

Molekulare Dynamik der Freisetzung eines photolabil geschützten Antibiotikums

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
der Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Lisa-Marie Herzig
aus Fulda

Frankfurt 2018
(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Goethe-Universität als
Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Erstgutachter: Prof. Dr. Josef Wachtveitl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Hintergrund	5
2.1	Spektroskopische Grundlagen	6
2.1.1	UV/vis-Absorptionsspektroskopie	7
2.1.2	Infrarotspektroskopie	9
2.1.3	Desaktivierung eines elektronisch angeregten Zustandes	10
2.2	Zeitaufgelöste Spektroskopie	12
2.2.1	Anrege-Abtast-Experiment	12
2.2.2	Erzeugung von ultrakurzen Laserpulsen	13
2.2.3	Nichtlineare Optik	14
2.2.4	Phasenanpassung	18
2.2.5	Optisch parametrische Verstärkung	21
2.2.6	Weißlichterzeugung	22
2.3	Quantenchemische Methoden	23
2.3.1	Schrödinger-Gleichung und Born-Oppenheimer-Näherung	23
2.3.2	Hartree-Fock Methode	24
2.3.3	Dichtefunktionaltheorie	25
3	Photoaktivierbare Verbindungen	29
3.1	Photoaktivierbare Biomoleküle	30
3.1.1	Cumarin-Derivate	33
3.1.2	Photochemie von Cumarin	34
3.2	Puromycin	37
3.2.1	Photoaktivierbares Puromycin	38
4	Experimentelles	41
4.1	Materialien	41
4.1.1	Untersuchte Verbindungen	41
4.1.2	Lösungsmittel	41
4.2	Statische Absorptionmessungen	41
4.2.1	Messungen im UV/vis-Bereich	41
4.2.2	Messungen im IR-Bereich	42
4.3	Fluoreszenzmessungen	42

4.3.1	Statische Fluoreszenzmessungen	42
4.3.2	Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung	43
4.4	Femtosekundenlaserspektroskopie	45
4.4.1	Femtosekundenlaserquelle	45
4.4.2	UV/vis	47
4.4.3	IR	48
5	Ergebnisse und Diskussion	51
5.1	Elektronische Zustände von DEACM-Puromycin und DEACM-OH	51
5.1.1	Quantenmechanische Rechnungen	51
5.1.2	UV/vis-Absorption	54
5.1.3	Fluoreszenz	56
5.1.4	Zeitkorrelierte Einzelphotonenmessung	61
5.1.5	Zeitaufgelöste UV/vis-Absorption	63
5.1.6	Fazit	67
5.2	Freisetzung des aktiven Puromycins	69
5.2.1	<i>In-vitro</i> Freisetzung von Puromycin	70
5.2.2	<i>In-vivo</i> Freisetzung von DEACM-Puromycin	71
5.2.3	Quantenmechanische Berechnung der Schwingungszustände	73
5.2.4	FTIR	74
5.2.5	Photochemische Quantenausbeute	75
5.2.6	Zeitaufgelöste IR-Absorption	79
5.2.7	Fazit	81
5.3	Überblick über die Resultate	81
6	Zusammenfassung	83
	Literatur	87
	Danksagung	104
	Eidesstaatliche Erklärung	109

Abbildungsverzeichnis

2.1	Orbitale von Formaldehyd.	8
2.2	Jablonski-Diagramm.	11
2.3	Schematische Darstellung eines Anreg-Abtast-Experiments.	12
2.4	Nichtlineare Effekte 2. Ordnung.	16
2.5	Schematische Darstellung der Doppelbrechung.	19
2.6	Indexellipsoid.	20
2.7	Geometrien zur Phasen Anpassung.	21
2.8	Wellenlängenabhängiger Brechungsindex.	22
3.1	Schematische Darstellung der Lichtregulation eines Biomoleküls durch einen Photoschalter und einer photolabilen Schutzgruppe.	30
3.2	Strukturen verschiedener photolabiler Schutzgruppen.	31
3.3	Chemische Struktur von Cumarin und Nummerierung des Grundgerüsts nach IUPAC.	33
3.4	Reaktionsmechanismus für DEACM-geschütztes Carbamat.	35
3.5	Wirkungsweise des Antibiotikums Puromycin.	36
3.6	Schematische Darstellung der Energielandschaft während der Proteinfaltung.	39
4.1	Schematische Darstellung des Aufbaus zur TCSPC-Messung.	44
4.2	Schematische Darstellung des Clark MXR/CPA2001.	45
4.3	Schematische Darstellung des Aufbaus für transiente UV/vis-Messungen im Femtosekundenbereich mit referenzierter Abfrage.	46
4.4	Pulsschema des Anreg- und Abfragepulses.	47
4.5	Schematische Darstellung des Messaufbaus für Femtosekunden-spektroskopie im IR-Bereich.	48
5.1	Molekülorbitale von DEACM.	52
5.2	Schematische Darstellung der geometrieoptimierten Strukturen des S ₀ - und des S ₁ -Zustandes aus verschiedenen Perspektiven.	53
5.3	Absorptionsspektrum von DEACM-Puromycin und reinem DEACM-OH.	54
5.4	Reaktionsspektren infolge der 385 nm-Belichtung von DEACM-Puromycin in DMSO.	56
5.5	Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus zur photolytischen Freisetzung von Puromycin aus einer DEACM-geschützten Verbindung.	57

5.6	Fluoreszenzspektren von DEACM-puormycin in DMSO.	58
5.7	Fluoreszenzspektren von DEACM-Puromycin und DEACM-OH in verschiedenen Lösungsmittelgemischen.	59
5.8	Graphische Darstellung der Fluoreszenzquantenausbeuten von DEACM-Puromycin und DEACM-OH in Abhängigkeit des Anteils an PBS-Puffer im Lösungsmittelgemisch.	60
5.9	Ergebnisse der TCSPC-Messungen.	61
5.10	Transiente Absorptionsspektren von DEACM-Puromycin (Vis).	64
5.11	Einzeltransienten (Vis)	65
5.12	Zerfallsassoziierte Spektren von DEACM-Puromycin und DEACM-OH.	66
5.13	Transiente Absorptionsspektren von DEACM-Puromycin in verschiedenen Lösungsmittelzusammensetzungen.	67
5.14	Ausgewählte Zeitschnitte im UV/vis-Bereich nach verschiedenen Zeitpunkten nach der Anregung.	68
5.15	Zusammenfassende Darstellung der Analyse der elektronischen Zustände von DEACM-Puromycin in Abhängigkeit des Lösungsmittelcharakters.	69
5.16	XTT Zellviabilitäts-Assay.	70
5.17	Partielle Belichtung von DEACM-Puromycin in Ratten Hippocampus Nervenzellen.	71
5.18	<i>In-vivo</i> Entschützung von DEACM-Puromycin mittels Zweiphotonenanregung.	72
5.19	Berechnete Schwingungsmoden von DEACM-Puromycin, DEACM-OH und Puromycin.	73
5.20	Statische IR-Spektren von DEACM-Puromycin und DEACM-OH.	74
5.21	Zeitabhängige Absorptionsänderungen nach 385 nm Anregung 2337 cm^{-1} und bei 1722 cm^{-1}	75
5.22	Quantenausbeute anhand der CO_2 -Entwicklung.	77
5.23	Transientes Absorptionsspektrum im infraroten Spektralbereich (1570 bis 1750 cm^{-1}).	78
5.24	Zerfallsassoziierte Spektren und Zeitschnitt der transienten Absorptionsmessung im infraroten Spektralbereich.	79
5.25	Transiente Absorptionsänderungen im infraroten Spektralbereich (2280 bis 2350 cm^{-1}).	80
5.26	Reaktionsmechanismus zur photoinduzierten Freisetzung von Puromycin aus einer DEACM-geschützten Verbindung.	81

Tabellenverzeichnis

5.1	Absorptionsmaxima von DEACM-Puromycin und DEACM-OH in verschiedenen Lösungsmittelzusammensetzungen.	55
5.2	Fluoreszenzquantenausbeuten von DEACM-Puromycin und DEACM-OH in verschiedenen Lösungsmittelzusammensetzungen nach Anregung mit 388 nm.	60
5.3	Vergleich der S_1 -Lebensdauern τ_{fl} , strahlender k_{fl} sowie nichtstrahlender Ratenkonstanten k_{nr} , Ratenkonstante für den <i>Uncaging</i> -Prozess k_1 von DEACM-Puromycin und DEACM-OH in verschiedenen Lösungsmitteln.	63

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
AgGaS₂	Silberthiogallat
ATP	Adenosintriphosphat
BBO	β -Barium-Borat
Bhc	(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl
CaF₂	Calciumfluorid
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate (zyklisches Adenosinmonophosphat)
CI	Conical Intersection (konische Überschneidung)
CPA	Chirped Pulse Amplification
CPCM	Conductor-like Polarizable Continuum Model
DAS	Decay Associated Spectra (Zerfallsassoziierte Spektren)
DEACM	[7-(Diethylamino)cumarin-4-yl)methyl
DFG	Difference Frequency Generation (Differenzfrequenzerzeugung)
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF-DMA	Dimethylformamid-Dimethylacetal
DMNB	(4,5-Dimethoxy)nitrobenzyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESA	Excited-State Absorption
F	Fluoreszenz
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektrometer
FQA	Fluoreszenzquantenausbeute
GFP	grün fluoreszierende Protein
GGA	Generalized Gradient Approximation (Gradientennäherung)
GVD	Group Velocity Dispersion (Gruppengeschwindigkeitsdispersion)
GVM	Group Velocity Mismatch (Fehlanpassung der Gruppengeschwindigkeit)
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital (Höchstes besetztes Molekülorbital)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IC	Internal Conversion (Innere Konversion)
ICT	Intramolecular Charge Transfer (Intramolekulare Ladungstransfer)
InGaAs	Indium Gallium Arsenit
IRF	Instrument Response Function (instrumentelle Antwortfunktion)
ISC	Inter System Crossing (Interkombination)
KTP	Kaliumtitanylphosphat
LDA	Locally Density Approximation (lokale Dichtenäherung)
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital (Niedrigstes unbesetztes Molekülorbital)
MCM	4-(Hydroxymethyl)-7-methoxycumarin

MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MCT	Mercury-Cadmium-Telluride (Quecksilber-Cadmium-Tellurid)
MIR	mittleres Infrarot
Nd:YAG	Neodym:Yttrium-Aluminium-Granat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanzspektroskopie)
NR	Non-emitting Relaxation (nichtstrahlende Relaxation)
NVOC	6-Nitroveratryloxycarbonyl
oNB	<i>ortho</i> -Nitrobenzol
OPA	Optical Parametric Amplifier (Optisch parametrischer Verstärker)
P	Phosphoreszenz
PBS	Phosphate-Buffered Solution (phosphatgepufferte Salzlösung)
pHP	<i>para</i> -Hydroxyphenacyl
PPLN	periodisch gepolter Lithiumniobat
PVDZ	Polarized Valence Double Zeta
SCF	Self-Consistent Field
SE	Stimulated Emission
SFG	Sum-Frequency Generation (Summenfrequenzerzeugung)
SHG	Second Harmonic Generation (Frequenzverdopplung)
TCSPC	Time-correlated Single Photon Counting (zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung)
TD	Time-Dependent (zeitabhängig)
TICT	Twisted Intramolecular Charge Transfer
tRNA	Transfer Ribonucleic Acid (Transfer Ribonukleinsäure)
UV	Ultraviolett
vis	Visible (Sichtbarer Spektralbereich)
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2 <i>H</i> -Tetrazolium-5-Carboxanilid

Kapitel 1

Einleitung

Innovative Forschungsideen der Wissenschaft und Technik werden seit jeher von der Natur inspiriert. So basierten die bereits im frühen 16. Jahrhundert beschriebenen Flugmaschinen von da Vinci auf seinen Beobachtungen des Vogelflugs. Um die in der Natur auftretenden Prozesse auf Forschungsprobleme zu übertragen, ist zunächst ein tiefgreifendes Verständnis dieser notwendig. Allerdings können die Naturphänomene hochkomplex sein, sodass ein umfangreiches Verständnis erschwert ist. Ein solches Beispiel ist die Photosynthese, bei der mithilfe von Licht eine Umwandlung von energiearmen Molekülen zu energiereichen Biomolekülen erreicht wird. Die Idee der Photosynthese wird bereits bei der künstlichen Photovoltaik zur Erzeugung von Solarstrom eingesetzt [1], wobei deren Effizienzmaximierung angesichts des Klimawandels als umweltschonende Energiequelle zunehmend an Bedeutung gewinnen wird [2]. Das Konzept der Photosynthese liegt in der Natur in zwei unterschiedlichen Formen vor: der chlorophyllbasierten und der Retinal-basierten Photosynthese. Bei der chlorophyllbasierten Variante wird die Photosynthese in sogenannten Lichtsammelkomplexen betrieben, wobei die Lichtabsorption sehr effizient stattfindet und dann die Anregungsenergie sehr schnell über Energietransferprozesse an das Reaktionszentrum weitergeleitet wird [3, 4]. Eine bedeutende Methode um diese ultraschnellen Prozesse untersuchen zu können, stellt die Anreg-Abtast-Spektroskopie mit Lichtpulsen im Zeitbereich von Femtosekunden (10^{-15} s) dar [5–7]. Denn mit dieser spektroskopischen Methode kann der zeitliche Verlauf einer lichtinduzierten Reaktion in Echtzeit beobachtet werden. Die Anreg-Abtast-Spektroskopie kann im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich angewendet werden, um Informationen über die elektronischen Eigenschaften der untersuchten Verbindungen zu generieren und daraus Einblicke über den Reaktionsmechanismus zu erhalten. Eine zusätzliche Studie im infraroten Spektralbereich liefert Informationen über mögliche strukturelle Änderungen der Verbindung infolge der optischen Anregung. Laufen lichtinduzierte Reaktionen langsamer als einige Nanosekunden (10^{-9} s) ab, dann sind entsprechend zusätzliche spektroskopische Methoden anzuwenden, um ein vollständiges Bild über den Reaktionsablauf zu erhalten.

Zudem kann Licht auf molekularer Ebene strukturelle Änderungen hervorrufen, was in der Natur effizient bei der Retinal-basierten Photosynthese umgesetzt wird [8–10]. Hierbei induziert Licht eine Isomerisierung des Chromophors Retinal, sodass dann Protonen über die Membran transportiert werden können. Das Konzept der optischen Schaltbarkeit auf

molekularer Ebene wird in der Wissenschaft durch die Verwendung von bistabilen Photoschaltern realisiert [11–13]. Diese Photoschalter können mittels Licht reversible Konformationsänderungen ausführen, wobei die strukturellen Übergänge auch auf makromolekularer Ebene zu Veränderungen führen können. Die Verknüpfung von Struktur und Funktion ermöglicht es, dass Photoschalter im Bereich der Materialforschung [14], als photodynamische Therapie in der Onkologie [15, 16] oder als Datenspeichermedium [17–19] eingesetzt werden können. Bei der Anwendung in biologischen Medien profitiert die Regulation mit Licht von einer hohen Orts- und Zeitauflösung, sodass eine präzise Steuerung möglich ist. Da Licht bestimmter Wellenlängen nicht mit zellulären Komponenten wechselwirkt, tritt keine Schädigung der lebenden Organismen auf. Folglich ist die lichtkontrollierte Steuerung von biologischen Prozessen eine milde Variante, um den Ablauf komplexer biochemischer Prozesse aufzuklären. Neben der Verwendung von Photoschaltern eignen sich hierfür auch sogenannte photolabile Schutzgruppen [20–24]. Diese Schutzgruppen werden an ein Biomolekül angebracht, sodass dieses temporär seine biologische Aktivität verliert. Durch einen gezielten Lichtpuls kann das Biomolekül irreversibel freigesetzt werden, wodurch nun unmittelbar eine zu erforschende Reaktion ausgelöst wird. Diese Methode wird in der vorliegenden Arbeit dazu verwendet, um die temporär unterdrückte biologische Aktivität des photolabil-geschützten Antibiotikums Puromycin durch einen Lichtpuls wiederherzustellen. Das genannte Antibiotikum induziert einen verfrühten Abbruch der ribosomalen Proteinbiosynthese. Die photoinduzierte Freisetzung von Puromycin kann verwendet werden, um die posttranslationale Faltung von Proteinen zu untersuchen und den Proteinabbau in Nervenzellen zu beobachten.

Im *Kapitel 2* werden die theoretischen Hintergründe dieser Arbeit beschrieben. Im Zuge dessen werden die spektroskopischen Grundlagen im UV/vis- und IR-Bereich dargelegt. Im Speziellen werden die Mechanismen, die zu einer spektralen Linienverbreiterung im UV/vis-Bereich führen, erklärt. Zudem werden die möglichen Relaxationsprozesse nach elektronischer Anregung im Hinblick auf strahlende und nichtstrahlende Desaktivierung erläutert. Im Abschnitt 2.2 wird das Anreg-Abtast-Experiment detailliert vorgestellt, was auch die Themen über die Erzeugung von ultrakurzen Pulsen sowie nichtlinearer Optik beinhaltet. Des Weiteren werden Prozesse beschrieben, die zur nichtlinearen Optik assoziiert sind (z.B. Weißlichterzeugung) und zur Durchführung eines Anreg-Abtast-Experiments nötig sind. Zudem werden die Grundlagen quantenmechanischer Methoden erläutert.

Im *Kapitel 3* werden zunächst photoaktivierbare Verbindungen im Allgemeinen vorgestellt, wobei das Konzept der Photoschalter mit dem der photolabilen Schutzgruppen verglichen wird. Anschließend werden wichtige Vertreter der photolabilen Schutzgruppen (*ortho*-Nitrobenzole, Nitroindoline, *p*-Hydroxylphenacyl und Cumarine) beschrieben und auf bereits mögliche Applikationsmodelle eingegangen. Im Besonderen werden verschiedene Cumarin-Derivate auf bekannte Vor- und Nachteile in der Anwendung als photolabile Schutzgruppe überprüft.

Zudem werden die charakteristischen Eigenschaften des Antibiotikums Puromycins und mögliche Einsatzgebiete, die durch das Schützen dieses Biomoleküls entstehen, vorgestellt. Im Hinblick auf potentielle Applikationsmöglichkeiten für das in dieser Arbeit untersuchte System im biologischen Kontext werden die Prozesse der Proteinfaltung und der dendritischen Proteinsynthese näher betrachtet.

Das *Kapitel 4* umfasst die in dieser Arbeit verwendeten spektroskopischen und quantenmechanischen Methoden. Hierzu wird eine detaillierte Beschreibung der Anlagen zur zeitkorrelierten Einzelphotonenmessung und zur Messung der ultraschnellen Dynamiken mittels der Anreg-Abtast-Spektroskopie im UV/vis- und IR-Bereich geliefert. Außerdem werden für jede Messmethode die dazugehörigen Datenanalyseverfahren erklärt. Zudem wird die Handhabung von Fluoreszenzspektren im Hinblick auf notwendige Korrekturmaßnahmen beschrieben.

Im *Kapitel 5* wird die photoinduzierte Freisetzung von Puromycin aus einer mit Cumarin geschützten Verbindung untersucht, welche bei *in-vivo* Applikationen zur Inhibierung der Proteinsynthese durch einen Lichtpuls führen soll. Zunächst erfolgt dabei eine Charakterisierung der elektronischen Eigenschaften des Systems in Kombination von DFT-Rechnungen und UV/vis-Spektroskopie. Durch eine Lösungsmittelstudie konnte gezeigt werden, dass die Präsenz von Wasser die Photospaltung der geschützten Verbindungen beschleunigt. Durch zeitaufgelöste spektroskopische Methoden im UV/vis-Bereich konnte ein Einblick in den Reaktionsmechanismus gegeben werden. Darüberhinaus konnte mittels eines *Assays* zur Analyse der Zellviabilität gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Freisetzung von Puromycin in Zellen möglich ist. Der spektroskopische Nachweis für die Freisetzung konnte über das simultan zu Puromycin freigesetzte Kohlenstoffdioxid mittels FTIR gegeben und die Effizienz der Photofreisetzung quantifiziert werden.

Kapitel 2

Theoretischer Hintergrund

Der Begriff Spektroskopie umfasst verschiedene Analyseverfahren mit denen die Wechselwirkung zwischen einer elektromagnetischen Welle und Materie untersucht werden können. Das Ziel dieser Methoden ist es, zentrale Informationen zur Strukturaufklärung, zu molekularen Eigenschaften und sogar zur potentiellen Reaktionsdynamik der untersuchten Substanz zu generieren. Eine Wechselwirkungsmöglichkeit ist die Absorption, wobei durch eine Substanz die Intensität einer elektromagnetischen Welle abgeschwächt wird.

Mittels der Absorptionsspektroskopie im ultravioletten (UV¹) und sichtbaren (vis²) Spektralbereich (Unterabschnitt 2.1.1) können elektronische Moleküleigenschaften untersucht werden. Aufgrund der hohen Nachweisempfindlichkeit wird die UV/vis-Absorptionsspektroskopie in der analytischen Chemie zur quantitativen Analyse von Verbindungen eingesetzt. In dieser Arbeit wird diese Methode neben der photophysikalischen Charakterisierung von Substanzen zur Bestimmung von Reaktionskinetiken verwendet, indem zeitabhängige Absorptionsänderungen während des Reaktionsverlaufs beobachtet werden. Zudem kann der Reaktionsverlauf auch anhand von Absorptionsänderungen im infraroten (IR³) Spektralbereich mithilfe der IR-Spektroskopie (Unterabschnitt 2.1.2) detektiert werden, da Änderungen im IR-Bereich auf strukturelle Unterschiede des Moleküls im Laufe der Reaktion hinweisen.

Um die vollständige Kinetik einer (photo-)chemischen Reaktion zu untersuchen, ist es notwendig, die Absorptionsänderungen auf den entsprechenden Zeitskalen zu betrachten. Statische Spektrometer für den UV/vis- sowie im IR-Bereich ermöglichen das Beobachten von Reaktionen im Bereich von Sekunden oder sogar noch längere Zeitskalen. Für schnellere Dynamiken müssen jedoch andere Messmethoden mit einer höheren Zeitauflösung verwendet werden, wie z.B. das Anrege-Abtast-Experiment (Abschnitt 2.2), das zur Detektion von Absorptionsänderungen im Pikosekunden-Bereich dient. Auf dieser Zeitskala können fundamentale (photo-)chemische Prozesse auftreten, wie beispielsweise Bindungsbrüche oder -bildungen.

Zum besseren Verständnis der experimentell gemessenen UV/vis- und IR-Spektren können quantenmechanische Rechnungen (Abschnitt 2.3) ein wichtiges Hilfsmittel sein, mit denen

¹Ultraviolett

²Visible (sichtbar)

³Infrarot

Moleküleigenschaften, wie Bindungscharakteristika, Dipoleigenschaften sowie Molekülorbitale, berechnet werden können.

2.1 Spektroskopische Grundlagen

Wenn elektromagnetische Strahlung in Wechselwirkung mit Materie tritt, kann es zur Absorption von Photonen bestimmter Wellenlängen λ bzw. Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ kommen. Eine Absorption ist möglich, wenn die Photonenenergie E resonant mit einem erlaubten Übergang zwischen einem besetzten und unbesetzten Zustand ist. Diese Resonanzbedingung wird durch die Planck'sche Gleichung (Gleichung 2.1) beschrieben,

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\tilde{\nu} \quad (2.1)$$

wobei h dem Planck'schen Wirkungsquantum $6,626 \cdot 10^{-34}$ Js und c der Lichtgeschwindigkeit ($2,998 \cdot 10^8 \frac{\text{m}}{\text{s}}$) entspricht. In der vorliegenden Arbeit wurden elektronische Übergänge im Bereich von 6,2-1,5 eV (200-800 nm) und Schwingungsübergänge im Bereich von 0,11-0,50 eV ($900\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$) untersucht.

Obwohl gemäß Gleichung 2.1 für einen Übergang diskrete Energien aufgenommen werden, sind in einem Absorptionsspektrum experimentell keine diskreten Absorptionslinien messbar. Die Ursache für die Linienbreite ist nicht ausschließlich die begrenzte Auflösung der Spektrometer, sondern insbesondere die im Folgenden dargestellten Mechanismen.

- Die natürliche Linienbreite einer Absorptionsbande entspricht der maximalen messbaren spektralen Auflösung gemäß der Heisenberg'schen Unschärferelation (Gleichung 2.2)[25].

$$\Delta E \Delta t \geq \frac{h}{4\pi} \quad (2.2)$$

Je kleiner die Lebensdauer eines angeregten Zustandes, desto kleiner wird die Unschärfe Δt bei der Bestimmung der Lebensdauer. Aus Gleichung 2.2 folgt dann eine größere Unschärfe bei der Bestimmung der Energie dieses angeregten Zustandes und somit eine breitere Absorptionsbande.

- Der Doppler-Effekt führt zu einer Linienverbreiterung von Spektrallinien die Doppler-Verbreiterung genannt wird [26]. Denn für die Wahrnehmung einer emittierten Strahlung mit der Wellenlänge λ ist es im Bezug auf einen ortsfesten Beobachtungspunkt entscheidend, ob sich diese Strahlung ausgehend von ihrer Strahlungsquelle mit einer bestimmten Geschwindigkeit auf den Beobachtungspunkt zu bewegt oder sich von ihr entfernt. Bewegt sich der Emittor auf den Beobachtungspunkt zu, dann wird eine Verschiebung zu kleineren Wellenlängen registriert, und bei einer sich entfernenden Bewegung wird eine Verschiebung zu größeren Wellenlänge beobachtet. Schließlich wird am Beobachtungspunkt eine Bande als Überlagerung aller durch den Doppler-Effekt verschobenen Linien detektiert.
- Durch die Wechselwirkung zwischen zwei sich stoßenden Teilchen werden deren Energieniveaus geringfügig geändert, was zu einer Linienverbreiterung der Spektrallinie

führt. Die Stoßverbreiterung wird etwa durch Stöße des absorbierenden Moleküls mit dem Lösungsmittel verursacht.

2.1.1 UV/vis-Absorptionsspektroskopie

Der Spektralbereich zwischen 200 und 400 nm ist als Ultraviolett definiert, wobei der sich daran anschließende Bereich von 400 bis 700 nm für das menschliche Auge sichtbar ist. Wenn die Resonanzbedingung aus Gleichung 2.1 erfüllt ist, dann legen die folgenden Auswahlregeln fest, ob ein Übergang im UV/vis-Spektrum sichtbar ist. Ein Übergang ist erlaubt und damit spektral sichtbar, wenn das Kriterium des Überlappungsverbots (Gleichung 2.3) erfüllt ist. Demnach ist ein Übergang verboten, wenn das Überlappungsintegral der Kernanteile der Wellenfunktion des Ausgangszustandes ϕ_i^* und des Endzustandes ϕ_f^* Null ist.

$$\int \phi_f^* \phi_i d\tau \neq 0 \quad (2.3)$$

Die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs wächst mit der Größe der Überlappung der beiden Wellenfunktionen.

Die Intensität eines Übergangs ist abhängig von dem Übergangsdipolmoment μ_{fi} (Gleichung 2.4), wobei μ den Dipoloperator beschreibt.

$$\mu_{fi} = \int \Psi_f^* \mu \Psi_i d\tau \quad (2.4)$$

Die Wahrscheinlichkeit für einen Übergang kann über das Betragsquadrat des Übergangsdipolmomentes $|\mu_{fi}|^2$ bestimmt werden, welches gemäß Gleichung 2.5 proportional zur Oszillatorstärke f ist,

$$f = \frac{8\pi^2 m_e \nu_{fi}}{3he^2} |\mu_{fi}|^2 \quad (2.5)$$

wobei m_e der Masse eines Elektrons, ν_{fi} der Übergangsfrequenz und e der Elementarladung entspricht. Für einen erlaubten Übergang ist die Oszillatorstärke $f \leq 1$ und für einen verbotenen Übergang gilt $f \ll 1$. Die Oszillatorstärke ist proportional zum Extinktionskoeffizient ϵ , der die Stärke des Übergangs mit dem Extinktionskoeffizient des Absorptionsmaximums ϵ_{max} und der Halbwertsbreite der Absorptionsbande $\Delta\nu_i$ auf makroskopischer Ebene angibt (Gleichung 2.6).

$$f \propto \frac{\epsilon_{max} \Delta\nu_i}{2,5 \cdot 10^8} \quad (2.6)$$

Über den wellenlängenabhängigen Extinktionskoeffizienten ϵ_λ wird nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Gleichung 2.7) die Größe der Absorbanz A einer Probe mit der Konzentration c und einer Schichtdicke d bestimmt. Experimentell geschieht dies durch das Messen der Intensität des einfallenden Lichtes I_0 im Vergleich zu dem durch die Probe transmittierten Lichts I .

$$A = \epsilon_\lambda cd = -\log \frac{I}{I_0} \quad (2.7)$$

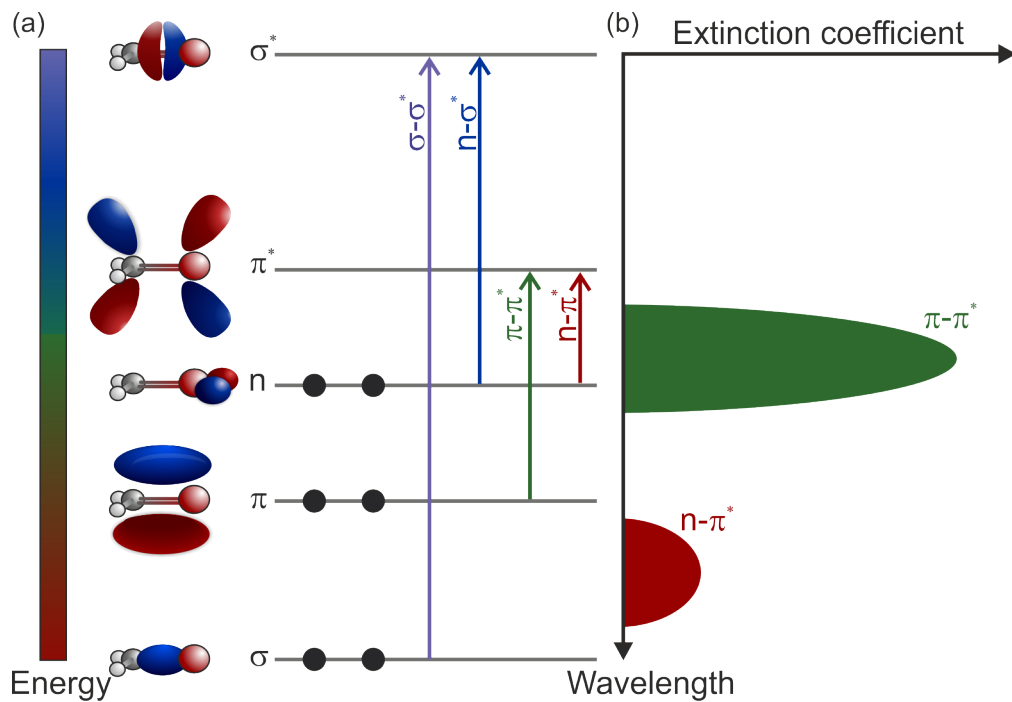


Abbildung 2.1: Orbitaldarstellung von Formaldehyd mit möglichen elektronischen Übergängen (a) und resultierendes Absorptionsspektrum (b).

Das Lambert-Beer'sche Gesetz ist nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich gültig, indem aufgrund geringer Konzentration Aggregation, elektrostatische Wechselwirkungen und Änderungen des Brechungsindex vernachlässigt werden können.

Für einen erlaubten Übergang mit großer Oszillatorstärke sollte die Multiplizitätsregel eingehalten werden, wonach sich der Gesamtspin S eines Moleküls infolge des Übergangs nicht ändern darf ($\Delta S = 0$). Da sich zahlreiche Moleküle im elektronischen Grundzustand im Singulett-Zustand ($S = 0$) befinden, ist nur ein Übergang in einen angeregten Singulett-Zustand erlaubt. Spinerlaubte Übergänge zeigen sehr intensive Absorptionsbanden im Absorptionsspektrum. Ein direkter Übergang in den ersten angeregten Triplett-Zustand T_1 ($S = 1$) kann trotz Verbot auftreten, äußert sich dann aber in einer geringen Intensität dieser Absorptionsbande. Die Laporte-Regel besagt, dass bei zentrosymmetrischen Molekülen nur Übergänge erlaubt sind, wenn sich die Parität der beteiligten Orbitale ändert. Eine Symmetrierniedrigung aufgrund von Kernbewegung setzt die Regel jedoch außer Kraft. Die Parität eines Orbitals wird als gerade (g) bezeichnet, wenn sich die Vorzeichen nach Inversion am Symmetriezentrum des Moleküls nicht ändern. Entsprechend ist die Parität eines Orbitals ungerade (u) für den Fall, dass sich infolge der Inversion die Vorzeichen ändern.

Durch Absorption im UV/vis-Bereich wird ein Valenzelektron eines sich im Grundzustand befindlichen Moleküls in einen angeregten Zustand überführt. Die räumlich definierte Wellenfunktion eines Elektrons in Kernnähe wird als Atomorbital bezeichnet. Atomorbitale lassen sich anhand der Bahndrehimpuls-Quantenzahl l ($l = 0, 1, 2, 3, \dots$) in die verschiedenen Orbitalarten (s,p,d,...) einteilen. Nähern sich zwei Atome unter Ausbildung einer Bindung an, verschmelzen die Atomorbitale zu Molekülorbitalen, die in bindende Orbitale

(σ und π), nicht-bindende (n) und anti-bindende Orbitale (σ^* und π^*) unterteilt werden können. Die Orbitalbesetzung erfolgt nach zunehmendem Energieniveau ($\sigma < \pi < n < \pi^* < \sigma^*$), wobei das höchste besetzte Orbital als HOMO⁴ und das niedrigste unbesetzte Orbital als LUMO⁵ bezeichnet wird. Bei elektronischer Anregung geht ein Elektron aus einem besetzten Orbital (z.B. dem HOMO) in ein unbesetztes Orbital (z.B. LUMO) über. In organischen Verbindungen können nach Abbildung 2.1 die folgenden Übergänge auftreten:

- $\sigma \rightarrow \sigma^*$: Für den elektronischen Übergang von einem bindenden σ -Orbital zu einem energiereicheren anti-bindenden σ^* -Orbital ist eine Energie im Bereich unterhalb von 200 nm nötig. Um ein Spektrum unterhalb von 200 nm aufzunehmen, muss unter Vakuum gearbeitet werden, da die Absorption von Sauerstoff alle Banden überlagern würde. Zudem muss auch die Absorption von Wasser in diesem Bereich berücksichtigt werden. Daher sind diese Übergänge, die vor allem bei Alkanen auftreten, in der Regel nicht relevant für die UV/vis-Spektroskopie.
- $n \rightarrow \sigma^*$: Diese Übergänge treten insbesondere bei gesättigten Verbindungen mit einem Heteroatom auf, wie beispielsweise Alkoholen.
- $\pi \rightarrow \pi^*$: Bei Verbindungen mit Doppelbindungen (C=C-Doppelbindung oder C=O-Bindung) können Übergänge von dem bindenden π -Orbital in ein Orbital mit antibindenden Charakter π^* auftreten. Für eine isolierte Doppelbindung würde der Übergang im UV-Bereich liegen, wobei durch Konjugation die Energie abgesenkt wird und ein Übergang im sichtbaren Bereich möglich ist. Da es sich um einen erlaubten Übergang handelt, ist der Extinktionskoeffizient groß, siehe Abbildung 2.1.
- $n \rightarrow \pi^*$: Gemäß Abbildung 2.1 handelt es sich bei dem $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang um die Anregung von einem Elektron aus dem HOMO in das LUMO, wobei dieser Übergang für Carbonylverbindungen im Allgemeinen energiearm (etwa 290 nm, 4 eV) ist. Allerdings ist dieser Übergang symmetrieverboten, daher ist der Extinktionskoeffizient relativ klein.

2.1.2 Infrarotspektroskopie

Durch Absorption im mittleren Infrarotbereich (MIR⁶) können Übergänge zwischen Schwingungsmoden eines Moleküls induziert werden. Ein solcher Übergang erfolgt nur, wenn das Molekül einen permanenten Dipol besitzt oder sich das molekulare Dipolmoment infolge der Schwingung ändert. Klassischerweise werden Schwingungen als Auslenkungen der Atome aus ihrer Ruhephase betrachtet. Als Modell können in einem zweiatomigen Molekül die Atome als Massepunkte angenommen werden, die durch eine massenlose Feder verbunden sind. Für eine harmonische Oszillation kann die Frequenz ν_0 dann analog zum Hooke'schen

⁴Highest occupied molecule orbital (Höchstes besetzte Molekülorbital)

⁵Lowest unoccupied molecule orbital (Niedrigstes unbesetztes Orbital)

⁶400-4000 cm^{-1}

Gesetz durch Gleichung 2.8 beschrieben werden,

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.8)$$

wobei k der Kraftkonstanten und μ der reduzierten Masse $\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$ entspricht. Aus der quantenmechanischen Betrachtung folgen mit der Schwingungsquantenzahl v ($v = 0, 1, 2, \dots$) nur äquidistante Energieniveaus E für die Schwingungsmoden

$$E = h\nu_0 \left(v + \frac{1}{2} \right) \quad (2.9)$$

Im Fall des harmonischen Oszillators sind nur Schwingungsübergänge erlaubt, wenn die Auswahlregel $\Delta v = \pm 1$ erfüllt ist.

Allerdings ist die Beschreibung durch den harmonischen Oszillator unzureichend, was insbesondere durch die Nichtberücksichtigung des Bindungsbruchs nach energiereicher Schwingungsanregung deutlich wird. Zudem werden elektrostatische Wechselwirkungen der Atome bei kleinen Gleichgewichtsabständen vernachlässigt. Für eine realistischere Beschreibung der anharmonischen Oszillationen eignet sich daher das Morse-Potential (Gleichung 2.10),

$$V = D_{Gl} [1 - e^{-a(R-R_{Gl})}]^2 \quad (2.10)$$

das über die Dissoziationsenergie D_{Gl} , den Gleichgewichtsbindungsabstand R_{Gl} und die molekülspezifische Konstante a ($a = \sqrt{\frac{k}{2D_{Gl}}} \nu_0$) mit der Kraftkonstanten k im Minimum definiert ist. Die Energieniveaus sind im Fall des anharmonischen Oszillators nicht mehr äquidistant, sondern werden wie folgt beschrieben (Gleichung 2.11),

$$E = \left(v + \frac{1}{2} \right) h\nu_0 - \left(v + \frac{1}{2} \right)^2 x_{Gl} h\nu_0 \quad (2.11)$$

wobei x_{Gl} der Anharmonizitätskonstante ($x_{Gl} = \frac{h\nu}{4D_{Gl}}$) entspricht. Die Auswahlregel für einen erlaubten Übergang im anharmonischen Fall ist $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$

2.1.3 Desaktivierung eines elektronisch angeregten Zustandes

Die Boltzmann-Verteilung gibt an, wie groß das Besetzungsverhältnis zweier Energieniveaus eines Systems ist. Das Besetzungsverhältnis N_0 für den Grundzustand und N_1 zu dem ersten angeregten Zustand ergibt sich aus dem Entartungsfaktor g_1 des ersten angeregten Zustands, der Temperatur T , Boltzmann-Konstanten k sowie der Energiedifferenz ΔE für die betrachteten Niveaus.

$$\frac{N_1}{N_0} = g_1 \cdot e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (2.12)$$

Bei Raumtemperatur ist die Energiedifferenz zwischen elektronischem Grundzustand und ersten angeregten Zustand ΔE ungefähr 10^4 cm^{-1} , sodass die Besetzung des elektronisch angeregten Zustandes nicht wahrscheinlich ist, da das Besetzungsverhältnis $\frac{N_1}{N_0}$ ungefähr bei $1,1 \cdot 10^{-21}$ liegt. Die Energieabstände zwischen Schwingungsniveaus liegen in der Regel bei etwa 10^3 cm^{-1} , woraus folgt, dass bei Raumtemperatur auch überwiegend der Schwin-

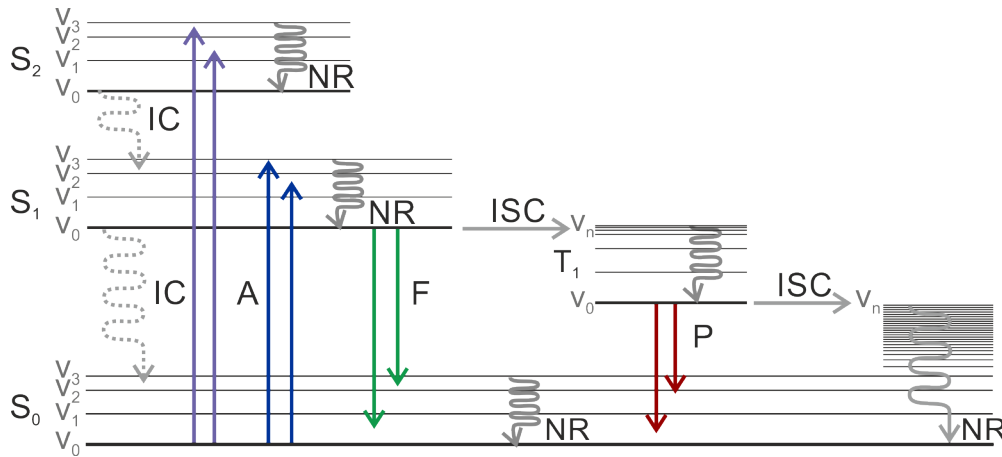


Abbildung 2.2: Jablonski-Diagramm mit Desaktivierungsmöglichkeiten nach elektronischer Anregung. Prozesse sind gekennzeichnet mit der Absorption A, der nichtstrahlenden Relaxation NR, der Fluoreszenz F, der inneren Umwandlung IC, der Interkombination ISC und der Phosphoreszenz P.

gungsgrundzustand ($\frac{N_1}{N_0} = 0,008$) besetzt ist.

Die Absorption von Photonen erfolgt innerhalb von wenigen Attosekunden (10^{-18} s), so dass Atomkerne aufgrund ihrer großen Masse auf dieser Zeitskala nicht reagieren können. Daraus folgt das Franck-Condon-Prinzip [27–29], wonach sich die Kernabstände eines Moleküls während einer elektronischen Anregung nicht ändern und folglich ein vertikaler Übergang im Jablonski-Diagramm [30] (Abbildung 2.2) resultiert. Der Übergang findet aus dem Schwingungsgrundzustand v_0 des elektronischen Grundzustands S_0 in eine schwingungsangeregte Mode des elektronisch angeregten Zustandes S_1 oder energiereichere elektronische Zustände S_n statt. Anschließend findet innerhalb von Pikosekunden eine strahlungslose Desaktivierung des S_1 über den Prozess der Schwingungsrelaxation zu der Nullpunktschwingung des ersten angeregten Zustandes statt. Auf der gleichen Zeitskala findet eine Desaktivierung der elektronisch höher angeregten Zustände statt, die über den Prozess der inneren Umwandlung in einen schwingungsangeregten Zustand des nächsttieferen elektronischen Niveaus mit darauffolgender Schwingungsrelaxation übergehen, wobei sich diese Abfolge wiederholt bis die Nullpunktschwingung des S_1 energetisch erreicht ist. Aufgrund der hohen Geschwindigkeit dieser Relaxationskaskade kann der im folgenden beschriebene Prozess der Fluoreszenz mit dem IC nicht konkurrieren. Aus dieser Beobachtung folgt die Regel von Kasha [31], wonach weitere Desaktivierungsmöglichkeiten generell aus dem Schwingungsgrundzustand v_0 des S_1 folgen. Ausnahmen dieser Regel sind möglich, wenn die Energiedifferenz zwischen S_2 und S_1 vergleichbar mit der Differenz von S_1 und S_0 ist. Bei Azulen erfolgt die Emission beispielsweise aus dem S_2 -Zustand, da der energetische Unterschied zwischen S_2 und S_1 so groß ist, dass der IC-Prozess verlangsamt ist und die Fluoreszenz in Konkurrenz dazu treten kann [32].

Die Desaktivierung des S_1 in den S_0 unter Emission eines Photons wird Fluoreszenz genannt. Dieser Übergang erfolgt in der Regel in schwingungsangeregte Moden des S_0 und besitzt typischerweise eine Lebensdauer von etwa 10^{-8} s. In Konkurrenz dazu können IC-Prozesse bis in den S_0 auftreten.

