

Methyliertes 2(1*H*)-Pyrimidinon als Modell der Sekundären Photochemie von DNA

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Gerald Raoul Ryseck
aus München

Düsseldorf, November 2013

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

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

Referent: Prof. Dr. Peter Gilch
Korreferent: PD Dr. Klaus Schaper

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2013

METHYLIERTES 2(1H)-PYRIMIDINON ALS MODELL DER
SEKUNDÄREN PHOTOCHEMIE VON DNA

GERALD RAOUL RYSECK



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

November 2013

Gerald Raoul Ryseck, *Methyliertes 2(1H)-Pyrimidinon als Modell der Sekundären Photochemie von DNA*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, November 2013

*MEINEN ELTERN IN DANKBARKEIT UND LIEBE
GEWIDMET.*

ABSTRACT

Deoxyribonucleic acid (DNA) absorbs in the ultraviolet spectral region (UV), in which sunlight has non-vanishing spectral intensity. Sunlight may, thus, induce photochemical processes in DNA. The most common UV-induced DNA lesions are dimerizations between adjacent pyrimidines (P) on DNA strands. These damages can be the origin of mutations, cell death, and cancer. The pyrimidine(6-4)pyrimidinone lesion is characterized by a 2(1*H*)-pyrimidinone moiety that, in contrast to P, absorbs light with longer wavelengths. Since the intensity of solar radiation rises with increasing wavelength, once a P(6-4)P lesion is formed it can be subject to secondary photo-processes. Indeed, for P(6-4)P lesions in natural DNA as well as in dinucleotide model systems, a Dewar valence isomerisation (DVI) has been observed.

In this thesis the photokinetics of 1-methyl-2(1*H*)-pyrimidinone (1MP), regarded as a minimal model for the chromophore P(6-4)P lesions, is examined. The radiative state of 1MP decays with a lifetime two to three orders of magnitude longer compared to P. This is attributed to activation barriers for internal conversion (IC) and intersystem crossing (ISC) in the excited state. The reaction quantum yield of 1MP is about an order of magnitude lower than for T(6-4)P lesions and cannot be solely assigned to a DVI. In a collaborative study, the influence of the DNA "backbone" on the mechanism of the DVI was examined. It is shown that for a formacetal linked T(6-4)T dinucleotide the DVI is only formed if the backbone "intact".

The photokinetics of 1MP is strongly influenced by the solvent environment and chemical substitution. The activation barriers for IC and ISC both increase in a similar way with the dielectric constant of the environment. Additionally, methylation of 1MP, i.e. 1,4,6-trimethyl-2(1*H*)-pyrimidinone (146TMP), shows an influence on these activation barriers, but in a different manner for IC or ISC.

The ISC process populates the triplet state of 1MP with a quantum yield of several ten percent. Triplet excited 1MP can abstract hydrogen atoms from suitable donors in bimolecular reactions. Solvents like alcohols as well as sugar dissolved in water can act as a donor. The latter is of photobiological relevance. In particular as it has been seen that 2-deoxy-D-ribose acts as a donor. In addition to the well known DVI it is, thus, shown that hydrogen abstraction may contribute, as another deactivation pathway, to the secondary photochemistry of P(6-4)P lesions. Up to date, the consequences for natural DNA are not clarified, which opens a new topic in the field of photo-induced DNA damages.

ZUSAMMENFASSUNG

Desoxyribonukleinsäure (DNA) absorbiert im ultravioletten Spektralbereich (UV), in dem die spektrale Intensität der Sonneneinstrahlung nicht vernachlässigbar ist. Sonnenlicht kann somit photochemische Prozesse in der DNA induzieren. Die häufigsten UV-induzierten Schäden sind Dimerbildungen zwischen benachbarten Pyrimidinen (P). Diese Schäden können Ausgangspunkt für Mutationen, Zelltod und Krebs sein. Der Pyrimidin(6-4)Pyrimidinon-Schaden kennzeichnet sich durch ein 2(1*H*)-Pyrimidinon-Motiv, das gegenüber P längerwelliges Licht absorbiert. Da die Intensität der Sonneneinstrahlung mit steigender Wellenlänge zunimmt, kann ein einmal gebildeter P(6-4)P-Schaden mit hoher Wahrscheinlichkeit sekundären photoinduzierten Prozessen unterliegen. Für P(6-4)P-Schäden ist in natürlicher DNA und in Dinukleotid-Modellsystemen eine Dewar Valenz-Isomerisierung (DVI) beobachtet worden.

In dieser Arbeit wird die Photokinetik von 1-Methyl-2(1*H*)-Pyrimidinon (1MP) als minimales Modell des Chromophors von P(6-4)P-Schäden untersucht. Die Lebensdauer des strahlenden Zustands von 1MP ist um zwei bis drei Größenordnungen länger als die von P. Dies wird auf Aktivierungsbarrieren für innere Konversion (IC) und Interkombination (ISC) im angeregten Zustand zurückgeführt. Die Reaktionsquantenausbeute von 1MP ist ca. eine Größenordnung niedriger als für T(6-4)P-Schäden und nicht alleine einer DVI zuzuordnen. Für den Mechanismus der DVI wurde in einer Kooperation der Einfluss des DNA-„Rückgrats“ untersucht. Für ein Formacetalverbrücktes T(6-4)T-Dinukleotid wird gezeigt, dass die DVI durch ein „intaktes“ Rückgrat bedingt ist.

Die Photokinetik von 1MP ist stark von der Lösungsumgebung und chemischer Substitution beeinflusst. Die Aktivierungsbarrieren für IC und ISC steigen beide in vergleichbarer Weise mit der dielektrischen Konstante der Umgebung an. Zusätzliche Methylierung von 1MP und 1,4,6-Trimethyl-2(1*H*)-Pyrimidinon (146TMP) zeigt ebenfalls einen, wenn auch für IC und ISC unterschiedlich starken, Einfluss auf diese Aktivierungsbarrieren.

Der ISC Prozess bedingt die Bevölkering des Triplettzustands von 1MP mit einer Quantenausbeute von mehreren zehn Prozent. Triplettangeregtes 1MP kann in bimolekularen Reaktionen Wasserstoffatome von geeigneten Donoren abstrahieren. Lösungsmittel wie Alkohole oder in Wasser gelöster Zucker können als solch ein Donor dienen. Letzterer ist von photobiologischer Relevanz. Besonders, da beobachtet wurde, dass 2-Desoxy-D-Ribose als Donor fungieren kann. Zusätzlich zu der bekannten DVI wird somit gezeigt, dass Wasserstoff-

fabstraktion als ein weiterer Deaktivierungskanal, zu der sekundären Photochemie von P(6-4)P beitragen könnte. Bislang sind die Konsequenzen für natürliche DNA nicht abgeklärt, was einen neuen Forschungsschwerpunkt im Bereich photoinduzierter DNA Schäden eröffnet.

PUBLIKATIONEN

Einige Inhalte und Abbildungen dieser Arbeit erschienen in gleicher oder ähnlicher Form in folgenden Publikationen:

1. Ryseck G. and Gilch P., *"Ultrafast Fluorescence Spectroscopy"*, DeGruyter, *in press*
2. Ryseck G., Villnow T., Hugenbruch S., Schaper K. and Gilch P. (2013), *"Strong impact of the solvent on the photokinetics of a 2(1H)-pyrimidinone"*, Photochem. Photobiol. Sci.. Vol. 12, pp. 1423-1430.
3. Fingerhut B. P., Herzog T. T., Ryseck G., Haiser K., Graupner F. F., Heil K., Gilch P., Schreier W. J., Carell T., de Vivie-Riedle R. and Zinth W. (2012), *"Dynamics of ultraviolet-induced DNA lesions: Dewar formation guided by pre-tension induced by the backbone"*, New Journal of Physics. Vol. 14(6), pp. 065006.
4. Ryseck G., Schmierer T., Haiser K., Schreier W., Zinth W. and Gilch P. (2011), *"The Excited-State Decay of 1-Methyl-2(1H)-pyrimidinone is an Activated Process"*, ChemPhysChem. Vol. 12(10), pp. 1880-1888.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
I	GRUNDLAGEN UND METHODEN	7
2	DNA-SCHÄDIGUNG DURCH LICHT	9
2.1	Vom Chromophor zum Makromolekül	9
2.1.1	DNA-Basen: Ausgangspunkt Photoinduzierter Prozesse	9
2.1.2	Einfluss von Substituenten — DNA-Analoga . .	12
2.1.3	Einfluss der Umgebung	13
2.2	DNA-Schädigung	15
2.2.1	Dimer-Schäden	15
2.2.2	“Indirekte” Schädigung der DNA	18
2.2.3	Sekundäre Photochemie des (6-4)-Chromophors	19
3	SPEKTROSOPISCHE METHODEN	23
3.1	Stationäre Spektroskopie	23
3.1.1	Fluoreszenzspektroskopie	24
3.1.2	Absorptionsspektroskopie	26
3.1.3	Umbelichtungsexperimente	27
3.2	Zeitaufgelöste Spektroskopie	29
3.2.1	Impulsanregung	29
3.2.2	Transiente Absorptionsspektroskopie	34
3.2.3	Nanosekunden Absorptionsspektroskopie . . .	38
3.2.4	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie	41
3.3	Korrektur und Analyse stationärer und transienter Spektren	49
II	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	55
4	PHOTOPHYSIK UND -CHEMIE VON T(6-4)T	57
4.1	Photochemie	57
4.1.1	Dewar Valenzisomerisierung von 64ac	57
4.1.2	Photochemie von 1MP	58
4.2	Photophysikalische Prozesse	59
4.2.1	1MP als Chromophor von P(6-4)P	59
4.2.2	Verzweigung aus dem Singulett-Zustand	62
4.2.3	Temperaturabhängigkeit	67
4.2.4	Photophysik des Pyrimidinon-Motivs in 64ac .	71
4.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Modellsystemen 1MP und 64ac	75
5	LÖSUNGSMITTEL- UND SUBSTITUENTENEFFEKTE AUF DIE PHOTOPHYSIK VON 1MP	81
5.1	Lösungsmittelabhängigkeit	81
5.1.1	Stationäre Spektren	81
5.1.2	Zeitaufgelöste Spektren	88

5.2	Einfluss zusätzlicher Methyl-Gruppen	93
6	PHOTOKINETIK DES 1MP-TRIPLETT-ZUSTANDS	99
6.1	Spektral aufgelöste Nanosekunden-Spektroskopie an 1MP in Wasser	99
6.2	Wasserstoffabstraktion durch den 1MP-Triplett	102
6.3	Photoreaktion des 1MP-Triplets mit DNA-Komponenten	105
7	ABSCHLIESSENDE BEMERKUNGEN UND AUSBLICK	109
	LITERATURVERZEICHNIS	113
III	ANHANG	135
A	ZUSATZABBILDUNGEN	137

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1	Wirkungsspektrum von <i>Staphylococcus aureus</i> . . .	2
Abbildung 1.2	Chromophor des T(6-4)T-Photoschadens. . . .	4
Abbildung 2.1	Absorptionskoeffizienten der DNA-Bausteine .	10
Abbildung 2.2	Modell der schnellen Deaktivierung photoan- geregter DNA-Basen	11
Abbildung 2.3	Fluoreszenzlebensdauer von Cytosin und De- rivaten	12
Abbildung 2.4	Struktur von B-DNA	14
Abbildung 2.5	Häufige direkte UV-induzierte DNA-Schädigun- gen	16
Abbildung 2.6	Vergleich von Absorption von Thymidin-Dimeren mit der Sonneneinstrahlung auf Meereshöhe .	20
Abbildung 2.7	Mögliche Photo-Reaktionen von 2(1 <i>H</i>)-Pyrimi- dinon	21
Abbildung 3.1	Stationäres Fluoreszenzspektrometer	24
Abbildung 3.2	Stationäres Absorptionsspektrometer	27
Abbildung 3.3	Umbelichtungsexperimente im UV/Vis- und IR- Spektralbereich	28
Abbildung 3.4	Der Titanium-Saphir-Laser	31
Abbildung 3.5	Prinzip eines regenerativen Verstärkersystems	32
Abbildung 3.6	Schema eines transienten UV/Vis-Absorptions- spektrometers	36
Abbildung 3.7	(Einkanal) Nanosekunden Absorptionsspektro- meter	39
Abbildung 3.8	Löschung des solvatisierten Elektrons	41
Abbildung 3.9	Prinzip einer Schmierbild-Kamera	43
Abbildung 3.10	Prinzip eines optischen Tors	45
Abbildung 3.11	Realisierung eines optischen Tors	46
Abbildung 3.12	Photoselektivität bei Anregung von Molekülen	52
Abbildung 4.1	IR-Spektren der Umbelichtung von 64ac und 1MP	58
Abbildung 4.2	Stationäre Absorptions- und Emissionsspektren von 1MP und 64ac in wässriger Lösung	60
Abbildung 4.3	Femtosekunden Transiente Absorption von 1MP in Wasser	63
Abbildung 4.4	Zerfallsassoziierte Amplitudenspektren für 1MP in Wasser	64
Abbildung 4.5	Femtosekundenzeitaufgelöste IR-Absorption des Grundzustandsausbleichens von 1MP	65
Abbildung 4.6	ns-IR-Absorption des Grundzustandsausbleichens von 1MP	66

Abbildung 4.7	Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute von 1MP	68
Abbildung 4.8	Temperaturabhängigkeit der Triplett-Ausbeute von 1MP	69
Abbildung 4.9	Temperaturabhängigkeit der Aktivierungskanäle von 1MP	70
Abbildung 4.10	fs-Transiente Absorption von 64ac.	71
Abbildung 4.11	Schmierbildmessung des Fluoreszenzzerfalls von 64ac	73
Abbildung 4.12	Temperaturabhängigkeit des Fluoreszenzzerfalls von 64ac	74
Abbildung 4.13	Nanosekundenzeit aufgelöste IR-Messung von 64ac	75
Abbildung 4.14	Modell für die Photophysik von 1MP	76
Abbildung 4.15	Schema zur Kinetik von 64ac	77
Abbildung 4.16	Mechanismus der rückgratvermittelten Dewar Valenzisomerisierung	78
Abbildung 5.1	Lösungsmiteinfluss auf stationäre Spektren von 1MP	82
Abbildung 5.2	Orbitalbilder des HOMO und LUMO von 1MP	85
Abbildung 5.3	Abhängigkeit der Anregungsenergie gegen empirischen Lösungsmittelparameter E_T^N	86
Abbildung 5.4	Vibronische Struktur der 1MP Absorptionsspektren	87
Abbildung 5.5	Einfluss der Lösungsumgebung auf die Zerfallskinetik von 1MP	89
Abbildung 5.6	Einfluss des Lösungsmittels auf das Triplett-Spektrum	90
Abbildung 5.7	Einfluss der Dielektrizitätskonstante auf die Aktivierungsenergie der inneren Konversion und Interkombination	92
Abbildung 5.8	Absorptionsspektren von 146TMP	93
Abbildung 5.9	Vergleich der Fluoreszenzlebensdauern von 146TMP und 1MP	94
Abbildung 5.10	Triplett-Quantenausbeute von 146TMP im Vergleich zu 1MP	95
Abbildung 6.1	Einkanalige Nanosekunden Transiente Absorption im Sichtbaren von 1MP	100
Abbildung 6.2	Flash-Photolyse von 1MP in Wasser	101
Abbildung 6.3	Nanosekunden Flash-Photolyse von 1MP in Wasser	102
Abbildung 6.4	Stern-Volmer-Plot für 1MP	103
Abbildung 6.5	Spektrum des 1MP-Dimers	104
Abbildung 6.6	Elektrochemische Reduktion von 2(1 <i>H</i>)-Pyrimidinon	105

Abbildung 6.7	Lösungsmittelabhängigkeit der Reaktionsquantenausbeute von 1MP und 146TMP	106
Abbildung 6.8	Reaktions-Quantenausbeuten der bimolekularen Photochemie von 1MP	107
Abbildung A.1	Schmierbild-Messung der Fluoreszenz von 1mp in Wasser	137
Abbildung A.2	1MP Oszillatorstärke	138
Abbildung A.3	10 ps Spektren von 1MP in verschiedenen Lösungsmitteln	138

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 5.1	Lösungsmiteleinfluss auf stationäre Spektren von 1MP	83
Tabelle 5.2	Einfluss des Lösungsmittels auf die Ratenkonstante von innerer Konversion und Interkombination	91
Tabelle 5.3	Photophysikalische Eigenschaften von 146TMP in verschiedenen Lösungsmitteln	96

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

¹⁴ 6TMP	1,4,6-Trimethyl-2(1H)-pyrimidinone
¹ MP	1-Methyl-2(1H)-pyrimidinone
64ac	formacetal-verbrückter T(6-4)T-Schaden
BBO	Barium Borat, engl. barium borate
CI	konische Durchschneidung, engl. conical intersection
CPD	Cyclo-Butan-Dimer, engl. cyclobutane pyrimidine dimer
DAS	Amplitudenspektrum, engl. decay associated spectrum
DNA, RNA	(Desoxy-)ribonukleinsäure, engl. (desoxy-)ribonucleic acid
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektrometer, engl. fourier transform infrared spectroscopy
FWHM	volle Halbwertsbreite, engl. full width at half maximum
GVD	Gruppengeschwindigkeits-Dispersion, engl. group velocity dispersion
GVM	Gruppengeschwindigkeits-Fehlanpassung, engl. group velocity mismatch
HA	Wasserstoff-Abstraktion, engl. hydrogen abstraction
HOMO	höchst-energetisch besetzten Molekülorbital, engl. highest occupied molecular orbital
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. high-performance liquid chromatography
IC	innere Konversion, engl. internal conversion
IRF	Apparatefunktion, engl. instrumental response function
ISC	Interkombination, engl. intersystem crossing
Laser	Lichtverstärkung durch angeregte Strahlungsemission, engl. light amplification by stimulated emission of radiation
LUMO	nieder-energetisch unbesetzten Molekülorbital, engl. lowest unoccupied molecular orbital
NMR	Kernspinresonanz, engl. nuclear magnetic resonance

- NOPA nicht-kollinear phasenangepasster OPA, engl. noncollineary phase-matched OPA
- O() Omikron, in der Größenordnung von...; hier nicht im mathematischen Sinne als Landau-Symbols
- OPA optisch parametrischer Verstärker, engl. optical parametric amplification
- ROS reaktive Sauerstoff-Spezies, engl. reactive oxygen species
- RQY, FQY (chemische/Fluoreszenz-) Quantenausbeute, engl. (reaction/fluorecence) quantum yield
- SNR Signal-zu-Rauschverhältnis, engl. signal-to-noise ratio
- SVD Singulärwertzerlegung, engl. singular value decomposition
- TTET Triplett-Triplett Energie-Übertragung, engl. triplet-triplet energy transfer
- UV, Vis, (N)IR ultravioletter, sichtbarer, (nah-)infraroter Spektralbereich, engl. ultraviolet, visible, (near-)infrared spectral region

EINLEITUNG

Viele biologische Prozesse sind auf die Sonneneinstrahlung angewiesen [1]. So basiert die Umwandlung von Lichtenergie in chemisch gebundene Energie auf der Photosynthese. Neben diesem Prozess ist schon allein das Phänomen des “Sehens” Beweis genug für die weitreichende Bedeutung der Sonne für Prozesse in der Natur. Im Sehprozess ist die direkte Umwandlung von Licht in elektrische Impulse Grundlage für die visuelle Wahrnehmungsfähigkeit. Nach heutigem Wissenstand induziert das auf die Netzhaut (Retina) einfallende Licht eine Konformationsänderung von in Proteinkanälen enthaltenen Retinal-Chromophoren [1]. Dieser lichtinduzierte “Schaltvorgang” von *trans*- zu *cis*-Isomeren ist der Ausgangspunkt für Folgeprozesse, an deren Ende eine Reaktion des zerebralen Systems steht. Dabei folgt die Isomerisierung auf die Absorption *eines einzelnen* Photons hin. Die Energie eines Photons im sichtbaren Spektralbereich ist mit üblichen Bindungsenergien von chemischen Verbindungen vergleichbar [2]. Folglich hat Sonnenlicht das Potential, in *direkter* Weise chemische Prozesse zu induzieren.

Neben diesen biologisch “nützlichen” lichtinduzierten Prozessen können durch Sonnenlicht Schäden induziert werden. Beispielhaft dafür ist die Photochemie von Desoxyribonukleinsäure (DNA, *engl. desoxyribonucleic acid*). Schon früh wurde die Auswirkung von Licht auf Organismen untersucht, indem deren Reaktion in Abhängigkeit von den physikalischen Parametern des Anregungslichts beobachtet wurde (Wirkungsspektrum). Gerade die zelluläre Antwort, wie z.B. die Letalität von Zellen, in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge, kann Hinweise auf den Chromophor und damit den (Bestand-)Teil der Zelle geben, welcher durch den lichtinduzierten Prozess einer photochemischen Änderung unterliegt. Der Vergleich der Wirkungsfunktion von *Staphylococcus aureus* [3] mit dem Absorptionsspektrum natürlicher DNA (siehe Abbildung 1.1) führt zu der These, dass direkte Schädigung der DNA durch ultraviolettes Licht (UV, *engl. ultraviolet*) zum Zelltod führen kann [4, 5, 3] — dieses Wissen über die schädigende Wirkung von UV-Strahlung ist älter als das Wissen über die Bedeutung der DNA als Erbinformationsträger.

Die Messung des Wirkungsspektrums macht in unstrittiger Weise klar, dass photochemische Prozesse ablaufen, die mit der Absorption der UV-Strahlung durch die DNA einhergehen. In welchem Ausmaß eine Photoanregung von DNA zu einer chemischen Reaktion führt, wurde in zahlreichen Studien beleuchtet und liefert für unterschiedliche Photoprodukte Quantenausbeuten in der Größenordnung von

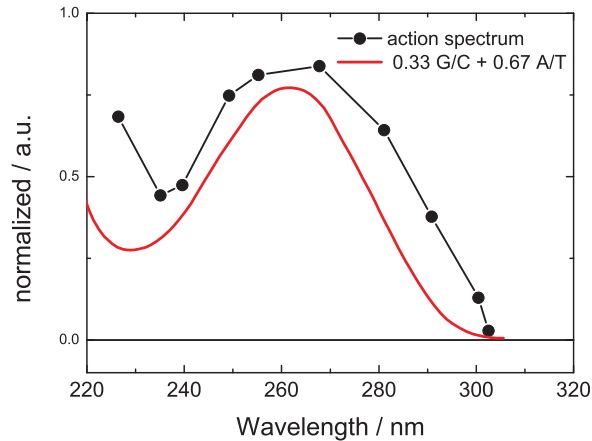


Abbildung 1.1: Wirkungsspektrum von *Staphylococcus aureus* (schwarze Punkte, nachgezeichnet nach [3]) überlagert mit dem Absorptionsspektrum der Nukleobasen von DNA (rot, entnommen aus [6], gewichtet nach [7] mit 33% G/C und 67% A/T Basenpaare). Die Wirkungsfunktion gibt die relative Häufigkeit von Inaktivierung der Zellteilung gegen die Bestrahlungswellenlänge an. Das Absorptionsspektrum ist als molarer Absorptionskoeffizient gegen die Wellenlänge aufgetragen. Beide Spektren sind und für den direkten Vergleich skaliert aufgetragen.

$\sim 10^{-4} - 10^{-2}$ ($\sim 0.01 - 1\%$)¹ [8, 9]. Obwohl auf Höhe des Meeresspiegels kaum Licht im Spektralbereich der Absorptionsbande von DNA ankommt, entstehen also DNA-Schäden. Dies bedeutet, dass Zellen geeignete Mechanismen besitzen müssen, um diese Photoschäden zu reparieren. Die hohe spezifische Wirksamkeit von Proteinen, welche den genetischen Code der DNA in zelluläre Funktionen umsetzen, setzt eine intakte DNA voraus. Aus diesem Grund verhelfen unterschiedlichste Strategien den Zellen mit DNA Schäden umzugehen, dies aber je nach Photoschaden mit unterschiedlicher Wirksamkeit und Effizienz [10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18].

Der Schaden, der im Zentrum dieser Arbeit steht, wird mit einer relativ kleinen Ausbeute gebildet. Dieser sogenannte T(6-4)T-Schaden kennzeichnet sich durch eine kovalente Bindung zwischen zwei auf einem DNA Strang benachbarten Pyrimidin-Basen aus. Der T(6-4)T-Schaden kann in einer weiteren Photoreaktion in sein Dewar Valenzisomer T(Dewar)T übergehen [19, 20, 8] (siehe Abbildung 1.2). Diese sekundäre Reaktion hat im Vergleich zur Primärreaktion eine um Größenordnungen höhere chemische Quantenausbeute. Zudem ist die Absorption des T(6-4)T-Schadens rotverschoben zu der von DNA Basen. Auf Niveau des Meeresspiegels bedingt die höhere Intensität in

¹ Quantenausbeuten werden in dieser Arbeit immer als Dezimalzahl und in Prozent angegeben, um Missverständnisse zu vermeiden.

diesem Spektralbereich einen hohen Umsatz hin zum T(Dewar)T. Es ist also zu erwarten, dass ein einmal gebildeter T(6-4)T-Schaden als Dewar Valenzisomer vorliegt. Zudem lieferten bis dato mehrere Studien Kenntnis über den Zusammenhang dieses Schadens mit einem breiten Spektrum von Mutationen [21, 22, 14].

Diese Beobachtungen machen die spezielle Bedeutung des T(Dewar)T-Schaden für mutationsbedingte Erkrankungen von Organismen deutlich. Neben den Forschungsschwerpunkten die Physiologie und die Reparaturmechanismen dieses DNA Photoschadens betreffend, ist ein Verständnis über das photophysikalische und -chemische Verhalten des Chromophors der Ausgangsverbindung T(6-4)T von großem Interesse. Wissen über den Mechanismus und die Ausbeuten der Dewar Valenzisomerbildung können Beiträge zur Aufklärung von Theorien, wie z.B. zur Evolution des genetischen Codes oder zum Reparaturmechanismus, geben.

Ein vollständiges mechanistisches Bild von in der Natur auftretenden Reaktionen beinhaltet eine Charakterisierung von Umgebungseinflüssen und gekoppelte Nebenreaktionen. Dies kann bei einem komplexen Makromolekül wie der DNA schwierig umzusetzen sein und/oder ausgeklügelte Experimente voraussetzen. Eine Möglichkeit, dieser Schwierigkeit zu begegnen, ist die "Vereinfachung" des zu untersuchenden Systems. Im Falle von lichtinduzierten DNA-Schäden ist dies experimentell durch eine Reduzierung auf einzelsträngige Dinukleotide erreicht worden [23, 24, 25, 26]. Auch DNA-Basen wurden als minimale Modelle zur Erforschung der Photochemie von DNA untersucht. Die Basen sind die UV-Chromophore von DNA und deshalb zwingend Ausgangspunkt für lichtinduzierte Vorgänge nach der Absorption. Der Vergleich ihrer Photochemie mit der von komplexeren Modellen von DNA bietet die Möglichkeit, zwischen den Basen intrinsischen Merkmalen und ihrer Rolle im Kontext zu natürlicher DNA zu differenzieren.

In analoger Weise beziehen sich Experimente zur Photoisomerisierung des T(6-4)T-Schadens auf die Untersuchung von Modellsystemen unterschiedlichen Abstraktionsgrades. In dieser Arbeit wird 1-Methyl-2(1H)-pyrimidinon (1MP) als minimales System für die photoinduzierte Isomerisierung des T(6-4)T-Schadens untersucht (siehe Abbildung 1.2). Dieses Molekül spiegelt die Struktur des Chromophors des T(6-4)T-Schadens wider und repräsentiert den chemischen Rest, welcher der Isomerisierung unterliegt. Es stellt sich heraus, dass sich die Photophysik von 1MP zu der von DNA-Basen unterscheidet. Dies wird in Bezug auf die in der Literatur beschriebenen Derivate von DNA-Basen diskutiert. Zudem werden Untersuchungen zum Einfluss der Lösungsumgebung zusammengefasst und Ergebnisse zu Messungen an zusätzlich methyliertem 1MP in unterschiedlichen Lösungsmitteln dargelegt. Im Weiteren werden Untersuchungen am

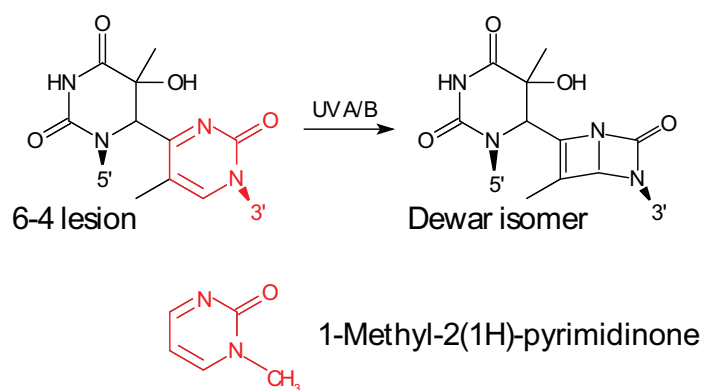


Abbildung 1.2: Chromophor des T(6-4)T-Photoschadens: Der (6-4)-Schaden kann in einer lichtinduzierten Reaktion in sein Dewar Valenzisomer übergehen (Das Zucker-Phosphat-Rückgrat ist nicht mit eingezeichnet). Das einzige im UVA/B-Spektralbereich absorbierende konjugierte π -System ist ausschließlich Bestandteil des Pyrimidinon-Rests. Die Isomerisierung betrifft ebenfalls nur diesen Rest. Als minimales Modell für den (6-4)-Schaden kann 1-Methyl-2(1H)-pyrimidinon identifiziert werden. Aus Referenz [27] entnommen.

T(6-4)T-Dimer vorgestellt und diese auf Basis der Ergebnisse für 1MP diskutiert.

Um ein mechanistisches Bild von den nach der Photoanregung ablaufenden Reaktionen zu erhalten, sollte eine Technik angewendet werden, welche es erlaubt, Moleküle mit einer Auflösung auf der Längenskala chemischer Bindungen abzubilden. Dies ist heutzutage mit modernen abbildenden Techniken prinzipiell möglich [28], aber durch messtechnische Anforderungen limitiert. Die zu untersuchenden Moleküle müssen in einen Zustand präpariert werden, der sich von den physikalischen Parametern im natürlichen System unterscheidet. Zudem bieten diese Techniken keine ausreichende Zeitauflösung. Deshalb sind spektroskopische Methoden vorzuziehen, allen voran die UV/Vis/NIR-Absorption und -Emissions-Spektroskopie. Das Licht in diesem Wellenlängenbereich induziert natürlich vorkommende Photoreaktionen [1, 29, 2]. Dabei liefert die Wellenlängenabhängigkeit der Absorption oder Emission physikalisch interpretierbare Werte über die energetische Lage von vibronischen Zuständen.

Da jeder Prozess innerhalb einer endlichen Zeitspanne (und auf einer endlichen Längenskala) abläuft, muss für ein direktes zeitliches Verfolgen eben dieses eine Messtechnik mit einer geeigneten Zeitauflösung angewendet werden. Das untere Limit für die Zeitskala, auf der chemische Reaktionen ablaufen, liegt im Femtosekundenbereich ($1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$) [29, 2] und ist auf rein elektronischem Wege nicht zu erreichen [30]. Erst mit der Erfindung des Lasers und der darauf folgenden Entwicklung breitbandig emittierender Lasersysteme wurden Laserimpulse mit Impulsdauern im Femtosekundenbereich er-

reicht. In der Anregungs-/Abfrage-Messtechnik kommen solche Laserimpulse für hoch zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen zum Einsatz [30, 31].

1.0.0.1 *Gliederung der Arbeit*

In Kapitel 2 finden sich die Grundlagen zur Photophysik von DNA Basen. An Beispielen wird der Einfluss von Substitutionen und der chemischen Umgebung herausgearbeitet. Im Weiteren werden die direkte Photochemie und exogene Einflüsse diskutiert. Abschließend wird näher auf den T(6-4)T Schaden und bekannte photochemische Prozesse von 2(1*H*)-Pyrimidinone (2P) eingegangen.

Die in dieser Arbeit verwendeten spektroskopischen Methoden werden in Kapitel 3 behandelt. Neben den stationären Methoden werden die zeitaufgelösten Aufbauten besprochen. Die zeitaufgelösten Emissionsmessungen in dieser Arbeit wurden mittels einer Streak-Kamera aufgenommen. Der Kerr-Schalter, welcher am Arbeitskreis aufgebaut wurde, ist für schnelle hoch-zeitaufgelöste Fluoreszenz-messungen konzipiert. Die Fluoreszenzlebensdauer der in dieser Arbeit behandelten Moleküle ist nicht ohne weiteres mit ihm zu vermessen. Ansätze, dies möglich zu machen, werden diskutiert.

In Kapitel 4 wird die Photophysik von 1-methyliertem 2P (1MP) und einem Formacetal-verbrücktem T(6-4)T-Schaden untersucht. Die Verzweigung aus dem primär angeregten Singulettzustand, genauer das Verhältnis von Rückgang in den Grundzustand und Bevölkung des Triplett-Zustands, wird quantifiziert. Abschließend werden die Unterschiede in der Photokinetik herausgearbeitet und der Mechanismus der Dewar Valenzisomerisierung dargelegt.

Der Einfluss von Lösungsmittelumgebung und zusätzlicher Methylierung auf die Photophysik von 1MP ist Gegenstand von Kapitel 5. Es zeigt sich eine starke Abhängigkeit der Triplett-Quantenausbeute mit diesen Faktoren. Die Deaktivierungskanäle des gebildeten Triplets werden in Kapitel 6 behandelt. Dabei wird ein reaktiver Pfad gefunden und im Kontext zu DNA-Komponenten, hier mit Schwerpunkt auf die dR Gruppe, untersucht.

Die Ergebnisse werden abschließend in Kapitel 7 zusammengefasst und deren Bedeutung diskutiert. Ein Ausblick auf weitere Forschungsvorhaben wird gegeben.

Teil I

GRUNDLAGEN UND METHODEN

DNA-SCHÄDIGUNG DURCH LICHT

Die Chemie von DNA ist ein breites Forschungsfeld. Ein Schwerpunkt ist die Aufklärung der Entstehung von lichtinduzierten DNA-Schäden. In diesem Kapitel werden die für diese Arbeit relevanten Erkenntnisse dargelegt. Für weiterreichende Informationen wird der Leser auf die Literaturquellen der Referenzen [32, 6, 18, 33] verwiesen.

Die DNA-Basen sind für die Absorption niederenergetischer elektromagnetischer Strahlung verantwortlich und Ausgangspunkt primärer Photoreaktionen. Ihr photophysikalisches Verhalten zeigt eine starke Abhängigkeit von der chemischen Umgebung und von Änderungen ihrer chemischen Struktur. Für DNA wird vor allem die Dimer-Bildung benachbarter Pyrimidine durch [2+2]-Cycloaddition beobachtet.

Ein photoinduziertes Dimer ist der (6-4)-Schaden. Er kann Gegenstand einer weiteren, sekundären Photochemie sein. Dabei wird das Dewar Valenzisomer seines Chromophors gebildet. Für den isolierten Chromophor sind weitere Reaktionen bekannt. Je nach Substitutionsmuster können unterschiedliche Photoprodukte, durch Mechanismen wie z.B. Ringöffnung oder Wasserstofftransfer, identifiziert werden.

Es ist bekannt, dass andere photoinduzierte Spezies für chemische Modifikationen von DNA verantwortlich sein können. Diese kann unter anderem durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies oder durch Energietransfer über Triplett-Zustände geschehen. Neben der Dewar Valenzisomerisierung könnten daher noch weitere Mechanismen eine Rolle in für die sekundären Photochemie von (6-4)-Schäden spielen.

2.1 VOM CHROMOPHOR ZUM MAKROMOLEKÜL

2.1.1 DNA-Basen: Ausgangspunkt Photoinduzierter Prozesse

Die Erbinformation von Lebewesen ist in der DNA kodiert [34]. Die fehlerfreie Weitergabe dieser, bedarf einer chemischen Stabilität des DNA Polymers. Neben der chemischen Modifikation der DNA durch reaktive Spezies und Enzyme im Zytoplasma können Schäden durch Strahlung induziert werden [1]. Speziell die DNA der oberen Hautschicht ist der Sonnenstrahlung im UV-Spektralbereich ausgesetzt. DNA absorbiert diese fast ausschließlich durch die DNA-Basen, wie in Abbildung 2.1 ersichtlich wird. Die Bestandteile des Phosphat-Zucker-Rückgrats, 2-Desoxy-D-Ribose und die Phosphat-Gruppen hingegen absorbieren höherenergetische Strahlung.

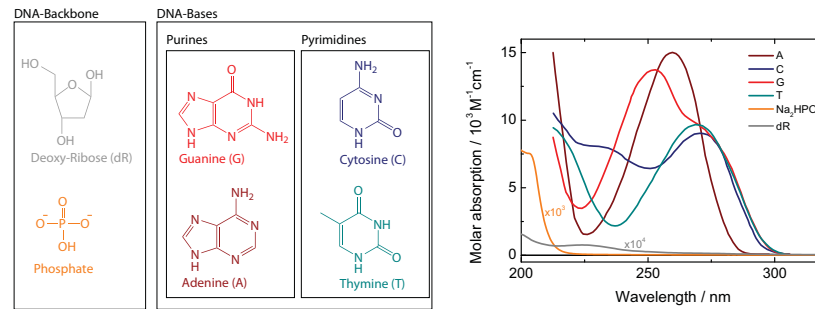


Abbildung 2.1: Absorptions-Koeffizient der DNA-Bausteine: 2-Desoxy-D-Ribose und Phosphat sind die chemischen Motive des DNA-Rückgrats. Gegenüber den DNA-Basen absorbieren sie im kurzwelligerem Spektralbereich. Ihre molaren Absorptionskoeffizienten sind um Größenordnungen kleiner. Absorptionsdaten der DNA-Basen aus Referenz [6] übernommen.

Die Absorptionsbanden der Purin-Basen Adenin (A) und Guanin (G) und der Pyrimidin-Basen Cytosin (C) und Thymin (T) rühren von einem $\pi\pi^*$ -Übergang her. Ihr molarer Absorptionskoeffizient liegt bei $\sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und hat eine spektrale Breite (FWHM) von $\sim 5000 \text{ cm}^{-1}$ [6]. Dies spricht für eine strahlende Ratenkonstante im Nanosekundenbereich [35, 36]. Die extrem niedrigen Fluoreszenz-Quantenausbeuten in Höhe von $\sim 0.5 - 3 \cdot 10^{-4}$ (0.005 – 0.03%) [36] deuten auf einen viel schnelleren Zerfall des angeregten Zustands hin. Es wurden basierend auf diese Ausbeuten eine Fluoreszenzlebensdauer von Pikosekunden abgeschätzt [36]. Mit dem Aufkommen der Anrege-Abfrage-Technik war es möglich, den Fluoreszenzzerfall auf dieser Zeitskala direkt zu beobachten [37]. Die DNA Basen zeigen einen schnellen Zerfall des strahlenden Zustands innerhalb von $\lesssim 1 \text{ ps}$ und ein lösungsmittelabhängiges Kühlen des heißen Grundzustands im Pikosekundenbereich [6, 38].

Die schnelle Entvölkerung des strahlenden Zustands verringert die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion und wurde als entscheidend für die Photostabilität von DNA diskutiert [39, 6, 40, 38]. Quantenmechanische Berechnungen haben gezeigt, dass eine konische Durchschneidung (CI, engl. *conical intersection*) Grund für die effektive innere Konversion (IC, engl. *internal conversion*) hin zum Grundzustand sind [37, 40] (siehe Abbildung 2.2). Ein weit akzeptierter Mechanismus, der zum Durchlaufen einer CI in DNA Basen führt, ist die "Ethen-ähnliche" Deaktivierung. Für Pyrimidin-Basen wurde (in theoretischen Studien) gezeigt, dass eine Torsion um die C5=C6 Doppelbindung (siehe Abbildung 2.3) verantwortlich für die schnelle Entvölkerung des zuerst angeregten $\pi\pi^*$ -Zustands ist [41, 42]. Nach Photoanregung verlängert sich die C5-C6 Bindung und eine Deformation um die Bindungsachse erfolgt. Die Potentialfläche im angeregten Zustand ist auf Grund des anti-bindenden Charakters flach entlang dieser "kollektiven" Koordinate; im Grundzustand ist wegen des Dop-

pelbindungscharakters ein steiler Anstieg der Potential-Fläche mit dieser Kernbewegung zu erwarten. Im Schnittpunkt der Potentialflächen ist durch die starke vibronische Kopplung ein Übergang vom angeregten in den Grundzustand begünstigt (Abbildung 2.2, A).

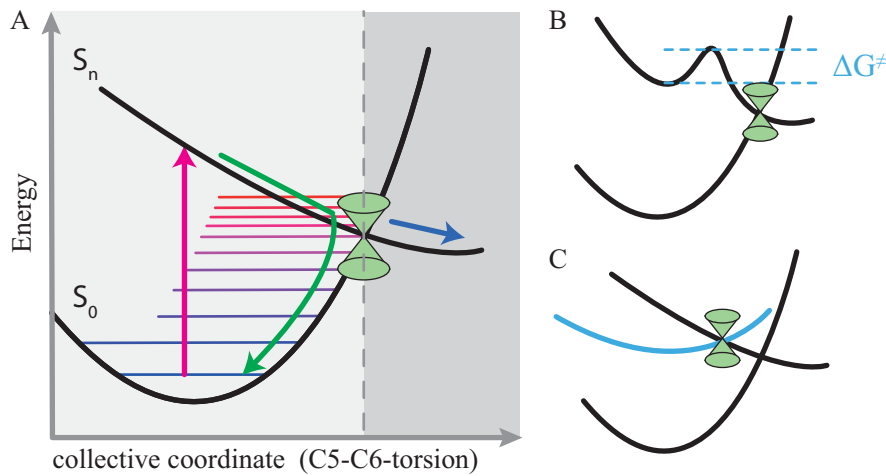


Abbildung 2.2: (A) Modell der schnellen Deaktivierung photoangeregter DNA-Basen: Die Potentialflächen des elektronischen Grund- und angeregten Zustands (schwarze Linie) in Abhängigkeit einer "kollektiven" Koordinate (Kernbewegung). Nach Photoanregung relaxiert das System zu einer konischen Durchschneidung (CI, grüner Kegel) und bevölkert den "heißen" Grundzustand. Durch Dissipation der Überschussenergie an die Umgebung kehrt das System schließlich in den Schwingungsgrundzustand zurück. Prinzipiell stellt die CI eine Verzweigung dar, die neben dem photophysikalischen Deaktivierungspfad (hell-grau hinterlegt) auch zu photochemischen Prozessen führen könnte (dunkel-grau). (B) Bestimmte Faktoren können eine Energiebarriere im angeregten Zustand bedingen. Die Rate, mit der die CI erreicht werden kann, kann dadurch erniedrigt sein und dementsprechend eine verzögerte Deaktivierung des angeregten Zustands bewirken. (C) Weiter können andere (nicht primär angeregte) Zustände bevölkert werden und ein anderer Deaktivierungspfad wirksam werden.

Quantenmechanische Berechnungen zu Pyrimidinen haben ergeben, dass die Potentialfläche des angeregten Zustands (von Pyrimidin-Basen) nicht völlig flach abfällt. Das angeregte Molekül relaxiert aus der Franck-Condon-Region in ein Minimum. Dieses ist durch eine Aktivierungs-Barriere (siehe Abbildung 2.2, B) von der CI getrennt [43, 44]. Die Höhe der berechneten Barriere ist in Größenordnung bzw. kleiner als die thermische Energie ($\sim 200 \text{ cm}^{-1}$) und spielt bei Raumtemperatur eine geringe Rolle für die Kinetik, genauer, die ultraschnelle Entvölkerung über die CI.

Dieses Schema der Deaktivierung des angeregten Zustands von DNA-Basen ist eine starke Vereinfachung. Neben dem "Ethen-ähn-

lichen“ Pfad sind auch weitere Mechanismen wirksam. In quantenmechanischen Studien wurde gefunden, dass die Deaktivierung des $\pi\pi^*$ -Zustands über andere nicht-strahlende ($n\pi^*$, $\pi\sigma^*$) Zustände als Intermediate (Abbildung 2.2, C) ablaufen kann und, je nach Art der DNA-Base und der Lösungsmittel-, bzw. chemischen Umgebung, zu langlebigeren Spezies führen kann [37, 6, 38].

2.1.2 Einfluss von Substituenten — DNA-Analoga

Der “Ethen-ähnliche” Deaktivierungs-Mechanismus legt nahe, dass ein Substituent in der C5- bzw. C6-Position die Deformation des Heterocyclus hindert und zu einem Anstieg der Fluoreszenzlebensdauer führen kann. Fluoreszenzstudien an Uracil (U) und Cytosin (C), deren C5-C6-Beweglichkeit durch tri-Methylen-Brücken (TM) blockiert ist, zeigen eine starke Erhöhung der Fluoreszenz-Lebensdauer; 1.2 ns für TMC und 30 ps für TMU [45].

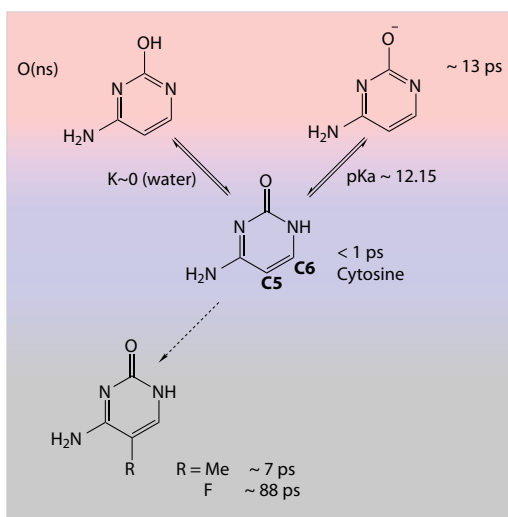


Abbildung 2.3: Fluoreszenz-Lebensdauer von Cytosin und Derivaten: Der angeregte strahlende Zustand von Cytosin (blau hinterlegt) zerfällt, wie der anderer DNA-Basen, innerhalb einer Pikosekunde. Modifikationen wie Tautomerisierung und Deprotonierung (rot) oder Substitution (grau) zeigen einen beträchtlichen Einfluss auf die Fluoreszenz-Lebensdauer.

In Abbildung 2.3 sind die Zerfallszeiten des strahlenden Zustands für Cytosin und zwei C5-substituierte Derivate angegeben. Eine Methylierung bedingt eine um eine Größenordnung langsamere Deaktivierung, ein Fluoro-Substituent sogar eine Verlangsamung um ungefähr zwei Größenordnungen. Beide Beispiele verdeutlichen, dass neben dem sterischen Effekt auch weitere Eigenschaften des Substituenten bzw. des substituierten Heterocyclus einen starken Einfluss auf die Kinetik haben können. Dies spricht für eine Modifikation der Potential-Fläche des angeregten Zustands [38]. In einer jüngeren

Studie zu Uracil [44] wurde die lange Fluoreszenzlebensdauer des C5-fluorinierten Derivats einem intrinsischen elektronischen Effekt des Moleküls zugeordnet. Eine theoretische Studie an C4- und C5-substituiertem Cytosin und 2(1H)-Pyrimidinon zeigt eine starke Abhängigkeit der Energien angeregter Zustände vom Substituent und der Position der Substitution [46].

Chemisch modifizierte DNA-Basen kommen in der Natur vor. Zum Beispiel hat C5-methyliertes Cytosin in DNA unter anderem biologische Relevanz in der Regulierung der Gen-Expression [47]. In RNA wurden eine Vielzahl an modifizierten Basen identifiziert [48]. Die Pyrimidin-Basen kommen oft als C5-substituierte Derivate vor. Häufig sind auch Alkylierungen und Deaminierungen von Purin-Basen anzutreffen [48]. Die Frage nach dem evolutionären Aspekt, weshalb DNA (hauptsächlich) aus den vier "kanonischen" DNA-Basen (Abbildung 2.1) besteht, ist Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion [49, 39, 48, 50]. Gerade ihr photophysikalisches Verhalten könnte mit ein Grund für ihre "Selektion" sein [39]. Neben dem natürlichen Vorkommen von Basen-Derivaten werden Analoga auch gezielt in der Forschung verwendet, besonders zur Untersuchung von strukturellen und dynamischen Fragestellungen zu DNA [51]. Dies liegt gerade an den häufig besonderen Fluoreszenzeigenschaften bei geringer Störung der DNA-Struktur. Neben der hohen Fluoreszenzquantenausbeute einiger Basen-Analoga besitzen viele eine starke Abhängigkeit der Emission von der lokalen Umgebung.

2.1.3 Einfluss der Umgebung

Durch Migration eines Wasserstoffatoms können DNA-Basen in tautomeren Formen vorliegen. Vergleicht man die Fluoreszenzlebensdauer von Cytosin in der amino-oxo-Form mit der in der amino-hydroxy-Form, ist eine Verlängerung der Lebensdauer von einem Faktor $\mathcal{O}(10^3)$ ¹ zu beobachten [38] (siehe Abbildung 2.3). Es ist bekannt, dass in der Gasphase Cytosin in der amino-enol-Form vorliegt, in Wasser hingegen in der amino-keto-Form [37]. Einen ähnlichen, aber schwächer ausgeprägten Effekt hat die Deprotonierung. In stark alkalischer wässriger Lösung erhöht sich die Fluoreszenzlebensdauer um mehr als eine Größenordnung [52]. Dies macht deutlich, welchen starken Einfluss die Umgebung auf die Photophysik von DNA-Basen haben kann. Die in DNA-Basen gefundenen nicht-strahlenden $n\pi^*$ -Zustände werden bei Übergang von der Gasphase zu Wasser zu höheren Energien verschoben. Der Effekt ist für die strahlenden $\pi\pi^*$ -Zustände weniger stark ausgeprägt. Dieser Lösungsmittelleffekt kann zu einer Umordnung der energetischen Lage von Zuständen führen

¹ Das Omikron $\mathcal{O}$ wird in dieser Arbeit als Abkürzung von "in der Größenordnung von ..." verwendet.

und damit entscheidenden Einfluss auf die Kinetik angeregter DNA-Basen haben [37, 53, 6, 38].

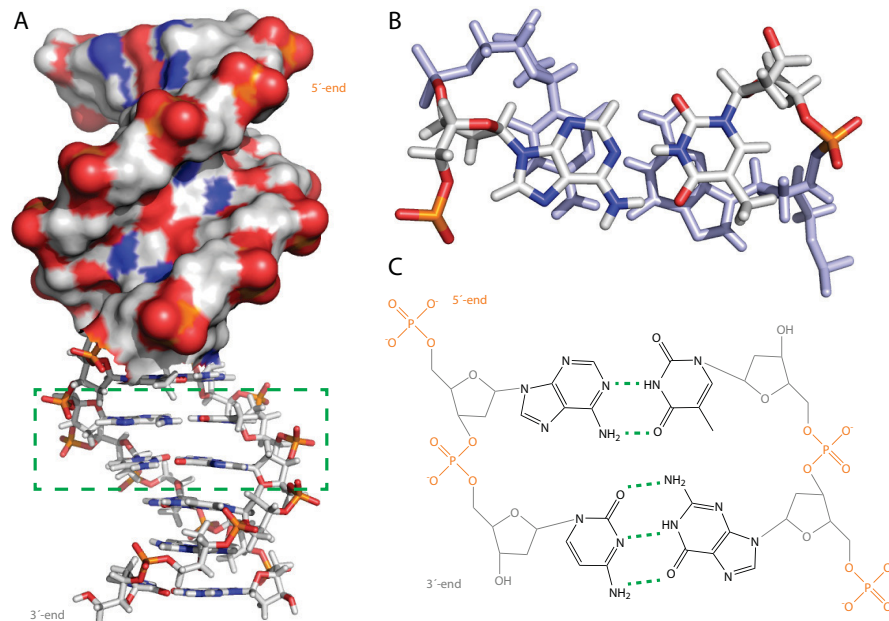


Abbildung 2.4: Struktur von B-DNA: (A) Doppelsträngige DNA bildet eine Helixstruktur. Das Zucker-Phosphat-Rückgrat zeigt nach außen und "umschließt" die DNA-Basen. Der obere Teil zeigt die durch Wassermoleküle erreichbaren Bereiche der DNA. Der untere Teil zeigt die Struktur als "Stäbchen"-Modell. Die DNA-Basen zeigen eine entlang eines Strangs, wie auch zwischen beiden Strängen geordnete Struktur. Der grün eingerahmte Bereich ist in Aufsicht in (B) dargestellt. Die Struktur ist aus PDB 2M2C [54] (NMR, wässrige Lösung) entnommen und mittels PyMOL [55] dargestellt. (B) Die DNA-Basen jedes Stranges sind in einer Weise gestapelt, die eine Interaktion der π -Orbitale möglich macht. (C) Lewis-Struktur des Abschnitts aus (B). In grün sind die Wasserstoffbrücken zwischen gegenüberliegenden (zwischen beiden Strängen) Basen dargestellt.

