

**Synthese und Untersuchung photoschaltbarer
Spiropyrane und Diarylethene
für die
photoschaltbare Fluoreszenz und als DNA
Interkalatoren**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Florian May

Bielefeld 2012

1. Gutachter:

Prof. Dr. Jochen Mattay

2. Gutachter:

Prof. Dr. Andreas Hütten

Tag der mündlichen Prüfung:

Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde in der Zeit von Mai 2009 bis Juni 2012 unter Anleitung von Prof. Dr. Jochen Mattay an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Mattay für die interessante Aufgabenstellung und die Freiheiten in der Wahl des Weges, welchen ich zur Lösung beschreiten durfte.

Bei Prof. Dr. Andreas Hütten möchte ich mich für die Übernahme des zweiten Gutachten und die gute Kooperation bedanken.

Bei meiner Freundin Severine Machoczek möchte ich mich für die Unterstützung bedanken die sie mir immer gewährt hat und auch wenn es mal schwierig war stand sie immer hinter mir. Denk immer daran: Der Seestern liebt dich!!

Ich danke auch meinen Eltern Helga und Mathias die immer an mich geglaubt haben und deren Unterstützung ich immer hatte und noch habe. Ihr seid die besten Eltern die es gibt. Meinem Bruder Jonas danke ich dafür, dass er der beste Bruder ist, den ich mir wünschen kann. Und wir kommen schon noch nach Berlin.

Meiner zweiten Familie Angelika, Roderich und Andre Machoczek, die nie aufhören mich mit Hilfe zu überschwemmen.

Meiner dritten Familie aus der ehemaligen Wohngemeinschaft: Alexander Moreth und Jens Eberhardt für vielen Jahre die wir mit prickelnden Kaltgetränken, Pizza, guter Musik und Laune unter einem Dach verbracht haben.

Michael Gossing für tollen Abende, ob mit Rechner oder Warhammer, dem Kowa für das Ertragen von Harkim, Steffen Schwarz für die gute Abendgestaltung und Festivalbegleitung, Elmar Berman, Mirko Sobotta und Jan Baumann für die vielen Abende im Moschpit.

Ich danke natürlich auch der alten, wie der neuen OCI, ich hatte immer viel Spaß an meiner Arbeit und auch in der gemeinsamen Freizeit. Besonders möchte ich natürlich meinem Kollegen aus dem alten Labor Dr. Tobias Schröder danken, der mir in der Startphase der Promotion viel geholfen hat, auch wenn ich selten Musik hören durfte.

Und natürlich meinen neuen Laborkollegen: Ramona Hartmann, die gute Seele unseres Labors, die uns Verrückten ertragen musste. Sebastian Wiegmann der immer eine wahnsinnige Idee hatte wenn mal Not am Mann war. Und Dr. Michael Peter für eine gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und die vielen Bosselduelle.

II

Den Doktoren Oliver Tomic, Kai Altenhöner, Sebastian Bringmann und Marlene Paletta für die super Einführung in den Arbeitskreis, die unzähligen Hilfestellungen und die vielen Aktivitäten auch neben der Arbeit.

Natürlich auch Dr. Christian Schäfer bei dem ich mein erstes Blockpraktikum in der OCI machen konnte.

Ich danke auch der „neuen“ OCI, Marcel Heidlindemann für die vielen DSA und Decent Abende, Phillip Böhm und Richard Metzner für die Feierabendgestaltung im Kaffeeraum.

Den drei Damen: Carolin Giese, Anna Reimer und Tina Ress danke ich für die eifrige Begleitung ins Unifit.

Bei Thomas Geisler möchte ich mich besonders bedanken für seine unermüdliche Arbeit die er hier leistet und Dieter Barth für die Gespräche auf dem Flur und die saubere Handtücher.

Ich danke auch dem Chemikalienlager um Heike Kosellek, Stefanie Boese und Jonna Gröger für die Versorgung mit allem Möglichen und die vielen kleinen Gefallen die ich bekommen habe.

Meinen Blockern Jan Horstmann und Thomas Kuhlmann danke ich natürlich auch.

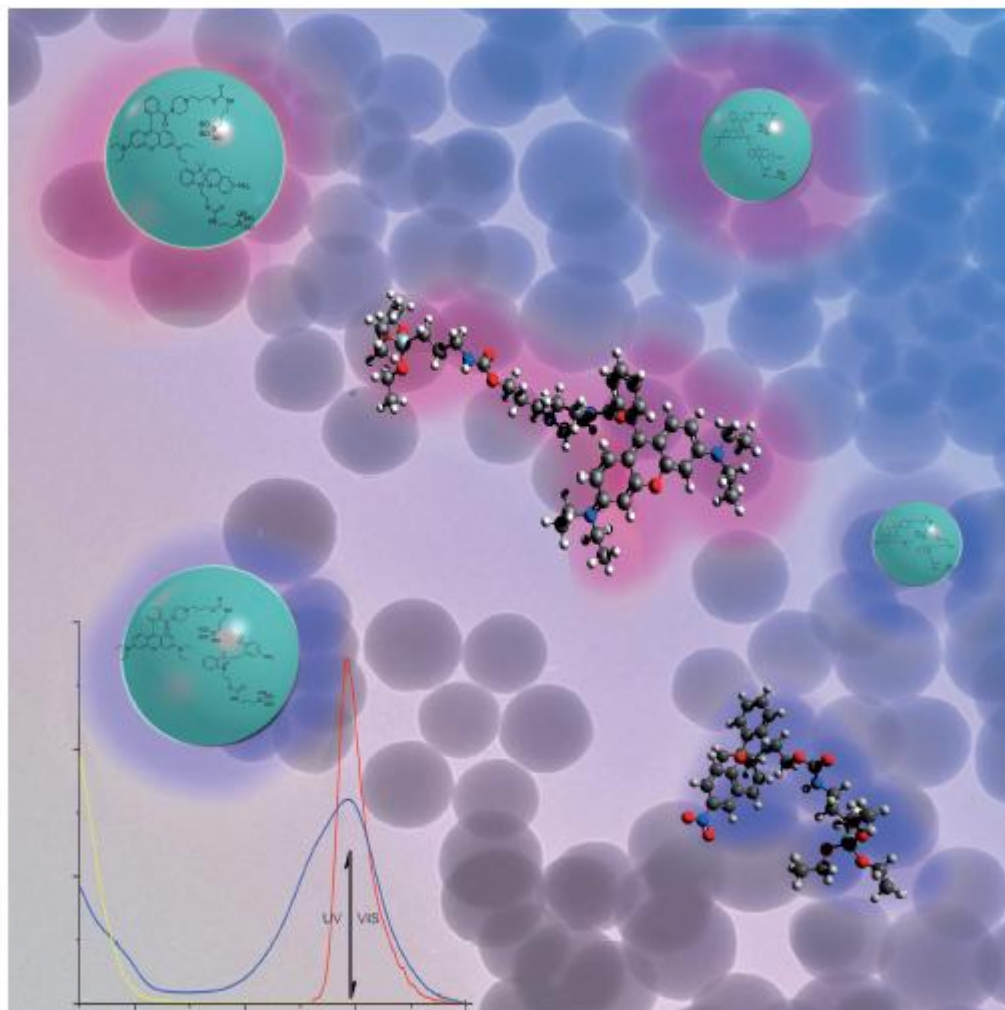
Vieles an dieser Arbeit wäre ohne die Analytikabteilung nicht möglich gewesen, deswegen geht mein Dank auch an Peter Mester und Gerd Lipinski für die vielen gemessenen NMRs und der Massenspektrometrieabteilung mit Olliver Kollas, Sandra Heitkamp und Mathias Letzel.

III

1. EINLEITUNG	1
2. ALLGEMEINER TEIL	2
2.1 PHOTOCROMIE	2
2.2 SPIROPYRANE	7
2.3 DIARYLETHENE	13
2.4 ERMÜDUNG VON PHOTOSCHALTERN	16
2.5 PHOTOSCHALTBARE FLUORESZENZ UND HOCHAUFLÖSENDE SPEKTROSKOPIE	17
2.6 FLUORESZIERENDE SILIZIUMOXID NANOPARTIKEL	23
2.7 PHOTOSCHALTBARE INTERKALATION VON PHENANTHROLIN-DERIVATEN IN DER DNA	26
3. AUFGABENSTELLUNG	29
4. ERGEBNISSE	30
4.1 RHODAMIN-B-SPIROPYRANKONJUGATE (I)	30
4.2 DIARYLETHENE FÜR PHOTOSCHALTBARE FLUORESZENZ IN CORE-SHELL NANOPARTIKELN (II)	34
4.3 PHOTOSCHALTBARE FLUORESZIERENDE SILIZIUMDIOXIDNANOPARTIKEL (III)	38
4.4 PHOTOSCHALTER FÜR DIE DNA INTERKALATION (IV)	42
5. ZUSAMMENFASSUNG	46
6. SUMMARY	47
7. LITERATUR	48
8. ANHANG	52

Synthesis and Characterization of Photoswitchable Fluorescent SiO₂ Nanoparticles

Florian May,^[a] Michael Peter,^[a] Andreas Hütten,^[b] Luca Prodi,^[c] and Jochen Mattay^{*,[a]}



1. Einleitung

In einer Zeit, in der immer genauere Informationen über Lebensmittel, Krankheiten, das Leben an sich und sogar den Weltraum erlangt werden liegt die Vermutung nahe, dass dies an Verbesserungen der Analytikmethoden liegen mag. Auf diesem Sektor hat sich in den letzten Jahren eine unglaubliche Verfeinerung der Methoden vollzogen. Dies liegt daran, dass viele alt hergebrachte Methoden und Dogmen in Frage gestellt und neu überarbeitet wurden. Zu diesem Bereich gehört, auch die Mikroskopie.

Die modernen Mikroskopiemethoden basieren immer noch auf den Prinzipien der Physik des Lichtes, auch wenn die Geräte heute nicht mehr viel mit den Aufbauten der letzten Jahrhunderte zu tun haben. Laser haben vielerorts als Lichtquellen Einzug gehalten und das Auge ist als Detektor von Kameras abgelöst worden.

Besonders in der Mikroskopie werden alte Regeln gedehnt und umgangen. Dadurch werden völlig neue Bereiche erschlossen. So können mittlerweile Auflösungen erreicht werden, von denen früher nur geträumt werden konnte. Anstatt nur *in vitro* Untersuchungen durchzuführen, besteht nun die Möglichkeit, diese auch *in vivo* vorzunehmen.

Diese Arbeit soll dabei helfen, diese Grenzen durch die Synthese und Untersuchung von kleinen organischen Molekülen, welche besondere Eigenschaften im Bezug auf Licht haben, noch weiter zu verschieben. Vielleicht hilft dieser Beitrag dabei, unsere Sicht auf die Dinge noch ein wenig zu erweitern.

2. Allgemeiner Teil

2.1 Photochromie

Der Begriff Photochromie beschreibt die Umwandlung eines Stoffes von einem Zustand **A** in einen Zustand **B** durch Bestrahlung mit Licht. Dieser Vorgang ist reversibel und die Substanz kann, entweder durch erneute Bestrahlung mit Licht oder Zuführung von thermischer Energie wieder in ihren Ausgangszustand überführt werden. Das Wort Photochromie kommt aus dem Griechischen und leitet sich aus *phos* (Licht) und *chroma* (Farbe) her, wobei der Name selbst erst 1950 von HIRSHBERG eingeführt wurde.^[1] Der Ursprung weist auf das markanteste Merkmal photochromer Verbindungen hin, die Änderung ihrer Farbe. Jedoch ändern sich auch viele andere physikalische Eigenschaften, wie die Struktur, der Brechungsindex oder das Oxidations/Reduktionspotenzial bei Bestrahlung.^[2, 3, 4]

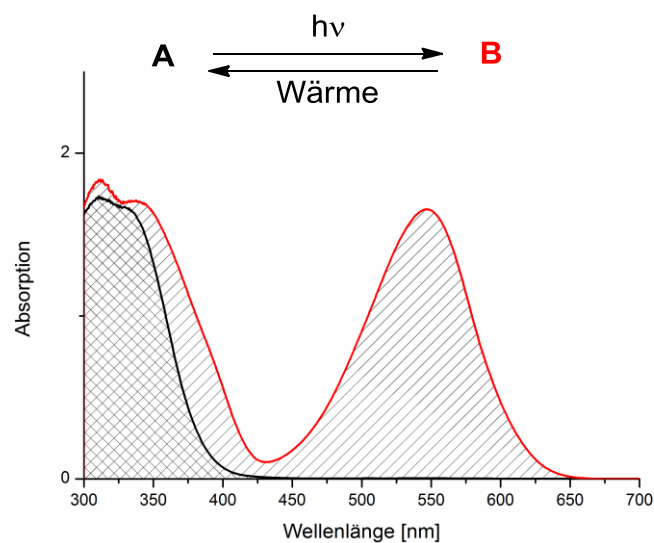


Abbildung 2.1: Absorptionsspektrum einer photochromen Substanz nach Bestrahlung (rote Linie, B). Nach thermischer Rückschaltung wird das Ausgangsspektrum erhalten (schwarze Linie, A).

Generell wird bei photochromen Verbindungen zwischen zwei Klassen von Chromophoren unterschieden: die *T-Typ* Chromophore, deren Rückreaktion zum Ausgangszustand **A** thermisch verläuft, und die *P-Typ* Chromophore, bei denen dieser Schritt durch Bestrahlung erfolgen kann.

Die Reaktion von Zustand **A** zu **B** erfolgt über die Absorption elektromagnetischer Strahlung und resultiert in einem, zum Ausgangszustand, veränderten Absorptionsspektrum. Organischen photochromen Systemen liegen in den meisten Fällen unimolekulare Reaktionen zugrunde. Im Falle positiver Photochromie ist die Form **A** farblos oder schwach gelblich (Absorption über 400 nm) und Form **B** farbig. Im umgekehrten Fall, wenn Form **A** farbig und **B** farblos ist, spricht man von negativer oder inverser Photochromie.

Die zugrunde liegenden Prozesse sind Einphotonenmechanismen. Hierbei wird die Form **B** vom angeregten Singulett- ($^1A^*$) und/oder vom Triplettzustand ($^3A^*$) gebildet. Es gibt aber auch die Möglichkeit eines Zweiphotonenmechanismus. Hierbei wird der Endzustand über zwei gleichzeitige oder schrittweise Absorptionen von zwei Photonen erreicht (vgl. Abbildung 2.2).^[2]

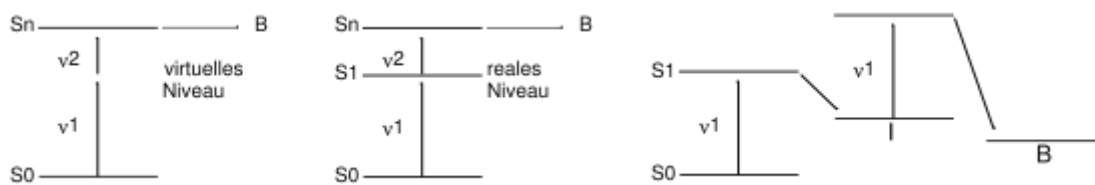


Abbildung 2.2: Zwei-Photonen-Mechanismus, simultane Absorption von zwei Photonen (links) und schrittweise Absorption von zwei Photonen (Mitte), oder sequenziell über ein reales Niveau (rechts).

Die erste Erwähnung von photochromen Substanzen geht auf FRITSCHÉ zurück, welcher 1867 über das Ausbleichen einer orangefarbenen Lösung von Tetracen und die spätere Rückbildung der Farbe im Dunkel berichtete.^[5]

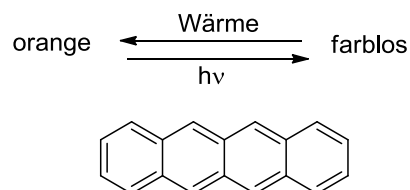


Abbildung 2.3: Tetracen und die von FRITSCHÉ beobachtete Entfärbung bei Sonneneinstrahlung.

4 Allgemeiner Teil

Wenig später fand TER MEER einen Farbwechsel des Kaliumsalzes von Dinitroethan im Festkörper von gelb im Dunkeln zu rot im Tageslicht.^[6] Andere Beispiele wurden von PHIPSON und MARKWALD beschrieben.^[7, 8]

Eine wirkliche Aufklärung und Beschreibung des Reaktionsmechanismus fand jedoch erst in der Mitte des 20. Jahrhunderts statt, als FISCHER und HIRSHBERG verstärkt Studien zu diesem Thema durchführten. Dies mündete in dem 1950 von HIRSHBERG geprägten Terminus Photochromie.^[1]

In den darauffolgenden Jahren kam es zu einer Aufschwung in dem Gebiet der Photochromie, als mehrere photochrome Systeme, wie Spiropyrane, Spirooxazine, Fulgide/Fulgimide, Diarylethene, Chromene, Azobenzole etc. entdeckt und detaillierter charakterisiert wurden (vgl. Abbildung 2.4). Die unterschiedlichen Photoschalter zeigen verschiedene Schaltmechanismen. Der von Azoverbindungen beruht auf einer *cis-trans* Isomerisierung der Stickstoff-Stickstoff-Doppelbindung.

Bei Diarylethenen, Fulgiden/Fulgimiden sowie Spiropyranen und Spirooxazinen beruht der Schaltmechanismus auf pericyclischen Reaktionen, die zu einem Ringschluss bzw. einer Ringöffnung führen, und so die Photochromie hervorrufen. Fulgide/Fulgimide und Diarylethene zeigen als einzige der hier genannten Schalter reine *P-Typ* Photochromie. Spiropyrane und Oxazine hingegen lassen sich auch thermisch zurückschalten.

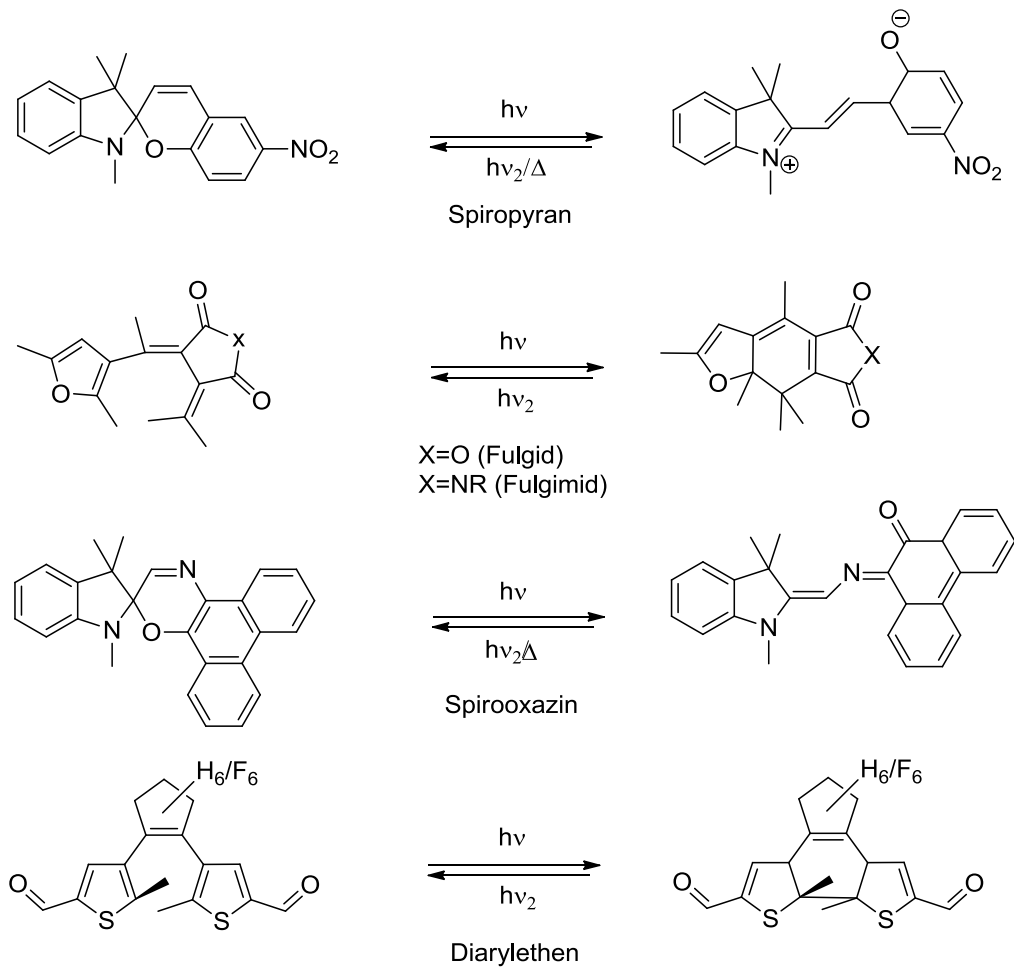


Abbildung 2.4: Beispiele für verschiedene photochrome Verbindungen.