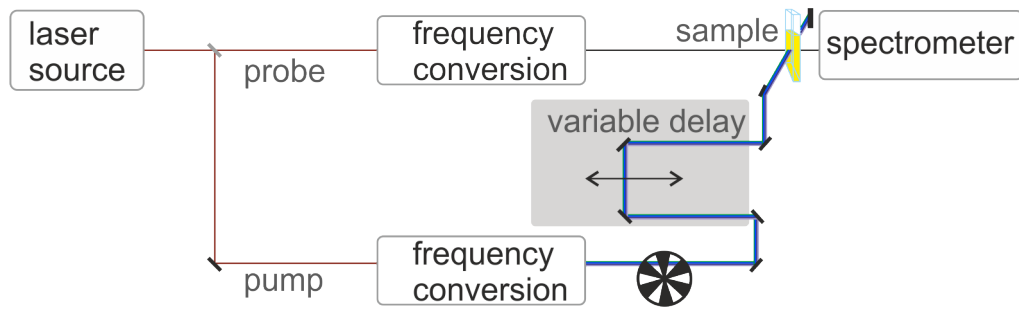


Abbildung 2.3: Beispiel eines Anreg-Abtast-Experiments

Ausgehend vom Schwingungsgrundzustand des S_1 kann alternativ ein isoenergetischer Übergang unter Spinumkehr in einen schwingungsangeregten Zustand des Triplett-Zustand T_1 stattfinden, welcher sofort strahlungslos relaxiert. Dieser Prozess der Interkombination ist eigentlich spinverboten, wobei dieses Verbot jedoch mit zunehmender Spinbahnkopplung umgangen werden kann. Von der Nullpunktschwingung des T_1 kann unter Emission eines Photons und unter erneuter Spinumkehr ein Übergang in schwingungsangeregte Moden des S_0 erfolgen. Dieser Vorgang wird als Phosphoreszenz bezeichnet und läuft auf einer Zeitskala bis zu 10^2 s ab.

Zudem kann ein Molekül ausgehend von dem S_1 chemische Reaktionen eingehen, wodurch es nicht mehr in seine Geometrie des S_0 zurückkehrt. Denkbare Photoreaktionen sind die Dissoziation, Isomerisierung und Protonentransferreaktionen.

2.2 Zeitaufgelöste Spektroskopie

Fundamentale Prozesse der Natur basieren auf chemischen Reaktionen, die in verschiedenen Zeitbereichen von Femtosekunden bis hin zu Tagen ablaufen können. Zur Aufklärung der Reaktionspfade ist es notwendig, dass die verwendete Untersuchungsmethode eine geeignete Zeitauflösung für den untersuchten Bereich aufweist. Zur Untersuchung von Prozessen auf der Femto- bis Pikosekundenzeitskala eignet sich das sogenannte Anreg-Abtast-Experiment (Unterabschnitt 2.2.1), was auf der Verwendung von ultrakurzen Laserpulsen basiert (Unterabschnitt 2.2.2).

2.2.1 Anrege-Abtast-Experiment

Um Reaktionsdynamik anhand von zeitabhängigen Absorptionsänderungen zu messen, kann das sogenannte Anreg-Abtast-Experiment (siehe Abbildung 2.3) verwendet werden. Das Experiment basiert auf der Verwendung eines Anregungspulses (*Pump*) und eines Abtastpulses (*Probe*), deren Strahlengänge ausgehend von der Laserquelle bis zum Probenort gleich lang sind, sodass die Pulse am Probenort simultan auftreffen können. Durch die Verwendung einer variablen Verzögerungsstrecke in einem der beiden Strahlengänge kann eine zeitliche Verzögerung generiert werden, was über einen elektronisch ansteuerbaren Verschiebetisch mit einem Retroreflektor realisiert werden kann. Der Anregungspuls führt zur Anregung der Probe, deren Absorptionsänderung durch den Abtastpuls abgefragt wird. Hierbei verfügt der Abtastpuls über eine gewisse spektrale Bandbreite, sodass die dynami-

schen Informationen über einen großen Spektralbereich gewonnen werden können. Durch Variation der Verzögerungsstrecke kann die Absorptionsänderung der Probe nach Photoanregung als Funktion der Zeit erhalten und somit die Dynamik der Probe analysiert werden. Da diese Methode auf der Detektion von Absorptionsänderungen beruht, muss jeder Abtastpuls mit und ohne Anregungspuls gemessen werden, sodass anhand des Transmissionsverhältnisses die Absorptionsänderung ermittelt werden kann. Experimentell wird dies durch den Einsatz eines Unterbrecherrades umgesetzt, wodurch beispielsweise jeder zweite Anregungspuls geblockt wird.

2.2.2 Erzeugung von ultrakurzen Laserpulsen

Die Erzeugung ultrakurzer Laserpulse [33–35] ist ein elementarer Baustein, um (bio-)chemische Reaktionen auf einer Zeitskala von wenigen Femtosekunden bis hin zu Nanosekunden mittels spektroskopischer Methoden untersuchen zu können. Die rauschfreie und kontrollierte Erzeugung der ultrakurzen Puls hat sich seit der Realisierung des ersten Rubinlasers durch Maiman 1960 [36] aufgrund der Verwendung neuer Lasermedien stetig verbessert, wobei zunächst Farbstofflaser eingesetzt wurden und seit den 1990er Jahren Festkörperlaser im Fokus stehen. Besonders die Verwendung von Titan:Saphir als Lasermedium hat aufgrund dessen hoher thermischer Leitfähigkeit und hoher Verstärkungsbandbreite die Realisierung von Femtosekundenpulsen ermöglicht [37]. Heutzutage sind Laser mit Pulsdauern von unter 100 Attosekunden möglich [38].

Um solche ultrakurze Pulse zu generieren, eignen sich verschiedene Techniken, die am Beispiel der Güteschaltung und Modenkopplung im Folgenden näher erläutert werden.

Güteschaltung

Das Prinzip der Güteschaltung basiert auf der Idee, dass ein effizienter, gepulster Laserbetrieb erst möglich ist, wenn die maximale Besetzungsinversion erreicht ist. Realisiert wird dieses Prinzip durch die Modulation der Resonatorverluste, wobei ein schnell schließbarer Modulator in den Strahlengang eingebracht wird. Bei geschlossenem Modulator (Pumpphase) wird die Besetzungsinversion erhöht. Nach dieser Pumpphase wird der Modulator geöffnet und die Rückkopplung auf das Lasermedium wird wiederhergestellt, sodass die Lichtleistung dann aufgrund der stimulierten Emission exponentiell ansteigt. Da die Modulation der Verluste eine Änderung der Resonatorgüte bedeutet, wird diese Art der Pulserzeugung als Güteschaltung bezeichnet. Die generierte Pulsdauer ist abhängig von der Schaltschnelligkeit des Modulators, wobei diese im Bereich von wenigen Nanosekunden liegen kann [39].

Modenkopplung

Eine sehr große spektrale Bandbreite des Lasermediums führt bei Abwesenheit von modenselektierenden Elementen im Resonator dazu, dass mehrere Moden ohne feste Phasenbeziehung zueinander anschwingen können und eine kontinuierliche Laseremission erfolgt. Aufgrund von Interferenzeffekten würde in diesem Fall auch eine zeitlich instabile Intensitätsverteilung resultieren. Durch einen Frequenzmodulator kann eine feste Phasenbeziehung

hung der einzelnen Moden und eine konstruktive Überlagerung der Einzelmoden induziert werden, was als Modenkopplung bezeichnet wird. Hierbei gilt, dass die Pulsdauer umso kürzer ist, umso mehr Moden konstruktiv miteinander interferieren. Folglich ist die Pulsdauer τ_H abhängig von der spektralen Breite des Emissionsspektrums $\Delta\nu$ des Lasermediums.

$$\tau_H \geq \frac{1}{\Delta\nu} \quad (2.13)$$

Die Modenkopplung kann entweder mittels der aktiven oder passiven Modenkopplung erfolgen. Bei der aktiven Modenkopplung befindet sich der Frequenzmodulator innerhalb des Resonators, wobei der akusto-optische Effekt ausgenutzt werden kann. Zur Regulation der Modulation muss dann eine Spannung mit der Frequenz $\Delta\nu$ angelegt werden, die dem Abstand zweier Moden zueinander entspricht, wobei c der Lichtgeschwindigkeit und L die Länge des Resonators ist.

$$\Delta\nu = \frac{1}{\tau_H} = \frac{c}{2L} \quad (2.14)$$

Zur passiven Modenkopplung können sättigbare Absorber in den Resonator eingebracht werden. Die Modulation beruht hierbei auf der intensitätsabhängigen Absorption, sodass nur Moden mit fester Phasenbeziehung den Absorber passieren können. Zudem eignen sich beispielsweise Kerr-Linsen, bei denen deren intensitätsabhängiger Brechungsindex zur Modenkopplung ausgenutzt wird. Das Kerr-Medium hat eine Reaktionszeit von wenigen Femtosekunden. Aufgrund der schnelleren Reaktionszeit der Medien können mittels der passiven Modenkopplung kürzere Pulsdauern erzeugt werden als mit der aktiven Modenkopplung.

2.2.3 Nichtlineare Optik

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass immer eine lineare Abhängigkeit zwischen dem elektromagnetischen Feld \vec{E} des auftreffenden Lichts und der Polarisation eines Materials $\vec{P}(\vec{E})$ besteht:

$$\vec{P}(\vec{E}) = \epsilon_0 \cdot \chi^{(1)} \cdot \vec{E} \quad (2.15)$$

Hierbei ist $\chi^{(1)}$ die lineare Suszeptibilität und ϵ_0 die dielektrische Konstante.

Die ersten Beobachtungen zu nichtlinearen Prozessen machte Kerr in den 1870er Jahren, als er feststellte, dass sich der Brechungsindex einiger Materialien beim Anlegen eines starken elektrischen Feldes ändert [40, 41]. Um einen solchen Effekt mittels Licht herbeizuführen, mussten jedoch erst entsprechend starke Lasersysteme realisiert werden. Das erste erfolgreiche Experiment zur Untersuchung von nichtlinear optischem Verhalten wurde in den 1960er Jahren an der University of Michigan durchgeführt, in dem ein Rubinlaser auf einen Quarzkristall fokussiert wurde und somit eine Frequenzverdopplung (SHG⁷) des Laserstrahls induziert wurde [42].

Die lineare Näherung unter Gleichung 2.15 ist bei großen elektrischen Feldstärken unzureichend, sodass zusätzlich Terme höherer Ordnung berücksichtigt werden müssen [33, 43–45]. Mathematisch erfolgt die Beschreibung des nichtlinearen Verhaltens dann mit einer

⁷Second Harmonic Generation (Frequenzverdopplung)

Taylor-Reihenentwicklung,

$$\vec{P}(\vec{E}) = \epsilon_0 \left[\left(\chi^{(1)} \cdot \vec{E} \right) + \left(\left(\chi^{(2)} \cdot \vec{E} \right) \cdot \vec{E} \right) + \dots \right] \quad (2.16)$$

wobei $\chi^{(n)}$ der Suszeptibilität n-ter Ordnung entspricht. Der Prozess der Frequenzverdopplung ist ein Prozess 2. Ordnung, dessen nichtlinearer Anteil dann folglich durch Gleichung 2.17 beschrieben wird.

$$\vec{P}^{(2)}(\vec{E}) = \epsilon_0 \left(\left(\chi^{(2)} \cdot \vec{E} \right) \cdot \vec{E} \right) \quad (2.17)$$

Wenn zwei ebene elektromagnetische Wellen mit der Ausbreitungsrichtung \vec{z} , den Frequenzen w_1 und w_2 sowie den Wellenvektoren \vec{k}_1 und \vec{k}_2 überlagern, dann folgt für das elektrische Feld (Gleichung 2.18).

$$\vec{E} = \vec{E}_1 \cdot \cos(w_1 \cdot t + \vec{k}_1 \cdot \vec{z}) + \vec{E}_2 \cdot \cos(w_2 \cdot t + \vec{k}_2 \cdot \vec{z}) \quad (2.18)$$

Für die induzierte Polarisation in einem isotropen dielektrischen Medium gilt dann Gleichung 2.19.

$$\begin{aligned} \vec{P}^{(2)}(\vec{E}) = \epsilon_0 \cdot \chi^{(2)} \left[\left(\vec{E}_1 \cdot \cos(w_1 \cdot t + \vec{k}_1 \cdot \vec{z}) \right)^2 \right. \\ \left. + \left(\vec{E}_2 \cdot \cos(w_2 \cdot t + \vec{k}_2 \cdot \vec{z}) \right)^2 \right. \\ \left. + 2\vec{E}_1 \vec{E}_2 \cdot \cos(w_1 \cdot t + \vec{k}_1 \cdot \vec{z}) \cdot \cos(w_2 \cdot t + \vec{k}_2 \cdot \vec{z}) \right] \end{aligned} \quad (2.19)$$

Aufgrund von $\cos^2(x) = \frac{1}{2}(1 + \cos(2x))$ und $\cos(x) \cdot \cos(y) = \frac{1}{2}[\cos(x+y) + \cos(x-y)]$ ergibt sich:

$$\begin{aligned} \vec{P}^{(2)}(\vec{E}) = \epsilon_0 \cdot \chi^{(2)} \left[\frac{1}{2} \vec{E}_1^2 + \frac{1}{2} \vec{E}_2^2 + \frac{1}{2} \vec{E}_1^2 \cdot \cos(2w_1 t + 2\vec{k}_1 \vec{z}) \right. \\ \left. + \frac{1}{2} \vec{E}_2^2 \cdot \cos(2w_2 t + 2\vec{k}_2 \vec{z}) \right. \\ \left. + \vec{E}_1 \vec{E}_2 \cdot \cos((w_1 + w_2)t + (\vec{k}_1 + \vec{k}_2) \vec{z}) \right. \\ \left. + \vec{E}_1 \vec{E}_2 \cdot \cos((w_1 - w_2)t + (\vec{k}_1 - \vec{k}_2) \vec{z}) \right] \end{aligned} \quad (2.20)$$

Daraus ist ersichtlich, dass aus der Wechselwirkung der beider Wellen eine Polarisation resultiert, die zur Erzeugung neuer Frequenzen führen kann (Abbildung 2.4). Diese Prozesse können anhand der entstehenden Frequenzen unterschieden werden, sodass gemäß Gleichung 2.20 der frequenzunabhängige Term $(\frac{1}{2}\vec{E}_1^2 + \frac{1}{2}\vec{E}_2^2)$ der optischen Gleichrichtung, die Terme mit $2w_1$ und $2w_2$ der Frequenzverdopplung, der Term $w_1 + w_2$ der Summenfrequenz (SFG⁸) sowie der Term $w_1 - w_2$ der Differenzfrequenz (DFG⁹) entsprechen. Die

⁸Sum-Frequency Generation (Summenfrequenzerzeugung)

⁹Difference Frequency Generation (Differenzfrequenzerzeugung)

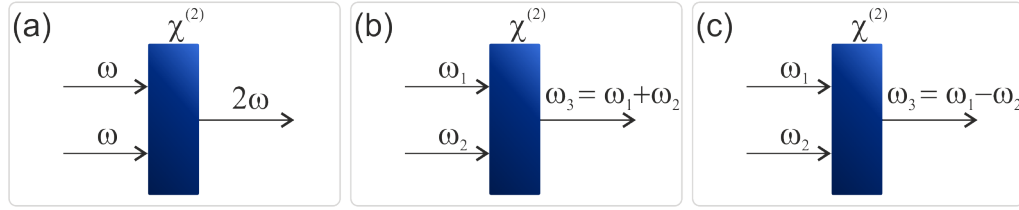


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung nichtlinearer Effekte 2. Ordnung. (a) Frequenzverdopplung, (b) Summenfrequenzerzeugung, (c) Differenzfrequenzerzeugung.

nichtlineare Suszeptibilität zweiter Ordnung $\chi^{(2)}$ ist ein Tensor dritter Stufe, wobei sich für die i -te Komponente eine Polarisation der zweiten Ordnung von Gleichung 2.21 ergibt [43].

$$vP_i(w) = \sum_{jk} \sum_{nm} \chi_{ijk}^{(2)}(w_n + w_m, w_n, w_m) E_j(w_n) \cdot E_k(w_m) \quad (2.21)$$

Durch m, n in Gleichung 2.21 werden die eingestrahnten Frequenzen indiziert, die in einem Dreiwellenmischprozess zur Polarisation beitragen. Für die nichtlineare Suszeptibilität gilt dann:

$$\chi_{ijk}^{(2)} = (w_3, w_1, w_2) \quad w_3 = w_1 + w_2 \quad (2.22)$$

Zur Beschreibung der nichtlinearen Suszeptibilität müssen die folgenden sechs Tensoren berechnet werden, woraus sich zusätzlich weitere sechs Tensoren mit der jeweiligen negativen Frequenz ergeben.

$$\begin{aligned} &\chi_{ijk}^{(2)}(w_1, w_3, -w_2) && \chi_{ijk}^{(2)}(w_1, -w_2, w_3), && \chi_{ijk}^{(2)}(w_2, w_3, -w_1), \\ &\chi_{ijk}^{(2)}(w_2, -w_1, w_3), && \chi_{ijk}^{(2)}(w_3, w_1, w_2), && \chi_{ijk}^{(2)}(w_3, w_2, w_1) \end{aligned}$$

Anhand von i, j, k wird in Gleichung 2.21 jeweils eine der drei Raumrichtungen beschrieben, wonach sich jeder der 12 Tensoren der Suszeptibilität aus $9 \cdot 3 = 27$ Komponenten zusammensetzt (Gleichung 2.23) und letztlich 324 verschiedene Elemente berücksichtigt werden müssen, um die nichtlineare Suszeptibilität eines Dreiwellenmischprozesses zu beschreiben.

$$\chi^{(2)} = \begin{pmatrix} \chi_{111}^{(2)} & \chi_{112}^{(2)} & \chi_{113}^{(2)} \\ \chi_{121}^{(2)} & \chi_{122}^{(2)} & \chi_{123}^{(2)} \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ \chi_{331}^{(2)} & \chi_{332}^{(2)} & \chi_{333}^{(2)} \end{pmatrix} \quad (2.23)$$

Die Suszeptibilität ist stark abhängig von Symmetrieeigenschaften des nichtlinearen Mediums, wodurch die Komponentenanzahl des Tensors durch diverse Symmetriebetrachtungen reduziert werden kann. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass die elektrischen Felder der beteiligten Wellen reell sind, da es sich um eine physisch bestimmbare Messgröße

handelt. Dies führt zu folgenden Bedingungen:

$$\begin{aligned} E_j(-w_n) &= E_j(w_n)^* \\ E_k(-w_m) &= E_k(w_m)^* \end{aligned} \quad (2.24)$$

Da aus Gleichung 2.21 resultiert, dass die Polarisation und die elektrischen Felder über $\chi^{(2)}$ miteinander in Beziehung stehen, kann für die positiven und negativen Frequenzkomponenten der Suszeptibilität geschlussfolgert werden, dass gilt:

$$\chi_{ijk}^{(2)}(-w_n - w_m, -w_n, -w_m) = \chi_{ijk}^{(2)}(w_n + w_m, w_n, w_m)^* \quad (2.25)$$

Zudem gilt die intrinsische Permutationssymmetrie, wonach eine Vertauschung der erzeugenden Frequenzen w_1 und w_2 möglich ist, sodass folgt:

$$\chi_{ijk}^{(2)}(w_3, w_1, w_2) = \chi_{ikj}^{(2)}(w_3, w_2, w_1) \quad (2.26)$$

Veranschaulicht wird die Gleichung 2.26 durch die Überlegung, dass es bei dem Produkt $E_j(w_n)E_k(w_m)$ keine Rolle spielt, welches das erste bzw. das zweite Feld ist. Für ein verlustfreies Medium gilt, dass die Gesamtenergie des Systems konstant bleibt und die Suszeptibilität reell ist. Folglich resultiert die volle Permutationssymmetrie für diese Art von Medien, sodass alle Frequenzen vertauschbar sind, wenn die dazugehörigen Indizes i, j, k simultan getauscht werden:

$$\chi_{ijk}^{(2)}(w_3, w_1, w_2) = \chi_{jki}^{(2)}(-w_1, -w_2, -w_3) \quad (2.27)$$

Gemäß Gleichung 2.25 entspricht die rechte Seite der obigen Gleichung $\chi_{jki}^{(2)}(w_1, -w_2, w_3)^*$, sodass aufgrund der reellen Suszeptibilität der verlustfreien Medien gilt:

$$\chi_{ijk}^{(2)}(w_3, w_1, w_2) = \chi_{jki}^{(2)}(w_1, -w_2, w_3) = \chi_{kij}^{(2)}(w_2, w_3, -w_1) \quad (2.28)$$

Wenn die Dispersion der Suszeptibilität vernachlässigt werden kann, ist die Kleinman-Symmetriebedingung erfüllt, wobei gilt:

$$\begin{aligned} \chi_{ijk}^{(2)}(w_3, w_1, w_2) &= \chi_{jki}^{(2)}(w_1, -w_2, w_3) = \chi_{kij}^{(2)}(w_2, w_3, -w_1) \\ &= \chi_{ikj}^{(2)}(w_3, w_2, w_1) = \chi_{kji}^{(2)}(w_2, -w_1, w_3) \\ &= \chi_{jik}^{(2)}(w_1, w_3, -w_2) \end{aligned} \quad (2.29)$$

Liegt nach Gleichung 2.29 die Kleinman-Symmetrie vor, so kann zur Beschreibung der Suszeptibilität $\chi_{ijk}^{(2)}$ gemäß Gleichung 2.30 die sogenannte kontrahierte Schreibweise verwendet werden:

$$d_{ijk} = \frac{1}{2} \chi_{ijk}^{(2)} \quad (2.30)$$

Unter der Annahme das d_{ijk} symmetrisch bezüglich der beiden Indizes j, k ist, können diese zu einem Index l zusammengefasst werden. Folglich reduziert sich der Tensor aus

Gleichung 2.23 zu einer (6x3)-Matrix mit

$$d_{il} = \begin{pmatrix} d_{11} & d_{12} & d_{13} & d_{14} & d_{15} & d_{16} \\ d_{21} & d_{22} & d_{23} & d_{24} & d_{25} & d_{26} \\ d_{31} & d_{32} & d_{33} & d_{34} & d_{35} & d_{36} \end{pmatrix} \quad (2.31)$$

In dieser Arbeit wurde ein BBO⁽¹⁰⁾-Kristall zur Erzeugung der SHG verwendet. Ein BBO-Kristall hat die Raumgruppe $3m$, wonach sich nach obiger Symmetriebetrachtung die Matrix reduziert zu:

$$d_{il} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & d_{31} & -d_{22} \\ -d_{22} & d_{22} & 0 & d_{31} & 0 & 0 \\ d_{31} & d_{31} & d_{33} & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (2.32)$$

2.2.4 Phasenanpassung

Phasenanpassung

Gemäß Gleichung 2.20 werden durch eine einstrahlende Grundwelle in einem nichtlinearen Medium oszillierende Dipole induziert, die ihrerseits zur Erzeugung einer Oberwelle führen: Für den Wellenvektor \vec{k}_i gilt,

$$\vec{k}_i = n(w_i) \frac{w_i}{c} = \frac{w_i}{v(w_i)} = \frac{2\pi n_i}{\lambda_i}, \quad (2.33)$$

wobei $v(w_i)$ die frequenzabhängige Phasengeschwindigkeit, n_i der Brechungsindex bei der Frequenz w_i und c die Lichtgeschwindigkeit ist. Eine effektive Konversion ist nur möglich, wenn sich Grund- und Oberwelle in Phase zueinander im nichtlinear optischem Kristall ausbreiten. Aufgrund der unterschiedlichen Phasengeschwindigkeit sind die beiden Wellen jedoch nach einer gewissen Wegstrecke im dispersiven Medium im Allgemeinen nicht mehr in Phase.

$$l_c = \frac{\lambda_{\text{Grundwelle}}}{4[n_{\text{Oberwelle}} - n_{\text{Grundwelle}}]} \quad (2.34)$$

Je größer der Unterschied der Brechungsindices n_i zwischen Grund- und Oberwelle ist, desto kleiner ist die Kohärenzlänge l_c , die eine destruktiven Interferenz und somit die Auslöschung der Oberwelle bewirkt. Für effektive Erzeugung einer Frequenzverdoppelten muss daher neben der Energieerhaltung (Gleichung 2.35),

$$w_2 = 2w_1 = w_1 + w_1 \quad (2.35)$$

auch die Impulserhaltung bzw. Phasenanpassung ($\Delta k = 0$) gegeben sein:

$$\vec{k}_2 = 2\vec{k}_1 = \vec{k}_1 + \vec{k}_1 \quad (2.36)$$

In isotropen Medien ist eine Phasenanpassung aufgrund normaler Dispersion ($1 < n(\lambda_{\text{blau}}) < n(\lambda_{\text{grün}}) < n(\lambda_{\text{rot}})$) nicht möglich, sodass zur Realisierung der Phasenanpassung $\Delta k = 0$ anisotrope Medien zu verwenden sind. Hierbei beschränkt sich die weiterführende Beschrei-

¹⁰ β -Bariumborat

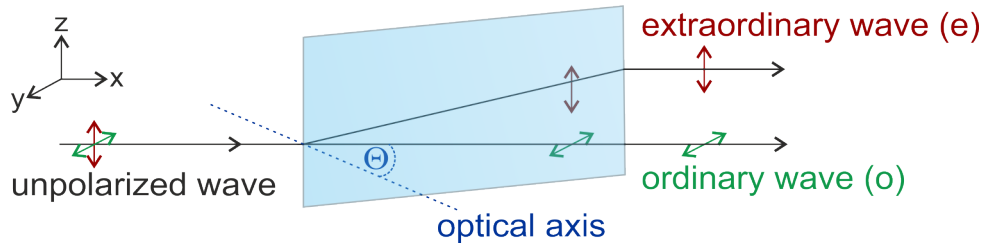


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Doppelbrechung, wobei eine Aufspaltung des eintreffenden Strahls in einen ordentlichen Strahl (o) und in einen außerordentlichen Strahl (e) stattfindet. Es ist zu beachten, dass der Hauptschnitt in der Zeichenebene liegt.

bung auf uniaxiale Kristalle. Diese doppelbrechenden Kristalle besitzen eine Vorzugsrichtung, die als optische Achse bezeichnet wird, und erzeugen zwei unterschiedliche Strahlen. Die optische Achse und die Ausbreitungsrichtung des einfallenden Strahls spannen den sogenannten Hauptschnitt auf, der in Abbildung 2.5 in der Zeichenebene liegt. Anhand des Hauptschnitts können die erzeugten Strahlen unterschieden werden. Der Strahl dessen Polarisation senkrecht zu dem Hauptschnitt ist, wird als ordentlicher Strahl (o) bezeichnet, da dieser den Gesetzmäßigkeiten des Snellius'schen Brechungsgesetzes folgt. Der außerordentliche Strahl (e) wird gebrochen und das Snellius'schen Brechungsgesetz ist nicht gültig. In der Ebene des Hauptschnitts wird der außerordentliche Strahl entweder nach oben oder unten abgelenkt. Doppelbrechende Kristalle werden unterteilt in optische negative Kristalle ($n_e < n_o$) und in optische positive Kristalle ($n_e > n_o$), wobei im Folgenden nur optische negative Kristalle betrachtet werden (siehe Abbildung 2.6). In diesen Kristallen wird der außerordentliche Strahl nach oben gelenkt. Zur Phasen Anpassung kann nun die funktionelle Abhängigkeit des Brechungsindex n_e von dem Winkel Θ ausgenutzt werden, der sich zwischen der Ausbreitungsrichtung und der optischen Achse ergibt.

$$n_e(\Theta) = \frac{n_o \cdot n_e}{\sqrt{n_o^2 \sin^2 \Theta + n_e^2 \cos^2 \Theta}} \quad (2.37)$$

Bei der Winkelphasenanpassung (kritische Phasen Anpassung) können zwei Grundtypen unterschieden werden:

- Typ I – skalare Phasen Anpassung. Es wird eine kollineare Geometrie entsprechend Abbildung 2.7 (a) gewählt. Da für negativ uniaxiale Kristalle gilt, dass ($n_e < n_o$) und von einer normalen Dispersion ausgegangen wird, ist die erzeugende Grundwelle der ordentliche Strahl und die erzeugte Oberwelle der außerordentliche Strahl. Für die Frequenzverdopplung gilt dann:

$$n_e(2\omega, \Theta) = n_o(\omega, \Theta) \quad (2.38)$$

- Typ II – vektorielle Phasen Anpassung. Um die Phasen Anpassungsbedingung zu erfüllen, wird eine Geometrie gemäß Abbildung 2.7 (b) verwendet. Die Grundwelle wird in einem Winkel verkippt zur optischen Achse eingestrahlt, sodass sich die Polarisation auf ordentlichen und außerordentlichen Strahl verteilt. Die Oberwelle resultiert dann entweder als ordentlicher oder außerordentlicher Strahl. Diese Art der Phasen Anpassung

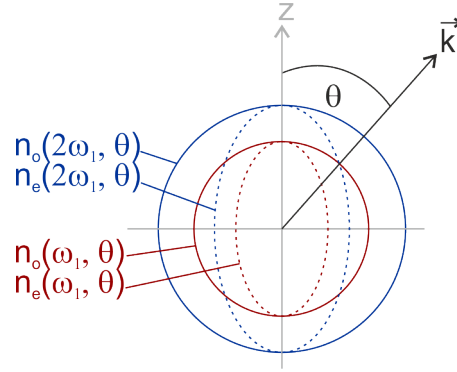


Abbildung 2.6: Indexellipsoid für einen optisch negativen uniaxialen Kristall für eine Fundamentalwelle und deren zweite Harmonische.

sung findet bei der Erzeugung von SFG und DFG Verwendung.

Zusätzlich zur Phasenanpassung über den Winkel ist es möglich bei einem Winkel $\Theta = 0^\circ$ oder $\Theta = 90^\circ$ eine sogenannte nichtkritische Phasenanpassung über Temperaturänderung herbeizuführen, wobei die anisotrope Temperaturabhängigkeit der Brechungsindizes von n_o und n_e ausgenutzt wird. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Phasenanpassung über einem weiten Akzeptanzbereich für Wellenlänge, Temperatur und Winkel vorliegt.

Gruppengeschwindigkeit

Als Gruppengeschwindigkeit $v_g(\lambda)$ wird die Geschwindigkeit bezeichnet mit der die Hüllkurve eines Pulses mit der Zentralwellenlänge λ sich in einem Medium ausbreitet, wobei gilt:

$$v_g(\lambda) = \frac{c_0}{n(\lambda) - \lambda \cdot \frac{dn}{d\lambda}} \quad (2.39)$$

Aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindizes und somit folglich verschiedenen Gruppengeschwindigkeiten resultiert bei Dreiwellenmischprozessen ein zeitliches Auseinanderlaufen (zeitlicher walk-off) der beteiligten Pulse.

$$GVM(\lambda_1, \lambda_2) = \frac{1}{v_g(\lambda_1)} - \frac{1}{v_g(\lambda_2)} \quad (2.40)$$

Diese Fehlanpassung der Gruppengeschwindigkeiten (GVM¹¹) limitiert die effektive Wechselwirkungslänge im nichtlinearem Medium und führt somit zu geringen Konversionseffizienzen. Darüber hinaus beeinflusst die Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD¹²) die Einhüllende, wodurch sich die verschiedenen Frequenzkomponenten des Pulsspektrums mit unterschiedlicher Geschwindigkeit im Medium ausbreiten. Langwelligere Frequenzanteile passieren ein transparentes Medium schneller als kurzwelligere, sodass die langwelligeren Komponenten im zeitlichen Pulsprofil vorausseilen und die kurzwelligeren dazu zeitlich verzögert sind. Daraus folgt ein zeitliche Verbreiterung des Pulses. Die Oszillatorstärke sowie elektronische und vibronische Eigenschaften des Mediums beeinflussen dabei den

¹¹Group Velocity Mismatch (Fehlanpassung der Gruppengeschwindigkeit)

¹²Group Velocity Dispersion (Gruppengeschwindigkeitsdispersion)

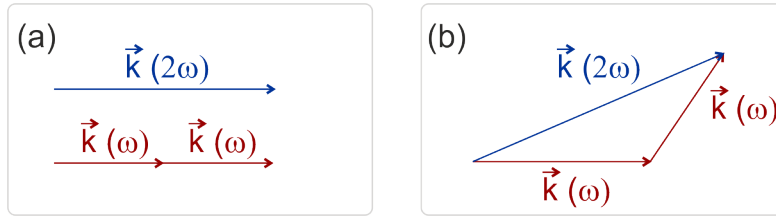


Abbildung 2.7: Phasenanpassungsbedingung mit kollinearere Geometrie zu Typ I Phasenanpassung (a) und nichtkollineare Anordnung zu Typ II Phasenanpassung (b).

Brechungsindex n , der gemäß der Sellmeier-Gleichung (Gleichung 2.41) berechnet werden kann,

$$n^2(\lambda) = 1 + \frac{B_1\lambda^2}{\lambda^2 - C_1} + \frac{B_2\lambda^2}{\lambda^2 - C_2} + \frac{B_3\lambda^2}{\lambda^2 - C_3} \quad (2.41)$$

dabei stellen B_1 , B_2 , B_3 , C_1 , C_2 und C_3 empirisch ermittelte Koeffizienten dar [46, 47]. Im Allgemeinen induziert ein Medium mit normaler Dispersion einen positiven Chirp des propagierenden Laserpulses. Infolge der Transmission durch verschiedene Medien verlängert sich also die Pulsdauer. Um diesen Effekt insbesondere für Experimente mit Bedarf an höchster Zeitauflösung zu kompensieren, wird durch die Anordnung mehrerer Prismen ein negativer Chirp generiert, der dann der Gruppengeschwindigkeitsdispersion entgegen wirken soll. In dieser Arbeit wurde ein Prismenkompressor mit zwei Prismen zur Kompensation der normalen Dispersion verwendet.

Neben den optischen Medien induziert auch das Lösungsmittel in der Probe eine Dispersion, deren Einfluss sich besonders bei dem Abtastpuls bemerkbar macht [48]. Die durch das Lösungsmittel erzeugten Artefakte sowie die Dispersion werden daher bei der Korrektur der aufgenommenen Spektren berücksichtigt. In Abbildung 2.8 ist exemplarisch der wellenlängenabhängige Brechungsindex für die beiden in der Arbeit verwendeten Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO¹³) und Wasser dargestellt. Die Brechungsindexkurven wurden anhand der Gleichung 2.41 berechnet, die entsprechenden Sellmeier-Koeffizienten wurden der Literatur entnommen [49, 50]. Aus der Abbildung 2.8 geht hervor, dass bei Messungen in DMSO ein stärker ausgeprägter positiver *Chirp* zu erwarten ist als in Wasser.

2.2.5 Optisch parametrische Verstärkung

In einem nichtlinearen Medium kann unter Einhaltung der Phasenanpassungsbedingung (Gleichung 2.36) für $\chi^{(2)}$ -Prozesse eine parametrische Zerlegung von einer Eingangsfrequenz in zwei kleinere Frequenzen erfolgen. Die eintreffende Welle wird *Pump*, die erzeugte Welle *Signal* und die gemäß der Energieerhaltung resultierende Welle *Idler* genannt. In dieser Anordnung würde ohne weitere Beeinflussung eine frequenzspezifische Aufteilung stattfinden. Wenn allerdings eine weitere Welle mit spezifischer Frequenz (*Seedwelle*) simultan auf das Medium eintrifft, dann wird bevorzugt diese spezifische Frequenz verstärkt. Dieser Prozess wird dann als optisch parametrischer Verstärker (OPA¹⁴) bezeichnet.

¹³Dimethylsulfoxid

¹⁴Optical Parametric Amplifier (Optisch parametrischer Verstärker)

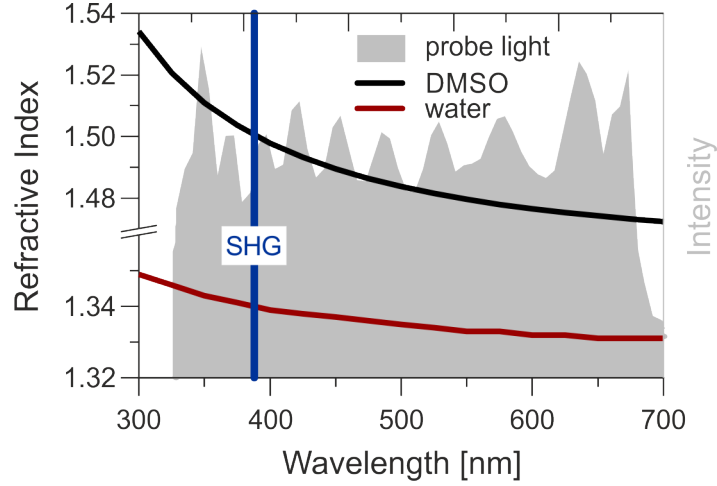


Abbildung 2.8: Darstellung des wellenlängenabhängigen Brechungsindex von Dimethylsulfoxid (schwarz) und Wasser (rot) sowie ein exemplarisches Weißlichtspektrum (grau) und Anregungspuls mit SHG (blau).

2.2.6 Weißlichterzeugung

Die Generierung von Weißlicht bzw. eines Superkontinuums mittels ultrakurzer Laserpulse ist ein komplexer $\chi^{(3)}$ -Prozess, der erstmals von Alfano und Shapiro anhand von Pikosekundenpulsen beschrieben wurde [51–53]. Das Fokussieren hochintensiver Pulse in isotrope Medien ($\chi^{(2)} = 0$) resultiert in einem intensitätsabhängigen Brechungsindex n , was als optischer Kerr-Effekt bezeichnet wird:

$$n(I) = n_0 + n_2 \cdot I(t) \quad (2.42)$$

Hierbei ist $n_0 = \sqrt{(1 + \chi^{(1)})}$ der lineare Brechungsindex und n_2 resultiert aus dem $\chi^{(3)}$ -Prozess ($n_2 \sim \frac{1}{n_0 c^2} \cdot \chi^3$). Da die Pulsintensität über die Zeit gaußförmig verteilt ist, folgt ein entsprechendes Zeitprofil der Intensität auch für den Brechungsindex. Für die Phase einer elektromagnetischen Welle um eine zentrale Frequenz ω_0 gilt:

$$\phi = \omega_0 t - \vec{k} \cdot \vec{z} = \omega_0 t - \frac{\omega_0 n \vec{z}}{c_0} = \omega_0 t - \frac{\omega_0 n_0 \vec{z}}{c_0} - \frac{\omega_0 n_2 I(t) \vec{z}}{c_0} \quad (2.43)$$

Dabei handelt es sich bei $\frac{\omega_0 n_2 I(t) \vec{z}}{c_0}$ um die Phasendifferenz der Propagation einer Welle unter Einfluss des Kerr-Effektes im Vergleich zu einer Welle mit linearem Brechungsindex. Die zeitlichen Differentiation von Gleichung 2.43 ergibt das zeitabhängige Frequenzspektrum:

$$\begin{aligned} \delta\omega(t) &= \frac{\partial\phi}{\partial t} \\ \delta\omega(t) &= \omega_0 - \frac{\omega_0 z}{c_0 n_2} \frac{\partial I(t)}{\partial t} \end{aligned} \quad (2.44)$$

Aus Gleichung 2.44 ist ersichtlich, dass während des Pulsanstiegs die Ableitung $\frac{\partial I(t)}{\partial t}$ positiv ist, sodass langwelligere Frequenzen im Vergleich zur eingestrahelten Frequenz ω_0 generiert werden. Dementsprechend werden im zeitlichen Intensitätsabfall des Pulses in Relation zu

ω_0 Frequenzen mit höherer Energie generiert. Durch diese sogenannte Selbstphasenmodulation im Kerr-Medium wird also aus jedem eingestrahlenen Puls mit der Zentralfrequenz ω_0 ein weiterer Flügel von Frequenzen induziert.

2.3 Quantenchemische Methoden

2.3.1 Schrödinger-Gleichung und Born-Oppenheimer-Näherung

Das Fundament der Quantentheorie bildet die zeitabhängige Schrödinger-Gleichung (Gleichung 2.45), wodurch die zeitliche Entwicklung eines molekularen Systems mit dem Zustand Ψ abhängig von dem Hamilton-Operator \hat{H} beschrieben wird,

$$\hat{H}(x)\Psi(x, t) = i\hbar \frac{d}{dt}\Psi(x, t) \quad (2.45)$$

wobei x die Spinkoordinate (eine Kombination aus Ort und Spin) und t die Zeit darstellt. Ausgehend von einem zeitunabhängigen Hamilton-Operator kann aus Gleichung 2.45 unter Verwendung eines Separationsansatzes die zeitunabhängige Schrödinger-Gleichung (Gleichung 2.46) generiert werden. Das molekulare System bestehend aus N Elektronen und \mathcal{N} Kernen wird durch die Wellenfunktion $\Phi(r, R)$ beschrieben, die abhängig von den Koordinaten der Elektronen ($r = r_1, r_2, r_3, \dots$) und der Atome ($R = R_1, R_2, R_3, \dots$) sind. Durch das Lösen der zeitunabhängigen Schrödinger-Gleichung können dann die stationären Eigenzustände n erhalten werden,

$$\hat{H}(r, R)\psi_n(r, R) = E_n\psi_n(r, R) \quad (2.46)$$

wobei E_n die Energieeigenwerte des Systems sind. Der nichtrelativistische Hamilton-Operator \hat{H} in atomaren Einheiten setzt sich aus kinetischer \hat{T} und potentieller Energie \hat{V} der Elektronen e und Atomkerne K zusammen.

$$\begin{aligned} \hat{H} &= \hat{T} + \hat{V} \\ &= \underbrace{-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2}_{\hat{T}_e} - \underbrace{\frac{1}{2} \sum_{A=1}^{\mathcal{N}} \frac{1}{m_A} \nabla_A^2}_{\hat{T}_K} - \underbrace{\sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^{\mathcal{N}} \frac{Z_A}{r_i R_{iA}}}_{\hat{V}_{eK}(r_i, R_{iA})} + \underbrace{\sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}}}_{\hat{V}_{ee}(r_i)} + \underbrace{\sum_{A=1}^{\mathcal{N}} \sum_{B>A=1}^{\mathcal{N}} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}}_{\hat{V}_{KK}(R_{iA})} \end{aligned} \quad (2.47)$$

Als ∇ ist der Nabla-Operator, als m_A ist die Masse des Atomkerns, als Z ist die Kernladungszahl, und als r bzw. R ist der jeweilige Abstand der betrachteten Spezies untereinander definiert. Die potentielle Energie resultiert dabei jeweils aus der Coulomb-Wechselwirkung der Kerne und Elektronen.

Allerdings ist die zeitunabhängige Schrödinger-Gleichung für biochemisch interessante Systeme nicht exakt lösbar. Mittels der Born-Oppenheimer-Näherung ist eine Separation der Gleichung 2.46 in einen elektronischen und einen Kernanteil möglich, wenn die elektronischen Zustände energetisch ausreichend voneinander getrennt sind und aus Symmetriegründen keine Kopplung möglich ist. Gemäß dieser Näherung ist es aufgrund der vergleichsweise trägen Masse der Atomkerne erlaubt, die Elektronenbewegung im Feld eines

festen Kerngerüsts zu betrachten, sodass \hat{T}_K annähernd 0 und \hat{V}_K konstant ist. Die Kerne nehmen effektiv nur das gemittelte Feld der Elektronen wahr. Für die elektronische Schrödinger-Gleichung gilt dann:

$$\hat{H}_e(r, \mathcal{R})\psi_e(r, R) = E_e(R)\psi_e(r, R) \quad (2.48)$$

Gleichung 2.48 kann gelöst werden, indem die Kernkoordinaten als Parameter behandelt werden. Mit den resultierenden elektronischen Energieeigenwerten $E_n(R)$ kann dann die Kern-Schrödinger-Gleichung berechnet werden. Die Summe aus den Energieeigenwerten $E_n(R)$ und der potentiellen Energie \hat{V}_{KK} der Kerne wird als Potentialfläche bezeichnet.

