

Konformerenselektive Infrarotspektroskopie von Biomolekülen in der Gasphase

Inaugural–Dissertation

Zur

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

vorgelegt von

Kai Andre Seefeld

aus Neuss

- April 2008 -

Aus dem Institut für Physikalische Chemie I
der Heinrich–Heine–Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. K. Kleiner
Koreferent: PD. Dr. M. Schmitt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	3
2.1	Molekularstrahlen	3
2.1.1	Theorie der Überschalldüsenstrahlen	3
2.1.2	Verwendung der Überschalldüsenstrahlen	4
2.1.3	Vorteile der Molekularstrahlen	5
2.2	Laser	8
2.2.1	Prinzip	8
2.2.2	Nichtlineare optische Prozesse	10
2.3	Spektroskopische Methoden	11
2.3.1	Resonanzverstärkte Mehrphotonenionisation	11
2.3.2	Doppelresonanzspektroskopie	12
3	Experiment	15
3.1	Laserdesorption	15
3.2	Apparativer Aufbau	17
3.2.1	Lasersysteme	17
3.2.2	Molekularstrahlapparatur	25
3.2.3	Zeitliche Steuerung	29
4	Quantenmechanische Rechnungen	31
4.1	Potentialflächen	32
4.2	Molekülorbitale	33
4.3	Dichtefunktionaltheorie	34

5	Veröffentlichungen	39
5.1	2-Aminopurin (2-AP)	40
5.1.1	Introduction	41
5.1.2	Experimental and theoretical methods	43
5.1.3	Results and discussion	45
5.1.4	Conclusions	54
5.1.5	Acknowledgements	54
5.2	Guanin (G)	55
5.2.1	Introduction	55
5.2.2	Experimental Methods	56
5.2.3	Calculations	57
5.2.4	Results	59
5.2.5	Summary	64
5.2.6	Acknowledgment.	65
5.3	FTIR Aminoacids	67
5.3.1	Introduction	67
5.3.2	Experiment	68
5.3.3	Results	69
5.3.4	Discussion	75
5.4	Prolin-Tryptophan (ProTrp)	77
5.4.1	Introduction	77
5.4.2	Experiment	79
5.4.3	Results	82
5.4.4	Calculations	85
5.4.5	Discussion	94
5.4.6	Summary	97
5.4.7	Acknowledgment	98
5.5	Tryptophan-Serin (TrpSer)	99
5.5.1	Introduction	99
5.5.2	Experiment	101
5.5.3	Computational Methods and Technical Details	103
5.5.4	Results	104
5.5.5	Discussion	110
5.5.6	Summary	111
5.5.7	Acknowledgment	112

6	nichtveröffentlichte Ergebnisse	115
6.1	7-Methylguanin (7-MG) und 9-Methylguanin (9-MG)	115
6.1.1	Einführung	115
6.1.2	IR/UV-Doppelresonanz von 7-MG	116
6.1.3	IR/UV-Doppelresonanz von 9-MG	120
6.2	Tryptophan-Serin Wassercluster (TrpSer(H ₂ O))	123
6.2.1	IR-UV Doppelresonanz	124
6.3	Pentapeptid (AlaAlaAlaTyrAla)	129
6.3.1	R2PI	129
6.3.2	IR/UV Doppelresonanz	129
6.4	Häm- / Chlorophyll- Modellsysteme	133
6.4.1	H ₂ TPP	133
7	Zusammenfassung	137
	Literaturverzeichnis	140
	Abbildungsverzeichnis	157
	Tabellenverzeichnis	159

Kapitel 1

Einleitung

Der Mensch ist seit jeher fasziniert von dem Gedanken nach dem Ursprung des Lebens, sowie der Idee, komplexe natürliche Vorgänge zu begreifen und die Bausteine des Lebens näher kennenzulernen. Jedoch erschweren makroskopische Effekte wie Solvation und Wechselwirkungen mit anderen Molekülen die Untersuchungen intrinsischer Eigenschaften von Biomolekülen. Für die Unterscheidung der dem Molekül innewohnenden Eigenschaften sowie dem Verhalten, welches aus seiner biochemischen Umgebung resultiert, müssen die Biomoleküle isoliert betrachtet werden. Dabei prägt die Struktur der Moleküle - ihre Konstitution oder Konformation - maßgeblich ihr intrinsisches Verhalten. Aus diesem Grund nehmen in der vorliegenden Dissertation strukturaufklärende Untersuchungsmethoden von Biomolekülen bzw. entsprechenden Analoga auf Basis der Infrarotspektroskopie den Hauptstellenwert ein. Die Verwendung von Molekularstrahlen erlaubt die Spektroskopie individueller Spezies ohne jegliche äußere Einflüsse, so daß das intrinsische Verhalten genau studiert werden kann. Wie sich dieses Verhalten bei Wechselwirkung mit der Umgebung ändert, kann dann mit Hilfe von sequenzieller Addition einzelner Wechselwirkungspartner wie beispielsweise Wassermolekülen studiert werden.

Die untersuchten Moleküle lassen sich im Prinzip in drei Klassen unterteilen.

Zunächst wurden Tautomere der Nucleobasen und Analoga untersucht. Hier steht die Aufklärung spezieller Konstitutionsisomere, d.h. gleiche Summenformel, andere Verknüpfung der Atome (z.B. Tautomere) im Vordergrund. Es zeigt sich, dass selbst in den für Chemiker und Biologen relativ kleinen molekularen Systemen wie den Nucleobasen die Struktur ganz entscheidend für die Photochemie des Moleküls ist. So wird derzeit nach Erklärungsansätzen für die besondere Photostabilität der DNA-Bausteine gesucht. Zu

Zeiten präbiotischer Evolution ohne schützende Ozonschicht, die Organismen wirksam gegen UV-Strahlung abgeschirmt hätte, müssen maßgeschneiderte Bausteine des Lebens für eine Anpassung an die Umweltbedingungen gesorgt haben. Es wird angenommen, dass es ultraschnelle Vorgänge in den Nucleobasen ermöglichen, die Energie von UV-Strahlung in unschädliche Wärme umzuwandeln. Die natürliche Selektion sorgte für die Vererbung besonders geeigneter Strukturen zum Schutz der Organismen und schaffte die Basis für weitere Entwicklungen.

Die Form folgt der Funktion. Dieser Ausspruch gilt besonders für die zweite Gruppe von Biomolekülen bzw. deren Modellsystemen, den Peptiden. Hochspezialisierte Polypeptide, die *Proteine*, unterstützen als Werkzeuge eine Vielzahl von Aktivitäten in Organismen: So dienen sie als Boten- und Signalstoffe, werden bei der Bewegung und Abwehr von Fremdstoffen eingesetzt, speichern und transportieren andere Stoffe, regulieren den Stoffwechsel, indem sie diverse chemische Reaktionen katalysieren oder finden als Bausteine von Stützstrukturen Anwendung. Es ist bekannt, dass sich nicht nur ihre *Konstitution* also die Verknüpfung ihrer Aminosäuren untereinander (Primärstruktur), sondern auch ihre *Konformation* (Sekundär- und Tertiärstruktur) in besonderem Maße für die Rolle und Wirkungsweise eines Proteins verantwortlich zeichnet. Sekundär- und Tertiärstrukturen präsentieren sich als Folge komplexer intra- und intermolekularer Wechselwirkungen, sowie entropischer Effekte. Dies erschwert das Verständnis für die Faltungs- bzw. Entfaltungsmechanismen von Proteinen erheblich, da die physiologische Umgebung maßgeblichen Einfluss auf das Verhalten eines Proteins ausübt, während die intrinsischen Eigenschaften verschleiert bleiben. Zu dieser Arbeit wurden kleine Modellpeptide untersucht, wie sie als Bausteine in jedem Protein vorkommen können. Dabei lassen sich die hier getätigten Experimente vor allem als Gradmesser für neuere theoretische Methoden nutzen, um in Zukunft die Strukturen von Proteinen besser simulieren bzw. vorhersagen zu können.

Die dritte Gruppe umfasst Porphyrine. Porphyrine sind Bestandteil biochemisch bedeutender Moleküle wie z.B. Cytochrome, Hämoglobin oder Chlorophyll von Pflanzen und Bakterien.

Kapitel 2

Grundlagen

2.1 Molekularstrahlen

2.1.1 Theorie der Überschalldüsenstrahlen

Überschalldüsenstrahlen (engl.: supersonic jets) liegt eine adiabatische Expansion eines Trägergases zugrunde. Das Trägergas mit dem Stagnationsdruck p_0 strömt dabei durch eine Pulsdüse in eine evakuierte Kammer mit dem vorherrschenden Druck p_i . Dabei gilt für die Druckverhältnisse:

$$p_0 \gg p_i \quad (2.1)$$

Aus Gründen der Energieerhaltung lässt sich der Expansionsvorgang mit Hilfe der Thermodynamik wie folgt beschreiben:

$$U_0 + p_0 V_0 + E_{kin,0} = U_i + p_i V_i + E_{kin,i} \quad (2.2)$$

Beachtet man, dass die kinetische Energie des Trägergases vor der Expansion sehr klein ist (näherungsweise Null) und der Druck $p_i \approx 0$ so lässt sich die Gleichung zu

$$U_0 + p_0 V_0 = U_i + E_{kin,i} \quad (2.3)$$

vereinfachen. Aufgrund der Tatsache, dass im Regelfall $p_0 V_0 \ll E_{kin,i}$ gilt, wird deutlich, dass die innere Energie U_i des Trägergases bei der Expansion abnehmen muss damit die Gleichung weiterhin erfüllt ist. Die innere Energie der beteiligten Atome bzw. Moleküle wird in gerichtete, kinetische Energie, d.h. Translationsenergie umgewandelt.

Unter der Voraussetzung, dass die mittlere freie Weglänge der Trägergasatome λ_0 sehr viel kleiner als der Durchmesser D der Düsenöffnung ist,

$$D \gg \lambda_0 \quad (2.4)$$

finden viele (Molekül-)Stöße in der Expansionsregion statt. Durch die Übertragung kinetischer Energie von den schnelleren Molekülen auf die langsamer fliegenden, kommt es zu einer Angleichung der mittleren Geschwindigkeiten, d.h. die Geschwindigkeitsverteilung wird stark eingengt. Während die Relativgeschwindigkeit abnimmt, steigt aber die Durchschnittsgeschwindigkeit an. Durch die Verwendung eines Skimmers wird der Anteil des Trägergases mit vektoriellen Geschwindigkeitskomponenten senkrecht zur Ausbreitungsrichtung abgeschält. Nach dieser Kollimation des Düsenstrahls spricht man von einem Molekularstrahl.

Während die Maxwell-Boltzmann-Geschwindigkeitsverteilung (siehe Abb. 2.1) der Teilchen innerhalb des Reservoirs recht breit ist, ist der Betrag der mittleren Geschwindigkeit im Molekularstrahl höher und die Verteilung sehr viel schmäler.

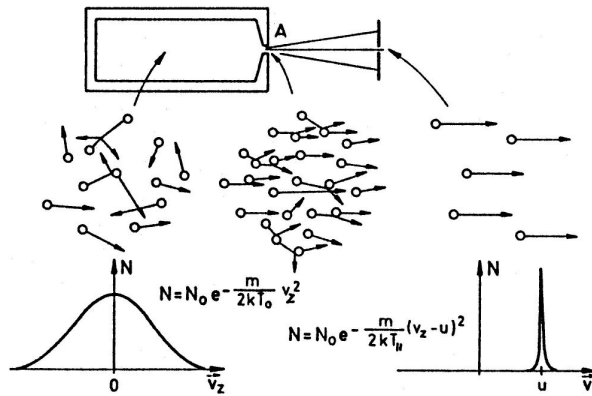


Abbildung 2.1: Die Geschwindigkeitsverteilung des expandierten Gases vor und nach der Düsenöffnung [1]

2.1.2 Verwendung der Überschalldüsenstrahlen

In der Expansionsregion direkt hinter der Düsenöffnung ist die Abkühlung von Probenmolekülen durch Stöße mit dem Trägergas besonders effizient, während im Idealfall einige Millimeter weiter in Ausbreitungsrichtung keine Stöße mehr stattfinden.

Die Übertragung von Rotations- und Schwingungsenergie in Translationsenergie ist

allerdings aufgrund viel kleinerer Wirkungsquerschnitte entsprechend ineffizienter als die durch elastische Stöße hervorgerufene Translationsenergieübertragung. Hieraus resultiert ein thermisches Ungleichgewicht für die beteiligten Translations-, Rotations-, sowie Schwingungsfreiheitsgrade: $T_{trans} < T_{rot} < T_{vib}$.

In der Praxis sind Werte von < 1 K für die Translationstemperatur, 1–5 K für die Rotationstemperatur und ca. 10–20 K für die Schwingungstemperatur typisch.

2.1.3 Vorteile der Molekularstrahlen

Die Verwendung von Molekularstrahlen bietet einige Vorteile:

- Aufgrund der sehr starken Abkühlung der Probenmoleküle durch den Überschalldüsenstrahl beschränkt sich die Population der Probenmoleküle auf lediglich einige wenige Rotations- und nahezu keine höheren Schwingungszustände. Infolgedessen erfolgt die vibronische Anregung meist aus dem Schwingungsgrundzustand, was die erhaltenen Spektren wesentlich vereinfacht.
- Senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Molekularstrahles wird dieser von den Lasern gekreuzt. Es liegt also nahezu keine Geschwindigkeitskomponente des Molekularstrahls, parallel oder antiparallel, zum eingestrahlten Laser vor, was die Dopplerverbreiterung der Banden im Spektrum minimiert.
- Anders als in Matrizen oder der kondensierten Phase können Moleküle hierbei in einer isolierten Umgebung unter weitgehend stoßfreien Bedingungen studiert werden. Da ihre spektroskopischen Eigenschaften nicht mehr durch Interaktion mit anderen Partnern gestört sind, lassen sich die intrinsische Charakteristika der Probenmoleküle untersuchen.
- Zusätzlich kann in einem Überschalldüsenstrahl auch der schrittweise Einfluss der Umgebung auf die Probenmoleküle mit Hilfe sequentieller Addition der Wechselwirkungspartner genau untersucht werden (z.B. Wassercluster). Aufgrund der geringen Stoßanzahl und niedrigen Temperatur sind schwach gebundene Addukte mit niedrigen Bindungsenergien wie zum Beispiel wasserstoffbrückengebundene Partnern oder van-der-Waals-Cluster stabil. In Kombination mit dem Massenspektrometer lassen sich definierte Clustergrößen spektroskopisch untersuchen. Dieser Vorteil wird in der

vorliegenden Arbeit bei den Untersuchungen eines Dipeptid-Wasser-Clusters ausgenutzt.

Die sogenannte Machzahl M ist eine charakteristische Größe für die Überschalldüsenstrahlen. Sie ist wie folgt definiert:

$$M \equiv \frac{u}{a} \quad (2.5)$$

Darin sind u die Massenfluggeschwindigkeit und a die Schallgeschwindigkeit. Die Schallgeschwindigkeit a ist gegeben durch:

$$a = \sqrt{\frac{\gamma k T}{m}} \quad \text{mit} \quad \gamma = \frac{C_p}{C_v} \quad (2.6)$$

Die statistische *Brownsche Bewegung* der Atome/Moleküle wird bei isentropischer Expansion in einen gerichteten Massenfluss kanalisiert. Dabei sinkt die Temperatur der Atome/Moleküle sehr stark. Beschränkt man sich bei dieser Betrachtung auf das Modell eines idealen Gases (diese Näherung ist berechtigt, da Edelgase expandiert werden), so kann die Temperatur unter reversiblen, adiabatischen Bedingungen wie folgt beschrieben werden:

$$\frac{T_i}{T_0} = \left(\frac{P_i}{P_0} \right)^{\frac{(\gamma-1)}{\gamma}} = \left(\frac{\rho}{\rho_0} \right)^{\gamma-1} = \left(1 + \frac{\gamma-1}{2} M^2 \right)^{-1} \quad (2.7)$$

Die mit 0 indizierten Werte repräsentieren die Bedingungen, die innerhalb des Reservoirs (in der Düse, also vor der Expansion) vorliegen, während die i indizierten Werte die Bedingungen im Düsenstrahl wiedergeben.

Nach Gleichung (2.6) nimmt mit fallender Temperatur dann auch die Schallgeschwindigkeit a ab und folglich führt die Abnahme der Schallgeschwindigkeit a nach Gleichung (2.5) zu einer ansteigenden Machzahl M . Außerhalb der Düse ist $M > 1$. Es resultiert ein Überschalldüsenstrahl.

Die Abhängigkeit der Machzahl von den experimentellen Parametern Düsenabstand x und dem Durchmesser D der Düsenöffnung kann für einatomige Gase mit Hilfe der von Ashkenas und Sherman [2] gefundenen, empirischen Formel ausgedrückt werden:

$$M = 3.26 \left(\frac{x}{D} - 0.075 \right)^{0.67} - 0.61 \left(\frac{x}{D} + 0.075 \right)^{-0.67} \quad (2.8)$$

Andersen und Fenn [3] haben eine empirische Gleichung zur Berechnung der maximalen Machzahl in Abhängigkeit der experimentellen Parameter aufgestellt. Dabei betrachteten sie die stoßenden Teilchen näherungsweise als nicht deformierbare Kugeln:

$$M_{max} = 2,05\varepsilon^{-\frac{1-\gamma}{\gamma}} \left(\frac{\lambda_0}{D} \right)^{-\frac{1-\gamma}{\gamma}} = 133 (P_0 D)^{0,4} \quad \text{für Argon} \quad (2.9)$$

ε ist dabei die effektive Stoßkonstante. Sie berücksichtigt die wahllose Geschwindigkeitsverteilung beim Stoß.

2.2 Laser

2.2.1 Prinzip

Die Übergangswahrscheinlichkeit für Absorption und Emission zwischen zwei Niveaus hängt maßgeblich von den zwei Faktoren Übergangsdipolmoment M (hier spielen Franck-Condon-Faktoren eine wesentliche Rolle) und Besetzung N_i der Niveaus ab [4]. Liegt im Grundzustand der Spezies eine deutlich höhere Besetzung vor, so wird vornehmlich Absorption von Licht eintreten. Besetzen im umgekehrten Fall viele Spezies einen angeregten Zustand, so wird das System unter Emission von Licht wieder in den Grundzustand zurückkehren. Man unterscheidet zwei Arten der Emission:

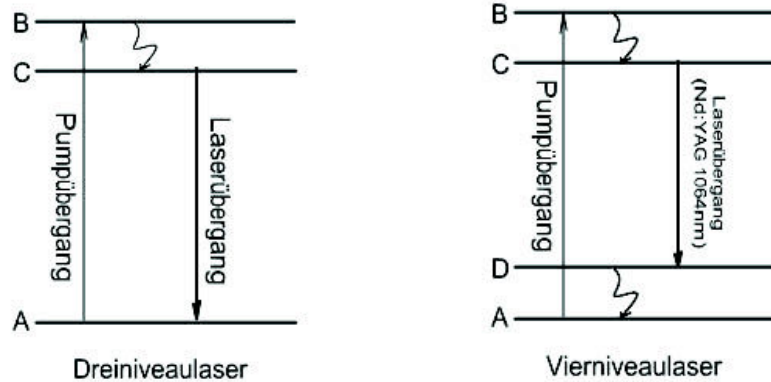
- Zunächst kann diese Emission durch Anregungsphotonen induziert werden; in diesem Fall wird der Vorgang stimulierte Emission genannt (LASER).
- Zum anderen kann ein durch spontane Emission gebildetes Photon die Besetzung angeregter Spezies abräumen (ASE).

Um einen Lasereffekt zu erzielen, ist eine Besetzungsinversion notwendig, d.h. es müssen sich mehr Moleküle im angeregten Zustand als im Grundzustand befinden. Nach der Boltzmann-Statistik ist dies durch thermische Anregung für ein Zweiniveausystem ausgeschlossen. Bei unendlich hoher Temperatur wird das Verhältnis der Besetzung gerade 1:1.

Für einen Laserprozess werden deshalb Systeme verwendet, bei denen mehr als zwei Niveaus eingehen. Bei solchen Systemen besteht die Möglichkeit, durch Bestrahlung mit Licht, sogenanntes optisches Pumpen, eine Spezies aus dem Grundzustand A in einen höheren Zustand B zu promovieren (Abb. 2.2 (a) und (b)). In dem angeregten Zustand gebe diese Spezies einen Teil der absorbierten Energie durch strahlungslose Übergänge ab und gelange dadurch in ein etwas tiefer liegendes Niveau C. Bei Niveau C ist dann eine Besetzungsinversion, und damit ein Laserprozess, denkbar, wenn der Übergang von B nach C schnell und der Übergang von C nach A ausreichend langsam verlaufen. Dies beschreibt den klassischen Fall des Dreiniveaulasers.

Bei Dreiniveaulasern ist es schwierig, eine dauerhafte Besetzungsinversion zu erreichen, zumal sehr viele Moleküle in das Niveau B angehoben werden müssen. Es hat sich als vorteilhafter herausgestellt, Vierniveausysteme zu verwenden. Abweichend von dem eben Erläuterten findet hierbei kein Laserübergang von Niveau C in den Grundzustand A statt,

sondern zwischen C und einem neuen Niveau D, welches sich von A unterscheidet (Abb. 2.2 (b)). Es resultiert dann stimulierte Emission von Niveau C aus, wenn dieses eine höhere Population aufweist als Niveau D, unter der Voraussetzung der Übergang von C nach D verläuft langsam und der von D nach A schnell.



(a) Der Dreinevelaulaser

(b) Der Vierniveaulaser

Abbildung 2.2: Schema des Drei- und Vierniveaulasers

2.2.2 Nichtlineare optische Prozesse

Um die bei den hier durchgeführten Experimenten erforderlichen Frequenzen der elektromagnetischen Strahlung zu bekommen, wurde auf die Eigenschaften optisch nichtlinearer Kristalle zurückgegriffen. Eine ausführliche Beschreibung der Grundlagen nichtlinearer Optik findet sich im Buch Laserspektroskopie von Demtröder[1] Zur Ausnutzung nichtlinearer Effekte bedarf es elektromagnetischer Strahlung mit hoher Intensität. Letzteres wird durch den Einsatz von gepulsten Lasern erreicht, deren kurze Laserpulse die erforderlichen, hohen Intensitäten liefern.

Frequenzverdopplung Bei der Frequenzverdopplung werden zwei identische Grundwellen in einem nichtlinearen Medium, beispielsweise einem β -Bariumborat-Kristall, zu einer Oberwelle addiert. Da die beiden einfallenden Photonen aus dem gleichen Laser kommen, ist

$$\omega_1 = \omega_2 = \omega \quad \text{und damit} \quad E_1 = E_2 = E_0 \cos(\omega t - kz) \quad (2.10)$$

Die resultierende Oberwellenfrequenz ist dann gerade gleich dem doppelten der Frequenz einer Grundwelle.

Dabei muss die *Phasenanpassungsbedingung* erfüllt sein:

$$k(2\omega) = 2k(\omega) \quad \implies \quad \nu_{Ph}(2\omega) = \nu_{Ph}(\omega) \quad (2.11)$$

Differenzfrequenzmischung Zur Erzeugung des IR-Laserlichts wird eine weitere Eigenschaft bestimmter nichtlinearer Kristalle ausgenutzt: Die Differenzfrequenzmischung. Für sie gilt:

$$\omega_D = \omega_1 - \omega_2 = 2\pi c \left(\frac{1}{\lambda_1} - \frac{1}{\lambda_2} \right) \quad (2.12)$$

und für die Phasenanpassungsbedingung:

$$k_D = k_1 - k_2 \quad (2.13)$$

In diesem Fall wird die Fundamentale (mit der Frequenz ω_2) eines geseedeten Nd:YAG-Lasers mit dem Dylaserstrahl (Frequenz ω_1) eines, durch selbigen Nd:YAG-Laser auf 532 nm gepumpten, Farbstofflasers gemischt (siehe Kap. 3.2.1 IR-System). Das erzeugte Infrarot besitzt dann die Frequenz ω_D .

2.3 Spektroskopische Methoden

Zur Charakterisierung der untersuchten Modellsysteme wurden verschiedene spektroskopische Methoden verwandt. Bei den Molekularstrahlexperimenten wurden zunächst elektronische Spektren massenselektiv mit Hilfe der resonanzverstärkten Mehrphotonenionisation aufgenommen. Dabei ergeben sich die Spektren als Summe der vibronischen Teilspektren aller elektronisch angeregten Konformations- bzw. Konfigurationsisomere mit der gleichen Masse. Für eine spektrale Trennung der Konformere oder Tautomere, bedient man sich der Doppelresonanzspektroskopie. Beide Methoden werden im Folgenden näher erläutert.

2.3.1 Resonanzverstärkte Mehrphotonenionisation

Bei der resonanzverstärkten Mehrphotonenionisation (engl.: resonance enhanced multi photon ionization, REMPI) werden die zu untersuchenden Atome, Moleküle oder Cluster mit Hilfe zweier oder mehrerer Photonen ionisiert. Abhängig von der Anzahl der verwendeten Photonen wird diese Methode auch genauer als $(n + m)$ -REMPI bezeichnet, mit n als Zahl der Anregungsphotonen und m als Anzahl der Ionisationsphotonen. Ein spezieller Fall der REMPI-Spektroskopie ist auch als R2PI (engl. resonant 2 photon ionization) bekannt.

Dabei wird das Molekül durch ein Photon vom elektronischen Grundzustand S_0 in einen elektronisch angeregten Zustand S_n , mit $n > 0$, überführt. Wenn der angeregte Zustand eine gewisse Lebensdauer besitzt, welche durch die Pulslänge des verwendeten Lasersystems vorgegeben wird, kann daraufhin unter Absorption eines weiteren Photons die Ionisation des Moleküls erfolgen (siehe Abb. 2.3). Erfüllen die Photonen die sogenannte Resonanzbedingung ($\Delta E_{\text{Übergang}} = h\nu$), so verläuft der Ionisationsprozess des Moleküls nach zwei aufeinander folgenden effizienten Einphotonenprozessen, während er im nichtresonanten Fall aus einem ineffizienten Zweiphotonenprozess besteht. Die Absorptionsquerschnitte $\sigma_{n \leftarrow 0}$ und $\sigma_{IP \leftarrow n}$ der beiden Einphotonenprozesse liegen um Größenordnungen über dem Absorptionsquerschnitt σ des Zweiphotonenprozesses:

$$\sigma_{n \leftarrow 0} > \sigma_{IP \leftarrow n} \gg \sigma$$

Bei letzterem werden so wesentlich weniger Ionen erzeugt.

Die entstehenden Ionen werden auf einem Detektor, beispielsweise einem linearen Flugzeitmassenspektrometer (engl.: TOF-MS; time-of-flight mass spectrometer) abgebildet.

Messtechnisch wird die Intensität des Ionensignals als Funktion der Wellenlänge eines durchstimmbaren Lasers ermittelt.

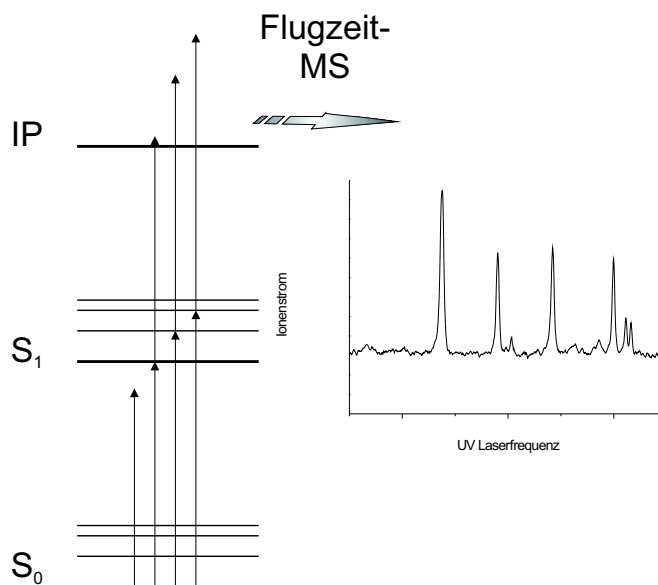


Abbildung 2.3: Termschema des REMPI-Prozesses

Abhängig von den Wellenlängen der beteiligten Photonen m und n spricht man von Einfarben-R2PI ($m=n$, $(1+1)$ -R2PI) oder vom Zweifarben-R2PI ($m \neq n$, $(1+1')$ -R2PI). Dabei ist es maßgeblich die elektronische Struktur bzw. Lage der elektronischen Zustände, die einen Einfarben- bzw. Zweifarbeneinsatz bedingt. Reicht die Energie des zweiten Photons nicht aus, um das Ionisationspotential zu erreichen, oder ist die Energie deutlich zu hoch, so dass Fragmentation auftreten kann, muss die Ionisationsfarbe angepasst werden. Hierzu bedient man sich in der Regel eines weiteren Lasersystems, z.B. ein zweiter Farbstofflaser, eine Harmonische des Nd:YAG oder eines Excimerlasers.

2.3.2 Doppelresonanzspektroskopie

Die Doppelresonanzspektroskopie, auch unter dem Namen spektrales Lochbrennen (engl.: spectral hole burning, SHB) bekannt, bietet die Möglichkeit diskrete Spektren von Molekülen oder Clustern aufzunehmen, die zwar dieselbe Masse besitzen, aber unterschiedliche Konformationen oder Konfigurationen und daher unterschiedliche vibronische

Grundzustände.

Das Prinzip besteht darin, zunächst mittels Brennlaser Moleküle aus dem Grundzustand in ein energetisch höheres Niveau (meist elektronische oder Schwingungsanregung) zu promovieren und dann die Besetzung des Grundzustandes mit dem Analyselaser abzufragen.

Experimentell wird ein UV-Laser zur Erzeugung eines konstanten Ionensignals festfrequent auf eine Resonanz eines Isomers des Moleküls eingestellt (sog. Analyselaser). Für Grundzustandsuntersuchungen wird etwa 100-200 ns vorher ein weiterer Laser eingestrahlt, dessen Wellenlänge durchgestimmt wird (sog. Brennlaser). Regt der Brennlaser eine Resonanz des gleichen Isomers an wie der Analyselaser, so lässt sich ein Einbruch im Ionensignal erfassen, welcher durch eine spezifische resonante Depopulation des Grundzustandes hervorgerufen wird. Ist der Brennlaser resonant zu einem anderen Isomer desselben Moleküls, bleibt das Ionensignal auf der Masse davon unberührt, d.h. es wird kein Dip registriert.

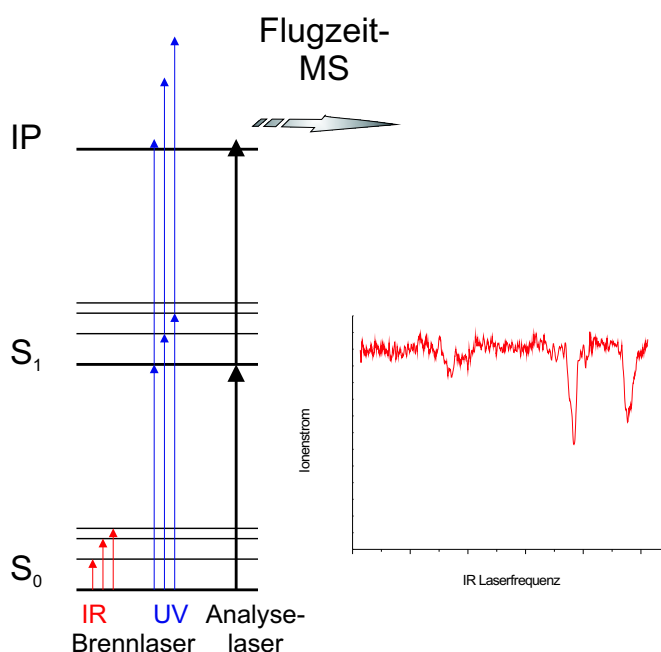


Abbildung 2.4: Termschema der IR/UV- und UV/UV-Doppelresonanzspektroskopie

Abhängig von der Wahl des Brennlasers kann noch zwischen UV/UV- und IR/UV-

Doppelresonanzspektroskopie unterschieden werden. Während im ersten Fall die jeweilige Spezies in einen elektronisch angeregten Zustand $S_n \leftarrow S_0$ überführt wird, werden im zweiten Fall mit dem IR-Laser Schwingungszustände des elektronischen Grundzustands S_0 angeregt (siehe Abb. 2.4).

Die Qualität der Messung wird maßgeblich durch die Puls-zu-Puls Stabilität des Signals und der erreichten Lochtiefe bestimmt. Daher haben wir eine einfache wie effektive Methode entwickelt, um diesen Unsicherheiten entgegenzuwirken. Der Analyselaserstrahl wird an einem Strahlteiler aufgespalten. Während ein Teil des Laserpulses direkt in die Ionisationskammer geleitet wird, durchläuft der andere Teil des selben Laserpulses eine Verzögerungsstrecke von ca. 30m ehe er zurück in die Ionisationskammer der Molekularstrahlapparatur geleitet wird. Dies führt zu einem weiteren zeitlich um etwa 100ns verzögerten Ionensignal der gleichen Probenmoleküle. Eine Fokussierung des rückgeleiteten Laserstrahls bewirkt ein sehr viel geringeres Wechselwirkungsvolumen mit dem Brennlaser als der unfokussierte erste Teilstrahl. Dies führt dazu, dass das zeitverzögerte Ionensignal in aller Regel das nichtresonante Ionensignal reflektiert. Da beide Ionensignale demselben Laser- und Gaspuls entstammen, wird das Rauschen, welches auf Laserintensitätsschwankungen und ungleichmäßiger Teilchendichte von Gaspuls zu Gaspuls beruht, weitgehend minimiert. Die Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisse entspricht etwa dem Faktor 4. Für statistische Überlegungen zur maximal erreichbaren Lochtiefe kann in erster Näherung die Boltzmann-Verteilung herangezogen werden:

$$N_i = N_0 e^{-\left(\frac{\Delta E}{kT}\right)} \quad (2.14)$$

Aus mathematischer Sicht kann also die maximale Besetzung N_i des Zustandes i gerade gleich dem Besetzungsgrad N_0 des Grundzustandes werden, wenn T gegen Unendlich strebt. Das entspricht einem Verhältnis von 1:1 bzw. 50%. Existieren gemessen an der Pulslänge des verwendeten Lasers weitere schnelle Zerfallskanäle, wie zum Beispiel Intersystem Crossing (ISC) in einen Triplettzustand oder eine intramolekulare Schwingungsumverteilung (engl.: Intramolecular Vibrational Redistribution, IVR) vor, so kann das Besetzungsverhältnis von Grund- und angeregtem Zustand auch zugunsten einer höheren Besetzung im angeregten Zustand verschoben sein. Die Folge wären dann erreichbare Lochtiefen, die über 50% hinausgehen. Als weitere schnelle Zerfallskanäle wären Photodissoziation im S_1 -Zustand, Fluoreszenz in angeregte Schwingungszustände des S_0 bzw. chemische Reaktionen zu nennen.

Kapitel 3

Experiment

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Modellsysteme dreier verschiedener Substanzklassen in der Gasphase spektroskopisch untersucht. Dabei stand mal die Frage nach der Existenz und Struktur möglicher Konformere (Dipeptide), ein anderes Mal das Verhalten der Modellsysteme bei Einsatz von UV-Licht im Vordergrund. Hauptsächlich wurden Molekularstrahlexperimente durchgeführt. Die Substanzen wurden wenn möglich thermisch (2-AP), oder mit Hilfe der bewährten Laserdesorption [5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18] (ungeschützte Dipeptide, Guanin, Methylguanin und Porphyrine) in die Gasphase überführt. Letztgenannte Methode fand Anwendung, um technisch nicht erreichbaren Evaporationstemperaturen (Porphyrine) bzw. möglichen thermischen Zerfallskanälen wie Decarboxylierung (Dipeptide) Rechnung zu tragen.

3.1 Laserdesorption

Die Laserdesorption wird hier als Alternative zur thermischen Methode genutzt, um die Probe unzersetzt in die Gasphase zu überführen. Das Adsorbat (Peptid, Guanin, Methylguanin, Porphyrin, TPP) wird auf das Adsorbens (Trägermaterial: Graphit, siehe Abb. 3.1) aufgetragen, wo es durch van-der-Waals-Wechselwirkungen an der Oberfläche gebunden ist. Die sogenannte Physisorption wird dann im Vakuum mit Hilfe eines Laserpulses wieder aufgehoben.

Im vorliegenden Fall (Abb. 3.1) werden die Probenmoleküle von einem Graphitrad unterhalb der Pulsdüse in einen Überschalldüsenstrahl desorbiert, in dem sie sofort eine sehr starke Abkühlung erfahren. Die Temperatur der Moleküle liegt bei etwa 10 K.

Bei Laserdesorptionsexperimenten fällt das Signal-Rauschverhältnis aufgrund der zusätz-

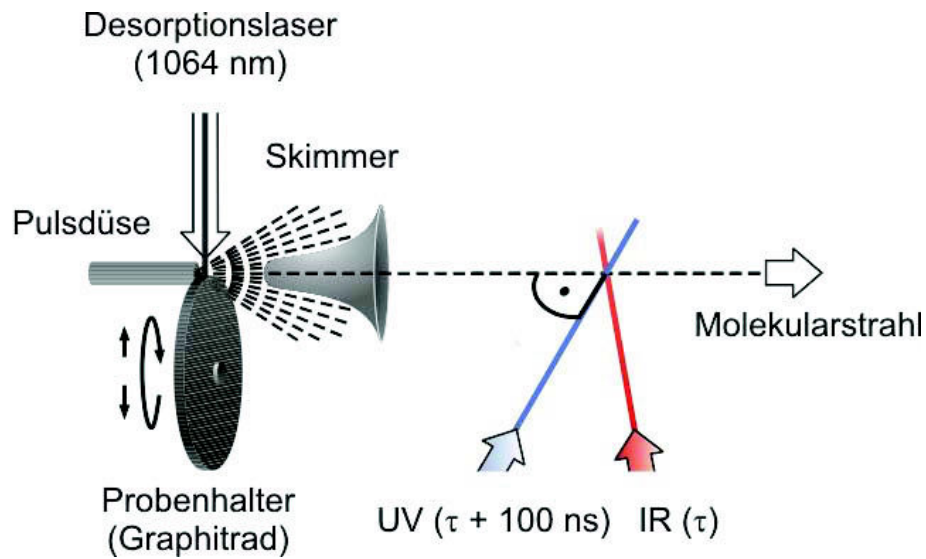


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Desorptionsquelle nach [19]

lichen Unsicherheiten der Desorptionsquelle wie Schuss-zu-Schuss-Stabilität des Desorptionslasers und Homogenität der adsorbierten Probenschicht im Vergleich zu thermischen Quellen erheblich schlechter aus.

3.2 Apparativer Aufbau

Die verwendete Apparatur und deren Bestandteile werden in Abbildung 3.2 vorgestellt. Das Herzstück der Apparatur ist die Molekularstrahlapparatur. Ferner gehören hierzu zwei Lasersysteme zur Erzeugung ultravioletter bzw. infraroter Laserstrahlung, sowie die zeitliche Steuerungselektronik und die Messdatenerfassung.

3.2.1 Lasersysteme

Für die meisten REMPI-, sowie Doppelresonanzexperimente kamen zwei Typen von Lasersystemen zum Einsatz. Mit ersterem wurde das UV-Laserlicht für die elektronische Anregung der Probenmoleküle erzeugt, mit dem zweiten System infrarote Frequenzen zur Bestimmung der Schwingungsmoden im Molekül. Beiden Systemen liegt ein Farbstofflasersystem zugrunde, welches durch einen gepulsten Nd:YAG-Laser optisch gepumpt wird. Die Unterschiede bestehen in der nichtlinearen Optik, welche eine Frequenzkonversion der Fundamentalwellenlängen ins Ultraviolette oder Infrarote ermöglicht.

Nd:YAG-Laser Bei diesem Lasertyp handelt es sich um einen gepulsten Vierniveau-Festkörperlaser. Das aktive Medium besteht aus zu etwa 1% mit Nd^{3+} dotierten Yttrium-Aluminium-Granat (kurz: YAG; $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$). Das optische Pumpen der Nd:YAG-Stäbe wird von Blitzlampen gewährleistet. Der intensivste Laserübergang (Fundamentale) des Nd:YAG-Laser hat eine Wellenlänge von 1064 nm und liegt somit im nahen infraroten Bereich. Unter Ausnutzung nichtlinearer optischer Prozesse (siehe dort) kann an geeigneten, anisotropen Kristallen eine Frequenzverdopplung oder -verdreifung durchgeführt werden. Die resultierenden Wellenlängen von 532 nm und 355 nm liegen im grünen, sichtbaren bzw. im ultravioletten Spektralbereich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum einen die Fundamentale an einem Kaliumdihydrogenphosphat (KDP)-Kristall verdoppelt und zum optischen Pumpen der Farbstofflaser verwendet, zum anderen wurde die Fundamentale eines Nd:YAG für den Misch- und Verstärkungsprozess in der DFM1/OPA Einheit zur Erzeugung intensiver IR-Strahlung genutzt. Ferner kam ein weiterer Nd:YAG-Laser bei der Desorption zum Einsatz.

Dye-Laser Viele Lasersysteme, wie zum Beispiel der zuvor angesprochene Nd:YAG-Laser, weisen lediglich diskrete Laserlinien auf. Farbstofflaser bieten hier den unschätzbaren Vorteil durchstimmbare zu sein.

Die eingesetzten Farbstofflösungen sind das eigentliche aktive Medium. Im vorliegenden

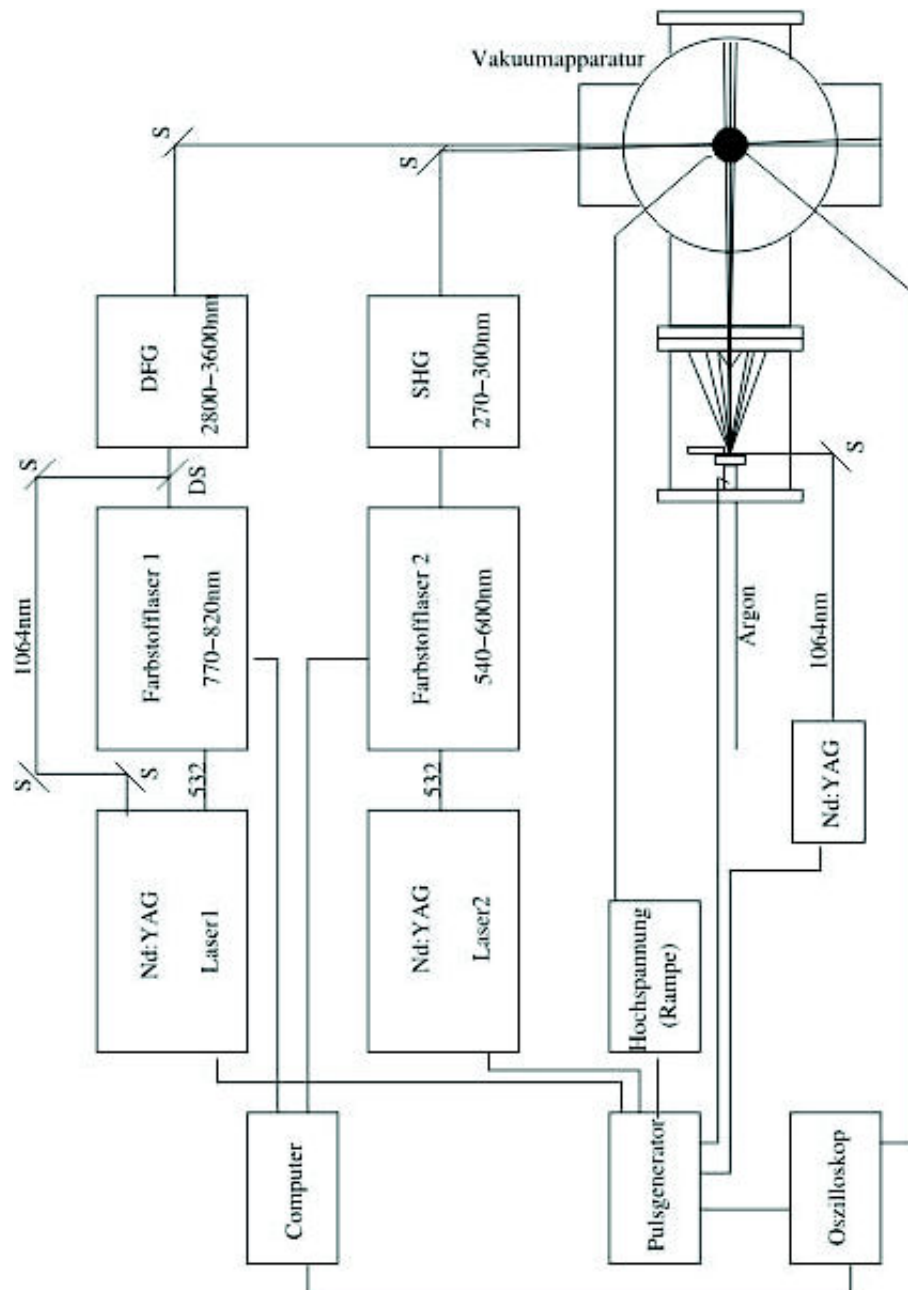


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der IR-UV Apparatur [19]

Fall werden die Farbstoffmoleküle mit der frequenzverdoppelten Fundamentalen (532 nm) eines Nd:YAG-Lasers gepumpt.

Die Anregung erfolgt dabei in schwingungsangeregte Niveaus des S_1 -Zustands des verwendeten Farbstoffs mit den jeweilig entsprechenden Wahrscheinlichkeiten, die von Franck-Condon-Faktoren bestimmt werden. Von diesen Niveaus relaxieren die Farbstoffmoleküle innerhalb weniger Picosekunden nach der Anregung strahlungslos durch Stöße mit Lösungsmittelmolekülen auf das unterste Schwingungsniveau des ersten angeregten Zustands. Ausgehend von dem Schwingungsgrundzustand ($v = 0$) des S_1 sind im wesentlichen zwei Übergänge von Interesse:

- Der erste Fall besteht darin, dass die Farbstoffmoleküle unter Emission von Fluoreszenz wieder in den elektronischen Zustand zurückkehren. Durch das optische Pumpen wird die Aussendung von Fluoreszenzphotonen stimuliert, d.h. es resultiert der gewünschte Laserprozess. Aufgrund vieler Stöße der Farbstoffmoleküle mit den Lösungsmittelmolekülen sind die Übergänge der Farbstoffmoleküle und somit das Verstärkungsprofil dieses Lasertyps homogen verbreitert. Die Breite der beobachteten Emissionsbanden kann bis zu 100 nm betragen.
- Beim zweiten Fall handelt es sich um einen quantenmechanisch verbotenen Übergang in den niedrigsten Triplett-Zustand (T_1). Infolge der Verletzung der Spinauswahlregel (Umkehr des Spinzustands der Elektronen beim Übergang) ist der Übergang zwar nicht unmöglich, aber von geringer Wahrscheinlichkeit. Doch wegen der hohen Lebensdauern der Triplettzustände (einige μs bis s) können sich die Farbstoffmoleküle in diesen Zuständen anhäufen, woraufhin sie für den erwünschten Laserprozess nicht mehr zur Verfügung stehen. Dies wird auch als Triplettquenching bezeichnet.

Es kann sich nur dann eine stehende (Licht-) Welle in dem Resonator bilden, wenn die Wellenlänge des Lichts ein ganzzahliges Vielfaches der Resonatorlänge ist. Die gewünschte Laserwellenlänge wird nun durch ein Gitter im Resonator herausselektiert (durchgestimmt). Da die Fluoreszenz im Hinblick auf die Absorption immer rotverschoben ist, liegen die mit Farbstofflaser erreichbaren Wellenlängen stets oberhalb der Pumpwellenlänge; so resultiert bei einer Pumpwellenlänge von 532 nm ein nutzbarer Bereich ab ca. 540 nm. Mit einigen optischen Tricks, wie Frequenzverdopplung, -verdreifachung,

Frequenzmischung (siehe Kapitel: nichtlineare Optik) oder auch Raman-shifting der Farbstofflaserwellenlänge kann der Spektralbereich zwischen rund 200 nm (UV) und etwa 1000 nm erfasst werden.

In der Praxis arbeitet man mit Strömungskörpern, um zu verhindern, dass sich wegen der hohen Energiedichte der Pumplaser die Farbstofflösungen zu stark aufheizen und sich somit zersetzen oder in die Küvettenwände einbrennen. Die angeregten Farbstoffmoleküle können auf diese Weise aus dem Anregungsbereich strömen, so dass die entstehende Wärme abgeführt werden kann. Ein weiterer Vorteil von Strömungskörpern besteht in der kurzen Verweilzeit der Farbstoffmoleküle im Bereich des Pumplaserstrahls, die unterhalb der Triplettlebensdauer liegt. Dies verhindert weitgehend die bereits oben beschriebene Akkumulation von Triplettzuständen.

UV-Lasersystem Dieses System besteht aus einem durchstimmbaren Farbstofflaser (LAS), welcher von der 2. Harmonischen (532 nm) eines Nd:YAG-Laser (Spectra Physics GCR 3) gepumpt wird. Die Dyelaserfundamentale wird anschliessend in einem geeigneten nichtlinearen Medium, in diesem Fall einem β -Bariumboratkristall, frequenzverdoppelt.

