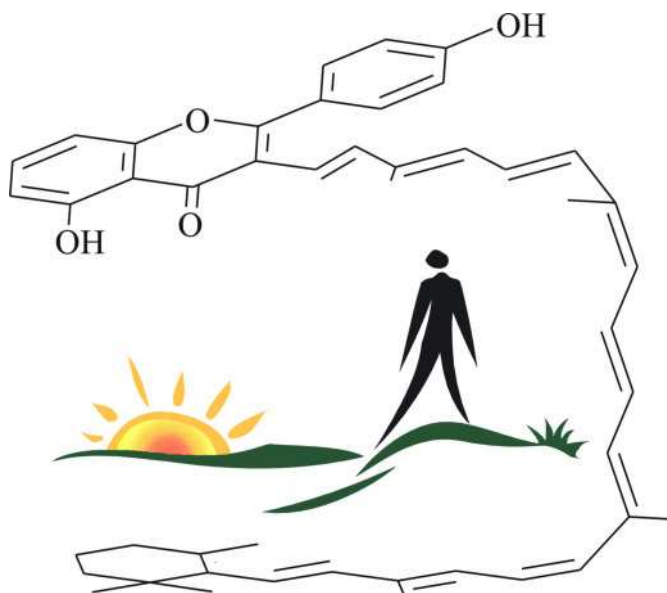


Sonderforschungsbereich 663

Molekulare Antwort nach elektronischer Anregung

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

2005/2 – 2010/1



Abschlussbericht
2009/2 – 2010/1

Deutsche Forschungsgemeinschaft
- Sonderforschungsbereiche -
53170 Bonn

Abschlussbericht des Sonderforschungsbereichs 663

„Molekulare Antwort nach elektronischer Anregung“

"Molecular Response to Electronic Excitation"

gefördert seit 2005/2

für die Jahre 2009/2 – 2010/1

Sprecherhochschule: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Sprecherin des SFB 663:
Prof. Dr. Christel M. Marian

Dienstanschrift
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Institut für Theoretische Chemie
und Computerchemie
Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf
Telefon: (0211) 81-13210
Telefax: (0211) 81-13466
E-Mail: christel.marian@uni-duesseldorf.de

Sekretariat des SFB 663:
Karin Schuck/Gudrun Brauwers

Dienstanschrift
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Institut für Theoretische Chemie
und Computerchemie
Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf
Telefon: (0211) 81-13208
Telefax: (0211) 81-10765
E-Mail: sfb663@theochem.uni-duesseldorf.de

Düsseldorf, den 20. September 2010



Prof. Dr. Christel M. Marian
Sprecherin des SFB 663

1 Übersicht

1.1 Teilprojektleiterinnen und Teilprojektleiter

Name, Vorname, akad. Titel	m/w	Geb. Jahr	Institut	TP	Beginn u. Ende
Fleig, Timo, Prof. Dr.	m	1967	Theoretische Chemie und Computerchemie	C3	Juli 2005 Juni 2009
Gärtner, Wolfgang, Prof. Dr.	m	1951	MPI für Bioanorganische Chemie	B3	Juli 2005 Dez. 2009
Gerhards, Markus, Prof. Dr.	m	1963	Physikalische Chemie I	A3	Juli 2005 Juni 2008
Heberle, Joachim, Prof. Dr.	m	1960	Biologische Struktur forschung, IBI-2, FZ Jülich / Universität Bielefeld, PCIII	B3	Juli 2005 Juni 2009
Holzwarth, Alfred, Prof. Dr.	m	1949	MPI für Bioanorganische Chemie	B2	Juli 2005 Juni 2010
Jahns, Peter, Prof. Dr.	m	1960	Biochemie der Pflanzen	B2	Juli 2005 Juni 2010
Kleinermanns, Karl, Prof. Dr.	m	1950	Physikalische Chemie I	A4	Juli 2005 Juni 2010
Kühnemuth, Ralf, Dr.	m	1963	Physikalische Chemie II	B4	Juli 2005 Juni 2009
Lubitz, Wolfgang, Prof. Dr.	m	1949	MPI für Bioanorganische Chemie	A7	Juli 2005 Juni 2010
Marian, Christel, Prof. Dr.	w	1954	Theoretische Chemie und Computerchemie	C1, Z1	Juli 2005 Juni 2010
Martin, Hans-Dieter, Prof. Dr.	m	1939	Organische Chemie und Makromolekulare Chemie I	B1	Juli 2005 † 8.3.2009
Neese, Frank, Prof. Dr.	m	1967	MPI für Bioanorganische Chemie	C2	Juli 2005 März 2007
Ritter, Helmut, Prof. Dr.	m	1948	Organische Chemie und Makromolekulare Chemie II	B4	Juli 2005 Juni 2009
Schaper, Klaus, Priv.-Doz. Dr.	m	1965	Organische Chemie und Makromolekulare Chemie I	A8, B6	Juli 2005 Juni 2010
Schmitt, Michael, Priv.-Doz. Dr.	m	1964	Physikalische Chemie I	A2	Juli 2005 Juni 2010
Seidel, Claus, Prof. Dr.	m	1961	Physikalische Chemie II	A8, B4	Juli 2005 Juni 2010
Stahl, Wilhelm, Prof. Dr.	m	1955	Biochemie und Molekularbiologie I	B1	Juli 2005 Juni 2010

Allgemeiner Teil

Staudt, Claudia, Prof. Dr.	w	1964	Organische und Makromolekulare Chemie II	B5	Juli 2005 Dez. 2009
Thiel, Walter, Prof. Dr.	m	1949	MPI für Kohlenforschung	C4	Juli 2005 Juni 2010
Weinkauf, Rainer, Prof. Dr.	m	1954	Physikalische Chemie I	A1	Juli 2005 Juni 2010

1.2 Teilprojekte

TP	Titel	Fachgebiet und Arbeitsrichtung	Leiter/in, Institut, Ort	Beginn u. Ende
A1	Direkte Spektroskopie von Triplett-, Ladungstransfer- und Übergangsverbotenen Singulett-Zuständen in Molekülen und Stoßkomplexen	Physikalische Chemie/ Laser-Massenspektroskopie	Prof. Dr. R. Weinkauf, Physikalische Chemie I, HHU, Düsseldorf	Juli 2005 Juni 2010
A2	Bestimmung von Strukturen und Lebensdauern photoprotektiver Addukte in elektronisch angeregten Zuständen	Physikalische Chemie/ Hochauflösende Laserspektroskopie	Priv.-Doz. Dr. M. Schmitt, Physikalische Chemie I, HHU Düsseldorf	Juli 2005 Juni 2010
A3	Analyse von Struktur und Reaktivität in elektronisch angeregten Singulett- und Triplettzuständen von Molekülen und Clustern	Physikalische Chemie/ Spektroskopie	Prof. Dr. M. Gerhards, Physikalische Chemie I, HHU Düsseldorf	Juli 2005 Juni 2008
A4	Primärprozesse und molekulare Folge-mechanismen nach Photoanregung von DNS-Basen- und Porphyrin-Systemen	Physikalische Chemie/Molekül-spektroskopie/Laser-massenspektrometrie	Prof. Dr. K. Kleiner-manns, Physikalische Chemie I, HHU Düsseldorf	Juli 2005 Juni 2010
A7	Elektronische Struktur und Wechselwirkung der Triplett-zustände von Carotinoiden und Chlorophyllen	Biophysikalische Chemie/ Spektroskopie	Prof. Dr. W. Lubitz, MPI für Bioanorganische Chemie, Mülheim	Juli 2005 Juni 2010
A8	Steigerung der Signalstärke und Photostabilität von Fluorophoren bei der Einzelmolekülspektroskopie	Physikalische Chemie/ Organische Chemie Spektroskopie	Prof. Dr. C. Seidel, Physikalische Chemie II, HHU Düsseldorf / Priv.-Doz. Dr. K. Schaper, Organische Chemie und Makromolekulare Chemie I HHU Düsseldorf	Juli 2005 Juni 2010

TP	Titel	Fachgebiet und Arbeitsrichtung	Leiter/in, Institut, Ort	Beginn u. Ende
B1	Photoprotektion und Photodynamik durch Mikronährstoffe und analoge Verbindungen	Organische Chemie/Natur und Wirkstoffforschung / Medizin/Medizinische Biochemie	Prof. Dr. H.-D. Martin, Organische und Makromolekulare Chemie I / Prof. Dr. W. Stahl, Biochemie und Molekularbiologie I, HHU Düsseldorf	Juli 2005 Juni 2010
B2	Molekulare Grundlagen photoprotektiver Mechanismen in Pflanzen	Biochemie der Pflanzen biophysikalische-Ausrichtung und Biophysik	Prof. Dr. P. Jahns, Biochemie der Pflanzen, HHU Düsseldorf / Prof. Dr. A. R. Holzwarth, MPI für Bioanorganische Chemie, Mülheim	Juli 2005 Juni 2010
B3	Schwingungsspektroskopische Untersuchungen an Flavin-haltigen biomimetischen Systemen	Biophysikalische Chemie, Spektroskopie, Bioorganische Chemie	Prof. Dr. J. Heberle, Forschungszentrum Jülich, IBI-2, danach Universität Bielefeld, PCIII / Prof. Dr. W. Gärtner, Max-Planck-Institut für bioanorganische Chemie, Mülheim	Juli 2005 Dez. 2009
B4	Einfluss mechanischer Kräfte auf die photochemischen Primärprozesse polymergebundener Chromophore	Makromolekulare Chemie, Physikalische Chemie, Spektroskopie	Prof. Dr. H. Ritter, Organische und Makromolekulare Chemie II / Prof. Dr. C. Seidel / Dr. R. Kühnemuth, Physikalische Chemie II, HHU Düsseldorf	Juli 2005 Juni 2009
B5	Immobilisierung von chromophoren Gruppen an funktionalisierten Copolyimiden	Präparative Makromolekulare Chemie	Prof. C. Staudt, Organische und Makromolekulare Chemie II, HHU Düsseldorf	Juli 2005 Dez. 2009
B6	<i>Caged Compounds</i> : Entwicklung verbesserter Werkzeuge für die Biophysik auf der Grundlage eines mechanistischen Verständnisses	Organische Chemie/ Organische Photochemie	Priv.-Doz. Dr. K. Schaper, Organische und Makromolekulare Chemie I HHU Düsseldorf	Juli 2005 Juni 2010

Allgemeiner Teil

TP	Titel	Fachgebiet und Arbeitsrichtung	Leiter/in, Institut, Ort	Beginn u. Ende
C1	Quantenchemische Bestimmung von spinmagnetischen Wechselwirkungen und Singulett-Triplett-Kopplungen mit Multireferenz-Konfigurationswechselwirkungs-Methoden	Theoretische Chemie, Quantenchemie	Prof. Dr. C. M. Marian, Theoretische Chemie und Computerchemie, HHU Düsseldorf	Juli 2005 Juni 2010
C2	Dichtefunktional und Hartree-Fock basierte Berechnung der Nullfeldaufspaltung in großen Molekülen	Theoretische Chemie, Quantenchemie	Prof. Dr. F. Neese, MPI für Bioanorganische Chemie, Mülheim	Juli 2005 März 2007
C3	Energetische Lage von Ladungsübertragungszuständen	Theoretische Chemie, Quantenchemie	Prof. Dr. Timo Fleig, Theoretische Chemie und Computerchemie, HHU, Düsseldorf	Juli 2005 Juni 2009
C4	Elektronisch angeregte Zustände in großen Molekülen	Theoretische Chemie, Quantenchemie	Prof. Dr. W. Thiel, MPI für Kohlenforschung, Mülheim	Juli 2005 Juni 2010
Z1	Zentrale Aufgaben des Sonderforschungsbereichs		Prof. Dr. C. M. Marian, Institut für Theoretische Chemie und Computerchemie, HHU Düsseldorf	Juli 2005 Juni 2010

1.3 Beteiligte Fachbereiche, Institute und Einrichtungen der Hochschule und außeruniversitären Institute

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Wissenschaftliche Einrichtung Chemie

Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie

Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie

Institut für Theoretische Chemie und Computerchemie

Wissenschaftliche Einrichtung Biologie

Institut für Biochemie der Pflanzen

Medizinische Fakultät

Institut für Biochemie und Molekularbiologie I

Forschungszentrum Jülich GmbH

Institut für Biologische Informationsverarbeitung

IBI-2: Biologische Strukturforschung

Max-Planck-Gesellschaft

Max-Planck-Institut für Bioorganische Chemie, Mülheim a. d. Ruhr

Abteilung Biophysikalische Chemie

Abteilung Bioorganische Chemie

Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim a. d. Ruhr

Abteilung Theorie

Universität Bielefeld

Fakultät für Chemie

Physikalische Chemie III

1.4 Finanzielle Ausstattung

Haushalts- jahr	Personalmittel	Sachmittel	Investitionsmittel	Summe
2005/2	470,1	172,1	249,9	892,1
2006	1.063,2	287,1	55,0	1.405,3
2007	974,4	357,1		1.331,5
2008	945,0	361,2		1.306,2
2009/1	457,8	154,1		611,9
Zwischensumme erste Förderperiode				5.547
2009/2	369,6	70,5		440,1
2010/1	325,5	79,5		405,0
Zwischensumme zweite Förderperiode				845,1
Gesamtsumme:				6.392,1

(Alle Angaben in Tausend Euro)

2 Zentrale Ergebnisse des Sonderforschungsbereichs

2.1 Wissenschaftliche Entwicklung

Im Zentrum der Forschungsaktivitäten des Mitte 2005 gegründeten SFB 663 „*Molekulare Antwort nach elektronischer Anregung*“ standen molekulare Prozesse auf elektronisch angeregten Potentialflächen komplexer chemischer, biomimetischer und biologischer Systeme. Vorrangiges Ziel war es dabei, die durch Einwirkung von Photonen auftretenden intra- und intermolekularen Wechselwirkungen im Detail zu verstehen, die elektronischen Zwischenzustände und Reaktionswege der beteiligten Moleküle zu identifizieren und aufbauend auf diesen Erkenntnissen, gezielt verbesserte oder gar neuartige photoaktive Systeme zu konzipieren.

Zentrale Fragestellungen des SFB 663 rankten sich um die Themen Photostabilität, Photoprotektion und Photoreaktivität. Zur Untersuchung dieser Fragestellungen wurde die Strategie verfolgt, die molekulare Antwort eines elektronisch angeregten Chromophors in komplexer Umgebung zunächst auf vereinfachte Modellsysteme zurückzuführen und interdisziplinär zu bearbeiten. Schritt für Schritt sollte die Komplexität erhöht werden, um sich damit den natürlich vorkommenden oder artifiziellen Systemen von komplexer Struktur anzunähern. Neben konkreten Anwendungen stand die Entwicklung neuer experimenteller und theoretischer Methoden im Vordergrund.

Um eine synergetische Verstärkung zu erreichen, wurde besonderer Wert gelegt auf eine enge Verzahnung von Experiment und Theorie, die Bündelung der Expertisen aus Chemie, Biologie und Medizin, die Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Charakterisierung elektronisch angeregter Zustände, die Anwendung komplementärer Methoden auf Fächer übergreifende Fragestellungen, die Etablierung einfacher molekularer Modelle und die Übertragung der an diesen Modellen gewonnenen Erkenntnisse auf komplexe Systeme. Das langfristige Ziel, nämlich die iterative Optimierung gewünschter Eigenschaften von Chromophorsystemen konnte trotz der reduzierten Förderzeit in Teilbereichen umgesetzt werden. In zahlreichen Fällen ist es gelungen, den Bogen von der theoretischen Chemie über die Spektroskopie und Synthese hin bis zur Biologie/Medizin zu spannen. Darüber hinaus entwickelten sich zahlreiche bilaterale Kooperationen. Im Folgenden werden beispielhaft einige wesentliche, im SFB 663 errungene Erkenntnisse und Fortschritte präsentiert.

Carotinoide und andere Polyene spielen im SFB eine zentrale Rolle, da ihre ungewöhnliche Elektronenstruktur sie zu vielfältigen Photoprotektionsreaktionen befähigt. Die Weiterentwicklungen am Puls-ENDOR-Aufbau (Q-Band) ermöglichten die Aufnahme von ENDOR-Spektren von kurzlebigen Triplettzuständen mit bisher nicht erreichtem Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Dadurch gelang es erstmals, die Triplett-Spindichte-Verteilung im Carotinoid einer Antenne zu bestimmen, was einen Durchbruch in der Triplett-Spektroskopie darstellt.[1*] Bisher waren alle Versuche an den sehr kleinen Signalen und den schnellen Zerfallszeiten (auch bei sehr tiefen Temperaturen) gescheitert. Die sehr ungewöhnliche Relaxationsdynamik (elektronische Kohärenz) der angeregten Zustände von längerkettigen Carotinoiden, die für das Verständnis der Funktion von Carotinoiden bei Energie- und Elektronentransfer-Reaktionen eine zentrale Rolle spielt, konnte durch das Zusammenwirken Femtosekunden aufgelöster Spektroskopie und quantenchemischen Untersuchungen auf eine konische Durchschneidung der $^1B_u^+$ und $^1B_u^-$ zurückgeführt werden.[2*] Im Gegensatz dazu ist die stark von der Umgebung abhängige Relaxationsdynamik carbonylhaltiger Carotinoide noch weitgehend unverstanden. In einer fächerübergreifenden Kooperation wurden im SFB phenolische und quinoide Carotinoide untersucht. Von diesen zeigte 3,3'-Dihydroxyisorenieratin (DHIR) herausragende photoprotektive und antioxidative Wirkung.[3*,4*] Die einzigartige elektronische Struktur dieses Moleküls, das natürlich in Belägen von Rotschimmelkäsen vorkommt, ist für diese besonderen Eigenschaften maßgeblich verantwortlich.[5*] Diese Substanz könnte als Lichtschutzmittel und Antioxidanz eingesetzt werden und als Komponente in funktionellen Nahrungsmitteln oder Supplementen zur Prävention altersabhängiger Erkrankungen dienen. Ein Patent wurde von der HHU Düsseldorf zusammen mit der BASF angemeldet.[40*] Ein Durchbruch auf dem Weg zum

Verständnis der photoprotektiven Energiedissipationsprozesse (=NPQ-Mechanismus) in Pflanzen ergab sich durch die Etablierung einer neuartigen Messmethode, welche die Anwendung ultraschneller Fluoreszenz-Spektroskopie auf intakte Blätter und somit die Untersuchung des NPQ-Mechanismus unter *in vivo* Bedingungen erlaubt. [6*] Anhand vergleichender Messungen an verschiedenen Mutanten konnte ein neues Modell für die Lokalisation des NPQ entwickelt werden, in dem erstmals zwei parallel arbeitende, unabhängige NPQ-Zentren mit zwei unterschiedlichen NPQ-Mechanismen vorgeschlagen werden. Damit ist es nun möglich, die bisher in der Literatur vorgeschlagenen, konträren Modelle zur Lokalisation des NPQ-Schutzmechanismus in einem gemeinsamen Modell zu vereinigen.[7*] Die Dynamik der *cis/trans*-Isomerisierung im S_1 Zustand wurde am Beispiel von Retinal-Modellen mit „surface hopping“ Simulationen untersucht.[8*] Kurzkettige und cyclische Polyene können als Triplettlöcher für Fluoreszenzfarbstoffe fungieren. Für die Löschung der bei der intensiven Anregung von Rhodamin-Farbstoffen in der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie entstehenden langlebigen, nicht fluoreszierenden Farbstoffspezies (T_1 , R^+ , R^-) wurde ein neues Reaktionsmodell entwickelt.[9*] Wichtige Aspekte waren dabei die Vorhersage der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Konzentration des Löschers und vom Löschmechanismus. Einige Triplettlöcher zeigten zusätzlich eine antioxidative Wirkung, so dass die Zählrate auf das Achtfache gesteigert werden konnte. Erste Konjugate zwischen Farbstoffen und Triplettlöchern wurden hergestellt, der Optimierungsprozess ist aber noch nicht abgeschlossen. Für die Optimierung der Eigenschaften wichtig ist die Kenntnis der energetischen Lage der Triplettzustände. Mit Hilfe des in der ersten Förderperiode neu konzipierten und in der zweiten Förderperiode zur Anwendungsreife entwickelten Anionenphotoelektronenspektrometers gelang an isolierten Polyenen und ihren Komplexen mit molekularem Sauerstoff der direkte Nachweis optisch dunkler Zustände. Komplementär wurde mit transientser Triplettabsorptionsspektroskopie das Verhalten der intermediären Zustände in einer Lösungsumgebung untersucht. Carotinoide und ihre kurzkettigen Verwandten werden auch weiterhin ein Gegenstand intensiver Forschung sein, zumal diese Moleküle hohe Anforderungen nicht nur an die spektroskopischen sondern auch an die theoretischen Methoden stellen, wie im SFB durchgeführte Benchmarkrechnungen belegen. [10*,11*,12*]

Im SFB 663 wurden grundlegende Erkenntnisse über allgemeine Strukturmerkmale für die Existenz schneller Relaxationswege in photostabilen Substanzen gewonnen. Durch die Erforschung der spektralen Eigenschaften von isolierten Molekülen sowie ihrer Komplexe mit Wasser hat der SFB wichtige Beiträge zum Verständnis der Struktur-Stabilitäts-Beziehung von Nucleobasen und anderen heterozyklischen Systemen geleistet. Von besonderem Vorteil war dabei, dass die spektroskopischen Untersuchungen durch gezielte Synthesen von Derivaten unterstützt und ihre Interpretation durch quantenchemische Rechnungen begleitet wurden. So waren z. B. im Falle der DNA-Base Guanin durch resonante Zweiphotonenionisation vier Tautomere nachgewiesen worden, die Zuordnung der Spektren zu den Tautomeren war jedoch lange Zeit umstritten. Der SFB konnte zur Auflösung dieser Streitfrage entscheidende Beiträge leisten. Theoretische Untersuchungen zeigten, dass die biologisch relevante Form spektral nicht erfasst wird, sondern durch eine konische Durchschneidung in den elektronischen Grundzustand relaxiert und daher besonders photostabil ist.[13*] Simulationen der schnellen Relaxationsdynamik durch „surface hopping“ Rechnungen ergaben, dass in der Regel mehrere konkurrierende Relaxationspfade existieren.[14*] Experimentell konnte gezeigt werden, dass nach Laserdesorption von Guanin Iminotautomere im Molekularstrahl vorhanden sind, die für die spektrale Signatur verantwortlich sind.[15*] Unter dem Einfluss von Lösungsmittel und Temperatur ergeben sich spektrale Verschiebungen, die durch QM/MM-Methoden gut reproduziert werden und belegen, dass dies ein gangbarer Weg zur Behandlung von Umgebungseinflüssen auf elektronisch angeregte Zustände ist.[16*] Surface-Hopping-Rechnungen auf OM2/MRCI-Niveau wurden auch an den Pyrimidin-Nucleobasen Uracil, Thymin und Cytosin, um die nichtadiabatische Dynamik und die Relaxationsmechanismen dieser Moleküle in der Gasphase zu verstehen, wobei die berechneten Lebensdauern generell gut mit den publizierten experimentellen Daten übereinstimmten.[17*] Bei Uracil und Thymin dominiert dabei ein schrittweiser Relaxationsmechanismus, während in Cytosin der direkte $S_1 \rightarrow S_0$ Übergang am wichtigsten ist. Die Natur der experimentell beobachteten langlebigen Dunkelzustände in Pyrimidin-Nucleobasen und die Beteiligung von transienten Triplettzustän-

Allgemeiner Teil

den am Relaxationsprozess konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Während die Interpretation von Molekularstrahlexperimenten den S_1 -Zustand als Ursprung des mehrere Hundert Nanosekunden langlebigen Dunkelzustands favorisiert,[18*] postulieren quantenchemische Untersuchungen, dass der eventuell populierte intermediäre S_1 -Zustand in isolierten Uracilderivaten durch Interkombination ultraschnell in den darunter liegenden T_1 -Zustand relaxiert.[19*] Die Auflösung dieses Widerspruchs erfordert weitere Untersuchungen.

Von der Kooperation zwischen experimentellen und theoretisch arbeitenden Gruppen haben in der Regel beide Partner profitiert. So konnten durch hochgenaue Messungen an Indolderivaten in der Gasphase Daten erhoben werden, die als Prüfstein für die Qualität der theoretischen Näherungsverfahren in den Projekten dienen. Dabei konnten nicht nur die stationären Punkte auf den angeregten Potentialflächen abgetastet werden, sondern es wurde auch die konische Durchschneidung zwischen den L_a - und L_b -Zuständen charakterisiert.[20*,21*] Umgekehrt lieferten quantenchemische Rechnungen entsprechende Interpretationshilfen bei der Zuordnung der Spektren.

Dem Ziel, die mechanistischen Hintergründe komplexer photophysikalischer, photochemischer und photobiologischer Prozesse auf molekularer Ebene zu verstehen, ist der SFB 663 während seiner Förderzeit ein gutes Stück näher gekommen. Die Bedeutung der Umgebung für den Ablauf der photoinduzierten Prozesse wurde von uns an vielen Beispielen gezeigt. Durch das Zusammenwirken von Theorie und Experiment sind zum Beispiel die ersten Schritte verstanden, die der primären Photoanregung des Flavinmononukleotids in der LOV1-Domäne von Blaulicht-sensitiven Photorezeptoren folgen. Wie bereits zu Beginn des Förderzeitraums bekannt war, erfolgt zunächst ein Übergang von der Potentialfläche des elektronisch angeregten Singulett-Zustands in einen Triplett-Zustand. Entgegen früherer Annahmen zeigen unsere Simulationen jedoch, dass die Interkombination in der Proteinumgebung und in wässrigen Lösungen nicht über einen Zwischenzustand vom $n \rightarrow \pi^*$ -Typ verläuft, sondern über vibronische Spin-Bahn-Kopplung zweier $\pi \rightarrow \pi^*$ -Zustände.[22*,23*] Diese nach den El Sayed-Regeln verbotene Art der Interkombination wurde bisher wenig beachtet, scheint nach unseren Erkenntnissen aber ein weit verbreiteter Mechanismus in polar protischen Umgebungen zu sein.[24*] Zur weiter gehenden Aufklärung der Photochemie von Blaulichtrezeptoren wurden chemisch modifizierte Flavine synthetisiert [25*] und mit einem eigens entwickelten Protokoll in eine Proteinmatrix unter Austausch des nativen Chromophors eingebunden. Ein bedeutender Aspekt der Photochemie des 5-Deaza-Riboflavins, das nach photochemischer Anregung mit einem Cystein-Rest der LOV-Domäne des Proteins YtvA aus *Bacillus subtilis* reagiert, ist die Photoadressierbarkeit. Hierbei wurde ein in beiden Richtungen photo-schaltbares System identifiziert, das eine breite Palette an potentiellen biologischen und biotechnologischen Anwendungen aufweist. Durch transiente Triplett-Triplett-Absorptionsspektroskopie konnte für 5-Deaza-Riboflavin die Bildung eines intermediären Triplets gezeigt werden.[26*] Der rasche Zerfall der starken Fluoreszenz von 1-Deaza-Riboflavin im ps-Zeitbereich und die starke Lösungsmittelabhängigkeit des Prozesses sind noch unverstanden.[27*] Auch an donorsubstituierten *caged compounds* vom *o*-Nitrobenzyltyp konnten grundlegend neue mechanistische Erkenntnisse gewonnen werden, die durch begleitende theoretische Arbeiten erhärtet wurden.[28*] Ebenso wie in der Flavinphotochemie besteht hier die Herausforderung darin, Chromophore zu finden, die längerwellig absorbieren aber dennoch photoaktivierbar sind. Bereits in der ersten Förderperiode konnten im SFB 663 wichtige Forschungsergebnisse mit Anwendungsorientierung erzielt werden. Neben den bereits erwähnten photoprotektiven phenolischen Carotinoiden [3*,4*] sind dies Hochleistungspolymere [29*] mit photovernetzbaaren Seitengruppen, die in fester Phase ohne Zugabe von Photoinitiatoren vernetzt wurden. Die resultierenden Polymere zeigen hervorragende Filmbildungseigenschaften und sind selbst gegen aggressive organische Lösemitteln resistent, so dass ein hohes Anwendungspotential im Bereich der membranunterstützten Auftrennung von Stoffgemischen erwartet wird.

Auch auf Seiten der Methodenentwicklung konnten beachtliche Erfolge verzeichnet werden. Die Etablierung der Anionenphotodetachmentspektrometrie erwies sich als unerwartet schwierig. Der Aufbau der Apparatur, die es erlaubt, nicht nur T_1 -Zustände, sondern auch höhere Triplett- und Singulettzustände spektroskopisch zu charakterisieren, konnte erst in der zweiten Förderperiode abgeschlossen werden.[30*] Weltweit ist es jetzt damit erstmals möglich, mit

dieser Technik optisch dunkle angeregte Neutralzustände von größeren π -Systemen und ihren Clustern in der Gasphase zu untersuchen. Bisher wurden mit der neu konzipierten Apparatur Ladungsübertragungskomplexe von Indol-Sauerstoff sowie Singulett- und Triplett-Zustände von Diphenylpolyenen, Oligothiophenen, Benzochinon, Xanthon sowie weiteren heterozyklischen Systeme spektroskopiert und charakterisiert. Wegen der verzögerten Fertigstellung des apparativen Aufbaus stehen Publikationen noch weitgehend aus. Deshalb sei an dieser Stelle auf den ausführlichen Bericht im TP A1 verwiesen. Die Anpassung molekularer Parameter an experimentelle, spektral hoch aufgelöste Spektren wird mit zunehmender Komplexität der Moleküle deutlich komplizierter und in manchen Fällen mit klassischen Zuordnungsmethoden sogar unmöglich. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren erfolgreich automatisierte Zuordnungsverfahren entwickelt, die auf der Anwendung genetischer Algorithmen beruhen.[38*] Im Bereich der optischen Spektroskopie gelang es, mehrere methodische Weiterentwicklungen zu etablieren: So konnten u. a. erstmals an isolierten Molekülen kombinierte UV/IR/UV-Techniken zur Analyse von reaktiven elektronisch angeregten Zuständen bzw. Triplettzuständen eingesetzt werden.[31*] Auch die bisher einzigartige Messung der Spindichteverteilung eines sehr kurzlebigen Carotinoid-Tripletts beruhte wesentlich auf apparativen Weiterentwicklungen der ENDOR-Spektroskopie (EPR-detektierte NMR) bezüglich Zeitauflösung und Empfindlichkeit.[1*,32*,33*] Im Rahmen des SFB wurde weiterhin eine völlig neue Apparatur konstruiert, in der mittels einer externen Zugkraft die Fluoreszenzeigenschaften eines Farbstoffs gezielt und eindeutig manipuliert werden können. Auch wenn die erzielten Effekte sehr klein waren, konnte mit unserer Studie die Machbarkeit optischer Kraftsensoren demonstriert werden.[34*] In Vorarbeiten für die zweite Förderperiode, zu deren Finanzierung der SFB 663 wesentlich über Pauschale Mittel beigetragen hat, gelang der AG Müller durch Domino- und Multikomponenten-Synthese von Heterocyclen neben pH-sensitiven Fluorophoren und ungewöhnlichen fluoreszierenden Spirocyclen auch der schnelle Aufbau von kryofluoreszenten Verbindungen, bei denen in Lösung bei tiefen Temperaturen Konformationsänderungen eingefroren werden und sich durch Fluoreszenz bemerkbar machen. Damit besteht nun die Möglichkeit, diversitätsorientierte Synthese zur Adressierung photochemischer und photophysikalischer Fragestellungen als neue experimentell-präparative Methode bereitzustellen und neue Konzepte zu erproben und zu entwickeln.

Auch innerhalb der Theorieprojekte nahm die Methodenentwicklung einen breiten Raum ein. Sie konzentrierte sich auf folgende Schwerpunkte: Entwicklung von Verfahren zur Berechnung von Raten für Singulett-Triplett-Interkombinationen; Entwicklung von Methoden zur Charakterisierung spinmagnetischer Eigenschaften von Triplettzuständen; Entwicklung von kombinierten QM/MM Verfahren zur Untersuchung von elektronischen Spektren und photochemischen Reaktionen in großen Biomolekülen unter Einbeziehung der Umgebung; Entwicklung eines semiempirischen QM Verfahrens zur Behandlung von elektronisch angeregten Zuständen in großen Biomolekülen. Zur Berechnung von Interkombinationsraten wurden während der Laufzeit des SFB 663 verschiedene Verfahren entwickelt. Neben dem mittlerweile wohl erprobten, aber häufig sehr Ressourcen intensiven zeitunabhängigen Formalismus für direkte und vibronische Spin-Bahn-Kopplung [24*] wurden in der zweiten Förderperiode neue Methoden zur Berechnung von Raten in Condon-Näherung im zeitabhängigen Formalismus etabliert. Eine Publikation hierzu ist in Vorbereitung. Schon sehr früh wurde ein effizientes und allgemein anwendbares Programm zur Berechnung der Elektron-Elektron Spin-Spin-Kopplung auf der Basis von Kohn-Sham Wellenfunktionen entwickelt und erfolgreich in das ORCA Programmpaket integriert.[35*] Die Schnittstelle zwischen dem in der AG Neese (ehemaliges TP C2) entwickelten Programm zur Berechnung von RI-genäherten dipolaren Elektron-Elektron Spin-Spin-Wechselwirkungsintegralen und dem ebenfalls im SFB entwickelten DFT/MRCI-basierten SPOCK.SISTR-Programm konnte fertig gestellt werden, so dass technisch jetzt auch größere organische Moleküle mit räumlich nicht entarteten angeregten Triplettzuständen einer Berechnung von Nullfeldaufspaltungen zugänglich sind.[36*] Benchmarkrechnungen zeigen, dass die Fehler, die man bei der RI-Näherung mit Standard-Hilfsbasen macht, verschwindend gering sind. Vergleiche mit experimentell bekannten Daten zeigen jedoch auch, dass zur Berechnung der Nullfeldaufspaltung durch elektronische Spin-Spin-Wechselwirkung große und flexible Valenzorbitalbasen, möglichst von Quadrupel-Zeta-Qualität, benötigt werden. Die Entwicklung von kombinierten QM/MM Verfahren zur Untersuchung von elektronischen

Allgemeiner Teil

Spektren und photochemischen Reaktionen in großen Biomolekülen unter Einbeziehung der Umgebung umfassten Arbeiten zur Lokalisierung von konischen Durchschneidungen [37*] und zur Surface-Hopping-Dynamik [39*] sowie die Anpassung von QM/MM Techniken zur Geometrieoptimierung und zur Berechnung freier Energien. Die Entwicklung eines semiempirischen QM Verfahrens zur Behandlung von elektronisch angeregten Zuständen in großen Biomolekülen erfordert die Auswahl geeigneter Referenzdaten für die nötigen semiempirischen Parametrisierungen. Hierzu wurden eine Reihe von Benchmark-Rechnungen von vertikalen Anregungsenergien und Oszillatorenstärken durchgeführt (s. z. B. [10*,11*]). Darüber hinaus wurden die wichtigsten, derzeit verfügbaren semiempirischen Methoden bezüglich der jetzt neu erstellten ab initio Referenzdaten für elektronisch angeregte Zustände systematisch evaluiert, dabei erwiesen sich die OMx-Methoden bereits in ihrer Grundzustands-Parametrisierung als deutlich überlegen gegenüber den etablierten Standardmethoden wie MNDO, AM1, PM3 oder INDO/S. Es ist zu erwarten, dass die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der OMx-Methoden für elektronisch angeregte Zustände weiter gesteigert werden kann, wenn entsprechende Referenzdaten in die Parametrisierung einbezogen werden. Derartige Parametrisierungen sind derzeit im Gange. Durch die Eingliederung der DFT/MRCI-, SPOCK- und ORCA-Programme in die ChemShell wurde das Arsenal der verfügbaren QM/MM Methoden für elektronisch angeregte Zustände erheblich erweitert und auf die Behandlung spinabhängiger Eigenschaften ausgedehnt. Dennoch besteht bei den Verfahren zur theoretischen Beschreibung der Struktur und Dynamik elektronisch angeregter Zustände in komplexen molekularen Systemen weiterhin erheblicher Entwicklungsbedarf.

2.2 Interne Kooperation und Organisation

Der SFB hat von der engen Kooperation zwischen präparativen, spektroskopischen und theoretischen Projekten außerordentlich profitiert. So konnten z. B. chemische Substanzen für bestimmte Zwecke Maß geschneidert bzw. biologische Komplexe durch gezielte Mutagenese verändert und ihre spektroskopische Signatur mit Theorieunterstützung interpretiert werden, um Einblicke in Reaktions- und Relaxationsmechanismen zu erhalten und so die Eigenschaften gezielt zu optimieren. Die Fächer übergreifende Bearbeitung der wissenschaftlichen Fragestellungen des SFB durch Arbeitsgruppen aus der physikalischen und theoretischen Chemie, der organischen und makromolekularen Chemie, der Biochemie, der Biophysik und der Molekularbiologie war zu Beginn mit den üblichen Anlaufschwierigkeiten behaftet, da zunächst eine gemeinsame Sprache gefunden werden musste. Um die Fähigkeit zu interdisziplinärer Forschung zu verbessern, wurde von den Teilprojektleitern des SFB 663 eine zweisemestrige, englischsprachige Ringvorlesung angeboten. In der Folge hat sich die interdisziplinäre Zusammenarbeit als sehr fruchtbar erwiesen, was sich unter Anderem in einer Vielzahl Projekt übergreifender Publikationen niedergeschlagen hat.

Ursprünglich waren am SFB neben der Sprecherhochschule, der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHUD), drei externe Institutionen beteiligt: das Forschungszentrum (FZ) Jülich und die Max-Planck-Institute (MPI) für Bioanorganische Chemie und für Kohlenforschung in Mülheim. Auf Grund der Wegberufung von Joachim Heberle an die Universität Bielefeld entfiel der Standort am FZ Jülich. Zwischen dem FZ Jülich und der HHUD bestehen jedoch weiterhin enge Kontakte, die von beiden Seiten auf allen Ebenen organisatorisch gefördert werden. Nach dem Umzug der Arbeitsgruppe Heberle nach Bielefeld gestaltete sich die Zusammenarbeit trotz guter Vorsätze schwierig. Die Kooperation zwischen den Arbeitsgruppen des SFB 663 an der HHUD und den MPIs in Mülheim verlief hingegen sehr intensiv. Zusätzlich zu den durch das SFB-Büro zentral organisierten Veranstaltungen kam es auf der Ebene der Teilprojektleiter(innen) und Mitarbeiter(innen) immer wieder zu Arbeitstreffen im kleinen Kreis. Als besonders nutzbringend hat sich dabei die Komplementarität der Expertisen und Apparaturen an beiden Standorten erwiesen. Beflügelt wurden die Kontakte auch sicherlich durch die Tatsache, dass die Mülheimer Teilprojektleiter der HHUD als Honorarprofessoren oder außerplanmäßige Professoren verbunden sind und ihre Doktorand(inn)en an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der HHUD promoviert werden.

Der SFB 663 hatte folgende Organisationsstruktur gewählt:

A Photoinduzierte Prozesse in Modellsystemen

B Photoinduzierte Prozesse in komplexen Systemen

C Theoretische Modellierung

Z Allgemeine Aufgaben

Diese Gliederung hat sich bewährt, allerdings waren die Abgrenzungen zwischen den Teilbereichen A, B und C nicht scharf. Vielmehr hat die zunehmende Vernetzung in der ersten Förderperiode ein enges Zusammenwachsen des SFB 663 bewirkt. Obwohl die Zusammenarbeit zwischen Experiment (in A und B) und der Theorie (in C) im SFB 663 hervorragend funktioniert hat, wäre der Versuch interessant, Experimente und applikative Aspekte der theoretischen Modellierung in systemisch definierten Bereichen zusammen zu fassen, um die Synergie noch zu steigern. Während im Bereich Z in der ersten Förderperiode nur das zentrale Verwaltungsprojekt beheimatet war, hatten wir für die zweite Förderperiode als weiteres Z-Projekt ein integriertes Graduiertenkolleg vorgesehen, das die strukturierte Doktorandenausbildung befördern sollte, ein Konzept, das die Gutachter allerdings leider nicht überzeugt hat. Nach den Erfahrungen der letzten Jahre würde ich die Personalstruktur im zentralen Verwaltungsprojekt ändern wollen. Die Aufgaben des SFB-Sekretariats, das neben der zentralen Mittelverwaltung, der Erhebung von statistischen Daten und der Erstellung von Berichten und Anträgen auch noch an der Öffentlichkeitsarbeit und bei der Organisation von Workshops, Tagungen, Kolloquien und Kursen für Doktorandinnen und Doktoranden mitwirken soll, waren zu komplex für eine Sekretariatsangestellte oder einen Sekretariatsangestellten, so dass große Teile dieser Organisationstätigkeiten auf den Schultern der Sprecherin und ihres Stellvertreters lagen. Zur Entlastung der Sprecherin oder des Sprechers eines Sonderforschungsbereichs von diesen organisatorischen Aufgaben wäre es wünschenswert, ihr/ihm eine wissenschaftliche Koordinatorin oder einen wissenschaftlichen Koordinator mit einer Beschäftigungszeit von wenigstens 50% der regulären Arbeitszeit zur Seite zu stellen und die Aufgaben der/des dann ebenfalls in Teilzeit beschäftigten Sekretariatsangestellten auf die Mittelverwaltung, die Erhebung von statistischen Daten und die Mitwirkung bei der Erstellung von Berichten und Anträgen zu beschränken.

In der Ordnung des SFB 663 waren folgende Organe vorgesehen:

1. Sprecher(in) und Stellvertreter(in), jeweils gewählt für eine Förderperiode
2. Kommission, ebenfalls gewählt für eine Förderperiode und bestehend aus Sprecher(in) und Stellvertreter(in), je zwei Vertretern der Teilbereiche A und B sowie einem Vertreter des Teilbereichs C
3. Mitgliederversammlung, bestehend aus allen Teilprojektleiter(inne)n als stimmberechtigten Mitgliedern sowie auf Antrag weiteren, nicht stimmberechtigten Mitgliedern, die in der Regel promovierte Wissenschaftler(innen) sind

Die Kommission bereitet die Entscheidungen der Mitgliederversammlung vor, insbesondere in Fragen der Programmplanung und Mittelverteilung und unterstützte die Sprecherin und ihren Stellvertreter bei der Erstellung des Gesamtberichts und eventueller Fortsetzungsanträge. Diese Organisationsstruktur hat sich im Großen und Ganzen bewährt, allerdings halte ich es nach den Erfahrungen der letzten Jahre für wünschenswert, die Doktorandinnen und Doktoranden eines SFB stärker in die Beratungs- und Entscheidungsprozesse einzubeziehen, z. B. durch gewählte Gremienvertreter.

Bei der internen Vergabe von zentral bewilligten Mittel haben wir uns um hohe Transparenz bemüht, ohne dabei jedoch einen bürokratischen Wasserkopf zu generieren. Reisemittel wurden entsprechend eines Schlüssels aufgeteilt, der sich an der Anzahl der Mitarbeiter(innen) im Teilprojekt orientierte, wobei Teilprojektleiter(innen) mitgezählt wurden. Es wurde den Teilprojekten gestattet, Verbrauchsmittel, Mittel für Kleingeräte und Reisemittel frei zu konvertieren. Die Verteilung der Mittel für Zuschüsse zu Reise- und Aufenthaltskosten von externen Gästen wurden wie folgt gehandhabt: Mittel für Kolloquiumsgäste mit kurzzeitigem Aufenthalt wurden unabhängig vom Standort und ohne Quotierung nach Teilprojekten auf mündliche Anfrage oder Anfrage per E-Mail an die Sprecherin gewährt. Über Gästemittel für längerfristige Aufenthalte externer Kooperationspartner entschied die Mitgliederversammlung,

Allgemeiner Teil

bei Dringlichkeit in Ausnahmefällen auch die Kommission. Zuschüsse zu Druckkosten von Veröffentlichungen des SFB z. B. für essentielle Farbabbildungen wurden nach Anmeldung des Bedarfs jährlich nach dem Windhundverfahren (first come – first served) verteilt. Pauschale Mittel standen dem SFB ab Mitte 2006 bis Mitte 2009 zur Verfügung. Sie wurden zur Anschubfinanzierung von Vorhaben neu berufener Kollegen und zur Beschaffung neuartiger Geräte auf schriftlichen, ausführlich begründeten Antrag an die Sprecherin gewährt. Über die Priorität der Anträge und die Höhe der Zuweisung entschied die Mitgliederversammlung, bei großen Beträgen ggf. gestützt auf ein externes schriftliches Gutachten. Als günstig hat es sich erwiesen, die wichtigsten Richtlinien der DFG zur Vergabe von pauschalen Mitteln in die Ordnung aufzunehmen, um jeglicher Diskussion über die Vergaberichtlinien vorzubeugen. Die dem SFB bereitgestellten Mittel für Forschungssemester wurden eingesetzt, um im Sommersemester 2006 eine Vertretung für die Durchführung von Lehrveranstaltungen in der Theoretischen Chemie zu gewährleisten, da dieses Fach nur durch eine Professur an der HHU vertreten war.

Die Verteilung der dezentralen Mittel wurde auf Beschluss der Mitgliederversammlung für die an der HHU angesiedelten Teilprojekte und die externen Teilprojekte unterschiedlich vorgenommen. Externe Teilprojekte erhielten ihre Personal, Sach- und Investitionsmittel wie bewilligt, vermehrt um ihren Anteil an den Reisekosten. (In einem Fall wurde von diesem Prinzip abgewichen: Eine promovierte Mitarbeiterin war in einem MPI-Projekt auf einer halben EG 13 Stelle zunächst über einen Stipendienvertrag finanziert worden. Nachdem diese Praxis 2008 von der DFG für unzulässig erklärt worden war, hat der SFB aus Restmitteln für ein halbes Jahr die Aufstockung der Stelle auf 100% EG 13 bis zum Ende der ersten Förderperiode finanziert.) Die HHU-Projekte erhielten Personalmittel in Einheiten von Personenmonaten statt eines festen Geldbetrags in Höhe des von der DFG bewilligten Durchschnittsgehalts. Diese Maßnahme sollte vor allem dazu dienen, soziale Diskriminierung zu verhindern, die entstehen könnte, wenn ein Teilprojekt eventuelle Mehrkosten durch Eingruppierung einer erfahrenen Mitarbeiterin oder eines erfahrenen Mitarbeiters in eine höhere Entgeltstufe oder durch Familienzuschläge über seine Verbrauchsmittel kompensieren muss. In Übergangsphasen wurden einzelnen Projekten auf Antrag zusätzlich eine halbe Personalstelle für eine Dauer von bis zu zwei Monaten gewährt. Nicht verbrauchte, umwidmungsfähige Mittel wurden jährlich nach einem transparenten internen Vergabeverfahren auf schriftlichen Antrag mit Begründung der Bedeutung der Maßnahme für die Forschung des SFB an die teilnehmenden HHU-Teilprojekte zum Kauf von Kleingeräten oder teuren Chemikalien ausgeschüttet. Auch hier entschied die Mitgliederversammlung über die Priorität der Anträge und die Höhe der Zuweisungen.

2.3 Außenwirkung

In der Zeit vom 16.-18. April 2007 wurde vom SFB 663 das internationale Symposium „Molecular Response to Electronic Excitation“ in Bad Münstereifel durchgeführt. Ziel des Symposiums war es, einen Überblick über den aktuellen Stand der Forschung SFB-relevanter Themen zu vermitteln und somit auch wissenschaftliche Maßstäbe für die Arbeit des SFB zu setzen. Themenschwerpunkte des Symposiums waren Struktur und Dynamik von elektronisch angeregten Zuständen, Spektroskopie von Singulett- und Triplettzuständen, Mechanismen photochemischer Reaktionen, Photostabilität von Biomolekülen sowie Photoschäden und Photoprotektion. Zu den einzelnen Themenschwerpunkten gab es Beiträge international renommierter Experten aus dem In- und Ausland. Darüber hinaus wurde das Symposium von zahlreichen Mitgliedern des SFB genutzt, um bis dahin erreichte Ergebnisse in Vorträgen und Posterbeiträgen einer breiten wissenschaftlichen Öffentlichkeit zu präsentieren und die gewonnenen Erkenntnisse mit den externen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern kritisch zu diskutieren.

Vom 6.-10. März 2009 fand der internationale Workshop zum Thema „Photoprotection and Non-Photochemical Quenching“ in Parsberg statt, der vom SFB 663 in Zusammenarbeit mit dem Cluster of Excellence der Universität Frankfurt (CEF) ausgerichtet wurde. Das Thema stellt einen Schwerpunkt der Forschung des SFB dar. Die eingeladenen Redner(innen) kamen aus allen weltweit auf diesem Gebiet relevanten Arbeitsgruppen. Der gut besuchte Workshop bot

einer signifikanten Anzahl von Nachwuchswissenschaftler(inne)n des SFB die Möglichkeit, über Ergebnisse der eigenen Arbeiten intensiv mit den eingeladenen Sprecher(inne)n zu diskutieren.

Im September 2009 fand das 45. Symposium für Theoretische Chemie in Neuss bei Düsseldorf statt. Es wurde vom Lehrstuhl für Theoretische Chemie und Computerchemie der HHU Düsseldorf ausgerichtet und stand unter dem Motto „Excited States: From Photophysics to Photobiology“. Obwohl organisatorisch nicht direkt mit dem SFB 663 verknüpft, bot das internationale Symposium insbesondere den Theoriegruppen des SFB, aber auch den Experimentatoren die Gelegenheit, sich über den aktuellen Stand der Forschung an vorderster Front zu informieren und im Gegenzug den insgesamt 256 Teilnehmer(inne)n aus 18 Nationen ihre eigenen überaus beachtlichen Ergebnisse zu Fragestellungen des SFB zu präsentieren.

Zusätzlich haben Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler des SFB 663 ihre Forschung auf vielen nationalen und internationalen Tagungen, Workshops und Kolloquiumsveranstaltungen in Form von Vorträgen und Postern präsentiert.

Neben regelmäßig stattfindenden öffentlichen SFB-Kolloquien an den Standorten des SFB wurden vier interne Workshops durchgeführt, die der Information und dem Austausch von Erfahrungen sowie der Fortschrittskontrolle dienten. Die ebenfalls öffentlich zugänglichen SFB-Nachmittage, die typischerweise englischsprachigen Kurzvorträgen von Nachwuchswissenschaftler(inne)n aus den Teilprojekten vorbehalten waren, wurden reihum von allen beteiligten Instituten organisiert.

Zur Außendarstellung seiner Forschungsaktivitäten nahm der SFB 663 regelmäßig am Tag der Forschung der HHU Düsseldorf teil. Die an den beiden Max-Planck-Instituten in Mülheim angesiedelten Projekte haben sich am „Tag der offenen Tür“, der nur alle fünf Jahre stattfindet, im Jahr 2008 einer breiten Öffentlichkeit präsentiert. Im Jahrbuch der HHU Düsseldorf 2005/2006 wurde eine zusammenfassende Darstellung der Forschungsziele des SFB 663 veröffentlicht.

Ausgewählte aus der Arbeit des Sonderforschungsbereichs entstandene Publikationen

a) Arbeiten, die in Publikationsorganen mit einer wissenschaftlichen Qualitätssicherung zum Berichtszeitpunkt erschienen oder endgültig angenommen sind

- [1*] Niklas, J., Schulte, T., Prakash, S., van Gestel, M., Hofmann, E. & Lubitz, W. Spin-density distribution of the carotenoid triplet state in the peridinin-chlorophyll-protein antenna. A Q-band pulse electron-nuclear double resonance and density functional theory study. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 15442 (2007)
- [2*] Ostroumov, E., Müller, M. G., Marian, C. M., Kleinschmidt, M., Holzwarth, A. R., Electronic coherence provides a direct proof for excited state level crossing in carotenoids. *Phys. Rev. Lett.* **103**, 108302(2009).
- [3*] Martin, H.-D., Kock, S., Scherrers, R., Lutter, K., Wagener, T., Hundsdörfer, C., Frixel, S., Schaper, K., Ernst, H., Schrader, W., Görner, H., & Stahl, W. 3,3'-Dihydroxyisorenieratene, a natural carotenoid with superior antioxidant and photoprotective properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**: 400 (2009)
- [4*] Lutter, K., De Spirt, S., Kock, S., Kröncke, K.-D., Martin, H.-D., Wagener T. & Stahl, W. 3,3' Dihydroxyisorenieratene prevents UV-induced formation of reactive oxygen species and the release of protein-bound zinc ions in human skin fibroblasts. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 285 (2010)
- [5*] Ostroumov, E. E., Müller, M. G., Hundsdörfer, C., Stahl, W., Marian, C. M. & Holzwarth, A. R., Excited state relaxation dynamics and electronic properties of a quinoid carotenoid. *Chem. Phys.* **373**, 137 (2010).
- [6*] Miloslavina, Y., Szczepaniak, M., Müller, M.G., Sander, J., Nowaczyk, M., Rögner, M. & Holzwarth, A.R. Charge separation kinetics in intact photosystem II core particles is trap-limited. A picosecond fluorescence study. *Biochemistry* **45**, 2436 (2006)
- [7*] Nilkens, M., Kress, E., Lambrev, P. H., Miloslavina, Y., Müller, M., Holzwarth, A. R. & Jahns, P. Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-

- photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady state conditions in *Arabidopsis*, *Biochim Biophys Acta* **1797**, 466 (2010).
- [8*] Hoffmann, M., Wanko, M., Strodel, P., König, P. H., Frauenheim, T., Schulten, K., Thiel, W., Tajkhorshid, E. & Elstner, M. Color tuning in rhodopsins: the mechanism for the spectral shift between bacteriorhodopsin and sensory rhodopsin II. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 10808 (2006).
- [9*] Pfiffi, D., Bier, B., Marian, C. M., Schaper, K. & Seidel, C. A. M. Diphenylhexatrienes as photo-protective agents for ultra-sensitive fluorescence detection. *J. Phys. Chem. A* **114**, 4099 (2010).
- [10*] Schreiber, M. Silva-Junior, M. R., Sauer S. P. A. & Thiel, W. Benchmarks for electronically excited states: CASPT2, CC2, CCSD, and CC3. *J. Chem. Phys.* **128**, 134110 (2008).
- [11*] Silva-Junior, M. R., Schreiber, M., Sauer, S. P. A. & Thiel, W. Benchmarks for electronically excited states: Time-dependent density functional theory and density functional based multireference configuration interaction. *J. Chem. Phys.* **129**, 104103 (2008).
- [12*] Marian, C. M. & Gilka N. Performance of the DFT/MRCI method on electronic excitation of extended π -systems. *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 1501-1515 (2008).
- [13*] Marian, C. M. The guanine tautomer puzzle: Quantum chemical investigation of ground and excited states. *J. Phys. Chem. A* **111**, 1545-1553 (2007).
- [14*] Lan, Z., Fabiano E. & Thiel W., Photoinduced Nonadiabatic Dynamics of 9H-Guanine. *ChemPhysChem* **10**, 1225 (2009).
- [15*] Seefeld, K., Brause, R., Häber, Th. & Kleineremanns, K. Imino tautomers of gas phase guanine from mid-infrared laser spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* **111**, 6217 (2007).
- [16*] Parac, M., Doerr, M., Marian, C. M. & Thiel, W., QM/MM calculation of solvent effects on absorption spectra of guanine. *J. Comp. Chem.* **31**, 90 (2010).
- [17*] Lan, Z., Fabiano, E. & Thiel, W. Photoinduced nonadiabatic dynamics of pyrimidine nucleobases: On-the-fly surface-hopping study with semiempirical methods. *J. Phys. Chem. B* **113**, 3548-3555 (2009).
- [18*] Busker, M., Nispel, M., Häber, Th., Etinski, M. & Fleig, T. Electronic and vibrational spectroscopy of 1-methylthymine and its water clusters: The dark state survives hydration. *ChemPhysChem* **9**, 1570-1577 (2008)
- [19*] Etinski, M., Fleig, T., Marian, C. M., Intersystem crossing and characterization of dark states in the pyrimidine nucleobases uracil, thymine, and 1-methylthymine. *J. Phys. Chem. A* **113**, 11809 (2009)
- [20*] Böhm, M., Tatchen, J., Krügler, D., Kleineremanns, K., Nix, M. G. D., LeGreve, T. A., Zwier, T. S. & Schmitt M. Spectroscopic signatures for L_a/L_b mixing near a conical intersection. *J. Phys. Chem. A* **113** 2456 (2009)
- [21*] Brand, Ch., Küpper, J., Pratt, D. W., Meerts, W. L., Krügler, D., Tatchen, J., & Schmitt, M. Vibronic coupling in indole: I. Theoretical description of the $^1L_a-^1L_b$ interaction and the electronic spectrum. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 4980 (2010)
- [22*] Salzmann S., Tatchen, J. & Marian, C. M. The photophysics of flavins: What makes the difference between gas phase and aqueous solution? *J. Photochem. Photobio. A: Chemistry* **198**, 221 (2008).
- [23*] Salzmann, S., Silva-Junior, M. R., Thiel, W., Marian, C. M., Influence of the LOV domain on low-lying excited states of flavin: A combined quantum-mechanics / molecular-mechanics investigation. *J. Phys. Chem. B* **113**, 15610 (2009).
- [24*] Tatchen, J., Gilka, N. & Marian, C. M. Intersystem crossing driven by vibronic spin-orbit coupling: A case study on psoralen. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9**, 5209 (2007).
- [25*] Mansurova, M., M. S. Koay, and W. Gärtner. Synthesis and electrochemical properties of structurally modified flavin compounds. *Eur. J. Org. Chem.* 5401 (2008).
- [26*] Salzmann, S., Martinez-Junza, V., Braslavsky, S. E., Mansurova, M., Marian, C. M. & Gärtner, W. Photophysical properties of structurally and electronically modified flavin derivatives determined by spectroscopy and theoretical calculations. *J. Phys. Chem. A* **113**, 9365(2009).
- [27*] Slavov, C., Mansurova, M., Holzwarth, A.R., and Gärtner, W. Excited state processes in 1-deazariboflavin studied by ultrafast fluorescence kinetics. *Photochem. Photobiol.* **86**, 31 (2010)

- [28*] Bley, F., Schaper, K., & Görner, H., Photoprocesses of molecules with 2-nitrobenzyl protecting groups and caged organic acids, *Photochem. Photobiol.* **84**, 162 (2008).
- [29*] Schmeling, N., Hunger, K., Engler, G., Breiten, B., Rölling, P., Mixa, A., Staudt, C. & Kleinermanns, K. Photo Cross-linking of Ethylene Methacrylic Acid Copolymers Functionalized with Maleimide Side Groups, *Polymer International* **58**, 720 (2009).
- [30*] Siegert, S., Vogeler, F., Schiedt, J. and Weinkauff, R. Direct spectroscopy of contact charge transfer states: Possible consequences for tryptophan excited-state deactivation pathways by O₂ and formation of reactive oxygen species. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 4996 (2010)
- [31*] Bartl, K., Funk, A. & Gerhards, M. IR/UV spectroscopy on jet cooled 3-hydroxyflavone (H₂O)_n (n=1,2) clusters along proton transfer coordinates in the electronic ground and excited states. *J. Chem. Phys.* **113**, 234306 (2008)
- [32*] Niklas, J., Epel, B., Antonkine, M.L., Sinnecker, S., Pandelia, M.E. & Lubitz, W. The electronic structure of the intermediate A₁⁻ of photosystem I investigated by advanced pulse EPR and ENDOR techniques, *J. Phys. Chem. B* **113**, 10367 (2009).
- [33*] Marchanka, A., Lubitz, W. & van Gastel, M. Spin density distribution of the excited triplet states of bacteriochlorophylls. Pulsed ENDOR and DFT studies, *J. Phys. Chem. B* **113**, 6917 (2009).
- [34*] Marawske, S., Dörr, D., Schmitz, D., Koslowski, A., Lu, Y., Ritter, H., Thiel, W., Seidel, C. A. M. & Kühnemuth, R. Fluorophores as optical sensors for local forces. *ChemPhysChem* **10**, 2041 (2009).
- [35*] S. Sinnecker and F. Neese, Spin-spin contributions to the zero-field splitting tensor in organic triplets, carbenes and biradicals - A density functional and ab initio study. *J. Phys. Chem. A* **110**, 12267 (2006).
- [36*] Ganyushin, D., Gilka, N., Taylor, P. R., Marian, C. M. & Neese, F. The resolution of the identity approximation for calculations of spin-spin contribution to zero-field splitting parameters. *J. Chem. Phys.* **132**, 144111 (2010).
- [37*] Keal, T. W., Koslowski, A. & Thiel, W. Comparison of algorithms for conical intersection optimisation using semiempirical methods. *Theor. Chem. Acc.* **118**, 837-844 (2007).

b) Andere Veröffentlichungen

- [38*] Schmitt, M. & Meerts, W. L. Rotationally resolved electronic spectroscopy and automatic assignment techniques using evolutionary algorithms. *Handbook of High Resolution Spectroscopy* (2010).
- [39*] Fabiano, E., Lan, Z., Lu Y., & Thiel W. Adiabatic trajectory calculations with ab initio and semiempirical methods. In: Conical Intersections: Theory, Computation and Experiment, W. Domcke, D. R. Yarkony und H. Köppel (Hrsg.), World Scientific Publishing, Singapore, angenommen am 29.04.2010.

c) Patente

- [40*] Ernst, H., Kock S., Martin H.-D. & Scherrers R. Verwendung von 3,3'-Dihydroxyisorenieratin und verwandter Carotinoide. *Deutsche Patentanmeldung, BASF Aktiengesellschaft, Veröffentlichungs-Nr. WO002008009675A*, 24. Januar 2008.

Pauschale Mittel hatten einen untergeordneten Anteil am Forschungserfolg des SFB 663, da sie hauptsächlich zur Anschubfinanzierung neuer Projekte genutzt worden waren, die nicht mehr realisiert werden konnten. Die beschafften Geräte werden jedoch voll umfänglich einer geplanten Nachfolgeinitiative zugute kommen.

3 Strukturwirkung des Sonderforschungsbereichs am Standort

3.1 Personelle Auswirkungen

Berufungspolitik

Die personelle Ausstattung des SFB 663 wurde durch gezielte Berufungen im Fachbereich Chemie verstärkt. Bei der Wiederbesetzung der Lehrstühle für Organische Chemie und Biochemie der HHUD wurden Forschungsprofile gefordert, die sich methodisch und inhaltlich gut in den SFB eingliedern ließen. Die neu berufenen Kollegen *Thomas J. J. Müller* (Lehrstuhl für Organische Chemie) und *Lutz Schmitt* (Lehrstuhl für Biochemie) konnten zur Mitarbeit im SFB 663 gewonnen werden, partiell unterstützt durch eine Anschubfinanzierung ihrer Projekte mit pauschalen Mitteln des SFB. Darüber hinaus wurden drei neue Stellen für den wissenschaftlichen Nachwuchs geschaffen. *Peter Gilch* (LMU München) nahm 2009 den Ruf auf eine Heisenberg-Professur (W2) für Femtosekundenspektroskopie an der HHUD an. Er verstärkt den bisher im SFB 663 nur durch die Arbeitsgruppe um Alfred Holzwarth am MPI für bioanorganische Chemie vertretenen Bereich der Ultrakurzzeitspektroskopie. Die damit verbundenen umfangreichen baulichen Maßnahmen zur Einrichtung geeigneter Labore sind mittlerweile abgeschlossen. Die neu eingerichtete Juniorprofessur in Theoretischer Chemie wurde 2009 mit *Jörg Tatchen* (Weizmann-Institut Rehovot, Israel) besetzt, der das an der HHUD vertretene Methodenspektrum in Richtung auf Kerndynamik im angeregten Zustand erweitert. *Frank Neese* wurde im Sommer 2008 für die Dauer von 5 Jahren zum Max-Planck-Fellow ernannt. Die mit dieser Ernennung verbundene, neu geschaffene Arbeitsgruppe am MPI für bioanorganische Chemie sollte den SFB im Bereich der theoretischen Spektroskopie weiter verstärken. Wegen der abschlägigen Förderempfehlung des Fortsetzungsantrags durch die DFG kamen alle diese Struktur bildenden Maßnahmen dem SFB 663 aber nicht mehr zugute.

Gleichstellung und Vereinbarkeit von Familie und Beruf

An der HHUD wurde von der Gleichstellungsbeauftragten das Selma-Meyer-Mentoring-Programm initiiert, um den Erfahrungsschatz von Professorinnen und Expertinnen aus der Wirtschaft, Industrie oder öffentlichen Einrichtungen in Form einer Mentorinnen-Partnerschaft für den wissenschaftlichen Nachwuchs (Mentee) zu nutzen. Den Wissenschaftlerinnen der Max-Planck-Institute steht mit dem "Minerva-FemmeNet" ein ähnliches Netzwerk zur Verfügung.

Das Gleichstellungsbüro der HHUD bietet darüber hinaus Qualifizierungsmaßnahmen für Wissenschaftlerinnen an. Teilnehmerinnen erhalten über diese Kurse die Chance, von professionellen Beraterinnen begleitet zu werden mit dem Ziel, Führungspositionen in der Wissenschaft zu erlangen. Die Max-Planck-Institute in Mülheim bieten Schülerinnen an, an sehr individuell betreuten, mehrwöchigen Praktika teilzunehmen. Zudem nehmen beide Institute seit einigen Jahren am Girl's Day teil und bieten etwa 30 Schülerinnen die Möglichkeit, verschiedene Ausbildungsprofile in naturwissenschaftlichen und technischen Berufen kennen zu lernen.

Auf dem Campus der HHUD werden bereits seit längerem vier Tagespflegeeinrichtungen betrieben, die in städtischer Trägerschaft und Trägerschaft des Studentenwerks Düsseldorf sind. Im Frühjahr 2010 wurde ein neues Familienzentrum auf dem Campus mit drei gemischten Altersgruppen von jeweils 20 Kindern eröffnet. Neben Betreuungsmöglichkeiten für Kinder von Null bis drei Jahren gibt es in diesem Zentrum auch Angebote zur Sprachförderung, eine Babysittingbörse und eine Tagespflegevermittlung.

Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses

Im Hinblick auf die Förderung von Nachwuchswissenschaftlern war der SFB 663 höchst erfolgreich. Timo Fleig habilitierte sich 2006 an der HHUD für das Fach Theoretische Chemie und wechselte 2008 auf eine Professorenstelle an die Universität Paul Sabatier in Toulouse, Frankreich. Joachim Heberle, Nachwuchsgruppenleiter am Institut für biologische Strukturforschung am Forschungszentrum Jülich, nahm den Ruf auf einen Lehrstuhl für Biophysikalische Chemie der Universität Bielefeld an. Frank Neese, Nachwuchsgruppenleiter

am Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie in Mülheim, folgte einem Ruf auf den Lehrstuhl für Theoretische Chemie der Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität Bonn. Markus Gerhards, vormals Privatdozent an der HHU Düsseldorf, wechselte an die Universität Kaiserslautern, wo er eine W2-Professur für Physikalische Chemie innehat.

Habilitationen:

Männlich: 1

Rufe auf Professuren:

Männlich: 2 W3, 1 W2, 1 unbefristete Professur im Ausland

Anzahl der abgeschlossenen Promotionen im SFB 663:

Weiblich: 13

Männlich: 19

Der Frauenanteil an der Gesamtzahl der Promovierenden im SFB 663 liegt mit ca. 40% deutlich über dem Durchschnitt der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, der derzeit in etwa 30 % beträgt. In der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät wurde ein Fast-Track-Programm etabliert, das hervorragenden Bachelorabsolventen einen direkten Einstieg in das Promotionsstudium ermöglicht. Im SFB 663 haben zwei Doktoranden an diesem Programm erfolgreich teilgenommen.