2.3.2 Hartree-Fock Methode

Die elektronische Schrödinger-Gleichung ist ebenfalls ohne weitere Annahmen nicht lösbar. Einen Lösungsansatz stellt die Hartree-Fock Näherung dar. Bei dieser Methode werden die Bewegung eines Elektrons im gemittelten Feld aller anderen Elektronen untersucht, wobei das gemittelte Feld keinen Einfluss auf die Bewegung des betrachteten Elektrons hat ($\hat{V}_{ee} = 0$). In diesem Fall ist die Lösung von Gleichung 2.48 eine Slater-Determinante (Gleichung 2.49), die sich aus n Spinorbitalen ϕ_i zusammensetzt, welche wiederum als das Produkt der räumlichen Wellenfunktion ψ_i und der Spinfunktion σ_i definiert sind.

$$\psi = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \phi_1(r_1) & \phi_1(r_2) & \dots & \phi_1(r_N) \\ \phi_2(r_1) & \phi_2(r_2) & \ddots & \phi_2(r_N) \\ \vdots & \dots & \dots & \vdots \\ \phi_N(r_1) & \phi_N(r_2) & \dots & \phi_N(r_N) \end{vmatrix} \quad (2.49)$$

Aufgrund der antisymmetrischen Eigenschaft der Slater-Determinante wird das Pauli-Prinzip erfüllt [54]. Zudem wird das Variationsprinzip verwendet, wonach der berechnete Energieeigenwert immer größer als der tatsächliche Eigenwert des Grundzustandes E_0 ist.

$$E_0 \leq \frac{\langle \psi | H | \psi \rangle}{\langle \psi | \psi \rangle} \quad (2.50)$$

Unter der Annahme, dass die Spinorbitale zueinander orthonormiert $\langle \psi | \psi \rangle$ sind, ergibt sich dann die Hartree-Fock-Gleichung,

$$\hat{f}(r_i)\phi_i(r_i) = \epsilon\phi_i(r_i) \quad (2.51)$$

die den Fock-Operator \hat{f} enthält, für den gilt:

$$\hat{f}(r_i) = \hat{h}(r_i) + \sum_{l=1}^N \left[\hat{J}(r_i)_l + \hat{K}_l(r_i) \right] \quad (2.52)$$

Der in Gleichung 2.52 enthaltene Eielektronenoperator \hat{h} ist definiert als:

$$\hat{h}(r_i)\phi_k(r_i) = \left[-\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_{A=\infty}^N \frac{Z_A}{r_{iA}} \right] \phi_k(r_i) \quad (2.53)$$

Der Coulomb-Operator $\hat{J}(r_i)_l$ beschreibt die klassische Wechselwirkung zweier verschiedener Elektronendichten:

$$\hat{J}(r_i)_l\phi_k(r_i) = \left[\int \phi_l^*(r_j) \frac{1}{r_{ij}} \phi_l dx_j \right] \phi_k(x_i) \quad (2.54)$$

Der Austausch-Operator $\hat{K}(r_i)_l$ ergibt sich aus der Wechselwirkung zweier identischer Elektronendichten stellt somit einen Korrekturterm des Coulomb-Operators dar, da dieser aufgrund der Vernachlässigung von antisymmetrischen Eigenschaften der Elektronendichte die abstoßende Wirkung der Elektronen überschätzt.

$$\hat{K}(r_i)_l\phi_k(r_i) = \left[\int \phi_l^*(r_j) \frac{1}{r_{ij}} \phi_k dx_j \right] \phi_l(x_i) \quad (2.55)$$

Allerdings kann auch Gleichung 2.51 nur iterativ gelöst werden. Hierzu wird ausgehend von einer gewissen Anzahl an Startfunktionen ("initial guess") der Fock-Operator berechnet, anhand dessen dann die Hartree-Fock-Gleichung gelöst wird, sodass ein Satz an Lösungsfunktionen zur Verfügung steht. Anschließend wird erneut ein solcher Zyklus gestartet und diese Optimierung solange durchgeführt, bis die berechneten Wellenfunktionen sowie die Energien konvergieren. Das Ergebnis ist dann selbstkonsistent (SCF¹⁵-Verfahren).

2.3.3 Dichtefunktionaltheorie

Die Dichtefunktionaltheorie basiert auf dem Theorem von Hohenberg und Kohn nach dem die Elektronendichte die elektronische Energie und alle molekularen Eigenschaften des Grundzustandes eindeutig beschreibt [55, 56]. Daher wird bei dieser Methode die Schrödinger-Gleichung eines polyatomaren Systems nicht in Abhängigkeit der Wellenfunktion, sondern als Funktion der Elektronendichte gelöst.

$$\rho_s(r) = \sum_i^N \sum_s |\Psi(r, s)|^2 = \rho(r) \quad (2.56)$$

Ein zentraler Vorteil dieser Methode ist, dass sich die Dimensionalität des betrachteten Systems drastisch reduziert. Denn während die Wellenfunktion eine Abhängigkeit von der Anzahl der im System vorhandenen N Elektronen zeigt, ist die Elektronendichte unabhängig von der Elektronenanzahl und immer dreidimensional.

Die Energie eines Systems E kann dann als Funktion der Elektron-Kern Wechselwirkung E_{Ke} , der kinetischen Energie T und der Elektron-Elektron-Abstoßung E_{ee} beschrieben

¹⁵Self-Consistent Field

werden, wobei F_{HK} der Hohenberg-Kohn-Operator ist:

$$E(\rho) = E_{Ke}(\rho) + \underbrace{T(\rho) + E_{ee}(\rho)}_{F_{HK}} \quad (2.57)$$

Das zweite Hohenberg-Kohn-Theorem beruht auf dem Variationsprinzip, wonach die Grundzustandselektronendichte diejenige ist, die in der niedrigsten Energie resultiert ($E_{\text{exakt}} \leq E(\tilde{\rho})$).

Die Kohn-Sham Theorie ermöglicht die zeitabhängige Dichtefunktionaltheorie (TDDFT¹⁶), wonach die Elektronendichte eines Systems anhand der Kohn-Sham-Orbitale $\psi_i(r)$ beschrieben werden kann [57]:

$$\rho(r) = \sum_{i=1}^N \sum_s |\psi_i(r, s)|^2 \quad (2.58)$$

Basierend darauf ist es möglich, die Gesamtenergie E des Systems entsprechend als Funktionale nichtwechselwirkender Elektronen zu formulieren, wobei $J(\rho)$ der effektiven Coulomb-Wechselwirkung und $E_{xc}(\rho)$ dem Austausch-Korrelations-Funktional entspricht:

$$E(\rho) = E_{Ke}(\rho) + T_s(\rho) + J(\rho) + E_{xc}(\rho) \quad (2.59)$$

Das Austausch-Korrelations-Funktional umfasst alle Energien, die zur Abweichung von der exakten Grundzustandsenergie führen. Allerdings ist das Funktional abhängig von jeder Elektronendichte bei jeder exakten Position des Systems, wodurch es nahezu unlösbar ist. Um dennoch eine Lösung für das Funktional zu generieren, sind weitere Näherungen notwendig. Die einfachste Näherung ist der sogenannte LDA¹⁷-Ansatz [57], wonach die Elektronendichte in einem kleinen Volumenelement als homogen verteilt angenommen werden kann. Um die Inhomogenität der Dichte nicht vollständig zu vernachlässigen, wurde im Rahmen des GGA¹⁸-Ansatz ein Gradient zur Beschreibung der Änderung der Elektronendichte eingeführt. Ausgehend von diesen beiden Lösungsansätzen gibt es eine Vielzahl an Funktionalen, die in Austausch- und Korrelations-Funktionale unterteilt werden können. Austauschfunktionale (z.B. Slater [58] oder Becke [59]) beschreiben die Austauschenergie durch ein homogenes Elektronengas und führen zu einer nicht hinreichend genauen Beschreibung von Bindungslängen. Als Korrelationsfunktionale sind P86 von Perdew [60] und LYP [61] von Lee, Yang und Parr zu nennen. Für eine genauere Beschreibung der Systeme werden meist Hybrid-Funktionale verwendet, die eine Kombination aus Hartree-Fock Austausch- und DFT Austausch-Korrelations-Funktionalen darstellen. Hierbei wird die nichtlokale Austauschenergie durch die Hartree-Fock Theorie exakt bestimmt und um die fehlenden Korrelationseffekte durch die Austausch-Korrelations-Funktionale ergänzt. In dieser Arbeit wurde das Dreiparameterpotential von Becke (B3LYP) [62] verwendet,

$$E_{xc}^{B3LYP} = AE_x^{\text{Slater}} + (1 - A)E_x^{\text{HF}} + BE_x^{\text{Becke}} + (1 - C)AE_c^{\text{VWN}} + CE_c^{\text{LYP}} \quad (2.60)$$

¹⁶Time-Dependent Density-Functional Theory

¹⁷Locally Density Approximation (lokale Dichtennäherung)

¹⁸Generalized Gradient Approximation (Gradientennäherung)

wobei A, B und C angepasste Parameter sind. Über Parameter A werden die Anteile an exakter Austauschenergie aus der Hartree-Fock-Methode E_x^{HF} und dem Anteil aus dem LDA-Funktional E_x^{Slater} festgelegt. Parameter B legt die Anteile der Austauschenergie fest, die anhand des GGA-Funktional E_x^{Becke} bestimmt werden. Die Korrelationsenergie wird über das GGA-Funktional LYP sowie das LDA-Funktional VWN [63] von Vosko, Wilk und Nusair ermittelt, deren Anteile über den Parameter C determiniert sind.

Kapitel 3

Photoaktivierbare Verbindungen

Heutzutage gelten fundamentale Prozesse in der Biologie und Chemie immer noch als nicht vollständig verstanden. Die Kontrolle der Reaktionsabläufe mittels Licht kann in Kombination mit biotechnologischen Methoden einen wichtigen Beitrag zum Verständnis dieser komplexen Prozesse liefern [64, 65]. Der Einsatz von Licht ist eine sehr attraktive Untersuchungsmethode, da es sich um eine nichtinvasive Methode handelt. Zudem bietet die lichtinduzierte Regulation die Möglichkeit, in lebenden Organismen Prozesse mit einer hohen Orts- und Zeitaufösung zu induzieren. Ein weiterer Vorteil der Lichtsteuerung ist, dass durch die Wahl einer entsprechenden energiearmen Wellenlänge und geringen Intensität nur eine minimale Energiedosis auf die Probe gelangt, was einer Beschädigung der Probe vorbeugt. Bisher sind auf molekularer Ebene zwei verschiedene Strategien der Lichtregulation biologisch aktiver Moleküle etabliert. Zum einen kann ein bistabiler Photoschalter in das zu untersuchende System eingebracht werden [11–13]. Diese Moleküle können gezielt durch Lichtabsorption von einem biologisch aktiven Konformationszustand A reversibel in einen Konformationszustand B überführt werden, wobei letztere über keine biologische Aktivität mehr verfügt. Die Reversibilität erlaubt ein mehrfaches An- und Ausschalten der Aktivität (Abbildung 3.1). Die Photoschalter unterscheiden sich in der Art der photoinduzierten Konformationsänderung. Azobenzole [66–68] sowie Stilbene [69, 70] führen nach Absorption eine cis/trans-Isomerisierung aus und Spiropyrane [71–75] sowie Fulgimide [76, 77] zeichnen sich durch Ringöffnungs-/schlussreaktionen aus. Werden diese Photoschalter in Makromoleküle eingebaut, kann die lichtinduzierte Konformationsänderung des Photoschalters eine Strukturänderung des kompletten Moleküls bewirken, die sich dann beispielsweise auch auf die makroskopischen Materialeigenschaften des Moleküls auswirkt. Auf diese Weise wurden bereits optisch kontrollierbare Daten- [18] sowie Energiespeicher [78], Enzyme [79] und DNA [73, 80, 81] auf der Basis molekularer Schalter realisiert.

Ein weiteres Konzept der lichtbasierten Aktivitätskontrolle von Biomolekülen beruht auf der Verwendung von photolabilen Verbindungen oder auch *caged-compounds* [20–24], welche fortlaufend als photoaktivierbare Biomoleküle bezeichnet werden. Hierbei wird ein Biomolekül durch das Anbringen eines Chromophors temporär inaktiv. Infolge eines gezielten Lichtimpulses wird der Chromophor vom Biomolekül gespalten, das dadurch irreversibel aktiviert wird (Abbildung 3.1). Daher kann mit den geschützten Verbindungen ein biolo-

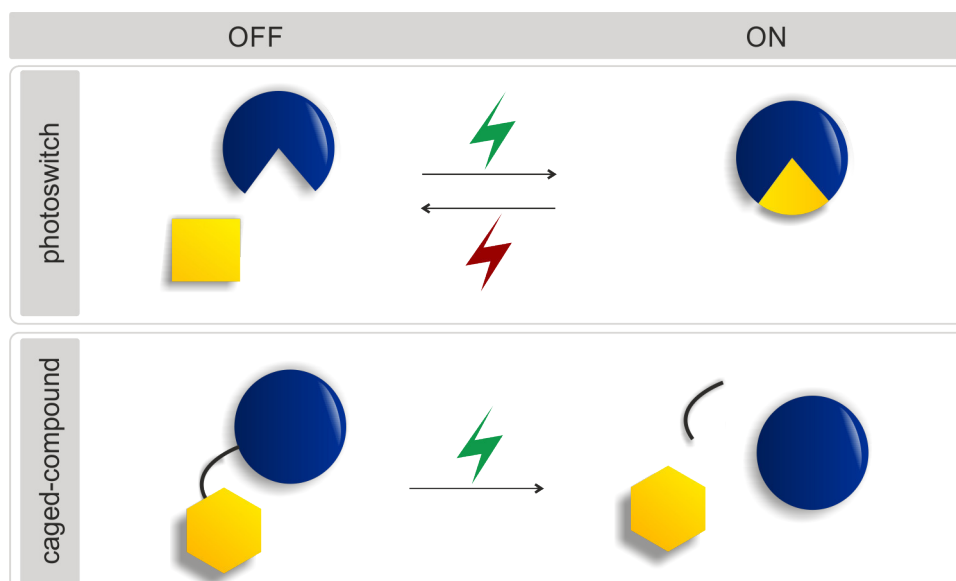


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Möglichkeiten der Lichtregulation eines Biomoleküls (blau), wobei durch einen Photoschalter (oben) eine reversible und durch eine photoaktivierbare Verbindung (unten) eine irreversible Steuerung möglich ist.

gischer inaktiver Zustand in einen Zustand mit biologischer Aktivität überführt werden, dieser eindeutige An- und Auszustand stellt einen erheblichen Vorteil der geschützten Verbindungen dar. Weitere Eigenschaften dieses Verbindungstyps werden in Abschnitt 3.1 näher erläutert.

3.1 Photoaktivierbare Biomoleküle

Charakteristisch für photoaktivierbare Biomoleküle ist, dass sie generell aus zwei Komponenten bestehen, einem Chromophor und dem Biomolekül, das aufgrund der Bindung zu einer photolabilen Schutzgruppe in seiner biologischen Aktivität gehemmt ist. Durch Anregung der photolabilen Schutzgruppe kann die Bindung zum Biomolekül gespalten und dadurch dessen biologische Aktivität wiederhergestellt werden, was als *Uncaging* bezeichnet wird. Die erste photoinduzierte Freisetzung wurde von Ciamician und Silber bereits 1901 am Beispiel von *ortho*-Nitrobenzylaldehyd beschrieben [82]. Zunächst beschränkte sich die Anwendung dieser photolabilen Schutzgruppen auf Anwendungen im Bereich der organischen Synthese, wobei funktionelle Strukturen durch das gezielte Anbringen dieser Gruppen für weitere Syntheseschritte inert sind. Das Konzept wurde von Engels für das *Uncaging* von Biomolekülen adaptiert, indem er zeigte, dass cAMP¹ durch UV-Licht erfolgreich aus einer mit Nitrobenzyl geschützten Verbindung freigesetzt werden kann [83]. Der Begriff *caged-compounds* für Moleküle mit photolabilen Schutzgruppen wurde 1978 von Kaplan eingeführt [84], wobei diese Bezeichnung aufgrund der irreführenden bildlichen Darstellung des Konzepts oft kritisiert wurde, sich aber schließlich doch in der Literatur durchsetzte.

¹Cyclic Adenosinmonophosphate (zyklisches Adeninmonophosphat)

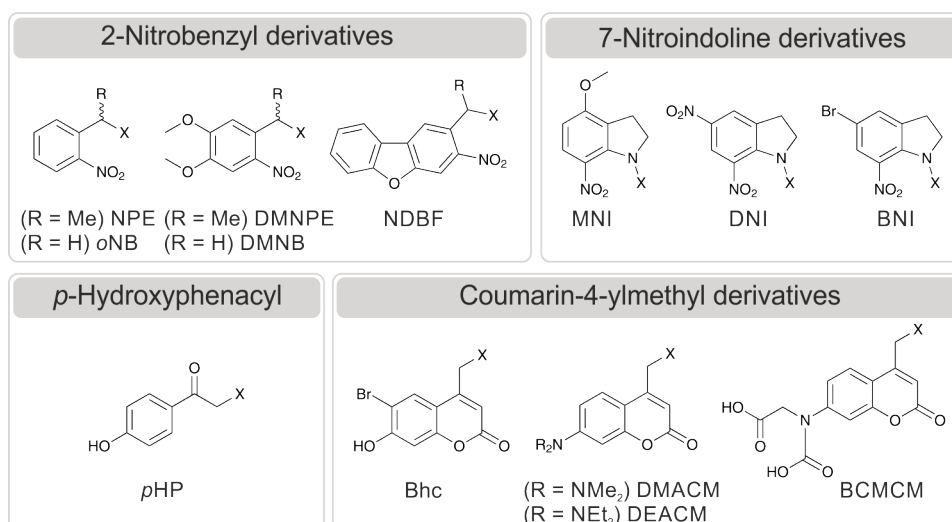


Abbildung 3.2: Strukturen verschiedener *cages*, wobei x immer die Position des Biomoleküls darstellt. Als Beispiele sind 2-Nitrobenzyl-Derivate [oNB (*ortho*-Nitrobenzyl), NPE [85, 86] (1-(2-Nitrophenyl)ethyl), DMNPE [87, 88] ((1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl)-Ester), DMNB [89, 90] (4,5-Dimethoxy-nitrobenzyl) und NDBF [91, 92] (Nitrodibenzofuran)], 7-Nitroindolin-Derivate [MNI [93, 94] (4-Methoxy-7-nitroindolin), DNI (5,7-Dinitroindolin), BNI (5-Brom-7-nitroindolin)], *p*-Hydroxylphenacyl (pHP [95]) und Coumarin-Derivate [Bhc (6-Bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethoxycarbonyl [96, 97]), DMACM ((7-Dimethylaminocoumarin-4-yl)methyl), DEACM ([7-(Diethylamino)coumarin-4-yl)methyl), BCMCM ([6,7-Bis(carboxymethoxy)coumarin-4-yl)methyl]) gezeigt.

Als Anforderungen an eine photolabile Schutzgruppe kristallisieren sich folgende Kriterien heraus:

- **Schnelle Freisetzung:** Um eine hinreichende Aussage über den anschließenden biologischen Prozess treffen zu können, sollte die Freisetzung des Biomoleküls auf einer schnellen Zeitskala ablaufen.
- **Effizienz:** Die *Uncaging*-Reaktion sollte sehr effizient sein, sodass die Belastung der biologischen Probe durch die Lichtquelle möglichst gering gehalten werden kann. Die Effizienz wird zum einen durch den Extinktionskoeffizient bei der Belichtungswellenlänge beeinflusst, wobei bei einem großen Extinktionskoeffizienten eine vergleichsweise niedrige Lichtdosis angewendet werden kann. Zum anderen spielt die photochemische Quantenausbeute eine erhebliche Rolle, die das Verhältnis der Anzahl der reagierten Moleküle zu den absorbierten Photonen angibt. Folglich kann bei einer hohen Quantenausbeute eine niedrige Lichtdosis verwendet werden.
- **Photolyse bei geeigneten Wellenlängen:** Zu bedenken ist, dass viele Biomoleküle im Bereich zwischen 260 und 280 nm absorbieren sowie Wasser bei 900 nm. Daher sollte die Absorption der photoaktivierbaren Biomoleküle in dem Fenster zwischen diesen Wellenlängen liegen, um eine kompetitive Absorption auszuschließen, die neben einem gewissen Filtereffekt womöglich zu Photoschäden der Biomoleküle führen könnte. Zudem ist auch hier zu bedenken, dass bei einer Absorption der geschützten

Verbindung im sichtbaren im Vergleich zum UV-Spektralbereich eine Photolyse mit relativ energiearmen Wellenlängen induziert werden kann, sodass in biologischer Umgebung mildere Reaktionsbedingungen angewendet werden können. Daher wird versucht, photoaktivierbare Biomoleküle mit Absorptionsmaxima bei möglichst großen Wellenlängen zu entwickeln [98–100].

- Toxizität: Die aus der Freisetzungsreaktion entstehenden Produkte sollten inert und ungiftig sein.
- Löslichkeit und Permeabilität: Im Hinblick auf biologische Anwendungen sollten die photolabil geschützten Verbindungen eine Löslichkeit im wässrigen Medium aufweisen. Zudem sollte für zellbiologische Anwendung die Zellmembran permeabel für die photoaktivierbaren Biomoleküle sein.
- Zweiphotonenphotolyse: Beim Prozess der Zweiphotonenanregung werden zwei Photonen simultan absorbiert, wobei meist dasselbe Energieniveau wie in der Einphotonenanregung populiert wird. Jedoch gelten andere Auswahlregel für die Einphotonen- und Zweiphotonenanregung im Hinblick auf die beteiligten Anfangs- und Endzustände, wobei für die Drehimpulsquantenzahl bei Zweiphotonenanregung $\Delta l = 0, \pm 2$ erfüllt sein muss. Die Technik ermöglicht ein Anregungsvolumen von wenigen Femtolitern ($10^{-15}l$) mit energiearmen Anregungswellenlängen, die ungefähr der doppelten Wellenlänge des Absorptionsmaximums der photoaktivierbaren Biomoleküle entspricht [101–104]. Aufgrund der sehr präzisen räumlichen Auflösung dieser Methode ist diese geeignet für zellbiologische Anwendungen [105, 106]. Damit eine erfolgreiche Photolyse mit der Zweiphotonenanregung erfolgen kann, muss das photoaktivierbare Biomolekül einen hohen Zweiphotonenwirkungsquerschnitt aufweisen, was ein Maß für die Effizienz nach Zweiphotonenanregung darstellt.

Neben den oben genannten Eigenschaften können weitere anwendungsspezifische Kriterien für einen *cage* definiert werden.

In Abbildung 3.2 sind in der Literatur weitverbreitete, photolabile Schutzgruppen dargestellt, die im Folgenden unter dem Gesichtspunkt der oben genannten Anforderungsbedingungen vorgestellt werden. Da die grundlegenden photochemischen Eigenschaften der *ortho*-Nitrobenzylaldehyde bereits seit mehr als 100 Jahren bekannt sind, konzentrierte sich die Forschung auf die Entwicklung verschiedener Derivate dieser Schutzgruppen mit verbesserten Photolyseeigenschaften. Durch das Anbringen von elektronenschiebenden Resten an das Grundgerüst kann eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums auf bis zu 350 nm herbeigeführt werden, was sich günstig auf Anwendungen in biologischer Umgebung auswirkt [107, 108]. Der Reaktionsmechanismus der schließlich zur Freisetzung des Biomoleküls führt, wurde spektroskopisch bei verschiedenen Derivaten untersucht. Es zeigte sich, dass in Gegenwart von Wasser die UV-Anregung nach einem Protonentransfer zur Population eines Aci-Nitro-Intermediats führt [109], welches in einen zyklischen Übergangszustand übergeht [108] und dann irreversibel zur Freisetzung des Biomoleküls sowie des Nitroso-Produktes führt. Die Photofreisetzung erfolgt im Allgemeinen mit einer geringen Quantenausbeute, was durch die Population eines nicht reaktiven Triplettzustandes des

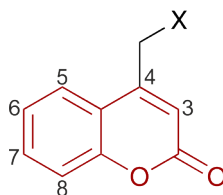


Abbildung 3.3: Chemische Struktur von Cumarin (rot) als photolabile Schutzgruppe mit der Abgangsgruppe X und Nummerierung des Grundgerüsts nach IUPAC.

Aci-Nitro-Intermediats begründet wird [110–112]. Der relativ kleine Extinktionskoeffizient und die toxischen Nitrosophotoprodukte sind nachteilig für biologische Anwendungen.

Eine weitere Klasse der *cages* stellen die Nitroindoline dar, deren Photolyse erstmals von Pass *et al.* 1981 beschrieben wurde [113]. Nach Photoanregung ist es abhängig vom Lösungsmittel, welches Photoprodukt gebildet wird. Bei Präsenz von Wasser entsteht ein Nitrosoprodukt [114], wobei sich in anderen nukleophilen Lösungsmitteln ein Nitroprodukt bildet [115]. Diese *cages* zeichnen sich durch eine hohe Resistenz gegenüber Hydrolyse sowie einem Absorptionsmaximum von etwa 350 nm aus. Aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit sind diese *cages* weit verbreitet. Allerdings weisen sie meist einen geringen Extinktionskoeffizienten und eine geringe photochemische Quantenausbeute auf, sodass eine hohe Lichtdosis für ein erfolgreiches *Uncaging* nötig ist, was unvorteilhaft für biologische Anwendungen ist.

Dass *p*-Hydroxyphenacyl als *cage* Verwendung finden kann, wurde zuerst von Sheehan und Umezawa 1973 publiziert [116]. Dieser *cage* besticht durch eine hohe photochemische Quantenausbeute sowie durch eine schnelle Freisetzungsrate. Der Reaktionsmechanismus scheint nach Anregung über eine Interkombination zur Population eines Triplets zu führen, welches im Anschluss eine Photo-Favorskii-Umlagerung ausführt. Nachteilig bei der Verwendung von *p*-Hydroxyphenacyl ist, dass die Anregung aufgrund schwacher Absorption oberhalb von 300 nm mittels UV-Licht herbeigeführt werden muss, sodass dieser *cage* für biologische Fragestellungen weniger gebräuchlich ist.

Cumarin-Derivate spielen eine wichtige Rolle unter den *cages*, und werden in Abschnitt 3.1.1 genauer erläutert.

Mit den genannten *cages* war es bereits möglich, folgende Targetmoleküle photochemisch zu kontrollieren: Peptide [117], DNA [118, 119], tRNA [120, 121], Ca^{2+} [122–124] sowie Neurotransmitter [94, 125, 126].

3.1.1 Cumarin-Derivate

Die Cumarin-Derivate basieren auf dem namensgebenden natürlich vorkommenden Farbstoff Cumarin, dessen Grundgerüst ein 1,2-Benzopyronring darstellt (siehe Abbildung 3.3). Dank ihrer stark fluoreszierenden Eigenschaften wurden Cumarine zunächst hauptsächlich als Laserfarbstoffe [127, 128] oder Chemosensoren u.a. für Cyanide [129] und Al^{3+} [130, 131] eingesetzt. Givens und Matuszewski beschrieben 1984 als erstes die Anwendungsmöglichkeit von 4-(Hydroxymethyl)-7-methoxycumarin (MCM) als *cage* für Phosphatester [132], indem sie nachwiesen, dass aus der Belichtung mit 360 nm der entsprechenden geschützten

Verbindung neben Diethylphosphat der respektive Cumarin-Alkohol (MCM-OH) resultierte. Da bei der Photolyse keine toxischen Nebenprodukte entstehen, wurde das Interesse an der Entwicklung von Cumarin-Derivaten mit einem langwelligeren Absorptionsmaximum und somit einer energieärmeren *Uncaging*-Möglichkeit geweckt. Zudem sollte beim Design neuer Cumarin-Derivate eine Erhöhung der Wasserlöslichkeit sowie der photochemischen Quantenausbeute im Hinblick auf biologische Anwendungen erzielt werden [95]. Furuta *et al.* stellten die These auf, dass durch das Anbringen elektronenziehender Reste sowie Substituenten mit Schwereatomeffekt an das Cumarin-Grundgerüst die photochemischen Eigenschaften verbessert würden. Daher wurde von ihnen 1999 das an der C6-Position modifizierte Cumarin-Derivat (6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl (Bhc) und die dazugehörigen strukturellen Analoga vorgestellt [102], wobei deren Absorptionsmaxima nun bei 370 nm liegen und die photochemische Quanteneffizienz für ein *Uncaging* dem Zwanzigfachen von DMNB entspricht [133]. Offensichtlich kann ein durch Bhc geschütztes Zielmolekül entweder wasserlöslich sein oder eine Membranpermeabilität aufweisen [96]. Allerdings ist bei der Anwendung von Bhc-*cages* zu beachten, dass die Absorptionsbande bei 370 nm aus der an der C7-Position deprotonierten Hydroxyl-Einheit resultiert, sodass bei niedrigen pH-Werten aufgrund der Abwesenheit jener Spezies eine hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums um bis zu 50 nm erfolgt.

Eine weitere Verbesserung der photochemischen Eigenschaften konnte durch das Einführen eines Diethylamino-Substituenten an der C7-Position erzielt werden [134]. Hervorzuheben sind neben dem Absorptionsmaximum im Bereich von 380-400 nm, ein sehr hoher Extinktionskoeffizient (ca. $20000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und eine im Vergleich zu Bhc weiter erhöhte photochemische Quantenausbeute von 7-Diethylaminocumarin-4-yl (DEACM). Aufgrund dieser wertvollen Charakteristika ist DEACM bei biologischen Fragestellungen weit verbreitet, wobei bereits Aminosäuren [135], Nukleobasen [136] oder ATP² [137] mit diesem *cage* geschützt worden sind. Zur Untersuchung der Proteinsynthese wurden tRNA [121] und auch das Antibiotikum Puromycin [138] als Zielmolekül durch DEACM geschützt und photoinduziert reaktiviert.

Das Bestreben das Absorptionsmaximum der Cumarin-Derivate zu noch größeren Wellenlängen zu schieben, ist nach wie vor Bestandteil der Forschung. Ellis-Davies *et al.* führten ein Analogon zu DEACM ein, welches bei 450 nm absorbiert [99] und Jullien *et al.* haben ein Cumarin-Derivat vorgestellt, welches ein *Uncaging* mit 470-500 nm erlaubt [98].

3.1.2 Photochemie von Cumarin

Die Komplexität der Photochemie von Cumarin-Derivaten ist eine Herausforderung der aktuellen Forschung [139], wobei die Verwendung der Cumarine als *cage* das Bestreben nach Aufklärung der Reaktionspfade vorantreibt. Das Absorptionsverhalten wird maßgeblich von den Substituenten sowie dem umgebenden Lösungsmittel beeinflusst. So wird die langwellige Absorptionsbande vieler Cumarin-Derivate als π - π^* -Übergang identifiziert. Bei vielen Cumarinen ist der n - π^* -Übergang dem letztgenannten energetisch sehr nahe, sodass eine Mischung der beiden Übergänge beobachtet wird. Aufgrund der erheblich klei-

²Adenosintriphosphat (ATP)

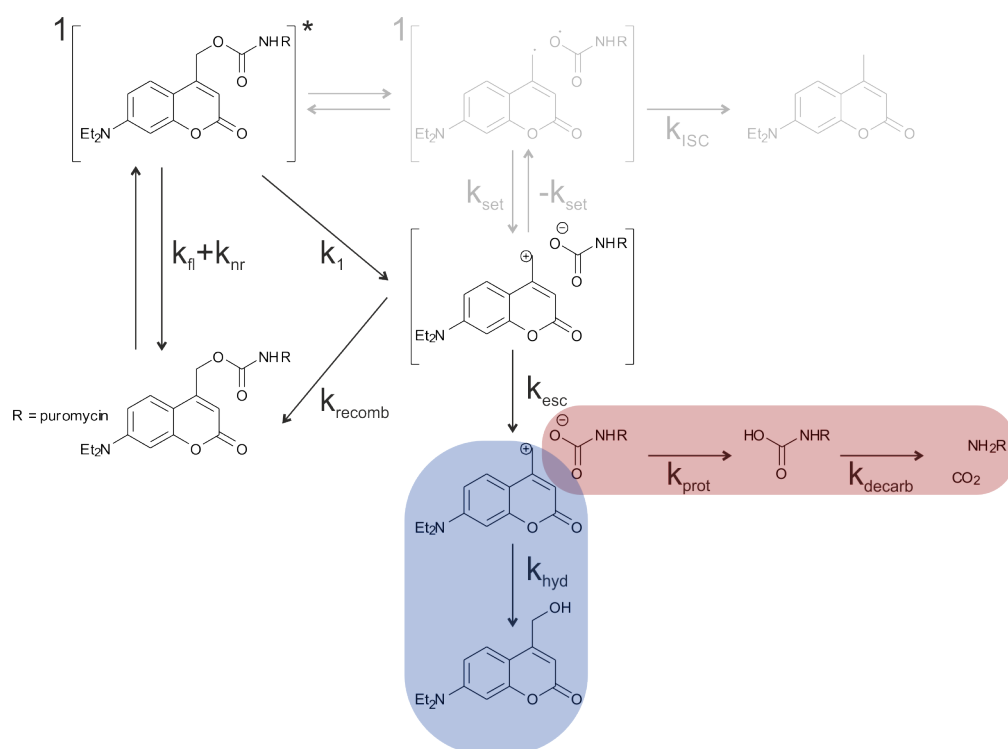


Abbildung 3.4: Vermeintlicher Reaktionsmechanismus für DEACM-geschützte Carbamate nach Schade *et al.* [141, 142]. Die Raten für die unterschiedlichen Reaktionspfade wurden mit k bezeichnet, sodass k_{fl} der Fluoreszenz, k_{nr} der nichtstrahlenden Relaxation, k_{ISC} dem *Intersystem Crossing*, k_{set} dem Einzelelektronentransfer, k_1 dem ersten *Uncaging*-Schritt, k_{recomb} der Rekombination zum Grundzustand, k_{esc} dem lösungsmittelassistenten Separationsschritt, k_{hyd} der Hydratation, k_{prot} der Protonierung und k_{decarb} der Decarboxylierung entspricht.

neren Übergangswahrscheinlichkeit für den $n-\pi^*$ -Übergang ist der $\pi-\pi^*$ -Übergang meist dominant [140, 141]. Der Umgebungseinfluss auf diese Übergänge wurde anhand von (7-Methoxycumarin-4-yl)methyl (MCM) gezeigt, wobei in nicht-polaren Lösungsmitteln die Population des S_1 aus einem $n-\pi^*$ -Übergang und in polarer protischer Umgebung aus einem $\pi-\pi^*$ -Übergang resultiert [141]. Die Übergänge sind assoziiert zu Übergängen von dem HOMO und HOMO-1 zum LUMO, wobei bei unsubstituierten Cumarinen ein Ladungstransfer von dem Benzylring auf die Pyranon-Einheit stattfindet. Die elektronischen Eigenschaften von Substituenten können diesen intramolekularen Ladungstransfer (ICT³) unterstützen, indem ein sogenanntes *Push-Pull*-System kreiert wird. Ein solches System kann durch einen elektronschiebenden Rest (z.B. Diethylamino) in der C7-Position und einen starken elektroneziehenden Rest (z.B. CHO) in der C3-Position realisiert werden [143]. Generell verursachen die 7-Dialkylamino-Substituenten aufgrund ihrer starken Donoreigenschaften eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums sowie einen stark erhöhten Extinktionskoeffizienten, wobei die langwellige Absorption aus einem $\pi-\pi^*$ -Übergang resultiert [140]. Bei diesen Derivaten wurde in polaren Medien neben ICT auch ein sogenannter *twisted intramolecular charge transfer* (TICT⁴) beobachtet. Nach Anregung

³Intramolecular Charge Transfer

⁴Twisted intramolecular charge transfer

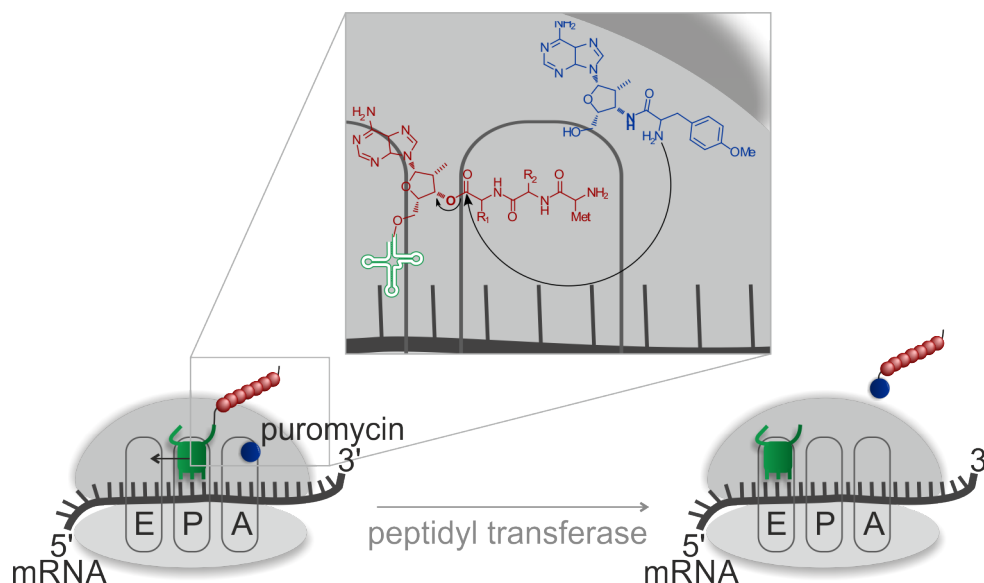


Abbildung 3.5: Wirkungsweise des Antibiotikums Puromycin auf die ribosomale Proteinsynthese.

eines 7-Dialkylamino-Cumarins wird demnach zunächst ein partieller Ladungstransfer im ICT-Zustand ausgebildet, der unter einer Verdrillung des Substituenten in den TICT-Zustand übergeht [144]. Im TICT-Zustand findet ein vollständiger Ladungstransfer statt, wobei der Substituent eine pyramidale Struktur einnimmt.

Die Betrachtung dieser photophysikalischen Eigenschaften ist wichtig, um die Dynamik von Cumarin-geschützten Verbindungen zu verstehen, da der Fluoreszenz- und der *Uncaging*-Pfad ein kompetitives Verhältnis zueinander haben. Der Reaktionsmechanismus dieser photolabilen Schutzgruppen wurde bisher besonders für Cumarin-geschützte Phosphatester und Carboxylate untersucht [140–142, 145, 146]. Es wird angenommen, dass eine elektronische Anregung zunächst unmittelbar zur Besetzung des angeregten Zustands S_1 führt. Anschließend kann eine strahlungslose Desaktivierung und Fluoreszenz zu einer Population des Grundzustandes oder eine heterolytische Bindungsspaltung zu einem Ionenpaar führen. Die Rekombination des Ionenpaares ist ein Pfad zurück zum Grundzustand, welcher in Konkurrenz zur Ausbildung des Cumarin-Alkohols als Photoprodukt steht. Dieser Schritt wird assistiert durch das Lösungsmittel, wobei dieses eine Hydratation ausführt und anschließend mit dem Cumarin-Kation unter Deprotonierung reagiert. Die Effizienz der *Uncaging*-Reaktion ist dabei durch die Eigenschaften der Abgangsgruppe determiniert, wobei eine schwache Base eine gute Abgangsgruppe darstellt. Zudem kann in polaren Lösungsmitteln eine Stabilisierung des Ionenpaares durch das Lösungsmittel zu einer erhöhten Effizienz führen. Ein polares protisches Lösungsmittel führt zusätzlich zu einer verringerten Fluoreszenzquantenausbeute, sodass der Pfad des *Uncappings* bevorzugt wird [141]. Des Weiteren wurde von Hagen *et al.* beobachtet [141], dass die Freisetzungsrates durch die Anwesenheit eines polaren protischen Lösungsmittels beschleunigt wird. Unter den Cumarin-Derivaten zeigte sich, dass DEACM eine vergleichsweise hohe photochemische Quantenausbeute und eine schnelle Freisetzungsrates kombiniert. So beträgt die Quantenausbeute für DEACM-geschütztes cAMP 21% und im Vergleich dazu für MCM-

geschütztes cAMP nur 3%, wobei festzuhalten ist, dass die Untersuchungen unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden [142]. Für DEACM-geschütztes Glycin wurde mittels zeitaufgelöster Spektroskopie eine Freisetzung innerhalb von 3 μ s beobachtet [147].

Es ist zu beachten, dass Furuta *et al.* einen radikalischen Reaktionsmechanismus für Cumarin *cages* vermuten, wonach infolge der Photoanregung ein Triplett-Zustand populiert wird, der im Anschluss zu einer homolytischen Bindungsspaltung führt [102]. Diese gegensätzlichen Ideen werden daher in dieser Arbeit untersucht.

Verschiedene Cumarine wurden auch schon zum Schützen von Aminen verwendet, wobei die funktionelle Gruppe als Carbamat an das Cumarin-Gerüst angebracht wurde [102, 148]. Vermutlich erfolgt nach der photoinduzierten Bindungsspaltung eine Decarboxylierung, die dann zur Freisetzung des Amins führt. Eine Untersuchung der Photodynamik dieser Art der *cages* ist bisher nicht erfolgt und wird daher in dieser Arbeit diskutiert.

3.2 Puromycin

Die Substanzklasse der Antibiotika stellt einen variantenreichen Werkzeugkoffer dar, wobei ein jedes dieser Werkzeuge für Bakterien sowie andere Mikroorganismen hemmend oder gar tödlich sein kann. Antibiotika können anhand ihrer Wirkungsweise in verschiedene Klassen unterteilt werden: Wirkung auf die Zellwand (z.B. Penicilin G), auf ribosomale Proteinsynthese (Neomycin, Tetracyclin, Puromycin) und auf Nukleinsäuren der Bakterien (Levofloxacin).

Der Wirkmechanismus von Puromycin beruht beispielsweise auf der strukturellen Analogie zur Tyrosyl-Adenosin-Einheit am 3'-Ende der Tyr-tRNA [149, 150]. Aufgrund dieser Ähnlichkeit wird Puromycin von einem Ribosom fälschlicherweise als tRNA erkannt und kann während des Peptidyltransfers anstelle der tRNA kodonunspezifisch an die ribosomale A-Seite binden. Anschließend wird die naszierende Polypeptidkette auf das Puromycin übertragen, wobei die neu ausgebildete Peptidbindung vom Ribosom jedoch nicht spaltbar ist. Zudem weist das Peptidyl-Puromycin-Fragment einen Mangel an struktureller Ähnlichkeit mit der Aminoacyl-tRNA auf, sodass die Affinität vom Ribosom zu diesem Fragment minimiert ist und dieses ausgestoßen wird. Die Proteinsynthese wird verfrüht abgebrochen. Das Anwendungsgebiet für Puromycin ist breit gefächert, so kann Puromycin verwendet werden, um die Bildung von Peptidbindungen zu untersuchen [150–155], wobei der Einsatz von Puromycin eine vergleichsweise wenig invasive Methode darstellt [156]. In hohen Konzentrationen dient Puromycin als Proteinsyntheseinhibitor und in niedrigen Konzentrationen kann sich Puromycin als Marker für kürzlich zuvor synthetisierte Proteine in deren C-terminales Ende einbauen, wobei es keine Rolle spielt, ob die Proteine die volle Länge aufweisen oder verkürzt vorliegen [157, 158]. Um die Proteinsynthese in Echtzeit in Zellen beobachten zu können, steht die Synthese von zellpermeablen Puromycin-Analoga im Mittelpunkt des Interesses, sodass eine Fluorophor-markierte Bildgebung in Zellen ermöglicht werden kann [159].

3.2.1 Photoaktivierbares Puromycin

Indem eine photolabile Schutzgruppe an das Puromycin-Gerüst angebracht wird, kann dessen Aktivität temporär unterdrückt werden. Mittels eines Lichtpulses kann die Reaktivität des Antibiotikums wieder regeneriert werden, wobei der Lichtpuls simultan als Triggersignal einer entsprechenden Beobachtungsmethode fungieren kann. Geschütztes Puromycin kann dann zur Kontrolle der Proteinsynthese verwendet werden, sodass beispielsweise die posttranslationale Proteinfaltung mittels NMR untersucht oder die lokale Proteinsynthese in Nervenzellen überwacht werden könnte.

Proteinfaltung

Der hochkomplexe Vorgang der Faltung von Polypeptiden in die Tertiärstruktur eines Proteins ist bisher nicht vollständig verstanden. Der Faltungsprozess kann in zwei Stufen unterteilt werden, wobei sich die erste Stufe während der Elongation der Proteinkette während der Translation abspielt. Die endgültige Faltung ereignet sich posttranslational nach dem die Polypeptide vom Ribosom getrennt sind. Unter den Sekundärstrukturen wird z.B. in α -Helix und β -Faltblatt unterschieden, wobei entscheidende Informationen zur Faltung bereits in der Primärstruktur, d.h. in der Aminosäuresequenz determiniert sind [160, 161]. Allerdings scheint die Faltung gemäß dem Levinthal-Paradoxon nicht zufällig zu erfolgen, sondern entlang eines vorgegebenen Pfads abzulaufen, da ein Ausprobieren aller möglicher Konformationskombinationen unendlich viel Zeit in Anspruch nehmen würde [162].

