

---

Breitbandige, zeitaufgelöste Spektroskopie als  
empfindliche Methode zur Beobachtung von  
biomolekularer Dynamik

---

DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER NATURWISSENSCHAFTEN

Vorgelegt beim Fachbereich:  
14 - Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

Von  
Peter P. Trojanowski  
aus Puławy (Polen)

Frankfurt am Main 2014  
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan	Prof. Dr. Michael Karas
1.Gutachter	Prof. Dr. Josef Wachtveitl
2.Gutachter	Prof. Dr. Joachim W. Engels

---

Datum der Disputation	20.02.2015
-----------------------	------------



*„Da steh ich nun, ich armer Tor und  
bin so klug als wie zuvor. Heiße  
Magister, heiße Doktor gar, und ziehe  
schon an die zehen Jahr herauf, herab  
und quer und krumm meine Schüler an  
der Nase herum - und sehe, daß wir  
nichts wissen können!“*

*~ Johann Wolfgang von Goethe aus Faust: Der Tragödie Erster Teil ~*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Motivation dieser Arbeit</b>	<b>1</b>
1.1	Eine notwendige Vielfalt an experimentellen Methoden . . . . .	1
1.2	Fluoreszenzmarker als Observable . . . . .	1
1.3	Ziel dieser Arbeit . . . . .	2
<b>2</b>	<b>Spektroskopische Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1	Absorption von elektromagnetischer Strahlung . . . . .	3
2.1.1	Das Lambert-Beer'sche Gesetz . . . . .	5
2.1.2	Elektronische Übergänge in der UV/Vis-Spektroskopie . . . . .	6
2.2	Folgeprozesse der Absorption: Nichtstrahlende und strahlende Deaktivierung	6
2.2.1	Nichtstrahlende Deaktivierungsprozesse . . . . .	7
2.2.2	Strahlende Deaktivierungsprozesse . . . . .	8
2.2.2.1	Kasha und Kasha-Vavilov Regel . . . . .	8
2.2.2.2	Fluoreszenzquantenausbeute (FQA) . . . . .	9
2.2.2.3	Solvatochromismus, Permittivität und Polarität . . . . .	9
2.3	Theorie der zeitaufgelösten Spektroskopie . . . . .	11
2.3.1	Nichtlineare Optik . . . . .	12
2.3.1.1	Materialantwort in Form der Polarisierung . . . . .	13
2.3.1.2	Konsequenzen des Übergangs zur nichtlinearen Optik . . . . .	14
2.3.1.3	Phasenanpassung in anisotropen Medien . . . . .	16
2.3.1.4	Optisch parametrische Verstärkung . . . . .	17
2.3.1.5	Optischer Kerr-Effekt . . . . .	19
2.3.1.6	Gruppengeschwindigkeitsdispersion . . . . .	21
2.3.2	Ultrakurze Laserpulse . . . . .	21
2.3.2.1	Güteschaltung („Q-Switch“) . . . . .	21
2.3.2.2	Modenkopplung . . . . .	22
2.3.2.3	Verstärkung gechirpter Pulse . . . . .	24
<b>3</b>	<b>Experimentelle Methoden</b>	<b>25</b>
3.1	Aufnahme und Korrektur stationärer Spektren . . . . .	25
3.2	Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten . . . . .	26
3.3	Wellenlängenkonversion . . . . .	29
3.3.1	Weißlichterzeugung . . . . .	29
3.3.2	Summenfrequenzerzeugung und Frequenzverdopplung . . . . .	29
3.3.3	Kollinearer optisch parametrischer Verstärker . . . . .	30
3.3.4	Nichtkollinear optisch parametrischer Verstärker . . . . .	32
3.4	Prismenkompressor . . . . .	33
3.5	Das Anreg-/Abtast-Experiment . . . . .	35
3.5.1	Clark MXR-CPA-2001 . . . . .	35
3.5.2	Experimenteller Aufbau . . . . .	35
3.5.3	Verschiedene Signaltypen . . . . .	37
3.5.4	Bestimmung des prozentualen Anteils der angeregten Moleküle . . . . .	38
3.5.5	Lebensdauerdichteanalyse der transienten Absorptionsdaten . . . . .	39

3.6	Messungen mit einer Streak-Kamera . . . . .	41
3.6.1	Funktionsweise einer Streak-Kamera . . . . .	41
3.6.2	Die Streak-Kamera im experimentellen Aufbau . . . . .	42
3.6.3	Auswertung der Messungen mit der Streak-Kamera . . . . .	43
3.7	Quantenchemische Rechnungen . . . . .	44
<b>4</b>	<b>Aufbau, Charakterisierung und Anwendung eines Kerr-Schalters</b>	<b>45</b>
4.1	Funktionsweise des Kerr-Schalters . . . . .	46
4.1.1	Zeitauflösung . . . . .	46
4.1.2	Schalteffizienz . . . . .	46
4.2	Praktische Umsetzung des Kerr-Schalters . . . . .	47
4.2.1	Tsunami-Spitfire-Lasersystem . . . . .	48
4.2.2	Experimentelle Umsetzung des Kerr-Schalters . . . . .	49
4.2.3	Das Messprogramm . . . . .	52
4.2.4	Justierung des Kerr-Schalters . . . . .	55
4.2.5	Wahl der Schaltwellenlänge . . . . .	56
4.2.6	Korrekturkurve der spektralen Empfindlichkeit des Kerr-Schalters . .	57
4.2.7	Messung von N,N-Dimethyl-para-nitroanilin . . . . .	58
4.2.8	Messungen an Proteorhodopsin . . . . .	61
4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	64
<b>5</b>	<b>Fluoreszenzmarker für Ribonukleinsäuren</b>	<b>65</b>
5.1	Einführung . . . . .	65
5.1.1	Ribonukleinsäure <sup>[201]</sup> . . . . .	65
5.1.2	Fluoreszenzmarker . . . . .	68
5.2	Pyrenmodifizierte Nukleobasen . . . . .	69
5.2.1	Synthese . . . . .	70
5.2.2	Messspezifische Informationen . . . . .	71
5.2.3	Ergebnisse der Untersuchungen an 2-(1-Ethynylpyren)-adenosin . . . .	73
5.2.3.1	Stationäre Charakterisierung . . . . .	73
5.2.3.2	Transiente Absorptionsmessung in Methanol . . . . .	77
5.2.3.3	Vergleich der Ergebnisse der transienten Absorptionsmessungen in den verschiedenen Lösungsmitteln . . . . .	82
5.2.3.4	Streak-Kamera-Messungen . . . . .	87
5.2.3.5	Quantenchemische Rechnungen . . . . .	90
5.2.3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	97
5.2.4	Ergebnisse der Untersuchungen an 2-(1-Ethynylpyren)-desoxyadenosin	98
5.2.4.1	Stationäre Messungen . . . . .	99
5.2.4.2	Transiente Absorptionsmessungen . . . . .	103
5.2.4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	108
5.3	Das mit PyA-modifizierte neomycinbindende Aptamer . . . . .	110
5.3.1	Neomycinbindendes Aptamer . . . . .	110
5.3.2	Das modifizierte N1-Aptamer . . . . .	111
5.3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	113
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>115</b>

6.1	Kerr-Schalter . . . . .	115
6.2	Pyrenmodifizierte Nukleobasen . . . . .	115
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>117</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>137</b>
8.1	Abbildungen . . . . .	137
8.1.1	Streak-Kamera-Messungen an 2-(1-Ethynylpyren)-desoxyadenosin . . .	137
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>138</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>140</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>141</b>
	<b>Eigene Publikationen und Konferenzbeiträge</b>	<b>142</b>

# 1 Motivation dieser Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit im Femtosekundenbereich zeitaufgelöster Spektroskopie, im Genaueren mit der Entwicklung und der Charakterisierung eines experimentellen Aufbaus zur Messung zeitaufgelöster Fluoreszenz (Kerr-Schalter) sowie der Untersuchung der photophysikalischen Prozesse eines Fluoreszenzmarkers (2-(1-Ethynylpyren)-adenosin (PyA)) mittels zeitaufgelösten Absorptionsmessungen für dynamische Strukturänderungen von Ribonucleinsäure (engl. ribonucleic acid, RNA).

## 1.1 Eine notwendige Vielfalt an experimentellen Methoden

Je nachdem, welcher dynamische Prozess einer biologischen Reaktion untersucht werden soll, treten unterschiedliche Methoden in den Vordergrund, die in ihrer Zeitauflösung und in ihren Observablen variieren, um diese Dynamik aufzuklären. Im Fall von RNA ist es heutzutage mit NMR-Spektroskopie bzw. Röntgenbeugung möglich, Änderungen der Tertiär- und zum Teil der Sekundärstruktur<sup>[1]</sup> direkt nachzuverfolgen, da diese langsamer als einige hundert Mikrosekunden<sup>[2]</sup> bzw. Millisekunden<sup>[3]</sup> sind. Schnellere Prozesse wie zum Beispiel die Bindung von Liganden, kollektive Helixbewegungen oder frühe Änderungen der Sekundärstruktur bedürfen Methoden mit einer höheren zeitlichen Auflösung. Viele dieser Methoden wie z.B. zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (engl. **t**ime-**c**orrelated **s**ingle **p**hoton **c**ounting, TCSPC)<sup>[4,5]</sup>, Streak-Kamera<sup>[6]</sup>, Up-Conversion<sup>[7]</sup> und Kerr-Schalter<sup>[8]</sup> nutzen die Fluoreszenz als Observable, um Informationen über Dynamiken bis in den Pikosekunden- bzw. den Femtosekundenbereich zu erhalten. Die Beobachtung struktureller Veränderungen ist über die Fluoreszenz möglich, da sie sensitiv auf Änderungen der direkten Umgebung des Fluorophors reagiert, was sich in der Veränderung der Lebenszeiten des emittierenden Zustands und der spektralen Eigenschaften äußert<sup>[9]</sup>.

Jede dieser Methoden hat ihre Vor- und Nachteile. Sind Dynamiken im Femto- bis Pikosekundenbereich wie z.B. bei photoinduzierten Konformations- bzw. Konfigurationsänderungen von Interesse scheitern die TCSPC und die Streak-Kamera aufgrund ihres elektronischen Detektionssystems, das eine solche Zeitauflösung nicht erlaubt. Erst die Verwendung des Kerr-Schalters oder der Up-Conversion ermöglicht es, diesen Zeitbereich zu erschließen. Die Up-Conversion ist wegen der zugrundeliegenden Prozesse der nichtlinearen Optik meist auf einen kleinen spektralen Korridor ( $\approx 100$  nm) beschränkt<sup>[7,10,11]</sup> und kann nur unter großem Aufwand<sup>[12]</sup> einen spektral breiten Bereich, wie es der Kerr-Schalter erlaubt<sup>[8,13]</sup>, abdecken. Jeder dieser Aufbauten muss aber zwangsläufig bezüglich seiner spektralen und zeitabhängigen Eigenschaften charakterisiert werden, da nur infolgedessen die notwendigen Einstellungen für ein optimales Ergebnis gefunden und somit verlässliche Informationen über die untersuchten Proben gewonnen werden können.

## 1.2 Fluoreszenzmarker als Observable

Aufgrund der bereits erwähnten Sensitivität gegenüber Umgebungsparametern ist die Fluoreszenz eine sehr gute Observable für dynamische Prozesse. Fluoresziert die zu untersuchende Probe nicht selbst oder sind Informationen über spezifische Bereiche eines Makromoleküls erwünscht, können Fluoreszenzmarker eingesetzt werden. Sie werden in ein zu untersuchendes

makromolekulares System an spezifischen Stellen eingebracht und liefern Informationen über die Dauer und im besten Fall die Art der Umgebungsänderungen.

Einen sehr bekannten, oft verwendeten und dadurch gut untersuchten Fluorophor stellt Pyren dar<sup>[14–20]</sup>, was mitunter auf seiner besonders interessanten Eigenschaft beruht Excimere bilden zu können<sup>[14,21]</sup>. Eine Vielzahl von Studien mit auf Pyren als Fluorophor basierenden Markern wurden an Desoxyribonukleinsäure (engl. **deoxyribonucleic acid**, DNA) durchgeführt. Mit diesen wurden Thematiken, wie z.B. Elektrontransferprozesse zwischen Nukleobase und Fluorophor in Folge von Photoanregung<sup>[22–28]</sup>, spezifische Erkennung von Nukleobasen bzw. Strukturen<sup>[29–33]</sup>, Einsatz als FRET-Sonde<sup>[33–35]</sup> und molekulare Hybridisierungssonden<sup>[36–45]</sup>, untersucht. Dies belegt, dass diese Art von Markern bereits eine breite Verwendung bei der Aufklärung von dynamischen Prozessen bei DNA gefunden hat. Bei RNA ist der Anteil der auf Pyren basierenden Marker kleiner, wobei die größere strukturelle Flexibilität und Komplexität von RNA<sup>[46–49]</sup> zusätzliche Ansprüche an die Marker stellt. Dementsprechend wurde eine Vielfalt an Markern mit variierenden Linkern und Verknüpfungspositionen synthetisiert<sup>[43,50–57]</sup>. Hierbei sticht vor allem die C2' Position am Zucker der jeweiligen Nukleobase als Verknüpfungspunkt heraus, da hier eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass der Fluorophor bei einer typischen A-Helix, wie sie bei RNA häufig vorkommt, in den freien Raum der Umgebung zeigt<sup>[43,50,51,53–58]</sup>. Die direkte Modifikation der Nukleobase stellt eine Alternative dar, wie sie bisher oft im Fall von DNA genutzt wurde<sup>[22–28,36,37,39,59–61]</sup>. Im Fall des in dieser Arbeit vorgestellten Markers wurde von Prof. Dr. Joachim W. Engels<sup>1</sup> die Idee propagiert die Position 2 von Adenin über einen Ethinyllinker mit Pyren zu verknüpfen, wodurch der Fluorophor in die kleine Furche einer A-Helix zeigen und infolgedessen die Gesamtstruktur nicht stören sollte<sup>[62]</sup>. Die Verwendung von Pyren als Marker führt jedoch zwangsläufig durch den notwendigen Austausch eines der Protonen am Pyren mit einem für biologische Fragestellung nutzbaren Baustein zu Änderungen der elektrochemischen Natur des Pyrens. Diese Veränderungen zeigen großen Einfluss auf die spektralen Eigenschaften in Abhängigkeit der Position sowie der elektrochemischen Natur des neuen Substituenten<sup>[20,63]</sup>. Zur Interpretation der spektralen Veränderungen und für eine Einschätzung der Verlässlichkeit des Markers bedarf es folglich eines hinreichend guten Verständnisses der zugrundeliegenden photophysikalischen Prozesse. Basierend darauf können die Dauer und die Abfolge dynamischer Prozesse wie z.B. De-/Hybridisierung von RNA<sup>[43,56,57,64]</sup> oder deren Faltung<sup>[58]</sup> analysiert werden.

### 1.3 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Aufbau eines Kerr-Schalters darzustellen, genauso wie die bisher damit erzielten Ergebnisse zu präsentieren. Des Weiteren wird ein auf Pyren basierender Fluoreszenzmarker für RNA vorgestellt, bei dem insbesondere dessen photophysikalische Eigenschaften aufgezeigt werden sollen, um eine präzise Interpretation von Messergebnissen bei dessen Anwendung in biologischen Systemen zu ermöglichen.

---

<sup>1</sup>Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Goethe-Universität Frankfurt am Main, Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt am Main, Deutschland.

## 2 Spektroskopische Grundlagen

Als elektromagnetische Welle ist Licht in der Lage mit Materie zu interagieren. Dabei ruft es Veränderungen in der Verteilung der Elektronendichte der Materie hervor, aus denen das Material besteht. Im Normalfall erfolgt dies über die elektrische Komponente der Strahlung. Die Polarisationssebene der Strahlung wird über die Ausbreitungsrichtung und die Richtung des elektrischen Feldvektors definiert. Diese Wechselwirkung des Lichts mit der Materie zeigt dabei eine Abhängigkeit von der Energie des eingestrahlten Lichts. Damit ermöglicht sie Rückschlüsse auf bestimmte quantenmechanische Material- bzw. Moleküleigenschaften.

Die Art der zu untersuchenden Proben ist dabei nicht auf anorganische oder einkomponentige Systeme eingeschränkt. Infolgedessen können mitunter für komplexe biologische Systeme Aussagen über photoinduzierte Prozesse und Eigenschaften getroffen werden. In diesem Kapitel soll dem Leser ein Einblick in die theoretischen Abläufe bei spektroskopischen Methoden gegeben werden. Zur Vereinfachung werden die Vorgänge an einem Molekül und keinem komplexeren System erläutert, Abweichungen davon werden an den entsprechenden Stellen kenntlich gemacht. Die jeweiligen Inhalte werden in gängigen Lehrbüchern in Detail beschrieben<sup>[9,65–70]</sup>.

### 2.1 Absorption von elektromagnetischer Strahlung

Das elektromagnetische Spektrum besteht aus verschiedenen Bereichen (Abb. 1), wobei deren genaue Aufteilung historisch begründet ist. Ausschlaggebend dafür, in welchem dieser Bereiche man sich bewegt, ist die Wellenlänge bzw. die Wellenzahl.

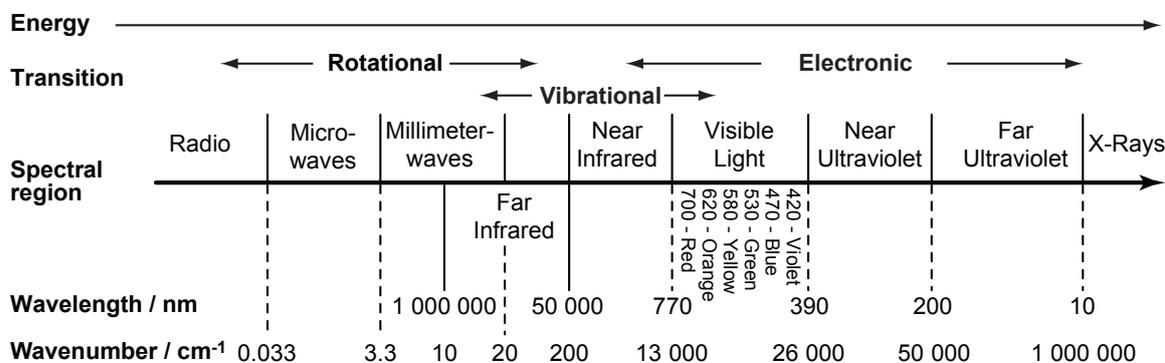


Abbildung 1: Schematische Darstellung des elektromagnetischen Spektrums und dessen Unterteilung in Wellenlängen- und Wellenzahlenbereiche. Abbildung abgewandelt aus Ref. 65 und 66.

Dabei wird der Spektralbereich des ultravioletten (UV<sup>1</sup>: 10-390 nm) und des sichtbaren (Vis: 390-770 nm) Lichts oft in Nanometern angegeben. Bei infrarotem (IR<sup>2</sup>: 0,77-1000  $\mu\text{m}$ ) Licht hingegen wird der Spektralbereich meist in Wellenzahlen, einer der Energie proportionalen Größe, angegeben.

Licht kann seine Energie an ein Molekül abgeben. Dieser Prozess wird als Absorption bezeichnet. Zur besseren Veranschaulichung dieses Phänomens wird in das Photonenbild ge-

<sup>1</sup>UV-Untergruppen: VUV: 10-200 nm, UV-C: 200-280 nm, UV-B: 280-320 nm und UV-A: 320-390 nm.

<sup>2</sup>Entspricht in Wellenzahlen:  $\sim 13333\text{-}10\text{ cm}^{-1}$ .

wechselt. Die Photonenenergie ( $E(\nu)$ ) besitzt eine lineare Abhängigkeit von der Frequenz und eine antiproportionale Abhängigkeit von der Wellenlänge der elektromagnetischen Strahlung (Gl. (2.1)).

$$E(\nu) = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} = h \cdot c \cdot \tilde{\nu} \quad (2.1)$$

- $h$ : Plancksches Wirkungsquantum ( $6,626 \cdot 10^{-34}$  Js)
- $c$ : Lichtgeschwindigkeit (299 792 458 m/s)
- $\lambda$ : Wellenlänge
- $\tilde{\nu}$ : Wellenzahl

Durch die Absorption eines Photons wird das Molekül aus einem stationären Zustand  $m$  in einen energetisch höher gelegenen Zustand  $n$  angeregt. Allgemein gilt für elektromagnetische Übergänge, dass die Energiedifferenz der beiden Zustände ( $\Delta E$ ) dabei der Energie des Photons entspricht, was der Bohr'schen Frequenzbedingung (Gl. (2.2)) Rechnung trägt und somit der Energieerhaltung entspricht.

$$\Delta E_{mn} = E_n - E_m = E(\nu) = h \cdot \nu \quad (2.2)$$

Dies entspricht der Energieerhaltung. Zusätzlich zu der Energieerhaltung als einschränkender Bedingung, muss das betreffende Molekül zumindest temporär ein elektrisches Dipolmoment aufweisen. Dies schlägt sich in der Übergangswahrscheinlichkeit  $|\mu_{mn}|^2$  nieder, welche ausschlaggebend für die Auswahlregeln der spektroskopischen Übergänge ist, und somit der Unterscheidung zwischen erlaubten ( $|\mu_{mn}|^2 \neq 0$ ) beziehungsweise verbotenen ( $|\mu_{mn}|^2 = 0$ ) Übergängen dient. Ist das Übergangsdipolmoment  $\mu_{nm}$  (Gl. (2.3)) ungleich Null, kommt es zu einer Ladungsdichteverchiebung beim Übergang vom Ausgangszustand  $m$  in den Endzustand  $n$  über ein Volumen  $dV$ .

$$\mu_{mn} = \int \psi_n^* \cdot \hat{\mu} \cdot \psi_m \cdot dV \quad (2.3)$$

- $\psi_n^*$ : Wellenfunktion des Endzustands
- $\hat{\mu}$ : Dipoloperator
- $\psi_m$ : Wellenfunktion des Ausgangszustands

Aus der Übergangswahrscheinlichkeit kann wiederum die Oszillatorstärke  $f_{Osc}(\nu_{nm})$  (Gl. (2.4)) bestimmt werden.

$$f_{Osc}(\nu_{nm}) = \frac{8 \cdot \pi^2}{3} \cdot \frac{m_0 \cdot \nu_{nm}}{h \cdot e^2} \cdot |\mu_{nm}|^2 \quad (2.4)$$

- $\nu_{nm}$ : Mittlere Frequenz des Übergangs
- $e$ : Ladung eines Elektrons
- $m_0$ : Masse eines Elektrons

Zusätzlich greift das Franck-Condon-Prinzip. Es besagt, dass elektronische Übergänge deutlich schneller ( $10^{-15}s$ ) sind als Molekülschwingungen ( $10^{-10} - 10^{-12}s$ ), die somit erst nach der Anregung zu einer Änderung der Atomgeometrie führen<sup>[71]</sup>. In Kombination mit der Energie- bzw. der Wellenlängenabhängigkeit aufgrund des Übergangsdipolmoments führt dies zu einem charakteristischen elektromagnetischen Spektrum für ein Material und den beinhalteten Molekülen.

### 2.1.1 Das Lambert-Beer'sche Gesetz

Grundlegend gilt für alle Übergänge, dass die Absorption ( $A$ ) beziehungsweise die Transmission ( $T$ ) eines Lichtstrahls mit der eingestrahnten Intensität ( $I_0$ ) bei allen Übergangsarten dem Lambert-Beer'schen Gesetz (2.5) folgt. Durch Bestimmung der Intensität des transmittierten Lichtstrahls ( $I$ ) kann die Absorption (bzw. Transmission) bestimmt werden.

$$A(\lambda) = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d = -\log(T) = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (2.5)$$

Dabei zeigt die Absorption ( $A(\lambda)$ ) eine lineare Abhängigkeit von der Konzentration ( $c$ ), der Schichtdicke der Probe ( $d$ ), die das Licht zu passieren hat, und dem molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten<sup>3</sup> ( $\varepsilon_\lambda$ ) (üblicherweise in  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$  angegeben), einem wellenlängenabhängigen und molekülspezifischen Proportionalitätsfaktor. Das Produkt dieser drei Größen wird als „Optische Dichte“ (OD) bezeichnet. Das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt nur unter bestimmten Bedingungen und für einen definierten Konzentrationsbereich. Die Wellenlängenabhängigkeit von  $\varepsilon_\lambda$  führt beispielsweise dazu, dass das Gesetz nur für monochromatisches Licht gilt. Wenn nun der Absorptionskoeffizient aus der Messung einer Konzentrationsreihe bestimmt wird und eine geringe spektrale Auflösung des Detektors vorliegt, führt dies zu einem Mittelwert von  $\varepsilon_\lambda$  über den durch die Auflösung begrenzten Spektralbereich. Daraus folgt die grundlegende Konvention, dass der Absorptionskoeffizient in der Regel für ein Absorptionsmaximum angegeben werden sollte, da dort die Absorptionsänderung über einen gewissen spektralen Bereich nahezu identisch ist. Ein weiteres Problem stellen lichtinduzierte Reaktionen beziehungsweise chemische Reaktionen dar, die innerhalb eines Zeitbereichs ablaufen, welcher der Messzeit entspricht. Kommt es zum Beispiel während der Aufnahme einer Konzentrationsreihe zur Änderung der Konzentration der absorbierenden Moleküle beziehungsweise entstehen Reaktionsprodukte, weisen diese möglicherweise abweichende Absorptionskoeffizienten aufgrund sich ändernder spektraler Eigenschaften auf. Zusätzlich stellen trübe beziehungsweise kolloidale Lösungen ein Problem aufgrund der auftretenden Streuung dar. Ein weitaus häufiger auftretender einschränkender Faktor ist allerdings der verlässliche Konzentrationsbereich für eine Messung. Hier ist der Bereich zu beachten, wie z.B. bei photoinduzierten Konformations- bzw. Konfigurationsänderungen in dem Messwerte mit einer Vertrauenswürdigkeit von 90 % liegen. Dieser Parameter ist abhängig von dem verwendeten Gerät. Betrachten wir allein die mittlere Intensitätsschwankung einer Lichtquelle mit z.B. 0,005 %<sup>4</sup>, liegen nur Messwerte zwischen einer OD von 0,05 und 1,3 in dem gewünschten Vertrauensbereich von 90 %.

<sup>3</sup>Früher auch als molarer Extinktionskoeffizient bezeichnet.

<sup>4</sup>JASCO V670 UV-VIS-NIR Absorptionsspektrometer, JASCO Germany GmbH, Deutschland, Groß-Umstadt.

Betrachtet man die molekularen Eigenschaften der untersuchten Probe, muss ein weiterer Aspekt bezüglich des verlässlichen Konzentrationsbereichs berücksichtigt werden. Neigt ein Molekül ab einer bestimmten Konzentration zur Aggregation (Oligomerisierung), ergibt sich eine Abweichung vom linearen Verhalten der Absorption mit steigender Konzentration. Eine oftmals vernachlässigbar kleine Komponente ist die Dauer, in der sich das Molekül im angeregten Zustand aufhält. In seltenen Fällen (z.B. sättigbarer Absorber, siehe Kap. 2.3.2.2) können jedoch langlebige, angeregte Zustände zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen, da diese während des Messintervalls zu einer Abnahme der absorbierenden Moleküle im Grundzustand führen (Grundzustandsphotobleichen (engl. **ground state bleach**, GSB)). All diese einschränkenden Parameter führen zu einer Verfälschung der Ergebnisse und zeigen die Schwierigkeiten bereits bei solch vermeintlich einfachen Messungen auf.

### 2.1.2 Elektronische Übergänge in der UV/Vis-Spektroskopie

Wie bereits erwähnt gibt es Bedingungen, an die eine Absorption von Photonen geknüpft ist. Die Photonenenergie muss resonant mit einem erlaubten Übergang sein (Gl. (2.1)) und dementsprechend die Energieerhaltung erfüllt sein. Sofern die Energie eines Photons dem ultravioletten bzw. dem sichtbaren Spektralbereich entspricht, stellt das typischerweise ein Übergang eines Valenzelektrons aus seinem Grundzustand ( $m$ ) in einen angeregten Energieeigenzustand ( $n$ ) dar. Dabei erfolgt bei Raumtemperatur (293,15 K bzw. 20°C) die Anregung grundsätzlich aus dem vibronischen Grundzustand, da sich dort aufgrund der Boltzmannverteilung nahezu alle Moleküle aufhalten sollten. Der Übergang findet dem Franck-Condon-Prinzip folgend in mehrere vibronische und rotatorische Zustände statt.

Die elektronischen Übergänge werden mit Hilfe der ursprünglichen und der resultierenden Molekülorbitale beschrieben. Valenzelektronen gelangen dabei meist aus bindenden  $\sigma$ - und  $\pi$ -Orbitalen oder nichtbindenden  $n$ -Orbitalen in antibindende  $\sigma^*$ - und  $\pi^*$ -Orbitale. Die typischen Übergänge können mit folgender Schreibweise nach Kasha gekennzeichnet werden:  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ,  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \sigma^*$  und  $n \rightarrow \pi^*$ <sup>[66]</sup>. Dabei sind  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ -Übergänge die höchstenergetischen, während gewöhnlich die  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge niederenergetischere Übergänge darstellen. Weit häufiger wird die weniger aussagekräftige enumerative Bezeichnung gewählt. Dabei wird in Singulett- und Triplettzustände ( $S_j$  und  $T_j$ ) unterteilt, die über den Index als Grundzustand ( $j = 0$ ) oder höhere angeregte Zustände ( $j = 1, 2, 3, \dots, m$ ) definiert werden. Dies ermöglicht eine grobe Zuordnung in Form eines Jabłoński-Diagramms (Abb. 2), ohne genauere Informationen über die Art der beteiligten Zustände und der ablaufenden Prozesse nach der Anregung.

## 2.2 Folgeprozesse der Absorption: Nichtstrahlende und strahlende Deaktivierung

Nach der Absorption eines Lichtquants kehrt das Molekül mit Hilfe verschiedener Prozesse in seinen Grundzustand zurück. Eine Zusammenfassung der für diese Arbeit relevanten Übergänge ist in Abbildung 2 in Form eines Jabłoński-Diagramms zu sehen. Man kann die ablaufenden Vorgänge in zwei grundlegende Kategorien unterteilen: (1) strahlungslose und (2) strahlende Prozesse.

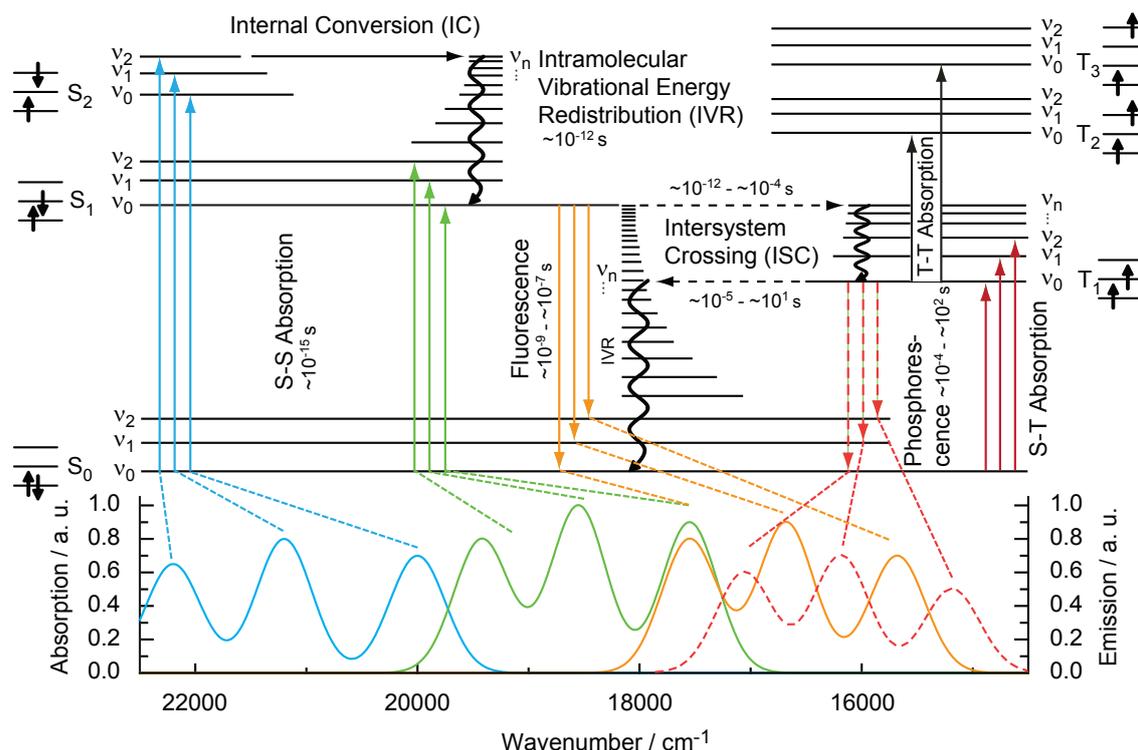


Abbildung 2: Jablonski-Diagramm mit enumerativer Bezeichnung von möglichen Zuständen und schematischer Darstellung der möglichen Prozesse nach Absorption eines Photons einer bestimmten Energie. Abgewandelt aus Ref. 68 und 71.

### 2.2.1 Nichtstrahlende Deaktivierungsprozesse

Bei den strahlungslosen Prozessen handelt es sich um die Umwandlung der überschüssigen Energie in Translations-, Schwingungs- und Rotationsenergie der umgebenden Moleküle oder wird bei einer Photoreaktion verbraucht (Ladungstransferreaktionen, Konformationsänderungen, Konfigurationsänderungen, *etc.*). Dies spielt vor allem in kondensierter Phase eine Rolle, da hier die Moleküle aufgrund der permanenten räumlichen Nähe nahezu instantan mit den umgebenden Molekülen (z.B. Lösungsmittelmolekülen) in Form von Stößen wechselwirken können. Nach der Anregung in einen energetisch höher liegenden elektronischen Zustand wird die Anregungsenergie sehr schnell ( $\sim 10^{-12}\text{s}$ <sup>[9]</sup>) in kleineren Schwingungs- und Rotations-Quanten an die umgebenden Moleküle abgegeben. Dies wird als intramolekulare Umverteilung von Schwingungsenergie (engl. **i**ntramolecular **v**ibrational energy **r**edistribution, IVR) bezeichnet (Abb. 2). Gleichzeitig kann das Molekül isoenergetisch in einen anderen elektronischen Zustand wechseln, was als innere Umwandlung (engl. **i**nternal **c**onversion, IC) bezeichnet wird. Grundvoraussetzung hierfür ist, dass ein ausreichend großer Überlapp der vibronischen Zustände vorherrscht. Besteht jedoch eine relativ große Energiedifferenz zwischen den an der inneren Umwandlung beteiligten Zuständen, führt dies bei einem anharmonischen Potential zu einer Anhäufung von überlappenden Schwingungsniveaus der beiden Zustände, mit einer großen Differenz in den Beträgen der Schwingungsquantenzahlen. Das Ergebnis ist ein geringer Überlapp der vibronischen Zustände und somit eine Verlangsa-

mung der inneren Umwandlung. Diese Tatsache wird als „energy gap law“ bezeichnet. Sie besagt grob zusammengefasst, dass mit steigender Nullpunktsenergie­differenz ( $\Delta E$ ) zwischen Ursprungs- ( $S_i$ ) und Endzustand ( $S_f$ ) eine Verringerung der Rate der inneren Umwandlung einhergeht<sup>[72,73]</sup>, was oft für den isoenergetischen Übergang vom ersten angeregten Zustand ( $S_1$ ) in den Grundzustand ( $S_0$ ) der Fall ist. Die Lebensdauern der Zustände variieren somit auch mit der Art der am Übergang beteiligten Zustände ( $\pi \leftarrow \pi^* \sim 10^{-9} - 10^{-7}$ s bzw. für  $n \leftarrow \pi^* \sim 10^{-6}$ s)<sup>[71,74]</sup>. Alternativ zu der IC ist als weiterer Prozess die Interkombination (engl. **inter system crossing**, ISC) (Abb. 2) zu erwähnen. Sie ist der Spin-Bahn-Kopplung geschuldet und stellt einen isoenergetischen Übergang von einem Singulett- in einen Triplett-Zustand dar. Dieser Übergang erfordert eine Spinumkehr und ist folglich, vor allem bei Molekülen mit einer kleinen Spin-Bahn-Kopplung, sehr langsam. Der Triplett-Zustand liegt immer energetisch günstiger als der Singulett-Zustand, da die benötigte Energie für die Spinpaarung wegfällt. Auch nach dem Erreichen des Triplett-Zustands folgt eine IVR, während das Molekül hier ebenfalls wiederholt in der Lage ist langsam über eine ISC zurück in den ursprünglichen Singulett-Grundzustand zu gelangen. Auf diese Weise kann das angeregte Molekül auch über einen langlebigen Triplettzustand zurück in den Grundzustand gelangen. Ist der Übergang in einen vibronisch angeregten Zustand des elektronischen Grundzustands vollzogen, folgt auch hier abermals eine IVR.

Natürlich gibt es Konkurrenzprozesse für die Deaktivierung über die IVR, IC und ISC, die im folgenden Kapitel als strahlende Prozesse zusammengefasst sind.

### 2.2.2 Strahlende Deaktivierungsprozesse

Strahlende Deaktivierungsprozesse (Lumineszenz bzw. Emission) stellen die alternative Möglichkeit zu den nichtstrahlenden Prozessen dar, die eine Rückkehr in den Grundzustand ermöglichen (Abb. 2). Sie können dabei in Abhängigkeit der Spinmultiplizität ( $2S+1$ ) des angeregten Zustands in zwei Kategorien eingeteilt werden, zum einen die Fluoreszenz ( $S = 0$ ) und zum anderen die Phosphoreszenz ( $S = 1$ ). Die Emission von Photonen wird dabei beim Übergang zwischen zwei Singulett-Zuständen als Fluoreszenz bezeichnet, während ein strahlender Übergang aus einem Triplett-Zustand in einen Singulett-Zustand als Phosphoreszenz benannt wird<sup>[9]</sup>. Während die Fluoreszenz Lebensdauern im Bereich um  $10^{-9}$ - $10^{-7}$  s aufweist, sind die bei der Phosphoreszenz beobachteten Lebensdauern aufgrund des spinverbotenen Übergangs mit  $10^{-4}$ - $10^2$  s deutlich länger<sup>[71]</sup>.

#### 2.2.2.1 Kasha und Kasha-Vavilov Regel

Michael Kasha schrieb 1950 in einer Veröffentlichung: „The emitting level of a given multiplicity is the lowest excited level of that multiplicity.“<sup>[75]</sup>. Diese Aussage fasst später den unter „Kasha’s Rule“ bekannt gewordenen Grundsatz zusammen, dass ein angeregtes Molekül vornehmlich aus seinem niedrigsten angeregten Zustand emittiert. Grund dafür ist die normalerweise sehr schnelle IC in den ersten elektronisch angeregten Zustand, die eine nennenswerte Fluoreszenz aus einem höher angeregten Zustand verhindert. Dies impliziert jedoch gleichzeitig auch, dass bei ausreichend hoher Messempfindlichkeit, einer ausreichend guten Beseitigung von Streulicht und einer ausreichend hohen Zeitauf­lösung eine Messung der Emission aus höher angeregten elektronischen Zuständen beobachtet werden kann. Diese ist jedoch meist deutlich kurzlebiger als die aus dem ersten angeregten Zustand wie z.B.

bei Pyren<sup>[74,76,77]</sup>. Mittlerweile wurden indes einige Ausnahmen dieser Regel gefunden. Diese Sonderfälle mit einer Emission aus höher angeregten Zuständen treten auf, wenn eine von folgenden zwei Situationen vorliegt<sup>[78]</sup>: (1) Die Bandlücke zwischen  $S_2$ - und  $S_1$ -Zustand und die Oszillatorstärke des  $S_1 \rightarrow S_0$  Übergangs ist jeweils klein, während die Oszillatorstärke des  $S_2 \rightarrow S_0$  Übergangs groß ist. Dadurch ist der  $S_1$  Zustand langlebig und populiert thermisch den  $S_2$  Zustand (z.B. Ovalen<sup>[79]</sup>). (2)  $S_2$  und  $S_1$  liegen sehr weit auseinander und der  $S_2 \rightarrow S_0$  Übergang weist eine hohe Oszillatorstärke auf, was zu einer langsamen inneren Umwandlung in den  $S_1$  führt, während der  $S_2$ -Zustand emittieren kann (z.B. Azulen<sup>[80]</sup>). Eine weitere Folge des „energy gap law“ (vgl. Kap. 2.2.1), also der vom aktuell bevölkerten Zustand abhängigen unterschiedlich schnellen IC, und der Tatsache, dass eine Interkombination in einen Triplettzustand ( $T_n$ ) deutlich langsamer als eine IC in den Grundzustand vonstatten geht, führte zu der Kasha-Vavilov Regel. Sie besagt, dass der Anteil an Molekülen, die strahlend rekombinieren, sei es über Fluoreszenz oder Phosphoreszenz, unabhängig von der Anregungswellenlänge ist<sup>[77,78]</sup>. Der ursprüngliche elektronische Zustand, in dem sich das Molekül nach der Anregung befindet, spielt keine Rolle.

### 2.2.2.2 Fluoreszenzquantenausbeute (FQA)

Die FQA ( $\phi_{Fl}$ ) beschreibt das Verhältnis der Anzahl an emittierten ( $n_{em}$ ) zu absorbierten ( $n_{abs}$ ) Photonen (Gl. (2.6)) eines makroskopischen Systems. Sie stellt einen wichtigen Parameter zur Beschreibung der Eigenschaften von Fluorophoren dar. Alternativ kann die FQA auch über das Verhältnis der Ratenkonstanten für einen strahlenden Zerfall ( $k_r$ ) und der Summe der Ratenkonstanten für alle strahlenden und nichtstrahlenden Deaktivierungsprozesse ( $k_{nr}$ ) definiert werden<sup>[9]</sup>.

$$\phi_{Fl} = \frac{n_{em}}{n_{abs}} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \cdot \tau \quad (2.6)$$

Die FQA kann dabei nahezu 1 sein, wenn  $k_{nr} \ll k_r$  ist. Dieser Wert wird jedoch in Lösung aufgrund von Relaxationsprozessen durch Stöße mit der Umgebung fast nie erreicht. Die beiden Ratenkonstanten bestimmen somit gemeinsam die Gesamtlebensdauer ( $\tau$ , Gl. (2.7)) des Fluorophors.

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (2.7)$$

### 2.2.2.3 Solvatochromismus, Permittivität und Polarität

Lösungsmittel üben aufgrund der Wechselwirkungen zwischen dem gelösten Stoff und dem Lösungsmittel (Ion-Dipol, Dipol-Dipol, Wasserstoffbrückenbindungen usw.) einen großen Einfluss auf die elektronischen Zustände eines Moleküls aus. Dabei verändert sich die energetische Lage der Zustände zueinander. Das Resultat ist entweder eine spektrale Verschiebung der Absorptionsbanden hin zu längeren Wellenlängen (bathochrom) aufgrund der energetischen Annäherung der beiden am Übergang beteiligten Zustände oder eine Verschiebung hin zu kleineren Wellenlängen (hypsochrom) infolge einer steigenden energetischen Diskrepanz zwischen den Zuständen<sup>[81]</sup>. Natürlich werden auch die Emissionseigenschaften des jeweiligen gelösten Stoffes verändert.

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Lösungsmittel in vier Kategorien eingeteilt.

1. Protisch
2. Aprotisch
3. Polar
4. Unpolar

Lösungsmittel, die in der Lage sind Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden und als Protonendonatoren dienen können, gehören zu Kategorie 1, den protischen Lösungsmitteln. Im Gegenzug gehören Lösungsmittel, die nicht in der Lage sind Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden und Protonen zu abstrahieren zu Kategorie 2, den aprotischen Lösungsmitteln. Zusätzlich können die Lösungsmittel der beiden Klassen Moleküle und Salze mit großen permanenten Dipolen entweder lösen (Polar, Kategorie 3) oder nicht (unpolar, Kategorie 4)<sup>[82]</sup>. Oft wird die relative Permittivität<sup>[82]</sup>, auch als relative Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon_r$ ) bekannt, angegeben, um die Polarität der Lösungsmittel zu beschreiben<sup>[83]</sup>. Bestimmt wird diese über die Änderung der Kapazität eines Kondensators aufgrund der Abschirmung durch das Lösungsmittel<sup>[82]</sup>. Polare Lösungsmittel weisen eine hohe relative Permittivität auf, während Lösungsmittel mit niedrigen Werten unpolar genannt werden. Diese Skala ist dabei nur abhängig von den Wechselwirkungen, welche die Lösungsmittel unter sich ausbilden. Betrachtet man die relative Permittivität der Moleküle, sieht man nur den Einfluss der Gesamtheit an Molekülen auf zwei unterschiedliche Ladungen (makroskopische Größe). Damit ergibt sich eine Abfolge, die nur auf den Eigenschaften der Lösungsmittelmoleküle selbst basiert (Abb. 3). Im Umkehrschluss berücksichtigt diese Beschreibung der Polarität des Lösungsmittels aber nicht die molekülspezifischen Eigenschaften, die aufgrund von intermolekularen Wechselwirkungen vorhanden sind.

Es sind andere Skalen vorhanden, die diese zusätzlichen Interaktionen mit einem Molekül berücksichtigen. Sie basieren auf den solvatochromatischen Eigenschaften dieses Moleküls wie z.B. bei der weit verbreiteten ET(30)-Skala<sup>[84,85]</sup> oder einer auf Pyren basierenden Polaritätsskala von Winnik *et. al.*<sup>[86]</sup>. Beide Skalen, die nachfolgend aufgeführt werden, konnten aus verschiedenen Gründen nicht verwendet werden, sollen aber dessen ungeachtet Erwähnung finden, um den Einfluss der Lösungsmittelklasse und die Schwierigkeit der Anwendung einer auf molekülspezifischen Parametern basierenden Polaritätsskala zu zeigen.

Die ET(30)-Skala basiert auf einer Rotverschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Pyridinium-N-Phenolat-Betain mit steigender Polarität<sup>[82]</sup>. Dies hat einen großen Effekt auf die Abfolge der Lösungsmittel entsprechend ihren Polaritäten bei einer Auswahl aus protischen und aprotischen Lösungsmitteln, was in Abbildung 3 ersichtlich wird. Wie innerhalb einer Lösungsmittelklasse zu erkennen ist, führt die Fähigkeit des Lösungsmittels Wasserstoffbrückenbindungen als Protonendonator auszubilden zu keiner Änderung der Reihenfolge bei der ET(30)-Skala, sie verändert aber deutlich die Reihenfolge bei Betrachtung der Gesamtanfolge aus beiden Lösungsmittelklassen.

Die Py-Polaritätsskala von Winnik *et. al.* wurde 1984 eingeführt und basiert auf den Unterschieden der Intensitätsverhältnisse zwischen dem ersten und dritten vibronischen  $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang im Fluoreszenzspektrum von Pyren. Zwar wird in dieser Arbeit der Einfluss von Lösungsmitteln auf ein Derivat von Pyren diskutiert, jedoch lässt sich die Pyren-Skala im Zusammenhang mit den hier durchgeführten Untersuchungen aufgrund von fehlenden Polaritätswerten für einige verwendete Lösungsmittel und der mangelnden Zugänglichkeit zu den

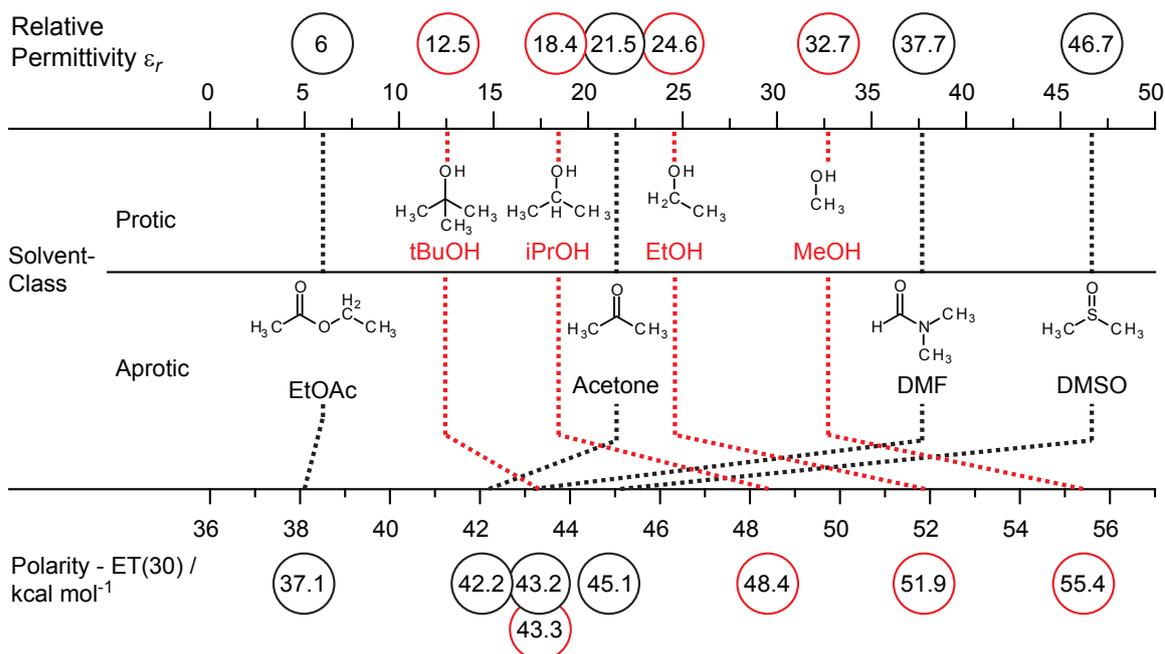


Abbildung 3: Chemische Strukturen der Lösungsmittel, die für die Betrachtung der Umgebungsabhängigkeit der photophysikalischen Eigenschaften von PyA & PydA verwendet wurden, sowie deren Permittivität<sup>[83]</sup> und deren Polarität nach der ET(30)-Skala<sup>[84,85]</sup>.

notwendigen Daten nicht nutzen. Da die in dieser Arbeit diskutierten, mit Pyren modifizierten Nucleoside eine deutliche Abhängigkeit von der Lösungsmittelklasse zeigen, ist es nicht ratsam die Polarität als absolut anzusehen, sondern die einzelnen Lösungsmittelklassen separat zu betrachten. Dadurch bedingt wird die relative Permittivität zur Beschreibung des Einflusses der Lösungsmittelpolarität genutzt.

Die in Abbildung 3 genannten Lösungsmittel werden bei den später gezeigten Untersuchungen genutzt (Kap. 5.2). Die verwendeten protischen Lösungsmittel werden der Einfachheit halber ab hier in Abbildungen und in Tabellen wie folgt abgekürzt: (1) Methanol (MeOH), (2) Ethanol (EtOH), (3) 2-Propanol (iPrOH) und (4) 2-Methyl-2-propanol (tBuOH).

## 2.3 Theorie der zeitaufgelösten Spektroskopie

Viele chemische und mitunter biochemische Prozesse auf molekularer Ebene erstrecken sich über einen großen Zeitbereich von Femtosekunden (fs) bis hin zu mehreren Sekunden. In Molekülen kann es dabei zu sehr schnellen, kleinen lokalen Änderungen kommen, zum Beispiel der elektronischen Struktur. Diese können allerdings zu Variationen einzelner Bindungsgeometrien bis hin zu großen geometrischen Veränderungen von Makromolekülen führen. Abbildung 4 veranschaulicht dabei die Zeitbereiche, in denen sich diese Prozesse abspielen, wobei die langsameren hier am Beispiel von RNA aufgezeigt werden. Generell ist aber zu erwähnen, dass diese Grenzen nicht scharf sind, da sie immer von dem betrachteten System abhängen. Um alle möglichen Zeitskalen messtechnisch abzudecken, bedarf es einer großen Vielfalt von Messmethoden (Abb. 4).

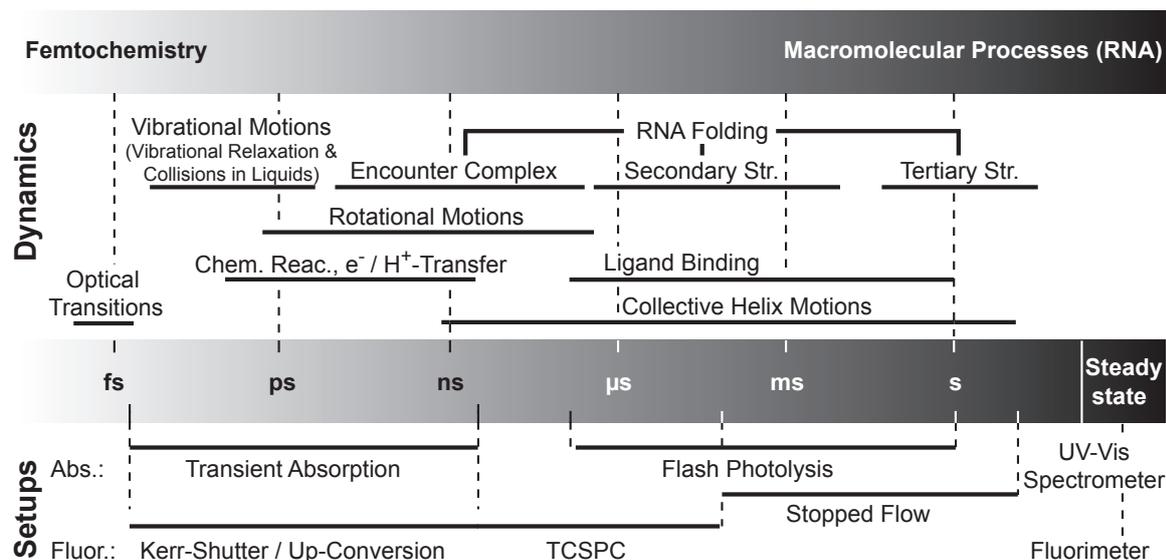


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zeitbereiche in denen Dynamiken der Femtochemie bis hin zu makromolekularen Dynamiken stattfinden. Zusätzlich sind die in unserem Arbeitskreis aktuell verfügbaren Messmethoden dargestellt und der Zeitbereich den diese abdecken, um die gezeigten Dynamiken zu untersuchen<sup>[1,87,88]</sup>.

Zur Untersuchung langsamerer Prozesse werden dabei zum großen Teil Standardmethoden eingesetzt. Aber je schneller die Prozesse sind, desto anspruchsvoller ist die benötigte Messmethode. Die Entwicklung des Lasers (engl. light amplification by stimulated emission of radiation) im Jahre 1960<sup>[89]</sup> und im Speziellen die Erzeugung von ultrakurzen Laserpulsen<sup>[90]</sup> bereitete den Weg für Messmethoden mit sehr hohen Zeitaufösungen. Mittlerweile ist es mit Hilfe eines kurzzeitgepulsten Lasers in Kombination mit elektronischen Methoden für die Detektion möglich, eine Zeitauflösung bis in den Pikosekundenbereich zu erreichen (z.B. TCSPC<sup>[4]</sup> und Streak-Kamera<sup>[91]</sup>). Möchte man jedoch Prozesse im Femtosekundenbereich untersuchen, muss man auf optische Methoden zurückgreifen, die eine Anregung und auch Abfrage der Probe in diesem Zeitbereich ermöglichen. Die theoretischen Hintergründe der Prozesse, die eine solche Zeitauflösung erlauben, sind dabei zum großen Teil sehr komplex und gehören zur nichtlinearen Optik.

### 2.3.1 Nichtlineare Optik

Prinzipien der nichtlinearen Optik ermöglichen eine Zeitauflösung im Femtosekundenbereich. Die zur nichtlinearen Optik zählenden Prozesse sind in gängigen Lehrbüchern bzw. Veröffentlichungen ausführlich diskutiert<sup>[92–96]</sup>. Im Folgenden wird nur auf das allgemeine Prinzip und einige spezifische Prozesse näher eingegangen. Vorab soll zwischen zwei Arten von Prozessen unterschieden werden: (1) den parametrischen und (2) den nichtparametrischen. Mit parametrischen Prozessen sind Übergänge gemeint, bei denen der quantenmechanische Ausgangs- und Endzustand der Gleiche ist, demzufolge die kurzzeitige Entvölkerung des Grundzustands in einen virtuellen Zustand stattfindet. Als nichtparametrisch werden Prozesse beschrieben, bei denen ein Übergang zwischen zwei realen Zuständen stattfindet.

### 2.3.1.1 Materialantwort in Form der Polarisation

In der linearen Optik wird von einem linearen Zusammenhang zwischen der Auslenkung eines Elektrons von seiner Ruhelage und der Rückstellkraft im Sinne eines klassischen Oszillatormodells ausgegangen. Das Resultat ist eine harmonische Schwingung des Elektrons. In einem makroskopischen Bild entspricht dies einem linearen Zusammenhang zwischen der Wechselwirkung eines elektromagnetischen Feldes ( $\vec{E}$ ) mit Materie und der dadurch induzierten Polarisation der Elektronendichte ( $\vec{P}(\vec{E})$ ), also der Summe der Vektoren von induzierten Dipolmomenten pro Volumeneinheit (Gl. (2.8)).

$$\vec{P}(\vec{E}) = \varepsilon_0 \cdot \chi^{(1)} \cdot \vec{E} \quad (2.8)$$

- $\chi^{(1)}$ : elektrischer Suszeptibilitätstensor der zweiten Stufe
- $\varepsilon_0$ : Dielektrizitätskonstante im Vakuum

Die Polarisation kann nicht beliebig stark anwachsen, da dies einer unbegrenzt starken Auslenkung eines Elektrons entsprechen würde. Daher muss die Polarisation eine anharmonische Schwingung als Antwort auf steigende Feldstärken liefern. Hieraus folgt, dass die elektrische Suszeptibilität selbst eine Abhängigkeit von der elektromagnetischen Feldstärke aufweisen muss und folglich Gleichung (2.8) nur eine Näherung für schwache Feldstärken darstellt.

In der nichtlinearen Optik wird nun davon ausgegangen, dass hohe Feldintensitäten zu einer Veränderung der Materialeigenschaften führen. Infolgedessen wird die Materialantwort in Form der Polarisation auf hohe Feldstärken oftmals als eine Potenzreihe von Suszeptibilitäten verschiedener Ordnung ( $\chi^{(i)}$ ) wiedergegeben (Gl. (2.9)).

$$\begin{aligned} \vec{P}(\vec{E}) &= \varepsilon_0 \left( (\chi^{(1)} \cdot \vec{E}) + ((\chi^{(2)} \cdot \vec{E}) \vec{E}) + (((\chi^{(3)} \cdot \vec{E}) \vec{E}) \vec{E}) + \dots \right) \\ &= \vec{P}^{(1)}(\vec{E}) + \vec{P}^{(2)}(\vec{E}) + \vec{P}^{(3)}(\vec{E}) + \dots \end{aligned} \quad (2.9)$$

- $\chi^{(i)}$ : elektrischer Suszeptibilitätstensor der (i+1)-ten Stufe
- $\vec{P}^{(i)}(\vec{E})$ : Polarisation der (i)-ten Ordnung

Die Suszeptibilitäten sind dabei ein Maß für die Stärke der Rückstellkraft infolge der Verformung der Elektronendichte. Sie spielen dabei wegen ihrer abnehmenden Größe ( $\chi^{(1)} \approx 1$ ,  $\chi^{(2)} \approx 10^{-12}$  m/V und  $\chi^{(3)} \approx 10^{-24}$  m<sup>2</sup>/V<sup>2</sup>) mit steigender Ordnung eine immer geringere Rolle<sup>5</sup>. Meist sind auch bei sehr hohen Feldstärken nur die Suszeptibilitäten bis hin zur dritten Ordnung ( $\chi^{(3)}$ ) für verschiedene Prozesse zu berücksichtigen. Feldstärken, die eine nichtlineare Materialantwort hervorrufen, werden dabei normalerweise nur mit Hochleistungslasern erreicht.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass Suszeptibilitäten einer geraden Ordnung in zentrosymmetrischen (isotropen) Materialien wegfallen, da die Polarisierung bei negativer und positiver Amplitude der Feldstärke auch eine Änderung des Vorzeichens erfährt (Gl. (2.10)).

$$\vec{P}^{(2)}(\vec{E}) = -\vec{P}^{(2)}(\vec{E}) \quad (2.10)$$

<sup>5</sup>Die Werte wurden entnommen aus dem Buch "Nonlinear Optics" von Boyd<sup>[95]</sup> und stellen die Größenordnung der Suszeptibilität für kondensierte Materie dar.

Dies ist nur möglich, wenn  $\vec{P}^{(2)}(\vec{E}) = 0$  ist. Im Oszillatorbild entspricht dies einer symmetrischen Energiepotentialfläche, d.h. die Rückstellkraft ist symmetrisch. Dadurch wird die zeitlich gemittelte Antwort der Polarisation auf die eintretende Welle in einem zentrosymmetrischen Kristall gleich Null. An der Grenzfläche eines Materials sind jedoch auch bei isotropen Materialien Asymmetrien vorhanden. Diese können zu kleinen Beiträgen der Polarisation zweiter Ordnung führen. Im Gegenzug dazu sind Suszeptibilitäten einer ungeraden Ordnung unabhängig von den Symmetrieeigenschaften des Materials.

### 2.3.1.2 Konsequenzen des Übergangs zur nichtlinearen Optik

In der linearen Optik ist das Superpositionsprinzip gültig, d.h. elektromagnetische Wellen, die gleichzeitig durch ein Medium propagieren, beeinflussen sich nicht gegenseitig. Der Übergang zur nichtlinearen Optik führt dazu, dass die durch ein elektrisches Feld induzierte Gesamtpolarisation Beiträge der Suszeptibilität höherer Ordnung besitzt. Die oszillierenden Dipolmomente können also mit verschiedenen Frequenzen schwingen und fungieren dadurch als Quelle für elektromagnetische Wellen, deren Frequenzspektrum über die Gesamtpolarisation definiert ist. Wird z.B. eine ebene elektromagnetische Welle ( $\vec{E}(t)$ ) betrachtet, die sich in z-Richtung im Medium ausbreitet und eine Überlagerung aus zwei ebenen Wellen mit den Frequenzen  $\omega_1$  und  $\omega_2$  darstellt (Gl. (2.11)):

$$\vec{E}(t) = \vec{E}_1 \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) + \vec{E}_2 \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \quad (2.11)$$

Wird Gleichung (2.11) in Gleichung (2.9) eingesetzt, ergibt sich:

$$\begin{aligned} \vec{P}(\vec{E}) = & \varepsilon_0 \chi^{(1)} \left[ \vec{E}_1 \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) + \vec{E}_2 \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \right] + \\ & + \left( \varepsilon_0 \chi^{(2)} \left[ \vec{E}_1 \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) + \vec{E}_2 \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \right] \right) \cdot \\ & \cdot \left[ \vec{E}_1 \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) + \vec{E}_2 \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \right] + \dots \end{aligned} \quad (2.12)$$

Wird der Einfachheit halber in den Skalarraum gewechselt, kann die Gesamtpolarisation wie folgt geschrieben werden (Gl. (2.13)):

$$\begin{aligned} \vec{P}(\vec{E}) = & \varepsilon_0 \chi^{(1)} \left[ E_1 \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) + E_2 \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \right] + \\ & + \varepsilon_0 \chi^{(2)} \left[ E_1^2 \cos^2(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) + E_2^2 \cos^2(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) + \right. \\ & \left. + 2 \cdot E_1 E_2 \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) \cdot \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \right] + \dots \end{aligned} \quad (2.13)$$

Berücksichtigt man die Additionstheoreme

$$\cos^2(\alpha) = \frac{1}{2}(1 + \cos(2\alpha)) \quad (2.14)$$

und

$$\cos(\alpha) \cdot \cos(\beta) = \frac{1}{2}[\cos(\alpha + \beta) + \cos(\alpha - \beta)], \quad (2.15)$$

erhält man für die Terme der Polarisation zweiter Ordnung ( $P^{(2)}(E)$ ) das folgende Ergebnis:

$$\begin{aligned}
 P^{(2)}(E) = & \varepsilon_0 \chi^{(2)} \left( \frac{1}{2} E_1^2 + \frac{1}{2} E_2^2 \right) + \\
 & + \varepsilon_0 \chi^{(2)} \left[ \frac{1}{2} E_1^2 \cos(2\omega_1 t + 2\vec{k}_1 \vec{z}) + \frac{1}{2} E_2^2 \cos(2\omega_2 t + 2\vec{k}_2 \vec{z}) \right] + \\
 & + \varepsilon_0 \chi^{(2)} \left[ E_1 E_2 \cos((\omega_1 + \omega_2)t + (\vec{k}_1 + \vec{k}_2) \vec{z}) \right] + \\
 & + \varepsilon_0 \chi^{(2)} \left[ E_1 E_2 \cos((\omega_1 - \omega_2)t + (\vec{k}_1 - \vec{k}_2) \vec{z}) \right]
 \end{aligned} \tag{2.16}$$

Gleichung (2.16) zeigt, in welcher Form bei einem Dreiwellenmischprozess die beiden ursprünglichen, elektromagnetischen Teilwellen parametrisch miteinander interagieren und welche neuen Frequenzen aufgrund der Interaktion miteinander entstehen können. Der erste Term  $(\frac{1}{2}E_1^2 + \frac{1}{2}E_2^2)$  ist frequenzunabhängig und wird als optische Gleichrichtung bezeichnet. Er führt zu einem statischen elektrischen Feld im Material, das in dieser Arbeit nicht weiter betrachtet wird. Interessanter sind die nachfolgenden Terme, welche die möglichen Frequenzkombinationen beschreiben. Die Terme, welche  $2\omega_1$  bzw.  $2\omega_2$  enthalten, beschreiben die Erzeugung der Frequenzverdoppelten (engl. **second harmonic generation**, SHG) der jeweiligen Teilwellen. Die Terme mit  $\omega_1 + \omega_2$  bzw.  $\omega_1 - \omega_2$  beschreiben die Erzeugung der Summenfrequenz (engl. **sum frequency generation**, SFG) bzw. die Erzeugung der Differenzfrequenz (engl. **difference frequency generation**, DFG). Alle diese Prozesse können mitunter in umgekehrter Richtung ablaufen.

Betrachtet man die SFG im Photonenbild näher, interagieren zwei Photonen geringerer Energie ( $\hbar\omega_1$  und  $\hbar\omega_2$ ) und erzeugen unter Berücksichtigung der Energieerhaltung (Gl (2.17)) ein drittes höherenergetisches Photon ( $\hbar\omega_3$ ).

$$\hbar\omega_3 = \hbar\omega_1 + \hbar\omega_2 \tag{2.17}$$

Die Energie des höherenergetischen Photons entspricht folglich der Summe der Energien der ursprünglichen Photonen. Ist dabei die Energie der beiden niederenergetischen Photonen die gleiche, betrachtet man die SHG. Die DFG hingegen beschreibt die Erzeugung eines Photons ( $\hbar\omega_3$ ), dessen Energie aufgrund destruktiver Interferenz der interagierenden Teilwellen ( $\omega_1$  und  $\omega_2$ ) um einen Betrag, der einer Differenz der Energie beider Photonen ( $\hbar\omega_1 - \hbar\omega_2$ ) entspricht, kleiner ist.

Zusätzlich zur Energieerhaltung muss bei diesen Prozessen zwingender Weise die Impulserhaltung erfüllt sein (Gl. (2.18)), was einer Phasenanpassung (Kap. 2.3.1.3) äquivalent ist.

$$\hbar k_3 = \hbar k_1 + \hbar k_2 \tag{2.18}$$

Wie eine Phasenanpassung und dadurch die Selektion eines einzelnen Prozesses erreicht werden kann, wird im nachfolgende Kapitel näher erläutert.

Es gibt auch nichtlineare parametrische Prozesse der Polarisation dritter Ordnung  $P^{(3)}(\omega)$ , die für diese Arbeit von Interesse sind. An dieser Stelle seien der Kerr-Effekt, die Erzeugung der Frequenzverdreifachten (engl. **third harmonic generation**, THG), die Selbstfokussierung und die Selbstphasenmodulation genannt. Sie werden in späteren Kapiteln näher erklärt. Diese Prozesse können ebenfalls durch die geeignete Wahl der Phasenanpassungsbedingungen

(Kap. 2.3.1.3) in einem geeigneten nichtlinearen Medium selektiv verstärkt werden, während die anderen Prozesse zum Großteil unterdrückt werden.

### 2.3.1.3 Phasenanpassung in anisotropen Medien

Die Phasenanpassung ist wichtig, da sich die von den einzelnen Atomen in einem Medium ausgehenden Wellen nur zu einer Gesamtwellen addieren können, wenn sich die Phasengeschwindigkeit der Ober- und Grundwellen gleichen und infolgedessen konstruktiv interferieren. Dabei muss die Impuls- ( $\vec{k}_3 = \vec{k}_1 + \vec{k}_2$ ) und Energieerhaltung ( $\hbar\omega_3 = \hbar\omega_1 + \hbar\omega_2$ ) eingehalten werden, der Phasenanpassungsfehler (2.19) muss folglich null sein.

$$\Delta\vec{k} = \vec{k}_3(\omega) - \vec{k}_1(\omega) - \vec{k}_2(\omega) \stackrel{!}{=} 0 \quad (2.19)$$

Um dies zu erreichen, werden anisotrope Medien verwendet. Das Besondere an ihnen ist, dass sie - anders als isotrope Medien - doppelbrechend sind. Die eintretende Welle mit dem Ausbreitungsvektor  $\vec{k}$  erfährt folglich in Abhängigkeit der Polarisation ihres elektrischen Feldvektors ( $\vec{E}$ ) einen unterschiedlichen Brechungsindex (Abb. 5). Hierbei ist zwischen optisch bi- oder uniaxialen Kristallen, die zwei oder eine Symmetrieachse besitzen, zu unterscheiden. Während biaxiale Kristalle zwei optische Achsen ( $n_x \neq n_y \neq n_z$ ) aufweisen, besitzen uniaxiale Kristalle nur eine optische Achse ( $n_x = n_y \neq n_z$ ). Von größerer Relevanz für eine Phasenanpassung sind typischerweise die uniaxialen Kristalle. Der wichtigste Vertreter der uniaxialen Kristalle, der in dieser Arbeit Erwähnung findet, ist der negativ uniaxiale **Beta-Barium-Borat-Kristall** ( $\beta$ -BaB<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, BBO). Dieser ist als negativ uniaxialer Kristall aufgrund eines großen Transparenzbereichs von 190 nm bis 3  $\mu$ m und seiner hohen Zerstörschwelle die Standardwahl für Dreiwellenmischprozesse.

