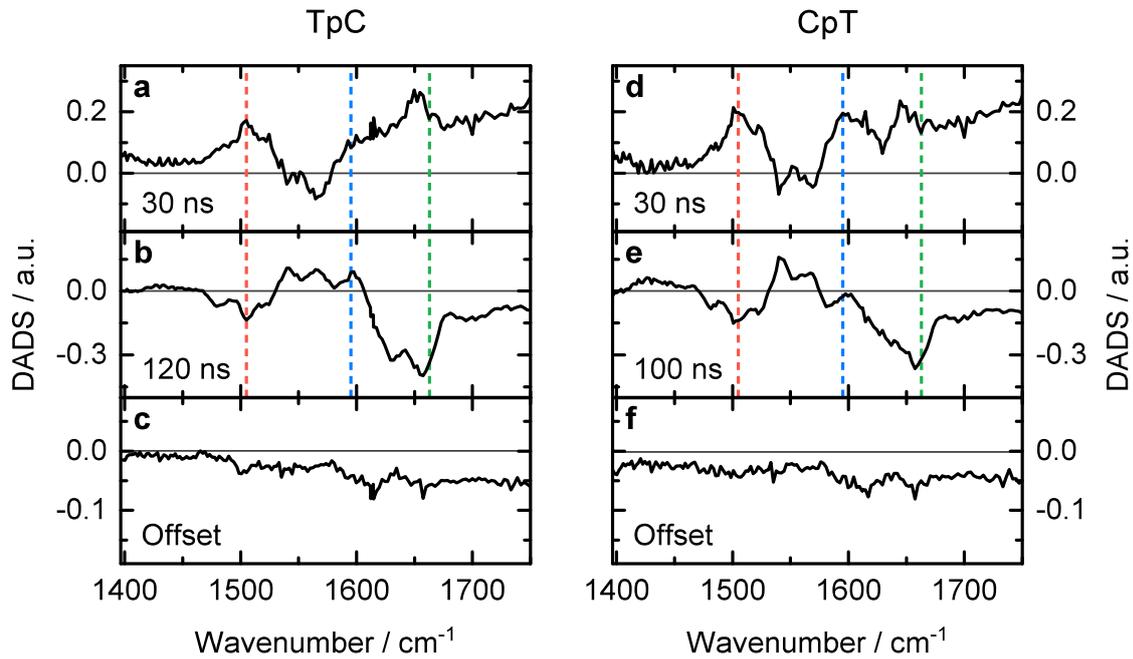


Abbildung A.3.: (a) – (c) DADS der Nanosekundenmessung (Anregungswellenlänge $\lambda = 250$ nm) an TpC ($c = 5$ mm) zu den Zeitkonstanten 30 ns (a) und 120 ns (b) sowie Offset-Spektrum (c). (d) – (f) DADS der Nanosekundenmessung (Anregungswellenlänge $\lambda = 250$ nm) an CpT ($c = 5$ mm) zu den Zeitkonstanten 30 ns (d) und 100 ns (e) sowie Offset-Spektrum (f). Senkrechte Linien bei 1505 cm^{-1} (rot), 1595 cm^{-1} (blau) und 1663 cm^{-1} (grün) markieren die Positionen der zeitlichen Verläufe der Absorptionsänderungen in Abbildung 5.3.

A.3. DADS von TpC und CpT

In Abbildung A.3 sind die DADS zu den Nanosekundenmessungen an TpC und CpT (siehe Unterabschnitt 5.1.1) abgebildet. Details zur Anpassung der Daten finden sich in Unterabschnitt 5.1.2.

Abkürzungsverzeichnis

2-M	2'-Methoxyacetophenon
A	Adenin
a.u.	<i>arbitrary unit</i>
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AMT	4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen
BBO	β -Bariumborat
BR	Biradikal
C	Cytosin
CG	Weißlichterzeugung
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CPA	<i>chirped pulse amplification</i>
CpC	2'-Desoxycytidylyl-(3'-5')-2'-desoxycytidin
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
CpT	2'-Desoxycytidylyl-(3'-5')-thymidin
DADS	<i>decay associated difference spectra</i>
DFM	Differenzfrequenzerzeugung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
G	Guanin
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GS	Grundzustand
HOMO	oberstes besetztes Molekülorbital
IC	interne Konversion
IR	Infrarot
ISC	Interkombination
LDA	<i>lifetime density analysis</i>
LUMO	unterstes unbesetztes Molekülorbital
MIR	Mittelinfrarot

NOPA	nicht kollinearer optisch parametrischer Verstärker
OPA	optisch parametrischer Verstärker
OPO	optisch parametrischer Oszillator
Pso	Psoralen
PUVA	Psoralen und UV-A
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SADS	<i>species associated difference spectra</i>
SFG	Summenfrequenzerzeugung
SHG	Erzeugung der zweiten Harmonischen
T	Thymin
THG	Erzeugung der dritten Harmonischen
TMP	Thymin-5'-monophosphat
TpC	Thymidylyl-(3'-5')-2'-desoxycytidin
TpT	Thymidylyl-(3'-5')-thymidin
TpU	Thymidylyl-(3'-5')-2'-desoxyuridin
TTET	Triplet-Triplet Energietransfer
U	Uracil
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UpT	2'-Desoxyuridylyl-(3'-5')-thymidin
UV	ultraviolett
Vis	sichtbar, engl.: <i>visible</i>
VR	Schwingungsrelaxation

Abbildungsverzeichnis

2.1. Strukturformeln der Nukleobasen und schematische Darstellung von Nukleotiden und Nucleosiden	6
2.2. Watson-Crick-Basenpaarung und schematische Darstellung einer DNA-Doppelhelix	7
2.3. Relative Intensität des Sonnenspektrums und relative Absorption des Ozons und der DNA	8
2.4. Jablonski-Diagramm strahlender und strahlungsloser Übergänge	9
2.5. Schematische Darstellung einer konischen Durchschneidung	13
2.6. CPD-Schaden zwischen zwei Thyminen	15
2.7. CPD-Diastereomere am Beispiel von TpT	16
2.8. Tautomerisierung von Cytosin	17
2.9. Desaminierung des CPD-Schadens am Beispiel von TpC	18
2.10. Schema der C → T Punktmutation	19
2.11. Bildung des (6–4)- und des Dewar-Schadens	20
2.12. Photohydratisierung von Cytosin	22
2.13. Reaktion von Guanin zu 8-Oxo-G	24
2.14. Strukturformeln von Aceton, Acetophenon, Benzophenon und Xanthon	26
2.15. Strukturformeln von Furan, Cumarin, Psoralen und Angelicin	27
3.1. Prinzip der Anrege-Abtast-Spektroskopie	30
3.2. Schematische Darstellung des verwendeten Anrege-Abtast-Systems	32
3.3. Abfolge der Triggersignale zwischen Anregungs- und Abtastimpuls	35
3.4. Schematische Darstellung der verwendeten Durchflussküvette und des Probenkreislaufs	39
4.1. UV/Vis-Spektren und Strukturformeln von TpC und CpT	42
4.2. IR-Spektren von TpC, CpT, TpT und CpC	44
4.3. IR-Spektren von TpC bei verschiedenen Konzentrationen	45
4.4. Strukturformeln von Acetophenon und 2-M	46
4.5. UV/Vis- und IR-Spektrum von 2-M	47
4.6. Absorptionsdifferenzspektren der photosensibilisierten Belichtung von TpC und CpT	49
4.7. Bestimmung der Quantenausbeute der CPD-Bildung am Beispiel von TpC	52
4.8. Ratenmodell der photosensibilisierten CPD-Bildung in TpC bzw. CpT	54
4.9. Absorptionsdifferenzspektren von TpC und CpT zu verschiedenen Inkubationszeiten nach der photosensibilisierten Belichtung	57