IR-Lasersystem Mit Hilfe eines Nd:YAG-Lasers wird hier ein Farbstofflaser gepumpt, der mit diversen Styryllaserfarbstoffen in Methanol bzw Dimethylsulfoxid (DMSO) betrieben wurde. Die nutzbare Fluoreszenz von Styryl 8 in Methanol liegt bei 730-770 nm, während DMSO die Fluoreszenz noch weiter ins Rote auf 760-790 nm verschiebt. Noch weiter im Roten schließen sich Styryl 9 bzw Styryl 11 an, so dass der Bereich bis ca. 815nm zugänglich wird.

Die Frequenzkonversion in den nahen IR-Bereich wird mittels Differenzmischeinheit DFM1 (engl. difference frequency generation, DFG) samt optisch-parametrischem Verstärker OPA (engl.: optical parametrical amplification) erreicht. Das mittlere Infrarot ist durch eine zusätzliche DFM2-Einheit zugänglich. Dieses Lasersystem basiert auf der Entwicklung von Gerhards et al.[20].

Wesentlicher Bestandteil der DFM1/OPA-Einheit sind zwei mit Magnesiumoxid dotierte Lithiumniobat-Kristalle ($\text{MgO} : \text{LiNbO}_3$). Dabei wird im DFM1-Kristall der Dyelaserstrahl mit einem Anteil der YAG-Fundamentalen (1064 nm) überlagert und durch Differenzfrequenzbildung ein IR-Laser erzeugt, gemäß:

$$\omega_{IR} = \omega_{Dye} - \omega_{YAG} = 2\pi c \left(\frac{1}{\lambda_{Dye}} - \frac{1}{1064nm} \right) \quad (3.1)$$

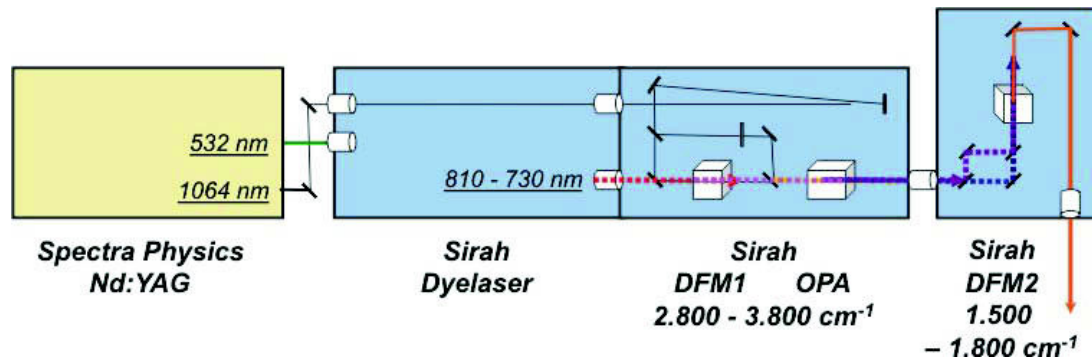


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Infrarotlasersystems zur Erzeugung von nahem und mittleren Infrarot nach [20]. Die Darstellung beinhaltet nicht die vollständige Optik, $\lambda/2$ -Platten und Blenden

Je nach Wahl des Laserfarbstoffes bzw. des Lösungsmittels ist im nahen Infrarot (NIR) der Bereich von ungefähr 2800 bis 3800 cm^{-1} zugänglich, womit CH-, NH- und OH-Streckschwingungen abgedeckt werden. Bei der Anfertigung der IR/UV-Doppelresonanzmessungen kamen zwei verschiedene Lithiumniobatkristalle für die Differenzfrequenzmischung zur Anwendung, da mit keinem der beiden im Bereich zwischen 2800 cm^{-1} und 3800 cm^{-1} kontinuierlich gemessen werden konnte. Kristall 1 besitzt zwischen 3450 cm^{-1} und 3500 cm^{-1} eine durch Farbzentren bedingte Absorption und liefert in diesem Bereich nicht ausreichend Leistung. Der zweite Kristall hat eine ähnliche Absorption oberhalb von 3520 cm^{-1} ; er liefert aber gute Leistungsausbeuten in der Lücke von Kristall 1.

Der in der DFM1 erzeugte Infrarotstrahl wird in einen weiteren Lithiumniobatkristall (OPA) geleitet und mit dem übrigen Anteil der YAG-Fundamentalen überlagert. Beim optisch-parametrischen Prozess verstärkt die YAG-Fundamentale den durchgeleiteten IR-Laserstrahl. Aus den Photonen der YAG-Fundamentalen (1064 nm, Frequenz etwa 9300 cm^{-1}) werden Photonen mit der gleichen Frequenz wie die ebenfalls eingestrahnten IR-Photonen (2800 bis ca. 3800 cm^{-1} , Idlerstrahlung), sowie der Differenzfrequenz aus beiden (5500 bis 6500 cm^{-1} , Signalstrahlung) gebildet. Bei diesem Prozess hängt die Intensität der gebildeten Laserstrahlung vom Produkt der Intensitäten beider Pumplaserstrahlen ab. Es steht mit Ausnahme der oben erwähnten Kristalllücke (hier ist kein OPA-Betrieb möglich) eine Pulsenergie von ca 5–10 mJ zur Verfügung.

Für die Messungen im mittleren Infraroten werden Signal und Idler nach Einstellung der benötigten Polarisierung in einem $\text{AgGa}(\text{Se})_2$ -Kristall überlagert und in diesem die Differenzfrequenz erzeugt. Bei ungefähr 10 mJ Eingangsenergie (Summe der Pulsenergien von

Signal und Idler) beträgt die Energie im mittleren Infraroten rund $300 \mu\text{J}$.

Aufgrund kleinerer technischer Probleme mit der Resonatorspindel weicht die Frequenz des IR-Lasers von der wahren Frequenz ab. Der Betrag ist nur geringfügig - meist zwischen 1 und 5 Wellenzahlen - jedoch sollten IR-Spektren für Veröffentlichungen im Hinblick darauf korrigiert werden.

Eine einfache Möglichkeit besteht im Ausnutzen der IR-Absorptionen atmosphärischen Wasserdampfs. Es wird nach einer gewissen Wegstrecke durch die Luft die Energie des IR-Lasers gemessen und das erhaltene Spektrum mit den Daten aus einem FTIR-Spektrum verglichen. In nachstehender Abbildung sind zwei Infrarotwasserspektren gezeigt. In obiger Spur befindet sich das Spektrum des IR-Lasers, unten ist als Referenz ein FTIR-Spektrum gezeigt.

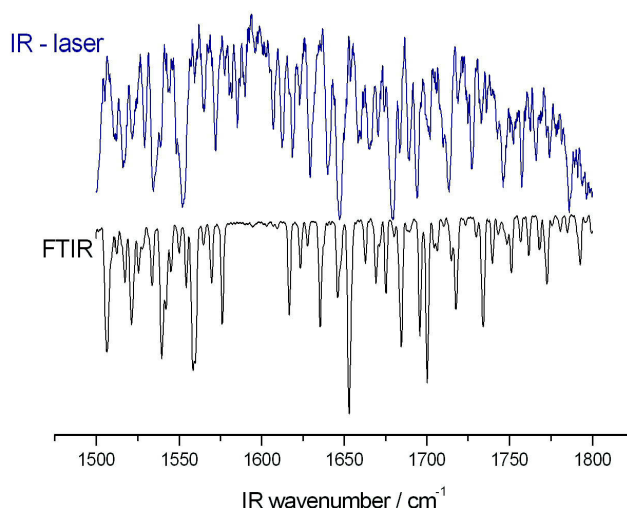


Abbildung 3.4: Vergleich der IR-Frequenzen des IR-Lasers und der FTIR-Referenz

Es ist ersichtlich, dass der IR-Laser stets etwas zu blau im Hinblick auf die Referenz liegt. Die Wellenzahldifferenzen für möglichst viele zu identifizierenden Banden werden berechnet und gegen die absoluten Referenzfrequenzen aufgetragen. Es erfolgt ein Sinus-FIT, der die Spindelbewegung des Resonators vom IR-Dyelaser ausgleichen soll (Abb 3.5)

Der Fit wurde mit der Demo-Software des leistungsstarken FIT-Programms Igor Pro (Vers. 5.0.4.7, Wavemetrics Inc, Oregon) erstellt. Nach erfolgtem Fit werden die ursprünglichen IR-Laserwellenzahlen nach der jeweiligen Fitgleichung korrigiert (Abb. 3.6).

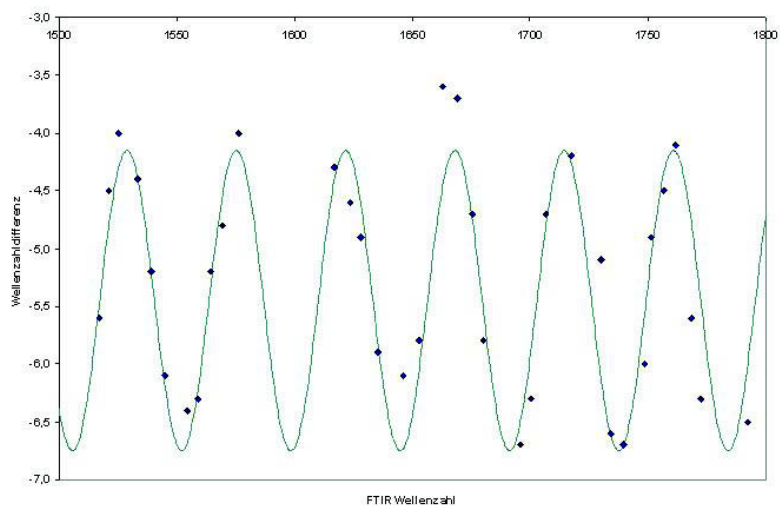


Abbildung 3.5: Sinusfit der gegen die Referenzdaten aufgetragenen Abweichungen des IR-Lasers

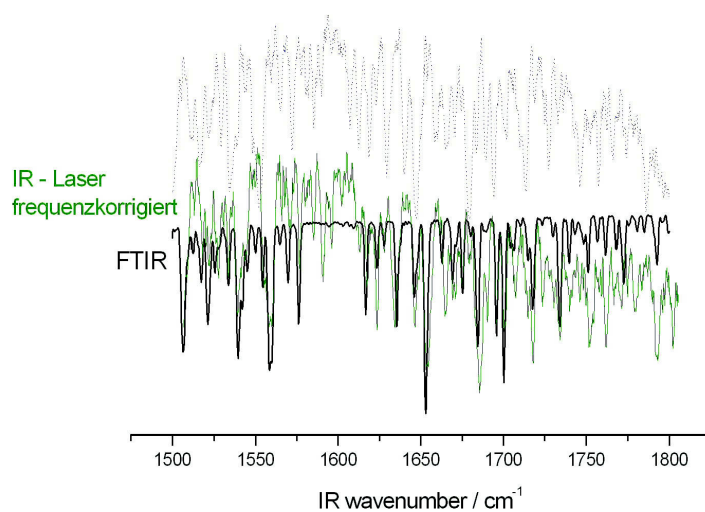


Abbildung 3.6: Korrektur der IR-Laserfrequenzen.

Laboratoriumsausstattung Aus der folgenden Tabelle lassen sich die verwendeten Laser, sowie Wellenlängen und Energien entnehmen. Für die Dye-Laser wurden Farbstofflösungen von Rhodamin 6G, Rhodamin B, Rhodamin 101, Fluorescein 27 und weitere in Methanol (UV-System) und Styryl 8 bzw. 9 in Methanol oder DMSO (IR-System) genutzt. Für IR-Experimente unterhalb von 3300 cm^{-1} wurde noch auf eine Mischung von Styryl 11 in Methanol zurückgegriffen.

Tabelle 3.1: Lasertypen und Laserenergien

Laser	Lasertyp	Verwendung	λ [nm]	Energie [mJ]
Nd:YAG	Continuum Minilite 1	Desorption	1064	1-3
Nd:YAG	Spectra Physics GCR 3	Pumplaser UV	532	400
Dye-Laser SHG	LAS, LDL 205	UV-System Analyselaser	540-640 270-320	25-40 0.5-2
Nd:YAG	Spectra Physics GCR 230Pro	Pumplaser IR Frequenzmischung	532 1064	400 500
Dye-Laser	Sirah Precision Scan-D	IR-System	770-820	40-70
DFM1/OPA	Sirah Tandem-V	Brennlaser	2600 -3600	5-10
DFM2	Sirah	Brennlaser	5500 -7100	$300 \cdot 10^{-3}$

3.2.2 Molekularstrahlapparatur

Mit Hilfe dieser Apparatur wurden im Rahmen der Dissertation DNA-, Peptid- und Porphyrinmodellsysteme auf ihre spektroskopischen Eigenschaften hin untersucht.

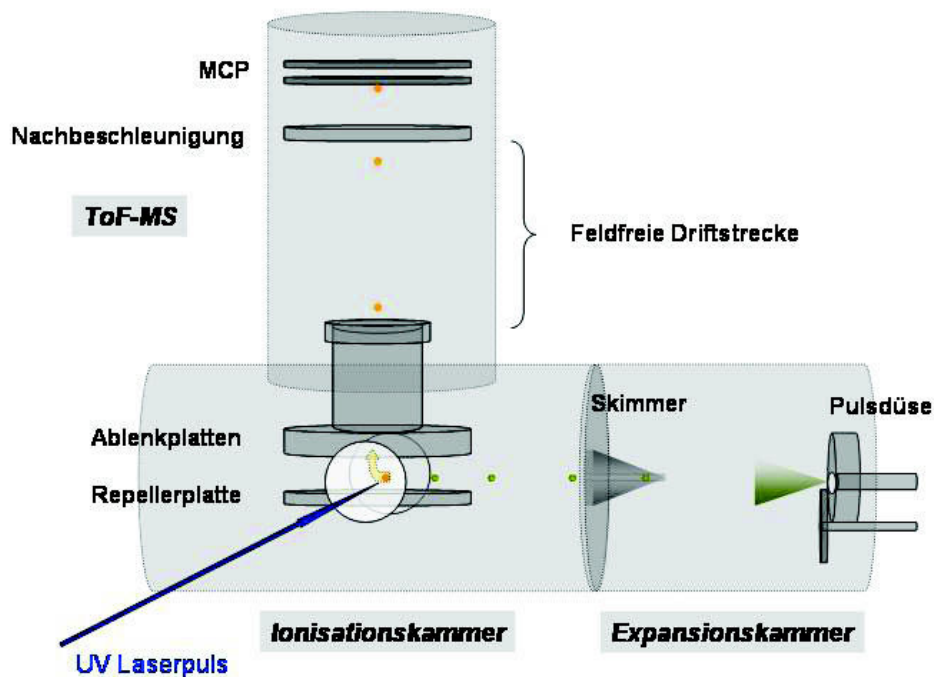


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Molekularstrahlapparatur. Aus Gründen der besseren Anschauung wurde auf Flansche und Vakuumpumpen verzichtet

Die Molekularstrahlapparatur besteht im Wesentlichen aus drei, differentiell gepumpten Vakuumkammern: der Expansionskammer, der Ionisationskammer und dem Flugzeitmassenspektrometer.

Expansionskammer In der Expansionskammer befindet sich die Pulsdüsenereinheit mit der thermischen Quelle bzw. der Laserdesorptionsquelle. Mit der Pulsdüse (0,3 mm Durchmesser, Öffnungszeit 230-300 μs) wird Argon, bei den Porphyrinexperimenten auch Ne, Xe und SF_6 unter einem variablen Stagnationsdruck (typischerweise von ca. 200mbar bis max. 5 bar) pulswise (Repetitionrate 10 Hz) ins Vakuum expandiert. Das Vakuum wird von einer Öldiffusionspumpe mit einer Drehschieberpumpe als Vorpumpe erzeugt und liegt typischerweise im Bereich von wenigen 10^{-5} mbar (ohne Gasballast). Bei laufender

Pulsdüse steigt der Innendruck auf ungefähr $5 \cdot 10^{-4}$ mbar an. Etwa 2,5 cm hinter der Pulsdüseneinheit befindet sich der Skimmer (Beam Dynamics, Öffnung: 2 mm Durchmesser), der an der Trennwand von der Quellschleife zur Ionisationskammer angebracht ist. Wie schon im Kapitel Molekularstrahlen erwähnt, schält der Skimmer den divergenztesten Teil des Überschalldüsenstrahls (den translatorisch wärmsten Anteil) ab, um die Geschwindigkeitskomponenten des Molekularstrahls parallel zum eingestrahlten Laser so gering wie möglich zu halten.

Aufgrund seines geringen Öffnungsdurchmessers verringert der Skimmer den anfallenden Gasballast in der Ionisationskammer, was dort zusätzlich die notwendige Pumpkapazität reduziert.

Ionisationskammer Die Ionisationskammer wird mit Hilfe einer Turbomolekularpumpe mit angeschlossener Drehschiebervorpumpe auf einige 10^{-6} mbar evakuiert. In dieser Kammer befindet sich die Ionenoptik, welche als Abzugsregion der erzeugten Ionen für das lineare Flugzeitmassenspektrometer dient. Dabei wird der kalte Kern des Molekularstrahls mit den Lasern im rechten Winkel gekreuzt (Minimierung der Dopplerverbreiterung), ehe die Ionen senkrecht zum Düsen- und Laserstrahl auf das Flugzeitmassenspektrometer abgebildet werden.

Ionenoptik und Flugzeitmassenspektrometer Das Flugzeitmassenspektrometer (engl.: time-of-flight mass spectrometer, TOF-MS) besitzt eine modifizierte Wiley-McLaren Anordnung (Bergmann Messgeräte Entwicklung KG, Murnau) [21] : Unterhalb des Ionisationsortes liegt eine Repellerplatte auf einem starken positiven Potential, typischerweise 2,3 kV. Damit werden die entstandenen Ionen nach oben, d.h. senkrecht zu Molekular- und Laserstrahl in Richtung TOF zwischen zwei halbzyylinderförmige Ablenkplatten beschleunigt.

Diese Ablenkplatten sind zunächst auf ein Potential von 1,7 kV eingestellt. Das Potential der beiden Platten wird nun mit Hilfe einer variablen Spannungsrampe angepasst. Die aus Sicht des Molekularstrahls vordere Platte wird um einen Betrag von 150 V abgesenkt, während die hintere Platte um 300 V angehoben wird. Dadurch entsteht ein Potentialgradient, der die Horizontalkomponente der Ionengeschwindigkeit ausgleicht. Infolgedessen müssen Startzeitpunkt der Spannungsrampe sowie deren Potentialgradient auf die Molekularstrahlgeschwindigkeit abgestimmt werden.

Dabei ist zu beachten, dass die Molekularstrahlgeschwindigkeit von dem verwendeten Trägergas abhängt. Die Spannungsrampe der Ionenoptik bietet nun den Vorteil, dass die zu

detektierenden Ionen der Probenmoleküle von solchen Ionen, die nicht aus dem Molekularstrahl stammen und deshalb eine andere vektorielle Komponenten der Geschwindigkeit besitzen, diskriminiert werden können.

Die oberhalb der Ionenoptik liegende feldfreie Flugstrecke wird wiederum durch eine Turbomolekularpumpe samt Drehschiebervorpumpe auf bis zu einige 10^{-8} mbar evakuiert. Die hierhin abgelenkten Ionen besitzen nunmehr eine von ihrer Masse abhängige Geschwindigkeit.

Findet Argon als Trägergas Anwendung, so hat das Flugzeitmassenspektrometer eine Auflösung von:

$$\frac{m}{\Delta m} = 335 \quad (3.2)$$

Nach Durchfliegen der feldfreien Driftstrecke werden die Ionen durch ein weiteres Hochspannungsfeld nachbeschleunigt ehe sie auf den Detektor, zwei Mikrokanalplatten (engl.: micro channel plate, MCP) in Chevron-Anordnung, auftreffen.

Dies ist notwendig, da besonders schwerere Probenmoleküle (z.B. das Tetraphenylporphyrin TPP) eine geringe Fluggeschwindigkeit und damit einhergehend eine recht geringe kinetische Energie haben, die mitunter nicht ausreicht, um Elektronen aus den Kanälen der ersten MCP herauszuschlagen. Das Prinzip der MCP ist im Grunde das eines üblichen Sekundärelektronenvervielfachers (SEV):

Die von den auftreffenden Ionen herausgeschlagenen Elektronen werden durch ein Hochspannungsgefälle in Richtung der zweiten MCP beschleunigt. Dabei wirkt jeder Kanal der MCP wie ein separater SEV. Somit ist verständlich, dass jede MCP das Ionensignal potentiell um einen Faktor von ca. 1000 verstärkt. Die Chevron-Anordnung der MCPs (antiparallel, also im Winkel von 180° , im Abstand von etwa 2mm gelegen) verhindert dabei eine Rückkopplung der gebildeten Elektronen.

Das verstärkte Ionensignal wird an der hinter den MCP liegenden Anode abgegriffen und auf einem Digitaloszilloskop wiedergegeben.

Laboratoriumsausstattung Die Pumpenausstattung der drei differentiell gepumpten Vakuumkammern der Molekularstrahlapparatur, sowie die Daten zur jeweiligen Pumpleistung sind der nachstehenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 3.2: Pumpen und Pumpenkapazität

	Expansionskammer	Ionisationskammer	TOF-MS
Vorpumpe	Leybold Trivac D65B 65 m ³ /h	Leybold Trivac D65B 65 m ³ /h	Leybold D8B 5.6 m ³ /h
Hauptpumpe	Diffusionspumpe Balzers Dif 250 1800 l/s	Turbopumpe Leybold Turbovac 151 145 l/s	Turbopumpe Leybold Turbovac 151C 145 l/s

3.2.3 Zeitliche Steuerung

Die Experimente wurden mit einer Frequenz von 10 Hz gepulst durchgeführt. Dies macht eine Steuerung der zeitlichen Abläufe anfangen von der Pulsdüsenöffnungszeit, über die Laserpulse, den Abzugszeitpunkt der Ionenoptik sowie des Oszilloskops (Tektronix DG 535) notwendig. Dabei helfen Pulsgeneratoren. Sie triggern die zeitlichen Ereignisse mit festgelegten Steuerpulsen.

Dabei können die beiden Uhren aus institutsinterner Entwicklung (Klaus Kelbert) um Einheiten von 25 bzw 50 ns, die kommerziell erhältliche Stanford-Uhr (stanford Research TDS 520) sogar um Einheiten von 5 ps eingestellt werden.

Einen beispielhaften Überblick für die zeitliche Steuerung gibt nachstehende Tabelle. T_0 ist dabei der (willkürlich gewählte) Startzeitpunkt. Als Trägergas diente Argon.

Tabelle 3.3: Triggerzeiten für das IR-UV Doppelresonanzexperiment an ProTrp

Puls-generator	Trigger-kanal	triggert	Trigger-signal	Zeitpunkt $T_0 + [\text{ms}]$
TDS 520	A	Oszilloskop	TTL	2.254082
	B	Rampe (TOF)	TTL inv	2.252313
	C	Q-Switch GCR 3	TTL	2.253895
	D	Q-Switch GCR230	TTL	2.253566
Uhr (III)	1	Blitzlampen Minilite	TTL	1.822950
	2	Pulsdüse	TTL	0.494500
	3	Blitzlampen GCR230	5V	2.068850
	4	Blitzlampen GCR3	5V	2.010050
Uhr (IV)	1	Q-Switch Minilite	TTL	1.980400

Kapitel 4

Quantenmechanische Rechnungen

Für ein besseres Verständnis der ermittelten, experimentellen Daten wurden die Modellsysteme mit Hilfe quantenmechanischer Methoden berechnet. Der Fokus dieser Rechnungen liegt bei der Strukturaufklärung. Die Frage nach dem Vorliegen spezifischer Konformere eines Moleküls ist eine Frage der relativen Stabilität desselben und damit nach seiner Grundzustandsenergie. Hierzu werden in der Theorie Berechnungen zur Molekülgeometrie durchgeführt, die die Grundzustandsenergie optimieren, also nach Minima auf der Potentialhyperfläche des Grundzustands suchen. Die Minima gehören dann den stabilsten Konformeren an.

Nach erfolgter Geometrieoptimierung schliessen sich Normalkordinatenanalysen an. Dabei wurde der von Kohn und Sham entwickelte Formalismus zur Dichtefunktionaltheorie (im Jahr 1964) verwendet und mittels des Gaussian03- und des Turbomole-Programmpakets an einem Parallelrechner vom Typ SGI Origin 2000 (Silicon Graphics Inc, SGI) des Rechenzentrums der Heinrich–Heine–Universität Düsseldorf, sowie institutsinternen Rechenplattformen auf Basis von Pentium4-PCs durchgeführt.

4.1 Potentialflächen

Im allgemeinen ist die Frage nach der chemischen Struktur von Molekülen nur in Verbindung mit der *Born–Oppenheimer*–Näherung sinnvoll zu beantworten, weil erst die Separation von Kern– und Elektronenbewegung eine Beschreibung der Gesamtenergie des Systems als Funktion der jeweiligen Kernkoordinaten ermöglicht. Die in dieser Arbeit spektroskopisch untersuchten Peptide stellen bei quantenchemischen Berechnungen ein kompliziertes Vielteilchenproblem dar, was sich aus der Anzahl der Kerne N und Elektronen n sowie deren Koordinaten R_α und r_i ergibt. Dieses Problem ist also $(3N + 3n)$ –dimensionaler Natur. Es wird vereinfacht, indem die Auswirkung des kinetischen Energieoperators der Kerne auf die Elektronenbewegung vernachlässigt wird. Letztere erfolgt durch die deutlich geringere Masse der Elektronen im Vergleich mit den Kernen sehr viel schneller. Somit gelangt man zu voneinander entkoppelten elektronischen Zuständen, die durch die elektronische Schrödingergleichung beschrieben werden können.

$$\hat{H}_{el}(r, \bar{R}) \psi_k(r, \bar{R}) = \epsilon_k^{el}(\bar{R}) \cdot \psi_k(r, \bar{R}) \quad (4.1)$$

Hierbei ist der elektronische Hamiltonoperator gegeben zu:

$$\hat{H}_{el}(r, \bar{R}) = \hat{T}_e + \hat{V}_{ke} + \hat{V}_{ee} \quad (4.2)$$

Er beinhaltet die Operatoren für die kinetische Energie der Elektronen ($\hat{T}_e$), die Wechselwirkungsenergie zwischen Kern und Elektronen ($\hat{V}_{ke}$), sowie die Wechselwirkungsenergie der Elektronen ($\hat{V}_{ee}$) untereinander.

Die Energien der elektronischen Zustände beschreiben dann in Abhängigkeit ausgewählter Kernkoordinaten die sogenannte *Potentialfläche* des Moleküls.

4.2 Molekülorbitale

Selbst nach der zuvor besprochenen Abtrennung der Kernfreiheitsgrade im Rahmen der *Born–Oppenheimer*–Näherung bleibt das Problem der elektronischen n -Teilchen–Schrödingergleichung im allgemeinen unlösbar. Aus diesem Grund wird die n -Teilchenwellenfunktion üblicherweise als Produkt aus n Einteilchen–Wellenfunktionen angesetzt. Die Wellenfunktion muss dabei antisymmetrisch bezüglich der Vertauschung der Koordinaten von zwei beliebigen Elektronen sein, weil Elektronen Fermionen sind (*Pauliprinzip*). Um dies zu berücksichtigen, wird zur Beschreibung des Produkts der n -Teilchenwellenfunktion ein antisymmetrisches Produkt, die *Slaterdeterminante*, herangezogen:

$$\psi_{el}^S(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n) = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} \chi_i(x_1) & \chi_j(x_1) & \cdots & \chi_h(x_1) \\ \chi_i(x_2) & \chi_j(x_2) & \cdots & \chi_h(x_2) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \chi_i(x_n) & \chi_j(x_n) & \cdots & \chi_h(x_n) \end{vmatrix} \quad (4.3)$$

Möglich ist auch eine Linearkombination mehrerer Slaterdeterminanten. Ein solches Molekülorbital beschreibt die Elektronenbewegung unter der Wirkung des elektrischen Feldes der Kerne, sowie einer gemittelten Verteilung der übrigen Elektronen.

Bei der *Hartree–Fock*–Methode werden die optimalen Spinfunktionen χ_i in der Slaterdeterminante durch numerisches Lösen der *Hartree–Fock–Gleichungen* bestimmt. Die Linearkombination der Atomorbitale (engl.: LCAO, linear combination of atomic orbital) führt zu den *Roothan–Hall–Gleichungen*.

Die Gleichungen werden auf Grund des iterativen Lösungsweges bis hin zur Selbstkonsistenz auch *SCF*–Gleichung (engl.: SCF, self consistent field) genannt wird.

Der Nachteil dieser Methoden liegt auf der Hand. Im Rahmen des iterativen Lösungsverfahrens muss eine Vielzahl von Matrizen berechnet werden. Auch wenn die Anzahl und Komplexität der Matrizen durch geschickte Wahl der Startorbitale und Ausnutzung etwaiger Molekülsymmetrien deutlich eingeschränkt werden können, ist es doch ein nicht unerheblicher Rechenaufwand, der mit der Anzahl der zu berücksichtigenden Elektronen skaliert und damit von der Molekülgröße abhängt.

4.3 Dichtefunktionaltheorie

Die Dichtefunktionaltheorie geht einen gänzlich anderen Weg, um die Korrelationseffekte von Elektronen während der Optimierung von Molekülorbitalen zu berücksichtigen.

Das Ziel der Dichtefunktionaltheorie (DFT) ist eine direkte Bestimmung der Elektronendichte ρ und der Energien ohne die Verwendung von Wellenfunktionen. Die Elektronendichte $\rho(r)$ selbst ist eine Funktion des Raumes r und die Energie ist das Funktional $E[\rho]$. Dieses Ziel begründet sich auf einer Tatsache, die erstmals 1964 von Hohenberg und Kohn bewiesen wurde [22]:

Es existiert ein einziges Funktional, das die Grundzustandsenergie, sowie alle weiteren elektronischen Eigenschaften des Molekülgrundzustandes beschreibt.

Es stellt sich jedoch als schwierig heraus, ein solches Funktional zu finden, zumal es hierfür keine Konstruktionsvorschrift gibt. Der *Kohn-Sham*-Formalismus [23] erlaubt eine Umgehung des Problems, indem die Elektronendichte in Eielektronenfunktionen ψ_i unabhängiger Teilchen expandiert wird. Die Kohn-Sham-Orbitale werden analog den SCF-Methoden aus Basisfunktionen entwickelt.

$$E[\rho] = -\frac{\hbar}{2m_e} \sum_{i=1}^n \int \psi_i^*(r_1) \nabla_1^2 \psi_i(r_1) dr_1 - \sum_{I=1}^N \int \frac{Z_I e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{I1}} \rho(r_1) dr_1 \\ + \frac{1}{2} \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{12}} dr_1 dr_2 + E_{XC}[\rho] \quad (4.4)$$

Hierin ist der erste Term mit der kinetischen Energie der Elektronen zu identifizieren, der zweite Term stellt die Wechselwirkungsenergie zwischen Kern und Elektronen dar, der dritte Term repräsentiert die Coulombenergie der Gesamtladungsverteilung über alle Orbitale. In dem letzten Term sind alle nicht-klassischen Wechselwirkungen zusammengefasst. Die sogenannte Austausch-Korrelations-Energie beinhaltet die Zwei-Elektronen-Austausch-Wechselwirkung, dynamische Elektronenkorrelation und eine Korrektur zu der kinetischen Energie des Systems.

Die Grundzustandselektronendichte ergibt sich dann durch Aufsummieren über die Kohn-Sham Orbitale

$$\rho(r_1) = \sum_{i=1}^n |\psi_i(r)|^2 \quad (4.5)$$

Werden die Gleichungen (3.4) und (3.5) in der Schrödingergleichung berücksichtigt, erhält man die Kohn–Sham–Gleichung:

$$-\frac{\hbar}{2m_e}\nabla_1^2\psi_i - \left(\sum_{I=0}^N \frac{Z_I e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{I1}} \int \frac{\rho(r_2)e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{12}} dr_2 - V_{XC}(r_1) \right) \psi_i(r_1) = \epsilon_i \psi_i(r_1) \quad (4.6)$$

Die Summe der Potentiale, die in der Klammer beschrieben sind, heißt Kohn–Sham–Potential V_0 . ϵ_i ist die Kohn–Sham Orbitalenergie. Das Austausch–Korrelationspotential V_{XC} wird durch Ableitung der Austausch–Korrelationsenergie nach der Elektronendichte erhalten:

$$V_{XC}[\rho] = \frac{\delta E_{XC}[\rho]}{\delta \rho} \quad (4.7)$$

Die Austausch–Korrelationsenergie E_{XC} wird durch verschiedene Näherungsfunktionale beschrieben. Im allgemeinen wird sie in zwei Anteile separiert, die Austauschenergie E_X und die Korrelationsenergie E_C :

$$E_{XC}[\rho] = E_X[\rho] + E_C[\rho] \quad (4.8)$$

Ein Modell, für das die Austausch–Korrelationsenergie exakt berechnet werden kann, ist das homogene (spin polarisierte) Elektronengas. Hierbei wird von einer gleichmäßigen Ladungsverteilung unendlich vieler Elektronen ausgegangen, wobei dieser zur Wahrung der Elektroneutralität eine gleichmäßige Verteilung der positiven Kerne gegenübersteht. Die Austauschenergie lässt sich nach Slater dann beschreiben als:

$$E_X^{LSDA} = -\frac{3}{2} \left(\frac{r}{4\pi} \right)^{\frac{1}{3}} \sum_{\sigma} \int \rho_{\sigma}^{\frac{4}{3}} d^3r \quad (4.9)$$

LSDA bedeutet lokale Spin–Dichte Näherung (engl.: LSDA, local spin density approximation). Die gesamte Austausch–Korrelationsenergie, die ein sphärisches symmetrisches Austausch–Korrelationsloch um die Elektronen beschreibt, kann dann zu

$$E_{XC}^{LSDA} = \int \epsilon_{XC}[\rho_{\alpha}(r), \rho_{\beta}(r)] d^3r \quad (4.10)$$

abgeschätzt werden. Hierin sind $\rho_{\alpha}(r)$ und $\rho_{\beta}(r)$ die lokalen Spindichten an einem Punkt r .

Ein etwas moderneres Verfahren berücksichtigt eine Veränderung der Elektronendichte. Hierbei ist das Austausch–Korrelationsfunktional nicht mehr ausschließlich von der Dichte abhängig, sondern auch von deren Gradienten. Becke [24] hat ein Austauschfunktional vorgeschlagen, dass dem Rechnung trägt:

$$E_X^{Becke88} = -\frac{1}{2} \int \frac{\rho_\sigma}{r} d^3r \quad (4.11)$$

bzw. als Korrektur für das LSDA Austauschfunktional formuliert:

$$E_X^{Becke88} = E_X^{LSDA} - \Delta E_X^{B88} \quad (4.12)$$

Das Austauschfunktional nach Becke wird heute meist in der Verbindung mit einem Korrelationsfunktional nach Lee, Yang und Parr [25] verwendet:

$$E_C^{LYP} = -a \int \frac{\rho}{1 + d\rho^{-\frac{1}{3}}} dr - ab \int \omega \rho^2 \left(C_F \rho^{\frac{8}{3}} + |\nabla \rho|^2 \left(\frac{5}{12} - \delta \frac{7}{12} \right) - \frac{11}{24} \rho^2 |\nabla \rho|^2 \right) dr \quad (4.13)$$

mit

$$\omega = \frac{e^{-c\rho^{-\frac{1}{3}}}}{1 + d\rho^{-\frac{1}{3}}} \rho^{-\frac{1}{3}}$$

$$\delta = c\rho^{-\frac{1}{3}} + \frac{d\rho^{-\frac{1}{3}}}{1 + \rho^{-\frac{1}{3}}}$$

Die Werte für die empirischen Parameter a , b , c und d entstammen einer Anpassung des Korrelationsfunktionals an die tatsächliche Heliumatomenergie.

Bei dem im Rahmen der theoretischen Berechnungen genutzten Austausch–Korrelationsfunktional handelt es sich um das als B3LYP bezeichnete Funktional. Dieses ist neben Austausch– (nach Becke) und Korrelationsenergien (nach Lee, Yang und Parr) auch noch mit Hartree–Fock Anteilen empirisch gemischt. Hinzu kommen noch einige lokale Korrelationsanteile, die von Vosko, Wilk und Nusair [26, 27, 28] parametrisiert wurden:

$$E_{XC}^{B3LYP} = E_x^{LSDA} + c_0 (E_X^{HF} - E_X^{LSDA}) + c_x \Delta E_X^{B88}$$

$$+E_C^{VWN} + c_C (E_C^{LYP} - E_C^{VWN}) \quad (4.14)$$

An der Entwicklung neuer Dichtefunktionale wird sehr intensiv geforscht. Ganz neue Methoden wie beispielsweise das von Grimme et al. entwickelte Dichtefunktional B-97D [29] beziehen sogar dispersive Wechselwirkungen mit ein.

Kapitel 5

Veröffentlichungen

5.1 2-Aminopurin (2-AP)

Tautomers and electronic states of jet-cooled 2-aminopurine investigated by double resonance spectroscopy and theory

Seefeld K. A., Plützer C., Löwenich D., Häber T., Linder R., Kleineremanns K., Tatchen J. and Marian C. M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7** (2005), 3021-3026

We present resonant two-photon ionization (R2PI), IR-UV, and UV-UV double resonance spectra of jet-cooled 2-aminopurine (2AP) as well as Fourier transform infrared (FTIR) gas phase spectra. 2AP is a fluorescing isomer of the nucleobase adenine. The results show that there is only one tautomer of 2AP which absorbs in the wavelength range 32300 - 34500 cm^{-1} . The comparison with the calculated IR spectra of 9H- and 7H-2AP points to 9H-2AP as the dominating tautomer in the gas phase but the spectra are too similar to allow an unambiguous assignment to the respective tautomer. Hence, we determined vertical and adiabatic excitation energies of both tautomers employing combined density functional theory and multi-reference configuration interaction techniques. For the 0-0 band of the first $\pi\pi^*$ transition of 9H-2AP we obtain a theoretical value of 32328 cm^{-1} , in excellent agreement with the band origin of our R2PI spectrum at 32371 cm^{-1} . The first singlet $\pi\pi^*$ transition of the less stable 7H-2AP tautomer is predicted to be red-shifted by about 1700 cm^{-1} with respect to the corresponding transition in 9H-2AP. From the absence of experimental bands in the energy region between 30300 and 32350 cm^{-1} we conclude that 7H-2AP is not present to an appreciable extent in the molecular beam. Our calculations yield nearly equal energies for the $^1n\pi^*$ and $^1\pi\pi^*$ minima of isolated 2AP, similar to the situation in adenine. The hitherto existing argument that the energetic order of states is responsible for the different spectroscopic properties of these isomers therefore does not hold. Rather, vibronic levels close to the origin of the $^1\pi\pi^*$ transition cannot access the conical intersection between the $^1\pi\pi^*$ and S_0 states along a puckering coordinate of the six-membered ring, in contrast to the situation in electronically excited 9H-adenine. As a consequence, a rich vibrational structure can be observed in the R2PI spectrum of 2AP whereas the spectrum of 9H-adenine breaks off at low energies.

5.1.1 Introduction

All DNA bases present in organisms have important spectroscopic properties in common. All four bases, adenine, guanine, cytosine and thymine, have very low fluorescence and phosphorescence quantum yields, associated with excited electronic state lifetimes of the order of picoseconds or below.[30, 31, 32] It has been argued[33] that evolution has arrived at this particular choice of building blocks for its genetic machinery, because the short lifetime protects them from degrading photochemically. The electronic excitation wavelengths of many bases, notably the purine-based ones, are about 280 to 300 nm. In this wavelength range solar radiation flux is small but not zero. Hence a photochemical protection is necessary, but its mechanism is not well known yet.[14, 34, 35, 36, 37, 38] Related to the two bases adenine and guanine is 2-aminopurine (2AP). This molecule is also a purine base. Its chemical structure differs from adenine (6-aminopurine) only in the position of the amino group. In spite of the structural similarity between adenine and 2AP, there are important spectroscopic differences. The lifetime of the first excited state of 2AP is significantly longer than the lifetime of adenine.[32, 39, 40] The fluorescence quantum yield of 9H-2AP depends strongly on the solvent and the temperature.[41] In aqueous solutions it is about a thousand times larger than the one of adenine.[30, 42] Because of these properties, 2AP is frequently used as a fluorescent probe[43] in DNA strands. A further difference between adenine and 2AP is the absorption wavelength region. The first band of 2AP is red-shifted by about 3700 cm^{-1} with respect to the 9H-adenine absorption spectrum.[30, 14, 42]

Several models have been invoked to explain the short lifetime of electronically excited adenine. The energetic proximity of the first singlet $\pi\pi^*$ and $n\pi^*$ states of adenine and their vibronic interaction have been made responsible for the fast non-radiative decay of the electronic excitation.[32, 33, 40, 44] Indeed, it was shown via double resonance and deuteration experiments, [45] from a rotational contour analysis,[46] and by means of high-resolution dispersed fluorescence measurements in the gas phase[47] that the complex vibronic spectrum of adenine consists of $n\pi^*$ and $\pi\pi^*$ bands. Recent quantum chemical studies[48] confirm the energetic proximity of the singlet $n\pi^*$ and $\pi\pi^*$ minima. Sobolewski et al.[38] suggested that a $\pi\sigma^*$ excited state may be instrumental in coupling the $\pi\pi^*$ state with the S_0 state via a conical intersection. In addition, a direct and fast relaxation pathway for vibrationally excited $\pi\pi^*$ levels was identified recently.[48] This quenching of the excited state population involves a conical intersection between the singlet $\pi\pi^*$ state and the electronic ground state that is separated from the minima in

the Franck-Condon region by a small barrier only, thus explaining the sudden break-off of vibrational structure observed by Kim et al.[44] in the R2PI spectrum of 9H-adenine. It has been argued[33, 14, 40, 41, 49, 50] that the different spectroscopic behavior of 2AP arises from the fact that the first excited singlet state of 2AP is a $\pi\pi^*$ state and hence does not couple efficiently with the higher $n\pi^*$ state. However, these conclusions rest on the observed energetic order of states in vertical absorption and magnetic circular dichroism (MCD) spectra of 2AP, 2-amino-9-methylpurine and 2-aminopurine-9-ribose in polar solvents. In this environment, the $^1n\pi^*$ state gives rise to the second (weak) transition.[49] Ingwall[51] has made exactly the same observation for 9H-adenine derivatives when their vertical spectra are recorded under similar experimental conditions as those of 2AP. The reason for the different spectroscopic properties of the two aminopurine isomers is thus by no means obvious. So far, the origin of the $^1n\pi^*$ band of 2AP has not been detected and the relative energies of the $^1\pi\pi^*$ and $^1n\pi^*$ minima are not known.

To examine these models it is necessary to use spectroscopy with vibronic resolution. This is not possible in solution but can be achieved in the gas phase. Because of the difficulty of evaporating purine bases without thermal decomposition, data of nucleobases and their isomers are still rather scarce in the gas phase. Nir et al. recorded R2PI (resonant enhanced two photon ionization) spectra of 2AP and other purine bases by combining laser desorption with jet cooling.[14] Although being only a minority component of adenine, the 7H-tautomer has been made responsible for major part of the adenine fluorescence in aqueous solution.[52] There are indications for tautomerism of 2AP in aqueous solutions[39, 49] and stretched polyvinyl alcohol matrices, too. In contrast to adenine, the 9H-tautomer of 2AP is believed to be the major source of fluorescence, however.

In this paper we report R2PI spectra of 2AP which was transferred into the gas phase via thermal heating. To investigate the possibility of different tautomers we recorded UV-UV, IR-UV and FTIR spectra. In the following we show that only one tautomer of 2AP contributes to the spectrum in the investigated wavelength range.

To gain deeper insight into the photophysical behavior of 2AP and the difference to adenine, we performed quantum chemical calculations on the electronic ground and excited states.

5.1.2 Experimental and theoretical methods

The apparatus used for double-resonance spectroscopy has been described in detail elsewhere.[53] Briefly, it consists of a source chamber pumped with a $3000\text{ }ls^{-1}$ oil diffusion pump (Leybold) in which the molecular beam is formed by expanding a mixture of helium and 2AP at around $230\text{ }^{\circ}C$ through the $300\text{ }\mu m$ orifice of a pulsed nozzle (General Valve, Iota One) equipped with Kalrez O-rings to endure high temperatures. The laser beams cross the skimmed molecular beam (Beam Dynamics Skimmer, 1 mm orifice) at right angles in the ionization chamber. The ions are extracted perpendicular to the molecular and laser beams in a modified Wiley-McLaren type time-of-flight (TOF) spectrometer and enter the third (drift)chamber, where they are detected using multi-channel plates (Topag). Typical mass resolution of the spectrometer is $m/\Delta m = 500$. 2-Aminopurine (98 % purity) was purchased from Acros Organics and was used without further purification.

The R2PI measurements were carried out using the frequency doubled output of a Nd:YAG (Spectra Physics, GCR3) pumped dye laser (LAS, LDL205) operated with DCM, Rhodamine 101, Sulforhodamine B and Rhodamine B. The dye laser was calibrated by recording an iodine vapor spectrum and comparison with its tabulated transition frequencies. The IR light ($3000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) was generated with a $LiNbO_3$ crystal by difference frequency mixing of the fundamental (1064 nm) of a seeded Nd:YAG laser (Spectra-Physics Quanta Ray Pro 230) and the output ($750\text{-}830\text{ nm}$) of a dye laser (Sirah Precision Scan D) pumped by the second harmonic (532 nm) of the same Nd:YAG laser. The IR laser was fired $50\text{-}100\text{ ns}$ prior to the UV laser. The IR laser was calibrated by recording a water vapor spectrum and comparison with its tabulated transition frequencies.

The UV-UV experiments were performed with the same laser systems.

The Fourier transform infrared (FTIR) measurements were performed in a simple heated gas cell. A stainless tube, 9 cm long and 3 cm in diameter, is sealed at both ends with NaCl windows and connected to a vacuum pump. Both, the tube and the windows are heated using heating tape or heating resistors. Heating the windows minimizes condensation of aminopurine on the window surface during the measurement. The sample is placed above a closed ball bearing valve, with a diameter of 16 mm. By turning the valve the sample falls down into the heated stainless steel tube ($300^{\circ}C$) and starts to sublime. During that time the pressure in the tube rises from $< 10^{-2}$ to about 1 mbar. The vacuum connections at the upper side of the gas cell are much colder than the

cell itself and provide possibilities for condensation. Hence, the method involves rapid heating followed by fast condensation so that the molecules do not have enough time to decompose. Indeed, we did not observe any hints of a substantial decomposition of aminopurine during the measurement.

The gas cell is mounted in the sample compartment of a FTIR spectrometer (Bruker, IFS 113). While the optical components of the spectrometer are kept under vacuum, the sample compartment is purged with dry, CO₂ free air. Infrared light is generated by a Globar source, split by a KBr beam splitter and detected by a pyroelectric DTGS detector. The infrared beam passes the gas cell along its long axis and is focused at the center of the cell. No optical filters are used to limit the spectral bandwidth. However, the NaCl windows limit the spectral coverage to frequencies greater than 900 cm⁻¹, blocking at least part of thermal radiation from the heated gas cell. All spectra were recorded at a spectral resolution of 2 cm⁻¹.

HartreeFock and second-order MøllerPlesset perturbation theory (MP2) calculations were performed using the Gaussian 98 program package.[54] A geometry optimization of the different tautomers was performed at the MP2 level employing the 6-311G(d,p) basis set. The vibrational frequencies of the ground state were calculated using the analytical second derivatives of the MP2 potential energy surface.

In addition, equilibrium geometries of the electronic ground state potential energy surfaces of the 9H-2AP and 7H-2AP tautomers were determined at the restricted KohnSham (KS) level (B3LYP functional[55, 56, 57]) utilizing the Turbomole package. [58] Geometry optimizations of excited singlet states were carried out at the level of time-dependent density functional theory (TDDFT).[59] For a proper representation of the diffuse charge distribution in the $\pi\sigma^*$ states Rydberg functions are of paramount importance. Thus, the standard valence triple zeta plus (d,p) polarization basis sets on nitrogen, carbon, and hydrogen from the Turbomole library[60] were augmented by two sets of Rydberg functions. Each set of Rydberg functions consisted of 3s, 3p, and 1d primitive Gaussians with exponents of 0.05, 0.02, 0.008 (s and p Rydberg) and 0.015 (d Rydberg) located at dummy centers. Their positions were allowed to adjust in the geometry optimization step. This basis set is denoted by TZVP+Ryd in the following. Harmonic vibrational frequencies in the electronic ground and first excited $\pi\pi^*$ states were determined at the (TD)DFT level in the pure TZVP basis. Since analytic second derivatives of TDDFT energies were not available, they were approximated by finite differences of the gradients using the SNF tool.[61] For the evaluation of the FranckCondon (FC) factors of the vibronic transitions we performed a Dushinsky transformation of the normal modes

employing the home-written program DISPLACED.[62]

At the optimized geometries, single-point DFT/MRCI calculations were carried out. The principal concept of this approach formulated by Grimme and Waletzke[63] is to describe major parts of dynamic electron correlation by density functional theory whereas static correlation effects are accounted for by MRCI expansions. The configuration state functions (CSFs) in the MRCI expansion are built up from KS orbitals employing the BHLYP functional.[55, 64] Double counting of dynamic correlation is avoided by scaling the off-diagonal matrix elements by a factor that decreases exponentially with the fourth power of the energy difference between the corresponding CSFs. A common set of reference CSFs is used for all spatial symmetries. The initial set can be generated automatically in a complete active space (CAS)-like procedure and is then iteratively improved.