Bei einem negativ uniaxialen Kristall<sup>6</sup> ist der ordentliche Brechungsindex  $n_o$ , welcher den Brechungsindex senkrecht zur optischen Achse definiert, konstant und unabhängig vom Öffnungswinkel zwischen Ausbreitungsvektor und optischer Achse (Phasenanpassungswinkel,  $\theta$ ). Der außerordentliche Brechungsindex  $n_e$ , welcher parallel zur optischen Achse orientiert ist, verändert sich hingegen in Abhängigkeit des Phasenanpassungswinkels. Folglich erfährt das Licht entsprechend seiner Polarisation je nach Phasenanpassungswinkel  $\theta$  immer den gleichen ordentlichen Brechungsindex, aber einen variierenden außerordentlichen Brechungsindex. Aus diesem Grund ist die Phasengeschwindigkeit von Lichtwellen in einem Medium ( $v_{ph}$ ) polarisationsabhängig (Gl. (2.20)).

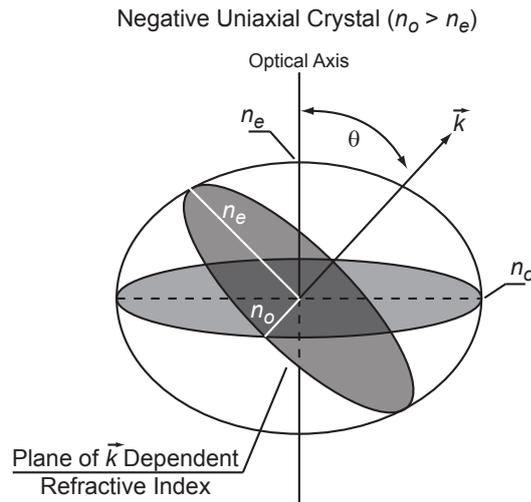


Abbildung 5: Polarisations Ebene in einem negativ uniaxialen Kristall.

<sup>6</sup>Das Attribut „Negativ“ weist darauf hin, dass  $n_o > n_e$  ist.

$$v_{ph(o)} = \frac{c}{n_o} \quad \text{bzw.} \quad v_{ph(e)} = \frac{c}{n_e(\Theta)} \quad (2.20)$$

Diese Polarisationsabhängigkeit wird genutzt, um bei den meisten Dreiwellenmischprozessen eine Phasenanpassung zu erreichen. Generell werden dabei zwei Typen von Phasenanpassungen unterschieden (Tab. 1).

Tabelle 1: Mögliche Anordnungen der Orientierungen (ordentlich (o) oder außerordentlich (e)) der Teilwellen für eine Phasenanpassung bei einem Dreiwellenmischprozess in einem positiv bzw. negativ uniaxialen Kristall. Es gilt:  $\omega_3 > \omega_2 \geq \omega_1$ .

	Typ-I			Typ-II		
	$\omega_1$	$\omega_2$	$\omega_3$	$\omega_1$	$\omega_2$	$\omega_3$
<b>negativ uniaxial</b>	o	o	e	o	e	e
<b>positiv uniaxial</b>	e	e	o	e	o	e

Die Typ-I-Phasenanpassung basiert auf einer parallelen Orientierung der beiden niederfrequenten elektromagnetischen Wellen ( $\omega_1$  und  $\omega_2$ ) zueinander, die resultierende höherenergetische Welle ( $\omega_3$ ) ist senkrecht zu diesen polarisiert. Eine Typ-II-Phasenanpassung geht hingegen von einer senkrechten Polarisierung der beiden niederfrequenten elektromagnetischen Wellen zueinander aus.

#### 2.3.1.4 Optisch parametrische Verstärkung

Eine kollineare optisch parametrische Verstärkung ist eine häufige Methode, um Photonen mit einer variabel einstellbaren Wellenlänge zu erzeugen. Aufbauten, die dieses Prinzip nutzen, werden als optisch parametrischer Verstärker (engl. **optical parametric amplifier**, OPA) bezeichnet. Die Erzeugung ist dabei ein Prozess der nichtlinearen Polarisation zweiter Ordnung und nutzt die umgekehrten Prinzipien der SFG und der Phasenanpassung. Per Definition wird bei der optisch parametrischen Verstärkung das an der SFG beteiligte Photon mit der höchsten Energie als Pumpphoton ( $\hbar\omega_3 = \hbar\omega_p$ ) bezeichnet, während die beiden niederenergetischen Photonen Signal- ( $\hbar\omega_1 = \hbar\omega_s$ ) bzw. Idlerphoton ( $\hbar\omega_2 = \hbar\omega_i$ ) genannt werden. Das höherenergetische der Beiden niederenergetischen Photonen ist dabei als Signalphoton definiert ( $\hbar\omega_s > \hbar\omega_i$ ).

Das Pumpphoton mit der Frequenz ( $\omega_p$ ) wird bei der optisch parametrischen Verstärkung mit ausreichend hoher Feldstärke ( $E_p$ ) in ein nichtlineares Medium geschickt. Quantitativ betrachtet werden dadurch die Atome im Medium in ein virtuelles Energieniveau angeregt (Abb. 6, A). Die Rückkehr in den Grundzustand findet dabei über einen Zerfall in zwei Photonen geringerer Energie ( $\hbar\omega_s$ , Signalphoton und  $\hbar\omega_i$ , Idlerphoton) statt. Dies geschieht unter Berücksichtigung der Energieerhaltung (Gl. (2.17)) und Impulserhaltung (Gl. (2.18)). Das Pumpphoton erzeugt dadurch bei Eintritt in ein nichtlineares Medium eine Vielzahl dieser Signal-Idler-Photonenpaare verschiedener Frequenzen, was als spontane parametrische Fluoreszenz (Superfluoreszenz) oder auch als Photonenrauschen bezeichnet wird. Aufgrund von Symmetriegründen werden die Photonen verschiedener Energie dabei kegelförmig emittiert.

Dies ist für Typ-I Phasenanpassung in Abb. 6 (B) dargestellt.

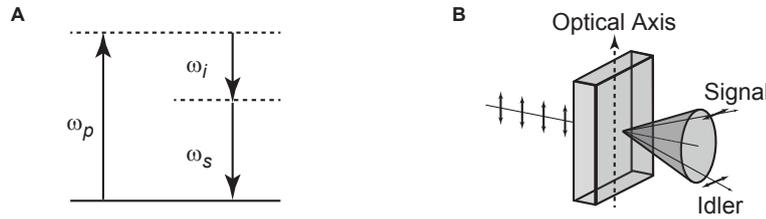


Abbildung 6: Entstehung von spontaner parametrischer Fluoreszenz. (A) Virtuelle Niveaus und Bezeichnung der einzelnen Frequenzkomponenten. (B) Ausbreitung der parametrischen Fluoreszenz und Polarisierung der eintretenden Welle, sowie der resultierenden Signal- und Idlerwelle.

Die Energiedifferenz zwischen Pumpphoton und Idlerphoton entspricht dabei immer der Energie des Signalphotons ( $\omega_s = \omega_p - \omega_i$ ). Die optisch parametrische Verstärkung nutzt den Effekt der DFG, indem die zu verstärkende Wellenlänge durch sogenannte Seedphotonen selektiert wird. Sie werden im nichtlinearen Kristall räumlich und zeitlich mit den PumpPhotonen überlagert. Dadurch wird die spontane parametrische Fluoreszenz unterbunden, denn das Seedphoton spielt im Kristall die Rolle eines Signalphotons und bestimmt die zu verstärkende Wellenlänge. Dies ist möglich, da das Seedphoton zur stimulierten Emission aus dem virtuellen Energieniveau führt. Folglich kommt es zur selektiven Verstärkung der Wellenlänge des Seedphotons. Gleichzeitig findet im Umkehrschluss eine entsprechende Verstärkung der Idlerphotonen statt.

Im quantenchemischen Bild entspricht dies dem Ergebnis einer nichtlinearen Interaktion zweier Wellen (Signal- und Pumpwelle) und demzufolge einer Gesamtpolarisation, die zu einer Verstärkung der Seedwelle führt, wobei als Nebenprodukt die Idlerwelle mitverstärkt wird. Es wird zwischen zwei möglichen Arten der Ausrichtung der Ausbreitungsvektoren von Pump- und Seedpulsen bei der optisch parametrischen Verstärkung unterschieden: (1) der kollinearen (Abb. 7, A) und (2) der nichtkollinearen (Abb. 7, B).

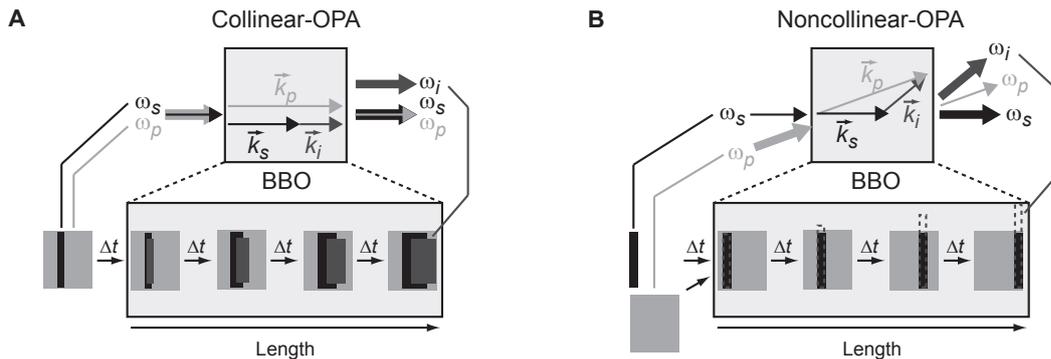


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer (A) kollinearen und (B) nichtkollinearen parametrischen Verstärkung. Oben sind die jeweiligen Phasen Anpassungsbedingungen und die Ein- bzw. Austrittsrichtung in einem BBO gezeigt. Darunter ist die jeweilige zeitliche Ausbreitung der Wellenpakete im BBO dargestellt.

Bei beiden Anordnungen kann in einem nichtlinearen Kristall über die Polarisierung der Wellenpakete eine Phasen Anpassung erreicht werden.

Bei der kollinearen Anordnung ist jedoch keine Anpassung der Gruppengeschwindigkeit möglich. Selbst wenn der Pumpimpuls zeitlich über die gesamte Länge des nichtlinearen Kristalls mit dem Seedimpuls interagieren kann, laufen Signal- und Idlerimpuls zeitlich auseinander (Abb. 7, A). Dadurch werden die entstehenden Signalphotonen der vorauslaufenden Front des Signalimpulses hinzugefügt, während die entstehenden Idlerphotonen an die nachlaufende Flanke des Idlerimpulses angehängt werden. Dies führt zwangsläufig zu längeren Pulsdauern. Der Vorteil dieser Anordnung ist jedoch, dass die entstehenden Signal- und Idlerphotonen aufgrund der gleichen Ausbreitungsrichtung ihrerseits wieder zu der Entstehung neuer Photonen führen können.

Die nichtkollineare Anordnung hat den Vorteil, dass nicht nur die Phasenanpassung erfüllt ist, sondern dass sie das Problem der unterschiedlichen Gruppengeschwindigkeiten von Signal- und Idlerimpuls löst und somit eine Verlängerung der Pulsdauer vermieden wird. Dies ist möglich, da der zusätzliche Weg aufgrund des Ausbreitungsvektors des Idlerimpulses derart gewählt wird, dass er die unterschiedlichen Gruppengeschwindigkeiten ausgleicht (Abb. 7, B). Dadurch wird die zeitliche Verlängerung durch die entstehenden Signal- und Idlerphotonen verhindert. Zusätzlich ist die Phasenanpassungsbedingung für einen sehr breiten Spektralbereich erfüllt, was die Verstärkung eines breiten Frequenzbereiches und eine anschließende Komprimierung zu sehr kurzen Pulsen erlaubt<sup>[97,98]</sup>. Der Nachteil dieser Anordnung ist der Verlust an Effizienz, da die entstehenden Idlerphotonen einen Ausbreitungsvektor besitzen, der zum Verlust des Überlapps mit dem Pumpimpuls führt. Infolgedessen können diese nicht zur Erzeugung weiterer Signalphotonen beitragen.

Eine rechnerische Abschätzung der unterschiedlich starken parametrischen Verstärkung der beiden Anordnungen lässt sich über die in Ref. 99 und Ref. 100 beschriebenen Formeln und der Verwendung des Programms SNLO<sup>7</sup> erhalten.

### 2.3.1.5 Optischer Kerr-Effekt

Der optische Kerr-Effekt ist ein parametrischer Prozess der Polarisation dritter Ordnung ( $P^3$ ). Er führt zu einer induzierten Doppelbrechung, wenn man ein isotropes Medium ( $P^2 = 0$ ), im Folgenden als Kerr-Medium bezeichnet, betrachtet. Werden die ersten drei Ordnungen der Polarisation im Skalarraum betrachtet, ergibt sich für die Gesamtpolarisation im Kerr-Medium (Gl. (2.21)):

$$\begin{aligned}
 P(E) &= P^{(1)}(E) + P^{(3)}(E) \\
 &= \varepsilon_0 \left[ \chi^{(1)} \cdot E + \chi^{(3)} \cdot E \cdot E \cdot E \right] \\
 &= \varepsilon_0 \left[ \left( \chi^{(1)} + \chi^{(3)} \cdot E^2 \right) E \right] \\
 &= \varepsilon_0 \cdot \chi_{neu}^{(1)} \cdot E
 \end{aligned} \tag{2.21}$$

- $E$ : Eingestrahlte Gesamtwelle

Offensichtlich ist die Suszeptibilität  $\chi_{neu}^{(1)}$  von der elektrischen Feldstärke abhängig. Da generell gilt, dass

<sup>7</sup>AS-Photonics, LLC 6916 Montgomery Blvd. NE Suite B8, Albuquerque NM 87109, USA, <http://www.as-photonics.com/SNLO>. Stand: 08-2014

$$n^2 = 1 + \chi_{neu}^{(1)} = 1 + \chi^{(1)} + \chi^{(3)} E^2 \quad (2.22)$$

ist, wird der Brechungsindex oft auch über Gl. (2.23) beschrieben.

$$n = n_0 + n_2 \cdot I = n_0 + \Delta n \quad (2.23)$$

Wobei für  $I$  gilt, dass

$$I = \frac{1}{2} \cdot n_0 \varepsilon_0 c |E|^2 \quad (2.24)$$

und  $n_2$  definiert ist als

$$n_2 \simeq \frac{1}{n_0^2 c \varepsilon_0} \cdot \chi^{(3)}. \quad (2.25)$$

Der übliche, von der Intensität unabhängige Brechungsindex ( $n_0$ ) wird dabei also um einen zweiten Term erweitert, mit einer Konstante ( $n_2$ ) für die Stärke, mit der das angelegte elektromagnetische Feld auf die zeitlich gemittelte Feldintensität ( $I$ ) reagiert. Der Unterschied im Brechungsindex ist dabei von der Wellenlänge ( $\lambda$ ), der Intensität des Lichts ( $I$ ) und der Kerr-Konstante ( $K$ ) abhängig (Gl. (2.26)):

$$\Delta n = \lambda K |E|^2 \quad (2.26)$$

Die Kerr-Konstante berücksichtigt dabei die Materialeigenschaften. Bildlich gesprochen, verzerrt das elektromagnetische Feld die Elektronendichte der Moleküle entlang seiner Schwingungsebene, wodurch eine optische Achse erzeugt wird.

In Flüssigkeiten kommt es dabei zusätzlich zu einer Kernantwort in Form einer Ausrichtung der Moleküle entlang ihres Dipols, welche in Kristallen entfällt<sup>[101]</sup>. Die Antwortzeit in Flüssigkeiten liegt infolgedessen im Pikosekundenbereich, während sie bei Kristallen im Femtosekundenbereich liegt und somit ein deutlich schnelleres, aber auch schwächeres Schalten der doppelbrechenden Eigenschaften erlaubt. Insgesamt bleibt der so resultierende Unterschied im Brechungsindex aufgrund der geringen Größe der Suszeptibilität dritter Ordnung trotzdem sehr klein.

### Selbstfokussierung

Durch die Intensitätsabhängigkeit des Brechungsindex kommt es bei Annahme eines räumlich gaußförmigen Pulses zur Ausbildung eines Linseneffektes. Der Laserstrahl fokussiert sich somit im Kerr-Medium selbst. Die Bereiche höherer Intensität werden dabei stärker fokussiert als die Bereiche geringer Intensität.

### Selbstphasenmodulation

Aufgrund der zeitabhängigen Änderung des Brechungsindex durch das zeitlich gaußförmige Pulsprofil kommt es zur Selbstphasenmodulation. Diese resultiert aus dem Kerr-Effekt in Kombination mit der Gruppengeschwindigkeitsdispersion (engl. **group velocity dispersion**, GVD). Beim Passieren des Mediums laufen die roten Anteile den blauen voraus. Dadurch wird der Puls aufgrund des nichtlinearen Anteils des Brechungsindex spektral breiter und wegen des linearen Anteils läuft er zeitlich auseinander. Für die zeitliche Verbreiterung gilt,

dass der Puls umso schneller auseinander läuft, je kürzer er ist.

### 2.3.1.6 Gruppengeschwindigkeitsdispersion

Ein Problem bei der Phasenanpassung stellt die GVD dar. Die Dispersion (Frequenzabhängigkeit) der Gruppengeschwindigkeit  $v_g$  (Gl. (2.27)) führt nicht nur zu einer insgesamt verlangsamteten Ausbreitung des Lichts im Medium, sondern zusätzlich bei Lichtpulsen zu einer Pulsverzerrung.

$$v_g = \frac{v_{ph}}{1 + \left(\frac{\omega_i}{n} \cdot \frac{dn}{d\omega_i}\right)} = \frac{\frac{c}{n}}{1 - \left(\frac{\lambda_i}{n} \cdot \frac{dn}{d\lambda_i}\right)} \quad (2.27)$$

- $\omega_i$  bzw.  $\lambda_i$ : Frequenz bzw. Wellenlänge des betrachteten elektrischen Feldes.

Diese äußert sich in Form einer Pulsverbreiterung. Bei normaler Dispersion ( $\frac{dn}{d\omega} > 0$ ) breiten sich die niederenergetischen (roten) Anteile eines Pulses schneller aus als die höherenergetischen (blauen), was als positiver Chirp bezeichnet wird. Bei anormaler Dispersion ( $\frac{dn}{d\omega} < 0$ )<sup>8</sup> kommt es zu einer spektral umgekehrten Pulsverzerrung, dem sogenannten negativen Chirp. Wird zusätzlich ein transparentes Medium mit einer schwachen Änderung des Brechungsindex bei variierender Frequenz gewählt, hat die GVD besonders im höherenergetischen Spektralbereich einen großen Einfluss auf die Pulslänge. Diese Pulsverbreiterung führt dazu, dass nur Pulse mit einem eingeschränkten Frequenzbereich die Phasenanpassungsbedingungen hinreichend erfüllen können.

## 2.3.2 Ultrakurze Laserpulse

Optische Methoden, die eine Zeitauflösung im Femtosekundenbereich ermöglichen, basieren auf der Verwendung von ultrakurzen Lichtpulsen<sup>[87]</sup>. Nur diese ermöglichen es, die nötige elektrische Feldintensität zu erreichen, um Effekte der nichtlinearen Optik hervorzurufen. Die Erzeugung von ultrakurzen Lichtpulsen mit Lasern kann in vielen Lehrbüchern beziehungsweise Veröffentlichungen nachgelesen werden<sup>[90,92–94,96,102]</sup>. Es folgt eine kurze Zusammenfassung der Methodik, wie ein Dauerstrich (engl. **continuous wave**, cw)-Laser in den gepulsten Betrieb überführt wird.

### 2.3.2.1 Güteschaltung („Q-Switch“)

Der Güteschalter stellt den einfachsten Weg dar, um eine periodische Emission kurzer Pulse zu erreichen. Eine Güteschaltung kontrolliert dabei die Resonatorverluste. Sie führt absichtlich zu einer schlechten Güte (Qualität) des Resonators und unterdrückt zuerst die Lasertätigkeit, indem jegliche Emission des gepumpten Lasermediums aus dem Resonator geleitet wird. Dadurch wirkt das Lasermedium als Energiespeicher und es wird eine starke Besetzungsinversion erzwungen. Wird die Güte schlagartig erhöht, kommt es durch die Reflektion des emittierten Lichts zum erneuten Passieren des Lasermediums und somit zur stimulierten Emission. Es entsteht ein kurzer Puls mit einer hohen Spitzenenergie. Auf diese Weise ist es möglich, gepulste Laserquellen mit einer Wiederholrate von 10 Hz bis 1 kHz und einer

<sup>8</sup>Tritt nur in der Nähe von optischen Resonanzen auf.

Pulsdauer im Pikosekundenbereich zu erzeugen. Zwei typische Systeme zur Steuerung der Güte sind zum einen die Pockels-Zelle und zum anderen der akkustooptische Modulator (AOM).

### **Pockels-Zelle**

Die Pockels-Zelle basiert auf dem Pockels-Effekt. Hierbei wird durch das Anlegen einer Spannung an einem kristallinen Material eine  $\lambda/4$ -Verzögerungsplatte induziert, welche selektiv die Polarisation des Lichts im Resonator steuert. Kombiniert man die Pockels-Zelle mit einem Polarisator, lässt sich die Güte des Resonators steuern. Pockels-Zellen haben typischerweise Schaltzeiten im Nanosekundenbereich.

### **Akkustooptischer Modulator (AOM)**

Der akkustooptische Modulator basiert auf dem Anlegen einer Schallwelle mit Hilfe eines Radiofrequenzgenerators, die in einem geeigneten Medium eine periodische Variation der Brechzahl erzeugt. Das Laserlicht wird dadurch im Medium gebeugt und somit abgelenkt, wobei es zu einer Frequenzverschiebung des Lichts kommt. Diese Variante einer Güteschaltung arbeitet ebenfalls im Nanosekundenbereich.

### **2.3.2.2 Modenkopplung**

Für die Erzeugung ultrakurzer Pulse, muss das Prinzip der Modenkopplung berücksichtigt werden. Um das Prinzip der Modenkopplung besser erklären zu können, wird für die Betrachtung von der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne gewechselt.

Ultrakurze Pulse lassen sich durch die Überlagerung von stehenden Wellen unterschiedlicher Frequenz in einem optischen Resonator erzeugen. Sind die stehenden Wellen in Phase, kommt es zur Superposition der Moden und es wird ein Wellenpaket erzeugt. Dies wird als Modenkopplung bezeichnet. Je mehr Moden koppeln, desto kürzer wird die Pulsdauer. Dieser Zusammenhang wird über das Zeit-Bandbreite-Produkt (Gl. (2.28)) beschrieben:

$$\Delta f \cdot \Delta t \geq X \quad (2.28)$$

- $\Delta f$ : Bandbreite der Moden
- $\Delta t$ : Pulsdauer
- $X = \frac{2\ln(2)}{\pi}$  (Gaußpuls)

Aufgrund des Zeit-Bandbreite-Produkts werden zur Erzeugung von ultrakurzen Laserpulsen Medien gebraucht, die einen ausreichend großen Spektralbereich emittieren. Einer der bekanntesten Vertreter der Lasermedien ist **Titan(3+)-dotierter Saphir**,  $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$  (Ti:Sa). Dies liegt zum einen an seiner breitbandigen Fluoreszenz von 600 nm bis 1080 nm, die eine gewisse Durchstimmbarekeit der Emissionswellenlänge ermöglicht, und zum anderen an seiner breiten Absorption im Bereich von 380 nm bis 650 nm, die es erlaubt, eine Besetzungsinversion im Lasermedium mit verschiedenen Anregungsquellen zu erzeugen. Handelt es sich dabei um eine optische Anregung, wird dies als optisches Pumpen bezeichnet. Als Pumpquellen eignen sich z.B. frequenzverdoppelte Laser, basierend auf Kristallen wie **Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat** (Nd:YAG), **Neodymium-dotiertes Yttrium-Lithium-Fluorid** (Nd:YLF)

und Neodym(3+)-dotierter Yttrium-Orthovanadat (Nd:YVO<sub>4</sub>). Diese werden meist von Diodenlasern<sup>9</sup> optisch gepumpt. Im Folgenden werden die Techniken erläutert, welche die Erzeugung kurzer Pulse trotz optischer Dauerstrichanregung ermöglichen. Es werden dabei zwei Techniken der Modenkopplung unterschieden, die aktive und passive.

### Aktive Modenkopplung

Wie der Name bereits sagt, wird bei der aktiven Modenkopplung aktiv durch einen optischen Modulator in die Kopplung der oszillierenden Lasermoden eingegriffen. Als optische Modulatoren dienen wie bei der Güteschaltung z.B. akusto- oder elektrooptische Modulatoren, wie die Pockels-Zelle und der akkustooptische Modulator (Kap. 2.3.2.1). Diese befinden sich im Strahlengang kurz vor den Endspiegeln des Resonators und sind in der Lage, ihre transmittierenden Eigenschaften bezüglich des cw-Laserlichts und somit die Resonatorverluste mit einer Frequenz ( $f$ ) wie bei der Güteschaltung zu modulieren. Wichtig ist hier jedoch, dass nun die Modulationsfrequenz der Umlaufzeit des Resonators entspricht (Gl. (2.29)):

$$f = \frac{c}{2d} \quad (2.29)$$

- $d$ : Abstand zwischen den Endspiegeln im Resonator

Durch diese Tatsache entstehen zusätzlich zur Trägerfrequenz  $\nu_0$  Seitenbanden mit einer um  $f$  modulierten Trägerfrequenz ( $\nu_0 \pm f$ ). Diese sind ebenfalls mit  $f$  moduliert und erzeugen weitere Seitenbanden. Die Modenkopplung erfolgt hierbei elektronisch, wobei die minimal erreichbare Pulsdauer derzeit bei ca. 10 ps liegt.

### Passive Modenkopplung

Die passive Modenkopplung basiert ebenfalls auf der Modulation der Resonatorverluste, kann aber Pulsdauern ermöglichen, die deutlich unter 1 ps liegen. Die experimentelle Realisierung ist außerdem sehr einfach, da man sich eines sättigbaren Absorbers oder der nichtlinearen Eigenschaften eines Kristalls bedient<sup>[103–105]</sup>. Während Techniken wie der sättigbare Absorber Pulse mit bis zu wenigen hundert Femtosekunden ermöglichen, erlaubt es die Kerr-Linsen-Modenkopplung<sup>[93,106,107]</sup>, Pulsdauern mit beispielsweise bis zu 4 fs zu erreichen. Sie stellt die derzeit gängigste Methode für die Erzeugung kurzer Pulse dar.

Für die genauere Beschreibung der Kerr-Linsen-Modenkopplung wird ein Resonator näher betrachtet, dieser läuft nur in einem bestimmten Bereich der Abstände der fokussierenden Spiegel stabil im cw-Betrieb, was eine Folge der Divergenz des Strahlprofils ist. Gleichzeitig überlappt dieser Bereich zum größten Teil mit dem für den gepulsten Betrieb. Leichte Fluktuationen aufgrund von Vibrationen oder ähnlichem führen dabei immer wieder zu Pulsen im Resonator. Die Pulse weisen verglichen mit dem cw-Betrieb eine deutlich höhere lokale Intensität in einem definierten Zeitbereich auf. Wie aus dem Kapitel (Kap. 2.3.1.5) über den Kerr-Effekt ersichtlich ist, ist der Brechungsindex abhängig von der Intensität des einstrahlenden Lichts. Durch die Selbstfokussierung werden die Bereiche hoher Intensität zusätzlich fokussiert, was bei Verwendung einer Blende das Abtrennen der Bereiche geringerer Intensität ermöglicht (Abb. 8).

<sup>9</sup>Mit elektrischem Strom gepumpte Halbleiterlaser

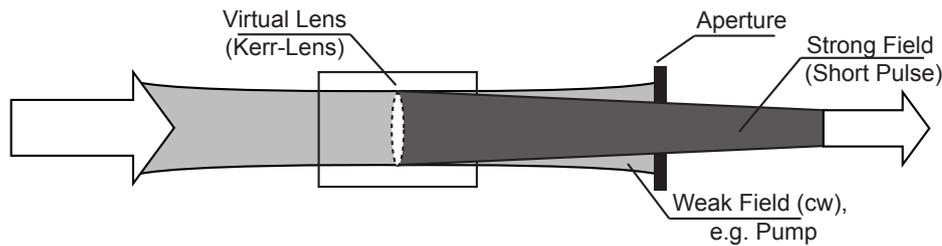


Abbildung 8: Prinzip der Kerr-Linsen-Modenkopplung.

Infolgedessen wird der gepulste Betrieb bevorzugt, da die cw-Anteile abgeschnitten und damit geschwächt werden. Zusätzlich kommt es zur Selbstphasenmodulation, was aufgrund des nichtlinearen Anteils des Brechungsindex zu einer spektralen Verbreiterung führt. Die zusätzlichen spektralen Anteile erlauben nach der Komprimierung des Pulses einen insgesamt kürzeren Puls.

### 2.3.2.3 Verstärkung gechirpter Pulse

Aus den hohen Spitzenintensitäten der ultrakurzen Pulse ergibt sich das Problem, dass diese ausreichen, um die Zerstörschwelle der zu passierenden optischen Komponenten im Resonator zu überschreiten. Um dieses Problem zu umgehen wird eine einfache Methode angewendet, die sogenannte Verstärkung gechirpter Pulse (engl. **chirped pulse amplification**, CPA). Hierbei wird ein Laser verwendet, der Pulse mit einer hohen Wiederholrate, jedoch geringen Pulsenergien erzeugt. Diese Art von Laser wird als Oszillator bezeichnet und die Pulse aus diesem als Seedpulse. Die Seedpulse werden durch einen Aufbau geleitet, der unter Verwendung eines dispersiven Elements diesen spektral aufspaltet (Stretcher). Durch unterschiedliche Wegstrecken der einzelnen spektralen Anteile wird dem Puls ein Chirp aufgeprägt. Infolgedessen ist die Pulsenergie über einen längeren Zeitraum verteilt und eine Schädigung der Optiken wird verhindert. Die Pulse können danach in den Resonator eines weiteren Lasers geleitet werden, dem regenerativen Verstärker. Hier entscheidet eine Pockelszelle, welche Seedpulse im Resonator verbleiben und bestimmt hierdurch die Wiederholrate des Systems. Die Pulszüge passieren anschließend das optisch gepumpte Lasermedium und räumen einen kleinen Teil der Besetzungsinversion in Form von stimulierter Emission ab. Bei jeder Durchquerung des Lasermediums werden die Pulse weiter verstärkt. Da die Wiederholrate des Verstärkers meist deutlich kleiner ist (kHz-Bereich) als die des Oszillators (MHz-Bereich), kann so die Verstärkung auf einige wenige starke Pulse konzentriert werden. Die Pulse benötigen mehrere Umläufe, um ausreichend Energie für eine vollkommene Beseitigung der Besetzungsinversion zu akkumulieren und werden nachfolgend durch eine Pockelszelle aus dem Verstärker ausgekoppelt. Anschließend wird der Puls durch den Kompressor geleitet. Dieser komprimiert die Pulsdauer nach der gleichen Methode, wie der Stretcher die Pulse zeitlich verbreitert. Hiermit können Pulse mit einer Pulsenergie von einigen wenigen Nanojoule auf eine Pulsenergie bis hin zu einigen Millijoule verstärkt werden.

# 3 Experimentelle Methoden

## 3.1 Aufnahme und Korrektur stationärer Spektren

### Stationäre Absorptionsmessungen

Für die Aufnahme von Absorptionsspektren wurde ein kommerziell erhältliches JASCO V670 UV-VIS-NIR Absorptionsspektrometer verwendet. Es wurden dabei Quarzglasküvetten mit einem Lichtweg von 1 mm (Hellma Analytics, Typ 110-QS) verwendet. Alle Spektren wurden hintergrundkorrigiert, um Signale aufgrund von Lösungsmittelabsorption auszuschließen.

### Stationäre Fluoreszenzmessungen

Die Fluoreszenzspektren wurden mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen JASCO FP-8500 Fluoreszenzspektrometers aufgenommen. Es wurden Quarzglasküvetten mit einer Breite (b) und Tiefe (Lichtweg, d) von je 3 mm (Hellma Analytics, Typ 105.251-QS) verwendet. Für die stationären Emissionsspektren wurde je nach Probe eine Konzentration gewählt, die einen Wert der OD kleiner 0,2 bei der Anregungswellenlänge liefert. Dies diente der Vermeidung von Reabsorptionseffekten. Die Fluoreszenzspektren ( $F_{Mess}(\lambda)$ ) wurden, um verbleibende Reabsorptionseffekte und spektrale Eigenschaften des Systems zu berücksichtigen, folgenden Korrekturen unterzogen:

1. Basislinienkorrektur:

$$F_{korr1}(\lambda) = F_{Mess}(\lambda) - F_{min} \quad (3.1)$$

- $F_{korr1}$ : Basislinienkorrigiertes Emissionsspektrum
- $F_{min}$ : Kleinster Intensitätswert, an dem kein Signal im Spektrum zu erwarten ist

2. Korrektur des Verlustes an Anregungsintensität:

$$F_{korr2}(\lambda) = \frac{F_{korr1}(\lambda)}{10^{-A(\lambda_{Exc}) \cdot \frac{l_{Exc}}{d}}} \quad (3.2)$$

- $A(\lambda_{Exc})$ : Absorptionswert bei der Anregungswellenlänge, bezogen auf die Gesamtlänge der Küvette (d)
- $l_{Exc}/d$ : Anteil am Lichtweg (d) in Anregungsrichtung bis zum Punkt in der Küvette, von wo aus die Fluoreszenz aufgesammelt wird (typischerweise  $d/2$ )
- $F_{korr2}$ : Anregungsverlustkorrigiertes  $F_{korr1}$ -Emissionsspektrum

3. Korrektur der spektralen Eigenschaften des Detektorzweigs:

$$F_{korr3}(\lambda) = \frac{F_{korr2}(\lambda)}{D(\lambda)} \quad (3.3)$$

- $D(\lambda)$ : Korrekturspektrum des Detektorzweigs
- $F_{korr3}$ : Detektorzweigkorrigiertes  $F_{korr2}$ -Emissionsspektrum

## 4. Reabsorptionskorrektur:

$$F_{korr}(\lambda) = \frac{F_{korr3}(\lambda)}{10^{-A(\lambda)} \cdot \frac{l_{Em}}{b}} \quad (3.4)$$

- $A(\lambda)$ : Absorptionsspektrum bei Passieren des Lichtwegs (d)
- $\frac{l_{Em}}{b}$ : Anteil der Strecke, bezogen auf den Lichtweg (d), vom Aufsammlerpunkt der Emission bis zum seitlichen Rand der Küvette (typischerweise  $b/2$ )
- $F_{korr}$ : Reabsorptionskorrigiertes  $F_{korr2}$ -Emissionsspektrum

Die Basislinienkorrektur ist eine Notwendigkeit, um Artefakte zu vermeiden. Sie entstehen, wenn das Untergrundsignal durch die Korrekturen unterschiedlich stark für die einzelnen Wellenlängen verändert wird. Die zweite Korrektur wird durchgeführt, um den Verlust an Intensität des Anregungslichts beim Passieren der Probe auszugleichen. Der Verlust ist ein Resultat dessen, dass bereits ein gewisser Teil des Anregungslichts absorbiert wird, bevor es an dem Punkt ankommt, von dem aus die erzeugte Fluoreszenz aufgesammelt wird. Die Berücksichtigung der spektralen Eigenschaften des Detektorzweigs stellt die dritte Korrektur dar. Sie ist notwendig, da die verwendeten Optiken das Licht verschiedener Wellenlängen unterschiedlich stark reflektieren bzw. diese eine unterschiedlich starke Detektorantwort hervorrufen. Diese Korrektur bedient sich einer für das Gerät bestimmten Kalibrierkurve, welche die spezifischen Verluste bei den jeweiligen Wellenlängen ausgleicht. Die Reabsorptionskorrektur fällt nur bei Proben ins Gewicht, bei denen das Emissions- und Absorptionsspektrum überlappen. Der Effekt hat einen starken Einfluss, wenn das emittierte Licht aufgrund eines langen Lichtwegs durch die Probe oder aufgrund einer hohen Konzentration im Überlappungsbereich stark absorbiert wird. Die gewählten Konzentrationen führten in den hier gezeigten Messungen zu einer Änderung der Gesamtfläche der Fluoreszenz um weniger als 1 %. Eine exemplarische Darstellung, wie sich die zweite bis vierte Korrektur auf ein Emissionsspektrum auswirken, befindet sich im Anhang (Abb. 63).

### 3.2 Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten

Die Bestimmung von absoluten Fluoreszenzquantenausbeuten bedarf der Kenntnis der genauen geräte- und messspezifischen Parameter, die zum Teil sehr schwierig zu erhalten sind, und stellt somit eine große Herausforderung dar<sup>[108,109]</sup>. Eine alternative Methode, die deutlich leichter zu verwertbaren Ergebnissen für verdünnte Lösungen führt, ist die Bestimmung von relativen Fluoreszenzquantenausbeuten mit Hilfe einer Referenz mit bekanntem  $\phi_{Fl}^{Ref}$ -Wert<sup>[110–112]</sup> nach der folgenden Formel<sup>[108,112]</sup>:

$$\phi_{Fl}^{Pr} = \phi_{Fl}^{Ref} \cdot \frac{F_{Pr}}{F_{Ref}} \cdot \frac{f(\lambda)_{Ref}}{f(\lambda)_{Pr}} \cdot \frac{n_{Pr}^2}{n_{Ref}^2} \quad (3.5)$$

- Index x: Pr = Probe und Ref = Referenz
- $\phi_{Fl}^x$  = Fluoreszenzquantenausbeute

- $F_x$  = Integrierte Fluoreszenzfläche für Referenz und Probe im gleichen Spektralbereich
- $f(\lambda)_x = 1 - 10^{-A(\lambda)_x}$  = Anteil des absorbierten Lichts, das die Probe passiert, wobei  $A(\lambda)_x$  die Absorption bei der Anregungswellenlänge ist
- $n_x$  = Brechungsindex der gemessenen Lösung, zumeist unbeeinflusst durch die gemessenen Moleküle aufgrund deren geringer Konzentration

Die in dieser Arbeit verwendete Vergleichsmethode zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten von PyA und PydA basiert auf einer Anleitung der Firma Jobin Yvon Ltd.<sup>[113]</sup>. Diese Methode stellt eine leicht abgewandelte Version einer typischen Vergleichsmethode dar, wie sie in Gleichung (3.5) gezeigt wurde. Der Unterschied basiert in diesem Fall darauf, dass Fluoreszenzquantenausbeuten mittels Messung einer Konzentrationsreihe bestimmt werden (Gl. (3.6)). Dabei erfolgt eine Auftragung der integrierten Fläche der Fluoreszenz gegen die Absorption der unterschiedlichen Konzentrationen der Probe und der Referenz, bei der jeweiligen Anregungswellenlänge. Die relative FQA wird anschließend über das Verhältnis der Steigungen von linearen Anpassungsfunktionen für die Probe und die Referenz bestimmt.

$$\phi_{Fl}^{Pr} = \phi_{Fl}^{Ref} \cdot \frac{m_{Pr}}{m_{Ref}} \cdot \frac{n_{Pr}^2}{n_{Ref}^2} \quad (3.6)$$

- $m_x$ : Steigung der linearen Anpassungsfunktion

Diese Vorgehensweise lässt sehr leicht auf eventuelle Konzentrationseffekte und abweichende Messpunkte während der Messungen schließen. Zusätzlich muss bei dieser Methode nicht die genaue Konzentration von Probe und Referenz bekannt sein.

Aber auch bei dieser vermeintlich einfachen Methode müssen gewisse Bedingungen erfüllt werden, um verlässliche Werte für die Fluoreszenzquantenausbeute zu erlangen. Nachfolgend werden die wichtigsten dieser Bedingungen mit Hinweisen und Bemerkungen aufgeführt<sup>[112,113]</sup>. (1) Nach der Anregungswellenlänge sollte eine geringe Absorption ( $A(\lambda) < 0,1$ ) hin zu größeren Wellenlängen gewährleistet sein. Dies dient dazu innere Filtereffekte, wie z.B. Reabsorption, zu verhindern. Diese Messbedingung wird zusätzlich zu den verwendeten niedrigen Konzentrationen durch die Reabsorptionskorrektur unterstützt. (2) Während der Messungen ist darauf zu achten, dass sich die Geräteparameter nicht ändern, um eine Vergleichbarkeit von Probe und Referenz zu garantieren. Mit Geräteparametern sind vor allem die Intensitätsschwankungen der Anregungsquelle oder thermische Effekte gemeint. Hierzu wurde die Langzeitstabilität des JASCO FP-8500 Fluoreszenzspektrometers überprüft, indem die Lampenintensität und die spektralen Eigenschaften der Fluoreszenz einer Probe über 2 Stunden hinweg gemessen und verglichen wurde. Die Messungen zeigten, dass nach einer halben Stunde das thermische Gleichgewicht erreicht ist und danach im Zeitbereich von mehreren Stunden keine weiteren nennenswerten Veränderungen zu beobachten sind. Ein stabiler Zeitbereich von 2 Stunden reicht für drei bis vier Messungen. Zusätzlich sollte, möglichst die gleiche Küvette für Absorptions- und Fluoreszenzmessungen verwendet werden, um Unterschiede der geometrischen und transmittiven Eigenschaften auszuschließen. (3) Die Anregungsintensität bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen ist zu berücksichtigen. Dies ist notwendig, da eine wellenlängenabhängigen Variationen in der Intensität der Lichtquelle und der reflektierenden Eigenschaften der verwendeten Optiken vorliegt. Im Fall

der hier gezeigten Messungen bestand die Möglichkeit bei der gleichen Wellenlänge anzuregen, dadurch konnte diese zusätzliche Unsicherheit vermieden werden. (4) Die spektralen Abhängigkeiten der verwendeten Optiken im Detektorzweig müssen berücksichtigt werden. Sie besitzen wellenlängenabhängige Reflektionseigenschaften und der Detektor selbst liefert nur in einem gewissen Bereich eine lineare Antwort auf die Anzahl der detektierten Photonen. Dieser Bedingung wird durch die im vorangehenden Kapitel genannte Detektorzweigkorrektur Rechnung getragen und durch einen vom Hersteller gesetzten Grenzwert für das Verlassen des linearen Bereichs. (5) Die letzte zu beachtende Bedingung bezieht sich auf die Probe und die Referenz. Sie sollten einen ähnlichen spektralen Emissionsbereich besitzen und, wenn möglich, mit einer nur geringen Abweichung der Anregungswellenlänge angeregt werden können. Daher wurde Quinin-Sulfat (Abb. 9, A) für die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute gewählt, da PyA und Quinin-Sulfat in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  eine hohe Übereinstimmung bezüglich ihrer Emissionseigenschaften aufweisen (Abb. 9, B).

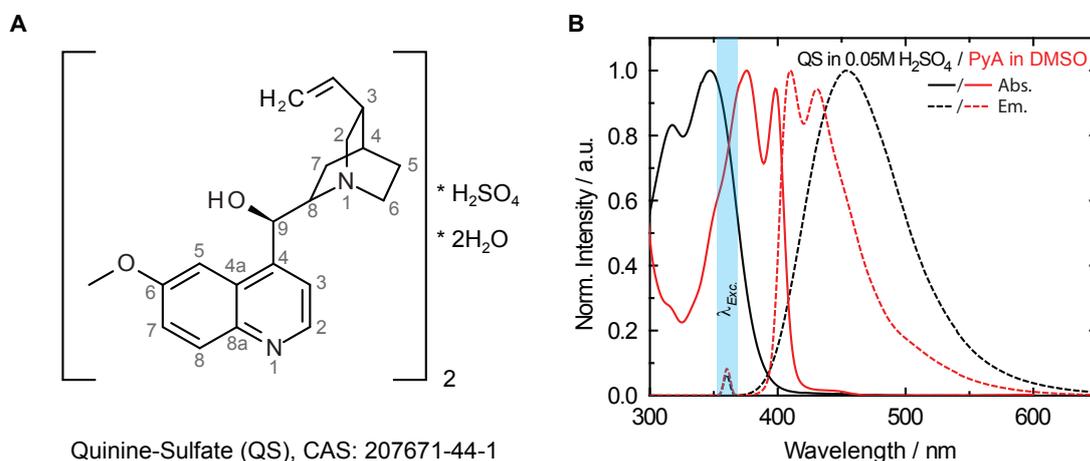


Abbildung 9: (A) Strukturformel und (B) spektrale Eigenschaften von Quinin-Sulfat im Vergleich mit denen von PyA in DMSO.

Bei den Messungen stützte man sich anfangs auf die Angaben eines Übersichtsartikels von Brouwer *et al.*<sup>[112]</sup> und die dort angegebenen Messbedingungen für die Untersuchungen von Suzuki *et al.*<sup>[111]</sup>. Da Brouwer *et al.* allerdings beim Zusammenfassen der Messeinstellungen ein Fehler bei der Angabe der von Suzuki *et al.* verwendeten  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Konzentration unterlaufen ist, wurden die Messungen mit einer zu geringen  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Konzentration vorgenommen. Um dem Rechnung zu tragen und anregungsspezifische Effekte aufgrund einer abweichenden Anregungswellenlänge auszuschließen, wurde eine Kreuzreferenzierung durchgeführt. Hierzu wurde eine Messung von Quinin-Sulfat ( $c(\text{QS}) = 10 \mu\text{M}$ ) mit den verwendeten Messeinstellungen (in  $0,05 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ,  $\lambda_{exc} = 366 \text{ nm}$ ) gegen eine mit den Einstellungen von Suzuki *et al.*<sup>[111]</sup> (in  $0,5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ,  $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$ ) referenziert. Dadurch hat sich die ursprüngliche FQA von  $0,60 \pm 0,02$  nach Suzuki *et al.* auf einen Wert von  $0,54 \pm 0,02$  bei unseren Bedingungen verringert.

### 3.3 Wellenlängenkonversion

Kurzpulslaser liefern typischerweise bei einer spezifischen Zentralwellenlänge spektral breite Pulse. Sie sind jedoch - falls überhaupt - nur in einem kleinem Bereich abstimbar, auch wenn das Lasermedium eine breite Emissionsbande aufweist. Jede Probe weist jedoch ein charakteristisches Absorptionsspektrum auf, wobei auch die Anregung von verschiedenen Bereichen der Absorptionsbanden von Interesse sein kann. Deswegen wurden Methoden der nichtlinearen Optik entwickelt, um Pulse mit der Zentralwellenlänge der Laserfundamentalen in andere Wellenlängenbereiche zu konvertieren.

#### 3.3.1 Weißlichterzeugung

Eine der wichtigsten Methoden ist die Erzeugung von Weißlicht (engl. **white-light generation**, WLK), oder auch Superkontinuumserzeugung. Sie wird benötigt, um spektral breite Pulse zu generieren, die als Abtastpulse oder Seed-Pulse genutzt werden. Die Laserfundamentale wird dabei in ein transparentes Medium fokussiert, wodurch ein Weißlichtfilament entsteht. Entscheidend für den zugänglichen Spektralbereich ist dabei das Medium und seine Bandlücke<sup>[114–116]</sup>. Derzeit werden vor allem Saphir ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) und Calciumfluorid ( $\text{CaF}_2$ -Fenster) als Substrate verwendet. Letzteres ist in der Lage, Weißlicht bis in den UV-Bereich ( $\lambda_{\min} \approx 350 \text{ nm}$ ) zu erzeugen. Jedoch ist es instabiler und weist eine geringere Zerstörschwelle bei kontinuierlicher lokal begrenzter Bestrahlung auf. Deswegen werden die  $\text{CaF}_2$ -Fenster transversal im Fokus der Laserfundamentalen bewegt, um die Dauer der Verwendbarkeit eines solchen  $\text{CaF}_2$ -Fensters zu erhöhen.

Der genaue Ablauf der Weißlichterzeugung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Man ist sich jedoch sicher, dass die Selbstphasenmodulation<sup>[117–119]</sup> und die Selbstfokussierung<sup>[120–122]</sup> eine große Rolle spielen (siehe Kap. 2.3.1.5). Zusätzlich wird der Puls raumzeitlich durch den Kerr-Effekt, die Plasmaerzeugung, die GVD, die Brechung und Aufsteilung der Pulsfront verformt. Insbesondere im räumlichen Bereich der Selbstfokussierung wurde von Dachraoui *et al.* ein Vierwellenmischprozess angenommen, der zur spektralen Verbreiterung führt<sup>[123]</sup>, wobei besonders Multiphotonenionisation für die Erzeugung von höheren Frequenzen (Anti-Stokes Verbreiterung) verantwortlich sein soll. Die Defokussierung im durch den Laser induzierten Plasma führt dabei im Wechselspiel mit der Selbstfokussierung zur Ausbildung von mehreren Filamenten<sup>[124]</sup>. Das Resultat ist ein spektral sehr breiter Puls, bei dem aufgrund der GVD die roten Wellenlängenteile den blauen vorauslaufen (positiver Chirp).

#### 3.3.2 Summenfrequenzerzeugung und Frequenzverdopplung

Die SFG als Prozess der Polarisation zweiter Ordnung (siehe Kap. 2.3.1.2) benötigt Kristalle ohne Inversionszentrum, da nur diese effizient Dreiwellenmischprozesse ermöglichen (siehe Kap. 2.3.1.3). Dafür wurde in den verschiedenen Experimenten ein **Beta-Barium-Borat**-Kristall ( $\beta\text{-BaB}_2\text{O}_4$ , BBO) verwendet. Die SHG der Laserfundamentalen ( $\approx 380\text{-}420 \text{ nm}$ ) wurde dabei mit Typ-I-Phasenanpassung vorgenommen, wobei der optimale Phasenanpassungswinkel des Kristalls ( $\theta \approx 30,8\text{-}27,9^\circ$ ) mit Hilfe des Programms SNLO<sup>1</sup> bestimmt wurde. Für die Erzeugung der SFG ( $\approx 290\text{-}380 \text{ nm}$ ) wurde die Typ-II-Phasenanpassung in einem

<sup>1</sup>AS-Photonics, LLC 6916 Montgomery Blvd. NE Suite B8, Albuquerque NM 87109, USA, <http://www.as-photonics.com/SNLO>. Stand: 08-2014

BBO verwendet. Der Phasenanpassungswinkel ( $\theta$ ) variierte dabei entsprechend der eingestellten Wellenlänge der Laserfundamentalen ( $\approx 760\text{-}840\text{ nm}$ ) und ist bei den jeweiligen Experimenten angegeben. Die THG ( $\approx 250\text{-}280\text{ nm}$ ) wurde über eine SHG und anschließender SFG mit der Laserfundamentalen realisiert.

### 3.3.3 Kollinearer optisch parametrischer Verstärker

Zur Erzeugung von hochenergetischen IR-Pulsen wurde der Prozess der optisch parametrischen Verstärkung genutzt. Die praktische Umsetzung eines zweistufigen OPAs<sup>[125,126]</sup> ist in Abb. 10 dargestellt. Die dort angegebenen Energiewerte sind exemplarisch und entsprechen Werten, die bei einem stabilen Betrieb gemessen wurden.

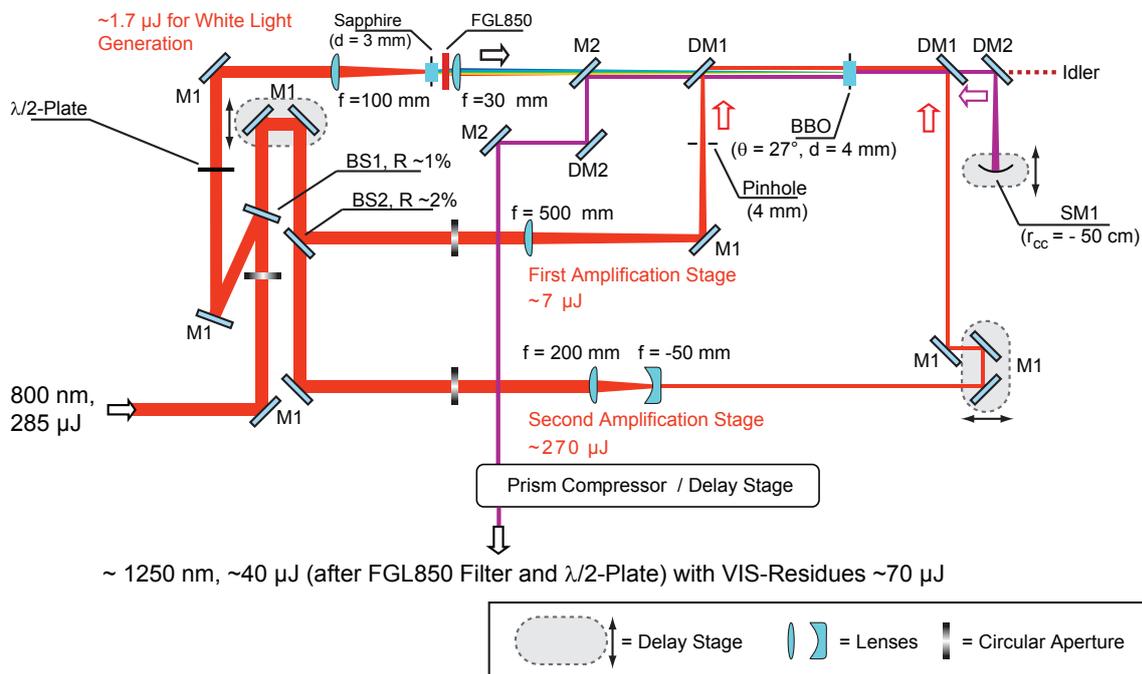


Abbildung 10: Schematischer Aufbau des verwendeten zweistufigen OPAs zur Wellenlängenkonversion. Die Energieangaben entsprechen gemessenen Werten bei stabilem Betrieb des OPAs. Es sind verschiedene einfache Spiegel (M) und dichroitische Spiegel (DM) verbaut: M1 (HR(45°, 800 nm)), M2 (Silberspiegel), DM1 (HR(45°, 800 nm), HT (45°, 1050-1600 nm)), DM2 (HR(45°, 1100-1300 nm), R<3% (45°, 1800-3000 nm)). Zusätzlich ist ein sphärischer Spiegel (SM1 (goldbeschichtet,  $r_{cc} = -50\text{ cm}$ )) und ein Filter (Schott, FGL850), der Licht einer Welllänge  $< 850\text{ nm}$  absorbiert, sowie zwei Strahlteiler (BS1(R $\approx 1\%$ ) & BS2(R $\approx 2\%$ )) verbaut.

Die Laserfundamentale (horizontal polarisiert, 760-840 nm) wird typischerweise mit  $\approx 285\text{ }\mu\text{J}$  in den OPA geleitet und über ein Glasfenster (BS1, Rp(45°, 800 nm)  $\approx 1\%$ ) aufgeteilt. Der erste Teilstrahl mit geringerer Intensität (1 %) wird zur Erzeugung von Weißlicht genutzt, während die restlichen 99 % für die zweistufige parametrische Verstärkung verwendet werden. Der Anteil der Fundamentalen für das Weißlicht wird mit einem  $\lambda/2$ -Plättchen in seiner Polarisation um 90° gedreht (vertikal polarisiert) und auf  $\approx 2\text{ }\mu\text{J}$  abgeschwächt. Anschließend wird dieser mit einer Quarzlinse ( $f = 100\text{ mm}$ ) in einen Saphir ( $d = 3\text{ mm}$ ) fokussiert (vgl. Kap. 3.3.1). Das entstehende Weißlicht wird direkt nach dem Saphir durch einen Filter (Schott,

Typ RG850) geleitet, der nur den IR-Anteil passieren lässt. Anschließend wird das transmittierte Weißlicht mit einer weiteren Quarzlinse ( $f = 30$  mm) aufgesammelt und als Seedpuls auf den oberen Teil eines ausreichend großen Typ-II BBO ( $\theta = 27^\circ$ ,  $\phi = 30^\circ$ , 5 mm·5 mm·4 mm, p-Beschichtung) fokussiert.

Der für die Verstärkerstufen verwendete Teil der Fundamentalen wird erneut über einen weiteren Strahlteiler (BS2, Rp(45°, 800 nm)  $\approx 2$  %) aufgetrennt. Der geringere Anteil von  $\approx 2$  % ( $\approx 7$   $\mu$ J) wird mit einer Quarzlinse, die eine lange Brennweite aufweist ( $f = 500$  mm), in den Typ-II BBO fokussiert. In diesem wird er mit dem Seedpuls räumlich und mit Hilfe einer Verzögerungsstrecke (engl. delay stage) auch zeitlich überlagert. Dadurch dient dieser als Pumpimpuls für die erste Verstärkerstufe des OPAs. Da es sich um eine optisch parametrische Verstärkung mit Typ-II-Phasenanpassung handelt, hat der verstärkte Signalpuls eine vertikale Polarisation und der Idlerpuls eine horizontale Polarisation. Wenn trotz des Überlapps parametrische Fluoreszenz zu beobachten ist, wird der Pumpimpuls über Neutralfilter abgeschwächt, um diese zu beseitigen. Der Signalpuls kann je nach Orientierung des BBOs im Spektralbereich zwischen 1100-1450 nm parametrisch verstärkt werden. Entsprechend liegt der Idlerpuls im Spektralbereich zwischen 1680-2200 nm. Bei den gezeigten Messungen wurde die optisch parametrische Verstärkung des Signalpulses auf eine Wellenlänge von  $\approx 1300$  nm optimiert. Beide Pulse treffen nach dem BBO auf einen dichroitisch beschichteten Spiegel (Abb. 10, DM1 (HR(45°, 800 nm), HT(45°, 1050-1600 nm))), der den Signal- und Idlerpuls passieren lässt. Ein weiterer dichroitischer Spiegel (DM2 (HRs  $> 99,9$  % (45°, 1120-1280 nm), Rp  $< 3$  % (45°, 1800-3000 nm))) trennt den Idlerpuls vom Signalpuls ab, indem er den Signalpuls auf einen goldbeschichteten Hohlspiegel ( $r_{cc} = -50$  cm ( $f = r/2$ )) leitet und den Idlerpuls passieren lässt. Der Idlerpuls wird anschließend geblockt. Der Hohlspiegel kollimiert den Signalpuls und reflektiert ihn etwas tiefer liegend zurück auf den BBO. Auf diese Weise dient dieser nun als Seedpuls für die zweite Verstärkerstufe.

Der größere Teil der Laserfundamentalen ( $\approx 270$   $\mu$ J), der den Strahlteiler BS2 passiert hat, wird in seinem Profil unter Verwendung eines Linsensystems ( $f = 200$  mm und  $-50$  mm) auf  $1/4$  seines ursprünglichen Durchmessers verengt. Er fungiert als Pumpimpuls für die zweite Verstärkerstufe, indem er mit dem Signalpuls aus der ersten Verstärkerstufe zeitlich über eine Verzögerungsstrecke und räumlich mit Hilfe des dichroitischen Spiegels DM1 überlagert wird. Vor allem bei der zweiten Verstärkerstufe wird darauf geachtet, dass keine parametrische Fluoreszenz zu beobachten ist. Der Pumpimpuls muss folglich ggf. abgeschwächt werden. Aufgrund des leicht abfallenden Strahlverlaufs bei der zweiten Verstärkung, verglichen zu der darüber laufenden ersten Verstärkerstufe, kann der verstärkte Signalpuls über einen tiefer liegenden Silberspiegel (M2) ausgekoppelt werden. Ein weiterer dichroitischer Spiegel des Typs DM2 und ein Filter des Typs FGL850 (Schott) trennen hinterher die unbrauchbaren, im sichtbaren Spektralbereich liegenden Anteile, ab. Der Puls wird bei Verwendung eines Prismenkompressors anschließend in seiner Polarisation um  $90^\circ$  (horizontal polarisiert) gedreht. Wird anstatt des Prismenkompressors nur die Verzögerungsstrecke verwendet, verbleibt der Puls in seiner senkrechten Polarisation. Der Puls besitzt anschließend eine Pulsdauer von ca. 50 fs mit und 70-80 fs ohne Verwendung des Prismenkompressors und weist eine Pulsenergie von  $\approx 40$   $\mu$ J auf. Je nach Einstellung kann die Zentralwellenlänge des Pulses im Spektralbereich von  $\approx 1150$ -1350 nm liegen. Am effektivsten stellte sich die Verstärkung jedoch für eine Wellenlänge von ca. 1250 nm heraus.

### 3.3.4 Nichtkollinear optisch parametrischer Verstärker

Für die Erzeugung von Laserpulsen bei verschiedenen Wellenlängen zur spezifischen Anregung der Probe oder für die SFG mit der Laserfundamentalen wurde ein nichtkollinear optisch parametrischer Verstärker (engl. **n**oncollinear **o**ptical **p**arametric **a**mplifier, NOPA) verwendet<sup>[119,127–130]</sup> (siehe Kap. 2.3.1.4). Der schematische Aufbau des NOPA ist in Abbildung 11 dargestellt.

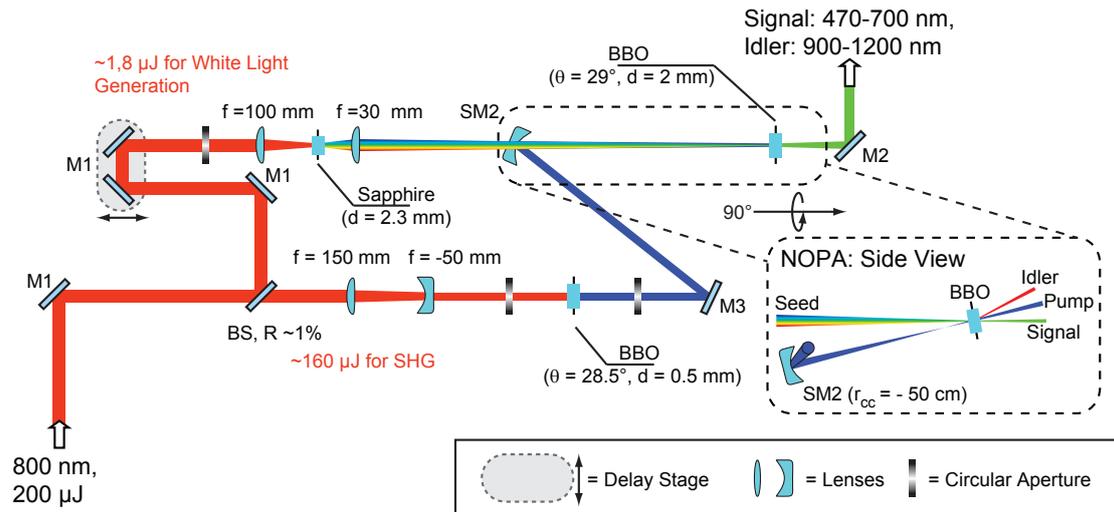


Abbildung 11: Schematischer Aufbau des verwendeten NOPAs zur Wellenlängenkonversion. Die Energieangaben entsprechen gemessenen Werten bei stabilem Betrieb des NOPAs nach Abschwächung durch Neutraldichtefilter. Es sind verschiedene einfache Spiegel (M) und dichroitische Spiegel (DM) verbaut: M1 (HR(45°, 800 nm)), M2 (Silberspiegel), M3 (HR(45°, 400 nm)). Zusätzlich ist ein sphärischer Spiegel (SM2 (silberbeschichtet,  $r_{cc} = -50$  cm)) verbaut.

Die Laserfundamentale (horizontal polarisiert, 760-840 nm) wird typischerweise mit  $\approx 200 \mu\text{J}$  in den NOPA geleitet und über ein Glasfenster (BS1, Rp(45°, 800 nm)  $\approx 1\%$ ) aufgetrennt. Der geringere, reflektierte Anteil ( $\approx 1\%$ ) wird über eine Verzögerungsstrecke in eine Quarzlinse ( $f = 100$  mm) geleitet und ihn in einen Saphir ( $d = 2,3$  mm) fokussiert. Das entstehende Weißlicht wird über eine Quarzlinse ( $f = 30$  mm) aufgesammelt und in einen Typ-II BBO ( $\theta = 29^\circ$ ,  $\phi = 0^\circ$ , 5 mm·5 mm·2 mm, p-Beschichtung) fokussiert. Dort dient es als Seedpuls. Der Hauptteil der Laserfundamentalen ( $\approx 99\%$ ) wird über ein Teleskopsystem ( $f = 150$  mm und  $f = -50$  mm) in seinem Strahldurchmesser auf  $1/3$  verringert und zur SHG in einen Typ-I BBO ( $\theta = 28,5^\circ$ ,  $\phi = 0^\circ$ , 5 mm·5 mm·0,5 mm, p-Beschichtung) gelenkt. Die nun vertikal polarisierte Frequenzverdoppelte wird vom verbleibenden Anteil der Laserfundamentalen über einen dichroitischen Spiegel (M3 (HR(45°, 400 nm)), der nur die Frequenzverdoppelte reflektiert, abgetrennt und gleichzeitig auf einen sphärischen Spiegel (SM2 (silberbeschichtet,  $r_{cc} = -50$  cm)) gelenkt. Dieser befindet sich exakt unterhalb der Seedpulsstrecke und fokussiert die als Pumpimpuls dienende Frequenzverdoppelte kurz hinter den Typ-II BBO ( $\theta = 29^\circ$ ). Der Öffnungswinkel zwischen Pump- und Seedpuls wird über das Auftreffen und die Höhe des sphärischen Spiegels (SM2) zwischen  $\approx 2,6^\circ$  und  $3,8^\circ$  variiert, um für die jeweilige Signalwellenlänge bei einer Pumpimpulswellenlänge von 400 nm optimale Bedingungen für eine NOPA zu schaffen<sup>[100]</sup>.

Da der Seedpuls aufgrund der Prozesse bei der WLK (3.3.1) einen positiven Chirp aufweist, kann über die in der Weißlichtstrecke integrierte Verzögerungsstrecke der zeitliche Überlapp von Seed- und Pumpimpuls eingestellt werden. Ein Aufbau wie der hier beschriebene ermöglicht es einen Spektralbereich von  $\approx 470\text{-}700\text{ nm}$  mit dem Signalimpuls und  $\approx 900\text{-}1200\text{ nm}$  mit dem Idlerimpuls abzudecken. Das ausgekoppelte Licht wird nachfolgend über eine weitere Quarzlinse ( $f = 100\text{ mm}$ ) im entsprechenden Abstand kollimiert. Anschließend kann der erzeugte Puls aus dem NOPA mit der Laserfundamentalen ( $\approx 760\text{-}840\text{ nm}$ ) in einer SFG kombiniert werden, um Pulse im UV-Bereich ( $\approx 290\text{-}380\text{ nm}$  bzw.  $\approx 410\text{-}490\text{ nm}$ ) zu generieren.

### 3.4 Prismenkompressor

Die mit dem OPA bzw. dem NOPA erzeugten Pulse weisen aufgrund der nichtlinearen Natur der Prozesse und der GVD durch das Passieren verschiedener Optiken einen Chirp auf. Typischerweise ist dieser positiv. Da die Zeitauflösung von der Dauer der verwendeten Pulse abhängt, müssen diese wieder zeitlich komprimiert werden, um die Zeitauflösung der jeweiligen Anlage zu erhöhen. Dies wird erreicht, indem ein negativer Chirp erzeugt wird, der den positiven Chirp ausgleichen soll<sup>[131]</sup>. Eine Möglichkeit dies zu erreichen bietet der Prismenkompressor<sup>[131–133]</sup>. Der schematische Aufbau eines solchen Prismenkompressors mit dem Strahlenverlauf ist in Abbildung 12 zu sehen.

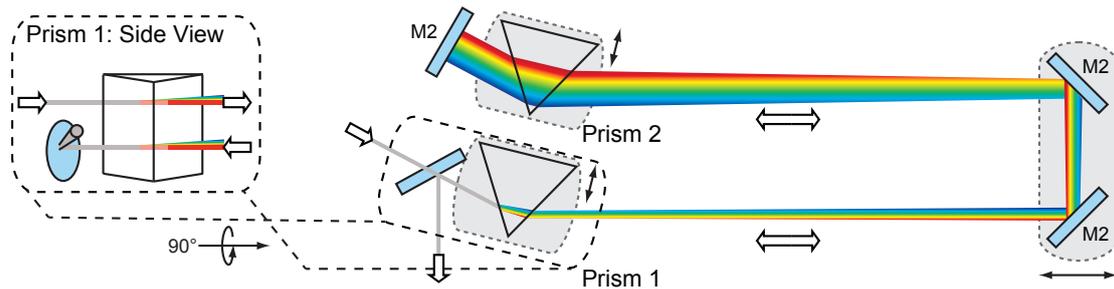


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Prismenkompressors mit Strahlenverlauf. M2 (Silberspiegel).

Der zu verkürzende, spektral breite Puls wird auf die Prismen unter dem Winkel minimaler Ablenkung ( $\delta_{min}$ , Gl. (3.7)) für das jeweilige Material, aus dem die Prismen sind, eingestrahlt (Abb. 13).

$$\delta_{min} = 2 \cdot \arcsin \left( n \cdot \sin \left( \frac{\gamma}{2} \right) \right) - \gamma \quad (3.7)$$

- $n_i$ : Brechungsindex des Prismenmaterials bei der entsprechenden Zentralwellenlänge des zu komprimierenden Pulses
- $\gamma$ : Öffnungswinkel des Prismas

Der Puls wird aufgrund der Wellenlängenabhängigkeit des Brechungsindex in seine spektralen Komponenten aufgefächert. Der Wert des Brechungsindex für die jeweilige Wellenlänge kann dabei über die Sellmeiergleichung<sup>[134]</sup> (Gl.(3.8)) und mit den aus der Literatur bekannten Werten für die einzelnen materialspezifischen Konstanten bestimmt werden.

$$n^2(\lambda) = 1 + \sum_{i=1}^n \frac{A_i \lambda^2}{\lambda^2 - B_i} \quad (3.8)$$

Es wird bei der Einkopplung in den Prismenkompressor darauf geachtet, dass der Puls möglichst die Spitze des Prismas trifft, um einen möglichst geringen Glasweg zu gewährleisten und den dadurch zusätzlich induzierten positiven Chirp möglichst klein zu halten.