Auch natürlich vorkommende Chromophore wurden entdeckt. Das Retinal, welches in Rhodopsin vorkommt, ist das berühmteste Beispiel dafür. (vgl. Abbildung 2.5)

6 Allgemeiner Teil

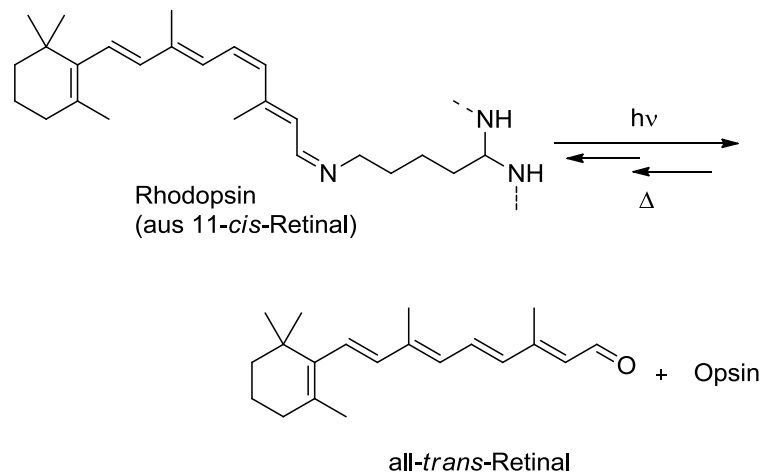


Abbildung 2.5: Die photochrome Reaktion des an Opsin gebundenen Retinals (Rhodopsin) und die darauffolgende Abspaltung vom Opsin.

Es spielt eine wichtige Rolle im Mechanismus unserer optischen Wahrnehmung. Hierbei ist das Retinal an das Protein Opsin gebunden, welches die Absorptionswellenlänge des Systems bestimmt, und kann zwischen seiner 11-*cis* und der all-*trans* Form geschaltet werden. Diese all-*trans* Form kann sich dabei vom Opsin abspalten und so eine Signalkaskade zum Sehnerv initiieren. Die Rückreaktion zur 11-*cis* Form geschieht durch die Retinal-Isomerase.

Anwendung finden photochrome Verbindungen in vielen Gebieten. Dabei wird zwischen Anwendungen unterschieden, die direkt an die Änderung des Absorptionsspektrums geknüpft sind, und solchen, die sich auf physikalische Änderungen im Chromophor berufen, wie z.B. Brechungsindex, Leitfähigkeit und Löslichkeit, um nur einige zu nennen. Zu den erst genannten gehören Aktinometer, die dazu dienen, die Anzahl der Photonen in einem Lichtstrahl zu messen. Hierbei werden z.B. Flugide verwendet.^[9]

Spiropyrene werden in photochromen Brillengläsern verwendet, welche sich bei Sonneneinstrahlung verfärben und im Dunkeln ihre Farbe wieder verlieren.^[10]

Mit Erfolg wurden auch schon optische Speichersysteme auf Basis von Spiropyranen entwickelt, die auf einer 3D-Struktur beruhen. Diese haben eine um den Faktor 1000 höhere Speicherdichte als eine herkömmliche DVD.^[11]

Diarylethene, Spiropyrene und Fulgide werden auch im Feld photoschaltbarer Fluoreszenz eingesetzt. Hierbei wird die Fluoreszenz von den Photoschaltern reversibel ausgeschaltet. Diese Technik wird in Auflösungs-erhöhender Fluoreszenzmikroskopie verwendet.^[12, 13, 14]

(vgl. Abschnitt 2.5)

2.2 Spiropyrane

Spiropyrane sind als photochrome Verbindungen seit 1952 bekannt und wurden von HIRSHBERG und FISCHER erstmals beschrieben.^[15] Sie gehören zur Klasse der *T-Typ* Chromophore und lassen sich zusätzlich auch durch Bestrahlung mit Licht im sichtbaren Bereich zurückschalten.

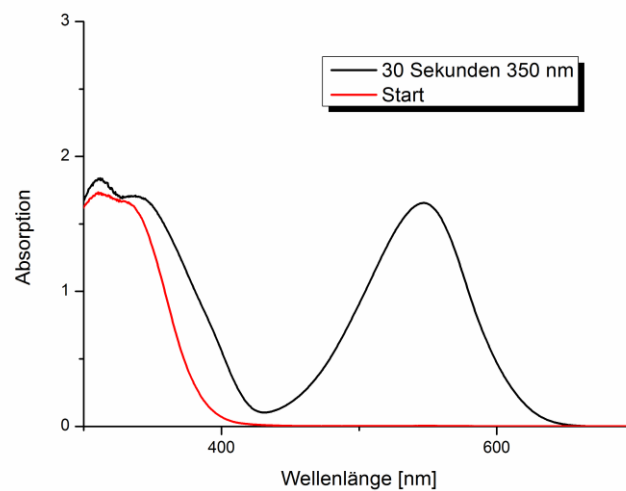


Abbildung 2.6: Typisches Absorptionsspektrum eines Spiropyrans vor und nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge von 350 nm in Ethanol.

Der Mechanismus, der dem Schaltprozess zugrunde liegt, ist eine 1,6-Elektrocyclisierung, die es ermöglicht, zwischen zwei valenzisomeren Formen – der farblosen bis leicht gelblichen Spiropyranform **1** und der farbigen Merocyaninform **2a/b** hin und her zu schalten.

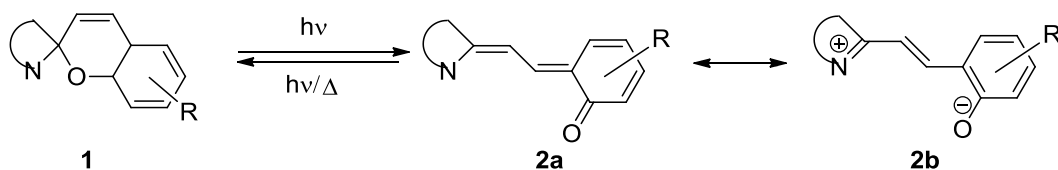


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung des Schaltverhaltens von Spiropyranen mit der farblosen bis leicht gelblichen Spiroform **1** und den beiden farbigen Merocyaninformen **2a** und **2b**.

8 Allgemeiner Teil

Im Schaltprozess wird photochemisch die C-O Bindung von **1** gespalten und es entsteht das Merocyanin. Während im polaren Medium die zwitterionische Form **2b** bevorzugt ist liegt im unpolaren Medium eher die ungeladene Form vor. Die Merocyaninform hat den Vorteil eines *push-pull* Systems, besonders wenn *para* zum Phenolat-Sauerstoff eine stark elektronenziehende Gruppe wie $-\text{NO}_2$ positioniert ist.

Spiroverbindungen allgemein haben zwei über ein tetraedrisches Kohlenstoffzentrum verknüpfte π -Systeme, welche in der Spiroform gegeneinander orthogonal verdrillt sind. Dadurch stehen die Molekülorbitale senkrecht zueinander (vgl. Abbildung 2.8).

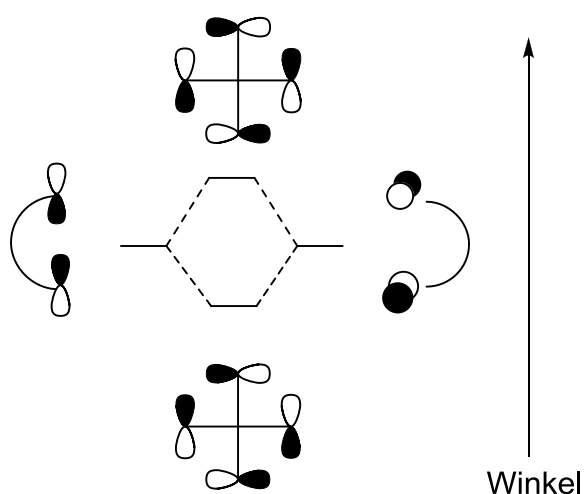


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der beiden am Spiroatom senkrecht aufeinander stehenden Phasen.

Die Ringöffnung, durch Bestrahlung beginnt mit der Bindungsspaltung der C-O Bindung im Stereoisomer (**R**)-**3**. Dies führt zu dem sterisch gehinderten Isomer **3b**, welches sich schnell zu den stabileren planaren Merocyanin-Isomeren **4a-d** umlagert.

Die Isomere werden durch die Konfiguration der molekularen Fragmente relativ zu den beiden Doppelbindungen (*cis*, *trans*: **C** und **T**) und der partiellen Doppelbindung (*S-cis*, *S-trans*: **C**, **T**) unterschieden. Da die *S-cis* Konformere in ihrer Energie signifikant höher liegen als die *S-trans* Isomere, beschränkt sich Abbildung 2.8 auf die Darstellung der *S-trans* Isomere.^[16]

Die Anwesenheit von verschiedenen Merocyaninformen in Lösung von Spiropyranen wurde in unterschiedlichen Studien durch Transient-Spektroskopie^[17], ^1H -, ^{13}C -, ^{19}F -NMR NOE,^[18] und zeitaufgelöster Resonanz-Raman-Spektroskopie^[19] nachgewiesen. Das CTC-**4b** und das TTC-**4c** Isomer sind als die stabilsten Isomere bekannt. Dies deckt sich mit den von BUNCCEL durchgeführten DFDT Rechnungen.^[20]

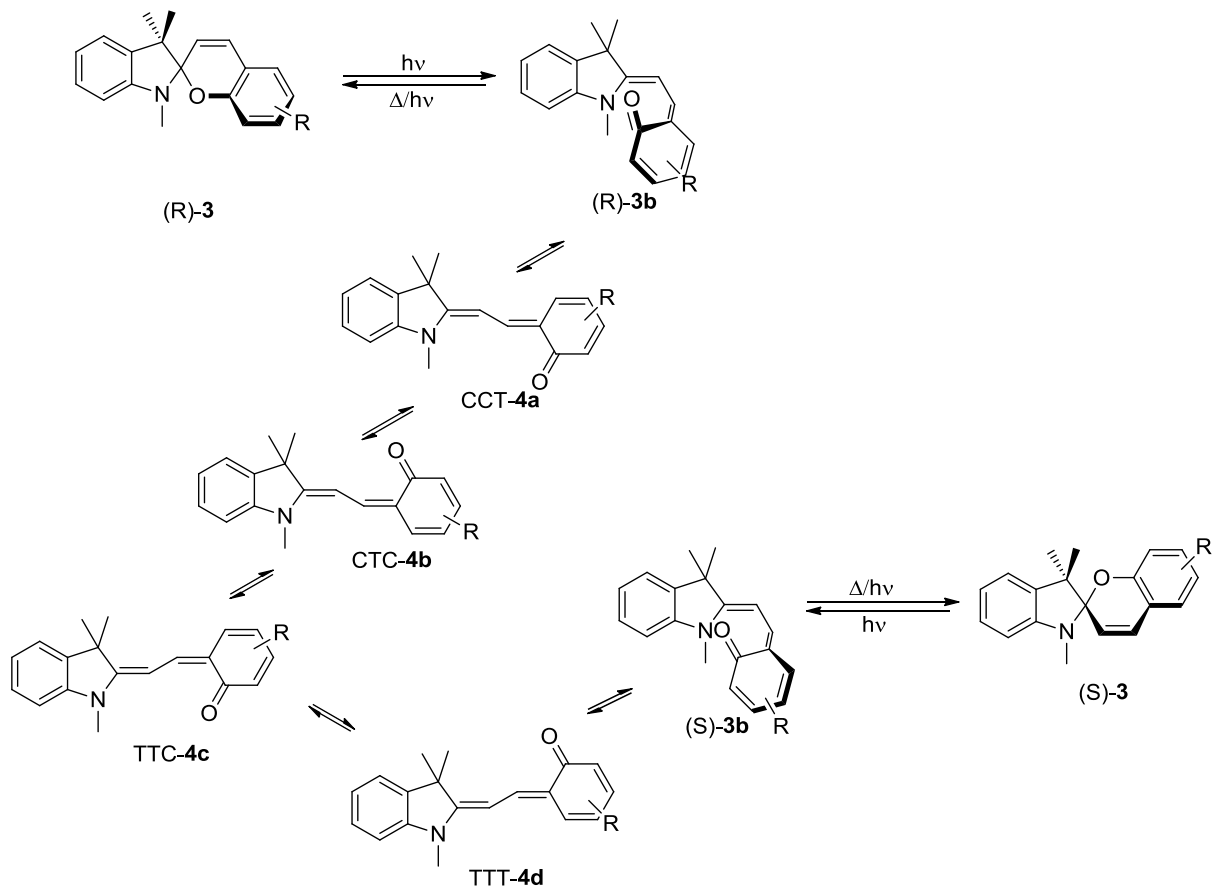


Abbildung 2.9: Die verschiedenen bis jetzt bekannten Isomere des Spiropyrans.

Spiropyrane in ihren Merocyaninformen neigen zur Aggregation und bilden dadurch die charakteristische rote Farbe. In gewissen Fällen ändert sich die Form der Aggregation, und es findet eine bathochrome Verschiebung statt.

Die Aggregation findet normalerweise in paralleler Anordnung statt (*head-to-head*), und es bilden sich die so genannten *J*-Aggregate. In unpolaren Lösungsmitteln kann es zu umgekehrten Strukturen (*head-to-tail*) kommen, welche als *H*-Aggregate bezeichnet werden. Diese Effekte werden hauptsächlich bei linearen Spiropyranen mit langen Alkylketten beobachtet (siehe Abbildung 2.10).

10 Allgemeiner Teil

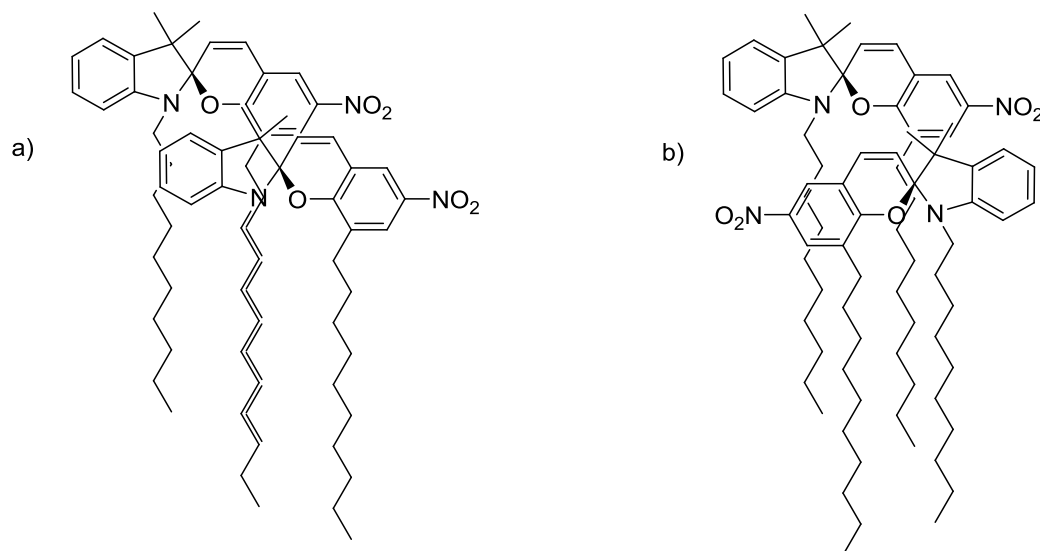


Abbildung 2.10: Anordnung von Spiropyranen in einem *J*-Aggregat (a) und einem *H*-Aggregat (b).

Das am häufigsten verwendete Spiropyran ist das 6'-Nitrospiropyran, dessen Synthese von 1,3,3-Trimethyl-2-methyleneindolin, auch FISCHERS-BASE genannt, oder ihren Derivaten ausgeht. Der zweite Baustein ist ein Nitrosalicylaldehyd, welches in den Positionen 5',7' und 8' funktionalisiert sein kann (vgl. Abbildung 2.12). Die Kondensation der beiden Komponenten wird klassisch unter Rückfluss in Ethanol durchgeführt. Dabei entsteht das Spiropyran in Ausbeuten von 75-90% (vgl. Abbildung 2.11).^[21, 16]

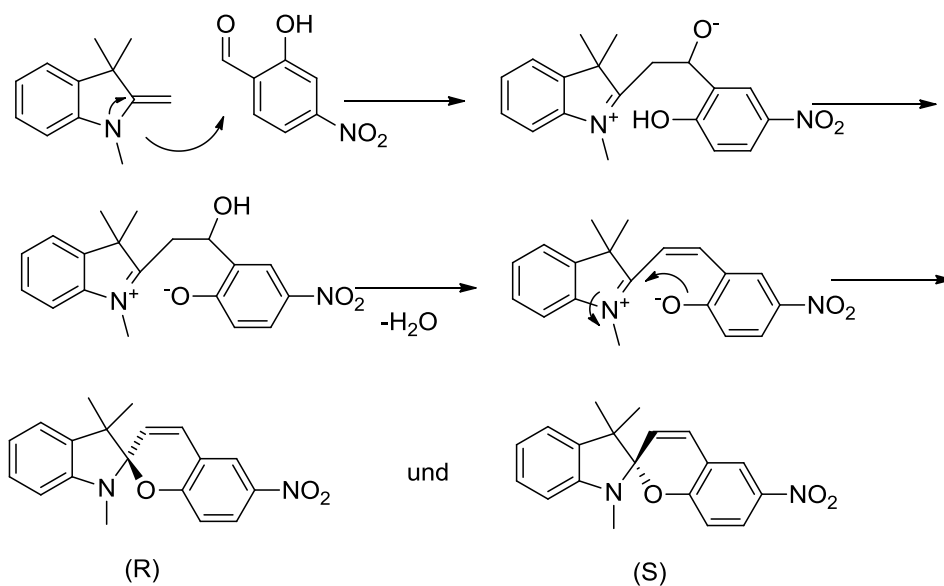


Abbildung 2.11: Mechanismus der Spiropyransynthese.

Die meisten synthetisierten Spiropyrane sind an ihrem Indolteil modifiziert worden. Dies liegt hauptsächlich an der leichten Zugänglichkeit der FISCHER'schen Base. Es gibt aber auch neuere Ansätze, wie die von METZGER synthetisierten Benzothiazole oder Verbindungen ohne Indol-Stickstoff wie die Benzodithiole von GUGLIELMETTI.^[22]

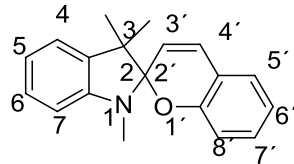


Abbildung 2.12: Nummerierungen von Spiropyranen nach HIRSHBERG und FISCHER.

Die Modifizierungen am Salicylaldehydteil des Spiropyrans sind ähnlich umfangreich. So können z.B. Benzanellierungen durchgeführt werden, die zu einer großen Bandbreite von Spiropyranen führen.

Die wenigsten Modifikation werden am fertigen Spiropyran durchgeführt, da die Vorstufen dafür meist ausreichen. Hier ist eine Modifikation einfacher zu realisieren.

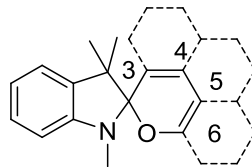


Abbildung 2.13: Beispiele für mögliche Benzanellierungen am Spiropyran.

Eine Anwendung von Spiropyranen besteht, durch ihre hohe Ermüdungsresistenz und die leichten Anknüpfungsmöglichkeiten, z.B. in sogenannten quasi-Flüssigkristallen (QLCs) (vgl. Abbildung 2.14).

12 Allgemeiner Teil

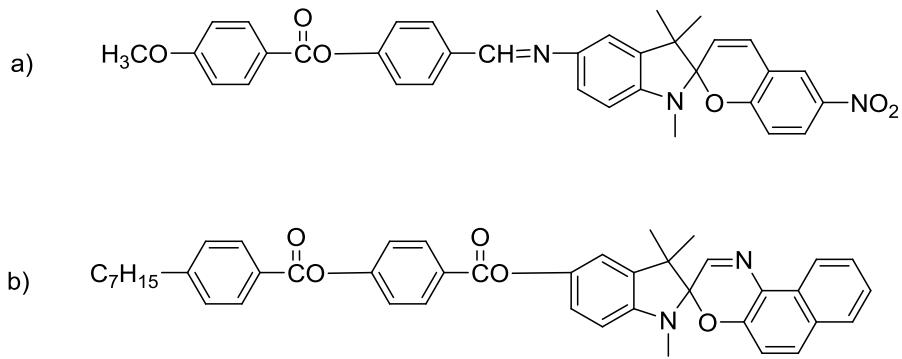


Abbildung 2.14: Jeweils ein Beispiel für QLCs, a) zeigt keine photochromen Eigenschaften, b) ist photochrom.