Offensichtlich sind DNA-Basen in der DNA einer speziellen Umgebung ausgesetzt. DNA (Abbildung 2.4, A) bildet eine kompakte Helixstruktur (B-DNA in wässriger Lösung) aus zwei komplementären Strängen. Die Stränge sind Polymere aus Nukleotiden, welche ihrerseits aus an Zucker-Phosphat gekoppelten DNA-Basen bestehen [34]. Durch die Helixstruktur ist die Lösungsumgebung in gewisser Weise von den Basen "abgeschirmt". Wassermoleküle sind in der DNA relativ spezifisch vorhanden, besonders an elektronegativen Atomen der Basen lokalisiert [56, 57]. Zudem könnte durch die räumliche Begrenzung der Wassermoleküle in der DNA eine Erniedrigung der Dielektrizitätskonstante vorliegen [58]. In allen Fällen stellt die Helix eine Diskontinuität dar, weshalb eine makroskopische elektro-

statische Beschreibung des Lösungsmittels nicht mehr gerechtfertigt ist [59, 60, 61].

In DNA kommt es zudem zu Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Basen: (i) Entlang eines DNA-Strangs sind die Basen zueinander in einer "gestapelten" Konformation (siehe Abbildung 2.4, A und B). Diese Anordnung eröffnet die Möglichkeit der Interaktion von π -Orbitalen benachbarter Basen [62, 60, 63]. (ii) Die beiden Stränge der DNA-Helix werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Pyrimidin/Purin-Paaren zusammengehalten. Diese Watson-Crick-Paarung geschieht zwischen Guanin/Cytosin und Adenin/Thymin und bedingt die Gleichheit der genetischen Information beider Stränge [64, 34].

DNA zeigt gegenüber isolierten DNA-Basen Beiträge längerlebiger angeregter Zustände. Nachdem Einzelstränge eine ähnliche Kinetik wie die Doppelhelix aufweisen [65] wird vermutet, dass (i) in DNA die Watson-Crick-Paarung einen vernachlässigbaren Einfluss ausübt und (ii) die Anregung auf einem Strang lokalisiert ist [6]. Ein starker Einfluss durch $\pi - \pi$ -Interaktion benachbarter Basen eines Stranges kann hingegen beobachtet werden. Ein Einzelstrang bildet in wässriger Lösung teilweise die Konformation wie in der Doppelhelix aus. Nach Photoanregung einer Base können sich innerhalb einer Pikosekunde zwischen benachbarten Basen Exciplexe ausbilden. Durch Ladungs-Rekombination auf einer Zeitskala von $\sim 10 - 100$ ps relaxiert dieser wieder zum Grundzustand [6]. Neben den Singulett-Spezies wird der Triplettzustand von DNA-Basen in Höhe von $\mathcal{O}(0.01 - 0.1)$, $\mathcal{O}(1 - 10\%)$ gebildet [6]. Durch den spinverbotenen Übergang zum Grundzustand sind sie wesentlich längerlebiger [29, 2]. Singulett wie auch Triplettzustände können neben der Deaktivierung durch nicht-reaktive Kanäle auch Ausgangspunkt von Schädigungen sein und die natürliche Funktion der DNA stören [11, 13].

2.2 DNA-SCHÄDIGUNG

2.2.1 Dimer-Schäden

Obwohl die kanonischen DNA-Basen eine ultraschnelle Deaktivierung des primär angeregten Zustands zeigen, bilden sich in DNA Schäden aus. Dabei können die chemischen Prozesse prinzipiell den Grundzustand ablaufen. Durch die schnelle Deaktivierung des primär angeregten Zustands werden energiereiche Schwingungsmoden im Grundzustand populierte. Es wird diskutiert, ob Schäden wie z.B. das Photohydrat von DNA-Basen auf Grund dieses "heißen Grundzustands" gebildet werden [66, 67, 33, 38]. Die häufigsten Schäden durch direkte Anregung der Basen sind aber die über [2+2]-Cycloaddition dargestellten Dimere zwischen benachbarten Basen (siehe

Abbildung 2.5). Für sie wurde gezeigt, dass angeregte Zustände Ausgangspunkt der Photochemie sind [23, 68].

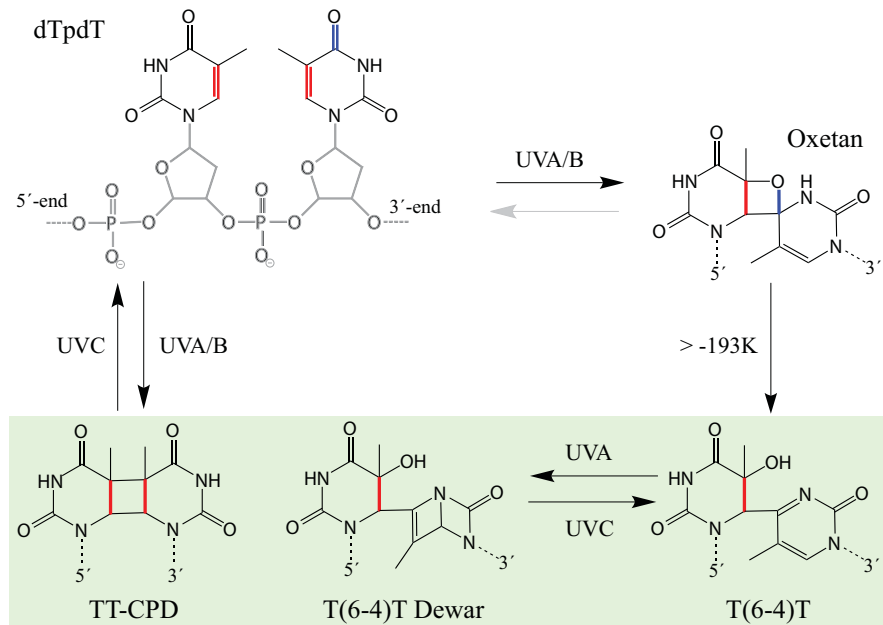


Abbildung 2.5: Auf einem DNA-Strang benachbarte Pyrimidin-Basen (hier Thymin) können nach Photoanregung im UVA- und UVB-Spektralbereich kovalente Bindungen eingehen. Der so am häufigsten gebildete DNA-Schaden, der Cyclo-Butan-Pyrimidin-Dimer (CPD) entsteht durch [2+2]-Cyclo-Addition (rote Ethen-Motive). Er kann durch energiereiche UVC-Strahlung rückgebildet werden. In einer Paternò-Büchi-Reaktion kann über das Carbonyl-Motiv (blau) ein Oxetan-Intermediat gebildet werden, welches bei den herrschenden Temperaturen in Organismen spontan in den (6-4)-Schaden übergeht. Dieser kann nicht mehr photochemisch zurückgewandelt werden. In einer durch UVA-Strahlung induzierten sekundären Photoreaktion isomerisiert der (6-4)-Schaden zu seinem Dewar Valenzisomer.

Der am häufigsten auftretende Photoschaden ist das Cyclo-Butan-Dimer (CPD, engl. *cyclobutane pyrimidine dimer*). Er wird mit einer chemischen Quantenausbeute von $RQY \sim \mathcal{O}(0.01)$, $\mathcal{O}(1\%)$ gebildet [8]. Die Bildung über den Singulett- und Triplettzustand sind möglich. Der Triplett-Pfad scheint aber eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dass trotz der schnellen Deaktivierung des angeregten Singulettzustands CPD-Schäden mit einer Quanteneffizienz im Prozentbereich entstehen, wird effektiv wirksamen CI zugeschrieben [6, 68]. Dass die Ausbeute nicht höher ausfällt konnte auf die Kontrolle durch Grundzustandsgeometrie zurückgeführt werden [24, 6].

Weniger häufig als das CPD wird mit einer RQY von $\mathcal{O}(10^{-4})$, $\mathcal{O}(0.01\%)$ eine Oxetan-Bildung (ebenfalls) zwischen zwei benachbarten Pyrimidinen beobachtet. Dieser Schaden ist thermisch instabil

und führt zu dem (6-4)-Schaden. [8]. Die primäre Oxetan-Formierung wird einem reaktiven Ladungsübertragungszustand zugeschrieben und zeigt eine starke Abhängigkeit der RQY von der Anregungsenergie [68]. Der CPD- und (6-4)-Schaden kann einer sekundären Photoreaktionen unterliegen. Der CPD Schaden wird in solch einer wieder zurückgebildet, wohingegen der (6-4)-Schaden in sein Dewar Valenzisomer überführt wird ($RQY \sim \mathcal{O}(10^{-2})$ $\mathcal{O}(1\%)$).

Daneben sind weitere Dimer-Schäden wie z.B. das Sporen-Photoprodukt zwischen Pyrimidinen [69] oder auch erst kürzlich entdeckte Schäden wie der C(4-8)G- bzw. G(8-4)C-Photoschaden zwischen Purinen [70] bekannt. Ihre Photochemie und biologische Relevanz sind aber nicht Gegenstand dieser Arbeit und nur der Vollständigkeit halber genannt.

2.2.1.1 Biologische Relevanz

Die biologische Relevanz von Schädigungen ist durch die Häufigkeit und die Effektivität von Reparaturmechanismen bestimmt. Für licht-induzierte Schäden wurde gefunden, dass Pyrimidin-Dimere, vor allem der CPD-, der (6-4)-Schaden und das Dewar Valenz-Isomer Ausgangspunkt für Behinderung der DNA-Transkription und Mutationen sind. [10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 71, 18]

CPD-Schäden können Ausgangspunkt von Punktmutationen, z.B. die Ersetzung von Cytosinen durch Thyminen sein [11, 15]. Dabei scheinen Cytosine der CPD-Schäden durch Desaminierung zu Uracil umgewandelt und bei der Replikation übergangen zu werden. Spezielle Polymerasen replizieren die Guanine auf dem komplementären DNA-Strang dann fehlerhafterweise als Adenine. Die Cytosine des CPD-Schadens werden in Folge durch Thyminen ersetzt [72].

(6-4)-Schäden zeigen ähnliche Replikationsfehler. Bei der Replikation von DNA kann ein Thymin des (6-4)-Schadens durch ein Guanin auf dem komplementären DNA-Strang gepaart und schließlich durch ein Cytosin ersetzt werden [21]. Ein völlig anderer Mechanismus scheint für den Basenaustausch beim Dewar Valenzisomer des (6-4)-Schadens vorzuliegen. Vergleicht man die Struktur des (6-4)-Schadens mit der seines Dewar Isomers, dann zeigt sich, dass letzterer die DNA-Konformation weniger stark "verzerrt" [20]. Dies könnte ein Grund sein, weshalb das Dewar Isomer schlechter vom Reparatursystem von Zellen erkannt wird [73]. Es scheint, dass Dewar-Schäden aus diesem Grund länger unerkannt bleiben und eine erhöhte Mutagenizität nach sich ziehen. Eine Polymerase, die über einen Dewar-Schaden hinweg repliziert, baut anstelle des Schadens vornehmlich Adenin-Basen ein, da die Dewar-Struktur für die Replikation keinerlei Informationsgehalt besitzt. Dieser Mechanismus wird als "A-Regel" bezeichnet und dominiert das Mutations-Potential von Dewar Isomeren.

Die Auswirkungen der drei genannten Pyrimidin-Dimere lassen sich nach Stand der Erkenntnisse wie folgt zusammenfassen: Sie alle zeigen das Potential für Mutationen und Zelltod. Im Vergleich zum CPD-Schaden gibt es Hinweise, dass der (6-4)-Schaden schneller repariert wird, aber eine höhere Rate für Zelltod bedingt [74]. Nachdem er unter natürlichen Lichtverhältnissen effektiv in sein Dewar Valenzisomer überführt wird, ist die Relevanz dieses Schadens eng mit seinem Dewar Valenzisomer verknüpft. Es wird berichtet, dass das Dewar Isomer ein breites Spektrum an Mutationen verursacht [21], aber mit einer geringeren Rate repariert wird [75].

2.2.2 “Indirekte” Schädigung der DNA

Die “direkte” Anregung von DNA-Basen ist nicht alleine Ausgangspunkt von lichtinduzierten Schädigungen. “Indirekte” Schädigungen durch angeregte Spezies anderer Substanzen sind ebenfalls beobachtbar [76, 77]. Eine Klasse von Reaktionen durch in DNA eingelagerte Chromophore (Interkalate) führen zu kovalenten Bindungen zwischen DNA und den interkalierten Substanzen. Ein Beispiel dafür sind Psoralene [78]. Hier wird die Reaktion nicht durch eine angeregte Spezies von DNA-Bestandteilen, sondern durch den angeregten Zustand von Psoralen getriggert [79]. Dieser Umstand gewinnt an Bedeutung, da Psoralene längerwelliger als DNA absorbieren können [79].

Ebenso können angeregte Zustände von Substanzen weitere reaktive Spezies bilden, die dann in einem weiteren Schritt mit der DNA reagieren. Zum Beispiel ist der elektronische Grundzustand von Sauerstoff ein Triplett und bekannt dafür, andere Triplettzustände — dann meist elektronisch angeregte — zu löschen [2]. Eine Vielzahl von reaktiven Spezies können so gebildet werden. Diese sind z.B. Singulett-Sauerstoff und das Hydroxyl-Anionradikal. Sie können die DNA auf verschiedenste Weise angreifen und werden als Ursache für die Oxidation von Purinen und Brüchen des Zucker-Phosphat-Rückgrats diskutiert [80, 76]. Es ist bekannt, dass durch UVA Strahlung reaktive Sauerstoff Spezies (ROS, engl. *reactive oxygen species*) gebildet werden und DNA schädigen [76, 77].

In den genannten Mechanismen liegt DNA als Reaktionspartner im Grundzustand vor. Photoangeregte Substanzen können aber DNA-Basen sensibilisieren und diese in einen angeregten Zustand überführen, welcher dann den photochemischen Prozessen unterliegt. Solche Photosensibilisatoren (PS) bevölkern meist über Triplett-Triplett-Energieübertragung (TTET, engl. *triplet-triplet energy transfer*) den Triplett von DNA-Basen. Eine Energieübertragung vom PS-Triplett zu DNA-Basen ist abhängig von den energetischen Lagen beider Triplets $\Delta E_{TT} = E_{PS} - E_{Base}$. Sandros et al. berechneten die Ratenkonstante k_{TT} für den allgemeinen Fall [81]:

$$k_{\text{TT}} = k_{\text{D}} \cdot \frac{1}{1 + \exp(-\Delta E_{\text{TT}}/k_{\text{B}}T)}. \quad (2.1)$$

Für den Fall, dass die Triplettenergie von PS viel höher als der von den Basen ist, ist die Ratenkonstante diffusionslimitiert (k_{D}), da der Bruch in Gleichung 2.1 gegen 1 geht. Der Prozess ist aber auch dann noch möglich, wenn die Triplettenergie der Base die von PS übersteigt. In diesem Fall nimmt die Ratenkonstante exponentiell mit der Energiedifferenz ab.

Isolierte DNA-Basen haben eine Triplettenergie zwischen $\sim 315 - 334 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ und die in DNA um ca. $50 - 60 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ abgesenkt wird [82, 83]. Es wurde gezeigt, dass Photo-Sensibilisierung von DNA Pyrimidin-Dimerisierung (CPD) nach sich zieht. Die Quantenausbeute dieser Reaktion liegt je nach Experiment bei $10^{-5} - 10^{-2}$ [83]. Für Pyrimidinone wurden in der Literatur Triplettenergien in Höhe von $\sim 290 - 350 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ berichtet [84, 85]. Die Zahlenwerte sprechen für eine von der Energetik her diffusionslimitierten TTET von Pyrimidinonen zu DNA-Basen. Es ist offen, wie sich dies in DNA verhält.

2.2.3 Sekundäre Photochemie des (6-4)-Chromophors

Benachbarte Pyrimidine können in einer primären Photoreaktion den (6-4)-Schaden bilden. Dabei werden beide Pyrimidine chemisch modifiziert. Das 3'-endige Pyrimidin wird in ein 2(1*H*)-Pyrimidinon (2P) umgewandelt. Dieses chemische Motiv kann Ausgangspunkt sekundärer Photoprozesse sein. In Abbildung 2.6 sind die Bildung des T(6-4)T-Schadens und Pfade der sekundären Photochemie skizziert. Die sekundäre Photochemie von (6-4)-Schäden führt zum Dewar Valenzisomer. Es zeigt sich, dass, im Vergleich zu seiner Bildung, die sekundäre Photochemie von (6-4)-Schaden unter natürlichen Lichtverhältnissen unterschiedlich stark getriggert werden. Neben der Quantenausbeute der Reaktionen ist dafür die spektrale Intensitätsverteilung der Sonneneinstrahlung verantwortlich.

Das Dewar Valenzisomer des (6-4)-Schadens und ebenso der CPD Schaden (nicht dargestellt) absorbieren im UVC-Spektralbereich. In diesem Bereich ist die Intensität des Sonnenlichts vernachlässigbar. Eine weitere Photochemie dieser Schäden ist daher unwahrscheinlich. Verstärkend wirkt die Tatsache, dass energiereiches UVC von fast allen chemischen Strukturen absorbiert wird und im Vergleich zu niederenergetischer Strahlung weniger weit in biologisches Gewebe eindringen kann.

Für den (6-4)-Schaden ist die niederenergetische Bande gegenüber der von intakten Thymin-Basen rotverschoben. Die chemische Modifikation des 3'-endigen Thymins ist Grund für die breite Absorption im UVA-Bereich. In diesem Bereich weist die Sonneneinstrahlung eine höhere spektrale Intensität auf als im UVC, wo Thymin sein

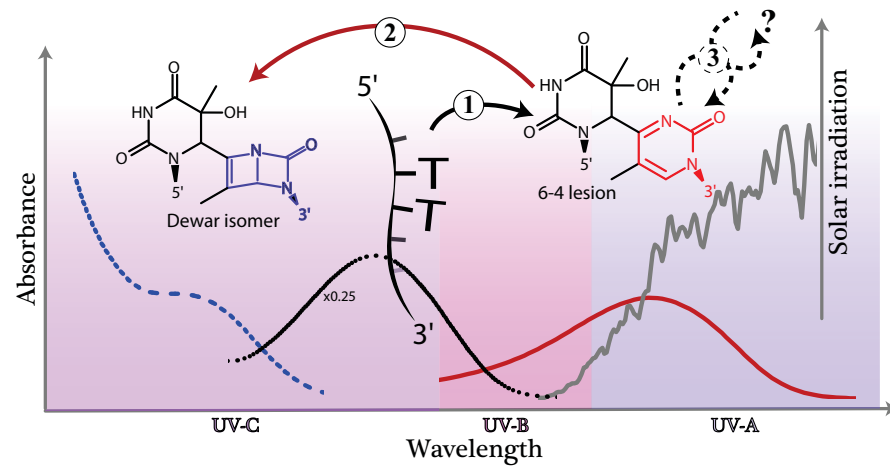


Abbildung 2.6: Vergleich von Absorption von Thymidin-Dimeren mit der Sonneneinstrahlung auf Meereshöhe: Thymin absorbiert im UVB/C-Spektralbereich (schwarz). Nur ein geringer Anteil der solaren Einstrahlung deckt diesen Spektralbereich ab (grau). Der größte Anteil liegt im UVA/Vis. Wird ein Photon absorbiert, kann ein (6-4)-Schaden gebildet werden (Pfad 1). Seine Absorption ist durch die entstandene 2(1*H*)-Pyrimidinon-Gruppe gegenüber der von Thymin rotverschoben (rot). Die Wahrscheinlichkeit einer Anregung ist deshalb erhöht und es kann zu einer Isomerisierung kommen (Pfad 2). Das gebildete Dewar Valenzisomer absorbiert im UVC-Bereich und eine "Triggerung" weiterer Photoreaktionen ist unwahrscheinlich. Prinzipiell ist eine sekundäre Photoreaktion durch Wechselwirkung eines angeregten (6-4)-Schadens mit anderen Strukturen denkbar (Pfad 3). Daten aus [33, 26] übernommen.

Absorptionmaximum hat. Folglich ist die "Triggerung" eines photochemischen Prozesses wahrscheinlicher, als für die Bildung des (6-4)-Schadens. Anders ausgedrückt, sobald ein (6-4)-Schaden gebildet wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass es zu einem sekundären Photoprozess kommt. Hier wirkt wieder verstärkend, dass langwelligeres Licht prinzipiell tiefer in Gewebe eindringen kann.

Neben der Dewar-Valenzisomerisierung wurde für DNA und DNA-Modellsystemen bisher keine andere Reaktion in der Literatur erwähnt. Betrachtet man den isolierten Chromophor (2P), dann sind weitere Deaktivierungspfade möglich (siehe Abbildung 2.7).

Die Dewar-Struktur von substituiertem 2P wurde als thermisch stabiles Photoprodukt in Lösung dargestellt [86]. Die Ausbeute der Photoreaktion zeigte eine Abhängigkeit vom Substitutionsmuster. Für 1,4,6-Trimethyl-2(1*H*)-Pyrimidinon wurde eine Reaktions-Quantenausbeute von 0.79 angegeben [86]. Dieser Wert konnte jedoch in Messungen nicht reproduziert werden.² Ebenfalls war die Photoreaktion (für

² Unabhängige Messungen am Lehrstuhl für BioMolekulare Optik in München, siehe [33], ergaben ebenfalls nicht das Ergebnis aus [86].

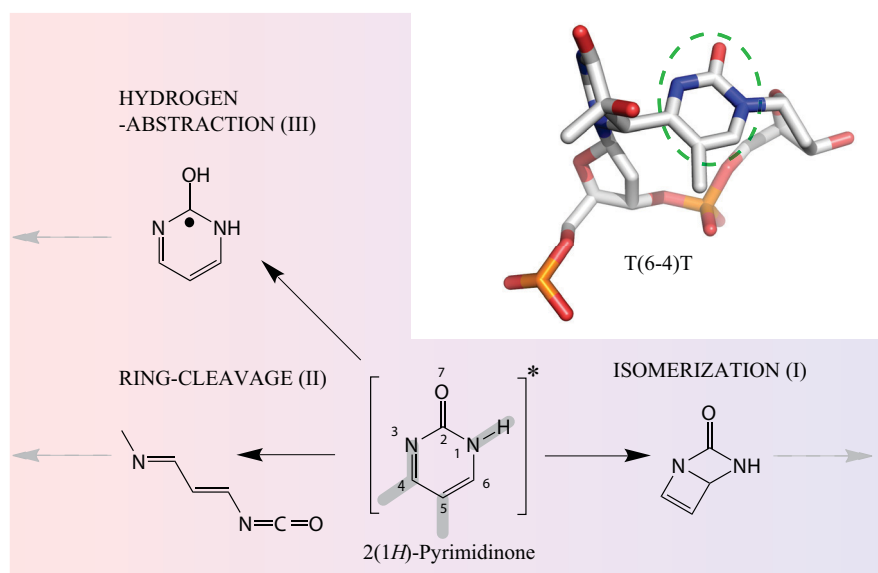


Abbildung 2.7: Der Chromophor von (6-4)-Schäden hat ein 2(1H)-Pyrimidinon-Motiv (grün eingekreist). Die Struktur stammt aus NMR-Aufklärung in Lösung [22] (mit PyMOL dargestellt [55]). Er ist chemisch verwandt mit Pyrimidin-Basen (die Bereiche abweichender chemischer Struktur für Pyrimidin-Nukleotide sind grau markiert, untere Grafik). Für isolierte Derivate von 2P (2(1H)-Pyrimidinon) wurden verschiedene Reaktionstypen vorgeschlagen. Durch eine elektrocyclische Reaktion kann das Dewar Valenzisomer dargestellt werden (blau hinterlegt, I). Ein weiteres mögliches Produkt ist ein Isocyanat durch Ringöffnung (rot hinterlegt, II). 2P-Derivate können Reaktionspartner in Wasserstoff-Abstraktionsreaktionen sein. Dabei können Hydroxyl-Radikale von 2P oder ein entsprechendes Tautomer entstehen (III). Die grauen Pfeile deuten an, dass thermische Folgereaktionen stattfinden können.

ein Derivat angegeben) stark vom Lösungsmittel abhängig. In Wasser wurden nur noch "Spuren" des Dewars festgestellt [86]. Studien zu substituierten 4-(3H)-Pyrimidinonen berichten ebenfalls von der Bildung dieses Isomers [87]. Jedoch zerfällt das Isomer in bestimmten chemischen Umgebungen thermisch. Die Folgeprodukte waren entweder offenkettig oder besaßen einen Vierer-Ring (Lactam-Struktur) [86, 88, 89, 87, 90, 91, 92, 93, 94].

Für substituierte Derivate von 2P wurden Norrish Typ I Reaktionen vorgeschlagen, in denen sich der Pyrimidinon-Ring öffnet. [95, 94] Die erhaltenen Isocyanate reagieren mit Alkoholen. Diese Folgeprodukte wurden als Nachweis der Ringöffnung angesehen. In einer späteren Studie konnten die Isocyanate in einer Ar-Matrix direkt nachgewiesen werden [96]. Ebenfalls ist Wasserstoffabstraktion (HA, *engl. hydrogen abstraction*) als Reaktionsmotiv vorgeschlagen worden [91, 93]. Solche Reaktionen sind auch für DNA-Basen berichtet worden.

Nach 266 nm-Anregung bilden sich mit geringer Quantenausbeute ($\mathcal{O}(10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4})$) Isocyanate, die in wässriger Lösung oder unter Exposition von Amin-Gruppen weiter reagieren können [97, 9, 98].

Ein Wasserstofftransfer kann in einem einzigen Schritt ablaufen oder über einen Wasserstofftransfer nach einem zuvor abgeschlossenen Elektrontransfer erfolgen [29, 2]. Für die Photoreaktion von 1,4,6-substituierten 2P mit aliphatischen Aminen wurde die schrittweise Wasserstoffabstraktion vorgeschlagen [99]. Ebenfalls ist ein intermolekularer Wasserstofftransfer für 1,4,6-substituiertes 2P beobachtet worden [93].

Eine jüngere Studie schließt aus Belichtungs- und Löschexperimenten, dass ein Triplett-Energieübertrag von dem in (6-4)-Schäden enthaltenen Pyrimidinon auf Thymin abläuft und zu einer CPD-Schädigung führen kann.[85] In der gleichen Studie wurde die Bildung von ROS (Singulett-Sauerstoff und Hydroxyl-Radikal) nachgewiesen.

Die aufgezählten Reaktionen zeugen von einer recht diversen Photochemie von 2P. Je nach Substitutionmuster sind unterschiedliche Reaktionspfade bevorzugt. Prinzipiell sind neben der Dewar Valenzisomerisierung von T(6-4)T-Schäden auch grundsätzlich andere Reaktionspfade möglich. In Kapitel 6 wird die in dieser Arbeit gefundene Wasserstoffabstraktion von 1-methylierten 2P diskutiert.³

³ In Abschnitt 5.2 werden Hinweise auf die Generierung von solvatisierten Elektronen durch angeregtes 1,4,6-methyliertes 2P dargelegt.

Die vibronischen¹ Übergänge in einem Molekül bestimmen die Absorptions- und Emissionsbanden [100, 29, 2]. Somit liefern Spektren Informationen über die elektronische Struktur bzw. die Kernbindungen. Aus stationären Spektren können neben energetischen Lagen von Zuständen auch Informationen zur Photokinetik abgelesen werden [100, 29, 2]. Um direkt kinetische und dynamische Prozesse zu beobachten, muss auf zeitaufgelöste Techniken übergegangen werden. Mit der Entwicklung des Lasers und im speziellen gepulster Laserquellen sind auf der einen Seite hohe Zeitaufösungen möglich, auf der anderen Seite stehen hohe Intensitäten zur Verfügung, die die effektive Anwendung nicht-linearer optischer Effekte ermöglichen [30, 101, 102].

3.1 STATIONÄRE SPEKTROSKOPIE

Bevor zeitaufgelöste Techniken zur Untersuchung der Dynamik und Kinetik eines Systems Anwendung finden, steht die Charakterisierung von Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften an erster Stelle. Dies geschieht über stationäre Messungen. Dabei sind die verwendeten Lichtleistungen so gering, dass im Mittel so gut wie keine Population eines elektronisch angeregten Zustands erfolgt. Mit der über die Strickler-Berg-Relation abgeschätzten strahlenden Lebensdauer von ~ 10 ns [103, 35] kann das Fließ-Gleichgewicht

$$K_{\text{steady-state}} = \frac{k_{S_0 \leftarrow S_1}}{k_{S_0 \rightarrow S_1}} = \frac{k_{\text{deactivation}}}{k_{\text{excitation}}} = \frac{(10 \text{ ns})^{-1}}{\frac{P_{\text{ex}} \lambda_{\text{ex}}}{h c_0}} \quad (3.1)$$

zwischen Grund- und elektronisch angeregtem Zustand berechnet werden. Bei den üblichen Spektrometern übersteigt die Anregungsleistung P_{ex} nicht den Milliwattbereich und $K_{\text{steady-state}}$ ist für den UV/Vis/NIR-Spektralbereich $\lesssim 10^{-8}$. Aus diesem Grund adressieren Absorptionsmessungen ausschließlich Übergänge, die vom elektronischen Grundzustand ausgehen. Für die Detektion der Emission in der Fluoreszenzspektroskopie ist die Population des elektronisch angeregten Zustands aus dem gleichen Grund limitiert.

Die Abschätzungen beziehen sich auf Fluorophore, die nur durch den strahlenden Prozess, sprich Fluoreszenz, deaktiviert werden. Nicht-radiative Prozesse können die Fluoreszenzlebensdauer merklich herabsetzen [29, 2] und in Folge eine geringere Population des ange-

¹ Bei vibronischen Übergängen ändert sich der Schwingungs- und elektronische Zustand; engl. **vibrational** and **electronic**.

regten Zustands im Fließgleichgewicht bedingen. Neben den nicht-reaktiven Kanälen können auch reaktive Kanäle eine neue Spezies populieren. Mit steigender Belichtungszeit stellt sich somit eine Änderung der spektralen Signaturen ein. Dies ist bei der Charakterisierung von Molekülen zu verhindern, indem ausreichende Konzentration und Probevolumina verwendet werden und ein stetiger Austausch des belichteten Volumenanteils gewährleistet wird. Für Umbelichtungsexperimente muss hingegen ein hohes Maß an angeregten Molekülen erreicht werden.

3.1.1 Fluoreszenzspektroskopie

Ein typisches Fluoreszenz-Spektrometer (siehe Abbildung 3.1) besteht aus einer polychromatischen Lichtquelle, einem Anregungsmonochromator, einem Proberaum für Küvetten, einem Emissionsmonochromator und einem Detektor. Unterschiedliche Moleküle können mit abstimmbaren Lichtquellen angeregt werden. Anregungswellenlängen vom ultravioletten (UV) bis zum sichtbaren (Vis) Spektralbereich werden oft über eine Xenon-Lichtbogenlampe erhalten. Sie zeigen im UV/Vis-Bereich ein flaches und kontinuierliches Emissionsspektrum mit einer geringen Anzahl scharfer atomarer Emissionslinien [103]. Optiken leiten das Licht weiter zu einem Anregemonochromator. Normalerweise ist dieses Gerät ein Gitterspektrometer, in welchem das Licht über ein Gitter Winkeldispersion erfährt. Über Rotation dieses Gitters kann die durch den Monochromator transmittierte Wellenlänge λ_{ex} , über die Eingangs- und Ausgangsspaltbreiten, die spektrale Bandbreite $\Delta\lambda_{ex}$, eingestellt werden. Dieses monochromatische Licht wird auf die Probenküvette abgebildet.

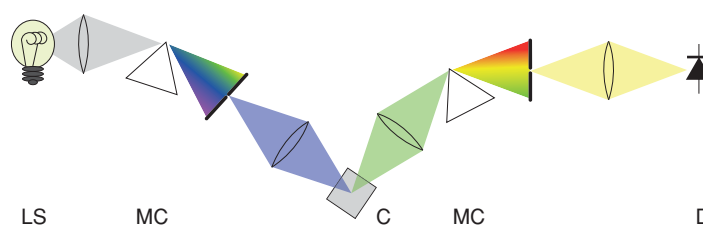


Abbildung 3.1: Stationäres Fluoreszenzspektrometer: Die Emission einer polychromatischen Lichtquelle (LS) wird mit einem Monochromator (MC) spektral aufgespalten. Ein spektraler Anteil wird auf eine Probeküvette (C) fokussiert. Das generierte Fluoreszenzlicht wird auf einen zweiten Monochromator abgebildet. Das durch diesen spektral aufgespaltene Licht wird auf einen Detektor (D) gebracht. Die Monochromatoren sind hier als refraktive Elemente (Prismen) dargestellt. Kommerzielle Spektrometer arbeiten gewöhnlich mit Gittern (diffraktive Elemente). Aus [100] übernommen.

Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird über Optiken auf den Eingangsschlitz eines Emissionsmonochromators geleitet. Dieser spaltet das Fluoreszenzlicht spektral auf und es kann somit für einzelne Wellenlängenbereiche mittels eines Detektors vermessen werden. Es bedarf einer hochsensitiven Detektion, um Fluoreszenzspektren aufzunehmen. Normalerweise werden deshalb Photoelektronenvervielfacher eingesetzt [103]. Diese technische Anforderung hat mehrere Gründe. (i) Wie eingangs erwähnt, sind die üblichen Anregungsleistungen so gering, dass nur ein verschwindend kleiner Anteil der Moleküle im angeregten Zustand ist und Fluoreszenzlicht emittiert. (ii) Viele vom Standpunkt der Photophysik und -chemie aus interessante Systeme zeigen zudem eine geringe Fluoreszenzquantenausbeute [29, 2]. (iii) Geometrische Fehler, sprich eine Abweichung zwischen dem angeregten Probevolumen und dem für die Detektion eingesammelten Probevolumen muss vermieden werden. Die Konzentrationen der Probe werden deshalb so gering (optische Dichte $\lesssim 0.05$) gewählt, dass eine gleichmäßige Emission über den Küvettenquerschnitt garantiert ist [103]. (iv) Letztendlich wird nicht das ganze in alle Raumrichtungen ausgesendete Fluoreszenzlicht eingesammelt und auch nicht ohne Verluste über die Optiken zur Detektion gebracht. Die vor der Detektion spektrale Aufspaltung verringert ebenfalls die Lichtstärke am Detektor.

Durch Rotation des Gitters des Emissionsmonochromators kann der Photonenfluss in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgenommen werden. Das so erhaltene Spektrum ist geräteabhängig. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht erfährt wegen des Transmissionsverhaltens der Optiken eine wellenlängenabhängige Abschwächung. Die Quanteneffizienz des Detektors ist ebenfalls eine Funktion der Wellenlänge. Aus diesem Grund muss eine Korrektur angewendet werden, welche die wellenlängenabhängige Sensitivität des Fluoreszenzspektrometers widerspiegelt [104]. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzspektrometer (HORIBA Scientific, FluoroLog II; HORIBA Scientific, FluoroMax-4) bieten eine automatische Wellenlängenkorrektur, welche über Messungen bekannter Fluorophore und dem Vergleich mit veröffentlichten Spektren gegengeprüft wurde. Die so erhaltenen korrigierten Spektren weisen im allgemeinen noch Beiträge des Lösungsmittel (vor allem Ramanbanden) auf, weshalb eine Referenzmessung mit reinem Lösungsmittel für eine weitere Korrektur notwendig ist. Bei den Messungen wurde darauf geachtet, im linearen Regime der Detektion zu messen.

3.1.1.1 Absolute Fluoreszenzquantenausbeuten

Absolute Fluoreszenzparameter können aus Spektren erhalten werden, bedürfen aber technisch anspruchsvoller Messmethoden. Referenzmessungen eines genau charakterisierten Farbstoffes werden deshalb oft zur Bestimmung herangezogen [103]. Um systematische Feh-

ler durch ungenaue Korrektur in verschiedenen Spektralbereichen zu vermeiden, sind Zentralwellenlänge und spektrale Breite ähnlich zu dem des zu untersuchenden Moleküls gewählt. In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzquantenausbeute von methylierten Pyrimidinonen im Vergleich zu zwei Laserfarbstoffen bestimmt (PPO in Cyclohexan $\phi_{fl}^{ref} = 0.9$ [105], 1-NPO in Cyclohexan $\phi_{fl}^{ref} = 0.7$ [106]). Die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_{fl} ist über

$$\phi_{fl} = \phi_{fl}^{ref} \cdot \frac{\int I(\lambda) d\lambda}{\int I^{ref}(\lambda) d\lambda} \cdot \frac{1 - 10^{A_{ex}^{ref}}}{1 - 10^{A_{ex}}} \cdot \frac{n^2}{(n^{ref})^2} \quad (3.2)$$

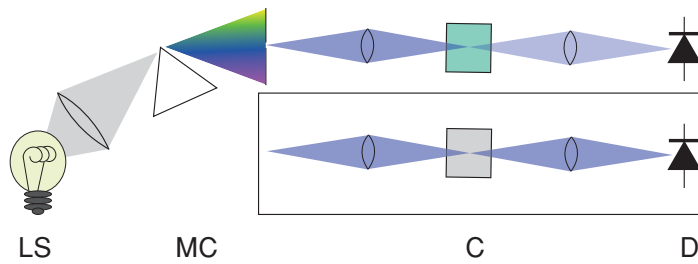
mit den Messgrößen verknüpft [103]. Dabei sind $I(\lambda)$ die gemessenen und korrigierten Fluoreszenzspektren und A_{ex} die optische Dichte bei der Anregewellenlänge. Das hochgestellte "ref" steht für den Referenzfarbstoff. Der zweite Faktor von Gleichung 3.2 ist das Verhältnis der gesamten Fluoreszenzemission zwischen der Probe und der Referenz, der dritte Faktor das Verhältnis der Anzahl angeregter Moleküle. Der letzte Faktor korrigiert den Wert bezüglich der Brechungsindizes n der Lösungsmittel.

3.1.2 Absorptionsspektroskopie

Ein Absorptionsspektrometer (siehe Abbildung 3.2) beinhaltet meist zwei Lichtquellen. Eine handelsübliche Halogenlampe emittiert vom Infraroten bis zum nahen ultravioletten Spektralbereich. Wellenlängen im Ultravioletten werden standardmäßig durch die Emission einer Deuterium-Lampe adressiert [103]. Über einen Monochromator wird ein spektraler Anteil mit definierter Zentralwellenlänge und spektraler Breite selektiert. Dieses quasi monochromatische Licht wird auf die Probenküvette gebracht und nach dem "Durchleuchten" dieser auf einen Detektor abgebildet. Dabei wird, um Fluoreszenz- und Streubeiträge zu minimieren, unter kleiner numerischer Apertur gearbeitet. Größere wellenlängenabhängige Variationen des transmittierten Lichts können mit einer Detektion ausreichender Dynamik, meist Photomultiplier im Strommodus, instantan aufgenommen werden. Sie bieten neben ihrer guten Linearität über viele Größenordnungen auch eine ausreichende Sensitivität, so dass mit kleinen Leistungen der Lichtquelle gearbeitet werden kann [103]. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Spektren im UV/Vis/NIR-Bereich aufgenommen. Zur Detektion im Infrarotbereich müssen andere Detektoren verwendet werden, da die Quanteneffizienz von Photoelektronen-Detektoren in diesem Spektralbereich gegen Null geht.

Absorptionsspektren sind nach Definition referenziert; dies wird über das Lambert-Beer'sche Gesetz ausgedrückt:

$$T(\lambda) = \frac{I_t(\lambda)}{I_0} = 10^{-A} = 10^{-\epsilon(\lambda)cd} \quad (3.3)$$



Abbildungung 3.2: Stationäres Absorptionsspektrometer: Die Emission einer polychromatischen Lichtquelle (LS) wird mit einem Monochromator (MC) spektral aufgespalten. Ein spektraler Anteil wird auf eine Probeküvette (C) abgebildet. Das transmittierte Licht wird auf einen Detektor (D) gebracht. Zur Referenzierung wird das Licht aufgespalten und eine Referenzküvette in einem baugleichen Pfad (Kasten) simultan gemessen. Dadurch werden Absorptionsbeiträge durch die Referenz mitprotokolliert und Leistungsschwankungen korrigiert. Teilweise aus Referenz [100] übernommen.

Der Anteil T des transmittierten Lichts ist gleich dem Quotienten aus den Lichtintensitäten vor (I_0) und nach (I_t) der Probe. Er ist über die optische Dichte A mit dem molaren Absorptionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$, der Konzentration c und der Schichtdicke d der Probe verknüpft. Bei Kenntnis von c, d ist die stoffspezifische wellenlängenabhängige Konstante $\epsilon(\lambda)$ als absoluter Absorptionsparameter bestimmbar.

Um Beiträgen durch die Absorption der Küvette und des Lösungsmittels Rechnung zu tragen, wird in der Praxis meist ein Doppelstrahl Aufbau verwendet. Hierbei wird die Transmission durch die Probeküvette zeitgleich zu der durch die Referenzküvette, welche ausschließlich das reine Lösungsmittel enthält, gemessen.

In dieser Arbeit wurden Absorptionsspektren mit unterschiedlichen Absorptionsspektrometern (PerkinElmer, Lambda19; PerkinElmer, Lambda750; Agilent, Cary 4000) aufgenommen. Alle Spektrometer weisen eine Linearität bis zu einer optischen Dichte von mindestens $A = 2$ auf. Nachdem die meisten Lösungsmittel Absorption im Ultravioletten aufweisen, können in diesem Spektralbereich Abweichungen vom linearen Verhalten auftreten und systematische Fehler verursachen. Deshalb wurden neben den referenzierten Messungen auch die Referenzspektren (reines Lösungsmittel) protokolliert.

3.1.3 Umbelichtungsexperimente

Umbelichtungsexperimente von 1MP wurden auf zwei verschiedene Weisen durchgeführt. Infrarotbanden sind spektral schmalbandig und strukturspezifisch. Sie können als Marker für (photo)chemische Reaktionen eingesetzt werden [107]. Die Reaktionsquantenausbeute wurde in dieser Arbeit über Umbelichtung mit der vierten Harmo-

nischen eines gütegeschalteten Nd:YAG Lasers (Continuum, NY60-B) bestimmt (siehe Abbildung 3.3, A). Die Zentralwellenlänge betrug 266 nm und die Lichtleistung 7.4 mW. Der Umsatz an Edukt wurde über Absorptionsänderungen im Infrarotbereich detektiert. Dies geschah mittels eines spektrographen (FTIR) (Bruker, IFS 66). Die Belichtung wurde in einer Küvette mit 1 cm Strahlengang, die Messung in einer speziell angefertigten Durchflussküvette mit CaF₂-Fenstern und einer Schichtdicke von $\sim 100 \mu\text{m}$ durchgeführt. Über eine Walkpumpe wurden Belichtungs- und Probavolumina ausgetauscht. Da Infrarotmessungen sehr sensitiv für Beiträge von Wasserbanden sind, wurde der gesamte Kreislauf sowie der Proberaum des FTIRs mittels Trockenluft (nahezu) wasserfrei gehalten. Dieser Aufbau steht am Lehrstuhl für BioMolekulare Optik in München und wurde zur Bestimmung der Reaktionsquantenausbeute ϕ_r in der Veröffentlichung [108] verwendet.

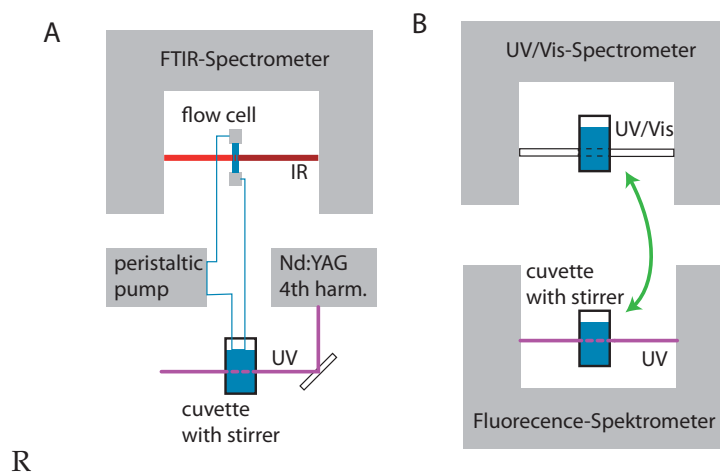


Abbildung 3.3: Umbelichtungsexperimente im UV/Vis- und IR-Spektralbereich: (A) Die vierte Harmonische eines Nd:YAG-Lasers wird zur Umbelichtung auf eine Küvette mit der Probesubstanz gelenkt. Über eine Walkpumpe wird das belichtete Volumen in eine Durchflussküvette gepumpt und die IR-Absorption mit einem Spektrometer vermessen. Der gesamte Kreislauf ist geschlossen und mit Trockenluft gespült. Dies minimiert die starken Signale von Wasserspuren in der Probe. (B) Für Messungen im UV/Vis-Spektralbereich dient die Anregungsquelle eines Fluoreszenzspektrometers zur Umbelichtung. Die abgeschlossene Küvette wird zur Messung in ein Absorptionsspektrometer überführt.

Nachdem dieser Aufbau für weitere Umbelichtungsexperimente nicht mehr zur Verfügung stand, wurden Experimente im UV/Vis-Spektralbereich durchgeführt (siehe Abbildung 3.3, B). Dies war aus mehreren Gründen auch von Vorteil. (i) Absorptionsbeiträge von Wasser sind vernachlässigbar und es ist kein wasserfreies Probavolumen nötig. (ii) Belichtung und Probemessung sind im gleichen Volumen

durchführbar und der in der Praxis schwierig handhabbare Kreislauf fällt weg.

Die Reaktionsquantenausbeute wurde über die Abnahme des Edukts bestimmt. Die Belichtung wurde in einem Fluoreszenzspektrometer (HORIBA Scientific, FluoroMax-4) durchgeführt und die Absorptionsänderung mittels eines Absorptionsspektrometers (Agilent, Cary 4000) protokolliert. Die anfängliche Eduktkonzentration ($\sim 0.5 \text{ mM}$) gewährleistet, dass in den ersten Belichtungsschritten nahezu alle Photonen absorbiert werden und gleichzeitig die Dynamik der Absorptionsmessung nicht überstiegen wird. Die Zentralwellenlänge für die Belichtung war nahe dem Absorptionsmaximum des Moleküls und mit einer Bandbreite von 10 nm wurden Lichtleistungen von $P_{\text{ex}} = 2.0 \text{ mW}$ erreicht. Die Lichtleistung wurde mittels eines Leistungsmesskopfs (Coherent, FieldMaxII) bestimmt. Messungen mit anderen Messköpfen ergaben dieselben Ergebnisse. Während der Umbelichtung wurde das Probenvolumen umgerührt (2mag AG, MIX-control eco) und Temperatur sowie Lichtleistung wurden kontrolliert. Als Probeküvette dienten Quarzküvetten mit 10 mm Schichtdicke (Hellma Analytics, 111-QS). Sauerstoffbefreite Proben wurden in einer Halmküvette (Hellma Analytics, 220-QX) mit gleicher Schichtdicke angesetzt. Für die Sauerstoffbefreiung wurde diese Küvette mit einem Gummistopfen verschlossen und die Probe für $\sim 10 \text{ min}$ mit Stickstoff gespült. Nach Belichtungszeiten von einigen bis einigen zehn Minuten wurden Spektren aufgenommen. Die anfänglich lineare Abnahme der Absorption ΔA nahe des Absorptionsmaximums gegen die Belichtungszeit Δt_{ex} wurde zur Bestimmung der Steigung $m = \frac{\Delta A}{\Delta t_{\text{ex}}}$ verwendet. Mit dem Probenvolumen V und dem Absorptionskoeffizienten kann die Reaktionsquantenausbeute über die Proportionalität mit dieser Steigung berechnet werden:

$$\phi_r = \frac{|m|}{\Delta \varepsilon \cdot d} / \frac{P_{\text{ex}} \lambda_{\text{ex}}}{hc_0 N_A \cdot V} \quad (3.4)$$

Es wurde angenommen, dass das Photoprodukt im spektralen Bereich, in der die Auswertung durchgeführt wurde, nicht absorbiert. Die Differenz der molaren Absorptionskoeffizienten $\Delta \varepsilon$ ist somit gleich dem Koeffizienten für das Edukt.

3.2 ZEITAUFGELÖSTE SPEKTROSKOPIE

3.2.1 Impulsanregung

Eine kontinuierliche Beleuchtung führt zu einem stationären Zustand, der *per se* keine zeitliche Änderung von spektralen Signaturen liefert.² Das Anregelicht muß also moduliert werden. Im Idealfall wird ein

² Dies heißt nicht, dass stationäre Spektren keine kinetische Informationen enthalten. Bandenformen sind durch kinetische und dynamische Prozesse mitbestimmt.

Anteil der Moleküle im Probevolumen augenblicklich in einen angeregten Zustand gehoben. Ausgehend von dieser “präparierten” Spezies kann die zeitliche Entwicklung spektral verfolgt werden. Dies kann durch kurze Lichtimpulse erreicht werden [100, 30].

3.2.1.1 Lichtquelle

Lichtimpulse können nicht beliebig kurz werden [30]. Die Impulsdauer τ_{pulse} entspricht einer Bandbreite $\Delta\nu$ im Frequenzbereich, welche technisch nicht beliebig breit ausfallen kann. Das Produkt $\tau_{\text{pulse}}\Delta\nu$ kann nicht kleiner als eine von der Impulsform abhängige Konstante werden (Größenordnung 0.5) [30]. Für die Wahl einer geeigneten Lichtquelle ist das kürzeste Zeitregime ausschlaggebend, auf welchem die Prozesse ablaufen, die untersucht werden sollen. (Lichtinduzierte) chemische Prozesse gehen mit Auslenkungen der Kerne eines Moleküls einher [29, 2]. Eine untere Schranke für die Zeitskala, auf der solche Auslenkungen stattfinden, kann über typische Schwingungsenergien abgeschätzt werden. Aus der Schwingungsspektroskopie ist bekannt, dass die Resonanzen von typischen Kernbindungen im Bereich von $\sim 100 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ liegen [107]. Dies entspricht Periodendauern im Bereich von einigen bis einigen hundert Femtosekunden. Prozesse in diesen Zeitbereichen können somit mit Femtosekunden-Laserimpulsen verfolgt werden.³

Die eingesetzten Lasermedien müssen eine ausreichend hohe spektrale Breite unterstützen. Heutzutage werden vor allem Laser mit Titanium-dotiertem Saphir als Lasermedium eingesetzt, da sie neben der spektralen Breite von 3120 cm^{-1} zusätzliche eine hohe thermische und mechanische Stabilität besitzen [100, 30] (siehe Abbildung 3.4).

Meist dient ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser als Lichtquelle für den Ti:Sa-Kristall. Seine Emission bei 530 nm stimmt mit der Absorption von Ti:Sa überein. Der Kristall ist Teil eines Resonators (definierter Lichtweg zwischen den Endspiegeln), in dem sich stehende Moden mit Frequenzen gemäß

$$\nu_N = \frac{c_0}{L} \left(\frac{1}{2} + N \right), \quad N \in \mathbb{N}_0 \quad (3.5)$$

ausbilden können. Dabei ist L die Resonatorlänge. Durch Dispersionskontrolle [112, 113, 114] und einem Mechanismus zur Modenkopplung (z.B. durch Kerrlinsen-Effekt im Medium)[115, 116] kann ein Impulsbetrieb des Lasers erreicht werden. Dabei überlagern sich die verschiedenen Frequenzen in einer definierten Phasenbeziehung. Zeitlich ist diese Überlagerung fast ausschließlich destruktiv, außer in einem kurzen Zeitfenster, in dem die Moden konstruktiv überlagern. Durch diese Technik sind kurze sehr intensive Impulse mit einer Wiederholrate von

³ Heutzutage sind Impulsdauern im Attosekundenbereich realisierbar, doch dies nur mit relativ hohem technischen Aufwand [109, 110].

