

5.1 Allgemeine Angaben zum beendeten Teilprojekt B9

5.1.1 Titel:

Analyse und Steuerung von Strukturänderungen in biologisch relevanten Systemen in kondensierter Phase

5.1.2 Fachgebiete und Arbeitsrichtung:

Optik, Quantenoptik, Physik der Atome, Moleküle und Plasmen

5.1.3 Leiter:

Prof. Dr. Karsten Heyne

geb. 01.12.1969
 Dienst- Freie Universität Berlin
 anschrift Institut für Experimentalphysik
 Arnimallee 14
 14195 Berlin
 Telefon 030/ 838 56107
 FAX 030/ 838 56081
 E-Mail karsten.heyne@fu-berlin.de

5.2 Bericht über die Entwicklung des Teilprojekts

5.2.1 Bericht

Die photoinduzierte Freisetzung von Singletsauerstoff ($^1\text{O}_2$) zum Einsatz in der Photodynamischen Therapie (PDT) ist ein bekannter Prozess. Dazu werden Photosensitizer (PS) verwendet, die entweder $^1\text{O}_2$ direkt abspalten oder aber durch Tripletannihilation des PS mit Tripletsauerstoff aus der Umgebung Singletsauerstoff erzeugen (Abb.1).

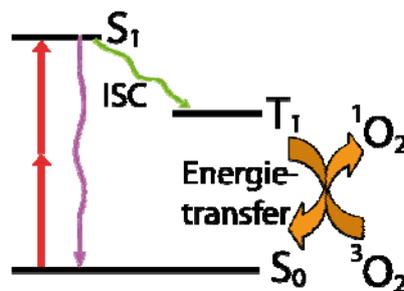


Abb. 1: Funktionsschema traditioneller Photosensitizer angeregt mit Zweiphotonenabsorption.

Der so erzeugte $^1\text{O}_2$ ist sehr reaktiv und kann Moleküle oxidieren und somit z.B. Zellmembranen zerstören. Dies führt bei genügender Konzentration des $^1\text{O}_2$ zur Auflösung

der Zellmembran und zum Zelltod. Ein bekanntes Problem dieser Anwendung ist jedoch, dass in Tumorgewebe die Konzentration von Tripletsauerstoff verringert ist und die Effizienz der Tripletannihilation deutlich herabgesetzt wird. Aus diesem Grund sind PS, die direkt $^1\text{O}_2$ durch photoinduzierte Abspaltung generieren von hohem Interesse, insbesondere wenn diese in Kombination mit traditionellen PS, die den Mechanismus der Tripletannihilation nutzen, eingesetzt werden. Ein solcher Photosensitizer ist das 4-fach endoperoxidverbrückte Phorphyrzine (Abb.2).

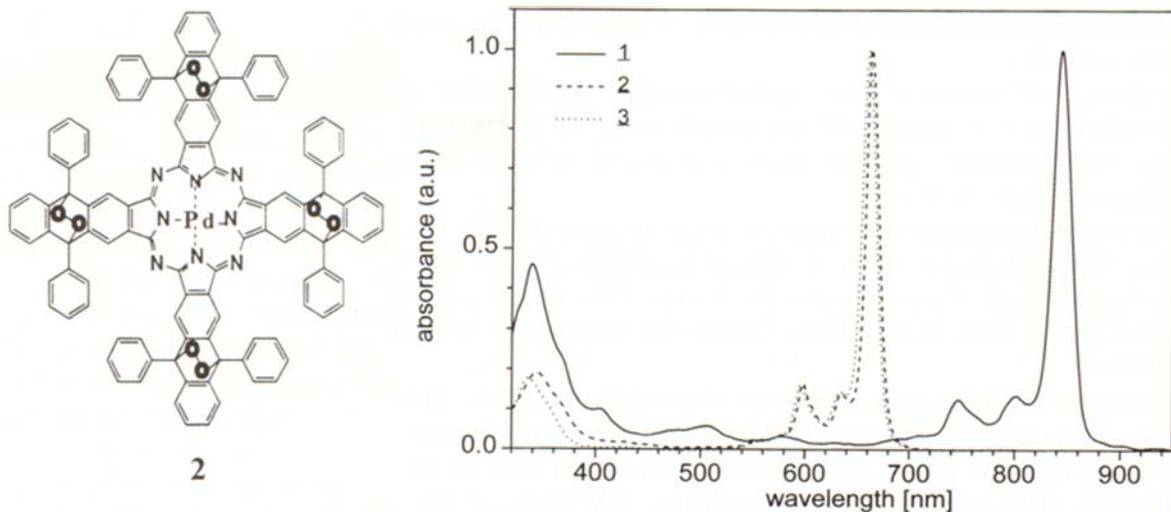


Abb. 2: Endoperoxid-Porphyrzine können direkt $^1\text{O}_2$ freisetzen, was zu einer Rotverschiebung der Absorption führt. Wenn alle vier $^1\text{O}_2$ Moleküle freigesetzt sind, ist das Porphyrzine noch als PS aktiv.

