

---

Synthese, Charakterisierung und Evaluation  
von lichtkontrollierbaren sowie kolloidalen  
Systemen zur Untersuchung von  
multivalenten Wechselwirkungen und  
biologischen Prozessen

---

Dissertation zur Erlangung der akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im  
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Janis Manuel Berkemeyer  
aus Berlin

Berlin, Dezember 2018



Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2012 bis Dezember 2018 am Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Eckart Rühl angefertigt. Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Synthese, Charakterisierung und Evaluation von lichtkontrollierbaren sowie kolloidalen Systemen zur Untersuchung und Kontrolle von multivalenten Wechselwirkungen und biologischen Prozessen“ ohne Benutzung anderer als der zugelassenen Hilfsmittel selbständig angefertigt zu haben. Alle angeführten Zitate sind als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation wurde in deutscher Sprache verfasst. Die vorliegende Arbeit wurde in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Eckart Rühl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Beate Kokschi

Tag der Disputation: 18.04.2019



## Kurzzusammenfassung

Die Kontrolle von biologischen Systemen mit Licht bietet die Möglichkeit zahlreiche biologisch relevante Prozesse lokal und zeitlich aufgelöst zu untersuchen oder chemische Reaktionen gezielt zu beeinflussen. Die Steuerung mit Licht kann hierbei zum Beispiel über Azobenzolphotoschalter oder photolabile Schutzgruppen, sogenannte Photokäfige, erreicht werden. Die Kenntnis der Schalteigenschaften von Azobenzolen oder der Photolyseeffizienzen von Photokäfigen ist für die Beurteilung der Eignung dieser Moleküle für ausgesuchte Anwendungen von entscheidender Bedeutung. Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Untersuchung multivalenter Wechselwirkungen. Diese stellen eine weit verbreitete Art der Interaktion zwischen Biomolekülen dar. Von besonderem Interesse sind dabei die thermodynamischen Eigenschaften sowie die Kontrolle von multivalenten Wechselwirkungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher einerseits verschiedene Systeme für die Kontrolle von biologischen Modellsystemen mit Licht untersucht sowie andererseits die Möglichkeit der hintergrundfreien Detektion von multivalenten Wechselwirkungen erforscht.

Zunächst wurde das Schaltverhalten von glycosilierten Photoschaltern, welche genutzt werden können, um schaltbare multivalente Systeme zu erhalten, mit einem hierfür erstellten Blitzlichtphotolyseexperiment untersucht. Die Photoschalter zeigten hierbei ein von der Konzentration, dem pH-Wert und den Substituenten abhängiges Schaltverhalten. Für die Erklärung dieser Beobachtungen wurde ein Modell vorgeschlagen und diskutiert. Im zweiten Teil der Arbeit wurden multivalente und mit Licht kontrollierbare Systeme, in Form von photoschaltbaren glycosilierten Goldnanopartikeln, hergestellt und deren Schaltverhalten ermittelt sowie getestet, ob sich diese zur Kontrolle von multivalenten Wechselwirkungen eignen. Es konnten schaltbare glycosilierte Goldnanopartikel in einem Größenbereich von 5 nm bis 80 nm dargestellt werden und das Schaltverhalten der immobilisierten Azobenzole ermittelt werden. Im dritten Abschnitt der Arbeit wurde ein medizinisch gegen Psoriasis wirksames Tetrapeptid an eine photolabile Cumarinschutzgruppe gekuppelt und die nichtlinearen optischen Eigenschaften des Konjugates charakterisiert. Hierfür wurde zunächst ein dafür geeigneter Aufbau zur Messung von Zweiphotonenfluoreszenz erstellt. Mit diesem wurde der Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt ermittelt. Des Weiteren wurden die Ein- und Zweiphotonenfreisetzungseffizienzen ermittelt. Im

letzten Teil der Arbeit wurde ein Konzept entwickelt um die thermodynamischen Eigenschaften von multivalenten Wechselwirkungen nahezu hintergrundfrei über einen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zu ermitteln. Als biologisches Modellsystem wurden Peptide, die *Coiled-Coil*-Heterodimere bilden, gewählt. Die Gleichgewichtsreaktion zwischen den Monomeren und dem Heterodimer stellt eine multivalente Wechselwirkung dar. Hierbei ist die Valenz des Systems vergleichsweise leicht durch die Peptidlänge variierbar. Als FRET-Donor wurden Aufkonvertierungsnanopartikel und als FRET-Akzeptor der Fluoreszenzfarbstoff TAMRA genutzt. Eines der Peptide konnte erfolgreich auf den Aufkonvertierungsnanopartikeln immobilisiert werden, das andere Peptid wurde mit TAMRA markiert. So konnte die Eignung dieses Systems zur Untersuchung der multivalenten Wechselwirkungen evaluiert werden.

## Abstract

The control of biological systems with light gives the opportunity to investigate many biologically relevant processes with spacial and temporal resolution, or to specifically manipulate chemical reactions. The controllability by light can be obtained by using e.g. azobenzene photoswitches or photolabile protecting groups, so called photocages. Information about the switching properties of azobenzenes or the efficiency of photolysis of photocages is crucial for the evaluation of the applicability of these molecules. A second focus of this work was the investigation of multivalent interactions. These interactions are a common type of interaction between biomolecules. The thermodynamic properties as well as the control of multivalent interactions are particularly interesting. Accordingly, different frameworks for the control of biological model systems with light were investigated within in the scope of this work. Another part of this work investigated the possibility of the background free detection of multivalent interactions.

The switching behavior of glycosylated azobenzenes, which can be used to create switchable multivalent systems, was investigated in the first part of this work. A flash photolysis set up was constructed for this purpose. The switches exhibited a concentration, pH, and substituent dependent switching behavior. A model for the explanation of these observations was proposed and discussed. In the second part of this work, photo switchable multivalent gold nanoparticles were synthesized. Subsequently, the switching behavior was investigated and it was tested if the switches are suitable for the control of multivalent interactions. Switchable glycosylated gold nanoparticles in a size range between 5 nm and 80 nm were synthesized and the switching behavior of the immobilized azobenzenes was evaluated. In the third part of this work, a tetrapeptide, which is pharmacologically active and can be used to potentially treat psoriasis, was coupled with a coumarin photocage and the nonlinear optical properties of the resulting conjugate were investigated subsequently. A set up to measure fluorescence after two-photon absorption was constructed to measure the two-photon absorption cross section. Additionally, the one- and two-photon uncaging action cross-sections were determined. In the fourth part of this work, a concept for the background free detection of the thermodynamic properties of multivalent interactions via Förster resonance energy transfer (FRET) was designed.

Coiled coil heterodimer forming peptides were used as biological model systems. The equilibrium reaction between the monomeric and dimeric state is a multivalent reaction. The valency can be adjusted easily via the peptide length. Upconversion nanoparticles were used as donor and the fluorescence dye TAMRA as acceptor for the FRET process. One of the peptides was successfully immobilized on the upconversion nanoparticles, the other one was labeled with TAMRA. It was possible to detect acceptor emission via FRET by the donor with negligible background by dyes. Subsequently, the suitability of the system for the investigation of multivalent interactions could be evaluated.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Methodische Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1. Multivalenz . . . . .	5
2.2. Azobenzolphotoschalter . . . . .	10
2.2.1. Eigenschaften von Azobenzolen . . . . .	11
2.2.2. Thermische Relaxation von Azobenzolen . . . . .	13
2.3. Nanopartikel . . . . .	17
2.3.1. Goldnanopartikel . . . . .	18
2.3.1.1. Optische Eigenschaften von Goldnanopartikeln . . . . .	18
2.3.1.2. Synthese von Goldnanopartikeln . . . . .	20
2.3.1.3. Ligandenaustausch an Goldnanopartikeln . . . . .	23
2.3.1.4. Schaltbare glycosilierte Goldnanopartikel . . . . .	24
2.3.2. Aufkonvertierungsnanopartikel - UCNP . . . . .	26
2.3.2.1. Optische Eigenschaften von UCNP . . . . .	26
2.3.2.2. Synthese von oleatfunktionalisierten UCNP . . . . .	29
2.3.2.3. Umfunktionalisierung von UCNP . . . . .	30
2.4. Photolabile Schutzgruppen . . . . .	31
2.5. Peptide . . . . .	34
2.6. Methoden . . . . .	36
2.6.1. UV/VIS- und Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	36
2.6.2. Zweiphotonenabsorption . . . . .	38
2.6.3. Blitzlichtphotolyse . . . . .	40
2.6.4. Aufkonvertierungsmechanismen . . . . .	42
2.6.5. Förster-Resonanzenergietransfer . . . . .	43
2.6.6. Circular dichroismus-Spektroskopie . . . . .	45

2.6.7. Infrarotspektroskopie . . . . .	46
2.6.8. Dynamische Lichtstreuung . . . . .	47
2.6.9. Elektronenmikroskopie . . . . .	49
2.6.10. Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie . . . . .	50
<b>3. Experimentalteil</b>	<b>55</b>
3.1. Methoden und Geräte . . . . .	55
3.1.1. Allgemeine Arbeitsvorschriften . . . . .	55
3.1.2. Festphasenpeptidsynthese . . . . .	55
3.1.3. Probeabspaltungen . . . . .	56
3.1.4. Lyophilisierung . . . . .	56
3.1.5. Analytische HPLC . . . . .	57
3.1.5.1. LaChrom-Elite HPLC . . . . .	57
3.1.5.2. Semi-micro Chromaster . . . . .	57
3.1.5.3. Primaide™ HPLC . . . . .	57
3.1.5.4. Gradienten für die analytische HPLC . . . . .	58
3.1.6. Präparative HPLC . . . . .	58
3.1.7. Circular dichroismus-Spektroskopie . . . . .	59
3.1.8. Dialyse zur Nanopartikelauflösung . . . . .	59
3.1.9. Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) . . . . .	60
3.1.10. Massenspektrometrie . . . . .	60
3.1.11. Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	61
3.1.12. UV/VIS Absorptionsspektroskopie . . . . .	61
3.1.12.1. PerkinElmer UV/VIS/NIR Spektrometer . . . . .	61
3.1.12.2. Jasco UV/VIS/NIR Spektrometer . . . . .	61
3.1.13. Elektronenmikroskopie (REM und STEM) . . . . .	61
3.1.14. Dynamische Lichtstreuung (DLS) . . . . .	62
3.1.15. Infrarotspektroskopie . . . . .	62
3.2. Messung der thermischen Relaxation von Azobenzolen . . . . .	63
3.2.1. Das Blitzlichtphotolyseexperiment . . . . .	63
3.2.2. Die Messungen . . . . .	65
3.2.2.1. Probenpräparation . . . . .	65

3.2.2.2.	Messungen für lange Relaxationszeiten . . . . .	66
3.2.2.3.	Messungen für kurze Relaxationszeiten . . . . .	67
3.3.	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie . . . . .	67
3.3.1.	Biosuplar 400T . . . . .	67
3.3.2.	Biacore X100 . . . . .	69
3.4.	Synthese von Nanopartikeln . . . . .	70
3.4.1.	Synthese von Citrat funktionalisierten Goldnanopartikeln . . .	70
3.4.1.1.	AuNP mit 5 nm Durchmesser . . . . .	70
3.4.1.2.	AuNP mit 14 nm Durchmesser . . . . .	70
3.4.1.3.	AuNP mit 30 nm Durchmesser . . . . .	71
3.4.1.4.	AuNP mit 50-100 nm Durchmesser . . . . .	71
3.4.1.5.	Teilfunktionalisierung der AuNP mit MUA . . . . .	71
3.4.1.6.	Teilfunktionalisierung der AuNP mit Photoschaltern . . . . .	72
3.4.1.7.	Darstellung von PEG-geschützten GlycoAzo-AuNP . . . . .	72
3.4.2.	Synthese von Aufkonvertierungsnanopartikeln (UCNP) . . . . .	73
3.4.2.1.	Darstellung von Lanthanoidoleaten . . . . .	73
3.4.2.2.	Synthese von Oleat-funktionalisierten UCNP . . . . .	74
3.4.2.3.	Darstellung von Aldehyd-funktionalisierten UCNP . . . . .	75
3.4.2.4.	Thiolisierung der UCNP . . . . .	75
3.4.2.5.	Peptidkupplung der UCNP . . . . .	76
3.5.	Synthese der Peptide für die FRET-Experimente . . . . .	76
3.5.1.	Konzentrationsbestimmung der Peptide . . . . .	77
3.6.	Synthese des photolabilen N-(6-Bromo-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxy- carbonyl-AAPV (BhcAAPV) . . . . .	79
3.6.1.	Synthese des Peptids AAPV . . . . .	79
3.6.2.	NHS-Aktivierung von BhcOH . . . . .	79
3.6.3.	Kupplung von AAPV an BhcOH . . . . .	80
3.7.	Freisetzungsexperimente nach Einphotonenabsorption . . . . .	80
3.7.1.	Experimenteller Aufbau . . . . .	80
3.7.2.	Messung der Einphotonenfreisetzung von AAPV . . . . .	81
3.7.3.	Darstellung Ferrioxalat . . . . .	82
3.8.	Experiment zur Messung von Fluoreszenz nach Zweiphotonenabsorption . . . . .	82
3.8.1.	Das Femtosekundenlasersystem . . . . .	82

