



HEINRICH HEINE  
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

# Ultraschnelle Prozesse bei der therapeutisch genutzten Photochemie von Psoralenen in DNA

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Sascha Fröbel**

aus Aachen

Düsseldorf, April 2016

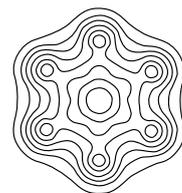
aus dem Institut für Physikalische Chemie II  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Peter Gilch  
Korreferent: Prof. Dr. Thomas J. J. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2016

Ich danke dem Fonds der Chemischen Industrie für die  
Förderung dieser Arbeit durch ein Chemiefonds-Stipendium.



**FCI**  
FONDS DER  
CHEMISCHEN  
INDUSTRIE



# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Prof. Dr. Peter Gilch, dem Betreuer meiner Promotion, für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Schon während meiner Bachelorarbeit und meiner anschließenden Beschäftigung als studentische Hilfskraft wurde ich durch seine erstklassige Betreuung optimal auf weitere akademische Schritte im Bereich der physikalischen Chemie vorbereitet. Während meiner Promotion ermöglichte er mir die Teilnahme an zahlreichen Konferenzen und verhalf mir bereits früh zu einer riesigen Zahl von Kontakten in der Forschung. Vor allem aber möchte ich mich für die ideale, lockere Arbeitsatmosphäre und viele Freiheiten bedanken. Meine Promotionszeit hätte nicht besser laufen können.

Prof. Dr. Thomas J. J. Müller möchte ich sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens für diese Arbeit und für die Möglichkeit, in seinen Laboren das zentrale Molekül für diese Arbeit zu synthetisieren, danken. Seiner Arbeitsgruppe und Priv.-Doz. Dr. Klaus Schaper bin ich für die Einladung zu vielen schönen Feiern dankbar.

Dem Betreuer meiner Masterarbeit, Prof. Dr. Claus A. M. Seidel, möchte ich für seinen steten Zuspruch und seine Hilfe bei mehreren Bewerbungen danken. Mindestens ebenso sehr half mir Prof. Dr. Dr. h.c. Silvia E. Braslavsky, die mich zunächst beim Einwerben von Drittmitteln für eine Konferenzteilnahme in Argentinien und dann auch vor Ort unterstützte und auch darüber hinaus extrem hilfsbereit ist.

Die Entscheidung, Chemie zu studieren, hätte ich sicherlich nicht getroffen, wenn ich nicht den hervorragenden Chemie-Leistungskurs unter Leitung von Frau Kaufmann besucht hätte. Bei ihr möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mein Interesse am Fach bestärkt und damit den Weg für diese Dissertation frei gemacht hat.

Mein Interesse an der Laserspektroskopie weckte Dr. Thomas Schmierer, der nach einem Lockvortrag zur Femtosekundenspektroskopie meine Bachelorarbeit betreuen durfte. Von ihm und den weiteren Münchnern, Dr. Benjamin Marx, Dr. Evelyn Plötz und Dr. Gerald Ryseck, habe ich eine Unmenge über Spektroskopie gelernt. Ich möchte aber allen Vieren und besonders Gerald auch für viele schöne Feierabendunternehmungen danken, die sich teilweise bis in den Morgen ausdehnten.

Auch die neuen Kollegen in Düsseldorf, Dr. Torben Villnow, Lars Czerwinski, Ramona

Mundt, Christian Torres, Jakob Nixdorf, Mathias Micheel und Anna Reiffers, sowie alle Bachelor- und Masterstudenten sorgten immer für ein sehr angenehmes Arbeitsklima. Anna möchte ich besonders dafür danken, dass es nie langweilig werden konnte und nun fliegende Gummihühner zur Gruppenausstattung gehören. Außerdem brachte sie dieses Projekt in ihrer Masterarbeit deutlich voran. Das gilt auch für die Bachelorstudentinnen Malika Seghaoui und Sabine Ulamec, deren Betreuung mir viel Spaß gemacht hat.

Zu guter Letzt möchte ich mich von Herzen bei meiner ganzen Familie und ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die mich immer mit allen Mitteln unterstützt haben. Dank ihnen habe ich durchweg sorgenfrei studieren können und ohne sie wäre diese Promotion sicher nicht möglich gewesen.

Meiner Verlobten Dr. Lucilla Levi möchte ich für bald neun wundervolle Jahre danken. Außerdem für ihr sorgfältiges Korrekturlesen dieser Arbeit, für die große Hilfe bei der Synthese und Aufreinigung meiner Moleküle, viel Verständnis in stressigen Zeiten, jede Menge gutes Essen und dafür, dass sie mich überredet hat unseren Hund Toby bei uns aufzunehmen.

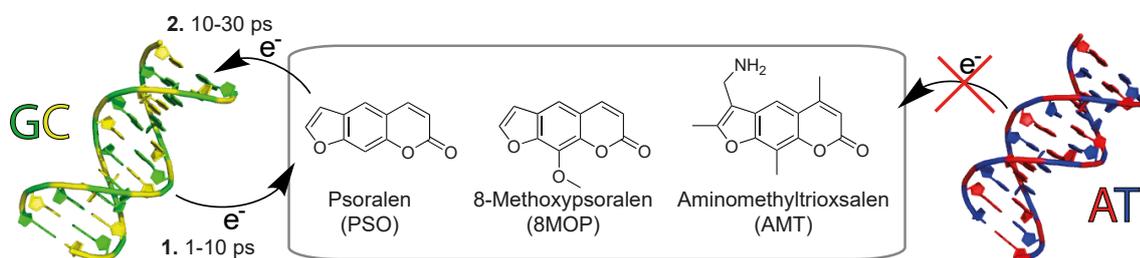
# Zusammenfassung

Die Erzeugung von DNA-Schädigungen durch exogene Substanzen ist ein weit verbreitetes therapeutisches Konzept, um die Proliferation erkrankter Zellen zu verhindern. Ein vertieftes Verständnis dafür, wie solche Schäden gebildet werden, ist daher von großem Interesse für die Natur- und Lebenswissenschaften. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das photophysikalische und -chemische Verhalten einer Klasse von DNA-schädigenden Exogenen, die sich mit Licht aktivieren lassen, mithilfe von hochzeitaufgelöster Spektroskopie direkt beobachtet und charakterisiert. Als Modellsystem für die Untersuchung solcher Exogene wurde die therapeutisch relevante Stoffklasse der Psoralene (auch: Furocoumarine, s. Abbildung 1) ausgewählt.

Psoralene sind vor allem durch ihren Einsatz im Rahmen der PUVA-Therapie (PUVA für Psoralen + UV-A Bestrahlung) zur Behandlung weitverbreiteter Hauterkrankungen wie Schuppenflechte (Psoriasis) und der Weißfleckenkrankheit (Vitiligo) bekannt. Zusätzlich finden sie vielfältige Anwendungen in medizinischen oder chemischen Laboren. Dazu zählen die Desaktivierung von Viren in Blutproben, die Analyse der Struktur von DNA-Fragmenten oder die Stabilisierung von DNA-Origamistrukturen. All diese Anwendungen basieren auf ihrer Wechselwirkung mit der DNA, von der schon mehrere Aspekte bekannt sind. In wässriger Umgebung interkalieren Psoralene ohne Lichteinwirkung zwischen die Basenpaare der DNA, was durch  $\pi$ -Elektronenwechselwirkungen zu einem freien Enthalpiegewinn führt. Innerhalb der DNA können sie dann selektiv mit UV-A Licht angeregt werden. Darauf können entweder unter Beteiligung ihrer Furan- oder ihrer Pyron Doppelbindungen [2+2]-Cycloadditionen mit Thyminbasen in der DNA stattfinden. Eine sekundäre [2+2]-Cycloaddition des Furanmonoaddukts über das Pyronfragment kann zu einer Quervernetzung der DNA führen. Sämtliche Addukte behindern das Auslesen der genetischen Information und können in den medizinischen Anwendungen ein Absterben der betroffenen Zelle verursachen. Die Reaktionsquantenausbeuten für diese Reaktionen sind jedoch klein – in der Regel liegen sie unter 2 %. Trotz intensiver Bemühungen, vor allem in den 1970er und 80er Jahren, sind die in der DNA ablaufenden photochemischen Mechanismen weitgehend unbekannt.

In dieser Arbeit wurde erstmals die ultraschnelle Photophysik und -chemie einiger

DNA-interkalierter Psoralenderivate, unter anderem durch Einsatz von hoch zeitaufgelöster Absorptions- und Raman Spektroskopie, untersucht. Da die Interkalation in die DNA ein chemisches Gleichgewicht darstellt, wurde zunächst ein Titrationsverfahren zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten entwickelt, über die der Anteil der nicht-interkalierten Psoralene für beliebige Lösungen vorhergesagt werden kann. Dann wurde eine Prozedur für die Subtraktion der Signale dieses Anteils in den zeitaufgelösten Messungen unter Berücksichtigung der absorbierten Lichtanteile im Gemisch entwickelt. Die so gewonnenen Daten der interkalierten Moleküle enthüllten das Auftreten eines reversiblen photoinduzierten Elektrontransfers (PET) von der DNA zu den Psoralenen, der die Lebensdauer des angeregten Singulettzustands drastisch verkürzt und in Konkurrenz zu den eigentlich gewünschten Cycloadditionen steht. Ein solcher PET wurde in bisherigen Untersuchungen zu Psoralenen nie in Betracht gezogen. Der Einsatz verschiedener Psoralenderivate zeigte, dass dieser Prozess bei allen gängigen Substitutionsmustern abläuft. Leichte Unterschiede in den jeweiligen Kinetiken konnten in guter Übereinstimmung mit Elektrontransfertheorie durch variierende freie Reaktionsenthalpien für den PET erklärt werden.



**Abbildung 1:** Schema des in dieser Arbeit erstmals beobachteten, reversiblen photoinduzierten Elektrontransfers von Guaninen zu Psoralenen in der DNA, der in Konkurrenz zu den eigentlich erwünschten [2+2]-Cycloadditionen steht.

Eine Variation der DNA-Sequenzen zeigte, dass nur Guanin in der DNA als Elektronendonator fungiert. Dies hat Konsequenzen für die möglichen Reaktionsmechanismen der etablierten Derivate in natürlicher DNA, die im letzten Abschnitt der Arbeit diskutiert werden. Da der PET in Konkurrenz zu den gewünschten Cycloadditionen steht, liefert seine Entdeckung einen neuen Ansatz zur Optimierung von Psoralenen für die DNA-Anbindung. Die Reaktionsquantenausbeuten sollten sich durch die Einführung von Substituenten, die die Reduktion der Psoralene erschweren, deutlich erhöhen lassen.

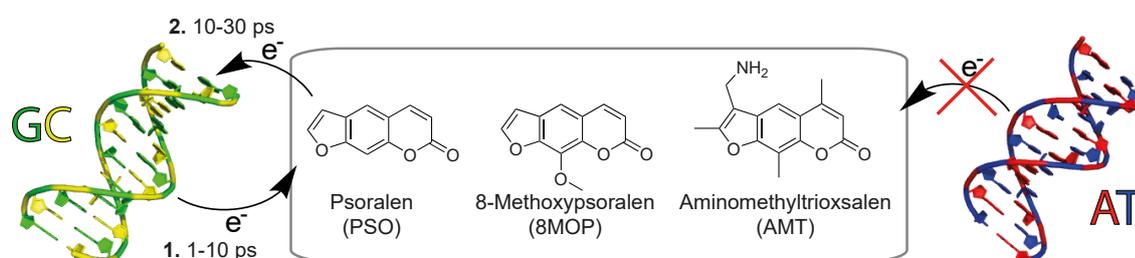
# Abstract

The generation of DNA lesions by exogeneous substances is a well-established therapeutic approach to suppress the proliferation of diseased cells. Thus, an elaborate understanding of how such lesions are formed is of utmost importance for the natural and life sciences. During this thesis, the photophysical and photochemical behavior of a medically relevant class of exogeneous compounds, which undergoes photoreactions with DNA, was studied by means of ultrafast spectroscopy. The class of psoralens (also known as furocoumarins, see Figure 1) was chosen as a model system for this purpose.

Psoralens are primarily known for their application in the framework of PUVA therapy (PUVA for psoralen + UV-A irradiation), which is used to treat widespread skin diseases like psoriasis and vitiligo. Additionally, they are applied for a multitude of purposes in medical and chemical research laboratories, including the disinfection of blood samples, structural analysis of DNA fragments, and the stabilization of DNA origami constructs. All of these applications are based upon their interaction with DNA. Several aspects of these interactions have already been revealed. In aqueous solution, psoralens intercalate between base pairs of double helical DNA, which reduces the free energy of the system due to  $\pi$ -electron interactions. Once situated between the DNA base pairs, they can be selectively excited using UV-A light. As a consequence of this excitation, [2+2]-cycloadducts with adjacent thymines may be formed, either incorporating their furan or pyrone moieties. If the initial adduct is formed at the furan side, a second UV-A excitation is possible. Then, a secondary [2+2]-cycloaddition via the pyrone moiety can crosslink the DNA strands. In the medical applications, all of these adducts impede the read-out of genetic information encoded in the DNA and potentially lead to necrosis or apoptosis of affected cells. However, the reaction quantum yields for these additions are low – usually below 2%. Despite large research efforts, in particular during the 1970's and 80's, the photochemical mechanisms of the additions, and the photoinduced processes within DNA in general, are widely unknown.

Within this thesis, the ultrafast photophysics and photochemistry of several DNA intercalated psoralen derivatives is studied for the first time, employing i.a. femtosecond transient absorption and femtosecond stimulated Raman spectroscopy. Since DNA in-

tercalation of these molecules is a chemical equilibrium, the development of a titration procedure for the determination of DNA binding constants was necessary in a first step. Relying on these binding constants, the femtosecond data can be corrected for the contributions of non-intercalated molecules. The data of intercalated molecules obtained this way reveals the occurrence of ultrafast photoinduced electron transfer (PET) processes from DNA to psoralens, which drastically reduces the excited singlet state lifetime of the latter and impedes the desired [2+2]-cycloadditions. Up to now, such a PET has never been considered as a process in the photochemistry of intercalated psoralens. The study of diverse psoralen derivatives shows that the transfers take place with all frequently used substitution patterns. Slight differences in the observed kinetics are nicely explained by varying free energy changes in the framework of electron transfer theory.



**Figure 1:** Scheme of the photoinduced electron transfer between guanines and psoralens within DNA discovered here. The transfer interferes with desired [2+2]-cycloadditions to DNA.

Employing diverse DNA molecules with defined sequences, it is shown that guanines are the only nucleobases acting as electron donors for the psoralens. This has implications for the photochemical mechanisms of the established derivatives in natural DNA, which are discussed at the end of this thesis. Since the PET occurs in competition with the desired cycloadditions, this work reveals a completely new approach for the optimization of psoralens with respect to their reaction with DNA. By introducing suitable substituents, which shift the reduction potentials to the negative, the reaction quantum yields for the addition to DNA can most likely be significantly increased.

# Publikationen & Konferenzbeiträge

Einige Ergebnisse, die während dieser Promotion entstanden und zum Teil in dieser Arbeit präsentiert werden, wurden bereits in den folgenden Fachartikeln publiziert oder in Form von Vorträgen oder Postern im Rahmen der aufgelisteten Konferenzen vorgestellt.

## Publikationen in Zeitschriften mit Fachgutachten

- Fröbel, S., Levi, L., Ulamec, S. M., Gilch, P. (2016): Photoinduced Electron Transfer between Psoralens and DNA: Influence of DNA Sequence and Substitution. In: *ChemPhysChem*, early view, DOI: 10.1002/cphc.201500889
- Fröbel, S., Gilch, P. (2016): Femtochemistry of Selected Di-Substituted Benzenes. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology A - Chemistry*, 318, 150-159, DOI: 10.1016/j.jphotochem.2015.05.036
- Fröbel, S., Reiffers, A., Torres Ziegenbein, C., Gilch, P. (2015): DNA Intercalated Psoralen Undergoes Efficient Photoinduced Electron Transfer. In: *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 6, 1260-1264. DOI: 10.1021/acs.jpcclett.5b00307
- Fröbel, S., Buschhaus, L., Villnow, T., Weingart, O., Gilch, P. (2015): The Photoformation of a Phthalide: A Ketene Intermediate Traced by FSRs. In: *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17, 376-386. DOI: 10.1039/C4CP03351E
- Fröbel, S., Appel, S., Ganter, C., Gilch, P. (2013): Extracting Picosecond Time Constants from Steady-State Spectroscopy: A Physical Chemistry Experiment. In: *Journal of Chemical Education*, 90, 1082-1086. DOI: 10.1021/ed4001393

## Publikationen ohne Fachgutachten

- Fröbel, S., Reiffers, A., Gilch, P. (2016): Femtochemie - Schnell, schneller, ultraschnell. In: *HighChem hautnah - Aktuelles zu Chemie und Licht*, Broschüre der GDCh
- Fröbel, S., Reiffers, A., Gilch, P. (2015): Femtochemie. In: *Aktuelle Wochenschau der GDCh*, Woche 9, unter [www.aktuelle-wochenschau.de](http://www.aktuelle-wochenschau.de)

## Aktive Konferenzteilnahmen

- **Posterpräsentation:** Fröbel, S., Torres Ziegenbein, C., Reiffers, A., and Gilch, P., Exploring the Photochemistry of PUVA Therapy: Ultrafast Spectroscopy on DNA-Intercalated Psoralens, Central European Conference on Photochemistry, Bad Hofgastein, Österreich; 02/2016
- **Vortrag:** Fröbel, S., Reiffers, A., Torres Ziegenbein, C., and Gilch, P., An Unexpected Electron Transfer is the Dominant Process in Psoralen-DNA Photochemistry, 27th International Conference on Photochemistry, Jeju Island, Südkorea; 06/2015
- **Vortrag:** Fröbel, S., Buschhaus, L., Villnow, T., Weingart, O., and Gilch, P., The photoinduced ring closure of an o-acylbenzaldehyde - Intricate Kinetics Deciphered by Femtosecond Spectroscopy and Quantum Chemistry, DPG Frühjahrstagung Sektion AMOP, Heidelberg; 04/2015
- **Vortrag:** Fröbel, S., Seghaoui, M., and Gilch, P., Femtosecond Spectroscopy on the Mechanism of Psoralen Photoaddition to DNA, 16th International Congress on Photobiology, Córdoba, Argentinien; 09/2014
- **Posterpräsentation:** Fröbel, S., and Gilch, P., Blue Raman Pump Pulses for Femtosecond Stimulated Raman Spectroscopy, 24th International Conference on Raman Spectroscopy, Jena; 08/2014
- **Vortrag:** Fröbel, S., Buschhaus, L., Villnow, T., Weingart, O., and Gilch, P., The Mechanism of Phthalide Formation: Femto- to Microsecond Kinetics of a Complex Photoreaction, 32nd European Congress on Molecular Spectroscopy, Düsseldorf; 08/2014
- **Vortrag:** Fröbel, S., Mundt, R., Villnow, T., and Gilch, P., FSRS reveals the Ketene Intermediate in the Photoformation of Phthalides, Central European Conference on Photochemistry, Bad Hofgastein, Österreich; 02/2014
- **Vortrag:** Fröbel, S., Vardanyan, H., Sindbert, S., Kalinin, S., Hanke, C., Gohlke, H., and Seidel, C. A. M., Influence of bulged nucleotides on the overall structure of RNA junctions - Precise structural modeling via single molecule FRET, DPG Frühjahrstagung Sektion AMOP, Hannover; 03/2013

# Abkürzungsverzeichnis

5MOP	5-Methoxypsoralen
8MOP	8-Methoxypsoralen
A	Adenin
a.u.	Beliebige Einheiten ( <i>engl.: arbitrary units</i> )
AMT	4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen
AT-DNA	Nur aus AT-Basenpaaren bestehendes DNA Oligomer (für Sequenz s. Kapitel 5.1.2)
BBO	$\beta$ -Bariumborat
C	Cytosin
CD	Circulardichroismus
CIP	Kontakt(radikal)ionenpaar ( <i>engl.: contact (radical) ion pair</i> )
CR	Ladungsrekombination ( <i>engl.: charge recombination</i> )
CS	Ladungstrennung ( <i>engl.: charge separation</i> )
CV	Cyclovoltammetrie
DA	Donor-Akzeptor
DAS	Amplitudenspektrum ( <i>engl.: decay associated spectrum</i> )
DMA	<i>N,N</i> -Dimethylanilin
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>engl.: deoxyribonucleic acid</i> )
ESI	Elektrosprayionisation
FC	Franck-Condon
fs	Femtosekunde ( $10^{-15}$ s)
FSRS	Femtosekunden-stimulierte Raman Spektroskopie
FWHM	Volle Halbwertsbreite ( <i>engl.: full width at half maximum</i> )
G	Guanin
GC-DNA	Nur aus GC-Basenpaaren bestehendes DNA Oligomer (für Sequenz s. Kapitel 5.1.2)
GTAC-DNA	Aus GC- und AT-Basenpaaren bestehendes DNA Oligomer (für Sequenz s. Kapitel 5.1.2)

HMT	4'-Hydroxymethyl-4,5',8-trimethylpsoralen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>engl.: high performance liquid chromatography</i> )
IC	Innere Konversion ( <i>engl.: internal conversion</i> )
ISC	Interkombination ( <i>engl.: inter system crossing</i> )
IVR	Intramolekulare Schwingungsenergieumverteilung ( <i>engl.: intramolecular vibrational energy redistribution</i> )
LFP	Blitzlichtphotolyse ( <i>engl.: laser flash photolysis</i> )
MS	Massenspektrometrie
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NHE	Normalwasserstoffelektrode ( <i>engl.: normal hydrogen electrode</i> )
NMR	Kernspinresonanz ( <i>engl.: nuclear magnetic resonance</i> )
NOPA	Nicht-kollinearer optisch parametrischer Verstärker ( <i>engl.: non-linear optical parametric amplifier</i> )
PCM	Polarisierbares Kontinuum Modell ( <i>engl.: polarizable continuum model</i> )
PET	Photoinduzierter Elektrontransfer
ps	Pikosekunde ( $10^{-12}$ s)
PSO	Psoralen
PUVA	Psoralene + UV-A Bestrahlung
RT	Raumtemperatur
SH-SC	Spektrale Kompression der zweiten Harmonischen ( <i>engl.: second harmonic spectral compression</i> )
SSIP	Solvenssepariertes (Radikal)ionenpaar ( <i>engl.: solvent separated (radical) ion pair</i> )
T	Thymin
TMP	4,5',8-Trimethylpsoralen
TTET	Triplett-Triplett Energietransfer
UV-A	Ultraviolett A
VER	Schwingungsenergielaxation ( <i>engl.: vibrational energy relaxation</i> )
Vis	Sichtbares (Licht) ( <i>engl.: visible</i> )

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b>	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>III</b>
<b>Abstract</b>	<b>V</b>
<b>Publikationen &amp; Konferenzbeiträge</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Schädigung der DNA durch exogene Substanzen . . . . .	3
1.2 Allgemeines zur PUVA-Therapie . . . . .	6
1.2.1 Eigenschaften der Psoralene . . . . .	8
1.2.2 Interaktionen von Psoralenen mit DNA . . . . .	9
<b>2 Theoretische Grundlagen</b>	<b>13</b>
2.1 Photophysikalische Prozesse nach elektronischer Anregung . . . . .	13
2.2 Theorie des Elektrontransfers . . . . .	20
2.3 Thermodynamik-Algorithmen zur Prognose der DNA-Sekundärstruktur . . . . .	25
<b>3 Methodik</b>	<b>29</b>
3.1 Probenvorbereitung und -handhabung . . . . .	29
3.2 Bestimmung der Interkalationsaffinität von Psoralenen . . . . .	31
3.3 Zeitaufgelöste Spektroskopie . . . . .	34
3.3.1 Femtosekunden UV/Vis-Spektroskopie . . . . .	34
3.3.1.1 Subtraktion der Signale von nicht-interkalierten Psoralenen im Gleichgewicht . . . . .	39
3.3.2 Femtosekunden-stimulierte Raman Spektroskopie (FSRS) . . . . .	40
3.3.3 Blitzlichtphotolyse . . . . .	44
3.3.4 Globale Datenanalyse . . . . .	45

<b>4</b>	<b>Konstruktion eines Raman-pump Zweiges für FSRS Experimente</b>	<b>49</b>
4.1	Erzeugung der Raman-pump Impulse . . . . .	50
4.2	Charakterisierung der Raman-pump Impulse . . . . .	53
<b>5</b>	<b>Photochemie und -physik von DNA-interkalierten Psoralenen</b>	<b>59</b>
5.1	Auswahl und Charakterisierung der Probenmoleküle . . . . .	59
5.1.1	Geeignete Psoralene . . . . .	59
5.1.1.1	Synthese von 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen (AMT) . . . . .	62
5.1.2	Geeignete DNA-Proben . . . . .	65
5.1.2.1	Vorhersage der Sekundärstruktur mittels Thermodynamik-Algorithmen . . . . .	67
5.2	Femtosekundspektroskopie an Psoralenen in Abwesenheit von DNA . . . . .	73
5.3	Beobachtung eines photoinduzierten Elektrontransfers von DNA zu AMT . . . . .	78
5.3.1	Identifizierung von Guanin als Elektronen donierende Base . . . . .	85
5.3.2	Detektion des Elektrontransfers in guaninreicher DNA mittels FSRS . . . . .	90
5.4	Einfluss der Psoralensubstitution auf den Elektrontransfer . . . . .	95
5.4.1	Die Stammverbindung: Psoralen . . . . .	95
5.4.2	Ein häufig appliziertes Derivat: 8-Methoxypsoralen . . . . .	98
5.4.3	Vergleich der Transfer-Kinetiken mit Elektrontransfertheorie . . . . .	100
5.5	Untersuchungen zum Mechanismus der [2+2]-Cycloaddition von AMT an Thyminbasen in der DNA . . . . .	106
<b>6</b>	<b>Diskussion - Implikationen der vorgestellten Resultate für Psoralenan-</b> <b>wendungen</b>	<b>119</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>123</b>
	<b>Anhang</b>	<b>140</b>
	<b>Eigenständigkeitserklärung</b>	<b>145</b>

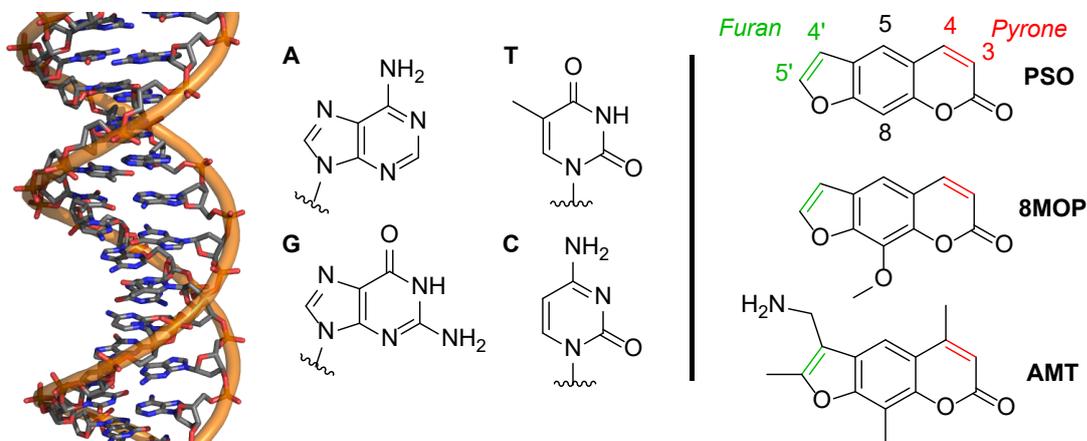
# 1 Einleitung

Veränderungen des Erbguts sind der Auslöser für verschiedenste Krankheiten, von denen einige lethale Auswirkungen haben können.<sup>[1,2]</sup> Die Natur hat daher eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um das Erbgut aller Lebewesen vor Beschädigungen durch innere und äußere Einflüsse zu schützen. Die Speicherung dieser Information in der Desoxyribonukleinsäure (DNA für *deoxyribonucleic acid*) im Inneren der Zellkerne führt bereits zu einer räumlichen Abgrenzung gegenüber vielen schädlichen Einflüssen. Desweiteren ist der Aufbau der DNA selbst darauf optimiert, Beschädigungen ihrer Struktur weitgehend zu vermeiden.<sup>[2]</sup> Sie bildet unter physiologischen Bedingungen eine doppelhelikale Struktur aus zwei polymeren Ketten aus. Das Rückgrat dieser Ketten besteht aus Phosphatgruppen, an die je eine der vier Nukleobasen – Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin – über glykosidische Brücken angebunden ist (Abbildung 1.1 links). Die Abfolge dieser Nukleobasen kodiert die Erbinformation der Zelle. In der doppelhelikalen Struktur sind die Nukleobasen aufgrund ihres hydrophoben Charakters wiederum dem Inneren zugewandt, wo sie unter anderem durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Einzelsträngen zusammengehalten werden. Zusätzlich zu dieser Abschirmung der Träger der Erbinformation ist die DNA auf eine intrinsisch niedrige chemische Reaktivität optimiert. Dazu zählt auch, dass die Nukleobasen durch in den ultravioletten Bereich des elektromagnetischen Spektrums verschobene Absorptionsspektren weitgehend vor Schädigungen durch Sonneneinstrahlung geschützt sind. Kommt es trotz der niedrigen Intensität des Sonnenlichts in diesem Spektralbereich zu einer elektronischen Anregung der DNA-Basen, so existieren ultraschnelle Relaxationsprozesse, die das Ablaufen von Photoreaktionen erschweren.<sup>[3,4,5,6]</sup> So führen nur etwa 1 % der Anregungen zu einer chemischen Veränderung einzelner Nukleobasen.

All dieser Vorkehrungen zum Trotz finden Schädigungen der DNA im menschlichen Körper täglich millionenfach statt,<sup>[7]</sup> da die Zellen permanent einer unüberschaubaren Zahl von schädlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt sind. Nur ein Teil dieser Schäden kann durch zelleigene Reparaturmechanismen<sup>[7,8,9,10]</sup> wieder behoben werden. Akkumulieren sich zu viele DNA-Schädigungen innerhalb einzelner Zellen, so kann zum Schutz des

## 1 Einleitung

Organismus ein Absterben dieser Zellen durch Apoptose oder Nekrose stattfinden.<sup>[2]</sup> Inzwischen existieren viele therapeutische Ansätze, bei denen dieser Effekt im positiven Sinne ausgenutzt wird. Erkrankte Zellareale, zum Beispiel in Form von Tumoren, können gezielt DNA-schädigenden exogenen Substanzen ausgesetzt werden, um schadhafte Zellen abzutöten.<sup>[10,11,12]</sup> Ein solcher Therapieansatz, mit dem verschiedene weitverbreitete Hautkrankheiten wie Schuppenflechte oder die Weißfleckenkrankheit therapiert werden, basiert auf einer Photoreaktion von Psoralenen (Abbildung 1.1 rechts) mit der DNA.<sup>[13,14,15]</sup> Die Charakterisierung der dabei ablaufenden ultraschnellen photophysikalischen und -chemischen Prozesse ist der Hauptgegenstand dieser Arbeit.



**Abbildung 1.1:** Links: Ausschnitt einer regulären B-DNA Doppelhelix sowie Strukturen der Nukleobasen (A: Adenin, T: Thymin, G: Guanin, C: Cytosin).<sup>[2]</sup> Die Phosphatrückgrate der Doppelhelix sind orange nachgezeichnet. Rechts: Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Psoralenderivate Psoralen (PSO), 8-Methoxypsoralen (8MOP) und 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen (AMT) mit der üblicherweise verwendeten klassischen Nummerierung der wichtigsten Positionen. Die reaktiven Doppelbindungen (s. Kapitel 1.2) sind in grün und rot hervorgehoben.

Auch außerhalb ihrer therapeutischen Anwendung hat die Stoffklasse der Psoralene in den letzten Jahren für Aufsehen gesorgt. Ihr Vorkommen als Naturstoff in einigen inzwischen in Europa weit verbreiteten Pflanzen wie dem Riesenbärenklau kann zu gesundheitlichen Problemen führen.<sup>[16]</sup> Gerät man in Kontakt mit einer solchen Pflanze, so können größere Mengen der Psoralene über die Haut aufgenommen werden. Bleibt man im Anschluss im Freien dem Sonnenlicht ausgesetzt, so kann es durch die Photoreaktionen der Psoralene mit der DNA zu verbrennungsartigen Entzündungen kommen.<sup>[16]</sup>

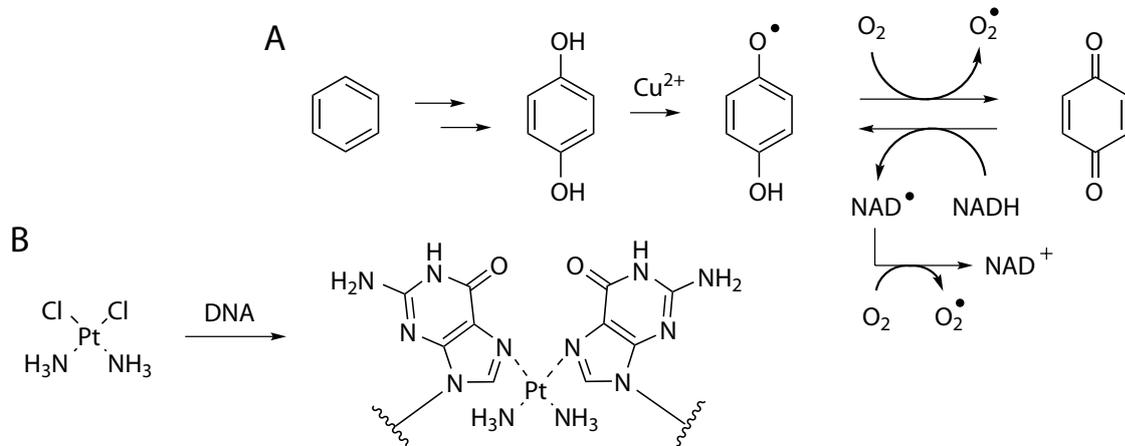
Dabei laufen die gleichen photochemischen Prozesse wie beim therapeutischen Einsatz der Psoralene ab, nur in unkontrollierter Weise.

In den folgenden Unterkapiteln werden zunächst mögliche Mechanismen für die Schädigung der DNA durch exogene Substanzen vorgestellt, bevor der bisherige Kenntnisstand und offene Fragen im Bezug zu photoinduzierten Prozessen zwischen Psoralenen und der DNA aufgezeigt werden.

## 1.1 Schädigung der DNA durch exogene Substanzen

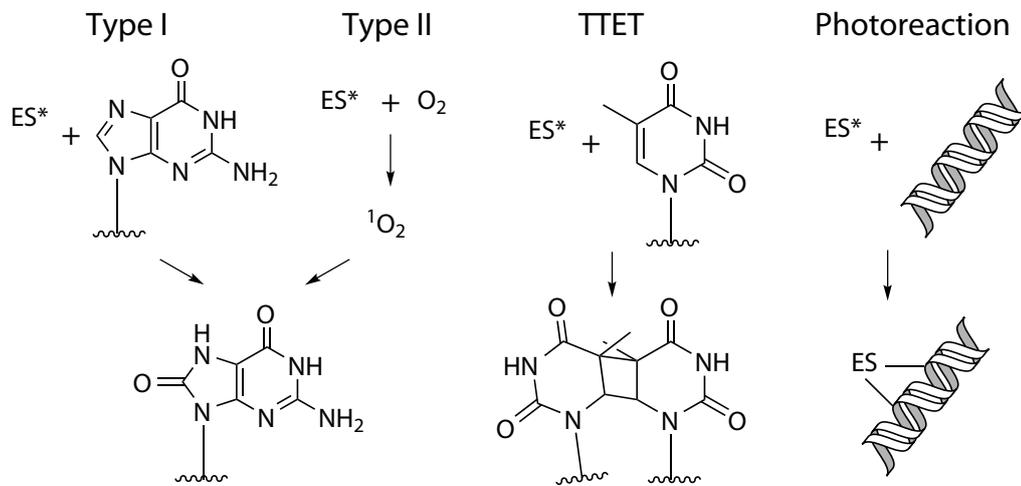
In diesem Abschnitt werden anhand ausgewählter Beispiele einige der wichtigsten Mechanismen für die Schädigung der DNA durch exogene Substanzen vorgestellt. Eines der bekanntesten Karzinogene das zu solchen Schäden führt ist Benzol. Während es vor einigen Jahrzehnten noch in nahezu jedem Chemielabor eingesetzt wurde, ist es heutzutage wegen seiner schädlichen Wirkungen nur noch in Ausnahmefällen vorzufinden. Die karzinogene Wirkung geht in diesem Fall jedoch nicht von Benzol selbst, sondern von seinen Metaboliten aus.<sup>[17]</sup> In mehrstufigen Reaktionen wird Benzol im Körper zunächst zu Phenol und anschließend zu 1,4-Hydrochinon und 1,4-Benzochinon umgesetzt. Diese Substanzen können dann auf einem thermischen Reaktionspfad reaktive Sauerstoffspezies wie das Radikal  $O_2^\bullet$  bilden, die zu oxidativen Schäden an der DNA führen können (Abbildung 1.2 A).<sup>[17]</sup> Die Produkte, die dabei gebildet werden, sind charakteristisch für diesen Reaktionsweg. So wird als Hauptprodukt meist die Nukleobase Guanin zu 8-Oxoguanin oxidiert (vgl. Abbildung 1.3 links), da sie den DNA-Bestandteil mit dem niedrigsten Oxidationspotenzial darstellt.<sup>[12,18,19]</sup>

Eine der prominentesten Verbindungen, die auf thermischem Weg direkt mit der DNA reagiert, ist das bifunktionelle Krebsmedikament Cisplatin ( $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ , Abbildung 1.2 B).<sup>[12,20,21]</sup> Es bindet mit starker Präferenz für Guanine an das Stickstoffatom in 7-Position der Purinbasen. Durch seine Bifunktionalität reagiert es darauf meist mit einer weiteren Purinbase auf dem gleichen DNA-Strang und führt so zu Vernetzungen auf diesem Strang, die eine deutliche Verzerrung der DNA-Struktur bewirken.<sup>[22]</sup>



**Abbildung 1.2:** A: Vereinfachtes Schema zur karzinogenen Wirkung von Benzol. In Zellen wird Benzol zu 1,4-Hydrochinon und 1,4-Benzochinon umgesetzt, die unter Beteiligung endogener Substanzen die Sauerstoffradikale  $\text{O}_2^\bullet$  bilden können (NAD: Nicotinamidadenindinukleotid). Diese Radikale schädigen anschließend die DNA.<sup>[17]</sup> B: Die Reaktion mit zwei Guaninbasen eines DNA-Strangs stellt die Hauptreaktion von Cisplatin mit der DNA dar.<sup>[22]</sup>

Während viele weitere Beispiele für Substanzen existieren, die auf thermischem Weg die DNA schädigen,<sup>[11,18,23]</sup> stehen in dieser Arbeit Substanzen im Vordergrund, die erst nach photochemischer Anregung zu einer DNA-Schädigung führen. Grundsätzlich können all diese Verbindungen sowohl unerwünschte Schäden an der DNA verursachen als auch für therapeutische Zwecke eingesetzt werden. Analog zum Karzinogen Benzol sind es auch in der Photochemie häufig nicht die exogenen Substanzen selbst, die mit der DNA reagieren. Man spricht in diesem Fall von Photosensibilisatoren, da bei Anwesenheit der Substanzen photoinduzierte Reaktionen in der DNA ablaufen, die bei der gleichen Lichteinstrahlung ohne sie nicht stattfinden. Somit wird die DNA indirekt für diese Lichteinstrahlung sensibilisiert. Die durch Photosensibilisatoren verursachten Reaktionen können wiederum über mindestens drei Mechanismen ablaufen (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3:** Illustration verschiedener photochemischer Mechanismen, die zur DNA-Schädigung durch exogene Substanzen führen können (ES\*: elektronisch angeregte exogene Substanz). Die Typ I & II Photosensibilisierungen führen überwiegend zur Bildung von 8-Oxoguanin, während Triplet-Triplet Energietransfers (TTET) hauptsächlich Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer Schäden zwischen Thyminbasen hervorrufen. Zusätzlich sind unter anderem verschiedenste direkte Photoreaktionen mit der DNA möglich.<sup>[12]</sup>

Ähnlich wie beim Karzinogen Benzol werden häufig reaktive Sauerstoffspezies erzeugt, die im Anschluss oxidative Schäden an der DNA verursachen. Dabei geht der Sensibilisator nach der Lichtabsorption meist in einen Tripletzustand über. Dadurch kann beispielsweise beim Zusammentreffen mit Sauerstoff ein als Triplet-Triplet Anihilation<sup>[24]</sup> bezeichneter Vorgang stattfinden, bei dem hochreaktiver Singulett-Sauerstoff erzeugt wird.<sup>[25,26]</sup> Die Endprodukte dieses als Typ II Photosensibilisierung bekannten Prozesses sind ähnlich wie im Fall von Benzol von 8-Oxoguanin dominiert.<sup>[12]</sup>

Als Typ I Photosensibilisierung wird die direkte Enelektronenoxidation eines DNA-Bestandteils durch angeregte Zustände eines Photosensibilisators bezeichnet.<sup>[12]</sup> Die in der DNA gebildeten Radikalkationen können verschiedene Folgereaktionen eingehen, sodass in diesem Fall neben 8-Oxoguanin ein größerer Anteil an weiteren Produkten gebildet werden kann.

Photosensibilisatoren in einem Tripletzustand können ihre Anregungsenergie auch über einen Triplet-Triplet Energietransfer<sup>[24]</sup> auf die DNA übertragen. Nach einem solchen Prozess befindet sich der Sensibilisator wieder in seinem elektronischen Grundzustand und eine Nukleobase in einem Tripletzustand. Voraussetzung dafür ist, dass die Tripletenergie des Sensibilisators über der von Thymin liegt. Thymin ist die Nukleoba-

se mit der niedrigsten Triplettenergie,<sup>[27]</sup> sodass Triplettanregungen in der DNA meist direkt oder nach intramolekularen Energietransferprozessen an Thyminbasen lokalisiert sind. Diese Lokalisierung führt dazu, dass nach diesem Mechanismus fast ausschließlich Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere zwischen benachbarten Thyminen gebildet werden.<sup>[12]</sup>

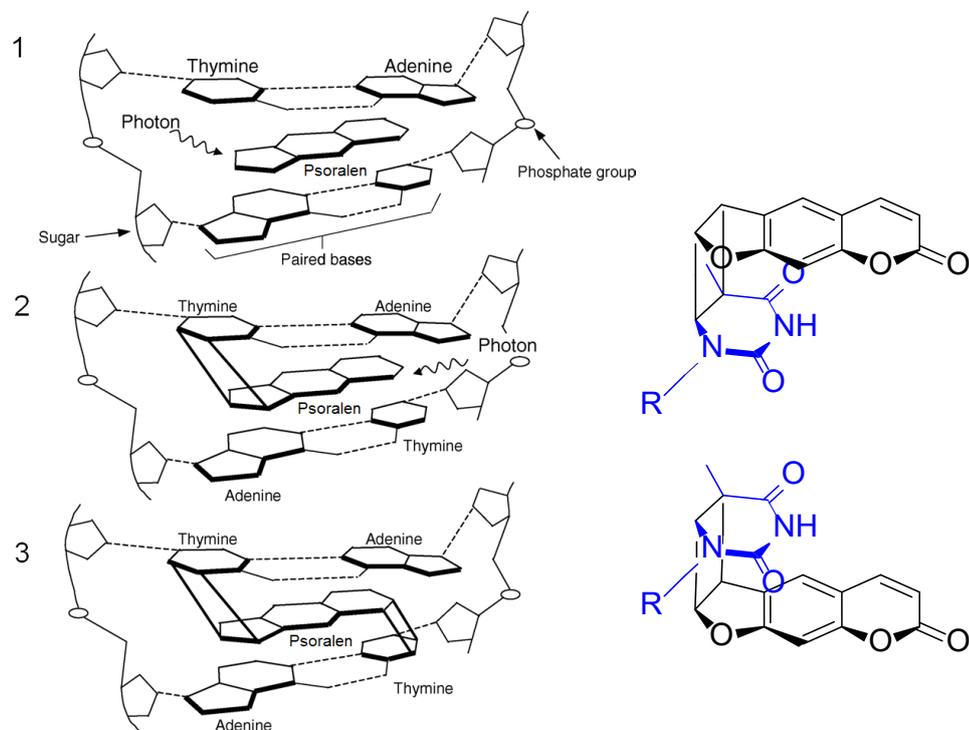
Die Stoffklasse der Psoralene ist ein Beispiel für Substanzen, die nach elektronischer Anregung direkte Reaktionen mit der DNA eingehen. Solche Substanzen werden prinzipiell nicht als Photosensibilisatoren bezeichnet. In der Literatur taucht dieser Begriff dennoch häufig im Zusammenhang mit Psoralenen auf,<sup>[28,29]</sup> da die ihrer Wirkung zugrunde liegenden Reaktionen erst nach ihrer Entdeckung bekannt wurden. Da Psoralene der zentrale Gegenstand dieser Arbeit sind, werden ihre Wechselwirkungen und Reaktionen mit DNA ausführlich in den nächsten Unterkapiteln vorgestellt.

## 1.2 Allgemeines zur PUVA-Therapie

Die Anwendung von Psoralenen zur Behandlung von Hauterkrankungen reicht bis ins Reich der alten Ägypter zurück, die psoralenhaltige Pflanzenextrakte als Salben verwendeten.<sup>[30]</sup> Die intensive Sonnenlichtexposition reichte zur Aktivierung der Psoralene in der Haut aus. In heutiger Zeit werden Psoralene seit mehr als 60 Jahren für dermatologische Zwecke eingesetzt.<sup>[13]</sup> Die als PUVA-Therapie (PUVA für Psoralene + UV-A Bestrahlung) bezeichnete Phototherapie wird unter anderem zur Behandlung von Volkskrankheiten wie der Schuppenflechte (Psoriasis) und der Weißfleckenkrankheit (Vitiligo) eingesetzt.<sup>[30,31,32]</sup> Beide Krankheiten treten weltweit bei jeweils ca. 1-3 % der Bevölkerung auf, was in absoluten Zahlen mehreren hundert Millionen Betroffenen entspricht. Bei der Therapie werden die Psoralene entweder in Form von Salben oder Bädern auf die Haut aufgebracht oder in Form von Tabletten appliziert.<sup>[33]</sup> Dabei lagern sie sich in allen erreichbaren Zellen ein. Über eine gezielte Bestrahlung der erkrankten Hautareale mit UV-A Licht werden dann Reaktionen der Psoralene mit der DNA ausgelöst.

Inzwischen ist das Hauptwirkprinzip der PUVA-Therapie bekannt (Abbildung 1.4).<sup>[14,34]</sup> Ein Teil der applizierten Psoralene interkaliert ohne Lichteinwirkung zwischen die Basenpaare der DNA. Werden die interkalierten Psoralene dann mit UV-A Licht bestrahlt, können sie Woodward-Hoffmann<sup>[35]</sup> erlaubte [2+2]-Cycloadditionen mit benachbarten Thyminbasen eingehen. Diese Reaktion kann entweder über die 4',5'-Doppelbindung des Furanfragments oder die 3,4-Doppelbindung des Pyronfragments der Psoralene ablaufen

(vgl. Abbildung 1.1). Die dabei gebildeten Cycloaddukte haben durch die sterischen Vorgaben in der DNA eine definierte *cis-syn*-Geometrie (Abbildung 1.4 rechts).<sup>[14]</sup> Findet die Reaktion über das Furanfragment statt, so bleibt der Chromophor der Moleküle weitgehend erhalten, wodurch sie erneut mit UV-A Licht angeregt werden können. In einer zweiten Reaktion kann so auch die Addition über das Pyronfragment stattfinden, wodurch Quervernetzungen zwischen den DNA-Strängen erzeugt werden. Sämtliche Mono- und Diaddukte behindern anschließend die Replikation der DNA, sodass sich die betroffenen Zellen nicht mehr teilen können oder bei einer großen Anzahl von Addukten durch Apoptose oder Nekrose absterben.



**Abbildung 1.4:** Links: Psoralene interkalieren bereits ohne Lichteinwirkung in die DNA (1). Die Anregung des Psoralens kann dann zu einem [2+2]-Cycloaddukt zwischen dem Psoralen und einem Thymin führen (2). Wird das Addukt über das Furanfragment gebildet, kann eine zweite Anregung mit UV-A Licht zu einer Quervernetzung der DNA-Stränge führen (3). Adaptiert aus Kitamura et al.<sup>[14]</sup> Rechts: *cis-syn*-Geometrie der Furanmonoaddukte zwischen Psoralen und Thymin.

Während die Photoprodukte von DNA-interkalierten Psoralenen seit einiger Zeit bekannt sind, sind die Mechanismen der Anbindung und die photophysikalischen Prozesse

in der DNA im Allgemeinen weitgehend unverstanden. In der Literatur sind teilweise widersprüchliche Aussagen zu den kinetischen Vorläufern der Cycloaddukte zu finden.<sup>[14]</sup> Unklar ist bislang auch, ob die verschiedenen Psoralenderivate über unterschiedliche Mechanismen an die DNA binden. Eine Übersicht des bisherigen Wissensstandes zu den Eigenschaften verschiedener Psoralene und zu ihrem Verhalten im Zusammenhang mit DNA wird in den folgenden Unterkapiteln gegeben.

### 1.2.1 Eigenschaften der Psoralene

Wie angedeutet sind Psoralene natürlich vorkommende aromatische Heterocyclen, die in systematischer Benennung auch als Furocoumarine bezeichnet werden. Während auch einige gewinkelte Derivate wie Angelicin (Furo[2,3-*h*]coumarin) biologische Aktivität zeigen,<sup>[14]</sup> sind für diese Arbeit in erster Linie lineare Furocoumarine mit dem Grundkörper Furo[3,2-*g*]coumarin (auch: 7*H*-furo[3,2-*g*]chromen-7-on) von Relevanz (vgl. Abbildung 1.1 rechts). Neben ihrer Anwendung für medizinische Zwecke, die auch die Behandlung einiger parasitärer Erkrankungen<sup>[36]</sup> und Lymphome<sup>[37]</sup> einschließt, werden Psoralene häufig für verschiedenste Zwecke in biologischen, medizinischen und chemischen Laboren eingesetzt. So werden sie unter anderem auch zur Desaktivierung von Viren in Blutproben,<sup>[38]</sup> zur Stabilisierung von DNA-Origami Strukturen,<sup>[39]</sup> oder zur Vermessung verschiedener DNA-Eigenschaften<sup>[34,40]</sup> verwendet.

Neben der Stammverbindung Psoralen (PSO) selbst sind vor allem methoxy- und methylsubstituierte Derivate gut charakterisiert. Sie werden daher häufig für Untersuchungen im Zusammenhang mit DNA eingesetzt. Hierzu zählen in erster Linie 5-Methoxypsoralen (5MOP), 8-Methoxypsoralen (8MOP) und 4,5',8-Trimethylpsoralen (TMP), die im Gegensatz zu PSO als Medikamente zugelassen sind.<sup>[41]</sup> Da ihr Einsatz meist in wässrigen Lösungen erfolgt, spielt die Wasserlöslichkeit der Substanzen eine wichtige Rolle. Die methoxysubstituierten Moleküle weisen wie die Stammverbindung Psoralen jedoch nur moderate Wasserlöslichkeiten im Bereich von  $10^{-4}$  M auf.<sup>[42]</sup> Die Substitution mit Methylgruppen in TMP führt zu einer noch wesentlich geringeren Wasserlöslichkeit (um  $10^{-6}$  M), was dessen Einsatz in spektroskopischen Untersuchungen teilweise unmöglich macht. Werden hohe Psoralenkonzentrationen benötigt, finden daher häufig Derivate mit zusätzlichen hydrophilen Substituenten Einsatz. Am häufigsten werden dann zwei Derivate von TMP mit einer Hydroxymethyl- oder Aminomethylfunktionalität in 4'-Position (HMT & AMT, vgl. Abbildung 1.1) verwendet.

Bezogen auf ihre elektronische Struktur in wässriger Lösung haben all diese Derivate zahlreiche Gemeinsamkeiten. So hat ihr niedrigster angeregter Singulettzustand  $S_1$  in der Regel  $\pi\pi^*$ -Charakter und wird in Absorptionsspektren meist als Schulter um 340 nm neben dem Übergang zum  $S_2$ -Zustand (um etwa 300 nm, ebenfalls mit  $\pi\pi^*$ -Charakter), der eine größere Oszillatorstärke besitzt, sichtbar (vgl. Abbildung 5.1).<sup>[43,44]</sup> Die Absorptionsspektren lassen sich in der Regel schon mit einfachen Molekülorbitalberechnungen gut reproduzieren.<sup>[43]</sup> Bei Rechnungen für die Gasphase taucht zwischen den beiden  $^1\pi\pi^*$ -Zuständen ein zusätzlicher  $^1n\pi^*$ -Zustand auf,<sup>[44,45]</sup> der jedoch in polaren Lösungsmitteln weit (ca. 0,5 eV) hypsochrom verschoben und damit nach Anregung in den  $S_1$ - oder  $S_2$ -Zustand nicht mehr erreichbar ist.<sup>[44]</sup> Die Fluoreszenzquantenausbeuten der meisten Derivate liegen in Wasser im Bereich weniger Prozent (vgl. Tabelle 5.1).<sup>[46]</sup> Alle genannten Psoralene haben in wässriger Lösung eine Triplettquantenausbeute im Bereich von einigen Prozent bis hin zu etwa 50 %.<sup>[46,47,48,49,50]</sup> Über moderne quantenchemische Methoden wurde jedoch gezeigt, dass die El-Sayed Regel (s. Kapitel 2.1) im Fall der Psoralene nicht greift.<sup>[51]</sup> In polar-protischen Lösungsmitteln sind ausgehend vom  $S_1$ -Zustand nur Triplettzustände zugänglich, die ebenfalls  $\pi\pi^*$ -Charakter besitzen. Die für diese Situation ungewöhnlich hohen Geschwindigkeitskonstanten für die Interkombination (im Bereich von  $10^8 \text{ s}^{-1}$ ) wurden über eine starke vibronische Spin-Bahn-Kopplung<sup>[52]</sup> erklärt.<sup>[51]</sup>

Während innerhalb der DNA nur die zuvor gezeigten [2+2]-Cycloadditionen ablaufen, sind nach Anregung von Psoralenen in wässriger Lösung eine Vielzahl von Reaktionen möglich. Da zum Teil langlebige Triplettzustände besetzt werden, können Reaktionen zweiter Ordnung nach diffusivem Aufeinandertreffen stattfinden. Die Produktverteilungen und Reaktionsquantenausbeuten weisen dadurch sowohl Konzentrations- als auch Sauerstoffabhängigkeiten auf. Neben verschiedenen Cycloadditionsreaktionen unter Beteiligung zweier Psoralene sind so auch eine Vielzahl von Oxidationsreaktionen und Ringöffnungen möglich.<sup>[53]</sup>

## 1.2.2 Interaktionen von Psoralenen mit DNA

### Interkalation

Die Interkalation von organischen Molekülen in die DNA drückt sich durch verschiedene Veränderungen der Eigenschaften beider Substanzen aus.<sup>[54,55]</sup> In einer umfangreichen

Studie wurden vor kurzem die Effekte der Interkalation von Psoralen in Kalbsthymus-DNA mit verschiedenen experimentellen Techniken untersucht.<sup>[56]</sup> Wie bei den meisten Interkalatoren steigt die Löslichkeit der Psoralene bei Zugabe von DNA zu einer wässrigen Psoralenlösung auf das Zwei- bis Fünffache.<sup>[57]</sup> Bezogen auf die DNA muss eine leichte Entwindung der Doppelhelix stattfinden, um ein Psoralen aufzunehmen. Dadurch wird das DNA Molekül etwas verlängert und starrer.<sup>[54]</sup> Dieser Effekt lässt sich beispielsweise makroskopisch durch eine Erhöhung der Viskosität der Lösung beobachten.<sup>[56]</sup> Zusätzlich hat die Interkalation eine stabilisierende Wirkung auf die Doppelhelix, die sich durch eine Erhöhung ihrer Schmelztemperatur (s. Kapitel 2.3) ausdrückt.<sup>[56]</sup>

Die Interkalation von Psoralenen in die DNA lässt sich zudem gut über Indizien in der optischen Spektroskopie beobachten. Während einige Interkalatoren durch die rigide Umgebung in der DNA eine erhöhte Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_{FI}$  zeigen,<sup>[54]</sup> führt die Interkalation von Psoralenen zu einer starken Reduzierung von  $\Phi_{FI}$ .<sup>[14,48,56]</sup> Eine Erklärung für dieses Verhalten wird erst in dieser Arbeit gegeben. Die Löschung der Fluoreszenz geschieht durch einen ultraschnellen Elektrontransferprozess von Guaninen (s. Kapitel 5.3).