Die Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der HHU Düsseldorf hat die Bedeutung einer strukturierten, transdisziplinären Graduiertenausbildung erkannt und im Jahre 2008 eine Dachorganisation, die „Interdisciplinary Graduate and Research Academy Düsseldorf“ (iGRAD) <http://www.uni-duesseldorf.de/iGRAD/>, gegründet. Die Sprecherin des SFB 663, Frau Prof. Marian, war zunächst stellvertretende Vorsitzende der iGRAD und hat Anfang 2010 den Vorsitz dieser Organisation übernommen. Die iGRAD bietet transdisziplinäre Querschnittsveranstaltungen an, die für mehrere Kollegs von Interesse sind, und unterstützt die Kollegs bei der Organisation von Kursen zur Vermittlung von Schlüsselqualifikationen und von Regeln guter wissenschaftlicher Praxis. Um seinen Doktorandinnen und Doktoranden optimale berufsqualifizierende Maßnahmen zu eröffnen, hat sich der SFB 663 dieser Graduiertenakademie angeschlossen. Für das fachspezifische, wissenschaftliche Ausbildungsprogramm und für die Einhaltung der Qualitätsstandards ist jedes Kolleg selbst verantwortlich. Um die Fähigkeit der Doktorand(inn)en zu interdisziplinärer Forschung zu verbessern, wurde von den Teilprojektleitern des SFB 663 eine zweisemestrige, englischsprachige Ringvorlesung angeboten. Weiterhin fanden Blockkurse für die Doktorand(inn)en des SFB 663 zu speziellen Themen wechselweise an den Max-Planck-Instituten in Mülheim und an der HHU Düsseldorf statt. Um eine zügige Promotion zu gewährleisten, haben die Doktoranden ihre Fortschritte regelmäßig an so genannten SFB-Nachmittagen zur Diskussion gestellt.

Förderung der Eigenständigkeit des wissenschaftlichen Nachwuchses

In der ersten Förderperiode wurde von zwei Doktorandinnen ein zweitägiger SFB-Workshop in der Historisch-Ökologischen Bildungsstätte Papenburg in Eigenregie organisiert und durchgeführt. Hierbei wurde spezieller Wert auf die Tatsache gelegt, dass sowohl die Vortragenden als auch die Moderatoren des Workshops nur SFB-Doktoranden und – Doktorandinnen waren und dass die Tagungssprache Englisch war. Der überwiegende Teil der Teilprojektleiter(innen) nahmen als Gäste an der Veranstaltung teil. Darüber hinaus wurden ebenfalls in Eigenregie zwei externe Sprecherinnen eingeladen. Die hierzu notwendigen finanziellen Mittel wurden vom Zentralprojekt zur Verfügung gestellt. Das Konzept der eigenverantwortlichen Organisation von Workshops hat sich als außerordentlich erfolgreich und motivierend erwiesen. Für die zweite Förderperiode waren vergleichbare Veranstaltungen geplant, die aber wegen des Auslaufens der Förderung nicht mehr zustande kamen. Auf ausdrücklichen Wunsch der Doktorand(inn)en des SFB sollten in der zweiten Förderperiode

Allgemeiner Teil

zusätzlich interne SFB-Nachmittage in Eigenregie durchgeführt werden mit ausschließlicher Beteiligung von Nachwuchswissenschaftler(inne)n.

3.2 Infrastruktur

Im Rahmen der Neubesetzung der Lehrstühle für Organische Chemie (*Thomas J. J. Müller*) und Biochemie (*Lutz Schmitt*) wurden umfangreiche Gebäudesanierungsmaßnahmen durchgeführt. Auch mit der Einrichtung der Heisenberg-Professur für Femtosekundenspektroskopie an der HHUD waren erhebliche Investitionen und umfangreiche bauliche Maßnahmen zur Einrichtung geeigneter Labore verbunden, die mittlerweile abgeschlossen sind. *Peter Gilch* wird zum Wintersemester 10/11 von München nach Düsseldorf umziehen. Der Inbetriebnahme seiner Geräte steht baulich nichts mehr im Wege. Darüber hinaus wurden zwei Laborräume im Bereich der Physikalischen Chemie I (*Karl Kleinermanns* bzw. *Michael Schmitt*) für die Zwecke des SFB hergerichtet. Die Beschaffung eines neuen Compute-Clusters für die Theoretische Chemie (*Christel Marian*) im Rahmen des SFB machte ebenfalls bauliche Maßnahmen notwendig, da die Kühlkapazität im Serverraum nicht ausreichte. Man entschied sich zunächst für eine kombinierte Maßnahme aus Zufuhr von Kaltluft und Absaugen der heißen Abluft. Letztendlich war dennoch ein Housing in den Räumen des Rechenzentrums unvermeidbar, da die Abluftgebläse des Chemie-Gebäudes abends und am Wochenende auf halbe Kapazität herunterfahren. Der Zugang zum Serverraum des Rechenzentrums ist noch nicht optimal geregelt und außerhalb der üblichen Dienstzeiten noch nicht möglich. Hieran wird derzeit aber gearbeitet.

In den Jahren 2005 - 2009 wurde aus Grundausrüstungsmitteln der HHUD und der MPG eine Reihe von Investitionen getätigt, die die Forschungsfähigkeit der SFB-Projekte verbessert hat. Eine Aufstellung der beschafften Geräte über 10.000 € findet sich im Berichtsband zur ersten Förderperiode.

5 Hinweise an die Deutsche Forschungsgemeinschaft

6 Berichte über die einzelnen Teilprojekte der letzten Förderperiode

6.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt A1

6.1.1 Titel: Direkte Spektroskopie von Triplett-, Ladungstransfer- und übergangsverbotenen Singulett-Zuständen in Molekülen und Stoßkomplexen

6.1.2 Projektleitung

Weinkauf, Rainer, Prof. Dr., *07.05.1954, deutsch

Institut für Physikalische Chemie

Heinrich-Heine-Universität

Universitätsstraße 1

40225 Düsseldorf

Telefon: 0211 81-11729

Telefax: 0211 81-11730

E-Mail: weinkauf@uni-duesseldorf.de

6.2 Entwicklung des Teilprojekts

6.2.1 Bericht

Ziel des Vorhabens war es dunkle angeregte Zustände in neutralen Chromophoren zu spektroskopieren und dabei neben den Absolutenergien insbesondere die Reihenfolge der elektronischen Zustände und damit ihre mögliche Beteiligung an photophysikalischen und photochemischen Prozessen zu klären. Unter dunklen Zuständen verstehen wir die Neutralzustände, die im neutralen Molekül vom S_0 aus nicht oder nur mit sehr kleinen Übergangsmomenten erreichbar sind. Solche sind: Triplett-Zustände T_1 - und T_2 -Zustände, $n\pi^*$ -Zustände, symmetrieverbotene Singulett-Zustände und Ladungstransfer-Zustände.

Erreicht werden soll dies mit Hilfe der Photodetachment-Photoelektronen-Spektroskopie (PD-PES) aus den isolierten Radikal-Anionen der Chromophore oder aus Anionenkomplexen mit anderen Molekülen. Die PD-PES ist vor allem wegen der geringen Anionenzahlen schwierig und wird deshalb weltweit von nur wenigen Forschergruppen betrieben. Davon beschäftigen sich zwei Gruppen ausschließlich mit deprotonierten, geschlossenschaligen und meist mehrfach geladenen Molekülen (Manfred Kappes und Lai-Sheng Wang). In den Arbeitsgruppen von Carl Lineberger, Kit Bowen, Dan Neumark, Ullrich Boesl von Grafenstein und Ori Cheshnovsky werden bisher bevorzugt atomare Cluster, sowie kleine Moleküle und Cluster aus diesen untersucht. Darüber hinaus wenden zwei weitere Gruppen die IR-Spektroskopie auf Anionen-Cluster an (Markus Gerhards, Mark Johnson). Zwei weitere Gruppen arbeiten mit fs-Lasern bevorzugt an negativen Metallclustern (Ludger Wöste, Bernd von Issendorf). Es ist in diesen Gruppen seit langem allgemein bekannt, dass Triplettzustände aus dem Radikalanion erreichbar sind.

Das Arbeitsgebiet „dunkle angeregte Neutralzustände von größeren π -Systemen und ihren Clustern“ wird jedoch bisher nur von unserer Arbeitsgruppe bearbeitet.

Die PD-PES kann die Auswahlregeln der Spektroskopie, wie sie in neutralen Molekülen gelten, überwinden, indem zunächst durch Elektronenanlagerung Radikalanionen gebildet werden die dann mit Photonen neutralisiert (Photodetachment) werden (siehe Abb. 1). Die offenschaligen Anionen besitzen ein zusätzliches Elektron im LUMO und damit einen Dublett Grundzustand ($S=1/2$). Durch Photoanregung mit einer geeigneten Wellenlänge können nun verschiedene Elektronen aus den MOs entfernt werden. Dies führt in gleichem Maße zu neutralen Singulett- ($S=0$) wie auch zu Triplett-Zuständen ($S=1$).

Eine genauere Analyse zeigt, dass das Photodetachment darüber hinaus weitere Möglichkeiten eröffnet. Während die Anregungen von $n\pi^*$ -Zuständen in neutralen Molekülen im Allgemeinen sehr schwach ist, wird beim Photodetachment des Anions beim Übergang zum $n\pi^*$ -Zustand nur aus dem n-Orbital ionisiert. Ähnlich ist es auch bei der Spektroskopie von intermolekularen Ladungstransferzuständen: Der Donor wird in Gegenwart des anionischen Akzeptors ionisiert. Zudem gibt es beim Photodetachment wie bei der

A1 Weinkauf

Ionisation keine Symmetrieauswahlregeln, so dass auch Übergangsverbotene Singulettzustände aus dem Anion angeregt werden können sollten.

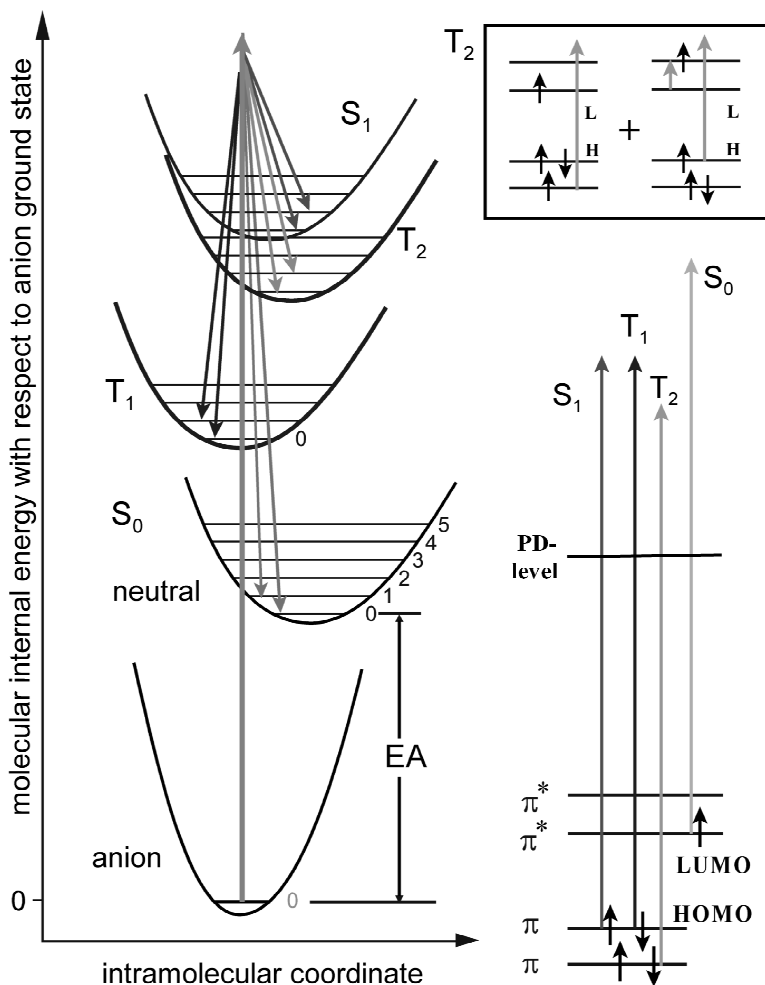
Zusammenfassend können mit der PD-PES neben dem Grundzustand nahezu alle unteren angeregten elektronische Zustände oder in Clustern sogar ladungsgetrennte Zustände (siehe unten) angeregt werden.

Bei fester Photonenenergie gibt die gemessene Elektronenenergie die Lage des Neutralzustandes wieder. Die Franck-Condon-Faktoren bestimmen die Breite der elektronischen Übergänge. Alle Neutralzustände sind um die Elektronenaffinität zu höheren Energien verschoben. Die Neutralübergangsenergien lassen sich als Differenzenergien zum S_0 errechnen. Dieses Konzept lebt von der Anwesenheit eines zusätzlichen Elektrons im LUMO und der Erreichbarkeit neutraler angeregter Zustände durch das Entfernen anderer Elektronen.

Die höherenergetischen Zustände können sich jedoch aus einer gemischten Elektronenkonfiguration zusammensetzen. In der Abbildung ist dies oben rechts exemplarisch für den T_2 dargestellt. Es gibt verschiedene energiegleiche Konfigurationen, die vom Anion aus durch eine Einfachanregung (links) oder durch eine Doppelanregung (rechts) erreichbar sind. Die PD-PES erlaubt nur ein-Photonen-ein-Elektron Anregungen, so dass die Konfigurationsanteile neutraler Zustände bei welchen aus dem Anion ein Elektron entfernt und gleichzeitig ein Elektron angeregt werden müsste unerreichbar sind. In den gemessenen Spektren treten daher gemischte Zustände nur mit ihren Einfachanregungsanteilen in Erscheinung und sind daher weniger intensiv.

Die Anregung von neutralen Zuständen, bei welchen sich zwei Elektronen im LUMO befinden, wie es zum Beispiel im S_1 -Zustand des β -Carotins der Fall ist, ist folglich vermutlich ebenfalls nicht erreichbar.

Abb. 1: Schematische Darstellung der Photodetachment-Photoelektronen-Spektroskopie. Links sind die Übergänge vom Anion zu den neutralen Singulett- und Triplett-Zuständen im elektronischen Zustandsdiagramm gezeigt. Rechts das MO-Schema mit der typischen Elektronenkonfiguration des Anions. Wenn die Photonenenergie ausreicht, können auch höher angeregte elektronische Zustände der neutralen Moleküle spektroskopiert werden. Auf der rechten Seite sind die analogen Prozesse im MO-Schema abgebildet, so dass das Erreichen von Singulett- und Triplett-Zuständen nachvollziehbarer ist. Oben rechts ist die Elektronenkonfigurationsmischung höherer Zustände exemplarisch für den T_2 -Zustand dargestellt. Nur der Konfigurationsanteil, der vom Anion aus durch Entfernen eines Elektrons erreichbar ist, wird sichtbar (linke Konfiguration). Konfigurationen des neutralen Moleküls bei welchen vom Anion aus ein Elektron entfernt und ein Elektron angeregt werden muss sind verboten. Für weitere Erklärungen siehe Text.



A) Aufbau und Beschreibung des Anionen-Photoelektronenspektrometers

Anionen-Photoelektronenspektrometer sind nicht käuflich zu erwerben. Sie sind komplexe Geräte, da die Radikalanionen vor der PD-PES zuerst erzeugt, gekühlt und massenselektiert werden müssen. Die Anionendichten sind sehr gering, so dass meist auch das Signal-zu-Rauschverhältnis klein ist und die Aufnahme der Spektren sehr schwierig ist und relativ lange dauert. Obgleich ich diese Art von Spektroskopie in meiner Arbeitsgruppe bereits in München betrieben habe, musste ich dieses Gerät (Massengrenze damals ca. 300 Da) zurücklassen und in der zurückliegenden Förderperiode ein neues Gerät in Düsseldorf aufbauen. Das neue Gerät wurde dabei natürlich speziell an die Anforderungen des SFB angepasst.

Trotz meiner Erfahrung (siehe Ref 1*-11*) dauerte dieser Aufbau wesentlich länger als geplant. Dies lag unter Anderem hauptsächlich daran, dass diverse Techniken zur effizienteren Darstellung der Radikal-Anionen entwickelt und der nutzbare Massenbereich erweitert werden mussten. Folgende Komponenten wurden verbessert:

- Die gepulste Hochtemperaturdüse, die für die Verdampfung von größeren, schwer flüchtigen und damit oft biologisch interessanteren Molekülen wichtig ist. Sie arbeitet bei 8 Bar inzwischen und bis über 300 °C. Durch das Vermeiden von Metallteilen werden katalytische Effekte vermieden. In der Praxis bedurfte das Ausweichen auf Keramik- und Polymermaterialien aber einen langwierigen Optimierungsprozess.
- Aufbau eines linearen Flugzeit-Massen-Spektrometers (TOF) mit Fokussierlinsen und schaltbarer Umlenkeinheit (Bender) und Ionendetektor.
- Der „dynamische Flankenpuls“ in der Ionenquelle, der ein völlig neues Konzept bei der Anionenbeschleunigung in der Ionenquelle verwirklicht, mit dem Ziel, die in der Ionenquelle örtlich breit verteilten Ionen auf möglichst ähnliche Energien zu beschleunigen und dabei gleichzeitig auch eine möglichst schmale Zeitverteilung zu erreichen. Damit werden ideale Bedingungen für das Photodetachment im Photoelektronen-Spektrometer und insbesondere für das Abbremsen der Ionen dort bereitgestellt.
- Die gepulste „Bender-Einheit“, ein gepulster elektrostatischer Umlenkquadrupol, das im TOF zusätzlich als Massenfilter eingesetzt wird und die Funktion hat die Ionen entweder auf den Massendetektor oder den Photodetachment-Ort abzubilden.
- Die Ionen-Stopeinheit, die in Kombination mit dem dynamischen Flankenpuls effizient eine große Anzahl von sehr langsamen Anionen am Photodetachment-Ort zu Verfügung stellen kann. Sie wirkt insbesondere für niederenergetische Ionen zudem örtlich fokussierend.
- Der spiegelsymmetrische Aufbau der Anlage bezüglich des Benders, der es mit Hilfe der Bender-einheit gestattet, die Anionen auf einem Detektor optimal zu bündeln, und anschließend das ionenoptische Ergebnis exakt auf den Ort der Photoelektronenmessung zu übertragen. Dabei kann die Flugzeit im Betrieb als Massenspektrometer direkt als Zeit für den Photodetachment-Laser verwendet werden.
- Die co-lineare Anordnung der magnetischen Flasche zur Anionengeschwindigkeit, die zusammen mit der symmetrischen Konstruktion eine effiziente, zeitlich umsetzbare Justage des Experimentes erlaubt und komplizierte Anforderungen an die Gestaltung des Magnetfeldes zur Abbildung der Elektronen auf den Detektor stellte.
- Die Datenaufnahme, die bei der für Photoelektronen unübliche Signalmenge ein vom Datenvolumen überschaubares und vor allem voran ein exaktes ($\Delta t \leq 2$ ns bei $t_{\text{gesamt}} = 10$ μ s) PE-Spektrum aufzeichnen kann.
- Die Datenauswertung, die nach Eingabe der Geräteparameter die flächenerhaltende Umrechnung der Elektronenflugzeit in Elektronenenergie ermöglicht.

Das neue Gerät ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Es besteht aus fünf Vakuumkammern, durch die die Ionen stoßfrei aus einem Druck von 10^{-3} mbar bis in den Druck 10^{-8} mbar transportiert werden.

In Kammer I werden in einem gepulsten N_2 -Überschallstrahl (Jet) die Probenmoleküle mit 8 bar co-expandiert und mit einem gepulsten Elektronenstrahl (1,5 keV Energie) beschossen. Die aus einer Elektronenkanone stammenden Primärelektronen ionisieren das Trägergas und erzeugen langsame Sekundärelektronen, die sich an die Probenmoleküle anlagern. Die Energie der Elektronenaffinität (0.5 –2 eV) wird dabei in Schwingungsenergie umgewandelt, so dass die Anionen durch Stöße im Jet extrem gekühlt werden müssen. Aus diesem Grunde ist der Expansionsdruck hoch und der Kammerdruck bricht auf 10^{-3} mbar zusammen.

Die Anionen driften mit der Neutralgeschwindigkeit des Überschallstrahls durch einen Skimmer in Kammer II, wo sie mit Hochspannungspulsen an den Blenden der Ionenquelle aus dem Jet heraus beschleunigt werden. Wegen der Größe der Ionenwolke und der normalerweise damit verbundenen Energieunschärfe muss ein völlig neuer Hochspannungspuls mit zeitlich veränderlichen (dynamischen) Abzugspulsen eingesetzt werden, so dass die Ionen doch ähnliche Energie aufweisen und ein relativ effektives

A1 Weinkauf

Abbremsen gewährleistet ist (siehe B3)). Die Ionen fliegen durch die Kammern III und IV, werden durch ihre Flugzeit nach ihrer Masse getrennt und in einem Umlenkquadrupol (Bender) selektiert.

Der Bender erlaubt je nach Betriebsart die Ablenkung auf den Massendetektor oder in die Kammer V zur weiter führenden Spektroskopie. Die jeweiligen Arme sind gleich lang und spiegelsymmetrisch, so dass mit dem Massendetektor die Zeit für den Laserzugriff in der PES-Kammer ermittelt und der Ionenstrahl optimiert werden können. Diverse Linsen, Ab- und Umlenkquadrupole dienen der Strahlführung und müssen ebenso wie viele gepulste Prozesse mit sehr hoher Genauigkeit gegeneinander justiert und stabil gehalten werden. Eine spezielle Ionenoptik vor dem Massendetektor und dem Ort des Photodetachments ermöglichen ein Abbremsen der Anionen.

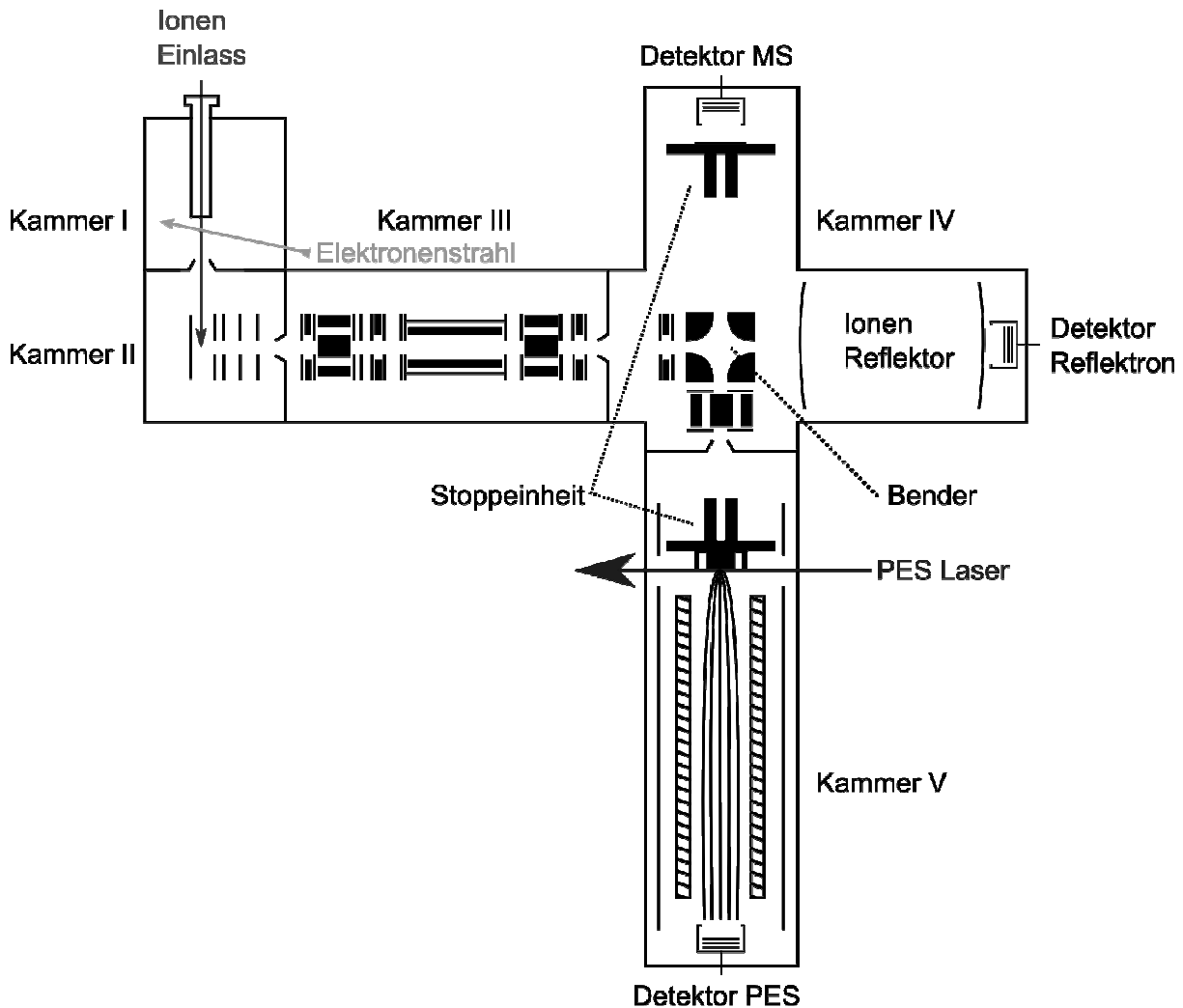


Abb. 2: Schematischer Aufbau des Anionen-Photoelektronenspektrometers. Die Anionen werden in Kammer I in einem Überschallstrahl durch Elektronenanlagerung erzeugt, in Kammer II beschleunigt, in Kammer III und IV massenselektiert und fokussiert und in Kammer V photodetachiert. Die Elektronen werden durch eine Flugzeitmessung in einer magnetischen Flasche nach ihrer Energie aufgelöst und aufgezeichnet. Für weitere Erklärungen siehe Text.

Eine so genannte magnetische Flasche (siehe Abb. 2) erlaubt den Nachweis der Elektronen im Raumwinkel 4π und reduziert so ganz erheblich die Messzeit. Die typische Energieauflösung des Flugzeit-PE-Spektrometers beträgt zurzeit je nach Elektronenenergie 30 – 70 meV. Sie wird

- durch die Zeit für das Umdrehen der Elektronen, die mit einer Flugrichtung in Gegenrichtung des Detektors starten, im inhomogenen Magnetfeld,

- durch die Laserpulsdauer (7 ns) und
- durch die Ionengeschwindigkeit, die sich auf die Elektronengeschwindigkeiten vektoriell addiert, begrenzt.

Insgesamt wurde sehr aufwändige apparative Aufbauarbeit geleistet. Aus der im oberen Teil beschriebenen Neuentwicklungen sind zahlreiche neue experimentelle Konzepte z. B. Variation des Magnetfeldes durch Magnetluftspulen oder Ringmagnete am Photodetachmentort zur 2π -Detektion, *post-source-acceleration* und Ionenreflektor zur zeitlichen Fokussierung der Ionen, Laserstrahloptimierung zur Minderung des Photountergrundes und verschiedene neue Düsen sowie Düsenheizungen getestet worden. Nicht jedes dieser Konzepte brachte die gewünschten Fortschritte. Weiterhin könnte die Anlage noch bezüglich des Einlasssystems mit Mischdüsen oder Laserdesorption, der Elektronenenergieauflösung und des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (Untergrund im UV durch Ionisation und Photoelektronen aus der Wand) verbessert werden.

B) Ergebnisse mit der Anionen-Photoelektronen-Spektroskopie (PD-PES)

Im Folgenden wird über die Ergebnisse berichtet:

- 1) Die Spektroskopie von T_1 - und T_2 -Zuständen in den großen und langen konjugierten Systemen der Oligothiophene und der Biphenylpolyene in Abhängigkeit von der Kettenlänge. Hier handelt es sich um die Triplet-Zustände vom Typ $\pi\pi^*$.
- 2) Die Spektroskopie von Triplet-Zuständen vom Typ $n\pi^*$ in den kleineren Chromophoren Benzochinon, Xanthon und Azobenzol. Hier liegt der Schwerpunkt auf der Lage des T_1 und der Frage, ob $n\pi^*$ -Zustände und symmetrieverbotene Zustände vom Anion aus erreichbar sind.
- 3) Die Spektroskopie von intermolekularen Ladungstransferzuständen an Bichromophoren Clustern und O_2 -Chromophor-Komplexen.

Mit der PD-PES an größeren Chromophoren und Chromophorkomplexen betreten wir völliges Neuland: Weder die Elektronenaffinitäten noch Daten zur Struktur der Anionen oder zu angeregten anionischen Zuständen sind bekannt.

B 1 Die Spektroskopie von T_1 - und T_2 -Triplet-Zuständen vom Typ $\pi\pi^*$

B 1.1 PD-PES an Stilben, 1,4-Diphenylbutadien und 1,6-Diphenylhexatrien

Im Folgenden werden Ergebnisse am synthetischen Mini-Carotin 1,6-Diphenylhexatrien (in der Arbeitsgruppe Schaper synthetisiert), und an den kleineren Analoga Stilben und 1,4-Diphenylbutadien dargestellt.

Die Carotine besitzen in biologischen Systemen mehrere Funktionen. Eine davon ist die Löschung des Singulett-Sauerstoffs (1O_2) (Arbeitsgruppe Schaper). Es wird vermutet, dass dabei die T_1 -Zustände der Carotine eine besondere Rolle spielen. Natürlich ist eine Löschung des 1O_2 durch den T_1 -Zustand eines Carotins nur dann möglich, wenn der T_1 der tiefere Zustand ist oder beide Zustände zumindest vergleichbare Energien besitzen. Zum Test dieser These soll die Lage der T_1 -Zustände in Abhängigkeit von der Kettenlänge der Carotine bestimmt werden. Wir haben zu diesem Zwecke das synthetische Mini-Carotin 5 1,6-Diphenylhexatrien (von der Arbeitsgruppe Schaper synthetisiert) und dessen kleinere Analoga 1,4-Diphenylbutadien und Stilben untersucht. Für die Zuordnung der jeweiligen S_1 Zustände wurden UV-VIS-Spektren bei einer 10^{-6} -molaren Konzentration in THF aufgezeichnet und zusammen mit den Theoriewerten zum Abgleich verwendet.

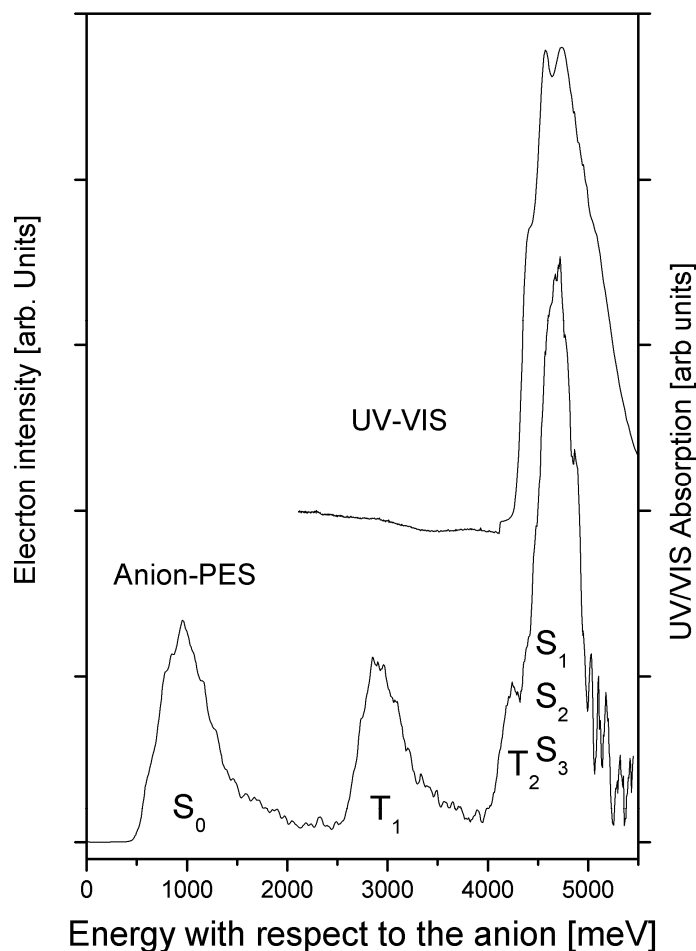
Für 1,6-Diphenylhexatrien, Stilben und 1,4-Diphenylbutadien liegen Daten zur Lage der T_1 -Zustände in Kristallen bei sehr tiefen Temperaturen vor [12-14] die eine Überprüfung unserer Methode erlauben. Es war uns möglich, mit Hilfe der Theorie (Kooperation mit Frau Marian (C1)) in unseren Spektren neben den T_1 - auch T_2 -Zustände zu identifizieren, die im Allgemeinen eine wichtige Rolle beim ISC aus dem S_1 spielen können. Werte zu T_2 -Zuständen fehlten für diese Moleküle bisher völlig. Eine Veröffentlichung zum Vergleich der experimentellen mit den theoretischen Daten von Frau Marian ist in Arbeit. Die Rechnungen von Frau Marian sind B3LYP-Rechnungen mit der TZVPP-Basis für das Anion und den neutralen Grundzustand sowie DFT/MRCI-Rechnungen für die vertikalen Absorptionsspektren bei der Geometrie des Anions. Dabei zeigt sich, dass die Geometrie des Anions ungefähr zwischen der Geometrie des S_0 und des S_1 liegt. Dies wird aus dem Vergleich der Elektronenkonfigurationen von Anionengrundzustand, neutralem S_1 -, bzw. T_1 -Zustand und S_0 -Zustand verständlich: Wir gehen deshalb davon aus, dass wir in

der Lage sind, aus dem Anstieg der Strukturen in unseren Spektren Werte zu erhalten, die dem jeweiligen adiabatischen Wert nahe sind. Die Intensität der neutralen Zustände in den A-PE-Spektren sollte dabei im Wesentlichen durch den Anteil der Einelektronenanregungen am Übergang bestimmt werden, der aus den Rechnungen ersichtlich ist.

Exemplarisch soll an dieser Stelle die Auswertung des PD-PES von Stilben erläutert und anschließend mit den beiden weiteren Messungen am 1,4-Diphenylbutadien und am 1,6-Diphenylhexatrien verglichen werden.

Es ist wohlbekannt, dass Stilben bei Lichtanregung zum S_1 mit hoher Ausbeute in das Cis-Isomer übergeht (siehe Projekt **B7**, Ritter). Stilben konnte von uns bei 100 °C in 8 Bar N_2 mit guten Ausbeuten in die Gasphase gebracht und im Überschallstrahl durch Elektronenanlagerung als Anion dargestellt werden. In Abbildung 3 ist sowohl das PD-PES des Stilben-Anions als auch das Absorptionsspektrum des neutralen Moleküls im Lösungsmittel gezeigt. Das PE-Spektrum wurde mit der 5. Harmonischen des Nd:YAG-Lasers (212,8 nm \equiv 5,826 eV) aufgezeichnet. Das PE-Spektrum enthält neben dem S_0 - und dem T_1 -Zustand weitere Strukturen, die dem T_2 - und einer Überlagerung von den S_1 -, S_2 - und S_3 -Zuständen zugeordnet werden können. Die Lage des S_0 -Zustandes relativ zum Anion (als $E = 0$ gesetzt) gibt die Elektronenaffinität (EA) des Moleküls wieder, für Stilben liegt sie bei 0,56 eV.

Abb.3: PES des Stilben-Anions (unten), aufgenommen mit einer Photodetachment-Wellenlänge von 212,8 nm. Im Vergleich dazu das Absorptionsspektrum des neutralen Moleküls (oben), jedoch zum direkten Vergleich verschoben um die EA von 0,56 eV). Das PE-Spektrum enthält neben dem S_0 -Übergang und dem T_1 -Übergang noch weitere Strukturen, die dem T_2 -Übergang und einer Überlagerung der S_1 - und S_3 -Zustände zugeordnet werden (siehe auch Text).

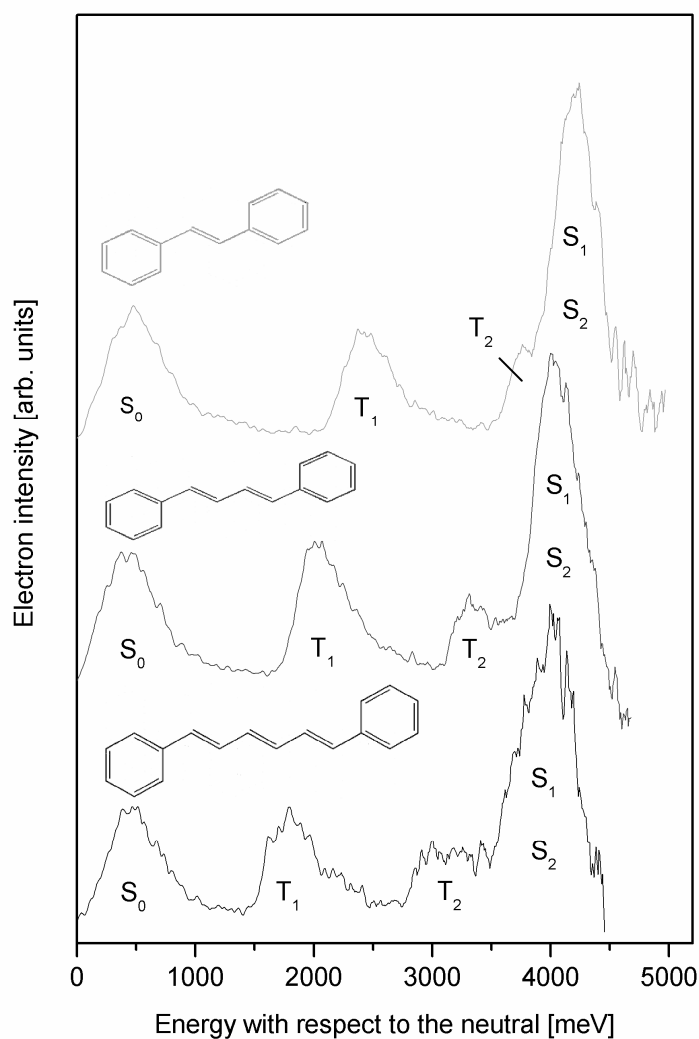


Der T_1 -Zustand ist im Kristall bekannt und liegt bei $17\,750\text{ cm}^{-1}$ (2,19 eV) [12]. Unser Wert für den Anstieg (adiabatischer Wert) beträgt in guter Übereinstimmung dazu 2,06 eV. Der Vergleich mit der Theorie (Marian, vertikal 2,05 eV bezogen auf S_0 an der Anionenengeometrie; adiabatisch 2,01 eV) zeigt, dass die Anregungsenergie in den Rechnungen leicht unterschätzt wird, das Spektrum aber zuverlässig zugeordnet werden kann. Weiterhin kann den Rechnungen entnommen werden, dass die Potentialfläche des T_1 -Zustands im Hinblick auf eine Verdrillung um die zentrale Bindung sehr flach ist, wohingegen der elektronische Grundzustand dabei erheblich destabilisiert wird. Während T_1 und S_1 zu über 90% Anregungen aus dem HOMO entsprechen und somit aus dem Anion gut erreichbar sind, ist laut Theorie (**C1**) die Anregung zum T_2 nur zu 62% eine Einelektronenanregung aus dem HOMO-3. Die Übergangswahrscheinlichkeit für den T_2 aus dem Anion sollte deshalb etwa um einen Faktor von $(0,62)^2 = 0,38$ schwächer sein als der des T_1 -Zustandes. Dies und die Reihenfolge der Zustände in der theoretischen Rechnung legen nahe, dass die schwache Schulter bei 4,1 eV im PD-PES (daraus 3,538 eV adiabatische Neutralenergie) dem T_2 -Zustand zuzuordnen ist (theoretischer vertikaler Wert aus TP **C1**: 3,51 eV).

Die zu höheren Energien folgende Struktur korrespondiert mit dem Übergang im Lösungsmittelspektrum des neutralen Moleküls und wird dem S_1 und den schwachen Zuständen S_2 (übergangsverboten im neutralen Molekül) und S_3 (schwach im neutralen Molekül) zugeordnet. Da diese Zustände alle von Anion aus erreichbar sein sollten und sich energetisch überlagern erwartet man einen sehr großen Peak. Dies stimmt mit der Beobachten der großen Struktur am rechten Rand von Abb. 3 gut überein. Der Anstieg des S_1 liegt somit bei einer Neutralenergie von 3,88 eV (UV-VIS-Spektrum, vertikal: 3,99 eV; theoretisch:

scher vertikaler Wert aus Projekt C1: 3,62 eV). Die Lagen der S_2 und S_3 -Zustände können auf Grund ihrer Überlagerung nicht angegeben werden. Ihre Präsenz im Spektrum würde aber mit der ungewöhnlichen Größe der Struktur am rechten Rand des PE-Spektrums qualitativ übereinstimmen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es uns möglich war, unsere Methode erfolgreich zu testen und die Lage des T_1 -Zustandes in der Gasphase zu bestimmen. Darüber hinaus haben wir die Lage des T_2 -Zustandes unterhalb des S_1 ermittelt, was die ungewöhnliche Erhöhung der ISC-Rate in Stilben-Xe-Clustern erklärt [15]. Im Folgenden sollen nun nur noch die Spektren von 1,4-Diphenylbutadien und von 1,6-Diphenylhexatrien mit den obigen Resultaten verglichen und deren Messwerte aufgeführt werden.



Das 1,4-Diphenylbutadien und das 1,6-Diphenylhexatrien konnten durch Heizen bei 120 °C bzw. 140 °C in die Gasphase gebracht werden. Beide A-PE-Spektren sind mit der 5. Harmonischen aufgenommen und in Abbildung 4 zusammen mit dem Spektrum des Stilbens gezeigt. Die EA des 1,4-Diphenylbutadiens ist 0,79 eV und die des 1,6-Diphenylhexatrien ist 1,06 eV. In der Abbildung sind alle EA abgezogen worden, so dass die Zustände der neutralen Moleküle miteinander verglichen werden können. Erwartungsgemäß vergrößern sich die EAs mit zunehmender Größe des π -Systems. Die Kühlung der Anionen ist offensichtlich ausreichend, denn in den Spektren wird nur ein geringer Anteil breiter, rot-verschobener heißer Banden gefunden. Im Vergleich der Spektren erkennt man deutlich, dass mit steigender Kettenlänge der T_2 -Zustand schneller energetisch absinkt und sich beim 1,6-Diphenylhexatrien viel deutlicher von den höheren Singulett-Zuständen absetzt. Über dem T_2 erkennt man wieder die überlagerten Übergänge zu den S_1 - und S_2 -Zuständen, die ähnlich schnell wie der T_1 -Zustand absinken. Die Zuordnungen wurden wieder durch den Vergleich mit den UV-VIS-Absorptionsspektren und den theoretischen Rechnungen qualitativ bestätigt.

Abb. 4: Vergleich der PE-Spektren von Stilben (oben), 1,4-Diphenylbutadien (mittig) und das 1,6-Diphenylhexatrien (unten) die mit einer Photodetachment-Wellenlänge von 212,8 nm aufgenommen wurden. Die EA von 0,56 eV (Stilben), 0,79 eV (1,4-Diphenylbutadien) und 1,06 eV (1,6-Diphenylhexatrien) sind bei den jeweiligen Spektren abgezogen, so dass die Zustände der neutralen Moleküle vergleichbar sind. Die PE-Spektren enthalten neben dem S_0 und dem T_1 noch weitere Strukturen, die dem T_2 und einer Überlagerung der S_1 - S_3 -Zustände zugeordnet werden (siehe auch Text).

Die Ursprünge der T_1 -Zustände im Kristall bei tiefen Temperaturen liegen bei 1,788 eV [12] für 1,4-Diphenylbutadien und 1,499 eV monoclinic bzw. 1,526 eV orthorombisch für 1,6-Diphenylhexatrien [14] und stimmen überraschend gut mit unserem Gasphasenwert (1,77 eV und 1,44 eV) überein. Eine Übersicht über die Messwerte unseres Experimentes, den Werten aus den jeweiligen Kristallen und der Theorie aus dem Teilprojekt C1 gibt die folgende Tabelle wieder.

A1 Weinkauf

Substanz\ in eV	S ₀	T ₁ exp. aus PES	T ₁ exp. Im Kristall	T ₁ theo. Marian (C1)	T ₂ exp. aus PES	T ₂ theo. Marian	S ₂ exp. aus PES	S ₂ theo. Marian
Stilben	0,56	2,06	2,19 [12]	2,01	4,1	3,54	3,86	
1,4-Diphenyl- Butadien	0,79	1,77	1,788	1,64	3,12	3,04	3,7	3,27
1,6-Diphenyl- Hexatrien	1,06	1,44	1,499 [14]		2,77		3,49	

Die theoretischen Werte liegen generell etwas zu tief, obgleich sie mit einer hochwertigen Methode berechnet wurden. Dies unterstreicht auch die Notwendigkeit für unsere Experimente als Eichwerte für die Theorie.

B1.2 PD-PES am Oligothiophenen

Thiophene sind allgemein von applikativem Interesse. Sie werden heutzutage in organischen Transistoren, organischen „light emitting devices“ (OLEDs) und in Solarzellen eingesetzt. Von allen technisch verwendeten Oligothiophenen ist das Sexithiophen das am häufigsten genutzte. Um die Eigenschaften der Thiophene im Detail zu verstehen, müsste man deren elektronische Struktur kennen. Da es anderweitig schwierig ist die Triplett-Zustände zu messen, bietet sich die PD-PES an um die Wissenslücke zu schließen. Es wäre außerdem interessant zu klären, warum die Thiophene eine sehr hohe ISC-Rate haben. Es ist nur bekannt, dass die ISC-Raten mit der steigender Kettenlänge vom Bithiophen bis zum Sexithiophen abnehmen. Bisher sind an den Oligothiophenen diverse Messungen und Kalkulationen durchgeführt worden. Es sind Absorptionsspektren in Lösungen, Matrizen, Kristallen und dünnen Filmen, Photolumineszenzspektren, kalorimetrische Messungen, Phosphoreszenzspektren, „Energy Loss Spektren“ und Rechnungen mit CASSCF, CASPT2, DFT sowie CC2 in der Literatur beschrieben.

Wir haben zur Klärung der elektronischen Strukturen der Oligothiophene die Reihe vom Bithiophen bis zum Sexithiophen mit verschiedenen Detachment-Wellenlängen aufgenommen, so dass wir nun die ersten fünf Oligothiophene beschreiben und mit einander vergleichen können. Eine Veröffentlichung zu den Oligothiophenen ist kurz vor dem Einreichen.

Um eine möglichst hochwertige Auflösung der Spektren präsentieren zu können, sind sie molekülweise jeweils aus drei Teilspektren zusammengesetzt. Die Einzelnen Spektren sind mit der fundamentalen Wellenlänge von 1064 nm, die der dritten Harmonischen von 355 nm und der vierten Harmonischen des Y-AGs von 266 nm photodetached worden. Die einzelnen Signale wurden hierzu integriert, dann flächen erhaltend aufskaliert und anschließend zusammengefügt. Die Bruchstellen der Einzelspektren sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Dieses Verfahren ermöglicht es die einzelnen Signale mit geringerer Elektronenüberschussenergie auszunehmen und dadurch eine bessere Auflösung zu erhalten.

a) Bithiophen:

Das Bithiophen hat nur eine sehr geringe EA von 0,049 eV und ist deshalb sehr schwierig als Anion darzustellen. Im direkten Vergleich kann man deshalb erkennen, dass das Signal-zu-Rausch Verhältnis schlechter als bei den übrigen Thiophenen ist. Die Auflösung dieses Spektrum ist im Vergleich zu den Anderen am besten, da das Bithiophen am kleinsten ist und die geringere Anzahl von niederfrequenten Schwingungen hat. Man kann daher auf den Signalen der ersten beiden Zustände eine Schwingungsstruktur erkennen. Die Schwingungen können einer C=C-Steckschwingung zugeordnet werden. Der erste Zustand nach dem S₀ ist der T₁. Er liegt bei 2,28 eV und stimmt überraschend gut mit dem Literaturwert von 2,26 eV im Kristall [16] überein. Das dritte Signal in dem Spektrum beginnt bei 3,83 eV und zeigt eine zweite Stufe bei 4,33 eV. Diese Struktur beinhaltet den T₂, den S₁ und vermutlich den T₃ sowie den T₄, die leider aufgrund ihrer hohen Zustandsdichte und des schlechten Signal-zu-Rausch Verhältnis nicht experimentell unterschieden werden können. Die Theorie aus dem Teilprojekt C1 sagt für diesen Energiebereich 4,01 eV für den S₁, 3,75 eV für den T₂, 4,09 eV und 4,19 eV für den T₄ voraus. Die so nah beieinander liegenden elektronischen Zustände erklären möglicherweise die ungewöhnlich hohe ISC-Rate des Bithiophens.

Abb. 5: In der Abbildung sind alle Spektren der Oligothiophenreihe gegeneinander ausgetragen. Bei allen Substanzen ist ihre EA (0,05 eV (2T), 0,50 eV (3T), 0,84 eV (4T), 0,95 eV (5T) und 1,13 eV (6T)) abgezogen, so dass alle Spektren auf den Grundzustand normiert sind. Man kann direkt die elektronisch an-

geregten Zustände miteinander vergleichen. Um die Auflösung zu verbessern sind die Spektren der Thiophene jeweils mit 1064 nm, 355 nm und 266 nm aufgenommen worden. Die Grenzen der Einzelspektren sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

b) Terthiophen:

Das Terthiophen hat mit 0,50 eV schon eine wesentlich höhere EA als das Bithiophen. Man kann den S_0 , den T_1 , den T_2 und den S_1 des Terthiophen getrennt erkennen. Mit 1,94 eV liegt unser gemessener T_1 -Wert recht nahe am Literaturwert von 1,88 eV aus der n-Alkanmatrix [17] und etwas höher als der theoretische adiabatische Wert von 1,74 eV. Unser S_1 -Wert beträgt 3,05 eV und stimmt sehr gut mit den Referenzen 3,04 eV im Lösungsmittel [18], 3,085 eV in der n-Dekanmatrix und 3,05 eV aus der Rechnung überein. Das Signal bei 3,4 eV kann aufgrund seiner Struktur nicht dem S_1 zugeschrieben werden und muss den T_2 darstellen. Dieser Wert konnte bislang nicht gemessen werden, da T_1 - T_n Absorptionsmessungen nicht so tief in den IR-Bereich vordringen konnten.

c) Tetrathiophen:

Beim Tetrathiophen wurde für die vergleichende Spektrenübersicht eine EA von 0,835 eV abgezogen. Der S_0 - T_1 Übergang stimmt mit seinen 1,72 eV gut mit dem 1,67 eV aus der Kristallmessung [16] überein. Die beiden weiteren Signale bei 2,6 eV und 3,06 eV sind verglichen mit den theoretischen Werten von 2,25 eV und 2,62 eV wieder etwas höher aber eindeutig der T_2 und der S_1 . Gestützt wird diese Zuordnung durch die Intensitätsverhältnisse der beiden Zustände: Der T_2 -Zustand lässt nur zu 36% eine Einelektronen-Anregung aus dem Anion zu.

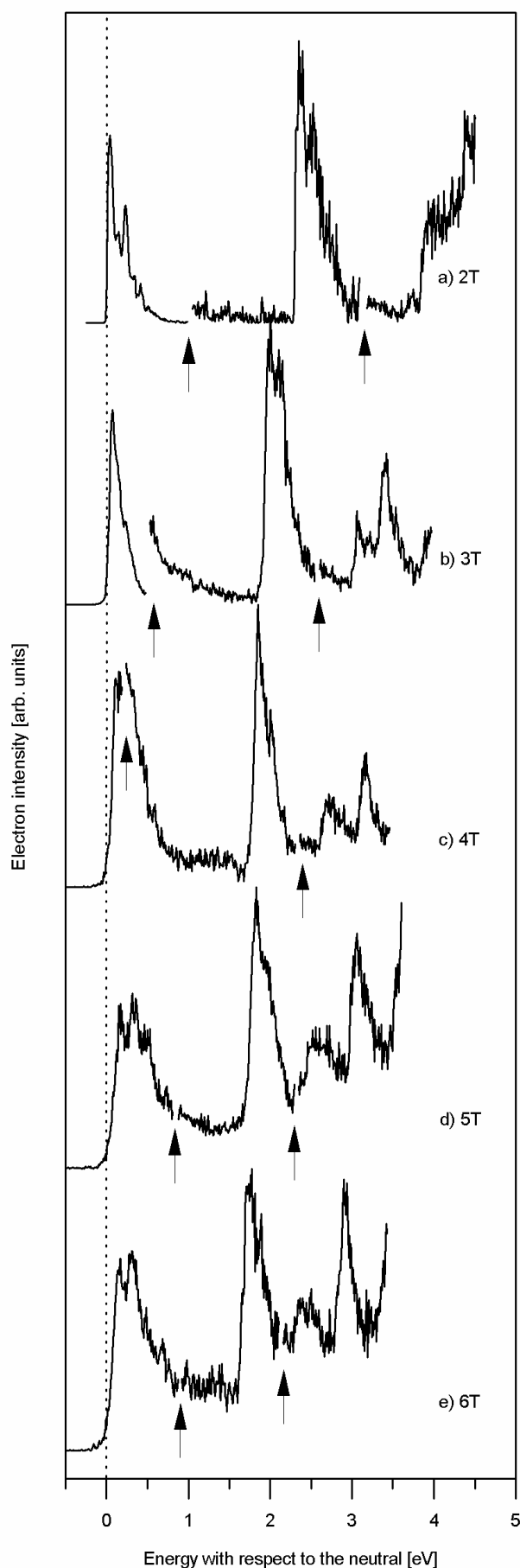
d) Quinquethiophene:

Das Spektrum des Quinquethiophene wurde um die EA von 0,95 eV versetzt in das Gesamtspektrum eingearbeitet. Man sieht den S_0 , den T_1 , den T_2 , den S_1 und am rechten Rand einen weiteren nicht zuzuordnenden Zustand. Bei uns liegen der T_1 -, der T_2 - und der S_1 -Zustand bei 1,69 eV, 2,43 eV und 2,95 eV. Die Größenverhältnisse der beiden oberen Zustände ist hier noch besser auf 1:2 abzuschätzen und lässt sich wieder durch den geringeren ein-Elektronen-Übergangs-konfiguration-anteil erklären.

e) Sexithiophen:

Das Sexithiophen hat eine EA von 1,13 eV. Die T_1 -, T_2 - und S_1 -Werte ergeben sich aus unserer Messung mit 1,61 eV, 2,28 eV und 2,78 eV. Der nächst-höhere Zustand am rechten Rand des Spektrums rückt mit zunehmender Kettenlänge weiter ins Blickfeld, kann aber immer noch nicht vollständig dargestellt werden. Eine Zuordnung ist daher schwierig. Die theoretischen Berechnungen legen nahe, dass es sich um eine Superposition der T_3 - und T_4 -Zustände handelt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die T_2 -Zustände und ihre Position im elektronischen Gefüge



der Oligothiophene bisher nicht bestimmt werden konnten. Unsere Messungen zeigen, dass der T_2 generell unterhalb der S_1 -Zustände liegt. Dies könnte eine Erklärung sein weshalb die ISC-Raten in den kurzen Oligothiophenen so groß sind.

B 2. Die Spektroskopie von $n\pi^*$ -Tripletzuständen

B 2.1 PD-PES am para-Benzochinon

1,4-Benzochinon ist ein geeignetes Testsystem um die PD-PES bezüglich der Anwendbarkeit auf $n\pi^*$ Zustände zu erproben. Es stellt ein relativ kleines aromatisches System mit Heteroatomen dar, hat ein starkes quadrupol Moment und daraus resultierend niedrig liegende $n\pi^*$ Zustände. Eine $n\pi^*$ Anregung hätte allgemein ein schwaches Übergangsmoment weil es nur einen geringen Überlapp der Orbitale gibt. Zusätzlich fallen diese Übergänge bei der Spektroskopie am Neutralteilchen durch Paritäts-, Symmetrie- bzw. Spinverbote besonders dunkel aus. Da die PD-PES alle diese Beschränkungen umgeht, erwarten wir auf Grund einer sehr geringen Geometrieänderung Franck-Condon Faktoren, die zu scharfen Spektren führen müssten. Benzochinon ist in der Literatur ausgiebig beschrieben und es gibt [19] bereits Elektron-Energie-Loss Spektren, so dass unsere Ergebnisse gut verglichen werden können. Das Molekülorbitalschema auf der rechten Seite zeigt, wie die n-Orbitale in der Elektronenstruktur eingebettet sind. Es gibt jedoch die Energetik und die Symmetrie der einzelnen Zustände nicht wahrheitsgetreu wieder, so dass man nicht die hohe Zustandsdichte oder die Symmetrieverbote der Übergänge ablesen kann.

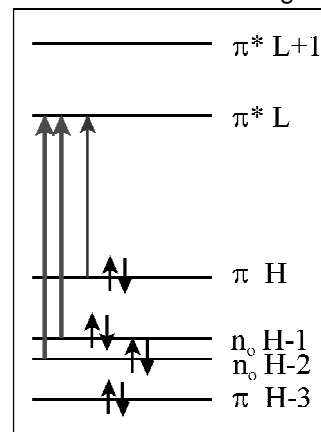
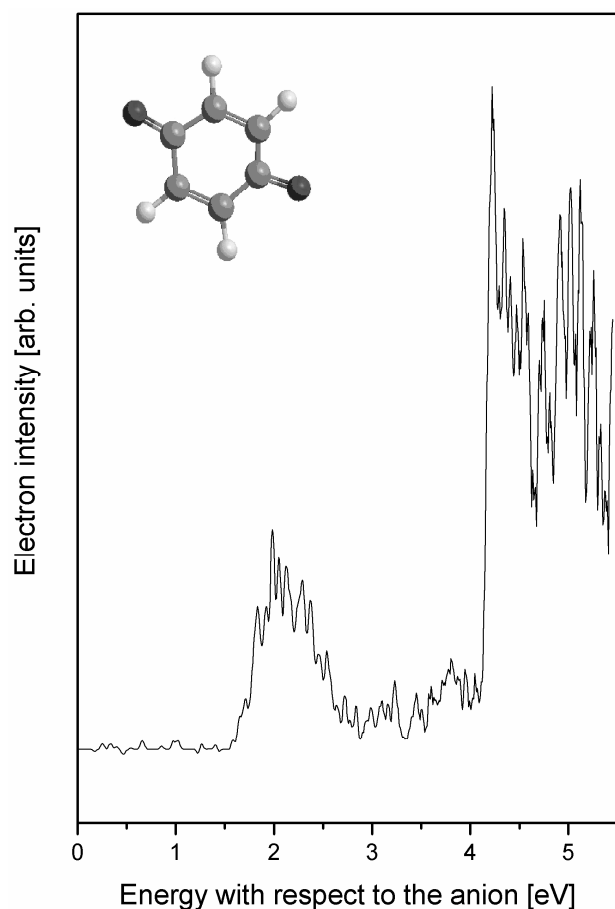


Abb. 6: Das Molekül Orbitalschema zeigt die Elektronenkonfiguration des Benzochinons. Die nicht bindenden Orbitale der Sauerstoffatome (n) liegen dicht bei den höchsten bindenden Orbitalen des π -Systems und können ebenfalls durch Photodetachment depopuliert werden.



Das Anionen-PE Spektrum ist mit einer Detachmentwellenlänge von 212,8 nm aufgenommen worden. Die gemessene Elektronenaffinität beträgt 1,86 eV und stimmt mit Vergleichswerten aus Münchner Messungen relativ gut überein. Man sieht im Spektrum einen steilen Anstieg oberhalb von 2,3 eV (im Bezug auf den S_0) und einen zweiten deutlichen Anstieg oberhalb von 2,5 eV. Die zweite Struktur ab 2,5 eV kann durch Vergleich mit der Literatur den S_1 - bzw. S_2 -Zuständen zugeordnet werden. Die vorderen Signale können daher nur von den tiefer liegenden, Symmetrie und Spin verbotenen $n-\pi^*$ -Übergänge des T_1 und des T_2 sein. Leider ist zurzeit nicht möglich die T_1 -, T_2 -, S_1 - und S_2 -Zustände explizit zu trennen. Die gemessenen Strukturen sind jedoch echt und vermutlich eine Überlagerung dieser vier Zustände. Es wäre eine deutlich höhere Elektronenenergieauflösung nötig um die Zustände zu trennen.

Abb. 7: Das PD-PE Spektrum von Benzochinon aufgenommen mit der 5. Harmonischen des NdYAG-Lasers (212,8 nm). Die Elektronenaffinität beträgt 1,86 eV. Ab 2,3 eV über dem Grundzustand finden wir eine hohe Zustandsdichte, die den T_1 -, T_2 -, S_1 - und S_2 -Zuständen zugeordnet wird. Es ist somit gezeigt, dass die PD-PES aus dem Radikalanion symmetrieverbotene und $n\pi^*$ -Zustände erreichen kann.

B 2.2 PD-PES am Xanthon

Xanthon ist wegen seiner Intersystem Crossing Rate von 10^{12}s^{-1} und seiner Triplettenergie-Donoreigenschaft von Interesse. Eine verzögerte Fluoreszenz aus dem S_1 , lässt auf einen energetisch nahe liegenden Triplett-Zustand schließen, der mit dem S_1 im thermischen Gleichgewicht steht. Der prinzipiell mögliche Übergang vom Singulett in den Triplett und zurück kann durch die El Sayed Regeln erklärt werden. Neben vielen Flüssigphasemessungen sind auch einige Gasphasenwerte zum Xanthon bekannt. Die Übergangsenergien von $T_1 \rightarrow S_0$ und $S_1 \rightarrow S_0$ betragen 3,2 eV und 3,34 eV [20]. Der $S_2 \rightarrow S_0$ Übergang liegt bei 3,8 eV [21]. Es ist bekannt, dass der energetisch T_1 ein $\pi\text{-}\pi^*$ -Zustand und der T_2 ein dunkler $n\text{-}\pi^*$ -Zustand ist.

Abb. 8: Das Anionen-PE Spektrum von Xanthon ist mit der 5. Harmonischen des NdYAG-Lasers (212,8 nm) aufgenommen worden und zeigt eine Elektronenaffinität von 0,9 eV. Der Grundzustand zeigt eine lange Schwingungsprogression, so dass eine starke Geometrieänderung zwischen dem Anion und dem neutralen Molekül angenommen werden kann. Vom Grundzustand aus gesehen erscheint eine hohe Zustandsdichte ab 3 eV, die den T_1 -, T_2 -, S_1 - und S_2 -Zuständen zugeordnet werden kann.

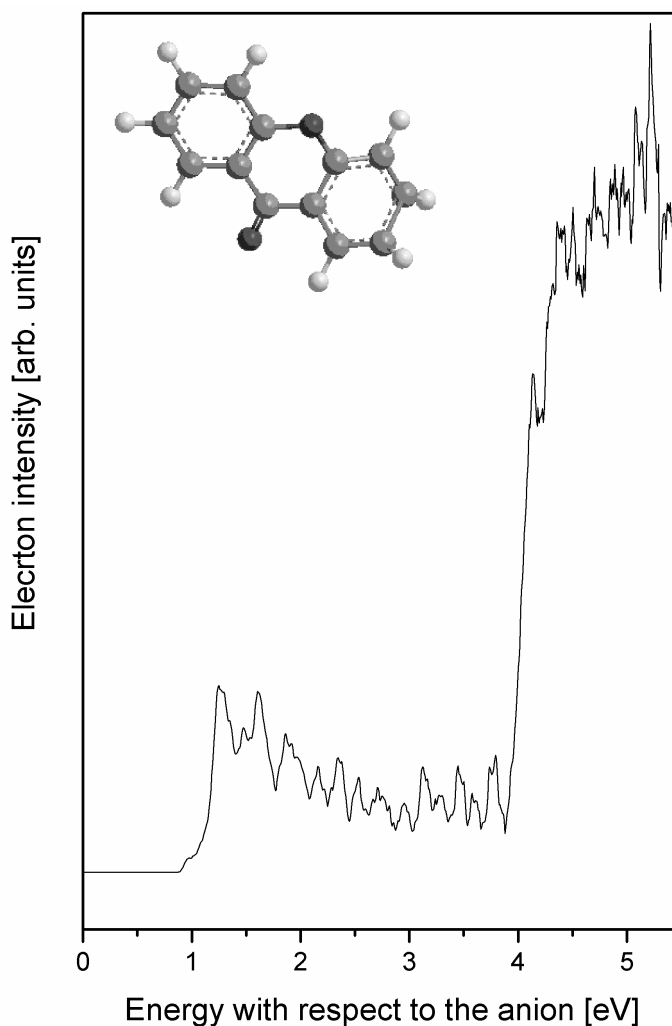
Die Messung des Xanthon wurde mit 212,7 nm als Detachmentwellenlänge (5. Harmonische des Nd:YAG-Lasers) aufgezeichnet. Der S_0 -Zustand liegt in Relation zum Anion bei 0,9 eV und stellt die Elektronenaffinität dar. Der T_1 (π/π^* -Übergang) liegt bei ca. 3 eV. Leider liegen S_1 , T_2 und S_2 zu dicht beieinander, so dass sie bei unserer Auflösung nicht getrennt werden können.

Dies kann jedoch mittels zweier Argumente erklärt werden. Erstens ist die Zustandsdichte sehr hoch, so dass die einzelnen Zustände nah beieinander liegen und beispielsweise die hohen ISC Raten bedingen und zweitens wird vermutet, dass der Anionenzustand des Xanthons im Gegensatz zum planaren Neutralzustand gewinkelt ist und durch diese Geometrieänderung eine lange Schwingungsprogression - wie beim S_0 zu beobachten - entsteht.

Zur genauen Aufklärung des Spektrums stehen noch exakte und teure Rechnungen aus, so dass vermutlich in Kürze eine bessere Interpretation möglich sein wird. Unsere Messungen unterstützen jedoch schon die Annahmen einer hohen Zustandsdichte, die sich aus $\pi\text{-}\pi^*$ -Zuständen und $n\text{-}\pi^*$ -Zuständen zusammensetzt.

PD-PES an weiteren molekularen Systemen

Es wurden A-PE-Spektren von 1-Hydroxy-Flavon, Azulen, Anthracen, Nitrobenzol und anderen Substanzen aufgezeichnet. Diese Messungen sind jedoch noch nicht abgeschlossen, insbesondere fehlt noch der Vergleich zur Theorie.



B 3 Messungen zu ladungstrennten Neutralzuständen in Komplexen

Eine entscheidende Frage beim Übergang vom isolierten Chromophor zum Cluster und dann zur komplexen Umgebung ist, inwieweit die Eigenschaft des Chromophors durch die Umgebung verändert wird. Neben der Solvatation können auch bimolekulare Ladungstransferprozesse auftreten, die als Zwischenschritte ganz wesentlich zur Photophysik und Photochemie beitragen können. Während in vororientierten Komplexen wie den Nucleinsäurebasenpaaren Ladungstransferzustände (CT-Zustände) auch die Dynamik der Singulettzustände beeinflussen können [22], spielen bei Diffusionsprozessen vor allem Triplettzustände eine wichtige Rolle als langlebige Energiespeicher.

Die PD-PES von Clustern bietet die Möglichkeit im Überschallstrahl verschiedene Moleküle zu co-expandieren und so beim Abkühlen mit einander zu verheiraten. Es können Stoßkomplexe erzeugt werden, die zum einen im Lösungsmittel wegen ihrer kurzen Lebensdauer kaum auffindbar wären und zum anderen im Neutralen wegen ihrer Geometrie nahezu keine Transmissionswahrscheinlichkeit in den CT-Zustand zeigen würden. Den zweiten Punkt unterstreicht die Abbildung 9, in der man erkennen kann, dass vom neutralen Grundzustand aus nur das auslaufende Potential des CT-Zustandes erreichbar ist und dass dadurch die Energie des Übergangs stark blau geschoben ist. Im Gegensatz dazu liegt bei der PD-PES von Clustern die Geometrie des Anions zwischen der des CT-Zustandes und der des Neutralen Komplexes. Aus diesem Grunde kann der Anionenteil beim Photodetachment in den neutralen Komplex oder der Neutralteil beim Ionisieren in den CT-Zustand überführt werden. Da alle Zustände durch einen ein-Photon-ein-Elektronen Schritt zugänglich sind, können sie mit unserer Methode spektroskopiert werden.