In the MRCI step, twelve roots of singlet multiplicity were determined. The reference space comprised about 90-100 CSFs, with the dimension depending slightly on the specific geometry. Only the inner shells (1s electrons at carbon and nitrogen) were treated as frozen core. The dimension of the actual MRCI space including energy-selected single and double excitations out of the reference space amounted to approximately 1.5-1.6 million CSFs.

5.1.3 Results and discussion

3.A. Tautomer assignment Fig. 5.1 shows the one-color, two-photon ionization spectrum of 2AP in the spectral range between 32350 and 34000 cm^{-1} obtained via thermal heating and taken at the parent mass $m/e = 135$ of 2AP. The spectrum is in very good agreement with the R2PI spectrum of 2AP obtained via laser desorption.[14]

The spectrum shows an extended vibronic structure compared to the sparse spectrum of 9H-adenine. The origin appears at 32371 cm^{-1} , which is about 3700 cm^{-1} to the red of that of 9H-adenine at 36105 cm^{-1} . The lower trace of Fig. 5.1 shows the UV-UV double resonance spectrum of 2AP taken with the probe laser tuned to the electronic origin of 2AP at 32371 cm^{-1} . A careful line by line comparison shows that all major bands in the R2PI spectrum of 2AP are also observed in the UV-UV double resonance spectrum. Therefore all transitions between 32350 and 34000 cm^{-1} belong to only one tautomer of 2AP - no other tautomers, isomers, hot bands or spectral features from dissociating clusters contribute to the larger bands of the R2PI spectrum (Fig. 5.1).

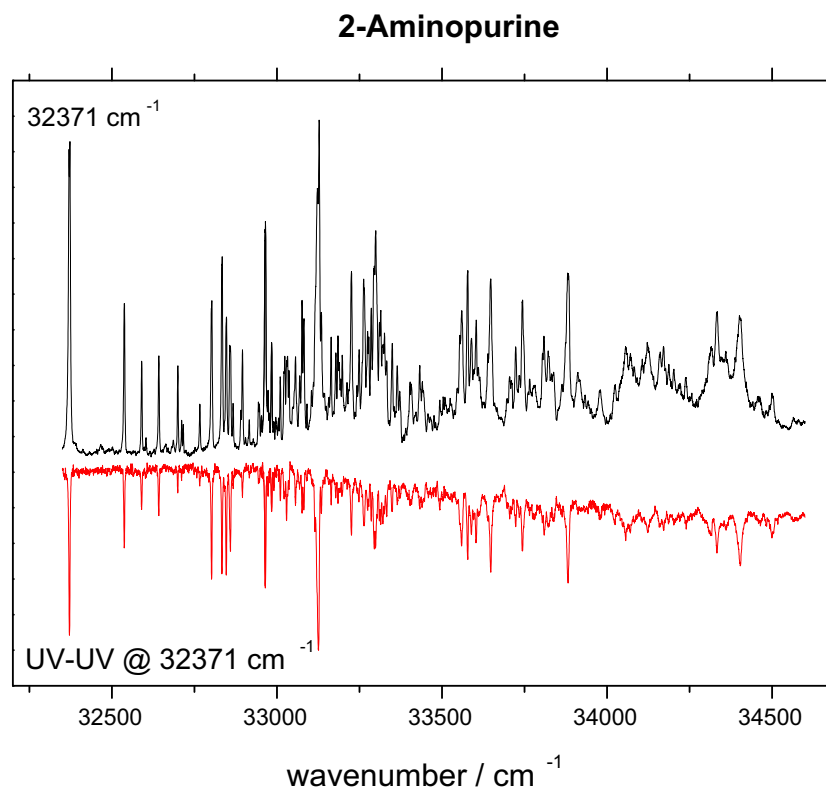


Abbildung 5.1: R2PI spectrum of 2-aminopurine in a supersonic jet. The lower trace shows the corresponding UV-UV double resonance spectrum of 2AP with the probe laser tuned to the electronic origin of 2AP at 32371 cm^{-1} .

Fig. 5.2 exhibits the IR-UV double resonance spectrum of 2AP with the R2PI laser tuned to the electronic origin of 2AP at 32371 cm^{-1} .

Calculated fundamental vibrational transitions of 9H- and 7H-2AP are displayed for comparison. Table 5.1 shows the comparison between experiment and theory in more detail. Unfortunately, the NH stretching frequencies of 9H- and 7H-2AP calculated at the MP2/6-311G(d,p) and B3LYP/TZVP levels are too similar to allow an assignment of the experimental spectrum to the 9H- or 7H-tautomer.

We performed UV-IR experiments by tuning the IR pump laser to each NH stretching frequency and scanning the UV probe laser (spectra not shown here). Again, the spectra demonstrate that only one tautomer of 2AP is present in the investigated wavelength range to an appreciable extent.

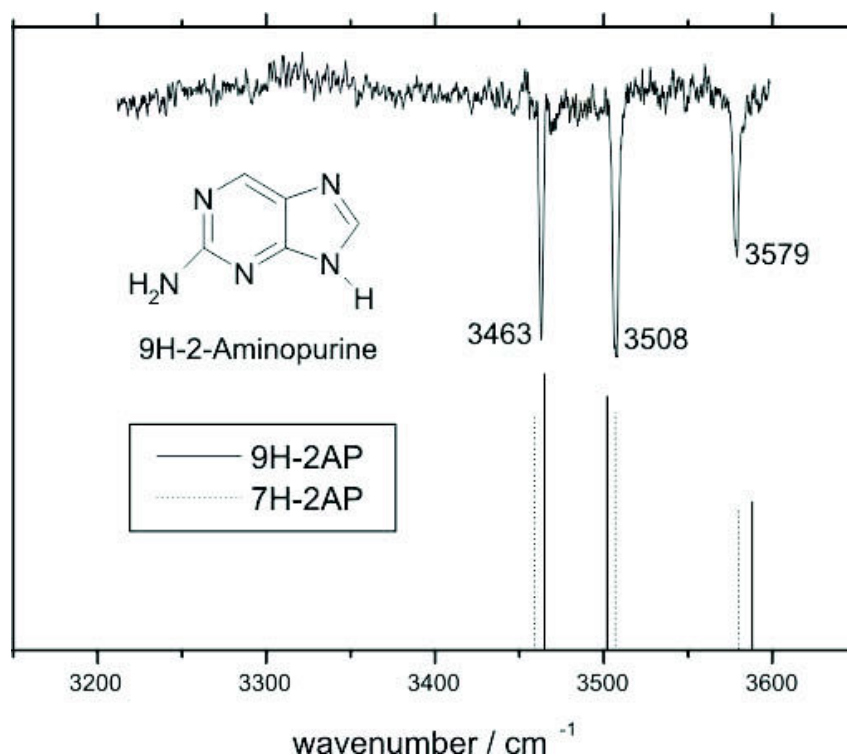


Abbildung 5.2: IR-UV double resonance spectrum of 2AP with the R2PI laser tuned to the electronic origin of 2AP at 32371 cm⁻¹. Scaled vibrational frequencies of 9H- and 7H-2AP calculated at the B3LYP/TZV(d,p) level are shown for comparison. A scaling factor 0.9613 as recommended in ref. [65] for B3LYP/6-31G(d) has been used.

Tabelle 5.1: Comparison of the experimental IR frequencies with the calculated vibrational frequencies for the 9H- and 7H tautomers of 2AP in the region of the NH vibrations. All calculations have been performed at the MP2/6-311G(d,p) and B3LYP/TZV(d,p) level of theory. All frequencies have been scaled and given in cm⁻¹

Assign- ment	Exp	9H-2AP				7H-2AP			
		MP2 ^a	Δ/%	B3LYP ^b	Δ/%	MP2 ^a	Δ/%	B3LYP ^b	Δ/%
Sym. NH ₂	3463	3410	-1.5	3465	+0.0	3406	-1.6	3459	-0.1
NH	3508	3473	-1.0	3502	+0.2	3477	-0.9	3507	+0.0
Antisym. NH ₂	3579	3531	-1.3	3588	+0.3	3526	-1.5	3580	+0.0

^a MP2 scaling factor: 0.9427. ^b B3LYP scaling factor: 0.9613 both as recommended in ref. 44 for the 6-31G(d) basis set.

To check whether the mid IR range is more informative with respect to tautomer assignment we measured the FTIR spectrum of 2AP in the gas phase, cf. Fig. 5.3 and Tables 5.1 and 5.2.

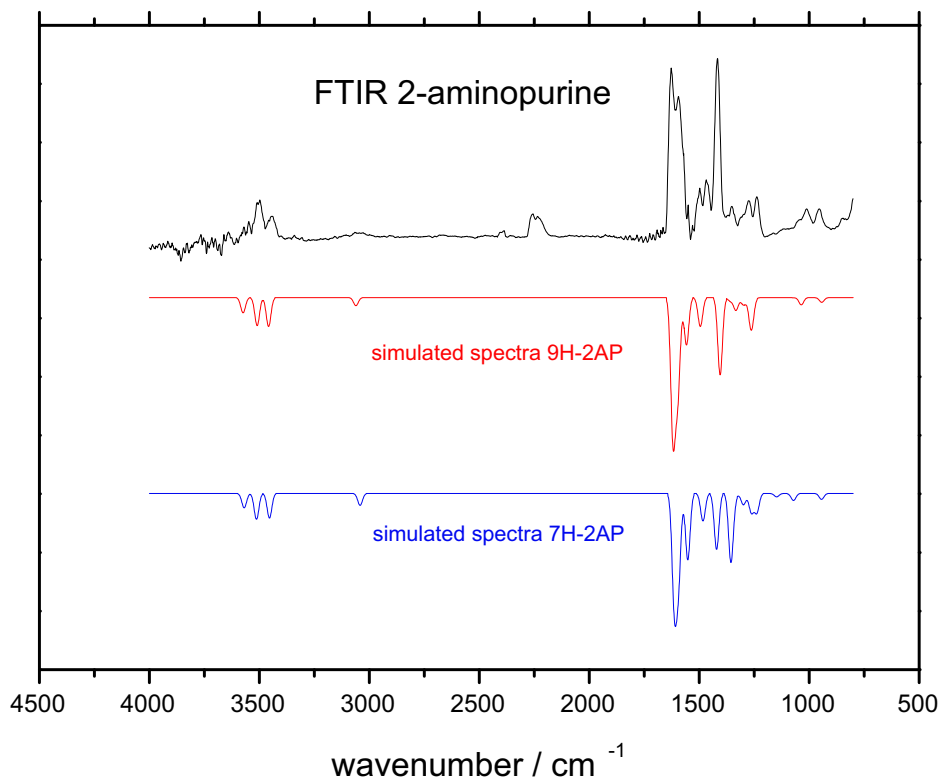


Abbildung 5.3: FTIR spectrum of 2AP in the region between 4000-800 cm^{-1} . The lower traces show the vibrational spectra of 9H- and 7H-2AP calculated at the B3LYP/TZV(d,p) level for comparison.

The agreement between measured and calculated spectra in the mid IR range is as good as in the near IR range and most of the vibrations can be assigned, compare for Table 5.2. The difference between the vibrational spectra of 9H- and 7H-2AP is, however, small in the mid IR range, too. There is one noticeable exception - the intensity of the N9-H/(N7-H + C6-H) in-plane bend vibration at 1352 cm^{-1} compared to the intensity of the C6-H/(N7-H - C6-H) in-plane bend vibration at 1416 cm^{-1} , cf. Table 5.2. The N7-H + C6-H bend vibration is somewhat more intense than the N7-H - C6-H bend vibration while the corresponding N9-H bend vibration is more than a factor of ten less intense than the C6-H bend vibration, in agreement with the dominance of the C6-H bend vibration in the experimental spectrum. This finding is an important hint that 9H-2AP is the dominant

Tabelle 5.2: Comparison of the experimental frequencies with calculated vibrational frequencies for the two possible aminopurine tautomers in the region from 4000 - 1000 cm^{-1} . The calculations have been performed at the B3LYP/TZV(d,p) level. The calculated frequencies have been scaled by the factor 0.9613. Most of the vibrations could be assigned. The intensities of the experimental and calculated spectra (shown in brackets) are scaled to the respective most intense vibration. N_{9/7}H assignments are separated by a slash. In phase and opposite phase coupling of vibrations are indicated with + and -, respectively

IR-UV	FTIR	9H-2AP B3LYP	7H-2AP B3LYP	Assignment
3579		3588 _(0.1)	3580 _(0.2)	NH ₂ as. stretch
3508	3503 _(0.2)	3502 _(0.2)	3507 _(0.2)	N _{9,7} H stretch
3463	3451 _(0.1)	3465 _(0.2)	3459 _(0.2)	NH ₂ sym. stretch
		3043 _(0.04)	3022 _(0.1)	C ₆ H stretch
	1626 _(0.9)	1600 _(1.0)	1592 _(1.0)	i.p. Ring distortion: CN stretches
	1594 _(0.8)	1569 _(0.7)	1567 _(1.0)	NH ₂ bend
	1550 _(0.3)	1540 _(0.3)	1534 _(0.6)	i.p. Ring distortion: CC stretches
	1497 _(0.3)	1476 _(0.2)	1465 _(0.3)	Coupled CN stretch vibrations
	1467 _(0.3)	1440 _(0.2)	1435 _(0.3)	Coupled CN stretch vibrations
	1416 _(1.0)	1391 _(0.5)	1405 _(0.5)	C ₆ H i.p. bend/(N ₇ H - C ₆ H) i.p. bend
	1352 _(0.2)	1348 _(0.02)	1339 _(0.6)	N ₉ H i.p. bend/(N ₇ H + C ₆ H) i.p. bend
		1314 _(0.1)	1323 _(0.01)	N _{9,7} H i.p. bend + NH ₂ i.p. bend
	1276 _(0.2)	1285 _(0.03)	1286 _(0.1)	C ₈ H i.p. bend
	1238 _(0.2)	1245 _(0.1)	1241 _(0.2)	(C ₈ H + C ₆ H) i.p. bend
		1234 _(0.1)	1218 _(0.2)	(C ₈ H - C ₆ H) i.p. bend
			1140 _(0.04)	C ₆ H i.p. bend + CN stretch
			1065 _(0.02)	NH ₂ rocking
	1011 _(0.1)	1022 _(0.1)	1060 _(0.07)	(N ₉ H-C ₈ H) i.p. bend/NH ₂ rocking
	955 _(0.1)	934 _(0.03)	934 _(0.06)	6-Ring i.p. deformation

tautomer in the gas phase. Matrix FTIR spectra of 2AP were also interpreted to arise from the overwhelming presence of 9H-2AP (despite that some minor extent of 7H-2AP were believed to be present).[66] From our FTIR spectra a minor contribution of 7H-2AP cannot be excluded neither.

According to the MP2 calculations 9H-2AP is 18 kJ mol^{-1} more stable than 7H-2AP, very close to the energy difference of 19 kJ mol^{-1} at the DFT/MRCI level of treatment. It is therefore quite probable that 9H-2AP is the dominant tautomer in the gas phase, similar to 9H-adenine[45] and 9H-purine.[67, 68] For the electronic ground states of the 9H-2AP and 7H-2AP tautomers we find almost planar nuclear arrangements of the atoms in the purine ring. At the level of B3LYP DFT, the amino group in 2-position is slightly pyramidal in both cases with H-N10-C2-N1 and H-N10-C2-N3 dihedral angles of about 15 degrees. The barrier to planarity amounts to merely 27 cm^{-1} and 45 cm^{-1} , respectively, and is thus located well below the zero vibrational level of the pyramidalization mode. At

the DFT/MRCI level, the situation is reversed and the planar, C_s symmetric structures are slightly favored. The calculated electronic absorption spectrum (see below) is completely unaffected by these slight geometry differences and we will therefore not dwell upon this subject.

To corroborate the assumption that only 9H-2AP is present in the molecular beam, we computed vertical and adiabatic excitation energies for both tautomers. The results are depicted in Fig. 5.4 (9H-2AP) and Fig. 5.5 (7H-2AP).

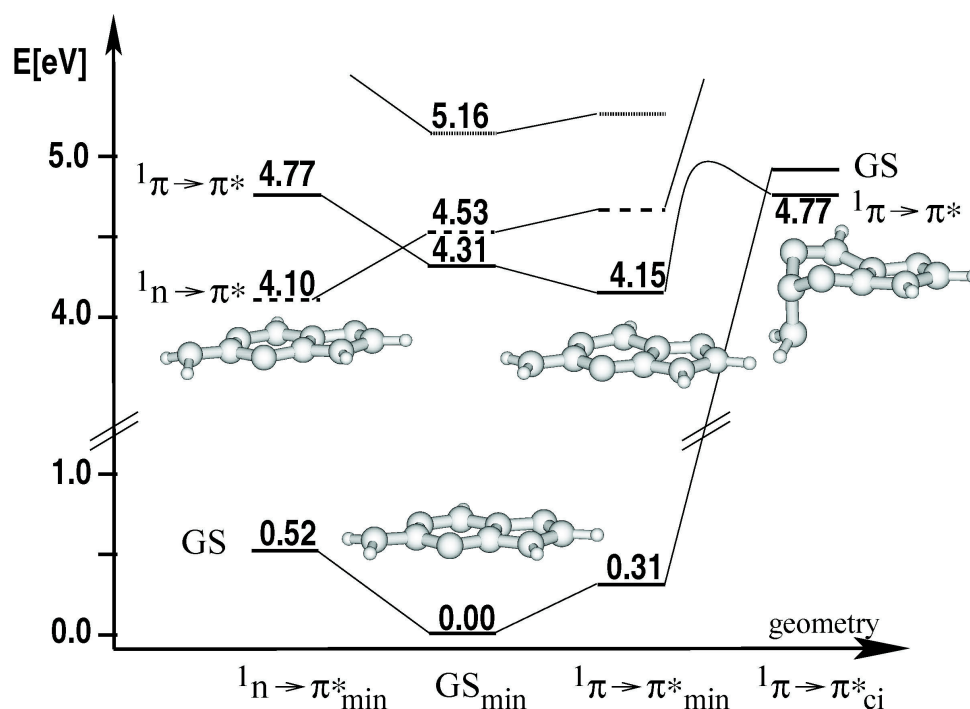


Abbildung 5.4: Vertical and adiabatic absorption energies of 9H-2AP calculated with the DFT/MRCI method. The minimum geometry of the electronic ground state (GS_{min}) was determined at the DFT level. Minimum geometries of the first excited $^1n \rightarrow \pi^*$ and $^1\pi \rightarrow \pi^*$ states (denoted by $^1n \rightarrow \pi^*_{min}$ and $^1\pi \rightarrow \pi^*_{min}$, respectively) as well as the conical intersection between the ground and first excited $^1\pi \rightarrow \pi^*$ states ($^1\pi \rightarrow \pi^*_{ci}$) were obtained at the TDDFT level. Solid lines: $\pi \rightarrow \pi^*$ states; dashed lines: $n \rightarrow \pi^*$ states; dotted lines: $\pi \rightarrow$ Rydberg excitations. The oscillator strength of the first $^1\pi \rightarrow \pi^*$ transition amounts to 0.18.

In both tautomers, the first absorption band corresponds to a $\pi\pi^*$ (homo-lumo) transition with large oscillator strength. The second vertical transition originates from an $n\pi^*$ excitation. Compared to the first band, it is predicted to be weaker by a factor of approximately 30. At the respective ground state equilibrium structures, the diffuse

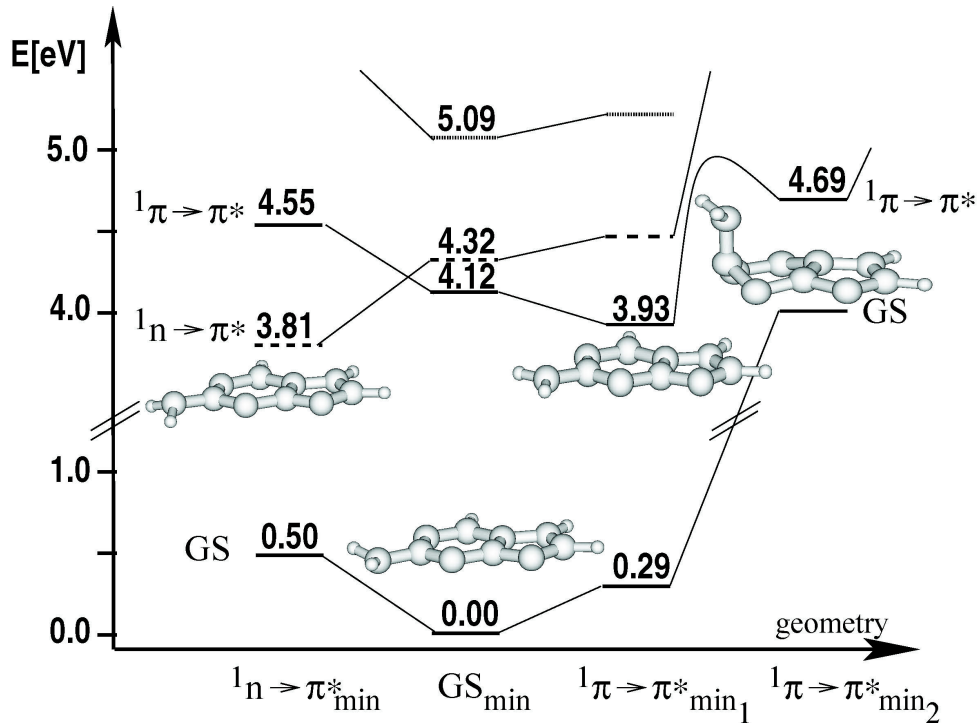


Abbildung 5.5: Vertical and adiabatic absorption energies of 7H-2AP calculated with the DFT/MRCI method. For details relating to the nuclear geometries see Fig. 5.4 and the text. The electronic ground state of this tautomer is located at 0.21 eV (20 kJ mol⁻¹) above the 9H-2AP minimum at this level of theory. Solid lines: $\pi \rightarrow \pi^*$ states; dashed lines: $n \rightarrow \pi^*$ states; dotted lines: $\pi \rightarrow$ Rydberg excitations. The oscillator strength of the first $\pi \rightarrow \pi^*$ transition amounts to 0.13.

states of $\pi\sigma^*$ character are located at considerably higher energies. The computed vertical excitation energies can tentatively be compared with the maxima of experimental absorption spectra in solution. In stretched films of polyvinyl alcohol[49] and other hydroxylic solvents,[41] the first absorption maximum is located at approximately 4.05-4.10 eV, somewhat red-shifted with respect to our computed value of 4.31 eV for the first excited $^1\pi\pi^*$ state of isolated 9H-2AP. In previous theoretical investigations at the level of multiconfigurational quasi-degenerate perturbation theory (MCQDPT),[69] a lower excitation energy (3.97 eV) was obtained for this transition. Our vertical $n\pi^*$ DFT/MRCI excitation energy of 4.51 eV compares favorably with the experimental estimate (ca. 36000 cm⁻¹ = 4.46 eV) by Holmen et al.[49] The MCQDPT calculations by Rachofsky et al.[69] place this transition at considerably higher energy (4.97 eV). Several single excitation configuration interaction (CIS) calculations on the electronic spectrum

of 2AP were published.[33, 70, 71] However, due to the lack of dynamical electron correlation, they yield much too high excitation energies and are not considered to be reliable.

3.B. Relaxation pathways Geometry relaxation on the S_1 potential energy surface leads to moderate bond length variations and retains the nearly planar geometrical structure of the purine rings in the electronic ground state. In the first excited $^1\pi\pi^*$ state of 9H-2AP and 7H-2AP, the amino nitrogen exhibits a planar coordination. In both tautomers, the most pronounced geometry change upon $\pi\pi^*$ excitation is an elongation of the N1-C6 bond by about 5 pm. (A list of geometry parameters can be found in Table S1 in the supplementary information material.) Starting from a pre-optimized planar saddle-point structure on the $^1n\pi^*$ surface, an unconstrained minimum search was successful for this state, too. At the $^1n\pi^*$ minimum, the amino group is pyramidal with H-N10-C2-N1 and H-N10-C2-N3 dihedral angles between 20 and 25 degrees. The N1C2 bond length is substantially contracted with respect to its electronic ground state value. (For further geometry parameters see Table S1.) The energetic position of the 0-0 $^1\pi\pi^*$ vibronic band in the theoretical spectrum of 9H-2AP is determined from the computed adiabatic DFT/MRCI excitation energy (33482 cm^{-1}) and the zero-point vibrational energy (ZPVE) correction obtained at the (TD)DFT level (-1154 cm^{-1}). The excellent agreement of the resulting value of 32328 cm^{-1} with the peak position in the observed R2PI spectrum of 2AP (32371 cm^{-1}) is probably somewhat fortuitous considering the usual error bars of the DFT/MRCI method (-0.2 eV). The $^1n\pi^*$ state lies more than 4000 cm^{-1} higher at this geometry. However, contrary to what has been expected,[33, 14, 40, 41, 49, 50] our calculations place the $^1n\pi^*$ minimum of isolated 9H-2AP in the same energy regime as the $^1\pi\pi^*$ minimum. We obtain an adiabatic excitation energy of 33090 cm^{-1} for the $^1n\pi^*$ state. This is actually even slightly below the $^1\pi\pi^*$ minimum energy at 33482 cm^{-1} . In our experimental double-resonance spectra of isolated 2AP we did not find any indications for $^1n\pi^*$ vibronic bands. One has to keep in mind though that the spectrum is rather dense and the oscillator strength for a $^1n\pi^*$ transition is expected to be lower by more than a factor of 30 compared to the $^1\pi\pi^*$ transition. Also, our spectra are not rotationally resolved so that the transition moment directions of the different vibronic bands could not be analysed.

According to the results of our calculations, the energy gaps between the $^1\pi\pi^*$ and $^1n\pi^*$ minima are quite similar in 9H-2AP and 9H-adenine. The argument that has been put forward repeatedly in the literature,[33, 14, 40, 41, 49, 50] stating that the reverse order

of the $^1\pi\pi^*$ and $^1n\pi^*$ states is the origin of the different spectroscopic behavior of these two isomers, therefore does not hold. On the other hand, we find a large difference when examining the direct relaxation pathway of the $^1\pi\pi^*$ excitation to the electronic ground state. In 9H-adenine, a conical intersection between these two states was detected[48] that is energetically accessible shortly above the band origin. The nuclear geometry at the potential energy hypersurface crossing is characterized by a strong puckering of the six-membered purine ring, with the C2H bond nearly perpendicular to the central C4C5 bond. For 9H-2AP, we find a conical intersection between $^1\pi\pi^*$ and the S_0 state for a similar geometry (Fig. 5.4, to the very right). However, in 2AP the amino group is attached to the C2 center instead of a hydrogen atom. Upon ring puckering, the NH₂ group in position 2 loses its property of stabilizing the $\pi\pi^*$ state because the lone-pair electrons at the N-atom are not part of the π -system anymore. As a consequence, the conical intersection occurs at elevated energies in 9H-2AP and cannot be accessed by vibronic levels close to the origin. We therefore expect sharp bands even for higherlying vibronic transitions and a long vibrational progression, as observed in our experiments.

The position of the azine bond in the five-membered ring is found to have large influence on the electronic excitation energies (Figs. 5.4 and 5.5). The lowest-lying $^1\pi\pi^*$, $^1n\pi^*$, and $^1\pi\sigma^*$ transitions of 7H-2AP are markedly red-shifted with respect to the corresponding transitions in 9H-2AP. A similar trend was observed for the 9H- and 7H-tautomers of adenine. [45, 48, 72] The computed $^1\pi\pi^*$ adiabatic excitation energy of 7H-2AP amounts to 31726 cm⁻¹. The ZPVE correction (-1113 cm⁻¹) is somewhat smaller than for the 9H-tautomer. Hence, we predict the origin of the $^1\pi\pi^*$ band of 7H-2AP to be red-shifted by about 1700 cm⁻¹ with respect to the $^1\pi\pi^*$ 0-0 transition in 9H-2AP. According to our calculations, we expect a similar red-shift for the $^1n\pi^*$ state of 7H-2AP for which we obtain an adiabatic excitation energy of 30703 cm⁻¹. A geometry optimization of the $^1\pi\pi^*$ state starting from a strongly puckered nuclear arrangement did not lead to a conical intersection with the electronic ground state but yielded a second (local) minimum on the S_1 surface (Fig. 5.5, to the very right) more than 6000 cm⁻¹ (40.7 eV) above the global $^1\pi\pi^*$ minimum. It thus appears that this coordinate does not provide a fast non-radiative relaxation path in 7H-2AP. A search for further bands in the region 30300 - 32370 cm⁻¹ using two color R2PI (266 nm ionization laser wavelength) was unsuccessful. The lack of spectral lines in this region is in favor of the single tautomer hypothesis as the $^1\pi\pi^*$ transitions exhibit similar oscillator strengths in both tautomers and even a minority component ought to be recognizable. Additional information about the nature of the electronically excited state of 2AP can be obtained by comparing the vibronic frequen-

cies and intensities from the R2PI measurements with theoretically determined harmonic vibrational frequencies and FC factors. A detailed discussion of these data can be found in the electronic supplementary information material.

5.1.4 Conclusions

In this work, we have investigated the vibronic spectrum of isolated 2AP by means of high-resolution gas phase experiments and combined DFT and MRCI quantum chemical methods. The results of our investigations give ample evidence that mainly the 9H-tautomer of 2AP is present in the molecular beam. We could explain the rich vibrational structure in the R2PI spectrum of 2AP compared to the spectrum of its isomer 9H-adenine whose UV spectrum breaks off at low energies. Further experimental and theoretical investigations will be directed towards an explanation of the different fluorescence quantum yields of 2AP in water and in nonprotic solvents. We plan investigations of clusters of 2-AP with water. Especially important are the energetic positions of the $\pi\pi^*$ and $n\pi^*$ states in these different environments and their coupling to the electronic ground state.

5.1.5 Acknowledgements

This work is part of the thesis of Kai Seefeld and has been supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft through projects Kl 531/24 and Ma 1051/5.

5.2 Guanin (G)

Imino Tautomers of Gas-Phase Guanine from Mid-Infrared Laser Spectroscopy

Seefeld K., Brause R., Häber T. and Kleineremanns K. *J. Phys. Chem. A* **111** (2007), 6217-6221

We reinvestigated the assignment of the three major guanine conformers detected via resonance enhanced two-photon ionization (R2PI) in supersonic expansions and present IR/UV double resonance spectra in the spectral region between 1500 and 1800 cm^{-1} . Comparison with B3LYP/TZVPP and RI-MP2/cc-pVQZ calculations shows that both conformers B and C are 7H-keto tautomers with an imine group in the 2-position. They differ only in the local conformation of the imine group but are otherwise identical. Conformer A is an amino-enol form with the OH group in the trans position.

5.2.1 Introduction

Tautomers of guanine have been studied by several groups in the past.[73, 14, 74, 15, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81] Four conformers were observed in the vibronic spectra of laser-desorbed guanine in supersonic expansions detected by resonant two-photon ionization (R2PI) and with electronic origins at 32864 cm^{-1} (A), +405 cm^{-1} (B), +1046 cm^{-1} (C)[15, 75] and +1891 cm^{-1} (D).[75] Using IR/UV double resonance spectra, two of them were assigned to amino-enol structures (A and D), and the other two were assigned to aminoketo structures (B and C).[15, 75, 76, 77] There remained some doubt as to whether the observed conformers were 7H or 9H tautomers because the IR spectra of 7H- and 9H-guanine are very similar.

Very recently Choi and Miller presented IR spectra of guanine in helium droplets.[82] They identified the 9H-amino-keto, the 7H-amino-keto and two 9H-amino-enol tautomers by the orientation of their transition moment angles. Remarkably, the IR spectra of the amino-keto tautomers in helium droplets did not agree with the IR spectra of tautomers B and C, which were assigned to amino-keto structures in the gas-phase studies.[15, 75, 76, 77] Because the keto assignment was certain (no OH stretch vibration of the enol form), imino-keto tautomers remained the most obvious assignment of tautomers B and C. This

was pointed out in ref [78] but no new experimental results were presented there to prove that possibility. The NH stretch vibration of the imine group, which absorbs in the near-IR, could give clear evidence for imino tautomers, but its absorption intensity is weak and could not be detected in refs [15, 75, 76, 77, 78].

Imino-keto and amino-keto structures are clearly distinguishable in the mid-IR spectral region by the presence of the very strong C=N stretch absorption of the imine group next to the C=O stretch band of the keto group. In the following, we present the spectra of guanine tautomers between 1500 and 1800 cm^{-1} that unambiguously prove the imino-keto assignment of tautomers B and C. Recent calculations of Marian[81] predict fast internal conversion of the amino-keto tautomers. Therefore, we concluded that the most stable and abundant amino-keto tautomers could not be detected via R2PI because their electronically excited-state is too short-lived for efficient ionization. On the other hand, the rare imino-keto tautomers were observed because of their efficient ionization pathway in R2PI experiments. R2PI only allows the detection of conformers that have an efficient ionization channel.

5.2.2 Experimental Methods

The basic principles of our IR/UV experimental setup were described in detail elsewhere.[83, 20, 84] Solid samples of guanine are vaporized into an argon jet (5 bar) by laser desorption and were investigated by IR/UV hole burning spectroscopy (Figure 5.6). Guanine (Merck >98%) is mixed with graphite powder (Aldrich) in a 1:2 ratio and is applied to the edge of a 2 mm thick graphite wheel (diameter 60 mm), which is placed underneath the orifice of a 300 μm pulsed valve (General Valve). Slow rotation of the graphite wheel (1 turn per 45 min) constantly provides fresh material to be exposed to the desorption laser (Minilite, Spectra Physics, 1064 nm, $\approx 5 \text{ mJ}/\text{cm}^2$).

The skimmed molecular beam (skimmer diameter 1 mm) crosses the UV ionization laser (LAS, frequency doubled, attenuated to $< 0.1 \text{ mJ}/\text{pulse}$) at a right angle inside the ion extraction region of a linear time-of-flight (TOF) mass spectrometer in the Wiley-McLaren configuration. A pulsed IR laser beam (burn laser) is aligned collinear to the UV beam (probe laser) and is fired 100 ns before the latter. The burn laser (IR) frequency is scanned over the vibrational transitions, while the ionization laser (UV probe laser) is kept at a frequency resonant with a vibronic transition of a single guanine tautomer. By monitoring the ion mass signal as a function of IR frequency, mass and conformer selective IR spectra can be obtained.

IR laser light is generated by a three-stage difference frequency generation (DFG)/optical parametric amplification (OPA) setup.[20] Basically, a dye laser (Precision Scan, Sirah), with Styryl 8 or 9 in methanol or dimethylsulfoxide (DMSO), is pumped by the 532 nm output of a frequency doubled Nd:YAG laser (GCR 230 Pro, Spectra Physics). The dye laser output is mixed with a part of the fundamental (1064 nm) of the same Nd:YAG laser in a LiNbO₃ crystal for difference frequency generation, which produces IR radiation around 2.6 μm that is amplified in an OPA stage. In the third stage, after proper rotation of the polarizations, IR radiation between 5 and 8 μm ($\approx 300 \mu\text{J}$) is produced by difference frequency mixing of the idler and the signal beams of the OPA stage in an antireflection coated AgGaSe₂ crystal.

Intensity noise due to shot-to-shot fluctuations can largely be compensated by creating a reference signal. We let the very same UV laser pulse that was used to ionize the molecules pass a 30 m delay line; then we re-direct and focus it into the sample region again, causing a second ion signal (reference signal) to appear ≈ 100 ns after the first. Because the redirected beam is focused, its interaction volume with the IR beam is small and shows only a small IR dip, if at all. The reference signal is scaled to match the baseline of the first ion signal and is subtracted from the latter. In this case, the baseline corresponds to the constant ion signal without the IR laser. Because both ion signals originate from the very same laser pulse and sample the same gas pulse, common noise due to energy and number density fluctuations is mostly eliminated in the resulting signal.

The ro-vibrational transitions of the water bending (1595 cm^{-1}) and stretching vibrations (3657 and 3756 cm^{-1}) were used for frequency calibration. We did not normalize the IR spectra to the IR laser intensity, but the intensities in each measurement were the same to within 20%, so the intensity scales in the spectra are comparable for each conformer.

5.2.3 Calculations

We calculated all 20 tautomers and conformers of guanine, which are displayed in Figure 5.7 together with their relative energies. To get a more reliable estimate of the relative energies, geometry optimization at the B3LYP/TZVPP level of theory was followed by a RI-MP2/cc-pVQZ single point calculation at the optimized DFT geometries. Vibrational frequencies were calculated at the DFT level and were scaled by 0.9552 (O-H stretch), 0.9588 (N-H stretch), and 0.982 ($\tilde{\nu} < 2000 \text{ cm}^{-1}$). The different scaling factors for the

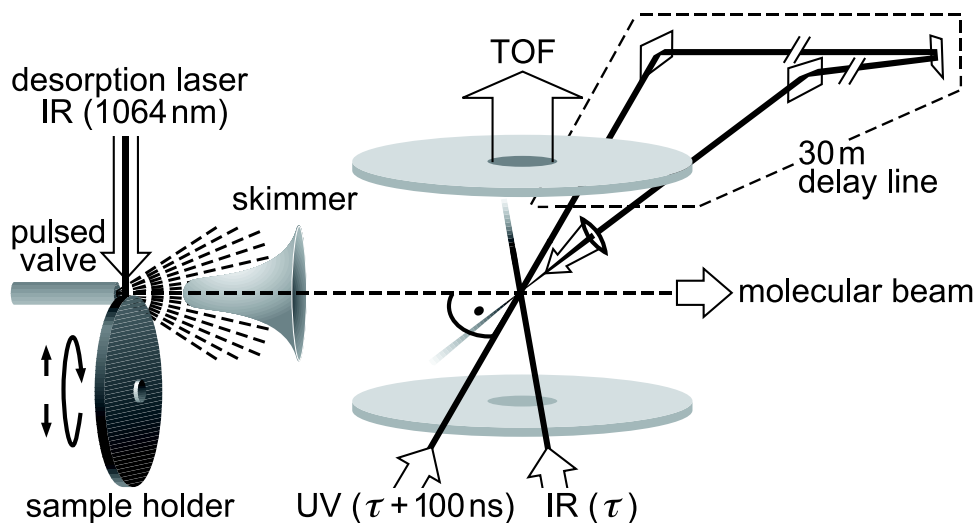


Abbildung 5.6: Experimental setup, showing the laser desorption and ionization region. The UV analysis laser travels more than 30 m after crossing the molecular beam, and then it is redirected and focused into the ionization region again to generate a reference signal of ions used to normalize the hole-burning signal.

OH and NH stretch vibrations were derived from calculations of 3- and 4-aminophenol. The relative energies in Figure 5.7 are corrected for the zero-point energy obtained by the above-mentioned DFT calculations. For the imino-keto tautomers we also calculated vibrational frequencies at the RI-MP2/cc-pVDZ, RI-MP2/ccpVTZ, and RI-MP2/TZVPP levels of theory. All calculations were performed using the Turbomole program package.[85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92]

We use the following abbreviations to label the different tautomers: 7H/9H represents the H-atom in the 7N or 9N position, 3H represents the tautomer with the hydrogen atom moved from the 1- to the 3-position, A is the amino group in the 2-position, I_u/I_d is the imine group (up/down) in the 2-position, O is the keto form, and E_c/E_t is the enol form (cis/ trans). Our nomenclature differs slightly from that introduced in ref [81]. Except for the amino group, guanine is a planar molecule in the electronic ground state, with the hydrogen atom of the enol- and imino-groups lying in the molecular plane. The definitions for cis/trans refer to the position of the enol hydrogen. In the cis conformer the hydrogen is on the N7 side (e.g., 7H-A- E_c). Similarly, up/down refer to the position of the iminohydrogen, with the hydrogen on the N1 side in the up conformer (e.g., 7H- I_u -O).

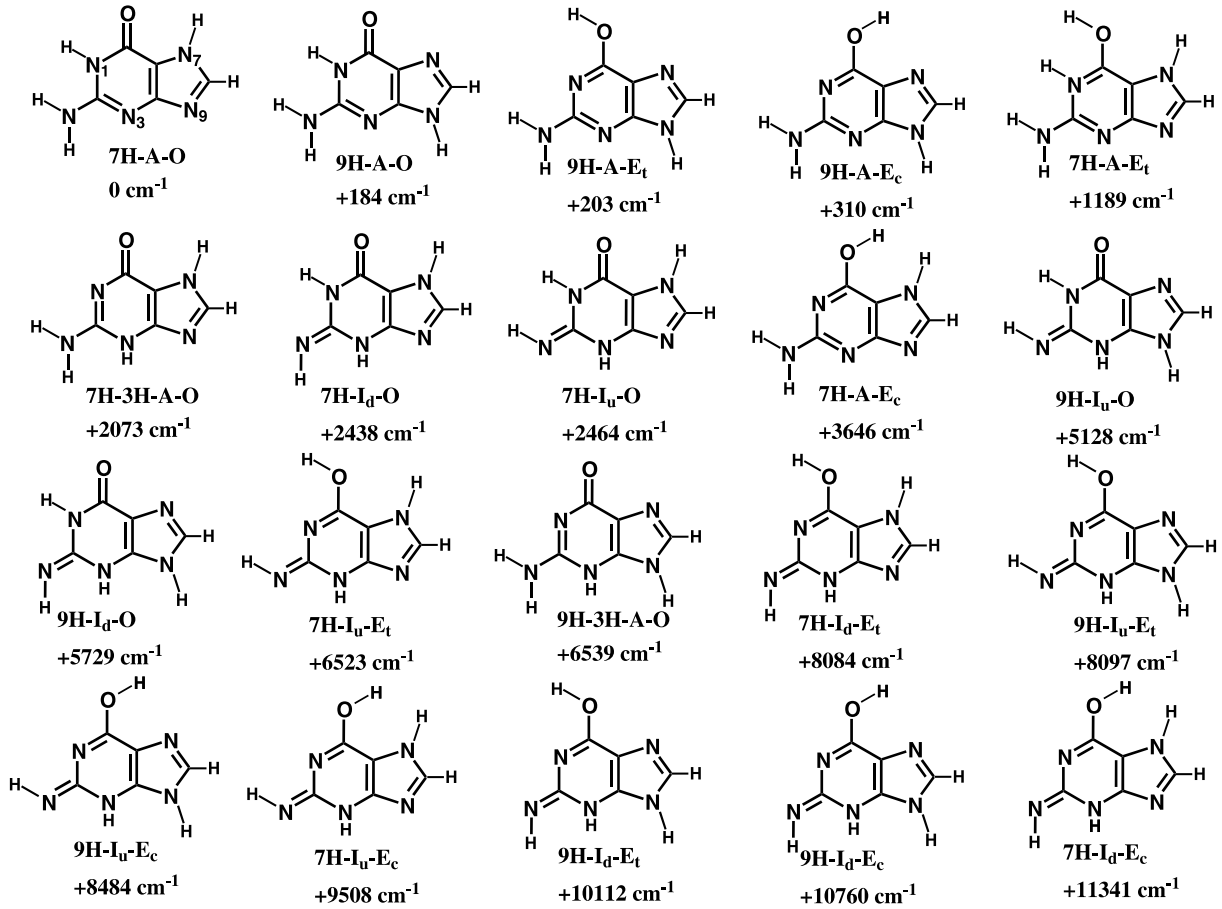


Abbildung 5.7: Structures, labels, and relative energies (B3LYP/TZVPP//RIMP2/cc-pVQZ, ZPE corrected) of all 20 tautomers of guanine and their relative energies in ascending order. The numbering of the atoms is indicated in the top-left structure. Abbreviations are as follows: 7H/9H) H-atom in 7N or 9N position, 3H) tautomer with the hydrogen atom moved from the 1- to the 3-position, A) amino group in the 2-position, I_u/I_d) imine group (up/down) in the 2-position, O) keto form, E_c/E_t) enol form (cis/trans).

5.2.4 Results

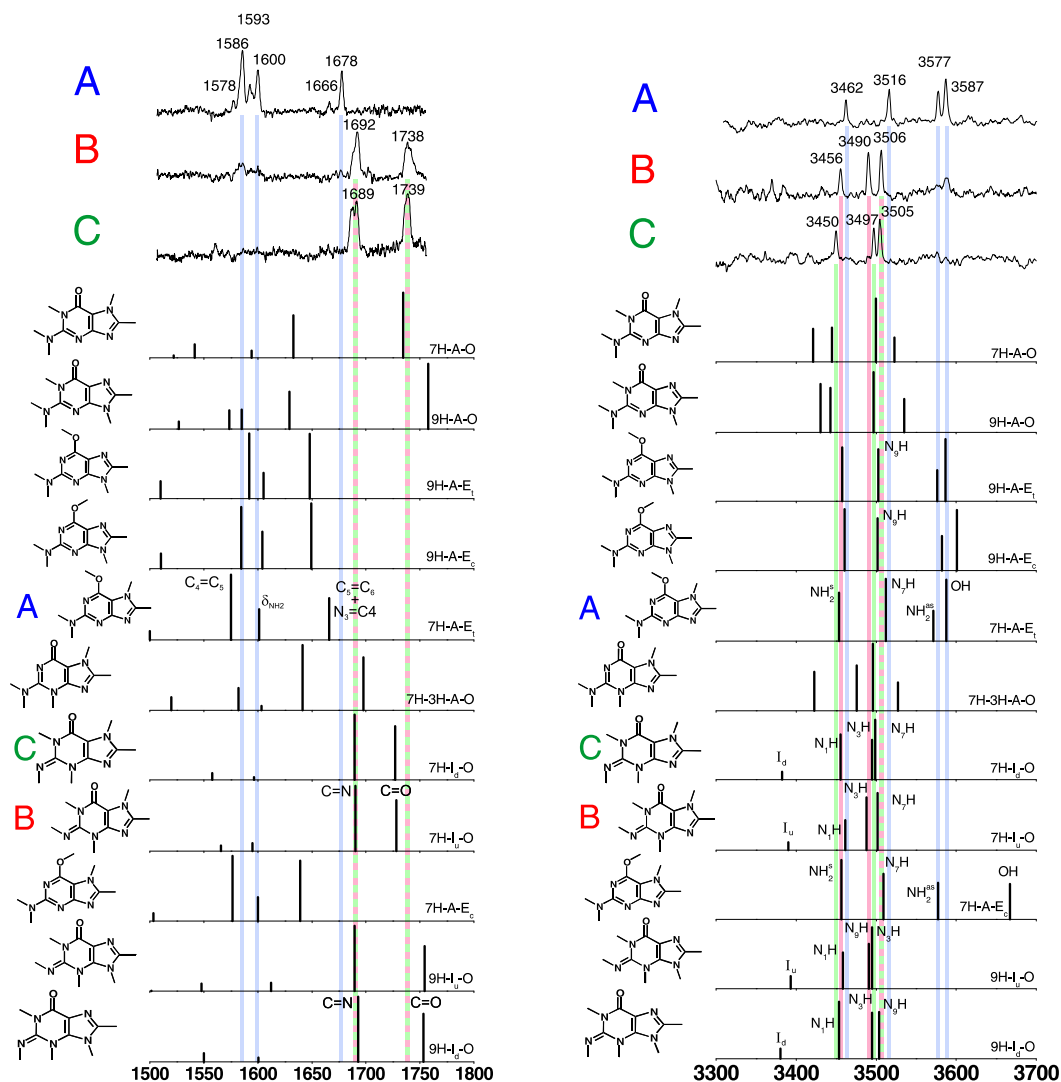
Figure 5.8 shows the IR/UV double resonance spectra of the three guanine conformers A, B, and C in the mid-IR region (top three traces). The UV probe laser was tuned to 32 864 (A), 32 864 + 405 (B), and 32 864 + 1046 cm⁻¹ (C), respectively. [15, 75, 77] Although we tried different experimental conditions (laser energy, timings, etc.), we did not observe the vibronic or IR spectrum of conformer D[75, 77] in our experiment. Contrary to non-methylated guanine, the vibronic and the mid-IR spectra of conformer

D of 9-methylguanine could be easily obtained.[93] Also shown in Figure 5.8 are the calculated and scaled stick spectra of the eleven most stable tautomers of guanine. The corresponding structures are indicated to the left of each stick spectrum. For the spectral assignment, we only considered tautomers with relative energies lower than 6000 cm^{-1} . Tautomers with higher energies are assumed to not be present in the supersonic expansion, or their contribution is assumed to be negligible compared to that of the major conformers. Vertical colored lines originating from the experimentally observed absorption maxima help to compare experimental and calculated spectra (A) blue, B) red, C) green lines).

Conformers B and C. The mid-IR spectra of conformers B and C are very similar (Figure 5.8) and show only two absorption maxima around 1690 and 1738 cm^{-1} . From previous work we know that both conformers B and C are keto forms, because they do not show the OH stretch vibration of the enol tautomers (see Figure 5.9).[15, 75] Consequently, the two bands at 1738 and 1739 cm^{-1} can be attributed to the C=O stretch vibrations of the keto group. This is supported by the FTIR gas-phase spectrum of thymine[94] and by mid-IR spectra of guanine-cytosine base pairs.[95] Now we compare the experimental spectra to the calculated spectra of keto tautomers in Figure 5.8. Only the imino-keto tautomers 7H- $I_{u/d}$ -O and 9H- $I_{u/d}$ -O reasonably agree with the experimental spectra. Therefore, the bands at 1689 and 1692 cm^{-1} must be the C=N stretch vibrations of the imine groups.