3.8.2. Experimenteller Aufbau . . . . .	83
3.9. Zweiphotonenabsorptionsmessungen . . . . .	84
3.9.1. Messung der Zweiphotonenabsorptionsquerschnitte . . . . .	84
3.9.2. Messung der Zweiphotonenfreisetzung von AAPV . . . . .	85
3.10. Aufkonvertierungsspektroskopie . . . . .	86
3.11. FRET Experimente . . . . .	86
<b>4. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>88</b>
4.1. Thermische Relaxation von Glycoazobenzolen . . . . .	88
4.1.1. Einführung . . . . .	88
4.1.2. Die Photoschalter . . . . .	89
4.1.3. Reproduzierbarkeit der thermischen Relaxation . . . . .	91
4.1.4. Allgemeine Charakterisierung der thermischen Relaxation von <b>AB2</b> und <b>AB3</b> . . . . .	97
4.1.5. pH-Abhängigkeit der thermischen Relaxation . . . . .	104
4.1.6. Konzentrationsabhängigkeit der thermischen Relaxation . . . . .	113
4.1.7. Zusammenfassung . . . . .	122
4.2. Darstellung und Studien mit schaltbaren, glycosilierten Goldnanopar- tikeln . . . . .	125
4.2.1. Einführung . . . . .	125
4.2.2. Synthese der GlyAzoThiol funktionalisierten Goldnanopartikel	125
4.2.2.1. Synthese der Goldnanopartikel . . . . .	126
4.2.2.2. Darstellung von mSAM-AuNP mit MUA und Citrat	128
4.2.2.3. Darstellung von mSAM-AuNP mit GlyAzoThiolen und Citrat . . . . .	132
4.2.3. Thermische Relaxation der mSAM-AuNP mit GlyAzoThiolen und Citrat . . . . .	145
4.2.3.1. Vergleich der Linkerlänge . . . . .	149
4.2.4. SPR-Untersuchungen . . . . .	151
4.2.5. mSAM-AuNP mit HS-PEG-Hintergrundliganden . . . . .	160
4.2.6. Zusammenfassung und Ausblick . . . . .	162

4.3. Lichtkontrollierte Freisetzung von AAPV durch Zweiphotonenabsorption einer photolabilen Cumarinschutzgruppe . . . . .	164
4.3.1. Einleitung . . . . .	164
4.3.2. Synthese des photolabil geschützten Peptids BhcAAPV . . . . .	165
4.3.2.1. Synthese von AAPV . . . . .	166
4.3.2.2. Synthese von BhcAAPV . . . . .	166
4.3.3. Ein- und Zweiphotonenabsorption von BhcAAPV . . . . .	168
4.3.4. Freisetzung durch Ein- und Zweiphotonenabsorption von BhcAAPV . . . . .	174
4.3.5. Zusammenfassung und Ausblick . . . . .	179
4.4. Untersuchung von multivalenten Wechselwirkungen zwischen Peptiden mit Hilfe des Förster-Resonanzenergietransfers . . . . .	181
4.4.1. Einführung . . . . .	181
4.4.2. Synthese von mit Peptid funktionalisierten UCNPs . . . . .	181
4.4.2.1. Synthese von NaYF <sub>4</sub> : Yb, Er, Gd-UCNP . . . . .	183
4.4.2.2. Umfunktionalisierung der UCNPs . . . . .	190
4.4.2.3. Design, Synthese und Charakterisierung der Peptide . . . . .	196
4.4.2.4. Peptidkupplung an die UCNPs . . . . .	201
4.4.3. FRET Experimente . . . . .	204
4.4.4. Zusammenfassung und Ausblick . . . . .	209
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>212</b>
<b>Literatur</b>	<b>217</b>
<b>A. Tabellen - thermische Relaxation von Glycoazobenzolen</b>	<b>241</b>
<b>B. Verwendete Chemikalien</b>	<b>244</b>
<b>C. Liste der Veröffentlichungen</b>	<b>249</b>
<b>D. Danksagung</b>	<b>250</b>



# 1. Einleitung

Die Kontrolle von chemischen und biologischen Prozessen durch externe Stimuli ist ein Themenfeld, das in den letzten Jahren große Beachtung erhalten hat [1–4]. *Jean-Pierre Sauvage*, *Sir J. Fraser Stoddart* und *Bernard L. Feringa* erhielten 2016 den Chemie-Nobelpreis für ihre bahnbrechenden Forschungen auf dem Gebiet der Nanomaschinen, unter anderem für ihre Arbeiten zu kontrollierbaren molekularen Motoren [5], Muskeln [6] und Transportsystemen [7, 8]. Einer der wichtigsten und am meisten genutzten Stimuli zur Kontrolle von nanoskaligen und molekularen Systemen ist Licht [9–11]. Die Besonderheit bei der Kontrolle von Prozessen mit Licht ist, dass dieses mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung appliziert werden kann. Daraus ergeben sich zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten, wie die photodynamische Therapie [12], die Photokatalyse [13] oder molekulare Transistoren [14, 15]. Die Steuerung von Prozessen mit Licht kann hierbei einerseits in Form von Anwendungen, wie bei der photodynamischen Therapie, andererseits aber auch als Werkzeug genutzt werden, um chemische oder biologische Prozesse zu verstehen [16]. Die Klasse der photolabilen Schutzgruppen, auch Photokäfige genannt, ermöglicht die kontrollierte lokale und zeitaufgelöste Freisetzung von Molekülen, um biologische Prozesse zu steuern oder auch zu analysieren [17, 18]. Eine andere Klasse von lichtresponsiven Molekülen sind die Photoschalter. Unter diesen wird insbesondere die Klasse der Azobenzolphotoschalter mit großem Interesse erforscht [19–21]. Diese molekularen Schalter werden beispielsweise genutzt, um über multivalente Wechselwirkungen stattfindende Adhäsion von Zellen auf Oberflächen zu steuern [22].

Ein weiteres Konzept, das seit grundlegenden Arbeiten von *Mammen et al.* viel Beachtung erhalten hat, ist die Erforschung der Multivalenz [23, 24]. Multivalente Wechselwirkungen sind für biologische Prozesse, wie zum Beispiel Erkennungs- und Adhäsionsprozesse, von essentieller Bedeutung [24]. Sie zeichnen sich durch das gleichzeitige Binden mehrerer untereinander verbundener Liganden an mehrere ebenfalls

untereinander verbundene Rezeptoreinheiten aus. Im Gegensatz zu monovalenten Bindungen können auf diese Weise starke wie auch reversible Bindungen erreicht werden [24]. Aus diesem Grund werden beispielsweise Grundlagen zur multivalenten Bindung [23, 25–27] und potentielle Anwendungen in Form von multivalenten Impfstoffen [28, 29] bzw. Inhibitoren [30] untersucht. Nanopartikel bieten hierbei die Möglichkeit, monovalente Liganden auf ihrer Oberfläche multivalent zu präsentieren [31–33]. Gleichzeitig bieten sie einzigartige Analysemöglichkeiten, wie im Fall von Goldnanopartikeln die Plasmonenresonanz [34] oder die Aufkonvertierung von Nahinfrarot in sichtbares Licht in Aufkonvertierungsnanopartikeln [35]. Aufkonvertierungsnanopartikel bieten aufgrund der Anregung im Nahinfrarotbereich die Möglichkeit zur hintergrundfreien Detektion der Emission im sichtbaren Spektralbereich. Im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie wird dies bereits intensiv genutzt, da biologische Proben in diesem Anregungswellenlängenbereich keine Autofluoreszenz aufweisen und die Strahlung wesentlich tiefer in die Proben eindringen kann [36]. Eine Nutzung dieser außergewöhnlichen optischen Eigenschaften für Untersuchungen von Wechselwirkungen zwischen biologischen Modellsystemen mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ist im Vergleich dazu noch gering ausgeprägt, sie erhält in letzter Zeit aber zunehmend an Aufmerksamkeit [37]. Ähnliche Vorteile wie die Aufkonvertierungs-partikel bieten Farbstoffe und Photokäfige, die hohe Absorptionsquerschnitte für den nichtlinearen Prozess der Zweiphotonenabsorption aufweisen [38–40]. Hierbei werden die Farbstoffe mit ultrakurzen Laserpulsen im Nahinfrarotbereich angeregt. Dabei herrschen ausschließlich im Fokus des Laserstrahls ausreichend hohe Photondichten für die zeitgleiche Absorption von zwei Photonen in einem signifikanten Ausmaß, so dass Methoden der Fluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie mit hoher dreidimensionaler Auflösung möglich sind [41, 42].

Im Rahmen dieser Arbeit sollen einerseits verschiedene Systeme für die Kontrolle von biologischen Modellsystemen mit Licht untersucht sowie andererseits die Möglichkeit der hintergrundfreien Detektion von multivalenten Wechselwirkungen erforscht werden.

Im ersten Kapitel soll die thermische Relaxation von in 4'-Position glycosilierten Azobenzolen mit variierender Substitution am Phenylring mittels Blitzlichtphotolyse-spektroskopie und UV/VIS-Absorptionsspektroskopie untersucht werden. Diese Moleküle sind Vorläufer von Schaltern, die nachfolgend für die Synthese von multivalenten

---

Goldnanopartikeln genutzt werden sollen. Die nach Anregung durch UV-Strahlung erhaltene *cis*-Konfiguration von Azobenzol ist metastabil und relaxiert unter Normalbedingungen zurück in die *trans*-Konfiguration. Die Dauer dieser thermischen Relaxation ist für die meisten Anwendungen von entscheidender Bedeutung [43, 44] und die Funktionalisierung mit  $\alpha$ -D-Mannose verleiht den Schaltern zusätzlich einzigartige Eigenschaften [45, 46]. Aus diesem Grund ist die Untersuchung der thermischen Relaxation von diesen neuen Azobenzolphotoschaltern ein notwendiger Schritt, um ihre Eignung für die Steuerung von multivalenten Wechselwirkungen zu überprüfen. Einige der Photoschalter weisen hierbei so kurze thermische Relaxationszeiten auf, dass sie mit Hilfe von Blitzlichtphotolysespektroskopie untersucht werden müssen. Hierbei soll insbesondere die Abhängigkeit der thermischen Relaxation von der Substitution in 2- und 4-Position, vom pH-Wert und von der Konzentration untersucht werden.

Im zweiten Kapitel des Ergebnisteils sollen mit glycosilierten Azobenzolen teil-funktionalisierte Goldnanopartikel mit variierender Größe dargestellt werden, um multivalente, schaltbare Systeme zu erhalten. Eine Möglichkeit multivalente Systeme zu erhalten, ist die multivalente Präsentation von Liganden auf der Oberfläche von Nanopartikeln. Die Anzahl der präsentierten Liganden kann über die Beladungsdichte der bindenden Liganden, die Größe der Partikel oder über ein- und ausschalten der Bindungsaktivität der einzelnen Liganden realisiert werden. In diesem Kapitel soll ein System dargestellt werden, welches mit Hilfe von Azobenzolphotoschaltern die Möglichkeit bietet, die Valenz der Partikel mit Hilfe von Licht zu steuern. Des Weiteren sollen Partikel unterschiedlicher Größe, aber mit gleicher Beladungsdichte hergestellt werden, um zusätzlich eine Variation der Valenz über die Nanopartikelgröße zu erhalten. Nach Erhalt einer solchen Bibliothek aus photoschaltbaren, multivalenten Goldnanopartikeln sollen Studien zur thermischen Relaxation der immobilisierten Azobenzole im Vergleich zu den frei in Lösung vorliegenden Schaltern sowie Bindungsstudien dieser Partikel in Abhängigkeit der Größe und des Schaltzustands durchgeführt werden.