4.10. Absorptionsänderungen von TpC und CpT während der Inkubation	58
4.11. DADS der Absorptionsänderungen während der Inkubation von TpC und CpT	59
4.12. Absorptionsdifferenzspektren der photosensibilisierten Belichtung von TpU, UpT und TpT	61
4.13. Absorptionsspektren der CPD-Schäden von TpC, desaminiertem TpC und TpU sowie Strukturformeln von CPD(TpC) und CPD(TpU)	62
4.14. Absorptionsspektren der CPD-Schäden von CpT, desaminiertem CpT und UpT sowie Strukturformeln von CPD(CpT) und CPD(UpT)	63
5.1. Konturdarstellung und transiente Spektren von TpC	69
5.2. Konturdarstellung und transiente Spektren von CpT	70
5.3. Zeitliche Verläufe der Absorptionsänderungen von TpC und CpT	71
5.4. SADS von TpC, CpT und TpT	73
5.5. Biradikal und CPD-Schaden von TpC	74
5.6. Konturdarstellung und DADS von CpC und 2-M	76
5.7. Absorptionsdifferenzspektren der photosensibilisierten Belichtung von CpC, TpC, CpT und TpT	78
5.8. Reaktionsmodell der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand für TpC und CpT	80
6.1. Strukturformeln von Psoralen und AMT	84
6.2. Schematische Darstellung der Interkalation und Photoaddition von AMT im d(TA)-Doppelstrang	84
6.3. UV/Vis-Spektrum von AMT und Belichtungsspektren von AMT und d(TA) ₂₀	87
6.4. IR-Spektren von AMT, d(TA) ₂₀ , AMT und d(TA) ₂₀ sowie Absorptionsdifferenzspektren von AMT und d(TA) ₂₀	91
6.5. Konturdarstellung und DADS von AMT	94
6.6. Konturdarstellung und DADS von AMT und d(TA) ₂₀	96
6.7. Zeitliche Verläufe der Absorptionsänderungen von AMT und d(TA) ₂₀	97
6.8. Biradikal und Monoaddukt von AMT und Thymin	101
6.9. Reaktionsmodell der Monoadduktbildung zwischen AMT und d(TA) ₂₀	102
A.1. Absorptionsspektren des Acetat-Puffers sowie von UpT vor und nach der Acetat-Korrektur	109
A.2. Bestimmung der Änderung des Extinktionskoeffizienten am Beispiel von TpC	110
A.3. DADS von TpC und CpT	111

Tabellenverzeichnis

4.1.	Zuordnung der Schwingungsmoden für TpC, CpT, TMP und CMP	44
4.2.	Belichtungsdauer und zugehörige Belichtungs-dosis der photosensibilisier-ten Belichtungsmessungen an TpC und CpT	50
4.3.	Gesamtquantenausbeute der photosensibilisierten CPD-Bildung für TpC und CpT sowie die verwendeten Werte für deren Berechnungen	53
4.4.	Quantenausbeuten der CPD-Bildung aus dem Triplett-Zustand von TpC und CpT sowie die verwendeten Werte für deren Berechnungen	55
6.1.	Zuordnung der Schwingungsmoden für AMT, $d(TA)_{20}$, TMP und AMP	90

Literatur

- [Alb04] B. ALBERTS, A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS und P. WALTER. *Molekularbiologie der Zelle*. Hrsg. von L. JAENICKE. 4. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH, 2004.
- [Alh97] C. ALHAMBRA, F. J. LUQUE, F. GAGO und M. OROZCO. *Ab Initio Study of Stacking Interactions in A- and B-DNA*. *The Journal of Physical Chemistry B* 101(19):3846–3853, 1997.
- [Ap06] P. W. ATKINS und J. DE PAULA. *Physikalische Chemie*. 4. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.
- [Ast09] D. ASTURIOL, B. LASORNE, M. A. ROBB und L. BLANCAFORT. *Photophysics of the π, π^* and n, π^* States of Thymine: MS-CASPT2 Minimum-Energy Paths and CASSCF on-the-Fly Dynamics*. *The Journal of Physical Chemistry A* 113(38):10211–10218, 2009.
- [Ave89] D. AVERBECK. *Recent Advances in Psoralen Phototoxicity Mechanism*. *Photochemistry and Photobiology* 50(6):859–882, 1989.
- [Ban11] A. BANYASZ, I. VAYÁ, P. CHANGENET-BARRET, T. GUSTAVSSON, T. DOUKI und D. MARKOVITSI. *Base Pairing Enhances Fluorescence and Favors Cyclobutane Dimer Formation Induced upon Absorption of UVA Radiation by DNA*. *Journal of the American Chemical Society* 133(14):5163–5165, 2011.
- [Ban12] A. BANYASZ, T. DOUKI, R. IMPROTA, T. GUSTAVSSON, D. ONIDAS, I. VAYÁ, M. PERRON und D. MARKOVITSI. *Electronic Excited States Responsible for Dimer Formation upon UV Absorption Directly by Thymine Strands: Joint Experimental and Theoretical Study*. *Journal of the American Chemical Society* 134(36):14834–14845, 2012.
- [Bap17] M. S. BAPTISTA, J. CADET, P. DI MASCIO, A. A. GHOGARE et al. *Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways*. *Photochemistry and Photobiology* 93(4):912–919, 2017.
- [BB60] R. BEUKERS und W. BERENDS. *Isolation and Identification of the Irradiation Product of Thymine*. *Biochimica et Biophysica Acta* 41(3):550–551, 1960.
- [BB68] E. BEN-HUR und R. BEN-ISHAI. *Trans-Syn Thymine Dimers in Ultraviolet-Irradiated Denatured DNA: Identification and Photoreactivity*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 166(1):9–15, 1968.

- [BCL95] Y. BARAK, O. COHEN-FIX und Z. LIVNEH. *Deamination of Cytosine-Containing Pyrimidine Photodimers in UV-Irradiated DNA SIGNIFICANCE FOR UV LIGHT MUTAGENESIS*. Journal of Biological Chemistry 270(41):24174–24179, 1995.
- [BD67] G. M. BLACKBURN und R. J. H. DAVIES. *Photochemistry of Nucleic Acids. III. Structure of DNA-Derived Thymine Photodimer*. Journal of the American Chemical Society 89(23):5941–5945, 1967.
- [Bea80] P. C. BEAUMONT, B. J. PARSONS, S. NAVARATNAM, G. O. PHILLIPS und J. C. ALLEN. *The Reactivities of Furocoumarin Excited States with DNA in Solution A Laser Flash Photolysis and Fluorescence Study*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis 608(2):259–265, 1980.
- [BEB67] E. BEN-HUR, D. ELAD und R. BEN-ISHAI. *The Photosensitized Dimerization of Thymidine in Solution*. Biochimica et Biophysica Acta 149(2):355–360, 1967.
- [BEL08] R. BEUKERS, A. P. M. EKER und P. H. M. LOHMAN. *50 Years Thymine Dimer*. DNA Repair 7(3):530–543, 2008.
- [Ber14] J. M. BERG, J. L. TYMOCZKO, L. STRYER und G. J. GATTO. *Biochemie*. 7. Auflage, korrigierter Nachdruck. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum, 2014.
- [Bet99] D. BETHEA, B. FULLMER, S. SYED, G. SELTZER, J. TIANO, C. RISCHKO, L. GILLESPIE, D. BROWN und F. P. GASPARRO. *Psoralen Photobiology and Photochemotherapy: 50 Years of Science and Medicine*. Journal of Dermatological Science 19(2):78–88, 1999.
- [BH68] D. M. BROWN und M. J. E. HEWLINS. *Dihydrocytosine and Related Compounds*. Journal of the Chemical Society C: Organic 0(0):2050–2055, 1968.
- [BIL54] G. BÜCHI, C. G. INMAN und E. S. 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.
- [Bla97] H. S. BLACK, F. R. DEGRUIJL, P. D. FORBES, J. E. CLEAVER, H. N. ANANTHASWAMY, E. C. DEFABO, S. E. ULLRICH und R. M. TYRRELL. *Photocarcinogenesis: An Overview*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 40(1):29–47, 1997.
- [BMS88] V. BOYER, E. MOUSTACCHI und E. SAGE. *Sequence Specificity in Photoreaction of Various Psoralen Derivatives with DNA: Role in Biological Activity*. Biochemistry 27(8):3011–3018, 1988.