Eine treibende Kraft der Faltung ist der hydrophobe Effekt, wonach sich hydrophile Aminosäuren in einem hydrophilen Lösungsmittel zur Außenseite des Proteins ausrichten und sich dazu ein hydrophober Kern bildet. Des Weiteren stabilisieren sich ausbildende Wasserstoffbrücken, Disulfidbrücken, sowie ionische und van-der-Waals-Effekte das Protein. Zudem wird die Faltung durch sogenannte Chaperone unterstützt, die eine Fehlfaltung der Proteine verhindern können. Es ist bekannt, dass die Faltung nicht entlang von definierten Übergangszuständen abläuft [163]. Die Energielandschaft der Faltung kann mittels eines dreidimensionalen Faltungstrichters (*folding funnel*) beschrieben werden, wodurch das Levinthal-Paradoxon umgangen wird. Der Ausgangspunkt bzw. die Weite der Trichteröffnung entspricht dem Ensemble aller möglichen denaturierten Konformationen. An dieser Stelle ist die Entropie maximal. Wird die Faltung induziert, dann minimiert sich die Entropie, es werden lokale Energieminima des Trichters erreicht und semistabile Zwischenstufen (*molten globule*) ausgebildet, in denen die Seitenketten der Aminosäuren noch nicht optimal stabilisiert sind. Das globale Energieminimum entspricht der nativen Struktur. Um den Prozess der posttranslationalen Proteinfaltung zu untersuchen, kann photoaktivierbares Puromycin verwendet werden. Die in der geschützten Form unterdrückte Funktion des Puromycins kann durch einen mit Licht getriggerten Prozess freigesetzt werden, sodass das Puromycin die Proteinsynthese stoppt und die posttranslationale Faltung des Protein-Fragments induziert wird. Mittels NMR kann dann die Faltung beobachtet werden [164].

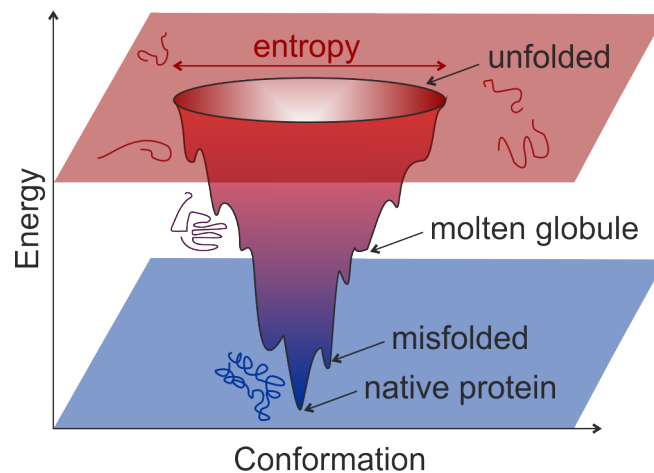


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Energielandschaft während der Proteinfaltung, wobei die Energie in Abhängigkeit der Anzahl an Konformeren gezeigt ist.

Dendritische Proteinsynthese

Kognitive Fähigkeiten wie das Gedächtnis sind komplexe Prozesse, die im zentralen Nervensystem ablaufen. Die Komplexität ergibt sich aus der Zusammensetzung des Gehirns, das aus 10^{11} Nervenzellen besteht, welche über insgesamt 10^{14-15} Synapsen untereinander verbunden sind und über Dendriten Signale aufnehmen können. Bereits vor 70 Jahren wurde erkannt, dass die Proteinsynthese in Neuronen eine wichtige Rolle bei der Etablierung eines Langzeitgedächtnisses spielt [165]. Als Langzeitgedächtnis werden im Gehirn dauerhaft abgespeicherte Informationen bezeichnet. Es wurde lange Zeit angenommen, dass sich die für das Langzeitgedächtnis relevante Proteinsynthese in den Zellkernen der Neuronen abspielt [166]. Im Jahr 1996 wurde dann erstmals die Bedeutsamkeit der dendritischen Proteinsynthese von Kang und Schuman nachgewiesen [167]. Die lokale Proteinsynthese in den Dendriten ist ein wichtiger Faktor bei der Ausbildung der synaptischen Plastizität [168–173], welche der neuronalen Fähigkeit entspricht, ihre Morphologie und Funktion je nach Aktivitätsbedarf anzupassen. Die Plastizität ist ein fundamentaler Mechanismus beim Etablieren des Langzeitgedächtnisses [174]. Diese Langzeit-Plastizität scheint zudem durch den lokalen Proteinabbau beeinflusst zu werden [175–179], der verantwortlich für neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer, Huntington oder Parkinson ist [180, 181]. Zur Erforschung der lokalen Proteinsynthese sowie des Proteinabbaus ist es sehr interessant, die wichtigen Proteine beobachten bzw. markieren zu können. Experimentell war es aufgrund der chemischen Ununterscheidbarkeit der Proteine schwierig, die interessanten Proteine zu markieren. Ein Ansatz soll nun auf der Verwendung von photoaktivierbarem Puromycin beruhen, wobei das Puromycin durch einen nichtinvasiven Lichtpuls freigesetzt wird und sich dann in frisch hergestellte Proteine einbaut [164]. Anschließend bindet ein Puromycin-Antikörper selektiv an das Protein-Puromycin-Fragment, was eine fluoreszierende Färbung auslöst, sodass eine mikroskopbasierte Beobachtung der Proteine ermöglicht wird [182].

Kapitel 4

Experimentelles

4.1 Materialien

4.1.1 Untersuchte Verbindungen

Die in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen (DEACM-OH und DEACM-Puromycin) wurden von Isam Elamri des AK Schwalbe synthetisiert [138]. Ausgehend von dem kommerziell erwerblichen 7-Diethylamino-4-methylcumarin wird zunächst der Cumarin Alkohol DEACM-OH nach einer Strategie von Weinreich *et al.* hergestellt [183]. Hierzu wird die genannte Verbindung mittels DMF-DMA¹ in ein Enamin überführt und anschließend durch Natriumperiodat zu einem Aldehyd oxidiert. Dann erfolgt die Reduktion mithilfe von Natriumborhydrid zu DEACM-OH. Um die biologisch aktive Aminofunktion des Puromycins als Carbamat zu schützen, ist es notwendig DEACM-OH zunächst zu Aktivieren. Dies wird durch die Reaktion mit Chlorameisensäure-4-nitrophenylester zu einem Aktivester realisiert. Im Anschluss kann diese Verbindung in Gegenwart von DIPEA² und DMAP³ mit Puromycin zu der geschützten Verbindung DEACM-Puromycin reagieren.

4.1.2 Lösungsmittel

Für diese Arbeit wird wasserfreies DMSO der Firma Carl Roth (ROTIPURAN, $\geq 99,8\%$, p.A.) und PBS⁴-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet. Der Puffer wurde im AK Heckel mit den folgenden Konzentrationen hergestellt: 1,4 mM KH₂PHO₄, 10 mM NaH₂PHO₄, 137 mM NaCl und 27 mM KCl.

4.2 Statische Absorptionsmessungen

4.2.1 Messungen im UV/vis-Bereich

Die Absorption der Proben im UV/vis-Bereich wird entweder mit dem Specord S600 oder dem Specord S100 Spektralphotometer der Firma Analytik Jena aufgenommen, deren

¹Dimethylformamid-Dimethylacetal

²Diisopropylethylamin

³4-(Dimethylamino)-pyridin

⁴Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)

Funktion jeweils auf der Diodenarraytechnik beruht. Diese Technik erlaubt das simultane Erfassen eines Wellenlängenbereiches von 200 bis 900 nm.

Eine Probenlösung wird so hergestellt, dass die Absorption der betrachteten Absorptionsbande im Bereich von 0,8 bis 1 OD in einer 1x1 cm Quarzglas-Küvette lag. Für Belichtungsexperimente wird die Probe über eine Belichtungseinheit angeregt, die eine 385 nm-LED (Thorlabs) beinhaltet, deren Licht über eine Linse auf eine Glasfaser fokussiert und dann auf die Probe geleitet wird. Die Belichtung erfolgte von oben, wobei die Küvette mit einer Quarzglasscheibe verschlossen wird. Während der Belichtungsdauer wird die Probe gerührt und die Temperatur bei 20° über ein Peltier-Element konstant gehalten.

4.2.2 Messungen im IR-Bereich

Die statischen IR-Messungen werden mittels des FTIR-Spektrometers VERTEX 80 der Firma Bruker aufgenommen. Die Probenkammer des Spektrometers wird während der Messung kontinuierlich mit Stickstoff gespült, um den Einfluss von Wasserdampf und Kohlenstoffdioxid zu minimieren. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in einem Wellenzahlbereich von 900-4000 cm^{-1} mit einer spektralen Auflösung von 2 cm^{-1} . Vor jeder Messung und jedem Probenwechsel wird die Probenkammer mindestens 30 Minuten gespült bevor mit einer Hintergrundmessung begonnen werden konnte. Zudem wird zu jeder Probe eine Lösungsmittelmessung durchgeführt.

Zur Probenvorbereitung werden zunächst 36 μL der Probenlösung auf ein Calciumfluorid-Fenster gegeben, anschließend ein Teflon®-Ring mit einer Dicke von 50 μm darüber platziert und dann ein zweites Fenster darauf gelegt. Damit die Probe dicht verschlossen war, wird der Teflon®-Ring mit einer PTFE-Paste (Carl Roth) eingefettet. Die Konzentrationen der Proben bewegten sich im mM-Bereich.

Für Belichtungsexperimente wird eine 385 nm-LED (Thorlabs) in die Probenkammer eingesetzt, wobei zu garantieren war, dass die Probe vollständig ausgeleuchtet wird. Um Absorptionsänderungen im IR-Bereich unter dem Einfluss der Belichtung zu messen, wird zunächst ein Spektrum ohne Lichteinfluss und dann im Abstand von 112 Sekunden wiederholt Spektren unter der LED-Belichtung aufgenommen bis keine Signaländerungen mehr zu beobachten waren. Die Spektren werden alle absolut zu einem zuvor aufgezeichneten Hintergrundspektrum gemessen. Eine Lösungsmittelkorrektur wird nicht vorgenommen.

4.3 Fluoreszenzmessungen

4.3.1 Statische Fluoreszenzmessungen

Die statische Emission der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen wird mit dem Spektralfluorimeter FP-8500 von Jasco Germany aufgenommen. Die Emission wird nach Anregung mit 388 nm gemessen, wobei die Fluoreszenz im Bereich von 300-800 nm in einer Schrittgröße von 2,5 nm mit einer Abtastgeschwindigkeit von 200 nm/min detektiert wird. Zu jeder Probe wird das entsprechende Lösungsmittel gemessen, um dessen Einfluss auf die Fluoreszenz berücksichtigen zu können. Um Reabsorptionseffekte zu minimieren, wird die Probenkonzentration so gewählt, dass die maximale Absorption der Probe kleiner als

0,1 OD entlang der 10 mm Seite der 1x10 mm Küvette war.

Zur Korrektur der Systemeigenschaften sowie der Reabsorption werden auf die aufgenommenen Fluoreszenzspektren die folgenden schrittweisen Korrekturen angewendet.

- 1. Basislinienkorrektur: Das unkorrigierte Spektrum wird einer Basislinienkorrektur unterzogen, indem ein Mittelwert $\overline{\lim} F_{min}$ in einem Spektralbereich ohne Emission gebildet und anschließend vom Rohspektrum $F_{Roh}(\lambda)$ subtrahiert wird. Auf diese Weise lassen sich Artefakte vermeiden.

$$F_{korr1}(\lambda) = F_{Roh}(\lambda) - \overline{\lim} F_{min} \quad (4.1)$$

- 2. Korrektur des Verlustes an Anregungsintensität: Hierbei wird berücksichtigt, dass die Anregungsintensität abhängig von der Wellenlänge aufgrund der Geräteparameter verschieden sein kann. Zudem muss beachtet werden, dass die Abfrage der Fluoreszenz in einem 90° Winkel zur Anregungsrichtung erfolgt und bis zur Abfrage typischerweise $\frac{d}{2}$ des Anrempulses zurückgelegt wird.

$$F_{korr2}(\lambda) = \frac{F_{korr1}(\lambda)}{10^{-A(\lambda_{ex}) \cdot \frac{l_{ex}}{d}}} \quad (4.2)$$

In Gleichung 4.2 entspricht $A(\lambda_{ex})$ dem Absorptionswert der Anregungswellenlänge, bezogen auf die Gesamtlänge der Küvette d und $\frac{l_{ex}}{d}$ Anteil am Lichtweg (d) in Anregungsrichtung bis zum Punkt der Detektion.

- 3. Korrektur der spektralen Eigenschaften des Detektorzweiges: Das bisher korrigierte Spektrum $F_{korr2}(\lambda)$ wird um die wellenlängenabhängige Empfindlichkeit des Detektors $D(\lambda)$ korrigiert.

$$F_{korr3}(\lambda) = \frac{F_{korr2}(\lambda)}{D(\lambda)} \quad (4.3)$$

- 4. Korrektur von Reabsorptionseffekte: Diese Korrektur in Gleichung 4.4 ist insbesondere wichtig, wenn Absorptions- und Emissionsspektrum der untersuchten Probe überlappen,

$$F_{korr4}(\lambda) = \frac{F_{korr3}(\lambda)}{10^{-A(\lambda) \cdot \frac{l_{em}}{b}}} \quad (4.4)$$

wobei $A(\lambda)$ das Absorptionsspektrum entlang der Seite d und $\frac{l_{em}}{b}$ Anteil der Strecke, bezogen auf den Lichtweg d , vom Aufnahmepunkt der Emission bis zum seitlichen Rand der Küvette ist.

4.3.2 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

Um Fluoreszenzlebensdauern im Nanosekundenbereich zu bestimmen, eignet sich die Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC⁵). Bei dieser Technik wird die Zeitdifferenz zwischen Anregung und Emission einer Probe mittels eines elektronischen Zählers gemessen. Pro Anrempuls wird ein emittiertes Photon in zeitlicher Korrelation zum

⁵Time Correlated Single Photon Counting - TCSPC

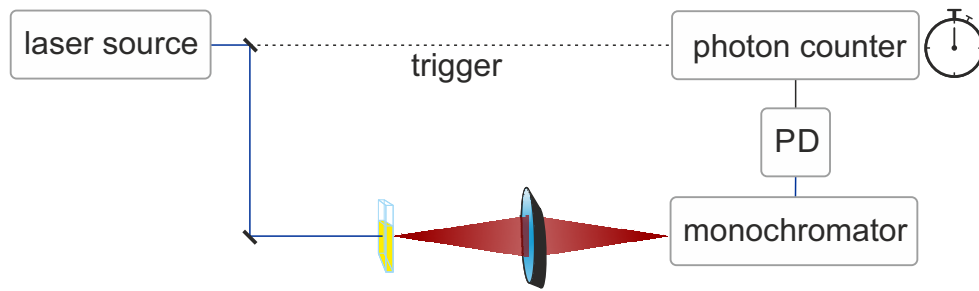


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Aufbaus zur TCSPC-Messung.

Anregpuls gezählt. Durch das mehrfache Wiederholen des Vorgangs resultiert am Ende der Messreihe ein Histogramm, in welchem die gezählten Photonen in Bezug zur zeitlichen Differenz eingeordnet sind. Der Abbildung 4.1 ist zu entnehmen, dass ein Laserpuls sowohl als Anregpuls als auch als Startsignal für die Messung fungiert, wobei das Signal an eine Zähllektronik weitergeleitet wird. Das von der Probe emittierte Photon wird zunächst mit einem Farbglasfilter vom Anregpuls abgetrennt, dann mittels eines Off-Axis Paraboloidspiegels (Janos Technologies, A8037-205) aufgefangen und auf einen Doppelmonochromator (Jobin-Yvon D3- 180 Gemini, Gitter 530 22 XXX, 330 nm holographic blaze) geleitet. Anschließend trifft das Fluoreszenzlicht auf einen Photomultiplier (Becker & Hickl PMC 100-4) und das Photosignal wird an eine computergesteuerte TCSPC-Karte (Becker & Hickl, MSA-1000) mit 1024 Kanälen bei maximaler Zeitauflösung von einer Nanosekunde weitergeleitet. Die Auflösung ist bedingt durch die zeitliche Auflösung der Laserpulse sowie durch die Dauer der Signalverarbeitung der Messelektronik. Zudem muss bei der Auswertung die Entfaltung der Instrumentenantwort⁽⁶⁾ berücksichtigt werden, wobei die IRF anhand einer Lösungsmittelmessung (DMSO) bestimmt wird. Durch eine wiederholte Messung wird eine statistische Verteilung der Fluoreszenzlebensdauern erhalten, die einem Abfall der Fluoreszenzintensität entspricht. Die Probenlösung wird in 1x10 mm Quarzglas-küvetten gemessen, wobei eine Konzentration von etwa 0,1 mM gewählt wird.

Die Datenanalyse erfolgt mit dem auf Matlab basierten Programm Tcspcfit von J. Enderlein und R. Erdmann [184]. Bei der Auswertung ist eine multiexponentielle Fitanalyse der Daten im Vergleich zur aufgenommenen IRF möglich. Das Programm macht sich zur schrittweisen Anpassung ausgehend von einer abgeschätzten Lebensdauer den Nelder-Meade Algorithmus zu nutze, wobei die Güte des Fits anhand der Größe der kleinsten Fehlerquadrate abgelesen werden kann. Eine ausführlichere mathematische Beschreibung kann der folgenden Quelle entnommen werden [184].

Als Laserquelle diente hier ein Spectra-Physics Tsunami-Spitfire-System, wobei eine genaue Beschreibung dieses Systems der Dissertation von N. Gildenhoff entnommen werden kann [185]. Die Laserfundamentale von 775 nm wird über einen SHG-Prozess in die Anregungswellenlänge von 388 nm umgewandelt.

⁶Instrument Response Function - IRF

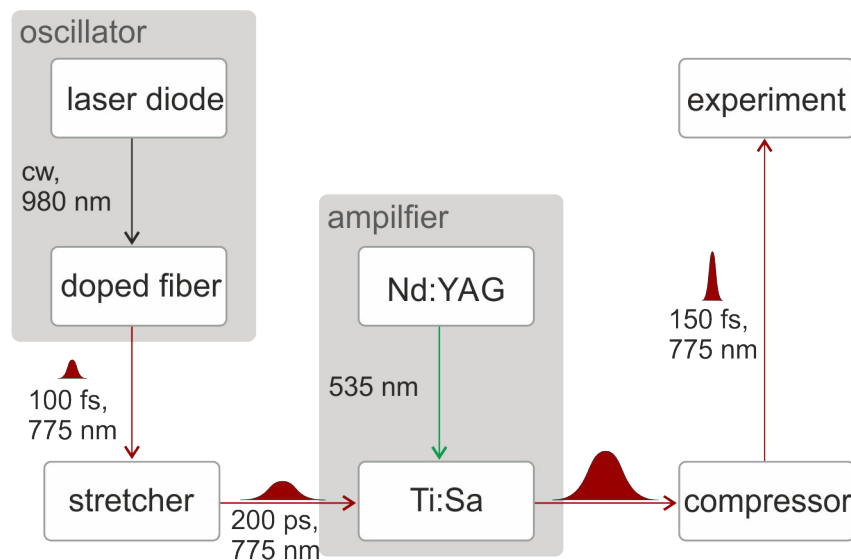


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Clark MXR/CPA2001.

4.4 Femtosekundenlaserspektroskopie

4.4.1 Femtosekundenlaserquelle

Für die Erzeugung der Femtosekundenlaserpulse wird ein Clark-MXR CPA 2001 für IR-Messungen bzw. ein Clark-MXR CPA 2010 für die UV/vis-Messungen verwendet. Beide Lasersysteme bestehen aus den in Abbildung 4.2 dargestellten Komponenten: Laserdiode, Faseroszillator, Strecker, Nd:YAG, Regenerativer Verstärker und Kompressor. Die Laserdiode ist ein Halbleiterlaser (InGaAs⁷) und liefert bei einer Wellenlänge von 980 nm eine Leistung von 160 mW. Das so erzeugte Licht wird über eine Faserverzweigung in den Faseroszillator geleitet, wodurch im erbiumdotierten (Er^{3+}) aktiven Medium eine Besetzungsinversion induziert wird. Der Oszillator besteht neben der dotierten auch aus einer undotierten Faser sowie einer Freistrahlstrecke, die wiederum aus verschiedenen Komponenten besteht, um eine additive Puls-Modenkopplung zu ermöglichen. Die Modenkopplung basiert hierbei auf der nichtlinearen Polarisationsdrehung von Wellenplatten ($\frac{\lambda}{2}$ - und $\frac{\lambda}{4}$ -Plättchen), wodurch nur Laserstrahlen mit sehr hohen Intensitäten transmittiert werden und ein Pulsbetrieb ermöglicht wird. Die Pulse besitzen eine Pulsdauer von 100 fs sowie eine Zentralwellenlänge von 1550 nm und werden in einem Lithiumniobat-Kristall (PPLN⁸) auf eine Wellenlänge von 775 nm frequenzverdoppelt. Bevor die Pulse in den Verstärker geleitet werden, ist eine Streckung der Pulse nötig, um eine Zerstörung der Optiken durch zu hohe Intensitäten auszuschließen. Mithilfe eines Gitterpulssteckers werden die Pulsdauern auf circa 200 ps zeitlich gedehnt, sodass eine Abschwächung der Pulse um den gleichen Faktor resultiert. Dieser zeitlich gedehnte Puls wird dann als *Seed*-Puls in den regenerativen Verstärker eingekoppelt, wo dieser auf einen frequenzverdoppelten *Pump*puls trifft, der mittels eines Nd:YAG⁹-Laser generiert wird. Dieser Laser basiert auf einem Nd:YAG-Kristall, der durch eine Blitzlampe mit kontinuierlicher Emission gepumpt

⁷Indiumgalliumarsenid

⁸periodisch gepolter Lithiumniobat

⁹Neodym:Yttrium-Aluminium-Granat

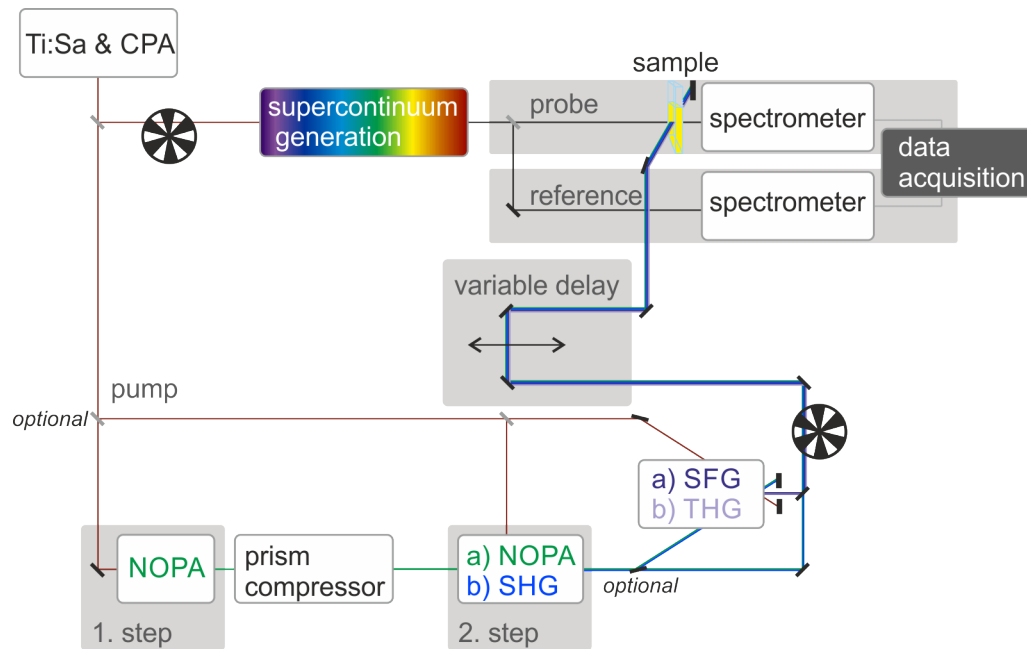


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des Aufbaus für transiente UV/vis-Messungen im Femtosekundenbereich mit referenzierter Abfrage.

wird. Das so erzeugte Laserlicht mit der Wellenlänge 1064 nm wird dann mithilfe eines KTP¹⁰-Kristalls auf 532 nm verdoppelt. Im Resonator befindet sich ein akusto-optischer Piezokristall, wodurch eine Güteschaltung realisiert wird. Der akusto-optische Modulator erzeugt eine stehende akustische Welle, welche zu hohen Beugungsverlusten im Resonator des Nd:YAG-Lasers führt und die Resonatorgüte reduziert. Durch das Ausschalten des Modulators erhöht sich sofort die Resonatorgüte, die Besetzungsinversion wird ausgenutzt und der Resonator kann nach Passieren des Verdopplerkristalls in Richtung des regenerativen Verstärkers verlassen werden. In diesem Verstärker ist ein Titan-Saphir-Kristall das aktive Medium, sodass die Energie des zeitlich gestreckten Oszillatordpulses um einen Faktor von 10^6 erhöht wird. Für eine erfolgreiche Verstärkung ist eine präzise zeitliche Abstimmung des *Seed-* und *Pumppulses* notwendig. Dies wird durch eine Pockelszelle ermöglicht, die mit einer Taktrate von 1 kHz betrieben wird und die Polarisation des transmittierten Lichtes abhängig von der angelegten Spannung drehen kann. Die Besetzungsinversion wird im Ti:Sa Medium generiert, wobei die Pockelszelle den *Seedpuls* an der Einkopplung in den Resonator hindert, um eine spontane Laseremission zu umgehen. Hat sich die Besetzungsinversion aufgebaut, wird der *Seedpuls* eingekoppelt und simultan der Resonator geschlossen. Innerhalb weniger Resonatorumläufe kann der Puls dann die Besetzungsinversion abräumen, sodass die gewünschte Verstärkung der Pulse resultiert. Die verstärkten Pulse können durch eine erneute Polarisationsdrehung den Resonator verlassen, wobei ein Zurücklaufen der Pulse in den Strecker durch einen sogenannten Faraday Rotator verhindert wird. Nach der Auskopplung aus dem regenerativen Verstärker wird der Puls durch einen Gitterkompressor auf eine Pulsdauer von circa 170 fs komprimiert.

¹⁰Kaliumtitanylphosphat

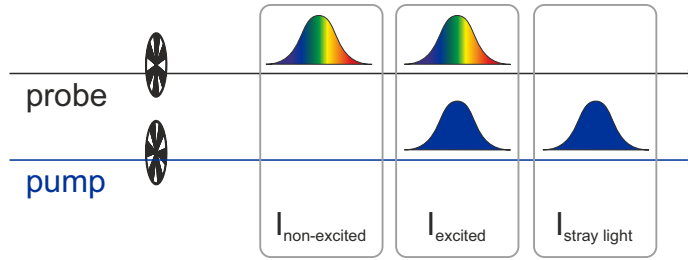


Abbildung 4.4: Aus dem Einsatz eines Unterbrecherrades im Strahlengang des Anreg- sowie des Abfragepulses resultierendes Pulsschema.

4.4.2 UV/vis

Die Femtosekunden zeitaufgelösten Absorptionsmessungen im UV/vis-Bereich werden an der in Abbildung 4.3 gezeigten Anlage durchgeführt, die von L. Dworak aufgebaut wurde. Der Fundamentalpuls mit der Wellenlänge 775 nm wird zunächst in einen Anreg- und einen Abtastpuls aufgeteilt. Im Anschluss passiert der Abtastpuls ein Unterbrecherrad, sodass die Pulse entsprechend Abbildung 4.4 geblockt werden. Anschließend wird der Puls in einen CaF_2^{11} -Kristall fokussiert, um ein Superkontinuum-Weißlicht zu generieren. Das erzeugte Weißlicht wird dann aufgeteilt, wobei ein Anteil zur Abfrage durch die Probe und der Andere zur Referenzierung der Messung an der Probe vorbei geleitet wird, um ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Beide Pulse werden je auf ein Spektrometer mit 64 Kanälen zur Datenerfassung geleitet. Zur Probenanregung wird der Fundamentalpuls dann individuell zur gewünschten Wellenlänge konvertiert. In dieser Arbeit wird ein Anrempuls der Wellenlänge 388 nm verwendet, der durch einen SHG-Prozess des Fundamentalpulses in einem BBO-Kristall ($d=0,5$ mm; $\theta=30^\circ$) generiert wird. Zur zeitlichen Kompression der Pulse wird der Anrempuls über einen Prismenkompressor geleitet. Zudem befindet sich auch im Strahlengang der Anregung ein Unterbrecherrad, sodass für dieses Experiment insgesamt ein Pulsschema gemäß Abbildung 4.4 resultiert. Zur zeitlichen Verzögerung des Anrempulses gegenüber dem Abtastpuls wird der Anrempuls über eine räumlich variable Verzögerungsstrecke geleitet. Mithilfe eines $\frac{\lambda}{2}$ -Plättchens wird die Polarisation des Anrempulses um $54,7^\circ$ im Vergleich zum Abtastpuls gedreht, um polarisationsbedingte Anisotropie zu vermeiden. Anschließend treffen die beiden Pulse am Probenort aufeinander, wobei darauf zu achten ist, dass der Strahldurchmesser des Abtast- im Vergleich zum Anrempuls kleiner ist, um zu garantieren, dass nur die jeweils homogen angeregte Probe abgetastet wird. Die Daten werden mit dem auf einer globalen Lebensdaueranalyse (GLA) basierenden Programm OPTIMUS von C. Slavov analysiert [186]. Als Näherung wird ein multiexponentielles Model an die Daten angepasst, das folgende mathematische Form hat:

$$S(\lambda_{pump}, \lambda_{probe}, t) = \sum_{i=1}^N A_i(\lambda_{probe}, \lambda_{pump} \tau_i) \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right) \quad (4.5)$$

wobei N der endlichen Anzahl der Zerfallskomponenten, A den wellenlängenabhängigen Amplituden und τ den respektiven Lebensdauern entspricht. Das Ergebnis der Anpassung

¹¹Calciumfluorid

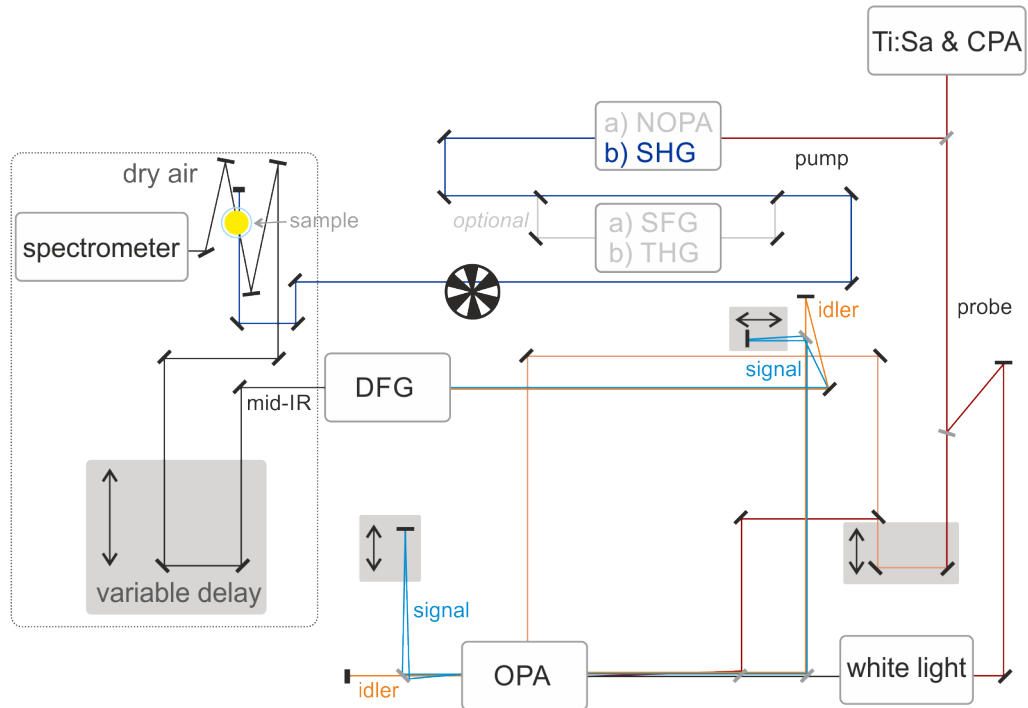


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung des Messaufbaus für Femtosekundspektroskopie im IR-Bereich.

ist ein zerfallsassoziiertes Spektrum (DAS¹²), in dem die Amplituden als Funktion der detektierten Wellenlänge dargestellt sind und diese den Einfluss einer jeden Lebensdauer auf das gemessene Spektrum zeigen. Die Zerfallsfunktion ist mit einer idealisierten IRF gefaltet, die durch eine Gaußsche Fehlerfunktion dargestellt ist. Die aus der Anpassung erhaltene Breite der IRF wird zur Bestimmung der zeitlichen Auflösung des Experiments herangezogen. Typischerweise wird mit einer maximalen Zeitauflösung von 100 fs gemessen. Die gemessenen Transientenkarten werden um den *Chirp* des Abfragepulses korrigiert und der Zeitnullpunkt mittels eines Polynomenfits angepasst. Das aus der Messung resultierende kohärente Artefakt wird mit einer Gaußfunktion sowie deren erster und zweiter Ableitung simuliert und dann von den gemessenen Daten subtrahiert [187, 188]. Alle hier gezeigten Daten werden um die genannten Einflüsse korrigiert.

4.4.3 IR

Die in Abbildung 4.5 schematisch dargestellte IR-Anlage wurde von K. Neumann aufgebaut [189]. Die Erzeugung der Anregepulse beruht auf ähnlichen Geometrie, wie bereits für die sichtbare Anlage beschrieben, sodass sich hier besonders auf die Erzeugung der Abtastpulse im mittleren Infraroten konzentriert wird. Die Abtastpulse werden mittels eines zweistufigen OPA-Prozesses mit anschließender Differenzfrequenzerzeugung generiert, wie von Hamm et al. beschrieben [190]. Der Fundamentalpuls wird zunächst in einen Strahlengang für den Anrege- und einen Abtastpuls aufgeteilt. Daraufhin wird der Fundamentalpuls im Abtastpuls erneut in zwei Strahlengänge geteilt, wobei ein Teil zur Weißlichterzeugung

¹²Decay Associated Spectra - DAS

in einen Saphirkristall fokussiert wird. Der andere Teil wird zunächst über eine variable Verzögerungsstrecke geführt und dann weiter aufgeteilt, sodass er jeweils als Pumpimpuls in dem OPA-Kristall fungieren kann. Für die erste Stufe des OPA wird das zuvor erzeugte Weißlicht als *Seedimpuls* und der Fundamentalimpuls als *Pumpimpuls* in einen BBO-Kristall fokussiert, um einen OPA-Prozess gemäß der Typ II Phasenanpassung zu realisieren. Aus diesem Prozess entstehen ein *Signalimpuls* und *Idlerimpuls*, der nicht weiter benötigt und deshalb entfernt wird. Der *Signalimpuls* ist über die Kristallorientierung in einem Bereich von 1,2 bis 1,45 μm durchstimmbare und wird zunächst über eine variable Verzögerungsstrecke geleitet. Anschließend wird der *Signalimpuls* zurück in den BBO-Kristall fokussiert, wo dieser mit dem Fundamentalimpuls überlagert wird, um den zweiten OPA-Prozess zu induzieren. Die daraus entstehenden *Signalimpuls* und *Idlerimpuls* werden mithilfe eines dichroitischen Spiegel getrennt. Der *Signalimpuls* wird dann über eine variable Verzögerungsstrecke geleitet und dann wieder mit dem *Idlerimpuls* in einen AgGaS_2 ¹³ Kristall zur Generierung der Differenzfrequenz fokussiert und überlagert. Das nun entstandene mittlere infrarote Licht ist in einem Bereich von 3 bis 10 μm durchstimmbare. Der Abtastimpuls wird dann durch einen Germaniumfilter zur Entfernung von verbliebenen Anteilen des *Signalimpulses* und *Idlerimpulses* in eine abgeschlossene Box geleitet, die mit trockener CO_2 -freier Luft gefüllt ist. Diese Trockenluft wird durch einen Spülgasgenerator von Typ PG85L (CMC Instruments, Eschborn) durch die Reinigung von Druckluft in Molekularsieben erzeugt, wodurch der Einfluss von dem in der Luft befindlichem Wasserdampf als Störfaktor bei der Messung minimiert wird. Obwohl die schmalen Absorptionsbanden der Rotationsschwingung des Gases spektral nicht aufgelöst werden, führt die Absorption dieser diskreten Linien zur Veränderung des Spektrums und zur Modulation des zeitlichen Verlauf des Abtastimpulses. Zudem wird durch die Absorption von Wasserdampf eine kohärente Polarisation und somit ein freier Induktionszerfall induziert. Hierbei wird MIR-Licht emittiert, welches wiederum absorbiert werden kann. Die abgestrahlten Wellen können zu verschiedenen Zeiten an unterschiedlichen Orten interferieren, wodurch ein komplexer Pulszug generiert wird. Aufgrund der geringen Linienbreiten der Rotationsübergängen in Gasen sind deren T_2 -Zeiten relativ groß, sodass die abfallende Flanke des Pulses um einige zehn Pikosekunden verzerrt werden können. Über eine weitere variable Verzögerungsstrecke wird dann die zeitliche Verzögerung zum Anregimpuls realisiert, wobei die beiden Pulse dann am Probenort aufeinander treffen. Der Abtastimpuls wird dann in das Spektrometer Sure-Spectrum 250is (CHROMEX, Albuquerque, USA) mit einem MCT¹⁴-Detektor geleitet, der 32 Messkanäle zur Verfügung stellt. Es kann in einem Spektralbereich von $<1 \mu\text{m}$ bis etwa 13 μm mit einer maximalen Empfindlichkeit von 12 μm gemessen werden.

Die Datenanalyse wird mit dem auf der Skriptsprache IDL beruhenden Programmpaket z20 von I. Lutz und S. Spörlein durchgeführt [191, 192]. Zunächst werden die einzelnen Durchläufe der Messung gemittelt und daraufhin der zeitliche Nullpunkt korrigiert. Zur weiteren Auswertung der transienten Spektren wird anhand Gleichung 4.6 eine globale Fitanalyse ausgeführt, wobei die Daten eine Summe aus n exponentiellen Zerfallsfunktionen entwickelt werden. Die Zerfallsfunktion ist dabei mit der Apparatefunktion gefaltet, welche

¹³Silberthiogallat

¹⁴Mercury-Cadmium-Telluride (Quecksilber-Cadmium-Tellurid)

durch die Fehlerfunktion $erf(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt$ dargestellt wird.

$$\Delta A(\tilde{\nu}, t) = \sum_{i=1}^N A_i(\tilde{\nu}) \exp\left(\frac{w^2(\tilde{\nu})}{4\tau_i^2} - \frac{t}{\tau_i}\right) \left[\frac{1}{2} erf\left(\frac{t}{w(\tilde{\nu} - \frac{w(\tilde{\nu})}{2\tau_i})}\right) + \frac{1}{2} \right] \quad (4.6)$$

In Gleichung 4.6 entspricht w der Kreuzkorrelationsbreite der gaußförmigen Pulse. Ausgehend von einer gegebenen Anzahl an Zeitkonstanten N wird ein nichtlinearer Levenberg-Marquart-Algorithmus angewendet, der die Summe der quadratischen Abweichungen für alle Zeiten t_i sowie Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ gleichzeitig minimiert. Das Ergebnis stellen dann die global optimierten Zeitkonstanten τ_i und die dazugehörigen wellenzahlabhängigen Amplituden $A_i(\tilde{\nu})$ dar.

Kapitel 5

Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der quantenmechanischen und spektroskopischen Charakterisierung von DEACM-Puromycin sowie des korrespondierenden Photoproduktes DEACM-OH vorgestellt und diskutiert. Zunächst erfolgt dabei die Auswertung der quantenmechanischen Studie der Cumarin-geschützten Verbindung im Hinblick auf die elektronischen Molekülzustände im Grundzustand und angeregten Zustand. Des Weiteren folgt eine Untersuchung der photophysikalischen Eigenschaften anhand von statischen Messungen der Absorption und der Fluoreszenz im UV/vis-Bereich. Im Zusammenspiel mit zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen ist dadurch ein Einblick in die ersten Schritte der photoinduzierten *Uncaging*-Reaktion gegeben. Die Dynamik auf der Femtosekunden- bis Nanosekunden-Zeitskala wurde mittels Anreg-/Abtast-Spektroskopie verfolgt und trägt zu einem erweiterten Bild des Reaktionsschemas bei. Durch eine Kombination der IR-Absorptionsmessungen und den DFT-Rechnungen konnte ein eindeutiger Nachweis für das erfolgreiche *Uncaging* gegeben werden.

In dieser Arbeit gelang es, den Reaktionsmechanismus, welcher in der Literatur von Schade *et al.* für Cumarin-Ester etabliert wurde [141], auf Cumarine mit Carbamat-Linker zu adaptieren und somit ein detailliertes Bild für den *Uncaging*-Prozess von DEACM-Puromycin zu entwickeln [138]. Zudem wurde die biologische Anwendbarkeit von DEACM-Puromycin in Zellen nachgewiesen. Der hier verwendete *cage* zeichnet sich durch verbesserte photochemische bzw. -physikalische Eigenschaften gegenüber dem bereits etablierten NVOC-Puromycin aus, sodass zukünftig DEACM-Puromycin bei Anwendungen in biologischen Systemen zu bevorzugen ist.

5.1 Elektronische Zustände von DEACM-Puromycin und DEACM-OH

5.1.1 Quantenmechanische Rechnungen

Um eine vollständige Charakterisierung der elektronischen Zustände des Cumarin-geschützten Systems zu erhalten, wurden DFT-Rechnungen auf dem Theorielevel von B3LYP unter Verwendung des cc-pVDZ-Basissatzes mit dem Programmpaket Gaussian09 [193] durch-

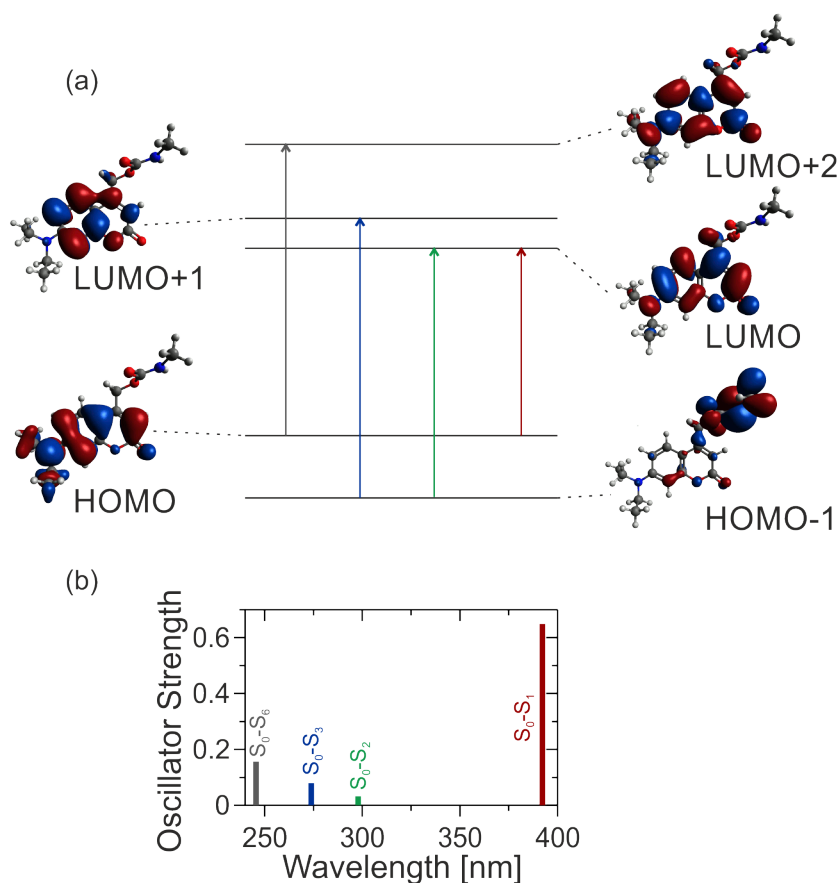


Abbildung 5.1: Ausgewählte Molekülorbitale, die an elektronischen Übergängen beteiligt sind. Es sind jeweils die Hauptbeiträge der Übergänge dargestellt (a). Oszillatorstärken der Übergänge in Abhängigkeit von der Wellenlänge (b).

geführt. Auf das System wurde ein implizites Lösungsmittelmodell mithilfe von CPCM¹ in Form von DMSO angewendet. Zur Vereinfachung des Systems wurde das Puromycin-Gerüst durch eine Methylcarbamat-Funktion ersetzt. Bereits von Landgraf *et al.* wurde nachgewiesen, dass die strukturellen Eigenschaften des Biomoleküls keinen Einfluss auf die elektronischen Zustände haben [112], sodass die Substitution von Puromycin durch die Methylcarbamat-Funktion gerechtfertigt ist. Aus den Berechnungen geht hervor, dass nach vertikaler Anregung der energieärmste angeregte Zustand im Singulett gemäß eines S_0-S_1 -Übergangs mit einem $\pi-\pi^*$ -Charakter besetzt wird. Der Übergang erfolgt bei 3,10 eV mit einer Oszillatorstärke von 0,649 und entspricht einem reinen HOMO-LUMO-Übergang (siehe Abbildung 5.1). Es handelt sich um den Übergang mit der größten Oszillatorstärke des Systems. Alle Molekülorbitale (MOs), die zum HOMO beitragen, sind über das aromatische Cumarin-Gerüst sowie den 7-Diethylaminosubstituenten lokalisiert. Das ausgedehnte π -System erklärt somit das im Vergleich zu anderen Cumarin-Derivaten bathochrom verschobene Absorptionsmaximum. Ein ähnliches Verhalten wurde von Bourbon *et al.* gezeigt [194]. Der Anteil des Substituenten am LUMO ist geringer ausgeprägt. Infolge einer Anregung in den S_1 -Zustand scheint ein Ladungstransfer der Amino-Einheit auf das Cumarin-Gerüst möglich zu sein. Im Gegensatz zum HOMO sind am LUMO auch MOs

¹Conductor-like Polarizable Continuum Model

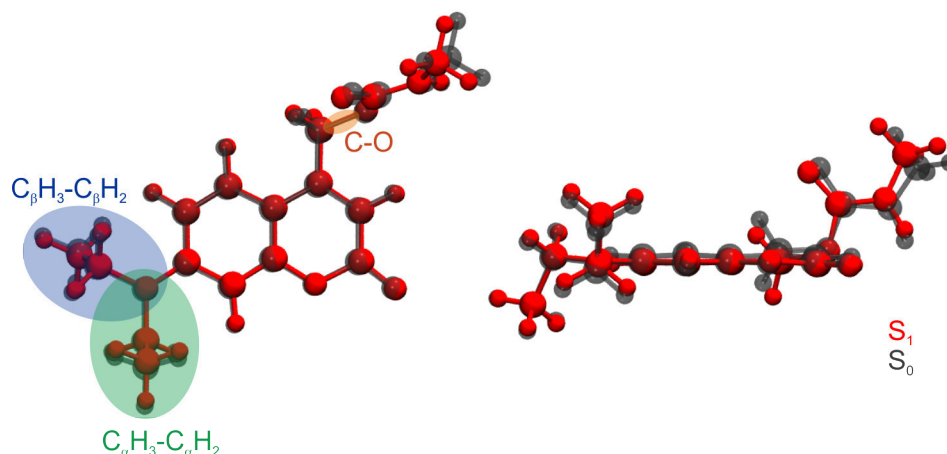


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der geometrieoptimierten Strukturen des S_0 - (grau) und des S_1 -Zustandes (rot) aus verschiedenen Perspektiven. Zur Veranschaulichung sind die nach Photoanregung gesplattene C-O-Bindung (orangefarben) sowie die beiden Ethylketten des 7-Diethylamino-Substituenten farblich hervorgehoben, wobei die Ethylketten in α (grün) und β (blau) unterschieden sind.

des 4-Substituenten beteiligt.