Die vier molekularen Einheiten die im Endoperoxid-Porphyrzin direkt Singletsauerstoff freisetzen sind Anthrazene-9,10-endoperoxide (APO). Der Mechanismus der Photochemie von APO ist allerdings stark umstritten. Es wurde berichtet, dass APO eine duale Photochemie aufweist, die je nach angeregtem elektronischen Zustand entweder zu einer direkten Abspaltung von $^1\text{O}_2$ oder aber zu einer homolytischen Spaltung der Endoperoxidgruppe führt (Abb. 3).

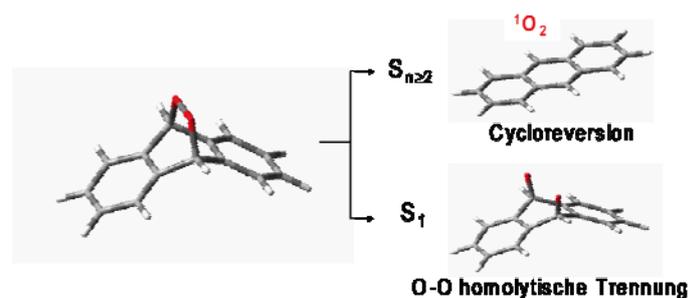


Abb. 3: Modell der dualen Photochemie von APO.

Kontrovers diskutiert wurde, ob die homolytische Spaltung wirklich von einem elektronisch angeregten Zustand ausgeht oder den bekannten thermischen Zerfallsprozess der APO-Moleküle widerspiegelt. Eine klare Aussage dazu war lange Zeit nicht möglich, da die Oszillatorstärke des $S_0 \rightarrow S_1$ Überganges etwa eine Größenordnung schwächer ist als höhere Übergänge und somit die Zuordnung der elektronischen Übergänge mit herkömmlichen Methoden nicht möglich war. Aus diesem Grund war eine Zuordnung der beobachtbaren Absorptionsbanden zu spezifischen elektronischen Übergängen, wie $\pi_{OO}^* \rightarrow \pi_{CC}^*$ für die Cycloreversion und $\pi_{OO}^* \rightarrow \sigma_{OO}^*$ für die homolytische Spaltung nicht möglich. Erste Ergebnisse aus unserem TP B9 in Kooperation mit TP C9 gaben Hinweise auf die Zuordnung der niedrigsten elektronischen Zustände von APO. Hierbei wurde eine neue Methode in der AG Heyne entwickelt, bzw. weiterentwickelt: Die Orientierungsbestimmung von elektronischen und Schwingungs-Übergangsdipolmomenten in Lösung mit polarisationsaufgelöster Femtosekundenspektroskopie (pols UV/VIS pump / IR probe). Mit dieser Methode war es erstmals möglich eine ultraschnelle Dynamik eines aromatischen Endoperoxids mittels zeitaufgelöster IR-Spektroskopie zu verfolgen. Aus unveröffentlichten Arbeiten an Artemisinin und APO zeigte sich, dass eine direkte schwingungsspektroskopische Verfolgung der Endoperoxidgruppe für uns nicht möglich ist. Dies liegt zum einen daran, dass die Streckschwingungen der O-O Endoperoxidgruppe im spektralen Bereich zwischen 700 und 900 cm^{-1} und somit am Rande unseres erreichbaren spektralen Bereichs liegen und dort die Nachweisempfindlichkeit verringert ist. Zum anderen daran, dass die berechneten und gemessenen Intensitäten der Endoperoxidschwingungen sehr klein sind. Aus diesem Grund haben wir eine C-H in plane Biegeschwingung ausgewählt, die spektral im Bereich um 1170 cm^{-1} liegt und eine relativ hohe IR-Intensität im Vergleich zu den Endoperoxidgruppen aufweist. Das Übergangsdipolmoment (tdm) dieser Schwingung ist im Molekül entlang der y-Achse orientiert (Abb. 4, schwarzer Pfeil).