-
- [Boo89] R. J. BOORSTEIN, T. P. HILBERT, J. CADET, R. P. CUNNINGHAM und G. W. TEEBOR. *UV-Induced Pyrimidine Hydrates in DNA Are Repaired by Bacterial and Mammalian DNA Glycosylase Activities*. *Biochemistry* 28(15):6164–6170, 1989.
- [Boo90] R. J. BOORSTEIN, T. P. HILBERT, R. P. CUNNINGHAM und G. W. TEEBOR. *Formation and Stability of Repairable Pyrimidine Photohydrates in DNA*. *Biochemistry* 29(46):10455–10460, 1990.
- [Bos06] F. BOSCA, V. LHIAUBET-VALLET, M. C. CUQUERELLA, J. V. CASTELL und M. A. MIRANDA. *The Triplet Energy of Thymine in DNA*. *Journal of the American Chemical Society* 128(19):6318–6319, 2006.
- [Boy08] R. W. BOYD. *Nonlinear Optics*. 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Academic Press, 2008.
- [BPC72] J. G. BURR, E. H. PARK und 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.
- [BSG03] M. BANYAY, M. SARKAR und A. GRÄSLUND. *A Library of IR Bands of Nucleic Acids in Solution*. *Biophysical Chemistry* 104(2):477–488, 2003.
- [Cad06] J. CADET, J.-L. RAVANAT, G. R. MARTINEZ, M. H. G. MEDEIROS und P. D. MASCIO. *Singlet Oxygen Oxidation of Isolated and Cellular DNA: Product Formation and Mechanistic Insights*. *Photochemistry and Photobiology* 82(5):1219–1225, 2006.
- [Cad09] J. CADET, T. DOUKI, J.-L. RAVANAT und P. D. MASCIO. *Sensitized Formation of Oxidatively Generated Damage to Cellular DNA by UVA Radiation*. *Photochemical & Photobiological Sciences* 8(7):903–911, 2009.
- [Cad12] J. CADET, S. MOURET, J.-L. RAVANAT und T. DOUKI. *Photoinduced Damage to Cellular DNA: Direct and Photosensitized Reactions*. *Photochemistry and Photobiology* 88(5):1048–1065, 2012.
- [CB04] M. J. CAVALUZZI und P. N. BORER. *Revised UV Extinction Coefficients for Nucleoside-5'-monophosphates and Unpaired DNA and RNA*. *Nucleic Acids Research* 32(1):e13–e13, 2004.
- [CD18] J. CADET und T. DOUKI. *Formation of UV-Induced DNA Damage Contributing to Skin Cancer Development*. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2018.
- [Cim85] G. D. CIMINO, H. B. GAMPER, S. T. ISAACS und J. E. HEARST. *Psoralens as Photoactive Probes of Nucleic Acid Structure and Function: Organic Chemistry, Photochemistry, and Biochemistry*. *Annual Review of Biochemistry* 54(1):1151–1193, 1985.

- [Cli07] T. CLIMENT, R. GONZÁLEZ-LUQUE, M. MERCHÁN und L. SERRANO-ANDRÉS. *On the Intrinsic Population of the Lowest Triplet State of Uracil*. Chemical Physics Letters 441(4–6):327–331, 2007.
- [Cli10] T. CLIMENT, I. GONZÁLEZ-RAMÍREZ, R. GONZÁLEZ-LUQUE, M. MERCHÁN und L. SERRANO-ANDRÉS. *Cyclobutane Pyrimidine Photodimerization of DNA/RNA Nucleobases in the Triplet State*. The Journal of Physical Chemistry Letters 1(14):2072–2076, 2010.
- [Con26] E. CONDON. *A Theory of Intensity Distribution in Band Systems*. Physical Review 28(6):1182–1201, 1926.
- [Coo03] M. S. COOKE, M. D. EVANS, M. DIZDAROGLU und J. LUNEC. *Oxidative DNA Damage: Mechanisms, Mutation, and Disease*. The FASEB Journal 17(10):1195–1214, 2003.
- [Cre04] C. E. CRESPO-HERNÁNDEZ, B. COHEN, P. M. HARE und B. KOHLER. *Ultrafast Excited-State Dynamics in Nucleic Acids*. Chemical Reviews 104(4):1977–2019, 2004.
- [CS03] G. CERULLO und S. D. SILVESTRI. *Ultrafast Optical Parametric Amplifiers*. Review of Scientific Instruments 74(1):1–18, 2003.
- [CT30] M. CZERNY und A. F. TURNER. *Über den Astigmatismus bei Spiegelspektrometern*. Zeitschrift für Physik 61(11):792–797, 1930.
- [CT78] J. CADET und R. TEOULE. *Comparative Study of Oxidation of Nucleic Acid Components by Hydroxyl Radicals, Singlet Oxygen and Superoxide Anion Radicals*. Photochemistry and Photobiology 28(4-5):661–665, 1978.
- [Cuq11] M. C. CUQUERELLA, V. LHIAUBET-VALLET, F. BOSCA und M. A. MIRANDA. *Photosensitized Pyrimidine Dimerisation in DNA*. Chemical Science 2(7):1219–1232, 2011.
- [Cuq12] M. C. CUQUERELLA, V. LHIAUBET-VALLET, J. CADET und M. A. MIRANDA. *Benzophenone Photosensitized DNA Damage*. Accounts of Chemical Research 45(9):1558–1570, 2012.
- [CV90] J. CADET und P. VIGNY. *The Photochemistry of Nucleic Acids. Bioorganic Photochemistry*. Hrsg. von H. MORRISON. (Volume 1). New York: Wiley, 1990: 1–272.
- [Dav78] D. B. DAVIES. *Conformations of Nucleosides and Nucleotides*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 12(3):135–225, 1978.
- [DC01] T. DOUKI und 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.
- [DC02] M. C. DEROSA und R. J. CRUTCHLEY. *Photosensitized Singlet Oxygen and Its Applications*. Coordination Chemistry Reviews 233-234:351–371, 2002.

-
- [DC92] T. DOUKI und J. CADET. *Far-UV Photochemistry and Photosensitization of 2'-Deoxycytidylyl-(3'-5')-Thymidine: Isolation and Characterization of the Main Photoproducts*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 15(3):199–213, 1992.
- [DC99] T. DOUKI und J. CADET. *Modification of DNA Bases by Photosensitized One-Electron Oxidation*. *International Journal of Radiation Biology* 75(5):571–581, 1999.
- [Dew69] J. DEWAR. 5. *On the Oxidation of Phenyl Alcohol, and a Mechanical Arrangement Adapted to Illustrate Structure in the Nonsaturated Hydrocarbons*. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 6:82–86, 1869.
- [DH71] M. DANIELS und W. HAUSWIRTH. *Fluorescence of the Purine and Pyrimidine Bases of the Nucleic Acids in Neutral Aqueous Solution at 300°K*. *Science* 171(3972):675–677, 1971.
- [Die19] J. DIEKMANN, J. GONTCHAROV, S. FRÖBEL, C. TORRES ZIEGENBEIN, W. ZINTH und P. GILCH. *The Photoaddition of a Psoralen to DNA Proceeds via the Triplet State*. *Journal of the American Chemical Society* 141(34):13643–13653, 2019.
- [DKJ70] G. DEBOER, O. KLINGHOFFER und H. E. JOHNS. *Reversal Mechanisms for the Photohydrates of Cytosine and Its Derivatives*. *Biochimica et Biophysica Acta* 213(2):253–268, 1970.
- [Dom14] P. N. DOMINGUEZ, M. HIMMELSTOSS, J. MICHELMANN, F. T. LEHNER, A. T. GARDINER, R. J. COGDELL und W. ZINTH. *Primary Reactions in Photosynthetic Reaction Centers of Rhodobacter Sphaeroides – Time Constants of the Initial Electron Transfer*. *Chemical Physics Letters* 601:103–109, 2014.
- [Dou00] T. DOUKI, M. COURT, S. SAUVAIGO, F. ODIN und J. CADET. *Formation of the Main UV-Induced Thymine Dimeric Lesions within Isolated and Cellular DNA as Measured by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. *Journal of Biological Chemistry* 275(16):11678–11685, 2000.
- [Dou03] T. DOUKI, A. REYNAUD-ANGELIN, J. CADET und E. SAGE. *Bipyrimidine Photoproducts Rather than Oxidative Lesions Are the Main Type of DNA Damage Involved in the Genotoxic Effect of Solar UVA Radiation*. *Biochemistry* 42(30):9221–9226, 2003.
- [Dou07] T. DOUKI. *Chapter 9: UV-Induced DNA Damage. Biophysical and Physiological Effects of Solar Radiation on Human Skin*. Hrsg. von P. U. GIACOMONI. Bd. 10. *Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 2007: 227–269.