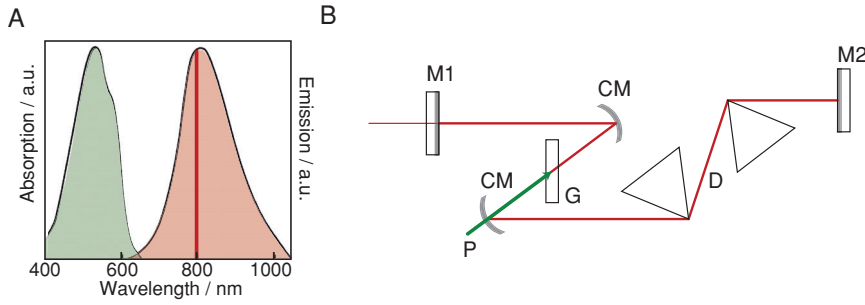


Abbildung 3.4: Der Titanium-Saphir-Laser: (A) Absorption (grün) und Emission (red) von Titanium-Saphir. Aus [100] übernommen; basiert auf Abbildung aus Referenz [111]. (B) Schematische Darstellung eines Titanium-Saphir-Lasers. Das Lasermedium (G, Titanium-Saphir-Kristall) wird über einen Dauerstrichlaser, der im grünen Spektralbereich emittiert, angeregt (P). Das vom Lasermedium emittierte Licht kann in der durch die Endspiegel (M1, M2) definierten Kavität eine Lasermode ausbilden. Dispersive Elemente (D) kompensieren die Dispersion des Laserlichts. Die abbildenden konkaven Spiegel (CM) dienen der Modenkopplung (engl. *mode-locking*).

$$\nu_{rep} = \frac{c_0}{2L} \quad (3.6)$$

realisierbar. Typische Impulsdauern liegen bei $\sim 10 - 100$ fs. Bei der typischen mittleren Ausgangsleistung in der Größenordnung von 1 W und Wiederholraten von 100 MHz liegen die Impulsenergien in der Größenordnung von 10 nJ [100, 30].

Für die transiente Spektroskopie ist diese Impulsleistung ausreichend, um einen großen Anteil der Moleküle in standardmäßig verwendeten Probenvolumina anzuregen. Dies kann wie folgt abgeschätzt werden: Das größtmögliche Signal wird erreicht, wenn alle Moleküle im Probenvolumen angeregt werden. Die übliche Probekonzentration betrug ~ 1 mM, was, bei typischen Volumina von $\sim (100 \mu\text{m})^3 = 1$ nL, einer Molekülanzahl von ~ 1 pmol entspricht. Dies entspricht der Photonenanzahl, die Impulse im UV/Vis mit Energien von $\mathcal{O}(100 \text{ nJ})$ bereitstellen.

Es ist aber wünschenswert höhere Impulsenergien zu erreichen, um nicht durch Verluste der strahlenführenden Optiken limitiert zu sein. Ein weiterer Grund für höhere Impulsenergien ist die "Nutzbarmachung" nicht-linearer optischer Effekte. Hohe Impulsenergien können unter bestimmten Licht-Materie-Wechselwirkungen zur Erzeugung von "neuen" Frequenzen genutzt werden und damit abstimmbare Lichtquellen realisiert werden [117]. Darüber hinaus beruhen manche Anrege-Abfrage-Techniken (siehe weiter unten) auf Abfrageimpulsen, die durch nicht-lineare Effekte erzeugt werden. Dies ist zwar auch mit Ti:Sa-Oszillatoren realisierbar, jedoch steigt die Effi-

zierung von optischen Prozessen höherer Ordnung (z.B. n -ter Ordnung) mit der n -ten Potenz der Intensität [118, 117].

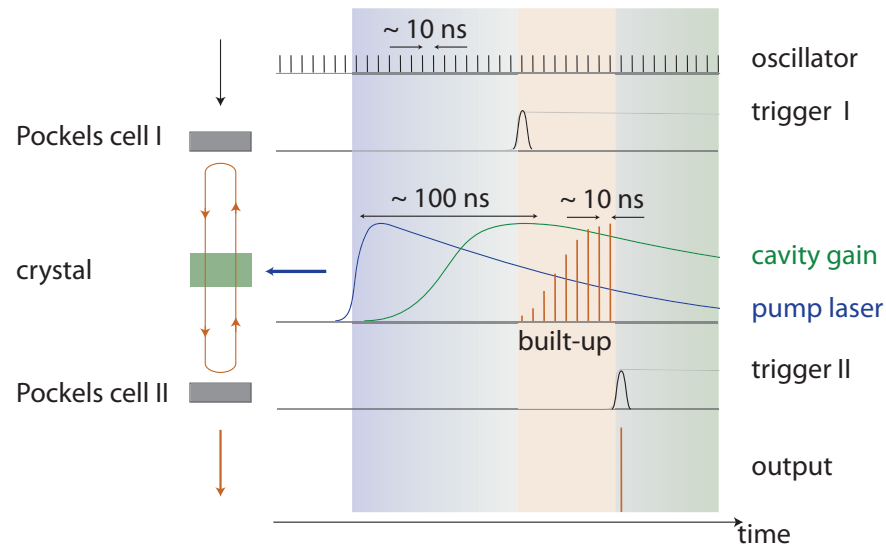


Abbildung 3.5: Prinzip eines regenerativen Verstärkersystems: Ein Femtosekundenimpuls wird über eine Pockelszelle in einen Resonator eingekoppelt. Der aktive Kristall im Verstärkersystem wird über einen gepulsten Laser gepumpt (blauer Zeitverlauf). Das Pumpen bedingt eine "Verstärkung" (grün). Durch mehrmaliges Durchlaufen des Verstärkers wächst die Impulsenergie des eingekoppelten Impulses an (orange). Über eine weitere Pockelszelle kann der verstärkte Impuls wieder ausgekoppelt werden. Aus [100] übernommen.

Eine Möglichkeit, höhere Impulsenergien zu erreichen, ist die Kombination eines Ti:Sa-Resonators mit einem regenerativen Verstärker (siehe Abbildung 3.5). In einem regenerativen Verstärker ist das aktive Medium meist wieder ein Ti:Sa-Kristall. Der Kristall ist Teil eines Resonators, in dem über die Kontrolle der Polarisationsrichtung mittels Pockelszellen einzelne Impulse des Ti:Sa-Resonators ein- und ausgekoppelt werden können. Einkoppelte Impulse durchlaufen den Resonator und gewinnen bei jedem Durchlauf durch den angeregten Ti:Sa-Kristall an Energie. Dadurch erhöht sich die Impulsenergie um mehrere Größenordnungen. Um eine hohe Verstärkung während der Durchläufe durch den Ti:Sa-Kristall zu erhalten, ist dieser über einen gepulsten Anregelaser mit Wiederholraten von 1 – 100 kHz angeregt. Die in dieser Arbeit verwendeten regenerativen Verstärkersysteme weisen Wiederholraten von einem Kilohertz und Impulsenergien von ~ 1 mJ auf — ausreichend für verschiedene optische Methoden der zeitaufgelösten Spektroskopie [30]. Bei diesem Verstärkungsschema erreichen die Impulse Leistungen, die zu Schäden der Optik führen können. Aus diesem Grund werden die Impulse vor der Verstärkerstufe zeitlich gestreckt. Nach der Impulsverstärkung werden sie wie-

der zeitlich komprimiert. Dies kann durch refraktive (oder auch diffraktive) Optiken erreicht werden [119, 30].⁴

3.2.1.2 Zeitauflösung

Nachdem durch Laserimpulse eine ausreichende Population von elektronisch angeregten Zuständen präpariert ist, kann die Beobachtung der zeitlichen Entwicklung dieser auf unterschiedlichem Weg erfolgen. Dabei ist die mögliche Zeitauflösung nicht nur durch die physikalische Eigenschaft der Detektion, sondern auch vom zeitlichen Verlauf des Anregeimpulses I_{ex} bestimmt. Die Zeitauflösung wird meist über die Apparatefunktion (IRF, *engl. instrumental response function*) charakterisiert, welche die Faltung von Anregeimpuls und der charakteristischen Antwortfunktion der Detektion I_{det} ist [100]:

$$\text{IRF}(t) \propto \int I_{\text{ex}}(t' - t) I_{\text{det}}(t') dt' \quad (3.7)$$

Eine Möglichkeit der Detektion besteht in der kontinuierlichen Messung auf rein elektronische Art. Die Zeitauflösung ist aber hier begrenzt. Dies lässt sich physikalisch begründen. Ein elektronisches Element lässt sich in erster Näherung durch ein RC-Glied als Ersatzschaltbild verstehen [120]. Ein RC-Glied beschreibt eine Kapazität C , deren Ladung über einen Widerstand R abfließt. Dieser Vorgang läuft auf einer charakteristischen Zeitskala $\tau_{\text{RC}} = (RC)^{-1}$ ab, somit ist der Frequenzgang eines solchen Elements bei Frequenzen größer als $f_{\text{RC}} = \tau_{\text{RC}}^{-1}$ stark gedämpft. Typischerweise lassen sich elektronisch Frequenzbandbreiten im Gigahertzbereich realisieren, bzw. verarbeiten. Auf eine Zeitskala übersetzt heißt dies, dass Zeitaufösungen besser als einige hundert Pikosekunden nicht, bzw. nur schwer erreicht werden [121, 103].

Deshalb sind für höhere Zeitaufösungen optische Methoden unabdingbar. Prinzipiell könnten durch ein definiertes Umlenken des zu messenden Lichts beliebig hohe Zeitaufösungen erreicht werden – ausschließlich durch den Anregeimpuls begrenzt. In der Praxis wird dies nicht erreicht. Die sogenannte Schmierbildtechnik (*engl. Streak technique*) basiert heutzutage auf dem Ablenken von Photoelektronen und hat eine durch die Elektronenabstoßung physikalisch limitierte Zeitauflösung. Zudem weist auch hier eine elektronische Synchronisierung die oben genannten Probleme auf [100, 30].

Eine andere Technik ist das Anrege-Abfrage-Verfahren. Nachdem die Probe durch einen Impuls angeregt wurde, kann ein zweiter Impuls zur Abfrage des Zustands herangezogen werden. Durch Veränderung des zeitlichen Abstandes zwischen beiden Impulsen können *transiente Spektren* zu verschiedenen definierten Zeitpunkten nach der Anregung aufgenommen werden. Die Verzögerung zwischen beiden

⁴ Dieses Verstärkungsschema wird *chirped pulse amplification* CPA, dt. Verstärkung gestreckter Impulse, genannt.

Impulsen kann über eine Verzögerungsstrecke s_d realisiert werden. Dabei beträgt die Verzögerungszeit

$$t_d = c_0^{-1} s_d. \quad (3.8)$$

Die Zeit zwischen Anrege- und Abfrageimpuls ist somit definiert. In der Praxis wird für beide Impulse die gleiche Laserimpulsquelle verwendet und über Strahlteiler Replika erzeugt, welche zueinander synchron sind. Die zur Detektion verwendete Elektronik geht nicht mehr in Gleichung 3.7 ein. Anstelle des Antwortverhaltens der Detektion tritt der zeitliche Verlauf des Abfrageimpulses.

Im Zusammenhang mit der Zeitauflösung sind optische Weglängen und Dispersionseigenschaften limitierende Parameter. Durch die endliche Ausdehnung des bestrahlten Bereichs am Probeort, sprich den Durchmesser des Anrefokokus, kann es zu optischen Wegunterschieden kommen [122]. Damit die Zeitauflösung dadurch nicht merklich verschlechtert wird, darf der zeitliche Wegunterschied nicht viel größer als die durch die Impulse vorgegebene Impulsdauer sein. Unter der Annahme von Impulsdauern in der Größenordnung von ~ 100 fs sollte der Durchmesser deshalb nicht viel größer als $\sim 10\text{--}100\text{ }\mu\text{m}$ sein.

Durch die Schichtdicke der Probe erfährt der Anregeimpuls eine zeitliche Verbreiterung. Dies ist durch die Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD, engl. *group velocity dispersion*) bedingt [30, 101]. Für Wasser liegt diese im nahen Infrarot bei $\mathcal{O}(30\text{ fs}^2\text{mm}^{-1})$ [123] und erhöht sich für niedrigere Wellenlängen [124, 125]. Für übliche Impulsdauern in der Anrege-Abfragespektroskopie von $\sim 10\text{--}100$ fs sollte für Pfadlängen unter einem Millimeter eine merkliche Impulsverbreiterung ausgeschlossen sein. Einen weitaus stärkeren Einfluss kann die Gruppengeschwindigkeitsfehlانpassung (GVM, engl. *group velocity mismatch*) zwischen dem Anrege- und Abfrageimpuls haben [30, 101]. Die Zentralwellenlänge der Anregeimpulse liegt im UV. Je größer der spektrale Abstand vom Abfrageimpuls ist, umso schneller laufen die Impulse zeitlich auseinander. Für Wasser liegen die Werte in Höhe von mehreren $100\text{ fs} \cdot \text{mm}^{-1}$ [126]. Die Pfadlänge sollte deshalb nicht $\frac{\text{GVM}}{\tau_{\text{pulse}}}$ überschreiten.

3.2.2 Transiente Absorptionsspektroskopie

3.2.2.1 Anregeimpulse

Als Laserimpulsquellen wurden regenerative Verstärker mit Ti:Sa Lasermedien verwendet. Die Zentralwellenlänge (Fundamentale) der Laserimpulse liegt bei $\sim 800\text{ nm}$. Die untersuchten Pyrimidinon-Derivate besitzen ihre energetisch niedrigste Absorptionsbande aber bei einer Wellenlänge um $\sim 300\text{ nm}$. Es müssen daher Techniken zur Frequenzkonvertierung angewendet werden. Einfachste Methode dafür

ist die Frequenzverdreifung. In einem BBO Typ I wird zunächst die zweite Harmonische bei $\sim 400\text{ nm}$ erzeugt. Diese wird mit dem Rest der Fundamentalen auf einem BBO Typ II gebracht. Über Summenfrequenzbildung erhält man somit Photonen mit $\lambda_{ex} = 266\text{ nm}$. Über Reflexionen über mehrere dichroische Spiegel werden Fundamentale und zweite Harmonische herausgefiltert. Bei dieser Methode bleiben die Impulsdauern des generierten Lichts in der Größenordnung von der der Fundamentalen. Zudem ist die Absorption der Pyrimidon-Derivate bei dieser Wellenlänge deutlich kleiner als im Maximum. Beide Einschränkungen werden bei Verwendung optisch parametrischer Verstärkung (OPA, engl. *optical parametric amplification*) vermieden [127].

In den in dieser Arbeit verwendeten OPAs (Light Conversion, TOPAS-white und HORIBA Jobin Yvon, Nopa-Pal) können Zentralwellenlängen in einem großen Bereich des sichtbaren Lichts generiert werden. Durch Frequenzverdopplung können somit gezielt Anregungswellenlängen im UV eingestellt werden. In einem transparenten Medium wird mit einem Anteil der Fundamentalen ein breitbandiges Superkontinuum generiert [127]. Über die passende Phasenanpassung in einem nichtlinearen Medium wird dieses *Signal* mittels der Fundamentalen hochverstärkt. Diese erste Verstärkerstufe dient der Präparation des gewünschten Laserimpulses und arbeitet meist nicht in Sättigung. Eine zweite Verstärkerstufe (meist in Sättigung) dient einer hohen Verstärkung des *Signals*. Die vom Verstärkungsprozess akzeptierten Bandbreiten bedingen zudem eine spektrale Verbreiterung der Impulse [101, 117]. Durch eine abschließende zeitliche Kompression mittels dispersiver Elemente sind so Anregeimpulse mit deutlich kürzerer Impulsdauer als die der Fundamentalen zu erreichen. Besonders mit der Technik des nicht-kollinearen Aufbaus eines OPAs (NOPA, engl. *noncollinear phase-matched OPA*) sind Impulsdauern von $\sim 10\text{ fs}$ möglich [128].

Die genannten Methoden liefern ausreichende Impulsenergie, um einen Großteil der Probe anzuregen. Die zugrundeliegenden nichtlinearen Prozesse haben eine Energieeffizienz von $\mathcal{O}(0.01 - .1)$ und durch Betreiben der OPAs mit Impulsenergien von $\mathcal{O}(100\text{ }\mu\text{J})$ sind die gewünschten Energien im Bereich von Mikrojoule zu erreichen [127].

3.2.2.2 Anrege-Abfrage-Spektroskopie am Beispiel des UV/Vis-Aufbaus

Der verwendete Aufbau für die Aufnahme transienter Absorptionsspektren im UV/Vis-Spektralbereich ist ausführlich in [129, 27, 130] beschrieben. In Abbildung 3.6 ist das Schema eines transienten Absorptionsspektrometers dargestellt. Über Strahlteiler werden Replika eines Impulses aus einem regenerativen Laserverstärkersystem zur Generierung eines Anrege- und eines dazugehörigen Abfrageimpulses erzeugt. Diese Impulse werden mittels einer Verzögerungsstrecke zu unterschiedlichen Zeiten auf die Probe gebracht. So kann für verschie-

dene Zeiten vor bzw. nach der Anregung ein "spektraler Schnappschuss" der Probe aufgenommen werden.

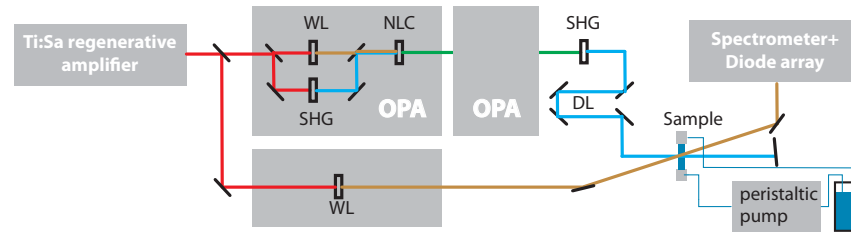


Abbildung 3.6: Schema eines transienten UV/Vis-Absorptionsspektrometers: Ein Anteil der Fundamentalen eines Ti:Sä-Verstärkersystems wird über einen optisch parametrischen Verstärker (OPA) frequenzkonvertiert. Meist werden zwei OPA-Stufen in Reihe geschaltet, um höhere Intensitäten zu erhalten. Die so generierten Impulse im sichtbaren Spektralbereich können über Frequenzverdopplung in Impulse im UV überführt werden. Über eine Verzögerungsstrecke (DL) wird dieser Anregungspulse auf die Probe geleitet. Aus einem weiteren Anteil der Fundamentalen wird ein spektral breites "Weißlicht" (WL) erzeugt und mit dem Anregungsstrahl in der Probe überlagert. Das transmittierte WL wird über einen Spektrographen zur Detektion gebracht.

Die Anregungsimpulse werden auf Quarz-Durchflußküvetten mit Schichtdicken $\mathcal{O}(100\text{ }\mu\text{m})$ fokussiert. Der Fokusedurchmesser ist in derselben Größenordnung. Das Probenvolumen wird sukzessive zwischen aufeinanderfolgenden Anregungsimpulse mittels einer Pumpe ausgetauscht. Die Gesamtstoffmenge der Probe wurde so gewählt, dass über die gesamte Messdauer hinweg kaum Produkt angereichert wird. Das beleuchtete Probenvolumen wird mit einem zweiten Impuls abgefragt. Instantane Detektion über den gesamten UV/Vis/NIR-Spektralbereich wird durch Abfrage mit einem Superkontinuum ("Weißlicht") erreicht. Als Medium zur Erzeugung des Weißlichts dient CaF_2 , da es aufgrund seiner großen Bandlücke Wellenlängen bis in den UV-Bereich unterstützt [131]. Schäden aufgrund der hohen Intensitäten werden durch Rotation vermieden. Ein exzentrisches Rotationsschema erhält zudem die Polarisationsseigenschaften des Kontinuums [132]. Die so generierten Abfrageimpulse reichen von $\sim 300\text{ nm}$ bis $\sim 750\text{ nm}$. Der Bereich um die Fundamentalen wird durch Reflexion an einem dichroischen Spiegel herausgefiltert, da ihre Intensität im Vergleich zu der des Kontinuums um Größenordnungen stärker ist. Da die Detektion nur einen limitierten dynamischen Bereich zulässt, ist dies unumgänglich. Das Abfragelicht hat eine Impulsleistung von $\sim 40\text{ nJ}$ und wird auf den Fokus des Anregungsstrahls abgebildet.⁵ Der Strahldurchmesser der Abfrage ist mit $d_{\text{probe}} \sim 40\text{ }\mu\text{m} < d_{\text{pump}}$ auf den Be-

⁵ Der Strahlengang von Abfrage und Anregung sind in erster Näherung kollinear.

reich höchster Intensität des Anregefokus abgestimmt. Nach Durchlaufen der Probe wird das Abfragelicht auf einen Gitterspektrographen gebracht. An dessen Ausgang ist eine Diodenzeile mit 512 Pixel installiert, welche über eine Analog/Digital-Karte ausgelesen wird. Die Ausleserate stimmt mit der Repetitionsrate des Lasersystems (~ 1 kHz) überein. Damit können separat Einzelschuss-Spektren $I_k(\lambda)$ aufgenommen werden. Bei jedem zweiten Schuss wird der Anregestrahle über ein Chopperrad blockiert und dadurch das Referenzspektrum $I_k^0(\lambda)$ erhalten. Auf empirischem Wege hat sich herausgestellt, dass es vorteilhaft ist, jeweils ein Paar von hundert Schüssen mit und ohne Anregimpuls aufzunehmen und den jeweiligen Mittelwert zu speichern. Für jede Verzögerungszeit $t_{d;k}$ werden $N = 20$ solcher Datenpaare $t_{d;k,l}$ gesammelt. Das transiente Absorptionsspektrum wird über

$$\Delta A_k(\lambda) = \frac{-1}{N} \sum_{l=1}^N \log \left(\frac{I_{k,l}(\lambda)}{I_{k,l}^0(\lambda)} \right) \quad (3.9)$$

gemäß Gleichung 3.3 bestimmt. Insgesamt werden für ~ 160 Verzögerungszeiten/Schritte transiente Spektren aufgenommen. Dabei werden ungefähr die Hälfte der Schritte für Verzögerungszeiten kleiner $\pm 1-10$ ps linear aufgenommen, um eine spätere Dispersionskorrektur vornehmen zu können und um das Anstiegsverhalten des Signals möglichst genau modellieren zu können. Die verbleibende Hälfte der Schritte ist äquidistant auf einer logarithmischen Zeitachse bis zu ~ 3300 ps gewählt. Dadurch ist sichergestellt, dass alle Zeitskalen von (sub-)Pikosekunden bis mehrere Nanosekunden aufgelöst werden. Dieses Abfrageschema ist das Resultat praktischer Erfahrungswerte. Eine Abtastspur (Satz von Spektren zu allen Verzögerungszeiten, *engl. scan*) nimmt eine Zeit von $\lesssim 10$ min in Anspruch. Innerhalb dieser Zeit sind keine Nullpunktverschiebungen (*engl. drift*) des Aufbaus zu verzeichnen. Mehrere Abtastspuren (~ 4) werden gefahren und gemittelt. Für die in dieser Arbeit aufgenommenen Spektren wurde zusätzlich der Anregimpuls über ein Chopper alternierend blockiert. Mit der zusätzliche Information des sich ergebenden "Vierer-Rhythmus"⁶ wurden die Anteile des Streulichts der Anregung aus den Differenzspektren herausgerechnet. Die Zeitauflösung (IRF), die mit dieser Anlage erreicht wird, ist $\sim 160 - 200$ fs.

3.2.2.3 IR-Abfrage

Transiente Spektren im Infrarot-Spektralbereich wurden von Karin Haiser (Ludwig-Maximilians-Universität) aufgenommen. Prinzipiell unterscheidet sich die Technik nicht wesentlich von der Technik für

⁶ So genannt, da für jede Verzögerungszeit Spektren für vier Fälle aufgenommen werden: (i) beide Chopper blockieren, (ii) Chopper der Anregung blockiert, (iii) Chopper der Abfrage blockiert und (iv) beide Strahlengänge werden nicht blockiert.

den UV/Vis-Spektralbereich. Das Abfragelicht wird hier aber mittels OPAs generiert und umfasst einen Spektralbereich von $\sim 1350 - 1800 \text{ cm}^{-1}$, welcher in Detektionsfenstern von $\sim 450 \text{ cm}^{-1}$ mit einer 32-kanaligem Quecksilber-CadmiumL-Tellurid-Zeile aufgenommen wird. Die Durchflussküvetten sind Sonderanfertigungen mit CaF_2 -Fenstern und Schichtdicken von $\sim 100 \mu\text{m}$. Die Zeitauflösung dieses Experiments beträgt $\gtrsim 400 \text{ fs}$. Derselbe Aufbau wurde auch zur Messung von transienten Verläufen im Nano- bis Mikrosekundenbereich verwendet. Dabei wurde die Lichtquelle durch die vierte Harmonische eines ND:YVO Lasers (AOT,YVO-25QSPHP) ersetzt. Die Anregungsimpulse besitzen eine Zentralwellenlänge von 266 nm und die Verzögerung ist gegenüber der Abfrage elektronisch eingestellt [133]. Eine genaue Beschreibung findet sich in Referenz [134, 27, 33].

3.2.3 Nanosekunden Absorptionsspektroskopie

Femtosekundenspektroskopie basiert auf synchronisierten Anrege- und Abfrageimpulsen. Eine (nahezu) perfekte Synchronisierung ist nur optisch, in der Praxis durch Strahlteiler, zu erreichen. Dies impliziert, dass die Zeitverzögerung zwischen Anregung und Abfrage auch auf optischen Wege realisiert werden muss. Laserlicht zeichnet sich durch seine geringe Divergenz aus [122] und es wurden schon Verzögerungsstrecken von hundert bis tausend Metern durch vielmalige Reflexion an Spiegeln realisiert [135, 136]. Dies entspricht Verzögerungszeiten im Mikrosekundenbereich. Für zeitaufgelöste Spektroskopie langlebiger Spezies spielt die Zeitauflösung eine eher untergeordnete Rolle und eine einfache Einstellmöglichkeit des Zeitfensters ist anzustreben. Wie weiter oben dargelegt, bieten elektronische Methoden Zeitaufösungen von $\sim 10 - 100 \text{ ps}$, wohingegen das Zeitfenster im Prinzip beliebig geändert werden kann. Absorptionsspektroskopie im Nanosekundenbereich ist daher am einfachsten über elektronische Techniken realisierbar.

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Absorptionsspektrometer mit Nanosekundenzeitauflösung eingesetzt (siehe Abbildung 3.7, B). Laura Buschhaus führte jüngst transiente Messungen an einem "Flash-Photolyse"-Aufbau aus, der in Referenz [137, 98] näher beschrieben ist. Zur Anregung der Probe in 1 cm Standard-Küvetten dient die vierte Harmonische (266 nm) eines Nd:YAG Lasers mit $\sim 10 \text{ ns}$ breiten Impulsen (Innolas, Spitlight 600). Senkrecht zur Anregung wird mit einer gepulsten Xenon Dampflampe abgefragt. Damit wird ein Zeitfenster von $\sim 150 \mu\text{s}$ und ein Spektralbereich von $\sim 300 - 600 \text{ nm}$ abgedeckt. Die Detektion umfasst einen Monochromator und einen Photomultiplier im Strommodus. Die Impulsenergie der Anregung beträgt $\sim 35 \mu\text{J}$.

Die Anlage stand für die Messungen in Referenz [27] nicht zur Verfügung, weshalb ein Einkanalspektrometer realisiert wurde (sie-

he Abbildung 3.7, A). Gegenüber dem Flash-Photolyse-Aufbau unterscheidet sich der Aufbau vor allem durch die Anregung mit Femtosekundenimpulsen.

3.2.3.1 Aufbau des Einkanalspektrometers

Der gleiche Anregestrahл, wie er auch für die Femtosekundenexperimente Verwendung findet, wird ohne Fokussierung (bzw. mit schwacher Fokussierung mit einer Rayleigh-Länge größer als die Schichtdicke) auf die Probenküvette gebracht. Die zeitliche Änderung der Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge wird über einen Dauerstrichlaser, welcher auf eine Photodiode fällt, abgefragt. Die zeitliche Modulation der Absorption bedingt einen variierenden Photostrom der Photodiode, welcher mit einem Oszilloskop aufgenommen wird. Zur Synchronisierung benötigt das Oszilloskop ein Triggersignal, welches entweder durch die Elektronik des Lasersystems der Anregung oder über die Detektion eines Rückreflexes des Anregimpulses mittels einer zweiten Photodiode bereitgestellt wird.

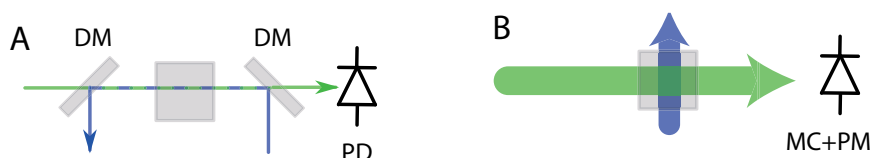


Abbildung 3.7: Nanosekunden Absorptionsspektrometer: (A) Einkanal-Setup mit Femtosekundenanregung. Der kollimierte Strahl einer Dauerstrich-Laserdiode (grün) durchdringt eine Probenküvette und fällt auf eine Photodiode PD. Der Diodenstrom kann mittels eines Oszilloskops detektiert werden. Über dichroische Spiegel DM werden Femtosekunden-Anregimpulse eingekoppelt. Sie dienen zum Anregen von Molekülen im "abgefragten" Volumen. (B) "Flash Photolyse"-Aufbau. Die vierte Harmonische eines Nd:YAG-Lasers (blau) mit Nanosekunden-Impulsdauer dient zur Anregung der Probe. Senkrecht dazu wird mit der kollimierten Emission einer gepulsten Xenon Dampflampe abgefragt. Über das zeitliche Messfenster ist die Abfrage konstant. Nach Durchlaufen eines Monochromators (MC) wird das Signal über einen Photomultiplier (PM) im Strommodus detektiert. Teilabbildung A aus [100] entnommen.

Für die in dieser Arbeit gezeigten Messungen wurde die Verdreifachte der Fundamentalen eines Femtosekunden-Laserverstärkersystems (Coherent, Libra-F-1K-HE, 100 fs, 800 fs) als Anregung verwendet. Der Strahl war kollimiert und hatte einen Durchmesser von $\sim 360 \mu\text{m}$ und eine Pulsenergie von $\sim 10 \mu\text{J}$. Als Abfragelichtquelle diente ein Diodenlasermodule (Thorlabs, LTC100-B), welches mit einer 635 nm Laserdiode (HL6344G) bestückt war. Die Leistung vor der Probe betrug 17 mW. Beide Strahlen wurden aus entgegengesetzter Rich-

tung kommend in einer 1 cm Quarzküvette (Hellma Analytics) überlagert. Der entgegengesetzte Strahlverlauf hatte rein praktischen Grund bezüglich Spiegeleinsatz und Reflexionen und hatte auf die erreichte Zeitauflösung keinen Einfluss. Zur Detektion kam eine schnelle PIN-Photodiode (Thorlabs, DET10A/M) zum Einsatz. Ihr Signal wurde mittels eines Digitaloszilloskops (LeCroy, WaveSurfer, 104MXs-A) bei einem Eingangswiderstand von $50\ \Omega$ protokolliert.

3.2.3.2 Limitationen

Der vorgestellte Aufbau für zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie unterliegt einigen Einschränkungen. Der zur Abfrage der Absorptionsänderung eingesetzte Laser ist, da kontinuierlich, spektral schmalbandig und erlaubt somit keine gleichzeitige Messung über einen breiten Spektralbereich. Dies kann durch Verwendung von Laserdioden mit verschiedenen Wellenlängen erreicht werden. Bisher sind aber im sichtbaren Bereich nur wenige Wellenlängen für kommerzielle Laserdioden erschlossen.

Durch die Femtosekundenanregung werden Spitzenintensitäten erreicht, die zu Mehrphotonenabsorption bis hin zur Ionisation führen können. Dabei können solvatisierte Elektronen generiert werden [138, 139]. Sie weisen ein lösungsmittel- [140] und temperaturabhängiges [141] Absorptionsmaximum im Nah-Infraroten auf. Speziell für Wasser und bei Raumtemperatur liegt es bei $\sim 700\text{ nm}$. Die Halbwertsbreite der Absorptionsbande beträgt mehrere hundert Nanometer und kann somit zum Signal im sichtbaren Spektralbereich beitragen. Zudem stellt ein solvatisiertes Elektron eine zusätzliche reaktive Spezies dar, welche mit dem zu untersuchendem System wechselwirken kann. In Wasser können, neben dem solvatisierten Elektron, durch Dissoziation oder als Folgeprodukt Hydroxyd- und Wasserstoff-Radikale gebildet werden [139].

In Abbildung 3.8 wird eine Messung von reinem Wasser mit dem vorgestellten einkanaligen Nanosekunden-Aufbau gezeigt. Das dargestellte transiente Signal bei 635 nm stammt vom solvatisierten Elektron. Seine Lebensdauer beträgt einige hundert Nanosekunden bei "normaler" Sauerstoffkonzentration (schwarze Quadrate). Bei Sauerstoffbefreiung erhöhen sich das Signal und die Lebensdauer des solvatisierten Elektrons (hier nicht gezeigt).

Es ist deshalb vor allem bei niedrigen Probenkonzentrationen notwendig, das solvatisierte Elektron gezielt zu löschen. Dies geschah in dieser Arbeit über Zugabe von 10 mM Natriumnitrat [142]. Wie aus Abbildung 3.8 ersichtlich wird, wird nicht nur die Konzentration an solvatisiertem Elektron mit der zugegebenen Menge Nitrat verringert, sondern zudem schnell entvölkert. Die angewendete Konzentration von Natriumnitrat garantiert, dass nach einigen 10 ns kein solvatisiertes Elektron mehr vorliegt und die Konzentrationen von

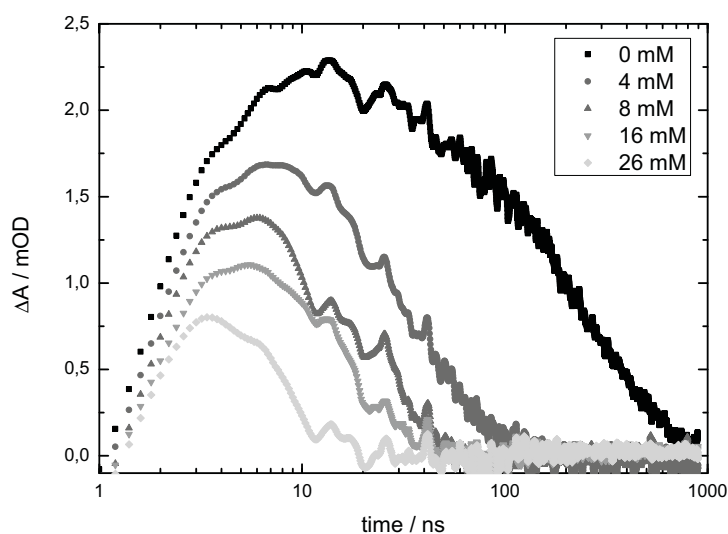


Abbildung 3.8: Transientes Signal von Nitrat-gelöschtem solvatisiertem Elektron. Solvatisierte Elektronen wurden in reinem Wasser durch Femtosekundenanregung mit einer Wellenlänge von ~ 266 nm dargestellt. Die Signalamplitude wie auch die Lebensdauer verringert sich mit steigender Konzentration von gelöstem Natriumnitrat. Die in allen Zeitverläufen wiederkehrende Signatur (vor allem bei 10 ns und 20 ns sichtbar) ist ein elektronisches Artefakt durch die Pockelszellen des regenerativen Laserverstärkersystems.

Folgeprodukten, welche aus Reaktionen des solvatisierten Elektrons stammen, minimiert werden.

Das beschriebene Problem ist nicht auf den einkanaligen Aufbau beschränkt. Die Intensität ist bei der Femtosekundenanregung jedoch gegenüber der Nanosekundenanregung um ungefähr drei Größenordnungen höher.

3.2.4 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Die relevante Zeitskala, auf der Fluoreszenzemission stattfindet, reicht bis ~ 10 ns. Diese obere Schranke kann durch die *Strickler-Berg-Relation* begründet werden. Für typische molekulare Übergänge sind die strahlenden Lebenszeiten in dieser Größenordnung [35, 103]. Nicht-strahlende Prozesse können diese Lebenszeit stark verkürzen [29, 2]. Diese Vorgänge sind meist mit Auslenkungen der Kerne im Molekül verbunden. Vor allem bei besonders schnellen photoinduzierten chemischen Reaktionen können Moleküle Fluoreszenzzerfallszeiten bis unter 100 fs aufweisen [143, 144]. Elektronische Methoden wie Modulationsfluoreszenzspektroskopie oder zeitkorrelierte Einzelphotonmessungen können nur Zeitaufösungen von $\sim 20 - 50$ ps bieten [100,

103]. Deshalb ist es besonders für die hoch-zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie photochemischer Systeme nötig, optische Methoden vorzuziehen. Zeitaufösungen von $\sim 10 - 100$ fs sind durch optische Tore und, unter Umständen, durch Schmierbild-Techniken realisierbar [100, 30]. Mit ihnen ist es möglich, spektral breitbandige transiente Spektren zu erhalten. In dieser Arbeit wurde vor allem ein Schmierbild-Kamerasystem verwendet [27]. Darüberhinaus wurden auch zeitaufgelöste Spektren mittels eines optischen Tors publiziert [145, 144]. Beide Systeme werden im Folgenden erklärt. Die Limitationen, die eine Messung von Pyrimidinon-Derivaten am optischen Tor bislang nicht zuließen, werden ebenfalls erläutert.

3.2.4.1 Schmierbild-Kamera

In Schmierbild-Experimenten wird die Probe durch einen kurzen Lichtimpuls angeregt. Die Fluoreszenz wird in ein Spektrometer eingekoppelt. Das spektral aufgespaltene Licht wird dann auf den Eingang einer Schmierbild-Kamera abgebildet. Dadurch wird die spektrale Information in eine räumliche übersetzt. Das so spektral aufgespaltene Licht induziert Photoelektronen an einer Photokathode am Eingang der Schmierbild-Kamera. Ein Potential beschleunigt diese Photoelektronen und führt sie zu einem senkrecht zur Flugrichtung stehenden Paar Umlenkplatten. Das Potential entlang dieser Platten wird kontinuierlich verändert. Dadurch erfährt ein Photoelektron eine Ablenkung, die von der Ankunftszeit des Photons abhängt. Damit wird die Ankunftszeit eines Photons in einen Ablenkwinkel übersetzt. Beide Informationen, spektrale und zeitliche, eines Photons definieren damit einen bestimmten Punkt auf einem zweidimensionalen Detektor. Aus technischen Gründen ist die Detektion wie folgt aufgebaut: Die spektral und zeitlich getrennten Photoelektronen werden über eine Mikrokanalplatte verstärkt und auf einen Phosphorschirm gebracht. Die so generierten Photonen werden mit einer zweidimensionalen CCD detektiert.

Es ist offensichtlich, dass die variierende Spannung an den Ablenkplatten linear mit der Zeit ansteigt und auf den Anregeimpuls synchronisiert werden muss. Bei der "Synchroscan"-Technik wird die Spannung über einen extrem stabilen Oszillator gesteuert, welcher mit der gleichen Frequenz wie der Laser-Oszillator läuft. Damit sind Zeitaufösungen von ~ 100 fs mit ~ 100 MHz Repititionsrate möglich. Es können aber nur Zeitfenster bis einige Nanosekunden erreicht werden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten System sind längere Zeitfenster benötigt worden und die brauchbare Repititionsrate auf ein Kilohertz beschränkt. Zur Synchronisierung wurde deshalb auf einen Trigger des Lasersystems zurückgegriffen. Es konnten so Zeitaufösungen bis ~ 10 ps realisiert werden. Prinzipiell ist diese Zeitauflö-

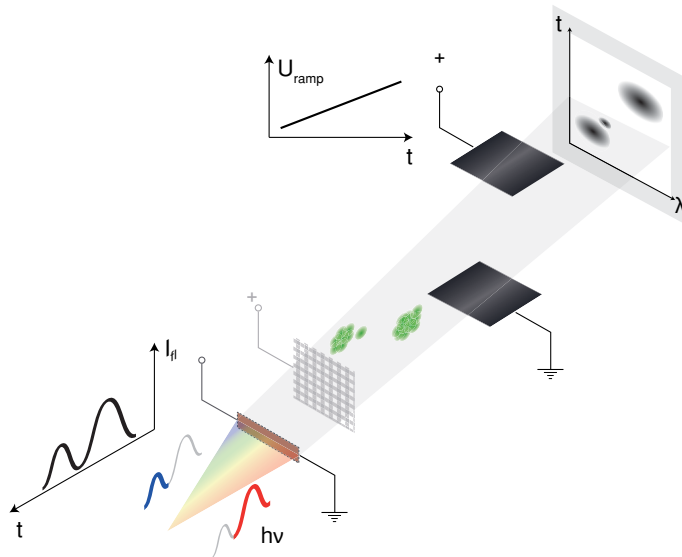


Abbildung 3.9: Prinzip einer Schmierbild-Kamera: Mit Impulsanregung generierte Fluoreszenz wird spektral aufgespalten und auf eine Photokathode abgebildet. Unterschiedliche Wellenlängen sind so einer unterschiedlichen Position (horizontal) auf der Kathode zugeordnet. Die erzeugten Photoelektronen werden über ein Potential beschleunigt und passieren ein Potential senkrecht zur Flugrichtung. Eine Spannungsrampe lenkt die Photoelektronen senkrecht ab, abhängig von dem Zeitverhalten der Fluoreszenz unterschiedlich stark. Die zeitliche "Information" wird so in eine räumliche (vertikal) übersetzt. Aus [100] entnommen.

sung durch elektronisches Flackern (*engl. jitter*) verursacht.⁷ Die effektiv erreichbare Zeitauflösung einer Schmierbildmessung hängt aber für längere Zeitfenster T ausschließlich von der Anzahl der Pixel entlang der Zeitachse ab. Die übliche Pixelanzahl von CCD-Arrays liegt zwischen $\sim 100 - 1000$. Daher können keine Zeitauflösungen besser als $\sim 0.001 - 0.01 \cdot T$ erreicht werden.

Das in dieser Arbeit verwendete Schmierbild-System wurde mit den gleichen Anregungsimpulsquellen wie bei den anderen Aufbauten betrieben. 150 fs-Lichtimpulse mit einer Impulsenergie von ~ 60 nJ und Zentralwellenlänge von ~ 320 nm wurden auf eine Durchflussküvette mit Schichtdicke von $200 \mu\text{m}$ fokussiert (Fokusbereich $\sim 15 \mu\text{m}$). Die Fluoreszenz wurde mit einem reflektiven Mikroskopobjektiv (Ealing, 15x, NA 0.5, BFL infinity) in einer vorwärtsstreuenden Geometrie eingesammelt und auf den $\sim 40 \mu\text{m}$ Eingangsschlitz

⁷ Bei Einzelschussmessungen können Zeitauflösungen unter zwei Pikosekunden erreicht werden. Dies bedarf einer kontinuierlichen Zwischenspeicherung und späterer "Jitter-Korrektur". Da der Phosphor-Schirm eine Abklingzeit von mehreren Millisekunden aufweist und die CCD nur mit 150 Hertz ausgelesen werden kann, ist diese Technik mit einer Verzehnfachung der Messzeit verbunden und wurde nicht angewendet.

eines Spektrographen (Princeton Instruments, Acton Serie SP 2356, $f=300$ mm) mittels einer 50 mm-Quarzlinse abgebildet. Ein 50 Linien-Gitter mit Blaze 500 wurde zum spektralen Aufspalten eingesetzt. Die rechnerische spektrale Auflösung des Spektrometers betrug 2.6 nm. Die Fokalebene des Spektrometers wurde auf die Photokathode des Schmierbild-Kamerasystems (Hamamatsu, C5680-24 C) abgebildet. Das System war mit einer 1:1 Eingangsoptik (A1976-01), einer Schmierbild-Röhre (N5716-01) und einer 1:0.5 Ausgangsoptik (A2886-06S) bestückt. Die Ausgangsoptik leitete das Licht des Phosphorschirms auf eine CCD-Kamera (C9300-201) weiter. Eine Dimension (640 pixel) des CCD-Chips repräsentierte die spektrale Achse und die Senkrechte (480 pixel) die zeitliche Achse. Das Zeitfenster wurde über eine schnelle Einzelspureinheit (Hamamatsu, M5677-01) eingestellt. Für Prozesse auf einer 100 ps-Zeitskala wurde ein Zeitfenster von 1.6 ns mit einer effektiven Zeitauflösung von ~ 20 ps gewählt. Für alle anderen längeren Prozesse wurde ein Zeitfenster von 32.3 ns mit einer effektiven Zeitauflösung von ~ 240 ps eingestellt. Die Fluoreszenz wurde im kontinuierlichen Modus mit Einzelphotonmessung betrieben. Für alle transienten Spektren wurden 10^5 Einzelspuren addiert.

3.2.4.2 Kerr-Schalter-Aufbau

Breitbandige hochzeitaufgelöste ($\mathcal{O}(100$ fs)) Fluoreszenzdaten können prinzipiell über eine Schmierbild-Kamera aufgenommen werden [30]. Dafür ist neben einer speziellen Elektronik auch eine spezielle Auswertemethode nötig. Die Technik des optischen Tors wird bislang als Standardmethode vorgezogen [100, 30]. Anders als bei der Anrege-Abfragetechnik wird hier der zweite Impuls nicht zur direkten spektralen Abfrage der Probe verwendet. Er soll vielmehr das Fluoreszenzlicht in Dauer seiner Anwesenheit durch ein optisches Element, einem "optischen Tor", transmittieren lassen. Das Prinzip wird in Abbildung 3.10 erläutert.

In gleicher Weise wie in der transienten Absorptionsspektroskopie wird über eine optische Verzögerungsstrecke der Schaltimpuls gegenüber dem Anregeimpuls um eine bestimmte Zeit t_d verzögert. Das optische Tor ist für die Dauer des Schaltimpulses offen und Fluoreszenzlicht kann den Photodetektor erreichen. Die einzelnen "Zeitschnitte" dienen der Rekonstruktion des zeitlichen Verlaufs des Fluoreszenzzerfalls.

Eine verbreitete Technik, die Funktionsweise eines optischen Tors in der Praxis umzusetzen, ist die Auf-Konvertierung (*engl. up-conversion*). Es wird ausgenutzt, dass in einem nicht-linearen Kristall Summenfrequenzbildung auftreten kann [30]. Dafür muss, neben räumlicher und zeitlicher Überlappung von Schaltimpuls und Fluoreszenzlicht, die Phasenanpassungsbedingung (siehe Abbildung 3.11) erfüllt sein. Das auf-konvertierte Licht ist spektral blau-verschoben; es gilt $\omega_{up} = \omega_{gate} + \omega_{fl}$ [117]. Da für im nah-ultravioletten fluoreszierende Proben

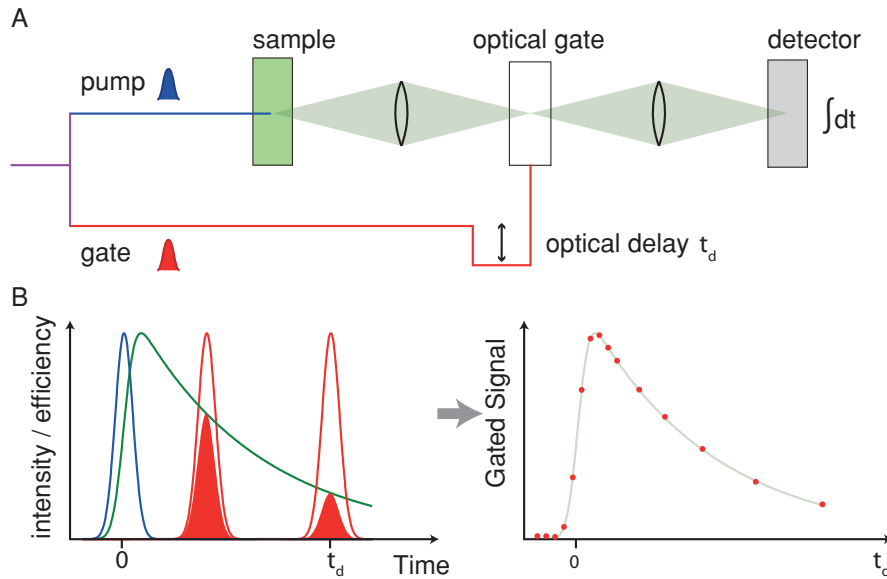


Abbildung 3.10: Prinzip eines optischen Tors: (A) Zwei Lichtimpulse, Anrege- (blau) und Schaltimpuls (rot), stammen von einem "Mutterimpuls" (violett). Der Anregeimpuls regt die Probe zur Fluoreszenz an. Optiken richten die Fluoreszenz auf ein "optisches Tor". Der Schaltimpuls "öffnet" dieses Tor zu einer bestimmten Zeit t_d nach der Anregung. Diese Zeit ist über eine optische Verzögerungsstrecke bestimmt. Das Licht, welches das offene Tor passiert, wird auf einen Photodetektor gebracht. Der Detektor selbst trägt nicht zur Zeitauflösung bei, vielmehr arbeitet er, verglichen mit den Impulsdauern, zeitlich integriert. (B) Das detektierte Licht ist proportional zu dem "ausgeschnittenen" Fluoreszenzlicht und dient zur Rekonstruktion des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenz. Aus [100] entnommen.

das konvertierte Licht technisch schwierig zu detektieren sein kann, kann auch eine Ab-Konvertierung über $\omega_{down} = \omega_{gate} - \omega_{fl}$ erfolgen. Grundsätzlich bieten diese Techniken die Möglichkeit, das "geschaltete" Licht von störenden Untergrundsignalen zu trennen. Das konvertierte Signal ist spektral von Schaltimpuls und Fluoreszenzlicht getrennt. Die Phasenanpassungsbedingung impliziert auch im allgemeinen eine unterschiedliche Ausbreitungsrichtung der Strahlen, wodurch das geschaltete Licht auch räumlich separiert werden kann. Je nach Wahl des nicht-linearen Mediums kann die Polarisationsrichtung als zusätzlicher Filtermechanismus eingesetzt werden.

Abgesehen von diesen Vorteilen ist aber wegen der Phasenanpassungsbedingen die "schaltbare" Bandbreite begrenzt [117]. Die Bandbreite $\Delta\nu$ kann durch einen dünneren Kristall erhöht werden; dabei ist sie invers-proportional zur Dicke L ($\Delta\nu \propto L^{-1}$).⁸ Eine Verringerung

⁸ Durch unterschiedliche Gruppengeschwindigkeiten von Fluoreszenz- und Schaltlicht ist die "sinnvolle" Dicke des nicht-linearen Kristalls limitiert.

der Kristalldicke geht aber auch mit einer Erniedrigung der Effizienz η einher. Die Effizienz der Summenfrequenzbildung wächst quadratisch mit der Dicke ($\eta_{sum} \propto L^2$). Eine hohe Bandbreite bedingt also eine starke Einbuße beim Schaltsignal. Dies kann dadurch vermieden werden, dass schmalbandige Zeitverläufe für verschiedene Phasenanpassungen (unter Änderung des Schnittwinkels des nicht-linearen Kristalls) mit hoher Effizienz aufgenommen werden und die transienten Spektren aus ihnen rekonstruiert werden. Dies bedarf aber einer genauen Kontrolle der Zeitnullpunkte. Zudem ist eine spektrale Kalibrierung wegen der Phasenanpassungsbedingung notwendig. Aus diesen Gründen wird (im Arbeitskreis Femtosekundenspektroskopie von Prof. Peter Gilch) der Kerr-Schalter-Technik Vorrang gegeben [146]. Sie basiert auf dem optischen Kerr-Effekt [117]. Dieser unterliegt keiner Phasenanpassungsbedingung, wodurch das gesamte Fluoreszenzlicht simultan geschaltet werden kann.

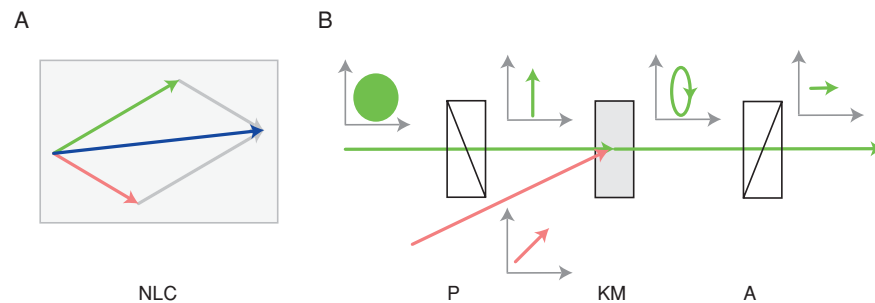


Abbildung 3.11: Realisierung eines "optischen Tors". (A) Auf-konvertierung: Fluoreszenzlicht (grün) und Schaltlicht (rot) kreuzen sich in einem nicht-linearen Kristall (NLC). Angenommen, der zeitliche Überlapp und die Phasenanpassung sind gewährleistet, dann wird auf-konvertiertes Licht über Summenfrequenzbildung generiert (blau). Im Kristall ergibt die vektorielle Summe des k -Vektors von Fluoreszenz- und Schaltlicht den k -Vektor des auf-konvertierten Lichts. (B) Kerr-Schalter: Das emittierte Fluoreszenzlicht ist schwach bis gar nicht polarisiert. Nach Passieren des Polarisators (P) ist es linear polarisiert. Es kann somit nicht den zweiten Polarisator, den Analysator (A), durchlaufen. Ein Kerr-Medium (KM) im Strahlengang kann die Situation ändern. Wenn es mit einem Schaltimpuls, welcher unter 45° zum Fluoreszenzlicht nach dem ersten Polarisator polarisiert ist, beleuchtet wird, wird das Kerr-Medium temporär doppelbrechend. Das ändert den Polarisationszustand des Fluoreszenzlichts und ein Anteil davon kann den Analysator passieren und detektiert werden.