Durch ihre Chiralität weist die DNA-Doppelhelix ausgeprägte Banden bei 245 nm und 275 nm in Circular dichroismus (CD) Experimenten auf. Die Interkalation von Psoralenen führt durch die leichte Entwindung der Doppelhelix zu einer Änderung der Intensität dieser Banden.<sup>[56]</sup> Zudem werden auch im Bereich der Psoralenabsorption CD-Signale sichtbar, die bei frei in Lösung vorliegenden Psoralenen nicht vorhanden sind. Über Titrations mit CD-Detektion lässt sich recht eindeutig feststellen, ob ein Molekül in die DNA interkaliert oder auf andere Weise an sie bindet.<sup>[58]</sup>

Einer der am leichtesten messbaren Effekte der Psoraleninterkalation ist eine deutliche Hypochromizität sowie eine leichte bathochrome Verschiebung der  $S_1$ - und  $S_2$ -Absorptionsbanden (s. auch Kapitel 3.2).<sup>[56,59,60]</sup> Diese Effekte werden durch die  $\pi$ -Elektronenwechselwirkungen innerhalb der gestapelten Basenpaare hervorgerufen, die eine Veränderung der Elektronendichteverteilung im Molekül bewirken.<sup>[55]</sup>

### Photoreaktionen

Der photochemische Mechanismus der [2+2]-Cycloadditionen von interkalierten Psoralenen an die DNA wurde vor allem in den 1970er und 80er Jahren intensiv untersucht.<sup>[34,61,62]</sup> Vor allem aufgrund mangelnder Zeitauflösung dieser Experimente sind die

kinetischen Vorläufer der Addukte jedoch noch immer unbekannt.<sup>[14]</sup> Es ist sowohl unklar, ob die Reaktionsmechanismen bei verschiedenen Psoralenderivaten unterschiedlich sind, als auch ob die Mechanismen für Furan- und Pyronmonoaddition sich prinzipiell unterscheiden.

Spekulationen auf Basis uneindeutiger Daten führten zu unterschiedlichen und teilweise widersprüchlichen Aussagen zur Reaktivität der Psoralene in der Literatur. Im Fall von 8MOP und AMT gibt es beispielsweise in einigen Studien Hinweise darauf, dass angeregte Singulettzustände die entscheidenden Vorläufer sind.<sup>[48,63,64,65]</sup> So wurden deutlich reduzierte Singulettlebensdauern und Triplettquantenausbeuten von 8MOP und AMT in Anwesenheit von DNA beobachtet, während die Triplettlebensdauern kaum beeinflusst wurden. Jedoch konnten die Signalbeiträge von interkalierten und nicht-interkalierten Psoralenen bislang nie klar separiert und die schnellsten Prozesse nicht aufgelöst werden. Die apparent reduzierten Triplettquantenausbeuten könnten daher entweder durch eine tatsächliche Reduzierung der Interkombinationsausbeuten oder durch sehr kurzlebige Triplettzustände in der DNA erklärt werden. In manchen aktuelleren Arbeiten wird hingegen davon ausgegangen, dass Triplettzustände die reaktiven Zustände sind.<sup>[45,66]</sup> Jedoch finden sich gerade in diesen neueren Arbeiten oft erhebliche Mängel. In einer Studie wurde ein Triplettpfad für die Addition von 8MOP vorgeschlagen, da sich bei Zugabe von DNA zu einer 8MOP Lösung die initiale Ausbeute des Triplettzustands im Gegensatz zu den zuvor erwähnten Arbeiten nicht deutlich änderte.<sup>[66]</sup> Jedoch lässt sich aus den Angaben in dieser Arbeit und der Dissoziationskonstante für die Interkalation von 8MOP<sup>[42]</sup> leicht errechnen, dass bei den dort verwendeten Konzentrationen ohnehin nur ein geringer Anteil (ca. 5 %) der Psoralene interkaliert sein konnte.

Ein anderer weitverbreiteter Irrtum ist, dass Photoreaktionen zwischen einzelnen isolierten Nukleobasen und Psoralenen in Lösung eine Aussage zur Reaktivität in der DNA erlauben. Dies ist nicht der Fall, da die Reaktionen in diesen Experimenten unter Diffusionskontrolle ablaufen. Da das diffusionskontrollierte Aufeinandertreffen der Moleküle in der Regel im Zeitbereich über einigen hundert Nanosekunden stattfindet, verlaufen die Reaktionen dann fast zwangsläufig über Triplettzustände. In der DNA hingegen sind auch schnellere Reaktionen über Singulettzustände möglich, sodass sich die Reaktivität dort deutlich unterscheiden kann.

Bekannt ist, dass die Cycloadditionen im Allgemeinen mit großer Präferenz an Thyminbasen stattfinden.<sup>[67,68]</sup> Als eine mögliche Erklärung für diese Präferenz wurde in

einzelnen Arbeiten spekuliert, dass Psoralene bevorzugt zwischen AT-Basenpaare interkalieren könnten.<sup>[69]</sup> Eine Quantifizierung der Interkalationsaffinität für verschiedene Basenpaare ist in der Literatur jedoch nicht zu finden. Titrationsexperimente in dieser Arbeit deuten für AMT auf ein eher unselektives Interkalationsverhalten hin (s. Kapitel 5.3.1). Durch den Einsatz verschiedener definierter DNA-Sequenzen wurde gezeigt, dass sowohl die Monoadditionen als auch die anschließende Diaddition im Fall von 8MOP bevorzugt in längeren AT-Sequenzen stattfindet.<sup>[70]</sup> Je weiter die nächste Guaninbase von der Interkalationsstelle entfernt ist, desto effizienter scheinen die Cycloadditionen ablaufen zu können. Der in dieser Arbeit entdeckte photoinduzierte Elektrontransfer von Guaninen liefert eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten (s. Kapitel 5.3 & 6).

In einer Studie mit Nanosekundenlaserimpulsen wurde zudem eine charakteristische „Wartezeit“ im Zusammenhang mit Psoralenadditionen beobachtet. Am Beispiel von AMT wurde gezeigt, dass nach einer Monoaddition an die DNA ca. 1  $\mu$ s vergehen muss, bevor durch erneute Anregung Diaddukte gebildet werden können.<sup>[59,71]</sup> Dieses Verhalten wurde spekulativ damit erklärt, dass nach der Monoaddition eine Konformationsänderung in der DNA stattfinden muss, bei der die Doppelhelix vorübergehend deformiert wird. Erst nach Abschluss dieser Konformationsänderung ist dann wieder eine Geometrie erreicht, bei der die zweite Cycloaddition stattfinden kann. Für die Experimente in dieser Arbeit hat diese Beobachtung die Bedeutung, dass auch innerhalb eines intensiven Laserimpulses von einigen Nanosekunden Dauer keine Diaddukte erzeugt werden können, sodass die Bildung von Monoaddukten in den zeitaufgelösten Messungen isoliert untersucht werden kann.

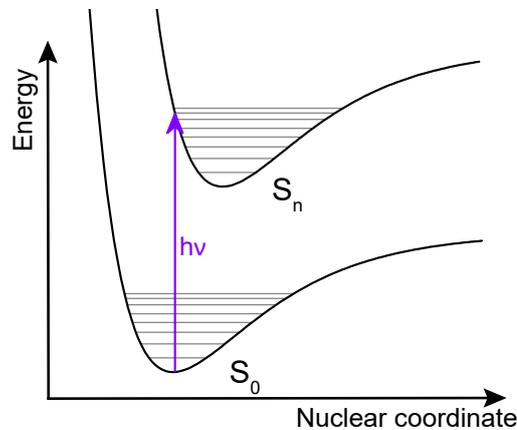
## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Photophysikalische Prozesse nach elektronischer Anregung

Die Absorption von elektromagnetischer Strahlung im ultravioletten und sichtbaren (UV/Vis) Bereich des Spektrums durch organische Moleküle führt zur Besetzung von elektronisch angeregten Zuständen, die im thermischen Gleichgewicht in guter Näherung nicht besetzt sind. Anschließend wird das System wieder zu einem thermischen Gleichgewicht zurückkehren. Für diese Rückkehr nach elektronischer Anregung existieren viele unterschiedliche Wege,<sup>[24,72]</sup> von denen die wichtigsten in diesem Kapitel kurz vorgestellt werden.

Den Ausgangspunkt für alle photophysikalischen und -chemischen Prozesse bildet die Lichtabsorption selbst. Sie findet im für diese Arbeit relevanten Fall von organischen Molekülen fast ausschließlich zwischen elektronischen Zuständen gleicher Spin-Multiplizität statt. Da die meisten organischen Verbindungen einen geschlossenschaligen Singulettzustand als elektronischen Grundzustand besitzen, führt die Absorption von Licht im UV/Vis Bereich zur direkten Besetzung von angeregten Singulettzuständen. Die damit einhergehende Umverteilung von Ladungsdichte im Molekül findet nahezu instantan statt. Während dieser Umverteilung bewegen sich die Atomkerne innerhalb des Moleküls aufgrund ihrer im Verhältnis zu den Elektronen großen Masse in guter Näherung nicht. Dadurch ergibt sich bezogen auf die Kernkoordinaten ein vertikaler Übergang zwischen den Potenzialflächen der beiden beteiligten Zustände (Abbildung 2.1). Kennt man die Form und Lage der Potenzialflächen, lässt sich darüber bereits die energetische Position des jeweiligen Absorptionsmaximums abschätzen. Dieses Prinzip wird als „klassisches“ Franck-Condon Prinzip bezeichnet. Dabei gilt die Annahme, dass die Atomkerne in ihrer Gleichgewichtslage im Grundzustand keinen Impuls besitzen. Bei der elektronischen Anregung gilt Impulserhaltung, sodass sowohl Ort als auch Impuls der Atomkerne sich beim Übergang nicht ändern. Anschaulich führt dies zum erwähnten vertikalen Über-

gang, bei dem die Potenzialfläche des höheren Zustands getroffen werden muss.

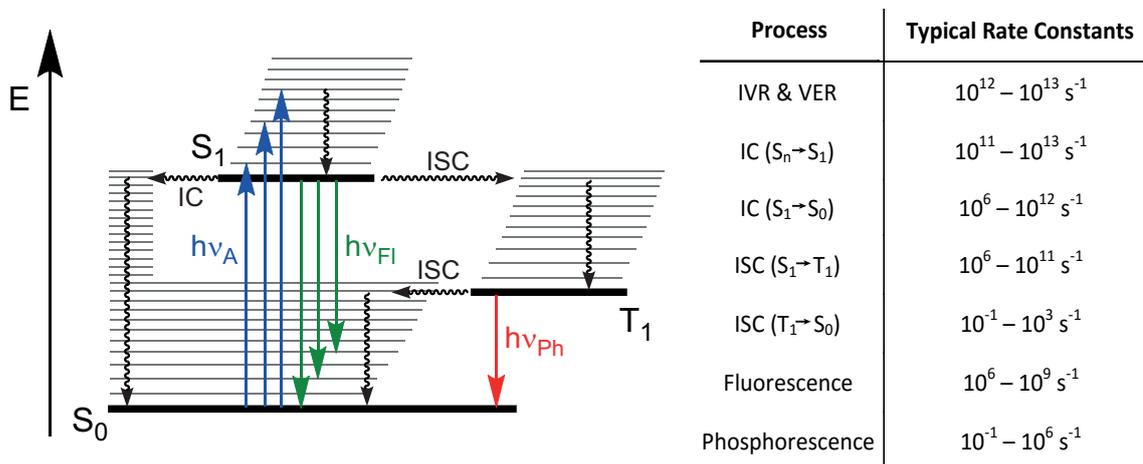


**Abbildung 2.1:** Auf eine Kernkoordinate vereinfachtes Schema der elektronischen Anregung eines Moleküls durch die Absorption eines Photons der Energie  $h\nu$ . Mit der elektronischen Anregung geht meist auch eine Schwingungsanregung einher. Die einfache Darstellung der Absorption als vertikalen Pfeil zwischen den Potenzialflächen veranschaulicht das „klassische“ Franck-Condon Prinzip.

Das „klassische“ Franck-Condon Prinzip lässt nur eine genau definierte Energie für den Übergang zwischen zwei elektronischen Zuständen zu. Es reicht daher nicht aus, um die reale Form von Absorptionsbanden zu erklären. Im Experiment können in der Regel breitere Energiebereiche zu Übergängen zwischen den Potenzialflächen beitragen. Um dies zu erklären, muss eine quantenmechanische Betrachtung herangezogen werden. Nach den Grundsätzen der Quantenmechanik kann entlang der elektronischen Potenzialflächen kein Kontinuum von Zuständen, sondern nur ein diskretes Schwingungsniveau je absorbiertem Photon besetzt werden.<sup>[73]</sup> Da sich die Form der beiden beteiligten Potenzialkurven in der Regel unterscheidet, führt eine elektronische Anregung in fast jedem Fall auch zu einer Schwingungsanregung im elektronisch angeregten Zustand. Die Wahrscheinlichkeit für den Übergang zwischen zwei diskreten Schwingungsniveaus verschiedener elektronischer Zustände lässt sich in quantenmechanischer Betrachtung durch Franck-Condon (FC) Faktoren beschreiben. Die FC Faktoren hängen von der Verschiebung der Potenzialflächen zueinander und vom Überlappintegral der beiden beteiligten Schwingungswellenfunktionen ab. Ist das Überlappintegral groß, so wird auch der FC Faktor groß und die Übergangswahrscheinlichkeit zwischen beiden Zuständen hoch. Da die Schwingungswellenfunktionen hoher Schwingungsniveaus eine große Zahl von Vorzei-

chenwechsellern aufweisen, wird das Überlappintegral und damit der FC Faktor tendenziell kleiner, je höher die Quantenzahl der beteiligten Schwingungsniveaus liegt.<sup>[73]</sup>

Eine Kombination von verschiedenen Prozessen kann auf sehr unterschiedlichen Zeitskalen zum Zerfall von angeregten Zuständen in Lösung beitragen (Abbildung 2.2). Diese Prozesse sind in nahezu jedem Photochemielehrbuch<sup>[24,72,73,74]</sup> ausführlich beschrieben und werden daher in den folgenden Unterkapiteln nur kurz vorgestellt. Vorab sei erwähnt, dass natürlich bei jedem dieser Prozesse Energieerhaltung gilt. Sie finden daher immer entweder auf einem konstanten Energieniveau statt oder es wird Energie in Form von Strahlung oder Wärme an die Umgebung abgegeben. Zusätzlich zu den angeführten photophysikalischen Prozessen können chemische Reaktionen auf allen Zeitskalen zur Entvölkerung der angeregten Zustände beitragen.



**Abbildung 2.2:** Links: Vereinfachtes Jablonski-Termschema. Die fettgedruckten horizontalen Linien symbolisieren den Schwingungsgrundzustand des jeweiligen elektronischen Zustands (S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> und T<sub>1</sub>), während die dünneren horizontalen Linien höhere Schwingungszustände andeuten. Gerade Pfeile zeigen Vorgänge unter Absorption oder Emission von Strahlung an (hν<sub>A</sub>: Absorption, hν<sub>Fl</sub>: Fluoreszenz, hν<sub>Ph</sub>: Phosphoreszenz), gewellte Pfeile stehen für nicht-strahlende Prozesse (vertikale gewundene Pfeile: Schwingungsrelaxation, IC: innere Konversion, ISC: Interkombination). Rechts: Typische Geschwindigkeitskonstanten für verschiedene photophysikalische Prozesse von organischen Molekülen in Lösung.<sup>[74]</sup>

## Verlust von Schwingungsanregung innerhalb eines elektronischen Zustands

Es existieren im Wesentlichen zwei Wege, über die Schwingungsanregungen relaxieren können.<sup>[75]</sup> Der erste dieser Wege wird als intramolekulare Schwingungsenergieumverteilung (IVR für *intramolecular vibrational energy redistribution*) bezeichnet. Hierbei handelt es sich um einen rein intramolekularen Prozess, bei dem die Energie, die zunächst in einem hohen Schwingungsniveau konzentriert ist, auf mehrere Schwingungsniveaus mit niedrigerer Energie umverteilt wird. Als Beispiel kann die Energie, die zunächst in der hochfrequenten Valenzschwingung einer bestimmten chemischen Bindung steckt, auf mehrere niederenergetische Schwingungsmoden wie Gerüstschwingungen übergehen. Im Rahmen der häufig zur Beschreibung von Schwingungsspektren verwendeten harmonischen Näherung des Schwingungsverhaltens wäre eine solche Umverteilung nicht zu erklären, da nach diesem Modell kein Energieübertrag zwischen verschiedenen Schwingungen möglich ist. Erst die Berücksichtigung der in realen Systemen auftretenden Anharmonizitäten<sup>[75,76,77]</sup> kann die IVR-Prozesse erklären.

Der zweite Weg, der zum Verlust von Schwingungsanregung führt, ist die Abgabe der Schwingungsenergie an umgebende Moleküle, die auch als Schwingungsenergielaxation bezeichnet wird (VER für *vibrational energy relaxation*). Bei Zusammenstößen mit diesen Molekülen kann die Energie so zum Beispiel an das Lösungsmittel übertragen werden, um zu einer thermischen Gleichgewichtssituation zurückzukehren.

Beide Prozesse haben einen Einfluss auf die Absorptions-, Fluoreszenz- und Schwingungsspektren des Moleküls. Befindet sich das Molekül in einem hochenergetischen Schwingungszustand, so ist der Energieabstand zu den nächsthöheren elektronischen bzw. Schwingungszuständen kleiner als im Schwingungsgrundzustand. Dadurch sind die Signale der Übergänge zu kleineren Frequenzen verschoben. Mit dem Ablaufen von IVR und VER verschieben sich diese wieder zu höheren Frequenzen. Zusätzlich sind die Banden während solcher Prozesse üblicherweise verbreitert, da vor der vollständigen Relaxation im betrachteten Ensemble von Molekülen eine Vielzahl von verschiedenen Schwingungsniveaus besetzt ist. In Lösung ist die Relaxation über IVR und VER meist innerhalb weniger Pikosekunden abgeschlossen.<sup>[74]</sup>

## Nicht-strahlende Übergänge zwischen elektronischen Zuständen

Der nicht-strahlende Übergang zwischen zwei elektronischen Zuständen mit gleicher Multiplizität wird als innere Konversion (IC für *internal conversion*) bezeichnet. Entscheidend für diesen Prozess ist die Kopplung zwischen Elektronen- und Kernbewegungen, die auch als vibronische Kopplung<sup>[74]</sup> bezeichnet wird. Der Impuls der Atomkerne bei Auslenkungen im Molekül hat bei genauer Betrachtung einen Einfluss auf die elektronischen Wellenfunktionen. Dies kann zu einer Verzerrung der Elektronendichteverteilung im Molekül führen, wodurch eine Annäherung der Elektronendichteverteilung des Ausgangszustands an die des finalen Zustands erfolgen kann. Letztlich werden dadurch Übergänge zwischen beiden Zuständen begünstigt. Wie zuvor angedeutet finden nicht-strahlende Übergänge isoenergetisch statt. Auch in diesem Fall geben FC Faktoren die Wahrscheinlichkeit für Übergänge zwischen zwei diskreten Schwingungsniveaus an. Liegen die beteiligten elektronischen Zustände energetisch weit auseinander, so muss der Übergang zu hohen Schwingungsniveaus des unteren elektronischen Zustands stattfinden. Dadurch werden diese Prozesse wie oben beschrieben in der Regel langsamer als bei elektronischen Zuständen ähnlicher Energie. Diese Regel wird auch als Energielückenregel (*energy gap rule*) bezeichnet.<sup>[24]</sup> Da der Abstand zwischen den elektronischen Zuständen mit steigender Quantenzahl üblicherweise kleiner wird, sind IC-Prozesse zwischen höheren angeregten Zuständen oft deutlich schneller als zwischen dem ersten angeregten Zustand ( $S_1$ ) und dem elektronischen Grundzustand ( $S_0$ ). Nach der Anregung in einen höheren angeregten elektronischen Zustand findet die Relaxation zum  $S_1$ -Zustand häufig innerhalb weniger Pikosekunden statt, während Lebensdauern von  $S_1$ -Zuständen organischer Moleküle – auch wenn es hier zahlreiche Ausnahmen gibt – typischerweise im Bereich weniger Nanosekunden liegen.<sup>[74]</sup> Dadurch finden Fluoreszenz und Photoreaktionen in der Regel fast ausschließlich aus dem niedrigsten angeregten Zustand statt. Dieser Umstand ist als Regel von Kasha und Vavilov bekannt.<sup>[24]</sup>

Der nicht-strahlende Übergang zwischen zwei elektronischen Zuständen mit unterschiedlicher Multiplizität ist prinzipiell nicht erlaubt, da sich in diesem Fall die Spinquantenzahl eines Elektrons ändern muss. Magnetische Wechselwirkungen innerhalb organischer Moleküle führen jedoch oft dazu, dass solche als Interkombination (ISC für *intersystem crossing*) bezeichneten Vorgänge dennoch stattfinden können. Die Elektronen selbst besitzen einen Spindrehimpuls und zusätzlich resultiert ein Bahndrehimpuls aus ihrer Bewegung um die positiv geladenen Atomkerne. Dadurch existieren zwei ma-

gnetische Momente, die miteinander wechselwirken können. Diese Wechselwirkung wird als Spin-Bahn-Kopplung bezeichnet.<sup>[24]</sup> Die Änderung der Spinquantenzahl kann damit prinzipiell durch eine Änderung der Quantenzahl für den Drehimpuls kompensiert werden. Eine Änderung der Drehimpulsquantenzahl kann in einem organischen Molekül als Wechsel des Molekülorbitalcharakters gesehen werden. Damit sind ISC-Prozesse zwischen Zuständen mit gleichem Orbitalcharakter (wie z.B.  $^1\pi\pi^*$  zu  $^3\pi\pi^*$ ) weiterhin verboten, während Übergänge mit Änderung des Orbitalcharakters (wie z.B.  $^1\pi\pi^*$  zu  $^3n\pi^*$  oder  $^1n\pi^*$  zu  $^3\pi\pi^*$ ) stattfinden können. Diese Grundregel für ISC-Prozesse wird als El-Sayed Regel bezeichnet.<sup>[78]</sup> Eine Ausnahme von dieser Regel bilden Moleküle, bei denen auch vibronische Anteile zur Spin-Bahn-Kopplung beitragen.<sup>[52]</sup> Dann können auch  $^1\pi\pi^*$  zu  $^3\pi\pi^*$  Übergänge verhältnismäßig hohe Geschwindigkeitskonstanten erreichen. Nach quantenchemischen Vorhersagen ist dies bei Psoralenen in polar-protischen Lösungsmitteln der Fall.<sup>[51]</sup>

### Strahlende Übergänge zwischen elektronischen Zuständen

Bei der zuvor beschriebenen Absorption von Licht wird ein Photon vernichtet und dadurch ein Molekül elektronisch angeregt. Ein analoger Prozess, bei dem ein bereits elektronisch angeregtes Molekül in den Grundzustand gebracht wird, wird als stimulierte Emission bezeichnet.<sup>[79]</sup> Dabei trifft ein elektromagnetisches Feld bzw. ein Photon auf das elektronisch angeregte Molekül, wodurch in diesem Fall ein Photon der gleichen Frequenz freigesetzt statt vernichtet wird. Bei einer gegebenen Frequenz sind Absorption und stimulierte Emission für individuelle Moleküle genau gleich wahrscheinlich. In stationären Spektren spielt die stimulierte Emission jedoch keine Rolle, da sich nur eine vernachlässigbare Anzahl von Molekülen im thermischen Gleichgewicht im angeregten Zustand befindet. Anders verhält es sich in Anrege-Abfrage Experimenten (vgl. Kapitel 3.3.1), in denen eine signifikante Konzentration von angeregten Molekülen angereichert wird. Hier wird beim Auftreffen des Abfragelichts die Emission von Strahlung stimuliert. Diese Emission deckt sich bei geeigneter Auftragung<sup>[72]</sup> spektral mit dem Fluoreszenzspektrum des Moleküls zum Abfragezeitpunkt.

Das Auftreten von spontaner Emission von Strahlung in Form von Fluoreszenz (Erhalt der Multiplizität) oder Phosphoreszenz (Änderung der Multiplizität) ließe sich ohne jegliche äußere Störung, beispielsweise durch die Anwesenheit eines elektromagnetischen Feldes, zunächst nicht erklären. Dennoch wird spontane Emission auch im Vakuum, oh-

ne Einstrahlung von Licht beobachtet. Dies lässt sich mithilfe der Quantentheorie des elektromagnetischen Feldes, auch Quantenelektrodynamik, erklären.<sup>[79,80]</sup> Im Rahmen dieser Theorie existieren Nullpunktsenergien und -amplituden auch für elektromagnetische Felder. Diese Nullpunktsamplituden reichen als Störung aus, um Fluoreszenz und Phosphoreszenz zu initiieren. Die Form von Fluoreszenz- und Phosphoreszenzspektren ist ebenfalls durch das Franck-Condon Prinzip bestimmt. Wieder ist der Übergang zwischen Zuständen gleicher Multiplizität erlaubt und damit deutlich schneller als Übergänge, die eine Änderung der Multiplizität erfordern (vgl. Abbildung 2.2 rechts). Die Geschwindigkeitskonstanten für die Phosphoreszenz sind bei Raumtemperatur im Vergleich zu denen anderer Zerfallsprozesse meist so gering, dass keine Phosphoreszenz detektierbar ist.<sup>[81]</sup>

## Intermolekulare Prozesse

Die elektronische Anregung eines organischen Moleküls geht grundsätzlich mit einer nahezu instantanen Änderung seiner Elektronendichteverteilung einher. Dadurch sind die solvatisierenden Lösungsmittelmoleküle unmittelbar nach der Anregung noch auf die Stabilisierung der vorigen Elektronenverteilung ausgerichtet. Dies führt zu einer erhöhten Gesamtenergie des Systems. Die Anpassung der Lösungsmittelorientierung auf die neue Ladungsverteilung wird allgemein Solvensrelaxation genannt und verläuft mit Zeitkonstanten, die von der Viskosität und der genauen Struktur des gewählten Lösungsmittels abhängen. Dabei wird Solvatationsenergie frei, sodass die Gesamtenergie des Systems sinkt. Viele Teilprozesse wie Rotationen, Translationen und die Neubildung von Wasserstoffbrückenbindungen führen zu verschiedenen Beiträgen zur Solvensrelaxation, die typischerweise Zeitkonstanten auf der Femtosekunden- und Pikosekundenzeitskala besitzen.<sup>[82,83]</sup> Im Fall von Wasser als Lösungsmittel ist ein Großteil der Solvatationsenergie (ca. 70 %) bereits nach etwa 20 fs bereitgestellt.<sup>[84,85]</sup> Die restlichen Anteile (je ca. 15 % Beitrag zur Solvatationsenergie) lassen sich in diesem Fall mit Zeitkonstanten von 400 fs und 2,7 ps beschreiben.<sup>[84]</sup> Da sich der Energieabstand zwischen angeregtem und Grundzustand des Systems im Laufe der Solvensrelaxation ändert, haben diese Prozesse ähnlich wie IVR und VER einen direkten Einfluss auf die Lage und Form der Absorptions- und Emissionsbanden des Moleküls. So werden bei Femtosekundenexperimenten in polaren Lösungsmitteln oft Änderungen der Bandenpositionen und -formen beobachtet.<sup>[86,87,88]</sup>

Während das gelöste Molekül bei der Solvensrelaxation im gleichen angeregten Zustand bleiben kann, stellen Energietransfer- und Elektrontransferprozesse zusätzliche Zer-

fallskanäle für elektronisch angeregte Moleküle dar.<sup>[81,89]</sup> Verschiedene Energietransferprozesse<sup>[89]</sup> können zur Rückkehr des Moleküls in den Grundzustand führen. Auf sie wird hier nicht näher eingegangen, da sie für diese Arbeit nicht relevant sind. Die theoretischen Grundlagen für Elektrontransferprozesse werden dagegen ausführlich im nächsten Kapitel erläutert, da die Beobachtung eines photoinduzierten Elektrontransferprozesses zwischen DNA und Psoralenen ein zentrales Resultat dieser Arbeit darstellt.

## 2.2 Theorie des Elektrontransfers

Die Kinetik von Elektrontransferreaktionen lässt sich im Rahmen einer Betrachtung nach Rudolph A. Marcus abschätzen.<sup>[90,91,92]</sup> Diese Theorie basiert auf einer Modifikation von Fermis goldener Regel, mit der im Rahmen der Störungstheorie die Geschwindigkeitskonstanten für verschiedene nicht-strahlende Übergänge zwischen zwei Zuständen berechnet werden können.<sup>[24]</sup>

Im Rahmen der Marcus Theorie hängt die Geschwindigkeitskonstante für einen Elektrontransfer  $k_{ET}$  (Gleichung 2.1) sowohl von Eigenschaften des Elektronendonors und -akzeptors als auch vom Verhalten des umgebenden Lösungsmittels ab. Der Ausdruck für  $k_{ET}$  lautet

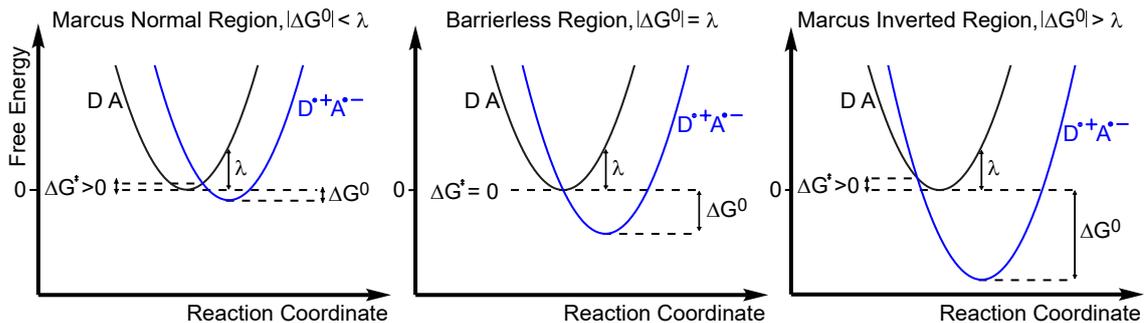
$$k_{ET} = \frac{4\pi^2}{h} \frac{H_{DA}^2}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} e^{-\Delta G^\ddagger / (k_B T)}. \quad (2.1)$$

Neben dem Plankschen Wirkungsquantum  $h$ , der Boltzmannkonstante  $k_B$  und der Temperatur  $T$  bezeichnet  $H_{DA}$  das von ihrem Abstand abhängige Matrixelement für die Störung zwischen Donor und Akzeptor, die den Elektrontransfer verursacht.<sup>[92]</sup> Die Reorganisationsenergie  $\lambda$  beschreibt die freie Enthalpie, die nötig ist um das System in seinem Anfangszustand auf die Geometrie des finalen Zustands zu bringen und  $\Delta G^\ddagger$  die Aktivierungsenergie für den Elektrontransferprozess. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{ET}$  erreicht also einen maximalen Wert, wenn die Aktivierungsenergie gegen null geht.  $\Delta G^\ddagger$  lässt sich über die freie Reaktionsenthalpie  $\Delta G^0$  und  $\lambda$  als

$$\Delta G^\ddagger = \frac{(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4\lambda} \quad (2.2)$$

schreiben. Damit werden Elektrontransferprozesse maximal schnell, wenn die Beträge von  $\Delta G^0$  und  $\lambda$  gleich groß sind. Entgegen der chemischen Intuition kann die Geschwin-

digkeitskonstante für einen Elektrontransfer also trotz steigender Triebkraft (definiert als  $-\Delta G^0$ ) sinken, wenn ihr Betrag den der Reorganisationsenergie überschreitet. In diesem Fall spricht man von Marcus invertiertem Verhalten.<sup>[92]</sup> Veranschaulichen lässt sich das Verhalten von  $k_{ET}$  über zwei zueinander verschobene Parabeln mit gleicher Öffnung (Abbildung 2.3).



**Abbildung 2.3:** Illustration der Marcus Theorie mithilfe von zueinander verschobenen Parabeln, die die relativen Energien des Anfangs- (DA, schwarz) und finalen Zustands ( $D^{\bullet+}A^{\bullet-}$ , blau) in Abhängigkeit einer Elektrontransfer Reaktionskoordinate andeuten. Im Marcus normalen (links) und -invertierten (rechts) Bereich besteht eine Aktivierungsbarriere, wodurch  $k_{ET}$  nicht seinen Maximalwert erreicht. Dies ist nur der Fall wenn die Beträge von  $\Delta G^0$  und  $\lambda$  gleich groß sind (Mitte).

Das System muss ausgehend vom Minimum der Parabel des Anfangszustands (DA) den Schnittpunkt mit der Parabel des finalen Zustands ( $D^{\bullet+}A^{\bullet-}$ ) überwinden, um den Elektrontransfer zu vollziehen. Im Marcus normalen und im Marcus invertierten Bereich unterscheidet sich der Betrag von  $\Delta G^0$  von  $\lambda$ , sodass der Schnittpunkt höher liegt als das Minimum des Anfangszustands (Abbildung 2.3 links & rechts). Die Differenz zwischen beiden entspricht der Aktivierungsenergie  $\Delta G^\ddagger$ . Wie erwähnt, erreicht der Elektrontransfer seine maximale Geschwindigkeitskonstante bei  $\Delta G^\ddagger = 0$  (Abbildung 2.3 Mitte).

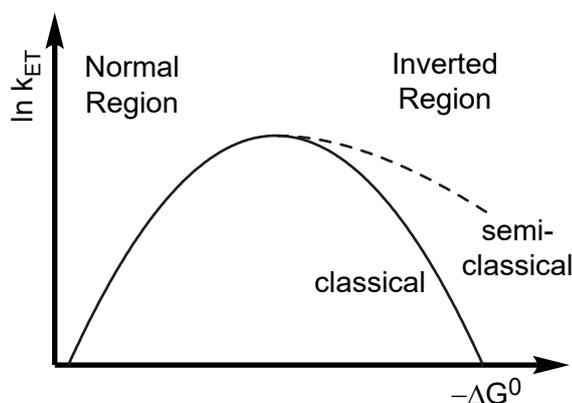
Gleichung 2.1 folgend würde der Logarithmus von  $k_{ET}$  in Abhängigkeit von  $\Delta G^0$  zu beiden Seiten des Maximums parabelförmig, das heißt symmetrisch, abfallen. Theoretische Vorhersagen<sup>[92,93,94]</sup> und experimentelle Daten<sup>[95,96]</sup> zeigen jedoch, dass der Abfall im Marcus invertierten Bereich eine kleinere Steigung aufweist als im Marcus normalen Bereich. Dieser Effekt kann durch semiklassische Erweiterungen der Marcus Theorie berücksichtigt werden. Im Rahmen der Marcus Theorie wird vorausgesetzt, dass die relevanten Kernkoordinaten klassisch behandelt werden können. Dies ist dann eine gute Näherung, wenn die Quantenenergie aller beteiligten Moden während des Elektrontrans-

fers deutlich niedriger als die thermische Energie ist. Da R. A. Marcus ursprünglich nur die Interaktion des Solvens mit den Reaktanten in Betracht zog, reichte diese Betrachtung aus.<sup>[90]</sup> Um die Asymmetrie von  $k_{ET}$  im Marcus invertierten Bereich zu erklären, müssen jedoch auch hochfrequente Moden des Donor-Akzeptor Systems berücksichtigt werden. Die Jortner Erweiterung der Marcus Theorie berücksichtigt diesen Effekt.<sup>[93,94]</sup> Statt eines finalen Zustands wird dabei eine Summe von finalen Zuständen eingeführt. Dies führt insbesondere dann zu Abweichungen vom klassischen Marcus Verhalten, wenn die Quantenenergie der Schwingungsmoden des ladungstrennten Zustands im Vergleich zur thermischen Energie groß ist.<sup>[94]</sup> Für cyclische aromatische Systeme ist dies häufig der Fall. In einer quantenmechanischen Betrachtung finden die Übergänge basierend auf dem Franck-Condon Prinzip<sup>[24]</sup> zwischen Schwingungsniveaus des Anfangs- und Endzustands statt. Die Wahrscheinlichkeit für den Übergang zwischen zwei bestimmten Schwingungsniveaus hängt demnach von ihrem Überlappintegral ab. Bezogen auf die Aktivierungsbarriere verhalten sich diese Überlappintegrale asymmetrisch, was auch die Asymmetrie der Geschwindigkeitskonstanten erklärt. Zur Vereinfachung der Erweiterung der Marcus Theorie wird oft nur eine, mittlere Schwingungsenergie  $\hbar\langle\omega\rangle$  verwendet. Dies führt für  $k_{ET}$  zum Ausdruck

$$k_{ET} = \frac{4\pi^2}{h} \frac{H_{DA}^2}{\sqrt{4\pi\lambda_s k_B T}} \sum_{n=0}^{\infty} e^{-\frac{\lambda_i}{\hbar\langle\omega\rangle}} \left( \frac{\lambda_i}{\hbar\langle\omega\rangle} \right)^n \frac{1}{n!} e^{-(\Delta G^0 + \lambda_s + n\hbar\langle\omega\rangle)^2 / (4\lambda_s k_B T)}, \quad (2.3)$$

der in manchen Fällen als Marcus-Levich-Jortner Gleichung bezeichnet wird.<sup>[97]</sup> Hierbei wird berücksichtigt, dass sich  $\lambda$  aus intramolekularen Beiträgen  $\lambda_i$  und Beiträgen des Lösungsmittels  $\lambda_s$  zusammensetzt, während  $\hbar\langle\omega\rangle$  die Energie der mittleren Schwingungsmode darstellt. Für cyclische Aromaten führt ein Wert von  $\hbar\langle\omega\rangle = 1500 \text{ cm}^{-1}$  meist zu guter Übereinstimmung mit dem Experiment.<sup>[95]</sup> Anschaulich repräsentiert der gesamte Summenterm die Summe aller möglichen Überlappintegrale von Schwingungswellenfunktionen (und damit Franck-Condon Faktoren), die am Elektrontransfer beteiligt sein können. Zur Vereinfachung werden diese Summanden hier als eine Summe von vielen Parabeln für den Produktzustand, die mit FC Faktoren gewichtet werden, genähert. Die Terme vor der Summe ergeben die maximale  $k_{ET}$  im barrierelosen Fall. Wie Gleichung 2.3 entnommen werden kann, steigt  $k_{ET}$  im Marcus normalen Bereich etwa Gauß-förmig an, während es im Marcus invertierten Bereich einen exponentiellen Abfall aufweist (Ab-

bildung 2.4).



**Abbildung 2.4:** Schematische Darstellung des Verlaufs einer Auftragung von  $\ln k_{ET}$  gegen  $-\Delta G^0$ . Nach der klassischen Marcus Theorie verlaufen Anstieg und Abfall von  $\ln k_{ET}$  symmetrisch (durchgezogene Linie, vgl. Gleichung 2.1). Die Erweiterung nach Jortner berücksichtigt, dass der Abfall von  $\ln k_{ET}$  im Marcus invertierten Bereich flacher verläuft (gestrichelte Linie, vgl. Gleichung 2.3).

Unabhängig von in zeitaufgelösten Experimenten beobachteten  $k_{ET}$  kann  $\Delta G^0$  über stationäre elektrochemische und spektroskopische Parameter der beteiligten Moleküle berechnet werden. Für den Fall einer photoinduzierten Ladungstrennung (CS für *charge separation*), stellten Rehm und Weller<sup>[98]</sup> den Ausdruck

$$\Delta G_{CS}^0 = E^0(D^{\bullet+}/D) - E^0(A/A^{\bullet-}) - E_{00} + \Delta G_W^0 \quad (2.4)$$

auf.  $\Delta G_{CS}^0$  lässt sich also über die in elektrochemischen Experimenten messbaren Standardelektrodenpotenziale  $E^0(D^{\bullet+}/D)$  für die Oxidation des Donors und  $E^0(A/A^{\bullet-})$  für die Reduktion des Akzeptors, sowie den Energieabstand zwischen den Schwingungsgrundzuständen des  $S_0$  und  $S_1$ -Zustands  $E_{00}$  (auch: 0,0-Übergangsenergie) berechnen.  $\Delta G_W^0$  wird als Arbeitsterm bezeichnet und beschreibt die Beiträge von Coulombwechselwirkungen der entstehenden Ladungsträger zur freien Reaktionsenthalpie im gegebenen Solvens.  $\Delta G_W^0$  hängt sowohl von der Lösungsumgebung als auch von der Art des gebildeten ladungstrennten Zustands ab. Für die freie Reaktionsenthalpie  $\Delta G_{CR}^0$  für den thermischen Rücktransfer (CR für *charge recombination*) der Ladung nach einem

photoinduzierten Elektrontransfer (PET) vereinfacht sich der Ausdruck zu

$$\Delta G_{CR}^0 = E^0(A/A^{\bullet-}) - E^0(D^{\bullet+}/D) - \Delta G_W^0. \quad (2.5)$$

Trennt mindestens ein einziges Lösungsmittelmolekül die entstehenden Radikationen, so spricht man von einem solvensseparierten Radikationenpaar (SSIP). Findet der PET zwischen zwei ursprünglich ungeladenen Teilchen statt, so hängt der Arbeitsterm

$$\Delta G_W^0 = -\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r} \quad (2.6)$$

bei Übertragung einer Elementarladung  $e$  nur vom Abstand der gebildeten Ladungsträger  $r$  und der relativen Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_r$  des Lösungsmittels ab. Der Term  $4\pi\epsilon_0$  fehlt in vielen Darstellungen in der Literatur, da dort oft mit dem elektrostatischen Einheitensystem und nicht wie hier mit dem SI-Einheitensystem gearbeitet wird. Dieser Term fehlt in vielen Darlegungen in der Literatur, da dort häufig mit dem elektrostatischen Einheitensystem gearbeitet wird. In polaren Lösungsmitteln und bei großen Abständen zwischen den Ladungsträgern wird  $\Delta G_W^0$  im Fall eines SSIP also klein.

Sind die Ladungsträger durch kein einziges Lösungsmittelmolekül getrennt, so bildet sich ein Kontaktionenpaar (CIP für *contact ion pair*). Dann werden die Ladungsträger nicht mehr als einzelne, getrennte Ionen betrachtet, sondern können als ein zusammenhängendes Konstrukt mit dem Kugelradius  $a$  und Dipolmoment  $\mu$  beschrieben werden. Die Stabilisierung durch das umgebende Lösungsmittel hängt in diesem Fall nicht mehr linear vom Abstand der beiden Ladungsträger, sondern vom Volumen des CIP ab, über das sich die Ladungen verteilen. Weller stellte 1982 Ausdrücke auf, mit denen sich  $\Delta G_{CS}^0$  und  $\Delta G_{CR}^0$  für CIP Bildung und Zerfall für Lösungsmittel mit beliebigen  $\epsilon_r$  abschätzen lassen (Gleichungen 2.7 & 2.8).<sup>[99]</sup>

$$\begin{aligned} \Delta G_{CS}^0(\epsilon_r) &= E_{MeCN}^0(D^{\bullet+}/D) - E_{MeCN}^0(A/A^{\bullet-}) - E_{00} \\ &\quad - \frac{1}{e4\pi\epsilon_0} \frac{\mu^2}{a^3} \left( \frac{\epsilon_r - 1}{2\epsilon_r + 1} - \frac{\epsilon_{r,Hexan} - 1}{2\epsilon_{r,Hexan} + 1} \right) + 0,38 \text{ eV} \end{aligned} \quad (2.7)$$

$$\begin{aligned} \Delta G_{CR}^0(\epsilon_r) &= E_{MeCN}^0(A/A^{\bullet-}) - E_{MeCN}^0(D^{\bullet+}/D) \\ &\quad + \frac{1}{e4\pi\epsilon_0} \frac{\mu^2}{a^3} \left( \frac{\epsilon_r - 1}{2\epsilon_r + 1} - \frac{\epsilon_{r,Hexan} - 1}{2\epsilon_{r,Hexan} + 1} \right) - 0,38 \text{ eV} \end{aligned} \quad (2.8)$$

Dabei wird ausgenutzt, dass der Unterschied zwischen den freien Reaktionsenthalpien

für das gewählte Lösungsmittel und für das sehr unpolare Lösungsmittel Hexan mithilfe empirischer Parameter abgeschätzt werden kann. Diese Parameter sind darauf ausgelegt, dass die Standardelektrodenpotenziale  $E_{MeCN}^0(D^{\bullet+}/D)$  und  $E_{MeCN}^0(A/A^{\bullet-})$  in Acetonitril eingesetzt werden.

## 2.3 Thermodynamik-Algorithmen zur Prognose der DNA-Sekundärstruktur

Die Arbeit mit DNA-Molekülen definierter Sequenzen erfordert eine Möglichkeit, ihre Sekundärstruktur unter den geplanten Messbedingungen zuverlässig vorherzusagen. Denn offensichtlich möchte man im Idealfall genau eine definierte doppelhelikale Struktur in Lösung erhalten. Je länger und komplexer die beteiligten DNA-Stränge sind, desto weniger wahrscheinlich ist eine völlig einheitliche Sekundärstruktur in Lösung zu erwarten. Daher sollten vor der Beschaffung der DNA-Stränge unbedingt Algorithmen zur Vorhersage der Sekundärstruktur verwendet werden. Ihre Funktionsweise soll hier kurz erläutert werden.

Das für diese Arbeit verwendete Programm NUPACK<sup>[100]</sup> basiert auf einem dynamischen Programmierungsalgorithmus,<sup>[101]</sup> mit dem die Zustandssummen  $Q$  aller Sekundärstrukturen  $s$  über empirische thermodynamische Parameter nach

$$Q = \sum_s e^{-\Delta G_s^0/RT} \quad (2.9)$$

berechnet werden. Dabei stellt  $R$  die allgemeine Gaskonstante,  $T$  die Temperatur und  $\Delta G_s^0$  die freie Reaktionsenthalpie für die Bildung der Sekundärstruktur dar. In einem nächsten Schritt wird die Wahrscheinlichkeit  $p(s^*)$  für das Auftreten jeder spezifischen Sekundärstruktur  $s^*$  im thermodynamischen Gleichgewicht über

$$p(s^*) = \frac{1}{Q} e^{-\Delta G_{s^*}^0/RT} \quad (2.10)$$

ermittelt. Analog lässt sich neben der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der gesamten Sekundärstruktur auch die Wahrscheinlichkeit für die Paarung einzelner Basenpaare innerhalb der Sekundärstruktur berechnen.

Der empirische Parametersatz über den  $\Delta G^0$  berechnet wird, wurde aus sieben un-

abhängigen Studien zur DNA-Thermodynamik, die alle vergleichbare Ergebnisse lieferten, ermittelt.<sup>[102]</sup> Die Berechnung von  $\Delta G^0$  basiert auf dem Prinzip des nächsten Nachbarn,<sup>[103,104]</sup> bei dem angenommen wird, dass die thermodynamische Stabilität eines Basenpaars nur durch die direkt benachbarten Basenpaare beeinflusst wird. Endständige Basenpaare werden durch gesonderte Parameter beschrieben und zusätzlich muss bei selbstkomplementären Strängen ein weiterer Entropieterm für die dann  $C_2$ -symmetrischen Doppelhelices berücksichtigt werden. Der volle Ausdruck für  $\Delta G^0$  lautet

$$\Delta G^0 = \sum_i n_i \Delta G_i^0 + \Delta G_{initGC}^0 + \Delta G_{initAT}^0 + \Delta G_{sym}^0, \quad (2.11)$$

wobei  $n_i$  die Häufigkeit eines Basenpaars mit einem bestimmten nächsten Nachbarn,  $\Delta G_i^0$  dessen empirischer Wert für die freie Reaktionsenthalpie,  $\Delta G_{initGC}^0$  bzw.  $\Delta G_{initAT}^0$  die Parameter für endständige GC- bzw. AT-Basenpaare und  $\Delta G_{sym}^0$  den zusätzlichen Entropiebeitrag für selbstkomplementäre Stränge beinhaltet. Werte für all diese Terme sind empirisch bestimmt und tabelliert.<sup>[102]</sup>

Die Schmelztemperaturen  $T_M$ , die für DNA-Moleküle als Temperatur, bei der die Hälfte der Basenpaare im Gleichgewicht ungepaart vorliegt definiert sind, lassen sich aus ähnlich tabellierten Werten für die Reaktionsenthalpie  $\Delta H^0$  und -entropie  $\Delta S^0$  berechnen. Für den in dieser Arbeit relevanten Fall von selbstkomplementären DNA-Strängen mit überschaubarer Länge lautet der Ausdruck für  $T_M$

$$T_M = \frac{\Delta H^0}{\Delta S^0 + R \ln c_{ssDNA}}, \quad (2.12)$$

mit der Gesamtkonzentration der DNA-Einzelstränge  $c_{ssDNA}$ .

Die tabellierten Werte für sämtliche Enthalpien und Entropien beziehen sich auf eine Standardsalzkonzentration von 1 M NaCl. Wird bei deutlich anderen Konzentrationen gearbeitet, so wird eine Salzkorrektur für die Berechnung von  $\Delta G^0([Na^+])$  durchgeführt. Diese Korrektur kann genähert als unabhängig von der genauen DNA-Sequenz gesehen werden, hängt jedoch von der Länge der verwendeten Stränge ab. Der empirische Zusammenhang zwischen den für 1 M NaCl berechneten freien Reaktionsenthalpien  $\Delta G^0$  und denen bei anderen NaCl-Konzentrationen  $\Delta G^0([Na^+])$  lautet

$$\Delta G^0([Na^+]) = \Delta G^0 - 0,114 \cdot N \cdot \ln[Na^+], \quad (2.13)$$

mit  $N$  als Hälfte der Anzahl der Phosphatgruppen im DNA-Rückgrat.

Die Abschätzungen der thermodynamischen Eigenschaften von DNA-Molekülen erreichen basierend auf dem angegebenen Parametersatz insbesondere bei einfachen Sequenzen, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden, eine sehr hohe Genauigkeit. Ein Vergleich von experimentellen und berechneten Schmelztemperaturen von 81 DNA-Molekülen mit 6 bis 24 Basenpaaren Länge bei diversen Salzkonzentrationen ergab eine Standardabweichung von nur 2,3 °C.<sup>[105]</sup> Ein analoger Vergleich mit mehr als 25 DNA-Molekülen ergab eine Standardabweichung von 0,5 kJ/mol für  $\Delta G^0([\text{Na}^+])$ .<sup>[102]</sup>



## 3 Methodik

Die Vorbereitung von DNA-Lösungen für spektroskopische Messungen erfordert verglichen mit der Vorbereitung einfacher organischer Verbindungen einige zusätzliche Schritte. Zudem werden durch den Gleichgewichtscharakter der Psoraleninterkalation zusätzliche stationäre Experimente für die Analyse der fs-Daten von Psoralen/DNA-Lösungen notwendig. In diesem Kapitel werden diese Methoden beschrieben, bevor die Grundlagen und die experimentellen Details der zeitaufgelösten Messungen erläutert werden.

### 3.1 Probenvorbereitung und -handhabung

Die synthetischen DNA-Proben (vgl. Kapitel 5.1.2) wurden grundsätzlich in lyophilisierter Form und zu Portionen von weniger als 100 mg aliquotiert erworben und bis zur Aufnahme in wässriger Pufferlösung bei  $-18\text{ °C}$  gelagert. Mehrfache Tau- und Gefrierzyklen wurden dabei vermieden. Unter diesen Bedingungen können die DNA-Stränge laut Herstellerangaben (*Thermo Fisher Scientific bzw. biomers.net GmbH*) mindestens ein Jahr gelagert werden.

#### Annealing der DNA-Stränge

In den lyophilisierten Proben liegen die DNA-Stränge ungeordnet, das heißt vor allem nicht als gepaarte Doppelhelices, vor. Daher muss nach der Aufnahme der Moleküle in wässrigem Puffer eine Prozedur zum „Verschmelzen“ der Stränge (englisch: *Annealing*) durchgeführt werden. Diese Prozedur basiert darauf, dass bei hohen Temperaturen praktisch alle Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Basen aufgebrochen werden, also alle DNA-Stränge einzeln und ungefaltet vorliegen. Beim anschließenden Abkühlen auf Raumtemperatur werden dann neue Basenpaare gebildet. Geschieht das Abkühlen langsam genug, so bilden sich die thermodynamisch stabilsten DNA-Verbindungen, also bei geeigneter Probenwahl die gewünschten Doppelhelices (vgl. Kapitel 5.1.2).

In dieser Arbeit wurde, falls nicht anders angegeben, je ein Aliquot DNA (25-100 mg)

in einem verschließbaren 50 ml Polyethylenröhrchen in wässrigem Phosphatpuffer (*Sigma Aldrich, BioUltra*, pH 7,2, 66 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, mit Zugabe von 100 mM NaCl, 3 mM KCl<sup>1</sup>) gelöst. Das Volumen des Puffers wurde so gewählt, dass die bei den jeweiligen Messungen angegebenen DNA-Konzentrationen erreicht wurden. Im Anschluss wurde das Röhrchen in einem Wasserbad langsam auf 95 °C erhitzt. Die Wärmezufuhr wurde dann abgeschaltet, um das Wasserbad samt Probe über ca. 3-4 Stunden auf Raumtemperatur abkühlen zu lassen. Die Proben wurden dann direkt verwendet oder bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Alle Messungen wurden innerhalb von 24 Stunden nach dem Annealing durchgeführt. Gegebenenfalls wurde die Annealingprozedur dafür mit der gleichen Probe wiederholt.

#### **Vorbereitung der Psoralen/DNA-Lösungen**

Bei gut wasserlöslichen Psoralenen wie AMT wurde eine konzentrierte Stammlösung (je 1 ml bei ca. 10 mM) in reinem Wasser angesetzt. Von dieser wurden dann je nach gewünschter Konzentration wenige Volumenprozent zur messbereiten DNA-Lösung gegeben, bevor das Probengemisch mit einem Spritzenvorsatzfilter (Polypropylenmembran, 0,2 µm Porengröße) von Verunreinigungen in Form von Feststoffen befreit wurde.

Bei den weniger gut wasserlöslichen Psoralenen PSO und 8MOP muss eine andere Methode verwendet werden, um die bei den zeitaufgelösten Messungen angegebenen Konzentrationen zu erreichen. Da in diesem Fall nah an der Löslichkeitsgrenze gearbeitet wird<sup>[42]</sup>, wurden die Psoralene hier als Feststoff zur vorbereiteten DNA-Lösung gegeben und einige Minuten geschüttelt.<sup>2</sup> Im Anschluss wurde das Gemisch wie zuvor beschrieben mithilfe eines Spritzenvorsatzfilters vom überschüssigen Feststoff befreit. Die Psoralenkonzentration wurde dann über die Absorptionsspektren bestimmt.

Das Probenvolumen wurde in jedem Fall so gewählt, dass der Umsatz der Psoralene durch Photoreaktionen innerhalb einer Messung unter 5 % lag.

---

<sup>1</sup>Die Zugabe weiterer Salze führt zu einer Stabilisierung doppelhelikaler Strukturen, da die negativen Ladungen der Phosphatrückgrate durch die Kationen abgeschirmt werden.<sup>[106,107]</sup>

<sup>2</sup>Auf die Verwendung eines Ultraschallbads zur Unterstützung des Lösungsvorgangs muss unbedingt verzichtet werden, da Ultraschall die DNA-Moleküle zersetzen kann.<sup>[108]</sup>

## 3.2 Bestimmung der Interkalationsaffinität von Psoralenen

Die Interkalation von Psoralenen in die DNA lässt sich wie erwähnt als chemisches Gleichgewicht



beschreiben. Die Interkalationsaffinität von Psoralenen wird in der Literatur meist durch die Angabe der Dissoziationskonstante  $K_D$  des interkalierten Komplexes ausgedrückt.  $K_D$  ist über die Gleichgewichtskonzentrationen der beteiligten Spezies Psoralen ( $c_{P, \text{frei}}$ ), DNA ( $c_{DNA, \text{frei}}$ ) und Interkalat ( $c_{\text{Interkalat}}$ ), als

$$K_D = \frac{c_{P, \text{frei}} \cdot c_{DNA, \text{frei}}}{c_{\text{Interkalat}}} \quad (3.2)$$

definiert. Die Angabe der DNA-Konzentration sollte sich hierbei formal auf die Konzentration der verfügbaren Interkalationsstellen beziehen. In der Literatur ist es jedoch üblich Basenpaarkonzentrationen ( $c_{bp}$ ) zu verwenden. Daher werden in dieser Arbeit ebenfalls  $K_D$ -Werte bezogen auf die Basenpaarkonzentration der DNA angegeben.<sup>3</sup> Ersetzt man die Gleichgewichts- durch die Einwaagekonzentrationen des Psoralens  $c_{P, \text{ges}}$  und der DNA  $c_{DNA, \text{ges}}$ , erhält man Gleichung 3.3. In diesem Fall bleibt die Konzentration des Interkalats im Gleichgewicht die einzige Unbekannte bei der Berechnung von  $K_D$ .

$$K_D = \frac{(c_{P, \text{ges}} - c_{\text{Interkalat}}) \cdot (c_{DNA, \text{ges}} - c_{\text{Interkalat}})}{c_{\text{Interkalat}}} \quad (3.3)$$

Zur Bestimmung von  $K_D$  muss also  $c_{\text{Interkalat}}$  bestimmt werden. Theoretisch wird hierzu lediglich ein Wert für  $c_{\text{Interkalat}}$  in einer beliebigen Psoralen/DNA-Lösung benötigt. Praktisch ist es jedoch schwierig diesen im Gleichgewicht zu bestimmen. Daher wurde im Laufe dieser Arbeit ein Titrationsverfahren entwickelt, bei dem die unbekannt Konzentrationen über stationäre UV/Vis Spektroskopie ermittelt werden. Dabei wird ausgenutzt, dass die Interkalation der Psoralene einen hypochromen Effekt auf ihre niederenergetischen Absorptionsbanden bewirkt (vgl. Abbildung 3.1).<sup>[54]</sup> Bei der Titration wird die Psoralenkonzentration konstant gehalten, während die DNA-Konzentration

<sup>3</sup>Bei den verwendeten kurzen DNA-Strängen wäre es auch möglich sich auf die Konzentration der DNA-Moleküle zu beziehen. Jede der genannten Angaben liefert „korrekte“, aber unterschiedliche Werte für  $K_D$ . Daher ist es immer notwendig anzugeben, auf welchen Wert sich  $K_D$  bezieht.

schrittweise variiert wird. So ergeben sich Lösungen, in denen unterschiedlich große Anteile der Psoralene interkaliert sind.