- [Dou14] T. DOUKI, I. BÉRARD, A. WACK und S. ANDRÄ. *Contribution of Cytosine-Containing Cyclobutane Dimers to DNA Damage Produced by Photosensitized Triplet–Triplet Energy Transfer*. *Chemistry – A European Journal* 20(19):5787–5794, 2014.
- [DVC91] T. DOUKI, L. VOITURIEZ und J. CADET. *Characterization of the (6–4) Photo-product of 2'-Deoxycytidylyl-(3' → 5')-Thymidine and of Its Dewar Valence Isomer*. *Photochemistry and Photobiology* 53(3):293–297, 1991.
- [DW62] H. DELLWEG und A. WACKER. *Strahlenchemische Veränderungen von Thymin und Cytosin in der DNS durch UV-Licht*. *Zeitschrift für Naturforschung B* 17(12):827–834, 1962.
- [EFM09] M. ETINSKI, T. FLEIG und C. M. MARIAN. *Intersystem Crossing and Characterization of Dark States in the Pyrimidine Nucleobases Uracil, Thymine, and 1-Methylthymine*. *The Journal of Physical Chemistry A* 113(43):11809–11816, 2009.
- [EL67] J. EISINGER und A. A. LAMOLA. *The Excited-State Precursor of the Thymine Dimer*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 28(4):558–565, 1967.
- [EIS63] M. A. EL-SAYED. *Spin–Orbit Coupling and the Radiationless Processes in Nitrogen Heterocyclics*. *The Journal of Chemical Physics* 38(12):2834–2838, 1963.
- [Epe11] B. EPE. *DNA Damage Spectra Induced by Photosensitization*. *Photochemical & Photobiological Sciences* 11(1):98–106, 2011.
- [ES68] J. EISINGER und R. G. SHULMAN. *Excited Electronic States of DNA*. *Science* 161(3848):1311–1319, 1968.
- [FCC04] M. G. FRIEDEL, M. K. CICHON und T. CARELL. *DNA Damage and Repair: Photochemistry*. *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*. Hrsg. von W. M. HORSPOOL und F. LENCI. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004: 141/1–141/22.
- [FD26] J. FRANCK und E. G. DYMOND. *Elementary Processes of Photochemical Reactions*. *Transactions of the Faraday Society* 21(February):536–542, 1926.
- [FG53] R. E. FRANKLIN und R. G. GOSLING. *Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate*. *Nature* 171(4356):740–741, 1953.
- [FHJ65] K. B. FREEMAN, P. V. HARIHARAN und H. E. JOHNS. *The Ultraviolet Photochemistry of Cytidylyl-(3'-5')-Cytidine*. *Journal of Molecular Biology* 13(3):833–848, 1965.
- [FJ76] G. FISHER und H. JOHNS. *Pyrimidine Photohydrates*. *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*. Elsevier, 1976: 169–224.

-
- [FKS90] L. A. FREDERICO, T. A. KUNKEL und B. R. SHAW. *A Sensitive Genetic Assay for the Detection of Cytosine Deamination: Determination of Rate Constants and the Activation Energy*. *Biochemistry* 29(10):2532–2537, 1990.
- [Foo91] C. S. FOOTE. *Definition of Type I and Type II Photosensitized Oxidation*. *Photochemistry and Photobiology* 54(5):659–659, 1991.
- [Fri03] E. C. FRIEDBERG. *DNA Damage and Repair*. *Nature* 421(6921):436–440, 2003.
- [Frö15] S. FRÖBEL, A. REIFFERS, C. TORRES ZIEGENBEIN und P. GILCH. *DNA Intercalated Psoralen Undergoes Efficient Photoinduced Electron Transfer*. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 6(7):1260–1264, 2015.
- [Frö16a] S. FRÖBEL. *Ultraschnelle Prozesse bei der therapeutisch genutzten Photochemie von Psoralenen in DNA*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 2016.
- [Frö16b] S. FRÖBEL, L. LEVI, S. M. ULAMEC und P. GILCH. *Photoinduced Electron Transfer between Psoralens and DNA: Influence of DNA Sequence and Substitution*. *ChemPhysChem* 17(9):1377–1386, 2016.
- [Gas18] F. P. GASPARRO. *Psoralen DNA Photobiology: Volume I*. 2018.
- [GES67] M. GUÉRON, J. EISINGER und R. G. SHULMAN. *Excited States of Nucleotides and Singlet Energy Transfer in Polynucleotides*. *The Journal of Chemical Physics* 47(10):4077–4091, 1967.
- [GG03] H. GÜNZLER und H.-U. GREMLICH. *IR-Spektroskopie: eine Einführung*. 4th ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.
- [Giu13] A. GIUSSANI, L. SERRANO-ANDRÉS, M. MERCHÁN, D. ROCA-SANJUÁN und M. GARAVELLI. *Photoinduced Formation Mechanism of the Thymine-Thymine (6–4) Adduct*. *The Journal of Physical Chemistry B* 117(7):1999–2004, 2013.
- [GJ68] C. L. GREENSTOCK und H. E. JOHNS. *Photosensitized Dimerization of Pyrimidines*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 30(1):21–27, 1968.
- [gkM01] F. R. DE GRUIJL, H. J. VAN KRANEN und L. H. F. MULLENDERS. *UV-Induced DNA Damage, Repair, Mutations and Oncogenic Pathways in Skin Cancer*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. Consequences of Exposure to Sunlight: Elements to Assess Protection* 63(1):19–27, 2001.
- [Gon10] R. GONZÁLEZ-LUQUE, T. CLIMENT, I. GONZÁLEZ-RAMÍREZ, M. MERCHÁN und L. SERRANO-ANDRÉS. *Singlet-Triplet States Interaction Regions in DNA/RNA Nucleobase Hypersurfaces*. *Journal of Chemical Theory and Computation* 6(7):2103–2114, 2010.

- [Gon19] J. GONTCHAROV, L. LIU, B. M. PILLES, T. CARELL, W. J. SCHREIER und W. ZINTH. *Triplet-Induced Lesion Formation at CpT and TpC Sites in DNA*. Chemistry – A European Journal 25(66):15164–15172, 2019.
- [Gra12] A. GRAND, J. CADET, L. A. ERIKSSON, V. LABET, N. L. JORGE, M. L. SCHREIBER, T. DOUKI und C. MORELL. *Comparison of the Mechanism of Deamination of 5,6-Dihydro-5-Methylcytosine with Other Cytosine Derivatives*. Theoretical Chemistry Accounts 131(4):1–11, 2012.
- [GWR96] I. G. GUT, P. D. WOOD und R. W. REDMOND. *Interaction of Triplet Photosensitizers with Nucleotides and DNA in Aqueous Solution at Room Temperature*. Journal of the American Chemical Society 118(10):2366–2373, 1996.
- [Hai12a] K. HAISER. *Femtosekunden-Infrarotspektroskopie von UV-induzierten Photoschäden in Nukleinsäuren*. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2012.
- [Hai12b] K. HAISER, B. P. FINGERHUT, K. HEIL, A. GLAS, T. T. HERZOG, B. M. PILLES, W. J. SCHREIER, W. ZINTH, R. DE VIVIE-RIEDLE und T. CARELL. *Mechanism of UV-Induced Formation of Dewar Lesions in DNA*. Angewandte Chemie International Edition 51(2):408–411, 2012.
- [Har08] P. M. HARE, C. T. MIDDLETON, K. I. MERTEL, J. M. HERBERT und B. KOHLER. *Time-Resolved Infrared Spectroscopy of the Lowest Triplet State of Thymine and Thymidine*. Chemical Physics 347(1-3):383–392, 2008.
- [HCK06] P. M. HARE, C. E. CRESPO-HERNÁNDEZ und B. KOHLER. *Solvent-Dependent Photophysics of 1-Cyclohexyluracil: Ultrafast Branching in the Initial Bright State Leads Nonradiatively to the Electronic Ground State and a Long-Lived $^1n\pi^*$ State*. The Journal of Physical Chemistry B 110(37):18641–18650, 2006.
- [HCK07] P. M. HARE, C. E. CRESPO-HERNÁNDEZ und B. KOHLER. *Internal Conversion to the Electronic Ground State Occurs via Two Distinct Pathways for Pyrimidine Bases in Aqueous Solution*. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(2):435–440, 2007.
- [Hea84] J. E. HEARST, S. T. ISAACS, D. KANNE, H. RAPOPORT und K. STRAUB. *The Reaction of the Psoralens with Deoxyribonucleic Acid*. Quarterly Reviews of Biophysics 17(1):1–44, 1984.
- [Hea89] J. E. HEARST. *Photochemistry of the Psoralens*. Chemical Research in Toxicology 2(2):69–75, 1989.
- [HKC96] G.-S. HWANG, J.-K. KIM und B.-S. CHOI. *NMR Structural Studies of DNA Decamer Duplex Containing the Dewar Photoproduct of Thymidylyl (3'→5') Thymidine*. European Journal of Biochemistry 235(1-2):359–365, 1996.
- [Hoe01] J. H. J. HOEIJMAKERS. *Genome Maintenance Mechanisms for Preventing Cancer*. Nature 411:366–374, 2001.