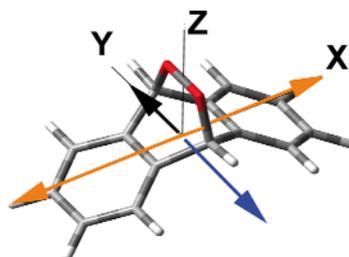


Abb. 4: Molekulare Struktur von APO mit der Orientierung des Schwingungsübergangsdipolmoments (schwarz), der Orientierung des Übergangsdipolmoments des $\pi_{OO}^* \rightarrow \pi_{CC}^*$ Übergangs (blau), des $\pi_{OO}^* \rightarrow \sigma_{OO}^*$ Übergangs (orange) und des $\pi_{CC}^* \rightarrow \pi_{CC}^*$ Übergangs (orange).

Aufgrund der Symmetrie von APO ist die Orientierung der meisten Schwingungen im Fingerprintbereich sowie die der niedrigen elektronischen Übergänge entlang einer der Achsen ausgerichtet. Das ermöglichte uns erstmals eine eindeutige Zuordnung der niedrigsten beobachtbaren Absorptionsbande zum $\pi_{OO}^* \rightarrow \pi_{CC}^*$ Übergang durch Messung des Winkels zwischen IR-tdm und elektronischem tdm und eine Identifizierung der anderen elektronischen Übergänge. Die beobachtete Transiente der Schwingungsbande deutete auf eine Quantenausbeute nahe 100% hin, was erst in der Publikation von Fidler et al. ausführlicher begründet werden konnte. Wir haben unsere Ergebnisse 2006 zur Publikation eingereicht, aber da unsere neuen Ergebnisse keinem der beiden kontrovers diskutierten Modelle entsprach, dauerte es bis 2008 bis unsere Ergebnisse in CPL veröffentlicht werden konnten (I. Corral et al., Chem. Phys. Lett., 452 (2008), 67-71).

Dennoch blieben auch nach der Zuordnung der elektronischen Zustände noch viele Fragen bezüglich der Reaktionsdynamik und möglicher entstehender Photoprodukte offen. Insbesondere die geringen Extinktionskoeffizienten von APO und die thermische Instabilität von APO, die ebenfalls zu einer homolytischen Spaltung der Endoperoxidgruppe führt, machten eindeutige Aussagen schwierig und ermöglichten keine genauen Aussagen über die duale Photochemie von APO. Da APO aber der zentrale Bestandteil zur direkten Erzeugung von 1O_2 aus Endoperoxid-Porphyrinen ist, haben wir uns weiterhin verstärkt bemüht die Photochemie von APO besser zu verstehen. Wir haben sehr viel Mühe darauf verwendet entstehende Photoprodukte von APO mittels NMR und optischen Methoden nach Anregung mit unterschiedlichen Wellenlängen und bei verschiedenen Temperaturen zu charakterisieren und zu quantifizieren. Dadurch konnten wir ein modifiziertes Photoreaktionsschema erstellen (Abb.5) und die Extinktionskoeffizienten und Spektren der entstehenden Produkte genauer angeben.

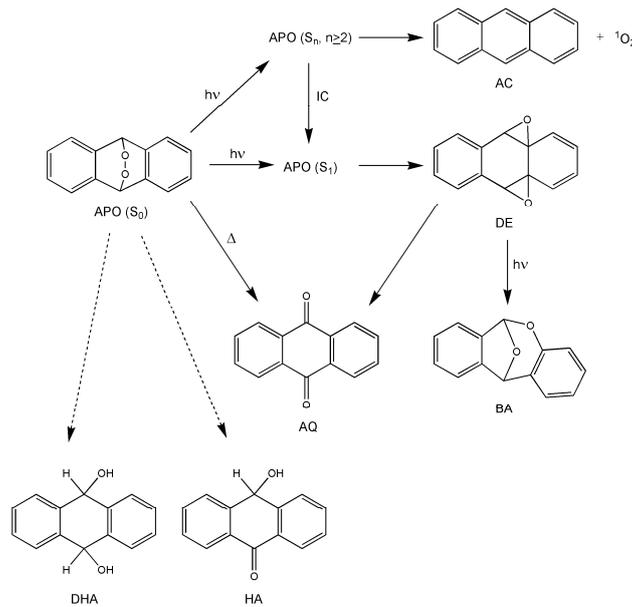


Abb. 5: Übersicht über Reaktionspfade von APO nach Lichtanregung und nach thermischer Anregung. APO: Anthracene-9,10-endoperoxide, AQ: Anthraquinone, AC: Anthracene, DE: Diepoxide, BA: Bicyclic acetal, HA: 9-hydroxy-10-anthrone, DHA: 9,10-dihydroanthracene. IC steht für interne Konversion, $h\nu$ für Lichtanregung und Δ für thermische Anregung.