Im dritten Kapitel des Ergebnisteils wird das Tetrapeptid mit dem Einbuchstaben-code **AAPV**, das therapeutischen Nutzen bei der Behandlung von Psoriasis aufweist, synthetisiert und an die photolabile Cumarinschutzgruppe BhcOH konjugiert. Bei dieser Verbindung handelt es sich um einen Photokäfig, der eine lichtkontrollierte

Freisetzung von **AAPV** mit hoher zeitlicher und lokaler Auflösung mittels Zweiphotonenabsorption ermöglicht. Ziel dieser Arbeiten ist die Erstellung eines Aufbaus zur Messung von Zweiphotonenfluoreszenzspektren, welcher die Charakterisierung des neuen Peptid-Photokäfig-Konjugats ermöglicht. Des Weiteren werden Freisetzungsstudien nach Ein- sowie Zweiphotonenabsorption durchgeführt, um zu ermitteln, ob sich das Konjugat, zum Beispiel für Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie eignet.

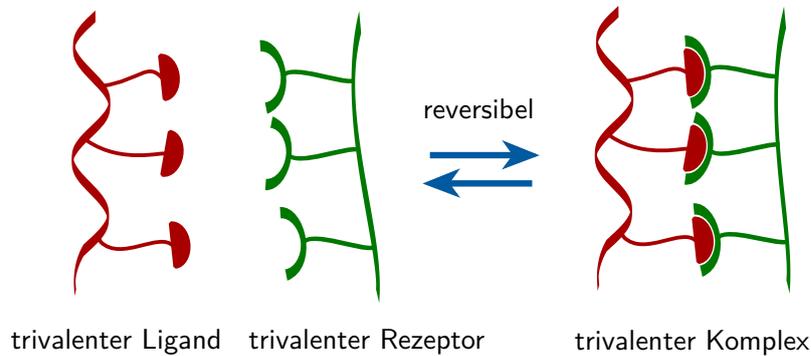
Im vierten Kapitel des Ergebnisteils wird die Möglichkeit untersucht, multivalente Wechselwirkungen zwischen Peptiden, die *Coiled-Coil*-Heterodimere bilden, mittels hintergrundfreiem FRET zu verfolgen. Hierbei sollen mit Ytterbium, Gadolinium und Erbium dotierte  $\text{NaYF}_4$ -Aufkonvertierungspartikel als FRET-Donor und der Fluoreszenzfarbstoff TAMRA als FRET-Akzeptor genutzt werden. Die *Coiled-Coil*-Struktur wird aus zwei oder mehr Peptidmonomeren gebildet. Die Monomere bilden diese Struktur hierbei über schwache Wechselwirkungen zwischen spezifischen hydrophoben sowie gegensätzlich geladenen Domänen der Monomere [47]. Aus diesem Grund ist die Bildung von *Coiled-Coil*-Dimeren in sich ein multivalenter Prozess, bei dem die Valenz über die Anzahl der Bindungsdomänen und damit die Länge der Monomere bestimmt wird. Aus diesem Grund eignen sich diese Peptide als biologische Modellsysteme mit systematisch veränderbarer Valenz. Hierfür sollen maßgeschneiderte Peptide, welche *Coiled-Coil*-Heterodimere bilden, synthetisiert werden. Ein Peptid soll hierbei so funktionalisiert werden, dass es auf den Nanopartikeln immobilisiert werden kann. Die anderen, unterschiedlich langen Peptide sowie ein Referenzpeptid sollen mit dem Fluoreszenzfarbstoff TAMRA markiert werden. Anschließend sollen Aufkonvertierungsnanopartikel mit möglichst hoher Aufkonvertierungseffizienz synthetisiert werden und in einer mehrstufigen Umfunktionalisierung mit dem Peptid teilfunktionalisiert werden. Anschließend sollen die erhaltenen Partikel charakterisiert und in FRET-Studien ermittelt werden, ob sich dieses System zur Untersuchung von multivalenten Wechselwirkungen zwischen biologischen Modellsystemen eignet.

## 2. Methodische Grundlagen

### 2.1. Multivalenz

Das Prinzip der Multivalenz ist in der Natur weit verbreitet und für zahlreiche Prozesse von zentraler Bedeutung [24, 48]. Hierbei unterscheidet sich die multivalente Bindung in einigen Eigenschaften von der einfachen monovalenten Bindung. Eine multivalente Bindung ist durch die chemische Wechselwirkung von über eine Grundstruktur miteinander verbundenen Liganden mit mindestens zwei identischen Bindungsstellen an eine mehrfach präsentierte Akzeptoreinheit charakterisiert [24]. Die Multivalenz ermöglicht starke Bindungen, welche in der Größenordnung von kovalenten Bindungen liegen oder diese übertreffen, die zugleich reversibel sind [24]. Ein bekanntes Beispiel aus der makroskopischen Welt ist die Klette, die durch zahlreiche kleine Haken auf Oberflächen wie Fell oder Kleidung halten kann, obwohl jede einzelne Verbindung von Haken zu Oberfläche nicht in der Lage ist das Gewicht der Klette zu halten. Hiervon abgeleitet ist der Klettverschluss aus synthetischen Materialien. Je größer die Fläche, also die Valenz des Klettverschlusses ist, desto stärker ist die Verbindung. Das Prinzip der Multivalenz erlaubt es nun, diese Verbindung ohne großen Kraftaufwand zu lösen, indem man die einzelnen Bindungen sequenziell trennt. Dieses Prinzip kann im Allgemeinen auf die mikroskopische Welt übertragen werden [24]. Es gibt zahlreiche Beispiele für multivalente Prozesse auf molekularer Ebene, wie z.B. Zell-Zell-Erkennung, die Ausbildung der Doppelhelix der DNS oder das Binden von Antikörpern an Zellen [23]. Ein weiteres, wichtiges Beispiel ist die Endozytose von Viren, zum Beispiel dem Grippevirus, durch Zellen. Hierbei findet eine simultane Wechselwirkung zwischen Hämagglutinin-Einheiten auf der Virusoberfläche und von Sialinsäure-tragenden Glykoproteinen auf der Zelloberfläche statt [23]. Diese Wechselwirkungen werden auch Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen

genannt. Im genannten Beispiel ist der Virus mit seinen Hämagglutinin-Einheiten der multivalente Ligand und die Zelloberfläche der multivalente Rezeptor. Eine schematische Darstellung der Bildung eines multivalenten Komplexes aus Ligand und Rezeptor ist in Abb. 2.1 dargestellt. Die Anzahl der Bindungsstellen des Liganden



**Abbildung 2.1.** – Schematische Darstellung der reversiblen Bildung eines trivalenten Komplexes aus einem trivalenten Liganden und Rezeptor [23].

(n) und die Anzahl der Bindungsstellen des Rezeptors (m) müssen nicht zwangsläufig gleich sein, aber in jedem Fall größer als eins. Um die Besonderheiten von multivalenten Bindungen besser zu verstehen, muss man die speziellen thermodynamischen Eigenschaften von diesen kennen. Die folgenden Informationen sind aus Arbeiten von *Ercolani et al.* [49, 50] sowie aus Reviews von *Mammen et al.* [23] und *Fasting et al.* [24] zusammengetragen [51]. Die freie Bindungsenthalpie  $\Delta G_N^{multi}$  von multivalenten Bindungsprozessen kann durch folgende Gleichung dargestellt werden [23]:

$$\Delta G_N^{multi} = \Delta H_N^{multi} - T\Delta S_N^{multi}. \quad (2.1)$$

Hierbei ist  $\Delta H_N^{multi}$  die Bindungsenthalpie und  $\Delta S_N^{multi}$  die Entropie einer N-valenten Bindungsreaktion bei der Temperatur  $T$ . Die gleiche Reaktion kann mit Hilfe der allgemeinen Gaskonstante  $R$  auch über die Assoziationskonstante  $K_N^{multi}$ , welche in diesem Zusammenhang auch als Affinitätskonstante bezeichnet wird, dargestellt werden (siehe Gl. 2.2) [23]. Insbesondere im Fall von multivalenten Reaktionen wird die Assoziationskonstante auch gelegentlich als Avidität bezeichnet [24]. Dieser Begriff stammt aus der Biochemie und wird in dieser Arbeit nicht weiter verwendet.

$$\Delta G_N^{multi} = -RT\ln(K_N^{multi}). \quad (2.2)$$

Die Assoziationskonstante wird für eine Gleichgewichtsreaktion zwischen Ligand  $Li$ , Rezeptor  $Re$  und einem Rezeptor-Ligand-Komplex  $ReLi$  (siehe Gl. 2.3), wie in Gleichung 2.4 gezeigt definiert. Damit ist sie ein Spezialfall der allgemeinen Gleichgewichtskonstante aus dem Massenwirkungsgesetz.



$$K_N^{multi} = \frac{[ReLi]}{[Re][Li]} = \frac{k_{hin}}{k_{rück}}. \quad (2.4)$$

Die mittlere freie Bindungsenergie  $\Delta G_{avg}^{multi}$  einer multivalenten Reaktion bezeichnet die Bindungsenergie einer einzelnen Ligandeneinheit des multivalenten Liganden mit einer Rezeptoreinheit des multivalenten Rezeptors [23]:

$$\Delta G_{avg}^{multi} = \frac{\Delta G_N^{multi}}{N}. \quad (2.5)$$

Diese einzeln betrachtete Bindung kann mit einer monovalenten Bindung verglichen werden. Der Faktor  $\alpha$ , die sogenannte Kooperativität, bezeichnet hierbei den Unterschied zwischen der monovalenten Bindung und der durchschnittlichen Bindung zwischen den Untereinheiten der multivalenten Reaktanden:

$$\Delta G_{avg}^{multi} = \alpha \Delta G^{mono} \quad (2.6)$$

Für die Assoziationskonstante kann man analog schreiben:

$$K_N^{multi} = (K_{avg}^{multi})^N = (K^{mono})^{\alpha N} \quad (2.7)$$

Ist  $\alpha > 1$  so spricht man von einer positiven Kooperativität (die Reaktion ist synergetisch), ist  $\alpha = 1$  spricht man von einem nicht kooperativen Effekt (additive Reaktion) und ist  $\alpha < 1$  findet eine Reaktion mit negativer Kooperativität (interferierende Wechselwirkung) statt. Es ist anzumerken, dass in den meisten multivalenten Reaktionen die Kooperativität nicht positiv ist [23, 52]. Ein wichtiger Grund ist die Entropie der Reaktion. In einer monovalenten Reaktion ist die Entropie  $\Delta S_{mono}$  des Systems zusammengesetzt aus der Translations-, Rotations- und Solvatationsentropie:

$$\Delta S^{mono} = \Delta S_{trans} + \Delta S_{rot} + \Delta S_{sol}. \quad (2.8)$$

Reagieren monovalente Liganden mit einem multivalenten Rezeptor, so ändert sich die Gesamtentropie des Systems kaum sobald der erste Ligand bindet. Denn alle noch nicht gebundenen Liganden erhalten ihre Freiheitsgrade. Die ist jedoch völlig anders, wenn die Liganden durch ein Grundgerüst, oft auch Spacer genannt, verbunden sind, man also von einem multivalenten Liganden spricht. Die Entropie ändert sich zunächst durch einen weiteren, hinzukommenden Term, die Konformationsentropie  $\Delta S_{kon}$ :

$$\Delta S^{multi} = \Delta S_{trans} + \Delta S_{rot} + \Delta S_{sol} + \Delta S_{kon}. \quad (2.9)$$

Bindet nun eine erste Ligandeneinheit an den Rezeptor, verringern sich alle Freiheitsgrade für den gesamten Liganden. Er verliert die Möglichkeit seine Konformation beliebig zu ändern, die Rotations- und Translationsfreiheitsgrade gehen verloren. Je nach Rezeptor- und Ligandenbeschaffenheit kann sich auch die Solvatationsentropie verringern. Das Binden der ersten Ligandeneinheit ist also entropisch erschwert [53]. *Mammen et al.* haben vereinfachend angenommen, dass sich die Enthalpie einer multivalenten Reaktion im Vergleich zur monovalenten Reaktion unabhängig vom Spacer linear mit der Valenz verstärkt ( $\Delta H_N^{multi} = N\Delta H^{mono}$ ) [24]. Hieraus ergibt sich für die Differenz der freien Bindungsenthalpien:

$$\Delta\Delta G = \Delta G_N^{multi} - N\Delta G^{mono}. \quad (2.10)$$

Mit  $\Delta S^{multi} = \Delta S^{mono} + \Delta S_{kon}$  ergibt sich zunächst:

$$\Delta\Delta G = N\Delta H^{mono} - T(\Delta S^{mono} + \Delta S_{kon}) - N(\Delta H^{mono} - T\Delta S^{mono}). \quad (2.11)$$