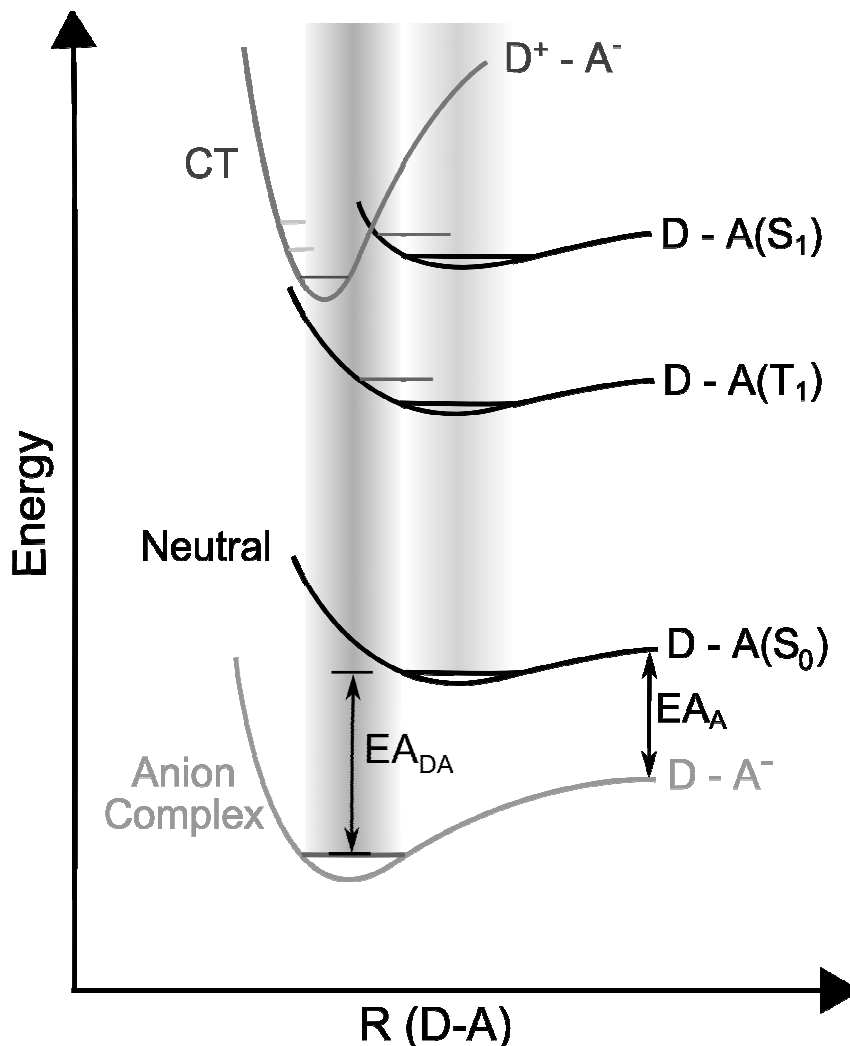


Abb. 9: Das Zustandsdiagramm zeigt den Anionenkomplex und die von ihm aus erreichbaren Zustände im Neutralen sowie den CT-Zustand. Die Geometrie erlaubt einen Übergang zu allen abgebildeten Zuständen, so dass die PD-PES eine direkte CT Spektroskopie ermöglicht.

Um zu demonstrieren, dass unsere Methode prinzipiell funktioniert, wurde zunächst ein CT System gewählt, das aus zwei in Größe und Dampfdruck ähnlichen Chromophoren zusammen gesetzt ist. Die Wahl fiel auf einen Bithiophen-Indol Cluster, bei dem nur das Bithiophen eine positive Elektronenaffinität aufweist. Durch die Anwesenheit des Anions ist dabei die Ionisationsenergie (IE) des neutralen Partners deutlich abgesenkt. Das Bithiophen-Indol⁻ Spektrum in Abbildung 10 zeigt, dass der CT-Zustand bestehend aus dem Bithiophen-Anion und dem Indol-Kation oberhalb des T₁ des Bithiophens liegt und somit nur in vor geformten Komplexen den S₁-Zustand löschen könnte.

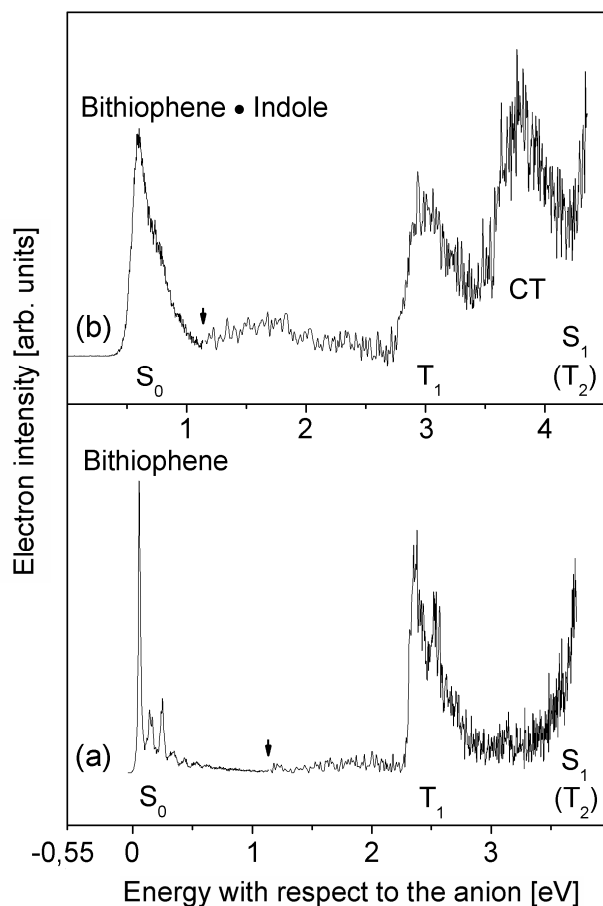
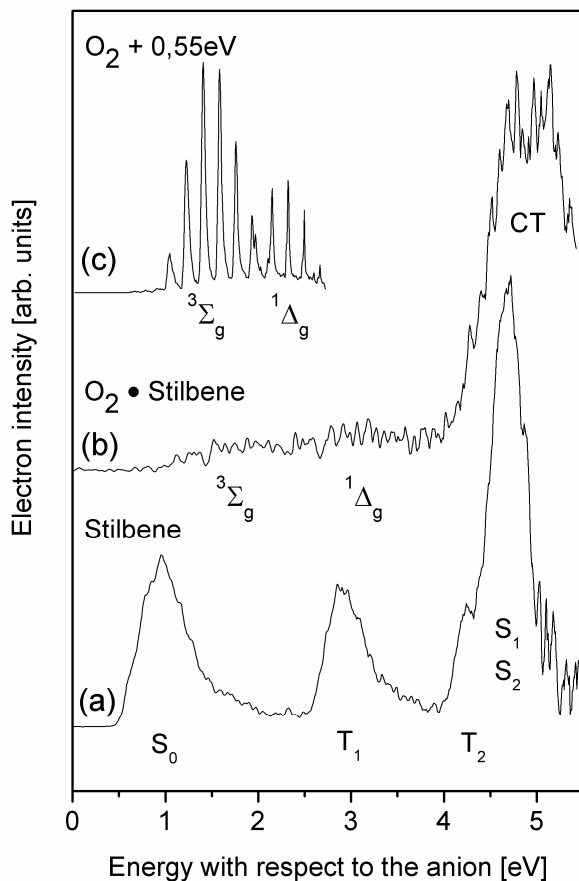


Abb. 10: (Abb. links) Photodetachment am Bithiophen-Anion führt zu S_0 und T_1 (a). Im Anionen-Komplex Indol-Bithiophen $^-$ (b) ist neben dem Photodetachment des Bithiophens (S_0 und T_1 , wie im unteren Fall) auch die Ionisation des Indols in Gegenwart des Anions möglich, es wird aus dem Anionenkomplex der neutrale CT-Zustand Indol $^+$ -Bithiophen $^-$ erzeugt. Für weitere Erklärungen siehe Text.

Erklärungen siehe Text).

Abb. 11: (Abb. unten) Das Anionen-PE Spektrum des Stilben- O_2^- -Clusters (b) und zum Vergleich des Stilbens $^-$ (a) sowie des O_2^- (c) aufgenommen mit einer Photodetachmentwellenlänge von 212,8 nm bzw. 532 nm beim O_2^- . Ein chemisch gebundener Komplex kann ausgeschlossen werden. Der Grundzustand und der erste angeregte Zustand des neutralen O_2 im Spektrum des Clusters sind nur sehr schwach erkennbar: Man beobachtet fast nur den Übergang zum CT-Zustand (weitere Er-



Zum weiteren Test der Methode wurde auch der Stilben- O_2^- -Komplex untersucht. In Abbildung 11 ist das PE-Spektrum des Stilben- O_2^- -Clusters (oben) im Vergleich zum Spektrum des Stilbens (unten) gezeigt. Ein chemisch gebundener Komplex kann ausgeschlossen werden, da das Entfernen von O_2 aus der Düse das Komplexsignal sofort verschwinden lässt. Im Fall Stilben- O_2^- ist der Zustand des neutralen O_2 im Spektrum nur sehr schwach erkennbar und wegen des großen Übergangsmomentes des Stilbens fast nur der Übergang zum CT-Zustand zu beobachten. Die Lage des CT-Zustandes kann bisher ebenfalls nur abgeschätzt werden: Mit einer Komplex-Bindungsenergie im Anion von 0,55 eV (siehe oben) und einer EA des O_2 von 0,45 eV liegt der CT-Zustand unterhalb von 3,1 eV über dem S_0 und somit auch über dem T_1 des Stilbens.

Da man aber davon ausgehen kann, dass Stilben- O_2 im Lösungsmittel extrem selten als vorgeformter Komplex vorliegt, wird dieser CT-Zustand keinen nennenswerten Anteil an der Deaktivierung des S_1 -Zustandes des Stilbens haben. Nach einer Photoanregung in den S_1 ist ein Stoß mit O_2 während der Lebensdauer des S_1 sehr unwahrscheinlich. Gleiches gilt vermutlich auch für Carotine und Carotin-Analoga. Versuche einer Komplexierung von 1,6-Diphenylhexatrien mit O_2^- scheiterten, da es während des Experiments zu einer chemischen Reaktion kommen kam und der Komplex nicht von einer mit Sauerstoff gebildeten Pe-

erklärungen siehe Text).

roxid-Verbindung unterschieden werden kann. Für solche Experimente soll in einem späteren Projekt eine Düse entwickelt werden, die verschiedene Partner erst in der Expansion zusammenbringen wird. Eine solche Düse könnte dann auch Verwendung finden, um Messungen mit Komplexen aus zwei Chromophoren ähnlichen Anregungsquerschnittes aber verschiedenen Arbeitstemperaturen bei der Verdampfung zu verwirklichen.

Ist der Absorptionsquerschnitt der beiden Chromophore noch unterschiedlicher als beim Stilben- O_2^- -Clusters, so beobachtet man fast nur den Übergang zum CT-Zustand. In Abbildung 12 sind die Anionen-PE Spektren vom N-methylindol- O_2^- und vom Indol- O_2^- -Cluster dargestellt. Durch die Methylierung des Indols kann gezeigt werden, dass sich mit der Ionisationsenergie auch die Energie des CT-Zustandes verschiebt.

Die breite Struktur der CT-Zustände mit jeweils einem sanften Anstieg in diesen Spektren erklärt sich aus der großen Geometrieänderung zwischen dem Anionenkomplex und dem stark kontrahierten CT-Zustand. Da die Solvatationsenergie der kleinen Ladung im O_2 durch das Indol wesentlich größer als die Bindung im neutralen Komplex sein muss, ist der Anionenkomplex bereits wesentlich komprimierter als der neutrale Komplex. Es werden deshalb zum schlechten elektronischen Übergangsmoment hinzukommend auch ungünstige Franck-Condon-Faktoren für den Übergang vom Anion zum neutralen Komplex im Grundzustand (Photodetachment des O_2^- im Komplex) erwartet. Die schwache Struktur vor dem CT-Zustand, die besonders im obigen Spektrum auffällt, wird wie beim Stilben- O_2^- -Cluster durch diese schwache Anregung zum neutralen O_2 -Komplex erklärt. Sie fehlt aber im zweiten Spektrum fast vollständig. Auf Grund dieser Beobachtung ist zu vermuten, dass im N-Methylindol (oben) das O_2^- über dem π -System und nicht mehr in der aus Polaritätsgründen energetisch günstigeren NH-Gruppe sitzt.

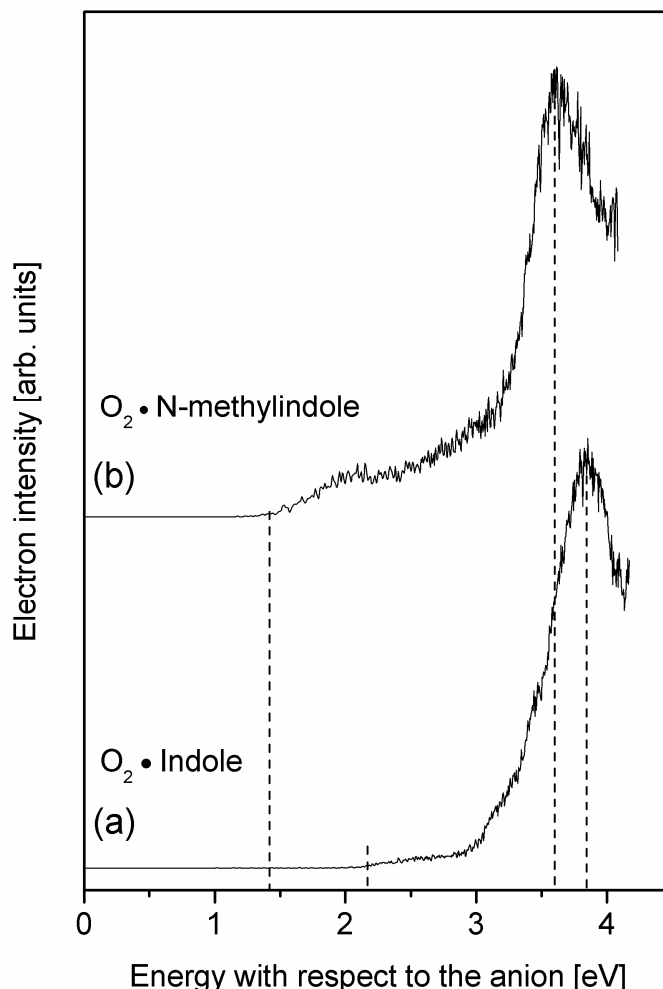


Abb. 12: Die Spektren vom Indol- O_2^- -Cluster (a) und vom N-methylindol- O_2^- -Cluster (b) demonstrieren den Einfluss von Substituenten bei der CT Bildung. Beim Indol bindet der negative Sauerstoff an den partiell positiven Wasserstoff der NH-Gruppe. Ist diese Bindungsstelle durch eine Methylgruppe blockiert, muss der Sauerstoff eine Position über dem π -System einnehmen und ist der Struktur des neutralen Komplexes dadurch ähnlicher. Als Folge davon ist in (b) das Maximum des CT- Zustandes verschoben und das Sauerstoffspektrum in der vorderen Flanke stärker ausgeprägt.

Schätzt man im Komplex von Indol mit O_2 die Komplex-Bindungsenergie im Anion mit 0,5 eV ab (siehe O_2 Naphthalin [1*]), so liegt der CT-Zustand unter dem T_1 -Zustand des Indols. Zusammen mit der sehr langen Lebensdauer des T_1 -Zustands in Tryptophan (in Abwesenheit von O_2) legt dieses Ergebnis einen neuen Mechanismus für die 1O_2 -Entstehung bei Photoanregung des Tryptophans nahe. Der Anteil des angeregten Tryptophans, der in den T_1 -Zustand relaxiert, speichert die Energie, bis es zufällig mit einem durch das Peptid diffundierenden O_2 -Molekül zusammen stößt. Durch den Übergang zum CT-Zustand (erster Elektronentransfer) und einem nachfolgenden Rücktransfer eines Elektrons mit einem anderen Spin (zweiter Elektronentransfer) kann dann der 1O_2 und das Tryptophan im Grundzustand erzeugt werden. Mag die Ausbeute über alle Prozesse auch relativ klein sein, so ist es nur eine Frage der Anzahl der Anregungen bis tryptophanhaltige Proteine durch UV-Anregung zerstört werden. Ähnliche Mechanismen werden von uns auch für Homo- und Hetero-Komplexe aus größeren Chromophoren prognostiziert, da meist die Elektronenaffinitäten hoch und die Ionisationsenergien niedrig sind.

Detailliertere Informationen können in unserem Paper nachgelesen werden [23].

C) Ergebnisse aus Kooperationen

C1) Die ultraschnelle Deaktivierung von Thiophen

In Zusammenarbeit mit Christel Marian (**C1**) wurde die schnelle strahlungslose Deaktivierung von Thiophen aufgeklärt. Die fs-pump-probe-Daten stammen noch aus meiner Münchner Zeit. Da im Thiophen einerseits zwei Tripletzustände unterhalb des S_1 liegen und andererseits die α -Oligothiophene ein sehr schnelles ISC im ps-Bereich zeigen, wurde der beobachtete schnelle Zerfall des angeregten Zustandes von etwa 80 fs zunächst mit Vorbehalt als ein schnelles ISC interpretiert. Diese Interpretation war jedoch wegen der schnellen Zerfallszeit fragwürdig und wurde deshalb lange nicht veröffentlicht. In Kooperation mit Frau Marian gelang es nun, als Deaktivierungsmechanismus eine Ringöffnung nach Photoanregung zu finden, die über einen konischen Schnitt mit dem Grundzustand die elektronische Energie schnell in Schwingungsenergie konvertiert [24*]. Diese theoretischen Ergebnisse stimmten auch mit unseren gemessenen Daten qualitativ überein [25*].

C2) 1-Hydroxy-Tryptamin, 1-Hydroxy-Indol

Für eine Kooperation mit Michael Schmitt wurden R2PI-Übersichtsspektren zu Hydroxy-Tryptamin [26*] und Hydroxy-Indol [27*] gemessen (siehe auch Arbeitsbericht in **A2**). Für Hydroxy-Tryptamin lassen sich Übergänge verschiedener Konformere lokalisieren und von den Übergängen, die von Clustern (hier mit Wasser) resultieren, trennen. Ziele der Messungen am 1-Hydroxy-Tryptamin waren, zu klären, ob die Reihenfolge der beiden elektronisch angeregten Zustände L_a und L_b durch die Substitution am Indolring vertauscht und wie die Hydroxy-Gruppe die relativen Konformationsenergien im Vergleich zum Tryptamin beeinflusst werden. Gegenwärtig wird mit anderen Modellsubstanzen, die große Dipole in der Seitenkette besitzen, an ähnlichen Fragestellungen gearbeitet. Beim 1-Hydroxy-Indol stand die Relativlage und Kopplung zwischen den L_a und L_b -Zuständen im Vordergrund.

C3) Caged compounds

Es wurden mit dem ESI-Massenspektrometer (ESI-MS) auch Experimente zum zeitnahen massenspektrometrischen Nachweis von Photofragmenten durchgeführt (siehe Bericht AG Schaper (**B6**)). Neben anderen Verbindungen wurde insbesondere die *caged-compound*-Verbindung γ -Aminobuttersäure (GABA) mit 308 nm bestrahlt und dann einige Minuten später im Massenspektrometer analysiert. Dabei konnte ein protoniertes Photoprodukt überzeugend nachgewiesen werden. Die Abspaltung folgt dabei dem typischen Muster dieser Substanzklasse (siehe Projekt **B6**). Die Methode „zeitnahe massenspektrometrische Analyse von Photoprodukten“ kann sicher bezüglich der Empfindlichkeit und der zeitlichen Nachweisgrenze optimiert werden. Aber es wird sicher schwierig sein, den Zeitbereich kleiner 1s zwischen Anregung und Massennachweis zu unterschreiten.

Diese Methode ist zum Teil komplementär zu optischen Methoden und kann in Einzelfällen einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung von Photoprozessen liefern. Eine Gefahr liegt jedoch im bevorzugten Nachweis protonierter Spezies im ESI-MS, so dass möglicherweise nicht alle Photoprodukte mit vergleichbarer Effizienz nachgewiesen werden können. Hier müssen weitere Experimente den Beitrag dieser Methode zur Aufklärung von Photoreaktionen klären (siehe Arbeitsprogramm).

Referenzen:

- [1*] Le Barbu, K., Schiedt, J., Weinkauff, R., Schlag, E.W., Nilles, J.M., Xu, S.-J., Thomas, O.C., & Bowen, K.H. Microsolvation of small anions by aromatic molecules: An exploratory study. *J. Chem Phys.* **116**, 9663-9671 (2002).
- [2*] Schiedt, J., Knott, W.J., LeBarbu, K., Weinkauff, R., & Schlag, E.W. Microsolvation of similar-sized aromatic molecules: Photoelectron spectroscopy of bithiophene-, azulene, and naphthalene-water anion clusters. *J. Chem. Phys.* **113**, 9470-9478 (2000).
- [3*] Schiedt, J., & Weinkauff, R. Efficient and robust anion source based on a micro-cannel plate electron gun. *Rev. Sci. Instrum.* **70**, 1-5 (1999).
- [4*] Lehr, L., Zanni, M.T., Greenblatt, B.J., Weinkauff, R., & Neumark, D.M. Electron solvation dynamics in finite systems: A femtosecond study of iodide-(water)_n anion clusters. *Science* **284**, 635-638 (1999).
- [5*] Schiedt, J., & Weinkauff, R. Resonant photodetachment via shape and Feshbach resonances: p-benzoquinone anions as a model system. *J. Chem. Phys.*, **110**, 304-314. (1999).
- [6*] Schiedt, J., Weinkauff, R., Neumark, D.M., & Schlag, E.W. Anion spectroscopy of uracil, thymine and the amino-oxo and the amino-hydroxy tautomers of cytosine and their water clusters. *Chem. Phys.* **239**, 511-524 (1998).
- [7*] Rentsch, S., Yang, J.P., Paa, W., Birkner, E., Schiedt, J., & Weinkauff, R. Size dependence of triplet and singlet states of α -oligothiophenes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1**, 1707-1714 (1999).
- [8*] Weinkauff, R., & Schiedt, J. Energetics of photoinduced electron transfer in the indole-O₂ cluster in the gas phase: Possible consequences for photoexcited tryptophan in solution. *Photochem. Photobiol.* **66**, 569-575 (1997).
- [9*] Schiedt, J., & Weinkauff, R. Photodetachment photoelectron spectroscopy of perylene and CS₂: Two extreme cases. *Chem. Phys. Lett.* **274**, 18-22 (1997).
- [10*] Schiedt, J., & Weinkauff, R. Photodetachment photoelectron spectroscopy of mass selected anions: Anthracene and the anthracene-H₂O cluster. *Chem. Phys. Lett.* **266**, 201-205 (1997).
- [11*] Schiedt, J., & Weinkauff, R. Spin-orbit coupling in the O₂⁻ anion. *Z. Naturforsch.* **50a**, 1041-1044 (1995).
- [12] Evans, D.F. Perturbation of singlet-triplet transitions of aromatic molecules by oxygen under pressure. *J. Chem. Soc.* **257**, 1351-1357 (1957).
- [13] Weiss, V., Port, H., & Wolf, H.C. Direct optical detection of the triplet T₁-state in diphenylpolyene single crystals. *Chem. Phys. Lett.* **192**, 289-293 (1992).
- [14] Teki, Y., von Schütz, J.U., Wachtel, H., Weiss, V. & Wolf, H.C. Triplet excitations in diphenylbutadiene and diphenylhexatriene single crystals by zero-field delayed fluorescence ODMR. *Chem. Phys. Lett.* **225**, 124-130 (1994).
- [15] Bellahn, U. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen, 2000
- [16] Landwehr, P., Port, H. and Wolf, H. C. *Chem. Phys. Lett.* **260**, 125-129 (1996)
- [17] Birnbaum, D. and Kohler, B. E. *J. Chem. Phys.* **90**, 3506-3510 (1989)
- [18] Colditz, R., Helbig, M. and Rentsch, S. *Chem. Phys.* **201**, 309-320 (1995)
- [19] Allan, M. *Chem. Phys.*, **84**, 311 (1984)
- [20] Baba, M., Kamai, T., Kiritani, M., *Chem. Phys. Lett.*, **185**, 354-358 (1991)
- [21] Y. Ohshima, T. Fujii, T. Fujita, D. Inaba, and M. Baba, *J. Phys. Chem. A*, **107**(42), 8851-8855 (2003)
- [22] Sobolewski, A. L., Domcke, W., Dedonder-Lardeux, C. & Jouvet, C. Excited-state hydrogen detachment and hydrogen transfer driven by repulsive 1^{*} states: a new paradigm for nonradiative decay in aromatic biomolecules, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **4**, 1093-1100 (2002)
- [23] Siegert, S., Vogeler, F., Schiedt, J. and Weinkauff, R. Direct spectroscopy of contact charge transfer states: Possible consequences for tryptophan excited-state deactivation pathways by O₂ and formation of reactive oxygen species. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 4996-5006 (2010)
- [24*] Salzmann, S., Kleinschmidt, M., Weinkauff, R., & Marian, C.M. Excited States of Thiophene: Ring Opening as Deactivation Mechanism. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 380-392 (2008)
- [25*] Weinkauff, R., Lehr, L., Schlag, E.W., Salzmann, S. & Marian, C.M. Ultrafast Dynamics in Thiophene Investigated by Femtosecond Pump Probe Photoelectron Spectroscopy and Theory. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 383-404 (2008).
- [26*] Vu, T.B.C., Kalkmann, I., Meerts, W.L., Brand, Ch., Svartsov, Y.N., Wiedemann, S., Weinkauff, R. & Schmitt, M. The conformational landscape of 5-methoxytryptamine studied by rotationally resolved fluorescence spectroscopy and resonant ionization spectroscopy
a. submitted to *PCCP* **11**, 2433-2440 (2009)

[27*] Ch. Brand, O. Oeltermann, D. Pratt, R. Weinkauf, W. L. Meerts, W. van der Zande, K. Kleinermanns, M. Schmitt, Rotationally resolved electronic spectroscopy of 5-methoxyindole, J. Chem. Phys. **133**, 024303 (2010).

6.2.2 Aus dem Teilprojekt entstandene Publikationen

a) Arbeiten, die in Publikationsorganen mit einer wissenschaftlichen Qualitätssicherung zum Zeitpunkt der Antragstellung erschienen oder endgültig angenommen sind

- 1 Siegert, S., Vogeler, F., Schiedt, J. and Weinkauf, R. Direct spectroscopy of contact charge transfer states: Possible consequences for tryptophan excited-state deactivation pathways by O₂ and formation of reactive oxygen species. Phys. Chem. Chem. Phys. **12**, 4996-5006 (2010)
- 2 Vu, T.B.C., Kalkmann, I., Meerts, W.L., Brand, Ch., Svartsov, Y.N., Wiedemann, S., Weinkauf, R. & Schmitt, M. The conformational landscape of 5-methoxytryptamine studied by rotationally resolved fluorescence spectroscopy and resonant ionization spectroscopy PCCP **11**, 2433-2440 (2009)
- 3 Ch. Brand, O. Oeltermann, D. Pratt, R. Weinkauf, W. L. Meerts, W. van der Zande, K. Kleinermanns, M. Schmitt, Rotationally resolved electronic spectroscopy of 5-methoxyindole, J. Chem. Phys. **133**, 024303 (2010).

6.3 Rückblick auf die Förderung

Das Teilprojekt wird seit Juli 2005 im Sonderforschungsbereich gefördert. Es wird mit Ablauf der zu Ende gehenden Förderperiode beendet.

6.3.1 Personal im Teilprojekt während der zu Ende gehenden Förderperiode

	laufende Nummer	Name, akademischer Grad, Dienststellung	engere Fachzugehörigkeit	Institut der Hochschule oder der außeruniversitären Einrichtung	Mitarbeit im Projekt in Wochenstunden	Entgeltgruppe
Grundausrüstung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	1	Ferdinand Vogeler	Chemie	HHU	19,5	
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter						
Ergänzungsausrüstung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	2	Swen Siegert	Chemie	HHU	19,5	
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter						

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Grundausrüstung):

1 Ferdinand Vogeler

Aufgabenbeschreibung:

Verbesserung der PD-PES-Anlage, insbesondere Entwicklung von gepulsten Aufbauten.

Messungen an Diphenylpolyenen sowie Ladungstransferzuständen.

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Ergänzungsausrüstung):

2 Swen Siegert

Aufbau und Verbesserung der PD-PES-Apparatur. Messungen an $n\pi^*$ -Zuständen, Oligothiophenen und Ladungstransferzuständen.

6.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt A2

6.1.1 Titel: Bestimmung von Strukturen und Lebensdauern photoprotektiver Addukte in elektronisch angeregten Zuständen.

6.1.2 Projektleitung

Schmitt, Michael, PD Dr., geb. 2.7.1964, deutsch
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Institut für Physikalische Chemie I
Universitätsstr. 1
D-40225 Düsseldorf
Telefon: 0211 81 13691
E-Mail: mschmitt@uni-duesseldorf.de

6.2 Entwicklung des Teilprojekts

6.2.1 Bericht

Im geförderten Teilprojekt A2 wurden Strukturen elektronisch angeregter Moleküle, die Lage ihrer Übergangsdipolmomente, die Natur des oder der niedrigsten angeregten Singulettzustände sowie ihre Lebensdauern bestimmt. Dieser Bericht orientiert sich in erster Linie an den im Abschnitt 3.3.2 angegebenen Publikationen aus diesem Teilprojekt. Bei den untersuchten Molekülen können zwei Klassen unterschieden werden. Zum einen Dimere von Aromaten, die über van der Waals oder Wasserstoffbrücken gebunden sind, wie zum Beispiel das Phenoldimer und das Benzoesäuredimer, zum anderen Derivate des Indolchromophors, wie Tryptamin, Methoxytryptamin, Azaindol und das Indol selbst. Die umfangreichsten Untersuchungen wurden am Tryptamin und am Indol als Modellsysteme durchgeführt. In Molekularstrahlen konnten bisher 7 verschiedene Konformere von Tryptamin gefunden werden, die vor einer Untersuchung ihrer elektronisch angeregten Zustände vollständig strukturell charakterisiert wurden.

Bei den Indolchromophoren steht die Reihenfolge der niedrigsten elektronisch angeregten Singulett-Zustände, L_a und L_b , im Mittelpunkt der Untersuchungen. Für das Indol konnte zum ersten Mal durch Kombination von *ab initio* quantenchemischen Rechnungen und rotationsauflösender elektronischer Spektroskopie die Modenselektivität der Abfolge von vibronischen L_a - und L_b -Banden aufgeklärt werden.[1]

Mit Hilfe der Kombination von rotationsauflösender elektronischer Spektroskopie von Torsionsbanden des Tryptamins und dispergierter Fluoreszenzspektroskopie der Ursprünge und einiger Torsionsbanden aller sieben beobachteten Konformere des Tryptamins war es uns möglich, den Einfluss des Chromophors auf die Ethylaminoseitenkette zu untersuchen. Hierbei konnten die niederfrequenten Schwingungsbanden im Bereich bis etwa 300 cm^{-1} über den entsprechenden Ursprüngen der verschiedenen Konformere Torsionsbewegungen zugeordnet werden, die bei der Faltung von Peptiden eine entscheidende Rolle spielen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, die zusammen mit TP A4 durchgeführt wurden, sind in Referenz [10] beschrieben.

Die Arbeitsgruppe von T. Zwier hat mit Hilfe von Populationstransferspektroskopie die Höhe der Barrieren zwischen einzelnen Konformeren des Tryptamins direkt bestimmen können. Um eine verlässliche Aussage über relative Stabilitäten der Konformere aus den Absorptionsintensitäten zu gewinnen, muss sichergestellt werden, dass die thermische Relaxation im Molekularstrahl wesentlich schneller ist als die Relaxation zwischen den Konformeren, die durch die Barrieren zwischen den stabilen Minimumstrukturen bestimmt wird. Zu diesem Zweck haben wir eine Untersuchung durchgeführt, in der die thermische Relaxation der Konformere durch Variation der Expansionsbedingungen und die Relaxation zwischen den Konformeren durch Variation der Düsensentemperatur systematisch variiert wurde.[3] Wir konnten zeigen, dass unter den gängigen experimentellen Bedingungen im Tryptaminsystem die Schwingungs- und die Konformerenrelaxation von der gleichen Größenordnung sein müssen. Das heißt, dass während der Ex-

pansion Populationstransfer zwischen verschiedenen Konformeren stattfindet, so dass die beobachtete Verteilung der Konformeren stark von den Expansionsbedingungen abhängt. Im aktuellen Fall konnte das Auftreten eines Konformers nur durch Variation des Stagnationsdrucks komplett unterdrückt werden.

In Zusammenarbeit mit Teilprojekt C1 wurden die beiden niedrigsten Singulettzustände aller sieben experimentell gefundener Konformere des Tryptamins durch eine Kombination von *ab initio* (RICC2), Dichtefunktional (TD-B3-LYP) und Multireferenzkonfigurationswechselwirkungsmethoden (DFT/MRCI) eingehend charakterisiert und die experimentell bestimmten Eigenschaften von elektronisch angeregtem Tryptamin auf Absorption in den L_b -Zustand zurückgeführt.[13] Daneben wurden nullpunktsenergiekorrigierte adiabatische Anregungsenergien und Orientierungen der Übergangsdipolmomente für den L_a - und den L_b -Zustand bestimmt.

Nach der experimentellen und theoretischen Charakterisierung der Konformerenlandschaft und der elektronischen Ursprünge und Eigenschaften des niedrigsten angeregten Zustands (L_b) wurden die beiden niedrigsten elektronisch angeregten Singulettzustände des stabilsten Konformers von Tryptamin untersucht.[4] Durch Messung der rotationsaufgelösten Spektren der vibronischen Banden des Gpy(out) Konformers konnten wir zeigen, dass der Ursprung des L_a -Zustandes etwa 400 cm^{-1} oberhalb des elektronischen Ursprunges des L_b -Zustandes liegt. In diesem Bereich ändert sich die Polarisation des Übergangsmoments von reiner a-Achsenpolarisation, die den L_b -Zustand charakterisiert, zu reiner b-Achsenpolarisation, charakteristisch für den L_a -Zustand. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass jede vibronische Bande oberhalb dieser Energie aus zwei oder mehreren vibronischen Übergängen besteht. Die Dichte der beobachteten vibronischen Banden folgt hierbei eng der Schwingungszustandsdichte des L_b -Zustandes. Durch die große Oszillatorstärke des L_a -Zustandes gewinnen alle energetisch naheliegenden L_b -Übergänge Intensität und treten daher im Spektrum auf. Die vergleichsweise geringe Intensität der L_a -Übergänge ist auf diese Verteilung der Oszillatorstärke auf mehrere L_b -Zustände, als auch auf ungünstige Franck-Condon Faktoren für die direkte Anregung in den L_a -Zustand zurückzuführen. Während im Energiebereich zwischen dem Ursprung des L_a -Zustandes und 300 cm^{-1} darüber jede Bande einem reinen Bandentyp von entweder L_a -Zustand oder L_b -Zustand entspricht, treten oberhalb dieser Energie nur noch gemischte Zustände auf, was anzeigt, dass beide Zustände ihre spektrale Identität völlig verloren haben. Mit Hilfe von CASSCF Rechnungen konnten wir eine konische Durchschneidung (CI) zwischen den gebundenen L_b - und L_a -Zuständen finden. Einzelpunktrechnungen entlang des so bestimmten Pfads für die konische Durchschneidung wurden mit der DFT/MRCI Methode durchgeführt und lokalisieren die CI bei einer Energie von etwa 900 cm^{-1} über dem L_b -Ursprung, in guter Übereinstimmung mit dem Energiebereich, in dem völliges Mischen der elektronischen Zustände auftritt. Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Teilprojekt A4 durchgeführt.

Die Einführung von Substituenten in den Indolchromophor des Tryptamins, welche die elektronischen Eigenschaften verändern, hat einen großen Einfluss auf deren Konformerenlandschaft. Als ersten Substituenten wählten wir eine Methoxygruppe in 5-Position des Chromophors, da diese Position die meist besetzte in biologisch aktiven Tryptaminderivaten darstellt. Die bekanntesten Vertreter dieser Klasse von Neurotransmittern sind das 5-Hydroxytryptamin, auch als Serotonin bekannt, und das N-Acetyl-5-Methoxytryptamin (Melatonin). Mit Hilfe der rotationsauflösenden elektronischen Spektroskopie konnten wir die Strukturen von drei Konformeren des 5-Methoxytryptamin bestimmen.[2] Auch hier findet man als niedrigsten elektronisch angeregten Singulettzustand den L_b , wie beim Tryptamin selbst.

Die Charakterisierung der L_a - und L_b -Zustände spielt auch eine zentrale Rolle in unserer Untersuchung der Wasserkomplexe des 7-Azaindols.[7] In diesem System wurde der Ursprung des 7-Azaindolmonomers mit rotationsauflösender Fluoreszenzspektroskopie als L_b charakterisiert. Clusterbildung mit einem oder zwei Wassermolekülen führt zu einer Vertauschung der energetischen Lage von L_a - und L_b -Zustand, so dass in den 7-Azaindol-Wasserkomplexen (1:1 und 1:2) der L_a -Zustand als energetisch niedrigster Singulettzustand experimentell beobachtet wird. Die Lebensdauern der elektronisch angeregten Zustände konnten für Monomer und Wassercluster zu etwa 10 ns bestimmt werden. Diese Werte stehen in eklatantem Widerspruch zu früheren Bestimmungen der Lebensdauern mit Pump-Probe Spektroskopie in der Gruppe von Castleman. Der energetische Wechsel von L_a - und L_b -Zustand wurde außer durch die experimentelle Bestimmung der Lagen des Übergangsdipolmoments auch durch quantenchemische Rechnungen bestätigt.[8] Geometrische Optimierung der angeregten Zustände mit coupled cluster Methoden (RICC2) und anschließende Bestimmung der Übergangsdipolmomente mit der kombinierten Dichtefunktionaltheorie / Multireferenzkonfigurationswechselwirkungsmethode (DFT/MRCI) konnten alle experimentell gefundenen Fakten bestätigen.

Wie das 7-Azaindol kann man auch das Adenin als weiteres System mit einem modifizierten Indolchromophor auffassen. Aus der experimentell beobachteten Kontur einiger Banden im Resonanzionisations-

spektrum von Adenin konnten wir die elektronischen Ursprünge der niedrigsten $\pi\pi^*$ - (ab-Typ Hybridbande bei 36105 cm^{-1}) und $n\pi^*$ -Zustände (c-Typ Bande bei 36062 cm^{-1}) von Adenin an Hand der Orientierungen ihrer Übergangsdipolmomente charakterisieren.[11] Der elektronisch erlaubte $\pi\pi^*$ -Übergang leiht dabei dem in einem planaren Molekül symmetrie-verbotenen $n\pi^*$ -Übergang Intensität durch Herzberg-Teller-Kopplung. Der Lorentzanteil der experimentellen Linienbreite entspricht einer Lebensdauer von mehr als 50 Pikosekunden, im Widerspruch zu Pump-Probe Experimenten nahe am $\pi\pi^*$ -Ursprung, die eine Lebensdauer von nur 9 ps berichten. Eine (out-of-plane) vibronische Bande des $n\pi^*$ -Zustands bei 36248 cm^{-1} zeigt eine (in-plane) ab-Kontour, die sich ebenfalls durch intensive vibronische Kopplung von $\pi\pi^*$ - und $n\pi^*$ -Übergang erklären lässt.

Die zweite große Klasse von bearbeiteten Systemen sind angeregte Zustände von Dimeren aromatischer Systeme, wie das in unserer Gruppe untersuchte Phenoldimer [9,12] und das Benzoessäuredimer.[6] Die Bestimmung der Geometrieänderungen aufgrund elektronischer Anregung erfolgt durch zwei verschiedene, sich aber bestens ergänzende Ansätze. Mit den in unserem Teilprojekt bestimmten Rotationskonstanten der angeregten Zustände kann, bei Untersuchung einer ausreichenden Anzahl von Isotopologen, die Geometrie im angeregten Zustand direkt bestimmt werden. Hierzu steht uns ein selbsterstelltes Programm (pKrFit) zur Verfügung, das eine beliebige Zahl von Geometrieparametern an einen oder mehrere Sätze von Rotationskonstanten mit Hilfe von genetischen Algorithmen anpasst. Relationen zwischen den Parametern, die zum Beispiel aus Symmetriegründen bestehen, können hierbei in den Fits verwendet werden. Dadurch ist es möglich, in einer Reihe von globalen Optimierungsschritten direkt vom Spektrum zu den Rotationskonstanten und darauf folgend von den Rotationskonstanten zur Struktur (pKrFit) zu gelangen. Falls die Anzahl der untersuchten Isotopologen nicht für eine Geometriebestimmung mit der gewünschten Anzahl an Geometrieparametern ausreicht, kann zusätzlich an die Intensität von Schwingungsbanden aus Fluoreszenzmissionsspektren unter Ausnutzung des Franck-Condon (FC) Prinzips angepasst werden, wie im TP4 von Kleinermanns ausführlich beschrieben wurde. Diese kombinierten Fits aus Rotationskonstanten und FC Intensitäten liefern höchst zuverlässige Daten zur Geometrieänderung nach elektronischer Anregung, da die anzupassenden Daten aus verschiedenen Experimenten stammen und daher im Allgemeinen keine Parameterkorrelationen zeigen. Mit diesen kombinierten Fits war es möglich die prinzipiellen Geometrieänderungen des Phenoldimers nach $\pi\pi^*$ -Anregung in den S_1 -Zustand zu bestimmen. Der S_1 -Zustand entspricht hierbei einer elektronischen Anregung der Donoreinheit des Phenoldimers. Die Wasserstoffbrücke wird bei elektronischer Anregung stark verkürzt, während der CH- π Abstand größer wird. Somit entfernen sich im Mittel die aromatischen π -Systeme durch sterische Hinderung voneinander. Während in diesem Heterodimer (die Monomere sind zwar chemisch äquivalent aber funktionell verschieden) natürlicherweise eine lokale Anregung der Donoreinheit und der Akzeptoreinheit angenommen werden kann, muss die Frage nach lokaler oder delokaler Anregung für Homodimere wie das Benzoessäuredimer [6] neu gestellt werden.

Beim Benzoessäuredimer konnte durch Auswertung der rotationsaufgelösten Spektren von fünf verschiedenen Isotopologen und einer Schwingungsbande die Lokalität der Anregung auf einer Monomereinheit gezeigt werden. Darüber hinaus konnte auch die Änderung der Tunnelbarriere für den doppelten Protonenaustausch nach elektronischer Anregung bestimmt werden. Der Schwerpunktabstand der beiden Monomere vergrößert sich bei der elektronischen Anregung, da die Wasserstoffbrückenbindungen bei der Anregung einer Benzoessäureeinheit geschwächt werden, während die Tunnelbarriere für den doppelten Protonenaustausch um 7% steigt. Dieselbe Lokalität konnte auch bei der elektronischen Anregung des Benzonitrildimers gefunden werden. Auch wenn beide Monomereinheiten strukturell und funktionell identisch sind, findet also eine auf einen Chromophor lokalisierte Anregung statt. Dies ist eine Folge der Tatsache, dass die Kopplung zwischen den π -Systemen der Monomere nur über die schwache Wasserstoffbrücke erfolgt.

Methodische Neuentwicklungen

Genetische Algorithmen – Evolutionäre Strategien

Die Anpassung der molekularen Parameter wie Rotationskonstanten oder Orientierung des Übergangsmoments an die experimentellen Spektren wird mit zunehmender Komplexität der Moleküle deutlich komplizierter, in manchen Fällen, mit klassischen Zuordnungsmethoden, sogar unmöglich. Aus diesem Grund haben wir in den letzten Jahren automatisierte Zuordnungsverfahren entwickelt, die auf der Anwendung genetischer Algorithmen (GA) beruhen.[14,15] In den meisten Publikationen dieses Teilprojekts wurden die GA zur Auswertung der rovibronischen Spektren oder auch nur der rovibronischen Konturen wie im Fall den Adenins [11] eingesetzt. In Fällen von Molekülen oder Molekülkomplexen mit sehr kleinen Rotationskonstanten und daraus resultierend sehr stark überlappenden rovibronischen Banden ist es für die GA zunehmend schwieriger, das globale Minimum mit vernünftigem Rechenaufwand zu finden. In

diesen Fällen kommt ein neuer Algorithmus zur Anwendung, der eine evolutionäre Strategie (ES) beinhaltet: der derandomisierte ES Algorithmus (ES DR2), der in den 90er Jahren von Ostenmeier entwickelt wurde. Bei dieser Variante werden Korrelationen zwischen aufeinander folgende Parameteränderungen verwendet, um den zufälligen Charakter der Variationen einzuschränken. Haben zwei Änderungen eine positive Korrelation, so wird angenommen, dass die optimale Lösung weiter in dieser Richtung zu finden ist. Auf diese Weise kann durch konsequentes Ausnutzen der Korrelationen für die Änderung jedes Parameters die Konvergenz des Algorithmus deutlich beschleunigt werden.

Phosphoreszenzdetektion

Der Detektor für den Phosphoreszenznachweis ist in die Maschine integriert und am Naphthalin getestet worden. Bisher konnten jedoch aus Zeitgründen keine Spektren neuer Verbindungen aufgenommen werden, da mir der ELS Pumplaser für den Ringfarbstofflaser wegen Defekten für fast zwei Jahre nicht zur Verfügung stand. Die Firma ELS hat mittlerweile Konkurs angemeldet. Die Produktion und Wartung wurde von der Firma Sahajanand übernommen, die ihrerseits meinen Laser fast ein Jahr lang zu reparieren versuchte, bevor sie ebenfalls Konkurs anmeldete. In der Zwischenzeit konnte ich einige der geplanten Experimente mit einem von meinem niederländischen Kooperationspartner geliehenen cw Nd:YAG Laser durchführen. Dieser stand mir jedoch nur zeitweise zur Verfügung und deckt wegen der größeren Wellenlänge (532 nm vs. 513 nm) nur einen Teil der zu untersuchenden Moleküle ab. Im Moment arbeite ich mit meinem alten Ar⁺-Ionenlaser bei 514 nm, für den ich eine gebrauchte Röhre geschenkt bekam. Deren Leistung ist im Moment ausreichend, um den Ringfarbstofflaser stabil zu pumpen.

6.2.2 Aus dem Teilprojekt entstandene Publikationen

- [1] Brand, Ch., Küpper, J., Pratt, D. W., Meerts, W. L., Krügler, D., Tatchen, J., & Schmitt, M. Vibronic coupling in indole: I. Theoretical description of the $^1L_a-^1L_b$ interaction and the electronic spectrum. PCCP **12** 4980 (2010)
- [2] Vu, T. B. C., Kalkman, I., Meerts, W. L., Brand, Ch., Svartsov, Y. N., Wiedemann, S., Weinkauff, R. & Schmitt M. The conformational landscape of 5-methoxytryptamine studied by rotationally resolved electronic spectroscopy. PCCP **11** 2433 (2009)
- [3] Böhm, M., Brause, R., Jacoby Ch. & Schmitt M. Conformational Relaxation Paths in Tryptamine J. Phys. Chem. **A 113** 448 (2009)
- [4] Böhm, M., Tatchen, J., Krügler, D., Kleinermanns, K., Nix, M. G. D., LeGreve, T. A., Zwier, T. S. & Schmitt M. Spectroscopic signatures for L_a/L_b mixing near a conical intersection. J. Phys. Chem. **A 113** 2456 (2009)
- [5] Kalkman, I., Vu, C., Schmitt & M., Meerts, W. L. Structure and internal rotation in the S_0 and S_1 states of o-toluidine studied by high resolution UV spectroscopy. PCCP **11** 4311 (2009)

Buchkapitel

- [6] Rotationally Resolved Electronic Spectroscopy and Automatic Assignment Techniques using Evolutionary Algorithms, Michael Schmitt, W. Leo Meerts, Handbook of High Resolution Spectroscopy, 2010

III. Nicht begutachtete Veröffentlichungen

- [7] Olivia Oeltermann "Hochauflösende Spektroskopie im Bereich von Singlett und Triplettübergängen aromatischer Moleküle" Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2009
- [8] Marcel Böhm "Rotationsaufgelöste elektronische Spektroskopie an flexiblen Molekülen und Molekülkomplexen" Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2010

6.3 Rückblick auf die Förderung

Das Teilprojekt wird seit Juni 2005 im Sonderforschungsbereich gefördert. Es wird mit Ablauf der zu Ende gehenden Förderperiode beendet.

6.3.1 Personal im Teilprojekt während der zu Ende gehenden Förderperiode

	laufende Nummer	Name, akademischer Grad, Dienststellung	engere Fachzugehörigkeit	Institut der Hochschule oder der außeruniversitären Einrichtung	Mitarbeit im Projekt in Wochenstunden	Entgeltgruppe
Grundausstattung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler						
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter						
Ergänzungsausstattung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	1.	Thi-Bao Chau Vu	Chemie	Inst. für Physikalische Chemie I		IIa/2
	2.	Olivia Oeltermann	Chemie	Inst. für Physikalische Chemie I		TV 13
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter						

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Grundausstattung):

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Ergänzungsausstattung):

1 Thi Bao Chau Vu

Aufnahme und Interpretation rotationsaufgelöster elektronischer Spektren

2 Olivia Oeltermann

Aufnahme und Interpretation rotationsaufgelöster elektronischer Spektren. Aufbau der Phosphoreszenzdetektion

6.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt A4

6.1.1 Titel: Primärprozesse und unmittelbare molekulare Folgemechanismen nach Photoanregung in Gas- und kondensierter Phase

6.1.2 Projektleitung

Kleinermanns, Karl, Prof. Dr., *16.01.1950, deutsch
Institut für Physikalische Chemie, Lehrstuhl für Molekülspektroskopie und Nanosysteme,
Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf
Telefon: 0211-81-12100
E-Mail: kleinermanns@uni-duesseldorf.de

6.2 Entwicklung des Teilprojekts

6.2.1 Bericht

Wasserstoff-Transfer in Guanosin-Aggregaten

Neben den Watson-Crick Basenpaaren sind auch Homo-Dimere wie G-G in die biochemische Aktivität der DNS involviert. Sequenzen mit mehreren aufeinander folgenden Guanosin-Einheiten bilden via H-Brückenbindungen in Telomeren die haarnadelförmigen Enden linearer Chromosomen.

Es wird angenommen, dass nach Anregung mit UV-Licht Wasserstoff-Transfer über die H-Brückenbindungen der Basenpaare erfolgt.¹ Dies hat Mutationen der DNS zur Folge. Aufgrund der Komplexität von DNS-Strängen und den damit verbundenen Schwierigkeiten bei der spektroskopischen Untersuchung der auf Photoanregung folgenden Prozesse, haben wir G-G-Aggregate mit *t*-Butyltrimethylsilyl-Schutzgruppen als Modellsystem gewählt. Diese Schutzgruppen fördern durch ihre Ausdehnung sterisch die Bildung der via H-Brücken gebundenen Aggregate. Zudem sind die Aggregate aufgrund der Silyl-Gruppen in aprotischen und unpolaren Lösungsmitteln wie *n*-Hexan sehr gut löslich. In diesen Lösungsmitteln ist die Bildung von H-Brückengebundenen Aggregaten gegenüber den Monomeren und gestapelten Aggregaten stark bevorzugt. Die Synthese erfolgte gemäß der Vorschrift von Sheu et al.²

Die Bildung der Aggregate wurde mit FTIR Spektroskopie untersucht. Abbildung 1a zeigt die FT-IR-Spektren von trisilyliertem Guanosin in *n*-Hexan bei verschiedenen Konzentrationen. Zum Vergleich dient in Abbildung 1b das IR-Spektrum von disilyliertem Guanosin in CDCl₃. Dieses Spektrum zeigt die asymmetrische und symmetrische Streck-Schwingung der nicht H-Brücken-gebundenen Aminogruppe bei 3530 cm⁻¹ und 3410 cm⁻¹. In *n*-Hexan sind auch bei geringen Konzentrationen keine Banden von nicht H-Brücken-gebundenen NH₂-Gruppen zu sehen. Unterhalb von 3300 cm⁻¹ befinden sich die NH-Schwingungen von H-Brücken-gebundenem Guanosin. Bei 3500 cm⁻¹ liegen die NH-Streckschwingung der freien NH in einer H-Brücken-gebundenen NH₂-Gruppe. Dies weist darauf hin, dass in *n*-Hexan keine G-Monomere, sondern ausschließlich Dimere und/oder höhere Aggregate vorhanden sind.

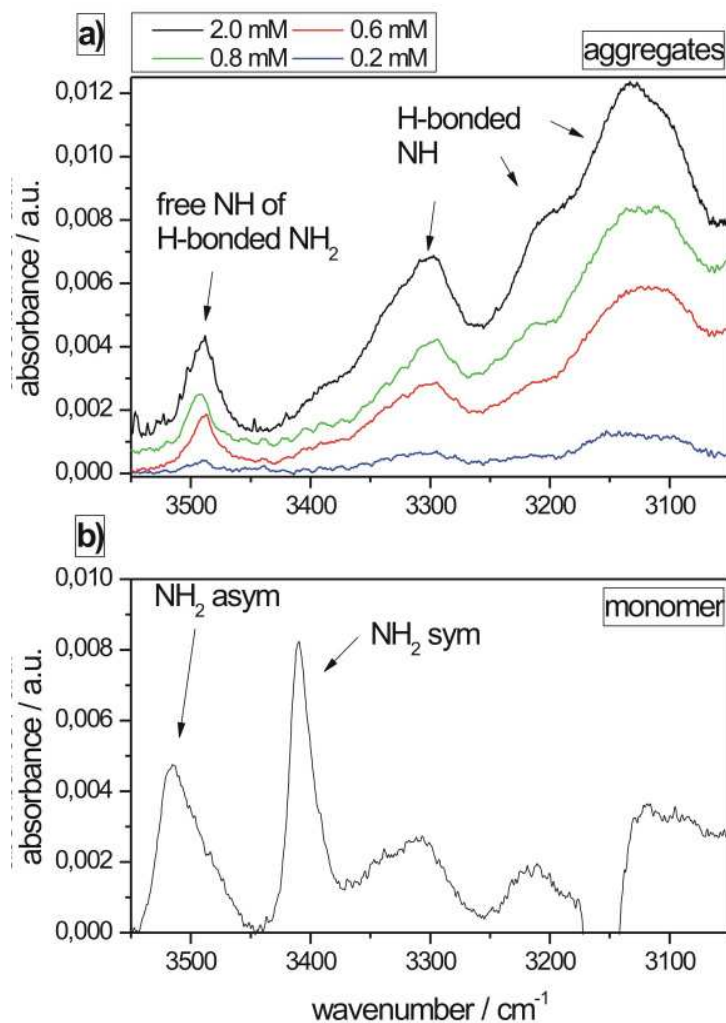


Abbildung 1: a) IR-Spektren von trisilyliertem Guanosin in n-Hexan bei verschiedenen Konzentrationen. b) IR-Spektrum von disilyliertem Guanosin in CDCl_3 .

Quantenchemische Rechnungen von R. Improtta (private Mitteilung) auf dem PCM/PBE0/6-31G(d) Niveau liefern drei mögliche Isomere des G-G-Dimers (Abb. 2). Sowohl mit Chloroform als auch mit n-Hexan als Lösungsmittel ist Isomer a energetisch bevorzugt, das „Reverse-Hoogsten“- Dimer (b) und das „Hoogsten“-Dimer (c) liegen 3,3 bzw. 5,9 kcal/mol darüber. Jedes dieser Isomere besitzt mindestens eine NH_2 -Gruppe, die nicht über H-Brücken an das zweite Molekül des Dimers gebunden ist. Im IR-Spektrum sind jedoch keine Banden der freien NH_2 -Gruppe zu sehen. Daraus schließen wir, dass in n-Hexan größere Aggregate als das Dimer vorliegen. Aus Isomer c kann durch die Anlagerung einer identischen Dimer-Einheit ein Quadruplex gebildet werden, der keine freien NH_2 -Gruppen enthält und daher als in der Lösung enthaltene Spezies in Frage kommt. Die Struktur dieses Quadruplexes ist in Abbildung 3 gezeigt.

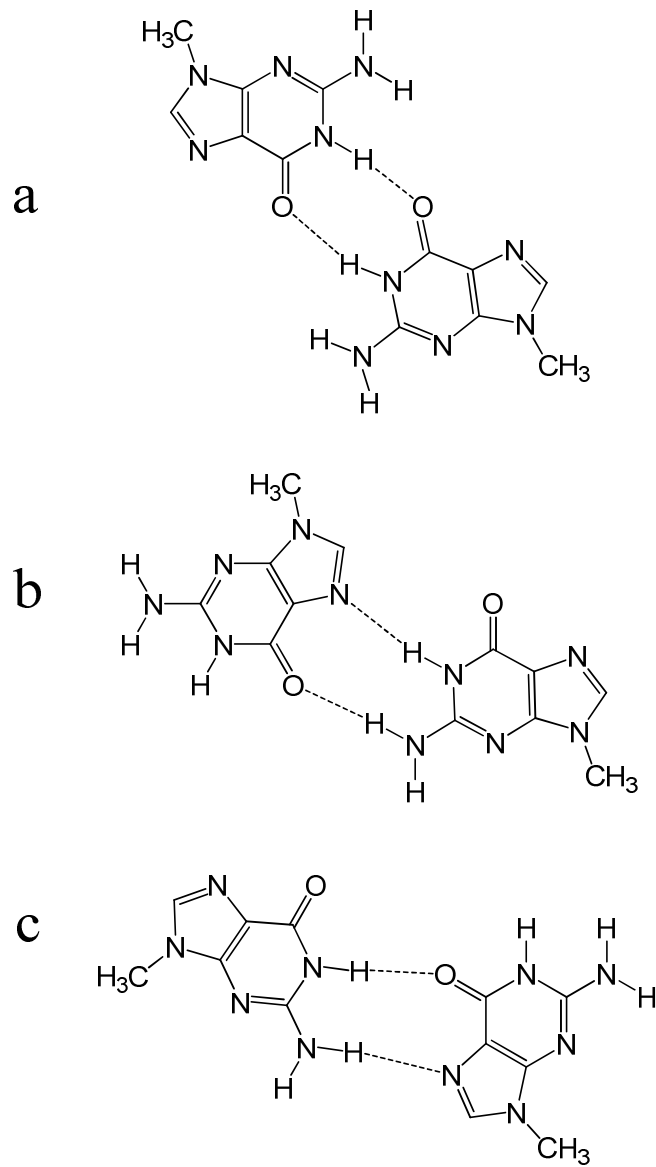


Abbildung 2: Strukturformeln der drei 9-Methyl-Guanin-Dimere

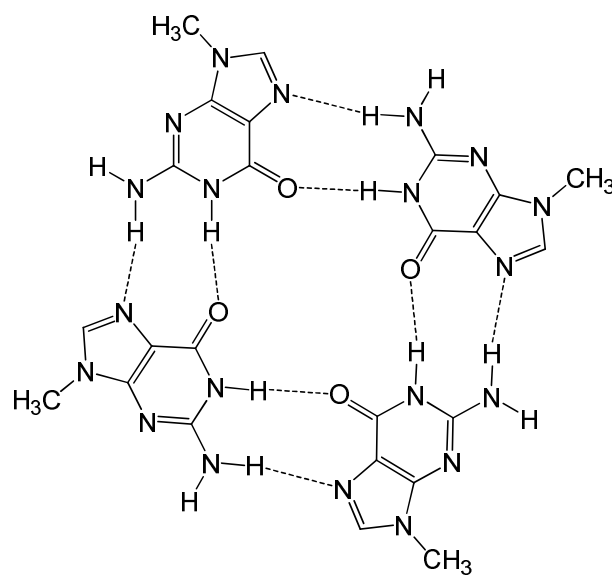


Abbildung 3: Strukturformel des G-Quadruplexes

Der energetisch niedrigste dunkle Zustand hat nach R.Improta (private Mitteilung) in den Isomeren b und c Charge-Transfer-Charakter und relaxiert auf der angeregten Potentialhyperfläche ohne Barriere in ein Plateau, das dem G^+G^- -Ionenpaar entspricht. Aus diesem Plateau erfolgt wiederum ohne Energiebarriere der Protonentransfer zum $G(-H)^+G(+H)^-$ -Biradikal, dessen Energieminimum nahe einer konischen Durchschneidung mit dem Grundzustand liegt. Rechnungen in der Triplett-Geometrie liefern den Charge-Transfer-Zustand für alle drei Isomere, mit den gleichen Folgeprozessen wie bei den Rechnungen in der Singulett-Geometrie. Danach kann bei den Isomeren b und c und wahrscheinlich auch bei dem Quadruplex, der aus Isomer c gebildet wird, H-transfer zum $G(-H)^+G(+H)^-$ -Biradikal ohne Barriere erfolgen. Allerdings muss zur Vermeidung von H-Rücktransfer (konische Durchschneidung mit dem GG Grundzustand) das Radikalpaar durch Wasserstofftransfer aus $G(+H)^+$ in einem H-Brückennetzwerk schnell getrennt werden. Andernfalls ist das freie $G(-H)^+$ Radikal spektroskopisch nicht nachweisbar.

Die Photophysik und Photochemie der Aggregate wurde mit stationärer und femto- bis mikrosekunden-aufgelöster UV/VIS Transientenspektroskopie untersucht. Die Messungen im fs/ps-Bereich wurden von S. Kovalenko (HU Berlin) durchgeführt. 650 ps nach dem Anregungspuls zeigt das Spektrum eine Absorptionsbande bei 300 nm bis 410 nm mit einem Maximum bei 310 nm. Unterhalb von 300 nm findet Bleaching statt, so dass das tatsächliche Maximum dieser Bande nicht ermittelt werden kann. Im Wellenlängenbereich von 410 nm bis 680 nm findet ebenfalls Absorption statt, die Intensität ist jedoch geringer. Beide Banden sind bis zum Ende der Messungen existent. Im Rahmen der ps-Messungen kann kein größerer zeitlicher Abstand als ca. 1 ns zwischen Anregungs- und Analysenpuls gewählt werden. Hier schließen sich unsere ns/ μ s-Experimente an.

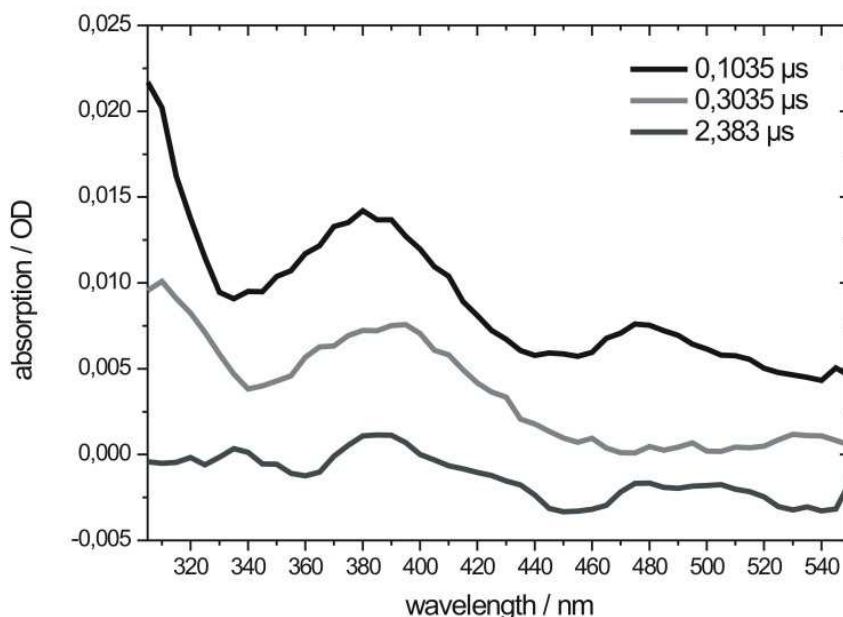


Abbildung 4: Transientenabsorptionsspektren einer 0,8 mM Lösung von Guanosin in n-Hexan zu verschiedenen Zeiten nach dem Anregungspuls.

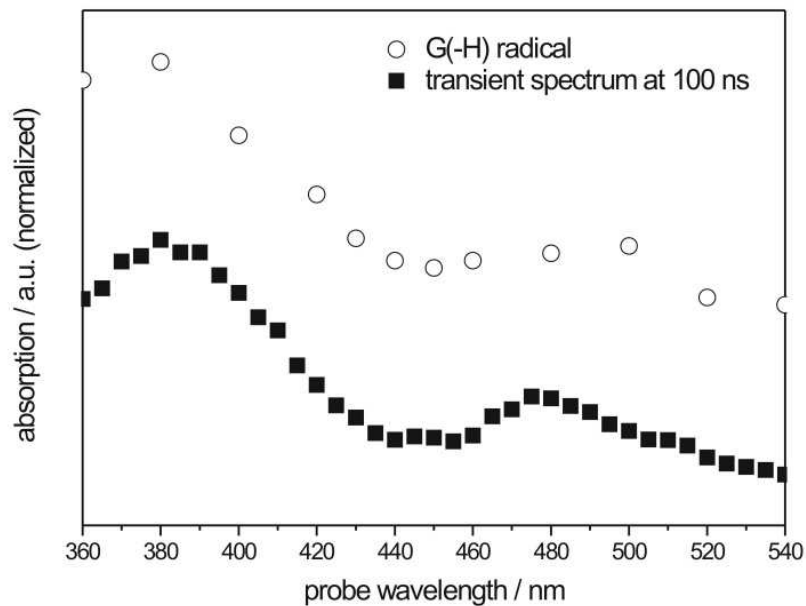


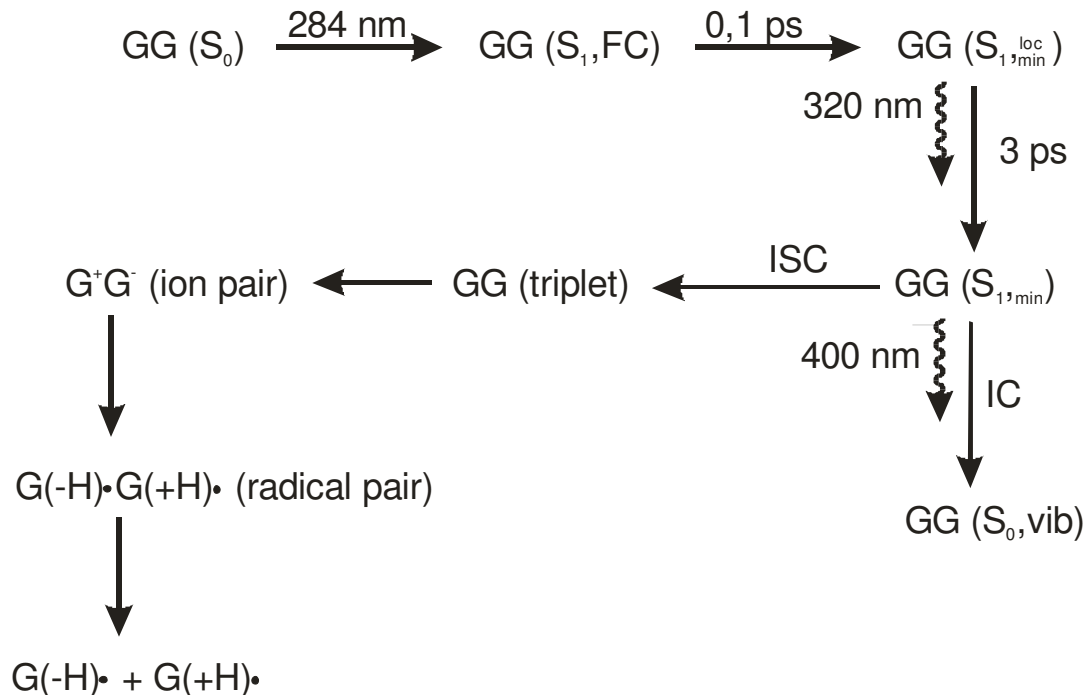
Abbildung 5: Pulsradiolyse-Spektrum des neutralen $G(-H)^{\bullet}$ -Radikals in Wasser (\circ)³ im Vergleich mit unserem Transientenabsorptionsspektrum nach 100 ns (\blacksquare)

Transientenabsorptionsspektren von Guanosin 100 ns, 300 ns und 2,4 μ s nach dem Anregungspuls sind in Abbildung 4 zu sehen. Die Spektren konnten nur in Lösungen erhalten werden, die älter als zwei Tage waren. Frisch angesetzte Lösungen zeigen keine transiente Absorption. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass für die Stabilisierung des Charge-Transfer-Zustandes größere Aggregate benötigt werden. In größeren Netzwerken kann durch H-Transfer eine räumliche Trennung von $G(+H)^{\bullet}$ und $G(-H)^{\bullet}$ erreicht werden, wodurch ein schneller Rücktransfer des Wasserstoffes verhindert wird. Solche Aggregate sind in frischen Lösungen noch nicht vorhanden, sondern bilden sich erst nach zwei Tagen aus. Diese Annahme wird durch die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz unterstützt. Die Intensität der Fluoreszenz sinkt mit steigender Temperatur, zudem wird eine leichte Verschiebung zu kleineren Wellenlängen beobachtet. Bei höheren Temperaturen werden die Aggregate zerstört, die kleineren Einheiten zeigen dann ein etwas anderes Fluoreszenzspektrum.