Der zweite angeregte Zustand mit einer Energie von 4,1 eV wird nach einem HOMO-1-LUMO-Übergang besetzt und besitzt eine Oszillatorstärke von 0,027. Aus einem HOMO-1-LUMO+1-Übergang resultiert der dritte angeregte Zustand bei 4,40 eV mit einer Oszillatorstärke von 0,096. Bemerkenswert ist, dass das HOMO-1 hauptsächlich entlang des 4-Substituenten lokalisiert ist, sodass eine Anregung in die beiden genannten Zustände eine Elektronendichteverschiebung des Substituenten auf das Coumarin-Gerüst zur Folge hätte. Die beiden nächsten Übergänge sind aufgrund einer Oszillatorstärke kleiner als 0,005 verboten. Allerdings weist der Übergang in den sechsten angeregten Zustand eine Oszillatorstärke von 0,154 bei 4,91 eV auf, wodurch in Überlagerung mit dem S_2 - und S_3 -Zustand die UV-Absorption von diesem Coumarin-Derivat erklärt werden kann. Der Übergang entspricht einem HOMO-LUMO+2-Übergang.

Da es sich bei dem S_0 - S_1 -Übergang um den Übergang mit der größten Oszillatorstärke handelt, wurden die Geometrien der beiden Zustände weitergehend analysiert, sodass zunächst eine Geometrieoptimierung der genannten Zustände durchgeführt wurde. Als Resultat zeigte sich, dass im Grundzustand das Coumarin-Gerüst sowie der Stickstoff der 7-Diethylamino-Substituenten in einer Ebene liegen (siehe Abbildung 5.2). Die beiden Ethylketten dieses Substituenten ragen dabei aber aus dieser Ebene heraus, wobei sie sich so entgegengesetzt zueinander anordnen, dass sie den größtmöglichen Abstand einnehmen können. Im ersten angeregten Zustand sind die Ethylgruppen im Vergleich zur Grundzustandsstruktur leicht verdreht. Zudem wurde beobachtet, dass die infolge der Photoreaktion zu splattende C-O Bindung im angeregten Zustand um 8% länger ist als im Grundzustand, was bereits eine potentielle Abspaltung andeutet. Sehr signifikant ist die Differenz der Dipolmomente der beiden Zustände. Während im Grundzustand ein Dipolmoment von 7,62 D vorliegt, besitzt der S_1 ein Dipolmoment von 13,99 D. Eine Erklärung hierfür könnte eine Umverteilung der Elektronendichte nach Anregung sein [138]. Dieser signifikante Unterschied

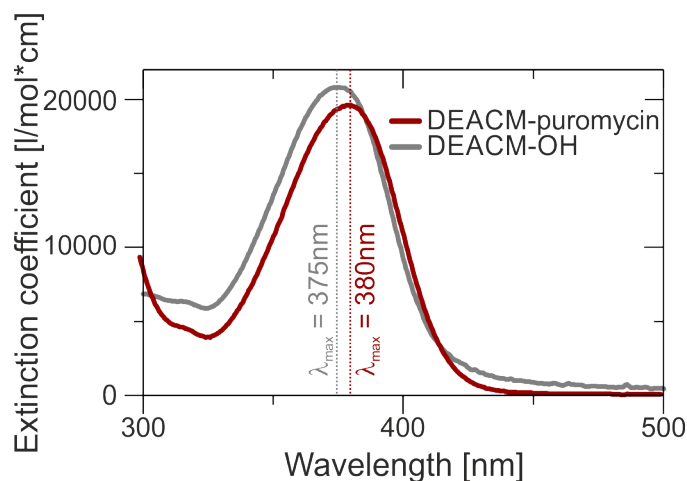


Abbildung 5.3: Absorptionsspektrum von DEACM-Puromycin (rot) und reinem DEACM-OH (grau).

in der Polarität der beiden Zustände wird im Weiteren durch eine Lösungsmittelstudie experimentell untersucht, da durch ein polares Lösungsmittel eine Stabilisierung des S_1 -Zustandes zu erwarten wäre, die sich in einem UV/vis-Spektrum in einer Verschiebung zu kleineren Energien äußert.

5.1.2 UV/vis-Absorption

Das Absorptionsspektrum des Cumarin-Alkohols DEACM-OH ist dominiert von einem Absorptionsmaximum bei 375 nm (siehe Abbildung 5.3). Diese Absorptionsbande resultiert aus einem π - π^* -Übergang, welcher im Vergleich zu anderen Cumarin-Derivaten bathochrom verschoben ist. Da diese Bande auch zur Anregung der geschützten Verbindung genutzt wird, ergibt sich im Hinblick auf biologische Anwendungen die Möglichkeit einer Initiierung der Photoreaktion mit einer Wellenlänge größer als 380 nm hilft etwaige Photoschäden einer Probe infolge von UV-Absorption zu minimieren. Reines Puromycin absorbiert bei 280 nm, wobei die Absorption von der Adenosin-Einheit verursacht wird, sodass eine Anregung oberhalb von 380 nm keine Schädigung des Puromycins auslösen sollte.

Das Absorptionsspektrum von DEACM-Puromycin geht nicht aus einer exakten Überlagerung der beiden Einzelkomponenten hervor, da das Absorptionsmaximum von DEACM-Puromycin gegenüber dem reinen DEACM-OH um 5 nm rotverschoben ist. Diese energetische Absenkung scheint durch den Carbamat-Linker der geschützten Verbindung induziert zu sein, indem eine Ausweitung des π -Systems aufgrund des freien Elektronenpaares des Sauerstoffs aus dem Carbamat-Linker herbeigeführt wird. Dennoch kann aus den Spektren abgelesen werden, dass sich Photoprodukt und DEACM-Puromycin in ihrer UV/vis-Absorption nur marginal unterscheiden. Diese geringen Absorptionsunterschiede erhöhen die Schwierigkeit der Detektion des *Uncagings* im UV/vis-Bereich.

Das Absorptionsverhalten in verschiedenen Lösungsmittelzusammensetzungen wurde untersucht, indem schrittweise der Anteil an protischem Lösungsmittel mithilfe von PBS erhöht wurde (Tabelle 5.1). Es zeigt sich, dass sowohl DEACM-Puromycin als auch DEACM-

Tabelle 5.1: Absorptionsmaxima von DEACM-Puromycin und DEACM-OH in verschiedenen Lösungsmittelzusammensetzungen.

Verbindung	λ_{max} [nm]		
	DMSO	DMSO/PBS 4:1	DMSO/PBS 2:1
DEACM-Puromycin	380	386,5	389,5
DEACM-OH	375	379,5	383,5

OH eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums in Gegenwart eines protischen Lösungsmittels erfahren, wobei dieser Effekt aus der gemeinsamen Cumarin-Struktur resultiert. Die bathochrome Verschiebung belegt eine Stabilisierung des angeregten Zustands, die infolge einer intermolekularen Wasserstoffbrückenbindung zwischen Wassermolekülen des Lösungsmittels und dem Carbonyl-Sauerstoff des Cumarins auftritt [195].

Eine Belichtung mit 385 nm führt gemäß Abbildung 5.4 zu einer Absorptionsabnahme von DEACM-Puromycin bei 380 nm, was neben der Absorptionzunahme im Bereich der Puromycin-Bande bei 280 nm auf ein erfolgreiches Entschützen der Probe hindeutet. Es sind zwei eindeutige isosbestische Punkte bei 330 nm und bei 414 nm zu identifizieren, die auf ein Zweizustandssystem hindeuten. Der isosbestische Punkt entspricht dem spektralen Punkt im Ensemble aller Einzelspektren an dem Edukt und Produkt den gleichen Extinktionskoeffizienten unabhängig von der gegenwärtigen Gleichgewichtslage aufweisen. Das Auftreten mehrerer isosbestischer Punkte deutet an, dass die Reaktionspartner bei zwei Wellenlängen den gleichen Extinktionskoeffizienten aufweisen.

Die Reaktionslösung färbt sich infolge der Belichtung gelblich, was durch die entstehende Bande bei 450 nm bewirkt wird. Diese Absorptionsbande lässt sich nicht durch das simultan entstehende Produkt DEACM-OH erklären, welches durch HPLC²-Spektren sowie anschließender Massenanalyse von Isam Elamri als Hauptprodukt nachgewiesen wurde [138]. Zudem wurde DEACM-OH auch in zuvor publizierter Literatur als das Hauptprodukt bei der Belichtung von Cumarin-geschützten Estern [134, 142, 147, 196, 197] identifiziert. Das hier entstehende Photoprodukt wurde auch bei der UV-Belichtung von anderen DEACM geschützten Verbindungen beobachtet [198]. Van Wilderen *et al.* weisen dabei daraufhin, dass eine groß spektrale Ähnlichkeit zwischen dem Photoprodukt und dem Cumarin-Aldehyd vorliegt. Jedoch wurden bei Belichtungsexperimenten im IR-Bereich die Entstehung einer Carbonylschwingung nicht beobachtet, was aufgrund der zusätzlichen Carbonylschwingung des Cumarin-Aldehyds aber zu erwarten wäre. Begründet wurde dies mit einem geringen prozentualen Anteil an Cumarin-Aldehyd nach Belichtung. Eine eindeutige Identifikation des Photoprodukts liegt nicht vor, sodass weitere Analysen unternommen wurden. Das Produkt ist über mehrere Tage in Lösung stabil, sodass ausgeschlossen werden kann, dass es sich um eine reaktive Spezies handelt. Um zu untersuchen, ob ein ähnliches Produkt infolge der UV-Belichtung von dem reinen Cumarin-Alkohol DEACM-OH entsteht, wurde auch dieses entsprechend belichtet. Hierbei wurde keine Absorptionzunahme im Bereich von 450 nm beobachtet, vielmehr wurden keine signifikanten Absorptionsände-

²High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)

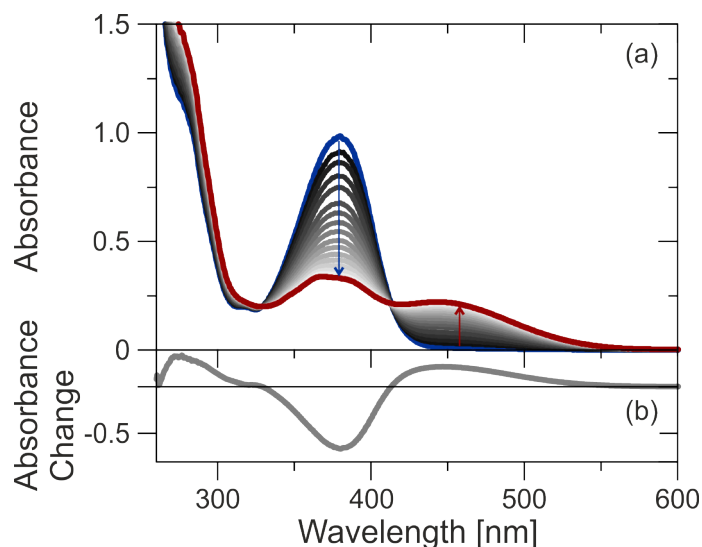


Abbildung 5.4: Reaktionsspektren infolge der 385 nm-Belichtung (12 mW für 1000s) von DEACM-Puromycin in DMSO, wobei das Startspektrum in Blau und das Spektrum nach 1000 s in Rot dargestellt ist (a) Die Spektren wurden im Abstand von 60 s aufgenommen. Differenzspektrum aus dem Spektrum vor und nach Belichtung (b).

rungen im untersuchten Spektralbereich zwischen 200-800 nm detektiert.

Der Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung auf das beobachtete Phänomen wurde analysiert, indem DEACM-Puromycin in verschiedenen Anteilen an wässriger Lösung belichtet wurde. Aus dieser Untersuchungsreihe geht hervor, dass in allen Lösungsmittelzusammensetzungen eine Abnahme der DEACM-Puromycin Konzentration zu beobachten war, aber mit steigendem Wasseranteil wesentlich weniger von der Spezies mit der Absorption bei 450 nm gebildet wird oder diese instantan weiterreagiert. Kamatham *et al.* beschreiben die Entstehung eines durch die Belichtung generierten DEACM-Carbokations, welches erst im Überschuss von Wasser reagiert [199]. Hierdurch würde jedoch nicht zwangsläufig die Absorption bei 450 nm zu erklären sein. Eine weitere Analyse mittels HPLC und Massenspektrometrie deutet aufgrund einer zweifachen Masse dieses Photoproduktes von DEACM-OH auf die photoinduzierte Dimerisierung nach Ausbildung des Carbokations mit DEACM-OH hin. Dass sich in einem Lösungsmittel mit höherem Wasseranteil weniger von dem Photoprodukt mit der Absorption bei 450 nm bildet, spricht dafür, dass das Carbokation in Gegenwart von Wasser bevorzugt zu DEACM-OH reagiert. Anscheinend stehen die Dimerisierung und die Hydratation zur Bildung von DEACM-OH in Konkurrenz zueinander. Für die Freisetzung des Biomoleküls scheint die Art der Reaktion des *cages* zunächst unerheblich, da sie sich gemäß Abbildung 5.5 nach der Abspaltung des Puromycins ereignet. Sowohl in aprotischem Lösungsmittel als auch in Wasser wurde die erfolgreiche Freisetzung von Puromycin beobachtet [138].

5.1.3 Fluoreszenz

Zur Analyse der Fluoreszenzeigenschaften der geschützten Verbindung wurde die Emission in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge detektiert. Aus Abbildung 5.6 geht hervor, dass das Emissionsmaximum unabhängig von der Anregungswellenlänge bei 459 nm liegt.

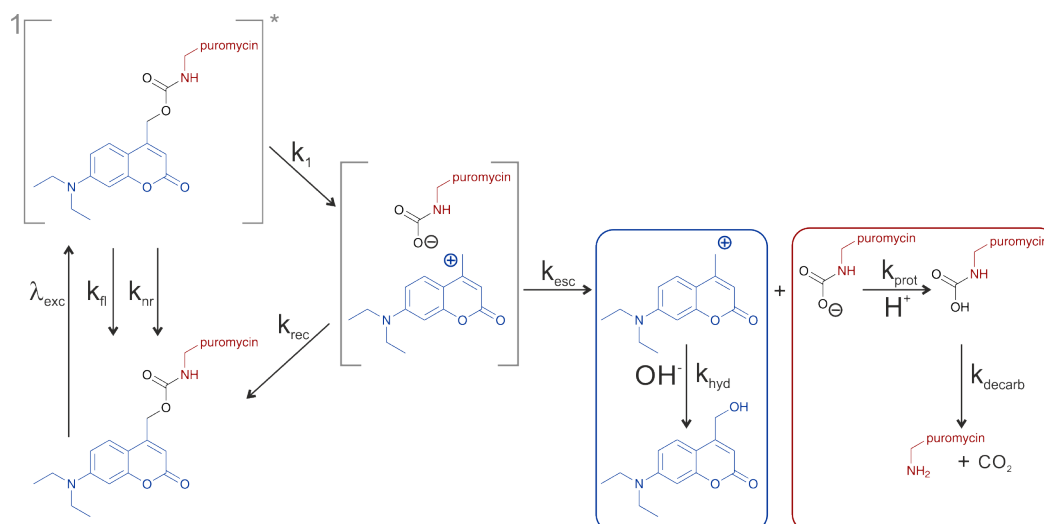


Abbildung 5.5: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus zur photolytischen Freisetzung von Puromycin aus einer DEACM-geschützten Verbindung nach [138].

Die Emission erfolgt aus dem S_1 -Zustand, welcher nach Anregung mit 380 nm besetzt wurde. Dieses Verhalten ist analog zu DEACM-OH, sodass die strukturellen Unterschiede der beiden Verbindungen keinen Einfluss auf die Fluoreszenz zu haben scheinen. Eine Erhöhung des Wasseranteils im Lösungsmittel induziert eine bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximums vergleichbar zur UV/vis-Absorption. Die spezifische Wechselwirkung mit dem protischen Lösungsmittel führt folglich zu einer Stabilisierung des angeregten Zustandes, welche mit zunehmendem Anteil an Wasser verstärkt wird. Des Weiteren ist zu beachten, dass 7-Aminocumarine aufgrund des elektronenschiebenden 7-Diethylamino-Substituenten und der elektronenziehenden Carbonylfunktion des Cumarin-Grundgerüsts einen intramolekularen Ladungstransfercharakter (ICT) im angeregten Zustand aufweisen können [200–202]. Nach Anregung wird zunächst ein *locally excited* S_1 -Zustand ($S_1(LE)$) populiert, der sich dann unter dem Einfluss des Lösungsmittels in einen polaren ICT-Zustand ($S_1(ICT)$) umwandelt, wie bereits für andere Systeme beschrieben [203–205]. Die Ausbildung eines ICT-Zustands wird durch die große Differenz der Dipolmomente zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand belegt. Daraus folgt, dass der sehr polare angeregte Zustand durch die erhöhte Polariät des anwesenden Lösungsmittels stabilisiert wird und eine bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximums induziert. Diese Stabilisierung ist auch in dem aprotischen Lösungsmittel DMSO zu beobachten, was auf die hohe Dielektrizitätskonstante von DMSO zurückzuführen ist [206].

Zudem ist in einem protischen Lösungsmittel eine definierte Schulter im Emissionsspektrum oberhalb von 520 nm zu erkennen (Abbildung 5.6 (b)), wobei dieses Phänomen auch bei dem Photoprodukt DEACM-OH zu beobachten ist. Dies kann mit der Anwesenheit eines angeregten Zustands erklärt werden, der energetisch im Vergleich zu dem Zustand mit ICT-Charakter abgesenkt ist. Dies kann zu einem durch intermolekulare Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen im S_1 , durch das Vorliegen eines verdrillten intramolekularen Ladungstransferzustandes (TICT) oder aus einem Zusammenspiel beider Möglichkeiten begründet werden [207, 208]. Bei einem TICT-Zustand bildet die 7-Diethylaminogruppe

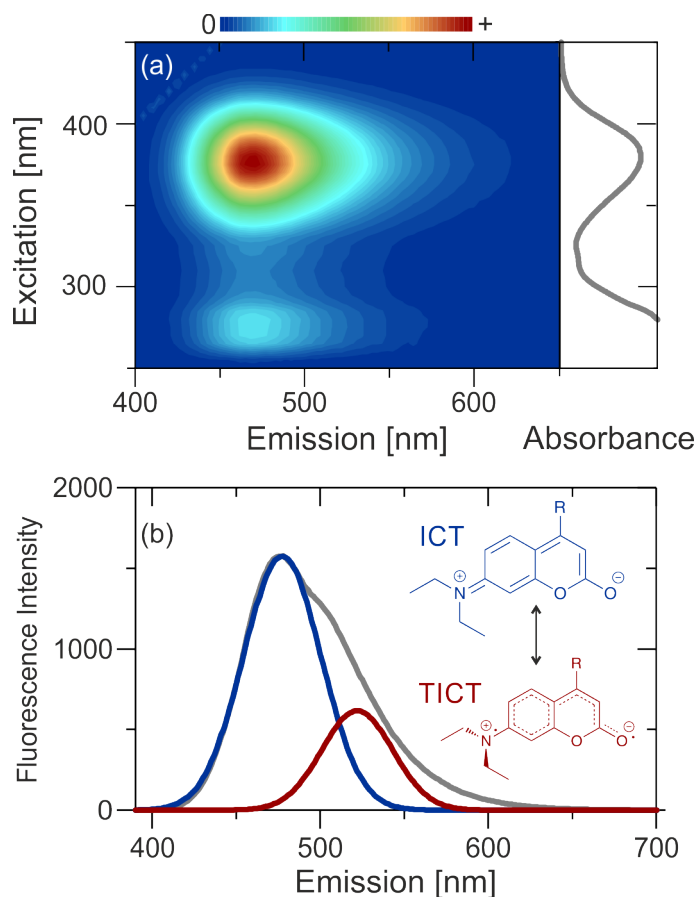


Abbildung 5.6: Fluoreszenzspektren von DEACM-puormycin in DMSO, wobei die Anregungswellenlänge gegen die Emission aufgetragen ist und die Fluoreszenzintensität die z-Achse darstellt, sowie einem Absorptionsspektrum von DEACM-Puormycin (a). Emissionsspektrum von DEACM-Puormycin in einem Lösungsmittelgemisch aus DMSO/PBS 2:1 (grau), wobei der Anteil an ICT-Zustand (blau) und an TICT-Zustand (rot) mit dazugehörigen Strukturformeln dargestellt sind.

infolge der Verdrillung eine pyramidale Struktur aus, sodass sie sich im Gegensatz zu dem ICT-Zustand nicht mehr in einer Ebene mit der Cumarin-Einheit befindet und eine vollständige Landungstrennung erfolgt [209–212]. Ein solcher TICT-Zustand wurde bereits auch für andere Fluorophore beschrieben [213]. Für die Entstehung des TICT-Zustandes aus dem ICT-Zustand ist es notwendig, dass die 7-Diethylaminoeinheit frei drehbar ist, sodass dementsprechend bei Cumarin-Derivaten mit einer verbrückten 7-Aminoereinheit kein TICT-Zustand beobachtet wurde. Zudem muss sich die Probe in einem polaren protischen Lösungsmittel befinden, da durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindung der ladungsseparierte Zustand stabilisiert wird [214]. Des Weiteren spielt die Viskosität des Mediums eine Rolle. So wurde von Jones *et al.* kein TICT-Zustand in hochviskosen Medien aufgrund der Verhinderung der Rotation der Aminogruppe beobachtet [127]. Die Existenz eines solchen Zustands äußert sich dann bei 7-Aminocumarinen in einer abnehmenden Fluoreszenzquantenausbeute bei zunehmenden Anteil an protischem Lösungsmittel [215]. Es wird davon ausgegangen, dass der TICT-Zustand einen zusätzlichen Kanal für nichtstrahlende Prozesse bereitstellt.

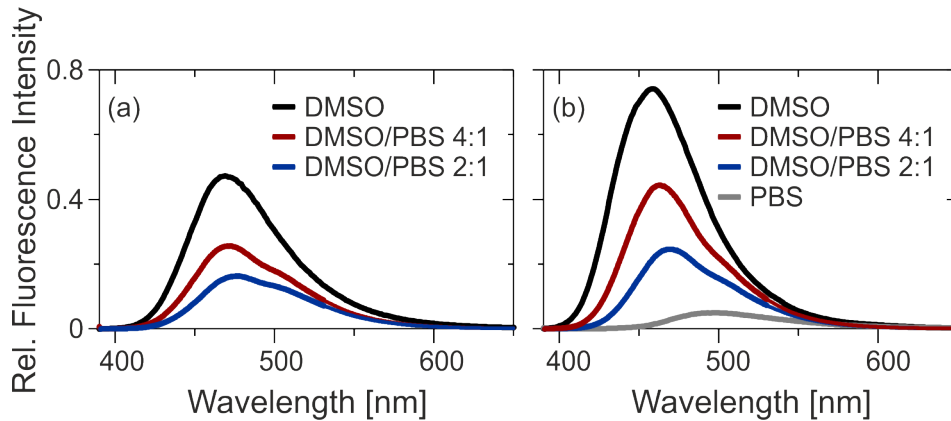


Abbildung 5.7: Fluoreszenzspektren von DEACM-Puromycin (a) und DEACM-OH (b) in verschiedenen Lösungsmittelgemischen. Die Spektren wurden unter Berücksichtigung der ermittelten Fluoreszenzquantenausbeute skaliert.

Fluoreszenzquantenausbeute

Die Fluoreszenzquantenausbeute (FQA) ist definiert als das Verhältnis aus der Anzahl an fluoreszierenden (N_{fl}) Teilchen zu den zuvor absorbierten Photonen (N_{abs}). Eine alternative Formulierung der FQA kann über die Ratenkonstanten k erfolgen, indem das Verhältnis aus den Ratenkonstanten für die strahlende Desaktivierung k_{fl} und der Summe der Ratenkonstanten aus allen möglichen Desaktivierungsprozessen ($k_{nr} + k_{fl}$) gebildet wird (Gleichung 5.1). Generell gilt $\phi_{fl} < 1$, da u. a. Stoßprozesse mit den Lösungsmittelmolekülen auch zur Relaxation des angeregten Zustandes beitragen können.

$$\phi_{fl} = \frac{N_{fl}}{N_{abs}} = \frac{k_{fl}}{k_{nr} + k_{fl}} \quad (5.1)$$

Die lösungsmittelabhängigen Fluoreszenzquantenausbeuten ϕ_{fl} von DEACM-Puromycin und DEACM-OH wurden mittels der relativen Methode gemäß der Anleitung der Firma Horiba Scientific bestimmt [131]. Der Ansatz beruht darauf, die Fluoreszenz einer Konzentrationsreihe eines Fluorophors mit bekannter FQA sowie der zu untersuchenden Probe aufzunehmen. Anschließend wurden die integrierten Fluoreszenzflächen gegen die Absorption der unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen. Aus der sich ergebenden linearen Funktion wurden die jeweiligen Steigungen m_x in ein Verhältnis zueinander gesetzt, sodass die relative FQA in Bezug auf die Referenzsubstanz anhand Gleichung 5.2 ermittelt werden konnte,

$$\phi_{fl}^{Probe} = \phi_{fl}^{Referenz} \cdot \frac{m_{Probe}}{m_{Referenz}} \cdot \frac{n_{Probe}^2}{n_{Referenz}^2} \quad (5.2)$$

wobei n_x dem Brechungsindex der gemessenen Lösung entspricht. Als Referenzsubstanz diente zunächst Cumarin 102 ($\lambda_{max} = 390$ nm; $\lambda_{fl} = 465$ nm; $\phi_{fl} = 0,58$) in Ethanol, da sich aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten zu DEACM-OH vergleichbare Absorptions- und Fluoreszenzspektren ergeben [216]. Anhand dessen wurde die FQA von DEACM-OH in Ethanol ermittelt ($\lambda_{max} = 375$ nm; $\lambda_{fl} = 455$ nm; $\phi_{fl} = 0,46$), welche im Anschluss als Referenz zur Bestimmung der FQA von DEACM-OH in DMSO diente. Diese so erhaltene

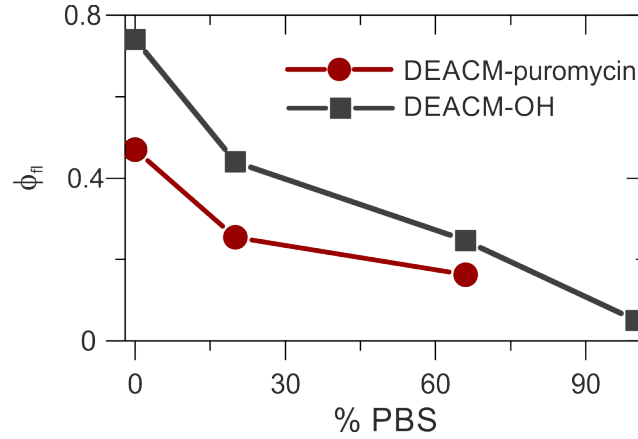


Abbildung 5.8: Graphische Darstellung der Fluoreszenzquantenausbeuten von DEACM-Puromycin (rot) und DEACM-OH (grau) in Abhängigkeit des Anteils an PBS-Puffer im Lösungsmittelgemisch.

Tabelle 5.2: Fluoreszenzquantenausbeuten von DEACM-Puromycin und DEACM-OH in verschiedenen Lösungsmittelzusammensetzungen nach Anregung mit 388 nm.

Verbindung	Lösungsmittel	λ_{fl} [nm]	ϕ_{fl}
DEACM-OH	DMSO	459	0,74 ± 0,02
DEACM-OH	DMSO/PBS 4:1	462	0,440 ± 0,010
DEACM-OH	DMSO/PBS 2:1	469	0,246 ± 0,006
DEACM-OH	PBS	497	0,050 ± 0,003
DEACM-Puromycin	DMSO	469	0,470 ± 0,010
DEACM-Puromycin	DMSO/PBS 4:1	470	0,255 ± 0,004
DEACM-Puromycin	DMSO/PBS 2:1	477	0,163 ± 0,003

λ_{fl} entspricht dem Emissionsmaximum. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit von DEACM-Puromycin in wässrigem Medium konnte keine Fluoreszenzmessung in reinem PBS durchgeführt werden.

FQA fungierte als Referenz für alle untersuchten Systeme.

Aus Tabelle 5.2 geht hervor, dass DEACM-OH in DMSO eine hohe FQA aufweist, welche vergleichbar mit strukturell ähnlichen Cumarinen ist. Es fällt auf, dass die FQA von DEACM-Puromycin im gleichen Lösungsmittel erheblich geringer ist. Dies kann mit alternativen Relaxationspfaden für DEACM-Puromycin aus dem angeregten Zustand begründet werden. Denn die FQA von geschützten Verbindung ist im Gegensatz zu der FQA von DEACM-OH auch abhängig von der photoinduzierten *Uncaging*-Reaktion, was in Gleichung 5.3 durch die Ratenkonstante k_1 ausgedrückt wird.

$$\phi_{fl}^{DEACM-OH} = \frac{k_{fl}}{k_{nr} + k_{fl}} \quad \phi_{fl}^{DEACM-Puromycin} = \frac{k_{fl}}{k_{nr} + k_{fl} + k_1} \quad (5.3)$$

Wie bereits aus Abbildung 5.7 deutlich wird, nimmt die Fluoreszenz von DEACM-Puromycin und DEACM-OH jeweils durch einen erhöhten Anteil an protischem Lösungsmittel ab. Dies manifestiert sich in den abnehmenden FQAs der beiden Verbindungen (Tabelle 5.2). In reiner wässrigen Lösung ist die kleinste FQA für DEACM-OH festzustellen, was bereits zuvor beschrieben wurde [217]. Dieser *Quenching*-Effekt kann nicht nur auf die Ausbildung von

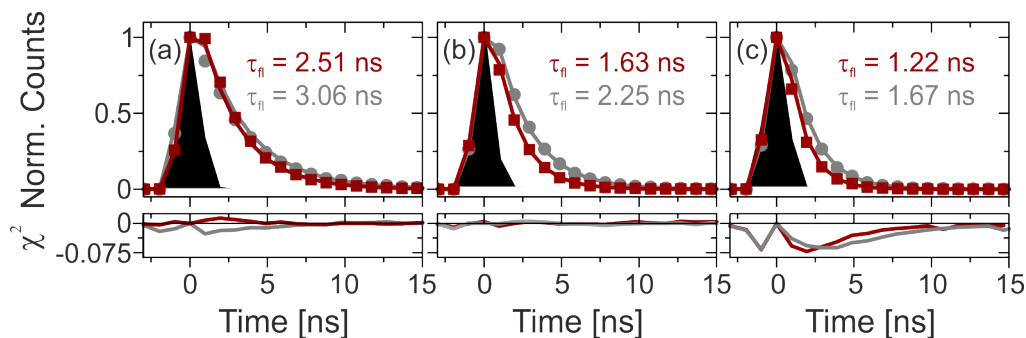


Abbildung 5.9: Vergleich der S_1 -Lebensdauern von DEACM-Puromycin (rot) und DEACM-OH (grau) in DMSO (a), DMSO/PBS 4:1 (b) sowie DMSO/PBS 2:1 (c). Die IRF ist in schwarz dargestellt. Die Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 388 nm durchgeführt, wobei die hier gezeigten Daten bei 485 nm aufgenommen wurden.

intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen sein, da in Ethanol noch eine wesentlich höhere FQA beobachtet wurde. Barik *et al.* konnten einen Zusammenhang zwischen der FQA von DEACM und dem Lippert-Mataga Lösungsmittelparameter Δf herstellen [218, 219], der definiert ist als Funktion der statischen Dielektrizitätskonstanten ϵ_r und dem Brechungsindex des Lösungsmittels n [214].

$$\Delta f = \frac{\epsilon_r - 1}{2\epsilon_r + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (5.4)$$

Mit steigendem Δf wurde eine starke Abnahme der FQA beobachtet, was auf die Bereitstellung eines alternativen Relaxationsweges in polaren protischen Lösungsmitteln infolge der Ausbildung eines nichtstrahlenden TICT-Zustandes zurückgeführt wird.

5.1.4 Zeitkorrelierte Einzelphotonenmessung

Es wurden zeitkorrelierte Einzelphotonenmessungen anhand des in Unterabschnitt 4.3.2 vorgestellten Messaufbaus durchgeführt. Der Anregungspuls besaß eine Anregungswellenlänge von 388 nm, die über einen SHG-Prozess aus der Laserfundamentalen erzeugt wurde. Die Emission wurde bei 485 nm detektiert. Bei jeder Messung wurde die IRF durch eine Messung von reinem DMSO neu ermittelt. Die Proben DEACM-Puromycin sowie DEACM-OH wurden dann in reinem DMSO, DMSO/PBS 4:1 und DMSO/PBS 2:1 gemessen, um den Einfluss des protischen Lösungsmittels auf die *Uncaging*-Dynamik zu untersuchen. Die erhaltenen Daten konnten alle mit einer monoexponentiellen Kinetik beschrieben werden. Aus der Abbildung 5.9 geht hervor, dass die Lebensdauern τ_{fl} von DEACM-Puromycin und DEACM-OH mit steigendem Anteil an protischem Lösungsmittel sinken. Da dieser Effekt bei beiden Verbindungen zu beobachten ist, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt aus dem Cumarin-Gerüst resultiert. Zur weiteren Analyse wurden die Ratekonstanten für die emittierenden k_{fl} und nichtstrahlenden Desaktivierungsprozesse k_{nr} berechnet, wobei zunächst für DEACM-OH gilt, dass die S_1 -Lebensdauer $\tau_{fl}^{DEACM-OH}$

abhängig von den eben genannten Raten ist.

$$\tau_{fl}^{DEACM-OH} = \frac{1}{k_{fl} + k_{nr}} \quad (5.5)$$

Unter Berücksichtigung von Gleichung 5.1 können dann bei Kenntnis der Fluoreszenzquantenausbeuten $\phi_{fl}^{DEACM-OH}$ die Ratenkonstanten ermittelt werden.

$$k_{nr} = \frac{1}{\tau_{fl}^{DEACM-OH}} \left(1 - \phi_{fl}^{DEACM-OH} \right) \quad (5.6)$$

$$k_{fl} = \frac{\phi_{fl}^{DEACM-OH}}{\tau_{fl}^{DEACM-OH}} \quad (5.7)$$

Der Tabelle 5.3 ist zu entnehmen, dass mit zunehmenden Anteil an wässrigem Lösungsmittel ein erheblicher Anstieg der nichtstrahlenden Ratenkonstante k_{nr} erfolgt. Diese Zunahme resultiert aufgrund der steigenden Dielektrizitätskonstanten und der Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen [206]. Zudem ist im wässrigem Medium die Präsenz des zuvor beschriebenen TICT-Zustandes ursächlich für den Anstieg von k_{nr} . Aus diesem Zustand wird ein schneller nichtstrahlender Desaktivierungskanal zum Grundzustand für 7-Dialkylaminocumarine ermöglicht [195, 202, 211].

Eine Abnahme der S_1 -Lebensdauer mit erhöhtem Anteil an wässrigem Medium ist auch bei DEACM-Puromycin zu beobachten. Dies wird zum einen durch die Anwesenheit eines TICT-Zustandes in der Cumarin-Einheit induziert. Zum anderen muss beachtet werden, dass diese Lebensdauer zusätzlich durch den ersten Schritt des photoinduzierten Entschütungsprozesses mit der Ratenkonstante k_1 limitiert ist. Folglich gilt dann:

$$\tau_{fl}^{DEACM-Puromycin} = \frac{1}{k_{fl} + k_{nr} + k_1} \quad (5.8)$$

Aufgrund der sehr ähnlichen Absorptionseigenschaften von DEACM-OH und der geschützten Verbindung kann gefolgert werden, dass im Grundzustand kein signifikanter Unterschied in der Energie sowie Symmetrie bezüglich der an einem HOMO-LUMO-Übergang beteiligten Orbitale vorliegt. Daher sollten die Ratenkonstanten k_{fl} und k_{nr} für die untersuchten Verbindungen vergleichbar sein [141, 145]. Gemäß dieser Annahme kann dann k_1 als Differenz der inversen Lebensdauern von DEACM-Puromycin und DEACM-OH interpretiert werden (Gleichung 5.9).

$$k_1 = \frac{1}{\tau_{fl}^{DEACM-Puromycin}} - \frac{1}{\tau_{fl}^{DEACM-OH}} \quad (5.9)$$

Im Vergleich zu anderen 7-Dialkylcumarinen ist k_1 um eine Größenordnung kleiner, was auf die strukturellen Unterschiede der Abgangsgruppe zurückzuführen sein muss [142, 146]. Im Gegensatz zu den genannten Studien erfolgt in dem hier gezeigten System eine Freisetzung aus einer Carbamat-Funktion und nicht aus einer Ester-Einheit. Anscheinend wird das infolge der Photoreaktion generierte Ionenpaar im Fall des Cumarin-Esters besser stabilisiert, bzw. die zu spaltende C-O-Bindung ist im Cumarin-Ester polarer, sodass eine

Photofreisetzung schneller ist.

Für DEACM-Puromycin muss beachtet werden, dass ein Anstieg von k_1 mit zunehmenden Wasseranteil stattfindet. Dieser Effekt wird durch eine erhöhte Stabilität des Ionenpaares in polaren protischen Lösungsmitteln induziert, sodass der *Uncaging*-Pfad begünstigt wird. Des Weiteren ist die Fluoreszenz in einem polaren protischen Medium als direkter konkurrierender Prozess zu k_1 unterdrückt, wodurch das *Uncaging* bevorzugt ablaufen kann.

Es ist festzuhalten, dass die Abspaltung der photolabilen Schutzgruppe gemäß $\frac{1}{k} = \tau$ in DMSO innerhalb von 14 ns erfolgt. Damit ist die Photolyse um drei Größenordnungen schneller als bei dem zuvor untersuchten NVOC-Puromycin, welche im gleichen Lösungsmittel als 32 μs bestimmt wurde [112]. Zudem kann die Effizienz der Photolyse anhand von

$$\phi_{\text{photolysis}} = \frac{k_1}{k_1 + k_{nr} + k_{fl}} \quad (5.10)$$

ermittelt werden. In DMSO ergibt sich dann eine Quantenausbeute von 17% und in dem Lösungsmittelgemisch aus DMSO/PBS sogar von 27% für die photoinduzierte Spaltung. Dieses Phänomen resultiert aus dem oben beschriebenen Effekt, dass die Fluoreszenz im protischen Lösungsmittel unterdrückt wird und zudem eine Stabilisierung des ionischen Intermediats erfolgt.

5.1.5 Zeitaufgelöste UV/vis-Absorption

Zur Untersuchung der Dynamik nach Anregung mit einem 388 nm Laserpuls auf der ultrakurzen Zeitskala im sichtbaren Spektralbereich wurden transiente Absorptionsmessungen durchgeführt, wobei zunächst die geschützte Verbindung DEACM-Puromycin und DEACM-OH in reinem DMSO gemessen wurden (siehe Abbildung 5.10). Direkt nach der Anregung ist in beiden transienten Absorptionsspektren eine positive Bande bei 425 nm zu erkennen, deren Amplitude bis 100 ps zunimmt und bis zum Ende der Experimentdauer an Intensität verliert (siehe Abbildung 5.11). Zudem bildet sich simultan eine breite negative Absorptionsbande im Bereich zwischen 450 nm und 500 nm aus, die nahezu keine

Tabelle 5.3: Vergleich der S_1 -Lebensdauern τ_{fl}^* , strahlender k_{fl} sowie nichtstrahlender Ratenkonstanten k_{nr} , Ratenkonstante für den *Uncaging*-Prozess k_1 von DEACM-Puromycin und DEACM-OH in verschiedenen Lösungsmitteln.

Verbindung	Lösungsmittel	τ_{fl}^* [$\cdot 10^{-8} \text{s}$]	k_{fl} [$\cdot 10^8 \text{s}^{-1}$]	k_{nr} [$\cdot 10^8 \text{s}^{-1}$]	k_1 [$\cdot 10^8 \text{s}^{-1}$]
DEACM-OH	DMSO	3,06	2,42	0,85	-
DEACM-OH	DMSO/PBS 4:1	2,25	1,97	2,48	-
DEACM-OH	DMSO/PBS 2:1	1,67	1,47	4,51	-
DEACM-OH	PBS		0,94	18,25	-
DEACM-Puromycin	DMSO	2,51	1,88	1,39	0,71
DEACM-Puromycin	DMSO/PBS 4:1	2,25	1,55	2,89	1,68
DEACM-Puromycin	DMSO/PBS 2:1	1,67	1,34	4,64	2,25

*Es wird ein experimenteller Fehler von $\pm 5\%$ angenommen.

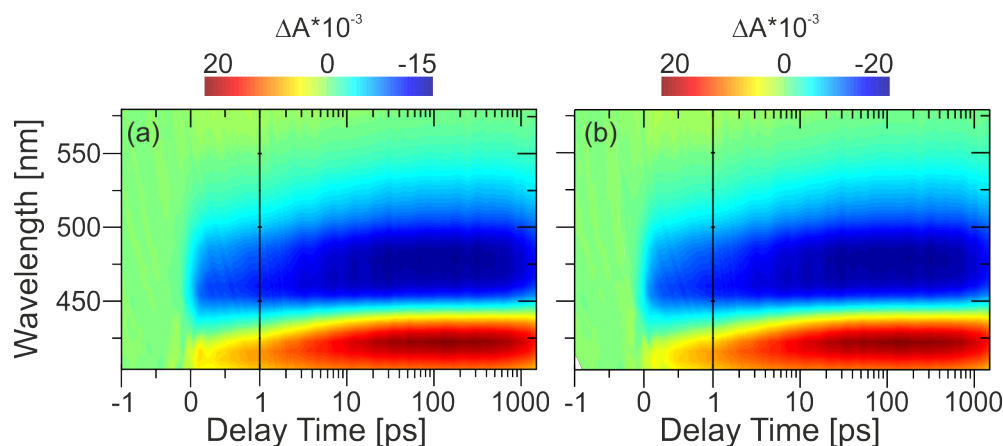


Abbildung 5.10: Transiente Absorptionsspektren nach Anregung mit 388 nm (75 nJ) in DMSO von DEACM-Puromycin (a) und DEACM-OH (b).

