

ZEITAUFGELOSTE UNTERSUCHUNGEN VON
LICHTINDUZIERTEN PROZESSEN AN DNS-BASEN,
XANTHON UND PHOTOVERNETZBAREN
POLYIMIDFILMEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

LAURA BUSCHHAUS
aus Berlin

Düsseldorf, 2013

aus dem Institut für Physikalische Chemie I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karl Kleiner
Korreferent: Prof. Dr. Michael Schmitt
Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
2. Theoretischer Hintergrund	10
2.1. Photophysik	10
2.2. Photochemie	15
2.2.1. Cycloadditionen	17
2.2.2. Die Norrish Reaktion	20
2.2.3. Wasserstofftransfer aus dem angeregten Zustand	22
2.2.4. Photochemie von DNS-Basen	27
3. Methoden	35
3.1. Zeitaufgelöste UV/Vis-Spektroskopie	35
3.1.1. Experimenteller Aufbau für die zeitaufgelöste UV/Vis-Spektroskopie	37
3.2. Stationäre FTIR-Spektroskopie	38
3.2.1. Theoretische Grundlagen	38
3.2.2. Experimenteller Aufbau für die Aufnahme stationärer FTIR-Differenz-	40
spektren	
3.3. Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie	41
3.3.1. Messprinzip	41
3.4. Quantenchemische Rechnungen	42
4. Etablierung einer AC-gekoppelten STEP-SCAN-FTIR-Messmethode	45
4.1. Theorie und experimenteller Aufbau für eine AC-gekoppelte STEP-SCAN-	45
Messung	
4.2. Kurze Einleitung in die Photochemie von <i>Bacteriorhodopsin</i>	49
4.3. Ergebnisse: AC-gekoppelte STEP-SCAN-Messung an <i>Bacteriorhodopsin</i> . .	51
4.4. Triplett-Schwingungsspektrum von Xanthon	54
4.4.1. Ergebnisse	54
4.4.2. Diskussion	57
5. Photochemie von DNS-Basen	58
5.1. DNA photoreacts by nucleobase ring cleavage to labile isocyanates	59
5.1.1. Abstract	59
5.1.2. Introduction	59
5.1.3. Materials and methods	60
5.1.4. Results and Discussion	61
5.1.5. Conclusions and outlook	69
5.1.6. Acknowledgment	69
5.1.7. Supplementary Information	70
5.1.8. Beiträge zur Veröffentlichung	79

5.2. UV light induced hydrogen transfer in guanosine-guanosine aggregates . . .	80
5.2.1. Abstract	80
5.2.2. Introduction	80
5.2.3. Results and Discussion	81
5.2.4. Conclusion	88
5.2.5. Materials and Methods	89
5.2.6. Acknowledgements	90
5.2.7. Supplementary Information	90
5.2.8. Beiträge zur Veröffentlichung	99
6. Untersuchungen von photovernetzbaaren Copolyimid-Filmen mittels IR Differenzspektroskopie	100
6.1. Characterization of Maleimide Dimers in Photo-Cross-Linked Copolyimide Films	101
6.1.1. Abstract	101
6.1.2. Introduction	101
6.1.3. Materials and Methods	103
6.1.4. Results	104
6.1.5. Discussion	112
6.1.6. Conclusions and Outlook	117
6.1.7. Acknowledgment	117
6.1.8. Supplementary Information	118
6.1.9. Beiträge zur Veröffentlichung	119
7. Zusammenfassung	120
8. Summary	123
A. Abkürzungsverzeichnis	148
B. Danke	151

1. Einleitung

Lichtinduzierte Prozesse und Reaktionen sind in vielen Forschungsgebieten wie den Materialwissenschaften, der Medizin, der Biologie oder der Biochemie von großem Interesse. Ultraviolettes Licht (UV) ist dafür bekannt, Reaktionen in der menschlichen Haut auszulösen.¹⁻³ So ist der UV-Anteil der Sonnenstrahlung für die Synthese von Vitamin D^{3;4} oder dem Abbau von Bilirubin² notwendig. Auch die Symptome von Neurodermitis-Patienten können durch UV-Licht gelindert werden.² Allerdings kann die UV-Strahlung die Haut auch schädigen, wobei die Art der Schädigung von der Wellenlänge abhängt. Die UV-A-Strahlung (320-400 nm) löst unter anderem eine direkte Pigmentierung der Haut aus, die erst zwei Stunden nach der Bestrahlung verschwindet. Sie ist eine Folge der Photooxidation des Melanins.^{3;5-7} Diese Bräune bietet im Vergleich zur indirekten Pigmentierung (72 Stunden nach Bestrahlung, hervorgerufen durch UV-B-Strahlung) keinen UV-Schutz. Die indirekte Pigmentierung fördert die Bildung von neuem Melanin, was einen erhöhten UV-Schutz hervorruft.^{3;8} Die Schäden durch UV-B-Strahlung (290-320 nm) sind meistens schwerwiegender als durch UV-A-Strahlung, da in diesem Frequenzbereich die DNS-Basen selbst absorbieren. So ist die UV-B-Strahlung die Hauptursache für den Sonnenbrand.¹⁻³ Desweiteren ist sie für die Bildung von Erythemen, Immunsuppressionen, Hautalterung und Hautkrebs, sowie für genetische Schäden verantwortlich.^{1-3;9-11}

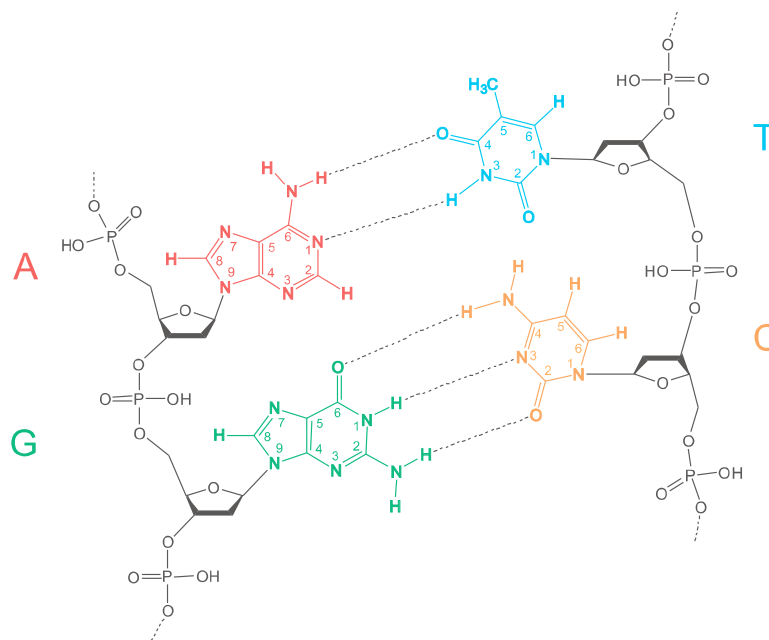


ABBILDUNG 1.1.: Schematische Darstellung der Watson-Crick Basenpaare A/T und G/C in der DNS mit ihren Wasserstoffbrücken in der DNS-Doppelhelixstruktur.¹²

In der DNS (Desoxyribonukleinsäure, engl. DNA Deoxyribonucleic acid) des Genapparates kommen vier verschiedene Nukleobasen vor (Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C)

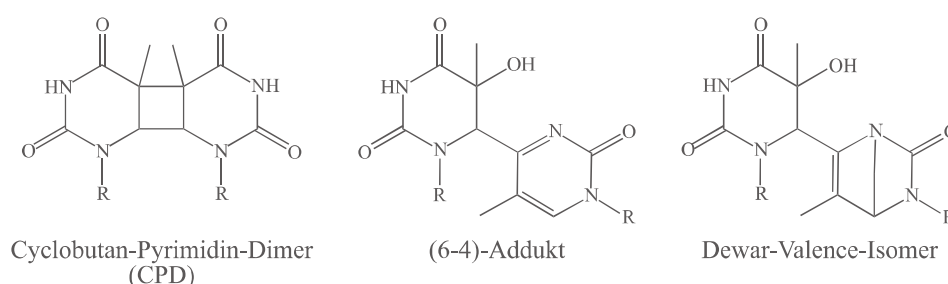


ABBILDUNG 1.2.: Bekannte Photoprodukte in der DNS am Beispiel des Thymins.

und Thymin (T)), die über Phosphatgruppen am Zucker (Desoxyribose) zu langen Ketten polymerisiert sind. Zwei Stränge lagern sich dabei anti-parallel in einer Doppelhelixstruktur zusammen, die über zwei bzw. drei Wasserstoffbrücken der Watson-Crick-Basenpaare (WC) (Abbildung 1.1) (Adenin/Thymin und Guanin/Cytosin) zusammengehalten werden.¹³ Außer den Watson-Crick-Basenpaaren gibt es noch andere, seltenere Motive, wie das G-Quadruplex-Motiv in den Telomeren^{14;15}, das Hoogsteen- und reverse-Hoogsteen-Basenpaar¹⁶ oder die Wobbel-Basenpaare¹⁷, die hauptsächlich in den tRNS (Transfer-Ribonukleinsäuren) vorkommen.

Die Reihenfolge der Nukleotide ist die Codierung unserer Erbinformation und regelt z.B. die Erzeugung von Proteinen. Fehler in der Nukleotidsequenz und/oder -struktur haben somit schwerwiegende Folgen, wie z.B. Mutationen, da die Replikation und Transkription der DNS verhindert wird bzw. zu fehlerhaften Proteinprodukten führt.¹⁸ Deshalb ist es wichtig die unterschiedlichen Photoprodukte der DNS-Basen zu kennen und ihr Schadenspotential zu bestimmen. Der wohl bekannteste Photoschaden der DNS ist die Dimerisierung zweier Pyrimidinbasen (T und/oder C) über eine [2+2]-Cycloaddition zu einem Cyclobutanpyrimidindimer (CPD)^{19–21} oder dem (6-4)-Addukt,²² welches über ein Oxetanintermediat gebildet wird. Aus dem (6-4)-Addukt kann sich durch Absorption eines weiteren Photons im UV-A-Bereich das Dewar-Valenz-Isomer bilden (Abbildung 1.2).^{23;24} Der CPD-Schaden ist für ~80 % der durch UV-B-Licht induzierten Mutationen verantwortlich, da er langsamer repariert wird, als der (6-4)-Schaden.^{25–28} Allerdings blockiert der (6-4)-Schaden die Transkription und Replikation deutlich effektiver und ist deshalb vermutlich für das durch UV-B-Licht induzierte Zellsterben verantwortlich.^{25;29} Ein weiterer Schaden, der das maligne Melanom hervorrufen kann, ist der Austausch der Basen T und C oder A und G.³⁰ Photoschäden in der DNS erfolgen auch indirekt. Durch die Photoanregung von kleinen Molekülen in der Zelle (meistens UV-A-Strahlung), wie z.B. Riboflavin, die wiederum mit dem in der Zelle befindlichen Sauerstoff reagieren, entstehen Oxidationsprodukte, wie das 8-Oxoguanin.^{1;22;25;31} Eine Strukturänderung in der DNS wird auch durch einen Protonentransfer in den WC-Basenpaaren entlang der Wasserstoffbrücken vermutet, wodurch sich die Erbinformation ändert und Fehler in der Duplikation auftreten.³²

Alle diese möglichen Schädigungen durch UV-Licht haben geringe Quantenausbeuten. Der am häufigsten vorkommende Schaden, das CPD zwischen zwei Thymin-Basen hat eine Quantenausbeute Φ von 0,033 in Poly(dT) (dT: Desoxythymidin) und 0,028 in (dT)₂₀.^{33–35} Die anderen Schäden treten mit einer Häufigkeit auf, die zwei bis drei Größenordnungen geringer ist.³⁶ Dies zeigt, dass die DNS eine hohe UV-Stabilität besitzt, was auf den hocheffizienten nichtstrahlenden Zerfall der angeregten DNS-Basen in den Grundzustand mittels konischer Durchschneidungen zurückzuführen ist.³⁷

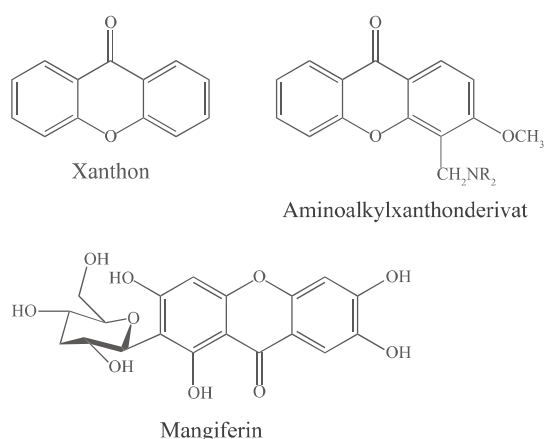


ABBILDUNG 1.3: Struktur von Xanthon und den Derivaten Mangiferin und ein Aminoalkylxanthon.

Die Photodimerisierung und Photooxidation der DNS sowie die Klärung der möglichen Reaktionswege sind von großem Interesse und werden intensiv untersucht.^{36;38–42} Aufgrund der Komplexität der DNS, der geringen Quantenausbeute der Photoschäden und des für die Reaktionswege enorm wichtigen Umgebungseinflusses, wie Wechselwirkung mit dem Lösemittel oder Aggregatbildung^{37;43}, werden immer neue mögliche Photoschäden in der DNS gefunden. In dieser Arbeit wurde mittels der FTIR-Spektroskopie gezeigt, dass die Basen Guanin, Cytosin und Thymin (im Monomer, wie auch in kurzen Strängen) nach UV-Bestrahlung zusätzlich zu den schon bekannten Reaktionswegen eine Ringöffnungsreaktion eingehen, die zu hochreaktiven Isocyanaten führt (siehe Kapitel 5.1). Diese reaktiven Isocyanate könnten in der Zelle mit den Aminogruppen von Aminosäuren wie Arginin oder Lysin reagieren und so zu kovalenten DNS-Protein-Bindungen führen.^{44–47} Das Wissen über den Wasserstofftransfer in der DNS ist noch begrenzt. Vermutungen über die Existenz dieses Transfers und seine mutagenen Wirkungen gibt es viele, aber der direkte experimentelle Nachweis ist bisher noch nicht gelungen.^{32;38;39} Quantenchemische Rechnungen zeigen, dass die ultraschnelle Rückkehr in den Grundzustand nach Photoanregung durch einen Elektronentransfer vom G zum C mit anschließendem Protonentransfer erheblich begünstigt wird.^{48–50} Die UV/Vis-Spektroskopie ist eine geeignete Methode um den Wasserstofftransfer von DNS-Basen in Lösung zu untersuchen, da sich die Spektren der neutralen Basen von denen ihrer Ionen und Radikale unterscheiden.^{12;51} In dieser Arbeit wurde das Guanosin als Modellsystem gewählt, da es aufgrund der Komplexität der DNS schwierig ist den Wasserstofftransfer direkt im Doppelstrang nachzuweisen und die Aggregate des Guanosins eine biologisch relevante Rolle in den Telomeren spielen.^{14;15;52–54}

Durch Lichtabsorption werden nicht nur photochemische Reaktionen gestartet, sondern auch photophysikalische Prozesse ausgelöst. Ein Beispiel dafür ist das Xanthon. Xanthon ist eine planare, heterocyclische, aromatische Verbindung, die zur Klasse der Ether und Ketone gehört (Abbildung 1.3). Es selbst kommt in der Natur nicht vor. Seine Derivate haben jedoch vielfältige biologische Wirkungen und Vorkommen.⁵⁵ Xanthon selbst wirkt tödlich auf Mottenlarven, weshalb es als Insektizid verwendet wird.⁵⁶ In den Blickpunkt der Pharmazie gelangten die Xanthonderivate 1968 durch die Entdeckung der harntreibenden und herzstärkenden Wirkung von natürlichem Mangiferin (Abbildung 1.3).⁵⁷ Kurze Zeit später wurde bei synthetisch hergestellten Aminoalkylxanthonderivaten (Abbildung 1.3) eine Wirkung als Aufputzmittel gefunden.^{58;59} Seitdem gibt es viele verschiedene biologische und pharmazeutische Anwendungen diverser Xanthonderivate.⁵⁵

Eine der wichtigsten Eigenschaften des Xanthons ist die hohe Triplett-Quantenausbeute nach UV-Anregung. Diese liegt nahezu bei eins,^{60;61} weshalb es in der Chemie oft Anwendung als Triplett-Sensibilisator findet.^{62;63} Xanthon besitzt zwei nahe beieinander liegende Triplett-Zustände, den T_1 -Zustand mit $\pi\pi^*$ -Charakter und den T_2 -Zustand mit $n\pi^*$ -Charakter.⁶⁴ Die hohe Triplett-Quantenausbeute ist mit der El-Sayed-Regel⁶⁵ (siehe Kapitel 2) zu erklären. Das ISC (Intersystem Crossing) von Xanthon ist ein ultraschneller Prozess, der in Wasser vom $^1\pi\pi^*$ -Zustand zum $^3n\pi^*$ -Zustand 1,5 ps benötigt. Anschließend geht das Xanthon mit 12 ps über Schwingungsrelaxation in den $^3\pi\pi^*$ -Zustand über.⁶⁰ In Wasser beträgt die Halbwertszeit $t_{1/2}$ des Triplett-Zustands 30 μ s.⁶⁶ Je nach verwendetem Lösemittel können die Lebensdauern des Triplets sowie auch ihre energetische Lage variieren.^{61;64}

Aufgrund der häufigen Anwendung des Xanthons als Triplett-Sensibilisator ist es zum Verständnis dieser Reaktionen wichtig, soviel wie möglich über die Lage und die Struktur des Triplett-Zustandes zu wissen. Zur Erlangung von Strukturinformationen eignet sich die IR-Spektroskopie. In dieser Arbeit wurden erste zeitaufgelöste Infrarot-Untersuchungen am Triplett-Zustand des Xanthons durchgeführt, wobei Informationen über die Strukturänderungen vom Grund- zum Triplett-Zustand sowie Lebensdauern erhalten wurden.

Mittels der Infrarot-Spektroskopie ist es auch möglich Strukturänderungen, zum Beispiel in Polymeren, die durch photochemische Reaktionen hervorgerufen werden zu untersuchen. Polymere sind mittlerweile nicht mehr aus unserem täglichen Leben wegzudenken und in fast allen industriellen Gebieten von großer Bedeutung. Ein wichtiges Anwendungsgebiet für funktionalisierte Polymere, wie PI (Polyimide), sind Membrantrennverfahren, bei denen das Polymer als Membranmaterial verwendet wird. Diese finden Anwendung in der Wasseraufbereitung, in der Umwelt- und Lebensmittelindustrie oder in der Öl-industrie.⁶⁷⁻⁷⁰ Aufgrund der EU-Richtlinie 98/70/EG⁷¹, die den Benzolanteil im Benzin auf 1 vol% beschränkt, sind effiziente und ökonomisch effektive Trennverfahren für Aliphaten/Aromaten-Gemische in den Blickpunkt der Industrie geraten.

Klassische Trennverfahren wie Destillation, Extraktion und Kristallisation sind energie- und kostenintensiv. Über 50 % der Energiekosten in der chemischen Industrie werden zur Trennung von gasförmigen oder flüssigen Gemischen verwendet.⁷² Diese können besonders bei schwierigen Trennprozessen, wie zum Beispiel bei azeotropen Gemischen, drastisch durch den Einsatz von Membrantrennverfahren reduziert werden.⁷³ In den letzten Jahren wurden Trennverfahren für chemische Gemische etabliert, die auf Osmose, Nanofiltration oder Pervaporation beruhen.⁷⁴⁻⁷⁷ Diese sind besonders für die Trennung von Gemischen aus Aliphaten und Aromaten geeignet.^{78;79}

Membranen mit definierten Porengrößen (z.B. ≈ 2 nm) bestehen oft aus Keramik, Zeolithen, Glas, Metall oder Kunststoffen.⁸⁰⁻⁸² Dabei erfolgt die Trennung des Gemisches aufgrund der unterschiedlichen Größe der einzelnen Komponenten. Die Trennung bei der Pervaporation erfolgt dagegen nach dem Sorptions-Diffusions-Modell.⁸³ Wichtige Größen sind dabei die Unterschiede in Löslichkeit und Diffusionskonstanten der zu trennenden Substanzen im Membranmaterial.⁸⁴⁻⁸⁶ Das zu trennende Gemisch („Feed“) wird dabei über die Membran geleitet. Die Komponente mit der höheren Sorptionsrate (bei Aromaten/Aliphaten-Gemischen meistens die aromatische Komponente) gelangt durch die Membran und reichert sich im „Permeat“ an. Dabei erfolgt ein Phasenübergang von flüssig nach gasförmig. Die dafür benötigte Energie wird durch Wärme zugeführt.⁸⁷ Die Komponente, die nicht so gut durch die Membran diffundiert, reichert sich im „Reten-

tat“ an.⁸⁸ Die Parameter für die Qualität einer Membran sind der Fluss (die Menge an Permeat) und die Selektivität (Anteil der gewünschten Komponente im Permeat). Beide Größen sollten für eine optimale Membran möglichst hoch sein.^{87–89}

Materialien, die sich als Pervaporationsmembranen eignen, müssen viele verschiedene Bedingungen erfüllen. So müssen sie stabil gegen die zu trennenden Chemikalien, im entsprechenden Feed-Gemisch unlöslich, UV-stabil, mechanisch beständig und vieles mehr sein.¹² Eine Stoffklasse, die diese Anforderungen erfüllt sind die Polyimide. Sie basieren auf der Imid-Gruppe $-R-CO-NR'-CO-R-$ und haben üblicherweise eine polyzyklische Struktur. Das erste Polyimid wurde 1908 nach dem Schema der heutzutage gut bekannten Nylonsynthese synthetisiert.^{90;91} Mittlerweile wird eine zweistufige Synthese verwendet, mit einem Dianhydrid oder einer Tetracarbonsäure als einem und einem Diamin als zweitem Monomer.^{89;92;93} Die in dieser Arbeit verwendeten Polyimide basieren auf den Monomeren 4,4'-Hexafluorisopropylidendiphthalsäureanhydrid (6FDA), 3,5-Diaminobenzoesäure (DABA) und 4-(4-(Aminophenoxy)benzenamin (ODA), wobei das DABA noch eine Carbonylgruppe zur weiteren Funktionalisierung enthält (6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1). Die Polyimide wurden von N. Schmeling synthetisiert.⁸⁹

Bei der Verwendung vom Polyimiden als Membranmaterial gibt es auch Beeinträchtigungen, da sie empfindlich auf Druck und aggressive Stoffe reagieren können. Dabei kann es zu Kohlenstoffdioxid bedingter Auflösung, Alterungserscheinungen und Quellungseffekten kommen, die die Trennleistung der Membran drastisch reduzieren.^{94;95} Durch Vernetzung des Membranmaterials können diese unerwünschten Effekte vermindert werden.^{96;97} Meistens wird dabei auch der Fluss verringert. Zudem kann die Selektivität durch die Vernetzung beeinflusst werden.¹² Die Vernetzung von Polymersträngen ist möglich, wenn noch eine funktionelle Gruppe, wie z. B. eine Carboxylgruppe, am Polymergerüst vorhanden ist. Diese kann ionisch oder kovalent durch Veresterung mit z. B. Diolen, Diaminen oder Aluminiumacetylacetonat vernetzt werden.^{88;96;98–101} Ein Nachteil ist der nötige Zusatz von Katalysatoren, die während der Pervaporation ausgewaschen werden können und somit das Permeat verunreinigen. Zudem wird das Verhalten der Membran durch Zusatzstoffe verändert.¹² Ein anderer Ansatz ist die photochemische Vernetzung. Dabei wird an die Carboxylgruppe ein Photovernetzer (z. B. ein Maleinimid-Derivat) synthetisiert.^{88;102;103} Für die Photovernetzung werden keine Katalysatoren benötigt und der Vernetzungsgrad kann über die Dauer der Bestrahlung sehr gut kontrolliert werden.¹²

Da der Vernetzungsgrad eine direkte Auswirkung auf den Fluss und die Selektivität einer Membran hat, ist es wichtig diese Größen genau messen zu können. Generell kann er durch Reologiemessungen^{104;105}, Quellungsexperimente¹⁰⁶, Gewichtsverhältnismessungen¹⁰⁷ oder spektroskopisch^{104;108;109} bestimmt werden. Die Spektroskopie hat den Vorteil, dass die Probe nichtinvasiv und in Echtzeit untersucht werden kann. Mithilfe der Fouriertransformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) konnte in dieser Arbeit präzise bestimmt werden, wie viele eingesetzte Photovernetzermoleküle (MI im Polyimid (6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1) reagiert haben. Zudem konnten die Photoprodukte identifiziert werden (siehe Kapitel 6.1).

2. Theoretischer Hintergrund

In diesem Kapitel wird eine kurze Einführung in die für diese Arbeit wichtigen Konzepte der Photophysik und der Photochemie organischer Moleküle mit besonderem Augenmerk auf die Prozesse und Moleküle, die in dieser Arbeit untersucht wurden, gegeben. Die hier vorgestellten Theorien und Beispiele beziehen sich ausschließlich auf die Flüssigphase. Weitere detailliertere Informationen können in Lehrbüchern von P. Klän und J. Wirz⁶³, P.W. Atkins¹¹⁰, P.W. Atkins und R.S. Friedmann¹¹¹, W. Demtröder¹¹², G.Wedler¹¹³ oder J.G. Calvert und J.N. Pitts Jr.¹¹⁴ nachgelesen werden.

2.1. Photophysik

Photophysikalische Prozesse sind strahlende und nichtstrahlende Übergänge in denen das Molekül von einem elektronischen oder vibronischen Zustand in einen anderen übergeht. Dabei erfolgen keine Änderungen der Verknüpfung der Atome im Molekül. Bindungslängen und Winkel unterscheiden sich aber in den verschiedenen Zuständen.⁶³ Abbildung 2.1 zeigt ein Jablonski-Diagramm. Dieses stellt die verschiedenen elektronischen und vibronischen Zustände, sowie die unterschiedlichen Prozesse nach Photoanregung, dar.

Durch Anregung mit Licht aus dem ultravioletten (UV) oder sichtbaren (Vis) Bereich des elektromagnetischen Spektrums wird ein Molekül aus dem Grundzustand S_0 in einen höher elektronisch angeregten Zustand S_n gebracht. Eine Anregung findet nur statt, wenn das Molekül bei der Anregungswellenlänge absorbiert. Die Absorptionsspektren sind charakteristisch für jedes Molekül. Typische Zeitkonstanten für die UV-Vis-Anregung liegen im Bereich von $\approx 10^{-15}$ s.⁶³

Die relative Intensität I für eine Anregung von einem Übergang i nach j ist proportional zum Quadrat des Übergangsdipolmoment μ (Gleichung (2.1)).

$$I \propto P^2 = (\langle \Psi_j | \mu | \Psi_i \rangle)^2 \quad (2.1)$$

Mit Ψ_i und Ψ_j als den entsprechenden Wellenfunktionen, P als der Übergangswahrscheinlichkeit und

$$\mu = -e \sum_a r_a + e \sum_b Z_b R_b = \mu_e + \mu_N \quad (2.2)$$

wobei e für die Elementarladung, N für Nukleonen, r_a für den Abstand des Elektrons zum Molekülschwerpunkt, R_b für den Abstand des Nukleons zum Molekülschwerpunkt und Z_b für die Kernladungszahl steht.^{111;112} Die Wahrscheinlichkeit P für den Übergang ist dann hoch, wenn sich die beiden Wellenfunktionen Ψ_i und Ψ_j genügend stark überlappen. Nach der Born-Oppenheimer-Näherung¹¹⁵ muss nur die Elektronenwellenfunktion berücksichtigt werden, da aufgrund des großen Masseunterschieds zwischen Elektronen und Kernen die Bewegung der Atomkerne vernachlässigt werden kann. Das Übergangsdipolmoment für den Übergang Grundzustand $|\epsilon\nu\rangle \rightarrow$ angeregter Zustand $|\epsilon'\nu'\rangle$ kann somit wie folgt beschrieben werden:

$$\langle \epsilon'\nu' | \mu | \epsilon\nu \rangle = \mu_{\epsilon'\epsilon} \int \psi_{\nu'}^*(R) \psi_{\nu}(R) d\tau_N = \mu_{\epsilon'\epsilon} S(\nu', \nu) \quad (2.3)$$

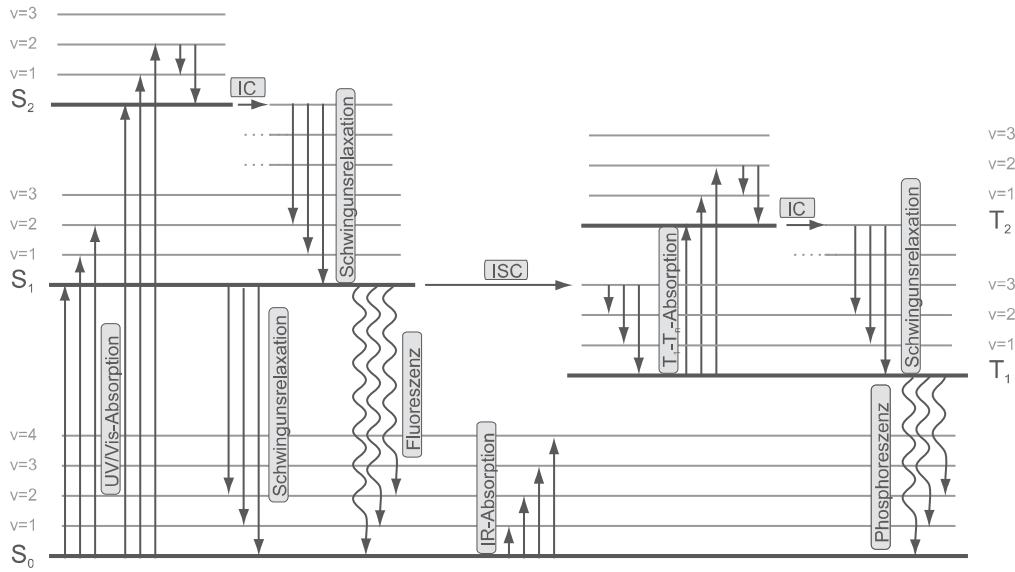


ABBILDUNG 2.1.: Jablonski-Diagramm: Schematische Darstellung der verschiedenen elektronischen Zustände mit ihren Schwingungszuständen und den dazugehörigen wichtigen Übergängen.¹²

Mit ϵ als elektronische Quantenzahl und ν als Schwingungsquantenzahl. Dabei gibt $S(\nu', \nu)$ das Überlappintegral der beiden Schwingungswellenfunktionen und $\mu_{e'\epsilon}$ das reine elektronische Übergangsdipolmoment an.¹¹¹ Das Betragsquadrat $|S(\nu', \nu)|^2$ wird auch Franck-Condon-Faktor genannt und ist ein Maß für die Intensität eines Übergangs.^{111;116;117} Nach UV-Vis-Anregung können verschiedene Prozesse eintreten. Zum einen kann das Molekül von einem angeregten Schwingungszustand in den Schwingungsgrundzustand desselben elektronischen Zustandes relaxieren (Abbildung 2.1). Diesen Prozess nennt man Schwingungsrelaxation und hat typischerweise Zeitkonstanten im Bereich von 10^{-13} bis 10^{-12} s. Schwingungsrelaxation findet sowohl in Singulett- als auch in Triplett-Zuständen statt. Dabei wird die überschüssige Energie durch Stöße an das Lösemittel abgegeben. Zum anderen kann das Molekül über Interne Konversion (IC (Internal Conversion)) isoenergetisch und strahlungsfrei in einen anderen (niedrigeren) elektronischen Zustand übergehen (Abbildung 2.1, $S_2 \rightarrow S_1$ Übergang oder $T_2 \rightarrow T_1$ Übergang). Typische Zeitkonstanten für IC liegen zwischen 10^{-12} und 10^{-6} s.⁶³

Aus dem $S_{1(v=0)}$ -Zustand kann ein strahlender Übergang in den S_0 -Zustand erfolgen. Dieser heißt Fluoreszenz. Aufgrund der Wechselwirkung mit umgebenden Molekülen (IC) findet Fluoreszenz in der kondensierten Phase immer aus dem niedrigsten Schwingungszustand des elektronisch angeregten Zustandes statt (Kasha Regel¹¹⁸). Die Intensitäten der Fluoreszenz werden durch das Franck-Condon-Prinzip bestimmt, da der Kernabstand während der Emission konstant bleibt. Somit gelangt das Molekül aus dem $S_{1(v=0)}$ -Zustand in unterschiedliche Schwingungszustände des Grundzustandes, was sagt, dass die Struktur des Fluoreszenzemissionsspektrums von der energetischen Lage der Schwingungsniveaus im S_0 -Zustand und dem jeweiligen Überlapp zum Schwingungsgrundzustand des S_1 -Zustands bestimmt wird. Aufgrund der strahlungslosen Energieverluste im elektronisch angeregten Zustand ist das Fluoreszenzemissionsspektrum verglichen mit dem Absorptionsspektrum zu kleineren Wellenzahlen verschoben (Stokes Verschiebung¹¹⁹).¹¹³ Die Fluoreszenzlebensdauern liegen typischerweise zwischen 10^{-9} und 10^{-7} s.⁶³

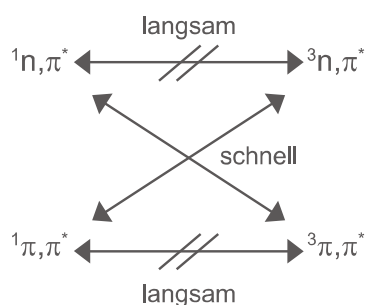


ABBILDUNG 2.2: Schematische Darstellung der El-Sayed-Regeln für ISC.^{63;65}

Desweiteren ist es möglich, dass aus dem $S_{1(v=0)}$ -Zustand ein isoenergetischer, strahlungsloser Übergang in einen Zustand anderer Spin-Multiplizität erfolgt (Intersystem Crossing (ISC))(Abbildung 2.1, $S_1 \rightarrow T_1$ Übergang), wobei ein Elektron seinen Spin umkehrt. Die Zeitkonstanten für ISC Prozesse liegen typischerweise zwischen 10^{-12} und 10^{-6} s.⁶³ Das ISC ist ein verbotener Übergang, da sich die Multiplizität des Zustandes ändert, und wird nur durch die Spin-Bahn-Kopplung zugänglich. Diese wird umso größer, je schwerer die Atome werden, weshalb dann die Wahrscheinlichkeit für einen ISC Übergang steigt.^{110;111} Eine erhöhte ISC-Rate wird außerdem beobachtet, wenn sich die Art der beteiligten Orbitale ändert. Zum Beispiel ist ISC zwischen einem π, π^* -Singulettzustand und einem n, π^* -Tripletzustand meist relativ schnell⁶³, während ein Singulett-Triplett-Übergang zwischen zwei Zuständen mit π -Symmetrie ($^1\pi, \pi^* \rightarrow ^3\pi, \pi^*$) langsamer verläuft (Abbildung 2.2). Bei ISC von $^1n, \pi^*$ nach $^3\pi, \pi^*$ und von $^1\pi, \pi^*$ nach $^3n, \pi^*$ ist der Spinwechsel des Elektrons erlaubt, da sich hierbei der Bahndrehimpuls der beteiligten Orbitale von σ nach π oder umgekehrt ändert. Entsprechend ist der Gesamtspin während des Übergangs konstant. Ändert sich der Bahndrehimpuls der beteiligten Orbitale nicht (von $^1\pi, \pi^*$ nach $^3\pi, \pi^*$ und von $^1n, \pi^*$ nach $^3n, \pi^*$) ist der Spinwechsel verboten, da sich dann die Gesamtmultiplizität ändert.¹²⁰ Diese qualitativen Beobachtungen sind als El-Sayed-Regel bekannt.⁶⁵

Die nach dem ISC schnell erfolgende Schwingungsrelaxation in den $T_{1(v=0)}$ -Zustand führt dazu, dass das Molekül nicht zurück in den S_1 -Zustand gelangen kann, da es Energie an die Umgebung abgegeben hat und energetisch deutlich unterhalb des S_1 -Zustandes liegt. Der Übergang $T_1 \rightarrow S_0$ ist ebenso wie das ISC verboten und nur durch die Spin-Bahn-Kopplung schwach erlaubt. Dieser $T_{1(v=0)} \rightarrow S_0$ Übergang kann strahlend erfolgen (Phosphoreszenz) und hat typische Lebensdauern zwischen 10^{-6} und 10^{-3} s.^{63;111} Der Triplett-Zustand kann zudem durch Stöße mit dem Lösemittel oder anderen Molekülen im Grundzustand depopuliert werden (Quenching).

Dabei ist Sauerstoff ein beliebtes Molekül um angeregte Triplett-Zustände ($^3S^*$) zu löschen, da er im Grundzustand als Triplett vorliegt. Es entsteht der kurzlebige und reaktive Singulett-Sauerstoff (Gleichung (2.4)).¹²¹



Moleküle, die eine hohe ISC Rate haben und gut in den Triplett-Zustand übergehen, werden oft als Triplett-Sensibilisatoren eingesetzt, um andere Moleküle in den Triplett-Zustand zu bringen. Dieser Triplett-Triplett-Energietransfer ist ein spinerlaubter Prozess, indem zeitgleich ein doppelter Elektronentransfer zwischen dem Triplett-angeregten Donormolekül ($^3D^*$) und dem im Grundzustand vorliegenden Akzeptormolekül (A) stattfindet (Gleichung (2.5)).



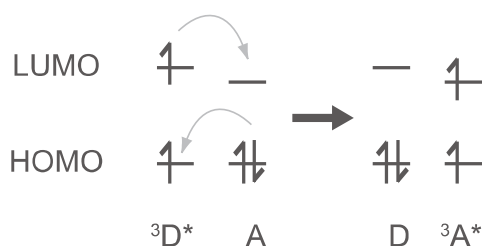


ABBILDUNG 2.3: Elektronentransfer nach dem Dexter-Mechanismus für einen Triplett-Triplett-Energietransfer vom $^3D^*$ zu A. Die horizontalen Striche stellen die molekularen Orbitalenergien dar.⁶³

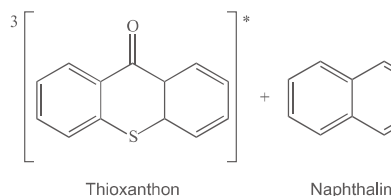


ABBILDUNG 2.4: Energietransfer des Triplett-angeregten Thioxanthons zum Naphthalin.

Der hierbei zugrunde liegende Mechanismus wird auch Dexter-Mechanismus genannt (Abbildung 2.3).¹²²

Der Triplett-Triplett-Energietransfer stellt eine wichtige Methode in der präoperativen Photochemie dar, da so Moleküle in den Triplett-Zustand gebracht werden können, die sonst kein ISC eingehen oder unerwünschte Reaktionen aus dem S_1 -Zustand starten. Ein Beispiel ist der Energietransfer vom Triplett-angeregten Thioxanthon zum Naphthalin (Abbildung 2.4).⁶³ Thioxanthon, genauso wie Xanthon und Benzophenon werden gerne als Donormoleküle eingesetzt^{123–125}, da sie eine hohe Triplett-Quantenausbeute besitzen ($\Phi=1$ für Xanthon in Tetrachlokokohlenstoff,⁶¹ $\Phi=0,85$ für Thioxanthon in Benzol,^{62;126} $\Phi=1$ für Benzophenon und Derivate¹²⁷) und bei längeren Wellenlängen absorbieren als die meisten Akzeptormoleküle. So kann die Reaktion durch die Bestrahlung mit Licht der Absorptionswellenlänge des Donors gestartet werden, was unerwünschte Nebenreaktionen vermeidet.

Ein weiterer Mechanismus für eine Energieübertragung von einem Donor- (D) zu einem Akzeptormolekül (A) ist nach T. Förster benannt und heißt Förster-Resonanzenergietransfer (FRET).^{128;129} Dabei handelt es sich um einen Singulett-Singulett-Energietransfer (Abbildung 2.5). Die Energie wird hierbei strahlungsfrei durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen übertragen. Die Ratenkonstante k_{FRET} für den Förster-Resonanzenergietransfer fällt mit der sechsten Potenz des Abstandes R (Abstand zwischen D^* und A) ab (Gleichung (2.6)).⁶³

$$k_{FRET} = \frac{R_0^6}{R^6 \tau_D^0} \quad (2.6)$$

Mit R_0 als dem Förster-Radius (Abstand zwischen D und A, bei dem die Energieübertragung zu 50 % erfolgt) und τ_D^0 als der Lebensdauer von D^* in Abwesenheit eines Akzeptormoleküls.

Über sukzessive Zwei-Photonen-Absorption ist es möglich das Spektrum eines angeregten Zustandes zu messen. Wenn, zum Beispiel, ISC nach der UV-Anregung stattfindet,

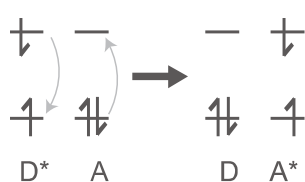


ABBILDUNG 2.5: Schematische Darstellung des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET).

kann ein zweites Photon (UV-Vis-Bereich) absorbiert werden, wobei ein höherer Triplett-Zustand T_n populiert wird. Die Methode, um $T_1 \rightarrow T_n$ Spektren aufzunehmen, ist in Kapitel 3 beschrieben. Wird anstatt eines zweiten Photons im UV-Vis-Bereich ein Photon mit einer Wellenlänge im IR-Bereich verwendet, werden die Schwingungen im Triplett-Zustand angeregt und man erhält ein Schwingungsspektrum des angeregten Triplett-Zustandes T_1 (siehe nachfolgend und Kapitel 3).

Wird Licht mit einer Wellenlänge im infraroten Bereich (IR) des elektromagnetischen Spektrums als Anregungsstrahlung für ein Molekül im Grundzustand verwendet, werden die höheren Schwingungszustände des Grundzustandes populiert (Abbildung 2.1). Dabei wird die Energie in eine Bewegung der Atome umgewandelt, wobei diese mit einer bestimmten Frequenz ν um ihre Gleichgewichtsgeometrie r_0 oszillieren.

In erster Näherung kann dies bei einem zweiatomigen Molekül mit dem Modell des eindimensionalen harmonischen Oszillators (Gleichung (2.7)) beschrieben werden,

$$V(r) = \frac{1}{2}kr^2 \quad (2.7)$$

mit k als Kraftkonstante der Bindung und r als Abstand der Atome voneinander. Diese Beschreibung entspricht dem Bild aus der klassischen Mechanik für die Auslenkung einer Feder (Hooksches Gesetz). Die Bindung zwischen zwei Atomen wird dabei als Feder mit der entsprechenden Kraftkonstanten angesehen. Gleichung (2.7) beschreibt das Potential des harmonischen Oszillators als eine Parabel, so dass von einem parabolischen Potential gesprochen. Hierbei liegen unendlich hohe Potentialwände vor. Die erlaubten Energieniveaus E_v sind äquidistant und werden mit der Schwingungsquantenzahl v nach Gleichung (2.8) berechnet.

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2}\right) h\nu \quad (2.8)$$

Das Modell des harmonischen Oszillators ergibt schlechte Werte, wenn Schwingungen mit hohen Quantenzahlen oder die Dissoziation eines Moleküls beschrieben werden sollen. In diesen Fällen liefert das Modell des anharmonischen Oszillators bessere Ergebnisse. Gleichung (2.9) beschreibt die potentielle Energie für den anharmonischen Oszillator über das Morsepotential, wobei D_e die Tiefe der Potentialmulde angibt, h die Planck-Konstante und c_0 die Lichtgeschwindigkeit.

$$V(r) = hc_0 D_e (1 - e^{ar})^2 \quad \text{mit} \quad a = \sqrt{\frac{k}{2hc_0 D_e}} \quad (2.9)$$

In der Nähe des Minimums verläuft das Morsepotential annähernd parabolisch. Bei höheren Energien öffnet es sich jedoch und erlaubt die Dissoziation. Die Energieniveaus E_v konvergieren nach Gleichung (2.10) gegen die Dissoziationsenergie D_0 mit x_e als Anharmonizitätskonstante.

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2}\right) h\nu - \left(v + \frac{1}{2}\right)^2 h\nu x_e \quad (2.10)$$

Jede Klasse an chemischen Bindungen (zum Beispiel Einfachbindungen, Doppelbindungen oder Dreifachbindungen) hat ihre eigene charakteristische Frequenz, je nach Bindungsstärke. So wird für die Anregung einer C-C-Streckschwingung Strahlung der Energie um 1000 cm^{-1} benötigt, für eine C=C-Streckschwingung schon 1640 cm^{-1} und für eine C $\equiv$ C-Streckschwingung 2200 cm^{-1} , da diese stärker sind und somit mehr Energie

zu Anregung benötigt wird.¹³⁰ Sind Heteroatome an einer Bindung beteiligt, verschieben sich die Schwingungsfrequenzen aufgrund der unterschiedlichen Massen. Zudem können wegen mesomerer und/oder induktiver Effekte von Heteroatome die Schwingungsfrequenzen verschoben sein. Atome, die einen elektronenschiebenden Effekt haben, stärken die Bindung und erhöhen die Schwingungsfrequenz. Atome mit elektronenziehendem Effekt dagegen schwächen die Bindung und verschieben somit die Schwingungsfrequenzen zu kleineren Wellenzahlen.¹³⁰ Desweiteren wird die Schwingungsfrequenz durch die Umgebung der Atome beeinflusst. So ist es möglich zwischen einer wasserstoffbrückengebundenen und einer freien OH-Streckschwingung zu unterscheiden. Die typische Frequenz für eine freie OH-Streckschwingung liegt zwischen 3650 cm^{-1} und 3590 cm^{-1} ,¹³⁰ während die wasserstoffbrückengebundene OH-Gruppe eine schwächere und breitere Absorptionsbande zu kleineren Frequenzen (zwischen 3600 cm^{-1} und 3200 cm^{-1}) zeigt. Je stärker also die Wasserstoffbrücke ist, desto schwächer wird die OH-Bindung und desto mehr wird die Schwingungsfrequenz zu kleineren Wellenlängen verschoben.¹³⁰ Auch aromatische Streckschwingungen ($1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$) können sehr gut von nichtaromatischen C=C Doppelbindungen ($>1600\text{ cm}^{-1}$) unterschieden werden. Die IR-Spektroskopie ist somit in der Lage Aussagen über die Struktur und die Umgebung von Molekülen zu geben.

2.2. Photochemie

Im Gegensatz zur Photophysik, bei der Prozesse nach Photoanregung untersucht werden, die keine strukturellen Änderungen in Molekül hervorrufen, werden unter Photochemie alle Reaktionen zusammengefasst, die durch Einwirkung von Licht gestartet werden und dabei die Molekülstruktur verändern. Das erste Gesetz der Photochemie (Grothus, 1817 und Draper, 1843) besagt, dass nur Licht, welches von einem System absorbiert wird, eine photochemische Reaktion auslösen kann. Desweiteren sagt das zweite Gesetz der Photochemie (Einstein 1905), dass jedes absorbierte Lichtquant einen photophysikalischen Primärprozess startet,⁶³ dem sich dann „normale“ Folgereaktionen anschließen können. Durch die Entwicklung von intensiven Lichtquellen (z.B. Laser) sind mittlerweile auch Multiphotonenprozesse möglich. Dabei absorbiert ein Molekül mehrere Photonen gleichzeitig. Nur die Energie der Photonen zusammen reicht aus, um das Molekül in einen angeregten Zustand zu bringen und damit die Photoreaktion zu starten.^{131;132}

Die Photochemie ist die Chemie der angeregten Zustände. Für sie gelten andere Auswahlregeln als für die Chemie des Grundzustandes, weshalb Reaktionen und Synthesewege durch die Anregung mit Licht zugänglich werden, die thermisch verboten sind. Zu solchen Reaktionen zählen die $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergänge von Alkenen, [2+2]-Cycloadditionen oder Norrishreaktionen. Auch *cis/trans*-Isomerisierungen sind photochemisch erlaubt, da sich der C=C-Doppelbindungscharakter im S_1 -Zustand abschwächt und somit die Drehung um die Bindung erleichtert wird.^{12;133} Ein Beispiel für neue Synthesewege ist die Herstellung des Malariawirkstoffes Artemisinin aus der Dihydroartemisininsäure über eine photochemisch gestartete Singulett-Sauerstoff-induzierte En-Reaktion (pericyclische Reaktion zwischen einem En (Alken) und einem Enophil) und die anschließende Addition von Triplett-Sauerstoff.¹³⁴ Vorher konnte Artemisinin nur aufwändig aus der Pflanze *Artemisia annua* (Einjähriger Beifuß) extrahiert werden.

Die Photochemie wird manchmal auch die „grüne Chemie“ genannt, da oft kein weiterer Reaktionspartner als das Licht gebraucht wird. Auch die normalerweise benötigte Aktivie-

rungsenergie (Wärme) muss nicht zugeführt werden. Photoreaktionen laufen nur solange ab, wie Licht auf die Reaktanten fällt und sind deshalb technisch gut kontrollierbar. Erste Versuche zur alternativen industriellen Herstellung von z.B. Feinchemikalien mittels Sonnenlicht sind erfolgreich angelaufen.^{135;136}

Eine wichtige Größe zur Quantifizierung von photochemischen Reaktionen ist die Quantenausbeute Φ . Φ ist eine einheitenlose Größe und gibt an, wie viele photochemische oder photophysikalische Ereignisse ($N_{photochem./photophys. \text{ Ereignis}}$) pro absorbiertem Photon ($N_{absorb. Photonen}$) ablaufen (Gleichung (2.11)).

$$\Phi = \frac{N_{photochem./photophys. \text{ Ereignis}}}{N_{absorb. Photonen}} \quad (2.11)$$

Werden nur die Primärprozesse nach Photoanregung betrachtet (wie Fluoreszenz, Phosphoreszenz, IC, ISC und Produktbildung) ist die Summe aller Primärquantenausbeuten gleich eins, da die Gesamtzahl aller durch strahlende oder strahlungslose Prozesse deaktivierten oder zum Produkt umgesetzten Moleküle gleich der Anzahl aller durch Photonenabsorption angeregten Moleküle sein muss. Bei photochemischen Reaktionen, die nach einem zusammengesetzten Mechanismus ablaufen, kann die Gesamtquantenausbeute auch größer als eins sein. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn pro absorbiertem Photon mehrere Produktmoleküle gebildet werden (zum Beispiel bei photochemischen Kettenreaktionen).¹³⁷

Damit Quantenausbeuten gut miteinander verglichen werden können und keine Missverständnisse aufkommen, muss das photochemische oder photophysikalische Ereignis genau definiert sein. Bei einer Reaktion $A \xrightarrow{h\nu} B$ kann das Ereignis als Abnahme des Edukts A definiert werden ($\Phi_{-A} = N_{-A}/N_{absorb. Photonen}$) oder als Zunahme vom Produkt B ($\Phi_B = N_B/N_{absorb. Photonen}$). Φ_{-A} und Φ_B müssen nicht identisch sein, wenn zum Beispiel noch ein weiteres Photoprodukt gebildet werden kann.^{63;110;114}

Die Eduktabnahme oder die Produktzunahme kann spektroskopisch bestimmt werden, wenn dem Edukt oder Produkt ein isolierte Bande eindeutig zuzuordnen ist. Hierbei eignet sich die UV-Vis- oder die IR-Spektroskopie. Auch eine Bestimmung der Produktkonzentration über NMR (Nuclear Magnetic Resonance) Spektroskopie oder GCMS (Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung) ist möglich. Wenn zudem die Anzahl der absorbierten Photonen pro Laserpuls E_{abs} bekannt ist, kann die Quantenausbeute für eine Produktbildung Φ_P nach Gleichung (2.12) mit c_P als Produktkonzentration, V als Probenvolumen, N_A als Avogadrokonstante, h als Plancksches Wirkungsquantum, c_0 als Lichtgeschwindigkeit, Z als Anzahl der Laserpulse und λ als Anregungswellenlänge berechnet werden.

$$\Phi_P = \frac{c_P V N_A h c_0}{E_{abs} Z \lambda} \quad (2.12)$$

Gebräuchlich und oft angegeben werden Quantenausbeuten für die Fluoreszenz, die Bildung von Triplett-Zuständen oder der Radikalbildung.

Bei Primärprozessen mit nur einem Chromophor ist die Quantenausbeute wellenlängenunabhängig, da die Kasha-Regel gilt. Sobald zwei oder mehr Chromophore an einer Reaktion beteiligt sind, wird die Quantenausbeute wellenlängenabhängig.⁶³

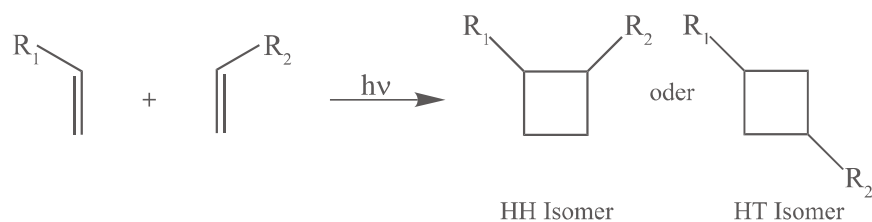
2.2.1. Cycloadditionen

Konzertierte Cycloadditionen können gemäß den Woodward-Hoffmann-Regeln¹³⁸ thermisch oder photochemisch ablaufen, aber niemals beides. Generell besagen die Regeln, dass Cycloadditionen mit $(4n+2)$ - π -Elektronen thermisch und Cycloadditionen mit $(4n)$ - π -Elektronen photochemisch ablaufen. Desweiteren betrachten die Woodward-Hoffmann-Regeln die Vorzeichen der beteiligten Orbitale. Überlappen die Orbitale während der Cycloaddition auf der gleichen Seite des π -Systems, bezeichnet man dies als suprafacial. Findet eine Überlappung auf unterschiedlichen Seiten des π -Systems statt, läuft die Reaktion antarafacial ab. Bei suprafacialen Additionen bleibt die Stereochemie erhalten, während diese bei antarafacialen Additionen sich umkehrt. Eine genauere Beschreibung der Woodward-Hoffmann-Regeln kann in einem Review von Goodall und Hayes¹³⁹ nachgelesen werden. Die Woodward-Hoffmann-Regeln geben keinen Hinweis auf die Reaktivität, eine *endo/exo*-Selektivität oder Regioselektivitäten, die bei Cycloadditionen oft beobachtet werden, weshalb die Mechanismen für jede Reaktion genau untersucht werden müssen. Abbildung 2.6 zeigt verschiedene $[2+2]$ -Cycloadditionen. Diese sind photochemisch erlaubt und finden immer zwischen einem angeregten Molekül und einem weiteren Molekül im Grundzustand statt (HOMO $\rightarrow$ LUMO Anregung)(HOMO: Highest Occupied Molecular Orbital; LUMO: Lowest Unoccupied Molecular Orbital).

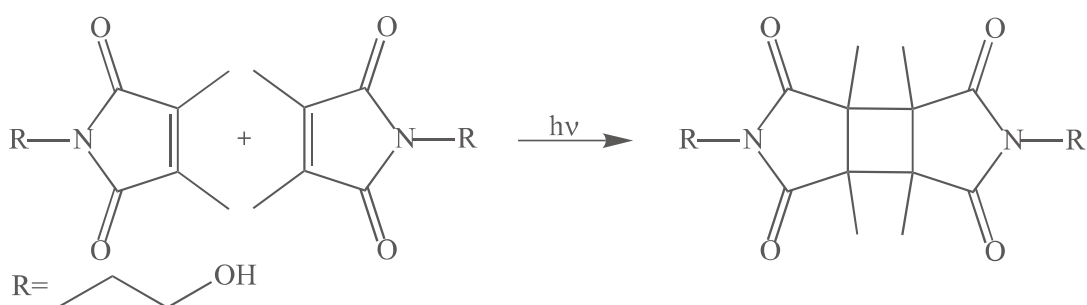
In Abbildung 2.6 A ist eine $[2+2]$ -Cycloaddition eines unsymmetrisch substituierten Alkens schematisch gezeigt. Dabei können sich zwei Diastereomere bilden. Liegen die beiden Substituenten im Produkt nebeneinander, ergibt sich das HH (head-to-head)-Isomer, liegen sich die Substituenten im Produkt gegenüber, wird dies als HT (head-to-tail)-Isomer bezeichnet. Welches der Diastereomere bevorzugt gebildet wird, liegt an den jeweiligen Substituenten und den Reaktionsbedingungen. Allgemein gilt die Regel, dass elektronenziehende Substituenten bevorzugt das HH-Isomer, elektronenschiebende Substituenten bevorzugt das HT-Isomer bilden.¹⁴⁰ Die faciale Diastereoselektivität kann durch Stereozentren in Nachbarschaft der Doppelbindung der Alkene sowie durch sterisch anspruchsvolle Substituenten beeinflusst werden. Ist dies nicht der Fall wird oft ein Gemisch der verschiedenen Isomere beobachtet.¹⁴⁰

$[2+2]$ Cycloadditionen müssen nicht konzertiert, sondern können auch nach ionischen oder radikalischen Mechanismen ablaufen. Bei der Dimerisierung von 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid (MI) (Abbildung 2.6 B) findet nach Anregung eines MI-Moleküls zunächst ISC in den Triplett-Zustand statt. Anschließend folgt ein Elektronentransfer zu einem MI-Molekül im Grundzustand. Das dann vorliegende Radikalanion-Radikalkation-Paar bildet schließlich das Cyclobutandimer aus.¹⁰²

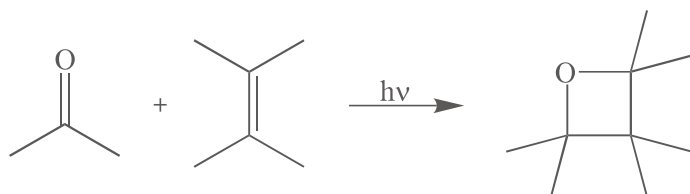
$[2+2]$ -Cycloadditionen finden auch zwischen einem Alken und einer angeregten Carbonylgruppe statt. Dabei bildet sich als Produkt ein Oxetan. Dieser Sonderfall wird Paternò-Büchi-Reaktion genannt (Abbildung 2.6 C).^{141;142} Mechanistisch hängt die Paternò-Büchi-Reaktion stark von den Edukten und ihren Substituenten ab.¹⁴³ Sie kann konzertiert aber auch schrittweise über Intermediate ablaufen. Die Mehrheit der Paternò-Büchi-Reaktionen läuft über den Triplett-Zustand der Carbonylgruppe. Anschließend addiert sich das Alken und es entsteht ein 1,4-Biradikal. Regioselektiv entsteht das Produkt, welches aus dem stabilsten Biradikal gebildet wird.^{140;141} Liegt der Triplett-Zustand des Alkens energetisch unter dem der Carbonylverbindung, wird ein Energietransfer bevorzugt und die Oxetanbildung verhindert. Bei Reaktion zwischen stark elektronenarmen Carbonylverbindungen und sehr elektronenreichen Alkenen findet ein kompletter Elektronentransfer zum Zwitterion statt.¹⁴⁰



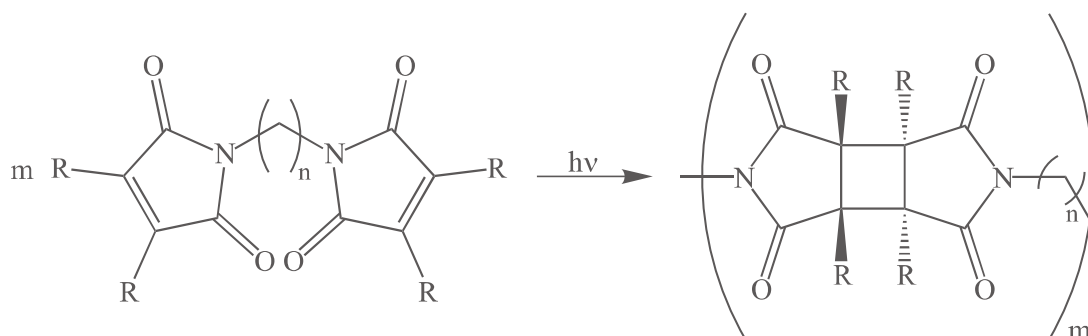
(A) Schematische [2+2]-Cycloaddition von asymmetrisch substituierten Alkenen. Welches der möglichen Diastereomere (head-to-head (HH) oder head-to-tail (HT)) entsteht, hängt von den Substituenten ab.



(B) [2+2]-Cycloaddition von 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid.



(C) Paternò-Büchi-Reaktion: [2+2]-Cycloaddition zwischen einer Carbonyl- und einer Alken-Gruppe zu einem Oxetan.



(D) Photopolymerisation von einem bifunktionalen N, N'-Alkylbismaleimid als Monomer.

ABBILDUNG 2.6.: Beispiele für verschiedene [2+2] Cycloadditionen.

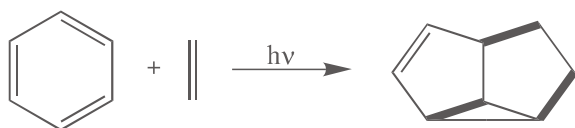


ABBILDUNG 2.7: Beispiel für eine [3+2]-Cycloaddition zwischen einem Aromaten (Benzol) und einem Alken (Ethen).

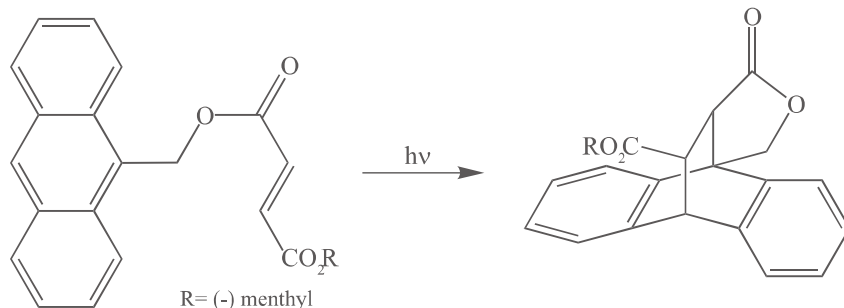


ABBILDUNG 2.8: Beispiel für eine Photo-Diels-Alder-Reaktion ([4+2]-Cycloaddition): Intramolekulare Zyklisierung von Antracen-9-ylmethyl(-)menthylfumerat.