Während der Puls die Verzögerungsstrecke passiert, laufen die verschiedenen spektralen Anteile weiter auseinander. Beim Auftreffen auf das zweite Prisma haben die blauen Anteile einen deutlich kleineren Glasweg als die roten vor sich. Dadurch wird ein negativer Chirp erzeugt und die Strahlen werden gleichzeitig parallelisiert. Der Spiegel nach dem zweiten Prisma ist leicht horizontal verkippt und reflektiert den Puls mit einem leichten Höhenversatz nach unten zurück. Der Puls passiert wiederholt das zweite Prisma, wodurch dieser noch einmal einen negativen Chirp erfährt und die spektralen Anteile beim Erreichen des ersten Prismas

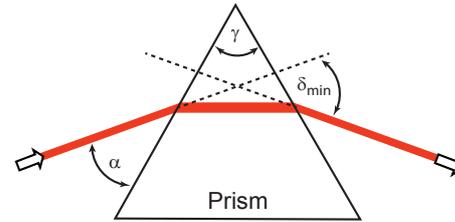


Abbildung 13: Minimaler Ablenkungswinkel ( $\delta_{min}$ ) in einem Prisma mit dem Öffnungswinkel ( $\gamma$ ) und daraus resultierender Öffnungswinkel zwischen einfallendem Strahl und Prismenoberfläche ( $\alpha$ ).

abermals zusammengeführt werden. Dort werden sie wiederholt parallelisiert und über einen tieferliegenden Silberspiegel in die gewünschte Richtung abgelenkt. In dieser Arbeit wurden zwei Materialien für die Komprimierung verwendet: (1) SF10 und (2) Quarzglas ( $\text{SiO}_2$ ). Im Fall der Pulse aus dem kollinearen OPA wurden Prismen aus SF10 (Schwerflintglas 10) verwendet. Sie weisen einen insgesamt höheren Brechungsindex auf als  $\text{SiO}_2$  und ermöglichen es auch Pulse im IR-Bereich über eine kurze Weglänge spektral aufzufächern. Die aus dem NOPA im sichtbaren Spektralbereich erzeugten Pulse wurden mit Hilfe von Prismen aus Quarzglas komprimiert. Idealerweise entspricht dabei der Winkel minimaler Ablenkung dem Brewster-Winkel (Gl. (3.9),  $\delta_{Br}(\text{SF10}) \approx 60,16^\circ$  bzw.  $\delta_{Br}(\text{SiO}_2) \approx 55,63^\circ$ ), was wiederum den Öffnungswinkel der Prismen definiert ( $\gamma(\text{SF10}) \approx 59,68^\circ$  bzw.  $\gamma(\text{SiO}_2) \approx 69,06^\circ$ ).

$$\delta_{Br} = \arctan\left(\frac{n_i}{n_a}\right) \quad (3.9)$$

- $n_a$ : Brechungsindex des Prismen umgebenden Materials

Wird der Brewster-Winkel eingehalten ist die Reflektivität an der Prismenoberfläche für parallel polarisiertes Licht am geringsten. Derzeit besitzen die Prismen noch einen Öffnungswinkel ( $\gamma$ ) von  $60^\circ$ , werden aber noch gegen Prismen mit dem angepassten Winkel ausgetauscht. Für beide Varianten wurde beim Aufbau der Kompressoren der Öffnungswinkel zwischen einfallendem Strahl und Prismenoberfläche ( $\alpha$ ) als Orientierungshilfe berechnet (Gl. (3.10)).

$$\alpha = 90 - \frac{\gamma - \delta_{min}}{2} \quad (3.10)$$

Diese Formel ist eine Folge einfacher geometrischer Überlegungen.

### 3.5 Das Anreg-/Abtast-Experiment

Es wurden zeitaufgelöste transiente Absorptionsmessungen<sup>[135]</sup> unter Verwendung eines selbst gebauten Anreg-/Abtast-Experiments durchgeführt. Dieses ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt. Das Experiment wurde bereits in Ref. 136 näher beschrieben und ist eine optimierte und erneuerte Version eines in Ref. 137, 138 und 139 genauer beschriebenen Aufbaus. Die transiente Absorption (TA) basiert auf Komponenten, die der nichtlinearen Optik zugrunde liegen (Kap. 2.3.1). Es liefert dabei Informationen über die durch Photonenanregung induzierten Kinetiken oder Dynamik, welche strukturelle Änderungen des Moleküls beschreiben.

#### 3.5.1 Clark MXR-CPA-2001

Die für die transienten Absorptionsmessungen notwendigen ultrakurzen Laserpulse wurden durch ein Lasersystem des Modells Clark MXR-CPA-2001<sup>[140]</sup> erzeugt. Es basiert auf einem Diodenlaser, der einen modengekoppelten Erbium-Glasfaseroszillator mit einer Wiederholrate von 35 MHz optisch pumpt. Die Pulse des Oszillators (1550 nm,  $\approx 100$  fs) werden frequenzverdoppelt (775 nm), mit Hilfe eines Stretchers zeitlich gestreckt ( $\approx 200$  ps) und in einen regenerativen Ti:Sa-Verstärker gelenkt, wo sie in ihrer Intensität verstärkt werden. Der Ti:Sa-Verstärker wird dabei von einem Nd:YAG-Laser mit Pulsen einer Dauer im Nanosekundenbereich bei einer Wellenlänge von 532 nm kontinuierlich optisch gepumpt ( $\approx 7,5$  mJ pro Puls). Der Pumplaser wird dabei seinerseits von einer Hochdruck-Bogenlampe kontinuierlich optisch gepumpt und erzeugt Pulse bei einer Wellenlänge von 1064 nm, die anschließend einer SHG in einem Kaliumtitanylphosphat-Kristall unterzogen werden. Nach der Verstärkung der Laserpulse werden sie mit einem Kompressor wieder komprimiert und führen zu einer Laserfundamentalen bei 775 nm mit Pulslängen von  $\approx 150$  fs bei einer Wiederholrate von 1 kHz und Pulsenergien von  $\approx 800$   $\mu$ J.

#### 3.5.2 Experimenteller Aufbau

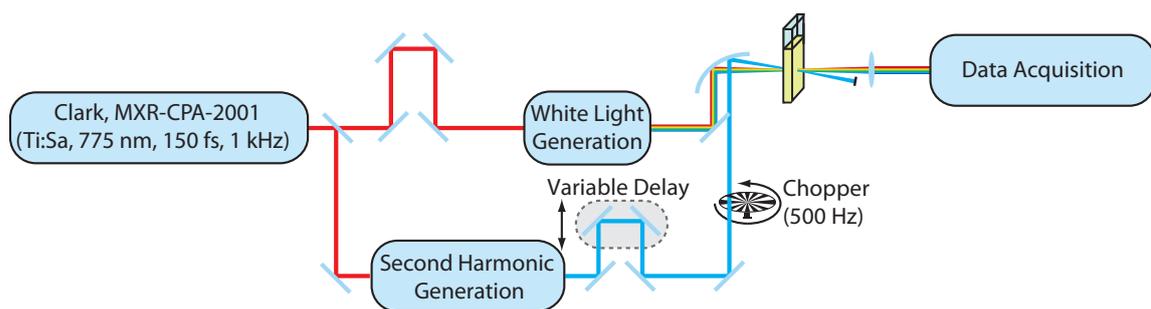


Abbildung 14: Schematische Darstellung eines Anreg-/Abtast-Experiments.

Nach Verlassen des Lasersystems wird die Laserfundamentale mit Hilfe eines Strahlteilers<sup>2</sup> in zwei Teilstrahlen aufgetrennt. Der erste Teil ( $\approx 1$  %, 20  $\mu$ J) wird verwendet, um durch

<sup>2</sup>Optisches Element aus einem beschichteten Quarzglas, das für bestimmte Wellenlängen das Licht nur zu einem gewissen Prozentsatz reflektiert, wobei der Rest transmittiert wird.

Fokussierung in einen Calciumfluoridkristall ( $\text{CaF}_2$ , Dicke: 5 mm) ein einzelnes Weißlichtfilament zu erzeugen (Kap. 3.3.1). Das so erzeugte Weißlicht deckt eine spektrale Breite von 350 nm bis hin zu 700 nm ab und dient zum Abfragen der Absorptionsänderungen in der Probe (Abtastpuls). Es wird auf einen Durchmesser von ca. 100  $\mu\text{m}$  am Probenort fokussiert. Der Abtastpuls wird nach dem Passieren der Probe in ein Spektrometer mit einer spektralen Auflösung von 4 nm gelenkt und mit Hilfe eines getriggerten Detektionssystems aufgenommen. Das Detektionssystem basiert auf einer Photodiodenzeile mit 128 Kanälen. Kombiniert ist diese mit einem Chip zur Signalverarbeitung (Hamamatsu Photonics, S8865-128), einem Treiberbaustein (Hamamatsu Photonics, C9118) und einer PCI-Karte zur Datenerfassung (National Instruments, NI-6120), die das analoge Signal der Photodioden mit einer Auflösung von 16 Bit für jeden Kanal digitalisiert. Der zweite Teil der Laserfundamentale ( $\approx 99\%$ , 190  $\mu\text{J}$ ) wird auf einen Anteil von ca. 20-50  $\mu\text{J}$  abgeschwächt und in einen BBO mit einer Dicke von 0,1 mm fokussiert. Die stattfindende SHG (Kap. 3.3.2) führt zu Pulsen bei einer Wellenlänge von ca. 388 nm mit einer Dauer von ca. 200 fs. Je nach Probe muss die Energie der Anregungspulse entsprechend der Überlegungen in Kapitel 3.5.4 abgeschwächt werden. Die Abschwächung erfolgt dabei über die Verkipfung des Einstrahlwinkels auf den BBO, da das Einbringen von Neutraldichtefiltern unweigerlich zu einer Verlängerung der Pulsdauer führen würde. Dies ist nicht gewünscht, da infolgedessen die zeitliche Auflösung des Experiments herabgesetzt wird, welche durch die Kreuzkorrelation aus der Dauer des Anregungspulses und des Abtastpulses bestimmt wird. Nachdem der Anregungspuls mit Hilfe einer Linse wieder kollimiert wird, wird dieser über einen Mikrostelltisch mit Retroreflektor gelenkt. Dies dient der zeitlichen Verschiebung des Anregungspulses, bezogen auf den Abtastpuls, denn eine Verlängerung der Laufstrecke entspricht einer zeitlichen Verzögerung. Dadurch wird bestimmt, wann die Probe nach der Anregung abgetastet wird. Da der Mikrostelltisch eine maximale Verzögerungstrecke von 30 cm aufweist und diese 2 mal passiert wird, ergibt sich unter Berücksichtigung der Lichtgeschwindigkeit eine maximale zeitliche Verzögerung von ca. 2 ns für diesen Aufbau. Ein gewisser Teil des Zeitbereichs geht verloren, da der Nullpunkt nicht exakt am Anfang des Mikrostelltischs liegt, sondern um einige wenige Zentimeter versetzt. Effektiv wird so mit den Messungen ein Zeitbereich von ca. 1,5 ns abgedeckt. Da eine minimale Schrittgröße von 2  $\mu\text{m}$  möglich ist, ergibt sich eine minimale Verzögerungszeit von ca. 7 fs<sup>[141]</sup>. Nach dem Mikrostelltisch wird der Anregungspuls mit Hilfe eines  $\lambda/2$ -Plättchens so polarisiert, dass er bezogen auf den Abtastpuls mit einer Polarisationsdrehung von  $54,7^\circ$  orientiert vorliegt und somit im magischen Winkel. Dadurch wird verhindert, dass die Rotation des Gesamtmoleküls zusätzliche Kinetiken in den transienten Absorptionmessungen hervorruft. Zusätzlich wird durch die Verwendung eines sich drehenden Rads mit senkrecht zum Strahlengang ausgerichteten Flügeln (Abb. 14, Chopper) jeder zweite Anregungspuls geblockt. Anschließend wird der Anregungspuls auf einen Durchmesser von ca. 200  $\mu\text{m}$  am Probenort fokussiert und nach Passieren der Probe geblockt. Die Probe wird dabei im rechten Winkel zum Abtastpuls bewegt, um eine Mehrfachanregung zu vermeiden. Da nur jeder zweite Anregungspuls die Küvette erreicht, trifft der Abtastpuls in einem Fall auf eine angeregte Probe und im anderen auf eine nicht angeregte Probe. Auf diese Weise erhält man je ein Absorptionsspektrum der zuvor angeregten bzw. der nicht angeregten Probe. Dies ist notwendig, um Differenzspektren zu erzeugen, welche die zum Teil sehr kleinen Änderungen in den Spektren deutlicher sichtbar machen (Abb. 15).

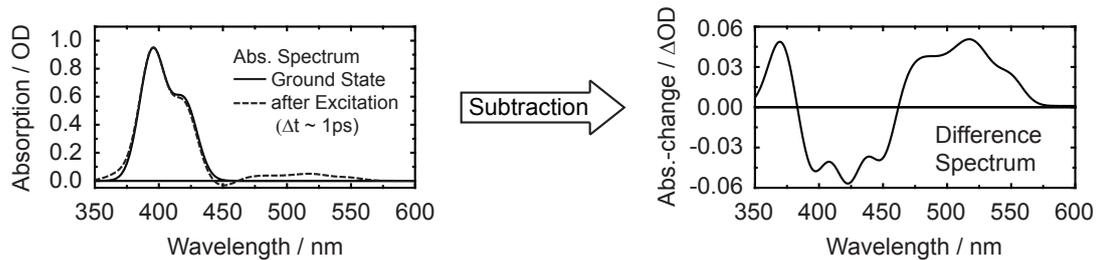


Abbildung 15: Beispielhaftes Absorptionsspektrum im sichtbaren Wellenlängenbereich vor der Anregung und nach der Anregung mit einer kurzen Verzögerungszeit  $\Delta t$ , z.B. 1 ps (links). Subtrahiert man das ursprüngliche Absorptionsspektrum, erhält man das resultierende Differenzspektrum (rechts).

Die direkt aufeinanderfolgende Messung der beiden Absorptionsspektren verhindert Artefakte aufgrund von Intensitätsschwankungen in den Pulsen, die meist bei einem längeren Messzeitraum auftreten können. Da die Anregungspulse zeitlich verzögert werden, erhält man Differenzspektren zu verschiedenen Zeitpunkten  $t_i$  vor und nach Anregung der Probe. Typischerweise liegt die Autokorrelation im Bereich von 200-250 fs. Dies ermöglicht die Betrachtung von Kinetiken, die eine Änderung der molekularen Struktur betreffen, allerdings nicht für die Betrachtung von typischen meist sehr schnellen Wellenpaketsbewegungen ausreichen<sup>[142]</sup>.

### 3.5.3 Verschiedene Signaltypen

Das exemplarische Differenzspektrum einer transienten Absorptionsmessung in Abbildung 15 zeigt, dass die Subtraktion des Absorptionsspektrums der nicht angeregten Probe von dem der angeregten Probe sowohl zu positiven als auch negativen Signalen führt. Dabei sind grundlegend drei Arten von Signalen zu unterscheiden, die zu einem Gesamtspektrum beitragen (Abb. 16), wenn man ein Photoprodukt ausschließen kann.

Der erste Typ von Signalen ist das Grundzustandsphotobleichen (engl. **ground state bleach**, GSB), welches zu einem negativem Signal führt. Es entsteht, da sich aufgrund der Anregung ein Teil der Moleküle im abgetasteten Bereich nicht mehr im Grundzustand, sondern in höherenergetischen Zuständen befinden. Die Feinstruktur entsteht, wie auch bei den anderen Signaltypen, durch Übergänge in verschiedene vibronische Zustände des angeregten Zustands. Trifft der Abtastpuls vor der Anregung auf nur im Grundzustand befindliche Moleküle, trifft er nach der Anregung nur noch auf  $100 - x\%$  der Moleküle im Grundzustand. Somit ist für den Anteil  $x$  der Moleküle der charakteristische Übergang in den angeregten Zustand nicht mehr vorhanden und die Intensität des Abtastlichts wird nicht mehr so stark abgeschwächt wie ohne Anregungspuls. Es werden dementsprechend mehr Photonen im Spektralbereich der Absorptionsbande detektiert. Der zweite Typ ist die stimulierte Emission (engl. **stimulated emission**, SE), die ebenfalls ein negatives Signal liefert. Die SE ist die durch Photonen induzierte Emission von Licht. Ist das Übergangsdipolmoment ausreichend groß, so werden die emittierten Photonen zusätzlich zu denen des Abtastpulses detektiert. Auch hier kommt es folglich zu einer erhöhten Detektion an Photonen, jedoch im Wellenlängenbereich der in den stationären Messungen beobachteten Fluoreszenz. Der letzte Signaltyp ist die Absorption des angeregten Zustands (engl. **excited state absorption**, ESA), ein positives Signal. Da sich ein Anteil der Moleküle im angeregten Zustand befindet, sind diese nun in der Lage von dort

aus ihrerseits in höhere energetische Zustände angeregt zu werden. Dabei sind natürlich auch Übergänge in verschiedene elektronische Zustände möglich. Auf diese Weise kommt es zu einer reduzierten Intensität des Abtastpulses bei den Wellenlängen der jeweiligen Übergänge.

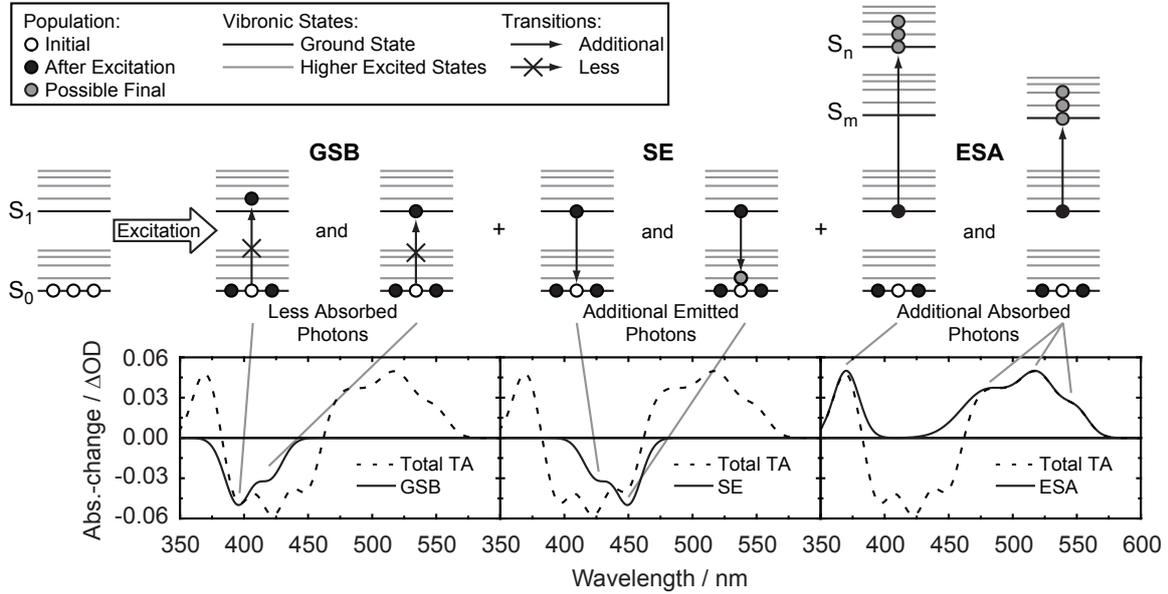


Abbildung 16: Schematische Darstellung der möglichen Übergänge bei einem Anreg-/Abtast-Experiment mit ihrer Bezeichnung (oben) und deren Beitrag zu einem exemplarischen Differenzspektrum (unten).

### 3.5.4 Bestimmung des prozentualen Anteils der angeregten Moleküle

Um eine Zweiphotonenabsorption zu vermeiden, muss die Photonendichte, bezogen auf die Anzahl der Moleküle im Anregungsvolumen ( $V_{Exc}$ ), klein gehalten werden. Das Anregungsvolumen wurde dabei von seiner Geometrie her als zylindrisch angesehen, da eine gaußförmige Pulsfront mit einer Rayleighlänge von 8 cm ( $z_r$ , Gl. (3.11)<sup>[94]</sup>) angenommen wurde. Diese Rayleighlänge ergibt sich aus der Verwendung der SHG als Anregungswellenlänge (388 nm) und dem Radius der vorliegenden Strahltaile ( $\omega_0$ ) von 100  $\mu\text{m}$ .

$$z_r = \frac{\pi \cdot \omega_0^2}{\lambda_{Exc}} \quad (3.11)$$

Somit errechnet sich das Anregungsvolumen aus der Länge des Lichtwegs durch die Probe ( $d_K$ , 1 mm) und dem Radius der Strahltaile (Gl. (3.12)).

$$V_{Exc} = \left( \frac{r_{Exc}}{2} \right)^2 \cdot \pi \cdot d_K \quad (3.12)$$

Typischerweise sollte das Verhältnis der Anzahl an Photonen ( $N_P$ , Gl. (3.13)) zu Molekülen ( $N_M$ , Gl. (3.14)) im Anregungsvolumen in einem Bereich liegen, der kleiner als 10 % ist.

$$N_P = \frac{I_{Exc}}{E_{Exc}} = \frac{I_{Exc}}{h \cdot \nu_{Exc}} = \frac{I_{Exc} \cdot \lambda_{Exc}}{h \cdot c} \quad (3.13)$$

- $I_{Exc}$ : Anregungspulsenergie
- $E_{Exc}$ : Energie eines Anregungsphotons
- $\nu_{Exc}$ : Frequenz eines Anregungsphotons
- $\lambda_{Exc}$ : Wellenlänge eines Anregungsphotons

$$N_M = c_M \cdot V_{Exc} \cdot N_A \quad (3.14)$$

- $c_M$ : Konzentration der Lösung
- $V_{Exc}$ : Anregungsvolumen
- $N_A$ : Avogadro-Konstante ( $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )

Bestimmt wurde der Anteil der angeregten Moleküle ( $P_{Exc}$ ) unter Verwendung von Gleichung (3.15), die sich auf Gleichung (3.13) und (3.14) bezieht.

$$P_{Exc} = \frac{N_P}{N_M} \quad (3.15)$$

### 3.5.5 Lebensdauerdichteanalyse der transienten Absorptionsdaten

Eine konventionelle globale Lebensdaueranalyse (engl. **global lifetime analysis**, GLA)<sup>[143]</sup> mit einer bestimmten Anzahl von einigen wenigen diskreten exponentiellen Lebensdauern ( $\leq 6$ ) führte für die hier untersuchten Proben zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen. Der Grund hierfür ist eine große Vielfalt von spektral und zeitlich überlagerten Signalen, bei denen zum Teil auch nichtexponentielle Kinetiken vermutet werden. Die resultierenden zerfallsassoziierten Spektren konnten infolgedessen nicht als hinreichend verlässlich betrachtet werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurde in Kooperation mit Dr. Chavdar Slavov<sup>3</sup> eine Lebensdauerdichteanalyse (engl. **lifetime-density analysis**, LDA) vorgenommen. Die LDA wurde in einem neuen Analyseprogramm mit dem Namen OPTIMUS implementiert, das für die Auswertung von zeitaufgelösten Messdaten entwickelt wurde. Derzeit sind noch keine Details zum Programm und den implementierten Analysemethoden veröffentlicht. Die grundlegende Idee bei der LDA ist, den zu untersuchenden Datensatz ( $I(t, \lambda)$ ) durch eine Integration über die Lebensdauern ( $\tau$ ) auszudrücken (Gl. (3.16)).

$$I(t, \lambda) = \int_0^{\infty} \Phi(\tau_i, \lambda) \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} d\tau \quad (3.16)$$

<sup>3</sup>Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main, Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt am Main, Deutschland.

Dies entspricht einer Laplace-Transformation von  $\Phi(\tau, \lambda)$ , dem Beitrag einer jeden Zeitkonstante ( $\tau_i$ ) an den stattfindenden Prozessen in Abhängigkeit von der betrachteten Wellenlänge.  $\Phi(\tau_i, \lambda)$  gibt dabei gewissermaßen die Wahrscheinlichkeit wieder, mit der eine beliebige Zeitkonstante bei einer bestimmten Wellenlänge die ablaufenden Prozesse beschreibt. Dadurch ist die LDA im Vergleich zur GLA, bei der nur einige wenige Zeitkonstanten entsprechend eines angenommenen Modells an den Datensatz angepasst werden, modellunabhängig. Ein Vorteil der Unabhängigkeit von einem Modell ist, dass sie von Natur aus mit nicht exponentiellen und gestreckten exponentiellen Kinetiken umgehen kann<sup>[144]</sup>. Die Extrema in den zerfallsassoziierten Spektren der GLA entsprechen dabei einem Zeitschnitt bei dieser Lebensdauer in der spektralen Dichtefunktion ( $\Phi(\tau_i, \lambda)$ ) der LDA.

In der Praxis wird eine Summe aus vielen Exponentialfunktionen (50-100) für die einzelnen Lebensdauern ( $\tau_i$ ) verwendet, die linear über einen logarithmisch skalierten Bereich von Lebensdauern gleichmäßig verteilt sind (Gl. (3.17)).

$$I(t, \lambda) = \sum_{i=1}^n \Phi(\tau_i, \lambda) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (3.17)$$

Der Bereich an untersuchten Lebensdauern geht dabei über die Messzeit des Datensatzes hinaus. Die Lebensdauern werden hierbei in den Exponentialfunktionen festgehalten und die spektrale Dichtefunktion ( $\Phi(\tau_i, \lambda)$ ) der jeweiligen Exponentialfunktion bestimmt und nicht wie bei der GLA eine kleine definierte Menge an Lebensdauern an den Datensatz angepasst. Die große Menge an Exponentialfunktionen ermöglicht damit die Näherung eines Kontinuums an Exponentialfunktionen. Um die spektrale Dichtefunktion und somit die Verteilung an Lebensdauern bei den gemessenen Wellenlängen aus dem untersuchten Datensatz zu extrahieren, muss eine inverse Laplace-Transformation durchgeführt werden. Da die Datensätze einen signifikanten Anteil an Rauschen enthalten und oftmals das Messsignal über den Messbereich nicht auf Null absinkt, herrschen schlechte Vorbedingungen für eine inverse Transformation. Dies führt zwangsläufig zu nicht eindeutigen Dichtefunktionen mit oftmals stark oszillierenden Werten, die nicht durch die experimentellen Daten gerechtfertigt sind. Dieses Problem wird durch die Anwendung von Regularisierungsverfahren adressiert. Dabei wird während der Minimierung der Fehlerquadrate unter Verwendung von typischen Methoden ein zweiter Strafterm eingeführt. Dadurch wird eine Funktion wie in Gleichung (3.18) erhalten.

$$M = \sum_{j=1}^m (S_j - S_{fit,j})^2 + \lambda^2 \cdot P^2 \quad (3.18)$$

$S_j$  stellt dabei die experimentellen Daten und  $S_{fit,j}$  die entsprechende Anpassungsfunktion dar.  $P$  ist die Straffunktion, die entsprechend der Art von Regularisierung eine spezifische Form annimmt, wobei der Lagrange-Multiplikator  $\lambda$  die relative Gewichtung der zwei verwendeten Bedingungen bestimmt. Typischerweise werden in der zeitaufgelösten Spektroskopie<sup>[145–150]</sup> Varianten der Maximum-Entropie-Methode<sup>[151]</sup> und Tikhonov-Regularisierung<sup>[152]</sup> verwendet. Derzeit verwendet OPTIMUS die Tikhonov-Regularisierung und ermöglicht dem Anwender eine Auswahl an verschiedenen Straffunktionen. Die Suche nach dem Lagrange-Multiplikator kann entweder manuell oder mit Hilfe von verschiedenen Suchmethoden (dem L-Kurve-Kriterium<sup>[153,154]</sup>, der Minimal-Produkt-Methode<sup>[155,156]</sup> oder dem Kreuzvalidierungsverfahren<sup>[148,157,158]</sup>) durchgeführt werden.

Gleichzeitig mit der inversen Laplacetransformation führt OPTIMUS eine Dekonvolution der Instrumentenantwort und eine Nullpunktsbestimmung durch die Anpassung einer Funktion an das kohärente Artefakt durch, welches beim Überlappen von Anregungs- und Abtastpuls entsteht. Die Vorgehensweise bei der Dekonvolution ist hierbei ähnlich der von van Stokkum *et al.*<sup>[143]</sup>, die auch den wellenlängenabhängigen Chirp berücksichtigt. Die Anpassung an das kohärente Artefakt für die Nullpunktsbestimmung bedient sich dabei einer Summe aus einer Gaußfunktion und deren ersten beiden Ableitungen.

Die so aus der LDA erhaltene spektrale Dichtefunktion kann als eine so genannte Lebensdauerdichtekarte (engl. **lifetime-density map**, LDM) dargestellt werden, die als Konturplot ähnlich dem von Croce *et al.*<sup>[145]</sup> visualisiert wird. Die Interpretation einer solchen Karte ist sehr einfach und gleicht der für die zerfallsassoziierten Spektren, die aus der GLA gewonnen werden. Ein positives Signal in der LDM beschreibt dabei in einem transienten Absorptionsspektrum entweder den Aufbau eines negativen Signals (GSB bzw. SE) oder den Zerfall eines positiven Signals (ESA). Für ein negatives Signal gilt dies in umgekehrter Weise.

### 3.6 Messungen mit einer Streak-Kamera

Um zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren zu erhalten, die frei von überlagernden Signalen wie GSB oder ESA sind, wurden in Kooperation mit Franziska F. Graupner<sup>4</sup> Messungen mit einer Streak-Kamera (engl. **streak camera**, SC) an einem von ihr errichteten experimentellen Aufbau unternommen. Nachfolgend wird dieser Aufbau als Streak-Kamera bezeichnet.

#### 3.6.1 Funktionsweise einer Streak-Kamera

Eine Streak-Kamera ist keine Kamera im eigentlichen Sinne. Sie dient der Aufnahme von ultraschnellen Lichtphänomenen<sup>[91]</sup>. Dabei gibt sie die Intensität des Lichts als eine Funktion der Zeit gegen die Position auf dem Detektor wieder, die als eine Wellenlängenskala kalibriert werden kann. Das Funktionsprinzip eines Streak-Kamera-Aufbaus für Fluoreszenzmessungen ist in Abbildung 17 dargestellt.

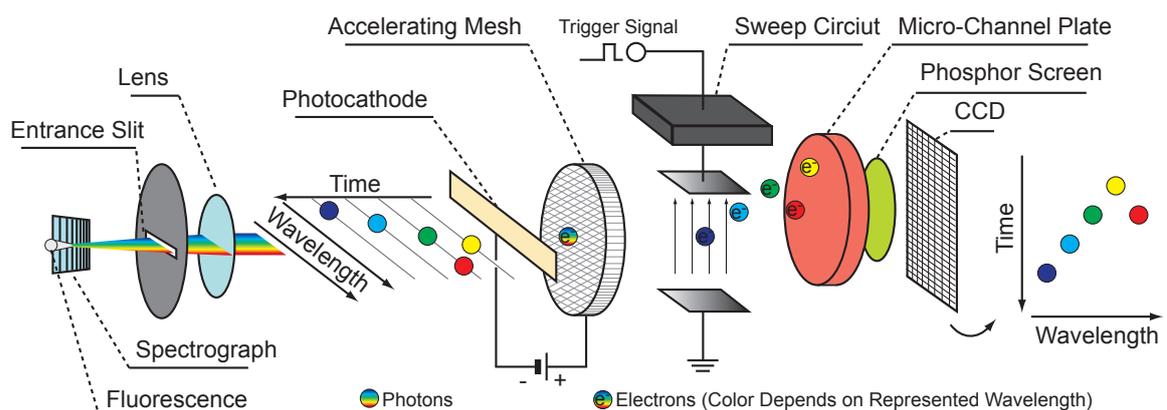


Abbildung 17: Funktionsprinzip einer Streak-Kamera, abgewandelt aus Ref. 91.

<sup>4</sup>Fakultät für Physik, Institut für Biomolekulare Optik, Zentrum für integrierte Proteinforschung, Ludwig Maximilians Universität München, Oettingenstrasse 67, 80538 München, Deutschland.

Die spektralen Komponenten der Fluoreszenz werden, bevor sie in die Streak-Kamera gelenkt werden, mit Hilfe eines Spektrografen räumlich separiert. Nachdem sie über einen Eintrittsspalt in die Kamera gelangen, kommt es zur Kollimierung des Lichtstrahls. Das Licht trifft anschließend auf eine Photokathode, dort schlägt das jeweilige Photon entsprechend des Zeitpunkts des Auftreffens ein Elektron aus dem Photokathodenschirm. Sie sind entsprechend der Wellenlänge des zugehörigen Photons räumlich verteilt und werden durch ein positiv geladenes Drahtgitter angezogen und dadurch beschleunigt. Anschließend treten sie in ein senkrecht zur spektralen Ausrichtung angelegtes elektrisches Feld ein, das nach dem Erhalt eines Startsignals in seiner Amplitude kontinuierlich zunimmt. Diese Zunahme wird durch eine Erhöhung der angelegten Spannung zwischen zwei Kondensatorplatten erreicht. Da die Größe der Ablenkung der Elektronen abhängig von der angelegten Spannung ist, wird eine räumliche Aufspaltung entsprechend ihres zeitlichen Eintreffens im elektrischen Feld erhalten, die senkrecht zu der spektralen Aufspaltung ist. Die abgelenkten Elektronen treffen auf einen Phosphorschirm, der in Abhängigkeit des Auftreffortes der Elektronen seinerseits Photonen erzeugt. Die Ablenkspannung variiert dabei kontinuierlich mit einem sinusförmigen Verlauf, dadurch kommt es zu zwei möglichen Ablenkrichtungen entlang der  $y$ -Achse und somit der Zuordnung von zwei  $y$ -Werten auf dem Phosphorschirm zu einem zeitlichen Ereignis. Damit nur eine Ablenkrichtung und ein definitiver Wert erhalten wird, sind in der Streak-Kamera nachfolgend zwei weitere Kondensatorplatten vorhanden, die senkrecht zu den ersten ausgerichtet sind. Diese lenken die Elektronen während der Phase des Spannungsabfalls so weit ab, dass sie nicht auf den Phosphorschirm treffen. Dies wird als kontinuierlicher Ablenkmodus bezeichnet. Die vom Phosphorschirm erzeugten Photonen werden mit einem CCD-Chip detektiert und führen zu einem zweidimensionalen Spektrum. Dieses Spektrum gibt die Wellenlänge und den Zeitpunkt des Erscheinens eines Photons nach dem Startsignal (Anregungspuls) wieder. Nimmt man die Anzahl der jeweiligen Photonen hinzu, wird ein dreidimensionales Spektrum der Fluoreszenzintensität erhalten. Der CCD-Chip wird dabei mit einer Frequenz von 150 Hz ausgelesen.

#### 3.6.2 Die Streak-Kamera im experimentellen Aufbau

Details zu dem verwendeten Aufbau sind in Veröffentlichungen von Lederer *et al.*<sup>[159]</sup> und Ryseck *et al.*<sup>[160]</sup> zu finden. Zusammengefasst, erzeugt ein kommerzielles Lasersystem mit kombiniertem Verstärker des Modells Clark MXR-CPA-2001 (Kap. 3.5.1) die benötigten ultrakurzen Laserpulse (150 fs, 780 nm). Diese werden mittels SHG in einem BBO Frequenzverdoppelt. Anschließend wird der Anregungsstrahl auf die Probe fokussiert, wodurch der Strahldurchmesser ca. 15  $\mu\text{m}$  am Probenort beträgt. Die Fluoreszenz wird dabei unter einem abweichenden Winkel von  $15^\circ$  bezogen auf die Ausbreitungsrichtung des Anregungsstrahls unter Verwendung eines achromatischen Linsensystems mit einem Luftspalt ( $f = 80$  mm,  $\varnothing = 20$  mm, Typ OUV 4.20, Bernhard Halle Nachfl. GmbH) eingesammelt. Nach der Kollimation der Fluoreszenz passiert diese einen Drahtgitterpolarisator (Moxtek, UBB01C,  $\varnothing = 36$  mm) mit einer Ausrichtung im magischen Winkel ( $54,7^\circ$ ), bezogen auf die Ausrichtung der Polarisation des Anregungsstrahls, um auch hier zusätzliche Kinetiken aufgrund von Rotationen des Gesamtmoleküls auszuschließen. Anschließend wird das polarisierte Licht mit einer weiteren achromatischen Linse ( $f = 75$  mm NUV,  $\varnothing = 25$  mm, Edmund Optics) auf die Mitte des Eintrittsspalts des Spektrografen fokussiert (Princeton Instruments, Acton Series SP2356,  $f = 300$  mm, mit einem 50  $\text{Linien/mm}$  Blazegitter optimiert für eine Blaze-Wellenlänge von

600 nm). Die Öffnung des Eintrittspalts wird dabei so klein wie möglich gehalten, um eine optimale zeitliche und spektrale Auflösung zu erhalten. Dies ist möglich, da auf diese Weise zum einen die Abbildung des Spalts und somit die Überlappung der Spektrallinien auf dem Gitter klein gehalten und des weiteren gleichzeitig die Randbereiche des Strahlprofils abgeschnitten werden, die aufgrund eines abweichenden Lichtwegs zeitlich verschoben am Detektor ankommen würden. Die kommerziell erhältliche Streak-Kamera (Hamamatsu, C5680-24 C) wurde derart eingestellt, dass die Fokalebene ihrer Photokathode mit der Fokalebene vom Spektrografen zusammenfällt. Ein vor der Probenanregung separierter Teil des Anregungslichts wird so eingekoppelt, dass er kurz vor der zu messenden Fluoreszenz auf eine Photodiode trifft. Dieses Ereignis definiert den Startpunkt für die Messung und löst das Abfahren der Ablenkspannung aus. Nach dem Abfahren der Spannungsrampe beginnt das Zählen der detektierten Photonen in Messgruppen (Photonenzählmodus). Eine Messgruppe ist dabei über den Auflösungsbereich, der durch die spektrale Auflösung und die zeitliche Auflösung (Instrumentenantwort) eingegrenzt wird, definiert. Um eine ausreichend starke Fluoreszenzintensität, sprich ein angemessenes Messsignal und eine vertretbare statistische Verteilung, in der Messgruppe zu erhalten, muss die Anregungspulsenergie individuell an die Zeitfenster angepasst werden. Für Prozesse, die in Zeitfenstern im Nanosekundenbereich ablaufen, wird der kontinuierliche Ablenkmodus verwendet. In diesem Modus werden aufgrund der Auslesefrequenz von 150 Hz sechs Anregungsereignisse pro Aufnahme auf dem CCD-Chip akkumuliert, bevor dieser ausgelesen wird. Bei Zeitfenstern unterhalb einer Nanosekunde wird die Ablenkgeschwindigkeit der beiden Kondensatoranordnungen mit Hilfe einer schnellen Einzelablenkeinheit (Hamamatsu, M5677-01) eingestellt. Sie ermöglicht es, dass nur die Photonen des ersten Anregungsereignisses von dem CCD-Chip detektiert werden. Dies wird erreicht, indem die zweite Kondensatoranordnung die Elektronen der nachfolgenden Anregungsereignisse über einen längeren Zeitraum vom Phosphorschirm weg lenkt und erst nach dem Auslesen des CCD-Chips ein erneutes Auftreffen auf dem Phosphorschirm ermöglicht. Das ist notwendig, da bei derart schnellen Aufnahmen eine leichte Verschiebung in der räumlichen Lage des zeitlichen Nullpunkts auf dem CCD-Chip entsteht und dadurch eine Überlagerung aus 6 Anregungsereignissen zu einem zeitlichen Verschmieren führen würde. Auf diese Weise ist es allerdings möglich, die zeitliche Auflösung durch eine Jitterkorrektur zu verbessern. Die Korrektur basiert auf der Einkopplung eines kleinen Teils des Anregungslichts in die Streak-Kamera, der zeitlich und räumlich von der Fluoreszenz separiert ist. Durch das Ausrichten der einzelnen Bilder eines Anregungsereignisses an dem Schwerpunkt dieses Signals wird ein zeitlicher Fixpunkt erhalten, der kleine zeitliche Verschiebungen im Startpunkt der Messung aufgrund der an ihre Grenzen kommenden Messelektronik ausgleicht.

### 3.6.3 Auswertung der Messungen mit der Streak-Kamera

Für die Auswertung der Streak-Kamera-Messungen, wurde eine globale Anpassungsfunktion verwendet, die auf einem Levenberg-Marquardt-Algorithmus zur Optimierung nichtlinearer Probleme basiert. Er bedient sich dabei der Methode zur Minimierung der Fehlerquadrate. Die Messdaten werden über eine Linearkombination aus exponentiellen Zerfallsfunktionen (Gl. (3.19))<sup>[161]</sup> angepasst, die mit einer Gaußfunktion gefaltet sind, um die Instrumentenantwort zu berücksichtigen.

$$\Delta A(\lambda_i, t_j) = \sum_{k=1}^r a_{k,i} \cdot e^{-\frac{t_j}{\tau_k}} \quad (3.19)$$

Auf diese Weise werden die Zeitkonstanten der strahlenden Prozesse und ihre zerfallsassoziierten Spektren erhalten. Eine detailliertere Beschreibung der Vorgehensweise findet sich in einer Veröffentlichung von Satzger und Zinth<sup>[161]</sup>. Wie bereits erwähnt (Kap. 3.5.5), ist es nicht möglich, eine spektrale Verschiebung ausreichend gut durch eine exponentielle Funktion zu beschreiben, jedoch können zumindest annähernde Werte für zugehörige Zeitkonstanten und die Wellenlängenabhängigkeit erhalten werden. Da ein Photonenzählmodus verwendet wird, liefern Rauschen und Hintergrundsignale keinen Beitrag zum Signal und müssen somit nicht berücksichtigt werden.

### 3.7 Quantenchemische Rechnungen

Alle in dieser Arbeit gezeigten quantenchemischen Rechnungen wurden in Kooperation mit Dr. Jürgen Plötner durchgeführt und die Ergebnisse dürfen mit seiner freundlichen Genehmigung hier präsentiert werden.

Die quantenchemischen Rechnungen wurden mit dem Turbomole<sup>[162]</sup> und dem Q-Chem Programmpaket<sup>[163]</sup> durchgeführt. Als Methoden wurden die zeitabhängige Dichtefunktionaltheorie (engl. **t**ime-**d**ependent **d**ensity-**f**unctional **t**heory, TDDFT)<sup>[164,165]</sup> und die **c**onfiguration-**i**nteraction **s**ingles (CIS)<sup>[166]</sup> verwendet<sup>5</sup>. Die TDDFT-Methoden stellen aufgrund des relativ geringen Rechenaufwands Standardmethoden dar und haben sich vor allem bei organischen Verbindungen bewährt<sup>[167]</sup>. Sie weisen aber Probleme im Umgang mit der Selbstwechselwirkung (engl. **s**elf-**i**nteraction, SI) bei Elektronentransferprozessen auf, was in zu geringen Anregungsenergien für Rydbergzustände und Zustände mit Ladungstransfercharakter resultiert<sup>[168–173]</sup>. Beimischungen des Anteils an **H**artree-**F**ock (HF)-Austausch (x) mit der jeweiligen Korrelation (c) im xc-Funktional (B-LYP, 0% HF < B3-LYP, 20% HF < BH-LYP, 50% HF) reduzieren den Einfluss des SI-Fehlers. Um den genauen Einfluss auf ein System zu überprüfen und eine Methode zu finden, welche das System hinreichend genau beschreibt, werden die verschiedenen Funktionale auf das zu untersuchende System angewendet und mit der Zustandsabfolge der SI-Fehler freien CIS-Methode verglichen. Diese unterschätzt dank ihres hohen HF-Anteils (100%) bei den Einzelreferenzmethoden zwar nicht die Anregungsenergien der Zustände die einen Ladungstransfer (engl. **c**harge **t**ransfer, CT) beschreiben, erfordert aber einen deutlich höheren Rechenaufwand. Das liegt daran, dass die Elektronenkonfiguration des Moleküls nicht nur im Grundzustand, sondern auch im angeregten Zustand berücksichtigt wird. Ein genereller Nachteil der Einzelreferenzmethoden ist die Vernachlässigung von höher angeregten Konfigurationen der Wellenfunktionen. Diese werden aber für eine korrekte Wiedergabe der Korrelationsenergie der Elektronen, z.B. bei der Anregung von zwei Elektronen in einen angeregten Zustand, benötigt. Normalerweise werden Doppelanregungen vernachlässigt, da sie meistens nicht ausschlaggebend sind. Konjugierte Systeme stellen allerdings eine Ausnahme dar. Deswegen wurde eine Variante der CIS-doubles (CIS-(D)) verwendet, sprich **s**caled **o**pposite **s**pin **C**onfiguration-**i**nteraction **s**ingles **d**oubles (SOS-CIS(D)), welche doppelt angeregte Zustände störungstheoretisch behandelt<sup>[174]</sup>.

<sup>5</sup>Ein Überblick über die verwendeten Methoden ist in einem Review gegeben<sup>[167]</sup>.

## 4 Aufbau, Charakterisierung und Anwendung eines Kerr-Schalters

Das Messen von zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren stellt eine große technische Herausforderung dar, da absolute Spektren aufgenommen werden, die eines komplexen Messaufbaus bedürfen und die eine Vielzahl von Korrekturen mit sich bringen. Eine Aufnahme eines solchen Spektrums lohnt sich indes, denn es gibt keine störenden Überlagerungen mit dem GSB oder der ESA. Um ein zeitaufgelöstes Fluoreszenzspektrum zu erhalten, kommen je nach Probe und Fragestellung verschiedene Methoden zum Einsatz. Sollen mit Licht getriggerte Prozesse betrachtet werden, kommen Methoden wie z.B. TCSPC, Up-Conversion (dt. Aufkonvertierung) oder das hier verwendete Kerr-Schalten in Frage. Die TCSPC weist aufgrund der auf elektronischen Komponenten basierenden Detektion eine maximale Zeitauflösung im Pikosekundenbereich auf<sup>[5]</sup>. Das Kerr-Schalten<sup>[8]</sup> und die Up-Conversion<sup>[7]</sup> gehören zu den optischen Schaltmethoden. Methoden wie diese verwenden einen optischen Prozess, bei dem die durch den Anregungspuls induzierte Fluoreszenz nur detektiert werden kann, solange dieser Prozess optisch aktiviert ist (Abb. 18). Vergleichbar ist es mit einem verschlossenem Tor (Gate), das nur während des Schaltens offen steht. Diese optische Aktivierung wird mit einem sogenannten Schaltimpuls erreicht. Verzögert man nun den Schaltimpuls gegenüber dem Anregungspuls, erhält man ein Intensitätsprofil der Fluoreszenz zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Anregung, wobei jeder Messpunkt der über die Dauer des Schaltimpulses gemittelten Intensität der Fluoreszenz entspricht. Dadurch ermöglichen diese Experimente zeitaufgelöste Messungen mit einer zeitlichen Auflösung im Femtosekundenbereich und einem maximalen Messbereich von 2 ns<sup>[7,10,11,175–178]</sup>.

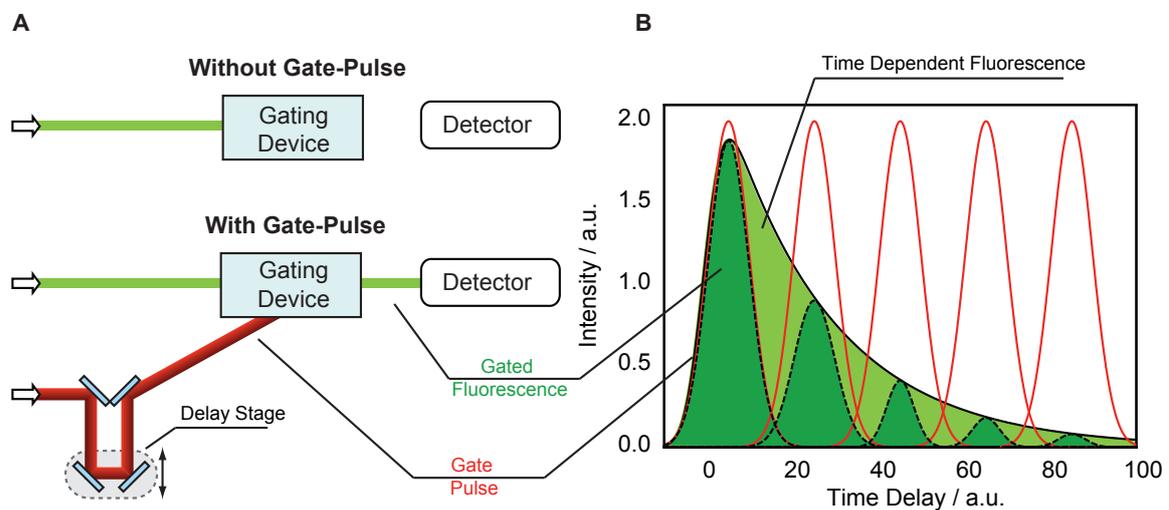


Abbildung 18: Schematische Darstellung der prinzipiellen Funktionsweise von optischen Schaltmethoden. (A) Eine Überlagerung von Schaltimpuls und Fluoreszenz ermöglicht das Passieren des Schalters und die Detektion der Fluoreszenz. (B) Das detektierte Signal gibt den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität wieder (rechts).

Der Vorteil des Kerr-Schaltens ist die einfach zu erreichende, enorme spektrale Breite ( $\approx 300$  nm),

die gleichzeitig detektiert werden kann, während bei den meisten Upconversion-Anlagen ohne großen Mehraufwand nur eine Wellenlänge oder relativ enge spektrale Korridore ( $\approx 100$  nm) gleichzeitig gemessen werden können<sup>[7,10–12]</sup>.

## 4.1 Funktionsweise des Kerr-Schalters

Im Fall des Kerr-Schalters basiert das optische Schalten auf dem Kerr-Effekt (Kap. 2.3.1.5). Die Fluoreszenz wird aufgesammelt und polarisiert auf ein Kerr-Medium fokussiert. Danach wird diese nochmals aufgesammelt, kollimiert und durch einen weiteren Polarisator (Analyseur) geleitet. Der Analyseur ist in seiner Polarisierungsebene senkrecht zum ersten orientiert, somit kann die Fluoreszenz diesen nicht passieren. Trifft ein Schaltimpuls, der in seiner Polarisation abweicht, auf das isotrope Kerr-Medium, kommt es zur Erzeugung von Anisotropie und folglich zur Doppelbrechung (Kap. 2.3.1.5). Hieraus ergibt sich eine Polarisationsänderung der Fluoreszenz. Diese ist eine Folge der Zerlegung des Feldvektors der Fluoreszenz in ihre Teilkomponenten parallel und senkrecht zur optischen Achse und der so entstehenden Phasenverschiebung<sup>[96]</sup>. Ein geringer Teil der Fluoreszenz weist daraufhin eine um  $90^\circ$  gedrehte Polarisation auf, kann den Analyseur passieren und detektiert werden (Abb. 19).

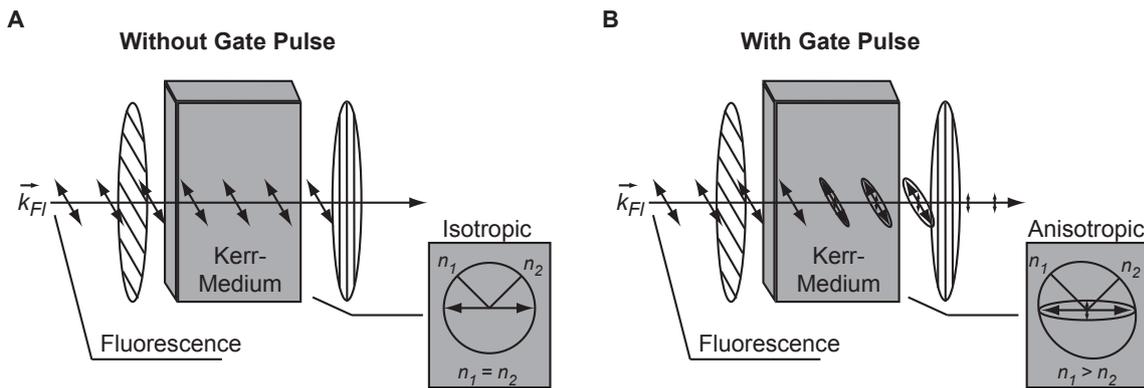


Abbildung 19: Polarisierungsebene der Fluoreszenz im Kerr-Schalter und Brechungsindexellipsoid im Kerr-Medium (A) ohne Gatepuls und (B) mit Gatepuls.

### 4.1.1 Zeitauflösung

Die maximal erreichbare Zeitauflösung des Kerr-Schalters hängt von der Dauer des Schalt- und des Anregungspulses, dem Kerr-Medium und der GVD in diesem ab. Als Kerr-Medium werden in solchen Anlagen vor allem transparente Gläser<sup>[101,175,179–181]</sup> und Flüssigkeiten<sup>[182]</sup> verwendet. Bei Gläsern führt nur die elektronische Komponente zu einer induzierten Anisotropie, sie folgt dem elektrischen Feld des Schaltimpulses nahezu instantan ( $< 100$  fs).

### 4.1.2 Schalteffizienz

Die Schalteffizienz  $T$ , also das Verhältnis der in einem Zeitintervall das Kerr-Medium passierenden zu den auf dieses auftreffenden Photonen, ist proportional zu der induzierten Phasen-

verschiebung  $\varphi(t)$  und dem Winkel zwischen der Polarisationsrichtung von Fluoreszenz und Schaltimpuls  $\Omega$  (Gl. (4.1))<sup>[183–185]</sup>.

$$T = \sin^2(2\Omega) \cdot \sin^2\left(\frac{1}{2}\varphi(r, t)\right) \quad (4.1)$$

Infolgedessen ist der optimale Polarisationsunterschied von Schalt- und Anregungspuls für eine maximale elliptische Polarisation der Fluoreszenz bei einem Winkel  $\Omega$  von  $45^\circ$  gegeben<sup>[182,186]</sup>.

Die Phasenverschiebung (Gl. (4.2),  $\varphi(t)$ ) zwischen dem ordentlichen und dem außerordentlichen Anteil des elektrischen Feldes ist antiproportional zur Wellenlänge der Fluoreszenz  $\lambda_{Fl}$  und proportional zur Dicke  $d$  des Kerr-Mediums und der Intensität des Schaltpulses  $I_S$ <sup>[179,187]</sup>.

$$\varphi(t) = \frac{2\pi\Delta n(I_S, t)d}{\lambda_{Fl}} \quad (4.2)$$

Bei hinreichend kleinen Werten für die Phasenverschiebung kann die Schalteffizienz unter Berücksichtigung von Gleichung (4.1) und (2.23) genähert werden als:

$$T \approx \left(\frac{\pi n_2 d I_S}{\lambda_{Fl}}\right)^2 \quad (4.3)$$

Die Schalteffizienz ist folglich proportional zum Quadrat des nichtlinearen Anteils des Brechungsindex  $n_2$ , der Länge des Kerr-Mediums  $d$  und der Intensität des Schaltpulses  $I_S$ . Sie nimmt jedoch antiproportional quadratisch mit steigender Wellenlänge  $\lambda_{Fl}$  des geschalteten spektralen Anteils des Fluoreszenzlichts ab. Die Abhängigkeit vom nichtlinearen Anteil des Brechungsindex  $n_2$  lässt darauf schließen, dass Materialien mit einem hohen Wert für  $n_2$  eine gute Wahl darstellen. Das Problem ist dabei die einhergehende starke Dispersion im sichtbaren Spektralbereich, welche die Zeitauflösung wiederum verringert. Dies gilt natürlich auch für die Länge des verwendeten Kerr-Mediums, wodurch vor allem dünne Kerr-Medien verwendet werden, um eine starke Dispersion zu vermeiden.

Je höher die Schalteffizienz, desto besser ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Zusätzlich ist ein geringes Untergrundsignal, das hauptsächlich durch Streuung am Kerr-Medium entsteht, sehr wichtig.

## 4.2 Praktische Umsetzung des Kerr-Schalters

Der Kerr-Schalter wurde anfänglich in Kooperation mit Dr. Nina Gildenhoff<sup>1</sup> aufgebaut. Er basiert auf einem Aufbau aus München, welcher von Dr. Bernhard Schmidt<sup>[8,183]</sup> und Dr. Björn Heinz<sup>[184]</sup> konstruiert wurde.

In Zusammenarbeit mit Dr. Nina Gildenhoff konnten erste Charakterisierungsschritte am Kerr-Schalter durchgeführt werden. Zum damaligen Zeitpunkt konnten jedoch nur Kreuzkorrelationen vom Schalt- und Anregungspuls gemessen werden<sup>[185]</sup>.

<sup>1</sup>Ehemals: Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main, Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt am Main, Deutschland.

### 4.2.1 Tsunami-Spitfire-Lasersystem

Der Kerr-Schalter nutzt die Laserpulse eines Tsunami-Spitfire-Lasersystems<sup>[102,188–190]</sup> von Spectra-Physics<sup>2</sup> (Abb. 20). Das Lasersystem besteht aus vier Teilkomponenten: zwei Pumpquellen (Millennia und Empower), einem Oszillator (Tsunami) und einem regenerativen Verstärker (Spitfire Pro F).

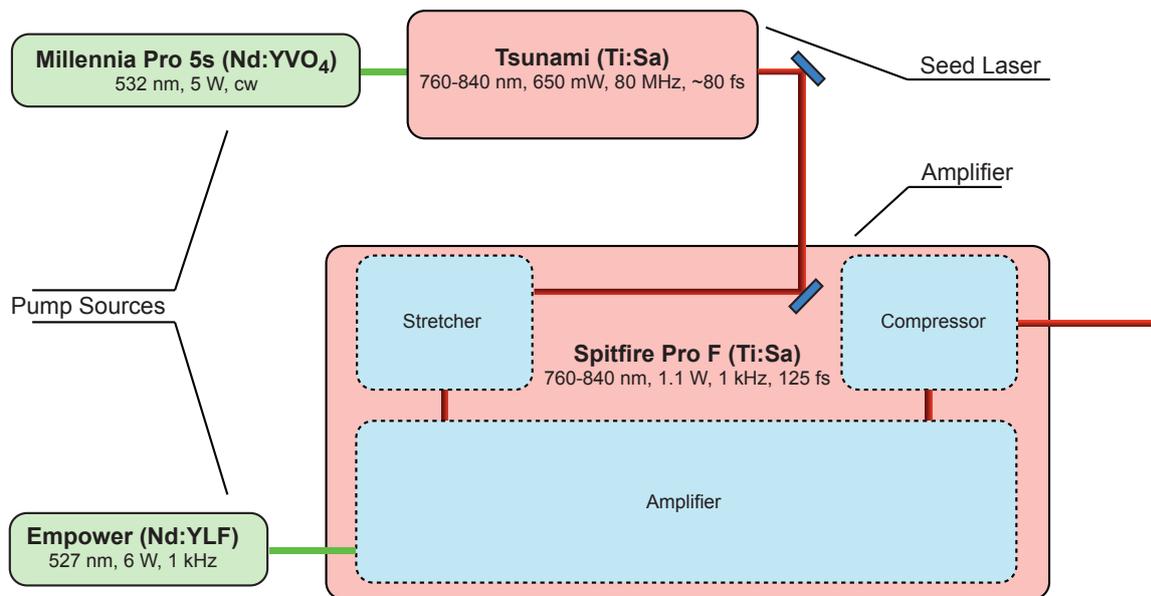


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Tsunami-Spitfire-Lasersystems. Alle angegebenen Werte sind nur ungefähre Richtwerte, die abhängig von Umgebungsparametern, Einstellungen und Laufdauer des Systems sind.

Der Millennium-Pumplaser besitzt einen Nd:YVO<sub>4</sub>-Kristall als Lasermedium, der selbst von einem Diodenlaser gepumpt wird und kontinuierlich bei 532 nm mit  $\approx 5$  W emittiert. Der Millennium pumpt wiederum den Oszillator (Tsunami), der einen Ti:Sa-Kristall als Lasermedium besitzt und mit Hilfe von passiver Modenkopplung bei gleichzeitiger Kompensation der GVD gepulst betrieben wird. Er emittiert dabei mit einer Wiederholrate von  $\approx 80$  MHz. Die erzeugte Zentralwellenlänge der Pulse kann mit Hilfe eines integrierten Prismenkompressors und eines dort eingebauten Spalts zwischen 760 nm und 840 nm eingestellt werden. Dabei weist das Gaußprofil der emittierten Wellenlänge eine Halbwertsbreite (engl. **full width at half maximum**, FWHM) von 10-12 nm und eine Pulsdauer von  $\approx 80$  fs auf. Die spektrale Breite lässt sich über die Spaltbreite verändern, ein zu weit geöffneter Spalt führt allerdings zu einer Instabilität in der Pulsdauer. Die so erzeugten Pulse besitzen eine Energie von  $\approx 8$  nJ und werden als Seedpulse für die Verstärkung im Spitfire Pro F durch die CPA-Methode genutzt. Dazu werden sie zuerst in einem Stretcher zeitlich gedehnt, um eine Beschädigung der Optiken zu vermeiden, die aufgrund von der hohen erreichbaren Energiedichte pro Puls bei der Verstärkung auftreten würde. Nachfolgend werden die Pulse in einem optisch gepumpten Ti:Sa-Kristall verstärkt und zuletzt abermals zeitlich komprimiert, um ultrakurze Pulse mit einer hohen Energiedichte zu erhalten. Optisch gepumpt wird der Ti:Sa-Kristall dabei durch

<sup>2</sup><http://www.spectra-physics.com>: Seit 2004 zugehörig zur Newport Corporation. Stand: 08-2014

den Empower Laser, der letzten verwendeten Teilkomponente. Dieser stellt einen gütegeschalteten gepulsten Laser mit einem Nd:YLF-Kristall als Lasermedium dar. Er erzeugt Pulse bei 527 nm mit einer Wiederholrate von 1 kHz und einer Leistung von 10 W ( $\approx 10$  mJ). Die Wiederholrate des Empower triggert dabei die Einkopplung der Seedpulse und die Auskopplung der Pulse der verstärkten Laserfundamentale mit Hilfe von Pockelszellen. Das Lasersystem ist dadurch in der Lage, Pulse mit einer Zentralwellenlänge im Bereich von 760-840 nm bei einer Wiederholrate von 1 kHz, einer Energie von ca. 1,1 mJ und einer Dauer von ca. 130 fs zu erzeugen. Hiervon werden  $\approx 60$  % für den Betrieb des Kerr-Schalters verwendet.

#### 4.2.2 Experimentelle Umsetzung des Kerr-Schalters

Abbildung 21 zeigt eine schematische Darstellung des Kerr-Schalter-Aufbaus. Zunächst wird die Laserfundamentale in zwei Teilstrahlen aufgeteilt.

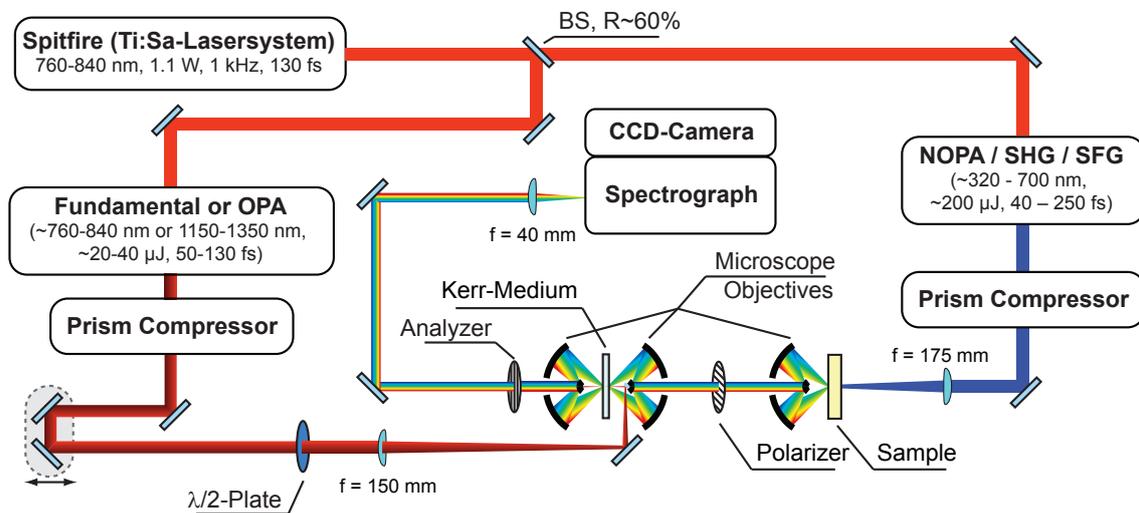


Abbildung 21: Schematische Darstellung der experimentellen Realisierung des Kerr-Schalter-Aufbaus.

Der erste, größere Anteil ( $\approx 60$  %) wird auf  $\approx 280$   $\mu\text{J}$ /Puls abgeschwächt. Er wird genutzt, um den zweistufigen OPA (Kap. 3.3.3) zu betreiben, oder wird direkt ohne Wellenlängenkonversion auf der gleichen Strecke weitergeleitet. Die Pulse im Spektralbereich von 760-840 nm (Laserfundamentale) oder von  $\approx 1150$ -1350 nm (OPA) dienen als Schaltimpuls. Der Schaltimpuls wird anschließend über eine elektronisch ansteuerbare Verzögerungsstrecke (Physik Instrumente, Modell M-531.DD, minimale Schrittgröße  $\Delta x_{\text{min}} = 0.1$   $\mu\text{m}$ ) mit einer maximalen Verfahrsstrecke ( $x$ ) von 306 mm gelenkt, was einer Verzögerung von maximal ca. 2 ns entspricht. Nach dem Passieren dieser Verzögerungsstrecke wird der Schaltimpuls in seiner Polarisation, ausgehend von seiner ursprünglichen parallelen<sup>3</sup> bzw. senkrechten<sup>4</sup> Orientierung, mit Hilfe eines für die Wellenlänge entsprechenden handelsüblichen  $\lambda/2$ -Plättchens um  $45^\circ$ , gedreht. Die Wahl, ob der OPA oder die Laserfundamentale genutzt wird, ist dabei abhängig von der zu

<sup>3</sup>Bei Verwendung eines Prismenkompressors zur Pulskomprimierung.

<sup>4</sup>Kein Prismenkompressor verwendet, sondern entsprechende Verzögerungsstrecke.

untersuchenden Probe. Die Vor- und Nachteile der verschiedenen Wellenlängen zum Schalten werden später näher erläutert (Kap. 4.2.5).

Der zweite Teil ( $\approx 40\%$ ,  $\approx 200 \mu\text{J}/\text{Puls}$ ) wird verwendet, um den NOPA (Kap. 3.3.4) zu betreiben. Zusätzlich kann mitunter eine SHG oder THG des Signalpulses, bzw. eine SFG aus Signalpuls des NOPA und der Laserfundamentalen generiert werden (Kap. 3.3.2). Die in ihrer Wellenlänge konvertierten Laserpulse werden als Anregungspulse für die Probe genutzt. Der Anregungspuls wird dabei zuvor über einen Prismenkompressor geleitet, um die zeitliche Auflösung des Experiments zu verbessern.

Die Anregungspulse werden über eine Quarzlinse ( $f = 175 \text{ mm}$ ) sanft auf die zu untersuchende Probe fokussiert. Sie befindet sich in einer Durchflussküvette aus Quarzglas (Hellma Analytics, Typ 130.199-QS) mit einem Lichtweg von  $0,5 \text{ mm}$ . Die Probe wird unter Verwendung einer Mikrozahnringpumpe (HNP Mikrosysteme GmbH, mzz®-2921,  $0,3\text{--}18 \text{ ml}/\text{min}$ ) durch die Küvette gepumpt. Aufgrund des sehr geringen Verdrängungsvolumens der Mikrozahnringpumpe von  $3 \mu\text{l}$  und von Teflonschläuchen mit einem geringen Innendurchmesser von  $0,8 \text{ mm}$  können minimale Probenvolumina von  $\approx 500 \mu\text{l}$  erreicht werden. Eine weitere Verringerung des Probenvolumens durch die Verwendung von Schläuchen mit einem noch geringeren Innendurchmesser stellte sich als nicht möglich dar. Dies führte zu Luftblasen im Durchflussraum der Küvette und dadurch zu erhöhter Streuung.

Die entstehende Fluoreszenz wird über ein Mikroskopobjektiv (Davin Optronics, Modell 5002-000) mit einer numerischen Apertur von  $0,5$  bei einer Fokallänge von  $13,41 \text{ mm}$  und einer Arbeitsdistanz von  $23,3 \text{ mm}$  aufgesammelt und kollimiert (Abb. 22).

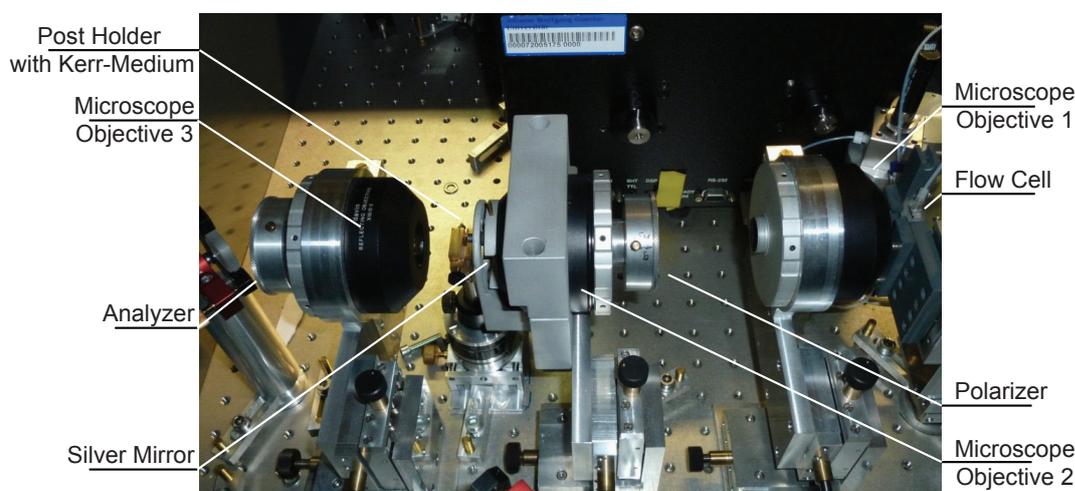


Abbildung 22: Foto des aufgebauten Kerr-Schalter-Teilstücks mit gekennzeichneten Einzelkomponenten.