Struktur aufweist. Die spektrale Breite dieser Bande nimmt bis 2 ns eine Ausdehnung von 450 bis 580 nm an. Im zeitlichen Verlauf nimmt die Bande ebenfalls bis 100 ps an Intensität zu und sinkt danach in ihrer Amplitude bis 2 ns. Da sich die letztgenannte und die positive Bande bei 425 nm zeitlich sehr ähnlich verhalten, resultieren diese Absorptionsänderungen aus der Besetzung eines angeregten Zustandes, wobei dieser als S_1 -Zustand identifiziert werden kann. Folglich handelt es sich bei der positiven Bande um die Absorption durch einen angeregten Zustand (ESA³) und bei der negativen Bande um eine stimulierte Emission (SE⁴) aus dem S_1 . Diese Banden treten nur bei einem besetzten S_1 auf, sodass die Amplitudenabnahme eine Relaxation anzeigt. Bei dem Cumarin-Alkohol DEACM-OH führt eine Desaktivierung zur Wiederbevölkerung des Grundzustands. Unter der Annahme, dass die Energiedifferenz zwischen HOMO-LUMO des Cumarin-Alkohols vergleichbar mit der von DEACM-Puromycin ist, sollte die Relaxation in den Grundzustand von DEACM-Puromycin bei Abwesenheit alternativer Desaktivierungsmöglichkeiten gleich schnell ablaufen. Aus den ausgewählten Transienten (Abbildung 5.11) geht jedoch hervor, dass der S_1 -Zustand von DEACM-Puromycin schneller depopuliert wird. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der S_1 von DEACM-Puromycin nicht ausschließlich in den Grundzustand relaxiert, sondern dass sich aus dem S_1 das zu erwartende Ionenpaar bildet. Im Zuge dessen ist festzuhalten, dass eine Triplett-Bildung auf der ultrakurzen Zeitskala nicht beobachtet wurde, welche eine breite positive Signatur in dem transienten Spektrum aufweisen würde. Dementsprechend kann die Abwesenheit von langlebigen Tripletttrradikalen angenommen werden, wobei die Präsenz von Singuletttrradikalen infolge einer homolytischen Bindungsspaltung nicht ausgeschlossen werden kann [141]. Allerdings sollte die Lebensdauer dieser Radikale relativ kurz sein, sodass sie entweder sehr schnell das Ionenpaar oder über einen ISC-Prozess ein Triplett bilden würden, wobei der letztgenannte Prozess nicht beobachtet wurde.

Zudem ist zu beobachten, dass die SE-Bande im Verlauf des Experiments eine bathochrome Verschiebung von 20 nm vollzieht, wobei sich das Amplitudenmaximum von 465 nm

³Excited-State Absorption - ESA

⁴Stimulated Emission - SE

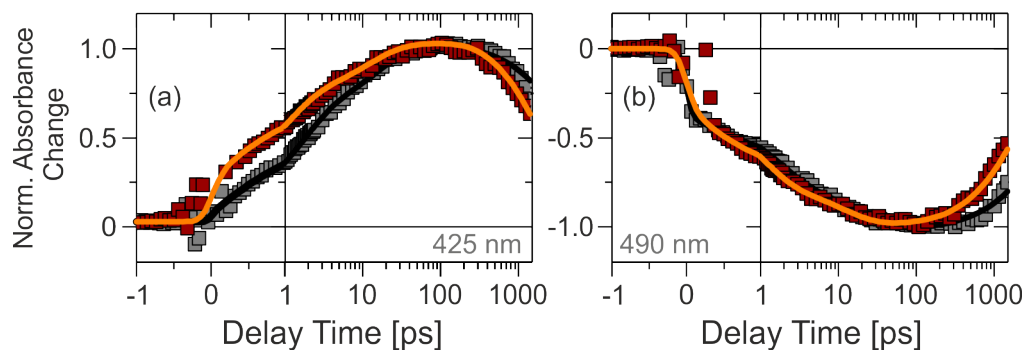


Abbildung 5.11: Normierte Einzeltransienten bei 425 nm (a) und 490 nm (b) der Ultrakurzzeitmessung von DEACM-Puromycin (Rot) und DEACM-OH (Grau) in DMSO. Die Daten sind in Quadrate und die dazugehörigen Fits als Linie dargestellt. Zur Veranschaulichung wurden die Daten am auf das jeweilige Intensitätsmaximum normiert.

zu kurzen Zeiten bis 485 nm bei 100 ps verschiebt. Diese Rotverschiebung ist bei beiden Proben zu beobachten, sodass der Rückschluss zulässig ist, dass das Cumarin-Gerüst dafür verantwortlich ist. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte neben Solvatationseffekten oder einem Elektronentransfer eine lösungsmittelunterstützte Änderung der Cumarin-Struktur infolge der Anregung sein, wodurch die Besetzung eines Zustands mit niedrigerer Energie möglich wird. Diese Beobachtung lässt sich einem intramolekularen Ladungstransfer von dem freien Elektronenpaar des Stickstoffs des 7-Diethylaminosubstituenten auf das Cumarin assistiert von einem polaren Lösungsmittel zuordnen [220].

In einer globalen Analyse zeigte sich, dass die Daten der beiden Verbindungen am besten mit vier Zeitkonstanten beschrieben werden, deren zerfallsassoziierte Spektren in Abbildung 5.12 gezeigt werden. Die Zeitkonstanten, die in der genannten Abbildung rot dargestellt sind, beschreiben sowohl den Zerfall der ESA- als auch der SE-Bande für beide Verbindungen und entsprechen damit der S_1 -Lebensdauer. Diese Zeitkonstanten wurden aus den zeitkorrelierten Einzelphotonenmessungen entnommen und zur weiteren kinetischen Analyse jeweils fixiert. Die anderen so gewonnenen Zeitkonstanten beschreiben die bathochrome Verschiebung der SE-Bande. Marciniak und Lochbrunner erklärten, dass das multiexponentielle Verhalten dieser Verschiebung bei einem vergleichbaren Cumarin-Derivat auf verschiedenen Effekten, wie bspw. der Lösungsmittelumorientierung und intramolekularer Relaxation, basiert [221]. Auffällig ist, dass dieses Phänomen bei dem Cumarin-Alkohol mit größeren Zeitkonstanten beschrieben wird.

Zur weiteren Analyse der beobachteten Effekte wurden die transienten Absorptionsmessungen von DEACM-Puromycin und DEACM-OH auch in Lösungsmittelgemischen mit erhöhtem Wasseranteil durchgeführt, wobei hier im Besonderen auf die Resultate der Messung der geschützten Verbindung eingegangen wird. Der Abbildung 5.13 ist zu entnehmen, dass in Gegenwart eines protischen Lösungsmittels die gleichen spektralen Signaturen auftreten wie im aprotischen Lösungsmittel DMSO zuvor. So entsteht direkt nach Anregung ein ESA-Signal bei 425 nm, welches in seiner Intensität bis 100 ps zunimmt und dann abnimmt. Zudem induziert die Anregung mit 388 nm in beiden Lösungsmittelzusammensetzungen auch wieder ein SE-Signal, welches in seiner negativen Amplitude bis 100 ps hin zunimmt und bis hin zu 2 ns abnimmt. Des Weiteren ist eine Rotverschiebung der SE

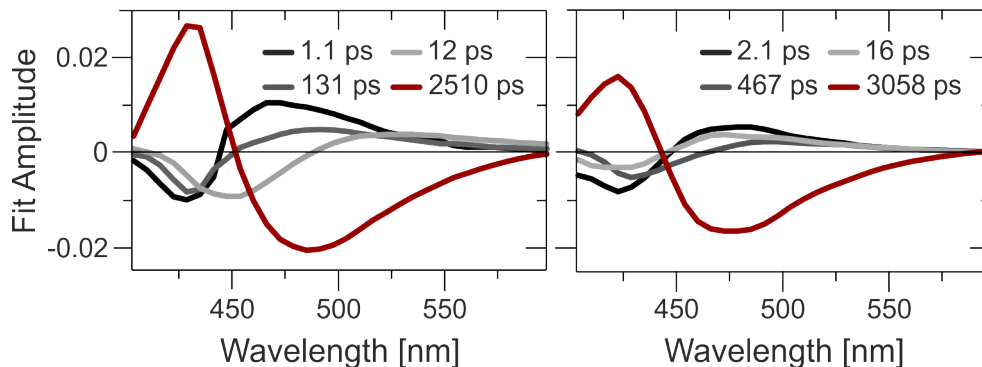


Abbildung 5.12: Zerfallsassoziierte Spektren von DEACM-Puromycin (a) und DEACM-OH in DMSO (b).

zu erkennen. Bereits aus den transienten Absorptionsspektren geht im Vergleich zur Messung in reinem DMSO hervor, dass die Lebensdauer der beschriebenen Signale kürzer ist, was eine kürzere S_1 -Lebensdauer anzeigt. Zur ausreichend guten Beschreibung der Datensätze mittels einer globalen Analyse sind wiederum vier Zeitkonstanten nötig. Auch hier wurde die mittels TCSPC-Messungen ermittelte S_1 -Lebensdauer für die Analyse fixiert. Aus den zerfallsassoziierten Spektren geht hervor, dass die drei weiteren Zeitkonstanten die bathochrome Verschiebung der SE beschreiben. Während die Zeitkonstanten τ_1 und τ_3 unabhängig von der Lösungsmittelzusammensetzung zu sein scheinen, zeigt sich bei der τ_2 -Zeit eine Verkürzung bei der Präsenz von protischem Lösungsmittel. Eine Hypothese ist, dass diese drei Konstanten nicht einzelne physikalische Prozesse repräsentieren, sondern in ihrer Gesamtheit betrachtet werden müssen. Ausgehend davon resultiert eine Beschleunigung der Rotverschiebung in der Gegenwart eines protischen Lösungsmittels. Diese Theorie wird durch die Beobachtung untermauert, dass protische Lösungsmittel aufgrund ihrer Fähigkeit Wasserstoffbrücken zu bilden, die Ausbildung bzw. Stabilisierung eines polaren bzw. ionischen ICT-Intermediats unterstützen können. Zudem besteht in polaren protischen Lösungsmitteln die Möglichkeit der Ausbildung eines TICT-Zustandes.

Für einen besseren Vergleich der Dynamik von DEACM-Puromycin in einem protischen und aprotischen Lösungsmittel auf der ultrakurzen Zeitskala sind in Abbildung 5.14 ausgewählte Zeitschnitte dargestellt. Aus diesen geht hervor, dass in beiden Fällen bereits innerhalb von 0,3 ps die ESA-Bande bei 425 nm und die SE-Bande bei 477 nm entstehen. Im Fall des aprotischen Lösungsmittels intensivieren sich die beiden Banden bis etwa 100 ps, wobei diese Amplitudenzunahme im protischen Lösungsmittel bereits nach ca. 20 ps abgeschlossen ist. Zudem findet im protischem Lösungsmittel zwischen 10 und 80 ps eine Abnahme der SE-Bande im Bereich zwischen 450 und 470 nm statt. Diese Beobachtung konnte nur in der Gegenwart von Protonen gemacht werden. Eine mögliche Erklärung für diese Amplitudenabnahme ausschließlich begrenzt auf den energiereichen Anteil der SE-Bande deutet daraufhin, dass hier ein emittierender Zustand zugunsten eines ebenfalls emittierenden Zustandes mit niedriger Energie depopuliert wird. Das Auftreten einer zweiten emittierenden Spezies bei der Präsenz von Protonen wurde bereits in den statischen Fluoreszenzspektren gezeigt.

Auf der Zeitskala zwischen 100 und 1000 ps ist in beiden Lösungsmitteln eine Abnah-

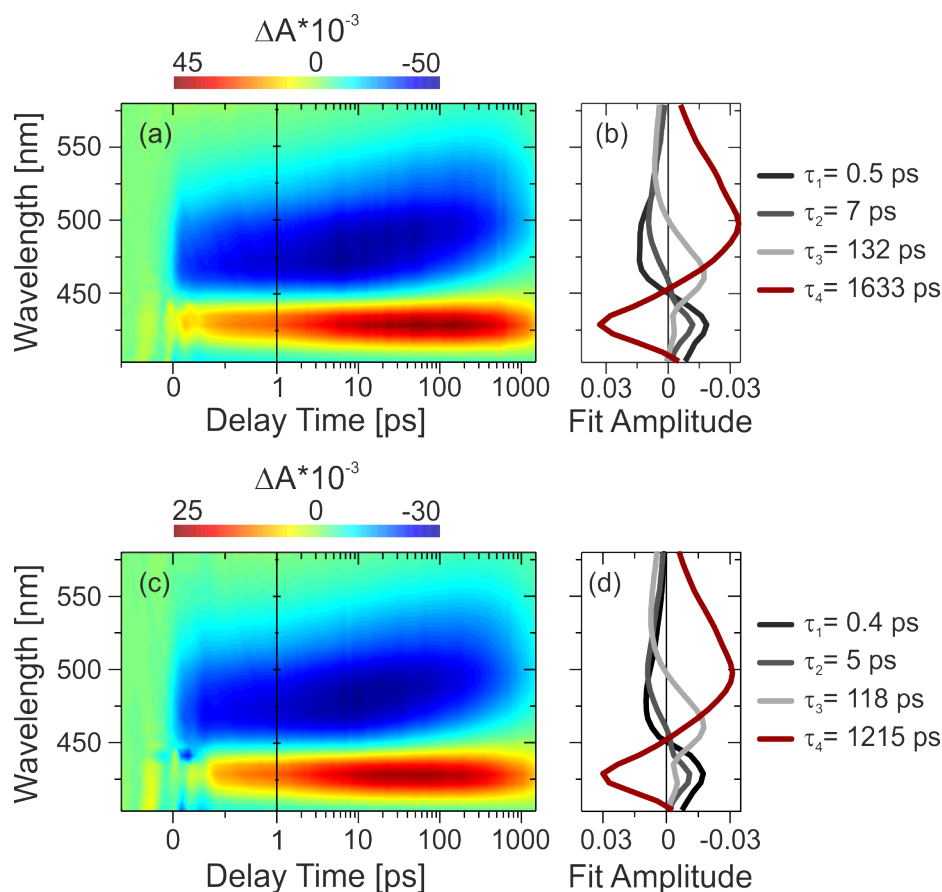


Abbildung 5.13: Transiente Absorptionsspektren von DEACM-Puromycin in einem Lösungsmittelgemisch aus DMSO/PBS 4:1 (a) und DMSO/PBS 2:1 (c) sowie jeweils die dazugehörigen zerfallsassoziierten Spektren (b) und (d).

me der ESA- und SE-Bande zu erkennen, wobei die Amplitudenänderung im Fall des protischen Lösungsmittels schneller stattfindet. Wie bereits aus den TCSPC-Messungen hervorgeht, führt die Gegenwart des protischen Lösungsmittels zu einer Verkürzung der S_1 -Lebensdauer, die durch diese beiden Banden gekennzeichnet ist. Zudem tritt auf dieser Zeitskala die bathochrome Verschiebung der SE-Bande auf, die im protischen Lösungsmittel stärker ausgeprägt ist.

5.1.6 Fazit

Die Untersuchung der elektronischen Zustände von DEACM-Puromycin und DEACM-OH ist wichtig, um einen Einblick in die frühe *Uncaging*-Dynamik zu erhalten. Über die Kombination von berechneten und gemessenen Spektren konnte gezeigt werden, dass die Absorption von DEACM-Puromycin sowie von DEACM-OH aus einem π - π^* -Übergang resultiert, der im Bereich von 380 nm liegt. Im Vergleich zur bisher untersuchten photolabilen Schutzgruppen NVOC für das Biomolekül Puromycin ist das Absorptionsmaximum um 30 nm bathochrom verschoben, sodass wesentlich mildere Bedingungen für ein lichtinduziertes *Uncaging* bei DEACM-Puromycin verwendet werden können [112].

Gemäß der Absorptionsspektren ist die HOMO-LUMO-Differenz bei der geschützten Verbindung und dem Photoprodukt sehr ähnlich, was zunächst die Beobachtung der Freiset-

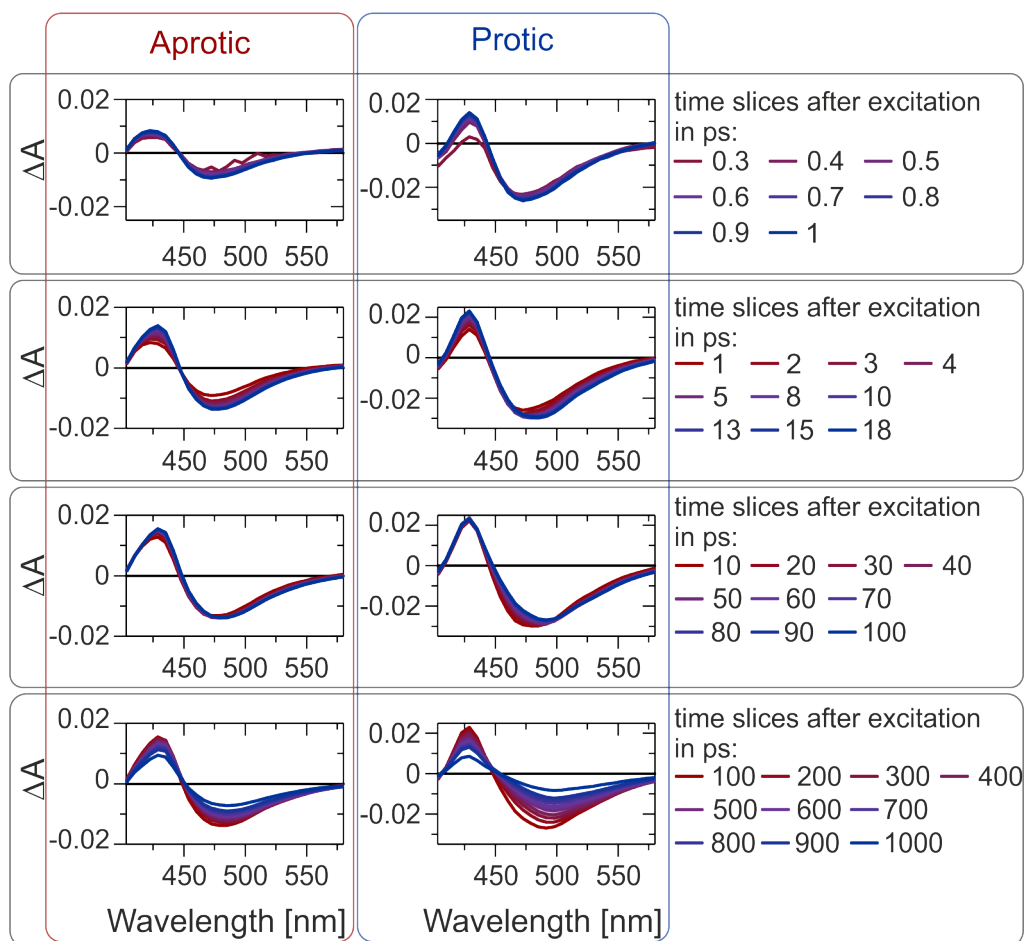


Abbildung 5.14: Ausgewählte Zeitschnitte nach verschiedenen Zeitpunkten nach der Anregung. Es werden hierbei die Auswirkungen der Ultrakurzzeitmessungen im polaren aprotischen Lösungsmittel DMSO mit den Resultaten im polaren protischen Lösungsmittelgemisch aus DMSO/PBS 2:1 verglichen.

zungsreaktion im UV/vis-Bereich aufgrund der geringen spektralen Unterschiede erschwert. Andererseits konnte dieses Phänomen bei der Berechnung der Ratenkonstanten k_1 für den ersten Freisetzungsschritt ausgenutzt werden. Hierzu wurden die Fluoreszenzlebensdauern des Produktes und der geschützten Verbindung zunächst anhand von TCSPC-Messungen ermittelt. Über die Differenzbildung der beiden Lebensdauern konnte so k_1 erhalten werden. In einer Lösungsmittelstudie konnte gezeigt werden, dass bei im protischen Lösungsmittel eine schnellere Bildung des Ionenpaares stattfindet. Dies resultiert aus der Stabilisierung des ionischen Intermediats durch das Lösungsmittel infolge von Wasserstoffbrückenbindungen. Zudem ist in Gegenwart eines protischen Lösungsmittels der zum *Uncaging* in Konkurrenz stehende Pfad der Fluoreszenz unterdrückt, sodass die Freisetzung deshalb auch schneller ablaufen kann.

Auf der ultrakurzen Zeitskala wurde beobachtet, dass durch das polare Lösungsmittel die planare Struktur eines ICT-Zustands stabilisiert wird, wodurch eine Verschiebung der SE-Bande induziert wird. Durch die Erhöhung des protischen Anteils im Lösungsmittelgemisch wurde beobachtet, dass der Ladungstransfer vom 7-Diethylaminosubstituenten auf das Cumarin-Gerüst schneller erfolgt. Zudem wurde nur im protischen Lösungsmittelge-

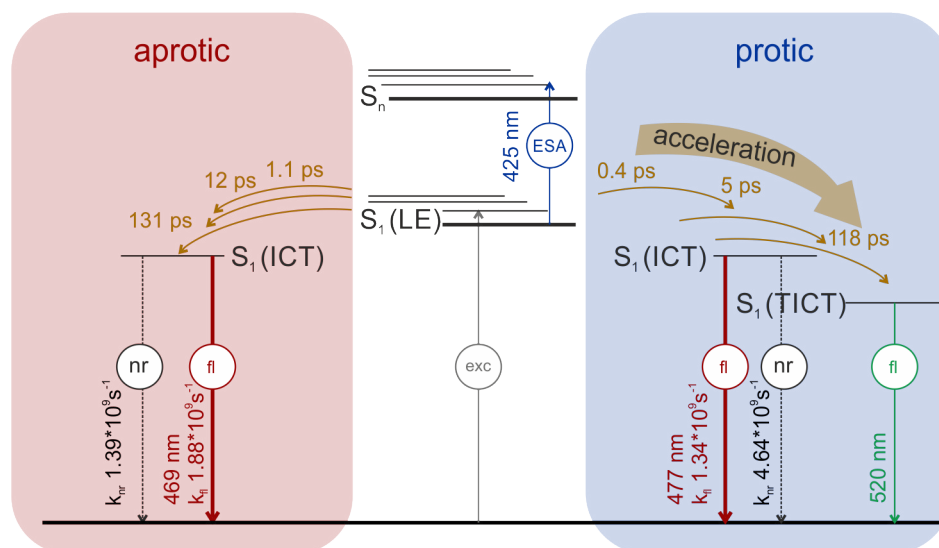


Abbildung 5.15: Zusammenfassende Darstellung der Analyse der elektronischen Zustände von DEACM-Puromycin in Abhängigkeit des Lösungsmittelcharakters.

misch eine Abnahme der stimulierten Emission bei 450-470 nm auf einer Zeitskala bis 80 ps beobachtet, die für eine Umwandlung von ICT-TICT-Zustand spricht.

In Abbildung 5.15 sind nun alle auftretenden Prozesse im Lösungsmittelvergleich dargestellt. In beiden Fällen findet eine Anregung in den *locally excited* S_1 -Zustand ($S_1(LE)$) statt. Anschließend ereignet sich in polaren Lösungsmitteln eine Relaxation unter Einbezug der Lösungsmittelumorientierung und der Ausbildung eines ladungsseparierten Zustands mit niedrigerer Energie ($S_1(ICT)$). Basierend auf dem Modell für die Umwandlung von ICT- zu TICT-Zustand von Grabowski *et al.* für *p*-(Dimethylamino)benzonnitril [203–205], ist eine solche in sehr polaren Lösungsmitteln auch für 7-Aminocumarine möglich. Im Unterschied zu diesem Modell gelten die TICT-Zustände der 7-Aminocumarine als schwach bis gar nicht emittierend. Es wird davon ausgegangen, dass in aprotischen Lösungsmitteln die Rotationsbarriere zur Ausbildung eines TICT-Zustands nicht überwunden wird. In protischen Lösungsmitteln kann der TICT-Zustand durch Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert und somit durch diese energetische Absenkung populiert werden. Dieser TICT-Zustand erklärt das zusätzliche Emissionsmaximum in den Fluoreszenzspektren. Die Anwesenheit dieses Zustandes führt zudem zur Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeute und der Rate für die strahlende Relaxation zum Grundzustand, da durch den TICT-Zustand ein weiterer Kanal zur nichtstrahlenden Relaxation zur Verfügung steht.

5.2 Freisetzung des aktiven Puromycins

Es ist wichtig zu belegen, dass infolge der Photoreaktion die biologische Aktivität des Puromycins regeneriert werden kann, sodass die in Unterabschnitt 5.2.1 dargestellten Analysen in Zellen durchgeführt wurden.

Der entscheidende Reaktionsschritt zur Reaktivierung der biologischen Fähigkeiten des Puromycins ist der Decarboxylierungsschritt, da hier die vollständige Abspaltung des Chromophors und Linkers von dem Biomolekül erfolgt. Folglich ist die Decarboxylierung ein

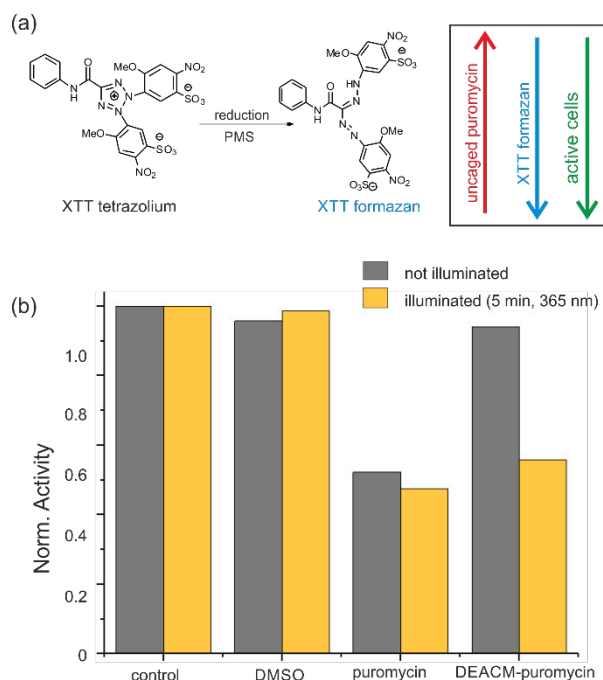


Abbildung 5.16: XTT Zellviabilitäts Assay mit Sf9 Insektenzellen (a). Die Zellen wurden mit $6,3 \mu\text{M}$ DEACM-Puromycin oder kommerziell erwerblichen Puromycin inkubiert, wobei die Zellaktivität vor Belichtung in grauen und nach Belichtung mit 365 nm für 5 min in gelben Balken dargestellt ist. Die Kontrollexperimente beinhalteten nur Zellmedium oder $0,1 \%$ DMSO (b) [138].

entscheidender Faktor zur Beurteilung der Güte der DEACM-geschützten Verbindung. Zur Untersuchung der CO_2 -Freisetzung eignen sich IR-spektroskopische Untersuchungen, da das entstehende CO_2 eine eindeutige Absorptionsbande in diesem Spektralbereich aufweist.

5.2.1 *In-vitro* Freisetzung von Puromycin

Um die lichtkontrollierte antibiotische Eigenschaft von DEACM-Puromycin zu untersuchen, wurde von Isam Elamri ein sogenannter XTT^5 viability assay durchgeführt [138]. Mit dieser Methode kann die Zellebensfähigkeit in der Gegenwart des freien und geschützten Puromycins untersucht werden. Der Assay beruht auf der Tatsache, dass in aktiven Zellen das Tetrazoliumsalz XTT durch zelluläre Enzyme der Mitochondrien zum farbigen Produkt Formazan metabolisiert werden kann (Abbildung 5.16 (a)). Infolge eines Zelltodes sind diese Enzyme unmittelbar inaktiv, sodass die Enzymaktivität eine direkte Quantifizierung der lebenden Zellen ermöglicht. Über die Absorptionsbande von Formazan bei 455 nm kann wiederum die direkte Detektion der Enzymaktivität erfolgen.

Aus Abbildung 5.16 (b) geht hervor, dass die antibiotische Wirkung von freiem Puromycin zu einer erheblichen Reduktion der Zellaktivität führt. Zudem geht aus den Kontrollexperimenten hervor, dass die Belichtung von 5 min mit 365 nm nicht zur Beeinträchtigung der Aktivität führt. Es zeigte sich, dass durch das synthetische Anbringen der photolabilen Schutzgruppe DEACM die Zytotoxizität des Puromycins maßgeblich unterdrückt wird,

⁵2,3-Bis-(2-Methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid

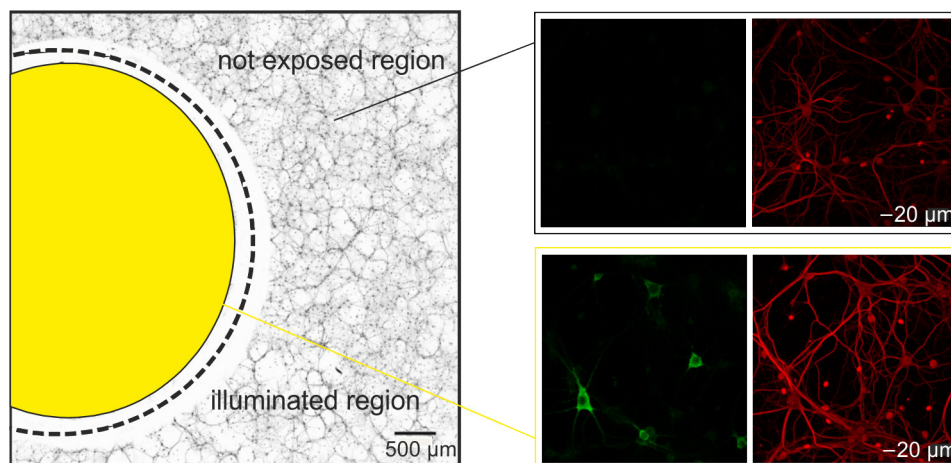


Abbildung 5.17: MatTek-Dish mit $3\mu\text{M}$ DEACM-Puromycin in Neurobasal-A[®] Medium und Ratten Hippocampus Nervenzellen. Die Belichtung erfolgte mit 365 nm. Zur Detektion des aktiven Puromycins wurden diese durch die Bindung mit Anti-Puromycin Antikörper grün und die Dendriten durch MAP2 rot eingefärbt. Die Daten sowie die Abbildung wurden von Maximilian Heumüller bereitgestellt.

sodass die Anzahl der lebenden Zellen mit denen aus dem Kontrollexperimenten übereinstimmt. Die photoinduzierte Freisetzung mit einer 365 nm LED führt zu einer vollständigen Regenerierung der zytotoxischen Wirkung von Puromycin, die vergleichbar mit dem kommerziell erhältlichen Puromycin ist.

5.2.2 *In-vivo* Freisetzung von DEACM-Puromycin

Ein zentraler Gesichtspunkt für die biologische Anwendung ist das erfolgreiche Entschützen von Puromycin in lebenden Organismen. Denn, wie bereits in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, kann aktiviertes Puromycin in geringen Konzentrationen dazu verwendet werden, um frisch translatierte Proteine in Neurozellen zu beobachten [164]. Durch das Konzept der geschützten Verbindung kann mithilfe eines Zweiphotonenpulses eine präzise örtliche und zeitliche Kontrolle der Aktivierung der antibiotischen Wirkung von Puromycin realisiert werden, sodass eine mikroskopbasierte Beobachtung der lokalen Proteinsynthese ermöglicht wird [182]. Die Untersuchung dieses lokalen Prozesses ist ein wichtiger Schlüssel zum Verständnis essentieller Abläufe im Gehirn, wie beispielsweise dem Lernen und dem Erinnerungsvermögen [168–173].

Um zu zeigen, dass eine Entschützung von DEACM-Puromycin in Nervenzellen möglich ist, wurde das folgende Experiment von Maximilian Heumüller (AK Schuman, MPI für Gehirnforschung in Frankfurt) durchgeführt: In einem sogenannten MatTek-Dish wurden $3\mu\text{M}$ DEACM-Puromycin in DMSO für 30 min in Nervenzellen aus dem Hippocampus von Ratten in Neurobasal-A[®] Medium inkubiert. Das MatTek-Dish zeichnet sich durch einen transparenten Glasboden aus, was eine Belichtung der Probe von unten ermöglicht. Zudem wurde eine kreisrunde Schablone angebracht, sodass eine partielle Belichtung der Probe ermöglicht wird. Anschließend wurde die Probe mit 365 nm für 60 s belichtet. Nach der Belichtung wurden die Zellen fixiert und anschließend eine immunhistochemische Fär-

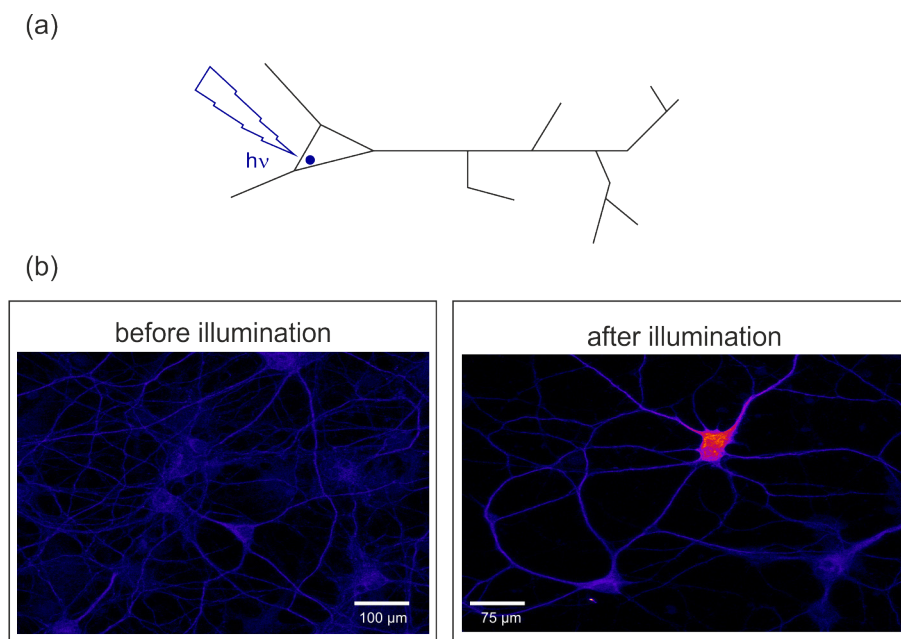


Abbildung 5.18: Schematische Darstellung der *In-vivo* Entschützung von DEACM-Puromycin mittels Zweiphotonenanregung (a). Experimentell wurden hierzu $3 \mu\text{M}$ DEACM-Puromycin in DMSO in GFP-transfizierte Nervenzellen von Ratten Hippocampus inkubiert und dann 10 mal in ein Minutenintervallen mit 720 nm belichtet. Mittels einer immunhistochemischen Färbung wurden die fixierten Zellen eingefärbt, wobei Anti-Puromycin Antikörper rot und Anti-MAP2 blau dargestellt ist (b). Die Abbildung wurde dankenswerter Weise von Maximilian Heumüller zur Verfügung gestellt.

bung durchgeführt, sodass das aktivierte Puromycin (Anti-Puromycin Antikörper) grün und die Dendriten (MAP2⁶) rot eingefärbt sind. Aus der Abbildung 5.17 geht hervor, dass die erfolgreiche Aktivierung von Puromycin durch die gezielte Anwendung von UV-Licht in lebenden Nervenzellen möglich ist. Denn in dem Bereich, der dem UV-Licht ausgesetzt war, kann das aktive Puromycin durch die Grünfärbung nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu, wurde in dem unbelichteten Bereich kein aktives Puromycin detektiert. Um die präzise Steuerung der Aktivierung des DEACM-geschützten Puromycins *in-vivo* zu zeigen, wurde eine Entschützung von Puromycin mithilfe eines Zweiphotonenpulses ausgelöst. Dazu wurden GFP⁷-transfizierte Nervenzellen für 30 min mit $3 \mu\text{M}$ DEACM-Puromycin inkubiert. Anschließend wurde eine einzelne Zelle mittels eines Zweiphotonenlasers mit der Zentralwellenlänge von 720 nm belichtet (8×8 Pixels, 5 ms Belichtung pro Pixel, 10 mal in einem ein Minutenintervall). 20 min nach der ersten Belichtung wurden die Zellen fixiert und eine immunhistochemische Einfärbung durchgeführt. Das aktivierte Puromycin kann infolge der selektiven Bindung des Anti-Puromycin Antikörpers rot und die Dendriten durch Anti-MAP2 Antikörper blau eingefärbt werden. Aus der Abbildung 5.18 geht hervor, dass die räumliche Auflösung durch das *Uncaging* von DEACM-Puromycin sehr hoch ist, was die Beobachtung der lokalen Proteinsynthese ermöglicht.

⁶Mikrotubuli-assoziiertes Protein

⁷grün fluoreszierende Protein

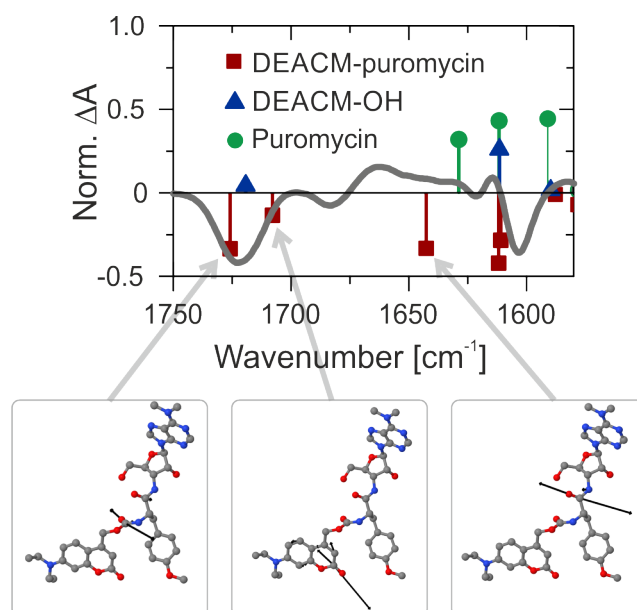


Abbildung 5.19: Berechnete Schwingungsmoden von DEACM-Puromycin (rot), DEACM-OH (blau) und Puromycin (grün) sowie ein experimentell bestimmtes Differenzspektrum nach Belichtung von DEACM-Puromycin. Zudem sind die Schwingungsmoden der drei Carbonylfunktionen von DEACM-Puromycin durch skalierten Auslenkungsvektor repräsentiert.

5.2.3 Quantenmechanische Berechnung der Schwingungszustände

Zur Berechnung der Schwingungsmoden von DEACM-Puromycin wurde nach einer Geometrieoptimierung des Grundzustands auf dem B3LYP Theorielevel mit dem Basissatz cc-pVDZ eine Frequenzanalyse mit Gaussian09 durchgeführt. Aus dieser Analyse geht hervor, dass DEACM-Puromycin strukturell bedingt drei Schwingungen aufweist bei denen Carbonylfunktionen beteiligt sind (siehe Abbildung 5.19). Eine Bande wurde bei 1645 cm^{-1} bestimmt und wurde als C-O-Schwingung der Amidgruppe resultierend aus der Puromycin-Einheit identifiziert. Im Vergleich hierzu ist diese Schwingung im freien Puromycin zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Diese Verschiebung könnte durch den Carbamat-Linker bzw. das Cumarin-Gerüst in DEACM-Puromycin induziert sein. Anscheinend führt die Verbindung mit dem *cage* dazu, dass die Schwingung sterisch gehindert ist und daher zur Initiierung höhere Energien notwendig sind. Des Weiteren sind Ringschwingungen im Bereich zwischen 1620 bis 1580 cm^{-1} bei DEACM-Puromycin zu beobachten. Diese werden zum einen durch das aromatische Gerüst des Cumarins oder durch die Methoxybenzyl- und Adenosin-Einheit des Puromycins hervorgerufen.

Eine weitere Carbonylschwingung der geschützten Verbindung resultiert aus der Cumarin-Einheit und ist bei 1705 cm^{-1} vorzufinden. Im reinen DEACM-OH ist diese Schwingung bei größeren Wellenzahlen anzutreffen.

Die dritte Vibrationsbande bei 1725 cm^{-1} ist eine Konsequenz der Carbonylschwingung des Carbamat-Linkers von DEACM-Puromycin und ist daher nur in der geschützten Verbindung zu erkennen.

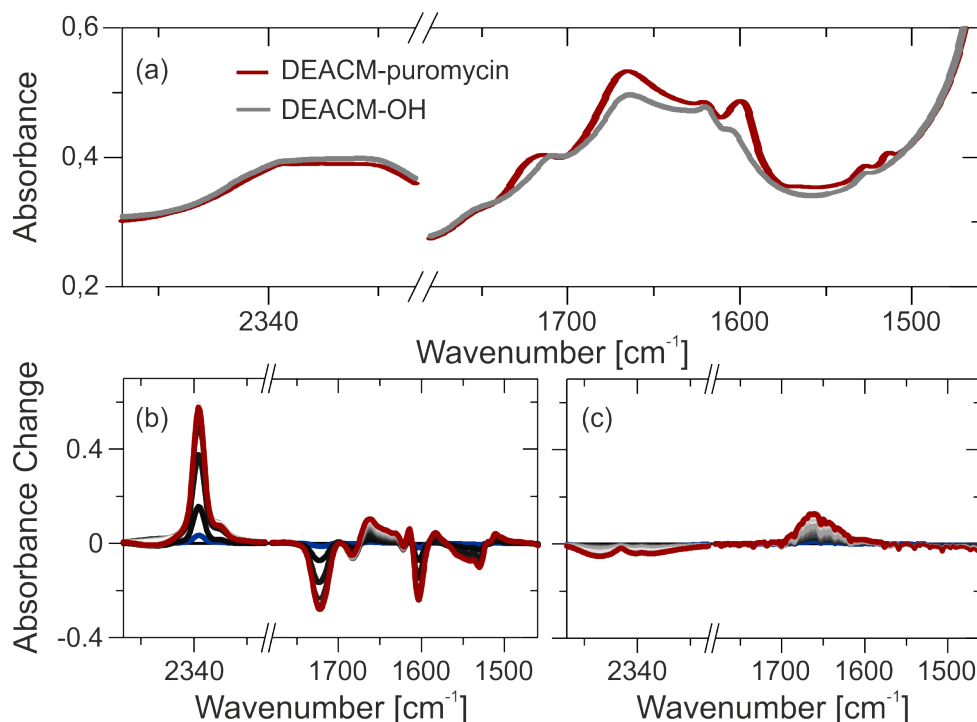


Abbildung 5.20: Absolute IR-Absorptionsspektren von DEACM-Puromycin (rot) und DEACM-OH (grau) in DMSO - nicht lösungsmittelkorrigiert (a). Differenzspektren infolge der Belichtung von DEACM-Puromycin in DMSO mit einer 385 nm LED (3,8 mW), wobei das erste Spektrum nach 112 s Belichtungsdauer in Blau und das Spektrum nach 3600 s Belichtungsdauer in Rot dargestellt ist (b). Differenzspektren eines analogen Experiments zu DEACM-OH (c). Der Wasseranteil des DMSO wurde anhand der Biegeschwingung von Wasser bei 1645 cm^{-1} als 4% ermittelt.