Begonnen wurden die Titrationsindem von einer möglichst hoch konzentrierten DNA-Lösung (vgl. Kapitel 3.1) ohne Psoralenzugabe in einer Quarzglasküvette mit 1 cm Schichtdicke ein Absorptionsspektrum aufgenommen wurde. Im Anschluss wurde zu dieser Lösung eine definierte Menge einer Psoralen-Stammlösung gegeben und erneut ein Absorptionsspektrum aufgenommen.<sup>4</sup> Parallel wurde eine weitere, reine Psoralenlösung angesetzt, die die gleiche Psoralenkonzentration wie die Psoralen/DNA-Lösung besaß. Dazu wurde ein Teil der Stammlösung auf die benötigte Konzentration verdünnt. Nun wurde in 20-25 Titrationschritten je ein Drittel der Psoralen/DNA-Lösung aus der Küvette entnommen und durch das gleiche Volumen der reinen Psoralenlösung ersetzt. Dadurch sinkt die DNA-Konzentration mit jedem Schritt, während die des Psoralens konstant bleibt.

Die Absorption solcher Psoralen/DNA-Lösungen  $A_{ges}$  setzt sich additiv aus den Beiträgen der interkalierten und nicht-interkalierten Psoralene  $A_{P,int}$  und  $A_{P,frei}$ , sowie der DNA  $A_{DNA}$  zusammen (Gleichung 3.4).

$$A_{ges} = A_{P,int} + A_{P,frei} + A_{DNA} \quad (3.4)$$

Im Bereich der  $S_1$ -Absorption der Psoralene (vgl. Abbildung 5.1) absorbiert die DNA zwar nur schwach, dennoch muss ihr Beitrag für die anschließende Ermittlung von  $K_D$  unter Berücksichtigung der jeweiligen DNA-Konzentration subtrahiert werden. Dann lässt sich die Absorption nach Lambert-Beer<sup>[72]</sup> über die jeweiligen Psoralenkonzentrationen ausdrücken. Da die Gesamtkonzentration der Psoralene  $c_{P,ges}$  konstant bleibt, lässt sich zugleich auch  $c_{P,frei}$  ersetzen, sodass man

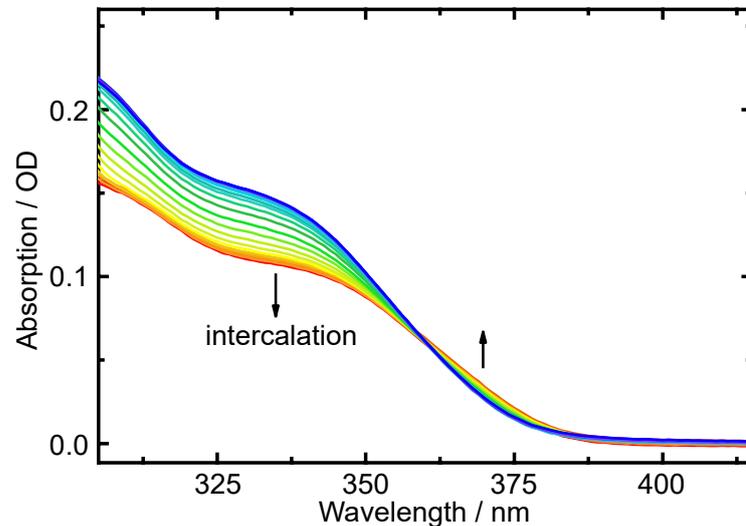
$$A_{(ges-DNA)} = \epsilon_{P,int} c_{P,int} d + \epsilon_{P,frei} (c_{P,ges} - c_{P,int}) d \quad (3.5)$$

erhält, wobei  $\epsilon$  für den jeweiligen Absorptionskoeffizienten und  $d$  für die optische Weglänge in der Küvette steht. Exemplarisch sind in Abbildung 3.1 die Absorptionsspektren der

---

<sup>4</sup>Das Gesamtvolumen der Lösung in der Küvette sollte im Idealfall 3 ml betragen, um die Handhabung zu erleichtern.

Titration von AMT mit GTAC-DNA (für Sequenz siehe Kapitel 5.1.2) dargestellt.



**Abbildung 3.1:** Absorptionsspektren der Titration von AMT mit GTAC-DNA (pH = 7,2, 66 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 3 mM KCl,  $d = 1$  cm). Die AMT-Konzentration betrug konstant 21  $\mu$ M, während die DNA-Konzentration von hoch ( $c_{bp} = 2,7$  mM, rot) zu niedrig (ca. 1  $\mu$ M, blau) variiert wurde. Der Beitrag der DNA zur Absorption wurde unter Beachtung der jeweiligen DNA-Konzentration subtrahiert. Adaptiert aus S. Fröbel et al.<sup>[109]</sup>

Die Auswertung der Titrationsdaten erfolgt durch die Lösung eines Gleichungssystems, das auf den Gleichungen 3.3 und 3.5 basiert:

$$K_D = \frac{(c_{P,ges} - c_{Interkalat,n}) \cdot (c_{DNA,ges} - c_{Interkalat,n})}{c_{Interkalat,n}} \quad (3.6)$$

$$A_{ges-DNA,n} = \epsilon_{P,int} c_{Interkalat,n} d + \epsilon_{P,frei} (c_{P,ges} - c_{Interkalat,n}) d$$

Hierbei wird nun berücksichtigt, dass die Konzentration des interkalierten Psoralens  $c_{Interkalat,n}$  mit jedem Titrationschritt  $n$  variiert. Abgesehen von  $c_{Interkalat,n}$ ,  $\epsilon_{P,int}$  und  $K_D$  sind alle Parameter des Gleichungssystems bekannte Messgrößen. Damit ist das Gleichungssystem ab dem dritten Titrationschritt lösbar (sechs Gleichungen bei fünf Unbekannten). Zur Lösung des Systems 3.6 wurde eine Mathcad Routine erstellt (siehe Anhang).

## 3.3 Zeitaufgelöste Spektroskopie

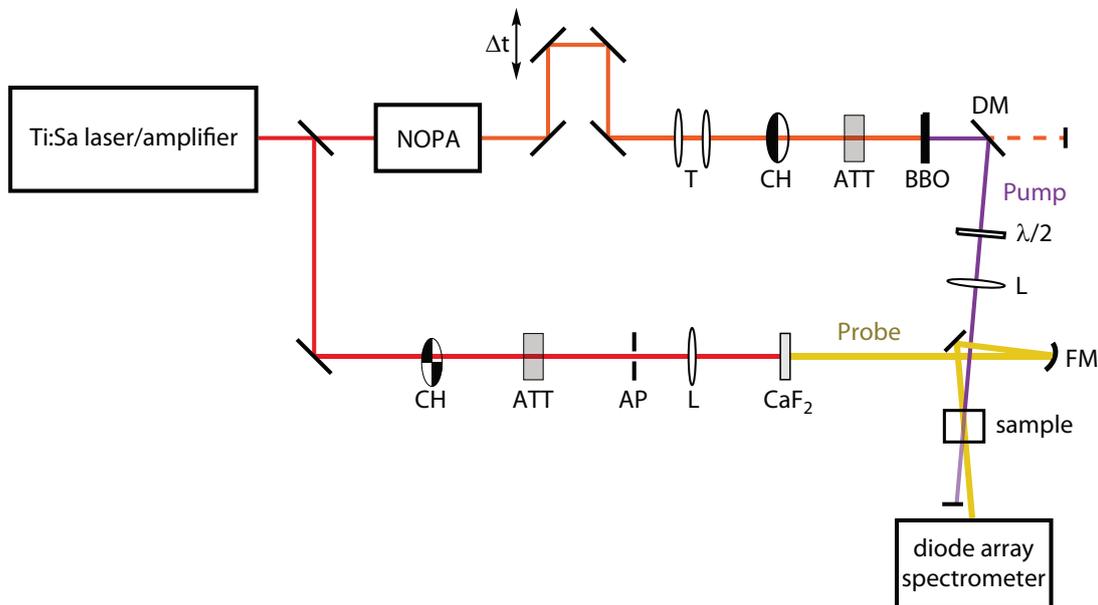
Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Techniken der zeitaufgelösten Spektroskopie verwendet. Im Femto- bis frühen Nanosekundenbereich wurden UV/Vis Absorptions- und Femtosekunden-stimulierte Raman Experimente durchgeführt. Die Charakterisierung langlebigerer Prozesse erfolgte mithilfe von Blitzlichtphotolyse mit Detektion im UV/Vis Bereich. In diesem Kapitel werden diese Techniken, die verwendeten experimentellen Aufbauten und Verfahren zur Datenanalyse vorgestellt.

### 3.3.1 Femtosekunden UV/Vis-Spektroskopie

Während durch Lichtabsorption induzierte spektrale Änderungen bis hin zu einigen hundert Pikosekunden noch direkt, beispielsweise mithilfe von Oszilloskopen, aufgezeichnet werden können, erfordert die Detektion noch schnellerer Änderungen ein völlig anderes Messprinzip. Das dazu genutzte Anrege-Abtast (englisch: *pump-probe*) Verfahren basiert auf der zeitlich definierten Anregung der Probenmoleküle mit einem ultrakurzen Laserimpuls (*pump*) und dem anschließenden Abtasten der spektralen Änderungen durch einen zweiten ultrakurzen Impuls (*probe*). Über die Veränderung der Wegstrecke von einem dieser Impulse kann die zeitliche Verzögerung zwischen der Anregung und dem Abtasten der Signale eingestellt werden. Während die Frequenz des pump-Impulses immer in Resonanz mit der Absorption der Probenmoleküle gebracht werden muss, bestimmt die Frequenz des probe-Impulses darüber, welche Art von spektroskopischer Information erhalten wird. Zur Messung von fs-UV/Vis Daten muss der probe-Impuls also in einen Frequenzbereich im sichtbaren oder ultravioletten Teil des Spektrums konvertiert werden. Sind die Impulse zeitlich ausreichend kurz, so lassen sich mit diesem Prinzip Zeitauflösungen im Bereich um zehn Femtosekunden erreichen.<sup>[110]</sup>

Ein Schema des experimentellen Aufbaus für die fs-UV/Vis Experimente in dieser Arbeit ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Das genaue Messprinzip mit dieser Apparatur wurde bereits ausführlich in der Literatur beschrieben.<sup>[111]</sup> Jedoch hat sich ein großer Teil der Komponenten im Vergleich zur Beschreibung dort geändert. Die fs-Impulse werden nun durch das fs-Laser/Verstärker System *Libra* der Firma *Coherent* erzeugt. Dieses emittiert Impulse mit einer Zentralwellenlänge von 802 nm und einer Dauer von ca. 100 fs (volle Halbwertsbreite (FWHM)). Die Wiederholrate beträgt 1 kHz bei Impulsenergien von ca. 3,4 mJ. Diese Impulse werden unmittelbar nach dem Austritt aus dem Verstärker

durch mehrere Strahlteiler in unterschiedlich intensive Impulszweige aufgeteilt. Zwei dieser Zweige werden zur Erzeugung der pump- und probe-Impulse verwendet.



**Abbildung 3.2:** Schema des Aufbaus für transiente Absorptionsmessungen mit Femtosekundaufösung. In den Strahlengängen der Anregung (*Pump*) und Abfrage (*Probe*) sind nur die entscheidenden Bauteile wie Chopper (*CH*), Abschwächer (*ATT*), Blende (*AP*), Linsen (*L*), Linsenteleskop (*T*), BBO-Kristall (*BBO*), dichroitische Spiegel (*DM*),  $\text{CaF}_2$ -Platte ( $\text{CaF}_2$ ), Halbwellenplatte ( $\lambda/2$ ) und Fokussierspiegel (*FM*) eingezeichnet. Stellen, an denen die Laserfrequenz konvertiert wird, sind durch eine veränderte Farbe des eingezeichneten Laserstrahls angedeutet.

Die durch einfache Frequenzverdopplungs-<sup>[112]</sup> oder Summenfrequenzerzeugungsprozesse<sup>[112]</sup> zugänglichen Wellenlängen von 401 nm und 267 nm sind für pump-Impulse zur Untersuchung von Psoralen-DNA Systemen nicht geeignet (keine Probenabsorption bzw. starke DNA-Absorption, vgl. Abbildung 5.1). Aus diesem Grund wurde die Zentralwellenlänge der Impulse zunächst durch einen nicht-linearen optisch parametrischen Verstärker<sup>[113]</sup> (NOPA, *Topas White* der Firma *Light Conversion*) auf 680 nm oder 650 nm konvertiert. Danach passieren die Impulse eine elektronisch ansteuerbare Verzögerungsstrecke, mit der die zeitliche Verzögerung zwischen pump- und probe-Impulsen im Experiment eingestellt wird. Über ein Linsenteleskop (*T*, zwei Quarzglaslinsen mit  $f = +750$  mm und  $f = -150$  mm) wird der sichtbare Strahldurchmesser auf etwas weniger als 5 mm reduziert, bevor die letztlich verwendete Anregungswel-

lenlänge von 340 nm bzw. 325 nm durch Frequenzverdopplung in einem geeigneten  $\beta$ -Bariumboratkristall (BBO-Kristall) erzeugt wird. Zur Einstellung der Lichtleistung befindet sich vor dem BBO-Kristall ein stufenlos einstellbarer Abschwächer (ATT) bestehend aus einer drehbaren Halbwellenplatte ( $\lambda/2$ -Platte) und einem Drahtgitterpolarisator, der für die ursprüngliche Laserpolarisation durchlässig ist. Drei dichroitische Spiegel (DM), die genähert nur die Anregungswellenlänge reflektieren, entfernen verbleibende Anteile des nicht frequenzverdoppelten Lichts. Die relative Polarisationsrichtung zwischen pump- und probe-Impulsen ist durch eine  $\lambda/2$ -Platte nach dem BBO-Kristall einstellbar. Sie wurde in allen Experimenten auf den *magischen Winkel* von  $54,7^\circ$  eingestellt, um Signaländerungen durch Rotationsdiffusion zu unterdrücken.<sup>[81]</sup> Eine bikonvexe Quarzglaslinse (L) mit einer Brennweite von 200 mm fokussiert das Anregungslicht auf die Probe (Strahldurchmesser am Probenort ca.  $140 \mu\text{m}$  (FWHM)). Eine rotierende Lochscheibe (CH für *Chopper*) sorgt im Experiment dafür, dass alternierend je zwei pump-Impulse bis zum Probenort gelangen und zwei Impulse geblockt werden.

Die spektral breitbandigen probe-Impulse werden in einer konzentrisch bewegten  $\text{CaF}_2$ -Platte mit 5 mm Schichtdicke erzeugt. Dazu wird die Impulsenergie über einen Abschwächer (ATT), der analog zu dem im pump-Zweig aufgebaut ist, auf ca.  $1 \mu\text{J}$  eingestellt. Eine Quarzglaslinse (L) mit einer Brennweite von 150 mm fokussiert das Licht nahe an das hintere Ende der  $\text{CaF}_2$ -Platte, wo dadurch ein breitbandiges Superkontinuum (*auch*: Weißlicht) erzeugt wird.<sup>[114,115,116]</sup> Eine variable Apertur (AP) vor der fokussierenden Linse erlaubt eine Feineinstellung der Fokussierungsbedingungen. Bei geeigneter Justage deckt das Spektrum der probe-Impulse einen breiten Spektralbereich ab, von dem der Bereich von ca. 315 nm bis 750 nm für die fs-UV/Vis Experimente verwendet wird. Über einen sphärischen Hohlspiegel (FM,  $f = 200 \text{ mm}$ , coated Al) wird das divergente Weißlicht in einem kleinen Winkel (ca.  $4^\circ$ ) reflektiert und nach passieren eines weiteren planen Spiegels am Probenort fokussiert (Strahldurchmesser ca.  $25 \mu\text{m}$ ). Ein zweiter rotierender Chopper lässt mit einer Frequenz von 500 Hz nur jeden zweiten probe-Impuls zum Probenort gelangen.

Pump- und probe-Impuls werden räumlich mit einem kleinen Winkel ( $< 5^\circ$ ) zueinander in der Probenlösung überlagert. So kann der pump-Impuls nach Durchlaufen der Lösung räumlich abgetrennt und geblockt werden. Der probe-Impuls wird dagegen nach Durchlaufen der Lösung zunächst von einem achromatischen Linsendublett (Sonderanfertigung der Firma *Lens Optics*,  $f = 150 \text{ mm}$ ) aus  $\text{CaF}_2$  und Quarzglas kollimiert und

anschließend von einem baugleichen Dublett auf den Öffnungsspalt eines Gitterspektrometers (100 Linien/mm Gitter) fokussiert. Das in erster Ordnung gebeugte Licht wird von einer Diodenzeile (*Hamamatsu S3902-512Q*, 512 Pixel mit je 500  $\mu\text{m}$  Höhe  $\times$  50  $\mu\text{m}$  Breite) mit einer Ausleserate von 1 kHz detektiert. Durch die spektral sehr breitbandige Detektion fällt das in 2. Ordnung gebeugte Licht aus dem UV-Bereich räumlich mit der 1. Beugungsordnung des roten Spektralbereichs zusammen.<sup>[117]</sup> So fällt beispielsweise in 2. Ordnung gebeugtes Licht der Wellenlänge 340 nm auf die gleichen Pixel wie in 1. Ordnung gebeugtes Licht bei 680 nm. Daher wird vor diese Pixel ein Langpass-Filter – mit hoher Transmission oberhalb von 450 nm – platziert.

Die Probenlösung durchläuft im Fokusbereich der Strahlen eine Quarzglas-Durchflussküvette (Sonderanfertigung der Firma *Hellma Analytics*, 137.084-QX, optische Schichtdicke 1 mm), die an einen Probenkreislauf angeschlossen ist. Die Flussgeschwindigkeit der Probe ist so gewählt, dass die Probe im relevanten Bereich zwischen zwei Einzelmessungen (1 ms) vollständig ausgetauscht wird. Das Gesamtvolumen der Lösung war immer ausreichend hoch um hohe Probenumsätze ( $\gtrsim 5\%$ ) während eines Experiments zu vermeiden.

Die Differenzabsorption  $\Delta A(\lambda, t, s)$  (Gleichung 3.7) bei jedem Zeitschritt  $t$  und Scan  $s$  wird wie folgt berechnet. Durch die Verwendung von zwei Chopperrn erhält man innerhalb von vier Laserschüssen vier verschiedene Signalspuren ( $I(\lambda, t, s)$ ):

1. Beide Impulse treffen auf die Probe ( $I(\lambda, t, s)_{\text{pump+probe}}$ )
2. Nur das Weißlicht trifft auf die Probe ( $I(\lambda, t, s)_{\text{probe}}$ )
3. Nur die Anregung trifft auf die Probe ( $I(\lambda, t, s)_{\text{pump}}$ )
4. Kein Impuls trifft auf die Probe ( $I(\lambda, t, s)_{\text{off}}$ )

Während die Spuren  $I(\lambda, t, s)_{\text{pump+probe}}$  und  $I(\lambda, t, s)_{\text{probe}}$  die zentralen Signale zur Berechnung von  $\Delta A(\lambda, t, s)$  darstellen, ermöglicht die Signalspur  $I(\lambda, t, s)_{\text{pump}}$  Streulichtbeiträge der pump-Impulse und Dunkelsignal des Detektors aus  $I(\lambda, t, s)_{\text{pump+probe}}$  herauszurechnen. Über  $I(\lambda, t, s)_{\text{off}}$  kann das Dunkelsignal des Detektors berücksichtigt und von  $I(\lambda, t, s)_{\text{probe}}$  subtrahiert werden. Die Berechnung der Differenzabsorption erfolgt schließlich basierend auf dem Lambert-Beerschen Gesetz nach

$$\Delta A(\lambda, t, s) = -\log \left( \frac{I(\lambda, t, s)_{pump+probe} - I(\lambda, t, s)_{pump}}{I(\lambda, t, s)_{probe} - I(\lambda, t, s)_{off}} \right) = \Delta \epsilon(\lambda) \cdot c^* \cdot d \quad (3.7)$$

wobei  $\Delta \epsilon(\lambda)$  den Differenzabsorptionskoeffizienten,  $c^*$  die Konzentration der angeregten Moleküle und  $d$  die effektive optische Schichtdicke der Probe darstellt. Befindet sich mehr als eine transiente Spezies in der Probe, muss im rechten Ausdruck eine Summe verschiedener  $\Delta \epsilon(\lambda)$  und  $c^*$  berücksichtigt werden.

Durch die hohe spektrale Breite des probe-Impulses erfährt dieser in der Regel eine hohe Gruppengeschwindigkeitsdispersion.<sup>[112]</sup> Das heißt seine spektralen Bestandteile durchlaufen Materie je nach Frequenz mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Dadurch wird der Impuls insgesamt verlängert und seine spektralen Bestandteile trennen sich zeitlich auf. Die zeitliche Verteilung der Frequenzkomponenten nennt man auch *Chirp*.<sup>[112,118]</sup> Im fs-UV/Vis Experiment führt dies zu einer zeitlichen Verzerrung der Zeitnullpunkte<sup>5</sup> als Funktion der Wellenlänge. Zur Korrektur dieser Verzerrung wurde an jedem Mess-tag eine separate, auf dem optischen Kerr-Effekt<sup>[119,120]</sup> beruhende Messung am reinen Lösungsmittel durchgeführt, über die die Zeitnullpunkte für jede Wellenlänge nach allen anderen Korrekturen (vgl. Kapitel 3.3.1.1) korrigiert wurden.

Für ein fs-UV/Vis Experiment wurden üblicherweise 1500 einzelne Differenzabsorptionsspektren pro Verzögerungszeit und pro Scan der Verzögerungsstrecke gemittelt und insgesamt in einem Zeitbereich von  $-0,5$  ps bis  $3,3$  ns 139 verschiedene Zeitschritte gemessen. Dabei wurden im Bereich von  $-0,5$  ps bis  $1$  ps lineare Zeitschritte und im Bereich über  $1$  ps exponentielle Zeitschritte gewählt.

Im Fall von AMT wurden pro Experiment typischerweise die Signale aus 2 Scans<sup>[109]</sup> und im Fall von PSO und 8MOP 4 Scans<sup>[121]</sup> der Verzögerungsstrecke gemittelt. Die Energie der Anregungsimpulse betrug ca.  $1 \mu\text{J}$ .

Die Subtraktion einer Lösungsmittelmessung unter geeigneter Skalierung (Faktor  $\frac{1-10^{-A_{\lambda_{exc}}}}{2,3 \cdot A_{\lambda_{exc}}}$ )<sup>[122]</sup> ermöglichte die Entfernung von Zeitnullpunktsartefakten. Die Zeitauflösung der Experimente betrug ca.  $180$  fs.

---

<sup>5</sup>Zeitpunkt, an dem pump- und probe-Impuls zeitgleich auf die Probenlösung treffen.

### 3.3.1.1 Subtraktion der Signale von nicht-interkalierten Psoralenen im Gleichgewicht

Wie zuvor erwähnt, ist ein gewisser Anteil an nicht-interkalierten (freien) Psoralenmolekülen in den fs-UV/Vis Experimenten in Anwesenheit von DNA nicht zu vermeiden (vgl. Kapitel 3.2, 5.3 & 5.4). Zudem gibt es keine Anregungswellenlänge, bei der die interkalierten Moleküle selektiv angeregt werden können (vgl. Abbildung 3.1). Für einen isolierten Blick auf die Signaturen der interkalierten Moleküle müssen daher die Signale des nicht-interkalierten Anteils der Psoralene subtrahiert werden. Innerhalb eines Messtages wurden zu diesem Zweck je vier fs-UV/Vis Experimente unter identischen Anrengungsbedingungen durchgeführt:

1. Psoralenderivat in wässriger Lösung
2. Wasser (Lösungsmittelmessung für 1.)
3. Psoralenderivat und DNA in wässriger Pufferlösung
4. DNA in wässriger Pufferlösung („Lösungsmittelmessung“ für 3.)

In einem ersten Schritt wurden die Lösungsmittelbeiträge zur Entfernung von Zeitnullpunktsartefakten von den Daten der Probenlösungen unter geeigneter Skalierung (s. Kapitel 3.3.1) subtrahiert. Im Anschluss mussten die lösungsmittelkorrigierten Daten von 1. mit einem Skalierungsfaktor  $S$  multipliziert und von den Daten der Lösung mit DNA (3.) subtrahiert werden.

Der Faktor  $S$  (Gleichung 3.8) beinhaltet zum einen, dass die Probenlösungen insgesamt eine unterschiedliche Zahl von Photonen absorbieren. Zum anderen berücksichtigt er, dass nur ein Teil dieser Photonen von den freien Psoralenen in der Lösung mit DNA absorbiert werden. Durch die Berücksichtigung beider Aspekte lässt sich die Signalhöhe der freien Psoralene im Gemisch bestimmen. Der Ausdruck für  $S$  lautet bei identischen Anrengungsbedingungen bei allen Messungen

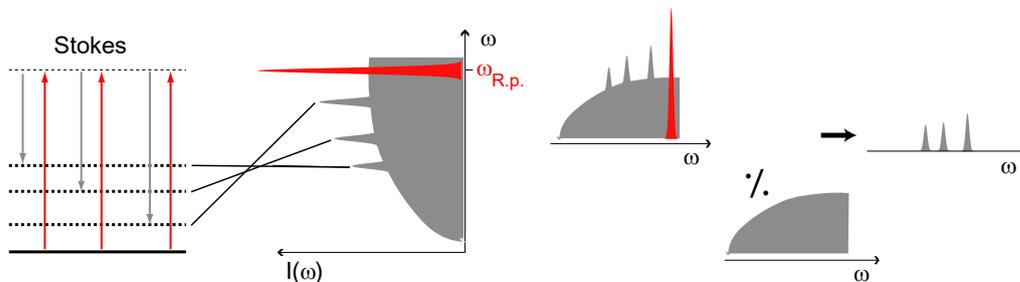
$$S = \frac{1 - 10^{-A_{\lambda_{exc},3.}}}{1 - 10^{-A_{\lambda_{exc},1.}}} \cdot \frac{\epsilon_{frei} c_{frei}}{\epsilon_{frei} c_{frei} + \epsilon_{int} c_{int}} \quad (3.8)$$

wobei  $\epsilon_{frei}$  und  $\epsilon_{int}$  die Absorptionskoeffizienten der nicht-interkalierten und interkalierten Psoralene bei der Anregungswellenlänge und  $c_{frei}$  und  $c_{int}$  ihre jeweiligen Gleichgewichtskonzentrationen darstellen. Hierbei wird die Absorption der DNA nicht berücksichtigt, was bei den Konzentrationsverhältnissen und Schichtdicken in den zeitaufgelösten Mes-

sungen zu vernachlässigbaren Fehlern führt. Die Konzentrationen wurden über den in Titrationsexperimenten bestimmten  $K_D$ -Wert errechnet.  $\epsilon_{int}$  lässt sich ebenfalls mithilfe der Auswerteroutine für die Titrationen ermitteln (vgl. Kapitel 3.2).

### 3.3.2 Femtosekunden-stimulierte Raman Spektroskopie (FSRS)

Die zeitaufgelöste Femtosekunden-stimulierte Raman Spektroskopie (FSRS) hat sich inzwischen längst als schwingungsspektroskopische Methode zur Untersuchung von ultraschnellen Photoreaktionen und photophysikalischen Prozessen etabliert.<sup>[123,124]</sup> Eine sehr umfangreiche Zusammenstellung der Grundlagen von FSRS, der weltweit eingesetzten Apparaturen, sowie der untersuchten Prozesse findet sich in einer aktuellen Übersichtsarbeit.<sup>[125]</sup>

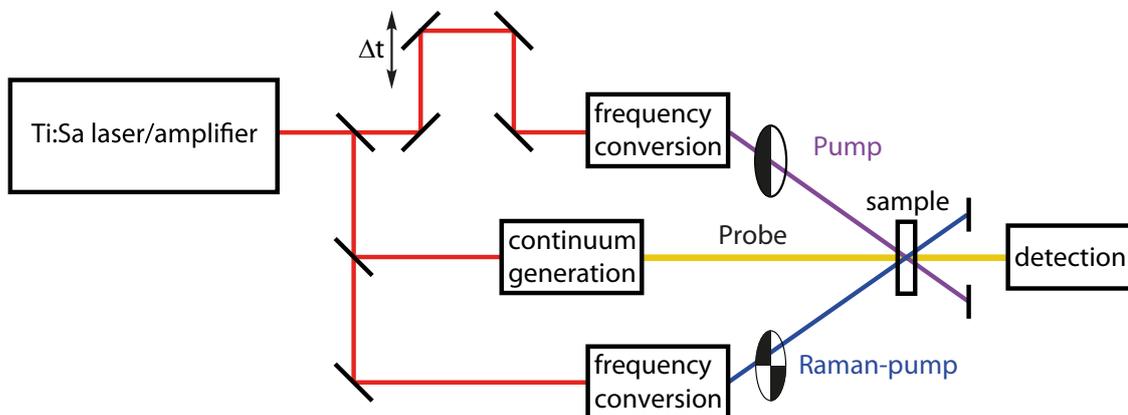


**Abbildung 3.3:** Links: Schema des FSRS Prozesses auf der Stokes-Seite. Photonen des spektral schmalbandigen Raman-pump Impulses ( $\omega_{R.p.}$ , rot) heben die Probenmoleküle in virtuelle Energieniveaus (dünne gestrichelte Linie), von wo die Emission von Photonen niedrigerer Frequenz (graue Pfeile) durch den probe-Impuls stimuliert wird. Die Energiedifferenz verbleibt als Schwingungsanregung (dicke gestrichelte Linien) in den Probenmolekülen. Dadurch steigt die Intensität des probe-Impulses (graue Fläche) bei den Resonanzfrequenzen der Probe. Adaptiert aus Plötz et al.<sup>[126]</sup> Rechts: Durch Referenzierung auf ein Spektrum ohne Raman-pump Impuls wird das FSRS Spektrum gewonnen.

Die Technik basiert wie die fs-UV/Vis Spektroskopie auf dem Anrege-Abtast Verfahren. Zusätzlich zu den pump- und probe-Impulsen ist für diese Technik jedoch ein weiterer Impuls, der als Raman-pump bezeichnet wird, nötig. Dieser wird räumlich und zeitlich mit dem probe-Impuls in der Probe überlagert, wodurch stimulierte Raman Signale erzeugt werden (Abbildung 3.3). Der Raman-pump Impuls muss dabei spektral schmalbandig sein, da seine Breite direkt die spektrale Auflösung der Raman Spektren

beeinflusst. Relativ zur spektralen Lage des Raman-pump Impulses deckt der probe-Impuls alle möglichen Schwingungsfrequenzen der untersuchten Probenmoleküle ab, so dass in einem Schritt vollständige stimulierte Raman Spektren erhalten werden. In dieser Arbeit werden die Spektren auf der Stokes-Seite des Raman-pump Impulses gemessen, also hin zu niedrigeren Frequenzen. Bei diesem Prozess werden Photonen des Raman-pump Impulses vernichtet, während bei den Schwingungsfrequenzen der Probenmoleküle Photonen erzeugt werden. Die Energiedifferenz dieser Photonen verbleibt in Form von Schwingungsanregungen in den Probenmolekülen.

Der für diese Arbeit verwendete Aufbau ist der gleiche wie für die fs-UV/Vis Experimente (vgl. Kapitel 3.3.1). Jedoch müssen einige Änderungen an diesem Aufbau vorgenommen werden, bevor FSRS Messungen möglich sind. Als größte Änderung wird wie erwähnt zusätzlich ein Raman-pump Impulszweig verwendet (Abbildung 3.4). Dessen Wellenlänge liegt im derzeitigen Aufbau um 400 nm und er wird wie der pump-Zweig in einem kleinen Winkel zu den probe-Impulsen durch die Probe und nicht direkt in das Spektrometer geleitet. Die Polarisationsvektoren von Raman-pump und probe-Impulsen werden parallel zueinander ausgerichtet. Die Konstruktion dieses Zweiges und die Erzeugung der Raman-pump Impulse über ein neues Prinzip waren Teil der apparativen Arbeiten im Rahmen dieser Promotion. Eine genaue Beschreibung des Strahlengangs und der optischen Bauteile befindet sich daher in Kapitel 4.



**Abbildung 3.4:** Stark vereinfachtes Schema eines zeitaufgelösten FSRS Experiments. Zusätzlich zu den in der fs-UV/Vis Spektroskopie eingesetzten pump- und probe-Impulsen wird hier ein spektral schmalbandiger Raman-pump Impuls benötigt, der zeitlich und räumlich mit dem probe-Impuls überlagert wird. Anders als hier angedeutet, wird im Rahmen dieser Arbeit jedoch nur ein Chopper im Raman-pump Zweig verwendet.

Weitere Änderungen, die für FSRS Experimente vorgenommen werden müssen, werden hier kurz dargestellt. Die spektrale Auflösung des Gitterspektrometers muss im Vergleich zu den fs-UV/Vis Experimenten erhöht werden. Daher wurde für die FSRS Messungen ein 600 l/mm Gitter eingesetzt, das in Kombination mit dem Diodenzeilendetektor eine spektrale Auflösung von ca.  $15 \text{ cm}^{-1}$  ermöglicht. Desweiteren muss die Position der Chopper verändert werden. Der mit 500 Hz laufende Chopper wird aus dem probe-Strahlengang entfernt und in den Raman-pump Strahlengang eingesetzt. So lassen sich abwechselnd Spektren des probe-Impulses mit und ohne stimuliertes Raman Signal aufnehmen. Der mit 250 Hz laufende Chopper kann prinzipiell im pump-Strahlengang eingesetzt werden, sodass analog zu den fs-UV/Vis Experimenten in einem 4er Zyklus gemessen werden kann.<sup>[111]</sup> Es erwies sich jedoch als effizienter, diesen Chopper aus dem Experiment zu entfernen und stattdessen über einen längeren Zeitraum, in dem in einem 2er Zyklus aufgenommen wurde, zu mitteln.<sup>[60,127]</sup>

Eine detaillierte Darstellung der Datenauswertung bei Nutzung des 2er Zyklus findet sich in S. Fröbel et al.<sup>[60]</sup> Man erhält in diesem Fall pro Zeitschritt zwei Signalspuren:

1. Alle drei Impulse treffen auf die Probe ( $I(\tilde{\nu}, t, s)_{,pump+probe+R.p.}$ )
2. Nur die pump- und probe-Impulse treffen auf die Probe ( $I(\tilde{\nu}, t, s)_{,pump+probe}$ )

Da das Streulicht des pump-Impulses in diesen Experimenten nicht im Detektionsfenster liegt, muss es in der Analyse nicht berücksichtigt werden. Natürlich muss jedoch auch in diesem Fall das Dunkelsignal des Detektors vor der Datenverarbeitung subtrahiert werden. Dazu wird zu Beginn des Experiments eine Dunkelmessung durchgeführt, bei der keiner der Impulse die Probe erreicht (*bgr* für *background*). Die FSRS Rohspektren  $R(\tilde{\nu}, t, s)$  in Abhängigkeit der Wellenzahl  $\tilde{\nu}$ , des Zeitschritts  $t$  und des Scans der Verzögerungsstrecke  $s$  werden dann über

$$R(\tilde{\nu}, t, s) = \frac{I(\tilde{\nu}, t, s)_{,pump+probe+R.p.} - bgr}{I(\tilde{\nu}, t, s)_{,pump+probe} - bgr} \quad (3.9)$$

berechnet. Da die Grundlinie bei FSRS Messungen meist deutlich fluktuiert,<sup>[125]</sup> wird darauf eine Spline Funktion, die an die Grundlinie angepasst wird, von  $R(\tilde{\nu}, t, s)$  subtrahiert, nachdem die Daten zunächst mit einem Savitzky-Golay Filter<sup>[128]</sup> (Polynom 4. Ordnung, 2 Punkte links und rechts) geglättet wurden.

Die grundlinienkorrigierten Daten  $R(\tilde{\nu}, t, s)_{,korr}$  müssen mithilfe eines weiteren Korrek-

turterms  $C(\tilde{\nu}_{Ref}, t, s)$  bearbeitet werden, da die Absorption der angeregten Moleküle in dieser Arbeit einen Teil des Raman-pump Lichts absorbieren. Dadurch weicht die gemessene Intensität der Raman Banden von ihrem realen Wert ab.<sup>[60,111]</sup> Für diese Korrektur wird die Intensität einer Lösungsmittelbande bei  $\tilde{\nu}_{Ref}$  als Referenz verwendet. Ihre reale Intensität sollte, unabhängig davon ob gelöste Moleküle angeregt werden, im gesamten Zeitfenster konstant sein. Durch die Absorption von angeregten Molekülen wird jedoch der Raman-pump Impuls bei positiven Verzögerungszeiten  $t$  abgeschwächt, was auch zu einer Reduktion der gemessenen Intensität der Lösungsmittelbanden führt. Das Verhältnis der Intensitäten mit (Verzögerungszeiten  $t$ ) und ohne Anregung der Probe (Verzögerungszeit  $t_{neg} = -4$  ps) zeigt an, wie stark der Raman-pump Impuls abgeschwächt wurde. Daher liefert die Multiplikation von  $R(\tilde{\nu}, t, s)_{korr}$  mit dem Faktor

$$C(\tilde{\nu}_{Ref}, t, s) = \frac{I(\tilde{\nu}_{Ref}, t_{neg}, s)_{,pump+probe+R.p.} - bgr}{I(\tilde{\nu}_{Ref}, t, s)_{,pump+probe+R.p.} - bgr} \quad (3.10)$$

Spektren, die hinsichtlich der Raman-pump Absorption korrigiert sind. Die durch FSRS hervorgerufenen Signalzunahmen auf der Stokes-Seite des Weißlichts werden als *Raman Gain* bezeichnet und typischerweise in Prozent oder Promille angegeben, wobei null für keine Änderung steht. Die finalen transienten FSRS Differenzspektren werden dann über

$$\Delta R(\tilde{\nu}, t, s) = R(\tilde{\nu}, t, s)_{,korr} \cdot C(\tilde{\nu}_{Ref}, t, s) - R(\tilde{\nu}, t_{neg}, s)_{,korr} \quad (3.11)$$

erhalten, wobei  $R(\tilde{\nu}, t_{neg}, s)_{,korr}$  dem FSRS Spektrum ohne Anregung der Probe, also der Probenlösung im Grundzustand, entspricht.

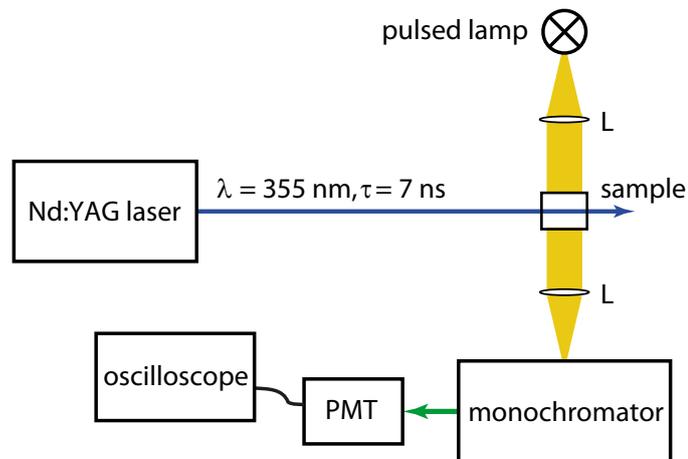
Je FSRS Experiment wurden 14000 einzelne Differenzspektren pro Verzögerungszeit und pro Scan der Verzögerungsstrecke gemittelt und im Anschluss insgesamt über 8 Scans der Verzögerungsstrecke gemittelt. In einem Zeitbereich von  $-0,5$  ps bis 200 ps wurde bei 32 verschiedenen Verzögerungszeiten gemessen. Die Energie der pump-Impulse bei 350 nm betrug bei einem Strahldurchmesser von etwa 110  $\mu\text{m}$  (FWHM) ca. 2,1  $\mu\text{J}$ , die der Raman-pump Impulse etwa 2,3  $\mu\text{J}$  (Schlitzeinstellung 400  $\mu\text{m}$ , spektrale Breite ca. 12  $\text{cm}^{-1}$ , Strahldurchmesser ca. 50  $\mu\text{m}$  (FWHM)). Die Zeitauflösung des Experiments beträgt ca. 200 fs.

### 3.3.3 Blitzlichtphotolyse

Mit der für diese Arbeit verwendeten Blitzlichtphotolyse (LFP für *laser flash photolysis*) Apparatur können spektrale Änderungen im UV/Vis Bereich mit einer Zeitauflösung von bis zu etwa 20 ns verfolgt werden. Da nur ein kleiner Zeitbereich zwischen dieser Auflösung und der maximalen Verzögerungszeit der fs-UV/Vis Experimente (ca. 3,3 ns) liegt, können in den meisten Fällen die Spezies, die am Ende der Femtosekundenmessungen bestehen bleiben, mit LFP weiter verfolgt werden.

Das Messprinzip bei dieser Apparatur beruht auf der Anregung der Probenmoleküle durch einen Nanosekundenlaserimpuls und der anschließenden Abfrage der Signaländerungen durch eine Xenon-Lampe. Die Signaländerungen werden dabei jeweils mit einem Oszilloskop als Zeitspuren für einen schmalen Wellenlängenbereich aufgezeichnet. Die Detektion erfolgt einkanalig mithilfe eines Sekundärelektronenvervielfachers. Anders als bei den fs-Experimenten wird also in einem Messschritt eine zusammenhängende Zeitspur für einen kleinen Wellenlängenbereich und nicht ein ganzes Spektrum für einen Zeitpunkt aufgenommen.

Der experimentelle Aufbau (Abbildung 3.5) basiert auf dem System *LKS.60* der Firma *Applied Photophysics*. Als Anregungsimpulse wurden für diese Arbeit 355 nm Impulse mit ca. 7 ns Dauer (FWHM) und einer Impulsenergie von ca. 3 mJ eines Nd:YAG Lasers (*InnoLas, SpitLight 600*) mit einer Repetitionsrate von 1 Hz verwendet (Strahldurchmesser ca. 8 mm). Die Abfrage durch das Licht einer mit 1 Hz gepulsten Xenon-Lampe (*Hamamatsu*, Modellnr. 2273, 150 W) erfolgt rechtwinklig zur Anregung. Nach Durchlaufen der Probenlösung, die sich in einer  $1 \times 1$  cm Quarzglas-Durchflussküvette befindet, wird der gewünschte Wellenlängenbereich des Abfragelichts durch einen Gittermonochromator ausgewählt und mit einem Sekundärelektronenvervielfacher (*Hamamatsu*, Modellnr. 1P28) detektiert. Das detektierte Signal wird dann mithilfe eines Oszilloskops (*Agilent*, Infiniium) digitalisiert. Für die Berechnung der Differenzabsorptionsdaten wurden zunächst zehn Einzelmessungen ohne Anregung und darauf zehn Einzelmessungen mit Anregung der Probenmoleküle gemittelt. Die spektrale Auflösung betrug ca. 5 nm.



**Abbildung 3.5:** Schema des Aufbaus für Blitzlichtphotolyse Messungen. Die Impulse einer Harmonischen eines Nd:YAG Lasers regen die Probe im rechten Winkel zum Abfragelicht an. Das Abfragelicht entstammt einer gepulsten Xenon-Lampe, deren Licht durch eine Quarzglaslinse (L) kollimiert und durch eine weitere auf einen Gittermonochromator fokussiert wird. Die durch einen Sekundärelektronenvervielfacher (PMT) detektierten Signale werden dann durch ein Oszilloskop digitalisiert.

### 3.3.4 Globale Datenanalyse

Ein großer Teil der in den zeitaufgelösten Messungen erhaltenen Daten wurde mithilfe einer globalen multiexponentiellen Anpassungsfunktion analysiert.<sup>[129,130]</sup>

Eine multiexponentielle Datenanalyse basiert auf der Annahme, dass sich alle kinetischen Teilschritte im beobachteten Zeitfenster durch einfache Exponentialfunktionen beschreiben lassen. Dies ist immer dann der Fall, wenn die zugrunde liegenden Kinetiken entweder einem Verhalten erster oder pseudo-erster Ordnung folgen. In den Femtosekundenexperimenten werden sehr häufig nur monomolekulare Prozesse, also Prozesse erster Ordnung, beobachtet, da Prozesse zweiter Ordnung unter Diffusionskontrolle und damit in der Regel auf einer langsameren Zeitskala stattfinden.<sup>[131,132]</sup> Zu Abweichungen vom exponentiellen Verhalten kann es in diesem Zeitbereich dennoch kommen. So können kohärente Wellenpaketsbewegungen bei sehr hoher Zeitauflösung ( $\lesssim 100 \text{ fs}$ ) zu zeitlichen Oszillationen der Signalhöhe führen.<sup>[133]</sup> Auch spektrale Verschiebungen durch IVR, VER oder Solvatationsprozesse (vgl. Kapitel 2.1) werden entlang der Zeitachse nicht ideal durch Exponentialfunktionen beschrieben. Die Blitzlichtphotolyse Experimente im Nano- bis Mikrosekundenbereich können grundsätzlich Prozesse zweiter Ordnung ent-

halten. Jedoch werden die Konzentrationen der angeregten Moleküle meist ausreichend gering gehalten, um bezogen auf eventuell in der Lösung vorhandene Reaktionspartner eine Kinetik pseudo-erster Ordnung zu erhalten. Eine multiexponentielle Anpassung ist damit in den meisten Fällen gerechtfertigt. Die Verwendung einer globalen Analyse, das heißt die simultane Analyse eines größeren Spektralbereichs anstatt einzelner Zeitspuren, erhöht die Zahl der berücksichtigten Datenpunkte bei der Anpassung erheblich und trägt so zu einer genaueren Bestimmung der Zeitkonstanten der Exponentialfunktionen bei.

Da die zeitaufgelösten Experimente bei diskreten Detektionswellenlängen und mit diskreten Zeitschritten durchgeführt werden, sind die Daten in einer Matrix  $M_{ij}$  mit  $i$  Wellenlängen und  $j$  Zeitschritten enthalten. Die Anpassung an diese Daten erfolgt mit der Summe einer variablen Zahl  $n$  von Exponentialfunktionen, die mit der Antwortfunktion *IRF* (*instrumental response function*) der Apparatur gefaltet werden (Gleichung 3.12). Diese Faltung ist notwendig, da die Form der beobachteten Zeitverläufe durch die endliche Zeitauflösung des Instruments verzerrt wird. Die Anpassung an die Datenmatrix erfolgt schließlich mit

$$M_{ij} = IRF \otimes \sum_n \Delta A_{ni} e^{-t_j/\tau_n} \quad (3.12)$$

wobei  $\tau_n$  die Zeitkonstante der Exponentialfunktion  $n$  und  $\Delta A_{ni}$  die Amplitude der Exponentialfunktion  $n$  bei der Wellenlänge  $i$  beschreibt.

Während der Anpassung wird mithilfe der am Lehrstuhl von Prof. Dr. W. Zinth (LMU München) erstellten IDL-basierten Software *Z20* alternierend ein Levenberg-Marquardt Algorithmus<sup>[134]</sup> zur Anpassung der Zeitkonstanten  $\tau_n$  und eine lineare Regression der Amplituden  $\Delta A_{ni}$  durchgeführt, bis das Abstandsquadrat zwischen Datenpunkten und Anpassungsfunktion minimiert ist. Die Zahl der Exponentialfunktionen wird in der Regel durch visuelle Inspektion der Daten festgelegt. Grundsätzlich wird je eine zusätzliche Exponentialfunktion mit einer festgesetzten Zeitkonstante von  $10^8$  ps für die Femtosekundendaten und  $10^8$   $\mu$ s für die Blitzlichtphotolysedaten hinzugefügt, um Signale die über das Ende des Messzeitfensters hinaus bestehen bleiben berücksichtigen zu können. Bleiben am Ende des Messzeitfensters keine Signale bestehen, so entsprechen alle Amplituden  $\Delta A_{ni}$  dieser Funktion, abgesehen von Rauschbeiträgen, null.

Die Auftragung aller Amplituden  $\Delta A_{ni}$  einer Exponentialfunktion gegen die Wellenlänge wird als Amplitudenspektrum (DAS für *decay associated spectra*) bezeichnet.

Die DAS geben Aufschluss darüber, ob mit der Zeitkonstante der jeweiligen Exponentialfunktion bei einer bestimmten Wellenlänge Signalanstiege oder -abnahmen stattfinden. Dem Verlauf der einfachen abfallenden Exponentialfunktionen folgend, entsprechen positive Amplituden also Signalabnahmen und negative Signalzunahmen. Die DAS entsprechen also nicht den Spektren einzelner Spezies in der Lösung, sondern beschreiben die Gesamtänderung des Signals, die mit einem bestimmten Exponentialterm einhergeht. Das DAS des Exponentialterms mit der hohen, festgesetzten Zeitkonstante ( $10^8$  ps bzw.  $10^8$   $\mu$ s) wird im folgenden auch als *offset*-Spektrum bezeichnet.

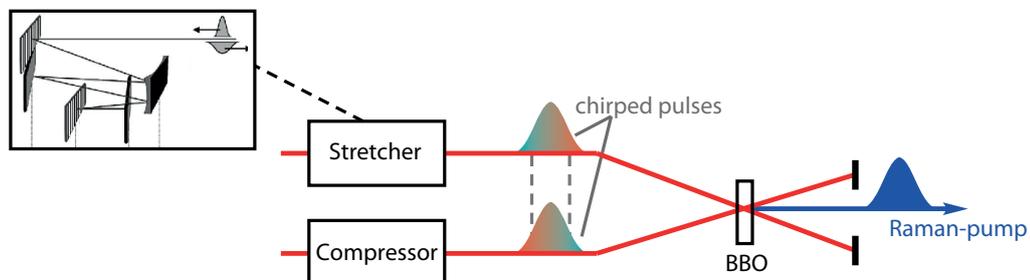
Finden mehrere Prozesse innerhalb des Messzeitfensters statt, so liegt der intrinsische Fehlerbereich der über die globale Anpassung bestimmten Zeitkonstanten auch bei sehr rauscharmen Daten typischerweise bei  $\pm 10$ - $20$  %. Gerade wenn die Zeitkonstanten zweier Prozesse nahe beieinander liegen und die Spektren der beteiligten Spezies überlappen, liegen die Unsicherheiten der ermittelten Zeitkonstanten häufig mit ca.  $\pm 30$ - $40$  % noch höher.<sup>[129,130]</sup>



## 4 Konstruktion eines Raman-pump Zweiges für FSRS Experimente

Die Gruppe von Prof. Dr. Peter Gilch, dem Betreuer dieser Promotion, ist bekannt für den Einsatz von zeitaufgelösten FSRS Experimenten zur Aufklärung von photochemischen Reaktionsmechanismen.<sup>[135,136,137]</sup> Nach dem Umzug der Gruppe von der LMU München an die HHU Düsseldorf sollte die Erzeugung der spektral schmalbandigen Raman-pump Impulse, die für solche Experimente benötigt werden (vgl. Kapitel 3.3.2), über ein neuartiges Prinzip realisiert werden, das den Justageaufwand für FSRS Messungen deutlich reduzieren sollte. Zu Beginn dieser Promotion wurden daher zunächst apparative Arbeiten notwendig.

An der LMU München basierte die Raman-pump Erzeugung auf der Summenfrequenzenerzeugung zweier invers gechirpter fs-Impulse in einem BBO-Kristall (s. Abbildung 4.1).<sup>[111]</sup>



**Abbildung 4.1:** Vereinfachtes Schema der ehemals verwendeten Raman-pump Erzeugung über Summenfrequenzgenerierung aus zwei invers gechirpten Impulsen. Durch den inversen Chirp hat die Summenfrequenz zu jedem Zeitpunkt den gleichen Wert. Der Aufbau des Gitterstreckers<sup>[111]</sup> ist im linken Bereich angedeutet.

Durch den entgegengesetzten Chirp kann die Summenfrequenz der beiden Impulse im Prinzip zu jedem Zeitpunkt den gleichen Betrag haben, sodass spektral sehr schmale Impulse erhalten werden können. Da die gesamten Spektren der Impulse zur Raman-pump Erzeugung beitragen, kann die Konversionseffizienz bei Nutzung dieses Prinzips hohe

Werte erreichen. Werden die beiden fs-Impulse zudem mit einem Winkel zueinander in den BBO-Kristall geleitet, so wird sich der Raman-pump Impuls in der Winkelhalbierenden ausbreiten. Untergrund durch verbleibendes Licht der fs-Impulse kann dann räumlich vollständig abgetrennt werden. Praktisch war es mit dem verwendeten Aufbau allerdings schwierig, ohne hohen Justageaufwand zufriedenstellende Impulseigenschaften zu erhalten. Zum Einbringen des Chirps in die Impulse wurden ein Gitterkompressor und -strecker verwendet, die aufwändig aufeinander abgestimmt werden mussten.

Inzwischen sind viele Möglichkeiten zur Erzeugung von spektral schmalbandigen Raman-pump Impulsen aus Femtosekundenimpulsen bekannt. Diese reichen von einfachem spektralem Filtern<sup>[138]</sup>, was jedoch niedrige Konversionseffizienzen mit sich bringt, zu komplexeren Verfahren wie dem Einsatz von nicht-kollinearen optisch parametrischen Verstärkern<sup>[127,139]</sup>. Eine Methode, die verhältnismäßig hohe Konversionseffizienzen bei niedrigem Justageaufwand verspricht, ist die spektrale Kompression der zweiten Harmonischen (SH-SC für *second-harmonic spectral compression*).<sup>[140,141]</sup> Diese Methode wurde im Zuge dieser Promotion zum Erzeugen der Raman-pump Impulse für FSRS Experimente implementiert.

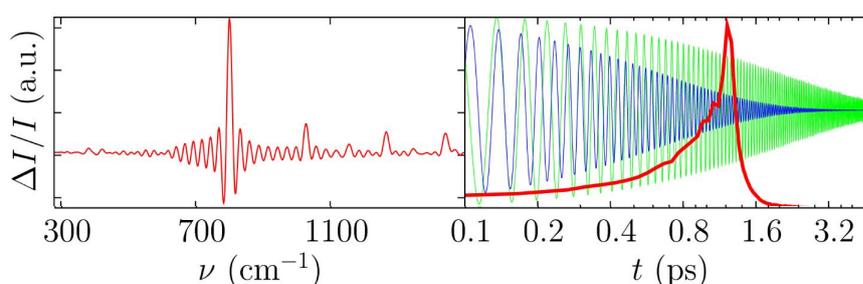
### 4.1 Erzeugung der Raman-pump Impulse

Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, wurde eine Raman-pump Erzeugung basierend auf dem SH-SC Verfahren errichtet, um den vorhandenen Aufbau für fs-UV/Vis Messungen (s. Kapitel 3.3.1) mit wenigen zusätzlichen Modifikationen auch für zeitaufgelöste FSRS Messungen nutzen zu können. SH-SC basiert auf dem simplen Konzept, Impulse aus einem fs-Laser/Verstärker System durch einen verhältnismäßig langen BBO-Kristall zu leiten und die dabei erzeugte zweite Harmonische zu nutzen. Die Verwendung eines langen Kristalls hat dabei drei Effekte:<sup>[140]</sup>

- Die Phasenanpassungsbedingung in einem langen Kristall ist nur für ein schmales Frequenzfenster gegeben, sodass die resultierende zweite Harmonische automatisch spektral schmalbandig wird.<sup>[112]</sup>
- Die Konversionseffizienz für dieses Frequenzfenster steigt mit dem optischen Weg durch den Kristall.

- Die äußeren Spektralbereiche des eingesetzten fs-Impulses können durch Summenfrequenzzeugung ebenfalls zur Erhöhung der resultierenden Impulsenergie beitragen.