In Abbildung 3.11 wird das Prinzip erläutert. Zwei zueinander senkrecht stehende Polarisatoren (Polarisator und Analysator bezeichnet) blockieren das Fluoreszenzlicht. Ein transparentes isotropes Medium zwischen diesen ändert von sich aus die vom Polarisator vorge-

gebene Polarisationsrichtung nicht. Durch einen Schaltimpuls kann jedoch eine Anisotropie in diesem Medium erzeugt werden. In Richtung seiner Polarisation erhöht sich der Brechungsindex nach

$$n_{||}(t) = n_0 + n_2 I(t) \quad (3.10)$$

gemäß dem zeitlichen Verlauf der Schaltintensität $I_g(t)$ [147, 117]. Er unterscheidet sich somit von dem senkrecht zur Polarisation des Schaltlichts ($n_{\perp} = n_0$). Das Medium wird doppelbrechend und die zur Polarisationsrichtung des Anregimpuls senkrechten und parallelen Anteile des Fluoreszenzlichts laufen mit einer unterschiedlichen Phasengeschwindigkeit. Nach dem Durchlaufen des Kerr-Mediums addieren sich diese Anteile und resultieren in einem geänderten Polarisationszustand (allgemein elliptisch polarisiert). Somit kann ein Anteil des Fluoreszenzlichts den Analysator passieren. Die Transmission durch den Kerr-Schalter ist durch

$$T = \sin^2(2\theta) \cdot \sin^2\left(\frac{1}{2}\phi(t)\right). \quad (3.11)$$

gegeben. Hier ist θ der Winkel zwischen der Polarisation des Schaltlichts und der des Fluoreszenzlichts und wird zur Maximierung der Transmission auf 45° eingestellt. Die Phasenverschiebung nach dem Kerr-Medium ist proportional zum Verhältnis zwischen der Länge L des Mediums und dem optischen Wegunterschied zwischen den Polarisationsachsen $\phi(t) = 2\pi \cdot L / (\lambda_{fl} / \Delta n)$ [147]. Somit ergibt sich eine zeitabhängige Transmission (für $\theta = 45^\circ$) von

$$T(t) = \sin^2\left(\frac{\pi n_2 I_g(t) L}{\lambda_{fl}}\right) \approx \left(\frac{\pi n_2 I_g(t) L}{\lambda_{fl}}\right)^2. \quad (3.12)$$

Wie bei der Auf-Konvertierung muss auch beim Kerr-Schalten ein Mittelweg zwischen Signalstärke und Zeitauflösung gefunden werden. Dafür ist aber beim Kerr-Schalter die spektrale Bandbreite der Transmission unabhängig von der Dicke des Mediums.

Über Gleichung 3.12 kann die nötige Impulsenergie für einen funktionierenden Kerr-Schalter abgeschätzt werden [100, 117]. Dafür muss zunächst die maximal sinnvolle Dicke des Kerr-Mediums berechnet werden. Aus Gründen geringer Mehrphotonenabsorption und der rein elektronischen Beiträge zur Suszeptibilität dritter Ordnung hat sich Quarzglas als geeignetes Kerr-Medium herausgestellt [146]. Wird gefordert, dass die Schaltimpulsdauer in der Größenordnung der Anregung ($\mathcal{O}(10 \text{ fs})$) liegen soll und eine Transmission von mehreren zehn Prozent erreicht werden soll, ist eine Impulsenergie von $\sim 1 - 10 \mu\text{J}$ erforderlich [30]. Eine spektrale Lage im Infraroten bietet gegenüber Impulsen im Sichtbaren die Vorteile, dass (i) Mehrphotonenprozesse weniger wahrscheinlich sind [117] und (ii) Rayleigh-gestreutes Schaltlicht durch Filter blockiert werden kann, ohne die Emission im sichtbaren Spektralbereich zu unterdrücken. Optisch parametrische

Verstärker im Infraroten können diese Anforderungen erfüllen [146]. In der von mir mit angeleiteten Diplomarbeit von Ramona Mundt [148] wurde ein zweistufiger OPA aufgebaut. Er liefert Impulsenergien von bis zu $\sim 30 \mu\text{J}$ bei einer Impulsdauer von $\sim 60 \text{ fs}$ und einer Zentralwellenlänge um 1200 nm .

3.2.4.3 Signal-zu-Rausch-Verhältnis des Kerr-Schalters

Das Quadrat des inversen Signal-zu-Rauschverhältnisses (SNR, engl. *signal-to-noise ratio*) eines Kerr-Schalter-Aufbaus ist nach [147] als

$$\begin{aligned} \text{SNR}^{-2}(t_d) &= \left(\frac{\delta S}{S} \right)^2 \\ &= [1 + r(t_d)]^2 \frac{1}{S} + [1 + 2r(t_d)] \left(\frac{\delta E_{\text{ex}}}{E_{\text{ex}}} \right)^2 + \left(\frac{\delta E_{\text{gate}}}{E_{\text{gate}}} \right)^2 \end{aligned} \quad (3.13)$$

gegeben.⁹ Hier ist der Faktor $r(t_d)$ explizit zeitabhängig. Wenn er gegen Null geht, ist das Rauschen durch die quadratische Summe von Schrotrauschen und Rauschen in der Anregungs- E_{ex} bzw. Schaltimpulsenergie E_{gate} gegeben, d.h. die einzelnen Rauschbeiträge tragen gemäß dem Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz zum Signalrauschen bei [150]. Unter realen Bedingungen ist der Faktor $r(t_d)$ ungleich Null und mit der Verzögerungszeit t_d exponentiell ansteigend [147]:

$$r(t_d) = \frac{\tau_{\text{fl}}/C}{T\delta t_{\text{gate}} \exp(-t_d/\tau_{\text{fl}})} \quad (3.14)$$

Hier wird von einem monoexponentiellen Fluoreszenzzerfall $\propto \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{fl}}}\right)$ ausgegangen. Der Faktor $r(t_d)$ hängt neben der Fluoreszenzlebensdauer τ_{fl} auch von den technischen Parametern des Kerr-Schalters ab. Diese sind der durch das Polarisator/Analysator-Paar gegebene Kontrast C , die Effizienz (bzw. Transmission nach Gleichung 3.12) des Kerr-Schalters T und die Impulsdauer des Schaltimpulses δt_{gate} . Der Dividend in Gleichung 3.14 ist proportional zu dem durch das geschlossene Polarisator/Analysator-Paar hindurchtretende Licht. Dieser Hintergrund wird mit zunehmender Fluoreszenzlebensdauer größer. Der Divisor ist proportional zu dem geschalteten Licht und wegen des angenommenen exponentiellen Abfalls der Fluoreszenzintensität zeitabhängig. $r(t_d)$ ist demnach das Verhältnis zwischen dem Hintergrund und dem Signal. Je größer dieses wird, desto geringer wird nach Gleichung 3.13 das SNR.

Der beschriebene Kerr-Schalter-Aufbau [146] wurde für Proben sehr schneller Fluoreszenzzerfälle konzipiert. Dafür wurde durch die Wahl

⁹ SNR ist definitionsgemäß das Inverse der auf die Signalstärke normierte Fluktuationen des Signals, sprich des relativen Fehlers der Messung. Um ein Signal eindeutig vom Rauschen zu unterscheiden muss das sog. Rose-Kriterium $\text{SNR} \geq \text{SNR}_{\text{Rose}}$ gelten [149].

des Kerr-Mediums und des Schaltimpulses die Zeitauflösung optimiert. Das Kerr-Medium, hier Quarzglas, zeichnet sich zudem durch eine geringe Dispersion und Eigenfluoreszenz aus. $r(t_d)$ kann, ohne diese Parameter zu verändern, nur durch eine Erhöhung des Kontrasts C minimiert werden. Der Kontrast des Kerr-Schalters ist vor allem durch die numerische Apertur der verwendeten Optiken limitiert [151, 152]. Dieser Umstand wurde in der von mir mit angeleiteten Bachelor-Arbeit von Beate Schulz [153] theoretisch und experimentell untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch Blockieren von Bereichen des Strahlengangs der Kontrast entscheidend erhöht werden kann. Erstmals wurde dies in einer Studie zur Photokinetik eines N-Oxides gezeigt werden [145]. Eine Bestimmung von mehreren Zerfallszeiten zwischen 200 fs und 200 ps bei einer Zeitauflösung von ~ 200 fs konnte durchgeführt werden [145]. Der Kerr-Schalter kann mit dieser Methode prinzipiell für die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie an Pyrimidinonen angewendet werden.

3.3 KORREKTUR UND ANALYSE STATIONÄRER UND TRANSIENTER SPEKTREN

Die Interpretation und Analyse von stationären und zeitaufgelösten Messungen erfordern eine genaue Zuordnung von Signaturen. Dabei sind nicht alle der Probe zuzuordnen, sondern können je nach Umsetzung des Experiments auch Beiträge der Optik und des Lösungsmittels darstellen. Zudem können unterschiedliche Artefakte durch z.B. Stabilitätsbedingungen und Datenbearbeitung auftreten. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit angewendeten Methoden der Datenbehandlung und Auswertung erläutert.

3.3.0.4 Wellenlängen- und Dispersionskorrektur

Bei den stationären Messungen wurden ausschließlich kommerzielle Spektrographen verwendet, die werksmäßig wellenlängenkalibriert sind. Die Richtigkeit der gerätespezifischen Korrektur wurde durch Referenzmessung mit in der Literatur charakterisierten Chromophoren überprüft. Für die zeitaufgelösten Messungen wurden die Kalibrierung und die Korrektur auf unterschiedliche Weisen behandelt.

Da die transiente Absorption eine referenzierende Messung darstellt, ist keine spezielle Wellenlängenkorrektur nötig. Die Kalibrierung der Wellenlängachse wurde mittels eines BG36-Filters überprüft. Dieser zeigt über den gesamten UV/Vis/NIR-Bereich klar abgegrenzte Absorptionsbande. Durch Vergleich dieser mit der Referenzmessung am kommerziellen Spektrometer kann abgeschätzt werden, dass die Bandenmaxima besser als 2 nm genau bestimmt werden können. Aufgrund der Dispersion der optischen Elemente des Aufbaus hängt der experimentelle Zeitnullpunkt von der Wellenlänge ab. Der wellenlängenabhängige Zeitnullpunkt wurde durch eine Kerr-

Messung erhalten. Dabei dient die Probenküvette als Kerr-Medium und der Anregeimpuls wird zum Schalten des Probeweißlichts verwendet. Dadurch ergibt sich eine Apparatefunktion zu jeder Wellenlänge. An diese werden Gausskurven gefittet. Das Maximum gibt den Zeitnullpunkt, das zweite Moment die Zeitauflösung für jede Wellenlänge an.

Bei den zeitaufgelösten Emissionsmessungen wurde die Korrekturkurve durch Vergleich eines grauen Strahlers mit der theoretischen Strahlungsformel eines schwarzen Strahlers nach Planck bestimmt. Als grauer Strahler wurde eine Halogenlampe (Osram, Farbtemperatur 2900 K) eingesetzt. Die so erhaltene Kurve deckt sich gut mit der aus den Herstellerangaben der Optiken berechneten. Leichte nicht-systematische Abweichungen sind im UV- und NIR-Spektralbereich zu verzeichnen.¹⁰ Für die Kerr-Schalter-Messungen musste zusätzlich noch eine spektrale Korrektur aufgrund der wellenlängenabhängigen Schalteffizienz nach Gleichung 3.12 durchgeführt werden. Die transienten Spektren wurden mit dem Faktor λ^2 multipliziert, um dies zu erreichen.

3.3.0.5 Lösungsmittelkorrektur und Skalierung auf angeregte Population

Um Beiträge des Lösungsmittels von denen der Probe zu unterscheiden, wurden bei allen Messungen die reinen Lösungsmittel separat aufgenommen. Allgemein kann das korrigierte Spektrum S_c aus dem unkorrigiertem S und dem Lösungsmittelspektrum nach

$$S_c = S - S_s \frac{E}{E_s} \cdot f \quad (3.15)$$

berechnet werden [154]. Hier sind E und E_s die Anregungsenergien bei der Messung der Probe bzw. des Lösungsmittels. Im Normalfall unterscheiden sich diese in der Praxis kaum. Der Faktor f gibt an, welcher Teil des Anregungslichts bei der Messung der Probe vom Lösungsmittel absorbiert wird und beträgt

$$f = \frac{1 - 10^{-OD}}{2.3OD}. \quad (3.16)$$

Bei zeitaufgelösten Messungen sind die Intensitäten in einem Bereich, in dem Mehrphotonenabsorption eine Rolle spielen kann [154]. Lösungsmittel können dadurch starke Signalbeiträge zeigen. Langlebige (länger als die Dauer der Apparatefunktion) Signale¹¹ durch Zweiphotonenabsorption des Anregungslichts können transiente Spektren überlagern [155] und, speziell in dieser Arbeit, die Signalhöhe von Offset-

¹⁰ Dies könnte durch das Einbeziehen der Emissivität der Glühwendel korrigiert werden. Nachdem das genaue Material nicht bekannt ist und nicht zu allen Materialien verlässliche Daten vorliegen, sollte bei Bedarf in diesem Bereich ein Vergleich mit einem Fluorophor vorgezogen werden.

¹¹ Um den Zeitnullpunkt sind Signalbeiträge durch die Absorption eines Anrege- und eines Abfrageimpulses möglich [154].

spektren verfälschen. Um dem Rechnung zu tragen, ist in Formel 3.15 die Ersetzung $f \mapsto f^2$ vorzunehmen. Diese Korrektur bezieht sich explizit auf späte Verzögerungszeiten.

3.3.0.6 Datenanalyse

Zeitaufgelöste Messungen wurden im Rahmen einer globalen Datenanalyse ausgewertet. Die Änderung spektraler Signaturen wird durch ein kinetisches Modell der Form

$$S(t_d, \lambda) = IRF(t_d) \otimes \sum_{k=1}^K DAS_k(\lambda) \cdot \exp\left(-\frac{t_d}{\tau_k}\right) \quad (3.17)$$

modelliert [156, 157]. Es wird hier angenommen, dass die Kinetik Elementarprozessen 1. Ordnung folgt [157]¹². Dabei ist das Signal S zur Verzögerungszeit t_d durch die Faltung der Apparatefunktion IRF und der Summe von K exponentiellen Zerfällen gegeben. DAS_k ist das Amplitudenspektrum (DAS, engl. *decay associated spectrum*) für die Zerfallszeit τ_k . Unter der Annahme, dass die Apparatefunktion gaußförmig, d.h. proportional zu $\exp\left(-\frac{t^2}{2\sigma^2}\right)$ ist, kann diese Faltung analytisch angegeben werden:

$$S(t_d) = \sum_{k=1}^K DAS_k(\lambda) \cdot \exp\left(\left(\frac{\sigma}{2\tau_k}\right)^2 - \frac{t_d}{\tau_k}\right) \cdot \operatorname{erfc}\left(\frac{\sigma}{2\tau_k} - \frac{t_d}{\sigma}\right) \quad (3.18)$$

Zum Anpassen dieser Gleichung an Datensätze wurde das am Institut für BioMolekulare Optik (Ludwig-Maximilians-Universität München) entwickelte, auf IDL basierende Programmpaket Z2o benutzt. Es ermittelt über die Methode der kleinsten Quadrate die Parameter $\{DAS_k, \tau_k\}$. Dabei wird abwechselnd die DAS über lineare Regression und die Zerfallszeiten mittels eines Levenberg-Marquardt-Algorithmus genähert. Der Parameter σ der Apparatefunktion beschreibt die ansteigende Flanke der Signale und wurde festgehalten. Der Offset DAS_K zur spätesten Verzögerungszeit ($t_d^{max} \sim 3.3$ ns) wird durch Festhalten einer Zeitkonstante $\tau_K \gg t_d^{max}$ bestimmt. Breiten von Kurven, und hier im Speziellen die zeitliche Dauer von Impulsen werden oft als Halbwertsbreiten (FWHM, engl. *full width at half maximum*) angegeben. Für gaußförmige Kurven besteht der Zusammenhang:

$$FWHM_{\text{gaussian}} = 2\sqrt{2 \ln(2)}\sigma \approx 2.355\sigma. \quad (3.19)$$

Prinzipiell ist die Datenanpassung an Erwartungsmodelle, wie Gleichung 3.17 sie darstellt, durch mehrere fundamentale Limitationen hinsichtlich der Genauigkeit der Parameterschätzung und Beliebigkeit der Anzahl der Parameter bestimmt [150]. Neben dem Erwartungsmodell ist für eine im statistischen Sinne vernünftige Parameterschätzung das Wissen über das passende Rauschmodell nötig. Die

¹² Dies ist für Prozesse im Femtosekundenbereich nicht immer gerechtfertigt.

Methode der kleinsten Quadrate, wie sie hier angewendet wird, ist nur für gleichbleibendes Rauschen mit gaussförmiger Wahrscheinlichkeitsverteilung um den Mittelwert, wie er durch das Erwartungsmodell beschrieben ist, anwendbar. Dies trifft auf transiente Absorptionsmessungen zu, jedoch weicht das Rauschmodell für die Emissionsmessungen (Schmierbild-Kamera) davon ab. Der Grund liegt in der Poissonstatistik, die der Einzelphotonzählung zugrunde liegt. Die Anzahl der physikalisch sinnvollen Parameter kann über mehrere Methoden abgeschätzt werden. Grundsätzlich ist die Abweichung des Erwartungsmodells zu den Daten für eine höhere Anzahl an Parametern geringer. Dagegen verschlechtert sich so die Präzision der einzelnen Parameter [150, 157]. In der Praxis wird versucht, spektral und zeitlich eingeschränkte transiente Spektren anzupassen. Die so ermittelten Parameter können dann für die Anpassung weiterer Parameter in einem größeren zeitlichen und spektralen Bereich festgehalten werden. Dieses Vorgehen kann helfen, während der numerischen Optimierung das globale Minimum der Anpassung zu finden.

3.3.0.7 Effekte polarisationssensitiver Detektion

Der Winkel θ zwischen dem Übergangsdipolmoment eines Moleküls und dem elektrischen Feldvektor des Anregungslichts bestimmt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Molekül angeregt wird [103, 102] (siehe Abbildung 3.12). Diese photoselektive Anregung kann sich in einer polarisationssensitiven Detektion widerspiegeln.

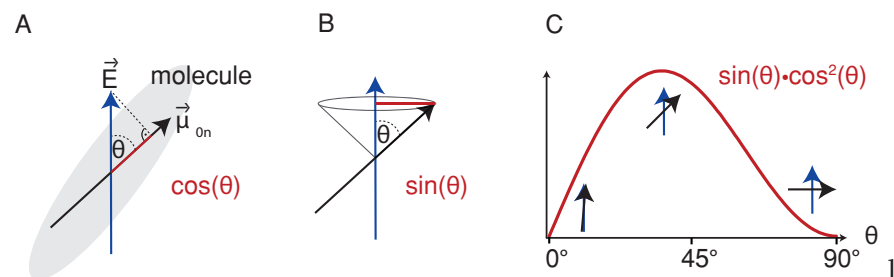


Abbildung 3.12: Photoselektivität bei Anregung von Molekülen: (A) Der Winkel θ zwischen dem Feldvektor des Anregungslichts und dem Übergangsdipolmoment des Moleküls bestimmt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Photon absorbiert wird. (B) In Lösung ist die Orientierung und damit die Richtung des Übergangsdipolmoments der gelösten Moleküle gleichverteilt. Die Wahrscheinlichkeit einer Orientierung ist gleich dem Sinus des Winkels θ . (C) Die Wahrscheinlichkeit einer Photoanregung ist demnach gleich $\sin(\theta) \cos(\theta)^2$. Die Wahrscheinlichkeit für Absorption eines Photons ist proportional zur Intensität. Diese ist das Quadrat des elektrischen Felds, weshalb der Kosinusterm quadratisch eingeht. (author?) [100]

Unter der Annahme, dass die Moleküle nicht beweglich sind, ist das Signal $S_{\perp}$ für die polarisationssensitive Detektion senkrecht zur Polarisation des Anregungslichts dreimal höher als das Signal parallel dazu $S_{\parallel}$. Dies wird über die Anisotropie

$$r = \frac{S_{\parallel} - S_{\perp}}{S_{\parallel} + 2S_{\perp}} = \frac{3 \langle \cos^2(\theta) \rangle - 1}{5} \quad (3.20)$$

quantifiziert [103]. Der Faktor zwei im Divisor berücksichtigt, dass zwei kartesische Koordinaten senkrecht zur Achse der Anregung liegen. In Lösung sind Moleküle beweglich und reorientieren sich aufgrund der Rotationdiffusion. Dies manifestiert sich in einer zeitlichen Abhängigkeit der Anisotropie. Die durch die Photoselektivität anfängliche anisotrope Verteilung angeregter Moleküle entwickelt sich in einer charakteristischen Zeit τ_{rot} zu einer isotropen Verteilung. Die Änderung der Anisotropie von ihrem anfänglichen Wert r_0 zu Null kann durch einen exponentiellen Zerfall $r(t) = r_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{rot}}}\right)$ angenähert werden. Die Zeitkonstante τ_{rot} kann über die Debye-Einstein-Relation [158, 103] abgeschätzt werden:

$$\tau_{\text{rot}} = \frac{V\eta}{k_{\text{B}}T}. \quad (3.21)$$

Hier ist V das hydrodynamische Volumen des Moleküls und η die Viskosität des Lösungsmittels. Diese Zeitkonstante kann bei zeitaufgelösten Messungen in spektralen Änderungen sichtbar sein und Informationen über das Lösungsmittel oder das Molekül liefern [103, 159]. Für Untersuchungen zur Kinetik von photoangeregten Systemen kann es wünschenswert sein, bei der Messung nicht sensitiv für diese Dynamik zu sein. Dies kann erreicht werden, wenn die Polarisationsrichtung der Detektion in einem Winkel von

$$\alpha_{\text{magic}} = \arccos\left(\sqrt{\frac{1}{3}}\right) \approx 54.74^\circ \quad (3.22)$$

zur Polarisationsrichtung des Anregungslichts eingestellt wird [103]. Unter diesem sogenannten *“magischen Winkel”* wird der Einfluss der Anisotropie auf transiente Spektren unterdrückt. In dieser Arbeit wurden transienten Absorptionsmessungen im UV/Vis unter dem magischen Winkel gemessen. Transiente Absorption im IR wurde simultan mit senkrechter und paralleler Detektion gemessen. Aus den zwei Datensätzen wurde dann ein auf Anisotropie nicht-sensitiver Datensatz berechnet [33]. Der Einfluss der Anisotropie auf die Messungen an den Fluoreszenzaufbauten und damit verbundene systematische Fehler in den Parametern der Datenanpassung werden im Folgenden behandelt.

Die Messungen mit der Schmierbild-Kamera wurden, abgesehen von einer leichten Polarisation durch das Spektrometer Gitter, nicht

polarisationssensitiv durchgeführt. Die detektierte Fluoreszenzintensität beträgt nach Gleichung 3.20

$$\begin{aligned} S_{\text{det}}(t) &= S_{\perp}(t) + S_{\parallel}(t) = \frac{1}{3}I(t) [2 + r(t)] \\ &= \frac{2}{3}I_0 \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{fl}}}\right) + \frac{1}{5} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{fl}} + \tau_{\text{rot}}}\right) \right], \quad (3.23) \end{aligned}$$

unter der Annahme eines monoexponentiellen Zerfalls der Anisotropie und der Fluoreszenz ($I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{fl}}}\right)$). Dies bedeutet, dass unabhängig von τ_{rot} die Amplitude um $\frac{1}{5}$ (20%) überschätzt wird. Ist τ_{rot} vergleichbar mit der Fluoreszenz-Zerfallszeit, dann wird diese aus diesem Grund mit einem relativen Fehler von $\lesssim 0.1$ (10%) unterschätzt [26]. Für das in dieser Arbeit untersuchte 64ac (siehe Kapitel 4) werden zwei Zerfallszeiten beobachtet und das Amplitudenverhältnis bestimmt. Die Amplituden weisen einen relativen Fehler von $\lesssim 0.1$ (10%) auf [26].

Prinzipiell kann bei beiden Techniken, der Schmierbild-Kamera und dem Kerr-Schalter, die Detektion unter dem magischen Winkel erfolgen. Für die Schmierbild-Kamera muss hierfür ein zusätzlicher Polarisator eingesetzt werden. Anders als bei den transienten Absorptionaufbauten arbeiten die hier besprochenen Emissionsaufbauten unter einer höheren numerischen Apertur ($NA = 0.5$) der Detektion. Der Einfluss der numerischen Apertur der Anregung und Detektion sind in den theoretischen Arbeiten von Fisz *et al.* [160, 161, 162, 163] behandelt. Gemäß dieser Arbeiten sind keine signifikanten Effekte innerhalb der Fehlergrenzen der hier gemachten Messungen zu erwarten.

Teil II

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Dewar Valenzisomerisierung der P(6-4)P-Schäden ist auf den Pyrimidinonrest begrenzt. Es ist daher von Interesse, dieses chemische Motiv als Modell für diesen Vorgang zu untersuchen. In diesem Kapitel werden Messungen zu dem Molekül 1-Methyl-2(1*H*)-pyrimidinon (1MP) und einem T(6-4)T-Dinukleotid gegenübergestellt. Das letztere Modellsystem besteht aus einem T(6-4)T-Schaden, dessen Phosphodiester zwischen den Desoxyribosen durch ein Formacetal als Bindeglied (64ac) ersetzt ist.

1MP stellt das Minimalmodell des Chromophors von 64ac (und von P(6-4)P-Schäden) dar. Das 2(1*H*)-Pyrimidinon ist in P(6-4)P-Photoschäden über das N1-Atom mit der Deoxy-Ribose des Rückgrats verbunden. In 1MP ist dies durch eine Methyl-Gruppe modelliert. Diese hat zudem die Funktion eine Enol/Keto-Tautomerisierung zu unterbinden.

Die photophysikalischen Eigenschaften von 1MP spiegeln sich in der Photokinetik von 64ac wider. Dabei zeigen sich aber Unterschiede in den Deaktivierungskanälen des angeregten Zustands. Es gibt zudem Anzeichen, dass unterschiedliche Konformere von 64ac mit unterschiedlicher Reaktivität existieren.

4.1 PHOTOCHEMIE

4.1.1 Dewar Valenzisomerisierung von 64ac

Die Valenzisomerisierung von P(6-4)P-Photoschäden hin zur Dewar-Struktur ist in der Literatur mit einer chemischen Quantenausbeute in Wasser von $RQY \sim 0.02$ (2%) bei einer Proben temperatur von $T = 288$ K und UV-Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 313$ nm angegeben [8]. Die Absorptionsbande bei 1781 cm^{-1} kann der Carbonyl-Streckschwingung des Dewar-Isomers zugeordnet werden [19]. Sie kann, da sie spektral kaum mit der Absorption von 64ac überlagert, als "Markerbande" für die Isomerisierung herangezogen werden [25]. Für 64ac wurde in einer stationären IR-Messung über die Zunahme der Markerbande eine chemische Quantenausbeute von $RQY_{64ac} = 0.08 \pm 0.02$ ($8 \pm 2\%$) bestimmt (in deuteriertem Wasser und $T \approx 296$ K, $\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm) [25]. Das Differenzspektrum im Bereich der Carbonyl-Streckschwingungen zeigt neben der Markerbande eine der Signalstärke nach gleichgroße Ausbleich-Signatur um 1650 cm^{-1} (siehe Abbildung 4.1, links). Gestützt wird die Zuordnung durch die Identifizierung des Dewar-Isomers über HPLC-Aufreinigung.

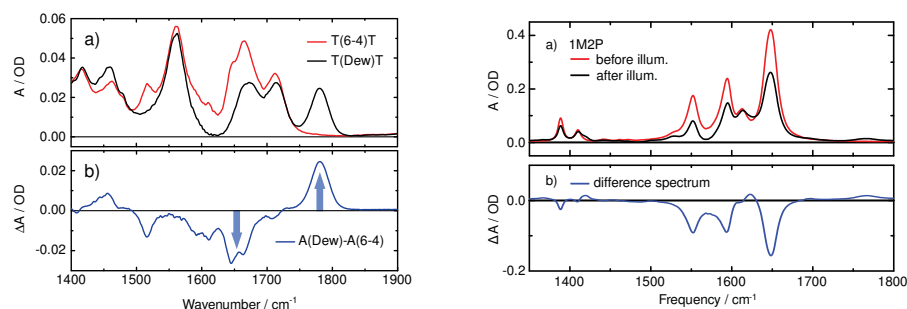


Abbildung 4.1: IR-Spektren von 64ac (links, a) und 1MP (rechts, a) in deuteriertem Wasser vor und nach vollständiger Umbelichtung. Die daraus berechneten Differenzspektren sind in (b) gezeigt. Abbildungen aus Referenz [33] übernommen.

Über den molaren Absorptionskoeffizienten dieser Bande ($\sim 333 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) wurde ein Wert von $\text{RQY}_{64ac} = 0.05 - 0.09$ (5 – 9%) aus zeitaufgelösten IR-Messungen berechnet, der innerhalb der Messgenauigkeiten mit der stationären Messung übereinstimmt. Dieser Wert stellt sich innerhalb einiger 100 ps mit dem Zerfall des strahlenden Singulett ein und bleibt für Verzögerungszeiten bis in den Mikrosekundenbereich nach Photoanregung konstant [25, 164].

Fehlt der Formacetal-Linker im 64ac-Modellsystem, zeigt sich keine Fraktion des Dewar-Valenz-Isomers mittels HPLC-Trennung [25]. Dieser experimentelle Befund deutet auf die Rolle des “intakten” Rückgrats für die Isomerisierung hin. Die Fluoreszenzquantenausbeute für das T(6-4)T-Dinukleotid beträgt 0.03 (3%). Entfernt man das komplette Zucker-Phosphat-Motiv, erhöht sie sich um einen Faktor 7 [165]. Diese Befunde sprechen für eine starke Kontrolle der Deaktivierungspfade aus dem Singulett-Zustand durch das Rückgrat.

4.1.2 Photochemie von 1MP

Die Umbelichtung von 1MP in deuteriertem Wasser wurde mittels einer stationären IR-Messung bei Raumtemperatur¹ charakterisiert. Die Anregungswellenlänge lag bei 266 nm. Die Differenz der Spektren vor und nach der Umbelichtung (Abbildung 4.1, rechts) zeigt fast ausschließlich negative mit den Carbonyl-Streckschwingungen assoziierte Banden. Für die chemische Quantenausbeute (RQY) wurde deshalb die Abnahme der Bande bei 1647 cm^{-1} protokolliert. Das obere Limit für die RQY beträgt ~ 0.005 (0.5%) [27] — eine Überlagerung mit dem Produktspektrum ist an dieser Stelle, ohne Kenntnis des Produkts, nicht ausgeschlossen. Dasselbe Experiment im UV-Spektralbereich ergibt einen Wert von 0.003 (0.3%) für die Abnahme der Absorption bei 302 nm. Das Produkt zeigt in diesem Bereich kei-

¹ Die Temperatur wurde nicht protokolliert. Es kann angenommen werden, dass sie vergleichbar mit der bei der Umbelichtung von 64ac war (296 K).

nen Beitrag und zeichnet sich durch einen strukturlosen Anstieg zu kürzeren Wellenlängen aus [33].

Der Literatur nach (vergleiche Kapitel 2, Abbildung 2.7) zeigen Pyrimidinone unterschiedliche photochemische Reaktionen. Eine Ringöffnung Norrish Typ I muss ausgeschlossen werden. Isocyanate reagieren mit Alkoholen auf der Zeitskala von Sekunden, wohingegen sie stabil in Dioxanen sind. Umbelichtung von 1MP in Methanol und 1,4-Dioxan zeigen die gleichen spektralen Änderungen. Für 1MP in Wasser und Standardbedingungen² ist eine Ringöffnung daher unwahrscheinlich. Eine weitere Ausführung ist in Abschnitt 6.2 zu finden.

Aus den IR-Spektrum nach Umbelichtung (Abbildung 4.1, rechts) ist eine isolierte Bande um 1780 cm^{-1} zu erkennen³. Dies könnte in Analogie zur Photochemie von 64ac für die Bildung des Dewar Valenzisomers sprechen. Eine Analyse mittels HPLC konnte dies jedoch nicht bestätigen. Eine Abschätzung der chemischen Quantenausbeute bezüglich dieser Bande ergab ein oberes Limit von 0.001 (0.1%) [33], also geringer als die über die Abnahme des Edukts ermittelte Ausbeute.

Der Literatur nach sind Dewar Valenzisomere photochemisch darstellbar, können aber weiterreagieren [86, 87]. Die experimentellen Befunde lassen daher die Hypothese zu, dass, falls ein Dewar Valenzisomer gebildet wird, dies nicht der einzige reaktive Kanal ist und / oder eventuelle sekundäre Reaktionen diese Spezies entvölkern könnten. Letztendlich weist die im Vergleich zu T(6-4)T und 64ac um 1 – 2 Größenordnungen geringere chemische Quantenausbeute auf eine höhere Photostabilität vom freien Pyrimidinon-Chromophor hin.

4.2 PHOTOPHYSIKALISCHE PROZESSE

4.2.1 1MP als Chromophor von P(6-4)P

Die stationären Spektren von 1MP in Wasser und 64ac in deuteriertem Wasser (Abbildung 4.2) wurden unter Standardbedingungen aufgenommen. Die Absorption zeigt neben einer starken Absorption um 220 nm eine niederenergetische bei 303 nm, bzw. 323 nm. Der molare Absorptionskoeffizient der niederenergetischen 300 nm-Bande beträgt $\sim 5000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($\sim 4000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für 64ac) und ist somit spektral und der Oszillatorstärke nach in einem Bereich, welcher mit $\pi\pi^*$ -Übergängen konjugierter Systeme dieser Größe vereinbar ist [2, 29].

² ATPS-Bedingung: Raumtemperatur und tatsächlicher Luftdruck

³ Hinweis auf eine Bande bei 1785 cm^{-1} wurde auch bei einer Umbelichtung in Acetonitril festgestellt. Die Messung war ein Versuch, das neu erhaltene IR-Spektrometer (Alpha von BRUKER) für die Charakterisierung einzusetzen.

Gestützt wird diese Zuordnung durch quantenmechanische Berechnung der vertikalen Anregungsenergien von 1MP [166].⁴

Eine viel schwächere Bande der 1MP-Absorption ($\mathcal{O}$ (1%) der 300 nm-Bande) ist als Schulter um 350 nm erkennbar (Abbildung 4.2, Inset) und könnte auf einen schwach erlaubten $n\pi^*$ -Übergang hinweisen. Eine weitere Möglichkeit ist eine Verunreinigung; das ^1H -NMR-Spektrum des Herstellers zeigt eine Signatur bei ~ 2.8 ppm, welche sich nicht zuordnen lässt.

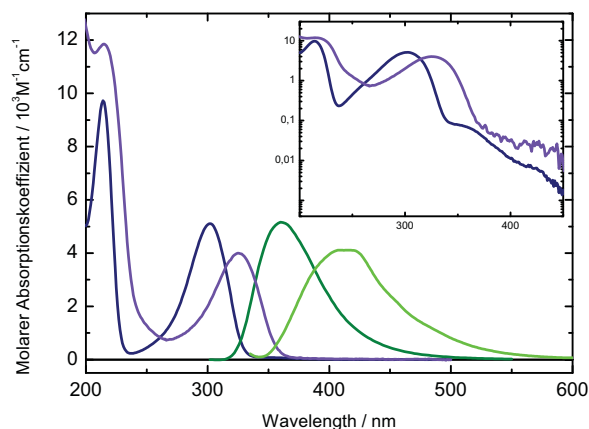


Abbildung 4.2: Stationäre Spektren von 1MP in Wasser (Absorption als dunkelblaue Linie, Emission dunkelgrün) und 64ac in deuteriertem Wasser (Absorption als lila Linie, Emission hellgrün). Im Inset sind die Absorptionsspektren auf einer logarithmischen Skala aufgetragen, um schwache Signaturen deutlicher hervorzuheben.

Deshalb wurde die Löslichkeit von 1MP in Acetonitril ausgenutzt, um den Anteil der vermuteten Verunreinigung zu beeinflussen. Es wurde 1MP in einer Menge höher als seine Löslichkeit zu Acetonitril gegeben und die Lösung "L" von dem nicht-gelösten Rest "R" getrennt. Nach Trocknung beider Teile und dem anschließenden Auflösen in Wasser wurden Absorptionsspektren aufgenommen. Die Höhe der 350 nm-Bande war im Vergleich zu der restlichen Absorption für den Anteil "R" erhöht und für den Anteil "L" erniedrigt. Eine zeitaufgelöste Emissionsmessung beider Anteile zeigte zudem eine Erhöhung eines ~ 5 ns-Zerfalls für den Anteil "R" und eine Verminderung für den Anteil "L". In Umbelichtungsexperimenten bleibt die Bande unbeeinflusst. Damit ist der Absorptionsbeitrag bei ~ 350 nm einer Verunreinigung zuzusprechen.

Die optische Dichte der 64ac Messung war geringer ($\sim 4000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 0.2 \text{ mm} \cdot 3.2 \text{ mM} \approx 0.3$), weshalb das Signal nur mit einer kleineren

⁴ Quantenchemischen Berechnungen zu 5-Methyl-2(1H)-pyrimidinone zeigen, dass der Grundzustand des Heterocyclus planar ist, und der $\pi\pi^*$ -Zustand gegenüber anderen die höchste Oszillatorstärke besitzt [167].

Dynamik von $\mathcal{O}(10^2)$ gemessen wurde (siehe Abbildung 4.2, Inset). Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich im langwelligen Flügel der niederenergetischen $\pi\pi^*$ -Bande schwach erlaubte Übergänge befinden.

Die Emission bei Anregung in die niederenergetischste Bande (300 nm) von 1MP besitzt in etwa die gleiche spektrale Breite von $\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ wie die Absorptionsbande und ihr Maximum liegt bei $\sim 360\text{ nm}$, was einer Stokes-Verschiebung von $\sim 5300\text{ cm}^{-1}$ entspricht. Unter Anwendung der Strickler-Berg-Relation [35] kann die strahlende Ratenkonstante berechnet werden. Sie liegt mit $\sim 0.07\text{ ns}^{-1}$ in der Größenordnung wie die für viele Fluorophore dieser Größe abgeschätzten strahlenden Ratenkonstante von $\mathcal{O}(10^8\text{ s}^{-1})$ (author?) [35, 103]. Die tatsächliche Lebensdauer kann unter Hinzunahme der Fluoreszenzquantenausbeute abgeschätzt werden. Diese wurde unabhängig im Vergleich zu zwei Chromophoren (PPO bzw. 1-NPO in Cyclohexan) bestimmt und beträgt 0.04 (4%). Die zu erwartende Zerfallszeit des strahlenden Zustands ist somit $\sim 0.6\text{ ns}$. Ähnliches gilt für 64ac. Die Stokes-Verschiebung von 6570 cm^{-1} errechnet sich aus dem Maximum der Emission bei 410 nm [33]. Diese Werte unterscheiden sich zu dem in [26] veröffentlichten Emissionsspektrum ($\lambda_{\text{fl,max}} \approx 400\text{ nm}$ und $\Delta\tilde{\nu}_{\text{Stokes}} \approx 5770\text{ cm}^{-1}$). Die gemessene Fluoreszenzquantenausbeute beträgt 0.007 (0.7%) (Referenzfarbstoff Coumarin 120 in Ethanol [168]). Eine Auswertung nach Stickler und Berg ergibt eine strahlende Ratenkonstante von 0.04 ns^{-1} und damit eine zu erwartende Fluoreszenzlebensdauer von $\sim 0.2\text{ ns}$.

Die, abgesehen von der spektralen Verschiebung (siehe weiter unten), ähnliche spektrale Form der UV/Vis-Spektren von 1MP und 64ac deutet auf einen schwachen Einfluss des Formacetal-Rückgrats und/oder des 5'-endigen Pyrimidin von 64ac auf die Grundzustandsspektren hin. Auffällig ist aber eine spektrale Verschiebung zwischen den Spektren von beiden Modellsystemen. Die Absorption von 1MP ist gegenüber von 64ac um $\sim 2050\text{ cm}^{-1}$, die Emission um 3400 cm^{-1} zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben. Dieses Verhalten kann auf die 5-Methylierung des Pyrimidinon zurückgeführt werden. In der Tat ist 1MP eher als Chromophor für den T(6-4)C Schaden anzusehen, dessen Absorptions- und Fluoreszenzmaximum niedriger als für T(6-4)T liegt [8, 165].

Der signifikante Unterschied der Fluoreszenzquantenausbeuten zwischen beiden Modellsystemen ist im Einklang mit der Literatur. Eine umfangreiche Studie [165] zu Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von P(6-4)P Modellmolekülen berichtet über einen starken Einfluss des Phosphat-Rückgrats und von C5-Substituenten am Pyrimidinon-Motiv. Weiter wurde auf die verminderte Fluoreszenzquantenausbeute von dehydrierten und desaminierten Pyrimidin-Motiven hingewiesen [169]. Wechselwirkungen zwischen diesen und dem

N₃ (bzw. O₇) des Pyrimidinon sind von ihrer Distanz her denkbar [170] und könnten dabei eine Rolle spielen.

Es ist anzumerken, dass die Stokes-Verschiebung und die Fluoreszenzquantenausbeute von 64ac eher mit den Werten von T(6-4)C (TpdC in Referenz [165]) als denen von T(6-4)T (TpT in Referenz [165]) übereinstimmen. Dagegen stimmen die von 1MP eher mit denen vom T(6-4)T-Schaden überein. In diesem Zusammenhang könnte auch die höhere chemischen Quantenausbeuten von 64ac im Vergleich zu denen für T(6-4)P berichteten [8] von Bedeutung sein. Beide Unstimmigkeiten deuten auf eine Modifizierung der Photokinetik von P(6-4)P bei Änderung des Bindungsmotivs des Phosphat-Zucker-Rückgrats hin. Gleiches wurde schon für die photoinduzierte (primäre Photochemie) Bildung von 64ac berichtet. Der (6-4)-Schaden wird in höherer Ausbeute gebildet, wenn die Phosphat-Gruppe durch ein Formacetal-Motiv ersetzt wird [171].

Die stationären Spektren lassen zusammenfassend folgenden Schluss zu: (i) Die Absorptionsspektren beider Modellsysteme haben die gleiche spektrale Form; die durch Photoanregung erreichbare Frank-Condon-Region scheint unabhängig vom chemischen Kontext, in dem sich der Chromophor befindet, zu sein. (ii) Jedoch erniedrigt eine 5-C Methylierung am Pyrimidinon-Chromophor die o-o-Übergangsenergie und erhöht die Stokes-Verschiebung. Das Substitutionsmuster des Chromophors hat einen Einfluss auf die elektronische "Energielandschaft". (iii) Der chemische Kontext, in dem sich der Chromophor befindet, hat Einfluss auf die Zerfallskinetik des angeregten Zustands. Dies könnte auch ein Hinweis auf einen Einfluss der Lösungsumgebung sein (siehe Kapitel 5).

4.2.2 Verzweigung aus dem Singulett-Zustand

Spektrale Änderungen während des Zerfalls des strahlenden Zustands wurden mittels transientser Absorption aufgenommen. Nach der Anregung von 1MP bei ~ 320 nm wurde in einem spektralen Fenster von 310 nm bis 720 nm abgefragt. Der spektrale Bereich zu längeren Wellenlängen konnte nicht abgedeckt werden, da das um Größenordnungen intensivere Licht der Fundamentalen bei 775 nm ausgefiltert werden musste. Von 650 nm zu höheren Wellenlängen sind Messartefakte⁵ zu erkennen, weshalb zur Darstellung und Auswertung dieser Bereich ebenfalls nicht mit einbezogen wurde.

Im Bereich um den Nullpunkt sind "Artefakte" zu erkennen. Sie können über die Wechselwirkung von Anrege- und Abfrageimpuls beschrieben werden [154]. Für die weitere Betrachtung wurde die-

⁵ Eine Ursache ist die Unterbrechung des Datenstroms der Diodenzeile bei Festplattenzugriffe des Messrechners. Dies wurde in neueren Messungen durch den Einsatz einer *ram disc* behoben. Weiter sind Muster ähnlich Interferenzen auf den Differenzspektren zu erkennen. Die Ursache konnte noch nicht abschließend geklärt werden.

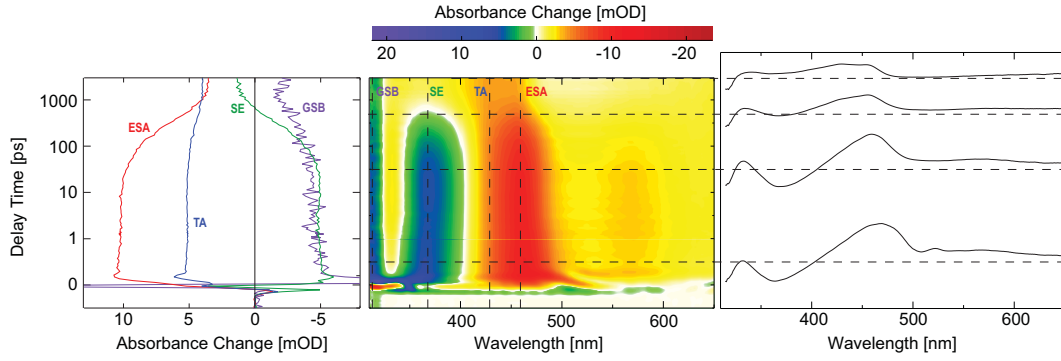


Abbildung 4.3: Femtosekunden Transiente Absorption von 1MP in Wasser. Im Konturplot (mittlere Abbildung) ist die Signalstärke zeitlich und spektral aufgelöst dargestellt. Die Farbkodierung geht von negativen Differenzabsorptionen (blau-grün) zu positiven (rot-gelb). Die Zeitverläufe bei ausgewählten Wellenlängen (linke Abbildung) können bestimmten Prozessen zugeordnet werden (siehe Erklärung im Text). Die Grundzustandserholung bei ~ 300 nm (GSB), die stimulierte Emission bei ~ 370 nm (SE) und die Absorption des angeregten Singulett-Zustands bei ~ 460 nm (ESA) sind erkennbar, das "Überlappen" mehrerer Beiträge (hier ESA und SA) wird im Verlauf um ~ 430 nm (TA) deutlich. Für definierte Verzögerungszeiten bei 0.5 ps, 30 ps, 0.5 ns und 3 ns sind transiente Spektren dargestellt (rechte Abbildung). Aus Referenz [27] entnommen.

ser Bereich ausgenommen, da die spektralen Änderungen für Zeiten $\gtrsim \mathcal{O}(1 \text{ ps})$ nicht durch das verwendete Softwarepaket angepasst werden konnten. Ab dem Zeitnullpunkt ist ein negatives Signal bei 310 nm und ~ 370 nm zu erkennen. Diese Signale werden auf einer Zeitskala von $\mathcal{O}(100 \text{ ps})$ positiver (siehe Abbildung 4.3 links, lila 1 und grün 2). Auf der gleichen Zeitskala fällt ein positiver Beitrag bei ~ 450 nm und ~ 570 nm ab. Anhand des stationären Absorptions- und Emissionsspektrums (siehe Abbildung 4.2) können diese Beiträge zugeordnet werden. Das negative Signal bei ~ 370 nm verschwindet nach einigen 100 ps und stimmt von der spektralen Position her mit dem Fluoreszenzspektrum überein. Dieser Beitrag stammt somit mit Sicherheit von stimulierter Emission. Der Fluoreszenzzerfall wurde explizit mittels Schmierbildmessungen verfolgt. Die Zeitauflösung dieser Experimente konnte spektrale Änderungen im Pikosekundenbereich nicht auflösen. Die Fluoreszenz zeigt in diesen Messungen eine spektrale Signatur, die mit $\mathcal{O}(100 \text{ ps})$ abfällt und stützt die Zuordnung in den transienten Absorptionsspektren. Die Fluoreszenzdaten finden sich in Anhang.

Der Grundzustand von 1MP hat sein Maximum bei ~ 300 nm und verschwindet für Wellenlängen $\gtrsim 350$ nm. Die positiven Beiträge > 400 nm rühren von der Absorption des angeregten Zustands her, das negative Signal am kurzwelligen Rand des Detektionsfensters ist ein

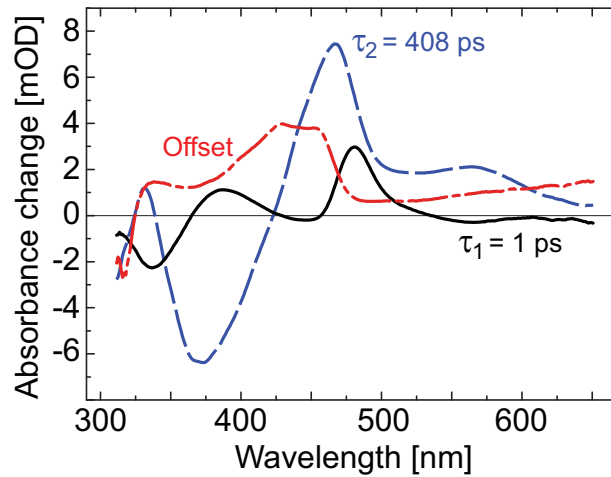


Abbildung 4.4: Zerfallsassoziierte Amplitudenspektren für 1MP in Wasser. Die Spektren sind über einen globalen Fit der Daten aus Abbildung 4.3 erhalten worden. Aus Referenz [27] entnommen.

Maß für das Ausbleichen des Grundzustandes. Das Grundzustandsausbleichen geht nach dem Zerfall des angeregten Zustands nur teilweise zurück. Zudem stellt sich für spätere Zeiten ($\gtrsim 1$ ns) ein Spektrum mit positivem Signal $\gtrsim 350$ nm ein. Dies deutet auf ein Intermediat oder Produkt, das aus dem Singulett-Zustand gebildet wird, hin. Es hat ein ausgeprägtes Maximum um ~ 430 nm und einen schwachen, schwach ansteigenden Beitrag im Bereich über 500 nm.

Neben der augenfälligen spektralen Änderung bei $\mathcal{O}(100)$ ps sind auch weniger stark ausgeprägte im Pikosekundenbereich zu erkennen. Information über die involvierten Zeitkonstanten wurde über eine globale Datenanalyse der transienten Spektren erhalten. Wegen der mit dem verwendeten Softwarepaket nicht modellierbaren Nullpunktsartefakte wurde der Datensatz ab einer Verzögerungszeit von 500 fs angepasst. Dabei waren zwei Zeitkonstanten und ein Offset nötig, um die spektralen Änderungen vollständig zu beschreiben.⁶ Die erhaltenen Zeitkonstanten ($\tau_1 = 1.1$ ps und $\tau_2 = 440$ ps) passen gut zu den qualitativen Beobachtungen und liefern neben dem Offsetspektrum ΔA_{offset} , welches (nahezu) identisch mit dem Spektrum für späte Zeiten ist, zwei Amplitudenspektren (ΔA_1 und ΔA_2 , siehe Abbildung 4.4). Diese geben die spektrale Änderungen mit den jeweiligen Zeitkonstanten an. Das Spektrum ΔA_1 , welches mit der Pikosekundenzeit assoziiert ist, zeigt ein sigmoidales Muster mit einer negativen Spitze bei ~ 340 nm und einer positiven bei ~ 380 nm. Die positive Spitze liegt spektral an der Stelle des Beitrags der stimulierten Emission im Spektrum ΔA_2 bei ~ 370 nm. Somit liegt nahe, dass ΔA_1 eine dynamischen Stokes-Verschiebung beschreibt [172, 173].

⁶ Eine SVD-Auswertung stützt das Modell.