5.2.4 FTIR

Die IR-Spektroskopie ermöglicht einen strukturellen Einblick in die photoinduzierten Prozesse, sodass unter Stickstoffatmosphäre gemäß der in Kapitel 4 beschriebenen Anleitung eine spektroskopische Charakterisierung der beiden untersuchten Verbindungen stattfand. In Abbildung 5.20 (a) sind die IR-Spektren von DEACM-Puromycin und DEACM-OH gezeigt. DEACM-Puromycin zeigt eine breite Bande im Bereich von 1722 cm^{-1} , welche in DEACM-OH als wesentlich schmalere Bande um 1710 cm^{-1} zu beobachten ist. Beide Spektren weisen bei 1620 cm^{-1} eine gleich intensive Bande aus, wobei eine Bande bei 1603 cm^{-1} im Fall von DEACM-Puromycin wesentlich intensiver vorliegt. DEACM-Puromycin als auch DEACM-OH verfügen über eine Absorptionsbande bei 1527 cm^{-1} , aber bei 1514 cm^{-1} absorbiert nur die geschützte Verbindung. Weitere Absorptionsmerkmale sind vergleichsweise schwach ausgeprägt. Die Bandenzuordnung erfolgte anhand von DFT-Rechnungen (Unterabschnitt 5.2.3). Die breite Absorptionsbande bei 1722 cm^{-1} ergibt sich aus einer Überlagerung zweier Banden, die zum einen aus Beiträgen der Carbonyl-Valenzschwingung des Carbamats und zum anderen der Carbonyl-Valenzschwingung des Cumarin-Grundgerüsts bei kleineren Wellenzahlen resultieren. Folglich ist letztere auch als Bande bei 1710 cm^{-1} beim Photoprodukt DEACM-OH zu beobachten. Die Banden bei 1620 , 1600 und 1527 cm^{-1} liegen im Bereich der Ringschwingungen, wobei aufgrund der

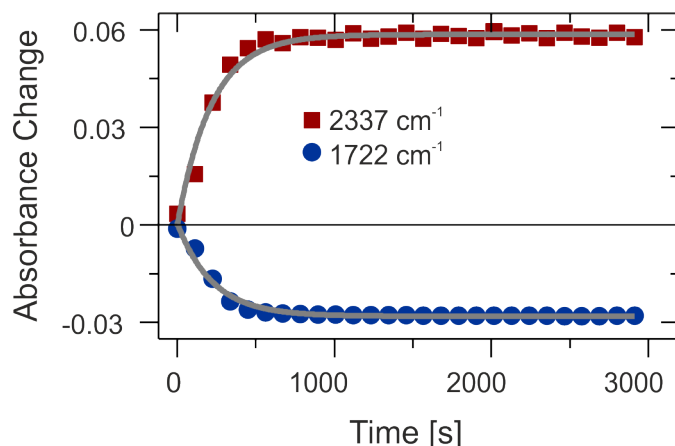


Abbildung 5.21: Absorptionsänderungen nach 385 nm Anregung in Abhängigkeit von der Zeit, wobei die Absorption bei 2337 cm^{-1} in Rot und bei 1722 cm^{-1} in Blau dargestellt sind.

Adenosin-Einheit der geschützten Verbindung hierbei eine größere Intensität zu erwarten ist. Eine weitere Absorptionsbande bei 1514 cm^{-1} kann der NH-Deformationsschwingung der Amid-Gruppe zugeordnet werden, welche durch die Puromycin-Einheit verursacht wird und daher nicht bei DEACM-OH vorzufinden ist.

Infolge der Belichtung von DEACM-Puromycin ist eine starke Zunahme der Bande bei 2337 cm^{-1} zu erkennen, was auf die Entstehung von solubilisiertem CO_2 als Konsequenz der erfolgreichen photoinduzierten Freisetzung hindeutet [222]. Im Gegensatz zu gasförmigen CO_2 zeichnet sich diese Bande durch eine geringere Halbwertsbreite aus. Obwohl während der Messung der Probenraum permanent mit Stickstoff geflutet war, konnte die Anwesenheit von gasförmigem CO_2 nicht vollständig verhindert werden. Dies äußerte sich in einer Fluktuation der Gaskonzentration, welche im Vergleich zur Amplitude des entstehenden solubilisierten CO_2 minimal ist, sodass deren Einfluss vernachlässigt werden kann. Zudem ist bei 1722 cm^{-1} eine Absorptionsabnahme zu detektieren, was auf einen Verlust der Carbamat C=O-Funktionalität zurückzuführen ist (Abbildung 5.20). Wie in Abbildung 5.21 zu sehen ist, tritt diese Abnahme mit der gleichen Zeit auf mit der sich die Absorptionsbande des CO_2 bildet. Das bestätigt die Vermutung, dass es sich bei der abnehmenden Bande um die Carbamat-Gruppe handelt, da eben aus dieser Gruppe das hier detektierte CO_2 infolge der Decarboxylierung entsteht. Anhand der Entstehung der CO_2 -Absorption kann nun (Unterabschnitt 5.2.5) die Quantenausbeute für die Freisetzung des Biomoleküls berechnet werden.

5.2.5 Photochemische Quantenausbeute

Die photochemische Quantenausbeute ist ein wichtiger Faktor zur Beurteilung der Güte einer Verbindung mit photolabiler Schutzgruppen, wobei diese in Kombination mit dem entsprechenden Extinktionskoeffizienten der Maßstab für die Effizienz der Freisetzung des Biomoleküls ist. Jedoch ist die Freisetzung von Puromycin in der Reaktionslösung im UV/vis- und IR-Bereich mit spektroskopischen Mitteln schwer zu detektieren. Die Beobachtung von entstehendem DEACM-OH ist nicht an die Freisetzung des Puromycins

gekoppelt, weil nach der Abspaltung des Cumarin-Gerüsts von Puromycins noch ein Decarboxylierungsschritt zur Aktivierung des Biomoleküls notwendig ist. Folglich kann die photochemische Quantenausbeute anhand der simultan zu Puromycin freigesetzten Menge an CO_2 ermittelt werden. Allgemein ist die Quantenausbeute definiert als das Verhältnis der freigesetzten Moleküle N_{reac} zu den Photonen, die von der geschützten Verbindung absorbiert wurden N_{abs} :

$$\phi = \frac{N_{\text{reac}}}{N_{\text{abs}}} \quad (5.11)$$

Die Anzahl der Photonen, die ein *Uncaging*-Event herbeigeführt haben können nach Lambert-Beer (Gleichung 2.7) gemäß

$$N_{\text{reac}} = \frac{A_{\text{CO}_2} V N_A}{\epsilon_{\text{CO}_2} d} \quad (5.12)$$

berechnet werden, wobei A_{CO_2} der Absorption der CO_2 -Bande, V dem Probenvolumen, N_A der Avogadro-Konstanten, ϵ_{CO_2} dem Extinktionskoeffizient von solubilisiertem CO_2 und d der Schichtdicke der verwendeten Küvette entspricht.

Jedoch muss die zeitabhängige Absorptionsänderung der CO_2 -Bande berücksichtigt werden. Hierzu wird angenommen, dass die CO_2 -Entstehung bei kleinen Belichtungszeiten ausschließlich aus der Freisetzung der geschützten Verbindung resultiert und keine Zersetzung der Probe stattfindet. Aus dem linearen Verhältnis der CO_2 -Absorption zur Belichtungsdauer ergibt sich eine Steigung m , sodass die zeitabhängige CO_2 -Absorption aus dem Produkt dieser Steigung m und der Belichtungsdauer t erhalten werden kann, wodurch folgt:

$$N_{\text{reac}} = \frac{mtV N_A}{\epsilon_{\text{CO}_2} d} \quad (5.13)$$

Die Anzahl der eingestrahelten Photonen kann durch

$$E = h\nu N_0 \quad (5.14)$$

ermittelt werden, wobei E der Anregungsenergie, h dem Planck'schen Wirkungsquantum und ν der Frequenz entspricht. Wird die Energie E durch das Produkt aus der Leistung P und der Zeit t ersetzt, wird die Anzahl der absorbierten Photonen abhängig von der Lichtleistung, die auf den Probenort trifft. Zudem muss berücksichtigt werden, dass die Lichtleistung proportional zur Transmission $(1 - T)$ der Probe bei der Anregungswellenlänge ist. Folglich ergibt sich nach Ersetzen der Frequenz durch den Quotienten aus Lichtgeschwindigkeit c und der Wellenlänge λ die Anzahl der absorbierten Photonen als

$$N_{\text{abs}} = \frac{Pt\lambda(1 - 10^{-A_0})}{hc} \quad (5.15)$$

Die Absorption A_0 entspricht der Absorption bei der Anregungswellenlänge zum Zeitpunkt $t = 0$. Durch das Einsetzen von Gleichung 5.13 und Gleichung 5.15 in Gleichung 5.11 ergibt sich dann die Bestimmungsformel für die photochemische Quantenausbeute als:

$$\phi = \frac{mV N_A h c}{\epsilon_{\text{CO}_2} d P \lambda (1 - 10^{-A_0})} \quad (5.16)$$

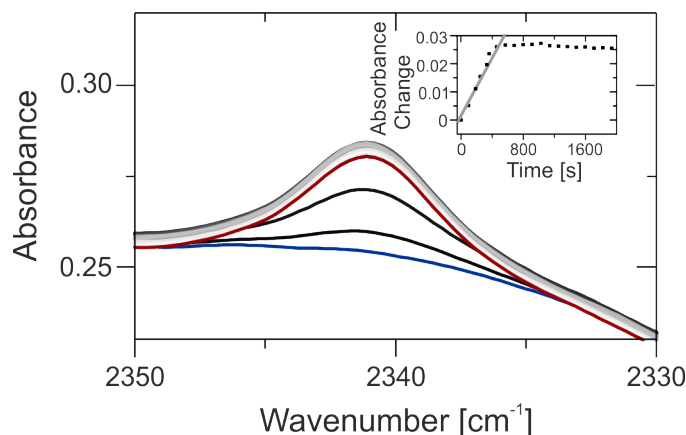


Abbildung 5.22: Bestimmung der Quantenausbeute im infraroten Spektralbereich anhand der photoinduzierten CO_2 -Entwicklung. Die Spektren wurden im Abstand von 112 s unter Belichtung mit 385 nm aufgenommen.

Mit $m = 5,1 \cdot 10^{-5} \frac{1}{s}$, $V = 36 \mu\text{l}$, $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \frac{1}{\text{mol}}$, $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{Js}$, $c = 3 \cdot 10^8 \frac{\text{m}}{\text{s}}$, $\epsilon_{\text{CO}_2} = 1500 \frac{\text{l}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$ [222], $d = 50 \mu\text{m}$, $P = 7,5 \text{ mW}$ und $A_0 = 0,24$ ergibt sich schließlich eine photochemische Quantenausbeute von $2,5 \pm 0,4 \%$. Um diesen Wert zu validieren, wurde unter gleichen experimentellen Bedingungen diese Bestimmung an NVOC-Puromycin wiederholt. Denn über eine ähnliche Methode wurde bereits die Quantenausbeute von Landgraf *et al.* als $1,7 \pm 0,5 \%$ ermittelt. Allerdings obliegt diese Analysemethode verschiedenen Fehlerquellen, wie z.B. die Bildung von Kohlensäure. Jedoch ist zu beachten, dass bei Raumtemperatur das Gleichgewicht ($[\text{CO}_2]/[\text{H}_2\text{CO}_3] = 400$) auf der Seite des solubilisierten CO_2 liegt und somit die Umwandlung zu Kohlensäure zu vernachlässigen ist [223]. Um die so bestimmte Quantenausbeute zu verifizieren, wurde von Landgraf *et al.* diese zusätzlich anhand der in diesem Fall entstehenden Absorptionsbande des Nitroso-Produktes bei 410 nm bestimmt, wobei sich eine Ausbeute von $1,1 \pm 0,2 \%$ ergab. Folglich konnte so die IR-Analyse der Quantenausbeute bestätigt werden. In Übereinstimmung mit diesen Werten wurde die photochemische Quantenausbeute von NVOC-Puromycin mit der oben beschriebenen Methode als $1,2 \pm 0,1 \%$ ermittelt. Daraus folgt, dass die Quantenausbeute für die Freisetzung des Biomoleküls anhand der CO_2 -Absorption bestimmt und verifiziert werden kann.

Auffällig ist, dass die Quantenausbeute für die photolytische Spaltung von DEACM-Puromycin in DMSO noch 17% beträgt (siehe Unterabschnitt 5.1.4), sodass die anschließenden Prozesse, wie etwa die Decarboxylierung, wesentlich weniger begünstigt ablaufen. Über die Kombination der im infraroten Bereich bestimmten Quantenausbeute und der mittels TCSPC-Messungen erhaltenen Daten, kann gemäß Schmidt *et al.* eine Abschätzung der Rate für die Rekombination k_{rec} des ionischen Intermediats erfolgen [145]. Dabei ist anzunehmen, dass die photochemische Quantenausbeute für die Freisetzung des Puromycins vergleichbar mit der Quantenausbeute für die Freisetzung des Cumarin-Alkohols ist, sodass dann gilt:

$$\phi = \frac{k_1}{k_1 + k_{nr} + k_{fl}} \cdot \frac{k_2}{k_{rec} + k_2} \quad (5.17)$$

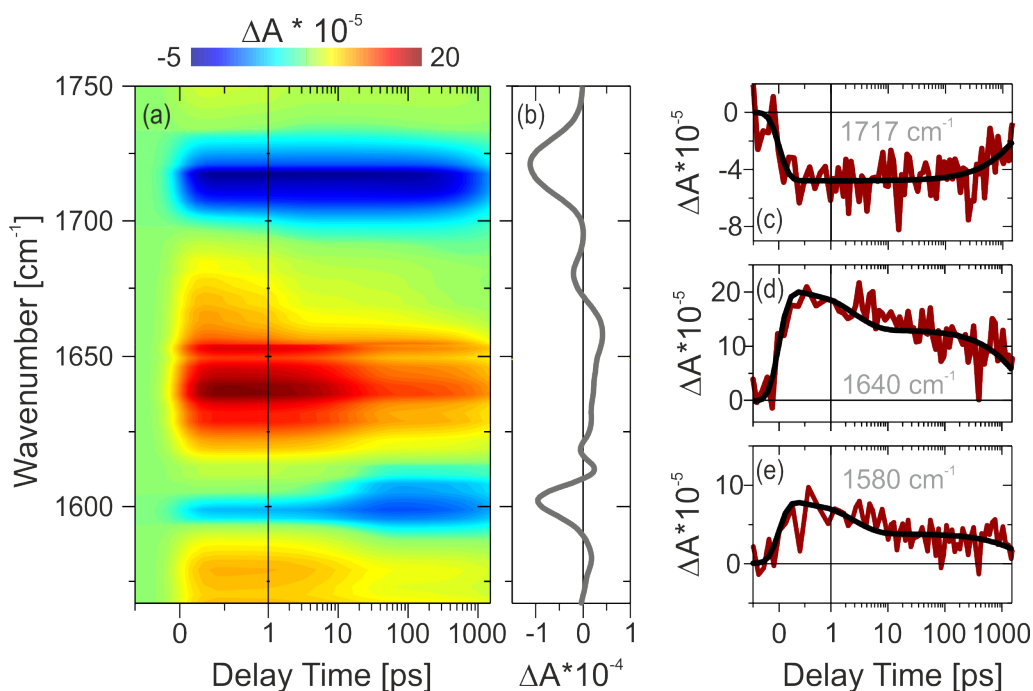


Abbildung 5.23: Transientes Absorptionsspektrum im infraroten Spektralbereich (1570 bis 1750 cm^{-1}) von DEACM-Puromycin nach Anregung mit einem 388 nm Puls in DMSO (a). Differenzspektrum der nach 3600 s Belichtung mit einer 365 nm LED (b). Ausgewählte Einzeltransienten (c)-(e).

k_2 ist die Kombination aus solvensassistierter Ionenpaartrennung und Deprotonierung zur Bildung des Cumarin-Alkohols DEACM-OH, wobei dieser zweistufige Prozess gemäß Schmidt *et al.* zu der genannten Rate zusammengefasst werden kann. Schließlich kann dann das Verhältnis von $\frac{k_{rec}}{k_2}$ als 5,8 bestimmt werden. Damit ist die Rekombination zum Grundzustand im Vergleich zu anderen Cumarin-Derivaten weniger ausgeprägt [142, 145]. Als Resultat kann zudem festgehalten werden, dass die Quantenausbeute von DEACM-Puromycin im Vergleich zu NVOC-Puromycin größer ist. Um die Effizienz der beiden geschützten Verbindungen zu vergleichen, wird das Produkt aus Quantenausbeute und Exkinktionskoeffizient gebildet. Dann ergibt sich im Zusammenspiel mit den jeweiligen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{DEACM} = 19600 \frac{\text{l}}{\text{mol}\cdot\text{cm}}$, $\epsilon_{NVOC} = 6210 \frac{\text{l}}{\text{mol}\cdot\text{cm}}$) für das Cumarin-geschützte Puromycin eine *Uncaging*-Effizienz von 490, wobei die Effizienz durch das NVOC-geschützte Puromycin nur bei 75 liegt. Die hohe Quanteneffizienz von DEACM-Puromycin bedeutet im Hinblick auf biologische Anwendungen, dass eine wesentlich geringere Lichtdosis zum Induzieren eines *Uncaging*-Events ausreichend ist als im Fall des NVOC-Puromycins. Daher ist die Verwendung von dieser Cumarin-Schutzgruppe eine schonendere und somit eine zu bevorzugende Variante zur Lichtsteuerung biologischer Prozesse. Zudem ist die Quantenausbeute von DEACM-Puromycin im Vergleich zu anderen DEACM-geschützten Verbindungen um den Faktor 2,5 größer. Beispielsweise beträgt die photochemische Quantenausbeute für Nicotinamid, welches auch über einen Carbamatlinker an DEACM gebunden ist, lediglich 1% [148]. Die Differenz kann auf die unterschiedliche Stabilität der Abgangsgruppen zurückgeführt werden, da es sich bei den freizusetzenden Biomolekülen um den signifikantesten Unterschied der beiden Systeme handelt. Im Fall des

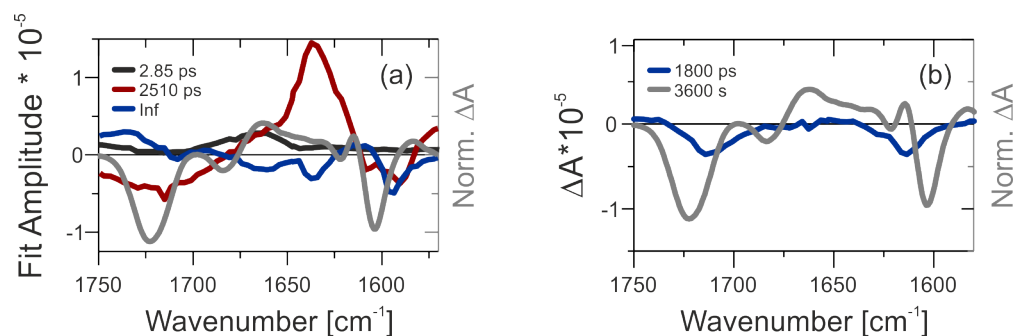


Abbildung 5.24: Zerfallsassozierte Spektren der transienten Absorptionsmessung im infraroten Spektralbereich mit dem Einfluss der 3,15 ps Zeitkonstanten in Blau und der 2510 ps Zeitkonstanten in Rot. Zudem wurde in Grau die Absorptionsänderung der statischen IR-Messung nach 3600 s Belichtung mit einer 385 nm LED gezeigt (a). Vergleich des Differenzspektrums nach 1800 ps nach Anregung und nach 3600 s Belichtung (b).

DEACM-Puromycins scheint die photoinduzierte Bindungsspaltung zu einem stabilisierten Ionenpaar zu führen, wobei die Rekombination zum Grundzustand weniger favorisiert ist als bei DEACM-nicotinamid.

5.2.6 Zeitaufgelöste IR-Absorption

Aufgrund der spektral ähnlichen Eigenschaften von DEACM-Puromycin und DEACM-OH sind Unterscheidungen im UV/vis-Bereich kaum möglich. Daher wurden auch für die Ultrakurzzeitskala transiente Absorptionsspektren im infraroten Spektralbereich von 1570-1750 cm^{-1} aufgenommen. Die so erhaltenen Resultate können der Abbildung 5.23 entnommen werden. Unmittelbar nach der Anregung sind verschiedene intensive Amplitudenänderungen zu erkennen. Eine negative Bande bei etwa 1600 cm^{-1} kann einer Bleichbande zugeordnet werden, die von breiten positiven Banden umgeben ist. Bei den positiven Banden handelt es sich vermutlich um ESA-Banden, wobei deren Amplitude innerhalb von 10 ps abnimmt. Bei längeren Verzögerungszeiten sind residuale Bleichbanden bei 1717 und 1600 cm^{-1} zu erkennen. Des Weiteren sind residuale positive Amplitudenänderungen bei 1580 cm^{-1} sowie im Bereich zwischen 1625 und 1660 cm^{-1} zu finden.

Zur globalen Fitanalyse wurden drei Zeitkonstanten zur korrekten Beschreibung der Daten verwendet, deren zerfallsassozierte Spektren der Abbildung 5.24 (b) entnommen werden können. Analog zu den Ultrakurzzeitmessungen im sichtbaren Spektralbereich beschreibt die Zeitkonstante von 2,85 ps den Lösungsmiteleinfluss auf den ersten angeregten Zustand, wobei es sich um einen Solvatationseffekt bzw. um die lösungsmittelassistierte Stabilisierung eines ICT-Zustandes handeln kann. Die Zeitkonstante von 2510 ps korreliert mit der S_1 -Lebensdauer und wurde wie bereits in Unterabschnitt 5.1.4 beschrieben durch TCSPC-Messungen ermittelt. Zur Auswertung wurde diese Zeitkonstante fixiert. Im infraroten Bereich beschreibt diese Zeitkonstante die Relaxation vom S_1 -Zustand in den Grundzustand. Die positive Amplitude bei 1645 cm^{-1} ist wohl auf die Erhitzung von H_2O in der Probe zurückzuführen, wobei der Wasseranteil dieser Probe mittels FTIR-Messungen auf 4% geschätzt wurde. Die residualen Signale werden durch eine unendlich-Zeitkonstante wiedergegeben, die auf eine Produktbildung hindeuten. In Abbildung 5.24 (a) werden die

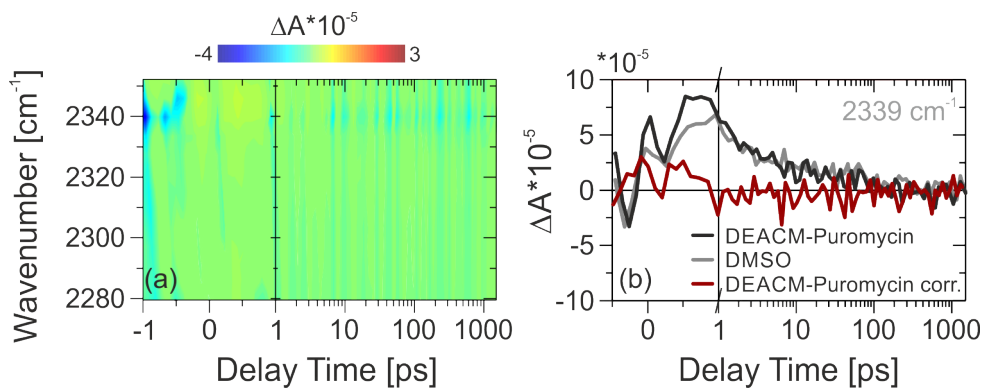


Abbildung 5.25: Transiente Absorptionsänderungen im infraroten Spektralbereich (2280 bis 2350 cm^{-1}) von DEACM-Puromycin nach Anregung mit 388 nm in DMSO (a) sowie Einzeltransienten bei 2339 cm^{-1} von DEACM-Puromycin (schwarz), DMSO (grau) und von DEACM-Puromycin lösungsmittelkorrigiert (rot).

spektralen Eigenschaften dieser Zeitkonstanten mit dem statischen Differenzspektrum verglichen. Das genannte Differenzspektrum ergibt sich nach einer Belichtung von DEACM-Puromycin mit einer 385 nm LED für eine Dauer von einer Stunde. Es zeigt sich, dass insbesondere die negative Amplitude bei 1605 cm^{-1} konform beschrieben wird, welche aus den Ringschwingungen des Moleküls resultiert. Besonders auffällig ist, dass innerhalb der Messdauer von 1800 ps kein Verlust der Carbamat-Funktion bei 1725 cm^{-1} zu detektieren ist. Dies spricht dafür, dass der Decarboxylierungsschritt nicht auf dieser Zeitskala stattfindet und die residualen Signale vermutlich durch das ionische Intermediat nach der C-O-Bindungsspaltung des Cumarins von Puromycin verursacht werden. Der Zeitschnitt nach 1800 s ((Abbildung 5.24 (b)) untermauert aufgrund der spektralen Unterschiede zum statischen Differenzspektrum, dass der *Uncaging*-Prozess noch nicht auf der hier untersuchten Zeitskala abgeschlossen ist. Die Bildung des ionischen Intermediats findet mit einer Quantenausbeute von 17% statt, was durch TCSPC-Messungen quantifiziert wurde (Unterabschnitt 5.1.4). Bei der residualen Bande bei 1717 cm^{-1} handelt es sich im Gegensatz zu dem Differenzspektrum nicht um die Schwingung des Carbamat-Linkers, sondern um die Carbonyl-Schwingung des Cumarins. Gemäß der Resultate der DFT-Rechnungen (Unterabschnitt 5.2.3) tritt die letztgenannte Schwingung bei kleineren Wellenzahlen auf. Um die These, dass innerhalb von 2 ns nach Anregung keine Freisetzung des Puromycins und simultan von CO_2 erfolgt zu belegen, wurde auch der spektrale Bereich zwischen 2280 bis 2350 cm^{-1} untersucht. Wie bereits zuvor erwähnt, ist die Bande bei 2337 cm^{-1} charakteristisch für das Vorliegen von solubilisiertem CO_2 und kann zu einer eindeutigen Zuordnung verwendet werden [222]. Aus der Abbildung 5.25 kann entnommen werden, dass infolge der Photoanregung keine Bildung von Kohlenstoffdioxid auf der untersuchten Zeitskala stattfindet. Folglich erfolgt auch keine Freisetzung des Biomoleküls Puromycin innerhalb von 2 ns. Anscheinend ist die Decarboxylierung der ratenlimitierende Schritt bei der Freisetzung des aktiven Puromycins. Die in Abbildung 5.25 (b) gezeigte positive Absorptionszunahme bis etwa 10 ps kann einem Artefakt zugeordnet werden, welches auch in den reinen Lösungsmittelmessungen auftrat. Der von Karsten Neumann in diesem Wellenzahlbereich untersuchte Effekt wird durch die CaF_2 -Küvettenfenster verursacht [189],

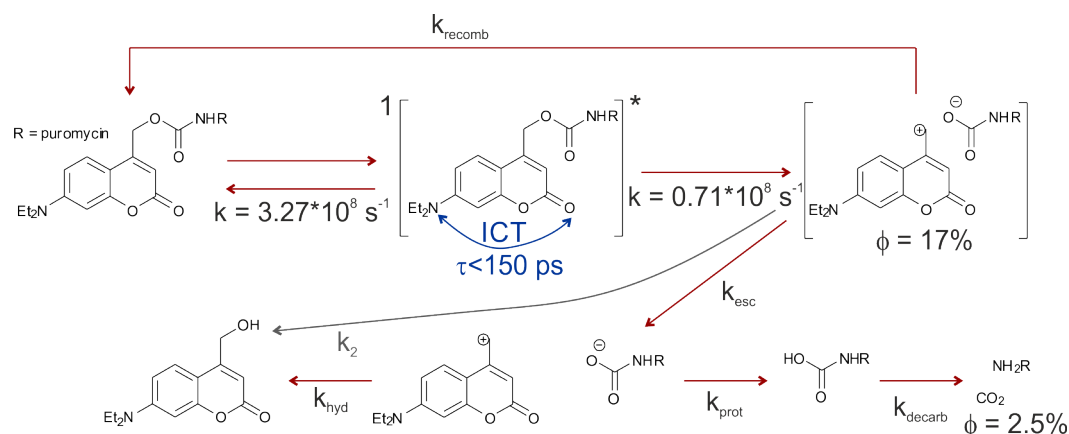


Abbildung 5.26: Reaktionsmechanismus zur photoinduzierten Freisetzung von Puromycin aus einer DEACM-geschützten Verbindung.

wobei es sich vermutlich um die Erzeugung von Ladungsträgern im CaF_2 -Substrat handelt. Daher wurde die Spektren um diesen Effekt korrigiert.

5.2.7 Fazit

Die photoinduzierte Wiederherstellung der biologischen Aktivität von Puromycin nach Freisetzung aus DEACM-Puromycin wurde anhand eines XTT Zellviabilitätsassay *in-vitro* gezeigt. Biologische Anwendungen im Sinne der Neuroforschung sind daher mit DEACM-Puromycin möglich. Der Vorteil von DEACM-Puromycin gegenüber bereits verwendeten Systemen wie NVOC-Puromycin ist die mehr als sechsfach höhere Effizienz der Freisetzung. Die Effizienz konnte anhand des simultan zu Puromycin entstehenden Kohlenstoffdioxids ermittelt werden. Kohlenstoffdioxid verfügt über eine charakteristische Bande im infraroten Spektralbereich. Durch Kombination von DFT-Rechnungen und statischen IR-Messungen konnte gezeigt werden, dass die beobachtete CO_2 -Bildung aus dem Carbamat-Linker der geschützten Verbindung resultiert und nicht eine Folge der Zersetzung des Cumarin-Gerüsts darstellt.

Die Untersuchung auf der ultrakurzen Zeitskala im infraroten Spektralbereich ergab, dass eine Freisetzung von Puromycin nicht innerhalb von 2 ns nach Anregung erfolgt. Dies bestätigt bereits die in Abschnitt 5.1 gezeigten Beobachtungen des langlebigen elektronisch angeregten Zustands. Jedoch konnten die residualen Signale der IR-Messung auf die Bildung des ionischen Intermediats zurückgeführt werden. Aus den TCSPC-Messungen konnte für diese Reaktion eine Quantenausbeute von 17% bestimmt werden.

5.3 Überblick über die Resultate

Mithilfe der hier gezeigten Messungen im UV/vis und infraroten Bereich sowie der DFT-Rechnungen war es möglich den Reaktionsmechanismus für die photoinduzierte Freisetzung von DEACM-geschütztem Puromycin zu verfolgen. In Abbildung 5.26 sind die Reaktionspfade nach Anregung zusammengefasst. Infolge der Anregung wird der erste angeregte Zustand nach einem HOMO-LUMO-Übergang populierte. Eine Triplettbildung wurde nicht

beobachtet. Der angeregte Zustand kann mit einer Rate von $3,3 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ über nichtstrahlende Prozesse sowie Fluoreszenz in den Grundzustand relaxieren. Im angeregten Zustand findet auf einer Pikosekundenzeitskala zudem ein intramolekularer Ladungstransfer innerhalb des Coumarin-Gerüsts statt, wobei eine Elektronendichteverchiebung ausgehend vom 7-Diethylaminosubstituenten erfolgt. Durch die Anwesenheit von Protonen kann der Ladungstransfercharakter des Moleküls im angeregten Zustand unterstützt werden, wodurch ein niederenergetischer Zustand besetzt wird. In diesem Zustand ist der Relaxationspfad über die Fluoreszenz unterdrückt, sodass die Bildung des Ionenpaares bevorzugt wird. Die Bildung des Ionenpaares entspricht der Abspaltung der photolabilen Schutzgruppe von dem Puromycin und erfolgt mit einer Rate von $0,71 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ und mit einer Quantenausbeute von 17%. Allerdings ist durch diese photolytische Spaltung die Aktivität des Puromycin nicht regeneriert. Die Wiederherstellung der antibiotischen Wirkung des Puromycin vollzieht sich erst mit der Decarboxylierung des Carbamatlinkers, der sich nach Spaltung von DEACM noch am reaktiven Zentrum des Puromycins (der Amingruppe) befindet. Über die Decarboxylierung konnte die *Uncaging*-Quantenausbeute als 2,5% ermittelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Freisetzung von Puromycin auch in lebenden Organismen möglich ist.

Die hier gezeigten Ergebnisse sind in zwei Publikationen zusammengefasst, wobei eine bereits veröffentlicht ist und die zweite gerade in Vorbereitung ist:

- Lisa-Marie Herzig, Isam Elamri, Harald Schwalbe, Josef Wachtveitl, "Light-induced antibiotic release from a coumarin-caged compound on the ultrafast timescale", **2017**, Phys. Chem. Chem. Phys. 19, 14835-14844.
- L.-M. Herzig, I. Elamri, H. Schwalbe, and J. Wachtveitl, "Photodynamics of coumarin caged puromycin: Release of an antibiotic on the ultrafast timescale, in International Conference on Ultrafast Phenomena, OSA Technical Digest (online) (Optical Society of America, 2016), paper UTu4A.12.
- Isam Elamri, Lisa-Marie Herzig, Maximilian Heumüller, Erin Schumann, Josef Wachtveitl, Harald Schwalbe, "DEACM-caged puromycin for biological application", *in preparation*.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Licht ist ein wertvolles Werkzeug zur Regulation biochemischer Reaktionsabläufe. Denn die Anwendung von Licht erlaubt eine sehr präzise Einflussnahme auf den Ort und den Startzeitpunkt der zu untersuchenden Reaktionen. Als nichtinvasives Medium bietet die Lichtkontrolle bei der Wahl einer geeigneten Anregungswellenlänge den Vorteil nur minimal in einen lebenden Organismus einzugreifen. Um eine solche lichtbasierte Kontrolle für biologische Anwendungen zu realisieren, ist die Anwesenheit einer lichtsensitiven Verbindung nötig. Ein Konzept der lichtsensitiven Verbindungen ist die sogenannte photolabile Schutzgruppe. Im Allgemeinen handelt es sich hierbei um einen Chromophor der temporär an ein Biomolekül angebracht wurde, um dessen biologische Aktivität zu unterdrücken.

In dieser Arbeit wurde dieses Konzept auf das Antibiotikum Puromycin angewendet, welches durch das synthetische Anbringen der Cumarin-Schutzgruppe DEACM in seiner biologischen Aktivität behindert und durch einen Lichtpuls wieder hergestellt wurde.

Die antibiotische Wirkung von Puromycin beruht auf der strukturellen Ähnlichkeit zum 5'-Ende von Tyrosyl-tRNA, wodurch sich das Antibiotikum kondonunspezifisch während der Translation der Proteinsynthese an das Ribosom anlagern kann. Anschließend wird die naszierende Polypeptidkette auf das Puromycin transferiert. Da diese neue Bindung unter biologischen Bedingungen nicht spaltbar ist, führt dies zu einer verfrühten Freisetzung des Polypeptid-Puromycin-Fragments. Schließlich ist die Proteinsynthese vollständig abgebrochen.

Die Motivation zur photoinduzierten Kontrolle von Puromycin besteht in der Vielzahl an biologischen Anwendungsmöglichkeiten, da die lichtregulierte Freisetzung der biologischen Aktivität als Trigger für sich anschließende biochemische Abläufe verwendet werden kann. Durch das hier untersuchte System kann in Kombination mit anderen Techniken (z.B. NMR) die posttranslationale Proteinfaltung beobachtet werden, welche als hochgradig komplexer Prozess bisher nicht verstanden ist. Eine weitere Motivationsgrundlage ist die Anwendung von DEACM-Puromycin in Nervenzellen. Hier kann durch die Photofreisetzung die Proteinsynthese in den Dendriten der Neuronen beobachtet werden, wodurch Rückschlüsse auf neurodegenerative Krankheiten möglich sein sollten, wie z.B. Alzheimer-Krankheit.

In dieser Arbeit konnte *in-vitro* nachgewiesen werden, dass die antibiotische Wirkung von Puromycin mittels Licht kontrollierbar ist. Aus der photophysikalischen Grundcharakterisierung ging hervor, dass DEACM-Puromycin einen hohen Extinktionskoeffizienten bei Wellenlängen größer als 380 nm aufweist. Die bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums von DEACM sowie die Erhöhung des Extinktionskoeffizienten im Vergleich zu unsubstituierten Cumarin-Derivaten kann auf die Einführung der 7-Diethylaminogruppe zurückgeführt werden. Zur lichtkontrollierten Freisetzung von Puromycin wurde bisher die auf einem substituierten *ortho*-Nitrobenzol basierende NVOC-Schutzgruppe eingesetzt, wobei das Absorptionsmaximum von NVOC-Puromycin im Vergleich zu DEACM-Puromycin um 30 nm hypsochrom verschoben ist und dessen Extinktionskoeffizient dreimal so klein ist. Daher kann zur Induktion der Photolyse von DEACM-Puromycin eine geringere Lichtdosis mit energieärmerer Strahlung als bei dem Vorläufersystem NVOC-Puromycin verwendet werden, angesichts dessen ist das hier neu vorgestellte System für Anwendungen in Zellen zu empfehlen.

Mittels quantenchemischer Rechnungen und spektroskopischen Methoden konnte gezeigt werden, dass die Absorption bei 380 nm von DEACM-Puromycin und dem Photoprodukt DEACM-OH jeweils aus einem $\pi - \pi^*$ -Übergang resultiert. Einerseits erschwerte diese spektrale Ähnlichkeit zwar die direkte Untersuchung der Freisetzungsdynamik im UV/vis-Bereich, andererseits konnte dieses Phänomen bei der Bestimmung der Ratenkonstante k_1 für den ersten Freisetzungsschritt ausgenutzt werden, wobei der erste *Uncaging*-Schritt die photoinduzierte Abspaltung von DEACM von der Puromycin-Einheit ist und zur Bildung eines ionischen Intermediats führt. Die vergleichbare HOMO-LUMO-Differenz von DEACM-Puromycin und DEACM-OH führte nun dazu, dass sich die Ratenkonstante k_1 näherungsweise aus der Differenz der Fluoreszenzlebensdauern der beiden Verbindungen ergab. Die Spaltung der photolabilen Schutzgruppen vom Puromycin findet mit einer Rate von $0,71 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ statt, welche im Vergleich zum Vorgängersystem NVOC-Puromycin um eine Größenordnung höher ist. Zudem zeigte sich ein Einfluss der Lösungsmittelszusammensetzung auf die *Uncaging*-Schritte. In Gegenwart eines protischen Lösungsmittels wurde der zum *Uncaging* in Konkurrenz stehende Prozess der Fluoreszenz unterdrückt, wodurch die Freisetzungsschritte effektiver wurden. Zudem führt die Präsenz von Protonen zu einer Stabilisierung des ionischen Intermediats, sodass die Bildung dessen beschleunigt ablaufen kann. Auf der ultrakurzen Zeitskala wurde beobachtet, dass die Anregung von DEACM-Puromycin zur Population eines *locally excited* S_1 -Zustandes führt, der in polaren Lösungsmitteln infolge von Lösungsmittelumorientierung zugunsten eines energetisch abgesenkten S_1 -Zustandes mit ICT-Charakter depopuliert wurde. Bei diesem ICT-Zustand erfolgte in einer planaren strukturellen Anordnung des Aminocumarins ein Ladungstransfer vom 7-Diethylaminosubstituenten auf die Cumarin-Einheit. In der Gegenwart eines polaren, protischen Lösungsmittels wurde zusätzlich eine Umwandlung des zunächst ausgebildeten ICT-Zustands in einen TICT-Zustand auf der Pikosekunden-Zeitskala beobachtet. Aufgrund des TICT-Zustandes ist die Fluoreszenzquantenausbeute in protischen im Vergleich zu aprotischen Lösungsmitteln verringert, da durch diesen Zustand ein zusätzlicher Kanal zur nichtstrahlenden Relaxation zur Verfügung steht. Da die Fluoreszenz in Konkurrenz

zu der Freisetzungsreaktion steht, ist die Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeute in protischen Lösungsmitteln ein Vorteil im Hinblick auf die Freisetzungseffizienz des Puromycins.

Die biologische Aktivität wird erst nach einem anschließenden Decarboxylierungsschritt wiederhergestellt. Mithilfe von IR-Messungen konnte die Decarboxylierung beobachtet und daraus die Quantenausbeute zu 2,5% bestimmt werden. Die so ermittelte Quantenausbeute entspricht etwa dem Zweifachen von NVOC-Puromycin, sodass die hier untersuchte Verbindung eine sechsfach höhere Freisetzungseffizienz aufweist.

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass DEACM-Puromycin vorteilhafte photophysikalische Eigenschaften aufweist, die diese Verbindung zu einem wertvollen Hilfsmittel für eine Vielzahl von lichtkontrollierten Untersuchungen in biologischer Umgebung machen. Zudem wurden Einblicke in den Reaktionsmechanismus gewonnen, die das molekulare Verständnis der photolytischen Spaltung von Carbamat-geschützten Cumarinen erstmals auf der ultrakurzen Zeitskala ermöglichen.

Literatur

- [1] V. Balzani, A. Credi und M. Venturi. »Photochemical conversion of solar energy.« In: *ChemSusChem* 1 (2008), S. 26–58.
- [2] X.-G. Zhu, S. P. Long und D. R. Ort. »What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass?« In: *Curr. Opin. Biotechnol.* 19 (2008), S. 153–159.
- [3] W. Kühlbrandt, D. N. Wang und Y. Fujiyoshi. »Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography.« In: *Nature* 367 (1994), S. 614–621.
- [4] R. Croce und H. van Amerongen. »Natural strategies for photosynthetic light harvesting.« In: *Nat. Chem. Biol.* 10 (2014), S. 492–501.
- [5] W. Zinth und J. Wachtveitl. »The first picoseconds in bacterial photosynthesis—ultrafast electron transfer for the efficient conversion of light energy.« In: *Chem-PhysChem* 6 (2005), S. 871–880.
- [6] T. Brixner, J. Stenger, H. M. Vaswani, M. Cho, R. E. Blankenship und G. R. Fleming. »Two-dimensional spectroscopy of electronic couplings in photosynthesis.« In: *Nature* 434 (2005), S. 625–628.
- [7] R. Berera, R. van Grondelle und J. T. M. Kennis. »Ultrafast transient absorption spectroscopy: principles and application to photosynthetic systems.« In: *Photosynth. Res.* 101 (2009), S. 105–118.
- [8] T. Kobayashi, T. Saito und H. Ohtani. »Real-time spectroscopy of transition states in bacteriorhodopsin during retinal isomerization.« In: *Nature* 414 (2001), S. 531–534.
- [9] M. O. Lenz, R. Hubert, B. Schmidt, P. Gilch, R. Kalmbach, M. Engelhard und J. Wachtveitl. »First steps of retinal photoisomerization in proteorhodopsin.« In: *Biophys. J.* 91 (2006), S. 255–262.
- [10] C. E. Eckert, J. Kaur, C. Glaubitz und J. Wachtveitl. »Ultrafast photoinduced deactivation dynamics of proteorhodopsin.« In: *J. Phys. Chem. Lett.* 8 (2017), S. 512–517.
- [11] W. Szymański, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker, W. A. Velema und B. L. Feringa. »Reversible photocontrol of biological systems by the incorporation of molecular photoswitches.« In: *Chem. Rev.* 113 (2013), S. 6114–6178.

- [12] J. Broichhagen, J. A. Frank und D. Trauner. »A roadmap to success in photopharmacology.« In: *Acc. Chem. Res.* 48 (2015), S. 1947–1960.
- [13] M. M. Lerch, M. J. Hansen, W. A. Velema, W. Szymański und B. L. Feringa. »Orthogonal photoswitching in a multifunctional molecular system.« In: *Nat. Comm.* 7 (2016), S. 1–10.
- [14] M.-M. Russew und S. Hecht. »Photoswitches: from molecules to materials.« In: *Adv. Mater.* 22 (2010), S. 3348–3360.
- [15] O. Babii, S. Afonin, L. V. Garmanchuk, V. V. Nikulina, T. V. Nikolaienko, O. V. Storozhuk, D. V. Shelest, O. I. Dasyukevich, L. I. Ostapchenko, V. Iurchenko, S. Zozulya und A. S. Ulrich I. V. Komarov. »Direct photocontrol of peptidomimetics: an alternative to oxygen-dependent photodynamic cancer therapy.« In: *Angew. Chem.* 128 (2016), S. 5583–5586.
- [16] J. E. Sheldon, M. M. Dcona, C. E. Lyons, J. C. Hackett und M. C. T. Hartman. »Photoswitchable anticancer activity via trans–cis isomerization of a combretastatin A-4 analog.« In: *Org. Biomol. Chem.* 14 (2016), S. 40–49.
- [17] B. L. Feringa, W. F. Jager und B. de Lange. »Organic materials for reversible optical data storage.« In: *Tetrahedron* 49 (1993), S. 8267–8310.
- [18] G. Berkovic, V. Krongauz und V. Weiss. »Spiropyrans and spirooxazines for memories and switches.« In: *Chem. Rev.* 100 (2000), S. 1741–1754.
- [19] V. Adam, H. Mizuno, A. Grichine, J.-I. Hotta, Y. Yamagata, B. Moeyaert, G. U. Nienhaus, A. Miyawaki, D. Bourgeois und J. Hofkens. »Data storage based on photochromic and photoconvertible fluorescent proteins.« In: *J. Biotechnol.* 149 (2010), S. 289–298.
- [20] A. P. Pellicciolia und Jakob Wirz. »Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications.« In: *Photochem. Photobiol. Sci.* 1 (2002), S. 441–458.
- [21] G. C. R. Ellis-Davies. »Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology.« In: *Nat. Meth.* 4 (2007), S. 619–628.
- [22] P. Klàn, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov und J. Wirz. »Photoremovable protecting groups in chemistry and biology: reaction mechanisms and efficacy.« In: *Chem. Rev.* 113 (2013), S. 119–191.
- [23] P. Wang. »Photolabile protecting groups: structure and reactivity.« In: *Asian J. Org. Chem.* 2 (2013), S. 452–464.
- [24] J. M. Amatrudo, J. P. Olson, H. K. Agarwal und G. C. R. Ellis-Davies. »Caged compounds for multichromic optical interrogation of neural systems.« In: *Eur. J. Neurosci.* 41 (2015), S. 5–16.
- [25] W. Heisenberg. »Über den anschaulichen Inhalt der quantentheoretischen Kinematik und Mechanik.« In: *Z. Phys.* 43 (1927), S. 172–198.