Hierfür werden Materialien benötigt, welche auf Licht, wie auch auf eine elektrische Anregung reagieren. Durch die Verknüpfung mit verschiedenen Spiropyranen werden Verbindungen erhalten, welche diese Eigenschaften besitzen und unter T_g (Glasübergangstemperatur) ein Flüssigkristallsystem bilden (Abbildung 2.14). Diese Verbindungen wurden auch erfolgreich an Polymere angeknüpft, die als *Photochromic Liquid Crystal Polymers* (PLCPs) (Abbildung 2.15) bezeichnet werden.

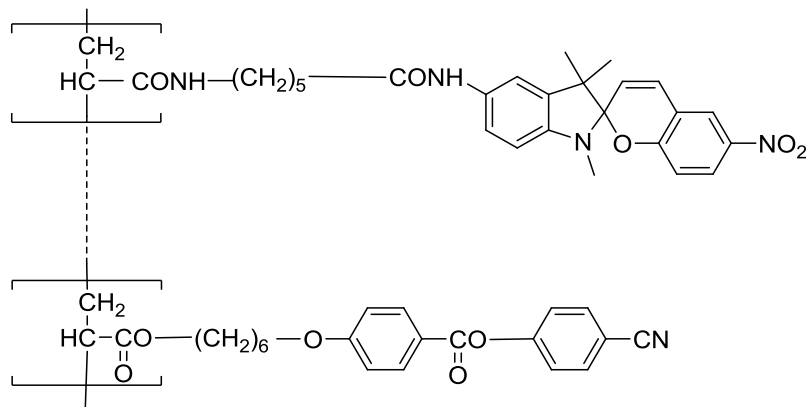


Abbildung 2.15: Beispiel für ein PQLC.

Diese Klasse von Verbindungen bietet große Variationsmöglichkeiten bezüglich der Anzahl der photochromen Gruppen, der Länge der flexiblen Spacer, Strukturen der Hauptketten und dem Molekulargewicht. Die photochromen Eigenschaften hängen in PQLCs auch von T_g (Glasübergangstemperatur) ab und es lassen sich mehrere Farben, abhängig von der Temperatur, erzeugen.^[23]

2.3 Diarylethene

Diarylethene basieren auf einer Stilben-artigen Grundstruktur, welcher ein 1,3,5-Hexatriensystem zugrunde liegt (vgl. Abb. 2.16). Stilben lässt sich durch Bestrahlung mit UV-Licht in Dihydrophenanthren umwandeln. Bei Anwesenheit von Sauerstoff kommt es zu einem irreversiblen Schritt, bei dem Phenanthren erhalten wird. In entgasten Lösungen ist diese Reaktion jedoch reversibel.^[24] IRIE *et al.* machten sich 1988 diese Eigenheit zunutze und entwickelten das photochrome Diarylethengrundgerüst. Diese Klasse von Photoschaltern ist extrem ermüdungsresistent.^[25]

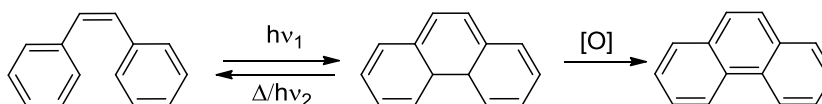


Abbildung 2.16: Die Bestrahlung von Stilben mit UV-Licht führt zu Dihydrophenanthren. In nicht entgasten Lösungen erfolgt eine Oxidation zum Phenanthren.

Um den Oxidationsprozess zu unterbinden, wurden zwei Methylgruppen anstelle der Wasserstoff-Atome an der 4a- bzw. 4b-Position eingeführt. Dies führt indes zu der Bildung von zwei verschiedenen Isomeren, dem parallelen und dem antiparallelen Isomer. Jedoch ist nach den *Woodward-Hoffmann-Regeln* nur das antiparallele Isomer photochrom, da die Photocyclisierung konrotatorisch abläuft.^[25] Das vorliegende Grundgerüst (vgl. Abbildung 2.16), in der geschlossenen Form, weist eine geringe Stabilität auf. Die Rearomatisierungstendenz der Aromatenringe ist zu stark, so dass die Rückreaktion zum offenen Isomer eintritt, sobald die Bestrahlung mit UV-Licht beendet wird.

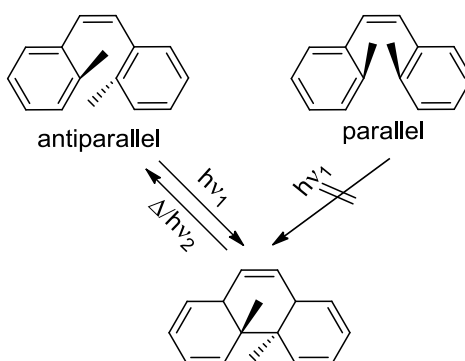


Abbildung 2.17: Nur das antiparallele Isomer kann durch Bestrahlung mit UV-Licht in die geschlossene Form überführt werden.

14 Allgemeiner Teil

Dieses Problem wurde dadurch gelöst, indem Heteroaromaten verwendet wurden. Die Stabilität der geschlossenen Form hängt dabei stark von der Aromatenstabilisierungsenergie ab: je geringer diese ist, umso stabiler ist die geschlossene Form des Diarylethens. KELLOGG *et al.* berichteten über Diarylethene mit Thiopheneinheiten, welche im Dunkeln in der geschlossenen Form bei 80°C eine Lebenszeit von mehr als drei Monaten besitzen. Erst Bestrahlung mit Sonnenlicht führt zur Rückreaktion.^[26]

Ein weiteres Problem, das bei dieser Art von Photoschaltern besteht, ist die *cis-trans*-Isomerisierung der Doppelbindung. Allein die *cis*-Form gestattet die konzertierte Ringschlussreaktion. Da bei jedem Zyklus diese Isomerisierung eintritt, folgt daraus eine schnelle Ermüdung des Systems. Durch die Einführung von sterisch anspruchsvollen Gruppen oder Ringen kann diese Isomerisierung unterbunden werden (vgl. Abb. 2.18).

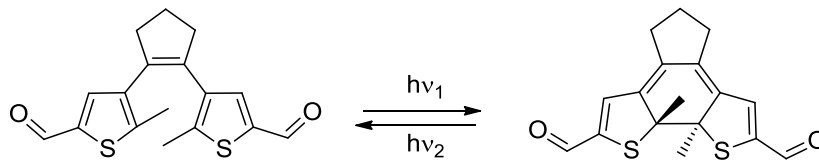


Abbildung 2.18: Beispiel für ein thermisch irreversibles Diarylethen.^[4]

Wie die meisten Photoschalter wird das Diarylethen bei Bestrahlung der offenen Form, in die geschlossene überführt und ein Farbwechsel tritt auf. Dieser Farbwechsel ist je nach Substitutionsmuster unterschiedlich, findet meistens aber von einer farblosen zu einer blauen Form hin statt. In Abbildung 2.19 ist ein typisches Absorptionsspektrum eines Diarylethens gezeigt.

Diese Farbänderung hängt von der Größe des konjugierten Systems ab, welches in der offenen Form durch die nicht planare Anordnung des 1,3,5-Hexatriensystems eingeschränkt wird. In der geschlossenen Form liegt dagegen ein verbundenes, planares π -System vor. Wenn dieses durch weitere konjugierte Gruppen erweitert wird, führt dies zu einer bathochromen Verschiebung.^[27]

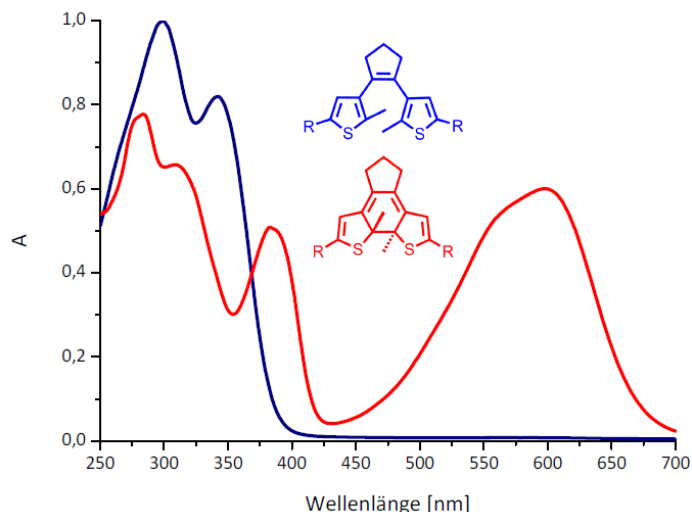


Abbildung 2.19: Typisches Absorptionsspektrum eines Diarylethens mit der offenen (blau) und der geschlossenen Form (rot).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Diarylethene beruhen zum einen auf dem Perfluorocyclopenten und zum anderen dem nicht fluorierten Cyclopenten als Grundgerüst. Die 1,2-Diarylperfluorocyclopentene werden nach den von IRIE *et al.* zuerst vorgestellten Methoden synthetisiert.

Dabei wird zunächst einmal vom bromierten Thiophenderivat ausgegangen und dieses mit *n*-Butyllithium und Perfluorocyclopenten zum entsprechenden Dithienyl-perfluorocyclopenten umgesetzt (Methode 1). Alternativ kann auch der schon fertige Photoschalter verwendet werden, welcher anschließend funktionalisiert werden kann (Methode 2) (vgl. Abb. 2.20).^[28]

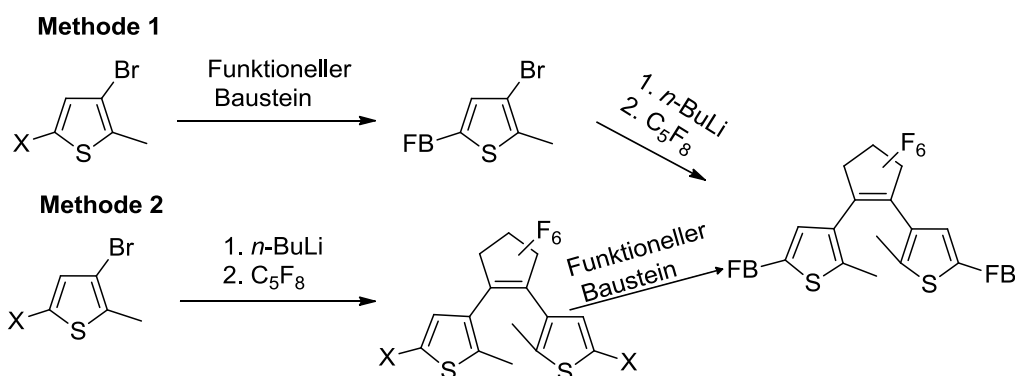


Abbildung 2.20: Schema für beide möglichen Routen der Diarylethensynthese nach IRIE *et al.* Mit X = Gruppe zur chemischen Anbindung und FB = einem funktionellen Baustein. Bei Methode 1 wird zuerst das Thiophen funktionalisiert und dann eine Umsetzung zum Diarylethen vorgenommen, wohingegen bei Methode 2 erst die Reaktion zum Diarylethen stattfindet.

16 Allgemeiner Teil

Die Diarylcyclopentene werden nach einer Vorschrift von FERINGA hergestellt.^[29] Dabei wird ein lithiiertes 2-Methylthiophen verwendet welches mit Glutarsäurediester zum Diketon umgesetzt wird. Das 1,5-Diketon wird nun über eine McMurry-Kupplung zum entsprechenden „Dichlorschalter“ umgesetzt (vgl. Abb. 2.21).^[29]

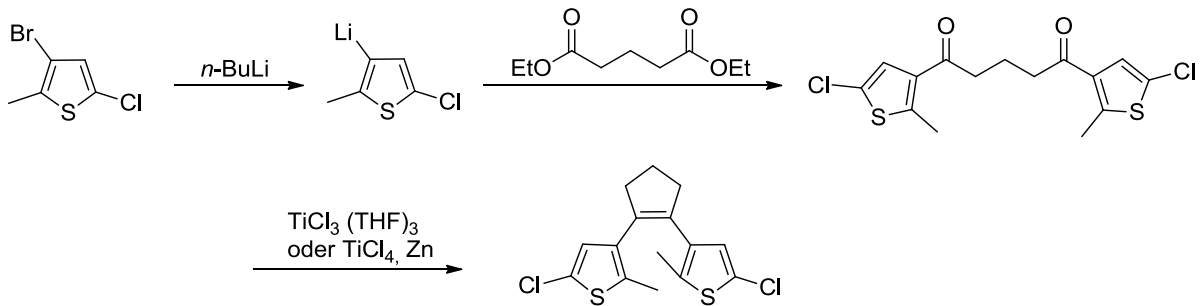


Abbildung 2.21: Synthese eines Diarylethens nach FERINGA mittels einer McMurry-Kupplung.^[29]

2.4 Ermüdung von Photoschaltern

Photochrome Reaktionen selbst verlaufen zerstörungsfrei, jedoch können die photochromen Verbindungen chemischen Abbaureaktionen unterliegen. Der Begriff *Ermüdung* bezeichnet die Abnahme der Effizienz eines photochromen Systems durch solche Abbauprozesse. Der wichtigste Vorgang ist hierbei die Oxidation. Die Hydrolyse der zwitterionischen Merocyaninform in polaren Lösungsmitteln ist der Hauptgrund für die Ermüdung von Spiropyranen.

Die Zyklenanzahl von Spiropyranen beträgt ungefähr 100 Zyklen. Dies ist aber im Einzelnen abhängig von dem verwendeten Lösungsmittel und der Schaltdauer in den verschiedenen Zuständen.

Ein sehr ermüdungsresistenter Photoschalter ist das methylierte Dithienylfluorocyclopenten. Es übersteht mehr als 10^4 Schaltzyklen, vom Zustand **A** in den Zustand **B** und zurück, ohne Zersetzung.^[4]

2.5 Photoschaltbare Fluoreszenz und hochauflösende Spektroskopie

Die Fluoreszenz einer Verbindung lässt sich in einem gewissen Rahmen modulieren. Dies kann durch verschiedene Mechanismen geschehen. Die Desaktivierung des angeregten Zustands eines Fluorophors kann neben der strahlungslosen Desaktivierung durch Stöße (intermolekular) oder Schwingungen/Rotationen (intramolekular) durch einen Elektronentransfer (engl. *photoinduced electron transfer*) oder einen Resonanzenergietransfer (engl. *resonance energy transfer*). Diese Prozesse erfolgen strahlungslos. Im Folgenden werden diese Mechanismen anhand von Beispielen erläutert.

Um eine Photoschaltbarkeit mit Hilfe dieser Prozesse zu gewährleisten muss eine Möglichkeit bestehen zwischen zwei verschiedenen Zuständen hin und her zu schalten. Dies kann durch photochrome Verbindungen, thermische Reaktionen mit nachfolgender Bindungsspaltung oder auch verschiedenen Anregungsmechanismen erfolgen.^[30]

Der lichtinduzierte Elektronentransfer zwischen einem Fluorophor und einem Photoschalter macht es sich zunutze, dass photochrome Verbindungen in ihren verschiedenen Formen auch ein unterschiedliches Redoxpotential haben können.^[31] Durch das Schalten ändert sich entweder das Oxidations- oder Reduktionspotential des Schalters, wodurch es bei Wahl des passenden Fluorophors möglich ist, einen Elektronentransfer zu ermöglichen oder zu verhindern.

In Abbildung 2.22 ist ein Beispiel von DÜRR und GUST gezeigt.^[32]

Hierbei wird ein Konjugat eines Spiroindolizins mit einem Porphyrin photochemisch mit UV-Licht geschaltet. Dabei findet in der geschlossenen Form kein Übertrag statt und bei einer Anregungswellenlänge von 650 nm zeigt das Fluorophor eine Emission bei 720 nm. Sobald aber in die offene, zwitterionische Form geschaltet wird, wird das Spiroindolizin vom angeregten Fluorophor reduziert und die Fluoreszenz wird gelöscht. Dieser Effekt kann durch eine Bestrahlung mit Vis-Licht wieder rückgängig gemacht werden.

18 Allgemeiner Teil

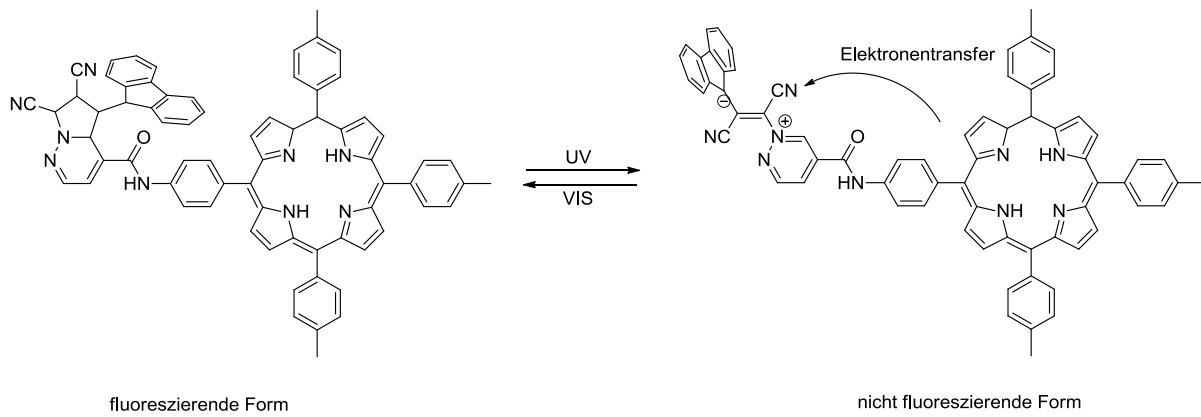


Abbildung 2.22: Beispiel für einen photoinduzierten Elektronentransfer, in diesem Falle vom Porphyrin zur zwitterionischen Form des Spiroindolizins.^[32]

Ein alternativer Mechanismus ist, die Emission über einen Energietransferprozess zu beeinflussen.^[33] Das Chromophor wird so passend zu dem Fluorophor gewählt, dass nur eine der beiden Formen in dem Bereich der Emission absorbiert. In Abbildung 2.23 wird ein Beispiel für diesen Prozess aufgezeigt. Hierbei findet erst eine Überlappung des Absorptionsspektrums des Spiropyrans mit dem Emissionsspektrum des *boron-dipyrrromethene* (BODIPY) in der Merocyaninform statt. Diese Überlappung ist zentral für den Prozess der strahlungslosen Energieübertragung und wird durch das Überlappungsintegral J ausgedrückt.^[34] Der Energieübertrag (RET) beruht auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und ist damit auch entfernungs- und orientierungsabhängig. Dies wird durch den so genannten Förster-Radius R_0 beschrieben.^[34,35] In dem oben genannten Beispiel wird das Konjugat mit 254 nm bestrahlt und schaltet in seine Merocyaninform. Dies führt zu einem Absinken der Fluoreszenz auf 44% des Startwertes der Emission bei 549 nm. Über einen thermischen Rückschaltprozess kann dieser Wert wieder auf 100% angehoben werden. Die Zyklenzahl für diese Reaktion ist jedoch mit maximal fünf Zyklen gering. Ein Elektronentransfer findet nicht statt, da die Änderung des Redoxpotentials nicht ausreicht, um das BODIPY zu oxidieren.^[36]

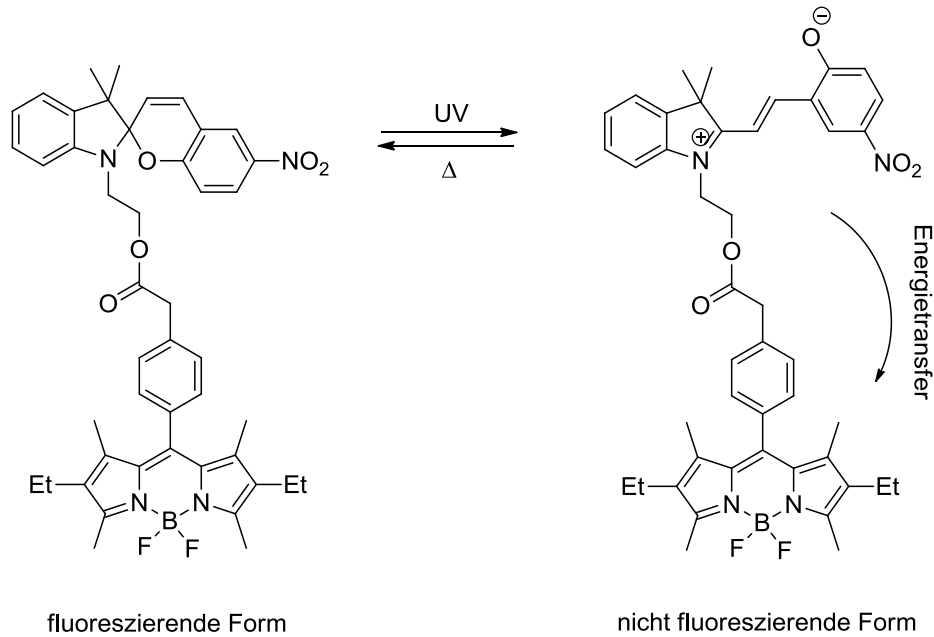


Abbildung 2.23: Beispiel eines strahlungslosen Energieübertrags vom BODIPY Fluorophor zum Spiropyran in der Merocyanin-Form.^[36]

Diese Art von Prozessen ist nicht nur auf die Kombination Fluorophor-Photoschalter beschränkt, es gibt Beispiele für Photoschalter-Fluorophor-Photoschalter-^[13] und Fluorophor-Photoschalter-Fluorophor-^[37] Triaden.