-
- [Hof18] S. M. HOFMANN. *Faltung und Entfaltung eines neu entwickelten lichtschaltbaren beta-hairpin Modellpeptids und Untersuchung seiner hydrophoben Wechselwirkungen*. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2018.
- [HZ13] X. HUANG und R. ZHANG. *A Theoretical Rationale Why Furan-Side Monoadduct Is More Favorable Toward Diadduct Formation in 8-Methoxypsoralen and Thymine Complexes*. *Photochemistry and Photobiology* 89(4):891–899, 2013.
- [Isa77] S. T. ISAACS, C.-K. J. SHEN, J. E. HEARST und H. RAPOPORT. *Synthesis and Characterization of New Psoralen Derivatives with Superior Photoreactivity with DNA and RNA*. *Biochemistry* 16(6):1058–1064, 1977.
- [Isa82] S. T. ISAACS, C. CHUN, J. E. HYDE, H. RAPOPORT und J. E. HEARST. *A Photochemical Characterization of Reactions of Psoralen Derivatives with DNA*. *Trends in Photobiology*. Hrsg. von C. HÉLÈNE, M. CHARLIER, T. MONTENAY-GARESTIER und G. LAUSTRIAT. Boston, MA: Springer US, 1982: 279–294.
- [Ism02] N. ISMAIL, L. BLANCAFORT, M. OLIVUCCI, B. KOHLER und M. A. ROBB. *Ultrafast Decay of Electronically Excited Singlet Cytosine via a π, π^* to n, π^* State Switch*. *Journal of the American Chemical Society* 124(24):6818–6819, 2002.
- [Jab35] A. JABŁOŃSKI. *Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren*. *Zeitschrift für Physik* 94(1):38–46, 1935.
- [Joh77] B. H. JOHNSTON, M. A. JOHNSON, C. B. MOORE und J. E. HEARST. *Psoralen-DNA Photoreaction: Controlled Production of Mono- and Diadducts with Nanosecond Ultraviolet Laser Pulses*. *Science* 197(4306):906–908, 1977.
- [Joh81] B. H. JOHNSTON, A. H. KUNG, C. B. MOORE und J. E. HEARST. *Kinetics of Formation of Deoxyribonucleic Acid Crosslinks by 4'-(Aminomethyl)-4,5',8-Trimethylpsoralen*. *Biochemistry* 20(4):735–738, 1981.
- [JT93] N. JIANG und J.-S. TAYLOR. *In Vivo Evidence That UV-Induced C \rightarrow 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.
- [JW71] H. E. JOHNS und D. W. WHILLANS. *Properties of the Triplet States of Thymine and Uracil in Aqueous Solution*. *Journal of the American Chemical Society* 93(6):1358–1362, 1971.
- [Kan82a] D. KANNE, K. STRAUB, J. E. HEARST und H. RAPOPORT. *Isolation and Characterization of Pyrimidine-Psoralen-Pyrimidine Photodiadducts from DNA*. *Journal of the American Chemical Society* 104(24):6754–6764, 1982.

- [Kan82b] D. KANNE, K. STRAUB, H. RAPOPORT und J. E. HEARST. *The Psoralen-DNA Photoreaction. Characterization of the Monoaddition Products from 8-Methoxypsoralen and 4,5',8-Trimethylpsoralen*. *Biochemistry* 21(5):861–871, 1982.
- [Kas50] M. KASHA. *Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules*. *Discussions of the Faraday Society* 9(0):14–19, 1950.
- [KKN05] N. KITAMURA, S. KOHTANI und R. NAKAGAKI. *Molecular Aspects of Furocoumarin Reactions: Photophysics, Photochemistry, Photobiology, and Structural Analysis*. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 6(2):168–185, 2005.
- [KNT93] J. L. F. KAO, S. NADJI und J.-S. TAYLOR. *Identification and Structure Determination of a Third Cyclobutane Photodimer of Thymidylyl-(3'→5')-Thymidine: The Trans-Syn-II Product*. *Chemical Research in Toxicology* 6(4):561–567, 1993.
- [Koh10] B. KOHLER. *Nonradiative Decay Mechanisms in DNA Model Systems*. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 1(13):2047–2053, 2010.
- [Kol03] F. KOLLER. *Zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie an Azobenzolderivaten im Zeitbereich von Pikosekunden*. Diplomarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2003.
- [KRH84] D. KANNE, H. RAPOPORT und J. E. HEARST. *8-Methoxypsoralen-Nucleic Acid Photoreaction. Effect of Methyl Substitution on Pyrone vs. Furan Photoaddition*. *Journal of Medicinal Chemistry* 27(4):531–534, 1984.
- [KSK91] T. M. G. KONING, J. J. G. SOEST und R. KAPTEIN. *NMR Studies of Bipyrimidine Cyclobutane Photodimers*. *European Journal of Biochemistry* 195(1):29–40, 1991.
- [KVC88] L.-S. KAN, L. VOITURIEZ und J. CADET. *Nuclear Magnetic Resonance Studies of Cis-Syn, Trans-Syn, and 6–4 Photodimers of Thymidylyl(3'-5')Thymidine Monophosphate and Cis-Syn Photodimers of Thymidylyl(3'-5')Thymidine Cyanoethyl Phosphotriester*. *Biochemistry* 27(15):5796–5803, 1988.
- [KVC92] L.-S. KAN, L. VOITURIEZ und J. CADET. *The Dewar Valence Isomer of the (6–4) Photoadduct of Thymidylyl-(3'–5')-Thymidine Monophosphate: Formation, Alkaline Lability and Conformations Properties*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 12(4):339–357, 1992.
- [Lab13] V. LABET, N. JORGE, C. MORELL, T. DOUKI, A. GRAND, J. CADET und L. A. ERIKSSON. *UV-Induced Formation of the Thymine–Thymine Pyrimidine (6–4) Pyrimidone Photoproduct – a DFT Study of the Oxetane Intermediate Ring Opening*. *Photochemical & Photobiological Sciences* 12(8):1509–1516, 2013.

-
- [Lak06] J. R. LAKOWICZ. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006.
- [Lam73] A. A. LAMOLA. *Photochemistry and Structure in Nucleic Acids*. *Pure and Applied Chemistry* 34(2):281–304, 1973.
- [Lau86] G. LAUSTRIAT. *Molecular Mechanisms of Photosensitization*. *Biochimie. Molecular, Cellular and Medical Aspects of Photosensitization* 68(6):771–778, 1986.
- [LGT87] R. LETELLIER, M. GHOMI und E. TAILLANDIER. *Normal Coordinate Analysis of 2'-Deoxythymidine and 2'-Deoxyadenosine*. *European Biophysics Journal* 14(7):423–430, 1987.
- [LHC99] J.-H. LEE, G.-S. HWANG und B.-S. 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 → C Transition of the (6–4) Adduct*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(12):6632–6636, 1999.
- [Lin79] T. LINDAHL. *DNA Glycosylases, Endonucleases for Apurinic/Apyrimidinic Sites, and Base Excision-Repair*. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Hrsg. von W. E. COHN. Bd. 22. Academic Press, 1979: 135–192.
- [Liu15] L. LIU, B. M. PILLES, A. M. REINER, J. GONTCHAROV und W. ZINTH. *2'-Methoxyacetophenone: An Efficient Photosensitizer for Cyclobutane Pyrimidine Dimer Formation*. *ChemPhysChem* 16(16):3483–3487, 2015.
- [Liu16a] L. LIU. *Cyclobutane Pyrimidine Dimers via Photosensitization – Combined Stationary and Time-Resolved Studies*. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2016.
- [Liu16b] L. LIU, B. M. PILLES, J. GONTCHAROV, D. B. BUCHER und W. ZINTH. *Quantum Yield of Cyclobutane Pyrimidine Dimer Formation Via the Triplet Channel Determined by Photosensitization*. *The Journal of Physical Chemistry B* 120(2):292–298, 2016.
- [LM29] P. A. LEVENE und T. MORI. *Ribodesose and Xylodesose and Their Bearing on the Structure of Thyminose*. *Journal of Biological Chemistry* 83(3):803–816, 1929.
- [LN74] T. LINDAHL und B. NYBERG. *Heat-Induced Deamination of Cytosine Residues in Deoxyribonucleic Acid*. *Biochemistry* 13(16):3405–3410, 1974.
- [LPH07] G. LÖFFLER, P. E. PETRIDES und P. C. HEINRICH, Hrsg. *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007.