Zusätzlich konnten wir die Quantenausbeuten für die einzelnen Photoprodukte in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge bestimmen, wodurch wir zeigen konnten, dass im Bereich < 300 nm die Quantenausbeute für die Gesamtreaktion bei 100% liegt, wovon maximal 30% auf die Cycloreversion entfallen (Abb. 6).

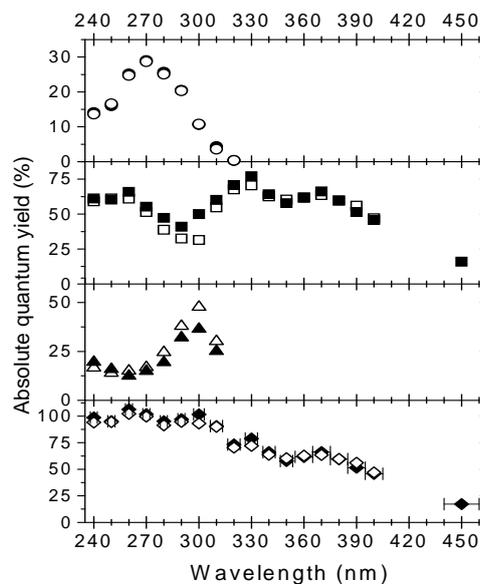


Abb. 6: Absolute photochemische Quantenausbeuten als Funktion der Anregungswellenlänge für die folgenden Photoprodukte von oben nach unten: Anthracene, Diepoxide, Bicyclic acetal und alle Summe aller Photoprodukte (einschließlich Anthraquinone).

Das bedeutet, dass APO nicht nur eine duale Photochemie mit zwei Reaktionspfaden aufweist, wovon der eine einen doppelten C-O Bindungsbruch zur Folge hat und der andere Reaktionspfad eine O-O homolytische Spaltung, sondern dass der C-O Bindungsbruch aus dem zweiten elektronisch angeregten Zustand sogar eine hohe Quantenausbeute von bis zu 30% haben kann. Dies stellt einen sehr ungewöhnlichen Reaktionsmechanismus dar, wobei nicht klar ist auf welcher Zeitskala die einzelnen Reaktionsschritte ablaufen. Die Cycloreversion erzeugt Anthracene und $^1\text{O}_2$ und offene Fragen sind, (i) ob der C-O Bindungsbruch ein sequentieller oder konzertierter Mechanismus ist, (ii) ob Anthracene im elektronisch angeregten oder im elektronischen Grundzustand erzeugt wird, (iii) wie schnell wird Anthracene und $^1\text{O}_2$ erzeugt, und (iv) ob es kohärente Wellenpakete gibt. Für die homolytische Spaltung aus dem niedrigsten elektronisch angeregten Zustand stellen sich noch die Fragen, ob (i) Diepoxide direkt aus dem homolytischen Radikalpaar erzeugt wird, (ii) welche Lebensdauer das Radikalpaar hat, (iii) wird Diepoxid im elektronisch angeregten Zustand oder Grundzustand erzeugt, (iv) wird Anthraquinone auf der Pikosekundenzeitskala erzeugt, (v) gibt es kohärente Wellenpakete? Insgesamt stellt sich auch die übergeordnete Frage, warum es in APO eine derart ausgeprägte duale Photochemie gibt.

Um einige dieser Fragen zu lösen haben wir in Zusammenarbeit mit TP B1 (Ernsting) UV pump – supercontinuum probe Messungen mit einer Zeitauflösung von etwa 80 fs an APO durchgeführt. Die Ergebnisse dieser erfolgreichen Messungen werden derzeit zur Veröffentlichung versandt und werden kurz vorgestellt.

Da APO im Vergleich zu während der Photoreaktion entstehenden Photoprodukten wie Anthracene (AC), Anthraquinone (AQ) und Diepoxid (DE) einen vergleichsweise geringen Extinktionskoeffizienten aufweist, haben wir APO bei der für diese Messungen optimalen Wellenlänge von 282 nm angeregt, da dort APO im Vergleich zu entstehenden Photoprodukten maximal absorbiert. Zusätzlich wurden UV pump – supercontinuum probe Messungen an AC und AQ durchgeführt um Signalbeiträge dieser Moleküle zu identifizieren. Vergleichende Messungen an DE konnten nicht durchgeführt werden, da DE eine Lebensdauer von nur wenigen Stunden hat und nicht erwerbbar ist.