Auch durch die Knüpfung oder Spaltung von chemischen Bindungen kann Fluoreszenzlöschung erreicht werden. Das prominenteste Beispiel ist die Dimerisierung von Anthracen. Dabei wird durch Bestrahlung das monomere Anthracen dimerisiert und zeigt keine Fluoreszenz bei 450nm mehr (vgl. Abbildung 2.24).^[38]

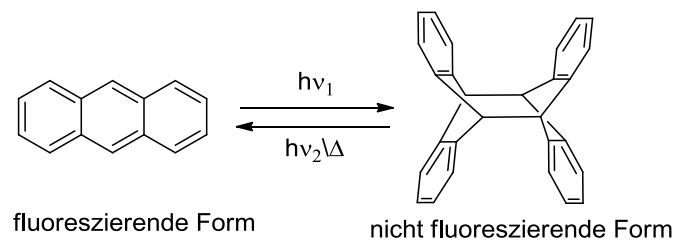


Abbildung 2.24: Anthracen mit dem fluoreszierenden Monomer und dem nicht-fluoreszierenden Dimer.

Auch fluoreszierende Core Shell Nanopartikel sind bekannt. Diese bestehen beispielsweise aus einem CdSe-Kern und werden von einer Zinksulfid-Hülle, an der der Schalter gekoppelt wird, umschlossen (vgl. Abbildung 2.25). Es findet nun in der MC Form ein Energieübertrag vom Partikel auf das Spiropyran statt und die Emission wird gelöscht. Durch eine thermische Rückreaktion kann die ursprüngliche Emission wieder hergestellt werden.^[39]

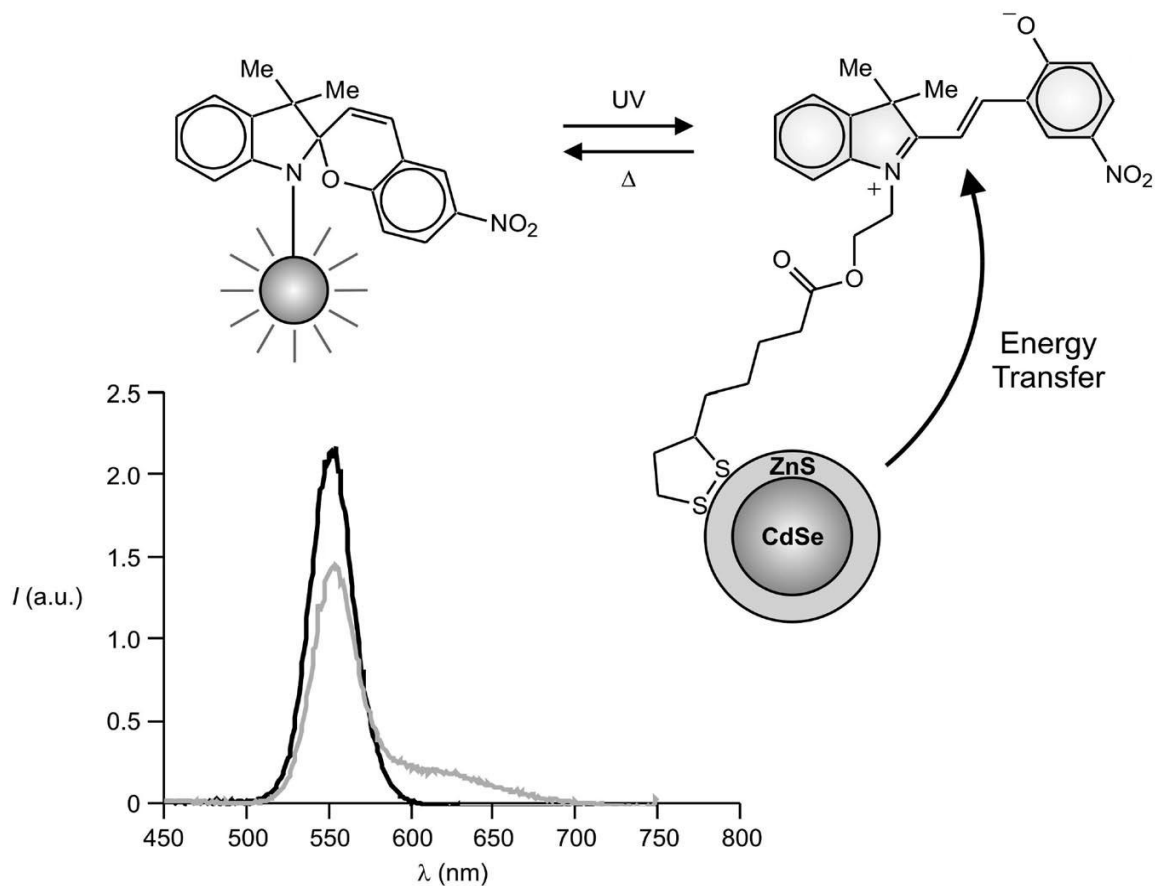


Abbildung 2.25: Das photoschaltbare Fluoreszenzsystem mit einem CdSe-Nanopartikel und einem Spiropyran.^[39]

Die Lichtmikroskopie gehört zu den wichtigsten Methoden, um biologische Systeme und Strukturen *in vivo* zu untersuchen. In neuerer Zeit gewann die Zellmikroskopie immer weiter an Bedeutung. Jedoch gab es ein Problem: die meisten beobachteten Prozesse finden in einem Bereich unterhalb der Beugungsgrenze des Lichtes statt. Die erste Beschreibung des Phänomens der Beugungsgrenze stammt von ERNST ABBE.^[40] Er beschreibt, dass Objekte in der Bildebene nur unterschieden werden können, wenn sie um mindestens $\Delta d = \lambda / (2n \sin \alpha)$ von einander getrennt sind, da der Lichtfleck am Fokuspunkt nicht kleiner als Δd sein kann. Dabei ist λ die Wellenlänge des Lichts, n der Brechungsindex der Probe und α der halbe Öffnungswinkel des Lichtkegels. Da λ auf 400–700 nm und α auf $< 70^\circ$ begrenzt sind, erschien es unmöglich, gleichartige Objekte unterhalb von 200 nm zu unterscheiden. Bei der klassischen Fluoreszenzmikroskopie gilt dieses Prinzip noch immer. Ein Fluorophor wird angeregt und fällt unter der Emission von Fluoreszenzlicht in den Grundzustand zurück. Weil auch dieses angeregte Licht der Beugung unterliegt, kann der kleinste aufgenommene Punkt $\Delta d = 200$ nm nicht unterschreiten.^[40] Diese Einschränkung kann umgangen werden, indem

das Fluorophor kurzfristig in einen nicht fluoreszierenden Zustand versetzt wird. Dies geschieht mit der Eingrenzung in einen kleineren Bereich des ursprünglichen Spots. Dieser Vorgang muss reversibel sein, damit das Bild nicht verfälscht wird. Dieses Konzept wird RESOLF (engl. *Reversible Saturable Optical Fluorescent Transitions*) genannt.^[41] Einer der ersten Vertreter dieser Technik nennt sich STED-Mikroskopie (engl. **ST**imulated **E**mission **D**epletion). Dabei wird sich zunutze gemacht, dass Licht ein Molekül nicht nur anregen, sondern auch bei gleicher Effizienz wieder abregen kann (vgl. Abbildung).^[42]

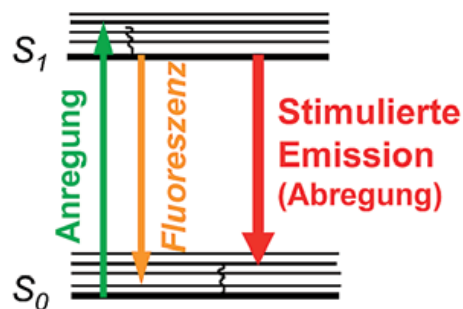


Abbildung 2.26 : Energiediagramm eines Fluorophors und die Möglichkeit der stimulierten Emission.^[43]

Dabei wird ein *Donut*-artiger (ringförmigen) Laser-Fokus verwendet, der über den eigentlichen Spot gelegt wird und in seinem Bereich, die angeregten Fluorophore wieder abregt. Diese Technik benötigt Leistungen um $0,1 \text{ GW/cm}^2$ bei einer Bestrahlungszeit von 1 bis 300 ps.

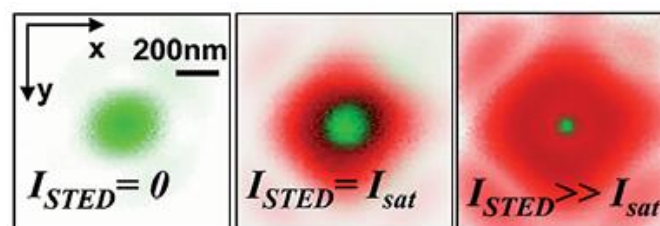


Abbildung 2.27: Wirkungsprinzip eines STED-Mikroskops.^[43]

Wenn nun die gesamte Probe auf diese Weise (mit dem verkleinerten Spot) abgerastert wird, lässt sich die Gesamtauflösung auf bis zu 50 nm verbessern. Dazu wird die ursprüngliche Formel von ABBE wie folgt modifiziert:

22 Allgemeiner Teil

$$\Delta d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I/I_{sat}}}$$

Formel 2.1: Für STED-Mikroskopie modifizierte Formel der Beugungsgrenze, mit I_{sat} für die Sättigungsintensität, bei der die Fluoreszenz eines Moleküls mit einer gewissen (ca. 63%) Wahrscheinlichkeit verhindert wird.^[42]

Durch Erhöhung des Terms I/I_{sat} „verbessert sich die Auflösung bis $\Delta d \rightarrow 0$ “. ^[42] In Abbildung 2.27 ist dies schematisch dargestellt. Hierbei wird der grüne Anregungslaser in die Fokalebene (links) fokussiert. Dann wird ein zeitlich synchronisierter Abregungslaser darüber gelegt, dieser wird mit einer Phasenmaske so ausgerichtet, dass sich eine zentrale Nullstelle bildet (Mitte). Wenn nun die Intensität erhöht wird, verkleinert sich der Bereich in dem angeregt wird (rechts).

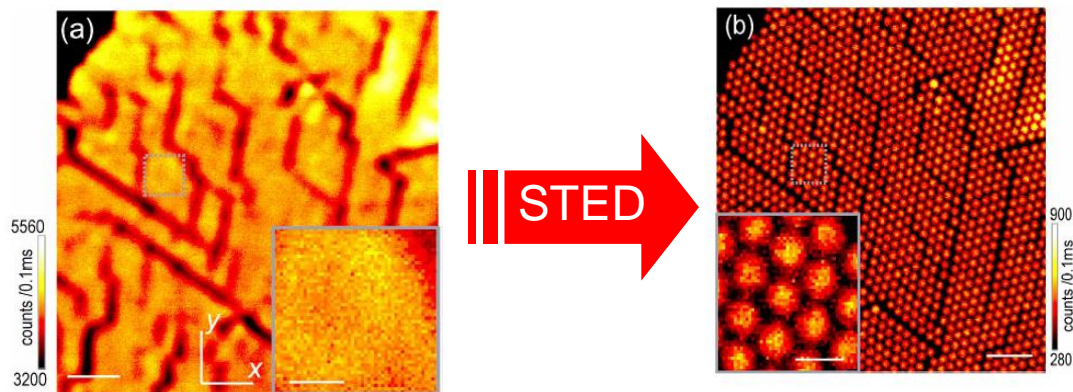


Abbildung 2.28.: Beispiel der Auflösungserhöhung durch STED an einer Zelle die mit fluoreszierenden Proteinen markiert ist.^[44]

In Abbildung 2.28 ist die Verbesserung des Bildes durch die erhöhte Auflösung durch STED gezeigt. Es ist eine Zelle zu sehen, die mit dem fluoreszierenden Protein SNAP 25 markiert wurde. Links ist die konfokale Aufnahme und rechts die durch STED auflösungserhöhte Zelle gezeigt.^[44]

Energien im GW/cm^2 Bereich sind für viele Biomoleküle wie auch die Fluorophore eine zu hohe Intensität, um diese auf längere Zeit zerstörungsfrei aushalten zu können. Aus diesem Grund wurde nach Alternativen gesucht, die auch auf dem RESOLF-Prinzip beruhen. Mit STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*), DSOM (*dynamic saturation optical microscopy*) und PALM (*photoactivated localisation microscopy*) wurden geeignete Möglichkeiten gefunden.^[45] Dabei wird nicht die Desaktivierung des angeregten Singulett ausgenutzt, sondern es werden anderen Löschmethoden wie RET oder

Elektronenübertragung genutzt, um die Emission kurzfristig reversibel zu löschen. Außerdem muss die Probe, nicht wie bei STED, kontinuierlich abgeregt werden, sondern kann gezielt bestrahlt werden und dass auch mit geringerer Laserleistung im Milliwatt-Bereich. Bei thermisch nicht stabilen Photoschaltern kann außerdem einfach durch Ausschalten des Lasers eine Rückschaltung erreicht werden und dadurch eine Probe schnell und effizient gerastert werden.

2.6 Fluoreszierende Siliziumoxid Nanopartikel

Fluorophore, die in der modernen Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt werden, haben Nachteile, welche durch ihre Struktur bedingt sind. Sie sind meistens nicht wasserlöslich, was die Anwendung in biologischen Systemen stark einschränkt. Die Anknüpfung an die zu mikroskopierenden Verbindungen gestaltet sich als schwierig und viele Farbstoffe sind zudem noch toxisch. Aus diesem Grund wurden in den 1990´er Jahren Siliziumdioxid-Nanopartikel mit eingeschlossenen Fluorophoren nach der reversen Mikroemulsionstechnik entwickelt. Welche wurden intensiv von ARRIGADA und OSSEO-ASARE studiert.^[46] Welche dem Fluorophor eine stabile, nicht toxische Matrix bieten, die nach Belieben mit Amino- oder Carboxy-Funktionalitäten modifiziert werden kann.

In der Arbeitsgruppe um TAN wurden Nanopartikel entwickelt, die physikalisch einen Tris(2,2,9-bipyridyl)dichlorruthenium-Komplex eingebunden hatten.^[47] Da dieser nicht kovalent an die Siliziummatrix angebunden war, kam es zu sogenannten Blutungseffekten. Dabei treten Teile des Fluorophors aus dem Partikel aus und führen so zu einer Erhöhung des Backgroundsignals, einer Abnahme der Partikelhelligkeit und einer Aussetzung des Fluorophors mit der Umgebung, was weitere Messungen unmöglich macht.

Ende der 1960´er Jahre wurde von STÖBER eine milde Sol-Gel Synthese für Siliziumdioxid-Nanopartikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 100 nm entwickelt.^[48] Diese Synthese baut auf der Hydrolyse und Kondensation von TEOS (Tetraethoxysilan) in Ethanol/Wasser und Ammoniak auf. Unterschiedliche Reaktionsbedingungen und ihr Einfluss auf das Aussehen und die Größe der Partikel wurden intensiv von ZUKOSKI in den darauffolgenden Jahren untersucht.^[49] Das kovalente Einbinden von Fluorophoren in den Partikel geschieht über die Einkondensierung des Fluorophors über reaktive Organosilikatfunktionen.^[50]

24 Allgemeiner Teil

Die so hergestellten Partikel zeigen keine Blutungseffekte und sind generell als sehr stabil anzusehen. Die Eigenschaften des Fluorophors verändern sich in der Regel nicht, es kann auch eine erhöhte Fluoreszenzquantenausbeute beobachtet werden (vgl. Abbildung 2.29a). Etwas abgeändert davon sind die durch Mizellen in ihrer Größe kontrollierten Nanopartikel in Abbildung 2.29 b. Hierbei wird den Fluorophoren ein Tensid, in diesem Falle Igepal CO-520, zugesetzt und so eine Wasserlöslichkeit erzeugt. Erst dann wird mit der Kondensation zum Nanopartikel begonnen.

Eine andere Variante sind die von MANCIN und PRODI entwickelten PEG (Polyethylenglycol) Siliziumdioxid-Nanopartikel. Hierbei wird die Stöber-Methode modifiziert, indem in Wasser Pluronic F127 vorlegt wird, was zu einer Mizellenbildung führt. In diese Mizellen kann nun das Fluorophor eingeschlossen werden. Erst dann wird die Kondensation zum Nanopartikel gestartet und das Fluorophor wird mitsamt der Mizelle in den Partikel eingeschlossen (vgl. Abbildung 2.29 c), wobei die Silikathülle um den Kern herum aufwächst^[51]

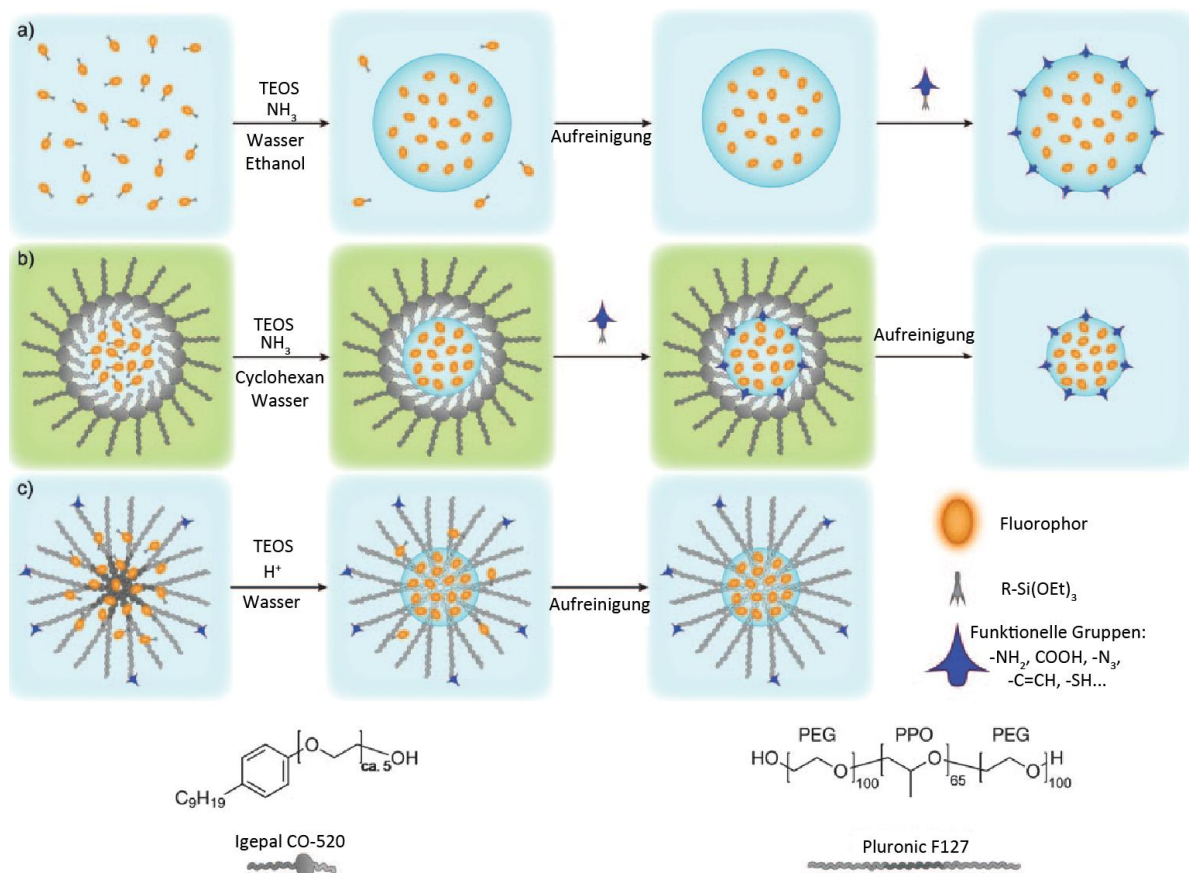


Abbildung 2.29: Die unterschiedlichen Ansätze zur Siliziumdioxid-Nanopartikel-Synthese. a) Die Stöber-Variante mit TEOS, NH_3 in Ethanol/Wasser. b) Beschränkung der maximalen Größe durch die Zugabe von Tensiden zur „Stöber-Lösung“. c) Die von PRODI *et al.* entwickelte Methode, die Tenside in die Partikel einbaut und so eine Art Tensidnetz einführt.