Die kinetischen Kurven wurden für jede Wellenlänge monoexponentiell angefitet. Die so erhaltenen Lebensdauern variieren zwischen 200 und 300 ns. Der Vergleich mit einem durch Pulsradiolyse erhaltenen Spektrum des neutralen $G(-H)^{\bullet}$ -Radikals von Kobayashi et al.³ zeigt gute Übereinstimmung mit dem von uns gemessenen Spektrum nach 100 ns (Abb. 5). Das Spektrum zu 650 ps nach der Anregung entspricht eher dem von Kobayashi et al. gemessenen Spektrum des G^+ -Kations. Die Übereinstimmung ist jedoch nicht so deutlich, so dass auch andere Spezies, wie $^3(G-G)$, in Frage kommen.

A4 Kleinermanns

Die im ns/ μ s-Bereich gemessene Absorption kann durch Sauerstoff gelöscht werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass ein Triplett-Zustand als Precursor in der Bildung des G-Radikals involviert ist, der mit Sauerstoff gemäß ${}^3(\text{G}\cdot\text{G}) + {}^3\text{O}_2 \rightarrow {}^1(\text{G}\cdot\text{G}) + {}^1\text{O}_2$ reagiert. Alternativ kommt ein Singulett-Zustand in Frage, dessen Lebensdauer größer ist als die Diffusionszeit des Sauerstoffs.



Schema 1: Vorgeschlagener Mechanismus

Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse vermuten wir den in Schema 1 dargestellten Mechanismus. Nach Anregung des Systems in den S_1 -Zustand folgt nach den fs-Messungen schnelle interne Umwandlung in den Grundzustand ähnlich wie im Guanin Monomeren⁴ und parallel Intersystem Crossing (ISC) in einen energetisch benachbarten Triplett $\pi\pi^*$ - oder $n\pi^*$ - Zustand. Durch interne Umwandlung wird der Triplett-Charge-Transfer-Zustand (aus dem HOMO der angeregten G-Einheit in das LUMO der über eine H-Brücke daran gebundenen G-Einheit) besetzt der zu einem G^+G^- -Ionenpaar führt. Anschließend erfolgt der Protonentransfer entlang der H-Brücke zum $\text{G}(+\text{H})\cdot\text{G}(-\text{H})\cdot$ -Diradikal. Das Diradikal kann nun im Aggregat durch H-Übertragung räumlich voneinander getrennt werden, so dass die Rückreaktion verzögert wird. Bei doppeltem H-Transfer kann die enolische Form des Guanosins gebildet werden.

Durch weitere IR-Untersuchungen und Vergleich mit gerechneten Dimer- und Triplex-/Quadruplex-Schwingungsspektren sollen die Aggregatstrukturen in unseren Messungen weiter charakterisiert werden. Ziel ist die Aufklärung des H-Transfers und die Detektion des $\text{G}(-\text{H})\cdot$ -Radikals in Zentromeren und Telomeren sowie Superstrukturen von Triplexen und Quadruplexen

Langlebige Fluoreszenz von 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien

Das Minicarotin 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) dient als Modellsystem für Carotinoide wie β -Carotin und Astaxanthin. Diese spielen eine wichtige Rolle als Antioxidantien im menschlichen Körper, sowie als Lichtsammelkomplexe für die Photosynthese in Pflanzen.

DPH zeigt nach Laser-Anregung (355 nm) intensive Fluoreszenz mit ungewöhnlich hoher Lebensdauer. Die Entstehung erfolgt während des Laserpulses (3 ns), es kann daher nicht aufgelöst werden, mit welcher Zeitkonstante der emittierende Zustand populiert wird (<3 ns). Bei Laserpuls-Intensitäten größer 1 mJ und DPH-Konzentrationen von über 1 $\mu\text{mol/L}$ steigt die Lebensdauer der Fluoreszenz auf bis zu 70 ns. Bei Anwesenheit von Sauerstoff wird die Emission bis auf einen geringen Anteil gelöscht. Die Lebensdauer der verbleibenden Fluoreszenz liegt unterhalb der Laserpulsbreite und ist deutlich weniger intensiv. Die durchgeführten Messungen und eine mögliche Interpretation der Ergebnisse sind in der beigefügten, noch nicht publizierten Vorveröffentlichung „Long-lived fluorescence of 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene“ beschrieben.

In Abbildung 6 sind die transienten Absorptionsspektren von DPH in Cyclohexan nach Spülen mit Sauerstoff und Stickstoff gezeigt. Unterhalb 430 nm ist eine breite Bande zu sehen, die bei 380 nm in den Bleaching-Bereich übergeht. Die Absorption hat eine Lebensdauer von über 400 μs und wird von Sauerstoff teilweise gelöscht. Auch die Bande bei 510 nm verschwindet in Anwesenheit von Sauerstoff, während die Bande zwischen 460 nm und 480 nm nicht gelöscht wird und ebenfalls über 400 μs lang besetzt ist. Der Vergleich mit von C. Marian berechneten S_1 - S_n und T_1 - T_n – Übergängen (persönliche Mitteilung) zeigt, dass es sich bei dem lange lebenden Zustand wahrscheinlich um den ersten angeregten Singulett – Zustand handelt. Die durch Sauerstoff löschraren Banden sind auf T_1 - T_n -Übergänge zurückzuführen. Im Bereich von 380 – 430 nm überlagern sich Singulett- und Triplett – Banden. Das Spektrum liefert also einen wichtigen Hinweis sowohl darauf, dass der Triplett populiert wird, als auch auf die ungewöhnlich lange Lebensdauer des S_1 .

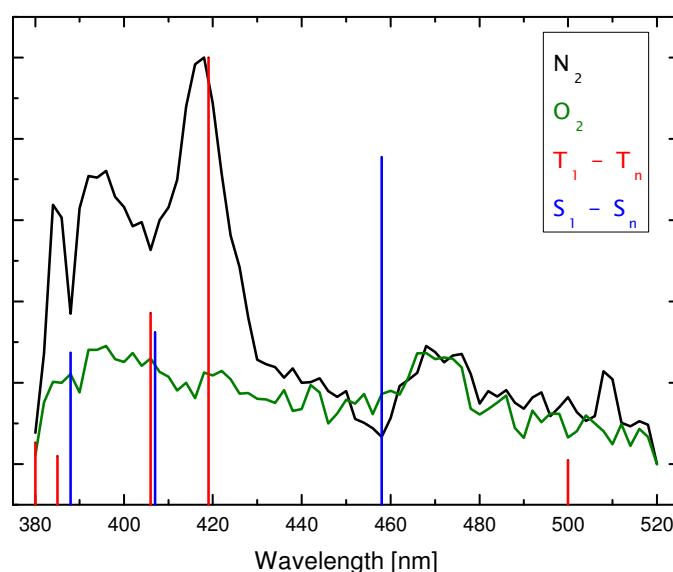


Abbildung 6: Transientenabsorptionsspektren von DPH in Cyclohexan nach Spülen mit Stickstoff und Sauerstoff, berechnete Singulett- und Triplett-Übergänge.

Neben dem in diesem Entwurf geschilderten Mechanismus gibt es weitere mögliche Erklärungen. Nach Anregung in den S_2 -Zustand relaxiert das Molekül in den S_1 -Zustand. Durch Intersystem Crossing (ISC) werden energetisch nahe liegende T_n -Zustände populiert, innere Umwandlung führt zum T_1 . Unter der Annahme, dass DPH in Cyclohexan Aggregate bildet, ist es möglich, dass aus zwei im Aggregat benachbarten $^3(\text{DPH})$ -Molekülen via T-T-Annihilation ein Molekül im Grundzustand und ein elektronisch angeregtes Singulett-Molekül entstehen. Diese andauernde Repopulation des emittierenden Zustandes führt zu einer verlängerten Lebensdauer der Fluoreszenz.

Auch intramolekulare T-T-Annihilation kommt als Ursache für die langlebige Fluoreszenz in Frage. In diesem Fall wird davon ausgegangen, dass die Singulett-Anregung des DPH-Moleküls in der Polyenkette erfolgt. Anschließend relaxiert das Molekül in einen Triplettzustand, der an einem der Benzolringe lokalisiert ist. Innerhalb des gleichen Laserpulses kann die Polyenkette erneut angeregt und der zweite Benzolring in den Triplettzustand überführt werden. Nun erfolgt T-T-Annihilation der beiden Benzol-Triplets wodurch der emittierende DPH-Singulettzustand erzeugt wird.

Um den Mechanismus vollständig aufzuklären, müssen noch quantenmechanische Rechnungen sowie einige Messungen durchgeführt werden.

- 1 K. Kobayashi, R. Yamagami and S. Tagawa, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 10752-10757.
- 2 C. Sheu and C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 6439-6442.
- 3 K. Kobayashi and S. Tagawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 10213-10218.
- 4 V. Karunakaran, K. Kleinermanns, R. Improta and S. A. Kovalenko, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 5839-5850.

6.3 Rückblick auf die Förderung

Das Teilprojekt wird seit 6/2005 im Sonderforschungsbereich gefördert. Es wird mit Ablauf der zu Ende gehenden Förderperiode beendet.

6.3.1 Personal im Teilprojekt während der zu Ende gehenden Förderperiode

	laufende Nummer	Name, akademischer Grad, Dienststellung	engere Fachzugehörigkeit	Institut der Hochschule oder der außeruniversitären Einrichtung	Mitarbeit im Projekt in Wochenstunden	Entgeltgruppe
Grundausrüstung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	1.	Kleinermanns, Karl, Prof. Dr.	Physikal. Chemie	Institut für Physikalische Chemie 1, HHUD	10	
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter	2.	Kelbert, Klaus, Elektroniker		Institut für Physikalische Chemie 1, HHUD	8	
Ergänzungsausrüstung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	3.	Häber, Thomas Dr. Postdoktorand	Physikal. Chemie	Institut für Physikalische Chemie 1, HHUD	39,8	TVL 13
	4.	Busker, Matthias	Physikal. Chemie	Institut für Physikalische Chemie 1, HHUD	19,9	TVL 13/2
	5.	Seefeld, Kai	Physikal. Chemie	Institut für Physikalische Chemie 1, HHUD	19,9	TVL 13/2
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter						

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Grundausrüstung):

1. Kleinermanns, Prof. Dr.

Vertretung des Teilprojektes sowie Planung, Leitung und Koordination der REMPI-, Doppelresonanz-, DF-, Photolyse/UV-VIS Analyse- und FTIR Step-Scan-Experimente.

2. Kelbert, Elektroniker

Entwicklung neuer elektronischer Komponenten sowie Reparatur defekter Teile

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Ergänzungsausrüstung):

3. Häber, Thomas, Dr.

Koordination und Durchführung der Photolyse/UV-VIS Analyse und DF-Experimente, Analyse der Daten und Präsentation der Ergebnisse.

4. Busker, Matthias

Durchführung der REMPI-Experimente, Analyse der Daten und Präsentation der Ergebnisse.

5. Seefeld, Kai.

Durchführung der Doppelresonanz-Experimente, Analyse der Daten und Präsentation der Ergebnisse.

6.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt A7

6.1.1 Titel: Elektronische Struktur und Wechselwirkung der Triplettzustände von Carotinoiden und Chlorophyllen

6.1.2 Projektleitung

Lubitz, Wolfgang, Prof. Dr. Dr. h.c., *23. 07.1949, deutsch
Max-Planck-Institut für Bioorganische Chemie, Stiftstr. 34-36, 45470 Mülheim an der Ruhr
Telefon: 0208-3063614
E-Mail: lubitz@mpi-muelheim.mpg.de

6.2 Entwicklung des Teilprojekts

6.2.1 Bericht

Das Ziel unserer Untersuchungen im Teilprojekt A7 war es, ein umfassendes Verständnis der elektronischen Struktur von kurzlebigen photoinduzierten Triplettzuständen ($S=1$) der Chlorophylle und Carotinoide in photosynthetischen Systemen zu erarbeiten. Dazu wurden die Wellenfunktionen (Spindichteverteilungen) der Triplettzustände mittels zeitauflösender EPR/ENDOR-Techniken bestimmt, Änderungen im Reaktionsgeschehen verfolgt und die Ergebnisse mit quantenchemischen Rechnungen verglichen. Die untersuchten Systeme umfassten dabei das PS I und PS II der oxygenen Photosynthese, verschiedene Lichtsammelkomplexe sowie das Reaktionszentrum (RZ) der photosynthetisierenden Bakterien. Ferner wurden diverse Modellsysteme untersucht.

Ein detaillierter Bericht über die Entwicklung des Teilprojekts und die Ergebnisse im Zeitraum Juli 2005 bis Dezember 2008 findet sich im letzten Antrag/Bericht vom Januar 2009. Hier werden daher nur letzte Resultate referiert, die vom Jan 2009 bis Juli 2010 erarbeitet wurden (Abschluss des Sfb 663). Es wurde in diesem Zeitraum eine Promotion zur Thematik des Sfb (A. Marchanka) abgeschlossen und 7 Arbeiten publiziert; eine Reihe weiterer Arbeiten befinden sich noch in der Vorbereitung (s. Text). Dies ist insbesondere durch den Weggang von Herrn Dr. J. Niklas nach Chicago (USA) und durch den noch ausstehenden Abschluss der Dissertation von Herrn P. Rangadurai bedingt. Der Bericht konzentriert sich speziell auf diejenigen Arbeiten, die noch nicht eingereicht bzw. angenommen worden sind.

Apparative und methodische Entwicklungen: Wie berichtet sind während der Förderung durch den Sfb die apparativen und methodischen Voraussetzungen für hochempfindliche ENDOR Messungen [1*] über einen weiten Temperaturbereich mit guter Zeitauflösung ($\approx 10 \mu\text{s}$) nach gepulster *in-situ* Laseranregung bei 34 GHz (Q-Band) geschaffen worden. Unter anderem wurde ein spezieller Probenkopf mit großem Probenvolumen entwickelt, der effiziente wellenlängenselektive *in-situ* Photoanregung erlaubt. Dazu sind Berechnungen angestellt worden. (*Reijerse et al., Publikation in Vorbereitung). In der Auslaufperiode des Sfb wurde im Labor das spektroskopische Repertoire um das W-Band (95 GHz) erweitert. Die Entwicklung von Resonatoren für diesen Frequenzbereich (Fenster für *in situ* Bestrahlung; RF-Spulen für ENDOR) ist allerdings noch nicht ganz abgeschlossen (*Savitsky et al., in Vorbereitung). Wir versprechen uns im W-Band für ENDOR eine bessere Zeitauflösung bei den photoinduzierten Prozessen (etwa $5 \mu\text{s}$). Des Weiteren wurde ein neuer Laser (Spectra Physics, Quanta-Ray Pro 230-10; OPO GWU) mit deutlich höherer Leistung angeschafft und installiert.

EPR/ENDOR an Modellen für (Bacterio)Chlorophyll-Triplettzustände: Die Arbeit zu den Bacteriochlorophyll (BChl *a/b*) Triplets in organischen Gläsern ist inzwischen publiziert worden [2*]. Damit konnte erstmals ein erweiterter Satz von Hyperfeinkopplungen gemessen und einzelnen Positionen im Molekül zugeordnet werden. Kurz vor dem Abschluss steht auch die Arbeit zu Zn-Bacteriochlorophylliden, die in *de novo* synthetisierte Peptid-Maquettes eingebaut wurden als Modelle für Lichtsammelkomplexe der Photosynthese (Kooperation mit Dr. Noy, Weizmann-Istitut, Rehovot, Israel). Von den lichtinduzierten Pigment-Triplettzuständen in diesen Systemen konnten EPR/ENDOR-Spektren gemessen und interpretiert werden (*Cohen-Ofri et al., in Vorbereitung).

A7 Lubitz

Die ideale Matrix zur Untersuchung der Pigmente ist ein natives Protein; wir haben dazu Myoglobin (Mb) gewählt und verschiedene Chlorophyll-Derivate in die Bindungstasche des Apoproteins eingebracht (laufende Dissertation Rangadurai). Von den Pigment-Triplettzuständen im Mb sind EPR- und ENDOR-Spektren erhalten worden. (*Rangadurai et al., in Vorbereitung). Momentan wird an der sich schwierig gestaltende Kristallisation der neuen Protein-Pigment-Komplexe mit einer möglichst einfachen Einheitszelle gearbeitet; die Einkristalle sollen zur orientierungsabhängigen Messung der Wechselwirkungstensenoren der Triplettzustände eingesetzt werden.

EPR/ENDOR an Modellen für Carotinoid-Triplettzustände: Carotinoid-Triplettzustände lassen sich nicht durch direkte Anregung erhalten. Wir haben daher für diese Systeme eine Carotin-Porphyrin-Dyade gewählt aus der Arbeitsgruppe Gust/Moore (ASU, Tempe, Arizona, USA). Hier wird das ^3Car durch T-T-Transfer aus dem Porphyrin-Triplett gebildet und hat eine Lebensdauer von $>5 \mu\text{s}$, was für EPR und auch ENDOR-Experimente in unserem Spektrometer ausreicht. Wir konnten mit diesem Ansatz erstmals ein Modell-Carotin im Triplettzustand mit ENDOR spektroskopieren; allerdings in Überlagerung mit dem $^3\text{Porphyrin}$. Diese Arbeiten sind noch in einer frühen Phase und sollen an ähnlichen Systemen weiter verfolgt werden. Ferner sind DFT-Rechnungen an dem ^3Car geplant.

EPR/ENDOR an Chlorophyll-Triplets im PS II und PS I: Wie bereits berichtet ermöglichte uns der erheblich empfindlichere Puls-ENDOR-Aufbau im Q-Band die Aufnahme von ENDOR-Spektren kurzlebiger Triplettzuständen in Proteinen mit exzellentem Signal-zu-Rausch-Verhältnis, z.B. am Triplettzustand des primären Donators in verschiedenen Präparationen des Photosystems (PS) II ($^3\text{P}_{680}$) und auch im PS I ($^3\text{P}_{700}$). (Abb. 1). In der letzten Phase des Sfb 663 konnten wir die Datenqualität der schwierigen Messungen am $^3\text{P}_{700}$ nochmals verbessern. Die Abb. 1 zeigt einen Vergleich von $^3\text{P}_{680}$ und $^3\text{P}_{700}$. Die Spektren und DFT-Berechnungen der Hyperfeinkopplungen zeigen eindeutig, dass in beiden Fällen der Triplettzustand auf einem monomeren Chlorophyll lokalisiert ist. Ferner sind diese Triplets im PS I und PS II ähnlich. Sechs größere HFCs konnten aufgelöst und Molekülpositionen zugeordnet werden. Der Vergleich mit den isolierten Pigmenten zeigt Unterschiede, die auf die Proteinumgebung zurückgeführt werden. Bei höheren Temperaturen wurde in beiden Systemen eine Delokalisation des Triplettexzitons beobachtet. Eine abschließende Interpretation und Publikation der Daten steht noch aus (*Niklas et al., in Vorbereitung).

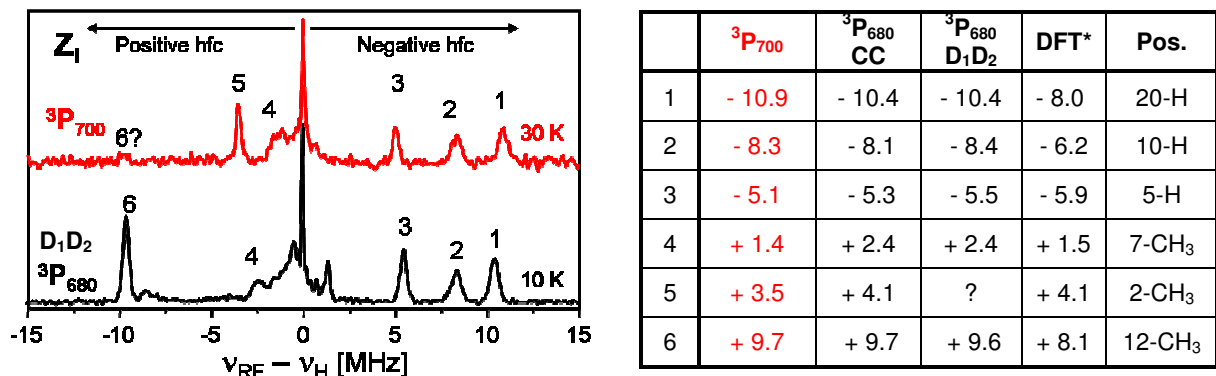


Abb. 1: Vergleich der Q-Band Puls-ENDOR-Spektren der Triplettzustände der primären Donatoren im PS I und PS II (Z_1 Position in der EPR). Tabellarischer Vergleich der HFCs von $^3\text{P}_{700}$ und $^3\text{P}_{680}$ (CC: core complexes, D₁D₂: D₁D₂-Partikel) und einer DFT-Rechnung am $^3\text{Chl } a$ (H₂O als axialer Ligand; Funktional BP86, spin-unrestricted, TZVP Basis-Satz).

EPR/ENDOR an Bacteriochlorophyll-Triplets in bakteriellen Reaktionszentren (RZ): Im Rahmen der Dissertation Marchanka konnten von den Triplettzuständen der primären Donatoren im RZ, $^3\text{P}_{865}$ in *Rhodobacter sphaeroides* und $^3\text{P}_{960}$ in *Blastochloris viridis*, EPR- und ENDOR-Daten erhalten werden [*8]. Eine erste globale Interpretation der Hyperfeinkopplungen lieferte eine Delokalisation des Triplettzustands über die beiden Hälften des BChl *a*- bzw. BChl *b*-Dimers, die den primären Donator bilden. Eine solche Delokalisation wurde in früheren Arbeiten auch für die Radikalkationen gezeigt. Eine genauere Analyse der einzelnen HFCs der Triplets zeigt jedoch einige Unstimmigkeiten. Wir sind momentan dabei, durch quantenchemische Rechnungen diese Probleme zu lösen (*Marchanka et al., in Vorbereitung). Für die Ladungstrennung und -rekombination im RZ ist die Kenntnis dieser Zustände von großer Bedeutung.

Transiente EPR-Untersuchungen an WT und Mutanten des photosynthetisierenden Bakteriums *Rhodobacter sphaeroides* wurden in einem parallelen Projekt an den Triplettzuständen des primären

Donators und des Carotins im RZ durchgeführt. Diese Messungen gaben Aufschluss über die Möglichkeit der Ladungstrennung über den ansonsten inaktiven B-Zweig und sind damit wichtig für ein Verständnis des schnellen Elektronentransports im bakteriellen RZ [6*].

EPR/ENDOR am Triplett-Radikalpaar: Vorläufer des Triplettzustands des primären Donators in allen RZ der pflanzlichen und bakteriellen Photosynthese ist das spinkorrelierte Radikalpaar. Von dem Triplett-Radikalpaar können neben EPR- zeitaufgelöste ENDOR-Spektren erhalten werden, die über die beteiligten Radikale kurz nach deren Entstehung direkt Auskunft geben. Mit dem neuen Q-Band Puls-ENDOR-Aufbau wurden erheblich bessere Spektren von kurzlebigen Radikalpaaren erhalten, z.B. im PS I [3*, 4*, 5*]. Wir haben an solchen Radikalpaaren im bakteriellen RZ mittels gepulster Hochfeld-EPR (95 GHz) Beiträge geliefert zur Messung von präzisen Abständen und Orientierungen der beteiligten Radikale und damit auch zu dem Problem der seit langem diskutierten lichtinduzierten Strukturänderung im bakteriellen RZ [7*] beigetragen. In unseren Messungen konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass beim Einfrieren der RZ - entweder während der Bestrahlung oder im Dunkeln mit nachfolgender Belichtung - keine Geometrieänderung im Radikalpaar auftritt. Die Ursachen für die deutlich unterschiedlichen Raten der Ladungsrekombination in diesen Proben müssen also andere Ursachen haben [7*].

EPR/ENDOR an Carotinoid-Triplettzuständen: ENDOR-Experimente an Carotinoid-Triplettzuständen wurden erstmals im Rahmen dieses Teilprojekts durch die erhöhte Empfindlichkeit und die kurzen Pulssequenzen des Q-Band ENDOR-Geräts möglich. Die Arbeiten am Peridinin-Triplett im PCP (Peridinin-Chlorophyll-Protein) wurden fortgeführt mit dem Ziel, das Peridinin im PCP zu identifizieren, welches den Triplettzustand trägt (PCP enthält 4 Peridinine). Die Mutation N89L in der refolded form (RF) der PCP-Antenne des Dinoflagellaten *Amphidinium carterae* zeigte im Vergleich zum Wildtyp (WT) modifizierte Triplettzerfallszeiten und leicht geänderte Nullfeldaufspaltungsparameter (D) in der FSE-EPR und hatte auch einen kleinen Einfluss auf die ¹H-HFCs im ENDOR-Spektrum. Daraus konnte geschlossen werden, dass das dem Asparagin 89 benachbarte Peridinin 614 den Triplettzustand vom benachbarten Chlorophyll übernimmt; siehe Abb. 2 (*Niklas et al., in Vorbereitung).

Trotz der sehr kurzen Lebensdauern und der schwachen Zustandsbesetzung gelangen ähnliche ENDOR-Experimente auch am Triplettzustand des Carotinoide Spheroidin im bakteriellen photosynthetischen Reaktionszentrum (*Marchanka et al., in Vorbereitung).

Wir arbeiten weiter mit der AG Holzwarth (TP B2) an dem **Mechanismus der Photoprotektion** von intakten Photosystem II Core-Komplexen mittels transienter EPR, um herauszufinden, ob die primäre Ladungstrennung bei hoher Lichtintensität auch auf dem inaktiven D2-Zweig des RZ erfolgen kann und der dann entstehende Triplettzustand auf dem akzessorischen Chlorophyll Chl_{D2} durch das β-Carotin Car_{D2} gelöscht wird. Dieser Mechanismus wäre für die Photoprotektion im PS II sehr wichtig.

Zur Quantifizierung von **Singulett-Sauerstoff- und ROS-Erzeugung in Pflanzen** sowie der EPR an Chlorophyll- und Carotinoid-Triplets in PS II and Antennenkomplexen (LHC II) gab es in der abschließenden Periode des Sfb keine weiteren Ergebnisse.

Quantenchemische Rechnungen an Chlorophyll- und Carotinoid-Triplets :

Die Interpretation der gemessenen Wechselwirkungsparameter aus der EPR- und ENDOR-Spektroskopie erfolgte im Rahmen von quantenchemischen Rechnungen an geometrieoptimierten Systemen. In der Vergangenheit haben wir diese sehr großen offenschaligen Pigmentsysteme mit semiempirischen Verfahren behandelt, was im Falle der Radikationen zu akzeptablen Ergebnissen führte. Umgebungseffekte konnten dabei nur in eingeschränktem Maße berücksichtigt werden, ebenso war eine Geometrieoptimierung nur ansatzweise möglich. In enger Kooperation mit dem TP C2 (Neese) haben wir in der Antragsperiode das dort erstellte ORCA-Programmpaket eingesetzt und verschiedene Rechnungen damit durchgeführt. Im Rahmen des Sfb-Projekts sind auch Rechnungen an den Triplettzuständen der Bacteriochlorophylle [2*] und Carotinoide (*Niklas et al., JACS, 129, 15442, 2007) nach Geometrieoptimierung erfolgreich verlaufen. Besonders gut ist die Übereinstimmung der berechneten HFC-Tensoren, während die ZFS und g-Tensoren allgemein größere Schwierigkeiten bereiten.

Der Ansatz, DFT Rechnungen unter Berücksichtigung zweier angeregter Zustände für ³BChl durchzuführen, hat sich als sehr vielversprechend für die korrekte Berechnung der HFCs herausgestellt [2*]. Dieser Ansatz ist auf die ³Chl Modellsysteme, und die Chl-Triplettzustände in Proteinen ausgedehnt worden. Mit dem Projekt C4 (Thiel) haben wir begonnen, die QM/MM-Technik am Peridinin-Triplett in der PCP-Antenne als Modellfall einzusetzen (noch unpubliziert).

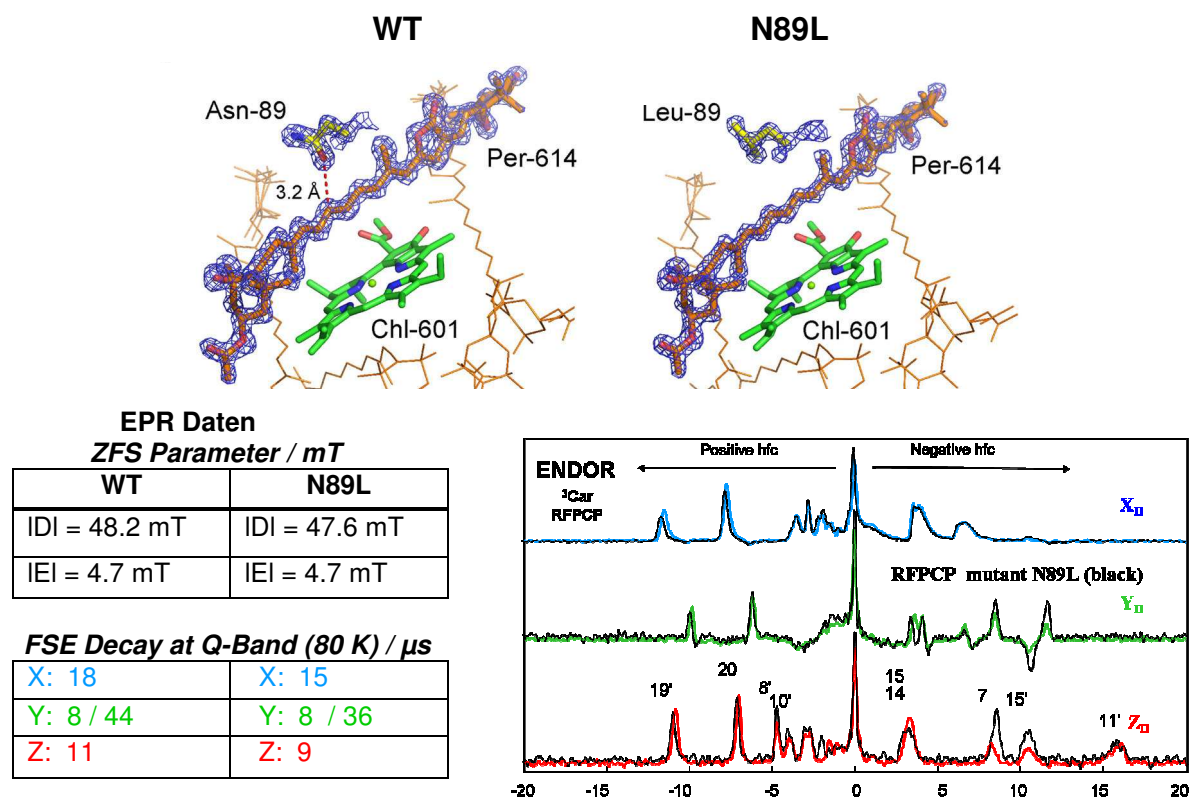


Abb. 2: EPR-Daten (Nullfeldaufspaltung, anisotrope Zerfallszeiten) und ENDOR-Spektren des Peridinin-Triplets im Wildtyp (WT) und der N89L-Mutante (mit Strukturen, s.o.) des "refolded" PCP aus *A. carterae*. Die Röntgenstrukturdaten sind aus Schulte et al. PNAS 106, 20764 (2009).

6.2.2 Aus dem Teilprojekt entstandene Publikationen

Hier sind alle Publikationen angeführt, die seit dem letzten Bericht im Januar 2009 veröffentlicht wurden und im Zusammenhang mit dem Sfb 663 stehen.

a) Publikationen, die erschienen sind bzw. sich im Druck befinden

- [1*] Kulik, L.; Lubitz, W. Electron-Nuclear Double Resonance. *Photosynth. Res.* **2009**, *102*, 391-401.
- [2*] Marchanka, A.; Lubitz, W.; van Gestel, M. Spin Density Distribution of the Excited Triplet State of Bacteriochlorophylls. Pulsed ENDOR and DFT Studies. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6917-6927.
- [3*] Niklas, J.; Epel, B.; Antonkine, M. L.; Sinnecker, S.; Pandelia, M.-E.; Lubitz, W. Electronic Structure of the Quinone Radical Anion A_1^- of Photosystem I Investigated by Advanced Pulse EPR and ENDOR Techniques. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 10367-10379.
- [4*] van der Est, A.; Pushkar, Y.; Karyagina, I.; Fonovic, B.; Dudding, T.; Niklas, J.; Lubitz, W.; Golbeck, J. H. Incorporation of 2,3-Disubstituted-1,4-Naphthoquinones into the A_1 Binding Site of Photosystem I Studied by EPR and ENDOR Spectroscopy. *Appl. Magn. Res.* **2010**, *37*, 65-83.
- [5*] Niklas, J.; Gupta, O.; Epel, B.; Lubitz, W.; Antonkine, M. L. Investigation of the Stationary and Transient A_1^- Radical in Trp \rightarrow Phe Mutants of Photosystem I. *Appl. Magn. Res.* **2010**, *38*, 187-203.
- [6*] Marchanka, A.; Savitsky, A.; Lubitz, W.; Möbius, K.; van Gestel, M. B-branch Electron Transfer in the Photosynthetic Reaction Center of a *Rhodospira rubra* Quadruple Mutant. Q- and W-Band Electron Paramagnetic Resonance Studies of Triplet and Radical-Pair Cofactor States. *J. Phys. Chem. B*. 2010 in press DOI: 10.1021/jp1003424

[7*] Flores, M.; Savitsky, A.; Paddock, M.; Abresch, E.; Dubinskii, A.; Okamura, M.; Lubitz, W.; Möbius, K Electron-Nuclear and Electron-Electron Double Resonance Spectroscopies Show that the Primary Quinone Acceptor Q_A in Reaction Centers from Photosynthetic Bacteria *Rhodobacter sphaeroides* Remains in the Same Orientation Upon Light-Induced Reduction *J. Phys.Chem. B* (2010) in press

b) Andere Veröffentlichungen

[8*] Marchanka, A. Triplet States in Bacterial Reaction Centers of *Rhodobacter sphaeroides* and Related Systems; Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2009).

6.2.3 Rückblick auf die Förderung

Das Teilprojekt wurde seit dem Juli 2005 im Sonderforschungsbereich gefördert und im Juni 2010 beendet.

6.2.4 Personal im Teilprojekt während der zu Ende gehenden Förderperiode

	laufende Nummer	Name, akademischer Grad, Dienststellung	engere Fachzugehörigkeit	Institut der Hochschule oder der außeruniversitären Einrichtung	Mitarbeit im Projekt in Wochenstunden	Entgeltgruppe
Grundausrüstung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	1.	Lubitz, Wolfgang, Prof. Dr.	Phys. Chem.	MPI Bioanorganische Chemie, Mülheim/R.	10	
	2.	Savitsky, Anton, Dr.	Exp. Phys.	wie 1	10	
	3.	Reijerse, Eduard, Dr.	Phys. Chem.	wie 1	5	
	4.	Ogata, Hideaki, Dr.	Kristallographie	wie 1	5	
	5.	Rangadurai, Prasanna	Biophys. Chem.	wie 1	20	
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter	6.	Laurich, Christoph Chemotechniker		wie 1	12	
	7.	Klihm, Gudrun Laborantin		wie 1	8	
Ergänzungsausrüstung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	8.	Niklas, Jens, Dr.	Phys. Chem.	wie 1	39,8	TVöD-EG 14
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter						

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Grundausrüstung):

1. Professor Dr. W. Lubitz

Prof. Lubitz ist wissenschaftlicher Leiter des Projekts. Er betreut die wissenschaftlichen Mitarbeiter bei deren fachlicher Arbeit, koordiniert die wissenschaftlichen Kooperationen und ist für das gesamte TP verantwortlich.

A7 Lubitz

2. Dr. A. Savitsky

Dr. Savitsky betreut und entwickelt die W-Band-EPR Spektrometer weiter, welche in vielen Projekten eingesetzt werden. Er arbeitet an der Untersuchung der Triplett- und Radikalpaarzustände mit.

3. Dr. E. Reijerse

Dr. Reijerse betreut die cw/Puls-EPR/ENDOR/ELDOR-Spektrometer. Er unterstützt die wissenschaftlichen Mitarbeiter bei den Experimenten und der Auswertung der spektroskopischen Ergebnisse und ist mit der gezielten Weiterentwicklung der Spektrometer (insbesondere Hochfeld-EPR), der Methodik und den Auswertungsprogrammen befasst. Herr Reijerse führt auch Gastmessungen für andere Teilprojekte im SFB durch.

4. Dr. H. Ogata

Dr. Ogata ist an der Kristallisation des PS II, der modifizierten Myoglobine und der bakteriellen RZ beteiligt und führt auch die Röntgenstrukturanalysen durch.

5. P. Rangadurai

P. Rangadurai arbeitet im Rahmen seiner Doktorarbeit an der Darstellung von Pigmenten, deren Inkorporation ins Apomyoglobin, der Kristallisation sowie der spektroskopischen Charakterisierung.

6. C. Laurich (Chemotechniker)

Herr Laurich betreut die Probenbereitung (Hochvakuumtechnik) für die Spektroskopie und die Spektroelektrochemie. Er ist ferner zusammen mit der Werkstatt (S. Syring) am Bau von Resonatoren für die verschiedenen EPR-Techniken beteiligt.

7. G. Klihm (Physiklaborantin)

Frau Klihm betreut und wartet die EPR-Geräte, führt Testmessungen durch und ist an der Weiterentwicklung der Geräte beteiligt.

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Ergänzungsausstattung):

8. Dr. J. Niklas

Durchführung der experimentellen Arbeiten im Projekt (Puls-EPR/ENDOR-Spektroskopie angewandt auf Pigmentradikale und -triplettzustände in biologischen Systemen). Bestimmung von Populations- und Depopulationsraten der Triplettzustände, Feinstrukturparameter, g -Anisotropie (Hochfeld-EPR) und der Hyperfeinstruktur der magnetischen Kerne (ENDOR-Techniken). Durchführung von Proben-Präparationen sowie der Dateninterpretation im Rahmen theoretischer Modelle (Kontakte mit dem TP C1, Marian sowie TP C4, Thiel).

6.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt A8

6.1.1 Titel: Steigerung der Signalstärke und Photostabilität von Fluorophoren bei der Einzelmolekülspektroskopie

6.1.2 Projektleitung

Seidel, Claus, Prof. Dr., 20.01.1961, deutsch
Lehrstuhl für Molekulare Physikalische Chemie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Universitätsstr. 1
40225 Düsseldorf
Telefon: +49-211-8115881
E-Mail: cseidel@gwdg.de

Müller, Thomas J. J., Prof. Dr., 24.07.1964, deutsch
Lehrstuhl für Organische Chemie
Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Universitätsstr. 1
40225 Düsseldorf
Telefon: +49-211-8112298
E-Mail: ThomasJJ.Mueller@uni-duesseldorf.de

Schaper, Klaus, PD Dr., 16.01.1965, deutsch
Arbeitsgruppe für organische Photochemie
Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Universitätsstr. 1
40225 Düsseldorf
Telefon: +49-211-8112571
E-Mail: schaper@klaus-schaper.de

6.2 Entwicklung des Teilprojekts

6.2.1 Bericht

I. Einleitung

Das Ziel dieses Projektes, nämlich die Steigerung der Signalstärke und Photostabilität von Fluorophoren bei der Einzelmolekülspektroskopie, sollte durch den Einsatz von selektiven Löschern von Dunkelzuständen erreicht werden. Entscheidend für eine höchstauflösende Analyse von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Experimenten ist eine ausreichende Photonenzahl, die zur Reduktion des statistischen Photonenrauschens führt. In der AG Seidel ist der Donorfarbstoff in FRET-Experimenten meist ein nicht alkyliertes Rhodamin mit dem Stammkörper von Rhodamin 123 (Rh123), damit die spektrale Separation zum Akzeptorfarbstoff maximal ist. Daher werden in diesem Projekt photoprotektive Additive insbesondere für diesen Rhodaminfarbstoff gesucht bzw. entsprechende Bichromophore hergestellt.

Die Triplett- und Radikalzustände eines Fluorophors tragen zur Reduktion der Signalstärke der Fluoreszenz bei, da sie relativ langlebig sind und ein Fluorophor keine Fluoreszenzphotonen aussenden kann, während er in diesen "Dunkelzuständen" verweilt. Die Langlebigkeit dieser Zustände ist auch wichtig für die Photozerstörung eines Chromophors. Zudem kann der Triplettzustand durch ein weiteres Photon angeregt werden, so dass es leicht zur Photoionisierung und in der Folge zur Zerstörung des Chromophors kommen kann.

Daher bestand das Hauptziel in der ersten Förderperiode darin, selektive Triplettlöscher zu finden, die die Lebensdauer des Triplettzustandes reduzieren. Wichtig ist dabei, dass ein entsprechender Löscher den

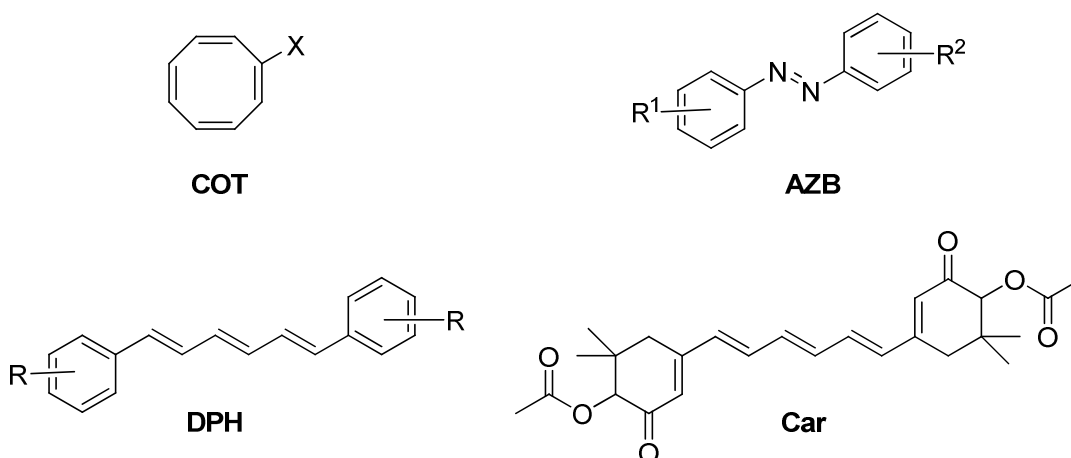
Triplett und nicht den Singulettzustand löscht. Des Weiteren wurden weitere Antioxidantien zur Reduktion der Radikalkationen untersucht.

Ein geeigneter Löscher muss so ausgewählt werden, dass ein Löschen des Triplettzustandes ein exergonischer Prozess ist, wohingegen ein Löschen des Singulettzustandes endergonischer Natur ist. Daher muss der Löscher, verglichen mit dem Fluorophor, eine große Singulett-Triplett-Lücke besitzen.

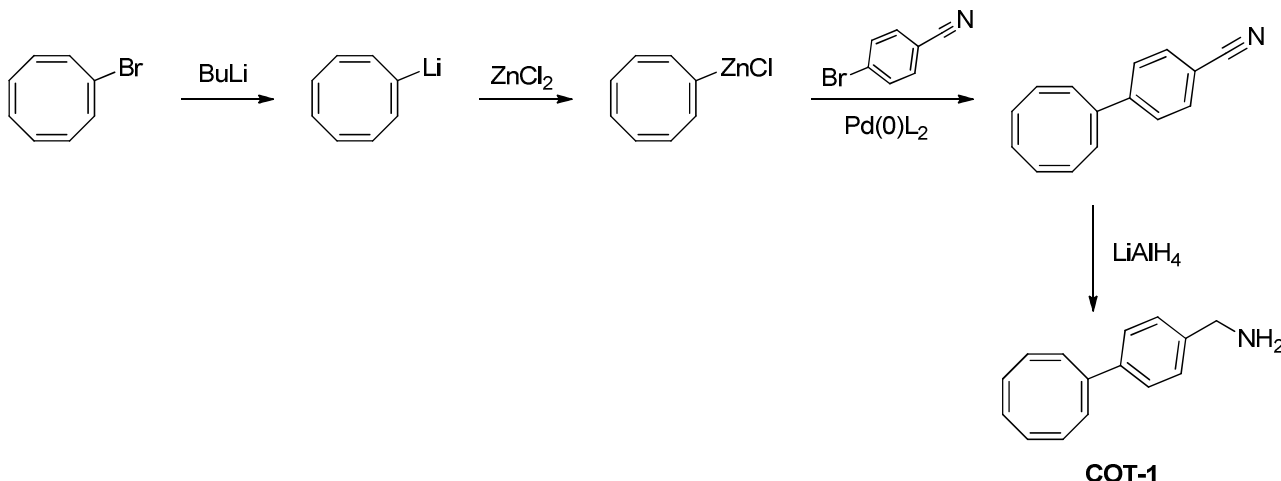
Weiterhin dürfen photochemisch induzierte bimolekulare Redoxprozesse, wie die Photooxidation und die Photoreduktion des Fluorophors, nicht stattfinden, da diese bestenfalls zum nicht erwünschten Löschen der Fluoreszenz und im schlimmsten Fall zur Zerstörung des Chromophors führen.

II. Synthesen

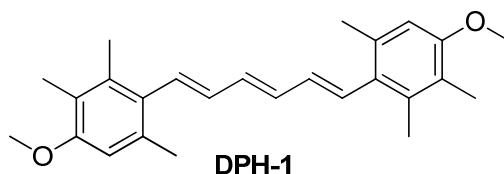
Im Rahmen unseres Berichtes aus dem Jahr 2009 haben wir drei Bibliotheken von möglichen Triplettlöschern vorgestellt, die im Rahmen dieses Projektes synthetisiert wurden. Dabei handelt es sich um Cyclooctatetraen-Derivate (**COT**), Azobenzol-Derivate (**AZB**) und Polyene. Die Bibliothek der Polyene besteht überwiegend, aber nicht ausschließlich, aus verschiedenen substituierten α,ω -Diphenylhexatrienen (**DPH**). Bei den übrigen Polyenen handelt es sich um verschiedenen Minicarotinoide (**Car**).



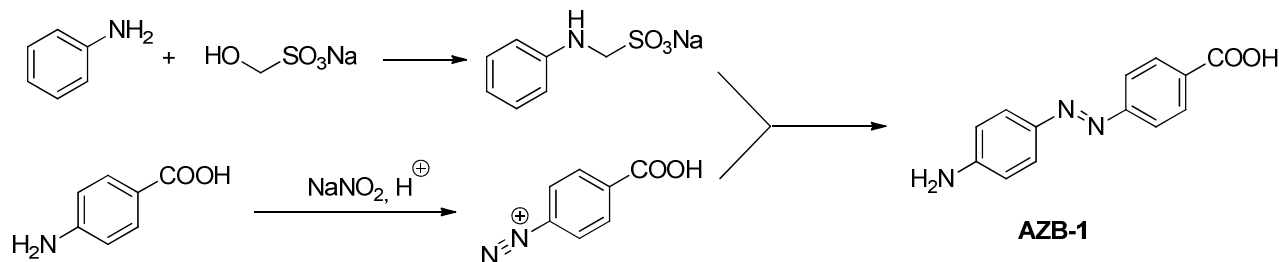
Im Rahmen unser Arbeiten im letzten Jahr haben wir die spektroskopische Charakterisierung der Bibliotheken vervollständigt und die Bibliotheken erweitert.



Als Beispiel ist die Synthese des COT-Derivates **COT-1** gezeigt. Durch Wittig-Horner Reaktion wurde die Bibliothek an Minicarotinoiden erweitert. Das hier gezeigte Minicarotinoid **DPH-1** leitet sich vom Dihydroxyisorenieriatin ab.

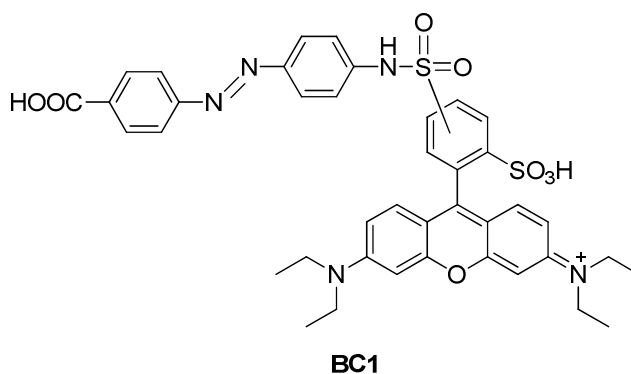


In früheren Untersuchungen hatte sich gezeigt, dass das Azobenzolderivat **AZB-1** interessante Eigenschaften als Triplettlöcher besitzt. Allerdings ergaben sich bei den Messungen immer wieder Probleme. Auch wenn die Verbindung im Fluoreszenzspektrometer kein detektierbares Fluoreszenzsignal besaß, so beobachteten wir dennoch eine störende Fluoreszenz in der viel empfindlicheren Fluoreszenzkorrelationspektroskopie. Daher wurde zur Synthese von AZB-1 die gezeigte alternative Syntheseroute gewählt, die weniger verunreinigtes Produkt liefert. Die auch hier enthaltenen Verunreinigungen können mittels semipräparativer HPLC abgetrennt werden. Es zeigt sich, dass sich die fluoreszierende, nicht charakterisierte Verunreinigung, vermutlich durch Oxidationsprozesse, beim Lagern von **AZB-1** nachbildet.

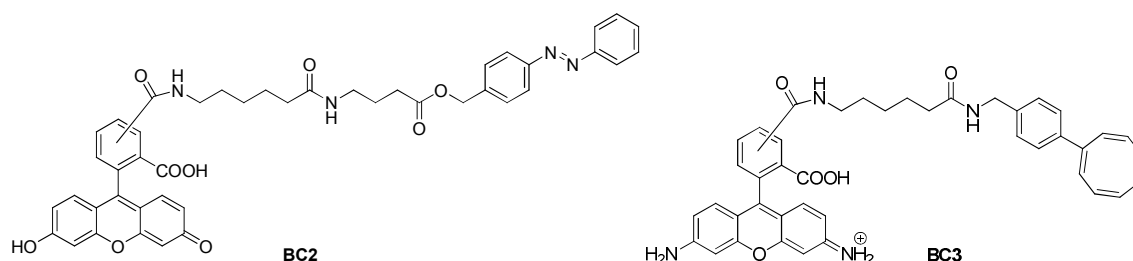


Des Weiteren haben wir uns mit der Synthese von Bichromophoren bestehend aus einem Fluorophor (einem Rhodamin- oder einem Fluorescein-Derivat) und einem Triplettlöcher befasst. In unseren bisherigen Arbeiten sind wir dabei zwei verschiedene Wege gegangen.

Zum einen haben wir Fluorophore über eine Sulfonamid-Bindung mit Triplettlöchern gekoppelt. Hierzu haben wir aminosubstituierte Triplettlöcher mit Fluorophoren gekoppelt, die eine Sulfonsäurechlorid Gruppe tragen. Ein Beispiel hierfür ist der Bichromophor **BC1**.



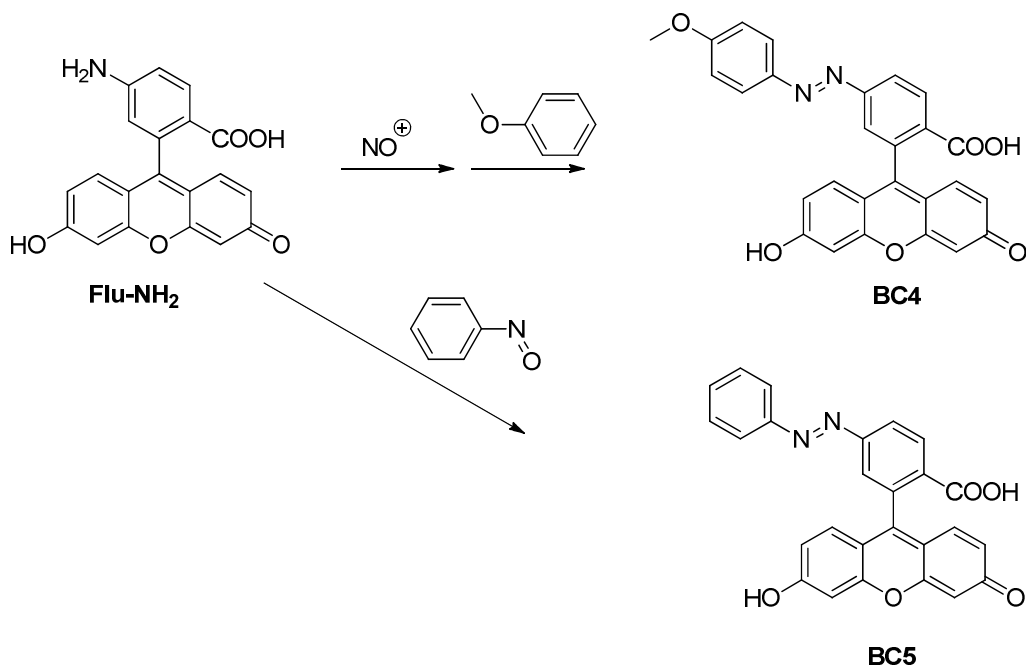
Der zweite Weg ist die Verknüpfung von Fluorophor und Löscher mit Hilfe eines Linkers unter Verwendung von Amidbindungen. Ein Beispiel für diese Strategie ist der Bichromophor **BC2**.



In Analogie zu diesen Synthesen wurde ausgehend von **COT-1** der neue Bichromophor **BC-3** aufgebaut. Die Erfolgreiche Kopplung zum Bichromophor wurde massenspektrometrisch nachgewiesen.

Im letzten Jahr haben wir zusätzlich eine weitere Strategie angewendet. Sowohl Fluorescein als auch Rhodamin besitzen einen Xanthen-Chromophor. In beiden Fällen ist ein Arylsubstituent in 9-Position vorhanden. Dieser Arylsubstituent ist wichtig für die Stabilität des Xanthen-Chromophors, beeinflusst diesen aber nur wenig, da er orthogonal zum Xanthen-Chromophor steht. Üblicherweise handelt es sich bei den Arylresten um einfach oder mehrfach carboxylierte Phenylreste. Es sind aber auch aminosubsti-

tuierte Derivate bekannt, wie zum Beispiel das Amino-Fluorescein **Flu-NH₂**. Daraus entstand der Gedanke, dass man diesen Arylrest in den Löscher inkorporieren kann. Zunächst wurde angestrebt den Bichromophor **BC3** durch Azokupplung aufzubauen. Dazu wurde **Flu-NH₂** zunächst diazotiert und anschließend mit Anisol gekoppelt. Leider gelang es nicht **BC4** in ausreichender Ausbeute und Reinheit zu isolieren. Daher wurde eine alternative Syntheseroute zur Darstellung von Azofarbstoffen, nämlich die direkte Kondensation von Nitrosoaromaten mit Arylaminen verwendet. Auf diesem Weg kann der Bichromophor **BC5** erhalten werden.



Die Syntheseroute von Azobenzolderivaten über Nitrosoverbindungen liefert generell reine Produkte in guten Ausbeuten. Als Manko muss man aber nennen, dass nur wenige Nitrosoaromaten kommerziell erhältlich sind und die Darstellung ausgehend von Aminen oder Nitroaromaten häufig Schwierigkeiten bereitet.

III. Untersuchungen

III.1 Einleitung

Das elektronische Zustandsmodell. Die Photostabilitätsuntersuchungen wurden in diesem Projekt für niedrige (Küvettenbestrahlung) und hohe (konfokale Mikroskopie) Leistungsdichten durchgeführt. Das photophysikalische und photochemische Verhalten eines Farbstoffs kann im Rahmen eines elektronischen 5-Niveauschemas mit den Zuständen S₀, S₁, T₁, S_n und T_n kinetisch beschrieben werden (vergleiche Förderantrag 2009 S.230, Abb. 1). Zusätzlich zu diesen Zuständen wird die Bildung eines Radikalkations R⁺ durch Photooxidation berücksichtigt. Die Geschwindigkeitskonstanten k'_0 , k'_T und k'_{red} der drei Zustände S₁, T₁ und R⁺ sowie die Geschwindigkeitskonstante der Photooxidation k'_{ox} sind abhängig von der Konzentration [Q] der Löschmoleküle (vergleiche Förderantrag 2009 S.230, Abb. 1C).

$$k'_0 = k_0 + k_{qS} [Q], \quad (1)$$

$$k'_T = k_T + k_{qT} [Q], \quad (2)$$

$$k'_{red} = k_{red0} + k_{qR} [Q], \quad (3)$$

$$k'_{ox} = k_{oxS} + k_{oxT} \frac{k_{ISC}}{k'_T} + k_{ox(Q)} [Q]. \quad (4)$$

In dem vorliegenden Modell kann der Fluorophor demnach in zwei Dunkelzuständen (T₁ und R⁺) vorliegen. Um die maximale Steigerung der Fluoreszenzzählrate F_{cpm} auch bei hohen Anregungsleistungen zu

erreichen, müssen demnach beide Dunkelzustände gelöscht werden (siehe Simulation der Fluoreszenz-zählrate bei gleichzeitiger Löschung der Zustände, Förderantrag 2009 S.231, Abb. 2).

Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS). Die experimentellen Daten aus der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) wurden mit Hilfe folgender Gleichung analysiert:

$$G(t_c) = 1 + \left[\frac{1}{N_F} \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_d}} \cdot \frac{1}{\sqrt{(1 + (\omega_0 / z_0)^2 t_c / t_d)}} \right] \cdot G_T(t_c) \cdot G_R(t_c) \quad (5)$$

Darin enthalten sind ein Diffusionsterm (erster Faktor) und jeweils ein Bunchingterm für die Triplett- ($G_T(t_c)$) und die Radikalkinetik ($G_R(t_c)$). Diese beinhalten die Geschwindigkeitskonstanten der Be- und Entvölkerung des jeweiligen Zustands. Ein Überblick über die darin enthaltenen Ausdrücke liefert folgende Tabelle.

Triplettkinetik	Radikalkinetik
$G_T(t_c) = 1 - A_T + A_T \cdot e^{-t_c/t_T}$	$G_R(t_c) \approx (1 + A_R e^{-t_c/t_R})$
$A_T = \frac{k_{ISC} k_{01}}{(k_{ISC} + k'_T) k_{01} + k'_T k'_0}$	$A_R = \frac{-\lambda_1(1 - F_{eq}) - k_{ox}}{(\lambda_2 - \lambda_1) F_{eq}}$
$t_T = \frac{k_{01} + k'_0}{(k_{ISC} + k'_T) k_{01} + k'_T k'_0}$	$t_R \approx 1/(k'_{red} + k_{ox})$
	$\lambda_{1,2} = -1/t_d + \frac{1}{2}(-k'_{red} - k_{ox} - k_{bR} \pm \sqrt{k'^2_{red} + k^2_{ox} + k^2_{bR} - 2k_{ox}k_{bR} + 2k_{ox}k'_{red} + 2k'_{red}k_{bR}})$
	Stationäre Besetzungswahrscheinlichkeit F_{eq} des Fluorophors in den elektronischen Zuständen S_0, S_1, T_1, S_n und T_n :
	$F_{eq} = \left[1 + \frac{k_{ox}(1 + k_{bR} t_d)}{k'_{red} + k_{bR} + 1/t_d} \right]^{-1}$

III.2 Löschung des Triplettzustands und Reduktion des Radikalkations des Fluoreszenzfarbstoffs Rh123

Die der Bibliothek von Additiven (siehe Abschnitt II) wurde die Wirkung von drei Additiven als prototypische Vertreter besonders intensiv untersucht: Cyclooctatetraencarbonsäure (COC), ((4 - Phenyl)azo)-benzoesäure (AZB) und 4 - (4' - Amino-phenyl)azo -benzoesäure (AAZB). In Abbildung 1 sind die normierten Fluoreszenzkorrelationskurven von Rh123 bei drei verschiedenen Konzentrationen an AAZB (0; 12 und 181 μ M) und unterschiedlicher Leistungsdichte $\langle I \rangle$ aufgetragen. Die Analyse der Triplettparameter A_T und t_T liefert die Geschwindigkeitskonstante für die Triplettlöschung durch AAZB ($k_{qT} = 3.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; Tabelle 2). Zusätzlich zur Triplettkinetik wurde ein Radikalbunchingterm zur Anpassung der FCS-Kurven benötigt.

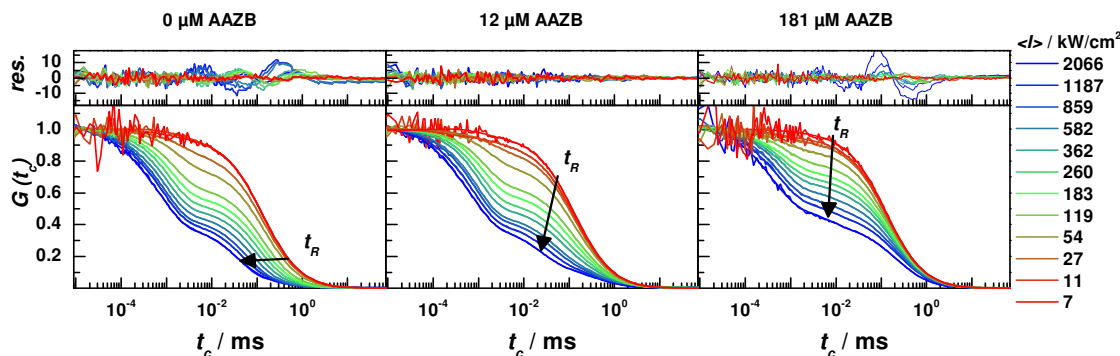


Abbildung 1: Normierte Korrelationskurven von Rh123 mit AAZB und korrespondierende angepassten Kurven. Die schwarzen Pfeile zeigen den Verlauf der Radikalkorrelationszeit t_R bei steigender Laserleistung.

Im Fall des COC, das als reiner Triplettlöcher wirkt, sind Amplitude A_R und Korrelationszeit t_R nahezu unabhängig von der Additivkonzentration. Dies trifft für AAZB nicht mehr zu. Sowohl Triplett- als auch Radikalparameter von Rh123 zeigen eine Abhängigkeit von der der Löschmolekülkonzentration. Im Gegensatz zur Triplettkinetik, die erst bei Konzentrationen im Bereich von 20 μM vom Additiv beeinflusst wird, ist die Radikalkinetik aufgrund der längeren Lebensdauer des Radikalkations deutlich empfindlicher in Bezug auf Additive mit reduzierender Wirkung. Bereits im unteren μM -Konzentrationsbereich wurde eine Verringerung der Radikalpopulation A_R und eine Verkürzung der Radikalkorrelationszeit t_R festgestellt (Abbildung 2, Einsätze rechts).

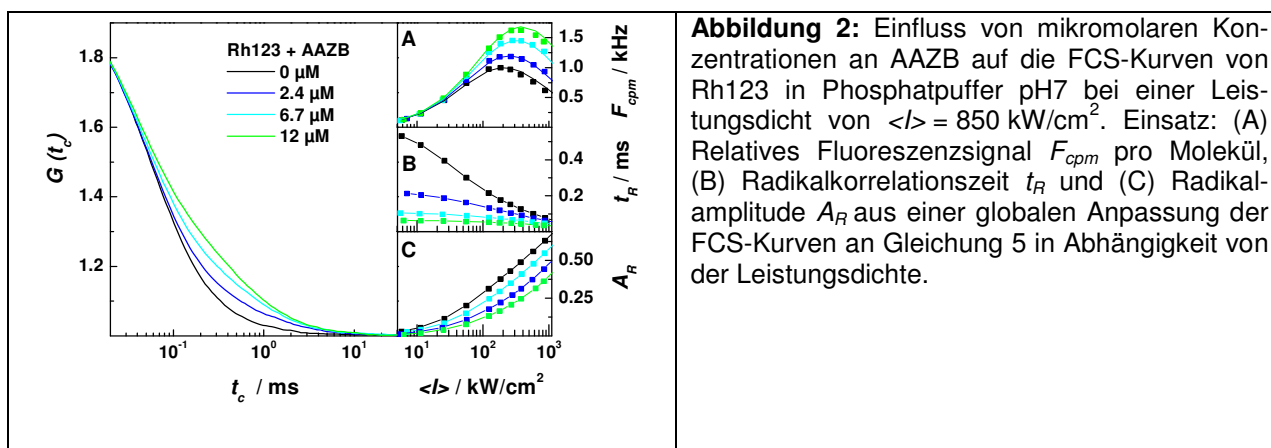


Abbildung 2: Einfluss von mikromolaren Konzentrationen an AAZB auf die FCS-Kurven von Rh123 in Phosphatpuffer pH7 bei einer Leistungsdichte von $\langle I \rangle = 850 \text{ kW/cm}^2$. Einsatz: (A) Relatives Fluoreszenzsignal F_{cpm} pro Molekül, (B) Radikalkorrelationszeit t_R und (C) Radikal-amplitude A_R aus einer globalen Anpassung der FCS-Kurven an Gleichung 5 in Abhängigkeit von der Leistungsdichte.

Der von der Laserleistung und der Konzentration $[Q]$ abhängige Zeitbereich, in dem der Radikalbunching-term von Rh123 zu beobachten ist, ist in Abbildung 1 für die jeweilige Azobenzol-Konzentration mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Bei niedrigen Leistungsdichten (rote Kurven) wurde für Rh123 eine Radikalkorrelationszeit t_R von 520 μs gefunden (Abbildung 1 links). Durch Zugabe des Azobenzols AAZB wird bei 12 μM die Zeit t_R auf 50 μs verkürzt, bei 181 μM beträgt t_R nur noch 9 μs .

Abhängig von der Konzentration $[Q]$ überlagert sich der Zeitbereich der Radikalkorrelationszeit t_R mit dem der Diffusionszeit t_d . Durch eine globale Anpassung der leistungsabhängigen FCS-Kurven einer Messreihe an Gleichung 5, die die Geschwindigkeitskonstanten der Radikalkinetik enthält, konnten die beiden Korrelationszeiten separiert werden.

Bei der Anpassung wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Oxidation k_{ox}' und k_{oxn} , der Photozerstörung k_{br} , der Reduktion k_{red}' und der Radikallöschung k_{qr} für die FCS-Kurven bei verschiedenen Leistungen und Additivkonzentrationen global angepasst. Mit Hilfe dieser Methode konnte zwischen den beiden Prozessen, Diffusion des Moleküls durch das Detektionsvolumen mit der Diffusionszeit t_d und Oxidation und Reduktion von Rhodamin 123 mit der Korrelationszeit t_R , unterschieden werden. Aus den Messungen an Rhodamin 123 mit den Additiven COC, AZB und AAZB wurden die Geschwindigkeitskonstanten für die farbstoffspezifischen Prozesse des Fluorophors gemittelt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Farbstoffspezifische Geschwindigkeitskonstanten von Rh123 in Phosphatpuffer pH7 aus FCS-Messungen und Photostabilitätsuntersuchungen.

k_T	k_{ISC}	k_{ox}	k_{oxn}	k_{red0}	k_{bR}	k_{oxS}	k_{oxT}
10^5 s^{-1}	10^5 s^{-1}	10^4 s^{-1}	$\text{cm}^2 \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$	s^{-1}	s^{-1}	10^3 s^{-1}	10^3 s^{-1}
4.2 ^a	7.6 ^a	1.6 ^a	0.042 ^b	1470 ^c	200 ^d	6.3 ^e	5.9 ^e

^a Die Standardabweichung aus wiederholten Messungen variiert von 3 – 13 %. ^b Mittelwert aus der Anpassung der F_{cpm} -Plots und der FCS-Kurven. $k_{oxn} = 0.058 \pm 0.012 \text{ cm}^2 \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (F_{cpm}); $k_{oxn} = 0.026 \pm 0.009 \text{ cm}^2 \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (FCS). ^c Aus der Anpassung der Messungen bei niedriger AAZB-Konzentration. Für alle weiteren Analysen wurde dieser Parameter fixiert. ^d Der Wert kann zwischen 0 und 200 s^{-1} fixiert werden, ohne die Fitqualität zu beeinflussen. ^e Die Standardabweichung aus der Anpassung der Messdaten lag bei 2 – 14 %.