Jedoch führt ein weiterer Effekt dazu, dass mit SH-SC allein keine für zeitaufgelöste FSRS Experimente brauchbaren Impulse erhalten werden können. Das zeitliche Profil der SH-SC Impulse wird bei den benötigten Impulsenergien stark asymmetrisch.<sup>[140]</sup> Dadurch dass bereits in den ersten Millimetern des Kristalls ein Teil der Fundamentalen konvertiert wird, steht zu Beginn mehr Impulsenergie für den SH-SC Prozess zur Verfügung als in den hinteren Bereichen des Kristalls.<sup>[141]</sup> Im Experiment erhält man somit SH-SC Impulse, deren Intensität relativ zum Raman-probe Impuls zunächst etwa quadratisch mit der Zeit ansteigt und darauf scharf abfällt (s. Abbildung 4.2, rechts). Der scharfe Abfall der Impulsenergie führt in den FSRS Spektren zu Artefakten in Form von Oszillationen um die Resonanzfrequenzen der Probenmoleküle. Dieser Effekt hängt mit der Fourierbeziehung zwischen Zeit- und Frequenzprofil zusammen. Das spektrale Profil einer Raman Bande kann als die Fouriertransformierte des Produktes der zeitlichen Amplitude des Raman-pump Impulses und der jeweiligen molekularen Schwingungsamplitude gesehen werden.<sup>[141]</sup> Endet der Raman-pump Impuls also abrupt innerhalb der Dephasierungszeit der molekularen Schwingung, erhält man die charakteristischen Oszillationen im Spektrum.

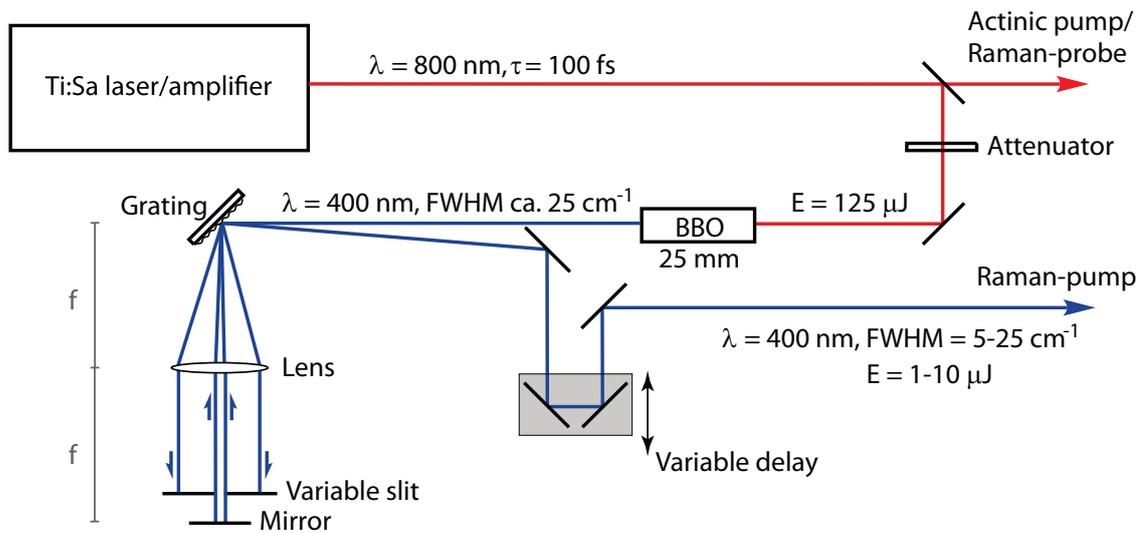


**Abbildung 4.2:** Links: Oszillationen im FSRS Spektrum von Cyclohexan. Rechts: Zeitliches Profil des Raman-pump Impulses (hier 520 nm), mit dem das Cyclohexanspektrum aufgenommen wurde (rot). Der scharfe Abfall der Impulsintensität innerhalb der Dephasierungszeit der 802  $\text{cm}^{-1}$  (grün) und 1027  $\text{cm}^{-1}$  (blau) Schwingungen von Cyclohexan verursacht die Oszillationsartefakte im Spektrum. Adaptiert von Pontecorvo et al.<sup>[141]</sup>

Um dem entgegenzuwirken, kann die SH-SC Methode mit anschließendem spektralen Filtern kombiniert werden.<sup>[141]</sup> Dies ermöglicht zusätzlich die Kontrolle der spektralen

Breite der Raman-pump Impulse, welche auf Kosten der Impulsenergie prinzipiell beliebig niedrig gewählt werden kann. Die asymmetrische zeitliche Form der SH-SC Impulse drückt sich im Spektrum der Impulse in Form von spektralen Flanken um die Frequenz der zweiten Harmonischen aus. Filtert man diese Flanken heraus, erhält man zeitlich symmetrische, annähernd Gauß-förmige Impulse, die sich sehr gut für FSRS Experimente eignen (vgl. Kapitel 4.2, Abbildung 4.4).

Die apparative Umsetzung dieses Konzepts (Abbildung 4.3) erfolgt hier mit einem 25 mm langen BBO-Kristall (Typ I,  $\theta = 29,2^\circ$ , Maße  $5 \times 5 \times 25 \text{ mm}^3$ ). Die Fundamentale des Laser/Verstärker-Systems (800 nm, ca. 100 fs) wird ohne vorherige Frequenzkonversion für den SH-SC Prozess verwendet. Der sichtbare Durchmesser der Lasermode wird vor Eintritt in den Kristall mithilfe eines Teleskops auf knapp unter 5 mm reduziert. Die Eintrittsleistung in den Kristall kann über eine Kombination aus  $\lambda/2$ -Platte und Drahtgitterpolarisator abgeschwächt werden. Über einen dichroitischen Spiegel (*Laser Komponenten*, HR400,  $45^\circ$ ) werden die Impulse die den Kristall verlassen durch einen gefalteten  $4f$ -Filter<sup>[139]</sup> ( $4f$  für vierfaches Durchlaufen der Linsenbrennweite  $f$ , Gesamtweglänge  $2 \times 500 \text{ mm}$ ) geleitet. Dieser besteht aus einem Reflektionsgitter (*Newport*, holographisch, 3600 l/mm, 300 nm Blaze), das in 1. Beugungsordnung verwendet wird, einer zylindrischen Linse ( $f = 250 \text{ mm}$ ), die das gebeugte Licht kollimiert, einem variablen Schlitz (*Thorlabs*, VA100/M), mit dem der gewünschte spektrale Ausschnitt selektiert wird und einem Endspiegel (coated Al), der das Licht mit einem kleinen Höhenversatz reflektiert. Der leichte Höhenversatz wird genutzt um das Licht, das den  $4f$ -Aufbau durchlaufen hat, räumlich vom eintretenden Licht zu trennen. Die gefilterten Impulse werden dann über insgesamt fünf weitere dichroitische Spiegel (*Laser Komponenten*, HR400,  $45^\circ$ ) zur Probe geleitet und mit einer Quarzglaslinse ( $f = 200 \text{ mm}$ ) auf die Probe fokussiert (Strahldurchmesser am Probenort ca.  $50 \mu\text{m}$  (FWHM)). Zwei der dichroitischen Spiegel befinden sich auf einem manuell einstellbaren Verschiebetisch, um den zeitlichen Überlapp zwischen Raman-pump und -probe Impulsen einstellen zu können.



**Abbildung 4.3:** Vereinfachter schematischer Aufbau des Raman-pump Zweiges für FSRS Experimente. Exemplarisch ist ein typischer Wertesatz für Impulsenergien und -breiten angegeben.

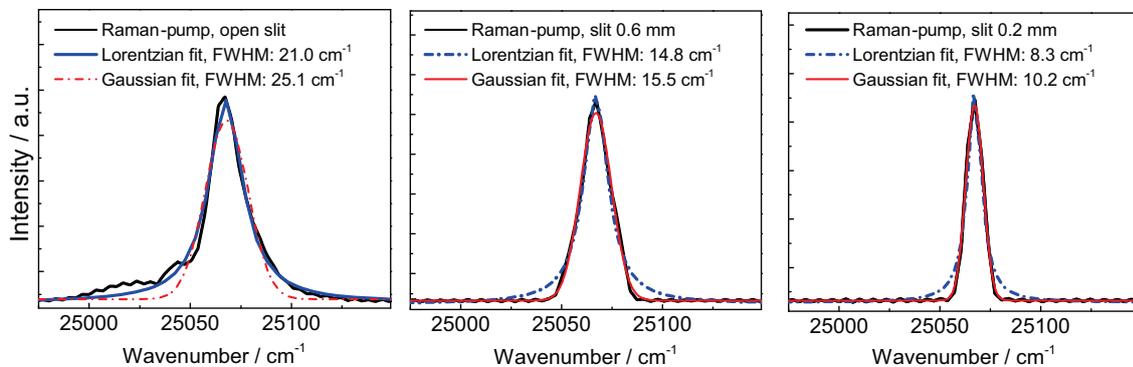
## 4.2 Charakterisierung der Raman-pump Impulse

Die spektrale Form der erhaltenen Raman-pump Impulse kann je nach Justage deutlich variieren. Da nur ein schmaler Frequenzbereich der Fundamentalen konvertiert wird, kann schon durch den Einfallswinkel in den BBO-Kristall die Zentralwellenlänge der SH-SC Impulse im Rahmen von ca. 399-402 nm variiert werden. Im Anschluss kann dann wiederum ein spektraler Bereich von etwa  $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$  über den variablen Schlitz des  $4f$ -Filters ausgewählt werden. Diese leichte Durchstimmbarkeit der Impulse kann prinzipiell dazu genutzt werden, die Raman-pump Frequenz in einem Experiment zu variieren, um so Untergrundbeiträge mit konstantem Pixelmuster besser von relevanten Signalen unterscheiden zu können.<sup>[138,142,143]</sup> Bei der Justage in den Kristall ist darauf zu achten, dass durch geeigneten Einfallswinkel und geeignete Impulsenergie möglichst keine Superfluoreszenz<sup>[144]</sup> entsteht (hellblaue ringförmige Emission), da diese die SH-SC Konversionseffizienz negativ beeinflusst.

Ohne spektrales Filtern, das heißt bei offenem Schlitz im  $4f$ -Aufbau, erhält man Impulse mit einer spektralen Breite von mehr als  $20 \text{ cm}^{-1}$  (s. Abbildung 4.4, links). Da die Raman Banden auch bei kurzlebigen Intermediaten typischerweise spektral schmaler

sind (ca.  $10\text{-}15\text{ cm}^{-1}$ ),<sup>[125]</sup> ist eine spektrale Einengung der Impulse auch unabhängig von den im vorigen Abschnitt beschriebenen Artefakten sinnvoll. Das ungünstige zeitliche Profil wirkt sich wie im letzten Abschnitt beschrieben auch auf die spektrale Form aus. Bei geöffnetem Schlitz besitzt das Raman-pump Spektrum in guter Näherung ein Lorentz-förmiges Profil. Filtert man die spektralen Flanken heraus, so werden die spektralen Profile Gauß-förmig (Abbildung 4.4, Mitte & rechts). Ihre volle Halbwertsbreite lässt sich über die Öffnung des variablen Schlitzes gut einstellen.

Über die lineare Dispersion<sup>[117]</sup> des Filteraufbaus von ca.  $0,64\text{ nm/mm}$  können die theoretisch erwarteten spektralen Breiten der Impulse grob abgeschätzt werden, wenn man – stark vereinfacht – ein kastenförmiges Spektrum annimmt. Unter der Annahme, dass die eingehenden Impulse spektral um ein vielfaches breiter sind als die spektrale Breite nach dem Filtern, würde man für  $0,6\text{ mm}$  Schlitzbreite eine resultierende spektrale Breite von ca.  $23\text{ cm}^{-1}$  und für  $0,2\text{ mm}$  Schlitzbreite von ca.  $8\text{ cm}^{-1}$  erwarten. Da die realen Impulse schon vor dem Filtern verhältnismäßig schmal und Gauß-förmig sind, erhält man jedoch Gauß- statt kastenförmige Spektren, deren Halbwertsbreiten etwas unter den abgeschätzten spektralen Breiten liegen. Angesichts dieser Tatsache stimmen die gemessenen spektralen Breiten gut mit den Erwartungswerten überein.



**Abbildung 4.4:** Beispielhafte Spektren der über SH-SC erzeugten Raman-pump Impulse (schwarz) ohne (links) und mit spektraler Filterung (Mitte & rechts). Die Anpassungen an die Daten zeigen, dass die Impulse ohne Filterung Lorentz- (blau) und mit Filterung Gauß-förmig (rot) sind.

Die Konversionseffizienz des SH-SC Prozesses bezogen auf die Lichtleistung (Verhältnis aus Lichtleistung des  $400\text{ nm}$  Lichts nach und des  $800\text{ nm}$  Lichts vor dem BBO-Kristall) beträgt ca.  $42\%$ . Beispielhaft sind in Tabelle 4.1 typische Impulsparameter mit verschieden starker spektraler Filterung angegeben. Die Daten zeigen, dass selbst bei

spektral stark eingeeengten Impulsen (bis zu ca.  $7 \text{ cm}^{-1}$ ) eine Impulsenergie im Bereich von  $1 \mu\text{J}$  erhalten wird, was in der Regel für zeitaufgelöste FSRS Messungen ausreicht.

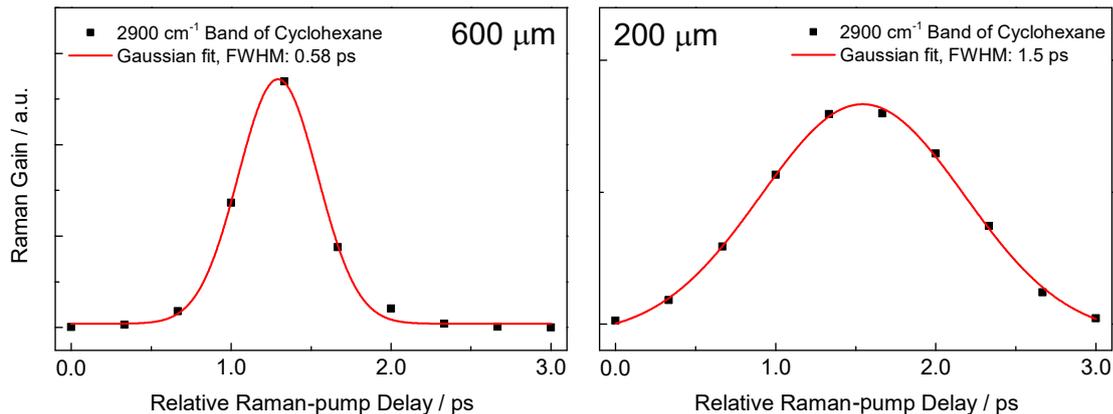
**Tabelle 4.1:** Raman-pump Impulsparameter bei verschiedenen Breiten des variablen Schlitzes im  $4f$ -Aufbau. Die Lichtleistung am Probenort sowie die über die Anpassung einer Gauß-Funktion bestimmte spektrale Breite der Impulse sind angegeben.

Schlitzbreite / mm	Lichtleistung / mW	Spektrale Breite / $\text{cm}^{-1}$ (aus Gauß-Fit, FWHM)
offen	6,1	25,1
0,6	4,0	15,5
0,4	2,7	12,2
0,2	1,8	10,2
0,1	0,9	6,8

Das zeitliche Profil der Raman-pump Impulse kann indirekt anhand der gemessenen Raman Intensitäten einer Probe durch eine Art Kreuzkorrelationsexperiment<sup>[118]</sup> mit dem Raman-probe Impuls bestimmt werden. Dazu wird der Raman-pump Impuls relativ zum Raman-probe Impuls schrittweise über die variable Verzögerungsstrecke (s. Abbildung 4.3) verschoben. Bei jedem Schritt wird dann die Intensität des FSRS Signals der Probe bestimmt. Da die Impulsdauer des Raman-probe Impulses (ca.  $100 \text{ fs}$ ) deutlich geringer ist als die der spektral eingeeengten Raman-pump Impulse, erhält man so ein zeitliches Intensitätsprofil, das in guter Näherung proportional zur Energie des Raman-pump Impulses ist. Durch das idealerweise konstante Zeit-Bandbreite-Produkt<sup>[112]</sup> erwartet man, dass die Impulse länger werden, je stärker sie spektral eingeeengt sind. Zusätzlich zu dem Effekt, dass sich die Impulsenergie durch das Herausfiltern von spektralen Bestandteilen verringert, wird also auch die Energie pro Zeitintervall abgesenkt. Beide Faktoren senken die resultierende Intensität von FSRS Signalen, sodass ein Kompromiss zwischen spektraler Einengung und Signalintensität gefunden werden muss.

Exemplarisch sind in Abbildung 4.5 die Kreuzkorrelationsverläufe für zwei Filtereinstellungen (Schlitzbreiten  $0,6 \text{ mm}$  und  $0,2 \text{ mm}$ ) gezeigt. In diesem Fall wurde die Intensität des FSRS Signals der Doppelbande von Cyclohexan um ca.  $2900 \text{ cm}^{-1}$  verfolgt. Bei einer Schlitzbreite von  $0,2 \text{ mm}$  wurde eine spektrale Breite von  $10,2 \text{ cm}^{-1}$  (FWHM) bestimmt (vgl. Tabelle 4.1). Über das Zeit-Bandbreite-Produkt von  $0,441$  für Gauß-förmige Impulse<sup>[112]</sup> erwartet man bei diesem Spektrum eine zeitliche Halbwertsbreite von  $1,44 \text{ ps}$

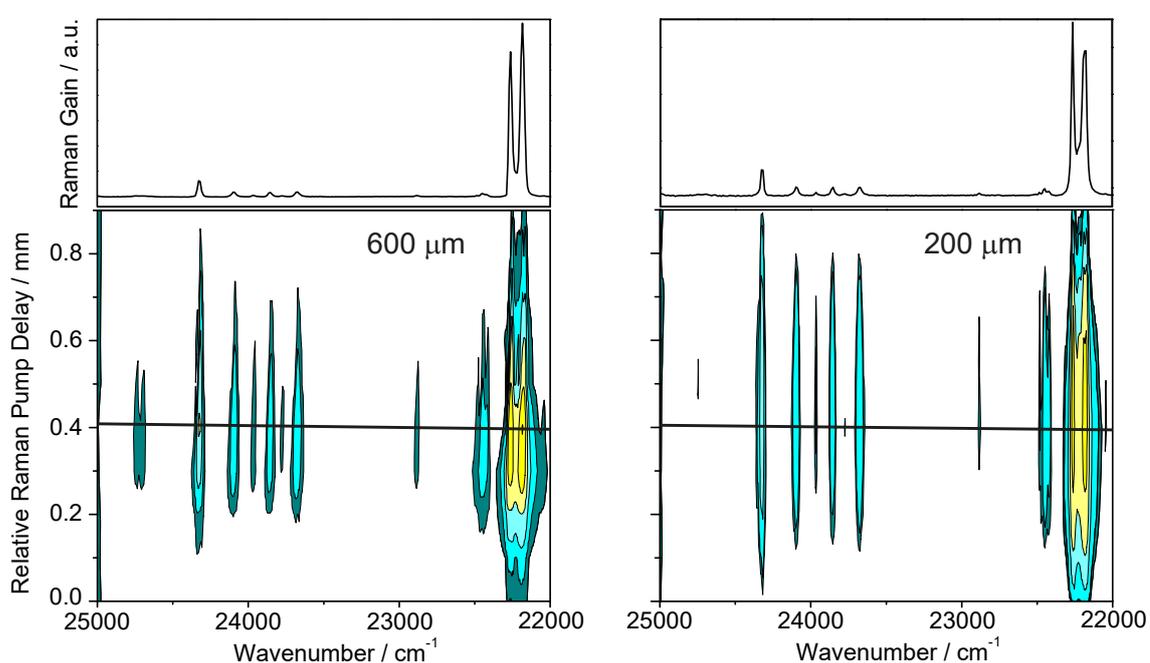
(FWHM). Das Ergebnis der Kreuzkorrelation von 1,5 ps stimmt damit nahezu ideal überein. Die Kreuzkorrelation für eine Schlitzbreite von 0,6 mm liefert eine Impulsdauer von ca. 0,6 ps. Diese Dauer liegt etwas unterhalb des durch das Zeit-Bandbreite Produkt gegebenen theoretischen Limits von 0,95 ps (bei einer Breite von  $15,5 \text{ cm}^{-1}$ ), was vermutlich auf Messungenauigkeiten zurückzuführen ist.



**Abbildung 4.5:** Kreuzkorrelationen der SH-SC Raman-pump Impulse mit dem Ramanprobe Impuls. Die relative Amplitude der Kreuzkorrelation wurde jeweils über das spektrale Integral der Raman Banden von Cyclohexan um  $2900 \text{ cm}^{-1}$  bei verschiedenen Ankunftszeiten des Raman-pump Impulses bestimmt. Bei einer Schlitzbreite von 0,6 mm (links) liefert die Anpassung einer Gauß-Funktion (rot) eine Impulsdauer von 0,58 ps, bei 0,2 mm (rechts) erhält man 1,5 ps.

Die Ergebnisse der Kreuzkorrelationen zeigen, dass die Raman-pump Impulse am Probenort eine in etwa bandbreitenlimitierte Impulsdauer, also keinen nennenswerten Chirp, besitzen. Durch die geringe spektrale Breite der *gefilterten* SH-SC Impulse wird bei ihnen ohnehin kein nennenswerter Chirp erwartet. Bei den Raman-probe Impulsen, die einen wesentlich breiteren Spektralbereich abdecken müssen, muss dies jedoch noch überprüft werden. Bei einer Raman-pump Wellenlänge von 400 nm und Raman Verschiebungen der Schwingungsbanden von bis zu  $\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ , müssen die Raman-probe Impulse den Wellenlängenbereich von 400 nm bis ca. 465 nm abdecken. Sollte in diesem Bereich ein nennenswerter Chirp vorliegen, so können die relativen Signalhöhen der Raman Banden von nieder- und hochfrequenten Schwingungen verfälscht werden. Zur Bestimmung des Chirps des Raman-probe Impulses in diesem Spektralbereich, wurden vollständige FSRS Spektren von Cyclohexan als Funktion der relativen Verzögerung zwischen Raman-pump und -probe Impuls aufgenommen (Abbildung 4.6). Die Steigung einer Geraden, die durch

die Intensitätsmaxima der Raman Signale gelegt wird, erlaubt dann eine Abschätzung des Chirps. In zwei unabhängigen Experimenten (Raman-pump Impulse bei Schlitzbreiten von 0,6 mm und 0,2 mm) liegen die Maxima der Banden über den gesamten Bereich des Raman Spektrums jeweils weniger als 50 fs auseinander. Der Chirp des Raman-probe Impulses ist bei Berücksichtigung der sehr viel höheren Impulsdauern der Raman-pump Impulse also vernachlässigbar klein. Gute Übereinstimmungen zwischen gemessenen und Literaturspektren<sup>[145]</sup> von Cyclohexan und Benzonitril (hier nicht gezeigt) bestätigen diese Beobachtung.



**Abbildung 4.6:** Konturdarstellungen der FSRS Spektren von Cyclohexan in Abhängigkeit der relativen Verzögerungsstrecke zwischen Raman-pump (Schlitzbreiten 0,6 mm (links) und 0,2 mm (rechts)) und -probe Impuls. Gelbe Farbtöne deuten hohe und blaugrüne niedrige Signale an. Bei der relativen Strecke von 0 mm trifft der Raman-probe Impuls zuerst auf die Probe, bei großen Werten erreichen die Raman-pump Impulse zuerst die Probe. Die schwarzen Linien verlaufen durch die Intensitätsmaxima der Raman Banden. Oberhalb der Konturdarstellungen sind jeweils die FSRS Spektren bei 0,4 mm relativer Verschiebung gezeigt. Über den gesamten Spektralbereich lassen sich in beiden Fällen Verschiebungen der Maxima von maximal 50 fs errechnen.

Die spektral gefilterten SH-SC Impulse wurden im Rahmen dieser Promotion zusätzlich zu den Messungen an Psoralenen (s. Kapitel 5.3.2) auch in einem weiteren Projekt erfolg-

#### 4 Konstruktion eines Raman-pump Zweiges für FSRS Experimente

---

reich für zeitaufgelöste FSRS Messungen eingesetzt. Als Erweiterung vorangegangener Studien der Gilch-Arbeitsgruppe zur Photochemie *ortho*-substituierter Nitrobenzolderivate<sup>[135,146,147,148]</sup> wurde in diesem Projekt ein intramolekularer Wasserstofftransfer in *o*-Acetylbenzaldehyd auf der Pikosekundenzeitskala nachgewiesen. Aus diesem Nebenprojekt entstanden zwei Publikationen.<sup>[60,137]</sup>

# 5 Photochemie und -physik von DNA-interkalierten Psoralenen

## 5.1 Auswahl und Charakterisierung der Probenmoleküle

Wie in der Einleitung angedeutet, weisen die verschiedenen Psoralenderivate deutlich unterschiedliche Eigenschaften im Hinblick auf ihre Interkalationsaffinität, Reaktionsquantenausbeuten und weitere Parameter auf. Die Auswahl geeigneter Psoralenderivate für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen war daher entscheidend für den Erfolg des Projekts. Zusätzlich spielen die Sequenzen der DNA-Moleküle eine wichtige Rolle. Über den gezielten Einbau von AT-Basenpaaren lässt sich beispielsweise die maximale Ausbeute der gebildeten Mono- und/oder Diaddukte beeinflussen. In diesem Kapitel wird beschrieben, nach welchen Kriterien die eingesetzten Probenmoleküle ausgewählt wurden. Zusätzlich werden jeweils die wichtigsten spektroskopischen Eigenschaften zusammengefasst.

### 5.1.1 Geeignete Psoralene

Mehrere Eigenschaften entscheiden über die Eignung eines Psoralenderivats für die hier durchgeführten Experimente im Femtosekundenbereich. Zunächst sollen nun die Ansprüche an ein „ideales“ Derivat zusammengefasst werden.

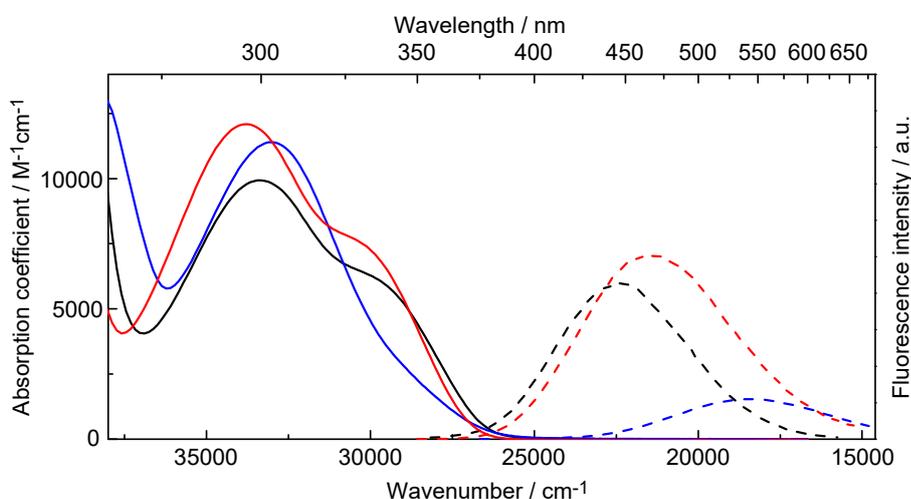
Während die Messbedingungen wie Schichtdicke und Konzentration in der stationären Spektroskopie recht flexibel sind, gelten für die Experimente mit Femtosekundenauflösung größere Einschränkungen. Da die Signale in Femtosekundenmessungen meist erheblich kleiner sind als im stationären Bereich, müssen die eingesetzten Psoralenderivate in möglichst hohen Konzentrationen einsetzbar sein. Als Lösungsmittel kommt im Zusammenhang mit DNA nur Wasser in Frage, daher sollte ein ideales Psoralen über eine hohe Wasserlöslichkeit verfügen. Desweiteren ist eine hohe Interkalationsaffinität nötig,

um in Mischungen mit DNA einen möglichst hohen Anteil an interkalierten Psoralenen zu erhalten. Die interkalierten Moleküle sollten dann eine starke Absorption im Wellenlängenbereich über etwa 320 nm aufweisen, um sie in den Mischungen möglichst selektiv anregen zu können. Zur Untersuchung des Mechanismus der Photoaddition an die DNA ist zudem eine möglichst hohe Reaktionsquantenausbeute  $\Phi_R$  gefordert. Dabei sollten im Idealfall deutliche spektrale Änderungen auftreten, um die Reaktion in den zeitaufgelösten Experimenten verfolgen zu können.

Einige der genannten Eigenschaften lassen sich bereits über eine Literaturrecherche beurteilen. Jedoch sind die Literaturangaben für die meisten Psoralene unvollständig, sodass in fast jedem Fall zusätzlich eigene Messungen notwendig werden. Dennoch kristallisierte sich zu Beginn der Arbeit ein Derivat heraus, dessen Eignung die der meisten bekannten Derivate deutlich übertrifft. Hierbei handelt es sich um 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen (AMT). Seine herausragende Wasserlöslichkeit und Interkalationsaffinität wurden bereits 1977 beschrieben.<sup>[149]</sup> Erstere übertrifft mit  $3,4 \cdot 10^{-2}$  M die der meisten Psoralene um etwa zwei Größenordnungen, was durch die Aminomethylsubstitution erklärt werden kann. Unter physiologischen Bedingungen (pH um 7,2 – 7,4)<sup>[2]</sup> liegt AMT in seiner Ammoniumform vor. Dies ist nicht nur vorteilhaft für seine Wasserlöslichkeit, sondern trägt sicher auch entscheidend zu seiner Interkalationsaffinität bei. Durch Coulombwechselwirkungen zwischen der Ammoniumgruppe und dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA wird die Anlagerung von AMT an die DNA deutlich erleichtert. Bezogen auf die Konzentration der DNA Basenpaare beträgt die Dissoziationskonstante  $K_D$  für die Interkalation in Kalbsthymus-DNA laut Literatur  $6,6 \cdot 10^{-6}$  M.<sup>[149]</sup> Sie ist damit ebenfalls um mehrere Größenordnungen günstiger – also niedriger – als für viele andere Derivate.<sup>[42]</sup> Aus diesen Gründen wurde AMT für die meisten Experimente in dieser Arbeit verwendet. Ein ideales Molekül zur Untersuchung des Additionsmechanismus stellt jedoch auch AMT nicht dar. Zum einen zählt AMT nicht zu den Derivaten, die tatsächlich für medizinische Anwendungen wie die PUVA-Therapie eingesetzt werden. Zum anderen liegt  $\Phi_R$  für die Photoaddition von AMT an Kalbsthymus-DNA bei lediglich 0,022 und damit im üblichen Bereich für Psoralene (0,002 – 0,084)<sup>[42]</sup>, was den Nachweis der Adduktbildung in den zeitaufgelösten Messungen schwierig macht.  $\Phi_R$  lässt sich jedoch, wie im folgenden Kapitel beschrieben, durch den Einsatz maßgeschneiderter DNA Sequenzen etwas steigern.

Da AMT in vielerlei Hinsicht einen Sonderfall unter den Psoralenen darstellt, wur-

den in dieser Arbeit auch Derivate verwendet, die über weniger günstige Eigenschaften verfügen. So wurde gezeigt, dass sich das photochemische und -physikalische Verhalten von interkaliertem AMT im Wesentlichen mit dem anderer Psoralene deckt. Für diese Untersuchungen wurde die Stammverbindung Psoralen (PSO) selbst, sowie das häufig in der PUVA-Therapie applizierte 8-Methoxypsoralen (8MOP) ausgewählt. Bezogen auf Kalbsthymus-DNA finden sich für diese Moleküle in der Literatur  $K_D$ -Werte von  $4 \cdot 10^{-3}$  M und  $1,3 \cdot 10^{-3}$  M sowie Reaktionsquantenausbeuten von 0,03 und 0,013 bei moderaten Wasserlöslichkeiten von rund  $2 \cdot 10^{-4}$  M.<sup>[42]</sup> Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren aller drei Moleküle in wässriger Lösung sind in Abbildung 5.1 dargestellt. Dort ist zu erkennen, dass die Methoxysubstitution zu einer deutlichen Abschwächung der  $S_1$ -Absorption (jeweils langwellige Schultern um 340 nm) und einer bathochromen Verschiebung der Fluoreszenzemission führt. Die Spektren von AMT und PSO ähneln sich jedoch stark. Aus dem Schnittpunkt der Absorptions- und Fluoreszenzspektren lässt sich jeweils nach geeigneter Auftragung die 0,0-Übergangsenergie  $E_{00}$  abschätzen (siehe Kapitel 5.2, Tabelle 5.1). Hierzu wurden die Spektren zunächst auf eine Energieachse überführt und auf intrinsische Frequenzabhängigkeiten korrigiert.<sup>[72]</sup>

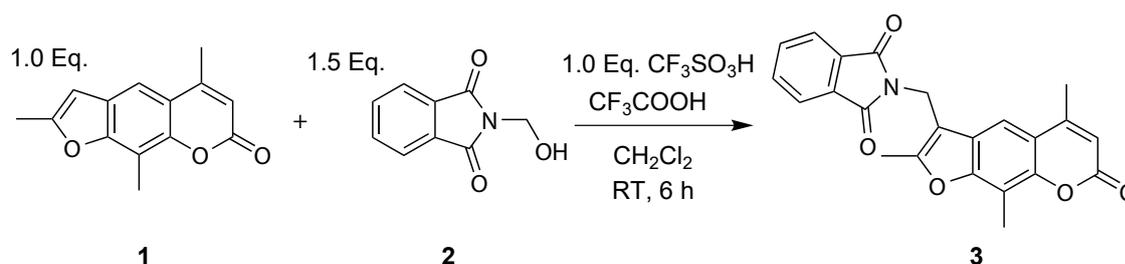


**Abbildung 5.1:** Absorptions- und Fluoreszenzspektren (durchgezogene und gestrichelte Linien) der Psoralene AMT (schwarz), PSO (rot) und 8MOP (blau) in wässriger Lösung. Die Fluoreszenzspektren wurden zur Umzeichnung auf die Wellenzahlachse mit dem Quadrat der Wellenlänge multipliziert<sup>[72]</sup> und auf die Höhe der jeweiligen  $S_1$ -Absorptionsbanden der Psoralene (Schultern im langwelligen Bereich) skaliert. Ihre Höhe repräsentiert daher *nicht* das Verhältnis der Fluoreszenzquantenausbeuten (siehe dafür Tabelle 5.1).

### 5.1.1.1 Synthese von 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen (AMT)

AMT war zu Beginn dieser Arbeit kommerziell nicht verfügbar, beziehungsweise in den benötigten Mengen nicht erschwinglich. Daher wurde es mithilfe einer modifizierten Gabriel-Synthese mit anschließender Hydrazinolyse aus 4,5',8-Trimethylpsoralen hergestellt. Der hier beschriebene Reaktionsansatz lieferte insgesamt ca. 700 mg AMT als Hydrochlorid.

In einem ersten Schritt wurde wie in der Literatur beschrieben<sup>[150]</sup> 4'-*N*-Phthalimidomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen **3** dargestellt (Schema 1).<sup>1</sup> Dazu wurden 1920 mg (8,4 mmol) 4,5',8-Trimethylpsoralen **1** mit 2230 mg (12,6 mmol) *N*-Hydroxymethylphthalimid **2** in 40 ml Dichlormethan suspendiert. Unter Kühlen mit einem Eisbad wurde über 15 min eine Lösung aus 0,75 ml (8,4 mmol) Trifluormethansulfonsäure<sup>2</sup> in 11 ml Trifluoressigsäure zugetropft. Anschließendes Rühren für 6 h bei Raumtemperatur ergab eine klare orangefarbene Lösung. Dünnschichtchromatographie mit Hexan:Essigester (1:1) eignet sich hier zur Umsatzkontrolle (kieselgelbeschichtete Aluminiumplatten, Merck KGaA, 60, F254). Nach Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde das Produkt ebenfalls bei vermindertem Druck über Nacht über Kaliumhydroxidplättchen im Exsikkator getrocknet um verbliebene flüchtige Säureanteile zu entfernen. Nach Lösen in 100 ml Chloroform und dreifachem Waschen mit je ca. 40 ml Wasser wurde die organische Phase mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel bei reduziertem Druck vom nun gelben Feststoff entfernt.



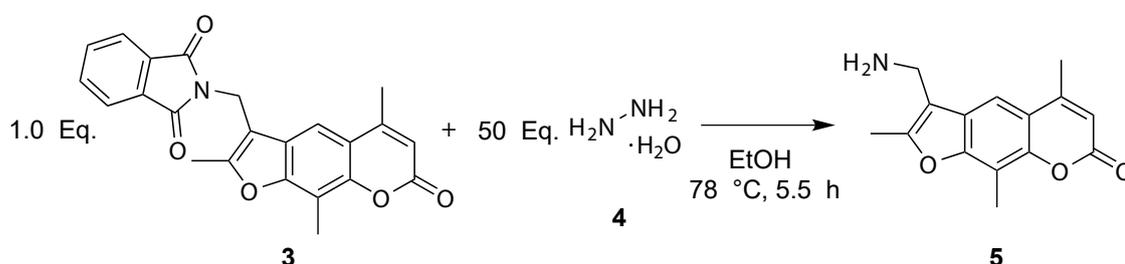
**Schema 1:** Darstellung von 4'-*N*-Phthalimidomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen **3**.

Der gesamte Feststoff wurde dann ohne weitere Aufreinigung zusammen mit 17,5 ml einer 80 prozentigen wässrigen Hydrazinhydrat Lösung **4** in 300 ml Ethanol gelöst und für

<sup>1</sup>In den Schemata steht Eq. für Äquivalente (engl.: *equivalents*).

<sup>2</sup>Trifluormethansulfonsäure zählt zu den Supersäuren (pK<sub>S</sub> ≈ -14).

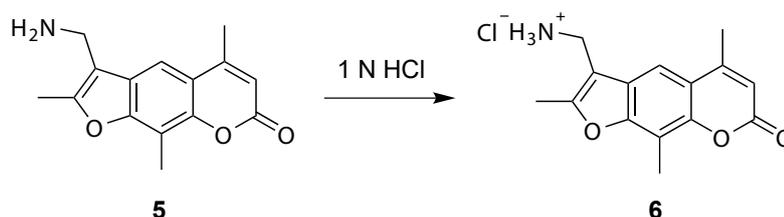
5,5 h zum Rückfluss erhitzt (Schema 2). Dünnschichtchromatographie mit reinem Diethylether zeigte nach dieser Zeit vollständigen Umsatz von **3** an. Die Hitzezufuhr wurde daraufhin abgeschaltet und das Gemisch weiter gerührt. Beim Abkühlen auf Raumtemperatur fiel über Nacht eine große Menge gelber Feststoff aus. Am Folgetag wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der Feststoff in 300 ml wässriger Kaliumhydroxid-Lösung (0,1 N) suspendiert. 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen **5** wurde dann in mehreren Schritten mit insgesamt etwa 500 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, zur Aufreinigung mit ca. 100 ml gesättigter, kühler Natriumchloridlösung gewaschen und anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert bevor das Lösemittel erneut unter reduziertem Druck entfernt wurde.



**Schema 2:** Hydrazinolysen von **3** ergibt 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen **5**.

Im Zuge einer Umsatzkontrolle durch Dünnschichtchromatographie wurde eine komfortable Möglichkeit zur Aufreinigung von **5** gefunden. Die Hauptverunreinigung an diesem Punkt der Synthese stellte sich als nicht umgesetztes **1** heraus. Da dieses sehr unpolar ist, ließ es sich zusammen mit einer kleineren Verunreinigung säulenchromatographisch durch Einsatz von Ethylacetat als Laufmittel „ausspülen“, wobei **5** am Anfang der Chromatographiesäule (Kieselgel 60 M) verblieb.<sup>3</sup> Nach dem Entfernen der Verunreinigungen wurde das Laufmittel auf Aceton geändert, um **5** zu eluieren. Das Lösemittel wurde dann unter vermindertem Druck entfernt.

<sup>3</sup>**1** fluoresziert unter UV-Licht blau, die kleinere Verunreinigung gelb. Das gewünschte Produkt **5** fluoresziert unter UV-Einstrahlung ebenfalls blau.



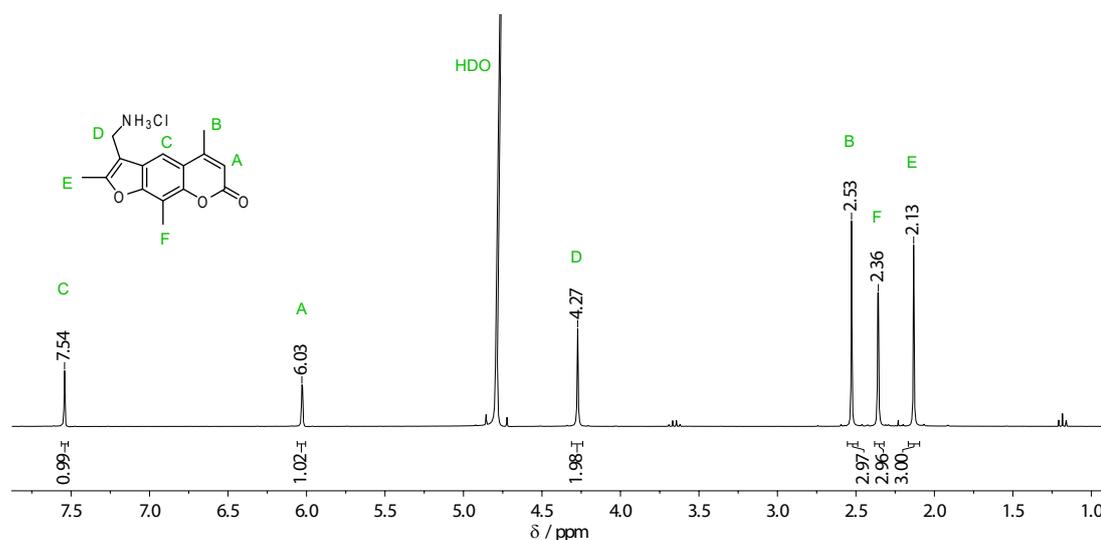
**Schema 3:** Darstellung des HCl-Salzes **6** von AMT.

Nach diesem Reinigungsschritt wurde **5** in einem letzten Schritt analog zu einer Beschreibung in der Literatur<sup>[149]</sup> zu seinem Hydrochlorid **6** umgesetzt.<sup>4</sup> **5** wurde dazu in 300 ml 1 N Salzsäure gelöst und in mehreren Schritten mit insgesamt ca. 150 ml Chloroform gewaschen. Im Anschluss wurde das Lösemittel der wässrigen Phase unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Feststoff in ca. 300 ml Ethanol gelöst.<sup>5</sup> Diese Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Diethylether überschichtet, wobei ein Feststoff ausfiel. Das Gemisch wurde für 24 h bei ca. 6 °C gelagert, bevor der leicht gelbliche Feststoff abgenutscht und mit ca. 70 ml eisgekühltem Diethylether gewaschen wurde.

Es wurden 690 mg (2,3 mmol) **6** erhalten, was bezogen auf den Einsatz von **1** einer Gesamtausbeute von etwa 27 % entspricht. In Absorptions- und Fluoreszenzspektren sind nach diesen letzten Schritten keinerlei Verunreinigungen mehr zu erkennen. Ein ESI-(+)MS-Spektrum (*Bruker Daltonics*, UHR-QTOF maXis 4G) zeigt ein Signal bei der Masse von **6** ohne Chloridgegenion ( $m/z = 258,1$ ) und ein intensiveres bei  $m/z = 241,1$ , das von einem protonierten Fragment von **6** nach Verlust der  $\text{NH}_3^+$ -Gruppe stammt. Ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum in  $\text{D}_2\text{O}$  (Abbildung 5.2) zeigt alle erwarteten Signale. Die Protonen des Ammoniumsubstituenten liefern, wie für protische Lösungsmittel erwartet, wegen eines schnellen Austauschgleichgewichts mit Solvensdeuteronen keine Signale. Um 1,2 ppm und 3,7 ppm sind niedrige Signale durch verbleibende Ethanolreste zu erkennen (entspricht nach Integralen ca. 0,6 Gew.-%).

<sup>4</sup>Dadurch lässt es sich schneller in wässrigen Systemen lösen und letzte Verunreinigungen werden entfernt.

<sup>5</sup>Der Lösungsvorgang erwies sich als äußerst langsam, sodass zunächst ca. 1 l Ethanol zugegeben wurde, bevor nach vollständigem Lösen wieder auf ca. 300 ml eingengt werden konnte.



**Abbildung 5.2:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **6** in  $\text{D}_2\text{O}$  (aufgenommen an einem Avance III-300 von *Bruker*, 300 MHz). Über den Signalen ist ihre chemische Verschiebung in ppm, unter ihnen ihr relatives Integral angegeben.

### 5.1.2 Geeignete DNA-Proben

Wie zuvor angedeutet muss auch die Auswahl der DNA-Proben, die mit den Psoralenen eingesetzt werden, wohlüberlegt sein. Eine der ersten Fragen, die sich stellt, ist die, ob natürliche oder synthetische DNA-Stränge verwendet werden sollten. Beide sind heutzutage kommerziell erhältlich. Natürliche DNA, die zum Beispiel häufig aus Kalbsthymus extrahiert wird, ist kostengünstiger, hat aber gegenüber synthetischen Strängen mehrere Nachteile. Zum ersten werden bei der Extraktion nicht alle übrigen Zellbestandteile vollständig entfernt. So verbleibt auch in den hochwertigsten DNA-Proben ein gewisser Proteinanteil.<sup>6</sup> Desweiteren haben natürliche Stränge eine sehr hohe Kettenlänge, die ohne weitere Bearbeitung oft zu hochviskosen und in der Handhabung schwierigen Lösungen führt. Zusätzlich sind die Basenabfolgen stark variierend und unkontrollierbar, was die Analyse und Reproduzierbarkeit der Daten erschwert. Da die hier durchgeführten spektroskopischen Messungen vor allem eine möglichst hohe Reinheit erfordern, wurden durchweg synthetische DNA-Stränge verwendet.

Bei synthetischer DNA kann die Länge der Stränge sowie die Basenabfolge genau de-

<sup>6</sup>Dieser Anteil wird dann häufig über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm (Maximum der DNA) zu der bei 280 nm (Maximum von Proteinen) abgeschätzt.

finiert werden. Schon die Wahl einer geeigneten Länge erfordert einige Überlegungen: Um die Quantifizierung der Daten zu erleichtern und eine möglichst geringe Viskositäts-erhöhung beim Lösen der DNA zu erreichen, sollten die DNA-Stränge möglichst kurz gewählt werden. Synthetisch gut zugänglich sind DNA-Stränge ab ca. 7 Basenpaaren, da darunter die Separation der DNA vom Reaktionsgemisch nicht mehr funktioniert.<sup>7</sup> Aus thermodynamischen Überlegungen ist es jedoch oft nötig deutlich längere Stränge zu verwenden. Für die Untersuchungen im Zusammenhang mit Psoralenen benötigt man wie in den Hautzellen stabile DNA-Doppelhelices. Je nach Anteil der GC- oder AT-Basenpaare ergeben sich für diese Doppelhelices bei Raumtemperatur unterschiedliche Stabilitäten, sodass für jede Sequenz die thermodynamischen Eigenschaften abgeschätzt werden müssen. Sie bestimmen dann die Mindestlänge der DNA-Stränge. Möglich sind solche Abschätzungen mithilfe von Thermodynamik-Algorithmen, welche im nächsten Unterkapitel näher beschrieben werden (siehe auch Kapitel 2.3).

Als erste DNA-Probe wurden selbstkomplementäre Stränge mit der Sequenz 5'-GCGTACGC-3' (ab hier als GTAC bezeichnet) ausgewählt. Dafür gab es verschiedene Gründe: Diese Stränge bilden bei Raumtemperatur thermodynamisch stabile Doppelhelices (gemessen am Anteil der gepaarten Basen im Gleichgewicht, vgl. Kapitel 5.1.2.1) und wurden schon zuvor in einer Studie zur Photoadduktbildung von Psoralenen eingesetzt.<sup>[151]</sup> In dieser Studie wurden zehn verschiedene synthetische DNA-Proben unter gleichen Bedingungen in Anwesenheit eines Psoralens belichtet. Bei Verwendung der GTAC-Stränge bildete sich dabei die größte Menge an Monoaddukten. Desweiteren gab es, wie in der Einleitung beschrieben, Hinweise in der Literatur, dass einige Psoralene bevorzugt zwischen 5'-TA-3'-Basenpaare interkalieren.<sup>[34]</sup> GTAC hätte in diesem Fall genau eine bevorzugte Interkalations- und Additionsstelle geboten, was die Quantifizierung der Daten erleichtert hätte. Es stellte sich jedoch schnell heraus, dass die Interkalation, vor allem von AMT, wenig selektiv verläuft (vgl.  $K_D$ -Werte in Kapitel 5.3.1 und Artikel von Smith et al.<sup>[68]</sup>).

Bei der Verwendung der GTAC-Stränge in dieser Arbeit wurde unerwartet ein photoinduzierter Elektrontransfer von der DNA zu AMT beobachtet (siehe Kapitel 5.3). Welche DNA-Basen dabei als Elektronendonoren auftraten war zunächst unklar. Daher wurden auch DNA-Proben, die entweder nur GC- oder nur AT-Basenpaare enthalten, verwendet. Erstere bilden bereits ab sehr kleinen Basenzahlen stabile Doppelhelices, sodass

---

<sup>7</sup>Die Stränge werden nach der Synthese durch Ethanol-fällung separiert.<sup>[2]</sup>

8-mere der Sequenz 5'-(GC)<sub>4</sub>-3' (ab hier als GC bezeichnet) verwendet werden konnten (vgl. Kapitel 5.1.2.1). AT-Basenpaare liefern wie in der Einleitung erwähnt eine geringere thermodynamische Stabilität. Daher wurde hier die längere Sequenz 5'-(TA)<sub>20</sub>-3' (ab hier als AT bezeichnet) eingesetzt.

### 5.1.2.1 Vorhersage der Sekundärstruktur mittels Thermodynamik-Algorithmen

Wie in Kapitel 2.3 beschrieben, ist es möglich die Sekundärstruktur von DNA-Molekülen einer bestimmten Sequenz *in silico* abzuschätzen. Für diese Arbeit wurde die Applikation *NUPACK*,<sup>[100,152]</sup> die vom California Institute of Technology bereitgestellt wird, verwendet.

Bei der Vorhersage der Sekundärstruktur können viele relevante Parameter wie die Temperatur und der Salzgehalt der Lösung mit einbezogen werden. Man sollte sich jedoch vor Augen halten, dass die verwendeten Algorithmen weder Makel der synthetisierten Proben noch Imperfektionen bei der Probenvorbereitung berücksichtigen. Sie geben also die Sekundärstruktur der eingegebenen DNA-Stränge unter Idealbedingungen an. Je länger die DNA-Stränge sind, desto höher wird typischerweise auch der Anteil an Strängen, bei denen in der Synthese Fehler unterlaufen sind. So finden sich bei einem 40-mer beispielsweise oft auch nach der Aufreinigung durch Methoden wie die HPLC gewisse Anteile an 39- oder 38-meren, mitunter mit einzelnen fehlerhaften Stellen (falscher Basenabfolge). Natürlich werden auch diese Stränge in doppelhelikale Moleküle eingebaut. Sie bieten dann punktuell schlechtere Interkalationsstellen als die gewünschten DNA-Moleküle. Solche Imperfektionen sind bei der Arbeit mit Biomolekülen wie DNA nicht zu vermeiden und es ist kaum möglich sie vollständig quantitativ zu erfassen. Daher sollte man sich vor Augen halten, dass sich Werte wie Dissoziationskonstanten von Psoralenen immer auf die gesamte DNA-Lösung mit sämtlichen kleineren Makeln beziehen. Sie können daher je nach Hersteller und auch bei verschiedenen Bestellungen vom gleichen Hersteller leicht variieren. In dieser Arbeit wurde jedoch die Erfahrung gemacht, dass die Unterschiede recht gering und die Reproduzierbarkeit von Werten wie  $K_D$  oder kinetischen Parametern aus zeitaufgelösten Messungen sehr hoch ist.<sup>8</sup>

---

<sup>8</sup>Bei der Bestellung von bereits untersuchten DNA-Sequenzen bei einem neuen Hersteller empfiehlt sich dennoch immer eine Überprüfung der  $K_D$ -Werte.

### GTAC-DNA – 5'-GCGTACGC-3'

Die Einstellungen zur Abschätzung der Sekundärstruktur von GTAC waren folgende (siehe Kapitel 2.3 für Erläuterungen):

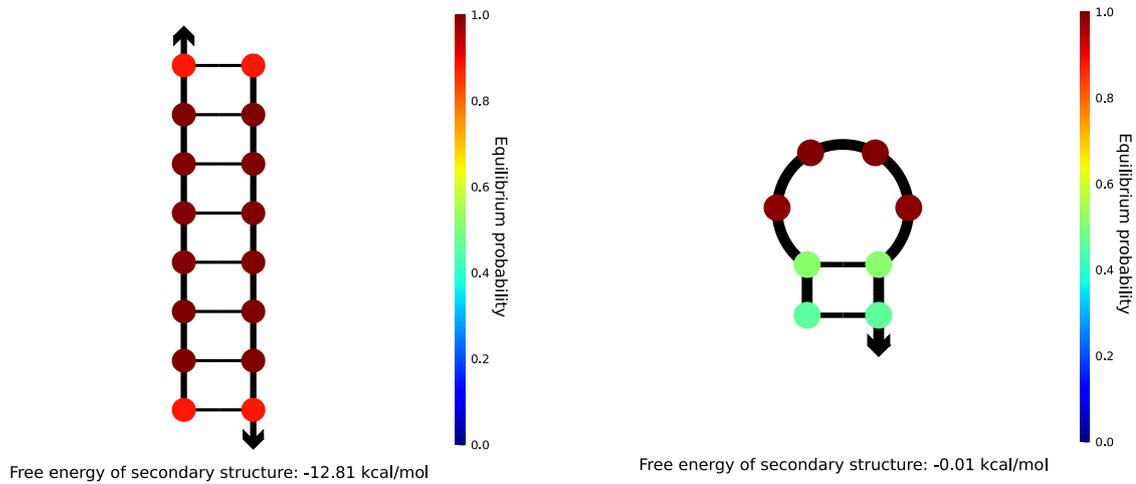
- Konzentration der Einzelstränge: 1 mM
- Temperaturbereich für die Schmelzpunktberechnung von 10 °C bis 80 °C in 5 °C Schritten
- Maximale Anzahl von Strängen in einer Sekundärstruktur: 4 Einzelstränge
- Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-Konzentration: 166 mM/0 mM
- *Dangle* Behandlung: *some*<sup>9</sup>

Die Berechnungen ergeben unter diesen Bedingungen, dass 98,7 % der Moleküle bei 25 °C in der gewünschten doppelhelikalen Struktur vorliegen (s. Abbildung 5.3 links). Die restlichen 1,3 % liegen als Einzelstrang mit Haarnadelstruktur vor (Abbildung 5.3 rechts). Der berechnete Schmelzpunkt der DNA in Lösung liegt bei ca. 58 °C (s. Abbildung 5.4). Ein temperaturabhängiges Experiment mit UV/Vis Detektion an einer in dieser Arbeit verwendeten GTAC-Probe ergibt einen Schmelzpunkt von ca. 57 °C und stimmt damit hervorragend mit der Vorhersage überein.<sup>10</sup>

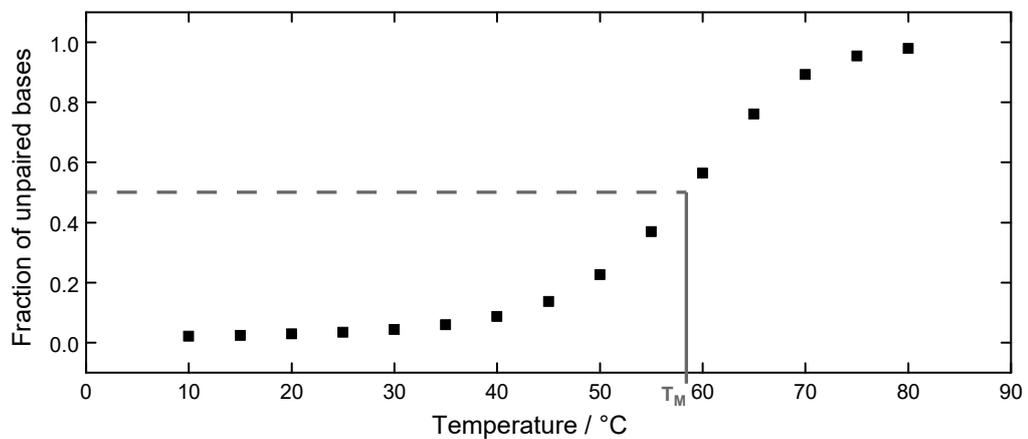
---

<sup>9</sup>Berücksichtigt Energiebeiträge zur Bildung der Sekundärstruktur von ungepaarten Basen, die in direkter Nachbarschaft zu Basenpaaren stehen.<sup>[152]</sup>

<sup>10</sup>Die temperaturabhängige Messung wurde von Malika Seghaoui im Rahmen ihrer Bachelorarbeit unter meiner Anweisung durchgeführt.



**Abbildung 5.3:** Ausgabe der thermodynamischen Analyse zur Sekundärstruktur der GTAC-DNA mit der Applikation *NUPACK*<sup>[152]</sup>. Die Farbkodierung gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit bestimmte Basen (farbige Punkte) sich im thermischen Gleichgewicht in der gezeigten Basenpaarung befinden. Laut Berechnung erhält man bei 25 °C 0,5 mM des Doppelstrangs (links) und 0,0065 mM der Haarnadelstruktur (rechts). Der freie Energiegewinn durch die Bildung der Sekundärstrukturen ist jeweils am unteren Rand angegeben.