4.2.2.1 Quantifizierung der Grundzustandserholung

Die bisherige Analyse der zeitaufgelösten Absorptionsmessung zeigt eine Verzweigung aus dem angeregten Singulett-Zustand. Dabei erholt sich der Grundzustand zum Teil. Das Grundzustandsspektrum von 1MP ist im Amplitudenspektrum ΔA_{offset} enthalten und überlagert sich mit dem Spektrum der Spezies, welches zu späteren Verzögerungszeiten vorliegt. Das Verhältnis von der Signalstärke um $\sim 300\text{ nm}$ zu der um $\sim 430\text{ nm}$ kann zum Abschätzen des Verzweigungsverhältnisses herangezogen werden. Dies ist aber nur unter bestimmten Annahmen möglich: (i) Im Spektralbereich um $\sim 300\text{ nm}$ trägt nur das Grundzustandsausbleichen bei. (ii) Der molare Absorptionskoeffizient des Intermediats (mit der Bande um $\sim 430\text{ nm}$) ist vergleichbar mit dem des Grundzustands. Aus Abbildung 4.4 kann so ein Verzweigungsverhältnis in der Größenordnung von 0.5 ϕ (50%) abgelesen werden. Dies bedeutet, dass die Hälfte der anfänglich angeregten Moleküle über IC in den Grundzustand zurückgeht. Selbst wenn die Annahmen stimmen, ist eine quantitative Aussage problematisch, da die Absorptionsbande des Grundzustands am Rand des Detektionsfensters liegt. Zudem ist in diesem Spektralbereich nur eine geringe Intensität des Abfragelichts vorhanden, was ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis bedingt.

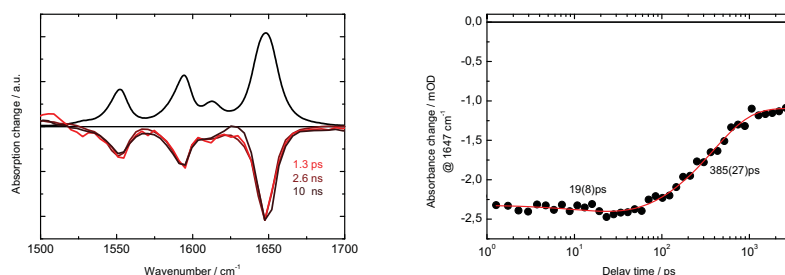


Abbildung 4.5: Femtosekundenzeitaufgelöste IR-Absorption des Grundzustandsausbleichens von 1MP. Von 1 ps bis zu Verzögerungszeiten von einigen Nanosekunden stimmen die transienten Spektren mit dem stationären Spektrum überein (links; die Spektren wurden normiert). Die Bande bei 1647 cm^{-1} zeigt eine leichte Änderung auf der ps-Zeitskala und einen Anstieg um ungefähr die Hälfte mit dem Zerfall des angeregten Singulett-Zustands. Zeitkonstanten der einkanaligen Anpassungen (rote Linie) sind in der Abbildung mit angegeben. Die Werte in den Klammern geben die Unsicherheit der Anpassung an. Abbildungen aus [27, 33] entnommen.

Zur Bestimmung des in den Grundzustand zurückgehenden Anteils wurde deshalb eine transiente Messung im IR-Spektralbereich durchgeführt. Es wurde die zeitliche Entwicklung der Carbonyl-Steckschwingung bei 1647 cm^{-1} spektral verfolgt. Das Ausbleichen dieser Bande entspricht von Position und Stärke her dem Grundzustandss-

pektrum (siehe Inset der Abbildung 4.2) und ändert sich spektral nicht über das Messzeitfenster. Aus dem Verhältnis des Ausbleichens nach dem Abbau des angeregten Singulett-Zustands (~ -1.15 mOD) und des anfänglichen Ausbleichens (~ -2.35 mOD) kann eine Grundzustandserholung in Höhe von ~ 0.49 (49%) bestimmt werden. Dieser Wert stimmt gut mit dem aus der UV/Vis-Messung (Abbildung 4.4) abgeschätzten Größenordnung überein.

4.2.2.2 Charakterisierung des Intermediats

Die zeitaufgelösten Messungen zeigen die Bevölkerung eines Intermediats zu einem Anteil von $\mathcal{O}(0.5)$ ($\mathcal{O}(50\%)$). Messungen der zeitlichen Änderung im Nanosekunden- bis Mikrosekundenbereich zeigen eine weitere Abnahme der Carbonyl-Streckschwingung (1647 cm^{-1}) auf der Zeitskala von einigen $\mathcal{O}(10)$ Nanosekunden. Zudem bleibt ein konstantes Grundzustandsausbleichen von ~ 0.2 ($\sim 20\%$) bis zu Verzögerungszeiten von hundert Mikrosekunden bestehen. Dies entspricht ~ 0.1 (10%) der initial angeregten Population.

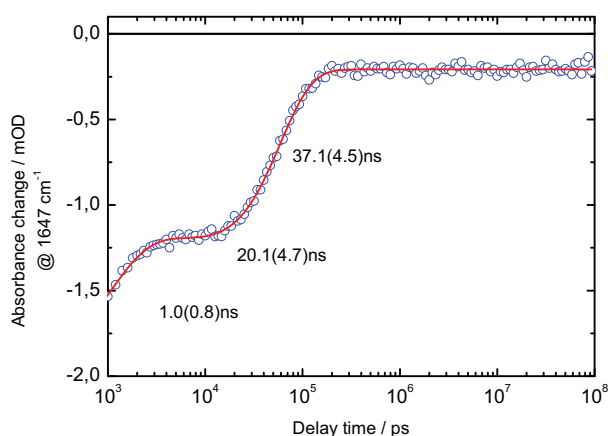


Abbildung 4.6: Zeitaufgelöste IR-Absorption von 1MP im Nanosekunden- bis Mikrosekundenbereich. Die Messung ist die Fortführung des zeitlichen Verlaufs der fs-Messung (Abbildung 4.5). Die erste Zeitkonstante ist innerhalb der Zeitauf Auflösung ($\sim 0.6\text{ ns}$) in Übereinstimmung mit dem Zerfall des angeregten Singulett-Zustands. Der Zerfall im $\mathcal{O}(10)$ -Nanosekundenbereich kann nur über zwei Zeitkonstanten modelliert werden. Dabei ist neben dem Zerfall mit $\sim 40\text{ ns}$ noch eine schwache Änderung mit $\sim 20\text{ ns}$ und ein Offset zu erkennen. Abbildungen nach Daten aus [33].

Aufgrund der kurzen Länge der π -Konjugation von 1MP und davon abgeleiteten Isomeren ist es unwahrscheinlich, dass das DAS A_{offset} eine Spezies im Grundzustand ist [29, 2]. 1MP besitzt keinen Absorptionsbeitrag für Wellenlängen $> 350\text{ nm}$, das Intermediat hingegen schon. Nachdem keine Emission festgestellt wurde, die dieser

Spezies zugeordnet werden kann, handelt es sich wahrscheinlich um einen dunklen angeregten Zustand. In DNA gibt es Hinweise auf eine schwache Bevölkerung von $n\pi^*$ -Singulett-Zuständen, die auf einer Zeitskala von $\sim 10 - 100$ ps zerfallen [6]. Die hier beobachtete Spezies ist um Größenordnungen langlebiger. Dies deutet eher auf eine Triplett-Spezies hin. Aufgrund der hohen Konzentration von 1MP (~ 64 mM) tritt Selbstlöschung auf, was die hier beobachtete, für einen Triplett-Zustand untypische [29, 2], Zerfallszeit von $\mathcal{O}(10$ ns) bedingt. In Abschnitt 6.1 wird die Selbstlöschung näher charakterisiert.

Die Zuordnung des DAS A_{offset} zum 1MP-Triplett ist aus folgenden weiteren Gründen plausibel: (i) In einem ESR-Experiment wurde das Intermediat von 1,4,6-Trimethyl-2(1H)-pyrimidinon (146TMP) nach Photoanregung als Triplettzustand interpretiert [174]. Es muss angemerkt werden, dass die Autoren die ~ 300 nm-Bande dem $^1n\pi^*$ -Zustand zuschreiben und in Folge den Triplett dem $^3\pi\pi^*$ [174], abweichend von der hier für 1MP vorgenommenen Zuordnung der Interkombination (ISC, engl. *intersystem crossing*) als $^1\pi\pi^* \rightarrow ^3n\pi^*$ -Übergang. (ii) In einer neueren Studie zu zuckersubstituiertem 2(1H)-Pyrimidinon wurde der Triplett charakterisiert [85]. Die spektrale Signatur bei ~ 400 nm stimmt sehr gut mit dem in dieser Arbeit erhaltenen Offsetspektrum überein. (iii) Die Untersuchung zu 64ac (siehe weiter unten) zeigt ein von der Form und spektralen Lage her ähnliches Offsetspektrum. Die Bande bei ~ 430 nm und der nahezu flache Beitrag über den sichtbaren Spektralbereich sind vorhanden. Die mit dieser Bande verbundene Kinetik konnte einem Triplett zugeordnet werden [26].

4.2.3 Temperaturabhängigkeit

Die aus den stationären Spektren abgeschätzte Fluoreszenzlebensdauer und die aus der transienten Messung bestimmte Zerfallszeit der stimulierten Emission ist ungefähr drei Größenordnungen größer [27] als die von den kanonischen Pyrimidin-Basen [6, 38]. Für Letztere ist bekannt, dass die Deaktivierung des primär angeregten Zustands nicht durch eine Aktivierungsbarriere bestimmt ist und innerhalb ca. einer Pikosekunde abgeschlossen ist (siehe Kapitel 2.1.1). 1MP, das von Thymin, bzw. Cytosin abgeleitet ist, zeigt dieses Verhalten nicht; der angeregte Zustand ist langlebiger. Über temperaturabhängige Messungen wurde die vermutete Aktivierungsbarriere vermessen (siehe Abbildung 4.7).

In einem Temperaturbereich von 278 K bis 360 K wurden Fluoreszenzspektren bei sonst gleichen Bedingungen aufgenommen. Die Absorption war unabhängig von der Temperatur. Die spektralen Integrale der Emissionsdaten wurden auf eine Fluoreszenzquantenausbeute von 0.04 bei einer Raumtemperatur von 296 K geeicht. Spektral breit-

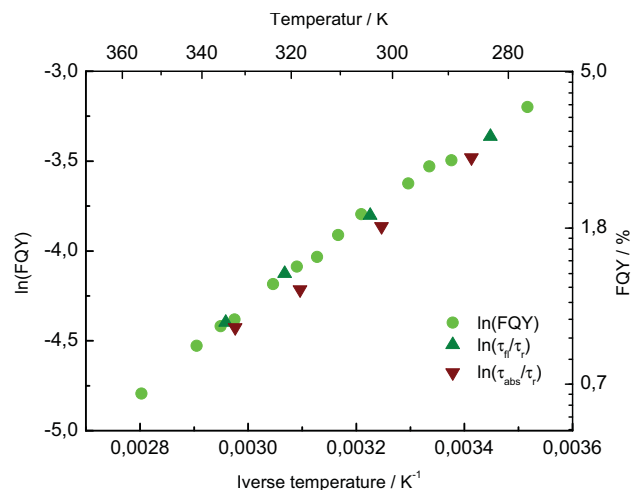


Abbildung 4.7: Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute von 1MP: Logarithmus der Fluoreszenzquantenausbeuten (grüne Punkte) gegen die inverse Temperatur. Logarithmus der angepassten Zeitkonstanten für zeitaufgelöste Fluoreszenz- (τ_f , dunkelgrüne Dreiecke) und transiente Absorptionsmessungen (τ_{abs} , dunkelrote Dreiecke). Die Fluoreszenzquantenausbeuten aus den Anpassungen wurde gemäß $FQY = \frac{\tau_{f,abs}}{\tau_r}$ mit $\tau_r = (0,07 \cdot 10^9)^{-1}$ s bestimmt.

bandige zeitaufgelöste Absorptions- und Emissionsmessungen wurden in einem Bereich von 291 K bis 338 K durchgeführt und mittels globaler Datenanalyse ausgewertet. Die so ermittelten Zeitkonstanten auf der 100 ps-Zeitskala wurden mit der strahlenden Rate von $\frac{1}{\tau_r} = 0,07 \text{ ns}^{-1}$ multipliziert. Dieses Produkt ist die aus den Zerfallszeiten abgeschätzte Fluoreszenzquantenausbeute und stimmt gut mit den aus den stationären Messungen ermittelten Werten überein. Die Werte aus den zeitaufgelösten Emissionsmessungen sind innerhalb der statistischen Schwankungen gleich mit denen aus den stationären Messungen. Die aus der transienten Absorption abgeleiteten Quantenausbeuten weichen in systematischer Weise zu kleineren Werten mit einem relativen Fehler kleiner 0,1 (10%) ab.

Neben der beschleunigten Entleerung des angeregten Singulett-Zustands mit steigender Temperatur ist eine Abnahme des Offsetspektrums in der transienten Absorption erkennbar. Dies ist in Abbildung 4.8 (links) für Messungen an einer Probe mit einer Konzentration von $\sim 8 \text{ mM}$ dargestellt. Die Temperaturabhängigkeit ist 2 ns nach der Photoanregung im Bereich von 285 K bis 345 K in einem Messdurchlauf aufgenommen worden. Dafür wurden zu jeder Temperatur über 10 Spektren mit 2 s Aufnahmedauer gemittelt und direkt danach die Temperatur schrittweise erhöht. Als relatives Maß der Ausbeute der zum Spektrum gehörigen Spezies wurde der Wert bei 430 nm herangezogen. Der Verlauf (Abbildung 4.8, rechts) stimmt gut mit den Werten aus den vollständigen transienten Messungen, die zur Be-

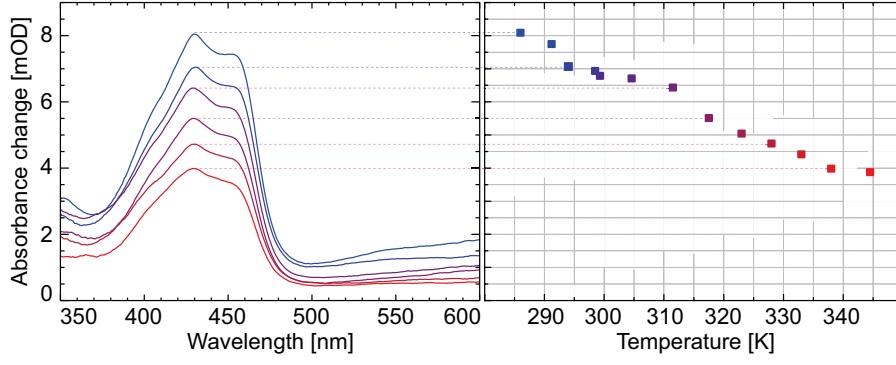


Abbildung 4.8: Temperaturabhängigkeit der Triplettausbeute von 1MP in Wasser: Die Höhe des Offsets, als Maß der Triplettausbeute, bei Verzögerungszeiten $\gtrsim 1$ ns erniedrigt sich mit steigender Temperatur (links). Als Maß der Population der assoziierten Spezies wurde die Differenzabsorption bei einer Verzögerungszeit von 2 ns und einer Wellenlänge von 430 nm gegen die Temperatur aufgetragen (rechts).

stimmung der Zerfallszeiten in Abbildung 4.7 aufgenommen wurden, überein. Für einige Temperaturen wurden die Werte nach dem Messdurchlauf überprüft, um einen systematischen Fehler durch Umsatz des Ausgangsstoffes auszuschließen.

Basierend auf der Ratenkonstante des Singulett-Zerfalls k_{S_1} und der Quantenausbeute der Triplett-Bevölkerung können die Ratenkonstanten für interne Konversion (IC) k_{ic} und Interkombination (ISC) k_{isc} berechnet werden. Die Quantenausbeuten der Fluoreszenz und des photochemischen Prozesses sind im Vergleich zu denen von IC und ISC so klein, dass diese Kanäle vernachlässigt werden können und es gilt

$$k_{S_1}(T) = \frac{1}{\tau_{fl}} \approx k_{ic}(T) + k_{isc}(T). \quad (4.1)$$

Mit dieser Näherung ist die Triplett-Quantenausbeute über

$$\phi_t(T) = \frac{k_{isc}(T)}{k_{isc}(T) + k_{ic}(T)} \quad (4.2)$$

gegeben. Über die Gleichung 4.1 und 4.2 können die Ratenkonstanten für IC und ISC in Abhängigkeit von der Temperatur ermittelt werden (siehe Abbildung 4.9). Dabei stellt sich heraus, dass die Temperaturabhängigkeit hauptsächlich vom IC Prozess bestimmt ist. Beide Abhängigkeiten sind über einen Arrhenius Ansatz

$$k_{ic,isc}(T) = k_{ic,isc}^0 \exp\left(-\frac{E_{a,ic,isc}}{k_B T}\right) \quad (4.3)$$

ausgewertet worden. Dabei ist der prä-exponentielle Faktor k^0 als temperaturunabhängig angenommen worden. Die berechnete Energiebarriere E_a für die interne Konversion ist mit $E_{a,ic} = 2140 \text{ cm}^{-1}$

größer als die für die Interkombination mit $E_{a,isc} = 640 \text{ cm}^{-1}$. Der prä-exponentiale Faktor für den IC Prozess ist in der Größenordnung von Frequenzen von molekularen Schwingungen ($k_{ic}^0 = 40 \text{ ps}^{-1}$) [29, 2]. Das deutet darauf hin, dass eine effektive Kopplung von angeregtem und Grundzustand vorliegt. Dieses Verhalten ist typisch für konische Durchschneidungen (*engl. conical intersection, CI*) [40]. Solche CI sind als Begründung der schnellen Grundzustandserholung von DNA-Basen diskutiert und durch quantenmechanische Rechnungen identifiziert worden [6, 38]. Bei 1MP scheint solch ein CI erst nach thermischer Aktivierung erreichbar zu sein.

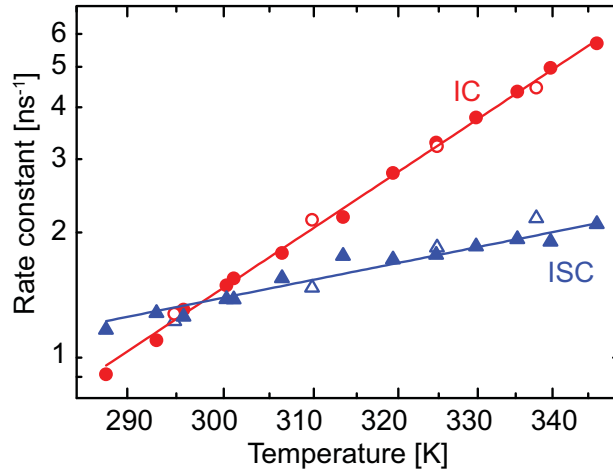


Abbildung 4.9: Ratenkonstanten der internen Konversion (IC) und der Interkombination (ISC) von 1MP gegen die reziproke Temperatur. Beide Prozesse zeigen eine Abhängigkeit, wobei IC dominiert. Die ausgefüllten Symbole wurden aus den Werten aus Abbildung 4.8 berechnet; Kreise stehen für die Ratenkonstanten von IC, Dreiecke für die des ISC. Die offenen Symbole wurden aus den Offsetspektren der globalen Datenanalyse von zeitaufgelösten Messungen bestimmt. Aus Referenz [27] entnommen.

Der prä-exponentielle Faktor der Interkombination beträgt $k_{isc}^0 = 0.03 \text{ ps}^{-1}$ und ist konsistent mit Ratenkonstanten für andere Systeme, bei denen eine effektive Spin-Orbit-Kopplungen vorliegt [29, 2]. Diese ist typisch für Interkombinationen, bei denen sich die Elektronenkonfiguration ändert. Für 1MP weist dies auf einen $^1\pi\pi^* \mapsto ^3n\pi^*$ -Übergang hin [175].

Die Werte der Energien sind mit einem relativen Fehler von $\mathcal{O}(0.1)$ ($\mathcal{O}(10\%)$) behaftet. Die Angaben zu den prä-exponentiellen Faktoren stellen eine Extrapolation zur hohen Temperaturen ($\frac{1}{T} \mapsto 0$) dar. Aus diesem Grund sind die Werte mit einem Fehler von $\mathcal{O}(1)$ ($\mathcal{O}(100\%)$) behaftet und müssen als Angabe zur Größenordnung interpretiert werden.

4.2.4 Photophysik des Pyrimidinon-Motivs in 64ac

4.2.4.1 Photophysik

Transiente Absorptionsspektren für 64ac in deuteriertem Wasser wurden mit einem spektroskopischen Aufbau am Institut für BioMolekulare Optik in München aufgenommen. Prinzipiell unterscheidet er sich im Wesentlichen nicht von dem der 1MP-Messungen. Die genauen Parameter sind in der Referenz [26] angegeben. Nach Photoanregung mit 323 nm-Impulsen wurde in einem spektralen Fenster von 350 – 700 nm mittels Weißlicht-Impulsen abgefragt. Die globale Anpassung ergab, dass die Daten mit einem minimalen Parametersatz von drei Zeitkonstanten ($\tau_1 = 2.9$ ps, $\tau_2 = 120$ ps und $\tau_3 = 1.1$ ns) und einem Offset beschrieben werden können. In Abbildung 4.10 sind transiente Spektren für Zeiten bis eine halbe Nanosekunde (a) und für längere Verzögerungszeiten bis 3.5 ns (b) dargestellt.

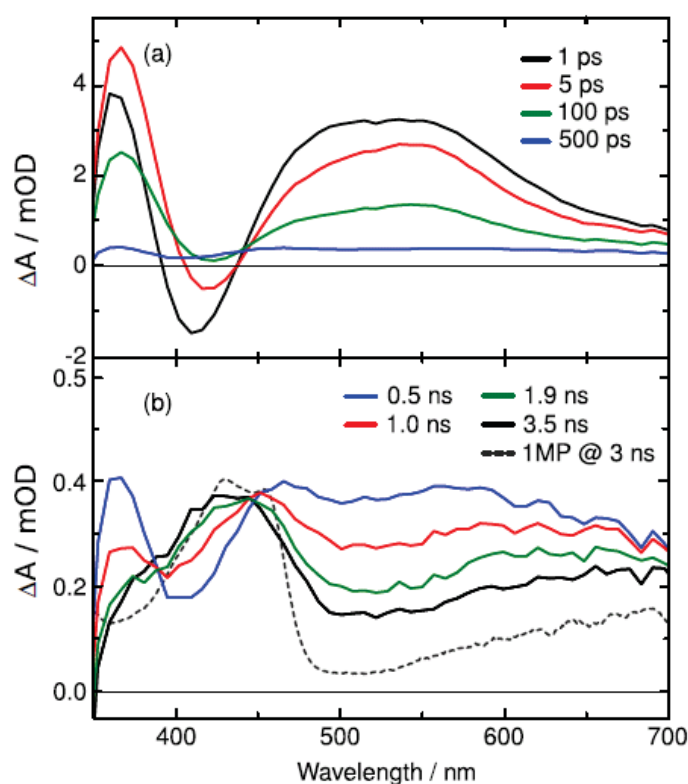


Abbildung 4.10: Transiente Spektren von 64ac in deuteriertem Wasser. Nach Photoanregung sind starke Änderungen in zwei Zeitbereichen zu beobachten. Ein Zerfall des angeregten Zustands innerhalb von einigen hundert Pikosekunden (a) und das Ausbilden einer spektralen Signatur mit einer Zeitkonstante von ~ 1 ns, die dem “Offsetspektrum” von 1MP ähnelt (b). Aus Referenz [26] entnommen.

Vergleicht man die Spektren von 1 ps und 5 ps, erkennt man das Verhalten des Pikosekundenprozesses von 1MP. Eine breite positive

Signatur der Absorption des angeregten Zustands ist von der stimulierten Emission (Verminderung der Absorption bei Wellenlängen um ~ 415) überlagert. Der negative Beitrag der stimulierten Emission verschiebt sich von ~ 410 nm bei 1 ps zu ~ 420 nm bei 5 ps und ist bei 500 ps praktisch nicht mehr vorhanden. Dies ist im Einklang mit den Beobachtungen bei 1MP. Die Verschiebung im Pikosekundenbereich kann einer dynamischen Stokes-Verschiebung zugeschrieben werden. Mit der Zeitkonstante τ_2 zerfällt der primär angeregte $\pi\pi^*$ -Singulett-Zustand innerhalb von mehreren 100 ps. Diese Zeitskala stimmt mit der abgeschätzten Fluoreszenzlebensdauer gut überein.

Das transiente Signal von 64ac bei 3.5 ns weist ähnliche Signaturen auf wie 1MP bei 3 ns (siehe gepunktete Linie in Abbildung 4.10). Eine Bande bei ~ 430 nm und eine nahezu flache, leicht ansteigende Absorption für Wellenlängen > 500 nm deuten auf die Populierung des Triplets von 64ac hin. Die Quantenausbeute für die Interkombination konnte über zeitaufgelöste IR-Messungen auf $0.025 < \phi_t < 0.08$ abgeschätzt werden [26]. Die "Triplet-Signatur" stellt sich erst auf einer Zeitskala von Nanosekunden vollständig ein. Grund dafür ist eine weitere langlebige strahlende Spezies, die im Folgenden untersucht wird.

4.2.4.2 Beitrag eines zweiten Konformers

Der Zerfall des angeregten Singulett-Zustands wurde über eine Schmierbild-Messung verfolgt. Nach Anregung von 64ac in deuteriertem Wasser wurde die Fluoreszenz in einem Spektralbereich zwischen 350 nm und 600 nm bei einer Temperatur von 301 K verfolgt (Abbildung 4.11). In Übereinstimmung mit der aus den stationären Spektren abgeschätzten Lebensdauer und der Zeitkonstante τ_2 der transienten UV/Vis-Absorptionsmessung ist ein Abfall der Fluoreszenz innerhalb mehrerer 100 ps zu erkennen. Unter Annahme eines monoexponentiellen Zerfalls sollte bei einer Verzögerungszeit von 0.8 ns das Signal auf $\mathcal{O}(0.1\%)$ der anfänglichen Amplitude abgefallen sein. Aus der Konturdarstellung wird ersichtlich, dass immer noch ein Beitrag von $\mathcal{O}(1\%)$ stehen bleibt.

Aus diesem Grund wurde das Messzeitfenster auf mehrere Nanosekunden ausgeweitet und eine globale Anpassung mit zwei Zeitkonstanten durchgeführt. Die DAS sind in Abbildung 4.11 mit eingezeichnet. Eine schnelle Komponente zerfällt mit $\tau_{fl} = 106$ ps. Das Maximum des assoziierten Spektrums liegt bei ~ 420 nm. Das zweite DAS mit dem Maximum bei ~ 405 nm gehört zu einer Zeitkonstante von ~ 0.9 ns. Die relativen Amplituden der assoziierten Spektren betragen $\sim 87\%$ und $\sim 13\%$ für die schnelle bzw. die langlebige Komponente.

Das Zucker-Formacetal-Rückgrat von 64ac bricht die Symmetrie für den Pyrimidinon-Chromophor, weshalb sich durch Rotation um die 6-4- σ -Bindung die Konformation ändert. Für zwei solche Konfor-

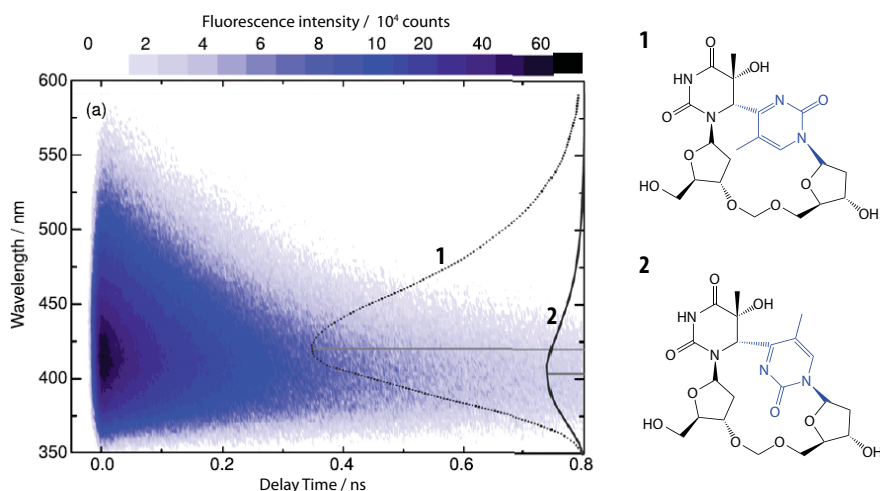


Abbildung 4.11: Zeitaufgelöste Messung von 64ac in deuteriertem Wasser mittel einer Schmierbild-Kamera bei einer Temperatur von ~ 331 K. Die zu den Zerfallszeiten von ~ 106 ps (Emissionsmaximum bei ~ 420 nm) und ~ 0.9 ns (402 nm) gehörigen DAS können zwei Konformeren von 64ac zugeordnet werden (siehe Text). Abbildung teilweise aus [26] entnommen.

mere (siehe Abbildung 4.11, rechts) wurde die Grundzustandsenergie berechnet [26]. Sie unterscheiden sich durch die Lage der Carbonyl-Gruppe. Diese zeigt entweder von der Formacetal-Gruppe weg (1) oder zu ihr hin (2). Die freie Enthalpie von Konformer 2 ist gegenüber der von Konformer 1 um $\Delta G^0 = 0.05$ eV höher [26]. Wenn angenommen wird, dass beide Konformationen im thermodynamischen Gleichgewicht (bei Raumtemperatur) vorliegen, kann gemäß der Boltzmann-Verteilung ein Verhältnis von

$$\frac{N_1}{N_2} = \exp\left(-\frac{\Delta G^0}{k_B T}\right) \stackrel{293\text{ K}}{\approx} \exp\left(-\frac{0.05\text{ eV}}{0.025\text{ eV}}\right) \approx 0.14 \quad (4.4)$$

zwischen den Populationen der Konformere mit Besetzung $N_{1,2}$ angegeben werden [176]. Dieser Wert ist nahe dem Verhältnis der aus den Schmierbildmessungen gewonnenen relativen Amplituden mit $\frac{13\%}{87\%} \approx 0.15$. Bei Messungen bei höherer Temperatur verschiebt sich dieser Quotient zu höheren Werten; dies ist ebenfalls mit Gleichung 4.4 konsistent.⁷ Die 1 ns-Zeitkonstante wird somit einem zweiten Konformer von 64ac zugeordnet werden. Beide Komponenten der Fluoreszenz zeigen eine Temperaturabhängigkeit in Einklang mit den Beobachtungen bei 1MP.

Eine Auswertung gemäß dem Arrhenius-Ansatz (Gleichung 4.3) ergibt einen prä-exponentiellen Faktor von 0.6 ps^{-1} und eine Aktivierungsenergie von 1090 cm^{-1} für den 100 ps-Zerfall. Die entsprechenden Werte für die 1 ns Zerfallskonstante lauten 0.9 ps^{-1} und 1470 cm^{-1} .

⁷ Eine andere Interpretation wäre die einer sequentiellen Kinetik. Dagegen spricht aber, dass Konformer 1 langwelliger als Konformer 2 emittiert.

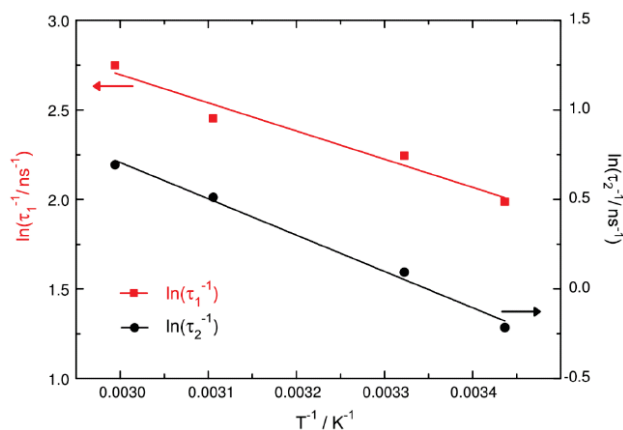


Abbildung 4.12: Aus temperaturabhängigen Messungen von 64ac in deuteriertem Wasser erhaltene Ratenkonstanten für den schnellen (rot) und langsamen (schwarz) Fluoreszenzzerfall. Die Datenpunkte sind aus der globalen Datenanalyse der zeitaufgelösten Messungen bestimmt worden. Die durchgezogenen Linien sind Ergebnis einer linearen Regression. Aus Referenz [26] entnommen.

Der Einfluss der Temperatur auf k_{S_1} wurde hier nicht in die IC- und ISC-Beiträge aufgeteilt. Zum Vergleich: Die entsprechende Auswertung für 1MP ergab eine Aktivierungsenergie von 1570 cm^{-1} und einen prä-exponentiellen Faktor von 5 ps^{-1} . Die Werte der Energien sind mit einem relativen Fehler von $\mathcal{O}(0.1)$ ($\mathcal{O}(10\%)$) behaftet, die Angaben zu den prä-exponentiellen Faktoren mit einem Fehler von $\mathcal{O}(1)$ ($\mathcal{O}(100\%)$).

4.2.4.3 Bevölkerung des Triplets

In den UV/Vis transienten Spektren ist nach dem Zerfall der 100 ps-Fluoreszenzkomponente keine Signatur des Triplets zu erkennen (siehe Abbildung 4.10, a). Dafür ähnelt das Spektrum bei 500 ps dem bei 1 ps und ist der Signalstärke nach ungefähr um einen Faktor 0.1 schwächer. Das Minimum um $\sim 400 - 410 \text{ nm}$ kann der stimulierten Emission der längeren Fluoreszenzlebenszeit (Maximum bei $\sim 405 \text{ nm}$) zugeordnet werden. Erst nach dem vollständigen Entleeren des angeregten Singulett-Zustands ist die Triplet-Signatur zu erkennen. Es ist somit denkbar, dass der Triplet allein aus dem Singulett-Zustand des Konformer 2 gebildet wird. Zudem liegen die Parameter des Arrhenius-Ansatzes für die Aktivierungsbarriere der langlebigen Fluoreszenz näher an denen für 1MP als die der kurzlebigen Fluoreszenz. Unter der Annahme, dass sich der langlebigere Zerfall (13% der Population) ähnlich dem von 1MP ($\phi_t = 0.5$) verhält, kann eine Triplet-Quantenausbeute von $0.13 \cdot 0.5 \approx 0.07$ ($\sim 7\%$) abgeschätzt werden. Dieser Wert ist in der Größenordnung des aus den Messun-

gen abgeschätzten Wertes in Höhe von $\sim 0.025 - 0.08$ ($\sim 2.5 - 8\%$) [26].

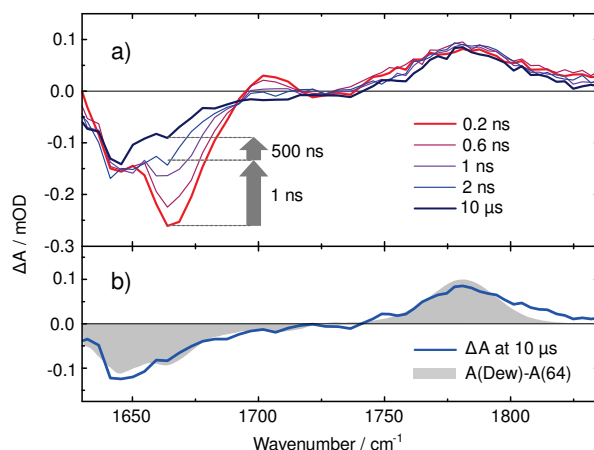


Abbildung 4.13: Nanosekundenzeitaufgelöste IR-Messung von 64ac. Die Differenzspektren zeigen eine Änderung auf einer Zeitskala von ~ 1 ns und 500 ns (obere Grafik). Das Differenzspektrum bei $10\mu\text{s}$ stimmt mit dem stationären Differenzspektrum überein. Aus Referenz [33] übernommen.

Uneindeutiger ist das Verhalten in den transienten IR-Spektren (siehe Abbildung 4.13). Auf der Nanosekundenzeitskala ist eine Abnahme des Ausbleichens bei $1660 - 1670\text{ cm}^{-1}$ zu beobachten, wie es für die Grundzustandserholung auf 100 ps-Zeitskala beobachtet wurde; somit im Einklang mit der Interpretation der UV/Vis-Daten. Im Unterschied dazu ist aber keine signifikante Änderung für Wellenzahlen $\lesssim 1650\text{ cm}^{-1}$ zu erkennen, was ebenfalls das Grundzustandsbleichen beschreibt. Damit können die Beiträge der beiden Konformere zur Triplett-Bevölkerung nicht zweifelsfrei abgeschätzt werden.

4.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Modellsystemen 1MP und 64ac

4.2.5.1 1MP

Basierend auf den experimentellen Beobachtungen und der Bestimmung der Ratenkonstanten für die Deaktivierung des angeregten Singulett-Zustands kann folgendes Schema für die Photophysik von 1MP aufgestellt werden. Nach Anregung in den Franck-Condon-Bereich des niederenergetischen $^1(\pi\pi^*)$ -Zustands relaxiert das System in dessen Minimum. Dieser Vorgang ist nach einigen Pikosekunden abgeschlossen.

Der angeregte Singulett-Zustand (S_1) wird hauptsächlich über interne Konversion (IC) und Interkombination (ISC) entvölkert. Der strahlende Zerfall mit einer Ratenkonstante von $0.07 \cdot 10^9\text{ s}^{-1}$ und der reaktive Kanal tragen nur in geringen Maße bei. Es ist nicht ge-

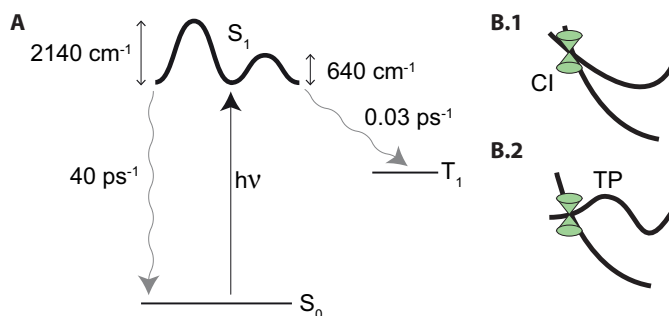


Abbildung 4.14: Modell für die Photophysik von 1MP. (A) Die Deaktivierung des primär angeregten Zustands ist zum Großteil durch interne Konversion (IC) und Interkombination (ISC) gegeben. (B.1) Die konische Durchschneidung (CI) für IC kann dabei energetisch höher als das Minimum des angeregten Zustands liegen. Zwischen der CI und dem Minimum existiert kein energetischer Übergangszustand (TP). (B.2) Falls ein TP vorhanden ist, spielt die energetische Lage von der CI keine Rolle. Aus den experimentellen Befunden kann nicht zwischen beiden Möglichkeiten unterschieden werden. Zum Teil aus Referenz [27] entnommen.

sichert, ob ein einzelner reaktiver Kanal die Photochemie von 1MP allein bestimmt und ob dieser vom initialen Singulett erfolgt; eine obere Schranke für die Rate kann über die chemische Quantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer bei Raumtemperatur abgeschätzt werden und ergibt $k_c < \phi_c \tau_{fl} = 7.5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$.

IC und ISC sind aktivierte Prozesse. Dabei kann aufgrund der experimentellen Befunde nicht unterschieden werden, ob ein energetischer hochliegender Übergangszustand durchlaufen werden muss (siehe Abbildung 4.14, B.2) oder nicht (B.1). Für IC wird eine konische Durchschneidung (CI) zum Grundzustand angenommen.

Das aufgestellte Modell ist in guter Übereinstimmung mit theoretischen Berechnungen von zu 1MP in Beziehung stehenden Molekülen. Für 5-Methyl-2-Pyrimidinon wurde eine konische Durchschneidung des $\pi\pi^*$ -Zustands mit dem Grundzustand gefunden. Sie liegt $\sim 2300 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ über dem $\pi\pi^*$ -Minimum (gemäß Schema B.1) [167]. Das aufgestellte Modell wird zudem durch Berechnungen zum 64ac-System und dessen nativer Form T(6-4)T gestützt [177]. Das ähnliche photophysikalische Verhalten von 1MP und 64ac stärkt das vorgeschlagene Schema (Abbildung 4.14).

4.2.5.2 64ac

Für 64ac wurden ähnliche transiente Spektren wie für 1MP beobachtet. Der auffälligste Unterschied zu 1MP ist die Emission mit zwei Zerfallszeiten. Dies kann durch zwei Konformerpopulationen interpretiert werden. Basierend auf den zeitaufgelösten IR-Messungen ist gesichert, dass das Dewar Valenzisomer von 64ac ausschließlich durch

Konformer 1 im Zuge der Singulett-Entvölkerung auf einer 100 ps-Zeitskala gebildet wird.

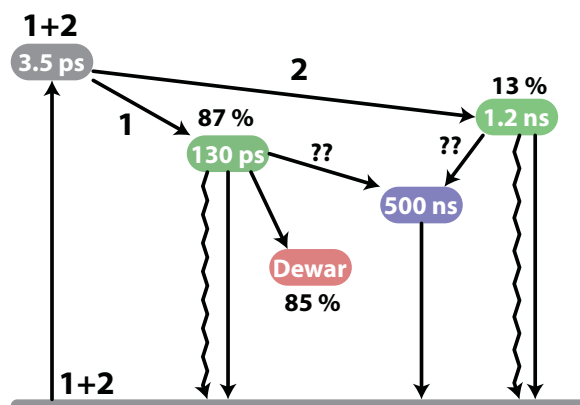


Abbildung 4.15: Schema zur Kinetik von 64ac. Nach Photoanregung relaxiert das System innerhalb von Pikosekunden aus dem Franck-Condon-Bereich (grau). Die zwei Fluoreszenzzerfälle auf hundert Pikosekunden und Nanosekunden Zeitskala werden zwei anfänglichen Grundzustandskonformeren zugeschrieben (1+2). Der schnellere Zerfall geht mit der quantitativen Bildung des Dewar Valenzisomers einher (rot). Auf der Zeitskala der langlebigen Fluoreszenz wird keine Photochemie beobachtet. Die Populierung des Triplets (blau) ist nicht eindeutig einer strahlenden Spezies zugeordnet. Nach Abbildung aus Referenz [33] erstellt.

Nach Photoanregung von 64ac (Konformer 1) in den Frank-Condon-Bereich des Singulettzustands mit $\pi\pi^*$ -Charakter relaxiert das System. Die Prozesse aus dem Minimum des $^1(\pi\pi^*)$ -Zustands sind hauptsächlich interne Konversion und ein chemischer Pfad hin zum Dewar Valenzisomer. Beide Kanäle sind durch thermische Aktivierung zugänglich. Dabei zeigen theoretische Rechnungen auf eine konische Durchschneidung ($\text{CoIn}_{\text{Dewar}}$) hin [26, 178]. Sie bedingt eine Verzweigung vom angeregten Zustand hin zur Grundzustandspotentialfläche von 64ac und der vom Dewar Valenzisomer (siehe Abbildung 4.16). Eine effektive Interkombination ist aufgrund der experimentellen Befunde unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen. Die Photophysik des zweiten Konformers von 64ac zeigt eine höhere Aktivierungsenergie als Konformer 1. Der Zerfall des Singulett-Zustands ist durch interne Konversion und Interkombination bestimmt. Ein reaktiver Kanal spielt eine untergeordnete Rolle.

4.2.5.3 Mechanismus der Dewar-Bildung

Die Reaktivität von 64ac (Konformer 1) bezüglich der Dewar Valenzisomerisierung ist höher als für 64 (64ac ohne "Formacetal-Brücke") [25] und 1MP [27]. Dies deutet auf den Einfluss des Rückgrats von T(6-4)T auf dessen Deaktivierungskanäle hin. Eine heuristische Argu-

mentation bezüglich der Symmetrie liefert eine Interpretation des Befundes. 1MP ist im Grundzustand planar [167, 179, 166]. Der Pyrimidinon-Ring in T(6-4)T ist ebenfalls nahezu planar [20, 71] — für 64ac gilt dasselbe [178] — wohingegen sein Dewar Valenzisomer nicht planar ist [20, 71].⁸ Die Geometrie eines Dewar-Isomers hat also eine geringere Symmetrie als das Ausgangsisomer und könnte daher durch einen äußeren Zwang begünstigt werden. Das Rückgrat in 64ac stellt eben einen solchen Symmetriebruch für seinen Chromophor dar. Diese Argumentation macht die hohe chemische Quantenausbeute des 64ac Dewar Valenzisomers im Vergleich zu 1MP und 64 plausibel.

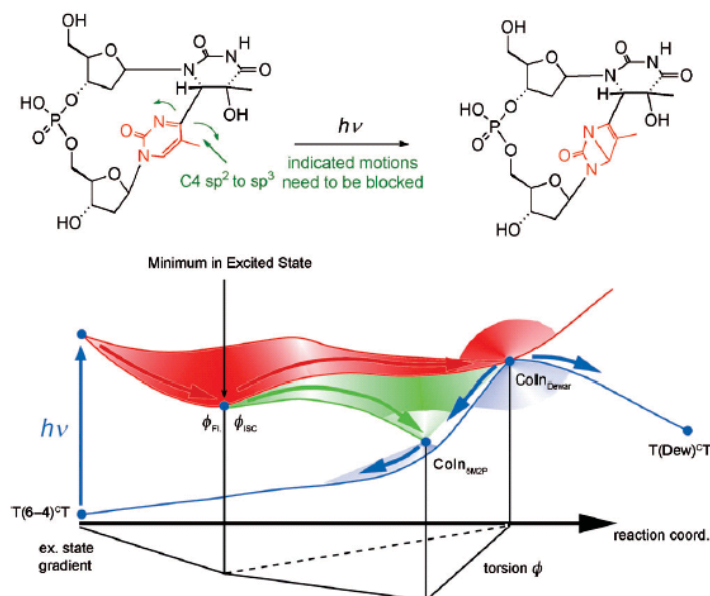


Abbildung 4.16: Mechanistisches Bild der Bildung des Dewar Valenzisomers. Die Kernbewegung (oberes Reaktionsschema, grün) des Pyrimidinon-Chromophor (rot) ist durch das Zucker-Phosphat-Rückgrat gehindert. Dadurch ist die konische Durchschneidung CoIn_{MCP} , die eine nicht-reaktive Deaktivierung zum Grundzustand bietet, schwerer zugänglich (untere Abbildung, grüne Potentialfläche). Die konische Durchschneidung $\text{CoIn}_{\text{Dewar}}$ tritt durch das Rückgrat effektiv in Erscheinung und vermittelt neben dem Übergang zum Grundzustand eine quantitative Fraktion hin zum Dewar-Isomer. Aus Referenz [25] entnommen.

Theoretische Studien geben einen tieferen Einblick in den zugrunde liegenden Mechanismus. Berechnungen zu 5-Methyl-2pyrimidinon (5M2P) stützen die in dieser Arbeit gefundenen spektroskopischen Befunde zu 1MP [46, 179, 167]. Eine kanonische Durchschneidung vom angeregten und dem Grundzustand ist durch eine Energiebar-

⁸ Theoretische Berechnungen zu dem zu 1MP verwandten 2-Pyrimidin (oxo- und hydroxy-Form) deuten ebenfalls auf eine planare Struktur im Grundzustand hin. [180, 181] Die Planarität im Grundzustand scheint für diese Heterocyklen eine allgemeine Regel zu sein.

riere vom initial populierten Singulett-Minimum getrennt. Berechnungen zur Kernbewegung von $5M2P$ im angeregten Zustand zeigen eine starke Bewegung des N_1 -Stickstoffs aus der planaren Ebene des Pyrimidinons [25, 26, 178]. Eine Änderung des Orbitalcharakters des $C6$ -Kohlenstoffatoms geht mit dieser Bewegung einher. Diese Kernbewegung erlaubt dem Molekül, die konische Durchschneidung $CoIn_{5M2P}$ zu erreichen und in den Grundzustand zurückzukehren. Durch das Rückgrat ist die N_1 -Bewegung eingeschränkt und dieser Deaktivierungskanal ist gehemmt. Dafür ist die konische Durchschneidung $CoIn_{Dewar}$ durch die sterische Einschränkung des Rückgrats effektiv an der Entvölkerung des angeregten Zustands beteiligt. Dieser Mechanismus erklärt die höhere chemische Quantenausbeute des Dewar-Isomers von 64ac und demnach auch von T(6-4)T Schäden [25, 26].

LÖSUNGSMITTEL- UND SUBSTITUENTENEFFEKTE AUF DIE PHOTOPHYSIK VON 1MP

Experimentelle Befunde und quantenchemische Berechnungen zu dem Modellsystem 64ac haben eine Begründung für die stärkere Reaktivität von T(6-4)T-Schäden gegenüber dem isolierten Chromophor (2(1H)-Pyrimidinon) gegeben: das Rückgrat verzerrt das Pyrimidinon-Motiv und begünstigt die Dewar Valenzisomerisierung (siehe Kapitel 4.2.5). Die dazu gemachten Untersuchungen basieren auf wässrigen Lösungen von 1MP und 64ac. Der Chromophor ist aber in DNA-Strängen nicht ausschließlich Wassermolekülen ausgesetzt; benachbarte chemische Motive (Desoxy-Ribose, Phosphate-Gruppen und DNA-Basen) bedingen eine veränderte lokale Umgebung. In diesem Kapitel wird der Einfluss der Lösungsmittelumgebung auf die Photophysik von 1-Methyl-2(1H)-Pyrimidinon (1MP) untersucht. Die Deaktivierung des primär angeregten Zustands erfolgt mit sinkender Dielektrizitätskonstante und zunehmender Protizität des Lösungsmittels schneller und eine Verminderung der Triplett-Ausbeute geht einher.

Das 2(1H)-Pyrimidinone ist in T(6-4)T-Schäden neben dem C1-Atom über das C4-Atom kovalent gebunden. Dieser Einfluss wird durch zusätzliche Substituierung von 1MP modelliert. Dabei zeigt sich ebenfalls ein starker Einfluss auf die Zerfallskanäle. Zwei zusätzliche Methyl-Gruppen an Position C4 und C6 von 1MP (1,4,6-Trimethyl-2(1H)-Pyrimidinon, 146TMP) bedingen einen beschleunigten Zerfall des primär angeregten Singulett-Zustands und eine geringere Bevölkerung des Triplett-Zustands.

5.1 LÖSUNGSMITTELABHÄNGIGKEIT

1MP liegt in Lösung in der Keto-Form vor. Das N3- wie auch das O7-Atom sind in besonderem Maße Angriffspunkte für die Lösungsmittelumgebung. In protischen Lösungsmitteln können stabilisierende Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Durch das Keton-Motiv besitzt 1MP ein ausgeprägtes Dipolmoment. Elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel sollten deshalb den Grundzustand von 1MP stark stabilisieren.

5.1.1 Stationäre Spektren

In einer Messreihe wurden die stationären Spektren von 1MP in mehreren Lösungsmitteln aufgezeichnet. Neben dem schon behandelten

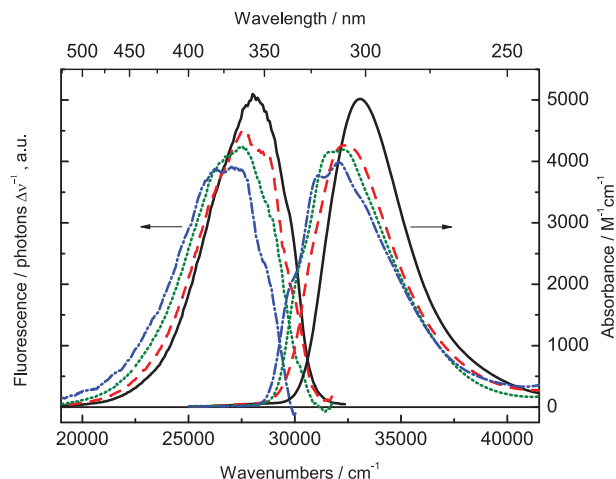


Abbildung 5.1: Lösungsmiteleinfluss auf stationäre Spektren von 1MP: Absorptions- (rechte Skala) und Emissionsspektren (linke Skala) von 1MP in Wasser (schwarz), Methanol (rot, gestrichelt), Acetonitril (grün, gepunktet) und 1,4-Dioxan (blau, strichpunkt).

protisch-polaren Wasser wurde das Hauptaugenmerk auf folgende drei zusätzliche Lösungsmittel gelegt: (i) Methanol als protisches Lösungsmittel mit geringerer Polarität als Wasser, (ii) Acetonitril als nicht-protisches Lösungsmittel mit vergleichbarer Polarität zu Methanol und (iii) 1,4-Dioxan als nicht-protisches nahezu unpolares Lösungsmittel. Andere unprotische Lösungsmittel, wie z.B. Cyclohexan waren aufgrund der schlechteren Löslichkeit von 1MP nicht geeignet.