Die Fluoreszenz passiert anschließend einen Drahtgitterpolarisator auf einem Substrat aus Quarzglas (Moxtek, PFU04C,  $d = 0,7 \text{ mm}$ ,  $\varnothing = 36 \text{ mm}$ , Transmissionswinkel =  $0^\circ$ ) mit einer maximalen Transmission von größer  $82\%$  und einem Kontrast (Transmissionsverhältnis offen zu geschlossen) größer  $1:4000$  im Spektralbereich von  $450\text{--}700 \text{ nm}$ <sup>5</sup>. Erst ein solch hoher Kontrast erlaubt ein ausreichend hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis für die Messung

<sup>5</sup>Informationen entstammen dem Datenblatt für den Polarisator auf der Webpage von Moxtek, <http://www.moxtek.com/optics-product/visible-polarizers>, Stand: 08-2014

von sehr kleinen Signalen. Die parallel polarisierte Fluoreszenz wird über ein zweites Mikroskopobjektiv (ebenfalls Davin Optronics, Modell 5002-000) scharf auf das Kerr-Medium fokussiert. Gleichzeitig wird der Schaltimpuls sanft über eine Quarzlinse ( $f = 150$  mm) fokussiert und über zwei Umlenkspiegel aus Silber so ausgerichtet, dass er kollinear zur Fluoreszenz das Kerr-Medium im Fokus erreicht. Um eine Einkopplung zu ermöglichen, ohne die Fluoreszenz abzuschneiden, wurde ein kleiner Silberspiegel (Photon LaserOptik GmbH,  $d = 1$  mm,  $\varnothing = 4$  mm) sehr nah am zweiten Mikroskopobjektiv in einem Winkel von  $45^\circ$  zu diesem angebracht. Als Kerr-Medium wird Quarzglas (Suprasil, Heraeus,  $d = 1,0$  mm) verwendet. Aufgrund der Verwendung von reflektiven Optiken bis zum Kerr-Medium wird verhindert, dass es zu einer GVD des Fluoreszenzlichts kommt, was die Zeitauflösung herabsetzen würde. Die Fluoreszenz wird nach dem Passieren des Kerr-Mediums von einem dritten Mikroskopobjektiv (ebenfalls Davin Optronics, Modell 5002-000) aufgesammelt und trifft kollimiert auf den Analysator (Moxtek, USA, PFU04C,  $d = 0,7$  mm,  $\varnothing = 36$  mm, Transmissionswinkel  $= 0^\circ$ ), der senkrecht zum ersten Polarisator ausgerichtet ist. Gleichzeitig blockt das dritte Mikroskopobjektiv den Schaltimpuls, indem dieser auf die Rückseite der Spiegelhalterung des kleineren inneren Spiegels trifft.

Nach dem Analysator leiten zwei Silberspiegel die Fluoreszenz weiter auf eine Quarzlinse ( $f = 40$  mm), die eine optimale Ausleuchtung der im Spektrografen (Acton Research, SpektraPro 2358,  $f = 300$  mm) verbauten Optiken ermöglicht. Das Strahlprofil seiner Fluoreszenz wird mit einer 7,5-fachen Vergrößerung des ursprünglichen Strahldurchmessers ( $\approx 10$  mm) von einem Hohlspiegel im Spektrografen kollimiert und lenkt die Fluoreszenz gleichzeitig auf eines der drei verbauten Gitter ( $150$  G/mm,  $68$  mm  $\cdot$   $68$  mm) mit einer jeweiligen Blazewellenlänge ( $\lambda_{Blaze}$ ) für eine optimale Reflektion von entweder  $300$  nm,  $500$  nm oder  $800$  nm (Abb. 23).

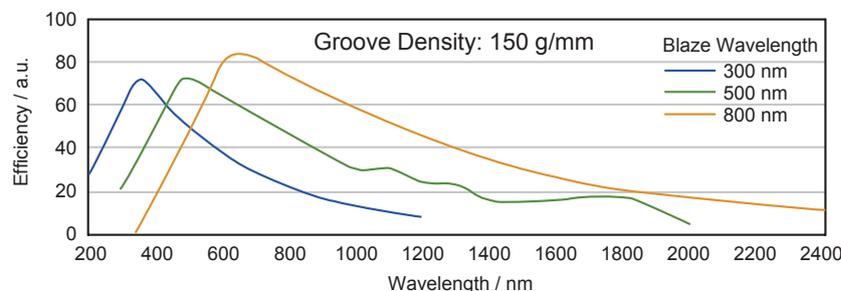


Abbildung 23: Reflektionseigenschaften der drei im Spektrografen (SpektraPro 2358) verbauten Blazegitter.<sup>6</sup>

Die in dieser Arbeit gezeigten Spektren wurden ausschließlich mit dem Gitter aufgenommen, das eine Blazewellenlänge von  $500$  nm aufweist.

Das spektral aufgespaltene Fluoreszenzlicht wird auf einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten und rückseitig belichteten CCD-Chip ( $26,8$  mm  $\cdot$   $8,0$  mm,  $1340$  Pixel  $\cdot$   $400$  Pixel (1 Pixel =  $20$   $\mu$ m  $\cdot$   $20$   $\mu$ m)) der Kamera (Princeton Instruments, Spec-10:400B/LN) detektiert. Der CCD-Chip weist eine Quanteneffizienz größer  $30$  % in einem Bereich von  $200$ - $950$  nm auf und limitiert folglich den Detektionsbereich hin zu hohen Wellenlängen. Das für den flüssigen

<sup>6</sup>Abbildung wurde dem Datenblatt „Acton Series Monochromators and Spectrographs“ entnommen und angepasst. Das Datenblatt mit der Originalabbildung ist zu finden unter <http://www.princetoninstruments.com/Uploads/Princeton/Documents/Datasheets>. Stand: 09-2014.

Stickstoff verwendete Dewargefäß besitzt eine Kapazität von 1,7 l und erlaubt eine Messzeit von über 24 Stunden ohne temperaturabhängige Abweichungen der Detektorempfindlichkeit. Der Beginn der Detektion wird nicht durch den Anregungspuls gestartet, sondern beginnt, nachdem die elektronisch ansteuerbare Verzögerungsstrecke ihre Endposition erreicht hat und diese verifiziert wurde. Eine interne Blende wird im Anschluss daran geöffnet und alle Anregungsereignisse werden während der eingestellten Integrationszeit aufsummiert.

Der hier beschriebene Aufbau ermöglicht zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen mit einer Zeitauflösung von  $\approx 100$  fs in einem Spektralbereich von ca. 350-950 nm. Die untere Grenze des Wellenlängenbereichs ist durch die Kontrasteigenschaften der Polarisatoren gegeben, während die obere Grenze durch die Sensitivität des CCD-Chips festgelegt ist.

### 4.2.3 Das Messprogramm

Eine Anlage wie der Kerr-Schalter bedarf eines komplexen Messprogramms, um die beteiligten elektronischen Komponenten des Messaufbaus (Mikrostelltisch und CCD-Kamera) anzu-steuern, die Daten zu akquirieren und für eine anschließende Auswertung aufzuarbeiten. Das Messprogramm sowie weitere Zusatzprogramme zur Optimierung der Messeinstellungen und des Anlagenaufbaus wurden mit Hilfe von LabVIEW 8.6<sup>7</sup> (National Instruments, München) erstellt. LabVIEW stellt eine Programmiersprache dar, bei der eine graphische Oberfläche zur Erzeugung sogenannter „Virtueller Instrumente“ (VI) dient. Diese „Virtuellen Instrumente“ bestehen aus einer Programmierenebene, dem „Blockdiagramm“ und einer Bedienebene, dem „Frontpanel“ (siehe Abb. 24).

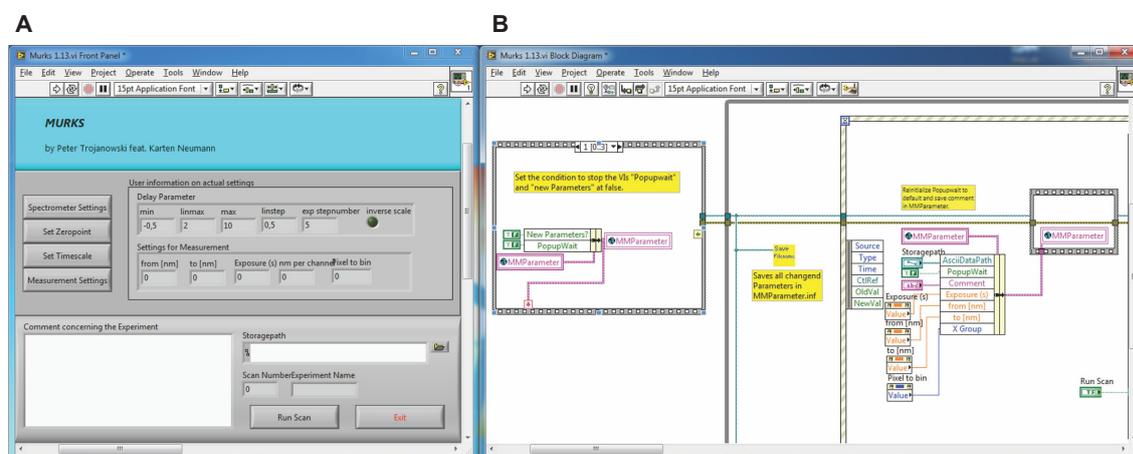


Abbildung 24: Bildschirmabbildung des für den Kerr-Schalter verwendeten Messprogramms (Version 1.12). (A) „Frontpanel“ mit Bedienoberfläche und (B) „Blockdiagramm“ mit einem kleinen Bildausschnitt des Gesamtprogramms.

Auf der Programmierenebene kann der Benutzer die VIs, welche auf einfachen vorgefertigten Unterroutinen oder Rechenoperationen in Form von weiteren VIs basieren, dahingehend programmieren, dass diese komplexe Aufgaben verrichten. Das Messprogramm stellt die oberste Ebene des für den Kerr-Schalter programmierten VIs dar. Je nachdem, welcher Parameter geändert oder ob eine Messung gestartet werden soll, werden zahlreiche Unterroutinen in

<sup>7</sup>LabVIEW 8.6 steht für **L**aboratory **V**irtual **I**nstrumentation **E**ngineering **W**orkbench Version 8.6

Form von weiteren VIs aufgerufen. Typischerweise stellen die meisten Hersteller VIs zusammen mit der Hardware zur Verfügung, zusätzlich zu einem eigenen Programm zur Steuerung des Geräts. Ist dies nicht der Fall, kann mit Windows als Betriebssystem auf die ActiveX-Technologie von Microsoft zurückgegriffen werden, um die benötigte Hardware anzusteuern. Hierbei greift LabVIEW direkt auf die dll (**d**ynamic **l**ink **l**ibrary)-Dateien des mitgelieferten Steuerprogramms zu und nutzt deren Unterrouinen, indem es einen Kommunikationspfad aufruft. Dadurch ist es in der Lage, die bei LabVIEW eingestellten Parameter an die Unterrouinen weiterzuleiten und von diesen dann verarbeiten zu lassen. Infolgedessen lassen sich alle Funktion des mitgelieferten Programms nutzen und neu strukturieren, um an die eigenen Bedürfnisse angepasst zu werden. Da eine komplette Beschreibung des Messprogramms und der programmierten Unterrouinen den Rahmen dieser Arbeit deutlich überschreiten würde, ist in Abbildung 25 ein vereinfachtes Schema der Messprogramm-Version 1.12 mit den wichtigsten Menüpunkten bzw. Unterrouinen und deren grundlegenden Aufgaben dargestellt.

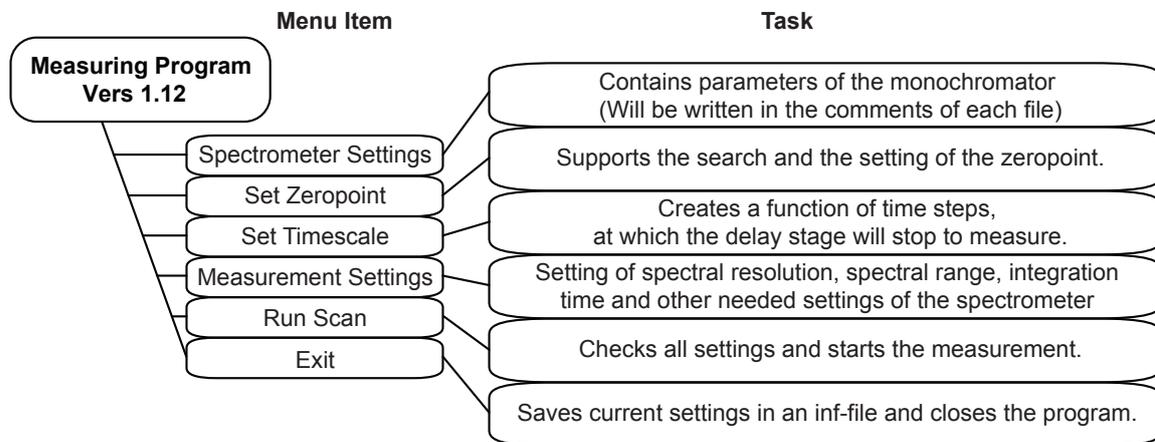


Abbildung 25: Schema des Aufbaus der Version 1.12 des Messprogramms für den Kerr-Schalter und den grundlegenden Aufgaben der Unterrouinen.

Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, besteht das Messprogramm aus sechs Menüunterpunkten: „Spectrometer Settings“, „Set Zeropoint“, „Set Timescale“, „Measurement Settings“, „Run Scan“ und „Exit“. Diese stellen ausführbare Unterrouinen dar. Die Unterrouinen rufen wiederum zum Teil Untermenüs auf (Tab. 2) und erlauben dem Benutzer, in Abhängigkeit vom Menüpunkt den Zeitnullpunkt mit Hilfe der Kreuzkorrelation zwischen Anregungspuls und Schaltspuls zu suchen, die Messeinstellungen vorzunehmen, die Messung zu steuern oder das Programm zu beenden. Die Menüunterpunkte, die in diesen Unterrouinen implementiert sind, die Aufgaben, welche die Unterrouine bzw. die Untermenüs erfüllen und Anmerkungen zu deren Besonderheiten sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Es ist darauf hinzuweisen, dass die Unterrouine „Set Zeropoint“ auf einer von Dr. Karsten Neumann<sup>[191]</sup> programmierten Subroutine basiert.

Bei der Programmierung wurde Wert darauf gelegt, dass die eingegebenen Parameter überprüft und bei falschen Eingaben automatisch korrigiert werden, wobei der Benutzer auf diesen Umstand hingewiesen wird. Diesbezüglich wurden viele weitere Unterrouinen geschrieben, die eine größtmögliche Stabilität des Programms ermöglichen und den Messvorgang erleichtern sollen. Auf diese wird der Übersicht halber nicht weiter eingegangen.

Tabelle 2: Subroutinen der Messprogramm-Version 1.12 und eventuelle Menüpunkte der Subroutinen, Aufgaben und Anmerkungen zu diesen sowie wichtigen Eigenschaften der Subroutinen.

<b>Unterroutine</b>	<b>Menüpunkte</b>	<b>Aufgaben &amp; Anmerkungen</b>
<b>Spectrometer Settings</b>	-	Einstellungen am Monochromator (Wird im Datensatz gespeichert). Derzeit: Nummer des eingestellten Gitters, dessen Blazewellenlänge (Standardmäßig Nr. 2 = 500 nm) und Apertur des Einkoppelspalts.
<b>Set Zeropoint</b>	Current Spectrum	Einstellen des zu messenden spektralen Bereichs für die Suche des Nullpunkts in nm oder Pixel, je nach Einstellung des Systems (ersichtlich bei „Transient Spectrum“).
	Transient Spectrum	Auswahl, ob eine Transiente oder eine Aufsummierung von Transienten über einen gewissen spektralen Bereich angezeigt werden soll.
	Parameter for Time Steps	Eingabe des zu messenden Zeitbereichs für die Suche des Nullpunkts. Zusätzlich ist das manuelle Ansteuern des Mikrostelltisches möglich.
<b>Set Timescale</b>	Delay parameter	Eingabe des zeitlichen Messbereichs. Es findet zuerst eine lineare und anschließend eine logarithmische Änderung der zeitlichen Abstände zwischen den Messpunkten statt.
<b>Measurement Settings</b>	Needed Parameter	Eingabe des spektralen Messbereiches, der Integrationszeit und der spektralen Auflösung.
	Additional Parameter	Erlaubt spezifische CCD Pixel vertikal zu mitteln und das Akkulieren von Spektren.
	Background Settings	Auswahl, ob eine Hintergrundmessung vorgenommen werden soll und an welcher Messposition wie oft gemittelt werden soll.
<b>Run Scan</b>	-	Anzeige des aktuellen Spektrums und die bisherigen Transienten bei einer ausgewählten Wellenlänge. Bietet zusätzlich zwei Stopp-Möglichkeiten: (1) direktes Beenden der Messung oder (2) Beenden der Messungen nach dem derzeit aktuellen Scan.
<b>Exit</b>	-	Beendet das Programm und speichert die globale Variable mit allen aktuellen Messeinstellungen.

#### 4.2.4 Justierung des Kerr-Schalters

Der Kerr-Schalter stellt einen sehr komplexen Aufbau dar. Aus diesem Grund soll nachfolgend eine kurze Zusammenfassung der Justierung des Kerr-Schalters gegeben werden.

Wird eine Teilkomponente des Aufbaus ersetzt oder umgebaut, erfolgt zuerst eine Überprüfung der Polarisations Ebenen von Schalt- und Anregungspuls. Zusätzlich kann die räumliche Anordnung der Mikroskopobjektive mit Hilfe eines stark emittierenden Fluorophors (z.B. Coumarin 153) über die Abbildung des aufgesammelten Fluoreszenzlichts überprüft und nachgestellt werden. Die Haltestege der inneren Spiegel erzeugen dabei einen Schatten in horizontaler und vertikaler Ausrichtung, der als Fadenkreuz genutzt werden kann. Anschließend wird der räumliche sowie zeitliche Überlapp gesucht. Generell wird für die Suche die Streuung des Anregungspulses an einem Streumedium anstelle einer Probe verwendet. Dies hat den Vorteil, dass ein zeitlich sehr kurzes und intensives Signal geschaltet wird, das dadurch auch bei schlechter Justierung auffindbar ist. Für die Suche nach dem räumlichen Überlapp wird eine handelsübliche, sehr dünne Digitalkamera mit einem Sichtschirm aus Papier versehen und dieser in den Fokus des zweiten Mikroskopobjektivs anstelle des Kerr-Mediums gestellt. Das abgebildete Streulicht wird dann mit dem Signal der Fluoreszenz des Papiers aufgrund des intensiven Schaltimpulses überlagert. Das Signal des Schaltimpulses ist hierbei typischerweise um ein Faktor zwei größer im Durchmesser als das des Streulichts. Anschließend wird bei größeren Änderungen der Wegstrecke die Digitalkamera durch eine schnelle Photodiode mit angeschlossenem Oszilloskop ausgetauscht. Dies ermöglicht eine Eingrenzung des Weglängenunterschieds zwischen Schalt- und Anregungspuls.

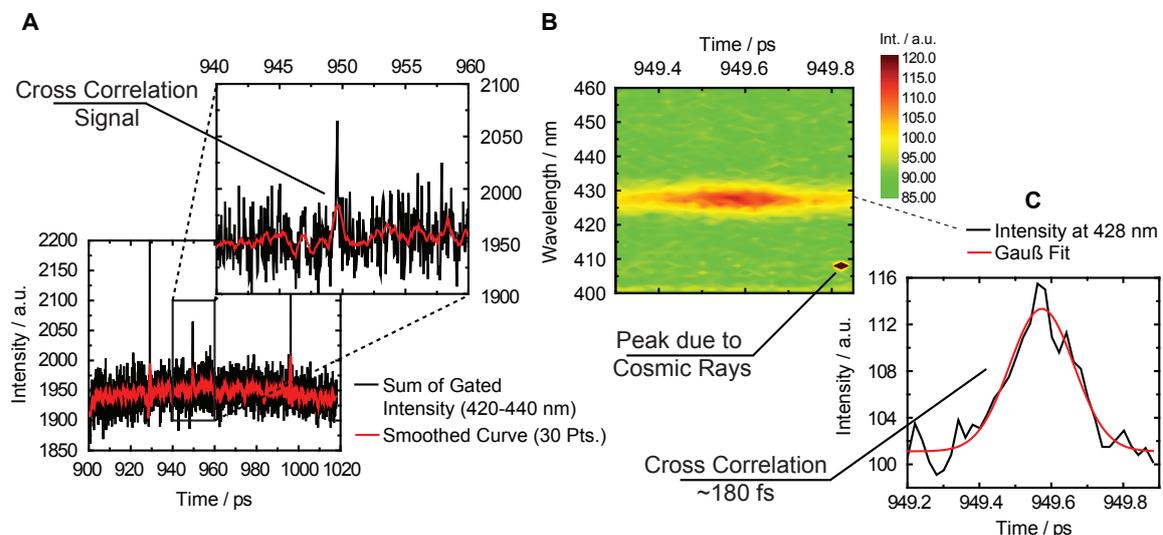


Abbildung 26: Beispiel einer Messung der Kreuzkorrelation im Kerr-Medium zwischen Anregungs- (428 nm, 200 nJ) und Schaltimpuls ( $\approx 1250$  nm, 35  $\mu$ J). (A) Darstellung als Summe der Intensitäten in einem Spektralbereich der SHG von 420-440 nm mit Zoom in den zeitlichen Bereich des tatsächlichen Kreuzkorrelationssignals. (B) 2D-Auftragung der Intensitätsverteilung im Zeitbereich des Signals und (C) eine Transiente bei 428 nm mit einer gaußförmigen Anpassungsfunktion mit einem Wert von 180 fs für die Kreuzkorrelation.

Bevor der Punkt der zeitlichen Überlagerung näher bestimmt werden kann, muss der Analysator entsprechend einer maximalen Auslöschung der Streuung ausgerichtet werden. Bei

zu großen Hintergrundsignalen kann das Messsignal ansonsten im Rauschen untergehen. An dieser Stelle kann gegebenenfalls die Einkopplung in den Spektrografen überprüft und nachjustiert werden. Für die Feinjustierung der zeitlichen Überlagerung wird das Kreuzkorrelationssignal der beiden Pulse gesucht (Abb. 26)<sup>[185]</sup>. Das Messsignal ist bei nicht gut justiertem Aufbau zum Teil sehr schwer zu entdecken (Abb. 26, A) und dient dann als Orientierungspunkt für eine manuelle Suche. Meistens sind steile, starke Signalanstiege aufgrund von kosmischer Strahlung zu beobachten, die bei einer Aufsummierung der Intensitäten über einen gewissen Spektralbereich zu Störsignalen führen (Abb. 26, B). Bei Verwendung der SHG als Anregungspuls wurden typischerweise Kreuzkorrelationen mit Dauern um 200 fs gemessen (Abb. 26, C). Unter Verwendung eines komprimierten Anregungspulses im sichtbaren Wellenlängenbereich und einem komprimierten Schaltpulse aus dem OPA wurden auch Werte im Bereich von 80 fs für die Kreuzkorrelation gemessen. Ist der Überlapp gefunden, wird die Polarisationsebene des Schaltpulse auf das maximale Signal der Kreuzkorrelation optimiert und die Einkopplung in den Spektrografen nachjustiert. Der Kerr-Schalter zeigte eine typische Schalteffizienz von  $\approx 4-10\%$  auf, in Abhängigkeit der Wellenlänge und Intensität des Schaltpulse.

#### 4.2.5 Wahl der Schaltwellenlänge

Eine Schaltwellenlänge von 1250 nm sollte einen starken Streuuntergrund in den Messungen verhindern, da die Quanteneffizienz der verwendeten CCD-Kamera ab 1100 nm  $< 2,5\%$  ist<sup>[183–185]</sup>. Testmessungen mit N,N-Dimethyl-para-nitroanilin (DMPNA) (Kap. 4.2.7) zeigten schnell, dass diese Schaltwellenlänge Vor- und Nachteile aufweist (Abb. 27).

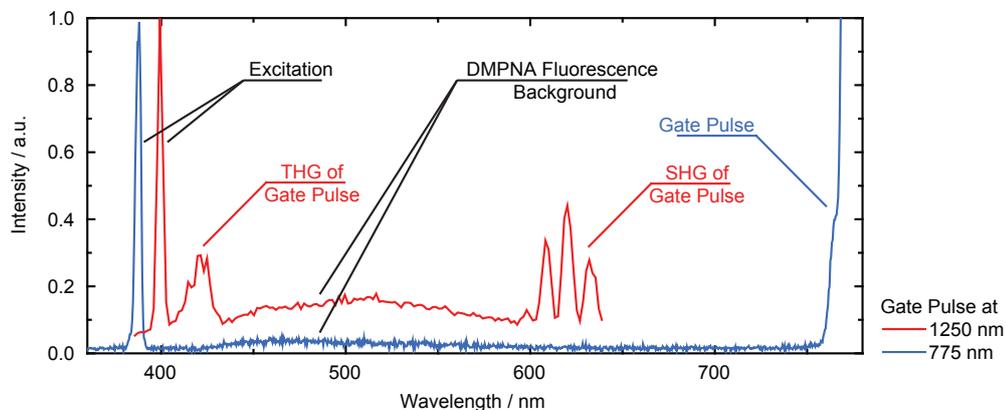


Abbildung 27: Vergleich des Intensitätsverlaufs von Kerr-Schalter-Spektren unter Verwendung eines Schaltpulse bei einer Wellenlänge von 1250 nm ( $\approx 29\ \mu\text{J}$ ) bzw. 775 nm ( $\approx 32\ \mu\text{J}$ ) für DMPNA vor dem zeitlichen Überlapp (normiert auf das Signal des Anregungspulses). Das Fluoreszenzuntergrundsignal von DMPNA und die Signale variieren aufgrund der Spaltbreite des Spektrografen, der Integrationszeit und der unterschiedlichen verwendeten Polarisatoren.

Der Nachteil eines Schaltpulse mit einer Wellenlänge von 1250 nm ist, dass es im Spektralbereich um 417 nm zur THG und im Spektralbereich um 625 nm zur SHG des Schaltpulse im Kerr-Medium kommt. Diese Signale können durch die Wahl einer geeigneten Stelle im Kerr-Medium ohne Störstellen reduziert, aber nicht vollständig beseitigt werden. Dadurch fallen bei sehr geringen Schaltsignalen diese beiden Spektralbereiche für eine Messung weg.

Im Gegenzug ist die Verwendung der Laserfundamentalen (760-840 nm) möglich. Sie lässt sich deutlich einfacher handhaben, da keine Wellenlängenkonversion erforderlich ist. Als Nachteil der Verwendung der Laserfundamentalen erweist sich aber der Verlust des Spektralbereichs um deren Zentralwellenlänge aus den selben Gründen wie für niederenergetische Schaltpulse. Das Signal ist sehr intensiv und führt bei einem weit geöffneten Spalt zu einem sehr starken Untergrundsignal, das gegebenenfalls durch Filter unterdrückt werden muss.

Wegen der oben genannten möglichen Störsignale sollte die Schaltwellenlänge entsprechend der Emissionseigenschaften und dem zu untersuchenden Spektralbereich gewählt werden.

#### 4.2.6 Korrekturkurve der spektralen Empfindlichkeit des Kerr-Schalters

Die von dem Mikroskopobjektiv aufgesammelte Fluoreszenz wird über bzw. durch verschiedene optische Elemente geleitet, welche unterschiedliche spektrale Eigenschaften der Reflektivität, Empfindlichkeit bzw. Absorption besitzen. Vor allem die Blazegitter des Spektrografen und die Empfindlichkeit des Detektors tragen dadurch zu einer Verzerrung des spektralen Intensitätsverlaufs bei. Diese Verzerrung lässt sich im einfachsten Fall durch das Ermitteln einer Korrekturkurve für den Detektorzweig ausgleichen (vgl. Kap. 3.1). Eine erste Korrekturkurve bei geschlossenem Kerr-Schalter (Polarisatoren (Moxtek, PFU04C) gekreuzt zueinander) wurde mit Hilfe einer Glühlampe (LOT-Oriel, Modell 63358,  $P = 6,50$  W,  $U = 7,30$  V), welche einem schwarzen Strahler nahekommt und einer entsprechend zugehörigen Kalibrierkurve des Herstellers, bestimmt (Abb. 28).

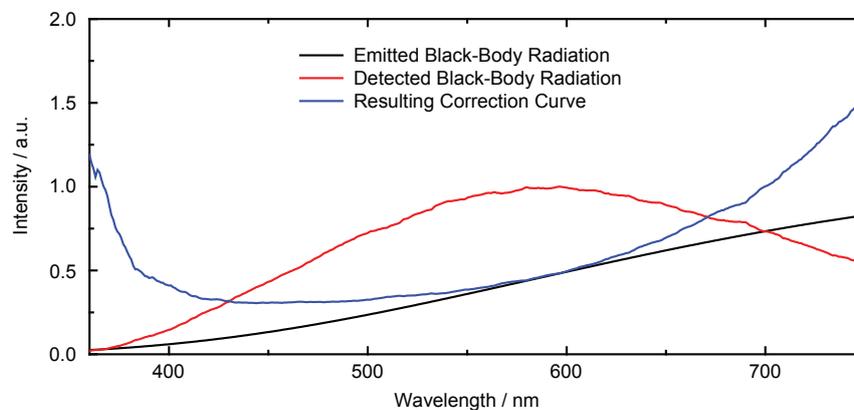


Abbildung 28: Spektrale Korrekturkurve (blau) für den Kerr-Schalter unter Verwendung von Gitter Nr. 2 ( $\lambda_{Blaze} = 500$  nm), erstellt mit Hilfe einer Kalibrierkurve des Herstellers für einen schwarzen Strahler (schwarz) und dessen detektiertes Spektrum (rot) bei gekreuzten Polarisatoren.

Im Fall des Kerr-Schalters kommt eine weitere Komponente für die Korrektur hinzu, die wellenlängenabhängige Schalteffizienz (Gl. (4.3)). Schmidt et al. <sup>[8,183]</sup> zeigten dabei, dass der nichtlineare Brechungsindex vernachlässigt werden kann und infolgedessen eine Multiplikation der Spektren mit  $\lambda^2$  zu einem Ausgleich des Einflusses der Schalteffizienz für den spektralen Verlauf des zeitlich integrierten Spektrums führt.

## 4.2.7 Messung von N,N-Dimethyl-para-nitroanilin

Zur Charakterisierung des Kerr-Schalters und nachfolgend zur Einstellung des Aufbaus wurde N,N-Dimethyl-para-nitroanilin (DMPNA) als Fluorophor ausgewählt (Abb. 29).

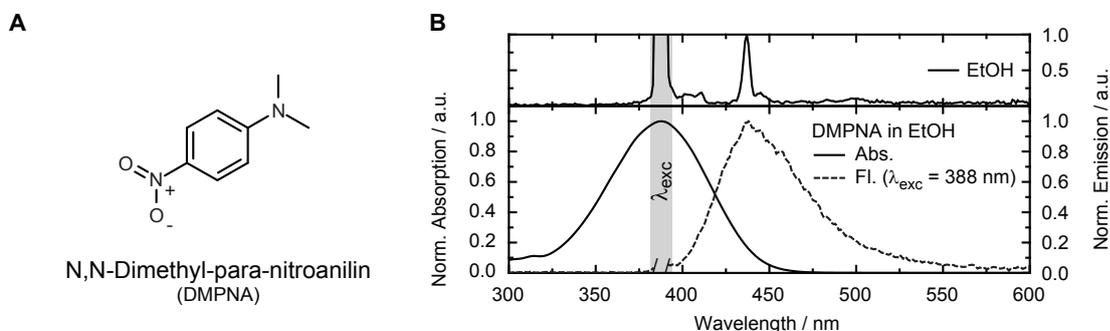


Abbildung 29: (A) Strukturformel und (B) stationäre Spektren von N,N-Dimethyl-para-nitroanilin in Ethanol (unten) sowie ein Emissionsspektrum von reinem Ethanol (oben).

DMPNA löst sich sehr gut in protischen sowie aprotischen Lösungsmitteln und ist photostabil. Es besitzt eine breite unstrukturierte Absorptionsbande im Spektralbereich von  $\approx 325\text{-}450\text{ nm}$  ( $\lambda_{max} = 388\text{ nm}$ ), was eine Anregung unter Verwendung der SHG im Fall des Kerr-Schalters erlaubt, und fluoresziert sehr schwach zwischen  $\approx 400\text{-}550\text{ nm}$ , wobei das Intensitätsmaximum der Fluoreszenz bei  $\approx 440\text{ nm}$  liegt. Die spektrale Lage des Emissionsbereichs erlaubt es, sowohl den Laser direkt als auch den OPA als Quelle für den Schaltimpuls zu nutzen.

Der Farbstoff wurde bereits kurzzeitspektroskopisch mittels transienter Absorption untersucht<sup>[192,193]</sup> und weist eine komplexe Dynamik der Kühlprozesse in Abhängigkeit des Lösungsmittels auf<sup>[192]</sup>. Ermittelt wurde, dass ein Ladungstransfer innerhalb von 80 fs stattfindet, der eine Drehung um die -NO<sub>2</sub>-Bindung einschließt und sich in Form einer Stokesverschiebung zeigt. Auf diesen Ladungstransfer folgt die IC aus dem ersten angeregten Zustand in einen heißen Grundzustand ( $S_1 \rightarrow S_0^*$ ) mit einer Zeitkonstante von 0.76 ps und ein Abkühlen des heißen Grundzustands durch Energieabgabe an die Lösungsmittelhülle im Pikosekundenbereich ( $S_0^* \rightarrow S_0$ ). Da im Kerr-Schalter nur die Fluoreszenz betrachtet werden kann, sind nur die ersten beiden Zeitkonstanten von Relevanz.

Abbildung 30 zeigt die Messung einer Lösung von hochkonzentriertem DMPNA in Ethanol als Lösungsmittel. Eindeutig zu sehen ist der Verlust der Fluoreszenzintensität unterhalb von  $\approx 425\text{ nm}$  aufgrund der verwendeten Filter (Schott, GG400 und BG38,  $d = 3\text{ mm}$ ) und der durch die hohe Probenkonzentration bedingten Reabsorption. Außerdem ist in den Transienten mit steigender Wellenlänge ein zunehmend früherer Beginn der Fluoreszenz ersichtlich. Dies entspricht einem positiven Chirp aufgrund der passierten Optiken zwischen Entstehungsort der Fluoreszenz und dem Ort der Schaltung. Die Fluoreszenz scheint in einem Zeitbereich von einigen wenigen hundert Femtosekunden abzuklingen.

Eine detailliertere Analyse war jedoch erst nach folgenden Korrekturen möglich: Zunächst wurden einige spektrale Korrekturen durchgeführt, um den korrekten spektralen Verlauf des Spektrums zu erhalten. Die spektralen Eigenschaften des Detektorzweiges wurden berücksichtigt, indem die einzelnen Spektren bei jedem Messpunkt ( $\Delta t = 0,1\text{ ps}$ ) mit der Korrekturkurve multipliziert wurden (Kap. 4.2.6).

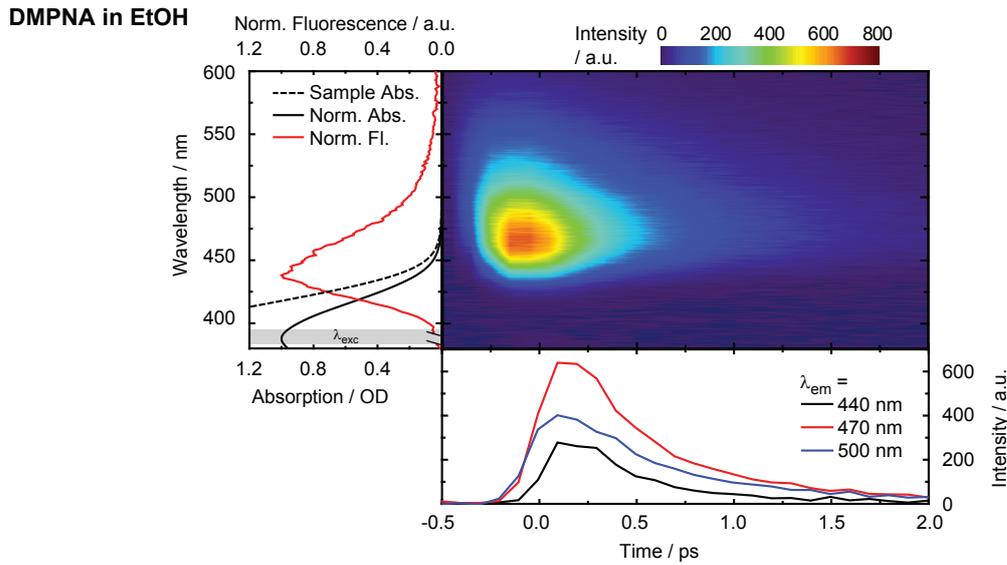


Abbildung 30: Rohdaten einer Kerr-Schalter-Messung von DMPNA in Ethanol mit einer zeitlichen Schrittgröße von 0,1 ps. Stationäres Absorptions- und Fluoreszenzspektrum einer 1 zu 50 verdünnten gesättigten DMPNA-Stammlösung und ein den Küvetten-eigenschaften (Lichtweg = 0,5 mm) entsprechend skaliertes Absorptionsspektrum mit einer OD von  $\approx 2$  bei  $\lambda_{exc} = 388$  nm (links). Unkorrigierte Konturauftragung der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung aus dem Kerr-Schalter (rechts oben) und Transienten bei verschiedenen Emissionswellenlängen (rechts unten). Verwendet wurden PFU04C-Polarisatoren, 1 mm Suprasil Quarzglas als Kerr-Medium, Schaltpulse (20  $\mu$ J) mit einer Wellenlänge von 775 nm und ein GG400-Filter (Schott,  $d = 3$  mm,  $T > 50$  % über 395 nm) und BG38-Filter (Schott,  $d = 3$  mm,  $T > 50$  % zwischen 335-600 nm) nach dem Analysator.

Anschließend wurden die Spektren, wie in Kapitel 3.1 (Gl. (3.4)) beschrieben, einer Reabsorptionskorrektur unterzogen. Da die OD der Probe sehr hoch ist, verschwindet das Fluoreszenzsignal unterhalb von 425 nm vollständig, wodurch es zu einer Verstärkung des reinen Messrauschens unterhalb dieser Wellenlänge kommt. Die Wellenlängenabhängigkeit der Schalteffizienz wurde durch die Multiplikation der Intensität in den Spektren mit den  $\lambda^2$ -Werten berücksichtigt (Kap. 4.2.6). Als nächstes wurde der Einfluss der Gruppengeschwindigkeitsdispersion ( $GVD = d/v_g$ ) korrigiert. Dazu wurde als Erstes die Gruppengeschwindigkeit ( $v_g$ , Gl. (2.27)) der einzelnen Wellenlängen in Quarzglas bestimmt. Der benötigte Brechungsindex für die jeweilige Wellenlänge wurde über die Sellmeiergleichung (Kap. 3.4, Gl. (3.8)) berechnet und die erste Ableitung nach der Wellenlänge für die Berechnung der Gruppengeschwindigkeit gebildet. Für die Bestimmung der Verzögerungszeit zwischen dem Ort der Entstehung der Fluoreszenz und dem Kerr-Medium wurde ein Glasweg ( $d$ ) von 2,7 mm angenommen. Dieser setzt sich aus den folgenden Anteilen zusammen: (1) dem Weg des Lichts durch die Hälfte der Probe (0,25 mm) unter der Annahme, dass die Fluoreszenz aus der Küvettenmitte aufgesammelt wird, (2) der Dicke der Küvettenrückwand (1,25 mm), (3) der Dicke des Polarisators (0,7 mm) und (4) der Hälfte des Weges durch das Kerr-Medium (0,5 mm), wenn von einem Schaltprozess inmitten des Kerr-Mediums ausgegangen wird.

Das Maximum des Signals des Anregungsstreulichts wurde als Nullpunkt definiert und die Transienten der anderen Wellenlängen entsprechend zeitlich verschoben.

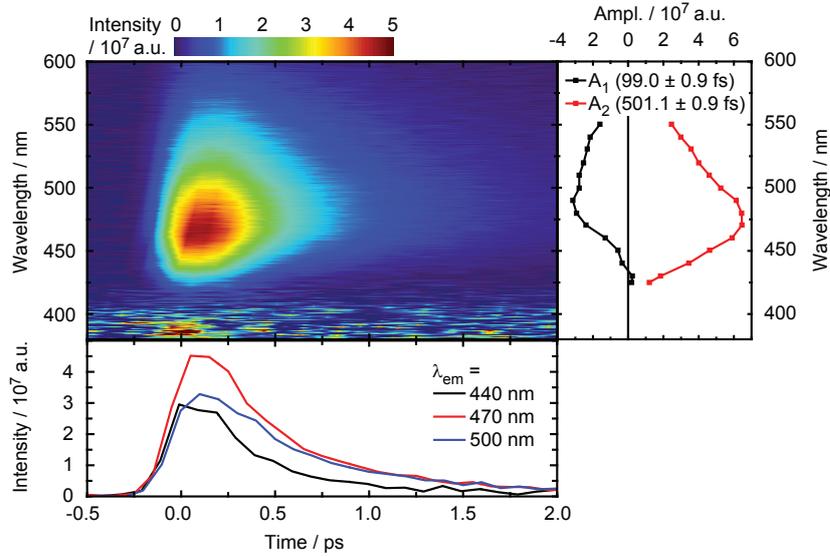
**DMPNA in EtOH  
(Corrected)**


Abbildung 31: Spektral und zeitlich korrigierte Daten der zuvor gezeigten Kerr-Schalter-Messung von DMPNA in Ethanol. Korrigierte Konturauftragung (links oben), zugehörige Transienten bei verschiedenen Emissionswellenlängen (links unten) und zerfallsassoziierte Amplituden einer globalen Anpassungsfunktion (rechts oben).

Die Konturauftragung des korrigierten Spektrums (Abb. 31) zeigt unterhalb von 425 nm das durch die Reabsorptionskorrektur verstärkte Rauschen, welches den spektralen Bereich unterhalb dieser Wellenlänge für die Auswertung der Fluoreszenz unbrauchbar macht. Gleichzeitig wird aber nun die Lage des Streulichts der Anregung sichtbar und somit den zeitlichen Nullpunkt der Messung zeigt. Anhand der Transienten ist zu erkennen, dass die rechnerische Abschätzung der GVD ein gutes Ergebnis liefert, da der initiale Signalanstieg zum gleichen Zeitpunkt stattfindet. Gleichzeitig ist zu sehen, dass das Intensitätsmaximum der Transienten mit steigender Wellenlänge zunehmend später auftritt. Dies deutet auf eine dynamische Stokesverschiebung hin. Dieses Phänomen wurde mit Hilfe einer globalen Anpassungsfunktion näher untersucht (Gl. (4.4)):

$$I(t) = I_o + \sum_{i=1}^n A_i e^{-\left(\frac{t-t_o}{t_i}\right)} \quad (4.4)$$

Angepasst wurde diese an Transienten mit einem zeitlichen Abstand der Messpunkte von 100 fs im Bereich von 430-550 nm und einem Abstand von ca. 10 nm im Zeitbereich von 0-2 ps. Da das Spektrum untergrundkorrigiert wurde, ist die Grundintensität der Emission  $I_o$  gleich Null gesetzt worden. Die Überlegung, dass das Maximum des Anregungspulses den Zeitnullpunkt definiert, führt zum Festsetzen des Zeitnullpunkts der Messung  $t_o$  auf Null. Es zeigte sich, dass zwei Zeitkonstanten benötigt werden, um die Dynamik zu beschreiben. Eine sehr schnelle Kinetik mit  $99,0 \pm 0,9$  fs im Bereich der Zeitauflösung und eine etwas langsamere Kinetik mit  $501,1 \pm 0,9$  fs. Aufgrund der geringen Schrittgröße zwischen den einzelnen Messpunkten sind die Ergebnisse für die schnelle Kinetik jedoch mit Vorsicht zu betrachten, werden hier aber diskutiert. Der Verlauf des zerfallsassoziierten Amplitudenspektrums der ersten Zeitkonstante zeigt kleine positive Beiträge im kurzwelligen Wellenlängenbereich

der Fluoreszenz und fällt mit steigender Wellenlänge deutlich ins Negative ab. Dieses Verhalten ist typisch für eine Stokesverschiebung, bei der die energetisch niedriger liegenden vibronischen Zustände nach und nach aus höheren bevölkert werden und folglich leicht zeitlich verzögert ihre maximale Bevölkerung erreichen. Kovalenko *et al.*<sup>[192]</sup> beobachteten einen Ladungstransfer in Form einer Drehung um die  $-\text{NO}_2$ -Bindung, was zu einem ähnlichen spektralen Verhalten wie die hier beobachtete Verschiebung führte. Die Ladungstransferzeit von 80 fs ist unter Berücksichtigung des zeitlichen Abstands der Messpunkte vergleichbar mit den hier ermittelten 99 fs. Die zweite Zeitkonstante hat Beiträge im zerfallsassoziierten Amplitudenspektrum über den gesamten Spektralbereich der gemessenen Fluoreszenz und ist eindeutig mit der Entvölkerung des emittierenden  $S_1$ -Zustands und folglich der von Kovalenko *et al.* beobachteten IC zu assoziieren. Der hier ermittelte Wert von  $\approx 500$  fs weicht auch hier in einem vertretbaren Bereich von dem von Kovalenko *et al.* gefundenen Wert von 760 fs ab. Gründe für diese Abweichung könnten die starke Polaritätsabhängigkeit der Deaktivierungsprozesse und Unterschiede im Wasseranteil des verwendeten Ethanol im Vergleich zu den Messungen von Kovalenko *et al.* sein.

Diese Messung zeigt die Einsatzfähigkeit des hier konstruierten Kerr-Schalter-Aufbaus und die Notwendigkeit der spektralen Korrekturen wie auch die Plausibilität einer rechnerischen Abschätzung der GVD mit Hilfe des hier beschriebenen Verfahrens.

#### 4.2.8 Messungen an Proteorhodopsin

Mit Hilfe des hier gezeigten Kerr-Schalters sollte grün absorbierendes Proteorhodopsin, im Folgenden nur als Proteorhodopsin (PR) bezeichnet, untersucht werden<sup>[191,194–196]</sup>. Es handelt sich um ein Retinalprotein von marinen Proteobakterien, das als lichtgetriebene Protonenpumpe fungiert, wobei die Richtung des vektoriellen Protonentransports eine Umkehrung bei einem pH-Wert von  $\approx 7$  erfährt. Ausgangspunkt des Transportprozesses ist ein Retinalchromophor, das bei Absorption eines Photons eine Isomerisierung von *all-trans* nach *13-cis* vollführt (Abb. 32). Über eine Serie von Photoprodukten, die durch weitere thermisch getriebene Reaktionen gebildet werden, kehrt PR in einem Photozyklus typischerweise wieder zum Grundzustand mit dem *all-trans* Chromophor zurück.

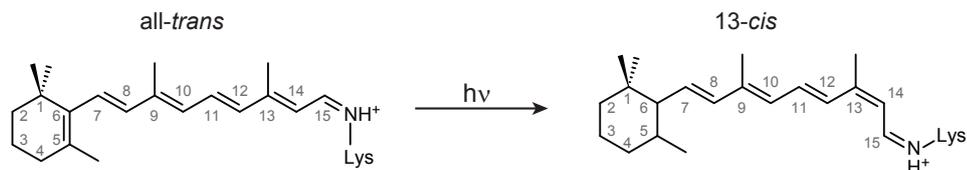


Abbildung 32: All-*trans* und 13-*cis* Retinalchromophor.

Dieser Reaktionszyklus bewegt sich im Bereich von ca. 50 ms und beinhaltet einen Deprotonierungsschritt, bei dem die kovalent an das Retinal gebundene Schiffbase (Lysin 231, K231) infolge der Isomerisierung ihr Proton abgibt. Untersuchungen zeigten, dass mit steigendem pH-Wert ein kleiner Teil der Schiffbase bereits deprotoniert vorliegt. Erkennlich wird dies durch die Zunahme der Absorption um 360 nm ( $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang) und bei Anregung dieser Absorptionsbande durch das Erscheinen einer Fluoreszenzbande um 600 nm, die unter sauren

Bedingungen nicht beobachtet wird<sup>[194]</sup> (Abb. 33)<sup>8</sup>.

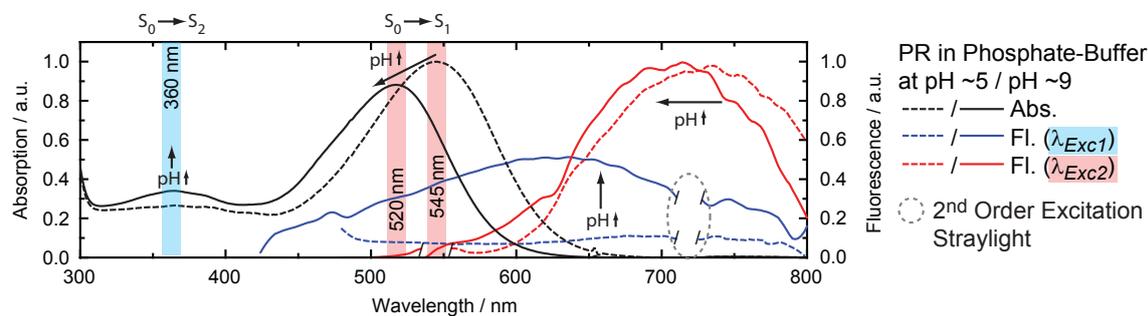


Abbildung 33: Stationäre Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Proteorhodopsin in Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von  $\approx 5$  bzw.  $\approx 9$ . Die Fluoreszenzspektren wurden wegen ihres geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses mit einem Savitzky-Golay-Filter geglättet, um ein besseres Bild des spektralen Verlaufs zu erhalten. Für die Anpassung wurde ein Polynom zweiter Ordnung mit einen Anpassungsbereich von 10 Messpunkten genutzt.

Da bekannt ist, dass bei einigen Rhodopsinen auch die deprotonierte Schiffbase am Reaktionszyklus teilnimmt<sup>[197]</sup> und keine deutlichen Änderungen des Reaktionszyklus identifiziert werden konnten, rückte die Rolle der deprotonierten Schiffbase ins Interesse der Forschung. Es soll die Frage beantwortet werden, ob die deprotonierte Schiffbase auch im Fall von PR einen eignen Reaktionszyklus hat oder der Teil mit deprotonierter Schiffbase einem alternativen Deaktivierungspfad folgt und nicht in den Reaktionszyklus eingreift. Die Vielzahl der verschiedenen sich überlagernden Signale in der transienten Absorption und die kurze Lebensdauer des ersten angeregten Zustands legt die Verwendung des Kerr-Schalters nahe, um zusätzliche Informationen über die schnellen photophysikalischen Prozesse zu gewinnen. Eine Studie an Bacteriorhodopsin von Schmidt *et al.* zeigt, dass diese Art von Probe sich für eine Untersuchung mit dem Kerr-Schalter eignet<sup>[198]</sup>.

In Abbildung 34 ist das gemessene Kerr-Schalter-Spektrum von Proteorhodopsin in Puffer gezeigt, das eine FQA im Bereich von  $2,6 \cdot 10^{-4}$  besitzt<sup>[199]</sup>. Dies zeigt, dass der Kerr-Schalter Messungen der Fluoreszenz an Proben mit solch geringen FQA ermöglicht.

Für die Auswertung der Daten wurden als erstes Signalspitzen aufgrund kosmischer Strahlung entfernt. Dazu wird eine Verteilungsfunktion der Intensitätswerte aller Transienten bei einem spezifischen Zeitpunkt erstellt und Werte, die den Grenzbereich zwischen einem 25 %- und 75 %-Quantil verlassen, bei der Mittelung der Messdaten durch einen Wert aus dem ermittelten Bereich ersetzt, der zuvor mit einer zufälligen Zahl multipliziert wird. Anschließend wurden die bei der Messung an DMPNA (Kap. 4.2.7) bereits gezeigten spektralen Korrekturen und die Korrektur der GVD vorgenommen. Als zeitlicher Nullpunkt wurde wieder das geschaltete Streulicht der Anregung genutzt. Die starke Reabsorption der Probe führt wie bei der Messung an DMPNA zu einer deutlichen Abweichung von dem stationären Fluoreszenzspektrum (Abb. 34, links oben). Zusätzlich kommt es durch die Verwendung der selben Filterkombination (Schott, BG48- und GG400-Filter) zu einem zusätzlichen spektralen Intensitätsverlust im längerwelligen Spektralbereich des gezeigten Fluoreszenzspektrums.

<sup>8</sup>Daten dürfen mit freundlicher Genehmigung von Elena Bühl, geborene Pepler, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main, Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt am Main, Deutschland, gezeigt werden.

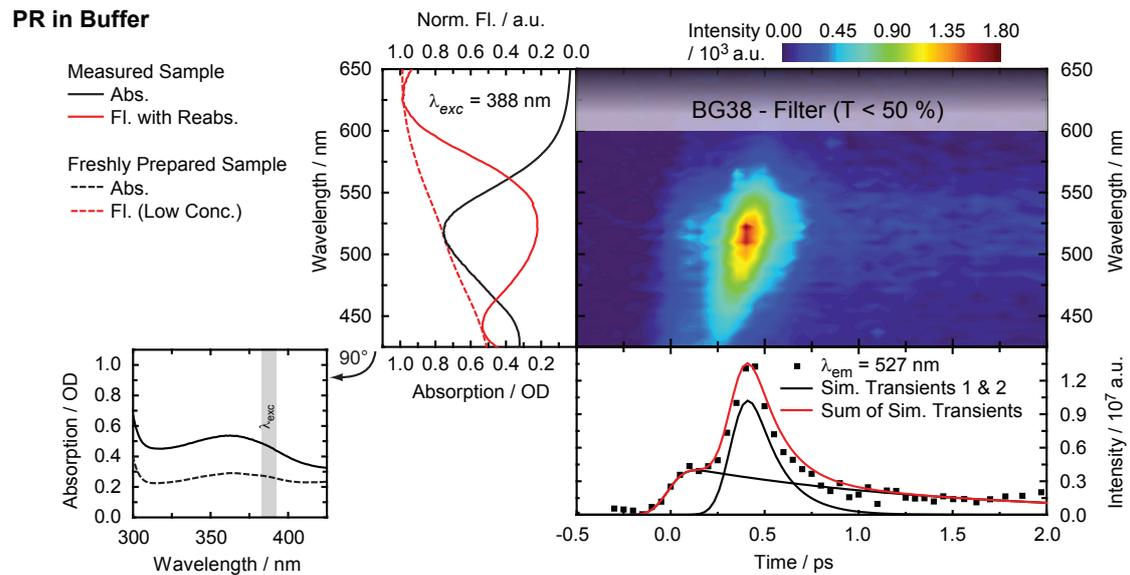


Abbildung 34: Konturauftragung einer spektral und zeitlich korrigierten Kerr-Schalter-Messung von Proteorhodopsin in Puffer (rechts oben). Zusätzlich das an die Küvettenlänge ( $d = 5$  mm) angepasste Absorptionsspektrum und das zugehörige Fluoreszenzspektrum sowie die erwarteten Spektren, basierend auf skalierten Daten einmal im Bereich der Kerr-Schalter-Messung (links oben) und im Bereich der Bande der deprotonierten Schiffbase bei 360 nm (links unten). Außerdem ist eine Transiente der Kerr-Schalter-Messung bei 527 nm gezeigt und simulierte Transienten, welche als Summe das beobachtete Verhalten der gemessenen Transiente wiedergeben. Verwendet wurden PFU04C-Polarisatoren, 1 mm Suprasil Quarzglas als Kerr-Medium, Schaltpulse ( $20 \mu\text{J}$ , ca. 140 fs) mit einer Wellenlänge von 775 nm, ein GG400-Filter (Schott,  $d = 3$  mm,  $T > 50\%$  über 395 nm) und ein BG38-Filter (Schott,  $d = 3$  mm,  $T > 50\%$  zwischen 335-600 nm) nach dem Analysator. Zur Anregung wurde die SHG (388 nm, 175 nJ, ca. 200 fs) verwendet.

Auffällig bei der Kerr-Schalter-Messung ist, dass die Fluoreszenz zeitlich verzögert ihren maximalen Intensitätswert erreicht und eine ausgeprägte dynamische Stokesverschiebung besitzt. Diese Verschiebung scheint nach 500 fs abgeschlossen zu sein und geht in eine langlebigere Fluoreszenzkomponente über (Abb. 34, rechts oben). Ein Blick auf eine Transiente bei 527 nm (Abb. 34, rechts unten) zeigt, dass der verzögerte Anstieg der Fluoreszenz eine weitere Komponente aufweist, die innerhalb der ersten 200 fs für eine schwache Zunahme der Fluoreszenz sorgt, die kurzzeitig in ein Plateau übergeht, bevor sie weiter ansteigt. Dieses Verhalten ist untypisch und deutet auf das Vorhandensein mehrerer emittierender Spezies hin. Wird das Absorptionsspektrum der Probe näher betrachtet und mit publizierten Daten<sup>[199]</sup> verglichen, lässt sich erkennen, dass die zusätzliche Absorption im Bereich von 360 nm ungewöhnlich hoch für einen pH-Wert von 9 ausfällt. Dies wiederum führt zu der Annahme, dass dies im Vorhandensein von freiem Retinal begründet liegt, welches bei  $\approx 380$  nm die Absorptionsbande des  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs aufweist<sup>[200]</sup> und dadurch auf eine teilweise Zersetzung der Probe hinweist. Dies würde sich in zwei übereinanderliegenden Fluoreszenzsignalen äußern, der Emission aus dem  $S_1$ -Zustand des freien und des im Protein inkorporierten Retinals. Zwei simulierte Transienten, die das Verhalten der beiden Fluoreszenzsignale wiedergeben, sind in Abb. 34 (rechts unten) gezeigt. Die Summe aus beiden Transienten beschreibt das gemessene Signal hinreichend gut.

Abschließend kann gesagt werden, dass der Kerr-Schalter auch für die Anwendung bei biolo-

gischen Fragestellungen geeignet ist. Jedoch sind bezüglich des untersuchten Systems weitere Messungen an Proben ohne Degradationserscheinungen notwendig. Um den Messbereich auf die gesamte Fluoreszenz zu erweitern, sollte versucht werden, die Messung mit einer längeren Wellenlänge des Schaltimpulses zu messen, was die Verwendung anderer Filter erlaubt.

### 4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der Kerr-Schalter ermöglicht es, Informationen über sehr schnelle photophysikalische Prozesse der emittierenden Zustände zu gewinnen ohne die störenden Überlagerungen mit der ESA oder dem GSB wie im Fall der transienten Absorption. Der Benutzer besitzt dabei die Möglichkeit zwischen zwei verschiedenen Bereichen der Schaltwellenlänge ( $\approx 760\text{-}840\text{ nm}$  bzw.  $\approx 1150\text{-}1350\text{ nm}$ ) zu wählen, wobei eine Schalteffizienz im Bereich von 4-10 % erreicht wird. Die Anregung durch die Kombination von NOPA, SHG und SFG deckt dabei einen sehr breiten Spektralbereich ( $\approx 320\text{-}700\text{ nm}$ ) ab. Die Kreuzkorrelation und die dadurch bedingte Schaltdauer betragen in Abhängigkeit der gewählten Anregungs- und Schaltwellenlänge in einem 1 mm dicken Quarzglas als Kerr-Medium bisher zwischen 80 fs und 200 fs, können jedoch durch eine bessere Komprimierung der Anregungspulse noch verkürzt werden. Je nach Schaltwellenlänge ist die Aufnahme von großen Bereichen zwischen 380 nm und  $\approx 1000\text{ nm}$  möglich, die jedoch durch Störsignale aufgrund der hohen Intensität des Schaltimpulses unterbrochen sind. Der Kerr-Schalter lässt sich dabei sehr gut mit Hilfe von DMPNA einstellen und die gezeigten Korrekturen führen zu einem vertrauenswürdigen Ergebnis. Als Proben eignen sich vor allem Moleküle mit sehr kurzlebigen emittierenden Zuständen, wobei diese auch sehr kleine Fluoreszenzquantenausbeuten bereits ab einem Wert in der Größenordnung von  $10^{-5}$  aufweisen können.

# 5 Fluoreszenzmarker für Ribonukleinsäuren

## 5.1 Einführung

RNA ist bekannt dafür, eine wichtige Rolle bei der Genexpression und deren Regulation zu spielen. Bei der Genexpression, also im engeren Sinne die Synthese von Proteinen, den Strukturgebern und den molekularen Maschinen der Zelle, aus der DNA als Träger des Erbgutes, dient sie als Bindeglied zwischen DNA und Proteinen. Darüber hinaus kann sie gleichzeitig aktiv die Genexpression regulieren, oft als Folge struktureller Änderungen in spezifischen Bereichen der RNA, induzierbar durch eine hoch affine Bindung von Liganden.<sup>[49]</sup> Ermöglicht werden diese strukturellen Änderungen durch die große strukturelle Flexibilität, welche in einer hohen konformationellen Komplexität der RNA resultiert<sup>[46–49]</sup>. Das Nachverfolgen der strukturellen Änderungen, aber vor allem der entsprechenden Dynamik, bedarf einer Observablen, die Informationen über diese Veränderungen liefern kann. Hier kommen Fluoreszenzmarker ins Spiel, sie werden als konformationelle Sonden genutzt und erlauben es die Bindungsdynamik zu untersuchen.

### 5.1.1 Ribonukleinsäure<sup>[201]</sup>

RNA definiert als Begriff ein linear aufgebautes und unverzweigtes Makromolekül (einen Strang), das durch die Verknüpfung von vier frei kombinierbaren Nucleotiden entsteht (Abb. 35, A) und oft auch als Oligonucleotid bezeichnet wird.

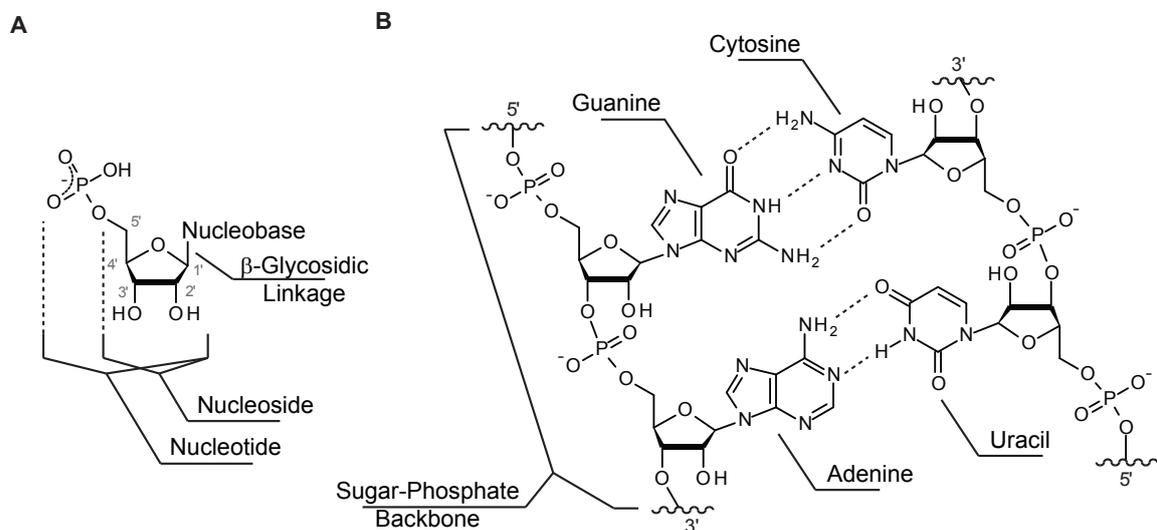


Abbildung 35: Struktur von RNA und die natürlich vorkommenden Nucleobasen. (A) Struktur eines einzelnen Nucleotids bzw. Nucleosids. Bei fehlender C2'-OH-Gruppe handelt es sich um einen DNA-Baustein. (B) Struktur der Nucleobasen Guanin, Adenin, Cytosin und Uracil in der jeweiligen Watson-Crick-Basenpaarung mit Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte Linien).

Ein Nucleotid wiederum besteht aus drei Teilkomponenten: (1) einem Zucker, (2) einem Phosphatteil und (3) typischerweise einer der vier natürlichen Nucleobasen. Von den vier in RNA vorkommenden Nucleobasen besitzen zwei ein Puringrundgerüst (Adenin und Gua-

nin) und zwei ein Pyrimidingrundgerüst (Cytosin und Uracil). Die Nucleobasen sind mit dem Zucker (Ribose) über das C1'-Atom kovalent verbunden, wobei diese Bindung als  $\beta$ -glykosidische Bindung bezeichnet wird. Der Begriff glykosidische Bindung definiert eine Bindung zwischen dem anomeren Kohlenstoffatom eines Zuckers (Glycon) und meistens einem Heteroatom eines weiteren Zuckers bzw. Nicht-Zuckers (Aglycon). Die einzelnen Nucleoside im Makromolekül sind untereinander über ihren Zucker durch Phosphodiesterbrücken verbunden, was als Zucker-Phosphatrückgrat bezeichnet wird (Abb. 35, B). Ist anstelle der C2'-OH-Gruppe ein Proton vorhanden, wird von Desoxyribose gesprochen und das Makromolekül als DNA bezeichnet, wobei hier die Nucleobase Uracil durch Thymin substituiert ist. Die negative Ladung des Zucker-Phosphatrückgrats führt in einem neutralen pH-Bereich zu einer Abschirmung gegenüber nukleophilen Angriffen von z.B. OH<sup>-</sup>-Ionen, welche aufgrund der Autoprotolyse von Wasser stets vorhanden sind. Die Abfolge der angeordneten Nucleotide definiert die Primärstruktur des RNA-Stranges. Die Nucleobasen können über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander interagieren, was als Basenpaarung bezeichnet wird. Am stabilsten sind die Watson-Crick-Basenpaarungen (Abb. 35, B), jedoch sind noch weitere meist weniger stabile Varianten möglich, die für diese Arbeit nicht weiter von Interesse sind. Bei den Watson-Crick-Basenpaarungen bilden die Nucleobasen Guanin und Cytosin ein über drei Wasserstoffbrückenbindungen verbrücktes Basenpaar, während Adenin und Uracil nur über zwei Wasserstoffbrückenbindungen verfügt und dementsprechend eine schwächere Verbindung eingehen.

Zwei Oligonucleotide sind in der Lage über Basenpaare miteinander zu interagieren und doppelsträngige Helices (Duplexe) zu bilden<sup>[202]</sup>. Während DNA eine B-Form-Helix ausbildet, nimmt RNA eine A-Form-Helix an, die etwas breiter im Durchmesser ist und durch die C3'-endo anstatt C2'-endo Konformation des Zuckers andere geometrische Eigenschaften der Gesamtstruktur aufweist (Abb. 36).

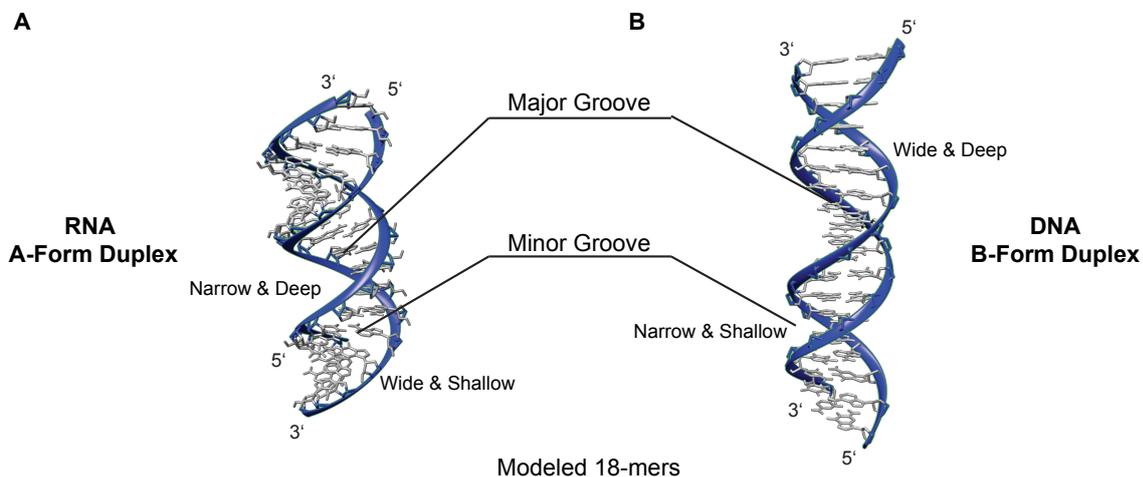


Abbildung 36: Dreidimensionales Modell der Struktur eines idealisierten 18-mer-Duplex als (A) A-Form-Helix (RNA) und (B) B-Form-Helix (DNA). Bei beiden Duplex sind kleine und große Furche gekennzeichnet, sowie ihre strukturellen Eigenschaften beschrieben.

Für diese Arbeit wichtige strukturelle Charakteristika der RNA sind die sogenannten Furchen. Bei diesen Furchen handelt es sich um Ausbuchtungen zwischen dem Zucker-Phosphatrück-

grat der beiden Stränge die den Duplex bilden. Hierbei wird aufgrund ihrer Erscheinung bei einer B-Form-Helix (DNA) die Furche, die nach außen zeigt, als kleine Furche und die in das Innere des Duplex zeigende als große Furche bezeichnet. In einer A-Form-Helix (RNA) ist die große Furche schmal und tief, während die kleine Furche breit und flach ist. Bei der B-Form-Helix (DNA) ist die große Furche hingegen breit und tief, während die kleine Furche schmal und flach ist. Infolgedessen bietet die kleine Furche bei RNA mehr Platz.