Figure 5.9 shows previous measurements in the region of the OH/NH stretch vibrations[15] together with the calculated and scaled stick spectra in that region. Conformers B and C show three absorptions between 3450 and 3510 cm^{-1} . According to the calculated spectra of the 7H- $I_{u/d}$ -O and 9H- $I_{u/d}$ -O tautomers, the red-most band belongs to the N_1H stretch vibration, whereas the other two are the N_3H and $N_{7/9}H$ stretch vibrations. The NH stretch vibration of the imino group (below 3400 cm^{-1}) is weak and is not discernible in the experimental spectra.

The mid-IR spectra show that conformers B and C are indeed imino-keto conformers, but the spectra differ only by small changes in the N-H stretch region, which makes the differentiation between 7H/9H and up/down tautomers difficult. Unfortunately, the calculated IR spectra of the imino tautomers are also very similar to each other. We did calculate the vibrational frequencies of the four imino-keto tautomers at different levels of theory to predict the reliability of the small frequency shifts between the different tautomers. If the shifts are systematic and consistent at each level of theory, then we could use them to distinguish between 7H/9H and up/down imino-keto tautomers and to



(a) IR/UV double resonance spectra of the three guanine conformers A, B, and C between 1500 and 1800 cm^{-1} (top three traces). Also shown are the calculated and scaled stick spectra of the 11 most stable tautomers with relative energies less than 6000 cm^{-1} (cf. Figure 5.7). Colored lines indicate the positions of experimentally determined absorption maxima (A) blue, B) red, C) green). Conformers B and C are imino-keto structures, whereas conformer A is an amino-enol structure.

(b) IR/UV double resonance spectra of the major guanine conformers A, B, and C between 3300 and 3700 cm^{-1} (top three traces). Also shown are the calculated and scaled stick spectra of the 11 most stable tautomers with relative energies less than 6000 cm^{-1} (cf. Figure 5.7). Colored lines indicate the positions of experimentally determined absorption maxima (A) blue, B) red, C) green). Conformers B and C are imino-keto structures, whereas conformer A is an amino-enol structure.

Abbildung 5.8: mid- and near- IR/UV double resonance spectra of the major guanine conformers A, B, and C

provide tentative assignments for conformers B and C.

Table 5.3 lists the unscaled C=N, C=O, and N-H stretch frequencies obtained at the B3LYP/TZVPP, RI-MP2/cc-pVDZ, RI-MP2/cc-pVTZ, and RI-MP2/TZVPP levels of theory. δ is the spacing between the C=N and C=O stretch vibrations.

Tabelle 5.3: Unscaled C=N, C=O, and N-H Stretch Frequencies (in cm^{-1}) of the Four Imino Tautomers at Various Levels of Theory^a

conformer	C=N	C=O	δ	N ₁ -H	N ₃ -H	N _{7,9} -H
B3LYP/TZVPP						
7H-I _d -O	1721	1759	(38)	3604	3646	3649
7H-I _u -O	1721	1760	(38)	3610	3638	3652
9H-I _d -O	1724	1785	(61)	3602	3654	3645
9H-I _u -O	1721	1786	(66)	3607	3641	3645
RI-MP2/cc-pVDZ						
7H-I _d -O	1765	1830	(64)	3622	3673	3666
7H-I _u -O	1767	1833	(66)	3625	3669	3670
9H-I _d -O	1768	1837	(69)	3622	3680	3668
9H-I _u -O	1768	1840	(72)	3622	3672	3669
RI-MP2/cc-pVTZ						
7H-I _d -O	1744	1801	(57)	3617	3671	3667
7H-I _u -O	1746	1804	(58)	3623	3664	3669
9H-I _d -O	1747	1812	(65)	3617	3680	3673
9H-I _u -O	1746	1815	(68)	3621	3669	3672
RI-MP2/TZVPP						
7H-I _d -O	1738	1790	(53)	3616	3673	3669
7H-I _u -O	1740	1794	(53)	3624	3664	3671
9H-I _d -O	1741	1802	(61)	3617	3683	3675
9H-I _u -O	1741	1805	(65)	3623	3669	3674

^a δ is the spacing between the C=N and C=O stretch vibrations.

From Table 5.3 it is clear that the spacing between and the energetic order of the N₃H and N_{7,9}H vibrations strongly depend on the theoretical method and the basis set. The δ value also depends on the theoretical level, but it is consistently larger for the 9H-tautomers as compared to the 7H-tautomers. In the experimental spectra, the spacing is the same for conformers B and C, indicating that both conformers are probably either 7H- or 9H-tautomers. If one conformer belongs to 7H and the other to 9H, then the experimental spacing between C=N and C=O vibrations would most likely differ by at least 10 cm^{-1} . Finally, there is a systematic, albeit small, blue shift of the N₁H vibration when going from an I_d to an I_u conformer. If the small shift is reliable, then we can assign

conformer B to an up (I_u) and conformer C to a down (I_d) conformer.

Considering the uncertainties in the calculated spectra, we cannot derive conclusive assignments of the experimental spectra to specific tautomers of guanine (e.g., a 7H/9H assignment) exclusively based on the IR spectra. Further information is provided by energetic arguments and by comparison with previous calculations.[81] Experimentally, conformers B and C have ion signals of comparable intensities at their electronic origins. If we assume an equal detection probability for both conformers, then their number densities in the supersonic jet are comparable as well. Then, using the zero-order picture of a Boltzmann distribution, both conformers should have about the same energy relative to the most stable conformer. Upon inspection of Figure 5.7, the energies of tautomers 7H- I_d -O and 7H- I_u -O differ only by about 30 cm^{-1} , whereas 9H- I_u -O and 9H- I_d -O are 600 cm^{-1} apart and are about 3000 cm^{-1} higher in energy than the corresponding 7H tautomers. On the basis of an energetic argument, we would assign conformers B and C to 7H. If we now take into account the small shift of the N_1H stretch vibration, then conformers B and C can be assigned to tautomers 7H- I_u -O and 7H- I_d -O, respectively. A similar energetic argument could be derived from the IR spectra, because of the similar IR intensities. However, one has to be careful when comparing IR intensities in double-resonance experiments because saturation effects and dissociation (mainly for clusters) can alter relative intensities significantly.

The assumption of an equal detection probability is supported by recent calculations of Marian.[81] There, the corresponding 7H- $I_{u/d}$ tautomers have the same oscillator strength and similar Franck-Condon factors for vertical excitations, reflecting the fact that both structures differ only by the orientation of the imine group. Furthermore, the electronic origin of the up tautomer is predicted to be to the red of the corresponding down tautomer, which supports our assignment of conformers B and C to 7H- I_u -O and 7H- I_d -O, respectively. According to Shukla and Leszczynski[79] the 9H-I-O tautomers absorb about 4000 cm^{-1} to the blue of the corresponding 7H tautomers.

Additional support for the 7H assignment comes from measurements of 7-methylguanine.[93] There, the C=O stretch vibration of the corresponding 7-methylguanine conformer is red-shifted by 10 cm^{-1} as compared to non-methylated guanine, which is in good agreement with theory. However, the C=O stretch vibration of 9-methylguanine remains unchanged in the calculations. Also, 9-methylguanine has only one prominent peak in the REMPI spectrum, which correlates with conformer D of non-methylated guanine (a 9H-A-E tautomer).[75, 77, 78] There is no vibronic transition of 9-methylguanine in the spectral range of conformers A, B, and C of guanine. Howe-

ver, 7-methylguanine has two conformers with electronic origins close to conformers A and B of guanine and with IR spectra that are similar to those of the non-methylated conformers.[75, 93] Either the number densities of the 9H-I-O tautomers are too small for detection or, if they are formed in sufficient amounts, they do not absorb in the same spectral region as the 7H-I-O tautomers (see above), or we simply cannot detect them because of unfavorable Franck-Condon factors or fast internal conversion. In either case, the non-observation of 9-methylguanine tautomers close to conformers B and C supports our 7H assignment of the those conformers. Therefore, together with the IR spectra and predictions of the electronic origins of conformers B and C, we can safely assign conformers B and C to 7H-I_u-O and 7H-I_d-O, respectively.

Conformer A. Conformer A shows four absorptions between 3450 and 3600 cm⁻¹ (Figure 5.9), which were previously assigned to the enolic OH (3587 cm⁻¹), NH₂ a (3577 cm⁻¹), N₇H or N₉H (3516 cm⁻¹), and NH₂ s (3462 cm⁻¹) stretch vibrations.[15, 75] Comparison with our calculations shows that its spectrum agrees best with 9H-A-E_t, 9H-A-E_c, and 7H-A-E_t. We can rule out 7H-A-E_c because the OH stretch frequency is blue-shifted to about 3680 cm⁻¹, due to steric interactions between the OH and the N₇H group. Between 1500 and 1800 cm⁻¹, conformer A shows three strong bands at 1586, 1600, and 1678 cm⁻¹ (Figure 5.8). For the three tautomers in question, these vibrations have predominantly C₄=C₅ stretch, NH₂ bending, and C₅=C₆ + N₃=C₄ stretch character, respectively. Although the assignment is not as convincing as for conformers B and C, the mid-IR spectrum of conformer A agrees best with 7H-A-E_t, with the enolic OH group in the trans conformation. Our assignment confirms previous studies of Mons and co-workers.[75, 77] This is in line with calculations of the vertical excitation energies.[81] Only 7H-A-E_t has an electronic origin at lower energies, whereas 9H-A-E_t and 9H-A-E_c have vertical transition energies higher than the 7H-I-O tautomers.

5.2.5 Summary

We presented the mid-IR spectra of the three guanine conformers A, B, and C. In combination with previous measurements in the OH/NH stretch region[15] and with DFT and ab initio calculations, we demonstrated the existence of imino-keto structures in supersonic expansions. Specifically, conformers B and C are assigned to 7H-I_u-O and 7H-I_d-O, respectively, which differ only in the orientation of the imino group. Our assignment is supported by comparison with UV and IR/UV spectra of 7- and 9-methylguanine,[75, 77, 78, 93] as

well as with recent predictions of electronic origins, oscillator strength, and relaxation pathways of different guanine tautomers.[81] In contrast, conformer A is an amino-enol form and is assigned to 7H-A- E_t , with the OH group in the trans position, in agreement with previous work.[75, 77, 81] Considering theoretical calculations[81] and our re-assignment, none of the three major conformers A, B, and C detected by R2PI are the biologically relevant 9H-A- O tautomer, which has not been observed via R2PI so far.

5.2.6 Acknowledgment.

This work has been supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 663/A4). The authors thank C. Marian for fruitful discussions. We gratefully acknowledge the referees comments.

5.3 FTIR Aminoacids

Gas phase infrared spectra of nonaromatic amino acids

Linder R., Seefeld K., Vavra A. and Kleiner Manns K. *Chem. Phys. Letters* **453** (2008), 1-6

We present the first gas phase Fourier Transform InfraRed (FT-IR) spectra of the uncapped (natural) amino acids glycine, alanine, threonine, cysteine, methionine and capped methionine by using a fast thermal heating technique up to around 520 K to vaporize them. The experimental spectra taken in the range 700-4000 cm^{-1} show no sign of decomposition and are in good agreement with ab initio calculated frequencies and intensities of the nonzwitterionic form of the amino acids.

5.3.1 Introduction

Gas phase infrared spectra are free from solvent interactions and can be used as benchmarks to check the quality of ab initio calculations of harmonic and anharmonic vibrational frequencies [96, 97]. In addition, gas phase spectra can be compared with spectra in liquids, solutions and matrix isolation, in order to assess the interaction with the solvent and neighboring molecules [98, 99, 100, 101, 102, 103, 104]. Biomolecules, like amino acids and peptides, have very low vapor pressures and are well known for their thermal instability. Indeed, all natural amino acids decompose before or upon sublimation to some extent [105], therefore preventing easy measurements of gas phase infrared spectra in static thermally heated gas cells. Some gas phase spectra of amino acids were measured using thermally heated nozzles [106, 107, 108] or laser desorption techniques [109, 110, 111]. Since both sources yield only very low number densities, sensitive detection schemes like REMPI [106, 107, 109], IR-CRLAS [108], or microwave spectroscopy [110, 111, 112, 113, 114] are required. However, only three natural amino acids, namely phenylalanine, tryptophane and tyrosine, have chromophores with low lying electronic states and are suited for REMPI detection in combination with IR-UV double resonance experiments.

In earlier experiments we reported the first gas phase FTIR spectra of the amino acids phenylalanine, proline, valine, leucine and isoleucine [115]. We used a technique of rapid heating of the solid sample to about 250 °C, followed by fast condensation of the

vapor, so that the molecules do not have enough time to decompose [45, 94, 17]. In this paper we extend our measurements to the natural amino acids glycine, alanine, threonine, methionine and cysteine. The spectra are compared to density functional calculations at the B3LYP/6-31G(d,p) level of theory.

5.3.2 Experiment

The experimental set up has been described in detail before [115]. A stainless steel tube is sealed at both ends with NaCl windows and connected to a vacuum pump. Both, the tube and the windows are heated using heating tape or heat resistors to minimize condensation. The amino acid sample is placed above a closed ball bearing valve. By turning the valve the sample falls down into the heated stainless steel tube and starts to sublime leading to a time window of about 20 to 30 seconds with sufficient partial pressure for detection. During that time the pressure in the tube rises from $< 10^{-2}$ to about 1-2 mbar. At later times the pressure starts to decrease again to about $5 \cdot 10^{-2}$ mbar indicating a condensation of the amino acid in colder regions of the gas cell. Typically 1.0 to 1.3 mmol amino acid are used for one measurement at a tube temperature of about 250 C.

All spectra were recorded in the spectral range 700-4000 cm^{-1} at a spectral resolution of 2 cm^{-1} using a FTIR spectrometer (Bruker, IFS 113) kept under vacuum while the sample compartment is purged with dry, CO free air.

Additional measurements were performed with the same technique using a Nicolet 6700 FTIR spectrometer. It is worth noting, that we did not observe any hints for a substantial decomposition of the amino acids at early times of the measurement after careful optimization of temperature and analysis time (especially necessary for glycine).

Quantum chemical calculations were performed with the TURBOMOLE program package [85, 86, 87, 88, 89, 116, 90, 91, 92]. Geometries of the amino acids were optimized and harmonic frequencies calculated at the B3LYP/6-31G(d,p) level of theory. In order to stay consistent with regard to our previous measurements the same DFT functional was chosen (b3-lyp_Gaussian in TURBOMOLE). We also performed calculations at the MP2/TZVP level, which showed similar results (not shown here). Due to the high temperature of our experiment, we limited ourselves to the calculation of a single conformer with the free OH group in syn configuration (no $\text{OH} \cdots \text{NH}_2$ H-bond). Harmonic frequencies of the O-H-, N-H- and C-H-stretch vibrations were scaled by 0.9546, while all other vibrations ($< 2000\text{cm}^{-1}$) were scaled by 0.964. The scaling factors are the same used in earlier studies and were derived from tryptophane [117, 83]. In case of glycine where we

found evidence for a minor quantity of hydrogen bonded species we compared our results to high level *ab initio* calculations from other groups.

5.3.3 Results

Fig. 5.9 and 5.10 show the FTIR spectra of glycine (Gly), alanine (Ala), threonine (Thr), cysteine (Cys) and methionine (Met).

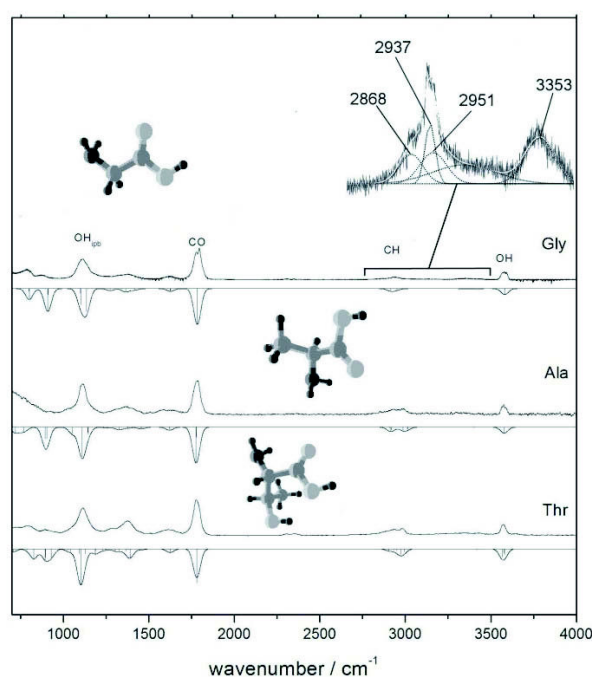


Abbildung 5.9: FT-IR gas-phase spectra of glycine (Gly), alanine (Ala) and threonine (Thr) measured at 250 °C. The band at 2349 cm^{-1} arises from insufficient purging of atmospheric CO_2 and not from decomposition of the sample. Underneath each experimental spectrum is a simulated spectrum obtained from B3LYP/6-31G(d,p) calculations. Calculated frequencies were scaled by 0.964 and 0.9546 (see text for details). The inset shows IR bands of weakly populated conformers of glycine (see text and Table 5.4) and a gaussian fit of the band shape.

All spectra were taken at 250°C with cell windows heated to 270° C. The spectra were averaged over the five FTIR scans with the strongest absorption and smoothed with a 5-point Savitzky-Golay smoothing function.[118] Below each spectrum and with the peaks going down is a simulated spectrum obtained from harmonic frequency calculations at

the B3LYP/6-31G(d,p) level. Harmonic frequencies were scaled (see above) and convoluted with a Gaussian profile with a full-width at half-maximum (FWHM) of 50 cm^{-1} . Calculated intensities were scaled to match the most intense peak of the corresponding experimental spectrum.

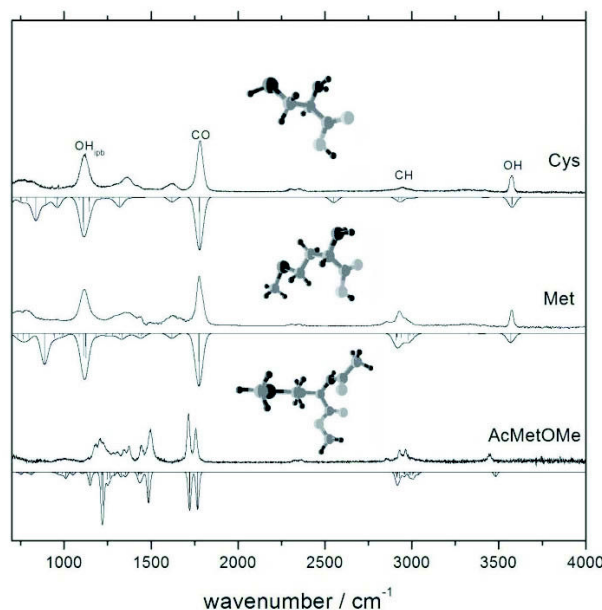


Abbildung 5.10: FT-IR gas-phase spectra of cysteine (Cys), methionine (Met) and N-acetyl-methionine methylester (AcMetOMe) measured at $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. The band at 2349 cm^{-1} arises from insufficient purging of atmospheric CO_2 and not from decomposition of the sample. Underneath each experimental spectrum is a simulated spectrum obtained from B3LYP/6-31G(d,p) calculations. Calculated frequencies were scaled by 0.964 and 0.9546 (see text for details).

The absorption at 2349 cm^{-1} belongs to remaining CO in the sample chamber due to insufficient purging. Typically the background spectrum is taken a few minutes before the sample spectrum. We observe (positive and negative) CO_2 absorptions of similar magnitude in the difference spectra of background scans and sample scans. Because CO has a large infrared absorption cross section, the decomposition of even a small amount of molecules should be visible via strong positive CO absorptions substantially larger than those obtained in the difference spectra of background scans. We checked for absence of decomposition by comparing the spectra at different analysis times in the range 10-60 seconds. Generally absorption signals decrease again after 30 seconds, because the

substance starts to condensate on cold surfaces of the apparatus. On the other hand, an increase of the absorption, for example of CO_2 indicates decomposition of the sample.

The spectra of the five amino acids are very similar in the investigated spectral range. Larger differences are only visible in the regions of the C-H stretch and bend vibrations around 3000 cm^{-1} and between 1200 and 1600 cm^{-1} . The absorption maxima of the main features are summarized in Table 5.4.

Tabelle 5.4: Experimental absorption frequencies (cm^{-1}) of glycine (Gly), alanine (Ala), threonine (Thr), cysteine (Cys) and methionine (Met)

Assign- ment	Gly	Ala	Thr	Cys	Met
OH _{ipb} (COOH)	1114 (0.67)	1114 (0.92)	1114 (0.78)	1118 (0.74)	1117 (0.87)
CH/NH bend			1282 (0.21)		
		1372 (0.2)	1377 (0.41)	1364 (0.28)	1369 (0.27)
					1442 (0.19)
		1590 (0.15)			
	1620 (0.13)	1627 (0.14)	1614 (0.17)	1627 (0.16)	1630 (0.21)
C=O	1787 (1.0)	1785 (1.0)	1779 (1.0)	1782 (1.0)	1777 (1.0)
CH					2860 (0.1)
	2937 (0.1)/2868 (0.05)	2924 (0.17)	2928 (0.17)	2952 (0.1)	2930 (0.31)
	2951 (0.09)	2991 (0.18)	2981 (0.19)		
OH (COOH)	3577 (0.26)/3353 (0.05)	3575 (0.31)	3570 (0.3)	3572 (0.32)	3572 (0.34)
OH			3652 (0.04)		

Intensities are given in brackets.

In all cases we observe the free O-H stretch vibration of the carboxyl group around 3580 cm^{-1} . This indicates a non-zwitterionic ("neutral") form of the amino acids in the gas phase, as expected for stationary gas-phase measurements.

At 250°C the thermal energy is comparable to the stabilization energy of a typical hydrogen bond. Our spectra show that the carboxylic OH group is free, i.e. does not form a hydrogen bond under our conditions. An additional confirmation of this finding is the O-H in-plane-bend vibration around 1110cm^{-1} (COH bend), which is typical for a non-hydrogen bonded carboxylic OH group [117]. Similarly, the absorption maxima of the C=O stretch vibrations around 1790 cm^{-1} are typical for free carboxylic C=O groups [117]. The information content of our spectra however does not exclude other H bond interactions or minor quantities of H-bonded species, see discussion of the glycine spectra in the next section.

Fig.5.9 and Fig.5.10 show that the experimental and (scaled) calculated frequencies generally agree well. For comparison with the methionine spectrum we also measured the spectrum of the protected amino acid N-acetyl-methionine methyl ester (AcMetOMe). We obtained 3449 (3481), 2962/2925 (3035-2903), 1761 (1767), 1708 (1721), 1488 (1485), 1207 (1222) cm^{-1} for the NH stretch, C-H stretches, C=O stretch of the ester group, C=O stretch of the acetyl group, NH in-plane-bend and a coupled stretch- and deformation vibration (the scaled frequencies calculated at the B3LYP/6-31G(d,p) level are in brackets). See "<http://www-public.rz.uni-duesseldorf.de/~pc1/kleinermanns/archiv/aminoacids.zip>" for visualization of the amino acid vibrations (molden format).

The simulated spectra are generally in good agreement with experiment and the main features (O-H and C=O stretch, O-H in-plane-bend) are reproduced perfectly, underlining the reasonable quality of (scaled) density functional calculations for monomeric species without significant dispersion interaction. Even the band shapes of the C-H stretch vibrations and of the C-C stretch and C-H/N-H bending vibrations between 1200 and 1600cm^{-1} are mainly reproduced. Relative absorption intensities are also in good agreement with experiment. A selection of calculated harmonic frequencies and intensities are given in Table 5.5. Table 5.5 shows that the symmetric and antisymmetric N-H stretch vibrations at around 3340 and 3410 cm^{-1} are very weak and barely visible in the simulated spectra. Indeed, we do not observe the N-H stretch vibrations in our experiment.

Tabelle 5.5: Harmonic frequencies (cm^{-1}) of glycine (Gly), alanine (Ala), threonine (Thr), cysteine (Cys) and methionine (Met) calculated at the B3LYP/6-31G(d,p) level of theory

Assign- ment	Gly	Ala	Thr	Cys	Met
OH _{ipb} (COOH)	1101 (114.9) ^a	1109 (211.8) ^a	1102 (259.4) ^a	1110 (168.5) ^{a,c}	1112 (109.06) ^{b,c}
	1135 (160.4) ^a	1144 (47.9) ^{a,b,c}	1187 (41.3) ^d	1144 (73.0) ^{a,b,c}	1124 (119.0) ^{a,b,c}
OH _{ipb}			1390 (68.1) ^c		
CH/NH bend					1428 (7.9)
			1368 (11.8)		1442 (12.0)
		1452 (7.1)	1448 (2.6)	1375 (5.1)	1447 (1.4)
	1416 (11.1)	1460 (5.0)	1459 (5.1)	1440 (4.3)	1455 (3.8)
	1626 (19.6)	1621 (21.4)	1624 (29.2)	1620 (24.4)	1619 (23.6)
C=O	1783 (257.1)	1776 (258.0)	1780 (242.9)	1778 (263.5)	1775 (256.1)
SH				2551 (27.6)	
CH stretch					2909 (5.0)
					2911 (33.6)
					2916 (18.6)
			2903 (13.5)		2937 (21.4)
		2907 (5.8)	2933 (7.1)		2957 (1.5)
		2916 (26.0)	2950 (9.2)	2924 (12.8)	2976 (29.6)
	2937 (17.4)	2986 (21.8)	2973 (39.5)	2940 (12.9)	2989 (10.2)
	2951 (9.9)	3013 (13.3)	2993 (19.4)	3005 (5.8)	3009 (7.4)
NH ₂ stretch	3341 (0.1)	3331 (0.1)	3343 (0.8)	3344 (2.1)	3327 (0.9)
	3413 (0.41)	3403 (0.4)	3414 (2.1)	3423 (3.3)	3403 (1.8)
OH (COOH)	3581 (42.1)	3578 (42.5)	3568 (57.6)	3576 (50.5)	3568 (44.3)
OH stretch			3617 (40.6)		

Intensities are given in brackets.

^a OH in-plane-bend with contribution of CN stretch.

^b OH in-plane-bend with contribution of CH₂ wagging/NH₂ twist.

^c OH in-plane-bend with contribution of CH bend.

^d OH in-plane-bend with contribution of NH₂ twist/CH bend.

5.3.4 Discussion

Glycine is probably the best investigated amino acid in the gas and condensed phase. Its vibrational spectrum has been obtained at very different experimental conditions and calculated at the highest theoretical levels. Therefore, we choose this amino acid for a more detailed discussion of our results.

The vibrational frequencies of glycine obtained at around 520 K can be compared with IR-UV double resonance spectra of peptides containing glycine obtained at a few Kelvin in a supersonic jet[83]. The OH and C=O stretch vibrations of the carboxyl group are observed at 3577/1787 cm^{-1} in the hot FTIR spectrum (Fig.5.9) and at 3583/1781, 3588(3582)/1794(1789) and 3585/1782 cm^{-1} in jet-cooled conformers of Gly-Trp, Trp-Gly and Trp-Gly-Gly with a “free” (not hydrogen bonded) COOH group [83]. The intense OH in plane bend vibration absorbs at 1100, 1106(1129) and 1106 cm^{-1} in jet spectra of these conformers [117] and at 1114 cm^{-1} in the hot FTIR-spectrum in Fig.5.9. These examples show that there is no significant temperature influence on these most intense vibrational frequencies of glycine, so our vibrational spectrum can be compared quite well with a computed “zero Kelvin” spectrum. Of course the band width of 50 cm^{-1} is essentially due to temperature dependant rotational broadening.

Our IR spectrum of glycine in the gas phase can be compared with IR spectra of neutral glycine in the solid phase. Matrix isolation spectroscopy revealed OH stretch, C=O stretch, NH_2 bend and COH bend vibrational frequencies of glycine at 3560, 1790-1800, 1622-1630 and 1100 cm^{-1} [103, 119], in good agreement with 3577, 1787, 1620 and 1114 cm^{-1} in our FTIR spectrum. Low temperature vacuum sublimation of glycine and quick deposition of a glycine film on a substrate at 9K revealed the presence of both the neutral and zwitterionic forms in the FTIR spectrum of glycine [100]. Upon temperature increase, neutral forms convert irreversibly to the zwitterionic forms [100]. The spectra show OH stretch, C=O stretch, NH_2 bend and COH bend vibrational frequencies of neutral glycine at 3365, 1715, 1643 and 1247 cm^{-1} with red/blue shifts of the stretch/bend vibrations because they are involved in hydrogen bonds in the glycine film [117]. Sodiated glycine was investigated in the gas phase by IR multiphoton dissociation of matrix assisted laser desorbed glycine in an ICR cell [101]. The neutral form was established by observation of a C=O stretch vibration at 1727 cm^{-1} and the absence of COO^- vibrations [101]. Compared to a value of 1790-1800 cm^{-1} for “free” C=O in glycine, the lower value in sodiated glycine points to substantial $\text{C=O}\cdots\text{Na}^+$ interaction as pointed out by the authors [101]. Our experimental IR spectra of gaseous glycine can be compared with *ab initio*

(MP2/DZP) correlation-corrected vibrational self-consistent field calculations which take vibrational anharmonicity into account.[120] Unscaled (!) frequencies of 3598, 2986/2959, 1805, 1669 and 1122 cm^{-1} were calculated for the OH, CH, C=O stretch and the NH_2 , COH bend vibrations of a glycine conformer with only a weak $\text{NH}_2 \cdots \text{O}=\text{C}$ interaction [120]. These values compare favourably with 3577, 2937, 1787, 1620 and 1114 cm^{-1} as obtained in our experiment.

The low-temperature near IR spectrum of glycine trapped in helium clusters exhibits bands at 3585 and 3580 cm^{-1} (OH in *syn* configuration with OH/ NH_2 in *trans* and *cis* arrangements, respectively) and 3295 cm^{-1} (OH in *anti* configuration with $\text{OH} \cdots \text{NH}_2$ H-bond) upon removal of matrix effects by extrapolation.[121] The values for OH in *syn* configuration compare favourably with 3577 cm^{-1} in our hot FTIR spectrum. The weak NH_2 antisymmetric stretch of the most stable glycine conformer (OH in *syn* and OH/ NH_2 in *trans* position) was observed at 3436 cm^{-1} (not observed here due to its low intensity)[121]. These values are in quantitative agreement with a full-dimensional anharmonic treatment of the glycine vibrations based on conformer structures and energetics calculated at the MP2/aug-cc-pVDZ level of theory.[122] Miller et al. proposed a fourth conformer at somewhat higher energies with OH in *syn* and OH/ NH_2 in *trans* position, but rotated C-N bond.[123] They predicted a CH_2 symmetric stretch at 2875 cm^{-1} which is unique for this conformer[123]. In our experiment we indeed observed some minor contributions from bands which can tentatively be assigned to different conformers, see inset of Figure 5.9. The band at 3353 cm^{-1} in the inset of the glycine spectrum might be due to the stretch vibration of OH in *anti* configuration with $\text{OH} \cdots \text{NH}_2$ H-bond while the weak shoulder at around 2868 cm^{-1} compares favourably with the CH_2 symmetric stretch of the fourth conformer calculated at 2875 cm^{-1} in Ref. [123] and 2880 cm^{-1} in Ref. [122]. Hence despite the high temperature of our experiment some contribution of hydrogen bonded conformers is discernible in our spectra.

In the future we will try to cool the evaporated hot molecules by using a cold argon flow to achieve lower rotational temperatures and better spectral resolution (collisional cooling cell [124, 125]). Also, the geometry of the cell will be matched to the IR beam profile, so that most of the evaporated molecules pass the interaction region with the IR beam. Finally we hope to be able to extend the measurements to a larger spectral range.

Acknowledgement We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (project Kl 531/27) for financial support and the reviewers for their helpful suggestions.

5.4 Prolin-Tryptophan (ProTrp)

Mid- and Near-Infrared Spectra of Conformers of H-Pro-Trp-OH

Häber T., Seefeld K. and Kleineremanns K. *J. Phys. Chem. A* **111** (2007), 3038-3046

We present near- and mid-infrared-UV double resonance spectra of the natural dipeptide H-Pro-Trp-OH. Two conformers are present in the supersonic expansion: a stretched conformer with fully extended backbone and a folded conformer with an $\text{OH}\cdots\text{OC}_{\text{pep}}$ hydrogen bond. Both conformers are stabilized by dispersion interaction between indole ring and peptide backbone and a $\text{NH}_{\text{pep}}/\text{N}_{\text{proline}}$ contact. The vibrational and conformational assignment is supported by DFT and MP2 calculations. An adequate description of the energetic order of different conformers requires the explicit inclusion of dispersion and geometry optimization at the MP2 level. We will address the very sensitivity of the observed conformations to the structure of the end groups.

5.4.1 Introduction

The formation of secondary structures is the first step in the folding process of proteins and depends on numerous factors such as intra- and intermolecular hydrogen bonds (among residues and with the solvent), van der Waals and electrostatic interactions, as well as entropic effects.[126, 127] Gas-phase studies of small biomolecules provide a unique way to investigate the intrinsic molecular properties of these biomolecular building blocks without the influence of solvents or under size-controlled conditions by adding a definite number of water molecules, summarized in a number of recent reviews.[128, 129, 130, 131, 132] Such studies provide useful information about the interactions responsible for the different kinds of structural motifs like β -sheets, α -helices and tight turns. In this field, UV/UV and IR/UV double resonance methods[130] are of special importance, because of the unprecedented mass and conformational selectivity, combined with sufficiently high spectral resolution to allow for a direct comparison with high level ab initio calculations.[133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142] After the pioneering work of Levy and co-workers on tryptophane,[143, 144, 145] a number of papers concerning amino acids,[107, 146, 106, 147, 148, 109, 149] natural and capped (model) di- and tripeptides,[134, 135, 150, 151, 117, 83, 152, 153, 154, 155, 156, 157] and

β -sheet models[158, 159, 160, 161, 162, 163] were published.

However, when studying model peptides, one always has to consider end group effects, whether in natural or capped peptides, because end groups can impose specific local conformations in small model peptides other than that observed in a natural peptide chain, i.e., when the end groups themselves are part of the hydrogen bonds and not simple spectators. The existence of a strong sequence dependence on the local conformations of phenylalanine and tryptophane containing dipeptides demonstrate such effects nicely.[132, 117, 83, 152, 153] Therefore, it is not trivial to study the real intrinsic folding properties of the peptide backbone by investigating model systems. In fact we observe first the intrinsic properties of the isolated model system in the gas-phase. The sum of all studies on different types of model systems will then give us a very good picture of the involved kinds of interactions, the driving forces and provide stringent tests for theory. Only that combination might enable us to better understand the folding properties of proteins. It should be noted that the hydrogen bonded conformer is not necessarily the dominant species found in supersonic expansions, in spite of the flexibility of the carboxylic OH group in natural (uncapped) peptides and the strength of an $\text{OH} \cdots \text{OC}_{\text{pep}}$ hydrogen bond.[133, 117, 83]

In this work we present the IR/UV spectra of the dipeptide H-Pro-Trp-OH (from now on labeled ProTrp). Proline is the only amino acid with a secondary amino group found in proteins. The relatively rigid, five-membered pyrrolidine ring puts a rigid constraint on the N-CR bond rotation and restricts the value of ϕ in proteins to about -60 to -75° . [127, 164] Since the proline residue in proteins has no amide hydrogen, it cannot act as a hydrogen bond donor, but the peptide bond preceding the proline residue can adopt the cis configuration more easily. Proline is commonly found in β turns, as the first residue of α helices and in hydroxy polyproline helices, which is the major secondary structure in collagen. ProTrp is the first of a series of natural proline containing peptides that we will study in our lab to address the specific role of proline in proteins.

Figure 5.11 depicts the structure of H-Pro-Trp-OH and the dihedral angles used to characterize the different conformers, ϕ , ψ , ω , and χ . The nomenclature of the dihedral angles follows the proposal of Edsall et al.[165] ϕ and ψ are measured along the peptide backbone. The fully extended backbone corresponds to $\phi = \psi = 180^\circ$ [127] $\chi_{1,2}$ is the first dihedral angle of the indole side chain and defined as $\text{NC}_\alpha\text{C}_\beta\text{C}_\gamma$. The amino acid residues are counted starting from the nitrogen end.

The remaining paper is organized as follows: First, a brief description of the experimental setup with an emphasis on the mid-infrared laser source and on improvements of

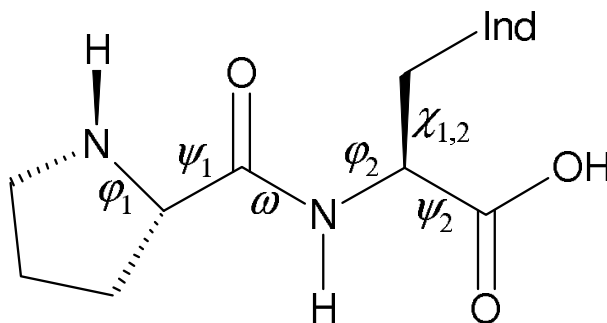


Abbildung 5.11: Structure of H-Pro-Trp-OH and angles used to describe the different conformers..

the signal-to-noise ratio in our laser desorption measurements is given. Afterward we will present the experimental results and provide a tentative assignment of the vibrational bands, based on the comparison with previous studies. In the next section we will present the results of DFT calculations and ab initio calculations at the MP2 level of theory. We will mainly focus on structural principles and on how structural changes influence spectral fingerprints. Finally, we will discuss the results in the light of our previous measurements of tryptophane containing di- and tripeptides[117, 152] and other proline containing model peptides.[151, 152]

5.4.2 Experiment

The basic principles of our IR-UV experimental setup were described in detail elsewhere.[83, 161, 166, 20] Here we will give a brief summary of the major components and focus on new aspects like the mid-infrared measurements and the use of a reference signal to improve the signal-to-noise ratio of our measurements. Solid samples of ProTrp are vaporized into an argon jet by laser desorption and investigated by IR-UV hole burning spectroscopy. ProTrp (Bachem) is mixed with graphite powder (Aldrich) in a $\approx 1:2$ ratio and applied to the edge of a 2 mm thick graphite wheel (diameter 60 mm), which is placed underneath the orifice of a 300 μm pulsed valve (General Valve). A slow rotation of the graphite wheel (1 turn per 45 min) constantly provides fresh material to be exposed to the desorption laser (Minilite, Spectra Physics, 1064 nm, $\approx 5 \text{ mJ/cm}^2$). Argon is used as carrier gas, at a stagnation pressure of 3 bar.

The skimmed molecular beam (skimmer diameter 1 mm) crosses the UV ionization laser (LAS, frequency doubled, attenuated to $< 0.1 \text{ mJ/pulse}$) at right angle inside the ion extraction region of a linear time-of-flight (TOF) mass spectrometer in Wiley-McLaren

configuration (Figure 5.12).

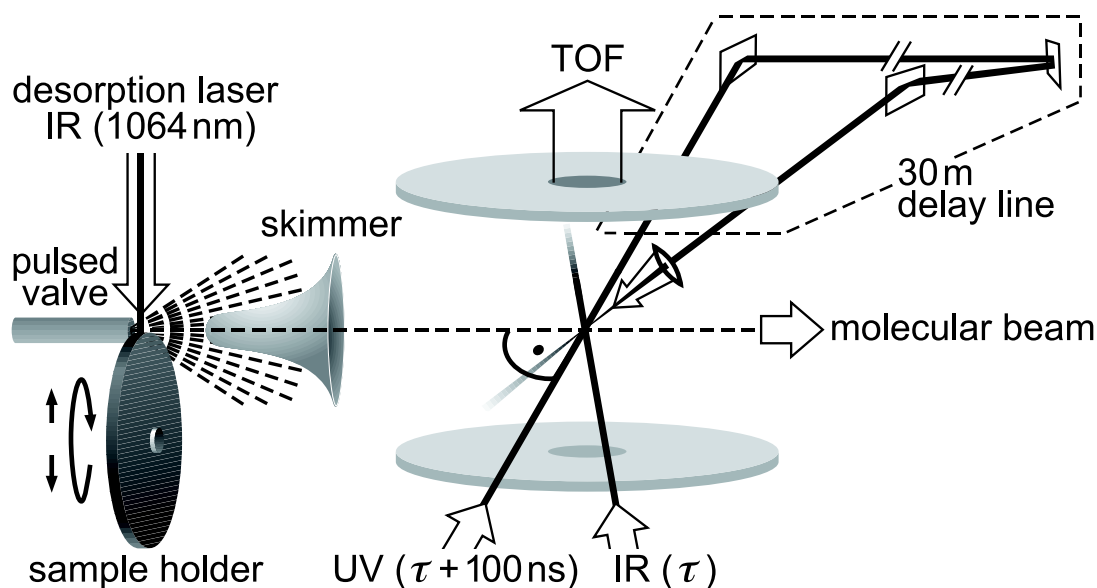


Abbildung 5.12: Experimental setup, showing the laser desorption and ionization region. The UV analysis laser travels more than 30 meters after crossing the molecular beam, then it is redirected and focused into the ionization region again to generate a reference signal of ions used to normalize the hole-burning signal.

A pulsed IR laser beam (burn laser) is aligned collinear to the UV beam (probe laser) and fired 100 ns before the latter. The burn laser (IR) frequency is scanned over the vibrational transitions, while the ionization laser (UV probe laser) is kept at a frequency resonant with an electronic transition of a single conformer (resonance enhanced 2-photon ionization, R2PI). Each time the burn laser excites a vibrational transition of the conformer, which is in resonance with the UV laser, the ground states get depleted, accompanied by a decrease of the corresponding mass signal, since the ionization of a vibrationally excited-state is no longer resonance enhanced at the given UV frequency. By monitoring the ion mass signal as a function of IR frequency, mass and conformer selective infrared spectra can be obtained.

IR laser light is generated by a setup originally developed by Gerhards and co-workers[20] and involves a three-stage difference frequency generation (DFG)/optical parametric amplification (OPA) setup in order to generate infrared radiation between 5 and 8 μm . Basically, a dye laser (Precision Scan, Sirah), with Styryl 8 or 9 in methanol or DMSO, is pumped by the 532 nm output of a frequency doubled Nd:YAG laser (GCR 230Pro, Spectra Physics). The dye laser output is mixed with a part of the fundamental (1064

nm) of the same Nd:YAG laser in a LiNbO₃ crystal for difference frequency generation, producing infrared radiation around 2.6 μm . After separating the infrared beam from the dye and Nd:YAG fundamentals by dichroic mirrors, the IR beam is mixed with the Nd:YAG fundamental in a second LiNbO₃ crystal, utilizing an OPA process to generate signal and idler beams at about 2.6 and 1.8 μm , respectively. Pulse energies of up to 8 mJ (idler) at a resolution of $\approx 0.5 \text{ cm}^{-1}$ can be achieved with our setup. After proper rotation of the polarizations, IR radiation between 5 and 8 μm is produced in the third stage by difference frequency mixing idler and signal beams of the OPA stage in an antireflection coated AgGaSe₂ crystal. Energies of up to 300 μJ @ 1800 cm^{-1} can be obtained with a total incident energy of 10 mJ (signal + idler of the OPA stage) on the AgGaSe₂ crystal, which is sufficient for the measurement of IR/UV hole burning spectra. Because the generated mid-infrared beam is quite diverging, it has to be focused into the ion extraction region by a 60 cm focal length lens.

The ro-vibrational transitions of the water bending (1595 cm^{-1}) and stretching vibrations (3657 and 3756 cm^{-1}) were used for frequency calibration. Up to now, our IR laser system is operated unpurged, therefore absorption bands of the water stretching vibrations are visible in the mid-infrared region as well, because of atmospheric water absorptions in the first DFG and OPA stage. A disadvantage of the unpurged operation is the strong atmospheric absorption along the path length of the mid-infrared beam between laser source and apparatus (about 1.5 m), resulting in a decrease of the mid-infrared pulse energy to less than 50 μJ at certain frequencies. Nonetheless, IR spectra of laser-desorbed molecules and good signal-to-noise ratio can be obtained even with an unpurged system. The problem of atmospheric water absorptions will be discussed later and a purging system will be installed shortly. We did not normalize the infrared spectra to the IR laser energy. A major source of noise in laser desorption experiments are shot-to-shot fluctuations of the number of desorbed molecules. These might be caused by an inhomogeneous coating of the graphite wheel, pulse-to-pulse fluctuations of the desorption laser energy, or an inhomogeneous heating of the graphite wheel and graphite/substrate mixture at different positions on the wheel. Intensity noise due to shot-to-shot fluctuations can largely be compensated by creating a reference signal: We redirect and focus the same UV laser pulse, we used to ionize the molecules into the sample region again. After passing a 30 m delay line, it causes a second ion signal to appear $\approx 100 \text{ ns}$ after the first. Because the redirected beam is focused, its interaction volume with the IR beam is small and the corresponding ion signal reflects mostly nonresonant ionization; hence, it shows only a small IR dip, if at all. The reference signal is scaled then to match the baseline of the

first ion signal and subtracted from the latter. Since both ion signals originate from the very same laser pulse and sample the same gas pulse, common noise due to energy and number density fluctuations are mostly eliminated in the resulting signal. An increase of the signal-to-noise ratio by a factor of ≈ 4 could be obtained.

5.4.3 Results

Previously, we published R2PI spectra of ProTrp in the wavenumber range between 34650 and 35100 cm^{-1} .^[155] In that frequency range, UV-UV hole-burning spectra revealed the existence of two conformers, A and B. (From now on we will use capital letters A and B for the experimentally determined conformers.) Their apparent electronic origins had a spacing of about 160 cm^{-1} . In the same frequency range, the R2PI spectra of the ProTrp conformers closely resemble the corresponding spectra of GlyTrp,^[83, 155] except for a smaller spacing in the rovibronic progression of conformer A, so one might expect similar IR spectra and structures as well.

Figure 5.13 shows the IR-UV hole burning spectra of both conformers of ProTrp in the near and mid-infrared region, with the UV probe laser tuned to 34719 and 34861 cm^{-1} for conformer A and B, respectively. UV frequencies were calibrated against R2PI spectra of aniline and compared to literature values.^[167] From earlier measurements of the GlyTrp, TrpGly, and TrpGlyGly systems^[117, 83] we expect six IR bands with sufficient intensity for detection: three bands between 3200 and 3600 cm^{-1} and another three between 1500 and 1800 cm^{-1} . Namely, they are the O-H stretch vibration of the carboxyl group of the tryptophane residue (OH), the N-H stretch vibration of the indole group (NH_{ind}), the N-H stretch vibration of the peptide bond (NH_{pep}), the C=O stretch vibrations of the carboxyl group ($\text{CO}(\text{OH})$) and peptide bond (CO_{pep}), and the N-H in-plane-bend vibration of the peptide bond (NH_{ipb}). We did not observe the N-H stretch vibration of the pyrrolidine ring, which has a low calculated infrared absorption intensity (see calculations).

Table 5.6 summarizes the observed absorption maxima and tentative assignments.

When looking at the infrared spectra in Figure 5.13 one first notices that the CO_{pep} band of conformer A seems to be very weak, if visible at all (dashed line). We might assign the reproducible structure around 1648 cm^{-1} to the CO_{pep} band, but the difference between IR-UV and reference signal is quite small and within the noise limits of our measurements. At that wavenumber, we observe strong atmospheric absorptions of the mid-IR beam due to the water bending vibration in air (see experimental section) and the IR pulse energy drops down to $\approx 50 \mu\text{J}$. The lack of sufficient energy might be the

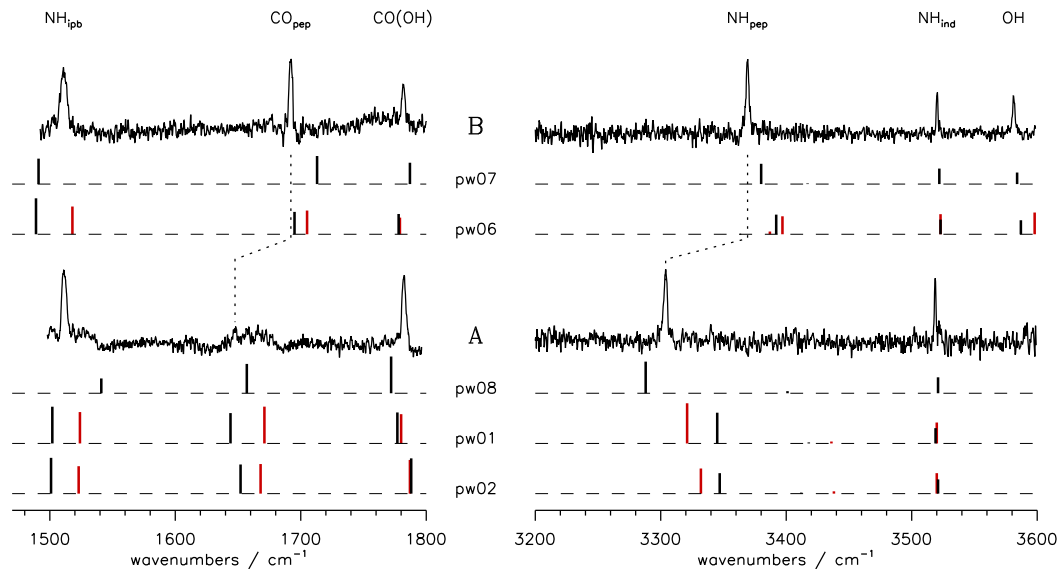


Abbildung 5.13: IR/UV double resonance spectra of both conformers of Pro-Trp(A and B[155]) in the mid (left) and near-infrared (right). Assignments are indicated by the labels on top and dotted lines. See text for more details. Laser pulse energies ranged between 50-300 μJ and 1-2 mJ in the mid and near-infrared, respectively, with an UV analysis laser pulse of about 10-20 μJ . Also shown are the calculated and scaled stick spectra of selected calculated conformers at the DFT (black) and MP2 (red) level of theory, ordered in groups according to an increasing MP2 energy (from bottom to top) for each experimental conformer.