In Abbildung 5.1 sind Absorptions- und Emissionsspektren gegen die Energieskala aufgetragen. Dabei wurden die Fluoreszenzspektren gemäß $d\nu = d\lambda \cdot \lambda^{-2}$ korrigiert [103].¹ Es zeigt sich, dass mit sinkender Polarität (Dielektrizitätskonstante $\epsilon \rightarrow 1$) und hin zu nicht-protischen Lösungsmitteln eine Abnahme des maximalen molaren Absorptionskoeffizienten $\epsilon_{\lambda_{\max}}$ der niederenergetischen Absorptionsbande erfolgt. Gleichzeitig verbreitert sich diese. Die Oszillatorstärke f , als Integral über die Absorptionsbande [103]

$$f = \frac{4.39 \cdot 10^{-9}}{n} \int \epsilon(\nu) d\nu, \quad (5.1)$$

ist nahezu unabhängig vom Lösungsmittel und beträgt, unter Beachtung der Brechungsindizes n der Lösungsmittel, 0.068 ± 0.007 .² Theoretische Berechnungen [166] ergeben eine Oszillatorstärke von 0.15 ± 0.01 — alle Angaben beziehen sich auf den Mittelwert und die Standardabweichung der über Gleichung 5.1 berechneten Werten f

¹ Wenn nicht explizit angegeben, steht ν für die Energie-, bzw. Frequenzangabe in cm^{-1} , im Unterschied zu dem dafür gebräuchlichen Ausdruck $\tilde{\nu}$.

² Der Wert beträgt 0.093 ± 0.007 unter Vernachlässigung des Brechungsindex. Die Oszillatorstärke ist in der Literatur mit und ohne Brechungsindex definiert [182, 183, 184, 2].

Solvent	ϵ	Absorption		Emission		Strickler-Berg
		$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} / \text{nm}$	$\epsilon \lambda_{\text{max}}^{\text{max}} / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{fl}}^{\text{max}} / \text{nm}$	ϕ_{fl}	$\tau_{\text{fl}}^{\text{SB}} / \text{ps}$
H ₂ O	80	302	5030	360	0.04	550
MeOH	32	309	4260	370	0.016	230
MeCN	36	313	4140	374	0.008	130
1,4-Dioxan	2.2	316	3820	378	0.002	30

Tabelle 5.1: Lösungsmiteleinfluss auf stationäre Spektren von 1MP: Für die Lösungsmittel Wasser, Methanol, Acetonitril und 1,4-Dioxane mit unterschiedlicher Polarität (Dielektrizitätskonstante ϵ) zusammengefasste Parameter der stationären Absorptions- und Emissionsdaten. Die Maxima λ^{max} der Spektren (zur Analyse siehe Text) mit dem molaren Absorptionskoeffizienten ϵ [185] im Absorptionsmaximum und der Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_{fl} . Die letzte Spalte gibt die aus den stationären Spektren abgeschätzten Lebensdauern des strahlenden Zustands wieder.

für die in Abbildung 5.3 angegebenen Lösungsmittel (für explizite Werte siehe Anhang, Abbildung A.2).

Die Spektren wurden nach der Strickler-Berg-Relation [35] ausgewertet. Es stellt sich eine geringe nicht systematische Abhängigkeit heraus mit einer natürlichen Ratenkonstante von $\sim 0.07 \pm 0.005 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$.³ Dagegen ist ein starker Einfluss auf die Fluoreszenzquantenausbeute zu beobachten. Sie ist am höchsten für Wasser und nimmt mit sinkender Polarität und Protizität ab. Die Ausbeuten wurden im Vergleich zur Fluorezenzquantenausbeute von 1MP in Wasser bestimmt, welche selbst über den Vergleich mit zwei Referenzfarbstoffen bestimmt wurde (siehe Abschnitt 3.1.1). Die genauen Parameter der stationären Spektren und der abgeschätzten Fluoreszenzlebensdauer sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Die Absorptionbande verschiebt sich mit sinkender Polarität zu längeren Wellenlängen (negative Solvatochromie). Neben dieser bathochromen Verschiebung der Absorption ist auch die Emissionsbande zu längeren Wellenlängen verschoben. Die Stokes-Verschiebung $\Delta\nu$ stellt sich als kaum abhängig vom Lösungsmittel heraus. Für protische Lösungsmittel (H₂O, MeOH) beträgt sie $\sim 5300 \text{ cm}^{-1}$ und ist etwas höher als für nicht-protische (MeCN, 1,4-Dioxan) mit 5200 cm^{-1} . Einen systematischen (linearen) Zusammenhang zwischen $\Delta\nu$ und der Polaritäts-Funktion (Orientierungs-Polarisierbarkeit)

$$\Delta f(\epsilon, n) = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (5.2)$$

³ In der Literatur wird der Begriff “natürliche” Ratenkonstante verwendet [103]. Es ist die *strahlende* Ratenkonstante bei Abwesenheit weiterer Deaktivierungskanäle gemeint.

nach Lippert-Mataga [103] kann nicht gefunden werden. Eine Berechnung der Änderung des Dipolmoments $\Delta\mu$ nach

$$\Delta\nu = \nu_{\text{abs}} - \nu_{\text{fl}} \propto \Delta\mu^2 \cdot \Delta f \quad (5.3)$$

ist nicht möglich. Das könnte mehrere Gründe haben: (i) Δf hängt nicht-linear von der Dielektrizitätskonstante ab. Für große Werte von ϵ wächst Δf kaum noch mit ϵ an; die stärkste Änderung ist für $\epsilon \lesssim 10$ zu erwarten. Wasser, Methanol und Acetonitril liegen darüber und haben ein vergleichbares $\Delta f \sim 0.31$. (ii) Die Bestimmung der vertikalen Anregungsenergie aus UV/Vis-Spektren kann wegen strukturierter Bandenformen mit einem Fehler $\mathcal{O}(1 \text{ nm})$ einhergehen. (Für die in dieser Arbeit angewendete Analyse siehe weiter unten) (iii) Für ein substituiertes 2-(1H)-Pyrimidinon wurde eine Abweichung von der Lippert-Mataga-Gleichung berichtet. Dies wurde dem Einfluss von Wasserstoffbrückenbindungen zugeschrieben und nach Ausschluss von protischen Lösungsmitteln konnte eine Änderung des Dipolmoments von ~ 2 Debye ermittelt werden [84]. Aus Berechnungen zu 1MP [166] konnte ein theoretischer Wert in dieser Größenordnung bestimmt werden: er beträgt -1.1 ± 0.4 Debye (Mittelwert und Standardabweichung der Werte in Vakuum, Acetonitril, Methanol und Wasser).

5.1.1.1 Vergleich mit quantenchemischen Berechnungen

Die negative Solvatochromie von 1MP deutet auf stärkere energetische Stabilisierung des Grundzustandes gegenüber dem angeregten Zustand bei Übergang von Vakuum zu polaren Lösungsmitteln hin. Marc Anlauf hat den Einfluss des Lösungsmittels auf die vertikalen Anregungsenergien in seiner Bachelorarbeit [166] am Institut für theoretische und Computerchemie von Prof. Christel Marian der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf untersucht. Die Molekülorbitale des energetisch niedrigsten Übergangs mit $\pi\pi^*$ -Charakter, welche in Abbildung 5.2 dargestellt sind, können dieses Verhalten erklären. Das höchstbesetzte Molekülorbital (HOMO, *engl. highest occupied molecular orbital*) hat eine höhere Elektronendichte am Sauerstoffatom (O7) als das niedrigst unbesetzte Molekülorbital (LUMO, *engl. lowest unoccupied molecular orbital*). Bei Anregung wird die Elektronendichte vom Sauerstoff in den Ring verschoben (siehe Abbildung 5.2). Aus den berechneten Orbitalen geht hervor, dass der Grundzustand von 1MP stärker durch das Lösungsmittel stabilisiert wird als sein angeregter Zustand. Es kann hier angenommen werden, dass für 1MP im angeregten Zustand eine Erniedrigung des Dipolmoments erfolgt – weitere Emissionsexperimente mit aprotischen unpolaren ($\epsilon \lesssim 15$) Lösungsmitteln könnten diese Annahme festigen. Die Berechnungen [166] sind in Übereinstimmung mit der beobachteten negativen Solvatochromie.

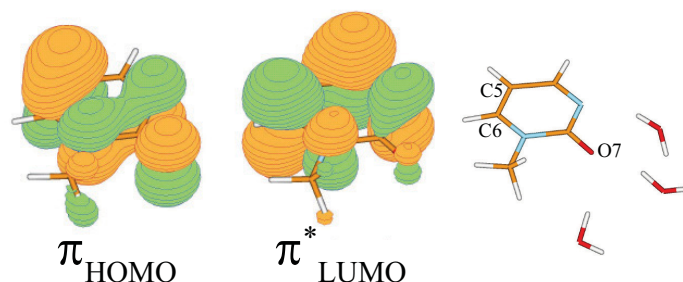


Abbildung 5.2: Quantenmechanische Berechnungen (DFT/MRCI Methode mit BH-LYP/TZVP; Geometrie: B3-LYP/TZVP) von 1MP im Vakuum. Die dargestellten Grenzorbitale mit π -Charakter stellen das HOMO und LUMO dar. In Vakuum sind sie dem S_2 - in Lösung dem S_1 -Übergang zugeordnet; die Struktur ändert sich nicht grundlegend bei Übergang ins Lösungsmittel und unter Hinzunahme expliziter Lösungsmittelmoleküle. Der $\pi\pi^*$ -Übergang zeichnet sich durch (i) eine Verschiebung der Elektronendichte vom O7-Atom in den Ring und (ii) einen Übergang von einem bindenden zu einem anti-bindenden Charakter der C5-C6-Bindung aus. Die rechte Darstellung dient zur Orientierung; C- braun, N- blau, O- rot und H-Atome weiß. Die eingezeichneten Wassermoleküle geben die Positionen der expliziten Lösungsmittelmoleküle in den Rechnungen an. Die Abbildungen ist größtenteils aus Referenz [166] entnommen.

Neben der dielektrischen Wechselwirkung zwischen 1MP und der Lösungsumgebung sind auch lösungsmittelspezifische Wechselwirkungen, vor allem der Einfluss der Protizität, wirksam. Ihnen wurde Rechnung getragen, indem die vertikalen Anregungsenergien gegen den Lösungsmittelparameter E_T^N nach Dimroth und Reichardt [186] aufgetragen wurden. Dieser Parameter wurde schon als Indikator für spezifische Wechselwirkungen herangezogen, hier für Wasserstoffbrücken [187]. Im Gegensatz zu physikalischen Parametern (genauer, die Parameter ϵ , n), welche das Lösungsmittel als Kontinuum beschreiben, messen empirische Polaritätsskalen (wie diese hier) die Interaktion "auf einer mikroskopischen Ebene" [188, 189]. In Abbildung 5.3 sind neben den aus den energetischen Lagen (hier in eV) der Absorptionsmaxima für 1MP in verschiedenen Lösungsmitteln die berechneten [166] vertikalen Anregungsenergien beigegefügt — der Wert für Vakuum kann mit angegeben werden, da die E_T^N -Skala für Vakuum definiert ist. Abgesehen von einem um $\mathcal{O}(0.4\text{ eV})$ höheren Wert stimmt der Trend der theoretischen Werte mit den gemessenen überein. Die Berechnungen zeigen, dass der Einfluss der Polarität auf die Anregungsenergien für Wasser, Methanol und Acetonitril vergleichbar ist [166]. Erst die Hinzunahme von expliziten Lösungsmittelmolekülen (Wasser und Methanol), welche in Wechselwirkungen mit dem N3- und O7-Atom von 1MP stehen, ergeben die in Abbildung 5.3 gezeigte Übereinstimmung zwischen Theorie und Experi-

ment. Wasserstoff-Brücken scheinen somit einen starken Einfluss auf die Stabilisierung des Grundzustandes von 1MP zu haben.

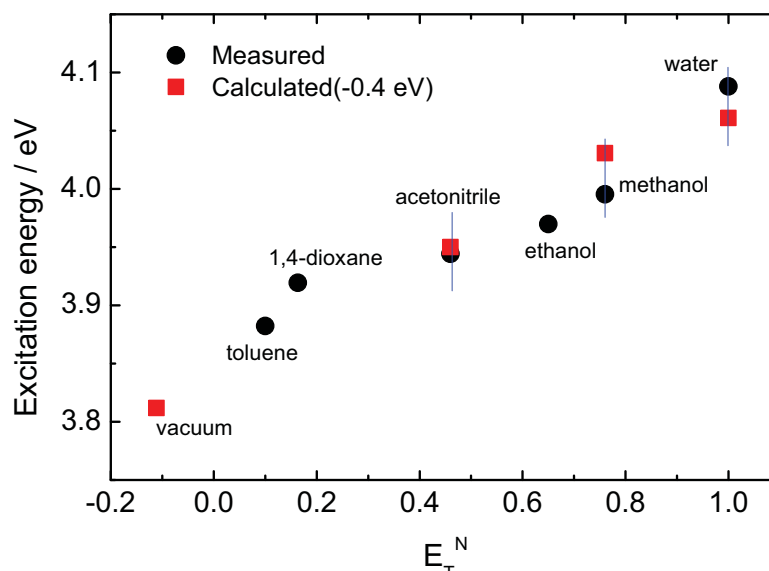


Abbildung 5.3: Abhängigkeit der Anregungsenergie von dem empirischen Lösungsmittelparameter E_T^N : Die aus den Maxima (siehe Text für genaue Bestimmung) der Absorptionsspektren von 1MP ermittelten vertikalen Anregungsenergien (schwarze Punkte) sind zusammen mit berechneten vertikalen Anregungsenergien (rote Kästchen) gegen den empirischen Lösungsmittelparameter aufgetragen. Zum Vergleich wurde 0.4 eV von den theoretischen Werten abgezogen. Lösungsmittel, für die experimentelle und theoretische Werte vorliegen, sind markiert (blaue vertikalen Linie).

5.1.1.2 Analyse der vibronischen Struktur

Zur Bestimmung der vertikalen Anregungsenergie wurden die Absorptionsspektren durch eine Modellfunktion angepasst und deren Maxima bestimmt. Dieses Vorgehen war nötig, da die vibronische Struktur, die für sinkende Polarität sichtbar wird, eine Zuordnung des globalen Maximums erschwerte. Eine asymmetrische Gauß-Funktion stellte sich gegenüber einer asymmetrischen doppel-sigmoidalen Funktion als weniger geeignet dafür heraus. Obwohl sich die Verwendung einer asymmetrischen Gauß-Funktion gegenüber einer doppel-sigmoidalen physikalisch begründen lässt, hat die Anpassung mit dieser Modellfunktion die experimentellen Spektren am besten wiedergegeben.

Die Differenz des in Toluol gemessenen Spektrums und dessen Anpassung ist in Abbildung 5.4 dargestellt. Sie stimmt gut mit der zweiten Ableitung des gemessenen Spektrums überein. Eine Ableitung

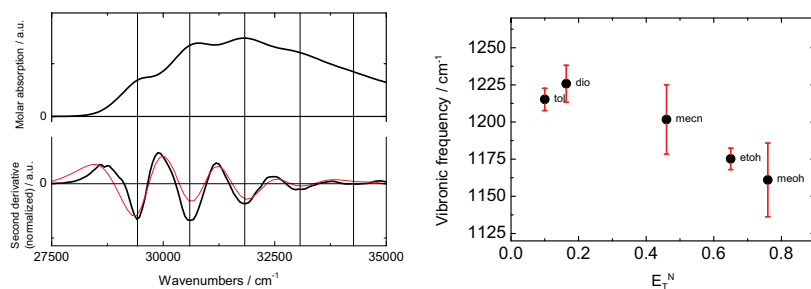


Abbildung 5.4: Vibronische Struktur der 1MP Absorptionsspektren: Das Absorptionsspektrum von 1MP in Toluol zusammen mit der zweiten Ableitung (linke Abbildung). Die Minima der zweiten Ableitung bestimmen die energetische Lage der vibronischen Maxima (vertikale Linien). Zum Vergleich ist die Differenz der Anpassung (asymmetrische doppel-sigmoidale Modellfunktion) und des Ursprungsspektrum eingezeichnet (dunkelrote Kurve). Der Abstand zwischen den vibronischen Maxima ist gegen den empirischen Lösungsmitteleffizienzparameter E_T^N (rechte Abbildung) aufgetragen. Dieser Wert gibt die Frequenz der mit der Anregung assoziierten Normalmode an (schwarze Punkte). Er wurde aus der Anpassung einer linearen Funktion an die ermittelten Maxima gewonnen. Der Standardfehler der Anpassung ist als Fehlerbereich mit eingezeichnet (rote Fehlerbalken).

ist gleichbedeutend mit einer Filterung im "Frequenzraum" (im mathematischen Sinne). Die Absorptionsbande ist im Vergleich zu der vibronischen Struktur "breiter" und wird durch Ableiten herausgefiltert. Die Minima der zweifachen Ableitung geben die Lage der vibronischen Banden an [190]. Die sich in der vibronischen Struktur widerspiegelnden Frequenzen sind durch die Schwingungsmoden mit großen Franck-Condon-Faktoren [191, 192] bedingt.

Außer für das Lösungsmittel Wasser konnte so die Frequenz der Schwingungsprogression ermittelt werden. Je nach Ausprägung der vibronischen Struktur konnten 3 – 5 Werte abgelesen werden. Das Ergebnis einer linearen Regression ist in Abbildung 5.4 gegen den Lösungsmitteleffizienzparameter E_T^N aufgetragen. Die Schwingungsfrequenz nimmt systematisch von $\sim 1225 \text{ cm}^{-1}$ in unpolaren Lösungsmitteln zu $\sim 1160 \text{ cm}^{-1}$ in Methanol ab. Dies ist konsistent mit Frequenzen für C-O-Valenzschwingungen ($1050 - 1300 \text{ cm}^{-1}$) [107]. Eine Frequenz von $\sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ wurde z.B. der C-O-Streckschwingung im angeregten Zustand von Formaldehyd zugeschrieben [193]. Im Gegensatz zu Frequenzen von C=O-Streckschwingungen im Grundzustand von $\sim 1650 - 1780 \text{ cm}^{-1}$ [107], bedingt eine vergrößerte Bindungslänge im angeregten Zustand eine Erniedrigung der Schwingungsenergie. Dies ist der Fall, wenn der Übergang in ein nichtbindendes Orbital mit einem Knoten zwischen dem Kohlenstoff und dem Sauer-

stoff erfolgt. Die berechneten Orbitale von 1MP (siehe Abbildung 5.2) liefern ein Indiz dafür.

Eine Frequenzanalyse der Daten zeigt für Toluol und 1,4-Dioxane einen zusätzlichen Beitrag bei $\sim 650\text{ cm}^{-1}$, dessen Auftauchen stark abhängig von der Wahl des Filterfensters der Fourier-Analyse ist; es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass es ein Artefakt der Analyse darstellt. Es könnte jedoch auch ein Indiz für aktive "Ring"-Moden sein [107] und wäre im Einklang mit der starken Verschiebung der Elektronendichte in den Ring bei Photoanregung (siehe Abbildung 5.2). Eine genaue Zuordnung ist ohne weitere Untersuchungen (Berechnung der Schwingungsmoden im angeregten Zustand) nicht möglich, es kann aber festgehalten werden, dass eine $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ -Schwingung in den Spektren aller (für Wasser nicht beobachtet) Lösungsmittel gefunden wurde. Ihre Amplitude und Frequenz steigt kontinuierlich zu nicht-polaren, aprotischen Lösungsmittel hin an.

Die Lösungsmittelabhängigkeit der stationären Spektren zeigt zusammenfassend folgende Ergebnisse: (i) mit steigender Polarität und Protizität sinkt die o-o-Übergangsenergie bei nahezu konstanter Stokes-Verschiebung. Der Charakter des energetischen Minimums des angeregten Zustands scheint unbeeinflusst. (iii) Eine Normalmode mit einer Frequenz von $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ ist mit der Anregung von 1MP assoziiert. (iv) Die Depopulation vom Minimum des angeregten Zustands ist stark von der Lösungsmittelumgebung beeinflusst.

5.1.2 Zeitaufgelöste Spektren

Die Auswertung der stationären Spektren zeigt einen starken Einfluss der Lösungsmittelumgebung auf die Lebensdauer des angeregten Singulett-Zustands. Mit Übergang von Wasser zum unpolaren, nicht-protischen 1,4-Dioxid ist danach eine Erniedrigung der Fluoreszenzlebensdauer um eine Größenordnung zu erwarten (Kapitel 5.1.1). Wie in Kapitel 4.2.5 diskutiert, sind interne Konversion (IC) und Interkombination (ISC) maßgeblich für den Zerfall des Singulett verantwortlich. Beide Prozesse sind aktiviert, wobei der IC-Kanal eine stärkere Temperaturabhängigkeit zeigt. Der Einfluss der Lösungsmittelumgebung auf die Kinetik wurde mittels transientser UV/Vis-Absorptions-Spektren für Wasser, Methanol, Acetonitril und 1,4-Dioxan untersucht. In allen Lösungsmitteln zeigt sich eine zueinander ähnliche zeitliche Entwicklung der zeitaufgelösten Spektren. An die transienten Absorptionsdaten wurde eine Modellfunktion mit zwei exponentiellen Zerfällen und einem Offset angepasst. Unterschiede zwischen den Lösungsmitteln werden, wie folgt, anhand ausgewählter transientser Spektren und Zeitverläufen diskutiert.

In Abbildung 5.5 (linke Grafik) sind die Zeitverläufe bei einer Abfragewellenlänge von 450 nm dargestellt. Die Kinetik auf einer Zeitskala bis $\sim \mathcal{O}(10\text{ ps})$ (grau hinterlegt) ist, analog zu den Ausführun-

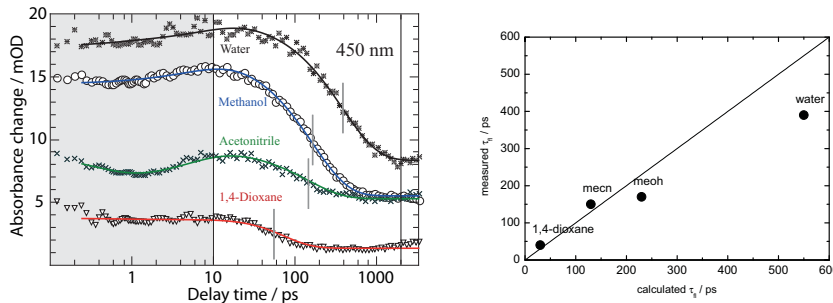


Abbildung 5.5: Einfluss der Lösungsumgebung auf die Zerfallskinetik von 1MP: (linke Grafik) Zeitverläufe bei 450 nm für 1MP (Datenpunkte) und Anpassung aus globaler Datenanalyse (Kurven). Relaxationsprozesse auf einer Zeitskala bis ~ 10 ps (grau unterlegt) werden von dem Zerfall des angeregten Singulett-Zustands gefolgt. Die Zeitkonstante (graue Markierung) nimmt mit sinkender Dielektrizitätskonstante ab (rechte Grafik). Der Vergleich von den gemessenen Zeitkonstanten mit den aus stationären Spektren abgeschätzten zeigt eine Übereinstimmung innerhalb einer relativen Abweichung von 10 – 40 %. Linke Grafik aus Referenz [108] entnommen.

gen in Kapitel 4.2.2, der dielektrischen und Schwingungsrelaxation zum Singulett-Minimum zuzuschreiben. Der Zerfall dieser Singulett-Population erfolgt dann auf einer Zeitskala von $\mathcal{O}(10 - 100 \text{ ps})$. Die aus der globalen Datenanalyse erhaltenen Fluoreszenzzerfallszeiten τ_{fl} sind in den Zeitverläufen markiert. Eine Auftragung der Werte gegen die in Kapitel 5.1.1 aus den stationären Spektren abgeschätzten ist in der rechten Grafik abgebildet (Abbildung 5.5). Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen ihnen. Die Abnahme der Zerfallszeiten mit sinkender Lösungsmittel-Polarität deutet auf einen starken Einfluss der Lösungsumgebung auf die Aktivierungsparameter des Zerfalls hin. Nachdem interne Konversion und Interkombination aktiviert sind, kann nur über das Einbeziehen der Triplett-Ausbeute eine präzisere Interpretation des Lösungsmiteleinflusses erfolgen. Für Wasser wurde eine Triplett-Ausbeute von $\phi_t \approx 0.5$ bei Raumtemperatur ermittelt (siehe Kapitel 4.2.2). Unter der Annahme, dass die Oszillatorstärke der Triplett-Triplett-Absorption nicht vom Lösungsmittel abhängt, kann, relativ zum Wert für Wasser, die Triplett-Ausbeute für die Lösungsmittel über das Spektrum zu späten Verzögerungszeiten ermittelt werden.

5.1.2.1 Triplett-Spektren

In Abbildung 5.6 sind die transienten 1MP-Spektren in den untersuchten Lösungsmitteln bei einer Verzögerungszeit von 2 ns gezeigt. Die ausgeprägte Bande um 430 nm zeigt eine leichte Verschiebung ($\sim 10 \text{ nm}$) zu kürzeren Wellenlängen bei Übergang zu unpolaren

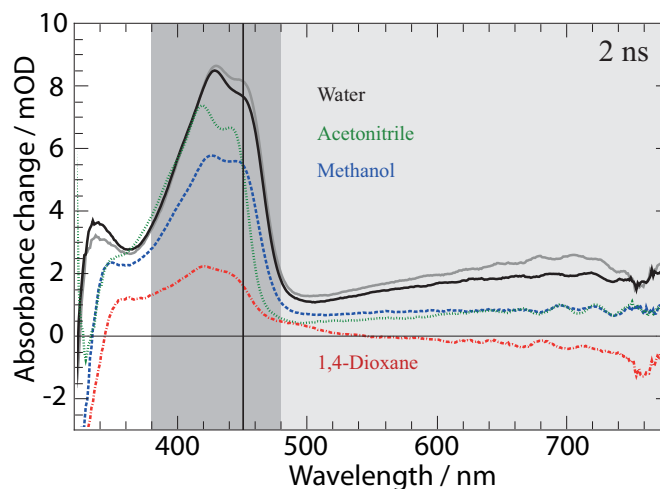


Abbildung 5.6: Einfluss des Lösungsmittels auf das Triplett-Spektrum: Alle Spektren sind von ihrer Signalstärke her direkt vergleichbar. Die Triplett-Quantenausbeuten wurden über das Integral von 380 – 480 nm (dunkelgrau hinterlegt) und dem Vergleich mit dem Wert für Wasser ermittelt. Für den Wellenlängenbereich > 500 nm (grau hinterlegt) kann ein größerer Fehler durch die Lösungsmittelkorrektur nicht ausgeschlossen werden. Mit sinkender Dielektrizitätskonstante ist eine Abnahme der Triplett-Ausbeute zu erkennen. Die Bande um ~ 430 nm erfährt eine Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen in der Größe von ~ 10 nm beim Übergang von Wasser zu 1,4-Dioxan.

Lösungsmitteln (Ein spezifischer Einfluss der Protizität konnte nicht ausgeschlossen werden). Dies spricht für einen $n\pi^*$ -Charakter des Triplett-Zustands [194]. Diese Zuordnung ist im Einklang mit einer Bevölkung vom $\pi\pi^*$ -Singulett. Wie im Abschnitt 4.2.5 dargelegt, beträgt der prä-exponentielle Faktor für die Interkombination (ISC) von 1MP $3 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1}$. Dieser Wert legt nahe, dass effektive Spin-Orbit-Koppelungselemente existieren. Diese liegen vor, wenn ein ISC-Prozess mit einer Änderung der Elektronenkonfiguration einhergeht [175, 2].

Die direkte Vergleichbarkeit der Bandenhöhen wurde gewährleistet, indem folgenden Punkten Rechnung getragen wurde: (i) Etwaige Drifts zwischen den Messungen in den verschiedenen Lösungsmitteln wurden ausgeschlossen, indem sie in einer zusammenhängenden Messreihe aufgenommen wurden. Dabei wurde mit der Messung im Lösungsmittel Wasser begonnen, die nach Abschluss der Reihe nochmals durchgeführt wurde. Der Vergleich der Spektren (schwarze und graue Kurve) zeigt eine gute Übereinstimmung. (ii) Die lösungsmittelabhängige Absorption von 1MP wurde mit einberechnet. Die angesetzten Konzentrationen von $\sim 3 - 5$ mM bedingten Signalbeiträge des Lösungsmittels, auf welche korrigiert werden musste. Die Angewendeten Korrekturen sind in Kapitel 3.3 beschrieben.

Solvent	τ_{fl} / ps	ϕ_{isc} (RT)	$k_{\text{ic}} / 10^9 \text{s}^{-1}$	$k_{\text{isc}} / 10^9 \text{s}^{-1}$
H ₂ O	390	0.5	1.3	1.3
MeOH	170	0.35	3.9	2.0
MeCN	150	0.34	4.5	2.3
1,4-Dioxane	40	0.13	19.9	2.9

Tabelle 5.2: Einfluss des Lösungsmittel auf die Ratenkonstante von interner Konversion und Interkombination: Die aus der experimentell ermittelten Fluoreszenzlebensdauer τ_{fl} und Triplet-Quantenausbeute k_{isc} berechneten Ratenkonstanten für interne Konversion k_{ic} und Interkombination k_{isc} zeigen eine Lösungsmittelabhängigkeit. Beide nehmen mit sinkender Dielektrizitätskonstante zu.

Die Höhe der Spektren zeigt eine Abnahme mit abnehmender Polarität und Protizität des Lösungsmittels. Die Triplet-Quantenausbeute (bei Raumtemperatur) erniedrigt sich in gleicher Weise. Zum Abschätzen der Ausbeute wurde das Integral von 380 nm bis 480 nm (dunkelgrau hinterlegt) betrachtet. Der Bereich > 500 nm (grau hinterlegt) wurde nicht mit einbezogen, da sich hier starke Beiträge des Lösungsmittels zeigten. Besonders bei 1,4-Dioxan waren die Beiträge vergleichbar mit dem Signal von 1MP. Das physikalisch unsinnige negative Signal ist dadurch erklärbar. Zudem sind für Methanol und Acetonitril in diesem Bereich die Signale gleich hoch. Für die Bande < 500 nm konnte abgeschätzt werden, dass die Fehler in den Signalthöhen nicht größer als der Unterschied zwischen der Messung in Wasser vor und nach der Messreihe sind.

Die absoluten Triplet-Quantenausbeuten sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Basierend auf diesen Werten und den Fluoreszenzlebensdauern können über

$$\phi_{\text{isc}} = \frac{k_{\text{isc}}}{k_{\text{isc}} + k_{\text{ic}}} = k_{\text{isc}} \tau_{\text{fl}} \quad (5.4)$$

die Ratenkonstanten für interne Konversion k_{ic} und Interkombination k_{isc} berechnet werden. Andere Deaktivierungskanäle sind vernachlässigbar. Die strahlende Ratenkonstante für 1MP in Wasser ist mit 0.07 ns^{-1} eine Größenordnung kleiner und noch geringer für die anderen Lösungsmittel. Die zeitaufgelösten Spektren liefern zudem keinen Hinweis auf weitere Prozesse.

Die berechneten Werte (Tabelle 5.2) zeigen, dass beide Prozesse durch die Lösungsmittelumgebung beeinflusst sind. Es ist ein systematischer Anstieg beider Ratenkonstanten mit abnehmender Lösungsmittel-Polarität zu beobachten. Der zugrundeliegende Mechanismus kann über Analyse der Ratenkonstanten in Verbindung mit dem Arrhenius-Ansatz (Gleichung 4.3) ermittelt werden.

Im Fall, dass die Lösungsumgebung ausschließlich Einfluss auf den prä-exponentiellen Faktor hat, besteht bei konstant gehaltener Temperatur ein rein linearer Zusammenhang zwischen den Ratenkonstanten und dem prä-exponentiellen Faktor $k_{ic,isc}^0$:

$$k_{ic,isc} \propto a_{ic,isc} \cdot k_{ic,isc}^0. \quad (5.5)$$

Für die in Tabelle 5.2 angegebenen Ratenkonstanten und den in Abschnitt 4.2.5 angegebenen prä-exponentiellen Faktoren würde dies bedeuten, dass sich bei Übergang von unpolaren Lösungsmitteln zu Wasser die Proportionalitätskonstante a für IC und ISC von 1 auf ~ 15 bzw. ~ 2 erhöht.

Die andere Möglichkeit besteht in einer Modifikation der Aktivierungsbarrieren:

$$E_{ic,isc} = a_{ic,isc} \cdot E_{ic,isc}^0. \quad (5.6)$$

Die experimentellen Daten sind mit der Arrhenius-Gleichung 4.3 nur dann vereinbar, wenn $a_{ic} = (0.99 \pm 0.04) \cdot a_{isc}$ gilt. Dies bedeutet, dass beide Energiebarrieren in gleicher Weise beeinflusst werden. Damit reduziert sich die Anzahl der Parameter auf $a = a_{ic} = a_{isc}$. Er vermindert sich von 1 für Wasser auf ~ 0.7 für unpolare Lösungsmittel.

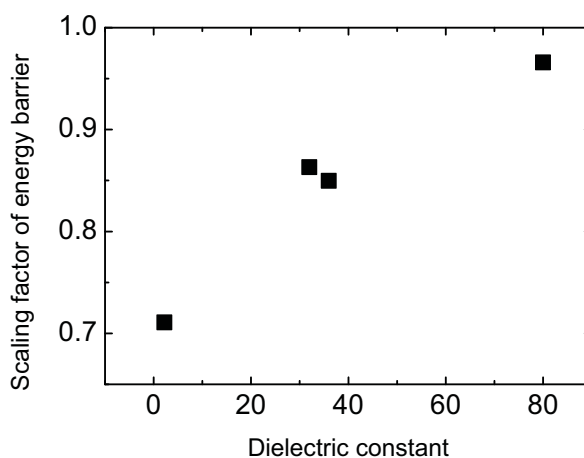


Abbildung 5.7: Einfluss der Dielektrizitätskonstante auf die Aktivierungsenergie der inneren Konversion und Interkombination: Der Skalierungsfaktor a (siehe Text) ist gegen den Lösungsmitteleparameter aufgetragen. Mit sinkender Dielektrizitätskonstante ϵ verringert sich die Barrierenhöhe um den Faktor a . Beide Prozesse, innere Konversion und Interkombination, sind in gleicher Weise beeinflusst.

Der Skalierungsfaktor für die Energiebarrieren a zeigt einen nahezu linearen Zusammenhang mit der dielektrischen Konstante des Lösungsmittels (siehe Abbildung 5.7). Eine Auftragung gegen den empirischen Parameter E_T^N erzielt eine schlechtere Korrelation. Es tritt ein

Bruch zwischen der Gruppe der protischen und aprotischen Lösungsmittel auf. Dies ist ein Indiz dafür, dass der Einfluss des Lösungsmittels ausschließlich auf seine dielektrische Eigenschaft zurückzuführen ist. Diese Interpretation lässt außer Acht, dass sehr wohl weitere lösungsmittelspezifische Eigenschaften, wie z.B. Viskosität, Wärmekapazität, etc., eine Rolle spielen könnten.

5.2 EINFLUSS ZUSÄTZLICHER METHYL-GRUPPEN

Neben der kovalenten Bindung am N1 des 2-Pyrimidinon-Motivs ist in P(6-4)P-Photo-Schäden ebenfalls das Pyrimidin über das C6-Atom mit dem C4-Atom des Pyrimidinons verknüpft (siehe Abbildung 4.11). Diese C6-C4-Bindung ist das typische chemische Motiv dieser Schäden und nicht zuletzt namensgebend. Für das Modellsystem 64ac wurde eine Fluoreszenzlebensdauer von ~ 100 ps bestimmt. Der Wert für 1MP in Acetonitril in Höhe von 150 ps kommt diesem Wert nahe — die Temperaturen beider Messungen waren vergleichbar. Jedoch ist die Triplett-Quantenausbeute von 1MP in Acetonitril mit 0.34 (34%) signifikant höher als die von 64ac in Wasser mit < 0.1 ($< 10\%$). Die schnellere Entvölkerung des angeregten Singulets von 64ac kann deshalb nicht alleine durch Lösungsmittelleffekte begründet werden. Das Substitutionsmuster könnte einen Einfluss auf das Verhältnis zwischen innerer Konversion und Interkombination ausüben.

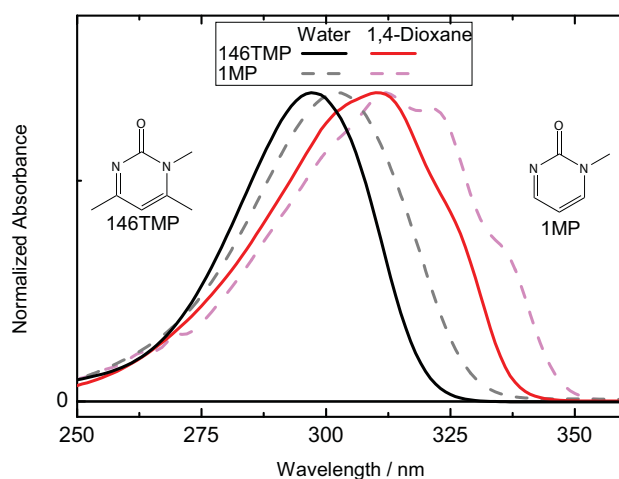


Abbildung 5.8: Absorptionsspektren von 146TMP in Wasser (schwarz) und 1,4-Dioxan (rot). Zum Vergleich sind die Spektren von 1MP (gestrichelt grau und magenta, respektive) eingezeichnet. Neben einer "Blau"-Verschiebung mit C4/C6-Methylierung ist eine schwächer ausgeprägte Schwingungsprogression zu erkennen.

Das Absorptionsmaximum von 146TMP ist gegenüber dem von 1MP um $\sim 400 \text{ cm}^{-1}$ "blau"-verschoben (Abbildung 5.8). Wie bei 1MP beobachtet, ist hin zu unpolaren Lösungsmitteln die Ausprägung der Schwingungsprogression zu erkennen, allerdings schwächer als für 1MP. Die mit ihr verbundene Schwingungsfrequenz von $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ kann, wie schon für 1MP diskutiert, nicht eindeutig zugeordnet werden, ist aber im Rahmen der Messgenauigkeit höher.

In der Diplomarbeit von Stefan Hugenbruch [195] wurden Absorptions- und Emissionsmessungen an 146TMP in verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die molaren Absorptionskoeffizienten vergleichbar mit 1MP sind. Die zusätzlichen Methylierungen zeigen somit nur einen geringen Einfluss auf die Oszillatorstärke von 1MP. Strickler-Berg-Abschätzungen liefern zudem eine vergleichbare strahlende Ratenkonstante. Die Fluoreszenzquantenausbeuten (siehe Tabelle 5.3) sind gegenüber 1MP deutlich erniedrigt und deuten auf eine schnellere Entvölkerung des Singulett-Zustands hin.⁴

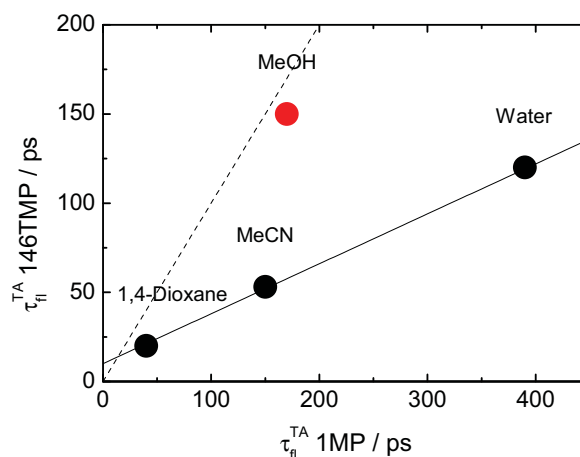


Abbildung 5.9: Auftragung der Fluoreszenzlebensdauern von 146TMP in verschiedenen Lösungsmitteln gegen die entsprechenden Zeitkonstanten von 1MP. Die Werte wurden über globale Datenanalyse der transienten Absorptionsspektren erhalten. Bis auf Methanol zeigt sich eine systematische Beschleunigung der Singulett-Zerfalls durch die zusätzlichen Methyl-Gruppen. Als visuelle Hilfe ist eine Gerade mit Steigung ~ 0.28 (durchgezogene Linie) und Steigung 1 (gestrichelt) eingezeichnet.

Messungen in den Lösungsmitteln Wasser, Methanol, Acetonitril und 1,4-Dioxane bestätigen die kürzere Fluoreszenzlebensdauer (Tabelle 5.3 und Abbildung 5.9). Es ist anzumerken, dass der Wert von 146TMP in Methanol aus der Reihe fällt und eher den Werten von

⁴ Nicht alle Werte aus der Diplomarbeit konnten reproduziert werden. Alle hier präsentierten Werte wurden reproduziert.

Wasser entspricht. Der schnellere Zerfall des angeregten Singulett könnte auf eine geringere Ausbeute der Interkombination hinweisen. Die Triplett-Quantenausbeute von 146TMP wurde deshalb über den Vergleich der transienten Spektren mit denen von 1MP bestimmt. In Abbildung 5.10 ist dies für das Lösungsmittel Wasser und Acetonitril dargestellt. Die Messungen von 1MP und 146TMP wurden unter vergleichbaren, aber nicht denselben experimentellen Bedingungen aufgenommen. Die Signalhöhe der stimulierten Emission (linke Grafik) ist für 1MP und 146TMP ungefähr gleich stark. Nachdem die Oszillatorstärken ebenfalls vergleichbar sind, kann von ähnlich starken Populationen des angeregten Zustands beider Moleküle ausgegangen werden. Die Triplett-Quantenausbeute kann deshalb über den direkten Vergleich der Offsetspektren (rechte Grafik) erhalten werden.

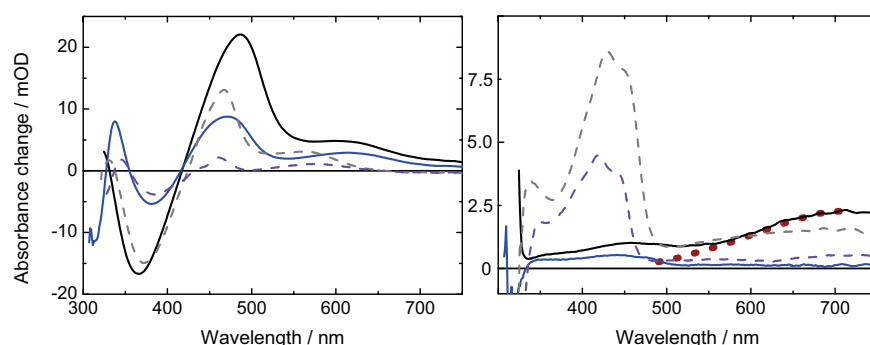


Abbildung 5.10: Aus TA-Daten gewonnene Amplitudenspektren von 146TMP (durchgezogene Linien) im Vergleich zu 1MP (gestrichelt) für zwei Lösungsmittel, Wasser (schwarz/grau) und Acetonitril (blau/violett). In der linken Grafik finden sich die mit dem Singulett-Zerfall assoziierten Amplitudenspektren. Die gute Übereinstimmung in den Höhen der stimulierten Emission (~ 370 nm) indizieren eine vergleichbare Singulett-Population. In der rechten Grafik sind die Offsetspektren eingezeichnet. 146TMP zeigt eine geringere Triplett-Quantenausbeute als 1MP. Zum Vergleich ist das (skalierte) Absorptionsspektrum des solvatisierten Elektrons in Wasser mit eingezeichnet (dunkelrote Punkte, aus Referenz [196] übernommen).

Die Offsetspektren zeigen für 146TMP eine schwache Bande um ~ 440 nm, die wie für 1MP als Maß für die Triplett-Quantenausbeute dient. Es zeigt sich, dass durch die zusätzlichen Methylierungen nur noch $\mathcal{O}(10\%)$ der Triplett-Quantenausbeute wie für 1MP erreicht wird. Unter Einbeziehen der experimentellen Parameter können Ausbeuten von $\sim 0.04 - 0.09$ (Acetonitril zu Wasser) bei Raumtemperatur abgeschätzt werden (Tabelle 5.3).

Im Spektralbereich von ~ 500 nm hin zu längeren Wellenlängen ist ein nahezu flacher Signal-Beitrag zu erkennen. Dies deutet auf die Generierung solvatisierter Elektronen hin. Diese Spezies kann von Mehrphotonenabsorption des Lösungsmittels [138, 139] herrühren oder

durch das Pyrimidinon generiert werden — es ist bekannt, dass Polynukleotide Elektronen freisetzen können [197]. Für Acetonitril nimmt der langwellige Absorptionsbeitrag von 1MP zu 146TMP um einen Faktor ~ 2.5 hin ab; für die ~ 400 nm-Bande ist eine Abnahme um den Faktor ~ 8 zu erkennen. Diese Diskrepanz spricht dagegen, dass die Signale in den verschiedenen Spektralbereichen von der gleichen Spezies herrühren. Wie schon im Abschnitt 5.1.2 diskutiert, muss für den > 500 nm-Spektralbereich ein größerer Fehler angenommen werden. Für beide Moleküle sind Lösungsmittelkorrekturen angewendet worden, die vor allem im längerwelligen Bereich Beiträge zeigen. Die Messungen in Wasser zeigen ein annähernd gleich starkes Signal des Offsetspektrums beider Moleküle für den langwelligen Spektralbereich. Dabei ist für 146TMP ein steilerer Anstieg zu erkennen als für 1MP. Die Form der Kurve ändert sich nicht bei Messungen für eine höhere Konzentration von 146TMP (optische Dichte von 1.7 im Vergleich zu 0.5). Für Wellenlängen > 550 nm stimmt die Kurve gut mit dem Absorptionsspektrum des solvatisierten Elektrons in Wasser überein [196]. 2(1H)-Pyrimidinone, vor allem 146TMP, sind demnach höchstwahrscheinlich eine Quelle für solvatisierte Elektronen.

solvent	$\tau_{\text{fl}}^{\text{TA}} / \text{ps}$	ϕ_{fl}	ϕ_{isc}
H ₂ O	120	0.0042	0.085
MeOH	150		0.08
MeCN	53		0.043
1,4-Dioxan	20	0.0017	

Tabelle 5.3: Photophysikalische Eigenschaften von 146TMP in verschiedenen Lösungsmitteln. Aus den transienten Absorptionsspektren über globale Datenanalyse erhaltene Werte für die Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{\text{fl}}^{\text{TA}}$ und Triplett-Quantenausbeute ϕ_{isc} . Angaben zur Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_{fl} sind aus Referenz [195] entnommen.

Die lösungsmittelabhängigen Messungen an 146TMP lassen folgende Schlussfolgerungen zu: (i) Der angeregte Singulett-Zustand ist sensitiv auf die zusätzlichen Methylierungen an C4 und C6 von 1MP. Seine Entvölkerung ist durch die Substituenten beschleunigt. (ii) Die höhere Zerfallsrate kann nicht auf einen "reinen" Lösungsmittelfekt der Methylgruppen zurückgeführt werden. Dies ist durch die extreme Abnahme der Triplett-Quantenausbeute gegenüber den in Abschnitt 5.1.2 berichteten ersichtlich. Basierend auf dem Modell für 1MP (siehe Abschnitt 4.2.5) sind die Befunde mit einer Abnahme der Aktivierungsenergie auf $\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ für innere Konversion und einer leichten Erhöhung der Aktivierungsenergie auf $\sim 700 \text{ cm}^{-1}$ für Interkombination konsistent. (iii) Es gibt neben interner Konversion und Interkombination einen weiteren Deaktivierungsmechanismus. Für 146TMP in Wasser wurde eine weitere Spezies (wahrscheinlich

ein solvatisiertes Elektron) nach dem Singulett-Zerfall beobachtet. Für 5-Methyl-Zubularin, ein 2(1*H*)-Pyrimidinon mit Zucker- und Methyl-Substitution, wurden ROS nachgewiesen [85]. Nach einer Photoanregung werden Sauerstoff im Singulett-Zustand und Hydroxyl-Radikale gebildet. Hinweise auf solvatisierte Elektronen wurden in Referenz [85] nicht genannt.

Die zeitaufgelösten Messungen von ¹⁴⁶TMP in Wasser zeigen einen Fluoreszenzzerfall mit einer Zeitkonstante von ~ 120 ps. Die Triplett-Quantenausbeute konnte auf ~ 0.085 (8.5%) abgeschätzt werden. Für das Modellsystem 64ac in deuteriertem Wasser sind die entsprechenden Werte ~ 120 ps und $\sim 0.025 - 0.08$ (2.5 – 8%). Basierend auf diesen Ergebnissen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass für die Photophysik des T(6-4)T-Schadens in Wasser die kovalenten Bindungen zum Phosphat-Zucker-Rückgrat und nicht die lokale Lösungsumgebung verantwortlich sind.

PHOTOKINETIK DES 1MP-TRIPLETT-ZUSTANDS

Der Triplett von 1MP hat eine Lebensdauer von $\sim 8 \mu\text{s}$. Bimolekulare Wechselwirkungen können diese Lebensdauer stark verkürzen. Neben der "Löschung" des angeregten Triplets durch Sauerstoff und 1MP im Grundzustand konnte ein weiterer Deaktivierungskanal aufgedeckt werden. Von Molekülen, die ein $-\text{CH}_2 - \text{O}$ -Motiv enthalten, kann 1MP Wasserstoff abstrahieren. In T(6-4)T-Schäden ist die Deoxy-Ribose (dR) des Phosphat-Zucker-Rückgrats, welche das gleiche chemische Motiv aufweist, in direkter Nachbarschaft zum Pyrimidinon-Chromophor. Die bimolekulare Reaktion von dR mit 1MP konnte nachgewiesen werden.

6.1 SPEKTRAL AUFGELÖSTE NANOSEKUNDEN-SPEKTROSKOPIE AN 1MP IN WASSER

In Kapitel 4 wurde die Populierung des 1MP-Triplets postuliert. Diese Zuordnung wurde durch Vergleich mit Ergebnissen für anderen Pyrimidinon-Derivate gestärkt [26, 85]. Die in Kapitel 4 diskutierten zeitaufgelösten IR-Messungen ergaben eine für Triplett-Zustände recht kurze [29, 2] Lebensdauer von $\sim 40 \text{ ns}$. Dies wurde der Selbstlöschung von 1MP zugeschrieben. Um die Ratenkonstante der Selbstlöschung und die intrinsische Ratenkonstante (oft als natürliche Ratenkonstante bezeichnet) zu bestimmen, wurde die Abhängigkeit der Zerfallszeit des Triplets von der Konzentration in einem einkanali-gen Nanosekundenexperiment im sichtbaren Spektralbereich (635 nm) durchgeführt (siehe Abbildung 6.1).

Es wurden die Zerfälle für eine Konzentration von 50 mM 1MP und einer 10-fache Verdünnung in sauerstoffbefreitem Wasser aufgenommen. Der Einfluss von durch die Anregung gebildeten solvatisierten Elektronen wurde durch Zugabe von Salpeter (NaNO_3) vermieden (siehe Abschnitt 3.2.3). Bei Konzentrationen von 10 mM wird erwartet, dass Nitrationen solvatisierte Elektronen innerhalb von $\sim 10 \text{ ns}$ löschen [142].¹ Eine mono-exponentielle Anpassung lieferte eine Zeitkonstante von 60 ns bei 50 mM 1MP bzw. 360 ns bei 5 mM 1MP. Messungen für eine stärkere Verdünnung waren wegen des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nicht möglich.

¹ In zukünftigen Experimenten sollte die gängige Praxis des Spülens mit N_2O umgesetzt werden. Neben einer effektiven Unterdrückung solvatisierter Elektronen ist eine Sauerstoff-Befreiung der Lösung garantiert.

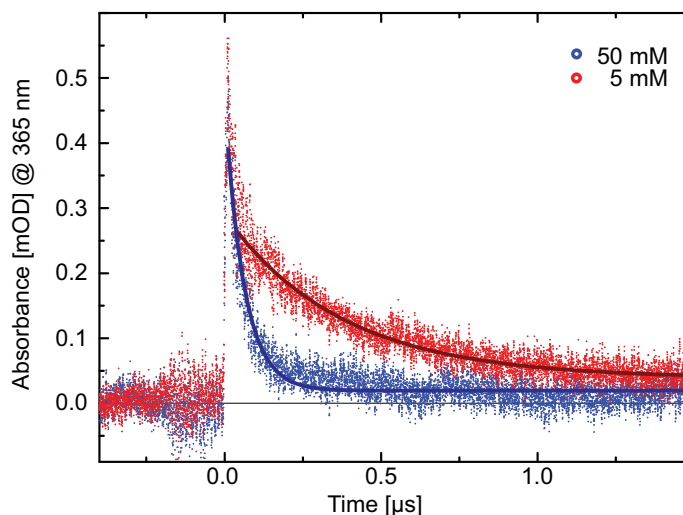


Abbildung 6.1: Nanosekunden zeitaufgelöste Absorptionsänderung von 1MP bei 365 nm. In einer 10 mM-igen Lösung von Salpeter (NaNO_3) in Wasser wurde 1MP mit ~ 90 fs-Impulsen bei ~ 266 nm angeregt. Die durch die hohe Intensität erzeugten solvatisierten Elektronen wurden durch die NO_2^{2-} -Ionen unterdrückt. Eine Erniedrigung der 1MP-Konzentration zeigt ein längeres Zerfallssignal. Abbildung aus [27] entnommen.