Das Fluorophor ist physikalisch im Partikel und durch die Mizelle, umgeben von der äußeren Mizellenschicht, gefangen.

Diese Art von Partikel haben eine hohe Wasserlöslichkeit, gute Monodispersitäten und Helligkeiten. Die Partikel selbst sind dabei vollständig unabhängig vom Fluorophor. Diese müssen auch nicht gesondert funktionalisiert werden. Der durchschnittliche Durchmesser wurde durch TEM (Transmissionselektronenmikroskopie) bestimmt und liegt bei ca. 10 ± 1 nm.^[52]

Die von WIESNER und WEBB 2008 mit Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), gemessenen Werte der Helligkeiten von Tetramethylrhodamin, einmal innerhalb eines Siliziumdioxidnanopartikels und einmal in Lösung, zeigen, dass die Helligkeit in Partikeln um den Faktor 7.5 bis sogar 27 ansteigt.^[53] Der einzige limitierende Faktor bei fluoreszierenden Nanopartikeln ist der, dass bei zu hohen Fluorophorkonzentrationen der Selbstlöschungseffekt durch Energieübertragung innerhalb der Fluorophore einsetzt.

Neuere Arbeiten von HELL, PRODI, LIU und MATTAY nutzen diesen Effekt, um gezielt die Fluoreszenz mit Hilfe von Energietransferprozessen zu verschiedenen Photoschaltern zu modulieren.^[12, 54, 55, 14] Diese funktionalisierten Siliziumoxid-Nanopartikel werden in der hochauflösenden Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt, sie sind ungiftig, wasserlöslich und können, wie normale Siliziumoxid-Nanopartikel, mit Amino- oder Carboxy-Funktionen modifiziert werden, um eine Bindung an Biomoleküle zu ermöglichen.^[56, 57]

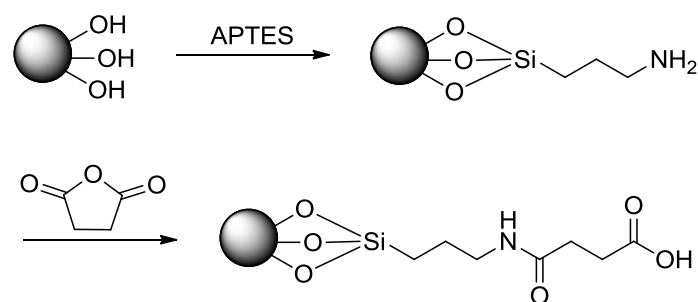


Abbildung 2.30: Die Funktionalisierung von Siliziumdioxid-Nanopartikeln mit APTES und Bernsteinsäureanhydrid zu den Amino- bzw. Carboxy-funktionalisierten Partikeln.

Die Modifizierung mit Aminogruppen geht von den freien Hydroxy-Gruppen des Partikels aus, an diese wird mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) durch eine Einkondensierung die Aminopropylgruppe eingeführt. Darauf aufbauend wird mit Bernsteinsäureanhydrid und

einer Amidkupplung die Carboxyfunktion angebracht. Dieser funktionalisierte Partikel kann nun z.B. in einer Amid-Kupplung mit verschiedenen Biomolekülen eingesetzt werden.^[58]

2.7 Photoschaltbare Interkalation von Phenanthrolin-Derivaten in der DNA

In der medizinischen Chemie hat sich in den letzten Jahren ein Bedarf an Wirkstoffen, die in der Lage sind, DNA zu schädigen, zu entwickelt. Diese Wirt-Gast Beziehung zwischen DNA und Ligand führt dazu, dass die natürlichen Funktionen durch eine Veränderung in der Struktur der DNA verhindert oder unterdrückt werden.^[59, 60] Eine selektive Interkalation von kleinen Molekülen liefert einen therapeutischen Ansatz, bei dem gezielt Tumorzellen an ihrer DNA-Replikation gehindert werden sollen, ohne dass umliegende Zellverbände geschädigt werden. In diesem Zusammenhang sind so genannte „Photonucleasen“^a erwähnenswert, die ihre irreversible Wirkung erst nach Bestrahlung mit sichtbarem oder UV-Licht entfalten.^[61] Ein Beispiel dafür ist das 8-Methoxypsoralen (vgl. Abbildung 2.31) welches zur Behandlung von Schuppenflechte unter lokaler Anwendung der betroffenen Hautstellen verwendet wird. Bei Bestrahlung mit UV-Licht tritt eine [4+2] Cycloaddition bevorzugt an eine Pyrimidinbase der DNA ein. Dies führt dazu, dass die weitere DNA-Synthese unterbunden wird und die Zelle abstirbt.^[62]

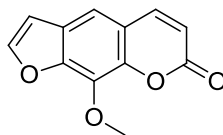


Abbildung 2.31: Das zur Behandlung von Schuppenflechte eingesetzte 8-Methoxypsoralen.

Andere Arten von Interkalatoren wie Porphyrine^[63] oder Cyaninfarbstoffe wie Thiazolorange und Oxazolorange^[64,65] binden nur an DNA-Einzelstränge. Für die Bindung an doppelsträngige DNA wird zwischen der Interkalation parallel zu den Basenpaaren der Doppelhelix und der Bindung in die große oder kleine Furche der DNA unterschieden. Typischerweise sind es polycyclische kationische Aromaten. Dazu zählen Derivate des Acridins wie z.B. Proflavin oder Acridinorange^[66, 67], Aza-Farbstoffe wie Methylblau und

^a Nuclease ist ein falscher, aber häufig benutzter Begriff, da Nucleasen Enzyme bezeichnen, jedoch „Photonucleasen“ die Selektivität und die Katalyseaktivität eines Enzyms nicht aufweisen.

Methylviolett^[68], Phenanthridiniumsalze wie z.B. Ethidiumbromid^[69] oder Thiazolorange.^[61] (vgl. Abbildung 2.32).

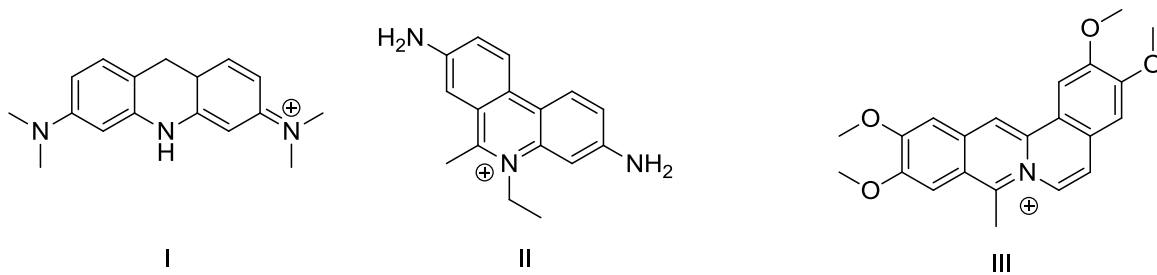


Abbildung 2.32: Typische Interkalatoren Acridinorange (I), Ethidiumbromid (II) und Thiazolorange (III).

Das Modell der Interkalation basiert auf dem Prinzip, dass Wechselwirkungen zwischen dem Liganden und dem Phosphatrückgrad der DNA stattfinden. Von positiv geladenen Molekülen wird vermutet, dass diese Wechselwirkung verstärkt ist.^[66] Bei den meisten Interkalatoren wird die positive Ladung durch Einführung von Aminofunktionen oder Pyridineinheiten, welche nachfolgend protoniert oder quarternisiert werden, erhalten.

Bei doppelsträngiger DNA sind zwei verschiedene Bindungsmotive mit den Gastmolekülen bekannt: Die Interkalation parallel zu den Basenpaaren der Doppelhelix und die Bindung in die große und kleine Furche der DNA. Dabei basiert der Zusammenhalt bei beiden Prozessen auf π - π -Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals Kräften und Dispersionskräften. Bei einer positiven Ladung des Liganden kommen zusätzlich noch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Zuckerphosphatrückgrad dazu.

Die beiden Bindungsmoden eines Gastmoleküls an die DNA verändern die physikalischen Eigenschaften der DNA (oder auch des Liganden) im Vergleich zur unkomplexierten Form. Es ist möglich, aus dieser Änderung der Eigenschaften auf einen potenziellen Bindungsmodus zurückzuschließen. Mögliche Messmethoden, um die Änderungen zu bestimmen, sind hydrodynamische Messungen der Viskosität und des Sedimentationskoeffizienten, sowie die Schmelztemperatur. Genauere Informationen über den Bindungsmodus können durch CD- und LD-Spektroskopie erlangt werden. Durch Absorptions- und Emissionsmessungen lassen sich weitere Daten über die Wechselwirkung des Liganden mit der DNA gewinnen. Eine verlässliche Aussage über den Bindungsmodus kann jedoch nur in der Kombination von mehreren verschiedenen Messungen erhalten werden.^[70]

Neuere Ansätze verlangen nach DNA-Interkalatoren, die in der Lage sind, zwischen einem An- und Aus-Zustand hin und her schalten zu können. Der Aus-Zustand sollte keine oder nur eine kleine Interkalation mit der DNA zeigen und erst beim Schalten in den An-Zustand sollte eine messbare Interkalation auftreten.^[71] Das Schalten zwischen den verschiedenen Zuständen zur Kontrolle der Interkalation kann thermisch oder photochemisch erfolgen.^[72, 73, 74, 75]

Für diese Art der Anwendung sind Photoschalter perfekt geeignet, da sie reversibel zwischen ihren Zuständen geschaltet werden können und so die Interkalation kontrolliert werden kann. Diese Art von interkalierenden Schaltern wurde mit Diarylethenen von FERINGA^[76], Spiropyranen von ANDRÉASSON^[77], Chromenen von IHMELS und FEDOROVA^[78] und Azobenzolen von NAKATANI^[79, 80] gezeigt (vgl. Abbildung 2.33).

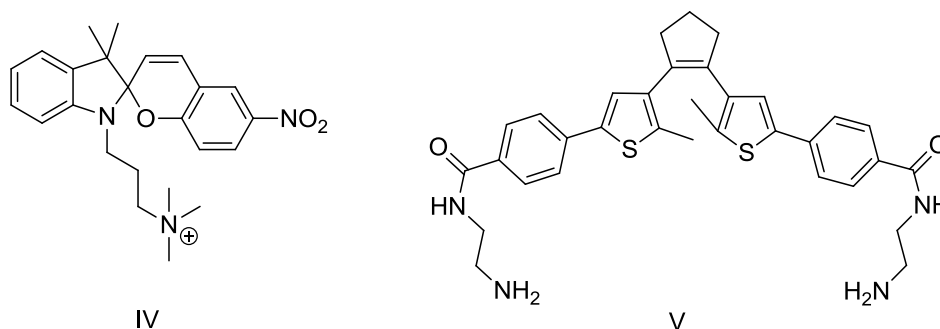


Abbildung 2.33: Beispiele für Photoschalter als Interkalatoren, (IV) das von ANDRÉASSON verwendete Spiropyran und (V) das Diarylethen von FERINGA.^[76, 77]

Beim Spiropyran (IV) konnte durch LD-Spektroskopie gezeigt werden, dass eine reversible Bindung an die DNA möglich ist. Eine Interkalation fand nur statt nachdem das Molekül mit UV-Licht bestrahlt wurde. Die Bindung konnte durch Bestrahlung mit Licht im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums wieder rückgängig gemacht werden.

Für das Diarylethen (V) konnte gezeigt werden, dass beide Formen in die DNA interkalieren, aber keine Unterschiede zwischen den beiden Formen in der Stärke der Wechselwirkung zwischen Ligand und DNA bestehen. Die DNA induziert eine Chiralität im Schalter und der Schalter beeinflusst die Struktur der Doppelhelix. Die chiroptischen Eigenschaften des Komplexes können durch das Schalten zwischen den beiden Zuständen verändert werden.

3. Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollen verschiedene Photoschalter und Photoschalter-Fluorophor-Konjugate auf Basis von photoschaltbaren Spiropyranen hergestellt und untersucht werden. Diese sollen auf Basis von photoschaltbarer Fluoreszenz zur Auflösungserhöhung in optischen Mikroskopen mit RESOLF-Technik eingesetzt werden können.

Die benötigten Schalter sollen so funktionalisiert werden, dass sie an alle gängigen Fluorophore angeknüpft werden können und in der Lage sind, die Emission zu löschen. Dabei sollen die Schalter eine hohe photochemische Stabilität aufweisen und wenn möglich im sichtbaren Bereich des Lichtes schaltbar sein. Es soll dann nach Möglichkeiten für eine effiziente Anknüpfung an Biomoleküle gesucht werden, um diese Art von gemarkerten Molekülen in optischen Mikroskopen einsetzen zu können.

Die Arbeiten sollen in Zusammenarbeit mit den Arbeitskreisen SAUER aus Würzburg sowie PRODI aus Bologna (Italien) und LATTERINI Perugia (Italien) durchgeführt werden.

Als erstes sollen verschiedene Spiropyrane synthetisiert werden und nicht kovalent verknüpft mit verschiedenen Fluorophoren in Einzelmolekülexperimenten untersucht werden. Dann sollen kovalent-verknüpfte Photoschalter-Fluorophor-Systeme synthetisiert und auf ihre Eigenschaften hin untersucht werden.

Mit den daraus gewonnen Erfahrungen sollen nun Siliziumdioxid-Nanopartikel mit Fluorophoren und Schaltern synthetisiert werden. Diese sollen dann auf ihre Fähigkeiten hinsichtlich schaltbarer Emission untersucht werden. Geeignete Systeme sollen danach weiter funktionalisiert werden, um eine Anknüpfung an Biomoleküle wie Biotin, Streptavidin oder IGG zu ermöglichen. Diese sollen in weiterführenden Experimenten in *in vivo* Experimenten eingesetzt werden.

Mit der Arbeitsgruppe IHMELS in Siegen war geplant, photoschaltbare DNA-Interkalatoren zu entwickeln. Damit sollte die Möglichkeit geprüft werden ob die Interkalation an der DNA reversibel zwischen einem An- und Aus-Zustand hin und her geschaltet werden kann. Diese neuartige Klasse von Interkalatoren könnte Anwendung in der modernen gezielten Krebstherapie finden.

4. Ergebnisse

Die im folgenden Abschnitt gezeigten Ergebnisse wurden in Fachzeitschriften veröffentlicht und werden hier noch einmal kurz zusammengefasst. Die Manuskripte sind mit I-IV gekennzeichnet.

4.1 Rhodamin-B-Spiropyrankonjugate (I)

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Spiropyran-Rhodamin-B-Konjugate zur Darstellung photoschaltbare Fluoreszenz verwendet. Es wurde Rhodamin B als Fluorophor und ein Derivat des Spiropyrans als Photoschalter gewählt. Liegt das Spiropyran in der MC-Form vor, besitzt dieses Konjugat eine sehr gute Überlappung zwischen der Emission des Fluorophors und der Absorption des Schalters (vgl. Abbildung 4.1).

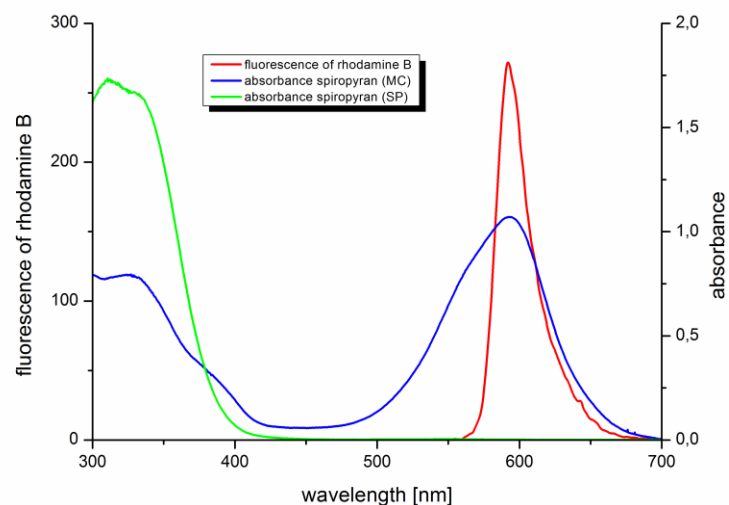


Abbildung 4.1: Überlappung der Rhodamin B Emission (rot) mit der Absorption des Spiropyrans in der SP-Form (grün) und in der MC-Form (blau).

Rhodamin B ist ein günstiges, einfach zu funktionalisierendes Fluorophor mit guten Fluoreszenzquantenausbeuten von nahezu 100%.^[81] Es wurden drei Rhodamin-B-Spiropyran-Konjugate synthetisiert. Dazu wurden am Grundgerüst bei zwei der verwendeten Rhodamine Piperazin-Linker eingeführt. Diese Derivatisierung war nötig, da Rhodamin B im Falle einer Amidkupplung mit dem entsprechenden Spiropyran, bei der ein sekundäres Amin

entsteht, im basischen und neutralen Milieu zu einer Laktam-Bildung neigt. Das entstehende Laktam zeigt keine Emission mehr.^[82] Die Konjugate sind in Abb. 4.2 dargestellt.

Das Ziel war es Linker verschiedener Längen anzubringen und zu testen, welches System die optimalen Ergebnisse liefert.

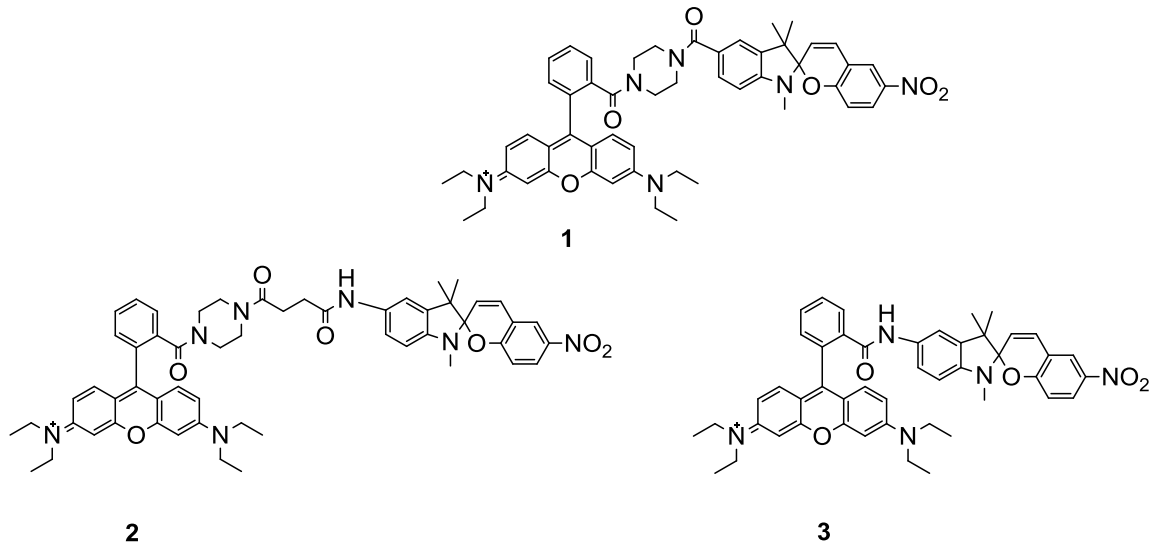


Abbildung 4.2: Die drei synthetisierten Rhodamin-Spiropyran-Konjugate.

Das Konjugat (**1**) wurde aus dem Piperazin-Rhodamin-B (**4**) und dem Carboxy-Spiropyran (**8**) durch eine Amidkupplung erhalten. Für (**2**) wurde das Piperazin Rhodamin B (**4**) mit Bernsteinsäure zum entsprechenden Carbonsäure-Rhodamin B (**5**) umgesetzt. Bei (**3**) wurde auf den Piperazin-Linker verzichtet, um einen möglichst kleinen Abstand zwischen Fluorophor und Photoschalter zu erreichen (vgl. Abbildung 4.3). Alle drei Produkte wurden in Ausbeuten von 25-30% nach säulenchromatographischer Aufreinigung in hoher Reinheit erhalten.

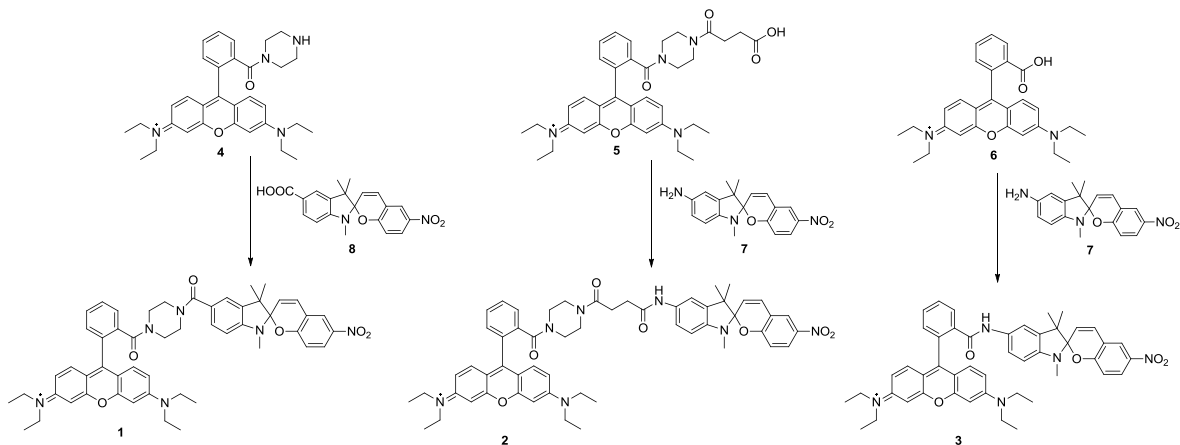


Abbildung 4.3: Syntheschema der drei Konjugate (**1, 2, 3**).