Tabelle 5.6: Experimentally Determined IR Band Maxima (in cm^{-1}) of the Two Conformers of ProTrp

vibration	conformer A	conformer B
OH	3582	
NH_{ind}	3519	3520
NH_{pep}	3304	3369
$\text{CO}(\text{OH})$	1782	1782
CO_{pep}	(1648) ^a	1692
NH_{ipb}	1511	1511

^a The CO_{pep} band of conformer A was obscured by a strong water absorption, reducing the IR pulse energy at that frequency to about 50 μJ (see text for details).

main reason for the weakness of the CO_{pep} band of conformer A. All other bands have

frequencies next to or in between water absorptions. Currently we are preparing a purging system to remove the gaseous water from the beam path. However, we cannot rule out intrinsic effects (e.g., a special conformation of the molecule) as a source for the weakness of the band. We tried to normalize the mid-infrared spectra to the IR laser energy in order to compensate in part for water absorptions, but the signal-to-noise ratio around 1648 cm^{-1} is too low to be improved by the normalization.

The spectral assignment, as indicated in Figure 5.13 and Table 5.6, is based mainly on the comparison with infrared spectra of GlyTrp and TrpGly.[117, 83] Conformer A shows no OH band around 3585 cm^{-1} , indicating that the OH group is bound via a hydrogen bond to the backbone. If the assignment of the CO_{pep} band is correct, this would match to the red shift of the CO_{pep} frequency relative to conformer B, and the OH group is most likely bound to the CO_{pep} group. According to calculations (Table 5.6 and refs [133] and [83]), the absorption of such a hydrogenbonded OH group is shifted below 3200 cm^{-1} . However, the hydrogen-bonded OH group has never been observed experimentally, [83] probably due to a broadening of the absorption of hydrogen-bonded OH groups.[168] We did not observe any other band between 3200 and 3700 cm^{-1} .

Surprisingly, the NH_{pep} band is red-shifted as well: to near 3300 cm^{-1} . From previous studies[132, 83, 152, 169] one would expect such a large shift only for *strongly* hydrogen-bonded NH groups of the peptide bond or indole side chain; like in single or multiple (repeated) γ -turns. Since the NH_{ind} band of ProTrp is observed at its normal, unbound position (around 3520 cm^{-1}), the band at 3304 cm^{-1} has to be the NH_{pep} band (the intensity of the $\text{NH}_{\text{proline}}$ band being too weak for observation; see next section). However, ProTrp is too small to have a back-folding backbone and does not permit a $\text{NH}_{\text{pep}} \cdots \text{X}$ hydrogen bond. Therefore, we can rule out hydrogen bond formation to be responsible for the large red shift NH_{pep} band. We did not observe any dimer mass signals, so fragmentation of dimers is an unlikely source for the NH_{pep} band. From that could result the observation of a hydrogen-bonded NH_{pep} band of the dimer on the parent mass channel. Conformer B resembles the spectrum of a stretched or fully extended backbone. The OH band at 3582 cm^{-1} corresponds to a non-hydrogen-bonded OH group, like in all three conformers of TrpGly and conformer B of GlyTrp. Likewise, the CO_{pep} band at 1692 cm^{-1} shows no significant red-shift, so it is not involved in a hydrogen bond. All other bands (NH_{ind} , $\text{CO}(\text{OH})$, and NH_{ipb}) are rather insensitive to changes in the conformational structure and resemble those of previous measurements.[117, 83]

5.4.4 Calculations

Our theoretical approach is intended to explore the properties of different conformers and the influence of structural changes on the spectral fingerprint. Their structures were chosen by chemical intuition, by a combinatorial approach, and by taking into account the forbidden regions of the Ramachandran plot.[165, 170] Such an approach will give us an overview of the types of interactions involved and provides a tool to classify the type of interaction by the vibrational frequencies of the NH_{pep} , CO_{pep} and OH vibrations. All calculations were performed using the Turbomole program package.[86, 89, 116] In order to maintain compatibility of the data with our previous calculations on tryptophane containing di- and tripeptides[117, 83] we used the b3-lyp_Gaussian functional and the 6-31G(d,p) basis set obtained from ref 55. Benchmark calculations on selected systems showed only marginal differences between the results obtained from either the Turbomole or Gaussian[171] program package, so we can use the same and well investigated scaling factors for the calculated harmonic frequencies of tryptophane containing oligopeptides as in our previous work.[117, 83]

A total number of 21 different conformers of ProTrp were calculated at the B3LYP/6-31G(d,p) level of theory. Table 5.7 summarizes the main structural properties as well as the calculated energies ΔE_0 (including zero-point correction) relative to the most stable conformer (pw01) at that level of theory. Some conformers with different starting geometries collapsed to one of these 21 structures and are not listed in Table 5.7.

ϕ , ψ and χ are the usual dihedral angles used to describe the conformational landscape of polypeptides[127, 165, 170] and are depicted in Figure 5.11. Since the residues are counted from the nitrogen (NH_2) end, subscripts 1 and 2 refer to the proline (Pro) and tryptophane (Trp) subunits, respectively. α is the dihedral angle of the OH group of the carboxyl group measured relative to the C=O bond. As usual, the peptide bond was kept in trans conformation ($\omega = 180^\circ$) in the starting geometries and did not change much upon geometry optimization. Figure 5.14 depicts the molecular structures of the 12 most stable conformers of ProTrp.

The conformers are labeled in the one letter code (pw) and consecutively numbered with respect to an ascending DFT energy. Three letters in square brackets are used to indicate the specific conformation. The first letter describes the local conformation of the proline residue (see below). For the local conformation of the tryptophane residue we adopted the nomenclature according to its position in the Ramachandran plot (e.g., γ_L ,

Tabelle 5.7: Dihedral Angles (in deg) and Relative Energies (in kJ mol⁻¹) of the Calculated Structures [B3LYP/6-31G(d,p)] of ProTrp

conformer	ϕ_1^a	ψ_1^a	ϕ_2^a	ψ_2^a	$\chi_{1,2}^a$	α^b	ΔE_0^c
pw01[n γ_L g+]	-110.5	-4.3	-72.8	56.0	49.1	-178.1	0.0
pw02[n γ_L g-]	-113.5	0.1	-73.8	58.4	-54.3	177.7	4.8
pw03[n γ_D g-]	-137.4	12.1	67.4	-53.4	-57.5	-179.1	13.5
pw04[n γ_L a]	-113.8	1.2	-75.9	67.4	-154.7	171.5	14.4
pw05[o γ_L g+]	15.8	152.8	-74.4	57.4	47.7	-178.0	14.7
pw06[n β_L g+]	-139.3	14.3	-162.6	177.7	60.9	0.8	15.2
pw07[n ϵ_L g+]	-111.0	-2.1	-99.2	179.2	63.7	1.3	17.0
pw08[n γ_D g+]	-101.2	-10.8	42.4	-28.5	55.0	177.9	17.6
pw09[n β_L a]	-143.6	19.5	-157.9	143.9	-177.9	-4.2	18.4
pw10[n γ_D a]	-111.7	-1.2	66.6	-59.7	-169.7	-172.1	20.1
pw11[o β_L g+]	13.3	159.8	-162.0	175.5	61.8	0.2	20.9
pw12[o γ_L g-]	8.8	159.0	-75.1	61.3	-51.2	176.8	21.4
pw13[n ϵ_L g-]	-142.7	14.8	-111.5	164.1	-66.1	-0.2	22.6
pw14[o β_L a]	12.4	158.7	-158.6	148.8	-178.1	-4.6	25.2
pw15[o β_L g-]	-19.9	156.4	-126.7	165.4	-66.2	-0.6	27.9
pw16[x γ_L g-]	-143.3	93.9	-74.8	59.3	-51.9	177.1	29.7
pw17[o γ_L a]	19.4	150.2	-76.9	69.2	-154.6	172.1	31.4
pw18[x β_L g+]	-43.1	-11.3	-159.4	179.9	60.6	0.9	33.2
pw19[x β_L a]	-44.8	-7.8	-158.8	149.0	-178.1	-4.5	35.1
pw20[x β_L g-]	-44.8	-16.7	-120.5	167.1	-67.0	-0.2	39.6
pw21[n δ_L a]	-114.5	11.5	-144.6	37.7	-145.6	174.5	40.0

^a For the definition of dihedral angles see text and Figure 5.11.

^b Conformation of the carboxyl group (syn, $\alpha \approx 0^\circ$; anti, $\alpha \approx 180^\circ$).

^c Including zero-point vibrational energy

γ_D , β_L , δ_L , ϵ_L). Finally, the third letter indicates the position of the indole side chain: anti (a, $\chi_{1,2} \approx 180^\circ$), gauche plus (g+, $\approx +60^\circ$), and gauche minus (g-, $\approx -60^\circ$). $\chi_{2,2}$ is almost always (90° in proteins[172] and was kept at -90° in this study).

In a *real* peptide, where the proline residue is preceded by another amino acid, steric effects limit the values of ϕ_1 to about -60 to -75° . [127, 170] Such rigid constraints are not valid for ProTrp, because it has only a small secondary NH group. In addition, an inversion of the proline nitrogen has to be considered as well. Starting from a large set of different ϕ and ψ values, almost all conformers collapsed into two different local conformations of the proline residue. One has a close $\text{NH}_{\text{pep}}/\text{N}_{\text{proline}}$ contact with a $\text{H}\cdots\text{N}$ distance of ≈ 2.10 - 2.20 Å, in which the NH_{pep} group is interacting with

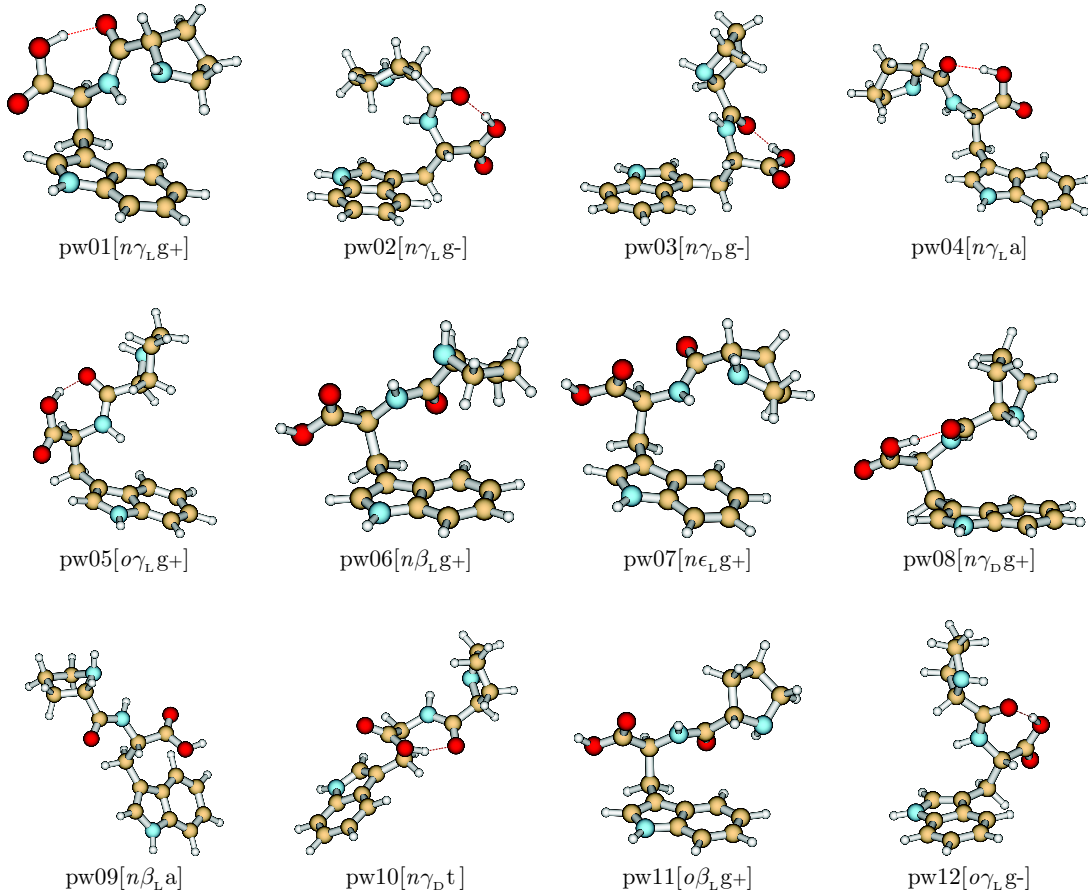


Abbildung 5.14: Structures of the 12 most stable conformers [B3LYP/6-31G(d,p)] of ProTrp (see Table 5.7). At that level of theory, pw01 is the lowest energy conformer and exhibits an $\text{OH} \cdots \text{OC}_{\text{pep}}$ hydrogen bond as well as a $\text{NH}_{\text{pep}}/\text{N}_{\text{proline}}$ interaction. Upon explicit inclusion of dispersion interaction [MP2/TZVPP] the energetic order changes and pw02 becomes the most stable conformer (see Figure 5.15).

the lone pair of the proline nitrogen (e.g., pw01, pw02, pw06, and pw07 in Figure 5.14). In this set of conformers the proline residue has ϕ_1 and ψ_1 values of $\approx -120^\circ$ and 0° , respectively. The second major type of conformations is characterized by a $\text{CO}_{\text{pep}}/\text{NH}_{\text{proline}}$ interaction (also known as C_5 contact) and an $\text{O} \cdots \text{H}$ distance of $\approx 2.15\text{--}2.25 \text{ \AA}$ (e.g., pw05, pw11 and pw12). Here the CO_{pep} and $\text{NH}_{\text{proline}}$ bonds are nearly collinear ($\phi_1 \approx 0^\circ$, $\phi_1 \approx -155^\circ$). Because the local conformations of the proline residue obtained from our calculations are different from those found in *real* peptides, we label the conformations according to the type of interaction. That is, conformers with $\text{NH}_{\text{pep}}/\text{N}_{\text{proline}}$ and $\text{CO}_{\text{pep}}/\text{NH}_{\text{proline}}$ interactions are labeled *n* and *o*,

respectively (see Table 5.7). Those with neither kind of interaction are generally labeled x .

According to Table 5.7, three of the four most stable structures in our calculations differ only in the position of the indole side chain. They are characterized by a strong $\text{OH}\cdots\text{OC}_{\text{pep}}$ hydrogen bond and $\text{NH}_{\text{pep}}/\text{N}_{\text{proline}}$ contact. In the most stable structures (pw01 and pw02) the indole ring is underneath the backbone, while the anti conformation is the least stable (pw04). Analogous results are obtained for other sets of conformers, which also differ only in the position of the indole side chain (e.g., pw05/ 12/17 and pw11/14/15). Generally g+ conformers are the most stable structures, while anti (a) conformers tend to be the least stable or to have similar energies as g conformers. This implies a significant interaction between indole ring and peptide backbone, although the B3LYP method does not satisfactorily account for dispersion interactions, which are necessary for an adequate description of π interactions (see below).

For otherwise similar conformations, $\text{NH}_{\text{pep}}/\text{N}_{\text{proline}}$ interactions are energetically favored over $\text{CO}_{\text{pep}}/\text{NH}_{\text{proline}}$ contacts by $\approx 15 \text{ kJmol}^{-1}$. For example, pw01[n γ LG+] is more stable than pw05[o γ LG+]. Other examples are pw03/pw11 and pw04/pw17. Likewise, $\text{NH}_{\text{pep}}/\text{N}_{\text{proline}}$ and $\text{CO}_{\text{pep}}/\text{NH}_{\text{proline}}$ interactions are favored over conformations with no such interaction at all (pw18, pw19, pw20). Over all, the proline residue in ProTrp tends to adopt a local conformation with a $\text{NH}_{\text{pep}}/\text{N}_{\text{proline}}$ contact present.

We performed single point calculations and geometry optimizations for the 11 most stable conformers of Table 5.7 at the RI-MP2/TZVPP level of theory, to get an idea of the importance of dispersion interactions between indole ring and peptide backbone in ProTrp. Figure 5.15 summarizes the relative energies of the B3LYP/6-31G(d,p) calculations (DFT, left), MP2 single point calculations at the optimized DFT geometries (MP2(SP), middle) and the MP2 geometry optimizations (MP2(Opt), right). For an easier comparison, we arbitrarily chose the energies of the pw04 conformer to be equal in all three types of calculations, because the indole side chain points away from the backbone and dispersion between indole ring and backbone plays a minor role in this conformer.

Figure 5.15 illustrates perfectly that an explicit inclusion of dispersion at the MP2 level does change the energetic order of the conformers dramatically and that single point calculations at the optimized DFT geometries are not sufficient for an adequate description of the energetic order and relative energies.

Now, pw02 is the most stable conformer. The distance between the five-membered pyrrolidine ring and the indole ring decreases by about 1 Å compared to the DFT calculations, while it is increasing by less than 0.1 Å for conformer pw01, which is now

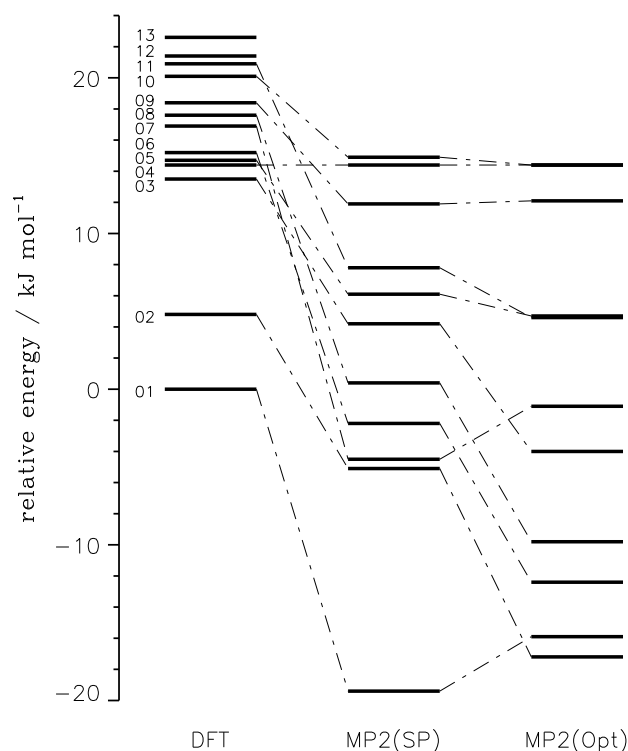


Abbildung 5.15: Relative energies of the ProTrp conformers at different levels of theory. The corresponding structures are indicated by their numbers (see Table 5.7 and Figure 5.14). DFT: Fully relaxed structures at B3LYP/6-31G(d,p). MP2(SP): Single point calculation at MP2/TZVPP, using the optimized DFT geometries. MP2(Opt): Relative energies of the optimized structures at MP2/TZVPP. (DFT energies include zero-point correction.)

the second most stable structure. Both conformers are now much closer in energy and stabilized by dispersion between indole ring and peptide backbone. On the other hand, conformer pw04 is now among the least stable structures, because its geometry (anti conformation of the indole side chain) prohibits such a stabilizing dispersion interaction. In general, the structural changes between DFT and MP2 optimized geometries are rather small, except for a slight contraction of the indole ring/backbone distance in cases where dispersion plays a significant role. It is interesting to note that conformer pw06, which has no stabilizing $\text{OH} \cdots \text{OC}_{\text{pep}}$ hydrogen bond, but a peptide backbone which is lying on top of the indole ring, is now one of the most stable structures and energetically comparable to pw01 and pw02. Although MP2 tends to overestimate dispersion, this

indicates the importance of dispersion in calculating energies and structures of different conformers of model peptides.[133] Furthermore, stabilization by dispersion is probably the reason why fully extended (stretched) conformers can be observed in supersonic jets, despite the strong tendency of most model peptides to form hydrogen-bonded ζ -turns. This was nicely demonstrated for the H-Trp-Gly-OH system just recently,[133] where only stretched conformers were found experimentally.[117, 83]

Table 5.8 shows the calculated vibrational transition frequencies and infrared intensities of the different ProTrp conformers at the B3LYP/6-31G(d,p) level of theory. Vibrational frequencies are expressed as frequency shifts relative to the pw11 conformer, a stretched conformer with fully extended backbone (ψ_1 and ψ_2 are close to 180°). This way, one can easily identify those vibrations, which are more or less sensitive or insensitive to structural changes. Since conformer pw11 is fully extended, strong hydrogen-bond-like interactions in the different conformers will result in negative values of the frequency shifts (red shift). NH/OH stretch frequencies were scaled by a factor of 0.9546[83] and C=O stretch and N-H in-plane-bend frequencies by 0.964,[117] which are the empirical scaling factors required for the most prominent tryptophane monomer[107] to match the experimental to the calculated indole N-H and carboxylic C=O stretching frequencies.

Tabelle 5.8: Vibrational Frequency Shifts (in cm^{-1}), Relative to Conformer pw11, of the Calculated Structures [B3LYP/6-31G(d,p)] of ProTrp^a

conformer	NH _{ipb}	CO _{pep}	CO(OH)	NH _{proline}	NH _{pep}	NH _{ind}	OH
pw01[n γ _L g+]	2 ₍₃₅₁₎	-46 ₍₂₉₀₎	3 ₍₂₉₆₎	93 ₍₅₎	-110 ₍₁₄₇₎	-4 ₍₇₃₎	-523 ₍₇₀₃₎
pw02[n γ _L g-]	2 ₍₃₄₂₎	-38 ₍₂₇₉₎	15 ₍₃₃₇₎	88 ₍₅₎	-107 ₍₉₈₎	-2 ₍₆₈₎	-522 ₍₇₈₂₎
pw03[n γ _D g-]	23 ₍₂₉₆₎	-38 ₍₂₂₉₎	16 ₍₃₃₂₎	51 ₍₆₎	-86 ₍₁₂₆₎	-1 ₍₆₇₎	-495 ₍₆₉₄₎
pw04[n γ _L a]	1 ₍₃₆₁₎	-37 ₍₂₃₄₎	17 ₍₃₁₁₎	86 ₍₄₎	-87 ₍₁₃₆₎	-1 ₍₆₇₎	-414 ₍₆₄₂₎
pw05[o γ _L g+]	4 ₍₃₄₂₎	-46 ₍₁₉₁₎	9 ₍₂₈₉₎	18 ₍₁₈₎	-30 ₍₁₆₅₎	-4 ₍₇₅₎	-425 ₍₅₉₀₎
pw06[n β _L g+]	-10 ₍₃₄₄₎	5 ₍₂₁₄₎	4 ₍₁₉₄₎	39 ₍₀₎	-63 ₍₉₄₎	0 ₍₇₀₎	0 ₍₆₇₎
pw07[n ϵ _L g+]	-8 ₍₂₄₃₎	24 ₍₂₆₈₎	13 ₍₂₀₄₎	92 ₍₃₎	-75 ₍₉₇₎	-1 ₍₇₄₎	-3 ₍₅₅₎
pw08[n γ _D g+]	42 ₍₁₄₁₎	-32 ₍₂₈₀₎	-2 ₍₃₅₁₎	76 ₍₁₀₎	-167 ₍₁₅₁₎	-2 ₍₇₆₎	-815 ₍₁₂₆₈₎
pw09[n β _L a]	-13 ₍₄₀₅₎	11 ₍₂₃₄₎	-8 ₍₁₇₄₎	37 ₍₀₎	-56 ₍₉₉₎	0 ₍₇₃₎	-10 ₍₄₆₎
pw10[n γ _D a]	17 ₍₃₁₃₎	-37 ₍₁₈₃₎	22 ₍₂₈₄₎	84 ₍₃₎	-106 ₍₁₉₈₎	1 ₍₇₂₎	-500 ₍₇₇₃₎
pw11[o β _L g+]	0 ₍₂₄₀₎	0 ₍₁₇₂₎	0 ₍₁₉₆₎	0 ₍₃₀₎	0 ₍₅₈₎	0 ₍₇₁₎	0 ₍₇₀₎
pw12[o γ _L g-]	-4 ₍₃₁₃₎	-38 ₍₁₇₃₎	19 ₍₃₂₄₎	28 ₍₂₁₎	-34 ₍₉₈₎	-2 ₍₇₆₎	-429 ₍₆₈₁₎
pw13[n ϵ _L g-]	-7 ₍₃₃₄₎	28 ₍₂₀₁₎	7 ₍₂₅₈₎	36 ₍₀₎	-48 ₍₉₁₎	1 ₍₆₅₎	-4 ₍₅₇₎
pw14[o β _L a]	-6 ₍₂₈₉₎	6 ₍₁₈₃₎	-12 ₍₁₉₆₎	5 ₍₃₄₎	-5 ₍₅₃₎	-1 ₍₇₄₎	-8 ₍₅₂₎
pw15[o β _L g-]	-2 ₍₂₂₂₎	24 ₍₁₆₂₎	-5 ₍₂₅₀₎	1 ₍₃₂₎	-10 ₍₄₄₎	-1 ₍₇₀₎	-7 ₍₆₆₎
pw16[x γ _L g-]	-3 ₍₃₄₈₎	-31 ₍₁₈₉₎	15 ₍₃₄₆₎	35 ₍₀₎	-41 ₍₁₁₃₎	-1 ₍₇₃₎	-502 ₍₈₄₆₎
pw17[o γ _L a]	-3 ₍₃₁₆₎	-38 ₍₁₄₆₎	20 ₍₂₉₈₎	13 ₍₁₈₎	11 ₍₃₃₎	-1 ₍₇₁₎	-324 ₍₅₁₇₎
pw18[x β _L g+]	-16 ₍₂₅₂₎	2 ₍₁₉₂₎	-6 ₍₁₉₅₎	120 ₍₂₎	4 ₍₄₆₎	-1 ₍₇₀₎	-1 ₍₇₂₎
pw19[x β _L a]	-22 ₍₂₈₇₎	6 ₍₂₀₉₎	-14 ₍₁₈₈₎	121 ₍₁₎	12 ₍₃₈₎	0 ₍₇₅₎	-8 ₍₅₁₎
pw20[x β _L g-]	-19 ₍₂₁₃₎	28 ₍₁₈₆₎	-7 ₍₂₄₆₎	122 ₍₄₎	3 ₍₃₆₎	1 ₍₆₇₎	-5 ₍₆₅₎
pw21[n δ _L a]	-42 ₍₃₇₅₎	30 ₍₁₇₇₎	35 ₍₂₅₁₎	83 ₍₄₎	-118 ₍₁₅₅₎	0 ₍₆₅₎	-37 ₍₉₈₎

^a Calculated infrared intensities (km/mol) are given as subscripts in parentheses. NH/OH stretch frequencies were scaled by 0.9546, before calculating the frequency shifts. All other frequencies were scaled by 0.964. Scaled vibrational transition frequencies (in cm^{-1}) for conformer pw11: NH_{ipb}, 1499; CO_{pep}, 1690; CO(OH), 1774; NH_{proline}, 3325; NH_{pep}, 3455; NH_{ind}, 3523; OH, 3586.

Table 5.8 shows that the NH_{ind} and NH_{ipb} vibrations are the least sensitive with regard to structure determination. While NH_{ind} does not shift at all, NH_{ipb} shows larger shifts only for the four least stable conformers. Similarly, the carboxylic $\text{C}=\text{O}$ stretch vibration is largely insensitive to structural changes, although local β_L conformations of the tryptophane residue mostly result in negative shifts, whereas $\text{OH}\cdots\text{OC}_{pep}$ hydrogen bonds induce a slight blue shift. However, no strong correlation between conformational structure and vibrational frequency is observable for that band. In contrast, the CO_{pep} vibration exhibits a systematic (and obvious) red-shift of about -40 cm^{-1} upon $\text{OH}\cdots\text{OC}_{pep}$ hydrogen bond formation, but remains otherwise insensitive. Similarly, the OH stretch vibration is red-shifted by about $400\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ due to hydrogen bond formation. The previously mentioned $\text{CO}_{pep}/\text{NH}_{proline}$ interaction has no significant influence on the CO_{pep} vibration. Among the vibrations listed in Table 5.8, the NH_{pep} band shows by far the largest effect and is influenced by direct $\text{NH}\cdots\text{X}$ contacts (e.g., pw06) as well as by indirect interactions via the peptide bond (e.g., pw05), or by both types of interaction (e.g., pw02, pw08). Figure 5.16 shows the scaled NH_{pep} frequency as a function of the OH stretch frequency. Clearly, four distinct clusters of points can be identified, indicating a systematic correlation between structure and vibrational frequency. The positions of four selected conformers are represented by their numbers. Moving on the abscissa from the right to the left corresponds to the formation of an $\text{OH}\cdots\text{OC}_{pep}$ hydrogen bond, whereupon the OH frequency shifts to lower wavenumbers.

Closer inspection of the calculated structures reveals that the two clusters at the bottom of Figure 5.16 exhibit exclusively $\text{NH}_{pep}/\text{N}_{proline}$ interactions, while the top two clusters do not. The four valence dash formulas in Figure 5.16 depict the basic structural motive of each cluster.

Two major conclusions can be drawn from Figure 5.16: (1) The NH_{pep} bond is influenced not only by a direct $\text{NH}_{pep}/\text{N}_{proline}$ interaction, but also indirectly via the peptide bond, when the CO_{pep} group is involved in an $\text{OH}\cdots\text{OC}_{pep}$ hydrogen bond. Similar effects were observed in previous calculations of conformers of GlyTrp and TrpGly.[83] (2) The frequency shifts of both types of interaction (≈ 30 and 70 cm^{-1}) are roughly additive. Hence, in the case of ProTrp, the NH_{pep} frequencies could be divided up into four regions, each characterizing a distinct type of interaction with the NH_{pep} bond and peptide group.

There are three points in our present data set that do not fit into the four distinct clusters of points. The first one is conformer pw16, with an OH frequency of about 3260 cm^{-1} . It has an $\text{OH}\cdots\text{OC}_{pep}$ hydrogen bond, but no $\text{NH}_{pep}/\text{N}_{proline}$ interaction. The second conformer is pw21, with a NH_{pep} frequency of about 3335 cm^{-1} . This conformer has an OH/π

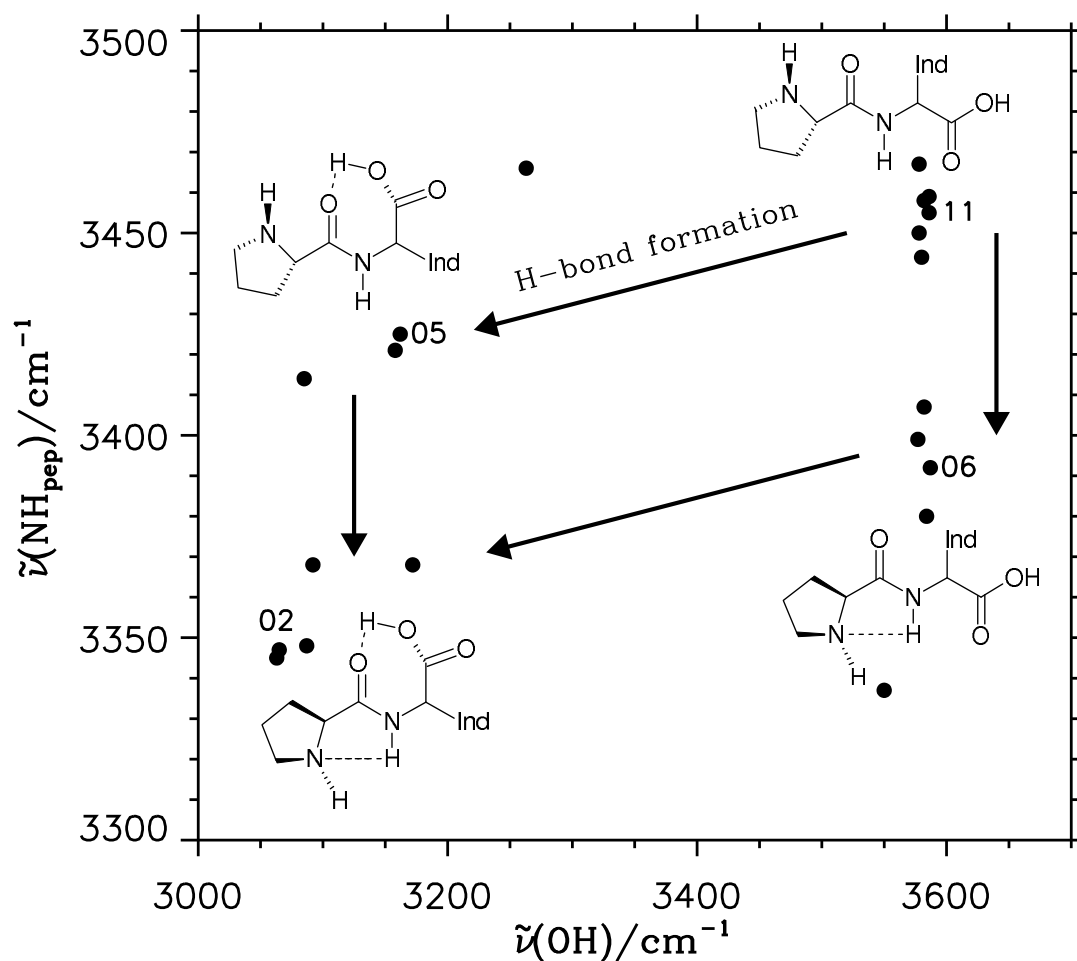


Abbildung 5.16: Correlation between NH_{pep} and OH stretch frequencies(scaled) of the different calculated conformers of ProTrp. The pattern is dominated by two types of interactions, namely an $\text{OH} \cdots \text{OC}_{\text{pep}}$ hydrogen bond and a loose $\text{NH}_{\text{pep}}/\text{N}_{\text{proline}}$ contact. Four insets in the plot corners indicate the corresponding conformation of the backbone. Numbers indicate the position of four selected conformers in Figure 5.14. Because of its large OH frequency shift, conformer pw08 is situated at the lower left corner but not visible in the plot.

(peptide) and $\text{NH}_{\text{pep}}/\text{N}_{\text{proline}}$ interaction, but shows only a small red shift of the OH stretch frequency. However, both conformers still fit into the correlation between NH_{pep} frequency and structure. Finally, pw08 shows the largest red-shift of both the NH_{pep} (3288 cm^{-1}) and OH group (2771 cm^{-1}) and is situated outside the lower left corner of Figure 5.16. While in all other calculated structures the OH bond is tilted by about 30° against the plane formed by the peptide bond, it is almost coplanar with that plane in pw08 (see

Figure 5.14). The coplanarity provides a better overlap with the lone electron pair on the oxygen atom and leads to a stronger hydrogen bond. However, because of a local γ_D conformation on the tryptophane residue in combination with a g+ conformation of the indole side chain as in pw08, the coplanarity is forced by the repulsion between the indole ring and the CO_{pep} group only. This puts a considerable ring strain on the 7-membered ring formed by the hydrogen bond. Hence, pw08 is energetically less favorable than pw02 or pw01, despite its stronger hydrogen bond (see Figure 5.15).

The NH stretch vibration of the proline residue might be another sensitive probe of molecular structure. The NH_{proline} frequency shift mainly follows that of the NH_{pep} group, but with opposite sign. Unfortunately, as is evident from Table 5.8, the infrared intensity is too low to be detected in our experiment. Also, that very same band is absent in a peptide, where the proline residue is preceded by another amino acid.

5.4.5 Discussion

Using the vibrational assignment (Table 5.6) of the experimental IR/UV spectra in Figure 5.13, we attempt to characterize the conformational structures of conformers A and B by comparison with the DFT calculations in Table 5.8. Any possible structure of conformer A has to meet at least two criteria: (1) The OH group must be involved in a hydrogen bond, because we do not observe the free OH band around 3585 cm⁻¹. Since the CO_{pep} bond is the only accessible acceptor site, this implies a red shift of the CO_{pep} band as well, although our interpretation of the weak feature at 1648 cm⁻¹ could be challenged. (2) The NH_{pep} band must experience a strong red shift by about 150 cm⁻¹ compared to a structure with a fully extended backbone ($\nu(\text{NH}_{free}^{pep}) \approx 3450 \text{ cm}^{-1}$ [132, 83]), indicating a kind of strong interaction with the NH_{pep} group or peptide bond. Basically, these criteria would put conformer A into the lower left corner in Figure 5.16.

According to Table 5.8, of the most stable structures only pw01, pw02, and pw08 fulfill the criteria mentioned above and match the experimental spectra with reasonable accuracy. Figure 5.13 shows the calculated and scaled stick spectra of pw01, pw02, and pw08 at the DFT level of theory (black) beneath the IR/UV spectrum of conformer A, sorted according to an increasing relative energy at the MP2 level of theory. pw01 and pw02 differ only in the conformation of the indole side chain (g+ vs g-), but are otherwise the same. Consequently, their calculated IR spectra are nearly identical and indistinguishable at the current level of theory and in the spectral region of interest.

However, experimental and calculated NH_{pep} frequencies differ by about 40 cm⁻¹. The ex-

perimental NH_{pep} frequency (3304 cm^{-1}) is red-shifted by about 150 cm^{-1} with respect to a free NH_{pep} group. A shift of this size is well-known in structures with single or repeated γ -turns, where the NH_{pep} group itself is the donor in a (strong) hydrogen bond,[152, 132] but conformer A does not permit this type of hydrogen bond, due to structural constraints. On the other hand, structure pw08 does account for the strong red-shift of the NH_{pep} band because of its stronger hydrogen bond (Figure 5.13), but shows a blue shift of the NH_{ipb} absorption to about 1540 cm^{-1} , which we do not observe experimentally. Therefore, it is reasonable to assign conformer A to a structural motif like pw01 or pw02, which are the two most stable conformers in our data set.

On the basis of the DFT calculations, the shift of the NH_{pep} band originates mainly from the combination of an $\text{OH}\cdots\text{OC}_{\text{pep}}$ hydrogen bond and $\text{NH}_{\text{pep}}/\text{N}_{\text{proline}}$ contact, where the influence of the latter is the largest; similar to conformer A of the natural dipeptide GlyTrp.[83] It should be noted that this type of interaction is not present in proteins because the secondary nitrogen atom of the proline residue is no longer sp^3 hybridized and the lone electron pair no longer accessible for the neighboring NH_{pep} bond. An additional contribution to the frequency shift probably stems from a dispersive interaction with the indole ring lying underneath the peptide bond and proline moiety. Such interactions are poorly described at the B3LYP level of theory and might account for the present differences between theory and experiment.

We did calculate harmonic frequencies of the three most stable conformers pw02, pw01, and pw06 at the MP2/TZVPP level of theory, though the calculation is quite expensive. Appropriately scaled stick spectra are also displayed in Figure 5.13 (red); NH/OH stretch frequencies were scaled by 0.9552 and $\text{C}=\text{O}/\text{NH}_{\text{ipb}}$ frequencies by 0.9833 to match the experimental NH_{ind} and $\text{CO}(\text{OH})$ frequencies of tryptophane. We observe a blue shift of all frequencies, relative to the corresponding DFT calculations, but not for the NH_{pep} vibrational stretch frequency of pw01 and pw02, which is red-shifted. So the large red shift of the NH_{pep} frequency may be caused in part by dispersion interactions in addition to an $\text{OH}\cdots\text{OC}_{\text{pep}}$ hydrogen bond and $\text{NH}_{\text{pep}}/\text{N}_{\text{proline}}$ contact.

Conformer B differs from conformer A in that it has no hydrogen-bonded OH, since we observe the free OH group at 3582 cm^{-1} . Consequently, the CO_{pep} band is not red-shifted and appears at a typical frequency of free CO_{pep} groups around 1690 cm^{-1} . [117] In addition, the NH_{pep} band is red-shifted by about 80 cm^{-1} compared to a structure with an extended backbone. Among the lowest energy structures, only pw06 and pw07 fulfill the above conditions. pw06 fits best to the experimental spectrum of conformer B and is by 24.5 kJmol^{-1} more stable than pw07 at the MP2/TZVPP level of theory (Figure 5.15).

Figure 5.13 shows the calculated and scaled stick spectra of pw06 and pw07 beneath the IR/UV spectrum of conformer B. Also shown is the calculated stick spectrum of structure pw06 at the MP2 level of theory, which is similar to the DFT result. Hence, we assign conformer B to structure pw06.

Considering the ϕ , ψ values, both conformers A and B of H-Pro-Trp-OH adopt an α -like local conformation of the proline residue. Mons and co-workers measured the IR/UV spectra of N-Acetyl-Phe-Pro-NH₂ and N-Acetyl-Pro-Phe-NH₂ and found that the proline residue prefers to adopt a local γ_L conformation in the major conformers.[132, 152] The γ_L conformation is stabilized by an NH($i \pm 1$) $\cdots$ CO($i \mp 1$) hydrogen bond, where i is the number of the proline residue. Similar observations were made by Compagnon et al. for Z-Pro-NHMe.[151] This is confirmed by ab initio calculation of isolated YCO-Pro-X model dipeptides (Y = H, Me; X = NH₂, NHMe) in vacuo,[140, 141, 142, 152] whereas in aqueous solutions α_L and ϵ_L conformations become more stable.[140] The natural dipeptide H-Pro-Trp-OH in our work does not permit the formation of a NH($i \pm 1$) $\cdots$ CO($i \mp 1$) hydrogen bond because of the missing half residue at the proline end, and is therefore unlikely to adopt a local γ_L conformation of the proline residue, but the flexibility of the carboxylic OH group leads to a local γ conformation of the tryptophane residue in conformer A.

These examples demonstrate the high sensitivity of the backbone conformation to the model peptides structure and to the influence of end groups on the local conformation, whether it is the normal end group of a natural peptide or an artificial end group in capped peptides. In most cases, γ turns are formed, which directly involve one of the end groups of the model peptide, like the COOH group in natural peptides[83] or the NH₂ or NHMe groups in capped (amidated) peptides.[132, 151, 152, 153] This is not surprising because the hydrogen-bonded structures correspond to the most stable conformers in the gas-phase. In our case, the most stable ProTrp conformer has indeed a local γ -conformation of the tryptophane subunit and the α -conformation of the proline unit is favored due to the stability of the NH_{pep}/N_{proline} contact.

However, the most stable hydrogen bonded conformer is not necessarily the major conformer in supersonic expansions. In some cases (TrpGly, TrpPro, and TrpSer), hydrogen bonded conformers were not observed at all.[117, 83] As was demonstrated by Valdes et al.[133] and our own work (Figure 5.15), stretched (fully extended) conformers are stabilized by dispersion interaction between peptide backbone and indole side chain and comparable in energy to the most stable hydrogen-bonded structures. The observation of fully extended conformers in all of our studies of natural peptides[117, 83, 173] supports

this conclusion (e.g., conformer B and structure pw06 in this work). This and the apparent sensitivity of the local conformation to the type of end groups of the model peptide might stimulate further theoretical work on these kind of systems. With the number of experimentally investigated systems rapidly increasing, they provide us both with the necessary data to improve theory and a good reason to study many different small model systems in order to predict the behavior of larger biological systems.

The question remains why, in some cases, we do not observe the hydrogen bonded (stabilized) conformer (e.g., TrpGly). And why we do not observe both of the two most stable conformers of ProTrp, namely pw01 and pw02, which differ only by 1.3 kJmol^{-1} in energy. UV/UV double resonance spectra revealed only two conformers in supersonic expansions ProTrp.[155] Since the structures are very similar, we would expect both conformers to absorb in the same spectral region, but we cannot rule out different lifetimes in the electronically excited-state or unfavorable Franck-Condon factors as a cause for not observing one of the conformers by REMPI spectroscopy. Also, supersonic expansions combined with laser desorption sources start from a hot nonequilibrium condition and conformational relaxation is hindered by the rapid cooling and limited number of collisions in the expansion. So it is not uncommon to observe other conformers than the global equilibrium structures in these types of experiments.

It is interesting to note that, although proline exists in γ formation,[170, 174] the vast majority of proline residues in proteins belong to the α and polyproline II (ϵ_L) regions of the Ramachandran plot.[127, 170, 175] Furthermore, γ -turns seem to be rare compared to β -turns, because of the rather strained geometry of the former.[126, 170] So far, we are only starting to understand more common types of turns[132, 137, 138] as well as β -sheets[158, 159, 160, 161, 162, 163] and helices.[137, 150, 154] In the future, we might have to consider ways to influence the abundance of specific structural motifs in our measurements, in order to study and understand a larger variety of motifs in the gas-phase.[176, 177, 178]

5.4.6 Summary

On the basis of our DFT calculations, we tentatively assign conformers A and B of ProTrp to structures pw01/pw02 and pw06, respectively (Figure 5.14). They only differ in the formation of an $\text{OH} \cdots \text{OC}_{\text{pep}}$ hydrogen bond in conformer A, but adopt the same local conformation of the proline residue and orientation of the indole side chain relative to the backbone. Both structures have a favorable $\text{NH}_{\text{pep}}/\text{N}_{\text{proline}}$ interaction, causing a red shift

of the NH_{pep} band, which is enhanced by the $\text{OH}\cdots\text{OC}_{\text{pep}}$ hydrogen bond in conformer A. Furthermore, dispersive interactions play a major role in the relative stability of the different conformers as well as the NH_{pep} frequency in cases where the NH_{pep} bond interacts with the indole side chain. Single point MP2 calculations at the optimized DFT structures are not sufficient to describe the energetic order in these systems. Finally, the local conformations of the peptide residues depend strongly on the specific type of model system and its end groups.

5.4.7 Acknowledgment

We thank M. Gerhards and M. Schmitt for fruitful discussions. This work has been supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Kl 531/26).

5.5 Tryptophan-Serin (TrpSer)

IR/UV spectra and quantum chemical calculations of Trp-Ser: Stacking interactions between backbone and indole side-chain

Häber T., Seefeld K., Engler G., Grimme S. and Kleineremanns K.

Phys. Chem. Chem. Phys. (2008), published on the web, DOI:10.1039/b718710f

We present infrared-UV double resonance spectra and quantum chemical calculations of the natural di-peptide HTrpSerOH. Two conformers are present in the supersonic expansions. They have a compact folded structure with two hydrogen bonds and with the serin residue stacked above the indole ring and an unusual $\text{NH}(\text{Trp}) \cdots \text{O}=\text{C}$ interaction in the lowest energy conformer. Conformational assignments are based on comparison with calculated (B97-D/ TZV2P) structures and vibrational frequencies. Inclusion of dispersion in the quantum chemical calculations is mandatory for an accurate description of the conformer energies. We provide comparisons between methods often used in biochemistry and the dispersion-corrected double hybrid functional (B2PLYP-D) as a reference. Only concerted experimental and theoretical studies can unravel the conformational complexity already present in a dipeptide.

5.5.1 Introduction

London dispersion interactions [132, 179] are not only important for non-covalently bound molecular complexes. Recent work on electronically quite simple chemical reactions [180, 181] indicates, that these non-local electron correlations on medium and long-range length scales also play a significant role for the thermodynamics of large molecules [182]. Such intramolecular dispersion effects always influence relative energies when the size and shape changes in a chemical reaction. Folding processes and other conformational transitions are a good example and recent theoretical studies on energetically low-lying conformations of a tripeptide [134] indicate, that rather high quantum chemical levels like coupled-cluster (CCSD(T)) are needed to reach an acceptable accuracy (errors for relative conformational energies $< 0.2 \text{ kcal mol}^{-1}$). The importance of non-local electron correlation effects for folding processes can even be observed in simple alkanes as shown recently [183](for related recent theoretical work on peptide folding models see ref. [184]).

Formation of secondary structures is the first step in the folding process of proteins and depends on numerous factors such as intra- and intermolecular hydrogen bonds (among residues and with the solvent), dispersion (van der Waals) and electrostatic interactions, as well as entropic effects. [126, 127] Gas-phase studies of small biomolecules in combination with high level quantum chemical calculations provide a unique way to investigate the intrinsic molecular properties of these *biomolecular* building blocks without the influence of solvents, as summarized in a number of recent reviews. [128, 129, 130, 131, 132, 179] In this work we present the IR/UV spectra of the di-peptide HTrpSer OH (from now on labeled TrpSer) and provide conformational assignments based on state-of-the-art quantum chemical calculations. Figure 5.17 depicts the structure of TrpSer.

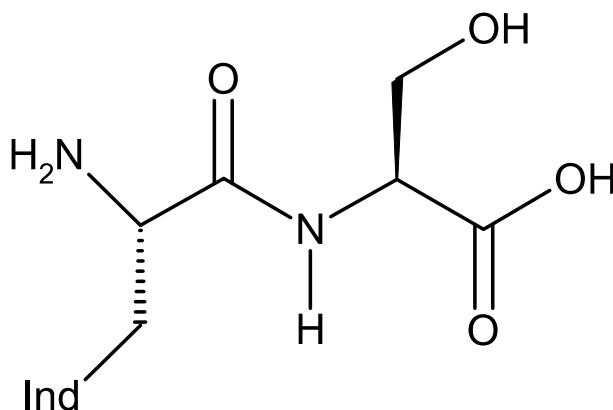


Abbildung 5.17: Structure of HTrpSerOH.

In addition to the carboxylic OH group it has a second OH group on the serine side-chain that can act as hydrogen bond donor. De Vries and co-workers have studied the cyclic dipeptide (Phe-Ser) in the past. [180] They found that in some of the experimentally identified conformers, the OH group of the serine residue forms a strong hydrogen bond with the C=O group of the same residue. A similarly strong hydrogen bond has been observed in the serine containing penta-peptide FDASV. [181]

Regarding the necessary computations it is clear that already TrpSer is too large to perform large basis set coupled-cluster computations for many possible conformers and hence one has to resort to simpler approaches. However, quantum chemical methods that accurately include dispersion interactions must be used for our problem. Along these lines we recently developed the so-called double-hybrid density functionals that (beside including exact Fock exchange) replace part of the semi-local correlation by a perturbative MP2-type expression. These functionals contain only two empirical scaling parameters and we employ here the variant with Beckes exchange GGA (B2PLYP [185], for another

double-hybrid functional see Ref. [186]).