Die [2+2]-Cycloaddition wird auch in der Polymersynthese verwendet, da sie es ermöglicht lineare, stark verzweigte oder vernetzte Polymere mit Heterozyklen im Polymergerüst zu erhalten. Dieser Reaktionsweg ist sehr effektiv und es entstehen kaum bis keine Nebenprodukte. Ein Beispiel für die Photopolymerisation ist die [2+2]-Cycloaddition von bifunktionalem N,N'-Alkylbismaleimid (Abbildung 2.6 D).¹³⁹

Außer den [2+2]-Cycloadditionen gibt es auch [3+2]- und [4+2]-Cycloadditionen. Der Mechanismus der intermolekularen [3+2]-Cycloaddition zwischen Aromaten und Alkenen ist gut untersucht, weshalb diese Reaktion oft und gerne in der Naturstoffsynthese eingesetzt wird. Zunächst erfolgt nach Anregung einer aromatischen Verbindung in den S_1 -Zustand ein Ladungstransfer zum Alken. Es bildet sich ein Exciplex. Durch Ausbildung der zwei neuen C-C-Bindungen entsteht ein Zwitterion, welches anschließend den Cyclopropanring bildet (Abbildung 2.7).¹⁴⁴

Die wohl bekannteste [4+2]-Cycloaddition ist die Diels-Alder-Reaktion^{145;146}, die im Normalfall thermisch abläuft. Es gibt nur sehr wenige Beispiele für die Photo-Diels-Alder-Reaktion. Eines ist die asymmetrische intramolekulare Zyklisierung von Antracen-9-ylmethyl(-)menthylfumerat (Abbildung 2.8).⁶³

2.2.2. Die Norrish Reaktion

Eine der wichtigsten photochemischen Reaktionen von Carbonylgruppen sind die Reaktionen nach Norrish Typ I und Norrish Typ II.¹⁴⁷ Bei der Norrish Typ I Reaktion findet eine homolytische Spaltung der α -Bindung statt, der sich oft eine Decarboxylierung anschließt (Abbildung 2.9). Der Bindungsbruch erfolgt dabei sehr häufig aus dem Triplett-Zustand des angeregten Ketons.¹⁴⁸

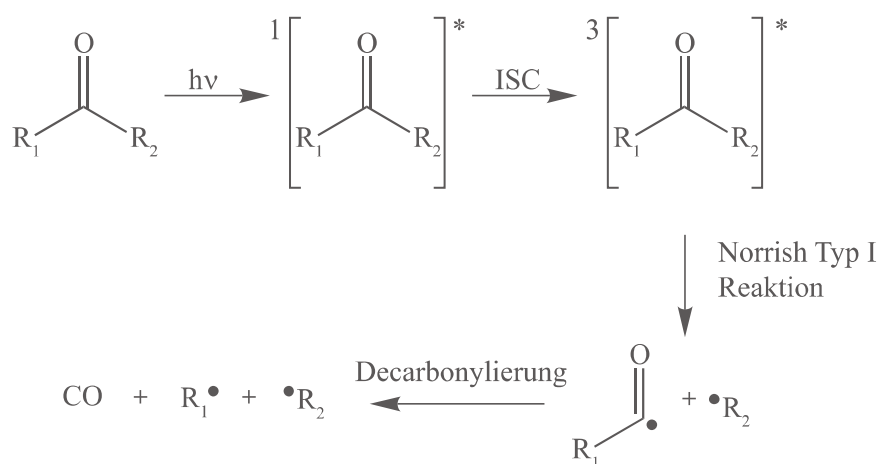


ABBILDUNG 2.9.: Schema der Norrish Typ I Reaktion mit anschließender Decarboxylierung.

Der Bindungsbruch von Ketonen aus einem angeregten $n\pi^*$ -Zustand erfolgt erheblich schneller als bei Ketonen, bei denen der niedrigste angeregte Zustand $\pi\pi^*$ -Charakter hat. Dies liegt daran, dass das σ -Orbital der sich öffnenden Bindung mit einem nur halb besetzten n-Orbital des Sauerstoffs überlappt.¹⁴⁹ So ist die Ratenkonstante $k_{\alpha\text{-Spaltung}}$ vom angeregten $n\pi^*$ -Triplett-Zustand des Benzylphenylketons um mehr als drei Größenordnungen höher als die vom $\pi\pi^*$ -Triplett-Zustand des angeregten Biphenyl-*tert*-butylketon (Tabelle 2.1).^{63;149}

TABELLE 2.1.: Ratenkonstanten für die α -Spaltung $k_{\alpha\text{-Spaltung}}$ verschiedener Ketone

Ketone	$k_{\alpha\text{-Spaltung}}$ 10^8 s^{-1}
Benzylphenylketon	0,02 ¹⁴⁹
Biphenyl- <i>tert</i> -butylketon	<0,001 ¹⁴⁹

Allgemein korreliert die Ratenkonstante für den Bindungsbruch in α -Position $k_{\alpha\text{-Spaltung}}$ gut mit der Stabilität des sich bildenden Acylradikals. Das gleiche gilt auch für die sich meist anschließende Decarboxylierung. Eine schnelle CO-Abgabe wird bei der Bildung von stabilen Benzyl- oder *tert*-Butylradikalen beobachtet, während die Bildung von instabilen Arylradikalen langsam stattfindet.¹⁵⁰

Die Norrish Typ II Reaktion findet nur bei Ketonen statt, die ein Wasserstoffatom in γ -Position besitzen. Nach Photoanregung erfolgt ein intramolekularer 1,5-Wasserstofftransfer

zum 1,4-Biradikal. Dieses kann auf verschiedene Wege weiterreagieren: (I) Eine Rückreaktion zum Ausgangsstoff, (II) eine Eliminierungsreaktion, was zur Bildung eines Enols und eines Alkens führt und (III) eine Ringschließung des 1,4-Biradikals zu einem zyklischen Alkohol (Yang-Zyklisierung) (Abbildung 2.10).¹⁵¹

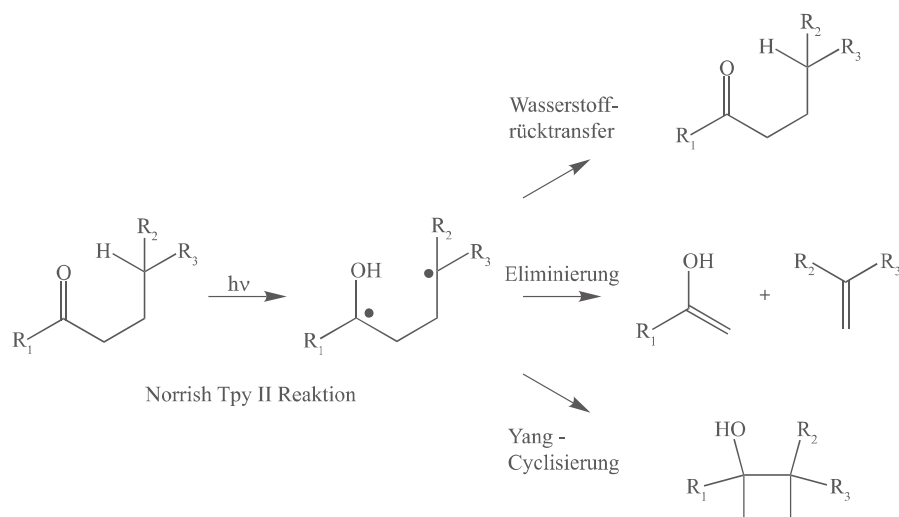


ABBILDUNG 2.10.: Schema der Norrish Typ II Reaktion: Bildung des 1,4-Biradikals nach UV-Anregung und die drei möglichen Wege zum Weiterreagieren (I) Rückreaktion, (II) Eliminierungsreaktion und (III) Yang-Zyklisierung.

2.2.3. Wasserstofftransfer aus dem angeregten Zustand

Die Elektronendichteverteilung von Molekülen im Grundzustand und im angeregten Zustand nach Photoanregung unterscheidet sich zum Teil dramatisch. Als Folge davon kann der pK_a -Wert des Grundzustandes und des angeregten Zustandes (pK_a^* -Wert) um einen Faktor von bis zu 10 variieren.^{152;153} Photosäuren (wie Hydroxyaryle oder aromatische Amine) erhöhen ihre Azidität im angeregten Zustand, während bei Photobasen (z.B. stickstoffhaltige Aromaten) die Basizität im angeregten Zustand steigt.^{153;154} Beobachtet wurde dies zuerst von Weller¹⁵⁵ und Förster¹⁵⁶. Letzterer entwickelte ein Modell um aus dem pK_a -Wert des Grundzustandes den pK_a^* -Wert des angeregten Zustandes zu bestimmen, den sogenannten Förster-Zyklus. Eine allgemeine Darstellung des Förster-Zyklus ist in Abbildung 2.11 zu sehen. Die Ecken des Kubus repräsentieren die jeweilig vorliegende Spezies des Moleküls. An den Kanten ist der dazugehörige Prozess gezeigt. Die Länge der Kanten ist proportional zur jeweiligen Energieänderung (oder freien Energieänderung) des entsprechenden Prozesses, sodass für jedes Molekül ein unregelmäßiger Hexaeder entsteht. Die Flächen symbolisieren jeweils einen der drei Zyklen: (I) Protolyse-Förster-Zyklus (blau und gegenüberliegende Fläche), (II) Michaelis-Zyklus (orange und gegenüberliegende Fläche), (III) Elektronentransfer-Förster-Zyklus (grün und gegenüberliegende Fläche).¹² Hier erfolgt nur eine kurze Erläuterung der drei Zyklen. Eine detaillierte Beschreibung des dreidimensionalen Förster-Zyklus sowie Anwendungsbeispiele sind in der Veröffentlichung von Grabowski et al. nachzulesen.¹⁵⁷

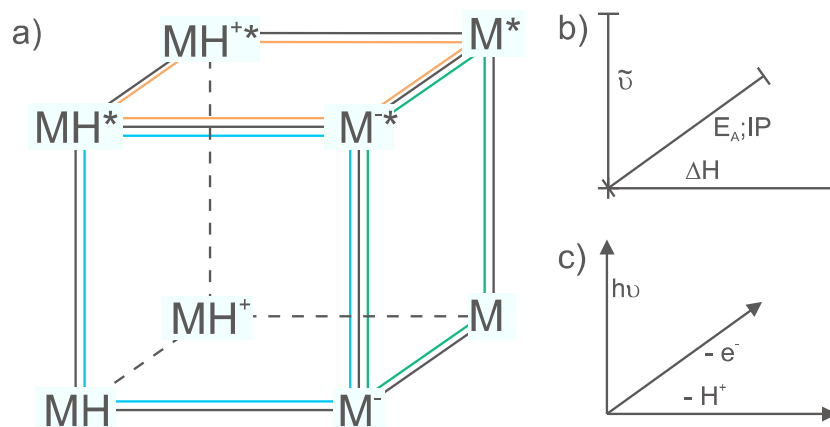


ABBILDUNG 2.11.: a) Der dreidimensionale Förster-Zyklus. Die Ecken stellen den chemischen Zustand des Moleküls dar, die Kanten zeigen den dazugehörigen Prozess um von einem Zustand zum Anderen zu kommen. Die Flächen gehören zu den einzelnen thermodynamischen Zyklen, auf denen der Förster-Zyklus basiert. b) ΔH : Änderung der Standardbildungsenthalpie während der Säure-Base Reaktion, E_A : Elektronenaffinität, IP : Ionisierungspotential, $\tilde{\nu}$: Anregungsenergie. c) Prozesse, die während der Reaktion ablaufen.¹²

Der Elektronentransfer Förster-Zyklus (grün) verknüpft den Elektronentransfer mit der photoinduzierten Anregung des Moleküls.

Der Michealis-Zyklus (orange) verbindet den Protonentransfer mit dem Elektronentransfer. Dies zeigen die Gleichungen (2.13) und (2.14),^{157;158} in denen der pK_a -Wert mit den entsprechenden Redoxpotentialen in Relation gesetzt wird.

$$pK_a(MH) - pK_a(MH^+) = \frac{E(MH/MH^+) - E(M^-/M)}{0,059} \quad (2.13)$$

$$pK_a^*(MH^*) - pK_a^*(MH^{+*}) = \frac{E(MH^*/MH^{+*}) - E(M^{-*}/M^*)}{0,059} \quad (2.14)$$

Dabei sind $E(MH/MH^+)$ und $E(M^-/M)$ bzw. $E(MH^*/MH^{+*})$ und $E(M^{-*}/M^*)$ die jeweiligen Redoxpotentiale, die gegen die Standardwasserstoffelektrode gemessen werden können.¹⁵⁷

Der Protolyse-Förster-Zyklus (blau) verknüpft die energetische Anregung $h\nu$ mit dem Protonentransfer. Dies kann nach Gleichung (2.15) geschehen

$$\Delta H^* - \Delta H = N_A h(\nu_{MH} - \nu_{M^-}) \quad (2.15)$$

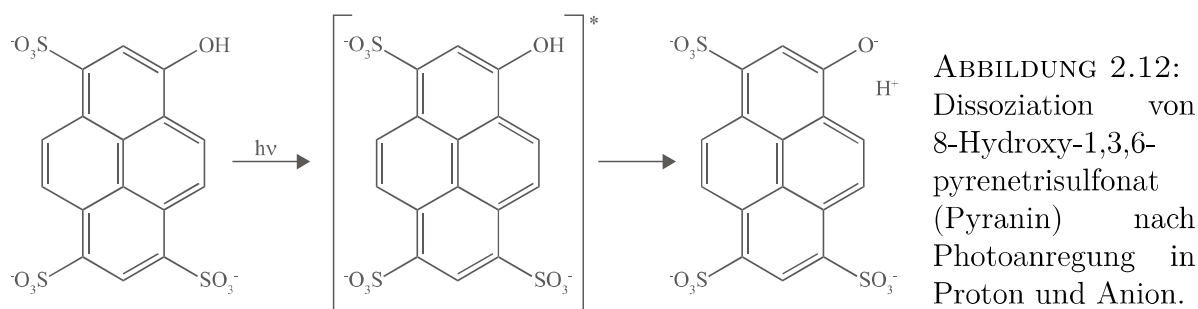
mit ΔH^* und ΔH als Enthalpieänderung im angeregten bzw. Grundzustand, N_A als Avogadrokonstante, h als Plank'schem Wirkungsquantum und ν_{MH} und ν_{M^-} als 0-0 Anregungsenergie vom Grund- zum angeregten Zustand des protonierten (MH) und deprotonierten (M^-) Moleküls. Diese können aus Absorption- und Emissionsmessungen ermittelt werden.^{152;153} Gleichung (2.15) kann durch einige Umformungen in Gleichung (2.16)^{152;154;157} überführt werden, aus der der pK_a^* -Wert direkt, mit T als Temperatur und R als allgemeiner Gaskonstante, berechnet werden kann.

$$pK_a^* - pK_a = \frac{N_A h(\nu_{MH} - \nu_{M^-})}{2,3RT} \quad (2.16)$$

Der pK_a^* -Wert kann auch über zeitaufgelöste Absorptions- oder Emissionsmessungen im Pikosekundenbereich experimentell bestimmt werden, wenn ein linearer Zusammenhang zwischen dem pK_a^* -Wert und dem Logarithmus der Ratenkonstante für die Deprotonierung k_d besteht. Dies ist nur in Systemen der Fall, in denen kein weiterer schneller Prozess mit dem Protonentransfer im angeregten Zustand konkurriert. Desweiteren muss das Säure-Base-Gleichgewicht innerhalb der Lebensdauer des angeregten Zustandes erreicht werden.^{12;158;159}

Allgemein kann eine Protonentransfer-Reaktion im angeregten Zustand (Excited-State-Proton-Transfer: ESPT) in vier Schritte unterteilt werden: I. Die Anregung in den angeregten Zustand (Subfemtosekundenbereich), II. Änderung der Elektronendichteverteilung und Umorientierung von Wasserstoffbrücken (wenn welche existieren) (Femtosekundenbereich), III. Dissoziation des Moleküls in Proton und Anion (Pikosekundenbereich) und IV. Rekombination des dissoziierten Protons mit einer Base, Quenching und Rückkehr in den Grundzustand (Nanosekundenbereich).¹⁵³ Dieser kurze Zeitbereich für den Protonentransfer lässt auf eine sehr niedrige Energiebarriere schließen, die für die Reaktion überwunden werden muss. Sobald Wasserstoffbrücken vorliegen, findet ESPT bevorzugt entlang dieser Bindungen statt.¹⁶⁰ Zwischen der Länge der Wasserstoffbrückenbindung und der zu überwindenden Energiebarriere wurde ein linearer Zusammenhang gefunden.¹⁶¹ Dabei spielt es keine Rolle, ob die Wasserstoffbrücke zu einem Sauerstoff oder Stickstoffatom ausgebildet wird.

Ein Beispiel für die Proton-Dissoziation im angeregten Zustand ist das sulfonierte Pyren-Derivat Pyranin (8-Hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonat) (Abbildung 2.12). Dabei wurden drei



unterschiedliche Zeitkonstanten gemessen. Die Erste ($< \approx 300$ fs) wird der Umorientierung des umgebenden, wässrigen Lösemittels zugeordnet. Die zweite Zeitkonstante ($\approx 2,2$ ps) gibt die Änderung des elektronischen Zustandes an und die dritte Zeitkonstante (≈ 87 ps) wird dem Protonentransfer zugeschrieben.^{158;162}

ESPT findet nur effektiv statt, wenn ein geeignetes Akzeptormolekül vorhanden ist. Dieser Akzeptor kann intramolekular an einem Substituenten desselben Moleküls zu finden sein¹⁶³ oder intermolekular¹⁵² an einem weiteren Molekül. Auch Lösemittelmoleküle können als Akzeptor fungieren.¹⁵² Ein gut untersuchtes System für den ESPT sind die Hydroxyaryle (besonders Naphthol).¹⁵³ Durch die $S_0 \rightarrow S_1$ Anregung im Naphthol findet eine Elektronendichteverchiebung statt, wobei sich die Elektronendichte an der Hydroxygruppe vermindert und so die OH-Bindung schwächt.¹⁵³ Im aromatischen Ring dagegen wird die Elektronendichte größer. Dies kann zu einem Protonentransfer führen, wenn ein durch die Elektronendichteverchiebung stark negativ geladenes Kohlenstoffatom im Aromaten nukleophil die geschwächte Hydroxygruppe angreift (Abbildung 2.13).^{12;153;164} Durch den Einfluss eines elektronenziehenden Cyano-Substituenten an verschiedenen Positionen des 2-Naphthols wird dieses im Grundzustand etwas azider. Im angeregten Zustand verstärkt sich dies noch deutlich.¹⁶⁵ Elektronenschiebende Substituenten dagegen verschlechtern die Azidität. Der ESPT in Naphthol findet in Wasser zum H_3O^+ sehr effektiv statt, während er in Alkohol oder anderen nicht-wässrigen Lösemitteln nicht zu beobachten ist.¹⁵⁴ Dies wird auf die unterschiedlich ausgeprägten Wasserstoffbrücken zwischen Naphthol und dem Lösemittel zurückgeführt.^{153;154;166}

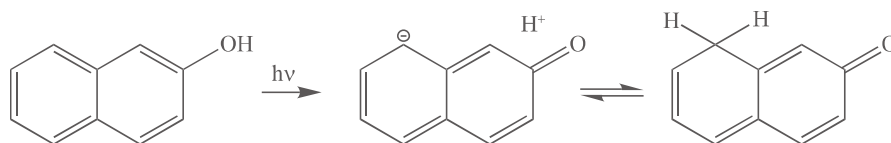
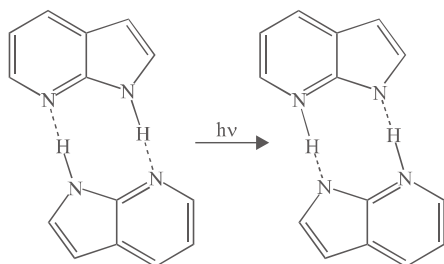


ABBILDUNG 2.13.: ESPT von Naphthol mit vorgeschlagenem Lösungsmechanismus.¹⁶⁴

Ein gut untersuchtes Beispielsystem für ESPT in den Watson-Crick (WC)-Basenpaaren Guanin/Cytosin (G/C) und Adenin/Thymin (A/T) ist das Azaindol-Dimer (Abbildung 2.14), bei dem ein doppelter Protonentransfer nach Photoanregung (Excited-State-Double-Proton-Transfer: ESDPT) beobachtet wurde.^{160;166} Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen im Femtosekundenbereich zeigen einen Zeitverlauf, der biexponentiell mit zwei Zeitkonstanten ($\tau_1=0,2$ ps und $\tau_2=1,1$ ps) angepasst werden konnte. Dabei wird τ_1 dem $S_2 \rightarrow S_1$ Übergang zugeordnet und τ_2 dem Doppelprotonentransfer aus dem S_1 -Zustand.¹⁶⁷ Die Autoren dieser Veröffentlichung gehen aufgrund ihrer Ergebnisse von einem konzertierten Mechanismus aus. Gasphasenexperimente dagegen zeigen Hinweise auf einen Übergangszustand der innerhalb von ≈ 650 fs erscheint und mit ≈ 3 ps zerfällt.¹⁶⁸ Bis jetzt ist noch

konzertierter Mechanismus



Mechanismus mit Übergangszustand

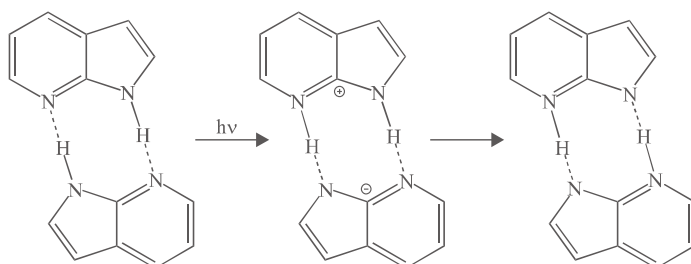


ABBILDUNG 2.14: Zweifacher Protonentransfer im Azaindol-Dimer nach Photoanregung: Oben ist der konzertierte Mechanismus und unten der andere mögliche schrittweise Mechanismus über einen ionischen Übergangszustand gezeigt.

nicht abschließend geklärt, ob ein stufenweiser oder konzertierter Mechanismus vorliegt. Allerdings verdichten sich die Hinweise dahingehend, dass der Doppelprotonentransfer im Azaindol-Dimer konzertiert abläuft.^{12;166;169}

Auch wasserstoffbrückengebundene Pyridin-Pyrol-Dimere werden als Modellsysteme für die Watson-Crick Basenpaare in Hinblick auf einen Wasserstoffatomtransfer untersucht.¹⁶⁶ Dabei wurden zwei Übergänge (zwischen dem S_0/S_1 - und dem S_1/S_2 -Zustand) auf der potentiellen Energiefläche (PES) gefunden, die für das Verständnis der ESPT-Reaktion des Pyridin-Pyrol-Systems von Bedeutung sind. Die Kreuzung zwischen dem S_2/S_1 -Zustand ist verantwortlich für den schnellen Elektronentransferprozess vom Pyrol zum Pyridin nach Photoanregung. Anschließend erfolgt der Protonentransfer im angeregten Zustand. Der dadurch stark stabilisierte CT (Charge-Transfer)-Zustand führt zu einer konischen Durchschneidung zwischen dem S_1/S_0 -Zustand. Diese ist für den ultraschnellen Abfall in den Grundzustand verantwortlich.¹⁷⁰

Quantenchemische Rechnungen am WC-Basenpaar GC zeigen eine konische Durchschneidung zwischen dem ersten angeregten (S_1) Zustand und dem Grundzustand. Zudem existiert ein lokales Minimum auf der S_1 -Potentialfläche für eine Charge-Transfer-Struktur (CT). Dieser CT-Zustand lässt vermuten, dass nach dem Elektronentransfer ein Protonentransfer vom G zum C folgt. Der wahrscheinlichste Reaktionsweg dafür ist die Protonenwanderung entlang der $N-H \cdots N$ Wasserstoffbrücke, da dieser energetisch exotherm abläuft. Dies ist ein effizienter Reaktionspfad für die strahlungsfreie Deaktivierung des angeregten Zustandes.⁴⁸⁻⁵⁰ Zudem erklärt es die ungewöhnlich kurzen Lebensdauern der mittels UV-Licht angeregten Zustände und die damit verbundene erhöhte Photostabilität des WC-Basenpaares in Gasphasenmessungen und DNS-Monomeren in Lösung verglichen mit nicht-WC-Basenpaaren wie z.B. dem GG-Dimer.^{171;172} Neuere Ergebnisse dagegen lassen vermuten, dass der ESPT in GC-Watson-Crick-Basenpaaren in Lösung nicht der dominierende Deaktivierungs-Reaktionspfad ist.¹⁷³ De La Harpe et. al. dagegen sehen den ESPT in Duplex DNS als wichtigen Deaktivierungspfad an, wenn die richtigen DNS-Sequenzen (GC) vorliegen und „ π -stacking“-Wechselwirkungen vorliegen. Ein direkter

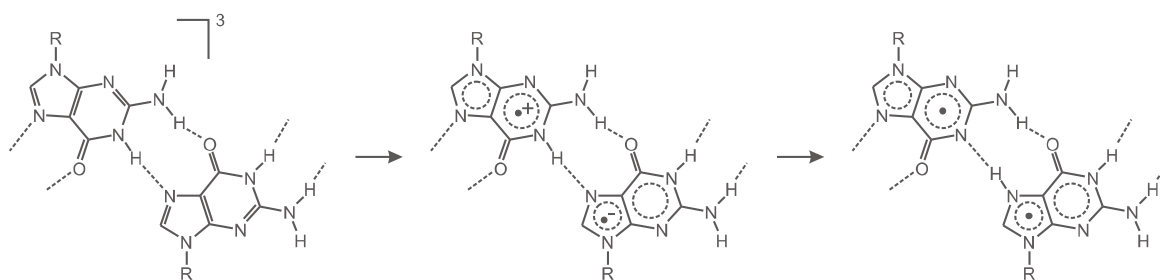


ABBILDUNG 2.15.: Vorgeschlagener Mechanismus für den Wasserstofftransfer in Guanosin-Aggregaten. Eines der Guanosin Moleküle wird durch Laseranregung in den ersten Singulett-Zustand angeregt, woraus anschließend ISC in den Triplett-Zustand erfolgt. Danach findet ein Elektronentransfer zu einem weiteren Guanosin-Molekül statt, das über Wasserstoffbrücken an das Erste gebunden ist. Es entsteht ein $G^{\bullet+}G^{\bullet-}$ Radikalienpaar. Das Proton folgt dann dem Elektron, was zu einem $(G-H)^{\bullet+}(G+H)^{\bullet-}$ Radikal-Paar führt¹².

experimenteller Nachweis des Protonentransfers in GC ist aber noch nicht gelungen.¹⁷⁴ Der Elektronentransfer von G zu C kann auch als Loch-Transfer von C zu G beschrieben werden. In der DNS oder in Oligonukleotiden kann der Ladungstransfer entlang mehrerer Basen erfolgen.^{175;176} Da Guanosin das niedrigste Oxidationspotential aller DNS-Basen besitzt, fungiert es oft als positiver Ladungsträger.¹⁷⁷

Der Mechanismus für den Protonentransfer in GG-Aggregaten sollte ähnlich dem für GC ablaufen. Abbildung 2.15 zeigt den vermuteten Mechanismus. Zeitaufgelöste Absorptionsmessungen in Kombination mit PCM/CAM-B3LYP-Rechnungen zeigen deutliche Hinweise auf einen Protonentransfer entlang der $N-H \cdots N$ -Wasserstoffbrücke aus dem 3CT -Zustand. Das aus dem Elektronentransferprozess entstehende Ionenpaar, sowie das aus dem Protonentransfer entstehende Radikalpaar, werden entlang der Wasserstoffbrücken in den GG Aggregaten (bandähnliche Struktur) in unpolaren Lösemitteln separiert (siehe Kapitel 5.2).

2.2.4. Photochemie von DNS-Basen

Der wohl bekannteste und in der DNS am häufigsten vorkommende Photoschaden nach UV-Anregung ist die Dimerisierung über eine [2+2]-Cycloaddition der C(5)-C(6) Doppelbindung zweier benachbarter Pyrimidinbasen (Abbildung 2.16), wobei ein Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD) entsteht.²² Der CPD-Schaden wurde 1960 erstmals zwischen zwei Thyminmolekülen beschrieben.^{19;20}

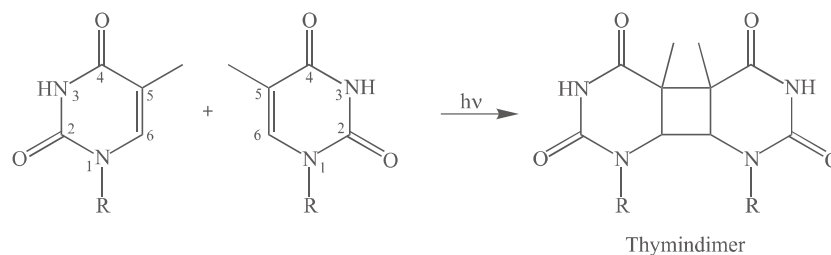


ABBILDUNG 2.16.: [2+2]-Cycloaddition von zwei Thyminmolekülen.

Aufgrund der sterischen Vororientierung in der DNS-Doppelhelix bildet sich dort fast ausschließlich das *cis-syn*-Isomer (Abbildung 2.17).¹⁷⁸ Allerdings werden die möglichen drei anderen Isomere auch gebildet, wenn die sterische Vororientierung aufgehoben ist, also im DNS-Einzelstrang, in denaturierter DNS oder in Lösungen der Basenmonomere.⁴² Der CPD-Schaden tritt nicht nur zwischen zwei Thymin-Basen auf, sondern auch zwischen Thymin und Cytosin sowie zwischen zwei Cytosin-Basen (Abbildung 2.18). Bei den „gemischten“ CPDs wird zwischen dem 5'-T(CPD)C-3' und dem 5'-C(CPD)T-3' unterschieden, je nachdem welche Base dem 5'- oder dem 3'-Ende des DNS-Strangs zugeordnet wird. Die Häufigkeit des Auftretens des CPD-Schadens in der DNS folgt folgendem Trend: 5'-T(CPD)T-3' > 5'-C(CPD)T-3' > 5'-T(CPD)C-3' > 5'-C(CPD)C-3'.^{22;42;178} Dabei ist die Bildung des Thymidindimers T(CPD)T mehr als dreimal so hoch wie die des C(CPD)T-Dimers. Wie zeitaufgelöste Messungen am Einzelstrang belegen, findet die Reaktion innerhalb von wenigen Pikosekunden statt. Dabei wurde lange davon ausgegangen, dass die Dimerisierung aus einem angeregten Triplett-Zustand erfolgt. Allerdings deuten neuere Ergebnisse auf eine wichtige Rolle von angeregten Singulett-Zuständen während der Dimerisierungsreaktion hin.³³

Ein weiterer UV-Photoschaden in der DNS ist die Bildung eines (6-4)-Addukts (Abbildung 2.19).¹⁷⁹ Dabei findet eine Paternò-Büchi-Reaktion zwischen der C=C-Doppelbindung des 5'-Thymidins mit der Carbonylgruppe des 3'-Thymidins statt. Das sich bildende Oxetanintermediat ist nicht stabil und öffnet sich unter Ausbildung des (6-4)-Addukts. Auch hier ist die Reaktion nicht nur zwischen zwei Thyminbasen, sondern zwischen Thymin und Cytosin sowie zwischen zwei Cytosin-Molekülen beobachtet worden. Das (6-4)-Addukt besteht am 3'-Ende aus einem Pyrimidonring, welcher an der C(5)-Position den C(4)-Substituenten der 3'-Base besitzt. Dies ist im Fall des Thymins eine Alkoholgruppe, im Fall des Cytosins eine Aminogruppe. Mechanistisch ist beim Cytosin zu beachten, dass die Reaktion aus dem Imino-Oxo-Tautomer¹⁸⁰ heraus stattfindet und somit kein Oxtan-, sondern ein Azetidintermediat gebildet wird. Die Bildung des (6-4)-Addukts in der DNS läuft über den angeregten Singulett-Zustand.³⁶

Desweiteren ist aus dem (6-4)-Addukt im Thymin durch eine weitere Photoanregung (≈ 320 nm) die Bildung des sogenannten Dewar-Valenz-Isomers nachgewiesen worden (Abbildung 2.20).²³ Dabei findet eine 4π -elektrocyclische Reaktion statt, die eine bemerkenswert

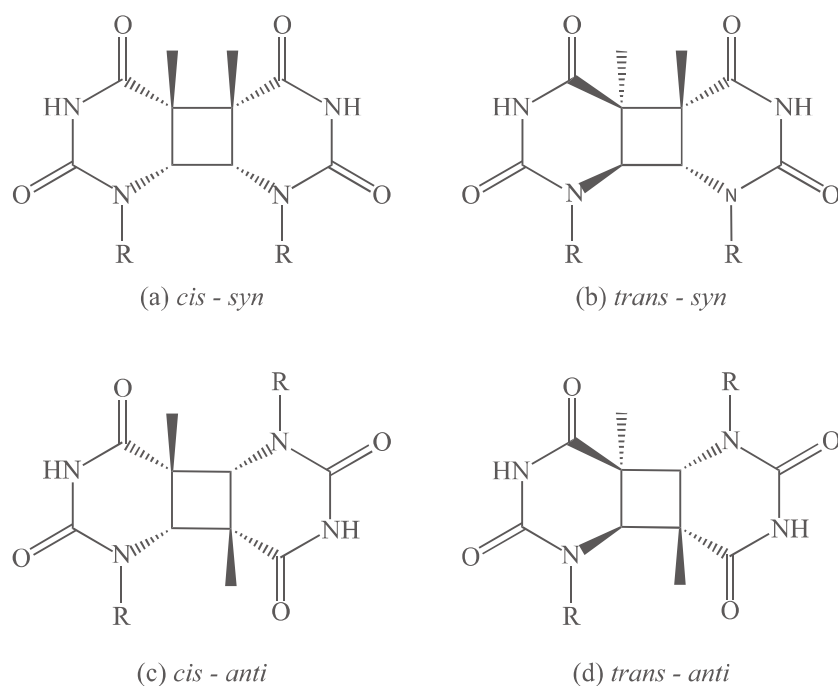


ABBILDUNG 2.17.: Mögliche Diastereomere nach der [2+2]-Cycloaddition des Thymins. Die Wasserstoffatome am Cyclobutanring (nicht gezeichnet) sind analog der Methylgruppe des gleichen Thyminmoleküls orientiert.

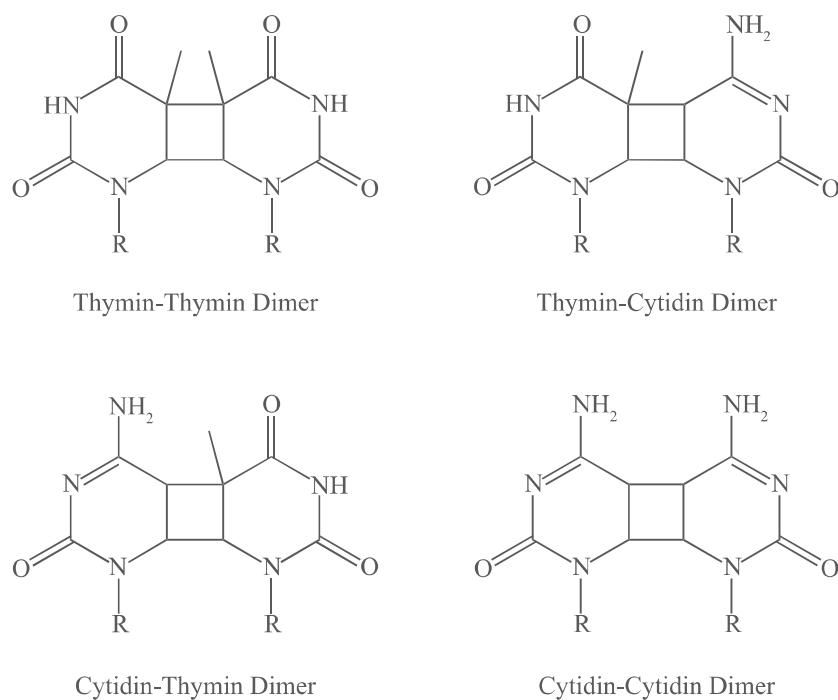


ABBILDUNG 2.18.: Die vier möglichen Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere in der DNS.

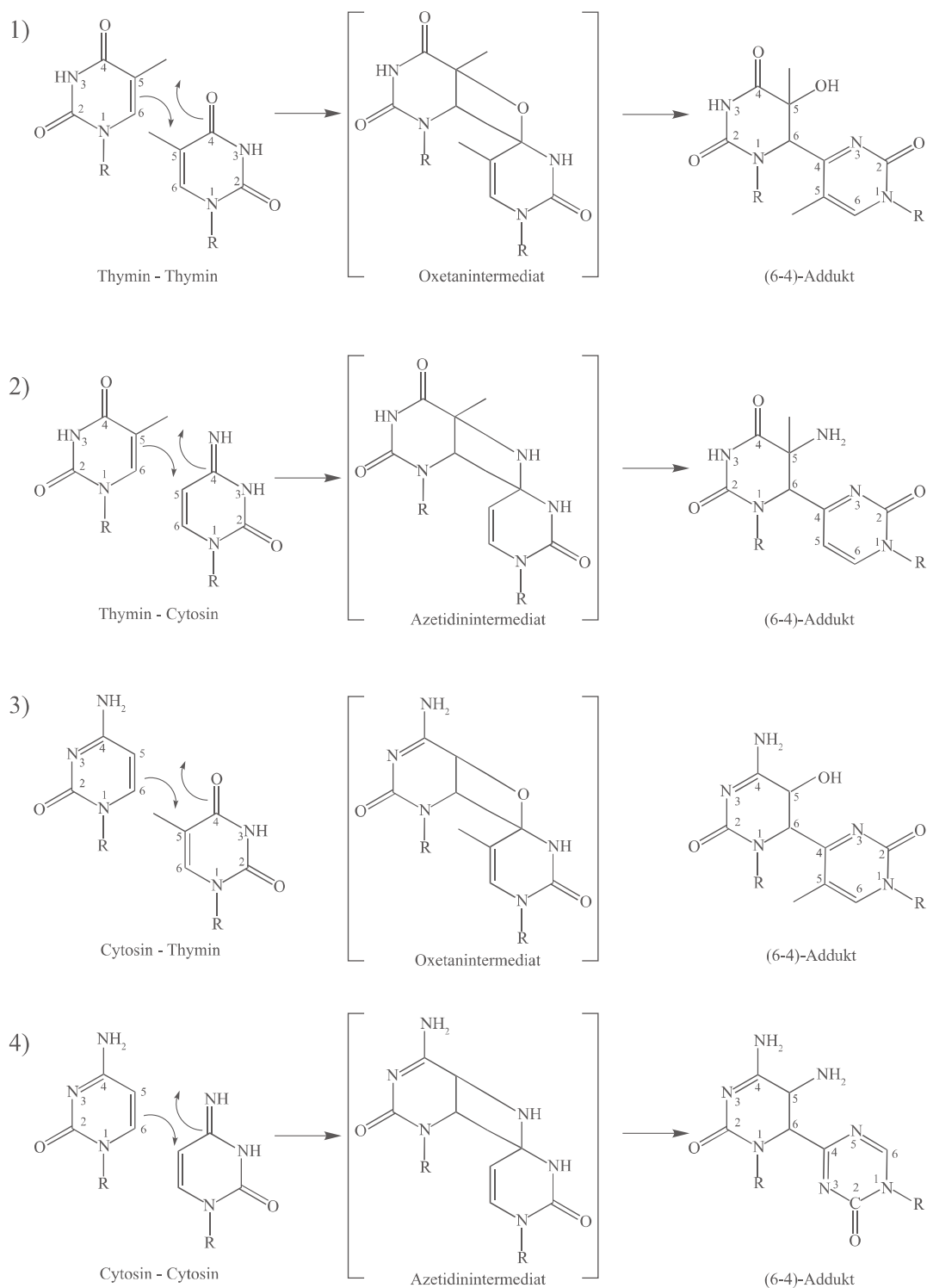


ABBILDUNG 2.19.: Bildung des (6-4)-Addukts zwischen zwei Thyminmolekülen, zwei Cytosinmolekülen und jeweils einem Thymin- und Cytosin-Molekül.

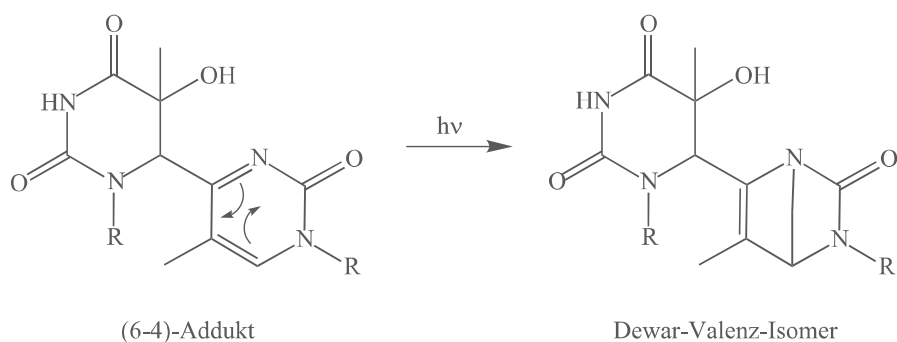


ABBILDUNG 2.20:
Bildung des Dewar-
Valenz-Isomers aus
dem (6-4)-Addukt
zweier Thyminmo-
leküle.

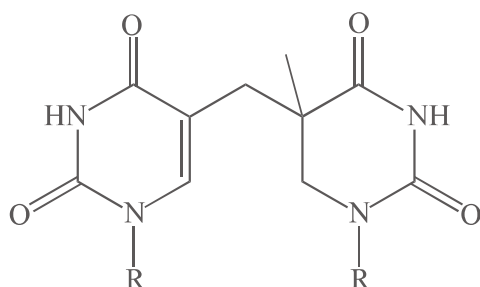


ABBILDUNG 2.21: Das Spore-
Photoprodukt: Die beiden Thy-
minbasen sind über eine C-Brücke
miteinander verbunden.

hohe Umsatzeffizienz besitzt (8,2 %).^{181;182} Die Bildung des Dewar-Valenz-Isomers wird durch die Vororientierung der Basen über das Rückgrad der DNS-Helix unterstützt.^{24;181} Beim CDP-Schaden dagegen hilft das intakte Gerüst der Helix diesen zu vermeiden. Zwei Thyminbasen können auch über eine C-Brücke verbunden sein. Das durch UV-Licht entstehende 5-Thyminyl-5,6-Dihydrothymine (Abbildung 2.21) wird auch Spore-Photoprodukt genannt.¹⁸³ Die Bildung läuft vermutlich über einen radikalischen Mechanismus ab.¹⁸⁴

Cytosin kann unter UV-Licht zum Cytosin-Hydrat hydriert werden. Dieses reagiert unter Desaminierung zum Uracil-Hydrat weiter (Abbildung 2.22).^{42;185}

Trotz der Tatsache, dass die Pyrimidinsequenzen in der DNS die bevorzugten Stellen für Photoreaktionen sind, sind die Photoschäden an den Purinbasen nicht zu unterschätzen. Zwei benachbarte Adenin-Basen können verschiedene Dimere ausbilden (Abbildung 2.23). Nach einer [2+2]-Cycloaddition zwischen der C(8)=N(7)-Doppelbindung und der C(5)-C(6)-Bindung zweier benachbarter Adenin-Moleküle entsteht ein instabiles Azetidinintermediat. Dieses reagiert über zwei konkurrierende Reaktionswege zu den zwei unterschiedlichen Adenin-Adenin-Dimeren in Abbildung 2.23 (A) und (B) weiter.¹⁸⁶ Die Quantenausbeute in Poly(dA) (Polydesoxyadeninsäure) liegt für Dimer (A) bei 0,0016 und für Dimer (B) bei 0,0014.¹⁸⁶ Auch eine Dimerisierung zwischen einem Adenin und

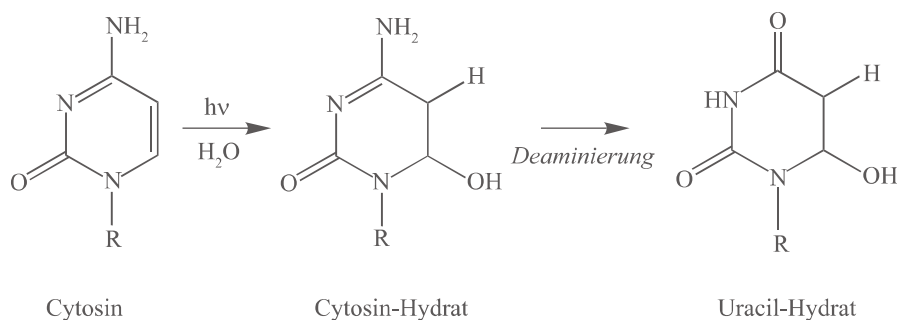


ABBILDUNG 2.22:
Bildung des Uracil-
Hydrates aus einem
Cytosin durch
UV-Licht.

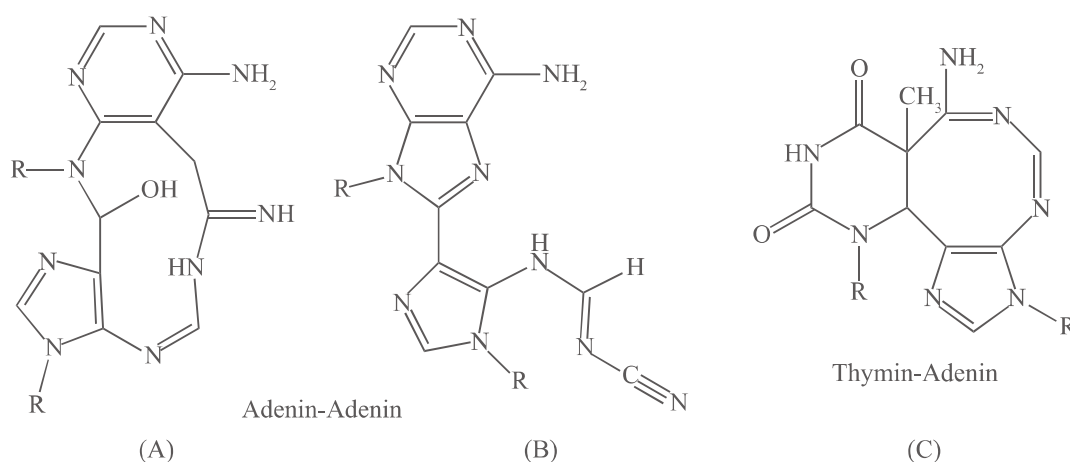


ABBILDUNG 2.23.: Nachgewiesene Adenin-Adenin- (A und B) und Adenin-Thymin- (C) Dimere in der DNS.

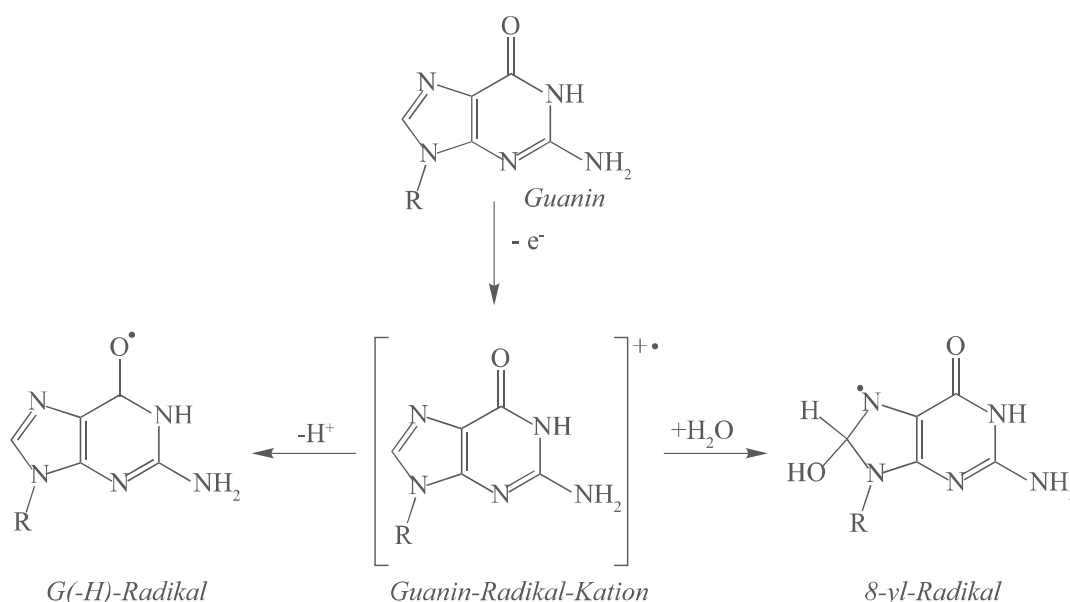


ABBILDUNG 2.24.: Einelektronenoxidation eines Guanins mit anschließender Hydrierung oder Deprotonierung.

einem benachbarten Thymin ist bekannt (Abbildung 2.23 (C)). Dabei bildet sich nach der Cycloaddition zwischen den beiden C(5)-C(6)-Bindungen zum Cyclobutanring ein Achtring aus.¹⁸⁷

Ein anderer Mechanismus für die Bildung von Photoschäden in der DNS kommt besonders häufig bei der Base Guanin vor. Guanin besitzt das niedrigste Oxidationspotential¹⁷⁷ von allen vorkommenden Basen in der DNS und ist somit am anfälligsten für Oxidationsreaktionen. Meistens wird die Oxidation über eine Photosensibilisierung Typ I erreicht. Dabei erfolgt ein Elektronentransfer zwischen einem Guanin und dem Photosensibilisator. Das entstehende Guanin-Radikal-Kation reagiert in wässriger Lösung auf zwei konkurrierenden Wegen weiter. Zum Einen kann es deprotoniert und zum Andern hydriert werden (Abbildung 2.24). Welcher Reaktionspfad bevorzugt stattfindet, hängt von vielen Parametern wie z.B. der Struktur der DNS-Sequenz oder dem pH-Wert ab.²² Die Hydrierung

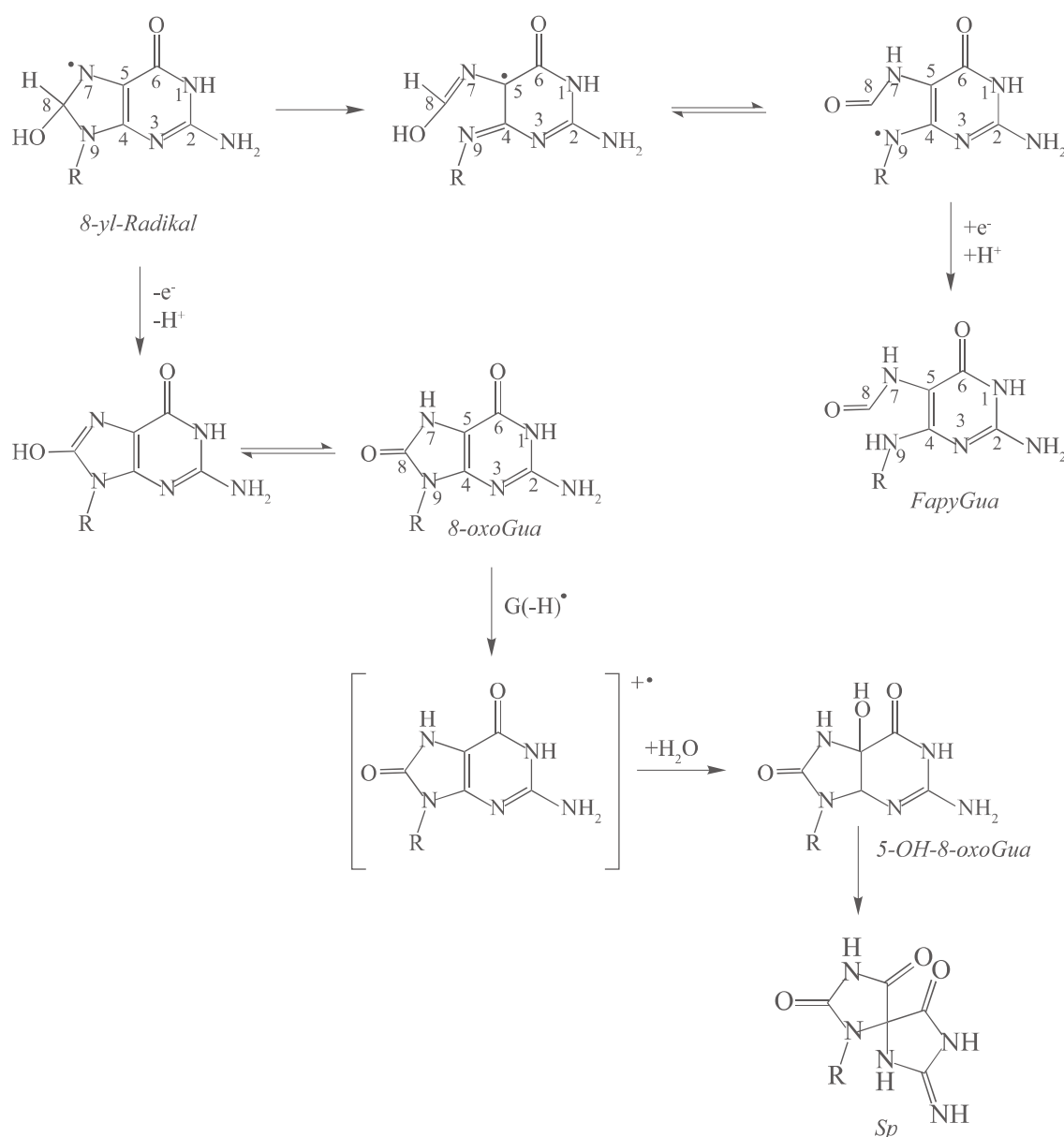


ABBILDUNG 2.25.: Mögliche Reaktionswege des 8-yl-Radikals: (I) Bildung von 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FapyGua); (II) Bildung eines Spiroiminodihydantoin Nukleosid (Sp).

des Guanin-Radikal-Kations zum 8-Hydroxy-7,8-dihydroguanylradikal (8-yl Radikal, Abbildung 2.24) erfolgt mit einer Ratenkonstante $k = 6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pseudo-erster Ordnung im DNS-Doppelstrang.¹⁸⁸ Die anschließende Reduktion des 8-yl-Radikals führt in wässriger Lösung zum 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FapyGua) (Abbildung 2.25). Dabei wird die C(8)-C(9)-Bindung des Imidazolrings am Guanin gespalten.²² Diese Ringöffnung läuft mit einer Ratenkonstante $k = 2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ (gemessen über Pulsradiolyse) ab.¹⁸⁹

Die Oxidation des 8-yl-Radikals ist immer dann bevorzugt, wenn Sauerstoff in der Lösung vorliegt. Sie führt zur Bildung des 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoGua), was als Biomarker für oxidative Stoffe verwendet wird (Abbildung 2.25).²²

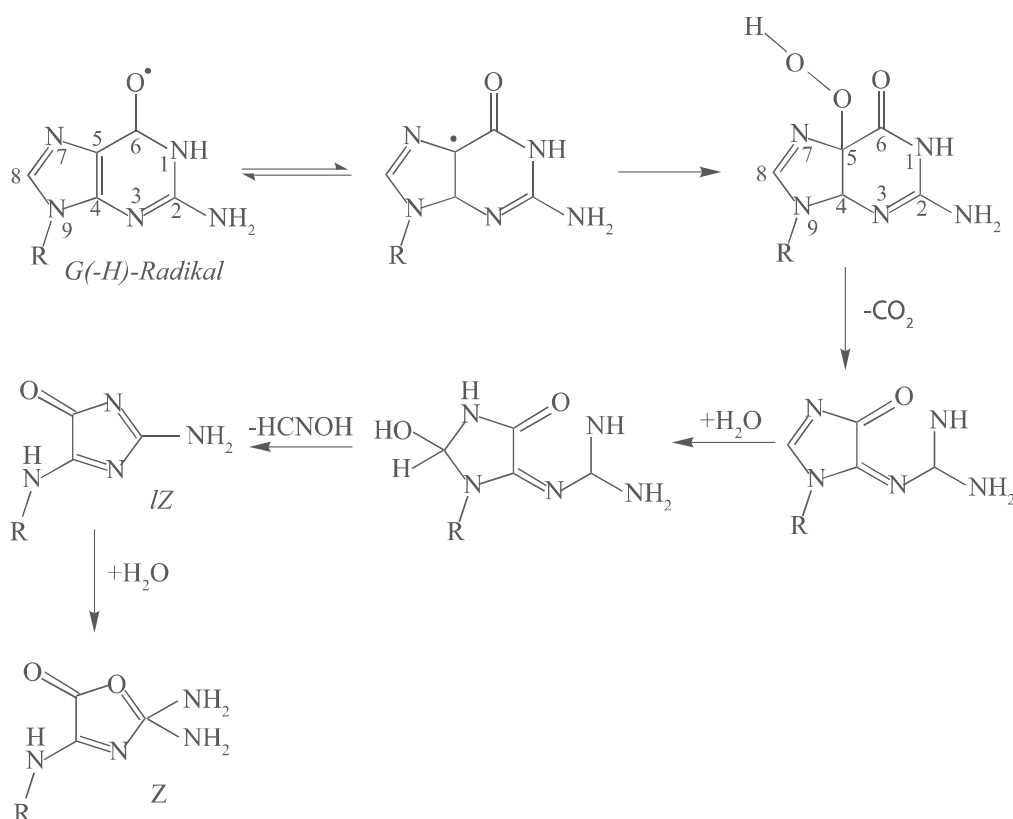


ABBILDUNG 2.26.: Bildung von 2,2,4-Triamino-5(2H)-oxazolone (Z) aus dem G(-H) Radikal.

Die Deprotonierung des Guanin-Radikal-Kations (pK_a : 3.9) ist in isolierten Nukleosiden und Einzelstrang-DNS ein effektiver Prozess¹⁸⁹ und führt zu sehr reaktiven (G-H)-Radikalen (Abbildung 2.24). In wässriger Lösung reagiert es zum 2,2,4-Triamino-5(2H)-oxazolone (Z) mit dem instabilen 2,5-Diamino-4H-imidazol-4-one (IZ) als Vorstufe (Abbildung 2.26). Dabei wird angenommen, dass das (G-H)-Radikal durch Zugabe von Sauerstoff zu einem Peroxylradikal an der C(5)-Position reagiert. Anschließend öffnet sich der Pyrimidinring an der C(5)-C(6)-Bindung. Unter Decarboxylierung und Hydrierung der C(7)=C(8)-Doppelbindung entsteht ein Carbinolamin, welches durch Tautomerisierung und unter Abspaltung von Formamin das 2,5-Diamino-4H-imidazol-4-one (IZ) bildet. Dieses lagert sich nochmal zum 2,2,4-Triamino-5(2H)-oxazolone (Z) um (Abbildung 2.26).²² 8-oxoGua kann in wässriger Lösung mit dem sich bildenden (G-H)-Radikal weiterreagieren. Dabei bildet sich ein Spiroiminodihydantoin-Nukleosid (Sp) aus (Abbildung 2.25). Zudem ist Guanin in der Lage mit Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) über eine Diels-Alder-Reaktion ein 4,8-Endoperoxid auszubilden, welches sich in ein 8-Hydroperoxy-2'-deoxyguanosin umlagern kann (Abbildung 2.27). Durch die Abspaltung eines Wassermoleküls bildet sich ein chinoides Intermediat, dessen C(5)-N(7)-Doppelbindung sehr anfällig für die nukleophile Addition von Wasser ist. So entsteht das 5-Hydroxy-8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (5-OH-8-oxoGuo) woraus sich wieder ein Spiroiminodihydantoin-Nukleosid (Sp) bildet. Aus dem 8-Hydroperoxy-2'-deoxyguanosin kann sich zudem in einer Konkurrenzreaktion das 8-oxodGuo bilden (Abbildung 2.27).²²

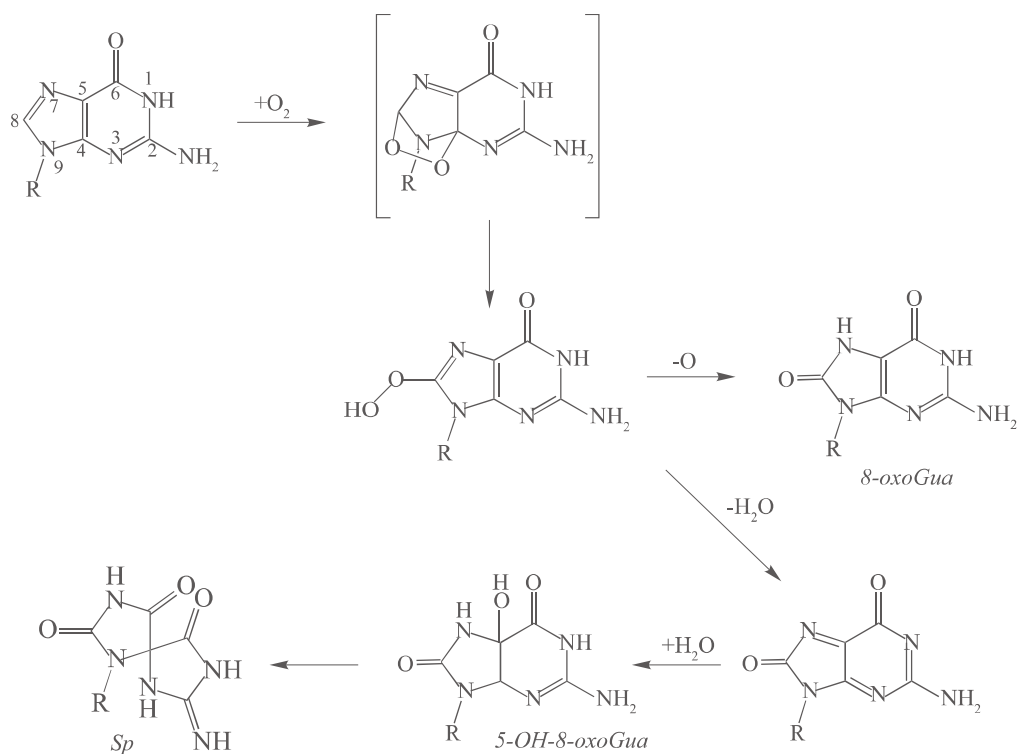


ABBILDUNG 2.27.: Reaktionssequenz von Guanin mit Singulett-Sauerstoff in wässriger Lösung.