- [LR93] D. G. E. LEMAIRE und B. P. RUZSICKA. *Kinetic Analysis of the Deamination Reactions of Cyclobutane Dimers of Thymidyl-3',5'-2'-Deoxycytidine and 2'-Deoxycytidyl-3',5'-Thymidine*. *Biochemistry* 32(10):2525–2533, 1993.
- [LY67] A. A. LAMOLA und T. YAMANE. *Sensitized Photodimerization of Thymine in DNA*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 58(2):443–446, 1967.
- [LY78a] F.-T. LIU und N. C. YANG. *Photochemistry of Cytosine Derivatives. 1. Photochemistry of Thymidyl-(3' → 5')-Deoxycytidine*. *Biochemistry* 17(23):4865–4876, 1978.
- [LY78b] F.-T. LIU und N. C. YANG. *Photochemistry of Cytosine Derivatives. 2. Photohydration of Cytosine Derivatives. Proton Magnetic Resonance Study on the Chemical Structure and Property of Photohydrates*. *Biochemistry* 17(23):4877–4885, 1978.
- [MJ04] M. J. FRISCH, G. W. TRUCKS, H. B. SCHLEGEL, G. E. SCUSERIA et al. *Gaussian 03*. Manual. Wallingford, CT, 2004.
- [MA05] V. O. MELNIKOVA und H. N. ANANTHASWAMY. *Cellular and Molecular Events Leading to the Development of Skin Cancer*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Biological Effects of Ultraviolet Radiation* 571(1):91–106, 2005.
- [Mar12] C. M. MARIAN. *Spin–Orbit Coupling and Intersystem Crossing in Molecules*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* 2(2):187–203, 2012.
- [Mat04] S. MATSIKA. *Radiationless Decay of Excited States of Uracil through Conical Intersections*. *The Journal of Physical Chemistry A* 108(37):7584–7590, 2004.
- [MCC18] M. M. MELOUGH, E. CHO und O. K. CHUN. *Furocoumarins: A Review of Biochemical Activities, Dietary Sources and Intake, and Potential Health Risks*. *Food and Chemical Toxicology* 113:99–107, 2018.
- [Mer05] M. MERCHÁN, L. SERRANO-ANDRÉS, M. A. ROBB und L. BLANCAFORT. *Triplet-State Formation along the Ultrafast Decay of Excited Singlet Cytosine*. *Journal of the American Chemical Society* 127(6):1820–1825, 2005.
- [Mer06] M. MERCHÁN, R. GONZÁLEZ-LUQUE, T. CLIMENT, L. SERRANO-ANDRÉS, E. RODRÍGUEZ, M. REGUERO und D. PELÁEZ. *Unified Model for the Ultrafast Decay of Pyrimidine Nucleobases*. *The Journal of Physical Chemistry B* 110(51):26471–26476, 2006.
- [MHC93] S. L. MUROV, G. L. HUG und I. CARMICHAEL. *Handbook of Photochemistry*. 2nd ed, rev. and expanded. New York: M. Dekker, 1993.
- [MHS71] T. A. MOORE, M. L. HARTER und P.-S. SONG. *Ultraviolet Spectra of Coumarins and Psoralens*. *Journal of Molecular Spectroscopy* 40(1):144–157, 1971.

-
- [Mid09] C. T. MIDDLETON, K. DE LA HARPE, C. SU, Y. K. LAW, C. E. CRESPO-HERNÁNDEZ und B. KOHLER. *DNA Excited-State Dynamics: From Single Bases to the Double Helix*. Annual Review of Physical Chemistry 60(1):217–239, 2009.
- [MK11] S. MATSIKA und P. KRAUSE. *Nonadiabatic Events and Conical Intersections*. Annual Review of Physical Chemistry 62(1):621–643, 2011.
- [MM05] S. MARGUET und D. MARKOVITSI. *Time-Resolved Study of Thymine Dimer Formation*. Journal of the American Chemical Society 127(16):5780–5781, 2005.
- [MMK03] R. J. MALONE, A. M. MILLER und B. KOHLER. *Singlet Excited-State Lifetimes of Cytosine Derivatives Measured by Femtosecond Transient Absorption*. Photochemistry and Photobiology 77(2):158–164, 2003.
- [Mou06] S. MOURET, C. BAUDOUIN, M. CHARVERON, A. FAVIER, J. CADET und 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):13765–13770, 2006.
- [Mou10] S. MOURET, C. PHILIPPE, J. GRACIA-CHANTEGREL, A. BANYASZ, S. KARPATI, D. MARKOVITSI und T. DOUKI. *UVA-Induced Cyclobutane Pyrimidine Dimers in DNA: A Direct Photochemical Mechanism?* Organic & Biomolecular Chemistry 8(7):1706–1711, 2010.
- [MS03] M. MERCHÁN und L. SERRANO-ANDRÉS. *Ultrafast Internal Conversion of Excited Cytosine via the Lowest $\pi\pi^*$ Electronic Singlet State*. Journal of the American Chemical Society 125(27):8108–8109, 2003.
- [ODo94] R. E. O'DONNELL, R. J. BOORSTEIN, R. P. CUNNINGHAM und G. W. TEEBOR. *Effect of pH and Temperature on the Stability of UV-Induced Repairable Pyrimidine Hydrates in DNA*. Biochemistry 33(33):9875–9880, 1994.
- [OE09] S. OMAR und L. A. ERIKSSON. *Interaction and Photobinding between 8-Methoxypsoralen and Thymine*. Chemical Physics Letters 471(1):128–132, 2009.
- [Oro94] A. OROSKAR, G. OLACK, M. J. PEAK und F. P. GASPARRO. *4'-Aminomethyl-4,5',8-Trimethylpsoralen Photochemistry the Effect of Concentration and UVA Fluence on Photoadduct Formation in Poly(dAdT) and Calf Thymus DNA*. Photochemistry and Photobiology 60(6):567–573, 1994.
- [PF92] M. A. PATHAK und T. B. FITZPATRICK. *The Evolution of Photochemotherapy with Psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 14(1):3–22, 1992.

- [Pil14] B. M. PILLES, D. B. BUCHER, L. LIU, P. CLIVIO, P. GILCH, W. ZINTH und W. J. SCHREIER. *Mechanism of the Decay of Thymine Triplets in DNA Single Strands*. The Journal of Physical Chemistry Letters 5(9):1616–1622, 2014.
- [Pil16] B. M. PILLES. *Monitoring the Excited State Dynamics of Thymine by Time-Resolved IR Spectroscopy*. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2016.
- [Pil18] B. M. PILLES, B. MAERZ, J. CHEN, D. B. BUCHER, P. GILCH, B. KOHLER, W. ZINTH, B. P. FINGERHUT und W. J. SCHREIER. *Decay Pathways of Thymine Revisited*. The Journal of Physical Chemistry A 122(21):4819–4828, 2018.
- [PJT11] C. S. PENG, K. C. JONES und A. TOKMAKOFF. *Anharmonic Vibrational Modes of Nucleic Acid Bases Revealed by 2D IR Spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society 133(39):15650–15660, 2011.
- [PPK00] J.-M. L. PECOURT, J. PEON und 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.
- [PPK01] J.-M. L. PECOURT, J. PEON und 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.
- [PS96] W. PENG und B. R. SHAW. *Accelerated Deamination of Cytosine Residues in UV-Induced Cyclobutane Pyrimidine Dimers Leads to CC → TT Transitions*. Biochemistry 35(31):10172–10181, 1996.
- [Qui07] S. QUINN, G. W. DOORLEY, G. W. WATSON, A. J. COWAN, M. W. GEORGE, A. W. PARKER, K. L. RONAYNE, M. TOWRIE und J. M. KELLY. *Ultrafast IR Spectroscopy of the Short-Lived Transients Formed by UV Excitation of Cytosine Derivatives*. Chemical Communications (21):2130–2132, 2007.
- [RB89] M. RUIZ-RUBIO und R. BOCKRATH. *On the Possible Role of Cytosine Deamination in Delayed Photoreversal Mutagenesis Targeted at Thymine-Cytosine Dimers in E. Coli*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 210(1):93–102, 1989.
- [RDC01] J.-L. RAVANAT, T. DOUKI und 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 und W. ZINTH. *Generation of 10 to 50 Fs Pulses Tunable through All of the Visible and the NIR*. Applied Physics B 71(3):457–465, 2000.