In der Tabelle 1 sind die Ergebnisse für Rh123 in Phosphatpuffer bei pH7 zusammengestellt: Geschwindigkeitskonstante der Oxidation aus den ersten angeregten Zuständen S_1 und T_1 (k_{ox}) und der Oxidationen aus höher angeregten Zuständen (k_{oxn}) sowie die Geschwindigkeitskonstante der Reduktion des Radikalkations in Abwesenheit eines Löschmoleküls (k_{red0}). Da die Photozerstörung aus dem Radikalzustand unbedeutend klein ist, wurde sie für die Anpassung auf einen maximalen Wert so fixiert, dass die Qualität der Kurvenanpassung nicht beeinflusst wird. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Deaktivierung des Radikalkations k_{red0} aus FCS-Messungen stimmt in etwa mit einem Literaturwerte aus Laserblitzlichtphotolyse-Experimenten überein.⁸² Alle Geschwindigkeitskonstanten für Oxidations- und Reduktionsprozesse zeigten eine starke Abhängigkeit von Pufferkonzentration, Temperatur und Sauerstoffgehalt.

Die experimentellen Daten der Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals F_{cpm} von der Laserleistung können mit Gleichung 6 analysiert werden.

$$F_{cpm} = G_{Detect} \Phi_{F(Q)} k'_0 S_{1eq} F_{eq} \quad (6)$$

Hierbei wird der Einfluss des Löschers auf die Bevölkerung des Radikalzustands in der Geschwindigkeitskonstante k'_{red} der Reduktion berücksichtigt, die u.a. von k_{qR} abhängt. Neben den Parametern, die die Oxidations- und Reduktionsprozesse beschreiben, ist die Zählrate von der Detektionseffizienz G_{Detect} des Aufbaus und von einigen farbstoffspezifischen Parametern (Fluoreszenzquantenausbeute $\Phi_{F(Q)}$, Geschwindigkeitskonstante für die S_1 -Entvölkerung k'_0 und den stationären Populationen S_{1eq} und F_{eq}) abhängig. Die Singulettlöschung trägt bei den verwendeten niedrigen Konzentrationen im Rahmen der Messgenauigkeit nicht zur Verringerung des Fluoreszenzsignals bei und k_{qS} kann vernachlässigt werden. In Abbildung 3 ist das Fluoreszenzsignal F_{cpm} pro Molekül von Rh123 als Funktion der Laserleistung mit den Additiven COC, AZB und AAZB in vergleichbaren Konzentrationen aufgetragen. Die Substanzen COC und AZB liefern bezüglich ihrer Eigenschaften als Triplettlöcher eine Steigerung der Signalstärke, die mit den entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten der Triplettlöschung k_{qT} korreliert (Tabelle 2). Die beiden Azobenzolderivate zeigen vergleichbare Triplettlöscheffizienzen, AAZB verursacht aber jedoch eine signifikant höhere Signalsteigerung als AZB.

Die Verbesserung des Fluoreszenzsignals von Rh123 durch AAZB auf ca. 70 % des Signals eines Fluorophors im 2-Niveausystem kann mit einem Radikallöschprozess erklärt werden (gestrichelte Linie in Abb. 3). Das Azobenzol reduziert in einem Elektronentransferprozess das Radikalkation des Rhodamins. Aus den mittels cyclischer Voltammetrie bestimmten elektrochemischen Redoxpotentialen konnten die freie Enthalpie ΔG_{ET} der Elektronentransferreaktion zwischen dem photooxidierten Fluorophorradikal und dem Additiv AAZB bestimmt werden. Der reduktive Elektronentransfer zwischen R^{++} und AAZB ist exergonisch. Die simultane Löschung der beiden Dunkelzustände T_1 und R^{++} , die nur für das Additiv AAZB beobachtet wurde, verursacht die größtmögliche Steigerung des Fluoreszenzsignals von Rh123, die auch bei Zugabe geringer Mengen an Additiv deutlich wird (Abbildung 2). Im Gegensatz dazu wird das Fluoreszenzsignal von Rh123 von mikromolaren Konzentrationen an COC und AZB nicht beeinflusst.

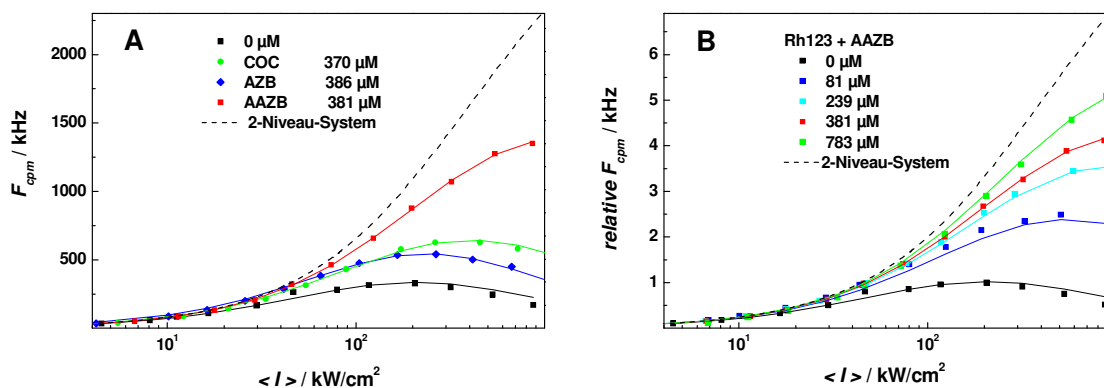


Abbildung 3: Fluoreszenzzählrate pro Molekül F_{cpm} des Fluoreszenzfarbstoffes Rh123 in Abhängigkeit von der Laserleistung (A) in Anwesenheit von ca. 380 μM der Additive COC, AZB oder AAZB und (B) bei Zugabe von AAZB. An die experimentelle ermittelten Daten (Punkte) wurden nach Gleichung 3 Fitkurven (durchgezogene Linien) angepasst, wobei folgende Parameter verwendet wurden: $G_{Detect} = 0.0014$; $\Phi_{F(0)} = 0.98$; $k_0 = 2.5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$; $k_T = 4.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$; $k_{ISC} = 7.6 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$; $t_d = 130 \mu\text{s}$; $\gamma = 2.5 \times 10^{18} \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $\sigma_{01} = 2.6 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$; $k_{bR} = 200 \text{ s}^{-1}$; $k_{red0} = 1470 \text{ s}^{-1}$; $k_{oxn} = 0.042 \text{ cm}^2 \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$. In beiden Abbildungen wurde das theoretische Signal eines 2-Niveau-Systems als gestrichelte Linie dargestellt

Tabelle 2: Bimolekulare Geschwindigkeitskonstanten k_{qT} und k_{qR} für die T_1 -Löschung bzw. R-Reduktion von Rh123 in Phosphatpuffer pH7. Geschwindigkeitskonstanten der additivinduzierten Farbstoffoxidation $k_{ox(Q)}$ und additivinduzierten Photozerstörung aus dem Singulett- ($k_{bS(Q)}$) und Triplett-Zustand ($k_{bT(Q)}$), die aus FCS- und stationären Photozerstörungsmessungen bestimmt wurden.

	k_{qT}^a	k_{qR}^b	$k_{ox(Q)}^c$	$k_{bS(Q)}^d$	$k_{bT(Q)}^d$
	$10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
COC	2.5	0	2.6 ± 1.6	9.7 ± 1.4	17.3 ± 4.7
AZB	3.6	0.2	15.0 ± 1.8	0	0
AAZB	3.9	6.2	0	0	0

^a Aus FCS-Messungen. Der Fehler bei der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Triplettlöschung liegt bei $\pm 0.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. ^b Mittelwerte aus der Analyse der FCS-Messungen und der leistungsabhängigen Zählraten. ^c Aus der Anpassung der konzentrationsabhängigen Geschwindigkeitskonstante der Oxidation. ^d Aus stationären Photozerstörungsmessungen.

Die aus FCS-Analysen bestimmten Werte für k_{qT} des jeweils verwendeten Löschmoleküls sowie die für Rh123 bekannten Parameter wurden für die Anpassung fixiert ($\Phi_{F(0)} = 0.98$; $k_0 = 2.5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$; $k_T = 4.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$; $k_{ISC} = 7.6 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$; $t_d = 130 \mu\text{s}$; $\gamma = 2.5 \times 10^{18} \text{ W}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $\sigma_{01} = 2.6 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$). Der Absorptionsquerschnitt σ_{01} für den Übergang vom S_0 -Grundzustand in den ersten angeregten S_1 -Zustand wurde anhand des Extinktionskoeffizienten von Rh123 für die Anregungswellenlänge von 496.5 nm berechnet. In Tabelle 1 sind die Geschwindigkeitskonstanten für Oxidation und Reduktion als Mittelwerte aus der Analyse der FCS-Kurven und der leistungsabhängigen Zählraten für den Fluorophor zusammengefasst. Man erhält daraus die Geschwindigkeitskonstante für die Reduktion des Radikalkations R^{+} durch AAZB von $k_{qR} = 6.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Überraschenderweise zeigt AZB eine Radikallöschung ($k_{qR} = 0.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), obwohl dieser Prozess bezüglich der energetische Lage der Redoxpotentiale endergonisch sein sollte. Dieser Effekt kann durch äußerst geringe Mengen an reduzierenden Verunreinigungen in der Substanz hervorgerufen werden. Die Verbindung AZB wurde käuflich erworben und nicht weiter gereinigt. Für Löschreaktionen mit langlebigen Zuständen, wie der des Radikalkations, reichen Konzentrationen von einigen μM aus um eine reduktive Wirkung zu induzieren. Dies wurde bereits in Untersuchungen an AAZB gezeigt.

III.3 Geschwindigkeitskonstante für Oxidationsprozesse

Die globalen Analysen der FCS-Messungen nach Gleichung 5 liefern die Geschwindigkeitskonstante k_{ox}' für die Oxidation aus den ersten angeregten Zuständen S_1 und T_1 in Abhängigkeit von der Konzentration $[Q]$ (Abbildung 4). Durch eine Anpassung der Daten an den theoretischen Ausdruck für die Geschwindigkeitskonstante der Oxidationsprozesse (Gl. 4) können die Prozesse in Reaktionen aus dem S_1 - und T_1 -Zustand (k_{oxS} und k_{oxT}) und in eine zusätzliche oxidierende Wirkung des Additivs, ausgedrückt durch die Geschwindigkeitskonstante $k_{ox(Q)}$, separiert werden. Im Bereich bis 100 μM dominiert die photoprotektive Wirkung aller Additive auf Rh123 durch die zunehmende Depopulation des Triplettzustands. Bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration an AZB oder COC steigt k_{ox}' , da auch die Additive selbst die Bildung des Radikalkations von Rhodamin induzieren und jetzt der Term $k_{ox(Q)}$ bestimmend ist. Wir interpretieren dies als einen oxidativen Elektronentransfer zwischen Rh123 im angeregten Zustand und dem Additiv. Die Abschätzung der freien Enthalpie ΔG_{ET} der Elektronentransferprozesse mit der Rehm-Weller-Gleichung bestätigt die oxidative Wirkung von AZB ($\Delta G_{ET} = -0.46$ eV für Oxidationen aus dem S_1 und 0.01 eV für Oxidationen aus dem T_1). Für COC ist der ΔG_{ET} -Wert etwa null, was die Verlangsamung von $k_{ox(Q)}$ erklärt.

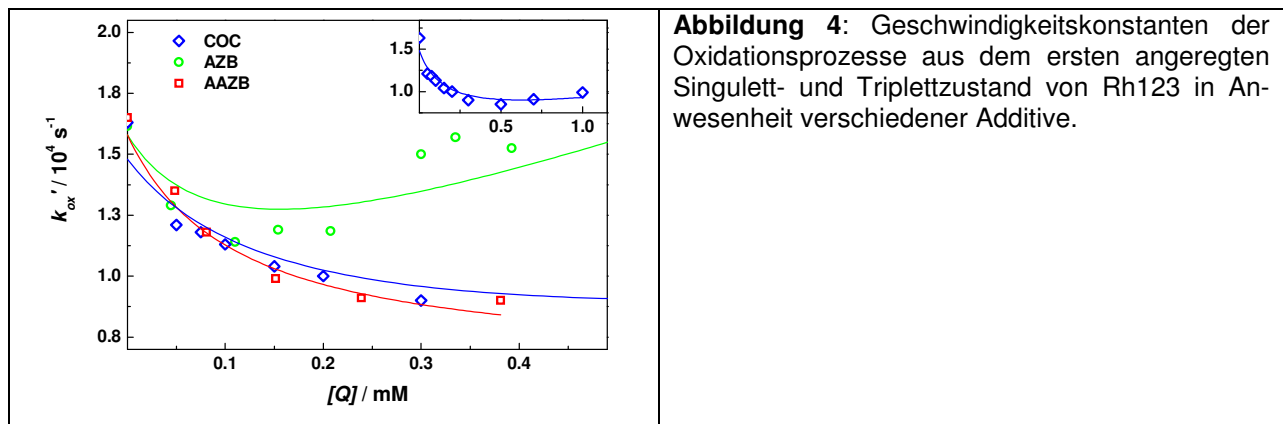


Abbildung 4: Geschwindigkeitskonstanten der Oxidationsprozesse aus dem ersten angeregten Singulett- und Triplettzustand von Rh123 in Anwesenheit verschiedener Additive.

III.4 Steigerung der Photostabilität von Rhodamin 123 mit Azofarbstoffen

Aus der stationären Messung des exponentiellen Abnahme der Fluoreszenzintensität in Küvetten mit kontinuierlicher Laserbestrahlung kann die Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung k_b in Anwesenheit der verschiedenen Additive ermittelt werden (Abbildung 5 A). Da bei diesen Untersuchungen Leistungsdichten von $< 10 \text{ W/cm}^2$ zur Anregung des Fluorophors eingesetzt wurden, können Übergänge in höher angeregte Zustände vernachlässigt werden. Abbildung 5 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der irreversiblen Photozerstörung von Rh123 für die Additive COC, AZB und AAZB. Durch die Zugabe eines Azobenzolderivats wird k_b deutlich reduziert. Hierbei sind keine nennenswerten Unterschiede zwischen dem Azobenzol mit triplettlöschendem Charakter AZB und dem Derivat mit triplett- und radikallöschenden Eigenschaften zu erkennen, was zeigt, dass hier aufgrund der niedrigen Population des Radikalzustands die Radikallöschung nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die Gl. 6 zeigt, dass durch die zunehmende Entvölkerung des T_1 -Zustands bei Erhöhung der Konzentration $[Q]$ zwischen der Photozerstörung aus dem S_1 - und T_1 -Zustand unterschieden werden kann.

$$k_b = \left[k_{bR} \frac{k_{ox}}{k'_{red}} + k_{bT} \frac{k_{ISC}}{k'_T} + k_{bS} \right] \frac{k_0}{k'_0} \approx \left[k_{bT} \frac{k_{ISC}}{k'_T} + k_{bS} \right] \frac{k_0}{k'_0} \quad (7)$$

Die Gl. 7 liefert mit den Geschwindigkeitskonstanten der Ausbleichung k_{bS} und k_{bT} eine theoretische Beschreibung der Reaktionen aus dem S_1 und T_1 und einem durch die Löschmoleküle induzierten Beitrag $k_{bX(Q)}$, wobei $X = S$ oder T . k_{bS} und k_{bT} stellen charakteristische Parameter des Fluorophors dar und wurden für AZB und AAZB global angepasst (Tabelle 3).

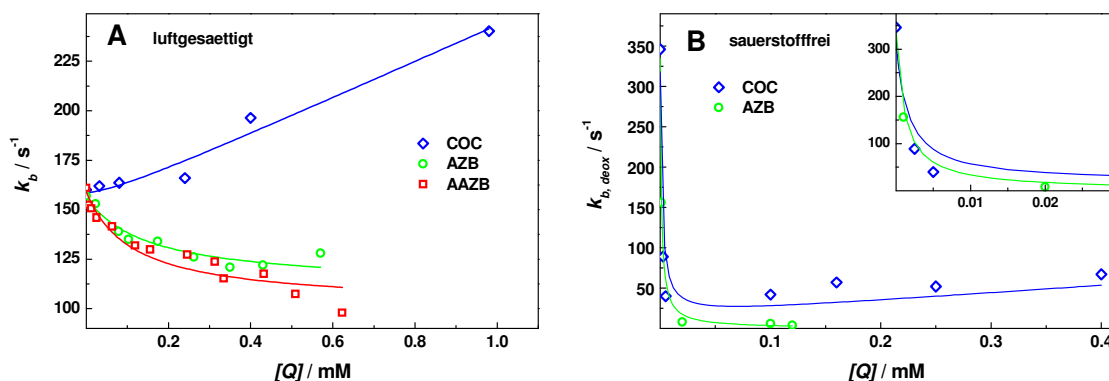


Abbildung 5: Geschwindigkeitskonstante k_b der Photozerstörung aus stationären Photozerstörungsmessungen in (A) luftgesättigtem und (B) sauerstofffreiem Phosphatpuffer bei pH7. Die Anpassungen der Daten an den theoretischen Ausdruck Gl. 7 sind mit durchgezogenen Linien dargestellt.

Für die Veranschaulichung der individuellen Photozerstörungsmechanismen aus dem S_1 und T_1 ist die Definition einer Quantenausbeute Φ_{bS} bzw. Φ_{bT} der Photozerstörung aus den beiden Zuständen sinnvoll:

$$\Phi_{bS} = k_{bS} / (k'_0 + k_{ISC} + k_{bS}) \quad (8)$$

$$\Phi_{bT} = k_{bT} / (k'_T + k_{bT}) \quad (9)$$

Für die Quantenausbeute für irreversible Photozerstörung aus dem S_1 -Zustand erhält man demnach $\Phi_{bS} = 4.3 \times 10^{-7}$, für den Reaktionsweg über den Triplettzustand $\Phi_{bT} = 7.4 \times 10^{-5}$. Dies zeigt, dass der Triplettzustand verstärkt in Photozerstörungsreaktionen involviert ist und die Löschung dieses Zustands stark zur Photostabilisierung beiträgt.

Tabelle 3: Farbstoffspezifische Geschwindigkeitskonstanten von Rh123 in Phosphatpuffer pH7 aus Photostabilitätsuntersuchungen.

luftgesättigt		sauerstofffrei			
k_{bS}	k_{bT}	k_{bS}^0	k_{bT}^0	$k_{qS}^{O_2}$	$k_{qT}^{O_2}$
s^{-1}	s^{-1}	s^{-1}	s^{-1}	$10^4 M^{-1} s^{-1}$	$10^4 M^{-1} s^{-1}$
108 ^a	31 ^a	≈ 0	6	35	9.7

^a Die Standardabweichung aus der Anpassung der experimentellen Daten variiert von 2 – 14 %.

Im Gegensatz zu den Azobenzolen besitzt COC keine photoprotective Wirkung auf Rh123, sondern verstärkt die Ausbleichreaktionen. Die durch COC verursachte verstärkte Photozerstörung kann hypothetisch durch einen Reaktionsmechanismus erklärt werden, der die Bildung eines Rhodamin-Radikalanions berücksichtigt.

III.5 Der Einfluss von Sauerstoff auf die Ausbleichreaktionen

Bei den stationären Photostabilitätsuntersuchungen an Rh123 mit AZB und COC als Additive in sauerstofffreiem Phosphatpuffer wurde eine komplexe exponentielle Zerfallskinetik mit fluoreszierenden Intermediaten gemessen. Um die Zerfallskurven der Fluoreszenzintensität dennoch auswerten zu können, wurde jeweils der Mittelwert aus den Zerfallszeiten verwendet. Der freie Fluorophor Rh123 zeigt eine mittlere Geschwindigkeitskonstante für die Photozerstörung $k_{b,deox}$ in sauerstofffreier Umgebung von $346 s^{-1}$ (Abbildung 5 B, zum Vergleich $k_b = 160 s^{-1}$ in luftgesättigter Umgebung).

Dies zeigt, dass zwei Effekte von molekularem Sauerstoff auf die Photophysik von Rh123 wichtig sind:

(I) Unter Sauerstoffausschluss wird die Deaktivierungsrate von T_1 verringert ($k_{T,deox} = 4000 s^{-1}$). Daraus kann die Geschwindigkeitskonstante der Triplettlöschung durch Sauerstoff ($k_{qT(O_2)} = 1.4 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$) abgeschätzt werden.

(II) Sauerstoff induziert eine Erhöhung der Interkombinationsübergänge k_{ISC} in Rhodaminen. Basierend auf Literaturwerten zum Einfluss von Sauerstoff auf die Interkombinationsübergänge von Rh6G wurde ein

Wert von $2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ für die Geschwindigkeitskonstante $k_{ISC,deox}$ in Abwesenheit von Sauerstoff für die weiteren Betrachtungen angenommen.

Für Rh123 in luftgesättigter Lösung ($[O_2] = 290 \mu\text{M}$) wurden mit Gl. 7 die Geschwindigkeitskonstanten k_{bS} und k_{bT} für die Photozerstörung aus dem S_1 - und T_1 -Zustand ermittelt. Werden ausschließlich die beiden oben beschriebenen Auswirkungen von Sauerstoff berücksichtigt, kann ein theoretischer Wert für $k_{b,deox}$ berechnet werden. Durch Einsetzen der Geschwindigkeitskonstanten $k_{T,deox}$ und $k_{ISC,deox}$ für entgaste Bedingungen und der Werte k_{bS} und k_{bT} aus Messungen in luftgesättigter Lösung in Gl. 7 wird ein theoretischer Wert von $k_{b,deox} = 1660 \text{ s}^{-1}$ erhalten. Die experimentell bestimmte Geschwindigkeitskonstante ist aber fast fünfmal kleiner ($k_b = 346 \text{ s}^{-1}$). Folglich müssen zusätzliche Zerfallsreaktionen durch molekularen Sauerstoff oder Sauerstoffspezies auf k_{bS} und k_{bT} in Betracht gezogen werden, d.h. reaktive Sauerstoffspezies reagieren zusätzlich auch direkt mit Rhodamin.

Eine konzentrationsabhängige Reihe von k_b -Werten unter Ausschluss von Sauerstoff wurde an Gleichung 5 angepasst. Die experimentellen Daten sowie die angepassten Kurven sind in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** B aufgetragen. Hierbei wurden die in luftgesättigter Lösung bestimmten Werte für k_{qT} , $k_{bS(Q)}$ und $k_{bT(Q)}$ fixiert und Triplettparameter k_T und k_{ISC} für sauerstofffreie Bedingungen eingesetzt ($k_T = 4000 \text{ s}^{-1}$ und $k_{ISC} = 2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$). Unter Ausschluss von Sauerstoff erhält man so eine Geschwindigkeitskonstante für Photozerstörungsreaktionen aus dem Tripletzzustand von $k_{bT}^0 = 6 \text{ s}^{-1}$, die Geschwindigkeitskonstante für den Singulettkanal ist näherungsweise null. Der Einfluss von Sauerstoff bzw. Sauerstoffspezies auf die Geschwindigkeitskonstanten der Photozerstörung kann durch $k_{bX} = k_{bX}^0 + k_{qX}^{O_2} [O_2]$ beschrieben werden, wobei $X = S$ oder T . k_{bX}^0 ist dabei die Geschwindigkeitskonstante in Abwesenheit von Sauerstoff, $k_{qX}^{O_2}$ die durch Sauerstoff verursachte Geschwindigkeitskonstante der Photozerstörung und $[O_2]$ die Sauerstoffkonzentration der Lösung. Anhand der bestimmten Werte bei zwei Sauerstoffkonzentrationen, 0 und $290 \mu\text{M}$, können die sauerstoffinduzierten Geschwindigkeitskonstanten $k_{qS}^{O_2} = 35 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{qT}^{O_2} = 9.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt werden (Tabelle 3). Zur Bewertung dieses Ergebnisses ist es wiederum zweckmäßig, die Quantenausbeute der Photozerstörung $\Phi_{bS}^{O_2}$ bzw. $\Phi_{bT}^{O_2}$ durch Sauerstoffspezies für den Singulett- bzw. Tripletzzustand zu betrachten:

$$\phi_{bS}^{O_2} = k_{qS}^{O_2} [O_2] / (k_{bS}^0 + k_{qS}^{O_2} [O_2]) \quad (10)$$

$$\phi_{bT}^{O_2} = k_{qT}^{O_2} [O_2] / (k_{bT}^0 + k_{qT}^{O_2} [O_2]) \quad (11)$$

Da unter Ausschluss von gelöstem Sauerstoff keine Photozerstörungsreaktionen aus dem Singulettzustand erfolgten ($k_{bS}^0 = 0 \text{ s}^{-1}$), beträgt die Quantenausbeute $\Phi_{bT}^{O_2}$ praktisch 100%. In luftgesättigter Lösung werden dagegen nur 82 % der irreversiblen Ausbleichreaktionen aus dem Tripletzzustand durch Sauerstoff verursacht.

III.6 Untersuchung der triplettlöschenden Wirkung von AAZB bei weiteren Fluorophoren

Die Steigerung der Signalstärke durch die Löschung von Triplet- und Radikalzuständen in Anwesenheit des Azobenzolderivats AAZB wurde auch an weiteren Fluoreszenzfarbstoffen untersucht. Dazu wurden leistungsabhängige FCS-Messungen in Phosphatpuffer bei pH7 durchgeführt. Hierbei stand vor allem die Frage im Vordergrund, inwieweit AAZB in der Lage ist, die Tripletzustände von Fluorophoren mit langwelligeren Absorptionsbanden zu löschen.

Es sind nur wenige experimentelle Daten über die Lage der Tripletenergien von diesen Fluoreszenzfarbstoffen verfügbar. Für einige Rhodamine wurde eine S_1 - T_1 -Energilücke von durchschnittlich 3100 cm^{-1} bestimmt. Basierend auf diesem Wert verschiebt sich die Lage des T_1 -Zustands des Fluorophors in Abhängigkeit vom Singulettzustand. Für diese Untersuchung wurden daher hauptsächlich Atto-Farbstoffe mit zunehmend rotverschobenen Absorptionswellenlängen gewählt.

Leistungsabhängige FCS-Messungen lieferten die photophysikalischen Geschwindigkeitskonstanten für die Deaktivierung des T_1 -Zustands k_T und für Interkombinationsübergänge k_{ISC} der untersuchten Fluorophore (Tabelle 4). Die **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** zeigt die Fluoreszenzählraten pro Molekül und die Triplettparameter der drei Rhodaminfarbstoffe Rh123, Rh110 und Alexa 488 mit nicht-alkylierten Aminogruppen am Xanthengerüst. Die im Vergleich zu Rh123 und Rh110 deutlich erhöhte Geschwindigkeitskonstante für Intersystemcrossing von Alexa 488 wird durch einen Schwereatomeffekt der Schwefelatome in den Sulfonsäuregruppen verursacht. Gleichzeitig ist die Deaktivierung des Tripletzustands langsamer, weshalb der Tripletzustand bei Alexa 488 deutlich stärker bevölkert ist (Abbildung 6 B). Daraus resultiert die geringste Signalstärke im Vergleich zu den anderen grünfluoreszierenden Farbstoffen (Abbildung 6 A).

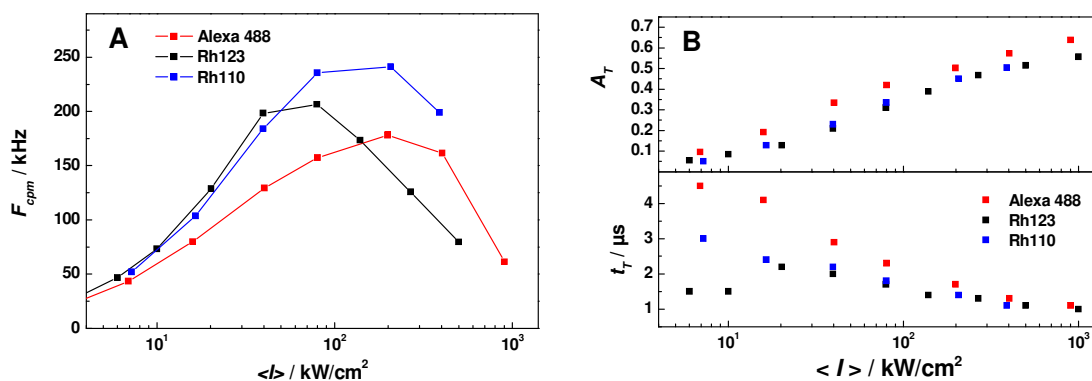


Abbildung 6: (A) Fluoreszenzzählrate F_{cpm} pro Molekül und (B) Triplettparameter aus FCS-Messungen an grünen Fluorophoren in Phosphatpuffer pH7.

Tabelle 4: Photophysikalische Parameter und bimolekulare Geschwindigkeitskonstanten für die Löschung des Tripletzustands des jeweiligen Fluorophors in Phosphatpuffer bei pH7 mit dem Additiv AAZB. Freie Enthalpie $\Delta G_{ET,red}$ des reduktiven Elektronentransfers zwischen AAZB und dem Radikalkation R^{+} des Fluorophors. Die Fluorophore basieren auf unterschiedlichen chemischen Strukturen, die in die Klassen der Rhodamine (r), der Carbopyronine (c) und der Oxazine (o) unterteilt wurden.

Stoffklasse		k_T	k_{ISC}	$\sigma_{01}(\lambda_{ex})^a$	k_{qT}	$\Delta G_{ET,red}(R^{+})$
		10^5 s^{-1}	10^5 s^{-1}	10^{-16} cm^2 (nm)	$10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	eV
Rh123	r	4.2	7.6	2.60 (496)	3.9 ± 0.3	-0.03
Rh110	r	3.3	7.6	2.62 (496)	b	-0.17
Alexa 488	r	2.1	12.0	2.61 (496)	0.9 ± 0.2	-0.29
Atto 590	r	4.8	8.0	2.00 (559)	2.6 ± 0.2	-0.12
Atto Rho14	r	3.1	3.4	3.27 (635)	2.4 ± 0.2	-0.15
Atto 647N	c	3.3	2.5	4.43 (635)	1.5 ± 0.3	0.03
Atto 655	o	4.0	1.4	2.85 (635)	c	-0.12

^a Die Absorptionsquerschnitte σ_{01} wurden für die verwendete Anregungswellenlänge λ_{ex} mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten berechnet. ^b Wurde nicht untersucht. ^c Zusätzliche Löschung. Aufgrund der Überlagerung zweier Bunchingterme war eine Bestimmung von k_{qT} nicht möglich.

Die Geschwindigkeitskonstante k_{qT} für die bimolekulare Löschung des Tripletzustandes von Alexa 488 durch den Löscher AAZB liegt mit $0.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ deutlich unter dem Wert von Rh123. Im Gegensatz zum Fluorophor Rh123, der einen kationischen Grundzustand besitzt, trägt Alexa 488 zwei negative Ladungen, weshalb eine elektrostatische Abstoßung zwischen AAZB und dem Alexa-Farbstoff die für einen Tripletenergietransfer notwendige Annäherung der Reaktanden verhindert.

Die Reduktion des Radikalkations von Alexa 488 durch AAZB ist deutlich exergonisch ($\Delta G_{ET} = -0.29 \text{ eV}$, Tabelle 4). Da bei den Korrelationskurven von Alexa 488 nur bei extrem hohen Leistungen ein Radikalbunchingterm angepasst werden konnte, konnte keine globale Analyse der FCS-Daten analog zu Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** zur Bestimmung der Löscheffizienz k_{qR} des Radikalkations durchgeführt werden. Die Fluoreszenzzählrate bei hohen Leistungsdichten weist kaum Sättigungseffekte auf, was auf eine gleichzeitige Löschung des Triplet- und Radikalzustands durch AAZB schließen lässt.

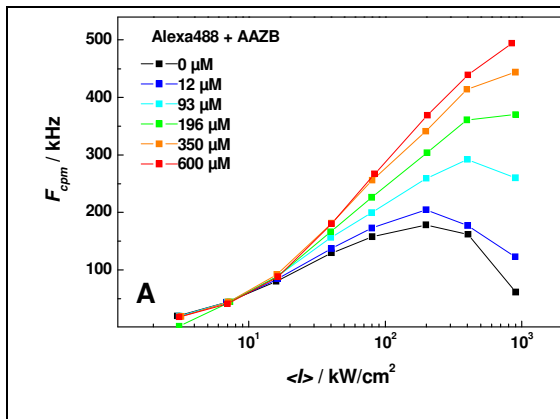


Abbildung 7: (A) Fluoreszenzzählrate pro Molekül des Fluoreszenzfarbstoffes Alexa 488 in Abhängigkeit von der Laserleistung in Anwesenheit des Additivs AAZB in Phosphatpuffer bei pH7.

In weiteren Untersuchungen wurden Atto-Farbstoffe mit zunehmend rotverschobenen Absorptionswellenlängen untersucht. Falls die Tripletenergien dieser Farbstoffe relativ zu der Lage ihrer S_1 -Zustände mit zunehmender Anregungswellenlänge abnehmen, sollte auch die Effizienz der Triplettlöschung sinken. Dieser Trend konnte in den Geschwindigkeitskonstanten k_{qT} des Tripletenergietransfers auf das Azobenzol AAZB beobachtet werden (Tabelle 4). Während für den kurzwelligsten Fluorophor Atto590 eine Geschwindigkeitskonstanten für die T_1 -Löschung von $2.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt wurde, sank k_{qT} mit zunehmender Absorptionswellenlänge des Farbstoffs. AAZB zeigte gegenüber Atto 647N nur noch eine Löscheffizienz von $1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

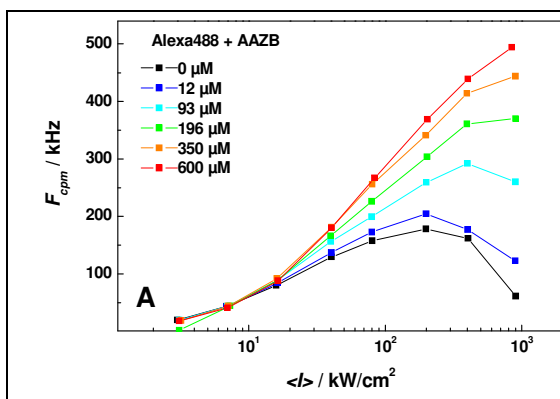


Abbildung 7: (A) Fluoreszenzzählrate pro Molekül des Fluoreszenzfarbstoffes Alexa 488 in Abhängigkeit von der Laserleistung in Anwesenheit des Additivs AAZB in Phosphatpuffer bei pH7.

Die Fluoreszenz des Atto-Farbstoffs Atto 655 wird durch AAZB nicht gesteigert, da schon bei niedrigen Konzentrationen eine statische Löschung durch Komplexbildung beobachtet wird. Bei den Farbstoffen Atto 590, Atto Rho14 und Atto 647N wird erst bei höheren Additivkonzentrationen ($> 300 \mu\text{M}$) ein durch Komplexbildung hervorgerufener FCS-Bunchingterm und eine Löschung des Fluoreszenzsignals beobachtet.

III.7 Steigerung der Signalstärke bei fluoreszenzmarkierten Biomolekülen

Die signalsteigernde Wirkung von Additiven auf die Fluoreszenz von markierten Biomolekülen wurde anhand von zwei doppelsträngigen mit Alexa 488-markierten DNA-Proben untersucht (Abbildung 8). Für die FCS-Messungen wurden zwei Proben mit unterschiedlich langen Linkern zwischen dem DNA-Gerüst und dem Fluorophor gewählt. Bei der Probe mit dem kurzen Linker (S_1) ist der Farbstoff über eine unflexible Propargyl-Gruppe an das DNA-Rückgrat gebunden. In dieser Probe trennen 4 Atome den Fluorophor von der DNA, während der lange Linker (L) aus insgesamt 11 Atomen besteht und eine bewegliche C_6 -Alkylgruppe beinhaltet. Aufgrund des negativ geladenen Phosphat-Rückgrats der DNA unterscheidet sich die Umgebung dieses Systems stark von dem zuvor untersuchten freien Farbstoff.

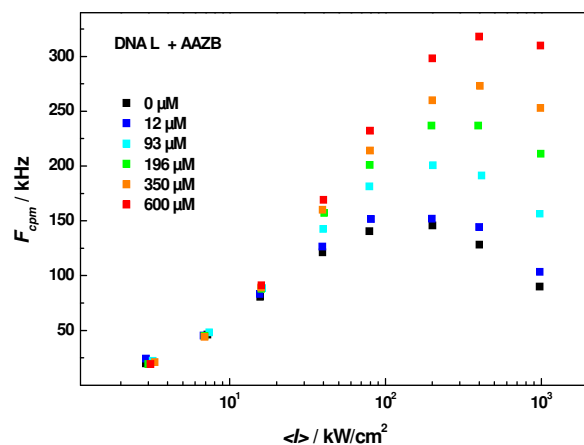


Abbildung 8: Fluoreszenzzählrate F_{cpm} pro Molekül von Alexa 488-markierter DNA bei Zugabe des Additivs AAZB.

	k_T	k_{ISC}	k_{qT}
	10^5 s^{-1}	10^5 s^{-1}	$10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Alexa 488	2.1	12.0	8.9 ± 0.2
DNA S _t	1.6	14.4	4.1 ± 0.7
DNA L	1.5	16.0	4.2 ± 1.2

Tabelle 5: Triplettparameter und Geschwindigkeitskonstanten für die Löschung des Tripletzustands von AAZB an Alexa 488 und Alexa 488-markierter DNA unterschiedlicher Linkerlängen.

Durch die Anbindung des Farbstoffs an die DNA sinkt die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante k_{qT} von AAZB auf 4.1 bzw. $4.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für die Probe mit dem kurzen (S_t) bzw. langen (L) Linker (Tabelle 5). Verglichen mit dem freien Farbstoff ist die Triplet-Löschkonstante um einen Faktor 2 kleiner. Die Verringerung der T₁-Löscheffizienz von AAZB ist hier noch stärker ausgeprägt und wird zusätzlich zur elektrostatischen Abstoßung durch sterische Abschirmung der Reaktionszentren durch das DNA-Gerüst hervorgerufen. Der Unterschied zwischen dem langen und kurzen Farbstofflinker ist dagegen statistisch nicht signifikant.

III.8 Zusammenfassung

In dem abgelaufenen Projekt wurden neue photoprotektive Additive für Rh123 gefunden. Wenn der Triplettlöcher Sauerstoff durch Additive wie Azobenzole oder Cyclooctatetraen-Derivate ersetzt wird, konnte die Geschwindigkeit der Photozerstörung um einen Faktor 50 verringert werden, was ebenfalls ein Rekord für Rhodamine ist, weil die bisher bekannten photoprotektiven Additive nur wenig Wirkung bei Rhodaminen zeigten. Zudem steigt bei einer AAZB-Konzentration von $850 \mu\text{M}$ das Fluoreszenzsignal um einen Faktor 5 auf $1,5 \text{ MHz/Molekül}$, was nach meinem Wissen für organische Farbstoffe ein absoluter Spitzenwert ist. Bei den bis jetzt hergestellten Bichromophoren wurde eine mehr oder weniger starke Fluoreszenzlöschung festgestellt. Die Unterdrückung der S₁-Löschung unter Erhalt der anderen Löscheigenschaften ist der Ausgangspunkt für die Optimierung der Bichromophore in weiteren gemeinsamen Arbeiten. Dabei müssen neben einer Feinabstimmung der elektronischen Eigenschaften auch die sterischen Aspekte der Chromophoranordnung berücksichtigt werden.

III.9 Kooperationen

Die Synthesen der Minicarotinoide wurden in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe Martin (TP **B1**) durchgeführt. Bei der Synthese der Bichromophore wurde ein enger Erfahrungsaustausch mit den anderen Gruppen (Martin (TP **B1**) und Müller (TP **A10**)), die an der Synthese von Bichromophoren interessiert sind, durchgeführt.

Die physikochemischen Untersuchungen der Chromophore wurden begleitet von quantenchemischen Untersuchungen, die in Kooperation mit der Gruppe von Frau Marian (TP **C1**) durchgeführt wurden. In Ergänzung zu den Rechnungen wurden intensive spektroskopische Untersuchungen angestrebt. Dabei hat es sich gezeigt, dass speziell die DPHs den hochaufgelösten Messungen in der Arbeitsgruppe Schmitt (TP **A2**) nicht zugänglich sind. Untersuchungen der verbotenen Übergänge an DPH (Mini-5-Carotenoid) und am entsprechenden Mini-7-Carotenoid wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Weinkauf erfolgreich durchgeführt (TP **A1**).

Eine Reihe von FCS-Experimenten wurde in enger Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Jerker Widengren (Experimental Biomolecular Physics, Royal Institute of Technology, Stockholm, Schweden) durchgeführt.

6.2.2 Aus dem Teilprojekt entstandene Publikationen

- a) Arbeiten, die in Publikationsorganen mit einer wissenschaftlichen Qualitätssicherung zum Zeitpunkt der Antragstellung erschienen oder endgültig angenommen sind, und Buchveröffentlichungen
- [1] Martin, H.-D., Kock S., Scherrers, R., Lutter, K., Wagener, T., Hundsdörfer, C., Frixel, S., **Schaper, K.**, Ernst, H., Schrader, W., Görner, H., & Stahl, W., 3,3-Dihydroxyisorenieratin, ein natürliches Carotinoid mit überlegenen antioxidativen und photoprotektiven Eigenschaften *Angew. Chem.* **121**, 406 – 410 (2009).
 - [2] **Pfiffi, D., Bier, B. A., Marian, C. M., Schaper, K., & Seidel, C. A. M.** Diphenylhexatrienes as photoprotective agents for ultrasensitive fluorescence detection, *The Journal of Physical Chemistry A* **114**, 4099 – 4108 (2010).
- b) Andere Veröffentlichungen; und
Eine ausführliche Publikation zu den Abschnitten III.2-III.5 ist in Vorbereitung.
- c) Patente;
keine

6.3 Rückblick auf die Förderung

Das Teilprojekt wird seit Juli. 2005 im Sonderforschungsbereich gefördert. Es wurde im Juni. 2010 beendet.

	laufende Nummer	Name, akademischer Grad, Dienststellung	engere Fachzugehörigkeit	Institut der Hochschule oder der außeruniversitären Einrichtung	Mitarbeit im Projekt in Wochenstunden	Entgeltgruppe
Grundausstattung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	1	Seidel, Claus A. M., Prof. Dr.	Physikalische Chemie	Lehrstuhl für mol. Phys. Chem.	10	
	2	Müller, Thomas J.J., Prof. Dr.	Organische Chemie	Lehrstuhl für Org. Chem.	2, B	
	3	Schaper, Klaus, PD Dr.	Organische Chemie	Lehrstuhl für Org. Chem.	10	
	4	Mayer, Bernhard, Dr.	Organische Chemie	Lehrstuhl für Org. Chem.	3, B	
	5	Spitzley, Jan, Dipl.-Chem.	Organische Chemie	Lehrstuhl für Org. Chem.	5	
	6	Kühnemuth, Ralf, Dr.	Physikalische Chemie	Lehrstuhl für mol. Phys. Chem.	8	
	7	Overmann, S., Dipl. Chem.	Physikalische Chemie	Lehrstuhl für mol. Phys. Chem.	20	
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter	8	Riedl, Dagmar	Organische Chemie	Lehrstuhl für Org. Chem.	3	
	9	Schramm, Martin	Physikalische Chemie	Lehrstuhl für mol. Phys. Chem.	5	
Ergänzungsausstattung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	1	Pfiffi, Daniela, Dipl.-Chem,	Physikalische Chemie	Lehrstuhl für mol. Phys. Chem.	19.9	TVL-13/2
	2	Bier, Brigitte, Dipl.-Chem.	Organische Chemie	Lehrstuhl für org. Chem.	19.9	TVL-13/2
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter						

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Grundausstattung):

- Prof. Dr. Claus Seidel.
Leitung des Teilprojekts: Er bringt seine Erfahrung bei der Auswahl der Additive und Durchführung der spektroskopischen Analyse (FCS, Ausbleichexperimente und TRABS) und ihrer Wirkung ein. Anleitung der Doktoranden, Auswertung; Koordination der Zusammenarbeit mit Dritten. Analyse und Zusammenfassung der Ergebnisse, Erstellung von Publikationen.
- Prof. Dr. Thomas J. J. Müller.
Leitung des Teilprojekts in beratender Funktion: Er bringt seine Erfahrung in synthetischer Organischer und Metallorganischer Chemie für den Aufbau von funktionalisierten Chromophoreinheiten ein. Anleitung des Doktoranden; Koordination der Zusammenarbeit mit Dritten. Analyse, Diskussion und Zusammenfassung der Ergebnisse.

3. PD Dr. Klaus Schaper.
Leitung des Teilprojekts: Er bringt seine Erfahrung bei der Planung und Durchführung der Organischen Synthesen ein. Anleitung der Doktoranden, Auswertung; Koordination der Zusammenarbeit mit Dritten. Analyse und Zusammenfassung der Ergebnisse, Erstellung von Publikationen.
4. Dr. Bernhard Mayer.
Arbeit insbesondere in der AG Müller. Präparation und Reinigung von COT-Derivaten, Beratung bei der Synthese von Chromophoren.
5. Dipl.-Chem. Jan Spitzley.
Arbeit insbesondere in der AG Müller. Präparation und Reinigung von Azofarbstoffen.
6. Dr. Ralf Kühnemuth.
Beratung der Doktoranden des Teilprojektes bei optischen, photophysikalischen und photochemischen Fragestellungen. Anleitung der nichtwissenschaftlichen Mitarbeiter, Analyse und Zusammenfassung der Ergebnisse, Erstellung von Publikationen.
7. Dipl.-Chem. Sebastian Overmann, Doktorand.
Optische Ensemble-Spektroskopie. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und Photostabilitätsmessungen.
8. Dagmar Riedl.
Synthese von nicht kommerziell erhältlichen Synthesebausteinen.
9. Martin Schramm, Ingenieur.
Herr Schramm ist technischer Angestellter und betreut die Laser und elektronischen Geräte im Lehrstuhl für Molekulare Physikalische Chemie. Ferner ist er für den Betrieb der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC) und der Apparatur zur Messung der Photostabilität von Fluoreszenzfarbstoffen in einer Küvette zuständig.

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Ergänzungsausstattung):

1. Dipl.-Chem. Daniela Pfiffi.
Arbeit insbesondere in der AG Seidel. Fluoreszenzcharakterisierung der AZB-Verbindungen, alle elektrochemische Untersuchungen, alle Untersuchungen zur Rolle des Sauerstoffs und Test von ROX-Systemen.
2. Dipl.-Chem. Brigitte Bier.
Arbeit insbesondere in der AG Schaper. Synthese und Charakterisierung von Triplettlöschern und von Bichromophoren, bestehend aus Fluorophor und Triplettlöcher.

6.1.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt B1

6.1.2 Titel: Photoprotektion und Photodynamik durch Mikronährstoffe und analoge Verbindungen

6.1.3 Projektleitung

Prof. Dr. Wilhelm Stahl
Geb. 29.5.1955
Deutsch
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
Universitätsstr.1
D-40225 Düsseldorf

Telefon: 0211-811-2711
E-Mail: wilhelm.stahl@uni-duesseldorf.de

6.2 Entwicklung des Teilprojekts

6.2.1 Bericht

Carotinoide und Polyphenole sind sekundäre Pflanzenstoffe mit photoprotektiven Eigenschaften, die auch zum Lichtschutz beim Menschen beitragen können [1]. Abhängig von der Struktur der genannten Verbindungen sind Lichtabsorption, Deaktivierung elektronisch angeregter Zustände und/oder Reaktionen mit photochemischen Primär- und Sekundärprodukten die Mechanismen der Photoprotektion [2]. In biologischen Systemen sind auch Wechselwirkungen mit lichtabhängigen oder ROS-gesteuerten Signalwegen von Bedeutung [3].

Im Rahmen des gesamten Projektes wurden Naturstoffe und abgeleitete Verbindungen, in Modellsystemen und Zellkultur auf photoprotektive Eigenschaften und zugrundeliegende Wirkmechanismen untersucht. Dabei handelt es sich insbesondere um Substanzen mit funktionalen π -Systemen wie Carotinoide, Flavonoide, Carotenylflavonoide und Vitamin E-analoge Verbindungen.

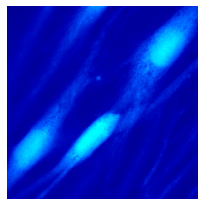
Schwerpunkt der Arbeiten in der Förderperiode 7-2009 bis 6-2010 waren weitergehende Untersuchungen zu den photoprotektiven Wirkungen aromatischer Carotinoide und Carotenylflavonoide sowie orientierende Untersuchungen zu natürlich vorkommenden und synthetischen Chalkonen. Des Weiteren wurden zusätzliche Methoden etabliert. Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst.

1. Aromatische Carotinoide

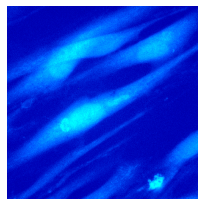
Isorenieratin (IR) und 3,3'-Dihydroxyisorenieratin (DHIR) sind natürlich vorkommende Carotinoide mit außergewöhnlicher Struktur. Beide Verbindungen tragen am zentralen Polyensystem aromatische Endgruppen. Sie werden u.a. von Rotschmierebakterien wie *Brevibacterium linens* gebildet. DHIR erwies sich in Modellsystemen im Vergleich zu anderen Carotinoiden als äußerst wirksamer Photoprotektor. Die Substanz wirkt aufgrund ihrer Struktur als multifunktionelles Antioxidans [1*].

Innerhalb der Zelle findet man Zn^{2+} ausschließlich gebunden an Proteine. Unter UV-Bestrahlung werden Zn^{2+} Ionen freigesetzt und können mit dem Fluoreszenzfarbstoff Zinquin nachgewiesen werden. Photoprotektive Verbindungen vermindern die UV-abhängige Zn^{2+} -Freisetzung. Unter photooxidativer oder thermischer Belastung wird Zn^{2+} aus den Proteinkomplexen freigesetzt. Unter Bestrahlung korreliert die Zunahme an freien Zinkionen mit dem Anstieg an reaktiven Sauerstoffverbindungen. Sind die Zellen mit DHIR vorbehandelt ist die Zinkfreisetzung deutlich verringert. Eine Schutzwirkung von DHIR gegenüber thermisch-induzierter Zn-Freisetzung war nicht zu beobachten. Dies wird als Hinweis auf die rein photoprotektive Wirkung gewertet. Der Mechanismus der UV-induzierten Zn^{2+} -Freisetzung ist bisher nicht geklärt. Da an der Komplexbildung von Zinkionen häufig Thiolgruppen beteiligt sind, könnte eine chemische Modifikation dieser funktionellen Gruppen (Konjugation mit elektrophilen Zerfallsprodukten) oder Oxidation zu Disulfiden eine Rolle spielen [2*].

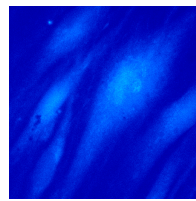
Zn-Freisetzung in humanen Hautfibroblasten (Zinquin)



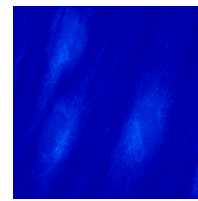
Kontrolle - UV



Lutein – UV



DHIR – UV



Kontrolle - unbestrahlt

Ergänzend zu Zellkulturstudien wurde die Freisetzung von Metallionen aus einem Cystein-Histidin Komplex untersucht. Im Modellpeptid mit Cysteinresten und Histidinresten sind Co^{2+} Ionen komplexometrisch gebunden. Unter UV-Bestrahlung werden die Ionen freigesetzt was spektrometrisch verfolgt werden kann (Abnahme der Absorption bei 642 nm).

Bei Bestrahlung mit UVA im Bereich von 10-40 J/cm² wird Co^{2+} aus dem Proteinkomplex freigesetzt, wobei mit der höchsten Dosis fast eine vollständige Freisetzung zu beobachten ist. Zusatz von Lutein oder Isorenieratin hat keinen Effekt auf die Dekomplexierung der Ionen. Wird der Proteinkomplex mit DHIR gemischt, ist bereits ab einer Bestrahlungsdosis von 10 J/cm² UVA eine signifikant verminderte Co^{2+} - Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.

Aminosäuresequenz des Modellpeptids: H₂N-Arg-Pro-Phe-Met-Cys-Thr-Trp-Ser-Tyr-Cys-Gly-Lys-Arg-Phe-Thr-Arg-Ser-Asp-Glu-Leu-Gln-Arg-His-Lys-Arg-Thr-His-Thr-Gly-CONH₂

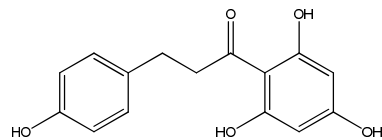
Die Wirkung von DHIR, IR und Lutein auf die UV-induzierte Lipidperoxidation wurde in einem Liposomenmodell untersucht. Liposomen werden mit UV-Licht bestrahlt und so Lipidoxidation induziert. Ein Reaktionsprodukt des Lipidabbaus ist Malondialdehyd, der mittels HPLC quantifiziert wird. Zur Bestimmung der protektiven Wirkung gegen UV-induzierte Lipidoxidation werden die Liposomen mit den zu untersuchenden Substanzen vorab beladen. Es wurde gezeigt, dass von den ausgewählten Substanzen nur DHIR im Modell vor Lipidoxidation schützt. Isorenieratin und Lutein waren nur wenig wirksam. Die protektive Wirkung von DHIR gegenüber Lipidperoxidation konnte zudem in dermalen Fibroblasten nachgewiesen werden. Die Schutzeffekte korrelieren mit der antioxidativen Wirkung von DHIR, gemessen als verminderte Bildung von ROS in den Zellen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von dermalen Fibroblasten zeigten, dass DHIR in der Zellmembran akkumuliert und durch Endozytose in das Zellinnere aufgenommen wird. Mittels HPLC wurde die Aufnahme weiter bestätigt.

2. Toxizität der Oxidationsprodukte von Carotinoiden

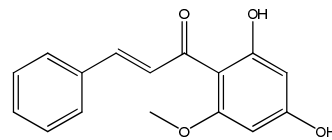
Unsere Untersuchungen in Zellkultur weisen daraufhin, dass einige Carotinoide wie beta-Carotin oder Lycopin unter UV-Bestrahlung chemisch reaktive Oxidationsprodukte bilden, die zelltoxische Wirkungen entfalten. Dabei handelt es sich vermutlich um alpha-beta ungesättigte Carbonylverbindungen, die elektrophile Intermediate darstellen. Mehrfach ungesättigte Mono- und Dialdehyde als Abbauprodukte des Lycopins mit Wirkung auf zelluläre Signalwege sind beschrieben [4]. Die Zelltoxizität korreliert in unseren Untersuchungen mit der Photostabilität der Substanzen. Die photostabilen Carotinoide wie DHIR, Astaxanthin und Canthaxanthin sind weniger toxisch unter UV-Bestrahlung als Lycopin und beta-Carotin. Mit Hilfe von ausgewählten Thiolverbindungen sollen die reaktiven Abbauprodukte abgefangen und identifiziert werden. Dazu sind erste Versuche durchgeführt worden.

3. Chalkone

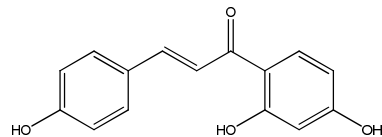
Bei der Biosynthese von Flavonoiden entstehen als Zwischenprodukte verschiedene Chalkone und analoge Verbindungen, die wie das Phloretin, Cardamomin, Isoliquiritigenin oder Xanthohumol, dann als sekundäre Pflanzenstoffe auch in Nahrungsmitteln vorkommen. Zu den biologischen und insbesondere photoprotektiven Eigenschaften dieser Substanzen ist wenig bekannt. Sie zeigen elektrophile Wirkungen und induzieren sekundäre Verteidigungssystem in Zellkultur.



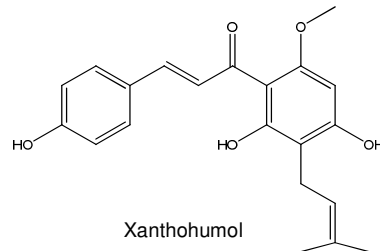
Phloretin



Cardamomin



Isoliquiritigenin



Xanthohumol

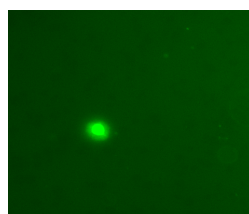
Zu den genannten Verbindungen wurden bisher Effekte auf die Zellviabilität (Toxizität), sowie die Expression der Hämoxxygenase-1 untersucht. Es ergab sich folgende Reihe mit zunehmender Toxizität bei einer Konzentration von 50 μM ; Angabe in % überlebende Zellen. Phloretin (90%), Cardamomin (70%), Isoliquiritigenin (60%), Xanthohumol (50%). Untersuchungen zur Hämoxxygenaseexpression zeigten keine Induktion nach Behandlung mit Phloretin; stark induktive Effekte zeigten sich nach Behandlung der Zellen mit den eigentlichen Chalkonen Cardamomin, Isoliquiritigenin und Xanthohumol.

4. Methodenentwicklung - Weiterentwicklung

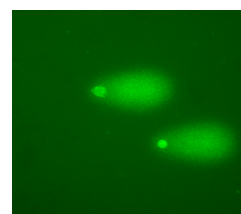
DNA-Schädigung: Unter UV-Bestrahlung bilden sich Thymidindimere, die wir mit spezifischen Antikörpern nachweisen. Messparameter einer photoprotektiven Wirkung ist die Verminderung der Thymidindimerenbildung nach Behandlung mit photoprotektiven Substanzen. Zusätzlich wurde als weitere Methode zur Beurteilung von DNA Schäden der Comet-Assay etabliert.

Mit dem Comet-Assay werden DNA Schäden (u.a. Einzel- und Doppelstrangbrüche, alkalilabile Stellen) nachgewiesen. Das Prinzip beruht auf der Einzelzellgelelektrophorese wobei nach Zellyse DNA-Bruchstücke im elektrischen Feld nach Größe aufgetrennt werden. Intakte DNA ist unter den Bedingungen des Assays nicht mobil. Das Ausmaß der DNA-Schädigung wird nach Anfärben mit z.B. Midori-Green durch Bewertung des DNA-Schweifs erfasst. Die Methode wird weiterentwickelt, auf UV-Schädigungen adaptiert und auch zur Untersuchung genotoxischer Wirkungen von Photooxidationsprodukten genutzt.

Comet-Assay mit humanen Hautfibroblasten (DNA-Färbung Midori-Green)

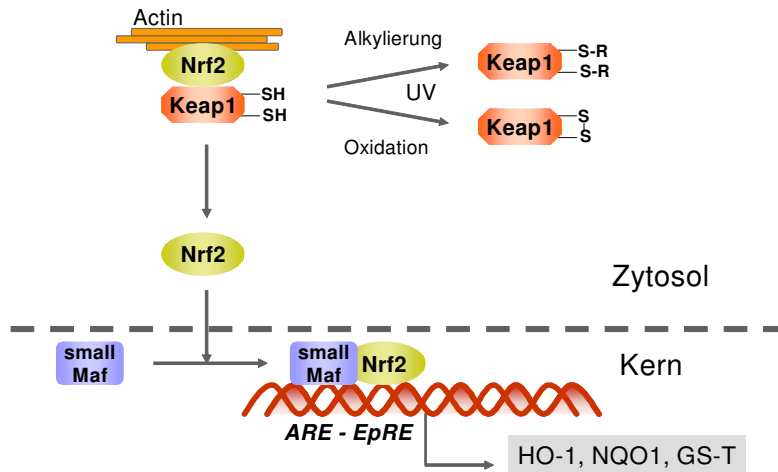


Kontrolle (DMSO)



H₂O₂ (500 $\mu\text{M}/2\text{h}$)

Das Nrf2-Keap1 System ist ein Thiolgruppen abhängiger Sensor, der auf elektrophile oder oxidative Stimuli reagiert und auch UV-abhängig aktiviert wird. Oxidation oder chemische Modifikationen von Thiolgruppen des Proteins Keap1 induzieren eine zelluläre Signalkaskade die u.a. zur Translokation von Nrf2 in den Zellkern führt. Dort steuert Nrf2 als Transkriptionsfaktorkomponente die Expression bestimmter Gene wie Hämoxxygenase-1 (HO-1), NAD(P)H-Chinon-Oxidoreductase-1 (NQO1) oder Glutathion-S-Transferasen (GS-T).

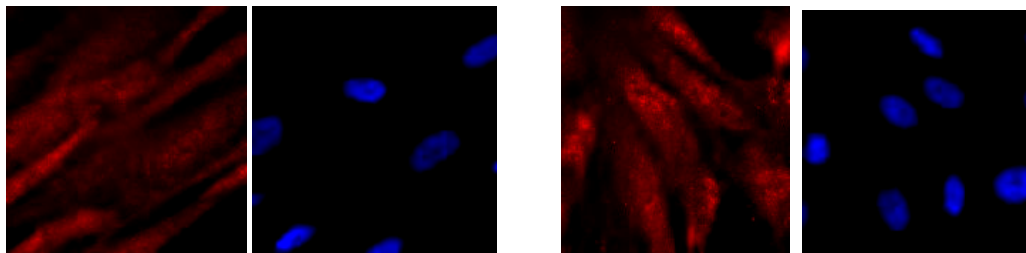


Zusätzlich zur Bestimmung der HO-1 Expression haben wir die Analyse der Expression von NQO1 und der Gesamtaktivität der Glutathion-S-Transferasen als Parameter der Endstrecke des Nrf2-Keap1 Systems etabliert. Untersuchungen zur Expression von Nrf2 ergaben keine Beeinflussung unter UV-Bestrahlung. Es wurde ein Verfahren etabliert und optimiert, um mit Immunfluoreszenzmikroskopie die Translokation von Nrf2 aus dem Zytosol in den Zellkern zu verfolgen. Erste Untersuchungen zur Translokation unter UV-Bestrahlung lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Daher werden zusätzliche Versuche mit Western-Blot Analysen auf Nrf2 an isolierten Kernen durchgeführt.

Translokation von Nrf2 in den Kern von humanen Hautfibroblasten

Unbestrahlt

UV (10 J cm²)



UV-A 10 J/cm² (3h post-Exposition) – Nrf2 (rot); DAPI-DNA Färbung (blau, Kern)

Literatur

- [1] Stahl, W. & Sies, H. Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. *Mol. Biotechnol.* **37**, 26–30 (2007).
- [2] Stahl, W. & Sies, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta* **1740**, 101-107 (2005).
- [3] Tyrrell, R.M. & Reeve, V.E. Potential protection of skin by acute UVA irradiation - from cellular to animal models. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **92**, 86-91 (2006).
- [4] Linnewiel K., Ernst H., Caris-Veyrat C., Ben-Dor A., Kampf A., Salman H., Danilenko M., Levy J., Sharoni Y. Structure-activity relationship of carotenoid derivatives in activation of the electrophile/antioxidant response element transcription system. *Free Radic. Biol. Med.* **47**:659-67 (2009).

6.2.2 Aus dem Teilprojekt entstandene Publikationen

Veröffentlichungen 2009 bis 2010

I. Begutachtete Veröffentlichungen

- 1*. Martin, H.-D., Kock, S., Scherrers, R., Lutter, K., Wagener, T., Hundsdörfer, C., Frixel, S., Schaper, K., Ernst, H., Schrader, W., Görner, H., & Stahl, W. 3,3'-Dihydroxyisorenieratene, a natural ca-

rotenoid with superior antioxidant and photoprotective properties. Angew. Chem. Int. Ed. 48: 400-403 (2009)

- 2*. Lutter, K., De Spirt, S., Kock, S., Kröncke, K.-D., Martin, H.-D., Wagener, T. & Stahl, W. 3,3'-Dihydroxyisorenieratene prevents UV-induced formation of reactive oxygen species and the release of protein-bound zinc ions in human skin fibroblasts. Mol. Nutr. Food Res. 54, 285-291 (2010)
- 3*. De Spirt, S., Lutter, K., Stahl, W. Carotenoids in photooxidative stress. Curr. Nutr. Food Sci. 6, 36-43 (2010)
- 4*. Ostroumov, E.E., Müller, M.G., Hundsdörfer, C., Stahl, W., Marian, C.M., Holzwarth, A.R. Excited state relaxation dynamics and electronic properties of a quinoid carotenoid. Chem Phys 373 137-144 (2010)

II. Andere Veröffentlichungen

Lutter, K. Untersuchungen zur photoprotektiven Wirkung von 3,3'-Dihydroxyisorenieratin und Vitamin E Derivaten. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2009)

Hundsdörfer, C. Carotenylflavonoide: Synthese, Charakterisierung und Wirkungen in humanen Hautfibroblasten. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2009)

Wagener, T. Untersuchungen zur photoprotektiven Wirkung von Carotinoiden in Modellsystemen und dermalen Fibroblasten. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2009)

6.3 Rückblick auf die Förderung

Das Teilprojekt wird seit 7-2005 im Sonderforschungsbereich gefördert.

6.3.1 Personal im Teilprojekt während der zu Ende gehenden Förderperiode

	laufende Nummer	Name, akademischer Grad, Dienststellung	engere Fachzugehörigkeit	Institut der Hochschule oder der außeruniversitären Einrichtung	Mitarbeit im Projekt in Wochenstunden	Entgeltgruppe
Grundausstattung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	1	Prof. Dr. Wilhelm Stahl	Biochemie	Institut für Biochemie und Molekularbiologie I	5	
	2	Dr. Silke DeSpirt	Biochemie	Institut für Biochemie und Molekularbiologie I	10	
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter	3	Peter Graf		Institut für Biochemie und Molekularbiologie I	10	
Ergänzungsausstattung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	1	Tanja Wagener	Biochemie	Institut für Biochemie und Molekularbiologie I	19,9 7-2009 bis 12-2009	E13 1/2
	2	Claas Hundsdörfer	Biochemie	Institut für Biochemie und Molekularbiologie I	29,8 7-2009 bis 12-2009	E12 2/3
	3	Dr. Daniela Maydt	Biochemie	Institut für Biochemie und Molekularbiologie I	39,8 1-2010 bis 6-2010	E13
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter						

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Grundausstattung):

1. Prof. Dr. Wilhelm Stahl – Projektleiter

Prof. Stahl ist verantwortlich für die Planung und Koordination des Projektes. Er erstellt in Absprache mit den anderen Projektleitern die Versuchsplanung für synthetische, mechanistische, in-vitro und Zellkulturuntersuchungen und überwacht die Durchführung der Studien. Ihm obliegt die Analyse und Zusammenfassung der Ergebnisse sowie die Erstellung von Publikationen.

2. Frau Dr. Silke De Spirt – Laborleiterin

Frau Dr. De Spirt ist verantwortlich für die Detailplanung und Durchführung der Studien im Labor. Sie betreut im täglichen Laborbetrieb die Mitarbeiter des Projektes und überprüft bzw. erstellt Protokolle. Sie ist an der Konzeption der Studien beteiligt ebenso wie an der Erstellung von Publikationen.

3. Peter Graf - MTA

Herr Graf verfügt über langjährige Erfahrung in der HPLC Analytik und ist beteiligt an der Durchführung von projektbezogenen HPLC-Analysen. Er unterstützt neue Mitarbeiter bei der Einarbeitung und Methodenentwicklung im Bereich Analytik.