Die Basen Thymin, Guanin und Cytosin bilden nach meinen Untersuchungen zudem unter Bestrahlung mit UV-Licht Photoproducte aus, die eine Isocyanatgruppe ($N=C=O$) enthalten. Aufgrund der fehlenden Carbonylgruppe ist dies im Adenin nicht möglich. Eine genaue Beschreibung dieser Reaktion ist im Kapitel 5.1 zu finden.

3. Methoden

In diesem Kapitel werden die für diese Arbeit wichtigen Methoden vorgestellt. Dazu gehört die stationäre und zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie sowie die zeitaufgelöste UV/Vis-Absorptionsspektroskopie. Zudem wird auf die Verfahren eingegangen, die für die Auswertung und Interpretation der Daten benötigt werden. Die experimentellen Aufbauten werden kurz erläutert.

3.1. Zeitaufgelöste UV/Vis-Spektroskopie

Die Grundlage der zeitaufgelösten UV/Vis-Spektroskopie ist die Blitzlichtphotolyse, auch „pump-probe-Spektroskopie“ genannt. Diese wurde 1949 erstmals von Porter und Norris vorgestellt.^{190;191} Sie ist eine sehr leistungsstarke Methode um die photochemischen Eigenschaften von Molekülen nach Bestrahlung durch Laserlicht zu untersuchen. Grundlage hierbei ist die Erzeugung transientser Spezies. Als transiente Spezies werden Zustände von Atomen oder Molekülen bezeichnet, die eine Lebensdauer im Submillisekundenbereich besitzen. Solche Zustände sind zum Beispiel angeregte Zustände (S_1 oder T_1), Ionen oder Radikale. Die transienten Spezies werden mit einem Laserpuls („pump-Prozess“) geeigneter Wellenlänge generiert. Prinzipiell sind drei Prozesse denkbar, die durch den Laserpuls gestartet werden können.

In den meisten Fällen findet eine $S_0 \rightarrow S_n$ -Absorption gefolgt von schnellem IC in den S_1 -Zustand statt. Es können nur Prozesse beobachtet werden, die langsamer ablaufen als die Pulsbreite ist, die der Anregungslasers besitzt. Der in dieser Arbeit verwendete Anregungslaser hat eine Pulsbreite von mehreren Nanosekunden. Der $S_n \rightarrow S_1$ -Übergang benötigt nur wenige Pikosekunden und ist deshalb mit der hier verwendeten Apparatur nicht zu detektieren. Es können also nur Prozesse beobachtet werden, die dem $S_n \rightarrow S_1$ -Übergang folgen, wie zum Beispiel ISC in den Triplett-Zustand.

Ist die Energie des Laserpulses hoch genug, um das Ionisationspotential (IP) zu übersteigen, kann das Molekül ionisiert werden. Selbst wenn die Absorption eines Photons dies nicht erlaubt, kann eine Ionisation durch Mehrphotonenabsorption erfolgen. Damit in dem hier verwendeten Aufbau Ionen sichtbar sind, müssen diese durch das Lösemittel (z.B. Wasser) oder andere Moleküle stabilisiert werden. Dadurch wird eine sofortige Rekombination des Kations mit dem Elektron verhindert.

Weiterhin kann die Energie des Laserpulses ausreichen um Bindungen zu spalten. Dabei entstehen Radikale oder andere stabile Übergangszustände, aus denen sich anschließend photochemisch erzeugte Produkte bilden.

Nach Erzeugung der transienten Spezies mit dem Laserpuls („pump“-Prozess) wird ihre Absorption A gemessen („probe“-Prozess). Da nur eine kleine Anzahl an Molekülen angeregt wird, überlagert die Absorption der Moleküle im Grundzustand die Absorption der transienten Spezies. Deshalb wird bei der Messung die Probe mit allen Molekülen im Grundzustand als Referenz genommen und nicht nur das reine Lösemittel. Dadurch werden nur die Änderungen sichtbar, die durch die Laseranregung bedingt sind. Die Depopu-

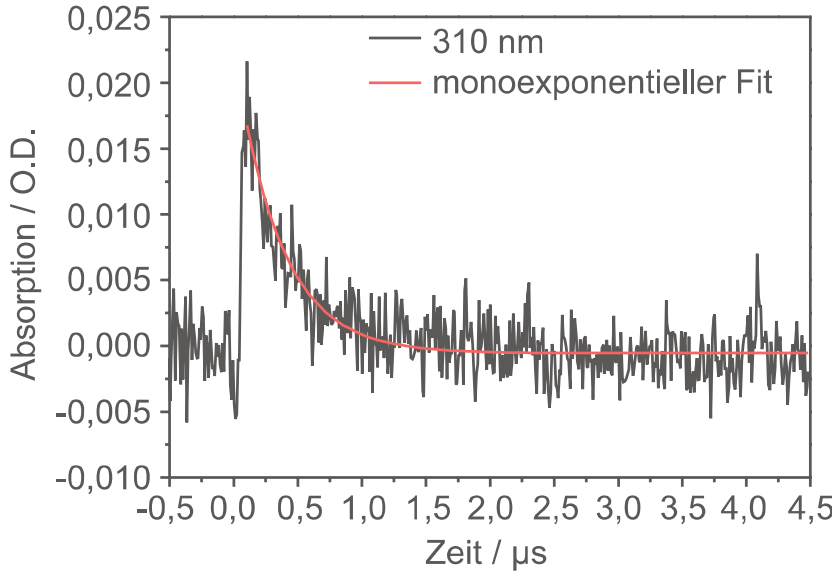


ABBILDUNG 3.1: Zeitabhängige Absorption von einem Guanosinderivat in n-Hexan bei 310 nm nach Anregung mit 266 nm (schwarz) und dem monoexponentiellen Fit mit $\tau=0,35 \mu\text{s}$ (rot).

lierung des Grundzustandes wird als negatives Signal („Bleaching“) im Spektrum sichtbar. Die Absorption A kann nach Gleichung (3.1) berechnet werden, mit I_A =Intensität nach Laseranregung, I_B = Intensität vor Laseranregung und I_0 =Lichtintensität des „probe“-Lichtstrahls.

$$A = -\log \left(1 - \frac{I_A - I_B}{I_0} \right) \quad (3.1)$$

Die Absorption wird für jede Wellenlänge zu verschiedenen Zeiten (wenigen Nanosekunden bis einigen Mikrosekunden) aufgenommen. Aus den Änderungen der Absorption mit der Zeit können die Ratenkonstanten k für Bildung und Zerfall der transienten Spezies bestimmt werden. Dabei wird ein exponentieller Fit in die zeitabhängige Kurve gelegt (Abbildung 3.1). Als Beispiel ist hier die Absorption bei 310 nm eines Guanosinderivats in n-Hexan gezeigt (siehe auch Kapitel 5.2). Die Datenaufnahme beginnt 500 ns vor dem Laserpuls. Da bis dahin keine transiente Spezies gebildet wurde, ist die Absorption Null. Diese Datenpunkte werden als Referenz genommen um zu sehen, ob alle Moleküle wirklich in den Grundzustand zurückkehren oder sich Photoprodukte bilden, die im gleichen Spektralbereich, wie das untersuchte Molekül, absorbieren. Innerhalb weniger Nanosekunden nach dem Laserpuls steigt das Absorptionssignal zum Maximum an und verschwindet mit einem monoexponentiellen Verlauf. Dieser hat die Form

$$y(x) = Ae^{-kx} + y_0 \quad (3.2)$$

mit k als Ratenkonstante aus der die Lebensdauer τ über $\tau=k^{-1}$ bestimmt werden kann. Absorbiert mehr als eine Spezies im gleichen spektralen Bereich, zeigt die zeitabhängige Kurve ein multiexponentielles Verhalten. Die Funktion, die angepasst wird, muss somit auch eine multiexponentielle Funktion sein (Gleichung (3.3)), um die Lebensdauern der einzelnen Spezies bestimmen zu können.

$$y(x) = A_1e^{-k_1x} + A_2e^{-k_2x} + A_3e^{-k_3x} + \dots + y_0 \quad (3.3)$$

Indem die Absorptionsintensität zur gewünschten Zeit bei jeder aufgenommenen Wellenlänge zusammengesetzt wird, erhält man das komplette Spektrum zu dieser bestimmten

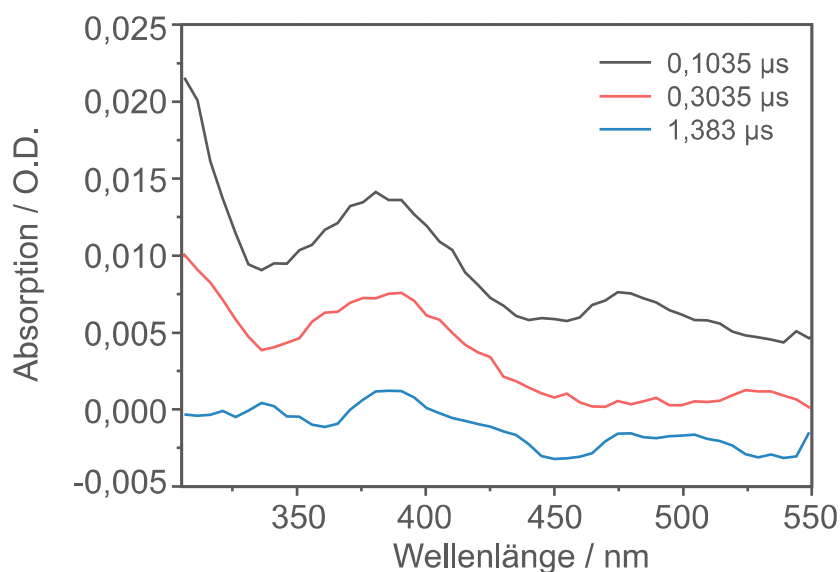


ABBILDUNG 3.2: Absorptionsspektrum von Guanodin in n-Hexan bei verschiedenen Zeiten nach Laseranregung mit 266 nm. Die Lösung wurde während der Messung mit Stickstoff gespült.

Zeit (Abbildung 3.2). Auch hier ist als Beispiel die zeitabhängige Absorption des Guanosinderivats in n-Hexan (Stickstoff gespülte Lösung) gezeigt. Nach 0,1035 μs sind im Spektrum Maxima bei 310 nm, 380 nm und 470 nm erkennbar. Nach 1,383 μs ist die Absorption auf nahezu Null zurückgegangen. Es ist nur eine Basislinie erkennbar. Wenn das gleiche Experiment mit einer sauerstoffgespülten Lösung durchgeführt wird, sinkt die Absorption sofort nahezu auf Null (siehe Kapitel 5.2). Dabei reagieren die Sauerstoffmoleküle mit dem angeregten Guanodin, sodass die zuvor beobachtete transiente Spezies gelöscht wird. Dies ist immer ein Hinweis darauf, dass nach Anregung ISC in den Triplett-Zustand erfolgt. Man erhält somit durch die Blitzlichtphotolyse nicht nur die Lebensdauern von transienten Spezies sondern auch Informationen über die Natur des angeregten Zustandes. Weitere detaillierte Informationen können in den Dissertationen von K. Hunger¹² und D. Löwenich¹⁹² nachgelesen werden.

3.1.1. Experimenteller Aufbau für die zeitaufgelöste UV/Vis-Spektroskopie

Der experimentelle Aufbau für die zeitaufgelösten UV/Vis-Absorptionsspektroskopie ist in Abbildung 3.3 zu sehen. Für die Messungen werden zwei Lichtquellen benötigt, der Nd:YAG-Laser („pump“) und die Xenonlampe („probe“). Der verwendete Laser (Spotlight 600, Innolas) generiert auf der fundamentalen Wellenlänge (1064 nm) Pulse mit einer Breite von 12 ns. Er kann aber auch bei den Wellenlängen 532 nm, 355 nm, 266 nm und 213 nm betrieben werden. Die 150 W Xenonlampe wird gepulst betrieben. Mit der verwendeten Osram XBO Birne konnte bis zum Wellenlängenminimum von $\lambda = 300$ nm gemessen werden. Die Xenonlampe generiert einen Puls von 1,5 ms mit einem Plateau von 400 μs . Detaillierte Informationen über den Laser, die Xenonlampe sowie den verwendeten Photomultiplier (R928, Hamamatsu) als Detektor und die dazugehörigen Spezifikationen können anderswo nachgelesen werden.^{192;193}

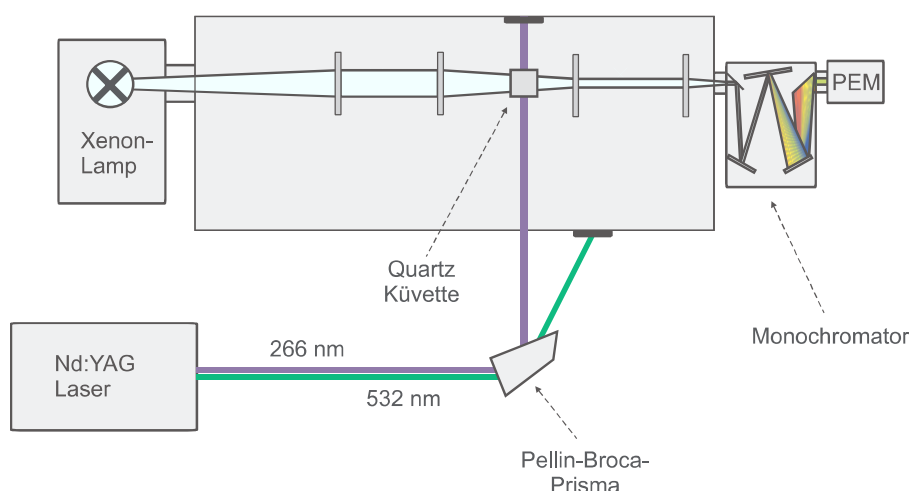


ABBILDUNG 3.3:
Experimenteller
Aufbau für
zeitaufgelöste
UV-Vis-Messungen
im Nanosekunden-
bereich.

3.2. Stationäre FTIR-Spektroskopie

Die Grundlagen und Prinzipien der Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) sind in den bekannten Lehrbüchern von P.W. Atkins¹¹⁰ oder G. Wedler¹¹³ sowie in den Veröffentlichungen von Herres und Gronholz^{194–196} verständlich und gut beschrieben. Hier wird nur kurz auf die elementaren Prinzipien und Methoden eingegangen.

3.2.1. Theoretische Grundlagen

Die FTIR-Spektroskopie (FT=Fouriertransformation) ist eine Methode der Schwingungsspektroskopie, bei der ein komplettes Spektrum mittels modulierter IR-Strahlung simultan aufgenommen wird (im Gegensatz zu dispersiven Methoden, wo jede Wellenlänge einzeln abgetastet wird). Die Modulation des von einem Global erzeugten IR-Lichts, wird durch ein Michaelson Interferometer realisiert (Abbildung 3.4). Dieses besteht aus einem

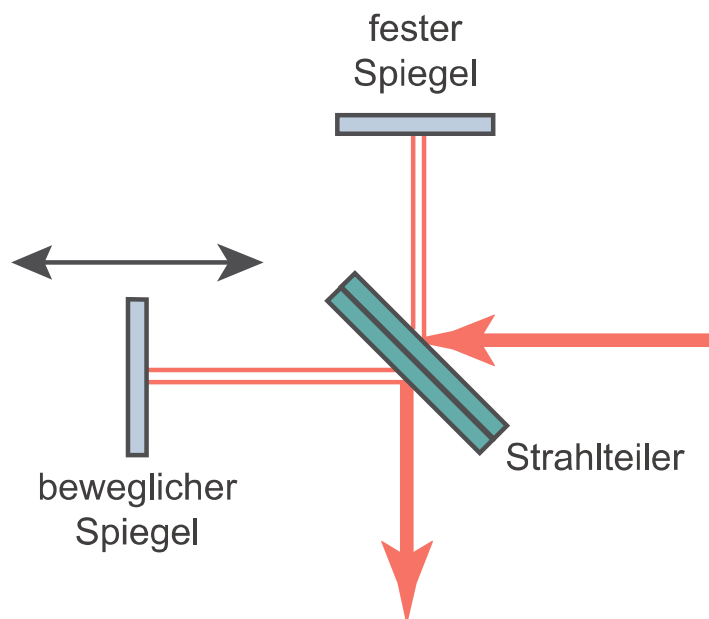


ABBILDUNG 3.4.: Schematischer Aufbau eines Michaelson-Interferometers.

Strahlteiler sowie einem festen und einem beweglichen Spiegel. Das einfallende IR-Licht wird durch den Strahlteiler in zwei Teilstrahlen zerlegt und trifft auf die Spiegel, die es zurück zum Strahlteiler reflektieren. Dort interferieren sie miteinander. Der bewegliche Spiegel sorgt dabei für eine Phasenverschiebung der Teilstrahlen in Abhängigkeit der Spiegelposition. Die Interferenzmuster einzelner Wellenlängen (konstruktive und destruktive Interferenz) überlagern sich dabei. Am Detektor wird die Lichtintensität aller Wellenlängen in Abhängigkeit der Spiegelposition aufgenommen, was als Interferogramm bezeichnet wird. Die maximale Intensität des Interferogramms („Centerburst“) entspricht der Spiegelposition Null, d.h. beide Teilstrahlen legen die gleiche Weglänge zurück. Die genaue Spiegelposition, an der das Signal vom Detektor aufgenommen wird, wird mit Hilfe der Nulldurchgänge der monochromatischen Strahlung eines eingekoppelten He-Ne (Helium-Neon)-Lasers bestimmt. Ein einseitiges Interferogramm enthält alle spektralen Informationen und kann mit der diskreten Fouriertransformation in ein sogenanntes Einkanalspektrum umgerechnet werden. Während einer Vorwärts- und Rückwärtsbewegung des Spiegels, werden vom Detektor zwei doppelseitige Interferogramme (entspricht vier einseitigen Interferogrammen) aufgenommen. Dies entspricht vier Spektren. Meistens sind diese doppelseitigen Interferogramme in sich nicht symmetrisch, weshalb eine Phasenkorrektur durchgeführt werden muss. Dies wird meistens nach der von Mertz entwickelten Methode realisiert (siehe Kapitel 4).¹⁹⁵ Es ist unmöglich ein Interferogramm bis zu einer unendlichen Spiegelauslenkung aufzunehmen. Aufgrund dieser Endlichkeit entstehen am Rand der Absorptionsbanden nach der Fouriertransformation sogenannte „Füßchen“. Um diese zu vermeiden, wird das Interferogramm mit einer Apodisationsfunktion multipliziert.¹⁹⁵ Durch das sogenannte „Zerofilling“ erfolgt eine Interpolation der Datenpunkte im Spektrum. Dabei werden an beiden Enden des Interferogramms Nullen angehängt.¹⁹⁴ Die spektrale Auflösung wird nur durch die Spiegelauslenkung bestimmt. Dies wird mit dem sogenannten Rayleigh-Kriterium beschrieben, welches besagt, dass ein Interferogramm bis zu einer Wegdifferenz von $1/d$ aufgenommen werden muss, wenn zwei im Abstand d benachbarte Spektrallinien aufgelöst werden sollen.¹⁹⁴ Die maximale Frequenz ν_{max} , die noch eindeutig detektiert werden kann, hängt vom Abstand Δx zwischen zwei Punkten im Interferogramm ab (Nyquist-Theorem, Gleichung (3.4)).

$$\Delta x = \frac{1}{2\nu_{max}} \quad (3.4)$$

Um Datenmengen zu reduzieren wird oft das sogenannte „Undersampling“¹⁹⁵ verwendet. Hierbei werden optische Filter benutzt um den spektralen Bereich des Spektrums einzuschenken, was zu einer Reduktion von Interferogrammpunkten führt.

In der Schwingungsspektroskopie werden üblicherweise Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ anstelle von Wellenlängen λ oder Frequenzen ν verwendet. Diese hängen nach Gleichung (3.5) zusammen.

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c_0} = \frac{1}{\lambda} \quad (3.5)$$

Die Einstrahltechnik der FTIR-Spektrometer macht es notwendig für jede Probe zunächst ein Hintergrund-Einkanalspektrum $I(\tilde{\nu})_{Hintergrund}$ ohne Probe und anschließend ein Einkanalspektrum mit Probe $I(\tilde{\nu})_{Probe}$ zu messen. Das Absorptionsspektrum $A(\tilde{\nu})$ errechnet sich dann nach Gleichung (3.6).

$$A(\tilde{\nu}) = -\log \left(\frac{I(\tilde{\nu})_{Probe}}{I(\tilde{\nu})_{Hintergrund}} \right) \quad (3.6)$$

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich lichtinduzierte Differenzspektren aufgenommen. Bei einem Differenzspektrum wird die Differenz des Absorptionsspektrums nach Bestrahlung und vor Bestrahlung gebildet. Dies ist identisch mit der Bildung des negativen dekadischen Logarithmus aus dem Quotienten der Einkanalspektren vor und nach Bestrahlung (Gleichung (3.7)).

$$\Delta A(\tilde{\nu}) = A(\tilde{\nu})_{\text{nach Bestrahlung}} - A(\tilde{\nu})_{\text{vor Bestrahlung}} = -\log \left(\frac{I(\tilde{\nu})_{\text{nach Bestrahlung}}}{I(\tilde{\nu})_{\text{vor Bestrahlung}}} \right) \quad (3.7)$$

Der Vorteil der Differenzspektren besteht darin, dass nur Banden sichtbar sind, die sich durch die Bestrahlung ändern. Negative Banden gehören zum Edukt, welches durch die Photoreaktion verschwindet und positive Banden zum Produkt, welches sich durch die Photoreaktion bildet. Eine genauere Beschreibung, wie man mittels der FTIR-Differenzspektroskopie den Umsatz einer Photoreaktion bestimmt, kann in Kapitel 6.1 nachgelesen werden. Die Möglichkeit der Produktidentifikation ist in den Kapiteln 6.1 und 5.1 genauer beschrieben.

3.2.2. Experimenteller Aufbau für die Aufnahme stationärer FTIR-Differenzspektren

Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 3.5 zu sehen. Für alle FTIR-Messungen wurde ein Spektrometer der Firma Bruker (Ettlingen), Vertex 80v, mit einem MCT-Detektor ($\text{Hg}_{0.8}\text{Cd}_{0.2}\text{Te}$) verwendet. Die IR-Lichtquelle im Spektrometer ist ein Globar (Siliziumcarbid, betrieben bei 1500 K). Die Probe wurde, wenn nicht anders beschrieben, als Film auf einem CaF_2 -Substrat präpariert. Der Probenraum wurde auf 2,5 mbar evakuiert. Als UV-Lichtquelle dient Strahlung eines Nd:YAG-Lasers (INDI, Spectra Physics, 10 Hz, 10 ns Pulsbreite) der Wellenlänge 532 nm, welches nochmal extern mit Hilfe eines BBO-Kristalls (Beta-Bariumborat: BaB_2O_4) weiter auf 266 nm frequenzverdoppelt wird. Dieses

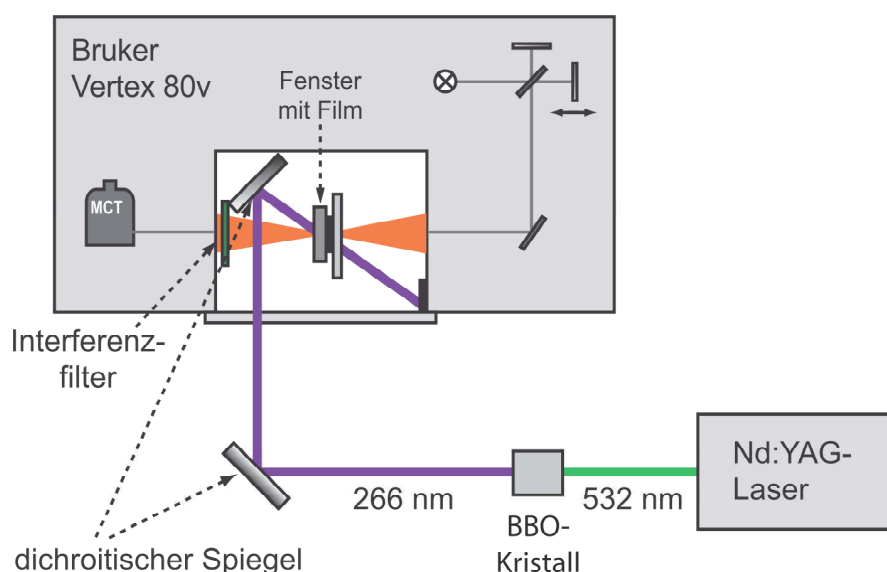


ABBILDUNG 3.5.: Experimenteller Aufbau für die Messung von lichtinduzierten IR-Differenzspekten im Film.

Licht wurde über dichroitische Spiegel (Melles Griot) durch ein Quarzglasfenster in den Probenraum gelenkt. Die Probe ist so justiert, dass der Laserstrahl und das IR-Licht dort überlappen. Somit ist sichergestellt, dass nur die bestrahlte Probe mit dem IR-Licht detektiert wird. Vor dem Detektor befindet sich ein Interferenzfilter (Bruker, 4000-900 cm^{-1}), um Streulicht des Anregungslasers zu blockieren.

3.3. Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie

3.3.1. Messprinzip

Zeitaufgelöste FTIR-Messungen können über zwei unterschiedliche Messmodi realisiert werden: den Rapid-Scan im Millisekundenbereich und den STEP-SCAN für den Nano- bis Mikrosekundenbereich. Während eines Rapid-Scans wird das Interferogramm mit der Spiegelbewegung aufgezeichnet. Dabei gilt: Je schneller der Spiegel und je kürzer die benötigte Spiegelauslenkung ist, desto besser ist die Zeitauflösung.^{197;198}

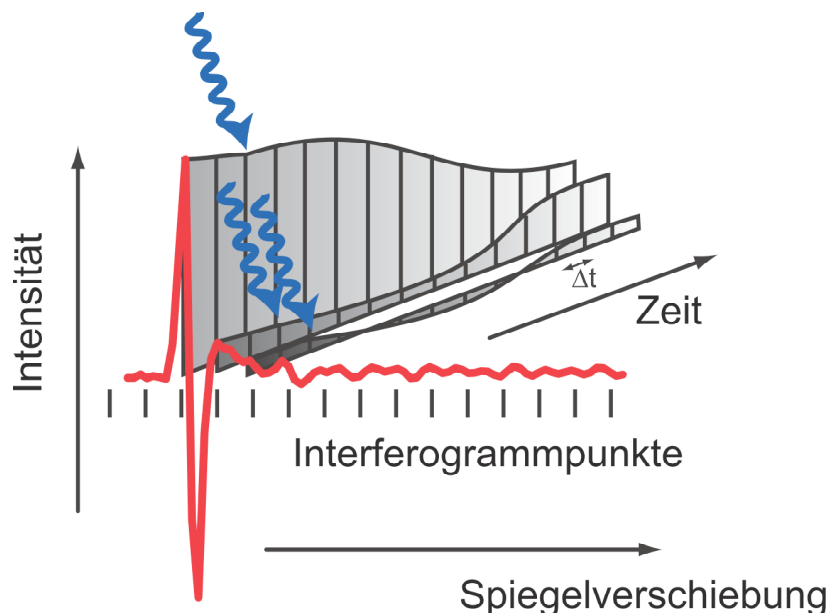


ABBILDUNG 3.6.: Prinzip der Datenaufnahme in einem STEP-SCAN-Experiment. In rot ist ein Interferogramm dargestellt. Der bewegliche Spiegel wird an jedem Interferogrammpunkt gestoppt und die Intensität des IR-Lichts in Abhängigkeit von der Zeit aufgenommen.

Das Messprinzip bei STEP-SCAN-Experimenten ist genau anders herum. Der bewegliche Spiegel wird nicht kontinuierlich durchgeföhrt, sondern stoppt an jedem Interferogrammpunkt. Dort wird jeweils die zu untersuchende Reaktion gestartet und die Lichtintensität als Funktion der Zeit aufgenommen. Anschließend fährt der Spiegel zum nächsten Interferogrammpunkt weiter (Abbildung 3.6). Die Zeitauflösung ist hierbei von der Anstiegszeit der Detektorelektronik (Nanosekundenbereich) abhängig. Aus den so aufgenommen zeitabhängigen Kurven an den unterschiedlichen Interferogrammpunkten können die Interferogramme zu den einzelnen Zeiten zusammengesetzt und über eine Fouriertransformation

in die jeweiligen Spektren umgerechnet werden. Für STEP-SCAN-Messungen ist es erforderlich, dass die untersuchte Reaktion sehr gut reproduzierbar ist, damit bei jedem Durchlauf an jeder Interferogrammposition die Reaktionsbedingungen gleich sind. Die STEP-SCAN-Methode wurde an der bakteriellen lichtgetriebenen Protonenpumpe *Bacteriorhodopsin* etabliert.¹⁹⁹

Der genaue experimentelle Aufbau für STEP-SCAN-Messungen wird in Kapitel 4 ausführlich beschrieben.

3.4. Quantenchemische Rechnungen

Quantenchemische Rechnungen sind eine unverzichtbare Hilfe um die experimentellen spektroskopischen Daten zu interpretieren. Dabei geben die Rechnungen Aufschluss über die Molekülgeometrie des Grund- oder angeregten Zustandes und können auch elektronische oder vibronische Anregungen voraussagen. Alle quantenchemischen Rechnungen in dieser Arbeit wurden mit dem Programm TURBOMOLE^{200–206} durchgeführt.

Die *ab initio* Methoden basieren auf der Lösung der Schrödingergleichung und der Hartree-Fock-Theorie.^{207–209} Die Schrödingergleichung lautet:

$$\hat{H}\psi = E\psi \quad (3.8)$$

mit E als Energie, Ψ als Wellenfunktion und $\hat{H}$ als Hamiltonoperator, der sich aus dem Operator für die potentielle Energie $\hat{V}$ und der kinetischen Energie $\hat{T}$ zusammensetzt (Gleichung (3.9)).

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{V} \quad (3.9)$$

Eine eindeutige, exakte Lösung der Schrödingergleichung ist nur für Eielektronensysteme möglich und kann zum Beispiel in Büchern von Atkins¹¹¹ oder Cramer²¹⁰ nachgelesen werden. Für Mehrelektronensysteme müssen einige vereinfachende Annahmen getroffen werden, um die Energien und Wellenfunktionen zu erhalten.

Nach der Born-Oppenheimer-Näherung kann die Schrödingergleichung in zwei Teile zerlegt werden, einen für die Elektronen und einen für die Atomkerne.¹¹⁵ Die große Massendifferenz zwischen den Atomkernen und den Elektronen führt zu einer hohen Trägheit der Atomkerne, verglichen mit den Elektronen. Darauf basierend, folgen die Elektronen jeder Änderung der Atomkerne sofort, sodass die Elektronenschrödingergleichung $\hat{H}^e \psi_{(\vec{R},r)}^e = E_{\vec{R}}^e \psi_{(\vec{R},r)}^e$ für jede Lage der Atomkerne $\vec{R}$ einzeln bestimmt werden kann, mit r als Koordinaten der Elektronen.

Die Idee der Dichte-Funktional-Theorie (DFT) besteht darin, dass die Energie eines elektronischen Systems durch die Elektronendichte φ beschrieben werden kann, ohne eine Schrödingergleichung lösen zu müssen.²¹¹ Dies wurde durch das Hohenberg-Kohn-Theorem bewiesen.^{212;213} Während die Wellenfunktion eines N-Elektronensystems von $3N$ Koordinaten abhängt, kann die Elektronendichte φ durch drei kartesische Koordinaten beschrieben werden. Dies minimiert die Anzahl der Dimensionen und damit auch die Rechenzeit.^{12;111}

Nach dem Prinzip der unabhängigen Teilchen kann das Dichtefunktional $E[\varphi]$ eines Mehrelektronensystems nach Gleichung (3.10) in Beiträge aus der kinetischen Energie der Elektronen $T[\varphi]$, der potentiellen Energie der Atomkern-Atomkern- und der Elektron-Atomkern-Wechselwirkung $V[\varphi]$, der Coulombwechselwirkung zwischen den Elektronen

untereinander $E_{ee}[\varphi]$ und $K_{XC}[\varphi]$, dem Austausch-Korrelations-Funktional zerlegt werden.

$$E[\varphi] = T[\varphi] + V[\varphi] + E_{ee}[\varphi] + K_{XC}[\varphi] \quad (3.10)$$

Die Form des Austausch-Korrelations-Funktional ist unbekannt, weshalb dafür verschiedenen Näherungen verwendet werden.^{214–218} Ein Modellsystem für das Austausch-Korrelations-Funktional ist die lokale Spin-Dichte-Näherung (LSDA). Dabei wird vom homogenen, spin-polarisierten Elektronengas ausgegangen, wobei die Elektronendichte an jeder Position den gleichen Wert hat.²¹⁰ Ein etwas komplexeres Modell wurde von Perdew und Wang entwickelt.²¹⁹ Dabei ist die Elektronendichte nicht mehr uniform, sondern von ihrem Gradienten abhängig. Dieses Austausch-Korrelations-Funktional wird GGA (generalized gradient approximation) genannt.²¹⁹ Durch die Kombination von Hartree-Fock-Energien, LSDA und GGA wurden sogenannte Hybridfunktionale, wie das B3LYP-Funktional (Gleichung (3.11)), konstruiert, welches in dieser Arbeit ausschließlich verwendet wurde.^{220;221} Die im B3LYP Funktional verwendeten GGAs sind das GGA von Becke (B88, E_X^{GGA})²²² und das Korrelations-GGA von Lee, Yang and Parr (LYP, E_C^{GGA})²²³.

$$E_{XC[\rho]}^{B3LYP} = (1 - a)E_{XC[\rho]}^{LSDA} + aE_X^{HF} + bE_X^{GGA} + (1 - c)E_C^{LSDA} + cE_C^{GGA} \quad (3.11)$$

Die Werte von a, b und c variieren zwischen den verschiedenen Methoden. Im verwendeten Programm TURBOMOLE V5.10 hat das implementierte B3LYP-Funktional die Werte a = 0,2; b = 0,72 und c = 0,81.

Die Qualität der quantenchemischen Rechnung hängt signifikant von der Wahl des Basissatzes ab, der die Spinorbitale darstellt. Um Rechenkosten zu sparen und die Fehler trotzdem möglichst gering zu halten, werden die Atomorbitale (oft durch Slater-Typ-Orbitalen (STO, Slaterfunktionen)²²⁴ beschrieben) durch eine Kombination von verschiedenen Gaussian-Typ-Orbitalen (GTO, Gaussfunktionen)²²⁵ dargestellt. Die GTOs haben den Vorteil, dass sie besser zu berechnen sind, aber den Nachteil, dass sie Atomorbitale schlechter wiedergeben. Der einfachste Basissatz (minimale Basissatz) besteht aus einer Funktion für jedes Orbital. Allerdings verbessert sich das Ergebnis erheblich, wenn mehrere Funktionen für jedes Orbital verwendet werden.¹¹¹ In dieser Arbeit wurde der „Triple-Zeta-Split-Valence“-Basissatz (TZVP) verwendet. Er verwendet jeweils eine Funktion für die inneren Orbitale und drei Funktionen für jedes Valenzorbital sowie Polarisationsfunktionen, die eine höhere Drehimpulsquantenzahl haben.^{12;210}

Mit dem Berny-Algorithmus wird die Gleichgewichtsgeometrie mit dem niedrigsten Energiegradienten gesucht. Dieser Algorithmus verwendet dazu die Hesse-Matrix, deren Elemente die gemischten zweiten Ableitungen der Energie entlang der Normal-Koordinaten sind.²²⁶ An der Gleichgewichtsgeometrie ist der Energiegradient entlang aller internen Koordinaten gleich Null. In einem nichtlinearen Molekül mit N Atomen gibt es 3N-6 Normalkoordinaten, bei denen keine Änderung des Molekülschwerpunktes während der Schwingung stattfindet. Auslenkungen entlang dieser Koordinaten entsprechen den Schwingungen des Moleküls.¹¹¹ Die Schwingungsfrequenzen werden über eine Normalkoordinatenanalyse bestimmt. Dazu werden von der K-Matrix (Kraftkonstantenmatrix; 2. Ableitung der potentiellen Energie nach den massegewichteten kartesischen Koordinaten) die Eigenwerte und Eigenvektoren bestimmt. Die Eigenwerte entsprechen den gesuchten Schwingungsfrequenzen. Eine Normalschwingung wird über eine Linearkombination der Koeffizienten der Eigenvektoren entlang der massegewichteten kartesischen Koordinaten beschrieben. Die Änderung des Dipolmomentes als Funktion der Schwingung ist dann proportional zur

IR-Intensität. Hat die Geometrieoptimierung zu einem Übergangszustand geführt, sind eine oder mehrere der Frequenzen unrealistisch. Um trotzdem die Grundzustandsgeometrie zu erhalten, wird die Übergangsgeometrie als Startwert angenommen und die Geometrieoptimierung erneut gestartet. Optional kann die Übergangsgeometrie auch leicht verzerrt werden, um das Molekül zu zwingen aus dem lokalen Minimum des PES (Potenzialfläche) herauszukommen. Zudem kann das Konvergenzkriterium verschärft werden.

Das bisher Dargelegte bezieht sich auf Rechnungen auf die Gasphase. Das Molekül befindet sich im Vakuum und hat keine Wechselwirkungen mit anderen Molekülen, weder zwischen zwei Molekülen noch zwischen Molekül und Lösemittel.

Um auch Lösemittelleffekte mit in die quantenchemische Rechnung einzubeziehen, wurde in dieser Arbeit das COSMO-Modell verwendet. COSMO steht dabei für **C**onductor-like **S**creening **M**odel.^{227–230} Bei diesem Modell wird das Lösemittel als Kontinuum mit einer Dielektrizitätskonstante ϵ betrachtet. Dieses schließt das Molekül wie eine Art Käfig ein (zum Beispiel eine Kugel um das Molekül herum). Da das Lösemittel leitend ist, existiert innerhalb des Lösemittels kein Potential. Stattdessen muss man sich das Bild von Ladungen auf einer leitenden Oberfläche vorstellen, die mit einem Medium im Kontakt sind. Dieses Bild vereinfacht die benötigten elektrostatischen Gleichungen für die Berechnung der polarisierten freien Energie.²¹⁰ Ist das Lösemittel ein idealer Leiter muss das elektrische Potential auf der Käfigoberfläche verschwinden. Ist die Ladungsverteilung eines Moleküls bekannt, ist es möglich die jeweilige Ladung auf den einzelnen Oberflächenteilen zu bestimmen. Allerdings ist diese Ladung für Lösemittel mit endlichen Dielektrizitätskonstanten immer niedriger als die berechnete. Deshalb wird die in COSMO-Modellen vereinfacht berechnete polarisierte freie Energie mit einem Faktor f (Gleichung (3.12)) (Onsager Faktor) nach der Berechnung skaliert.²¹⁰

$$f = \frac{2(\epsilon - 1)}{(2\epsilon + 1)} \quad (3.12)$$

Ein anderes Modell zur Berechnung von Lösemittelleffekten ist das D-PCM (**d**ielectric **p**olarizable **c**ontinuum **m**odel). Dabei wird das Lösemittel als polarisierbares Kontinuum behandelt. Auch bei dieser Methode wurde eine Modifikation ähnlich der COSMO-Methode eingeführt, das C-PCM (**c**onductor-like **p**olarizable **c**ontinuum **m**odel).^{231;232} Alle Modelle geben in etwa gleich gute Ergebnisse, sodass die Unterschiede in den Annahmen für das Lösemittel keinen Einfluss haben.²¹⁰

4. Etablierung einer AC-gekoppelten STEP-SCAN-FTIR-Messmethode

In diesem Kapitel wird gezeigt, wie die AC-gekoppelte STEP-SCAN-Messung^{233;234} im Vergleich zur normalerweise angewandten DC-STEP-SCAN-Messung^{197;198;235} funktioniert (AC Detektorsignal: alternating current - Detektion von Änderungen; DC Detektorsignal: direct current - Detektion der gesamten Intensität). Die beschriebene Methode wurde anhand des bekannten Testsystems der lichtgetriebenen Protonenpumpe *Bacteriorhodopsin* (BR) getestet.

4.1. Theorie und experimenteller Aufbau für eine AC-gekoppelte STEP-SCAN-Messung

Bei STEP-SCAN-Messungen werden immer einseitige Interferogramme aufgenommen. Vor der Fouriertransformation wird das Interferogramm mit einem ADC (Analog Digital Wandler) digitalisiert (hier: Transientenboard MI314142 (Bruker), 14 bit und interner ADC (Bruker), 24 bit). Die Intensität des im DC-Modus aufgenommenen Interferogramms ist erheblich größer als die des im AC-Modus aufgenommenen Interferogramms, bei dem nur die Intensitätsänderungen detektiert werden. Deshalb kann die Verstärkung des AC-Signals, die benötigt wird um den kompletten dynamischen Bereich des ADCs auszufüllen, erheblich größer sein als beim DC-Signal. Damit verbessert sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis deutlich und kleine Signale, die beim DC-Modus (viel weniger verstärkt) unter der 1 bit Schwelle liegen, werden im AC-Modus erst sichtbar.^{233;234}

Das gewünschte Differenzspektrum, das gemessen werden soll, bezieht das gemessene Einkanalspektrum nach Bestrahlung auf das gemessene Einkanalspektrum vor Bestrahlung. Das Differenzspektrum zeigt also die prozentualen Änderungen der einzelnen Banden. Der im AC-STEP-SCAN-Modus gemessene Unterschied zwischen den Einkanalspektren reicht somit nicht aus um ein „echtes“, auf den Grundzustand bezogenes, Differenzspektrum zu berechnen.^{233;234} Das AC-STEP-SCAN-Einkanal-Spektrum vor Bestrahlung zeigt keine Änderungen und muss deshalb im DC-Modus aufgenommen werden.

Das DC-STEP-SCAN-Spektrum wird bei AC-gekoppelten STEP-SCAN-Messungen ohne Laseranregung aufgenommen und mit dem internen ADC (24 bit, Eingangsspannung: ± 10 V) digitalisiert. Die Zeitauflösung liegt im Mikrosekundenbereich. Die AC-STEP-SCAN-Messung wird mit Laseranregung gemessen und hat eine Zeitauflösung von wenigen Nanosekunden (hier 20 ns). Dabei ist der Detektor an einen externen schnellen Vorverstärker angeschlossen und das Signal wird mit dem im PC integrierten Transientenboard (14 bit, Eingangsspannung: $\pm 5 - \pm 0,5$ V) digitalisiert.

Die Interferogramme werden, wie in Kapitel 3 erwähnt, korrigiert und über die Fouriertransformation in Einkanalspektren umgewandelt. Wichtig ist hierbei die Phasenkorrektur. Im idealen Fall ist das Interferogramm vollkommen symmetrisch. In der Realität

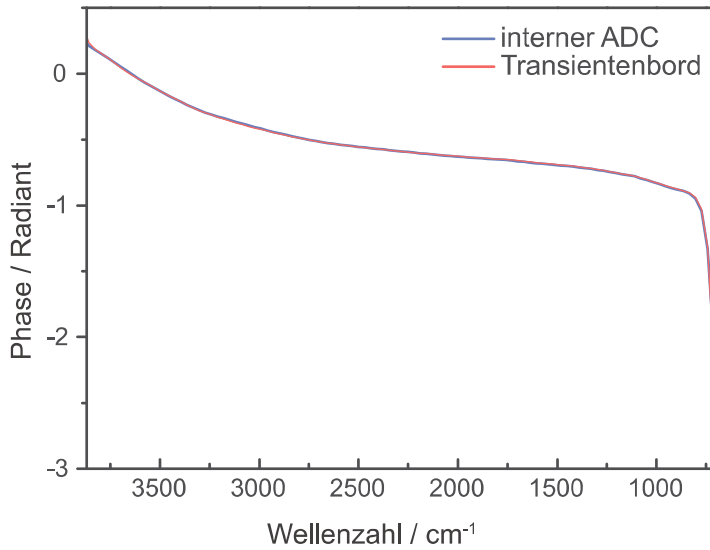


ABBILDUNG 4.1: Phasenspektren, die mit unterschiedlichen ADCs aufgenommen wurden: Es ist kein Unterschied zwischen der Phase, die mit dem internen ADC und der Phase, die mit dem Transientenboard aufgenommen wurden erkennbar, da diese nur von der verwendeten Optik, nicht aber von der Elektronik, abhängen.

ist dies nicht der Fall, weil die genaue „Center-Burst“-Position (Maximum des Interferogramms) nie exakt in der Messung getroffen wird. Deshalb ergibt die Fouriertransformation ein komplexes Spektrum. Aus dem für jede Frequenz komplexen Datenpunkt kann eine Phase bestimmt werden (Phasenspektrum), um die das unsymmetrische Interferogramm korrigiert wird (Mertz-Methode¹⁹⁵).²³³ Die Grundvoraussetzung für die Mertz-Methode ist, dass alle Messwerte positiv sind, weil diese das Vorzeichen des Phasenwinkels bestimmen.²³³ Da bei AC-STEP-SCAN-Messungen Intensitätsänderungen gemessen werden, kann diese Methode hier so nicht angewendet werden.

Um diese Probleme zu umgehen wird vor der eigentlichen AC-STEP-SCAN-Messung das DC-STEP-SCAN-Spektrum der Probe ohne Belichtung, also im Grundzustand, aufgenommen. Dieses Einkanalspektrum kann anschließend als Hintergrundspektrum benutzt werden um aus der AC-Messung ein „richtiges“ Differenzspektrum zu erhalten. Zudem wird das Phasenspektrum der DC-Messung zur Korrektur der AC-Messung verwendet. Dies setzt eine ausreichende Stabilität der Apparatur voraus. Abbildung 4.1 zeigt, dass das Phasenspektrum in STEP-SCAN-Messungen nur von der verwendeten Optik abhängt und solange reproduzierbar ist, wie die Spiegelpositionen in den Messungen gleich definiert sind (gleiche Anzahl an Interferogrammpunkten). Die verwendete Elektronik hat keinen Einfluss auf die Phase, sodass für die AC- und DC-STEP-SCAN-Messungen unterschiedliche ADCs verwendet werden können (AC: Transientenboard (14 bit), DC: interner ADC (24 bit)). Dies ist messtechnisch von großem Vorteil, da dadurch während des Experimentes kein Umbau notwendig ist.

Abbildung 4.2 zeigt den experimentellen Aufbau für ein AC-gekoppeltes STEP-SCAN-Experiment. Die Lichtanregung erfolgt mit einem Nd:YAG-Laser (INDI, Spectra Physics, 10 Hz, 10 ns Pulsbreite) der Wellenlänge 532 nm (frequenzverdoppelt) und wird über Spiegel (Melles Griot) so in den Probenraum geleitet, dass es dort mit dem IR-Licht überlappt. Da eine Zeitauflösung von wenigen Nanosekunden angestrebt wird, wird der Laser mittels eines Delaygenerators (Scientific Instruments, DG 645) mit dem Spektrometer synchronisiert. Das dazugehörige Triggerschema zeigt Abbildung 4.3. Zwischen den Laserblitzlampen (Lamp Sync out) und dem Q-Switch liegen 230 μ s, was die maximale Laserleistung ergibt. Der Lichtpuls kommt weitere 250 ns nach dem Q-Switch. Dies ist bei der Auswertung zu beachten um genau zu wissen, wann das Licht auf die Probe getroffen

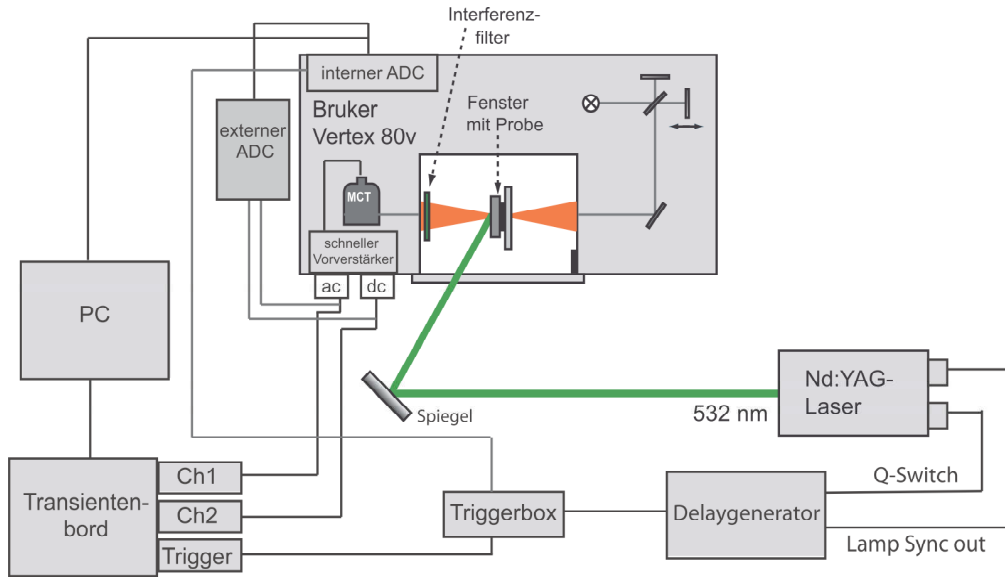


ABBILDUNG 4.2.: Experimenteller Aufbau für AC-gekoppelte STEP-SCAN -Messungen

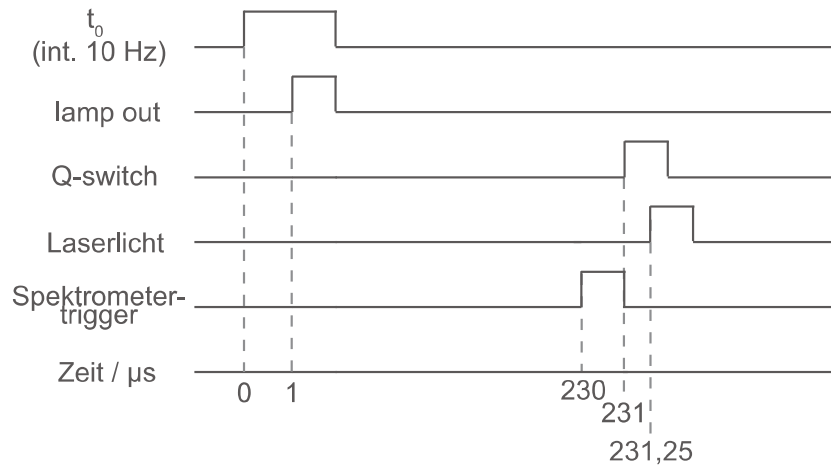


ABBILDUNG 4.3.: Triggerschema für eine STEP-SCAN-Messung, gesteuert vom Delay-generator

ist. Das Spektrometer bekommt seinen Trigger schon 1 μs vor dem Q-Switch, damit einige Punkte vor der Messung als Kontrolle aufgenommen werden.

Mit Hilfe des Phasenspektrums der DC-Messung lässt sich das Einkanalspektrum der AC-Messung bestimmen. Das Differenzspektrum berechnet sich hierbei nach Formel (4.1), wobei ΔI dem AC-STEP-SCAN-Spektrum und I_0 dem DC-STEP-SCAN-Spektrum entspricht.

$$\Delta_{abs} = -\log \left(1 + \frac{\Delta I}{I_0} \right) \quad (4.1)$$

Da die beiden STEP-SCAN-Spektren mit unterschiedlichen ADCs aufgenommen werden, die eine unterschiedliche Verstärkung haben, müssen die Intensitäten der Einkanalspektren zuvor noch aufeinander skaliert werden.²³⁴ Tabelle 4.1 zeigt die unterschiedlichen Skalierungsfaktoren für das DC-STEP-SCAN-Spektrum, aufgenommen mit dem internen ADC bei ± 10 V Eingangsspannung zum AC-STEP-SCAN-Spektrum, aufgenommen mit

TABELLE 4.1.: Skalierungsfaktoren für die DC-STEP-SCAN Messung bei unterschiedlichen Einstellungen des Transientenboards, mit dem die AC Messung aufgenommen wird.

Eingangsspannung Transientenboard	Skalierungsfaktor
$\pm 0,5V$	16,2
$\pm 1V$	7,6
$\pm 2V$	4,0
$\pm 5V$	1,6

dem Transientenboard bei $\pm 5V$, $\pm 2V$, $\pm 1V$ oder $\pm 0,5V$ Eingangsspannung. Desweiteren werden bei der AC- und der DC-STEP-SCAN-Messung unterschiedliche Aperturen (d.h. unterschiedliche IR-Lichtintensitäten) verwendet. Auch hierfür muss ein Skalierungsfaktor bestimmt werden. Dieser wird für jede Probe und Messung neu bestimmt, indem bei ansonsten exakt gleichen Einstellungen mit den beiden verwendeten Aperturen ein Spektrum gemessen wird.²³⁴

Zur Auswertung wird an dem gemessenen 3D-Datensatz ein *Global Fit* durchgeführt. Hierbei wird von einem sequenziellen Modell ausgegangen, d.h. es existieren nur irreversible Übergänge zwischen den im System vorkommenden Intermediaten (A,B,C...), die mit der dazugehörigen Zeitkonstante τ_i verschwinden (Formel (4.2))



Rück- oder Nebenreaktionen werden bei diesem Modell vernachlässigt.¹⁹⁷ Mathematisch kann dies als Summe von Exponentialfunktionen betrachtet werden (Formel (4.3)). Die darin vorkommenden Ratenkonstanten k_i werden gleichzeitig mit den dazugehörigen, wellenlängenabhängigen Amplituden a_i an den gemessenen Datensatz angepasst.²³⁶ Aus den Ratenkonstanten kann über $\tau=k^{-1}$ die Zeitkonstante bestimmt werden.

$$A(\lambda, t) = \sum_{i=1}^n a_i(\lambda) e^{-k_i t} \quad (4.3)$$

Zudem kann das Spektrum zu bestimmten Zeiten einem Intermediat zugeordnet werden. Dieses Programm für den *Global Fit* wurde von Víctor A. Lórenz Fonfría (FU Berlin) in MATLAB geschrieben und mir zur Anwendung zur Verfügung gestellt.

4.2. Kurze Einleitung in die Photochemie von *Bacteriorhodopsin*

Das Protein Bacteriorhodopsin (BR) befindet sich in der Zellmembran des salzliebenden Archaeobakteriums *Halobacterium salinarum*. Es ermöglicht einen alternativen Weg zur Atmungskette zur Herstellung eines Protonengradienten, indem es als lichtgetriebene Protonenpumpe fungiert.^{237;238} BR besteht aus 248 Aminosäuren und dem lichtabsorbierenden Chromophor Retinal (Abbildung 4.4).²³³ Dieses auch in Sehzellen vorkommende Molekül liegt im Grundzustand in einer *all-trans*-Konformation vor. Durch Lichtabsorption findet eine *all-trans*/*13-cis*-Isomerisierung statt.^{239–242} Das Umwandeln des *13-cis*-Isomers zurück in die *all-trans* Grundzustandsgeometrie bildet den Photozyklus des BRs, währenddessen ein Proton durch das Molekül hindurch auf die andere Seite der Membran transportiert wird.^{243;244} Durch die zeitabhängigen Farbänderungen des Retinals lässt

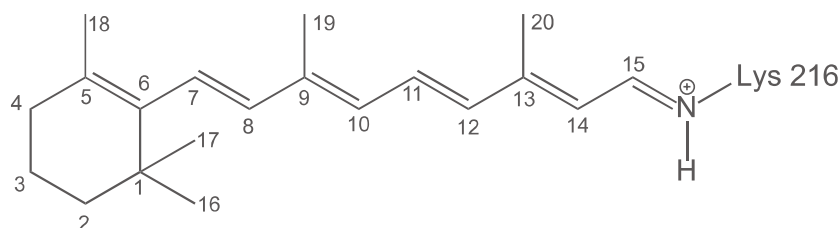


ABBILDUNG 4.4.: Struktur und Nummerierung von Retinal. Es ist über die Schiff'sche Base an die Aminosäure Lys 216 des Proteins gebunden.

sich der Photozyklus des BRs grob in verschiedene Intermediate einteilen (Abbildung 4.5).^{239;245;246} Im Folgenden werden diese kurz erläutert. Die Nomenklatur der Intermediate erfolgt über Großbuchstaben in alphabetischer Reihenfolge, beginnend bei J, und einem Index, der dem Absorptionsmaximum des Intermediates entspricht.^{233;239;245}

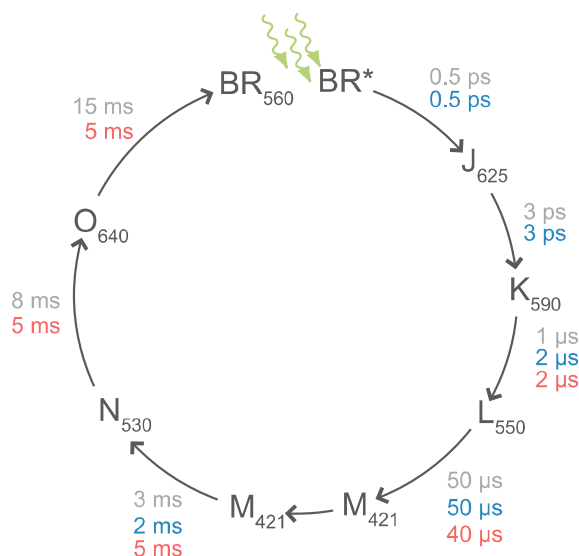


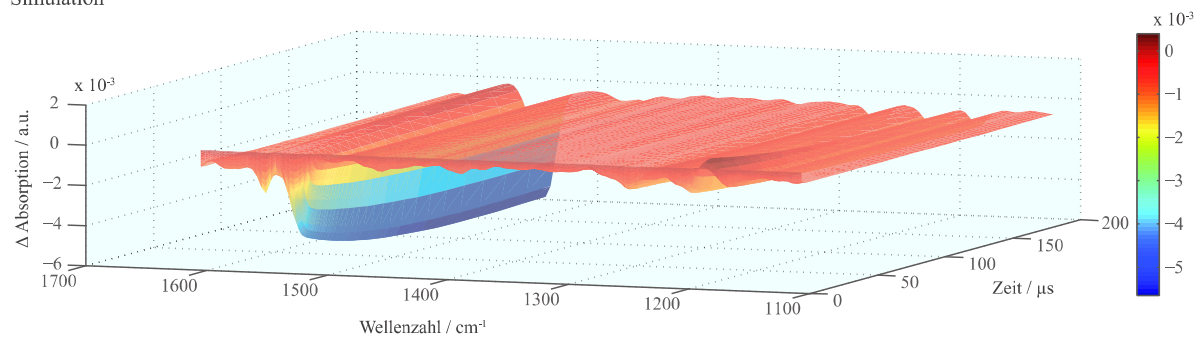
ABBILDUNG 4.5.: Photozyklus des BRs. An den Pfeilen ist jeweils die zugehörige Zeitkonstante angegeben; grau: nach Baldwin²³³, blau: nach Terentis et al.²⁴¹, rot: nach Subramaniam et al.²⁴⁶.

- $\text{BR}_{568} \rightarrow \text{J}_{625}$: Das Retinal befindet sich im Grundzustand, absorbiert ein Photon und dreht sich um die C13=C14-Doppelbindung. Es entsteht das *13-cis*-Isomer.²⁴⁷
- $\text{J}_{625} \rightarrow \text{K}_{590} \rightarrow \text{L}_{550}$: Es werden erste Änderungen im Spektrum sichtbar. Das Retinal gibt überschüssige Energie an die Umgebung ab.^{233;239;241}
- $\text{L}_{550} \rightarrow \text{M}_{412}$: Das Proton der sich im Protein befindlichen Schiff'schen Base wird zur Aminosäure Asp 85 verschoben. Die dadurch veränderte Elektronenstruktur ist durch die starke Blauverschiebung des Absorptionsmaximums erkennbar.^{233;248}
- $\text{M}_{412} \rightarrow \text{M}'_{412}$: Um eine Reprotonierung zu ermöglichen, orientiert sich die Schiff'sche Base zur cytoplasmatischen (intrazelluläre) Seite um. Dies ist nicht durch spektrale Änderungen sichtbar, weshalb der gleiche Buchstabe dieses Intermediat kennzeichnet.²³³
- $\text{M}'_{412} \rightarrow \text{N}_{530}$: Die Schiff'sche Base wird durch die Aminosäure Asp 96 wieder protoniert.²⁴⁹⁻²⁵¹
- $\text{N}_{530} \rightarrow \text{O}_{640}$: Die Aminosäure Asp 96 wird reprotoniert und das Retinal geht in den *all-trans*-Grundzustand zurück.²⁵²
- $\text{O}_{640} \rightarrow \text{BR}_{568}$: Die Aminosäure Asp 85 gibt ihr Proton ab. Damit ist das Protein wieder in den Grundzustand zurückgekehrt und der Photozyklus kann von neuem starten.²³³

4.3. Ergebnisse: AC-gekoppelte STEP-SCAN-Messung an *Bacteriorhodopsin*

Abbildung 4.6 zeigt das gemessene zeitaufgelöste IR-Spektrum von *Bacteriorhodopsin* sowie den dazugehörigen *Global Fit*. Es sind deutlich negative Banden (Grundzustandsbleach) und positive Banden erkennbar, wie von einem Differenzspektrum zu erwarten ist. Die Zeitauflösung beträgt 20 ns. Die Anregungswellenlänge lag bei 532 nm ($1,5 \text{ mJ cm}^{-1}$). An jeder Spiegelposition wurde 32 mal gemessen (8×4 Coadditionen). Der Skalierungsfaktor für die unterschiedlichen ADCs war 16,2 und für die unterschiedlichen Aperturen 43. Die aus dem *Global Fit* erhaltenen Zeitkonstanten τ sind in Tabelle 4.2 aufgelistet und passen gut zu den Literaturwerten.