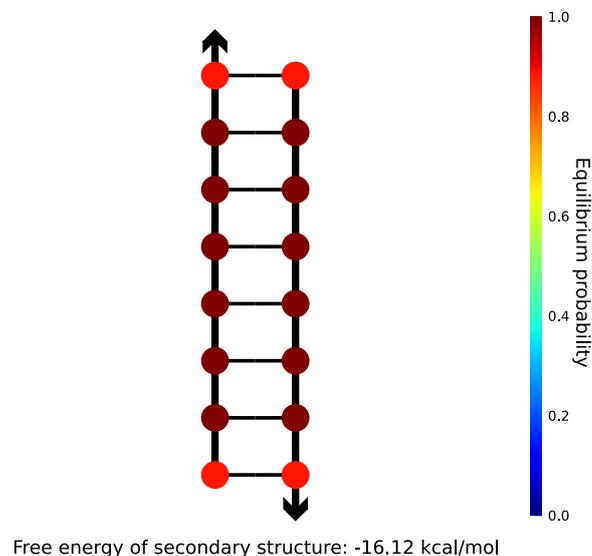
**Abbildung 5.4:** Mit der Applikation *NUPACK*<sup>[152]</sup> berechnete Schmelzkurve der GTAC-DNA. Der Schmelzpunkt  $T_M$  liegt bei ca. 58 °C, sodass problemlos bei Raumtemperatur gearbeitet werden kann.

### GC-DNA – 5'-(GC)<sub>4</sub>-3'

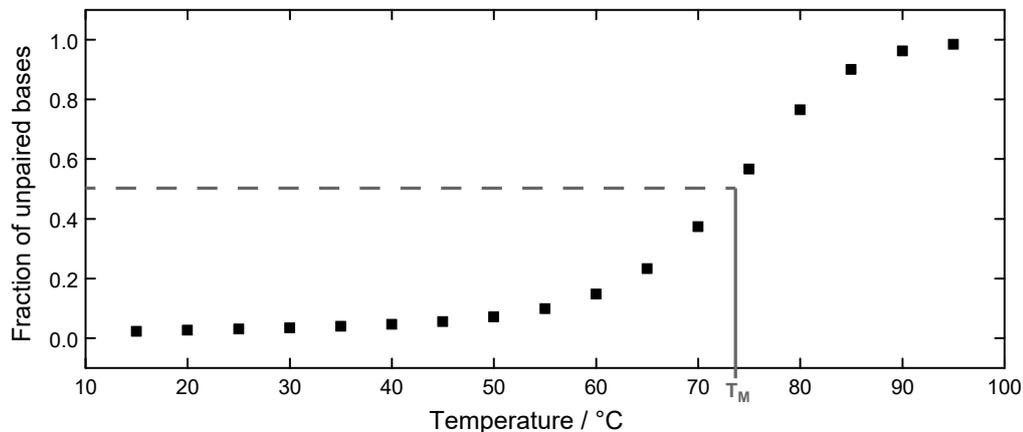
Die Einstellungen zur Abschätzung der Sekundärstruktur von GC waren folgende (siehe Kapitel 2.3 für Erläuterungen):

- Konzentration der Einzelstränge: 1 mM
- Temperaturbereich für die Schmelzpunktberechnung von 15 °C bis 95 °C in 5 °C Schritten
- Maximale Anzahl von Strängen in einer Sekundärstruktur: 4 Einzelstränge
- Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-Konzentration: 166 mM/0 mM
- Dangle Behandlung: *some*

Die Berechnungen ergeben unter diesen Bedingungen, dass 100 % der Moleküle bei 25 °C in der gewünschten doppelhelikalen Struktur vorliegen (s. Abbildung 5.5). Sonstige Strukturen scheinen keine Rolle zu spielen. Der Schmelzpunkt der doppelhelikalen Moleküle liegt bei ca. 74 °C (s. Abbildung 5.6).



**Abbildung 5.5:** Ausgabe der thermodynamischen Analyse zur Sekundärstruktur der GC-DNA mit der Applikation *NUPACK*<sup>[152]</sup>. Die Farbkodierung gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit bestimmte Basen (farbige Punkte) sich im thermischen Gleichgewicht in der gezeigten Basenpaarung befinden. Laut Berechnung erhält man bei 25 °C nur die doppelsträngige Struktur. Der freie Energiegewinn durch die Bildung der Sekundärstruktur ist am unteren Rand angegeben.



**Abbildung 5.6:** Mit der Applikation *NUPACK*<sup>[152]</sup> berechnete Schmelzkurve der GC-DNA. Der Schmelzpunkt  $T_M$  liegt bei ca. 74 °C, sodass problemlos bei Raumtemperatur gearbeitet werden kann.

### AT-DNA – 5'-(TA)<sub>20</sub>-3'

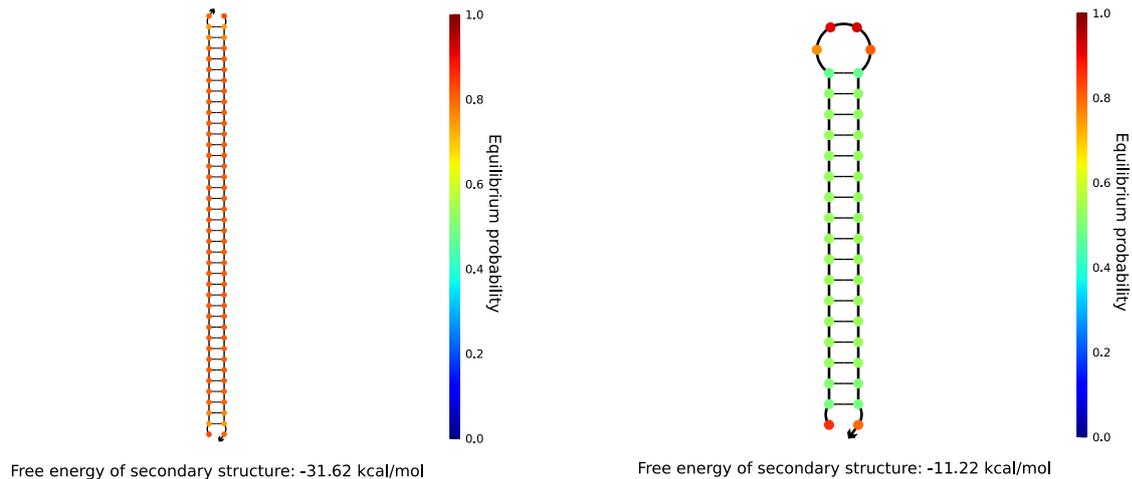
Die Einstellungen zur Abschätzung der Sekundärstruktur von AT waren folgende (siehe Kapitel 2.3 für Erläuterungen):

- Konzentration der Einzelstränge: 0,15 mM
- Temperaturbereich für die Schmelzpunktberechnung von 5 °C bis 90 °C in 5 °C Schritten
- Maximale Anzahl von Strängen in einer Sekundärstruktur: 3 Einzelstränge
- Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-Konzentration: 166 mM/0 mM
- Dangle Behandlung: *some*

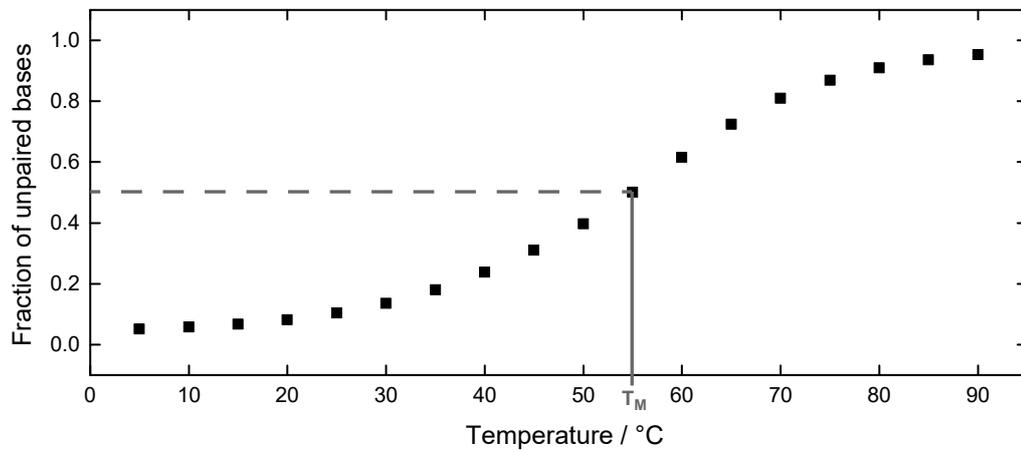
Die Berechnungen ergeben unter diesen Bedingungen, dass nur 54,6 % der Moleküle bei 25 °C in der gewünschten doppelhelikalen Struktur vorliegen (s. Abbildung 5.7 links). Die restlichen 45,4 % liegen wie im Fall von GTAC als Einzelstrang mit Haarnadelstruktur vor (Abbildung 5.7 rechts). Der Schmelzpunkt der DNA in Lösung liegt bei ca. 55 °C (s. Abbildung 5.8).

Ein relativ hoher Anteil an Haarnadelstrukturen lässt sich bei DNA die nur aus AT-Basenpaaren besteht nicht vermeiden. Die Länge der AT-Stränge wurde daher so gewählt, dass auch die Haarnadelstrukturen im Wesentlichen brauchbare Interkalationsstellen für

die Psoralene aufweisen. Wie in Abbildung 5.7 zu erkennen ist, bilden in den Doppelsträngen 76 von 80 Basen und in den Haarnadelstrukturen 34 von 40 Basen reguläre Basenpaare. In einer Lösung die zu den angegebenen Anteilen aus Doppelhelices und Haarnadeln besteht, bilden also im Idealfall 90,5 % der Basen Basenpaare zwischen die Psoralene interkalieren können.



**Abbildung 5.7:** Ausgabe der thermodynamischen Analyse zur Sekundärstruktur der AT-DNA mit der Applikation *NUPACK*<sup>[152]</sup>. Die Farbkodierung gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit bestimmte Basen (farbige Punkte) sich im thermischen Gleichgewicht in der gezeigten Basenpaarung befinden. Laut der Berechnung erhält man bei 25 °C 0,053 mM des Doppelstrangs (links) und 0,044 mM der Haarnadelstruktur (rechts). Der freie Energiegewinn durch die Bildung der Sekundärstrukturen ist jeweils am unteren Rand angegeben.



**Abbildung 5.8:** Mit der Applikation *NUPACK*<sup>[152]</sup> berechnete Schmelzkurve der AT-DNA. Der Schmelzpunkt  $T_M$  liegt bei ca. 55 °C. Bei 25 °C liegen im thermischen Gleichgewicht etwa 10 % der Basen ungepaart vor.

## 5.2 Femtosekundenspektroskopie an Psoralenen in Abwesenheit von DNA

Die DNA-Interkalationsaffinität der verwendeten Psoralene reicht nicht aus, um bei DNA-Zugabe in den verwendeten Probenlösungen vollständige Interkalation zu erreichen. Ein über die  $K_D$ -Werte und die jeweiligen Konzentrationen bestimmter Anteil der Psoralene wird also immer frei in Lösung vorliegen. Für die Analyse der Experimente mit DNA-Zugabe müssen daher die Signaturen dieser freien Psoralene bekannt sein. Zu diesem Zweck wurden zunächst fs-UV/Vis Experimente an den drei verwendeten Derivaten in wässriger Lösung durchgeführt.

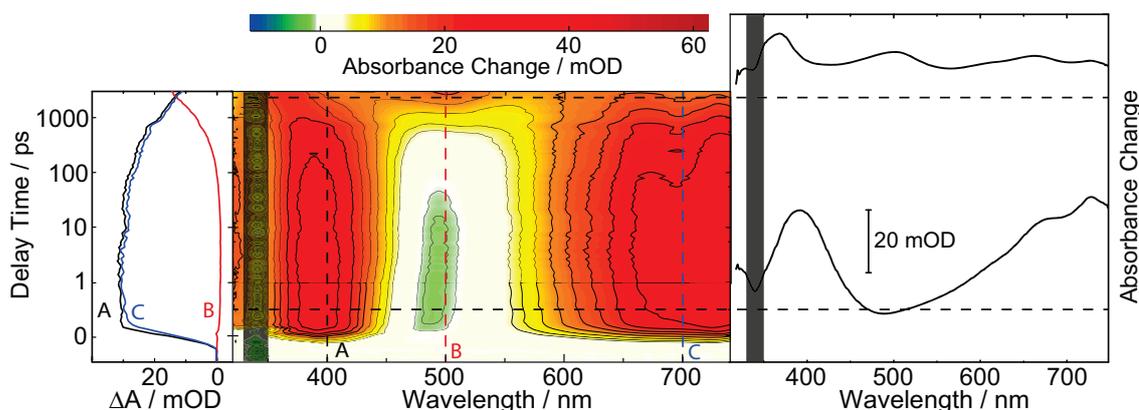
Abgesehen von den in dieser Arbeit präsentierten Daten wurden noch keine Femtosekundenexperimente an Psoralenderivaten veröffentlicht. Über zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen wurden jedoch für einige Psoralene die Singulettlebensdauern  $\langle \tau_{S1} \rangle$  bestimmt. Zudem sind weitere photophysikalische Eigenschaften wie die Fluoreszenzquantenausbeuten  $\Phi_F$  und Triplettquantenausbeuten  $\Phi_T$  in wässriger Lösung publiziert. Eine Übersicht der wichtigsten photophysikalischen Parameter findet sich in Tabelle 5.1.

**Tabelle 5.1:** Übersicht der 0,0-Übergangsenergien  $E_{00}$ , mittleren  $S_1$ -Lebensdauern  $\langle\tau_{S1}\rangle$ , Fluoreszenzquantenausbeuten  $\Phi_F$  und Triplettquantenausbeuten  $\Phi_T$  der Psoralene in wässriger Lösung.

	$E_{00}$ / eV	$\langle\tau_{S1}\rangle^{[153]}$ / ns	$\Phi_F^{[46]}$	$\Phi_T$
AMT	3,21	1,84	0,06	0,2 <sup>[48]</sup>
PSO	3,25	1,04	0,019	0,45 <sup>[47]</sup> / 0,55 <sup>[50]</sup>
8MOP	2,93	1,15	0,0015	0,06 <sup>[49]</sup> / 0,14 <sup>[47]</sup>

In den fs-UV/Vis Daten von AMT in Wasser (Abbildung 5.9) sind unmittelbar nach der Anregung in den ersten angeregten Singulettzustand zwei intensive Differenzabsorptionsbanden um 390 nm und 730 nm zu erkennen.<sup>11</sup> Die Breite der langwelligen Bande ist deutlich höher als die der 390 nm Bande und sie weist ein zweites Maximum um 670 nm auf. Zugleich zeigt sich ein schwacher negativer Beitrag um 490 nm, der durch einen Vergleich mit dem Fluoreszenzspektrum von AMT (siehe Abbildung 5.1) der langwelligen Flanke der stimulierten Emission zugeordnet werden kann. Bis auf leichte Verschiebungen und Änderungen in den Bandenformen bleiben diese Signaturen für etwa 1 ns erhalten, bis ein deutlich verändertes Spektrum mit Absorptionsbanden um 370 nm und 500 nm entsteht. Dieses Spektrum findet sich in Blitzlichtphotolysemessungen wieder und die verursachende Spezies lässt sich durch Sauerstoff löschen (siehe Kapitel 5.5). Zudem ist die Lage der 500 nm Bande vergleichbar mit der einer Triplettbande in Ethanol aus der Literatur,<sup>[48]</sup> weshalb die späte Signatur dem Triplettzustand von AMT zugeschrieben wird.<sup>[109]</sup> Ein Grundzustandsausbleichen ist im zugänglichen Spektralbereich nicht zu beobachten.

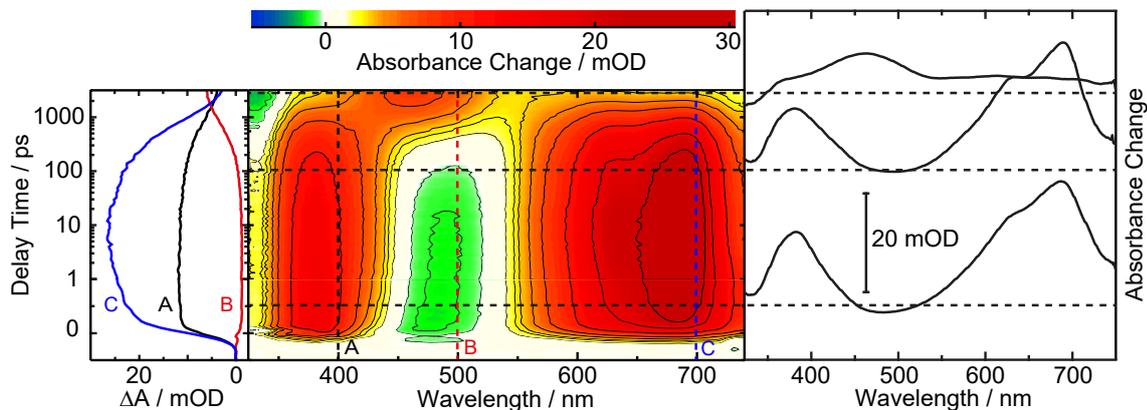
<sup>11</sup>Die Experimente wurden sowohl in reinem Wasser als auch in Phosphatpuffer durchgeführt und es wurden keine spektralen oder kinetischen Unterschiede beobachtet. Über längere Zeit entstand bei AMT in Phosphatpuffer jedoch eine leichte Trübung, die das Signal-zu-Rauschen Verhältnis verschlechterte.



**Abbildung 5.9:** fs-UV/Vis Daten zu 0,30 mM AMT in Wasser mit Anregung bei 340 nm. Die gestrichelten horizontalen Linien in der Konturdarstellung (Mitte) zeigen die zeitliche Position der transienten Spektren im rechten Bereich an, während die vertikalen die spektrale Position der Zeitverläufe im linken Bereich angeben. Die grauen Balken im mittleren und rechten Teil blenden den Bereich der Anregungswellenlänge aus, in dem Streulicht die Messung störte. Die Daten aus dieser Abbildung wurden bereits publiziert.<sup>[109]</sup>

Die fs-UV/Vis Daten zu PSO in Wasser (Abbildung 5.10) ähneln denen von AMT.<sup>12</sup> Wieder sind direkt nach der Anregung zwei intensive Absorptionsbanden zu erkennen. In diesem Fall liegen ihre Maxima um 380 nm und 690 nm. Eine Schulter beziehungsweise ein Nebenmaximum der langwelligeren Bande ist nun um etwa 650 nm zu erkennen. Auch in diesem Datensatz zeigt sich die langwellige Flanke der stimulierten Emission um 490 nm in Form eines negativen Beitrags. Deutliche spektrale Änderungen sind erneut erst nach mehreren hundert Pikosekunden zu erkennen. In diesem Fall entsteht jedoch ein Spektrum mit nur einer Absorptionsbande um 460 nm, deren Lage sich mit Literaturdaten zum Triplettzustand von PSO in Wasser deckt.<sup>[47]</sup> Relativ zu den  $S_1$ -Absorptionsbanden ist diese intensiver als die Triplettbanden von AMT, was wegen des Verhältnisses der Triplettquantenausbeuten zu erwarten ist (s. Tab. 5.1). Das Fehlen der kurzwelligen Absorptionsbande im Triplettpektrum von PSO führt dazu, dass in den Spektren bei hohen Verzögerungszeiten um 330 nm Ausläufer des Grundzustandsausbleichens sichtbar werden.

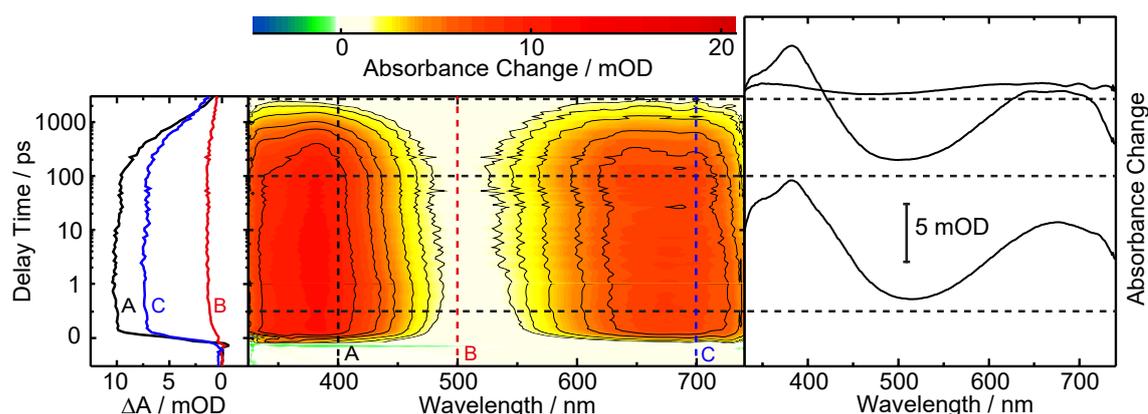
<sup>12</sup>Die fs-UV/Vis Experimente an PSO und 8MOP in Wasser wurden mit einer Anregungswellenlänge von 325 nm durchgeführt, um eine höhere Absorption bei der Anregungswellenlänge zu erreichen (vgl. Abbildung 5.1).



**Abbildung 5.10:** fs-UV/Vis Daten zu 0,25 mM PSO in Wasser mit Anregung bei 325 nm. Die gestrichelten horizontalen Linien in der Konturdarstellung (Mitte) zeigen die zeitliche Position der transienten Spektren im rechten Bereich an, während die vertikalen die spektrale Position der Zeitverläufe im linken Bereich angeben. Die Daten aus dieser Abbildung wurden bereits publiziert.<sup>[121]</sup>

Deutlichere Unterschiede zu den beiden diskutierten Datensätzen zeigen sich in den Messungen an 8MOP in Wasser (Abbildung 5.11). Nur in diesem Fall ist kein negativer Beitrag durch stimulierte Emission erkennbar. Die Positionen der unmittelbar nach der Anregung gebildeten Absorptionsbanden um 380 nm und 690 nm sind vergleichbar mit denen von AMT und PSO, jedoch ist nun die kurzwellige Absorptionsbande deutlich verbreitert. Dies lässt sich entweder durch eine tatsächliche Verbreiterung der Absorptionsbande des angeregten Zustands oder durch eine reduzierte Intensität des Beitrags der stimulierten Emission erklären. In diesem Fall wird letzteres der dominierende Grund für das Fehlen von negativen Beiträgen sein. Das Übergangsdipolmoment für den  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang ist bei 8MOP deutlich niedriger als bei den anderen Derivaten, was sich in den niedrigen Absorptionskoeffizienten für die Anregung in den  $S_1$ -Zustand widerspiegelt (s. Abbildung 5.1). Dadurch sinkt auch die relative Intensität der stimulierten Emission aus diesem Zustand (vgl. Kapitel 2.1). Die beiden Absorptionsbanden bleiben wie bei den anderen Derivaten für einige hundert Pikosekunden bestehen. Nach ihrem Zerfall ist jedoch die Entstehung von Absorptionsbanden des Tripletzustands nicht deutlich zu erkennen. In den Spektren bei hohen Verzögerungszeiten sind lediglich schwache Banden um 350 nm und 650 nm sichtbar, die jedoch gut zu einem Triplettspektrum von 8MOP in Wasser aus der Literatur<sup>[47]</sup> passen (s. transiente Spektren in Abbildung 5.11). Die niedrige Amplitude der Banden deckt sich mit der relativ niedrigen  $\Phi_T$  von 8MOP. In der

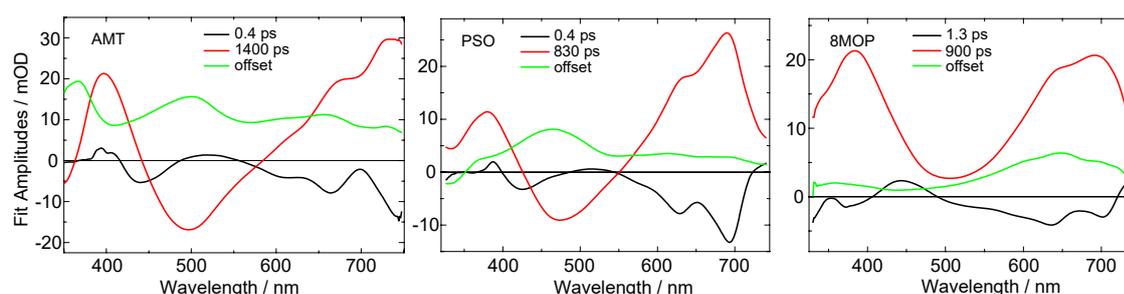
Literatur sind unterschiedliche Werte für diese Quantenausbeute publiziert (vgl. Tabelle 5.1). In einer Studie, in der  $\Phi_T$  von PSO und 8MOP unter identischen Bedingungen bestimmt wurde, ergab sich ein dreifach größerer Wert für PSO.<sup>[47]</sup> Entsprechend weist die Absorption des Triplettzustands von 8MOP um 350 nm nur etwa ein Drittel der Amplitude der 460 nm-Bande bei PSO auf. Alle beobachteten Unterschiede zu AMT und PSO sind also in guter Übereinstimmung mit der Literatur.



**Abbildung 5.11:** fs-UV/Vis Daten zu 0,33 mM 8MOP in Wasser mit Anregung bei 325 nm. Die gestrichelten horizontalen Linien in der Konturdarstellung (Mitte) zeigen die zeitliche Position der transienten Spektren im rechten Bereich an, während die vertikalen die spektrale Position der Zeitverläufe im linken Bereich angeben. Die Daten aus dieser Abbildung wurden bereits publiziert.<sup>[121]</sup>

Die visuelle Inspektion der Daten zeigt also für alle drei Derivate ein analoges und recht einfaches Verhalten. Der erste angeregte Singulettzustand bleibt für mehrere hundert Pikosekunden populiert, bevor in unterschiedlichem Ausmaß Triplettzustände besetzt werden, die bis zum Ende des Messzeitfensters bestehen bleiben. Zur quantitativen Analyse der jeweiligen Kinetik wurde eine globale multiexponentielle Anpassungsfunktion verwendet (s. Kapitel 3.3.4). Sie ergab für AMT eine Zeitkonstante für den Zerfall des  $S_1$ -Zustands von 1400 ps, für PSO von 830 ps und für 8MOP von 900 ps. Die so bestimmten  $S_1$ -Lebensdauern liegen etwa 25 % unter den Literaturwerten (vgl. Tabelle 5.1), was jedoch angesichts der unterschiedlichen Messtechniken eine akzeptable Übereinstimmung darstellt. Bei AMT und PSO ist in den entsprechenden Amplitudenspektren (Abbildung 5.12, rot) der Anstieg der Triplettsignaturen in Form von negativen Beiträgen zu erkennen. Zusätzlich war für eine akzeptable Anpassung jeweils eine kinetische Komponente im Bereich um 1 ps notwendig (Abbildung 5.12, schwarz). In diesem

Zeitbereich wurde bei keinem Derivat der Zerfall oder die Bildung von Differenzabsorptionsbanden beobachtet. Diese Komponente beschreibt, wie für polare Lösungsmittel erwartet, die Verformung und Verschiebung der bestehenden Banden der  $S_1$ -Zustände durch diverse Relaxationsprozesse (vgl. Kapitel 2.1). Die *offset*-Spektren beinhalten im Wesentlichen die zuvor genannten Absorptionsbanden der jeweiligen Tripletzustände (Abbildung 5.12, grün). Zusätzlich werden im Bereich um 650 nm unterschiedlich hohe Konzentrationen an solvatisierten Elektronen zur Differenzabsorption beitragen<sup>[154]</sup>, die häufig in fs-Experimenten an wässrigen Pufferlösungen beobachtet werden.<sup>[155,156]</sup> Diese Beiträge sind durch die relativ niedrige Anregungsleistung bei den Messungen von AMT und PSO eher gering. Im Fall von 8MOP ist im *offset*-Spektrum jedoch eine relativ starke Absorption im Bereich um 650 nm zu erkennen. Dies lässt sich durch verhältnismäßig hohe Quantenausbeuten für die mono- ( $\Phi = 0,015$ ) und biphotonische Photoionisation von 8MOP in Wasser erklären.<sup>[157]</sup>



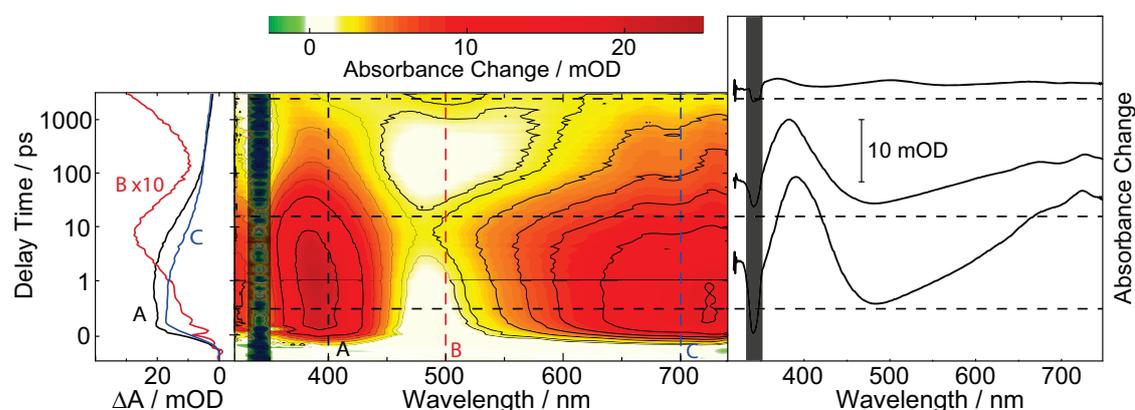
**Abbildung 5.12:** Amplitudenspektren zu den fs-UV/Vis Daten von AMT (links), PSO (Mitte) und 8MOP (rechts) in Wasser. Die erste kinetische Komponente (schwarz) beschreibt Änderungen der Bandenformen und -positionen durch Relaxationsprozesse, die zweite den Zerfall des angeregten Singulettzustands und die partielle Bevölkung von Tripletzuständen. Die *offset*-Spektren beinhalten im Wesentlichen die Signaturen der Tripletzustände. Die Daten aus dieser Abbildung wurden bereits publiziert.<sup>[109,121]</sup>

### 5.3 Beobachtung eines photoinduzierten Elektrontransfers von DNA zu AMT

Als Probe für die ersten fs-UV/Vis Experimente in Anwesenheit von DNA wurde aus zuvor angeführten Gründen das Psoralenderivat AMT in Kombination mit GTAC-DNA (s. Kapitel 5.1.1 & 5.1.2) ausgewählt. Bezogen auf die Basenparkonzentration der DNA beträgt die Dissoziationskonstante  $K_D$  für diese Kombination  $3,4 \cdot 10^{-4}$  M (s.

Abbildung 3.1).<sup>13</sup> Über Belichtungsexperimente mit UV/Vis Detektion wurde für diese Probe eine Reaktionsquantenausbeute  $\Phi_R$  von 0,01 – 0,02 für die Photoaddition an die DNA bestimmt (s. Kapitel 5.5).

Schon auf den ersten Blick ist ersichtlich, dass sich das spektral-zeitliche Verhalten von AMT im Femtosekundenexperiment bei Zugabe von DNA deutlich ändert (vgl. Abbildungen 5.13 und 5.9). Unmittelbar nach der Anregung ähnelt die transiente Absorption des Gemischs zunächst der von freiem AMT. Intensive Banden mit Maxima um 390 nm und 700 nm sind auch hier zu beobachten. Negative Beiträge durch stimulierte Emission sind jedoch nicht mehr sichtbar, was möglicherweise durch eine leichte Verbreiterung der 700 nm Bande begründet werden kann. In diesem Datensatz ändern sich die Signaturen jedoch zu deutlich früheren Verzögerungszeiten als bei freiem AMT. Im Zeitbereich zwischen 1 ps und 10 ps sind deutliche Anstiege und Zerfälle der Differenzabsorption zu beobachten, bevor nach etwa 1 ns die Triplettsignaturen von AMT mit Banden um 370 nm und 500 nm in schwacher Ausprägung sichtbar wird. Auffällig ist, dass in den Zeitverläufen um 500 nm nun deutlich drei kinetische Komponenten, statt zuvor eine, zu erkennen sind (s. Abbildung 5.13 links, Zeitverlauf B).

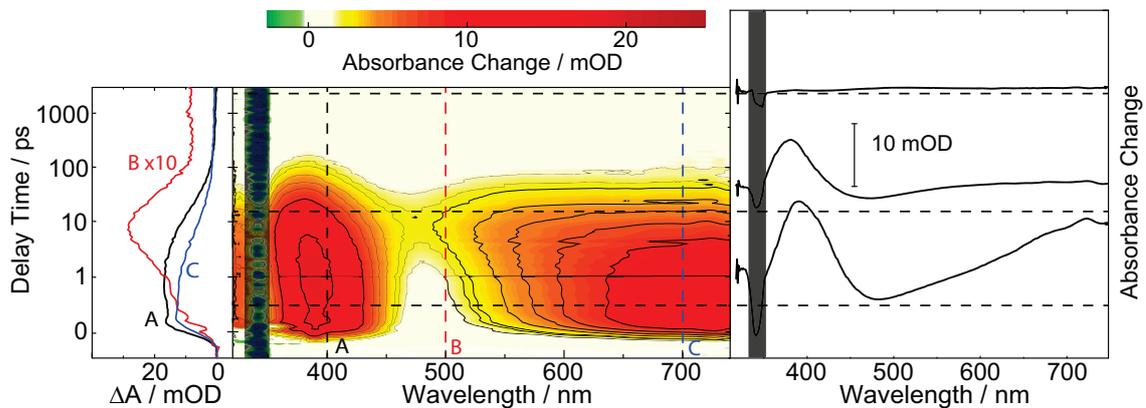


**Abbildung 5.13:** fs-UV/Vis Daten zu 0,30 mM AMT mit 3,2 mM GTAC-DNA ( $c_{bp}$ ) in wässrigem Phosphatpuffer mit Anregung bei 340 nm. Die gestrichelten horizontalen Linien in der Konturdarstellung (Mitte) zeigen die zeitliche Position der transienten Spektren im rechten Bereich an, während die vertikalen die spektrale Position der Zeitverläufe im linken Bereich angeben. Die grauen Balken im mittleren und rechten Teil blenden den Bereich der Anregungswellenlänge aus, in dem Streulicht die Messung störte. Die Daten aus dieser Abbildung wurden bereits publiziert.<sup>[109]</sup>

<sup>13</sup>In der ersten Veröffentlichung dieser Daten wurde  $K_D = 1,7 \cdot 10^{-5}$  M bezogen auf die Konzentration der DNA-Moleküle angegeben.<sup>[109]</sup>

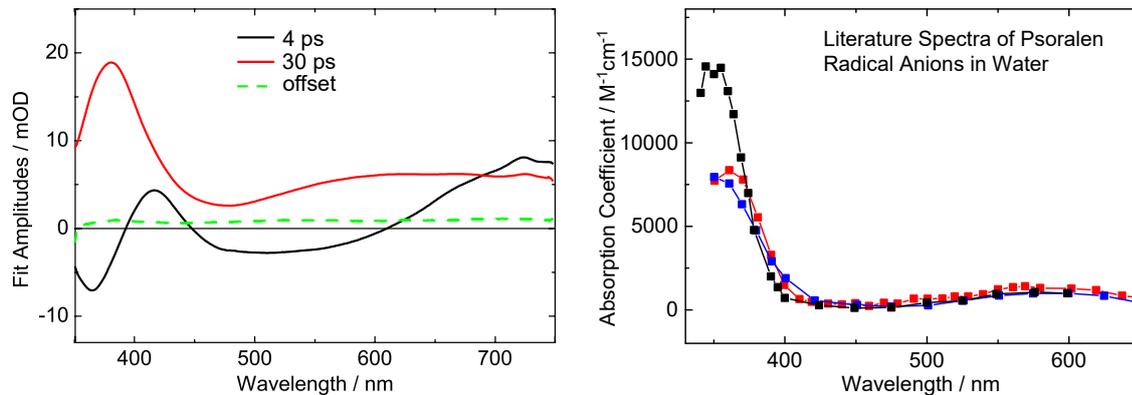
Anhand der Dissoziationskonstante lässt sich für die verwendeten Konzentrationen ein Anteil von 11 % nicht-interkalierten AMTs errechnen, dessen Signaturen aus der Messung ohne DNA-Zugabe bekannt sind. Um das Verhalten der interkalierten Moleküle isoliert betrachten zu können, wurde der Signalsatz des freien AMT (Abbildung 5.9), der unter identischen Bedingungen am gleichen Tag gemessen wurde, geeignet skaliert (s. Kapitel 3.3.1.1) und von den Daten des Gemischs subtrahiert (s. Abbildung 5.14).

Im so erhaltenen Datensatz sind ausschließlich Signale mit Lebensdauern unterhalb von 100 ps erkennbar. Interkalation von AMT in die DNA reduziert also die Lebensdauer der transienten Spezies drastisch. Wieder ist innerhalb der ersten Pikosekunden nach der Anregung die Signatur des ersten angeregten Singulettzustands von AMT mit Differenzabsorptionsbanden um 390 nm und 700 nm zu erkennen. Wie bereits vor der Subtraktion zu erahnen, scheint eine leichte Verbreiterung der 700 nm Bande die Beiträge der stimulierten Emission zu überlagern. Im gesamten Spektralbereich ist daher keine negative Differenzabsorption vorhanden. Im Zeitbereich zwischen 1 ps und 10 ps treten bei den interkalierten Molekülen deutliche spektrale Änderungen auf. Eine neue Spezies mit einem Differenzspektrum, das eine intensive Bande um 380 nm und eine sehr breite, schwächere um 600 nm aufweist, bildet sich aus (vgl. Abbildung 5.14 rechts). Mit einer Zeitkonstante von einigen zehn Pikosekunden verschwindet dieses Intermediat und die Differenzabsorption sinkt im gesamten Spektralbereich annähernd auf null. Besonders deutlich ist die Bildung und der anschließende Zerfall des Intermediats im Wellenlängenbereich um 500 nm sichtbar (s. Abbildung 5.14 links, Zeitverlauf *B*). Bei Interkalation in diese DNA-Moleküle sind also keine Anzeichen für die Besetzung von Triplettzuständen zu erkennen. Auch die Bildung von Photoaddukten mit der DNA ist im zugänglichen Spektralbereich nicht zu beobachten. Wie in der Einleitung und Kapitel 5.5 dargestellt, weisen die Addukte erst unterhalb von etwa 340 nm signifikante Absorption auf.



**Abbildung 5.14:** fs-UV/Vis Daten der in GTAC-DNA interkalierten AMT-Moleküle. Dieser Datensatz wurde nach skaliertem Subtraktion der Signale des freien AMT-Anteils (Abbildung 5.9) von denen des Gemischs (Abbildung 5.13) erhalten (für Skalierungsverfahren s. Kapitel 3.3.1.1). Die Daten aus dieser Abbildung wurden bereits publiziert.<sup>[109]</sup>

Eine globale multiexponentielle Anpassung (vgl. Kapitel 3.3.4) an den Datensatz der interkalierten Moleküle ergibt Zeitkonstanten von 4 ps für die Bildung des Intermediats aus dem  $S_1$ -Zustand und 30 ps für seinen Zerfall. Im Amplitudenspektrum zum ersten Prozess (Abbildung 5.15 links, schwarz) drückt sich die deutliche Abnahme der Differenzabsorption durch positive Beiträge über 600 nm aus. Zwischen 450 nm und 600 nm zeigen negative Beiträge den Anstieg der Differenzabsorption durch die Bildung des Intermediats an. Da sein intensivstes Maximum bei kürzeren Wellenlängen liegt als das des  $S_1$ -Zustands, sind unterhalb von ca. 450 nm positive und negative Beiträge zu finden. Das Amplitudenspektrum des zweiten Prozesses (Abbildung 5.15 links, rot) enthält im Wesentlichen das Absorptionsspektrum des Intermediats, da die Differenzabsorption nach seinem Zerfall im gesamten Spektralbereich nahe bei null liegt. Die verbleibenden kleinen Amplituden im *offset*-Spektrum (Abbildung 5.15 links, grün) weisen wenig Struktur auf und sind vermutlich auf Imperfektionen bei der Datensubtraktion zurückzuführen.



**Abbildung 5.15:** Links: Amplitudenspektren zu den fs-UV/Vis Daten des in GTAC-DNA interkalierten Anteils von AMT aus Abbildung 5.14. Die Daten aus dieser Abbildung wurden bereits publiziert.<sup>[109]</sup> Rechts: Absorptionsspektren der durch Pulsradiolyse erzeugten Radikalanionen von PSO (schwarz), 8MOP (rot) und 5-Methoxypsoralen (blau) in wässriger Lösung aus der Literatur.<sup>[158]</sup>

Vergleiche des Intermediatspektrums mit Literaturspektren von diversen ionisierten oder angeregten Zuständen von Psoralenen offenbaren eine große Ähnlichkeit mit Radikalanionspektren einiger Derivate in wässriger Lösung (vgl. Intermediatspektrum in Abbildung 5.15 links (rot) mit Literaturspektren in Abbildung 5.15 rechts). Diese Spektren weisen eine starke Bande im Bereich um 350-360 nm und eine schwächere, breite Bande um 600 nm auf. Diese Beobachtung ist ein erster Hinweis auf einen reversiblen photoinduzierten Elektrontransfer (PET) von DNA zu AMT. Es ist bekannt, dass PETs häufig zwischen organischen Chromophoren und der DNA auftreten.<sup>[97,159]</sup> Die Amplitudenverhältnisse der Banden stimmen jedoch nicht genau mit denen des Intermediats überein. Zudem sind die Maxima der intensiveren Banden um etwa 20 nm zu kürzeren Wellenlängen verschoben. Diese Unterschiede lassen sich durch die veränderte Lösungsumgebung in DNA, die unterschiedliche Substitution der verwendeten Psoralene und eventuell durch die unterschiedliche Messtechnik erklären. Für das Derivat AMT wurden zuvor noch keine Radikalanionspektren veröffentlicht. Daher wurde die Messung eines solchen Spektrums erforderlich.

### Bestimmung des Radikalanionspektrums von AMT

Ein Radikalanionspektrum von AMT innerhalb der DNA lässt sich mit unseren Methoden nicht kontrolliert aufnehmen. Daher wurde ein Photoreduktionsexperiment in Lösung

durchgeführt (s. Abbildung 5.16 links). Zu diesem Zweck wurde *N,N*-Dimethylanilin (DMA), das als starkes Photoreduktionsmittel bekannt ist,<sup>[160]</sup> zu einer Lösung von AMT gegeben. AMT wurde dann gezielt bei einer Wellenlänge von 355 nm angeregt und die spektralen Änderungen mithilfe von Blitzlichtphotolyse beobachtet. Da die Umgebung innerhalb der DNA deutlich unpolarer ist als in Wasser, wurde Acetonitril als Lösungsmittel für dieses Experiment gewählt. Die relative Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_r$  von Acetonitril beträgt bei Raumtemperatur ca. 36.<sup>[83]</sup> Für reine, „trockene“ DNA wurde vor kurzem mithilfe einer Kombination aus elektrostatischer Kraftmikroskopie und Molekulardynamiksimulationen  $\epsilon_r = 8$  bestimmt.<sup>[161]</sup> Chromophore, die in wässriger Lösung in die DNA interkaliert sind, haben jedoch effektiv eine Umgebung mit höherer  $\epsilon_r$ . Messungen mit solvatochromen Fluoreszenzfarbstoffen die an die DNA-Furchen binden, sowie Dielektrophoreseexperimente ergaben Werte zwischen 20 und 55.<sup>[162,163,164]</sup> Da der Wert von Acetonitril in einem ähnlichen Bereich liegt, sollte der Einfluss dieses Lösungsmittels auf das Radikalanionenspektrum grob mit dem der DNA vergleichbar sein.

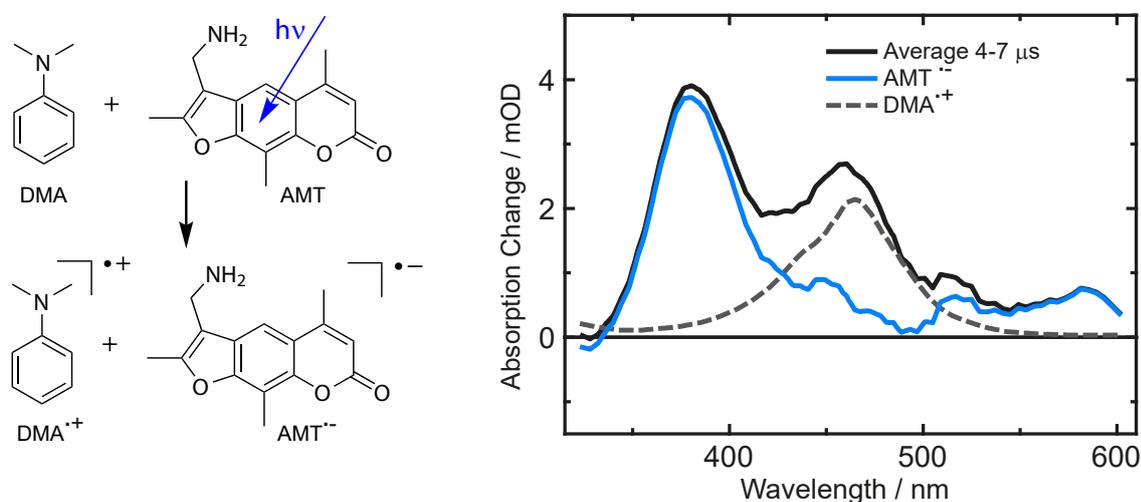
Ein Vergleichsexperiment an einer reinen AMT Lösung in Acetonitril zeigt, dass unterhalb der Zeitauflösung der Blitzlichtphotolyse der Tripletzustand von AMT bevölkert wird. Dieser besitzt Differenzabsorptionsmaxima bei ca. 380 nm und 450 nm und zerfällt unter Sauerstoffausschluss mit einer Zeitkonstante von ca. 2,5  $\mu\text{s}$  ( $c_{\text{AMT}} = 20 \mu\text{M}$ ).<sup>[109]</sup> Zugabe von ca. 1,2 mM DMA führt zur Bildung von deutlich langlebigeren Zuständen durch Photoreduktion des Tripletzustandes von AMT. Sichtbar wird dies durch die Ausbildung der charakteristischen Absorptionsbande von  $\text{DMA}^{\bullet+}$  um 460 nm<sup>[165]</sup> innerhalb der ersten 2  $\mu\text{s}$ , die mit einer Zeitkonstante  $> 15 \mu\text{s}$  wieder zerfällt. Zusätzlich entsteht eine intensive Absorptionsbande bei 380 nm mit einer Lebensdauer von 6  $\mu\text{s}$ , die auf die Bildung von  $\text{AMT}^{\bullet-}$  zurückzuführen ist. Da die Lebensdauer der  $\text{DMA}^{\bullet+}$ -Signale deutlich länger ist als die von  $\text{AMT}^{\bullet-}$ , scheint der Zerfall von  $\text{AMT}^{\bullet-}$  im Wesentlichen über andere Kanäle als die Ladungsrekombination mit  $\text{DMA}^{\bullet+}$  zu verlaufen.

Im Zeitbereich von 4-7  $\mu\text{s}$  sind also  $\text{DMA}^{\bullet+}$  und  $\text{AMT}^{\bullet-}$  in der Lösung vorhanden. Die Spektren aus diesem Zeitbereich wurden gemittelt und geglättet (s. Abbildung 5.16 rechts, schwarze Linie), um anschließend das Spektrum von  $\text{AMT}^{\bullet-}$  (Abbildung 5.16 rechts, blaue Linie) zu extrahieren.<sup>14</sup> Dazu wurde das Spektrum von  $\text{DMA}^{\bullet+}$ <sup>[165]</sup> skaliert

---

<sup>14</sup>Analoge Experimente wurden auch in Wasser durchgeführt. Das  $\text{AMT}^{\bullet-}$  Spektrum zeigte dabei eine deutliche Solvatochromie.<sup>[109]</sup> Das Maximum der intensiven Bande liegt in Wasser bei ca. 360 nm und passt damit gut zu den Literaturspektren der anderen Derivate (Abbildung 5.15 rechts). In sehr unpolarem 2-Methyltetrahydrofuran liegt das Maximum von  $8\text{MOP}^{\bullet-}$  bei 77 K bei ca. 400 nm.<sup>[166]</sup>

von den Daten des Gemischs abgezogen.

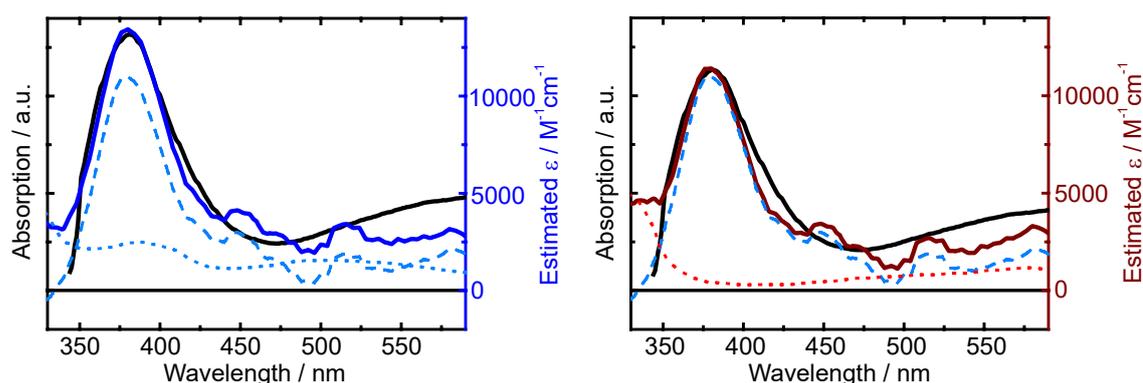


**Abbildung 5.16:** Links: Schema der Photoreduktion von AMT durch DMA. Rechts: Von 4-7  $\mu\text{s}$  gemittelt und geglättet (gleitender Mittelwert, 4 Punkte) Spektrum von 20  $\mu\text{M}$  AMT in Gegenwart von 1,2 mM DMA in Acetonitril (schwarz). Ein Literaturspektrum<sup>[165]</sup> von  $\text{DMA}^{\bullet+}$  in Acetonitril (grau gestrichelt) wurde skaliert von diesem Spektrum abgezogen, um das Spektrum von  $\text{AMT}^{\bullet-}$  (blau) zu erhalten.<sup>15</sup>

Innerhalb der DNA muss eine der DNA-Basen als Elektronendonator fungieren. Daher wird in den fs-UV/Vis Daten im Fall eines PET von der DNA zu AMT ein Radikalpaarspektrum erwartet, das sich aus der Summe der Spektren von  $\text{AMT}^{\bullet-}$  und dem Radikalkation einer DNA-Base zusammensetzt. Für die Berechnung solcher Radikalpaarspektren müssen die Absorptionskoeffizienten  $\epsilon$  des  $\text{AMT}^{\bullet-}$  Spektrums abgeschätzt werden. Genaue Werte für  $\text{AMT}^{\bullet-}$  sind nicht bekannt, jedoch liegen die maximalen  $\epsilon$  in den publizierten Spektren der Psoralenradikalanionen alle in einer ähnlichen Größenordnung (s. Abbildung 5.15 rechts). Basierend auf ihren Werten wurde  $\epsilon_{\text{max}}$  von  $\text{AMT}^{\bullet-}$  zu  $11000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  abgeschätzt. Von den vier DNA-Bausteinen besitzen Guanosin und Adenosin die niedrigsten Oxidationspotenziale.<sup>[19,167]</sup> Eine Abschätzung der Triebkraft für einen PET weist darauf hin, dass nur sie als Elektronendonoren in Frage kommen (vgl. Kapitel 5.4.3).<sup>[109]</sup> Spektren der Radikalkationen der entsprechenden Nukleosidmonophosphate  $\text{G}^{\bullet+}$  und  $\text{A}^{\bullet+}$  in wässriger Lösung sind in der Literatur zu finden (s. Abbildung 5.17, gepunktete Spektren).<sup>[168]</sup> Ein Spektrum von  $\text{G}^{\bullet+}$  innerhalb einer DNA-Doppelhelix<sup>[169]</sup> unterscheidet sich im relevanten Spektralbereich kaum von dem in wässriger Lösung, sodass diese Spektren

<sup>15</sup>Die Blitzlichtphotolyse Daten wurden von Christian Torres Ziegenbein aufgenommen.

zur Berechnung des Radikalpaarspektrums verwendet werden können. Ihre Beiträge zu den berechneten Radikalpaarspektren sind vergleichsweise gering. Die resultierenden Radikalpaarspektren sind in sehr guter Übereinstimmung mit dem in den fs-UV/Vis Daten beobachteten Intermediatspektrum (s. Abbildung 5.17). Leichte Abweichungen oberhalb von 550 nm sind vermutlich auf kleine zusätzliche Beiträge von solvatisierten Elektronen im fs-UV/Vis Experiment zurückzuführen.



**Abbildung 5.17:** Vergleich des Intermediatspektrums aus den fs-UV/Vis Daten von interkaliertem AMT (schwarz, Spektrum bei 16 ps) mit berechneten Radikalpaarspektren.<sup>[109]</sup> Links wurde das Spektrum des Radikalpaars  $G^{\bullet+}AMT^{\bullet-}$  (blau) aus der Summe der  $AMT^{\bullet-}$  (blau gestrichelt) und  $G^{\bullet+}$  (blau gepunktet)<sup>[168]</sup> Spektren berechnet. Rechts wurde das des Radikalpaars  $A^{\bullet+}AMT^{\bullet-}$  (rot) aus der Summe der  $AMT^{\bullet-}$  (blau gestrichelt) und  $A^{\bullet+}$  (rot gepunktet)<sup>[168]</sup> Spektren berechnet.<sup>16</sup>

Ein effizienter PET von einer der beiden Purinbasen erklärt also die drastische Reduktion der Singulettlebensdauer (von 1400 ps in Wasser auf 4 ps) und die Beobachtung eines Intermediats bei der Messung von AMT in GTAC-DNA. Das gebildete Radikalpaar zerfällt darauf im Wesentlichen durch Rekombination mit einer Zeitkonstante von 30 ps.

### 5.3.1 Identifizierung von Guanin als Elektronen donierende Base

Die im vorigen Kapitel beschriebene Beobachtung eines reversiblen PET von der DNA zu AMT lässt die Frage offen, ob beide oder nur eine der beiden Purinbasen innerhalb der DNA als Elektrondonor fungiert. Im Hinblick auf die photochemischen Mechanismen in der PUVA-Therapie hat die Frage des Elektrondonors direkte Auswirkungen. Sollten beide Purinbasen den angeregten Singulettzustand des Psoralens durch

<sup>16</sup>Die Blitzlichtphotolysedaten wurden von Christian Torres Ziegenbein aufgenommen.

einen PET im Pikosekundenbereich löschen, so könnte ein Triplettpfad für die eigentlich gewünschte Photoaddition an die DNA generell ausgeschlossen werden. Denn dann würden die schnellen PET Prozesse unabhängig von der Interkalationsstelle des Psoralens die Besetzung von Triplettzuständen verhindern. Diente dagegen nur Guanin, als DNA-Base mit dem niedrigsten Oxidationspotenzial,<sup>[19,167]</sup> als Elektronendonator, so könnten bei Interkalation in längere AT-Sequenzen zumindest teilweise auch Triplettzustände zur Photoadduktbildung beitragen.