-
- [Sal80] C. SALET, T. MACEDO DE SA E MELO, R. BENSASSON und E. J. LAND. *Photophysical Properties of Aminomethylpsoralen in Presence and Absence of DNA*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 607(2):379–383, 1980.
- [Sat04] H. SATZGER. *Untersuchung initialer Schritte der Peptidfaltung mit Ultrakurzzeitspektroskopie*. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2004.
- [SB10] S. I. SMITH und J. S. BRODBELT. *Rapid Characterization of Cross-Links, Mono-Adducts, and Non-Covalent Binding of Psoralens to Deoxyoligonucleotides by LC-UV/ESI-MS and IRMPD Mass Spectrometry*. *Analyst* 135(5):943–952, 2010.
- [SC66] R. B. SETLOW und W. L. CARRIER. *Pyrimidine Dimers in Ultraviolet-Irradiated DNA's*. *Journal of Molecular Biology* 17(1):237–254, 1966.
- [Sch03] O. D. SCHÄRER. *Chemistry and Biology of DNA Repair*. *Angewandte Chemie International Edition* 42(26):2946–2974, 2003.
- [Sch07] W. J. SCHREIER, T. E. SCHRADER, F. O. KOLLER, P. GILCH, C. E. CRESPO-HERNANDEZ, V. N. SWAMINATHAN, T. CARELL, W. ZINTH und B. KOHLER. *Thymine Dimerization in DNA Is an Ultrafast Photoreaction*. *Science* 315(5812):625–629, 2007.
- [Sch08] W. J. SCHREIER. *UV-Strahlung und DNA-Schäden – Untersuchung UV-induzierter Prozesse in Nukleinsäuren mit Femtosekunden-Infrarotspektroskopie*. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2008.
- [Sch09] W. J. SCHREIER, J. KUBON, N. REGNER, K. HAISER, T. E. SCHRADER, W. ZINTH, P. CLIVIO und P. GILCH. *Thymine Dimerization in DNA Model Systems: Cyclobutane Photolesion Is Predominantly Formed via the Singlet Channel*. *Journal of the American Chemical Society* 131(14):5038–5039, 2009.
- [Ser07] J. J. SERRANO-PÉREZ, R. GONZÁLEZ-LUQUE, M. MERCHÁN und L. SERRANO-ANDRÉS. *On the Intrinsic Population of the Lowest Triplet State of Thymine*. *The Journal of Physical Chemistry B* 111(41):11880–11883, 2007.
- [SGZ15] W. J. SCHREIER, P. GILCH und W. ZINTH. *Early Events of DNA Photodamage*. *Annual Review of Physical Chemistry* 66(1):497–519, 2015.
- [SK66] R. SHAPIRO und R. S. KLEIN. *The Deamination of Cytidine and Cytosine by Acidic Buffer Solutions. Mutagenic Implications*. *Biochemistry* 5(7):2358–2362, 1966.
- [SL07] M. K. SHUKLA und J. LESZCZYNSKI. *Electronic Spectra, Excited State Structures and Interactions of Nucleic Acid Bases and Base Assemblies: A Review*. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 25(1):93–118, 2007.

- [SM85] D. STRICKLAND und G. MOUROU. *Compression of Amplified Chirped Optical Pulses*. Optics Communications 56(3):219–221, 1985.
- [SM87] E. SAGE und E. MOUSTACCHI. *Sequence Context Effects on 8-Methoxypsoralen Photobinding to Defined DNA Fragments*. Biochemistry 26(12):3307–3314, 1987.
- [SMS08] J. J. SERRANO-PÉREZ, M. MERCHÁN und L. SERRANO-ANDRÉS. *Photoreactivity of Furocoumarins and DNA in PUVA Therapy: Formation of Psoralen-Thymine Adducts*. The Journal of Physical Chemistry B 112(44):14002–14010, 2008.
- [Soc01] G. SOCRATES. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. 3rd ed. Chichester ; New York: Wiley, 2001.
- [Spi95] H. P. SPIELMANN, T. J. DWYER, J. E. HEARST und D. E. WEMMER. *Solution Structures of Psoralen Monoadducted and Cross-Linked DNA Oligomers by NMR Spectroscopy and Restrained Molecular Dynamics*. Biochemistry 34(40):12937–12953, 1995.
- [SPM76] B. R. SCOTT, M. A. PATHAK und G. R. MOHN. *Molecular and Genetic Basis of Furocoumarin Reactions*. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology 39(1):29–74, 1976.
- [Spö01] S. SPÖRLEIN. *Femtosekunden-Spektroskopie schnellster Strukturänderungen in Peptid-Chromophor-Komplexen*. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2001.
- [SSM08] J. J. SERRANO-PÉREZ, L. SERRANO-ANDRÉS und M. MERCHÁN. *Photosensitization and Phototherapy with Furocoumarins: A Quantum-Chemical Study*. Chemical Physics. Ultrafast Photoinduced Processes in Polyatomic Molecules 347(1):422–435, 2008.
- [ST79] P.-S. SONG und K. J. TAPLEY. *Photochemistry and Photobiology of Psoralens*. Photochemistry and Photobiology 29(6):1177–1197, 1979.
- [Ste12] R. S. STERN. *The Risk of Squamous Cell and Basal Cell Cancer Associated with Psoralen and Ultraviolet A Therapy: A 30-Year Prospective Study*. Journal of the American Academy of Dermatology 66(4):553–562, 2012.
- [Svo93] D. L. SVOBODA, C. A. SMITH, J.-S. TAYLOR und A. SANCAR. *Effect of Sequence, Adduct Type, and Opposing Lesions on the Binding and Repair of Ultraviolet Photodamage by DNA Photolyase and (A)BC Excinuclease*. Journal of Biological Chemistry 268(14):10694–10700, 1993.
- [SYT98] S. SRIVASTAVA, E. YOURD und J. P. TOSCANO. *Structural Differences between $\pi\pi^*$ and $n\pi^*$ Acetophenone Triplet Excited States as Revealed by Time-Resolved IR Spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society 120(24):6173–6174, 1998.

-
- [Tay94] J.-S. TAYLOR. *Unraveling the Molecular Pathway from Sunlight to Skin Cancer*. Accounts of Chemical Research 27(3):76–82, 1994.
- [Tay95] J.-S. TAYLOR. *DNA, Sunlight and Skin Cancer*. Pure and Applied Chemistry 67(1):183–190, 1995.
- [TC87] J.-S. TAYLOR und M. P. COHRS. *DNA, Light, and Dewar Pyrimidinones: The Structure and Biological Significance to TpT3*. Journal of the American Chemical Society 109(9):2834–2835, 1987.
- [TDP98] Y. TU, R. DAMMANN und G. P. PFEIFER. *Sequence and Time-Dependent Deamination of Cytosine Bases in UVB-Induced Cyclobutane Pyrimidine Dimers in Vivo*. Journal of Molecular Biology 284(2):297–311, 1998.
- [Tin60] I. TINOCO. *Hypochromism in Polynucleotides*. Journal of the American Chemical Society 82(18):4785–4790, 1960.
- [TK93] D. C. THOMAS und T. A. KUNKEL. *Replication of UV-Irradiated DNA in Human Cell Extracts: Evidence for Mutagenic Bypass of Pyrimidine Dimers*. Proceedings of the National Academy of Sciences 90(16):7744–7748, 1993.
- [TM06] J. TATCHEN und C. M. MARIAN. *Vibronic Absorption, Fluorescence, and Phosphorescence Spectra of Psoralen : A Quantum Chemical Investigation*. Physical Chemistry Chemical Physics 8(18):2133–2144, 2006.
- [TO90] J.-S. TAYLOR und C. L. O'DAY. *Cis-Syn Thymine Dimers Are Not Absolute Blocks to Replication by DNA Polymerase I of Escherichia Coli in Vitro*. Biochemistry 29(6):1624–1632, 1990.
- [Tre69] E. TREACY. *Optical Pulse Compression with Diffraction Gratings*. IEEE Journal of Quantum Electronics 5(9):454–458, 1969.
- [TRS91] N. J. TURRO, V. RAMAMURTHY und J. C. SCAIANO. *Modern Molecular Photochemistry*. Sausalito, California: University Science Books, 1991.
- [Tur69] N. J. TURRO. *The Triplet State*. Journal of Chemical Education 46(1):2, 1969.
- [Uml85] M. E. UMLAS, W. A. FRANKLIN, G. L. CHAN und W. A. HASELTINE. *Ultraviolet Light Irradiation of Defined-Sequence DNA Under Conditions of Chemical Photosensitization*. Photochemistry and Photobiology 42(3):265–273, 1985.
- [Val01] B. VALEUR. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. New York: Wiley-VCH, 2001.
- [Vig85] P. VIGNY, F. GABORIAU, L. VOITURIEZ und J. CADET. *Chemical Structure of Psoralen-Nucleic Acid Photoadducts*. Biochimie 67(3):317–325, 1985.
- [Voe63] D. VOET, W. B. GRATZER, R. A. COX und P. DOTY. *Absorption Spectra of Nucleotides, Polynucleotides, and Nucleic Acids in the Far Ultraviolet*. Biopolymers 1(3):193–208, 1963.