Nach kürzen und vereinfachen erhält man dann Gleichung 2.12.

$$\Delta\Delta G = T(N - 1)\Delta S^{mono} - T\Delta S_{kon}. \quad (2.12)$$

Man kann daraus schließen, dass besonders hohe Valenzen entropisch begünstigt werden. Zudem kann man des Weiteren schließen, dass gilt: je flexibler und länger der Spacer ist, desto höher sind die Verluste an Freiheitsgraden durch die Bindung. Daher

werden rigide Spacer entropisch bevorzugt. Hierbei ist jedoch nun zu beachten, dass die Annahme, dass die Enthalpie keinen bedeutenden Einfluss hat, mit Sicherheit in den meisten Fällen nicht korrekt ist [24]. Insbesondere im Fall von entropisch begünstigten rigiden Spacern ist es von fundamentaler Bedeutung, dass dieser Spacer passgenau mit den Rezeptorabständen übereinstimmt. Des Weiteren kann der Spacer des multivalenten Liganden sowohl chemischen als auch sterischen Einfluss auf die Rezeptoreinheiten, die Lösungsumgebung sowie Ladungsverteilung haben und so die Assoziation begünstigen oder aber auch erschweren [24]. Diese Betrachtungen zeigen, dass die Kooperativität kein besonders aussagekräftiger Parameter ist, um multivalente Reaktionen zu beschreiben. Aus diesem Grund haben *Mammen et al.* den sogenannten Verstärkungsfaktor  $\beta$  eingeführt, der sich aus der Assoziationskonstante der multivalenten und monovalenten Reaktion ableitet (siehe Gl. 2.13) [23].

$$\beta = \frac{K_N^{multi}}{K_{mono}} \quad (2.13)$$

Obwohl viele multivalente Reaktionen mutmaßlich nicht kooperativ sind, beobachtet man dennoch hohe Verstärkungsfaktoren. Ein Grund hierfür ist die erhöhte lokale Konzentration von Liganden im Bereich des Rezeptors, nachdem die erste Bindung erfolgt ist, weil damit die Knüpfung weiterer Bindungen vereinfacht werden kann. Ebenso gibt es die Möglichkeit des statistischen Rückbindens. Hiermit ist folgendes gemeint: betrachtet man ein multivalentes System, das bereits eine erhöhte Anzahl von besetzten Rezeptorstellen aufweist und an einer Bindung eine Dissoziation erfolgt, so entfernt sich die Ligandeneinheit aufgrund der noch verbundenen Einheiten nicht weit. Daher ist eine erneute Assoziation wahrscheinlich. Die Folge ist ein erhöhter Verstärkungsfaktor, man beobachtet daher eine hohe Affinität zwischen Ligand und Rezeptor [52, 54].

Multivalente Reaktionen zeichnen sich demnach durch zahlreiche spezifische Eigenschaften aus, die sie von monovalenten Reaktionen unterscheiden und dadurch einzigartige und komplexe Vorgänge, wie zum Beispiel die Gruppierung von Rezeptoren auf Zelloberflächen, bewirken können [55]. Das Vorhandensein von mehreren Bindungsstellen muss nicht zwangsläufig für eine höhere Affinität zwischen den Spezies verantwortlich sein. Es gibt zum Beispiel auch multivalent präsentierte Rezeptoren, welche die Orientierung der Liganden steuern [51, 56]. Dies ist vor allem in

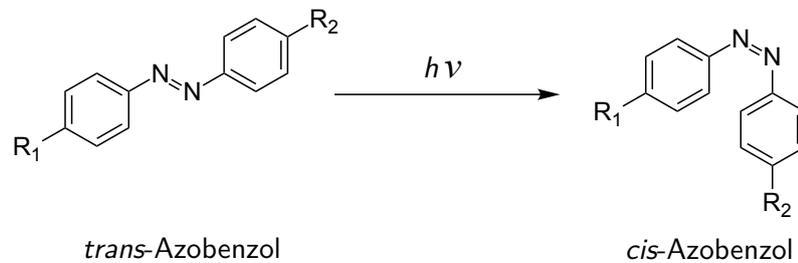
Enzymen von großer Bedeutung, da bei den Vorgängen vom Binden und Ausrichten des Substrats im aktiven Zentrum, als auch bei der Reaktion, immer heterogene multivalente Wechselwirkungen beteiligt sind [51]. Multivalente Wechselwirkungen werden aufgrund ihrer zahlreichen Möglichkeiten, insbesondere bei der Herstellung neuer Wirkstoffe für Medikamente, intensiv wissenschaftlich untersucht [57, 58]. In den meisten Fällen werden multivalente Liganden untersucht, die mit natürlich vorkommenden multivalenten Rezeptoren wechselwirken können. Unter anderem werden Peptide [59–64], Polymere [23, 24, 59, 65, 66], kleine Moleküle [60, 67] sowie Nanopartikel [33, 54, 68–70] untersucht.

Aufgrund der Tatsache, dass es zahlreiche Einflussfaktoren für multivalente Wechselwirkungen gibt, ist es eine besondere Herausforderung, einzelne Effekte von multivalenten Reaktionen systematisch zu untersuchen. Alleine die Frage ob die Spacerlänge und Flexibilität von multivalenten Liganden eine entscheidende Rolle spielen, ist Gegenstand von Diskussionen [71] und zeigt, dass weitere Forschung auf diesem Gebiet notwendig ist.

### 2.2. Azobenzolphotoschalter

Photoschalter sind kleine organische Moleküle, die in der Lage sind durch Anregung mit Licht ihre Struktur reversibel zu ändern [44, 72]. Hierdurch kann man durch Licht zwischen mindestens zwei isomeren Zuständen kontrolliert wechseln. Diese Zustände weisen oft signifikant unterschiedliche Eigenschaften auf. Diese Eigenschaft macht Photoschalter zu einem populären und äußerst interessanten Forschungsthema. Sie werden zum Beispiel genutzt um DNS kontrolliert von Oberflächen freizusetzen [73], die Tertiärstruktur von Peptiden zu kontrollieren [74], sich wieder selbst löschende Nanopartikeltinte herzustellen [75], molekulare Motoren herzustellen [72], optisch schaltbare Transistoren zu erzeugen [76] und es wird daran geforscht Bakterien kontrolliert auf Oberflächen anzuheften zu lassen und wieder freizusetzen [45, 77]. Der am häufigsten erforschte Photoschalter ist Azobenzol und seine zahlreichen Derivate [72, 78]. Dies liegt an seiner einfachen Struktur, weshalb es recht einfach synthetisiert werden kann sowie daran, dass es durch Anregung mit Licht eine *trans* → *cis* Isomerisation durchläuft [72]. Die *cis*- und *trans*-Isomere weisen verschiedene

räumliche Anordnungen der beiden aromatischen Ringe auf und besitzen damit signifikant unterschiedliche chemische Eigenschaften [72]. Dies gilt insbesondere für Azobenzolderivate, die in 4,4'-Position Substituenten aufweisen (siehe Abb. 2.2) [78]. Da die Isomerisation des Weiteren äußerst resistent gegen Photobleichen ist, eignet

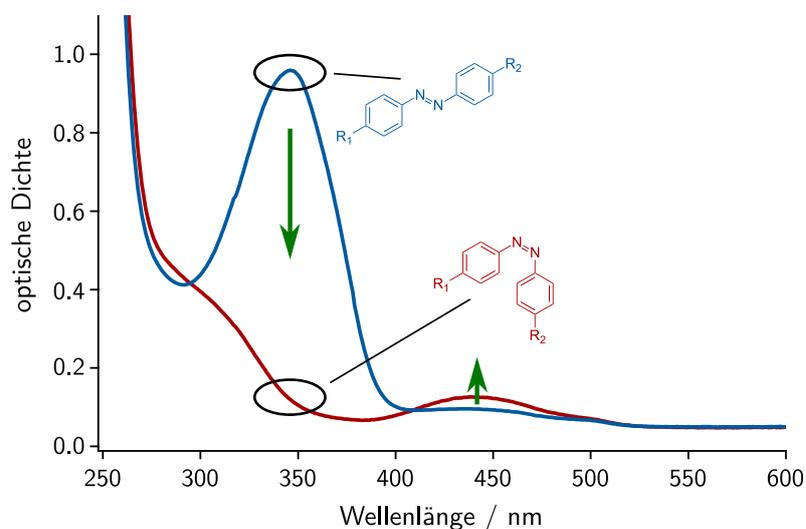


**Abbildung 2.2.** – Strukturformeln von *trans*- und *cis*-Azobenzol mit den Substituenten  $R_1$  und  $R_2$  in 4,4'-Position.

sich Azobenzol hervorragend für ein breites Feld an Anwendungen [45, 73–75, 77, 78]. Die Isomerieänderung kann ihre volle Effizienz jedoch erst entfalten, wenn das Molekül auf einer Oberfläche immobilisiert ist. Daher stellt einer der symbolisierten Substituenten in Abbildung 2.2 meist eine Gruppe dar, mit der das Molekül auf eine Oberfläche binden kann [78]. Diese Gruppe wird dann üblicherweise als Linker bezeichnet. In vielen Anwendungsfällen ist ein Nachteil von Azobenzol, dass die meisten Derivate bei Raumtemperatur nach der Anregung unkontrolliert in das *trans*-Isomer übergehen, da das *cis*-Isomer aufgrund der Abstoßung der beiden Phenylringe metastabil ist [72, 79]. Dieser Vorgang wird thermische Relaxation genannt [80].

### 2.2.1. Eigenschaften von Azobenzolen

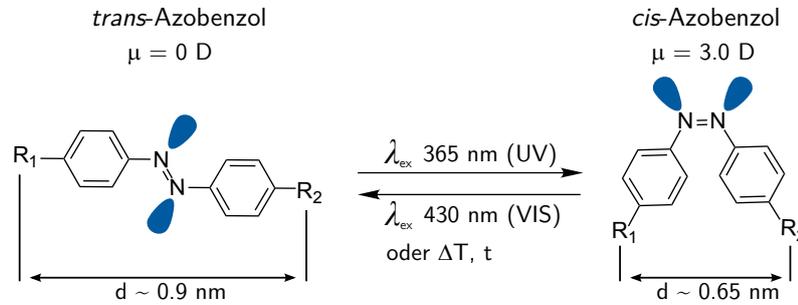
Mit der zuvor beschriebenen strukturellen Veränderung des Moleküls geht eine drastische Änderung der UV/VIS-Absorptionsspektren einher (siehe Abb. 2.3). Im Spektrum des *trans*-Isomers dominiert eine Bande um 355 nm, welche auf den  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang zurückzuführen ist. Die Ursache liegt im konjugierten  $\pi$ -Elektronensystem, welches über das gesamte planare *trans*-Isomer delokalisiert ist [81]. Im *cis*-Isomer hingegen beträgt der Winkel, welcher zwischen dem Phenylring und der Fläche die zwischen den Stickstoffatom und benachbartem Kohlenstoff aufgespannt wird,  $53.3^\circ$  [82]. Damit ist das  $\pi$ -Elektronensystem nicht mehr über das gesamte Molekül delokalisiert und die Dominanz des  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang verschwindet zu Gunsten



**Abbildung 2.3.** – UV/VIS-Absorptionsspektren von *trans*-Azobenzol (blau) und *cis*-Azobenzol (rot).

des  $n\text{-}\pi^*$ -Übergangs bei 445 nm [78]. Der Mechanismus der Photoisomerisation war lange Zeit ungeklärt, erst 2015 konnten *Tan et al.* entscheidende Messungen zu den involvierten Zuständen  $S_1(n\pi^*)$  und  $S_2(\pi\pi^*)$  durchführen und mit Hilfe von quantenmechanischen Rechnungen einen Inversions-assistierten Rotationsweg mit einer Barriere von ca.  $8.4 \text{ kJ mol}^{-1}$  bestimmen [83]. Die Quantenausbeute der Photoisomerisation ist entgegen der Kasha-Regel abhängig von der Anregungsenergie [83, 84]. Dies erklären *Tan et al.* damit, dass die Anregung des zur Isomerisation führenden  $S_1(n\pi^*)$ -Zustandes nur bei Anregung bestimmter Schwingungsmoden, wie der  $\nu_{23}$ -Mode, erfolgen kann, da der  $S_1(n\pi^*) \leftarrow S_0$ -Übergang aus Symmetriegründen verboten ist und nur durch gewisse Schwingungen, welche die Symmetrie aufbrechen, erfolgen kann [83]. Die Konversion von *trans* nach *cis* erfolgt nie vollständig, es wird ein von der Anregungswellenlänge und Intensität abhängiges Gleichgewicht erreicht. Dieses Gleichgewicht wird photostationärer Zustand genannt und hängt auch vom Lösungsmittel und insbesondere von den Substituenten ab [78, 85]. Ähnliches gilt auch für die *trans*-Form, je nach Substituenten und Lösungsmittel ist das Verhältnis von *cis/trans* unterschiedlich. Reines Azobenzol liegt bei Tageslicht und Raumtemperatur je nach Lösungsmittel in Isomer-Mischungen vor, die 15% bis 40% *cis*-Form enthalten [79]. Das Molekül weist in der *trans*-Konfiguration ein Dipolmoment von 0 D und in der *cis*-Konfiguration ein Dipolmoment von 3.0 D auf