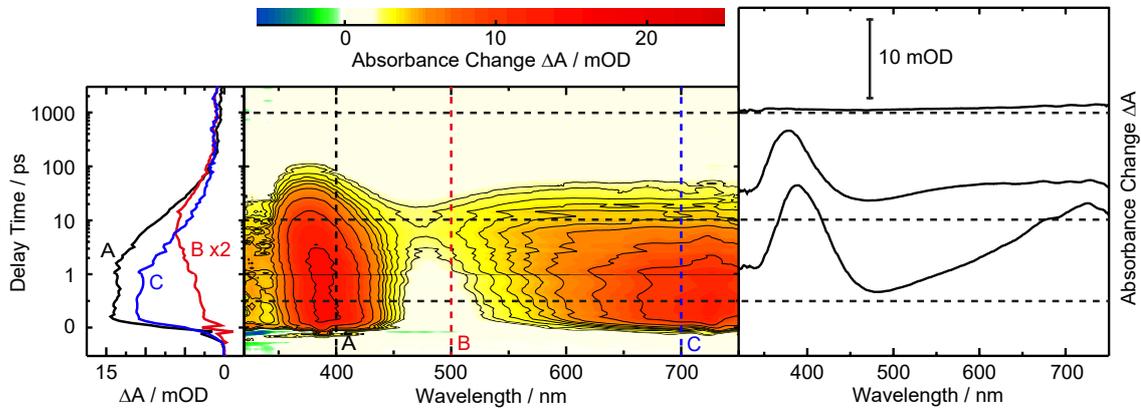
Aus diesem Grund wurden zusätzliche Experimente mit DNA-Molekülen, die entweder nur GC- oder nur AT-Basenpaare enthalten, durchgeführt (für Sequenzen s. Kapitel 5.1.2). In der Literatur finden sich bereits Hinweise darauf, dass nur Guaninbasen den angeregten Singulettzustand von AMT stark löschen.<sup>[170]</sup> Die Kinetik und der Mechanismus hierfür waren jedoch bislang unklar. Die Interkalationsaffinitäten von AMT für GC- und AT-Basenpaare liegen in einem ähnlichen Bereich, sodass innerhalb der zuvor verwendeten GTAC-DNA vermutlich keine stark bevorzugten Interkalationsstellen existieren. Für die hier verwendete GC-DNA beträgt  $K_D = 1,8 \cdot 10^{-4}$  M, für die AT-DNA ist  $K_D = 4,4 \cdot 10^{-4}$  M (siehe Abbildungen A.2 & A.3 im Anhang).<sup>17</sup> Dies führt für die in diesem Kapitel gezeigten fs-UV/Vis Experimente zu Anteilen von 7 % und 15 % von nicht-interkalierten Molekülen. Zusätzlich wurden die Reaktionsquantenausbeuten von AMT in GC- und in AT-DNA in Belichtungsexperimenten bestimmt (s. Kapitel 5.5). In GC-DNA wurde ein extrem niedriger Wert von  $\Phi_R < 10^{-6}$  ermittelt. In AT-DNA beträgt  $\Phi_R$  für die Photoaddition dagegen etwa 0,15 (vgl. Kapitel 5.5). Dieser Wert ist deutlich höher als die Quantenausbeuten in Kalbsthymus-DNA ( $\Phi_R = 0,022$ )<sup>[42]</sup> oder der GTAC-DNA ( $\Phi_R = 0,01 - 0,02$ , s. Kapitel 5.5).

Da Guanin die DNA-Base mit dem niedrigsten Oxidationspotenzial<sup>[19,167]</sup> ist, wird bei Verwendung der GC-DNA ein effizienter PET erwartet. Das entsprechende fs-UV/Vis Experiment (Abbildung 5.18) bestätigt diese Vermutung. Die Daten sind nahezu identisch mit denen von AMT in GTAC-DNA (vgl. Abbildung 5.14). Unmittelbar nach der Anregung ist erneut die Signatur des  $S_1$ -Zustands von AMT mit Banden bei 390 nm und 700 nm sichtbar. Nach wenigen Pikosekunden wird dann das durch PET verursachte Radikalpaarspektrum mit Maxima bei ca. 380 nm und 600 nm sichtbar, welches unterhalb von 100 ps wieder zerfällt. Auch hier bleibt im Anschluss keine strukturierte

---

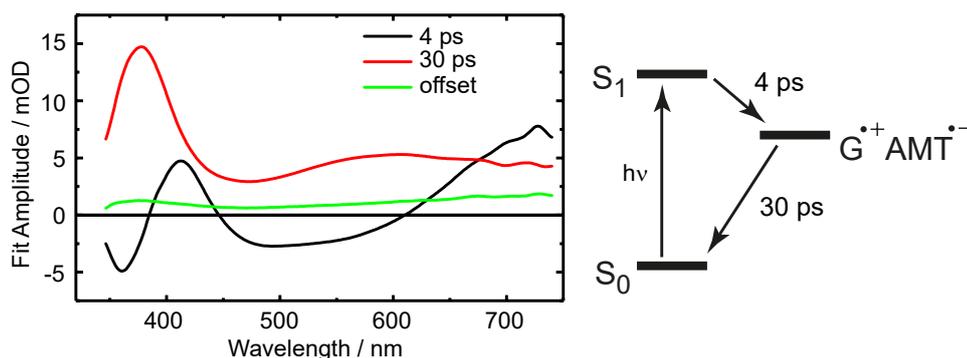
<sup>17</sup>Die eher kleinen Unterschiede in  $K_D$  sind möglicherweise auch durch leicht unterschiedliche Probenqualitäten beeinflusst (vgl. Kapitel 5.1.2).

Differenzabsorption bestehen.



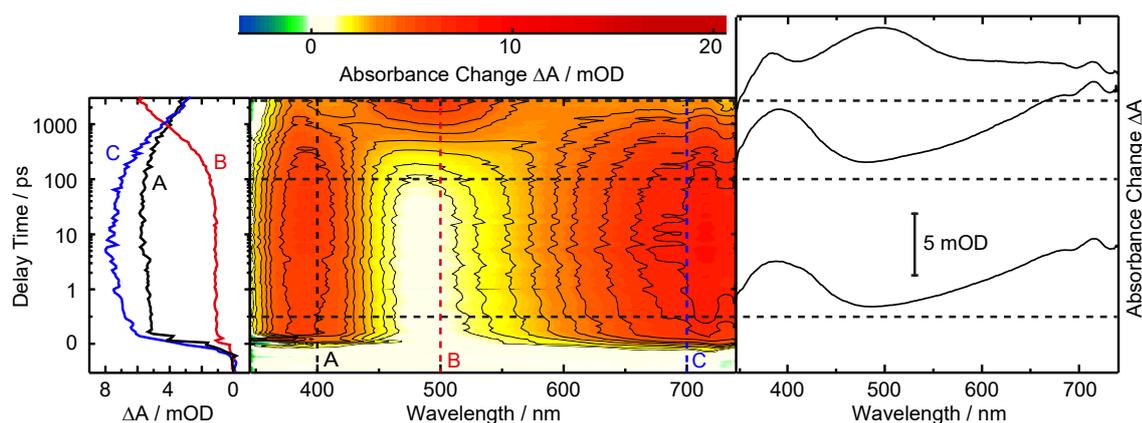
**Abbildung 5.18:** fs-UV/Vis Daten der in GC-DNA interkalierten AMT-Moleküle in wässrigem Phosphatpuffer mit Anregung bei 340 nm. Die Daten wurden nach skalierter Subtraktion der Signale des freien AMT-Anteils (für Skalierungsverfahren s. Kapitel 3.3.1.1) erhalten. Die Gesamtkonzentrationen in der Lösung betragen  $c_{DNA,bp} = 2,7$  mM und  $c_{AMT} = 0,3$  mM. Entnommen aus S. Fröbel et al. [121]

Eine globale multiexponentielle Anpassung an die Daten ergibt Zeitkonstanten von 4 ps für den PET und 30 ps für die anschließende Rekombination (Abbildung 5.19). Diese Zeiten und die zugehörigen Amplitudenspektren sind nahezu identisch mit denen der GTAC-DNA Daten (vgl. Abbildung 5.15). Eine große Ähnlichkeit der beiden Datensätze war zu erwarten, da auch in der GTAC-DNA der Großteil der interkalierten Moleküle ein GC-Basenpaar in unmittelbarer Nachbarschaft hat.



**Abbildung 5.19:** Amplitudenspektren zu den fs-UV/Vis Daten von AMT in GC-DNA aus Abbildung 5.18. Zur Veranschaulichung ist auf der rechten Seite ein vereinfachtes Schema zu den beobachteten Prozessen gezeigt. Adaptiert aus S. Fröbel et al. [121]

Ein völlig anderes Bild ergibt sich in der Messung von AMT in AT-DNA (Abbildung 5.20). Auf den ersten Blick gleicht dieser Datensatz stark dem von AMT in Wasser (vgl. Abbildung 5.9). Nach der Anregung ist zwar wie in der Messung mit GC-DNA das charakteristische Spektrum des  $S_1$ -Zustands in DNA mit Maxima um 390 nm und 700 nm sichtbar. Jedoch bleibt es in dieser Messung sehr viel länger (etwa 1 ns) bestehen als in den anderen beiden DNA-Proben. Im Anschluss wird ein Spektrum mit einem ausgeprägten Maximum um 500 nm ausgebildet, das aufgrund seiner Ähnlichkeit zur Triplettsignatur in Wasser (vgl. Abbildung 5.9) dem Tripletzustand von AMT innerhalb der DNA-Umgebung zugeordnet wird. Dieser bleibt bis zum Ende des Messzeitfensters bestehen. Die Differenzabsorptionsbande des Tripletzustands um 370 nm, die in der Messung in Wasser stärker ausgeprägt ist, scheint in der DNA-Umgebung jedoch spektral verschoben oder abgeschwächt zu sein. Anzeichen für einen PET sind in diesem Datensatz nicht zu erkennen.

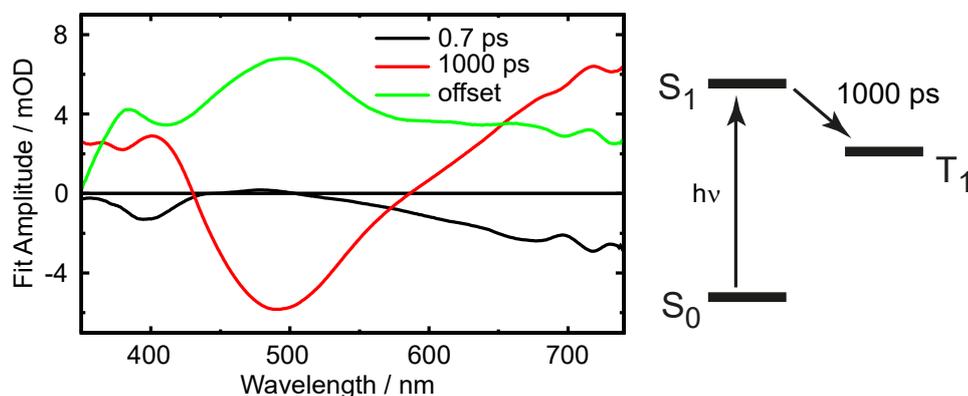


**Abbildung 5.20:** fs-UV/Vis Daten der in AT-DNA interkalierten AMT-Moleküle in wässrigem Phosphatpuffer mit Anregung bei 340 nm. Die Daten wurden nach skaliertem Subtraktion der Signale des freien AMT-Anteils (für Skalierungsverfahren s. Kapitel 3.3.1.1) erhalten. Die Gesamtkonzentrationen in der Lösung betragen  $c_{DNA,bp} = 2,7$  mM und  $c_{AMT} = 0,3$  mM.<sup>[121]</sup>

Eine Anpassung an diese Daten ergibt zwei Zeitkonstanten von ca. 0,7 ps und 1000 ps (Abbildung 5.21). Wie in der Messung an AMT in Wasser beschreibt die erste kinetische Komponente leichte Änderungen in den Bandenformen und -positionen durch Relaxationsprozesse. Deutliche spektrale Änderungen finden in diesem Zeitbereich nicht statt. Die Komponente mit einer Zeitkonstante von 1000 ps wird dem Übergang vom angeregten Singulettzustand zum Tripletzustand von AMT zugeordnet. Der negative Beitrag im

zugehörigen Amplitudenspektrum um 500 nm beschreibt den Anstieg der intensiven Triplettbände. Der Anstieg der relativ schwach ausgeprägten Bande um 380 nm hinterlässt eine Delle im insgesamt positiven Beitrag um 390 nm. Die restlichen positiven Beiträge zeigen den simultanen Zerfall der  $S_1$ -Signatur an. Das *offset*-Spektrum beinhaltet nun die Summe aus der Triplettsignatur und eventuell Ansätzen des Grundzustandsausbleichens im Bereich unter 380 nm.

Im Vergleich zu AMT in Wasser ist die Singulettlebensdauer also auf etwa 70 % des Ausgangswerts reduziert. Eine sehr ähnliche Reduktion dieser Lebensdauer wurde bereits in Messungen der Fluoreszenzlebensdauer von AMT in Anwesenheit von DNA die ausschließlich AT-Basenpaare enthielt beobachtet.<sup>[170]</sup> Dieser Effekt ist sehr wahrscheinlich nicht auf einen langsamen PET, sondern auf die veränderte Lösungsumgebung von AMT zurückzuführen. Die Umgebung innerhalb der DNA ist unpolarer als in Wasser, was zur Verkürzung der  $S_1$ -Lebensdauer führt. Dieser Effekt deckt sich mit der Lösungsmittelabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauern des sehr ähnlichen Trimethylpsoralen und 8MOP.<sup>[171]</sup> Ein weiteres Indiz spricht gegen einen PET. Würde ein PET die Singulettlebensdauer verkürzen, so stünde er in Konkurrenz zur Besetzung des Tripletzustands und ein niedrigeres Triplettsignal als in Wasser wäre zu erwarten. Das Triplettsignal bei 500 nm scheint in AT-DNA jedoch eher erhöht zu sein.<sup>[121]</sup> Abschätzungen zur Triebkraft des Elektrontransfers werden diese Interpretation weiter stützen (s. Kapitel 5.4.3).



**Abbildung 5.21:** Amplitudenspektren zu den fs-UV/Vis Daten von AMT in AT-DNA<sup>[121]</sup> aus Abbildung 5.20. Zur Veranschaulichung ist auf der rechten Seite ein vereinfachtes Schema zu den beobachteten Prozessen gezeigt.

Damit ist Guanin als einzige DNA-Base identifiziert, die einen PET ermöglicht. Wie zu Beginn dieses Kapitels angedeutet, kann die photochemische Kinetik der interkalierten

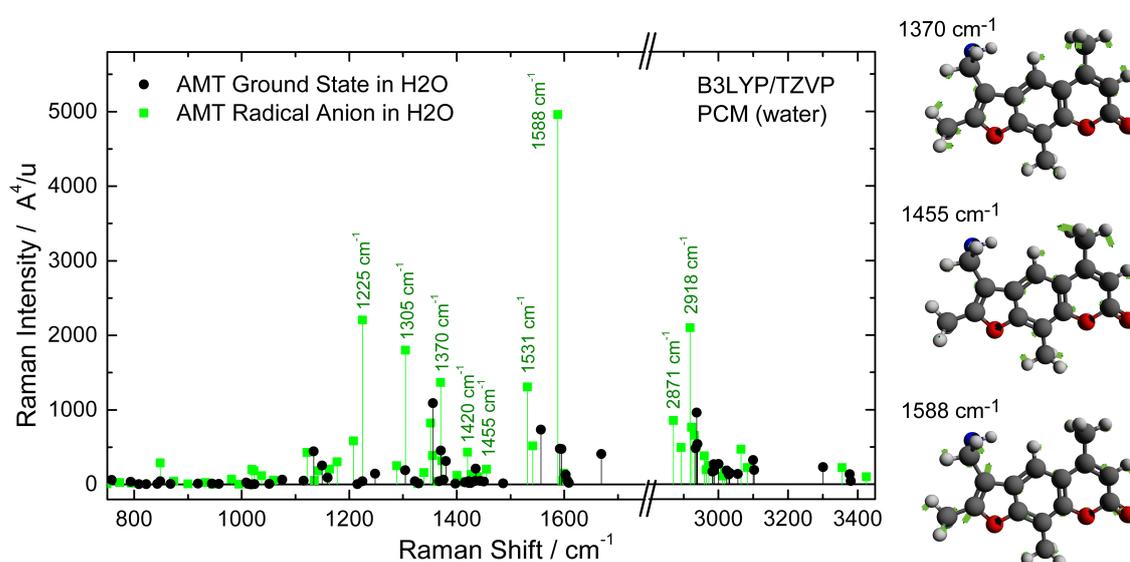
Psoralene also vom Abstand der Interkalationsstelle zum nächsten Guanin abhängen.<sup>[172]</sup> Mit diesem Wissen können die Ergebnisse der Messung an AMT in GTAC-DNA (Abbildung 5.14 & 5.15) weiter analysiert werden. AMT, das in der GTAC-Probe zwischen die beiden AT-Basenpaare interkaliert, könnte durch die größere Distanz zum nächsten Guanin eine von den übrigen Interkalaten abweichende Kinetik aufweisen.<sup>[172]</sup> Dessen Anteil an den interkalierten Molekülen kann im Gleichgewicht nicht genau bestimmt werden. Da die  $K_D$ -Werte von AMT für GC- und AT-DNA sehr ähnlich sind, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass dieser Anteil bei den sieben möglichen Interkalationsstellen der GTAC-DNA maximal ein Siebtel der interkalierten Moleküle ausmacht. Sollte sich sein spektral-zeitliches Verhalten unterscheiden, so scheinen die Amplituden dieser Signale unterhalb der Detektionsgrenze der fs-UV/Vis Experimente zu liegen.

### 5.3.2 Detektion des Elektrontransfers in guaninreicher DNA mittels FSRS

Als Ergänzung zu den fs-UV/Vis Daten zum PET wurden zusätzlich zeitaufgelöste FSRS Experimente an AMT in GC-DNA durchgeführt. Das System eignet sich aus verschiedenen Gründen gut für zeitaufgelöste Untersuchungen mit der hier verwendeten FSRS Apparatur. Zum einen findet der PET mit einer sehr hohen Ratenkonstante statt, was sich über die starke Löschung des  $S_1$ -Zustands in GC-DNA ausdrückt. Die Quantenausbeute für diesen Prozess sollte daher nahe bei eins liegen. Zudem weist das gebildete  $AMT^{\bullet-}$  eine deutliche Absorption bei der Wellenlänge der Raman-pump Impulse von 400 nm auf, sodass Resonanzüberhöhung<sup>[173,174]</sup> zu einer deutlichen Verstärkung einiger FSRS Signale dieser Spezies führen kann.

Zur Abschätzung der Lage der Raman Banden von AMT und  $AMT^{\bullet-}$  wurden quantenchemische (DFT) Berechnungen mithilfe des Programmpakets *Gaussian09*<sup>[175]</sup> durchgeführt (Abbildung 5.22). Dabei wurde der Einfluss des Lösungsmittels über ein polarisierbares Kontinuum Modell (PCM, Befehl *SCRF* in *Gaussian09*) berücksichtigt.<sup>[176]</sup> Nach einer Strukturoptimierung wurden die Spektren für  $AMT^{\bullet-}$  sowohl für Wasser als auch für das unpolarere und besser mit der DNA-Umgebung vergleichbare Pyridin berechnet. Die Unterschiede in den Spektren erwiesen sich jedoch als vernachlässigbar, sodass hier nur das Spektrum für Wasser gezeigt ist. Im Vergleich zu AMT besitzt  $AMT^{\bullet-}$  zahlreiche Resonanzen deren Raman Intensitäten die von AMT deutlich übersteigen. Be-

sonders dominant tritt eine Bande bei  $1588\text{ cm}^{-1}$  hervor. Es ist jedoch zu beachten, dass die Berechnung nicht für Bedingungen mit Resonanz-Raman Überhöhung durchgeführt wurde, da dies deutlich komplexere Methoden erfordern würde. In dem im Folgenden gezeigten Experiment können daher wie erwähnt einige der Banden deutlich verstärkt werden. Da dieser Effekt nicht alle Banden betrifft, weichen die Intensitätsverhältnisse in Resonanz-Raman Spektren meist von denen in einfachen Raman Spektren ab.<sup>[173]</sup> Die spektrale Lage der Banden ändert sich jedoch nicht, sodass diese Information aus den hier berechneten Spektren genutzt werden kann.



**Abbildung 5.22:** Links: Mit dem Programmpaket *Gaussian09*<sup>[175]</sup> über Dichtefunktionaltheorie (B3LYP/TZVP) berechnete Raman Spektren von AMT im Grundzustand (schwarz) und von  $\text{AMT}^{\bullet-}$  (grün) in Wasser. Lösungsmittelleffekte wurden über ein polarisierbares Kontinuum Modell<sup>[176]</sup> berücksichtigt und die Frequenzachse mit dem Skalierungsfaktor 0,965 korrigiert.<sup>[177]</sup> Rechts: Kraftvektoren (grüne Striche) der Schwingungsmoden von AMT, die im FSRS Experiment sichtbar werden (s. unten).

Sämtliche Banden im stationären FSRS Spektrum der Lösung (Abbildung 5.23 rechts, oberes Fenster) können auf Resonanzen des Lösungsmittels (Phosphatpuffer in  $\text{D}_2\text{O}$ ) und der DNA zurückgeführt werden. Bei der Konzentration von nur 1,5 mM sind keine FSRS Banden von AMT erkennbar, insbesondere da für den Grundzustand des Moleküls keine Resonanzüberhöhung zu erwarten ist. Entsprechend werden im zeitaufgelösten FSRS Experiment (Abbildung 5.23 links & unteres Fenster rechts) auch keine deutlichen negativen Signale durch Grundzustandsausbleichen beobachtet. Jedoch werden im zugänglichen

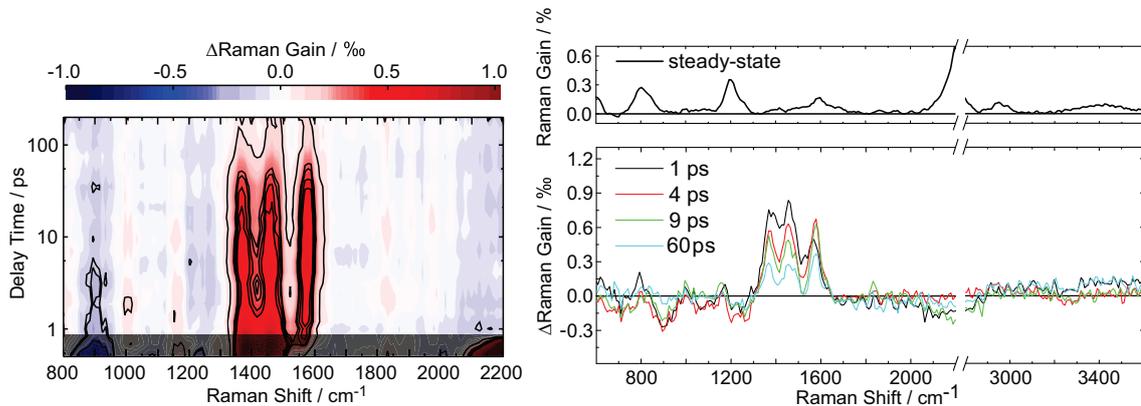
Spektralbereich von etwa  $400\text{ cm}^{-1}$  bis  $3800\text{ cm}^{-1}$  drei intensive transiente FSRS Signale bei  $1370\text{ cm}^{-1}$ ,  $1455\text{ cm}^{-1}$  und  $1580\text{ cm}^{-1}$  sichtbar. Alle drei Frequenzen stimmen gut mit Resonanzen im berechneten Spektrum von  $\text{AMT}^{\bullet-}$  überein und können daher vermutlich dieser Spezies zugeordnet werden.<sup>18</sup> Der Charakter der jeweiligen Schwingungsmoden ist durch die Kraftvektoren in Abbildung 5.22 angedeutet. Die Moden bei  $1370\text{ cm}^{-1}$  und  $1455\text{ cm}^{-1}$  sind im Wesentlichen durch CH-Biegeschwingungen an den Methylsubstituenten in 4- und 5'-Position bzw. in 4- und 8-Position bestimmt, während die Mode bei  $1580\text{ cm}^{-1}$  den Charakter einer Valenzschwingung der 4'-5'-Doppelbindung besitzt. Jedoch ist auch nicht völlig auszuschließen, dass das Signal bei  $1580\text{ cm}^{-1}$  dem simultan entstehenden Radikalkation von Guanin zuzuschreiben ist. In einer sehr aktuellen Arbeit zu einem PET von DNA zu einem anderen Chromophor wurde ein FSRS Signal bei  $1565\text{ cm}^{-1}$  dieser Spezies zugeordnet.<sup>[178]</sup> Auch in diesem Fall kann die Entstehung des Signals als Indikator für das Ablaufen des PET von Guanin zu AMT gesehen werden.

Im zeitaufgelösten FSRS Experiment ist die Entstehung der Bande bei  $1580\text{ cm}^{-1}$  nach 1 ps deutlich zu erkennen. Die Entstehung der beiden anderen Banden wird jedoch teilweise durch ein intensives kohärentes Artefakt, das erst bei etwa 1 ps abklingt überdeckt. Ähnliche Artefakte sind im frühen Zeitbereich um  $900\text{ cm}^{-1}$  und  $2150\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen. Solche Artefakte treten häufig in zeitaufgelösten FSRS Messungen auf.<sup>[125,138]</sup> Sie sind besonders dann zu erwarten, wenn alle drei Impulse zeitgleich auf die Probe treffen. Bei den hier gewählten Einstellungen des Raman-pump Impulses besitzt dieser eine Dauer von etwas mehr als 1 ps (FWHM, SchlitzEinstellung  $400\text{ }\mu\text{m}$ , s. Kapitel 3.3.2 & 4.2), was das Auslaufen der Artefakte bis fast zu 1 ps erklärt. Die drei transienten FSRS Banden zerfallen etwa zeitgleich unterhalb von 100 ps wieder.<sup>19</sup>

---

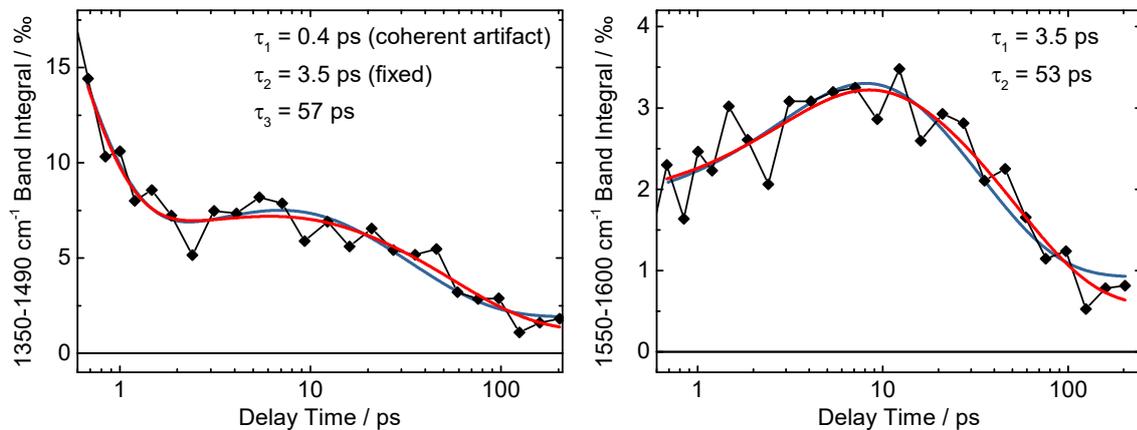
<sup>18</sup>Unter den angegebenen Bedingungen sollten mehr als 90 % des AMT interkaliert sein ( $K_D = 1,8 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ ). Langlebige Signalbeiträge von nicht-interkaliertem AMT mussten in diesem Fall nicht subtrahiert werden, da sie offenbar unter dem Rauschniveau liegen.

<sup>19</sup>Ein analoges Experiment wurde auch in nicht-deuterierter Lösung durchgeführt. Die beobachteten Signaturen und Zeitkonstanten (ca. 3 ps und 30 ps) sind dabei vergleichbar. Jedoch ist das Signal-zu-Rauschen Verhältnis deutlich niedriger, da die breite Raman Resonanz von Wasser um  $1600\text{ cm}^{-1}$  die Signale überlagert.



**Abbildung 5.23:** Links: Konturdarstellung der FSRS Daten zu 1,5 mM AMT mit GC-DNA ( $c_{DNA,bp} = 3,2$  mM) in Phosphatpuffer auf D<sub>2</sub>O-Basis (s. Kapitel 3.1) mit Anregung bei 350 nm. Raman Banden bei 1370 cm<sup>-1</sup>, 1455 cm<sup>-1</sup> und 1580 cm<sup>-1</sup> werden sichtbar und zerfallen in weniger als 100 ps wieder. Der frühe Zeitbereich, in dem kohärente Artefakte die Messung stören, ist grau gekennzeichnet. Rechts: Transiente FSRS Spektren zu ausgewählten Zeitpunkten (unteres Fenster) und stationäres FSRS Spektrum der Lösung.

Zur genaueren Analyse der beobachteten Kinetik wurde zunächst eine biexponentielle Anpassung an das Zeitverhalten der Bande um 1580 cm<sup>-1</sup> durchgeführt (Abbildung 5.24 rechts). Dazu wurde in einem ersten Schritt das Integral der Bande berechnet, um das Signal-zu-Rauschen Verhältnis der Daten zu verbessern. Die Anpassung an dieses Integral liefert Zeitkonstanten von 3,5 ps und 53 ps, die aufgrund des immer noch hohen Rauschens mit verhältnismäßig großen Standardfehlern von 1,78 ps und 18,7 ps belegt sind. Die Anpassung an die anderen beiden Banden wurde nach Berechnung der Summe ihrer Integrale durchgeführt, da sich beide Banden zeitlich gleich verhalten (Abbildung 5.24 links). Bei der Anpassung an diese Daten ist durch das Abklingen des kohärenten Artefakts ein weiterer Exponentialterm erforderlich. Abgesehen von diesem Term, der eine Zeitkonstante von 0,4 ps besitzt, lassen sich die Daten bei Verwendung der Zeitkonstanten für die 1580 cm<sup>-1</sup> Bande gut reproduzieren. Eine globale multiexponentielle Anpassung an alle drei Banden ergibt sehr ähnliche Zeitkonstanten von 0,3 ps, 4,7 ps und 54 ps. In allen Fällen wurde die Endamplitude der Anpassungsfunktionen variabel gelassen.



**Abbildung 5.24:** Links: Zeitverhalten des Integrals der beiden Banden um  $1370\text{ cm}^{-1}$  und  $1455\text{ cm}^{-1}$  (schwarz) mit triexponentieller Anpassung (rot). Der erste Exponentialterm wird durch das Abklingen eines kohärenten Artefakts notwendig. Rechts: Zeitverhalten des Integrals der Bande um  $1580\text{ cm}^{-1}$  (schwarz) mit biexponentieller Anpassung (rot). Zusätzlich sind in beiden Diagrammen Anpassungsfunktionen gezeigt, bei denen die Zeitkonstanten aus den UV/Vis Experimenten (4 ps & 30 ps, Abbildung 5.19) festgelegt wurden (blau). Die Daten lassen sich auch mit diesen Zeitkonstanten gut beschreiben.

Berücksichtigt man die Fehlergrenzen sowohl der FSRS als auch der fs-UV/Vis Daten von AMT in GC-DNA, so sind die beobachteten Zeitkonstanten beider Experimente in guter Übereinstimmung (vgl. Kapitel 5.3.1). Da die Lage der in den FSRS Daten beobachteten Banden gut mit für  $\text{AMT}^{\bullet-}$  berechneten Resonanzfrequenzen – beziehungsweise mit einer in der Literatur<sup>[178]</sup>  $\text{G}^{\bullet+}$  zugeordneten Bande – übereinstimmt, unterstützen die Resultate des zeitaufgelösten FSRS Experiments die Zuordnung der fs-UV/Vis Signaturen zu Bildung und Zerfall eines Radikationenpaares in der DNA.

## 5.4 Einfluss der Psoralensubstitution auf den Elektrontransfer

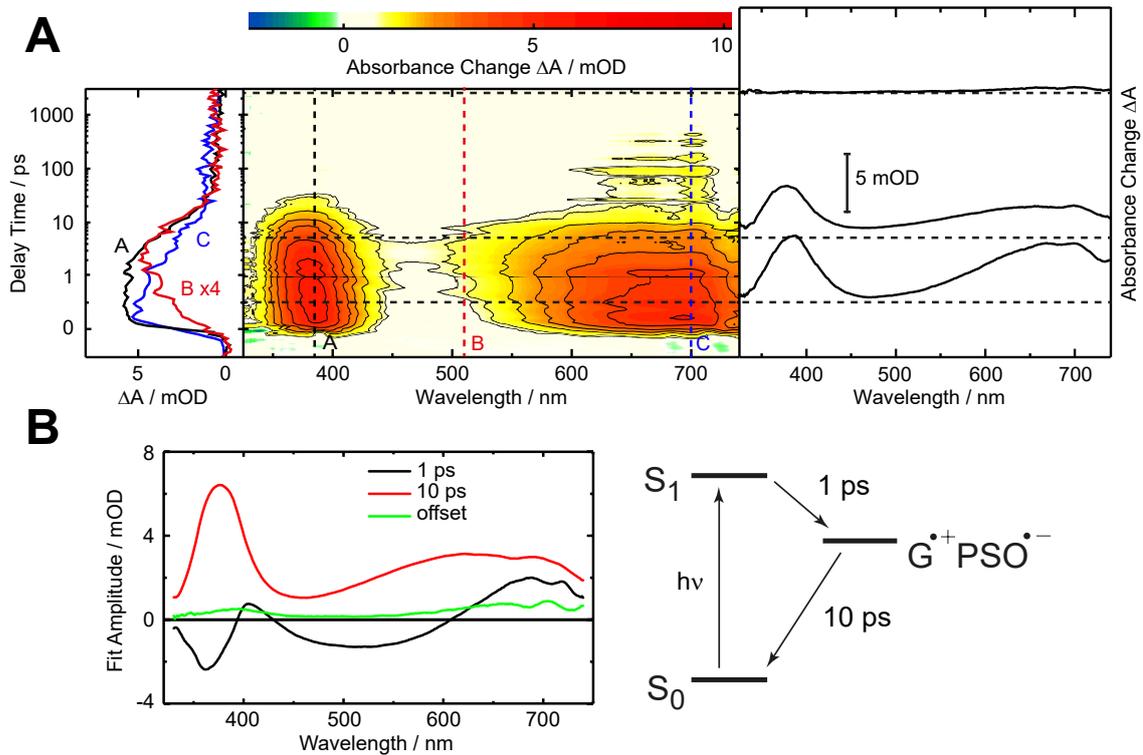
Das Psoralenderivat AMT stellt bezüglich seiner Wasserlöslichkeit und hohen Interkalationsaffinität einen Sonderfall unter den Psoralenen dar (vgl. Kapitel 1 & 5.1.1). Im Rahmen der PUVA-Therapie wird es nicht eingesetzt. Im Gegensatz zu den meisten Psoralenen trägt es in wässriger Lösung unter physiologischen Bedingungen eine positive Ladung in Form einer Ammoniumgruppe, die die Triebkraft für einen PET prinzipiell beeinflussen könnte. An dieser Stelle wäre also prinzipiell denkbar, dass ein PET mit Derivaten, die für die PUVA-Therapie eingesetzt werden, nicht stattfindet. Es mussten daher Experimente mit weiteren Psoralenderivaten durchgeführt werden, um Aussagen über die photochemischen Prozesse in Anwendungen wie der PUVA-Therapie treffen zu können. Als repräsentative Verbindungen wurden die Stammverbindung PSO, sowie das häufig in der PUVA-Therapie eingesetzte Derivat 8MOP ausgewählt. Die geringere Wasserlöslichkeit und Interkalationsaffinität dieser Derivate führt generell zu höheren Anteilen an nicht-interkalierten Molekülen (oft im Bereich  $> 50\%$ ), was die Experimente im Vergleich zu denen an AMT erschwert. Zur Bestimmung der Kinetik möglicher PET Prozesse wurden fs-UV/Vis Experimente für diese Psoralene nur in Kombination mit GC-DNA durchgeführt.

### 5.4.1 Die Stammverbindung: Psoralen

Für die Stammverbindung PSO in Kombination mit GC-DNA wurde eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 3,4 \cdot 10^{-3}$  M bestimmt (siehe Abbildung A.4 im Anhang). Dies führt im fs-UV/Vis Experiment zu einem Anteil von nur 49 % interkalierten Molekülen (Abbildung 5.25, A). Entsprechend sinkt durch das Subtraktionsverfahren (Kapitel 3.3.1.1) das Signal-zu-Rauschen Verhältnis. Dennoch ist klar sichtbar, dass das photophysikalische Verhalten dem von AMT in GC-DNA (vgl. Abbildung 5.18) stark ähnelt.

Die Signatur des  $S_1$ -Zustands von PSO in DNA mit Maxima um 385 nm und 700 nm gleicht der von AMT stark. Wieder ist die 700 nm Bande deutlich breiter und es sind keine negativen Beiträge von stimulierter Emission vorhanden. Die Signatur bleibt für etwa 1 ps bestehen, bis ein verändertes Spektrum mit einer intensiven Bande um ca. 375 nm und einer schwächeren, breiten Bande die in diesem Fall um 630 nm liegt,

sichtbar wird. Die Daten sind durch das schlechtere Signal-zu-Rauschen Verhältnis nicht so eindeutig wie im Fall von AMT. Die starke Reduktion der  $S_1$ -Lebensdauer im Vergleich zu Wasser (ca. 830 ps) und die große Ähnlichkeit zu den Daten von AMT erlaubt jedoch die Zuordnung des zweiten Spektrums zu einem Radikalpaar, das durch einen PET gebildet wird. Dieses zerfällt im Zeitbereich von etwa 10 ps. Die Entstehung und der Zerfall des Radikalpaars lässt sich erneut gut im Wellenlängenbereich um 500 nm (Zeitverlauf *B* in Abbildung 5.25, A) beobachten. Durch die geringe Signalstärke von PSO wird in der Konturdarstellung eine schwache positive Differenzabsorption im Bereich um 700 nm sichtbar, die länger bestehen bleibt als die Signatur des Radikalpaars. Sie kann der Anwesenheit von geringen Konzentrationen von solvatisierten Elektronen zugeschrieben werden, die in fs-Experimenten an wässrigen Pufferlösungen häufig beobachtet werden (vgl. Kapitel 5.2).<sup>[155,156]</sup> Diese Beiträge zum Signal sind jedoch äußerst gering, was in den transienten Spektren und Zeitverläufen deutlich wird (vgl. Zeitverlauf *C* und Spektrum um 2,5 ns in Abbildung 5.25, A). Auch in diesem Datensatz sind keine Anzeichen für die Besetzung eines Triplettzustandes zu erkennen.



**Abbildung 5.25:** A: fs-UV/Vis Daten der in GC-DNA interkalierten PSO-Moleküle in wässrigem Phosphatpuffer mit Anregung bei 340 nm. Die Daten wurden nach skalierter Subtraktion der Signale des freien PSO-Anteils (für Skalierungsverfahren s. Kapitel 3.3.1.1) erhalten. Die Gesamtkonzentrationen in der Lösung betragen  $c_{DNA,bp} = 3,4$  mM und  $c_{PSO} = 0,3$  mM.<sup>[121]</sup>

B: Amplitudenspektren zu den fs-UV/Vis Daten von PSO in GC-DNA.<sup>[121]</sup> Zur Veranschaulichung ist auf der rechten Seite ein vereinfachtes Schema zu den beobachteten Prozessen gezeigt.

Eine globale multiexponentielle Anpassung an die Daten ergibt Zeitkonstanten von 1 ps und 10 ps für die Bildung und den Zerfall des Radikalpaars. Die Form der Amplitudenspektren gleicht der von AMT in GTAC- und GC-DNA, sodass sie analog interpretiert werden können. Die Ladungstrennung und -rekombination laufen im Fall von PSO jedoch etwas schneller ab als bei AMT. Eine Begründung dafür wird ein Vergleich der Triebkräfte für den PET in Kapitel 5.4.3 liefern.

### 5.4.2 Ein häufig appliziertes Derivat: 8-Methoxypsoralen

Als Beispiel für ein Psoralen, das häufig im Rahmen der PUVA-Therapie zur Behandlung von Hautkrankheiten eingesetzt wird, wurde 8MOP ausgewählt. Untersuchungen an diesem Derivat sind zusätzlich dadurch interessant, dass sich in Bezug auf die Zustände, die an der Photoadditionsreaktion dieses Derivats mit DNA beteiligt sein sollen, widersprüchliche Aussagen in der Literatur finden (vgl. Kapitel 1). Bezogen auf die GC-DNA beträgt  $K_D$  für 8MOP  $2,6 \cdot 10^{-3}$  M (siehe Abbildung A.4 im Anhang). Der Anteil der interkalierten Moleküle im fs-UV/Vis Experiment (Abbildung 5.26) beträgt damit 46 %.

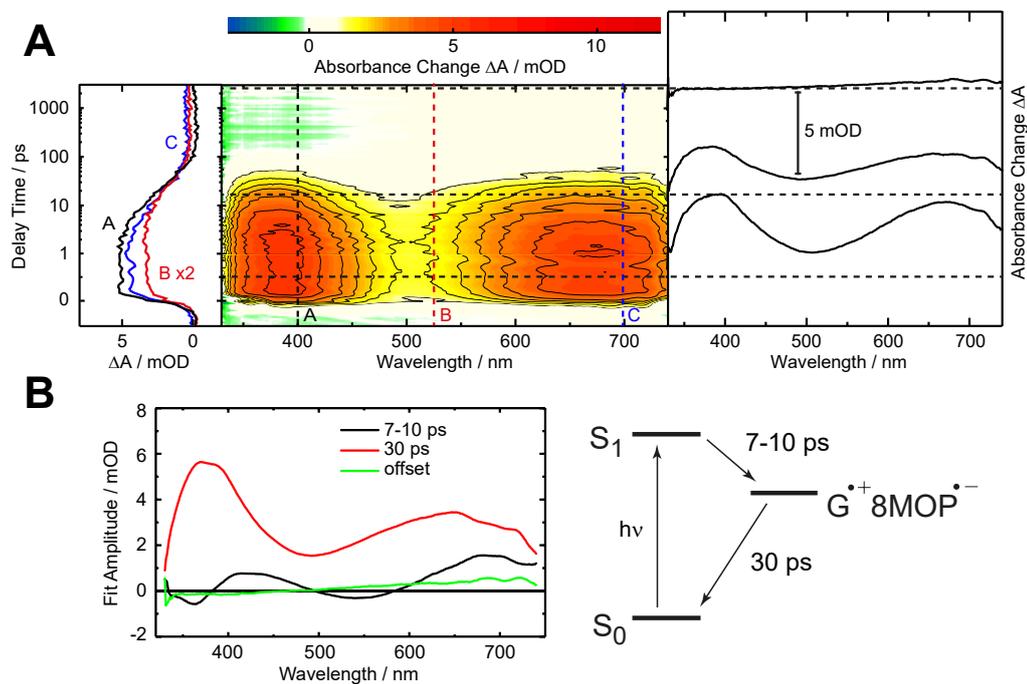
Wie im fs-UV/Vis Experiment an 8MOP in wässriger Lösung (Abbildung 5.11, A), ist die Differenzabsorptionsbande des  $S_1$ -Zustands um 385 nm in DNA deutlich breiter als die der anderen Derivate.<sup>20</sup> Ansonsten gleicht die  $S_1$ -Signatur, die unmittelbar nach der Anregung sichtbar ist, der von AMT und PSO (vgl. Abbildung 5.18 & 5.25). Im Unterschied zu den Messungen an den beiden anderen Derivaten ist die Bildung eines Radikalpaars hier nicht auf Anhieb zu erkennen. Auch im Bereich um 500 nm wird durch die Verbreiterung der Banden kein deutlicher Anstieg sichtbar. In der Konturdarstellung ist um 10 ps jedoch die charakteristische Verschiebung des Absorptionsmaximums von 385 nm zu ca. 375 nm zu beobachten. Zudem ist auch hier die  $S_1$ -Lebensdauer im Vergleich zum Experiment in Wasser (ca. 900 ps) um ein vielfaches reduziert. Nach etwa 50 ps bleibt nahezu keine Differenzabsorption bestehen.

Die globale multiexponentielle Anpassung an die Daten zeigt schließlich, dass auch in diesem Fall ein effizienter PET stattfindet. Werden analog zur Auswertung der anderen Derivate zwei kinetische Komponenten und ein *offset* für die Anpassung verwendet, so finden sich die charakteristischen Signaturen eines PET in den Amplitudenspektren wieder (Abbildung 5.26, B). Die erste Komponente besitzt eine Zeitkonstante zwischen 7 ps und 10 ps. Ihr numerischer Wert hängt von den Startbedingungen der Anpassung ab und kann daher nicht genauer eingegrenzt werden. Die Form des zugehörigen Amplitudenspektrums (Abbildung 5.26, B, schwarze Linie) ist bis auf kleine Abweichungen unabhängig von den Startbedingungen. Ähnlich wie bei den anderen Derivaten enthält dieses Spektrum positive Beiträge im Bereich um 430 nm und 700 nm, die den Zerfall der  $S_1$ -Signatur anzeigen, und negative um 370 nm und 520 nm, die die Entstehung des

---

<sup>20</sup>Das fs-UV/Vis Experiment an 8MOP in GC-DNA wurde mit einer Anregungswellenlänge von 325 nm durchgeführt, da die Absorption von 8MOP im UV-A Bereich schwächer ausgeprägt ist als die der anderen Derivate (vgl. Abbildung 5.1).

Radikalpaarspektrums andeuten (vgl. Abbildung 5.19 & 5.25, B). In diesem Fall sind die Amplituden durch die kleineren Unterschiede zwischen beiden Spektren jedoch geringer. Für den Zerfall des Radikalpaars ergibt sich eine Zeitkonstante von 30 ps. Abgesehen von der Verbreiterung der kurzwelligen Bande gleicht das zugehörige Amplitudenspektrum (Abbildung 5.26, B, rote Linie) denen von AMT und PSO. Im *offset*-Spektrum sind erneut nur geringe Amplituden durch Imperfektionen bei der Subtraktion der Daten des freien Anteils 8MOP und niedrige Mengen solvatisierter Elektronen zu erkennen. Auch hier gibt es keine Anzeichen für die Besetzung von Triplettzuständen.



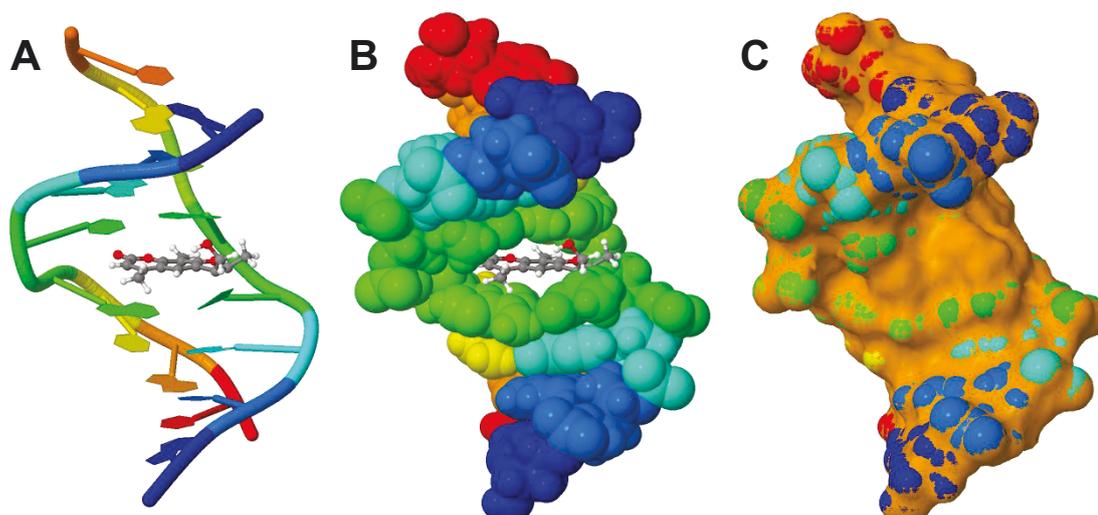
**Abbildung 5.26:** A: fs-UV/Vis Daten der in GC-DNA interkalierten 8MOP-Moleküle in wässrigem Phosphatpuffer mit Anregung bei 325 nm. Die Daten wurden nach skaliertem Subtraktion der Signale des freien 8MOP-Anteils (für Skalierungsverfahren s. Kapitel 3.3.1.1) erhalten. Die Gesamtkonzentrationen in der Lösung betragen  $c_{DNA,bp} = 3,2$  mM und  $c_{8MOP} = 0,2$  mM.<sup>[121]</sup>

B: Amplitudenspektren zu den fs-UV/Vis Daten von 8MOP in GC-DNA.<sup>[121]</sup> Zur Veranschaulichung ist auf der rechten Seite ein vereinfachtes Schema zu den beobachteten Prozessen gezeigt.

### 5.4.3 Vergleich der Transfer-Kinetiken mit Elektrontransfertheorie

Die fs-UV/Vis Experimente in den vorangegangenen Kapiteln haben gezeigt, dass benachbarte Guanine die angeregten Singulettzustände aller DNA-interkalierten Psoralene durch einen PET im Pikosekundenbereich löschen. Die Kinetik der PETs unterscheidet sich jedoch für die verschiedenen Derivate leicht. So läuft beispielsweise die Ladungstrennung bei PSO (1 ps) in etwa zehnmal schneller ab als bei 8MOP (7-10 ps). Diese Unterschiede können durch unterschiedlich große freie Reaktionsenthalpien  $\Delta G_{CS}^{\circ}$  (bzw. Triebkräfte  $-\Delta G_{CS}^{\circ}$ ) für die Elektrontransferprozesse erklärt werden (vgl. Kapitel 2.2). Um diese freien Reaktionsenthalpien zu quantifizieren und damit die beobachteten kinetischen Unterschiede erklären zu können, muss zunächst geklärt werden, ob es sich bei den gebildeten Radikationenpaaren um solvensseparierte oder Kontaktionenpaare handelt (s. Kapitel 2.2).

Als Elektrondonor fungiert bei Verwendung der GC-DNA in jedem Fall eine Guaninbase in der DNA, die durch kein weiteres Basenpaar vom interkalierten Psoralenderivat getrennt ist. Es stellt sich jedoch die Frage, ob der Abstand zwischen Elektrondonor und -akzeptor in der DNA für die Einlagerung von Solvensmolekülen ausreicht. Ist dies nicht der Fall, bildet sich ein Kontaktionenpaar aus und die Gleichungen 2.7 und 2.8 können zur Bestimmung der Triebkräfte für die Elektrontransfers verwendet werden. Für DNA-interkalierte Psoralene sind keine genauen Strukturen veröffentlicht, die eine Abschätzung des Abstands erlauben. Jedoch sind über NMR-Spektroskopie bestimmte Strukturen der Mono- und Diaddukte des Psoralenderivats 4'-Hydroxymethyl-4,5',8-trimethylpsoralen in einem DNA-Molekül mit der Sequenz der GTAC-DNA (s. Kapitel 5.1.2) bekannt.<sup>[179]</sup> Anhand dieser Strukturen wird ersichtlich, dass die Elektrondonoren und -akzeptoren innerhalb der DNA aufgrund des sterischen Anspruchs der Psoralene nicht durch Solvensmoleküle separiert sein können (Abbildung 5.27). In einer Darstellung, in der die Van-der-Waals Radien der Atome in der DNA verwendet werden, deutet sich dies bereits an (Abbildung 5.27, B). Zusätzlich lässt sich im verwendeten Darstellungsprogramm Jmol<sup>[180]</sup> eine Abschätzung der für Solvensmoleküle unzugänglichen Bereiche anzeigen (Abbildung 5.27, C). Diese unterstützt die Vermutung, dass bei den PET Prozessen in der DNA CIP ausgebildet werden müssen.

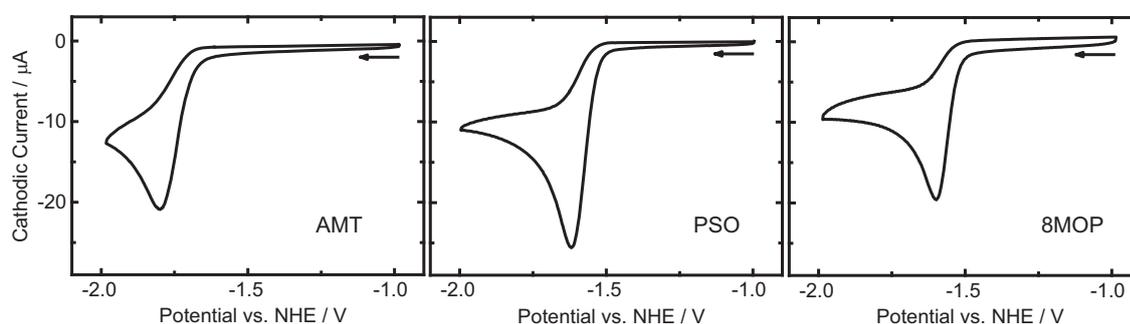


**Abbildung 5.27:** Über NMR-Spektroskopie bestimmte Strukturen des Furanmonoaddukts von 4'-Hydroxymethyl-4,5',8-trimethylpsoralen (HMT) an GTAC-DNA<sup>[179]</sup> (PDB Eintrag 203D<sup>[181]</sup>). A: DNA in *Cartoon*-Darstellung, HMT als Kugel-Stab-Modell, B: DNA Atome mit der Größe ihrer Van-der-Waals-Radien, HMT als Kugel-Stab-Modell, C: Zusätzlich zu der Darstellung aus B ist in orange eine Abschätzung der für Solvensmoleküle unzugänglichen Bereiche angezeigt.

Für die Berechnung der Triebkräfte können also die Gleichungen 2.7 und 2.8 verwendet werden. In diesem Fall werden neben den zuvor angegebenen 0,0-Übergangsenergien  $E_{00}$  der Psoralene (s. Tabelle 5.1) explizit die Standardelektrodenpotenziale der Elektronendonoren und -akzeptoren in Acetonitril benötigt (s. Kapitel 2.2). Für isolierte DNA-Basen in Acetonitrillösung wurden diese Potenziale bereits publiziert. Sie betragen 1,47 V gegen die Normalwasserstoffelektrode (NHE) für die Oxidation von Guanin und 1,94 V für die Oxidation von Adenin.<sup>[19]</sup> Natürlich können die Potenziale innerhalb der DNA durch Protonierungsgleichgewichte oder Wechselwirkungen zwischen den Basen leicht beeinflusst werden.<sup>[167,182]</sup> Im Rahmen der hier verwendeten Gleichungen<sup>[99]</sup> sollen die für die isolierten Nukleobasen publizierten Werte jedoch für eine Abschätzung der Triebkräfte ausreichen.

Für die Reduktion der hier verwendeten Psoralenderivate sind in der Literatur bislang keine Angaben zu den Standardelektrodenpotenzialen zu finden. Sie wurden daher in Kooperation mit dem Institut für Organische und Makromolekulare Chemie über cyclovoltammetrische (CV) Messungen bestimmt (Abbildung 5.28). Der Potenzialbereich reichte dabei von  $-1$  V (vs. NHE) bis  $-2$  V. Bei allen Psoralenen zeigt sich ein Maximum

im Stromfluss im Bereich zwischen  $-1,6$  V und  $-1,8$  V. Bei Umkehr der Scanrichtung sind keine Banden zu beobachten. Damit zeigen alle drei Cyclovoltammogramme irreversible Reduktionen der Psoralene an.<sup>[183]</sup> Die direkte Bestimmung der Standardelektrodenpotenziale für ihre Reduktion  $E_{MeCN}^0(A/A^{\bullet-})$  ist so zunächst nicht möglich. In einem ersten Schritt wurden daher die kathodischen Peakpotenziale  $E_{cp}$  abgelesen (s. Tabelle 5.2). Das gemessene Peakpotenzial von 8MOP von  $-1,60$  V deckt sich recht gut mit einem Literaturwert von  $-1,55$  V (vs. NHE).<sup>[166]</sup> Für die anderen Psoralene sind keine Vergleichswerte vorhanden.



**Abbildung 5.28:** Cyclovoltammogramme zur Reduktion von 2 mM Lösungen der Psoralene in Acetonitril (Leitsalz: 100 mM Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat, Scangeschwindigkeit: 100 mV/s).<sup>21</sup> Die Pfeile zeigen den Startpunkt und die Richtung der Scans an. Adaptiert aus S. Fröbel et al.<sup>[121]</sup>

Auch bei höheren Scangeschwindigkeiten (nicht gezeigt) zeigen die Psoralene irreversibles Verhalten. Dies deutet auf schnelle Folgereaktionen der gebildeten Radikalanionen hin. Solche Reaktionen werden sehr wahrscheinlich mit Kinetiken (pseudo)-erster Ordnung oder zweiter Ordnung ablaufen. In beiden Fällen kann  $E_{MeCN}^0(A/A^{\bullet-})$  aus den  $E_{cp}$  errechnet werden, wenn die Geschwindigkeitskonstanten für die Folgereaktionen abgeschätzt werden können. Folgende Ausdrücke ergeben sich für Reaktionen (pseudo)-erster<sup>[186]</sup> (Gleichung 5.1) und zweiter<sup>[187]</sup> Ordnung (Gleichung 5.2):

<sup>21</sup>Die Cyclovoltammogramme wurden im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Organische und Makromolekulare Chemie von Dr. Lucilla Levi aufgenommen (Arbeitselektrode: glasiges Carbon, Gegenelektrode: Platindraht, Referenzelektrode: Ag/AgCl, 3,5 M KCl). Die gemessenen Potenziale wurden in zusätzlichen Messungen mit Ferrocenzugabe ( $E_{1/2}^{0/+1} = 440$  mV<sup>[157,184]</sup>) als internem Standard kalibriert und durch Addition von 205 mV<sup>[185]</sup> auf Werte gegen NHE umgerechnet (s. S. Fröbel et al.<sup>[121]</sup>).

$$E_{MeCN}^0(A/A^{\bullet-}) = E_{cp} - \left[ \frac{RT}{2nF} \ln \left( \frac{k_f RT}{\nu nF} - 1,56 \right) \right] \quad (5.1)$$

$$E_{MeCN}^0(A/A^{\bullet-}) = E_{cp} - \left[ \frac{RT}{3nF} \ln \left( \frac{k_b c_{ges} RT}{\nu nF} - 3,12 \right) \right] \quad (5.2)$$

Hierbei ist  $R$  die allgemeine Gaskonstante,  $T$  die Temperatur,  $F$  die Faraday-Konstante,  $n$  die Zahl der übertragenen Elektronen,  $c_{ges}$  die Gesamtkonzentration der Psoralene,  $k_f$  und  $k_b$  die Geschwindigkeitskonstanten erster und zweiter Ordnung und  $\nu$  die Scangeschwindigkeit.