Aufgrund der hohen strukturellen Flexibilität und Komplexität<sup>[46–49]</sup> kommt es bei RNA in den einzelnen Oligonukleotiden oft zur Ausbildung von Sekundärstrukturen, den sogenannten Schleifen (engl. loops). Sie treten in Bereichen, bei denen die Basenpaarung unterbrochen bzw. gestört ist, und dadurch in den verschiedensten Formen auf. Dies führt zu einer großen Vielfalt an Tertiärstrukturen durch die Faltung der RNA<sup>[203–205]</sup>. Die verschiedenen Sekundärstrukturen können in vier übergeordnete Kategorien eingeteilt werden (Abb. 37):

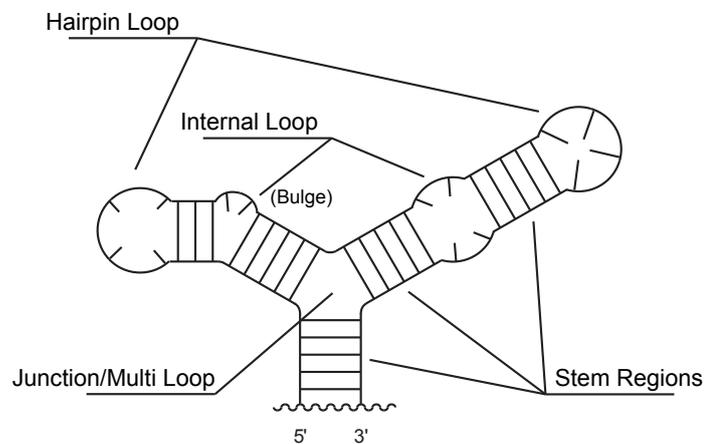


Abbildung 37: Schematische zweidimensionale Darstellung von RNA mit gekennzeichneten Sekundärstrukturmotiven.

(1) Helikale Bereiche, die einer A-Helix entsprechen können, aber nicht zwangsläufig müssen und deshalb oft nur als Doppelstrangbereich (engl. stem region) bezeichnet werden. (2) Haarnadelschleifen (engl. hairpin loops), die eine ungepaarte Sequenz am Ende eines Doppelstrangbereichs beschreiben, welcher aus einem einzigen Strang besteht. (3) Interne Schleifen (engl. internal loops), welche zwei Doppelstrangbereiche durch eine Abfolge von nicht zur Basenpaarung fähigen Basen in den beiden gegenläufigen Strängen voneinander trennen. Ist diese Unterbrechung nur einer Seite des Doppelstranges geschuldet, wird dies als Ausbuchtung (engl. bulge) bezeichnet. (4) Knotenpunkts- bzw. Mehrfachschleifen (engl. junction/multi loops), welche eine Ansammlung an Schleifen bezeichnen, die an Knotenpunkten von drei oder mehr Doppelstrangbereichen entstehen und nicht zwangsläufig Fehlpaarungen enthalten müssen.

Diese strukturelle Komplexität und die Flexibilität durch das bewegliche Zucker-Phosphatrückgrat ermöglicht das spezifische und starke Binden von Liganden wie organischen Molekülen, wobei die spezifisch bindende RNA in drei Klassen eingeteilt werden kann<sup>[205]</sup>: (1) Speziell funktionalisierte RNA wie z.B. autokatalytisch spleißende Gruppe-I-Introns. (2) Die in den untranslatierten Regionen der mRNA (messenger-RNA) vorkommenden Riboschalter. Die-

se Art der natürlich vorkommenden ligandenbindenden RNA enthält einen Sequenzbereich, der zur Bindung von Liganden dient, die sogenannten Aptamer-Domänen. Der verbleibende Teil des Riboschalters stellt die zweite Domänen-Art, die Expressions-Plattform, welche vom Bindungszustand der Aptamer-Domäne beeinflusst wird und dadurch die Expression der nachfolgenden Gene entsprechend reguliert. (3) Die *in vitro* über SELEX<sup>1</sup> [206,207] gefundenen Aptamere. Aptamere stellen derzeit ein sehr interessantes und wichtiges Forschungsfeld z.B. bei Arzneimitteltransport im Körper<sup>[208]</sup> oder bei der Genregulation<sup>[209,210]</sup> dar.

### 5.1.2 Fluoreszenzmarker

Die Fluoreszenz stellt einen Prozess dar, der die Beobachtung nicht photoinduzierter Dynamik von RNA erlaubt. Sie kann dabei, je nach Fluorophor, eine sehr umgebungsempfindliche Observable sein, was sich in der Fluoreszenzlebensdauer und den spektralen Eigenschaften des Fluorophors widerspiegelt<sup>[9]</sup>. Die Nukleobasen weisen in Wasser eine FQA in der Größenordnung von  $\approx 10^{-4}$  auf und fluoreszieren dementsprechend kaum. Dies ist eng mit der sehr kurzen Lebensdauer ( $\approx 10^{-12}$  ps) des emittierenden Zustands verbunden<sup>[211]</sup>. Kleine Signaländerungen aufgrund von Umgebungsänderungen sind folglich schwer zu erfassen, da sie im Rauschen der Messdaten untergehen würden. Um diese Problematik zu umgehen und zusätzlich lokale Informationen an spezifischen Stellen der RNA zu gewinnen, kommen Fluoreszenzmarker zum Einsatz. Fluoreszenzmarker setzen sich in der Regel aus einem Fluorophor und einem weiteren Baustein zusammen, der es erlaubt, spezifisch Nukleobasen durch den Marker zu ersetzen bzw. diese zu modifizieren und das, wenn möglich, ohne das Zucker-Phosphatrückgrat zu verändern. Meistens werden hierfür die natürlichen Nukleobasen mit dem Fluorophor verknüpft. Dadurch erhält man eine ortsspezifische Observable, die im Idealfall das untersuchte System nicht in seiner Struktur und Reaktivität verändert und trotzdem für seine Aufgabe optimale photophysikalische Eigenschaften besitzt<sup>[52]</sup>.

Im Fall von DNA wurde eine Vielzahl an Studien mit Pyren als Fluorophor durchgeführt, um Elektrontransferprozesse zwischen Nukleobase und Fluorophor, induziert durch Photoanregung<sup>[22-28]</sup>, und spezifische Erkennung von Nukleobasen bzw. Strukturen<sup>[29-33]</sup>, zu untersuchen. Auch wurde Pyren als FRET-Sonde (**F**örster-**R**esonanz**e**nergietransfer-Sonde)<sup>[33-35]</sup> bzw. molekulare Hybridisierungssonde eingesetzt<sup>[36-45]</sup>. Unterstützt wurde die Interpretation der Ergebnisse bei dieser Vielfalt an Anwendungen durch die Tatsache, dass Pyren als Monomer sehr gut charakterisiert ist<sup>[14-20]</sup> und Excimere bilden kann<sup>[14,21]</sup>. Für RNA ist aufgrund der höheren Komplexität die Verwendung von Fluoreszenzmarkern seltener anzutreffen, aber es sind trotzdem viele Variationen an Linkern und Anknüpfungspunkten synthetisiert worden<sup>[43,50-57]</sup>. Eine favorisierte Anknüpfungposition stellt dabei die C2'-Position der Ribose dar, da bei dieser Art der Modifikation der Fluorophor bei einem A-Helix-Strukturmotiv in den freien Raum zeigt<sup>[43,50,51,53-58]</sup> und dadurch die ungestörte Beobachtung von Hybridisierungs-<sup>[43,52,56,57]</sup> und Faltungseignissen<sup>[58]</sup> erlaubt. Ein alternativer Verknüpfungspunkt ist an der Nukleobase selbst, welcher oft Anwendung bei DNA gefunden hat<sup>[22-28,36,37,39,59-61]</sup>.

Der in dieser Arbeit vorgestellte Fluoreszenzmarker (2-(1-Ethynylpyren)-adenosin) greift auf diese Möglichkeit der Verknüpfung zurück (Abb. 38).

---

<sup>1</sup>SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) ist eine Methode zur *in vitro* Suche nach Nukleinsäuren, die spezifische Zielmoleküle erkennen und binden (Aptamere).

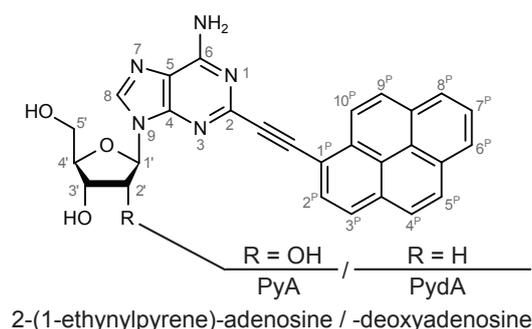


Abbildung 38: Strukturformeln von 2-(1-Ethynylpyren)-adenosin (PyA) und 2-(1-Ethynylpyren)-desoxyadenosin (PydA).

Hierbei erfolgt eine kovalente Verknüpfung über die Position 2 des Adenins und der 1-Position des Pyrens unter Verwendung eines Ethynyllinkers. Als Folge der Wahl der Verknüpfungspolition sollte das Pyren in die kleine Furche einer A-Helix zeigen, wobei weiterhin die Möglichkeit einer Basenpaarung des markierten Adenins mit einer geeigneten Nucleobase besteht (Abb. 39). Deswegen wird erwartet, dass die Gesamtstruktur kaum beeinflusst wird<sup>[62]</sup>.

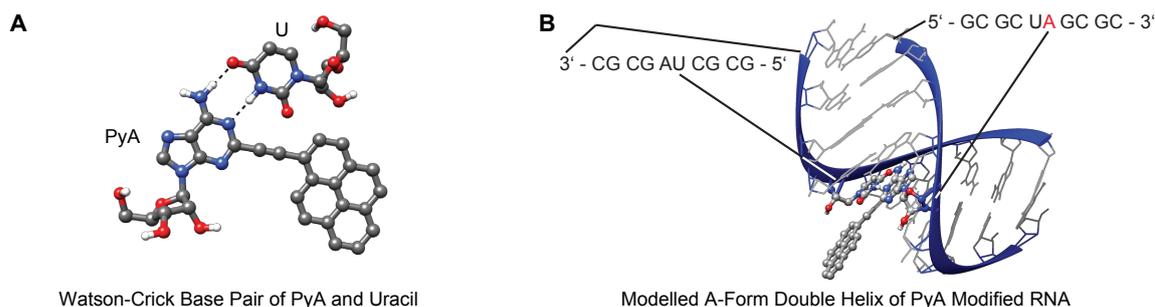


Abbildung 39: Dreidimensionales Modell der Struktur von PyA: (A) als PyA-Uracil-Basenpaar und (B) als Duplex mit helikalem Doppelstrangbereich unter Ausbildung des zuvor genannten Basenpaares.

## 5.2 Pyrenmodifizierte Nucleobasen

Das Substitutionsmuster von Pyren beeinflusst im Allgemeinen sehr stark die Eigenschaften des Absorptions- und Emissionsspektrums wie z.B. die spektralen Positionen und die Oszillatorstärken des  $S_0 \rightarrow S_1$ - und des  $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergangs. Dabei ist sowohl die Verknüpfungspolition<sup>[27,63,212]</sup> als auch die elektrochemische Natur<sup>[212,213]</sup> des Substituenten entscheidend. Die Verknüpfung mit einem Substituenten über die 1-Position von Pyren führt zu einer besonders starken elektronische Kopplung, wodurch Veränderungen der Umgebung der Nucleobase Einfluss auf die spektralen Eigenschaften des Fluorophors nehmen<sup>[26,27,63]</sup>. Infolgedessen zeigt das mit den Nucleobasen über die 1-Position verknüpfte Pyren deutlich abweichende spektrale Eigenschaften vom unsubstituierten Pyren. Nachfolgend werden Untersuchungsergebnisse bezüglich der Aufklärung der photophysikalischen Eigenschaften und der Anwendung der modifizierten Nucleobasen als Fluoreszenzmarker in RNA gezeigt.

Als Erstes werden die Untersuchungen am PyA (Abb. 38) vorgestellt, da es sich dabei um das im Mittelpunkt der Untersuchungen stehende Molekül handelt. Es folgen Untersuchungen an PydA (Abb. 38) einer desoxy-Variante von PyA. Diese dienen der Aufklärung des Einflusses der C2'-OH, Gruppe auf die Photophysik von PyA in Form einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung.

### 5.2.1 Synthese

Die pyrenmodifizierten Nucleobasen wurden von Dr. Christian Grünwald im Arbeitskreis von Prof. Dr. Engels<sup>2</sup> nach den Methoden synthetisiert, die in einer Veröffentlichung zur Herstellung eines geschützten 2-(1-Ethynylpyren)-adenosins beschrieben sind<sup>[62]</sup>. Kurz zusammengefasst, wird zunächst 2-Iodoadenosin in einer vierstufigen Synthese aus Guanosin dargestellt<sup>[214–216]</sup>, welches bei Bedarf zur Synthese von Oligonucleotiden in einer weiteren 6-stufigen Synthese zu einem ACE-geschützten Phosphoamidit umgewandelt werden kann<sup>[217]</sup>. Ein Äquivalent (1,00 g, 2,55 mmol) des geschützten 2-Iodoadenosins wird zusammen mit 1,3 Äquivalenten (0,751 g, 3,32 mmol) 1-Ethynylpyren, 0,17 Äquivalenten (0,44 mmol, 0,084 g) Kupfer(I)-iodid und 10 Äquivalenten (0,176 g, 0,25 mmol) Bis(triphenylphosphin)palladium(II)-chlorid in eine zuvor entgaste Lösungsmittelmischung aus 60 mL Dimethylformamid und 5 mL Triethylamin gegeben. Die Lösungsmittelmischung wird entgast, um jegliche Reste an Sauerstoff aus der Reaktionslösung auszuschließen, da die Edukte mit Sauerstoff reagieren. Die orangefarbene Reaktionslösung wird anschließend für 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Abfiltrieren von Kupfer(I)-iodid wird das Produkt in der Lösung auf Kieselgel aufgebracht und dort adsorbiert. Anschließend wird das Produkt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Das Eluieren mit einem Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol im Verhältnis von 9:1 mit anschließender Umkristallisation lieferte das gewünschte 2-(1-Ethynylpyren)-adenosin als gelbliches Pulver mit einer Ausbeute von 80 %.

Um die photophysikalischen Eigenschaften der mit Pyren modifizierten Nucleobasen zu untersuchen, wurde die Abhängigkeit der spektralen Eigenschaften von der Lösungsmittelpolarität und dessen Fähigkeit, intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden zu können (protische und aprotische Lösungsmittel), untersucht. Diesbezüglich wurden die verschiedenen modifizierten Nucleobasen in acht unterschiedlichen Lösungsmitteln gelöst, wobei jeweils vier der Lösungsmittel einer von zwei verschiedenen Lösungsmittelklassen entstammen (Abb. 3). Einerseits den protischen (Methanol, Ethanol, Isopropanol und tert-Butanol) und andererseits den aprotischen Lösungsmitteln (DMSO, DMF, Aceton und EtOAc). Da sich die mit Pyren modifizierten Nucleoside am besten in DMSO lösen und kaum in den anderen verwendeten Lösungsmitteln, wurden die anderen verwendeten Lösungen aus einer DMSO Stammlösung hergestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Endkonzentration an DMSO 1 Vol.-% betrug, um eine Vergleichbarkeit zu garantieren. Dieser Restgehalt an DMSO hat zur Folge, dass tert-Butanol bei Raumtemperatur ( $\approx 23^\circ\text{C}$ ) flüssig bleibt und nicht auskristallisiert.

---

<sup>2</sup>Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Goethe-Universität Frankfurt am Main, Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt am Main, Deutschland.

## 5.2.2 Messspezifische Informationen

### Stationäre Messungen

Die Absorptionsspektren wurden in einem Spektralbereich von 300-600 nm aufgenommen, einzig die Spektren in Aceton beginnen aufgrund von starker Lösungsmittelabsorption erst ab 340 nm. Solange nicht anderweitig erwähnt, wurde für alle stationären Absorptionsmessungen eine Nukleosidkonzentration von 150-200  $\mu\text{M}$  (OD von  $\approx 0,7$  pro mm) gewählt, um ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis auch bei den transienten Absorptionsmessungen zu gewährleisten. Zur besseren Darstellung der Signale ist der Spektralbereich in Abhängigkeit der Probe auf 360-525 nm bzw. 360-700 nm eingeschränkt.

### Messung der Fluoreszenzquantenausbeute

Für die Messungen wurden Quarzglasküvetten (Hellma Analytics, Typ 104.002F-QS) mit einer Breite ( $b$ ) von 2 mm und einer Tiefe (Lichtweg,  $d$ ) von 10 mm verwendet. Die Konzentrationsreihen weisen sechs Messpunkte mit Absorptionswerten mit einer OD bis zu 0,25 pro cm auf. Der ungefähre Abstand zwischen den einzelnen Messpunkten entspricht einer OD von  $\approx 0,05$  pro cm bei der Anregungswellenlänge ( $\lambda_{Exc} = 366$  nm für PyA und PydA).

### Transiente Absorptionsmessungen

Solange nicht anders erwähnt, wurde für alle transienten Absorptionsmessungen eine Nukleosidkonzentration von 150-200  $\mu\text{M}$  (OD von  $\approx 0,7$  pro mm) gewählt. Die Anregungswellenlänge für die stationären Emissionsmessungen wurde entsprechend der Position des niederenergetischen Maximums gewählt (siehe Kap. 5.2.3.1). Da für die transiente Absorption als Anregung die SHG der Laserfundamentalen verwendet wurde, lag die Anregungswellenlänge bei 388 nm. Die Anregungspulsenergie lag bei 100 nJ, was zu einer Anregung von ca. 7 % der Moleküle im Anregungsvolumen führte. Dadurch wurde die Wahrscheinlichkeit einer Zweiphotonenabsorption minimiert. Auch bei Anregungspulsenergien von 250 nJ war keine Veränderung der Dynamik zu beobachten, weshalb davon auszugehen ist, dass Zweiphotonenabsorption keine Rolle spielt. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis lag bei einem Faktor von  $10^3$  für die Messungen, wobei durchschnittlich 6 Einzelmessungen gemittelt wurden mit jeweils  $2,5 \cdot 10^3$  detektierten Anregungsereignissen pro Einzelmessung. Um eine Photodegradation während der Messungen auszuschließen, wurden vor und nach den Messungen Absorptionsspektren der Probe aufgenommen.

Für die LDA wurde ein Satz von 100 Exponentialfunktionen ( $\tau_i$ ) in einem Zeitbereich von 0,05-8000 ps gewählt. Die LDA wurden unter Verwendung einer Einheitsmatrix als Glättungsnorm und eines optimierten Wertes für den Regularisierungsparameter, der über das L-Kurve-Kriterium und das Kreuzvalidierungsverfahren bestimmt wurde, berechnet.

### Streak-Kamera-Messungen

Für die Streak-Kamera-Messungen wurden Konzentrationen von PyA und PydA im Bereich von 50-60  $\mu\text{M}$  (OD von 0,15 pro mm) gewählt, um Reabsorption zu vermeiden. Da auch bei den Streak-Kamera-Messungen die SHG der Laserfundamentalen zur Anregung der Probe verwendet wurde, lag die Anregungswellenlänge bei 390 nm. Die Anregungspulsenergie variierte zwischen 50-200 nJ in Abhängigkeit des Messfensters und des Lösungsmittels (Details siehe Tab. 3). Es wurde darauf geachtet, dass die Anregungspulsenergie so gering ist, dass keine Artefakte aufgrund von zu hohen Photonendichten entstehen. Die jeweilige Probe wur-

de mit Hilfe einer Peristaltikpumpe durch eine Durchflussküvette aus Quarzglas mit einem Lichtweg von 0,5 mm gepumpt. Hierdurch kann davon ausgegangen werden, dass bei jedem der Anregungspulse ausschließlich nicht angeregte Moleküle im Anregungsvolumen vorhanden waren.

Tabelle 3: Anregungspulsenergien ( $E_{Exc}$ ) bei den Streak-Kamera-Messungen. Zf = Gemessenes Zeitfenster.

Lösungsmittel	Aprotisch		Protisch		
	DMSO	EtOAc	MeOH	tBuOH	
	Zf / ns	PyA			
$E_{Exc}$ / nJ	0,12	150	n.b.	150	n.b.
	0,48	n.b.	200	150	150
	4,27	n.b.	60	60	40
	10,33	50	60	60	40
		PydA			
$E_{Exc}$ / nJ	0.12	200	n.b.	200	n.b.
	0.48	200	200	200	150
	4,27	n.b.	80	80	40
	10,33	60	80	80	40

Der Eintrittspalt des Spektrografen wurde auf eine Spaltbreite zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 15  $\mu\text{m}$  eingestellt, woraus eine spektrale Auflösung von 1,3 nm bis 2 nm resultierte. Das gemessene Zeitfenster wurde während der Messungen entsprechend der spektralen Eigenschaften angepasst. Zeitfenster, die keine neuen Informationen liefern würden, wurden ausgelassen. Die Anregungspulsenergie für die kurzen Zeitfenster wurde derart eingestellt, dass ein ausreichend starkes Messsignal erhalten wurde.

Für die Messungen im Einzelablenkmodus wurde unter Verwendung der Jitterkorrektur eine Zeitauflösung von kleiner 5 ps im 0,12 ns Zeitfenster und 6-20 ps im 0,48 ns Zeitfenster erreicht. Die Messungen im kontinuierlichen Ablenkmodus lieferten eine Zeitauflösung von 80-100 ps im 10,33 ns Zeitfenster und 40-50 ps im 4,27 ns Zeitfenster. Alle Datensätze wurden im Photonen-zählmodus aufgenommen mit einer typischen Anzahl von 103-104 detektierten Photonen im Emissionsmaximum für eine Messgruppe. Dabei wurde die Erfassungszeit im kontinuierlichen Ablenkmodus im Bereich von  $\approx 15$  min gehalten, während im Einzelablenkmodus eine Erfassungszeit von  $\approx 60$  min eingehalten wurde. Um eine Photodegradation während der Messungen auszuschließen, wurden vor und nach den Messungen Absorptionsspektren der Probe aufgenommen.

### 5.2.3 Ergebnisse der Untersuchungen an 2-(1-Ethynylpyren)-adenosin

#### 5.2.3.1 Stationäre Charakterisierung

Es wurden stationäre Absorptions- und Emissionsspektren von 2-(1-Ethynylpyren)-adenosin (PyA) in acht verschiedenen Lösungsmitteln (Abb. 40), vier protischen (Methanol, Ethanol, Isopropanol und tert-Butanol) und vier aprotischen (DMSO, DMF, Aceton und EtOAc), aufgenommen (Abb. 3). Die wichtigsten Charakteristika der stationären Messungen sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Es sei vorab darauf hingewiesen, dass keine Dimerisierung oder Excimerbildung bis zu Konzentrationen von 2 mM beobachtet wurde.

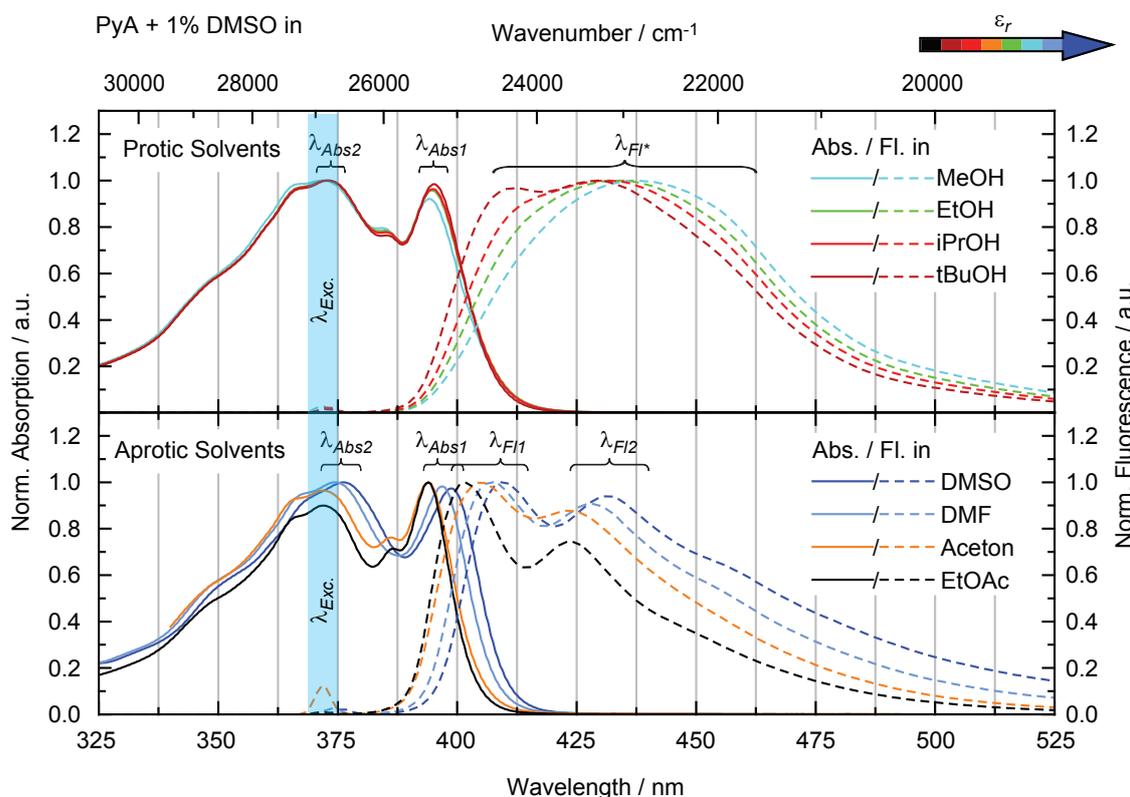


Abbildung 40: Stationäre Absorptions- ( $c(\text{PyA}) = 150 \mu\text{M}$ ) und Fluoreszenzspektren ( $c(\text{PyA}) = 10 \mu\text{M}$ ) von PyA in acht unterschiedlichen Lösungsmitteln. Oben: Protische Lösungsmittel. Unten: Aprotische Lösungsmittel.

#### Stationäre Absorption

PyA zeigt in allen Lösungsmitteln eine breite, strukturierte Absorption im Spektralbereich zwischen 325 nm und 420 nm, wobei ab ca. 400 nm ein schneller Abfall der Absorption zu beobachten ist. Die Absorption in diesem Spektralbereich wird von zwei Hauptmaxima beherrscht (Tab. 4,  $\lambda_{\text{Abs}1}$  und  $\lambda_{\text{Abs}2}$ ), deren Lage lösungsmittelabhängig ist. Das niederenergetische Maximum liegt bei ca. 395 nm ( $\lambda_{\text{Abs}1}$ ), das höherenergetische Maximum bei ca. 374 nm ( $\lambda_{\text{Abs}2}$ ). Zusätzlich sind mehrere Schultern bei den Absorptionsbanden im Spektrum zu er-

kennen. Bis ca. 450 nm (Wellenlänge ist lösungsmittelabhängig) ist eine sehr schwache verbleibende Absorption zu sehen (Abb. 41, Einschub).

In protischen Lösungsmitteln führt ein Anstieg der Permittivität zu minimalen Veränderungen des Intensitätsverhältnisses der Absorptionsmaxima ( $\lambda_{Abs1} / \lambda_{Abs2}$ ) zugunsten des höherenergetischen Absorptionsmaximums ( $\lambda_{Abs1}$ ). Bei dem Maximum um 374 nm ist zusätzlich eine schwache Intensitätszunahme der niederenergetischen Flanke zu beobachten.

In aprotischen Lösungsmitteln lässt sich, wie bei den protischen Lösungsmitteln, eine Änderung des Absorptionsbandenverhältnisses zugunsten des höherenergetischen Maximums beobachten. Zusätzlich kommt es zu einer bathochromen Verschiebung ( $\Delta\lambda \approx 5$  nm) des Gesamtspektrums mit steigender Permittivität des Lösungsmittels.

Der geringere Einfluss der Permittivität in protischen Lösungsmitteln auf die spektralen Eigenschaften von PyA weist auf einen starken Einfluss von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen hin. Diese resultieren in einer Stabilisierung der Elektronendichte im Grundzustand. Der Verlust der elektrostatischen Wechselwirkungen in aprotischen Lösungsmitteln aufgrund des Fehlens von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen führt zu einer stärkeren Abhängigkeit der spektralen Charakteristika von der Permittivität.

### Stationäre Emission

Da in allen Messungen keine Anzeichen für Phosphoreszenz gefunden wurden, wird das Emissionsspektrum im Folgenden als reines Fluoreszenzspektrum angesehen. Allgemein erstreckt sich das Spektrum von PyA in allen gemessenen Lösungsmitteln von knapp 380 nm bis hin zu 600 nm (Abb. 40). Die Fluoreszenzbande weist dabei eine lösungsmittelabhängige Feinstruktur und eine bathochrome Verschiebung mit steigender Permittivität des Lösungsmittels auf. Der spektrale Verlauf der Fluoreszenz ist unabhängig von der Anregungswellenlänge. Besonders ist jedoch das Vorhandensein von Fluoreszenz unterhalb der Anregungswellenlänge bei Anregungswellenlängen  $> 400$  nm (Abb. 41, graue Linie,  $\lambda_{Exc1} = 421$  nm).

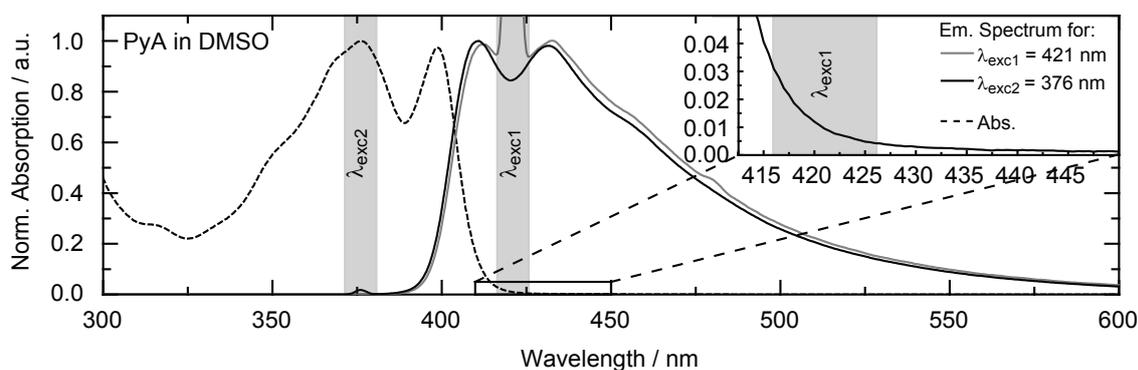


Abbildung 41: Stationäres Absorptionsspektrum ( $c(\text{PyA}) = 150 \mu\text{M}$ ) und Fluoreszenzspektren ( $c(\text{PyA}) = 10 \mu\text{M}$ ) von PyA in DMSO zur Veranschaulichung einer heißen Absorptionsbande im Grundzustand.

Fluoreszenz unterhalb der Anregungswellenlänge wird in der Regel nur beobachtet, wenn vor der Anregung ein höherer vibronischer Grundzustand bevölkert oder eine alternative Konformation im Grundzustand vorhanden ist, die energetisch ungünstiger als die ursprüngliche ist und eine ausreichend kleine Energiebarriere zwischen beiden Grundzustandskonformationen

vorliegt. Eine alternative Konformation ist unwahrscheinlich, da die Struktur des Fluoreszenzspektrums von der Anregungswellenlänge unabhängig ist. Wäre dies nicht der Fall, sollten sich zumindest kleine spektrale Änderungen aufgrund der veränderten Reaktionskoordinate ergeben.

In protischen Lösungsmitteln (Abb. 40) zeigen sich für PyA bei geringer Lösungsmittelpermittivität zwei Fluoreszenzmaxima (412 nm und 426 nm in tert-Butanol) und schwache, aber erkennbare Schultern, die auf eine vibronische Feinstruktur hinweisen. Die Feinstruktur ist jedoch mit steigender Permittivität der Lösungsmittel zunehmend schwächer ausgeprägt und eine breite, zunehmend unstrukturierte Bande erscheint. Die unstrukturierte Fluoreszenzbande weist weiterhin schwache Schultern auf, die auch hier auf eine darunterliegende Feinstruktur hindeuten. In Tabelle 4 sind Werte für die spektrale Position der Fluoreszenzmaxima angegeben, die über die Zentralwellenlänge der Bande bei halber Amplitude bestimmt wurden (mit  $Fl^*$  gekennzeichnet)<sup>3</sup>. Die so bestimmte spektrale Rotverschiebung von tert-Butanol ( $\lambda_{Fl^*} = 431$  nm) hin zu Methanol ( $\lambda_{Fl^*} = 440$  nm) liegt bei  $\approx 9$  nm.

In aprotischen Lösungsmitteln ist eine stark strukturierte Emission mit zwei Maxima zu sehen (Tab. 4,  $\lambda_{Fl1}$  und  $\lambda_{Fl2}$ ), die, wie auch die zugehörigen Absorptionsbanden, eine spektrale Rotverschiebung mit steigender Permittivität zeigen. Das erste Maximum ( $\lambda_{Fl1}$ ) schiebt um 11 nm, das zweite Maximum ( $\lambda_{Fl2}$ ) ändert seine spektrale Lage um knapp 10 nm. Gleichzeitig gewinnt das zweite Maximum ( $\lambda_{Fl2}$ ) zusammen mit der roten Flanke der Fluoreszenzbande im Vergleich zu dem ersten Maximum an Intensität.

Die unterschiedliche Struktur der Fluoreszenz in den beiden Lösungsmittelklassen weist auf zwei verschiedene emittierende Zustände hin. Ein Zustand ( $S_1$ ) scheint für die in den aprotischen Lösungsmitteln beobachtete strukturierte Fluoreszenz verantwortlich zu sein, während der andere Zustand ( $S_{1x}$ ) die in den protischen Lösungsmitteln etwas rotverschobene, breite und unstrukturierte Fluoreszenzbande hervorzurufen scheint. Da beide Fluoreszenzbanden spektral sehr nahe beieinander liegen, müssen die zugehörigen emittierenden Zustände energetisch nahe beieinander liegen.

Als Ursache einer breiten unstrukturierten Fluoreszenzbande wie im Fall der protischen Lösungsmittel wird bei Pyrenderivaten oftmals ein intramolekularer Ladungstransfer (engl. **intramolecular charge transfer**, ICT) angesehen. Begründet wird dies mit einer starken Abweichung in der Molekülgeometrie des resultierenden ICT-Zustands von der des ursprünglichen Grundzustands, aufgrund einer sich ändernden Reaktionskoordinate<sup>[25,218]</sup>. In gewissen Fällen wird durch die Bevölkung des ICT ein nachfolgender Protonentransfer hervorgerufen, der dadurch einen alternativen lokal angeregten Zustand unter den ICT-Zustand absenkt. Wird dieser dann bevölkert und besitzt eine stark abweichende Reaktionskoordinate, resultiert das auch in einer unstrukturierten Fluoreszenzbande<sup>[22,219]</sup>. Das Vorhandensein eines ICT-Zustands ist jedoch unwahrscheinlich, da die Rotverschiebung der Fluoreszenzbande deutlich stärker ausfallen müsste als beobachtet<sup>[20,218,220,221]</sup>. Eine weitere Erklärung für die schwache Rotverschiebung wäre ein nur schwacher Dipolcharakter des emittierenden Zustands. Aufschluss darüber, ob es sich um einen ICT-Zustand oder einen Zustand mit schwachem Dipolcharakter handelt, können die Fluoreszenzquantenausbeuten und zeitaufgelösten Messungen geben.

---

<sup>3</sup>Dieses Vorgehen war notwendig, weil eine Überlagerung mehrerer Banden nicht ausgeschlossen werden kann und eine Angabe der spektralen Position über das Intensitätsmaximum nicht gerechtfertigt ist.

### Fluoreszenzquantenausbeuten

Die gemessenen FQA ( $\phi_{Fl}$ , Tab. 4) sind in beiden Lösungsmittelklassen sehr hoch ( $\approx 0,8$ ). In aprotischen Lösungsmitteln variieren sie zwischen 0,76 (DMF) und 0,83 (Aceton), zeigen jedoch keinen eindeutigen Trend. In protischen Lösungsmitteln scheint die FQA mit Zunahme der Permittivität abzufallen (tert-Butanol (0,78) = Isopropanol (0,78) > Ethanol (0,76) > Methanol (0,76)). Aber auch hier sind die Werte mit Vorsicht zu betrachten, da die Änderungen innerhalb des Messfehlers ( $\Delta\phi_{Fl} = \pm 0,04$ ) liegen. Aus diesem Grund wird der Trend nicht weiter diskutiert. Da aber die unterschiedlich starke Bevölkung der beiden emittierenden Zustände ( $S_1$  und  $S_{1x}$ ) folglich zu keiner nennenswerten Änderung der FQA führt, müssen die beiden beobachteten Zustände eine zumindest ähnlich hohe FQA besitzen.

Betrachtet man die Möglichkeit eines ICT-Zustands unter Berücksichtigung der FQA, muss berücksichtigt werden, dass mit einer Bevölkung des Ladungstransferzustands typischerweise die Begünstigung eines nicht strahlenden Reaktionspfades einhergeht und dementsprechend auch eine Verringerung der FQA<sup>[25,218,222–224]</sup>. Die geringe bathochrome Verschiebung der Fluoreszenzbande mit steigender Permittivität des Lösungsmittels und die hohe gemessene FQA (Tab. 4) deuten auf eine schwache Ladungsverschiebung hin. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass die Ladungsdichte auf der reaktiven Gruppe des Akzeptors der Wasserstoffbrückenbindung nur schwach lokalisiert und zum größten Teil über das gesamte Molekül delokalisiert ist. Darum hat die Wasserstoffbrückenbindung nur noch einen schwachen Einfluss auf das System<sup>[223]</sup>. Dies stützt die Annahme, dass der für die unstrukturierte Emission verantwortliche Zustand nur eine schwache Ladungsverschiebung und keinen ICT Charakter aufweist.

Anregungsspektren in Methanol und DMSO (Abb. 42) zeigen, dass die FQA nur eine sehr schwache Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge aufweist.

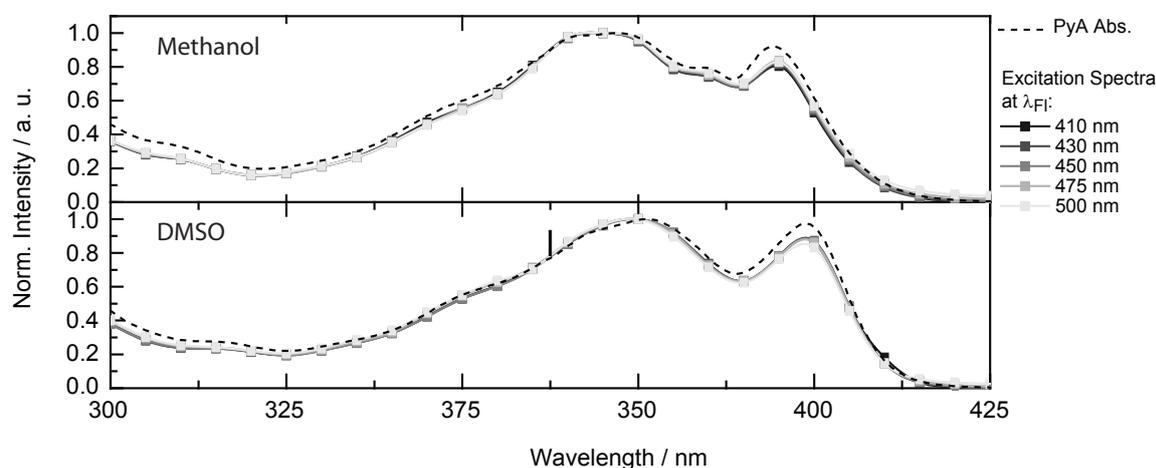


Abbildung 42: Steady-State Absorptions- ( $c(\text{PyA}) = 150 \mu\text{M}$ ) und Anregungsspektren ( $c(\text{PyA}) = 10 \mu\text{M}$ ) von PyA in Methanol und DMSO.

Dabei deutet die geringere FQA bei Anregung in die rote Flanke der Absorptionsbande auf einen Verlustkanal hin. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine hohe Energiebarriere zwischen den beiden emittierenden Zuständen. Berücksichtigen wir aber die Tatsache, dass wir Emission aus zwei energetisch nahe beieinander liegenden Zuständen beobachten,

die verschiedene Spektralbereiche dominieren (Abb. 40), sollte es bei einer hohen Energiebarriere zwischen den beiden Zuständen je nach betrachteter Emissionswellenlänge folglich zu Unterschieden im Verlauf der Anregungsspektren kommen. Weil dies aber nicht der Fall ist (Abb. 42), muss von einer kleinen Energiebarriere zwischen den beiden Zuständen ausgegangen werden, die ein schnelles Einstellen des thermischen Gleichgewichts erlaubt. Das Besetzungsverhältnis der beiden Zustände ist demnach unabhängig von der Anregungswellenlänge. Die Wellenlängenabhängigkeit der FQA muss also mit dem ursprünglich angeregten Zustand zusammenhängen. Als mögliche Erklärung für diesen Verlustkanal bleiben nur noch unterschiedliche Relaxationsraten der beiden Zustände, die zu einer unterschiedlich großen Gesamtbevölkerung im nachfolgenden Gleichgewicht führen. Die Bedeutung dessen ist, dass eine niederenergetische Anregung zu einer leicht höheren nicht strahlenden Gesamtrate führt und infolgedessen die FQA verringert. Welcher der beiden Zustände eine höhere, nicht strahlende Relaxationsrate besitzt, ist nicht feststellbar.

Ein klareres Bild über das vermutete Gleichgewicht sowie die Ursache für die Rotverschiebung und die beteiligten Zustände liefern zeitaufgelöste Messungen.

Tabelle 4: Stationäre Eigenschaften von PyA in versch. Lösungsmitteln.  $\epsilon_r$  = Permittivität der Lösungsmittel.  $\lambda_{Abs1/2}$  bzw.  $\lambda_{Fl1/2}$  = Wellenlängen der Absorptions- bzw. Emissionsmaxima.  $\lambda_{Fl*}$  = Zentralwellenlänge der Fluoreszenz bei halber Amplitude.  $\phi_{Fl}$  = FQA, gemessen relativ zu Chininsulfat in 0.05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

	PyA in	$\epsilon_r$	Abs. Max. / nm		Fl. Max. / nm		$\phi_{Fl}$
			$\lambda_{Abs2}$	$\lambda_{Abs1}$	$\lambda_{Fl1}$	$\lambda_{Fl2}$	
Aprotisch	DMSO	47,2	376	399	410	432	0,79 ± 0,03
	DMF	38,3	374	397	407	428	0,76 ± 0,03
	Aceton	21,0	371	394	405	424	0,83 ± 0,04
	EtOAc	6,1	371	394	399	422	0,77 ± 0,03
$\lambda_{Fl*}$							
Protisch	MeOH	33,0	371	394	440*		0,76 ± 0,03
	EtOH	25,3	372	395	437*		0,76 ± 0,03
	iPrOH	20,2	372	395	434*		0,78 ± 0,03
	tBuOH	12,5	372	395	431*		0,78 ± 0,03

### 5.2.3.2 Transiente Absorptionsmessung in Methanol

Um die zwei unterschiedlichen emittierenden Zustände näher zu charakterisieren und ihre Dynamik aufzuklären, wurden zeitaufgelöste Absorptionsmessungen vorgenommen. Die transienten Absorptionsmessungen wurden in allen acht Lösungsmitteln bei einer Anregungswellenlänge von 388 nm aufgenommen. Da PyA in den verschiedenen Lösungsmitteln die gleiche grundlegende Dynamik und übereinstimmende Signale zeigt, werden diese beispielhaft für Methanol diskutiert. Anschließend werden die Unterschiede in den Lösungsmittelklassen und die Abhängigkeit von der Permittivität des Lösungsmittels näher beleuchtet.

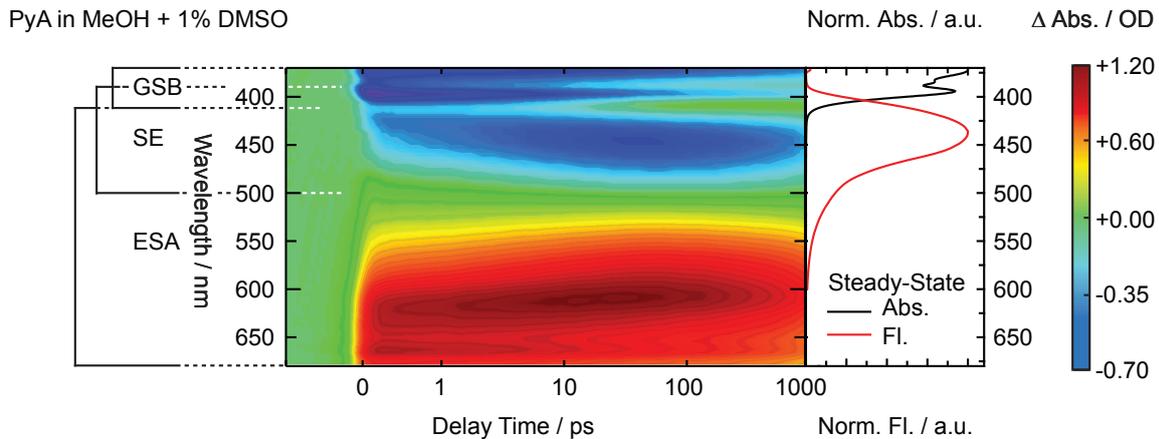


Abbildung 43: Transientes Absorptionsspektrum von PyA ( $c(\text{PyA}) = 150 \mu\text{M}$ ) in Methanol mit 1 Vol.-% DMSO (mitte) und zusätzlich normiertes stationäres Absorptions- und Fluoreszenzspektrum (rechts). Die Bereiche des GSB, der SE und der ESA sind gekennzeichnet (links)

Die transienten Absorptionsdaten von PyA können grundsätzlich in drei Signallbereiche eingeteilt werden. Im Fall von Methanol als Lösungsmittel (Abb. 43) ist das GSB-Signal im Bereich von 370 nm bis ca. 410 nm zu sehen. Dieses ist teilweise durch die SE überlagert, die bereits geringe Amplituden bei 390 nm aufweist und ab 410 nm bis ca. 500 nm das Spektrum dominiert. Zwischen 500 nm und 550 nm sind kleine Amplitudenanteile der SE zu erwarten. Die ESA, die den dritten Signaltypus darstellt, überlagert diese jedoch. Dadurch kommt es zu einem Nulldurchgang der Amplitude um 500 nm, wo eigentlich noch Signalanteile der SE zu erwarten wäre. Die ESA dominiert ab ca. 525 nm das transiente Absorptionsspektrum und erstreckt sich bis über den Messbereich hinaus. Der Messbereich ist ab ca. 700 nm wegen Störsignalen aufgrund der Laserfundamentalen und gleichzeitig mangels intensiven Weißlichts nicht zugänglich. Deshalb ist es nicht möglich, die niederenergetischen Komponenten der ESA zu untersuchen. Auch der Spektralbereich bei Wellenlängen kürzer als 370 nm lässt sich nicht betrachten, da unterhalb dieser Wellenlänge das Weißlicht des Abtastpulses nicht ausreichend intensiv ist, um verlässliche Signale zu erhalten. Da die ESA nur bis ca. 550 nm durch Amplitudenanteile der SE überlagert werden kann (Abb. 43, rechts), werden vor allem ihre Signale betrachtet, um eindeutige Informationen über die Dynamik zu erhalten.

### Charakteristik der langwelligen ESA

Betrachtet man die Spektren bei fester Verzögerungszeit der TA (Abb. 44) ist festzustellen, dass das ESA-Signal zwischen ca. 500 nm und ca. 690 nm von zwei Banden dominiert wird (ESA1 und ESA2). Die ESA1-Bande erscheint während der ersten 500 fs nach Anregung und weist ein Maximum bei 663 nm ( $\lambda_{ESA1}$ ) auf. Zusätzlich sind zwei Schultern bei 639 nm und 623 nm zu sehen. Anschließend erscheint innerhalb von 6 ps die ESA2-Bande, die keine klar erkennbare Feinstruktur aufweist und über ein Intensitätsmaximum bei 614 nm ( $\lambda_{ESA2}$ ) verfügt. Im gleichen Zeitbereich verliert die ESA1-Bande an Amplitude. Dies spricht dafür, dass die ESA1-Bande zu einem Zustand gehört, der einen weiteren Zustand bevölkert, welcher durch die ESA2-Bande spektral beschrieben wird. Die ESA2-Bande schiebt anschließend innerhalb von 50 ps hypsochrom um ca. 6 nm (Abb. 44, oben) hin zu 608 nm ( $\lambda_{ESA2S}$ ).

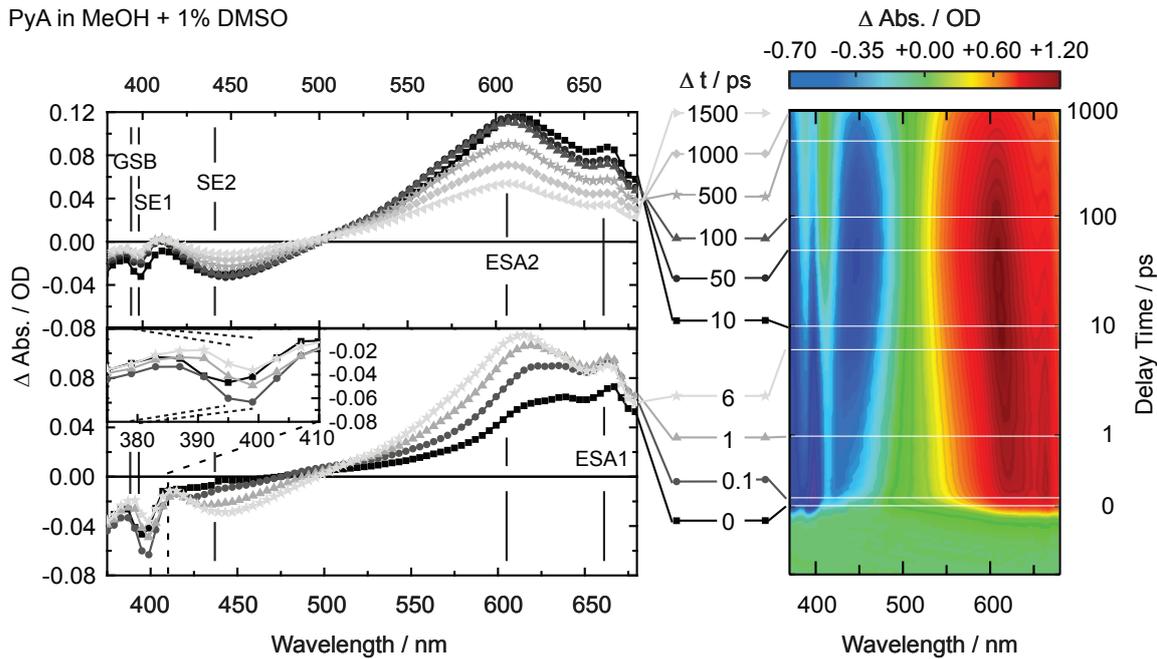


Abbildung 44: Spektren bei fester Verzögerungszeit des transienten Absorptionsspektrums von PyA ( $c(\text{PyA}) = 150 \mu\text{M}$ ) in Methanol mit 1 Vol.-% DMSO (links) und zugehörige Konturauftragung (rechts).

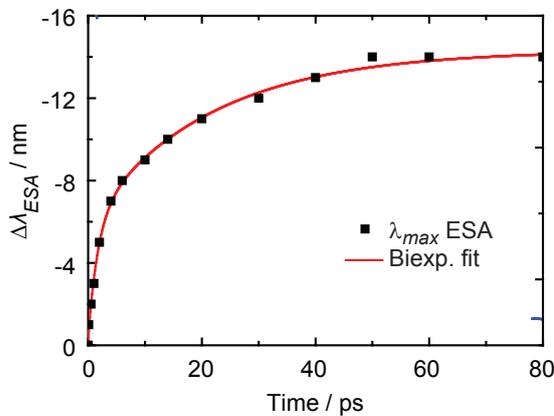


Abbildung 45: Spektrale hypsochrome Verschiebung der ESA2-Bande bei PyA in Methanol.

Eine solche spektrale Verschiebung spricht für eine energetische Stabilisierung des zugehörigen Zustands. Trägt man die spektrale Lage des Intensitätsmaximums der ESA2-Bande gegen die Verzögerungszeit nach der Anregung auf (Abb. 45) und legt eine exponentielle Anpassungsfunktion (Gl. (5.1)) an, werden zwei Zeitkonstanten benötigt, um die Funktion an die Daten ausreichend genau anzupassen.

$$f(t) = \sum_{i=0}^n A_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (5.1)$$

Die erste gefundene Zeitkonstante liegt bei  $1,8 \pm 0,3 \text{ ps}$ , während die zweite eine Größenordnung langsamer ist und einen Wert von  $22 \pm 3 \text{ ps}$  aufweist. Die erste kürzere Zeitkonstante lässt sich dem Erscheinen der ESA2-Bande zuordnen. Grund für diese Zuordnung ist die Berücksichtigung der Überlagerung der ESA1-Bande und der ESA2-Bande. Genauer gesagt, kommt es durch den Wechsel des Amplitudenverhältnisses zugunsten der ESA2-Bande aufgrund der zunehmenden Bevölkerung des zugehörigen Zustands, zu einer veränderten Lage des Intensitätsmaximums, was wie eine spektrale Verschiebung wirkt. Ein

Indiz dafür ist das am Anfang breite und strukturierte Maximum. Die zweite Zeitkonstante hingegen kann eindeutig der spektralen Verschiebung der ESA2-Bande zugeordnet werden. Nach der spektralen Verschiebung verlieren beide Banden (ESA1 und ESA2) an Amplitude mit einer Zerfallszeit, die das maximale Zeitfenster der Messung von 1,5 ns überschreitet.

### **GSB und SE Charakteristik**

Die Minima im Spektralbereich des GSB (395-375 nm) entsprechen in ihrer spektralen Position der Lage der stationären Absorptionsmaxima (vgl. Abb. 40  $\lambda_{abs1}$  und  $\lambda_{abs2}$  mit Abb. 44, Einschub links unten). Der Zerfall des Signals bei 375 nm zeigt dabei sehr wahrscheinlich nur die Wiederbevölkerung des Grundzustands. Dies kann angenommen werden, da im Bereich um 375 nm keine Emission in den stationären Messungen und kein Hinweis auf eine ESA zu beobachten ist. Beide Minima des GSB sollten entsprechend der stationären Messungen nahezu gleich große Amplituden besitzen. Das Minimum bei 395 nm wird aber von der SE überlagert und weist somit eine höhere Amplitude auf als das Minimum bei 375 nm. Innerhalb der ersten 500 fs nach Anregung ist eine spektrale Verschiebung des Minimums bei 395 nm zu sehen (Abb. 44, Einschub links unten). Diese spektrale Verschiebung wird der SE zugeschrieben und spricht für eine IVR, die in einem für Pyren typischen Zeitbereich stattfindet<sup>[20,220,220]</sup>. Die sich nach der IVR ausbildende SE ist strukturiert und wird im Folgenden als SE1 bezeichnet. Sie weist ein Maximum bei 400 nm ( $\lambda_{SE1}$ ) auf. Ähnlich wie die ESA1-Bande, verliert die SE1-Bande innerhalb von 6 ps an Amplitude. Gleichzeitig entsteht analog der ESA2-Bande eine weitere unstrukturierte SE-Bande (SE2). Sie erscheint im Bereich zwischen 435 nm und 515 nm. Das Maximum der SE2-Bande liegt bei ca. 443 nm. Anschließend schiebt die SE2-Bande bathochrom in den Bereich der ESA, wobei es aufgrund der überlagerten ESA nicht möglich ist, die genaue, endgültige spektrale Lage der SE2-Bande zu bestimmen. Die spektrale Verschiebung führt dabei zu einer Verringerung des Anteils der Amplitude der SE im Bereich des GSB. Folglich nähert sich das Amplitudenverhältnis der Minima des GSB dem aus den stationären Messungen erwarteten an (Abb. 44, oben). Sowohl ESA1 und SE1, als auch ESA2 und SE2 korrelieren im Hinblick auf die Zeitbereiche der Dynamik und die spektralen Änderungen. Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass ESA1 und SE1 den selben elektronischen Zustand ( $S_1$ ) beschreiben, während ESA2 und SE2 gemeinsam einen weiteren elektronischen Zustand ( $S_{1x}$ ) beschreiben. Die Signale im Bereich der SE zerfallen wie bei der ESA mit einer Zeit außerhalb des messbaren Zeitbereichs.

### **ESA im Bereich der SE**

Wie bereits erwähnt, kommt es im Fall von PyA zu einer Überlagerung von ESA und SE, was zu einer starken Kompensation beider Signale im Bereich um 500 nm führt. Da ein SE-Signal immer negativ ist, weist die positive Amplitude ab ca. 50 ps um 410 nm auf eine ESA (Abb. 44, oben links) im Bereich der SE hin. Diese Annahme wird gestützt durch das Fehlen eines Intensitätsminimums in den stationären Fluoreszenzmessungen, das um 410 nm sichtbar sein müsste (Abb. 43). Hinzu kommt, dass Pyren und seine Derivate dafür bekannt sind, im sichtbaren Spektralbereich eine sehr breite ESA aufzuweisen<sup>[19,20,23,26,59,225]</sup>. Das instantane Auftreten des Signals um 410 nm spricht dafür, dass es sich um einen Beitrag der ESA1-Bande handelt. Der Kompensationseffekt durch die Überlagerung von ESA und SE verhindert eine Bestimmung der Größenordnung der spektralen Verschiebung und der genauen spektralen Lage der SE1- und SE2-Banden.

### Lebensdauerdichteanalyse

Um die Anzahl der vorliegenden Kinetiken und die zugehörigen Zeitkonstanten zu bestimmen, wurde eine LDA durchgeführt. Im Fall von PyA in Methanol erhält man die in Abbildung 46 zu sehende LDM. Mit Hilfe der LDM wurde eine Gesamtanzahl von vier Zeitkonstanten gefunden, welche das System hinreichend genau beschreiben und auf die im Folgenden näher eingegangen wird. Die erste Zeitkonstante  $\tau_1$  liegt bei 0,2-0,3 ps, was innerhalb der

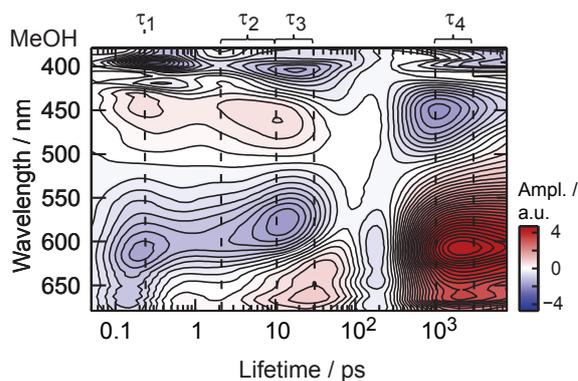


Abbildung 46: LDM von PyA in Methanol mit kenntlich gemachter zeitlicher Lage der Zeitkonstanten.

Zeitauflösung des Messaufbaus liegt. Sie besitzt Minima der Lebensdauerdichteverteilung bei 395 nm, 419 nm, 611 nm und 662 nm sowie ein Maximum bei 445 nm. Die Minima bei 395 nm und 419 nm beschreiben dabei die ultraschnelle spektrale Verschiebung der SE, die das GSB überlagert. Das Maximum bei 445 nm weist hingegen auf eine Signalzunahme der SE1-Bande hin. Die Minima bei 611 nm und 662 nm zeigen die Signalzunahme der strukturellen Komponenten der ESA1-Bande. Aufgrund der ultraschnellen Natur und der spektralen Lage der Extrema wird  $\tau_1$  der bereits erwähnten IVR zugeordnet.

Bei ca. 445 nm und 611 nm sind über einen großen Zeitbereich (2-30 ps) jeweils positive und negative Extrema der Lebensdauerdichteverteilungen zu sehen. Die zeitliche Ausdehnung dieser Beiträge ist die Folge einer Überlagerung zweier Kinetiken mit einer ähnlichen Größenordnung der Lebensdauern (Kap. 5.2.3.3). Die entsprechenden Zeitkonstanten ( $\tau_2$  und  $\tau_3$ ) sind daher hier nicht eindeutig bestimmbar, liegen aber im Bereich zwischen ca. 2-10 ps ( $\tau_2$ ) und ca. 10-20 ps ( $\tau_3$ ). Dieser Zeitbereich beschreibt in den transienten Absorptionsmessungen die Population des  $S_{1x}$ -Zustands mit  $\tau_2$  und die energetische Stabilisierung von diesem mit  $\tau_3$ . Die Anpassungsfunktion an die spektrale Positionsänderung der ESA2 liefert für diese Prozesse ebenfalls zwei Zeitkonstanten in diesem Bereich, was die Annahme von zwei gegenseitig überlagernden Signalen unterstützt. Deren Werte können aber auch dort wegen der zu geringen spektralen Auflösung ( $\approx 4$  nm) und zeitlichen Überlagerung der Kinetiken nicht als sehr verlässlich angesehen werden. Das im selben Zeitbereich für PyA in Methanol sichtbare Minimum bei 404 nm und das Maximum bei 663 nm sind eine Folge der spektralen Verschiebung, da diese zu reduzierten SE2- und ESA2-Amplituden in diesem Spektralbereich führen und die LDA dies bei den gegebenen Regularisierungsparametern als einen Zerfall wertet.

Bei den Zeitkonstanten zwischen 1 ns und 3 ns beobachtet man eine breite intensive Lebensdauerdichteverteilung bei 452 nm, 606 nm und 626 nm. Dieser Zeitbereich beschreibt den Zerfall der ESA und SE. Er weist aufgrund der logarithmischen Messschritte nur eine geringe Anzahl an Messpunkten auf. Zusätzlich überschreitet das Zerfallssignal den zeitlichen Messbereich. Deshalb ist eine Bestimmung der längsten Zeitkonstante  $\tau_4$  für die TA-Messungen nicht möglich.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen an PyA in Methanol<sup>[226]</sup> die Photophysik von PyA zwei angeregte Zustände aufweist und vier

Zeitkonstanten gefunden wurden. Die Zeitkonstanten  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  und  $\tau_4$  bewegen sich im selben Zeitbereich wie in den früheren Messungen. Die dritte Zeitkonstante  $\tau_3$  (10-20 ps), welche die spektrale Verschiebung der ESA2-Bande und SE2-Bande beschreibt, unterscheidet sich um eine Größenordnung, verglichen mit früheren Ergebnissen (470 ps)<sup>[227]</sup>. Dieser Unterschied zu den vorherigen Datensätzen liegt in der höheren spektralen Auflösung des verbesserten TA-Aufbaus und vor allem dem besser angepassten Analyseansatz begründet. Durch die Verwendung der LDA wird das Defizit einer exponentiellen globalen Anpassung bei spektralen Verschiebungen, die eine lineare Änderung mit der Zeit aufweisen, überwunden.

Eine Zusammenfassung der gefundenen Zeitkonstanten von PyA in allen Lösungsmitteln wird auf Seite 89 in Tabelle 5 gegeben.

### 5.2.3.3 Vergleich der Ergebnisse der transienten Absorptionsmessungen in den verschiedenen Lösungsmitteln

Gemäß der Untersuchungen an PyA in verschiedenen Lösungsmitteln liegen die Zeitkonstanten der IVR ( $\tau_1$ ) innerhalb der Zeitauflösung zwischen 0,2 ps und 0,3 ps, was typische Werte für Pyren und Pyrenderivate sind<sup>[19,20,220]</sup>. Es ist kein Einfluss der Lösungsmittelklasse oder der Permittivität auf  $\tau_1$  festzustellen. Nach der IVR sind jedoch deutliche Einflüsse auf die Dynamik und das spektrale Verhalten erkennbar (Abb. 48 und Abb. 49). Für beide Lösungsmittelklassen gilt aber weiterhin, dass der  $S_1$ -Zustand den energetisch nahe liegenden  $S_{1x}$ -Zustand bevölkert.

#### 2-(1-Ethynylpyren)-adenosin in protischen Lösungsmitteln

In protischen Lösungsmitteln wird der  $S_{1x}$ -Zustand innerhalb von 20 ps bevölkert. Auf den ersten Blick scheint mit einer steigenden Permittivität der Lösungsmittel der  $S_{1x}$ -Zustand zunehmend schneller bevölkert zu werden, da die maximale Signalamplitude der entsprechenden Banden (ESA2- und SE2-Bande) immer früher erreicht wird (Abb. 48). Die später gezeigten Streak-Kamera-Messungen (Kap. 5.2.3.4) deuten aber darauf hin, dass das immer frühere Erreichen des Amplitudenmaximums die Folge einer Verschiebung der energetischen Lage des  $S_{1x}$ -Zustands ist. Sie führt dabei zu einem Ansteigen des Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Übergänge aus dem  $S_{1x}$ -Zustand. Infolgedessen wird davon ausgegangen, dass die Permittivität keinen Einfluss auf die Rate dieses Prozesses nimmt. Die zum  $S_{1x}$ -Zustand zugehörige ESA2-Bande weist eine große Amplitude auf und deutet folglich auf einen stark bevölkerten  $S_{1x}$ -Zustand hin. Eine genaue Bevölkerungsverteilung ist nicht bestimmbar. Dies hat zwei Gründe: Erstens, sind die für eine Bestimmung benötigten Übergangsdipolmomente nicht bekannt; Zweitens, stört die Überlagerung der ESA1-Bande und ESA2-Bande eine genaue Unterscheidung der Anteile beider Zustände. Vergleicht man die LDM von PyA in Methanol mit denen in anderen Lösungsmitteln, z.B. tert-Butanol, bei dem die spektrale Verschiebung deutlich langsamer vonstatten geht (Abb. 47), erkennt man, dass bei ca. 200 ps ein zusätzliches Extremum jeweils in der ESA- und SE-Region zu sehen ist (Abb. 47, unten). Im Fall von PyA in Methanol liegen die beiden Extrema so nah beieinander, dass es zu einer langgezogenen intensiven Lebensdauerdichteverteilung kommt. Eindeutig ist aber eine leichte Zunahme der ESA2-Amplitude relativ zur ESA1-Amplitude mit steigender Permittivität des Lösungsmittels zu erkennen.

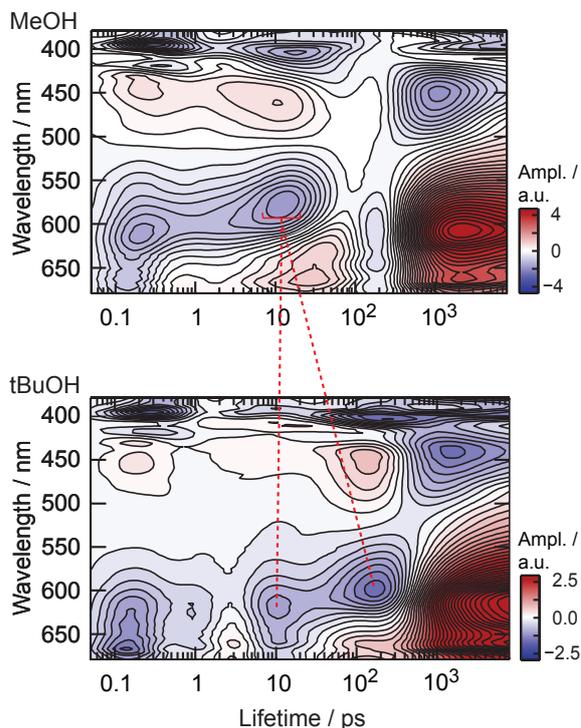


Abbildung 47: LDM von PyA in Methanol (oben) im Vergleich zu der in tert-Butanol (unten).

Dies spricht für eine Absenkung der energetischen Lage des  $S_{1x}$ -Zustands relativ zum  $S_1$ -Zustand, wobei die Bevölkerungsrate des  $S_{1x}$ -Zustands scheinbar nicht beeinflusst wird. Da die ESA2-Bande spektral von der ESA1-Bande überlagert wird, ist eine Aussage über die genaue spektrale Form der ESA2-Bande nach wie vor schwer, jedoch ist die ESA2-Bande auch in den anderen protischen Lösungsmitteln unstrukturiert. Die an die Bevölkerung des  $S_{1x}$ -Zustands anschließende hypsochrome Verschiebung der ESA2-Bande und die bathochrome Verschiebung der SE2-Bande werden mit steigender Permittivität der Lösungsmittel linear schneller und größer. Die als Ursache angenommene Stabilisierung des  $S_{1x}$ -Zustands wird mit einer Lösungsmittelreorganisation begründet<sup>[228]</sup>, die durch das Vorliegen eines Lösungsmittelgemischs aufgrund des 1 %-igen Volumenanteils an DMSO in ihrer Dynamik zusätzlich beeinflusst werden könnte<sup>[229]</sup>. Außerdem ist ein polarer Charakter des  $S_{1x}$ -Zustands verglichen zum  $S_1$ -Zustand anzunehmen, da die Permittivität nur Einfluss auf die spektralen Eigenschaften des

$S_{1x}$ -Zustands nimmt. Ein alternativer Erklärungsansatz für diese spektrale Verschiebung ist das Entstehen der ESA2- bzw. SE2-Bande während des Zerfalls der ESA1- und SE1-Bande, das bei einer geringen spektralen Distanz der Bandenmaxima wie eine spektrale Verschiebung wirkt. Dieser Ansatz wird aber wegen der Streak-Kamera-Messungen (Kap. 5.2.3.4) verworfen, da dort eine spektrale Verschiebung zu erkennen ist. Die zunehmend schnellere Verschiebung bei steigender Permittivität ist eine Folge der stärkeren elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem angeregten PyA und den umgebenden Lösungsmittelmolekülen. Ein Einfluss der Viskosität der Lösungsmittel ist dabei jedoch nicht auszuschließen.

Die Gesamtlebensdauer ( $\tau_4$ ) von PyA in den verschiedenen Lösungsmitteln konnte, wie im Fall von PyA in Methanol, aufgrund der Überschreitung des Messbereichs und mangelnder Anzahl an Messpunkten in diesem Bereich nicht mit Hilfe der LDM ermittelt werden.