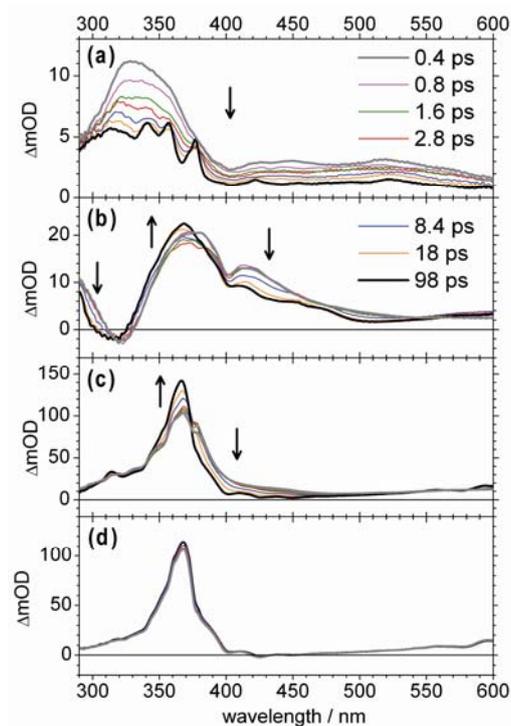


Abb. 7: Zeitabhängig Absorptionsspektren nach Anregung von (a) APO bei 282 nm, (b) AQ bei 266 nm, (c) AC bei 266 nm, (d) AC bei 376 nm. Alle Proben wurden in Acetonitrile gelöst und mit demselben Aufbau gemessen.

Die Ergebnisse in Abb. 7a zeigen beide Reaktionspfade von APO, den der Cycloreversion mit anschließender Anthracenebildung und den der homolytischen Spaltung und anschließender Diepoxidbildung. Im Vergleich dazu zeigen die Messungen direkt an Anthracene und an Anthraquinone, dass nach Anregung von APO kein elektronisch angeregter Zustand von AC oder AQ zu verzeichnen ist. Daraus kann sofort geschlossen werden, dass bei der Cycloreversion ausschließlich AC im elektronischen Grundzustand erzeugt wird. Die Erzeugung von AC ist in den zeitabhängigen Absorptionsspektren in Abb. 7a anhand der markanten Peaks zwischen 340 und 380 nm gut erkennbar und Auswertungen ergeben, dass AC schneller als in 3 ps gebildet wird. Die Tatsache, dass in dem für uns zugänglichen spektralen Bereich zwei unbekannte Photoreaktionen gleichzeitig ablaufen, macht eine Zuordnung von sub-ps Prozessen nahezu unmöglich. Kohärente Wellenpakete konnten bei gegebener Zeitauflösung nicht detektiert werden.

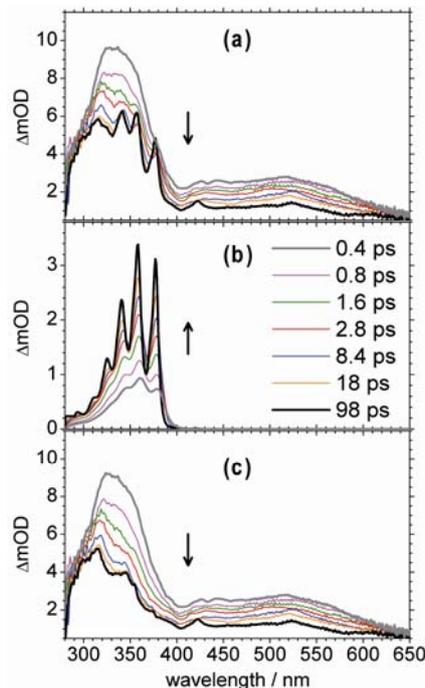


Abb. 8: Zerlegung der zeitabhängigen APO Spektren (a) in den Anteil der Anthracene-Bildung mit 3 ps und folgender thermischer Kühlung (b), und verbleibender spektraler Anteil nach Abzug der Anthracene-Dynamik (c).