As computationally cheaper method (mainly used for structure optimization and vibrational frequency calculation) the semi-local (non-hybrid) B97-D [29] functional is used. With resolution-of-the-identity (RI, also called density-fitting) integral approximation the computation time only scales as $O(N_{el}^3)$ with system size. This functional is a recent reparametrization of Beckes GGA ansatz from 1997 [187] but now including damped, atompairwise $C_6 \cdot R^{-6}$ corrections to account for long-range dispersion (van der Waals) effects (DFT-D method [188]). When other functionals or methods are used together with this dispersion correction, we add the suffix -D to the name in order to distinguish from conventional (uncorrected) computations. The current standard for DFT-D [29, 188, 189] (that originally has been developed in slightly different form in the context of HF theory [190] and later for DFTB computations [191]) has been successfully applied to many examples where dispersion is important [192, 193, 194, 195, 196, 197] and also tripeptide conformations have been investigated [198]. The dispersion-corrected double hybrid functional (B2PLYP-D) currently seems to be the most accurate quantum chemical model for large systems that can reach CCSD(T) accuracy [182]. This can be attributed to the importance of orbital-dependent correlation terms for folded or stacked (spatially compact) structures. Such contributions are absent in the simple DFT-D approach using conventional (hybrid) GGAs. We here use B2PLYP-D relative energies as benchmark values also to assess the performance of more approximate DFT-D, semiempirical and force-field approaches.

The remaining paper is organized as follows: First we will give a brief review of the experimental setup and the computational methods employed. After that we will present the IR/UV spectra of the TrpSer conformers and give a preliminary assignment based on the comparison with previous work. Then we will report the results of the quantum chemical calculations and its implications on future studies, before discussing the infrared spectra in the context of the calculated structures and vibrational frequencies.

5.5.2 Experiment

The basic principles of our IR-UV experimental setup were described in detail elsewhere. [166, 83, 84] Here we will give a brief summary of the major components. Solid samples of TrpSer are vaporized into an argon jet by laser desorption and investigated by IR-UV hole burning spectroscopy. TrpSer (Bachem) is mixed with graphite powder (Aldrich) in a 1:2 ratio and applied to the edge of a 2mm thick graphite wheel (diameter 60mm), which is placed underneath the orifice of a 300 μm pulsed valve (General Valve). A slow

rotation of the graphite wheel (1 turn per 45 min) constantly provides fresh material to be exposed to the desorption laser (Minilite, Spectra Physics, 1064 nm, ≈ 5 mJ/cm²). Argon is used as carrier gas, at a stagnation pressure of 3 bar. The skimmed molecular beam (skimmer diameter 1mm) crosses the UV ionization laser (LAS, frequency doubled, attenuated to <0.1 mJ/pulse) at right angle inside the ion extraction region of a linear time-of-flight (TOF) mass spectrometer in Wiley-McLaren configuration. A pulsed IR laser beam (burn laser) is aligned collinear to the UV beam (probe laser) and fired 100 ns before the latter. The burn laser (IR) frequency is scanned over the vibrational transitions, while the ionization laser (UV probe laser) is kept at a frequency resonant with a vibronic transition of a single TrpSer conformer. By monitoring the ion mass signal as a function of IR frequency, mass and conformer selective infrared spectra, detected as ion dips can be obtained. IR laser light is generated by a three-stage difference frequency generation (DFG)/optical parametric amplification (OPA) setup. [20] Basically, a dye laser (Precision Scan, Sirah), with Styryl 8 or 9 in methanol or DMSO, is pumped by the 532 nm output of a frequency doubled Nd:YAG laser (GCR 230 Pro, Spectra Physics). The dye laser output is mixed with a part of the fundamental (1064 nm) of the same Nd:YAG laser in a LiNbO₃ crystal for difference frequency generation, producing infrared radiation around 2.6 μ m, which is amplified in an OPA stage. In the third stage, after proper rotation of the polarizations, IR radiation between 5 and 8 μ m (≈ 300 μ J) is produced by difference frequency mixing of the idler and signal beams of the OPA stage in an anti-reflection coated AgGaSe₂ crystal.

Intensity noise due to shot-to-shot fluctuations can largely be compensated by creating a reference signal. We let the very same UV laser pulse that was used to ionize the molecules pass a 30m delay line, then we re-direct and focus it into the sample region again, causing a second ion signal (reference signal) to appear ≈ 100 ns after the first. Because the re-directed beam is focused, its interaction volume with the IR beam is small and produces only a small ion dip, if at all. The reference signal is scaled to match the baseline of the first ion signal and subtracted from the latter. In this case, the baseline corresponds to the constant ion signal without the IR laser. Since both ion signals originate from the very same laser pulse and sample the same gas pulse, common noise due to energy and number density fluctuations is mostly eliminated in the resulting signal. The ro-vibrational transitions of the water bending (1595 cm⁻¹) and stretching vibrations (3657 and 3756 cm⁻¹) were used for frequency calibration. We did not normalize the infrared spectra to the IR laser intensity.

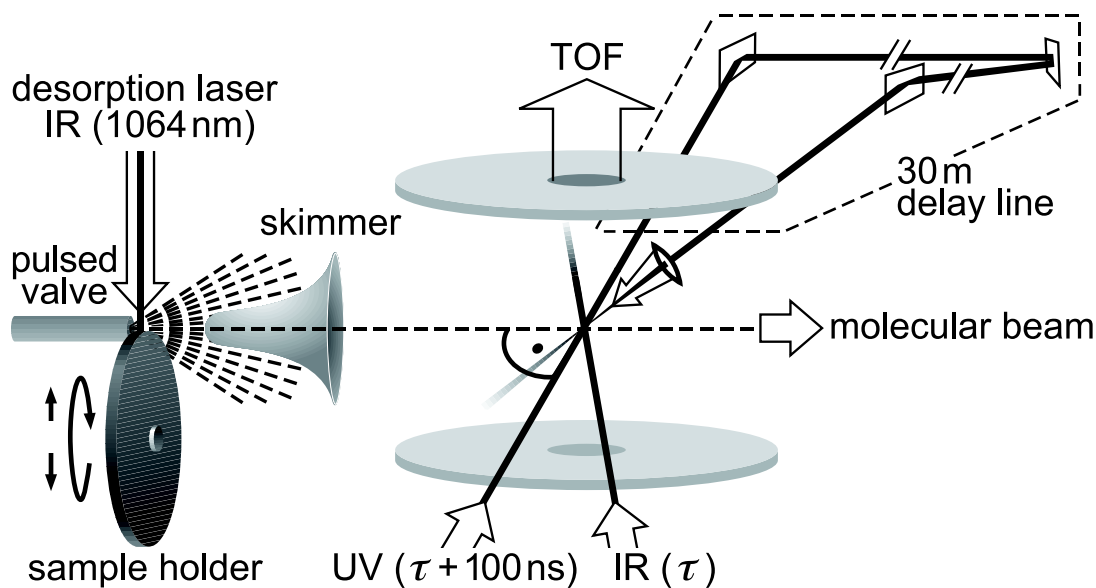


Abbildung 5.18: Experimental setup, showing the laser desorption and ionization region. The UV analysis laser travels more than 30 meters after crossing the molecular beam, then it is redirected and focused into the ionization region again to generate a reference signal of ions used to normalize the hole-burning signal.

5.5.3 Computational Methods and Technical Details

The DFT calculations have been performed with slightly modified versions of the TURBOMOLE suite of programs [199, 200]. As AO basis, the triple-zeta (TZV) sets of Schaefer et al. [60, 201] with two different sets of polarization functions (TZVPP: (2df,2dp) and TZV2P: (2d,2d)) have been employed. Previous basis set convergence studies on Hobzas tripeptide model [134] indicate that these basis sets yield results that are within 0.1 kcal mol⁻¹ of the basis set limit for conformational energies.

In the second-order perturbative treatments for B2PLYP also the RI approximation for the two-electron integrals has been used [92]. As RI-auxiliary basis, the sets of Weigend et al [202] that were optimized for the cc-pVXZ AO basis have been employed. The RI-approximation has also been used in DFT treatments with GGA functionals [203] and the corresponding optimized auxiliary basis sets [204] were employed. In general, the RI-approximation speeds up calculations by about a factor of 3-15 depending on system/basis size albeit at insignificant loss of accuracy (errors for conformational energies <0.02 kcal mol⁻¹ compared to non-RI treatments). All electrons have been correlated for consistency in the B2PLYP treatments. The expected absolute accuracy (including technical as well as methodological errors) of our most accurate B2PLYP-D approach for the conformatio-

nal energies is about $0.20.4 \text{ kcal mol}^{-1}$.

The geometry optimizations for DFT have been performed at the B97-D/TZV2P level and these structures have been used in all subsequent DFT single-point energy computations. For comparison, the semiempirical PM3 method including our dispersion correction (PM3-D [205]) as well as the MM3 classical force-field [206] have been applied and these cases refer to full structure optimizations. The vibrational frequencies and ZPVE contributions (unscaled) were obtained in the harmonic approximation at the B97-D/TZV2P level. They were obtained as numerical derivatives of analytically calculated gradients employing a modified version of the parallel program SNF [207].

The conformational space of TrpSer has been explored stochastically using the MMX force field as implemented in the PCmodel program [208]. The lowest 39 conformations have been considered in full B97-D/TZV2P geometry optimizations. During this process, five conformers collapsed to already existing structures. Some conformers occur as pairs or triplets of very similar structures which are distinguished only by a rotation of the NH_2 group which typically changes the relative energy in many of these cases by less than $0.05 \text{ kcal mol}^{-1}$. The figure 5.20 contains the full set of the initial 39 conformations as ordered by their B2PLYP-D/TZVPP relative energies. Later we concentrate on the lower-lying ones and on those which can experimentally be identified by the comparison of experimental and theoretical vibrational frequencies.

5.5.4 Results

IR/UV Spectra Previously we published R2PI spectra of TrpSer in the wavenumber range between 34500 and 35000 cm^{-1} . [155] In that frequency range, UV-UV hole-burning spectra revealed the existence of two conformers, A and B. (From now on we will use capital letters A and B for the experimentally determined conformers.) Figure 5.19 shows the IR-UV hole burning spectra of both conformers of TrpSer between 2800 and 3750 cm^{-1} and between 1750 and 1800 cm^{-1} , with the UV probe laser tuned to 34627 and 34914 cm^{-1} for conformer A and B, respectively. UV frequencies were calibrated against R2PI spectra of aniline and compared to literature values. [167]

Neglecting the CH stretch vibrations, we expect five prominent IR bands in the investigated spectral region; four bands between 2800 and 3600 cm^{-1} and another band between 1750 and 1800 cm^{-1} . Namely, they are the OH stretch vibration of the CH_2OH side-chain and the carboxyl group (COOH) of the serine residue, the NH stretch vibration of the indole group (NH_{ind}), the NH stretch vibration of the peptide bond (NH_{pep}) and

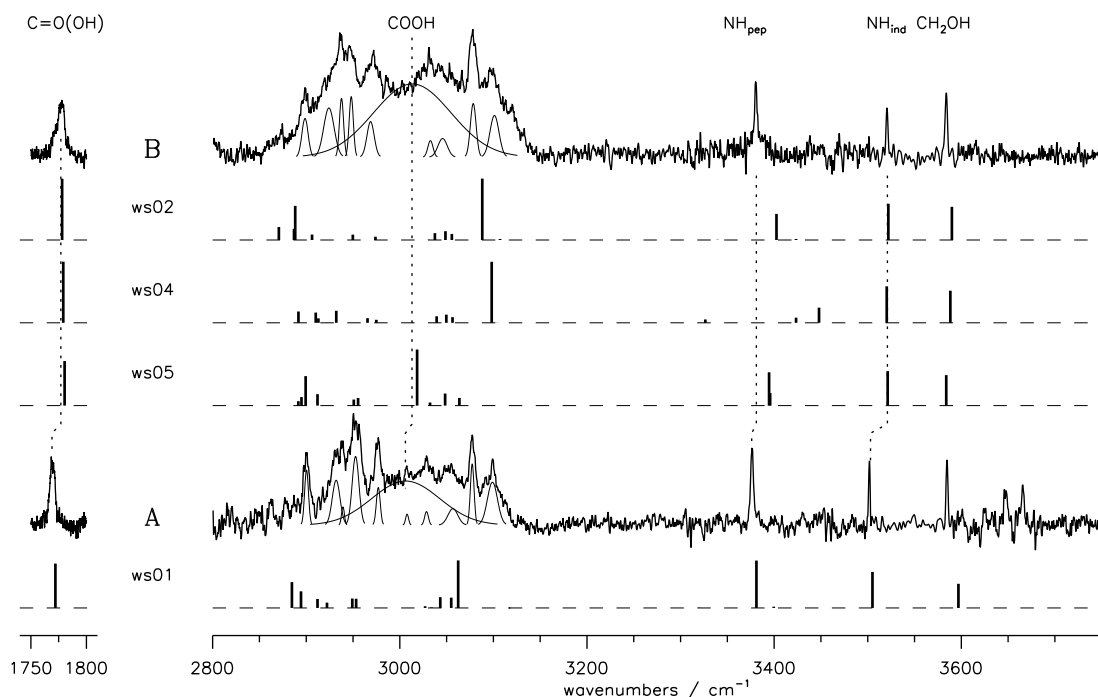


Abbildung 5.19: IR/UV double resonance spectra of both conformers of Trp-Ser(A and B50) between 1750 and 1800 cm^{-1} (left) and between 2800 and 3750 cm^{-1} (right). Assignments are indicated by the labels on top and dotted lines. See text for more details. Laser pulse energies ranged between 50-300 μJ and 1-2 mJ in the mid and near-infrared, respectively, with an UV analysis laser pulse of about 10-20 μJ . Also shown are the calculated and scaled stick spectra of selected calculated conformers (B97-D/TZV2P).

the C=O stretch vibrations of the carboxyl group (CO(OH)) below 1800 cm^{-1} . In addition, we expect to see the CH stretch vibrations of the indole and CH_2OH side-chains between 2900 and 3100 cm^{-1} . We did not observe the NH stretch vibrations of the amino group, which have a low calculated infrared absorption intensity (see calculations). Table 5.9 summarizes the observed absorption maxima and tentative assignments (see below).

The spectral assignment, as indicated in Figure 5.19 and Table 5.9, is based mainly on the comparison with infrared spectra of GlyTrp, TrpGly, ProTrp and *cyclo*-(Phe-Ser) [180, 83, 84, 117] and with calculations (see below). Both conformers have very similar infrared spectra. They differ slightly only in the position of the NH_{ind} and C=O bands. The NH_{pep} and NH_{ind} bands are at positions comparable with previous measurements.

Tabelle 5.9: Experimentally determined IR band maxima (in cm^{-1}) of the two conformers of TrpSer

Vibration	Conformer A	Conformer B
CH ₂ OH	3585	3584
(CO)OH	3006	3013
NH _{ind}	3503	3521
NH _{pep}	3376	3381
CH	3099	3101
	3077	3078
	3057	
	3029	3032
	2977	2969
	2953	2948
	2939	2938
	2932	2924
	2900	2899
C=O(OH)	1769	1777

We do not observe any absorption of a free CH₂OH hydroxyl group, which is expected to absorb at about 3696 cm^{-1} . [180] Instead we find an absorption near 3585 cm^{-1} that is very close to the absorption frequency of a free COOH hydroxyl group. Below 3100 cm^{-1} there is a strong broad absorption centered around 3050 cm^{-1} with some smaller but sharper bands on top of it. The latter are the CH stretch vibrations of the indole side-chain. Their frequencies agree quite well with those of indole and tryptophan analogs. [209, 210] Since the infrared spectra of indole, tryptamine and other tryptophan analogs show only sharp bands in the CH stretch region, we attribute the broad absorption in that region to an OH stretch vibration that is broadened and red-shifted due to the formation of a strong hydrogen bond. [168] To determine the position of the hydrogen bonded COOH vibration, we deconvoluted the broad feature below 3100 cm^{-1} with a set of Gaussians (as indicated in Figure 5.19). Gaussians were assigned to each of the sharp CH stretch vibrations. The broadening of the spectral feature around 3000 cm^{-1} was simulated by a single broad Gaussian. While the width of the absorption prevents an accurate determination of the shape and position of the hydrogen-bonded C=O(OH) vibration, the deconvolution helps to qualitatively discriminate between the C=O(OH) and CH stretch vibrations.

Such a strong red-shift is likely to be observed for a hydrogen bonded COOH group, but not for the hydroxyl group of the serine side-chain (see calculations below). For example, two out of five conformers of cyclo-(Phe- Ser) form a strong hydrogen bond between the

hydroxyl group of the serine residue and the carbonyl group of the same residue, but the absorption frequency is not shifted below 3400 cm^{-1} . [180] Similarly, in the pentapeptide FDASV the hydrogen-bonded CH_2OH group is shifted to near 3400 cm^{-1} . [181] Therefore, we assign the broad band centered around 3050 cm^{-1} to a hydrogen bonded COOH group, while the absorption close to 3585 cm^{-1} belongs to a hydrogen bonded CH_2OH group. The absorption frequency of the latter accidentally coincides with that of a free $\text{CO}(\text{OH})$ group.

Calculations The results for relative energies of 39 conformers (including doubles and the above mentioned NH_2 rotational isomers) of Trp-Ser with B2PLYP-D/TZVPP (reference method), B97-D/TZV2P (used for geometry optimization), PM3-D [205] and the MM3 force-field [206] are shown in the left part of Figure 5.20.

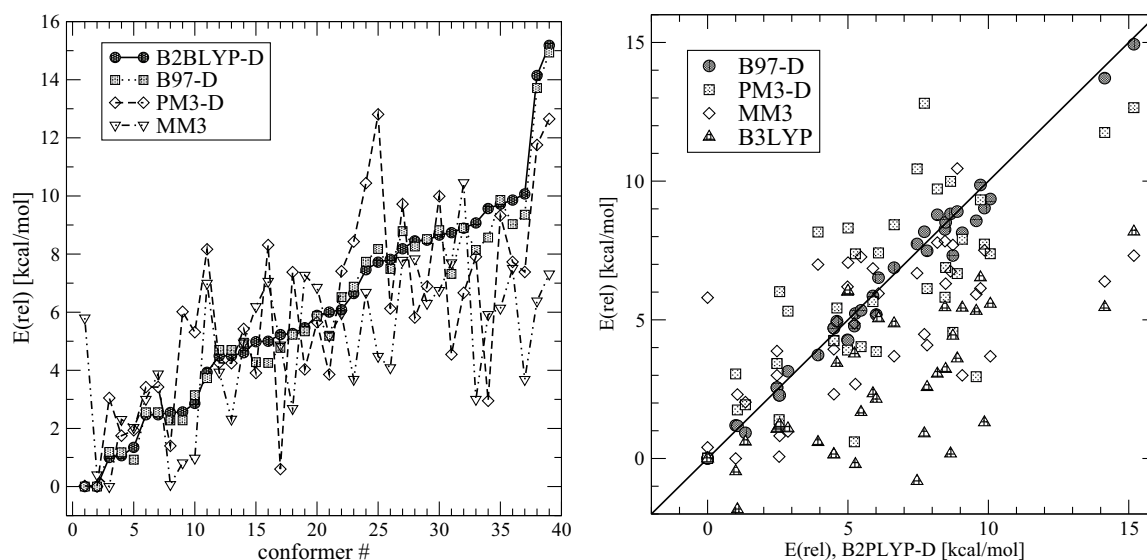


Abbildung 5.20: Relative energies (ZPVE uncorrected) of 39 low-lying conformers of TrpSer at different theoretical levels (left) and comparison with the B2PLYP-D/TZVPP reference energies (right). The solid line in the right plot has a slope of unity and an intercept of zero.

We also present in the right part a comparison to the B2PLYP-D reference values, where B3LYP [56, 57] results as an example for a dispersion-uncorrected conventional functional are also given. The structures of energetically low-lying conformers are shown in Figure 5.21.

The conformational energies are within an energy window of 15 kcal mol^{-1} and 37

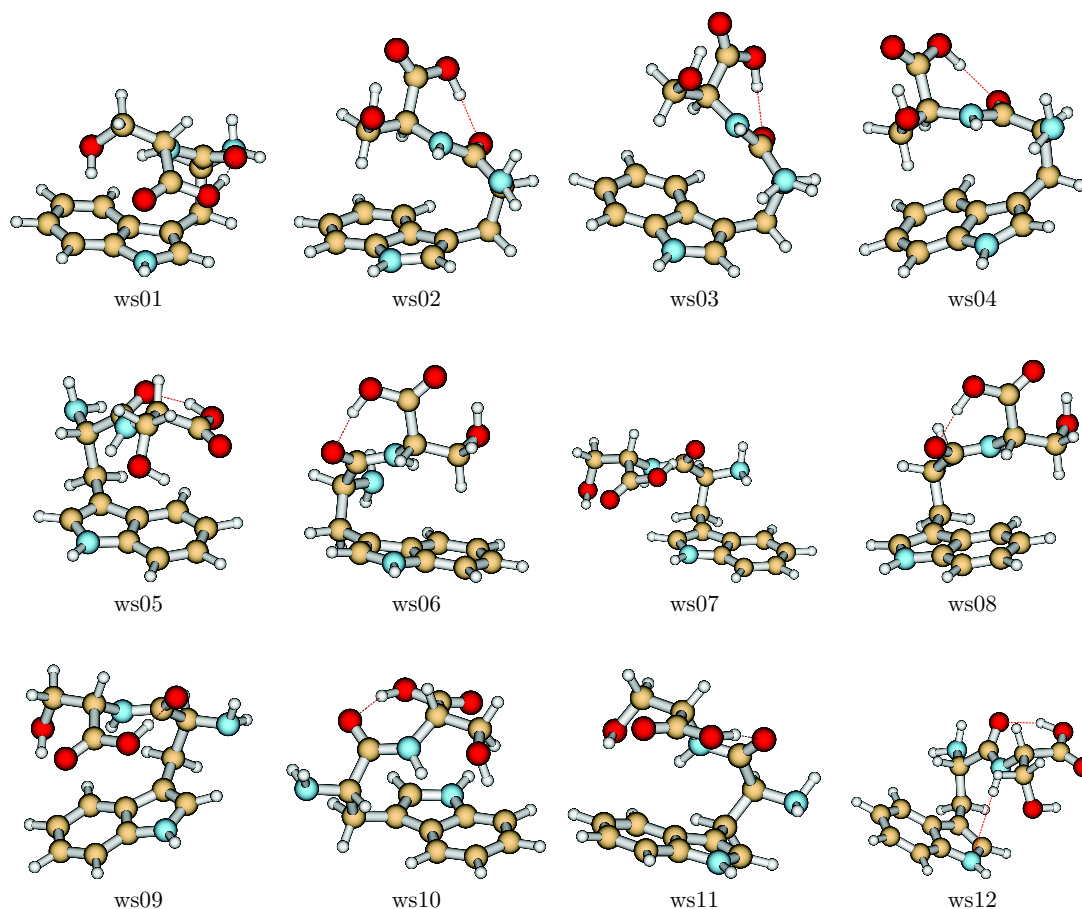


Abbildung 5.21: Optimized structures (B97-D/TZV2P) of low-lying conformers of TrpSer.

conformers are in a 10 kcal mol^{-1} range. At room temperature, the conformer distribution is dominated by the lowest energy structure ws01 (81.6) and the first four conformers together yield a population of > 99.5 . The relative zero-point vibrational energies (ZPVE, Table 5.10) vary between -0.1 and $0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ for the low-lying conformers. For the populations of these structures, the corrections are insignificant and the same holds for values derived from free energies. Table 5.10 also includes unscaled relative (ws01 set to zero) DFT-D dispersion energies that can be used to correct any conventional DFT result simply by adding these values to the corresponding electronic conformational energies. The lowest conformer ws01 features two $\text{C}=\text{O} \cdots \text{HO}$ hydrogen bridges (one strong and a weaker one) and an unique interaction between the ring NH and the Ser carbonyl group is clearly indicated by an up-bending of the NH bond vector (see Figure 5.21). This structure is spatially very compact (as indicated e.g. by the solvent-accessible-area) due to an almost complete stacking of the serine residue above the aromatic ring. Conformers ws02 to

ws04 also have two hydrogen bridges and they differ only in the rotation of the NH_2 group. Conformer ws05 has only one hydrogen bridge but rather a $\text{CH}_2\text{OH}\cdots\text{Indole}$ interaction and is already about $2.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ higher in energy. The six most stable conformers all have structures, where the serine residue is more or less stacked above the indole ring. Conformer ws07 is the first conformer with only weak interactions between the backbone and its indole ring and lies nearly 4 kcal mol^{-1} above the most stable conformer.

Compared to the previously investigated tripeptide case [182], the Trp-Ser conformational energies seem to be easier to predict. This is obvious from the close agreement of B2PLYP-D and B97-D data (root-mean-square (RMS) deviation of only $0.5 \text{ kcal mol}^{-1}$). However, the conformational problem still represents a challenge for simpler theoretical approaches that are often used in biochemical simulations. Both, semiempirical PM3 even with dispersion correction as well as the tested force-field show large maximum ($> 6 \text{ kcal mol}^{-1}$) and average (RMS of 2.6 and $3.0 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectively) errors. After all (and opposed to MM3) with PM3-D the lowest energy conformer is computed correctly. In any case, these simple methods can only be used for very crude initial screening purposes of favorable conformers which later must be investigated by reliable quantum chemical methods. Note that, due to missing intramolecular dispersion interactions, uncorrected B3LYP performs rather badly as well, with RMS and maximum deviations of 4.5 and $8.7 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectively. This is dramatically improved by adding the dispersion correction (i.e., B3LYP-D), which decreases the RMS to $0.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ (not shown in the left part of the Figure because they almost coincide with the B97-D data points and are thus not clearly visible). This indicates, that the orbital dependent correlation terms in the B2PLYP functional are not important in this case, which seems to be dominated by the hydrogen bonds and electrostatic interactions. The relative DFT-D dispersion energies given in Table 5.10 span a rather large range of about 9 kcal mol^{-1} . There is a weak correlation between the relative energy and the dispersion contribution in a sense that most of the energetically preferred conformers have a rather dense, folded conformation with favorable dispersion contributions.

Table 5.10 lists the calculated (B97-D/TZV2P) and scaled frequencies of the low energy conformers. Scaling factors were determined from a calculation of the most stable tryptophan conformer [107] at the same level. The calculated frequencies of the tryptophan NH_{ind} and carboxylic C=O stretch vibrations were compared to experimental values [107, 211] and scaling factors chosen accordingly (0.974 for NH/OH stretch vibrations, 1.015 for C=O stretch vibrations).

5.5.5 Discussion

The twelve lowest energy conformers (Figure 5.21) all feature a strong $\text{COOH} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{pep}}$ hydrogen bond and their COOH vibrational frequency is shifted well below 3100 cm^{-1} (Table 5.10). With the exception of conformers ws05 and ws10 they also have a strong $\text{CH}_2\text{OH} \cdots \text{O}=\text{C}(\text{OH})$ hydrogen bond in common. But because the carboxylic $\text{C}=\text{O}$ group is not an equally good hydrogen bond acceptor as the peptidic $\text{C}=\text{O}$ group, the frequency shift of the hydrogen bonded CH_2OH hydroxyl group is less pronounced and the frequency is close to 3600 cm^{-1} . Conformers ws05 and ws10 have a $\text{CH}_2\text{OH} \cdots$ Indole interaction instead. The frequency shift however is similar to that of the hydrogen bonded conformers. Larger red-shifts of the CH_2OH group close to 3200 cm^{-1} are only observed for conformers with a doubly bridged $\text{COOH} \cdots \text{OH} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{pep}}$ interaction, as in ws20, ws25 and ws31 (not shown in Figure 5.21). There the carboxylic OH group binds to the oxygen atom of the CH_2OH group, which itself forms a hydrogen bond with the peptidic $\text{C}=\text{O}$ group. The OH frequencies of both OH groups are now shifted below 3200 cm^{-1} . However, these conformers are far less stable ($>7.8 \text{ kcal mol}^{-1}$) than the doubly bridged arrangements realized in the lowest energy conformers.

Experimentally we observe OH absorptions near 3585 cm^{-1} and below 3100 cm^{-1} for both conformers, A and B. From the previous arguments it is clear that only the doubly bridged arrangement of the lowest energy conformers with $\text{COOH} \cdots \text{O}=\text{C}_{\text{pep}}$ and $\text{CH}_2\text{OH} \cdots \text{O}=\text{C}(\text{OH})$ hydrogen bonds can reproduce the observed frequency shifts. Further evidence that the CH_2OH hydroxyl group forms a hydrogen bond with the carboxylic $\text{C}=\text{O}$ group stems from the absorption of the latter (left part of Figure 5.19). Its frequency is red-shifted compared to a free (unbounded) carboxylic $\text{C}=\text{O}$ group. [83, 84, 117]

Figure 5.19 shows the experimental IR/UV spectra together with calculated and scaled stick spectra of the low energy conformers ws01, ws02, ws04 and ws05. We did not include ws03 because its spectrum is almost identical to that of ws02. Vertical dashed lines illustrate the small differences between the two conformers A and B. The most notable difference is the red-shift of the NH_{ind} stretch vibration in A compared to B. All of our previous investigations [83, 84, 117] showed the indolic NH group to be almost invariant to the local conformation of the backbone and its frequency to be close to 3520 cm^{-1} , as for conformer B. The red-shift in conformer A indicates some kind of interaction with the backbone. Among all calculated structures in Table 5.10 only structure ws01 and ws10 predicts such an interaction that results in a weakening of the NH bond and a slight up-bending of the NH bond vector (see Figure 5.21). Since the NH_{pep} frequency of

of the energetically highly unfavorable structure ws10 is more than 30 cm^{-1} red-shifted from that of ws01, we assign conformer A to the most stable structure ws01.

The structural assignment of conformer B is less obvious. Experimentally, the spectra of conformers A and B differ only by the position of the NH_{ind} and $\text{C}=\text{O}(\text{OH})$ absorptions. Considering the uncertainties in the deconvolution of the overlapping peaks around 3000 cm^{-1} the $(\text{CO})\text{OH}$ absorptions are indistinguishable in both conformers. So we are left with energetic arguments for the assignment of conformer B. Structures ws02 and ws03 differ by only $0.06\text{ kcal mol}^{-1}$ in energy (or $0.14\text{ kcal mol}^{-1}$ including ZPVE), but we cannot distinguish between those two, because the calculated spectra are too similar. Structure ws04 is ruled out by its higher NH_{pep} frequency of 3451 cm^{-1} . Structurally, conformers ws02, ws03 and ws04 are almost identical, except for the rotation of the NH_2 endgroup. The interaction of the NH_{pep} bond with the lone electron pair of the NH_2 group is responsible for the redshifted NH_{pep} frequency of conformers ws02 and ws03 compared to ws04. Finally, conformers ws05 and ws06 have very similar spectra and fit well to the experimental spectrum, considering the difficulties to theoretically predict the shift of $\text{C}=\text{O}(\text{OH})$ frequency, but their energies are already more than 1.5 kcal mol^{-1} higher than that of conformer ws02. Therefore we tentatively assign conformer B to either structure ws02 or ws03.

The R2PI spectra of TrpSer revealed only two conformers[155]. Considering the small energy differences between structures ws02 to ws04 one would expect more than two conformers to be present in the R2PI spectra. However, we cannot rule out different lifetimes in the electronically excited state or unfavorable Franck-Condon factors as a cause for not observing one of the other conformers by R2PI spectroscopy, since R2PI only allows the detection of conformers with an efficient ionization channel.[212, 78, 81] Also, as mentioned above, the three structures differ only in the rotation of the NH_2 endgroup. It is likely that ws04 relaxes to ws02 or ws03, because it requires only an inversion of the NH_2 group to convert ws04 into one of the more stable conformers.

5.5.6 Summary

We assign the two conformers of TrpSer that were found in supersonic expansions to compact structures in which the serine residue is stacked above the indole ring of the tryptophane side-chain. In addition, there is an unusual $\text{NH}(\text{Trp})\cdots\text{O}=\text{C}$ interaction in the lowest energy conformer. The observed stacking emphasizes the role of dispersion and limits the applicability of the B3LYP functional, commonly used for similar systems. As

mentioned above, only joined experimental and state-of-the-art theoretical studies can unravel the complexity already present in a dipeptide like TrpSer. The methods presented here can be applied to larger peptide model systems as well, which might form helices and β -sheets in the gas phase.

5.5.7 Acknowledgment

This work has been supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft in the framework of the SFB 424 (Molekulare Orientierung als Funktionskriterium in chemischen Systemen) as well as within the project Kl 531/26. The authors thank C. Mück-Lichtenfeld for technical assistance and helpful discussions.

Tabelle 5.10: Scaled vibrational frequencies (in cm^{-1}) of the calculated structures (B97-D/TZV2P) of TrpSer. Calculated infrared intensities (km/mol) are given as subscripts in parenthesis. NH/OH stretch frequencies were scaled by 0.974. All other frequencies were scaled by 1.015. Also listed are the relative electronic energies E_{rel} (ws01 set to zero) and relative zero-point vibrational energies ZPVE_{rel} (unscaled, in kcal mol^{-1}). $E_{\text{rel}}^{\text{disp}}$ is the contribution of dispersion relative to the fully stretched conformer ws34, which has the least interaction between the indole side-chain and the peptide backbone

Conformer	E_{rel}	ZPVE_{rel}	$E_{\text{rel}}^{\text{disp}}$	C=O(OH)	NH _{pep}	NH _{ind}	CO(OH)	CH ₂ OH
Experiment								
A				1769	3376	3503	3027	3585
B				1777	3381	3521	3044	3584
Calculation								
ws01	0.00	0.00	-9.26	1772(241)	3384(90)	3509(69)	3065(452)	3600(46)
ws02	1.00	-0.10	-7.81	1778(333)	3406(50)	3525(69)	3092(584)	3594(63)
ws03	1.06	-0.02	-6.52	1777(350)	3409(63)	3524(68)	3083(638)	3592(62)
ws04	1.35	0.29	-8.89	1779(332)	3451(29)	3524(69)	3102(580)	3592(61)
ws05	2.55	-0.26	-8.03	1780(242)	3398(63)	3525(66)	3022(533)	3588(58)
ws06	2.86	-0.10	-7.44	1776(326)	3398(56)	3525(63)	3018(703)	3590(64)
ws07	3.93	0.05	-6.29	1765(282)	3448(38)	3521(63)	3070(452)	3579(59)
ws08	4.50	-0.38	-5.04	1774(358)	3407(63)	3526(68)	3026(692)	3587(65)
ws09	4.61	-0.29	-8.08	1785(217)	3437(51)	3525(61)	3181(356)	3576(71)
ws10	5.00	-0.17	-10.5	1769(269)	3417(84)	3503(80)	2885(461)	3598(136)
ws11	5.23	-0.07	-8.19	1782(228)	3448(42)	3526(66)	3118(415)	3572(69)
ws12	5.27	-0.48	-4.08	1771(305)	3332(390)	3519(67)	3050(681)	3565(86)
ws13	5.47	-0.43	-5.65	1800(358)	3376(53)	3518(67)	3200(521)	3621(54)
ws14	5.89	-0.60	-5.81	1796(340)	3387(52)	3522(64)	3144(570)	3609(110)
ws15	6.01	-0.17	-6.01	1775(320)	3463(70)	3525(66)	3006(689)	3580(72)
ws16	6.09	-0.53	-7.88	1789(163)	3397(53)	3521(64)	3307(302)	3679(52)
ws17	6.64	-0.60	-7.41	1794(198)	3406(49)	3524(63)	3249(321)	3673(33)
ws18	7.46	-0.69	-1.21	1789(394)	3376(74)	3524(67)	3002(981)	3672(30)
ws19	7.72	-0.67	-2.73	1791(407)	3371(88)	3527(53)	3032(884)	3672(32)
ws20	7.82	-0.24	-4.18	1787(311)	3382(79)	3528(61)	3037(417)	3188(514)
ws21	8.18	-0.88	-4.14	1784(382)	3407(53)	3527(64)	2951(876)	3676(31)
ws22	8.45	-0.72	-6.60	1789(307)	3424(257)	3523(69)	3061(480)	3642(143)
ws23	8.48	-0.67	-4.06	1797(263)	3394(63)	3518(55)	3284(368)	3676(55)
ws24	8.65	-1.08	-1.15	1790(406)	3384(94)	3525(69)	3017(973)	3671(31)
ws25	8.74	0.05	-5.44	1796(304)	3460(54)	3522(64)	3070(508)	3198(480)
ws26	8.95	-0.65	-0.59	1789(325)	3384(64)	3526(65)	3573(55)	3359(513)
ws27	9.07	-0.62	-6.07	1789(298)	3383(294)	3520(68)	3089(564)	3607(227)
ws28	9.28	-0.91	-0.04	1753(333)	3405(75)	3525(64)	3564(62)	3595(66)
ws29	9.57	-0.36	-5.64	1793(302)	3450(256)	3523(66)	3065(581)	3650(21)
ws30	9.72	-0.72	-5.97	1798(214)	3413(62)	3526(59)	3259(315)	3676(34)
ws31	9.86	-0.24	-1.20	1792(337)	3357(98)	3527(60)	3047(577)	3181(723)
ws32	10.07	-0.57	-4.78	1802(371)	3421(44)	3525(65)	3156(590)	3539(335)
ws33	11.17	-0.67	-6.44	1799(314)	3400(47)	3525(63)	3569(50)	3652(24)
ws34	12.36	-1.27	0.00	1803(311)	3406(62)	3526(64)	3578(49)	3673(33)
ws35	14.14	-1.10	-0.92	1814(334)	3406(93)	3525(64)	3316(324)	3680(50)
ws36	15.18	-1.17	-2.33	1814(354)	3432(52)	3528(52)	3311(343)	3681(50)

Kapitel 6

nichtveröffentlichte Ergebnisse

6.1 7-Methylguanin (7-MG) und 9-Methylguanin (9-MG)

6.1.1 Einführung

Im Rahmen der Doppelresonanzuntersuchungen an Guanin wurden ebenfalls Experimente an methylierten Spezies durchgeführt. Mit Hilfe der Methylsubstitution kann im Vorfeld die Existenz bestimmter Konformere bzw. Tautomere ausgeschlossen werden, so beispielsweise durch eine Methylierung von Guanin in Position N₇ bzw. N₉, was eine N_{7,9}H-Tautomerie blockiert. Die Methylgruppen zeigen wenig Einfluss auf das spektroskopische Verhalten, d.h. es werden im Falle des methylierten Guanins keine starken Störungen der Schwingungs- und elektronischen Eigenschaften erwartet. Der induktive Effekt der Methylgruppe verursacht lediglich eine moderate Rotverschiebung in den UV-Spektren von wenigen hundert Wellenzahlen.[213, 75]

So zeigen die R2PI-Experimente von de Vries [213] an 9-Methylguanin und Mons [75] an 7-Methylguanin diesen Einfluss der Methylgruppe hin zu niedrigeren Anregungsenergien: Der Ursprung des 9-Methylguanins liegt zum Beispiel bei 34612 cm⁻¹ und ist damit von dem Guaninkonformer D ca 140 cm⁻¹ rotverschoben, welches von Mons et al. im Jahr 2002 durch eine Variante der IR-UV Doppelresonanzspektroskopie entdeckt wurde.[75] Die IR/UV Doppelresonanzuntersuchungen von Mons umfassten die Aufnahme von IR-Spektren des bislang einzig gefundenen Konformers des 9-Methylguanins, was infolge der großen Ähnlichkeit in den IR-Spektren wie auch dem leichten Rotshift im UV-Spektrum zum Guanin D ebenfalls Konformer D genannt wurde, sowie die UV- und IR/UV-Spektren

der Konformere A und B des 7-Methylguanins.

Wir ergänzten die IR-Doppelresonanzmessungen der methylierten Guanine (7-MG und 9-MG) von Mons et al. [75] um den Bereich des mittleren Infraroten.

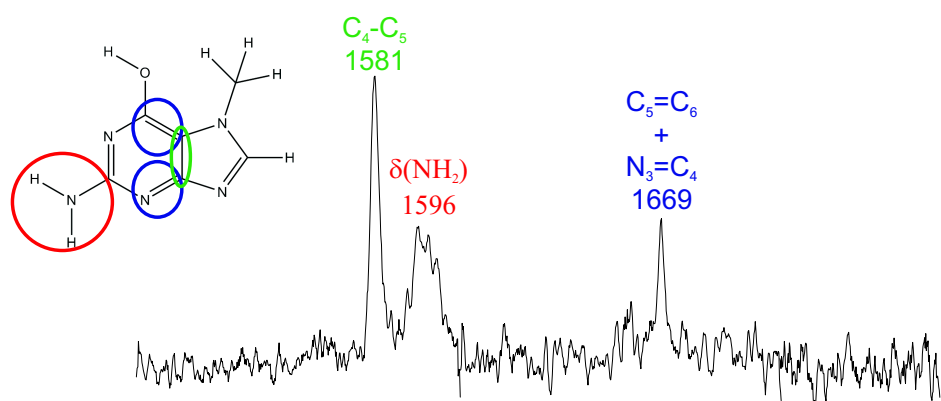
6.1.2 IR/UV–Doppelresonanz von 7-MG

Handelt es sich tatsächlich bei den Konformeren des 7-MG um Analoga der Guaninkonformere A und B, so ist zu erwarten, dass Konformer A des 7-MG ebenfalls eine enolische Struktur besitzt, während Konformer B eine Imino-Ketoform hat.[212] Die mid-IR-Spektren beider Konformere sind in nachfolgenden Abbildungen gezeigt.

7-MG Konformer A Für Konformer A ist im nahen IR bei rund 3580 cm^{-1} ein Dublett zu erkennen, was von Mons der asymmetrischen NH_2 -Streckschwingung (3575 cm^{-1}) sowie der O-H Streckschwingung (3582 cm^{-1}) zugeordnet wurde. Ihre Zuordnung fußt auf Experimenten an 2-Pyridon[214, 215] und 2-Hydroxypyridin[215, 216]. Dies deutet schon auf eine enolische Struktur des Konformers A hin.

Im von uns gemessenen mittleren Infrarot konnte übereinstimmenderweise keine C=O Schwingung oberhalb von 1720 cm^{-1} beobachtet werden. Stattdessen sind hier drei starke Absorptionen bei 1581 , 1596 und 1669 cm^{-1} zu erkennen. Zieht man zum Vergleich das mid-IR-Spektrum des Guaninkonformers A hinzu, so stellt man fest, dass die beiden prominenten Banden bei 1581 und 1596 cm^{-1} des methylierten Guanins um jeweils knapp 4 bis 5 cm^{-1} rotverschoben sind, während die Bande bei 1669 cm^{-1} sogar noch etwas stärker um rund 9 cm^{-1} rot verschoben ist. Da uns bis jetzt keine Rechnungen mit Normalkoordinatenanalysen der methylierten Spezies vorliegen, greifen wir auf die analogen theoretischen Frequenzen beim Guanin zurück.

Beim Guanin A konnten die drei beobachteten Banden vornehmlich $\text{C}_4=\text{C}_5$ Streck-, NH_2 Biege- und $\text{C}_5=\text{C}_6 + \text{N}_3=\text{C}_4$ Streckschwingungen zugeordnet werden. Infolge des induktiven Effekts der Methylgruppe ist die Elektronendichte des 7-MG im Aromaten im Vergleich zum Guanin erhöht. Es ist leicht vorstellbar, dass diese Aktivierung die beiden aromatischen Ringe aufweitet und so die Kraftkonstanten der aromatischen Bindung leicht geschwächt werden. Aus der Abnahme der Kraftkonstanten ergibt sich dann in einem harmonischen Bild der jeweiligen Schwingungen eine Verringerung der entsprechenden Schwingungsfrequenzen. Gerade dieser Effekt ist bei dem vorliegenden mid-IR-Spektrum des 7MG Konformer A zu sehen. Bei der harmonischen Kopplung der $\text{C}_5=\text{C}_6 + \text{N}_3=\text{C}_4$ Streckschwingungen sind gleich zwei Schwingungen von geschwächten



7-methylguanine - conf A

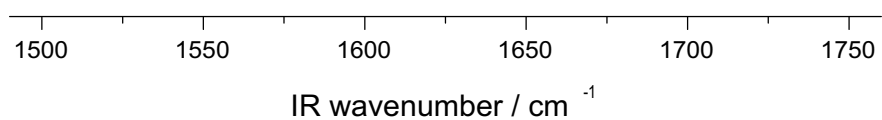
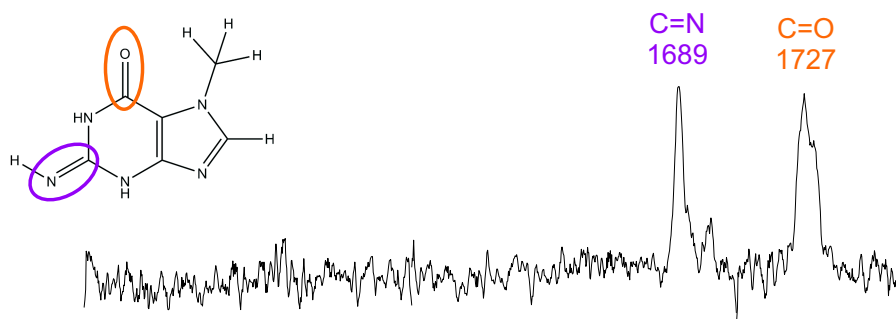


Abbildung 6.1: IR/UV-Doppelresonanzspektrum des Konformers A von 7-Methylguanin.



7-methylguanine - conf B

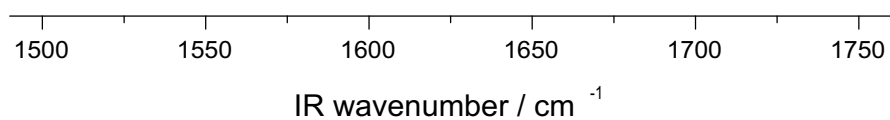


Abbildung 6.2: IR/UV-Doppelresonanzspektrum des Konformers B von 7-Methylguanin.

Kraftkonstanten betroffen, aufgrund dessen ist der Rotshift sogar noch etwas stärker ausgeprägt.

Weiterhin besitzen bei den Guaninrechnungen sämtliche C=N Schwingungen, die von einer Iminoform herrühren, deutlich höhere Schwingungsfrequenzen (vergl. Konformer B) mit ungefähr 1690 cm^{-1} . Die Abwesenheit einer Bande im Infrarotspektrum des 7-MG bei diesen Frequenzen, sowie die Tatsache, dass die relativen Energien der berechneten Imino-Enolformen beim Guanin über 6500 cm^{-1} höher in der Energie liegen, impliziert also das Vorliegen einer Amino-Enolstruktur für das Konformer A des 7-Methylguanins. Die Amino-Enolstruktur kann basierend auf unseren Rechnungen zum Guanin sogar in Bezug zu den beiden möglichen Rotameren 7M-A-E_c und 7M-A-E_t unterschieden werden. So zeigt sich, dass die enolische O-H Streckschwingung der 7H-A-E_c des Guanintautomers A infolge einer sterischen Wechselwirkung mit der N₇H Gruppe um ca. 100 Wellenzahlen blau auf ca. 3680 cm^{-1} verschoben sein sollte. Dieser sterische Effekt sollte konsequenterweise für das methylysubstituierte 7M-A-E_c noch größer ausfallen. Wir erwarten also eine mindestens ebenso große Verschiebung der O-H Streckschwingungsfrequenz für die *cis*-Form. Aus diesem Grund ordnen wir das Konformer A analog zum Guanin A einer *trans*-Form: 7M-A-E_t zu.

7-MG Konformer B Beim im UV-Spektrum rund 500 cm^{-1} blau verschobenen Konformer B zeigen die IR-Experimente von Mons kein Dublett im höherfrequenten IR-Bereich, sondern stattdessen nur eine einzige Bande bei 3456 cm^{-1} , was von den Autoren der symmetrischen NH₂ Streckschwingung zugeordnet wurde. Die asymmetrische NH₂ der mutmaßlichen Ketoform sei vermutlich aufgrund der apparativbedingten Lücke zwischen $3470\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ nicht zu sehen.

Unser mid-IR-Spektrum zeigt zwei prominente Banden bei 1689 und 1727 cm^{-1} . Wie bei den Guaninkonformeren B und C lässt sich die höherfrequente Bande einer C=O Streckschwingung zuordnen. Die Rotverschiebung derselben im Vergleich zu Guanin um ca. 11 oder 12 cm^{-1} lässt sich leicht verstehen, wenn man eine Wechselwirkung zwischen Carbonylsauerstoff und Methylgruppe entweder direkt über eine Wasserstoff-Brücke oder indirekt über einen induktiven Effekt seitens der Methylgruppe wie beim 7-MG Konformer A in Betracht zieht, denn auch die C=N Streckschwingung der Iminofunktion ist im Vergleich zum Guanin B mit rund 3 cm^{-1} auf 1689 cm^{-1} leicht rotverschoben.