[79]. Durch die Konfigurationsänderung ändert sich der Abstand der 4,4'-Positionen von 0.9 nm auf 0.65 nm (siehe Abb. 2.4 [78]). Dieser Umstand kann und wird in vielen Applikationen ausgenutzt [78]. Durch Anregung des *cis*-Azobenzols mit Licht



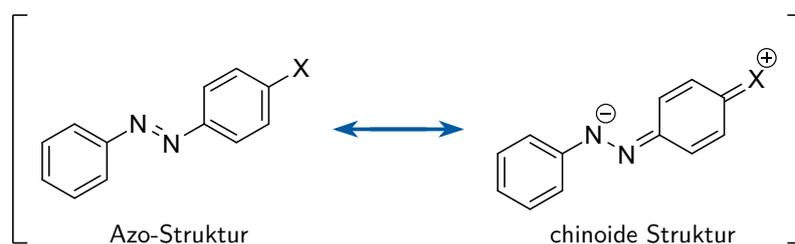
**Abbildung 2.4.** – Struktur von Azobenzol mit eingezeichneter Orientierung der freien Elektronenwolken der Stickstoffatome. Nach Ref. [78].

im sichtbaren Wellenlängenbereich um 430 nm ist es möglich, die Rückisomerisation zu initiieren bzw. zu beschleunigen [86]. Eine weitere Eigenschaft, die sich mit der Isomerisation ändert ist die Basizität. Azobenzol ist in seiner *cis*-Konfiguration eine stärkere Base [87].

### 2.2.2. Thermische Relaxation von Azobenzolen

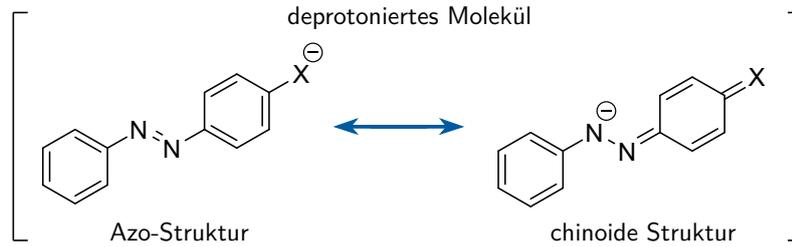
Die thermische Relaxation von Azobenzol und seinen Derivaten wurde bereits 1938 von *Hartley* spektroskopisch untersucht [79]. Seitdem wurden bis zur heutigen Zeit immer wieder Studien über die thermische Relaxation von Azobenzol und Azobenzolderivaten in verschiedenen Lösungen oder Matrices durchgeführt [80, 88–95]. Der Grund des großen Interesses ist, dass die thermische Relaxation für die allermeisten Anwendungen von großer Bedeutung ist. Entweder man benötigt einen Schalter, der möglichst lange oder gar bis zu einem erneuten, kontrollierten Anregen im geschalteten Zustand bleibt [78] oder man benötigt einen Schalter der möglichst schnell wieder in den Ausgangszustand zurückkehrt [96]. Daher ist es wichtig zu wissen, welchen Einfluss Substituenten [80], äußere Einflüsse wie Lösungsmittel [88], pH Wert [97], Temperatur [98] oder Aggregatzustand der Umgebung [99] auf die Relaxationsdauer haben. Reines Azobenzol relaxiert in Lösung bei Raumtemperatur mit einer Aktivierungsenergie von  $96.3 \text{ kJ mol}^{-1}$  [88]. In kristalliner Form und im Dunklen kann das *cis*-Isomer sogar isoliert werden und ist stabil [79]. In n-Hexan relaxiert Azobenzol

mit einer Kinetik erster Ordnung bei 25 °C mit einer Lebensdauer von ca. 172 h [79]. Schon *Hartley* fand 1938, dass Azobenzole mit protonierbaren Substituenten, wie der Hydroxylgruppe oder der Aminogruppe, wesentlich schneller relaxieren als reines Azobenzol. In protischen Lösungsmitteln war die Relaxation zu schnell für die damalige Methode (stationäre UV/VIS-Absorptionsspektroskopie). Zusätzlich fand er, dass diese Derivate empfindlich auf Säuren und Basen reagieren, welche die Relaxation nochmals beschleunigen. Selbst in Aceton konnte er erst das Spektrum der *cis*-Konformation beobachten, nachdem die Base Piperidin hinzugegeben wurde. Dies erklärte *Hartley* durch den Einfluss von aus der Atmosphäre gelöstem CO<sub>2</sub> und Wasser. Das ebenfalls von *Hartley* untersuchte 4-Hydroxyazobenzol war sogar so sensitiv in Bezug auf Hydroxylgruppen, dass die Enolform von Aceton, welche bei Raumtemperatur nur zu 10<sup>-5</sup>% vorliegt [100], die Halbwertszeit von 6 h auf unter 30 s senken konnte [79]. *Hartley* erklärte die Katalyse der thermischen Relaxation von diesen Azobenzolderivaten durch die vorhandene Mesomerie der Moleküle, die für ein neutrales Azobenzolderivat mit dem Substituenten X schematisch in Abbildung 2.5 gezeigt ist. Im Fall eines neutralen Moleküls und in einem aprotischen, unpolaren

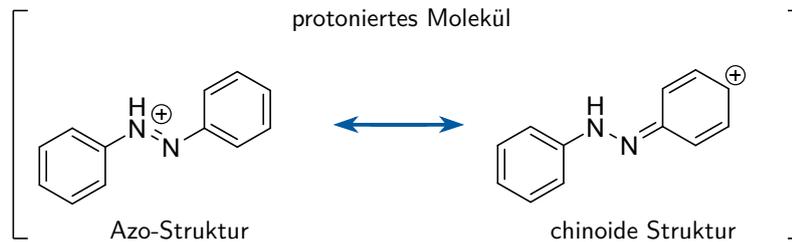


**Abbildung 2.5.** – Mesomere Grenzformeln für ein neutrales Azobenzolderivat mit dem allgemeinen Substituenten X. Nach Ref. [79].

Lösungsmittel liegt das Gleichgewicht deutlich auf der Seite der Azo-Struktur. Falls das Molekül jedoch durch eine Säure protoniert oder durch eine Base deprotoniert wird, kann das Gleichgewicht wiederum deutlich auf Seite der chinoiden Struktur liegen. Für ein deprotoniertes Molekül mit dem Substituenten X ist dieser Fall in Abbildung 2.6 dargestellt. Starke Säuren können selbst Azobenzol, welches eine schwache Base ist, an den Stickstoffatomen angreifen. Daher beschleunigt sich auch für reines Azobenzol die Relaxation bei Zugabe von starke Säuren (siehe Abb. 2.7). Für die chinoide Struktur ist die Energiebarriere für eine Rotation um die N-N'-Achse deutlich erleichtert, so dass eine schnelle Relaxation über den Rotationsmechanismus

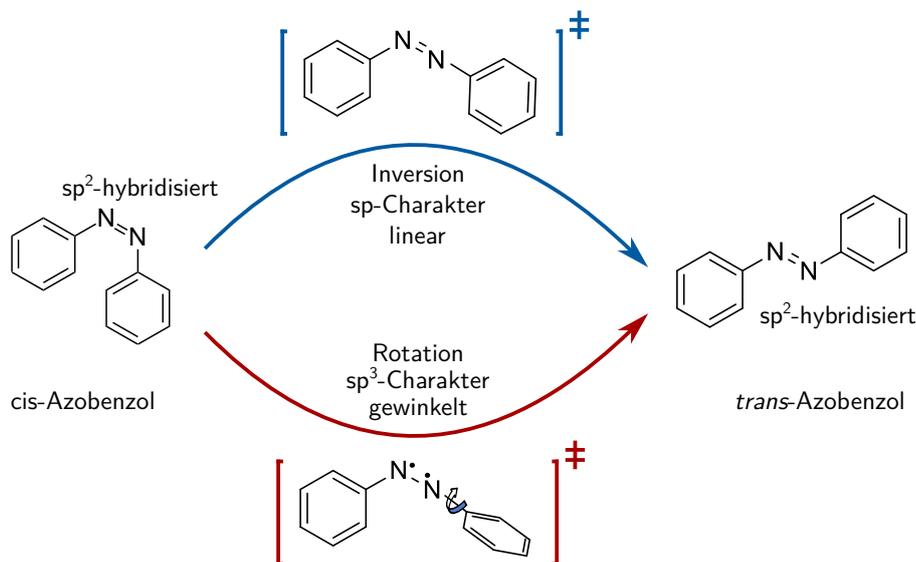


**Abbildung 2.6.** – Mesomere Grenzformeln für ein deprotoniertes Azobenzolderivat mit dem allgemeinen Substituenten X. Nach Ref. [79].



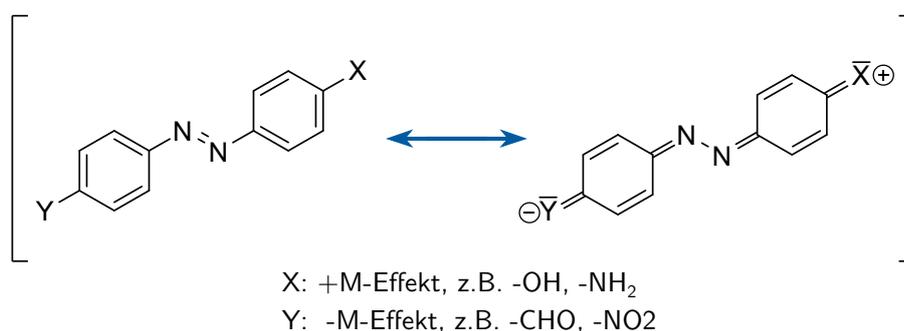
**Abbildung 2.7.** – Mesomere Grenzformeln für protoniertes Azobenzol. Nach Ref. [79].

erfolgen kann [79, 96, 97]. Allerdings ist die Annahme, dass die Relaxation über einen Rotationsmechanismus erfolgt bis heute nicht abschließend geklärt. Prinzipiell kann die thermische Relaxation über eine Inversion der oder eine Rotation um die Stickstoffdoppelbindung erfolgen (siehe Abb. 2.8). Zu diesem Thema wurden zahlreiche Studien veröffentlicht und die beiden Möglichkeiten diskutiert [80, 89–91, 96, 101–103]. Ein gewichtiges Argument gegen den reinen Rotationsmechanismus ist, dass die mesomeren Grenzformeln, welche insbesondere bei sogenannten Push-Pull-Azobenzolen (siehe Abb. 2.9) für einen schnellen Rotationsmechanismus von der *cis*-Form in die *trans*-Form herangezogen werden [91], in der *cis*-Form durch den Winkel zwischen den beiden Phenylringen nicht möglich sind [103, 104]. Der Rotationsmechanismus verlangt ein Brechen der N=N-Doppelbindung, sodass eine Rotation um diese Achse erfolgen kann. Die Energiebarriere für diese Rotation ist mit  $352 \text{ kJ mol}^{-1}$  wesentlich höher als die Rotation um die C=C-Doppelbindung, welche zwischen  $234\text{--}272 \text{ kJ mol}^{-1}$  liegt und mit ähnlich substituierten Stilbenen nicht zu Isomerisierungen führt [90]. Die beobachtete Aktivierungsenergie für Azobenzol in n-Hexan liegt mit  $96.3 \text{ kJ mol}^{-1}$  deutlich unter diesen Werten, obwohl keine favorisierten mesomeren Grenzformeln oder Lösungsmittelwechselwirkungen vorliegen, welche die Doppelbindung auch nur annähernd schwächen würden. Des Weiteren