Simulation



Messung

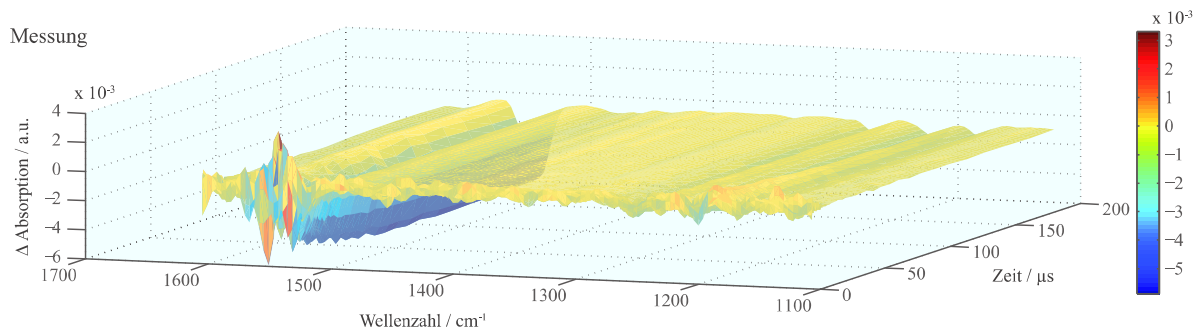


ABBILDUNG 4.6.: Messung und Simulation eines zeitaufgelösten IR-Spektrums von *Bacteriorhodopsin*.

TABELLE 4.2.: Zeitkonstanten aus dem *Global Fit* für die BR-STEP-SCAN-Messung im Vergleich zu verschiedenen Literaturwerten.

	Zeitkonstante / μs			
	eigene Messung	Baldwin ²³³	Terentis et al. ²⁴¹	Subramaniam et al. ²⁴⁶
τ_1	1,9	1	2	2
τ_2	63,5	50	50	40
τ_3	< 110	3000	2000	5000

Die Spektren zu den unterschiedlichen Zeiten (Abbildung 4.7) können verschiedenen Intermediaten im BR Photozyklus (Abbildung 4.5) zugeordnet werden. Zwischen 0.02 und

4.3. ERGEBNISSE: AC-GEKOPPELTE STEP-SCAN-MESSUNG AN *Bacteriorhodopsin*

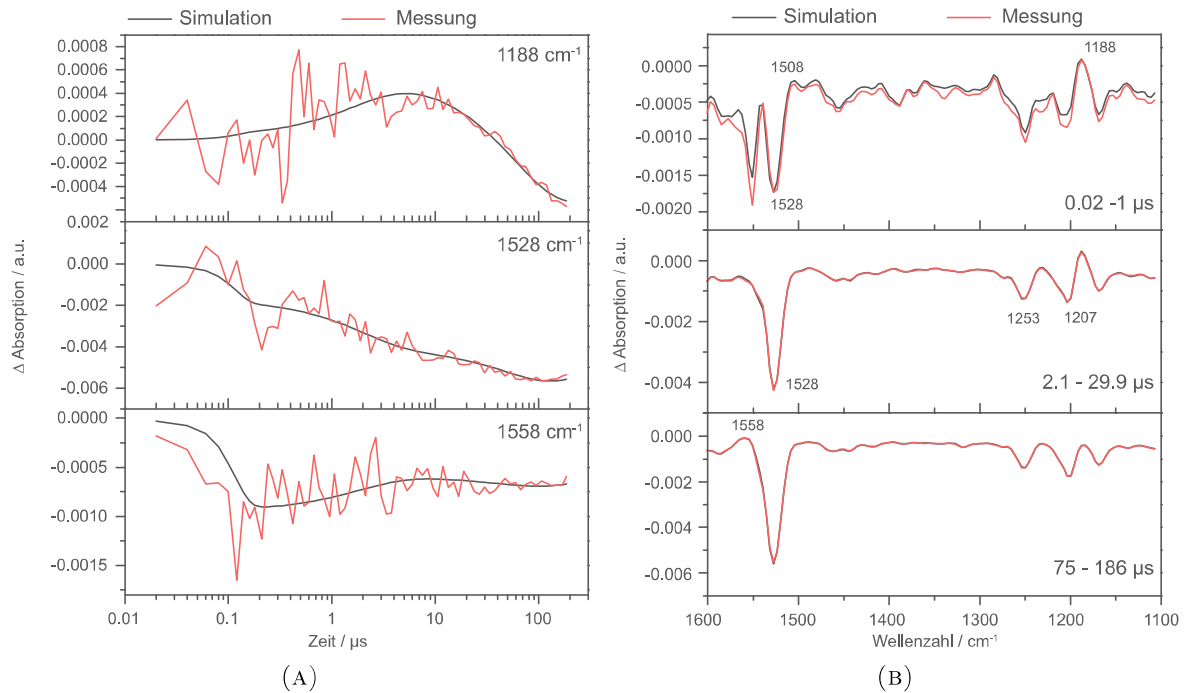


ABBILDUNG 4.7.: (A) Zeitlicher Verlauf der Banden bei 1188 cm^{-1} , 1528 cm^{-1} und 1554 cm^{-1} . (B) Gemittelte IR-Spektren (Messung und Simulation) zu den Zeiten, denen die Intermediate K, L und M des BRs dem Spektrum zugeordnet werden können: 0,02 - 1 μs : K-Intermediat; 2,1 - 29,9 μs : L-Intermediat; 75 - 186 μs : M-Intermediat.

TABELLE 4.3.: Bandenzuordnung der wichtigen IR Schwingungen des BRs mit Hilfe der Literatur²⁵³.

Bandenposition cm^{-1}		Zuordnung
Messung	Literatur ²⁵³	
1188	1189	C-C Streck Schwingung im <i>13-cis</i> Retinal
1253	1252	
1528	1526	C=C Streckschwingung Retinal vor Lichtanregung Amid II Schwingung
1558	1558	

1 μs liegt hauptsächlich das K-Intermediat vor. Im Bereich zwischen 2.1 und 29.9 μs passt das Spektrum zum L-Intermediat und das M-Intermediat ist zwischen 75 und 186 μs erkennbar. Zudem ist in Abbildung 4.7 zu sehen, dass der Fit mit der Messung gut übereinstimmt. Um dies auch beim zeitlichen Verlauf sichtbar zu machen, zeigt Abbildung 4.7 diesen, gemessen und simuliert, von wichtigen Banden. In Tabelle 4.3 ist eine Bandenzuordnung der Schwingungen mit Hilfe von Literaturdaten gezeigt. Diese stimmen gut mit der Messung überein. Die hier gezeigte Messung wurde nur bis 110 μs aufgenommen, weswegen τ_3 auch keinen größeren Wert annehmen kann.

Die Bande bei 1188 cm^{-1} kann einer C-C-Streckschwingung im protonierten *13-cis*-Retinal zugeordnet werden. Diese ist nach Zscherp et al.²⁵³ besonders gut im L- und N-Intermediat

sichtbar. Das Verhalten ist im zeitlichen Verlauf der Bande hier sichtbar, da sie bei 10 μs ein Maximum zeigt und anschließend immer mehr an Intensität verliert, wenn das L-Intermediat ins M-Intermediat übergeht. Die Bande bei 1528 cm^{-1} wird einer C=C-Streckschwingung im Retinal vor Lichtanregung zugeordnet und zeigt somit einen starken „Grundzustandsbleach“ während des ganzen Zyklus.²⁵³ Bei 1558 cm^{-1} befindet sich die Amid-II-Schwingung.²⁵³

Das im Verhältnis zur Literatur wenig intensive Signal der Messung ist auf die Probenpräparation zurückzuführen. Während der Messung wurden pH-Wert und Temperatur, sowie der Wassergehalt in der Probe nicht kontrolliert. Trotzdem zeigt das Experiment, dass die AC-gekoppelte STEP-SCAN-Messung funktioniert und so auf andere Systeme angewendet werden kann.

4.4. Triplett-Schwingungsspektrum von Xanthon

4.4.1. Ergebnisse

In Abbildung 4.8 sind erste zeitaufgelöste Messungen des Differenz-Schwingungsspektrums von Xanthon in CHCl_3 -Lösung gezeigt. Die Lösung (0,1 M) wurde während der ganzen Messung mit Stickstoff gespült, die Zeitauflösung beträgt 10 ns. Angeregt wurde mit der Wellenlänge 266 nm (12 mJ cm^{-1}) mit einer Wiederholrate von 10 Hz. An jeder Spiegelposition wurde über acht Messungen gemittelt. Der Skalierungsfaktor für die unterschiedlichen ADCs lag bei 16,2 und für die unterschiedlichen Aperturen bei 46,3. Um Temperaturdrifts im Spektrum zu minimieren, wurde die Lösung mit einem Thermostaten (Julabo F12) auf 18°C konstant gehalten. Über eine HPLC- (High-performance Liquid Chromatography) Pumpe (Knauer Smartline PUMP 100) wurde die Lösung durch Teflonschläuche in die CaF_2 -Zelle mit einer Schichtdicke von $146 \mu\text{m}$ gepumpt. Die Pumpgeschwindigkeit lag bei 2 ml/min .

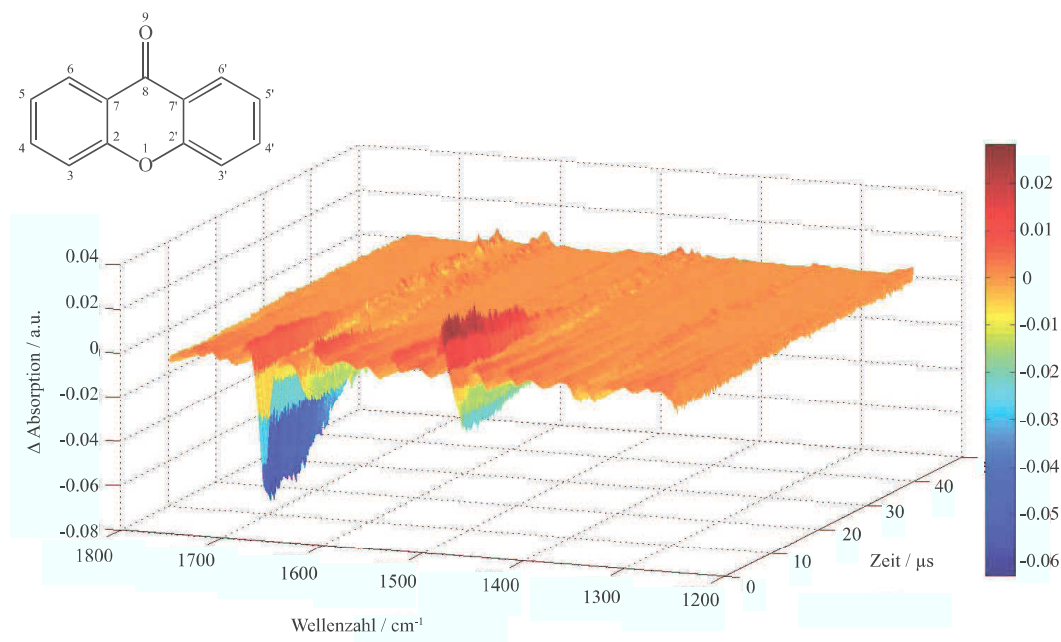


ABBILDUNG 4.8.: Zeitaufgelöstes Differenz-Schwingungsspektrum von Xanthon in Chloroform (0,1 M).

Das gemessene Differenzspektrum besitzt positive und negative Banden. Negative Banden liegen bei 1655 cm^{-1} und 1460 cm^{-1} vor und zeigen einen Grundzustandsbleach an. Bei 1481 cm^{-1} ist eine positive Bande sichtbar, die einem angeregten Zustand, vermutlich dem niedrigsten Triplett-Zustand zuzuordnen ist. Zur besseren Zuordnung der Banden und Interpretation des Spektrums wurden auch quantenchemische Rechnungen am S_0 -Zustand von Xanthon sowie an der Triplett-Geometrie durchgeführt (DFT/B3LYP/TZVP). Abbildung 4.9 zeigt das berechnete Grundzustandsspektrum (unskaliert, gefaltet mit 5 cm^{-1}) im Vergleich zum gemessenen Grundzustandsabsorptionsspektrum. Die berechneten Frequenzen sind alle leicht zu größeren Wellenzahlen verschoben. Bei 1655 cm^{-1} in der Messung und 1718 cm^{-1} in der Rechnung ist die C=O -Streckschwingung der Carbonylgruppe

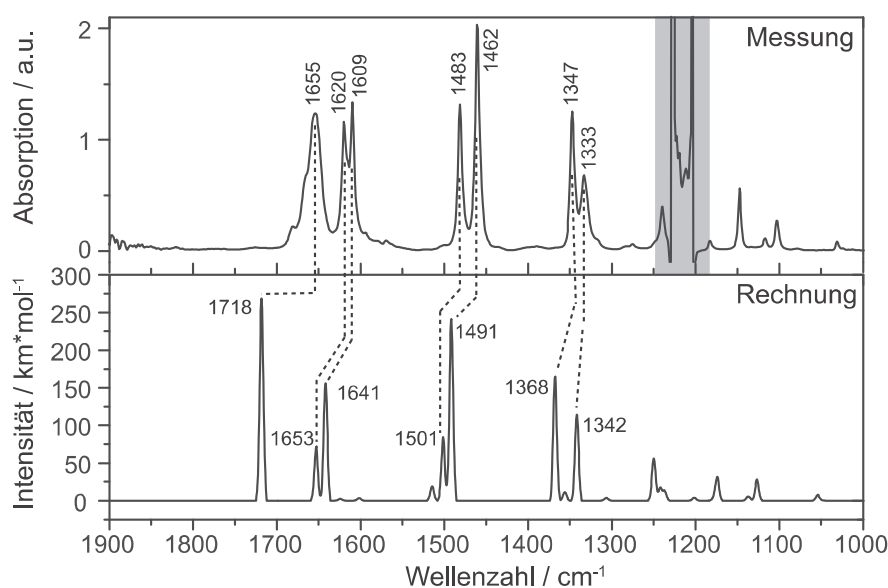


ABBILDUNG 4.9:
Vergleich zwischen dem gemessenen und berechneten (DFT/B3LYP/-TZVP, gefaltet mit 5 cm^{-1}) Grundzustandsspektrum von Xanthon. In grau unterlegt sind die C-H-Schwingungen des Lösemittels (Chloroform).

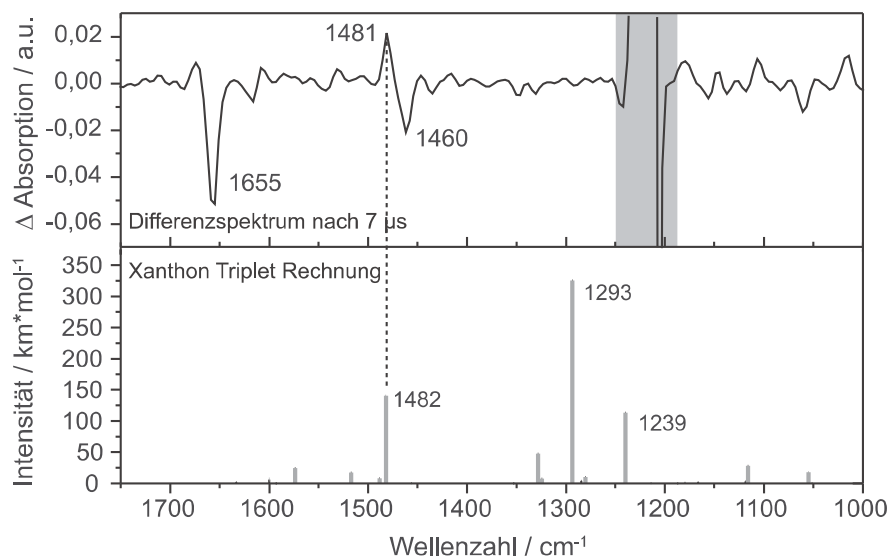


ABBILDUNG 4.10:
Vergleich zwischen dem gemessenen Differenzspektrum nach $7\text{ }\mu\text{s}$ und dem berechneten (DFT/B3LYP/-TZVP) Triplett-Spektrum von Xanthon. In grau unterlegt sind die C-H-Schwingungen des Lösemittels (Chloroform).

zu finden. Die Frequenzen 1620 cm^{-1} und 1609 cm^{-1} im Experiment lassen sich C-C-Ringdeformationsschwingungen zuordnen. C-H-Knickschwingungen sind bei 1483 cm^{-1} (hauptsächlich am C4, C4', C5 und C5') und 1460 cm^{-1} (hauptsächlich am C3, C3', C6 und C6') in der Messung zu finden. Die Banden bei 1347 cm^{-1} und 1333 cm^{-1} sind Gerüstschwingungen.

Im gemessenen zeitaufgelösten Differenzspektrum (Abbildung 4.8) sind negative Banden bei exakt den gleichen Frequenzen sichtbar (1655 cm^{-1} und 1460 cm^{-1}), sodass diese Banden eindeutig dem Grundzustandsbleach zugeordnet werden können.

In Abbildung 4.10 ist das gemessene Differenzspektrum nach $7\text{ }\mu\text{s}$ im Vergleich zum berechneten Triplett-Spektrum des Xanthons gezeigt. Die gemessene positive Bande bei 1481 cm^{-1} passt hervorragend zur berechneten Frequenz des Triplett-Spektrums bei 1482 cm^{-1} , was einer C-H-Gerüstschwingung zugeordnet werden kann. Die berechnete Bande bei 1293 cm^{-1} mit hoher Intensität ist eine gekoppelte C-C- und C=O-Schwingung an der Carbonylgruppe und den benachbarten Kohlenstoffatomen. Bei 1239 cm^{-1} sind C-H-

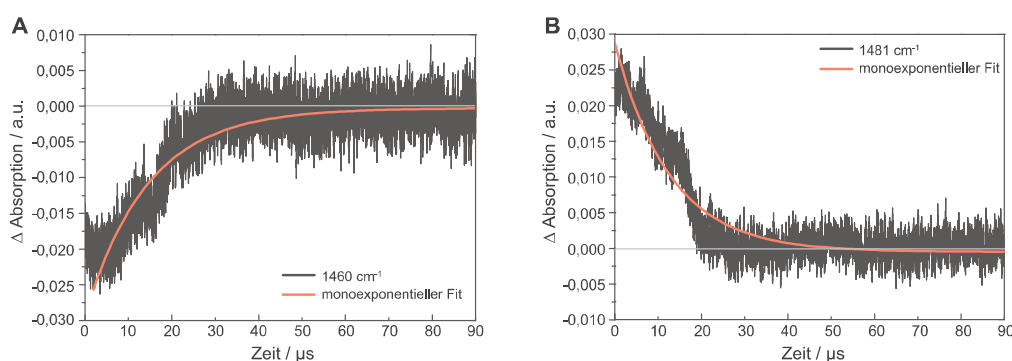


ABBILDUNG 4.11.: A: Zeitlicher Verlauf der negativen Bande bei 1460 cm^{-1} und der dazugehörige monoexponentielle Fit mit einem τ von $14,3\text{ }\mu\text{s}$. B: Zeitlicher Verlauf der positiven Bande bei 1481 cm^{-1} und der dazugehörige monoexponentielle Fit mit einem τ von $12,7\text{ }\mu\text{s}$. Die Lösung wurde während der Messung mit Stickstoff gespült.

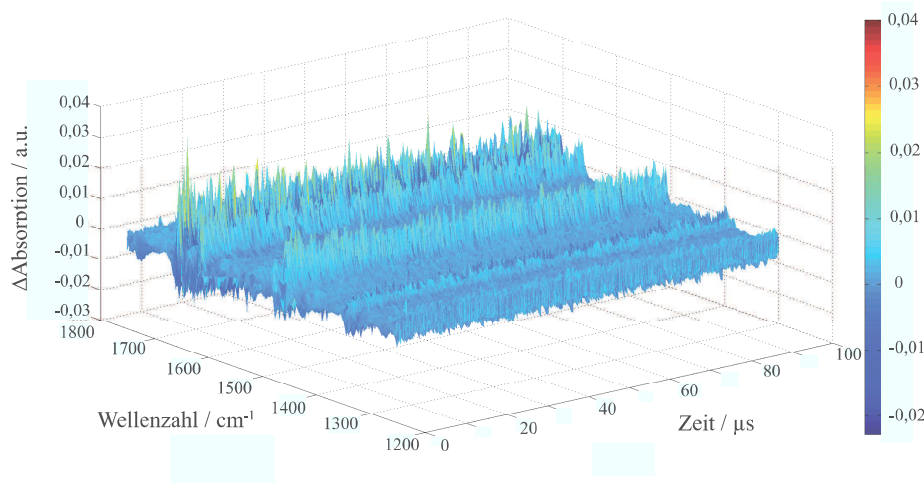


ABBILDUNG 4.12.: Zeitaufgelöstes Schwingungsspektrum von Xanthon in Chloroform ($0,1\text{M}$). Die Lösung wurde während der Messung mit Sauerstoff gespült. Eine zeitliche Änderung des Spektrums ist nicht mehr zu erkennen.

Knickschwingungen im Triplett-Zustand zu finden. Die beiden letzteren Banden sind in der Messung nicht erkennbar. Vermutlich sind sie im Vergleich zur Rechnung zu kleineren Wellenzahlen verschoben und werden von den C-H-Schwingungen des Chloroforms (Lösungsmittel, Abbildung 4.9 und 4.10) überlagert.

Der zeitliche Verlauf der Banden bei 1481 cm^{-1} und 1460 cm^{-1} ist in Abbildung 4.11 dargestellt. Beide Verläufe wurden mit monoexponentiellen Funktionen angepasst. Dabei ergibt sich für die Bande bei 1481 cm^{-1} eine Lebensdauer τ von $12,7\text{ }\mu\text{s}$ und für die Bande bei 1460 cm^{-1} ein τ von $14,3\text{ }\mu\text{s}$. Spült man die Lösung während der Messung mit Sauerstoff, so unterscheidet sich das gemessene Spektrum stark von dem mit Stickstoff gespültem. Eine zeitliche Änderung im Spektrum ist im zeitlichen Beobachtungsfenster nicht zu beobachten, wie in Abbildung 4.12 gezeigt ist. Im Bereich der Grundzustandsabsorption ist hierbei nur noch erhöhtes Rauschen erkennbar, was mit der hohen Konzentration der Lösung erklärt werden kann.

4.4.2. Diskussion

Die quantenchemischen Rechnungen sowie die Tatsache, dass das Spektrum in Gegenwart von Sauerstoff nicht gemessen werden kann, zeigen, dass hier das Schwingungsspektrum des Triplett-Zustandes des Xanthon in Chloroform gemessen wurde. Auch schon bekannte Triplett-Messungen von Xanthon in der Gasphase zeigen drei prominente Schwingungen des T_1 -Zustandes bei 1459 cm^{-1} , 1306 cm^{-1} und 1274 cm^{-1} , die gut zu diesen Messungen in Chloroform passen.²⁵⁴ Bemerkenswert ist die große Verschiebung der Carbonylschwingung um 425 cm^{-1} in der Rechnung zu kleineren Wellenzahlen im Triplett-Zustand (von 1718 cm^{-1} nach 1293 cm^{-1}). Dies wurde auch in den Gasphasenmessungen von Bartl et al.²⁵⁴ gefunden. Dort beträgt die Verschiebung 417 cm^{-1} . Dies ist auf eine Geometrieänderung vom S_0 -Zustand zum T_1 -Zustand zurückzuführen, wobei sich die C=O-Bindung verlängert, was zu einer niedrigeren Schwingungsfrequenz führt.²⁵⁴

Der gemessene Triplett-Zustand wird dem T_1 -Zustand mit $\pi\pi^*$ -Charakter zugeordnet. Messungen im Femto- und Pikosekundenbereich von Xanthon in Ethanol zeigen, dass die Anregung zunächst in einen Singulett-Zustand mit $\pi\pi^*$ -Charakter erfolgt, woraus in Übereinstimmung mit der El-Sayed-Regel ISC in den $^3n\pi^*$ -Zustand mit $\tau=1,5\text{ ps}$ stattfindet.⁶⁰ Aus diesem T_2 -Zustand erfolgt nach Schwingungsrelaxation der elektronische Übergang in den T_1 -Zustand ($\pi\pi^*$ -Charakter) mit $\tau=12\text{ ps}$.⁶⁰ Da das IR-Triplett-Spektrum mit einer Zeitauflösung von 10 ns gemessen wurde, haben diese Prozesse schon stattgefunden und das Xanthon befindet sich zu Beginn der Messung im T_1 -Zustand.

Die Triplett-Lebensdauer von Xanthon in Chloroform liegt zwischen $12,7\text{ }\mu\text{s}$ und $14,3\text{ }\mu\text{s}$. Diese recht langen Lebensdauern sind in guter Übereinstimmung mit gemessenen Triplett-Lebensdauern von Xanthon über zeitaufgelöste UV-Vis-Messungen.⁶¹ So beträgt die Triplett-Lebensdauer in Acetonitril $8,3\text{ }\mu\text{s}$, in einem Acetonitril/Wasser Gemisch $17,2\text{ }\mu\text{s}$, in Methanol $1,3\text{ }\mu\text{s}$ und in Tetrachlorkohlenstoff $0,7\text{ }\mu\text{s}$.⁶¹ In reinem Wasser wurde eine Halbwertszeit $t_{1/2}$ des Triplett-Zustandes von $30\text{ }\mu\text{s}$ gefunden.⁶⁶ Da in der hier gemessenen Xanthon-Chloroformlösung auch Wasserreste vorliegen, ist die lange Triplett-Lebensdauer durchaus realistisch.

Die monoexponentielle Anpassung an die gemessenen Zeitverläufe der Banden im Differenzspektrum (Abbildung 4.11) geben den experimentellen Verlauf nicht exakt passend wieder. Die Abnahme der Banden verläuft im Bereich zwischen ungefähr $5\text{ }\mu\text{s}$ und $20\text{ }\mu\text{s}$ eher linear als exponentiell. Dies kann zum einen an einem Sättigungseffekt liegen, da die Xanthonlösung sehr hoch konzentriert war und in der stationären IR-Absorption die Banden eine Intensität über eins hatten (Abbildung 4.9). Zum Anderen könnte es auch ein Artefakt durch das Umpumpen der Lösung während der Messung sein, da nicht für jede neue Anregung (10 Hz) bei der gewählten Pumpgeschwindigkeit (2 ml/min) die Lösung komplett ausgetauscht wird. Da dies hier erste STEP-SCAN-Messungen des Xanthon in Chloroform sind, muss für weitere Messungen das System weiter optimiert werden. Aus diesem Grund sind die hier beschriebenen Ergebnisse zunächst als grobe Richtwerte zu sehen.

Trotzdem zeigt das STEP-SCAN-Experiment an Xanthon in Chloroform, dass die Messung von IR-Triplett-Spektren möglich ist. Über diese ist bis jetzt noch wenig bekannt, obwohl sie besonders struktursensitiv sind und detaillierte Informationen über Geometrieänderungen geben. Deshalb sollen mit der hier vorgestellten Methode in Zukunft noch weitere Messungen von Triplett-Spektren und eventuell radikalischen Zwischenprodukten von photochemischen Reaktionen gemessen werden.

5. Photochemie von DNS-Basen

5.1. DNA photoreacts by nucleobase ring cleavage to labile isocyanates

LAURA BUSCHHAUS*, JOSEFIN ROLF* AND KARL KLEINERMANN*^{*}

^{*}INSTITUTE OF PHYSICAL CHEMISTRY, HEINRICH-HEINE UNIVERSITY DUESSELDORF, 40225 DUESSELDORF, GERMANY

accepted *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013.

5.1.1. Abstract

Differential infrared absorption spectroscopy was used to study the formation of isocyanates and further photo-products in the oligonucleotides dG₁₀, dC₁₀ and dT₁₀ and in their mononucleosides by ultraviolet light at 266 nm. We find that α -cleavage takes place in oligonucleotides and mononucleosides both in films and in solution. The very intense and spectrally isolated isocyanate (N=C=O) asymmetric stretch vibration at 2277 cm⁻¹ is used as spectroscopic marker for detection of the photo-product. The band disappears upon reaction with small amounts of water vapour as expected for isocyanates. Quantum yields for isocyanate formation by nucleobase ring cleavage in α -position to the carbonyl group are $\approx 5 \cdot 10^{-5}$ in the mononucleosides and up to $5 \cdot 10^{-4}$ in the oligonucleotides. In the mixed oligonucleotides dG₁₀/dC₁₀ and dA₁₀/dT₁₀ the quantum yield of α -cleavage drops by a factor of 10 compared to the single oligonucleotides. Implications for DNA repair and photo-induced DNA-protein cross-linking via isocyanate reaction with NH₂ groups of amino acids are discussed.

5.1.2. Introduction

DNA exhibits a number of strategies to minimize UV radiative damage. UV-excited DNA bases are known to undergo ultrafast internal conversion to the electronic ground state on the timescale of one picosecond or less^{38;255-257} similar to the function of many UV sunscreens.²⁵⁸ This process converts electronic energy to heat which can be safely dissipated to the environment, thus preventing photo-reactions that could lead to DNA degradation. DNA strands generally show somewhat longer excited state lifetimes of 10-100 ps due to exciplex formation between neighboring nucleobases in the helix.²⁵⁹ Despite the rapid non-reactive decay photo-lesion proceeds in DNA. The most important currently known photo-chemical process is cycloaddition of thymine bases adjacent in the helix to cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) with 2-3 % quantum yield.^{20;21;33;260;261} Metabolically costly enzyme based repair mechanisms are necessary to restore the genetic sequence and prevent mutagenic damage.⁴⁰ Other less abundant photo-products are pyrimidine (6-4) pyrimidone photo-adducts or rather their dewar valence isomers^{24;262} and formation of hydrates and alkali-labile sites.²⁶³ Further sources of damage include singlet oxygen oxidation and nucleobase electron transfer followed by proton loss and consecutive reactions of the (nucleobase-H)-radical.^{22;264}

In this work we report a new photo-degradation pathway: UV-induced ring cleavage in the α -position to the carbonyl group of guanosine, cytidine and thymidine leading to conjugated isocyanates both in films of DNA strands and mononucleosides and in no-

aqueous guanosine solution. The photo-products react irreversibly with water or with amine groups of amino acids to secondary products like amines or urea derivatives so that repair is probably impossible and persistent genetic damage results.

5.1.3. Materials and methods

Sample preparation

All films were prepared on CaF_2 -windows (International Crystal Laboratories, Garfield USA). For the monomer films 2.4 μmol of the trisilylated guanosine or cytidine (for structure and synthesis see figure S1 in the supporting information (SI)) were solved in 250 μl chloroform, adenosine and thymidine (each 2.4 μmol) were solved in 250 μl water and the solution was deposited on the window with a pipette. After several minutes the solvent was evaporated, leaving a dry film on the window. For the desoxyoligonucleotide-films 60 nmol dG₁₀, dC₁₀, dA₁₀ or dT₁₀ (Purimex, Germany) in 300 μl water were deposited on a window with a pipette and evaporated under a flux of dry air. For the monomer GC films 1.2 μmol G and 1.2 μmol C were solved in 250 μl chloroform. For the monomer AT films 1.2 μmol A and 1.2 μmol T were solved in 250 μl water. Again the solution was deposited on the window and the solvent evaporated. For the dG₁₀/dC₁₀ and dA₁₀/dT₁₀ films 30 nmol of each dG₁₀ and dC₁₀ or dA₁₀ and dT₁₀ were mixed in 300 μl water respectively. The solution was deposited on a window with a pipette and evaporated under a flux of dry air. The film thickness was determined with a micrometer gauge. It ranged from 6 μm to 15 μm for the monomer films and from 3 μm to 8 μm for the DNA films.

FTIR spectroscopy

FTIR spectroscopy was performed using a Vertex 80V spectrometer (Bruker, Ettlingen, Germany) with a MCT detector. All samples were measured in transmission mode in vacuum (2.5 mbar) and at room temperature. 1024 scans in the forward backward mode were averaged for each spectrum with a spectral resolution of 2 cm^{-1} . The photo-reaction was induced by the fourth harmonic of a Nd:YAG laser (INDI, Spectra Physics, Darmstadt, Germany) at 266 nm with a pulse width of 10 ns and a repetition rate of 10 Hz. The excitation energy was adjusted to 3 mJ/cm^2 . A broadband interference filter (Bruker, 4000-900 cm^{-1}) was used in front of the detector to block laser stray light. Light-induced FTIR difference spectra were obtained by calculating the negative common logarithm of the ratio of the single channel spectra after and before illumination. The single channel spectra were recorded without background correction. These bright-minus-dark IR difference spectra were determined at several positions on the same film and reproduced with different films.

DFT calculations

All calculations were performed at the DFT/TZVP level of theory using the B3LYP basis sets from the Turbomole program package.^{201–203;265} Calculated harmonic frequencies were scaled by 0.957 in order to match the experimental C=O stretch vibration of the

cytidine film. Since adenosine does not contain a carbonyl group, the calculated harmonic frequencies were scaled here by 0.993 in order to match the experimental NH stretch vibrations. For comparison of the calculated spectra with the measurements, difference spectra were simulated by subtraction of the calculated educt absorbance spectrum (guanine, cytosine, adenine or thymine) from the calculated product spectra. The stick spectra were convoluted with a Gaussian (FWHM=15 cm⁻¹). The intensities were not normalized but displayed with the calculated oscillator strengths. For taking solvent effects of water into account quantum chemical calculations on the DFT/TZVP/B3LYP level using the COSMO framework^{227;266;267} were performed. The calculated harmonic frequencies were scaled by 0.995 in order to match the experimental C=O stretch vibration of the thymidine film, which was made of a water solution.

5.1.4. Results and Discussion

Figure 5.1 shows the in vacuo recorded Fourier-Transform-Infrared (FTIR) difference spectra of films of 2',3',5'-O-tris(tert-butyldimethylsilyl)guanosine (G), the likewise derivatized cytidine (C) (used for a better solubility) and the mixed GC film obtained from evaporation of a CDCl₃ solution on a CaF₂ substrate. The derivatives are henceforth called G and C, see figure 5.7 in the supporting information (SI) for their structure. The G derivative here used is known to form ribbon-like aggregates.^{264;268} There are two possible structures: ribbon I with HNH...O=C and NH...N double hydrogen bonds, which is the dominating motif in n-hexane and ribbon II with HNH...N and NH...O=C interactions in CHCl₃.^{264;268} Our IR data show that in the G film both ribbon I and ribbon II motifs exist. A very similar C derivative was studied in CDCl₃ by Biemann et al..¹⁷³ This derivative shows mainly dimer structures with NH...N double hydrogen bonds in the used low concentration range. Because of the very high complex formation constant of Watson-Crick GC base pairs compared to the dimerisation constants of C and G alone, we assume preferential formation of the Watson-Crick motif in mixed GC films.²⁶⁹ Our IR spectra indeed show the absence of the free C=O stretch vibration of the C dimer (1663 cm⁻¹) in mixed GC films. That points to aggregate formation between G and C with a hydrogen bonded C=O stretch vibration of C measured at 1649 cm⁻¹ (see Fig. 5.8 in the SI) as expected for the Watson-Crick base pair.

The spectra (Fig. 5.1) are displayed as difference plots before and after irradiation at 266 nm for the times indicated. Negative absorbance points to disappearing educt bands, positive absorbance to emerging product bands. The very intense and spectrally isolated antisymmetrical isocyanate (N=C=O) stretch vibration at 2277 cm⁻¹ is used as spectroscopic marker for detection of the photo-product. Further positive bands from other photo-products (see Fig. 5.2 and 5.3) develop at above 1700 cm⁻¹ and below 1600 cm⁻¹. Comparison of possible calculated product minus educt vibrational difference spectra and the experimental IR difference spectra of G and C (Fig. 5.2 and 5.3) shows unambiguously the formation of isocyanates via the marker band at 2277 cm⁻¹.²⁷⁰ The proposed mechanisms for isocyanate formation in G and C are displayed in the insets of figure 5.1. Addition of O₂ did not significantly influence the isocyanate product yield.

The product bands at 1730 cm⁻¹ and 1658 cm⁻¹ in the G-film can be tentatively assigned to the C=O and C=N stretch vibrations of the imino-oxo tautomer which arises from hydrogen transfer from the NH₂ group to the neighbouring N-atom upon UV excitation,

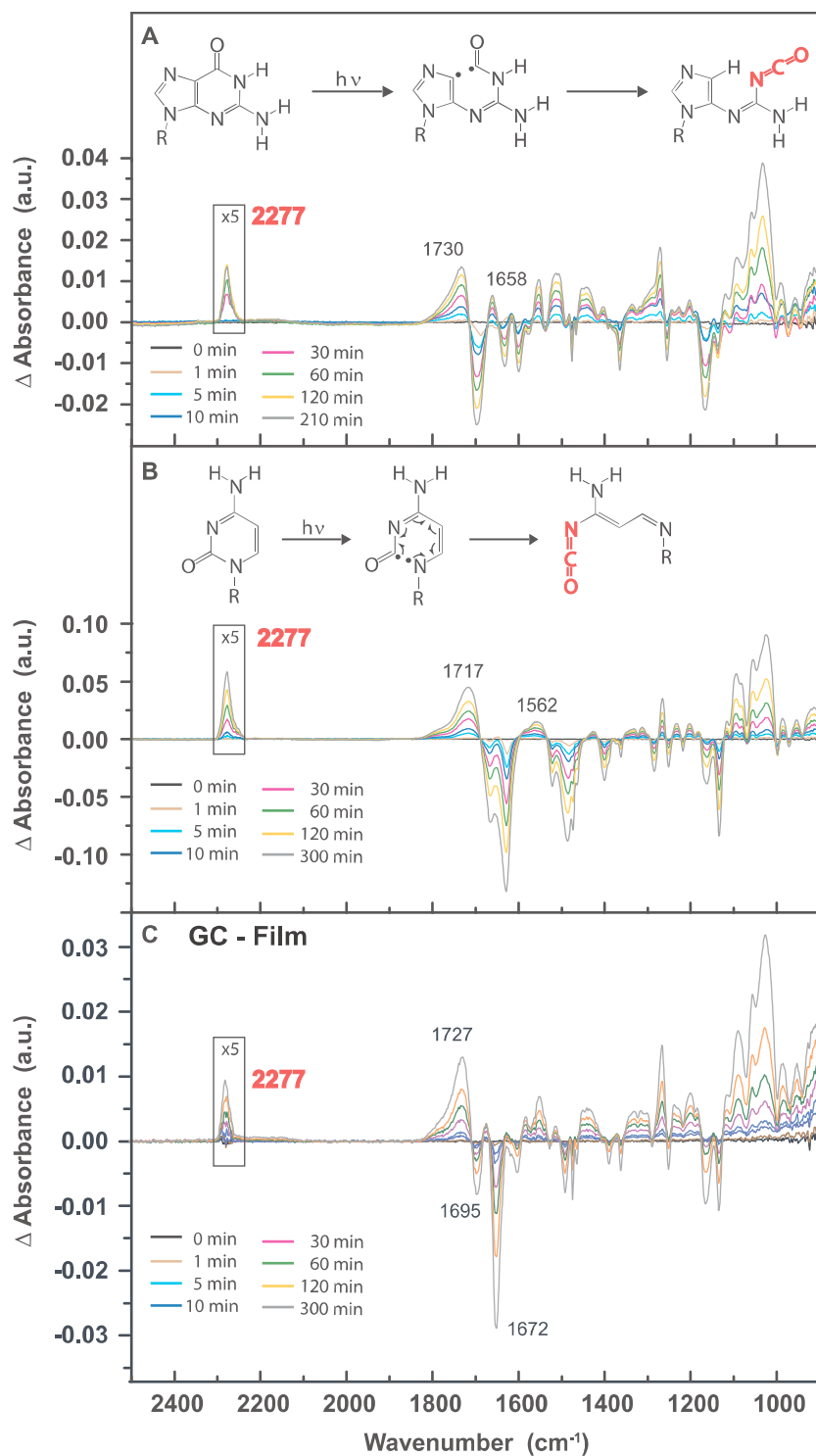


ABBILDUNG 5.1: A: Difference IR absorption spectra obtained upon irradiation of a dry film of G aggregate with 266 nm light at different exposure times. B: Difference IR absorption spectra obtained upon irradiation of a dry film of C aggregates with 266 nm light at different exposure times. C: Difference IR absorption spectra obtained upon irradiation of a dry film of mixed GC with 266 nm light at different exposure times. Marker band for isocyanate formation is the antisymmetric stretch vibration of the $\text{N}=\text{C}=\text{O}$ group at 2277 cm^{-1} . Proposals of mechanisms for isocyanate formation in G and C by Norrish I α -cleavage are shown in the insets. Further product bands (positive A) show up in the region of the $\text{C}=\text{O}$ stretch vibration at above 1700 cm^{-1} and below 1600 cm^{-1} , see text. The spectral region between 2220 cm^{-1} and 2300 cm^{-1} is enlarged by a factor of 5.

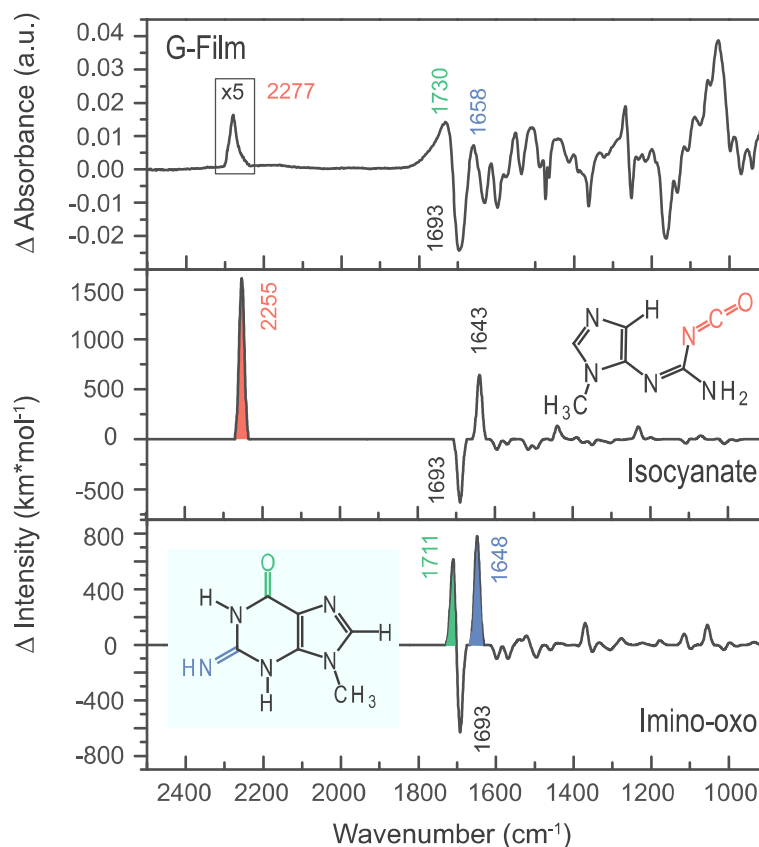


ABBILDUNG 5.2.: Comparison of the experimental difference IR absorption spectrum of the G mononucleoside film (Fig. 5.1) with difference vibrational spectra calculated for the most probable photo-products. The spectral region between 2220 cm^{-1} and 2300 cm^{-1} in the experiment is enlarged by a factor of 5. The calculated frequency of the isocyanate vibration for G is 2255 cm^{-1} and fits well to the measured value of 2277 cm^{-1} . Other photo-products than the isocyanate product do not show any bands in this spectral region. The measured spectrum exhibits a positive band at 1730 cm^{-1} which can be assigned to a C=O stretch vibration of a photo-product. This band cannot be explained by isocyanate formation, since this product does not contain a carbonyl group. Therefore it is evident that further photo-products are formed, possibly the imino-oxo tautomer, which features a C=O stretch vibration at 1711 cm^{-1} and a C=N stretch vibration at 1648 cm^{-1} according to the calculations. This is in agreement with the observed broad product feature at 1730 cm^{-1} and 1658 cm^{-1} .

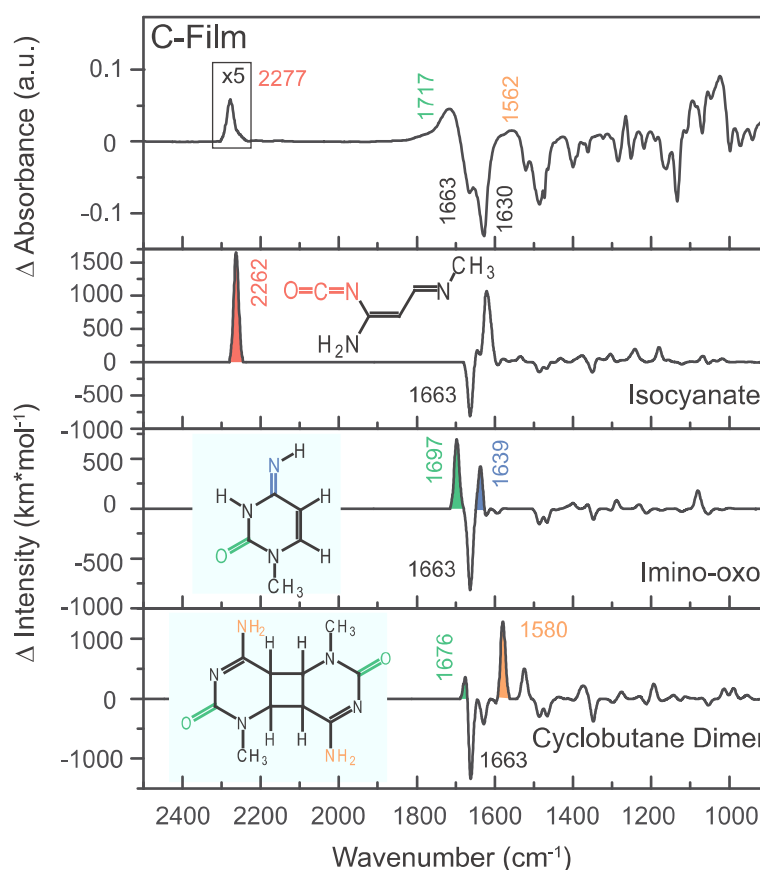


ABBILDUNG 5.3.: Comparison of the experimental difference IR spectrum of a C mononucleoside film (Fig. 5.1) with difference vibrational spectra calculated for the most probable photo-products. The spectral region between 2220 cm^{-1} and 2300 cm^{-1} in the experiment is enlarged by a factor of 5. The calculated frequency of the isocyanate vibration in C at 2262 cm^{-1} fits well to the measured one at 2277 cm^{-1} . No distinction between the different isocyanate isomers²⁷⁰ is possible because they show very similar spectral features and frequencies. Other possible photo-products do not show IR bands in this spectral region. The experimental spectrum exhibits a positive band at 1717 cm^{-1} which can be assigned to a photo-product carbonyl vibration. Therefore it is evident, that some other photo-products are formed e.g. the imino-oxo tautomer and/or the cyclobutane dimer. Further products cannot be excluded.^{22;263;271–273}

see figure 5.2.

The band at 1562 cm^{-1} in the C-film can be assigned to the NH bending vibrations of the NH_2 -groups of the cyclobutane dimers,²⁷¹ see also figure 5.3. The new C=O stretch vibration at 1717 cm^{-1} fits well with the calculated carbonyl frequency (1697 cm^{-1}) of the imino-oxo tautomer (Fig. 5.3). The region below 1600 cm^{-1} in both films shows too many partially overlapping product and educt bands for identification. Further products (for G see Fig. 5.9) can therefore not be excluded.

The isocyanate band is also observed in films of T (thymidine, Fig. 5.7) and mixed AT (Fig. 5.4). These films were made from evaporation of a water solution. Due to the missing carbonyl group isocyanate photo-product formation in A (adenosine, Fig. 5.7) is not possible. We assume that the films consist of T and A dimers and higher aggregates. Similar to

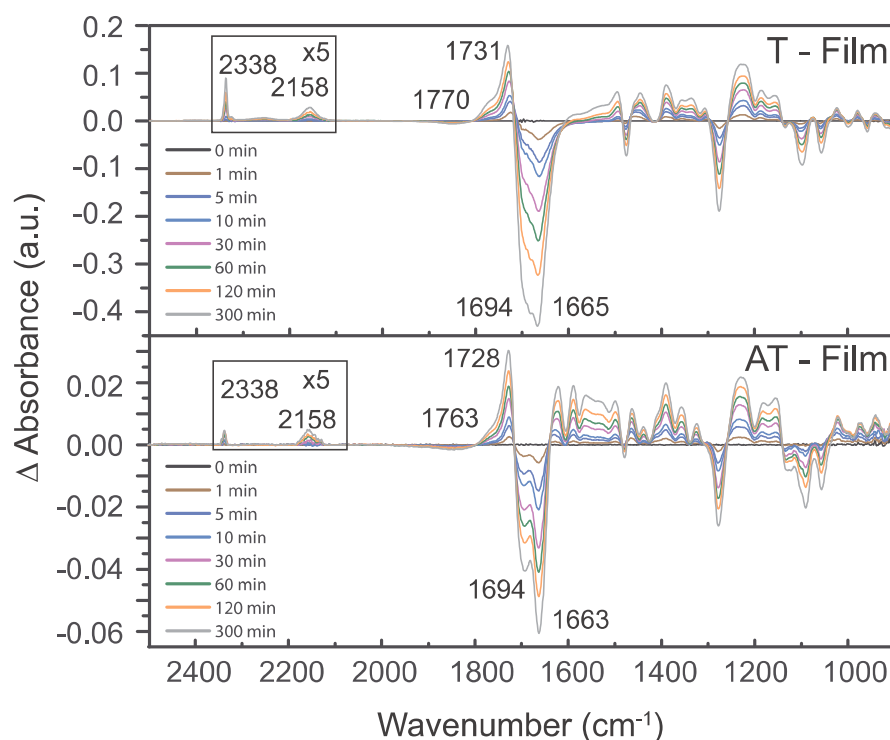


ABBILDUNG 5.4: Difference IR absorption spectra obtained upon irradiation of T and AT films with 266 nm light at different exposure times. The spectral region between 2220 cm^{-1} and 2300 cm^{-1} in the experiment is enlarged by a factor of 5.

mixed GC films, we assume Watson-Crick base pair formation in the mixed AT film due to the higher association constant of AT compared to AA and TT.²⁷⁴ The band assignment for nonradiated G, C, A and T films is shown in table 5.2 to table 5.5. All quantum chemical calculations for T photo-products were done on the DFT/TZVP/B3LYP level using the COSMO framework to take solvent effects of water into account. In the T monomer the frequency calculated for the isocyanate vibration is at 2300 cm^{-1} (Fig. 5.5) and fits well with the measured one at 2338 cm^{-1} . Compared to the isocyanate vibration of G and C the frequency is shifted 61 cm^{-1} to the blue in the T film. An explanation could be the different solvents, chloroform in the case of G and C and water in the case of T, from which the films are made. We observed similar blue shifts for the $\text{N}=\text{C}=\text{O}$ stretch vibration in dG₁₀ and dC₁₀ oligonucleotide films made from an aqueous solution (Fig. 5.6). The films most likely are not completely dry and some water molecules form hydrogen bonds to the isocyanate photo-product. There is no significant amount of free water in the film, because a broad band at 3500 cm^{-1} , characteristic for bulk water, is not observed in the IR spectra. The water molecules are rather hydrogen bonded hydrate water, which is known to be very difficult to remove. Compared to the quantum chemical calculations using the COSMO framework (for H₂O), the isocyanate frequencies calculated without the COSMO framework are shifted to the red by 60 cm^{-1} , which is in good agreement with the experiment.

No distinction between the different isocyanate isomers of T is possible. Other photo-products do not show any bands in this spectral area. The measured spectrum shows a positive band at 1731 cm^{-1} with a shoulder at 1770 cm^{-1} which can be assigned to a photo-product carbonyl vibration. Deconvolution of this band show three contributions at 1728 cm^{-1} , 1736 cm^{-1} and 1761 cm^{-1} . Therefore, further photo-products must be formed, e.g. the cyclobutane dimer, the (6-4) adduct and as a secondary photo-product the dewar valence isomer (Fig. 5.5), which exhibits a strong blue shift of one carbonyl group.^{20;24;275}

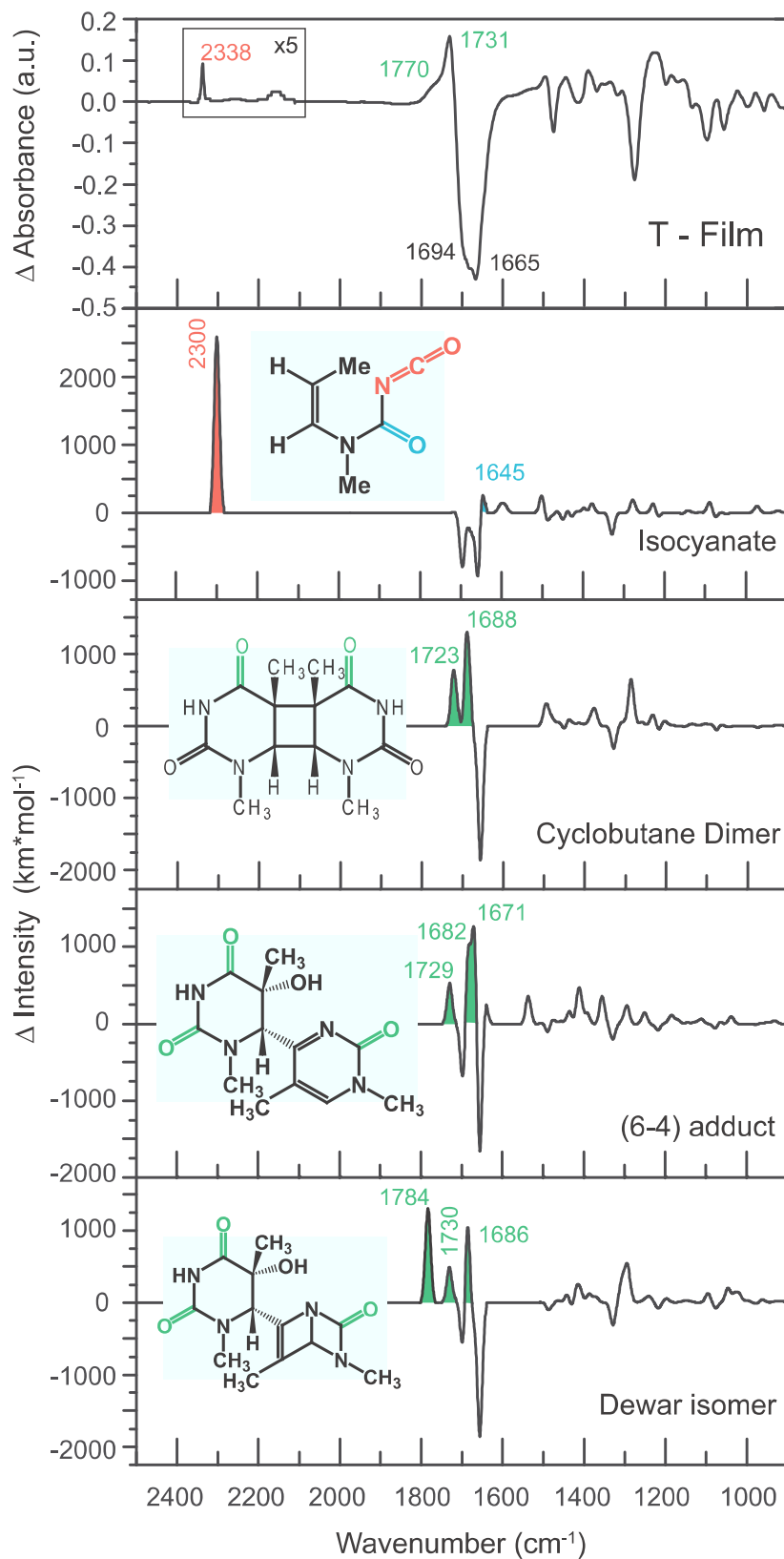


ABBILDUNG 5.5:
Comparison of the experimental difference IR absorption spectrum of a T film with difference vibrational spectra calculated for the most probable photo-products (DFT/COSMO). The spectral region between 2100 cm^{-1} and 2400 cm^{-1} is enhanced by a factor of 5 in the experimental spectrum.

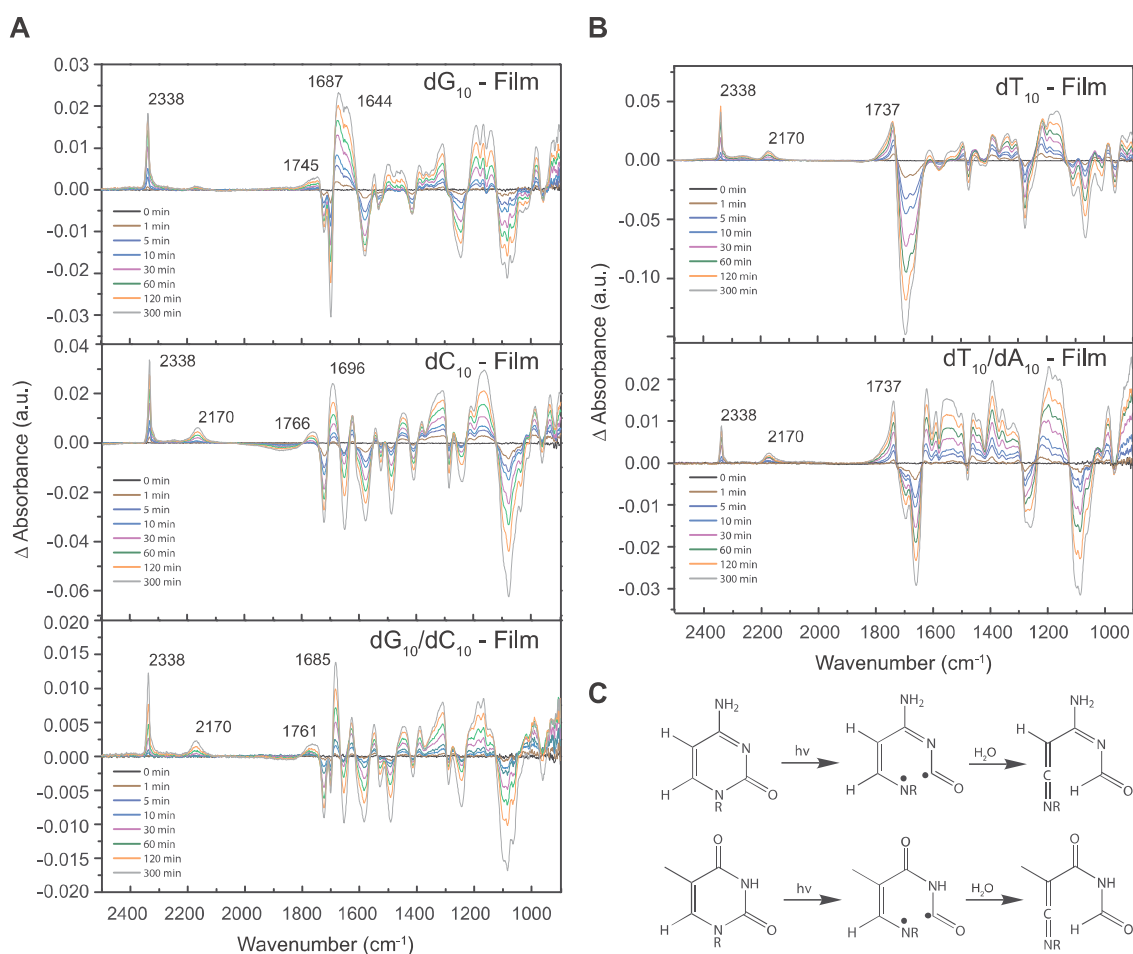


ABBILDUNG 5.6.: A: Differential IR absorption spectra obtained upon irradiation of dG₁₀, dC₁₀ and dG₁₀/dC₁₀ films with 266 nm light at different exposure times. B: Differential IR absorption spectra obtained upon irradiation of dT₁₀ and dT₁₀/dA₁₀ films with 266 nm light at different exposure times. C: Possible mechanism for ketenimine formation in C and T.