Deshalb wurden 1MP in Wasser mittels der Flash-Photolyse-Technik charakterisiert.²

Neben der zusätzlichen Wellenlängeninformation waren die verwendeten Impulsintensitäten um ein bis zwei Größenordnungen geringer. In Abbildung 6.2 ist der Datensatz der transienten Spektren von 0.3 mM 1MP in einem Zeitfenster bis $\sim 50 \mu\text{s}$ dargestellt. Es zeigt sich ein positives Signal bei ~ 430 nm, welches innerhalb von Mikrosekunden abfällt. Bei ~ 300 nm bleibt bis zur größten Verzögerungszeit ein negativer Beitrag vom Grundzustandsausbleichen erhalten; damit einher geht ein positiver Beitrag bei ~ 330 nm.

In Abbildung 6.3 sind die Amplitudenspektren der globalen Datenanalyse dargestellt. Die Daten konnten über eine Zerfallszeit von $\sim 5 \mu\text{s}$ und einem Offset modelliert werden. Die Form des Amplitudenspektrums für den Zerfall stimmt mit dem Triplett-Spektrum aus den Femtosekundenexperimenten überein.

Es zeigt sich demnach eine gute Übereinstimmung zwischen Femtosekunden- und Nanosekundenmessungen — Mehrphotonenprozesse in den Femtosekunden-Messungen können daher ausgeschlossen werden. Das Offsetspektrum der Datenanpassung zeigt, dass eine längerlebige ($> 100 \mu\text{s}$) Spezies existiert. In Abschnitt 4.2.2 wurde dies

² Messungen mit der ns-IR-Anlage in München wurden nicht durchgeführt. Vom Signal-zu-Rausch-Verhältnis und der zusätzlich mehrkanaligen Messung würde sich dies anbieten.

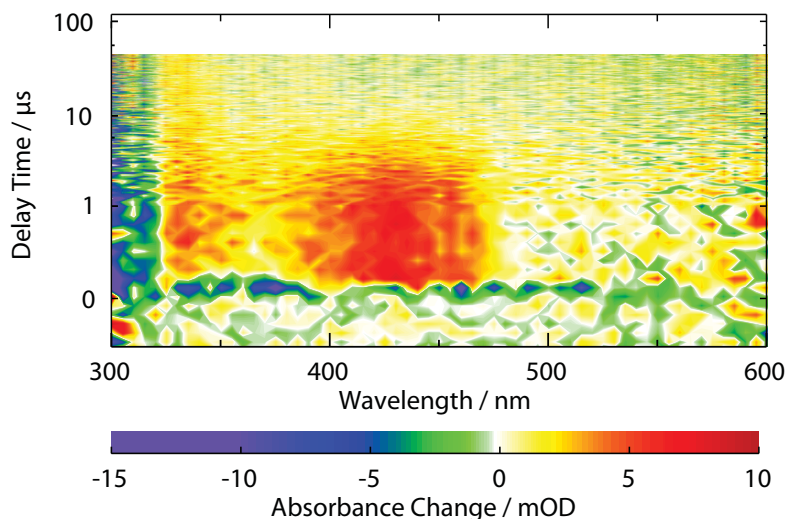


Abbildung 6.2: Flash-Photolyse von 1MP in Wasser: Spektral aufgelöste Flash-Photolyse-Messung von 1MP in sauerstoffbefreitem Wasser. Die Konturdarstellung zeigt positive (rot) Beiträge um ~ 430 nm die innerhalb von Mikrosekunden verschwinden. Bis zum Ende des zeitlichen Fensters von ~ 50 μ s bleibt ein positiver Beitrag bei ~ 330 nm bestehen. Der negative (blau) Beitrag am Detektionsende von ~ 300 nm ist dem Grundzustandsausbleichen zuzuschreiben.

auch in den ns-Transienten im IR-Spektralbereich gefunden (siehe dazu Abbildung 4.6). Dort wurde eine Population von ~ 0.1 (10%) bezüglich der anfänglich angeregten Moleküle abgeschätzt.

In einer Messreihe wurde die Konzentration von 1MP variiert (siehe Abbildung 6.4). Basierend auf diesen Daten wurde eine Analyse der Selbstlöschung durchgeführt. Über die Stern-Volmer-Gleichung [198]

$$k = \frac{1}{\tau} = k_0 + k_{\text{sq}}[1\text{MP}] \quad (6.1)$$

kann aus den Zerfallszeiten τ für verschiedene Konzentrationen von 1MP [1MP] die natürliche Ratenkonstante k_0 und die der Selbstlöschung k_{sq} abgeschätzt werden. Der Triplett von 1MP zerfällt demnach mit einer Zerfallszeit von $\frac{1}{k_0} \sim 8$ μ s. Für ein 1MP-Derivat wurde ein Triplett-Zerfall bei 420 nm mit einer Zerfallszeit von 9.7 μ s berichtet [85]. Die Form der angegebenen Spektren ist im Rahmen des Rauschens vergleichbar mit den hier abgebildeten. Für die Selbstlöschung wurde aus Abbildung 6.4 ein Wert von $k_{\text{sq}} = 0.6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ermittelt. Dieser Wert ist gleich dem für Thymin berichteten [199].

Eine Abschätzung aus den Flash-Photolyse-Messungen ergibt einen molaren Absorptionskoeffizienten des 1MP-Triplets in Wasser in Höhe von $\sim 2400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Aus den femtosekundenzeitaufgelösten Absorptionsmessungen kann ein molarer Absorptionskoeffizient in Hö-

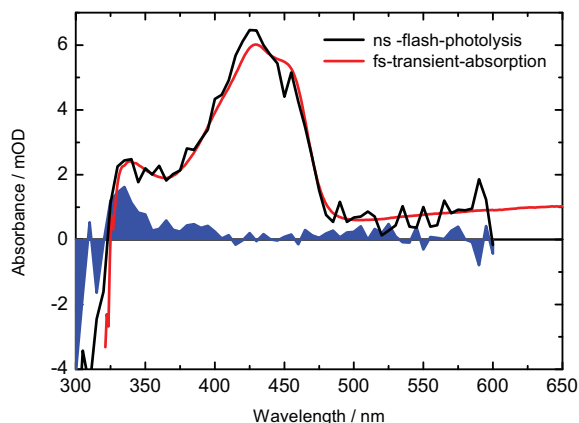


Abbildung 6.3: Die Amplitudenspektren des Triplett-Zerfalls (aus Abbildung 6.2) von 1MP in Wasser. Das Amplitudenspektrum eines Zerfalls innerhalb von Mikrosekunden (schwarze Linie) stimmt der Form her mit dem Triplettpektrum aus den Femtosekundenmessungen (rote Linie, skaliert) überein. Es bleibt nach 1 – 100 μ s ein Signalbeitrag bestehen (blaue Fläche). Neben dem negativen Beitrag der Grundzustandserholung ist ein positiver Beitrag einer weiteren Spezies erkennbar.

he von $\sim 4500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ermittelt werden. Beide Abschätzungen ergeben für den Koeffizienten einen mittleren Wert von ungefähr $3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und sind in vergleichbarer Höhe mit dem von Thymin-Derivaten [83].

6.2 WASSERSTOFFABSTRAKTION DURCH DEN 1MP-TRIPLETT

In Wasser ist die Reaktionquantenausbeute (RQY) — hier über die Abnahme des Edukts bestimmt — mit 0.003 (0.3%) gering. Es zeigt sich aber eine um Größenordnungen höhere Ausbeute in anderen Lösungsmitteln. In Methanol ist, bei Sauerstoffbefreiung (siehe Abschnitt 3.1.3), eine RQY von ~ 0.35 (35%) beobachtet worden[108]. In Abbildung 6.5 ist das Produktspektrum abgebildet — das Produktspektrum wurde nicht aus einer vollständigen Umbelichtung, sondern durch Subtrahieren vom skalierten Eduktspektrum erhalten. Die schwache Signatur um $\sim 350 \text{ nm}$ ist einer Verunreinigung zuzuordnen (siehe Abschnitt 4.2.1). Es zeigt sich, dass bei Belichtung um Wellenlängen im Bereich der niederenergetischen Bande ($\sim 300 \pm 30 \text{ nm}$) diese verschwindet und eine ausgeprägte Absorption um $\sim 250 \text{ nm}$ sichtbar wird.

Diese Reaktion lässt sich durch Belichtung des Produkts umkehren. Die Belichtung bei $\sim 250 \text{ nm}$ geht mit einem Rückgang des Produktspektrums einher. Dabei erscheint wieder ein Absorptionsspek-

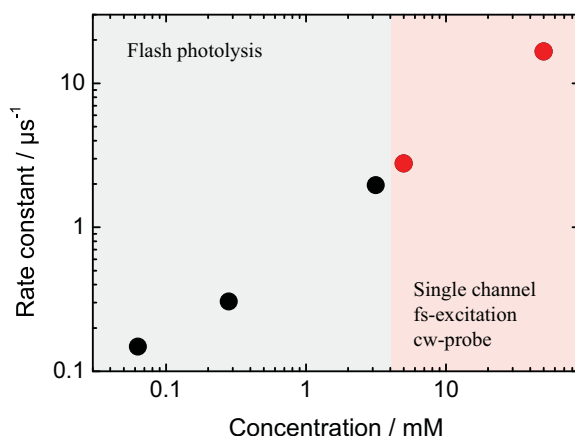


Abbildung 6.4: Stern-Volmer-Plot für 1MP in Wasser. Die roten Messpunkte sind die in Abbildung 6.1 mittels einkanaliger transientser Absorption erhobenen Werte. Die Abfragewellenlänge lag bei 635 nm. Die schwarzen Messpunkte wurden aus einer spektral breitbandigen Flash-Photolyse-Messung, wie in Abbildung 6.2 dargestellt, erhalten.

trum ($\text{RQY} \sim \mathcal{O}(0.05)$), welches dem von 1MP entspricht. Czochralska *et.al.* berichten von der photochemischen Umwandlung von 6,6'-bis-Pyrimidinon-Dimeren zu ihren Monomeren [201, 202, 203, 200]. Ein Vergleich des Spektrums vom 6,6'-bis-Dimer von 1MP [200] mit dem Produktspektrum der Umbelichtung von 1MP in Methanol zeigt eine gute Übereinstimmung (siehe Kurven in Abbildung 6.5).

Die Übereinstimmung des Produktspektrums und die ebenfalls beobachtete "Photoreversibilität" sprechen für einen Mechanismus wie in Abbildung 6.6 dargestellt. Eine Wasserstoffabstraktion vom Lösungsmittel mit einer darauffolgenden Dimerisierung ist im Einklang mit den Beobachtungen.³ Für substituierte 2(1H)-Pyrimidinone wurden inter- und intramolekulare Wasserstoffabstraktion beobachtet [91, 93]. Es ist bekannt, dass photoangeregte Carbonyl-Verbindungen Wasserstoff abstrahieren können [29, 204, 2]. Das bei Wasserstoff-Abstraktion gebildete Ketyl-Radikal kann über den Singulett- wie auch den Triplett-Kanal gebildet werden [29, 204, 2]. Die Abhängigkeit der Reaktion von der Sauerstoffkonzentration des Lösungsmittels ist ein Indiz für die Beteiligung eines Triplett-Zustands [2]. In Abbildung 6.7 sind die RQY für 1MP in verschiedenen Lösungsmitteln angegeben.

Es zeigt sich, dass sich die RQY bei Sauerstoffbefreiung (mit Ausnahme von Wasser) erhöht. Daraus wird geschlossen, dass die Was-

³ Eine Belichtung von 1MP in Acetonitril mit $\lesssim 100$ fs-Impulsen bei $\lambda \approx 266$ nm ergab Reaktionsquantenausbeuten von $\mathcal{O}(10\%)$. Dieser Effekt könnte auf die Reaktion von solvatisierten Elektronen mit 1MP zurückzuführen sein. Für das mutmaßlich gebildete Ketyl-Anion könnten ähnliche Reaktionen ablaufen. Weitere Untersuchungen in diese Richtung wurden nicht gemacht.

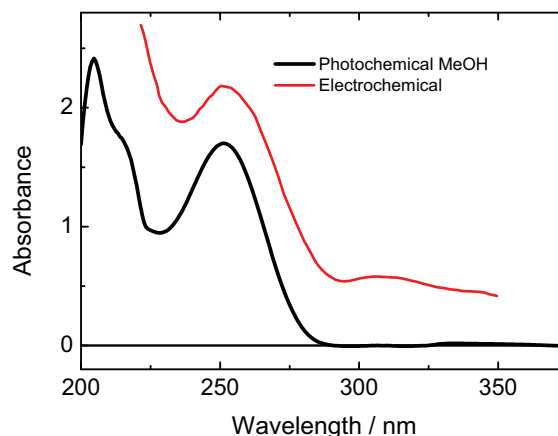


Abbildung 6.5: Spektrum des photoinduzierten 1MP-Dimers (schwarz). 1MP in Methanol wurde bei ~ 308 nm umbelichtet und der restliche Beitrag des Edukts substrahiert. Das Spektrum des 6,6'-bis-Dimers von 1MP in 10 mM-Phosphatpuffer ist aus der Arbeit von Czochralska *et. al.* [200] entnommen (rot, mit Faktor $\frac{1}{300}$ skaliert; ohne zusätzlichen Offset dargestellt.).

serstoff-Abstraktion vom Triplett-Zustand erfolgt. Diese Interpretation wird durch die Umbelichtungsversuche von 146TMP gestützt. Unabhängig vom Lösungsmittel ist annähernd die gleiche RQY von $\sim 0.02 - 0.03$ (2 – 3%) gefunden worden (siehe Abbildung 6.7). 146TMP hat eine um ungefähr eine Größenordnung geringere Triplett-Quantenausbeute als 1MP (siehe Abschnitt 5.2) und eine Reaktion über diesen Zustand fällt demnach weniger ins Gewicht.

Damit Sauerstoff einen Effekt auf die RQY haben kann, muss die Ratekonstante (pseudo-erster Ordnung) $k_{q,O_2}[O_2]$ in derselben Größenordnung wie die der Abstraktion $k_{q,S}[S]$ liegen. Unter der Annahme diffusionskontrollierter Löschung mit $k_{q,O_2} \approx 10^9 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (author?) [205] ist der Bereich der Sauerstofflöschung bei $\sim 10^6 \text{ s}^{-1}$ (für Sauerstoffkonzentrationen bei Standardbedingungen von $[O_2] \approx 0.1 - 1 \text{ mM}$ (author?) [205]). Für reine Lösungsmittel ist die Konzentration in der Größenordnung von $[S] \approx 10 \text{ M}$. Die bimolekulare Ratekonstante $k_{q,S}$ ist demnach $\mathcal{O}(10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$.

Wasserstoffabstraktion erklärt auch die viel höhere RQY in Methanol und 1,4-Dioxan im Vergleich zu Wasser und Acetonitril. Erstere Lösungsmittel sind im Vergleich zu letzteren gute Wasserstoffdonoren [206]. Für Photoreaktionen, die über einen Triplett-Zustand ablaufen, sollte die maximale Reaktionsquantenausbeute durch die Triplett-Quantenausbeute begrenzt sein. Für Methanol sind sie vergleichbar; $\sim 100\%$ des Triplets geht eine Wasserstoffabstraktion ein. Für 1,4-Dioxan ist sie ungefähr doppelt so hoch. Das durch Wasserstoffabstraktion gebildete 1,4-Dioxan-Radikal könnte ein 1MP-Molekül im Grundzustand angreifen. Solche Folge-Reaktionen in Radikalreaktio-

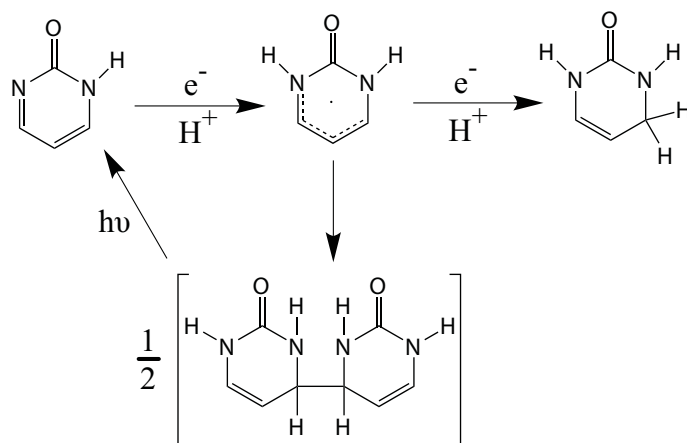


Abbildung 6.6: Elektrochemische Reduktion von 2-(1H)-Pyrimidinon nach Czocharlska *et. al.* [200]: Elektrochemisch wird eine Radikal durch Anlagerung eines Wasserstoffatoms gebildet. Dieses kann in einem weiteren (elektrochemischen) Schritt ein weiteres Wasserstoffatom anlagern oder durch Reaktion mit einem zweiten Radikal dimerisieren.

nen sind bekannt und auch für Wasserstoffabstraktion beobachtet worden [207]. Die Annahme baut zudem auf den Beobachtungen auf, dass (i) 1,4-Dioxan-Radikale nicht miteinander dimerisieren [208] und somit für Folgereaktionen verantwortlich sein können. (ii) 1,4-Dioxan-Radikale haben die Fähigkeit Wasserstoffabstraktion zu induzieren [209]. Letzteres bedeutet auch, dass ein gebildetes 1,4-Dioxan-Radikal in Folge Wasserstoff von 1MP abstrahieren könnte. Eine Umbelichtung von 1MP in 1,4-Dioxan könnte demnach, anders als in Methanol, zu einer weitaus vielfältigeren Produktbildung führen. Die nur teilweise mögliche "Photoreversibilität", die in den Umbelichtungsexperimenten gefunden wurde, könnte ein Indiz dafür sein.⁴ Aus Symmetriegründen (der bei der Abstraktion beteiligten Orbitale) ist Wasserstoffabstraktion durch $^3\pi\pi^*$ verboten. Die beobachteten hohen RQY sprechen daher für einen $n\pi^*$ -Triplet [210, 2]. Diese Zuordnung ist in Einklang mit der Zuordnung, die im vorhergehenden Kapitel gemacht wurde.

6.3 PHOTOREAKTION DES 1MP-TRIPLETTS MIT DNA-KOMPONENTEN

Es gibt einen groben Zusammenhang zwischen der Fähigkeit als Wasserstoff-Donor zu fungieren und der Bindungsenergie zum Wasserstoffatom [206]. Für Toluol, Cyclohexan liegt diese Bindungsenergie

⁴ Das NMR-Spektrum des in Dioxan umbelichteten 1MP zeigt eine Vielzahl an Signalen, die für drei unterschiedliche, aber parallel gebildete Photoprodukte sprechen. Eine genauere Analyse wurde nicht durchgeführt.

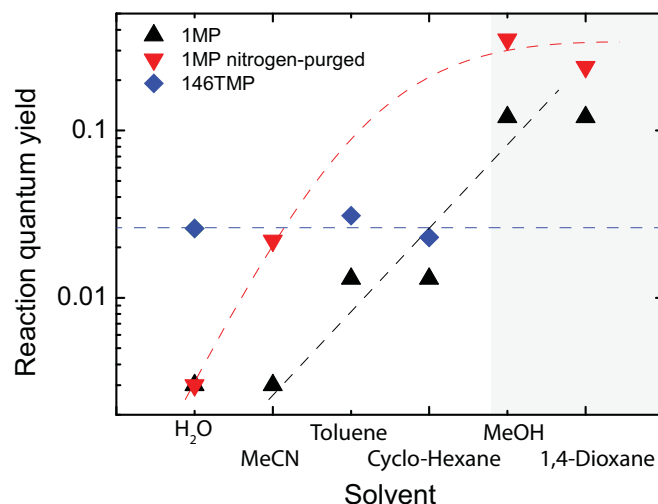


Abbildung 6.7: Logarithmische Auftragung der aus der Abnahme der niederenergetischen Absorptionsbande bestimmten Reaktionsquantenausbeute von 1MP (schwarze aufrechte Dreiecke) und 146TMP (blaue Raute). Für 1MP sind zudem die Werte für sauerstoffbefreite (rote nach unten gerichtete Dreiecke) eingezeichnet. Die Abzisse gibt das verwendete Lösungsmittel an. Die Anordnung folgt grob von schwachem Wasserstoffdonor (Wasser, Acetonitril) hin zu Lösungsmitteln mit $-\text{CH}_2-\text{O}-$ Motiv (Methanol, 1,4-Dioxan). Die gestrichelten Linien sind visuelle Hilfen.

nahe der für Methanol [185, 29] (für Wasser und Acetonitril ist der Wert um $\sim 100 \text{ kJ mol}^{-1}$ höher). Dieser Parameter allein kann die unterschiedliche Reaktivität nicht erklären. Demnach muss ein weiterer "Charakter" des Lösungsmittels eine Rolle spielen. Die Lösungsmittel in der eine hohe Reaktionsquantenausbeute beobachtet wird, hier Methanol und 1,4-Dioxan, besitzen das gemeinsame chemische Motiv $-\text{CH}_2-\text{O}-$. Diese Struktur könnte der Grund für die hohe Quantenausbeute sein. Nachdem sich dieses Motiv ebenfalls in Deoxy-Ribose (dR) wiederfindet, wurden Umbelichtungsexperimente von 1MP in wässriger dR-Lösung unter Sauerstoffausschluss durchgeführt (siehe Abbildung 6.8). Mit steigender Konzentration von dR ist eine Zunahme der RQY (ϕ_r) zu beobachten. Bei der Löslichkeitsgrenze von dR ($\sim 0.5 \text{ M}$) beträgt sie 0.063 (6.3%). Ein Anstieg der Absorption bei $\sim 250 \text{ nm}$ ist erkennbar. Dies ist in Übereinstimmung mit dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen Mechanismus. Die 1MP-Konzentration lag bei $\sim 0.36 \text{ mM}$ und damit ist ein Einfluss der Selbstlöschung gegeben. Nach

$$\phi_r^{\text{triplet}} = \frac{\phi_r}{\phi_t} = \frac{k_{\text{dR}}[\text{dR}]}{k_{\text{dR}}[\text{dR}] + k_{\text{sq}}[1\text{MP}] + k_0}$$

ist die chemische Quantenausbeute aus dem Triplet ϕ_r^{triplet} mit den Ratenkonstanten verknüpft. Durch Umstellung kann die Ratenkonstante

$$k_{\text{dR}} = \frac{k_{\text{sq}}[1\text{MP}] + k_0}{[\text{dR}]} \frac{\phi_r^{\text{triplet}}}{1 - \phi_r^{\text{triplet}}} \approx 1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

der Löschung durch dR ausgerechnet werden. Sie ist in der Größenordnung wie weiter oben abgeschätzt.

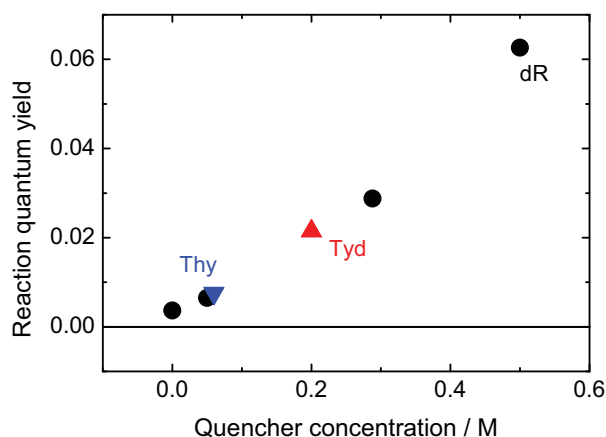


Abbildung 6.8: Die Reaktionsquantenausbeute von 1MP gegen die Konzentration eines beigefügten Moleküls. Die 1MP-Konzentration ist $\sim 0.3 - 0.8 \text{ mM}$. Unabhängig von den hier zugegebenen Stoffen, im speziellen 2-Deoxy- β -D-Ribose (dR, schwarze Punkte), Thymin (Thy, blaues nach unten gerichtetes Dreieck) und Thymidin (Tyd, rotes aufgerichtetes Dreieck), ist ein nahezu linearer Anstieg der Reaktionsquantenausbeute mit der Konzentration zu beobachten.

In einer aktuellen Studie wurde die Löschung des Triplett von deoxy-Zebularin (dZ) durch Thymidin beschrieben [85]. Zebularin (1-(β -D-2'-deoxyribosyl)-5-methyl-2(1*H*)-Pyrimidinon) und Thymidin tragen einen Zuckerrest. Es wurde aber eine um zwei Größenordnungen höhere Löschratenkonstante bestimmt ($1.6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Unter Einbeziehen der energetischen Lage der Triplets beider Moleküle kann der Mechanismus einem diffusionslimitierten Triplet-Triplett-Energietransfer zugeschrieben werden.⁵ Dies steht in Diskrepanz zu den Umbelichtungsversuchen bei Zugabe von Thymidin (Tyd) nahe der Löslichkeitsgrenze. Der Messpunkt (siehe Abbildung 6.8) liegt auf der durch reines dR beschriebenen Kurve. Dies spricht für den gleichen Mechanismus, hier der Wasserstoffabstraktion vom Zuckerrest.

Um den Einfluss des Thymin-Rests (Thy) näher zu untersuchen, wurde ein Umbelichtungsexperiment in gesättigter Thy-Lösung durch-

⁵ Nach der Sandros-Gleichung [81] ist die Rate bei Energieübertrag zu einem energetisch höherliegenden Triplet erniedrigt.

geführt. Überraschenderweise stimmt der zugehörige Messpunkt ebenfalls mit der Konzentrationsabhängigkeit der bisherigen überein. Weitere Untersuchungen zu diesem Verhalten sind für eine Aufklärung nötig.

Die nicht vernachlässigbare Triplet-Quantenausbeute von 64ac in Wasser könnte von biologischer Relevanz sein. Für 1MP kann der Triplet zu 100% in bimolekulare Reaktion eingehen. In T(6-4)T-Schäden ist der Pyrimidinon-Chromophor in räumlicher Nähe zum Zuckermotiv. Es besteht die Möglichkeit einer bimolekularen Reaktion des Pyrimidinone-Triplets und des Zuckerrests. Im Moment werden stationäre und zeitaufgelöste Experimente durchgeführt um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen.

ABSCHLIESSENDE BEMERKUNGEN UND AUSBLICK

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Charakterisierung der Photokinetik von 1-Methyl-2(1*H*)-Pyrimidinon (1MP). Dieses Molekül ist ein "minimales" Modellsystem für den Chromophor von P(6-4)P-Schäden. Durch eine primäre Photoreaktion zwischen benachbarten Pyrimidinen kommt es zu einer kovalenten Bindung. Durch den Photoprozess unterliegt das 3'-endige Pyrimidin (P) einer chemischen Umwandlung, welche zur Bildung einer 2(1*H*)-Pyrimidinon-Gruppe (2P) führt. Im Gegensatz zu dem initial vorliegenden P ist die Lebensdauer des angeregten Zustands von 2P um zwei bis drei Größenordnungen länger. Grund dafür sind Aktivierungsbarrieren, welche die Entvölkerung des angeregten Singulett-Zustands verzögern. Der Zerfall wird hauptsächlich durch zwei Prozesse bestimmt: Innerne Konversion (IC) zum Grundzustand und Interkombination (ISC) die zur Bevölkerung des Triplett-Zustands führt.

Für IC wird eine konische Durchschneidung (CI) zwischen Singulett- und Grundzustand angenommen. Die CI ist für eine schnelle Entvölkerung verantwortlich, jedoch muss sie erst durch thermische Aktivierung "erreicht" werden. Das Verhalten von 1MP ist im Einklang mit den experimentellen Befunden zu Analoga bzw. Derivaten von DNA-Basen. Sie zeigen häufig eine erhöhte Fluoreszenzlebensdauer gegenüber den kanonischen Basen. [6, 38] Zudem wurde eine starke Abhängigkeit von der Polarität des Lösungsmittels festgestellt. Für 1MP zeigt sich eine Absenkung der Aktivierungsbarrieren bei Übergang zu unpolaren Lösungsmitteln. Ebenso deuten die Experimente und die Berechnungen zu 1MP auf eine gewichtige Rolle von spezifischen Lösungsmittelwechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen hin. Beide Effekte, die Temperaturabhängigkeit wie auch Wechselwirkungen mit der Umgebung, beeinflussen in hohem Maße die Photokinetik von 1MP.

Die Pyrimidinon-Gruppe von (6-4)-Schäden zeigt im Gegensatz zu den kanonischen Pyrimidinen eine zu längeren Wellenlängen verschobene Absorption. Die Intensität der natürlichen Sonneneinstrahlung nimmt mit steigender Wellenlänge zu. Ein einmal gebildeter (6-4)-Schaden wird deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit einer sekundären Photoreaktion unterliegen. 1MP zeigt eine photochemische Umwandlung mit einer Quantenausbeute von ~ 0.003 (0.3%). Dies ist ungefähr eine Größenordnung niedriger als die für T(6-4)P-Dimere gefundene Quantenausbeute für die Dewar Valenzisomerisierung (DVI) [8]. Die in Kollaboration mit dem Institut für BioMolekulare Optik

durchgeführten Untersuchungen zu einem Formacetal-verbrückten T(6-4)T-Dinukleotid (64ac) zeigen eine noch höhere Quantenausbeute in Höhe von 0.08 (8%). Bei Abwesenheit der Formacetal-Brücke wurde keine DVI beobachtet. Der Grund für die Isomerisierung wird in dem sterischen Effekt durch das DNA-„Rückgrat“ vermutet. Quantenchemische Berechnungen stützen diese Interpretation der experimentellen Ergebnisse. Das Rückgrat stellt sich somit allgemein als der entscheidende Faktor für die Photochemie von Pyrimidin-Dimerschäden heraus [211] — die Quantenausbeute der CPD-Schadensbildung ist ebenfalls von der Grundzustandskonformation und damit vom Rückgrat abhängig [211].

Die sekundäre Photoisomerisierung von (6-4)-Schäden ist hauptsächlich durch die Reaktion des Singulett-Zustands begründet. Neben IC und Isomerisierung bevölkert ein Teil des Singulett durch ISC den Triplett. Für 64ac liegt die Quantenausbeute für diesen Prozess bei < 0.1 ($< 10\%$). Der Triplett-Zustand kann potentiell Ausgangspunkt weiterer sekundärer Photoprozesse sein. Für das Modellmolekül 1MP wurde aus diesem Grunde eine Charakterisierung der Photokinetik des Triplettzustands (^31MP) vorgenommen. Es zeigt sich, dass der 1MP-Triplett quantitativ, d.h. mit Quantenausbeuten gegen 1 (100%), Wasserstoff von Reaktionspartnern abstrahieren kann (Wasserstoffabstraktion, HA). Diese Reaktion wird hier für die bimolekulare Reaktion zwischen dem 1MP-Triplett und 2-Deoxy-D-Ribose (dR) vorgeschlagen (siehe Kapitel 6). Die Ratenkonstante für diese Reaktion beträgt $\sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. In einer jüngeren Studie zu 1-(β -D-2'-deoxyribosyl)-5-methyl-2(1H)-pyrimidinon (Pyo) wurde eine Triplett-Triplett Energieübertragung (TTET) zu Thymidin vorgeschlagen und eine Ratenkonstante in Höhe von $1.6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ angegeben [85]. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass die Triplett-Energie von Thymidin höher ist als die von Pyo, die Ratenkonstante der TTETs somit nach Referenz [81] vermindert ist. Dies ist in DNA nicht der Fall: Die energetische Lage des Triplett von Thymidin in DNA ist niedriger als die für Pyo. Wenn angenommen wird, dass die Triplett-Energie von dem 2(1H)-Pyrimidinon in natürlichen (6-4)-Schäden vergleichbar mit der von Pyo ist, ist die Ratenkonstante für TTET diffusionslimitiert, d.h. $\mathcal{O}(10^9 - 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$ [85].

Beide Mechanismen, TTET und HA, können eine Rolle für die Photoschädigung von DNA spielen. Es wurde in einer Studie von Vendrell-Criado *et al.* [85] gezeigt, dass photoangeregtes Pyo CPD-Schäden in DNA¹ induziert. Aus derselben Studie geht aber ebenso hervor, dass durch Anwesenheit von Pyo Brüche des Einzelstrangs auftreten (DNA+Pyo in Abbildung 2. aus Referenz [85]). Solche Einzelstrang-Brüche könnten über Radikale durch Wasserstoffabstraktion vom Zucker (dR) des DNA-Rückgrats induziert werden [212, 213, 214]. Neben der DVI und der möglichen TTET stellt die Wasserstoff-

¹ In der Studie [85] wurde ein zirkuläres DNA-Modellsystem untersucht

fabstraktion einen weiteren Deaktivierungspfad für photoangeregte P(6-4)P-Schäden dar. Die Rolle des Zuckers, dessen Photophysik und -chemie bislang wenig erforscht wurde und die photochemische Relevanz von Wasserstoffabstraktionen durch P(6-4)P sind prädestiniert, in zukünftigen Forschungsprojekten untersucht zu werden.

Ebenso können andere reaktive Spezies für sekundäre Photoprozesse verantwortlich sein. Für Pyo wurde, ebenfalls in [85], gezeigt, dass nach Photoanregung reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen. Die Produktion von Singulett-Sauerstoff und Hydroxyl-Radikalen wurde über Nachweisreagenzien beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde für 1,4,6-methyliertes 2(1*H*)-Pyrimidinon (146TMP) gezeigt, dass Pyrimidinon auch Quelle von solvatisierten Elektronen sein kann (siehe Abschnitt 5.2). Diese Spezies wirkt stark reduzierend und könnte DNA-Basen und das Phosphat-Zucker-Rückgrat angreifen [212, 213, 215]. Bisher ist unklar, ob das solvatisierte Elektron über einen Ein- oder Mehrphotonenprozess gebildet wird. Aufgrund der Intensität natürlicher Sonneneinstrahlung wäre eine biologische Relevanz nur für einen Einphotonenprozess zu erwarten. In welchem Ausmaß ROS die sekundäre Photochemie von P(6-4)P-Schäden mitbestimmen, ist noch eine offene Frage. Über Flash-Photolyse-Experimente können diese langlebigen ROS und deren Einfluss auf DNA-Bestandteile untersucht werden. Solche Experimente werden zur Zeit hier, am Institut für Physikalische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf am Arbeitskreis Prof. Gilch, durchgeführt.

Eine weitere Charakterisierung betrifft die Photoprodukte von Pyrimidinon. Aus der Literatur ist bekannt, dass substituierte Pyrimidine stabile Dewar Valenzisomere über den Singulett-Kanal bilden können [86]. Für 1MP ist diese Reaktion, wenn, dann nur ein möglicher Reaktionspfad. Für das zusätzlich methylierte 146TMP wurde eine gegenüber 1MP erhöhte Reaktionsquantenausbeute ($\sim 0.02 \sim 2\%$) ermittelt. Dieser Wert ist vergleichbar mit der Quantenausbeute der Dewar Valenzisomerisierung von T(6-4)P-Dimeren [8]. Darüber hinaus stimmt die Zerfallszeit des primär angeregten Singuletts mit ~ 120 ps und die abgeschätzte Triplett-Quantenausbeute von ~ 0.08 ($\sim 8\%$) mit den für 64ac bestimmten Werten überein. Dies könnte zum Schluss verleiten, dass der Einfluss des Rückgrats vor allem auf Alkylierung (hier einer C₄-Substitution am Pyrimidinon-Motiv) des Chromophors zurückzuführen ist. Das Ausbleiben der Isomerisierung für 64ac, wenn die Formacetal-Gruppe entfernt wird, spricht eher für die spezielle Rolle der C6-Substitution. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, das C5-methylierte 1MP (15DMP) eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute (FQY) besitzt, die auf den langlebigen Singulett mit Zerfallszeiten im Nanosekundenbereich zurückzuführen ist [169]. Das Verhältnis von FQY für 1MP zu 15DMP ist $\sim 5 - 6$ und ändert sich nicht bei Übergang zu T(6-4)C bzw T(6-4)T — die FQY fällt für beide Systeme eine Größenordnung geringer aus

[165]. Davon ist aber die Reaktions-Quantenausbeute für die Dewar Valenzisomerisierung von T(6-4)T und T(6-4)C unabhängig. Die verschiedenen Substitutionsmuster zeigen somit einen starken Einfluss auf die Deaktivierungspfade des (6-4)-Chromophors. Um die Effekte zu verstehen, wird im Anschluss an diese Arbeit eine systematische Untersuchung zur Photokinetik bei unterschiedlichen Substitutionsmustern von 1MP durchgeführt.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] L.O. Björn. *Photobiology: The Science of Life and Light*. Springer, 2007. (Zitiert auf den Seiten [1](#), [4](#), und [9](#).)
- [2] N.J. Turro, V. Ramamurthy, and J.C. Scaiano. *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*. University Sciences Books, Sausalito, California, 2010. (Zitiert auf den Seiten [1](#), [4](#), [15](#), [18](#), [22](#), [23](#), [25](#), [30](#), [41](#), [59](#), [66](#), [67](#), [70](#), [82](#), [90](#), [99](#), [103](#), und [105](#).)
- [3] Frederick L. Gates. A study of the bactericidal action of ultra violet light : Iii. the absorption of ultra violet light by bacteria. (Zitiert auf den Seiten [1](#) und [2](#).)
- [4] Frederick L Gates. On nuclear derivatives and the lethal action of ultra-violet light. *Science (New York, NY)*, 68(1768):479, 1928. (Zitiert auf Seite [1](#).)
- [5] Frederick L Gates. A study of the bactericidal action of ultra violet light: I. the reaction to monochromatic radiations. *The Journal of general physiology*, 13(2):231–248, 1929. (Zitiert auf Seite [1](#).)
- [6] C. T. Middleton, K. de La Harpe, C. Su, Y. K. Law, C. E. Crespo-Hernandez, and B. Kohler. DNA Excited-State Dynamics: From Single Bases to the Double helix. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 60:217–239, 2009. (Zitiert auf den Seiten [2](#), [9](#), [10](#), [12](#), [14](#), [15](#), [16](#), [67](#), [70](#), und [109](#).)
- [7] A Muto and S Osawa. The guanine and cytosine content of genomic dna and bacterial evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(1):166–169, 1987. (Zitiert auf Seite [2](#).)
- [8] D. G. E. Lemaire and B. P. Ruzsicska. Quantum yields and secondary photoreactions of the photoproducts of dTpdT, dTpdC and dTpdU. *Photochem. Photobiol.*, 57(5):755–769, 1993. (Zitiert auf den Seiten [2](#), [16](#), [17](#), [57](#), [61](#), [62](#), [109](#), und [111](#).)
- [9] Laura Buschhaus, Josefin Rolf, and Karl Kleinerhmanns. Dna photoreacts by nucleobase ring cleavage to form labile isocyanates. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15:18371–18377, 2013. (Zitiert auf den Seiten [2](#) und [22](#).)
- [10] F.R. de Gruijl. Skin cancer and solar {UV} radiation. *European Journal of Cancer*, 35(14):2003 – 2009, 1999. (Zitiert auf den Seiten [2](#) und [17](#).)

- [11] Clifford D Mol, Sudip S Parikh, Christopher D Putnam, Terence P Lo, and John A Tainer. DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 28(1):101–128, 1999. (Zitiert auf den Seiten 2, 15, und 17.)
- [12] Frank R de Gruijl, Henk J van Kranen, LH Mullenders, et al. Uv-induced dna damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 63(1-3):19, 2001. (Zitiert auf den Seiten 2 und 17.)
- [13] Rajeshwar P. Sinha and Donat-P. Hader. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1:225–236, 2002. (Zitiert auf den Seiten 2, 15, und 17.)
- [14] Thierry Douki, Anne Reynaud-Angelin, Jean Cadet, and Evelyn Sage. Bipyrimidine Photoproducts Rather than Oxidative Lesions Are the Main Type of DNA Damage Involved in the Genotoxic Effect of Solar UVA Radiation. *Biochemistry*, 42(30):9221–9226, 2003. PMID: 12885257. (Zitiert auf den Seiten 2, 3, und 17.)
- [15] Errol C Friedberg. DNA damage and repair. *Nature*, 421(6921):436–440, 2003. (Zitiert auf den Seiten 2 und 17.)
- [16] O. D. Schärer. Chemistry and biology of DNA repair. *Angew. Chem.-Int. Edit.*, 42(26):2946–2974, 2003. (Zitiert auf den Seiten 2 und 17.)
- [17] M.G. Friedel, M.K. Cichon, and T. Carell. DNA Damage and Repair: Photochemistry. In W. Horspool and F. Lenci, editors, *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*. CRC Press LLC, Boca Raton, 2004. (Zitiert auf den Seiten 2 und 17.)
- [18] Rajesh P Rastogi, Ashok Kumar, Madhu B Tyagi, Rajeshwar P Sinha, et al. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced dna damage and repair. *Journal of nucleic acids*, 2010, 2010. (Zitiert auf den Seiten 2, 9, und 17.)
- [19] J. S. Taylor and M. P. Cohrs. DNA, light, and dewar pyrimidinones - the structure and biological significance of TpT3. *J. Am. Chem. Soc.*, 109(9):2834–2835, 1987. (Zitiert auf den Seiten 2 und 57.)
- [20] John Stephen Taylor, Daniel S. Garrett, and Michael P. Cohrs. Solution-state structure of the dewar pyrimidinone photoproduct of thymidylyl-(3'→5')-thymidine. *Biochemistry*, 27(19):7206–7215, 1988. (Zitiert auf den Seiten 2, 17, und 78.)
- [21] J E LeClerc, A Borden, and C W Lawrence. The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone(6-4) ultraviolet light photopro-

- duct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transitions in *escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(21):9685–9689, 1991. (Zitiert auf den Seiten 3, 17, und 18.)
- [22] Joon-Hwa Lee, Sung-Hun Bae, and Byong-Seok Choi. The Dewar photoproduct of thymidylyl (3'→5')-thymidine (Dewar product) exhibits mutagenic behavior in accordance with the "A rule". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9):4591–4596, 2000. structure 1QKG of PDB which is. (Zitiert auf den Seiten 3 und 21.)
- [23] W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, P. Gilch, C. E. Crespo-Hernandez, V. N. Sinathan, T. Carell, W. Zinth, and B. Kohler. Thymine dimerization in DNA is an ultrafast photoreaction. *Science*, 315(5812):625–629, 2007. (Zitiert auf den Seiten 3 und 16.)
- [24] Wolfgang J. Schreier, Julia Kubon, Nadja Regner, Karin Haiser, Tobias E. Schrader, Wolfgang Zinth, Pascale Clivio, and Peter Gilch. Thymine dimerization in DNA model systems: Cyclobutane photolysis is predominantly formed via the singlet channel. *Journal of the American Chemical Society*, 131(14):5038–5039, 2009. (Zitiert auf den Seiten 3 und 16.)
- [25] Karin Haiser, Benjamin P. Fingerhut, Korbinian Heil, Andreas Glas, Teja T. Herzog, Bert M. Pilles, Wolfgang J. Schreier, Wolfgang Zinth, Regina de Vivie-Riedle, and Thomas Carell. Mechanism of UV-Induced Formation of Dewar Lesions in DNA. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(2):408–411, 2012. (Zitiert auf den Seiten 3, 57, 58, 77, 78, und 79.)
- [26] 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 Journal of Physics*, 14(6):065006, 2012. (Zitiert auf den Seiten 3, 20, 54, 61, 67, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 79, und 99.)
- [27] Gerald Ryseck, Thomas Schmierer, Karin Haiser, Wolfgang Schreier, Wolfgang Zinth, and Peter Gilch. The excited-state decay of 1-methyl-2(1h)-pyrimidinone is an activated process. *ChemPhysChem*, 12(10):1880–1888, 2011. (Zitiert auf den Seiten 4, 35, 38, 42, 58, 63, 64, 65, 67, 70, 76, 77, 100, und 137.)
- [28] Dimas G de Oteyza, Patrick Gorman, Yen-Chia Chen, Sebastian Wickenburg, Alexander Riss, Duncan J Mowbray, Grisha Etkin, Zahra Pedramrazi, Hsin-Zon Tsai, Angel Rubio, et al. Direct

- imaging of covalent bond structure in single-molecule chemical reactions. *Science*, 340(6139):1434–1437, 2013. (Zitiert auf Seite 4.)
- [29] P. Klan and J. Wirz. *Photochemistry of Organic Compounds. From Concepts to Practice*. Wiley, Chichester, 2009. (Zitiert auf den Seiten 4, 15, 22, 23, 25, 30, 41, 59, 66, 67, 70, 99, 103, und 106.)
- [30] C. Rullière, editor. *Femtosecond laser pulses: principles and experiments*. Springer Science+Business Media, LLC, New York, 2 edition, 2005. (Zitiert auf den Seiten 4, 5, 23, 30, 31, 32, 33, 34, 42, 44, und 47.)
- [31] Wolfgang Zinth, Alfred Laubereau, and Wolfgang Kaiser. The long journey to the laser and its rapid development after 1960. *The European Physical Journal H*, 36(2):153–181, 2011. (Zitiert auf Seite 5.)
- [32] Wolfgang Johannes Schreier. *UV-Strahlung und DNA-Schäden – Untersuchung UV-induzierter Prozesse in Nukleinsäuren mit Femtosekunden-Infrarotspektroskopie*. PhD thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2008. (Zitiert auf Seite 9.)
- [33] Karin Haiser. *Femtosekunden-Infrarotspektroskopie von UV-induzierten Photoschäden in Nukleinsäuren*. Doktorarbeit, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2012. (Zitiert auf den Seiten 9, 15, 20, 38, 53, 58, 59, 61, 65, 66, 75, und 77.)
- [34] B. Alberts, editor. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York, 4 edition, 2002. (Zitiert auf den Seiten 9, 14, und 15.)
- [35] S. Strickler and R. Berg. Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules. *J. Chem. Phys.*, 37:814–822, 1962. (Zitiert auf den Seiten 10, 23, 41, 61, und 83.)
- [36] M. Daniels and W. Hauswirth. Fluorescence of the Purine and Pyrimidine Bases of the Nucleic Acids in Neutral Aqueous Solution at 300 degrees K. *Science*, 171:675–677, February 1971. first time fluorescence quantum yield and estimation of fluorescence lifetime. (Zitiert auf Seite 10.)
- [37] C. E. Crespo-Hernandez, B. Cohen, P. M. Hare, and B. Kohler. Ultrafast excited-state dynamics in nucleic acids. *Chem. Rev.*, 104(4):1977–2019, 2004. (Zitiert auf den Seiten 10, 12, 13, und 14.)
- [38] Karl Kleineremanns, Dana Nachtigallová, and Mattanjah S. de Vries. Excited state dynamics of DNA bases. *International*

- Reviews in Physical Chemistry*, 32(2):308–342, 2013. review. (Zitiert auf den Seiten [10](#), [12](#), [13](#), [14](#), [15](#), [67](#), [70](#), und [109](#).)
- [39] L. Serrano-Andres and M. Merchán. Are the five natural DNA/RNA base monomers a good choice from natural selection? A photochemical perspective. *J. Photochem. Photobiol. C-Photochem. Rev.*, 10(1):21–32, 2009. (Zitiert auf den Seiten [10](#) und [13](#).)
- [40] Spiridoula Matsika and Pascal Krause. Nonadiabatic events and conical intersections. *Annual Review of Physical Chemistry*, 62(1):621–643, 2011. PMID: 21219147. (Zitiert auf den Seiten [10](#) und [70](#).)
- [41] Manuela Merchán, Remedios González-Luque, Teresa Climent, Luis Serrano-Andrés, Elena Rodríguez, Mar Reguero, and Daniel Peláez. Unified model for the ultrafast decay of pyrimidine nucleobases. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(51):26471–26476, 2006. PMID: 17181307. (Zitiert auf Seite [10](#).)
- [42] C. T. Middleton, B. Cohen, and B. Kohler. Solvent and solvent isotope effects on the vibrational cooling dynamics of a DNA base derivative. *J. Phys. Chem. A*, 111(42):10460–10467, 2007. (Zitiert auf Seite [10](#).)
- [43] Lluís Blancafort. Energetics of Cytosine Singlet Excited-State Decay Paths—A Difficult Case for CASSCF and CASPT2. *Photochemistry and Photobiology*, 83(3):603–610, 2007. (Zitiert auf Seite [11](#).)
- [44] Shohei Yamazaki and Tetsuya Taketsugu. Nonradiative deactivation mechanisms of uracil, thymine, and 5-fluorouracil: A comparative ab initio study. *The Journal of Physical Chemistry A*, 116(1):491–503, 2012. (Zitiert auf den Seiten [11](#) und [13](#).)
- [45] Marek Z. Zgierski, Takashige Fujiwara, William G. Kofron, and Edward C. Lim. Highly effective quenching of the ultrafast radiationless decay of photoexcited pyrimidine bases by covalent modification: photophysics of 5,6-trimethylenecytosine and 5,6-trimethylenouracil. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9:3206–3209, 2007. (Zitiert auf Seite [12](#).)
- [46] Kurt A. Kistler and Spiridoula Matsika. Cytosine in Context: A Theoretical Study of Substituent Effects on the Excitation Energies of 2-Pyrimidinone Derivatives. *The Journal of Physical Chemistry A*, 111(35):8708–8716, 2007. PMID: 17696511. (Zitiert auf den Seiten [13](#) und [78](#).)
- [47] Rudolf Jaenisch and Adrian Bird. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environ-

- mental signals. *Nature genetics*, 33:245–254, 2003. (Zitiert auf Seite 13.)
- [48] Andro C. Rios and Yitzhak Tor. On the origin of the canonical nucleobases: An assessment of selection pressures across chemical and early biological evolution. *Israel Journal of Chemistry*, 53(6-7):469–483, 2013. (Zitiert auf Seite 13.)
- [49] Leslie E. Orgel. The origin of life—a review of facts and speculations. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(12):491 – 495, 1998. (Zitiert auf Seite 13.)
- [50] Nicholas V. Hud, Brian J. Cafferty, Ramanarayanan Krishnamurthy, and Loren Dean Williams. The Origin of RNA and “My Grandfather’s axe”. *Chemistry & Biology*, 20(4):466 – 474, 2013. (Zitiert auf Seite 13.)
- [51] L. Marcus Wilhelmsson. Fluorescent nucleic acid base analogues. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 43:159–183, 5 2010. (Zitiert auf Seite 13.)
- [52] Rosalie J. Malone, Angela M. Miller, and Bern Kohler. Singlet excited-state lifetimes of cytosine derivatives measured by femtosecond transient absorption. *Photochemistry and Photobiology*, 77(2):158–164, 2003. (Zitiert auf Seite 13.)
- [53] Fabrizio Santoro, Vincenzo Barone, Thomas Gustavsson, and Roberto Improta. Solvent Effect on the Singlet Excited-State Lifetimes of Nucleic Acid Bases: A Computational Study of 5-Fluorouracil and Uracil in Acetonitrile and Water. *Journal of the American Chemical Society*, 128(50):16312–16322, 2006. PMID: 17165786. (Zitiert auf Seite 14.)
- [54] A. Ghosh, R.K. Kar, J. Jana, A. Biswas, S. Ghosh, D. Kumar, S. Chatterjee, and A. Bhunia. Structural Insights of DNA Duplex Stabilization by Potent Antimicrobial Peptide Indolicidin. (Zitiert auf Seite 14.)
- [55] Schrödinger, LLC. The PyMOL molecular graphics system, version 1.3r1. August 2010. (Zitiert auf den Seiten 14 und 21.)
- [56] Eric Westhof. Water: an integral part of nucleic acid structure. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 17(1):125–144, 1988. (Zitiert auf Seite 14.)
- [57] B. Schneider and H.M. Berman. Hydration of the DNA bases is local. *Biophysical Journal*, 69(6):2661 – 2669, 1995. (Zitiert auf Seite 14.)
- [58] Sanjib Senapati and Amalendu Chandra. Dielectric constant of water confined in a nanocavity. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(22):5106–5109, 2001. (Zitiert auf Seite 14.)