- [VR01] A. A. VINK und L. ROZA. *Biological Consequences of Cyclobutane Pyrimidine Dimers*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 65(2):101–104, 2001.
- [VW68] A. J. VARGHESE und S. Y. WANG. *Thymine-Thymine Adduct as a Photoproduct of Thymine*. Science 160(3824):186–187, 1968.
- [Wal95] G. C. WALKER. *SOS-Regulated Proteins in Translesion DNA Synthesis and Mutagenesis*. Trends in Biochemical Sciences 20(10):416–420, 1995.
- [WB70] P. J. WAGNER und D. J. BUCHECK. *Photodimerization of Thymine and Uracil in Acetonitrile*. Journal of the American Chemical Society 92(1):181–185, 1970.
- [WC53] J. D. WATSON und F. H. C. CRICK. *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. Nature 171(4356):737–738, 1953.
- [Wel59] A. WELLER. *Outer and Inner Mechanism of Reactions of Excited Molecules*. Discussions of the Faraday Society 27:28–33, 1959.
- [WF61] D. L. WULFF und G. FRAENKEL. *On the Nature of Thymine Photoproduct*. Biochimica et Biophysica Acta 51(2):332–339, 1961.
- [WH65] R. B. WOODWARD und R. HOFFMANN. *Stereochemistry of Electrocyclic Reactions*. Journal of the American Chemical Society 87(2):395–397, 1965.
- [WJ66] D. WEINBLUM und H. E. JOHNS. *Isolation and Properties of Isomeric Thymine Dimers*. Biochimica et Biophysica Acta 114(3):450–459, 1966.
- [WJJ04] G. T. WONDRAK, M. K. JACOBSON und E. L. JACOBSON. *Identification of Quenchers of Photoexcited States as Novel Agents for Skin Photoprotection*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 312(2):482–491, 2004.
- [WJJ06] G. T. WONDRAK, M. K. JACOBSON und E. L. JACOBSON. *Endogenous UVA-Photosensitizers: Mediators of Skin Photodamage and Novel Targets for Skin Photoprotection*. Photochemical & Photobiological Sciences 5(2):215–237, 2006.
- [WPR97] T. WILHELM, J. PIEL und E. RIEDLE. *Sub-20-Fs Pulses Tunable across the Visible from a Blue-Pumped Single-Pass Noncollinear Parametric Converter*. Optics Letters 22(19):1494, 1997.
- [WR96] P. D. WOOD und R. W. REDMOND. *Triplet State Interactions between Nucleic Acid Bases in Solution at Room Temperature: Intermolecular Energy and Electron Transfer*. Journal of the American Chemical Society 118(18):4256–4263, 1996.
- [WS57] K. L. WIERZCHOWSKI und D. SHUGAR. *Photochemistry of Cytosine Nucleosides and Nucleotides*. Biochimica et Biophysica Acta 25(Supplement C):355–364, 1957.

-
- [WSW53] M. H. F. WILKINS, A. R. STOKES und H. R. WILSON. *Molecular Structure of Nucleic Acids: Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids*. Nature 171(4356):738–740, 1953.
- [WT93] C. I. WANG und J.-S. TAYLOR. *The Trans-Syn-I Thymine Dimer Bends DNA by $\approx 22^\circ$ and Unwinds DNA by $\approx 15^\circ$* . Chemical Research in Toxicology 6(4):519–523, 1993.
- [WV67] S. Y. WANG und A. J. VARGHESE. *Cytosine-Thymine Addition Product from DNA Irradiated with Ultraviolet Light*. Biochemical and Biophysical Research Communications 29(4):543–549, 1967.
- [Yak06] P. YAKOVCHUK. *Base-Stacking and Base-Pairing Contributions into Thermal Stability of the DNA Double Helix*. Nucleic Acids Research 34(2):564–574, 2006.
- [Yan11] W. YANG. *Surviving the Sun: Repair and Bypass of DNA UV Lesions*. Protein Science 20(11):1781–1789, 2011.
- [YEZ11] Z. B. YANG, L. A. ERIKSSON und R. B. ZHANG. *A Theoretical Rationale for Why Azetidone Has a Faster Rate of Formation Than Oxetane in TC(6–4) Photoproducts*. The Journal of Physical Chemistry B 115(31):9681–9686, 2011.
- [YZE11] Z. B. YANG, R. B. ZHANG und L. A. ERIKSSON. *A Triplet Mechanism for the Formation of Thymine – Thymine (6-4) Dimers in UV-Irradiated DNA*. Physical Chemistry Chemical Physics 13(19):8961–8966, 2011.
- [ZE06] R. B. ZHANG und L. A. ERIKSSON. *A Triplet Mechanism for the Formation of Cyclobutane Pyrimidine Dimers in UV-Irradiated DNA*. The Journal of Physical Chemistry B 110(14):7556–562, 2006.
- [ZK93] W. ZINTH und W. KAISER. *Ultrafast Coherent Spectroscopy. Ultrashort Laser Pulses: Generation and Applications*. Hrsg. von W. KAISER. Topics in Applied Physics. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1993: 235–277.

Publikationen

J. GONTCHAROV, L. LIU, B. M. PILLES, T. CARELL, W. J. SCHREIER und W. ZINTH. *Triplet-Induced Lesion Formation at CpT and TpC Sites in DNA*. Chemistry – A European Journal 25(66):15164–15172, 2019.

J. DIEKMANN, J. GONTCHAROV, S. FRÖBEL, C. TORRES ZIEGENBEIN, W. ZINTH und P. GILCH. *The Photoaddition of a Psoralen to DNA Proceeds via the Triplet State*. Journal of the American Chemical Society 141(34):13643–13653, 2019.

L. LIU, B. M. PILLES, J. GONTCHAROV, D. B. BUCHER und W. ZINTH. *Quantum Yield of Cyclobutane Pyrimidine Dimer Formation Via the Triplet Channel Determined by Photosensitization*. The Journal of Physical Chemistry B 120(2):292–298, 2016.

L. LIU, B. M. PILLES, A. M. REINER, J. GONTCHAROV und W. ZINTH. *2' - Methoxyacetophenone: An Efficient Photosensitizer for Cyclobutane Pyrimidine Dimer Formation*. ChemPhysChem 16(16):3483–3487, 2015.

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich unterstützt haben. Im Besonderen möchte ich folgenden Personen danken:

Prof. Dr. Wolfgang Zinth für die Möglichkeit, diese Promotion durchführen zu können, die hervorragende Betreuung der Arbeit, die Hilfsbereitschaft, die zahlreichen Diskussionen und Ratschläge sowie die umfassende Unterstützung.

Prof. Dr. Peter Gilch für die Übernahme des Zweitgutachtens, die Möglichkeit am Psoralen-Projekt mitzuarbeiten und die hilfreichen Diskussionen.

Dr. Wolfgang Schreier für die Rechnungen zu den Dimeren und die Datenbesprechungen.

Janina Diekmann für die sehr angenehme Zusammenarbeit am Psoralen-Projekt, die Rechnungen und die Präparation der Proben.

Bert Pilles für die große Unterstützung im Labor und die stete Hilfsbereitschaft.

Lizhe Liu für die Einarbeitung in die photosensibilisierten Messungen.

Dominik Bucher für die Hilfe bei chemischen Fragestellungen.

Den z20-Laborkollegen: Stefan Hofmann, Lizhe Liu, Bert Pilles und Michael Rampp für die tatkräftige Unterstützung und die tolle Atmosphäre.

Den fleißigen Korrekturlesern: Wolfgang Schreier, Bert Pilles, Janina Diekmann, Stefan Hofmann und Florian Trommer für die konstruktive Kritik und die investierte Zeit.

Dr. Karl-Heinz Mantel und Florian Trommer für eine funktionierende Computer-Infrastruktur und schnelle Hilfe, wenn doch mal etwas schiefgegangen ist.

Der Werkstatt: Rudolf Schwarz, Alfons Stork, Christian Hausmann und Harald Hoppe für die sehr kompetente und schnelle Anfertigung verschiedenster Bauteile.

Dem Sekretariat: Alexandra Michaelis und Marianne Widmann für die unkomplizierte und freundliche Hilfe bei Verwaltungsangelegenheiten.

Den Mitarbeitern am BMO für das kollegiale Arbeitsklima und die gemeinsamen Aktivitäten.

Meiner Familie für die liebe Unterstützung und den Rückhalt.