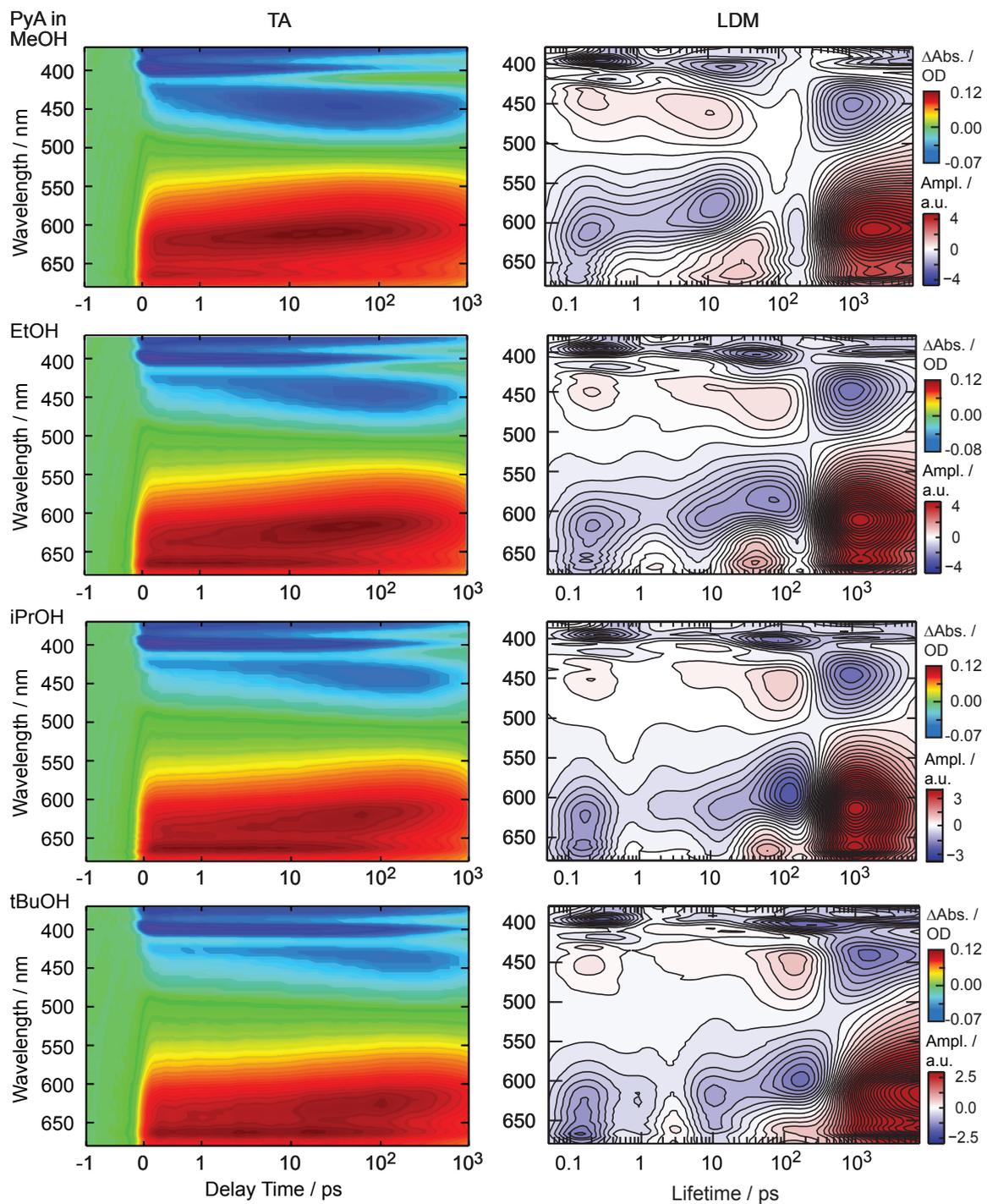


Abbildung 48: TA-Spektren und LDM von PyA in protischen Lösungsmitteln, sortiert von oben nach unten nach abnehmender Permittivität der Lösungsmittel.

### 2-(1-Ethynylpyren)-adenosin in aprotischen Lösungsmitteln

Anders als bei den protischen Lösungsmitteln ist in aprotischen Lösungsmitteln, ist mit steigender Permittivität der Lösungsmittel eine leichte spektrale Verschiebung der ESA1-Bande zu sehen (Abb. 49). Die Werte für die Lage der ESA1-Bande sind dabei wegen der Überlagerung der beiden ESA-Banden nicht exakt bestimmbar (Tab. 5). Das in den stationären Absorptionsspektren zu erkennende spektrale Schieben hin zu höheren Wellenlängen bewegt sich in Bezug auf die Größenordnung in einem ähnlichen Bereich (Abb. 40 und Tab. 4,  $\lambda_{Abs1}$ ). Das deutet auf eine Anhebung der energetischen Lage des  $S_0$ -Zustands bzw. eine Absenkung des  $S_1$ -Zustands mit steigender Permittivität hin. Welcher Prozess genau vorliegt, kann aber anhand der Messungen nicht entschieden werden. Eindeutig liegt jedoch eine leichte Verringerung in der energetischen Distanz der beiden Zustände aufgrund ihrer unterschiedlichen Polaritäten vor. Diese ist jedoch gering, so dass nur ein kleiner Unterschied in den Dipolmomenten der Zustände vorliegen muss. Dies erklärt, warum der  $S_1$ -Zustand in beiden Lösungsmittelklassen nur eine sehr geringe Abhängigkeit von der Permittivität zeigt. Die in den stationären Fluoreszenzspektren zu sehende Feinstruktur der Emission aus dem  $S_1$ -Zustand (Abb. 40) ist in den TA-Messungen nicht zu beobachten, was an der Überlagerung der SE mit der ESA und der spektralen Verschiebung der SE1-Bande liegt.

Der  $S_{1x}$ -Zustand wird, gemittelt über alle untersuchten aprotischen Lösungsmittel, innerhalb von 3.7 ps bevölkert, was, verglichen mit den protischen Lösungsmitteln, etwas schneller ist, aber auch hier keinen Einfluss der Permittivität auf die Bevölkerrungsrate erkennen lässt. In DMSO und N,N-Dimethylformamid (DMF) wird die zum  $S_{1x}$ -Zustand gehörende ESA2-Bande nahezu vollständig von der ESA1-Bande überlagert, wohingegen die beiden Banden in Aceton und Essigsäureethylester (EtOAc) spektral voneinander unterscheidbar sind (Abb. 49, links). Zusätzlich ist eine relative Amplitudenzunahme der ESA2-Bande, im Vergleich zu der ESA1-Bande, mit steigender Permittivität zu beobachten, was sich mitunter durch die Zunahme des Beitrags der Emission aus dem  $S_{1x}$ -Zustand in der stationären Fluoreszenz zeigt. Diese Amplitudenzunahme führt wie bei den aprotischen Lösungsmitteln zu der Annahme, dass eine Stabilisierung des  $S_{1x}$ -Zustands mit steigender Permittivität der Lösungsmittel einhergeht. Trotzdem ist die relative Amplitude der ESA2-Bande im Vergleich zur ESA1-Bande deutlich kleiner, was konträr zu den protischen Lösungsmitteln ist. Eine solche Amplitudenverteilung bedeutet, dass der  $S_{1x}$ -Zustand hier energetisch ungünstiger als der  $S_1$ -Zustand und somit nur gering bevölkert ist. Dies zeigt, dass nicht nur die Permittivität, sondern auch die Lösungsmittelklasse das Bevölkerungsverhältnis beeinflusst.

Die in allen protischen Lösungsmitteln beobachtete spektrale Verschiebung der SE2-Bande ist im Fall der aprotischen Lösungsmittel nur in DMSO und in DMF zu sehen, wobei keine spektrale Verschiebung der ESA2-Bande erkennbar ist. Eine solche Beobachtung lässt sich mit Hilfe der spektralen Überlagerung mit der ESA1-Bande erklären, da sie das deutlich schwächere Signal der ESA2-Bande verschleiert. Eine spektrale Verschiebung wird jedoch in den stationären Messungen für alle aprotischen Lösungsmittel beobachtet. Es ist daher davon auszugehen, dass eine spektrale Verschiebung der ESA2- und SE2-Bande für alle aprotischen Lösungsmittel vorliegt.

Wie im Fall der protischen Lösungsmittel konnte  $\tau_4$  nicht mit Hilfe der LDM bestimmt werden.

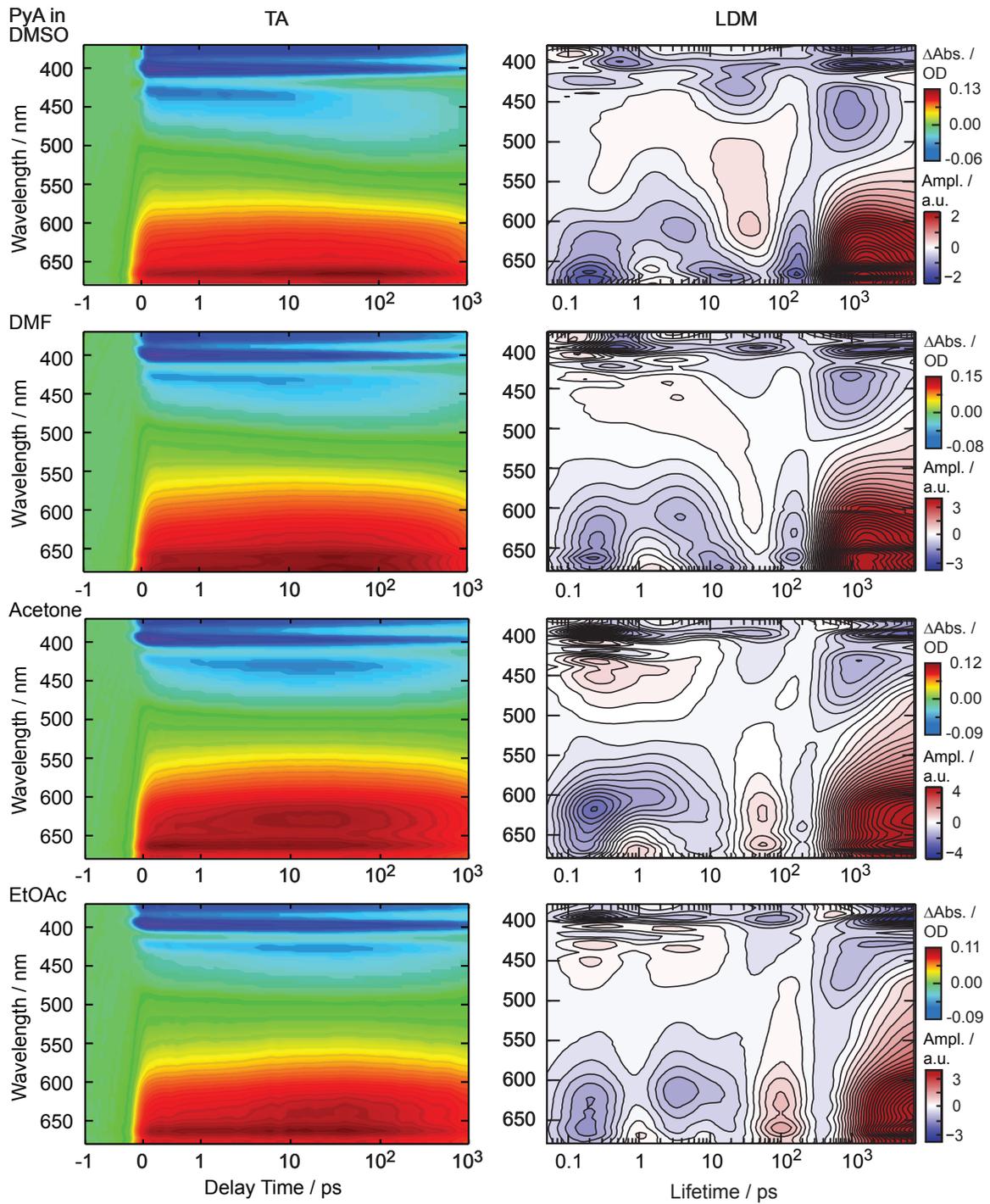


Abbildung 49: TA-Spektren und LDM von PyA in aprotischen Lösungsmitteln, sortiert von oben nach unten nach abnehmender Permittivität der Lösungsmittel.

### Zusammenfassung der relativen energetischen Lage der angeregten Zustände in Abhängigkeit der Lösungsmittelklasse und Permittivität

Wie oben bereits beschrieben erlauben Lösungsmittelklasse und Permittivität die Kontrolle des Bevölkerungsverhältnisses zwischen dem  $S_1$ -Zustand und dem  $S_{1x}$ -Zustand. Eine erhöhte Bevölkerung des  $S_{1x}$ -Zustands ist dabei das Resultat einer energetischen Stabilisierung des  $S_{1x}$ -Zustands relativ zum  $S_1$ -Zustand. Dabei ist der Einfluss der Lösungsmittelklasse größer als der Einfluss der Permittivität. Deswegen bleibt in aprotischen Lösungsmitteln der  $S_1$ -Zustand sogar bei einer hohen Permittivität der Lösungsmittel favorisiert (Abb. 49). In protischen Lösungsmitteln ist die Situation genau anders herum und der  $S_{1x}$ -Zustand ist stärker bevölkert sogar in Lösungsmitteln mit einer sehr geringen Permittivität (Abb. 48). Deswegen muss der  $S_{1x}$ -Zustand in protischen Lösungsmitteln energetisch tiefer liegen als der  $S_1$ -Zustand.

Obwohl die energetische Lage des  $S_{1x}$ -Zustands, bezogen auf den  $S_1$ -Zustand, in allen Lösungsmitteln variiert, verändert sich die spektrale Lage der SE2-Bande kaum. Dies bedeutet, dass der zugehörige Grundzustand des  $S_{1x}$ -Zustands gleich stark in seiner energetischen Lage verändert wird. Dies ist eine Folge der veränderten Lösungsmittelgeometrie im  $S_{1x}$ -Zustand, die bei Erreichen des Grundzustands erst wieder rückgängig gemacht werden muss, um die energetische Lage des ursprünglichen Grundzustands zu erreichen.

#### 5.2.3.4 Streak-Kamera-Messungen

Streak-Kamera-Messungen wurden in Kooperation mit Franziska F. Graupner durchgeführt, um die zeitaufgelösten Fluoreszenzeigenschaften zu untersuchen (Abb. 50).

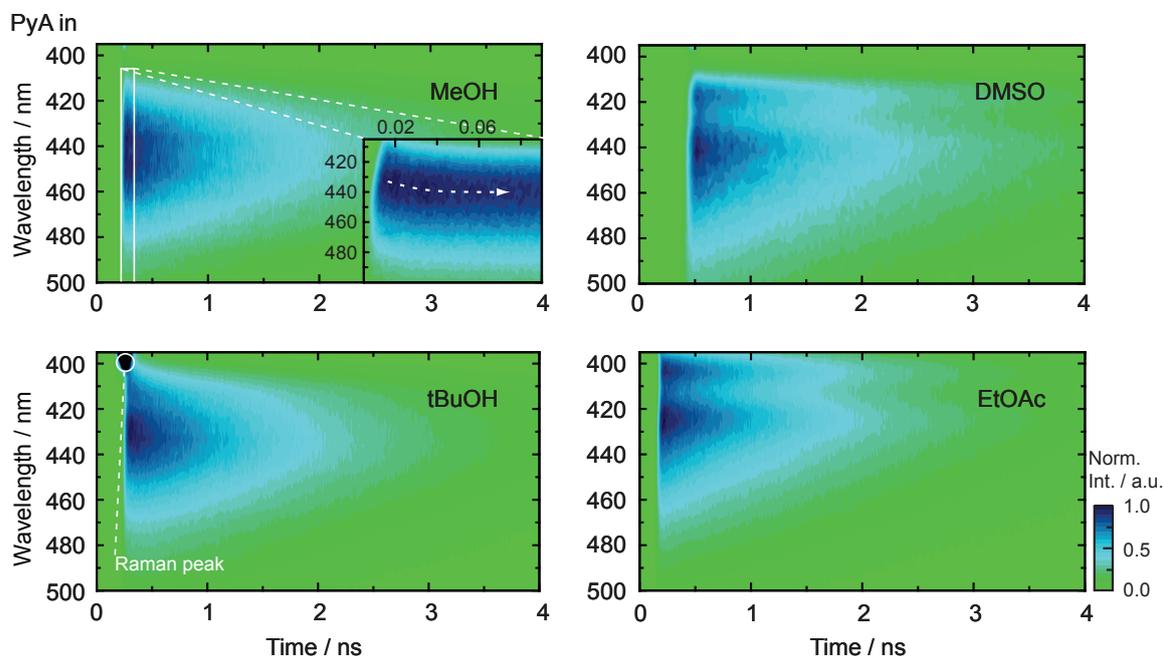


Abbildung 50: Streak-Kamera-Spektren von PyA in Methanol, tert-Butanol, DMSO und EtOAc in einem 4,27 ns Zeitfenster. Einschub im Fall von Methanol: Messung mit einem 0,48 ns Zeitfenster zur besseren Darstellung der spektralen Verschiebung.

Ziel war es, Daten über die Dynamik und das spektrale Verhalten der Fluoreszenz ohne die störenden Einflüsse des überlagerten GSB und der ESA zu erhalten, die eine Interpretation der Daten erschweren. Es sollte auch die Frage geklärt werden, ob eine spektrale Verschiebung aufgrund der Stabilisierung des  $S_{1x}$ -Zustands zu sehen ist, und nicht das Erscheinen eines weiteren Zustands den Eindruck einer spektralen Verschiebung vermittelt. Ein weiterer Fokus lag auf der Bestimmung der absoluten Gesamtlebensdauer von PyA im angeregten Zustand, die bisher über die zuvor beschriebene globale Lebensdaueranalyse nur abgeschätzt wurde, da sie den zeitlichen Messbereich des Messaufbaus überschritten hat. PyA wurde dabei in den Lösungsmitteln mit der höchsten und der niedrigsten Permittivität beider Lösungsmittelklassen (Methanol, tert-Butanol, DMSO und EtOAc) gemessen.

Im Fall von Methanol als Lösungsmittel ist deutlich zu erkennen, dass eine spektrale Verschiebung von  $\approx 9$  nm ( $\approx 431$  nm zu  $\approx 440$  nm) in einem Zeitbereich, der kleiner 100 ps ist, stattfindet (Abb. 50, oben links, Grafikeinschub). Trägt man die maximale Fluoreszenzintensität der Messung mit einem Zeitfenster von 0,5 ns gegen die Zeit auf (Abb. 51) und legt eine exponentielle Anpassungsfunktion (Gl. (5.1)) wie im Fall der ESA2-Bande an (Abb. 45), wird eine Zeitkonstante ( $\tau_3^{Fl}$ ) von  $16,8 \pm 1,0$  ps für die spektrale Verschiebung erhalten. Das Fehlen der schnellen Zeitkonstante, die bei der Anpassung an die ESA2-Bande gefunden wurde, lässt sich mit der schlechteren Zeitauflösung der Streak-Kamera-Messungen ( $\Delta t = 6-20$  ps) erklären. Die gefundene Zeitkonstante für die spektrale Verschiebung liegt im selben Zeitbereich wie jene, die mittels der LDM ermittelt wurde.

Das zweite untersuchte protische Lösungsmittel (tert-Butanol) sollte entsprechend der stationären und TA Messungen einen ähnlich stark bevölkerten  $S_1$ -Zustand und  $S_{1x}$ -Zustand aufweisen. Das Spektrum zeigt eine starke Ähnlichkeit mit dem von PyA in Methanol und weist auch eine spektrale Verschiebung auf, die langsamer vonstatten geht als in Methanol. Da die tert-Butanol Messungen jedoch ein sehr starkes Ramansignal

im Bereich der Fluoreszenz um 400 nm zeigen, ist eine detaillierte Analyse der kurzen Zeiten nicht möglich (Abb. 50). Im Rahmen der durchgeführten Messung lässt sich trotzdem feststellen, dass es sich um eine spektrale Verschiebung und nicht um einen weiteren Zustand, der bevölkert wird, handelt. Da die spektrale Verschiebung derart klein ausfällt, wird die Annahme unterstützt, dass kein ICT-Zustand vorliegt, sondern der  $S_{1x}$ -Zustand eine höhere Polarität als der  $S_1$ -Zustand aufweist (vgl. Kap. 5.2.3.1). Da anhand der TA-Messungen gezeigt werden konnte, dass in protischen Lösungsmitteln der  $S_{1x}$ -Zustand stark bevölkert ist, muss infolgedessen, wie bei den stationären Messungen zu sehen ist (Abb. 40), die Rückkehr in den Grundzustand aus dem  $S_{1x}$ -Zustand zu der unstrukturierten rot verschobenen Fluoreszenzbande führen (Abb. 50). Die Fluoreszenzbande von PyA in aprotischen Lösungsmit-

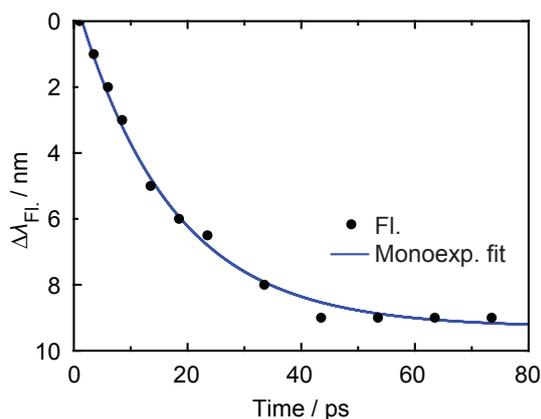


Abbildung 51: Spektrale Verschiebung des Fluoreszenzmaximums in Streak-Kamera-Messungen von PyA in Methanol aufgetragen gegen die Verzögerungszeit.

teln weist eine Feinstruktur auf, die mit steigender Permittivität des Lösungsmittels spektral rot verschoben ist, was wieder den Unterschied in der Polarität des  $S_0$ -Zustands und des  $S_1$ -Zustands aufzeigt. Den Ergebnissen der TA-Messungen folgend, ist in aprotischen Lösungsmitteln hauptsächlich der  $S_1$ -Zustand bevölkert. Aufgrund dessen ist die Rückkehr in den Grundzustand aus dem  $S_1$ -Zustand für die strukturierte Fluoreszenz verantwortlich (Abb. 40, unten).

Die mit Hilfe der globalen Lebensdaueranalyse bestimmten Lebensdauern<sup>4</sup> liegen im Bereich von 2 ns (Tab. 5). In allen Lösungsmitteln ist nur eine Zeitkonstante ( $\tau_4$ ) im Zeitbereich von 2 ns zu finden. Zusätzlich sind geringe Anteile einer möglichen spektralen Verschiebung gefunden worden, die jedoch aufgrund der mangelnden spektralen und zeitlichen Auflösung nicht eindeutig bestimmbar sind. Allgemein ist ein schwacher Trend zu einer erhöhten Gesamtlebensdauer mit steigender Permittivität zu erkennen. So liegt im Fall der protischen Lösungsmittel eine Zunahme von 1,8 ns (tert-Butanol) auf 2,4 ns (Methanol) vor, während bei aprotischen Lösungsmitteln eine Zunahme von 1,8 ns (EtOAc) auf 2,1 ns (DMSO) vorliegt.

Tabelle 5: Spektrale Eigenschaften sowie ermittelte Lebensdauern der TA- und Streak-Kamera-Messungen von PyA.  $\lambda_i$ : Position bzw. Spektralbereich der Banden. Die Spektralbereiche ( $i = ESA2$  und  $SE2$ ) wurden über die beobachteten isobestischen Punkte zwischen ESA und SE bei Verzögerungszeiten über 10 ps bestimmt.  $\lambda_{Trfl1/2}$ : Intensitätsmaxima der Fluoreszenz der Streak-Kamera-Messungen zum Zeitnullpunkt bzw. nach der spektralen Verschiebung.  $\tau_i$ : Zeitkonstanten, bestimmt über LDM der TA-Messungen ( $i = 1-3$ ) bzw. über eine globale Anpassungsfunktion im Fall der Streak-Kamera-Messungen ( $\tau_4$ ).

	PyA in	TA / nm.				SC / nm.		Lebensdauern / ps			
		$\lambda_{ESA1}$	$\lambda_{ESA2}$	$\lambda_{SE1}$	$\lambda_{SE2}$	$\lambda_{Trfl1}$	$\lambda_{Trfl2}$	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	$\tau_4$
Aprotisch	DMSO	666	575-n.b.	403	450-575	410	432	0,2	3,7		2100
	DMF	661	545-n.b.	401	430-545	n.b.	n.d.	0,3	3,7		n.d.
	Aceton	664	515-660	398	420-515	n.b.	n.d.	0,3	3,7		n.d.
	EtOAc	662	515-670	398	420-515	399	422	0,2	3,7		1800
Protisch	MeOH	663	515-630	399	435-515	432	440	0,3	2-10	10-20	2400
	EtOH	663	515-650	399	425-515	n.b.	n.d.	0,2	9,6	76	n.d.
	iPrOH	663	520-655	398	420-520	n.b.	n.d.	0,2	17	130	n.d.
	tBuOH	662	520-655	398	420-520	427	430	0,2	11	170	1800

Die Tatsache, dass nur eine Zerfallszeit, die lösungsmittelabhängig ist, für PyA bestimmt wird, spricht für das bereits bei den FQA (Kap. 5.2.3.1) angenommene Gleichgewicht zwischen den beiden Zuständen im Nanosekundenbereich. Sogar im Fall von tert-Butanol als Lösungsmittel, bei dem aufgrund der gleich starken Bevölkung des  $S_1$ -Zustands und des  $S_{1x}$ -Zustands eine weitere Zerfallszeit deutlich erkennbar sein sollte, konnte keine zusätzliche Zerfallszeit bestimmt werden. Das Gleichgewicht sollte sich im gleichen Zeitbereich wie die Bevölkung des  $S_{1x}$ -Zustands ( $\approx 20$  ps) einstellen, was vergleichsweise schnell ist bezogen auf die Gesamtlebensdauer des Systems. Der Anstieg der Lebensdauer mit steigender

<sup>4</sup>Die globale Lebensdaueranalyse wurde von Franziska F. Graupner durchgeführt.

Permittivität deutet auf eine Verlangsamung der Relaxationsraten aufgrund der veränderten Reaktionskoordinate durch die Stabilisierung des  $S_{1x}$ -Zustands hin.

### 5.2.3.5 Quantenchemische Rechnungen

Um ein besseres Verständnis der Ursache für die Feinstruktur in den Absorptionsspektren und die für das spektrale Verhalten der Fluoreszenz verantwortlichen Übergänge zu erhalten, wurden Untersuchungen mit Hilfe der Dichtefunktionaltheorie (DFT) an PyA durchgeführt<sup>5</sup>. Zusätzlich wurden die Ergebnisse für PyA mit Ergebnissen für Pyren verglichen, um die Ursache für die deutliche Abweichung in den Fluoreszenzeigenschaften zu untersuchen. Vorab ist unbedingt festzuhalten, dass bei den Berechnungen von einem Vakuum als Umgebung ausgegangen wird und somit jegliche Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel vernachlässigt werden.

#### Geometrieoptimierung des Grundzustands

Zuerst wurde eine Grundzustandsoptimierung mit dem Programmpaket Turbomole unter Verwendung der xc-Funktionale B-LYP, B3-LYP, BH-LYP und dem Dunning's double zeta polarisation (DZP) Basissatz durchgeführt.

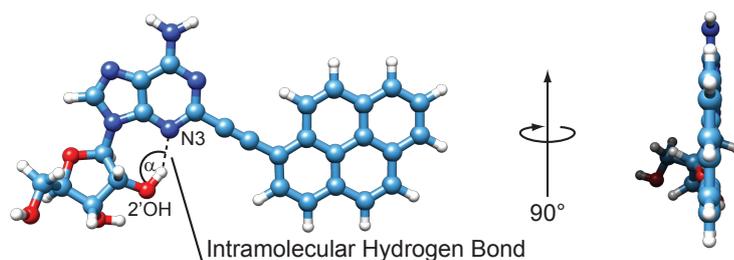


Abbildung 52: PyA-Geometrie für den quantenchemisch optimierten Grundzustand unter Verwendung des BH-LYP xc-Funktional.

Die im Grundzustand optimierte Struktur zeigt unabhängig von dem verwendeten xc-Funktional eine planare Anordnung des Pyrenrestes und des Adenins (Abb. 52, links). Die C2'-OH-Gruppe der Ribose weist eine gewinkelte intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zu dem N3-Stickstoffatom der Nukleobase auf (Abb. 52, links). Die Wasserstoffbrückenbindung hat dabei einen Öffnungswinkel ( $\alpha$ ) von  $151,2^\circ$  (Abb. 52, links). Der Bindungsabstand zwischen dem Sauerstoff- und dem Stickstoffatom ( $d_{O-N}$ ) liegt bei  $2,8 \text{ \AA}$ , während der Bindungsabstand vom Wasserstoff- zum Stickstoffatom ( $d_{H-N}$ ) bei  $1,9 \text{ \AA}$  liegt. Der Abstand zwischen Sauerstoff- und Stickstoffatom würde dabei nach Jeffrey<sup>[230]</sup> einer moderaten, hauptsächlich elektrostatischen Wasserstoffbrückenbindung ( $2,5-3,2 \text{ \AA}$ ) entsprechen. Da es sich aber um eine gewinkelte intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung handelt, muss hier berücksichtigt werden, dass die räumliche Nähe der beteiligten Atome und die große Abweichung von einer linearen Anordnung aufgrund der Molekülgeometrie die Bindungsstärke schwächen könnte. Zu erwarten ist, dass diese Wasserstoffbrückenbindung die Torsion um die glykosidische Bindung im Grundzustand und auch im  $S_1$ -Zustand einschränkt. Dies sollte zu einer erschwerten

<sup>5</sup>Die hier präsentierten quantenchemischen Rechnungen wurden in Kooperation mit Dr. Jürgen Plötner durchgeführt und dürfen mit freundlicher Genehmigung zusammen mit den Abbildungen verwendet werden.

Ausbildung anderer Konformationen und damit einhergehenden Veränderungen der Elektronendichteverteilung führen.

Unter Berücksichtigung der zuvor beobachteten Einflüsse der Lösungsumgebung (vgl. Kap. 5.2.3.3) kann vermutet werden, dass diese intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung geschwächt werden muss, um den  $S_{1x}$ -Zustand zu erreichen. Das wiederum ändert die Elektronendichte auf dem Adenin. Im Fall von aprotischen Lösungsmitteln ist hauptsächlich der  $S_1$ -Zustand bevölkert, was darauf schließen lässt, dass die intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung die Ausbildung der mit dem  $S_{1x}$ -Zustand verknüpften Konformation behindert. Das sollte die Konformation im angeregten  $S_{1x}$ -Zustand und die entsprechende Grundzustandskonformation energetisch ungünstig machen (vgl. Kap. 5.2.3.3). Betrachtet man hingegen PyA in protischen Lösungsmitteln, ist der  $S_{1x}$ -Zustand relativ zum  $S_1$ -Zustand energetisch favorisiert. Dies deutet darauf hin, dass das Stickstoffatom N3 mit den das PyA umgebenden Lösungsmittelmolekülen intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet, anstelle mit der C2'-OH-Gruppe. Das ermöglicht die Ausbildung der Konformation, die mit dem  $S_{1x}$ -Zustand assoziiert wird und gegenüber dem  $S_1$ -Zustand energetisch günstiger liegt. Weitere Untersuchungen des Einflusses der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung wurden mit Hilfe von PydA, der Desoxyvariante von PyA, durchgeführt (siehe Kap. 5.2.4).

### Getestete quantenchemische Methoden und deren Ergebnisse

Mit Hilfe der im Grundzustand optimierten Geometrie wurden die vertikal angeregten Zustände mittels der in Tabelle 6 gezeigten Methoden und dem DZP-Basissatz berechnet. Die Grundzustandsgeometrie und der DZP-Basissatz wurden auch in Kombination mit dem zusätzlichen SVP-Hilfsbasissatz für die SOS-CIS(D)-Methode verwendet. Die Ergebnisse werden im Anschluss mit den experimentellen Daten verglichen, um eine verlässliche Methode zur Berechnung der Situation im angeregten Zustand zu finden. In Tabelle 6 erkennt man bei den Anregungswellenlängen ( $E_{Exc}$ ), die einem Übergang in einen höheren energetischen Zustand entsprechen eine vom Funktional abhängende Blauverschiebung. Diese ist ein Resultat des zunehmenden Anteils des HF-Austauschs (B-LYP < B3-LYP < BH-LYP), der einen Einfluss auf den SI-Fehler nimmt und so zu einer Unterschätzung der Anregungsenergien führt. Die rechenaufwändige CIS-Methode, die dieses Problem nicht aufweist, dient als Referenz und zeigt einen Übergang mit einer hohen Oszillatorstärke in den  $S_1$ -Zustand und einen verbotenen Übergang in den  $S_2$ -Zustand im Bereich der beiden Hauptabsorptionsbanden (Abb. 40,  $\lambda_{Abs1}$  und  $\lambda_{Abs2}$ ). Ein Vergleich der Ergebnisse des CIS-Funktional mit denen des B-LYP-Funktional führt zu der Feststellung, dass das B-LYP-Funktional bei der Beschreibung der Reihenfolge der Zustände versagt und eine Reihe von zweifelhaften CT-Zuständen aufweist (Abb. 53).

Auch das B3-LYP-Funktional führt zu abweichenden Ergebnissen von der CIS-Methode. Hier weist z.B. der  $S_3$ -Zustand eine zu niedrige Oszillatorstärke ( $f_{Osc}$ ) auf. Der hohe CT-Charakter dieses Zustands, lässt das die Vermutung zu, dass es sich um einen eingeschobenen Zustand handelt, der energetisch zu niedrig berechnet wurde.

Erst im Fall des BH-LYP-Funktional wird eine Abfolge der Zustände erhalten, die dem der CIS-Methode entspricht. Die Ergebnisse der Rechnungen zeigen dabei einen optisch aktiven  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang ( $f_{Osc} = 0.6$  bis 1, Tab. 6), der einem Übergang vom HOMO zum LUMO entspricht. Der  $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang hingegen hat eine sehr kleine Oszillatorstärke und ist somit

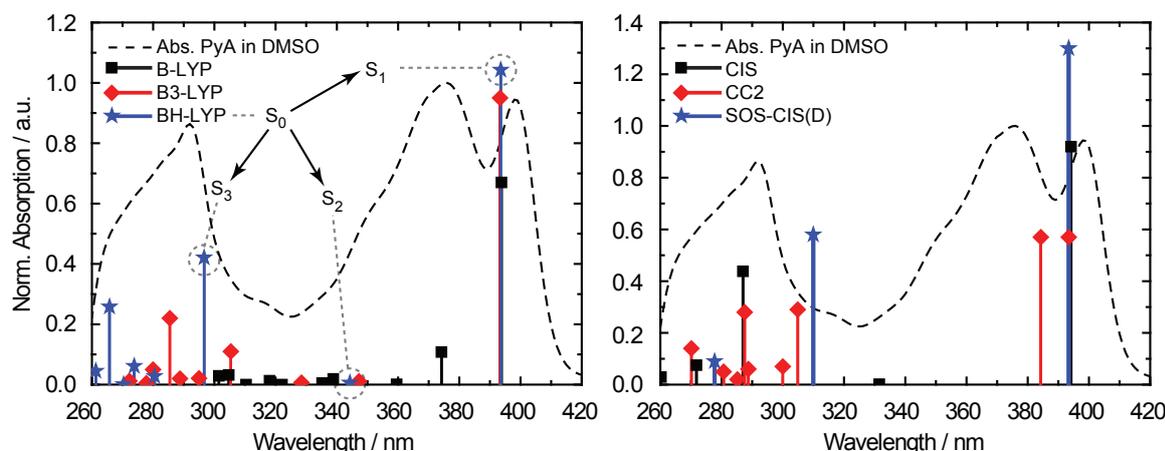


Abbildung 53: Vergleich der quantenchemisch berechneten Übergänge mit dem Absorptionsspektrum von PyA in DMSO.

als optisch inaktiv (dunkel) einzustufen. Außerdem weist er einen komplexeren Charakter auf mit großen Anteilen von drei verschiedenen Orbitalübergängen (HOMO-1 zu LUMO, HOMO zu LUMO+1 und HOMO-2 zu LUMO).

Wird der Einfluss einer doppelt angeregten Konfiguration der Wellenfunktion betrachtet (Tab. 6 und Abb. 53, SOS-CIS(D)), lässt sich feststellen, dass zwar immer noch nur ein dunkler und ein heller Zustand vorhanden sind, aber ein Tausch in der Reihenfolge der Zustände stattgefunden hat. Im Fall des SOS-CIS(D)-Funktional weist nun der Übergang in den  $S_2$ -Zustand einen HOMO zum LUMO Übergang und eine hohe Oszillatorstärke auf. Im Gegenzug ist der Übergang in den  $S_1$ -Zustand nun dunkel und weist Anteile zwei verschiedener Übergänge auf (Tab. 6). Die SOS-CIS(D)-Methode zeigt also einen starken Einfluss einer Doppelanregung, was aufgrund des konjugierten  $\pi$ -Elektronensystems bei PyA zu erwarten war. Um eine Methode mit ausreichend geringem Rechenaufwand zu finden, welche die Situation im angeregten Zustand qualitativ ausreichend genau beschreibt, müsste folglich der Einfluss von sogar höheren Anregungen untersucht werden. Da der Rechenaufwand für solche Untersuchungen aufgrund der Größe von PyA zu hoch ist, muss ein Vergleich mit den experimentellen Daten vorgenommen werden, um die Verlässlichkeit der Methode zu verifizieren.

Tabelle 6: Verwendete Methoden zur Bestimmung der vertikalen Übergänge aus dem Grundzustand und deren Charakteristik.  $\Gamma$  = Prozentualer Anteil der dominierenden Übergänge am Gesamtübergang.  $f_{Osc}$  = Oszillatorstärke der Übergänge.

Übergang: $S_0$ zu	$\lambda_{Exc}$ / nm	Charakter			$\Gamma$ / %	$f_{Osc}$
<b>B-LYP</b>						
$S_1$	475,3	HOMO	-	LUMO	78	0,67
$S_2$	447,0	HOMO-1	-	LUMO	62	0,108
$S_3$	426,3	HOMO-2	-	LUMO	96	0,0011
<b>B3-LYP</b>						
$S_1$	403,5	HOMO	-	LUMO	95	0,95
$S_2$	355,1	HOMO-1	-	LUMO	40	0,011
		HOMO	-	LUMO+1	28	
$S_3$	335,5	HOMO-2	-	LUMO	20	0,0064
		HOMO-1	-	LUMO	42	
		HOMO-2	-	LUMO+1	35	
		HOMO	-	LUMO+1	18	
<b>BH-LYP</b>						
$S_1$	348,2	HOMO	-	LUMO	92	1,043
$S_2$	309,0	HOMO-2	-	LUMO	28	0,006
		HOMO	-	LUMO+1	25	
$S_3$	270,1	HOMO-1	-	LUMO	21	0,421
		HOMO-1	-	LUMO	46	
		HOMO	-	LUMO+2	26	
<b>CIS</b>						
$S_1$	334,5	HOMO	-	LUMO	79	0,92
$S_2$	288,3	HOMO-1	-	LUMO	34	0,0017
		HOMO	-	LUMO+1	26	
$S_3$	254,0	HOMO-2	-	LUMO	12	0,438
		HOMO	-	LUMO+2	22	
		HOMO-1	-	LUMO	14	
<b>SOS-CIS(D)</b>						
$S_1$	330,9	HOMO-1	-	LUMO	40	0,0045
		HOMO	-	LUMO+1	18	
$S_2$	287,5	HOMO	-	LUMO	79	1,3
$S_3$	226,5	HOMO	-	LUMO+2	26	0,58
		HOMO-1	-	LUMO	13	

### Vergleich mit den experimentellen Daten

Eine Reihenfolge, wie im Fall der SOS-CIS(D)-Methode, bei welcher der Übergang in den  $S_1$ -Zustand dunkel und der Übergang in den  $S_2$ -Zustand erlaubt ist, entspricht dem des unsubstituierten Pyrens. Diese Abfolge ist aber nicht mit der hohen Fluoreszenzquantenausbeute ( $\approx 0,8$ ), der kleinen Stokesverschiebung und vor allem der kurzen Lebensdauer ( $\approx 2$  ns) von PyA zu vereinen. Dies würde nämlich unter Berücksichtigung der Kasha-Regel bedeuten, dass die hohe FQA ein Ergebnis der Fluoreszenz aus dem optisch verbotenen  $S_1$ -Zustand wäre. Da dieser aber eine sehr kleine Oszillatorstärke besitzt, müsste er lange bevölkert bleiben (Pyren:  $\approx 238$  ns in DMSO<sup>[15]</sup>) und eine langsame, nicht strahlende Relaxationsrate aufweisen, um eine derart hohe FQA zu ermöglichen. Zusätzlich wäre eine starke Stokes-Verschiebung zu erwarten (Pyren:  $\approx 40$  nm<sup>[15]</sup>), was im Fall von PyA nicht zu beobachten ist. Denn auch wenn die maximalen Intensitäten von  $\lambda_{Abs1}$  und  $\lambda_{Fl1}$  (in DMSO)  $\approx 10$  nm auseinanderliegen, überlappen Absorption und Emission weiterhin. Zusätzlich ähneln sich Absorption und Emission strukturell, was vor allem im Fall von EtOAc deutlich zu erkennen ist. Beides spricht für eine direkte Anregung in den emittierenden Zustand. Auch gibt es keine Anzeichen für einen energetisch günstiger liegenden dunklen Zustand in den Anregungsspektren (Abb. 42). Somit ist die Reihenfolge der Zustände, die mit Hilfe der CIS-Methode bestimmt wurde, am wahrscheinlichsten, auch wenn die absoluten Energien der Zustände nicht korrekt wiedergegeben werden.

Das BH-LYP-Funktional zeigt also als einzige DFT-Methode Ergebnisse mit vertretbarem Rechenaufwand, die den experimentellen Beobachtungen entsprechen (Abb. 53). Vor allem die Übereinstimmung des energetischen Abstands zwischen dem hellen  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang und dem  $S_0 \rightarrow S_3$ -Übergang, des nächsten erlaubten Übergangs, mit den experimentellen Daten weist darauf hin, dass das BH-LYP-Funktional die Situation von PyA im Grundzustand vertretbar wiedergibt (Abb. 53, links). Geht man von der Richtigkeit dieser Ergebnisse aus, so besteht die Absorptionsbande zwischen 325 nm und 420 nm aus einem erlaubten Übergang in den  $S_1$ -Zustand mit einer hohen Oszillatorstärke. Dabei ist die Feinstruktur die Folge dessen vibronischer Natur. Außerdem ist ein dunkler, energetisch höher liegender Zustand im selben Spektralbereich anzunehmen. Der  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang zeigt partielle Beiträge von Elektronendichte auf der Nukleobase. Auch wenn ein starker CT-Charakter der Zustände ausgeschlossen wurde (Kap. 5.2.3.1), verändert eine kleine Elektronendichteverchiebung, die nicht auf einer funktionellen Gruppe lokalisiert ist, die Fluoreszenzeigenschaften kaum<sup>[223]</sup>. Ein solcher schwacher Ladungstransfer bei Bevölkering des  $S_{1x}$ -Zustands erklärt die anschließende Stabilisierung durch eine Lösungsmittlereorganisation, da die Lösungsmittelmoleküle auf die neue elektrostatische Situation reagieren müssen (vgl. Abb. 48 und Abb. 49).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die SOS-CIS(D)-Methode eine Überstabilisierung des dunklen Zustands hervorruft und einen insgesamt starken Einfluss der doppelt angeregten Zustände zeigt, aber das BH-LYP-Funktional zumindest die optischen Übergänge aus dem Grundzustand des PyA hinreichend gut wiedergibt. Um die Reihenfolge der Zustände in der Situation des angeregten PyA analysieren zu können, müssten noch höhere Anregungen berücksichtigt werden, was aufgrund des Rechenaufwands derzeit nicht möglich ist. Dies verhindert Aussagen über die genaue Reaktionskoordinate, die den Übergang vom  $S_1$ -Zustand in den  $S_{1x}$ -Zustand beschreibt.

**Abweichende Reihenfolge der Zustände**

Um die Ursache für den Wechsel der Reihenfolge des hellen und des dunklen Zustands, verglichen mit Pyren, zu verstehen, müssen die an den Übergängen teilhabenden Orbitale näher betrachtet werden (Tab. 7). Im Fall des Pyrens weist der  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang einen komplexeren Charakter mit gleich großen Anteilen eines Übergangs vom HOMO-1 zum LUMO und vom HOMO zum LUMO+1 auf, wobei der Übergang eine Oszillatorstärke von praktisch Null besitzt<sup>[63,231]</sup>. Im Gegenzug dazu ist der  $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang des Pyrens optisch aktiv und ein reiner Übergang vom HOMO zum LUMO, genauso wie der  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang bei PyA.

Tabelle 7: Vergleich von quantenchemischen Rechnungen an PyA (BH-LYP) und Pyren (B3-LYP)<sup>[63]</sup>.  $f_{osc}$  = Oszillatorstärke der Übergänge.

Übergang: $S_0$ zu	PyA				Pyren			
	Charakter		$f_{osc}$		Charakter		$f_{osc}$	
$S_1$	HOMO	- LUMO	1,043		HOMO	- LUMO+1	0,000	
				HOMO	- LUMO+1			
$S_2$	HOMO-2	- LUMO	0,006		HOMO	-	LUMO	0,251
	HOMO	- LUMO+1						
	HOMO-1	- LUMO						

Ein Vergleich der Orbitale der beiden erlaubten Übergänge, also die jeweiligen Übergänge vom HOMO zum LUMO, zeigt, dass die Orbitale zwar im Fall von PyA über die Nukleobase hinweg delokalisiert sind, aber der auf dem Pyren lokalisierte Teil nahezu identisch ist (Tab. 8). Beim Vergleich der verbotenen Übergänge wird ersichtlich, dass die beteiligten Orbitalübergänge ähnlich sind. Im Fall von PyA ist ein zusätzlicher Orbitalübergang in Form eines Übergangs vom HOMO-2 zum LUMO vorhanden, wobei das HOMO-2 des PyA dem HOMO-1 des Pyrens ähnelt. Dieser zusätzliche Anteil am Übergang zeigt den Einfluss der Substitution an der 1-Position auf die Orbitale des Pyrens. Das HOMO-1 von PyA, das am  $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang beteiligt ist, ähnelt hingegen keinem der Pyrenorbitale und scheint die Ursache für die Destabilisierung des  $S_1$ -Zustands relativ zum  $S_2$ -Zustand zu sein. Somit kann gesagt werden, dass im Fall von PyA der  $S_1$ -Zustand und der  $S_2$ -Zustand ihre energetische Reihenfolge tauschen und keine Änderung der Extinktionskoeffizienten aufgrund von veränderten Reaktionskoordinaten der Zustände vorliegt.

Tabelle 8: Molekulare Orbitale von PyA und Pyren, berechnet mit dem BH-LYP-Funktional.

Orbital	PyA	Pyren
LUMO+1		
LUMO		
HOMO		
HOMO-1		
HOMO-2		

## 5.2.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die zuvor genannten Beobachtungen und Argumentationen führen zu dem in Abbildung 54 gezeigten Modell der ablaufenden photophysikalischen Prozesse. Verglichen mit den frühe-

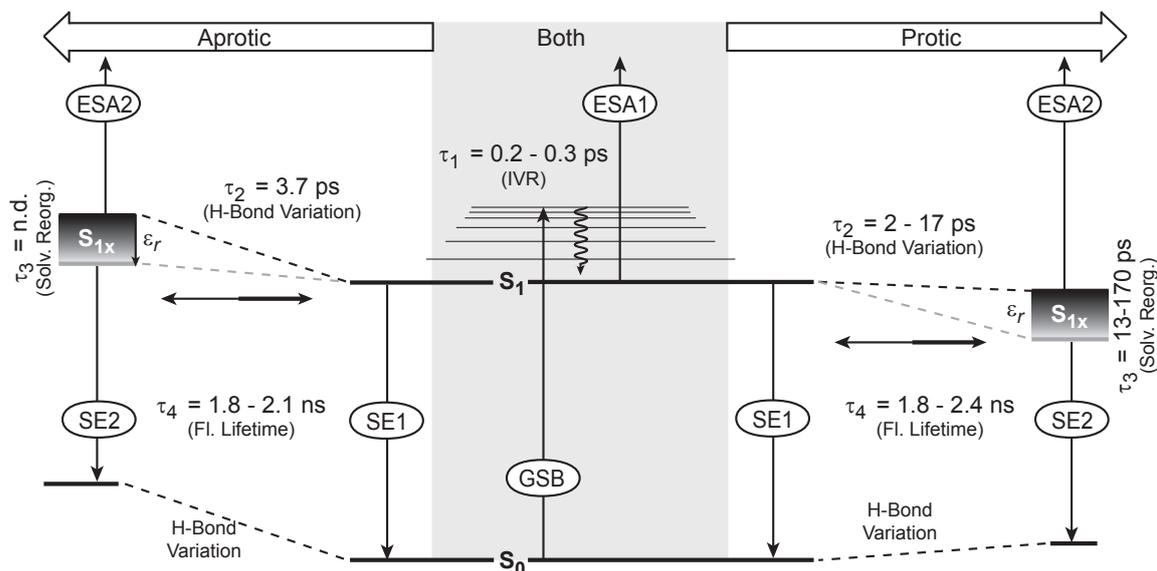


Abbildung 54: Zusammenfassendes Modell der photophysikalischen Prozesse von PyA. n.d.: nicht bestimmbar (not determinable).

ren Ergebnissen bezüglich der Photophysik eines strukturell minimal anderen Derivates von PyA<sup>[227]</sup> und von mit PyA modifizierten RNA-Strängen<sup>[226]</sup> kommt es zu einer neuen Interpretation der Eigenschaften der angeregten Zustände. Generell wird ein starker Einfluss der Lösungsmittelklasse und Permittivität der Lösungsmittel beobachtet. Vor allem die Rolle der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Stickstoffatom N3 und dem Proton der C2'-OH-Gruppe führen zu einer neuen Sichtweise der Dynamik im angeregten Zustand. Infolgedessen werden den gemessenen Zeitkonstanten andere Prozesse zugeordnet. Für beide Lösungsmittelklassen führt hierbei eine Anregung zwischen 325 nm und 420 nm zu einem  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang, wobei keine Übergänge in höher energetische Zustände beobachtet werden. Ob dabei ein Teil der Moleküle direkt in den  $S_{1x}$ -Zustand angeregt wird, ist nicht festzustellen. Nach der IVR ( $\tau_1$ ) bevölkert der lokal angeregte  $S_1$ -Zustand den  $S_{1x}$ -Zustand mit  $\tau_2$ . Anders als bisher behauptet, hat der  $S_{1x}$ -Zustand keinen starken CT-Charakter, ist aber polarer als der  $S_1$ -Zustand. Der Grund für die erhöhte Polarität ist eine Änderung der Elektronendichte, die über die Nucleobase delokalisiert ist. Dieser Polaritätsunterschied führt nach der Bevölkering des  $S_{1x}$ -Zustands zu einer Stabilisierung des Zustands durch die Lösungsmittelmoleküle. Je polarer das Lösungsmittel, desto stärker wird der  $S_{1x}$ -Zustand energetisch abgesenkt. Dies führt zu der Annahme, dass  $\tau_3$  die zeitabhängige Stabilisierung des  $S_{1x}$ -Zustands beschreibt und nicht die bisher angenommene Zerfallszeit dieses Zustands<sup>[226]</sup>. Die spektrale Verschiebung der Fluoreszenz in den stationären Spektren für beide Lösungsmittelklassen deutet darauf hin, dass PyA in aprotischen Lösungsmitteln ebenfalls diesem Prozess unterliegt, obwohl dort eine  $\tau_3$  Zeitkonstante aufgrund der geringeren Bevölkering des  $S_{1x}$ -Zustands nicht in den LDM zu erkennen ist. Der Unterschied in der Größenordnung

von  $\tau_3$  im Vergleich zu Ref. 226 liegt dabei in den spektral besser aufgelösten Datensätzen und in dem neuen, auf der LDA basierenden Analyseansatz begründet. Beide Zustände ( $S_1$  und  $S_{1x}$ ) befinden sich im Gleichgewicht und zerfallen infolgedessen mit der selben Zeitkonstante ( $\tau_4$ ). Wird zusätzlich zu den genannten Beobachtungen die hohe FQA der beiden Zustände berücksichtigt, lässt sich vermuten, dass es sich beim  $S_{1x}$ -Zustand um einen Unterzustand auf der Potentialenergiefläche des ersten angeregten Zustands handelt. Der  $S_1$ -Zustand wird im weiteren Verlauf als  $S_{1L}$ -Unterzustand bezeichnet. Das L im Index soll dabei auf die Rolle als lokal angeregter Zustand hinweisen.

Sowohl der Grundzustand als auch das Bevölkerungsverhältnis zwischen dem  $S_{1L}$ -Unterzustand und dem  $S_{1x}$ -Unterzustand werden dabei stark durch die Lösungsmittelklasse beeinflusst. Grund hierfür ist eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen der C2'-OH-Gruppe der Ribose und dem N3 des Adenins, die mit Hilfe von quantenchemischen Rechnungen vorhergesagt wurde. Sie beeinflusst die energetische Lage des  $S_{1x}$ -Unterzustands relativ zum  $S_{1L}$ -Unterzustand in Abhängigkeit von der Lösungsmittelklasse. In aprotischen Lösungsmitteln, bei denen die intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung ungestört ist, wird der  $S_{1x}$ -Unterzustand relativ zum  $S_{1L}$ -Unterzustand energetisch destabilisiert. Als Resultat wird ein Bevölkerungsverhältnis beobachtet, bei dem der  $S_{1L}$ -Unterzustand und somit eine strukturierte Fluoreszenz in den stationären Messungen favorisiert ist (Abb. 40). Protische Lösungsmittel sind allgemein in der Lage intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen aufzubauen und dadurch Ladungstransferzustände zu stabilisieren<sup>[61,223]</sup>. Im Fall von PyA stören diese intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen die intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung. Dies führt zu einer Stabilisierung des  $S_{1x}$ -Unterzustands relativ zum  $S_{1L}$ -Unterzustand. Infolgedessen dominiert eine unstrukturierte Fluoreszenzbande die stationären Messungen. Bei beiden Lösungsmittelklassen führt eine hohe Permittivität der Lösungsmittel zu einer zusätzlichen Stabilisierung des  $S_{1x}$ -Unterzustands, wobei der zugehörige Grundzustand unverändert in seiner energetischen Lage bleibt. Die Stabilisierung muss in einer Lösungsmittelreorganisation begründet liegen und führt zu der spektralen Verschiebung der unstrukturierten Fluoreszenzbande. Anders als zuvor vermutet<sup>[227]</sup> konnte kein der Bevölkerung des  $S_{1x}$ -Unterzustands nachgeschalteter Protonentransfer beobachtet werden, der wie bei DNA<sup>[22,219]</sup> oder nicht kovalent gebundenen Farbstoffen<sup>[232]</sup> einen ICT stabilisiert.

Die Kenntnis darüber, wie und warum die Umgebungsparameter das stationäre Fluoreszenzspektrum beeinflussen, ermöglicht es, bereits kleinste Änderungen des stationären Fluoreszenzverhaltens den jeweiligen Umgebungsänderungen bei PyA-modifizierter RNA zuzuordnen, z.B. durch Bindung eines Liganden an eine RNA-Sequenz oder die Lösungsmittelzugänglichkeit der modifizierten Position.

#### 5.2.4 Ergebnisse der Untersuchungen an 2-(1-Ethynylpyren)-desoxyadenosin

Um den Einfluss der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Stickstoffatom N3 des Adenosins und der C2'-OH-Gruppe der Ribose näher zu untersuchen, wurden Messungen an einem Desoxyderivat des PyA (PydA) mit den selben Methoden durchgeführt. Die C2'-OH-Gruppe der Ribose ist im Desoxyderivat durch ein Wasserstoffatom substituiert. Dadurch ist es PydA nicht mehr möglich, die bei PyA angenommene intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung auszubilden.

## 5.2.4.1 Stationäre Messungen

Wie auch bei PyA wurden zunächst stationäre Absorptions- und Fluoreszenzmessungen in den acht verschiedenen Lösungsmitteln (Abb. 55) aufgenommen.

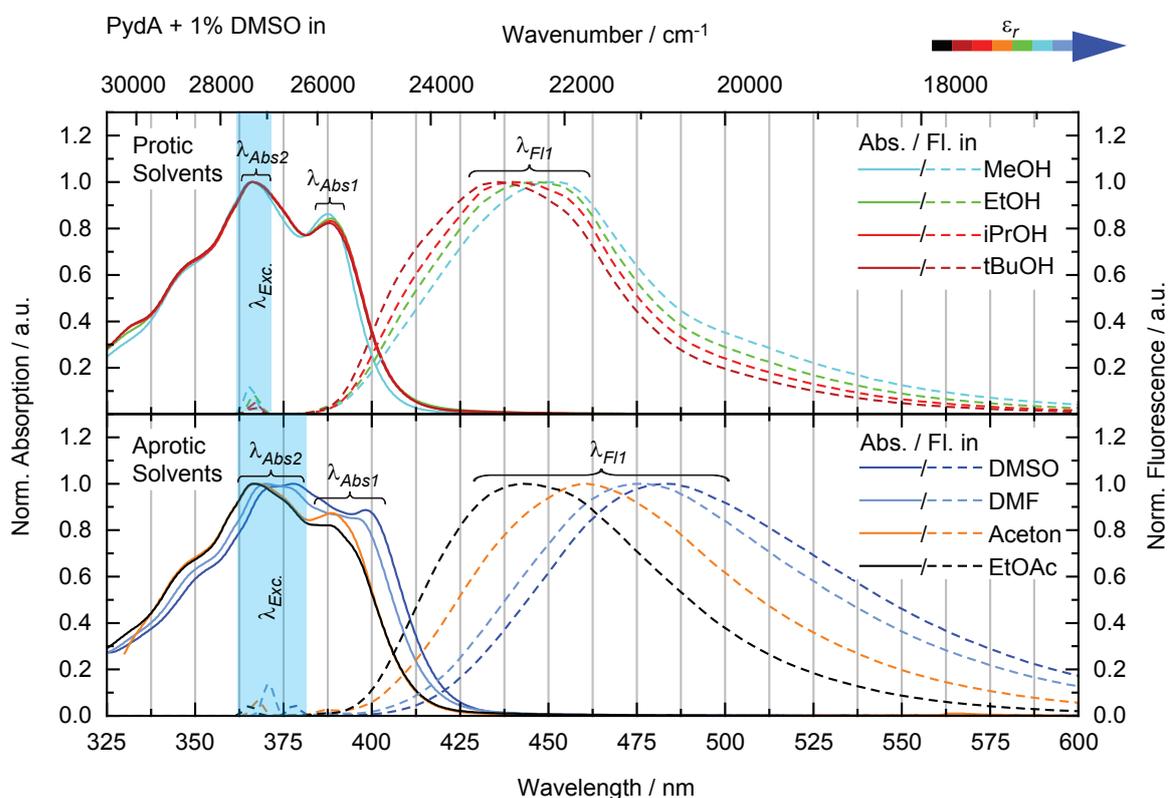


Abbildung 55: Stationäre Absorptions- ( $c(\text{PydA}) = 150 \mu\text{M}$ ) und Fluoreszenzspektren ( $c(\text{PydA}) = 10 \mu\text{M}$ ) von PydA in acht unterschiedlichen Lösungsmitteln. Oben: Protische Lösungsmittel. Unten: Aprotische Lösungsmittel. Die Anregungswellenlänge wurde in Abhängigkeit der maximalen Intensität des zweiten Absorptionsmaximums ( $\lambda_{Abs2}$ ) gewählt.

### Stationäre Absorption von 2-(1-Ethynylpyren)-desoxyadenosin

Ähnlich wie bei PyA ist im Absorptionsspektrum von PydA in allen Lösungsmitteln eine breite Absorption im Spektralbereich zwischen 325 nm und 420 nm zu sehen. Wieder sind zwei Absorptionsmaxima ( $\lambda_{Abs1}$  und  $\lambda_{Abs2}$ ) und mehrere Schultern an den Maxima zu beobachten. Der schnelle Abfall der Absorption nach dem ersten Maximum hin zu längeren Wellenlängen und eine sehr schwache Restabsorption in der roten Flanke bis hin zu 450 nm sind auch für PydA zu sehen. Die Feinstruktur und die beiden Absorptionsmaxima sind, verglichen mit PyA, deutlich schwächer ausgeprägt. Die Maxima sind dabei nicht in dem selben Maße scharf wie bei PyA, was auf einen breiteren Konformationsraum schließen lässt, den das PydA einnehmen kann. Dies könnte durch das Fehlen der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung hervorgerufen werden. In protischen Lösungsmitteln wird die energetische Lage der beiden Absorptionsmaxima wie bei PyA kaum von der Permittivität der Lösungsmittel beeinflusst.

Sie liegen aber im Vergleich zu PyA mit  $\approx 388$  nm ( $\lambda_{Abs1}$ ) und  $\approx 366$  nm ( $\lambda_{Abs2}$ ) jeweils um insgesamt 8 nm bzw. 5 nm hypsochrom verschoben. Dies bedeutet eine größere energetische Differenz zwischen dem Grundzustand und dem ersten angeregten Zustand, als es für PyA der Fall ist. Eine steigende Permittivität zeigt einen sehr geringen Einfluss auf das Intensitätsverhältnis von  $\lambda_{Abs1}$  zu  $\lambda_{Abs2}$ , das sich leicht zu Gunsten von  $\lambda_{Abs1}$  verschiebt. Dies bedeutet, dass wie bei PyA der Grundzustand durch die Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird und die Permittivität des umgebenden Lösungsmittelsystems nahezu keinen Einfluss auf die Elektronendichteverteilung im PydA nimmt. In aprotischen Lösungsmitteln zeigt sich auch in diesem Fall, ein starker Einfluss der Permittivität der Lösungsmittel. Zum einen wird, wie auch in den protischen Lösungsmitteln, mit steigender Permittivität des Lösungsmittels eine Änderung des Intensitätsverhältnisses der beiden Absorptionsmaxima zu Gunsten des ersten Absorptionsmaximums ( $\lambda_{Abs1}$ ) und zum anderen eine bathochrome Verschiebung der energetischen Lage der beiden Absorptionsmaxima beobachtet. Das erste Absorptionsmaximum schiebt dabei um ca. 9 nm (Tab. 9,  $\lambda_{Abs1}$ : EtOAc  $\rightarrow$  DMSO), was eine ungefähr um Faktor zwei größere Verschiebung wie bei PyA ( $\Delta\lambda = 5$  nm) ist. Die Größe der spektralen Rotverschiebung des zweiten Absorptionsmaximums ( $\lambda_{Abs2}$ ) ist nicht bestimmbar, da sie zusätzlich von einer Intensitätsänderung zwischen dem Maximum und einer niederenergetischen Schulter begleitet wird. Die spektrale Verschiebung bedeutet, wie auch beim PyA, dass die Distanz zum  $S_{1L}$ -Unterzustand mit steigender Permittivität zunehmend kleiner wird. Dabei kommt es gleichzeitig zum Teil zu Änderungen in der Oszillatorstärke der einzelnen Übergänge, was bei einer Anpassung der Molekülorbitale und somit der Elektronendichte eines umgebungsempfindlichen Fluorophors an die jeweilige Lösungsumgebung nicht verwunderlich ist. Die spektrale Lage der Maxima von PyA und PydA in DMSO gleicht einander, was für eine ähnliche Ausgangssituation bezüglich der Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand und dem ersten angeregten Zustand beider Moleküle spricht. Da die Abweichung der spektralen Lage jedoch groß für Lösungsmittel mit einer geringen Permittivität ist, muss davon ausgegangen werden, dass durch das Fehlen der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung unpolare Lösungsmittel entweder in der Lage sind den Grundzustand effektiver zu stabilisieren, oder der erste angeregte Zustand durch seine höhere Polarität von diesen Lösungsmitteln in seiner energetischen Lage weniger gut stabilisiert werden kann.

### **Stationäre Emission von 2-(1-Ethynylpyren)-desoxyadenosin**

Anders als bei PyA erstreckt sich das Fluoreszenzspektrum von PydA in allen Lösungsmitteln (Abb. 55) nicht nur von  $\approx 380$  nm bis hin zu 600 nm, sondern bis zu 700 nm, wobei die Fluoreszenzbande breit und unstrukturiert ist. Die rote Flanke der Fluoreszenzbande zeigt dabei einen langgezogenen Ausläufer, der auf eine breite, von der Hauptbande überlagerte Fluoreszenzbande hindeutet. Die fehlende Feinstruktur weist dabei, ausgehend von den Ergebnissen für PyA, auf eine sehr geringe Bevölkerung des  $S_{1L}$ -Unterzustands hin. Interessanterweise erscheint bei einer Anregung in die rote Flanke der Absorptionsbande, einem heißen Grundzustand des PydA, in allen protischen Lösungsmitteln und EtOAc eine strukturierte Fluoreszenzbande (Abb. 56). Der Extinktionskoeffizient bei einer Anregung in die Flanke bei längerer Wellenlänge ist mindestens um den Faktor 100 bis 1000 kleiner als bei Anregung in das zweite Absorptionsmaximum ( $\lambda_{Abs2}$ ). Um auszuschließen, dass es sich bei der strukturellen Charakteristik um Ramanbanden der Lösungsmittel handelt,

Tabelle 9: Stationäre Eigenschaften von PydA in verschiedenen Lösungsmitteln.  $\epsilon_r$  = Permittivität der Lösungsmittel.  $\lambda_{Abs1/2}$  bzw.  $\lambda_{Fl1}$  = Wellenlängen der Absorptionsmaxima bzw. des Emmissionsmaximums.  $\phi_{Fl}$  = gemessene FQA relativ zu Chininsulfat in 0.05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

	PydA in	$\epsilon_r$	Abs. Max. / nm		Fl. Max. / nm	$\Phi_{Fl}$
			$\lambda_{Abs2}$	$\lambda_{Abs1}$	$\lambda_{Fl1}$	
Aprotisch	DMSO	47,2	377	398	483	0,492 ± 0,017
	DMF	38,3	370	395	476	0,363 ± 0,015
	Aceton	21,0	367	389	460	0,368 ± 0,013
	EtOAc	6,1	367	387	444	0,391 ± 0,014
Protisch	MeOH	33,0	366	387	452	0,270 ± 0,010
	EtOH	25,3	366	388	446	0,389 ± 0,015
	iPrOH	20,2	366	388	441	0,486 ± 0,017
	tBuOH	12,5	366	388	435	0,485 ± 0,017

wurden die Fluoreszenzspektren mit Ramanspektren der Lösungsmittel verglichen, die einer Datenbank<sup>6</sup> entnommen wurden. Zusätzlich wurde zur Überprüfung jeweils das reine Lösungsmittel gemessen und mit den Fluoreszenzspektren von PydA in dem entsprechenden Lösungsmitteln verglichen. Es ist in allen Spektren nur ein Maximum mit einem Abstand zur Anregung von ca.  $\tilde{\nu} = 3000 \text{ cm}^{-1}$  als Ramanbande zu identifizieren (Abb. 56, grau gestrichelte Kreise). Die einfachste Erklärung für das Erscheinen der strukturierten Fluoreszenzbande geht von dem Vorhandensein einer Energiebarriere zwischen dem  $S_{1L}$ -Unterzustand und dem  $S_{1x}$ -Unterzustand aus. Diese ist aber unwahrscheinlich, da dies den Ergebnissen für PyA widersprechen würde. Wird berücksichtigt, dass der Extinktionskoeffizient der auslaufenden, schwachen Absorptionsbande je nach Messreihe stark variierte und bei PyA keine Änderung der Struktur der Fluoreszenzspektren zu sehen ist, wäre eine mögliche Erklärung die Fluoreszenz einer spezifischen Verunreinigung, die bei der Synthese von PydA entsteht. Dennoch ist die hohe Ähnlichkeit der spektralen Lage und Form der Fluoreszenz von der mutmaßlichen Verunreinigung und von PydA sehr unwahrscheinlich. Hinzu kommt, dass die Proben vor der Verwendung aufgereinigt und in Bezug auf ihren Reinheitsgrad überprüft wurden. Alternativ könnte es sich um ein Zersetzungsprodukt handeln, was aber auch eher unwahrscheinlich scheint, da PyA sehr photostabil ist und auch keine Akkumulation der Signale mit der Zeit zu beobachten waren. Plausibler lässt sich diese Beobachtung über einen weiteren alternativen Unterzustand auf der potentiellen Energiefläche des ersten angeregten Zustands erklären. Die Tatsache, dass die intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung bei PydA fehlt und somit ein breiterer Konformationsraum im Grundzustand zugänglich ist, spricht dafür, dass es so zu einer breiten potentiellen Energiefläche mit mehr als einem lokalen Minimum im Grundzustand kommt. Infolgedessen und weil das Molekül sich bei diesen Anregungsenergien in einem heißen Grundzustand befindet, ist es möglich, dass auch eher untypische Grundzustandskonformationen eingenommen werden. Diese führen bei Anregung, dem Franck-Condon-Prinzip

<sup>6</sup>Spectral Database for Organic Compounds, SDBS: [http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre\\_index.cgi](http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi), Stand: 09-2014.

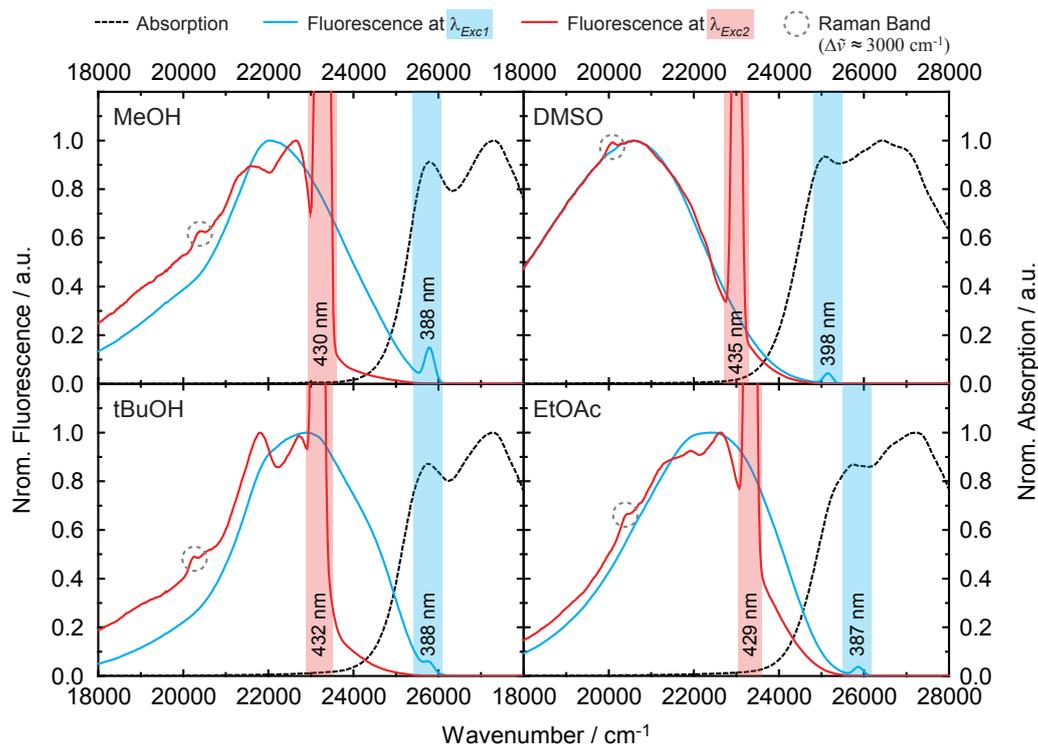


Abbildung 56: Stationäre Fluoreszenzspektren von PydA ( $c(\text{PydA}) = 10 \mu\text{M}$ ) bei Anregung in die rote Flanke der Absorptionsbande. Die Lagen der Ramanbanden wurden mit Hilfe von Ramanspektren der Lösungsmittel verifiziert.

folgend, in einen anderen Bereich auf der  $S_1$ -Energiefläche, welcher über eine zusätzliche, hohe Energiebarriere separiert von dem ursprünglich definierten  $S_{1L}$ - und  $S_{1x}$ -Unterzustand vorliegt und hierdurch von dort aus nicht zu erreichen ist.