- [59] B. Jayaram, Kim A. Sharp, and Barry Honig. The electrostatic potential of B-DNA. *Biopolymers*, 28(5):975–993, 1989. (Zitiert auf Seite 15.)
- [60] Richard A. Friedman and Barry Honig. The electrostatic contribution to DNA base-stacking interactions. *Biopolymers*, 32(2):145–159, 1992. (Zitiert auf Seite 15.)
- [61] M. A. Young, B. Jayaram, and D. L. Beveridge. Local Dielectric Environment of B-DNA in Solution: Results from a 14 ns Molecular Dynamics Trajectory. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(39):7666–7669, 1998. (Zitiert auf Seite 15.)
- [62] Christopher A Hunter and Jeremy KM Sanders. The nature of π - π interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 112(14):5525–5534, 1990. (Zitiert auf Seite 15.)
- [63] Benjamin W. Gung, Francis Wekesa, and Charles L. Barnes. Stacking interactions between nitrogen-containing six-membered heterocyclic aromatic rings and substituted benzene: Studies in solution and in the solid state. *The Journal of Organic Chemistry*, 73(5):1803–1808, 2008. PMID: 18266384. (Zitiert auf Seite 15.)
- [64] James D Watson, Francis HC Crick, et al. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171(4356):737–738, 1953. (Zitiert auf Seite 15.)
- [65] Carlos E Crespo-Hernández, Boiko Cohen, and Bern Kohler. Base stacking controls excited-state dynamics in A·T DNA. *Nature*, 436(7054):1141–1144, 2005. (Zitiert auf Seite 15.)
- [66] John G. Burr, Eun Hee Park, and Aurelia Chan. Nature of the reactive species in the photohydration of uracil and cytosine derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 94(16):5866–5872, 1972. (Zitiert auf Seite 15.)
- [67] Shih-Yi Wang. *Photochemistry and photobiology of nucleic acids*. Elsevier, 1976. (Zitiert auf Seite 15.)
- [68] Akos Banyasz, Thierry Douki, Roberto Improta, Thomas Gustavsson, Delphine Onidas, Ignacio Vayá, Marion Perron, and Dimitra Markovitsi. Electronic Excited States Responsible for Dimer Formation upon UV Absorption Directly by Thymine Strands: Joint Experimental and Theoretical Study. *Journal of the American Chemical Society*, 134(36):14834–14845, 2012. (Zitiert auf den Seiten 16 und 17.)
- [69] J. Cadet, C. Anselmino, T. Douki, and L. Voituriez. Photochemistry of nucleic-acids in cells. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, 15(4):277–298, 1992. (Zitiert auf Seite 17.)

- [70] Martin Münzel, Claudia Szeibert, Andreas F. Glas, Daniel Globisch, and Thomas Carell. Discovery and Synthesis of New UV-Induced Intrastrand C(4–8)G and G(8–4)C Photolesions. *Journal of the American Chemical Society*, 133(14):5186–5189, 2011. (Zitiert auf Seite 17.)
- [71] John-Stephen Taylor, Daniel S. Garrett, and Michael J. Wang. Models for the solution state structure of the (6–4) photoproduct of thymidylyl-(3'→5')-thymidine derived via a distance- and angle-constrained conformation search procedure. *Biopolymers*, 27(10):1571–1593, 1988. (Zitiert auf den Seiten 17 und 78.)
- [72] Myron F. Goodman. Error-prone repair dna polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1):17–50, 2002. PMID: 12045089. (Zitiert auf Seite 17.)
- [73] John-Stephen Taylor. New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 510(1–2):55 – 70, 2002. The bypass of {DNA} lesions and {RNA} polymerases. (Zitiert auf Seite 17.)
- [74] Gerd P. Pfeifer and Ahmad Besaratinia. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 11:90–97, 2012. (Zitiert auf Seite 18.)
- [75] Daniel Perdiz, Pál Gróf, Mauro Mezzina, Osamu Nikaido, Ethel Moustacchi, and Evelyn Sage. Distribution and Repair of Bipyrimidine Photoproducts in Solar UV-irradiated Mammalian Cells POSSIBLE ROLE OF DEWAR PHOTOPRODUCTS IN SOLAR MUTAGENESIS. *Journal of Biological Chemistry*, 275(35):26732–26742, 2000. (Zitiert auf Seite 18.)
- [76] Jean Cadet, Thierry Douki, Jean-Luc Ravanat, and Paolo Di Mascio. Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 8:903–911, 2009. (Zitiert auf Seite 18.)
- [77] Barbara Cortat, Camila Carriao Machado Garcia, Annabel Quinet, Andre Passaglia Schuch, Keronninn Moreno de Lima-Bessa, and Carlos Frederico Martins Menck. The relative roles of dna damage induced by uva irradiation in human cells. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 12:1483–1495, 2013. (Zitiert auf Seite 18.)
- [78] David M Noll, Tracey McGregor Mason, and Paul S Miller. Formation and repair of interstrand cross-links in dna. *Chemical reviews*, 106(2):277–301, 2006. (Zitiert auf Seite 18.)

- [79] B. J. Parsons. Psoralen photochemistry. *Photochemistry and Photobiology*, 32(6):813–821, 1980. (Zitiert auf Seite 18.)
- [80] J Cadet, M Berger, C Decarroz, JR Wagner, JE Van Lier, YM Giot, and P Vigny. Photosensitized reactions of nucleic acids. *Biochimie*, 68(6):813–834, 1986. (Zitiert auf Seite 18.)
- [81] Kjell Sandros. Transfer of triplet state energy in fluid solutions. *Acta Chem. Scand*, 18:2355–2374, 1964. (Zitiert auf den Seiten 18, 107, und 110.)
- [82] Paul D Wood and Robert W Redmond. Triplet state interactions between nucleic acid bases in solution at room temperature: intermolecular energy and electron transfer. *Journal of the American Chemical Society*, 118(18):4256–4263, 1996. (Zitiert auf Seite 19.)
- [83] M Consuelo Cuquerella, Virginie Lhiaubet-Vallet, Francisco Bosca, and Miguel A Miranda. Photosensitised pyrimidine dimerisation in DNA. *Chemical Science*, 2(7):1219–1232, 2011. (Zitiert auf den Seiten 19 und 102.)
- [84] G. Wenska, B. Skalski, and S. Paszyc. Photophysical and photochemical properties of 4-(1,2,4-triazol-1-yl)-pyrimidin-2(1h)-ones. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 57(1–3):279–291, 1991. (Zitiert auf den Seiten 19 und 84.)
- [85] Victoria Vendrell-Criado, Gemma M. Rodriguez, A. M. Biguez-Muniz, M. Consuelo Cuquerella, Virginie Lhiaubet-Vallet, and Miguel A. Miranda. Photosensitization of dna by 5-methyl-2-pyrimidone deoxyribonucleoside: (6-4) photoproduct as a possible trojan horse. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(25):6476–6479, 2013. (Zitiert auf den Seiten 19, 22, 67, 97, 99, 101, 107, 110, und 111.)
- [86] Takehiko Nishio, Akira Kato, Choji Kashima, and Yoshimori Omote. Photochemical electrocyclization of 1,4,6-trisubstituted pyrimidin-2-ones to 2-oxo-1,3-diazabicyclo[2.2.0]hex-5-enes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 0:607–610, 1980. (Zitiert auf den Seiten 20, 21, 59, und 111.)
- [87] Shunichi Hirokami, Tamiko Takahashi, Kazumi Kurosawa, Masanori Nagata, and Takao Yamazaki. Photochemistry of 4-pyrimidinones: isolation of Dewar isomers. *The Journal of Organic Chemistry*, 50(2):166–169, 1985. (Zitiert auf den Seiten 21 und 59.)
- [88] Shunichi Hirokami, Tamiko Takahashi, Masanori Nagata, Yoshiro Hirai, and Takao Yamazaki. Photochemistry of 2,3,6-trialkyl-4-pyrimidinones in liquid ammonia-ether solution. chemistry

- of dewar 4-pyrimidinones. *The Journal of Organic Chemistry*, 46(9):1769–1777, 1981. (Zitiert auf Seite 21.)
- [89] Takehiko Nishio, Katsuhiko Katahira, and Yoshimori Omote. Photochemical ring opening of 1-arylpyrimidin-2(1h)-ones. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 0:943–946, 1981. (Zitiert auf Seite 21.)
- [90] Tarniko Takahashi, Shun ichi Hirokami, Masanori Nagata, and Takao Yamazaki. Photochemistry of 4-pyrimidinones in aqueous solution. isolation of reversible photohydrates. *Tetrahedron Letters*, 26(27):3247 – 3250, 1985. (Zitiert auf Seite 21.)
- [91] Takehiko Nishio, Satoshi Kameyama, and Yoshimori Omote. Photochemistry of pyrimidin-2(1h)-ones: intramolecular [gamma]-hydrogen abstraction by the nitrogen of the imino group. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 0:1147–1150, 1986. (Zitiert auf den Seiten 21 und 103.)
- [92] Shunichi Hirokami, Tamiko Takahashi, Masanori Nagata, and Takao Yamazaki. Rearrangements of Dewar 4-pyrimidinones and 4-methoxy-2-azetidines. Reactions through azetidinyll and acyl cations. *The Journal of Organic Chemistry*, 52(12):2455–2468, 1987. (Zitiert auf Seite 21.)
- [93] Takehiko Nishio and Yoshimori Omote. Photochemistry of pyrimidin-2(1h)-ones: intermolecular hydrogen abstraction by an imino group nitrogen. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 0:957–960, 1988. (Zitiert auf den Seiten 21, 22, und 103.)
- [94] Takehiko Nishio. Photochemical reactions of 1-aryl-2(1h)-pyrimidinones in alcohol. *Liebigs Annalen der Chemie*, 1992(1):71–73, 1992. (Zitiert auf Seite 21.)
- [95] Takehiko Nishio, Katsuhiko Katahira, Akira Kato, Choji Kashima, and Yoshimori Omote. Photochemistry of n-aryl-2(1h)-pyrimidin-2-ones. *Tetrahedron Letters*, 20(43):4211 – 4212, 1979. (Zitiert auf Seite 21.)
- [96] 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. (Zitiert auf Seite 21.)
- [97] Anthony A. Shaw and Martin D. Shetlar. Ring-opening photo-reactions of cytosine and 5-methylcytosine with aliphatic alcohols. *Photochemistry and Photobiology*, 49(3):267–271, 1989. (Zitiert auf Seite 22.)
- [98] Laura Buschhaus. *Zeitaufgelöste Untersuchungen von Lichtinduzierten Prozessen an DNA-Basen, Xanthon und Photovernetzba-*

- Polyimidfildmen*. Doktorarbeit, Institut für Physikalische Chemie der Herinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2013. (Zitiert auf den Seiten 22 und 38.)
- [99] Takehiko Nishio, Michiyo Kato, and Choji Kashima. Photochemical reactions of 1-alkyl-4,6-diaryl-2(1h)-pyrimidinones in the presence of amines. *Liebigs Annalen der Chemie*, 1989(7):611–615, 1989. (Zitiert auf Seite 22.)
- [100] Gerald Ryseck and Peter Gilch. fs-Fluorescence spectroscopy in chemistry and biology. in press. (Zitiert auf den Seiten 23, 24, 27, 30, 31, 32, 33, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 47, und 52.)
- [101] J.C. Diels and W. Rudolph, editors. *Ultrashort Laser Pulse Phenomena*, Fundamentals, Techniques, and Applications on a Femtosecond Time Scale. Academic Press Inc. / Elsevier Inc., 2 edition, 2006. (Zitiert auf den Seiten 23, 34, und 35.)
- [102] William W Parson. *Modern Optical Spectroscopy, With Exercises and Examples from Biophysics and Biochemistry, Student Edition*. Springer Verlag, 2009. (Zitiert auf den Seiten 23 und 52.)
- [103] J.R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition*. Springer, New York, 2006. (Zitiert auf den Seiten 23, 24, 25, 26, 33, 41, 42, 52, 53, 61, 82, 83, und 84.)
- [104] WH Melhuish. Absolute spectrofluorometry. *Natl. Bur. Stand. US Spec. Publ*, 378:137, 1973. (Zitiert auf Seite 25.)
- [105] D. Onidas, D. Markovitsi, S. Marguet, A. Sharonov, and T. Gustavsson. Fluorescence Properties of DNA Nucleosides and Nucleotides: A Refined Steady-State and Femtosecond Investigation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(43):11367–11374, 2002. (Zitiert auf Seite 26.)
- [106] H. Lami, G. Pfeffer, and G. Laustria. Rendements quantiques de fluorescence et durees de vie radiative de quelques solutes utilises dans les scentillateurs liquides. *J. Phys. Paris*, 27:398–404, 1966. (Zitiert auf Seite 26.)
- [107] Manfred Hesse, Herbert Meier, and Bernd Zeeh. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag, 2011. (Zitiert auf den Seiten 27, 30, 87, und 88.)
- [108] G. Ryseck, T. Villnow, S. Hugenbruch, K. Schaper, and P. Gilch. Strong impact of the solvent on the photokinetics of a 2(1h)-pyrimidinone. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 12:1423–1430, 2013. (Zitiert auf den Seiten 28, 89, 102, und 138.)
- [109] Ximao Feng, Steve Gilbertson, Hiroki Mashiko, He Wang, Sabih D. Khan, Michael Chini, Yi Wu, Kun Zhao, and Zenghu

- Chang. Generation of isolated attosecond pulses with 20 to 28 femtosecond lasers. *Phys. Rev. Lett.*, 103:183901, Oct 2009. (Zitiert auf Seite 30.)
- [110] Eiji J Takahashi, Pengfei Lan, and Katsumi Midorikawa. Generation of isolated attosecond pulses. In *Attosecond Physics*, pages 47–68. Springer, 2013. (Zitiert auf Seite 30.)
- [111] C. Rullière, editor. *Femtosecond laser pulses: principles and experiments*. Springer-Verlag, Berlin, 1998. (Zitiert auf Seite 31.)
- [112] E.B. Treacy. Optical pulse compression with diffraction gratings. *IEEE J. Quantum Electron.*, QE 5:454–458, 1969. (Zitiert auf Seite 30.)
- [113] W. Dietel, J. J. Fontaine, and J. C. Diels. Intracavity pulse-compression with glass - a new method of generating pulses shorter than 60 fsec. *Opt. Lett.*, 8(1):4–6, 1983. (Zitiert auf Seite 30.)
- [114] R. Fork, O. Martinez, and J. Gordon. Negative dispersion using pairs of prisms. *Opt. Lett.*, 9:150–152, 1984. (Zitiert auf Seite 30.)
- [115] L. E. Hargrove, R. L. Fork, and M. A. Pollack. Locking of He-Ne laser modes induced by synchronous intracavity modulation. *Appl. Phys. Lett.*, 5(1):4–5, 1964. (Zitiert auf Seite 30.)
- [116] D. E. Spence, P. N. Kean, and W. Sibbett. 60-fsec pulse generation from a self-mode-locked Ti-sapphire laser. *Opt. Lett.*, 16(1):42–44, 1991. (Zitiert auf Seite 30.)
- [117] R.W. Boyd, editor. *Nonlinear Optics. Third Edition*. Academic Press, Amsterdam, Boston, 2008. (Zitiert auf den Seiten 31, 32, 35, 44, 45, 46, und 47.)
- [118] Robert W. Boyd. Order-of-magnitude estimates of the nonlinear optical susceptibility. *Journal of Modern Optics*, 46(3):367–378, 1999. (Zitiert auf Seite 32.)
- [119] D. Strickland and G. Mourou. Compression of amplified chirped optical pulses. *Opt. Commun.*, 56(3):219–221, 1985. (Zitiert auf Seite 33.)
- [120] Horst Wupper. *Grundlagen elektronischer Schaltungen*. Huthig, 1983. (Zitiert auf Seite 33.)
- [121] S. Cova, A. Lacaita, M. Ghioni, G. Ripamonti, and TA Louis. 20-ps timing resolution with single-photon avalanche diodes. *Review of scientific instruments*, 60(6):1104–1110, 1989. (Zitiert auf Seite 33.)

- [122] Wolfgang Zinth and Ursula Zinth. *Optik: Lichtstrahlen-Wellen-Photonen*. Oldenbourg Wissenschaftsverlag, 2013. (Zitiert auf den Seiten 34 und 38.)
- [123] Timothy D Scarborough, Chad Petersen, and Cornelis J G J Uiterwaal. Measurements of the GVD of water and methanol and laser pulse characterization using direct imaging methods. *New Journal of Physics*, 10(10):103011, 2008. (Zitiert auf Seite 34.)
- [124] Yves Coello, Bingwei Xu, Tricia L. Miller, Vadim V. Lozovoy, and Marcos Dantus. Group-velocity dispersion measurements of water, seawater, and ocular components using multiphoton intrapulse interference phase scan. *Appl. Opt.*, 46(35):8394–8401, Dec 2007. (Zitiert auf Seite 34.)
- [125] Pampa Devi, Vadim V. Lozovoy, and Marcos Dantus. Measurement of group velocity dispersion of solvents using 2-cycle femtosecond pulses: Experiment and theory. *AIP Advances*, 1(3):2166, 2011. (Zitiert auf Seite 34.)
- [126] Ida Z. Kozma, Patrizia Krok, and Eberhard Riedle. Direct measurement of the group-velocity mismatch and derivation of the refractive-index dispersion for a variety of solvents in the ultraviolet. *J. Opt. Soc. Am. B*, 22(7):1479–1485, Jul 2005. (Zitiert auf Seite 34.)
- [127] Kent R Wilson and Vladislav V Yakovlev. Ultrafast rainbow: tunable ultrashort pulses from a solid-state kilohertz system. *JOSA B*, 14(2):444–448, 1997. (Zitiert auf Seite 35.)
- [128] E. Riedle, M. Beutter, S. Lochbrunner, J. Piel, S. Schenkl, S. Spörlein, and W. Zinth. Generation of 10 to 50 fs pulses tunable through all of the visible and the NIR. *Appl. Phys. B-Lasers Opt.*, 71(3):457–465, 2000. (Zitiert auf Seite 35.)
- [129] S. Laimgruber, H. Schachenmayr, B. Schmidt, W. Zinth, and P. Gilch. A femtosecond stimulated Raman spectrograph for the near ultraviolet. *Appl. Phys. B-Lasers Opt.*, 85(4):557–564, 2006. (Zitiert auf Seite 35.)
- [130] Sarah Bay, Torben Villnow, Gerald Ryseck, Vidisha Rai-Constapel, Peter Gilch, and Thomas J. J. Müller. The Ugi Four-Component Reaction Route to Photoinducible Electron-Transfer Systems. *ChemPlusChem*, 78(2):137–141, 2013. (Zitiert auf Seite 35.)
- [131] A. Brodeur and S. L. Chin. Band-gap dependence of the ultrafast white-light continuum. *Phys. Rev. Lett.*, 80:4406–4409, May 1998. (Zitiert auf Seite 36.)

- [132] Katsumi Midorikawa, Hiroyuki Kawano, Akira Suda, Chihiro Nagura, and Minoru Obara. Polarization properties of ultrafast white-light continuum generated in condensed media. *Applied physics letters*, 80(6):923–925, 2002. (Zitiert auf Seite 36.)
- [133] M. Towrie, A. Gabrielsson, P. Matousek, A. W. Parker, A. M. B. Rodriguez, and A. Vlcek. A high-sensitivity femtosecond to microsecond time-resolved infrared vibrational spectrometer. *Appl. Spectrosc.*, 59(4):467–473, 2005. (Zitiert auf Seite 38.)
- [134] T. Schrader, A. Sieg, F. Koller, W. Schreier, Q. An, W. Zinth, and P. Gilch. Vibrational Relaxation following Ultrafast Internal Conversion: Comparing IR and Raman Probing. *Chem. Phys. Lett.*, 392:358–364, 2004. (Zitiert auf Seite 38.)
- [135] Donald R. Herriott and Harry J. Schulte. Folded optical delay lines. *Appl. Opt.*, 4(8):883–889, Aug 1965. (Zitiert auf Seite 38.)
- [136] J. Altmann, R. Baumgart, and C. Weitkamp. Two-mirror multipass absorption cell. *Appl. Opt.*, 20(6):995–999, Mar 1981. (Zitiert auf Seite 38.)
- [137] Dennis Löwenich. *Stationäre und transiente UV-Spektroskopie an Cytochrom c und Porphyrin-Modellsystemen*. PhD thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2007. (Zitiert auf Seite 38.)
- [138] A. Reuther, A. Laubereau, and D. N. Nikogosyan. A simple method for the in situ analysis of femtosecond UV pulses in the pump-probe spectroscopy of solutions. *Opt. Commun.*, 141:180–184, 1997. (Zitiert auf den Seiten 40 und 95.)
- [139] S Pommeret, F Gobert, M Mostafavi, I Lampre, and J-C Mialocq. Femtochemistry of the hydrated electron at decimolar concentration. *The Journal of Physical Chemistry A*, 105(51):11400–11406, 2001. (Zitiert auf den Seiten 40 und 95.)
- [140] Fang-Yuan Jou and Gordon R Freeman. Band resolution of optical spectra of solvated electrons in water, alcohols, and tetrahydrofuran. *Canadian Journal of Chemistry*, 57(5):591–597, 1979. (Zitiert auf Seite 40.)
- [141] Fang-Yuan Jou and Gordon R Freeman. Temperature and isotope effects on the shape of the optical absorption spectrum of solvated electrons in water. *Journal of Physical Chemistry*, 83(18):2383–2387, 1979. (Zitiert auf Seite 40.)
- [142] George V Buxton, Clive L Greenstock, W Phillip Helman, and Alberta B Ross. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals. *Phys. Chem. Ref. Data*, 17:513–886, 1988. (Zitiert auf den Seiten 40 und 99.)

- [143] N.A. Anderson, J.J. Shiang, and R.J. Sension. Subpicosecond Ring Opening of 7-Dehydrocholesterol Studied by Ultrafast Spectroscopy. *J. Phys. Chem. A*, 103:10730–10736, 1999. (Zitiert auf Seite 41.)
- [144] Teja T. Herzog, Gerald Ryseck, Evelyn Ploetz, and Thorben Cordes. The photochemical ring opening reaction of chromene as seen by transient absorption and fluorescence spectroscopy. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 12:1202–1209, 2013. (Zitiert auf den Seiten 41 und 42.)
- [145] Thorben Cordes, Nadja Regner, Björn Heinz, Elina Borysova, Gerald Ryseck, and Peter Gilch. The complex photorearrangement of a heterocyclic n-oxide: Kinetics from picoseconds to minutes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 206(1):10 – 17, 2009. (Zitiert auf den Seiten 42 und 49.)
- [146] B. Schmidt, S. Laimgruber, W. Zinth, and P. Gilch. A broadband Kerr shutter for femtosecond fluorescence spectroscopy. *Appl. Phys. B*, 76:809–814, 2003. (Zitiert auf den Seiten 46, 47, und 48.)
- [147] S. Arzhantsev and M. Maroncelli. Design and characterization of a femtosecond fluorescence spectrometer based on optical Kerr gating. *Appl. Spectrosc.*, 59(2):206–220, 2005. (Zitiert auf den Seiten 47 und 48.)
- [148] Ramona Mundt. Aufbau eines optisch parametrischen Verstärkers für die Femtosekunden-Fluoreszenz-Spektroskopie. Diplomarbeit, Institut für Physikalische Chemie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2012. (Zitiert auf Seite 48.)
- [149] Albert Rose. *Vision: human and electronic*. 1973. (Zitiert auf Seite 48.)
- [150] Adriaan Van den Bos. *Parameter estimation for scientists and engineers*. Wiley. com, 2007. (Zitiert auf den Seiten 48, 51, und 52.)
- [151] K. Bahlmann and S. Hell. Electric field depolarization in high aperture focusing with emphasis on annular apertures. *J. Microsc.-Oxf.*, 200:59–67, 2000. (Zitiert auf Seite 49.)
- [152] K. Bahlmann and S. Hell. Depolarization by high aperture focusing. *Appl. Phys. Lett.*, 77(5):612–614, 2000. (Zitiert auf Seite 49.)
- [153] Beate Schulz. Optimierung des Auslöschungsverhältnisses eines Kerr-Gates für die fs-Fluoreszenzspektroskopie. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2012. Bachelor-Arbeit. (Zitiert auf Seite 49.)

- [154] M. Lorenc, M. Ziolk, R. Naskrecki, J. Karolczak, J. Kubicki, and A. Maciejewski. Artifacts in femtosecond transient absorption spectroscopy. *Appl. Phys. B-Lasers Opt.*, 74(1):19–27, 2002. (Zitiert auf den Seiten 50 und 62.)
- [155] T. Schmierer, G. Ryseck, T. Villnow, N. Regner, and P. Gilch. Kasha or state selective behavior in the photochemistry of ortho-nitrobenzaldehyde? *Photochem. Photobiol. Sci.*, 11:1313–1321, 2012. (Zitiert auf Seite 50.)
- [156] Roland Bonneau, Jakob Wirz, and Andreas D Zuberbuhler. Methods for the analysis of transient absorbance data. 1997. (Zitiert auf Seite 51.)
- [157] Andrei A Istratov and Oleg F Vyvenko. Exponential analysis in physical phenomena. *Review of Scientific Instruments*, 70(2):1233–1257, 1999. (Zitiert auf den Seiten 51 und 52.)
- [158] Peter Debye. *Polar Molecules*. Dover Publications, New York, 1929. (Zitiert auf Seite 53.)
- [159] B.R. Gayathri, J.R. Mannekutla, and S.R. Inamdar. Rotational diffusion of coumarins in alcohols: A dielectric friction study. *Journal of Fluorescence*, 18(5):943–952, 2008. (Zitiert auf Seite 53.)
- [160] J.J. Fisz, M. Buczkowski, and P Żuchowski. High-aperture-excitation and -detection fluorescence spectroscopy with polarized light. *Chemical Physics Letters*, 412(4–6):263 – 268, 2005. (Zitiert auf Seite 54.)
- [161] Jacek J. Fisz. Another look at magic-angle-detected fluorescence and emission anisotropy decays in fluorescence microscopy. *The Journal of Physical Chemistry A*, 111(50):12867–12870, 2007. (Zitiert auf Seite 54.)
- [162] Jacek J. Fisz. Fluorescence Polarization Spectroscopy at Combined High-Aperture Excitation and Detection: Application to One-Photon-Excitation Fluorescence Microscopy. *The Journal of Physical Chemistry A*, 111(35):8606–8621, 2007. PMID: 17691715. (Zitiert auf Seite 54.)
- [163] Jacek J. Fisz. Another Treatment of Fluorescence Polarization Microspectroscopy and Imaging. *The Journal of Physical Chemistry A*, 113(15):3505–3516, 2009. PMID: 19309131. (Zitiert auf Seite 54.)
- [164] Benjamin P. Fingerhut, Konstantin E. Dorfman, and Shaul Mukamel. Monitoring Nonadiabatic Dynamics of the RNA Base Uracil by UV Pump-IR Probe Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 4(11):1933–1942, 2013. (Zitiert auf Seite 58.)

- [165] J. Blais, T. Douki, P. Vigny, and J. Cadet. Fluorescence quantum yield determination of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoadducts. *Photochemistry and Photobiology*, 59(4):402–404, 1994. (Zitiert auf den Seiten [58](#), [61](#), [62](#), und [112](#).)
- [166] Marc M. Anlauf. Lösungsmittelabhängigkeit des Absorptionsspektrums von 1-Methyl-2(1H)-pyrimidinon: eine quantenchemische Untersuchung, 2011. (Zitiert auf den Seiten [60](#), [78](#), [82](#), [84](#), [85](#), und [138](#).)
- [167] Kurt A. Kistler and Spiridoula Matsika. The fluorescence mechanism of 5-methyl-2-pyrimidinone: An ab initio study of a fluorescent pyrimidine analog. *Photochemistry and Photobiology*, 83(3):611–624, 2007. (Zitiert auf den Seiten [60](#), [76](#), und [78](#).)
- [168] N.G. Bryantseva, I.V. Sokolova, A.B. Tsyrenzhapova, N.I. Selivanov, V.P. Khilya, and Ya.L. Garazd. Fluorescent characteristics of coumarin photosensitizers. *Journal of Applied Spectroscopy*, 75(5):700–705, 2008. (Zitiert auf Seite [61](#).)
- [169] W. Hauswirth and S.Y. Wang. Pyrimidine adduct fluorescence in UV irradiated nucleic acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 51(3):819 – 826, 1973. (Zitiert auf den Seiten [61](#) und [111](#).)
- [170] Junpei Yamamoto, Yoshiyuki Tanaka, and Shigenori Iwai. Spectroscopic analysis of the pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproduct: insights into the (6-4) photolyase reaction. *Org. Biomol. Chem.*, 7:161–166, 2009. (Zitiert auf Seite [62](#).)
- [171] Kousuke Satou, Yasuo Komatsu, Takuya Torizawa, Koichi Kato, Ichio Shimada, Osamu Nikaido, and Eiko Ohtsuka. Efficient chemical synthesis of a pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct analog and its properties. *Tetrahedron Letters*, 41(13):2175 – 2179, 2000. (Zitiert auf Seite [62](#).)
- [172] M. L. Horng, J. A. Gardecki, A. Papazyan, and M. Maroncelli. Subpicosecond Measurements of Polar Solvation Dynamics: Coumarin 153 Revisited. *J. Phys. Chem.*, 99:17311–17337, 1995. (Zitiert auf Seite [64](#).)
- [173] Y. Kanematsu, H. Ozawa, I. Tanaka, and S. Kinoshita. Femtosecond optical Kerr-gate measurement of fluorescence spectra of dye solutions. *J. Luminescence*, 87-9:917–919, 2000. (Zitiert auf Seite [64](#).)
- [174] Y. Lu, T. S. Lin, and J. S. Taylor. Electron-paramagnetic resonance studies of pyrimidinones. *J. Phys. Chem.*, 94(10):4067–4068, 1990. (Zitiert auf Seite [67](#).)

- [175] M.A. El-Sayed. Spin-orbit coupling and the radiationless processes in nitrogen heterocyclics. *J. Chem. Phys.*, 38:2834–2838, 1963. (Zitiert auf den Seiten 70 und 90.)
- [176] N.E. Henriksen and F.Y. Hansen. *Theories of Molecular Reaction Dynamics: The Microscopic Foundation of Chemical Kinetics*. Oxford graduate texts in mathematics. Oxford University Press, 2008. (Zitiert auf Seite 73.)
- [177] Y. J. Ai, R. Z. Liao, S. F. Chen, Y. Luo, and W. H. Fang. Theoretical Studies on Photoisomerizations of (6-4) and Dewar Photolesions in dna. *J. Phys. Chem. B*, 114(44):14096–14102, 2010. (Zitiert auf Seite 76.)
- [178] Benjamin P. Fingerhut, Sven Oesterling, Karin Haiser, Korbinian Heil, Andreas Glas, Wolfgang J. Schreier, Wolfgang Zinth, Thomas Carell, and Regina de Vivie-Riedle. ONIOM approach for non-adiabatic on-the-fly molecular dynamics demonstrated for the backbone controlled Dewar valence isomerization. *The Journal of Chemical Physics*, 136(20):204307, 2012. (Zitiert auf den Seiten 77, 78, und 79.)
- [179] Kurt A. Kistler and Spiridoula Matsika. Radiationless Decay Mechanism of Cytosine: An Ab Initio Study with Comparisons to the Fluorescent Analogue 5-Methyl-2-pyrimidinone. *The Journal of Physical Chemistry A*, 111(14):2650–2661, 2007. PMID: 17388372. (Zitiert auf Seite 78.)
- [180] Miquel Moreno and William H. Miller. On the tautomerization reaction 2-pyridone $\rightleftharpoons$ 2-hydroxypyridine: an ab initio study. *Chemical Physics Letters*, 171(5–6):475 – 479, 1990. (Zitiert auf Seite 78.)
- [181] Maciej J. Nowak, Leszek Lapinski, Jan Fulara, Andrzej Les, and Ludwik Adamowicz. Matrix isolation IR spectroscopy of tautomeric systems and its theoretical interpretation: 2-hydroxypyridine/2(1H)-pyridinone. *The Journal of Physical Chemistry*, 96(4):1562–1569, 1992. (Zitiert auf Seite 78.)
- [182] John Olmsted. Effect of refractive index on molecular radiative lifetimes. *Chemical Physics Letters*, 38(2):287 – 292, 1976. (Zitiert auf Seite 82.)
- [183] A.J. McHugh and M. Gouterman. Oscillator strengths for electronic spectra of conjugated molecules from transition gradients iii. polyacenes. *Theoretica chimica acta*, 13(3):249–258, 1969. role of refractive index oscillator strength questioned. (Zitiert auf Seite 82.)

- [184] Robert S. Knox. Dipole and Oscillator Strengths of Chromophores in Solution. *Photochemistry and Photobiology*, 77(5):492–496, 2003. right use of refractive index in Strickler-Berg relation. (Zitiert auf Seite 82.)
- [185] Marco Montalti, Alberto Credi, Luca Prodi, and M Teresa Gandolfi. *Handbook of photochemistry*. CRC, 2006. (Zitiert auf den Seiten 83 und 106.)
- [186] Karl Dimroth, Christian Reichardt, Theodor Siepmann, and Ferdinand Bohlmann. Über Pyridinium-N-phenol-betaine und ihre Verwendung zur Charakterisierung der Polarität von Lösungsmitteln. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 661(1):1–37, 1963. (Zitiert auf Seite 85.)
- [187] Dipak K. Palit, Ajay K. Singh, A. C. Bhasikuttan, and Jai P. Mittal. Relaxation dynamics in the excited states of lds-821 in solution. *The Journal of Physical Chemistry A*, 105(26):6294–6304, 2001. f(epsilon,n) versus ETN solvent parameter. (Zitiert auf Seite 85.)
- [188] Christian Reichardt. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chemical Reviews*, 94(8):2319–2358, 1994. (Zitiert auf Seite 85.)
- [189] Christian Reichardt and Thomas Welton. *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. wiley-VCH, 2011. (Zitiert auf Seite 85.)
- [190] Jozsef Myrcek. Differentiation of electronic absorption spectra complicated by vibronic fine structure. *Spectroscopy Letters*, 22(1):79–86, 1989. (Zitiert auf Seite 87.)
- [191] Eric J. Heller. Time-dependent approach to semiclassical dynamics. *The Journal of Chemical Physics*, 62(4):1544–1555, 1975. (Zitiert auf Seite 87.)
- [192] Eric J Heller. The semiclassical way to molecular spectroscopy. *Accounts of Chemical Research*, 14(12):368–375, 1981. (Zitiert auf Seite 87.)
- [193] S. J. Strickler and R. J. Barnhart. Absolute Vibronic Intensities in the $^1A_2 \leftarrow ^1A_1$ Absorption Spectrum of Formaldehyde. *J. Phys. Chem.*, 86:440–455, 1982. (Zitiert auf Seite 87.)
- [194] C. Ley, F. Morlet-Savary, P. Jacques, and J. P. Fouassier. Solvent dependence of the intersystem crossing kinetics of thioxanthone. *Chem. Phys.*, 255:335–346, 2000. (Zitiert auf Seite 90.)
- [195] Stefan Hugenbruch. Photochemie von substituierten 2(1H)-Pyrimidinonen. Diplomarbeit, 12 2012. (Zitiert auf den Seiten 94 und 96.)

- [196] Julien Bonin, Isabelle Lampre, and Mehran Mostafavi. Absorption spectrum of the hydrated electron paired with nonreactive metal cations. *Radiation Physics and Chemistry*, 74(5):288 – 296, 2005. (Zitiert auf den Seiten 95 und 96.)
- [197] Dimitra Markovitsi, Thomas Gustavsson, and Akos Banyasz. Absorption of UV radiation by DNA: Spatial and temporal features. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 704(1–3):21–28, 2010. ESF-EMBO Conference: Spatio-Temporal Radiation Biology: Transdisciplinary Advances for Biomedical Applications electron ejection from DNA. (Zitiert auf Seite 96.)
- [198] P.W. Atkins and J. de Paula. *Physical Chemistry, Seventh Edition*. Oxford University Press, Oxford, 2002. (Zitiert auf Seite 101.)
- [199] C. Salet and R. Bensasson. Studies on thymine and uracil triplet excited state in acetonitrile and water. *Photochemistry and Photobiology*, 22(6):231–235, 1975. (Zitiert auf Seite 101.)
- [200] Barbara Czochralska, Monika Wrona, and David Shugar. Electrochemically reduced photoreversible products of pyrimidine and purine analogues. In *Synthetic Organic Chemistry*, volume 130 of *Topics in Current Chemistry*, pages 133–181. Springer Berlin Heidelberg, 1986. (Zitiert auf den Seiten 103, 104, und 105.)
- [201] Barbara Czochralska and D. Shugar. Photochemically reversible pyrimidine dimer product of electrochemical reduction of pyrimidone-2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 281(1):1 – 10, 1972. (Zitiert auf Seite 103.)
- [202] Barbara Czochralska, Monika Wrona, and D. Shugar. Electrochemically induced pyrimidine dimerization. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1(1–2):40–48, 1974. (Zitiert auf Seite 103.)
- [203] Barbara Czochralska, Maria Szweykowska, and David Shugar. Photochemical redox transformations of dimers of nad^+ and n' -methylnicotinamide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 199(2):497 – 505, 1980. (Zitiert auf Seite 103.)
- [204] N.J. Turro, V. Ramamurthy, and J.C. Scaiano. *Principles of Molecular Photochemistry. An Introduction*. University Sciences Books, Sausalito, California, 2009. (Zitiert auf Seite 103.)
- [205] S. L. Murov, I. Carmichael, and G. L. Hug, editors. *Handbook of Photochemistry*. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong-Kong, 1993. (Zitiert auf Seite 104.)
- [206] Nicholas J Turro. *Modern molecular photochemistry*. Univ Science Books, 1991. (Zitiert auf den Seiten 104 und 105.)

- [207] Michael R. Topp. Activation-controlled hydrogen abstraction by benzophenone triplet. *Chemical Physics Letters*, 32(1):144 – 149, 1975. (Zitiert auf Seite 105.)
- [208] Thomas J Wallace, Roy J Gritter, and Harold G Walsh. Free radical chemistry of cyclic ethers: p-dioxane and morpholine. *Nature*, 198:284–285, 1963. (Zitiert auf Seite 105.)
- [209] Shamim A. Chaudhri. Pulse radiolysis of dioxane and dioxane + water mixtures. Yield of free solvated electrons and kinetics of the radical reactions. *The Journal of Physical Chemistry*, 76(9):1279–1283, 1972. (Zitiert auf Seite 105.)
- [210] Werner M. Nau. Pathways for the photochemical hydrogen abstraction by n,π^* -excited states. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 102(3):476–485, 1998. (Zitiert auf Seite 105.)
- [211] Zinth, W., Fingerhut, B. P., Herzog, T. T., Ryseck, G. R., Haiser, K., Graupner, F. F., Heil, K., Gilch, P., Schreier, W. J., Carell, T., and de Vivie-Riedle, R. Ultrafast spectroscopy of UV-induced DNA-lesions - on the search for strategies which keep DNA alive. *EPJ Web of Conferences*, 41:07005, 2013. (Zitiert auf Seite 110.)
- [212] Lisa R Karam, Miral Dizdaroglu, and Michael G Simic. Intramolecular H atom abstraction from the sugar moiety by thymine radicals in oligo- and polydeoxynucleotides. *Radiation research*, 116(2):210–216, 1988. (Zitiert auf den Seiten 110 und 111.)
- [213] David Crich and Qingwei Yao. Free radical chemistry of nucleosides and nucleotides. Ring opening of C4'-radicals. *Tetrahedron*, 54(3-4):305–318, 1998. (Zitiert auf den Seiten 110 und 111.)
- [214] Patric Schyman, Ru bo Zhang, Leif A. Eriksson, and Aatto Laaksonen. Hydrogen abstraction from deoxyribose by a neighbouring uracil-5-yl radical. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9:5975–5979, 2007. (Zitiert auf Seite 110.)
- [215] Christopher Tronche, Brian K Goodman, and Marc M Greenberg. DNA damage induced via independent generation of the radical resulting from formal hydrogen atom abstraction from the C1'-position of a nucleotide. *Chemistry & biology*, 5(5):263–271, 1998. (Zitiert auf Seite 111.)

Teil III

ANHANG

ZUSATZABBILDUNGEN

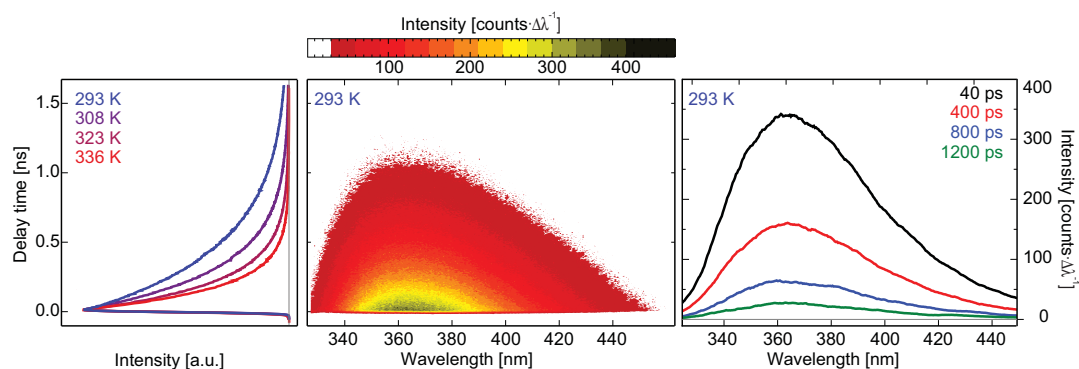


Abbildung A.1: Schmierbild-Messung der Fluoreszenz von 1mp in Wasser: Die Konturdarstellung (Mitte) und transiente Spektren (rechts) bei "Raumtemperatur" (20°C). Die transienten Spektren zeigen einen monoexponentiellen Zerfall innerhalb der Zeitauflösung. Bei Erhöhung der Temperatur ist eine Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer zu verzeichnen (links). Die Grafik ist aus Referenz [27] übernommen.

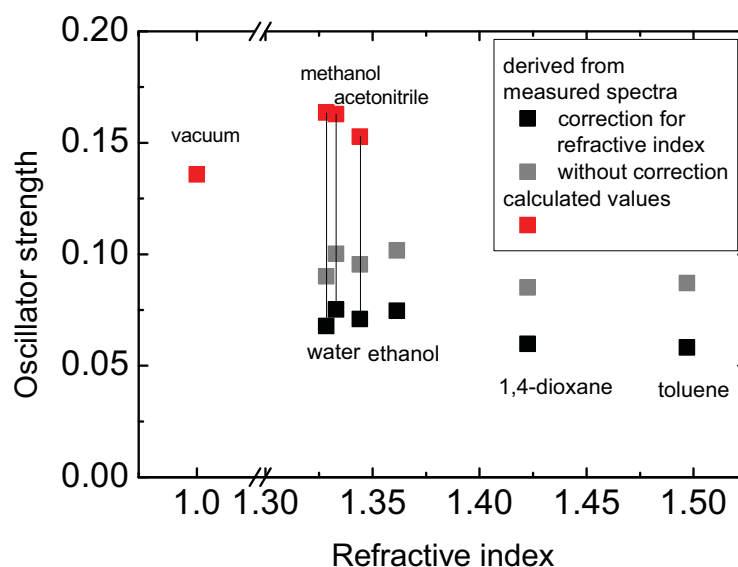


Abbildung A.2: Berechnete (rot, aus Referenz [166]) und aus der niederenergetischen Bande ermittelte (grau) Oszillatorstärken für 1MP sind gegen den Brechungsindex des jeweiligen Lösungsmittels aufgetragen. Die schwarzen Punkte sind mit einem Faktor $\frac{1}{n}$ korrigiert; n ist der Brechungsindex des Lösungsmittels.

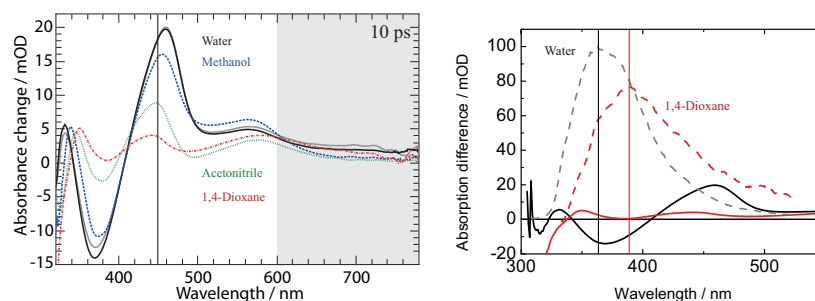


Abbildung A.3: (linke Grafik) Die transienten Spektren von 1MP in verschiedenen Lösungsmitteln bei einer Verzögerungszeit von 10 ps. Die Messungen wurden auf die jeweilige Absorption korrigiert und unter sonst gleichen Bedingungen aufgenommen. Die unterschiedliche Signalstärke lässt sich durch die stimulierte Emission erklären (linke Grafik). In der linken Grafik ist das transiente Spektrum für Wasser und 1,4-Dioxan bei 10 ps mit dem jeweiligen Signalbeitrag der stimulierten Emission (hier mit positiven Vorzeichen dargestellt) dargestellt. Die Signalthöhe der Emission wurde auf die absorbierte Lichtmenge skaliert. Dabei wird angenommen, dass die Stärke der stimulierten Emission proportional zur Oszillatorstärke ist. Linke Grafik ist aus Referenz [108] übernommen.

KOLOPHON

Dieses Dokument wurde mit LyX/MikTeX gesetzt unter Verwendung des von André Miede entwickelt `classicthesis`-Stils. Der Stil ist von Robert Bringhurst's Buch über Typographie, "*The Elements of Typographic Style*", inspiriert. Für das Literaturverzeichnis wurde `NatBib` verwendet.

Für einige Inhalte dieses Dokuments wurden folgende Programme/Systeme verwendet: Ubuntu, Inkscape, Qtplot, Gimp.

Final Version as of 14. Juli 2014 (`classicthesis` version 1.0).

DANKSAGUNG

Zuallererst gilt mein besonderer Dank **Herrn Prof. Peter Gilch** für die Möglichkeit, unter seiner Betreuung meine Doktorarbeit zu erstellen. Er stand mir jederzeit mit Rat zur Seite und war neben seiner Funktion als Mentor in wissenschaftlichen Fragen stets auch auf persönlicher Ebene ein besonderer Gesprächspartner. Weit über die Fragen bezüglich des Dissertationsthemas hinaus konnte ich viel von ihm lernen.

Herrn PD Klaus Schaper möchte ich für die fruchtbare Zusammenarbeit und für die Übernahme des Zweitgutachtens danken. In vielen Diskussionen konnte ich mich nicht nur über Chemie, sondern auch, im "Heimspiel", über physikalische Fragestellungen mit ihm austauschen.

Herrn Prof. Wolfgang Zinth gilt ebenfalls besonderer Dank. In vielen Gesprächen mit ihm vertiefte ich mein Wissen über die Hintergründe von Aufbauten, der Forschung im allgemeinen und technischer Raffinessen. Seine offene Art machte die Zeit am BMO in München zu einer überaus wichtigen Erfahrung. Ich danke ihm im Besonderen für das Vertrauen, das er mir bei dem Aufbau der Schmierbild-Kamera entgegenbrachte.

Auch dem Sekretariat möchte ich danken. **Frau Alexandra Michaelis** und **Frau Marianne Widmann-Diermeier** am BMO in München und **Frau Veronika Mendorf** am Institut für Physikalische Chemie in Düsseldorf waren in allen bürokratischen Fragen wie auch bei anderen Doktoranden-Wehwehchen immer zur Stelle und halfen, für alles eine Lösung zu finden. Ohne sie würde eine Forschungseinrichtung einfach nicht funktionieren.

Derselbe Dank gilt auch den vielen Helfern im Hintergrund. Der Werkstatt am BMO in München, **Herrn Rudolf Schwarz**, **Herrn Christian Hausmann**, **Herrn Alfons Stork** und der Werkstatt in Düsseldorf mit **Gerd Büttgenbach** und seinem Team: Ohne ihre schnelle und professionelle Arbeit wären die wissenschaftlichen Vorhaben niemals in die Tat umgesetzt worden.

Mein Dank gilt desweiteren **Herrn Karl-Heinz Mantel** (BMO) für seine Hilfe bei allen computertechnischen Fragen. **Herrn Harald Hoppe** (BMO), dessen Glasarbeiten nicht nur die Arbeit am BMO, sondern auch in Düsseldorf vereinfachten. **Herrn Martin Schramm** (Düsseldorf), der schnell und zuverlässig Elektronik für noch so spezialisierte Aufgaben entwickelte.

Allen meinen Kollegen am Arbeitskreis Femtosekunden-Spektroskopie: **Torben Villnow**, mit dem der Aufbau des Labors in Düsseldorf sehr erfolgreich verlief. Dank seiner Tätigkeit konnten wir

innerhalb kurzer Zeit wieder transiente Absorptionsmessungen fahren. Das gute alte Z20 ist wohl bei ihm in Meisters Hand. **Ramona Mundt**, die zum größten Teil den Kerr-Aufbau an unserem Institut umsetzte und jederzeit helfend zur Seite stand. **Lars Czerwinski**, der als Physiker wieder das Gleichgewicht in unserer Gruppe herstellte und mir stets klare Einblicke in seinen Forschungsschwerpunkt gab. **Laura Buschhaus und Stefan Hugenbruch** möchte ich für die gute Zusammenarbeit und den Erkenntnis zur Photophysik von 1MP danken. Die gemeinsame Arbeit und Zeit am Institut wird mir in bester Erinnerung bleiben. Mein/e NachfolgerIn kann sich über dieses familiäre Forschungsumfeld zu Recht freuen.

Allen "alten" Kollegen aus München. Der ganzen **Crew des Labors Z20 und Z21** für die fruchtbare Zusammenarbeit. Die Liste wäre wohl zu lang, weshalb ich ein generelles Dankeschön an alle BMOler richten möchte. Das sehr kollegiale, beinahe schon familiäre Umfeld ist wohl der Traum eines jeden Doktoranden. Danke euch! Besonders möchte ich der IR-Fraktion, **Wolfgang Schreier und Karin Haiser** danken. Ihre vorbildliche und gewissenhafte wissenschaftliche Praxis und ihr unermüdliches Arbeiten an dem nicht unkomplizierten Messaufbau lieferten einen beachtlichen Teil zur Aufklärung der Dewar Valenzisomerisierung.

Einigen Kollegen möchte ich einen speziellen Dank ausdrücken: Meinen alten Münchner Mitstreitern, **Thomas Schmierer und Evelyn Plötz**. Es war mir eine Ehre, mit euch die erste Zeit meiner Forschungsarbeit erleben zu dürfen. Nicht nur in technischen Fragen wart ihr mir stets zur Seite, sondern auch die eine oder andere Freizeitaktivität schweißte uns zusammen. **Dr. Benjamin Marx**, der den fast gleichen Doktorandenweg wie ich durchlebte; nicht nur als ein wunderbarer Diskussionspartner, sondern vor allem als Freund warst Du mir stets in allen Lagen Hilfe und ein offenes Ohr. Ich hoffe, dass wir auch in Zukunft manch einen Sonntag zur Wanderung oder, falls es regnet, zu kulturellen Veranstaltungen losziehen. **Sascha Fröbel** danke ich für gute wissenschaftliche Zusammenarbeit, die mir oft Hilfe war. Auch für die erlebten Feierabendstunden und guten Gespräche: Danke. Meinem Mitstreiter **Nils Krebs**, der fast täglich in wissenschaftliche Diskussion mit mir trat und bei Problemen keinen Moment zögerte, bei der Lösung zu helfen. Über die Arbeit hinaus habe ich in Dir einen guten Freund gefunden: Danke.

Den Korrekturlesern: **Peter Gilch, meinen Eltern Irene und Werner Ryseck, meiner Schwester Laura Ryseck, Herrn Sascha Fröbel und Herrn Dr. Benjamin Marx**. Ohne eure unermüdliche Suche nach Fehlern wäre die Arbeit zweifelsfrei nicht zustande gekommen.

All meinen Freunden und musikalischen Weggefährten mein herzlichster Dank! Vor allem möchte ich meinem Cousin **Alexander Manhardt** Dank aussprechen. Seit meiner Jugend der treue Begleiter an meiner Seite. **Christian Rössert**, der hoffentlich seinen PostDoc in

England baldigst zum Ende bringt und endlich mit mir zusammen unsere Philosophen-Bar in München eröffnet.

Wie immer in der Danksagung steht an letzter Stelle die **Familie**. Das bedeutet, dass man das Wichtigste zum Schluss aufführt. Meiner Mutter Irene, meinem Vater Werner, meinem Bruder Gilbert und meiner Schwester Laura: DANKE euch! Ich kann mich glücklich schätzen solch eine wundervolle Familie zu haben.

All denjenigen Freunden und Weggefährten, die ich nun in den letzten intensiven Stunden meiner Schreibarbeit vergessen habe hier zu erwähnen, einen nicht minder herzlichen

DANK !!!

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der "Grundsätze zur Sicherheit guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf" angefertigt und in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Fakultät eingereicht oder veröffentlicht.

Düsseldorf, November 2013

Gerald Raoul Ryseck