- [26] C. Doppler. »Über das farbige Licht der Doppelsterne und einiger anderer Gestirne des Himmels.« In: Hrsg. von Abhandlungen der königl. böhm. Gesellschaft der Wissenschaften. Bd. 5. 1848, S. 465–482.
- [27] J. Franck und E. G. Dymond. »Elementary processes of photochemical reactions.« In: *Trans. Faraday Soc.* 21 (1926), S. 536–542.
- [28] E. U. Condon. »A theory of intensity distribution in band systems.« In: *Phys. Rev.* 28 (1926), S. 1182–1201.
- [29] E. U. Condon. »Nuclear motions associated with electron transitions in diatomic molecules.« In: *Phys. Rev.* 32 (1928), S. 858–872.
- [30] A. Jablonski. »Efficiency of anti-stokes fluorescence in dyes.« In: *Nature* 131 (1933), S. 839–840.
- [31] M. Kasha. »Characterization of electronic transitions in complex molecules.« In: *Discuss. Faraday Soc.* 9 (1950), S. 14–19.
- [32] M. Beer und H. C. Longuet-Higgins. »Anomalous light emission of azulene.« In: *J. Chem. Phys.* 23 (1955), S. 1390–1391.
- [33] W. Demtröder. *Laserspektroskopie: Grundlagen und Technik*. Hrsg. von Springer Verlag. 2007.
- [34] K. Jesse. *Femtosekundenlaser*. Hrsg. von Springer Verlag. 2005.
- [35] M. Eichhorn. *Laserphysik*. Hrsg. von Springer Verlag. 2013.
- [36] T. H. Maiman. »Stimulated optical radiation in ruby.« In: *Nature* 187 (1960), S. 493–494.
- [37] U. Morgner, F. X. Kärtner, S.-H. Cho, Y. Chen, H. A. Haus, J. G. Fujimoto, E. P. Ippen, V. Scheuer, G. Angelow und T. Tschudi. »Sub-two-cycle pulses from a Kerr-lens mode-locked Ti:sapphire laser.« In: *Opt. Lett.* 24 (1999), S. 411–413.
- [38] K. Zhao, Q. Zhang, M. Chini, Y. Wu, X. Wang und Z. Chang. »Tailoring a 67 attosecond pulse through advantageous phase-mismatch.« In: *Opt. Lett.* 37 (2012), S. 3891–3893.
- [39] P. Peuser und N. P. Schmidt. *Diodengepumpte Festkörperlaser*. Hrsg. von Springer Verlag. 1995.
- [40] J. Kerr. »A new relation between electricity and light: Dielectrified media birefringent.« In: *Philos. Mag.* 50 (1875), S. 337–348.
- [41] J. Kerr. »A new relation between electricity and light: Dielectrified media birefringent (Second paper).« In: *Philos. Mag.* 50 (1875), S. 446–458.
- [42] P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters und G. Weinreich. »Generation of optical harmonics.« In: *Phys. Rev. Lett.* 7 (1961), S. 118–119.
- [43] R. W. Boyd. *Nonlinear Optics*. Hrsg. von Academic Press. 2008.

- [44] H. Fuchs. »Spektral hochaufgelöste Untersuchung von Pikosekundenimpulsen aus modengekoppelten Hochleistungsdiolenlaser Oszillator-Verstärker-Systemen mit der Methode des Frequency Resolved Optical Gating«. Dissertation. TU Kaiserslautern, 2005.
- [45] G. I. Stegeman und R. A. Stegeman. *Nonlinear Optics*. Hrsg. von Wiley VCH. 2012.
- [46] W. Sellmeier. »Zur Erklärung der abnormen Farbenfolge im Spectrum einiger Substanzen.« In: *Ann. Phys. Chem.* 143 (1871), S. 272–282.
- [47] Z. Bor und R. Racz. »Group velocity dispersion in prisms and its application to pulse compression and travelling-wave excitation.« In: *Opt. Commun.* 24 (1985), S. 165–170.
- [48] P. Devi, V. V. Lozovoy und M. Dantus. »Measurement of group velocity dispersion of solvents using 2-cycle femtosecond pulses: Experiment and theory.« In: *AIP Adv.* 1 (2011), S. 1–9.
- [49] G. M. Hale und M. R. Querry. »Optical constants of water in the 200-nm to 200- μ m wavelength region.« In: *Appl. Opt.* 12 (1973), S. 555–563.
- [50] I. Z. Kozma, P. Krok und E. Riedle. »Direct measurement of the group-velocity mismatch and derivation of the refractive-index dispersion for a variety of solvents in the ultraviolet.« In: *J. Opt. Soc. Am. B* 22 (2005), S. 1479–1485.
- [51] R. R. Alfano und S. L. Shapiro. »Emission in the region 4000 to 7000 Å via four-photon coupling in glass.« In: *Phys. Rev. Lett.* 24 (1970), S. 584–587.
- [52] R. R. Alfano und S. L. Shapiro. »Observation of self-phase modulation and small-scale filaments in crystals and glasses.« In: *Phys. Rev. Lett.* 24 (1970), S. 592–594.
- [53] R. R. Alfano und S. L. Shapiro. »Direct distortion of electronic clouds of rare-gas atoms in intense electric fields.« In: *Phys. Rev. Lett.* 24 (1970), S. 1217–1220.
- [54] J. C. Slater. »The theory of complex spectra.« In: *Phys. Rev.* 34 (1929), S. 1293–1322.
- [55] P. Hohenberg und W. Kohn. »Inhomogeneous electron gas.« In: *Phys. Rev.* 136 (1964), B864–B871.
- [56] R. G. Parr und W. Yang. *Density-functional theory of atoms and molecules*. Hrsg. von Oxford University Press. 1989.
- [57] W. Kohn und L. J. Sham. »Self-consistent equations including exchange and correlation effects.« In: *Phys. Rev.* 140 (1965), A1133–A1138.
- [58] J. C. Slater. »A simplification of the Hartree-Fock method.« In: *Phys. Rev.* 81 (1951), S. 385–390.
- [59] A. D. Becke. »Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior.« In: *Phys. Rev. A* 38 (1988), S. 3098–3100.
- [60] J. P. Perdew. »Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas.« In: *Phys. Rev. B* 33 (1986), S. 8822–8824.

- [61] C. Lee, W. Yang und R. G. Parr. »Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density.« In: *Phys. Rev. B* 37 (1988), S. 785–789.
- [62] A. D. Becke. »Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange.« In: *J. Chem. Phys.* 98 (1993), S. 5648–5652.
- [63] S. H. Vosko, L. Wilk und M. Nusair. »Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis.« In: *Can. J. Phys.* 58 (1980), S. 1200–1211.
- [64] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer und A. Heckel. »Light-controlled tools.« In: *Angew. Chem., Int. Ed.* 51 (2012), S. 8446–8476.
- [65] G. Mayer und A. Heckel. »Biologisch aktive Moleküle mit ‘Lichtschalter’.« In: *Angew. Chem.* 118 (2006), S. 5020–5042.
- [66] H. Asanuma, X. Liang, H. Nishioka, D. Matsunaga, M. Liu und M. Komiyama. »Synthesis of azobenzene-tethered DNA for reversible photo-regulation of DNA functions: hybridization and transcription.« In: *Nat. Protoc* 2 (2007), S. 203–212.
- [67] A. A. Beharry und G. A. Woolley. »Azobenzene photoswitches for biomolecules.« In: *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011), S. 4422–4437.
- [68] S. Steinwand, Z. Yu, S. Hecht und J. Wachtveitl. »Ultrafast dynamics of photoisomerization and subsequent unfolding of an oligo-azobenzene foldamer.« In: *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016), S. 12997–13005.
- [69] S. Takeuchi, S. Ruhman, T. Tsuneda, M. Chiba, T. Taketsugu und T. Tahara. »Spectroscopic tracking of structural evolution in ultrafast stilbene photoisomerization.« In: *Science* 322 (2008), S. 1073–1077.
- [70] S. J. Wenzemberger und B. L. Feringa. »Photocontrol of anion binding affinity to a bis-urea receptor derived from stiff-stilbene.« In: *Org. Lett.* 19 (2017), S. 324–327.
- [71] A. K. Chibisov und H. Görner. »Photoprocesses in spiropyran-derived merocyanines.« In: *J. Phys. Chem. A* 107 (1997), S. 4305–4312.
- [72] V. I. Minkin. »Photo-, thermo-, solvato-, and electrochromic spiroheterocyclic compounds.« In: *Chem. Rev.* 104 (2004), S. 2751–2776.
- [73] C. Brieke und A. Heckel. »Spiropyran photoswitches in the context of DNA: synthesis and photochromic properties.« In: *Chem. Eur. J.* 19 (2014), S. 15726–15734.
- [74] R. Klajn. »Spiropyran-based dynamic materials.« In: *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014), S. 148–184.
- [75] C. Özçoban, T. Halbritter, S. Steinwand, L.-M. Herzig, J. Kohl-Landgraf, N. Askari, F. Groher, B. Fürtig, C. Richter, H. Schwalbe, B. Suess, J. Wachtveitl und A. Heckel. »Water-soluble Py-BIPS spiropyranes as photoswitches for biological applications.« In: *Org. Lett.* 17 (2015), S. 1517–1520.
- [76] Y. Yokoyama. »Fulgides for memories and switches.« In: *Chem. Rev.* 100 (2000), S. 1717–1739.

- [77] C. Slavov, C. Boumrifak, C. A. Hammer, P. Trojanowski, X. Chen, W. J. Lees, J. Wachtveitl und M. Braun. »The ultrafast reactions in the photochromic cycle of water-soluble fulgimide photoswitches.« In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016), S. 10289–10296.
- [78] Z. Wang, J. Udmark, Börjesson, R. Rodrigues, A. Roffey, M. Abrahamsson, M. B. Nielsen und K. Moth-Poulsen. »Evaluating dihydroazulene-vinylheptafulvene photoswitches for solar energy storage applications.« In: *ChemSusChem* 10 (2017), S. 3049–3055.
- [79] R. Mogaki, K. Okuro und T. Aida. »Adhesive photoswitch: selective photochemical modulation of enzymes under physiological conditions.« In: *J. Am. Chem. Soc.* 139 (2017), S. 10072–10078.
- [80] Y. Kamiya und H. Asanuma. »Light-driven DNA Nanomachine with a photoreponsive molecular engine.« In: *Acc. Chem. Res.* 47 (2014), S. 1663–1672.
- [81] A. S. Lubbe, W. Szymański und B. L. Feringa. »Recent developments in reversible photoregulation of oligonucleotide structure and function.« In: *Chem. Soc. Rev.* 46 (2017), S. 1052–1079.
- [82] G. Ciamician und P. Silber. »Chemische Lichtwirkungen.« In: *Eur. J. Inorg. Chem.* 34 (1901), S. 1530–1543.
- [83] J. Engels und E.-J. Schlaeger. »Synthesis, structure, and reactivity of adenosine cyclic 3',5'-phosphate-benzyltriesters.« In: *J. Med. Chem.* 20 (1977), S. 907–911.
- [84] J. H. Kaplan, B. Forbush III und J. F. Hoffman. »Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue: Utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts.« In: *Biochemistry* 17 (1978), S. 1929–1935.
- [85] J. E. Corrie, J. H. Kaplan, B. Forbush III, D. C. Ogden und D. R. Trentham. »Photolysis quantum yield measurements in the near-UV; a critical analysis of 1-(2-nitrophenyl)ethyl photochemistry.« In: *Photochem. Photobiol. Sci.* 15 (2016), S. 604–608.
- [86] W. Echevarría, M. F. Leite, M. T. Guerra, W. R. Zipfel und M. H. Nathanson. »Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum.« In: *Nat. Cell Biol.* 5 (2003), S. 440–446.
- [87] B. E. Cohen, B. L. Stoddard und D. E. Koshland. »Caged NADP and NAD. Synthesis and characterization of functionally distinct caged compounds.« In: *Biochemistry* 36 (1997), S. 9035–9044.
- [88] M. Abo, D. W. Bak und E. Weerapana. »Optimization of caged electrophiles for improved monitoring of cysteine reactivity in living cells.« In: *ChemBioChem* 18 (2017), S. 81–84.
- [89] K. M. Vogeli, J. Suk-Won, G. R. Martin und D. Y. R. Stainier. »A common progenitor for haematopoietic and endothelial lineages in the zebrafish gastrula.« In: *Nature* 443 (2006), S. 337–339.

- [90] O. Sadvski, A. S. I. Jaikaran, S. Samanta, M. R. Fabian, R. J. O. Dowling, N. Sonenberg und G. A. Woolley. »A collection of caged compounds for probing roles of local translation in neurobiology.« In: *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010), S. 7746–7752.
- [91] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti und G. C. R. Ellis-Davies. »The nitrodibenzofuran chromophore: a new caging group for ultra-efficient photolysis in living cells.« In: *Nat. Methods* 3 (2006), S. 35–40.
- [92] S. Kantevari, Y. Buskila und G. C. R. Ellis-Davies. »Synthesis and characterization of cell-permeant 6-nitrodibenzofuranyl-caged IP₃.« In: *Photochem. Photobiol. Sci.* 11 (2012), S. 508–513.
- [93] M. Matsuzaki, G. C. R. Ellis-Davies, T. Nemoto, Y. Miyashita, M. Iino und H. Kasai. »Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons.« In: *Nat. Neurosci.* 4 (2001), S. 1086–1092.
- [94] M. Canepari, L. Nelson, G. Papageorgiou, J. E. T. Corrie und D. Ogden. »Photochemical and pharmacological evaluation of 7-nitroindolinyland 4-methoxy-7-nitroindoliny-amino acids as novel, fast caged neurotransmitters.« In: *J. Neurosci. Methods* 112 (2001), S. 29–42.
- [95] R. S. Givens, M. Rubin und J. Wirz. »Applications of p-hydroxyphenacyl (pHP) and coumarin-4-ylmethyl photoremovable protecting groups.« In: *Photochem. Photobiol. Sci.* 11 (2012), S. 472–488.
- [96] T. Furuta, H. Takeuchi, M. Isozaki, Y. Takahashi, M. Kanehara, M. Sugimoto, T. Watanabe, K. Noguchi, T. M. Dore, T. Kurahashi, M. Iwamura und R. Y. Tsien. »Bhc-cNMPs as either water-soluble or membrane-permeant photoreleasable cyclic nucleotides for both one- and two-photon excitation.« In: *ChemBioChem.* 5 (2004), S. 1119–1128.
- [97] Y. A. Kim, D. M. Ramirez, W. J. Costain, L. J. Johnston und R. Bittman. »A new tool to assess ceramide bioactivity: 6-bromo-7-hydroxycoumarinyl-caged ceramide.« In: *Chem. Commun.* 47 (2011), S. 9236–9238.
- [98] L. Fournier, I. Aujard, T. Le Saux, S. Maurin, S. Beaupierre, J.-B. Baudin und L. Jullien. »Coumarinylmethyl caging groups with redshifted absorption.« In: *Chem. Eur. J.* 19 (2013), S. 17494–17507.
- [99] J. P. Olson, H.-B. Kwon, K. T. Takasaki, C. Q. Chiu, M. J. Higley, B. L. Sabatini und G. C. R. Ellis-Davies. »Optically selective two-photon uncaging of glutamate at 900 nm.« In: *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013), S. 5954–5957.
- [100] I. Aujard, C. Benbrahim, M. Gouget, O. Ruel, J.-B. Baudin, P. Neveu und L. Jullien. »o-Nitrobenzyl photolabile protecting groups with red-shifted absorption: syntheses and uncaging cross-sections for one- and two-photon excitation.« In: *Chem. Eur. J.* 12 (2013), S. 6865–6879.

- [101] D. L. Pettit, S. S.-H. Wang, K. R. Gee und G. J. Augustine. »Chemical two-photon uncaging: a novel approach to mapping glutamate receptors.« In: *Neuron* 19 (1997), S. 465–471.
- [102] T. Furuta, S. S.-H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk und R. Y. Tsien. »Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls: photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two photon photolysis.« In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999), S. 1193–1200.
- [103] S. Gug, F. Bolze, A. Specht, C. Bourgoigne, M. Goeldner und J.-F. Nicaud. »Molecular engineering of photoremovable protecting groups for two-photon uncaging.« In: *Angew. Chem., Int. Ed.* 47 (2008), S. 9525–9529.
- [104] G. Bort, T. Gallavardin, D. Ogden und P. Dalko. »From one-photon to two-photon probes: 'caged' compounds, actuators, and photoswitches.« In: *Angew. Chem., Int. Ed.* 52 (2013), S. 4526–4537.
- [105] J. Noguchi, A. Nagaoka, S. Watanabe, G. C. R. Ellis-Davies, K. Kitamura, M. Kano und H. Kasai. »In vivo twophoton uncaging of glutamate revealing the structure function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice.« In: *J. Physiol.* 589 (2011), S. 2447–2457.
- [106] M. Matsuzaki, T. Hayama, H. Kasai und G. C. R. Ellis-Davies. »Two-photon uncaging of γ -aminobutyric acid in intact brain tissue.« In: *Nat. Chem. Biol.* 6 (2010), S. 255–257.
- [107] H. Görner. »Effects of 4,5-dimethoxy groups on the time-resolved photoconversion of 2-nitrobenzyl alcohols and 2-nitrobenzaldehyde into nitroso derivatives.« In: *Photochem. Photobiol. Sci.* 4 (2005), S. 822–828.
- [108] K. Schaper, M. Etinski und T. Fleig. »Theoretical investigation of the excited states of 2-nitrobenzyl and 4,5-methylenedioxy-2-nitrobenzyl caging groups.« In: *Photochem. Photobiol.* 85 (2009), S. 1075–1081.
- [109] G. Wettermark. »Light-induced isomerization of o-nitrotoluene in water solution.« In: *J. Phys. Chem.* 66 (1962), S. 2560–2562.
- [110] R. W. Yip, D. K. Sharma, R. Giasson und D. Gravel. »Picosecond excited-state absorption of alkylnitrobenzenes in solution.« In: *J. Phys. Chem* 88 (1984), S. 5770–5772.
- [111] K. Schaper, S. A. Madani Mobarekeh, P. Doro und D. Maydt. »The α ,5-dicarboxy-2-nitrobenzyl caging group, a tool for biophysical applications with improved hydrophilicity: synthesis, photochemical properties and biological characterization.« In: *Photochem. Photobiol.* 86 (2010), S. 1247–1254.
- [112] J. Kohl-Landgraf, F. Buhr, D. Lefrancois, J.-M. Mewes, H. Schwalbe, A. Dreuw und J. Wachtveitl. »Mechanism of the photoinduced uncaging reaction of puromycin protected by a 6-nitroveratryloxycarbonyl group.« In: *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014), S. 3430–3438.

- [113] S. Pass, B. Amit und A. Patchornik. »Racemization - free photochemical coupling of peptide segments.« In: *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981), S. 7674–7675.
- [114] J. Morrison, P. Wan, J. E. T. Corrie und G. Papageorgiou. »Mechanisms of photo-release of carboxylic acids from 1-acyl-7-nitroindolines in solutions of varying water content.« In: *Photochem. Photobiol. Sci.* 1 (2002), S. 960–969.
- [115] A. D. Cohen, C. Helgen, C. G. Bochet und J. P. Toscano. »The mechanism of photoinduced acylation of amines by N-Acyl-5,7-dinitroindoline as determined by time-resolved infrared spectroscopy.« In: *Org. Lett.* 7 (2005), S. 2845–2848.
- [116] J. C. Sheehan und K. Umezawa. »Phenacyl photosensitive blocking groups.« In: *J. Org. Chem.* 38 (1973), S. 3771–3774.
- [117] J. W. Walker, S. H. Gilbert, R. M. Drummond, M. Yamada, R. Sreekumar, R. E. Carraway, M. Ikebe und F. S. Fay. »Signaling pathways underlying eosinophil cell motility revealed by using caged peptides.« In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998), S. 1568–1573.
- [118] W. T. Monroe, M. M. McQuain, M. S. Chang, J. S. Alexander und F. R. Haselton. »Targeting expression with light using caged DNA.« In: *J. Biol. Chem.* 274 (2000), S. 20895–20900.
- [119] H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien und H. Okamoto. »Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos.« In: *Nat. Genet.* 28 (2001), S. 317–325.
- [120] A. Akahoshi, Y. Doi, M. Sisido, K. Watanabe und T. Ohtsuki. »Photo-dependent protein biosynthesis using a caged aminoacyl-tRNA.« In: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014), S. 5369–5372.
- [121] T. Ohtsuki, S. Kanzaki, S. Nishimura, Y. Kunihiro, M. Sisido und K. Watanabe. »Phototriggered protein syntheses by using (7-diethylaminocoumarin-4-yl)methoxy-car-bonyl-caged aminoacyl tRNAs.« In: *Nat. Commun.* 7 (2016), S. 5–8.
- [122] G. C. R. Ellis-Davies. »Development and application of caged calcium.« In: *Methods Enzymol.* 360 (2003), S. 226–238.
- [123] G. C. R. Ellis-Davies. »Neurobiology with caged calcium.« In: *Chem. Rev.* 108 (2008), S. 1603–1613.
- [124] H. K. Agarwal, R. Janicek, S.-H. Chi, J. W. Perry, E. Niggli und G. C. R. Ellis-Davies. »Calcium uncaging with visible light.« In: *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016), S. 3687–3693.
- [125] J. W. Walker, J. A. McCray und G. P. Hess. »Photolabile protecting groups for an acetylcholine receptor ligand. Synthesis and photochemistry of a new class of o-nitrobenzyl derivatives and their effects on receptor function.« In: *Biochemistry* 25 (1986), S. 1799–1805.
- [126] M. T. Richers, J. M. Amatrudo, J. P. Olson und G. C. R. Ellis-Davies. »Cloaked caged compounds: chemical probes for two-photon optoneurobiology.« In: *Angew. Chem., Int. Ed.* 56 (2017), S. 193–197.

- [127] G. Jones, W. R. Jackson, S. Kanoktanaporn und A. M. Halpern. »Solvent effects on photophysical parameters for coumarin laser dyes.« In: *Opt. Commun.* 33 (1980), S. 315–320.
- [128] S. A. Azim, S. M. Al-Hazmy, E. M. Ebeid und S. A. El-Daly. »A new coumarin laser dye 3-(benzothiazol-2-yl)-7-hydroxycoumarin.« In: *Opt. Laser Technol.* 37 (2005), S. 245–249.
- [129] G. J. Kim und H.-J. Kim. »Doubly activated coumarin as a colorimetric and fluorescent chemodosimeter for cyanide.« In: *Tetrahedron Lett.* 51 (2010), S. 185–187.
- [130] D. Maity und T. Govindaraju. »Conformationally constrained (coumarin-triazolyl-bipyridyl) click fluoroionophore as a selective Al^{3+} sensor.« In: *Inorg. Chem.* 49 (2010), S. 7229–7231.
- [131] S. M. Hossain, K. Singh, A. Lakma, R. N. Pradhan und A. K. Singh. »A schiff base ligand of coumarin derivative as an ICT-Based fluorescence chemosensor for Al^{3+} .« In: *Sens. Actuators, B* 239 (2017), S. 1109–1117.
- [132] R. Givens und B. Matuszweski. »Photochemistry of phosphate esters: an efficient method for the generation of electrophiles.« In: *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984), S. 6860–6861.
- [133] T. Furuta. »Designing caged compounds for spatiotemporal control of cellular chemistry.« In: *J. Synth. Org. Chem., Jpn.* 70 (2012), S. 1164–1169.
- [134] V. Hagen, J. Bendig, S. Frings, T. Eckhardt, S. Helm, D. Reuter und U. B. Kaupp. »Langwellig UV/Vis-anregbare, hocheffiziente und ultraschnelle Phototrigger für cAMP und cGMP.« In: *Angew. Chem.* 113 (2001), S. 1077–1080.
- [135] B. N. Goguen, A. Aemissegger und B. Imperiali. »Sequential activation and deactivation of protein function using spectrally differentiated caged phosphoamino acids.« In: *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011), S. 11038–11041.
- [136] C. Menge und A. Heckel. »Coumarin-caged dG for improved wavelength-selective uncaging of DNAs.« In: *Org. Lett.* 13 (2011), S. 4620–4623.
- [137] A. V. Pinheiro, P. Baptista und J. C. Lima. »Light activation of transcription: photocaging of nucleotides for control over RNA polymerization.« In: *Nucleic Acids Res.* 36 (2008), S. e90(1)–e90(7).
- [138] L.-M. Herzig, I. Elamri, H. Schwalbe und J. Wachtveitl. »Light-induced antibiotic release from a coumarin-caged compound on the ultrafast timescale.« In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19 (2017), S. 14835–14844.
- [139] M. Irfan, J. Iqbal, B. Eliasson, K. Ayub, U. A. Rana und S. U.-D. Khan. »Benchmark study of UV/Visible spectra of coumarin derivatives by computational approach.« In: *J. Mol. Struct.* 1130 (2017), S. 603–617.

- [140] T. Eckardt, V. Hagen, B. Schade, R. Schmidt, C. Schweitzer und J. Bendig. »Deactivation behavior and excited-state properties of (coumarin-4-yl)methyl derivatives. 2. photocleavage of selected (coumarin-4-yl)methyl-caged adenosine cyclic 3,5-monophosphates with fluorescence enhancement.« In: *J. Org. Chem.* 67 (2002), S. 703–710.
- [141] B. Schade, V. Hagen, R. Schmidt, R. Herbrich, E. Krause, T. Eckardt und J. Bendig. »Deactivation behavior and excited-state properties of (coumarin-4-yl)methyl derivatives. 1. Photocleavage of (7-methoxycoumarin-4-yl)methyl-caged acids with fluorescence enhancement.« In: *J. Org. Chem.* 64 (1999), S. 9109–9117.
- [142] R. Schmidt, D. Geissler, V. Hagen und J. Bendig. »Mechanism of photocleavage of (coumarin-4-yl)methyl esters.« In: *J. Phys. Chem. A* 111 (2007), S. 5768–5774.
- [143] J. Donovalová, M. Cigáň, H. Stankovičová, J. Gašpar, M. Danko, A. Gáplovský und P. Hrdlovič. »Spectral properties of substituted coumarins in solution and polymer matrices.« In: *Molecules* 17 (2012), S. 3259–3276.
- [144] A. Nag und K. Bhattacharyya. »Role of twisted intramolecular charge transfer in the fluorescence sensitivity of biological probes: Diethylaminocoumarin laser dyes.« In: *Chem. Phys. Lett.* 169 (1990), S. 12–16.
- [145] R. Schmidt, D. Geissler, V. Hagen und J. Bendig. »Kinetic study of the photocleavage of (coumarin-4-yl)methyl esters.« In: *J. Phys. Chem. A* 109 (2005), S. 5000–5004.
- [146] V. Hagen, B. Dekowski, V. Nache, R. Schmidt, D. Geißler, D. Lorenz, J. Eichhorst, S. Keller, H. Kaneko, K. Benndorf und B. Wiesner. »Coumarinylmethyl esters for ultrafast release of high concentrations of cyclic nucleotides upon one- and two-photon photolysis.« In: *Angew. Chem., Int. Ed.* 44 (2005), S. 7887–7891.
- [147] V. R. Shembekar, Y. Chen, B. K. Carpenter und G. P. Hess. »Coumarin-caged glycine that can be photolyzed within 3 mikros by visible light.« In: *Biochemistry* 46 (2007), S. 5479–5484.
- [148] P. Bourbon, Q. Peng, G. Ferraudi, C. Stauffacher, O. Wiest und P. Helquist. »Development of carbamate-tethered coumarins as phototriggers for caged nicotinamide.« In: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013), S. 6321–6324.
- [149] M. B. Yarmolinsky und G. L. D. L. Haba. »Inhibition by puromycin of amino acid incorporation into protein.« In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45 (1959), S. 1721–1729.
- [150] D. Nathans. »Puromycin inhibition of protein synthesis incorporation of puromycin into peptide chains.« In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51 (1964), S. 585–292.
- [151] A. Bashan, I. Agmon, R. Zarivach, F. Schlutzen, J. Harms, R. Berisio, H. Bartels, F. Franceschi, T. Auerbach, H. A. S. Harly, E. Kossoy, M. Kessler und A. Yanath. »Structural basis of the ribosomal machinery for peptide bond formation, translocation, and nascent chain progression.« In: *Mol. Cell* 11 (2003), S. 91–102.

- [152] E. M. Youngman, J. Brunelle, A. B. Kochaniak und R. Green. »The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release.« In: *Cell* 117 (2004), S. 589–599.
- [153] J. S. Weinger, K. M. Parnell, S. Dorner, R. Green und S. A. Strobel. »Substrate-assisted catalysis of peptide bond formation by the ribosome.« In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (2004), S. 1101–1106.
- [154] Y. S. Polikanov, T. A. Steitz und C. A. Innis. »A proton wire to couple aminoacyl-tRNA accommodation and peptide-bond formation on the ribosome.« In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21 (2014), S. 787–793.
- [155] M. K. Mateyak und T. G. Kinzy. »Breaking the silos of protein synthesis.« In: *Trends Biochem. Sci.* 42 (2017), S. 587–588.
- [156] D. R. Ziehr, J. P. Ellis, P. H. Culviner und S. Cavagnero. »Production of ribosome-released nascent proteins with optimal physical properties.« In: *Anal. Chem.* 82 (2010), S. 4637–4643.
- [157] N. Nemoto, E. Miyamoto-Sato, Y. Husimi und H. Yanagawa. »In vitro virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro.« In: *FEBS Lett.* 414 (1997), S. 405–408.
- [158] E. K. Schmidt, G. Clavarino, M. Ceppi und P. Pierre. »SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis.« In: *Nat. Methods* 6 (2009), S. 275–277.
- [159] J. Ge, C.-W. Zhang, X. W. Ng, B. Peng, S. Pan, S. Du, D. Wang, L. Li, K.-L. Lim, T. Wohland und S. Q. Yao. »Puromycin analogues capable of multiplexed imaging and profiling of protein synthesis and dynamics in live cells and neurons.« In: *Angew. Chem., Int. Ed.* 55 (2016), S. 4933–4937.
- [160] C. B. Anfinsen. »The formation and stabilization of protein structure.« In: *Biochem. J.* 128 (1972), S. 737–749.
- [161] C. B. Anfinsen. »Principles that govern the folding of protein chains.« In: *Science* 181 (1973), S. 223–230.
- [162] C. Levinthal. »Are there pathways for protein folding.« In: *J. Chim. Phys. Phys.-Chim. Biol.* 65 (1968), S. 44–45.
- [163] C. M. Dobson. »Protein folding and misfolding.« In: *Nature* 426 (2003), S. 884–890.
- [164] F. Buhr, J. Kohl-Landgraf, S. tom Dieck, C. Hanus, D. Chatterjee, A. Hegelein, E. M. Schuman, J. Wachtveitl und H. Schwalbe. »Design of photocaged puromycin for nascent polypeptide release and spatiotemporal monitoring of translation.« In: *Angew. Chem., Int. Ed.* 54 (2015), S. 3717–3721.
- [165] L. Monne. »Functioning of the cytoplasm.« In: *Adv. Enzymol.* 8 (1948), S. 1–69.
- [166] M. A. Sutton und E. M. Schuman. »Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory.« In: *Cell* 127 (2006), S. 49–58.
- [167] H. Kang und E. M. Schuman. »A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced synaptic plasticity.« In: *Science* 273 (1996), S. 1402–1406.

- [168] K. C. Martin, A. Casadio, H. Zhu, E. Yaping, J. C. Rose, M. Chen, C. H. Bailey und E. R. Kandel. »Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage.« In: *Cell* 91 (1997), S. 927–938.
- [169] K. M. Huber, M. S. Kayser und M. F. Bear. »Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression.« In: *Science* 288 (2000), S. 1254–1257.
- [170] S. Miller, M. Yasuda, J. K. Coats, Y. Jones, M. E. Martone und M. Mayford. »Disruption of dendritic translation of CaMKII α impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation.« In: *Neuron* 36 (2002), S. 507–519.
- [171] J. B. Cracco, P. Serrano, S. I. Moskowitz, P. J. Bergold und T. C. Sacktor. »Protein synthesis-dependent LTP in isolated dendrites of CA1 pyramidal cells.« In: *Hippocampus* 15 (2005), S. 551–556.
- [172] Y. Y. Huang und E. R. Kandel. »Theta frequency stimulation induces a local form of late phase LTP in the CA1 region of the hippocampus.« In: *Learn. Mem.* 12 (2005), S. 587–593.
- [173] C. A. Vickers, K. S. Dickson und D. J. Wyllie. »Induction and maintenance of late-phase long-term potentiation in isolated dendrites of rat hippocampal CA1 pyramidal neurons.« In: *J. Physiol.* 3 (2005), S. 803–813.
- [174] G. Yang, C. S. Lai, J. Cichon, L. Ma, W. Li und W. B. Gan. »Sleep promotes branch-specific formation of dendritic spines after learning.« In: *Science* 344 (2014), S. 1173–1178.
- [175] G. N. Patrick. »Synapse formation and plasticity: recent insights from the perspective of the ubiquitin proteasome system.« In: *Curr. Opin. Neurobiol.* 16 (2006), S. 90–94.
- [176] R. K. Murphey und T. A. Godenschwege. »New roles for ubiquitin in the assembly and function of neuronal circuits.« In: *Neuron* 36 (2002), S. 5–8.
- [177] A. DiAntonio und L. Hicke. »Ubiquitin-dependent regulation of the synapse.« In: *Annu. Rev. Neurosci.* 27 (2004), S. 223–246.
- [178] J. J. Yi und M. D. Ehlers. »Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function.« In: *Pharmacol. Rev.* 59 (2007), S. 14–39.
- [179] H. C. Tai und E. M. Schuman. »Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction.« In: *Nat. Rev. Neurosci.* 9 (2008), S. 826–838.
- [180] D. C. Rubinsztein. »The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration.« In: *Nature* 443 (2006), S. 780–786.
- [181] C. A. Ross und M. A. Poirier. »Protein aggregation and neurodegenerative disease.« In: *Nat. Med.* 10 (2004), S. 10–17.

- [182] S. tom Dieck, L. Kochen, C. Hanus, I. Bartnik, B. Nassim-Asir, K. Merk, T. Mosler, S. Garg, S. Bunse, D. A. Tirrell und E. M. Schuman. »Direct visualization of identified and newly synthesized proteins in situ.« In: *Nat. Methods* 12 (2015), S. 411–414.
- [183] T. Weinrich, M. Gränz, C. Grünwald, T. F. Prisner und M. W. Göbel. »Synthesis of a cytidine phosphoramidite with protected nitroxide spin label for EPR experiments with RNA.« In: *Eur. J. Org. Chem.* 2017 (2017), S. 491–496.
- [184] J. Enderlein und R. Edermann. »Fast fitting of multi-exponential decay curves.« In: *Opt. Commun.* 134 (1997), S. 371–378.
- [185] N. Gildenhoff. »Time-resolved spectroscopic analysis of fucoxanthin-chlorophyll proteins and isolated carotenoids«. Dissertation. Goethe-Universität Frankfurt, 2011.
- [186] C. Slavov, H. Hartmann und J. Wachtveitl. »Implementation and evaluation of data analysis Strategies for time-resolved optical spectroscopy.« In: *Anal. Chem.* 87 (2015), S. 2328–2336.
- [187] S. A. Kovalenko, A. L. Dobryakov, J. Ruthmann und N. P. Ernsting. »Femtosecond spectroscopy of condensed phases with chirped supercontinuum probing.« In: *Phys. Rev. A* 59 (1999), S. 2369–2384.
- [188] A. L. Dobryakov, S. A. Kovalenko, A. Weigel, J. L. Pérez-Lustres, J. Lange, A. Müller und N. P. Ernsting. »Femtosecond pump/supercontinuumprobe spectroscopy: Optimized setup and signal analysis for single-shot spectral referencing.« In: *Rev. Sci. Instrum.* 81 (2010), S. 113106(1)–113106(9).
- [189] K. Neumann. »Untersuchung ultraschneller Strukturdynamik photo-schaltbarer Moleküle mittels Femtosekunden-Infrarotspektroskopie«. Dissertation. Goethe Universität, 2010.
- [190] P. Hamm, R. A. Kaindl und J. Stenger. »Noise suppression in femtosecond mid-infrared light sources.« In: *Opt. Lett.* 25 (2000), S. 1798–1800.
- [191] I. Lutz. »Vielkanal-Femtosekunden-Spektroskopie der Primärreaktionen von archaebakteriellen Retinalproteinen im sichtbaren Spektralbereich«. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, 2001.
- [192] S. Spörlein. »Femtosekunden-Spektroskopie schnellster Strukturänderungen in Peptid-Chromophor-Komplexen«. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, 2001.
- [193] *Gaussian 09 Revision A*. Gaussian Inc. Wallingford CT 2009.
- [194] P. Bourbon, Q. Peng, G. Ferraudi, C. Stauffacher, O. Wiest und P. Helquist. »Synthesis, photophysical, photochemical, and computational studies of coumarin-labeled nicotinamide derivatives.« In: *J. Org. Chem.* 77 (2012), S. 2756–2762.
- [195] B. Maity, A. Chatterjee und D. Seth. »Photophysics of a coumarin in different solvents: use of different solvatochromic models.« In: *Photochem. Photobiol.* 90 (2014), S. 734–746.

- [196] A. Z. Suzuki, T. Watanabe, M. Kawamoto, K. Nishiyama, H. Yamashita, M. Ishii, M. Iwamura und T. Furuta. »Coumarin-4-ylmethoxycarbonyls as phototriggers for alcohols and phenols.« In: *Org. Lett.* 5 (2003), S. 4867–4870.
- [197] R. O. Schönleber, J. Bendig, V. Hagen und B. Giese. »Rapid photolytic release of cytidine 5-diphosphate from a coumarin derivative: a new tool for the investigation of ribonucleotide reductases.« In: *Bioorg. Med.* 10 (2002), S. 97–101.
- [198] L. J. G. W. van Wilderen, C. Neumann, A. Rodrigues-Correia, D. Kern-Michler, N. Mielke, M. Reinfelds, A. Heckel und J. Bredenbeck. »Picosecond activation of the DEACM photocage unravelled by VIS-pump-IR-probe spectroscopy.« In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19 (2017), S. 6487–6496.
- [199] N. Kamatham, J. P. Da Silva, R. S. Givens und V. Ramamurthy. »Melding caged compounds with supramolecular containers: photogeneration and miscreant behavior of the coumarylmethyl carbocation.« In: *Org. Lett.* 19 (2017), S. 3588–3591.
- [200] G. Jones, W. R. Jackson, C.-Y. Choi und W. R. Bergmark. »Solvent effects on emission yield and lifetime for coumarin laser dyes. Requirements for a rotatory decay mechanism.« In: *J. Phys. Chem.* 89 (1985), S. 294–300.
- [201] P. Dahiya, M. Kumbhakar, T. Mukherjee und H. Pal. »Effect of protic solvents on twisted intramolecular charge transfer state formation in coumarin-152 and coumarin-481 dyes.« In: *Chem. Phys. Lett.* 414 (2005), S. 148–154.
- [202] A. K. Satpati, M. Kumbhakar, S. Nath und H. Pal. »Photophysical properties of coumarin-7 dye: Role of twisted intramolecular charge transfer state in high polarity protic solvents.« In: *Photochem. Photobiol.* 85 (2009), S. 119–129.
- [203] K. Rotkiewicz, K. H. Grellmann und Z. R. Grabowski. »Reinterpretation of the anomalous fluorescence of pn, n-dimethylamino-benzonitrile.« In: *Chem. Phys. Lett.* 19 (1973), S. 315–318.
- [204] Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz und A. Siemiarczuk. »Dual fluorescence of donor-acceptor molecules and the twisted intramolecular charge transfer (TICT) states.« In: *J. Lumin.* 18 (1979), S. 420–424.
- [205] Z. R. Grabowski und J. Dobkowski. »Twisted intramolecular charge transfer (TICT) excited states: energy and molecular structure.« In: *Pure Appl. Chem.* 55 (1983), S. 245–252.
- [206] M. Cigáň, J. Donovalová, V. Szöcs, J. Gašpar, K. Jakusová und A. Gáplovský. »7-(Dimethylamino)coumarin-3-carbaldehyde and its phenylsemicarbazone: TICT excited state modulation, fluorescent H-Aggregates, and preferential solvation.« In: *J. Phys. Chem. A* 117 (2013), S. 4870–4883.
- [207] T. Lopez Arbeloa, F. Lopez Arbeloa, M. J. Tapia Estevez und I. Lopez Arbeloa. »Hydrogen-bonding effect on the photophysical properties of 7-aminocoumarin derivatives.« In: *J. Phys. Chem.* 97 (1993), S. 4704–4707.

- [208] T. Lopez Arbeloa, F. Lopez Arbeloa, M.J. Tapia Estevez und I. Lopez Arbeloa. »Binary solvent effects on the absorption and emission of 7-aminocoumarins.« In: *J. Lumin.* 59.6 (1994), S. 369–375.
- [209] A. Nag, T. Kundu und K. Bhattacharyya. »Effect of solvent polarity on the yield of twisted intramolecular charge transfer (TICT) emission. Competition between formation and nonradiative decay of the TICT state.« In: *Chem. Phys. Lett.* 160 (1989), S. 257–260.
- [210] B. B. Raju und T.S. Varadarajan. »Substituent and solvent effects on the twisted intramolecular charge transfer of three new 7-(diethylamino) coumarin-3-aldehyde derivatives.« In: *J. Phys. Chem.* 98 (1994), S. 8903–8905.
- [211] S. Nad, M. Kumbhakar und H. Pal. »Photophysical properties of coumarin-152 and coumarin-481 dyes: unusual behavior in nonpolar and in higher polarity solvents.« In: *J. Phys. Chem. A* 107.24 (2003), S. 4808–4816.
- [212] M. Cigáň, J. Filo, H. Stankovičová, A. Gáplovský und M. Putala. »Spectral properties of binaphthalene–coumarins interconnected through hydrazone linkage.« In: *Spectrochim. Acta, Part A* 89 (2012), S. 276–283.
- [213] W. Rettig. »Ladungstrennung in angeregten Zuständen entkoppelter Systeme–TICT-Verbindungen und Implikationen für die Entwicklung neuer Laserfarbstoffe sowie für den Primärprozeß von Sehvorgang und Photosynthese.« In: *Angew. Chem.* 98 (1986), S. 969–986.
- [214] A. Barik, M. Kumbhakar, S. Nath und H. Pal. »Evidence for the TICT mediated nonradiative deexcitation process for the excited coumarin-1 dye in high polarity protic solvents.« In: *Chem. Phys.* 315 (2005), S. 277–285.
- [215] B. D. Wagner. »The use of coumarins as environmentally-sensitive fluorescent probes of heterogeneous inclusion systems.« In: *Molecules* 14 (2009), S. 210–237.
- [216] G. A. Reynolds und K. H. Drexhage. »New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers.« In: *Opt. Commun.* 13 (1975), S. 222–225.
- [217] N. Barooah, J. Mohanty, H. Pal und A. C. Bhasikuttan. »Non-covalent interactions of coumarin dyes with cucurbit[7]uril macrocycle: modulation of ICT to TICT state conversion.« In: *Org. Biomol. Chem.* 10 (2012), S. 5055–5062.
- [218] E. Lippert. »Dipolmoment und Elektronenstruktur von angeregten Molekülen.« In: *Z. Naturforsch. A* 10 (1955), S. 541–545.
- [219] N. Mataga, Y. Kaifu und M. Koizumi. »Solvent effects upon fluorescence spectra and the dipolemoments of excited molecules.« In: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 29 (1956), S. 465–470.
- [220] L. Cong, H. Yin, Y. Shi, M. Jin und D. Ding. »Different mechanisms of ultrafast excited state deactivation of coumarin 500 in dioxane and methanol solvents: experimental and theoretical study.« In: *RSC Adv.* 5 (2015), S. 1205–1212.

- [221] H. Marciniak und S. Lochbrunner. »On the interpretation of decay associated spectra in the presence of time dependent spectral shifts.« In: *Chem. Phys. Lett.* 609 (2014), S. 184–188.
- [222] M. Falk und A. G. Miller. »Infrared spectrum of carbon dioxide in aqueous solution.« In: *Vib. Spectrosc.* 1 (1992), S. 105–108.
- [223] D. M. Kern. »The hydration of carbon dioxide«. In: *J. Chem. Educ.* 37 (1960), S. 14–23.