Betrachtet man den Einfluss der Lösungsmittelklasse, sind deutliche Ähnlichkeiten aber auch Unterschiede untereinander und vor allem im Vergleich zu PyA festzustellen. In protischen Lösungsmitteln ist eine bathochrome Verschiebung des Fluoreszenzmaximums mit steigender Permittivität des Lösungsmittels zu sehen, was für eine Stabilisierung des  $S_{1x}$ -Unterzustands wie bei PyA spricht. Der Effekt ist bei PydA mit einer Verschiebung von  $\approx 870 \text{ cm}^{-1}$  (17 nm) jedoch fast doppelt so groß wie für PyA ( $\Delta\tilde{\nu} 480 \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $\Delta \approx \lambda = 9 \text{ nm}$ ). Die Stabilisierung der energetischen Lage des  $S_{1x}$ -Unterzustands durch Lösungsmittel mit einer hohen Permittivität ist bei Fehlen der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung deutlich stärker. Eine weitere Ähnlichkeit zu PyA, die mit einem Anstieg der Permittivität des Lösungsmittels einhergeht, stellt der Verlust an Fluoreszenz der höherenergetischen Schulter bei ca. 408 nm dar, die ein spektrales Merkmal der Emission aus dem  $S_{1L}$ -Unterzustand ist. Infolgedessen können wir auch bei PydA eine Stabilisierung des  $S_{1x}$ -Unterzustands relativ zum  $S_{1L}$ -Unterzustand mit steigender Permittivität der Lösungsmittel annehmen. In aprotischen Lösungsmitteln weichen die Fluoreszenzspektren von PydA deutlich von den Fluoreszenzspektren von PyA ab. PydA weist durch den Verlust der Möglichkeit, eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung auszubilden, keinerlei Feinstruktur in den Fluoreszenzspektren auf und zeigt somit kein Indiz mehr für eine Emission aus dem  $S_{1L}$ -Unterzustand. Jedoch ist weiterhin die spektrale

Verschiebung des Intensitätsmaximums der Fluoreszenzbande und somit die Stabilisierung des  $S_{1x}$ -Unterzustands zu beobachten, sie ist aber mit 39 nm deutlich größer als bei PyA und als bei PydA in protischen Lösungsmitteln. Der Verlust jeglicher Möglichkeit, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, sei es intra- oder intermolekularer Natur, führt zu einer deutlich stärkeren Stabilisierung des  $S_{1x}$ -Unterzustands mit steigender Permittivität des Lösungsmittels. Dies legt nahe, dass die fehlenden Wasserstoffbrückenbindungen einen stärkeren Ladungstransfer beim Übergang vom  $S_{1L}$ -Unterzustand in den  $S_{1x}$ -Unterzustand bedingen und der  $S_{1x}$ -Unterzustand folglich bei PydA einen polarerer Charakter als bei PyA aufweist.

### Fluoreszenzquantenausbeuten

Die FQA von PydA liegen im Bereich von ca. 0,4 und sind somit ungefähr halb so groß wie die von PyA (vgl. Tab. 9 mit Tab. 4). Der Einfluss der Permittivität führt bei protischen Lösungsmitteln zu einem Abfall der FQA (tert-Butanol: 0,485 > ... > Methanol: 0,270). Bei aprotischen Lösungsmitteln ist kein definitiver Trend festzustellen. Es ist zuerst ein Abfall der FQA zu beobachten (EtOAc: 0,391 > ... > DMF: 0,363), wobei beim Übergang zu DMSO als Lösungsmittel wieder ein deutlicher Anstieg der FQA erkennbar ist (DMSO: 0,492). Dies deutet auf variierende Oszillatorstärken des Übergangs aus dem  $S_{1x}$ -Unterzustand in den Grundzustand hin. Dadurch kommt es zu einer Veränderung des Verhältnisses zwischen strahlender und nicht strahlender Relaxationsrate. Wird die Tatsache berücksichtigt, dass im Fall von PydA der  $S_{1x}$ -Unterzustand stärker bevölkert ist, muss davon ausgegangen werden, dass der  $S_{1x}$ -Unterzustand anders als für PyA angenommen keine gleich große, sondern eine geringere FQA besitzt. Zusätzlich zeigt die FQA eine Abhängigkeit von dem Grad der Stabilisierung des  $S_{1x}$ -Unterzustands.

#### 5.2.4.2 Transiente Absorptionsmessungen

Die zeitaufgelösten Absorptionsmessungen an PydA zeigen die gleichen spektralen Charakteristika wie jene an PyA (vgl. Kap. 5.2.3.2). Die markantesten Unterschiede sind auch hier vor allem beim Vergleich der beiden Lösungsmittelklassen untereinander festzustellen. Die ermittelten Zeitkonstanten für beide Lösungsmittelklassen sind in Tabelle 10 auf Seite 109 zusammengefasst.

### 2-(1-Ethynylpyren)-desoxyadenosin in protischen Lösungsmitteln

Abbildung 57 zeigt die Ergebnisse der TA-Messungen in protischen Lösungsmitteln. Sie ähneln auf den ersten Blick den Ergebnissen der TA-Messungen von PyA in protischen Lösungsmitteln (vgl. mit Abb. 48). Die ESA1- und ESA2-Banden liegen indes nicht gut erkennbar getrennt voneinander vor, sondern überlagern einander wie im Fall von PyA in aprotischen Lösungsmitteln. Dies verhindert die eindeutige Bestimmung der spektralen Lage und der Amplitudenverteilung der Banden. Die unstrukturierte Fluoreszenzbande in den stationären Messungen deutet aber darauf hin, dass das Bevölkerungsverhältnis wie bei PyA in protischen Lösungsmitteln auf der Seite des  $S_{1x}$ -Unterzustands liegt.

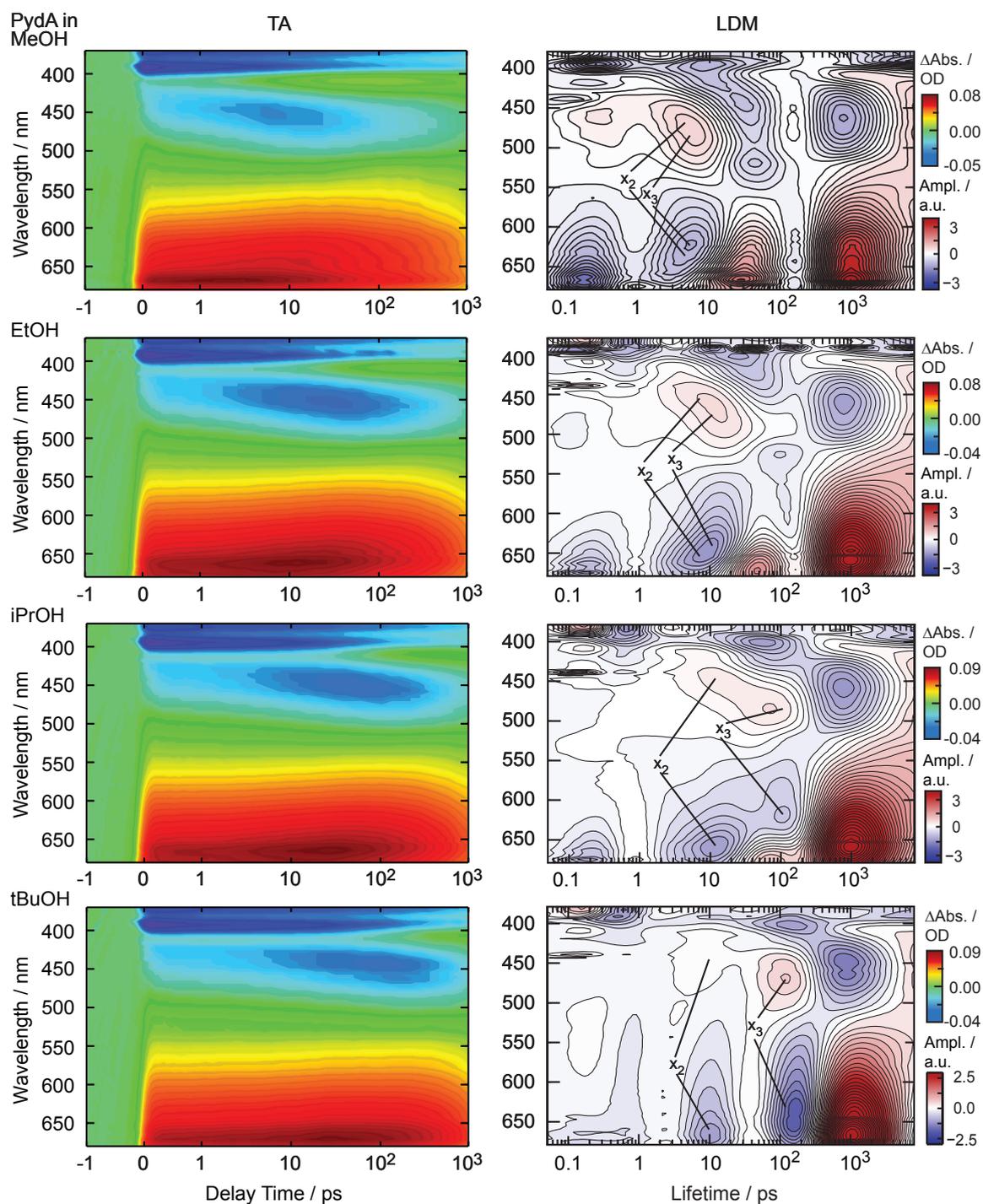


Abbildung 57: TA-Spektren und LDM von PydA in protischen Lösungsmitteln, sortiert von oben nach unten nach abnehmender Permittivität der Lösungsmittel.  $x_2$  kennzeichnet die Position der Extrema von  $\tau_2$  und  $x_3$  die von  $\tau_3$  in den LDMs.

Wie bereits aus den stationären Fluoreszenzmessungen zu erahnen war, ist der Schwerpunkt der SE2-Bande etwas stärker rot verschoben ( $\lambda_{SE2} = 459\text{-}463\text{ nm}$ ) als es bei PyA der Fall ist ( $\lambda_{SE2} = 439\text{-}448\text{ nm}$ ). Aufgrund der etwas größeren spektralen Verschiebung der SE2-Bande und da das GSB von PydA im Vergleich zu PyA weiter im Blauen liegt, ist die ESA1-Bande bei  $\approx 410\text{ nm}$  besser zu erkennen. Am deutlichsten ist dies im Spektrum von PydA in Methanol zu sehen. Die LDMs zeigen auch für PydA mehrere Extrema der Amplituden bei Zeitkonstanten um ca. 0,2 ps, welche auch der IVR zugeordnet werden können. Die Bestimmung der genauen Zeitkonstanten der Bevölkung des  $S_{1x}$ -Unterzustands und dessen Stabilisierung ist schwierig, da die LDA zusätzlich zu der zeitlichen Nähe der Zeitkonstanten unter der stärkeren spektralen Überlagerung der ESA1-Bande und der ESA2-Bande leidet. Dadurch ist im Fall von Methanol und Ethanol keine klare Unterscheidung zwischen  $\tau_2$  (Abb. 57,  $x_2$ ) und  $\tau_3$  (Abb. 57,  $x_3$ ) mehr möglich. Die Lebensdauern  $\tau_2$  und  $\tau_3$  werden infolgedessen durch ein gemeinsames Extremum beschrieben, das bei ca. 475 nm (SE) bzw. 625 nm (ESA) und  $\approx 8\text{ ps}$  in Methanol bzw.  $\approx 10\text{ ps}$  in Ethanol (Abb. 57) liegt. Erst bei Isopropanol als Lösungsmittel lassen sich die beiden Zeitkonstanten unterscheiden, wobei hier die ESA zur Bestimmung der Zeitkonstanten genutzt wird, da hier zwei klar separierte Maxima (Abb. 57, LDM für iPrOH,  $\tau_2: \approx 650\text{ nm}$ ,  $\approx 10\text{ ps}$  und  $\tau_3: \approx 620\text{ nm}$ ,  $\approx 100\text{ ps}$ ) vorliegen und nicht durch die SE gestört werden. tert-Butanol als Lösungsmittel stellt bei den LDM einen Sonderfall dar, da hier das zugehörige Maximum in der SE-Region zur Hilfe genommen wird, um eine Bestimmung der Zeitkonstante für die Stabilisierung ( $\tau_3$ ) zu ermöglichen, obwohl sie von der ESA überlagert wird. Grund für dieses Vorgehen ist die ungewöhnliche spektrale Breite des Minimums (550 nm bis 679 nm), das die  $\tau_3$  Zeitkonstante in der ESA-Region beschreibt. Auf die Ursache für das Phänomen wird im nachfolgenden Kapitel 5.2.4.2 bei den transienten Absorptionsmessungen in aprotischen Lösungsmitteln näher eingegangen. Die Rate der Bevölkung des  $S_{1x}$ -Unterzustands bewegt sich in protischen Lösungsmitteln in einem ähnlichen Zeitbereich wie bei PyA. Die Stabilisierung des  $S_{1x}$ -Unterzustands geht aber ein wenig schneller vonstatten (vgl. Tab. 10 mit Tab. 5). Die Gesamtlebensdauer von PydA ist wie bei PyA mit Hilfe von Streak-Kamera-Messungen bestimmt worden (siehe Anhang Abb. 64). In den protischen Lösungsmitteln, die eine geringe Permittivität aufweisen, ist  $\tau_4$  (tert-Butanol: 1600 ps) ähnlich den Zeitkonstanten, die für PyA (tert-Butanol: 1800 ps) bestimmt wurden. Jedoch verringert sich die Gesamtlebensdauer mit steigender Permittivität der Lösungsmittel. Dementsprechend sinkt die Fluoreszenzlebensdauer von PydA in Methanol, dem verwendeten protischen Lösungsmittel mit der höchsten Permittivität, um ca. 300 ps ( $\tau_4 = 1300\text{ ps}$ ). Im Gegenzug steigt diese im Fall von PyA in Methanol sogar auf 2400 ps an. Die Zerfallszeiten, die für PydA in den verschiedenen Lösungsmitteln mit Hilfe der LDA bestimmt werden können (Abb. 57), liegen in einem ähnlichen Zeitbereich wie die der Streak-Kamera-Messungen, sind jedoch wegen der bereits bei PyA genannten Gründen nicht verlässlich genug. Spektral gesehen zeigen die Streak-Kamera-Messungen eine Verschiebung des Intensitätsmaximums, die aber aufgrund ihres schnellen Ablaufs unterhalb der Zeitauflösung liegt, was die Bestimmung der zugehörigen Zeitkonstante unmöglich macht.

### **2-(1-Ethynylpyren)-desoxyadenosin in aprotischen Lösungsmitteln**

Die Konturauftragung der transienten Absorptionsmessungen von PydA in aprotischen Lösungsmitteln (Abb. 58, links) zeigt, dass der  $S_{1x}$ -Unterzustand nahezu instantan nach der Anregung stark bevölkert wird.

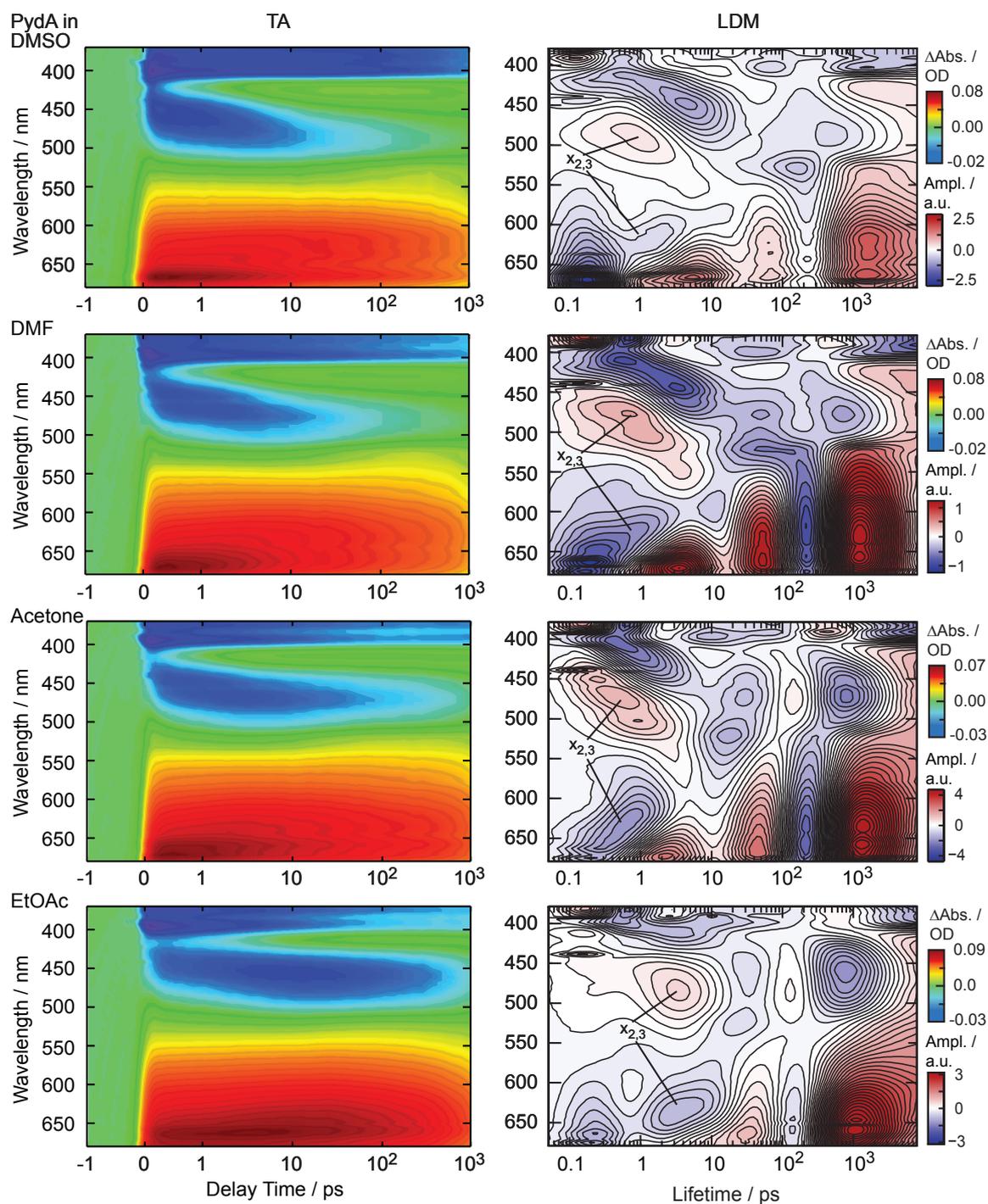


Abbildung 58: TA-Spektren und LDM von PydA in aprotischen Lösungsmitteln, sortiert von oben nach unten nach abnehmender Permittivität der Lösungsmittel.  $x_{2,3}$  kennzeichnet in den LDMs das langgezogene Extremum, das  $\tau_2$  und  $\tau_3$  umfasst.

Je höher die Permittivität des Lösungsmittels ist, desto weiter schiebt die zugehörige SE2-Bande zu längeren Wellenlängen, verglichen mit den bisher untersuchten Proben, was mit den stationären Messungen übereinstimmt (Kap. 5.2.4.1). Dies geschieht auch deutlich schneller als in den protischen Lösungsmitteln oder bei PyA. Dadurch wird die ESA-Bande bei 410 nm schon zu kurzen Verzögerungszeiten deutlicher sichtbar. Die SE2-Bande weist in DMF und Aceton eine schwache Feinstruktur auf, welche in EtOAc und DMSO nicht zu sehen ist. Ein solches Verhalten deutet auf eine Verschiebung des Minimums entlang der Potentialenergiefläche des ersten angeregten Zustands durch die Stabilisierung hin, wodurch die Übergangswahrscheinlichkeit in einen anderen vibronischen Zustand erhöht wird und dementsprechend eine Änderung der dominierenden Übergänge stattfindet. Interessanterweise nimmt auch mit steigender Permittivität der Lösungsmittel die Amplitude der SE2-Bande zu längeren Zeiten hin deutlich ab, während die ESA2-Bande diesem Trend scheinbar nicht folgt, obwohl deren spektrale Dynamik vergleichbar ist. Zusätzlich kommt es ab ca. 100 ps in der ESA um ca. 550 nm zu einem Amplitudenanstieg. Auch wenn die ESA1-Bande und ESA2-Bande einander überlagern, muss dies ein Effekt sein, der von der ESA2-Bande herrührt, da unter diesen Bedingungen hauptsächlich der  $S_{1x}$ -Unterzustand bevölkert ist.

Werden die LDM betrachtet, wird wieder eine sehr schnelle Zeitkonstante für die IVR ersichtlich (Tab. 10,  $\tau_1 = 0,2$  ps) und ein langgezogenes Extremum, das die Bevölkung ( $\tau_2$ ) und Stabilisierung ( $\tau_3$ ) des  $S_{1x}$ -Unterzustands beschreibt (Abb. 58,  $x_{2,3}$ ). Infolgedessen ist

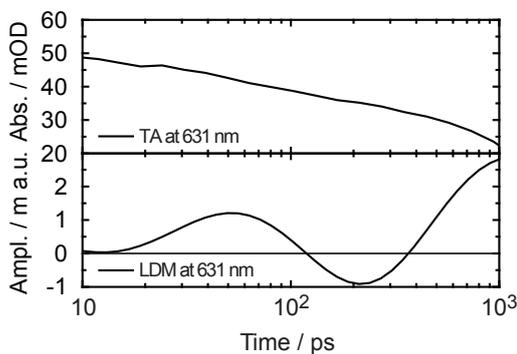


Abbildung 59: Vergleich zwischen einer Transiente der TA-Messung und der LDM von PydA in DMF.

nur die Angabe eines Zeitbereichs für diese beiden Zeitkonstanten möglich. Sind beide Prozesse abgeschlossen, beobachtet man in der ESA-Region ( $\approx 525$ - $687$  nm) der LDM zwei weitere stark ausgeprägte Extrema der Lebensdauerichtevertelung. Diese Extrema liegen bei 40-50 ps (Maximum) und 100-200 ps (Minimum). Es sind auch in der Region der SE Signale mit einer entsprechend umgekehrten Amplitude zu erkennen, was wegen der Verknüpfung zwischen SE2-Bande und ESA2-Bande nicht verwunderlich ist. Die Signale in der Region der SE sind jedoch deutlich schwächer ausgeprägt. Diese Signale wurden in den anderen Datensätzen bisher nur schwach oder gar nicht wahrgenommen, weshalb sie bis hierhin als

nicht relevant betrachtet wurden. Da die Signale in der SE-Region sehr schwach sind, werden sie nicht zur weiteren Diskussion herangezogen. Beide Signale zeigen keinerlei Einfluss der Permittivität und wurden aufgrund ihrer zeitlichen Lage bisher durch die starken Amplituden für die Zeitkonstanten, welche die Bevölkung und Stabilisierung des  $S_{1x}$ -Unterzustands beschreiben, überlagert. Ein Blick auf die Transienten der TA-Messungen im Vergleich mit denen der LDM bei den entsprechenden Wellenlängen zeigt keinen Anstieg des TA-Signals, welcher dem Minimum im hundert Pikosekundenbereich der LDM entspricht. Exemplarisch ist dies in Abb. 59 dargestellt, in der die Transienten der TA-Messung von PydA in DMF und die resultierende Transiente in der LDM bei einer Wellenlänge von 631 nm miteinander ge-

zeigt sind. Auch zeigten Versuche, den Verlauf der transienten Absorptionmessung mit einer exponentiellen Anpassungsfunktion in diesem Bereich nachzuvollziehen, keine Notwendigkeit für eine zusätzliche Zeitkonstante mit einer so stark negativen Amplitude. Eine Zeitkonstante mit einer positiven Amplitude im Bereich von 40-50 ps ( $\approx 670$  nm) wurde jedoch benötigt, um eine zufriedenstellende Anpassung der Funktionen zu erhalten. Eine mögliche Erklärung für diese zusätzliche Zeitkonstante könnte eine IVR des  $S_{1x}$ -Unterzustands in Verbindung mit einer Änderung der Übergangswahrscheinlichkeit aus dem  $S_{1x}$ -Unterzustand in den  $S_0$ -Zustand sein. Eine IVR würde in der LDM ein leicht hypsochrom verschobenes, negatives Signal zur Folge haben, was wiederum das Minimum zwischen 100 ps und 200 ps ( $\approx 620$  nm) erklären würde. Der fehlende Anstieg der Absorption in der transiente der TA-Messung, der einem negativen Signal in der LDM entspricht, lässt sich dabei durch eine Verringerung der negativen Steigung erklären. Grund für die Steigungsänderung wäre dadurch eine unterschiedliche Übergangswahrscheinlichkeit der beiden überlagerten ESA-Signale, die zu einem langsameren Abfall der Absorption führt und von der LDA als Signalanstieg gewertet wird. Eine Änderung in der Übergangswahrscheinlichkeit würde auch die geringere FQA ( $\phi_{Fl} \simeq 0,4$ ), verglichen mit PyA ( $\phi_{Fl} \simeq 0,8$ ), erklären. Die Betrachtung der aus den Streak-Kamera-Messungen ermittelten Gesamtlebensdauer (Tab. 10,  $\tau_4$ ) zeigt, dass diese mit steigender Permittivität zunimmt. Dies ist auf den ersten Blick merkwürdig, da es in den Messdaten der TA aussieht, als ob die Lebensdauer der SE abnimmt. Berücksichtigt man aber die Änderung der Übergangswahrscheinlichkeit des  $S_{1x} \rightarrow S_0$ -Übergangs und eine IVR im  $S_{1x}$ -Unterzustand, lässt sich diese Beobachtung durch eine abnehmende Intensität der SE bei gleichzeitiger Zunahme der Intensität des Signals für die ESA erklären.

#### 5.2.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die stationären und zeitaufgelösten Messungen an PydA zeigen deutlich den Einfluss der C2'-OH-Gruppe und der damit verbundenen intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung zum N3-Stickstoffatom des Adenins auf die Dynamik von PyA. Die stationären Absorptionmessungen von PydA ähneln noch stark denen von PyA und nur die Verbreiterung der Absorptionsbanden spricht für eine Vergrößerung des einnehmbaren Konformationsraums. Auch bei den stationären Fluoreszenzmessungen ähnelt PydA aufgrund der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen in protischen Lösungsmitteln zumindest zu einem gewissen Grad PyA. Der Wechsel hin zu aprotischen Lösungsmitteln führt jedoch zu einer sehr großen Stokes-Verschiebung der Fluoreszenzbande (Tab. 9). Dies bedeutet, dass der  $S_{1x}$ -Unterzustand durch das Fehlen jeglicher Wasserstoffbrückenbindungen deutlich stabilisiert wird. Dabei deutet die Zunahme der Stokes-Verschiebung mit steigender Permittivität der Lösungsmittel auf eine erleichterte Möglichkeit hin, den  $S_{1x}$ -Unterzustand zu stabilisieren. Die zeitaufgelösten Daten zeigen, dass der  $S_{1x}$ -Unterzustand bei Fehlen von jeglichen Wasserstoffbrückenbindungen und in polaren Lösungsmitteln nahezu augenblicklich bevölkert wird. Das Vorhandensein von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen verlangsamt die Bevölkерungs- und die Stabilisierungszeiten des  $S_{1x}$ -Unterzustands ( $\tau_2$  und  $\tau_3$ ), wobei unpolare Lösungsmittel (z.B. Isopropanol und tert-Butanol) zu mit PyA vergleichbaren Zeitkonstanten führen. Die Gesamtlebensdauer wird dabei in protischen Lösungsmitteln kürzer und die FQA sinkt. In aprotischen Lösungsmitteln wird ein umgekehrtes Verhalten beobachtet. Die Korrelation zwischen Gesamtlebensdauer und FQA ist nicht verwunderlich, aber der unterschiedliche Einfluss der Permittivität auf beide Prozesse lässt auf eine komplexe Änderung der Übergangswahrschein-

lichkeit des Übergangs aus dem  $S_{1x}$ -Unterzustand in den Grundzustand ( $S_0$ ) schließen. Auch wenn die dem  $S_{1x}$ -Unterzustand zugehörige Konformation nicht ermittelt werden konnte, wurde eindeutig gezeigt, dass eine elektrostatische Wechselwirkung aufgrund einer intermolekularen Wasserstoffbrückenbindung vorliegt und diese im hohen Maße die Fluoreszenzeigenschaften beeinflusst. Die Substitution der C2'-OH-Gruppe mit einem Wasserstoffatom führt somit zu grundlegenden Änderungen der photophysikalischen Eigenschaften nach der Anregung vor allem bei Fehlen jeglicher Wasserstoffbrückenbindungen.

Tabelle 10: Ermittelte Lebensdauern der TA und Streak-Kamera-Messungen für PydA.  $\tau_i$ : Zeitkonstanten, bestimmt mittels LDM für die TA ( $i = 1-3$ ) bzw. über eine globale Anpassungsfunktion im Fall der Streak-Kamera-Messungen ( $\tau_4$ ). Die mit \* markierten Zeitbereiche sind eine Mischung aus  $\tau_2$  und  $\tau_3$ , da diese nicht klar unterscheidbar sind in den jeweiligen LDMs.

		PydA in	Lebensdauern / ps			
			$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	$\tau_4$
Aprotisch	DMSO	0,2		0,3 - 3*	2600	
	DMF	0,2		0,3 - 4*	n.d.	
	Aceton	0,2		0,3 - 4*	n.d.	
	EtOAc	0,2		0,6 - 9*	1700	
Protisch	MeOH	0,2		0,9 - 14*	1300	
	EtOH	0,2		1,8 - 44*	n.d.	
	iPrOH	0,2	10	100	n.d.	
	tBuOH	0,2	10	120	1600	

### 5.3 Das mit PyA-modifizierte neomycinbindende Aptamer

Der in Kapitel 5.2.3 vorgestellte Fluoreszenzmarker PyA wurde von Dr. Ute Förster<sup>7</sup> auf seine umgebungsabhängigen spektralen Eigenschaften bei Einbau in RNA-Duplexe untersucht<sup>[226,233,234]</sup>. Die Ergebnisse zeigen, dass PyA einen Einfluss der den Fluoreszenzmarker flankierenden Basen spürt und bei flankierenden G-C-Basenpaaren in die RNA interkaliert, während dies bei flankierenden A-U-Basenpaaren nicht der Fall ist. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass PyA deutliche Veränderungen der Fluoreszenzintensität bei der Hybridisierung bzw. Dehybridisierung verschiedener Duplexe hervorruft. Diese Ergebnisse bestätigten die Anwendbarkeit von PyA für Faltungsstudien. Eine erste Faltungsstudie zielt auf das neomycinbindende Aptamer ab.

#### 5.3.1 Neomycinbindendes Aptamer

Das neomycinbindende Aptamer (N1-Aptamer) (Abb. 60, A) wurde von Weigand *et al.* durch SELEX und anschließendem *in vivo* Screening gefunden. Es fungiert als ein synthetischer Riboschalter und bindet das Aminoglykosid Neomycin B im nanomolaren Bereich (Abb. 60, B)<sup>[235,236]</sup>. Zusätzlich bindet es das Ribostamycin mit hoher Affinität im nanomolaren Bereich<sup>8</sup>.

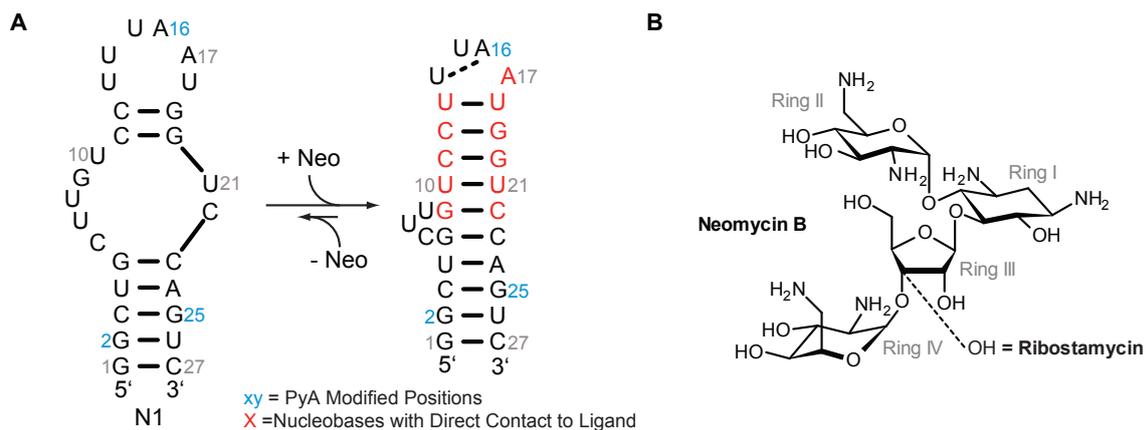


Abbildung 60: Strukturen von Neomycin B und dem zugehörigen N1-Aptamer. (A) Strukturen des N1-Aptamers vor und nach Bindung des Liganden. Rot gekennzeichnete Nucleobasen interagieren direkt mit dem Liganden. Blaue Zahlen geben die Position der mit PyA substituierten Nucleobasen an (siehe Text). (B) Struktur der bindenden Liganden Neomycin B und Ribostamycin.

Soweit bekannt, stellt das N1-Aptamer mit einer Länge von 27 Nucleotiden den kleinsten bekannten synthetischen Riboschalter dar<sup>[237]</sup>. Bei Raumtemperatur und ohne Ligand in einem Puffer mit neutralen pH-Wert weist es einen Doppelstrangbereich einer Länge von fünf Basenpaaren auf, der in eine asymmetrische interne Schleife übergeht, gefolgt von einem zwei Basenpaare langen Doppelstrangbereich, und mündet in einer terminalen Haarnadelschleife.

<sup>7</sup>Ehemals: Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main, Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt am Main, Deutschland.

<sup>8</sup>Diese Informationen entstammen der persönlichen Korrespondenz mit Dr. Julia Weigand, Fachbereich Biologie, Technische Universität Darmstadt, Schnittspahnstraße 10, 64287 Darmstadt, Deutschland.

Diese Struktur wird im Folgenden als die offene Form bezeichnet. Die Bindung des Liganden führt zur Ausbildung dreier weiterer Basenpaare. Die Bildung der Basenpaare U10-U21 und G9-C22 schließt die interne Schleife und es verbleibt eine Ausbuchtung mit den drei Basen C6, U7 und U8. Infolge dieser beiden neuen Basenpaare entsteht eine durchgängige A-Form-Helix aus den beiden einzelnen Doppelstrangbereichen, wobei die Basenpaare G9-C22 und G5-C23 aufgrund der Ausbuchtung aufeinander gestapelt sind. Das dritte sich bildende Basenpaar (U13:U18) verkleinert die terminale Haarnadelschleife und verlängert den oberen Doppelstrangbereich<sup>[237]</sup>. Die durch die Bindung des Liganden entstehende Struktur wird als gebundene Form bezeichnet. EPR- und NMR-Untersuchungen zeigten, dass die bei Raumtemperatur vorliegende offene Form auch ohne Bindung eines Liganden bei sinkenden Temperaturen ( $<6^{\circ}$  C) in eine der gebundenen Form ähnliche Struktur übergeht<sup>[238,239]</sup>. Dies führt zu der Annahme, dass die Ligandenbindung auf einer konformationellen Selektion basiert, bei der das Neomycin B an eine kompakte Form des N1-Aptamers bindet und diese Konformation dadurch weiter stabilisiert wird. Die gebundene Form ist in der Lage, das Ribosom bei der Translation im nicht kodierenden Bereich der mRNA zu blockieren, und unterdrückt damit die Genexpression, bevor das Ribosom den kodierenden Bereich erreicht. Ausschlaggebend für die Blockierung ist die Ausbuchtung, bestehend aus den drei Nukleobasen (C6, U7 und U8) der gebundenen Form, wobei die Art der Basen und ihre Sequenz nur von geringem Einfluss ist<sup>[236]</sup>. Mutationen der in der Haarnadelschleife befindlichen Basen (U14, U15, A16 und A17) führen meistens zu einer verringerten Regulation bei einer Bindungskonstante, die im nanomolaren Bereich verbleibt. Grund für die mit einer leicht erhöhten Regulation beobachteten Ausnahmen (U15A und U15C) ist dabei eine erhöhte Menge an der präformierten, kompakten und zugleich ungebundenen Form. Das in der Haarnadelschleife befindliche A17 und seine direkte Interaktion mit dem N1-Aptamer ist dabei essentiell für die Stabilisierung der gebundenen Form<sup>[237]</sup>.

### 5.3.2 Das modifizierte N1-Aptamer

Um die Bindungsdynamik aufzuklären, wurde das N1-Aptamer mit PyA an verschiedenen Stellen spezifisch modifiziert (Abb. 61). Bisher wurden drei verschiedene modifizierte N1-Aptamere synthetisiert: zwei einfach modifizierte (A16PyA und G2PyA) und eine doppelt modifizierte (G2/G25PyA). Bei dem A16PyA-Aptamer wurde das Adenosin an Position 16 (A16) durch PyA ersetzt. Das nun modifizierte Adenosin befindet sich in der terminalen Haarnadelschleife (Abb. 61, B) und liegt neben dem direkt mit dem Neomycin interagierenden A17. Dadurch ist zu erwarten, dass bei Bindung des Liganden an dieser Stelle eine starke Umgebungsänderung stattfindet. Dies sollte das Fluoreszenzsignal beeinflussen und somit Informationen über die Bindung des Liganden liefern. Das einfach modifizierte Aptamer, bei der das Guanosin an Position zwei (G2) durch ein PyA ersetzt wurde (G2PyA), dient als Kontrollprobe (Abb. 61, C), da sich bei der Bindung des Liganden hier nur eine minimale Umgebungsänderung ergeben sollte, wobei die Stabilität des Doppelstrangbereiches nur minimal geschwächt werden sollte. Das doppelt modifizierte Aptamer (G2/G25PyA), bei der zusätzlich zum G2 das Guanosin an Position 25 mit PyA und das Cytidin an Position zwei mit Uridin substituiert wurde (Abb. 61, D), führt aufgrund der Dimerbildung zwischen den beiden Pyrenresten zu einer Stabilisierung des Doppelstrangbereiches und soll der Untersuchung möglicher Einflüsse der Stabilität des Doppelstrangbereiches auf die Bindungsdynamik dienen.

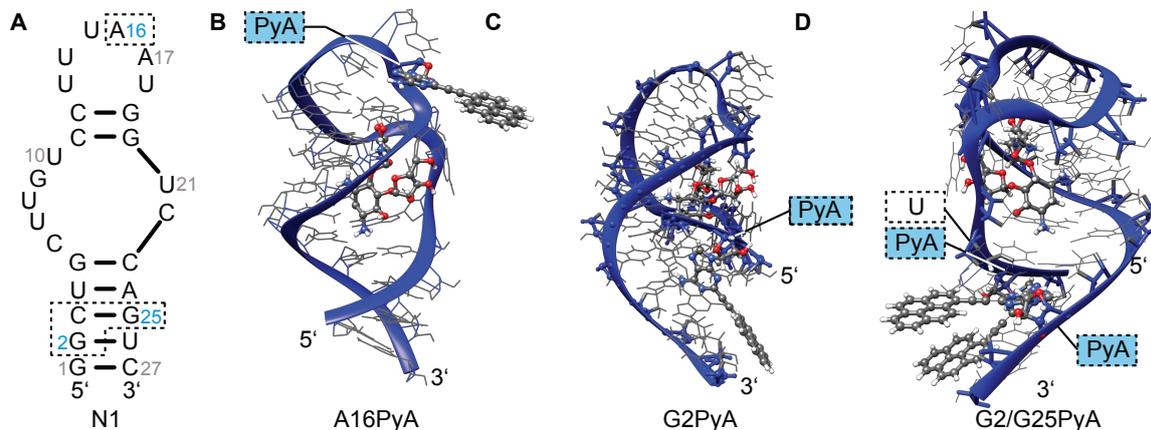


Abbildung 61: Sekundärstruktur des N1-Aptamers und modellierte dreidimensionale Strukturen der mit PyA modifizierten N1-Aptamere. (A) Sekundärstruktur des N1-Aptamers mit gekennzeichneten Bereichen (gestrichelte Umrandung), an denen Modifikationen vorgenommen wurden. Die blauen Nummern indizieren die mit PyA modifizierten Stellen des N1-Aptamers. (B) A16PyA-Aptamer, (C) G2PyA-Aptamer und (D) G2/G25PyA-Aptamer als modellierte dreidimensionale Struktur, wobei die einzelnen Modifikationen zusätzlich gekennzeichnet sind. Blau hinterlegt die mit PyA substituierten Positionen und ohne farbliche Hinterlegung substitutionen mit natürlichen Nucleobasen. Für die dreidimensionalen Strukturen wurden die in Ref. 239 ermittelte Struktur des N1-Aptamers (pdb-ID: 2KXM) verwendet und die veränderten Nucleobasen entsprechend ausgetauscht.

In einem ersten Schritt wurden vorläufige Untersuchungen zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) der modifizierten Aptamere unternommen, die auf  $K_d$ -Werte im nanomolaren Bereich hindeuten, jedoch qualitativ kleine Unsicherheiten aufweisen und deswegen noch unter optimierten Bedingungen wiederholt werden müssen. Nachfolgend wurden stationäre Spektren der modifizierten Aptamere vor und nach Zugabe von Neomycin B gemessen, um festzustellen, ob und wie sich die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften nach der Zugabe verändern (Abb. 62).

Bereits in den Absorptionsspektren ist zu sehen, dass die Bindung des Neomycins zu leicht veränderten spektralen Eigenschaften führt. Wird die Anregungswellenlänge bei der Untersuchung der Bindungsdynamik über die Fluoreszenz auf einen Wert gesetzt, bei dem ein isobestischer Punkt vorliegt, kann die zeitliche Änderung der Absorption jedoch vernachlässigt werden. Im Fall des für diese Arbeit interessantesten, modifizierten Aptamers wäre dies 388 nm, eine mitunter bei laserspektroskopischen Methoden einfach zugängliche Wellenlänge. Die Fluoreszenz des A16PyA-Aptamers zeigt eine Intensitätszunahme um ca. 37 % bei einer Wellenlänge von 458 nm, was zu einem ausreichenden Signal-zu-Rausch-Verhältnis in einer Stopped-Flow-Messung führen sollte. Außerdem verschiebt sich die spektrale Lage des Intensitätsmaximums von 445 nm auf 449 nm und sollte einer polarerer Umgebung des Fluorophors geschuldet sein. Beide Prozesse zeigen, dass die Bindung von Neomycin zu einer Umgebungsänderung des Fluoreszenzmarkers führt.

Das G2PyA-Aptamer zeigt im Vergleich zum A16PyA-Aptamer nur eine leichte Zunahme der Fluoreszenzintensität, wobei der Intensitätsunterschied in der langwelligen Flanke stärker zu Tage tritt. Das Intensitätsmaximum schiebt dabei um 2 nm von 447 nm zu 445 nm, was für eine unpolare Umgebung nach der Bindung spricht.

Solche kleinen Veränderungen sind zu erwarten, denn obwohl die Position 2 relativ weit von

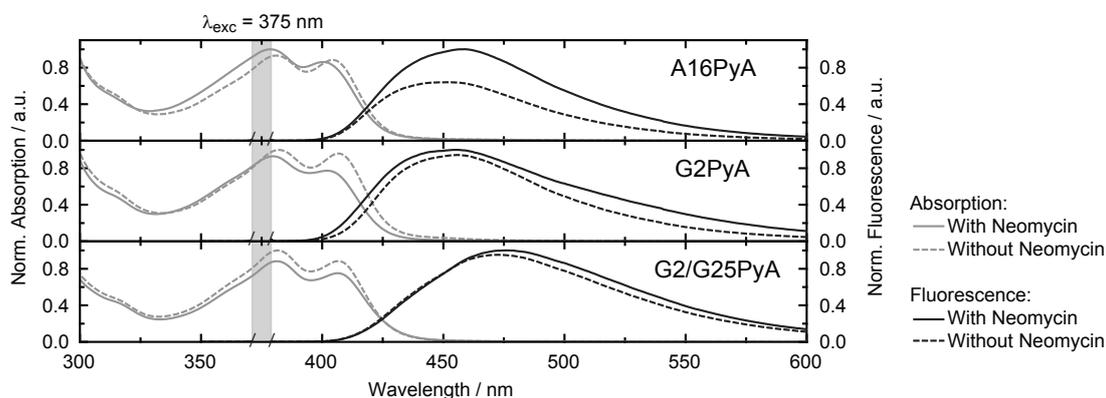


Abbildung 62: Stationäre Spektren der mit PyA modifizierten N1-Aptamere ( $c(\text{RNA}) = 10 \mu\text{M}$ ) in Phosphatpuffer ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  zu  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  im Verhältnis von 1 zu 4,21,  $\text{pH} = 6,2$ ,  $c(\text{MgCl}_2) = 3 \text{ mM}$ ,  $c(\text{KCl}) = 50 \text{ mM}$ ) nach der Faltung. Neomycinhaltige Proben enthielten die doppelte Konzentration an Neomycin ( $c(\text{Neomycin}) = 20 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zur Konzentration an modifiziertem N1-Aptamer. Die Anregungswellenlänge für die Fluoreszenzspektren betrug in allen Fällen  $375 \text{ nm}$ . Normiert wurden die beiden Absorptions- bzw. die beiden Fluoreszenzspektren, indem die Messwerte durch die maximale Intensität der beiden Messkurven (mit und ohne Neomycin) der Absorption im Spektralbereich über  $300 \text{ nm}$  bzw. der Fluoreszenz geteilt wurden.

der Bindetasche entfernt ist, können kleinere Strukturänderungen durch die Ligandenbindung nicht ausgeschlossen werden. Sehr interessant ist auch das Ergebnis für das G2/G25PyA-Aptamer. Im Vergleich zu den anderen modifizierten Aptameren ist eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums hin zu längeren Wellenlängen ( $\sim 450 \text{ nm} \rightarrow \sim 462 \text{ nm}$ ) sichtbar, was einem hohen Anteil an Excimerfluoreszenz zuzuordnen ist. Gleichzeitig ist eine sehr geringe Zunahme der Fluoreszenzintensität bei Bindung des Neomycins, ähnlich der bei dem G2PyA-Aptamer beobachteten, zu sehen. Das Maximum der Fluoreszenzintensität schiebt dabei nur um  $1 \text{ nm}$  hin zu  $463 \text{ nm}$ . Dies spricht dafür, dass die Umgebungsänderungen kleiner ausfallen als bei dem G2PyA-Aptamer und könnte auf eine zusätzliche Stabilisierung des Doppelstrangbereichs durch Dimerbildung der beiden Pyrenreste auch ohne Neomycin zurückzuführen sein.

### 5.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die stationäre Untersuchung des A16PyA-Aptamers zeigt bei Bindung von Neomycin B einen Abfall der Fluoreszenzintensität um ca.  $37 \%$  bei  $458 \text{ nm}$ . Dies zeigt, dass PyA im Fall des N1-Aptamers als Fluoreszenzmarker zur Untersuchung der Bindungsdynamik eingesetzt werden kann, da der Abfall direkt mit der Umgebungsänderung des Pyrenrestes in der Nähe des Liganden verknüpft ist.



## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei Themenblöcke bearbeitet. Zum einen der Aufbau und die Charakterisierung des Kerr-Schalters, einer Anlage zur Messung von Fluoreszenz mit einer Zeitauflösung im Femtosekundenbereich. Zum anderen die Charakterisierung von pyrenmodifizierten Nukleobasen, sowie deren Anwendung in einem neomycinbindenden Aptamer.

### 6.1 Kerr-Schalter

Der Kerr-Schalter erlaubt es durch die zeitaufgelöste Messung von Fluoreszenz Informationen über sehr schnelle photophysikalische Prozesse in angeregten Zuständen zu gewinnen. Dabei hat er gegenüber der transienten Absorption den Vorteil, dass die gemessene Fluoreszenz keine störenden Überlagerungen mit der ESA oder dem GSB in den Spektren aufweist. Die Schaltwellenlänge ist in zwei verschiedenen Spektralbereichen frei wählbar: (1) Emissionsbereich des Lasersystems ( $\approx 760\text{-}840\text{ nm}$ ) und (2) Verstärkungsbereich des OPAs ( $\approx 1150\text{-}1350\text{ nm}$ ). Der Aufbau weist eine Schalteffizienz im Bereich von 4-10 % auf. Eine Kombination aus NOPA, SHG und SFG ermöglicht die Verwendung von Anregungspulsen in einem breiten Spektralbereich ( $\approx 320\text{-}700\text{ nm}$ ). Die Zeitauflösung liegt bedingt durch die Pulsdauer der Schalt- und Anregungspulse in einem Bereich zwischen 80 fs und 200 fs, wobei ausschließlich Quarzglas als Kerr-Medium verwendet wurde. Es wurde auch gezeigt, dass der gleichzeitig detektierbare Spektralbereich zwischen  $\approx 380\text{ nm}$  und  $\approx 1000\text{ nm}$  liegt, wobei Störsignale im Spektralbereich der verwendeten Schaltwellenlänge und deren Harmonischen zu Unterbrechungen des messbaren Spektralbereichs führen. Mit dieser Arbeit wird dem Experimentator eine Arbeitsanleitung an die Hand gegeben, um den Kerr-Schalter einzustellen und welche Korrekturen auf die gemessenen Daten angewendet werden müssen. Der Kerr-Schalter eignet sich dabei vor allem für Moleküle mit sehr kurzlebig emittierenden Zuständen, selbst wenn diese sehr kleine Fluoreszenzquantenausbeuten ( $> 10^{-5}$ ) aufweisen.

### 6.2 Pyrenmodifizierte Nukleobasen

Bei den pyrenmodifizierten Nukleobasen wurde ein Modell der ablaufenden photophysikalischen Prozesse für PyA erstellt und diskutiert, das in Abbildung 54 (Kap. 5.2.3.6) gezeigt ist. Die Ergebnisse wurden vor dem Hintergrund bereits veröffentlichter Daten für ein strukturell leicht verändertes Derivat<sup>[227]</sup> und mehrerer PyA-modifizierter RNA-Stränge<sup>[226]</sup> diskutiert. Es lässt sich festhalten, dass generell ein starker Einfluss der Lösungsmittelklasse und der Permittivität der Lösungsmittel beobachtet wurde. Insbesondere die intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Stickstoffatom N3 des Adenins und dem Proton der C2'-OH-Gruppe der Ribose, welche mit Hilfe von quantenchemischen Rechnungen vorhergesagt wurde, zeigt einen großen Einfluss auf die spektralen Eigenschaften. Um das Vorhandensein dieser Bindung zu bestätigen wurde PyA so modifiziert, dass die Bildung dieser Wasserstoffbrücke ausgeschlossen werden konnte. Hierzu wurde PydA das Desoxyderivat von PyA synthetisiert und untersucht. Als Folge dieser Ergebnisse wurden den vier gefundenen Zeitkonstanten, welche die Dynamik des Systems beschreiben neue Prozesse zugeordnet. Eine Anregung in höhere vibronische Zustände des  $S_{1L}$ -Zustands (325-420 nm) führt dabei zu einer IVR ( $\tau_1$ ). Der  $S_{1L}$ -Zustand bevölkert anschließend den  $S_{1x}$ -Zustand mit  $\tau_2$ . Mit

der Bevölkerung des  $S_{1x}$ -Zustands geht eine Lösungsmittelreorganisation einher ( $\tau_3$ ), die den  $S_{1x}$ -Zustand stabilisiert. Grund für diese Lösungsmittelreorganisation ist die höhere Polarität des  $S_{1x}$ -Zustands aufgrund einer Änderung in der Verteilung der über die Nukleobase delokalisierten Elektronendichte. Hierbei gilt, dass sich die energetische Lage des  $S_{1x}$ -Zustands stärker und schneller absenkt, wenn die Lösungsmittelpolarität steigt. Die beiden Zustände ( $S_{1L}$  und  $S_{1x}$ ) befinden sich im Gleichgewicht und zerfallen mit einer Zeitkonstante ( $\tau_4$ ).

Es wurde auch gezeigt, dass der  $S_{1x}$ -Zustand einen Unterzustand auf der Potentialenergiefläche des ersten angeregten Zustands darstellt und nicht wie ursprünglich angenommen einen CT-Zustand. Die energetische Lage und somit das Bevölkerungsverhältnis zwischen dem  $S_{1L}$ -Unterzustand und dem  $S_{1x}$ -Unterzustand ist stark von der Lösungsmittelklasse abhängig. Als Grund hierfür zeigte sich die oben genannte intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung. Aprotische Lösungsmittel stören dabei die intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung bei PyA nicht und der  $S_{1x}$ -Unterzustand liegt relativ zum  $S_{1L}$ -Unterzustand energetisch höher (strukturierte Fluoreszenz). Protische Lösungsmittel stören diese intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung, vermutlich durch die Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Stickstoffatom N3. Hierdurch gewinnt PyA an Flexibilität und der  $S_{1L}$ -Unterzustand wird stärker stabilisiert (unstrukturierte Fluoreszenzbande).

Die Untersuchungen an PydA zeigten, dass es einen grundsätzlich größeren, einnehmbaren Konformationsraum aufgrund der fehlenden intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung aufweist und durch diese höhere Flexibilität der  $S_{1x}$ -Unterzustand deutlich stärker stabilisiert wird als bei PyA. Die Bevölkerung des  $S_{1x}$ -Unterzustands erfolgt dabei nahezu instantan in aprotischen Lösungsmitteln. Die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen bei protischen Lösungsmitteln verlangsamen diese jedoch deutlich. Sind die Lösungsmittel zusätzlich unpolar (z.B. Isopropanol und tert-Butanol) weisen sie sogar Zeitkonstanten auf, die ähnlich zu denen für PyA sind. Die unterschiedliche Abhängigkeit der FQA von der Permittivität in beiden Lösungsmittelklassen für PydA und der Unterschied zu den FQA von PyA zeigen, dass das Dipolmatrixelement des Übergangs aus dem  $S_{1x}$ -Unterzustand in den Grundzustand ( $S_0$ ) sehr stark mit der Permittivität und dem Vorhandensein der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen variiert.

Die dem  $S_{1x}$ -Unterzustand zugehörige Konformation konnte nicht ermittelt werden, aber es wurde eindeutig gezeigt, dass eine elektrostatische Wechselwirkung aufgrund einer intermolekularen Wasserstoffbrückenbindung vorliegt und diese im hohen Maße die Fluoreszenzeigenschaften beeinflusst. Die Substitution der C2'-OH-Gruppe mit einem Wasserstoffatom führt dabei zu grundlegenden Änderungen der photophysikalischen Eigenschaften, vor allem bei Fehlen jeglicher Wasserstoffbrückenbindungen.

Durch die Untersuchung des Einflusses der Umgebungsparameter und deren Effekt auf die stationären Fluoreszenzspektren ist es möglich, sogar kleinste Änderung des stationären Fluoreszenzverhaltens den jeweiligen Umgebungsänderungen bei PyA-modifizierter RNA zuzuordnen.

Zusätzlich wurden erste stationäre Untersuchungen an einem mit PyA-modifizierten, neomycinbindenden Aptamer durchgeführt, die als Basis für eine Aufklärung der Bindungsdynamik dienen können. Das A16PyA-Aptamer zeigte einen Abfall der Fluoreszenzintensität um ca. 37 %. Dieser erste Einsatz an einem biologisch relevanten RNA-Molekül ist sehr vielversprechend für Stopped-Flow-Messungen, da der Abfall direkt mit der Umgebungsänderung des Pyrenrestes in der Nähe des Liganden verknüpft ist.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Al-Hashimi, H. M. und Walter, N. G.: *RNA dynamics: It is about time*. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **18** (3), 321–329 (2008). Doi: 10.1016/j.sbi.2008.04.004.
- [2] Mayzel, M., Rosenl ow, J., Isaksson, L. und Orekhov, V.: *Time-resolved multidimensional NMR with non-uniform sampling*. *J. Biomol. NMR*, **58** (2), 129–139 (2014). Doi: 10.1007/s10858-013-9811-1.
- [3] Yang, X., van Ommen, J. R., Wagner, E. und Mudde, R. F.: *Time-resolved characterization of a flat-base spouted bed with a high speed X-ray system*. *Chem. Eng. J. (Amsterdam, Neth.)*, **254** (0), 143–152 (2014). Doi: 10.1016/j.cej.2014.05.050.
- [4] Becker, W.: *The bh TCSPC handbook*. Becker&Hickel GmbH, 5. Aufl. (2012).
- [5] Wahl, M.: *Time-correlated single photon counting*. Techn. Ber., PicoQuant GmbH, Rudower Chaussee 29, 12489 Berlin (2014).
- [6] Ryseck, G., Schmierer, T., Haiser, K., Schreier, W., Zinth, W. und Gilch, P.: *The excited-state decay of 1-methyl-2(1H)-pyrimidinone is an activated process*. *ChemPhysChem*, **12** (10), 1880–1888 (2011). Doi: 10.1002/cphc.201001063.
- [7] Schanz, R., Kovalenko, S. A., Kharlanov, V. und Ernsting, N. P.: *Broad-band fluorescence upconversion for femtosecond spectroscopy*. *Appl. Phys. Lett.*, **79** (5), 566–568 (2001). Doi: 10.1063/1.1387257.
- [8] Schmidt, B., Laimgruber, S., Zinth, W. und Gilch, P.: *A broadband Kerr shutter for femtosecond fluorescence spectroscopy*. *Appl. Phys. B: Lasers Opt.*, **76** (8), 809–814 (2003). Doi: 10.1007/s00340-003-1230-7.
- [9] Lakowicz, J. R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, New York, 3. Aufl. (2010). ISBN 0-387-31278-1.
- [10] Zhao, L., Luis Perez Lustres, J., Farztdinov, V. und Ernsting, N. P.: *Femtosecond fluorescence spectroscopy by upconversion with tilted gate pulses*. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **7**, 1716–1725 (2005). Doi: 10.1039/B500108K.
- [11] Cannizzo, A., Br am, O., Zgrablic, G., Tortschanoff, A., Oskouei, A. A., van Mourik, F. und Chergui, M.: *Femtosecond fluorescence upconversion setup with broadband detection in the ultraviolet*. *Opt. Lett.*, **32** (24), 3555–3557 (2007). Doi: 10.1364/OL.32.003555.
- [12] Sajadi, M., Quick, M. und Ernsting, N. P.: *Femtosecond broadband fluorescence spectroscopy by down- and up-conversion in  $\beta$ -barium borate crystals*. *Appl. Phys. Lett.*, **103** (17), 173514 (2013). Doi: 10.1063/1.4826686.
- [13] Cordes, T., Regner, N., Heinz, B., Borysova, E., Ryseck, G. und Gilch, P.: *The complex photo-rearrangement of a heterocyclic N-oxide: Kinetics from picoseconds to minutes*. *J. Photochem. Photobiol., A*, **206** (1), 10–17 (2009). Doi: 10.1016/j.jphotochem.2009.05.015.

- [14] Post, M., Langelaar, J. und van Voorst, J.: *Singlet excited monomer and excimer absorptions of pyrene*. Chem. Phys. Lett., **10** (4), 468–472 (1971). Doi: 10.1016/0009-2614(71)80336-6.
- [15] Nakajima, A.: *Fluorescence lifetime of pyrene in different solvents*. Bull. Chem. Soc. Jpn., **46** (8), 2602–2604 (1973). Doi: 10.1246/bcsj.46.2602.
- [16] Kubota T., Kano K., U. B. und T., K.: *Energetics of the sequential electroreduction and electrooxidation steps of benzenoid hydrocarbons*. Bull. Chem. Soc. Jpn., **60** (11), 3865–3877 (1987). Doi: 10.1246/bcsj.60.3865.
- [17] Foggi, P., Pettini, L., Santa, I., Righini, R. und Califano, S.: *Transient absorption and vibrational-relaxation dynamics of the lowest excited singlet-state of pyrene in solution*. J. Phys. Chem., **99** (19), 7439–7445 (1995). Doi: 10.1021/j100019a029.
- [18] Karpovich, D. S. und Blanchard, G. J.: *Relating the polarity-dependent fluorescence response of pyrene to vibronic coupling - Achieving a fundamental understanding of the Py polarity scale*. J. Phys. Chem., **99** (12), 3951–3958 (1995). Doi: 10.1021/j100012a014.
- [19] Neuwahl, F. und Foggi, P.: *Direct observation of  $S_2$ - $S_1$  internal conversion in pyrene by femtosecond transient absorption*. Laser Chem., **19** (1-4), 375–379 (1999). Doi: 10.1155/1999/37692.
- [20] Raytchev, M., Pandurski, E., Buchvarov, I., Modrakowski, C. und Fiebig, T.: *Bichromophoric interactions and time-dependent excited state mixing in pyrene derivatives. A femtosecond broad-band pump-probe study*. J. Phys. Chem. A, **107** (23), 4592–4600 (2003). Doi: 10.1021/jp027356c.
- [21] Förster, T.: *Excimere*. Angew. Chem., **81** (10), 364–374 (1969). Doi: 10.1002/ange.19690811004.
- [22] Amann, N., Pandurski, E., Fiebig, T. und Wagenknecht, H.-A.: *A model nucleoside for electron injection into DNA: 5-Pyrenyl-2'-deoxyribose*. Angew. Chem. Int. Ed., **41** (16), 2978–2980 (2002). Doi: 10.1002/1521-3773(20020816)41:16<2978::AID-ANIE2978>3.0.CO;2-5.
- [23] Amann, N., Pandurski, E., Fiebig, T. und Wagenknecht, H.-A.: *Electron injection into DNA: Synthesis and spectroscopic properties of pyrenyl-modified oligonucleotides*. Chem. - Eur. J., **8** (21), 4877–4883 (2002). Doi: 10.1002/1521-3765(20021104)8:21<4877::AID-CHEM4877>3.0.CO;2-P.
- [24] Trifonov, A., Raytchev, M., Buchvarov, I., Rist, M., Barbaric, J., Wagenknecht, H.-A. und Fiebig, T.: *Ultrafast energy transfer and structural dynamics in DNA*. J. Phys. Chem. B, **109** (41), 19490–19495 (2005). Doi: 10.1021/jp052108c. PMID: 16853518.
- [25] Wagner, C. und Wagenknecht, H.-A.: *Reductive electron transfer in phenothiazine-modified DNA is dependent on the base sequence*. Chem. Eur. J., **11** (6), 1871–1876 (2005). Doi: 10.1002/chem.200401013.

- 
- [26] Kaden, P., Mayer-Enthart, E., Trifonov, A., Fiebig, T. und Wagenknecht, H.-A.: *Real-time spectroscopic and chemical probing of reductive electron transfer in DNA*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 1637–1639 (2005). Doi: 10.1002/anie.200462592. DNA-ET.
- [27] Wanninger-Weiss, C. und Wagenknecht, H.-A.: *Synthesis of 5-(2-pyrenyl)-2'-deoxyuridine as a DNA modification for electron-transfer studies: The critical role of the position of the chromophore attachment*. *Eur. J. Org. Chem.*, **2008** (1), 64–69 (2008). Doi: 10.1002/ejoc.200700818.
- [28] Wanninger-Weiss, C., Valis, L. und Wagenknecht, H.-A.: *Pyrene-modified guanosine as fluorescent probe for DNA modulated by charge transfer*. *Bioorg. Med. Chem.*, **16** (1), 100–106 (2008). Doi: 10.1016/j.bmc.2007.04.064.
- [29] Okamoto, A., Kanatani, K. und Saito, I.: *Pyrene-labeled base-discriminating fluorescent DNA probes for homogeneous SNP typing*. *J. Am. Chem. Soc.*, **126** (15), 4820–4827 (2004). Doi: 10.1021/ja039625y.
- [30] Kawai, K., Yoshida, H., Takada, T., Tojo, S. und Majima, T.: *Formation of pyrene dimer radical cation at the internal site of oligodeoxynucleotides*. *J. Phys. Chem. B*, **108** (35), 13547–13550 (2004). Doi: 10.1021/jp049543b.
- [31] Seo, Y. J., Ryu, J. H. und Kim, B. H.: *Quencher-free, end-stacking oligonucleotides for probing single-base mismatches in DNA*. *Org. Lett.*, **7** (22), 4931–4933 (2005). Doi: 10.1021/ol0518582.
- [32] Seo, Y. J., Lee, I. J., Yi, J. W. und Kim, B. H.: *Probing the stable G-quadruplex transition using quencher-free end-stacking ethynyl pyrene-adenosine*. *Chem. Commun.*, 2817–2819 (2007). Doi: 10.1039/B707278C.
- [33] Kashida, H., Takatsu, T., Sekiguchi, K. und Asanuma, H.: *An efficient fluorescence resonance energy transfer (FRET) between pyrene and perylene assembled in a DNA duplex and its potential for discriminating single-base changes*. *Chem. - Eur. J.*, **16** (8), 2479–2486 (2010). Doi: 10.1002/chem.200902078.
- [34] Kato, T., Kashida, H., Kishida, H., Yada, H., Okamoto, H. und Asanuma, H.: *Development of a robust model system of FRET using base surrogates tethering fluorophores for strict control of their position and orientation within DNA duplex*. *J. Am. Chem. Soc.*, **135** (2), 741–750 (2013). Doi: 10.1021/ja309279w.
- [35] Astakhova, I. K., Santhosh Kumar, T., Campbell, M. A., Ustinov, A. V., Korshun, V. A. und Wengel, J.: *Branched DNA nanostructures efficiently stabilised and monitored by novel pyrene-peryene 2'- $\alpha$ -L-amino-LNA FRET pairs*. *Chem. Commun.*, **49**, 511–513 (2013). Doi: 10.1039/C2CC37547H.
- [36] Mayer, E., Valis, L., Wagner, C., Rist, M., Amann, N. und Wagenknecht, H.: *1-Ethynylpyrene as a tunable and versatile molecular beacon for DNA*. *ChemBioChem*, **5** (6), 865–868 (2004). Doi: 10.1002/cbic.200300845.

- [37] Hwang, G. T., Seo, Y. J., Kim, S. J. und Kim, B. H.: *Fluorescent oligonucleotide incorporating 5-(1-ethynylpyrenyl)-2'-deoxyuridine: Sequence-specific fluorescence changes upon duplex formation*. *Tetrahedron Lett.*, **45** (18), 3543–3546 (2004). Doi: 10.1016/j.tetlet.2004.03.071.
- [38] Hwang, G. T., Seo, Y. J. und Kim, B. H.: *Pyrene-labeled deoxyuridine and deoxyadenosine: Fluorescent discriminating phenomena in their oligonucleotides*. *Tetrahedron Lett.*, **46** (9), 1475–1477 (2005). Doi: 10.1016/j.tetlet.2005.01.015.
- [39] Valis, L., Mayer-Enthart, E. und Wagenknecht, H.-A.: *8-(Pyren-1-yl)-2'-deoxyguanosine as an optical probe for DNA hybridization and for charge transfer with small peptides*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16** (12), 3184–3187 (2006). Doi: 10.1016/j.bmcl.2006.03.063.
- [40] Venkatesan, N., Jun Seo, Y. und Hyeon Kim, B.: *Quencher-free molecular beacons: A new strategy in fluorescence based nucleic acid analysis*. *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 648–663 (2008). Doi: 10.1039/B705468H.
- [41] Astakhova, I. V., Ustinov, A. V., Korshun, V. A. und Wengel, J.: *LNA for optimization of fluorescent oligonucleotide probes: Improved spectral properties and target binding*. *Bioconjugate Chem.*, **22** (4), 533–539 (2011). Doi: 10.1021/bc1005027.
- [42] Huang, J., Wu, Y., Chen, Y., Zhu, Z., Yang, X., Yang, C. J., Wang, K. und Tan, W.: *Pyrene-excimer probes based on the hybridization chain reaction for the detection of nucleic acids in complex biological fluids*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50** (2), 401–404 (2011). Doi: 10.1002/anie.201005375.
- [43] Sau, S. P. und Hrdlicka, P. J.: *C2'-pyrene-functionalized triazole-linked DNA: Universal DNA/RNA hybridization probes*. *J. Org. Chem.*, **77** (1), 5–16 (2012). Doi: 10.1021/jo201845z.
- [44] Huang, K. und Martí, A. A.: *Recent trends in molecular beacon design and applications*. *Anal. Bioanal. Chem.*, **402** (10), 3091–3102 (2012). Doi: 10.1007/s00216-011-5570-6.
- [45] Zhang, R., Yang, L., Zhao, M., Dong, J., Dong, H., Wen, Y., Zhan, X., Yang, H. und Wang, G.: *Synthesis and fluorescence study of a pyrene-functionalized poly(4-vinylpyridine) quaternary ammonium for detection of DNA hybridization*. *Polymer*, **54** (4), 1289–1294 (2013). Doi: 10.1016/j.polymer.2012.12.080.
- [46] Tinoco Jr., I. und Bustamante, C.: *How RNA folds*. *J. Mol. Biol.*, **293** (2), 271–281 (1999). Doi: 10.1006/jmbi.1999.3001.
- [47] Cruz, J. A. und Westhof, E.: *The dynamic landscapes of RNA architecture*. *Cell*, **136** (4), 604–609 (2009). Doi: 10.1016/j.cell.2009.02.003.
- [48] Karunatilaka, K. S. und Rueda, D.: *Single-molecule fluorescence studies of RNA: A decade's progress*. *Chem. Phys. Lett.*, **476** (1-3), 1–10 (2009). Doi: 10.1016/j.cplett.2009.06.001.
- [49] Garst, A. D., Edwards, A. L. und Batey, R. T.: *Riboswitches: Structures and mechanisms*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2010). Doi: 10.1101/cshperspect.a003533.