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Ergänzungsausstattung):

4. Tanja Wagener

Frau Wagener hat im Rahmen ihrer Doktorarbeit Untersuchungen zu den photoprotektiven Wirkungen von Carotinoiden in Modellsystemen durchgeführt und neue Modellsysteme etabliert.

5. Claas Hundsdörfer

Herr Hundsdörfer hat im Rahmen seiner Doktorarbeit Carotenylflavonoide synthetisiert und deren photoprotektive Eigenschaften untersucht.

6. Frau Dr. Daniela Maydt

Frau Dr. Maydt hat die Aufgabe, in Modellreaktionen die Konjugation von Photooxidationsprodukten und elektrophilen Pflanzenstoffen (Chalkone) an Thiolgruppen zu untersuchen.

6.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt B2

6.1.1 Titel: Molekulare Grundlagen photoprotektiver Mechanismen in Pflanzen

6.1.2 Projektleitung

Prof. Dr. Peter Jahns

Institut für Biochemie der Pflanzen
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Universitätsstr. 1
40225 Düsseldorf
Tel: 0211-811-3862, Fax: 0211-811-3706
Email: pjahns@uni-duesseldorf.de
Geb. 26.01.1960

Prof. Dr. Alfred R. Holzwarth

Max-Planck-Institut für Bioanorganische
Chemie
Stiftstrasse 34-36
45470 Mülheim a.d. Ruhr
Tel.: 0208-306-3571, Fax: 0208-306-3951
Email: Holzwarth@mpi-muelheim.mpg.de
Geb. 08.01.1949

6.2 Entwicklung des Teilprojekts

6.2.1 Bericht

In diesem Projekt wurden die Mechanismen der Deaktivierung überschüssiger Anregungsenergie in den Antennen von Photosystem II (PSII) höherer Pflanzen untersucht. Pflanzen sind in ihrer natürlichen Umgebung häufig schnell (Sekunden bis Minuten) wechselnden Lichtbedingungen ausgesetzt. Zur Optimierung der Photosynthese und zur Vermeidung von photo-oxidativer Schädigung des Chloroplasten haben Pflanzen eine Reihe von Schutzmechanismen entwickelt. Einen der wichtigsten dieser Mechanismen stellt die Abführung überschüssiger Anregungsenergie in Form von Wärme in den Antennen von PSII dar (Übersichtsartikel: Demmig-Adams und Adams, 1992; Horton et al., 1996; Niyogi, 1999; Krause und Jahns, 2004). Die Grundlage dieser als nicht-photochemische Löschung (= NPQ) der Anregungsenergie bezeichneten Prozesse wird zurzeit intensiv und kontrovers diskutiert. Es ist allgemein akzeptiert, dass das NPQ ein sehr komplexer Prozess ist, der durch drei wesentliche Komponenten reguliert wird: (i) den Protonengradienten, ΔpH , über der Thylakoidmembran (Wraight und Crofts, 1970; Briantais et al., 1979), (ii) das Xanthophyll Zeaxanthin (Zx) (Demmig et al., 1987; Niyogi et al., 1998) welches aus Violaxanthin (Vx) im sog. Xanthophyllzyklus (Yamamoto et al., 1962; Jahns et al., 2009) gebildet wird, und (iii) das PsbS Protein (Li et al., 2000; Li et al., 2004).

Der genaue molekulare Mechanismus des NPQ ist unbekannt, aber es existieren verschiedene Hypothesen zum Mechanismus und den potentiellen Quenchern: Energietransfer von Chlorophyll (Chl) zu Zx in dem majoren Lichtsammelkomplex (LHCII) aus PSII (Frank et al., 2000), Elektronentransfer zwischen einem Carotinoid und Chl unter Bildung eines Zx-Chl or Lutein-Chl charge-transfer (CT) Zustandes (Holt et al., 2005; Avenson et al., 2009), direktes oder indirektes Quenching durch PsbS (Li et al., 2000; Niyogi et al., 2005), Energietransfer von Chl zu Lutein in LHCII, gekoppelt an die Aggregation von LHCII oder Konformationsänderungen in LHCII (Horton et al., 1991; Ruban et al., 2007), und schließlich ein fernrot (FR) emittierender und gequenchter CT Zustand, induziert durch die Aggregation von LHCII (Miloslavina et al., 2009).

Wir hatten in der ersten Förderperiode u.a. ein Mess-System etabliert, das es erlaubte, die Prozesse des NPQ unter physiologischen Bedingungen an intakten Blättern mittels zeitaufgelöster Chlorophyll Fluoreszenzspektroskopie zu charakterisieren. Die unter Verwendung verschiedener Mutanten erzielten Ergebnisse führten zu einem neuen in vivo NPQ-Modell (Abb. 1). Dieses Modell zeigt, dass LHCII-Aggregation und Zx-abhängiges Quenching nebeneinander und unabhängig voneinander zum NPQ beitragen und dabei zur Ausbildung von zwei Quenching sites, Q1 und Q2, führen [^{1*}]. Basierend auf den Analysen an verschiedenen Mutanten haben wir vorgeschlagen, dass Q1 durch Ablösung und Aggregation von LHCII-Trimeren entsteht und dass dieser Prozess durch das PsbS Protein vermittelt und durch den pH im Thylakoidlumen (pH_{Lumen}) reguliert wird. Über diesen einfachen Mechanismus kann die Größe der PSII-Antenne, aufgrund der strikten pH-Abhängigkeit dieses Prozesses schnell und flexibel reguliert werden. Die Zuordnung von Q1 zur Bildung von funktionell nicht mehr an das PSII gekoppelten LHCII-Oligomeren ergab sich dabei aus der spektralen Charakteristik der Fluoreszenzemission dieser Komponente, die sich durch das Auftreten einer

ausgeprägten Fluoreszenz im FR (720-730 nm) auszeichnete. Eine solche spektrale Charakteristik war früher für isolierte, oligomere LHCII-Trimere beschrieben worden (Miloslavina et al., 2008). Im Gegensatz zu Q1 ist Q2 in den mit PSII assoziierten Antennen des PSII (wahrscheinlich in einem oder mehreren der minoreren Antennenproteine CP24, CP26 und CP29) lokalisiert (Abb. 1) und strikt von der Bildung von Zx abhängig.

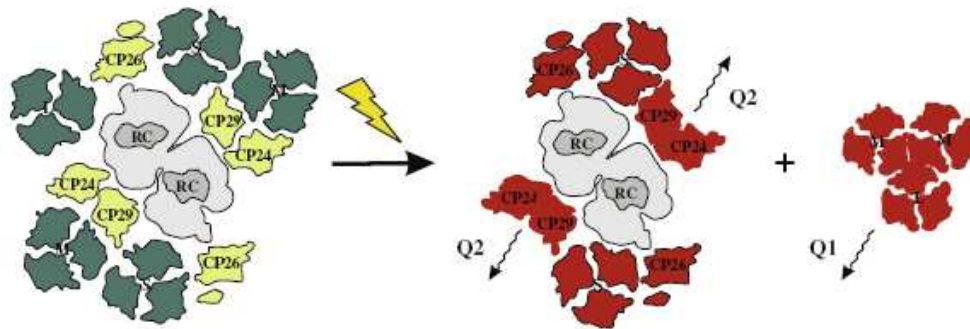


Abbildung 1: Modell zur vorgeschlagenen Lokalisation der mit NPQ assoziierten Quenching-Prozesse. Dargestellt ist die Anordnung und Zusammensetzung des PS II Superkomplexes im Dunkeladaptierten Zustand (links, modifiziert nach Dekker und Boekema, 2003) und im Lichtadaptierten 'NPQ'-Zustand (rechts). Die Bindung von Vx an den trimeren LHC II und die minore Antennen (CPs) im Dunkel ist durch die grüne und gelbe Färbung angezeigt, Zx-bindende LHC II-Trimere and minore CPs im Licht durch rote Färbung. Die Ausbildung der Quenching site Q1 benötigt PsbS, während die Bildung der Quenching site Q2 Zx-abhängig ist.

Aufgrund der Tatsache, dass der SFB 663 nicht weiter gefördert wurde, konnten im letzten Jahr nur die wichtigsten Untersuchungen abgeschlossen werden und daher nur ein kleiner Teil der für die zweite Förderperiode vorgesehenen Arbeiten durchgeführt werden. Wir haben uns dabei darauf konzentriert, die beiden Quenching sites Q1 und Q2 mit anderen methodischen Ansätzen näher zu charakterisieren. Ein limitierender methodischer Faktor zum detaillierten Verständnis der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen war, dass diese Messungen aufgrund der langen Messzeit von 30-40 min keine Informationen über die Kinetiken der Bildung und Relaxation von Q1 und Q2 lieferten. Aufgrund der strikten Abhängigkeit von Q1 vom PsbS Protein konnte allerdings spekuliert werden, dass die Bildung von Q1 in direktem Zusammenhang mit der qE-Komponente des NPQ steht, daher strikt durch den pH_{Lumen} reguliert wird und somit schnell (1-2 min) induzierbar und auch reversibel ist. Im Gegensatz dazu lässt die Zx-Abhängigkeit von Q2 eine langsamere Kinetik sowohl für die Induktion als auch die Relaxation vermuten, da die Bildung und der Abbau von Zx im Zeitbereich von etwa 10-30 min erfolgt. Um einen detaillierten Einblick in die Dynamik der beiden Quenching-Prozesse zu erlangen, wurde (unter gleichen experimentellen Bedingungen wie bei den zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen) die Dynamik des NPQ mit Hilfe eines PAM-Fluorometers untersucht und mit der Dynamik der Zx-Bildung und des Zx Abbaus verglichen.

In einer weiteren Arbeit bei der die Fluoreszenzkinetik an ganzen Zellen von zwei Diatomeen studierte wurde konnten wir zeigen, dass diese Organismen, die ganz andere Antennenkomplexe (sog. Fucoxanthin-Chlorophyll-Komplexe, FCPs) und auch andere Carotinoide im Xanthophyll-Zyklus aufweisen, ein sehr ähnliches NPQ-Prinzip aufweisen wie höhere Pflanzen, d.h. zwei Quenching-Sites und eine teilweise Abkoppelung eines Teils der PS II Antenne im NPQ-Zustand [^{2*}].

Dynamik des NPQ und Xanthophyllzyklus: Identifizierung einer Zx-abhängigen NPQ Komponente

In diesen Experimenten wurde die Kinetik der NPQ Induktion (während einer Belichtung von bis zu 90 min) und die Kinetik der anschließenden NPQ Relaxation (während einer anschließenden bis zu 180minütigen Dunkelphase) bestimmt und mit den entsprechenden Kinetiken der Zx-Bildung (während der Belichtung) und des Zx-Abbaus (im Dunkel) verglichen. Neben den in der Literatur bereits gut charakterisierten NPQ Komponenten qE (Energie-abhängiges Quenching, schnelle Induktion und Relaxation, jeweils im Zeitbereich von 1-2 min) und qI (Photoinhibition, Induktion und Relaxation im Zeitbereich von > 30 min) konnte anhand der durchgeführten Experimente und Analysen eine weitere NPQ Komponente, genannt qZ, identifiziert werden [^{3*}]. Die Induktion und Relaxation dieser Komponente erfolgt mit Kinetiken im Zeitbereich von 10-15 min in sehr guter kinetischer Korrelation mit der Bildung und dem Abbau von Zx.

Die vergleichende Analyse verschiedener *Arabidopsis* NPQ- Mutanten mit Wildtyp-Pflanzen belegte dabei, dass qZ unabhängig von qE, qI und auch qT (= state transitions) ist und somit eine eigenständige Zx-abhängige NPQ-Komponente darstellt. Bezogen auf das aus den zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen abgeleitete Modell (Abb. 1) ist es höchst wahrscheinlich, dass Q1 die qE-Komponente des NPQ widerspiegelt und Q2 die qZ-Komponente.

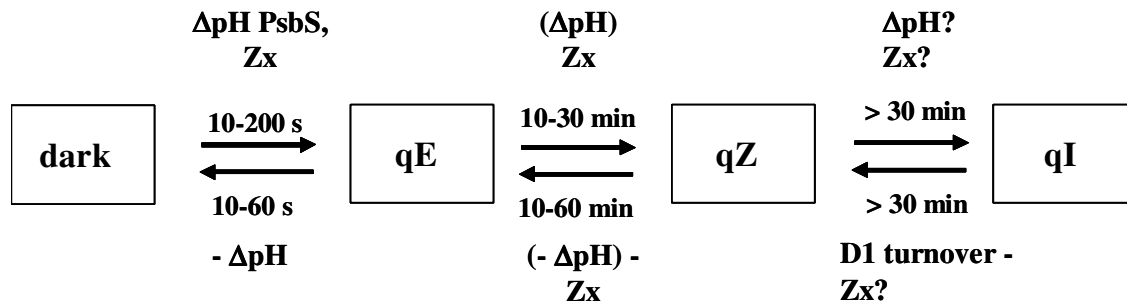


Abbildung 2. Modell für die Ausbildung unterschiedlicher NPQ Zustände unter Belichtung mit sättigenden Lichtintensitäten in *Arabidopsis*. Ausgehend vom Dunkeladaptierten Zustand wird zunächst qE in 10-200 s gebildet. qE ist strikt abhängig vom ΔpH und dem PsbS Protein, wird aber auch durch Z_x moduliert. In Dunkeladaptierten Pflanzen ist die Rate der Synthese von qE-aktivem Z_x der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Ausbildung des maximalen qE. qE ist reversibel mit Abbau des ΔpH . Bei längerer Belichtung wird im Zeitbereich von etwa 10 bis 30 min ein weiterer Z_x -abhängiger NPQ-Zustand (qZ) gebildet. Dieser hängt von der Bildung von Z_x aus langsam umwandelbarem V_x ab und damit auch indirekt vom ΔpH . Die Relaxation von qZ ist abhängig von der Rückumwandlung von Z_x und V_x (im Dunkel oder Schwachlicht) und bleibt somit auch noch nach dem Abbau des ΔpH bestehen. Zuletzt wird ein photoinhibitorischer NPQ-Zustand (qI) bei langanhaltender Belichtung (> 30 min) mit hohen Lichtintensitäten, für dessen Relaxation das D1 Protein abgebaut und neu synthetisiert werden muss. Die genaue Rolle von Z_x in qI ist noch unklar.

Die spektrale Charakteristik der verschiedenen NPQ Komponenten

Die PAM Fluorometrie erlaubt zwar die Charakterisierung und Unterscheidung unterschiedlicher NPQ-Komponenten anhand ihrer kinetischen Eigenschaften während der Induktion und Relaxation, ist allerdings methodisch eindeutig in der spektralen Auflösung limitiert. Das PAM Fluorometer misst typischerweise die Fluoreszenzemission bei Wellenlängen > 710 nm (Schreiber et al., 1986) und damit in einem Bereich mit reduziertem Anteil an PS II Fluoreszenz und einem relativ hohen Anteil an PSI Fluoreszenz, obgleich NPQ hauptsächlich Prozessen in PS II zugeordnet wird. Die von uns durchgeführten zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen zeigten jedoch, dass die Induktion des NPQ mit der Bildung einer neuen Komponente (Q1) mit erhöhter FR Fluoreszenzemission einhergeht [^{1*}]. Diese wäre ohne zusätzliche spektrale Informationen nur schwer auflösbar gewesen. Es war daher von großer Wichtigkeit, auch die Kinetiken der mit dem NPQ assoziierten spektralen Änderungen in der Fluoreszenz an *Arabidopsis*-Pflanzen unter *in vivo* Bedingungen zu charakterisieren. Zu diesem Zweck haben wir ein Multi-Wellenlängen-Spektrometer mit paralleler Detektion entwickelt, welches ermöglicht, den Zeitverlauf der Änderungen von Fluoreszenzspektren im Bereich von 670 bis 780 nm während der Induktion und Relaxation des NPQ mit hoher Empfindlichkeit zu messen [^{4*}]. Zusätzlich zu der zu erwartenden allgemeinen Abnahme der PS II Fluoreszenz (= Quenching) über das gesamte Spektrum, haben wir dabei zwei relative spektrale Änderungen detektiert, die spezifisch unter NPQ Bedingungen induziert wurden: (i) eine Abnahme der Hauptemissionsbande bei 682 nm relativ zum FR-Bereich (750-760 nm) des Spektrums (ΔF_{682}) und (ii) eine Zunahme bei 720-730 nm (ΔF_{720}) relativ zum FR-Bereich (Abb.3).

B2 Jahns/Holzwarth

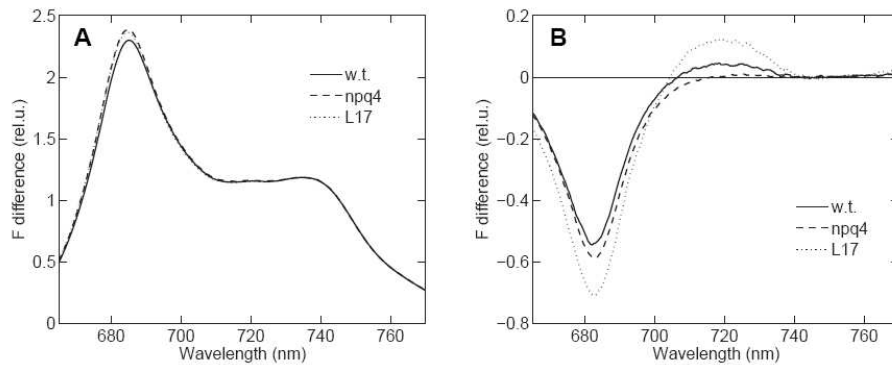


Abbildung 3. A, Fluoreszenzemissionsspektren Dunkeladaptierter Blätter von *Arabidopsis* Wildtyp (w.t.), *npq4* (kein PsbS Protein) und L17 (überexprimiertes PsbS Protein) Pflanzen, gemessen bei Raumtemperatur und normalisiert bei 750 nm. B, Differenzspektren (Licht minus Dunkel), die nach Messung der Spektren des Lichtadaptierten Zustandes nach 30 min Belichtung der Blätter mit sättigenden Lichtintensitäten ermittelt wurden.

Die Analyse der Kinetiken dieser beiden relativen spektralen Änderungen und deren Abhängigkeit von verschiedenen Mutanten ergab zweifelsfrei, dass ΔF_{682} und ΔF_{720} nicht auf den gleichen Prozess zurückzuführen sind, sondern sich mindestens zwei unabhängigen Prozessen zuzuordnen sind. ΔF_{720} war strikt abhängig vom PsbS Protein, und ließ sich der schnell reversiblen qE-Komponente des NPQ zuordnen (Abb. 4). In Anlehnung an unser NPQ-Modell (Abb. 1) können diese Änderungen im FR eindeutig dem Quenching-Prozess Q1 zugeschrieben werden und damit der pH-regulierten Ablösung von Teilen des LHCII von PSII. ΔF_{682} wird dagegen durch qE- und PsbS-unabhängige, aber Zx-abhängige Prozesse induziert und spiegelt zumindest teilweise das Quenching an Q2 wider.

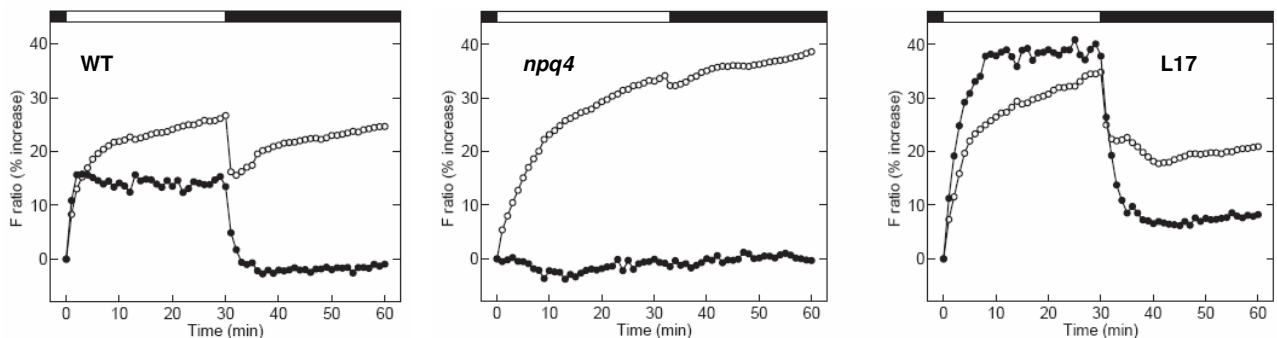


Abbildung 4. Zeitverlauf der Änderungen der Verhältnisse der Fluoreszenz bei 750 und 682 nm (F_{750}/F_{682}) (weiße Symbole) sowie bei 720 und 750 nm (F_{720}/F_{750}) (schwarze Symbole) während der Belichtung (620 nm, 600 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und anschließender Dunkelphase in Blättern von *Arabidopsis* Wildtyp (w.t.), *npq4* (kein PsbS Protein) und L17 (überexprimiertes PsbS Protein) Pflanzen. Die Verhältnisse sind als prozentualer Anstieg relativ zum dunkeladaptierten Zustand angegeben. Zur besseren Erkennbarkeit wurden die Werte für F_{720}/F_{750} mit dem Faktor 4 multipliziert.

Darüber hinaus konnten wir anhand der durchgeführten Messungen Hinweise auf einen dritten, neuen Quenching-Prozess erlangen. Dieser Prozess war unabhängig von PsbS und Zx, wurde durch eine hohe Turnover-Rate von PSII aktiviert und wies Induktions- bzw. Relaxationskinetiken im Zeitbereich von wenigen Minuten auf. Wir spekulieren, dass diese Komponente Quenching-Prozesse im Reaktionszentrum von PSII widerspiegelt [4*].

Quenching-Studien an isolierten LHCII Antennenkomplexen

Es war eine seit langer Zeit diskutierte Frage ob die sog. „oligomeren LHCII Komplexe“ gute Modelle für das *in vivo* NPQ-Quenching darstellen oder nicht (Horton et al., 2001, 2006). Wir haben daher zur Klärung dieser Frage verschiedene ultraschnelle spektroskopische Studien an solchen Komplexen durchgeführt. In der ersten Arbeit konnten wir zeigen dass die isolierten „oligomeren LHCII Komplexe“ tatsächlich sehr große Ähnlichkeit in ihren spektroskopischen Eigenschaften (z.B. ausgeprägte fernrote FR Fluoreszenz und sehr ähnliches kinetisches Verhalten) aufweisen wie die Q₁ NPQ-Komponente in den intakten Blättern von Arabi-

dopsis (Abb. 1). Wir kamen daher zu der Schlussfolgerung dass diese stark gelöschten LHCII Komplexe ein sehr gutes Modell für das *in vivo* NPQ-Quenching darstellen, obwohl natürlich ein erheblicher Unterschied zur *in vivo* Situation besteht, da diese LHCII- Oligomere kein PsbS aufweisen, das ja *in vivo* zwingend am Löschprozess beteiligt ist. Die kinetische Analyse der zeitaufgelösten Fluoreszenzdaten wies bereits auf die Bildung eines sog. Charge-Transfer-Zustandes (CT-Zustand) als Löschmechanismus hin [^{5*}]. In einer zweiten Arbeit haben wir mittels Femtosekunden-Absorptions-Spektroskopie nachgewiesen dass der Quench-Prozess in diesen LHCII Oligomeren tatsächlich die Bildung eines CT-Zustandes involviert [^{6*}] und dass ein Energietransfer von angeregtem Chl zu Carotinoiden definitiv ausgeschlossen werden kann. Ein solcher Energietransfer war z.B. von Ruban et al. (2007) als Löschprozess vorgeschlagen worden. In weitere zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen bei Tieftemperatur sowohl an oligomeren LHCII Komplexen als auch an LHCII Kristallen (in Zusammenarbeit mit der AG Kühlbrandt, MPI Biophysik, Frankfurt) konnten dann weitere eindeutige Beweise für das Auftreten von CT-Zuständen in den stark gelöschten LHCII-Komplexen erbracht werden (Ostroumov et al., Arbeit in Vorbereitung zur Publikation).

Dynamik der angeregten Zustände von isolierten Carotinoiden

In einem weiteren Unterprojekt war das Ziel die anomalen elektronisch angeregten „Dunkelzustände“ und ihre Relaxationsdynamik in isolierten Carotinoiden zu studieren. Der Zusammenhang mit den o.g. Arbeiten war durch die in der Literatur bevorzugte Hypothese gegeben, dass die Löschprozesse im NPQ durch Wechselwirkungen von Carotinoiden mit den Chlorophyllen zustande kommen. Es war daher von zentraler Bedeutung, die sehr komplexen angeregten Zustände von Carotinoiden - über die in der Literatur eine sehr kontroverse Debatte geführt wird (Polivka und Sundström, 2009) - und deren Relaxationsprozesse im Detail zu charakterisieren. Wir konnten erstmals zeigen dass in Lutein und β -Carotin i) die $^1B_u^+$ - und $^1B_u^-$ -Zustände tatsächlich sehr eng bei einander liegen, und ii) eine dynamische Kreuzung aufweisen. Dies führt bei Anregung mit Femtosekunden-Impulsen unter bestimmten Bedingungen zu kohärenten Oszillationen [^{7*}]. Erstmals konnte damit der $^1B_u^-$ -Zustand eindeutig in der Umgebung des $^1B_u^+$ -Zustandes spektroskopisch nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten wir in einer weiteren Arbeit zeigen dass die anderen sehr kontrovers diskutierten „Dunkelzustände“, wie z.B. der früher postulierte S^* -Zustand (Polivka und Sundström, 2009), in β -Carotin keinen eigenen separaten elektronischen Zustand darstellen, sondern in seinen spektroskopischen und dynamischen Eigenschaften vollständig durch einen vibratorisch angeregten $S_1 A_g$ -Zustand beschrieben werden kann [^{8*}]. Es wäre auf Grund unserer Resultate ohne weiteres möglich dass z.B. der ansonsten als Dunkelzustand charakterisierte $^1B_u^-$ -Zustand eine bedeutende Rolle beim Energietransfer und eventuell auch beim Quenching spielen könnte. In zwei weiteren Arbeiten zu isolierten Carotinoiden konnten wir die ultraschnelle Relaxationsdynamik von Carotinoiden mit phenolischen und chinoiden Endgruppen charakterisieren [^{9,10*}].

Weiterführende vorgesehene Arbeiten

AG Jahns

Neben den oben beschriebenen Untersuchungen, konnte eine tiefer gehende Charakterisierung der NPQ-Mechanismen mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie aus Zeitgründen im Rahmen der 1jährigen Auslauffinanzierung des TP nicht mehr weiter verfolgt werden.

Mit den im Antrag formulierten geplanten molekularbiologischen Arbeiten zur Herstellung weiterer Mutanten wurde begonnen. Insbesondere wurden Mutanten miteinander gekreuzt, die Defekte in einzelnen Genen aufweisen, die für die verschiedenen PSII Antennenproteine codieren. Auf diesem Weg sollen in Zukunft eine Vielzahl von Mehrfachmutanten hergestellt werden, die Defekte in mehreren Antennenproteinen des PSII aufweisen. An diesen Mutanten soll letztendlich die Lokalisation der einzelnen Quenching-Prozesse verifiziert werden und die Auswirkungen des Fehlens von spezifischen Antennenproteinen und damit potentiellen „quenching sites“ für die Regulation der Energiedissipation und die Photoprotektion untersucht werden.

Mit der Herstellung von Arabidopsis-Mutanten, die einzelne, mit einem spezifischen Protein-Anhang verknüpfte Antennenproteine überexprimieren wurde ebenfalls begonnen. Die geplanten Arbeiten in Zusammenarbeit mit TP A7 (Lubitz) zur Charakterisierung der Chlorophyll und Carotinoid-Triplettzustände in isolierten Antennenkomplexen mittels EPR-Spektroskopie konnten allerdings aus Zeitgründen nicht mehr angegangen werden.

AG Holzwarth

Ein vorgeschlagener *in vivo* Quench-Mechanismus involviert die Bildung eines Carotinoid-Kation-Radikals in einem PSII Antennenkomplex (Holt et al., 2005). Solche Radikale können nicht über Fluoreszenz sondern nur über transiente Absorptions-Detektion (TA) nachgewiesen werden. Um diese Hypothese zu prüfen haben wir umfangreiche Arbeiten durchgeführt um eine Methode zu entwickeln die es gestattet mittels Femtosekunden-TA an intakten Blättern die Bildung des NPQ-Zustandes zu verfolgen und die transienten Spektren der auftretenden Intermediate zu messen. Dies ist wegen der sehr ungünstigen optischen Eigenschaften eines Blattes, wie z.B. sehr hohe optische Dichte, sehr hohe Streuung, und der Probleme mit Singlett-Singlett-Annihilation, ein außerordentlich komplexes Problem. Wir konnten jedoch erhebliche Fortschritte mit der Entwicklung dieser Methode erzielen, die es uns in Zukunft erlauben werden, solche Messungen an intakten Blättern durchzuführen und die Intermediate zu charakterisieren. Auf Grund der fehlenden Personalmittel in der Auslaufphase des SFB konnten diese Arbeiten jedoch nicht mehr ganz zu einem erfolgreichen Abschluss gebracht werden. Wir planen uns in Zukunft in einem gemeinsamen Einzelprojekt auf diese Arbeiten mittels Femtosekunden-TA an intakten Blättern zu konzentrieren da dies unserer Meinung nach die vielversprechendste Methode ist, den Löschmechanismus *in vivo* aufzuklären. Weiterhin wurden zeitaufgelöste Fluoreszenz-Kinetiken an intakten Blättern einer größeren Zahl von Arabidopsis-Carotinoid-Mutanten durchgeführt, die sehr interessante Ergebnisse im Hinblick auf den Quench-Mechanismus ergaben, aber leider aus Zeit- und Personalmangel bisher ebenfalls nicht ganz abgeschlossen werden konnten. Es ist geplant diese ebenfalls im Rahmen eines Einzelantrages weiter zu bearbeiten. Aus der Gesamtheit der zeitaufgelösten Fluoreszenz-Messungen an intakten Blättern ergab sich dass diese Methode tatsächlich extrem leistungsfähig ist für die Charakterisierung der *in vivo* NPQ-Mechanismen. Es ist jedoch in Zukunft notwendig die Messzeit erheblich zu verkürzen um auch Zwischenzustände des NPQ erfassen zu können. Dies wäre z.B. mittels einer parallelen Mehrwellenlängen-Detektion möglich. Eine entsprechende Apparatur ist geplant und die Messungen sollten ebenfalls im Rahmen eines Einzelantrages gemeinsam mit der AG Jahns durchgeführt werden. Besonders leistungsfähig in dieser Hinsicht wäre die Kombination dieser Methode mit der oben beschriebenen Femtosekunden-TA an intakten Blättern.

Referenzen:

- Avenson TJ, Ahn TK, Niyogi KK, Ballottari M, Bassi R, Fleming GR (2009) Lutein can act as a switchable charge transfer quencher in the CP26 light-harvesting complex. *J Biol Chem* 284: 2830-2835
- Briantais J-M, Veronotte C, Picaud M, Krause GH (1979) A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 548: 128-138
- Dekker, J. P. & Boekema, E. J. (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta* 1706: 12-39
- Demmig-Adams B, Adams WWI (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 599-626
- Demmig B, Winter K, Krüger A, Czygan F-C (1987) Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light. *Plant Physiol* 84: 218-224
- Frank HA, Bautista JA, Josue JS, Young AJ (2000) Mechanism of nonphotochemical quenching in green plants: Energies of the lowest excited singlet states of violaxanthin and zeaxanthin. *Biochemistry* 39: 2831-2837
- Holt NE, Zigmantas D, Valkunas L, Li XP, Niyogi KK, Fleming GR (2005) Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. *Science* 307: 433-436
- Horton P, Ruban AV, Rees D, Pascal AA, Noctor G, Young AJ (1991) Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHCII chlorophyll protein complex. *FEBS Lett* 292: 1-4
- Horton P, Ruban AV, Walters RG (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 655-684
- Jahns P, Latowski D, Strzalka K (2009) Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochim Biophys Acta* 1787: 3-14
- Krause GH, Jahns P (2004) Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function. In GC Papageorgiou, Govindjee, eds *Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 463-495

- Li X-P, Björkman O, Shih C, Grossman AR, Rosenquist M, Jansson S, Niyogi KK (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403: 391-395
- Li XP, Gilmore AM, Caffarri S, Bassi R, Golan T, Kramer D, Niyogi KK (2004) Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. *J Biol Chem* 279: 22866-22874
- Miloslavina Y, Wehner A, Lambrev PH, Wientjes E, Reus M, Garab G, Croce R, Holzwarth AR (2008) Far-red fluorescence: A direct spectroscopic marker for LHCII oligomer formation in non-photochemical quenching. *FEBS Lett* 582: 3625-3631
- Niyogi KK (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 333-359
- Niyogi KK, Grossman AR, Björkman O (1998) Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10: 1121-1134
- Niyogi KK, Li XP, Rosenberg V, Jung HS (2005) Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *J Exp Bot* 56: 375-382
- Polivka T und Sundström V (2009) Dark excited states of carotenoids: Consensus and controversy. *Chem Phys Lett* 477: 1-11.
- Ruban AV, Berera R, Ilioaia C, van Stokkum IHM, Kennis JTM, Pascal AA, van Amerongen H, Robert B, Horton P, van Grondelle R (2007) Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature* 450: 575-578
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosyn Res* 10: 51-62
- Wraight CA, Crofts AR (1970) Energy-dependent quenching of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. *Eur J Biochem* 17: 319-327
- Yamamoto HY, Nakayama TOM, Chichester CO (1962) Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Arch Biochem Biophys* 97: 168-173

6.2.2 Aus dem Teilprojekt entstandene Publikationen

a) Begutachtete Veröffentlichungen

- [1*] Holzwarth AR, Miloslavina Y, Nilkens M and Jahns P (2009) Identification of Two Quenching Sites Active in the Regulation of Photosynthetic Light-Harvesting. *Chem Phys Lett* 483: 262-267.
- [2*] Miloslavina Y, Grouneva I, Lambrev PH, Lepetit B, Goss R, Wilhelm C and Holzwarth AR (2009) Ultrafast Fluorescence Study on the Location and Mechanism of Non-Photochemical Quenching in Diatoms. *Biochim Biophys Acta* 1787: 1189-1197.
- [3*] Nilkens M, Kress E, Lambrev P, Miloslavina Y, Müller M, Holzwarth AR and Jahns P (2010) Identification of a Slowly Inducible Zeaxanthin-Dependent Component of Non-Photochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence Generated Under Steady State Conditions in *Arabidopsis*. *Biochim Biophys Acta-Bioenergetics* 1797: 466-475.
- [4*] Lambrev PH, Nilkens M, Miloslavina Y, Jahns P and Holzwarth AR (2010) Kinetic and Spectral Resolution of Multiple Non-Photochemical Quenching Components in *Arabidopsis* Leaves. *Plant Physiol* 152: 1611-1624.
- [5*] Miloslavina Y, Wehner A, Wientjes E, Reus M, Lambrev P, Garab G, Croce R and Holzwarth AR (2008) Far-Red Fluorescence: A Direct Spectroscopic Marker for LHCII Oligomers Forming in Non Photochemical Quenching. *FEBS Lett* 582: 3625-3631.
- [6*] Müller MG, Lambrev P, Reus M, Wientjes E, Croce R and Holzwarth AR (2010) Singlet Energy Dissipation in Photosystem II Light-Harvesting Complex Does Not Involve Energy Transfer to Carotenoids. *ChemPhysChem* 11: 1289-1296.
- [7*] Ostroumov E, Müller MG, Marian CM, Kleinschmidt M and Holzwarth AR (2009) Electronic Coherence Provides a Direct Proof for Energy-Level Crossing in Photoexcited Lutein and β -Carotene. *Phys Rev Lett* 103: 108302-1-108302-4.
- [8*] Ostroumov EE, Müller M, Reus M and Holzwarth AR (2010) On the Nature of the "Dark S*" Excited State of B-Carotene. *J Phys Chem B in print*.

**B2
Jahns/Holzwarth**

- [9*] Ostroumov E, Müller MG, Hundsdörfer C, Stahl W, Marian CM and Holzwarth AR (2010) Excited State Relaxation Dynamics and Electronic Properties of a Quinoid Carotenoid. *Chem Phys* 373: 137-144.
- [10*] Marian CM, Kock SC, Hundsdörfer C, Martin H-D, Stahl W, Ostroumov E, Müller M and Holzwarth AR (2009) Spectroscopic Properties of Phenolic and Quinoid Carotenoids: A Combined Theoretical and Experimental Study. *Photochem Photobiol Sci* 8: 270-278.
- [11*] Casazza AP, Szczepaniak M, Müller MG, Zucchelli G and Holzwarth AR (2010) Energy Transfer Processes in the Isolated Core Antenna Complexes CP43 and CP47 of Photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1797: 1606-1615.
- [12*] Slavov C, Mansurova M, Holzwarth AR and Gärtner W (2010) Excited State Processes in 1-Deazariboflavin Studied by Ultrafast Fluorescence Kinetics. *Photochem Photobiol* 86: 31-38.
- [13*] Szczepaniak M, Sander J, Nowaczyk M, Müller MG, Rögner M and Holzwarth AR (2009) Charge Separation, Stabilization, and Protein Relaxation in Photosystem II Core Particles With Closed Reaction Center. *Biophys J* 96: 621-631.
- [14*] Martinez-Junza V, Szczepaniak M, Braslavsky SE, Sander J, Nowaczyk M, Rögner M and Holzwarth AR (2008) A Photoprotection Mechanism Involving the D₂ Branch in Photosystem II Cores With Closed Reaction Centers. *Photochem Photobiol Sci* 7: 1337-1343.
- [15*] Slavov C, Ballottari M, Morosinotto T, Bassi R and Holzwarth AR (2008) Trap-Limited Charge Separation Kinetics in Higher Plant Photosystem I Complexes. *Biophys J* 94: 3601-3612.
- [16*] Szczepaniak M, Sugiura M and Holzwarth AR (2008) The Role of TyrD in the Electron Transfer Kinetics in Photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1777: 1510-1517.

6.3 Rückblick auf die Förderung

Das Teilprojekt wurde vom 1.7.2009 bis zum 30.6.2010 als Auslauffinanzierung im Sonderforschungsbereich 663 gefördert. Es wird mit Ablauf der zu Ende gehenden Förderperiode beendet.

6.3.1 Personal im Teilprojekt während der zu Ende gehenden Förderperiode

AG Jahns

	laufende Nummer	Name, akademischer Grad, Dienststellung	engere Fachzugehörigkeit	Institut der Hochschule oder der außeruniversitären Einrichtung	Mitarbeit im Projekt in Wochenstunden	Entgeltgruppe
Grundausrüstung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	1	P. Jahns, Prof. Dr.	Biochemie der Pflanzen	Biochemie der Pflanzen	10	
Nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter	2	D. Leiser		Biochemie der Pflanzen	39.8	
Ergänzungsausrüstung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	3	M. Nilkens	Biologie	Biochemie der Pflanzen	19.9	E 13/2
	4	N. Schwarz	Biologie	Biochemie der Pflanzen	19.9	E 13/2
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter						

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Grundausrüstung):

1. Peter Jahns

Projektleitung des biochemisch-physiologischen Teils des Projektes. Betreuung der Mitarbeiter bei der Durchführung der Experimente und Vorbereitung der Publikationen. Koordination der wissenschaftlichen Kooperationen. Mitarbeit bei der Optimierung neu zu entwickelnder Methoden.

2. Dagmar Leiser

Unterstützung bei allen anfallenden Routinearbeiten in der AG Jahns, insbesondere bei Anzucht und Vermehrung der Pflanzen, der Isolation, Kreuzung und Vermehrung der verschiedenen Mutantenlinien sowie der Durchführung von biochemisch-physiologischen und molekularbiologischen Routinearbeiten.

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Ergänzungsausstattung):

3. Manuela Nilkens

Mitarbeit vom 1.7.2009 bis 31.3.2010. Durchführung der biochemisch-physiologischen Arbeiten zur Charakterisierung der verschiedenen Mutantenlinien in der AG Jahns. Mithilfe bei der experimentellen Durchführung der spektroskopischen Messungen. Koordination der Arbeiten zur Kreuzung und Vermehrung der einzelnen Mutantenlinien. Koordination der Bereitstellung von Pflanzenmaterial für die spektroskopischen Messungen in Kooperation mit der AG Holzwarth.

4. Nadine Schwarz

Mitarbeit vom 1.4.2010 bis 30.6.2010. Durchführung der molekularbiologischen Experimente zur Herstellung von *Arabidopsis*-Mutanten mit modifizierten Antennenproteinen, sowie der Überexpression rekombinanter Antennenproteine.

AG Holzwarth

	laufende Nummer	Name, akademischer Grad, Dienststellung	engere Fachzugehörigkeit	Institut der Hochschule oder der außeruniversitären Einrichtung	Mitarbeit im Projekt in Wochenstunden	Entgeltgruppe
Grundausrüstung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	1	Alfred R. Holzwarth, Prof. Dr.	Biophysik	MPI Bioanorganische Chemie	10	
	2	Marc G. Müller, Dr.	Biophysik	MPI Bioanorganische Chemie	15	
Nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter	3	Michael Reus		MPI Bioanorganische Chemie	7	
Ergänzungsausrüstung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	4	E. Ostroumov	Physik/Biophysik	MPI Bioanorganische Chemie	19.9	E 13/2
	5	P. Lambrev, Dr.	Biophysik	MPI Bioanorganische Chemie	39	Postdoc-Stipendium
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter						

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Grundausrüstung):

1. Alfred Holzwarth

Projektleitung des biophysikalischen und spektroskopischen Teils des Projektes. Betreuung der Mitarbeiter bei der Durchführung der Experimente und Vorbereitung der Publikationen. Koordination der wissenschaftlichen Kooperationen. Mitarbeit bei der Optimierung neu zu entwickelnder Methoden.

2. Marc Müller

Femtosekunden-Transienten-Absorptions-Messungen an oligomeren LHCII-Komplexen. Analyse und Interpretation der Femtosekunden-Daten. Entwicklung der Femtosekunden-TA-Methode an intakten Blättern. Mitarbeit an den Femtosekunden-Messungen an isolierten Carotinoiden

3. Michael Reus

Isolierung von Antennenkomplexen, insbesondere LHCII, und deren biochemische Charakterisierung. Herstellung und Charakterisierung von oligomeren LHCII Komplexen. Reinigung von Carotinoiden mittels HPLC und Probenvorbereitung für ultraschnelle Messungen.

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Ergänzungsausstattung):

4. Evgeny Ostroumov

Mitarbeit vom 1.7.2009 bis 30.6.2010. Femtosekunden-TA-Studien an isolierten Carotinoiden und theoretische Beschreibung der kohärenten Oszillationen im Rahmen seiner Dissertation. Theoretische Beschreibung der Relaxationsdynamik von angeregten Carotinoiden im Rahmen der Redfield-Theorie. Durchführung von zeitaufgelösten Fluoreszenz-Messungen an oligomeren LHCII-Komplexen und an LHCII Kristallen bei Tieftemperatur sowie die Interpretation der entsprechenden Daten im Rahmen des Charge-Transfer-Modells.

5. Petar Lambrev

Mitarbeit vom 1.7.2009 bis 30.9.2009. Durchführung von zeitaufgelösten Fluoreszenz-Messungen an isolierten Antennenkomplexen und oligomeren LHCII-Komplexen. Entwicklung der Mehr-Wellenlängen-Detektion für die Fluoreszenz-Induktion und Charakterisierung des NPQ-Verhaltens an intakten Blättern von Mutanten mit dieser neu entwickelten Methode.

6.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt B3

6.1.1 Titel: Schwingungsspektroskopische Untersuchungen an Flavin-haltigen biomimetischen Systemen

6.1.2 Projektleitung

Prof. Dr. Wolfgang Gärtner

Max-Planck-Institut für bioorganische Chemie
(vorm Strahlenchemie)

Stiftstr. 34-36

D-45470 Mülheim

Tel.: 0208-3063693, Fax: 0208-3063951

Email: gaertner@mpi-muelheim.mpg.de

geb. 03.01.1951

Aktuelle Angaben Prof. Heberle: Experimentelle Molekulare Biophysik, Fachbereich Physik, FU Berlin,
Telefon: 030-838 53337, e-mail: jheberle@zedat.fu-berlin.de

6.2 Entwicklung des Teilprojekts

6.2.1 Bericht

Vorbemerkung

Das Teilprojekt (TP) B3 war ursprünglich als gemeinsamer Antrag zweier Arbeitsgruppen formuliert worden, Prof. Dr. J. Heberle, seinerzeit FZ Jülich, und Prof. Dr. Wolfgang Gärtner, Max-Planck-Institut für Bioorganische Chemie, Mülheim. Im Verlauf der Förderung dieses Projekts erhielt Prof. Heberle nach einander Rufe an die Universität Bielefeld und an die FU Berlin, die er jeweils annahm. Entsprechend gestalteten sich gemeinsame Experimente schwierig, so dass für die Zeit ab Beginn 2008 stärkere Kooperationen zur AG Prof. C.M. Marian, Theoretische Chemie, Univ. Düsseldorf, aufgebaut wurden.

Förderzeitraum: Das Projekt B3 wurde nach Auslaufen der Förderperiode 7/2005 – 6/2009 für weitere sechs Monate gefördert (Ende 12/2009).

Zusammenfassung

Im TP B3 wurden durch chemische Synthese strukturell und elektronisch modifizierte Flavinderivate hergestellt und nach Etablierung eines Chromophor-Austauschprotokolls in die LOV Domäne des Blaulicht-(BL-) Photorezeptors YtvA aus *Bacillus subtilis* eingebaut. Ein Vergleich beider Meßreihen macht den Einfluss der Proteinumgebung auf die photophysikalischen/photochemischen Eigenschaften deutlich. Die photochemischen Eigenschaften dieser Verbindungen wurden sowohl in wässriger Lösung als auch in der Proteinumgebung charakterisiert. Für Isotopen-markierte Flavine wurden Ramanspektren aufgenommen, wobei die Isotopenmarkierung der Banden-Zuordnung diente. Die experimentellen Arbeiten wurden durch quantenchemische Berechnungen begleitet.

Einleitung

Das TP B3 beinhaltete Arbeiten über die photochemischen Aktivität von Flavinderivaten, die in mehreren photochemisch aktiven Proteinen als Chromophore identifiziert worden waren.(3) Arbeiten an diesen Flavin-haltigen, Blaulicht- (BL-) sensitiven Photorezeptoren wurden zum Beginnzeitpunkt dieses Teilprojekts von einer Reihe von internationalen Arbeitsgruppen auf der Proteinseite durchgeführt (sequenzielle Identifizierung und Darstellung rekombinanter Proteine, gerichtete Mutagenese, spektroskopische und kinetische Charakterisierung). In Deutschland wurden die meisten dieser proteinchemischen Untersuchungen im Rahmen der FOR526 gefördert. Die Flavinchemie war international in den 1960'er Jahren stark betrieben worden (Riboflavin wirkt als Vitamin B2). Mit Identifizierung von FMN und FAD (FMN, Flavinmononukleotid, FAD, Flavin-Adenin-Dinukleotid) als Chromophore in BL-sensitiven Photorezeptoren Anfang der 1990'er Jahre entstand erneut Bedarf an modifizierten Flavinen, um deren photochemi-

sche Eigenschaften genauer zu untersuchen. Außerdem zeigte sich, dass die Struktur von Schwingungsspektren dieser Chromoproteine auf Grund von energetischer Kopplung sehr komplex ist, so dass gezielt Isotopen-markierte Verbindungen benötigt wurden.

Unter den charakterisierten BL-Rezeptorfamilien, Cryptochrome, Phototropine und BLUF-Proteine,(2) ist die Phototropinfamilie am häufigsten in Pflanzen und Mikroorganismen vertreten.(1;7) Phototropine absorbieren Licht mittels eines in eine LOV-Domäne (LOV, light, oxygen, voltage) nicht-kovalent eingelagerten FMN-Chromophors. Photochemische Anregung des Flavins führt zur Bildung der Triplettform, aus der heraus mit einer Zeitkonstante von ca. 3 μ s eine kovalente Bindung zu einer Cysteinseitenkette des Proteins ausgebildet wird „Photoprodukt“). Dieser Zustand wird als die signalgebende Form von LOV-Domänen angesehen.(6) Die Absorptionsbande des Flavins wird wie in Wasser auch im Protein durch Wasserstoffbrückenbindungen geprägt und zeigt eine $S_1 \leftarrow S_0$ Absorption bei 445 nm und eine zweite $S_2/S_3 \leftarrow S_0$ bei 375/355 nm, wobei die Lage der langwelligen kaum, die der kurzwelligen Absorptionsbande dagegen stark vom Wasserstoffbrücken-Netzwerk beeinflusst wird.(13) Das Maximum der Fluoreszenz liegt bei 500 nm.(8)

Projektbeschreibung

Synthesen für Flavinderivate sind umfangreich beschrieben, wobei aber der Routine-Syntheseweg jeweils nach Art der Modifikation abzuwandeln ist. In der Arbeitsgruppe war vor Beginn der durch den SFB geförderten Untersuchungen keine Expertise zur Flavinsynthese vorhanden. Die synthetischen Arbeiten wurden durch Dr. Madina Mansurova ausgeführt, die auch für die spektroskopische Charakterisierung zuständig ist. Für die geplanten Untersuchungen wurden zunächst zwei sterisch und zwei elektronisch modifizierte Flavinderivate synthetisiert: 8-Isopropyl- und 7,8-didemethyl FMN sowie 1- bzw. 5-Deaza-FMN (Fig. 1). Flavinsynthesen beginnen in den meisten Fällen mit einem entsprechend substituierten Anilin, an das die Ribitylkette ankondensiert wird (Erzeugung einer Schiff Base mit nachfolgender NaBH_4 -Reduktion). Die Synthese wird vervollständigt durch Kupplung mit entsprechenden Uracilderivaten und dem abschließenden Ringschluss an Position 5.(9)

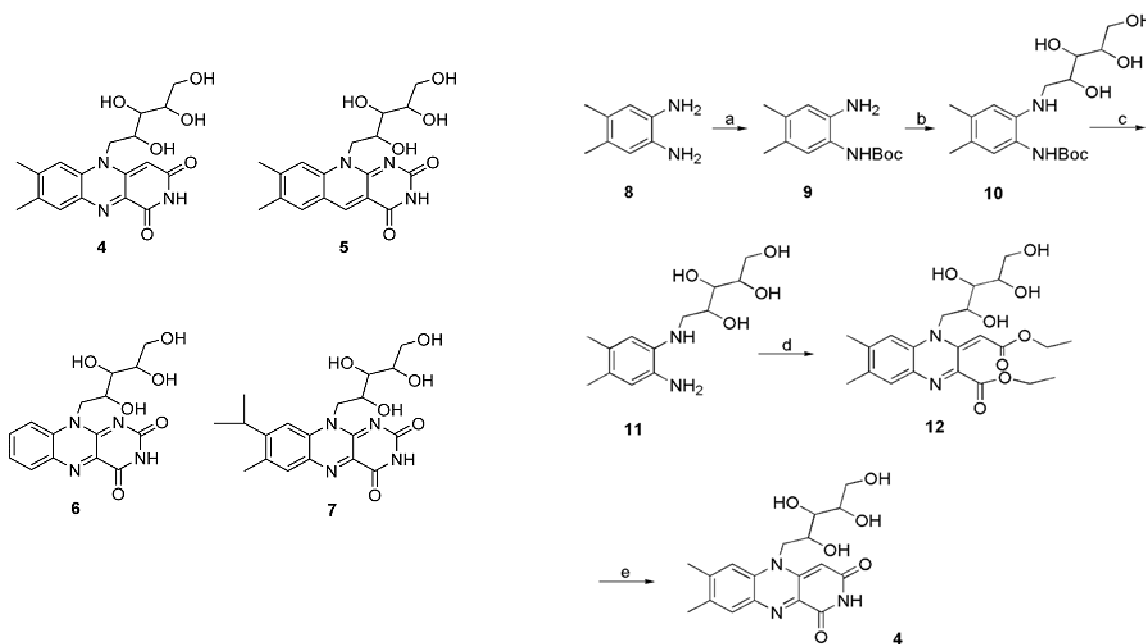


Fig. 1 Strukturformeln der modifizierten Flavine und Syntheseweg für 1-Deaza-Riboflavin

Synthese und Untersuchung der spektroskopischen Eigenschaften in wässrigen Lösungen: Die Synthese dieser vier Verbindungen gelang mit guten Ausbeuten, wobei besonders bezüglich der beiden Deaza-Derivate Änderungen der „Standardsynthese“ ausgearbeitet werden mussten (Fig. 1).(9) Die Eigenschaften der synthetisierten Verbindungen in wässrigen Lösungen wurden in Form der Riboflavine (RF) im Vergleich zu RF untersucht. Hier zeigte sich der elektronische Einfluss der Deaza-Substitution deutlich: 1-Deaza-RF weist ein stark bathochrom verschobenes Absorptionsmaximum auf ($\lambda_{\text{max}} = 537$ nm), während 5-Deaza-RF ein hypsochromes Absorptionsmaximum zeigt ($\lambda_{\text{max}} = 400$ nm). Die beiden alkylmodifizierten Flavine wiesen ein der Referenzverbindung RF vergleichbares Absorptionsverhalten mit etwas kurzwelligen Maxima auf (Tabelle 1). Darüber hinaus wurde für 1-Deaza-RF ein Extinktionskoeffi-

zient von ca. $6800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt, während die drei anderen Derivate einen RF-vergleichbaren Extinktionskoeffizient ($12500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) aufwiesen.

Tabelle 1: Extinktionskoeffizienten, Absorptionsmaxima und mid-point Potential modifizierter Flavine (nach Mansurova et al., 2008)

Sample	E_{av} (mV) (vs. Ag/AgCl)	λ_{max} , nm	ϵ_{max} , $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
1-deazariboflavin	-265±53	537	6800
5-deazariboflavin	-247±24	400	12500
7,8-didemethylriboflavin	-203±32	436	12500
8-isopropylriboflavin	-168±20	448	12500
riboflavin	-208±12	450	12500

Die steady-state und zeitaufgelösten spektroskopischen Charakterisierungen wurden in meiner Arbeitsgruppe, aber in Kooperation mit der AG Marian durchgeführt, die theoretische Rechnungen an diesen Verbindungen durchführte (ref); (für eine detailliertere Beschreibung der theoretischen Arbeiten s. Salzmann et al.).(11;12) Auch hier zeigte sich der Effekt der elektronischen Veränderung, insbesondere am 1-Deaza-RF. Diese Verbindungen zeigte weder unter Standardbedingungen eine messbare Fluoreszenz noch die Ausbildung eines Triplettzustands. Eine geringe Fluoreszenz konnte nur mittels ps-Zeitauflösung nachgewiesen werden (Koop. AG Holzwarth).(14) Das Fehlen eines bevölkerten Triplett-Zustands steht in Einklang mit quantenchemischen Rechnungen, in denen kein Schnittpunkt der Hyperflächen des angeregten Singulett- und des Triplettzustands gefunden wurde. Im Gegensatz dazu zeigt 5-Deaza-RF eine erhöhte Fluoreszenz- und Triplettausbeute. Der Triplettzustand von 5-Deaza-RF zerfiel mit $14 \mu\text{s}$ deutlich schneller als die beiden Alkylderivate und RF selbst, die alle Zerfallszeiten im Bereich von $20 - 25 \mu\text{s}$ aufwiesen.(12)

Die beiden alkyl-modifizierten Derivate verhielten sich bei diesen Messungen in wässriger Lösung wie die Vergleichsverbindung RF, allerdings zeigte die di-Demethylverbindung eine geringere Triplettquantenausbeute ($\Phi_{Tr} = 0.23$ gegenüber ca. $\Phi_{Tr} = 0.6$ für RF).

Neben den photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften wurden auch die Redox-Mittelpotentiale mittels potentiometrischer Titration bestimmt. Im Vergleich zum Literaturwert für RF (-208 mV), das als Referenzsubstanz eingesetzt wurde, bestimmten wir folgende Potentiale: Di-demethyl-RF: -203 mV, 8-*ipr*-RF: -168 mV, 1-deaza-RF: -265 mV, 5-deaza-RF: -247 mV. Auch hier wirkt sich der Austausch des Stickstoffs gegen eine Methingruppe für beide Positionen stark auf das Redox-Potential aus.(9)

Untersuchung der spektroskopischen Eigenschaften nach Einbau in die LOV-Domäne: Flavine fungieren in verschiedenen BL-sensitiven Rezeptoren als chromophore Gruppen, wobei FMN (in LOV Domänen) und FAD in Cryptochromen und BLUF Domänen gefunden wird. Zur Untersuchung der Eigenschaften modifizierter Flavine in der LOV Domäne von YtvA aus *B. subtilis* musste die chemisch erzeugte RF-Form phosphoryliert, d.h., in die FMN-Form umgewandelt werden. Dies geschieht nach Literaturangaben mit relativ moderaten Ausbeuten durch Einwirkung von o-Phosphorsäure. Wir haben alternativ eine enzymatische Methode angewandt, die mit einer speziellen Kinase aus *B. subtilis* RF zu FMN umsetzt, ohne dass in größeren Mengen FAD entsteht (Koop. mit M. Mack, FH Mannheim).

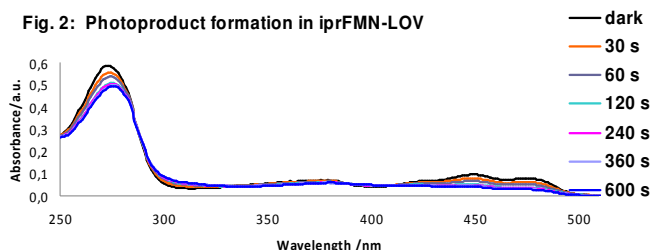
Rekombinante Flavin-enthaltende Proteine werden bei Expression auf Grund der ubiquitären Präsenz von Flavinen in lebenden Zellen i.a. gemeinsam mit dem eingebundenen Kofaktor erhalten. Zur Untersuchung der Chromophor-Protein Wechselwirkungen mit Hilfe modifizierter Flavine musste entsprechend ein Protokoll etabliert werden, das einen Chromophoraustausch ermöglichte (Mansurova et al., 2010, unpublished; erste Ergebnisse zu diesen Arbeiten wurden bereits während des Förderzeitraums erhalten). Die Einwirkung von Harnstoff (8 M) erlaubt die schonende Auffaltung des Proteins und ein Herauswaschen des Flavinchromophors. Dies wird dokumentiert durch Entnahme von Aliquots, an denen die Fluoreszenz gemessen wird (LOV Domänen fluoreszieren nur im „parent state“, entsprechend lässt sich bei Durchführung der Experimente unter Lichtausschluss mittels Fluoreszenzmessung die Menge an noch vorhandenem Chromophor bestimmen). Der Einbau modifizierter Chromophore in das so erzeugte Apoprotein gelingt durch graduelles Verdünnen der Harnstoffkonzentration in Anwesenheit des einzulagernden Chromophors. Zur Kontrolle wurden diese Arbeiten auch mit dem genuinen Chromophor FMN

durchgeführt. Die so erhaltenen Proteine zeigen unter diesen Bedingungen ein dem Wildtypprotein vergleichbares Verhalten.

Es gelang, sämtliche oben genannten modifizierten Flavine in funktioneller Form in das Protein YtvA einzulagern, so dass ihr Verhalten mit dem in wässrigen Lösungen verglichen werden konnte (Mansurova et al., 2010, unveröffentlicht). Darüber hinaus wurden selektiv auch RF, FMN, und FAD eingebaut, um die Bedeutung dieser natürlich vorkommenden Flavinderivate auf die photochemischen Eigenschaften separat zu bestimmen. Hintergrund der Verwendung dieser Flavine ist die Beobachtung, dass unter Bedingungen der heterologen Expression häufig ein Gemisch an RF und FMN gefunden wird, da offensichtlich durch die induzierte Expression der Flavin-pool der Wirtszelle stark reduziert wird. Der Einbau von FAD diente der Untersuchung, ob diese Verbindung als Chromophor in LOV Domänen fungieren kann. In der Tat führt der Einbau von FAD zu LOV Domänen mit veränderten photochemischen Eigenschaften.

Die bereits für die freien Verbindungen gefundenen veränderten Eigenschaften (im Vergleich zu RF) zeigen sich auch nach Einbau in das Protein: 1-Deaza-FMN zeigt die starke bathochrome Verschiebung der Absorption wie die freie Verbindung, aber darüber hinaus eine deutliche Feinstruktur der Absorptionsbande. Ausserdem findet sich eine stärkere Fluoreszenz mit einer längeren Abklingzeit im ns-Zeitbereich (unveröffentlicht). Wie aus den theoretischen Rechnungen abgeleitet und durch zeitaufgelöste Messungen nachgewiesen, zeigt diese Verbindung auch im Protein keine Triplettform und damit auch keine Ausbildung der LOV-typischen Ausbildung der kovalenten Bindung zum Cystein.

Für das sterisch anspruchsvollere 8-*ipr*-FMN (Fig. 2) findet sich eine deutlich beschleunigte thermische Rückkehrkinetik (48 gegenüber 120 Minuten für das Wildtyp- (WT-) protein), während dieser Prozess für das Demethyl-derivat dem WT vergleichbar bleibt. 8-*ipr*-FMN zeigt auch eine höhere Fluoreszenz-Quantenausbeute (0.40 gg. ca. 0.25 für den WT). Beide veränderten Parameter weisen auf eine stärkere sterische Interaktion zwischen Chromophor und Protein hin. Messungen der Triplett-Lebenszeit dagegen zeigen den stärksten Effekt für den Dimethyl-Chromophor: Hier findet sich ein Wert von ca. 13 μ s, während das WT-Protein eine Lebenszeit von ca. 2 μ s aufweist (Mansurova et al., submitted).



Eine Sonderstellung nimmt 5-Deaza-FMN ein: Diese Verbindung zeigt nach Einbau in das Apoprotein ein Absorptionsmaximum von 400 nm und bildet bei Belichtung das Photoaddukt aus ($\lambda_{\text{max}} = 350$ nm). Allerdings bleibt dies kovalent gebundene Form im Dunkeln stabil. Erst eine Belichtung führt dazu, dass aus der Photoadduktform der Ausgangszustand zurückgebildet wird. Dieses Verhalten

wurde bereits früher in der Literatur berichtet, allerdings wurde die Photochemie von 5-Deaza-LOV dort nicht im Detail untersucht.(ref) Untersuchung der „Rück-Photochemie“ zeigt, dass auch hier die Triplettform gebildet wird, die dann unter Bruch der kovalenten Bindung zwischen Chromophor und Protein die Ausgangsform regeneriert. Diese für LOV-Domänen bisher einzige in beide Richtungen schaltbare Photochemie lässt sich mehrfach ohne Veränderung der photochemischen Parameter wiederholen (unveröffentlicht).

Kooperationen mit anderen Arbeiten im Sonderforschungsbereich

Die Arbeiten an modifizierten Flavinen zur Untersuchung ihrer Funktion als Chromophore in BL-sensitiven Photorezeptoren wurden in enger Anlehnung an die theoretischen Arbeiten der Arbeitsgruppen **Thiel** und **Marian** durchgeführt, die die photochemische Prozesse der Flavine in freier Form und in der LOV-Domäne behandelten. Messungen an Flavinen mit einer sehr kurzlebigen und geringen Fluoreszenz (1-Deaza-RF) wurden in Kooperation mit der AG **Holzwarth** durchgeführt, da nur mit dem dort vorhandenen instrumentellen Aufbau derartige Messungen möglich sind.

Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs

Arbeiten zum Einbau modifizierter Flavine in LOV-Domänen werden in dieser Weise nur bei sehr wenigen Arbeitsgruppen ausgeführt.(5) Einen anderen, biologisch ausgerichteten Zugang zum Einbau modifizierter und Isotopen-markierter Flavine wählt die AG Hegemann (Dr. T. Mathes, HU Berlin) wählt, indem

in den zur Expression der Proteine gewählten Wirtsorganismus (*E. coli*) das Gen für einen Flavin-Transporter eingebracht und die zelleigene Biosynthese von Flavinen unterbunden wird.

Untersuchungen zur Interaktion von Chromophor und Proteine der LOV-Domänen durch Beeinflussung der Proteinsequenz (gerichtete Mutagenese) werden ebenfalls in meiner Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Ergebnisse ergänzen die hier mittel Chromophorderivaten erzielten Resultate und geben so Aufschluss über den Mechanismus der Umwandlung eines externen Stimulus in ein biologisches Signal.(4;10;15)

Zitierte Literatur

1. Briggs, W. R., C. F. Beck, A. R. Cashmore, J. M. Christie, J. Hughes, J. A. Jarillo, T. Kagawa, H. Kanegae, E. Liscum, A. Nagatani, K. Okada, M. Salomon, W. Rüdiger, T. Sakai, M. Takano, M. Wada, and J. C. Watson. 2001. The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* 13:993-997.
2. Briggs, W. R. and E. Liscum. 1997. The role of mutants in the search for the photoreceptor for phototropism in higher plants. *Plant Cell Environ.* 20:768-772.
3. Briggs, W. R. 2006. Flavin-based photoreceptors in plants. *In* Flavins photochemistry and photobiology. E. Silva and A. M. Edwards, editors. Elsevier, 183-216.
4. Buttani, V., W. Gärtner, and A. Losi. 2007. NTP-binding properties of the blue-light receptor YtvA and effects of the E105L mutation. *Eur. Biophys. J.* 36:831-839.
5. Hecht, S., G. Richter, A. Bacher, M. Joschi, W. Römisch, G. Greiner, R. Frank, S. Weber, W. Eisenreich, and M. Fischer. 2005. Photocycle of a blue light receptor LOV2 domain reconstituted with 5-Deaza-FMN. *In* Flavins and Flavoproteins 2005. T. Nishino, R. Miura, M. Tanokura, and K. Fukui, editors. Architect, Tokyo. 569-574.
6. Kottke, T., J. Heberle, Dominic Hehn, B. Dick, and P. Hegemann. 2003. Phot-LOV1: Photocycle of a Blue-Light Receptor Domain from the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys. J.* 84:1192-1201.
7. Losi, A. 2006. Flavin-based photoreceptors in bacteria. *In* Flavin photochemistry and photobiology. E. Silva and A. M. Edwards, editors. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 223-276.
8. Losi, A. 2007. Flavin-based Blue-light Photosensors: a Photobiophysics Update. *Photochem. Photobiol.* 83:1300.
9. Mansurova, M., M. S. Koay, and W. Gärtner. 2008. Synthesis and Electrochemical Properties of Structurally Modified Flavin Compounds. *Eur. J. Org. Chem.* 5401-5406.
10. Perez, M. A., J. Vreede, Y. Tang, O. Bende, A. Losi, W. Gärtner, and K. Hellingwerf. 2009. In vivo mutational analysis of the *Bacillus subtilis* LOV-domain containing protein YtvA: mechanism of light activation of the general stress response. *J. Biol. Chem.* 284:24958-24964.
11. Salzmann, S. and C. M. Marian. 2008. Effects of protonation and deprotonation on the excitation energies of lumiflavin. *Chem. Phys. Lett* 463:400-404.
12. Salzmann, S., V. Martinez-Junza, B. Zorn, S. E. Braslavsky, M. Mansurova, C. M. Marian, and W. Gärtner. 2009. Photophysical Properties of Structurally and Electronically Modified Flavin Derivatives Determined by Spectroscopy and Theoretical Calculations. *J. Phys. Chem. A* 113:9365-9375.
13. Salzmann, S., J. Tatchen, and C. M. Marian. 2008. What makes the difference between gas phase and aqueous solution? *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 198:221-231.
14. Slavov, C., M. Mansurova, A. R. Holzwarth, and W. Gärtner. 2010. Excited state processes in 1-deaza-riboflavin studied by ultrafast fluorescence kinetics. *Photochem Photobiol.* 86:31-38.

15. Tang, Y. F., Z. Cao, E. Livoti, U. Krauss, K. E. Jaeger, W. Gärtner, and A. Losi. 2010. Interdomain signalling in the blue-light sensing and GTP-binding protein YtvA: A mutagenesis study uncovering the importance of specific protein sites. *Photochemical & Photobiological Sciences* 9:47-56.