32 Ergebnisse

Die UV-VIS Spektren zeigen alle ein ähnliches Absorptionsmuster, da sich die Absorption von Rhodamin B und dem verwendeten Spiropyran stark überlagern. Aus diesem Grund ist nach Bestrahlung keine große Änderung zu erkennen.

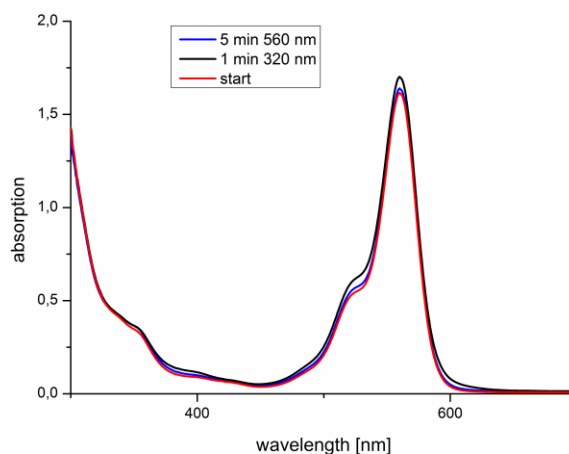


Abbildung 4.4: Absorptionsspektrum von (1) vor der Bestrahlung (rot), nach Bestrahlung mit UV-Licht 320 nm (schwarz) und nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 560 (blau).

Erst die Emissionsspektren zeigen eine reversible Veränderung nach Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 320 nm. Die Rückreaktion erfolgt durch Bestrahlung mit 560 nm und geht deutlich langsamer vonstatten als die des reinen Spiropyrans. Dies liegt an der oben genannten Absorption des Rhodamin B's, welches einen Teil der Energie absorbiert und so die Strahlungsmenge, die am Spiropyran ankommt, vermindert.

Die Abnahme der Fluoreszenzintensitäten ist unterschiedlich ausgeprägt. Die Verbindung (2) zeigt mit 31% die geringste Abnahme, während (3) mit 42% die größte zeigt. Das Konjugat (1) liegt mit einer Abnahme um 33% näher an (2), es kann vermutet werden, dass dieser Unterschied an den überbrückenden Piperazin-Gruppen liegt. Die theoretisch berechnete Fluoreszenzabnahme liegt bei 100%, da das Überlappungsintegral mit $J = 1.956 \cdot 10^{15}$ und der effektive Försterradius von $D_{\text{eff}} = 6.16$ nm im idealen Bereich liegen. Der Unterschied zwischen den berechneten und gemessenen Werten kann durch die unterschiedlich gute Stabilisierung des MC-Zustandes des Spiropyrans erklärt werden.

Im Falle von Verbindung (3) ist dies auf die Nähe zum positiv geladenen Rhodamin zurückzuführen. Dadurch wird die MC Form des Spiropyrans stärker stabilisiert und so das photochemische Gleichgewicht auf die Seite der MC Form verschoben.

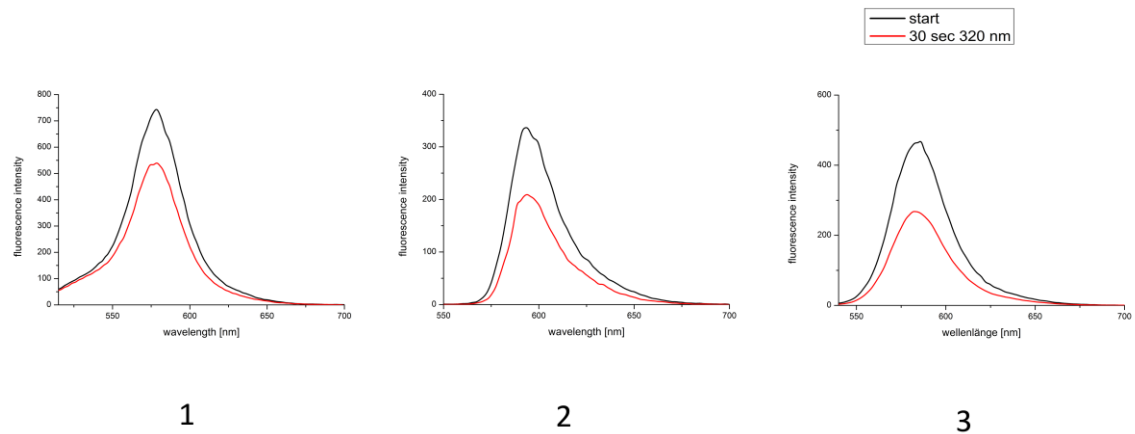


Abbildung 4.5: Die Fluoreszenzspektren der drei Konjugate (**1-3**) vor der Bestrahlung mit UV Licht (350 nm, rot) und nach der Rückschaltung mit sichtbarem Licht (560 nm, schwarz). Die Spektren wurden in Ethanol mit Zugabe von verdünnter Salzsäure bei 593 nm aufgenommen.

Alle drei Konjugate zeigen nach kurzer Zeit Ermüdungserscheinungen. Die Fluoreszenzintensität ist nach sechs Zyklen auf nur noch 15% des Startwertes abgesunken. Alle Verbindungen sind abhängig von der Stabilität ihrer Merocyaninform in der Lage, über einen Energietransfer die Fluoreszenz zu löschen. Die Wasserlöslichkeit und photochemische Stabilitäten sind etwas geringer als erwartet.

Vgl. Florian May, Jochen Mattay, eingereicht.

4.2 Diarylethene für photoschaltbare Fluoreszenz in core-shell Nanopartikeln (II)

Da die im vorhergehenden Kapitel vorgestellten Konjugate eine geringe Photostabilität aufweisen und ihre Löslichkeit im wässrigen Medium minimal ist, wurde eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe PRODI in Bologna, Italien angestrebt.

Um eine Erhöhung der Photostabilität der Schalter und der Fluorophore sowie eine Wasserlöslichkeit zu erzeugen, wurde ein Ansatz gewählt, der sich die Eigenschaften von Siliziumdioxid Nanopartikeln zunutze macht. Hierbei wurden die bereitgestellten Core-Shell-Nanopartikel, welche mit dem Rhodamin B Derivat (**9**) funktionalisiert wurden, durch Einbindung eines Diarylethens (**10**) in einer Lipidmembran von PRODI hergestellt.

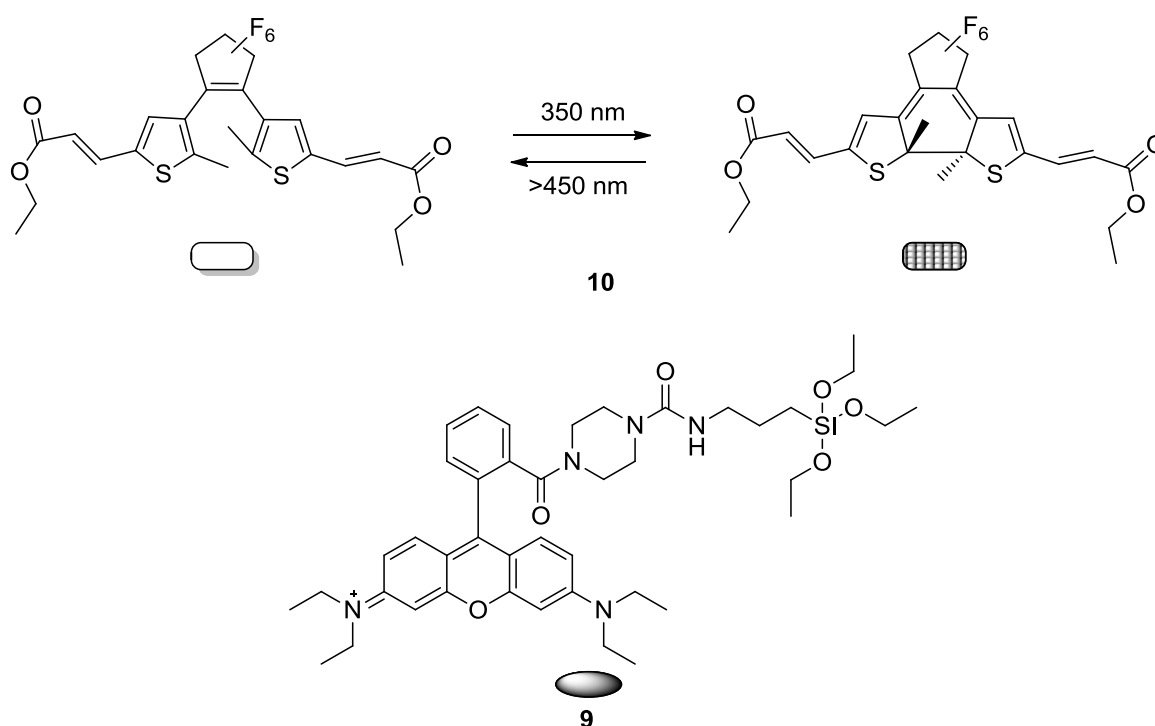


Abbildung 4.6: Das verwendete Diarylethen (**10**) in seiner offenen und in der farbigen, geschlossenen Form und das verwendete Rhodamin B Derivat (**9**).

Diarylethen (**10**) wurde durch eine Wittig Reaktion aus dem Dialdehydschalter hergestellt und zeigt das typische photochrome Verhalten von Schaltern mit verlängertem π -System (vgl. Abbildung 4.7).^[27] Es kann mit UV-Licht (350 nm) in seine farbige Form überführt werden und durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht (>450 nm) zurückgeschaltet werden. Dieser Schalter sollte nun in der Lipidmembran eines core-shell Nanopartikels, der im Kern

mit Rhodamin B kovalent dotiert worden war, modifiziert werden. Rhodamin B (**9**) emittiert bei 590 nm nach Anregung mit 488 nm.

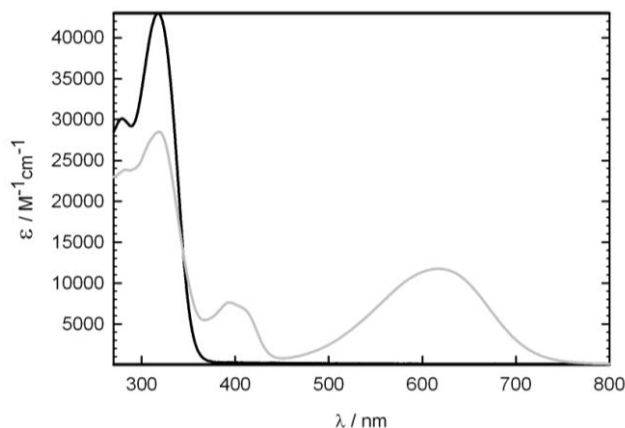


Abbildung 4.7: Absorptionsspektrum des Diarylethens (**10**) in Acetonitril vor der Bestrahlung (schwarze Linie) und nach Bestrahlung mit UV Licht der Wellenlänge 350 nm (graue Linie).

Die Partikel sind nach einer modifizierten Stöber Kondensation hergestellt worden (vgl. Abb. 4.8).^[51]

Der Photoschalter wurde in einer Acetonitril-Lösung zu den Partikeln gegeben und schnell von der Lipidhülle absorbiert. Diese Absorption wurde durch Ultrafiltrationsexperimente nachgewiesen. Die Partikel weisen eine Größe von 10 nm ohne und 25 nm mit Lipidhülle und sind zudem in Wasser löslich (vgl. Abb. 4.8).

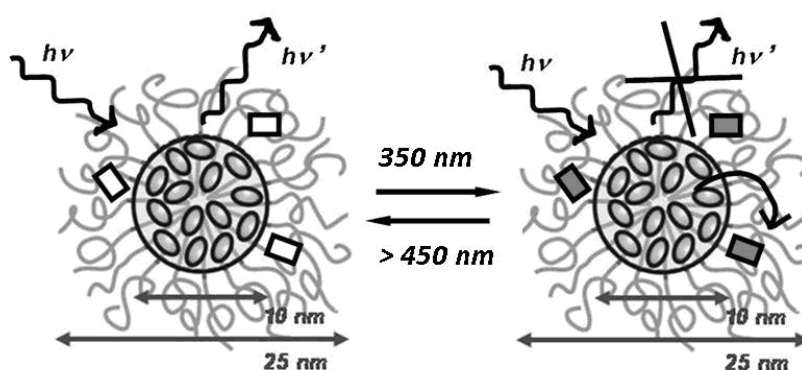


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung eines core-shell Partikels und des Energietransferprozesses.

Die Photochemie des Schalters wird nur leicht durch die veränderte Umgebung beeinflusst, die Effektivität und Photostabilität sind nur unwesentlich schlechter als in Lösung.

Bei Bestrahlung des Systems mit UV-Licht (330 nm, 1 min) wird der Schalter in seine geschlossene Form überführt und eine Absorptionsbande bei 630 nm detektiert. Die Form

der Emissionsbande bleibt erhalten, jedoch ändert sich die Intensität im Vergleich zur unbestrahlten Form. Diese wird um ca. 95% reduziert. Nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht ($\lambda > 450$ nm), kann die Intensität der Emission wieder auf ihren Startwert zurückgeschaltet werden. Dieser Zyklus kann vielfach ohne gravierende Ermüdungserscheinungen wiederholt werden (> 20 Zyklen). (vgl. Abb. 4.9 und 4.10).

Trotz des geringen Absorptionskoeffizienten ist der Energietransferprozess extrem effizient. Dies lässt auf eine hohe elektronische Kommunikation zwischen dem Rhodamin B und dem Schalter schließen.

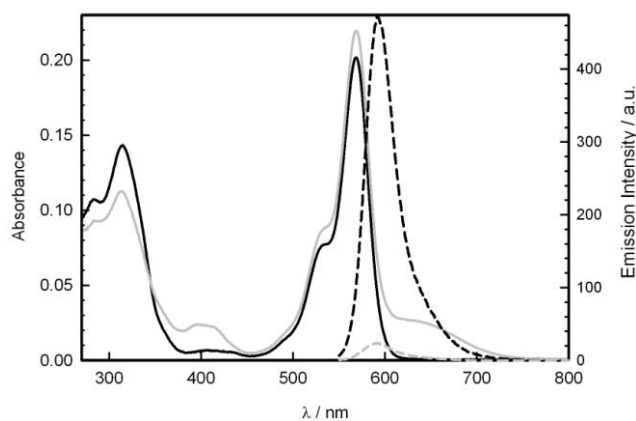


Abbildung 4.9: Die Absorptions- und Emissionsspektren des Partikels mit Schalter (10) vor (dunkle Linien, durchgehend und gestrichelt), sowie nach Bestrahlung (graue Linien, durchgehend und gestrichelt, 320 nm).

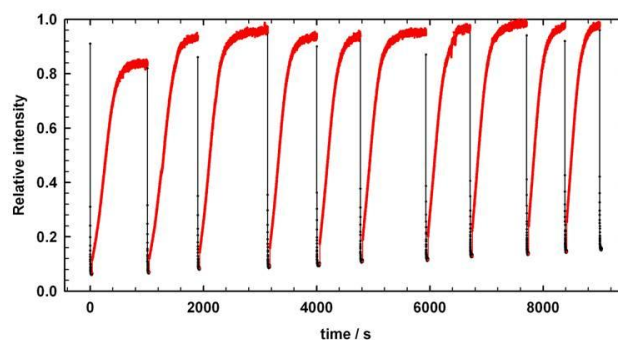


Abbildung 4.10: Fluoreszenz-Emissions Schaltungszyklen ($\lambda_{\text{Emission}} > 590$ nm) bei Bestrahlung mit 320 nm (schwarze Linien) und 580 nm (rote Linien).

Von den funktionalisierten Partikeln wurden auch Weitfeldaufnahmen gemacht. Es wurden dafür ein Anregungslaser bei 488 nm und eine CCD Kamera verwendet, die kontinuierlich Bilder der Nanopartikel aufnahm. Die Nanopartikel selbst wurden in einer wässrigen

Suspension auf einen Glasobjektträger aufgetragen. Bei Einstrahlung mit einer UV-Lampe (320 nm) konnte eine vollständige *Emission-Depletion* beobachtet werden. Sobald die UV-Lichtquelle ausgeschaltet wurde, reichte die Energie des Anregungslasers aus, um den Schalter wieder in seine offene Form zurückzuführen und es konnte erneut eine Emission beobachtet werden (vgl. Abb. 4.11).

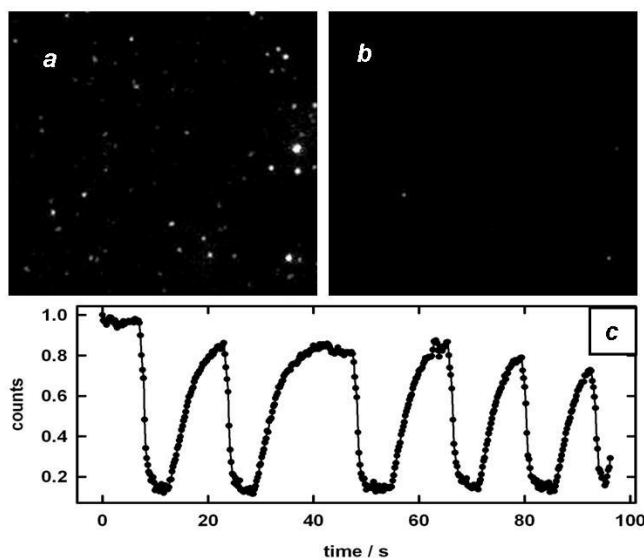


Abbildung 4.11: Weitfeldaufnahme der Nanopartikel/Photoschalter Suspension auf einem Glasobjektträger. (a) vor und (b) nach der Bestrahlung mit UV-Licht. c) zeigt die normalisierte Fluoreszenzintensität aller Partikel im Sichtfeld bei an- und ausgeschaltetem UV-Licht bei dauerhafter Anregung mit 488 nm.

Im dargelegten Manuskript konnte so gezeigt werden, dass Siliziumdioxidnanopartikel mit eingebetteten Rhodamin B und einer Lipidhülle in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis PRODI synthetisiert wurden. In die Lipidhülle wurde erfolgreich ein Photoschalter eingebunden. Die Bestrahlung mit UV-Licht führte zu einer Löschung der Fluoreszenz. Diese konnte durch Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich wieder auf ihren Ursprungswert zurückgeführt werden. Durch Fluoreszenzspektroskopie in Lösung und im Weitfeld-Mikroskop auf einem Objektträger im Einzelmolekül wurde dies gezeigt.

Vgl. D. Genovese, M. Montalti, L. Prodi, E. Rampazzo, N. Zaccheroni, O. Tosic, K. Altenhöner, F. May and J. Mattay, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 10975-10977.

4.3 Photoschaltbare fluoreszierende Siliziumdioxidnanopartikel (III)

Die in 4.2 vorgestellten Nanopartikel weisen den Nachteil auf, dass sie durch ihre Lipidhülle nicht weiter modifiziert werden können. Aus diesem Grund wurde eine weitere Klasse von Nanopartikeln synthetisiert, die im Folgenden vorgestellt werden soll. Diese Arbeit wurde in Kooperation mit Dr. Michael Peter und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. HÜTTEN in Bielefeld durchgeführt.

Auch diese Art von Partikel wurde nach der Stöber-Methode^[48] hergestellt, es wurden ebenfalls Rhodamin B als Fluorophor verwendet und Nitro-Spiropyran als Photoschalter. Nitrospiropyran (**6**) wurde dabei, wie auch Rhodamin B, mit einer Silylethergruppe funktionalisiert, um in beiden Fällen eine kovalente Bindung im Nanopartikel zu erhalten (vgl. Abb. 4.12).