**Abbildung 2.8.** – Schematische Darstellung der beiden diskutierten Relaxationspfade. Nach Ref.[103].

lassen sich die Beobachtungen, dass die Lebensdauern der thermischen Relaxation von der Lösungsmittelpolarität und Druck anhängen ebenfalls mit einem Inversionsmechanismus erklären [103, 104]. Hier wird argumentiert, dass bei substituierten Azobenzolen, insbesondere Push-Pull-Azobenzolen, welche eine starke Delokalisierung des  $\pi$ -Elektronensystems aufweisen, diese Delokalisierung im gewinkelten *cis*-Isomer nicht mehr vorliegt [103]. Somit ist erstens die energetisch favorisierte Delokalisierung aufgehoben und des Weiteren muss ein signifikanter Unterschied der Polarität vom *cis*-Isomer gegenüber eines hypothetischen Inversions-Übergangszustandes und



**Abbildung 2.9.** – Schematische Darstellung eines sogenannten Push-Pull-Azobenzols mit dem Elektronen schiebenden Substituenten X und dem Elektronen ziehenden Substituenten Y.

gegenüber des *trans*-Isomers vorliegen. Polare Lösungsmittel können daher diesen Übergangszustand (seine Delokalisierung der  $\pi$ -Elektronen) gut stabilisieren. Dadurch ist die Triebkraft in Richtung *trans*-Isomer je höher desto polarer das Lösungsmittel ist, bzw. desto besser es den Übergangszustand stabilisieren kann [103, 104]. Schaut man sich jedoch den Übergangszustand für den Inversionsmechanismus an, kann man erkennen, dass auch ein Inversions-assistierter Rotationsmechanismus, wie im Falle der *trans-cis* Photoisomerisation bewiesen wurde, nicht ausgeschlossen werden kann. Für Azobenzole, die starke pH-Wert-Abhängigkeit aufweisen und außerordentlich schnelle Relaxationszeiten aufweisen, werden diese in der jüngeren Literatur mit protonierten bzw. deprotonierten Strukturen erklärt, die einen Rotationsmechanismus favorisieren [96, 97]. Diese These wird im Kapitel 4.1.5 kritisch besprochen.

Informationen zu Azobenzolen, die auf Goldnanopartikel gebunden sind, befinden sich im Kapitel 2.3.1.4.

## 2.3. Nanopartikel

Nanopartikel sind als diskrete Teilchen definiert, die in mindestens einer Dimension eine Länge zwischen 1 und 100 nm aufweisen [105]. Die Besonderheit von Nanopartikeln im Vergleich zu makroskopischer Materie und auch Mikropartikeln ist hauptsächlich in zwei Eigenschaften begründet. Mit kleiner werdender Größe steigt das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis so weit, dass für die chemischen Eigenschaften der Nanopartikel die Oberflächenstruktur (freie Atombindungen) und Oberflächenfunktionalisierung (Liganden) entscheidend sind [106]. Des Weiteren beginnen in diesem Größenbereich Quanteneffekte zu wirken und geben den Nanopartikeln teils einzigartige optische Eigenschaften, wie die brillante Fluoreszenz von Quantendots oder die durch die Oberflächenplasmonenresonanz auftretende Farbe von Goldnanopartikellösungen [34, 107–109]. Zudem können Nanopartikel aufgrund ihrer Größe direkt mit biologischen Systemen interagieren, so dass sie zum Beispiel von Zellen aufgenommen werden [110–112]. Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften werden Nanopartikel in einem weiten Bereich wissenschaftlich untersucht. Ein wichtiger Aspekt ist die Anwendung von Nanopartikeln als optische und magnetische Marker in der Biologie und Medizin [113, 114] sowie als funktionales Substrat zum Präsentieren

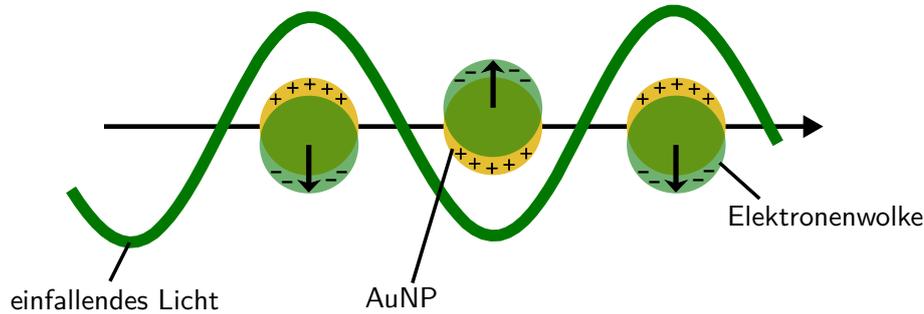
von Liganden, wie zum Beispiel Glycosiden um Protein-Zucker-Wechselwirkungen zu untersuchen [54].

### 2.3.1. Goldnanopartikel

Goldnanopartikel sind schon seit langer Zeit bekannt. Aufgrund ihrer, durch die Oberflächenplasmonenresonanz verursachten, schönen und intensiven Farben wurden sie bereits lange Zeit verwendet um Glas, zum Beispiel für Kirchenfenster, zu färben [115]. Sie wurden bereits im Jahr 1857 von Faraday bei optischen Untersuchungen von Partikeldispersionen entdeckt [116]. Es wurden mittlerweile zahlreiche Methoden zur Synthese von Goldnanopartikeln mit den verschiedensten Funktionalisierungen, Größen und Formen veröffentlicht. [117–119]. Aufgrund ihrer hohen Kernladungszahl sind sie hervorragend als Kontrastmittel für die Röntgenmikroskopie geeignet, sie werden aber auch in den Bereichen der Katalyse, Biochemie, Biosensorik und Medizin verwendet [34, 120, 121].

#### 2.3.1.1. Optische Eigenschaften von Goldnanopartikeln

Eine herausragende Eigenschaft von Goldnanopartikeln ist ihre Oberflächenplasmonenresonanz. In Goldnanopartikeln befinden sich freie Elektronen im Leitungsband. Diese können durch Licht mit gegebener Wellenlänge resonant angeregt werden, wodurch in den Partikeln ein Dipol induziert wird. Daraufhin erzeugt dieser seinerseits eine polarisierte Oberflächenladung, welche als Rückstellkraft auf die angeregten freien Elektronen wirkt. Als Folge beginnen die Elektronen in Resonanz mit der absorbierten Strahlung zu oszillieren. Dieser Effekt wird Oberflächenplasmonenresonanz genannt (siehe Abb. 2.10). Die Frequenz dieser Oszillation ist von der Größe und Form der Partikel sowie von der Permittivität der Umgebung abhängig und bestimmt die Wellenlänge der absorbierten Strahlung und damit auch die Farbe der Partikeldispersion. Diese Wellenlängen bzw. Frequenzen werden Resonanzfrequenzen genannt [34]. Die Abhängigkeit der Plasmonenresonanz von der Partikelgröße kann dazu genutzt werden, diese mit Hilfe von UV/VIS-Absorptionsspektroskopie zu bestimmen [117, 122]. Die 1908 von Gustav Mie entwickelte, nach ihm selbst benannte Mie-Theorie (auch Lorenz-Mie-Theorie), beschreibt Streuphänomene von elektromagnetischer Strahlung an Partikeln [123]. Diese kann genutzt werden, um die optischen



**Abbildung 2.10.** – Schematische Darstellung der Oberflächenplasmonenresonanz von Goldnanopartikeln (AuNP in gelb). Die transparent-grün dargestellte Elektronenwolke befindet sich mit dem einfallenden Licht in Resonanz. Nach Ref. [34].

Eigenschaften von Nanopartikeldispersionen zu beschreiben. Die Wechselwirkung der Partikeldispersion mit elektromagnetischen Wellen kann über den Extinktionsquerschnitt  $C_{ext}$  beschrieben werden. In Gleichung 2.14 ist der Extinktionsquerschnitt für kleine Partikel mit einer frequenzabhängigen, komplexen dielektrischen Funktion  $\epsilon = \epsilon' + i\epsilon''$  dargestellt [124].

$$C_{ext} = \frac{24\pi^2 r^3 \epsilon_m^{3/2}}{\lambda} \frac{\epsilon''}{(\epsilon' + 2\epsilon_m)^2 + \epsilon''^2} \quad (2.14)$$

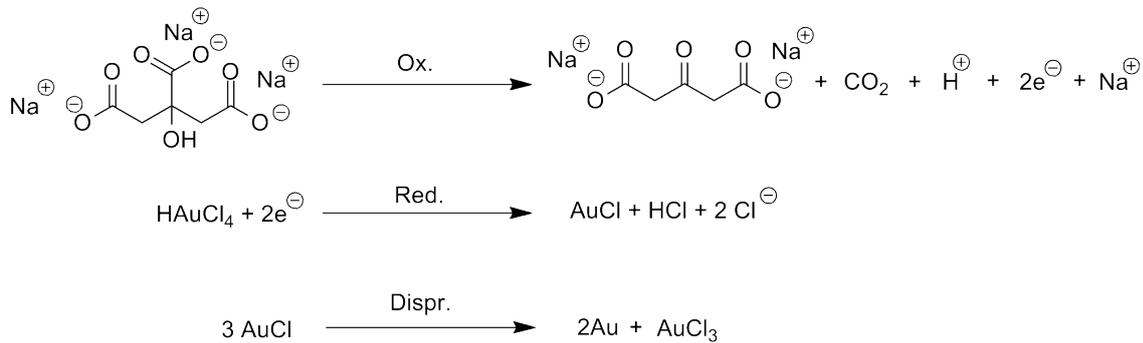
Hierbei ist  $r$  der Partikelradius,  $\epsilon_m$  die Permittivität des Dispersionsmittels,  $\lambda$  die Wellenlänge,  $\epsilon'$  der reale sowie  $\epsilon''$  der komplexe Teil der Permittivität der Nanopartikel. Eine ausführliche Herleitung von Gl. 2.14 kann in Ref. [125] nachgeschlagen werden. Anhand dieser Gleichung kann man erkennen, dass ein Absorptionsmaximum zu erwarten ist wenn folgende Bedingung erfüllt ist [126]:

$$\epsilon' = -2\epsilon_m. \quad (2.15)$$

Dieses Absorptionsmaximum wird Oberflächenplasmon genannt. Wird die Elektrodichte in den Partikeln durch Liganden reduziert, so verschiebt sich die Resonanzfrequenz zu niedrigeren Energien und eine Rotverschiebung im Spektrum kann beobachtet werden [127, 128]. Dies kann in Ligandenaustauschreaktionen zwischen mit Natriumcitrat stabilisierten Goldnanopartikeln und Thiolen, wie Mercaptoundecansäure, beobachtet werden [128, 129].

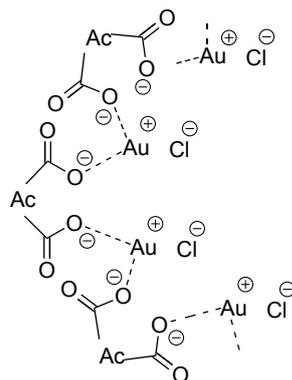
### 2.3.1.2. Synthese von Goldnanopartikeln

Goldnanopartikel (AuNP) können auf verschiedene Arten hergestellt werden. Unter anderem lassen sich AuNP mit Hilfe von physikalischen Methoden, wie der Laserablation, aus makroskopischem Gold herstellen (Top-down-Ansatz), aber es gibt auch zahlreiche Methoden die Goldnanopartikel mit chemischen Methoden, ausgehend von Goldsalzen im flüssigen Medium herstellen (Bottom-up-Ansatz) [130]. Die in dieser Arbeit hergestellten Nanopartikel wurden mit chemischen Methoden angefertigt. Für die Synthese von Goldnanopartikeln im flüssigen Medium gibt es zahlreiche Möglichkeiten. In dieser Arbeit wurden die Nanopartikel durch Reduktion von wässrigen Tetrachlorogoldsäure-Lösungen hergestellt [115, 117, 130, 131]. Faraday nutzte Phosphordampf als Reduktionsmittel [116]. Heute ist die Verwendung von Natriumcitrat als Reduktionsmittel eine weit verbreitete Methode [115]. Hierbei dienen die Citratmoleküle nicht nur als Reduktionsmittel, sondern stabilisieren auch die thermodynamisch instabilen neu gebildeten Nanopartikel. Diese Methode der Goldnanopartikelherstellung wurde 1951 von *Turkevich et al.* entdeckt und 22 Jahre später von Frens vereinfacht und optimiert [131, 132]. Frens fand heraus, dass man die Partikelgröße durch das Verhältnis von reduzierenden Citrat-Molekülen zu Goldsalz einstellen kann [131]. *Kumar et al.* veröffentlichten 2007 einen Mechanismus, der die Bildung von Goldnanopartikeln nach der Methode von Frens erklärt [133]. Es handelt sich hierbei um einen Nukleations-Wachstums-Mechanismus, bei dem das Partikelwachstum zeitlich von der Nukleation getrennt ist. Kumar und Mitarbeiter nahmen an, dass unmittelbar nach der Zugabe des Trinatriumcitrats eine schnelle Nukleation stattfindet. Nach der erfolgten Nukleation findet dann ein diffusionskontrolliertes Wachstum der Goldpartikelkeime statt. Hierbei bestimmt das Verhältnis von Citrat zu Goldionen über die Anzahl der während der Nukleation entstehenden Goldkeime. Eine wichtige Funktion des Citrats ist hierbei die Erzeugung von Acetondicarbonsäure (siehe Abb. 2.11), die durch die Oxidation des Citrats entsteht und durch eine stabilisierende Komplexbildung mit Au(I)Cl die vollständige Reduktion des Goldes ermöglicht [133]. Nach den in Abbildung 2.11 gezeigten Reaktionen wird in Wasser gelöstes  $\text{Au}^{3+}$  durch Citrat zu  $\text{Au}^+$  reduziert. Dieses bildet mutlimolekulare Komplexe mit Acetondicarbonsäure (siehe Abb. 2.12), die zu elementarem Gold und  $\text{Au}^{3+}$  disproportionieren. Das elementare Gold absorbiert