In all oligonucleotide (dG₁₀, dC₁₀, dG₁₀/dC₁₀, dT₁₀ and dA₁₀/dT₁₀ made of water solutions) photo-product spectra the isocyanate band is shifted to the blue (2338 cm⁻¹) with respect to the N=C=O band obtained upon nucleobase monomer irradiation in a film from chloroform solution (see discussion above about solvent shifts). In dC₁₀ and dT₁₀ as well as in the mixed dG₁₀/dC₁₀ and dA₁₀/dT₁₀ films an additional band appears at 2170 cm⁻¹. This could arise from formation of a ketenimine group (Fig. 5.6C). Quantum chemical calculations (DFT/TZVP/B3LYP, COSMO framework) show the C=C=N stretch vibration at 2145 cm⁻¹ for T and 2154 cm⁻¹ for C. Both frequencies fit well with the experimental value of 2170 cm⁻¹. The ketenimine group cannot be formed in G due to its structure (Fig. 5.7). We assume that the formation of the ketenimine product is supported by a small amount of water, which explains the absence in the C monomer films formed from a chloroform solution (Fig. 5.1). Like isocyanate generation ketenimine formation also proceeds via α -cleavage however proton transfer after ring cleavage leads to a further product, see figure 5.6 C. Other interesting product bands have developed at

$> 1760 \text{ cm}^{-1}$ and $< 1700 \text{ cm}^{-1}$ (carbonyl region). Deconvolution of the carbonyl band at 1745 cm^{-1} in dG_{10} shows three contributions at 1742 cm^{-1} , 1754 cm^{-1} and 1770 cm^{-1} . In dC_{10} the new carbonyl band at 1766 cm^{-1} has two contributions at 1743 cm^{-1} and 1830 cm^{-1} . This must be due to formation of further photo-products, since the isocyanate product does not contain a carbonyl group anymore. In dT_{10} this is not the case, since one carbonyl group in dT_{10} is preserved in the isocyanate. However, deconvolution of the new carbonyl band at 1737 cm^{-1} in the dT_{10} film shows three contributions with maxima at 1737 cm^{-1} , 1747 cm^{-1} and 1763 cm^{-1} , which provides evidence that other photo-products like the cyclobutane dimer, the (6-4) adduct and as a secondary photo-product the dewar valence isomer are formed (see T, Fig. 5.5). Isocyanate formation can also be observed upon irradiation with a UV lamp. Here a Hg-Lamp is used and the intensity was adjusted to 100 mW/cm^2 to simulate the sun intensity (Fig. 5.10 for dT_{10}). Furthermore the absorption of the isocyanate band correlates linearly with the laser excitation intensity (see Fig. 5.11). Hence reaction by multiphoton excitation can be excluded.

Furthermore the isocyanates generated by ring cleavage are known to react easily with water to form amines after decarboxylation, with alcohols to urethanes and with amines to urea derivatives.²⁷⁶ Indeed, the isocyanate band disappears in all films with small amounts of water vapour, see figure 5.12. The postulated secondary products are known from HPLC measurements of uracil and cytidine with amines in water.^{47;277}

TABELLE 5.1.: Quantum yields for total photo-reaction (Φ_{tot}), isocyanate- ($\Phi_{N=C=O}$) and imino-oxo formation ($\Phi_{imino-oxo}$) in nucleobases and DNA strands. a) not observed b) not identified due to overlapping bands, see also (Fig. 5.3).

	Φ_{tot} 10^{-3}	$\Phi_{N=C=O}$ 10^{-3}	$\Phi_{imino-oxo}$ 10^{-3}
G	7.8	0.04	0.26
C	10.6	0.06	<i>b</i>
GC	1.7	0.02	0.14
A	7.2	<i>a</i>	<i>a</i>
T	30.2	0.16	<i>a</i>
AT	8.2	0.02	<i>a</i>
dG_{10}	1.5	0.15	1.01
dC_{10}	1.9	0.45	<i>b</i>
$\text{dG}_{10}/\text{dC}_{10}$	1.0	0.04	0.39
dA_{10}	9.5	<i>a</i>	<i>a</i>
dT_{10}	15.4	0.46	<i>a</i>
$\text{dA}_{10}/\text{dT}_{10}$	3.4	0.01	<i>a</i>

Total and product specific reaction quantum yields are given in table 5.1. The procedures to obtain these values are described in the SI. In the monomer films the isocyanate quantum yields are nearly the same for G and C and for mixed GC. The isocyanate quantum yields in the single oligonucleotide films (dG_{10} , dC_{10} , dT_{10}) are significantly higher than those obtained for the monomers. In the mixed oligonucleotide films ($\text{dG}_{10}/\text{dC}_{10}$ and $\text{dA}_{10}/\text{dT}_{10}$) the yields are smaller than in the single oligonucleotides, but of the same order

of magnitude than in the mixed monomers. This indicates that the formation of Watson-Crick base pairs in the helix increases the resistance against UV-induced α -cleavage. In adenine no isocyanate can be formed due to the missing C=O group. Comparison between the monomers and the oligonucleotides shows that the total product quantum yields decrease slightly in DNA. The total quantum yields of dT₁₀0 and T are higher than for the other nucleobases (1.5 % and 3 % respectively). Quantum yields for T oligonucleotides in solution were found to be $\approx 3\%$ for dT₂₀³⁵ or 1-2% for thymidylyl(3'-5')thymidine in literature.²⁷⁸ In isolated calf thymus DNA the quantum yields are much lower. The formation of the TT CPD has a quantum yield of 0.548 ‰, the CC CPD formation only 0.031 ‰.²⁷⁹ This is probably due to the larger distance between the T or C moieties in calf thymus DNA compared to the distance in T or C oligonucleotide films.

5.1.5. Conclusions and outlook

As described above the isocyanate quantum yields are generally below 1%,. Despite this rather low yield, ring cleavage is important because most likely it cannot be repaired by enzymes and only be cured by excision of the corresponding sites from the DNA strand. Photo-produced conjugated isocyanate transients in the living cell probably react immediately with an amino group of histone amino acids (arginine or lysine, for example) and give rise to a photo-induced covalent DNA-protein cross-linking.⁴⁴⁻⁴⁷ Irreversible chromatine damage due to reaction between DNA and the histone amino acids like arginine or lysine can result, which leads to photo-induced covalent DNA-protein linking. Further investigations are directed to investigate these secondary reactions.

5.1.6. Acknowledgment

We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Kl 531/29-1) for financial support and K. Hunger for valuable discussions.

5.1.7. Supplementary Information

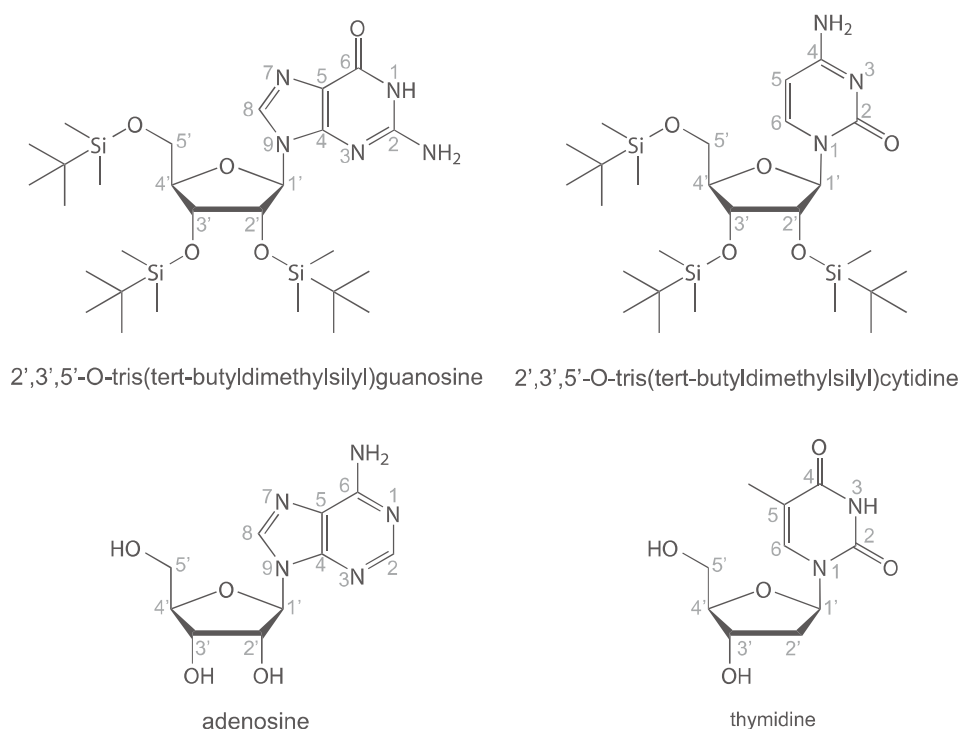


ABBILDUNG 5.7.: Structures of the monomers used: 2',3',5'-O-tris(tert-butyldimethylsilyl)guanosine, 2',3',5'-O-tris(tert-butyldimethylsilyl)cytidine, adenosine and thymidine.

Synthesis

The guanosine and cytidine derivatives were synthesized according to Sheu and Ogilvie^{280;281}. For preparation of 2',3',5'-O-tris(tert-butyldimethylsilyl)guanosine 2.025 g guanosine (SIGMA, 98 %), 4.817 g imidazole and 4.255 g TBDMSCl (tert-butyldimethylsilylchloride) were solved under nitrogen in 30 ml dry DMF (dimethylformamide). The solution was stirred for 24 h at room temperature. Afterwards 20 ml water and 20 ml ethyl acetate were added. The aqueous phase was washed three times with 20 ml ethyl acetate and the joined organic phases were dried over MgSO_4 . After filtration the solution was reduced under vacuum to yellow oil. The product was precipitated as a white solid by addition of 20 ml water and dried under vacuum. For preparation of 2',3',5'-O-tris(tert-butyldimethylsilyl)cytidine 1.787 g cytidine (SIGMA, 98 %) were used. The synthesis was performed as described for 2',3',5'-O-tris(tert-butyldimethylsilyl)guanosine. All samples were characterized by NMR spectroscopy and mass spectrometry.

2',3',5'-O-Tris(tert-butyldimethylsilyl)guanosine:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ = -0.18 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), -0.01 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.00 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.81 (2s, 27H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 3.60 - 3.77 (m, 2H, 5'-H), 3.85 (m, 1H, 4'-H), 4.07 (m, 1H, 2'-H), 4.49 (m, 1H, 3'-H), 6.36 (s, 1H, 1'-H), 6.91 (s, 2H, NH_2), 7.79 (s, 1H, 1-H), 10.52 (s, 1H, NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6): δ = -5.14, -5.10, -5.09, -4.44, -4.40, -4.30 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 17.93, 18.17, 18.39 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 25.83, 26.10, 26.21 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 63.34 (5'-C), 73.30 (3'-C), 75.58 (2'-C), 85.39 (1'-C), 86.11 (4'-C), 116.69 (2-C), 135.47 (1-C), 151.98 (5-C), 154.25 (4-C), 157.09 (3-C) ppm.

ESI: m/z : 626 $[\text{M}]^+$, 649 ($+\text{Na}^+$), 511 ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

2',3',5'-O-tris(tert-butyldimethylsilyl)cytidine:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = -0.07 (2s, every 3H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), -0.01-0.00 (2s, every 3H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.02 (s, 3H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.11 (s, 3H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.77 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.79 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.84 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 1.59 (s, 2H, NH_2), 3.66 (dd, 1H, 2'-H), 3.89-4.00 (m, 4H, 5'-H, 4'-H, 3'-H), 5.46 (d, 1H, 3-H), 5.67 (d, 1H, 1'-H), 8.07 (d, 1H, 4-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = -5.54, -5.28, -5.11, -5.02, -4.12, -4.08 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 18.06, 18.09, 18.55 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 25.88, 25.92, 26.10 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 60.89 (5'-C), 69.22 (3'-C), 76.25 (2'-C), 82.82 (1'-C), 90.37 (4'-C), 92.95 (3-C), 142.06 (4-C), 155.74 (1-C), 165.51 (2-C) ppm.

ESI: m/z : 585.5 $[\text{M}]^+$, 609 ($+\text{Na}^+$).

Adenosine (Acros Organics, >99 %) and thymidine (Sigma Aldrich, >99 %) were used without further purification.

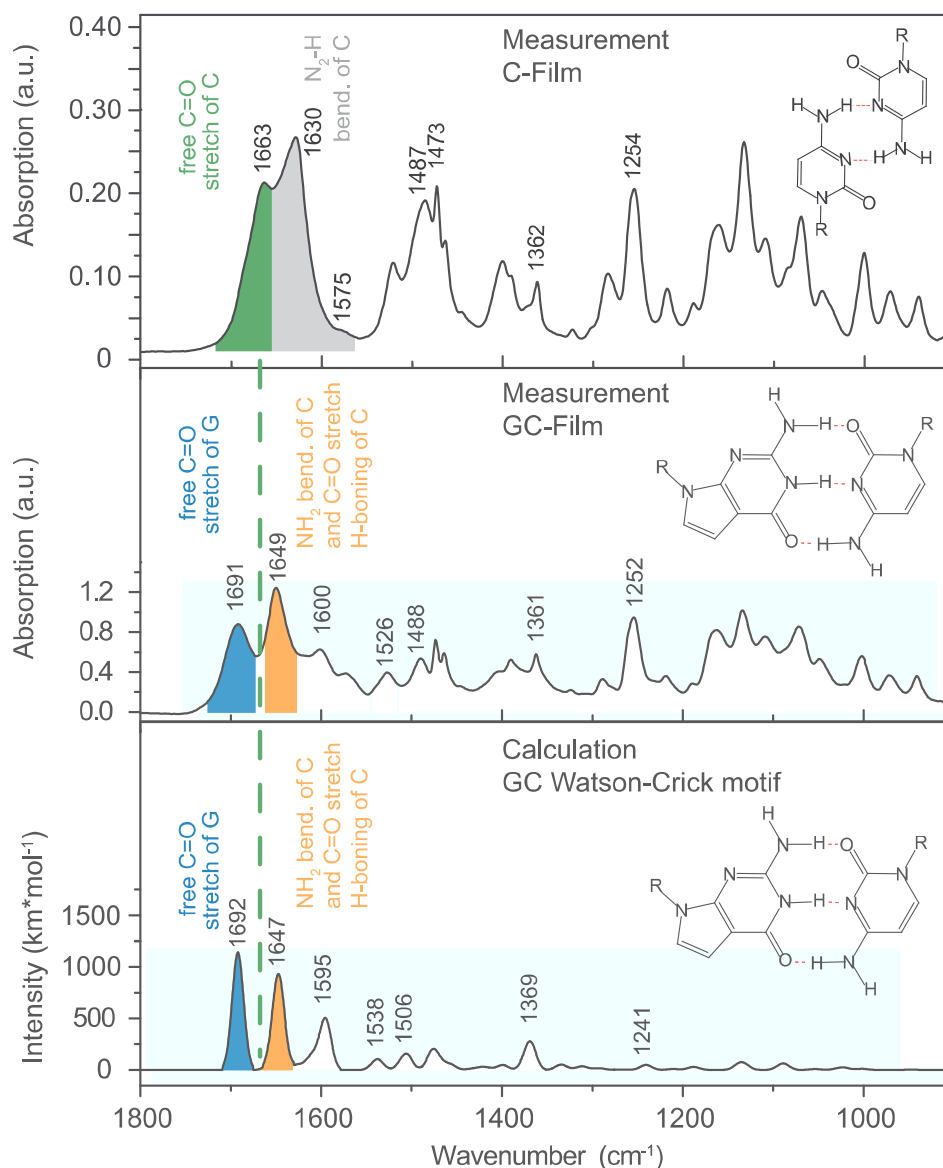


ABBILDUNG 5.8.: Comparison of the IR Absorption spectra before irradiation of a C film, a mixed GC film and a calculated spectrum (DFT/TZVP/B3LYP) of the GC Watson Crick base pair. The free C=O stretch vibration in the C film is observed at 1663 cm^{-1} . The proposed dimer structure is shown as inset. In the mixed GC film only the combined H-bonded C=O stretch vibration an NH₂ vibration of C at 1649 cm^{-1} is observed. The calculated structure is shown as inset. The calculation is scaled with 0.957.

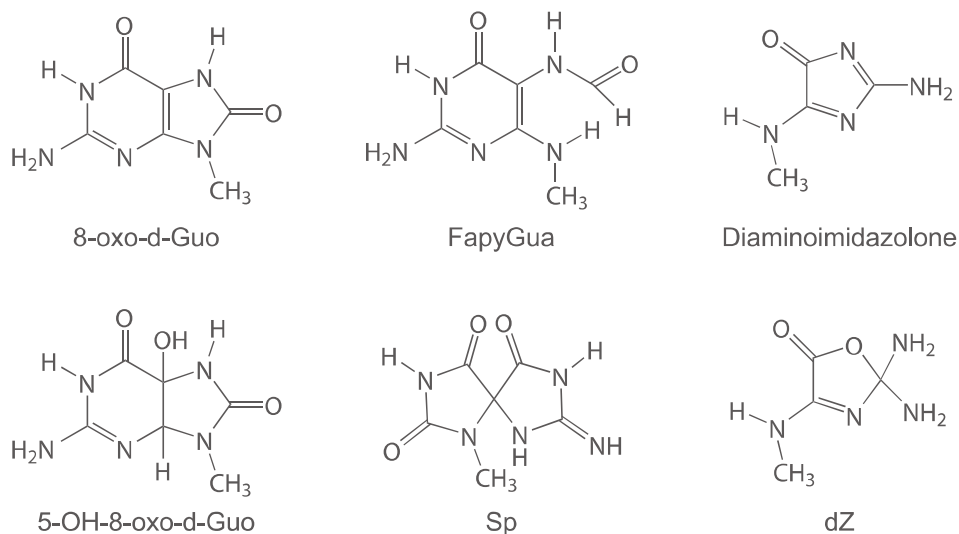


ABBILDUNG 5.9.: Structures of the calculated oxidation products or hydrates of G. We compared the experimental broad spectra with calculated spectra of several possible oxidation products or hydrates discussed in the literature, like the 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (short: 8-oxo-d-Guo), the 5-OH-8-oxoGuo, a spiroiminodihydantoin nucleoside (Sp), the 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua), the 2,2,4-triamino-5(2H)-oxazolone (dZ) and the 2,5-diamino-4H-imidazol-4-one (Diaminoimidazolone).^{22;275} The comparison does not point to any of these products in our experiment, which was performed in vacuum in the absence of oxygen and water.

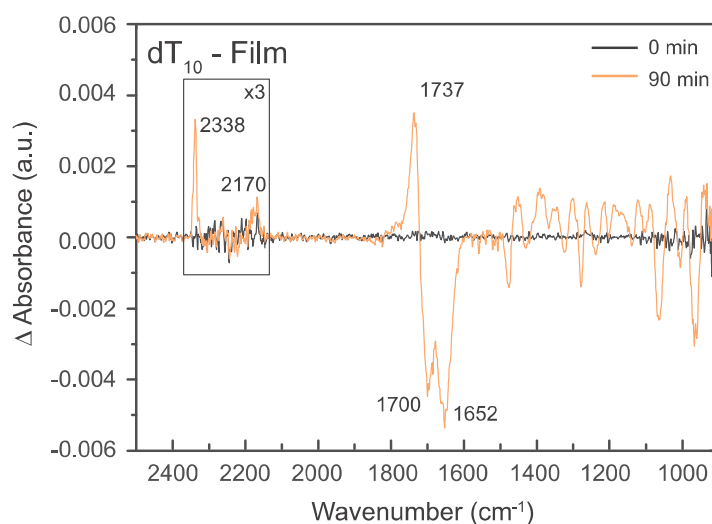


ABBILDUNG 5.10.: Isocyanate formation in dT_{10} upon irradiation with a UV lamp. The spectral region between 2100 cm^{-1} and 2400 cm^{-1} is enlarged by a factor of 3.

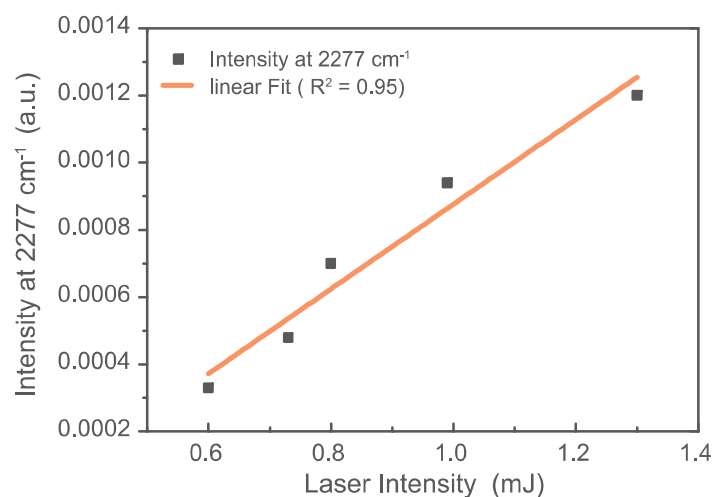


ABBILDUNG 5.11.: IR Absorption at 2277 cm^{-1} after 10 minutes dependence on the laser intensity and the corresponding linear fit.

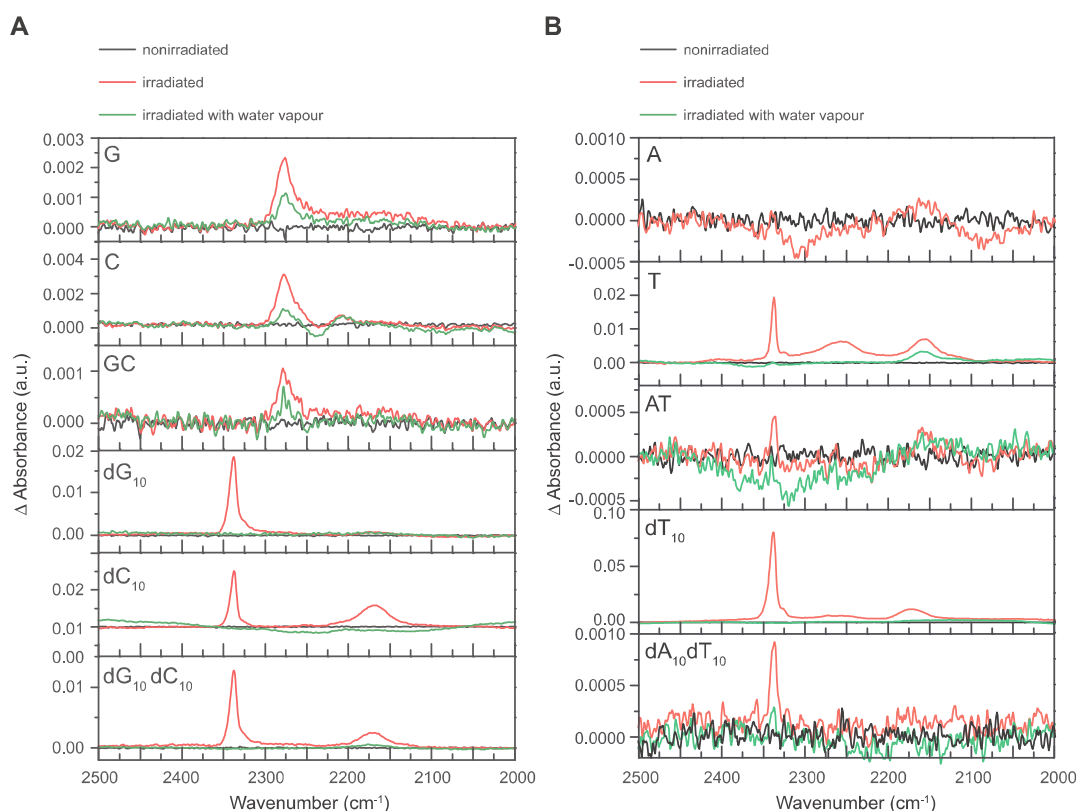


ABBILDUNG 5.12.: A: Reaction of isocyanate photo-products with water vapour. The isocyanate band at 2277 cm^{-1} in G, C and GC and at 2338 cm^{-1} in dG_{10} , dC_{10} and dG_{10}/dC_{10} disappears. New amine product bands appear in the area between 3000 cm^{-1} and 3500 cm^{-1} (spectra not shown here). The ketenimine band at 2170 cm^{-1} in dC_{10} and dG_{10}/dC_{10} disappears as well. B: Reaction of isocyanate photo-products with water vapour. The isocyanate band at 2338 cm^{-1} in T, AT, dT_{10} and dA_{10}/dT_{10} and the ketenimine band at 2170 cm^{-1} in T and dT_{10} disappear. New amine product bands appear in the area between 3000 cm^{-1} and 3500 cm^{-1} for dT_{10} (spectra not shown here).

TABELLE 5.2.: Vibrational assignment of IR bands in the G film (calculations are scaled with 0.957).

spectral position		vibrational assignment
experiment (cm^{-1})	calculation (cm^{-1})	
3492	3545	free N-H stretch of H-bonded NH_2 group
3478	3528	NH_2 stretch, free
3440	3428	N(1)-H stretch, free
3304	3366	N-H stretch of H-bonded NH_2
3133	3097	N(1)-H stretch - H-bonded and C(8)-H stretch
2953	2962	C-H stretch, sugar - protection groups
2928	2914	C-H stretch, sugar - protection groups
2899	2891	C-H stretch, sugar
2857	2836	C-H stretch, sugar
1693	1693	C=O stretch, H-bonded
1628	1598	N-H bending of free NH_2
1595	1568	N(1)-H, NH_2 bending - H-bonded
1534	1517	C(4)=N(3) stretch
1472	1458	C-N stretch, ring
1253	1244	C-H bending, sugar- protection groups

TABELLE 5.3.: Vibrational assignment of IR bands in the C film (calculations are scaled with 0.957).

spectral position		vibrational assignment
experiment (cm^{-1})	calculation (cm^{-1})	
3491	3521	N-H stretch - free of H-bonded NH_2
3127	3090	N-H stretch - H-bonded NH_2
2954	2966	C-H stretch; sugar - protection groups
2929	2922	C-H stretch; sugar - protection groups
2889	2891	C-H stretch, sugar
2858	2836	C-H stretch, sugar
1663	1663	C=O stretch
1630	1629	NH_2 bending ; C=C stretch, ring
1575	1593	NH_2 bending ; C=C stretch, ring
1487	1486	C-C stretch, ring
1473	1465	C-N stretch, ring
1362	1349	skeleton vibration
1254	1245	C-H bending, sugar- protection groups

TABELLE 5.4.: Vibrational assignment of IR bands in the T film (calculations are scaled with 0.957).

spectral position		vibrational assignment
experiment (cm^{-1})	calculation (cm^{-1})	
3403	3435	N(3)-H stretch
3053	3070	C(6)-H stretch
2829	2877	C-H stretch, sugar
1694	1685	C(2)=O stretch
1665	1672	C(4)=O stretch, N(3)-H bending
1476	1405	C(1')-H bending
1277	1237	C-H bending
1096	1076	skeleton vibration
1054	1048	C-O sugar

TABELLE 5.5.: Vibrational assignment of IR bands in the A film (calculations are scaled with 0.993).

spectral position		vibrational assignment
experiment (cm^{-1})	calculation (cm^{-1})	
3333	3331	C(2')O-H stretch
2924	2989	C-H stretch, sugar
1646	1646	NH ₂ bending
1602	1607	NH ₂ bending
1577	1595	C-N ring, NH ₂ bending
1507	1520	C(8)-H bending, C-N ring
1478	1494	C(2)-H bending
1421	1379	skeleton vibration
1372	1355	skeleton vibration
1333	1321	C(1')-H, C(4')-H bending
1299	1270	skeleton vibration
1262	1242	C(5')-O bending, C-H bending sugar
1247	1216	C-H bending
1207	1185	skeleton vibration
1173	1130	skeleton vibration
1121	1078	C-C ring sugar
1086	1046	C(5')-O stretch
1054	1022	skeleton vibration
1014	955	skeleton vibration

Quantum Yields

The total quantum yield of photo-reaction Φ_{tot} is defined as the number of reacted molecules $N_{react.Ed.}$ divided by the number of absorbed photons N_{abs} .

$$\Phi_{tot} = \frac{N_{react.Ed.}}{N_{abs}} = \frac{\frac{\Delta A}{A} \cdot N_{illum.}}{E_{abs} \cdot Z \cdot \frac{\lambda}{h \cdot c}} \quad (5.1)$$

Here $N_{illum.}$ is the number of molecules in the illumination area, which can be calculated from the amount of substance on the whole film, the film thickness and the illumination area. λ is the irradiation wavelength (266 nm), c the light velocity and h the Planck constant. Z is the number of laser pulses and E_{abs} the energy absorbed by the sample per laser pulse, which is determined for each film separately. A is the absorbance of the film before illumination at a specific wavelength of an isolated educt marker band. The difference absorption ΔA is determined from the difference spectra. $\Delta A/A$ is the percentage of reacted educt molecules. The temporal evolution of the negative difference bands is fitted biexponentially. The first time constant τ_1 is assigned to photo-reaction, the second time constant τ_2 to photo-damage by thermal effects and laser desorption⁸⁸. To correct the difference absorbance for the photo-damage, monoexponential curves with the time constant τ_1 and the corresponding amplitude A_1 from the biexponential fit are calculated. The difference absorption ΔA of these curves is used for the quantum yield calculation.

To obtain the isocyanate quantum yield $\Phi_{N=C=O}$, the extinction coefficient of the resulting product is needed. Therefore a calibration with 1,4-phenylenediisocyanate (PDICy) is used.

$$\frac{I_{calc.product}}{I_{calc.PDICy}} = \frac{\epsilon_{product}}{\epsilon_{PDICy}} \quad (5.2)$$

From the ratios of the calculated integrated absorption coefficients I of the possible isocyanate photo-products and of 1,4-phenylenediisocyanate (PDICy) and from the experimental extinction coefficients ϵ_{PDICy} , $\epsilon_{product}$ can be calculated. The isocyanate quantum yield can then be determined as follows,

$$\Phi_{N=C=O} = \frac{c_{N=C=O} \cdot V_{illum.} \cdot N_A}{E_{abs} \cdot Z \cdot \frac{\lambda}{h \cdot c}} \quad (5.3)$$

with $V_{illum.}$ as the volume of the film which is illuminated, N_A as Avogadro constant and $c_{N=C=O}$ as isocyanate concentration. The concentration can be calculated from the Lambert-Beer law, with the absorbance at 2277 cm^{-1} or 2338 cm^{-1} , respectively.

Furthermore the quantum yield for the imino-oxo tautomer $\Phi_{imino-oxo}$ is calculated. The extinction coefficient $\epsilon_{imino-oxo}$ is determined from the ratios between the calculated intensities of the imino-oxo products, the isocyanate products and the isocyanate extinction coefficient.

$$\frac{I_{Imino-Oxo}}{I_{N=C=O}} = \frac{\epsilon_{Imino-Oxo}}{\epsilon_{N=C=O}} \quad (5.4)$$

$$\Phi_{N=C=O} = \frac{c_{IminoOxo} \cdot V_{illum.} \cdot N_A}{E_{abs} \cdot Z \cdot \frac{\lambda}{h \cdot c}} \quad (5.5)$$

The concentration $c_{\text{imino-oxo}}$ is determined by the Lambert-Beer law as described above by using the absorbance of the C=N stretch vibration around 1640 cm^{-1} in G.

5.1.8. Beiträge zur Veröffentlichung

Titel: DNA photoreacts by nucleobase ring cleavage to labile isocyanates.

Autoren: Laura Buschhaus, Josefin Rolf und Karl Kleinermanns.

Eingereicht bei: Physical Chemistry Chemical Physics (Impact Factor: 3.573)

Die IR-Spektren dieser Veröffentlichung wurden von mir und von J. Rolf im Rahmen ihrer Masterarbeit, die von mir betreut wurde, gemessen. Die quantenchemischen Rechnungen für die Gasphase wurde auch von mir und J. Rolf gemeinsam durchgeführt. Die COSMO Rechnungen wurden von mir alleine durchgeführt. Die Interpretation der Ergebnisse erfolgte durch mich, J. Rolf und K. Kleinermanns. Die Veröffentlichung wurde von K. Kleinermanns und mir geschrieben.

5.2. UV light induced hydrogen transfer in guanosine-guanosine aggregates

KATHARINA HUNGER*, LAURA BUSCHHAUS*, LARS BIEMANN*, MICHAELA BRAUN*, SERGEY KOVALENKO[#], ROBERTO IMPROTA[†], KARL KLEINERMANN^{*}

* DEPARTMENT OF PHYSICAL CHEMISTRY, HEINRICH-HEINE-UNIVERSITY, 40225 DÜSSELDORF, GERMANY

[#] DEPARTMENT OF CHEMISTRY, HUMBOLDT UNIVERSITY, 12489 BERLIN, GERMANY

[†] ISTITUTO BIOSTRUTTURE E BIOIMMAGINI-CNR, 80134 NAPOLI, ITALY

Printed in *Chemistry - A European Journal*, 19(17):5425-5431, 2013.

5.2.1. Abstract

Aggregates of a lipophilic Guanine (G) derivative have been studied in n-hexane by femtosecond-to-microsecond UV-visible broad-band transient absorption, stationary infrared and UV-visible spectroscopy and by quantum chemical calculations. We report the first time-resolved spectroscopic detection of hydrogen transfer in GG aggregates, which leads to (G-H)· radicals via G^+G^- charge transfer followed by proton transfer. These radicals show a characteristic electronic spectrum in the range 300-550 nm. The calculated superimposed spectrum of the species that result from $NH\cdots N$ proton transfer agrees best with the experimental spectrum.

5.2.2. Introduction

In addition to Watson-Crick (WC) base pairs in DNA, less common homodimers such as GG play an important role in replication and transcription, especially in transfer RNA (tRNA).^{53;54} Sequences with G repeats exist in eukaryotic centromeres and telomeres which form hairpins at the end of linear chromosomes by means of GG hydrogen bonding.^{52;282} Their end acts as a primer for the synthesis of the complementary DNA strand. Gradual loss of G from telomeres is probably important in ageing. In addition, superstructures of DNA triplexes and quadruplexes are formed by GG base pairs and play a role in specific recognition mechanisms.²⁸³ DNA damage and mutagenesis by formation of rare tautomers through hydrogen transfer along the GG and (guanine-cytosine) GC WC hydrogen bonds has long been assumed to be induced by UV-light; however, it is difficult to probe these processes directly by spectroscopy due to the complexity of DNA strands and collective modes of the DNA backbone.^{32;38;284} In the absence of the backbone, IR/UV hole-burning spectra provide evidence for electron-driven interbase proton-transfer in WC base pairs.¹⁷¹ Ab initio calculations show that this path is barrierless in WC but not in non-canonical base pairs.⁴⁹

Herein we report hydrogen transfer in GG aggregates by using nucleosides with bulky

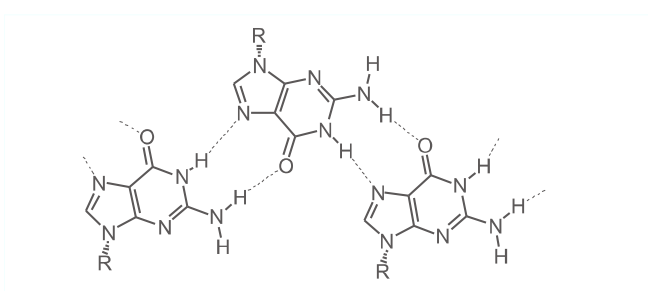


ABBILDUNG 5.13: Structure of the Ribbon I motif in GG aggregates, formed by reverse Hoogsteen hydrogen bonds.

non-polar groups that sterically enforce specific G·G ribbon aggregation motifs. The derivatized nucleoside is highly solvable in aprotic and non-polar solvents like n-hexane, in which the formation of hydrogen-bonded aggregates is strongly favoured, whereas solvated monomers and probably also stacked complexes are generated in polar protic solvents like water. NMR spectroscopic investigations point to extended G ribbons as the prevailing structures in concentrated solutions of derivatised guanine in chloroform and hydrocarbon solvents with two different hydrogen-bond arrangements.²⁶⁸ Ribbon I is built by reverse Hoogsteen hydrogen bonding (figure 5.13), a motif that is also found in vivo in triple-helical DNA structures.

The biological functions of this structure are yet to be surveyed. However, it has been supposed to play a role as molecular switch to modulate gene expression, in chromatin organization and DNA repair.^{285;286} Recently, ribbon structures formed by G in self-assembly have gained much interest in material science. The highly ordered structures can be brought atop solid surfaces by evaporation. In this form they can find application in electronic and optical devices owing to their optical and photoconductive properties.^{268;287} In this paper we follow the dynamics of the guanosine ribbons from the Franck-Condon (FC) region of the optical transition pumped at 266 and 284 nm to the formation of the (G-H)· radical.

5.2.3. Results and Discussion

Figure 5.14 shows the stationary infrared spectra of 0.8 mM 2',3',5'-O-tris (tert-butyl-dimethylsilyl) guanosine (see figure 5.23, in the supplementary information SI) (henceforth called G) in n-hexane as solvent. The IR spectral features in figure 5.14 point out that only aggregate bands of guanosine are present in n-hexane whereas monomer and aggregate bands show up in the spectrum in figure 5.15 of the sample taken in CDCl₃. Below 3400 cm⁻¹ are the stretch vibrations of the hydrogen bonded NH groups. At 3487 cm⁻¹ in n-hexane and 3490 cm⁻¹ in CDCl₃ the stretching vibration of the free NH (NH_f) in the hydrogen bonded NH₂-groups shows up. The NH stretching vibrations of the amine group of monomeric G (3410 cm⁻¹ and 3516 cm⁻¹ in CDCl₃) are no longer discernible in n-hexane, which points to nearly complete GG aggregation under these conditions. figure 5.15 shows that 0.8 mM G in CDCl₃ as solvent led to less aggregation with the monomer bands clearly visible. See also Biemann et al.¹⁷³ with similar results for C.

Our proposal of the prevailing GG ribbon structure with HNH...O=C and NH...N double hydrogen bonds as depicted in figure 5.13 (ribbon I in Ref.²⁶⁸) is based on the observed IR spectra and DFT calculations (see figure 5.25 in the Supporting Information). Our IR data clearly show that in addition to the ribbon I motif we have a minor quantity of ribbon

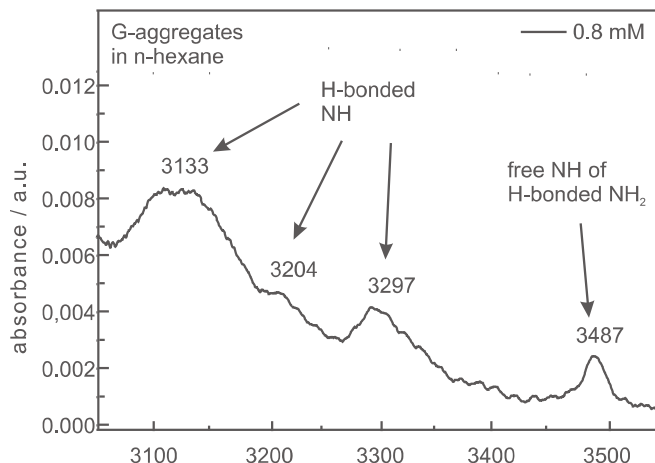


ABBILDUNG 5.14: FT-IR measurements of 0.8 mM trisilylated guanosine in dry n-hexane.

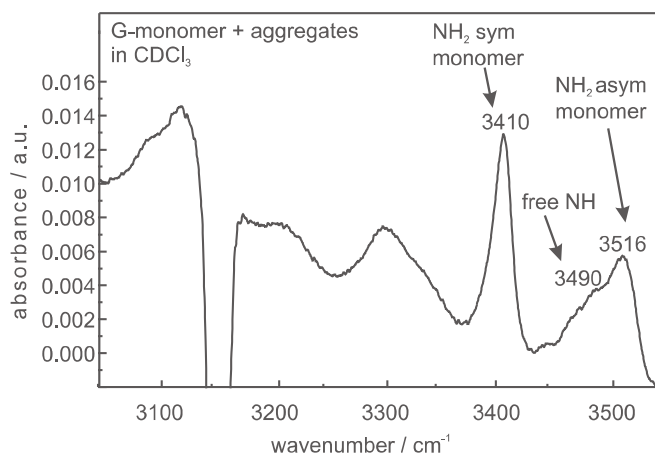


ABBILDUNG 5.15: IR spectrum of 0.8 mM trisilylated guanosine in CDCl_3 . No bands from water impurities could be detected in the IR experiments.

II motifs with $\text{HNH}\cdots\text{N}$ and $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}$ interactions in our solution of G in n-hexane (see figure 5.24 in the Supporting Information for the structure of ribbon II). Polarizable continuum model (PCM)/Coulomb-attenuating method (CAM)-B3LYP calculations in solution on the trimer (see figure 5.16a) indicate that ribbon I is more stable than ribbon II by 0.16 eV (with the 6-31G(d) basis set) and 0.20 eV (with the 6-311+G(2d,2p) basis set), which is in agreement with the experimental indications.

The experimental absorption and fluorescence spectra of G in the UV-visible spectral range are displayed in figure 5.17a for comparison with the calculated spectra in figure 5.17b. A description of the lowest energy singlet and triplet states is reported in Tab.5.6 and 5.7 in the Supporting Information, respectively. There are three excited states in the trimer that are reminiscent of the lowest energy excited state of the monomer which is a bright HOMO-LUMO $\pi\pi^*$ transition (usually labelled as L_a).²⁸⁸ Cartesian coordinates of the ribbon I trimer and the L_a state of ribbon I trimer are reported in Tab.5.8 and 5.9 in the Supporting Information. Analogously, there are three excited states similar to the HOMO-LUMO+1 transition of the monomer (usually labelled as L_b). The three $n\pi^*$ transitions are destabilized with respect to what is found in the monomer in non-polar solutions due to the presence of intermolecular hydrogen bonds. Their energy is more similar to that predicted in water, that is, approximately 0.7 eV less stable than L_a -like transitions.²⁸⁸

Finally, we find several charge transfer (CT) transitions. The most stable CT transition ($G2 \rightarrow G3$, according to the atom labelling reported in figure 5.16a) is higher in ener-

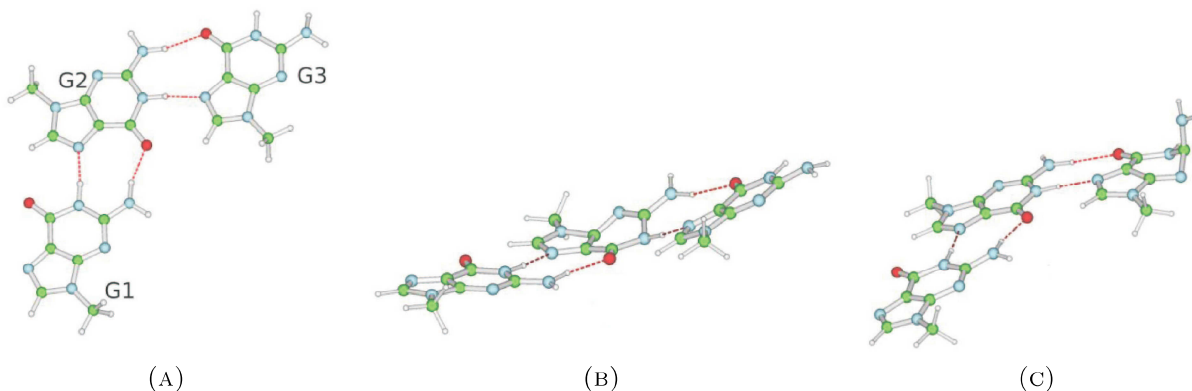


ABBILDUNG 5.16.: (A) Schematic drawing of the L_a excited state minimum localized on G2. (B) Schematic drawing of the L_a excited state minimum localized on G2. (C) Schematic drawing of a representative structure of the crossing region between the L_a excited state localized on G3 and S₀.

gy by approximately 0.6 eV than the lowest energy transition at the linear response (LR)PCM/CAM-B3LYP level. Time-dependent (TD)-DFT calculations using standard functionals overestimate the stability of CT transitions, but this deficiency can be averted by the use of long range corrected functionals at the CAM-B3LYP level, which indeed provides fairly reliable estimates of CT transition energies.^{289–292} Just as an example, with regard to intra-strand CT transitions, CAM-B3LYP predictions are within 0.2 eV of those obtained at the CC2 level,²⁹³ and a similar accuracy has been found for cytosine-guanine and adenine-thymine inter-strand CT states.^{289–292} In particular, CAM-B3LYP provides a description of the proton-coupled electron transfer in GC²⁸⁹ and AT²⁹² pairs, that is extremely close to that obtained at the CASPT2 and at the CC2 levels.

On the other hand LR-PCM/TD-DFT calculations are known to underestimate solvent stabilisation of CT excited states, and it would be necessary to resort to state specific (SS) PCM methods.^{294;295} SS-PCM/CAM-B3LYP/6-31G(d) calculations indeed predict that the G2→G3 CT transition is 0.45 eV lower in energy than the S₁ L_a-like excited state at the FC point. This value has to be considered with some caution: the CT transition energy is expected to be rather sensitive to the value of the radii used to build the PCM cavity, a parameter that was not investigated in detail for non-polar solvents. Furthermore in low-dielectric solvents transition energies could be sensitive to properties not considered in standard PCM treatments, such as the solvent polarizability.²³² Though CAM-B3LYP²⁹⁶ is not biased by the deficiencies of 'standard' density functionals in the treatment of long range CT transitions, some overestimation cannot be excluded.

On the other hand, a G→G CT transition is not expected to be much less stable than a G→C CT transition, since the electron affinity of C is not significantly larger than that of G (~0.2 eV,²⁹⁷). The G→C CT transition is known to be close in energy to the lowest excited electronic states in the gas phase, which constitutes the main excited state deactivation channel.⁵⁰ It is thus reasonable that the G2→G3 CT transition falls in the proximity of S₁ L_a-like excited states. The computed vertical excitation energies to the lowest energy triplets are collected in Tab.5.7 in the Supporting Information. The nine lowest energy triplets can be described as three π - π^* triplets localized on the different G monomers, significantly more stable than the corresponding singlet excited states. The energy of the triplet G2→G3 CT is instead similar to that of its singlet counterpart, and

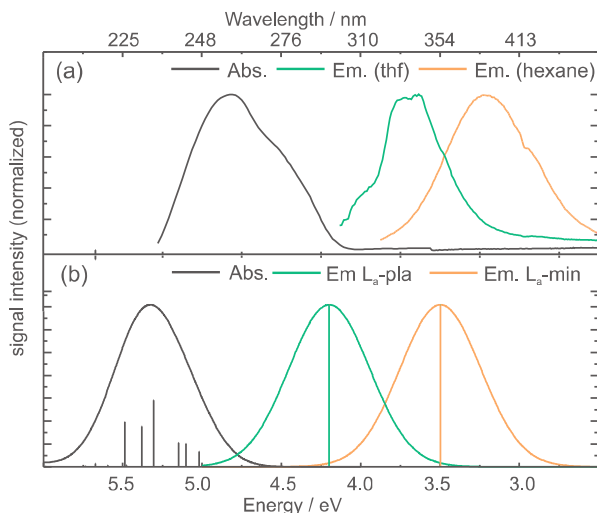


ABBILDUNG 5.17: (a) Absorption and stationary fluorescence spectra of G in hexane and THF. Fluorescence bands with maxima at 390 nm in hexane relative to 330 nm in THF can be attributed to a higher degree of aggregation in non-polar hexane than to the polar and hydrogen-bond solvent THF. (b) Computed absorption spectrum of Ribbon I in n-hexane, (LR-PCM/TD-CAM-B3LYP/ 6-31+G(d,p) // PCM/CAM-B3LYP/ 6-31G(d)), black. Computed emission spectra (SS-PCM/ TD-CAM-B3LYP/ 6-31+G(d,p) // PCM/ CAM-B3LYP/ 6-31G(d)), orange: L_a -min, green: L_a -pla. The curves were obtained by convoluting the stick spectra with a phenomenological Gaussian with half width at half-maximum (HWHM)=0.3 eV.

it should therefore fall in the proximity of the spectroscopic singlet states.

Geometry optimisations of the two L_a -like states for 'external' G residues (G1 and G3) provide a picture very similar to that obtained for the isolated G monomer.²⁸⁸ The system reaches a flat plateau (L_a -pla, mainly responsible for the monomer emission) and then a barrierless motion, which primarily involves the out-of-plane motion of the NH_2 substituent, leads to a crossing region with the ground electronic state (see figure 5.16a), and therefore to excited state deactivation. For the inner G2 residue, after the planar plateau the system decays to a real minimum of the PES (L_a -min), characterized by partial pyramidalization at the N3, C2 and C4 atoms. This minimum is stabilized by the hydrogen bonds with the G3 molecule which hinders the out-of-plane motion of the $C2-NH_2$ group. SS-PCM/CAM-B3LYP/6-31+G(d,p) calculations predict that the emission energy from the planar plateau is approximately 4.2 eV, whereas emission from L_a -min appears at ~ 3.5 eV, as shown in figure 5.17b. The computed absorption maximum (~ 5.30 eV, PCM/TD-CAM-B3LYP/6-31+G(d,p) calculations) is blueshifted by approximately 0.5 eV with respect to the experimental one (~ 260 nm resp. 4.77 eV). We can thus associate emission from L_a -pla to the peak at 330 nm (~ 3.75 eV) registered in tetrahydrofuran (THF), in which the formation of hydrogen bonded aggregates is not as favoured as in hexane, and emission from L_a -min to the peak (~ 390 nm, 3.20 eV) found in hexane.

Figure 5.18 shows the femtosecond (fs) transient absorption spectra of 6 mM G in n-hexane, that is at concentrations at which GG aggregation is complete. At shorter times the signal at about 300 nm first increases ($\tau_1 = 0.1 - 0.2$ ps) and then decays with similar time constants as the signal in the range 400-700 nm, namely $\tau_2 = 4$ ps, $\tau_3 = 40$ ps. The evolution is qualitatively similar to the behaviour of guanosine monophosphate (GMP) in water at pH 7.²⁸⁹ The time component τ_1 corresponds to fast molecular rearrangement. Fluorescence in a flat local minimum of the excited state close to the Franck-Condon region (320 nm) decays and emission at about 400 nm appears. This redshifted emission arises from a deeper S_1 potential minimum at lower energies and decays with τ_2 due to internal conversion into the electronic ground state S_0 . The excited state minima discus-

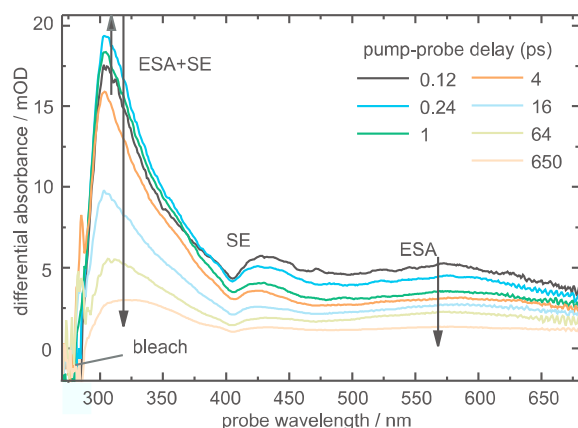


ABBILDUNG 5.18: Femtosecond transient absorption spectra of trisilylated 6 mM G in n-hexane upon excitation at 284 nm.

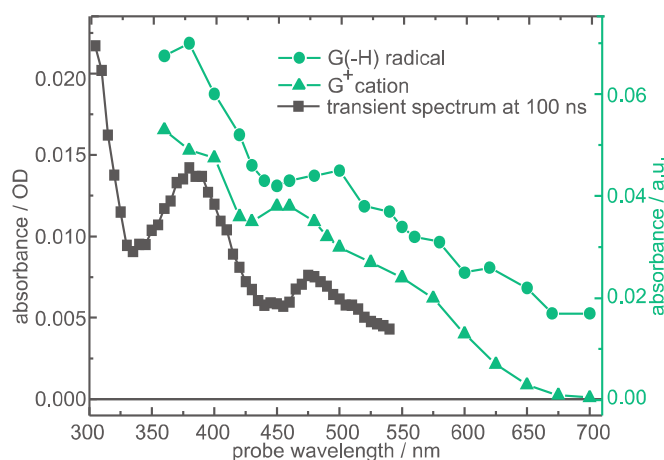


ABBILDUNG 5.19: Spectrum of the neutral guanosine radical and of the G cation in water obtained by pulse radiolysis by Kobayashi et al.⁵¹ (green) in comparison with the transient absorption spectrum measured by us (black).

sed above are discernible as stimulated emission (negative absorption) contributions at approximately 320 and 400 nm to the transient signal in figure 5.18 and as a stationary fluorescence maximum at approximately 390 nm in figure 5.17a.

In addition to these fast transients significant spectral contributions persist up to 650 ps ($\tau_4 > 650$ ps) which is the largest pump-probe delay used in our femtosecond experiments. The "late" spectrum shows an intensity minimum at about 410 nm followed by a signal increase up to around 310 nm. Below 310 nm the spectrum is obscured by the bleaching contribution (negative absorption) so that the true maximum of the band in the blue part of the spectrum cannot be determined. Above 410 nm the spectral intensity increases up to about 450 nm followed by a flat curve that progresses up to 680 nm.

For elucidation of this temporally enduring spectral contribution we measured the transient spectrum at later times in our nanosecond pump-probe spectrometer. Figure 5.19 shows the spectral course at 100 ns delay and figure 5.26 the Supporting Information exhibits persistence of this spectrum up to about 1.4 μ s. The monoexponential lifetimes (figure 5.28 the Supporting Information) are slightly higher at wavelengths below 425 nm ($\tau = 291 \pm 26$ ns) than above ($\tau = 197 \pm 32$ ns). We observe these spectra only from solutions of protected G in n-hexane that are kept in the dark for 1 to 2 days. In fresh solutions no spectrum could be observed.

Figure 5.27 the Supporting Information demonstrates complete quenching of the "late" transient spectrum by flushing the solution with oxygen. Since triplet species can be efficiently quenched by O_2 , we assume that triplet states act as precursors for the transient spectrum observed on the nanosecond timescale. We very tentatively assign the transient

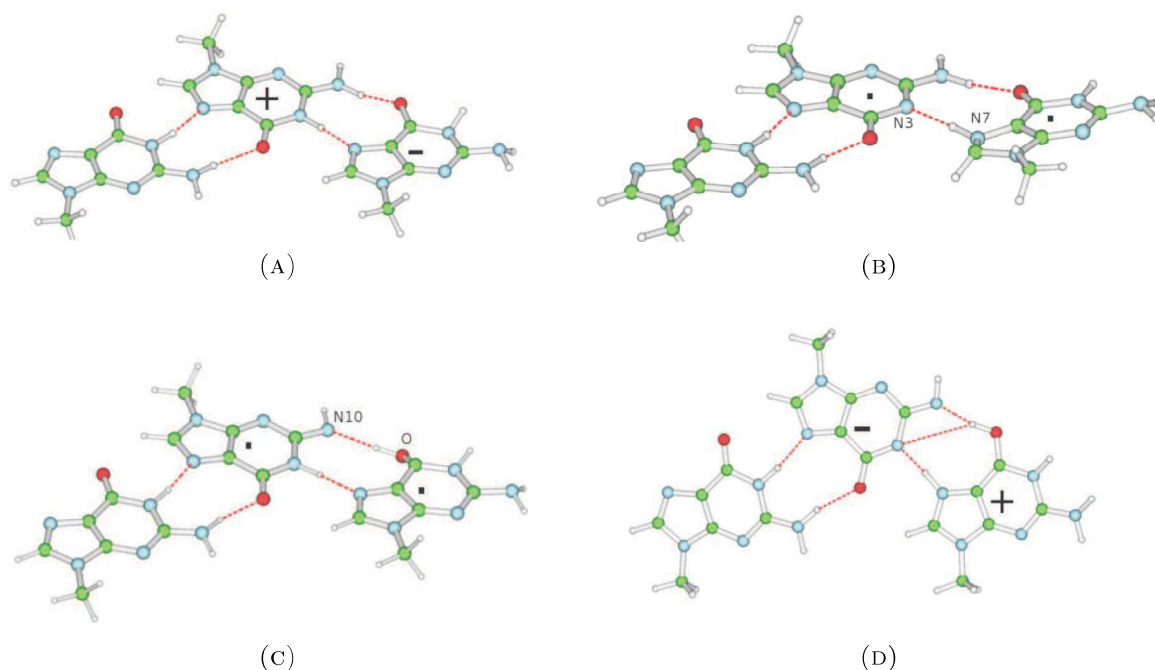


ABBILDUNG 5.20.: Schematic drawing of the species which could be involved in the deactivation path of the G2G3 CT state.

spectrum that persists up to 650 ps in the femtosecond experiment to triplet state absorption. For comparison, figure 5.19 shows the spectra of the G^+ radical cation and the neutral deprotonated G radical $(G-H)^\cdot$ in water.⁵¹ The transient spectrum at 100 ns is in good agreement with the electronic spectrum of the $(G-H)^\cdot$ radical. The spectral course however is not specific enough to exclude contributions from the G radical cation or other species such as 3GG .

For comparison of the measured transient spectra with calculations we have explored the reactivity of the $G2 \rightarrow G3$ singlet CT ($^1GG_{CT}$) state. LR-PCM/CAM-B3LYP geometry optimizations predict that three exoergonic barrierless decay paths are possible, as depicted in figure 5.20 and figure 5.29 in the Supporting Information. A proton transfer from N3-H of the G2 cation to N7 of the G3 anion can occur, thus leading to the formation of a $(G-H)^\cdot/(G+H)^\cdot$ diradical species (path b in figure 5.20). The proton transfer reaction can involve an amino proton of G2 and the oxygen atom of G3 (path c in figure 5.20), leading to the $(G-NH)^\cdot/(GOH)^\cdot$ diradical. A double proton transfer reaction is also possible (path d in figure 5.20), thus leading to the formation of the G enol form. From the thermodynamic point of view, path b is energetically favoured over paths c and d by 0.21 and 0.42 eV, respectively (LR-PCM/TD-CAM-B3LYP/6-31G(d) calculations). Interestingly, the three minima that result from the proton transfer reactions are close in energy to the electronic ground state (S_1/S_0 energy gap in the range 1.4-0.6 eV), which suggests that these processes could act as deactivation paths for the GG excited states, in analogy with the findings for GC dimers in the gas phase.^{50;298}

Geometry optimization of the $G2 \rightarrow G3$ triplet CT ($^3GG_{CT}$) provides the same conclusions. Three exoergonic barrierless paths are possible, that involve proton transfer(s) and lead to stable triplet minima. The minimum that results from path b is the favoured

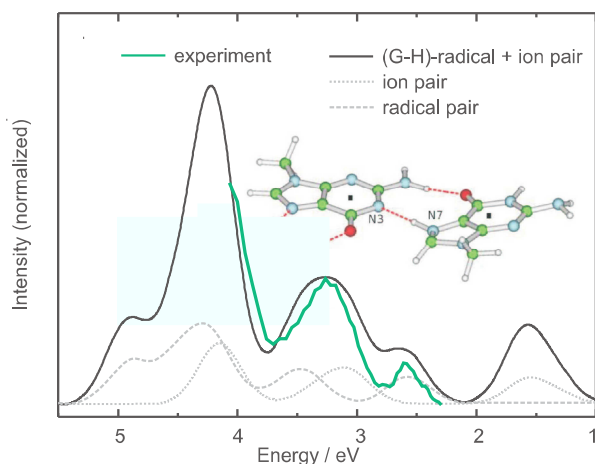


ABBILDUNG 5.21: Comparison between experimental and calculated transient spectrum. The calculated spectrum (convolution with HWHM=0.2 eV) of G(N-H)G(N+H) was shifted to the blue by 0.3 eV and normalized to obtain an overlap with the experimental spectrum at 3.3 eV. The calculated spectrum of the ion pair was adjusted with the same parameters. The best agreement with the experimental spectrum is obtained with a 2:3 superposition of the calculated G(N-H)G(N+H)- and ion pair spectra.

one, followed by path c (+0.18 eV) and path d (+0.33 eV), according to PCM/CAM-B3LYP/6-311+G(2d,2p)//PCM/CAM-B3LYP/6-31G(d) calculations. Interestingly, the minimum of the most stable ${}^3\text{GG}_{\text{CT}}$ state, which is formed in path b as precursor of the (G-H)·/(G+H)· diradical species, is the most stable triplet minimum. It is slightly more stable (0.01 eV) than the minimum of the ${}^3\pi\pi^*$ state localized on G2.

We have computed the absorption spectra of the different radical species at the LR-PCM/TD-CAM-B3LYP/6-31+G(d,p) level, optimized in n-hexane at the CAM-B3LYP/6-31G(d) level, together with that of the G^+ radical cation and G^- radical anion, which would be the product of GG charge transfer if proton transfer reactions were slowed down by dynamical solvation effects, as in the GC dimer in CHCl_3 ,²⁸⁹ (figure 5.29 in the Supporting Information). It seems that path b agrees best with the experimental 100 ns spectrum, however, we cannot exclude a contribution of path a to our transient spectra. Of the triplet-triplet absorption spectra computed for the three minima that result from the GG CT deactivation paths and the optimized triplet radical ion pair (figure 5.30 in the Supporting Information), path b shows the best resemblance with the experimental 100 ns spectrum (figure 5.31 in the Supporting Information). Any superposition of path b and c results in less agreement than path b alone. By combining the spectrum of the species obtained after proton transfer along path b with that of the radical ion pair present before hydrogen transfer (path a), a very good agreement with the experimental spectrum is obtained, if one takes into account all the possible limitations of our theoretical treatment. The normalized 2:3 superposition (2 times path b + 3 times path a) is shown in figure 5.21.