In der Literatur wurden Reaktionen der Radikalanionen mit Wasser aus dem Restwassergehalt in Acetonitril ( $\gtrsim 0,02$  Vol.-%, entspricht ca. 11 mM) als Zerfallsweg für  $8MOP^{\bullet-}$  in CV Experimenten vorgeschlagen.<sup>[166]</sup> Solche Reaktionen würden genähert mit einer Kinetik pseudo-erster Ordnung verlaufen. Nimmt man an, dass die Folgereaktionen tatsächlich nach erster Ordnung verlaufen und dass sich alle Psoralene ähnlich verhalten, so kann die Lebensdauer der Radikalanionen im Blitzlichtphotolyseexperiment, in dem das Spektrum von  $AMT^{\bullet-}$  in Acetonitril bestimmt wurde (s. Kapitel 5.3), für die Abschätzung von  $k_f$  verwendet werden. In diesem Experiment betrug die Lebensdauer von  $AMT^{\bullet-}$  ca. 10  $\mu$ s. Damit läge  $k_f$  im Bereich von  $10^5$   $s^{-1}$ . Unter diesen Annahmen beträgt die Differenz  $E_{MeCN}^0(A/A^{\bullet-}) - E_{cp}$  bei der Scangeschwindigkeit von 100 mV/s ca.  $-0,1$  V.

Folgereaktionen zweiter Ordnung können jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. Dadurch ergibt sich eine gewisse Unsicherheit bei der Bestimmung der  $E_{MeCN}^0(A/A^{\bullet-})$  Werte. Für  $k_b \approx 10^6 - 10^9$   $M^{-1}s^{-1}$  lägen die Differenzen  $E_{MeCN}^0(A/A^{\bullet-}) - E_{cp}$  im Bereich von  $-0,03$  V bis  $-0,1$  V. Für die weiteren Berechnungen wurde der Wert von  $E_{MeCN}^0(A/A^{\bullet-}) - E_{cp} = -0,1$  V verwendet, den man für Reaktionen erster Ordnung und schnelle Reaktionen zweiter Ordnung erwartet (s. Tabelle 5.2).

Zur Berechnung der Triebkräfte für die photoinduzierte Ladungstrennung  $-\Delta G_{CS}^{\circ}$  und die anschließende Rekombination  $-\Delta G_{CR}^{\circ}$  (Gleichungen 2.7 & 2.8) müssen schließlich noch die Parameter des Arbeitsterms festgelegt werden. Der Abstand zwischen interkaliertem Psoralen und dem benachbarten Guanin in der GC-DNA entspricht in etwa dem Abstand zweier Basenpaare (vgl. Abbildung 5.27), der  $3,4 \text{ \AA}^{[2]}$  beträgt. Da bei den PET Prozessen eine Elementarladung  $e$  über etwa diese Strecke übertragen wird, kann das Dipolmoment  $\mu$  des CIP als  $e \cdot 3,4 \text{ \AA}$  genähert werden.<sup>[109,121]</sup> Der Kugelradius  $a$  des CIP

**Tabelle 5.2:** Über Cyclovoltammetrie bestimmte Parameter der Psoralene (vs. NHE).<sup>[121]</sup> Die kathodischen Peakpotenziale  $E_{cp}$  wurden aus den Daten in Abbildung 5.28 bestimmt. Mithilfe dieser Werte wurden die Standardelektrodenpotenziale  $E_{MeCN}^0(A/A^{\bullet-})$  wie im Text beschrieben abgeschätzt. Die experimentellen bzw. rechnerischen Unsicherheiten sind in Klammern angegeben.

	$E_{cp} / V$	$E_{MeCN}^0(A/A^{\bullet-}) / V$
AMT	-1,80 ( $\pm 0,02$ )	-1,90 ( $\pm 0,07$ )
PSO	-1,62 ( $\pm 0,02$ )	-1,72 ( $\pm 0,07$ )
8MOP	-1,60 ( $\pm 0,02$ )	-1,70 ( $\pm 0,07$ )

wird auf 4 Å geschätzt.<sup>[109,121]</sup> Der effektive Wert für die relative Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_r$  der DNA ist nicht exakt bekannt und wurde bereits in Kapitel 5.3 diskutiert. Der Einfluss von  $\epsilon_r$  auf den Betrag des Arbeitsterms ist jedoch ohnehin eher gering. Variiert man  $\epsilon_r$  im Bereich zwischen 15 und 80, variiert der Wert des Arbeitsterms lediglich zwischen -0,3 eV und -0,4 eV. Basierend auf der Diskussion in Kapitel 5.3 wird hier ein Wert von  $\epsilon_r = 20$  gewählt. Damit ergibt sich für den Arbeitsterm ein Betrag von 0,34 eV, um den  $\Delta G_{CS}^\circ$  abgesenkt und  $\Delta G_{CR}^\circ$  angehoben wird. Die freien Reaktionsenthalpien für alle relevanten Ladungstrennungs- und -rekombinationsprozesse der drei Psoralenderivate sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

**Tabelle 5.3:** Freie Reaktionsenthalpien für die photoinduzierte Ladungstrennung  $\Delta G_{CS}^\circ$  und die Rekombination  $\Delta G_{CR}^\circ$  der DNA-interkalierten Psoralene nach Gleichung 2.7 & 2.8. Für die Berechnung dieser Werte wurden die Standardelektrodenpotenziale aus Tabelle 5.2 verwendet. Ihre Genauigkeit wird zu circa  $\pm 0,07$  eV abgeschätzt.<sup>[121]</sup>

	$\Delta G_{CS}^\circ / eV$	$\Delta G_{CS}^\circ / eV$	$\Delta G_{CR}^\circ / eV$
	Adenin	Guanin	Guanin
AMT	0,29	-0,18	-3,03
PSO	0,07	-0,40	-2,85
8MOP	0,37	-0,10	-2,83

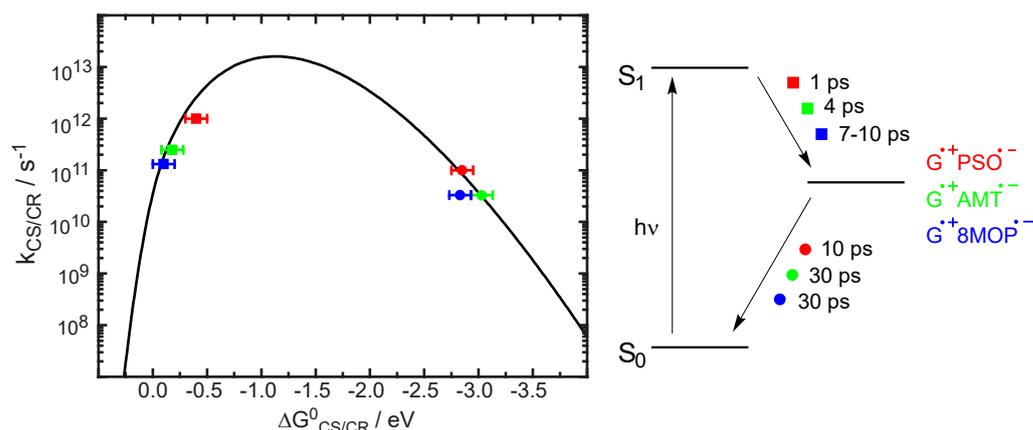
Das experimentelle Ergebnis, dass Adenin nicht als Elektronendonator für den  $S_1$ -Zustand von AMT fungieren kann (s. Kapitel 5.3.1), wird durch den deutlich positiven Wert für die freie Reaktionsenthalpie bestätigt. Für die Kombination 8MOP und Adenin liegt der Wert sogar noch höher, sodass auch in diesem Fall ein PET ausgeschlossen werden kann.

Lediglich im Fall von PSO könnte die Triebkraft für einen PET von Adenin innerhalb der Singulettlebensdauer von 830 ps (Abbildung 5.12) ausreichen. Bei  $\Delta G_{CS}^{\circ} = 0,07$  eV wird ein PET mit einer Geschwindigkeitskonstante von ca.  $7 \cdot 10^9$  s<sup>-1</sup> erwartet (vgl. Abbildung 5.29, links), was zu einer Zeitkonstante im Bereich von 150 ps führen würde.<sup>22</sup> Für Guanin dagegen werden in Übereinstimmung mit den fs-UV/Vis Experimenten mit GC-DNA durchweg negative Werte für  $\Delta G_{CS}^{\circ}$  erhalten. Der Trend in diesen Werten (höchste Triebkraft für PSO, niedrigste für 8MOP) passt zur Reihenfolge der experimentell beobachteten Zeitkonstanten für die Ladungstrennung. Die Triebkräfte für die Ladungsrekombination sind so hoch, dass man sich im Marcus invertierten Bereich befindet. Dadurch kann die Rekombination wie beobachtet langsamer sein als die Ladungstrennung, obwohl die Triebkraft für diesen Prozess deutlich höher ist (vgl. Kapitel 2.2).

Wie in Kapitel 2.2 beschrieben, lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten für Elektrontransferprozesse als Funktion von  $\Delta G_{CS/CR}^{\circ}$  über die Marcus-Levich-Jortner Theorie (Gleichung 2.3) vorhersagen. Einige Parameter für diese Vorhersage wie das elektronische Kopplungsmatrixelement  $H_{DA}$  oder der Huang-Rhys Faktor sind jedoch nicht ohne weiteres für das System Psoralene in DNA zu bestimmen. In der Literatur finden sich jedoch einige Studien zu ähnlichen Systemen.<sup>[97,172,188,189]</sup> In einer umfangreichen Arbeit zur Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von PET Prozessen von  $\Delta G_{CS/CR}^{\circ}$ , wurden Chromophore aus fünf verschiedenen Substanzklassen als Endgruppen an DNA-Haarnadelstrukturen angebunden.<sup>[97]</sup> Die Geschwindigkeitskonstanten der Elektrontransfers in diesen Systemen wurden mithilfe von fs-UV/Vis und fs-Fluoreszenzspektroskopie bestimmt. Eine Anpassung von Gleichung 2.3 an ihre Datenpunkte erlaubte die Bestimmung eines Parametersatzes, der das Verhalten aller Chromophore die direkt an eine als Elektronendonator wirkende DNA-Base gebunden waren, gut beschreibt. Eine analoge Anpassung von Gleichung 2.3 an die hier gewonnenen Daten ist nicht sinnvoll, da die Wertepaare der Psoralene angesichts der vielen freien Parameter bei einer solchen Anpassung zu nahe beieinander liegen. Vergleicht man die in der Literatur erhaltene Funktion mit den hier für interkalierte Psoralene bestimmten Datenpunkten, so ergibt sich eine exzellente Übereinstimmung (Abbildung 5.29). Das Verhältnis der in den fs-UV/Vis Experimenten bestimmten Geschwindigkeitskonstanten zu den davon unabhängig bestimmten Werten für  $\Delta G_{CS/CR}^{\circ}$  deckt sich also nahezu ideal mit dem über Marcus-Levich-Jortner Theorie vorhergesagten Verhalten. Die Geschwindigkeitskonstante für einen PET von Adenin zu

<sup>22</sup>Das entsprechende Experiment wurde in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

AMT läge nach dieser Vorhersage bei ca.  $3,4 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ . Damit läge die Zeitkonstante für den PET Prozess bei etwa 300 ns. Die Interpretation, dass die Reduktion der  $S_1$ -Lebensdauer von AMT in AT-DNA (1 ns) verglichen mit Wasser (1,4 ns) nicht durch einen langsamen PET sondern durch „Lösungsmittelleffekte“ zustande kommt, wird damit bestärkt (vgl. Kapitel 5.3.1).



**Abbildung 5.29:** Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{CS/CR}$  für die Elektrontransferprozesse der drei Psoralene in GC-DNA von der freien Reaktionsenthalpie  $\Delta G_{CS/CR}^{\circ}$  (links, bunte Symbole). Die schwarze Linie im linken Diagramm entspricht dem erwarteten Verhalten nach Gleichung 2.3. Die Parameter für diese Funktion sind  $\lambda_s = 0,23 \text{ eV}$ ,  $\lambda_i = 0,99 \text{ eV}$ ,  $H_{DA} = 347 \text{ cm}^{-1}$  und  $\hbar\langle\omega\rangle = 1500 \text{ cm}^{-1}$ . Sie wurden aus den Angaben zu "Fit II" von Lewis et al.<sup>[97]</sup> entnommen. Rechts ist ein zusammenfassendes Schema mit den Zeitkonstanten der Elektrontransferprozesse nach Anregung der Psoralene in GC-DNA gezeigt. Adaptiert aus S. Fröbel et al.<sup>[121]</sup>

## 5.5 Untersuchungen zum Mechanismus der [2+2]-Cycloaddition von AMT an Thyminbasen in der DNA

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist der photochemische Reaktionsmechanismus der [2+2]-Cycloaddition von Psoralenen an die DNA trotz großer Bemühungen über mehrere Jahrzehnte ungeklärt (Kapitel 1). In der Literatur finden sich je nach Derivat widersprüchliche Aussagen darüber, ob angeregte Singulettzustände, Triplettzustände oder möglicherweise beide zur Bildung der Addukte führen. Hinzu kommt, dass inner-

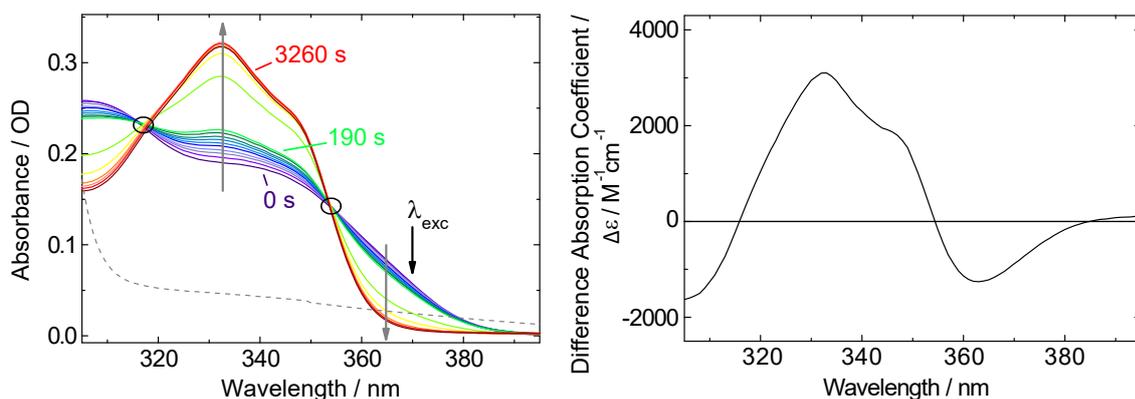
halb der DNA drei verschiedene [2+2]-Cycloaddukte gebildet werden, deren kinetische Vorläufer sich unterscheiden können. Im Rahmen dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Bildung der Furan- und Pyronmonoaddukte. Die Folgereaktion des Furanmonoaddukts zum quervernetzenden Diaddukt wurde bislang nicht untersucht. Aufgrund seiner hohen Interkalationsaffinität und Löslichkeit (vgl. Kapitel 5.1.1) wurde auch für diese Untersuchungen das Derivat AMT ausgewählt. Für die mechanistischen Untersuchungen wurden zunächst die Produktsignaturen und Reaktionsquantenausbeuten in Abhängigkeit der DNA-Sequenz mithilfe von Belichtungsexperimenten bestimmt. Im Anschluss wurden die charakteristischen Produktsignaturen dann mit Blitzlichtphotolysedaten verglichen. Der spektrale Bereich der fs-Experimente reicht nicht aus, um die im UV-Bereich absorbierenden Produkte eindeutig beobachten zu können (vgl. Kapitel 5.3 & 5.4).

## Belichtungsexperimente

In einer Belichtungsstudie mit anschließender Analyse der Photoprodukte mittels HPLC wurden die relativen Anteile der verschiedenen Cycloaddukte für AMT in Kalbsthymus- und poly(AT)-DNA bestimmt.<sup>[67]</sup> In beiden Fällen zeigte sich bei niedrigen Umsätzen eine große Präferenz für die Bildung von Furanmonoaddukten (ca. 90 % aller Photoaddukte), mit einer leichten Abhängigkeit der Produktverteilung von der AMT Konzentration. In den hier gezeigten Belichtungsexperimenten wird demzufolge ebenfalls ein Gemisch der beiden Monoaddukte mit hohem Anteil an Furanmonoaddukt gebildet, das nicht weiter aufgetrennt wird. Es ist bekannt, dass die Bildung des Furanadduktes zum Anstieg einer Absorptionsbande um 330 nm mit einer charakteristischen Schulter bei 350 nm führt.<sup>[67]</sup> Pyronaddukte, die sich bei der Belichtung bilden, zeigen erst unterhalb von ca. 300 nm signifikante Absorption, die hier von der hohen DNA-Absorption überdeckt wird.<sup>[34]</sup> Über etwa 370 nm absorbieren beide Addukte im Gegensatz zu interkaliertem AMT nur sehr schwach. Um Folgereaktionen der Monoaddukte zu vermeiden, wurde diese Wellenlänge für die Belichtungsexperimente ausgewählt.

Die Belichtung von AMT in Anwesenheit von AT-DNA zeigt das erwartete Verhalten (Abbildung 5.30, links). Von allen Spektren wurde der Beitrag der DNA-Absorption unter der Annahme, dass dieser sich bei Belichtung nicht ändert, subtrahiert. Diese Annahme wird damit begründet, dass in diesem Experiment selbst bei vollständigem Umsatz von AMT nur maximal 0,5 % der DNA-Basen an einer Reaktion beteiligt sind. Mit steigender Belichtungsdauer steigt die Absorption im Bereich um 330 nm an und die charakteristi-

sche Schulter des Furanmonoaddukts bei 350 nm wird sichtbar. Unterhalb von 318 nm und oberhalb von 355 nm nimmt die Absorption dagegen ab. Bei diesen Wellenlängen sind auch bei längeren Belichtungszeiten isobestische Punkte zu erkennen, die darauf hindeuten, dass keine Folgereaktionen der Monoaddukte stattfinden. In diesem Experiment wurde eine erschöpfende Belichtung durchgeführt, was daran zu erkennen ist, dass die Absorption des interkalierten AMT im Bereich über 370 nm auf null sinkt. Dadurch ist die Bestimmung der Absorptionskoeffizienten des Monoadduktgemischs relativ zu denen des Interkalats möglich. Ein Spektrum der Differenzabsorptionskoeffizienten  $\Delta\epsilon$  zeigt die relativen Absorptionsänderungen bei Belichtung (Abbildung 5.30, rechts). Über die Abnahme der Absorption bei 370 nm wurde unter Berücksichtigung der DNA-Absorption und eines Anteils von 10 % nicht-interkalierten Molekülen eine Reaktionsquantenausbeute von ca. 0,15 für die Monoaddition von interkaliertem AMT an AT-DNA bestimmt.<sup>23</sup>



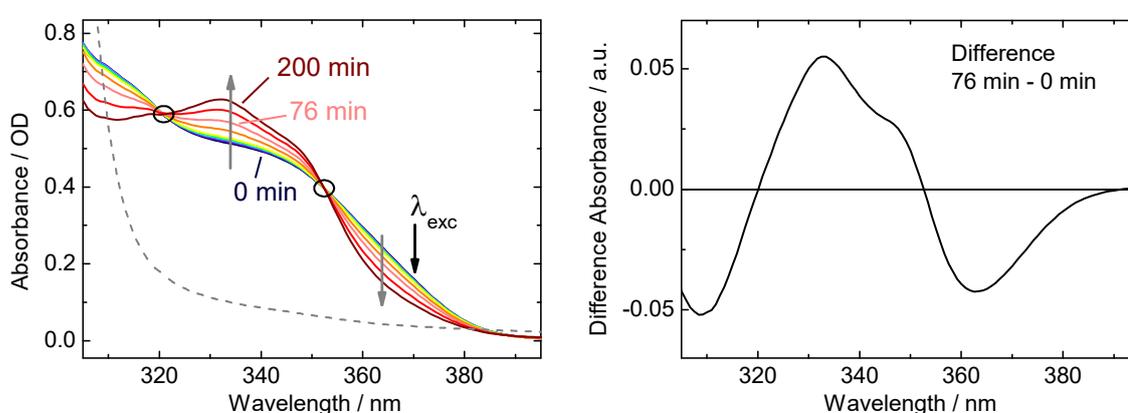
**Abbildung 5.30:** Absorptionsspektren einer Lösung von 35  $\mu\text{M}$  AMT mit AT-DNA ( $c_{DNA,bp} = 4 \text{ mM}$ ) in wässriger Pufferlösung nach verschiedenen Belichtungszeiten ( $\lambda_{exc} = 370 \text{ nm}$ ,  $P = 1,4 \text{ mW}$ ,  $V = 2 \text{ ml}$ ,  $d = 1 \text{ cm}$ ). Die DNA-Absorption (grau gestrichelt) wurde von sämtlichen Spektren subtrahiert. Es sind zwei isobestische Punkte zu erkennen (schwarz eingekreist). Graue Pfeile zeigen die Zu- und Abnahme der Absorption mit steigender Belichtungsdauer an. Exemplarisch sind einzelne Belichtungszeiten angezeigt. Die Gesamtbelichtungsdauer beträgt 65 min.<sup>24</sup>

Ein Belichtungsexperiment an AMT mit GTAC-DNA (Abbildung 5.31) zeigt nach

<sup>23</sup>Die Reaktionsquantenausbeuten für die Zersetzung des geringen Anteils nicht-interkalierter Moleküle sind konzentrationsabhängig und liegen in etwa bei 5-7 %.<sup>[53]</sup> Die dadurch verursachte Signalabnahme wurde in den Berechnungen von  $\Phi_R$  vernachlässigt, sodass die erhaltenen Werte mit einer leichten Unsicherheit behaftet sind.

<sup>24</sup>Die Daten in dieser Abbildung wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit unter meiner Anleitung von Sabine M. Ulapec aufgenommen.

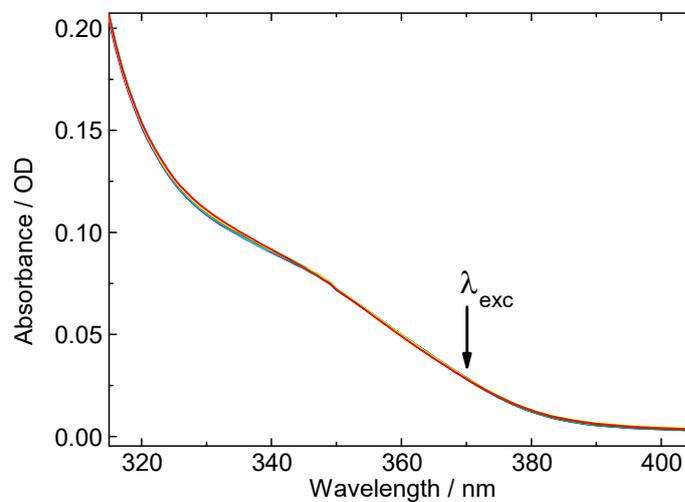
Subtraktion der DNA-Absorption ein sehr ähnliches Verhalten wie im Fall von AT-DNA. Wieder steigt die Absorption um 330 nm unter Ausbildung der charakteristischen Schulter bei 350 nm an und fällt in den übrigen Bereichen ab. Isosbestische Punkte sind in diesem Fall bei 320 nm und 352 nm zu erkennen. Das Differenzspektrum (Abbildung 5.31, rechts) bei Belichtung ist annähernd identisch mit dem in AT-DNA, sodass von einer ähnlichen Produktverteilung ausgegangen werden kann. Hier wurde unter Berücksichtigung der DNA-Absorption und eines Anteils von 6 % nicht-interkalierten Molekülen eine Reaktionsquantenausbeute zwischen 0,01 und 0,02 bestimmt.



**Abbildung 5.31:** Absorptionsspektren einer Lösung von 110  $\mu\text{M}$  AMT mit GTAC-DNA ( $C_{DNA,bp} = 5,3 \text{ mM}$ ) in wässriger Pufferlösung nach verschiedenen Belichtungszeiten ( $\lambda_{exc} = 370 \text{ nm}$ ,  $P = 1,25 \text{ mW}$ ,  $V = 2 \text{ ml}$ ,  $d = 1 \text{ cm}$ ). Die DNA-Absorption (grau gestrichelt) wurde von sämtlichen Spektren subtrahiert. Es sind zwei isosbestische Punkte zu erkennen (schwarz eingekreist). Graue Pfeile zeigen die Zu- und Abnahme der Absorption mit steigender Belichtungsdauer an. Exemplarisch sind einzelne Belichtungszeiten angezeigt. Die Gesamtbelichtungsdauer beträgt 200 min.

Es ist bekannt, dass die [2+2]-Cycloaddition von Psoralenen an Pyrimidinbasen in der DNA bevorzugt an Thyminen stattfindet.<sup>[14,67]</sup> Eine Quantifizierung dieser Präferenz ist für AMT in der Literatur jedoch nicht zu finden. Das Belichtungsexperiment an AMT in GC-DNA erlaubt nun einen Vergleich der Reaktionsquantenausbeute mit  $\Phi_R$  in AT-DNA. Es zeigt, dass in GC-DNA nahezu keine Photoreaktionen stattfinden (Abbildung 5.32). Auch nach hohen Belichtungszeiten sind keine systematischen Veränderungen in den Absorptionsspektren zu erkennen. Nach 200 min Belichtungszeit unter den in Abbildung 5.32 angegebenen Bedingungen kann daher nur eine obere Grenze für die Quantenausbeute der Photoreaktionen von interkaliertem AMT abgeschätzt werden. Die geringe

Absorptionsabnahme um 370 nm führt zu einem Wert von  $\Phi_R < 10^{-6}$ . AMT scheint also annähernd nicht mit Cytosin in GC-Basenpaaren zu reagieren. Im Gegenteil führt die Interkalation von AMT in GC-DNA zu einer bemerkenswerten photochemischen Stabilität. In wässriger Lösung führen zahlreiche Photoreaktionen wie Dimerisierungen und Ringöffnungsreaktionen<sup>[53]</sup> zu Reaktionsquantenausbeuten im Bereich einiger Prozent (s. Kapitel 1). Innerhalb der GC-DNA werden offenbar alle reaktiven Kanäle unterdrückt. Die ultraschnelle Löschung des angeregten Singulettzustands von AMT in GC-DNA durch den PET erklärt vermutlich dieses Verhalten (s. Diskussion in Kapitel 6).



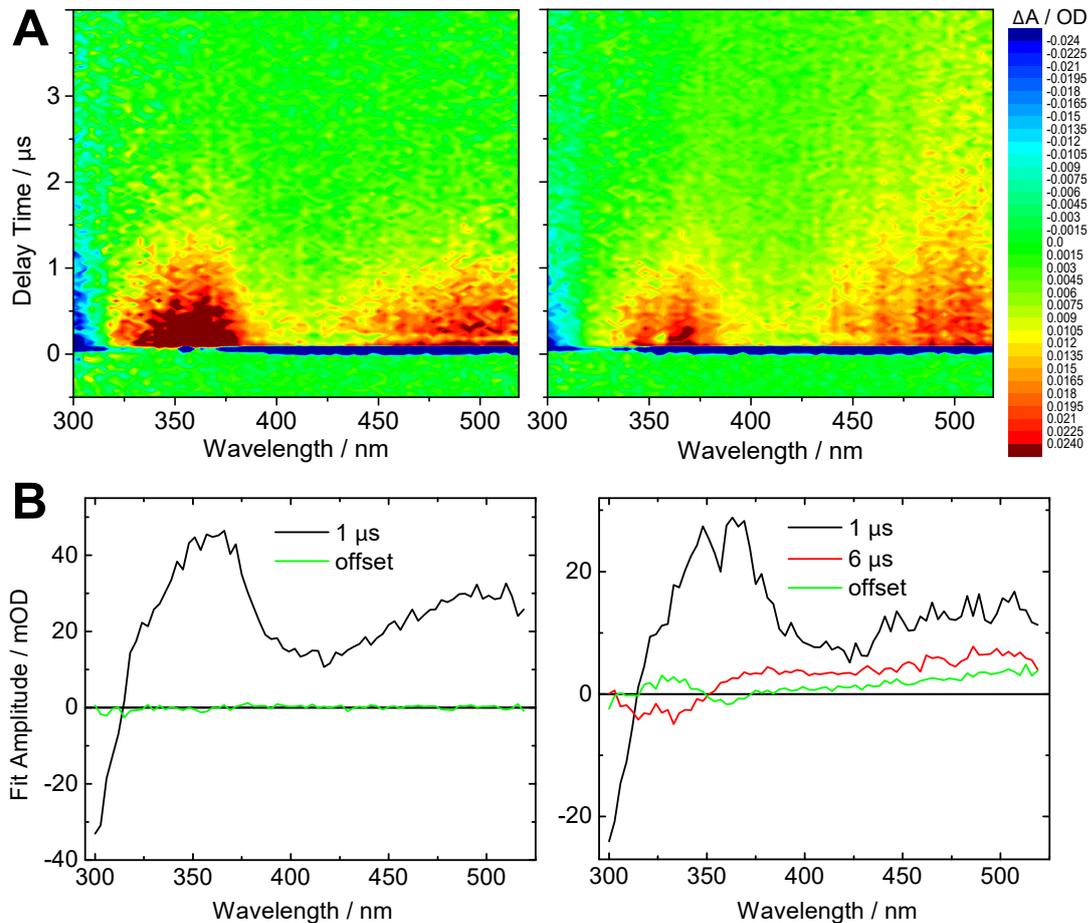
**Abbildung 5.32:** Absorptionsspektren einer Lösung von ca. 15  $\mu\text{M}$  AMT mit GC-DNA ( $c_{DNA,bp} = 2 \text{ mM}$ ) in wässriger Pufferlösung nach verschiedenen Belichtungszeiten ohne Subtraktion der DNA-Absorption ( $\lambda_{exc} = 370 \text{ nm}$ ,  $P = 1,4 \text{ mW}$ ,  $V = 3 \text{ ml}$ ,  $d = 1 \text{ cm}$ ). In diesem Fall sind auch nach sehr hohen Belichtungszeiten keine systematischen spektralen Änderungen zu erkennen. Die Gesamtbelichtungsdauer beträgt 200 min.<sup>25</sup>

## Blitzlichtphotolyse an AMT mit AT-DNA

Die charakteristische Form der Differenzspektren aus den Abbildungen 5.30 & 5.31 sollte sich in zeitaufgelösten Experimenten beobachten lassen. Der spektrale Bereich der fs-UV/Vis Experimente reicht jedoch wie erwähnt nicht aus, um diese Signatur eindeutig beobachten zu können. Die Blitzlichtphotolysedaten können dagegen bis in den

<sup>25</sup>Die Daten in dieser Abbildung wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit unter meiner Anleitung von Sabine M. Ulapec aufgenommen.

UV-Bereich aufgenommen werden. Die Frage, ob die Monoadditionen über Singulett- und/oder Triplettzustände ablaufen, ließe sich beantworten, wenn die Adduktsignaturen zu bestimmten Zeiten nach der Anregung eindeutig sichtbar wären. Um möglichst deutliche Signaländerungen zu erhalten, wurde für diese Experimente die Kombination aus AMT und AT-DNA, mit  $\Phi_R = 0,15$ , ausgewählt (Abbildung 5.33). Liefere die Addition allein über den angeregten Singulettzustand ab, so sollte das Differenzspektrum der Addukte bereits zu Beginn des Messzeitfensters vorhanden sein. Bei einer Reaktion über den Triplettzustand würde es sich erst mit dessen Zerfall ausbilden. Bereits an dieser Stelle sei jedoch gesagt, dass die Blitzlichtphotolysedaten keine eindeutige Aussage zu den reaktiven Zuständen der Psoralene zulassen. Wie im Folgenden dargelegt, verhindern überlagerte Signalbeiträge mehrerer Spezies im relevanten Spektralbereich und ein im Vergleich zu den fs-Daten hohes Rauschniveau die eindeutige Zuordnung der reaktiven Zustände.



**Abbildung 5.33:** A: Konturdarstellungen der Blitzlichtphotolysedaten zu 0,15 mM AMT in Wasser (links) und 0,11 mM AMT mit AT-DNA ( $c_{DNA,bp} = 0,4$  mM, rechts) in wässrigem Puffer ohne Sauerstoffbefreiung und mit Anregung bei 355 nm.<sup>26</sup> B: DAS aus einer globalen multiexponentiellen Anpassung an die Daten in A. Ohne DNA Zugabe (links) können die Daten mit einer kinetischen Komponente und *offset* beschrieben werden, mit DNA Zugabe (rechts) ist eine zusätzliche Komponente notwendig.

Für die Reproduzierbarkeit der Blitzlichtphotolysedaten erwies es sich aus bislang ungeklärten Gründen als hilfreich, vergleichsweise niedrige DNA-Konzentrationen zu verwenden. Dadurch liegt auch in diesen Experimenten ein signifikanter Anteil von nicht-interkalierten Molekülen vor. Um dessen Signale von denen des interkalierten AMTs unterscheiden zu können, wurden zwei analoge Experimente mit und ohne DNA-Zugabe durchgeführt (Abbildung 5.33).

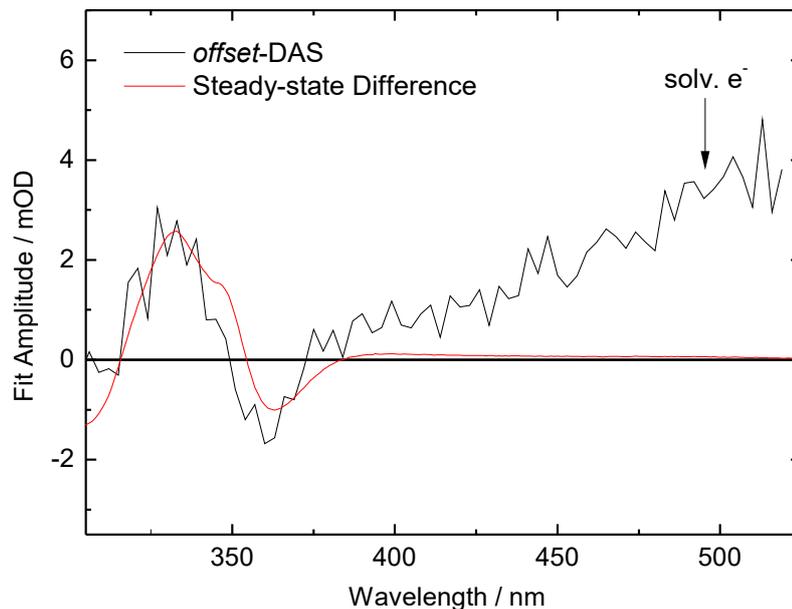
<sup>26</sup>Die Blitzlichtphotolysedaten wurden von Christian Torres Ziegenbein aufgenommen.

In der Konturdarstellung zeigt die Messung ohne DNA (Abbildung 5.33 A, links) die TriplettSignatur von AMT mit Banden um 360 nm und 500 nm, die bereits im *offset*-Spektrum der fs-UV/Vis Daten sichtbar war (vgl. Abbildung 5.9 & 5.12). Im UV-Bereich ist um 300 nm ein negativer Beitrag durch das Ausbleichen des Grundzustands sichtbar. Negative Beiträge am Zeitnullpunkt im Bereich von 370 nm bis 520 nm stammen von Fluoreszenzemission (vgl. Abbildung 5.1), die innerhalb der Zeitauflösung zerfällt. Eine globale multiexponentielle Anpassung (Kapitel 3.3.4) zeigt, dass die TriplettSignatur mit einer Zeitkonstante von 1  $\mu$ s zerfällt<sup>27</sup> (Abbildung 5.33 B, links). Im *offset*-DAS ist nach diesem Zerfall nahezu keine verbleibende Differenzabsorption zu beobachten.

Die Zugabe von AT-DNA führt zu einer Veränderung des spektral-zeitlichen Verhaltens (Abbildung 5.33 A, rechts). Das TriplettSpektrum von freiem AMT dominiert unter diesen Bedingungen (55 % nicht-interkaliertes AMT) immer noch die Differenzspektren. Im Vergleich zur Messung der reinen AMT Lösung sind die Signalamplituden um 360 nm und 500 nm aber nun von Beginn an niedriger. Zusätzlich sind langlebigere Komponenten vorhanden, die in der Konturdarstellung besonders im Bereich um 500 nm sichtbar sind. Die globale Anpassung an die Daten (Abbildung 5.33 B, rechts) erfordert nun eine weitere kinetische Komponente mit einer Zeitkonstante von 6  $\mu$ s. Da das DAS der Komponente mit 1  $\mu$ s dem des Zerfalls des freien AMT entspricht, wird diese längere Komponente dem Triplettzerfall von AMT in AT-DNA zugeordnet (vgl. auch Abbildung 5.35). Ein Grund für die höhere Lebensdauer des AMT Triplettzustands in DNA ist vermutlich die Abschirmung gegenüber Sauerstoff,<sup>[190]</sup> der den Triplettzustand des nicht-interkalierten AMT löscht. In Experimenten unter Sauerstoffausschluss wird auch für nicht-interkaliertes AMT in Wasser eine Zeitkonstante im Bereich von ca. 6  $\mu$ s beobachtet (vgl. Kapitel 5.3). Im *offset*-Spektrum sind nun Signalbeiträge zu erkennen, die bis über das Ende des Messzeitfensters von 20  $\mu$ s hinaus bestehen bleiben. Im Bereich zwischen 300 nm und 380 nm sind positive und negative Beiträge sichtbar, die dem des Differenzspektrums aus den Belichtungsexperimenten ähneln. Ein Vergleich beider Spektren (Abbildung 5.34) bestätigt die gute Übereinstimmung der beiden Spektren in diesem Bereich. Oberhalb von 380 nm weist das *offset*-Spektrum zusätzliche positive Amplituden auf, die der Entstehung solvatisierter Elektronen zugeordnet werden.<sup>[154]</sup>

---

<sup>27</sup>Für die Anpassung an die Blitzlichtphotolysedaten wird der frühe Zeitbereich bis nach dem Zerfall der Fluoreszenz ausgelassen.

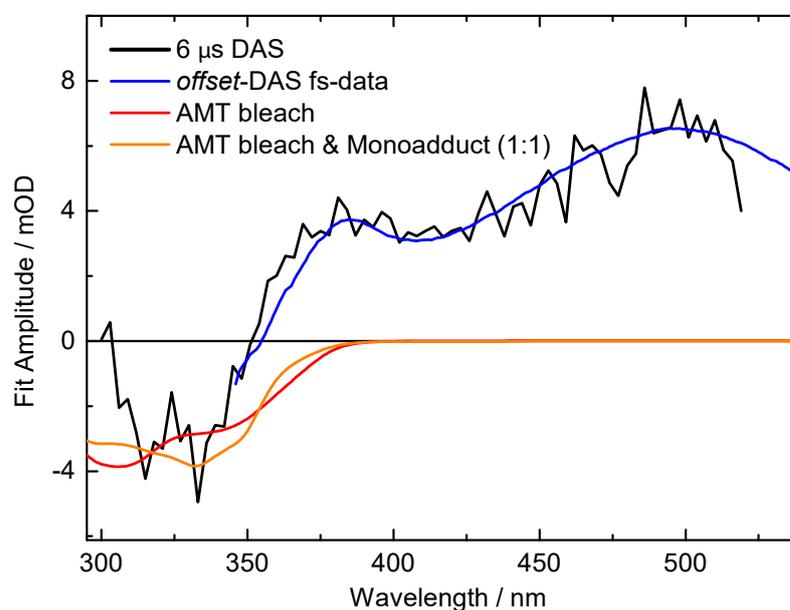


**Abbildung 5.34:** Vergleich des *offset*-DAS (schwarz) aus der Messung an AMT mit AT-DNA (vgl. Abbildung 5.33, rechts) mit dem Differenzspektrum aus dem Belichtungsexperiment (rot, vgl. Abbildung 5.30, rechts).

Grundsätzlich ist die Bildung der Monoaddukte nach dem Abklingen aller transienter Spezies also mit Blitzlichtphotolyse zu beobachten. Sollte diese Bildung zumindest zum Teil über den Triplettzustand ablaufen, so sollte das DAS des Triplettzerfalls die Signatur der Monoaddukte enthalten. Daher wurde eine genauere Analyse dieses DAS vorgenommen (Abbildung 5.35). Im Spektralbereich über 350 nm deckt sich das Spektrum ideal mit dem *offset*-DAS der fs-UV/Vis Daten zu AMT in AT-DNA, was die Zuordnung des Prozesses mit einer Zeitkonstante von 6  $\mu$ s zum Triplettzerfall von AMT in AT-DNA bekräftigt.

Für die Untersuchung des Additionsmechanismus ist der Bereich unterhalb von 380 nm relevant. In diesem Bereich sollte im Idealfall entweder nur die Erholung des Grundzustands oder zusätzlich die Entstehung der Monoaddukte zu beobachten sein. Die Absorptionsbanden beider Spezies würden in diesem DAS als negative Beiträge auftreten. Jedoch ist zusätzlich die Signatur des Triplettzustands in diesem Bereich unbekannt. Befinden sich Absorptionsbanden dieses Zustands in diesem Spektralbereich, so tragen sie in Form von positiven Amplituden zum DAS bei. Eine Aussage zur Triplettreaktivität ist daher nicht möglich. Die Überlagerung von drei Signaturen, die Ähnlichkeit der Grundzustands- und Monoadduktspektren und das niedrige Signal-zu-Rauschen Verhält-

nis des Spektrums verhindern eine verlässliche Auswertung.



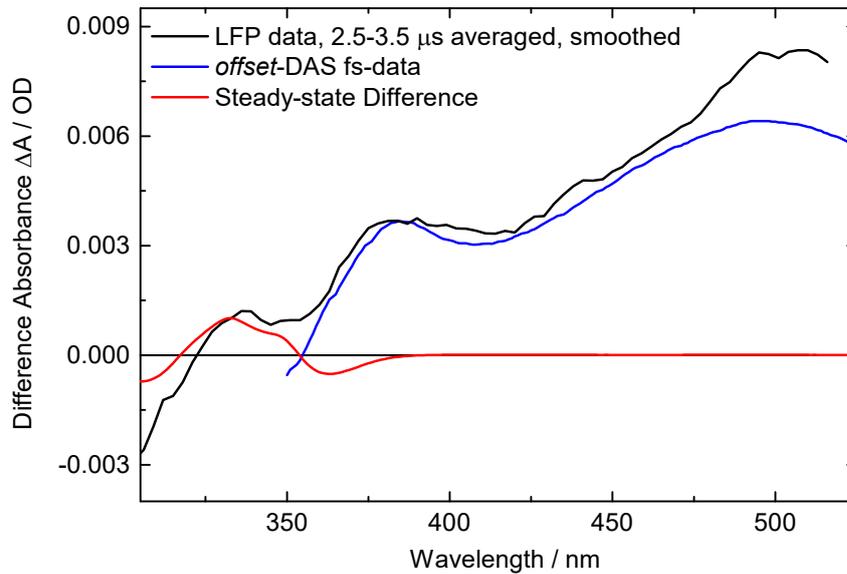
**Abbildung 5.35:** Vergleich des DAS der kinetischen Komponente mit  $\tau = 6 \mu\text{s}$  (schwarz) aus der Messung an AMT mit AT-DNA (Abbildung 5.33, rechts) mit dem *offset*-DAS der entsprechenden fs-UV/Vis Daten (blau, vgl. Abbildung 5.21), der ausgebleichten Grundzustandsabsorption von interkaliertem AMT (rot), sowie einer Kombination aus Grundzustandsabsorption und Monoadduktspektrum (orange, vgl. Abbildung 5.30).

Ein weiterer Ansatz zur Bestimmung der reaktiven Zustände ist der Vergleich der Differenzabsorptionsdaten mit dem Differenzspektrum aus den Belichtungsexperimenten (Abbildung 5.36). Sollte allein der angeregte Singulettzustand zur Adduktbildung führen, so würde die Signatur der Monoaddukte bereits nach 1 ns (vgl. Abbildung 5.21) und damit weit unterhalb der Zeitauflösung der Blitzlichtphotolyse (hier ca. 40 ns) ausgebildet sein. In diesem Fall würde sie bei der Anpassung an die Daten nur im *offset*-DAS auftauchen. Zu den Differenzabsorptionsspektren würde sie jedoch von Beginn an in Form des stationären Differenzspektrums beitragen. Die Differenzabsorptionsspektren zwischen null und ca. 2  $\mu\text{s}$  bestehen aus bis zu sechs Beiträgen:

1. Absorption des Triplettzustands von nicht-interkaliertem AMT
2. Absorption des Triplettzustands von interkaliertem AMT
3. Ausbleichen der Grundzustandsabsorption von nicht-interkaliertem AMT

4. Ausbleichen der Grundzustandsabsorption von interkaliertem AMT
5. Eventuell Absorption von Monoaddukten, die aus dem angeregten Singulettzustand gebildet wurden
6. Absorption durch solvatisierte Elektronen

Eine Subtraktion der Signale des nicht-interkalierten Anteils von AMT analog zum Vorgehen in den fs-UV/Vis Messungen kommt wegen des niedrigen Signal-zu-Rauschen Verhältnisses für diese Daten nicht in Frage. Die dominierenden Signale des nicht-interkalierten AMT machen die Spektren in diesem frühen Zeitbereich für eine eingehende Analyse unbrauchbar. Stattdessen wird für den Vergleich der Differenzabsorptionsdaten mit dem Differenzspektrum aus den Belichtungsexperimenten der Zeitbereich um 3  $\mu$ s (Abbildung 5.36) gewählt, bei dem die Signale des nicht-interkalierten AMT bereits abgeklungen sind. Zur Reduzierung des Rauschniveaus sind die Spektren über einen Zeitbereich von 1  $\mu$ s gemittelt und anschließend spektral über sechs Punkte geglättet (gleitender Durchschnitt). Im Spektralbereich über etwa 370 nm zeigt das Blitzlichtphotolysespektrum wie erwartet die Signatur des Triplettzustands von AMT in DNA mit einem zusätzlichen Beitrag der Absorption von solvatisierten Elektronen im Bereich um 500 nm. Unterhalb von 370 nm zeigt sich ein weiteres Absorptionsmaximum um 335 nm, das vermutlich auf die Absorption der Monoaddukte zurückzuführen ist. Jedoch sind bei einer Zeitkonstante von 6  $\mu$ s für den Zerfall der Triplettzustände von AMT in DNA zu diesem Zeitpunkt auch bereits etwa 40 % der Triplettanregungen zerfallen, sodass ohnehin ein gewisser Anteil an Monoaddukten, auch bei einem reinen Triplettreaktionspfad, erwartet wird. Die Überlagerung von immer noch drei Signalbeiträgen (Beiträge 2., 4. & 5.) im UV-Bereich führt dazu, dass über die Blitzlichtphotolysedaten keine klare Aussage über die reaktiven Zustände bei der Photoaddition gemacht werden kann.



**Abbildung 5.36:** Vergleich der Blitzlichtphotolysespektren bei 3  $\mu$ s (schwarz, gemittelt von 2,5-3,5  $\mu$ s & mit gleitendem Durchschnitt (6 Punkte) geglättet) aus der Messung an AMT mit AT-DNA (Abbildung 5.33, rechts) mit dem *offset-DAS* der entsprechenden fs-UV/Vis Daten (blau, vgl. Abbildung 5.21) und dem Differenzspektrum aus dem Belichtungsexperiment (rot, vgl. Abbildung 5.30, rechts).

Zusammenfassend konnte in den Blitzlichtphotolyseexperimenten die Signatur der Monoadukte nach dem Zerfall aller angeregten Zustände beobachtet werden. Ob diese Signatur bereits nach dem Zerfall des angeregten Singulettzustands in den Daten enthalten ist, lässt sich jedoch nicht beantworten. Wie im nächsten Kapitel dargelegt, sind zur Beantwortung dieser Frage Methoden wie zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie notwendig, bei denen die Signale der einzelnen Spezies schmaler und damit spektral weniger überlagert sein sollten.



## 6 Diskussion - Implikationen der vorgestellten Resultate für Psoralenanwendungen

Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, mithilfe von Femtosekundenexperimenten einen direkten Einblick in die ultraschnellen photoinduzierten Prozesse von DNA-interkalierten Psoralenen zu erhalten. Um die Signale der im Gleichgewicht interkalierten Moleküle von denen der nicht-interkalierten zu trennen, wurde eine Subtraktionsprozedur unter Berücksichtigung der Zahl der absorbierten Photonen beider Spezies im Probenmisch entwickelt. Dafür war die genaue Bestimmung des Anteils an interkalierten Molekülen in einer gegebenen Probenlösung notwendig. Hierzu wurden von den zeitaufgelösten Messungen unabhängige Titrationsprotokolle mit UV/Vis Detektion entwickelt, mit denen die Dissoziationskonstante  $K_D$  für jede Kombination von Psoralenderivat und DNA-Sequenz bestimmt werden konnte.

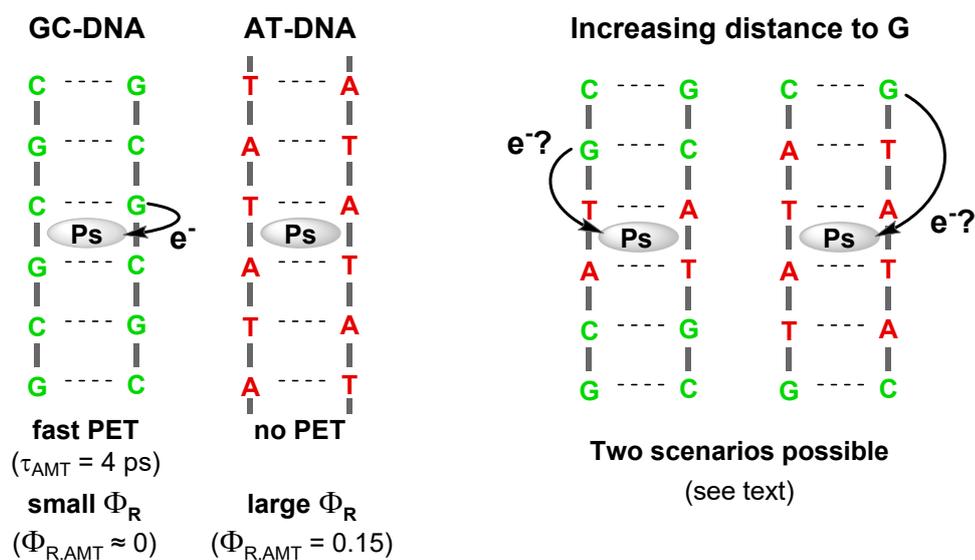
Das bedeutendste Resultat dieser Arbeit ist die Beobachtung eines effizienten PET von der DNA zu interkalierten Psoralenen. Obwohl in einigen vorangegangenen Studien eine deutliche Reduzierung der Singulettlebensdauern einiger Psoralene in Anwesenheit von DNA beobachtet wurde,<sup>[48,56,65]</sup> wurde ein solcher Prozess nie als mögliche Ursache für diese Reduzierung diskutiert. Durch Einsatz verschiedener Psoralenderivate mit den gängigsten Substitutionsmustern (Methoxy- und Methylsubstitutionen) wurde gezeigt, dass die PET Prozesse bei allen gebräuchlichen Psoralenderivaten stattfinden. Das schließt auch Derivate wie 8MOP ein, die als Wirkstoffe im Rahmen der PUVA-Therapie eingesetzt werden. Nach einem Umbau der Apparatur für FSRS Messungen im Rahmen dieser Arbeit konnte der PET Prozess zusätzlich zu den fs-UV/Vis Experimenten auch in zeitaufgelösten Raman Messungen beobachtet werden.

Über eine Variation der DNA-Sequenzen wurde Guanin als einzige Elektronen donierende Nukleobase identifiziert. Diese Erkenntnis hat direkte Relevanz für das mechanistische Verständnis der eigentlich im Rahmen der Psoralenanwendungen erwünschten

[2+2]-Cycloadditionen mit Thyminbasen in der DNA. Befindet sich innerhalb der DNA eine Guaninbase in direktem Kontakt zur Interkalationsstelle des Psoralens, so findet innerhalb weniger Pikosekunden ein PET statt, der den angeregten Singulettzustand des Psoralens löscht und die Besetzung von Triplettzuständen unmöglich macht. Sollten aus einer solchen Position heraus Photoadditionen stattfinden, so müssten diese über angeregte Singulettzustände ablaufen. Interkaliert ein Psoralen hingegen in eine längere Sequenz von AT-Basen, so reicht die Triebkraft für einen PET nicht für eine effiziente Löschung der Singulettzustände aus und Triplettzustände werden weiterhin besetzt. In diesem Fall könnten entweder nur Singulett- oder Triplettzustände oder auch beide Arten von Zuständen zur Bildung der Addukte beitragen. Die Ermittlung der reaktiven Zustände von AMT in AT-DNA mithilfe von Blitzlichtphotolyseexperimenten war durch eine Vielzahl überlappender Signalbeiträge im Bereich der Adduktabsorption nicht möglich. Hilfreich wären hier zeitaufgelöste Infrarotmessungen, bei denen die Signale deutlich schmaler sind und daher deutlich weniger stark überlappen. Für solche Messungen fehlt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gilch die technische Ausstattung. Im Anschluss an diese Arbeit ist daher eine Kooperation mit dem Institut für BioMolekulare Optik an der LMU München geplant, in der die reaktiven Zustände innerhalb reiner AT-DNA – anhand der Zeitkonstanten für die Entstehung der Adduktensignatur – identifiziert werden sollen.

Für das kinetische Verhalten von angeregten Psoralenen in natürlicher DNA oder DNA mit gemischter Basenzusammensetzung sind zwei Szenarien denkbar (Abbildung 6.1). Interkaliert ein Psoralen zwischen zwei AT-Basenpaare, die von GC-Basenpaaren umgeben sind, so wären die entstehenden Radikationen durch eine Nukleobase separiert. Es würde somit formal kein CIP, sondern ein SSIP gebildet. Damit kann sich die Triebkraft für einen PET trotz der geringen Abstandsänderung zum nächsten Guanin deutlich ändern. In diesem Fall sind die Gleichungen 2.4 und 2.6 für die Berechnung der PET Triebkraft relevant. Ob die freie Reaktionsenthalpie  $\Delta G_{CS}^0$  in diesem Fall für einen PET ausreicht, hängt stark davon ab, welcher Wert für die relative Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_r$  des Lösungsmittels gewählt wird. Wie in Kapitel 5.3 bereits diskutiert wurde, unterscheidet sich der effektive Wert für  $\epsilon_r$  für interkalierte Psoralene von dem für reine DNA bestimmten Wert von  $\epsilon_r = 8$ ,<sup>[161]</sup> da das umgebende Wasser ebenfalls einen stabilisierenden Einfluss haben kann. Eine solche Heterogenität kann in den einfachen dielektrischen Modellen, auf denen die angegebenen Gleichungen basieren, nicht berücksichtigt wer-

den. Verwendet man einen Ionenabstand von  $6 \text{ \AA}$ , was einem realistischen Wert für eine separierende Nukleobase nahe kommen sollte, und  $\epsilon_r = 8$  für eine Abschätzung von  $\Delta G_{CS}^0$  so erhält man  $\Delta G_{CS}^0 = -0,14 \text{ eV}$ . Auch bei einem durch den größeren Donor-Akzeptor Abstand im Vergleich zum CIP geringeren Kopplungsmatrixelement  $H_{DA}$  würde dieser Wert für einen PET innerhalb der Singulettlebensdauer vermutlich ausreichen.<sup>[97]</sup> Geht man jedoch von einem effektiven  $\epsilon_r$  im Bereich von 20 oder höher aus, so erreicht  $\Delta G_{CS}^0$  positive Werte und ein effizienter PET innerhalb der Singulettlebensdauer wird unmöglich. Im ersten Szenario findet also ein PET auch über separierende Basen hinweg statt, dessen Geschwindigkeitskonstante dann stufenweise mit steigender Zahl von separierenden Basen abfällt. Für dieses Szenario sprechen Daten zu 8MOP in Verbindung mit verschiedenen definierten DNA-Sequenzen, nach denen die Photoadditionen effizienter ablaufen, je länger die AT-Basenabfolge innerhalb der DNA-Moleküle ist.<sup>[70]</sup> Bei – im Durchschnitt – wachsendem Abstand zur nächsten Guaninbase könnte in diesem Fall die Geschwindigkeitskonstante für den PET abfallen und somit mehr Zeit für Photoreaktionen bleiben.



**Abbildung 6.1:** Einfluss der DNA-Sequenz auf die Photochemie interkalierter Psoralene (Ps). Befinden sich Guanine in direkter Nachbarschaft zur Interkalationsstelle, findet innerhalb weniger Pikosekunden ein PET statt (GC-DNA). Bei großem Abstand zum nächsten Guanin findet kein PET statt und die Cycloadditionen an die DNA werden effizienter (AT-DNA). Exemplarisch sind Zeitkonstanten ( $\tau_{AMT}$ ) und Reaktionsquantenausbeuten ( $\Phi_{R,AMT}$ ) für AMT angegeben. Ist das nächste Guanin durch wenige AT-Basenpaare von der Interkalationsstelle separiert, sind zwei Szenarien denkbar (s. Text).