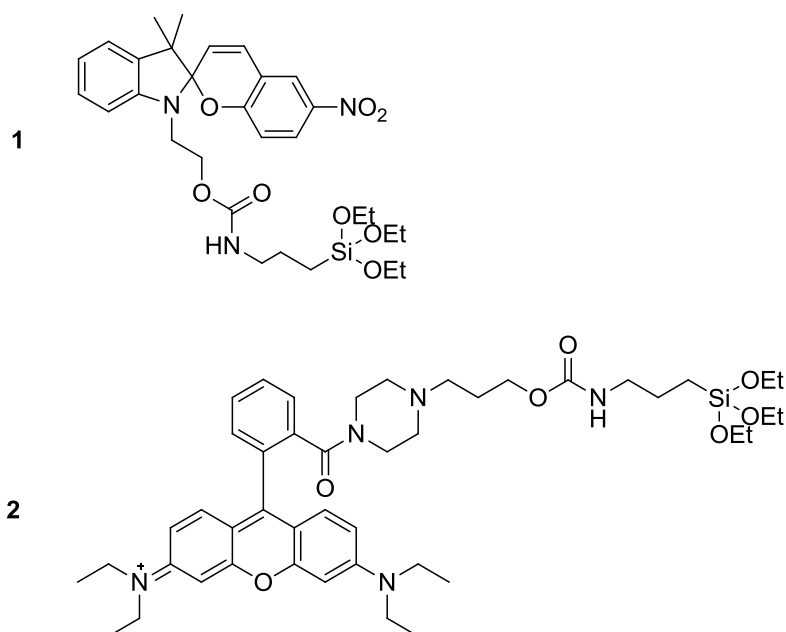


Abbildung 4.12: Das für die Nanopartikelsynthese verwendete Spiropyran (**1**) und das Rhodamin B (**2**).

Das für die Darstellung des Nitro-Spiropyrans (**1**) benötigte Hydroxy-Spiropyran (**6**) wurde, ausgehend von einem Hydroxyindolin (**4**) und Nitrosalicylaldehyd (**5**) in einer Ausbeute von 82 % hergestellt. Mit dem Silylether (**7**) ließ sich das Endprodukt (**1**) in einer guten Ausbeute von 69 % aus Ethanol kristallisieren (vgl. Abb. 4.13).

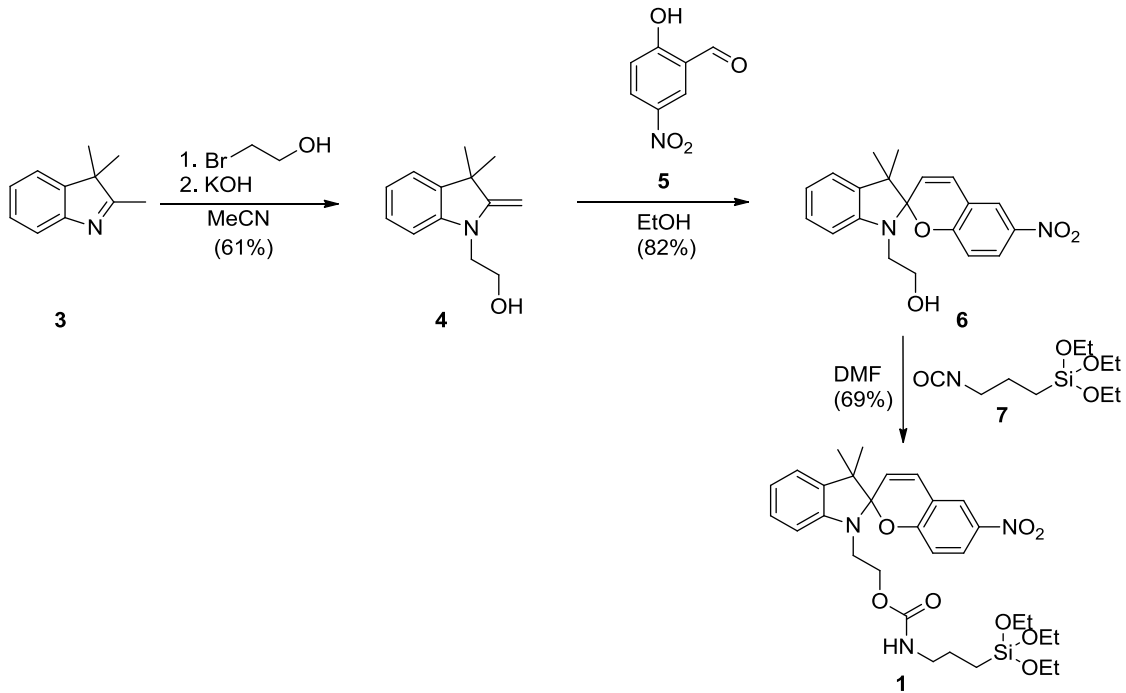


Abbildung 4.13: Syntheschema für die Herstellung des Spiropyrans (**1**).

Das Rhodamin B Derivat (**2**) konnte aus dem literaturbekannten Rhodamin B - Piperazin (**9**) dargestellt werden. Dazu wurde (**9**) mit 3-Brompropanol zum entsprechenden Alkohol (**10**) umgesetzt und dieser mit (**7**) in DMF zum silylierten Rhodamin B - Derivat (**2**). Das Piperazin geschützte Rhodamin B wurde gewählt, da somit eine Reaktion zum entsprechenden Lactam ausgeschlossen werden konnte und wurde aus dem kommerziell erhältlichen Rhodamin B (**8**) in einer Reaktion mit Piperazin erhalten.^[82]

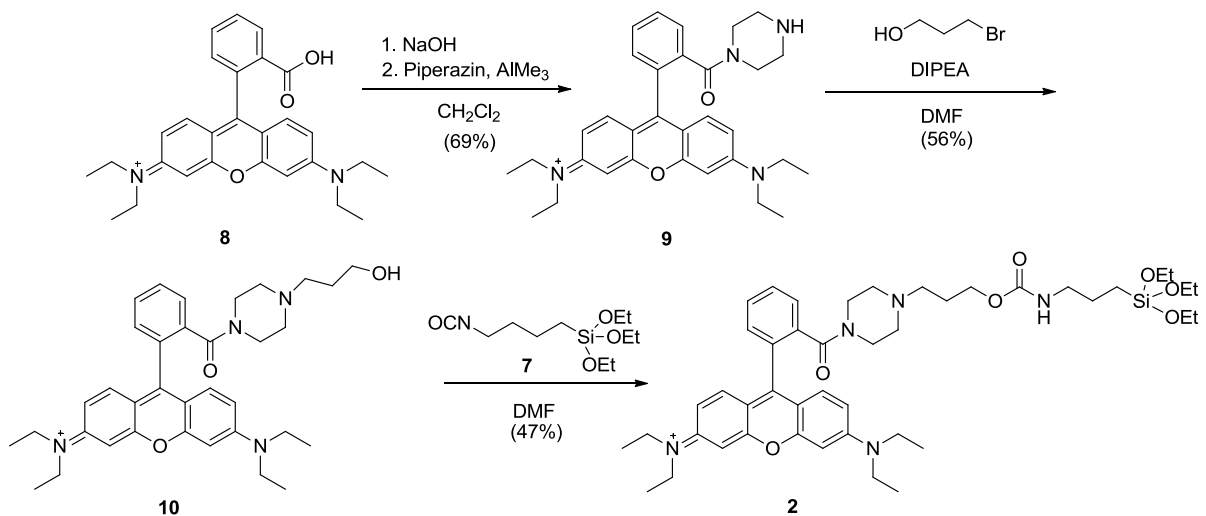


Abbildung 4.14: Syntheschema für die Herstellung des Rhodamin B (**2**).

40 Ergebnisse

Beide Verbindungen wurden nach der Aufreinigung direkt bei der Nanopartikelsynthese zusammen gegeben. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen untersucht. Zu hohe Konzentrationen an Photoschalter und Fluorophor führen zu kleinen, manchmal auch deformierten Partikeln, wobei zu kleine Konzentrationen keinen oder nur einen geringen Effekt beim Schaltverhalten zeigen. Die Größe der Partikel lässt sich auch durch eine Veränderung der Reaktionslösung beeinflussen (vgl. Tabelle 4.1). Dabei zeigten die für NP-10 gewählten Bedingungen die besten Ergebnisse.

Tabelle 4.1: Reaktionsbedingungen bei der Nanopartikelsynthese und deren spezifische Eigenschaften.

Probenname	(1) [mmol]	(2) [mmol]	Parameter ^a	Durchmesser ^b [nm]	Abnahme der Emissions Intensität (%) ^c
NP-1	0.09	0.003	A	112	61
NP-2	0.45	0.0015	A	104	58
NP-3	0.09	0.0003	A	141	63
NP-4	0.18	0.006	A	102	67
NP-5	0.09	0.003	B	113	64
NP-6	0.45	0.015	B	106	67
NP-7	0.09	0.0003	B	125	65
NP-8	0.18	0.006	B	70	68
NP-9	0.09	0.00003	A	100	76
NP-10	0.18	0.00006	A	98	89
NP-11	0.09	-	A	108	-
NP-12	-	0.00009	A	150	-
NP-13	-	-	A	170	-

a Es wurden zwei verschiedene Molverhältnisse von TEOS:NH₃:EtOH:H₂O benutzt. A: TEOS 2 ml: Ammoniak-Lösung 2 ml: bidest-Wasser 6 ml: EtOH 100 ml.

B: TEOS 4 ml: Ammoniak-Lösung 4 ml: bidest-Wasser 12 ml: EtOH 200 ml.

b Durchschnittlicher Durchmesser, durch TEM-Messungen.

c Alle Emissionsintensitäten wurden normalisiert. Das Emissionsmaximum beträgt 593 nm. Die Abnahme wird in Prozent angegeben.

Es konnte in allen hergestellten Nanopartikel-Fractionen scharfe Größenverteilungen durch TEM (TransmissionsElektronenSpektroskopie) nachgewiesen werden.

Die Fluoreszenz ist in allen Proben reversibel schaltbar, auch die Emissions-Intensität sinkt erst nach ca. 21 Zyklen langsam ab. Dies ist auf die Instabilität des Rhodamin B zurückzuführen, welches bei längeren Bestrahlungszeiten zerfällt (vgl. Abb. 4.15).

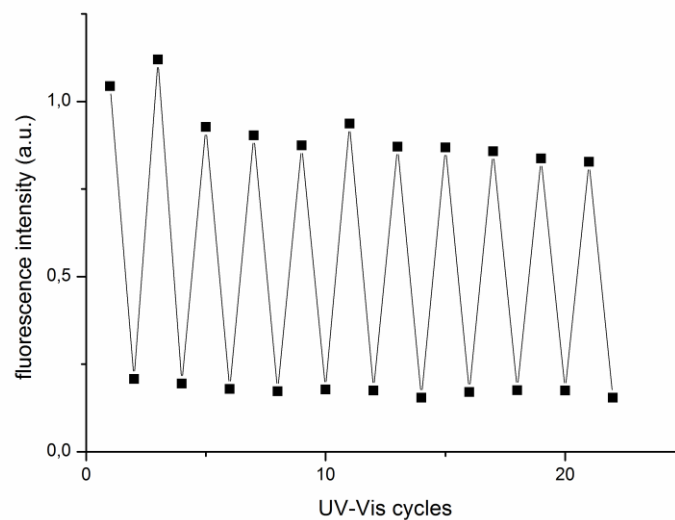


Abbildung 4.15: Schaltungszyklus der Fluoreszenzintensität ($\lambda_{ex}=520$ nm) von NP-10 (3×10^{-4} M) nach Bestrahlung mit UV Licht (350 nm, 30 Sek.) und sichtbarem Licht (590 nm, 60 Sek.), aufgenommen bei einer Wellenlänge von 593 nm.

Der berechnete Förster-Radius des Spiropyran-Rhodamin B Systems liegt bei $D_{eff} = 6.16$ nm. Aus diesen Daten wurde die experimentelle Energietransfer-Effizienz von $E=89.5\%$ bei einem durchschnittlichen Spiropyran-Rhodamin B Abstand von 2.93 nm berechnet.

Die aus den theoretischen Daten ermittelte FRET-Effizienz von 100%, welche aus den Überlappungsintegralen bestimmt wurde, konnte durch das Erreichen eines photostationären Zustandes nicht erzielt werden.

Die Abnahme der Fluoreszenzemissionsintensität um 89.5% zeigt jedoch, dass trotz des photostationären Zustandes eine fast komplette Fluoreszenzlöschung erreicht werden kann. Die hergestellten Partikel verlieren auch nach Wochen bei entsprechender Lagerung im Dunkeln keine ihre Eigenschaften und können damit direkt weiter verwendet werden.

Die Partikel lassen sich nachträglich mit Amino- bzw. Carboxyl-Gruppen funktionalisieren und für die Anbindung an Biomolekülen, wie Biotin oder Streptavidin nutzen.

Vgl. F. May, M. Peter, A. Hütten, L. Prodi and J. Mattay, *Chem. Eur. J.*, **2012** *18*, 814-821.

4.4 Photoschalter für die DNA Interkalation (IV)

In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis IHMELS aus Siegen wurde ein neuer Photoschalter entwickelt, welcher in der Lage ist, reversibel DNA zu interkalieren. Als Grundgerüst wurde ein Spirooxazin gewählt, das durch den planaren Phenanthrolinrest eine grundlegende Interkalationseigenschaft vorweisen sollte. Die Phenanthrolin-Einheit wurde zusätzlich an einem Stickstoff methyliert, damit so ein quarternisiertes Stickstoffatom erhalten werden kann, das durch seine positive Ladung eine Möglichkeit der DNA-Bindung am Phosphatrückgrad der Doppelhelix erleichtert. (vgl. Abbildung 4.16)

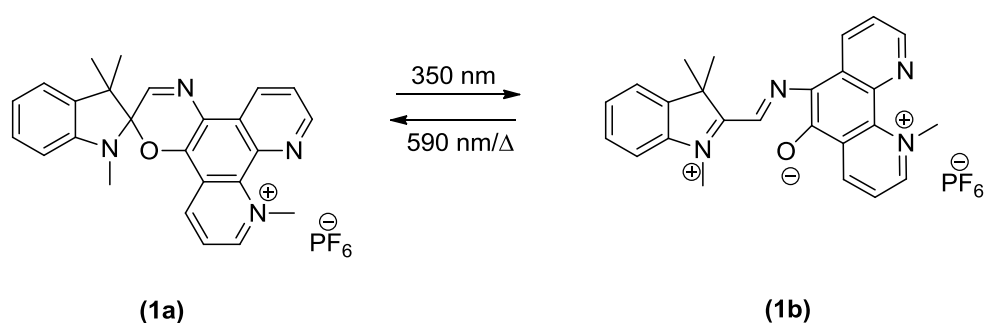


Abbildung 4.16: Schaltprozess des Spirooxazins (**1a**) bei Bestrahlung mit UV-Licht (350nm) und die Rückreaktion durch sichtbares Licht (590nm) oder thermisch im Dunkeln.

Dazu wurde Phenanthrolin mit Kaliumbromid in $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ zum entsprechenden Dion (**3**) umgesetzt. Verbindung (**4**) wurde aus (**3**) durch Rühren unter Rückfluss mit Hydroxylaminhydrochlorid in Ethanol erhalten. Die Kondensation zum Spirooxazin erfolgte in Ethanol mit (**5**) und einem Äquivalent Fischer-Base. Spirooxazin (**6**) wurde, nach Filtrieren über Kieselgel, als blauer amorpher Feststoff erhalten. Die Methylierung wurde in Methyljodid als Lösungsmittel durchgeführt und (**7**) in quantitativer Ausbeute erhalten. Die Umsalzung erfolgte über eine Kieselgelsäule mit Aceton und Ammoniumhexafluorophosphat. Das erhaltene Produkt (**1**) ist ein blauer, feinkristalliner Feststoff und konnte in einer Ausbeute von 31% erhalten werden (vgl. Abbildung 4.17).

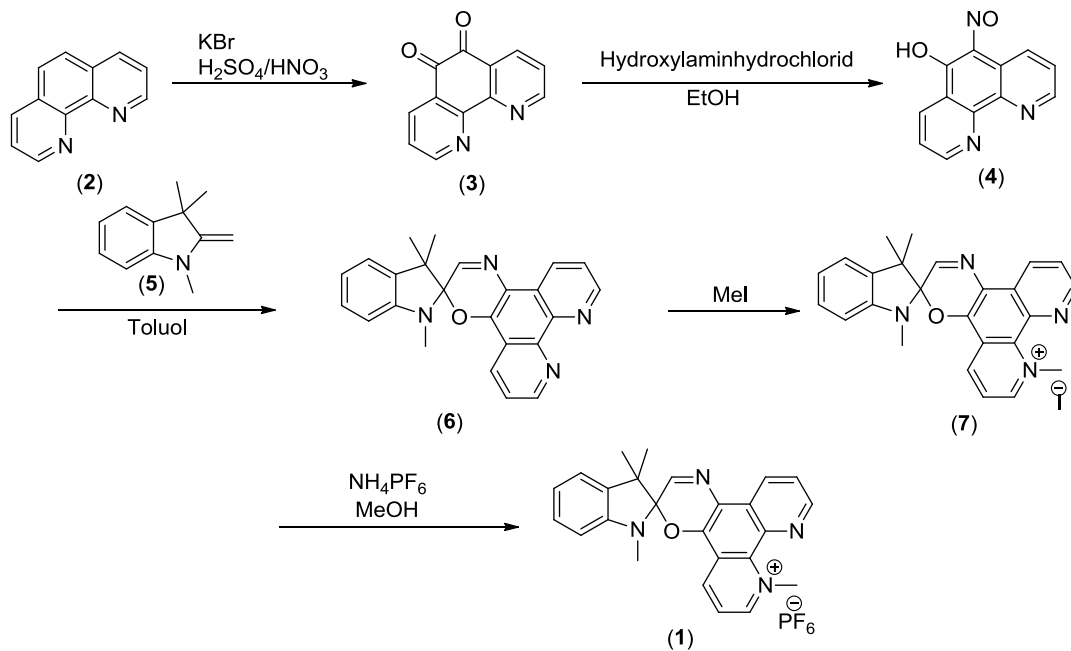


Abbildung 4.17: Syntheschema des Spirooxazins (3).

Die durchgeführten photometrischen Titrations von (1) zu einer Lösung von ct-DNA^b zeigten durch eine Veränderung der Absorptionsbanden, dass eine Interkalation des Photoschalters in die DNA stattfindet (vgl. Abbildung 4.18). Der Schalter selbst bleibt während der gesamten UV-Titration stabil und behält seine Merocyaninform bei.

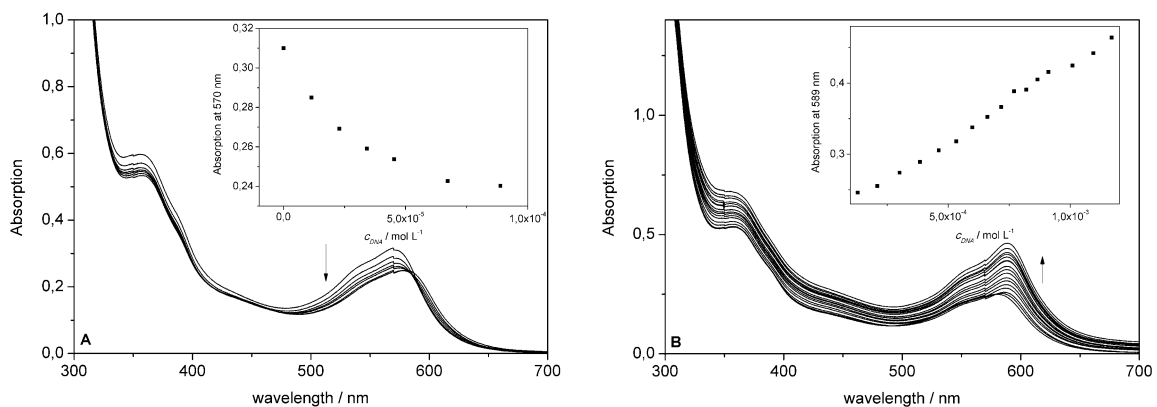


Abbildung 4.18: UV-Titration von ct-DNA ($c = 0$ -1170 μM) zu einer Lösung von 1b ($c = 100 \mu\text{M}$) in BPE Puffer.

A: Absorptionsspektrum bei einem Ligand: DNA Verhältnis von $>1:10$. B: Absorptionsspektrum bei einem Ligand: DNA Verhältnis von <0.08 ; die eingefügten Plots zeigen die Auftragung der Absorption gegen die Konzentration der DNA.

^b ct-DNA ist die DNA aus dem Thymus von Kälbern, in hoher Ausbeute gewonnen werden kann.

44 Ergebnisse

Die achirale Komponente (die Merocyaninform des Spirooxazins) zeigt im CD-Spektrum ein ICD Signal. Dieses kann durch die Bestrahlung mit sichtbarem Licht (590 nm) und Licht im UV-Bereich (350 nm) reversibel geschaltet werden (vgl. Abbildung 4.19). Eine Veränderung der CD-Bande der DNA liegt nicht vor und zeigt somit ebenfalls, dass eine photoschaltbare Interkalation vorliegt.