At first glance, the observed transient lifetimes seem too long for radicals or radical ions in a solvent like hexane with a low dielectricity constant of 1.8. However, G aggregates are known to be photoconductive, hence G^+G^- charge separation by means of hole transfer is possible in large aggregates.^{299;300} Owing to the spatial separation, charge recombination is inhibited and as a result long lifetimes are observed. Thus we suggest that the late transient spectrum originates from the separated G radical ions as well as from the (G-H)· and (G+H)· radicals. This assumption is strengthened by the two different lifetimes observed. The absorption in the wavelength region of 335 - 425 nm is dominated by the radicals with $\tau_{\text{rad}} = 300$ ns and in the wavelength region of 425 - 540 nm by the radical ions with $\tau_{\text{ion}} = 200$ ns. The fact, that the 100 ns spectrum only is observed in solutions that were kept in the dark for 1 to 2 days, leads to the assumption that more extended networks of hydrogen bonded G are formed upon ageing. These extended networks that

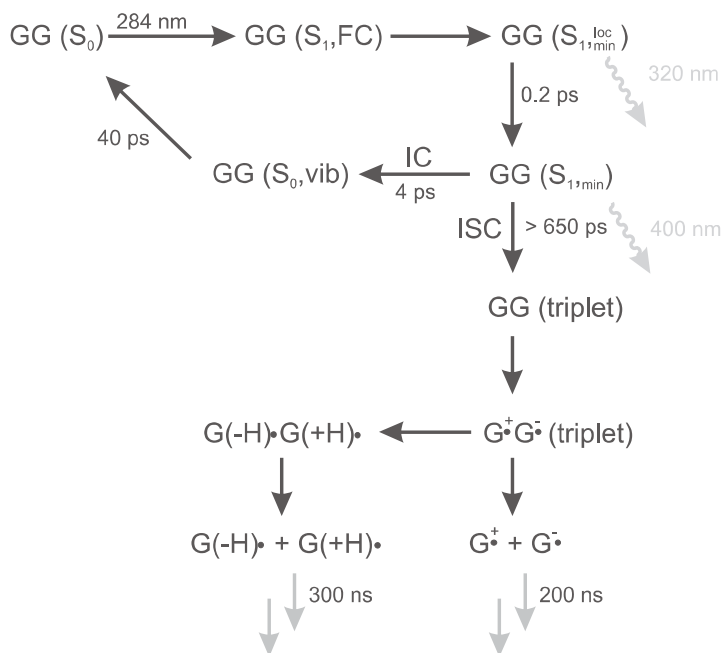


ABBILDUNG 5.22: Proposed mechanism for H-transfer in GG aggregates. For detailed description, see text.

are based on motifs as depicted in figure 5.13 are necessary for separation of the radical ions and thus prevent fast recombination. In fresh solutions in which extended networks are not yet formed, recombination of the radical ion pair occurs on a timescale faster than our nanosecond resolution.

5.2.4. Conclusion

We now know, what happens during ageing in guanosine solutions in lipophilic solvents: In chloroform, ribbon I (which was found to be the solid state structure) is predominant directly after dissolution. Within several days the structure changes to ribbon II (which is thermodynamically more stable in chloroform). The rate of transformation is increased in the presence of water.²⁶⁸ In hexadecane, ribbon I was observed exclusively, with no structural transition to ribbon II.²⁸⁷ Our IR spectra show that ribbon I is the predominant structure in our solution of G in n-hexane, with a minor fraction of ribbon II (see figure 5.14). Since we observe no changes in the IR spectra of fresh and aged solutions, we conclude that no structural transition occurs. However, growth of the aggregates does not lead to changes in the IR spectrum. The extended aggregates have the same binding motifs as the shorter ones, thus the network size cannot be distinguished by IR spectroscopy. The observed time for generation of extended networks is consistent with the reorganisation times of several days observed in the studies on guanosine derivatives mentioned above.^{268;287}

A possible scheme for our findings is depicted in figure 5.22. After relaxation of the initially excited S_1 state of the GG aggregates and inter-system crossing (ISC) to an energetically nearby triplet $\pi\pi^*$ - or $n\pi^*$ - state the system internally converts to a triplet charge transfer (3CT) state (transfer of HOMO electron density of one G moiety to the LUMO of its hydrogen bonded counterpart) to lead to a G^+G^- radical ion pair. Shortly afterwards, the electron follows the proton along the $NH\cdots N$ or $NH\cdots O=C$ pathways that lead to the $(G-H)\cdot/(G+H)\cdot$ radical pair which subsequently dissociates, reacts back or possibly con-

verts to other products like the G enol form. Our calculations suggest that, among these possible paths, path b with $\text{NH}\cdots\text{N}$ proton transfer is the more likely. The G^+G^- radical ion pair can also be separated by hole transfer, whereby proton transfer is inhibited. Further work will be directed towards detection of the $(\text{G-H})\cdot$ radical in G repeats of centromeres and telomeres and superstructures of DNA triplexes and quadruplexes in which stacking occurs and thus enables exciplex formation as a competing deactivation channel.

5.2.5. Materials and Methods

The guanosine derivative was synthesized according to Sheu and Ogilvie^{280;281}. For detailed information, see figure 5.23.

Stationary absorption spectra were recorded with a Shimadzu UV-3101 spectrophotometer. Stationary emission was measured with a Spex Fluorolog 212 upon excitation at 267 nm. The spectra were corrected for the instrument response.

FTIR spectra were performed using a Nicolet 5700 spectrometer (Thermo Scientific) with a MCT detector. All samples were measured in transmission mode at room temperature. The sample chamber was flushed with dry, CO_2 free air during the measurements. 32 scans in the forward backward mode were averaged for each spectrum with a spectral resolution of 2 cm^{-1} . A cell with CaF_2 windows and a 3 mm spacer was used (International Crystal Laboratories). All the measurements were performed at ambient temperature (21°C).

In the femtosecond transient absorption setup the Ti:Sa amplifier (Femtolasers) provides basic 30 fs pulses of $500\text{ }\mu\text{J}$ at 800 nm with a 140 Hz repetition rate. The beam is split in two parts. $420\text{ }\mu\text{J}$ are used to pump an optical parametric amplifier (TOPAS, Light Conversion) which delivers 50 fs, $5\text{ }\mu\text{J}$ pump pulses at 284 nm. The remaining $80\text{ }\mu\text{J}$ are converted into second harmonic 400 nm, $15\text{ }\mu\text{J}$ pulses in a 0.2 mm BBO crystal. The probe supercontinuum is generated by focusing the 400 nm pulses into a 1 mm CaF_2 plate. The probe light is spectrally altered with a dye solution flowing in a 0.3 mm cell and then split for the signal and reference. The signal beam is imaged onto the sample flow cell to a spot size of $100\text{ }\mu\text{m}$. The sample has typically an absorbance $A = 0.7$ over a 0.3 mm thickness. The signal and reference light is dispersed with homemade grating spectrographs and finally registered by photodiode arrays with 512 pixels (S39901-512Q, Hamamatsu) covering the spectral range 270-690 nm.

The nanosecond transient absorption setup (Applied Photophysics) utilises the output from a frequency quadrupled (266 nm) pulsed Nd:YAG laser (Innolas) for guanosine photoexcitation. The solutions (0.8 mM G in n-hexane) were excited with 70 mJ pump energy at 15 ns laser pulse width and 1 Hz repetition rate. The pump beam of 1 cm diameter is directed into the sample at right angle to the probe beam. A 0.4 mL cuvette with 1 cm length in the pump beam direction and 1 mm length in the probe beam direction was used. The samples were purged with dry nitrogen to remove dissolved oxygen from the solutions. For sensitive measurements of absorbance changes we use a high intensity pulsed xenon lamp (150 W, 1.5 ms) as probe source. Behind the sample the probe light is dispersed by a grating monochromator for wavelength selection. The output signal is detected by a photomultiplier (R928, 250-800 nm), digitized by an oscilloscope (Agilent Infinium) and transferred to a workstation (Iyonix). Typically 20 laser pulses are averaged to record a kinetic trace at a selected wavelength. The displayed spectra are averaged over five measured spectra.

Geometry optimizations were performed in aqueous solution at CAM-B3LYP²⁹⁶ or the

TD-CAM-B3LYP levels, by using 6-31G(d) basis set³⁰¹ and including bulk solvent effects by the polarizable continuum model (PCM).²³² Excited state geometry optimizations in solution have been performed by using the 'standard' LR (linear-response) implementation of PCM/TD-DFT, for which analytical gradients are available.^{302;303} All the calculations were performed by the Gaussian09 Program.

5.2.6. Acknowledgements

The Düsseldorf group thanks the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Kl 531/29-1) for financial support. R.I. thanks MIUR (PRIN 2008 and FIRB Futuro in Ricerca 2008) for financial support.

5.2.7. Supplementary Information

For preparation of 2',3',5'-O-tris(tert-butyldimethylsilyl)guanosine, 2.025 g guanosine (SIGMA, 98 %), 4.817 g imidazole and 4.255 g TBDMSCl (tert-butyldimethylsilylchloride) were solved under nitrogen in 30 ml dry DMF (dimethylformamide). The solution was stirred for 24 h at room temperature. Afterwards 20 ml water and 20 ml ethyl acetate were added. The aqueous phase was washed three times with 20 ml ethyl acetate and the joined organic phases were dried over MgSO₄. After filtration the solution was reduced under vacuum to yellow oil. The product was precipitated as a white solid by addition of 20 ml water and dried under vacuum. The sample was characterized by NMR spectroscopy and mass spectrometry.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = -0.18 (s, 6H, Si(CH₃)₂), -0.01 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.00 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.81 (2s, 27H, SiC(CH₃)₃), 3.60 - 3.77 (m, 2H, 5'-H), 3.85 (m, 1H, 4'-H), 4.07 (m, 1H, 2'-H), 4.49 (m, 1H, 3'-H), 6.36 (s, 1H, 1'-H), 6.91 (s, 2H, NH₂), 7.79 (s, 1H, 1-H), 10.52 (s, 1H, NH) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = -5.14, -5.10, -5.09, -4.44, -4.40, -4.30 (Si(CH₃)₂), 17.93, 18.17, 18.39 (SiC(CH₃)), 25.83, 26.10, 26.21 (SiC(CH₃)₃), 63.34 (5'-C), 73.30 (3'-C), 75.58 (2'-C), 85.39 (1'-C), 86.11 (4'-C), 116.69 (2-C), 135.47 (1-C), 151.98 (5-C), 154.25 (4-C), 157.09 (3-C) ppm.

ESI: m/z : 626 [M]⁺, 649 (+Na⁺), 511 (-Si(CH₃)₂C(CH₃)₃).

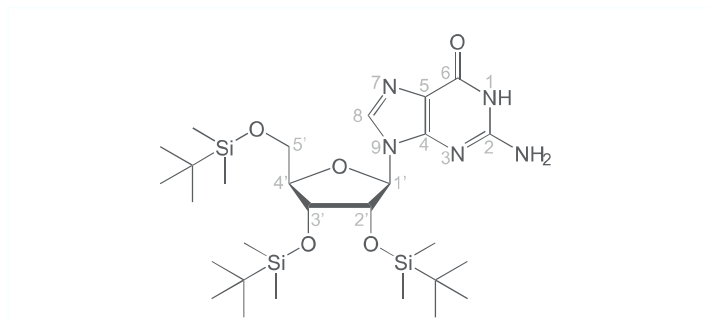


ABBILDUNG 5.23.: Silylated guanosine: 2',3',5'-O-Tris(tertbutyldimethylsilyl)guanosine used in the experiment.

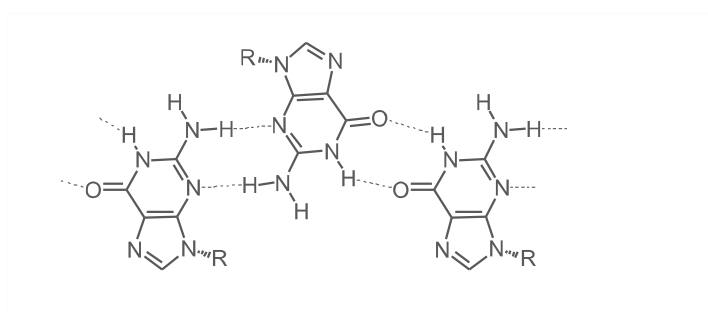


ABBILDUNG 5.24.: Structure of the Ribbon II motif in GG aggregates.

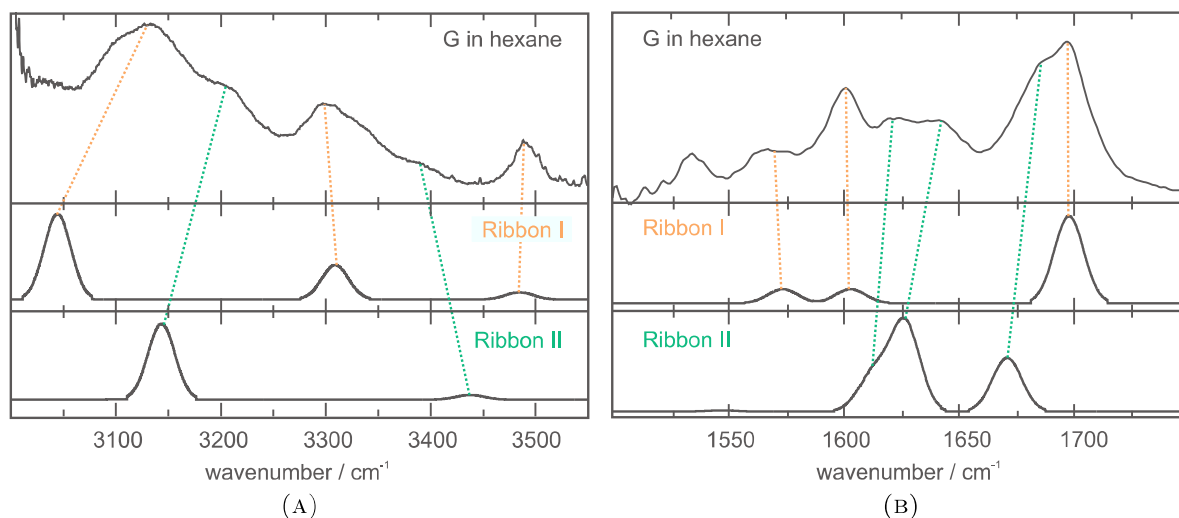


ABBILDUNG 5.25.: Comparison of the experimental spectrum of G aggregates in n-hexane with the calculated spectra of the ribbon I and ribbon II structural motifs (DFT-B3LYP/TZVP).

In ribbon I the $\text{fHNH}\cdots\text{O}=\text{C}$ stretch vibration (3487 cm^{-1}) fits very well with the experiment (3487 cm^{-1}). According to the calculations the free NH stretch vibration in the $\text{fHNH}\cdots\text{N}$ hydrogen bonds containing dimer absorbs at a much lower frequency of 3438 cm^{-1} in ribbon II. However, no IR absorption is observed in this spectral region. Furthermore, the H-bonded $\text{HNH}\cdots\text{O}=\text{C}$ stretch vibration in ribbon I (3308 cm^{-1}) is found in the experiment (3297 cm^{-1}). In this spectral area no absorption band is expected in ribbon II. Therefore we hypothesize ribbon I²⁶⁸ to be the prevalent structure for our G in n-hexane. This is in agreement with NMR and IR investigations from Giorgi et al.²⁶⁸ for guanosines with different bulky substituents as obtained in crystals, in a dry film and in hydrocarbon solvents. We have a high contribution of ribbon I motif and minor contribution of ribbon II motif in our hexane solution. All IR frequencies are scaled to the free NH stretch vibration of H bonded NH_2 in ribbon I at $\sim 3487\text{ cm}^{-1}$ (factor: 0.94).

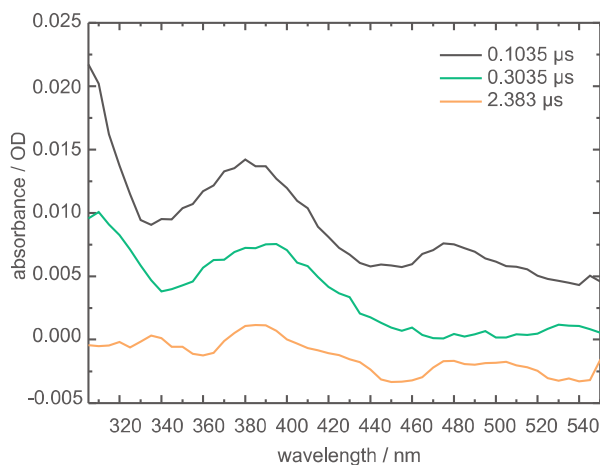


ABBILDUNG 5.26: Transient absorption spectra of a 0.8 mM solution of guanosine in n-hexane at different pump-probe delays after laser excitation at 266 nm. The solution was deaerated with N_2 . The measurements were performed in a 1 mm cuvette. The spectra could only be observed in n-hexane solutions older than two days. The decay times were fitted monoexponentially and vary between 200 ns and 300 ns (figure 5.29c).

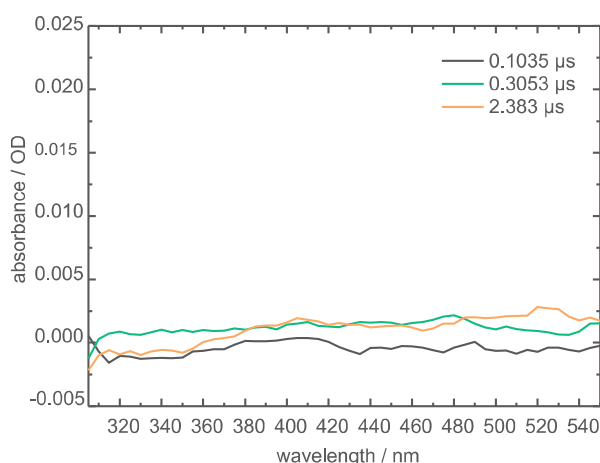


ABBILDUNG 5.27: Transient absorption spectra of a 0.8 mM solution of guanosine in n-hexane at different times after laser excitation. The solution was flushed with O_2 . The measurements were performed in a 1 mm cuvette. The absorption bands observed in the N_2 -flushed solution (figure 5.29a) are quenched by oxygen. Therefore it is assumed that the triplet state (or a long-lived singlet state with a lifetime longer than the diffusion time of O_2) is a precursor for the formation of the radical.

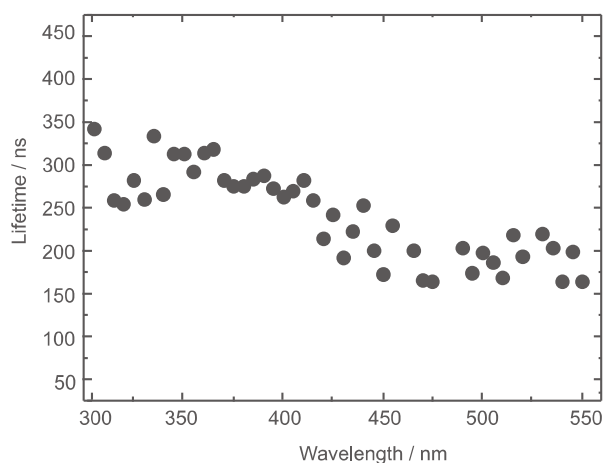


ABBILDUNG 5.28: Excited state lifetimes of a 0.8 mM solution of guanosine in n-hexane at different wavelengths. The kinetic curves were fitted monoexponentially. The lifetimes vary between 291 ± 26 ns below and 197 ± 32 ns above 425 nm.

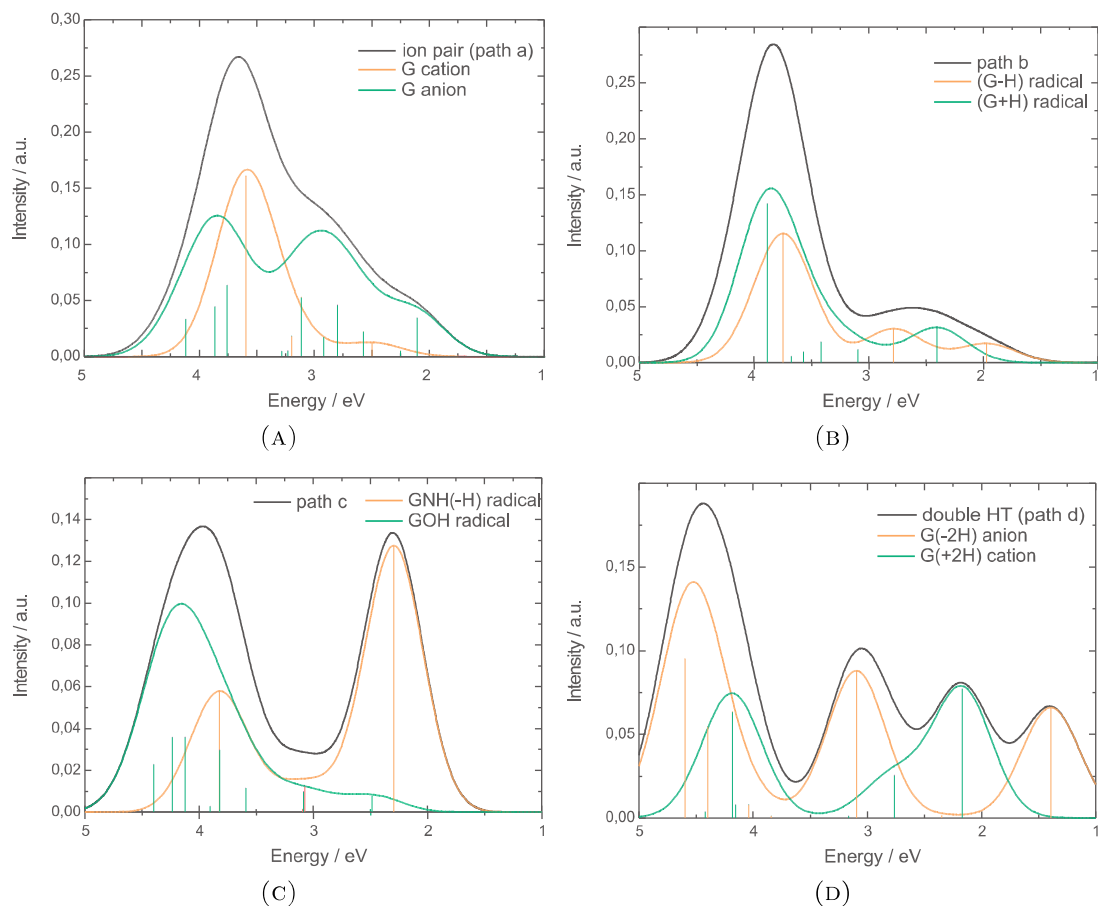


ABBILDUNG 5.29.: Computed absorption spectra of the species involved in the possible deactivation paths of G2→G3 CT state. (A) Spectra of the G^+ cation and G^- anion; (B) spectra of the species resulting from a proton transfer from N3-H of G2 cation to N9 of G3. c) Spectra of the species resulting from a proton transfer from NH_2 group of G2 cation to O atom of G3. (D) Spectra resulting from the double G2→G3 proton transfer. The curves are obtained by convoluting the stick spectra with a phenomenological Gaussian with HWHM=0.3 eV. Black curves are the spectra resulting from the sum of the spectra of the radical/ion species involved in each path.

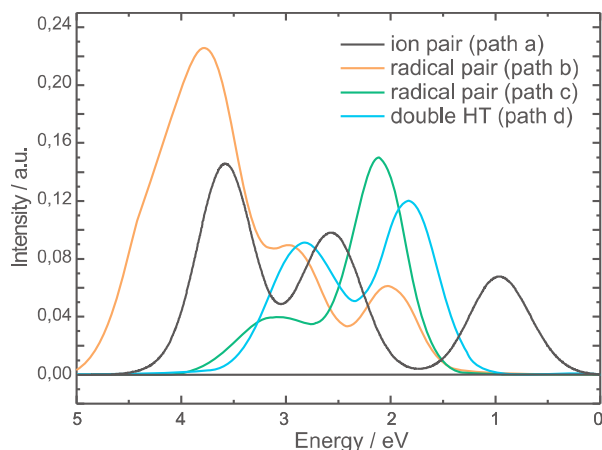


ABBILDUNG 5.30: Computed absorption spectra of the triplet species involved in the possible deactivation paths of $G2 \rightarrow G3$ 3CT state. Black: spectrum of the G^+ cation and G^- anion; red: spectrum of the species resulting from a proton transfer from N3-H of G2 to N9 of G3 (path b); green: spectrum of the species resulting from a proton transfer from NH_2 of G2 cation to O of G3 (path c); blue: spectrum resulting from the double $G2 \rightarrow G3$ proton transfer (path d). The curves are obtained by convoluting the stick spectra with a phenomenological Gaussian with $WHM=0.3$ eV.

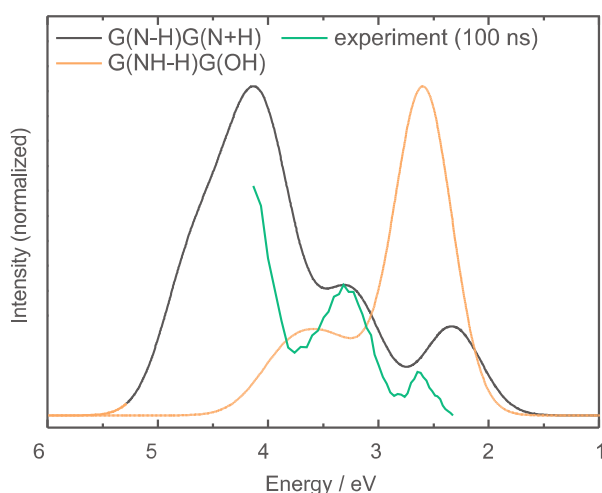


ABBILDUNG 5.31: Comparison between experimental and calculated transient spectra. The calculated spectrum of $G(N-H) G(N+H)$ was shifted to the blue by 0.3 eV and normalized to obtain an overlap with the experimental spectrum at 3.3 eV. The calculated spectrum of $G(NH-H) G(OH)$ was adjusted with the same parameters. The spectrum of $G(N-H) G(N+H)$ (path b) agrees better with the experimental 100 ns spectrum than that of $G(NH-H) G(OH)$ (path c). Superposition of both spectra does not lead to a better agreement with the measured spectrum.

TABELLE 5.6.: Vertical excitation energies of lowest energy singlet excited states computed for Ribbon I model by using LR-PCM/TD-CAM-B3LYP calculations on PCM/CAM-B3LYP/6-31G(d) minimum. Oscillator strengths are given in parentheses. See figure 5.23 for the guanine labelling.

States	6-31G(d)	6-31+G(d,p)	6-311+G(2d,2p)
$\pi\pi^*$ L _a G2	5.17(0.15)	5.02(0.13)	4.94(0.09)
$\pi\pi^*$ L _a G3	5.23(0.20)	5.10(0.20)	5.02(0.18)
$\pi\pi^*$ L _a G1	5.28(0.16)	5.15(0.21)	5.07(0.23)
$\pi\pi^*$ L _b G2	5.62(0.65)	5.38(0.36)	5.32(0.36)
$\pi\pi^*$ L _b G1	5.64(0.37)	5.30(0.58)	5.24(0.58)
$\pi\pi^*$ L _b G3	5.68(0.26)	5.49(0.39)	5.41(0.40)
$n\pi^*$ G1	5.66(0.00)	5.65(0.00)	5.61(0.00)
$n\pi^*$ G3	5.89(0.00)	5.85(0.00)	5.85(0.00)
$n\pi^*$ G2	5.90(0.00)	5.88(0.00)	5.86(0.00)
CT G2→G3	5.78(0.03)	5.67(0.03)	5.60(0.03)
CT G1→G3	5.89(0.00)	5.84(0.00)	5.77(0.00)
CT G1→G2	5.92(0.00)	5.89(0.00)	5.80(0.00)

TABELLE 5.7.: Vertical excitation energies of lowest energy triplet excited states computed for Ribbon I model by using LR-PCM/TD-CAM-B3LYP calculations on PCM/CAM-B3LYP/6-31G(d) minimum. See figure 5.23 for the guanine labelling.

States	6-31G(d)	6-31+G(d,p)	6-311+G(2d,2p)
$\pi\pi^*$ G2	3.77	3.72	3.65
$\pi\pi^*$ G3	3.83	3.78	3.71
$\pi\pi^*$ G1	3.89	3.84	3.76
$\pi\pi^*$ G1	4.04	4.01	3.98
$\pi\pi^*$ G3	4.07	4.04	4.01
$\pi\pi^*$ G2	4.12	4.09	4.06
$\pi\pi^*$ G1	4.99	4.93	4.87
$\pi\pi^*$ G2	5.00	4.96	4.90
$\pi\pi^*$ G3	5.00	4.97	4.91
$n\pi^*$ G1	5.19	-	-
$n\pi^*$ G1	5.43	-	-
$n\pi^*$ G3	5.49	-	-
CT G2→G3	5.76	-	-

TABELLE 5.8.: Cartesian coordinates of the Ribbon 1 trimer minimum as optimized at the PCM/CAM-B3LYP/6-31G(d) level in hexane.

Atomic number	X	Y	Z	Atomic number	X	Y	Z
7	-4.054432	-0.097836	0.116743	6	-5.342899	0.467752	0.057621
6	-6.340274	-0.561731	-0.015487	6	-5.917936	-1.883993	-0.023397
7	-4.662979	-2.382296	0.031857	6	-3.753828	-1.428974	0.104804
7	-7.060498	-2.631196	-0.103289	6	-8.103116	-1.728925	-0.138718
7	-7.716987	-0.487031	-0.089031	6	-7.133757	-4.074736	-0.137358
8	-5.476160	1.686310	0.072313	7	-2.446305	-1.760361	0.198295
1	-1.681881	-1.089837	0.110474	1	-2.232869	-2.737236	0.076137
1	-3.284801	0.593290	0.148402	1	-9.128561	-2.069783	-0.202597
1	-6.717293	-4.502648	0.777811	1	-6.574813	-4.465045	-0.991037
1	-8.179823	-4.371271	-0.227782	6	0.283306	0.959447	-0.003951
6	-0.691486	1.995584	0.042482	6	-0.271169	3.314960	0.012039
7	0.988719	3.789465	-0.052090	6	1.888240	2.823941	-0.091587
7	1.573428	1.489330	-0.069726	7	-1.418051	4.063054	0.060447
6	-2.463118	3.171115	0.115932	7	-2.063445	1.930907	0.108523
6	-1.493464	5.509934	0.049713	7	3.196340	3.135346	-0.169960
8	0.109574	-0.264897	0.005667	1	-3.500020	3.477965	0.155610
1	-1.059421	5.906035	-0.870813	1	-0.950876	5.923110	0.902540
1	-2.541189	5.805315	0.110869	1	2.331722	0.785800	-0.094280
1	3.954073	2.455190	-0.137626	1	3.428991	4.115081	-0.139913
8	5.719014	1.563334	-0.107810	6	5.864983	0.346199	-0.070531
6	4.882940	-0.685202	-0.051415	7	3.513099	-0.601354	-0.069454
7	7.159577	-0.209699	-0.030105	6	7.454548	-1.551246	0.022925
1	7.907989	0.472370	0.008577	7	8.772703	-1.880651	0.107958
1	8.968819	-2.864626	-0.009659	1	9.466449	-1.252427	-0.270347
7	6.546587	-2.491899	0.039544	6	5.283892	-2.007239	0.011212
7	4.129702	-2.740767	0.030399	6	3.096658	-1.836505	-0.018922
1	2.055081	-2.128723	-0.012703	6	4.032716	-4.188382	0.098997
1	5.045537	-4.589941	0.100979	1	3.521732	-4.493313	1.014505
1	3.492110	-4.574358	-0.767456				

TABELLE 5.9.: Cartesian coordinates of the L_a-minimum in Ribbon 1 trimer minimum as optimized at the PCM/TD-CAM-B3LYP/6-31G(d) level in hexane.

Atomic number	X	Y	Z	Atomic number	X	Y	Z
6	-0.273098	1.070345	0.699966	6	0.699642	2.085392	0.582168
6	0.284182	3.481678	0.428107	7	-0.913685	3.739939	-0.133283
6	-1.833559	2.783909	0.060088	7	-1.602233	1.616821	0.759955
7	1.479921	4.128795	0.026280	6	2.453940	3.198465	0.041185
7	2.027398	1.979336	0.330263	6	1.612650	5.543807	-0.224314
7	-3.071497	3.000838	-0.405218	8	-0.116838	-0.165376	0.781079
1	1.402273	6.114685	0.685789	1	0.906634	5.848700	-1.000872
1	2.629252	5.754608	-0.558530	1	-2.325407	0.887827	0.677048
1	3.493245	3.412329	-0.180283	1	-3.867788	2.375720	-0.257222
1	-3.228051	3.863895	-0.904816	7	3.939884	-0.111588	0.113838
6	5.193946	0.419970	-0.240451	6	6.166709	-0.626998	-0.362322
6	5.755780	-1.933210	-0.132375	7	4.533090	-2.399957	0.202957
6	3.646106	-1.429349	0.318775	7	6.870360	-2.703356	-0.317892
6	7.886492	-1.829818	-0.645266	7	7.508852	-0.584939	-0.683073
6	6.944575	-4.140488	-0.178429	8	5.322703	1.629919	-0.397450
7	2.376935	-1.720856	0.674332	1	1.609282	-1.045449	0.671112
1	2.153398	-2.699742	0.752533	1	3.192163	0.594136	0.220357
1	8.886676	-2.192927	-0.844252	1	6.219715	-4.623533	-0.837432
1	6.734042	-4.439643	0.851382	1	7.949432	-4.468606	-0.448477
8	-5.624721	1.559016	-0.331436	6	-5.761008	0.340410	-0.264274
6	-4.797804	-0.661526	0.042118	7	-3.465824	-0.540076	0.348549
7	-7.014209	-0.246712	-0.524552	6	-7.287492	-1.594299	-0.502798
1	-7.736627	0.407085	-0.803278	7	-8.558068	-1.959490	-0.831569
1	-8.768885	-2.933083	-0.662502	1	-9.316224	-1.318006	-0.648981
7	-6.394817	-2.510781	-0.233281	6	-5.170106	-1.993426	0.018789
7	-4.036304	-2.695721	0.316907	6	-3.043117	-1.763684	0.503582
1	-2.023306	-2.030045	0.747743	6	-3.920840	-4.139410	0.408045
1	-4.168063	-4.599594	-0.550504	1	-2.894128	-4.389636	0.674886
1	-4.597402	-4.523573	1.173697				

5.2.8. Beiträge zur Veröffentlichung

Titel: UV light induced hydrogen transfer in guanine-guanine aggregates.

Autoren: Katharina Hunger, Laura Buschhaus, Lars Biemann, Michaela Braun, Sergey Kovalenko, Roberto Improta and Karl Kleinermands.

Veröffentlicht in: Chemistry - A European Journal (Impact Factor: 5.925)

Die zeitaufgelösten UV/Vis-Spektren im Nanosekundenbereich sowie die stationären Fluoreszenzspektren wurden von mir in Zusammenarbeit mit K. Hunger gemessen. Die zeitaufgelösten UV/Vis-Spektren im Pikosekundenbereich wurden von S. Kovalenko gemessen. Die stationären IR-Spektren wurden von mir und von L. Biemann aufgenommen. Die gerechneten IR-Frequenzen wurden von M. Braun und L. Biemann bestimmt. Alle weiteren quantenchemischen Rechnungen wurden von R. Improta durchgeführt. Die Interpretation der vielen unterschiedlichen Ergebnisse und das Schreiben der Veröffentlichung erfolgte durch K. Kleinermands unter Mithilfe von K. Hunger und mir.

6. Untersuchungen von photovernetzbaren Copolyimid-Filmen mittels IR Differenzspektroskopie

6.1. Characterization of Maleimide Dimers in Photo-Cross-Linked Copolyimide Films

KATHARINA HUNGER[#], LAURA BUSCHHAUS[#], NADINE SCHMELING^{*}, CLAUDIA STAUDT^{*}, ANNA PFEIFER[#] AND KARL KLEINERMANN[#]

^{*} INSTITUTE OF ORGANIC AND MACROMOLECULAR CHEMISTRY, FUNCTIONAL MATERIALS, HEINRICH-HEINE UNIVERSITY DUESSELDORF, 40225 DUESSELDORF, GERMANY

[#] INSTITUTE OF PHYSICAL CHEMISTRY, HEINRICH-HEINE UNIVERSITY DUESSELDORF, 40225 DUESSELDORF, GERMANY

Printed in *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(13):4538-4547, 2012.

6.1.1. Abstract

Copolyimide membranes are established materials for the separation of gaseous and liquid mixtures. Cross-linking of the polymer strands improves the physical and chemical stability. The photo-cross-linking of a 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 copolyimide membrane containing maleimide side groups as linker was investigated by FTIR spectroscopy. IR absorption spectra of the copolyimide backbone, 3-hydroxypropyldimethylmaleimide and the copolyimide functionalized with 3-hydroxypropyldimethylmaleimide were measured before and after different irradiation times and compared to each other. For band assignment a normal mode analysis was performed. The backbone of the polymer and the maleimide linker can be well distinguished due to their different spectral band positions. Only the films containing a maleimide moiety perform a photoreaction, the polymer backbone does not interfere. Based on the difference spectra and the results of the DFT calculations it was shown that the *trans*- and the *cis*-cycloadduct as well as the previously suggested 2-2'-adduct without a cyclobutane ring are formed upon UV irradiation. Evidence for an oxetane-like photoproduct was not found. Different time constants for the increase of the product bands were observed. The cycloadduct accumulates with a shorter time constant ($\tau = 2$ to 5 min) than the 2-2'-adduct ($\tau = 75$ min). The yield of the photo-cross-linking reaction was determined by spectral deconvolution and kinetic fitting of several marker bands. For the copolyimide synthesized in this work, a maximum value of 6 % was reached. The stiffness of the copolyimide backbone inhibits further photo-cross-linking.

6.1.2. Introduction

In recent decades polymers gained importance for membrane-based separation processes especially for gaseous and liquid mixtures⁶⁹ since the costs for purification of industrially relevant chemicals as benzene is drastically lower compared to high energy consumptive conventional separation processes, e.g. extractive distillation. The theory of membrane-based separation of aromatics/aliphatics using pervaporation is described in detail elsewhere.⁹⁶ Polyimides are well suited as membrane materials due to their stability over a wide temperature range and resistance against most organic solvents. However, several

drawbacks are occurring in applications, where severe conditions of pressure or aggressive components in the mixture are present. In these cases, e.g. CO₂-induced plasticization, physical ageing and strong swelling effects appear.⁹⁴ As a result, a dramatic loss in the separation performance is observed. The lack of stability for polymeric membrane materials can be avoided if cross-links in the polymer backbone are implemented.^{96;97} Different approaches are possible for obtaining cross-linked materials. If suitable functional groups, e.g. benzophenone, are present in the polymer backbone, cross-linking can be performed by UV irradiation via a radical reaction.¹⁰³ However, in this case the packing density of the polymer is reduced drastically which is undesirable. Another approach is to start with polymers having a specific number of functional groups, e.g. hydroxyl, amino, carboxyl groups, *etc.*, on the polymer backbone, which can be used for further polymer-analogous reactions. These polymers can be cross-linked either covalently^{304;305} or ionically³⁰⁶. Since polyimides e.g. Upilex (UBE), P84 (Evonik) and Kapton (Du Pont) copolyimides have been established as advanced membrane material on the market, a lot of research activities were performed to reach cross-linked copolyimides with a high stability and outstanding separation properties. As basic materials functional copolyimides are used and cross-linking has been performed chemically as well as ionically.^{94;96;101;108;307}

A different approach is the cross-linking by light. In a first approach polyimides were cross-linked by UV irradiation using benzophenone as linker.^{308–310} One of the major advantages of photo-cross-linking is that the reaction does not need a catalyst. The problem of washing out reaction residues during the separation process does not occur. The procedure of cross-linking is easy to perform with a UV lamp and up-scaling for the production of large membrane areas is possible. First approaches for photo-cross-linking of polymer films have been done using maleimide side groups as photo-linker.^{109;311–315} It is known that maleimide performs a [2+2] cycloaddition upon irradiation with UV light.³¹⁶ Seifert *et al.* found evidence for a second dimerization product in aqueous solutions.¹⁰⁴ The structure of this asymmetric product was confirmed by X-Ray analysis.³¹⁷ In contrast to the cycloaddition reaction, a cyclobutane ring is not generated.

A covalent bond between the carbons in position 2 and 2' (see figure 6.6) in both maleimide rings is formed instead. On account of this structure the second photoproduct is called 2-2'-adduct. Maleimide functionalized polymers are commonly used as negative photoresists.³¹⁸ First investigations of the light-induced cross-linking in polymer films for production of pervaporation membranes used poly[ethane-*stat*-(methacrylic acid)] functionalized with maleimide side groups.¹⁰² It was found that UV irradiation leads to the formation of the maleimide triplet state. An electron transfer from a triplet maleimide to an adjacent ground state moiety follows. The radical anion and radical cation then recombine to form the cycloadduct.¹⁰² The kinetic investigation in the nanosecond to microsecond time range was performed by UV/Vis transient absorption spectroscopy. In the investigated sample maleimide was the only chromophore absorbing in the UV.

In this work we combined the photo-cross-linking using maleimide side groups with an established class of membrane materials. The following monomers were used: 4,4'-hexafluoroisopropylidene dipthalic anhydride (6FDA) and 4,4'-diaminodiphenyl ether (ODA). In order to obtain a copolyimide with functional groups, the monomer ODA and 3,5-diamino benzoic acid (DABA) was used in the polymerization reaction in a ratio of 4:1. Thereby a copolyimide with carboxyl groups was produced with a statistical distribution of the functional groups. The repeating units of 6FDA-ODA to 6FDA-DABA were adjusted to 4:1. The carboxylic acid groups of the DABA subunits were functionalized

with 3-hydroxypropyldimethylmaleimide as photo-cross-linker. The distance between two maleimide moieties has a distinct influence on the degree of cross-linking. The amount of cross-links between the polymer chains affects stability and permeability of the membrane material and is therefore an important property. Controlling the degree of cross-linking is highly desired since it is very important that membrane materials can be manufactured reproducibly. In the case of photo-cross-linking, the cross-linking yield can be adjusted by the duration and intensity of UV irradiation. Generally it can be examined by the determination of gel fractions,³¹⁹ weight ratios,¹⁰⁷ rheology,^{104;105} swelling properties,¹⁰⁶ or spectroscopy.^{104;108;109;311;314;320}

A major advantage of spectroscopic methods is that the sample can be investigated non-invasively and in real time. Furthermore, it provides structural information of the sample. Transient absorption spectroscopy in the UV/Vis region is not applicable with this copolyimide due to the fact that absorption from the maleimide cross-linker and from the phthalimide moiety of the polymer backbone cannot be distinguished. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy provides structural information and is well suited to follow chemical reactions. FTIR difference spectroscopy can be applied for the detection of photoproducts with minor yields. By using this technique only bands arising from vibrations which change during the monitored reaction appear in the spectrum. Vibrations that were not altered are not present. By this means small changes can be isolated from the strong background absorption in the IR. The sensitivity allows for monitoring changes of the initial IR absorption of 0.1 %. In this study, we established a noninvasive method for a quantitative analysis of the degree of cross-linking in a maleimide functionalized copolyimide membrane.

6.1.3. Materials and Methods

Synthesis and sample preparation

Polyimides were synthesized according to Sroog *et al.*⁹² In this work the following monomers were used for the formation of a copolyimide: 6FDA (4,4'-hexafluoroisopropylidene diphthalic anhydride), ODA (4,4'-diaminodiphenyl ether), DABA (3,5 diamino benzoic acid) in DMAc (dimethyl acetamide) as solvent. The polyaddition was performed in a 500 mL flask with a reflux condenser and a septum under nitrogen atmosphere. First the diamines 0.5607 g (2.8 mmol) ODA and 0.1065 g (0.7 mmol) DABA were dissolved in 2.91 mL of DMAc at room temperature. After complete dissolution of the diamines, 1.5549 g (3.5 mmol) 6FDA and 3.5 mL DMAc were added to the mixture which was then stirred for 24 hours. Afterwards 5.85 mL DMAc was added to the highly viscous solution. For performing the imidization, a mixture of 1.072 g (10.5 mmol) acetic anhydride and 1.062 g (10.5 mmol) triethylamine was added and the solution stirred for 30 minutes at 120 °C. After cooling down to room temperature the solution was poured into a 1:1 mixture of water/ethanol for precipitation. The formed fibres were washed several times with ethanol and sheared with a polymer mill to a yellow powder. The powder was dried at room temperature over night and then dried further in vacuum at 150 °C and 89 mbar for 24 hours. The yield was 1.7 g (0.57 mmol, relative yield 81 %). The stoichiometric ratio between ODA and DABA in the copolyimide was determined *via* ¹H and ¹³C NMR spectra recorded in tetrahydrofuran (d₈). The obtained ratio of ODA:DABA was 4:1. The functionalization of the synthesized polymer was performed by the activation of the carboxylic acid groups *via* acid chloride formation and esterification

with 3-hydroxypropyldimethylmaleimide in tetrahydrofuran. This is described in detail with poly[ethene-*stat*-(methacrylic acid)] as copolymer.¹⁰² The esterification was performed with the synthesized copolyimide at room temperature.

For the FTIR measurements the polymer dissolved in tetrahydrofuran was spread on a NaCl window (International Crystal Laboratories, Garfield, USA) by spin coating and dried at room temperature overnight. The film thickness was determined with a micrometre calliper to be 15 μm . Films made from the copolyimide without the esterification step and of 3-hydroxypropyldimethylmaleimide were prepared analogously.

FTIR spectroscopy

We performed FTIR spectroscopy using a Vertex 80V spectrometer (Bruker, Ettlingen, Germany) with a MCT detector. All samples were measured in transmission mode in vacuum (2.5 mbar) and at room temperature. 2048 scans in the forward-backward mode were averaged for each spectrum with a spectral resolution of 2 cm^{-1} . A broadband interference filter (Bruker, 4000 - 900 cm^{-1}) in front of the detector was used which efficiently blocked stray light. The photo-cross-linking was induced by the fourth harmonic of a Nd:YAG laser (INDI, Spectra Physics, Darmstadt, Germany) at 266 nm with a pulse width of 10 ns and a repetition rate of 10 Hz. The excitation energy was adjusted to 6 mJ/cm^2 . Light-induced FTIR difference spectra were obtained by calculating the negative common logarithm of the ratio of the single channel spectra before and after illumination. These light-minus-dark IR difference spectra were recorded at several positions on the same film and reproduced with different films.

DFT calculations

Geometry optimizations and harmonic frequency calculations were performed at the B3LYP / TZVP level of theory using the Turbomole program package.^{200–203} Calculated harmonic vibrational frequencies were scaled by 0.971 in order to match the experimental C=O stretching vibrations of the 3-hydroxypropyldimethylmaleimide modified copolyimide.

6.1.4. Results

The three following samples were investigated with FTIR spectroscopy and compared: 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 copolyimide functionalized with 3-hydroxypropyldimethylmaleimide as cross-linker (*copolyimide with MI*), 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 copolyimide without the maleimide linker (*copolyimide without MI*) and 3-hydroxypropyldimethylmaleimide without the polymer (*MIOH*) (figure 6.1).

Absorbance spectra

The IR absorbance spectrum of the copolyimide with MI (figure 6.2) shows multiple bands in the region of 1800 - 1000 cm^{-1} . For band assignment, spectra of the MIOH film and the copolyimide without MI were measured under the same conditions in vacuum. In order to correct for the different thicknesses of the films the spectra were scaled to marker bands. For the polymer backbone these were absorptions at 1502 and 1244 cm^{-1} and for the maleimide at 1443 and 1409 cm^{-1} .⁶⁹ The sum of the spectrum of the copolyimide without

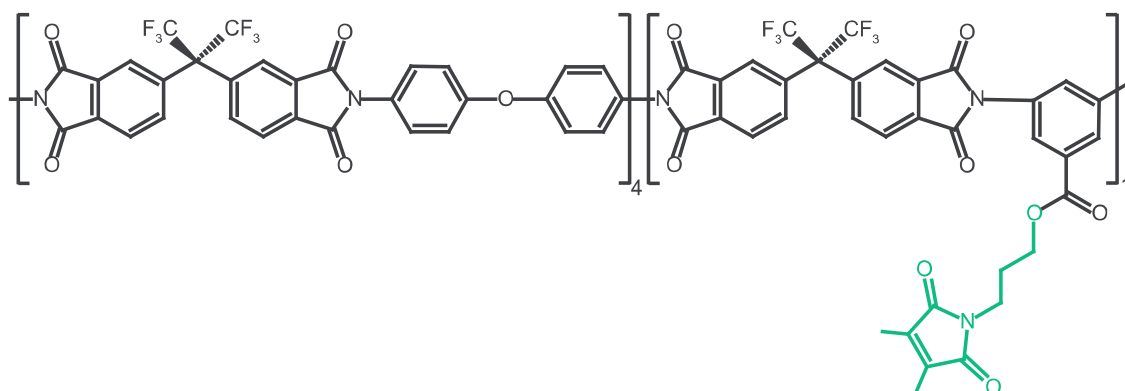


ABBILDUNG 6.1.: Chemical structure of 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 copolyimide functionalized with 3-hydroxypropyldimethylmaleimide. Depicted in green is the maleimide side group.

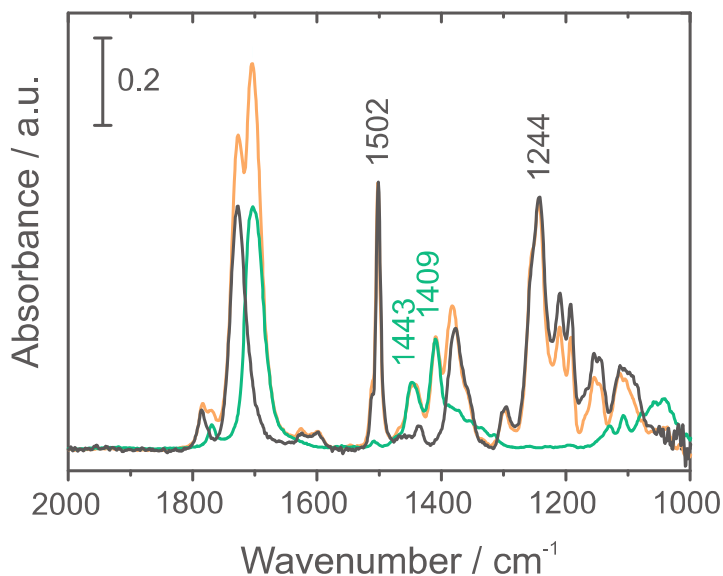


ABBILDUNG 6.2: FTIR absorbance spectra of 3-hydroxypropyldimethylmaleimide (green), 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 copolyimide (black) and the copolyimide with 3-hydroxypropyldimethylmaleimide (orange). All samples were prepared as films.

MI and the spectrum of MIOH reproduces the absorbance spectrum of the copolyimide with MI very well. The comparison of the absorbance spectra shows that the backbone of the polymer and the maleimide linker can be well distinguished due to their different spectral band positions.

In order to assign the band pattern of the polymer, a normal mode analysis was performed (figure 6.3). Since the whole copolyimide unity is very large, only subunits were calculated to save calculation time. As model compounds 3-hydroxypropyldimethylmaleimide (MIOH), *N*-methyl phthalimide (PHI), benzoic acid propylester (BAPE), diphenyl ether (DPE) and 2,2-bis-trifluoromethyl propane (TFMP) were used (figure 6.4).

The most interesting bands in terms of photo-cross-linking arise from carbonyl stretching vibrations in the region between 1800 and 1700 cm^{-1} . An overview of the assigned bands is given in table 6.1. The MIOH and the PHI subunits comprise two carbonyl groups each. The calculations reveal also two carbonyl normal modes for both molecules. The normal mode at higher wavenumbers represents the vibration of the carbonyl groups in phase. Approximately 50 cm^{-1} red shifted a vibration is calculated in which the two carbonyl groups move with opposite phase. The change of the net dipole moment of the opposite

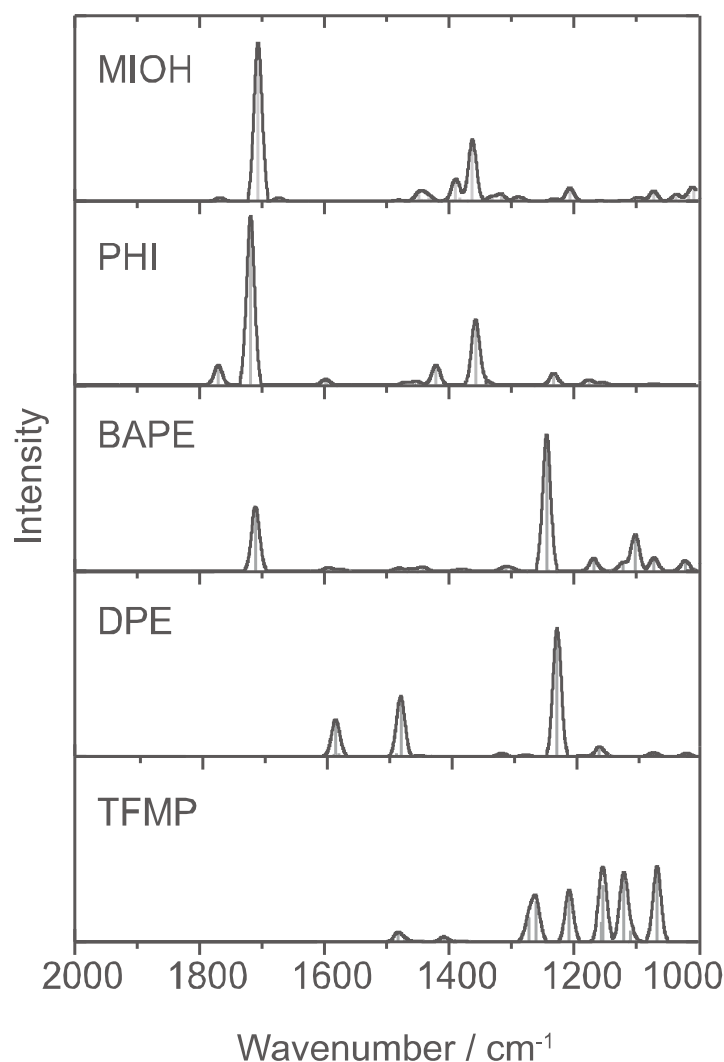


ABBILDUNG 6.3: Calculated IR bands (grey) and spectra with line broadening (Gaussian function, $\omega = 15 \text{ cm}^{-1}$, black).

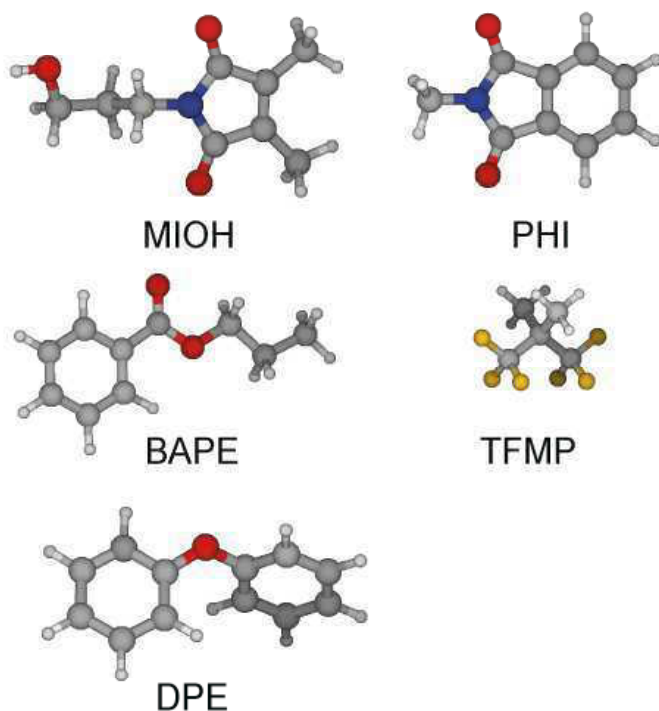


ABBILDUNG 6.4: Chemical structures of the calculated subunits of the copolyimide polymer: 3-hydroxypropyl-dimethylmaleimide (MIOH), *N*-methyl phthalimide (PHI), benzoic acid propylester (BAPE), 2,2 bis-trifluoromethyl propane (TFMP) and diphenyl ether (DPE). White: hydrogen, grey: carbon, red: oxygen, yellow: fluorine, blue: nitrogen.

TABELLE 6.1.: Vibrational bands of the copolyimide with MI.

spectral position		vibrational assignment
experiment (cm^{-1})	calculation (cm^{-1})	
1784	1771.3	PHI, C=O symmetric stretch
1770	1768.5	MIOH, C=O symmetric stretch
1727	1719.1	PHI, C=O antisymmetric stretch
1707	1711.2	BAPE, C=O stretch (ester)
1704	1706.9	MIOH, C=O antisymmetric stretch
1625	1597.6	PHI, C=C stretch, ring
1600	1587.5	DPE, C=C stretch, ring
1502	1476.3	DPE, C=C stretch, C-H bend, ring
1443	1389.0	MIOH, C-N stretch, chain
1409	1361.2	MIOH, C-N stretch, ring
1382	1356.2	PHI, C-N stretch
1298	1270.0	TFMP, C-F stretch
1244	1241.7	BAPE, C-O stretch
1210	1224.0	DPE, C-O-C antisymmetric stretch
1192	1205.4	TFMP, CF ₃ stretch
1154	1150.5	TFMP, CF ₃ stretch
1114	1117.7	TFMP, CF ₃ stretch

phase vibration exceeds the change during the symmetric in phase vibration. Hence, the extinction coefficient of the opposite phase C=O stretching vibration is much more intense than the combination with two in phase C=O stretching elongations. This is the case in the MIOH as well in the PHI subunit. In the carbonyl stretching region of the calculated spectra, the PHI bands are red shifted by 3 to 12 cm^{-1} compared to the MIOH bands. This is consistent with the experimental data where similar red shifts of 14 to 24 cm^{-1} were observed. In the absorbance spectrum of the 3-hydroxypropyldimethylmaleimide film, the bands at 1770 and 1704 cm^{-1} were assigned to the in phase and opposite phase carbonyl stretching combinations of MIOH (figure 6.2, dark grey curve). The corresponding C=O bands of the phthalimide moiety in the polymer backbone can be identified in the spectrum of the copolyimide without MI film at 1784 and 1727 cm^{-1} (figure 6.2, black curve). The carbonyl vibration of the ester group in the BAPE subunit shows up at 1711 cm^{-1} in the calculation and at 1707 cm^{-1} in the experiment. Due to the small difference in their band positions, the PHI, BAPE and MIOH carbonyl stretching bands overlap in the absorbance spectrum of the copolyimide with MI film (figure 6.2, light grey curve). In the lower wavenumber region the band assignment becomes more complex because the vibrations are not isolated anymore. The intense absorption band at 1502 cm^{-1} (figure 6.2) from the polymer backbone can be explained by a vibration with contributions of the carbon atoms in the phenyl rings and a bending of C-H in the diphenyl ether group. At 1443 and 1409 cm^{-1} the maleimide subunit has prominent absorption bands. The calculation reveals stretching vibrations of the C-N bond of the propyl chain and of the C-N bonds in the ring at 1389 and 1361 cm^{-1} , respectively. These vibrations were assi-

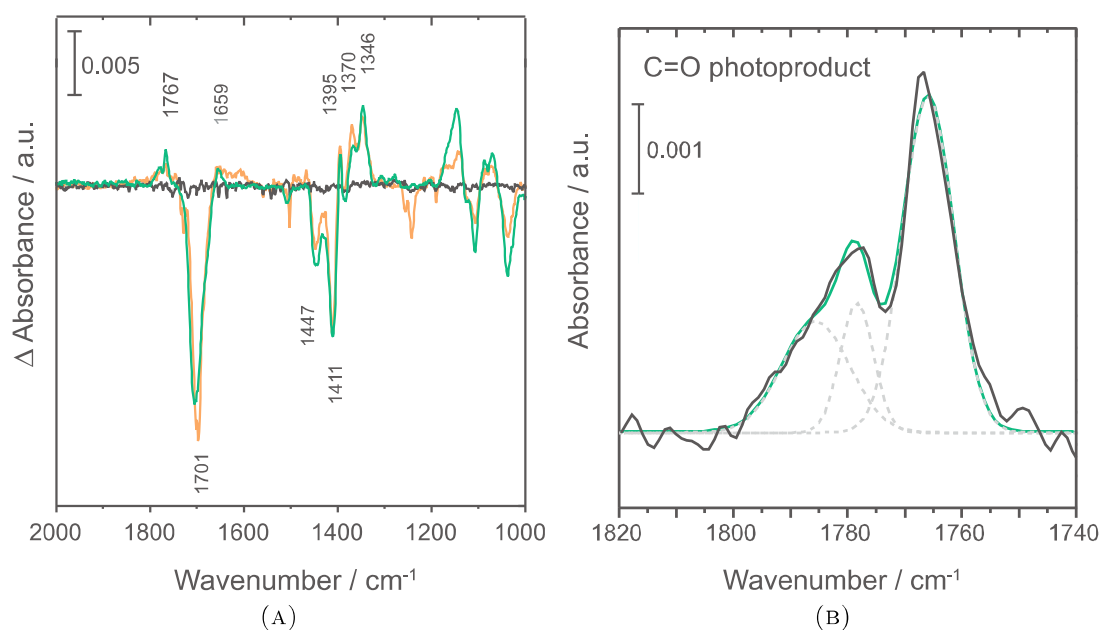


ABBILDUNG 6.5.: (A) Laser-induced FTIR difference spectra of 3-hydroxypropyldimethylmaleimide (green), 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 copolyimide (black) and the copolyimide with 3-hydroxypropyldimethylmaleimide (orange). (B) Difference spectrum of 3-hydroxypropyldimethylmaleimide (black) in the carbonyl region. The positive feature can be reproduced by the sum of three Gauss curves (green).

igned to absorption bands in the spectrum of the 3-hydroxypropyldimethylmaleimide film. Below 1400 cm^{-1} bending and torsion vibrations of the trifluoromethane groups in the copolyimide backbone dominate the spectrum.