Eine Trennung der zeitabhängigen Abläufe der homolytischen Spaltung von der Anthracene-Bildung und thermischen Relaxation ist durch eine Simulation und Berechnung des Anthracene-Anteils von langen Verzögerungszeiten ausgehend möglich. Dadurch ist die Trennung für lange Verzögerungszeiten deutlich besser als für kurze. Dennoch ermöglicht uns diese Herangehensweise auch Informationen über die Dynamik der homolytischen Spaltung zu gewinnen. Wir sehen eine schnelle Lebensdauer von etwa 1.5 ps mit nachfolgender thermischer Relaxation (~17 ps). Das vorliegende Spektrum ähnelt im Zeitbereich bis 100 ps nicht dem DE Absorptionsspektrum, und wir können es dem elektronisch angeregtem DE zuordnen. Aus diesem Grund gehen wir davon aus, dass der Zerfall des Radikalpaars und gleichzeitig die Bildung des DE im elektronisch angeregtem Zustand auf einer Zeitskala von etwa einer Pikosekunde geschieht.

Zusammenfassend haben wir die meisten essentiellen Fragen zur dualen Photochemie von APO gelöst und können festhalten, dass die duale Photochemie von APO möglich ist, weil einerseits die Reaktionen schnell ablaufen und andererseits die strukturellen Änderungen, die die Reaktionen auslösen, so groß sind, dass sie nahezu irreversibel sind. Diese Erkenntnisse passen auch sehr gut zu den theoretischen Modellen, die von Prof. Gonzalez als Fortführung des Projektes C9 berechnet wurden. Diese Berechnungen legen eine mehrfache konische

Durchschneidung der Potentialoberflächen, sowohl für die Cycloreversion als auch für die homolytische Spaltung, nahe, wodurch ein nahezu irreversibler Prozess gewährleistet wird.

Unser Projekt hat somit mit Frau Alexandra Lauer, die derzeit Ihre Doktorarbeit beendet, einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der $^1\text{O}_2$ Abspaltung von aromatischen Endoperoxiden geliefert. Im Rahmen von anderen Projekten, hoffen wir diese Erkenntnisse auch auf Phorphyrazine-Endoperoxide übertragen zu können, deren Photochemie noch komplexer erscheint.

Zweiphotonenanregungen sind bis jetzt an Corrolen von Frau Dagmar Jones im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt worden (Abb. 9). Frau Jones konnte auch zeigen, dass nach Anregung von Corrolen $^1\text{O}_2$ mit einer Ausbeute von etwa 60% erzeugt wird. Die Diplomarbeit konnte aufgrund einer langen Krankheit noch nicht abgeschlossen werden.

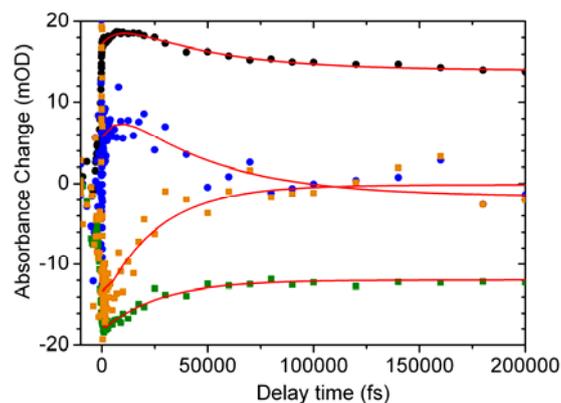


Abb. 9: IR-transienten von Al-Corrole nach Ein-Photonenanregung bei 530 nm (schwarz und grün) und nach Zwei-Photonenanregung bei 1050 nm (blau und orange).

Herr Till Stensitzki hat im Rahmen seiner noch nicht abgeschlossenen Diplomarbeit ein Programm zur Ansteuerung des Pulsshapers und zur genetischen Optimierung der Pulsform geschrieben. Dieser Aufbau optimiert die SH-Generation der Pumpulse und soll bei Corrolen zum Einsatz kommen.

Im Unterprojekt UP2 sollte keine Doktorandin beantragt werden, so dass versucht wurde Teile des Arbeitsprogramms über Diplomanden abzudecken. Ein Ziel war die gezielte Anregung von Schwingungsbanden im Protein mit gechirpten IR-Pulsen. Dazu wurde von Herrn Hartmann ein passiver IR-Pulshaper aufgebaut und charakterisiert. In Deutschland ist für den Pulshaper bereits ein Patent erteilt worden (Patent Nr. 10 2008022724 vom 11.02.2010). Die Funktionsweise ist in Abb. 10 dargestellt. Mit diesem passiven IR-

Pulsshaper kann IR-Pulsen, bei einem Energieverlust von weniger als 10%, ein linearer Chirp aufgeprägt werden. Dies ist essentiell für die gezielte Anregung und ladder climbing von Schwingungen. Der passive IR-Pulsshaper soll in Zukunft auch für 2D-IR Experimente eingesetzt werden. Herr Hartmann ist derzeit Doktorand der AG Heyne und führt seine erfolgreich angefangenen Aufgaben weiter.