- 
- [50] Mahara, A., Iwase, R., Sakamoto, T., Yamana, K., Yamaoka, T. und Murakami, A.: *Bispyrene-conjugated 2'-o-methyloligonucleotide as a highly specific RNA-recognition probe*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41** (19), 3648–3650 (2002). Doi: 10.1002/1521-3773(20021004)41:19<3648::AID-ANIE3648>3.0.CO;2-Y.
- [51] Mahara, A., Iwase, R., Sakamoto, T., Yamaoka, T., Yamana, K. und Murakami, A.: *Detection of acceptor sites for antisense oligonucleotides on native folded RNA by fluorescence spectroscopy*. *Bioorg. Med. Chem.*, **11** (13), 2783–2790 (2003). Doi: 10.1016/S0968-0896(03)00227-X.
- [52] Srivatsan, S. und Sawant, A.: *Fluorescent ribonucleoside analogues as probes for investigating RNA structure and function*. *Pure Appl. Chem.*, **83** (1), 213–232 (2010). Doi: 10.1351/PAC-CON-10-09-16.
- [53] Krasheninina, O., Novopashina, D. und Venyaminova, A.: *Oligo(2'-o-methylribonucleotides) containing insertions of 2'-bispyrenylmethylphosphorodiamidate nucleoside derivatives as prospective fluorescent probes for RNA detection*. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **37** (2), 244–248 (2011). Doi: 10.1134/S1068162011020099.
- [54] Waki, R., Yamayoshi, A., Kobori, A. und Murakami, A.: *Development of a system to sensitively and specifically visualize c-fos mRNA in living cells using bispyrene-modified RNA probes*. *Chem. Commun.*, **47**, 4204–4206 (2011). Doi: 10.1039/C0CC04639F.
- [55] Karlsen, K. K., Pasternak, A., Jensen, T. B. und Wengel, J.: *Pyrene-modified unlocked nucleic acids: Synthesis, thermodynamic studies, and fluorescent properties*. *ChemBioChem*, **13** (4), 590–601 (2012). Doi: 10.1002/cbic.201100689.
- [56] Ueda, T., Kobori, A., Yamayoshi, A., Yoshida, H., Yamaguchi, M. und Murakami, A.: *RNA-based diagnosis in a multicellular specimen by whole mount in situ hybridization using an RNA-specific probe*. *Bioorg. Med. Chem.*, **20** (20), 6034–6039 (2012). Doi: 10.1016/j.bmc.2012.08.028.
- [57] Wang, G., Bobkov, G. V., Mikhailov, S. N., Schepers, G., Van Aerschot, A., Rozen-ski, J., Van der Auweraer, M., Herdewijn, P. und De Feyter, S.: *Detection of RNA hybridization by pyrene-labeled probes*. *ChemBioChem*, **10** (7), 1175–1185 (2009). Doi: 10.1002/cbic.200900031.
- [58] Silverman, S. K. und Cech, T. R.: *RNA tertiary folding monitored by fluorescence of covalently attached pyrene*. *Biochemistry*, **38** (43), 14224–14237 (1999). Doi: 10.1021/bi991333f.
- [59] Netzel, T. L., Nafisi, K., Headrick, J. und Eaton, B. E.: *Direct observation of photoinduced electron transfer in pyrene-labeled dU nucleosides and evidence for protonated 2'-deoxyuridine anion, dU(H)<sup>-</sup>, as a Primary Electron Transfer Product*. *J. Phys. Chem.*, **99** (51), 17948–17955 (1995). Doi: 10.1021/j100051a020.
- [60] Malakhov, A., Malakhova, E., Kuznitsova, S., Grechishnikova, I., Prokhorenko, I., Skorobogatyi, M., Korshun, V. und Berlin, Y.: *Synthesis and fluorescent properties of 5-(1-pyrenylethynyl)-2'-deoxyuridine-containing oligodeoxynucleotides*. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **26**, 34–44 (2000). Doi: 10.1007/BF02758859. 10.1007/BF02758859.

- [61] Trifonov, A., Buchvarov, I., Wagenknecht, H. und Fiebig, T.: *Real-time observation of hydrogen bond-assisted electron transfer to a DNA base*. Chem. Phys. Lett., **409** (4-6), 277–280 (2005). Doi: 10.1016/j.cplett.2005.05.009.
- [62] Grünewald, C., Kwon, T., Piton, N., Foerster, U., Wachtveitl, J. und Engels, J. W.: *RNA as scaffold for pyrene excited complexes*. Bioorg. Med. Chem., **16** (1), 19–26 (2008). Doi: 10.1016/j.bmc.2007.04.058.
- [63] Crawford, A. G., Dwyer, A. D., Liu, Z., Steffen, A., Beeby, A., Pålsson, L. O., Tozer, D. J. und Marder, T.: *Experimental and theoretical studies of the photophysical properties of 2- and 2,7-functionalized pyrene derivatives*. J. Am. Chem. Soc., **133**, 13349–13362 (2011). Doi: 10.1021/ja2006862.
- [64] Nakamura, M., Fukunaga, Y., Sasa, K., Ohtoshi, Y., Kanaori, K., Hayashi, H., Nakano, H. und Yamana, K.: *Pyrene is highly emissive when attached to the RNA duplex but not to the DNA duplex: the structural basis of this difference*. Nucleic Acids Res., **33** (18), 5887–5895 (2005). Doi: 10.1093/nar/gki889.
- [65] Hollas, M. J.: *Moderne Methoden in der Spektroskopie, Vieweg-Lehrbuch physikalische Chemie*, Bd. 45. Friedr. Vieweg & Sohn VgmbH, Braunschweig/Wiesbaden, 1. Aufl. (1995). ISBN 3-528-06600-8.
- [66] Hesse, M., Meier, H. und Zeeh, B.: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 7. Aufl. (2005). ISBN 3-13-576107-7.
- [67] Atkins, P. W. und de Paula, J.: *Physikalische Chemie*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 4. Aufl. (2008). ISBN 3-527-31546-2.
- [68] Haken, H. und Wolf, H. C.: *Molekülphysik und Quantenchemie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 5. Aufl. (2006). ISBN 3-540-30314-6.
- [69] Khopkar, S. M.: *Basic concepts of analytical chemistry*. New Age International (P) Ltd. Publishers, Neu-Dehli, 2. Aufl. (2004). ISBN 81-224-1159-2.
- [70] Holtzhauer, M. und Behlke, J.: *Methoden in der Proteinanalytik*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1. Aufl. (1996). ISBN 3-540-60210-0.
- [71] Kiefer, J.: *Ultraviolette Strahlen*. de Gruyter, Berlin, New York, 1. Aufl. (1976). ISBN 3-11-001641-9.
- [72] Freed, K. F. und Jortner, J.: *Multiphonon processes in the nonradiative decay of large molecules*. J. Chem. Phys., **52** (12), 6272–6291 (1970). Doi: 10.1063/1.1672938.
- [73] Kelley, A. M.: *Condensed-phase molecular spectroscopy and photophysics*. Wiley & Sons, Inc., The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, 1. Aufl. (2012). ISBN 978-0-470-94670-1.
- [74] Marconi, G. und Salvi, P.: *Vibronic activity in the fluorescence and absorption spectrum of pyrene*. Chem. Phys. Lett., **123** (4), 254–260 (1986). Doi: 10.1016/0009-2614(86)80067-7.

- 
- [75] Kasha, M.: *Characterization of electronic transitions in complex molecules*. Discuss. Faraday Soc., **9**, 14–19 (1950). Doi: 10.1039/DF9500900014.
- [76] Nickel, B. und Karbach, H.-J.: *Complete spectra of the delayed luminescence from aromatic compounds in liquid solutions: On the observability of direct radiative triplet-triplet annihilation*. Chem. Phys., **148** (1), 155–182 (1990). Doi: 10.1016/0301-0104(90)89015-I.
- [77] Suppan, P.: *Chemistry and light*. RSC, The Science Park, Cambridge CB4 4WF, 1. Aufl. (1994). ISBN 0-85186-814-2.
- [78] Klán, P. und Wirz, J.: *Photochemistry of organic compounds: From concepts to practice*. John Wiley & Sons Ltd., The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, 1. Aufl. (2009). ISBN 978-1-4051-9088-6.
- [79] Kropp, J. und Stanley, C.: *The temperature dependence of ovalene fluorescence*. Chem. Phys. Lett., **9** (6), 534–538 (1971). Doi: 10.1016/0009-2614(71)85118-7.
- [80] Beer, M. und Longuet-Higgins, H. C.: *Anomalous light emission of azulene*. J. Chem. Phys., **23** (8), 1390–1391 (1955). Doi: 10.1063/1.1742314.
- [81] Reichardt, C. und Welton, T.: *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim, 4. Aufl. (2011). ISBN 978-3-527-32473-6.
- [82] Anslyn, E. V. und Dougherty, D. A.: *Modern physical organic chemistry*. University Science Books, Herndon, VA 20172 (2005). ISBN 1-891389-31-9.
- [83] Lide, D. R.: *Handbook of chemistry and physics*. CRC Press, Boca Ranton, New York, London, Tokyo, 81. Aufl. (2000). ISBN 0-8493-0477-6.
- [84] Reichardt, C.: *Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators*. Chem. Rev., **94** (8), 2319–2358 (1994). Doi: 10.1021/cr00032a005.
- [85] Reichardt, C. und Schäfer, G.: *Pyridinium N-phenoxide betaines and their application to the characterization of solvent polarities, XXI Determination of new and corrections of old ET(30) values as empirical measures of solvent polarity for 40 organic solvents*. Liebigs Ann. Chem., **1995** (8), 1579–1582 (1995). Doi: 10.1002/jlac.1995199508219.
- [86] Dong, D. C. und Winnik, M. A.: *The Py scale of solvent polarities*. Can. J. Chem., **62** (11), 2560–2565 (1984). Doi: 10.1139/v84-437.
- [87] Zewail, A. H.: *Femtochemistry: Atomic-scale dynamics of the chemical bond*. J. Phys. Chem. A, **104** (24), 5660–5694 (2000). Doi: 10.1021/jp001460h.
- [88] Zewail, A.: *Femtochemistry. Past, present, and future*. Pure Appl. Chem., **72** (12), 2219–2231 (2000). Doi: 10.1351/pac200072122219. 15th International Conference on Physical Organic Chemistry (ICPOC 15), GOTHENBURG, SWEDEN, JUL 08-13, 2000.
- [89] Maiman, T. H.: *Stimulated optical radiation in ruby*. Nature, **187** (4736), 493–494 (1960). Doi: 10.1038/187493a0.

- [90] DeMaria, A. J., Stetser, D. A. und Glenn, W. H.: *Ultrashort light pulses*. Science, **156 (3782)**, 1557–1568 (1967). Doi: 10.1126/science.156.3782.1557.
- [91] Hamamatsu Photonics K.K., 812 Joko-cho, Higashi-ku, Hamamatsu City, 431-3196, Japan: *Guide to streak cameras* (2008).
- [92] French, P. M. W.: *The generation of ultrashort laser-pulses*. Rep. Prog. Phys., **58**, 169–252 (1995). Doi: 10.1088/0034-4885/58/2/001.
- [93] Demtröder, W.: *Laserspektroskopie : Grundlagen und Techniken*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 5. Aufl. (2007). ISBN 978-3-540-33792-8.
- [94] Meschede, D.: *Optik, Licht und Laser*. Vieweg+Teubner, Wiesbaden, 3., durchges. Aufl. (2008). ISBN 3834892882 (Sekundärausgabe).
- [95] Boyd, R. W.: *Nonlinear optics*. Academic Press, 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California 92101-4495, USA, 2. Aufl. (2008). ISBN 978-0-12-369470-6.
- [96] Zinth, W. und Zintth, U.: *Optik: Lichtstrahlen-Wellen-Photonen*. Oldebbourg Verlag München, Rosenheimer Straße 145, D-81671 München, 2. Aufl. (2009). ISBN 978-3-486-58801-9.
- [97] Gale, G. M., Cavallari, M., Driscoll, T. J. und Hache, F.: *Sub-20-fs tunable pulses in the visible from an 82-MHz optical parametric oscillator*. Opt. Lett., **20 (14)**, 1562–1564 (1995). Doi: 10.1364/OL.20.001562.
- [98] Riedle, E., Beutter, M., Lochbrunner, S., Piel, J., Schenkl, S., Spörlein, S. und Zinth, W.: *Generation of 10 to 50 fs pulses tunable through all of the visible and the NIR*. Appl. Phys. B: Lasers Opt., **71**, 457–465 (2000). Doi: 10.1007/s003400000351. 10.1007/s003400000351.
- [99] Hongjun, L., Wei, Z., Guofu, C., Yishan, W., Zhao, C. und Chi, R.: *Investigation of spectral bandwidth of optical parametric amplification*. Appl. Phys. B: Lasers Opt., **79 (5)**, 569–576 (2004). Doi: 10.1007/s00340-004-1567-6.
- [100] Nautiyal, A., Bisht, P. B., Bindra, K. S. und Oak, S. M.: *Effects of thickness of  $\beta$ -barium borate and angle of non-collinearity on the fs pulse generation by optical parametric amplification*. Opt. Laser Technol., **41 (5)**, 539–544 (2009). Doi: 10.1016/j.optlastec.2008.11.004.
- [101] Aber, J. E., Newstein, M. C. und Garetz, B. A.: *Femtosecond optical Kerr effect measurements in silicate glasses*. J. Opt. Soc. Am. B, **17 (1)**, 120–127 (2000). Doi: 10.1364/JOSAB.17.000120.
- [102] Spectra-Physics, 3635 Peterson Way, Santa Clara, CA 95054, United States: *Spitfire Pro - Ti:sapphire regenerative amplifier systems* (2005).
- [103] Ippen, E. P., Liu, L. Y. und Haus, H. A.: *Self-starting condition for additive-pulse mode-locked lasers*. Opt. Lett., **15 (3)**, 183–185 (1990). Doi: 10.1364/OL.15.000183.

- 
- [104] Fermann, M. E., Stock, M. L., Andrejco, M. J. und Silberberg, Y.: *Passive mode locking by using nonlinear polarization evolution in a polarization-maintaining erbium-doped fiber*. Opt. Lett., **18** (11), 894–896 (1993). Doi: 10.1364/OL.18.000894.
- [105] Steinmeyer, G.: *Frontiers in ultrashort pulse generation: Pushing the limits in linear and nonlinear optics*. Science, **286** (5444), 1507–1512 (1999). Doi: 10.1126/science.286.5444.1507.
- [106] Brabec, T., Spielmann, C., Curley, P. F. und Krausz, F.: *Kerr lens mode locking*. Opt. Lett., **17** (18), 1292–1294 (1992). Doi: 10.1364/OL.17.001292.
- [107] Chen, S. und Wang, J.: *Self-starting issues of passive self-focusing mode locking*. Opt. Lett., **16** (21), 1689–1691 (1991). Doi: 10.1364/OL.16.001689.
- [108] Crosby, G. A. und Demas, J. N.: *Measurement of photoluminescence quantum yields. A review*. J. Phys. Chem., **75** (8), 991–1024 (1971). Doi: 10.1021/j100678a001.
- [109] Porrès, L., Holland, A., Pålsson, L.-O., Monkman, A., Kemp, C. und Beeby, A.: *Absolute measurements of photoluminescence quantum yields of solutions using an integrating sphere*. J. Fluoresc., **16** (2), 267–273 (2006). Doi: 10.1007/s10895-005-0054-8.
- [110] Pardo, A., Reyman, D., Poyato, J. und Medina, F.: *Some  $\beta$ -carboline derivatives as fluorescence standards*. J. Lumin., **51** (5), 269–274 (1992). Doi: 10.1016/0022-2313(92)90077-M.
- [111] Suzuki, K., Kobayashi, A., Kaneko, S., Takehira, K., Yoshihara, T., Ishida, H., Shiina, Y., Oishi, S. und Tobita, S.: *Reevaluation of absolute luminescence quantum yields of standard solutions using a spectrometer with an integrating sphere and a back-thinned CCD detector*. Phys. Chem. Chem. Phys., **11**, 9850–9860 (2009). Doi: 10.1039/B912178A.
- [112] Brouwer, A. M.: *Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report)*. Pure Appl. Chem., **83** (12), 2213–2228 (2011). Doi: 10.1351/PAC-REP-10-09-31.
- [113] Jobin Yvon Ltd., 2 Dalston Gardens, Stanmore, Middlesex HA7 1BQ UK: *A Guide to recording fluorescence quantum yields*.
- [114] Brodeur, A. und Chin, S. L.: *Band-gap dependence of the ultrafast white-light continuum*. Phys. Rev. Lett., **80**, 4406–4409 (1998). Doi: 10.1103/PhysRevLett.80.4406.
- [115] Brodeur, A. und Chin, S. L.: *Ultrafast white-light continuum generation and self-focusing in transparent condensed media*. J. Opt. Soc. Am. B, **16** (4), 637–650 (1999). Doi: 10.1364/JOSAB.16.000637.
- [116] Dharmadhikari, A., Rajgara, F. und Mathur, D.: *Systematic study of highly efficient white light generation in transparent materials using intense femtosecond laser pulses*. Appl. Phys. B: Lasers Opt., **80** (1), 61–66 (2005). Doi: 10.1007/s00340-004-1682-4.

- [117] Alfano, R. R. und Shapiro, S. L.: *Emission in the region 4000 to 7000 Å via four-photon coupling in glass*. Phys. Rev. Lett., **24**, 584–587 (1970). Doi: 10.1103/PhysRevLett.24.584.
- [118] Fork, R. L., Tomlinson, W. J., Shank, C. V., Hirlimann, C. und Yen, R.: *Femtosecond white-light continuum pulses*. Opt. Lett., **8** (1), 1–3 (1983). Doi: 10.1364/OL.8.000001.
- [119] Wilhelm, T., Piel, J. und Riedle, E.: *Sub-20-fs pulses tunable across the visible from a blue-pumped single-pass noncollinear parametric converter*. Opt. Lett., **22** (19), 1494–1496 (1997). Doi: 10.1364/OL.22.001494.
- [120] Gaeta, A. L.: *Catastrophic collapse of ultrashort pulses*. Phys. Rev. Lett., **84**, 3582–3585 (2000). Doi: 10.1103/PhysRevLett.84.3582.
- [121] Kolesik, M., Katona, G., Moloney, J. und Wright, E.: *Theory and simulation of supercontinuum generation in transparent bulk media*. Appl. Phys. B: Lasers Opt., **77** (2-3), 185–195 (2003). Doi: 10.1007/s00340-003-1178-7.
- [122] Kolesik, M., Katona, G., Moloney, J. V. und Wright, E. M.: *Physical factors limiting the spectral extent and band gap dependence of supercontinuum generation*. Phys. Rev. Lett., **91**, 043905 (2003). Doi: 10.1103/PhysRevLett.91.043905.
- [123] Dachraoui, H., Oberer, C., Michelswirth, M. und Heinzmann, U.: *Direct time-domain observation of laser pulse filaments in transparent media*. Phys. Rev. A, **82**, 043820 (2010). Doi: 10.1103/PhysRevA.82.043820.
- [124] Alfano, R. R. und Shapiro, S. L.: *Observation of self-phase modulation and small-scale filaments in crystals and glasses*. Phys. Rev. Lett., **24**, 592–594 (1970). Doi: 10.1103/PhysRevLett.24.592.
- [125] Cerullo, G., Nisoli, M. und De Silvestri, S.: *Generation of 11 fs pulses tunable across the visible by optical parametric amplification*. Appl. Phys. Lett., **71** (25), 3616–3618 (1997). Doi: 10.1063/1.120458.
- [126] Cerullo, G. und De Silvestri, S.: *Ultrafast optical parametric amplifiers*. Rev. Sci. Instrum., **74** (1), 1–18 (2003). Doi: 10.1063/1.1523642.
- [127] Piel, J., Beutner, M. und Riedle, E.: *20-50 fs pulses tunable across the near infrared from a blue-pumped noncollinear parametric amplifier*. Opt. Lett., **25** (3), 180–182 (2000). Doi: 10.1364/OL.25.000180.
- [128] Roth, M.: *Aufbau eines nichtkollinear gepumpten optisch parametrischen Verstärkers*. Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität, Jena (2000).
- [129] Huber, R., Satzger, H., Zinth, W. und Wachtveitl, J.: *Noncollinear optical parametric amplifiers with output parameters improved by the application of a white light continuum generated in CaF<sub>2</sub>*. Opt. Commun., **194** (4–6), 443–448 (2001). Doi: 10.1016/S0030-4018(01)01324-4.

- 
- [130] Studzinski, H.: *Aufbau und Charakterisierung eines nichtkollinear optisch-parametrischen Verstärkers*. Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität, Kiel (2002).
- [131] Fork, R. L., Martinez, O. E. und Gordon, J. P.: *Negative dispersion using pairs of prisms*. Opt. Lett., **9** (5), 150–152 (1984). Doi: 10.1364/OL.9.000150.
- [132] Kafka, J. D. und Baer, T.: *Prism-pair dispersive delay lines in optical pulse compression*. Opt. Lett., **12** (6), 401–403 (1987). Doi: 10.1364/OL.12.000401.
- [133] Duarte, F.: *Generalized multiple-prism dispersion theory for laser pulse compression: Higher order phase derivatives*. Appl. Phys. B: Lasers Opt., **96** (4), 809–814 (2009). Doi: 10.1007/s00340-009-3475-2.
- [134] von Sellmeier, W.: *Zur Erklärung der abnormen Farbenfolge im Spectrum einiger Substanzen*. Ann. Phys. (Berlin), **219** (6), 272–282 (1871). Doi: 10.1002/andp.18712190612.
- [135] Berera, R., van Grondelle, R. und Kennis, J. T. M.: *Ultrafast transient absorption spectroscopy: Principles and application to photosynthetic systems*. Photosynth. Res., **101** (2-3), 105–118 (2009). Doi: 10.1007/s11120-009-9454-y.
- [136] Trojanowski, P., Plotner, J., Grunewald, C., Graupner, F. F., Slavov, C., Reuss, A. J., Braun, M., Engels, J. W. und Wachtveitl, J.: *Photo-physical properties of 2-(1-ethynylpyrene)-adenosine: Influence of hydrogen bonding on excited state properties*. Phys. Chem. Chem. Phys., **16**, 13875–13888 (2014). Doi: 10.1039/C4CP01148A.
- [137] Dworak, L., Matylitsky, V. V. und Wachtveitl, J.: *Ultrafast photoinduced processes in alizarin-sensitized metal oxide mesoporous films*. Chem. Phys. Chem., **10** (2), 384–391 (2009). Doi: 10.1002/cphc.200800533.
- [138] Lenz, M.: *Kurzzeitspektroskopische Untersuchungen photoinduzierter Ladungstransferreaktionen*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität (2005).
- [139] Amarie, S.: *Photo-protective function of carotenoids in photosynthesis*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität (2008).
- [140] Clark-MXR, Inc., 7300 W. Huron River Dr., Dexter, 48130 Missouri, USA: *Manual Clark MXR CPA (2001)*.
- [141] Dworak, L.: *Elektronentransfer zwischen CdSe Quantenpunkten und Methylviologen*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität (2012).
- [142] Hentschel, M., Kienberger, R., Spielmann, C., Reider, G. A., Milosevic, N., Brabec, T., Corkum, P., Heinzmann, U., Drescher, M. und Krausz, F.: *Attosecond metrology*. Nature, **414** (6863), 509–513 (2001). Doi: 10.1038/35107000.
- [143] van Stokkum, I. H., Larsen, D. S. und van Grondelle, R.: *Global and target analysis of time-resolved spectra*. Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg., **1657** (2-3), 82–104 (2004). Doi: 10.1016/j.bbabi.2004.04.011.

- [144] Istratov, A. A. und Vyvenko, O. F.: *Exponential analysis in physical phenomena*. Rev. Sci. Instrum., **70** (2), 1233–1257 (1999). Doi: 10.1063/1.1149581.
- [145] Croce, R., Müller, M. G., Bassi, R. und Holzwarth, A. R.: *Carotenoid-to-chlorophyll energy transfer in recombinant major light-harvesting complex (LHCII) of higher plants. I. Femtosecond transient absorption measurements*. Biophys. J., **80** (2), 901–915 (2001). Doi: 10.1016/S0006-3495(01)76069-9.
- [146] Ablonczy, Z., Lukács, A. und Papp, E.: *Application of the maximum entropy method to absorption kinetic rate processes*. Biophys. Chem., **104** (1), 249–258 (2003). Doi: 10.1016/S0301-4622(02)00379-4.
- [147] Lórenz-Fonfría, V. A. und Kandori, H.: *Practical aspects of the maximum entropy inversion of the laplace transform for the quantitative analysis of multi-exponential data*. Appl. Spectrosc., **61** (1), 74–84 (2007). Doi: 10.1366/000370207779701460.
- [148] Mulligan, V. K., Hadley, K. C. und Chakrabartty, A.: *Analyzing complicated protein folding kinetics rapidly by analytical Laplace inversion using a Tikhonov regularization variant*. Anal. Biochem., **421** (1), 181–190 (2012). Doi: 10.1016/j.ab.2011.10.050.
- [149] Voelz, V. A. und Pande, V. S.: *Calculation of rate spectra from noisy time series data*. Proteins: Struct., Funct., Bioinf., **80** (2), 342–351 (2012). Doi: 10.1002/prot.23171.
- [150] Kutta, R.-J., Langenbacher, T., Kensy, U. und Dick, B.: *Setup and performance of a streak camera apparatus for transient absorption measurements in the ns to ms range*. Appl. Phys. B: Lasers Opt., **111** (2), 203–216 (2013). Doi: 10.1007/s00340-012-5320-2.
- [151] Jaynes, E. T.: *Information theory and statistical mechanics*. Phys. Rev., **106** (4), 620–630 (1957). Doi: 10.1103/PhysRev.106.620.
- [152] Tikhonov, A.: *Solution of incorrectly formulated problems and the regularization method*. Soviet Math. Doklady (1963), Bd. 4, 1035–1038.
- [153] Miller, K.: *Least squares methods for ill-posed problems with a prescribed bound*. SIAM J. on Math. Anal., **1** (1), 52–74 (1970). Doi: 10.1137/0501006.
- [154] Hansen, P.: *The discrete picard condition for discrete ill-posed problems*. BIT Numer. Math., **30** (4), 658–672 (1990). Doi: 10.1007/BF01933214.
- [155] Lian, J., Yao, D. und He, B.: *A new method for implementation of regularization in cortical potential imaging*. Engineering in Medicine and Biology Society, 1998. Proceedings of the 20th Annual International Conference of the IEEE (1998), Bd. 4, 2155–2158 vol.4. Doi: 10.1109/IEMBS.1998.747036.
- [156] Lian, J. und He, B.: *A minimal product method and its application to cortical imaging*. Brain Topogr., **13** (3), 209–217 (2001). Doi: 10.1023/A:1007807203163.
- [157] Golub, G. H., Heath, M. und Wahba, G.: *Generalized cross-validation as a method for choosing a good ridge parameter*. Technometrics, **21** (2), 215–223 (1979). Doi: 10.1080/00401706.1979.10489751.

- 
- [158] Lórenz-Fonfría, V. A. und Kandori, H.: *Bayesian maximum entropy (two-dimensional) lifetime distribution reconstruction from time-resolved spectroscopic data*. Appl. Spectrosc., **61** (4), 428–443 (2007). Doi: 10.1366/000370207780466172.
- [159] Lederer, F., Graupner, F., Maerz, B., Braun, M. und Zinth, W.: *Excimer formation in 9,10-dichloroanthracene - Solutions and crystals*. Chem. Phys., **428** (0), 82–89 (2014). Doi: 10.1016/j.chemphys.2013.11.005.
- [160] Ryseck, G., Schmierer, T., Haiser, K., Schreier, W., Zinth, W. und Gilch, P.: *The excited-state decay of 1-methyl-2(1H)-pyrimidinone is an activated process*. ChemPhysChem, **12** (10), 1880–1888 (2011). Doi: 10.1002/cphc.201001063.
- [161] Satzger, H. und Zinth, W.: *Visualization of transient absorption dynamics - towards a qualitative view of complex reaction kinetics*. Chem. Phys., **295** (3), 287–295 (2003). Doi: 10.1016/j.chemphys.2003.08.012.
- [162] Ahlrichs, R.: *TurboMole V5.10*. University of Karlsruhe, Germany (2007).
- [163] Kong, J., White, C., Krylov, A., Sherrill, D., Adamson, R., Furlani, T., Lee, M., Lee, A., Gwaltney, S., Adams, T., Ochsenfeld, C., Gilbert, A., Kedziora, G., Rassolov, V., Maurice, D., Nair, N., Shao, Y., Besley, N., Maslen, P., Dombroski, J., Daschel, H., Zhang, W., Korambath, P., Baker, J., Byrd, E., Van Voorhis, T., Oumi, M., Hirata, S., Hsu, C., Ishikawa, N., Florian, J., Warshel, A., Johnson, B., Gill, P., Head-Gordon, M. und Pople, J.: *Q-chem 2.0: A high-performance ab initio electronic structure program package*. J. Comput. Chem., **21** (16), 1532–1548 (2000). Doi: 10.1002/1096-987X(200012)21:16<1532::AID-JCC10>3.0.CO;2-W.
- [164] Runge, E. und Gross, E. K. U.: *Density-functional theory for time-dependent systems*. Phys. Rev. Lett., **52**, 997–1000 (1984). Doi: 10.1103/PhysRevLett.52.997.
- [165] Casida, M. E.: *Recent advances in density functional methods, part I*. World Scientific, Singapore (1995).
- [166] Bene, J. E. D., Ditchfield, R. und Pople, J. A.: *Self-consistent molecular orbital methods. X. Molecular orbital studies of excited states with minimal and extended basis sets*. J. Chem. Phys., **55** (5), 2236–2241 (1971). Doi: 10.1063/1.1676398.
- [167] Dreuw, A. und Head-Gordon, M.: *Single-reference ab initio methods for the calculation of excited states of large molecules*. Chem. Rev., **105** (11), 4009–4037 (2005). Doi: 10.1021/cr0505627.
- [168] Dreuw, A., Weisman, J. L. und Head-Gordon, M.: *Long-range charge-transfer excited states in time-dependent density functional theory require non-local exchange*. J. Chem. Phys., **119** (6), 2943–2946 (2003). Doi: 10.1063/1.1590951.
- [169] Dreuw, A. und Head-Gordon, M.: *Failure of time-dependent density functional theory for long-range charge-transfer excited states: The zincbacteriochlorin-bacteriochlorin and bacteriochlorophyll-spheroidene complexes*. J. Am. Chem. Soc., **126** (12), 4007–4016 (2004). Doi: 10.1021/ja039556n.

- [170] Plötner, J. und Dreuw, A.: *Pigment Yellow 101: A showcase for photo-initiated processes in medium-sized molecules*. Chem. Phys., **347** (1–3), 472–482 (2008). Doi: 10.1016/j.chemphys.2007.10.020.
- [171] Tozer, D. J.: *Relationship between long-range charge-transfer excitation energy error and integer discontinuity in Kohn-Sham theory*. J. Chem. Phys., **119**, 12697–12699 (2003). Doi: 10.1063/1.1633756.
- [172] Maitra, N. T.: *Undoing static correlation: Long-range charge transfer in time-dependent density-functional theory*. J. Chem. Phys., **122** (23), 234104 (2005). Doi: 10.1063/1.1924599.
- [173] Neugebauer, J., Gritsenko, O. und Baerends, E. J.: *Assessment of a simple correction for the long-range charge-transfer problem in time-dependent density-functional theory*. J. Chem. Phys., **124** (21), 214102 (2006). Doi: 10.1063/1.2197829.
- [174] Casanova, D., Rhee, Y. M. und Head-Gordon, M.: *Quasidegenerate scaled opposite spin second order perturbation corrections to single excitation configuration interaction*. J. Chem. Phys., **128** (16), 164106 (2008). Doi: 10.1063/1.2907724.
- [175] Kinoshita, S., Ozawa, H., Kanematsu, Y., Tanaka, I., Sugimoto, N. und Fujiwara, S.: *Efficient optical Kerr shutter for femtosecond time-resolved luminescence spectroscopy*. Rev. Sci. Instrum., **71** (9), 3317–3322 (2000). Doi: 10.1063/1.1287043.
- [176] Heinz, B., Schmierer, T., Laimgruber, S. und Gilch, P.: *Excited state processes of nitrobenzaldehydes probed by ultrafast fluorescence and absorption spectroscopy*. J. Photochem. Photobiol., A, **199** (2–3), 274–281 (2008). Doi: 10.1016/j.jphotochem.2008.06.011.
- [177] Sajadi, M., Oberhuber, T., Kovalenko, S. A., Mosquera, M., Dick, B. und Ernsting, N. P.: *Dynamic polar solvation is reported by fluorescing 4-aminophthalimide faithfully despite H-bonding*. J. Phys. Chem. A, **113** (1), 44–55 (2009). Doi: 10.1021/jp807605b.
- [178] Sajadi, M., Dobryakov, A., Garbin, E., Ernsting, N. und Kovalenko, S.: *Time-resolved fluorescence spectra of cis-stilbene in hexane and acetonitrile*. Chem. Phys. Lett., **489** (1–3), 44–47 (2010). Doi: 10.1016/j.cplett.2010.02.034.
- [179] Takeda, J., Nakajima, K., Kurita, S., Tomimoto, S., Saito, S. und Suemoto, T.: *Time-resolved luminescence spectroscopy by the optical Kerr-gate method applicable to ultrafast relaxation processes*. Phys. Rev. B, **62**, 10083–10087 (2000). Doi: 10.1103/PhysRevB.62.10083.
- [180] Sugimoto, N., Ito, S., Fujiwara, S., Suzuki, T., Kanbara, H. und Hirao, K.: *Femtosecond and terahertz optical Kerr shutter switching in glass containing high concentration of Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*. Opt. Commun., **161** (1–3), 47–50 (1999). Doi: 10.1016/S0030-4018(99)00018-8.
- [181] Nakamura, R. und Kanematsu, Y.: *Femtosecond spectral snapshots based on electronic optical Kerr effect*. Rev. Sci. Instrum., **75** (3), 636–644 (2004). Doi: 10.1063/1.1646739.

- 
- [182] Arzhantsev, S. und Maroncelli, M.: *Design and characterization of a femtosecond fluorescence spectrometer based on optical kerr gating*. Appl. Spectrosc., **59** (2), 206–220 (2005). Doi: 10.1366/0003702053085007.
- [183] Schmidt, B.: *Femtosekunden-Fluoreszenzspektroskopie photoisomerisierender Moleküle*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (2004).
- [184] Heinz, B.: *Alte Photoreaktionen in neuem Licht - Ultraschnelle Spektroskopie an Fulgimiden und photolabilen Schutzgruppen*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (2008).
- [185] Gildenhoff, N.: *Time-resolved spectroscopic analysis of fucoxanthin-chlorophyll proteins and isolated carotenoids*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität (2011).
- [186] Yan, L., Yue, J., Si, J. und Hou, X.: *Influence of self-diffraction effect on femtosecond pump-probe optical Kerrmeasurements*. Opt. Express, **16** (16), 12069–12074 (2008). Doi: 10.1364/OE.16.012069.
- [187] Duguay, M. A.: *The ultrafast optical Kerr shutter*. E. Wolf (Hg.), *Progress in Optics*, Elsevier, *Progress in Optics*, Bd. 14, 161 – 193 (1977). Doi: 10.1016/S0079-6638(08)70252-X.
- [188] Spectra-Physics, 3635 Peterson Way, Santa Clara, CA 95054, United States: *Millennia Pro s-series - diode-pumped, CW visible laser systems*. (2006).
- [189] Spectra-Physics, 3635 Peterson Way, Santa Clara, CA 95054, United States: *Empower - Intracavity-doubled, diode-pumped Nd:YLF laser systems* (2005).
- [190] Spectra-Physics, 3635 Peterson Way, Santa Clara, CA 95054, United States: *Tsunami - Mode-locked Ti:sapphire laser* (2002).
- [191] Neuman, K.: *Untersuchung ultraschneller Strukturdynamik photoschaltbarer Moleküle mittels Femtosekunden-Infrarotspektroskopie*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main (2010).
- [192] Kovalenko, S. A., Schanz, R., Hennig, H. und Ernsting, N. P.: *Cooling dynamics of an optically excited molecular probe in solution from femtosecond broadband transient absorption spectroscopy*. J. Chem. Phys., **115** (7), 3256–3273 (2001). Doi: 10.1063/1.1380696.
- [193] Trojanowski, P.: *Aufbau einer breitbandigen fs-zeitaufgelösten Fluoreszenzapparatur zur Charakterisierung von photosschaltbaren Systemem*. Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität (2009).
- [194] Imasheva, E. S., Shimono, K., Balashov, S. P., Wang, J. M., Zadok, U., Sheves, M., Kamo, N. und Lanyi, J. K.: *Formation of a long-lived photoproduct with a deprotonated Schiff base in proteorhodopsin, and its enhancement by mutation of Asp227*. Biochemistry, **44** (32), 10828–10838 (2005). Doi: 10.1021/bi050438h.

- [195] Verhoefen, M.-K.: *Funktionelle Dynamik des Retinalchromophors in verschiedenen Rhodopsinen*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität (2010).
- [196] Scholz, F.: *Photozyklusstudien an mikrobiellen Retinalproteinen*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität (2013).
- [197] Luck, M., Mathes, T., Bruun, S., Fudim, R., Hagedorn, R., Tran Nguyen, T. M., Kateriya, S., Kennis, J. T. M., Hildebrandt, P. und Hegemann, P.: *A photochromic histidine kinase rhodopsin (HKR1) that is bimodally switched by ultraviolet and blue light*. *J. Biol. Chem.*, **287** (47), 40083–40090 (2012). Doi: 10.1074/jbc.M112.401604.
- [198] Schmidt, B., Sobotta, C., Heinz, B., Laimgruber, S., Braun, M. und Gilch, P.: *Excited-state dynamics of bacteriorhodopsin probed by broadband femtosecond fluorescence spectroscopy*. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, **1706** (1–2), 165–173 (2005). Doi: 10.1016/j.bbabbio.2004.10.008.
- [199] Lenz, M. O., Huber, R., Schmidt, B., Gilch, P., Kalmbach, R., Engelhard, M. und Wachtveitl, J.: *First steps of retinal photoisomerization in proteorhodopsin*. *Biophys. J.*, **91** (1), 255–262 (2006). Doi: 10.1529/biophysj.105.074690.
- [200] Fein, A. und Szuts, E. Z.: *Photoreceptors, their role in vision*. IUPAB Biophysics Series. Cambridge University Press, 1. Aufl. (1982). ISBN 978-0521244336.
- [201] Berg, J. M., Tymoczko, J. L. und Stryer, L.: *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York, 6. Aufl. (2006). ISBN 0-7167-8724-5.
- [202] Watson, J. D. und Crick, F. H. C.: *Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid*. *Nature*, **171** (4356), 737–738 (1953). Doi: 10.1038/171737a0.
- [203] Moore, P. B.: *Structural motifs in RNA*. *Annu. Rev. Biochem.*, **68** (1), 287–300 (1999). Doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.287. PMID: 10872451.
- [204] Leontis, N. B. und Westhof, E.: *Analysis of RNA motifs*. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13** (3), 300–308 (2003). Doi: 10.1016/S0959-440X(03)00076-9.
- [205] Hendrix, D. K., Brenner, S. E. und Holbrook, S. R.: *RNA structural motifs: Building blocks of a modular biomolecule*. *Q. Rev. Biophys.*, **38**, 221–243 (2005). Doi: 10.1017/S0033583506004215.
- [206] Ellington, A. D. und Szostak, J. W.: *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. *Nature*, **346** (6287), 818–822 (1990). Doi: 10.1038/346818a0.
- [207] Wu, J., Zhu, Y., Xue, F., Mei, Z., Yao, L., Wang, X., Zheng, L., Liu, J., Liu, G., Peng, C. und Chen, W.: *Recent trends in SELEX technique and its application to food safety monitoring*. *Microchim. Acta*, **181** (5–6), 479–491 (2014). Doi: 10.1007/s00604-013-1156-7.
- [208] Liu, B., Zhang, J., Liao, J., Liu, J., Chen, K., Tong, G., Yuan, P., Liu, Z., Pu, Y. und Liu, H.: *Aptamer-functionalized nanoparticles for drug delivery*. *J. Biomed. Nanotechnol.*, **10** (11), 3189–3203 (2014). Doi: doi:10.1166/jbn.2014.1839.

- 
- [209] Smith, A. M., Fuchs, R. T., Grundy, F. J. und Henkin, T.: *Riboswitch RNAs: Regulation of gene expression by direct monitoring of a physiological signal*. RNA Biol., **7** (1), 104–110 (2010). Doi: 10.4161/rna.7.1.10757.
- [210] Wachter, A.: *Gene regulation by structured mRNA elements*. Trends Genet., **30** (5), 172–181 (2014). Doi: 10.1016/j.tig.2014.03.001.
- [211] Daniels, M. und Hauswirth, W.: *Fluorescence of the purine and pyrimidine bases of the nucleic acids in neutral aqueous solution at 300 K*. Science, **171** (3972), 675–677 (1971). Doi: 10.1126/science.171.3972.675.
- [212] Maeda, H., Maeda, T., Mizuno, K., Fujimoto, K., Shimizu, H. und Inouye, M.: *Alkynylpyrenes as improved pyrene-based biomolecular probes with the advantages of high fluorescence quantum yields and long absorption/emission wavelengths*. Chem. - Eur. J., **12** (3), 824–831 (2006). Doi: 10.1002/chem.200500638.
- [213] Yao, C., Kraatz, H.-B. und Steer, R. P.: *Photophysics of pyrene-labelled compounds of biophysical interest*. Photochem. Photobiol. Sci., **4**, 191–199 (2005). Doi: 10.1039/B414577C.
- [214] Robins, M. J. und Uznański, B.: *Nucleic acid related compounds. 33. Conversions of adenosine and guanosine to 2,6-dichloro, 2-amino-6-chloro, and derived purine nucleosides*. Can. J. Chem., **59** (17), 2601–2607 (1981). Doi: 10.1139/v81-374.
- [215] Matsuda, A., Shinozaki, M., Yamaguchi, T., Homma, H., Nomoto, R., Miyasaka, T., Watanabe, Y. und Abiru, T.: *Nucleosides and nucleotides. 103. 2-Alkynyladenosines: A novel class of selective adenosine A<sub>2</sub> receptor agonists with potent antihypertensive effects*. J. Med. Chem., **35** (2), 241–252 (1992). Doi: 10.1021/jm00080a007.
- [216] Matsuda, A., Shinozaki, M., Suzuki, M., Watanabe, K. und Miyasaka, T.: *A convenient method for the selective acylation of guanine nucleosides*. Synthesis, **1986** (05), 385–386 (2002). Doi: 10.1055/s-1986-31644.
- [217] Scaringe, S. A., Wincott, F. E. und Caruthers, M. H.: *Novel RNA synthesis method using 5'-o-silyl-2'-o-orthoester protecting groups*. J. Am. Chem. Soc., **120** (45), 11820–11821 (1998). Doi: 10.1021/ja980730v.
- [218] Sung, J., Kim, P., Lee, Y. O., Kim, J. S. und Kim, D.: *Characterization of ultrafast intramolecular charge transfer dynamics in pyrenyl derivatives: Systematic change of the number of peripheral N,N-dimethylaniline substituents*. J. Phys. Chem. Lett., **2** (7), 818–823 (2011). Doi: 10.1021/jz200042s.
- [219] Huber, R., Fiebig, T. und Wagenknecht, H.-A.: *Pyrene as a fluorescent probe for DNA base radicals*. Chem. Commun., **15**, 1878–1879 (2003). Doi: 10.1039/B305732A.
- [220] Fiebig, T., Stock, K., Lochbrunner, S. und Riedle, E.: *Femtosecond charge transfer dynamics in artificial donor/acceptor systems: Switching from adiabatic to nonadiabatic regimes by small structural changes*. Chem. Phys. Lett., **345** (1–2), 81–88 (2001). Doi: 10.1016/S0009-2614(01)00869-7.

- [221] Pandurski, E. und Fiebig, T.: *Femtosecond dynamics in directly linked pyrenyl donor-acceptor systems: orbital control of optical charge transfer in the excited state*. Chem. Phys. Lett., **357** (3-4), 272–278 (2002). Doi: 10.1016/S0009-2614(02)00487-6.
- [222] Kosower, E. M., Dodiuk, H. und Kanety, H.: *Intramolecular donor-acceptor system. 4. Solvent effects on radiative and nonradiative processes for the charge-transfer states of N-arylaminonaphthalenesulfonates*. J. Am. Chem. Soc., **100** (13), 4179–4188 (1978). Doi: 10.1021/ja00481a028.
- [223] Morimoto, A., Yatsushashi, T., Shimada, T., Biczók, L., Tryk, D. A. und Inoue, H.: *Radiationless deactivation of an intramolecular charge transfer excited state through hydrogen bonding: Effect of molecular structure and hard-soft anionic character in the excited state*. J. Phys. Chem. A, **105** (45), 10488–10496 (2001). Doi: 10.1021/jp0117213.
- [224] Grabowski, Z. R., Rotkiewicz, K. und Rettig, W.: *Structural changes accompanying intramolecular electron transfer: Focus on twisted intramolecular charge-transfer states and structures*. Chem. Rev., **103** (10), 3899–4032 (2003). Doi: 10.1021/cr940745l.
- [225] Crespo-Hernández, C. E., Burdzinski, G. und Arce, R.: *Environmental photochemistry of nitro-PAHs: Direct observation of ultrafast intersystem crossing in 1-nitropyrene*. J. Phys. Chem., **112** (28), 6313–6319 (2008). Doi: 10.1021/jp803847q.
- [226] Förster, U., Grünewald, C., Engels, J. W. und Wachtveitl, J.: *Ultrafast dynamics of 1-ethynylpyrene-modified RNA: A photophysical probe of intercalation*. J. Phys. Chem. B, **114** (35), 11638–11645 (2010). Doi: 10.1021/jp103176q.
- [227] Förster, U., Gildenhoff, N., Grünewald, C., Engels, J. W. und Wachtveitl, J.: *Photophysics of 1-ethynylpyrene-modified RNA base adenine*. J. Lumin., **129** (12), 1454–1458 (2009). Doi: 10.1016/j.jlumin.2009.03.033.
- [228] Bagchi, B. und Jana, B.: *Solvation dynamics in dipolar liquids*. Chem. Soc. Rev., **39**, 1936–1954 (2010). Doi: 10.1039/B902048A.
- [229] Kwak, K., Park, S. und Fayer, M. D.: *Dynamics around solutes and solute-solvent complexes in mixed solvents*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **104** (36), 14221–14226 (2007). Doi: 10.1073/pnas.0701710104.
- [230] Jeffrey, G. A.: *An introduction to hydrogen bonding*. Oxford University Press (1997).
- [231] Kerkines, I. S. K., Petsalakis, I. D., Theodorakopoulos, G. und Klopper, W.: *Low-lying absorption and emission spectra of pyrene, 1,6-dithiapyrene, and tetrathiafulvalene: A comparison between ab initio and time-dependent density functional methods*. J. Chem. Phys., **131** (22), 224315 (2009). Doi: 10.1063/1.3271347.
- [232] Shafirovich, V. Y., Courtney, S. H., Ya, N. und Geacintov, N. E.: *Proton-coupled photoinduced electron transfer, deuterium isotope effects, and fluorescence quenching in noncovalent benzo[a]pyrenetetraol-nucleoside complexes in aqueous solutions*. J. Am. Chem. Soc., **117** (17), 4920–4929 (1995). Doi: 10.1021/ja00122a024.

- 
- [233] Förster, U., Lommel, K., Sauter, D., Grünewald, C., Engels, J. W. und Wachtveitl, J.: *2-(1-Ethynylpyrene)-adenosine as a folding probe for RNA-pyrene in or out*. ChemBioChem, **11** (5), 664–672 (2010). Doi: 10.1002/cbic.200900778.
- [234] Förster, U.: *Untersuchung der Konformation und Dynamik von RNA mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffmoleküle*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität (2010).
- [235] Weigand, J. E., Sanchez, M., Gunnesch, E.-B., Zeiher, S., Schroeder, R. und Suess, B.: *Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation*. RNA, **14** (1), 89–97 (2008). Doi: 10.1261/rna.772408.
- [236] Weigand, J. E., Schmidtke, S. R., Will, T. J., Duchardt-Ferner, E., Hammann, C., Wöhnert, J. und Suess, B.: *Mechanistic insights into an engineered riboswitch: A switching element which confers riboswitch activity*. Nucleic Acids Res., **39** (8), 3363–3372 (2011). Doi: 10.1093/nar/gkq946.
- [237] Weigand, J. E., Gottstein-Schmidtke, S. R., Demolli, S., Groher, F., Duchardt-Ferner, E., Wöhnert, J. und Suess, B.: *Sequence elements distal to the ligand binding pocket modulate the efficiency of a synthetic riboswitch*. ChemBioChem, **15** (11), 1627–1637 (2014). Doi: 10.1002/cbic.201402067.
- [238] Krstić, I., Frolov, O., Sezer, D., Endeward, B., Weigand, J. E., Suess, B., Engels, J. W. und Prisner, T. F.: *PELDOR spectroscopy reveals preorganization of the neomycin-responsive riboswitch tertiary structure*. J. Am. Chem. Soc., **132** (5), 1454–1455 (2010). Doi: 10.1021/ja9077914.
- [239] Duchardt-Ferner, E., Weigand, J. E., Ohlenschläger, O., Schmidtke, S. R., Suess, B. und Wöhnert, J.: *Highly modular structure and ligand binding by conformational capture in a minimalistic riboswitch*. Angew. Chem. Int. Ed., **49** (35), 6216–6219 (2010). Doi: 10.1002/anie.201001339.



## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungen

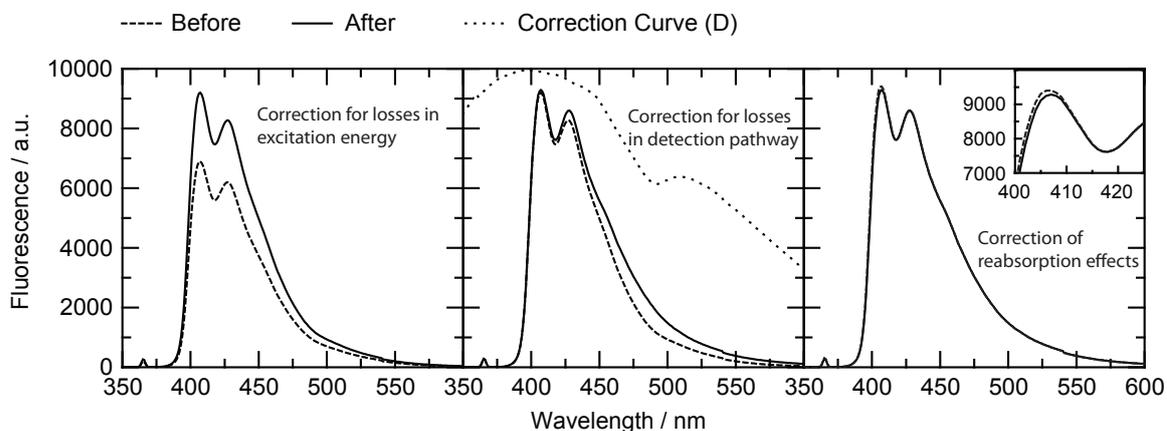


Abbildung 63: Einfluss der angewendeten Korrekturen auf die stationären Emissionsspektren. Exemplarisch an PyA in DMSO dargestellt.

#### 8.1.1 Streak-Kamera-Messungen an 2-(1-Ethinylnpyren)-desoxyadenosin

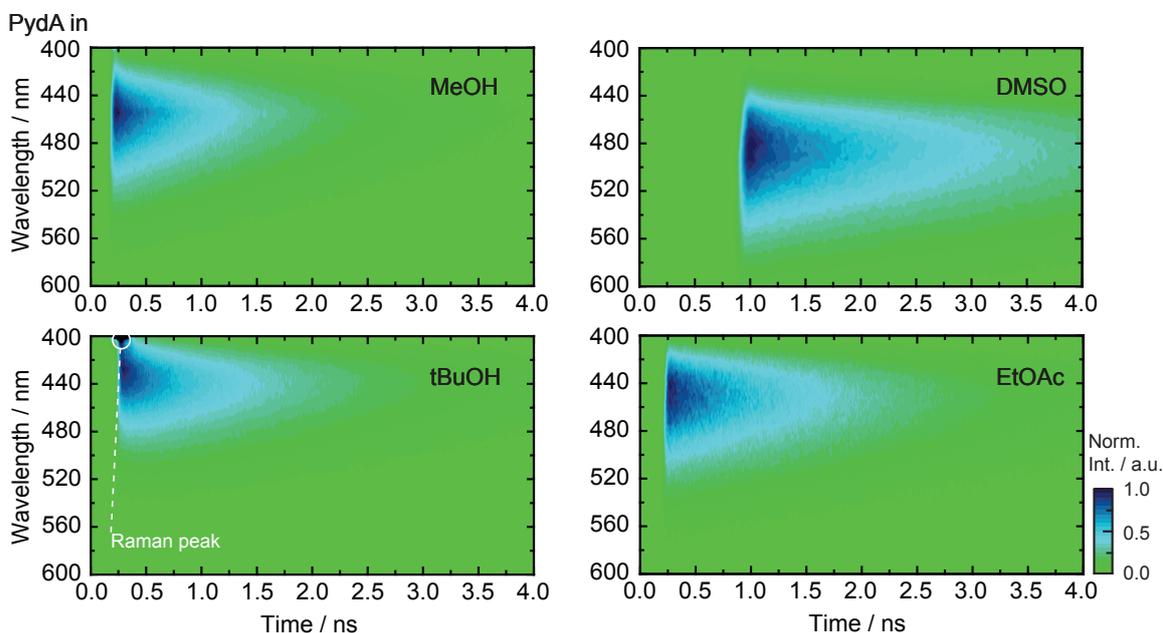


Abbildung 64: Streak-Kamera-Spektren von PydA in Methanol, tert-Butanol, DMSO und EtOAc in einem Zeitfenster von 10 ns für DMSO und 5 ns für die restlichen Lösungsmittel.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Elektromagnetisches Spektrum und dessen Spektralbereich. . . . .	3
Abb. 2: Jabłoński-Diagramm der Relaxationsprozesse nach Photoanregung. . . . .	7
Abb. 3: Struktur, Permittivität und Dielektrizitätskonstante der Lösungsmittel für die Messungen an PyA & PydA. . . . .	11
Abb. 4: Zeitbereiche verschiedener molekularer Kinetiken und spektroskopische Methoden. . . . .	12
Abb. 5: Polarisations Ebene in einem negativ uniaxialen Kristall. . . . .	16
Abb. 6: Entstehung von spontaner parametrischer Fluoreszenz. . . . .	18
Abb. 7: Schematische Darstellung einer kollinearen und nichtkollinearen parametrischen Verstärkung. . . . .	18
Abb. 8: Prinzip der Kerr-Linsen-Modenkopplung. . . . .	24
Abb. 9: Strukturformel und spektrale Eigenschaften von Quinin-Sulfat. . . . .	28
Abb. 10: Schematischer Aufbau des verwendeten zweistufigen OPAs. . . . .	30
Abb. 11: Schematischer Aufbau des verwendeten NOPAs. . . . .	32
Abb. 12: Schematischer Aufbau eines Prismenkompressors. . . . .	33
Abb. 13: Minimaler Ablenkungswinkel ( $\delta_{min}$ ) in einem Prisma. . . . .	34
Abb. 14: Schematische Darstellung eines Anreg-/Abtast-Experiments. . . . .	35
Abb. 15: Beispielhaftes Differenzspektrum in der transienten Absorptionsspektroskopie. . . . .	37
Abb. 16: Signaltypen bei einem Anreg-/Abtast-Experiment. . . . .	38
Abb. 17: Funktionsprinzip einer Streak-Kamera. . . . .	41
Abb. 18: Schematische Darstellung der prinzipiellen Funktionsweise von optischen Schaltmethoden. . . . .	45
Abb. 19: Polarisations Ebene der Fluoreszenz im Kerr-Schalter und Brechungsindexellipsoid im Kerr-Medium. . . . .	46
Abb. 20: Schematische Darstellung des Tsunami-Spitfire-Lasersystems. . . . .	48
Abb. 21: Schematische Darstellung der experimentellen Realisierung des Kerr-Schalter-Aufbaus. . . . .	49
Abb. 22: Foto des aufgebauten Kerr-Schalter-Teilstücks. . . . .	50
Abb. 23: Reflektionseigenschaften der drei im Spektrografen (SpektraPro 2358) verbauten Blazegitter. . . . .	51
Abb. 24: Bildschirmabbildung des für den Kerr-Schalter verwendeten Messprogramms. . . . .	52
Abb. 25: Schema des Aufbaus der Version 1.12 des Messprogramms für den Kerr-Schalter. . . . .	53
Abb. 26: Beispiel einer Messung der Kreuzkorrelation im Kerr-Medium zwischen Anregungs- und Schaltimpuls. . . . .	55
Abb. 27: Vergleich des Intensitätsverlaufs von Kerr-Schalter-Spektren unter Verwendung eines Schaltimpuls bei einer Wellenlänge von 1250 nm bzw. 775 nm. . . . .	56
Abb. 28: Spektrale Korrekturkurve für den Kerr-Schalter. . . . .	57

Abb. 29: Strukturformel und stationäre Spektren von N,N-Dimethyl-para-nitroanilin. . . . .	58
Abb. 30: Rohdaten einer Kerr-Schalter-Messung von DMPNA in Ethanol. . . . .	59
Abb. 31: Spektral und zeitlich korrigierte der Kerr-Schalter-Messung von DMPNA. . . . .	60
Abb. 32: All- <i>trans</i> und 13- <i>cis</i> Retinalchromophor. . . . .	61
Abb. 33: Stationäre Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Proteorhodopsin. . . . .	62
Abb. 34: Spektral und zeitlich korrigierte Kerr-Schalter-Messung von Proteorhodopsin. . . . .	63
Abb. 35: Struktur von RNA und die natürlich vorkommenden Nukleobasen. . . . .	65
Abb. 36: Dreidimensionales Modell der Struktur eines idealisierten 18-mer-Duplex. . . . .	66
Abb. 37: Schematische zweidimensionale Darstellung von RNA mit gekennzeichneten Sekundärstrukturmotiven. . . . .	67
Abb. 38: Strukturformeln von PyA und PydA. . . . .	69
Abb. 39: Dreidimensionales Modell der Struktur von PyA. . . . .	69
Abb. 40: Stationäre Spektren von PyA in unterschiedlichen Lösungsmitteln. . . . .	73
Abb. 41: Heiße Absorptionsbande von PyA in DMSO. . . . .	74
Abb. 42: Anregungsspektren von PyA in Methanol und DMSO . . . . .	76
Abb. 43: Transientes Absorptionsspektrum von PyA in Methanol. . . . .	78
Abb. 44: Spektren bei fester Verzögerungszeit des transienten Absorptionsspektrums von PyA in Methanol. . . . .	79
Abb. 45: Spektrale hypsochrome Verschiebung der ESA2-Bande bei PyA in Methanol. . . . .	79
Abb. 46: LDM von PyA in Methanol. . . . .	81
Abb. 47: LDM von PyA in Methanol im Vergleich zu der in tert-Butanol. . . . .	83
Abb. 48: TA-Spektren und LDM von PyA in protischen Lösungsmitteln. . . . .	84
Abb. 49: TA-Spektren und LDM von PyA in aprotischen Lösungsmitteln. . . . .	86
Abb. 50: Streak-Kamera-Spektren von PyA in Methanol, tert-Butanol, DMSO und EtOAc. . . . .	87
Abb. 51: Spektrale Verschiebung des Fluoreszenzmaximums in Streak-Kamera-Messungen von PyA in Methanol. . . . .	88
Abb. 52: PyA-Geometrie für den quantenchemisch optimierten Grundzustand. . . . .	90
Abb. 53: Vergleich der quantenchemisch berechneten Übergänge mit dem Absorptionsspektrum von PyA in DMSO. . . . .	92
Abb. 54: Zusammenfassendes Modell der photoinduzierten Dynamiken von PyA. . . . .	97
Abb. 55: Stationäre Spektren von PydA in verschiedenen Lösungsmitteln. . . . .	99
Abb. 56: Stationäre Fluoreszenzspektren von PydA bei Anregung in die rote Flanke der Absorptionsbande. . . . .	102
Abb. 57: TA-Spektren und LDM von PydA in protischen Lösungsmitteln . . . . .	104
Abb. 58: TA-Spektren und LDM von PydA in aprotischen Lösungsmitteln. . . . .	106
Abb. 59: Vergleich einer Transiente der TA-Messung und der LDM von PydA in DMF. . . . .	107
Abb. 60: Strukturen von Neomycin B und dem zugehörigen Aptamer (N1). . . . .	110
Abb. 61: Sekundärstruktur des N1-Aptamers und dreidimensionales Modell der Strukturen der mit PyA-modifizierten N1-Aptamere. . . . .	112
Abb. 62: Stationäre Spektren der mit PyA modifizierten N1-Aptamere. . . . .	113
Abb. 63: Einfluss der angewendeten Korrekturen auf die stationären Emissionsspektren. . . . .	137
Abb. 64: Streak-Kamera-Spektren von PydA in Methanol, tert-Butanol, DMSO und EtOAc . . . . .	137

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Mögliche Anordnungen der Orientierungen der Teilwellen für eine Phasenanpassung. . . . .	17
Tab. 2: Subroutinen der Messprogramm-Version 1.12 und eventuelle Menüpunkte. . .	54
Tab. 3: Anregungspulsenergien bei den Streak-Kamera-Messungen. . . . .	72
Tab. 4: Stationäre Eigenschaften von PyA in verschiedenen Lösungsmitteln. . . . .	77
Tab. 5: Spektrale Eigenschaften sowie ermittelte Lebensdauern der TA- und Streak-Kamera-Messungen von PyA. . . . .	89
Tab. 6: Verwendete Methoden zur Bestimmung der vertikalen Übergänge aus dem Grundzustand. . . . .	93
Tab. 7: Vergleich von quantenchemischen Rechnungen an PyA und Pyren. . . . .	95
Tab. 8: Molekülorbitale von PyA und Pyren. . . . .	96
Tab. 9: Stationäre Eigenschaften von PydA in verschiedenen Lösungsmitteln. . . . .	101
Tab. 10: Ermittelte Lebensdauern der TA und Streak-Kamera-Messungen für PydA .	109

# Abkürzungsverzeichnis

<b>BBO</b>	Beta- <b>B</b> arium- <b>B</b> orat-Kristall ( $\beta$ -BaB <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ).....	16
<b>CT</b>	Ladungstransfer (engl. <b>charge transfer</b> ).....	44
<b>CIS</b>	configuration- <b>i</b> nteraction <b>s</b> ingles.....	44
<b>CPA</b>	Verstärkung gechirpter Pulse (engl. <b>chirped pulse amplification</b> ).....	24
<b>cw</b>	Dauerstrich (engl. <b>continuous wave</b> ).....	21
<b>DFG</b>	Erzeugung der Differenzfrequenz (engl. <b>difference frequency generation</b> )...	15
<b>DFT</b>	Dichtefunktional <b>t</b> heorie.....	90
<b>DMF</b>	N,N- <b>D</b> imethylformamid .....	85
<b>DMPNA</b>	N,N- <b>D</b> imethyl- <b>p</b> ara- <b>n</b> itroanilin .....	56
<b>DMSO</b>	<b>D</b> imethylsulfoxid	
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure (engl. <b>deoxyribonucleic acid</b> ) .....	2
<b>DZP</b>	<b>d</b> ouble <b>z</b> eta <b>p</b> olarisation .....	90
<b>ESA</b>	Absorption des angeregten Zustands (engl. <b>excited state absorption</b> ) .....	37
<b>EtOAc</b>	Essigsäureethylester .....	85
<b>EtOH</b>	Ethanol.....	11
<b>FQA</b>	Fluoreszenz <b>q</b> uanten <b>a</b> usbeute .....	II
<b>FWHM</b>	Halbwertsbreite (engl. <b>full width at half maximum</b> ) .....	48
<b>GLA</b>	globale Lebensdaueranalyse (engl. <b>global lifetime analysis</b> ) .....	39
<b>GSB</b>	Grundzustandsphotobleichen (engl. <b>ground state bleach</b> ) .....	6
<b>GVD</b>	Gruppengeschwindigkeitsdispersion (engl. <b>group velocity dispersion</b> ) .....	20
<b>HF</b>	<b>H</b> artree- <b>F</b> ock .....	44
<b>IC</b>	innere Umwandlung (engl. <b>internal conversion</b> ) .....	7
<b>ICT</b>	intramolekularer Ladungstransfer (engl. <b>intramolecular charge transfer</b> ) ...	75
<b>ISC</b>	Interkombination (engl. <b>inter system crossing</b> ).....	8
<b>iPrOH</b>	2-Propanol.....	11
<b>IVR</b>	intramolekulare Umverteilung von Schwingungsenergie (engl. <b>intramolecular vibrational energy redistribution</b> ) .....	7
<b>LDA</b>	Lebensdauerdichteanalyse (engl. <b>lifetime-density analysis</b> ) .....	39
<b>LDM</b>	Lebensdauerdichtekarte (engl. <b>lifetime-density map</b> ) .....	41

<b>MeOH</b>	Methanol .....	11
<b>Nd:YAG</b>	Neodym-dotierter <b>Y</b> ttrium- <b>A</b> luminium- <b>G</b> ranat .....	22
<b>Nd:YLF</b>	Neodymium-dotiertes <b>Y</b> ttrium- <b>L</b> ithium- <b>F</b> luorid.....	22
<b>Nd:YVO<sub>4</sub></b>	Neodym(3+)-dotierter <b>Y</b> ttrium- <b>O</b> rthovanadat .....	23
<b>NOPA</b>	nichtkollinear optisch parametrischer Verstärker (engl. <b>n</b> oncollinear <b>o</b> ptical <b>p</b> arametric <b>a</b> mplifier) .....	32
<b>OPA</b>	optisch parametrischer Verstärker (engl. <b>o</b> ptical <b>p</b> arametric <b>a</b> mplifier) .....	17
<b>PyA</b>	2-(1-Ethiny <b>l</b> pyren)- <b>a</b> denosin .....	1
<b>PydA</b>	2-(1-Ethiny <b>l</b> pyren)- <b>d</b> esoxy <b>a</b> denosin	
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure (engl. <b>r</b> ibonucleic <b>a</b> cid).....	1
<b>SE</b>	stimulierte Emission (engl. <b>s</b> timulated <b>e</b> mission).....	37
<b>SFG</b>	Erzeugung der Summenfrequenz (engl. <b>s</b> um <b>f</b> requency <b>g</b> eneration) .....	15
<b>SHG</b>	Erzeugung der Frequenzverdoppelten (engl. <b>s</b> econd <b>h</b> armonic <b>g</b> eneration)..	15
<b>SI</b>	Selbstwechselwirkung (engl. <b>s</b> elf- <b>i</b> nteraction).....	44
<b>SC</b>	Streak-Kamera (engl. <b>s</b> treak <b>c</b> amera).....	41
<b>SOS-CIS(D)</b>	scaled <b>o</b> pposite <b>s</b> pin <b>C</b> onfiguration- <b>i</b> nteraction <b>s</b> ingles <b>d</b> oubles.....	44
<b>TA</b>	transiente <b>A</b> bsorption.....	35
<b>tBuOH</b>	2-Methyl-2-propanol .....	11
<b>TCSPC</b>	zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (engl. <b>t</b> ime- <b>c</b> orrelated <b>s</b> ingle <b>p</b> hoton <b>c</b> ounting) .....	1
<b>TDDFT</b>	zeitabhängige Dichtefunktionaltheorie (engl. <b>t</b> ime- <b>d</b> eendent <b>d</b> ensity- <b>f</b> unctional <b>t</b> heory) .....	44
<b>THG</b>	Erzeugung der Frequenzverdreifachten (engl. <b>t</b> hird <b>h</b> armonic <b>g</b> eneration)..	15
<b>Ti:Sa</b>	<b>T</b> itan(3+)-dotierter <b>S</b> aphir, Ti:Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	22
<b>WLG</b>	Erzeugung von Weißlicht (engl. <b>w</b> hite- <b>l</b> ight <b>g</b> eneration).....	29

# Eigene Publikationen und Konferenzbeiträge

## *Eigene Publikationen*

- Trojanowski, P., Plötner, J., Grünewald, C., Graupner, F. F., Slavov, C., Reuss, A. J., Braun, M., Engels, J. W. and Wachtveitl, J.: *Photo-physical properties of 2-(1-ethynylpyrene)-adenosine: Influence of hydrogen bonding on excited state properties*, Phys. Chem. Chem. Phys., **16**, 13875-13888 (2014).
- Förster, U., Weigand, J. E., Trojanowski, P., Suess, B. and Wachtveitl, J.: *Conformational dynamics of the tetracycline-binding aptamer*, Nucleic Acids Res., **40** (4), 1807-1817 (2012).

## *Konferenzbeiträge*

- Trojanowski, P., Förster, U., Grünewald, C., Engels, J. W. and Wachtveitl, J.: *Time-resolved transient absorption studies on pyrene-adenosine labeled RNA*, 22. GDCh Lecture Conference – Photochemistry, Erlangen (Deutschland), Poster (2010)
- Trojanowski, P., Plötner, J., Grünewald, C., Braun, M., Reuss, A., Engels, J. W. and Wachtveitl, J.: *Photophysical processes of the spectroscopic RNA probe 2-(1-ethynylpyrene)-adenosine (PyA)*, 18th International Conference on Ultrafast Phenomena, Lausanne (Schweiz), Poster (2012)
- Trojanowski, P., Grünewald, C., Graupner, F., Braun, M., Reuss, A., Engels, J. W. and Wachtveitl, J.: *Influence of Intramolecular Hydrogen Bonding on the Photodynamics of 2-(1-Ethynylpyrene)-Adenosine (PyA)*, 19th International Conference on Ultrafast Phenomena, Okinawa (Japan), Poster (2014)