**Abbildung 2.11.** – Reaktionsschema der Reduktion von Tetrachlorogoldsäure zu elementarem Gold nach Ref [133].

weitere  $\text{Au}^+$ -Ionen. Diese Aggregate werden wiederum durch Acetondicarbonsäure komplexiert und so stabilisiert. So werden sukzessive größere Aggregate gebildet, die oberhalb einer kritischen Größe elementare Goldcluster bilden, die dann durch weitere über Disproportionierung gebildete Goldatome diffusionskontrolliert wachsen [133]. Die so gebildeten Partikel werden durch eine Citrathülle kinetisch stabilisiert. Ausgehend von diesem Mechanismus wäre die Stöchiometrie solcherart, dass man drei Citratmoleküle benötigt, um zwei Atome elementares Gold zu erhalten. Arbeiten von Frens haben jedoch kleinere Verhältnisse gezeigt. Es wird daher vermutet, dass Aceton, welches bei hohen Temperaturen als Nebenprodukt gebildet wird, ebenfalls dreiwertiges Gold reduzieren kann [131–133]. Diese Synthese liefert Partikel im Grö-



**Abbildung 2.12.** – Ausschnitt der multimolekularen Komplexe von einwertigem Goldchlorid mit Acetondicarbonsäure (nach Ref. [133]).

ßenbereich von 10 nm bis 40 nm mit zufriedenstellenden Größenverteilungen [131].

Größere sowie kleinere Partikel werden in höherer Qualität mit anderen Methoden hergestellt [117, 118]. Eine scharfe Trennung von Nukleation und Wachstum führt zu engen Größenverteilungen, da in kurzem Zeitraum gebildete Keime die gleiche Größe besitzen und ein diffusionskontrolliertes Wachstum größtenteils statistisch erfolgt und so die Größenverteilung nicht erhöht, teilweise wird sie sogar verringert [117]. Aus diesem Grund ist eine schnelle Nukleation im oben beschriebenen Prozess für die Größenverteilung von Vorteil. Anschließend sollte die Konzentration von gebildeten Goldatomen geringer sein als für eine Nukleation benötigt. Daher muss die Nukleation möglichst schnell erfolgen. Da Citrat nur bei hohen Temperaturen der Lage ist, das genutzte Goldsalz zu reduzieren, muss die oben genannte Synthese in siedendem Wasser durchgeführt und das Citrat möglichst schnell zur Reaktion gegeben werden. Die Nutzung des starken Reduktionsmittels  $\text{NaBH}_4$  ermöglicht es, die Synthese bei Raumtemperatur durchzuführen [117]. Bei dieser Synthese wird weiterhin Citrat als stabilisierender Ligand eingesetzt, kann jedoch von Beginn an in der Lösung vorliegen, da es das Goldsalz nicht reduzieren kann. Es werden nur kleine Mengen  $\text{NaBH}_4$  benötigt um das  $\text{Au}^{3+}$  zu reduzieren. Daher ist die Zugabegeschwindigkeit viel höher, und der Zeitraum der Nukleation viel präziser einzustellen [117]. Diese Art der Synthese ist für Nanopartikel im Größenbereich von 5 nm geeignet. Größere Partikel können mit der sogenannten Seeded-Growth-Methode hergestellt werden [117, 134]. Hierbei nutzt man aus, dass man auf einfache Weise kleinere monodisperse Goldpartikel herstellen kann und lässt diese dann bei Raumtemperatur in kleinen Schritten wachsen. Hierbei werden die kleinen Goldnanopartikel, Seeds genannt, in einer Dispersion mit dem vergleichsweise starken Reduktionsmittel Hydroxylamin vorgelegt und eine Goldsalzlösung langsam hinzugegeben. In diesem Fall muss die Zugabe langsam erfolgen, damit die Goldkonzentration zu keinem Zeitpunkt Konzentrationen erreichen kann, bei denen es zur Nukleation kommt [117, 134]. So können ohne weiteres monodisperse Partikel mit Größen bis 100 nm erreicht werden, nach *Brown et al.* können sogar Goldpartikel bis 200 nm Durchmesser erreicht werden [134].

### 2.3.1.3. Ligandenaustausch an Goldnanopartikeln

Da reine Goldnanopartikel thermodynamisch nicht stabil sind, müssen sie durch eine Ligandenhülle stabilisiert werden. Die Art der Ligandenhülle, auch Funktionalisierung genannt, bestimmt maßgeblich die chemischen Eigenschaften der Nanopartikel und deren Wechselwirkung mit ihrer Umgebung [106, 135]. Obwohl es eine große Vielzahl an verschiedenen Reaktionswegen gibt, Goldnanopartikel direkt herzustellen, sind nicht alle Funktionalisierungen über eine Direktsynthese realisierbar [115, 136]. Aus diesem Grund gibt es eine mindestens ebenso große Anzahl an Prozeduren, um die Funktionalisierung von Goldnanopartikeln zu ändern [115, 136]. Ein wichtiges Feld ist dabei der Austausch aller oder eines Teils der Liganden [115, 136]. Es gibt im Grunde zwei Triebkräfte, die einen Ligandenaustausch ermöglichen. Im ersten Fall kann der neue Ligand in hohem Überschuss in die Partikeldispersion gegeben werden (Prinzip von Le Chatelier). Diese Variante hat aber den Nachteil, dass viele Nanopartikeldispersionen und insbesondere Goldnanopartikel sensibel auf hohe Ionenstärken reagieren und einige Moleküle zur Fällung der Partikel, statt zum Ligandenaustausch führen [136, 137]. Citrat-funktionalisierte Goldnanopartikel werden zum Beispiel durch geringe Konzentrationen von Natriumchlorid irreversibel ausgefällt [138]. Im zweiten Fall wird ein schwach bindender Ligand auf der Nanopartikeloberfläche durch einen wesentlich stärker bindenden Liganden ausgetauscht. Ein Beispiel hierfür ist der Austausch von Citrat gegen alle Arten von Thiol-Liganden [31, 115, 139–143]. Oft werden beide Methoden kombiniert, um einen vollständigen Austausch zu gewährleisten [139]. Die hohe Affinität der Thiolgruppe zur Bindung an Gold wird mit dem HSAB-Konzept erklärt [144]. Nach diesem Konzept werden sind sowohl Thiol bzw. Thiolat und Gold als weich einzuordnen [115]. Ob die Thiol-Liganden als Thiolat oder Thiol auf die Goldoberfläche binden, ist aufgrund von widersprüchlichen Messdaten aus Röntgenphotoelektronenspektroskopie sowie Thermolyse-Messungen bisher nicht vollständig geklärt [115]. Die Bindung von Liganden mit Thiol-, Amino- oder Carbonsäuregruppen auf Nanopartikeln ist nicht mit kovalenten Bindungen zu vergleichen. Mit  $126 \text{ kJ mol}^{-1}$  Bindungsstärke für Thiol-Gold-Bindungen hat Thiol dabei die stärkste Bindung der erwähnten funktionalen Gruppen, sie liegt aber immer noch bei nur ca. 30% von einer kovalenten C-C-Bindung [145]. Dies hat zur Folge, dass die Liganden in einem dynamischen Gleichgewicht von gebundenem und ungebundenem

Zustand vorliegen. Dadurch wird ein Ligandenaustausch ermöglicht, dies reduziert aber auch die Stabilität der Partikel. Aufgrund der recht starken Thiol-Goldbindung sind mit Thiol-Liganden funktionalisierte Partikel jedoch vergleichsweise stabil und werden genutzt, um Goldpartikel für biochemische Anwendungen nutzbar zu machen [115, 135].

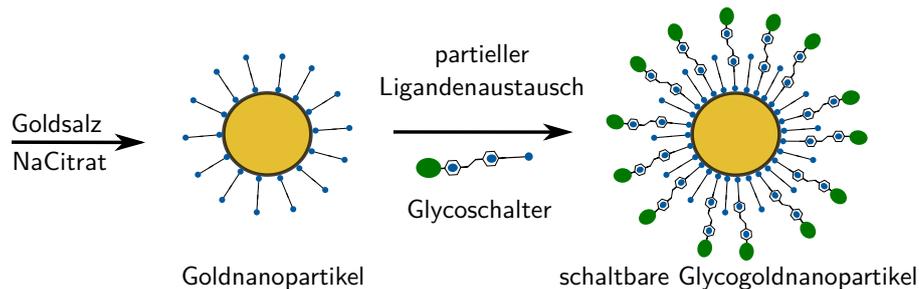
### 2.3.1.4. Schaltbare glycosilierte Goldnanopartikel

In Kapitel 2.2 wurde die in zahlreichen Bereichen anwendbare, Photoisomerisierung von Azobenzolphotoschaltern erklärt und darauf hingewiesen, dass diese ihre volle Effizienz erst dann entfalten kann, wenn das Molekül auf einer Oberfläche immobilisiert ist. Eine Möglichkeit der Oberflächenimmobilisation ist das Binden von Azobenzolen auf Goldnanopartikeln [44, 146].

Es gibt zahlreiche Anwendungen der auf Goldnanopartikeln immobilisierten Azobenzole. Unter anderem werden sie genutzt, um reversibel sich selbst anordnende Superkristalle [147] und molekulare Feldeffekttransistoren [148] zu erstellen oder um niedrigste Konzentrationen von Bisphenol A (BPA) nachzuweisen [149]. Azobenzol-Goldnanopartikel bieten dabei die Möglichkeit, sowohl die photoresponsiven Eigenschaften von Azobenzol (siehe Kap. 2.2.1) als auch die Oberflächenplasmonen von Goldnanopartikeln (siehe Kap. 2.3.1.1) in Kombination zu nutzen [148, 150]. Ein zusätzlicher Vorteil von Goldnanopartikeln als Substrat für Azobenzole sind die zahlreich etablierten Synthesewege und Funktionalisierungsmöglichkeiten [115, 136, 151, 152]. Die hohe Dichte und Ordnungszahl machen Goldnanopartikel zusätzlich zu hervorragenden Kontrastmitteln und erhöhen die Sensitivität in der Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPR-Spektroskopie), bei der das Signal vom Analytgewicht abhängt [115, 126]. Glycosilierte Goldnanopartikel, die z.B. Mannose auf ihrer Oberfläche präsentieren, können genutzt werden, um Zelloberflächen für Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zu markieren [115]. Dies ist möglich, da Mannose spezifisch FimH Adhäsin des Typs 1 bindet und diese Bindung durch die Präsentation auf Goldnanopartikeln verstärkt wird [153]. Wechselwirkungen zwischen Zellen finden oft über Polysaccharide, sogenannte Glycane statt. Die Wechselwirkung zwischen Zuckern findet über Wasserstoffbrücken statt, die für sich genommen allerdings schwach sind. Durch die multivalente Präsentation von Glycanen auf

Zelloberflächen können aber signifikante Bindungsstärken erreicht werden [154, 155]. Daher eignen sich Zuckermoleküle hervorragend um multivalente Wechselwirkungen zu untersuchen. Durch die Kombination von Azobenzolen und Zuckern ist es bereits gelungen, die Adhäsion von Bakterien auf Oberflächen mit Licht zu steuern [45]. Glycosilierte, schaltbare Goldnanopartikel vereinen die Möglichkeiten der drei beteiligten Systeme. Goldnanopartikel liefern das Substrat und die Möglichkeit, die multivalente Wechselwirkung der Zucker mit einer Oberfläche mittels SPR-Spektroskopie zu verfolgen und die Photoschalter ermöglichen eine nicht invasive Kontrolle dieser Wechselwirkung.