Photo-cross-linking

All three films were illuminated by a pulsed laser. Behind the $15\text{ }\mu\text{m}$ thick films the laser energy was determined to be 0.6 mJ cm^{-2} , i.e. 10 % of the initial laser energy. Therefore it is safe to assume that the area of excitation extends over the whole thickness of the film, but is not completely homogeneous. In the maleimide containing films, the irradiation is expected to induce the cross-linking of the maleimide side chains. The copolyimide without MI is used as reference. The light-induced difference spectrum of the copolyimide with MI resembles the spectrum of the film with only 3-hydroxypropyldimethylmaleimide present (figure 6.5A). This provides evidence that only the maleimide moiety takes part in the photoreaction. The spectrum of the copolyimide without MI does not exhibit any light-induced difference bands. Without the maleimide cross-linker a photoreaction does not occur. The positions of the negative peaks correspond to absorbance bands of the maleimide in the dark which are reduced upon irradiation.

The most prominent band at 1701 cm^{-1} results from the opposite phase combination of the carbonyl stretching vibration in the maleimide monomer. A negative band in the region of the weaker in phase stretching combination was not observed. The bands at 1447 and 1411 cm^{-1} were assigned to C-N stretching vibrations of maleimide. In the absorbance spectrum of the polymer maleimide bands overlap with bands from the copolyimide. As a consequence, the band maxima are shifted. Copolyimide bands do not contribute to

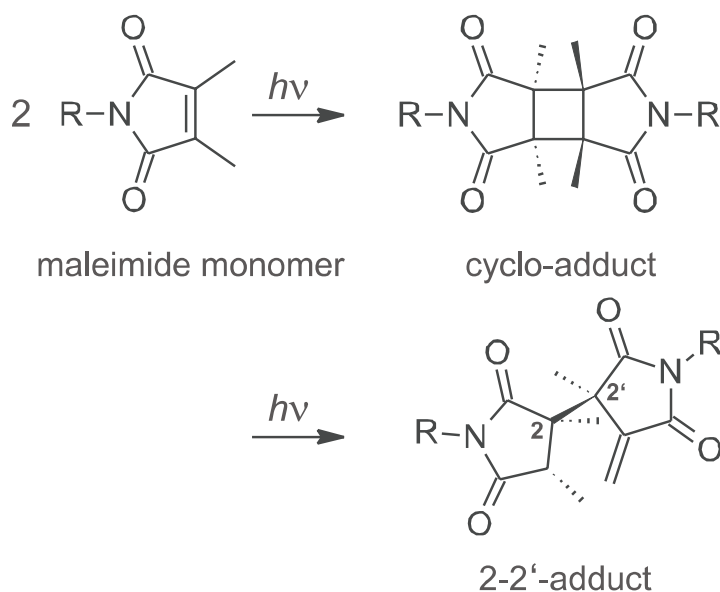


ABBILDUNG 6.6: Scheme of the dimerization of dimethyl maleimide under UV light to the cycloadduct and the 2-2'-adduct.³¹⁷

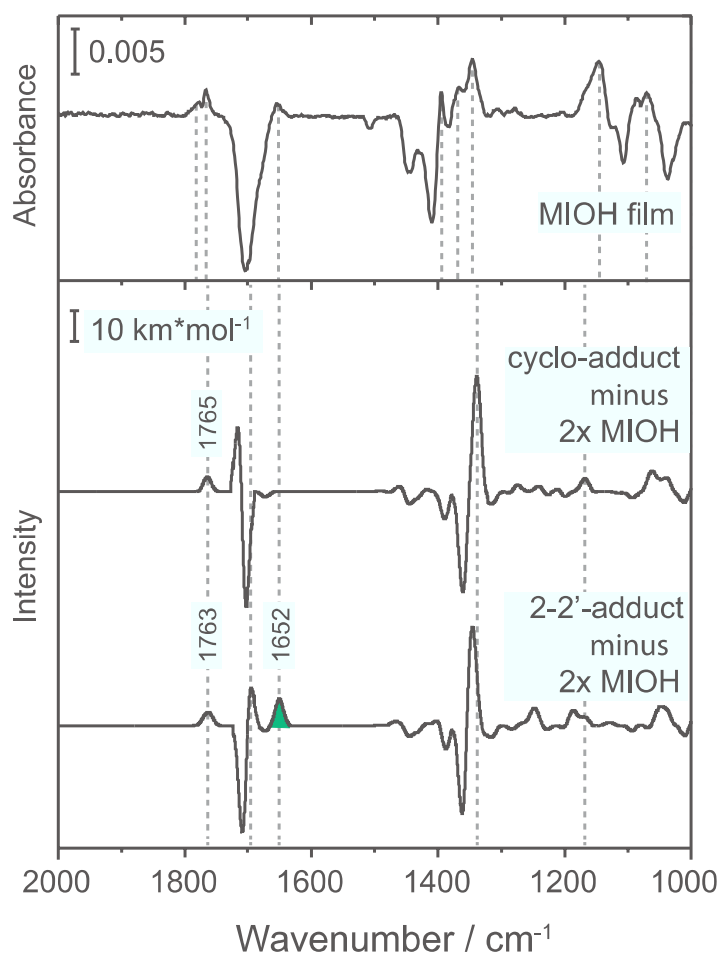


ABBILDUNG 6.7: Laser-induced FTIR difference spectra of 3-hydroxypropyldimethylmaleimide (upper trace), the calculated difference spectrum of the cycloadduct minus two times the calculated absorbance spectrum of 3-hydroxypropyldimethylmaleimide (middle trace) and the calculated difference spectrum of the 2-2'-adduct minus two times the calculated absorbance spectrum of 3-hydroxypropyldimethylmaleimide (lower trace). The marker band of the 2-2'-adduct at 1652 cm^{-1} is highlighted in green.

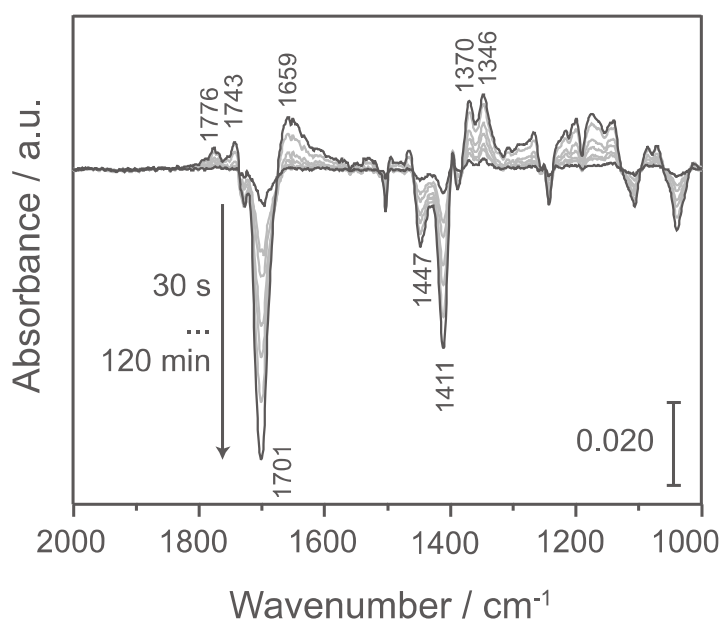


ABBILDUNG 6.8: Laser-induced FTIR difference spectra of 6FDA-ODA /6FDA-DABA 4:1 copolyimide functionalized with 3-hydroxypropyldimethylmaleimide after different illumination times. The first spectrum (30 s) is marked in black. The following spectra after 2, 4, 10, 20 and 60 min are depicted in grey and the last spectrum (120 min) of illumination is again marked in black. With longer UV illumination the difference bands become more intense.

the light-induced difference spectrum. Therefore the band positions of the negative peaks represent the unshifted positions of the maleimide monomer. Positive bands show those vibrations of the maleimide photoproduct, which exhibit different frequencies than the educts. Maleimide is known to form dimers *via* a [2+2] cycloaddition (figure 6.6).

Therefore, the positive band pattern should contain bands from this cycloadduct. It can be expected that the stretching vibration of the C=C double bond in the maleimide monomer vanishes upon formation of the cyclobutane ring.

Unfortunately, this vibration absorbs very weakly in the IR. However, a positive feature was detected in the region of the in phase stretching vibration of the carbonyl groups at 1767 cm^{-1} . The difference spectrum of the copolyimide with MI shows the same pattern as the difference spectrum of MIOH alone. Due to a better signal-to-noise ratio the positive band of the MIOH sample was further analyzed. A detailed view of this spectral region (figure 6.5B) shows two bands at 1777 and 1767 cm^{-1} . A sum of three Gaussian functions was needed to reproduce the band pattern. This hints at a contribution of three different carbonyl vibrations upon illumination. At lower wavenumbers a broad absorption with a maximum at 1659 cm^{-1} appears. In this region the unlinked film does not absorb. The most prominent photoproduct bands show up at 1395 , 1370 and 1346 cm^{-1} . For a better assignment of the difference bands, the IR spectra of the cycloadduct in *cis*- and *trans*-configuration were simulated by DFT calculations (figure 6.10). Additionally, a third possible dimer structure, the 2-2'-adduct,³¹⁷ was calculated (figure 6.6). In order to compare the calculated spectra with the measured light-minus-dark difference spectra, difference spectra were simulated by subtraction of the maleimide monomer (MIOH) absorbance spectrum calculated with doubled intensity from the calculated adduct spectrum. By this means, the number of oscillating carbonyls was kept constant during the simulated reaction. The intensities were not normalized but used with their calculated oscillator strengths. Thus, changes of the extinction coefficient of altered vibrations are taken into account. The resulting simulated difference spectra show similar band patterns (figure 6.7). The only significant difference is the additional band at 1652 cm^{-1} from the stretching vibration of the terminal C=C double bond in the 2-2'-adduct. Therefore, this band serves as marker band for this adduct species. The calculated difference spectrum of

the cycloadduct does not show a band in this spectral region. In the measured difference spectrum of the MIOH film and in the spectrum of the copolyimide with MI a band at 1659 cm^{-1} is present. This fact points to a contribution of the 2-2'-adduct to the cross-linked dimers after UV-illumination. Additional evidence for more than one photoproduct is provided by the positive carbonyl band with at least two contributions. Each of the two different photoadducts exhibits a band from the carbonyl symmetric stretching combination that differs by 2 cm^{-1} . The measured band pattern can be explained by a mixture of both adducts. The same situation appears in the area of the C-N stretching vibrations. In both adducts they are shifted to lower wavenumbers and display one intense band. The measured difference spectrum shows at least three prominent positive bands in this region. The comparison of the measured and calculated difference spectra lead to the conclusion that the cycloadduct and the 2-2'-adduct are formed in the film of 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 copolyimide functionalized with 3-hydroxypropyldimethylmaleimide under UV illumination.

Degree of cross-linking

The photo-cross-linking of the copolyimide film *via* the maleimide side chains was monitored at different illumination times from 30 s to 120 min (figure 6.8). The longer the sample was irradiated, the more intense the difference bands became. Saturation could only be observed for the positive bands. The negative band intensities increase with further illumination while the positive bands did not change any more after 120 min illumination. During the photoreaction most vibrations of the maleimide monomer are shifted upon dimerization due to the structural change. It is expected that the monomer bands decrease roughly to the same extent as the dimer bands appear. If the negative bands continue to increase and the positive bands do not change their intensity, a disappearance of the sample vibrations due to photodamage is likely. After 120 min of laser irradiation the copolyimide film showed brown spots. This implies that we did not only observe the photo-induced cross-linking but also a degradation process of the polymer backbone.

The kinetics of the difference bands were analyzed by exponential fitting (figure 6.9). For the negative bands a biexponential fit ($\tau_1 = 5\text{ min}$ and $\tau_1 > 120\text{ min}$) was necessary. The slower process with $\tau_2 > 120\text{ min}$ is assigned to photodamage and the faster process with $\tau_1 = 5\text{ min}$ to the decrease of the concentration of monomeric maleimide due to the cross-linking. With a similar early time constant $\tau_1 = 3\text{ min}$ the increase of the photoproduct bands below 1600 cm^{-1} can be fitted. A second time constant for product formation was determined to $\tau_2 = 40\text{ min}$. The product bands above 1600 cm^{-1} , where the carbonyl and C=C double bond stretching vibrations absorb, could well be described by a monoexponential curve with $\tau = 75\text{ min}$. The different behavior of the positive bands under prolonged irradiation hints at a secondary photochemical pathway or to contributions of several photoproducts with different rate constants for their formation. The band at 1659 cm^{-1} , which is a marker band for the 2-2'-adduct, can be reproduced by a monoexponential curve with $\tau = 75\text{ min}$. This leads to the conclusion that this adduct species plays a role at longer irradiation times. For a more precise analysis, the photoreaction should be followed by a pump-probe experiment in real time.

For analysis of the yield of cross-linking the amount of maleimide moieties which perform the photoreaction in the copolyimide film is determined. Thereby it is assumed that only maleimide side chains that react with $\tau_1 = 5\text{ min}$ contribute to adduct formation. In order to avoid contributions from overlapping product bands, the region between 1450 and

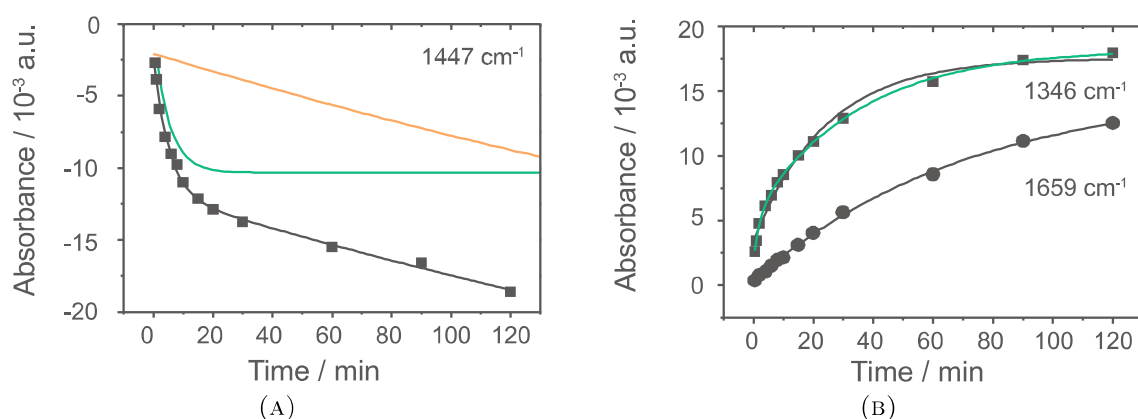


ABBILDUNG 6.9.: (A) Kinetic trace of the negative band at 1447 cm^{-1} that represents a C–N stretching vibration of the maleimide monomer (black squares). The biexponential fit with $\tau_1 = 5\text{ min}$ and $\tau_2 > 120\text{ min}$ is shown in black. The colored curves illustrate exponential functions with $\tau = 5\text{ min}$ (green) and $\tau > 120\text{ min}$ (orange). The former was used to evaluate the amount of maleimide that undergoes the photoreaction and was not photodegraded. (B) Kinetic traces of the positive bands at 1659 and 1346 cm^{-1} which originate from the vibration of the terminal C=C stretching of the 2-2'-adduct and a C–N vibration from the cycloadduct, respectively. The monoexponential fits are shown in black and the biexponential fit is drawn in green.

1400 cm^{-1} is used for the quantitative analysis. The photoadduct bands are red shifted by more than 40 cm^{-1} compared to the monomer bands in this spectral range. Monoexponential curves with the time constant $\tau_1 = 5\text{ min}$ and the amplitude A_1 derived from the biexponential fit of the negative bands at 1447 cm^{-1} and 1411 cm^{-1} have a maximum difference absorbance of $\Delta A = 0.010$ and $\Delta A = 0.018$, respectively (figure 6.9A). The initial absorption A is derived from the absorbance spectrum of the copolyimide with MI, which was deconvoluted by fitting Gauss curves (see S1). At 1447 cm^{-1} and 1411 cm^{-1} the contribution to the absorption is $A = 0.16$ and $A = 0.28$. The relative cross-link yield $\Delta A/A$ is thus determined to be 6.4% for both bands. The major part of the maleimide side chains therefore did not cross-link.

6.1.5. Discussion

Carbonyl stretching vibrations

The light-induced difference spectrum of the MIOH film as well as the spectrum of the copolyimide with MI shows a strong negative band at 1701 cm^{-1} and 1699 cm^{-1} , respectively, which corresponds to the C=O stretching vibration in the maleimide ring with opposite phase of the C=O elongations. Obviously, this band is altered upon UV illumination. Since the C=O double bond is not destroyed upon photoreaction, its stretching vibration is expected to be present among the positive bands.

A corresponding positive band is however not observed in the characteristic carbonyl region. There are three possible explanations. First, the bond strength is significantly weaker in the photoadduct so that the vibration is red shifted by more than 300 cm^{-1} . In the region below 1400 cm^{-1} different positive bands appear. In contrast, the calculations reveal a blue shift in the cycloadduct of 5 cm^{-1} and a red shift in the 2-2'-adduct of 2 cm^{-1} .

Therefore, a dramatic shift to other wavenumber regions is not likely. The second scenario is based on a negative band at the same spectral position that compensates the existent positive band from the asymmetric carbonyl stretching vibration.

From the comparison of the copolyimide with MI and the MIOH film it is evident that only the maleimide moiety reacts under UV irradiation. In the MIOH absorbance spectrum only two bands, the in phase and opposite phase carbonyl stretching vibration, are present in the spectral region of interest. Therefore, further contributions to the negative difference bands are not likely. A negative band that compensates the positive band from the opposite phase carbonyl vibration is not expected.

A third possibility is a significant decrease in the extinction coefficient. The inversion center of the *trans*-cycloadduct leads to a smaller net change of the dipole moment during the normal mode vibration. In this scenario it is expected that the maleimide before the photoreaction takes place absorbs stronger than the cycloadduct and as a result the difference spectrum contains only a negative contribution. The calculated absorbance spectra show however similar intensities of the asymmetric carbonyl stretching band in MIOH, the cycloadduct and the 2-2'-adduct (figure 6.11). The intensity refers to the unit $\text{km} \cdot \text{mol}^{-1}$. In the investigated sample volume 2 mol monomeric maleimide formed 1 mol adduct species. To account for this, the calculated MIOH absorbance spectra were scaled by a factor of 2 in the difference spectrum simulation. In these simulations a positive band is still visible though with smaller intensity. If the spectral shifts would be smaller than in the calculation, the positive part of the difference band would vanish. Therefore, the decrease of the extinction coefficient for the asymmetric stretch vibration might be the reason for the absence of a positive band in the difference spectrum. The assumption that the negative maleimide band at 1701 cm^{-1} is compensated by contributions of the photoproducts to the light-induced difference spectrum impedes the quantitative analysis. Therefore, the most prominent band is not applicable to determine the yield of cross-linking.

A negative band for the weaker absorbing in phase carbonyl stretching vibration of the maleimide was not detected. Either its intensity is too small to appear in the spectrum or it is compensated by a positive band arising from a photoproduct. The possibility that this band does not change frequency or intensity at all in the photoproduct is not likely because the opposite phase vibration shifts considerably.

Three photoproducts

It is well known that the cycloadduct is formed during the photoreaction.³¹⁶ Depending on the orientation of the maleimide moieties in the non-cross-linked film, not only the *trans*-configuration but also the *cis*-configuration can be formed. According to the calculations in the *cis*-cycloadduct the ring system is drilled which leads to a C_2 symmetry, while the *trans*-conformer shows higher symmetry (C_{2h}). The two configurations cannot be distinguished easily by infrared spectroscopy, since there are no prominent marker bands (figure 6.10). In the cycloadduct, four combinations of the carbonyl stretching vibrations are possible (figure 6.12).

- (I) all four C=O bonds stretch in phase,
- (II) the two C=O bonds of one ring stretch in phase, while the oscillation between the two rings shows opposite phase,
- (III) the two C=O bonds of one ring stretch in opposite phase, whereas the two rings vibrate in phase,

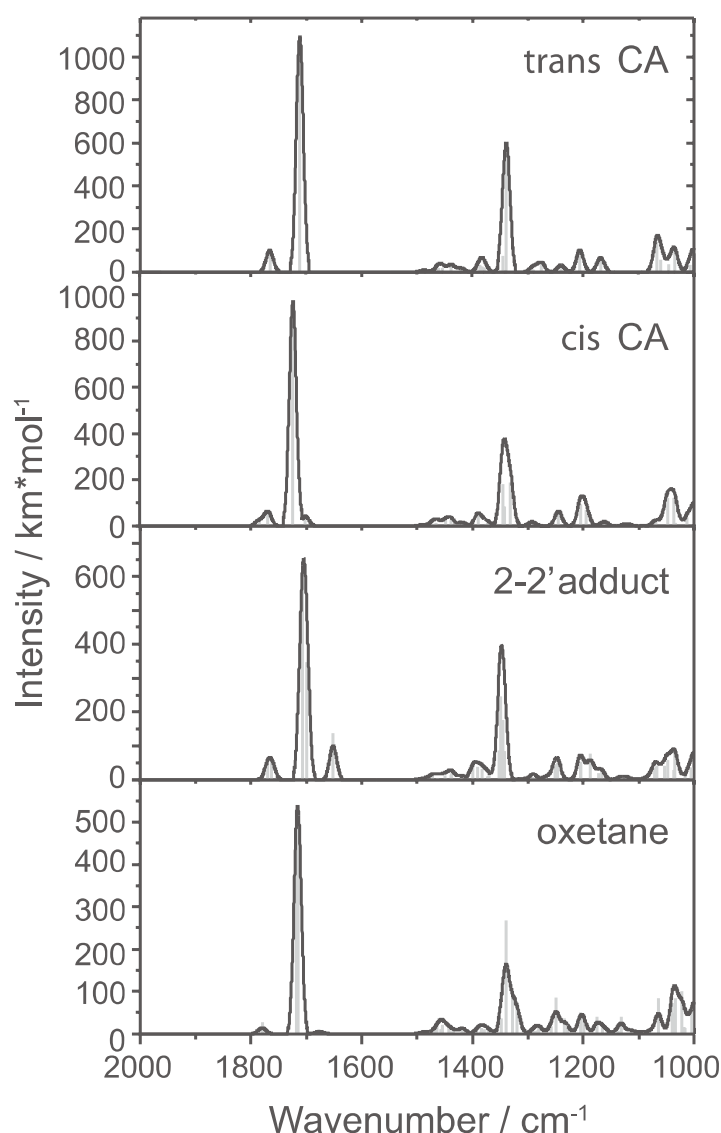


ABBILDUNG 6.10: Calculated IR bands (grey lines) and calculated absorbance spectra with line broadening (Gaussian function, $\omega = 15 \text{ cm}^{-1}$, black curves) of the photoproducts *cis*-cycloadduct, *trans*-cycloadduct, 2-2'-adduct and oxetane.

(IV) the two C=O bonds in one ring stretch in opposite phase, between the two rings the vibration is in opposite phase. Therefore the two C=O diagonal to each other move in phase. Due to the high symmetry of the *trans*-configuration only combinations II and III result in a net change of the dipole moment and therefore absorb IR light. The calculated IR spectrum of the *trans*-adduct shows only two carbonyl bands. In the *cis*-configuration all four combinations contribute to the absorption spectrum.

In the MIOH film the band pattern in the higher frequency C=O stretching region of the formed photoproduct shows three contributions that were verified by fitted Gauss curves centered at 1786, 1778 and 1766 cm^{-1} (figure 6.5B). The 2-2'-adduct was detected in solutions of polymers containing maleimid moieties before.^{104;317} In our experiments the presence of the 2-2'-adduct was proved by the marker band from the terminal C=C double bond. Therefore it is evident that it also contributes to the absorption pattern around 1770 cm^{-1} . The calculation predicts one band in this spectral region of interest. If the *trans*-cycloadduct and the 2-2'-adduct are formed in the copolyimide environment, only two bands would contribute to the positive difference band pattern. The calculated spectral difference is less than 1 cm^{-1} .

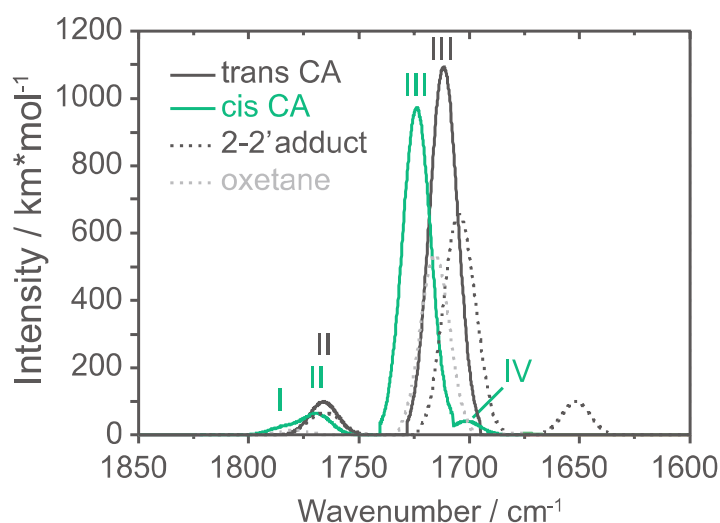


ABBILDUNG 6.11: Details of the carbonyl region of the calculated IR spectra of all four photoproducts. The absorption bands of the *trans*- and the *cis*-cycloadduct are labeled with the combinations of the vibrations according to figure 6.12.

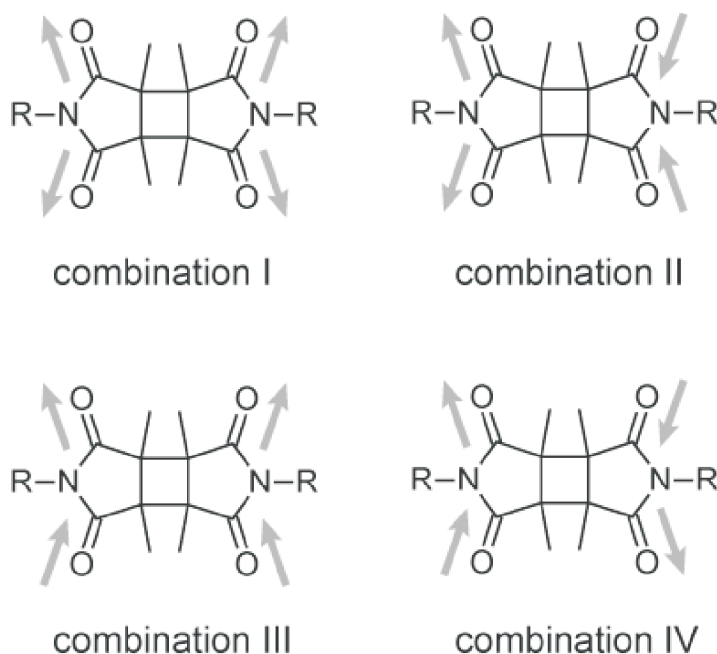


ABBILDUNG 6.12: Scheme of all four possible coupling combinations of the carbonyl stretching vibration combinations between 1600 and 1800 cm^{-1} in the cycloadduct.

Presumably, only one band would be visible in the measured spectrum. This is not sufficient to explain the band shape. A third contribution at higher wavenumbers is needed. Band I of the *cis*-adduct is calculated to 1786 cm^{-1} . The existence of both cycloadducts in the film could explain the spectral band pattern. One contribution from the *trans*-adduct (band II) heterodyned with two contributions from the *cis*-adduct (band I and II) could reproduce the positive band shape around 1770 cm^{-1} . Therefore, the shoulder at 1786 cm^{-1} in the measured absorption spectrum might be assigned to the all-in-phase carbonyl stretching combination of the *cis*-adduct. A combination of the *cis*-adduct and the 2-2'-adduct would additionally explain the measured band pattern.

Two maleimide moieties can also undergo a reaction according to Paternò and Büchi, resulting in an oxetane-like photoproduct.¹⁴¹ The energies of all four possible photoadducts were determined by DFT calculations. Among these photoproducts the *trans*-cycloadduct is the most stable one, followed by the 2-2'-adduct (+8.76 kJ/mol) and the *cis*-cycloadduct (+17.23 kJ/mol). The oxetane product has much higher energy (+123.93 kJ/mol) and

will therefore not be considered in the further discussion. It cannot be excluded that further photoproducts absorbing at the same spectral position are formed. Since the *trans*-cycloadduct is the most favorable adduct in energy, it is assumed that it contributes to the positive bands in the difference spectrum. Based on the light-induced difference spectra and the results of the DFT calculations it is assumed that the *trans*- and the *cis*-cycloadduct as well as the 2-2'-adduct are formed after UV irradiation of maleimide bound to copolyimide.

The photo-cross-linking of the copolyimide polymer *via* the maleimide side chains was followed in the minute time range. In contrast, the kinetics of the photoaddition of two maleimides is much faster and the elementary processes cannot be investigated with FTIR difference spectroscopy. Only the accumulation of the photoproduct was observed. This provides information on the yield of the cross-linking whereas the detailed photoreaction pathway could not be investigated. However, different time constants for the increase of the product bands were observed. Prominent bands in the C-N stretching region appear with $\tau = 2$ to 5 min. The band at 1653 cm^{-1} assigned to the 2-2'-adduct marker band increases with $\tau = 75$ min. This indicates that the 2-2'-adduct is formed with a lower yield than the cycloadduct. It is possible that the 2-2'-adduct is formed directly from the maleimide monomers. Additionally, the cycloadduct can serve as reactant for a rearrangement to the 2-2'-adduct. Both adduct species, the 2-2'-adduct and the cycloadduct (*cis* and *trans*), absorb at 266 nm better than the monomeric maleimide.³¹⁷ Therefore, further photoreactions should be considered. To obtain further insights on the reaction mechanism of the cycloadduct and 2-2'-adduct formation a time resolved experiment in the nano- and microsecond time range is required. This will be realized by step-scan FTIR spectroscopy in further investigations.

Determination of the cross-linking yield

For quantification of the cross-linking yield we established a method to determine the amount of maleimide moieties which perform the photoreaction in the copolyimide film. With regard to the application as pervaporation membranes, this value is of greater importance than the amount of polymer chains which were cross-linked.^{104;319} By our approach intramolecular reactions, which also affect the separation properties, are additionally taken into account. It is a common method to determine the cross-linking yield by analyzing a single prominent band.^{104;109;311;320} But since multiple competing processes have to be considered, like photodegradation and the spectral overlap of the absorption of products and reactants, this may not be sufficient. Therefore, we performed our analysis on several bands and additionally applied Gauss deconvolution to correct for the spectral overlap. The amount of cross-linked maleimide moieties reaches a maximum value of 6.4 %, determined by analysis of the bands at 1447 and 1411 cm^{-1} , where no overlap with product bands occurs. The possibility that negative bands might be compensated to some extent by photoproduct bands could not be excluded in the case of the carbonyl bands. In this case the negative maleimide bands would have an increased difference absorption that is compensated by adduct bands. As a result the cross-linking yield would exceed the 5 % determined from analysis at the carbonyl bands.

Further irradiation does not lead to a further increase of the cross-linking. In the film, the polymer chains are not as flexible as in solution. Additionally diffusion is inhibited. As a consequence not every excited maleimide side chain has a second maleimide in the vicinity to perform the photoaddition. A rearrangement is impeded by the high

stiffness of the 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 backbone due to π - π -interactions of the aromatic systems in the copolyimide chains, in contrast to other photo-cross-linkable polymers like polyurethane-acrylate or polymethacrylate, where higher cross-linking yields were reported.³¹¹ In these polymers the backbone is much more flexible. In principle, a low cross-linking yield is not disadvantageous for pervaporation membranes, since a high cross-linking degree mostly leads to a decrease in flow rates or poor mechanical stability, which makes the material inapplicable for the aspired application.

6.1.6. Conclusions and Outlook

UV-irradiation of 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 copolyimide films functionalized with 3-hydroxypropyldimethylmaleimide results in cross-linking of the polymer strands. We have shown with FT-IR difference spectroscopy that different photoreactions occur, which lead to at least three photoproducts, the *trans*- and *cis*-cycloadducts as well as the 2-2'-adduct. The degree of photo-cross-linking was defined as the amount of maleimide moieties which perform the photo-cross-linking reaction. A method to extract this information from the time-dependant changes of product and reactant absorption bands was established. The photo-cross-linking yield of 6 % is restricted by the stiffness of the polymer backbone, which inhibits the photoreaction due to a spatial separation of the cross-linker side chains. To obtain further insights on the formation mechanism of the cycloadduct and the 2-2'-adduct a time resolved experiment in the nano- and microsecond time range is required. This will be realized by step-scan FTIR spectroscopy in further investigations. In separation experiments the performance of the 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 cross-linked with photo-induced maleimide dimerization will be investigated concerning the affinity towards several solvent mixtures and the selectivity.

6.1.7. Acknowledgment

Financial support for this study from the German Research Foundation (Project KL 531/29-1) is gratefully acknowledged.

6.1.8. Supplementary Information

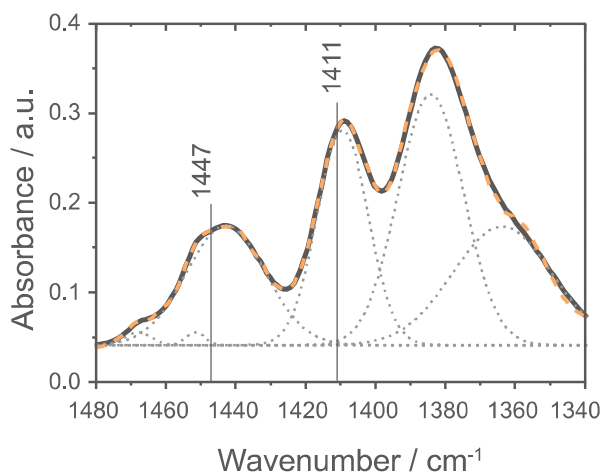


ABBILDUNG 6.13.: Deconvolution of the absorbance spectrum of the copolyimide with MI by five Gauss curves. The sum of the five Gauss curves is depicted in orange, the experimental absorbance spectrum in black.

6.1.9. Beiträge zur Veröffentlichung

Titel: Characterization of Maleimide Dimers in Photo-Cross-Linked Copolyimide Films.

Autoren: Katharina Hunger, Laura Buschhaus, Nadine Schmeling, Claudia Staudt, Anna Pfeifer and Karl Kleinermanns.

Veröffentlicht in: Physical Chemistry Chemical Physics (Impact Factor: 3.573)

Diese Veröffentlichung resultiert aus einer sehr effizienten Zusammenarbeit. Alle Synthesen wurden von N. Schmeling durchgeführt. Die FTIR-Spektren habe ich gemessen und die quantenchemischen Rechnungen hat K. Hunger durchgeführt. Die Ergebnisse wurden von K. Hunger, A. Pfeifer und mir zu gleichen Teilen diskutiert und interpretiert. Die Veröffentlichung wurde hauptsächlich von A. Pfeifer geschrieben.

7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Systeme in Hinblick auf ihr Verhalten nach Anregung durch UV-Licht untersucht.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit Photochemie der DNS-Basen. Alle vier DNS-Basen (Monomere und kurze DNS-Stränge dG₁₀, dC₁₀, dA₁₀, dT₁₀) wurden als Filme auf ein CaF₂-Substrat aufgebracht, und die FTIR-Differenzspektren nach Bestrahlung mit 266 nm (Nd:YAG-Laser) analysiert. Die Monomerfilme (aus einer Chloroformlösung) von 2',3',5'-O-tris-(tert-butyldimethylsilyl)guanosin (G) und 2',3',5'-O-tris-(tert-butyldimethylsilyl)cytidin (C) zeigen eine Bande bei 2277 cm⁻¹, die charakteristisch für eine Isocyanatgruppe ist. Sowohl die Thymidin-Filme, als auch die Filme aus den kurzen DNS-Strängen dG₁₀, dC₁₀ und dT₁₀, die aus Wasser gegossen wurden, zeigen eine entsprechende Bande bei 2338 cm⁻¹. In Filmen von Adenosin und dA₁₀ konnte weder eine Bande bei 2277 cm⁻¹ noch bei 2338 cm⁻¹ gemessen werden, was aufgrund der fehlenden C=O-Gruppe, die keine Isocyanatbildung zulässt, zu erwarten war. Die Zuordnung der Frequenz bei 2277 cm⁻¹ zu einer Isocyanatgruppe wurde durch quantenchemische Rechnungen (DFT) bestätigt. Die Frequenzverschiebung bei Filmen aus Wasser zu 2338 cm⁻¹ ist auf kleine Wasserrückstände im Film zurückzuführen. Diese Wassermoleküle bilden Wasserstoffbrücken mit der Isocyanatgruppe aus, die zu einer Blauverschiebung der Bande bei 2277 cm⁻¹ führen. Dies wurde durch Rechnungen mit Lösemittelumgebung (DFT COSMO) bestätigt. Experimentell konnte zudem noch gezeigt werden, dass die Isocyanatbande mit Wasserdampf im Überschuss wieder abnimmt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass Isocyanate mit Wasser schnell zu Harnstoffderivaten reagieren. Durch Vergleich der gemessenen mit berechneten Differenzspektren für verschiedene mögliche Produkte konnte gezeigt werden, dass im Thymidin zusätzlich zum Isocyanat die schon bekannten Produkte, wie das CPD, das (6-4)-Addukt und das Dewar-Valenz-Isomer gebildet werden. Auch im Cytidinfilm wurden Hinweise auf CPD sowie das Imino-Oxo-Tautomer gefunden. Letzteres entsteht vermutlich auch im Guanosinfilm. Für die Isocyanatbildung wie auch für die komplette Produktbildung wurden die Quantenausbeuten bestimmt. Diese sind für das Isocyanat sehr gering (im Bereich von 5·10⁻⁵). Nichtsdestotrotz ist dieser neue Reaktionsweg wichtig, da die hoch reaktiven Isocyanate in der Zelle sofort weiterreagieren und z.B. kovalente DNS-Protein-Bindungen ausbilden könnten. Mechanistisch kann die Ringöffnung zur Isocyanatgruppe nach Norrish Typ I beschrieben werden.

Das Guanosin (2',3',5'-O-tris-(tert-butyldimethylsilyl)guanosin) wurde in weiteren Untersuchungen in n-Hexan-Lösung auf das Vorliegen von photochemischen Transienten hin mittels der UV/Vis-Spektroskopie analysiert. Dabei wies das Spektrum mehrere Nano- bis Mikrosekunden nach dem Anregungspuls (266 nm) eine Bande zwischen 300-500 nm auf. Diese Bande konnte durch Sauerstoffsättigung der Lösung komplett gelöscht werden. Das Spektrum nach 100 ns wurde mit PCM/CAM-B3LYP Rechnungen (R. Improta, Università Federico II, Napoli) eines Guanosin-Trimers verglichen. Dabei wurden die Strukturen sowie die Singulett- und Triplett-Spektren des neutralen Trimers, des G⁺/G⁻-Ionenpaares

und verschiedenen Radikalpaaren berechnet. Informationen über die frühen Prozesse wurden durch Femtosekundenmessungen von S. Kovalenko (Humboldt Universität, Berlin) erhalten. NMR- und IR-Messungen zeigen, dass das verwendete Guanosinderivat in n-Hexan sich in bandähnlichen Strukturen zusammen lagert, wobei in n-Hexan die Struktur mit dem reverse-Hoogsten-Motiv dominiert.

Laut der Rechnungen ist der Reaktionsweg, bei dem nach Elektronentransfer ein Protonentransfer entlang der $\text{NH}\cdots\text{N}$ -Wasserstoffbrücke erfolgt, der energetisch günstigste. Im Vergleich zum Experiment gibt es die beste Übereinstimmung durch eine Überlagerung der gerechneten Spektren des Triplett-Ionenpaares und des Triplett-Radikalpaars. Dies passt auch zu den zwei unterschiedlichen, gemessenen Lebensdauern. Die Absorption zwischen 335 - 425 nm wird vom Radikalpaar mit einer Lebensdauer von $\tau_{\text{rad}}=300$ ns dominiert, während die Absorption zwischen 425 - 540 nm dem Ionenpaar mit einer Lebensdauer von $\tau_{\text{ion}}=200$ ns zugeordnet wird. Diese sehr langen Lebensdauern für Radikale und Ionen im unpolaren Lösemittel n-Hexan können nur beobachtet werden, da es eine Ladungstrennung entlang der bandähnlichen Guanosin-Aggregate gibt.

Nach Auswertung der vielen verschiedenen Messungen und Rechnungen ergibt sich folgendes Bild: Nach Schwingungsrelaxation eines Guanosins in den S_1 -Zustand erfolgt ISC in den energetisch naheliegenden Triplett-Zustand ($\pi\pi^*$ oder $n\pi^*$). Anschließend erfolgt sofort ein Ladungstransfer zu einem CT- (Charge Transfer) Zustand, was zu einem G^+/G^- -Ionenpaar führt. Als Konkurrenzreaktion kann der Ladungstransfer auch aus dem S_1 -Zustand erfolgen und anschließend in den Triplett-Zustand übergehen. Kurz nach dem Elektron folgt dann das Proton entlang der $\text{NH}\cdots\text{N}$ -Wasserstoffbrücke. Das entstehende $(\text{G-H})\cdots/(\text{G+H})$ -Radikalpaar kann anschließend dissoziieren, zurück reagieren oder ein Produkt, wie z.B. die Enol-Form des Guanosins, ausbilden. Das G^+/G^- Ionenpaar kann möglicherweise wie das Radikalpaar entlang der Guanosin-Aggregate dissoziieren, wodurch der Protonentransfer blockiert wird.

Das Ionen- und Radikalspektrum des Guanosins konnte nur in einer gealterten Lösung (1-2 Tage) beobachtet werden, was zu dem Schluss führt, dass große Aggregatnetzwerke benötigt werden, um die Ionen und Radikale zu separieren und zu stabilisieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit geht es um die Etablierung und Anwendung eines STEP-SCAN-FTIR-Spektrometers zur Messung von zeitaufgelösten IR-Spektren im Nanosekundenbereich.

Mit Hilfe der AC/DC-gekoppelten Messmethode ist es gelungen, das Gerät erfolgreich zu installieren. Durch Messung des schon bekannten Testsystems *Bacteriorhodopsin* (BR) konnte gezeigt werden, dass die Methode funktioniert. Die aus der Literatur bekannten zeitaufgelösten Spektren und Lebenszeiten wurden reproduziert. Desweiteren wurde das IR-Triplett-Spektrum von Xanthon in Chloroform gemessen. Dabei zeigte sich eine große Verschiebung der Carbonylschwingung hin zu kleineren Wellenzahlen (425 cm^{-1} in der Rechnung), was zeigt, dass im Triplett-Zustand die Carbonylbindung dramatisch länger wird. Auch hier wurden quantenchemische Rechnungen durchgeführt, die das gemessene Triplett-Spektrum bestätigen. Die Lebensdauer des Triplets von Xanthon in Chloroform zu $13,5 \pm 1\text{ }\mu\text{s}$ bestimmt. Diese mit guten Signal-zu-Rauschverhältnis durchgeführten Messungen zeigen, dass es nun mit der STEP-SCAN-FTIR-Methode routinemäßig möglich ist, IR-Spektren von Triplettmolekülen zu messen, wenn gute ISC Quantenausbeute vorliegt. Damit eröffnet sich ein neues Arbeitsgebiet für die IR-Spektroskopie in der Flüssigphase.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die photochemische Vernetzung von Polyimidmembranen (6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 Copolyimide, synthetisiert von N. Schmeling) mit dem Photovernetzer Maleinimid (MI) für die Anwendung in der Pervaporation untersucht. Dafür wurde die FTIR-Differenzspektroskopie genutzt, da mit dieser Methode zwischen dem Photovernetzer und dem Polymergrundgerüst unterschieden werden konnte.

Nach Photoanregung erfolgt die Vernetzung von zwei MI-Molekülen über eine [2+2]-Cycloaddition. Zur besseren Zuordnung der Banden wurde das Polyimid mit und ohne Vernetzer sowie der Vernetzer alleine gemessen. Da die Banden trotzdem viele Überlagerungen zeigen, wurden auch quantenchemische Rechnungen zur Produktidentifikation herangezogen. Aufgrund des Vergleichs der Messungen mit den Rechnungen konnte gezeigt werden, dass sowohl das *trans*- als auch das *cis*-Cycloaddukt des MIs sowie das 2-2'-Addukt gebildet werden. Der Nachweis des 2-2'-Addukts erfolgt über die Bande bei 1652 cm^{-1} , die der Streckschwingung der C=C-Doppelbindung zugeordnet werden kann. Die beiden Cycloaddukte (*cis* und *trans*) können mit der IR-Spektroskopie nicht auseinander gehalten werden, da sie keine isolierten Markerbanden besitzen. Allerdings zeigt das Bandenmuster im C=O-Bereich drei Beiträge, die nicht nur vom 2-2'-Addukt stammen können. Als weitere Produkte kommen die Cycloaddukte in Frage. Hinweise auf die Bildung eines energetisch ungünstigen Oxetanprodukts gibt es nicht.

Die Cycloaddukte bilden sich nach der Literatur schneller als das 2-2'-Addukt. Das legt die Vermutung nahe, dass das 2-2'-Addukt aus einer Umlagerung des Cycloaddukts gebildet werden kann. Zudem konnte über die spektrale Entfaltung und Anpassung des zeitlichen Verlaufes von verschiedenen Markerbanden der Vernetzungsgrad der Membran bestimmt werden. Dabei wurde die Photodegradation des Polymergerüsts mit berücksichtigt. Für das 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 Copolyimid liegt der maximale Vernetzungsgrad bei 6 %. Das liegt daran, dass nicht jedes Maleinimid ein zweites MI-Molekül in erreichbarer Nähe hat, um eine [2+2]-Cycloaddition einzugehen. Dies ist auf die hohe Steifheit des Polymergerüsts und die möglichen $\pi - \pi$ -Wechselwirkungen der aromatischen Systeme im Polymergerüst zurückzuführen. Dies ist nicht unbedingt von Nachteil, da ein zu hoher Vernetzungsgrad zu einer Verringerung des Durchflusses und damit zu einer schlechteren Performance der Membran im Pervaporationsprozess führt.

8. Summary

In this work the behavior of different systems upon irradiation with UV light was studied. The first part of this work deals with the photochemistry of the DNA bases. All four DNA bases, as well as their short DNA strands (dG₁₀, dC₁₀, dA₁₀, dT₁₀) were deposited on a CaF₂ substrate and the FTIR difference spectra after irradiation with 266 nm were analyzed. The monomer films of 2',3',5'-O-tris -(tert-butyldimethylsilyl)guanosin (G) und 2',3',5'-O-tris -(tert-butyldimethylsilyl)cytidin (C) (from a chloroform solution) show a band at 2277 cm⁻¹, which is a characteristic frequency for the isocyanate group. The spectra of all films cast from water solution (thymidine, dG₁₀, dC₁₀ and dT₁₀) show an equivalent band at 2338 cm⁻¹. No band is observed in films of adenosine and dA₁₀, due to the missing C=O group. Quantum chemical calculations (DFT) confirm the assignment of the frequency at 2277 cm⁻¹ to the respective isocyanate group. The frequency shift in films made of water to 2338 cm⁻¹ is due to small water residues, which form hydrogen bonds to the isocyanate groups. This is confirmed by quantum chemical calculations, which take solvent effects into account (COSMO-DFT). Upon exposition of the irradiated films with excess of water vapor, the isocyanate bands disappear, due to the well known reaction of isocyanate and water by which urea derivatives are formed. Comparison of the experimental difference spectra of thymidine with the calculated one shows that beside the isocyanate product, other photo-products like the CPD, the (6-4)-adduct and the Dewar-valenz-isomer are formed. In films of cytidine some bands indicate a formation of the CPD as well as the imino-oxo tautomer. The imino-oxo tautomer is also formed in guanosine films after irradiation. Quantum yields were determined for the formation of isocyanates and the overall product formation. For the formation of isocyanate, the quantum yields are very small (in the range around 5·10⁻⁵). Nevertheless this new reaction path could be very important due to the high reactivity of isocyanates. They for example can form covalent DNA-Protein bonds in living cells via a Norrish typ I reaction mechanism.

The guanosine derivative (2',3',5'-O-tris -(tert-butyldimethylsilyl)guanosin) was also investigated in n-hexane by transient UV-Vis spectroscopy. Some nano- to microseconds after the excitation pulse (266 nm) a band between 300- and 500 nm is emerging in the spectrum. This band is completely quenched in the presence of oxygen. The spectrum after 100 ns was compared to calculations at the PCM/CAM-B3LYP level of theory (performed by R. Improtà, Università Federico II, Napoli) of a guanosine trimer. the trimer structures as well as the singlet and triplet spectra of the neutral trimer, the ion pair (G⁺/G⁻) and different radical pairs were calculated. For informations about the early processes femtosecond measurements were performed (S. Kovalenko, Humboldt University, Berlin). NMR and IR spectra show that the guanosine dervative used for this work forms ribbon structures in n-hexane. In these ribbons the reverse Hoogsten motif dominates.

The calculations show that the favored reaction path after electron transfer is the proton transfer along the NH $\cdots$ N hydrogen bond. Compared to the experiment the best agreement with the calculations is obtained by a superposition of the calculated triplet ion pair and triplet radical pair spectra. This correspondes well with the two different lifetimes

observed. Between 335 - 425 nm the lifetime of $\tau_{rad}=300$ ns can be assigned to the radical pair and the life time of $\tau_{ion}=200$ ns between 425 - 540 nm corresponds to the ion pair. Such long lifetimes can only be obtained in unpolar solvents like n-hexane, where charge transfer along the ribbons leads to charge separation and prevents fast recombination. From the results obtained by the different experiments and calculations, the following scheme was developed: After vibrational relaxation of excited guanosine into the S_1 state ISC into the energetically nearest triplet state follows. Afterwards charge transfer takes place generating a G^+/G^- ion pair. Competitively charge transfer can occur in the S_1 state followed by ISC into the triplet state. Shortly after the electron the proton follows along the $NH \cdots N$ hydrogen bond, which results in formation of the $(G-H)^\cdot / (G+H)^\cdot$ radical pair. The radical pair has the possibility to dissociate, to react back or to form a product like the enol tautomer. Maybe The G^+/G^- ion pair is able to dissociate along the ribbons, whereby the proton transfer is blocked. The ion- and radical spectra are only observable in a solution prepared one or two days prior to the investigations. Therefore, it is assumed that extended networks of hydrogen bonded guanosines are necessary to separate, and thus stabilize, the radicals.

Another part of this work was the establishment and application of a STEP-SCAN-FTIR-spectrometer to measure time resolved IR spectra on a nanosecond time scale.

Therefore, the AC/DC coupled measuring technique was established. To obtain first results with this setup the well studied system *Bacteriorhodopsin* was reinvestigated. The transient spectra and the lifetimes known from literature were reproduced. In another study the IR triplet spectrum of xanthone in solution was measured. In the triplet state the carbonyl vibration is shifted dramatically to smaller wavenumbers (425 cm^{-1} in calculations). This indicates that the C=O distance increases significantly after excitation to the T_1 state. Quantum chemical calculations (DFT) confirm the interpretation of the measurements. The triplet lifetime was determined to $13,5 \pm 1\text{ }\mu\text{s}$ for xanthone in a chloroform solution. These STEP-SCAN experiments with good signal-to-noise ratio give the opportunity to measure IR-triplet spectra as a matter of routine if high ISC quantum yields are available. Therefore a new application area for IR spectroscopy in liquid phase is established.

In the third part of this work the photochemical cross-linking of polyimidemembranes (6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 Copolyimide, synthesized by N. Schmeling) used in pervaporation processes was analyzed. The photo-cross-linker applied was maleinimide (MI). The method used was the FTIR-difference-spectroscopy, since by this method it is possible to distinguish between the photo-cross-linker and the polymer backbone.

The cross-linking occurs via a light-induced [2+2] cycloaddition between two adjacent MI molecules. To perform a band assignment a product identification of the reaction partners the polyimide with and without MI as well as the MI molecule alone were measured. The assignment was supported by quantum chemical calculations. It was shown that the *trans*- and the *cis*-cycloadduct as well as the 2-2'-adduct is formed. The presence of the 2-2'-adduct was proven by the appearance of the absorption band at 1652 cm^{-1} , which could be assigned to the terminal C=C double bond stretching vibration. The *cis*- and *trans*- cycloadducts cannot be distinguished, since they do not have a characteristic marker band. However, the C=O stretching region band pattern after irradiation shows three contributions and thus cannot be explained by the formation of one of the cycloadducts

and the 2-2'-adduct alone. Evidence for formation of an energetically unfavored oxetane product was not found.

The cycloadducts accumulate with a shorter time constant than the 2-2'-adduct. Therefore, it can be assumed that the 2-2'-adduct is formed by a cycloadduct rearrangement. The photo-cross-linking yield could be determined by spectral deconvolution and kinetic fitting of several marker bands. This method takes the photo-degradation of the polymer backbone into account. For the 6FDA-ODA/6FDA-DABA (4:1) copolyimide, a maximum cross-linking yield of 6 % was obtained. That means: Not every maleimide has a second maleimide in the vicinity for performing the [2+2]-cycloaddition. Rearrangement is impeded by the high stiffness of the polyimide backbone and the possible $\pi - \pi$ interactions between the aromatic systems in the copolyimide. This is not necessary a drawback, since high crosslinking degrees lead to a decrease of the flow rate through the pervaporation membrane.

Literaturverzeichnis

- [1] P. C. Jou, R. J. Feldman, and K. J. Tomecki. UV protection and sunscreens: What to tell patients. *Clevel. Clin. J. Med.*, 79(6):427–436, 2012.
- [2] H. Langhals and K. Fuchs. Sonnenstrahlung, Hautreaktionen und Sonnenschutz: Chemie am Strand. *ChiuZ*, 38(2):98–112, 2004.
- [3] P. Kullavanijaya and H. W. Lim. Photoprotection. *J. Am. Acad. Dermatol*, 52(6):937–958, 2005.
- [4] M. F. Holick. Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *Am. J. Clin. Nutr.*, 61(3):638S–645S, 1995.
- [5] D. L. Damian, C. R. S. Patterson, M. Stapelberg, J. Park, R. S. C. Barnetson, and G. M. Halliday. UV radiation-induced immunosuppression is greater in men and prevented by topical nicotinamide. *J. Invest. Dermatol.*, 128(2):447–454, 2008.
- [6] M. A. Pathak and K. Stratton. Free radicals in human skin before and after exposure to light. *Arch. Biochem. Biophys.*, 123(3):468, 1968.
- [7] K. Jimbow, M. A. Pathak, and Fitzpatrick.T. Effect of ultraviolet on the distribution pattern of microfilaments and microtubules on the nucleus in human melanocytes. *Yale J. Biol. Med.*, 46(5):411–426, 1973.
- [8] H. Honigsmann. Erythema and pigmentation. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 18(2):75–81, 2002.
- [9] K. Yano, K. Kadoya, K. Kajiya, Y. K. Hong, and M. Detmar. Ultraviolet B irradiation of human skin induces an angiogenic switch that is mediated by upregulation of vascular endothelial growth factor and by downregulation of thrombospondin-1. *Br. J. Dermatol.*, 152(1):115–121, 2005.
- [10] J. H. Rabe, A. J. Mamelak, P. J. S. McElgunn, W. L. Morison, and D. N. Sauder. Photoaging: Mechanisms and repair. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 55(1):1–19, 2006.
- [11] P. C. Jou, T. S. McCormick, and E. D. Baron. UV immunosuppression and cutaneous malignancies. *Exp. Rev. Dermatol.*, 6(1):61–74, 2011.
- [12] K. Hunger. Time-resolved spectroscopy between nanoseconds and hours: Polymer photocrosslinking, 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene emission and guanosine hydrogen transfer. *Dissertation*, 2012.
- [13] J. D. Watson and F. H. C. Crick. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356):737–738, 1953.

-
- [14] P. Balagurumoorthy and S. K. Brahmachari. Structure and stability of human telomeric sequence. *J. Biol. Chem.*, 269(34):21858–21869, 1994.
- [15] T. M. Bryan and P. Baumann. G-quadruplexes: From guanine gels to chemotherapeutics. *Mol. Biotechnol.*, 49(2):198–208, 2011.
- [16] K. Hoogsteen. The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Crystallogr.*, 16(9):907–916, 1963.
- [17] F. H. C. Crick. Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis. *Journal of Molecular Biology*, 19(2):548–555, 1966.
- [18] T. Lindahl. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422):709–715, 1993.
- [19] R. Beukers and W. Berends. Isolation and identification of the irradiation product of thymine. *Biochim. Biophys. Acta*, 41(3):550–551, 1960.
- [20] R. Beukers, A. P. M. Eker, and P. H. M. Lohman. 50 years thymine dimer. *DNA Repair*, 7(3):530–543, 2008.
- [21] S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, and T. Douki. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(37):13765–13770, 2006.
- [22] J. Cadet, S. Courdavault, J. L. Ravanat, and T. Douki. UVB and UVA radiation-mediated damage to isolated and cellular DNA. *Pure Appl. Chem.*, 77(6):947–961, 2005.
- [23] J. S. Taylor and M. P. Cohrs. DNA, light, and dewar pyrimidinones: the structure and biological significance to TpT3. *J. Am. Chem. Soc.*, 109(9):2834–2835, 1987.
- [24] B. P. Fingerhut, T. T. Herzog, G. Ryseck, K. Haiser, F. F. Graupner, K. Heil, P. Gilch, W. J. Schreier, T. Carell, R. de Vivie-Riedle, and W. Zinth. Dynamics of ultraviolet-induced DNA lesions: Dewar formation guided by pre-tension induced by the backbone. *New J. Phys.*, 14:065006–, 2012.
- [25] G. P. Pfeifer and A. Besaratinia. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 11(1):90–97, 2012.
- [26] Y.-H. You, D.-H. Lee, J.-H. Yoon, S. Nakajima, A. Yasui, and G. P. Pfeifer. Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. *J. Bio. Chem.*, 276(48):44688–44694, 2001.
- [27] G. P. Pfeifer, Y. H. You, and A. Besaratinia. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat. Res. - Fund. Mol. M.*, 571(1-2):19–31, 2005.
- [28] D. L. Mitchell and A. A. Fernandez. Different types of DNA damage play different roles in the etiology of sunlight-induced melanoma. *Pigm. Cell Melanoma Res.*, 24(1):119–124, 2011.

-
- [29] D. L. Mitchell and R. S. Nairn. The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem. Photobiol.*, 49(6):805–819, 1989.
- [30] E. D. Pleasance, R. K. Cheetham, P. J. Stephens, D. J. McBride, S. J. Humphray, C. D. Greenman, I. Varela, M.-L. Lin, G. R. Ordóñez, G. R. Bignell, K. Ye, J. Alipaz, M. J. Bauer, D. Beare, A. Butler, R. J. Carter, L. Chen, A. J. Cox, S. Edkins, P. I. Kokko-Gonzales, N. A. Gormley, R. J. Grocock, C. D. Haudenschild, M. M. Hims, T. James, M. Jia, Z. Kingsbury, C. Leroy, J. Marshall, A. Menzies, L. J. Mudie, Z. Ning, T. Royce, O. B. Schulz-Trieglaff, A. Spiridou, L. A. Stebbings, L. Szajkowski, J. Teague, D. Williamson, L. Chin, M. T. Ross, P. J. Campbell, D. R. Bentley, P. A. Futreal, and M. R. Stratton. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature*, 463(7278):191–U73, 2010.
- [31] D. Angelov, A. Spassky, M. Berger, and J. Cadet. High-intensity UV laser photolysis of DNA and purine 2'-deoxyribonucleosides: Formation of 8-oxopurine damage and oligonucleotide strand cleavage as revealed by HPLC and gel electrophoresis studies. *J. Am. Chem. Soc.*, 119(47):11373–11380, 1997.
- [32] P.-O. Löwdin. Proton tunneling in DNA and its biological implications. *Rev. Mod. Phys.*, 35(3):724–732, 1963.
- [33] W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, P. Gilch, C. E. Crespo-Hernández, V. N. Swaminathan, T. Carell, W. Zinth, and B. Kohler. Thymine dimerization in DNA is an ultrafast photoreaction. *Science*, 315(5812):625–629, 2007.
- [34] Z. Tramer, K. L. Wierzchowski, and D. Shugar. Influence of polynucleotide secondary structure on thymine photodimerization. *Acta Biochim. Pol.*, 16(1):83–107, 1969.
- [35] S. Marguet and D. Markovitsi. Time-resolved study of thymine dimer formation. *J. Am. Chem. Soc.*, 127(16):5780–5781, 2005.
- [36] J. Cadet, S. Mouret, J.-L. Ravanat, and T. Douki. Photoinduced damage to cellular DNA: Direct and photosensitized reactions. *Photochem. Photobiol.*, 88(5):1048–1065, 2012.
- [37] K. Kleiner Manns, D. Nachtigallova, and M. S. de Vries. Excited state dynamics of DNA bases. *Int. Rev. Phys. Chem.*, pages 1–35, 2013.
- [38] C. E. Crespo-Hernández, B. Cohen, P. M. Hare, and B. Kohler. Ultrafast excited-state dynamics in nucleic acids. *Chem. Rev.*, 104(4):1977–2019, 2004.
- [39] C. T. Middleton, K. de La Harpe, C. Su, Y. K. Law, C. E. Crespo-Hernández, and B. Kohler. *DNA Excited-State Dynamics: From Single Bases to the Double Helix*, volume 60 of *Annu. Rev. Phys. Chem.*, pages 217–239. Annual Reviews, Palo Alto, 2009.
- [40] S. Lagerwerf, M. G. Vrouwe, R. M. Overmeer, M. I. Fouteri, and L. H. F. Mulenders. DNA damage response and transcription. *DNA Repair*, 10(7):743–750, 2011.