Aus dem Teilprojekt entstandene Publikationen

1. Slavov, C., Mansurova, M., Holzwarth, A.R., and Gärtner, W. (2010) Excited State Processes in 1-Deazariboflavin studied by ultrafast fluorescence kinetics. *Photochem. Photobiol.* 86 31-38.
2. Salzmann, S., Martinez-Junza, V., Zorn, B., Braslavsky, S.E., Mansurova, M., Marian, C.M., and Gärtner, W. (2009) Photophysical properties of structurally and electronically modified flavin derivatives, determined by spectroscopy and theoretical calculations. *J. Phys. Chem. A.* 113 9365-9375.

6.3 Rückblick auf die Förderung

Das Teilprojekt wird seit Juli 2005 im Sonderforschungsbereich gefördert. Es wurde zum Dezember 2009 (beinhaltend eine sechsmonatige Auslauffinanzierung) beendet. Eine Förderung der proteinchemischen Arbeiten an Phototropin-ähnlichen Photorezeptoren erfolgte im Rahmen der FOR526 von Mai 2004 bis April 2010.

6.3.1 Personal im Teilprojekt während der zu Ende gehenden Förderperiode

	laufende Nummer	Name, akademischer Grad, Dienststellung	engere Fachzugehörigkeit	Institut der Hochschule oder der außeruniversitären Einrichtung	Mitarbeit im Projekt in Wochenstunden	Entgeltgruppe
Grundausstattung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	1	Prof. Dr. W. Gärtner	BioAnorg-Chemie	MPI-BAC	8	
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter	2	Steffen, Helene		MPI-BAC	10	
	3	Koc, Gül		MPI-BAC	10	
Ergänzungsausstattung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	1	v. Dornick, Sven	Chemie	MPI-BAC	40	½ IIa BAT
	2	Mansurova, Madina, Dr.	Chemie	MPI-BAC	40	IIa BAT
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter						

Dr. Koji Nakayama, Univ. Osaka, Japan, ist gegenwärtig Humboldt-Stipendiat in meiner Gruppe (gefördert seit 10/2008). Er wurde vor seiner Förderung für einen Zeitraum von vier Monaten, in dem er synthetische Arbeiten durchführte, durch den SFB663 finanziert.

Dr. Aba Losi, Physik-Dept. Der Univ. Parma, Italien, führt seit mehreren Jahren gemeinsam mit uns Arbeiten an BL-sensitiven Photorezeptoren durch. Ihr wurde durch den SFB ein ein-monatiger Aufenthalt in Mülheim/Düsseldorf ermöglicht. Während ihres Aufenthalts hielt sie ein Seminar im Rahmen der SFB-Vortragsreihe.

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Grundausrüstung):

1., 2. **Frau Helene Steffen** und **Frau Gül Koc** sind beide in meiner Arbeitsgruppe am MPI-BAC tätig (Frau Steffen schied zu 30.6.2010 aus Altersgründen aus). Beide Mitarbeiterinnen sind in der Aufbereitung von Proben und routinemäßigen spektroskopischen Messungen beschäftigt.

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Ergänzungsausstattung):

1. **Dipl. Chem. Sven van Dornick** war im Zeitraum Juli 2005 bis Dezember 2006 im SFB663-Projekt in meiner Arbeitsgruppe beschäftigt. Er etablierte die Flavinsynthesen in der Gruppe. Allerdings ergaben sich durch Anfangsschwierigkeiten Verzögerungen, so dass er über Testreaktionen nicht hinaus kam.

2. **Dr. Madina Mansurova** ist seit Januar 2007 im SFB663-Projekt in meiner Arbeitsgruppe beschäftigt. Sie führt seit ihrem Eintritt bei uns chemische Synthesen von Flavinderivaten durch und ist auch für die analytische Charakterisierung und die steady-state und zeitaufgelöste Spektroskopie verantwortlich. Im Rahmen dieser Arbeiten betreut sie Studenten höherer Fachsemester, die Fachpraktika absolvieren und darüber hinaus Auszubildende des MPI (Ausb. zum Chemielaboranten).

6.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt B5

6.1.1 Titel: Immobilisierung von chromophoren Gruppen an funktionalisierten Co-polyimiden

6.1.2 Projektleitung

Prof. Dr. Claudia Staudt (*13.06.1964)
 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
 Organische Chemie und Makromolekulare Chemie
 Abteilung Funktionsmaterialien, Geb. 26.33
 Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf
 Telefon: 0211-81-15362, Fax: 0211-81-10696
 Email: staudt@uni-duesseldorf.de

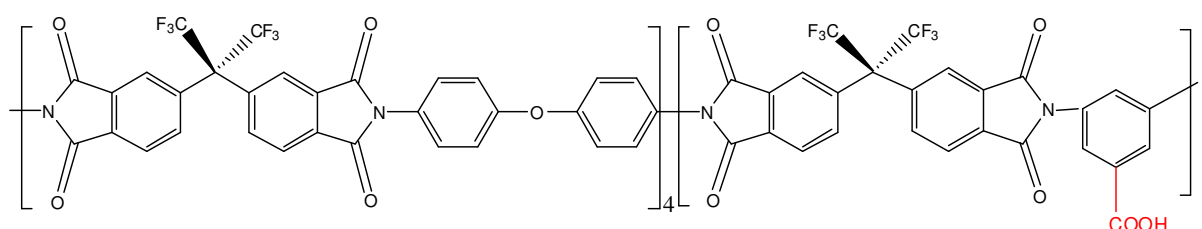
6.2 Entwicklung des Teilprojekts

6.2.1 Bericht

Funktionale Polymere sind wissenschaftlich besonders interessant, weil an den reaktiven Gruppen des Polymergrundgerüsts Modifizierungen durchgeführt werden können, die zu Werkstoffen mit völlig neuen Eigenschaften führen. Funktionale Polymere sollten innerhalb dieses Projekts in polymeranalogen Reaktionen mit photovernetzenden Gruppen umgesetzt werden. Das Ziel war es möglichst neue, homogen vernetzte, photostabile und temperaturbeständige Membranwerkstoffe für die Stofftrennung zu erzeugen, die sich im Vergleich zu anderen vernetzten Materialien einfach und kostengünstig verarbeiten lassen. Dabei sollte die Entwicklung von Vernetzungsstrategien ohne Photoinitiatoren durch direkte photoinduzierte Reaktion im Zentrum stehen. Zunächst wurden verschiedene Maleimid-derivate synthetisiert, die kovalent an das Polymergrundgerüst angebunden werden können. Diese Derivate fungieren dabei als Triplett-Sensibilisatoren bzw. Photoinitiatoren, so dass bei der Membranherstellung keine weiteren Zusätze mehr notwendig sind. Im mechanistischen Teil des Projektes sollten die Primärprozesse der Photoanregung und Folgeschritte der Vernetzung durch optisch spektroskopische Methoden zeitaufgelöst untersucht werden.

Ferner sollten an der Oberfläche filmbildender funktionaler Polymere durch geeignete Reaktionen spektroskopisch interessante Moleküle, wie beispielsweise Carotinoide, Xanthophylle oder Flavonoide immobilisiert werden. Die Anbindung erfolgte zum einen kovalent, aber auch über eine Wirt-Gast-Beziehung an der Polymeroberfläche. Dabei sollten polymere Trägermaterialien entwickelt werden, die es erlauben Singulett- und Triplett-Übergänge an Chromophoren ohne Aggregation in der Flüssigphase zu untersuchen. Hierzu wurden die Fluoreszenz-, Raman- und Absorptionsspektroskopie eingesetzt.

Innerhalb dieses Projektes wurden als funktionale Polymere das Polyethylenmethacrylsäurecopolymer und das Copolyimid 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 eingesetzt, wobei das Polyethylenmethacrylsäurecopolymer (Luwax[®]) von der Firma BASF bezogen wurde. Das Copolyimid 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 wurde in verschiedenen Chargen synthetisiert. Beide Polymere enthalten, obwohl sie völlig unterschiedliche Eigenschaften haben, als funktionelle Gruppen Carbonsäuren im Polymergerüst. Abbildung 1 zeigt die Struktur des Polyethylenmethacrylsäurecopolymers und die Struktur des 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 Copolyimids.



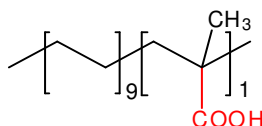


Abbildung 1: oben: Copolyimid 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 und unten: Polyethylenmethacrylsäurecopolymer

Um die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Copolymere zu diskutieren, sind in der nachfolgenden Tabelle die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Polyethylenmethacrylsäurecopolymer und des Copolyimids 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 aufgeführt.

Tabelle 1: Physikalisch-chemische Eigenschaften des Polyethylenmethacrylsäurecopolymer^[1] und des Copolyimids 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1.

Copolymer	M _w [g/mol]	T _g [°C]	SZ [mmol/g]
Polyethylenmethacrylsäurecopolymer	-	40	3,16
6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1	25033*/24014**	299,6	0,35

* bestimmt mittels UV Detektor

** bestimmt mittels RI Detektor

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, dass die Glasübergangstemperatur T_g des Polyethylenmethacrylsäurecopolymer bei 40 °C deutlich unter dem T_g des 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 von 299,6 °C liegt. Da z.B. organophile Pervaporationen (= Auftrennung flüssiger Stoffgemische mit Hilfe von Membranen meist oberhalb von 60 °C durchgeführt werden, ergeben sich hier deutliche Unterschiede in den Trenneigenschaften der beiden Copolymere. Das Polyethylenmethacrylsäurecopolymer liegt bereits oberhalb von 40 °C in einem gummiartigen Zustand vor, während das Copolyimid 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 bis 299,6 °C in einem glasartigen Zustand vorliegt. Während einer Pervaporationsmessung bei 60 °C würde dann das Polyethylenmethacrylsäurecopolymer in einem gummiartigen Zustand vorliegen, das Copolyimid befände sich dagegen noch in einem glasartigen Zustand. Polyethylenmethacrylsäurecopolymere und deren Derivate können beispielsweise hervorragend für die Auftrennung von Phenol/Wasser Mischungen eingesetzt werden^{[1]-[2]}, während Copolyimide hingegen in Wasser quellungsresistent sind, jedoch für die Aromaten/Aliphantentrennung^{[3]-[5]}, die Abtrennung schwefelhaltiger Aromaten^{[6]-[7]} etc. sehr gut geeignet sind. Vergleicht man die Säurezahl SZ der beiden Copolymere, ergeben sich deutliche Unterschiede. In einem Gramm Polyethylenmethacrylsäurecopolymer sind 3,16 mmol Säuregruppen vorhanden, während das Copolyimid sehr viel weniger, nämlich nur 0,35 mmol Säuregruppen pro Gramm beinhaltet. Jedoch ist im Polyethylenmethacrylsäurecopolymer jede 10. Wiederholungseinheit von einer Carboxylgruppe besetzt, während im 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 nur in jeder 5. Wiederholungseinheit eine Carboxylgruppe vorhanden ist. Das Polyethylenmethacrylsäurecopolymer besteht zu 72,8 Gewichtsprozenten aus Polyethylen und zu 27,2 Gewichtsprozenten aus Polymethacrylsäure^[1]. Auf molekularer Ebene bedeutet dies, dass im Abstand von 45 Å im Polyethylenmethacrylsäurecopolymer eine Carboxylgruppe zu finden ist, während im Copolyimid nur etwa nach 160 Å eine Carboxylgruppe erwartet wird.

Um Copolyimide mit einer definierten Anzahl funktioneller Gruppen herzustellen, wird entsprechend Abbildung 2 das Dianhydrid (6FDA) mit der Diaminobenzoesäure (DABA) und einem weiteren Diamin (ODA) umgesetzt. Das DABA beinhaltet die für die Vernetzung notwendige funktionelle Gruppe. In einer zweistufigen Polykondensationsreaktion wird das Copolyimid hergestellt, wobei die Carboxylgruppe der Diaminobenzoesäure als funktionelle Gruppe während der Polymerisationsreaktion erhalten bleibt, da ihre Reaktivität im Vergleich zum Dianhydrid am 6FDA-Monomeren gering ist.

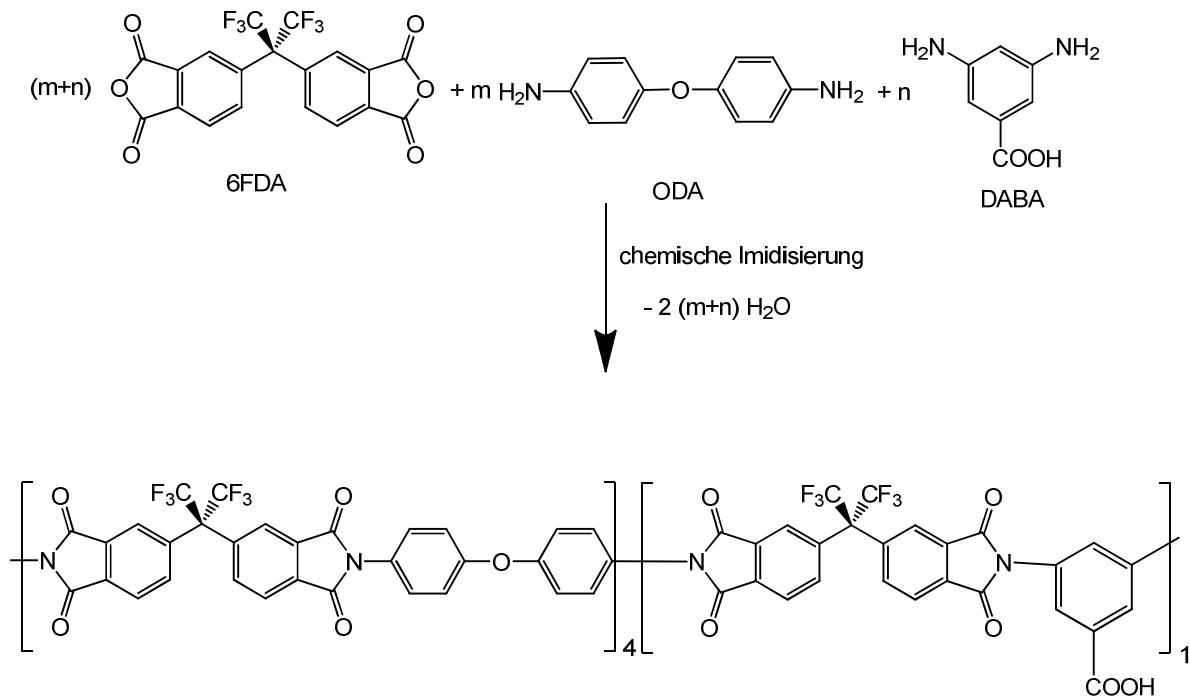


Abbildung 2: Polykondensationsreaktion zur Herstellung funktionalisierter Copolyimide

Der Vorteil bei dieser Herstellungsvariante für vernetzbare Membranpolymere ist, dass die Anzahl der vernetzbaren Gruppen durch das Verhältnis der Diamine in der Polykondensationsreaktion gesteuert wird. Beispielsweise wird bei einem Verhältnis von 4:1 der Diamine ODA zu DABA, wie in der Abbildung 2 gezeigt, ein Copolyimid erhalten, das statistisch verteilt in jeder 5. Polymereinheit eine Carboxylgruppe aufweist.

Die beiden Copolymere Polyethylenmethacrylsäure und 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 wurden in dieser Arbeit verwendet, weil sie gut filmbildend sind und sich für Trennexperimente, die in unserem Arbeitskreis durchgeführt werden, besonders gut eignen.

Ergebnisse: Photovernetzbare Membranmaterialien

Photovernetzbare Membranpolymere (Benzophenongruppen enthaltende Polycarbonate und Polyimide) wurden von Paul et al. hergestellt und untersucht^{[8]-[9]}. Jedoch tritt dabei eine unerwünschte Reduktion der Permeabilität auf und der Vernetzungsgrad muss durch die Dauer der Bestrahlung eingestellt werden, was zu einer unzureichenden Reproduzierbarkeit führt.

Deshalb wurde im Projekt B5 eine Funktionalisierung untersucht, bei der zunächst die Anzahl der vernetzbaren Gruppen durch die Stöchiometrie der Polymerisationsreaktion kontrolliert werden kann. In einer nachfolgenden polymeranalogen Reaktion wurden photovernetzbare Seitengruppen an den funktionalen Gruppen des Polymergrundgerüsts erzeugt. Die so erhaltenen Polymere können ohne Initiatorzusatzstoffe zu Membranen hergestellt werden und sind von besonderem Interesse, da kein Herauslösen der Vernetzer und damit unerwünschte Effekte im Trennprozess zu erwarten sind. Zunächst wurde der Photovernetzer 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid synthetisiert und danach in einer polymeranalogen Reaktion mit den Carboxylgruppen tragenden Polymeren umgesetzt. In Abbildung 3 wird die Synthese von 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid schematisch dargestellt.

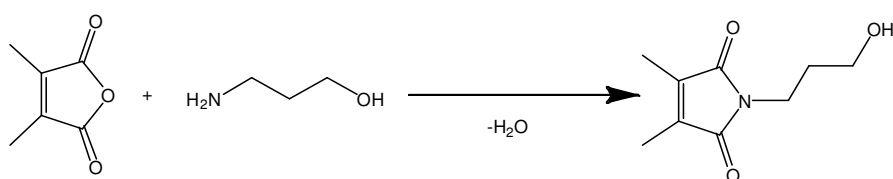


Abbildung 3: Synthese des 3-Hydroxypropyldimethylmaleimids

Im zweiten Schritt erfolgt die polymeranaloge Umsetzung des aktivierten Polymers mit dem Photovernetzer (siehe Abbildung 4).

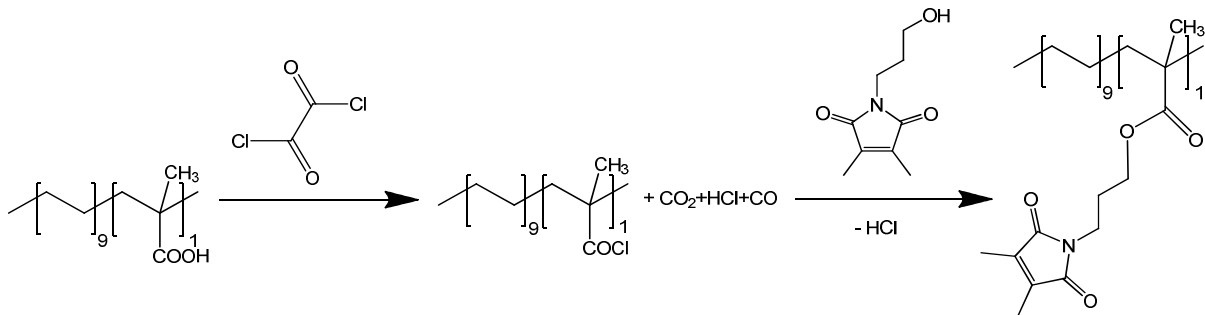


Abbildung 4: Polymeranaloge Reaktion des Polyethylenmethacrylsäurecopolymer mit 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid

Des Weiteren wurden die beiden Photovernetzer 4-Hydroxyphenyldimethylmaleimid und 4-Hydroxyphenylethyldimethylmaleimid synthetisiert (siehe Abbildung 5).

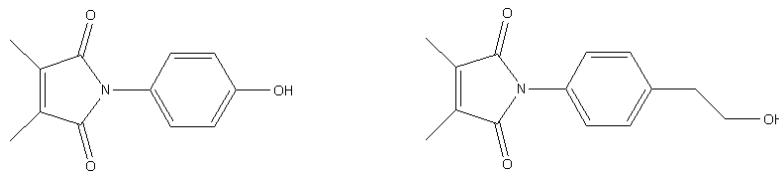


Abbildung 5: links: 4-Hydroxypphenyldimethylmaleimid und rechts: 4-Hydroxyphenylethyldimethylmaleimid

Das 4-Hydroxyphenyldimethylmaleimid wurde in verschiedenen Graden (0-100%) an Polyethylenmethacrylsäurecopolymer verestert und anschließend der Veresterungsgrad IR-ATR spektroskopisch untersucht^[10]. Mit der Synthese von 4-Hydroxyphenyldimethylmaleimid gelang die Synthese eines im Vergleich zu 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid bathochromer absorbierenden Photovernetzers^[11] (siehe Abbildung 6).

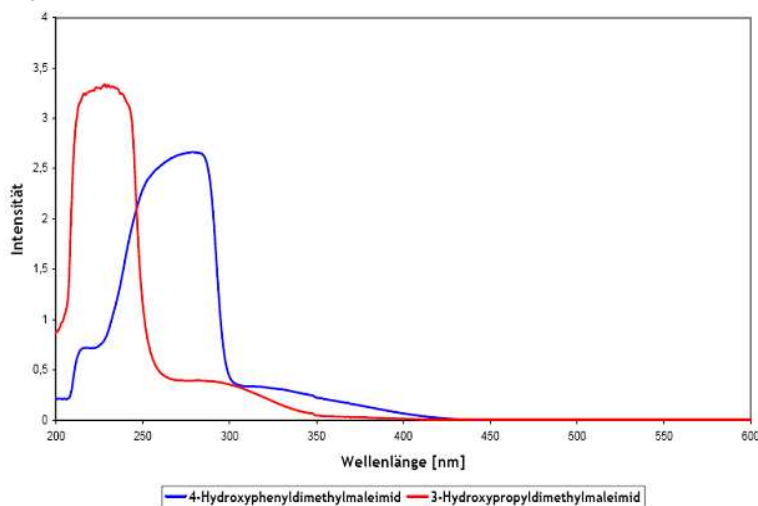


Abbildung 6: Vergleich der Absorptionsbanden von 4-Hydroxyphenyldimethylmaleimid und 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid^[11]

Da 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid 6 % ig verestert an Polyethylenmethacrylsäurecopolymer zum einen gut löslich in THF ist und zum anderen in vorhergehenden Arbeiten mittels transiente Absorptionsspektroskopie in flüssiger Phase untersucht wurde, wurde dieses System als Modellverbindung für transiente Absorptionsspektroskopie an fester Phase verwendet.

Zu mechanistischen Untersuchungen im Bereich photosensitiver Copolyimide, die filmbildend sind, sowie zu Photostabilitäten unter Bedingungen wie sie in Membrantrennverfahren vorliegen, gibt es nur einige wenige Publikationen, die wiederum keine Informationen über die mögliche Verwendung als Membranmaterial beinhalten^{[12]-[15]}.

Die in diesem Projekt eingesetzten funktionalen Polymere mit photovernetzbaeren Maleimidseitengruppen weisen den Vorteil auf, dass die Maleimide gleichzeitig Tripletsensibilisatoren und Elektronen-Transfer Photoinitiatoren^[16] sind. Deshalb sind sie für die Herstellung von photovernetzbaeren Membranen ohne externen Zusatz von Photoinitiatoren besonders geeignet^{[16]-[17]}. Eine direkte Photovernetzung eröffnet die Möglichkeit, die Primärprozesse der Photovernetzung in idealer Weise an Modellverbindungen und in situ mit laserbasierten spektroskopischen Methoden in mikroskopischem Detail zu verfolgen.

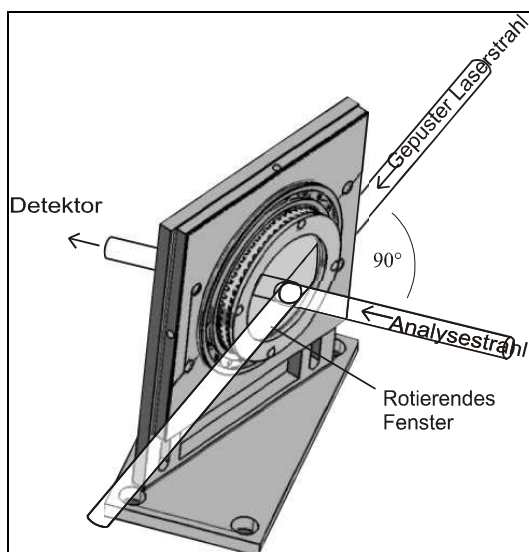


Abbildung 7: Rotierender Fensterhalter
nach Engler^{[10][18][19]}

Mit Hilfe der Transienten-Absorptions-Spektroskopie konnte der Mechanismus der Vernetzung des 3-Hydroxypropyldimethylmaleimids, welches 6 % ig verestert an Polyethylenmethacrylsäurecopolymer gebunden wurde (siehe Abbildung 3 und 4), zunächst qualitativ interpretiert werden. Erstmals konnten in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. K. Kleinermanns transiente Absorptionsmessungen auch in fester Phase, d.h. an einem Polymerfilm durchgeführt werden. Bisher war es nur möglich transiente Absorptionsmessungen in flüssiger Phase durchzuführen. Um einen Polymerfilm, so wie er

auch zur Auftrennung von Stoffgemischen eingesetzt wird, zu untersuchen, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kleinermanns (Teilprojekt A4) ein rotierender Fensterhalter (siehe Abbildung 7) entwickelt, mit welchem die photochemische Vernetzungsreaktion in einer festen Phase untersucht werden konnte. Durch die Transientenmessungen konnte gezeigt werden, dass der Vernetzungsmechanismus über ein Radikalanion verläuft, dessen Bande um 250 nm lokalisiert werden konnte. Eine Veröffentlichung von J. v. Sonntag und W. Knolle zeigt ebenfalls, dass es sich bei der Absorption bei 250 nm von substituierten Maleimiden um das Radikalanion handelt^[17]. In Abbildung 8 wird der postulierte Reaktionsmechanismus gezeigt^{[10][19]}.

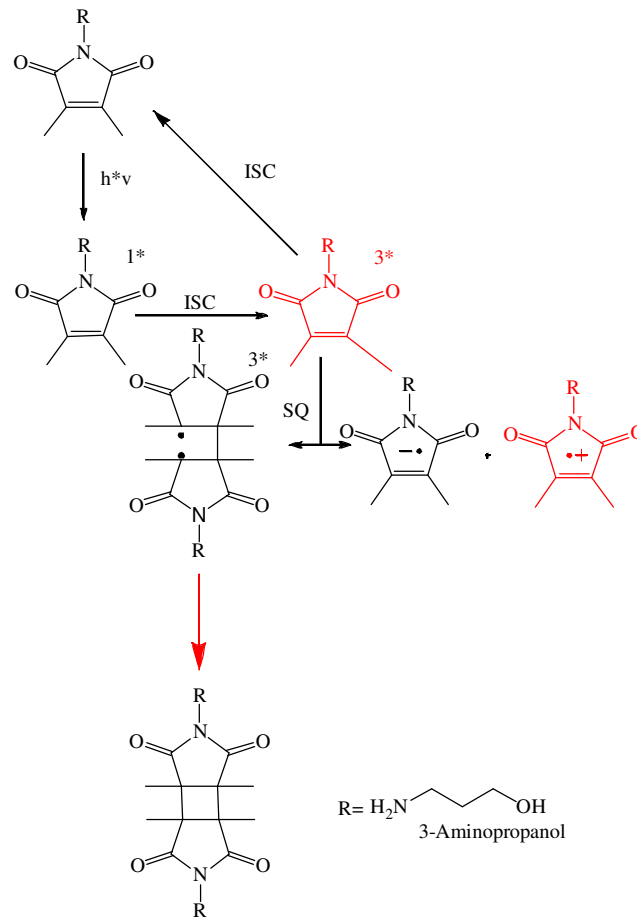


Abbildung 8: Mechanismus der Photovernetzung von 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid (6 % ig verestert mit Polyethylenmethacrylsäurecopolymer)

In weiteren Messungen wurde untersucht, ob die photochemische Vernetzung für ein verestertes Polyethylenmethacrylsäurecopolymer ebenso anhand eines veresterten Polyimids aufgeklärt werden kann. Als Modellsystem wurde das Copolyimid 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 100 % ig verestert mit 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid verwendet. Die Messungen wurden für die 100 % veresterten Copolyimide durchgeführt, da hier die größeren Effekte erwartet wurden, als für die 6 % ig vernetzten Copolymeren. Für die Untersuchungen wurden das veresterte Polymer, das Polymer nativ und der Photovernetzer 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid jeweils in THF gelöst und die Lösung auf ein Quarzglasfenster aufgetragen. Nachdem sich ein Polymerfilm gebildet hatte, wurden die Absorptionsspektren des veresterten Copolyimids (3-Hydroxypropyldimethylmaleimid 100 % ig verestert mit 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1), die Lage der Absorptionsbande des reinen 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 Copolyimids und die Lage der Absorptionsbande des Photovernetzers 3-Hydroxypropyl-dimethylmaleimid aufgenommen (Abbildung 9).

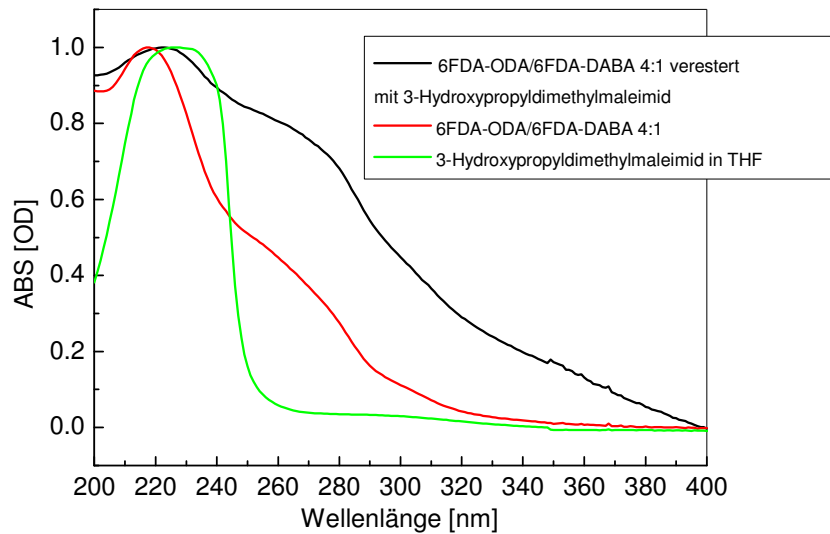


Abbildung 9: Stationäres Absorptionsspektrum von 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid 100 % ig verestert mit 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 (-) reines Copolyimid (-) sowie 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid (-)

Abbildung 9 zeigt für alle drei Komponenten ähnliche Absorptionsmaxima bei 220 nm. Eine Photovernetzungsreaktion kann demnach nicht verfolgt werden, weil der Photovernetzer bei nahezu identischer Wellenlänge wie das hier untersuchte Copolyimid 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 absorbiert. Abbildung 10 zeigt das stationäre Absorptionsspektrum von 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 100 % ig verestert mit 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid nach verschiedenen Bestrahlungszeiten mit einer Quecksilber dampflampe.

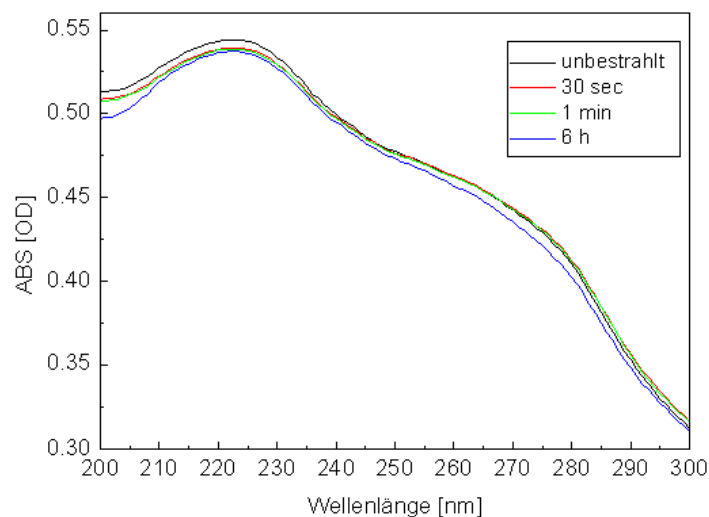


Abbildung 10: Stationäres Absorptionsspektrum von 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid 100% ig verestert mit 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 nach unterschiedlichen UV-Bestrahlungszeiten

Die Probe wurde unvernetzt nach 30 Sekunden, einer Minute und 6 Stunden UV-Bestrahlung untersucht. Auffällig ist hierbei, dass die Absorptionsbanden bereits nach einer Bestrahlung von 30 Sekunden abnehmen, aber sichtbare Absorptionsbanden nach 6 Stunden Bestrahlungsdauer noch vorhanden sind. Des Weiteren ist es nicht möglich die Absorptionsbande des Photovernetzers aus dem gemessenen

Spektrum zu identifizieren, da die Bande wahrscheinlich von den Absorptionsbanden des Copolyimids überlagert wird. Auch gibt es offene Fragen über die Stabilität des Copolyimids gegenüber UV-Strahlung. Aus der Literatur bekannte Arbeiten zeigen, dass bereits nach 10 Minuten Belichtungszeit eine deutliche Abweichung der Absorptionsbanden im UV-Spektrum bzw. neue Banden auftreten. Aus der Veränderung der UV-Spektren wird daher auf einen Zerfall der Copolyimidstruktur in Oligomere geschlossen^[20].

Im Vergleich zu Abbildung 10 wird in Abbildung 11 ein stationäres Absorptionsspektrum von Polyethylenmethacrylsäurecopolymer 6 % ig verestert mit 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid gezeigt.

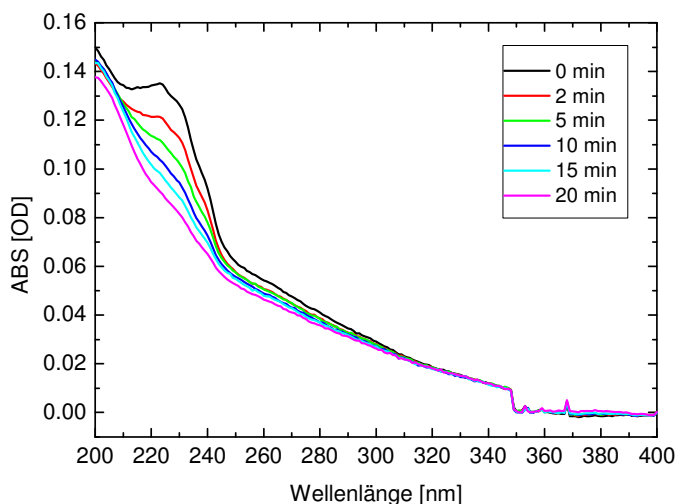


Abbildung 11: Stationäres Absorptionsspektrum von Polyethylenmethacrylsäurecopolymer (6% ig verestert mit 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid)

Aus Abbildung 11 geht eine insgesamt deutlich stärkere Abnahme der Absorptionsbande bei 220 nm hervor. Bereits nach 15 Minuten Bestrahlungszeit ist keine nennenswerte Absorption des Photoaddukts mehr erkennbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass bereits hier alle Photovernetzermoleküle miteinander reagiert haben.

Parallel zu den Untersuchungen die in Kooperation mit der Physikalischen Chemie I Arbeitskreis Prof. Dr. K. Kleinermanns (Teilprojekt A4) durchgeführt wurden, wurde der Copolymerfilm (6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 100 % ig verestert mit 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid) auf Löslichkeit vor und nach Bestrahlung in Tetrahydrofuran (THF) untersucht. Hierzu wurde der Copolymerfilm in einem eigens gebauten UV-Schrank zu verschiedenen Zeiten bestrahlt und auf mechanische Stabilität, Löslichkeit in THF vor und nach der Bestrahlung untersucht. Bei der verwendeten Lampe im UV-Schrank handelte es sich um einen Quecksilber-Hochdruckstrahler. Dieser zeigt bis auf schmale Emissionsbanden ein verhältnismäßig intensives Kontinuum, das den Bereich im Ultravioletten ab 200 nm bis zum Infraroten Bereich abdeckt^[20]. Auch bei relativ langen Bestrahlungszeiten (mehrere Minuten) war das veresterte Copolyimid löslich in THF.

Die Untersuchungen mit den vernetzten Polyethylenmethacrylsäurecopolymerfilmen (6 % ig verestert mit 3-Hydroxypropyldimethylmaleimid) zeigten ebenfalls keine mechanische Stabilität gegenüber Tetrahydrofuran. In Toluol dagegen lieferten die vernetzten Filme einen hohen Quellungsgrad von bis zu 91 %, wobei die vernetzten Filme mechanisch stabil blieben. Es ist daher ein weiteres Forschungsvorhaben die photochemisch vernetzten Polyethylenmethacrylsäurecopolymerfilme in Trennungsexperimenten, wie z.B. der Pervaporation qualitativ zu untersuchen.

Immobilisierung von Cyclodextrinen an funktionalen Polymeren

In diesem Projekt war es das Ziel herauszufinden, ob die Carboxylgruppen im 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 und im Polyethylenmethacrylsäurecopolymer, die beide statistische Copolymere darstellen, homogen verteilt sind oder eine Agglomeration z.B. aufgrund von Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel, wel-

ches zum Ausgießen verwendet wird, auftritt. Diese Information ist besonders für die Herstellung photochemisch aber auch kovalent vernetzter Membranen notwendig, da die Vernetzung natürlich nur dann besonders effizient ist, wenn die Vernetzungsstellen gleichmäßig über die Polymermatrix verteilt sind. Um dies herauszufinden, war es zunächst das Ziel Cyclodextrine auf einer funktionalisierten Polymeroberfläche (z.B. an dem Polyethylenmethacrylsäurecopolymer und dem 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1) zu fixieren und mittels Fluoreszenzmikroskopie zu detektieren.

Um Cyclodextrine an Polymeroberflächen zu immobilisieren, musste zunächst eine vorherige Aktivierung der Carboxylgruppen im Polymergerüst zum Säurechlorid erfolgen. Parallel zu diesem Schritt erfolgte die Markierung der Cyclodextrine mit Fluorescein. Der Mechanismus für die Markierung der Cyclodextrine mit Fluorescein ist in Abbildung 12 dargestellt^{[10][11]}.

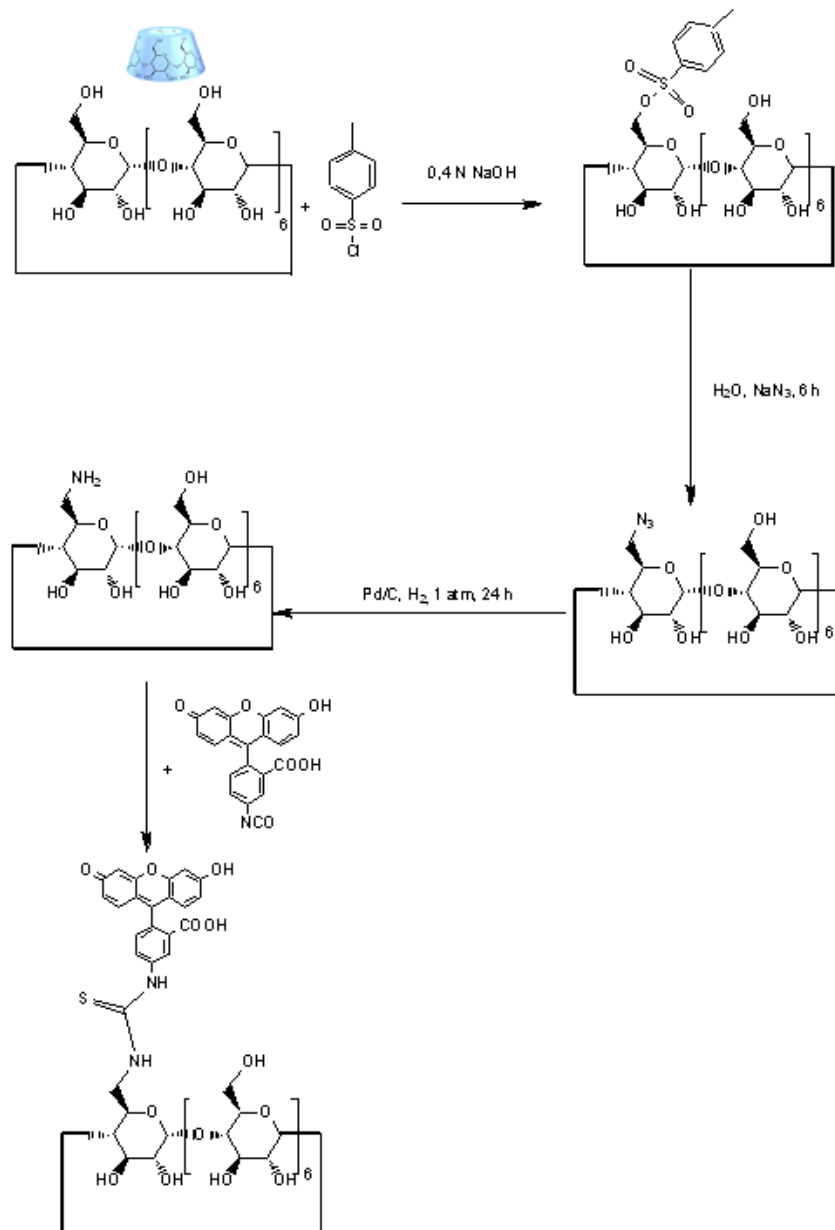


Abbildung 12: Syntheschema für die Markierung von β -Cyclodextrin mit Fluorescein^{[10], [11]}

Um die Immobilisierung abzuschließen, erfolgte nun die polymeranaloge Umsetzung des Säurechlorids mit dem Fluorescein gelabelten Cyclodextrin (siehe Abbildung 13).

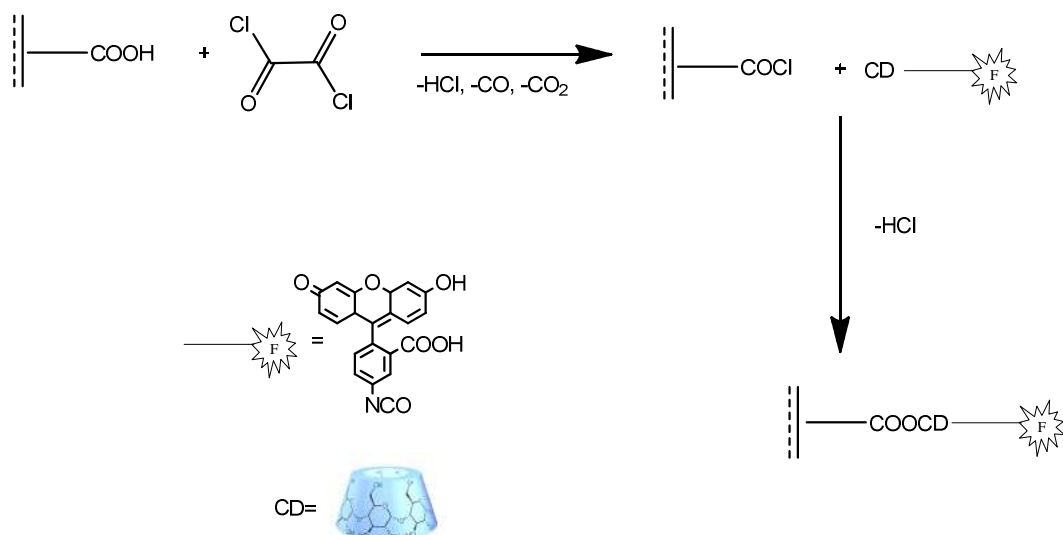


Abbildung 13: Immobilisierung von β -Cyclodextrin mit Fluorescein an ein Copolymer

Um qualitativ zu beweisen, dass eine Immobilisierung der Cyclodextrine stattgefunden hat, wurde in einem ersten Schritt ein Iod-Test durchgeführt. Dieser Test war einfach, da Cyclodextrine unter anderem mit Iod oder Iodiden eine Wirt-Gast-Beziehung ausbilden können^[21]. Zur Durchführung des Tests wurde im ersten Schritt eine geringe Menge an Iod in einen Exikator überführt und mit der β -Cyclodextrin oberflächenmodifizierten Membran kontaktiert. Im zweiten Schritt wurde eine Blindprobe mit einer unmodifizierten Membran durchgeführt. Um eine Verfärbung auszuschließen, wurde die Blindprobe zuvor in eine Lösung aus β -Cyclodextrin in n-Hexan/Toluol eingelegt, gespült und getrocknet. Nach zwei bis drei Stunden Wartezeit zeigte die mit β -Cyclodextrin oberflächenmodifizierte Membran eine braune Verfärbung, während die Blindprobe eine nur geringe Verfärbung aufwies.

Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie konnte gezeigt werden, dass sich für die Immobilisierung von Cyclodextrinen auf Polymeroberflächen mit einer möglichst homogenen Verteilung das Polyethylenmethacrylsäurepolymer weniger gut eignet. Da es bedingt durch die Hochdrucksynthese, die zur Darstellung des Copolymers eingesetzt wird, zur Ausbildung von Blockcopolymeren kommt, agglomerieren die funktionellen Gruppen des Copolymers. Deshalb wurden weitere Untersuchungen mit dem 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 Copolyimid durchgeführt. Bedingt durch das aromatische Grundgerüst weist das Copolyimid eine wesentlich geringere Dichte der Carboxylgruppen auf, so dass hier eine Agglomeration mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit erwartet wird.

Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie konnte bewiesen werden, dass bei dem 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 sowohl Agglomerationen der Cyclodextrine als auch einzelne Fluoreszenzspots vorliegen, welche einzelnen Cyclodextrinen zugeordnet werden konnten. Das Ergebnis für die Markierung von 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 mit Fluorescein markierten Cyclodextrinen ist in Abbildung 14 dargestellt.

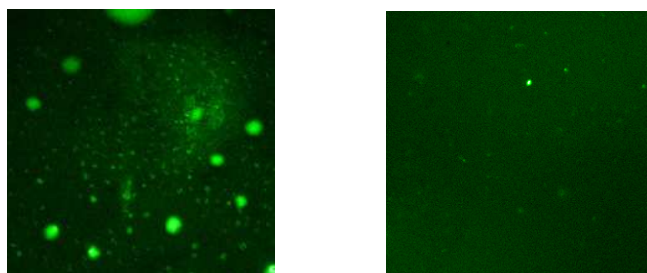


Abbildung 14: links: Ausschnitt eines mit Fluorescein markierten β -Cyclodextrins auf einer 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 Copolyimidoberfläche, rechts: Blindprobe^[10]

Abbildung 14 rechts zeigt im Vergleich zu Abbildung 14 links eine Aufnahme von einem nativen, d.h. nicht zum Säurechlorid aktivierten 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 Copolyimid. Dieses wurde ebenfalls mit einer Fluorescein markierten β -Cyclodextrinlösungen exponiert und diente als Blindprobe. Hier sind nur sehr wenige Fluoreszenzspots erkennbar.

Der Vergleich der beiden Aufnahmen in Abbildung 14 zeigt, dass kovalente Bindungen vom Copolyimid zum β -Cyclodextrin notwendig sind, um Fluoreszenzsignale zu erhalten. Durch einfache zwischenmolekulare Wechselwirkungen wie Physisorption, ist die Anlagerung von β -Cyclodextrinen an der Polymer-

oberfläche nicht möglich. Zur Auswertung der Fluoreszenzspektren wurde eine spezielle Auswertesoftware aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Seidel (Teilprojekt A8) verwendet.

Zusätzlich konnten an einem Polymerfilm zwei Phasengrenzflächen, einmal zwischen Deckglas und Polymer, und einmal zwischen Polymer und Luft aufgenommen werden. Dazu wurde der Copolymerfilm, der mit Fluorescein gelabelte Cyclodextrine enthält, auf das Objektiv gelegt und der Fokus durch die Änderung des Objektivs auf die jeweiligen Grenzschichten eingestellt. Abbildung 15 zeigt die verschiedenen Fluoreszenzaufnahmen.

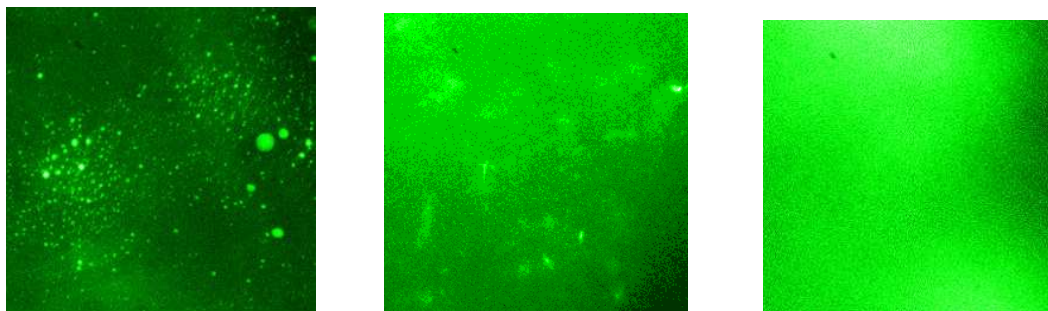


Abbildung 15: von links nach rechts: Phasengrenzfläche zwischen Glas und Polymer, Phasengrenzfläche zwischen Polymer und Luft und innerhalb des Polymers

Die erwarteten kleinen Fluoreszenzspots, die den markierten Cyclodextrinen zugeordnet werden können, befinden sich an der Grenzfläche zwischen Glas und Polymer (Abbildung 15 links) und sind weitgehend über die gesamte Oberfläche verteilt. Die Oberfläche des Polymers, die in Kontakt mit der Luft ist, weist im Vergleich zu der Phasengrenzfläche Glas-Polymer nur vereinzelte Fluoreszenzspots auf (Abbildung 15 Mitte). In Abbildung 15 rechts erscheint der Bildhintergrund zwar sehr hell (grün), dies ist aber nicht auf unendlich viele mit Fluorescein markierte β -Cyclodextrine zurückzuführen, sondern resultiert aus der Belichtungszeit der Probe. In der Abbildung 15 Mitte und rechts wurden längere Belichtungszeiten gewählt, weil bei der regulären Belichtungszeit von zwei Sekunden keine registrierbare Fluoreszenz auftrat. Die Ergebnisse aus Abbildung 15 zeigen, dass sich die meisten β -Cyclodextrine zwischen Glas und Polymer befinden. Da Cyclodextrine Wasserstoffbrückenbindungen zu den regelmäßig angeordneten Hydroxygruppen des Glases ausbilden können, ist dieser Effekt nachvollziehbar. Auch die im Gegensatz dazu geringe Fluoreszenzintensität auf der Oberfläche des Polymers ist verständlich, denn die Cyclodextrine können auf der Oberfläche des Polymers keine Wasserstoffbrückenbindungen oder andere Wechselwirkungen ausbilden. Die nicht vorhandene Fluoreszenz im Polymerbulk zeigt auch, dass die Cyclodextrine sich nicht in die Polymerstruktur assoziativ eingelagert haben. Da Rhodamine eine höhere Strahlungsintensität und daraus resultierend eine längere Photostabilität gegenüber Fluorescein aufweisen, wurde für weitere Messungen Rhodamin markiertes Cyclodextrin synthetisiert. Die Synthese erfolgte entsprechend dem Syntheschema in Abbildung 12. Anders als bei den Messungen zuvor, wurden Total Internal Reflection Fluoreszenzmikroskopie (TIRF)-Untersuchungen durchgeführt (Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Seidel Teilprojekt B8). Die TIRF-Untersuchungen eignen sich hierbei besonders gut für spektroskopische Aufnahmen von einzelnen Molekülen und sollten demnach eine genauere Auflösung der β -Cyclodextrine liefern. Abbildung 16 zeigt eine TIRF Messung von Rhodamin-Cyclodextrin, welches kovalent an das 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 Copolyimid über das Säurechlorid gebunden wurde.

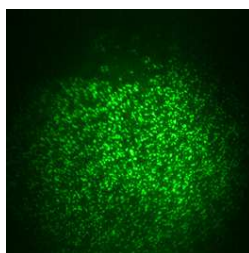


Abbildung 16: TIRF Aufnahmen von Rhodamin gelabelten β -Cyclodextrinen mit Polyimid

Man sieht wie gewünscht eine gleichmäßige Verteilung einzelner Fluoreszenzspots auf der Oberfläche des Copolyimids. Die unterschiedliche Helligkeit der einzelnen Fluoreszenzspots könnte auch ein Hinweis auf eine ungleichmäßige Oberfläche des Copolyimids sein, die durch das Abdampfen des Lösungsmittels entstanden ist.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen der Fluoreszenzmessungen schließen, dass mit dem Copolyimid 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 ein Polymer gefunden wurde, das eine weitgehend homogene Verteilung der markierten Cyclodextrine aufweist, während bei dem verwendeten Polyethylenmethacrylsäurecopolymer Agglomerationen auftreten. Die strukturellen Unterschiede zwischen dem Polyethylenmethacrylsäurecopolymer und dem Copolyimid 6FDA-ODA/6FDA-DABA 4:1 zeichnen sich auch in der Fluoreszenzmikroskopie ab. Das Polyethylenmethacrylsäurecopolymer liegt als Blockcopolymeres vor so dass daraus eine Agglomeration der Cyclodextrine resultiert. Daher wäre es für folgende Messreihen interessant ein Copolyimid 6FDA-ODA/6FDA-DABA 100:1 zu synthetisieren, um die Abstände der Fluoreszenzspots im Vergleich zu dem in diesem Projekt vermessenen Copolyimid zu untersuchen.

Literatur

- [1] Alexander Mixa, Polymermembranen bei der Entfernung organischer Schadstoffe in der Prozesswasseraufbereitung, *Diplomarbeit*, Heinrich-Heine Universität, (2005)
- [2] Mixa A. & Staudt, C. Membrane-based separation of phenol/water mixtures using ionic and covalent cross-linked ethylene-methacrylic acid copolymers, *International Journal of Chemical Engineering*, **2008**, Article ID 319392, DOI 10.1155/2008/319392
- [3] Katarzynski, D., Pithan, F. & Staudt, C. Pervaporation of Multi Component Aromatic/Aliphatic Mixtures through Copolyimide Membranes, *Separation Science and Technology* **43**, 59-70 (2008)
- [4] Katarzynski, D., & Staudt, C. Permeation properties of different aromatic substances in multicomponent aromatic/aliphatic pervaporation experiments, *Desalination*, **200**, 23-25 (2006).
- [5] Katarzynski, D. & Staudt-Bickel, C. Separation of multi component aromatic/aliphatic mixtures by pervaporation with copolyimide membranes, *Desalination*, **189**, 81-86 (2006).
- [6] Konietzny R., Bettermann I., Staudt C. ,Membrane based removal of sulfur aromatic compound from jet fuel, *2009 Bulletin of the Australian Institute of High Energetic Materials*, **61**, (2010)
- [7] I. Bettermann, C. Staudt, Permeation of binuclear aromatic and sulfur containing aromatic compounds, *Desalination* **250**, 1144–1146, (2010)
- [8] Wright, C. T. & Paul, D. R. Gas sorption and transport in UV-irradiated polyarylate copolymers based on tetramethyl bisphenol-A and dihydroxybenzophenone, *Journal of Membrane Science* **124**, 161-174, (1997).
- [9] Kita, H., Tanaka, K. & Okamoto K.-i., Effect of photocrosslinking on permeability and permselectivity of gases through benzophenone containing polyimide, *Journal of Membrane Science*, **87**, 139-147, (1994).
- [10] Schmelting, N., Synthese und mechanistische Untersuchungen an funktionalisierten Membranpolymeren, *Diplomarbeit*, Universität Düsseldorf, 2008.
- [11] Breiten, B. ,Synthese und Charakterisierung photovernetzbarer und oberflächenmodifizierter Membranpolymere, *Diplomarbeit*, Universität Düsseldorf, 2007.
- [12] Lu, J. & Yin, J. Synthesis and characterization of photocrosslinkable, side-chain, second-order
a. nonlinear optical poly(ester imide)s with great film-forming ability and long-term dipole orientation stability, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **41**(2), 303-312 (2003).
- [13] Son, S.W., Jung, S.H. & Cho, H.N., Novel fluorine-based polyimides with a confined chromophore, *Synthetic Metals*, **137** (1-3), 1065-1066 (2003).
- [14] Lee, M., Cheong, Y. & Gong, M. New soluble and intrinsically photosensitive polyimide: Synthesis and properties of Poly(amide-co-imide) containing p-phenylenediacyloyl moiety, *Korea Polymer Journal*, **9**(6), 327-331, (2001).
- [15] Sonntag, J.v. & Knolle, W., Maleimides as electron-transfer photoinitiators: quantum yields of triplet states and radical-ion formation, *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry*, **136**, 133-139 (2000).
- [16] Decker, C. & Bianchi, C., Photocrosslinking of a maleimide functionalized polymethacrylate, *Polymer International*, **52**, (5), 722-732 (2003).

- [17] Sonntag, J. v., Beckert, D., Knolle, W. & Mehnert, R. Electron transfer as the initiation mechanism of photocurable maleimide-vinyl ether based resins, *Radiation Physics and Chemistry*, **55**(5-6), 609-613 (1999).
- [18] Engler, G. & Hunger, K., Rotierender Fensterhalter für die Vermessung von Polymerfilmen Arbeitsgruppe Prof. Dr. K. Kleinermanns, unveröffentlichte Ergebnisse, Düsseldorf 2008
- [19] Schmeling, N., Hunger, K., Engler, G., Breiten, B., Rölling, P., Mixa, A., Staudt, C. & Kleinmanns, K., Photo Cross-linking of Ethylene Methacrylic Acid Copolymers Functionalized with Maleimide Side Groups, *Polymer International*, **58**, 720, 2009
- [20] Rölling, P. Synthese und Charakterisierung photovernetzbarer Membranmaterialien, Diplomarbeit, Universität Düsseldorf, 2007.
- [21] Lamers, M. Steuerung der Trenneigenschaften von Membranen durch supramolekulare Komplexbildung mit Cyclodextrinen, Dissertation Universität Düsseldorf, 2007.

6.2.2 Aus dem Teilprojekt entstandene Publikationen

- I. Schmeling, N., Hunger, K., Engler, G., Breiten, B., Rölling, P., Mixa, A., Staudt, C. & Kleinermanns, K. Photo Cross-linking of Ethylene Methacrylic Acid Copolymers Functionalized with Maleimide Side Groups, *Polymer International*, **2009**, Vol. 58, No.7, 720

Nicht begutachtete Publikationen:

- I. Rölling, P. Synthese und Charakterisierung photovernetzbarer Membranmaterialien, Diplomarbeit, Universität Düsseldorf, 2007.
- II. Breiten, B. Synthese und Charakterisierung photovernetzbarer und Oberflächenmodifizierter Membranpolymere, Diplomarbeit, Universität Düsseldorf, 2007.
- III. Schmeling, N. Synthese und mechanistische Untersuchungen an funktionalisierten Membranpolymeren, Diplomarbeit, Universität Düsseldorf, 2008.
- IV. Schmeling, N. & Hunger, K. Photo cross-linking of ethylene methacrylic acid copolymers functionalized with maleimide side groups, 21. Vortragstagung der Fachgruppe Photochemie der Gesellschaft Deutscher Chemiker mit dem Sonderforum Photochemie in den Materialwissenschaften, 06.10.2008–08.10.2008 Bielefeld, Posterpresentation
- V. Schmeling N. & Staudt, C. Synthesis and mechanistical investigations on photocrosslinkable membrane polymers, Workshop Internationales Promotionsnetzwerk PhD-net, Frontiers of Nanocomposite Materials, Universität Düsseldorf, 21. November – 4. Dezember 2008.

Rückblick auf die Förderung

Das Teilprojekt wurde von Juli 2005 bis Dezember 2009 im Sonderforschungsbereich gefördert.

6.3 Personal im Teilprojekt während der zu Ende gehenden Förderperiode

	laufende Nummer	Name, akademischer Grad, Dienststellung	engere Fachzugehörigkeit	Institut der Hochschule oder der außeruniversitären Einrichtung	Mitarbeit im Projekt in Wochenstunden	Entgeltgruppe
Grundausstattung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler		Prof. Dr. Claudia Staudt		Organische und Makromolekulare Chemie II	07/09-12/09 4 Std.	
		Projektleitung		Funktionsmaterialien	07/09-06/5 Std.	
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter						
Ergänzungsausstattung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler		Dipl.-Chem. Nadine Schmeling		Organische und Makromolekulare Chemie II	19,75 Std.	EG TVL 13/1/2
		Mitarbeiterin		Funktionsmaterialien		
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter						

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Grundausstattung):

Prof. Dr. Claudia Staudt
Projektleitung

Frau Prof. Dr. Claudia Staudt war wissenschaftliche Leiterin des Projekts. Sie betreute die wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter bei deren fachlicher Arbeit und der Vorbereitung von Veröffentlichungen. Sie koordinierte die wissenschaftlichen Kooperationen und war für das gesamte Teilprojekt verantwortlich.

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Ergänzungsausstattung):

Dipl.-Chem. Nadine Schmeling

Frau Schmeling beschäftigte sich mit der Synthese funktionalisierter Copolyimide und der Synthese verschiedener Photovernetzer basierend auf Maleimidderivaten. Auch führte sie die Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe zur Ermittlung der Verteilung der funktionellen Gruppen auf der Polymeroberfläche durch.

6.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt B6

6.1.1 Titel: *Caged Compounds*: Entwicklung verbesserter Werkzeuge für die Biophysik auf der Grundlage eines mechanistischen Verständnisses

6.1.2 Projektleitung

Schaper, Klaus, PD Dr., 16.01.1965, deutsch
Arbeitsgruppe für Organische Photochemie
Institut für Organische Chemie I
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Universitätsstr. 1
40225 Düsseldorf
Telefon: +49-211-8112571
E-Mail: schaper@klaus-schaper.de

6.2 Entwicklung des Teilprojekts

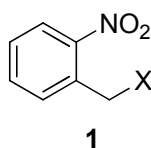
6.2.1 Bericht

I. Einleitung

Caged Compounds sind biologisch aktive Substanzen, die eine photolabile Schutzgruppe tragen. Durch diese Schutzgruppe verlieren die *biologisch aktiven Substanzen* ihre Aktivität. Durch Photolyse wird die Substanz freigesetzt und deren Aktivität wird so wieder hergestellt. *Caged Compounds* werden seit vielen Jahren als Werkzeuge in der Biochemie und Biophysik eingesetzt, da sie die Freisetzung der aktiven Substanz mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung ermöglichen.

Caged Compounds müssen eine Reihe von Anforderungen erfüllen, um für diese Anwendungen geeignet zu sein. Die Verbindungen müssen hinreichend wasserlöslich sein, da sie in biologischen Systemen eingesetzt werden sollen. Darüber hinaus müssen sie im Neutralen hydrolysestabil sein. Eine hohe Hydrophilie ist wünschenswert, um eine nicht gewünschte Wechselwirkung der *Caged Compound* mit hydrophoben Bestandteilen von biologischen Systemen zu minimieren. Neben diesen physikochemischen Anforderungen sind auch die biologischen Eigenschaften von Bedeutung. Durch die Einführung der Schutzgruppe soll die aktive Substanz ihre Aktivität vollständig verlieren. Gleichzeitig darf die *Caged Compound* aber auch den durch die biologisch aktive Substanz ausgelösten Prozess nicht inhibieren. Weiterhin soll die *Caged Compound* auch keinen Einfluss auf andere Prozesse im biologischen System nehmen. Dies wird häufig in der Forderung zusammengefasst, dass die *Caged Compound* keine Wechselwirkung mit dem zu untersuchenden biologischen Material zeigen soll. Diese Anforderung gilt nicht nur für die *Caged Compound*, sondern auch für alle Produkte der Photoreaktion, ausgenommen der aktiven Substanz. Einen Beitrag zur Verhinderung unerwünschter Wechselwirkungen mit biologischen Materialien kann dabei die schon oben erwähnte Steigerung der Hydrophilie der Schutzgruppe leisten. Zusätzlich zu den erwünschten biologischen und physikochemischen Eigenschaften gibt es photophysikalische Eigenschaften, die für *Caged Compounds* angestrebt werden. Hier sind vor allem eine niedrige Anregungsenergie, eine hohe Quantenausbeute und eine schnelle Freisetzung der aktiven Verbindung zu nennen. Weiterhin ist es wünschenswert, dass die photolabile Schutzgruppe leicht zugänglich ist und sich in einem einfachen Schritt mit verschiedenen biologisch aktiven Verbindungen koppeln lässt.

Verschiedene photolabile Schutzgruppen werden heute verwendet. Dabei haben die *o*-Nitrobenzylschutzgruppe **1** und ihre Derivate die weiteste Anwendung gefunden. Es besteht aber noch erhebliches Potential zur Entwicklung verbesserter Derivate.

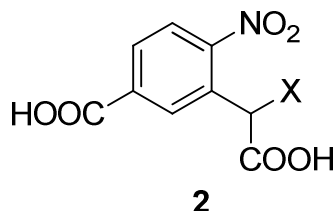


II. Stand der Forschung

Im Rahmen unserer synthetischen Arbeiten haben wir uns mehreren Fragestellungen gewidmet.

II.1 Hydrophile Caged Compounds

Wie in der Einleitung schon erläutert, haben wir uns für *Caged Compounds* mit hoher Hydrophilie interessiert. Bereits in unserem letzten Bericht haben wir über die Synthese von neuen hydrophilen *o*-Nitrobenzyl-Derivaten berichtet. Neben anderen Verbindungen erscheinen uns insbesondere Verbindungen vom Typ **2** interessant. Im letzten Jahr der Förderung haben wir die Synthese dieser Systeme weiter optimiert und die photophysikalische Charakterisierung dieser Derivate vervollständigt (siehe Lit 5).

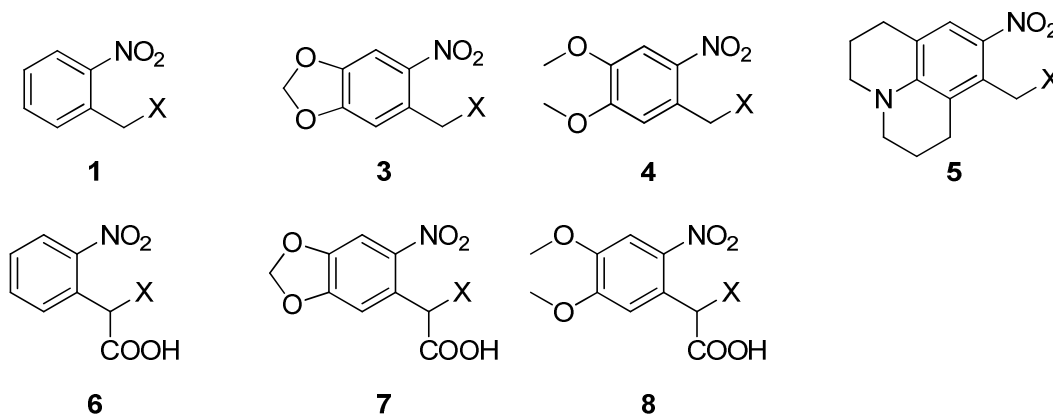


II.2 Bathochrom absorbierende Caged Compounds

Wenn *Caged Compounds* in biologischen Experimenten eingesetzt werden sollen, so ist es von großer Bedeutung, dass die *Caged Compounds* eine möglichst bathochrome Absorption besitzen. Für eine effiziente Photolyse ist es wichtig, dass der Chromophor eine hohe Absorbanz bei der Anregungswellenlänge hat. Eine hypsochrome Bestrahlung ergibt hinreichend hohe Absorbanzen, hat aber den Nachteil, dass es auch zu einer photochemischen, bzw. photobiologischen Zellschädigung kommt.

Eine Reihe von bathochrom absorbierenden *Caged Compounds* von anderem Strukturtyp als die *o*-Nitrobenzylsysteme ist beschrieben. Allerdings besitzen die vergleichsweise hypsochrom absorbierenden *Caged Compounds* vom *o*-Nitrobenzyl-Typ eine Reihe von Vorteilen, die auch dazu beigetragen haben, dass sie bei weitem am häufigsten verwendet werden. Daher haben wir uns für die Entwicklung und Untersuchung von bathochrom absorbierenden *Caged Compounds* vom *o*-Nitrobenzyl-Typ interessiert.

Eine bathochrome Absorption kann durch die Einführung von Donoren in den aromatischen Ring erreicht werden. Daher wurden die Derivate **3** – **5** und **7** synthetisiert (siehe Lit. 1), die verglichen mit **1** bathochrom absorbieren. Im letzten Jahr wurde diese Reihe von Verbindungen noch um das Derivat **8** ergänzt.