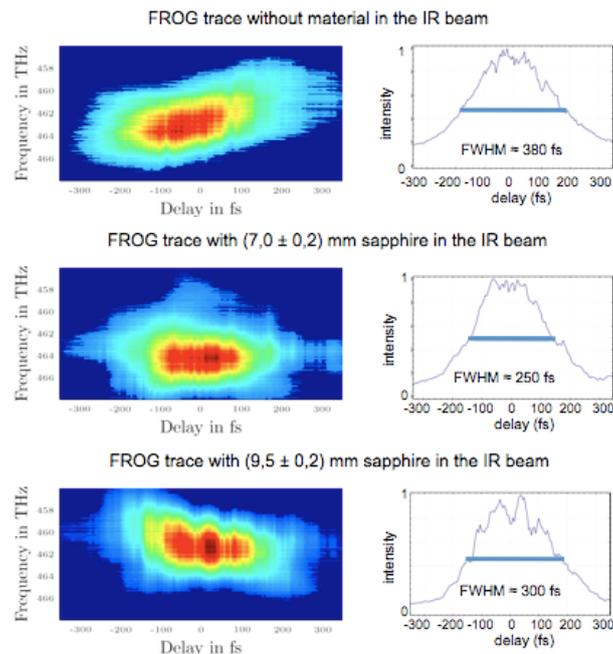


Abb. 10: Passiver IR-Pulsshaper, ein positiv gechirpter IR-Puls wird durch Variation des Shapers erst chirpfrei und danach linear negativ gechirpt.

Die im Rahmen dieses Projektes etablierte und weiter entwickelte Methode der polarisationsaufgelösten fs VIS pump / IR probe Spektroskopie (polfs UV/VIS pump / IR probe) konnte auch auf wichtige Fragestellungen in anderen Systemen angewendet werden. So hat es viel Resonanz auf die dreidimensionale Bestimmung des elektronischen Q_y Übergangsdipolmoments in Chlorophyll *a* gegeben. Mit Hilfe von drei IR Übergangsdipolmomenten, deren Winkel zum elektronischen Q_y Übergangsdipolmoment gemessen wurde, wurde es möglich die dreidimensionale Orientierung des Q_y Übergangsdipolmoments im Molekül zu bestimmen (Abb. 11).

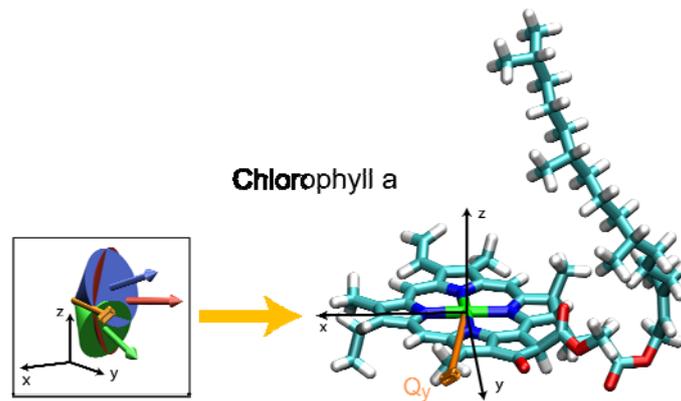


Abb. 11: Bestimmung der 3D Orientierung des Q_y Übergangsdipolmoments in Chlorophyll a (Linke et al. JACS, 130 (2008), 14904-14905).

Diese Methode ist weiterhin im Einsatz und wir hoffen damit strukturelle Änderungen in Echtzeit und dreidimensional verfolgen zu können.

Durch die aufgeführten Arbeiten und Entwicklungen ist die Zusammenarbeit mit Prof. González, Prof. Kühn (TP C9), Prof. Ernsting (TP B1) und Prof. May (TP C3) vertieft und verstetigt worden. Ein Beispiel hierfür ist der gemeinsam von Prof. Kühn und Prof. Heyne beantragte DFG-Antrag mit dem Titel „Infrarot-Laserkontrolle molekularer Reaktionsdynamik im elektronischen Grundzustand. Theorie und Experiment.“ und ein gemeinsames Paper zur Weiterentwicklung von IR-pump / IR-probe Methoden an DNA. Aus der Kooperation mit TP B2 resultierte ebenfalls eine Publikation in 2007.