Die vorliegenden Ergebnisse belegen zwar eindeutig die Imino-Ketoform des 7-MG Konformer B, jedoch kann eine Eingrenzung auf das entsprechende *up* oder *down* Konformer

wie beim Guanin nicht erfolgen, da bis jetzt die zum Vergleich notwendigen spektralen Informationen zum 7-MG Konformer C, sowie konkrete theoretische Schwingungsfrequenzen fehlen. Jedoch tendieren wir im Falle des 7-MG Konformer B aufgrund des durch die Methylierung hervorgerufenen moderaten Rotshifts von 207 cm^{-1} im UV-Spektrum (im Vergleich zum Guaninkonformer B) gegenüber mehr als 700 cm^{-1} beim Vergleich mit Guanin C zu einer analogen Struktur wie beim Guaninkonformer B. 7-MG Konformer B hat also wahrscheinlich die Struktur 7M-I_u-O.

6.1.3 IR/UV–Doppelresonanz von 9-MG

Das 9-Methylguanin insbesondere das Amino-Oxo Konformer 9M-A-O ist aus biologischer Sicht aufgrund der stärkeren Verwandtschaft zum Guanosin sicherlich das interessantere Methylderivat des Guanins. Das R2PI-Spektrum von 9-MG wurde zuerst von Kleiner-manns/de Vries veröffentlicht [14]. Das Spektrum ist im Vergleich zum Guaninspektrum überaus kurz und besitzt auch nicht die Dichte an Übergängen.

Der Ursprung des 9-Methylguanins (9-MG) findet sich bei 34612 cm^{-1} und liegt damit über 1800 Wellenzahlen blau vom 0-0 Übergang des Guaninkonformers A. Dieser Umstand widerspricht scheinbar der üblichen Rotverschiebung, welche durch die Methylierung bedingt ist und veranlasste Mons zu näheren Untersuchungen an Guanin und 9-MG. Er fand beim Guanin Hinweise auf ein weiteres Konformer D, welches im nahen Infraroten ein ähnliches Pattern zeigt wie Konformer A. Und auch das Nah-IR-Spektrum des bislang einzig gefundenen 9-Methylguaninkonformers zeigt starke Verwandtschaft mit den Strukturen A und D von Guanin. Mons fand bei 3582 respektive 3589 cm^{-1} ein ähnliches Dublett wie bei den enolischen Guaninformen.

In unseren mid-IR-Spektren von 9-MG (obere Spur) sind bei 1597 , 1604 , 1614 , 1642 und 1658 cm^{-1} insgesamt fünf prominente Banden zu entdecken. Zunächst fällt auf, dass ganz offensichtlich keine C=O Streckschwingung oberhalb von 1720 cm^{-1} zu beobachten ist. Ebenso wenig lässt sich eine C=N Streckschwingung wie im Falle der Guanin Konformere B (1692) und C (1689), sowie des 7-Methylguanins B (1682) oberhalb von 1680 cm^{-1} entdecken. Trotz gewisser Unterschiede in den mid-IR-Spektren ähnelt das 9-MG im mittleren Infrarot vielmehr dem Guanin A, dessen Spektrum zu Vergleichszwecken in unten stehender Spur gezeigt ist. Dies erlaubt den Schluss, dass es sich beim beobachteten 9-MG um ein enolisches Konformer (9M-A-E) und nicht um eine Ketoform handelt.

Dies ist im Einklang mit neueren Rechnungen von Marian [217] zu einem noch nicht nachgewiesenen 9M-A-O Konformer. Nach ihren Ergebnissen soll der $\pi\pi^*$ Übergang des denkbaren 9M-A-O Konformers bei ungefähr 32300 cm^{-1} liegen, sowie ähnliche Oszillatorstärken wie das bisher nicht in Molekularstrahlexperimenten gefundene 9H-A-O Guaninkonformer, aber auch vernachlässigbar kleine Franck–Condon–Faktoren ($< 10^{-57}$) besitzen. Weiterhin existiert für das 9M-A-O eine konische Durchschneidung zwischen $\pi\pi^*$ und dem Grundzustand, welche nach Marians Rechnungen sogar unterhalb des Energieminimums des elektronisch angeregten Zustands eintritt. Die konische Durchschneidung ist vom Potentialwall nur durch eine geringe Barriere getrennt, wobei letztere durch die Inversionsschwingungsmode der Aminogruppe hervorgerufen wird. Langer und Doltsinis

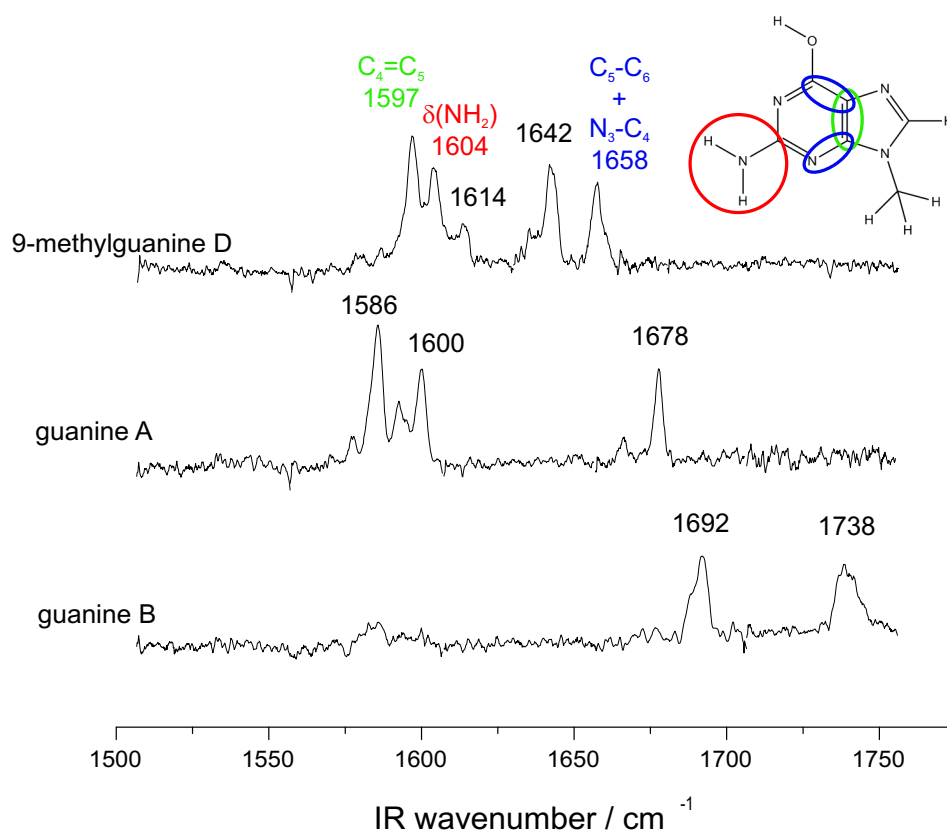


Abbildung 6.3: IR/UV-Doppelresonanzspektrum 9-Methylguanin (obere Spur). Darunter zum Vergleich das IR/UV-Doppelresonanzspektrum der Guaninkonformere A und B

[218, 219] führten CPMD (Car-Parrinello molecular dynamics)-Studien durch und fanden für die Amino-Ketoform des 9-MG nach Photoanregung ein thermisch instabiles quasi planares Minimum, welches nach ungefähr 30 fs Simulationszeit in das globale Minimum der S_1 -Potentialhyperfläche übergeht. Dieses Minimum zeichnet sich durch eine stark verzerrte *out-of-plane*-Struktur der Aminogruppe aus.

Offensichtlich ist also die Photoanregung eines Amino-Keto-Konformers von 9-MG mit einem sehr schnellen strahlungslosen Prozess verbunden. Das hat zur Folge, dass ein solches Konformer kein scharfes REMPI-Spektrum aufweisen würde, sondern entsprechend diffus und lebensdauerbreit, wie es auch für die übrigen biologisch relevanten Formen der DNA-Basen beispielsweise beim Adenin üblich ist.

Bis heute findet sich in Molekularstrahlexperimenten von Mons et al. und unserer eigenen Arbeitsgruppe kein Hinweis auf das Vorliegen eines Konformers mit breitem Spektrum. Möglicherweise reichte dazu der durchgestimmte Bereich ($\pm 1000 \text{ cm}^{-1}$ um den Ursprung

des 9M-A-E) nicht aus, oder die extrem niedrigen FC-Faktoren verhindern trotz annehmbarer Oszillatorstärken eine wirksame Detektion.

6.2 Tryptophan-Serin Wassercluster (TrpSer(H_2O))

Nach unseren Arbeiten an dem Dipeptid Tryptophan-Serin stellte sich die Frage, ob und inwieweit sich die Struktur des Dipeptides ändert, wenn es Wechselwirkungen mit einem Lösungsmittel unterworfen ist. Ändert sich die Konformation des Peptids, oder sind sogar zwitterionische Formen auszumachen, in denen Aminosäuren und Peptide in der kondensierten Phase üblicherweise vorliegen?

In diesem Experiment wurde die schrittweise Solvation durch Koexpansion (ca. 3bar gegen Vakuum) von Wasserdampf mit dem Trägergas Argon und anschließendes „pick up“ mit der desorbierten Probe simuliert. Während der Expansion können sich durch die polaren Gruppen beider Spezies (TrpSer und Wasser) wasserstoffbrückegebundene Cluster bilden, die entsprechend ihrer Größe im Flugzeitmassenspektrometer diskriminiert und nachgewiesen werden können. Für gewöhnlich erreicht man so eine sequentielle Solvation, d.h. man erhält Cluster unterschiedlicher Größe und damit anderer Masse. Anhand der Flugzeit wurde auf diese Weise der Einfach-TrpSer-Wassercluster TrpSer(H_2O) identifiziert und spektroskopisch näher untersucht.

Bei Molekularstrahlexperimenten zeigt sich, dass in aller Regel die Clusterbildung erst später im Überschalldüsenstrahl erfolgt, so dass die Triggerzeiten entsprechend etwas andere sind als bei optimalen Monomerbedingungen. In diesem Experiment wurde die Position auf dem Gaspuls etwa $40\mu s$ zu späteren Zeiten verschoben, um ein intensiveres Ionensignal des Einfachwasserclusters zu erreichen.

Der spektrale Bereich von 34000 cm^{-1} bis 35000 cm^{-1} wurde auf elektronische Übergänge des Wasserclusters untersucht. Es konnten jedoch keinerlei scharfe Resonanzen registriert werden, weswegen auch eine Abbildung des Spektrums unterbleibt. Möglicherweise handelt es sich um ein intensitätsschwaches, breites Spektrum. Ein ebensolches breites und strukturloses Spektrum wurde schon von Snoek et al.[146] für Tryptophan-Wassercluster ($\text{Trp}(H_2O)_1$) gefunden. Die spektrale Verbreiterung könnte durch erhöhte molekulare Temperaturen im Vergleich zum Monomer in der Argonexpansion, verkürzte Lebensdauern der Cluster oder eine Vielzahl vibronischer Banden hervorgerufen werden. Selbst unter unseren bestmöglichen Clusterbedingungen betrug die Signalintensität der TrpSer-Wasserclusterionen nur ein Bruchteil von der des TrpSer-Monomers. Dies war sogar bei UV-Laser Frequenzen der Fall, die rot vom Anregungsspektrum des Monomers liegen. Das heißt, dass sogar das nichtresonante Ionensignal des TrpSer stets größer als das des Wasserclusters war. Weitere Ionensignale von höheren Clustern konnten nicht verifiziert werden. Nur selten ließ sich auf der Masse TrpSer(H_2O)₂ ein Ionensignal ausmachen,

dass allerdings im Rauschen der Grundlinie unterging.

Die Desorptionsquelle ließe für zukünftige Wasserclusterexperimente durch eine spezielle Kühlung der Desorptionsmimik modifizieren, so dass durch Desorption eines Substrat/Eis-Gemisches eine entsprechend verbesserte Clusterbildung möglich wäre.

6.2.1 IR-UV Doppelresonanz

In der Hoffnung dennoch ein Infrarotspektrum des Einfachwasserclusters erhalten zu können, wurde der Analyselaser für das IR/UV-Doppelresonanzexperiment auf eine Frequenz von 34400 cm^{-1} und damit rot vom ersten vibronischen Übergang des TrpSer-Monomers (34549 cm^{-1}) abgestimmt.

Anhand der Strukturen von TrpSer und Wasser kann man im nahen Infrarot insgesamt 6 Banden erwarten, wenn man einmal von C-H Schwingungen und den gewöhnlich intensitätsschwachen Schwingungen der NH_2 -Gruppe absieht. Letztere sind bei Dipeptidexperimenten noch nicht beobachtet worden und besitzen zumindest nach den jeweiligen Rechnungen ausgesprochen geringe Infrarotaktivitäten. Übrig bleiben die Streckschwingungen folgender Gruppen, angefangen beim TrpSer-Anteil des Clusters: die freie bzw. im Sinne einer H-Brücke gebundene O-H Streckschwingung der Säuregruppe (COOH), die O-H der Serinseitenkette (CH_2OH), die peptidische NH Streckschwingung, sowie die indolische NH Schwingung des Tryptophans. Hinzukommen noch vom Wassermolekül sowohl die freie als auch die gebundene O-H Streckschwingung. Weiterhin sind Banden der C-H Streckschwingungen zwischen 2900 und 3100 cm^{-1} zu erwarten, welche vom Indolsystem wie auch vom Serinrest stammen. In nachstehender Abbildung ist das erhaltene Infrarotspektrum des Wasserclusters gezeigt.

Die Schwingung bei 3723 cm^{-1} kann basierend auf Experimenten von Simons et al. an Tryptophan-Wasserclustern [146] der freien O-H Streckschwingung des Wasserrestes zugeordnet werden. Für eine Schwingung im Dipeptidrest läge diese Bande nach unseren bisherigen Erkenntnissen Dipeptide betreffend ohnehin deutlich zu hochfrequent. Die Bande bei 3585 cm^{-1} wäre ein typischer Wert für eine freie COOH -Gruppe, allerdings zeigten unsere Untersuchungen am TrpSer-Monomer in Verbindung mit neusten Rechenmethoden, dass die Bande im Monomer einer schwach gebundenen O-H der Serinseitenkette angehört und die COOH in den stabilsten Konformeren bedingt durch eine starke intramolekulare H-Brücke sehr weit rot auf ungefähr 3050 cm^{-1} verschoben ist.[220] Wie in den beiden Monomerspektren lässt sich auch im Wassercluster eine stark verbreiterte Bande um 3030 cm^{-1} feststellen, was als deutliches Indiz auf eine H-Brücken

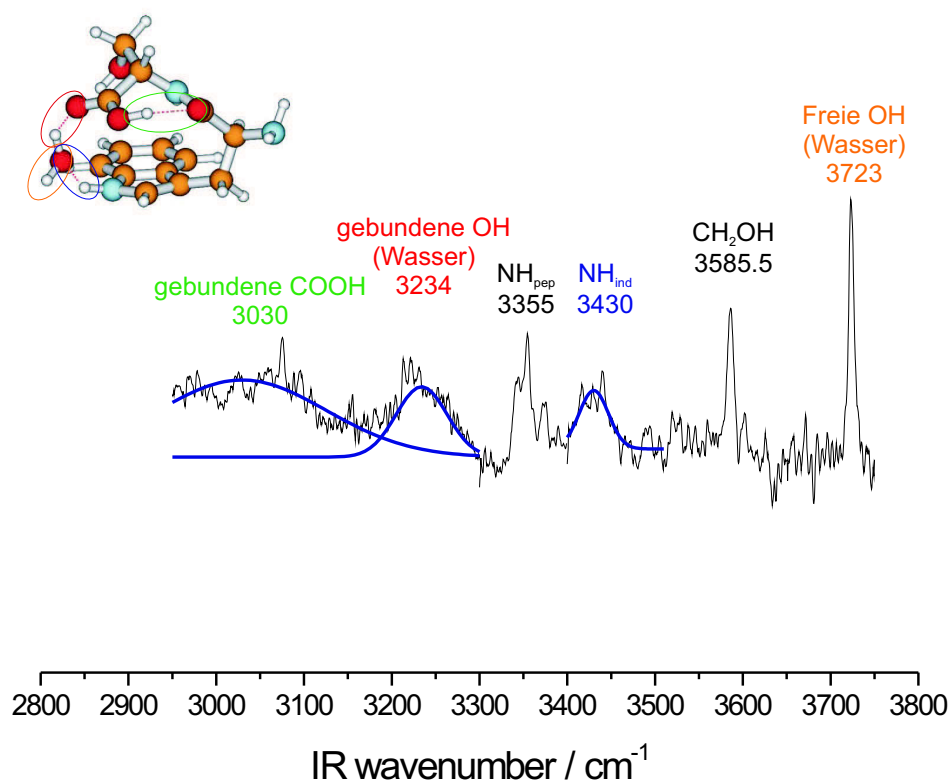


Abbildung 6.4: IR/UV Doppelresonanzspektrum von TrpSer(H_2O). Zur besseren Anschauung sind unter den spektral verbreiterten Banden Gaußskurven eingezeichnet. Dabei handelt es sich um eine rein qualitative Skizzierung, für konkretere Angaben ist das Signal-Rauschverhältnis zu schlecht, da sich vor allem im Bereich von 2900 und 3100 cm^{-1} weitere C-H Schwingungen befinden, welche zu der breiten Absorption beitragen (vergl. TrpSer-Monomer[220])

involvierte COOH gewertet werden kann, zumal derartige Rotverschiebungen einer Hydroxylschwingungen noch nicht beobachtet worden sind. So sind aus Experimenten an *cyclo*-PheSer einige Konformere bekannt, bei denen die O-H der Serinseitenkette in Wasserstoffbrückenbindungen involviert sind, allerdings lagen diese stets über 3400 cm^{-1} . [180] Ähnliches gilt auch für das Pentapeptid FDASV, wo die im Sinne einer H-Brücke gebundene O-H-Gruppe der Serinseitenkette nahe 3400 cm^{-1} lokalisiert ist. [181] Die Tatsache, dass keine freie O-H Streckschwingung des Serinrestes - wie unter Ref. [180] beschrieben - zu beobachten ist, liefert ebenfalls Grund zu der Annahme, dass der Fall hier ähnlich liegt wie im Monomer und die diskutierte Band bei 3585 cm^{-1} der

schwach wechselwirkenden CH_2OH zuzuordnen ist.

Interessanterweise ist bei ca. 3520 cm^{-1} keine freie NH_{Ind} zu erkennen, wohl aber eine Schwingungsbande bei 3430 cm^{-1} , welche offensichtlich spektral verbreitert ist. Die indolischen NH-Schwingungsfrequenzen des TrpSer-Monomers betragen zum Vergleich: TrpSer Konformer A bei 3503 , Konformers B bei 3521 cm^{-1} . Die relative Rotverschiebung der NH_{Ind} im Monomerkonformer A wird durch eine Wechselwirkung der indolischen NH mit dem Carbonylsauerstoff der endständigen Säuregruppe hervorgerufen. Dabei ist der Wasserstoff *out-of-plane* im Sinne der vom Indol definierten Ebene zum Sauerstoff geneigt (vergleiche die Struktur des Konf. ws01 aus[220]). Die Struktur ws01 des TrpSer-Monomers allein erklärt allerdings nicht den starken Shift einer möglichen NH_{Ind} im TrpSer-Wassercluster bis auf 3430 cm^{-1} . Der Carbonylsauerstoff ist für eine stärkere Wechselwirkung erstens zu weit entfernt und zweitens nicht in geometrisch optimaler Position (annähernd lineare Koordination von $\text{N-H}\cdots\text{O}=\text{C}$). Ein ähnlich starker Akzeptorpartner steht intramolekular nicht zur Verfügung, da mit dem Sauerstoff des Serinrestes zwar hypothetisch ein weiterer Partner existiert, dann aber die CH_2OH Schwingungsfrequenz des Wasserclusters entscheidend vom Monomerwert abweichen würde. Dies und die Tatsache der spektralen Verbreiterung der Schwingungsbande gibt Anlass zur Vermutung, dass es sich hier um die Wechselwirkung der indolischen N-H mit dem assoziierten Wassermolekül handelt. Unterstützung findet diese Annahme durch Infrarotuntersuchungen von Zwier et al. an Indol-Wasser, wo eine ebensolche H-Brücke die NH_{ind} -Streckschwingung auf 3436 cm^{-1} rot verschob[221]. Dabei fungiert die NH-Gruppe des Indols als Donor, während der Sauerstoff des Wassermoleküls die Akzeptorrolle einnimmt.

Nach unseren Erkenntnissen aus den Monomereperimenten sind die peptidischen N-H-Schwingungsfrequenzen beider TrpSer-Konformere auf unterhalb von 3400 cm^{-1} verschoben. Ein völlig gestrecktes Peptidrückgrad resultiert in einer wechselwirkungsfreien Amidgruppe, deren NH_{pep} an tryptophanhaltigen Peptiden um 3450 cm^{-1} auszumachen ist. Im TrpSer-Dipeptid ist die Carbonylfunktion der Peptidbindung einer Wechselwirkung mit der endständigen COOH in *trans*-Konfiguration unterworfen, was selbst ohne direkte Wasserstoffbrückenbindung seitens der peptidischen NH eine Rotverschiebung der N-H_{pep} Schwingungsfrequenz zur Folge hat. Es wird Elektronendichte aus der Amidbindung abgezogen, was letztendlich auch die Schwächung der N-H-Bindung zur Folge hat. Ähnliches mag auch für den Wassercluster gelten, dessen NH_{pep} -Schwingungsfrequenz noch ein wenig röter als das der beiden Monomerkonformere liegt. Allerdings zeigten Rechnungen, die im Rahmen unserer Untersuchungen an ProTrp entstanden sind, dass

eine derartige Rotverschiebung der peptidischen N-H Frequenz eine weitere Wechselwirkung erforderlich macht. Dabei ist die NH_{pep} Schwingungsfrequenz nur in solchen Strukturen auf ungefähr 3350 cm^{-1} verschoben, wenn neben der $COOH \cdots O=C_{pep}$ die NH_{pep} in einer zusätzlichen direkten H-Brücke involviert ist. Die Frequenzshifts verhalten sich annähernd additiv. Jedoch liegen die skalierten DFT-Frequenzen am Beispiel des ProTrp im Vergleich zum Experiment ungefähr 40 cm^{-1} zu blau, d.h. die wechselwirkenden Einflüsse auf die Amidgruppe werden unterschätzt.

Ob hier neben der Rückfaltung durch die *trans*-COOH noch eine weitere Wechselwirkung, möglicherweise direkter Art mit dem assoziierten Wasser, vorliegt, lässt sich ohne nähere theoretische Untersuchungen unter Berücksichtigung dispersiver Wechselwirkungen, wie es z.B. das neue von Grimme entwickelte Dichtefunktional erlaubt[29], nicht sicher ausschließen. Dennoch tendieren wir aufgrund des noch moderaten Shifts von 20 cm^{-1} der NH_{pep} -Schwingungsfrequenz des Wasserclusters im Vergleich zum Monomer zu einer nicht wasserassoziierten NH. Die Rotverschiebung der N-H Frequenz wäre auch in solchen Fällen denkbar, wenn die Wasserstoffbrückenbindung $COOH \cdots O=C_{pep}$ stärker als im Monomer ausfallen würde. Das tritt z.B. dann ein, wenn die Säuregruppe acider wird. Fungiert das Wassermolekül als Protonendonator z.B. für den Carbonylsauerstoff der Säurefunktion, so lässt sich spekulieren, dass aus der gesamten Hydroxylgruppe Elektronendichte abgezogen wird und dann als Konsequenz die Acidität der Säuregruppe steigt, was wiederum eine stärkere Wechselwirkung seitens der COOH mit dem peptidischen Sauerstoff erklären kann.

Bleibt zum Schluss noch die Bande bei 3234 , sowie ein spektral breites Feature, dessen Maximum etwa bei 3030 cm^{-1} liegt und zusätzlich eine schwache, aber reproduzierbare Bande bei 3075 cm^{-1} aufweist. Die breite Bande hatten wir bereits basierend auf unseren Überlegungen bezüglich des TrpSer-Monomers der wasserstoffbrückengebundenen *trans*-COOH zugeordnet. Die intensitätsschwache Bande bei rund 3075 cm^{-1} , welche auf der breiten Bande lokalisiert ist, wird von uns einer CH-Schwingung zugeschrieben, was in recht guter Übereinstimmung zu Ergebnissen an Indol und Tryptophan und dem TrpSer-Monomer ist.[209, 210, 220]

Wenn die bisherige Zuordnung korrekt ist, bleibt für die Bande bei 3234 nur die OH-Schwingung des Wassermoleküls übrig, die direkt an einer H-Brücke beteiligt und somit nicht mehr frei ist.

Aus den bisherigen Überlegungen schlagen wir eine Struktur für den Wassercluster vor, der im wesentlichen auf die Struktur des TrpSer-Monomerkonformers ws01

zurückgeht[220]. Dabei ist TrpSer über zwei Wasserstoffbrücken mit dem Wasserrest verbunden, zum einen über die indolische NH als Wasserstoffdonor, aber auch andererseits mit der Carboxylgruppe als Wasserstoffakzeptor.

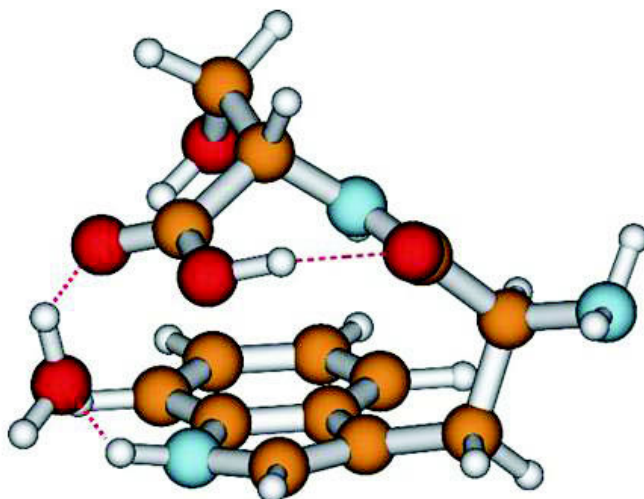


Abbildung 6.5: Strukturvorschlag von TrpSer(H₂O). Die Wasserstoffbrücken intra- wie auch intermolekular sind durch rote gestrichelte Linien hervorgehoben. Das Wassermolekül ist über die indolische NH und die Carboxylgruppe in zwei Wasserstoffbrücken mit dem TrpSer-Rest involviert.

6.3 Pentapeptid (AlaAlaAlaTyrAla)

Die Aufklärung der Sekundärstruktur des ungeschützten Pentapeptids Alanin-Alanin-Alanin-Tyrosin-Alanin ist im Hinblick auf die mögliche Ausbildung von helikalen Strukturen interessant. Die rechtsdrehende Spirale der α -Helix umfasst im Durchschnitt 3,6 Aminosäureseitenketten, wobei sie durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen n -tem Amidsauerstoff und $(n+4)$ ter NH_{pep} stabilisiert wird. Die Aminosäure Alanin findet sich nach der Glutaminsäure besonders häufig in α -Helices und ist daher auch als Helixbildner bekannt. In dem von uns untersuchten Pentapeptid sind also alle Voraussetzungen für eine α -Helix gegeben.

Das Pentapeptid wurde wie die ungeschützten Dipeptide mit Graphit im Verhältnis 1:2 gemischt und im Vakuum desorbiert. Als Trägergas diente auch hier Argon (Stagnationsdruck ca. 3 bar gegen Vakuum)

6.3.1 R2PI

In Abbildung ist das Einfarben-R2PI des Pentapeptids AlaAlaAlaTyrAla dargestellt.

Es fällt sofort auf, dass abgebildete REMPI-Spektrum recht breit ist. Dies erscheint zunächst ungewöhnlich, wenn man an bisherige REMPI oder LIF-Spektren von Tyrosin[222, 223, 224] und tyrosinhaltigen Dipeptiden[156] denkt. Zu beachten ist allerdings, dass die Anzahl möglicher Konformere beim Pentapeptid sehr viel größer ist. Die hohe Anzahl potentieller Konformere kann dazu führen, dass gleich mehrere Konformere im Molekularstrahl ausgefroren werden, die im gleichen Spektralbereich vibronische Spektren liefern und sich ihre Banden überschneiden. De Vries beobachtete beispielsweise für Tyrosin Konformerpaare mit geringer Energiedifferenz, die zwei möglichen phenolischen O-H Orientierungen zugeschrieben wurden.[156]. Für erste Lochbrennexperimente wurde der UV-Laser auf die Frequenz 35520 cm^{-1} abgestimmt.

6.3.2 IR/UV Doppelresonanz

Basierend auf unseren Erkenntnissen bei den Dipeptiden können für das Pentapeptid im nahen Infraroten insgesamt 6 Schwingungen erwartet werden. Eine phenolische O-H Schwingung der Tyrosinseitenkette bei ungefähr 3655 cm^{-1} [225, 224], sowie möglicherweise eine freie COOH bei ungefähr 3585 cm^{-1} und vier peptidische N-H Schwingungen. Das Infrarotspektrum des Pentapeptids im Bereich des nahen Infraroten von $3200\text{--}3750 \text{ cm}^{-1}$ ist in Abb. 6.7 abgebildet.

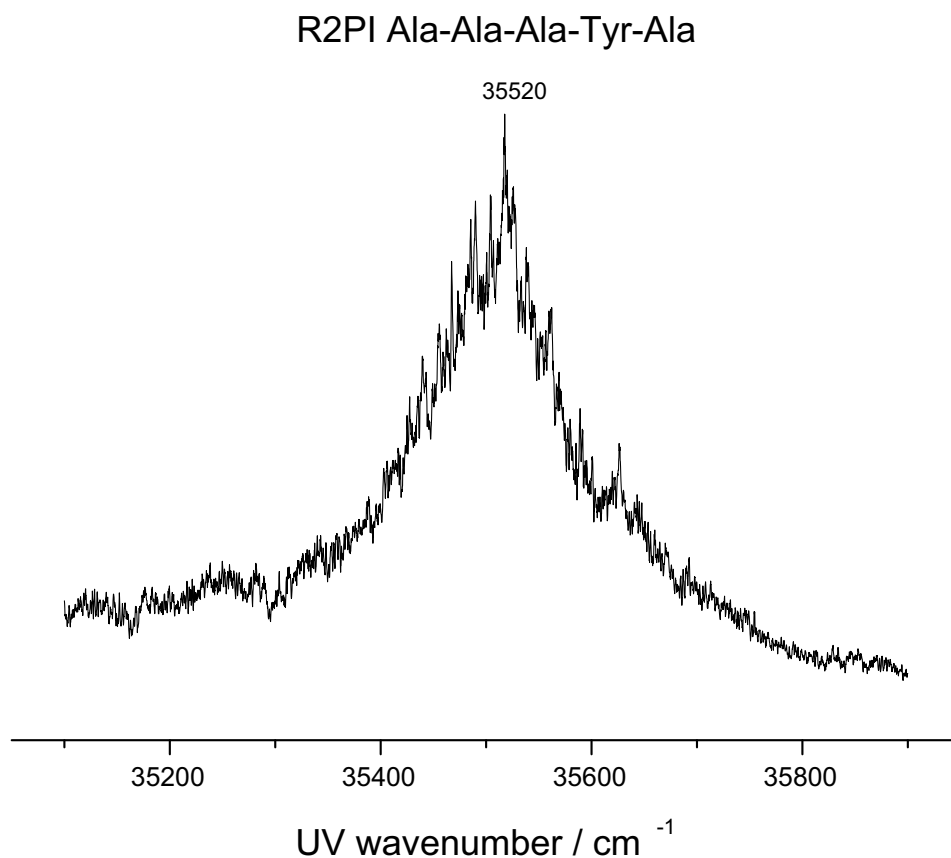


Abbildung 6.6: R2PI-Spektrum des Pentapetids AlaAlaAlaTyrAla, aufgenommen auf der Muttermasse

Tatsächlich lassen sich sowohl die tyrosinische O-H als auch eine Schwingung wie sie typisch für eine freie COOH ist beobachten. Dabei fallen unmittelbar zwei Dinge auf. Erstens zeigt die Bande bei 3661 cm^{-1} auf der roten Seite noch eine weitere kleinere Struktur (3651 cm^{-1}). Dabei könnte es sich um zwei verschiedene rotamere Formen der O-H des Tyrosins handeln, die aufgrund unterschiedlicher chemischer Umgebung geringfügig andere Schwingungsfrequenzen aufweisen. Weiterhin erscheint die von uns der freien COOH zugeordneten Bande im Vergleich mit der Tyrosin-OH bei 3661 cm^{-1} und des NH_{pep} -Bereichs deutlich schwächer. Das könnte ein Anzeichen für unterschiedliche Konformere sein. In Anbetracht des breiten, nicht näher separierten REMPI-Spektrums ist dies dann sogar wahrscheinlich. So wurden bei der gewählten Frequenz womöglich mindestens zwei

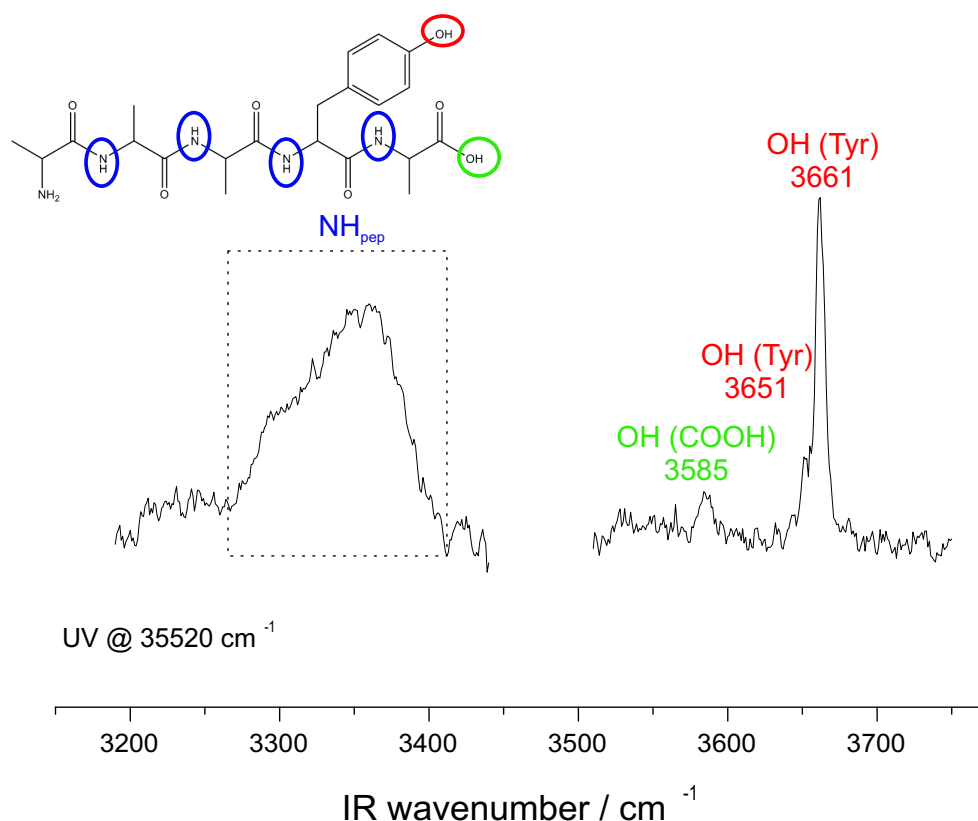


Abbildung 6.7: IR/UV des AlaAlaAlaTyrAla-Pentapeptids.

Konformere nicht spektral von einander diskriminiert und nur die unterschiedlichen IR-Intensitäten geben darauf einen Hinweis. Im Hinblick auf die IR-Intensitäten der beobachteten O-H Schwingungsbanden wählten wir in einem ersten Experiment eine andere Analyselaserfrequenz (35450 cm^{-1}), in der Hoffnung, dass sich das Verhältnis der beiden Konformere zu einander ändert. Die IR-Intensitäten blieben aber vergleichbar.

Im IR-Bereich unterhalb von 3400 cm^{-1} lässt sich nur eine breite unsymmetrische Bande erkennen. Basierend auf der Idee, dass wir wenigstens zwei Konformere nebeneinander beobachten, tragen also mindestens 8 peptidische NH Schwingungen dazu bei.

Für nähere Betrachtungen müssen die Konformere spektral von einander getrennt werden. Hier kämen UV/UV-Doppelresonanzuntersuchungen in Betracht. Für den Vergleich mit theoretischen Berechnungen wären weiterhin auch infrarotspektroskopische Messungen im mittleren Infraroten hilfreich.

6.4 Häm- / Chlorophyll- Modellsysteme

Als letzter Vertreter der Modellsysteme wurde ein phenylsubstituiertes Derivat des Porphins, das Tetra-Phenyl-Porphyrin, für die laserspektroskopischen Untersuchungen herangezogen. Später erfolgten Versuche mit unsubstituiertem Porphin. Das Porphinsystem ist der Prototyp aller Porphyrinderivate und besteht aus vier cyclisch angeordneten Pyrrolringen, die untereinander mit Hilfe von vier Methingruppen verbunden sind. Das Molekül ist ein *Hückel*-Aromat und dementsprechend planar aufgebaut. Chemisch gesehen bilden Porphyrine außerordentlich interessante vierzählige Liganden, die in vielfältigen Metallchelatkomplexen zum Einsatz kommen. So sind zum Beispiel im Chlorophyll der Pflanzen Mg^{2+} -Ionen äquatorial im Porphyrinsystem koordiniert. Ähnliches gilt für Fe^{2+} im Hämoglobin oder Myoglobin des menschlichen Körpers. Bei den Cytochromen ist der Einfluss des Porphyrinsystems auf das Redoxverhalten des zentralen Eisenions für die sogenannten Elektronenübertragungsreaktionen in der Atmungskette mit verantwortlich.

Infolge des sehr niedrigen Dampfdrucks von Porphinderivaten sind Gasphasenexperimente relativ rar. Edwards et al. präsentierten 1971 für Porphin und TPP, sowie einige Metall-TPP-Komplexe stationäre UV-Absorptionsspektren in der Gasphase.[226]. Die ersten Gasphasenspektren mit vibronischer Auflösung erfolgten durch Even et al. [227, 228, 229] mit Hilfe der laserinduzierten Fluoreszenz (LIF).

6.4.1 H₂TPP

Even präsentierte Fluoreszenz-Anregungsspektren im Bereich der Q_x -, Q_y - und der Soretbande des Tetraphenylporphyrins [227]. Sie expandierten das TPP bei rund 450 °C Düsentemperatur mit He ($P \approx 1200$ Torr). Im Bereich der Q_x -Bande, von 641 bis 625 nm, wurden scharfe Übergänge gefunden (FWHM 1–2 cm^{-1}). Der Ursprung liegt bei 15617 cm^{-1} bzw. 640,33 nm. Im Spektralbereich bis ca 200 cm^{-1} blau vom Ursprung finden die Autoren zwei weitere Banden, die sie Torsionsanregungen der Phenylringe relativ zur Porphinebene zuschreiben. Diese Banden lassen sich auch als Progressionen auf anderen fundamentalen Schwingungsfrequenzen im Bereich der Q_x -Bande bei höheren vibronischen Frequenzen feststellen. Ähnliches gilt nach Aussage der Autoren auch für die Q_y -Bande. Hier lässt sich jedoch keine wohldefinierte Schwingungsstruktur ausmachen. Sie führen als Begründung eine effektive elektronische Relaxation der Art $S_1^y \longrightarrow S_1^x$, sowie eine homogenene Verbreiterung der elektronischen Schwingungsübergänge infolge der bereits beobachteten Torsionsbewegung der Phenylreste.

Für den Bereich der Soretbande konnten Even et al. die Übergänge $S_0 \longrightarrow S_2^x$ unterhalb von 400 nm beobachten, allerdings fanden sie bis hinunter auf 370 nm keinen Hinweis auf das entsprechende $S_0 \longrightarrow S_2^y$ -Pendant. Im Bereich von 395–399 nm lässt sich wiederum eine Schwingungsprogression beobachten, deren erste Komponente ihren Ursprung bei 398,1 nm hat.

Basierend auf diesen Daten wollten wir mittels (1+1)-REMPI im Bereich der Soretbande $S_0 \longrightarrow S_2^x$ vibronische UV-Spektren aufnehmen. REMPI besitzt gegenüber LIF den Vorteil der Massenauflösung, so dass auch Porphyrinaggregate identifiziert und untersucht werden können. Infolge der für unsere thermischen Quellen unerreichbaren Verdampfungstemperaturen des H_2 TPP kam die Laserdesorption zum Einsatz. Es wurde zu diesem Zweck eine Mischung von H_2 TPP:Graphit in Höhe von 1:1 verwendet. Als Trägergas diente Argon, der Stagnationsdruck wurde zunächst auf ca. 3 bar gegen Vakuum festgelegt. Es ließen sich aber auf der Masse des TPP keinerlei Resonanzen im Bereich von 395 bis 400 nm detektieren, obwohl wir verschiedene apparative Parameter wie Expansionsdrucke und Laser- und Pulsdüsenöffnungszeitpunkt variierten. Auch ein (1+1')-REMPI mit 266 nm als Ionisationsfarbe brachte keine Ergebnisse im Hinblick auf ein vibronisches Spektrum, obwohl einwandfrei ein Zweifarbeffekt festgestellt werden konnte. Die Ionisationsfarbe wurde soweit abgeschwächt, dass sie nahezu kein nichtresonantes Ionensignal lieferte und zeitgleich mit dem Anregungslaser eingestrahlt. Die räumliche Überlappung beider Laserpulse wurde angepasst und die zeitliche Überlappung über eine Photodiode sichergestellt. Es zeigte sich, dass das H_2 TPP-Ionensignal resultierend aus beiden Laserpulsen größer als die Addition der Ionensignalintensitäten der separaten Laserpulse (jeweils Anregungs- oder Ionisationslaser geblockt) war. Die Energie aus beiden Photonen reichte sicher aus, um das Porphyrin zu ionisieren, aber möglicherweise ist es ultraschnellen Relaxationsvorgängen $S_2^x \longrightarrow S_1^x$ zu verdanken, dass wir nicht in der Lage sind, REMPI-Spektren zu erhalten. Einen Hinweis darauf liefern auch schon Even et al.[227] bei der Betrachtung der Linienbreiten von Soret und Q-Bande. Nach erster Abschätzung sollten die rotatorische Verbreiterung der Schwingungsbanden in beiden Zuständen ungefähr gleich sein. Jedoch sind die Schwingungsbanden im Bereich der Soretbande um einen Betrag von ca. 1 cm^{-1} breiter, welcher wahrscheinlich durch elektronische Relaxation hervorgerufen wird. Hieraus errechneten Evens et al. eine obere Grenze der Soret-Lebensdauer von ungefähr 5 ps, was eine effektive Ionisation in unserem Experiment schwierig macht. Neuere fs Pump-Probe-Untersuchungen an Metalloporphyrinderivaten von Shafizadeh et al. [230] scheinen die kurze Lebensdauer des Porphyrin S_2 -Zustandes im Picosekundenbereich zu bestätigen.

Daher wurde der Versuch unternommen, die Anregungsfarbe im Hinblick auf eine Anregung der Q-Bande zu variieren und der Anregungslaser entsprechend umgestellt (0-0: 15617 cm^{-1} , vergl. [227]). Hier soll die Lebensdauer knapp 10 ns betragen. Auch hier konnte der bereits oben beschriebene Zweifarbeffekt festgestellt werden. Jedoch konnten wir ebensowenig durch Durchstimmen der Q-Bande zu einem vibronischen Spektrum gelangen. Die Variation des Gasdrucks, sowie die zeitliche Variation der Lasertimings führte nicht zu scharfen REMPI-Resonanzen.

Unsere nächste Idee beruhte auf der Wahl eines anderen Expansionsgases, da das desorbierte H_2TPP infolge der großen Massendifferenz zum Argon möglicherweise durch Stöße nicht gut abgekühlt wird. Daher wählten wir als weitere Expansionsgase zunächst Xe und später sogar SF_6 , wobei stets die Pulsdüsen- und Laserdesorptionszeiten im Hinblick auf Ionisationslaser und Ionenabzugspuls zugunsten eines möglichst intensiven Ionensignals angepasst wurde. Auch diese Strategie führte nicht zum Erfolg. Später erfolgten noch Versuche mit 213 nm und 193 nm als Ionisationsfarbe. Aber außer, dass der Zweifarbeffekt bei 193 nm nicht mehr beobachtet werden konnte - hier ist schon ein Photon ausreichend um die Ionisationsschwelle von H_2TPP zu erreichen - blieben wir ergebnislos. Zusätzlich wurde das strukturell rigidere Porphin für die spektroskopischen Untersuchungen herangezogen, dass obendrein eine wesentlich geringere Masse besitzt. Doch auch hier konnte kein REMPI-Spektrum aufgezeichnet werden.

Die Gründe hierfür sind noch unverstanden. Möglicherweise ändert sich beim Übergang $S_1 \longrightarrow IP$ die Geometrie des Moleküls derart stark, dass die Franck-Condon-Faktoren sehr gering sind.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation sind konformerspezifische Infrarotmessungen an Purinbasen (2-Aminopurin, Guanin, 7-Methylguanin, 9-Methylguanin), Oligopeptiden (Prolin-Tryptophan, Tryptophan-Serin, Alanin-Alanin-Alanin-Tyrosin-Alanin), sowie an einem Dipeptid-Wassercluster ($\text{TrpSer}(\text{H}_2\text{O})$) in Überschalldüsenstrahlen durchgeführt worden. Diese Experimente umfassten neben Untersuchungen im nahen Infrarot (hier $2800\text{--}3800\text{ cm}^{-1}$) in einigen Fällen auch den Bereich des mittleren Infrarot ($1500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$). In Verbindung mit den Ergebnissen von *ab initio*-Methoden auf MP2-Niveau (Møller-Plesset 2. Ordnung) bzw. Dichtefunktionaltheorie (B3LYP, B-97D) konnten Schwingungsfrequenzen zugeordnet und somit die Struktur der Moleküle im elektronischen Grundzustand S_0 weitgehend aufgeklärt werden.

Purinbasen Im Falle des 2-Aminopurin konnte mit Hilfe der UV/UV-Doppelresonanz gezeigt werden, dass es sich bei der im Molekularstrahl nachgewiesenen Spezies um ein Tautomer handelt. Die IR/UV- bzw. FTIR-Messungen gaben in Verbindung mit kombinierten DFT und MRCI Methoden (Prof. C. M. Marian, Institut für Theoretische Chemie und Computerchemie der Universität Düsseldorf) den Hinweis, dass es sich dabei um das 9H-Tautomer des 2-Aminopurins handelt. Ebenso konnte die sehr reiche vibronische Struktur des R2PI-Spektrums von 2-AP verglichen mit dem seines strukturverwandten 9H-Adenin, dessen Spektrum schon früh abbricht, plausibel erklärt werden.

Bei den jüngsten Untersuchungen an Guanin kam die von uns an den Dipeptiden ProTrp und TrpSer etablierte und bislang einzigartige Methode zum Einsatz, die in der Kombination von Laserdesorption und midIR-Untersuchungen besteht. Hiermit konnte die bis dato strittige Zuordnung verschiedener Guaninkonformere im Molekularstrahl

geklärt werden. Basierend auf den bekannten und neu gesammelten Daten wurden die Strukturen der Guaninkonformere A, B und C identifiziert und 7H-Amino-Enol (Enol in *trans*-Stellung, Konformer A), sowie 7H-Imino-Keto-Formen mit verschiedenen Orientierungen der Imino-Gruppe (*up* Konformer B, *down* Konformer C) zugeordnet. Das von Mons et al. beschriebene Guaninkonformer D konnte von uns weder vibronisch noch infrarotspektroskopisch nachgewiesen werden.

Im Hinblick auf die Konformerenzuordnung halfen die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit aufgenommen midIR-Spektren der an 7- bzw. 9-Position methylierten Guaninderivate. Deren Strukturen sind bislang noch nicht mit konkreten theoretischen Untersuchungen der möglichen Methylguaninkonformere abgeglichen worden, befinden sich aber im Einklang mit den von uns publizierten Ergebnissen zum Guanin. Für das 7-Methylguanin wurden zwei IR/UV-Spektren den Konformeren 7M-Amino-Enol (A) und 7M-Imino-Keto (B) zugeordnet, während das einzig bislang gefundene 9-Methylguanin einer 9M-Amino-Enolform zugeordnet wurde.

Aminosäuren Wir veröffentlichten als erste die FTIR-Spektren der freien Aminosäuren Prolin, Alanin, Threonin, Cytosin, Methionin, sowie der geschützten Aminosäure Acetyl-Methionin-Methylester. Dabei kam eine eigens entwickelte Methode mit schnellem Heizen der festen Substanz gefolgt von schneller Kondensation zum Einsatz. Die Evaporationstemperatur betrug etwa 250°C. Bei dieser Temperatur ist die thermische Energie vergleichbar mit der Bindungsstärke einer typischen Wasserstoffbrücke. Die aufgenommenen Spektren der freien Aminosäuren zeigen die freie O-H Streckschwingung, sowie die O-H *in-plane-bend*-Schwingung bei ungefähr 1110 cm⁻¹, was ein üblicher Wert für eine nicht Wasserstoffbrücken gebundene Carboxylgruppe ist. Zusätzlich lässt sich feststellen, dass bei allen freien Aminosäuren unter unseren Bedingungen die neutrale und nicht die zwitterionische Form vorliegt. Generell ähneln sich die FTIR-Spektren untereinander bis auf einige Unterschiede im Bereich der CH-Schwingungen um 3000 cm⁻¹ als auch Schwingungen im Bereich zwischen 1600 und 1200 cm⁻¹.