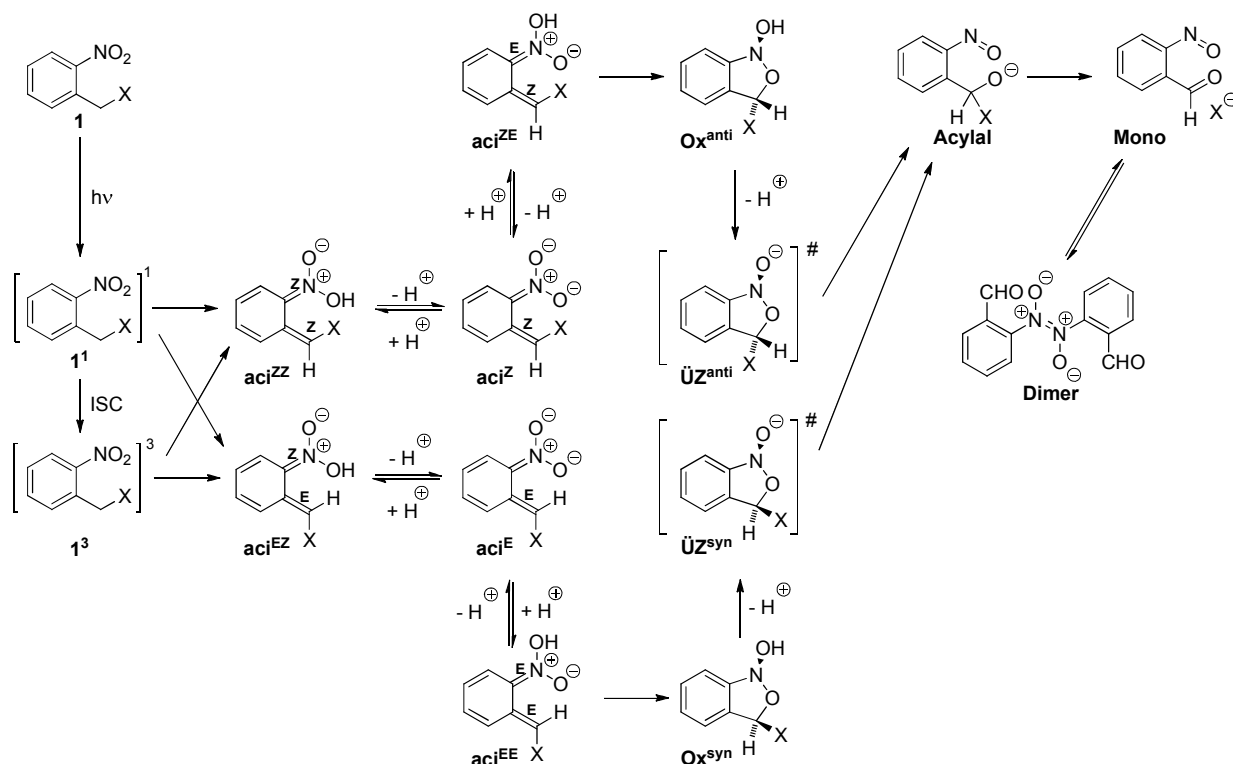


Es hat sich gezeigt, dass Verbindung **5** keine Photoreaktion eingeht. Bei den bereits literaturbekannten Derivate **3** und **4** gab es eine kontroverse Debatte über die Quantenausbeute. So wurde berichtet, dass diese Systeme fast keine Quantenausbeute besitzen, andererseits wurden diese Systeme immer wieder erfolgreich eingesetzt. Wir konnten zeigen, dass die Quantenausbeute je nach Polarität der Umgebung von gut bis nahezu Null variiert.

In Kooperation mit der theoretischen Chemie (Timo Fleig, **C3**) konnten wir dieses Verhalten erklären. Für Verbindungen vom Typ **2** kann die Photochemie aus S_1 und T_1 ablaufen. Für Verbindungen vom Typ **3** – **6** findet die Photoreaktivität ausschließlich aus dem Singulett-Zustand statt. Schema 1 gibt eine Übersicht über den Verlauf der Photoreaktion. Ausgehend von 1^1 und 1^3 ist eine Wasserstoffverschiebung zu den *aci*-Formen aci^{ZZ} und aci^{EZ} immer dann möglich wenn es sich bei den angeregten Zuständen um lokal angeregte $n-\pi^*$ -Zustände der Nitrogruppe handelt. In diesen Zuständen hat der Sauerstoff der Nitrogruppe einen stark radikalischen Charakter und ist so zur H-Abstraktion befähigt.

Für Verbindungen vom Typ **1** sind S_1 - und T_1 -Zustand lokal angeregte $n-\pi^*$ -Zustände der Nitrogruppe. Für Verbindungen vom Typ **3**, **4**, **7** und **8** ist die Lage komplizierter. Der T_1 -Zustand hat Charge Transfer (CT) Charakter und ist daher nicht reaktiv. Der S_1 -Zustand ist in unpolare Umgebung der lokal angeregte $n-\pi^*$ -Zustand, in polarer Umgebung hat der S_1 -Zustand dagegen CT-Charakter (siehe Lit. 4)

In Verbindungen vom Typ **5** besitzen sowohl S_1 - als auch T_1 -Zustand CT-Charakter und sind daher nicht reaktiv.



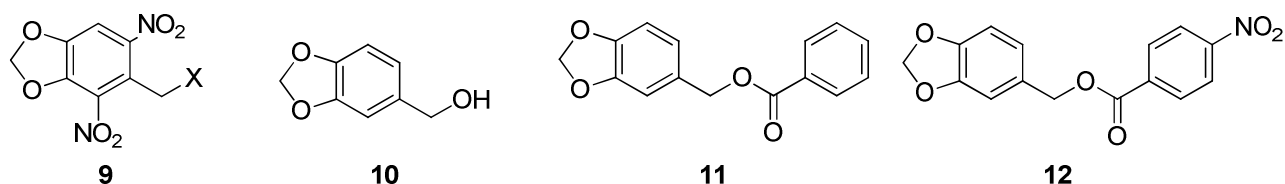
Schema 1: Mechanismus der Photoreaktion von *o*-Nitrobenzylverbindungen.

Es ist seit langem bekannt, dass Verbindungen vom Typ **6** eine ca. doppelt so hohe Quantenausbeute zeigen, wie Verbindungen vom Typ **1**. Bei der Synthese der Verbindungen vom Typ **7** und **8** haben wir das Ziel verfolgt, diesen Effekt auf die Verbindungen vom Typ **3** und **4** zu übertragen, sowie gleichzeitig die gesteigerte Hydrophilie zu nutzen. Tatsächlich hat sich gezeigt, dass diese Verdopplung der Quantenausbeute auch hier beobachtet wird.

Des Weiteren konnten wir in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Einführung von Donoren nicht wirklich zu einer bathochromeren Absorption führt. Zumindest in unpolaren Lösungsmitteln verschiebt sich die bathochromste Absorption, die lokale $n-\pi^*$ -Anregung der Nitrogruppe kaum. Allerdings gewinnt dieser sehr schwache, verbotene Übergang drastisch an Intensität, wenn einige wenige Prozent des CT-Übergangs einmischen, so dass der Eindruck einer stärker bathochromen Absorption entsteht.

Diese Erkenntnisse führen zu dem Problem, dass man durch die Einführung von Donoren zwar eine pseudo-bathochrome Absorption erreichen kann, aber die Lage des lokal angeregten $n-\pi^*$ -Zustandes der Nitrogruppe kaum beeinflusst. Sobald man zu deutlich bathochromer absorbierenden Systemen kommt, verliert man die Photoreaktivität.

Im letzten Jahr haben wir uns daher mit der Frage beschäftigt, ob es möglich ist, die Lage des lokal angeregten $n-\pi^*$ -Zustandes der Nitrogruppe zu beeinflussen.



In diesem Zusammenhang haben wir Verbindungen vom Typ **9** synthetisiert. Bei dieser eher trivale anmutenden Verbindung traten erhebliche Probleme bei der Synthese auf. Die doppelte Nitrierung von **10** liefert nicht den gewünschten Syntesebaustein. Vielmehr beobachtet man bei gleichzeitiger doppelter Nitrierung den Verlust der Seitenkette. In einem zweiten Versuch haben wir versucht geschützte Benzoesäuren als Modellverbindung für die photophysikalische Charakterisierung durch Nitrierung von **11** zu gewinnen. Hier ist eine doppelte Nitrierung zwar möglich, allerdings ergibt sich ein kompliziertes Produktgemisch. Neben doppelt und einfach nitrierter photolabiler Schutzgruppe und wenig Zersetzungsprodukt

beobachtet man nitrierte Benzoesäuren. Erst die Verwendung von **12** erlaubte die Synthese dieser neuartigen Schutzgruppe. Analoge Essigsäureester sind leichter zugänglich. Der photochemische Abbau dieser Verbindung bei 360 nm und 405 nm ist deutlich effizienter als die der anderen Derivate. Für diese Messungen wurde die Bestrahlungsapparatur LUMOS 43 verwendet, die im SFB beschafft wurde.

II.3 Sensibilisierte Bestrahlung von *Caged Compounds*

In Kapitel II.2 wurde die Synthese bathochrom absorbierender *Caged Compounds* ausführlich diskutiert. Alternativ dazu bietet sich eine sensibilisierte Bestrahlung der *Caged Compounds* an. Dieser Fragestellung haben wir uns im letzten Jahr gewidmet. In Abbildung 1 sind die Ergebnisse der sensibilisierten Bestrahlung zusammengefasst. Die Proben wurden bei 350 nm (durchgezogene Linie), bzw. bei 410 nm (gestrichelte Linie) in einer LUMOS 43 bestrahlt. Der Abbau der *Caged Compound* wurde mittels HPLC verfolgt (schwarze Linie). In Gegenwart von Xanthon **13** wird die Photoreaktion langsamer, in Gegenwart von Xanthon **14** beobachtet man deutliche Sensibilisierung und in Gegenwart von Thioxanthon **15** beobachtet man eine mehr als 80fache Beschleunigung der Photoreaktion. Auch bei einer Bestrahlung bei 410 nm in Gegenwart von Thioxanthon ist noch eine sehr schnelle Photoreaktion zu beobachten.

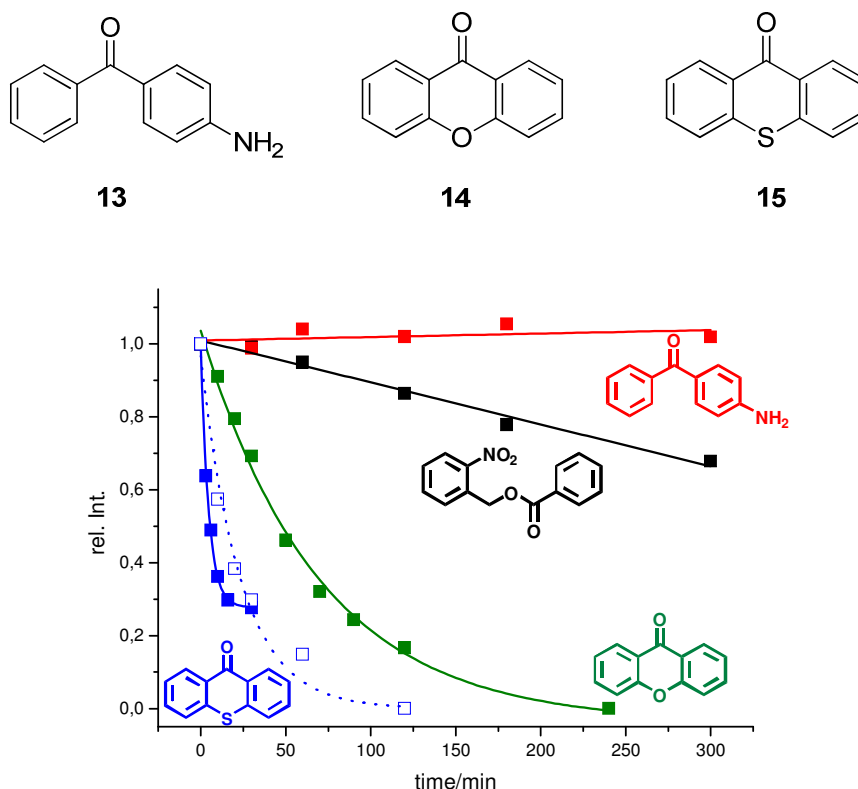
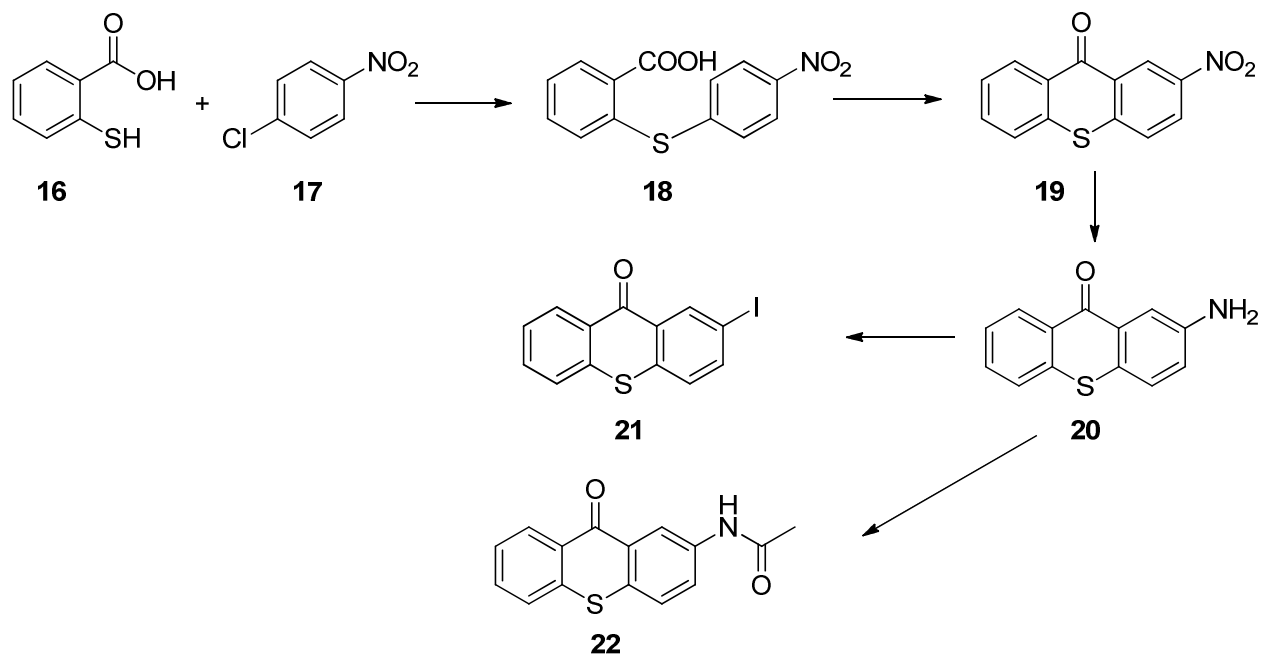


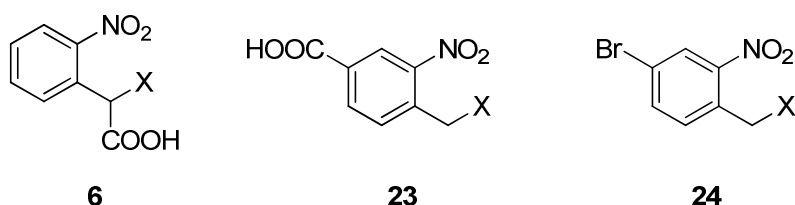
Abbildung 1: Sensibilisierte Bestrahlung von **1** (X = Benzoat).

II.4 Bichromophore

Der Vorteil des Einsatzes von Sensibilisatoren wurde in Kapitel II.3 diskutiert. Setzt man Sensibilisatoren bei Experimenten in der biologischen Matrix ein, so besteht das Risiko, dass es auch zur effektiven Sensibilisierung von Photoprozessen in der biologischen Matrix kommt. Um dies zu verhindern muss gewährleistet sein, dass die Energieübertragung auf die *Caged Compound* extrem effizient ist. Um dies zu erreichen, muss man extrem hohe Konzentrationen der *Caged Compound* verwenden, was nicht praktikabel ist, oder man muss Bichromophore bestehend aus *Caged Compound* und Triplettensensibilisator darstellen. Dieser Fragestellung haben wir uns im letzten Jahr gewidmet. Leider sind praktisch keine Derivate des Thioxanthon kommerziell erhältlich.



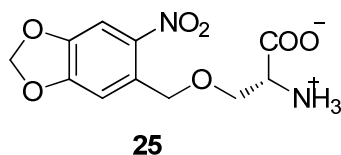
Das nitrierte Thioxanthon-Derivat **19** ist in zwei Stufen ausgehend von Thiosalicylsäure **16** und **17** zugänglich. Ausgehend von diesem Derivat konnte das entsprechende Amino-Derivat **20** erhalten werden. Schon früher haben wir monocarboxylierte *Caged Compounds* vom Typ **6** und **23** synthetisiert. Diese können direkt oder über einen Linker (Glycin, γ -Aminobuttersäure, ...) mit **20** gekoppelt werden. In diesen Bichromophoren ist das Thioxanthon Amid-substituiert. Alle Referenzverbindung wurde **22** synthetisiert. Dieses absorbiert noch einmal 20 nm bathochromer als Thioxanthon **15**. Untersuchungen zur Eignung von **22** als Sensibilisator werden gerade durchgeführt.



Alternativ wurde das Aminothioxanthon **20** auch in das Iodid **21** überführt. Dies soll in einer metallorganischen Kopplung mit **24** verknüpft werden.

II.5 Anwendung

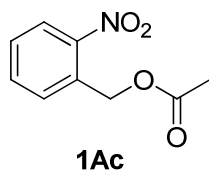
In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von L. Schmitt (**B8**) interessieren wir uns auch für photoaktivierbare Proteine. In diesem Zusammenhang haben wir uns mit der Synthese eines *caged* Serins **25** beschäftigt. In der Literatur sind verschiedene Synthesen beschrieben. Die Beschreibungen sind aber fehlerhaft und unvollständig und liefern schlechte Ausbeuten.



Daher haben wir begonnen eine effiziente Synthese zu entwickeln. Erste Versuche zum Einbau des *caged* Serins in Proteine laufen bereits.

II.6 Mechanismus

Für die gezielte Entwicklung von *Caged Compounds* mit verbesserten Eigenschaften ist ein detailliertes Verständnis des Reaktionsmechanismus unerlässlich. In früheren Arbeiten haben wir dabei der transienten Absorptionsspektroskopie mit ns-Zeitauflösung bedient. Mit dieser Methode ist eine Auflösung der schnellen Schritte zur Anfang der Photoreaktion nicht möglich.



In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Gilch (**A11**) haben wir deshalb die Photochemie von **1Ac** mit Hilfe der fs-Spektroskopie untersucht. Nach der Anregung, die überwiegend nach S_2 erfolgt, relaxiert der S_2 -Zustand innerhalb von 0.05 ps. Der S_1 -Zustand hat eine Lebensdauer von 1 ps und desaktiviert auf drei verschiedenen Pfaden, unter strahlungsloser Desaktivierung, unter ISC zum heißen T_1 -Zustand und unter Reaktion zum heißen *aci*-Nitro-Intermediat. Die beiden heißen Zustände leben für ca. 8 ps und geben ihre Energie durch Schwingungskühlen ab. Der T_1 -Zustand reagiert über ein unbekanntes Intermediat in zwei Schritten mit Lebensdauern von 560 ps und 1940 ps ebenfalls zur *aci*-Nitro-Verbindung. Die Natur dieses unbekanntes Intermediates ist nicht klar, es könnte sich um den T_1 -Zustand der *aci*-Nitro-Form handeln.

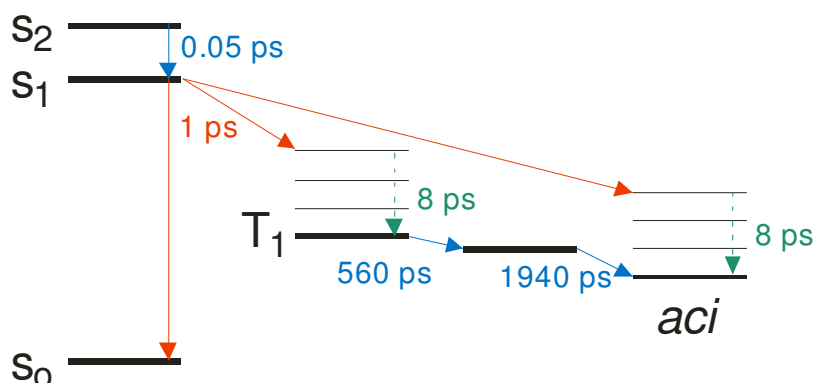


Abbildung 2: Gemessene Geschwindigkeitskonstanten für die Photolyse von **1Ac**.

6.2.2 Aus dem Teilprojekt entstandene Publikationen

- a) Arbeiten, die in Publikationsorganen mit einer wissenschaftlichen Qualitätssicherung zum Zeitpunkt der Antragstellung erschienen oder endgültig angenommen sind, und Buchveröffentlichungen:
- 1 Schaper, K., Etinski, M. & Fleig, T. Theoretical Investigations of the Excited States of 2-Nitrobenzyl and 4,5-Methylenedioxy-2-nitrobenzyl *Caging* Groups, *Photochem. Photobiol.*, **85**, 1075-1081(2009).
 - 2 Schaper, K., Madani Mobarekeh, S. A., Doro, P. & Maydt, D., The $\alpha,5$ -Dicarboxy-2-nitrobenzyl *Caging* Group, a Tool for Biophysical Applications with Improved Hydrophilicity: Synthesis, Photochemical Properties and Biological Characterization, *Photochem. Photobiol.*, *angenommen am 14.8.2010*

6.3 Rückblick auf die Förderung

Das Teilprojekt wird seit 7.2005 im Sonderforschungsbereich gefördert. Es wurde zum 6.2010 beendet.

6.3.1 Personal im Teilprojekt während der zu Ende gehenden Förderperiode

	laufende Nummer	Name, akademischer Grad, Dienststellung	engere Fachzugehörigkeit	Institut der Hochschule oder der außeruniversitären Einrichtung	Mitarbeit im Projekt in Wochenstunden	Entgeltgruppe
Grundausrüstung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	1	Schaper, Klaus, PD Dr.	Organische Chemie	Lehrstuhl für org. Chem.	10	
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter						
Ergänzungsausrüstung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	1	Lechner, Torsten Dipl.-Chem.	Organische Chemie	Lehrstuhl für org. Chem.	19.9	TVL-13/2
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter						

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Grundausrüstung):

- PD. Dr. Klaus Schaper:
Er hat seine Erfahrungen auf dem Bereich der Synthese und Untersuchung von *Caged Compounds* eingebracht. Zentrale Aufgabe war die Koordination der Kooperationen, so dass die physikochemischen und theoretischen Untersuchungen gezielt die Fragestellungen von Interesse ansprechen konnten und die Ergebnisse der verschiedenen Kooperationen gebündelt werden konnten.

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Ergänzungsausrüstung):

- Dipl. Chem. Thorsten Lechner:
Er hat die synthetischen Arbeiten fortgeführt. Dies beinhaltete die Bereitstellung von Modellsubstanzen zur Messung bei unseren Kooperationspartnern, sowie die Ausarbeitung neuer Synthesestrategien.

6.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt C1

6.1.1 Titel: Quantenchemische Bestimmung von spinmagnetischen Wechselwirkungen und Singulett-Triplett-Kopplungen mit Multireferenz-Konfigurationswechselwirkungs-Methoden

6.1.2 Projektleitung

Marian, Christel, Prof. Dr., *04.06.1954, deutsch
Institut für Theoretische Chemie und Computerchemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,
Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf
Telefon: (0211) 81-13209/-13210
E-Mail: Christel.Marian@uni-duesseldorf.de

6.2 Entwicklung des Teilprojekts

6.2.1 Bericht

Allgemeines Ziel des Teilprojekts C1 war die Aufklärung von Relaxations- und Reaktionsmechanismen, die der elektronischen Anregung verschiedener SFB-relevanter Chromophore folgen. Dabei nahmen die theoretische Beschreibung von Singulett-Triplett-Interkombinationen sowie die quantenchemische Charakterisierung intermediär auftretender Triplettzustände auf der Basis ihrer spinmagnetischen Eigenschaften eine zentrale Rolle ein.

In Einzelnen wollten wir unsere Methoden zur Berechnung von Intersystem Crossing (ISC)-Raten optimieren und zur Untersuchung des Mechanismus von Singulett-Triplett-Übergängen in photochemischen Reaktionen einsetzen. In Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen des SFB sollte die Rolle von intermediären Triplettzuständen in isolierten DNA-Basen und bei der Bildung von DNA-Photoschäden, bei der Signalgebung in Blaulichtrezeptoren sowie bei der Photolyse von photolabilen Schutzgruppen untersucht werden. Interessante mechanistische Fragestellungen betrafen Systeme mit ultraschneller Interkombination wie z. B. Xanthone, die als Triplettensensibilisatoren dienen können, oder Azobenzole und α,ω -Diphenylpolyene, die als Triplettlöcher für Fluoreszenzfarbstoffe fungieren können. Die in der vorherigen Förderperiode entwickelten und bisher nur an kleinen Systemen getesteten Methoden zur Berechnung von Nullfeldaufspaltungsparametern und g-Tensoren transienter Triplettzustände wollten wir auf Carotinoide und Chlorophylle anwenden. Schließlich hatten wir uns die Charakterisierung elektronisch angeregter Singulett- und Triplettzustände von Carotinoiden, insbesondere Carbonylcarotinoiden, und Chlorophyllen zum Ziel gesetzt.

Da die Projektförderung bereits nach einem Viertel des beantragten Zeitraums eingestellt wurde, konnten die Projektziele nur partiell erreicht werden. Aus diesem Teilprojekt sind seit dem letzten Bericht im Januar 2009 13 referierte Arbeiten hervorgegangen, und es konnten zwei Promotionen sowie zwei Diplomarbeiten abgeschlossen werden. Da es sich um ein sehr umfangreiches Teilprojekt handelte, wurde auf eine Auswahl verzichtet und in Abschnitt 3.2.2 alle Publikationen aufgeführt. Im Folgenden werden die Resultate kurz referiert und inhaltlich diskutiert.

Methodenentwicklung

Nullfeldaufspaltungen. Die Schnittstelle zwischen dem in der AG Neese (ehemaliges TP C2) entwickelten Programm zur Berechnung von RI-genäherten dipolaren Spin-Spin-Wechselwirkungsintegralen und dem von uns in der letzten Förderperiode entwickelten SPOCK.SISTR-Programm konnte fertig gestellt werden, so dass technisch jetzt auch größere organische Moleküle mit räumlich nicht entarteten Triplettzuständen der Berechnung von Nullfeldaufspaltungen zugänglich sind. [8*] Benchmarkrechnungen zeigen, dass die Fehler, die man bei der RI-Näherung mit Standard-Hilfsbasen macht, verschwindend gering sind. Vergleiche mit experimentell bekannten Daten zeigen jedoch auch, dass zur Berechnung der Nullfeldaufspaltung durch elektronische Spin-Spin-Wechselwirkung große und flexible Valenzorbitalbasen, möglichst von Quadrupel-Zeta-Qualität, benötigt werden.

Zeitabhängige Verfahren zur Berechnung von ISC-Raten. Es wurden zeitabhängige Methoden zur Berechnung von ISC-Raten in Condon-Näherung entwickelt, die in der Dissertationsschrift von M. Etinski

[15*] ausführlich beschrieben sind. Eine Veröffentlichung in einer wissenschaftlichen Zeitschrift ist in Vorbereitung. Der Formalismus lehnt sich eng an die Ansätze von Lin, Islampour und Mitarbeitern [1,2] für interne Konversion an, die auf der ‚generating function‘-Methode von Kubo und Mitarbeitern [3,4] basieren. Er setzt voraus, dass es sich bei der Wechselwirkung um eine kleine, nur langsam mit den Kernkoordinaten variierende Störung handelt, die Potentialflächen der koppelnden Singulett- und Triplettzustände harmonisch genähert und die jeweiligen Normalkoordinaten mit Hilfe einer affinen Abbildung, der Duschinsky-Transformation, in einander überführt werden können. Insgesamt wurden drei verschiedene Formeln abgeleitet und in das VIBES-Programm implementiert, das jetzt neben dem wohl erprobten zeitenabhängigen Formalismus zur Berechnung von ISC-Raten für direkte und vibronische Spin-Bahn-Kopplung [5] einen neuen Zweig zur Berechnung von ISC-Raten für direkte Spin-Bahn-Kopplung im zeitenabhängigen Formalismus enthält: (i) eine im Rahmen der genannten Näherungen exakte Formel für die Korrelationsfunktion, (ii) eine Cumulanten-Entwicklung der Korrelationsfunktion bis zur zweiten Ordnung sowie (iii) eine Kurzzeitapproximation zur Cumulanten-Entwicklung. Während die Integration der Ausdrücke (i) und (ii) über das gewählte Zeitintervall numerisch erfolgen muss, ist die Integration von (iii) analytisch möglich. Die Anwendbarkeit der drei Formeln wurde an ausgewählten Beispielen überprüft, für die in der letzten Förderperiode bereits Ergebnisse mit der zeitenabhängigen Methode erhalten worden waren: Thymin, ein Beispiel für schnelle ISC bei großer Energielücke und erheblichen Duschinsky-Rotationen, Flavon, ein Molekül mit ultraschneller ISC bei niedriger Symmetrie und einer mittelgroßen Anzahl von Schwingungsmoden, Phenalenon, ein planares Molekül mit verhältnismäßig kleiner Energielücke und hoher Triplettquantenausbeute, sowie Porphyrin, ein Beispiel für langsame ISC in Condon-Näherung bei hoher Symmetrie der Normalmoden. Als Komplikation ergaben sich im Fall der Moleküle mit geringer Verschiebung einiger Normalkoordinaten (Phenalenon, Porphyrin und partiell auch Flavon) lang anhaltende Oszillationen der Korrelationsfunktion, die eine numerische Integration des Zeitintervalls unmöglich machten. In realen Molekülen mit anharmonischem Kraftfeld werden diese Oszillationen gedämpft, da die Korrelationsfunktion durch Wechselwirkung mit einem Medium oder durch Kopplung der internen Schwingungsmoden dephasiert. Zur Behebung des Problems wurde eine gaußförmige Dämpfungsfunktion eingeführt, deren Breite durch den Anwender im Energiebereich festgelegt wird und die dann in die Zeitdomäne transformiert wird. Dadurch soll erreicht werden, dass die Wahl des Parameters in ähnlicher Weise geschehen kann wie die Wahl des Energieintervalls im zeitenabhängigen Formalismus. Die Testresultate zeigen, dass das zeitliche Integrationsintervall und die Anzahl der Stützstellen an die energetische Breite der Dämpfung angepasst werden müssen. Die Cumulanten-Entwicklung ist gegenüber der Wahl des Dämpfungsparameters deutlich stabiler als die exakte Korrelationsfunktion. Dennoch zeigt bei genügend groß gewähltem Integrationsintervall die exakte Korrelationsfunktion die beste Übereinstimmung mit den Vergleichswerten der zeitenabhängigen Rechnung, wenn auch die Cumulanten-Entwicklung nur wenig schlechter abschneidet. Die in der Kurzzeitznäherung ermittelten Raten sind in den vier Testbeispielen etwa eine Zehnerpotenz größer. In Anbetracht des geringen Aufwands für die Ratenberechnung im Rahmen dieses Ansatzes kann das Ergebnis dennoch als zufrieden stellend bewertet werden. Außerordentlich erfreulich ist der geringe Rechenzeitbedarf der neu entwickelten Methoden, der im schlimmsten Fall in der Größenordnung von einigen Minuten lag, während die diskrete Summation von Franck-Condon-Faktoren im zeitenabhängigen Zweig von VIBES in asymmetrischen Molekülen mitunter viele Wochen dauern kann, wenn der adiabatische Energieunterschied der wechselwirkenden Zustände groß ist. Vibronische Spin-Bahn-Kopplung kann derzeit noch nicht im zeitenabhängigen Formalismus behandelt werden. Eine Effizienzsteigerung der Verfahren zur Berechnung dieser Kopplung ist für Chromophore in komplexen protischen Umgebungen unabdingbar. Ein entsprechender Antrag auf Förderung im Normalverfahren wurde jetzt gestellt.

Anwendungen

DNA-Basen. Es kann als gesichert gelten, dass DNA-Basen nach UV-Anregung mehrheitlich durch ultraschnelle Relaxation in den elektronischen Grundzustand zurückfallen. Dieser experimentelle Befund wird durch Ergebnisse theoretischer Untersuchungen gestützt (s. auch Bericht TP C4), die die Existenz konischer Durchschneidungen zwischen den niedrigsten elektronisch angeregten Singulettzuständen und dem Grundzustand bestätigen. In der Literatur fanden sich widersprüchliche Interpretationen zur Identität eines optisch dunklen, langlebigen transienten Zustands, der in verschiedenen Uracilderivaten und ihren mikrohydratisierten Komplexen im Düsenstrahl beobachtet wurde. Vorgeschlagen worden waren S_1 ($n\pi^*$) oder T_1 ($\pi\pi^*$). Gemäß der von uns erhaltenen theoretischen Resultate zerfällt der S_1 ($n\pi^*$)-Zustand des Uracils, Thymins und 1-Methylthymins im Subnanosekundenbereich durch ISC in den T_1 ($\pi\pi^*$)-Zustand.[3*] Es ist deshalb wenig wahrscheinlich, dass der in TP A4 beobachtete transiente Zustand mit einer Lebensdauer von mehreren Hundert Nanosekunden der S_1 ($n\pi^*$)-Zustand ist. Für diese Interpretation spricht auch die hohe Triplettquantenausbeute von Uracilderivaten in aprotischen Lösungsmitteln sowie die gute Übereinstimmung des berechneten $S_0 - T_1$ -Differenzinfrarotspektrums mit experimentellen Befunden. Die Triplettquantenausbeute kann noch gesteigert werden kann, wenn das C_6 -Atom im Ring durch ein Stickstoffatom ersetzt wird. Dabei ändert sich allerdings, nach den Ergebnissen unserer Stu-

dien urteilend, die Rate für den strahlungslosen Übergang von S_1 ($n\pi^*$) nach T_1 ($\pi\pi^*$) kaum.[13*] Vielmehr deutet eine konische Durchschneidung zwischen dem primär angeregten S_2 ($\pi\pi^*$)-Zustand des 6-Azauracils und zwei niedrig liegenden $^1(n\pi^*)$ -Zuständen auf eine nahezu quantitative strahlungslose Relaxation der S_2 ($\pi\pi^*$)-Population in den S_1 ($n\pi^*$)-Zustand hin, der als Durchgangszustand für die Triplettbildung dient. Unsere Arbeiten zur Abhängigkeit der Lage der elektronisch angeregten Zustände vom Methylierungs- und Hydratisierungsgrad des Uracilgrüsts sind in [10*] dokumentiert. Hier konnten eindeutige Trends festgestellt und quantifiziert werden, die von der jeweiligen Elektronenstruktur des angeregten Zustands und der Position der Methylgruppe(n) abhängen und sich anschaulich über die Ladungsverteilung in den Grenzorbitale erklären lassen. Weiter zeigt sich, dass durch die Mikrohydratisierung die Reihenfolge der niedrigsten $^1(\pi\pi^*)$ - und $^1(n\pi^*)$ -Zustände im Vertikalspektrum umgedreht wird, dass adiabatisch dennoch der $^1(n\pi^*)$ -Zustand dem S_1 -Zustand entspricht. Erst die elektrostatische Wechselwirkung mit weiteren Wassermolekülen, die in diesem Fall durch ein Kontinuumsmodell simuliert wird, schiebt die ($n\pi^*$)-Zustände energetisch soweit nach oben, dass sie nicht mehr bzw. nur noch mit geringer Wahrscheinlichkeit als Zwischenzustände der ISC fungieren können. Ein avancierter Zugang zu Lösungsmittelfekten auf elektronische Anregungen wurde für Guanin in Kooperation mit TP C4 gewählt. Die Beschreibung des in Wasser gelösten Moleküls mit Hilfe eines mit Molekulardynamik (MD)-Simulationen kombinierten quantenmechanischen und molekülmechanischen (QM/MM)-Ansatzes zeigte, dass dynamische und elektrostatische Effekte auf das Absorptionsspektrum nahezu gleich groß und additiv sind.[6*]

Alle Arbeiten im Teilprojekt zu *Flavinen und verwandten Verbindungen* sind Bestandteil der Dissertation von S. Salzmann.[14*] Über die Photophysik von modifizierten Isoalloxazinen in wässriger Lösung, die wir gemeinsam mit TP B1 und B2 untersucht haben, wurde im Berichtsband zur vergangenen Förderperiode bereits ausführlich berichtet. Hierzu ist mittlerweile eine gemeinsame Publikation erschienen. [2*] Alloxazin, das sich von Isoalloxazin durch die Protonierung der N_1 - statt der N_{10} -Position unterscheidet und im elektronischen Grundzustand erheblich stabiler als Isoalloxazin ist, weist signifikant höhere elektronische Anregungsenergien als Isoalloxazin auf - mit Konsequenzen für die Photophysik.[5*] Im Berichtszeitraum wurden die theoretischen Arbeiten zum Einfluss der Proteinumgebung in der LOV-Domäne von Blaulichtrezeptoren auf den Triplettbildungsmechanismus von Flavinmononukleotid abgeschlossen.[4*] Gemeinsam mit TP C4 wurden Anregungsenergien und Spin-Bahn-Wechselwirkungen mit Hilfe eines QM/MM-Ansatzes berechnet, wobei die quantenmechanisch beschriebene Region zusätzlich zum Chromophor auch Teile der Proteinumgebung umfasste und die Einbettung der weiteren Umgebung elektrostatisch erfolgte. Die Kombination von DFT/MRCI und SPOCK (QM) und dem CHARMM-Kraftfeld (MM) hat sich dabei bewährt. Die theoretischen Untersuchungen ergeben ein differenziertes Bild zur bathochromen Verschiebung der ($n\pi^*$)-Zustände in der LOV-Domäne: Während Anregungen aus den nicht bindenden Sauerstofforbitalen gegenüber der Gasphase ähnlich starke Blauverschiebungen erfahren wie in wässriger Lösung, werden Anregungen aus nicht bindenden Orbitalen, die primär an den Stickstoffatomen des Isoalloxazingerüsts lokalisiert sind, von der Proteinumgebung kaum beeinflusst. Es ist deshalb damit zu rechnen, dass vibronische Spin-Bahn-Kopplung die nach El Sayed verbotene ISC zwischen dem S_1 ($\pi\pi^*$)- und dem T_1 ($\pi\pi^*$)-Zustand stärker beschleunigt als in wässriger Umgebung. Quantitative Aussagen zu ISC-Raten können erst dann getroffen werden, wenn effizientere Methoden zur Berechnung der vibronischen Spin-Bahn-Wechselwirkung entwickelt worden sind.

Aromatische Carbonylverbindungen. Interessante mechanistische Fragestellungen betrafen Systeme mit ultraschneller Interkombination wie z. B. Xanthone. Begonnen haben wir die Reihe der Untersuchungen an dieser Verbindungsklasse mit Thioxanthon, das im Arbeitskreis Gilch (geplantes TP A11, bewilligt als Normalverfahren GZ GI 349/5-1) untersucht wird. Über dieses Molekül war eine theoretische Arbeit erschienen, in der postuliert wurde, dass es zwei Konformere mit völlig unterschiedlichen Absorptionsspektren gibt, ein planares sowie ein V-förmiges. [6] Wir konnten zeigen, dass Thioxanthon im elektronischen Grundzustand planar ist und die Potentialfläche bei Abwinkelung entlang der so genannten *butterfly*-Mode sehr langsam ansteigt. Die von Rubio-Pons und Mitarbeitern gefundene sprunghafte Änderung der Anregungsenergien bei Erniedrigung der Molekülsymmetrie konnten wir auf Artefakte bei der Wahl des aktiven Raums ihrer CASSCF/CASPT2-Rechnungen zurückführen. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die ausgeprägte Schulter auf der kurzwelligen Seite des gemessenen statischen Absorptionsspektrums nicht von einem separaten elektronischen Übergang sondern von Schwingungsprogressionen in total-symmetrischen Moden stammt. DFT/MRCI-Rechnungen zur Lösungsmittelabhängigkeit der Spektren wurden begonnen, konnten aber im Berichtszeitraum nicht mehr zu Ende geführt werden.

Triplettlöcher. Quantenchemische Untersuchungen zur energetischen Lage elektronisch angeregter Singulett- und Triplettzustände in Rhodamin123 belegen die Anwendbarkeit unserer Methoden auf kationische Fluoreszenzfarbstoffe.[7*] Z/E-Isomerisierungspfade von elektronisch angeregtem Stilben, Azobenzol und 3,3'-Diphenylhexatrien (DPH) wurden im Rahmen zweier Diplomarbeiten berechnet. [16*,17*] Azobenzol und DPH sind Triplettlöcher, die in TP A8 zur Erhöhung der Photostabilität von Fluoreszenzfarbstoffen erprobt wurden. ESA-Spektren zu ihrer Charakterisierung in Lösung wurden in TP A4 aufge-

nommen, TP A1 hat die energetische Lage der Triplettzustände in der Gasphase durch Anionenphotodetachmentsspektroskopie im Überschallstrahl bestimmt. Während die beiden Phenylringe im T_1 -Zustand der kurzketigen Verbindungen Stilben und Azobenzol um etwa 90° verdrillt sind, finden wir für *trans*-DPH eine coplanare Anordnung: Der Energieunterschied zur 90° verdrillten Stellung ist allerdings nicht besonders groß, so dass diese Anordnung leicht erreichbar sein sollte. Allen drei Verbindungen gemeinsam ist, dass sich bei der verdrillten Kernanordnung S_0 und T_1 energetisch sehr nahe kommen und die Relaxation der Triplettpopulation in den Grundzustand begünstigt. Anders als in der Literatur beschrieben, wird für Stilben an dieser Geometrie keine konische Durchschneidung zwischen S_0 und S_1 oder S_2 gefunden. Dass unsere Rechnungen die Verhältnisse dennoch richtig widerspiegeln, zeigt die nahezu quantitative Übereinstimmung berechneter ESA-Spektren mit femtosekundenaufgelösten transienten Spektren, die von Kovalenko und Mitarbeitern [7] gemessen wurden. Eine Veröffentlichung hierzu ist in Vorbereitung.

Carotinoide. Auf die Überschneidung der Potentialflächen des optisch hellen $1B_u^+$ und dunklen $1B_u^-$ -Zustands von Lutein und β -Carotin entlang des interpolierten Relaxationspfades vom Franck-Condon-Punkt zum Minimum des $1B_u^+$ -Zustands und die daraus resultierende vibronische Kopplung der Zustände wurde bereits ausführlich im letzten Berichts- und Antragsband eingegangen. Mittlerweile gelang auch gemeinsam mit den Kollegen des TP B2 die Veröffentlichung in Phys. Rev. Letters.[1*] Die Relaxationsdynamik nach elektronischer Anregung stand auch im Mittelpunkt weiterer Untersuchungen an Isorenieratin-3,3'-dione (DHIRQ), einem chinoiden Retrocarotenoid mit einer effektiven Konjugationslänge von $n=16$. [11*] Über die spektakulären Eigenschaften dieser Verbindung (hohe photoprotektive Wirkung, blaue Farbe) wurde bereits in TP B1 berichtet. Die endständigen C=O-Gruppen bewirken die Existenz von niedrig liegenden internen Ladungstransfer (ICT)-Zuständen, die die Relaxationsdynamik nach optischer Anregung im sichtbaren und nahen Infrarot-Bereich erheblich komplizieren. Aus der Kombination der experimentellen und theoretischen Beobachtungen ergeben sich zwei mögliche Relaxationsschemata, die im Wesentlichen durch die energetische Reihenfolge der ICT-Zustände und des $2A_g^-$ -Zustands differieren. Um eines der beiden Modelle zu verifizieren, bedarf es weiterer Untersuchungen. In neueren theoretischen Studien an einer Reihe von E/Z-Isomeren des β -Carotins konnten wir zeigen, dass sowohl das B3-LYP Dichtefunktional als auch die DFT/MRCI-Methode die relative Stabilität der Isomere richtig beschreiben.[9*] Während die Bandenmaxima des $S_0 \rightarrow S_2$ Übergangs sowie der cis-Bande der *monocis*- und *dicis*-Isomere nur geringfügig variieren, konnten wir eine eindeutige Korrelation zwischen der Oszillatorstärke der niederenergetischen Übergänge und dem Abstand der Endatome der Polymerkette feststellen, die den Effekt der Molekülkonfiguration auf die Form der UV-Vis-Spektren erklären.

Porphyrine und Chlorophylle. Bereits in der vorangegangenen Förderperiode wurde damit begonnen, Spektren ausgehend von den S_1 - und T_1 -Zuständen des Tetraphenylporphyrins (TPP) zu berechnen. Da die sich die in der AG Kleinermanns (TP A4) und von Kovalenko (HU Berlin) gemessenen transienten Spektren bis weit in den UV-Bereich erstreckten, mussten sehr viele elektronisch angeregte Singulett- und Triplett-Zustände und ihre Dipolübergangswahrscheinlichkeiten zum S_1 - bzw. T_1 -Zustand berechnet werden. Dies gelang unter Ausnutzen der D_{2h} -Symmetrie mit Hilfe des kürzlich von uns parallelisierten DFT/MRCI-Programms. Allerdings stellte sich heraus, dass eine Zuordnung der gemessenen Spektren auf der Basis der berechneten Daten nicht möglich war. Ob dies an Unzulänglichkeiten der theoretischen Ansätze oder der experimentellen Durchführung lag, konnte letztendlich nicht geklärt werden. Ein auffällig starkes Signal im nanosekundenaufgelösten transienten Spektrum, das dem TPP-Kation zugeordnet werden konnte, wirft die Frage nach dem Einfluss von Ladungstransferprozessen auf. Von theoretischer Seite stellt sich die Frage nach dem Einfluss der Stellung der Phenylgruppen auf die elektronischen Eigenschaften des TPP und der Verlässlichkeit der DFT/MRCI-Methode für solch große Chromophore. Unsere bisherigen Untersuchungen ergeben keinen Hinweis darauf, dass die in langkettigen Polymeren und Carotinoiden beobachtete systematische Unterschätzung der elektronischen Anregungsenergien in Porphyrinen und Chlorophyllen (Chl) auftritt. Die Untersuchungen an Chl konzentrierten sich auf die Frage, welchen Einfluss ein zusätzlicher Wasserligand am Magnesiumzentrum auf die elektronischen Eigenschaften des Chl hat. Dazu wurden die Gleichgewichtsgeometrien verschiedener Konformere von Chl a-Wasser-Komplexen im elektronischen Grundzustand optimiert und Absorptionsspektren berechnet. Obwohl das Magnesiumzentrum in allen Komplexen erheblich aus der Ebene des π -Systems heraussteht, unterscheiden sich die Absorptionsspektren des Komplexes kaum von dem des isolierten Chl a. Untersuchungen zum Einfluss des Wasserliganden auf die spinmagnetischen Eigenschaften, der experimentell in TP A7 festgestellt worden war, wurden aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt.

Literaturangaben zu Arbeiten, die nicht im Teilprojekt bzw. nicht im Berichtszeitraum entstanden sind

- [1] M. Hayashi, A. M. Mebel, K. K. Liang and S. H. Lin, J. Chem. Phys. 1998, 108, 2044-2055.
- [2] R. Islampour and M. Miralinaghi, J. Chem. Phys. 2007. 111. 9454-9462.

- [3] R. Kubo, *Phys. Rev.* 1952. 86, 929-937.
- [4] R. Kubo and Y. Toyozawa, *Prog. Theor. Phys.* 1955, 13, 160-182.
- [5] J. Tatchen, N. Gilka and C. M. Marian, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2007. 9, 5209-5221.
- [6] Ó. Rubio-Pons, L. Serrano-Andrés, D. Burget and P. Jacques, *J. Photochem. Photobiol. A* 2006, 179, 298-304
- [7] S. A. Kovalenko, A. L. Dobryakow, I. Ioffe and N. P. Ernsting, *Chem. Phys. Lett.* 2010, 493, 255-258

6.2.2 Aus dem Teilprojekt entstandene Publikationen

An dieser Stelle sind alle Arbeiten angegeben, die seit dem letzten Bericht im Januar 2009 veröffentlicht wurden und die in direktem inhaltlichen Zusammenhang mit dem Teilprojekt stehen.

- a) Arbeiten, die in Publikationsorganen mit einer wissenschaftlichen Qualitätssicherung zum Berichtszeitpunkt der Antragstellung erschienen oder endgültig angenommen sind
- [1*] Ostroumov, E., Müller, M. G., Marian, C. M., Kleinschmidt, M., Holzwarth, A. R., Electronic coherence provides a direct proof for excited state level crossing in carotenoids. *Phys. Rev. Lett.* **2009**, 103, 108302-108306.
 - [2*] Salzmann, S., Martinez-Junza, V., Braslavsky, S. E., Mansurova, M., Marian, C. M., Gärtner, W., Photophysical properties of structurally and electronically modified flavin derivatives determined by spectroscopy and theoretical calculations. *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113, 9365-9375.
 - [3*] Etinski, M., Fleig, T., Marian, C. M., Intersystem crossing and characterization of dark states in the pyrimidine nucleobases uracil, thymine, and 1-methylthymine. *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113, 11809-11816.
 - [4*] Salzmann, S., Silva-Junior, M. R., Thiel, W., Marian, C. M., Influence of the LOV domain on low-lying excited states of flavin: A combined quantum-mechanics / molecular-mechanics investigation. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 15610-15618.
 - [5*] Salzmann, S., Marian, C. M., The photophysics of alloxazine: A quantum chemical investigation in vacuum and solution. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, 8, 1655-1666.
 - [6*] Parac, M., Doerr, M., Marian, C. M., Thiel, W., QM/MM calculation of solvent effects on absorption spectra of guanine. *J. Comp. Chem.* **2010**, 31, 90-106.
 - [7*] Pfiffi, D., Bier, B., Marian, C. M., Schaper, K., Seidel, C. A. M., Diphenylhexatrienes as photoprotective agents for ultra-sensitive fluorescence detection. *J. Phys. Chem. A* **2010**, 114, 4099-4108.
 - [8*] Ganyushin, D., Gilka, N., Taylor, P. R., Marian, C. M., Neese, F., The resolution of the identity approximation for calculations of spin-spin contribution to zero-field splitting parameters. *J. Chem. Phys.* **2010**, 132, 144111-1-144111-11.
 - [9*] Cerón-Carrasco, J. P., Requena, A., Marian, C. M., Theoretical study of the low-lying excited states of β -carotene isomers by a multireference configuration interaction method. *Chem. Phys.* **2010**, 373, 98-103.
 - [10*] Etinski, M., Marian, C. M., Ab initio investigation of the methylation and hydration effects on the electronic spectrum of uracil and thymine. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 4915-4923.
 - [11*] Ostroumov, E. E., Müller, M. G., Hundsdörfer, C., Stahl, W., Marian, C. M., Holzwarth, A. R., Excited state relaxation dynamics and electronic properties of a quinoid carotenoid. *Chem. Phys.* **2010**, 373, 137-144.
 - [12*] Rai-Constapel, V., Kleinschmidt, M., Salzmann, S., Serrano-Andrés, L., Marian, C. M., Thioxanthone: On the shape of the first absorption band. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 9320-9327.
 - [13*] Etinski, M., Marian, C. M., Overruling the energy gap law: Fast triplet formation in 6-azauracil. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, published online DOI [10.1039/C0CP00106F](https://doi.org/10.1039/C0CP00106F)

b) Andere Veröffentlichungen

- [14*] Salzmänn, S. Relaxation processes in electronically excited states: Blue-light receptors and related compounds, Dissertation, *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf* 2010.
- [15*] Etinski, M. Comparison between time-dependent and time-independent methods for the calculation of inter-system crossing rates: Application to uracil and its derivatives. Dissertation, *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf* 2010.
- [16*] Küpper, B. Quantenchemische Untersuchungen zur trans/cis-Isomerisierung von α,ω -Diphenylhexatrienen. Diplomarbeit, *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf* 2010.
- [17*] Gollnisch, K. Quantenchemische Untersuchungen zur Z/E-Isomerisierung von Stilben und Azobenzol. Diplomarbeit, *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf* 2010.

6.3 Rückblick auf die Förderung

Das Teilprojekt wird seit Juli 2005 im Sonderforschungsbereich gefördert. Es wurde im Juni 2010 beendet.

6.3.1 Personal im Teilprojekt während der zu Ende gehenden Förderperiode

	laufende Nummer	Name, akademischer Grad, Dienststellung	engere Fachzugehörigkeit	Institut der Hochschule oder der außeruniversitären Einrichtung	Mitarbeit im Projekt in Wochenstunden	Entgeltgruppe
Grundausstattung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	1	Marian, Christel, Prof. Dr., Universitätsprofessorin	Quantenchemie	Institut für Theoretische Chemie und Computerchemie HHUD	10	
	2	Kleinschmidt, Martin, Dr., Akademischer Rat	wie 1	wie 1	8	
	3	Küpper, Balduin	wie 1	wie 1	8	
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter	4	Schuck, Karin, Techn. Angestellte		wie 1	2	
	5	Eifert, Klaus, Techn. Angestellter EDV		wie 1	8	
Ergänzungsausstattung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	6	Salzmänn, Susanne, Dr.	wie 1	wie 1	39,8	TV-L 13
	7	Etinski, Mihajlo	wie 1	wie 1	26,6	TV-L 13
	8	Rai-Constapel, Vidisha, Dr.	wie 1	wie 1	10	TV-L 13
	9	Gollnisch, Kathleen	wie 1	wie 1	zuerst 17 dann 19,9	Hilfskraft TV-L 13
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter						

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Grundausstattung):

1. Marian, Christel

Projektleitung, Untersuchung der Photophysik von Polyenen und Carotinoiden

2. Kleinschmidt, Martin

Programmierunterstützung des Projekts, Einarbeitung von Mitarbeiter(inne)n, Berechnung der Absorptions- und ESA-Spektren von Porphyrinen und Chlorophyllen

3. Küpper, Balduin

Untersuchung der Photoisomerisierung von 3,3'-Diphenylhexatrien

4. Schuck, Karin

Unterstützung bei der Projektadministration

5. Eifert, Klaus

Systemadministration, Datensicherung und Pflege der Webseiten

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Ergänzungsausstattung):

6, Salzmann, Susanne

Untersuchung von photoinduzierten Prozessen in Flavinderivaten und Blaulichtrezeptoren, Einarbeitung von Mitarbeiter(inne)n

7, Etinski, Mihajlo

Entwicklung von zeitabhängigen Methoden zur Berechnung von ISC-Raten,

Untersuchung zur Lage von elektronischen Zuständen und Berechnung von ISC-Raten in Pyrimidinbasen

8, Rai-Constapel, Vidisha

Untersuchungen zur Photophysik von Thioxanthonen

9. Gollnisch, Kathleen

Untersuchung der Photoisomerisierung von Stilben und Azobenzol

6.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt C4

6.1.1 Titel: Elektronisch angeregte Zustände in großen Molekülen

6.1.2 Projektleitung

Thiel, Walter, Prof. Dr., *07.03.1949, deutsch
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim
Telefon: 0208-306-2150
E-Mail: thiel@mpi-muelheim.mpg.de

6.2 Entwicklung des Teilprojekts

6.2.1 Bericht

Der Antrag vom Januar 2009 enthielt einen Bericht über die in der ersten Förderperiode erzielten Resultate, die in 11 Publikationen aus den Jahren 2006-2008 dokumentiert sind. Im folgenden werden die seither erhaltenen Ergebnisse kurz zusammengefasst, genauere Angaben finden sich in den zugehörigen Publikationen [1-14] (siehe Abschnitt 3.2.2).

Das Teilprojekt C4 verfolgte drei allgemeine Ziele: (a) Entwicklung von kombinierten QM/MM Verfahren zur Untersuchung von elektronischen Spektren und photochemischen Reaktionen in großen Biomolekülen unter Einbeziehung der Umgebung; (b) Entwicklung eines semiempirischen QM Verfahrens zur Behandlung von elektronisch angeregten Zuständen in großen Biomolekülen; (c) Anwendung der entwickelten Verfahren auf konkrete Fragestellungen.

Die Arbeiten zu (a) umfassten die Entwicklung von QM/MM Modulen zur Lokalisierung von konischen Durchschneidungen und zur Surface-Hopping-Dynamik sowie die Anpassung von QM/MM Techniken zur Geometrieoptimierung und zur Berechnung freier Energien. Sie waren im wesentlichen bis Ende 2008 abgeschlossen (siehe Bericht vom Januar 2009). Im jetzigen Berichtszeitraum wurden drei Arbeiten zu dieser Thematik publiziert. Am Beispiel von Guanin wurden unsere Protokolle zur Berechnung von Absorptionsspektren in der Gasphase (QM) und in Lösung (QM/MM) in allen Einzelheiten vorgestellt und validiert, verbunden mit einer detaillierten Diskussion der Solvenseffekte [9]. Am Beispiel einer protonierten Schiffschens Base (PSB3) wurden technische Probleme bei Surface-Hopping-Dynamikrechnungen unter Verwendung von MRCI-Wellenfunktionen erörtert und verschiedene Lösungsmöglichkeiten aufgezeigt, darüber hinaus erfolgte ein genauer Vergleich zwischen semiempirischen OM2/MRCI und ab initio (CASSCF, CASPT2) Ergebnissen zur Validierung des OM2 Ansatzes [4]. Ferner wurde die Entwicklung semiempirischer Surface-Hopping-Methoden in einem eingeladenen Übersichtsartikel dargestellt [14].

Die Arbeiten zu (b) erfordern die Auswahl geeigneter Referenzdaten für die nötigen semiempirischen Parametrisierungen. Die entsprechenden Benchmark-Aktivitäten wurden fortgesetzt. Im Berichtszeitraum publiziert wurden Coupled-Cluster-Benchmark-Rechnungen von vertikalen Anregungsenergien und Oszillatorenstärken, zum einen ein Vergleich von nicht-iterativen und iterativen Triples-Korrekturen [3], CCSDR(3) vs. CC3, und zum anderen eine Studie zur Basissatz-Konvergenz [11], TZVP vs. aug-cc-pVTZ. Darüber hinaus wurden die wichtigsten, derzeit verfügbaren semiempirischen Methoden bezüglich der jetzt neu erstellten ab initio Referenzdaten für elektronisch angeregte Zustände systematisch evaluiert, dabei erwiesen sich die OMx-Methoden bereits in ihrer Grundzustands-Parametrisierung als deutlich überlegen gegenüber den etablierten Standardmethoden wie MNDO, AM1, PM3 oder INDO/S [13]. Es ist zu erwarten, dass die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der OMx-Methoden für elektronisch angeregte Zustände weiter gesteigert werden kann, wenn entsprechende Referenzdaten in die Parametrisierung einbezogen werden. Derartige Parametrisierungen sind derzeit im Gange.

Die Arbeiten zu (c) umfassten Dynamik-Rechnungen mit dem neu entwickelten Surface-Hopping-Programm, QM/MM Berechnungen zu den Spektren von Proteinen und kooperative Projekte gemeinsam

mit anderen SFB-Partnern. Surface-Hopping-Rechnungen auf OM2/MRCI-Niveau wurden an den Pyrimidin-Nucleobasen Uracil, Thymin und Cytosin [2] sowie an 9H-Guanin [5] durchgeführt, um die nichtadiabatische Dynamik und die Relaxationsmechanismen dieser Moleküle in der Gasphase zu verstehen, wobei die berechneten Lebensdauern generell gut mit den publizierten experimentellen Daten übereinstimmen [2,5]. Daneben wurden auch Surface-Hopping-Studien unter Verwendung von ab initio QM Verfahren (CASSCF) und von QM/MM-Methoden in Angriff genommen (Methaniminium-Kation; Adenin in Wasser) [14]. Die QM/MM Rechnungen zu den Absorptionsspektren in kondensierter Phase betrafen zum einen die im fernen roten Bereich fluoreszierenden Proteine DsRed.M1 [8,12] and HcRed [10], hier konnte der Einfluss der Proteinumgebung auf Struktur und Spektrum des Chromophors im Detail aufgeklärt werden. Auch bei der QM/MM Studie zum Blaulicht-Photosensor YvtA von *Bacillus subtilis* stand die Frage im Vordergrund, inwieweit das Spektrum des Flavin-Chromophors durch die LOV-Domäne des Proteins beeinflusst wird, im Vergleich zur Gasphase und zur wässrigen Lösung; dabei wurden zustandspezifische Effekte gefunden, auch hinsichtlich Spin-Bahn-Kopplung und Intersystem-Crossing (ISC) [7]. Diese Untersuchungen wurden gemeinsam mit Teilprojekt C1 (Marian) durchgeführt, ebenso wie die DFT/MRCI Rechnungen zur Photophysik des Phenalenons, mit denen die experimentell beobachteten hohen ISC-Raten in diesem Molekül erklärt werden konnten [1]. Die Kooperation mit Teilprojekt B4 (Ritter, Seidel, Kühnemuth) galt Fluorophoren, welche als optische Kraftsensoren dienen können, speziell Oligoparaphenylvinyl-Derivaten (OPV5), die in eine Polymerfolie eingebettet und unter Anwendung einer externen Zugspannung bestrahlt wurden [6]. Die berechneten (AM1/MRCI) Lebensdauern nehmen mit zunehmender externer Kraft deutlich ab, in qualitativer Übereinstimmung mit dem Experiment, hauptsächlich wegen des Anstiegs in den Emissionsenergien, der im Wesentlichen geometriebedingt ist (Streckung des Moleküls) [6].

Neben den 14 Publikationen liegen aus dem Berichtszeitraum 2009-2010 eine Reihe unveröffentlichter Ergebnisse vor, z.B. Untersuchungen zur Dynamik von DNA-Basenpaaren und von Helicenen (molekulare Motoren), zu Absorptionsspektren in kondensierter Phase (weitere Proteine, Solvenseffekte bei anderen kleinen Molekülen), zu Reaktionen im angeregten Zustand (LOV-Flavine) und zur OMx-Parametrisierung. Diese Ergebnisse werden hier nicht geschildert, weil die vorliegenden 14 Publikationen bereits ein adäquates Bild von unseren Forschungsaktivitäten im Berichtszeitraum 2009-2010 vermitteln sollten.

6.2.2 Aus dem Teilprojekt entstandene Publikationen

(a) Arbeiten, die in Publikationsorganen mit einer wissenschaftlichen Qualitätssicherung zum Zeitpunkt der Antragstellung erschienen oder endgültig angenommen sind

- [1] M. C. Daza, M. Doerr, S. Salzmann, C. M. Marian und W. Thiel, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 1688-1696 (2009). Photophysics of Phenalenone: Quantum-mechanical Investigation of Singlet-Triplet Intersystem Crossing.
- [2] Z. Lan, E. Fabiano und W. Thiel, *J. Phys. Chem. B* **113**, 3548-3555 (2009). Photoinduced Nonadiabatic Dynamics of Pyrimidine Nucleobases: On-the-fly Surface-Hopping Study with Semiempirical Methods.
- [3] S. P. A. Sauer, M. Schreiber, M. R. Silva-Junior und W. Thiel, *J. Chem. Theory Comput.* **5**, 555-564 (2009). Benchmarks for Electronically Excited States: A Comparison of Noniterative and Iterative Triples Corrections – CCSDR(3) versus CC3.
- [4] T. W. Keal, M. Wanko und W. Thiel, *Theor. Chem. Acc.* **123**, 145-156 (2009). Assessment of Semiempirical Methods for the Photoisomerisation of a Protonated Schiff Base.
- [5] Z. Lan, E. Fabiano und W. Thiel, *ChemPhysChem* **10**, 1225-1229 (2009). Photoinduced Nonadiabatic Dynamics of 9H-Guanine.
- [6] S. Marawske, D. Dörr, D. Schmitz, A. Koslowski, Y. Lu, H. Ritter, W. Thiel, C. A. M. Seidel und R. Kühnemuth, *ChemPhysChem* **10**, 2041–2048 (2009). Fluorophores as Optical Sensors for Local Forces.

- [7] S. Salzmann, M. R. Silva-Junior, W. Thiel und C. Marian, *J. Phys. Chem. B* **113**, 15610-15618 (2009). Influence of the LOV Domain on Low-Lying Excited States of Flavin: A Combined Quantum-Mechanics / Molecular-Mechanics Investigation.
- [8] E. Sanchez-Garcia, M. Doerr, Y.-W. Hsiao und W. Thiel, *J. Phys. Chem. B* **113**, 16622-16631 (2009). QM/MM Study of the Monomeric Red Fluorescent Protein DsRed.M1.
- [9] M. Parac, M. Doerr, C. M. Marian und W. Thiel, *J. Comput. Chem.* **31**, 90-106 (2010). QM/MM Calculation of Solvent Effects on Absorption Spectra of Guanine.
- [10] Q. Sun, M. Doerr, Z. Li, S. C. Smith und W. Thiel, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 2450-2458 (2010). QM/MM Studies of the Structural and Energetic Properties of the Far-red Fluorescent Protein HcRed.
- [11] M. R. Silva-Junior, S. P. A. Sauer, M. Schreiber und W. Thiel, *Mol. Phys.* **108**, 453-465 (2010). Basis Set Effects on Coupled Cluster Benchmarks of Electronically Excited States: CC3, CCSDR(3) and CC2.
- [12] E. Sanchez-Garcia, M. Doerr und W. Thiel, *J. Comput. Chem.* **31**, 1603-1612 (2010). QM/MM Study of the Absorption Spectra of DsRed.M Chromophores.
- [13] M. R. Silva-Junior und W. Thiel, *J. Chem. Theory Comput.* **6**, 1546-1564 (2010). Benchmark of Electronically Excited States for Semiempirical Methods: MNDO, AM1, PM3, OM1, OM2, OM3, INDO/S and INDO/S2.
- [14] E. Fabiano, Z. Lan, Y. Lu und Walter Thiel, in: *Conical Intersections: Theory, Computation and Experiment*, W. Domcke, D. R. Yarkony und H. Köppel (Hrsg.), World Scientific Publishing, Singapore, angenommen am 29.04.2010. Adiabatic Trajectory Calculations with Ab Initio and Semiempirical Methods.

6.3 Rückblick auf die Förderung

Das Teilprojekt wurde seit Juli 2005 im Sonderforschungsbereich gefördert. Es wurde mit Ablauf der zu Ende gehenden Förderperiode beendet.

6.3.1 Personal im Teilprojekt während der zu Ende gehenden Förderperiode

	laufende Nummer	Name, akademischer Grad, Dienststellung	engere Fachzugehörigkeit	Institut der Hochschule oder der außeruniversitären Einrichtung	Mitarbeit im Projekt in Wochenstunden	Entgeltgruppe
Grundausstattung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	1	Walter Thiel, Prof. Dr.	Chemie	MPI für Kohlenforschung	10	
	2	Elsa Sanchez-Garcia, Dr.	Chemie	MPI für Kohlenforschung	39	
	3	Mario Ramos da Silva, Doktorand	Chemie	MPI für Kohlenforschung	39	
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter	4	Horst Lenk		MPI für Kohlenforschung	10	
Ergänzungsausstattung						
Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler	1	Markus Doerr, Dr.	Chemie	MPI für Kohlenforschung	39	
	2	Zhenggang Lan, Dr.	Chemie	MPI für Kohlenforschung	39	
nichtwissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter						

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Grundausstattung):

1. Prof. Dr. Walter Thiel: wissenschaftliche Leitung des Projekts
2. Dr. Elsa Sanchez-Garcia: QM/MM Rechnungen, Absorptionsspektren in Proteinen
3. Mario Ramos da Silva: Benchmark-Rechnungen, Semiempirik, QM/MM an LOV-Proteinen
4. Horst Lenk: Systemadministrator, lokale Computer am MPI für Kohlenforschung

Aufgaben der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter (Ergänzungsausstattung):

1. Dr. Markus Doerr: DFT/MRCI Rechnungen, Absorptionsspektren
2. Dr. Zhenggang Lan: Surface-Hopping-Dynamik