- [41] J. Cadet, T. Douki, and J.-L. Ravanat. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radical Bio. Med.*, 49(1):9–21, 2010.
- [42] J.-L. Ravanat, T. Douki, and J. Cadet. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 63(1-3):88–102, 2001.
- [43] C. E. Crespo-Hernández, B. Cohen, and B. Kohler. Base stacking controls excited-state dynamics in A-T DNA. *Nature*, 436(7054):1141–1144, 2005.
- [44] K. M. Meisenheimer and T. H. Koch. Photocross-linking of nucleic acids to associated proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 32(2):101–140, 1997.
- [45] M. D. Shetlar, K. Hom, S. Distefano, K. Ekpenyong, and J. Yang. Photochemical reactions of cytosine and 5-methylcytosine with methylamine and n-butylamine. *Photochem. Photobiol.*, 47(6):779–786, 1988.
- [46] A. A. Shaw and M. D. Shetlar. Ring-opening photoreactions of cytosine and 5-methylcytosine with aliphatic-alcohols. *Photochem. Photobiol.*, 49(3):267–271, 1989.
- [47] K. Hom, G. Strahan, and M. D. Shetlar. Ring opening photoreactions of cytosine and uracil with ethylamine. *Photochem. Photobiol.*, 71(3):243–253, 2000.
- [48] P. R. L. Markwick and N. L. Doltsinis. Ultrafast repair of irradiated DNA: Nonadiabatic ab initio simulations of the guanine-cytosine photocycle. *J. Chem. Phys.*, 126(17), 2007.
- [49] A. L. Sobolewski, W. Domcke, and C. Hattig. Tautomeric selectivity of the excited-state lifetime of guanine/cytosine base pairs: The role of electron-driven proton-transfer processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(50):17903–17906, 2005.
- [50] A. L. Sobolewski and W. Domcke. Ab initio studies on the photophysics of the guanine-cytosine base pair. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6(10):2763–2771, 2004.
- [51] K. Kobayashi and S. Tagawa. Direct observation of guanine radical cation deprotonation in duplex DNA using pulse radiolysis. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(34):10213–10218, 2003.
- [52] E. H. Blackburn. Structure and function of telomeres. *Nature*, 350(6319):569–573, 1991.
- [53] E. Henderson, C. C. Hardin, S. K. Walk, I. Tinoco, and E. H. Blackburn. Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine guanine base-pairs. *Cell*, 51(6):899–908, 1987.
- [54] R. J. Wellinger and D. Sen. The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur. J. Cancer*, 33(5):735–749, 1997.
- [55] M. M. M. Pinto, M. E. Sousa, and M. S. J. Nascimento. Xanthone derivatives: New insights in biological activities. *Curr. Med. Chem.*, 12(21):2517–2538, 2005.
- [56] L. F. Steiner and S. A. Summerland. Xanthone as an ovicide and larvicide for the codling moth. *J. Econ. Entomol.*, 36(3):435–439, 1943.

-
- [57] R. A. Finnegan, R. A. Stephani, G. Ganguli, S. N. Ganguly, and A. K. Bhattacharya. Occurrence of mangiferin in hiptage madablota geartn. *J. Pharm. Sci.*, 57(6):1039–1040, 1968.
- [58] P. Da Re, V. Mancini, E. Tóth, and L. Cima. Xanthone derivatives with centrally stimulating and analeptic activities. *Arzneim.-Forsch./Drug. Res.*, 18(6):718–720, 1968.
- [59] P. Da Re, V. Mancini, P. Valenti, and L. Cima. Central nervous system stimulants of the xanthone series. *J. Med. Chem.*, 13(3):527–531, 1970.
- [60] H. Satzger, B. Schmidt, C. Root, W. Zinth, B. Fierz, F. Krieger, T. Kiefhaber, and P. Gilch. Ultrafast quenching of the xanthone triplet by energy transfer:new insight into the intersystem crossing kinetics. *J. Phys. Chem. A*, 108(46):10072–10079, 2004.
- [61] J. C. Scaiano. Solvent effects in the photochemistry of xanthone. *J. Am. Chem. Soc.*, 102(26):7747–7753, 1980.
- [62] G. Amirzadeh and W. Schnabel. On the photoinitiation of free radical polymerization-laser flash photolysis investigations on thioxanthone derivatives. *Macromol. Chem. Phys.*, 182(10):2821–2835, 1981.
- [63] P. Klán and J. Wirz. *Photochemistry of organic compounds*. John Wiley & Sons, West Sussex, 2009.
- [64] B. Heinz, B. Schmidt, C. Root, H. Satzger, F. Milota, B. Fierz, T. Kiefhaber, W. Zinth, and P. Gilch. On the unusual fluorescence properties of xanthone in water. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 8(29):3432–3439, 2006.
- [65] M. A. El-Sayed. Vanishing first- and second-order intramolecular heavy-atom effects on the ($\pi^* \rightarrow n$) phosphorescence in carbonyls. *J. Chem. Phys.*, 41(8):2462–2467, 1964.
- [66] F. Krieger, B. Fierz, O. Bieri, M. Drewello, and T. Kiefhaber. Dynamics of unfolded polypeptide chains as model for the earliest steps in protein folding. *J. Mol. Bio.*, 332(1):265–274, 2003.
- [67] T. Melin and R. Rautenbach. *Membranverfahren*. Springer, 3rd edition, 2007.
- [68] S. P. Nunes and K.-V. Peinemann. *Membrane Technology: in the Chemical Industry*. Wiley-VCH, 1st edition, 2006.
- [69] L. Y. Jiang, Y. Wang, T. S. Chung, X. Y. Qiao, and J. Y. Lai. Polyimide membranes for pervaporation and biofuels separation. *Prog. Polym. Sci.*, 34(11):1135–1160, 2009.
- [70] M. T. Ravanchi, T. Kaghazchi, and A. Kargari. Application of membrane separation processes in petrochemical industry: a review. *Desalination*, 235(1-3):199–244, 2009.
- [71] Directive 98/70/ec of the european parliament and of the council of 13 october 1998 relating to the quality of petrol and diesel fuels and amending council directive 93/12/eec, 1998.

-
- [72] C. J. King. *Separation Processes, Introduction*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.
- [73] J. C. Davis, R. J. Valus, R. Eshraghi, and A. E. Velikoff. Facilitated transport membrane hybrid systems for olefin purification. *Sep. Sci. Tec.*, 28(1-3):463–476, 1993.
- [74] A. Jonquière, R. Clément, P. Lochon, J. Nèel, M. Dresch, and B. Chrétien. Industrial state-of-the-art of pervaporation and vapour permeation in the western countries. *J. Membr. Sci.*, 206(1-2):87–117, 2002.
- [75] H. E. A. Brüscke. *State-of-the-Art of Pervaporation Processes in the Chemical Industry*, pages 151–202. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.
- [76] D. Beaumelle, M. Marin, and H. Gibert. Pervaporation with organophilic membranes: state of the art. *Food Bioprod. Process.*, 71:77–89, 1993.
- [77] J. Z. Ren, C. Staudt-Bickel, and R. N. Lichtenthaler. Separation of aromatics/aliphatics with crosslinked 6FDA-based copolyimides. *Sep. Purif. Tech.*, 22-3(1-3):31–43, 2001.
- [78] P. A. Kober. Pervaporation, perstillation and percrystallization. *J. Membr. Sci.*, 100(1):61–64, 1995.
- [79] J. P. Garcia Villaluenga and A. Tabe-Mohammadi. A review on the separation of benzene/cyclohexane mixtures by pervaporation processes. *J. Membr. Sci.*, 169(2):159–174, 2000.
- [80] M. Kondo, M. Komori, H. Kita, and K. Okamoto. Tubular-type pervaporation module with zeolite NaA membrane. *J. Membr. Sci.*, 133(1):133–141, 1997.
- [81] S. M. Holmes, M. Schmitt, C. Markert, R. J. Plaisted, J. O. Forrest, P. N. Sharratt, A. A. Garforth, C. S. Cundy, and J. Dwyer. Zeolite A membranes for use in alcohol/water separations - Part I: Experimental investigation. *Chem. Eng. Res. Des.*, 78(A8):1084–1088, 2000.
- [82] A. W. C. van den Berg, L. Gora, J. C. Jansen, M. Makkee, and T. Maschmeyer. Zeolite A membranes synthesized on a UV-irradiated TiO₂ coated metal support: The high pervaporation performance. *J. Membr. Sci.*, 224(1-2):29–37, 2003.
- [83] T. Graham. XXII.-On the absorption and dialytic separation of gases by colloid septa. *J. Chem. Soc.*, 20:235–288, 1867.
- [84] S. T. Hwang. Fundamentals of membrane transport. *Kor. J. Chem. Eng.*, 28(1):1–15, 2011.
- [85] V. S. Cunha, M. L. L. Paredes, C. P. Borges, A. C. Habert, and R. Nobrega. Removal of aromatics from multicomponent organic mixtures by pervaporation using polyurethane membranes: experimental and modeling. *J. Membr. Sci.*, 206(1-2):277–290, 2002.

-
- [86] O. Sae-Khow and S. Mitra. Pervaporation in chemical analysis. *J. Chromatogr. A*, 1217(16):2736–2746, 2010.
- [87] T. Gittel. *Aufarbeitung mizellarer Lösungen durch organophile Pervaporation*. Dissertation, 2004.
- [88] K. Hunger, L. Buschhaus, N. Schmeling, C. Staudt, A. Pfeifer, and K. Kleinermanns. Characterization of maleimide dimers in photo-cross-linked copolyimide films. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14(13):4538–4547, 2012.
- [89] N. Schmeling. *Vernetzbare Polymermaterialien für die Pervaporation - Synthese, Charakterisierung und Anwendungen*. Dissertation, 2013.
- [90] M. T. Bogert and R. R. Renshaw. 4-Amino-o-phthalic acid and some of its derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 30(7):1135–1144, 1908.
- [91] W. H. Carothers. Linear polyamides and their production, 1938.
- [92] C. E. Sroog, A. L. Endrey, S. V. Abramo, C. E. Berr, W. M. Edwards, and K. L. Olivier. Aromatic polypyromellitimides from aromatic polyamic acids. *J. Polym. Sci. Part A*, 3(4PA):1373–1390, 1965.
- [93] G. M. Bower and L. W. Frost. Aromatic polyimides. *J. Polym. Sci. A*, 1(10):3135–3150, 1963.
- [94] Y. C. Xiao, B. T. Low, S. S. Hosseini, T. S. Chung, and D. R. Paul. The strategies of molecular architecture and modification of polyimide-based membranes for CO₂ removal from natural gas - a review. *Prog. Polym. Sci.*, 34(6):561–580, 2009.
- [95] J. H. Petropoulos, M. Sanopoulou, and K. G. Papadokostaki. Physically insightful modeling of non-fickian kinetic regimes encountered in fundamental studies of isothermal sorption of swelling agents in polymeric media. *Eur. Polym. J.*, 47(11):2053–2062, 2011.
- [96] N. Schmeling, R. Konietzny, D. Sieffert, P. Rölling, and C. Staudt. Functionalized copolyimide membranes for the separation of gaseous and liquid mixtures. *Beilstein J. Org. Chem.*, 6:789–800, 2010.
- [97] S. Basu, A. L. Khan, A. Cano-Odena, C. Liu, and I. F. J. Vankelecom. Membrane-based technologies for biogas separations. *Chem. Soc. Rev.*, 39(2):750–768, 2010.
- [98] K. Inui, T. Noguchi, T. Miyata, and T. Uragami. Pervaporation characteristics of methyl methacrylate-methacrylic acid copolymer membranes ionically crosslinked with metal ions for a benzene/cyclohexane mixture. *J. Appl. Polym. Sci.*, 71(2):233–241, 1999.
- [99] S. Matsui and D. R. Paul. Pervaporation separation of aromatic/aliphatic hydrocarbons by crosslinked poly(methyl acrylate-co-acrylic acid) membranes. *J. Membr. Sci.*, 195(2):229–245, 2002.
- [100] S. Matsui and D. R. Paul. Pervaporation separation of aromatic/aliphatic hydrocarbons by a series of ionically crosslinked poly(n-alkyl acrylate) membranes. *J. Membr. Sci.*, 213(1-2):67–83, 2003.

-
- [101] A. M. Kratochvil and W. J. Koros. Effects of supercritical CO₂ conditioning on cross-linked polyimide membranes. *Macromolecules*, 43(10):4679–4687, 2010.
- [102] N. Schmeling, K. Hunger, G. Engler, B. Breiten, P. Rölling, A. Mixa, C. Staudt, and K. Kleinermmans. Photo-crosslinking of poly[ethene-stat-(methacrylic acid)] functionalised with maleimide side groups. *Polym. Int.*, 58(7):720–727, 2009.
- [103] C. T. Wright and D. R. Paul. Gas sorption and transport in UV-irradiated polyarylate copolymers based on tetramethyl bisphenol-A and dihydroxybenzophenone. *J. Membr. Sci.*, 124(2):161–174, 1997.
- [104] S. Seiffert, W. Oppermann, and K. Saalwächter. Hydrogel formation by photocross-linking of dimethylmaleimide functionalized polyacrylamide. *Polymer*, 48(19):5599–5611, 2007.
- [105] R. Schinner and T. Wolff. Defined photo-cross-linking and viscometric data - II. photo-cross-linking versus coordinative cross-linking. *Colloid Polym. Sci.*, 279(12):1225–1230, 2001.
- [106] C. D. Vlad and C. Hulubei. Crosslinked copolymers based on n-(π -carboxyphenyl)-maleimide. *High Perform. Polym.*, 14(1):31–40, 2002.
- [107] Y. Chen and C. J. Tsay. Preparation and photo-cross-linking behaviors of polyesters derived from trans-2,2'-dihydroxystilbene. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, 33(8):1319–1327, 1995.
- [108] A. Taubert, J. D. Wind, D. R. Paul, W. J. Koros, and K. I. Winey. Novel polyimide ionomers: CO₂ plasticization, morphology, and ion distribution. *Polymer*, 44(6):1881–1892, 2003.
- [109] C. Decker, C. Bianchi, and S. Jonsson. Light-induced crosslinking polymerization of a novel N-substituted bis-maleimide monomer. *Polymer*, 45(17):5803–5811, 2004.
- [110] P.W. Atkins and J. de Paula. *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2006.
- [111] P.W. Atkins. *Molecular Quantum Mechanics*. Oxford University Press, 3rd edition, 1996.
- [112] W. Demtröder. *Molekülphysik: Theoretische Grundlagen und experimentelle Methoden*. Oldenbourg Wissenschaftsverlag, München, Wien, 1st edition, 2003.
- [113] G. Wedler. *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. Wiley-VCH, 2004.
- [114] J. G. Calvert and J. N. Pitts Jr. *Photochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York, London, Sydney, 2nd edition, 1966.
- [115] M. Born and R. Oppenheimer. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Ann. Phys.*, 389(20):457–484, 1927.
- [116] E. Condon. A theory of intensity distribution in band systems. *Phys. Rev.*, 28(6):1182–1201, 1926.

- [117] E. Condon. Nuclear motions associated with electron transitions in diatomic molecules. *Phys. Rev.*, 32(6):858–872, 1928.
- [118] M. Kasha. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Farad. Discuss.*, 9:14–19, 1950.
- [119] G. G. Stokes. On the change of refrangibility of light. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 142:463–562, 1852.
- [120] N.J. Turro. *Modern Molecular Photochemistry*. University Science Books, Sausalito, 1991.
- [121] L. K. Patterson, G. Porter, and M. R. Topp. Oxygen quenching of singlet and triplet states. *Chem. Phys. Lett.*, 7(6):612–614, 1970.
- [122] D. L. Dexter. A theory of sensitized luminescence in solids. *J. Chem. Phys.*, 21(5):836–850, 1953.
- [123] K. Meier and H. Zweifel. Thioxanthone ester derivatives: efficient triplet sensitizers for photopolymer applications. *Journal of Photochemistry*, 35(3):353–366, 1986.
- [124] S. Lazare, R. Lapouyade, and R. Bonneau. Photocyclization of 2-vinylbiphenyls and related compounds under triplet sensitization: an adiabatic reaction on the triplet surface. *J. Am. Chem. Soc.*, 107(23):6604–6609, 1985.
- [125] H. Shizuka. Excited-state proton-transfer reactions and proton-induced quenching of aromatic compounds. *Acc. Chem. Res.*, 18(5):141–147, 1985.
- [126] X. Allonas, C. Ley, C. Bibaut, P. Jacques, and J. P. Fouassier. Investigation of the triplet quantum yield of thioxanthone by time-resolved thermal lens spectroscopy: solvent and population lens effects. *Chem. Phys. Lett.*, 322(6):483–490, 2000.
- [127] G. Porter and P. Suppan. Primary photochemical processes in aromatic molecules. part 12.-excited states of benzophenone derivatives. *Trans. Faraday Soc.*, 61(0):1664–1673, 1965.
- [128] T. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.*, 437(1-2):55–75, 1948.
- [129] T. Förster. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften*, 33(6):166–175, 1946.
- [130] M. Hesse, H. Meier, and B. Zeeh. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Thieme, Stuttgart, 7th edition, 2005.
- [131] W. Kaiser and C. G. B. Garrett. Two-photon excitation in CaF_2 : Eu^{2+} . *Phys.Rev.Lett.*, 7(6):229–231, 1961.
- [132] M. Göppert-Mayer. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys.*, 401(3):273–294, 1931.

-
- [133] L. Biemann, M. Braun, and K. Kleinermanns. Gas phase infrared spectra and corresponding DFT calculations of alpha, omega-diphenylpolyenes. *J. Mol. Spectrosc.*, 259(1):11–15, 2010.
- [134] F. L  vesque and P. H. Seeberger. Kontinuierliche Synthese des Malariawirkstoffs Artemisinin. *Angew. Chem.*, 124(7):1738–1741, 2012.
- [135] P. Esser, B. Pohlmann, and H.-D. Scharf. The photochemical synthesis of fine chemicals with sunlight. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 33(20):2009–2023, 1994.
- [136] M. Oelgem  ller, C. Jung, J. Ortner, J. Mattay, and E. Zimmermann. Green photochemistry: solar photooxygenations with medium concentrated sunlight. *Green Chem.*, 7(1):35–38, 2005.
- [137] J. H. Baxendale and J. A. Wilson. The photolysis of hydrogen peroxide at high light intensities. *Trans. Faraday Soc.*, 53(0):344–356, 1957.
- [138] R. Hoffmann. Building bridges between inorganic and organic chemistry (nobel lecture). *Angew. Chem., Int. Ed.*, 21(10):711–724, 1982.
- [139] G. W. Goodall and W. Hayes. Advances in cycloaddition polymerizations. *Chem. Soc. Rev.*, 35(3):280–312, 2006.
- [140] T. Bach. Stereoselective intermolecular [2+2]-photocycloaddition reactions and their application in synthesis. *Synthesis*, 1998(05):683–703, 1998.
- [141] G. B  chi, C. G. Inman, and E. S. Lipinsky. Light-catalyzed organic reactions .1. The reaction of carbonyl compounds with 2-methyl-2-butene in the presence of ultraviolet light. *J. Am. Chem. Soc.*, 76(17):4327–4331, 1954.
- [142] E. Patern   and G. Chieffi. *Gazz. Chim. Ital.*, 39(1):341, 1909.
- [143] A. G. Griesbeck, M. Abe, and S. Bondock. Selectivity control in electron spin inversion processes: Regio- and stereochemistry of Patern  -B  chi photocycloadditions as a powerful tool for mapping intersystem crossing processes. *Acc. Chem. Res.*, 37(12):919–928, 2004.
- [144] N. Hoffmann. Photochemical cycloaddition between benzene derivatives and alkenes. *Synthesis-Stuttgart*, (4):481–495, 2004.
- [145] O. Diels. Description and importance of the aromatic basic skeleton of the steroids. *Nobel Lectures Chemistry*, 1942–1962:253–266, 1950.
- [146] K. Alder. Diene synthesis and related reaction types. *Nobel Lecture Chemistry*, 1942–1962:267–302, 1950.
- [147] R. G. W. Norrish and M. E. S. Appleyard. Primary photochemical reactions. Part IV. decomposition of methyl ethyl ketone and methyl butyl ketone. *J. Chem. Soc.*, 0(0):874–880, 1934.
- [148] C. Chatgililoglu, D. Crich, M. Komatsu, and I. Ryu. Chemistry of acyl radicals. *Chem. Rev.*, 99(8):1991–2070, 1999.

-
- [149] F. D. Lewis and J. G. Magyar. Photoreduction and alpha cleavage of aryl alkyl ketones. *J. Org. Chem.*, 37(13):2102–2107, 1972.
- [150] M. A. Garcia-Garibay and L.M. Campos. *Photochemical decarboxylation of ketones: Recent advantages and reactions in crystalline solids*, chapter 48, pages 1–41. CRC Press, Boca Ranton, 2004.
- [151] P. J. Wagner. Type II photoelimination and photocyclization of ketones. *Acc. Chem. Res.*, 4(5):168–177, 1971.
- [152] L. G. Arnaut and S. J. Formosinho. Excited-state proton transfer reactions I. fundamentals and intermolecular reactions. *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.*, 75(1):1–20, 1993.
- [153] N. Agmon. Elementary steps in excited-state proton transfer. *J. Phys. Chem. A*, 109(1):13–35, 2005.
- [154] L. M. Tolbert and K. M. Solntsev. Excited-state proton transfer: From constrained systems to superphotoacids to superfast proton transfer. *Acc. Chem. Res.*, 35(1):19–27, 2002.
- [155] A. Weller. Fast reactions of excited molecules. *Prog. React. Kinet. Mech.*, 1:187, 1961.
- [156] T. Förster. Die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz von Naphthalinderivaten. *Z. Elektrochem. Angew. P.*, 54(7):531–535, 1950.
- [157] Z. R. Grabowski and W. Rubaszewska. Generalised Förster cycle. Thermodynamic and extrathermodynamic relationships between proton transfer, electron transfer and electronic excitation. *J. Chem. Soc. Faraday T.*, 73:11–28, 1977.
- [158] M. H. V. Huynh and T. J. Meyer. Proton-coupled electron transfer. *Chem. Rev.*, 107(11):5004–5064, 2007.
- [159] E. M. Kosower and D. Huppert. Excited-state electron and proton transfers. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 37:127–156, 1986.
- [160] A. Mallick, P. Purkayastha, and N. Chattopadhyay. Photoprocesses of excited molecules in confined liquid environments: An overview. *J. Photochem. Photobio. C: Photochem. Rev.*, 8(3):109–127, 2007.
- [161] S. Scheiner. Theoretical studies of excited state proton transfer in small model systems. *J. Phys. Chem. A*, 104(25):5898–5909, 2000.
- [162] J. T. Hynes, T. H. Tran-Thi, and G. Granucci. Intermolecular photochemical proton transfer in solution: new insights and perspectives. *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.*, 154(1):3–11, 2002.
- [163] S. J. Formosinho and L. G. Arnaut. Excited-state proton-transfer reactions .2. intramolecular reactions. *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.*, 75(1):21–48, 1993.

- [164] S. P. Webb, L. A. Philips, S. W. Yeh, L. M. Tolbert, and J. H. Clark. Picosecond kinetics of the excited-state, proton-transfer reaction of 1-naphthol in water. *J. Phys. Chem.*, 90(21):5154–5164, 1986.
- [165] D. Huppert, L. M. Tolbert, and S. Linares-Samaniego. Ultrafast excited-state proton transfer from cyano-substituted 2-naphthols. *J. Phys. Chem. A*, 101(25):4602–4605, 1997.
- [166] D. R. Weinberg, C. J. Gagliardi, J. F. Hull, C. F. Murphy, C. A. Kent, B. C. Westlake, A. Paul, D. H. Ess, D. G. McCafferty, and T. J. Meyer. Proton-coupled electron transfer. *Chem. Rev.*, 112(7):4016–4093, 2012.
- [167] S. Takeuchi and T. Tahara. The answer to concerted versus step-wise controversy for the double proton transfer mechanism of 7-azaindole dimer in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(13):5285–5290, 2007.
- [168] A. Douhal, S. K. Kim, and A. H. Zewail. Femtosecond molecular-dynamics of tautomerization in model base-pairs. *Nature*, 378(6554):260–263, 1995.
- [169] X.-F. Yu, S. Yamazaki, and T. Taketsugu. Theoretical study of the excited-state double proton transfer in the (3-methyl-7-azaindole)-(7-azaindole) heterodimer. *J. Comput. Chem.*, 33(20):1701–1708, 2012.
- [170] L. M. Frutos, A. Markmann, A. L. Sobolewski, and W. Domcke. Photoinduced electron and proton transfer in the hydrogen-bonded pyridine-pyrrole system. *J. Phys. Chem. B*, 111(22):6110–6112, 2007.
- [171] A. Abo-Riziq, L. Grace, E. Nir, M. Kabelac, P. Hobza, and M. S. de Vries. Photochemical selectivity in guanine-cytosine base-pair structures. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(1):20–23, 2005.
- [172] N. K. Schwalb and F. Temps. Ultrafast electronic relaxation in guanosine is promoted by hydrogen bonding with cytidine. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(30):9272–9273, 2007.
- [173] L. Biemann, T. Häber, D. Maydt, K. Schaper, and K. Kleinermanns. Fourier transform infrared spectroscopy of 2'-deoxycytidine aggregates in CDCl₃ solutions. *J. Chem. Phys.*, 134(11), 2011.
- [174] K. de La Harpe, C. E. Crespo-Hernández, and B. Kohler. Deuterium isotope effect on excited-state dynamics in an alternating GC oligonucleotide. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(48):17557–17559, 2009.
- [175] B. Giese and S. Wessely. The significance of proton migration during hole hopping through dna. *Chem. Comm.*, 0(20):2108–2109, 2001.
- [176] B. Giese. Long distance charge transport in dna: The hopping mechanism. *Accounts of Chemical Research*, 33(9):631–636, 2000. Times Cited: 396.
- [177] D. Mishra and S. Pal. Ionization potential and structure relaxation of adenine, thymine, guanine and cytosine bases and their base pairs: A quantification of reactive sites. *J. Mol Struct.*, 902(1-3):96–102, 2009.

- [178] K. Heil, A. C. Kneuttinger, S. Schneider, U. Lischke, and T. Carell. Crystal structures and repair studies reveal the identity and the base-pairing properties of the UV-induced spore photoproduct DNA lesion. *Chem.-Eur. J.*, 17(35):9651–9657, 2011.
- [179] J. Cadet, E. Sage, and T. Douki. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat. Res. - Fund. Mol. M.*, 571(1-2):3–17, 2005.
- [180] L. Lapinski, I. Reva, M. J. Nowak, and R. Fausto. Five isomers of monomeric cytosine and their interconversions induced by tunable UV laser light. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13(20):9676–9684, 2011.
- [181] K. Haiser, B. P. Fingerhut, K. Heil, A. Glas, T. T. Herzog, B. M. Pilles, W. J. Schreier, W. Zinth, R. de Vivie-Riedle, and T. Carell. Mechanism of UV-induced formation of dewar lesions in DNA. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 51(2):408–411, 2012.
- [182] D. G. E. Lemaire and B. P. Ruzsicska. Quantum yields and secondary photoreactions of the photoproducts of dTpdT, dTpdC and dTpdU. *Photochem. Photobio.*, 57(5):755–757, 1993.
- [183] J. E. Donnellan Jr. and R. B. Setlow. Thymine photoproducts but not thymine dimers found in ultraviolet-irradiated bacterial spores. *Science*, 149(3681):308–310, 1965.
- [184] A. J. Varghese. 5-Thyminy-5,6-dihydrothymine from DNA irradiated with ultraviolet light. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38(3):484–490, 1970.
- [185] R. J. Boorstein, T. P. Hilbert, R. P. Cunningham, and G. W. Teebor. Formation and stability of repairable pyrimidine photohydrates in DNA. *Biochemistry*, 29(46):10455–10460, 1990.
- [186] P. H. Clingen, R. Jeremy, and H. Davies. Quantum yields of adenine photodimerization in poly (deoxyadenylic acid) and dna. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 38(1):81–87, 1997.
- [187] R. J. H. Davies, J. F. Malone, Y. Gan, C. J. Cardin, M. P. H. Lee, and S. Neidle. High-resolution crystal structure of the intramolecular d(tpa) thymine-adenine photoadduct and its mechanistic implications. *Nucleic Acids Research*, 35(4):1048–1053, 2007.
- [188] B. Giese and M. Spichty. Long distance charge transport through DNA: Quantification and extension of the hopping model. *Chem. Phys. Chem.*, 1(4):195–198, 2000.
- [189] L. P. Candeias and S. Steenken. Reaction of HO $\cdot$ with guanine derivatives in aqueous solution: Formation of two different redox-active OH-adduct radicals and their unimolecular transformation reactions. properties of G-H. *Chem.-Eur. J.*, 6(3):475–484, 2000.
- [190] R.G.W. Norrish and G. Porter. Chemical reactions produced by very high light intensities. *Nature*, 164(158), 1949.

- [191] G. Porter. Flash photolysis and some of its applications. *Nobel lecture*, 1967.
- [192] D. Löwenich. Stationäre und transiente UV-Spektroskopie an Cytochrom C und Porphyrin-Modellsystemen. *Dissertation*, 2007.
- [193] Applied Photophysics. *Laser Flash Photolysis Reaction Analyser User Handbook*. 2002.
- [194] W. Herres and J. Gronholz. Understanding FT-IR data processing. part 1: Data acquisition and fourier transformation. *Comp. Appl. Lab.*, 216:1–5, 1984.
- [195] W. Herres and J. Gronholz. Understanding FT-IR data processing, part 2: Details of the spectrum calculation. *Instrum. & Comp.*, 10:6–12, 1985.
- [196] W. Herres and J. Gronholz. Understanding FT-IR data processing, part 3: Further useful computational methods. *Intell. Instrum. Comp.*, 3:13–23, 1985.
- [197] A. Pfeifer. Infrarotspektroskopische Aufklaerung lichtinduzierter Strukturaenderungen im Blaulichtsensor Phototropin. *Dissertation*, 2009.
- [198] C. Roedig and F. Siebert. *Instrumental Aspects of Time-Resolved Spectra Generated Using Step-Scan Interferometers*. John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- [199] W. Uhmann, A. Becker, C. Taran, and F. Siebert. Time-resolved FT-IR absorption spectroscopy using a step-scan interferometer. *Appl. Spectrosc.*, 45(3):390–397, 1991.
- [200] O. Treutler and R. Ahlrichs. Efficient molecular numerical integration schemes. *J. Chem. Phys.*, 102(1):346–354, 1995.
- [201] M. Von Arnim and R. Ahlrichs. Performance of parallel TURBOMOLE for density functional calculations. *J. Comput. Chem.*, 19(15):1746–1757, 1998.
- [202] A. Schäfer, C. Huber, and R. Ahlrichs. Fully optimized contracted gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr. *J. Chem. Phys.*, 100(8):5829–5835, 1994.
- [203] R. Ahlrichs, M. Bär, M. Häser, H. Horn, and C. Kölmel. Electronic structure calculations on workstation computers: The program system turbomole. *Chem. Phys. Lett.*, 162(3):165–169, 1989.
- [204] P. Deglmann, F. Furche, and R. Ahlrichs. An efficient implementation of second analytical derivatives for density functional methods. *Chem. Phys. Lett.*, 362(5-6):511–518, 2002.
- [205] P. Deglmann and F. Furche. Efficient characterization of stationary points on potential energy surfaces. *J. Chem. Phys.*, 117(21):9535–9538, 2002.
- [206] P. Deglmann, K. May, F. Furche, and R. Ahlrichs. Nuclear second analytical derivative calculations using auxiliary basis set expansions. *Chem. Phys. Lett.*, 384(1-3):103–107, 2004.
- [207] J. C. Slater. A simplification of the hartree-fock method. *Phys. Rev.*, 81(3):385–390, 1951.

-
- [208] V. Fock. Näherungsmethode zur Lösung des quantenmechanischen Mehrkörperproblems. *Z. Physik*, 61:126–149, 1930.
- [209] D. R. Hartree and W. Hartree. Self-consistent field, with exchange, for beryllium. *Proc. Roy. Soc. A*, 150(869):9–33, 1935.
- [210] J. C. Cramer. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*. John Wiley & Sons, 2 edition, 2004.
- [211] T. Ziegler. Approximate density functional theory as a practical tool in molecular energetics and dynamics. *Chem. Rev.*, 91(5):651–667, 1991.
- [212] P. Hohenberg and W. Kohn. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev. B*, 136(3B):B864, 1964.
- [213] W. Kohn and L. J. Sham. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev.*, 140(4A):1133–1138, 1965.
- [214] A. D. Becke. Density-functional thermochemistry .4. a new dynamical correlation functional and implications for exact-exchange mixing. *J. Chem. Phys.*, 104(3):1040–1046, 1996.
- [215] R. Colle and O. Salvetti. Approximate calculation of the correlation energy for the closed shells. *Theo. Chim. Acta*, 37(4):329–334, 1975.
- [216] S. H. Vosko, L. Wilk, and M. Nusair. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. *Can. J. Phys.*, 58(8):1200–1211, 1980.
- [217] L. A. Cole and J. P. Perdew. Calculated electron affinities of the elements. *Phys. Rev. A*, 25(3):1265–1271, 1982.
- [218] J. P. Perdew and A. Zunger. Self-interaction correction to density-functional approximations for many-electron systems. *Phys. Rev. B*, 23(10):5048–5079, 1981.
- [219] J. P. Perdew and Y. Wang. Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy. *Phys. Rev. B*, 45(23):13244–13249, 1992.
- [220] A. D. Becke. Density-functional thermochemistry. III. the role of exact exchange. *J. Chem. Phys.*, 98(7):5648–5652, 1993.
- [221] P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski, and M. J. Frisch. Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *J. Phys. Chem.*, 98(45):11623–11627, 1994.
- [222] A. D. Becke. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A*, 38(6):3098–3100, 1988.
- [223] C. T. Lee, W. T. Yang, and R. G. Parr. Development of the Colic-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, 37(2):785–789, 1988.
- [224] J. C. Slater. Atomic shielding constants. *Phys. Rev.*, 36(1):57–64, 1930.

- [225] S. F. Boys. Electronic wave functions. i. a general method of calculation for the stationary states of any molecular system. *Proc. R. Soc.*, 200(1063):542–554, 1950.
- [226] M. W. Schmidt, K. K. Baldrige, J. A. Boatz, J. H. Jensen, S. Koseki, M. S. Gordon, K. A. Nguyen, T. L. Windus, and S. T. Elbert. Berny optimization. *QCPE Bulletin*, 10:52–62, 1990.
- [227] A. Klamt and G. Schüürmann. COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, (5):799–805, 1993.
- [228] J. Ho, A. Klamt, and M. L. Coote. Comment on the correct use of continuum solvent models. *J. Phys. Chem. A*, 114(51):13442–13444, 2010.
- [229] A. Schäfer, A. Klamt, D. Sattel, J. C. W. Lohrenz, and F. Eckert. COSMO implementation in TURBOMOLE: Extension of an efficient quantum chemical code towards liquid systems. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2(10):2187–2193, 2000.
- [230] A. Klamt. The COSMO and COSMO-RS solvation models. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci.*, 1(5):699–709, 2011.
- [231] M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, and V. Barone. Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *J. Comput. Chem.*, 24(6):669–681, 2003.
- [232] J. Tomasi, B. Mennucci, and R. Cammi. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.*, 105(8):2999–3093, 2005.
- [233] C. Bolwien. Zeitaufloesende Schwingungsspektroskopie an Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin. *Dissertation*, 2002.
- [234] V. A. L. Fonfria. *persoenliche Kommunikation*, 2012.
- [235] C. Rodig, H. Georg, F. Siebert, I. Rousso, and M. Sheves. Temperature effects of excitation laser pulses during step-scan FT-IR measurements. *Laser Chemistry*, 19(1-4):169–172, 1999.
- [236] I. Chizhov, D. S. Chernavskii, M. Engelhard, K.-H. Mueller, B. V. Zubov, and B. Hess. Spectrally silent transitions in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys. J.*, 71:2329–2345, 1996.
- [237] D. Oesterheld and W. Stoeckenius. Rhodopsin-Litre protein from the purple membrane of halobacterium halobium. *Nat. New Biol.*, 233(39):149–152, 1971.
- [238] D. Oesterheld. *The Purple Membrane of Halobacterium halobium: A New System for Light Energy Conversion*, pages 147–167. John Wiley & Sons, Ltd., 2008.
- [239] U. Haupts, J. Tittor, and D. Oesterheld. Closing in on bacteriorhodopsin: Progress in understanding the molecule. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 28(1):367–399, 1999.
- [240] C. Braeuchle, N. Hampp, and D. Oesterheld. Optical applications of bacteriorhodopsin and its mutated variants. *Advanced Materials*, 3(9):420–428, 1991.

-
- [241] A. C. Terentis, L. Ujj, H. Abramczyk, and G. H. Atkinson. Primary events in the bacteriorhodopsin photocycle: Torsional vibrational dephasing in the first excited electronic state. *Chem. Phys.*, 313(1-3):51–62, 2005.
- [242] J. Tittor, S. Paula, S. Subramaniam, J. Heberle, R. Henderson, and D. Oesterheld. Proton translocation by bacteriorhodopsin in the absence of substantial conformational changes. *J. Mol. Biol.*, 319(2):555–565, 2002.
- [243] H. J. Sass, G. Buldt, R. Gessenich, D. Hehn, D. Neff, R. Schlesinger, J. Berendzen, and P. Ormos. Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin. *Nature*, 406(6796):649–653, 2000.
- [244] J. Heberle, G. Bueldt, E. Koglin, J. P. Rosenbusch, and E. M. Landau. Assessing the functionality of a membrane protein in a three-dimensional crystal. *J. Mol. Biol.*, 281(4):587–592, 1998.
- [245] R. H. Lozier, R. A. Bogomolni, and W. Stoeckenius. Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in halobacterium halobium. *Biophys. J.*, 15(9):955–962, 1975.
- [246] S. Subramaniam, M. Gerstein, D. Oesterheld, and R. Henderson. Electron diffraction analysis of structural changes in the photocycle of bacteriorhodopsin. *EMBO J.*, 12(1), 1993.
- [247] M. C. Nuss, W. Zinth, W. Kaiser, E. Koelling, and D. Oesterheld. Femtosecond spectroscopy of the first events of the photochemical cycle in bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Lett.*, 117(1):1–7, 1985.
- [248] M. S. Braiman, T. Mogi, T. Marti, L. J. Stern, H. G. Khorana, and K. J. Rothschild. Vibrational spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants: light-driven proton transport involves protonation changes of aspartic acid residues 85, 96, and 212. *Biochemistry*, 27(23):8516–8520, 1988.
- [249] H.J. Butt, K. Fendler, E. Bamberg, J. Tittor, and D. and Oesterheld. Aspartic acids 96 and 85 play a central role in the function of bacteriorhodopsin as a proton pump. *EMBO J.*, 8(6):1657–1663, 1989.
- [250] H. Otto, T. Marti, M. Holz, T. Mogi, M. Lindau, H. G. Khorana, and M. P. Heyn. Aspartic acid-96 is the internal proton donor in the reprotonation of the schiff base of bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(23):9228–9232, 1989.
- [251] K. Gerwert, G. Souvignier, and B. Hess. Simultaneous monitoring of light-induced changes in protein side-group protonation, chromophore isomerization, and backbone motion of bacteriorhodopsin by time-resolved fourier-transform infrared spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(24):9774–9778, 1990.
- [252] S. O. Smith, J. A. Pardo, P. P. J. Mulder, B. Curry, J. Lugtenburg, and R. Mathies. Chromophore structure in bacteriorhodopsin’s O₆₄₀ photointermediate. *Biochemistry*, 22(26):6141–6148, 1983.
- [253] C. Zscherp and J. Heberle. Infrared difference spectra of the intermediates L,M,N, and O of the bacteriorhodopsin photoreaction obtained by time-resolved attenuated total reflection spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, 101(49):10542–10547, 1997.

-
- [254] K. Bartl, A. Funk, and M. Gerhards. Structure of isolated xanthone in the T1 state obtained via combined UV/IR spectroscopy. *ChemPhysChem*, 10(11):1882–1886, 2009.
- [255] T. Gustavsson, R. Improta, and D. Markovitsi. DNA/RNA: Building blocks of life under UV irradiation. *J. Phys. Chem. Lett.*, 1(13):2025–2030, 2010.
- [256] N. K. Schwalb and F. Temps. Base sequence and higher-order structure induce the complex excited-state dynamics in DNA. *Science*, 322(5899):243–245, 2008.
- [257] C. T. Middleton, K. de La Harpe, C. Su, Y. K. Law, C. E. Crespo-Hernández, and B. Kohler. DNA excited-state dynamics: From single bases to the double helix. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 60:217–239, 2009.
- [258] D. Markovitsi, T. Gustavsson, and I. Vaya. Fluorescence of DNA duplexes: From model helices to natural DNA. *J. Phys. Chem. Lett.*, 1(22):3271–3276, 2010.
- [259] T. Takaya, C. Su, K. de La Harpe, C. E. Crespo-Hernández, and B. Kohler. UV excitation of single DNA and RNA strands produces high yields of exciplex states between two stacked bases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(30):10285–10290, 2008.
- [260] J.-H. Yoon, C.-S. Lee, T. R. O’Connor, A. Yasui, and G. P. Pfeifer. The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight. *J. Mol. Biol.*, 299(4):681–693, 2000.
- [261] W. J. Schreier, J. Kubon, N. Regner, K. Haiser, T. E. Schrader, W. Zinth, P. Clivio, and P. Gilch. Thymine dimerization in DNA model systems: Cyclobutane photolysis is predominantly formed via the singlet channel. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(14):5038–5039, 2009.
- [262] G. Ryseck, T. Schmierer, K. Haiser, W. J. Schreier, W. Zinth, and P. Gilch. The excited-state decay of 1-methyl-2(1H)-pyrimidinone is an activated process. *Chem. Phys. Chem*, 12(10):1880–1888, 2011.
- [263] W. A. Franklin, K. M. Lo, and W. A. Haseltine. Alkaline lability of fluorescent photoproducts produced in ultraviolet light-irradiated DNA. *J. Bio. Chem.*, 257(22):13535–13543, 1982.
- [264] K. Hunger, L. Buschhaus, L. Biemann, M. Braun, S. Kovalenko, R. Improta, and K. Kleiner. UV light induced hydrogen transfer in guanosine-guanosine aggregates. *Chem. Eur. J.*, 19(17):5425–5431, 2013.
- [265] O. Treutler and R. Ahlrichs. Efficient molecular numerical integration schemes. *J. Chem. Phys.*, 102(1):346–354, 1995.
- [266] K. J. Jalkanen, I. M. Degtyarenko, R. M. Nieminen, X. Cao, L. A. Nafie, F. Zhu, and L. D. Barron. Role of hydration in determining the structure and vibrational spectra of L-alanine and n-acetyl L-alanine n’-methylamide in aqueous solution: a combined theoretical and experimental approach. *Theor. Chem. Acc.*, 119(1-3):191–210, 2008.
- [267] Andreas Klamt. Calculation of UV/Vis spectra in solution. *J. Phys. Chem.*, 100(9):3349–3353, 1996.

- [268] T. Giorgi, F. Grepioni, I. Manet, P. Mariani, S. Masiero, E. Mezzina, S. Pieraccini, L. Saturni, G. P. Spada, and G. Gottarelli. Gel-like lyomesophases formed in organic solvents by self-assembled guanine ribbons. *Chem.-Eur. J.*, 8(9):2143–2152, 2002.
- [269] N. K. Schwalb, T. Michalak, and F. Temps. Ultrashort fluorescence lifetimes of hydrogen-bonded base pairs of guanosine and cytidine in solution. *J. Phys. Chem. B*, 113(51):16365–16376, 2009.
- [270] L. Lapinski, H. Rostkowska, A. Khvorostov, R. Fausto, and M. J. Nowak. Photochemical ring-opening reaction in 2(1H)-pyrimidinones: A matrix isolation study. *J. Phys. Chem. A*, 107(31):5913–5919, 2003.
- [271] T. Douki and 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.
- [272] T. Douki, D. Angelov, and J. Cadet. UV laser photolysis of DNA: Effect of duplex stability on charge-transfer efficiency. *J. Am. Chem. Soc.*, 123(46):11360–11366, 2001.
- [273] D. G. E. Lemaire and B. P. Ruzsicska. 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.
- [274] Y. Kyogoku, R. C. Lord, and A. Rich. The effect of substituents on the hydrogen bonding of adenine and uracil derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 57(2):250–257, 1967.
- [275] J.-L. Ravanat, C. Saint-Pierre, P. Di Mascio, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, and J. Cadet. Damage to isolated DNA mediated by singlet oxygen. *Helv. Chim. Acta*, 84(12):3702–3709, 2001.
- [276] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, and P. Wothers. *Organic Chemistry*. 2001.
- [277] M. D. Shetlar and J. Chung. Opened-ring adducts of 5-methylcytosine and 1,5-dimethylcytosine with amines and water and evidence for an opened-ring hydrate of 2'-deoxycytidine. *Photochemistry and Photobiology*, 87(4):818–832, 2011.
- [278] Y. K. Law, J. Azadi, C. E. Crespo-Hernández, E. Olmon, and B. Kohler. Predicting thymine dimerization yields from molecular dynamics simulations. *Biophys. J.*, 94(9):3590–3600, 2008.
- [279] Thierry Douki. The variety of uv-induced pyrimidine dimeric photoproducts in dna as shown by chromatographic quantification methods. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2013.
- [280] C. Sheu and C. S. Foote. Reactivity toward singlet oxygen of a 7,8-dihydro-8-oxoguanosine (8-hydroxyguanosine) formed by photooxidation of a guanosine derivative. *J. Am. Chem. Soc.*, 117(24):6439–6442, 1995.
- [281] K. K. Ogilvie. The tert-butyldimethylsilyl group as a protecting group in deoxynucleosides. *Can. J. Chem.*, 51(22):3799–3807, 1973.

- [282] A. Gualberto, R. M. Patrick, and K. Walsh. Nucleic acid specificity of a vertebrate telomere-binding protein: evidence for G-G base pair recognition at the core-binding site. *Genes & Development*, 6(5):815–824, 1992.
- [283] J. L. Battiste, H. Y. Mao, N. S. Rao, R. Y. Tan, D. R. Muhandiram, L. E. Kay, A. D. Frankel, and J. R. Williamson. α helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 rev peptide RRE RNA complex. *Science*, 273(5281):1547–1551, 1996.
- [284] P. O. Löwdin. Isotope effect in tunneling and its influence on mutation rates. *Mutation Res.*, 2(3):218–, 1965.
- [285] R. Zain and J. S. Sun. Do natural DNA triple-helical structures occur and function in vivo? *Cell. Mol. Life Sci.*, 60(5):862–870, 2003.
- [286] F. A. Buske, J. S. Mattick, and T. L. Bailey. Potential in vivo roles of nucleic acid triple-helices. *Rna Biology*, 8(3):427–439, 2011.
- [287] G. Gottarelli, S. Masicro, E. Mczzina, S. Pieraccini, J. P. Rabe, P. Samor , and G. P. Spada. The self-assembly of lipophilic guanosine derivatives in solution and on solid surfaces. *Chem. Eur. J.*, 6(17):3242–3248, 2000.
- [288] V. Karunakaran, K. Kleinermanns, R. Improta, and S. A. Kovalenko. Photoinduced dynamics of guanosine monophosphate in water from broad-band transient absorption spectroscopy and quantum-chemical calculations. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(16):5839–5850, 2009.
- [289] L. Biemann, S. A. Kovalenko, K. Kleinermanns, R. Mahrwald, M. Markert, and R. Improta. Excited state proton transfer is not involved in the ultrafast deactivation of guanine-cytosine pair in solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 133(49):19664–19667, 2011.
- [290] R. Improta and V. Barone. Interplay between "neutral nd "charge-transfer xcimers rules the excited state decay in adenine-rich polynucleotides. *Angew.Chem., Int. Ed.*, 50(50):12016–12019, 2011.
- [291] F. Santoro, V. Barone, and R. Improta. Excited states decay of the A-T DNA: A PCM/TD-DFT study in aqueous solution of the (9-methyl-adenine)(2)center dot(1-methyl-thymine)(2) stacked tetramer. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(42):15232–15245, 2009.
- [292] M. Dargiewicz, M. Biczysko, R. Improta, and V. Barone. Solvent effects on electron-driven proton-transfer processes: adenine-thymine base pairs. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14(25):8981–8989, 2012.
- [293] A. W. Lange and J. M. Herbert. Both intra- and interstrand charge-transfer excited states in aqueous B-DNA are present at energies comparable to, or just above, the $^1\pi\pi^*$ excitonic bright states. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(11):3913–3922, 2009.
- [294] R. Improta, V. Barone, G. Scalmani, and M. J. Frisch. A state-specific polarizable continuum model time dependent density functional theory method for excited state calculations in solution. *J. Chem. Phys.*, 125(5), 2006.

-
- [295] R. Improta, G. Scalmani, M. J. Frisch, and V. Barone. Toward effective and reliable fluorescence energies in solution by a new state specific polarizable continuum model time dependent density functional theory approach. *J. Chem. Phys.*, 127(7), 2007.
- [296] Y. Tawada, T. Tsuneda, S. Yanagisawa, T. Yanai, and K. Hirao. A long-range-corrected time-dependent density functional theory. *J. Chem. Phys.*, 120(18):8425–8433, 2004.
- [297] J. D. Gu, Y. M. Xie, and H. F. Schaefer III. Electron attachment to DNA single strands: gas phase and aqueous solution. *Nucleic Acids Res.*, 35(15):5165–5172, 2007.
- [298] E. Nir, K. Kleinermanns, and M. S. de Vries. Pairing of isolated nucleic-acid bases in the absence of the DNA backbone. *Nature*, 408(6815):949–951, 2000.
- [299] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Kohler, M. Spormann, and S. Wessely. Direct observation of hole transfer through DNA by hopping between adenine bases and by tunnelling. *Nature*, 412(6844):318–320, 2001.
- [300] F. D. Lewis. DNA molecular photonics. *Photochem. Photobiol.*, 81(1):65–72, 2005.
- [301] M. J. Frisch, J. A. Pople, and J. S. Binkley. Self-consistent molecular-orbital methods. 25. supplementary functions for gaussian basis sets. *J. Chem. Phys.*, 80(7):3265–3269, 1984.
- [302] M. Cossi and V. Barone. Time-dependent density functional theory for molecules in liquid solutions. *J. Chem. Phys.*, 115(10):4708–4717, 2001.
- [303] G. Scalmani, M. J. Frisch, B. Mennucci, J. Tomasi, R. Cammi, and V. Barone. Geometries and properties of excited states in the gas phase and in solution: Theory and application of a time-dependent density functional theory polarizable continuum model. *J. Chem. Phys.*, 124(9):094107, 2006.
- [304] D. Katarzynski and C. Staudt-Bickel. Separation of multi component aromatic/aliphatic mixtures by pervaporation with copolyimide membranes. *Desalination*, 189(1-3):81–86, 2006.
- [305] D. W. Wallace, J. Williams, C. Staudt-Bickel, and W. J. Koros. Characterization of crosslinked hollow fiber membranes. *Polymer*, 47(4):1207–1216, 2006.
- [306] S. Hess, C. Staudt-Bickel, and R. N. Lichtenthaler. Propene/propane separation with copolyimide membranes containing silver ions. *J. Membr. Sci.*, 275(1-2):52–60, 2006.
- [307] F. Santoso, W. Albrecht, M. Schroeter, T. Weigel, D. Paul, and R. Schomäcker. A novel technique for preparation of aminated polyimide membranes with microfiltration characteristics. *J. Membr. Sci.*, 223(1-2):171–185, 2003.
- [308] A. A. Lin, V. R. Sastri, G. Tesoro, A. Reiser, and R. Eachus. On the cross-linking mechanism of benzophenone-containing polyimides. *Macromolecules*, 21(4):1165–1169, 1988.

-
- [309] Y. Liu, C. Pan, M. Ding, and J. Xu. Effect of crosslinking distribution on gas permeability and permselectivity of crosslinked polyimides. *Eur. Polym. J.*, 35(9):1739–1741, 1999.
 - [310] H. Kita, T. Inada, K. Tanaka, and K. Okamoto. Effect of photo-cross-linking on permeability and permselectivity of gases through benzophenone-containing polyimide. *J. Membr. Sci.*, 87(1-2):139–147, 1994.
 - [311] C. Decker and C. Bianchi. Photocrosslinking of a maleimide functionalized polymethacrylate. *Polym. Int.*, 52(5):722–732, 2003.
 - [312] G. Mattson, E. Conklin, S. Desai, G. Nielander, M. D. Savage, and S. Morgensen. A practical approach to crosslinking. *Mol. Biol. Rep.*, 17(3):167–183, 1993.
 - [313] S. Pfeifer and J. F. Lutz. Development of a library of N-substituted maleimides for the local functionalization of linear polymer chains. *Chem. - Eur. J.*, 14(35):10949–10957, 2008.
 - [314] M. P. Stevens and A. D. Jenkins. Crosslinking of polystyrene via pendant maleimide groups. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, 17(11):3675–3685, 1979.
 - [315] M. Nagarathinam and J. J. Vittal. A rational approach to crosslinking of coordination polymers using the photochemical [2+2] cycloaddition reaction. *Macromol. Rapid Commun.*, 27(14):1091–1099, 2006.
 - [316] J. Put and F.C. De Schryver. Photochemistry of nonconjugated bichromophoric systems. intramolecular photocycloaddition of N,N'-alkylenedimaleimides in solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 95(1):137–145, 1973.
 - [317] X. Yu, C. Corten, H. Görner, T. Wolff, and D. Kuckling. Photodimers of N-alkyl-3,4-dimethylmaleimides - product ratios and reaction mechanism. *J. Photochem. Photobiol. A*, 198(1):34–44, 2008.
 - [318] W. Y. Chiang and J. Y. Lu. Preparation and properties of Si-containing copolymer for near-UV resist. 3. maleimide / silylstyrene copolymer. *J. Appl. Polym. Sci.*, 49(5):893–899, 1993.
 - [319] M. J. Marks, D. C. Scott, B. R. Guilbeaux, and S. E. Bales. Synthesis and thermochemistry of phenylmaleimide- and phenylnadimide-terminated bisphenol A polycarbonates. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, 35(2):385–390, 1997.
 - [320] C. W. Lee, J. M. Kim, D. K. Han, and K. D. Ahn. Photopolymerization of bifunctional maleimides based on electron-donor/acceptor systems. *J. Macromol. Sci. Pure*, A36(10):1387–1399, 1999.

A. Abkürzungsverzeichnis

6FDA	4,4'-Hexafluorisopropylidendiphthalsäureanhydrid
8-oxoGua	8-Oxo-7,8-dihydroguanin
ϵ	elektronische Quantenzahl und Dielektrizitätskonstante
Φ	Quantenausbeute
φ	Elektronendichte
λ	Wellenlänge
μ	Übergangsdipolmoment
μm	Mikrometer
μs	Mikrosekunden
ν	Schwingungsquantenzahl
ν	Frequenz
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
τ	Lebensdauer
Ψ	Wellenfunktion
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
A	Adenin oder Akzeptormolekül oder Absorption
AC	alternating current
ADC	Analog Digital Wandler
ASP	Asparaginsäure
BAPE	Benzoessäurepropylester
BBO	Beta-Bariumborat
BR	Bacteriorhodopsin
C	Cytosin
c	Konzentration
c_0	Lichtgeschwindigkeit
CAM	Coulomb-attenuating method
cm	Zentimeter
COSMO	Conduktor-like-Screening Model
C-PCM	conductor-like polarizable continuum model
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
CT	Charge-Transfer
D	Donormolekül
DABA	3,5-Diaminobenzoessäure
DC	direct current
D_0	Dissoziationsenergie
D_e	Tiefe der Potentialmulde
DFT	Dichte-Funktional-Theorie
DMAc	Dimethylacetamid
DMF	Dimethylformamide
DNA	Deoxyribonukleinsäure

DNS	Desoxyribonukelinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxide
D-PCM	dielektric polarizable continuum model
DPE	Diphenylether
e	Elementarladung
E	Energie
E_A	Elektronenaffinität
E_ν	Energieniveau
ESDPT	Excited-State-Double-Proton-Transfer
ESPT	Excited-State-Proton-Transfer
eV	Elektroneonvolt
FapyGua	2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin
FC	Franck-Condon
fs	Femrpsekunden
FT	Fourietransformation
FWHM	Full width at half maximum
g	Gramm
G	Guanin
GCMS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
GGA	generalized gradient approximation
GMP	Guanosine monophosphate
GTO	Gaussian-Typ-Orbitale
$\hat{H}$	Hamiltonoperator
H	Standartbildungsenthalpie
h	Planck-Konstante
HOMO	highest occupied molecular orbital
HPLC	High-performance Liquid Chromatography
HWHM	Half-width at half maximum
Hz	Hertz
I	Intensität
IC	Interne Konversion oder internal conversion
IP	Ionisierungspotential
IR	Infrarot
ISC	Intersystem Crossing
J	Joul
k	Ratenkonstante oder Kraftkonstante
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
LSDA	lokale Spin-Dichte-Näherung
Lys	Lysin
lZ	2,5-Diamino-4H-imidazol-4-one
M	Molar
mM	Millimolar
MCT	Quecksilber-Cadmiumtellurid
MI	Maleinimid
min	Minute
ml	Milliliter
N	Nukleonen und Anzahl

N_A	Avogadrokonstante
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
nm	Nanometer
ns	Nanosekunden
ODA	4-(4-(Aminophenoxy)benzenamin
P	Übergangswahrscheinlichkeit
PCM	polarizable continuum model
PES	Potential Energy Surface (potentielle Energiefläche)
PHI	N-methylphthalimid
PI	Polyimid
ps	Pikosekunden
R	Radien oder Abstände
r	radien oder Abstände
S_0	Grundzustand
$S(\nu', \nu)$	Überlappintegral der Schwingungswellenfunktionen
S_n	höher elektronisch angeregter Zustand
SI	Supporting Information
Sp	Spiroiminodihydantoin-Nukleosid
STO	Slater-Typ-Orbitale
$\hat{T}$	Operator für die kinetische Energie
T	Thymin
T_1	erster angeregter Triplett-Zustand
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TBDMSCl	tert-butyldimethylsilylchloride
TFMP	2,2-bis-trifluoromethylpropan
THF	Tetrahydrofuran
Ti:Sa	Titan:Saphir
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
TZVP	Triple-Zeta-Split-Valence
UV	Ultra-Violett
$\hat{V}$	Operator für die potentielle Energie
V	potentielle Energie und Volumen und Volt
vol %	Volumenprozent
W	Watt
WC	Watson-Crick
x_e	Anharmonizitätskonstante
Z	Anzahl der Laserpulse und 2,2,4-Triamino-5(2H)-oxazolone

B. Danke

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Karl Kleineremanns für die Möglichkeit der Promotion, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die vielen hilfreichen Diskussionen und Anmerkungen. Besonders danke ich ihm für das in mich gesetzte Vertrauen, dass ich ein für diesen Arbeitskreis komplett neues Projekt selbstständig aufbauen und durchführen durfte.

Herrn Prof. Dr. Michael Schmitt danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die Hilfe und Unterstützung bei Fragen zu Rechnungen und anderen Problemen, gerade im Schlusspurt der Promotion.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Prof. Claudia Staudt, Dr. Roberto Improta und Dr. Sergey Kovalenko für die gute Zusammenarbeit bei den gemeinsamen Projekten. Großer Dank gehört auch Nadine Schmeling für die Synthese und Präparation der von mir benötigten Polyimidfleim und die so toll funktionierende Zusammenarbeit.

Klaus Kelbert gehört großer Dank für die immerwährende Lösung aller elektronischer Probleme und technische Hilfe beim Modifizieren des Aufbaus für mein „Mädchenvakuum“. Desweiteren danke ich den Mitarbeitern der mechanischen Werkstätten für die verschiedenen, maßgenauen kleinen und auch größeren Bauteilen, die für die Durchführung meiner Experimente unverzichtbar waren. Andrea Lotzwick danke ich für ihre Unterstützung bei allem was mit dem alltäglichen Bürokratiewahnsinn zu tun hat und für den obligatorischen morgentlichen Kaffee.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen: Lars Biemann, Kai Seefeld, Matthias Busker, Thorsten Wilke, Olivia Oeltermann, Dominika Radziejewski, Martin Wilke, Gernot Engler, Markus Böning sowie besonders Daniel Ogermann, der mich schon während meine Vertiefung so nett in den Arbeitskreis eingeführt hat; Michaela Braun und Benjamin Stuhlmann, für den gemeinsamen frühen morgendlichen Motivationskaffee (oder auch Tee); Christian Brand, der immer alle Fragen (sinnig und unsinnig) geduldig beantwortet hat, Josefin Rolf, für die tolle Zusammenarbeit bei der Entdeckung merkwürdiger Banden und die Idee des wöchentlichen Stammtisches; Anna Pfeifer, für die Einführung in die STEP-SCAN-Technik und die tolle Zeit der Haus-WG sowie Katharina Hunger, für die tolle, gemeinsame Zeit seit Beginn meiner Diplomarbeit, als Bürokollegin und Freundin. Euch allen vielen Dank für die tolle Atmosphäre und vielen kleinen und großen Hilfen zwischen Labor und Büro. Dem Baron, Hermann, Herrn Vogel, Herrn Berger und anderen flüchtigen Bekanntschaften aus dem Orientexpress danke ich, dass sie die Fürstin trotz verschiedener Umwege nach Konstantinopel und zurück begleitet haben, auch wenn es manchen in den Wahnsinn getrieben hat ;-). Christian Brand, Katharina Hunger und Josefin Rolf danke ich zudem noch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Besonders Danke ich meinen Eltern und meinem Bruder, die mich immer unterstützt und an mich glaubt haben.