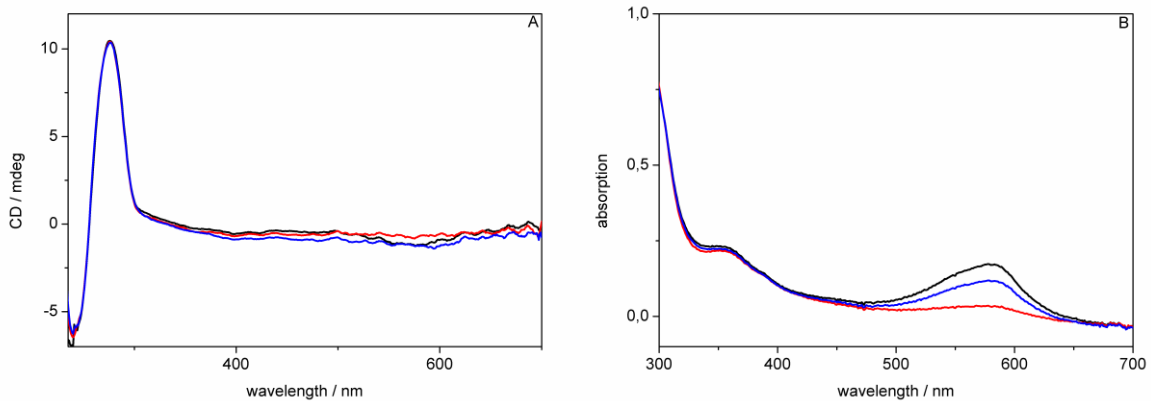


Abbildung 4.19: A: CD-Spektrum von ct DNA und Ligand (**1**) mit dem zugehörigen UV-Spektrum B (schwarz: Start, rot: nach Bestrahlung mit VIS-Licht 590 nm, blau: nach Bestrahlung mit UV-Licht 350 nm).

Um den Bindungsmodus des Liganden in die DNA (**1**) zu bestimmen, wurden nachfolgend Verdrängungsexperimente mit Thiazolorange (TO) durchgeführt. Da die Fluoreszenz von TO nur bei einer Interkalation in die DNA zu sehen ist, kann die Verdrängung durch einen anderen Interkalator an derselben Position der DNA in den Fluoreszenzspektren verfolgt werden. Die Abnahme um 44% der Ursprungsfloreszenzintensität von TO zeigt eindeutig, dass bei Zugabe des Liganden (**1**) in der Merocyaninform eine Verdrängung von TO stattfindet (vgl. Abbildung 4.20).

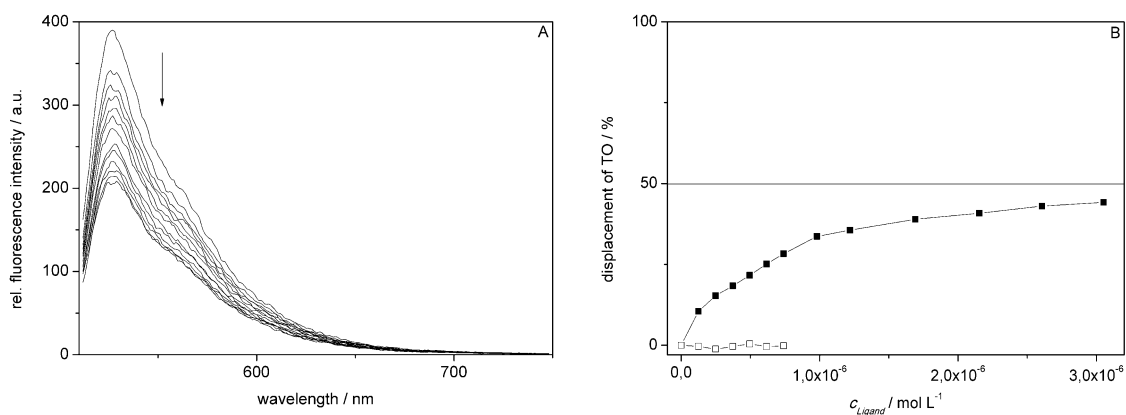


Abbildung 4.20: A: Fluoreszenzspektroskopische Messung der Abnahme der TO Emission in duplex DNA bei Zugabe des Liganden (**1b**). B: Auftragung der relativen Verdrängung von TO versus die Konzentration des Liganden (**1a**) (□) und (**1b**) (■).

Viskosimetrische Titrations des Liganden (**1b**) zu ct DNA zeigten einen Anstieg der DNA Viskosität, mit ansteigendem Ligand-DNA Verhältnis. Die Quadratwurzel der relativen Viskosität der Lösung wurde gegen das Ligand-DNA Verhältnis aufgetragen und die Steigung als Indikator für die wachsende Versteifung der interkalierten DNA genutzt. Die gemessene Steigung liegt bei 0.319, was signifikant niedriger als die der Vergleichsmessung mit Ethidiumbromid (0.621) ist (vgl. Abbildung 4.21). Die dadurch erhaltene Abschätzung der Bindungsstärke des Schalters an die DNA zeigt, dass dieser zwar eine geringere Stärke als Ethidiumbromid hat, jedoch dieser Unterschied vernachlässigbar ist in Hinblick auf die zugrundeliegende Photoschalterstruktur.

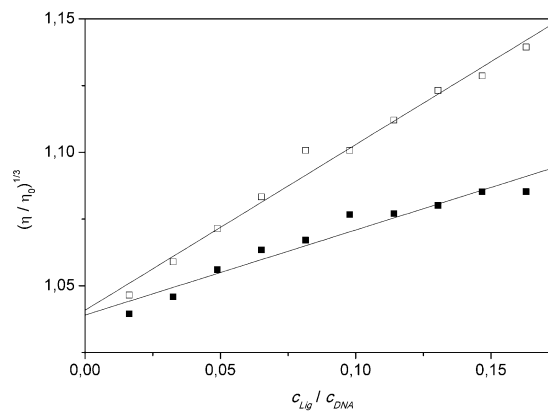


Abbildung 4.21: Die relative Viskosität einer wässrigen Lösung von ct DNA in Anwesenheit von Ethidiumbromid (□) und dem Ligand **1** (■), dargestellt als relative Viskosität $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ gegen das Ligand-DNA Verhältnis.

Durch diese Experimente konnte eine Interkalation, welche nur in einer der ineinander überführbaren Formen des Photoschalters wirksam ist, nachgewiesen werden.

Auf den Bindungsmodus konnte durch die Verdrängung von TO geschlossen werden, abschließend kann darüber jedoch keine endgültige Aussage gemacht werden.

Vgl. F. May, L. Thomas, H. Ihmels, J. Mattay (eingereicht).

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Photoschalter und Fluorophore auf unterschiedlichen Wegen mit einander verknüpft, mit dem Ziel neue Verbindungen für die photoschaltbare Fluoreszenz zu erhalten. Dies geschah zuerst kovalent im Falle der Rhodamin-Spiropyran-Konjugate. Die dabei erzielten Ergebnisse ließen in Hinsicht auf Stabilität und Modulationseigenschaften noch Fragen offen, zeigten aber, dass es ein Schritt in die richtige Richtung war.^[83]

Die nicht kovalent verknüpften Diarylethen-Rhodamin-Siliziumnanopartikel aus der Zusammenarbeit mit PRODI et. al. zeigten dahingehend weitaus bessere Ergebnisse. Hier konnte die Stabilität und das Schaltverhalten deutlich verbessert werden, da variable Mengen an Schalter in die mit einer Lipidhülle umgebenen Partikel eingeführt werden konnten. Das im Kern kovalent fixierte Rhodamin konnte dadurch gezielt in seiner Fluoreszenz beeinflusst werden.^[54] Eine Anbindung an Biomoleküle war jedoch auch hier nicht möglich.

Dieser Schritt wurde erst durch die kovalent in den Siliziumnanopartikel eingebundenen Spiropyrane und Rhodamine in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe HÜTTEN möglich. Hier ist eine nachträgliche Funktionalisierung der fertigen Partikel mit Carboxyl- oder Amino-Funktionen durchführbar, welche eine Anbindung an Biomoleküle wie Streptavidin oder Biotin ermöglichen. Dies geschieht unabhängig von den Schaltern und Fluorophoren und beeinflusst deren Schaltverhalten nicht.^[14]

Auch die photoschaltbare Interkalation von DNA konnte in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis IHMELS erreicht werden. Hier wurde erfolgreich ein Spirooxazin mit einem methylierten Phenanthrolin modifiziert, dass eine Interkalation möglich war. Die Interkalationseigenschaften des Spirooxazins konnten durch Bestrahlung mit Licht im UV- bzw. Vis-Bereich zwischen einer interkalierenden und nicht interkalierenden Form moduliert werden.^[84]

6. Summary

In this work different photoswitches and fluorophores were combined to reach the aim of photoswitchable fluorescence. The covalently linked rhodamine-spiropyrane conjugates were the first examples in this work. Unfortunately, these compounds lacked in their stability and modulation abilities. Nevertheless, they were the first step in the right direction.^[83]

The non-covalent dithienylethene-rhodamine silicananoparticles, in cooperation with PRODI et. al., exhibited better results. The stability and switching properties were greatly improved and the switch-fluorophor ratio could easily be changed because of the nanoparticle lipid shell. The covalently to the core incorporated rhodamine with its fluorescence could be targeted directly.^[54] Binding to biomolecules wasn't possible either.

Together with the workgroup HÜTTEN we were able to bind rhodamines and spiropyrans covalently into silica nanoparticles. These particles could be modified with carboxy- or amino-groups for biotin or streptavidine binding afterwards. This could be done without interfering with the switches or fluorophores and therefore their properties weren't influenced.^[14]

The topic of photoswitchable intercalation was successfully addressed by the synthesis of a spirooxazine with a modified phenanthroline moiety in cooperation with the IHMELS group in Siegen. The intercalating properties of this switch are interesting because of its ability to intercalate only in the open quinone form and not in the closed spiro form. This was shown by CD-switching-spectra and fluorescence displacement measurements.^[84]

7. Literatur

- [1] Y. Hirshberg, *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **1950**, 903–904.
- [2] H. Dürr, *Angewandte Chemie* **2004**, *116*, 3404–3418.
- [3] H. Dürr, H. Bouas-Laurent, *Photochromism. Molecules and systems*, Elsevier Science Pub. Co., Amsterdam, New York, U.S.A, **1990**.
- [4] B. Feringa, *Molecular switches*, Wiley-VCH, Weinheim, Cambridge, **2000**.
- [5] J. Fritzsche, *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **1867**, 1035–1038.
- [6] E. ter Meer, *Justus Liebigs Ann. Chem* **1876**, *181*, 1–22.
- [7] T. L. Phipson, *Chem. News* **1881**, 283.
- [8] W. Markwald, *Z. Phys. Chem.* **1899**, 140–142.
- [9] H. G. Heller, J. R. Langan, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1981**.
- [10] G. Gliemeroth, K.-H. Mader, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* **1970**, *9*, 434–445.
- [11] D. A. Parthenopoulos, P. M. Rentzepis, *Science* **1989**, 843–846.
- [12] J. Fölling, S. Polyakova, V. Belov, A. van Blaaderen, M. L. Bossi, S. W. Hell, *Small* **2008**, *4*, 134–142.
- [13] B. Seefeldt, K. Altenhöner, O. Tomic, T. Geisler, M. Sauer, J. Mattay, *Photochem. Photobiol. Sci* **2011**.
- [14] F. May, M. Peter, A. Hütten, L. Prodi, J. Mattay, *Chem. Eur. J* **2012**, *18*, 814–821.
- [15] E. Fischer, Y. Hirshberg, *J. Chem. Soc* **1952**, 4522–4524.
- [16] V. I. Minkin, *Chem. Rev* **2004**, *104*, 2751–2776.
- [17] S. Aramaki, G. H. Atkinson, *J. Am. Chem. Soc* **1992**, *114*, 438–444.
- [18] S. Nakamura, K. Uchida, A. Murakami, M. Irie, *J. Org. Chem* **1993**, *58*, 5543–5545.
- [19] J. Aubard, F. Maurel, G. Buntinx, R. Gugliemetti, G. Levi, *Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology. Section A. Molecular Crystals and Liquid Crystals* **2000**, *345*, 203–208.
- [20] J. T. C. Wojtyk, A. Wasey, P. M. Kazmaier, S. Hoz, E. Buncel, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 9046–9055.
- [21] M. Beining, *Dissertation*, Univesität Bielefeld, Bielefeld, **2008**.
- [22] G. Dumelin, P. Maldonado, R. Gugliemetti, J. Metzger, *Bulletin de la société chimique de france* **1969**, *3*, 817822.
- [23] V. I. Minik, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2751–2776.

- [24]F. B. Mallory, C. W. Mallory in *Organic Reactions*, John Wiley & Sons, Inc, **2004**.
- [25]M. Irie, M. Mohri, *J. Org. Chem* **1988**, *53*, 803–808.
- [26]R. M. Kellogg, M. B. Groen, H. Wynberg, *J. Org. Chem* **1967**, *32*, 3093–3100.
- [27]O. Tomic, J. Mattay, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 371–376.
- [28]M. Hanazawa, R. Sumiya, Y. Horikawa, M. Irie, *J. Chem. Soc., Chem. Commun* **1992**, 206–207.
- [29]L. N. Lucas, J. J. D. d. Jong, J. H. v. Esch, R. M. Kellogg, B. L. Feringa, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 155–166.
- [30]J. Cusido, E. Deniz, F. M. Raymo, *Eur. J. Org. Chem* **2009**, *2009*, 2031–2045.
- [31]F. M. Raymo, M. Tomasulo, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 7343–7352.
- [32]Y. Terazono, G. Kodis, J. Andréasson, G. Jeong, A. Brune, T. Hartmann, H. Dürr, A. L. Moore, T. A. Moore, D. Gust, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 1812–1814.
- [33]L. Giordano, T. M. Jovin, M. Irie, E. A. Jares-Erijman, *J. Am. Chem. Soc* **2002**, *124*, 7481–7489.
- [34]David L Andrews, David S Bradshaw, *European Journal of Physics* **2004**, *25*, 845.
- [35]T. Förster, *Ann. Phys* **1948**, *437*, 55–75.
- [36]M. Tomasulo, E. Deniz, R. J. Alvarado, F. M. Raymo, *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 8038–8045.
- [37]T. Kawai, T. Sasaki, M. Irie, *Chem. Commun* **2001**.
- [38]H. Bouas-Laurent, A. Castellan, J.-P. Desvergne, R. Lapouyade, *Chem. Soc. Rev* **2000**, *29*, 43–55.
- [39]M. Tomasulo, I. Yildiz, F. M. Raymo, *Inorganica Chimica Acta* **2007**, *360*, 938–944.
- [40]E. Abbe, *Archiv für mikroskopische Anatomie*, Berlin, J. Springer [etc.], **1873**.
- [41]S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153–1158.
- [42]Benjamin Harke, Jan Keller, Chaitanya K. Ullal, Volker Westphal, Andreas Schönle, Stefan W. Hell, *Opt. Express* **2008**, *16*, 4154–4162.
- [43]S. W. Hell, K. I. Willig, V. Westphal, *Biospektrum* **2006**, 492–494.
- [44]K. I. Willig, J. Keller, M. Bossi, S. W. Hell, *New J. Phys* **2006**, *8*, 106.
- [45]Mike Heilemann, Sebastian van de Linde, Mark Schüttpelz, Robert Kasper, Britta Seefeldt, Anindita Mukherjee, Philip Tinnefeld, Markus Sauer, *Angewandte Chemie* **2008**, *120*, 6266–6271.
- [46]F. J. Arriagada, K. Osseo-Asare, *Journal of Colloid and Interface Science* **1995**, *170*, 8–17.

- [47]L. Wang, K. Wang, S. Santra, X. Zhao, L. R. Hilliard, J. E. Smith, Y. Wu, W. Tan, *Anal. Chem* **2006**, *78*, 646–654.
- [48]W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *Journal of Colloid and Interface Science* **1968**, *26*, 62–69.
- [49]G. H. Bogush, M. A. Tracy, C. F. Zukoski IV, *Journal of Non-Crystalline Solids* **1988**, *104*, 95–106.
- [50]A. van Blaaderen, A. Vrij, *Journal of Colloid and Interface Science* **1993**, *156*, 1–18.
- [51]S. Bonacchi, D. Genovese, R. Juris, M. Montalti, L. Prodi, E. Rampazzo, N. Zaccheroni, *Angew. Chem. Int. Ed* **2011**, *50*, 4056–4066.
- [52]R. F. Egerton, *Physical principles of electron microscopy. An introduction to TEM, SEM, and AEM*, Springer Science+Business Media, New York, **2005**.
- [53]D. R. Larson, H. Ow, H. D. Vishwasrao, A. A. Heikal, U. Wiesner, W. W. Webb, *Chem. Mater* **2008**, *20*, 2677–2684.
- [54]D. Genovese, M. Montalti, L. Prodi, E. Rampazzo, N. Zaccheroni, O. Tomic, K. Altenhoner, F. May, J. Mattay, *Chem. Commun* **2011**, 47.
- [55]T. Wu, G. Zou, J. Hu, S. Liu, *Chemistry of Materials* **2009**, *21*, 3788–3798.
- [56]S. Saleh, R. Müller, H. Mader, A. Duerkop, O. Wolfbeis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *398*, 1615–1623.
- [57]Y. An, M. Chen, Q. Xue, W. Liu, *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, *311*, 507–513.
- [58]R. M. Yates, A. Hermetter, D. G. Russell, *Traffic* **2005**, *6*, 413–420.
- [59]L. H. Hurley, *J. Med. Chem* **1989**, *32*, 2027–2033.
- [60]E. M. Tuite, J. M. Kelly, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1993**, *21*, 103–124.
- [61]B. A. Armitage in *Topics in Current Chemistry* (Eds.: M. J. Waring, J. B. Chaires), Springer Berlin / Heidelberg, **2005**.
- [62]J. F. Ennever, *Photochemistry and Photobiology* **1988**, *47*, 871–876.
- [63]C. Bustamante, S. Gurrieri, R. F. Pasternack, R. Purrello, E. Rizzarelli, *Biopolymers* **1994**, *34*, 1099–1104.
- [64]J. Nygren, N. Svanvik, M. Kubista, *Biopolymers* **1998**, *46*, 39–51.
- [65]K. H. Abramo, J. B. Pitner, L. B. McGown, *Biospectroscopy* **1998**, *4*, 27–35.
- [66]L. S. Lerman, *Journal of Molecular Biology* **1961**, *3*, 18–IN14.
- [67]R. W. Armstrong, T. Kurucsev, U. P. Strauss, *J. Am. Chem. Soc* **1970**, *92*, 3174–3181.

- [68]E. Tuite, B. Norden, *J. Am. Chem. Soc* **1994**, *116*, 7548–7556.
- [69]J.-B. Lepecq, C. Paoletti, *Journal of Molecular Biology* **1967**, *27*, 87–106.
- [70]E. C. Long, J. K. Barton, *Acc. Chem. Res* **1990**, *23*, 271–273.
- [71]E. Pazos, J. Mosquera, M. E. Vázquez, J. L. Mascareñas, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1958–1973.
- [72]S. Jiang, M. Liu, *Chem. Mater* **2004**, *16*, 3985–3987.
- [73]A. D’Urso, A. Mammana, M. Balaz, A. E. Holmes, N. Berova, R. Lauceri, R. Purrello, *J. Am. Chem. Soc* **2009**, *131*, 2046–2047.
- [74]Y. Liu, A. Chouai, N. N. Degtyareva, D. A. Lutterman, K. R. Dunbar, C. Turro, *J. Am. Chem. Soc* **2005**, *127*, 10796–10797.
- [75]P. G. A. Janssen, A. Ruiz-Carretero, D. González-Rodríguez, E. W. Meijer, A. P. H. J. Schenning, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 8103–8106.
- [76]A. Mammana, G. T. Carroll, J. Areephong, B. L. Feringa, *J. Phys. Chem. B* **2011**, 11581–11587.
- [77]J. Andersson, S. Li, P. Lincoln, J. Andreïasson, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 11836–11837.
- [78]S. V. Paramonov, V. Lokshin, H. Ihmels, O. A. Fedorova, *Photochem. Photobiol. Sci* **2011**, *10*, 1279–1282.
- [79]C. Dohno, T. Yamamoto, K. Nakatani, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 4051–4058.
- [80]C. Dohno, S.-n. Uno, K. Nakatani, *J. Am. Chem. Soc* **2007**, *129*, 11898–11899.
- [81]T. Karstens, K. Kobs, *J. Phys. Chem* **1980**, *84*, 1871–1872.
- [82]T. Nguyen, B. M. Francis, *Organic Letters* **2003**, *18*, 3245–3248
- [83]Florian May, Jochen Mattay, eingereicht.
- [84]F. May, L. Thomas, H. Ihmels, J. Mattay, eingereicht.

8. Anhang