Oligopeptide und Wassercluster Es wurden von den aus UV/UV-Experimenten bekannten Konformeren der Dipeptide Prolin-Tryptophan und Tryptophan-Serin Infrarotspektren im nahen und mittleren IR-Bereich angefertigt. Als erste Gruppe kombinierten wir die Laserdesorption mit midIR-Untersuchungen. Beim ProTrp konnten die beiden

Konformere Strukturen zugewiesen werden, die sich einander zwar in der Ausbildung einer $\text{COOH} \cdots \text{OC}_{\text{pep}}$ Wasserstoffbrücke unterscheiden, aber im Grunde beide die gleiche Konformation des Prolinrestes und die Orientierung der Indolseitenkette im Hinblick auf das Peptidrückgrat einnehmen. Bei beiden Strukturen lassen sich Wechselwirkungen zwischen der peptidischen NH-Gruppe und dem Prolinstickstoff feststellen, was zu einer Rotverschiebung der NH_{pep} -Schwingungsfrequenzen führt. Weiterhin wurde ein erheblicher Einfluss dispersiver Wechselwirkungen sowohl auf die relative Stabilität der Konformere als auch auf die Schwingungsfrequenz der NH_{pep} -Bindung festgestellt, sofern die Amidgruppe mit der Indolseitenkette interagiert.

Im Falle des Tryptophan-Serin erfolgte die Zuordnung der beiden Konformere auf Basis einer Kooperation mit Stefan Grimme (Universität Münster). Letzterer entwickelte ein neues Dichtefunktional (B-97D), welches die Vorteile der Dichtefunktionaltheorie - recheneffizient und schnell - mit dispersiven Wechselwirkungen kombiniert wie sie sonst nur bei erheblich aufwändigeren Methoden (MP2, CC2) berücksichtigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Serinrest in beiden Konformeren oberhalb der Indolseitenkette lokalisiert ist und nicht im Sinne einer vollständig gestreckten Konformation vorliegt. Das energetisch günstigste Konformer zeichnet sich durch eine $\text{NH}_{\text{Ind}} \cdots \text{O}=\text{C}$ Wasserstoffbrückenbindung aus.

Neben der Zuordnung der beobachteten Konformere besticht vor allem die Erkenntnis, dass in der Vergangenheit der Einfluss dispersiver Wechselwirkungen beim Vergleich spektroskopischer Daten mit theoretischen Betrachtungen unter Zuhilfenahme der Dichtefunktionaltheorie stark unterschätzt wurde. Dies ist vor allem für die Entwicklung neuerer effizienter Rechenmethoden interessant. Zusätzlich liefern die hochauflösenden Infrarotspektren an den Dipeptiden eine gute Basis zur Kalibration der errechneten Schwingungsfrequenzen.

Weiterhin konnte mit den Experimenten am Pentapeptid AlaAlaAlaTyrAla demonstriert werden, dass es grundsätzlich möglich ist, schrittweise zu größeren Peptiden überzugehen und Infrarotspektren zu erhalten. Allerdings ist hier sicherlich noch weitere Arbeit notwendig, um im vibronischen Spektrum mögliche Konformere voneinander spektral zu diskriminieren und separierte Infrarotspektren für eine Strukturbestimmung zu erhalten. Hier könnte die UV/UV-Doppelresonanz weiterhelfen.

Ähnliches gilt für den TrpSer-Wassercluster. Es konnten zwar Infrarotmessungen durchgeführt werden, was allerdings durch die geringe Bildung von Dipeptid-Wasserclustern bei der Desorption erheblich erschwert wurde. Dies führte letztendlich zu dem wesentlich schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis im Vergleich zum TrpSer-Monomer. Möglicherwei-

se lässt sich die Bildung des Wasserclusters durch simultanes Desorbieren eines Dipeptid-Eisgemisches verbessern. Hierzu wären jedoch umfangreiche Änderungen an der existierenden Desorptionsquelle erforderlich, die das Herunterkühlen des Desorptionsmaterials ermöglicht, damit das eingefrorene Wasser beim Evakuieren nicht abdampft.

Literaturverzeichnis

- [1] Demtröder, W.: *Laserspektroskopie*. 3. Auflage. Springer, Berlin, 1993.
- [2] Ashkenas, H. und Sherman, F. S.: *Rarefied Gas Dynamics, 4th Symposium Vol. II*. Appl Phys., 1966.
- [3] Anderson, J. B. und Fenn, J. B.: *Velocity distributions in molecular beams from nozzle sources*. *Phys. Fluids* **8** (1965), 780.
- [4] Wedler, G.: *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. 3. Auflage. VCH, Weinheim, 1987.
- [5] Posthumus, M. A., Kistemaker, P. G. und Meuzelaar, H. L. C.: *Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules*. *Anal. Chem.* **50** (1978), 985.
- [6] v. Weyssenhoff, H., Selzle, H. L. und Schlag, E. W.: *Laser-Desorbed large molecules in a supersonic jet*. *Z. Naturforsch.* **40** (1985), 674.
- [7] Liang, L. und Lubman, D. M.: *Pulsed laser desorption method for volatilizing thermally labile molecules for supersonic jet spectroscopy*. *Rev. Sci. Instrum.* **59** (1988), 557.
- [8] Tembreull, R. und Lubman, D. M.: *Pulsed Laser desorption with resonant two photon ionization detection in supersonic beam mass spectrometry*. *Anal. Chem.* **58** (1986), 1299.
- [9] Tembreull, R. und Lubman, D. M.: *Resonant Two-Photon ionization of small peptides using pulsed laser desorption in supersonic beam mass spectrometry*. *Anal. Chem.* **59** (1987), 1003.
- [10] Lucchese, R. R. und Tully, J. C.: *Laser induced thermal desorption from surfaces*. *J. Chem. Phys.* **81** (1984), 6313.

- [11] Meijer, G., de Vries, M. S., Hunziker, H. E. und Wendt, H. R.: *Laser desorption jet-cooling spectroscopy of para-amino benzoic acid monomer, dimer, and clusters. J. Chem. Phys.* **92** (1990), 7625.
- [12] Handshuh, M., Nettesheim, S. und Zenobi, R.: *Is laser heating advantageous for thermal desorption of large polar molecules?. J. Chem. Phys.* **107** (1997), 2603.
- [13] Nir, E., Kleineramnns, K., Grace, L. und de Vries, M. S.: *Pairing of isolated nucleic-acid bases in the absence of the DNA backbone. Nature* **408** (2000), 949.
- [14] Nir, E., Grace, L., Kleineramnns, K. und de Vries, M. S.: *On the photochemistry of purine nucleobases. J. Phys. Chem.A* **105** (2001), 5106.
- [15] Nir, E., Imhof, P., Kleineramnns, K. und de Vries, M. S.: *Guanine tautomerism revealed by UV hole burning spectroscopy. J. Chem. Phys.* **115** (2001), 4604.
- [16] Nir, E., Plützer, C., Kleineramnns, K. und de Vries, M. S.: *Properties of isolated DNA bases, base pairs and nucleosides examined by laser spectroscopy. Eur. Phys. J. D* **20** (2002), 317.
- [17] Nir, E., Janzen, C., Imhof, P., Kleineramnns, K. und de Vries, M. S.: *Pairing of the nucleobase guanine studied by IR-UV double-resonance spectroscopy and ab initio calculations. Phys. Chem. Chem. Phys.* **4** (2002), 732.
- [18] Nir, E., Janzen, C., Imhof, P., Kleineramnns, K. und de Vries, M. S.: *Pairing of the nucleobase guanine and cytosine in the gas phase studied by IR-UV double-resonance spectroscopy and ab initio calculations. Phys. Chem. Chem. Phys.* **4** (2002), 740.
- [19] Hünig, I. *Kleine Peptide in der Gasphase: Doppelresonanzspektroskopie an laser-desorbierten Di- und Tripeptiden.* Dissertation, Heinrich–Heine Universität, Düsseldorf, 2003.
- [20] Gerhards, M.: *Opt. Commun.* **241** (2004), 493.
- [21] Wiley, W. C. und McLaren, I. H.: *Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. Rev. Sci. Instrum.* **26** (1955), 1150.
- [22] Kohn, W. und Hohenberg, P.: *Inhomogenous electron gas. Phys. Rev.* **136** (1964), B864.

- [23] Sham, L. J. und Kohn, W.: *Self consistent equations including exchange and correlation effects. Phys. Rev.* **140** (1965), A1133.
- [24] Becke, A. D.: *Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. Phys. Rev. A* **238** (1988), 3098.
- [25] Lee, C., Yang, W. und Parr, R.: *Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. Phys. Rev. B* **37** (1988), 785.
- [26] Vosko, S., Wilk, L. und Nusair, M.: . *Can. J. Phys.* **58** (1980), 1200.
- [27] Salvetti, R. C. O.: *Approximate Calculations of the Correlation energy for the Closed and Open Shells. Theor. Chim. Acta* **53** (1979), 55.
- [28] Colle, R. und Salvetti, O.: *Generalization of the Colle-Salvetti correlation energy method to a many-determinant wave function. J. Chem. Phys.* **93** (1990), 534.
- [29] Grimme, S.: . *J. Comput. Chem.* **27** (2006), 1787.
- [30] Häupl, T., Windolf, C., Jochum, T., Brede, O. und Herman, R.: *Assignment of the S_1 - S_0 Electronic Absorption Spectra of 7-Azaindole and 1-Azaindolizine as $\pi^* - \pi$ by Rotational Band Contour Analysis. Chem. Phys. Letters* **280** (1997), 580.
- [31] Fujiwara, T., Kamoshida, Y., Morita, R. und Yamashita, M.: *Temporally-separated ultrafast-emission dynamics of neutral and cationic molecules in guanine and its derivative aqueous solutions. J. Photochem. Photobiol. B* **41** (1997), 114.
- [32] Crespo-Hernandez, C. E., Cohen, B., Hare, P. M. und Kohler, B.: *Ultrafast excited-state dynamics in nucleic acids. Chem. Rev.* **104** (2004), 1977.
- [33] Broo, A.: *A theoretical investigation of the physical reason for the very different luminescence properties of the two isomers adenine and 2-aminopurine. J. Phys. Chem. A* **102** (1998), 526.
- [34] Voet, D., Gratzer, W. B., Cox, R. A. und Dotty, P.: . *Biopolymers* **1** (1963), 193.
- [35] Eisinger, J. und Lamola, A. A. *Excited States of Proteins and Nucleic Acids*. Macmillan, New York, 1971 Seite 107.
- [36] Bokacheva, L. P. und Semenov, S. G.: . *Opt. Spectrosc.* **75** (1993), 708.

- [37] Clark, L. B., Peschel, G. G. und Tinoco Jr., I.: . *J. Phys. Chem.* **699** (1965), 3615.
- [38] Sobolewski, A. L., Domcke, W., Dedonder-Lardeux, C. und Jouvet, C.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **4** (2002), 1093.
- [39] Neely, R. K., Magennis, S. W., Dryden, D. T. F. und Jones, A. C.: . *J. Phys. Chem. B* **108** (2004), 17606.
- [40] Canuel, C., Mons, M., Piuzzi, F., Tardivel, B., Dimicoli, I. und Elhanine, M.: . *J. Chem. Phys.* **122** (2005), 74316.
- [41] Smagowicz, J. und Wierzchowski, K. L.: . *J. Luminesc.* **8** (1974), 210.
- [42] Santosh, C. und Mishra, P.: . *Spectrochim. Acta, Part A* **47** (1991), 1685.
- [43] Nordlund, T., Andersson, S., Nilsson, L., Rigler, R., Gräslund, A. und McLaughlin, W.: . *Biochemistry* **28** (1989), 9095.
- [44] Kim, N. J., Jeong, G., Kim, Y. S., Sung, J., Kim, S. K. und Park, Y. D.: . *J. Chem. Phys.* **113** (2000), 10051.
- [45] Plützer, C. und Kleineremanns, K.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **4** (2002), 4877.
- [46] Lee, Y., Kim, B., Schmitt, M. und Kleineremanns, K. (2005). Unpublished results on 9H-adenine.
- [47] Kim, N. J., Kang, H., Jeong, G., Park, Y. D. und Kim, S. K.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6** (2004), 2802.
- [48] Marian, C. M.: . *J. Chem. Phys.* **122** (2005), 104314.
- [49] Holmen, A., Norden, B. und Albinsson, B.: *Electronic Transfer Moments of 2-Aminopurine. J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997), 3114.
- [50] Drobnik, J. und Augenstein, L.: . *Photochem. Photobiol.* **5** (1966), 83.
- [51] Ingwall, J. S.: . *J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972), 5487.
- [52] Wilson, R. W. und Callis, P. R.: . *Photochem. Photobiol.* **31** (1980), 323.
- [53] Janzen, C., Spangenberg, D., Roth, W. und Kleineremanns, K.: . *J. Chem. Phys.* **110** (1999), 12240.

- [54] Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Zakrzewski, V. G., Montgomery, Jr., J. A., Stratmann, R. E., Burant, J. C., Dapprich, S., Millam, J. M., Daniels, A. D., Kudin, K. N., Strain, M. C., Farkas, O., Tomasi, J., Barone, V., Cossi, M., Cammi, R., Mennucci, B., Pomelli, C., Adamo, C., Clifford, S., Ochterski, J., Petersson, G. A., Ayala, P. Y., Cui, Q., Morokuma, K., Malick, D. K., Rabuck, A. D., Raghavachari, K., Foresman, J. B., Cioslowski, J., Ortiz, J. V., Baboul, A. G., Stefanov, B. B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Gomperts, R., Martin, R. L., Fox, D. J., Keith, T., Al-Laham, M. A., Peng, C. Y., Nanayakkara, A., Gonzalez, C., Challacombe, M., Gill, P. M. W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M. W., Andres, J. L., Gonzalez, C., Head-Gordon, M., Replogle, E. S. und Pople, J. A. *Gaussian 98, Revision A.7*. Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA (1998).
- [55] Lee, C., Yang, W. und Parr, R.: . *Phys. Rev. B* **37** (1988), 785.
- [56] Becke, A. D.: . *J. Chem. Phys.* **98** (1993), 5648.
- [57] Stephens, P. J., Devlin, F. J., Chabalowski, C. F. und Frisch, M. J.: . *J. Phys. Chem.* **98** (1994), 11623.
- [58] Ahlrichs, R., Bär, M., Baron, H.-P., Bauernschmitt, R., Böcker, S., Degelmann, P., Ehrig, M., Eichkorn, K., Elliott, S. und et al., F. *TURBOMOLE (vers. 5.6)* (2002).
- [59] Furche, F. und Ahlrichs, R.: . *J. Chem. Phys.* **117** (2002), 7433.
- [60] Schäfer, A., Huber, C. und Ahlrichs, R.: . *J. Chem. Phys.* **100** (1994), 5829.
- [61] Kind, C., Reiher, M., Neugebauer, J. und Hess, B. A. *SNF (version 2.2.1)* (1999).
- [62] Tatchen, J., Dissertation, Heinrich–Heine–Universität, Düsseldorf, 2005.
- [63] Grimme, S. und Waletzke, M.: . *J. Chem. Phys.* **111** (1999), 5645.
- [64] Becke, A. D.: . *J. Chem. Phys.* **98** (1993), 1372.
- [65] Foresman, J. B. und Frisch, A. E. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods* (1996).
- [66] Ramaekers, B., Adamowicz, L. und Maes, G.: . *Eur. Phys. J. D.* **20** (2002), 375.

- [67] Nowak, M., Lapinski, L. und Kwiatkowski, J. S.: . *Chem. Phys. Letters* **157** (1989), 14.
- [68] Peng, S., Padva, A. und LeBreton, P. R.: . *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **1737** (1976), 2966.
- [69] Rachofsky, E. L., Ross, J. B. A., Krauss, M. und Osman, R.: . *J. Phys. Chem. A* **105** (2001), 190.
- [70] Mishra, S. K., Shukla, M. K. und Mishra, P. C.: . *Spectrochim. Acta, Part A* **56** (2000), 1355.
- [71] Jean, J. M. und Hall, K. B.: . *J. Phys. Chem. A* **104** (2000), 1930.
- [72] Marian, C. M., Kleinschmidt, M. und Tatchen, J. Unpublished results on 7H-adenin.
- [73] Nir, E., Grace, L., Brauer, B. und de Vries, M. S.: *REMPI-Spectroscopy of Jet-Cooled Guanine. J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999), 4896.
- [74] Piuzzi, F., Mons, M., Dimicoli, I., Tardivel, B. und Zhao, Q.: . *Q. Chem. Phys.* **270** (2001), 205.
- [75] Mons, M., Dimicoli, I., Piuzzi, F., Tardivel, B. und Elhanine, M.: . *J. Phys. Chem. A* **106** (2002), 5088.
- [76] Nir, E., Plützer, C., Kleineremanns, K. und de Vries, M. S.: . *Eur. Phys. J. D.* **20** (2002), 317.
- [77] Chin, W., Mons, M., Dimicoli, I., Piuzzi, F., Tardivel, B. und Elhanine, M.: . *Eur. Phys. J. D.* **20** (2002), 347.
- [78] Mons, M., Piuzzi, F., Dimicoli, I., Gorb, L. und Leszczynski, J.: . *J. Phys. Chem. A* **110** (2006), 10921.
- [79] Shukla, M. und Leszczynski, J.: . *Chem. Phys. Letters* **429** (2006), 261.
- [80] Chen, H. und Li, S.: . *J. Phys. Chem. A* **110** (2006), 12360.
- [81] Marian, C. M.: . *J. Phys. Chem. A* **111** (2007), 1545.
- [82] Choi, M. Y. und Miller, R. E.: . *J. Phys. Chem. A* **110** (2006), 9344.

- [83] Hünig, I. und Kleineremanns, K.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6** (2004), 2650.
- [84] Häber, T., Seefeld, K. und Kleineremanns, K.: . *J. Phys. Chem. A* **111** (2007), 3038.
- [85] Huber, C., Ahlrichs, R. und Schäfer, A.: . *J. Chem. Phys.* **100** (1994), 5829.
- [86] Treutler, O. und Ahlrichs, R.: . *J. Chem. Phys.* **102** (1995), 346.
- [87] von Arnim, M. und Ahlrichs, R.: . *J. Comput. Chem.* **19** (1998), 1746.
- [88] Deglmann, P., May, K., Furche, F. und Ahlrichs, R.: *Nuclear second analytical derivative calculations using auxiliary basis set expansions. Chem. Phys. Letters* **384** (2004), 103.
- [89] Deglmann, P., Furche, F. und Ahlrichs, R.: *An efficient implementation of second analytical derivatives for density functional methods. Chem. Phys. Letters* **362** (2002), 511.
- [90] Dunning, T. H.: . *J. Chem. Phys.* **90** (1989), 1007.
- [91] Weigend, F., Häser, M., Patzelt, H. und Ahlrichs, R.: . *Chem. Phys. Letters* **294** (1998), 143.
- [92] Weigend, F. und Häser, M.: . *Theor. Chem. Acc.* **97** (1997), 331.
- [93] Seefeld, K., Brause, R., Kleineremanns, K. und Marian, C. M. (2007). In preparation.
- [94] Plützer, C., Hünig, I., Kleineremanns, K., Nir, E. und de Vries, M. S.: . *Chem. Phys. Chem.* **4** (2003), 838.
- [95] Bakker, J. M., Compagnon, I., Meijer, G., von Helden, G., Kabelac, M., Hobza, P. und de Vries, M. S.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6** (2004), 2810.
- [96] Gerber, R. B., Brauer, B., Gregurick, S. K. und Chaban, G. M.: . *Phys. Chem. Comm.* **5** (2002), 142.
- [97] Gerber, R. B., Chaban, M., Gregurick, S. K. und Brauer, B.: . *Biopolymers* **68** (2003), 370.
- [98] Cao, X. L. und Fischer, G.: . *J. Phys. Chem. A* **103** (1999), 9995.
- [99] Cao, X. L. und Fischer, G.: . *Spectrochimica Acta Part A - Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **55** (1999), 2329.

- [100] Gomez-Zavaglia, A. und Fausto, R.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **5** (2003), 3154.
- [101] Kapota, C., Lemairi, J., Maitre, P. und Ohanessian, G.: . *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004), 1836.
- [102] Lomeneck, C., Berry, G., Costa, D., Stievano, L. und Lambert, J. F.: . *Chem. Phys. Chem.* **6** (2005), 1061.
- [103] Stepanian, S. G., Reva, I. B., Radchenko, E. D., Rosado, M. T. S., Fausto, M. L. T. S. D. R. und Adamowicz, L.: . *J. Phys. Chem. A* **102** (1998), 1041.
- [104] Stepanian, S. G., Reva, I. B., Radchenko, E. D. und Adamowicz, L.: . *J. Phys. Chem. A* **105** (2001), 10664.
- [105] Chickos, J. S. und Acree, W. E.: . *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **31** (2002), 537.
- [106] Snoek, L. C., Robertson, E. G., Kroemer, R. T. und Simons, J. P.: . *Chem. Phys. Letters* **321** (2000), 49.
- [107] Snoek, L. C., Kroemer, R. T., Hockridge, M. R. und Simons, J. P.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **3** (2001), 1819.
- [108] Chapo, C. J., Paul, J. B., Provencal, R. A., Roth, K. und Saykally, R. J.: . *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998), 12956.
- [109] Bakker, J., Aleese, L. M., Meijer, G. und von Helden, G.: . *Phys. Rev. Letters* **91** (2003), 203003/1.
- [110] Lesarri, A., Mata, S., Cocinero, E. J., Blanco, S., Lopez, J. C. und Alonso, J. L.: . *Angewandte Chemie - International Edition* **41** (2002), 4673.
- [111] Lesarri, A., Cocinero, E. J., Lopez, J. C. und Alonso, J. L.: . *Angewandte Chemie - International Edition* **43** (2004), 605.
- [112] Blanco, S., Lesarri, A., Lopez, J. C. und Alonso, J. L.: . *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004), 11675.
- [113] Lesarri, A., Cocinero, E. J., Lopez, J. C. und Alonso, J. L.: . *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005), 2572.

- [114] Lesarri, A., Cocinero, E. J., Lopez, J. C. und Alonso, J. L.: . *Chem. Phys. Chem.* **6** (2005), 1559.
- [115] Linder, R., Nispel, M., Häber, T. und Kleineremanns, K.: . *Chem. Phys. Letters* **409** (2005), 260.
- [116] Deglmann, P. und Furche, F.: *Efficient characterization of stationary points on potential energy surfaces. J. Chem. Phys.* **117** (2002), 9535.
- [117] Bakker, J. M., Plützer, C., Hünig, I., Häber, T., Compagnon, I., von Helden, G., Meijer, G. und Kleineremanns, K.: . *Chem. Phys. Chem.* **6** (2005), 120.
- [118] Savitzky, A. und Golay, M. J. E.: . *Analytical Chemistry* **36** (1964), 1627.
- [119] Reva, I. D., Plokhotnichenko, A. M., Stepanian, S. G., Ivanov, A. Y., Radchenko, E. D., Sheina, G. G. und Blagoi, Y. P.: . *Chem. Phys. Letters* **232** (1995), 141.
- [120] Brauer, B., Chaban, G. M. und Gerber, R. B.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6** (2004), 2543.
- [121] Huiskens, F., Werhahn, O., Ivanov, A. Y. und Krasnokutski, S. A.: . *J. Chem. Phys.* **111** (1999).
- [122] Bludsky, O., Chocholousova, J., Vacek, J., Huiskens, F. und Hobza, P.: . *J. Chem. Phys.* **113** (2000).
- [123] Miller, T. F., Clary, D. C. und Meijer, A. J. H. M.: . *J. Chem. Phys.* **122** (2005).
- [124] Kunzmann, M. K., Signorell, R., Taraschewski, M. und Bauer-Ecker, S.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **3** (2001), 3742.
- [125] Signorell, R.: . *Mol. Phys.* **101** (2003), 3385.
- [126] Richardson, J.: . *Adv. Protein Chem.* **34** (1981), 167.
- [127] Creighton, T. E.: *Proteins: structures and molecular properties*. W. H. Freeman and Company: San Francisco, CA, 1993.
- [128] Simons, J. P.: . *C. R. Chim.* **6** (2003), 17.
- [129] Robertson, E. und Simons, J.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **3** (2001), 1.

- [130] Zwier, T.: . *J. Phys. Chem. A* **105** (2001), 8827.
- [131] Weinkauff, R., Schermann, J.-P., de Vries, M. und Kleineremanns, K.: . *Eur. Phys. J. D.* **20** (2002), 309.
- [132] Chin, W., Piuuzzi, F., Dimicoli, I. und Mons, M.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8** (2006), 1033.
- [133] Valdes, H., Řeha, D. und Hobza, P.: . *J. Phys. Chem. B* **110** (2006), 6385.
- [134] Řeha, D., Valdes, H., Vondrašek, J., Hobza, P., Abu-Riziq, A., Crews, B. und de Vries, M.: . *Chem.-Eur. J.* **11** (2005), 6803.
- [135] Abo-Riziq, A., Bushnell, J., Crews, B., Callahan, M., Grace, L. und de Vries, M.: . *Int. J. Quantum Chem.* **105** (2005), 437.
- [136] Jalkanen, K., Elstner, M. und Suhai, S.: . *J. Mol. Struct.* **675** (2004), 61.
- [137] Perczel, A., Jakli, I. und Csizmadia, I.: . *Chem.-Eur. J.* **9** (2003), 5332.
- [138] Perczel, A., Jakli, I., McAllister, M. und Csizmadia, I.: . *Chem.-Eur. J.* **9** (2003), 2551.
- [139] Möhle, K. und Hofmann, H.-J.: . *J. Mol. Model* **4** (1998), 53.
- [140] Benzi, C., Improta, R., Scalmani, G. und Barone, V.: . *J. Comput. Chem.* **23** (2002), 341.
- [141] Baldoni, H., Rodriguez, A., Zamora, M., Zamarbide, G., Enriz, R., Farkas, O., Császàr, P., Torday, L., Sosa, C., Jakli, I., Perczel, A., Papp, J., Hollosi, M. und Csizmadia, I.: . *J. Mol. Struct.* **465** (1999), 79.
- [142] Sahai, M., Kehoe, T., Koo, J., Setiadi, D., Chass, G., Viscolcz, B., Penke, B., Pai, E. und Csizmadia, I.: . *J. Phys. Chem. A* **109** (2005), 2660.
- [143] Rizzo, T. R., Park, Y. D., Peteanu, L. A. und Levy, D. H.: . *J. Chem. Phys.* **84** (1986), 2534.
- [144] Cable, J., Tubergen, M. und Levy, D.: . *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1987), 6198.
- [145] Cable, J., Tubergen, M. und Levy, D.: . *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989), 9032.

- [146] Snoek, L. C., Kroemer, R. T. und Simons, J. P.: *A spectroscopic and computational exploration of tryptophan-water cluster structures in the gas phase. Phys. Chem. Chem. Phys.* **4** (2002), 2130.
- [147] Lee, Y., Jung, J., Kim, B., Butz, P., Snoek, L., Kroemer, R. und Simons, J.: *J. Phys. Chem. A* **108** (2004), 69.
- [148] Dian, B. C., Longarte, A., Mercier, S., Evans, D. A., Wales, D. J. und Zwier, T. S.: *J. Phys. Chem.* **117** (2002), 10688.
- [149] Çarçabal, P., Kroemer, R., Snoek, L., Simons, J., Bakker, J. M., Compagnon, I., Meijer, G. und Helden, G. V.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6** (2004), 4546.
- [150] Abo-Riziq, A., Crews, B., Callahan, M., Grace, L. und de Vries, M.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **45** (2006), 5166.
- [151] Compagnon, I., Oomens, J., Bakker, J., Meijer, G. und Helden, G. V.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7** (2005), 13.
- [152] Chin, W., Mons, M., Dognon, J.-P., Piuzzi, F., Tardivel, B. und Dimicoli, I.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6** (2004), 2700.
- [153] Chin, W., Piuzzi, F., Dognon, J.-P., Dimicoli, I. und Mons, M.: *J. Chem. Phys.* **123** (2005), 1.
- [154] Chin, W., Piuzzi, F., Dognon, J.-P., Dimicoli, I., Tardivel, B. und Mons, M.: *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2006), 11900.
- [155] Hünig, I., Seefeld, K. A. und Kleineremanns, K.: *REMPI and UV-UV double resonance spectroscopy of tryptophan ethylester and the dipeptides tryptophan-serine, glycine-tryptophan and proline-tryptophan. Chem. Phys. Letters* **369** (2003), 173.
- [156] Cohen, K., Brauer, B., Nir, E., Grace, L. und de Vries, M.: *J. Phys. Chem. A* **104** (2000), 6351.
- [157] Fricke, H., Gerlach, A., Unterberg, C., Rzepecki, P., Schrader, T. und Gerhards, M.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6** (2004), 4636.
- [158] Gerhards, M. und Unterberg, C.: *Structures of the protected amino acid Ac-Phe-OMe and its dimer: A beta-sheet model system in the gas phase. Phys. Chem. Chem. Phys.* **4** (2002), 1760.

- [159] Unterberg, C., Gerlach, A., Schrader, T. und Gerhards, M.: . *J. Chem. Phys.* **118** (2003), 8296.
- [160] Unterberg, C., Gerlach, A., Schrader, T. und Gerhards, M.: . *Eur. Phys. J. D.* **20** (2002), 543.
- [161] Gerhards, M., Unterberg, C. und Gerlach, A.: *Structure of a beta-sheet model system in the gas-phase: Analysis of the C=O stretching vibration.* *Phys. Chem. Chem. Phys.* **4** (2002), 5563.
- [162] Gerhards, M., Unterberg, C., Gerlach, A. und Jansen, A.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6** (2004), 2682.
- [163] Fricke, H., Gerlach, A. und Gerhards, M.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8** (2006), 1660.
- [164] Balbach, J. und Schmid, F. X. In *Mechanisms of Protein Folding*, herausgegeben von R. H. Pain. Oxford University Press: Oxford, U.K., 2000, .
- [165] Edsall, J. T., Flory, P. J., Kendrew, J. C., Liquori, A., Nemethy, G., Ramachandran, G. und Scheraga, H.: . *J. Biol. Chem.* **241** (1966), 1004.
- [166] Janzen, C., Spangenberg, D., Roth, W. und Kleinerhmanns, K.: *Structure an vibration of phenol(H₂O)_{7,8} studied by infrared-ultraviolet and ultraviolet-ultraviolet double-resonance spectroscopy and ab initio theory.* *J. Chem. Phys.* **110** (1999), 9898.
- [167] Mikami, N., Hiraya, A., Fujiwara, I. und Ito, M.: . *Chem. Phys. Letters* **74** (1980), 531.
- [168] Imhof, P., Roth, W., Janzen, C., Spangenberg, D. und Kleinerhmanns, K.: *Hydrogen-bonded phenol-acid clusters studied by vibrational resolved laser spectroscopy and ab initio calculations - II. Acetic acid.* *Chem. Phys.* **242** (1999), 153.
- [169] Gerlach, A., Unterberg, C., Fricke, H. und Gerhards, M.: . *Mol. Phys.* **103** (2005), 1521.
- [170] Lovell, S., Davis, I., Arendall, III, W., De Bakker, P., Word, J., Prisant, M., Richardson, J. und Richardson, D.: . *Proteins: Struct., Function, Genetics* **50** (2003), 437.

- [171] Frisch, M. J. et al. . *Gaussian 98, Revision A.9*. Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA (1998).
- [172] Lovell, S., Word, J., Richardson, J. und Richardson, D.: . *Proteins: Struct., Function, Genetics* **50** (2000), 389.
- [173] Seefeld, K., Häber, T. und Kleinermanns, K. (2006). IR/UV spectra of TrpPro and TrpSer, manuscript in preparation.
- [174] Guruprasad, K., Prasad, M. und Kumar, G.: . *J. Peptides Res.* **56** (2000), 250.
- [175] Guruprasad, K., Pavan, M., Rajkumar, S. und Swaminathan, S.: . *Curr. Sci.* **79** (2000), 992.
- [176] Clarkson, J., Baquero, E., Shubert, V., Myshakin, E., Jordan, K. und Zwier, T.: . *Science* **307** (2005), 1443.
- [177] Clarkson, J., Dian, B., Moriggi, L., Defusco, A., McCarthy, V., Jordan, K. und Zwier, T.: . *J. Chem. Phys.* **122** (2005), 1.
- [178] Zwier, T.: . *J. Phys. Chem. A* **110** (2006), 4133.
- [179] de Vries, M. S. und Hobza, P.: . *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58** (2007), 585.
- [180] Abo-Riziq, A. G., Crews, B., Bushnell, J. E., Callahan, M. P. und de Vries, M.: . *Mol. Phys.* **103** (2006), 1491.
- [181] Abo-Riziq, A., Bushnell, J. E., Crews, B., Callahan, M., Grace, L. und de Vries, M. S.: . *Chem. Phys. Letters* **431** (2006), 227.
- [182] Schwabe, T. und Grimme, S.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9** (2007), 3397.
- [183] Grimme, S., Antony, J., Schwabe, T. und Mück-Lichtenfeld, C.: . *Org. Biomol. Chem* **5** (2007), 741.
- [184] van Mourik, T., Karamertzanis, P. G. und Price, S. L.: . *J. Phys. Chem. A* **110** (2006), 8.
- [185] Grimme, S.: . *J. Chem. Phys.* **124** (2006), 034108.
- [186] Grimme, S. und Schwabe, T.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8** (206), 4398.

- [187] Becke, A. D.: . *J. Chem. Phys.* **107** (1997), 8554.
- [188] Grimme, S.: . *J. Comput. Chem.* **25** (2004), 1463.
- [189] Jurecka, P., Cerny, J., Hobza, P. und Salahub, D. R.: . *J. Comput. Chem.* **28** (2007), 555.
- [190] Ahlrichs, R., Penco, R. und Scoles, G.: . *Chem. Phys.* **19** (1977), 119.
- [191] Elstner, M., Hobza, P., Frauenheim, T., Suhai, S. und Kaxiras, E.: . *J. Chem. Phys.* **114** (2001), 5149.
- [192] Zoo, B., Dreger, K., Mück-Lichtenfeld, C., Grimme, S., Schäfer, H. J., Fuchs, H. und Chi, L.: . *Langmuir* **21** (2005), 1364.
- [193] Piacenza, M. und Grimme, S.: . *Chem. Phys. Chem.* **6** (2005), 1554.
- [194] Parac, M., Etinski, M., Peric, M. und Grimme, S.: . *J. Chem. Theor. Comput.* **1** (2005), 1110.
- [195] Piacenza, M. und Grimme, S.: . *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005), 14841.
- [196] Antony, J. und Grimme, S.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8** (2006), 5287.
- [197] Grimme, S., Mück-Lichtenfeld, C. und Antony, J.: . *J. Phys. Chem. C* **111** (2007), 11199.
- [198] Cerny, J., Jurecka, P., Hobza, P. und Valdes, H.: . *J. Phys. Chem. A* **111** (2007), 1146.
- [199] Ahlrichs, R. et al. . *TURBOMOLE (vers. 5.9)* (2006).
- [200] Ahlrichs, R., Bär, M., Horn, M. H. H. und Kölmel, C.: . *Chem. Phys. Letters* **162** (1989), 165.
- [201] The basis sets are available from the turbomole homepage *via* the ftp server button (in the subdirectories basen, jbasen and cbasen).see <http://www.turbomole.com>.
- [202] Weigend, F., Köhn, A. und Hättig, C.: . *J. Chem. Phys.* **116** (2002), 3175.
- [203] Eichkorn, K., Treutler, O., Öhm, H., Häser, M. und Ahlrichs, R.: . *Chem. Phys. Letters* **240** (1995), 283.

- [204] Eichkorn, K., Weigend, F., Treutler, O. und Ahlrichs, R.: . *Theor. Chim. Acta* **97** (1997), 119.
- [205] McNamara, J. P. und Hillier, I. H.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9** (2007), 2362.
- [206] Allinger, N. L., Yuh, Y. H. und Lii, J.-H.: . *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989), 8551.
- [207] Neugebauer, J., Reiher, M., Kind, C. und Hess, B. A.: . *J. Comput. Chem.* **23** (2002), 895.
- [208] *PCmodel 9.1* (2005). Serena Software, Bloomington.
- [209] Dian, B. C., Longarte, A. und Zwier, T. S.: . *J. Chem. Phys.* **118** (2003), 2696.
- [210] Unterberg, C., Jansen, A. und Gerhards, M.: *Ultraviolet/infrared-double resonance spectroscopy and ab initio calculations on the indole⁺ and indole(H₂O)₁⁺ cations*. *J. Chem. Phys.* (2000), 7945.
- [211] Bakker, J. M., Dissertation, Radboud Universiteit Nijmegen, 2004.
- [212] Seefeld, K., Brause, R., Häber, T. und Kleineremanns, K.: . *J. Phys. Chem. A* **111** (2007), 6217.
- [213] Nir, E., Janzen, C., Imhof, P., Kleineremanns, K. und de Vries, M. S.: . *J. Phys. Chem. A* **105** (2001), 4604.
- [214] Matsuda, Y., Ebata, T. und Mikami, N.: . *J. Chem. Phys.* **110** (1999), 8397.
- [215] Florio, G. M., Gruenloh, C. J., Quimpo, R. C. und Zwier, T. S.: . *J. Chem. Phys.* **113** (2000), 11143.
- [216] Matsuda, Y., Ebata, T. und Mikami, N.: . *J. Phys. Chem. A* **105** (2001), 3475.
- [217] Marian, C. M. Unpublished results on 7-methyl- and 9-methyl-guanine.
- [218] Langer, H. und Doltsinis, N. L.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **5** (2003), 4516.
- [219] Langer, H. und Doltsinis, N. L.: . *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6** (2004), 2742.
- [220] Häber, T., Seefeld, K. und Kleineremanns, K. (2007). Published on the web, **DOI:** 10.1039/b718710f.

- [221] Carney, J. R. und Zwier, T. S.: *Infrared and ultraviolet spectroscopy of water-containing clusters of indole, 1-methylindole, and 3-methylindole. J. Phys. Chem. A* **103** (1999), 9943.
- [222] Martinez, S. J., Alfano, J. C. und Levy, D. H.: . *J. Mol. Spec.* **156** (1992), 421.
- [223] Grace, L. I., Cohen, R., Dunn, T. M., Lubman, D. M. und de Vries, M. S.: *The R2PI spectroscopy of tyrosine: A vibronic analysis. J. Mol. Spec.* **215** (2002), 204.
- [224] Inokuchi, Y., Kobayashi, Y., Ito, T. und Ebata, T.: *Conformation of L-Tyrosine Studied by Fluorescence-Detected UV-UV and IR-UV Double-Resonance Spectroscopy. J. Phys. Chem. A* **111** (2007), 3209.
- [225] Tanabe, S., Ebata, T., Fujii, M. und Mikami, N.: *OH Stretching Vibrations of Phenol-(H₂O)_n (n = 1 – 3) Complexes Observed by IR-UV Double Resonance Spectroscopy. Chem. Phys. Letters* **215** (1993), 347.
- [226] Edwards, L. und Dolphin, D. H.: . *J. Mol. Spec.* **38** (1971), 16.
- [227] Even, U., Magen, J., Jortner, J., Friedman, J. und Levanon, H.: *Isolated ultra-cold porphyrins in supersonic expansions. 1. Free-base tetraphenylporphyrin and Zn-tetraphenylporphyrin. J. Chem. Phys.* **77** (1982), 4374.
- [228] Even, U., Magen, J., Jortner, J. und Friedman, J.: . *J. Chem. Phys.* **77** (1982), 4384.
- [229] Even, U. und Jortner, J.: . *J. Chem. Phys.* **77** (1982), 4391.
- [230] Shafizadeh, N., Krim, L., Sorgues, S. und Soep, B.: . *Chem. Phys. Letters* **357** (2002), 37.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Geschwindigkeitsverteilung	4
2.2	Schema des Drei- und Vierniveaulasers	9
2.3	Termschema des REMPI-Prozesses	12
2.4	Termschema der IR/UV- und UV/UV-Doppelresonanzspektroskopie	13
3.1	Schematische Darstellung der Desorptionsquelle	16
3.2	Schematische Darstellung der IR-UV Apparatur	18
3.3	Infrarotlasersystem	21
3.4	Vergleich der IR-Frequenzen des IR-Lasers und der FTIR-Referenz	22
3.5	Sinusfit der IR-Frequenz	23
3.6	Korrektur der IR-Laserfrequenzen	23
3.7	Schematische Darstellung der Molekularstrahlapparatur	25
5.1	R2PI spectrum of 2-aminopurine	46
5.2	IR-UV double resonance spectrum of 2AP	47
5.3	FTIR spectrum of 2AP in the region between 4000-800 cm^{-1}	48
5.4	Vertical and adiabatic absorption energies of 9H-2AP	50
5.5	Vertical and adiabatic absorption energies of 7H-2AP	51
5.6	Experimental setup	58
5.7	Structures, labels, and relative energies of all 20 guanine tautomers	59
5.8	mid- and near- IR/UV double resonance spectra of the major guanine con- formers A, B, and C	61
5.9	FT-IR gas-phase spectra of glycine (Gly), alanine (Ala) and threonine (Thr)	69
5.10	FT-IR gas-phase spectra of cysteine (Cys), methionine (Met) and N-acetyl- methionine methylester (AcMetOMe)	70
5.11	Structure of H-Pro-Trp-OH	79
5.12	Experimental setup	80

5.13	mid IR/UV and near IR/UV double resonance spectra of both conformers of ProTrp(A and B)	83
5.14	Structures of the 12 most stable conformers of ProTrp	87
5.15	Relative energies of the ProTrp conformers at different levels of theory . . .	89
5.16	Correlation between NH_{pep} and OH stretch frequencies(scaled) of the different calculated conformers of ProTrp	93
5.17	Structure of HTrpSerOH	100
5.18	Experimental setup	103
5.19	IR/UV double resonance spectra of both conformers of TrpSer	105
5.20	Relative energies (ZPVE uncorrected) of 39 low-lying conformers of TrpSer at different theoretical levels	107
5.21	Optimized structures (B97-D/TZV2P) of low-lying conformers of TrpSer . .	108
6.1	IR/UV-Doppelresonanzspektrum 7MG Konformer A	117
6.2	IR/UV-Doppelresonanzspektrum 7MG Konformer B	117
6.3	IR/UV-Doppelresonanzspektrum 9-MG	121
6.4	IR/UV Doppelresonanzspektrum von TrpSer(H_2O)	125
6.5	Strukturvorschlag von TrpSer(H_2O)	128
6.6	R2PI-Spektrum des Pentapetids AlaAlaAlaTyrAla, aufgenommen auf der Muttermasse	130
6.7	IR/UV des AlaAlaAlaTyrAla-Pentapetids. Der Analyselaser wurde hierbei auf eine Frequenz von 35520 cm^{-1} gesetzt	131

Tabellenverzeichnis

3.1	Lasertypen und Laserenergien	24
3.2	Pumpen und Pumpenkapazität	28
3.3	Triggerzeiten für das IR-UV Doppelresonanzexperiment an ProTrp	29
5.1	Comparison of the experimental IR frequencies with the calculated vibrational frequencies for the 9H- and 7H tautomers of 2AP in the region of the NH vibrations. All calculations have been performed at the MP2/6-311G(d,p) and B3LYP/TZV(d,p) level of theory. All frequencies have been scaled and given in cm^{-1}	47
5.2	Comparison of the experimental frequencies with calculated vibrational frequencies for the two possible aminopurine tautomers in the region from 4000 - 1000 cm^{-1} . The calculations have been performed at the B3LYP/TZV(d,p) level. The calculated frequencies have been scaled by the factor 0.9613. Most of the vibrations could be assigned. The intensities of the experimental and calculated spectra (shown in brackets) are scaled to the respective most intense vibration. N _{9/7} H assignments are separated by a slash. In phase and opposite phase coupling of vibrations are indicated with + and -, respectively	49
5.3	Unscaled C=N, C=O, and N-H Stretch Frequencies (in cm^{-1}) of the Four Imino Tautomers at Various Levels of Theory ^a	62
5.4	Experimental absorption frequencies (cm^{-1}) of glycine (Gly), alanine (Ala), threonine (Thr), cysteine (Cys) and methionine (Met)	72
5.5	Harmonic frequencies (cm^{-1}) of glycine (Gly), alanine (Ala), threonine (Thr), cysteine (Cys) and methionine (Met) calculated at the B3LYP/6-31G(d,p) level of theory	74

5.6	Experimentally Determined IR Band Maxima (in cm^{-1}) of the Two Conformers of ProTrp	83
5.7	Dihedral Angles (in deg) and Relative Energies (in kJ mol^{-1}) of the Calculated Structures [B3LYP/6-31G(d,p)] of ProTrp	86
5.8	Vibrational Frequency Shifts (in cm^{-1}), Relative to Conformer pw11, of the Calculated Structures [B3LYP/ 6-31G(d,p)] of ProTrp ^a	91
5.9	Experimentally determined IR band maxima (in cm^{-1}) of the two conformers of TrpSer	106
5.10	Scaled vibrational frequencies (in cm^{-1}) of the calculated structures (B97-D/TZV2P) of TrpSer. Calculated infrared intensities (km/mol) are given as subscripts in parenthesis. NH/OH stretch frequencies were scaled by 0.974. All other frequencies were scaled by 1.015. Also listed are the relative electronic energies E_{rel} (ws01 set to zero) and relative zero-point vibrational energies ZPVE_{rel} (unscaled, in kcal mol^{-1}). $E_{\text{rel}}^{\text{disp}}$ is the contribution of dispersion relative to the fully stretched conformer ws34, which has the least interaction between the indole side-chain and the peptide backbone	113

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Bedeutung
χ	Suszeptibilität
ε_0	Dielektrizitätskonstante $8.854 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2/(\text{J m})$
λ_0	Mittlere freie Weglänge eines Gases
ν	Frequenz
τ	Mittlere Lebensdauer eines Zustandes
v	Wellenzahl
ω	Frequenz einer elektromagnetischen Welle
$\hbar$	$h/2\pi = 1.054 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$
a	Schallgeschwindigkeit
bar	Bar
BBO	Bariumborat
C	Coulomb
c	Lichtgeschwindigkeit $2.998 \cdot 10^8 \text{ m/s}$
cm^{-1}	Wellenzahlen
C_p	Wärmekapazität bei konstantem Druck
C_v	Wärmekapazität bei konstantem Volumen
D	Düsendurchmesser
DFG	Difference Frequency Generation
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E	Energie
h	Plancksche Konstante $6.626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$
Hz	Hertz
IR	Infrarot
ISC	Inter System Crossing
IVR	Intramolecular Vibrational Redistribution
k	Boltzmann-Konstante
K	Kelvin
KDP	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LED	Leuchtdiode (engl.: Light Emitting Diode)
M	Machzahl

Symbol	Bedeutung
m	Masse (als Formelsymbol)
m	Meter (als Formaleinheit)
MCP	Micro Channel Plate
mol	Mol
n	Brechungsindex
$Nd:YAG$	Neodym Yttrium Aluminium Granat
P_r	Reservoirdruck
$R2PI$	Resonant 2-Photon Ionisation
$REMPI$	Resonance Enhanced MultiPhoton Ionisation
s	Sekunde
SHB	Spectral Hole Burning
SHG	Second Harmonic Generation
S_n	n-ter elektronisch angeregter Zustand
T	Temperatur
t	Zeit
$ToF-MS$	Time of Flight Mass Spectrometer
TTL	Transistor-Transistor-Logik
U	Spannung
u	Massenflussgeschwindigkeit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIS	Sichtbarer Spektralbereich (engl.: visible light)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum September 2004 bis März 2008 im Institut für Physikalische Chemie I der Heinrich–Heine–Universität Düsseldorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Karl Kleinermanns.

Mein besonderer Dank gilt:

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Karl Kleinermanns für die interessante Themenstellung, die persönliche Betreuung, sowie seine zahlreichen Anregungen danken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Herrn PD. Dr. Michael Schmitt danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens wie auch für seine Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft.

Dr. Thomas Häber bin ich für die sehr gute Zusammenarbeit und die kritische Betrachtung der experimentellen Ergebnisse überaus dankbar.

Klaus Kelbert für seine Unermüdlichkeit, den Fehlerteufel der Elektronik auszutreiben.

Der Feinmechanik um Gerd Büttgenbach für Anregungen rund um technische Fragen, sowie viele apparative Bauteile.

Den Doktoren Michael Nispel und Dennis Löwenich, die mich seit Studienbeginn auf dem Wege des Chemikers begleiten, möchte ich für das gemeinsame Durchleben von Höhen und Tiefen des Studiums und ihre stete Hilfsbereitschaft, sowie dem kameradschaftlichen Zusammenhalt danken.

Meinen Bürokollegen Katharina Hunger und Gernot Engler für das heitere Büroklima, diverse Gefälligkeiten und die kleinen Albernheiten zwischendurch. Meinen Kollegen Matthias Busker, Lars Biemann, Ke Feng, Ivo Kalkmann, Chau Vu, Daniel Ogermann und Thorsten Wilke für die netten Tee- bzw. Kaffeerunden und die sehr angenehme und

lustige Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin allen Kollegen und Exkollegen für die tolle Zeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, Johannes, meinen Schwestern Pia und Celine, meinen Großeltern, meinen Freunden Michael und Cornelia Zgoll, Heike Pauen, Garlef Ehlig, meinem "Nachbarn" Daniel Eckers, Jan und Simone, Janin und Ralf Engels, Alex und Patricia, Christian Reipen, Christian Schmitz für ihre ständige Anteilnahme und den Rückhalt den sie mir während des Studiums bis einschließlich der Promotion boten.

Meiner geliebten Freundin Laura Engelke für ihr Verständnis und ihre Liebe.

Die vorliegende Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 14.04.2008

Kai Seefeld