Daten aus dieser Arbeit zu AMT in GTAC-DNA lassen keine klaren Rückschlüsse zu. Während die Signale des Anteils der AMT-Moleküle, die in der GTAC-DNA zwischen die AT-Basenpaare interkalieren, möglicherweise unterhalb der Detektionsgrenze der fs-UV/Vis Experimente lagen (Kapitel 5.3), zeigten die Belichtungsexperimente eindeutig die Bildung von Monoaddukten mit einer Reaktionsquantenausbeute  $\Phi_R$  im Bereich von 0,01-0,02 an (s. Abbildung 5.31). Eine analoge Messung in reiner AT-DNA ergab einen Wert von  $\Phi_R = 0,15$ . Unter der Annahme, dass alle Interkalationsstellen in etwa mit gleicher Wahrscheinlichkeit besetzt werden (s. Kapitel 5.3.1), sollte sich in der GTAC-DNA ca. ein Siebtel der Psoralene zwischen den zentralen AT-Basenpaaren befinden. Da das Verhältnis der Werte für  $\Phi_R$  für die GTAC-DNA und die AT-DNA ebenfalls ungefähr im Bereich eines Siebtels liegt, liegt die Vermutung nahe, dass sich die dort zwischen den AT-Basenpaaren interkalierten Moleküle genau wie in AT-DNA verhalten. Eine separierende Nukleobase könnte also ausreichen, um den Elektrontransfer zu verhindern, was das zweite mögliche Szenario für die Kinetik in gemischter DNA darstellt. Aufschluss darüber, welches der beiden Szenarien zutrifft, könnten weitere zeitaufgelöste Experimente mit unterschiedlich langen AT-Basenabfolgen und unterschiedlich hohen AT- zu GC-Basenpaarverhältnissen geben. Existiert eine stufenweise Abhängigkeit der PET Geschwindigkeitskonstanten, so sollten beispielsweise in DNA-Molekülen der Sequenz 5'-GCATATATGC-3' mehrere unterschiedliche Zeitkonstanten für den PET beobachtet werden.

Generell liefern die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse einen Ansatz, über den Psoralenderivate für die DNA-Anbindung optimiert werden können. Die Beobachtung des PET zeigt erstmals, dass elektrochemische Eigenschaften wie die Standardreduktionspotenziale der Psoralene einen entscheidenden Einfluss auf die Quantenausbeuten ihrer [2+2]-Cycloadditionen an die DNA haben. Verschiebt man diese Potenziale und/oder ihre 0,0-Übergangsenergien durch geeignete Substitution um nur etwa 0,3-0,4 eV, so sollte dies die PET Prozesse von Guaninbasen energetisch verhindern und somit die Reaktionsquantenausbeuten erhöhen. Ein entsprechendes Projekt, das auf den Erkenntnissen dieser Arbeit aufbaut, hat in Kooperation mit dem Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie bereits begonnen.

# Literaturverzeichnis

- [1] E. C. Friedberg, L. D. McDaniel, and R. A. Schultz. The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 14(1):5–10, 2004.
- [2] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto Jr., and L. Stryer, editors. *Biochemistry*. W. H. Freeman, New York, USA, 8th edition, 2015.
- [3] N. K. Schwalb and F. Temps. Base sequence and higher-order structure induce the complex excited-state dynamics in DNA. *Science*, 322(5899):243–245, 2008.
- [4] N. K. Schwalb, T. Michalak, and F. Temps. Ultrashort fluorescence lifetimes of hydrogen-bonded base pairs of guanosine and cytidine in solution. *J. Phys. Chem. B*, 113(51):16365–16376, 2009.
- [5] 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.
- [6] W. J. Schreier, P. Gilch, and W. Zinth. Early events of DNA photodamage. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 66:497–519, 2015.
- [7] E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, and R. D. Wood. *DNA repair and mutagenesis*. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C., USA, 2005.
- [8] A. Sancar. DNA excision repair. *Annu. Rev. Biochem.*, 65(1):43–81, 1996.
- [9] R. D. Wood. DNA repair in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.*, 65(1):135–167, 1996.
- [10] D. M. Noll, T. McGregor Mason, and P. S. Miller. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chem. Rev.*, 106(2):277–301, 2006.
- [11] S. R. Rajski and R. M. Williams. DNA cross-linking agents as antitumor drugs. *Chem. Rev.*, 98(8):2723–2796, 1998.
- [12] J. Cadet, S. Mouret, J.-L. Ravanat, and T. Douki. Photoinduced damage to cellular DNA: Direct and photosensitized reactions. *Photochem. Photobiol.*, 88(5):1048–1065, 2012.

- [13] D. Bethea, B. Fullmer, S. Syed, G. Seltzer, J. Tiano, C. Rischko, L. Gillespie, D. Brown, and F. P. Gasparro. Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. *J. Dermatol. Sci.*, 19(2):78–88, 1999.
- [14] N. Kitamura, S. Kohtani, and R. Nakagaki. Molecular aspects of furocoumarin reactions: Photophysics, photochemistry, photobiology, and structural analysis. *J. Photochem. Photobiol., C*, 6:168–185, 2005.
- [15] F. Almutawa, N. Alnomair, Y. Wang, I. Hamzavi, and H. W. Lim. Systematic review of UV-based therapy for psoriasis. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 14(2):87–109, 2013.
- [16] C. Nielsen, H. P. Ravn, W. Nentwig, and M. Wade, editors. *The Giant Hogweed Best Practice Manual. Guidelines for the management and control of an invasive weed in Europe*. Forest & Landscape Denmark, Hoersholm, Denmark, 2005.
- [17] Y. Hiraku and S. Kawanishi. Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites. *Cancer Res.*, 56(22):5172–5178, 1996.
- [18] C. J. Burrows and J. G. Muller. Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. *Chem. Rev.*, 98(3):1109–1152, 1998.
- [19] C. A. M. Seidel, A. Schulz, and M. H. M. Sauer. Nucleobase-specific quenching of fluorescent dyes. 1. Nucleobase one-electron redox potentials and their correlation with static and dynamic quenching efficiencies. *J. Phys. Chem.*, 100(13):5541–5553, 1996.
- [20] D. B. Zamble and S. J. Lippard. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem. Sci.*, 20(10):435–439, 1995.
- [21] J. Reedijk. New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 100(7):3611–3616, 2003.
- [22] P. M. Takahara, A. C. Rosenzweig, C. A. Frederick, and S. J. Lippard. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature*, 377(6550):649–652, 1995.
- [23] T. Helleday, S. Eshtad, and S. Nik-Zainal. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat. Rev. Genet.*, 15(9):585–598, 2014.
- [24] P. Klán and J. Wirz. *Photochemistry of organic compounds: From concepts to practice*. John Wiley & Sons, West Sussex, UK, 2009.
- [25] H. Sies and C. F. M. Menck. Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat. R.-DNAging G*, 275(3-6):367–375, 1992.

- [26] H.-C. DeFedericis, H. B. Patrzyc, M. J. Rajecki, E. E. Budzinski, H. Iijima, J. B. Dawidzik, M. S. Evans, K. F. Greene, and H. C. Box. Singlet oxygen-induced DNA damage. *Radiat. Res.*, 165(4):445–451, 2006.
- [27] P. D. Wood and R. W. Redmond. Triplet state interactions between nucleic acid bases in solution at room temperature: intermolecular energy and electron transfer. *J. Am. Chem. Soc.*, 118(18):4256–4263, 1996.
- [28] M. A. Pathak and D. M. Krämer. Photosensitization of skin in vivo by furocoumarins (psoralens). *BBA-Nucleic Acids Prot. Synth.*, 195(1):197–206, 1969.
- [29] L. Musajo, G. Rodighiero, and F. Dall'Acqua. Evidences of a photoreaction of the photosensitizing furocoumarins with DNA and with pyrimidine nucleosides and nucleotides. *Experientia*, 21(1):24–26, 1965.
- [30] A. K. Gupta and T. F. Anderson. Psoralen photochemotherapy. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 17(5):703–734, 1987.
- [31] J. A. Parrish, T. B. Fitzpatrick, L. Tanenbaum, and M. A. Pathak. Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. *N. Engl. J. Med.*, 291:1207–1211, 1974.
- [32] R. S. Stern. Psoralen and ultraviolet A light therapy for psoriasis. *N. Engl. J. Med.*, 357(7):682–690, 2007.
- [33] M. Zanolli. Phototherapy arsenal in the treatment of psoriasis. *Dermatol. Clin.*, 22(4):397–406, 2004.
- [34] G. D. Cimino, H. B. Gamper, S. T. Isaacs, and J. E. Hearst. Psoralens as photoactive probes of nucleic acid structure and function: Organic chemistry, photochemistry, and biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.*, 54(1):1151–1193, 1985.
- [35] R. Hoffmann and R. B. Woodward. Selection rules for concerted cycloaddition reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 87(9):2046–2048, 1965.
- [36] R. T. Eastman, L. K. Barrett, K. Dupuis, F. S. Buckner, and W. C. Van Voorhis. Leishmania inactivation in human pheresis platelets by a psoralen (amotosalen HCl) and long-wavelength ultraviolet irradiation. *Transfusion*, 45(9):1459–1463, 2005.
- [37] R. Edelson, C. Berger, F. Gasparro, B. Jegasothy, P. Heald, B. Wintroub, E. Vonderheid, R. Knobler, K. Wolff, G. Plewig, et al. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. *N. Engl. J. Med.*, 316(6):297–303, 1987.

- [38] M. Wainwright. The emerging chemistry of blood product disinfection. *Chem. Soc. Rev.*, 31:128–136, 2002.
- [39] A. Rajendran, M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, and H. Sugiyama. Photo-cross-linking-assisted thermal stability of DNA origami structures and its application for higher-temperature self-assembly. *J. Am. Chem. Soc.*, 133(37):14488–14491, 2011.
- [40] I. Bermúdez, J. García-Martínez, J. E. Pérez-Ortín, and J. Roca. A method for genome-wide analysis of DNA helical tension by means of psoralen – DNA photo-binding. *Nucleic Acids Res.*, 38(19):e182, 2010.
- [41] L. O. Björn. *Photobiology: The Science of Life and Light*. Springer, New York, USA, 2007.
- [42] S. T. Isaacs, C. Chun, J. E. Hyde, H. Rapoport, and J. E. Hearst. A photochemical characterization of reactions of psoralen derivatives with DNA. In *Trends Photobiol.*, pages 279–294. Springer, New York, USA, 1982.
- [43] T. A. Moore, M. L. Harter, and P.-S. Song. Ultraviolet spectra of coumarins and psoralens. *J. Mol. Spectrosc.*, 40(1):144–157, 1971.
- [44] J. Tatchen and C. M. Marian. Vibronic absorption, fluorescence, and phosphorescence spectra of psoralen: a quantum chemical investigation. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 8:2133–2144, 2006.
- [45] J. J. Serrano-Peréz, R. González-Luque, M. Merchán, and L. Serrano-Andrés. The family of furocoumarins: Looking for the best photosensitizer for phototherapy. *J. Photochem. Photobiol. A*, (199):34–41, 2008.
- [46] S. C. Shim. *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*. CRC Press, Boca Raton, USA, 1st edition, 1995.
- [47] R. V. Bensasson, E. J. Land, and C. Salet. Triplet excited state of furocoumarins: Reaction with nucleic acid bases and amino acids. *Photochem. Photobiol.*, 27(3):273–280, 1978.
- [48] C. Salet, T. M. De Sa é Melo, R. Bensasson, and E. J. Land. Photophysical properties of aminomethylpsoralen in presence and absence of DNA. *BBA-Nucleic Acids Prot. Synth.*, 607(2):379–383, 1980.
- [49] M. Craw, R. V. Bensasson, J.-C. Ronfard-Haret, M. T. Sa é Melo, and T. G. Truscott. Some photophysical properties of 3-carbethoxypsoralen, 8-methoxypsoralen and 5-methoxypsoralen triplet states. *Photochem. Photobiol.*, 37(6):611–615, 1983.

- [50] T. Sa é Melo, M. Bazin, J.-C. Ronfard-Haret, and R. Santus. Quantification of the solvent effects on the triplet quantum yield of psoralen by the linear solvation energy relationship. *Photochem. Photobiol.*, 58(1):19–21, 1993.
- [51] J. Tatchen, N. Gilka, and C. M. Marian. Intersystem crossing driven by vibronic spin-orbit coupling: a case study on psoralen. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9:5209–5221, 2007.
- [52] E. C. Lim. *Excited States*, volume 4, p. 305. Academic Press, New York, USA, 1977.
- [53] S. Caffieri. Furocoumarin photolysis: chemical and biological aspects. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1:149–157, 2002.
- [54] E. C. Long and J. K. Barton. On demonstrating DNA intercalation. *Acc. Chem. Res.*, 23(9):271–273, 1990.
- [55] H. Ihmels and D. Otto. *Supramolecular Dye Chemistry*, chapter Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA – General principles and recent developments, pages 161–204. Number 258 in *Top. Curr. Chem.* Springer, Berlin, Deutschland, 2005.
- [56] X. Zhou, G. Zhang, and L. Wang. Probing the binding mode of psoralen to calf thymus DNA. *Int. J. Biol. Macromol.*, 67:228–237, 2014.
- [57] L. Musajo, G. Rodighiero, G. Colombo, V. Torlone, and F. Dall’Acqua. Photosensitizing furocoumarins: interaction with DNA and photo-inactivation of DNA containing viruses. *Experientia*, 21(1):22–24, 1965.
- [58] N. C. Garbett, P. A. Ragazzon, and J. B. Chaires. Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-DNA interactions. *Nat. Protoc.*, 2(12):3166–3172, 2007.
- [59] B. H. Johnston, A. H. Kung, C. B. Moore, and J. E. Hearst. Kinetics of formation of deoxyribonucleic acid crosslinks by 4’-(aminomethyl)-4,5’,8-trimethylpsoralen. *Biochemistry*, 20(4):735–738, 1981.
- [60] S. Fröbel, L. Buschhaus, T. Villnow, O. Weingart, and P. Gilch. The photoformation of a phthalide: A ketene intermediate traced by FSRS. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17:376–386, 2015.
- [61] P.-S. Song and K. J. Tapley. Photochemistry and photobiology of psoralens. *Photochem. Photobiol.*, 29(6):1177–1197, 1979.
- [62] D. Averbeck. Recent advances in psoralen phototoxicity mechanism. *Photochem. Photobiol.*, 50(6):859–882, 1989.

- [63] P. C. Beaumont, B. J. Parsons, G. O. Phillips, and J. C. Allen. A laser flash photolysis study of the reactivities of the triplet states of 8-methoxypsoralen and 4,5',8-trimethylpsoralen with nucleic acid bases in solution. *Biochim. Biophys. Acta*, (562):214–221, 1979.
- [64] P. C. Beaumont, E. J. Land, S. Navaratnam, B. J. Parsons, and G. O. Phillips. A pulse radiolysis study of the complexing of furocoumarins with DNA and proteins. *BBA-Nucleic Acids Prot. Synth.*, 608(1):182–189, 1980.
- [65] P. C. Beaumont, B. J. Parsons, S. Navaratnam, and G. O. Phillips. A laser flash photolysis and fluorescence study of aminomethyltrimethylpsoralen in the presence and absence of DNA. *Photobiochem. Photobiophys.*, 5:359–364, 1983.
- [66] G. G. Gurzadyan. Excited singlet state and photoionization of 8-methoxypsoralen. Picosecond transient absorption study. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1:757–762, 2002.
- [67] A. Oroskar, G. Olack, M. J. Peak, and F. P. Gasparro. 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen photochemistry: the effect of concentration and UVA fluence on photoadduct formation in poly(dAdT) and calf thymus DNA. *Photochem. Photobiol.*, 60(6):567–573, 1994.
- [68] S. I. Smith and J. S. Brodbelt. Rapid characterization of cross-links, mono-adducts, and non-covalent binding of psoralens to deoxyoligonucleotides by LC-UV/ESI-MS and IRMPD mass spectrometry. *Analyst*, 135:943–952, 2010.
- [69] J. W. Tessman, S. T. Isaacs, and J. E. Hearst. Photochemistry of the furan-side 8-methoxypsoralen-thymidine monoadduct inside the DNA helix. Conversion to diadduct and to pyrone-side monoadduct. *Biochemistry*, 24(7):1669–1676, 1985.
- [70] E. Sage and E. Moustacchi. Sequence context effects on 8-methoxypsoralen photobinding to defined DNA fragments. *Biochemistry*, 26(12):3307–3314, 1987.
- [71] B. H. Johnston, M. A. Johnson, C. B. Moore, and J. E. Hearst. Psoralen-DNA photoreaction: controlled production of mono- and diadducts with nanosecond ultraviolet laser pulses. *Science*, 197(4306):906–908, 1977.
- [72] W. W. Parson. *Modern Optical Spectroscopy, With Exercises and Examples from Biophysics and Biochemistry, Student Edition*. Springer, New York, USA, 2009.
- [73] H. Haken and H. C. Wolf. *Molekülphysik und Quantenchemie, 5. Auflage*. Springer, Berlin, Deutschland, 2006.
- [74] N. J. Turro, V. Ramamurthy, and J. C. Scaiano. *Principles of Molecular Photochemistry. An Introduction*. University Sciences Books, Sausalito, USA, 2009.

- [75] M. D. Fayer, editor. *Ultrafast Infrared and Raman Spectroscopy*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 2001.
- [76] J. L. Duncan. The determination of vibrational anharmonicity in molecules from spectroscopic observations. *Spectrochim. Acta A*, 47(1):1–27, 1991.
- [77] O. Golonzka, M. Khalil, N. Demirdöven, and A. Tokmakoff. Vibrational anharmonicities revealed by coherent two-dimensional infrared spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 86(10):2154, 2001.
- [78] M. A. El-Sayed. Spin-orbit coupling and the radiationless processes in nitrogen heterocyclics. *J. Chem. Phys.*, 38:2834–2838, 1963.
- [79] D. Meschede. *Optik, Licht und Laser*. Vieweg+Teubner Verlag, Berlin, Deutschland, 2. edition, 2005.
- [80] R. Loudon. *The quantum theory of light*. OUP Oxford, Oxford, UK, 2000.
- [81] J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, New York, USA, 3rd edition, 2006.
- [82] B. Bagchi and B. Jana. Solvation dynamics in dipolar liquids. *Chem. Soc. Rev.*, 39(6):1936–1954, 2010.
- [83] 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.
- [84] M. J. Lang, X. J. Jordanides, X. Song, and G. R. Fleming. Aqueous solvation dynamics studied by photon echo spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, 110(12):5884–5892, 1999.
- [85] R. Jimenez, G. R. Fleming, P. V. Kumar, and M. Maroncelli. Femtosecond solvation dynamics of water. *Nature*, 369:471–473, 1994.
- [86] D. Bingemann and N. P. Ernsting. Femtosecond solvation dynamics determining the band shape of stimulated emission from a polar styryl dye. *J. Chem. Phys.*, 102:2691–2700, 1995.
- [87] S. A. Kovalenko, R. Schanz, V. M. Farztdinov, H. Hennig, and N. P. Ernsting. Femtosecond relaxation of photoexcited para-nitroaniline: Solvation, charge transfer, internal conversion and cooling. *Chem. Phys. Lett.*, 323:312–322, 2000.
- [88] M. Glasbeek and H. Zhang. Femtosecond studies of solvation and intramolecular configurational dynamics of fluorophores in liquid solution. *Chem. Rev.*, 104(4):1929–1954, 2004.

- [89] V. May and O. Kuhn, editors. *Charge and Energy Transfer Dynamics in Molecular Systems*. John Wiley & Sons, West Sussex, UK, 3rd revised and enlarged edition, 2011.
- [90] R. A. Marcus. On the theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer. 1. *J. Chem. Phys.*, 24(5):966–978, 1956.
- [91] R. A. Marcus. Theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer. 4. A statistical-mechanical basis for treating contributions from solvent, ligands, and inert salt. *Discuss. Faraday Soc.*, (29):21–31, 1960.
- [92] R. A. Marcus and P. Siders. Theory of highly exothermic electron transfer reactions. *J. Phys. Chem.*, 86(5):622–630, 1982.
- [93] J. Jortner. Temperature dependent activation energy for electron transfer between biological molecules. *J. Chem. Phys.*, 64(12):4860–4867, 1976.
- [94] P. F. Barbara, T. J. Meyer, and M. A. Ratner. Contemporary issues in electron transfer research. *J. Phys. Chem.*, 100(31):13148–13168, 1996.
- [95] G. L. Closs, L. T. Calcaterra, N. J. Green, K. W. Penfield, and J. R. Miller. Distance, stereoelectronic effects, and the Marcus inverted region in intramolecular electron transfer in organic radical anions. *J. Phys. Chem.*, 90(16):3673–3683, 1986.
- [96] I. R. Gould, D. Ege, S. L. Mattes, and S. Farid. Return electron transfer within geminate radical ion pairs. Observation of the Marcus inverted region. *J. Am. Chem. Soc.*, 109(12):3794–3796, 1987.
- [97] F. D. Lewis, R. S. Kalgutkar, Y. Wu, X. Liu, J. Liu, R. T. Hayes, S. E. Miller, and M. R. Wasielewski. Driving force dependence of electron transfer dynamics in synthetic DNA hairpins. *J. Am. Chem. Soc.*, 122(49):12346–12351, 2000.
- [98] D. Rehm and A. Weller. Bindungszustand und Fluoreszenzspektren von Hetero-Excimeren. *Z. Phys. Chem.*, 69:183–200, 1970.
- [99] A. Weller. Photoinduced electron transfer in solution: exciplex and radical ion pair formation free enthalpies and their solvent dependence. *Z. Phys. Chem.*, 133(1):93–98, 1982.
- [100] R. M. Dirks and N. A. Pierce. An algorithm for computing nucleic acid base-pairing probabilities including pseudoknots. *J. Comput. Chem.*, 25:1295–1304, 2004.
- [101] T. H. Cormen, C. E. Leiserson, R. L. Rivest, and C. Stein. *Introduction to algorithms*. MIT press, Cambridge, USA, 2009.

- [102] J. SantaLucia Jr. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 95(4):1460–1465, 1998.
- [103] D. M. Crothers and B. H. Zimm. Theory of the melting transition of synthetic polynucleotides: Evaluation of the stacking free energy. *J. Mol. Biol.*, 9(1):1 – 9, 1964.
- [104] H. DeVoe and I. Tinoco. The stability of helical polynucleotides: base contributions. *J. Mol. Biol.*, 4(6):500–517, 1962.
- [105] J. SantaLucia Jr. and D. Hicks. The thermodynamics of DNA structural motifs. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33:415–440, 2004.
- [106] C. Schildkraut and S. Lifson. Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration. *Biopolymers*, 3(2):195–208, 1965.
- [107] R. Owczarzy, Y. You, B. G. Moreira, J. A. Manthey, L. Huang, M. A. Behlke, and J. A. Walder. Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: improved predictions of melting temperatures. *Biochemistry*, 43(12):3537–3554, 2004.
- [108] H. I. Elsner and E. B. Lindblad. Ultrasonic degradation of DNA. *DNA*, 8(10):697–701, 1989.
- [109] S. Fröbel, A. Reiffers, C. Torres Ziegenbein, and P. Gilch. DNA intercalated psoralen undergoes efficient photoinduced electron transfer. *J. Phys. Chem. Lett.*, 6:1260–1264, 2015.
- [110] D. Polli, D. Brida, S. Mukamel, G. Lanzani, and G. Cerullo. Effective temporal resolution in pump-probe spectroscopy with strongly chirped pulses. *Phys. Rev. A*, 82:053809, 2010.
- [111] 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.
- [112] C. Rullière, editor. *Femtosecond laser pulses: principles and experiments*. Springer Science+Business Media, LLC, New York, USA, 2nd edition, 2005.
- [113] G. Cerullo and S. De Silvestri. Ultrafast optical parametric amplifiers. *Rev. Sci. Instrum.*, 74(1):1–18, January 2003.
- [114] A. Brodeur and S. L. Chin. Band-gap dependence of the ultrafast white-light continuum. *Phys. Rev. Lett.*, 80:4406–4409, 1998.

- [115] R. Huber, H. Satzger, W. Zinth, and J. Wachtveitl. Noncollinear optical parametric amplifiers with output parameters improved by the application of a white light continuum generated in  $\text{CaF}_2$ . *Opt. Commun.*, 194(4-6):443–448, 2001.
- [116] M. Ziolk, R. Naskrecki, and J. Karolczak. Some temporal and spectral properties of femtosecond supercontinuum important in pump-probe spectroscopy. *Opt. Commun.*, 241(1-3):221–229, 2004.
- [117] W. Zinth and U. Zinth. *Optik: Lichtstrahlen-Wellen-Photonen*. Oldenbourg Wissenschaftsverlag, München, Deutschland, 2013.
- [118] A. Monmayrant, S. Weber, and B. Chatel. A newcomer’s guide to ultrashort pulse shaping and characterization. *J. Phys. B*, 43(10):103001, 2010.
- [119] P. P. Ho and R. R. Alfano. Optical Kerr effect in liquids. *Phys. Rev. A*, 20(5):2170–2187, 1979.
- [120] R. W. Boyd. *Nonlinear Optics*. Academic Press, Amsterdam, Netherlands, 3rd edition, 2008.
- [121] S. Fröbel, L. Levi, S. M. Ulamec, and P. Gilch. Photoinduced electron transfer between psoralens and DNA: Influence of DNA sequence and substitution. *ChemPhysChem*, page early view, 2016.
- [122] 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.
- [123] P. Kukura, S. Yoon, and R. A. Mathies. Femtosecond stimulated Raman spectroscopy. *Anal. Chem.*, 78(17):5952–5959, 2006.
- [124] R. R. Frontiera, C. Fang, J. Dasgupta, and R. A. Mathies. Probing structural evolution along multidimensional reaction coordinates with femtosecond stimulated Raman spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, (14):405–414, 2012.
- [125] D. R. Dietze and R. Mathies. Femtosecond stimulated Raman spectroscopy. *ChemPhysChem*, page early view, 2016.
- [126] E. Plötz, S. Laimgruber, S. Berner, W. Zinth, and P. Gilch. Femtosecond stimulated Raman microscopy. *Appl. Phys. B*, 87(3):389–393, April 2007.
- [127] S. A. Kovalenko, A. L. Dobryakov, and N. P. Ernsting. An efficient setup for femtosecond stimulated Raman spectroscopy. *Rev. Sci. Instrum.*, 82(6):063102, 2011.

- [128] A. Savitzky and M. J. E. Golay. Smoothing + differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.*, 36(8):1627, 1964.
- [129] I. H. M. van Stokkum, D. S. Larsen, and R. van Grondelle. Global and target analysis of time-resolved spectra. *Biochim. Biophys. Acta*, 1657(2):82–104, 2004.
- [130] H. Satzger and W. Zinth. Visualization of transient absorption dynamics - towards a qualitative view of complex reaction kinetics. *Chem. Phys.*, 295(3):287–295, 2003.
- [131] P. W. Atkins and J. de Paula. *Physical Chemistry*. Oxford University Press, Oxford, UK, 7th edition, 2002.
- [132] M. Montalti, A. Credi, L. Prodi, and T. Gandolfi. *Handbook of Photochemistry*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, 3rd edition, 2006.
- [133] M. Gruebele and A. H. Zewail. Femtosecond wave packet spectroscopy - coherences, the potential, and structural determination. *J. Chem. Phys.*, 98(2):883–902, 1993.
- [134] J. J. Moré. The Levenberg-Marquardt algorithm: implementation and theory. *Numeric. Anal.*, pages 105–116, 1978.
- [135] S. Laimgruber, T. Schmierer, P. Gilch, K. Kiewisch, and J. Neugebauer. The ketene intermediate in the photochemistry of *ortho*-nitrobenzaldehyde. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 10:3872–3881, 2008.
- [136] T. Schmierer, S. Laimgruber, K. Haiser, K. Kiewisch, J. Neugebauer, and P. Gilch. Femtosecond spectroscopy on the photochemistry of *ortho*-nitrotoluene. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12:15653–15664, 2010.
- [137] S. Fröbel and P. Gilch. Femtochemistry of selected di-substituted benzenes. *J. Photochem. Photobiol. A*, 318:150–159, 2016.
- [138] D. McCamant, P. Kukura, S. Yoon, and R. A. Mathies. Femtosecond broadband stimulated Raman spectroscopy: Apparatus and methods. *Rev. Sci. Instrum.*, 75(11):4971–4980, 2004.
- [139] S. Shim and R. A. Mathies. Generation of narrow-bandwidth picosecond visible pulses from broadband femtosecond pulses for femtosecond stimulated Raman. *Appl. Phys. Lett.*, 89(12), 2006.
- [140] E. Pontecorvo, S. M. Kapetanaki, M. Badioli, D. Brida, M. Marangoni, G. Cerullo, and T. Scopigno. Femtosecond stimulated Raman spectrometer in the 320–520nm range. *Opt. Express*, 19(2):1107–1112, 2011.

- [141] E. Pontecorvo, C. Ferrante, C. G. Elles, and T. Scopigno. Spectrally tailored narrowband pulses for femtosecond stimulated Raman spectroscopy in the range 330–750 nm. *Opt. Express*, 21(6):6866–6872, 2013.
- [142] A. P. Shreve, N. J. Cherepy, and R. A. Mathies. Effective rejection of fluorescence interference in Raman spectroscopy using a shifted excitation difference technique. *Appl. Spectrosc.*, 46(4):707–711, 1992.
- [143] M. Kloz, R. van Grondelle, and J. T. M. Kennis. Wavelength-modulated femtosecond stimulated Raman spectroscopy – approach towards automatic data processing. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13(40):18123–18133, 2011.
- [144] R. Bonifacio and L. A. Lugiato. Cooperative radiation processes in two-level systems: Superfluorescence. *Phys. Rev. A*, 11:1507–1521, 1975.
- [145] B. Schrader and W. Meier, editors. *Raman/IR Atlas of Organic Compounds*. Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1975.
- [146] S. Laimgruber, W. J. Schreier, T. Schrader, F. Koller, W. Zinth, and P. Gilch. The photochemistry of o-nitrobenzaldehyde as seen by femtosecond vibrational spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44:7901–7904, 2005.
- [147] T. Schmierer, W. J. Schreier, F. O. Koller, T. E. Schrader, and P. Gilch. Impact of vibrational excitation on the kinetics of a nascent ketene. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 11:11596–11607, 2009.
- [148] T. Schmierer, F. Bley, K. Schaper, and P. Gilch. The early processes in the photochemistry of ortho-nitrobenzyl acetate. *J. Photochem. Photobiol. A*, 217(2-3):363–368, 2011.
- [149] S. T. Isaacs, C.-K. J. Shen, J. E. Hearst, and H. Rapoport. Synthesis and characterization of new psoralen derivatives with superior photoreactivity with DNA and RNA. *Biochemistry*, 16(6):1058–1064, 1977.
- [150] N. D. Heindel, M. Choudhuri, J. Ressler, and N. Foster. Aminomethyl psoralens. Electrophilic substitution of hydroxymethylphthalimide on linear furocoumarins. *J. Heterocycl. Chem.*, 22(1):73–76, 1985.
- [151] H. P. Spielmann, S. S. Sastry, and J. E. Hearst. Methods for large-scale synthesis of psoralen furan-side monoadducts and diadducts. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 89:4514–4518, 1992.
- [152] J. N. Zadeh, C. D. Steenberg, J. S. Bois, B. R. Wolfe, M. B. Pierce, A. R. Khan, R. M. Dirks, and N. A. Pierce. NUPACK: analysis and design of nucleic acid systems. *J. Comput. Chem.*, 32(1):170–173, 2011.

- [153] A. Andreoni, R. Cubeddu, F. Dall'Acqua, C.N. Knox, and T.G. Truscott. Fluorescence lifetimes of furocoumarins. Psoralens. *Chem. Phys. Lett.*, 114(3):329–333, 1985.
- [154] F.-Y. Jou and G. R. Freeman. Temperature and isotope effects on the shape of the optical absorption spectrum of solvated electrons in water. *J. Phys. Chem.*, 83(18):2383–2387, 1979.
- [155] J. M. L. Pecourt, J. Peon, and B. Kohler. DNA excited-state dynamics: Ultrafast internal conversion and vibrational cooling in a series of nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.*, 123(42):10370–10378, 2001.
- [156] B. Cohen, P. M. Hare, and B. Kohler. Ultrafast excited-state dynamics of adenine and monomethylated adenines in solution: Implications for the nonradiative decay mechanism. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(44):13594–13601, 2003.
- [157] P. D. Wood and L. J. Johnston. Photoionization and photosensitized electron-transfer reactions of psoralens and coumarins. *J. Phys. Chem. A*, (102):5585–5591, 1998.
- [158] R. V. Bensasson, O. Chalvet, E. J. Land, and J. C. Ronfard-Haret. Triplet, radical anion and radical cation spectra of furocoumarins. *Photochem. Photobiol.*, 39(3):287–291, 1984.
- [159] A. M. Brun and A. Harriman. Dynamics of electron transfer between intercalated polycyclic molecules: effect of interspersed bases. *J. Am. Chem. Soc.*, 114(10):3656–3660, 1992.
- [160] S. G. Cohen, A. Parola, and G. H. Parsons Jr. Photoreduction by amines. *Chem. Rev.*, 73(2):141–161, 1973.
- [161] A. Cuervo, P. D. Dans, J. L. Carrascosa, M. Orozco, G. Gomila, and L. Fumagalli. Direct measurement of the dielectric polarization properties of DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 111(35):E3624–E3630, 2014.
- [162] R. Jin and K. J. Breslauer. Characterization of the minor groove environment in a drug-DNA complex: bisbenzimidazole bound to the poly [d(AT)]. poly [d(AT)] duplex. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 85(23):8939–8942, 1988.
- [163] D. A. Barawkar and K. N. Ganesh. Fluorescent d(CGCGAATTCGCG): characterization of major groove polarity and study of minor groove interactions through a major groove semantophore conjugate. *Nucleic Acids Res.*, 23(1):159–164, 1995.
- [164] R. Hölzel. Dielectric and dielectrophoretic properties of DNA. *IET Nanobiotechnol.*, 3(2):28–45, 2009.

- [165] S. Sumalekshmy and K. R. Gopidas. Reaction of aromatic amines with  $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$  in acetonitrile as a facile route to amine radical cation generation. *Chem. Phys. Lett.*, 413(4):294–299, 2005.
- [166] T. Chen, M. S. Platz, M. Robert, J.-M. Savéant, A. Marcinek, J. Rogowski, J. Gebicki, Z. Zhu, and T. Bally. Electron transfer chemistry of psoralen and coumarin derivatives by means of radiolytic and electrochemical experiments. *J. Phys. Chem. A*, 101(11):2124–2130, 1997.
- [167] B. Thapa and H. B. Schlegel. Calculations of pKa's and redox potentials of nucleobases with explicit waters and polarizable continuum solvation. *J. Phys. Chem. A*, 119(21):5134–5144, 2015.
- [168] L. P. Candeias and S. Steenken. Electron transfer in di(deoxy)nucleoside phosphates in aqueous solution: rapid migration of oxidative damage (via adenine) to guanine. *J. Am. Chem. Soc.*, 115(6):2437–2440, 1993.
- [169] E. D. A. Stemp, M. R. Arkin, and J. K. Barton. Oxidation of guanine in DNA by  $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})^{3+}$  using the flash-quench technique. *J. Am. Chem. Soc.*, 119(12):2921–2925, 1997.
- [170] B. H. Johnston and J. E. Hearst. Characterization of the photoreaction between DNA and aminomethyl-trimethylpsoralen using absorption and fluorescence spectroscopy. *Photochem. Photobiol.*, 33(6):785–791, 1981.
- [171] T.-I. Lai, B. T. Lim, and E. C. Lim. Photophysical properties of biologically important molecules related to proximity effects: psoralens. *J. Am. Chem. Soc.*, 104(26):7631–7635, 1982.
- [172] F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, and M. R. Wasielewski. Distance-dependent electron transfer in DNA hairpins. *Science*, 277(5326):673–676, 1997.
- [173] E. Smith and G. Dent. *Modern Raman Spectroscopy*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, UK, 2005.
- [174] A. C. Albrecht. On the theory of Raman intensities. *J. Chem. Phys.*, 34(5):1476–1484, 1961.
- [175] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, Jr. J. A. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N.

- Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox. Gaussian09 Revision D.01. Gaussian Inc. Wallingford CT 2009.
- [176] J. Tomasi, B. Mennucci, and R. Cammi. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.*, 105(8):2999–3094, 2005.
- [177] R. D. Johnson III. NIST computational chemistry comparison and benchmark database NIST standard reference database number 101, release 17b, September 2015.
- [178] M. A. Harris, A. K. Mishra, R. M. Young, K. E. Brown, M. R. Wasielewski, and F. D. Lewis. Direct observation of the hole carriers in DNA photoinduced charge transport. *J. Am. Chem. Soc.*, 138(17):5491–5494, 2016.
- [179] H. P. Spielmann, T. J. Dwyer, J. E. Hearst, and D. E. Wemmer. Solution structures of psoralen monoadducted and cross-linked DNA oligomers by NMR spectroscopy and restrained molecular dynamics. *Biochemistry*, 34(40):12937–12953, 1995.
- [180] R. M. Hanson, J. Prilusky, Z. Renjian, T. Nakane, and J. L. Sussman. JSmol and the next-generation web-based representation of 3D molecular structure as applied to proteopedia. *Isr. J. Chem.*, 53(3-4):207–216, 2013.
- [181] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, and P. E. Bourne. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.*, 28(1):235–242, 2000.
- [182] Y. Paukku and G. Hill. Theoretical determination of one-electron redox potentials for DNA bases, base pairs, and stacks. *J. Phys. Chem. A*, 115(18):4804–4810, 2011.
- [183] C. H. Hamann and W. Vielstich. *Elektrochemie*. Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland, 4. edition, 2005.
- [184] V. V. Pavlishchuk and A. W. Addison. Conversion constants for redox potentials measured versus different reference electrodes in acetonitrile solutions at 25°C. *Inorg. Chim. Acta*, 298(1):97–102, 2000.
- [185] J. L. Roberts D. T. Sawyer, A. Sobkowiak. *Electrochemistry for Chemists*. John Wiley & Sons, New York, USA, 2nd edition, 1995.

- [186] R. S. Nicholson and I. Shain. Theory of stationary electrode polarography. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. *Anal. Chem.*, 36(4):706–723, 1964.
- [187] M. L. Olmstead, R. G. Hamilton, and R. S. Nicholson. Theory of cyclic voltammetry for a dimerization reaction initiated electrochemically. *Anal. Chem.*, 41(2):260–267, 1969.
- [188] M. J. Park, M. Fujitsuka, K. Kawai, and T. Majima. Excess-electron injection and transfer in terthiophene-modified DNA: Terthiophene as a photosensitizing electron donor for thymine, cytosine, and adenine. *Chem. - Eur. J.*, 18(7):2056–2062, 2012.
- [189] S.-H. Lin, M. Fujitsuka, M. Ishikawa, and T. Majima. Driving force dependence of charge separation and recombination processes in dyads of nucleotides and strongly electron-donating oligothiophenes. *J. Phys. Chem. B*, 118(42):12186–12191, 2014.
- [190] B. S. Fujimoto, J. B. Clendenning, J. J. Delrow, P. J. Heath, and M. Schurr. Fluorescence and photobleaching studies of methylene blue binding to DNA. *J. Phys. Chem.*, 98(26):6633–6643, 1994.



# Anhang

## Mathcad Routine zur $K_D$ -Wert Bestimmung aus Titrationsdaten

Kd-Bestimmung über Gleichungssystem für je eine Wellenlänge  $\lambda$  oder einen gemittelten Wellenlängenbereich

Für jedes Experiment müssen folgende Werte geändert werden (grün):

- Absorptionskoeff.  $\epsilon_1$  des freien Psoralens für die entsprechende  $\lambda$
- Gesamtkonzentration des Psoralens unter "Vorgaben"
- Die Vektoren Abs und DNA (DNA-korrigierte Absorption und DNA Konzentration, können aus Origin kopiert werden)
- falls nicht genau 20 Messpunkte vorliegen, müssen Vorgaben zugefügt/gelöscht werden

$\epsilon_2$  entspricht dem Abs.koeff. des interkalierten Psoralens

Konstanten:

$$\epsilon_1 := 5943$$

$$c_{ges} := 2.02 \cdot 10^{-5}$$

Formeln:

$$A(c_{frei}, c_{ges}, \epsilon_2) := \epsilon_1 \cdot c_{frei} + \epsilon_2 \cdot (c_{ges} - c_{frei})$$

$$cDNA(c_{frei}, c_{ges}, K_d) := \frac{(c_{ges} - c_{frei}) \cdot (c_{frei} + K_d)}{c_{frei}}$$

Schätzwerte:

$$\epsilon_2 := 4200 \quad K_d := 4 \cdot 10^{-5}$$

$$\begin{matrix} c_{1a} := 10^{-5} & c_{1b} := 10^{-5} & c_{1c} := 10^{-5} & c_{1d} := 10^{-5} & c_{1e} := 10^{-5} & c_{1f} := 10^{-5} \\ c_{1g} := 10^{-5} & c_{1h} := 10^{-5} & c_{1i} := 10^{-5} & c_{1j} := 10^{-5} & c_{1k} := 10^{-5} & c_{1l} := 10^{-5} \\ c_{1m} := 10^{-5} & c_{1n} := 10^{-5} & c_{1o} := 10^{-5} & c_{1p} := 10^{-5} & c_{1q} := 10^{-5} & c_{1r} := 10^{-5} \\ c_{1s} := 10^{-5} & c_{1t} := 10^{-5} & & & & \end{matrix}$$

Vorgabe

$$c_{ges} = 2.02 \cdot 10^{-5}$$

$$\begin{matrix} A(c_{1a}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_0 & A(c_{1g}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_6 & A(c_{1m}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_{12} & A(c_{1s}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_{18} \\ A(c_{1b}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_1 & A(c_{1h}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_7 & A(c_{1n}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_{13} & A(c_{1t}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_{19} \\ A(c_{1c}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_2 & A(c_{1i}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_8 & A(c_{1o}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_{14} & \\ A(c_{1d}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_3 & A(c_{1j}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_9 & A(c_{1p}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_{15} & \\ A(c_{1e}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_4 & A(c_{1k}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_{10} & A(c_{1q}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_{16} & \\ A(c_{1f}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_5 & A(c_{1l}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_{11} & A(c_{1r}, c_{ges}, \epsilon_2) = Abs_{17} & \end{matrix}$$

$$\begin{matrix} cDNA(c_{1a}, c_{ges}, K_d) = DNA_0 & cDNA(c_{1g}, c_{ges}, K_d) = DNA_6 & cDNA(c_{1m}, c_{ges}, K_d) = DNA_{12} & cDNA(c_{1s}, c_{ges}, K_d) = DNA_{18} \\ cDNA(c_{1b}, c_{ges}, K_d) = DNA_1 & cDNA(c_{1h}, c_{ges}, K_d) = DNA_7 & cDNA(c_{1n}, c_{ges}, K_d) = DNA_{13} & cDNA(c_{1t}, c_{ges}, K_d) = DNA_{19} \\ cDNA(c_{1c}, c_{ges}, K_d) = DNA_2 & cDNA(c_{1i}, c_{ges}, K_d) = DNA_8 & cDNA(c_{1o}, c_{ges}, K_d) = DNA_{14} & \\ cDNA(c_{1d}, c_{ges}, K_d) = DNA_3 & cDNA(c_{1j}, c_{ges}, K_d) = DNA_9 & cDNA(c_{1p}, c_{ges}, K_d) = DNA_{15} & \\ cDNA(c_{1e}, c_{ges}, K_d) = DNA_4 & cDNA(c_{1k}, c_{ges}, K_d) = DNA_{10} & cDNA(c_{1q}, c_{ges}, K_d) = DNA_{16} & \\ cDNA(c_{1f}, c_{ges}, K_d) = DNA_5 & cDNA(c_{1l}, c_{ges}, K_d) = DNA_{11} & cDNA(c_{1r}, c_{ges}, K_d) = DNA_{17} & \end{matrix}$$

Abs :=	0.09811	DNA :=	6.16296E-4
	0.10057		4.10864E-4
	0.103		2.73909E-4
	0.10627		1.82606E-4
	0.10866		1.21738E-4
	0.11195		8.11584E-5
	0.11462		5.41056E-5
	0.11573		3.60704E-5
	0.1171		2.40469E-5
	0.11814		1.60313E-5
	0.1185		1.06875E-5
	0.11908		7.12501E-6
	0.11943		4.75001E-6
	0.11975		3.16667E-6
	0.11964		2.11112E-6
	0.12004		1.40741E-6
	0.12036		9.38273E-7
	0.12016		6.25516E-7
	0.12041		4.1701E-7
	0.12041		4.1701E-7

## Mathcad Routine zur $K_D$ -Wert Bestimmung aus Titrationsdaten (Fortsetzung)

Lösungen:

Kdis  
eps2  
cg  
a  
b  
c  
d  
e  
f  
g  
h  
i  
j  
k  
l  
m  
n  
o  
p  
q  
r  
s  
t

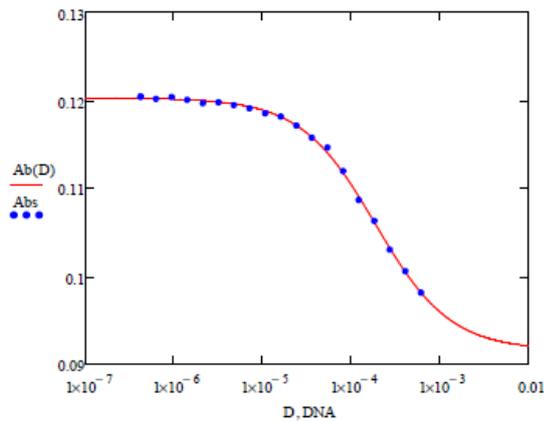
$:= \text{Suchen}(Kd, \epsilon 2, c_{ges}, c_{la}, c_{lb}, c_{lc}, c_{ld}, c_{le}, c_{lf}, c_{lg}, c_{lh}, c_{li}, c_{lj}, c_{lk}, c_{ll}, c_{lm}, c_{ln}, c_{lo}, c_{lp}, c_{lq}, c_{lr}, c_{ls}, c_{lt}) =$

	0
0	$1.784 \cdot 10^{-4}$
1	$4.524 \cdot 10^{-5}$
2	$2.024 \cdot 10^{-5}$
3	$4.623 \cdot 10^{-6}$
4	$6.356 \cdot 10^{-6}$
5	$8.07 \cdot 10^{-6}$
6	$1.037 \cdot 10^{-5}$
7	$1.206 \cdot 10^{-5}$
8	$1.438 \cdot 10^{-5}$
9	$1.626 \cdot 10^{-5}$
10	$1.704 \cdot 10^{-5}$
11	$1.801 \cdot 10^{-5}$
12	$1.874 \cdot 10^{-5}$
13	$1.899 \cdot 10^{-5}$
14	$1.94 \cdot 10^{-5}$
15	...

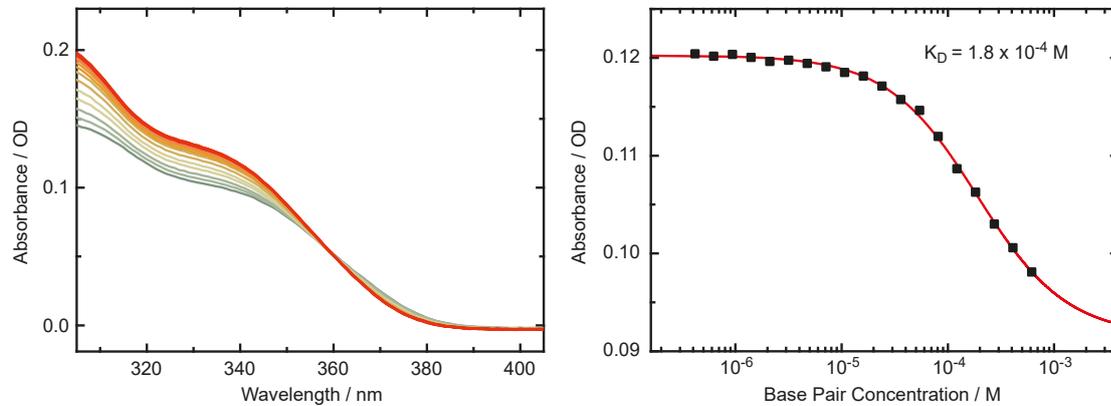
Vergleich zwischen Daten und Fitsergebnissen:  
(Die Werte für  $K_d$ ,  $c_{ges}$  und  $\epsilon 2$  werden automatisch aus der Lösung des Fits  
genommen und mit den experimentellen Daten überlagert dargestellt)

$$Ab(D) := \epsilon 2 \left[ \frac{D}{2} + \frac{K_{dis}}{2} + \frac{c_g}{2} - \sqrt{\frac{D^2 + 2 \cdot D \cdot K_{dis} - 2 \cdot D \cdot c_g + K_{dis}^2 + 2 \cdot K_{dis} \cdot c_g + c_g^2}{2}} \right] \dots$$

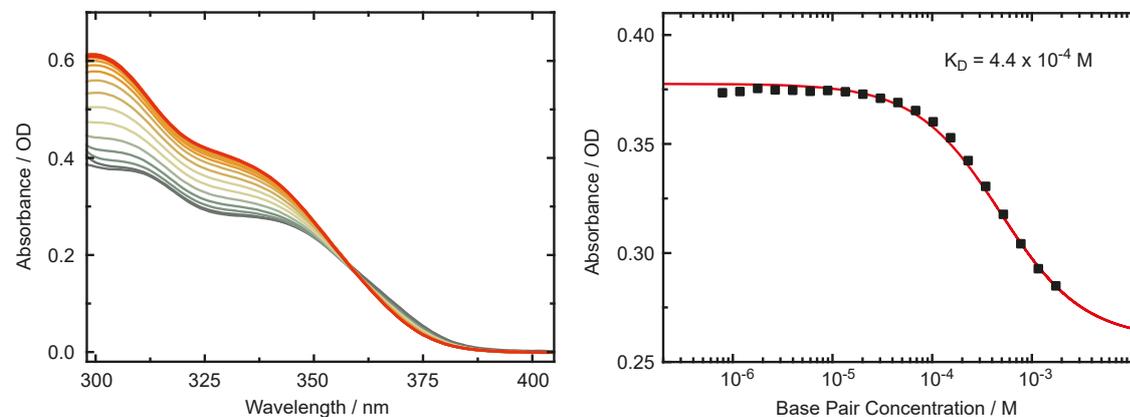
$$+ \epsilon 1 \left[ c_g - \left( \frac{D}{2} + \frac{K_{dis}}{2} + \frac{c_g}{2} - \sqrt{\frac{D^2 + 2 \cdot D \cdot K_{dis} - 2 \cdot D \cdot c_g + K_{dis}^2 + 2 \cdot K_{dis} \cdot c_g + c_g^2}{2}} \right) \right]$$



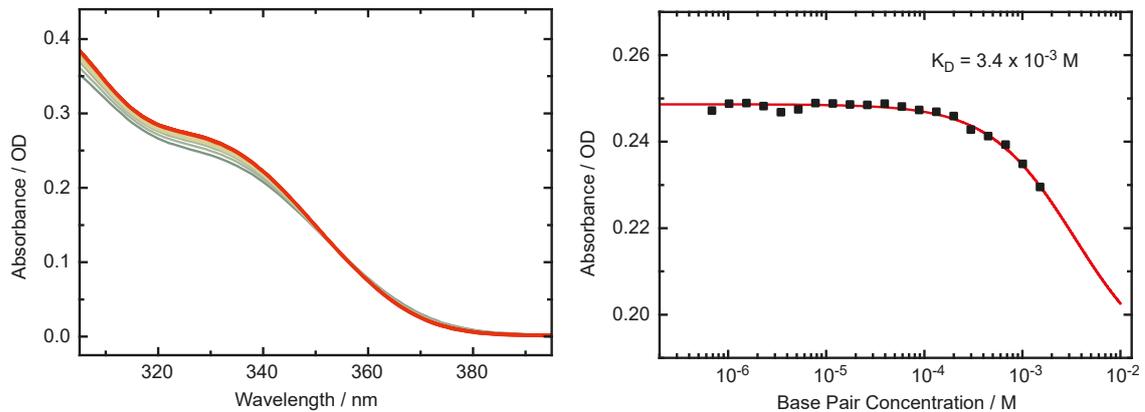
## Titrationsexperimente zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten



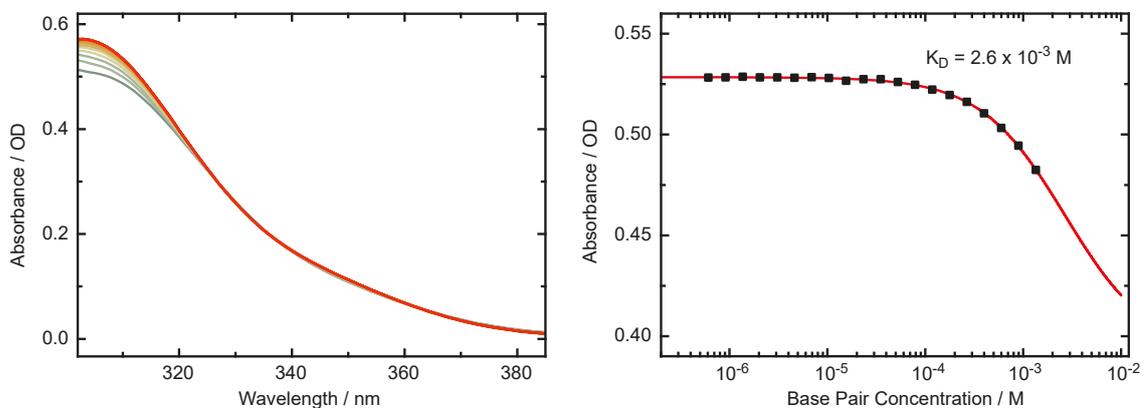
**Abbildung A.2:** Links: Absorptionsspektren der Titration von AMT mit GC-DNA in Phosphatpuffer ( $d = 1$  cm). Die AMT-Konzentration betrug konstant  $20 \mu\text{M}$ , während die DNA-Konzentration von hoch (grün) zu niedrig (rot) variiert wurde. Der Beitrag der DNA zur Absorption wurde unter Beachtung der jeweiligen DNA-Konzentration subtrahiert. Rechts: AMT-Absorption um  $338$  nm in Abhängigkeit der DNA-Konzentration (schwarze Punkte) mit der Anpassungsfunktion zur Bestimmung von  $K_D$  aus der Mathcad Routine (rot). Entnommen aus S. Fröbel et al. [121]



**Abbildung A.3:** Links: Absorptionsspektren der Titration von AMT mit AT-DNA in Phosphatpuffer ( $d = 1$  cm). Die AMT-Konzentration betrug konstant  $62 \mu\text{M}$ , während die DNA-Konzentration von hoch (grün) zu niedrig (rot) variiert wurde. Der Beitrag der DNA zur Absorption wurde unter Beachtung der jeweiligen DNA-Konzentration subtrahiert. Rechts: AMT-Absorption um  $335$  nm in Abhängigkeit der DNA-Konzentration (schwarze Punkte) mit der Anpassungsfunktion zur Bestimmung von  $K_D$  aus der Mathcad Routine (rot). Entnommen aus S. Fröbel et al. [121]



**Abbildung A.4:** *Links:* Absorptionsspektren der Titration von PSO mit GC-DNA in Phosphatpuffer ( $d = 1 \text{ cm}$ ). Die PSO-Konzentration betrug konstant  $35 \mu\text{M}$ , während die DNA-Konzentration von hoch (grün) zu niedrig (rot) variiert wurde. Der Beitrag der DNA zur Absorption wurde unter Beachtung der jeweiligen DNA-Konzentration subtrahiert. *Rechts:* PSO-Absorption um  $330 \text{ nm}$  in Abhängigkeit der DNA-Konzentration (schwarze Punkte) mit der Anpassungsfunktion zur Bestimmung von  $K_D$  aus der Mathcad Routine (rot). Entnommen aus S. Fröbel et al. [121]



**Abbildung A.5:** *Links:* Absorptionsspektren der Titration von 8MOP mit GC-DNA in Phosphatpuffer ( $d = 1 \text{ cm}$ ). Die 8MOP-Konzentration betrug konstant  $48 \mu\text{M}$ , während die DNA-Konzentration von hoch (grün) zu niedrig (rot) variiert wurde. Der Beitrag der DNA zur Absorption wurde unter Beachtung der jeweiligen DNA-Konzentration subtrahiert. *Rechts:* 8MOP-Absorption um  $310 \text{ nm}$  in Abhängigkeit der DNA-Konzentration (schwarze Punkte) mit der Anpassungsfunktion zur Bestimmung von  $K_D$  aus der Mathcad Routine (rot). Entnommen aus S. Fröbel et al. [121]



# Eigenständigkeitserklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 20.4.2016

Sascha Fröbel

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2012 bis April 2016 am Institut für Physikalische Chemie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Peter Gilch angefertigt.