Insgesamt ist das Projekt nach der Aufbauphase gut angelaufen. Es hat sich allerdings herausgestellt, dass Experimente mit APO, einem Molekül, dass bei geringster Belichtung fast vollständig in verschiedene Photoprodukte zerfällt, sehr zeitraubend und schwierig sind. Das lag hauptsächlich daran, dass jedes Experiment schon nach wenigen Minuten abgebrochen werden musste, damit die Probe ausgetauscht werden kann. Dazu kommt, dass die Synthese von APO, die Herr Dr. Freyer am MBI für uns durchführte, ein komplexer und langwieriger Prozess ist. Das hat die Zeit für Untersuchungen an anderen Molekülen stark eingeschränkt, obwohl sich Frau Lauer sehr bemüht hat. Es stehen noch einige interessante Fragestellungen im Projekt aus, die untersucht werden können, aber aufgrund des Auslaufens des SFB 450 wird auch unser Teilprojekt B9 eingestellt.

5.2.2 Liste der aus dem Teilprojekt seit der letzten Antragstellung entstandenen Publikationen

Publikationen:

- [FLF 09] H. Fidder, A. Lauer, W. Freyer, B. Koepppe, K. Heyne, *Photochemistry of Anthracene-9,10-endoperoxide* J. Phys. Chem. A **250**, 119-125, (2009)
- [LLH 09] M. Linke, A. Lauer, T. von Haimberger, A. Zacarias, K. Heyne, *Three-dimensional Orientation of the $Q(y)$ Electronic Transition Dipole Moment within the Chlorophyll a Molecule Determined by Femtosecond Polarization Resolved VIS Pump-IR Probe Spectroscopy* J. Am. Chem. Soc. **130**, 14904-14905, (2009)
- [HKK 08] K. Heyne, GM. Krishnan, O. Kühn, *Revealing anharmonic couplings and energy relaxation in DNA oligomers by ultrafast infrared Spectroscopy* J. Phys. Chem. B **112**, 7909-7915, (2008)
- [CGL 08] I. Corral, L. Gonzalez, A. Lauer, W. Freyer, H. Fidder, K. Heyne, *Identifying the low-lying electronic states of anthracene-9,10-endoperoxide* Chem. Phys. Lett. **452**, 67-71, (2008)
- [EHD 07] T. Elsaesser, N. Huse, J. Dreyer, JR. Dwyer, K. Heyne, E.T.J. Nibbering, *Ultrafast vibrational dynamics and anharmonic couplings of hydrogen-bonded dimers in solution*, J. Chem. Phys. **341**, 175-188, (2007)

Patente

akzeptiert

- [HHM10] K. Heyne, M. Hartmann, K. Molkenhuth, *Pulsshaper und Infrarotlaser mit Pulsshaper*, Deutsches Patent- und Markenamt, Germany, Freie Universität Berlin, **10 2008 022 724**, 11.

5.3 Bewilligte Mittel für die laufende Förderperiode

Das Teilprojekt wurde im Sonderforschungsbereich von 07/2007 bis 06/2010 gefördert.

Haushalts-jahr	Personalmittel	Sachmittel	Investitionsmittel	Gesamt
2007/2	22.3	10.0	20.0	52.3
2008	44.6	13.5	0	58.1
2009	41.9	10.0	0	51.9
2010/1	19.6	3.5	0	23.1
Summe	128.4	37.0	20.0	185.4

(Alle Angaben in Tausend EUR)

5.3.1 Personal im Teilprojekt

Name, akad. Grad, Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	im SFB tätig von (Monat / Jahr) bis (Monat / Jahr)	Entgelt- gruppe
Grundaussstattung				
wissenschaftl. Personal (einschl. Hilfskräfte)	Experimentalphysik	Inst. f. Exp.-Physik, FUB	07/2007 – 06/2010	/
2. Fidler, Henk, Dr.	Experimentalphysik	Inst. f. Exp.-Physik, FUB	07/2007 – 06/2010	
Ergänzungsausstattung				
wissenschaftl. Personal (einschl. Hilfskräfte)	Experimentalphysik	Inst. f. Exp.-Physik, FUB	07/2007 – 06/2010	BAT IIa2/3
4. Schnitzbauer, Jörg, stud. Hilfskraft	Experimentalphysik	Inst. f. Exp.-Physik, FUB	01/2009 – 12/2009	TVStud. II