Ein häufig genutzter Weg solche Partikel herzustellen, ist zunächst mit Citrat geschützte Partikel der gewünschten Größe nach *Frens* zu synthetisieren. Anschließend wird der neue Ligand, in diesem Fall also der Glycophotoschalter, über einen Ligandenaustausch auf den Partikeln immobilisiert (siehe Abb. 2.13) [31]. Hierfür



**Abbildung 2.13.** – Skizzierte Darstellung der schrittweisen Synthese von mSAMs aus Citrat und Glycophotoschalterliganden, um schaltbare Goldnanopartikel zu erhalten.

eigenen sich Thiol-Liganden, aufgrund ihrer vergleichsweise starken Bindung zu Gold, besonders gut (vgl. Kap. 2.3.1.3). Hierbei ist zu beachten, dass typische Thiol-Linker, wie Mercaptoalkane oder PEG-Thiole, auf Goldnanopartikeln einen Platz von ca.  $0.2 \text{ nm}^2$  einnehmen [78]. Es hat sich gezeigt, dass Azobenzole bei dieser dichten Anordnung sterisch am Schalten gehindert werden. Erst oberhalb eines mittleren freien Platzes von ca.  $0.4 \text{ nm}^2$  sind Azobenzole auf Oberflächen schaltbar [78]. Aus diesem Grund werden Azobenzole häufig in Form von gemischten Ligandenschichten (*engl. mixed self assembled monolayer* mSAM) auf Goldnanopartikeln immobilisiert. Dies kann durch einen nur teilweisen Austausch erreicht werden. Zudem darf die Länge des Linkers nicht zu kurz (z.B. vier Kohlenstoffatome zwischen der Thiol-

gruppe und Azobenzol) sein, da sonst die Plasmonenresonanz der Goldpartikel die Photoisomerisation quencht [78]. Des Weiteren wird die thermische Relaxation der Azobenzole durch kooperative Effekte über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen beschleunigt [156].

### 2.3.2. Aufkonvertierungsnanopartikel - UCNP

Es gibt zahlreiche Arten von Aufkonvertierungspartikeln, die sich in der Art des Grundgerüsts als auch in der Dotierung unterscheiden [157]. In der vorliegenden Arbeit wurden mit den Lanthanoiden Ytterbium, Erbium und in einigen Fällen zusätzlich Gadolinium dotierte  $\text{NaYF}_4$ -Nanopartikel synthetisiert und genutzt. Daher werden im Folgenden die Eigenschaften anhand dieser Art Partikel erläutert. Die Informationen der folgenden Abschnitte wurden größtenteils aus den Publikationen von *Resch-Genger et al.* [157] sowie *Liu et al.* entnommen [158]. Für weiterführende Informationen wird daher auf diese und weitere Publikationen verwiesen [35, 36, 159, 160].

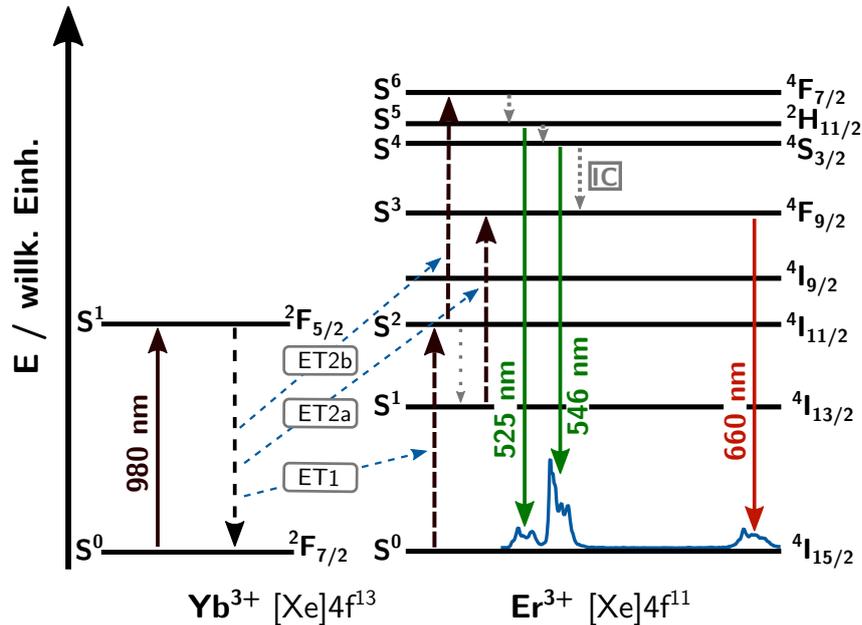
Mit Lanthanoiden dotierte Aufkonvertierungspartikel (engl. *upconversion nanoparticles* - UCNP) mit einer Grundstruktur aus  $\text{NaYF}_4$ , haben in den letzten Jahren viel Beachtung erlangt und ihren Weg in immer mehr Anwendungen gefunden [35, 36, 159, 160]. Sie sind in der Lage, mehrere Photonen mit geringer Energie im Nahinfrarotbereich, sequentiell zu absorbieren und Licht mit höherer Energie, im sichtbaren Bereich zu emittieren [157]. Im Vergleich zu dem nichtlinearen Prozess der Zweiphotonenabsorption, werden bei diesem Prozess reale Zustände angeregt, weshalb wesentlich geringere Anregungsintensitäten im Bereich von  $1 \text{ W cm}^{-2}$  bis  $500 \text{ W cm}^{-2}$  benötigt werden [158]. Die Anregung im Nahinfrarotbereich sorgt für größere Penetrationstiefen der Strahlung in biologische Proben, eine geringere Schädigung dieser und ein Ausbleiben von Autofluoreszenz [157]. Aus diesem Grund sind sie besonders attraktiv als Marker in der biologischen Bildgebung, bieten aber auch interessante Möglichkeiten für die Detektion von Bindungsvorgängen über Resonanzenergietransfer-Experimente [36, 161].

#### 2.3.2.1. Optische Eigenschaften von UCNP

Die speziellen optischen Eigenschaften von  $\text{NaYF}_4$ : Yb, Er-Nanopartikeln haben ihre Ursache in der Dotierung mit Ytterbium- und Erbium-Ionen. Ytterbium ( $\text{Yb}^{3+}$ )

dient hierbei als sogenannter *Sensitizer*, Erbium ( $\text{Er}^{3+}$ ) als *Aktivator*. Der *Sensitizer* absorbiert hierbei das Licht und transferiert die Energie über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf den *Aktivator*, welcher emittierende Zustände im sichtbaren Bereich aufweist [157]. Die Möglichkeit sequentiell mehrere Photonen zu absorbieren und diese Energie dann auf höher energetische Zustände zu transferieren, setzt unter anderem langlebige Zustände voraus [157]. Aufgrund dessen, dass die  $4f-4f$  Übergänge paritätsverboten sind, wird die Lebensdauer der angeregten Zustände von Lanthanoiden vergleichsweise lang [157]. Ytterbium eignet sich daher hervorragend als *Sensitizer*, da es nur einen emittierenden Zustand mit langer Lebensdauer und vergleichsweise hohem Absorptionsquerschnitt im Nahinfrarotbereich aufweist. Durch die geringe Zahl an angeregten Zuständen, werden konkurrierende Relaxationspfade reduziert [157]. In Abbildung 2.14 ist ein Schema der für die hier besprochenen optischen Eigenschaften relevanten Energieniveaus von  $\text{Yb}^{3+}$  und  $\text{Er}^{3+}$  in  $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ -Nanopartikeln dargestellt. Im Gegensatz zu  $\text{Yb}^{3+}$  weist  $\text{Er}^{3+}$  eine Vielzahl an emittierenden und nicht emittierenden angeregten Zuständen auf. Die Energieabstände zwischen einigen dieser Zustände stimmen mit dem Übergang in Ytterbium überein, so dass ein effizienter Energietransfer durch Resonanz stattfinden kann [158]. Nähere Informationen zu den verschiedenen Möglichkeiten des Erreichens der höher energetischen Zustände in Erbium, wie die Absorption des angeregten Zustands (engl. *excited state absorption* - ESA) oder die Energietransfer-Aufkonvertierung (engl. *energy transfer upconversion* - ETU), finden sich im Kapitel 2.6.4.

Nach der Absorption von Licht mit einer Wellenlänge von 980 nm durch Ytterbium, kann ein Energietransfer zum zweiten angeregten Zustand von Erbium ( $^4I_{11/2}$ ) erfolgen. Ein weiterer Energietransfer von einem angeregten Ytterbium-Ion kann Erbium in den Zustand  $^4F_{7/2}$  anregen. Stattdessen kann aber auch eine innere Umwandlung in Erbium von dem Zustand  $^4I_{11/2}$  in den ersten angeregten Zustand  $^4I_{13/2}$  erfolgen. Aus diesem kann eine Anregung in dritten angeregten Zustand  $^4F_{9/2}$  erfolgen. Letzterer ist ein im roten Wellenlängenbereich (660 nm) emittierende Zustand. Ausgehend von dem Zustand  $^4F_{7/2}$  werden die im grünen Wellenlängen Bereich emittierenden Zustände  $^4H_{11/2}$  (525 nm) und  $^4S_{3/2}$  (546 nm) über innere Umwandlung erreicht [157, 158]. Bei den hier erläuterten Anregungs- und Relaxationspfaden handelt es sich um die wichtigsten, aber keinesfalls die einzig möglichen Prozesse [158]. Die Energiedifferenz zwischen einigen Zuständen in Erbium, insbesondere zwischen



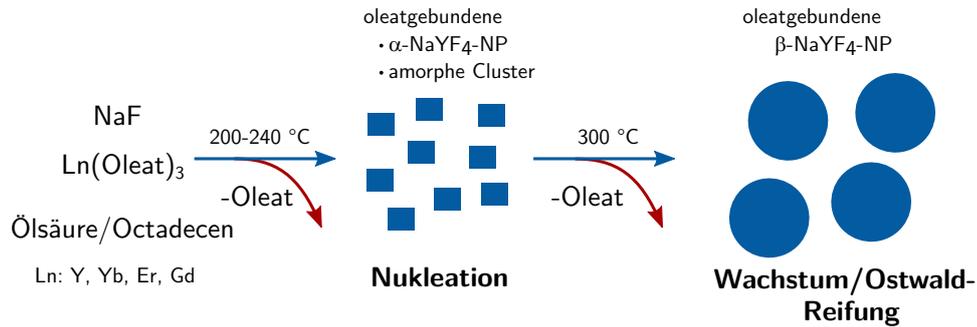
**Abbildung 2.14.** – Schematische Darstellung der Energieniveaus mit Termsymbolen nach Russel-Saunders-Kopplung der relevanten Übergänge von  $\text{Yb}^{3+}$  und  $\text{Er}^{3+}$  in  $\text{NaYF}_4$ : Yb, Er-Nanopartikeln, die zur Aufkonvertierung der 980 nm Anregungsstrahlung führen. Farblich durchgezogene Linien stehen für optische Übergänge, gestrichelte, schwarze für Anregungen mit Energietransfer. Grau gestrichelte Linien stehen für nicht strahlende Relaxation (innere Umwandlung). Zur Verdeutlichung der Übergänge ist ein Fluoreszenzspektrum von Aufkonvertierungsnanopartikeln eingefügt. Die Abbildung wurde nach Vorlagen aus Ref. [162] und Ref. [157] erstellt.

den Zuständen  $^4I_{11/2}$  und  $^4I_{13/2}$ , liegt in der Größenordnung von den Streckschwingungen der Hydroxygruppe ( $\nu(\text{OH})$ :  $3300 - 3700 \text{ cm}^{-1}$ ) und C-H-Streckschwingungen ( $\nu(\text{CH})_n$ :  $2800 - 2950 \text{ cm}^{-1}$ ) von organischen Molekülen und Wasser [163]. Wechselwirkungen an der Partikeloberfläche mit Lösungsmitteln oder Liganden, welche diese Schwingungen aufweisen, führen zu signifikant erhöhten Abklingraten des jeweiligen Zustands. Dies reduziert die Gesamtemission, erhöht aber Vergleichsweise die Population des rot emittierenden Zustands  $^4F_{9/2}$  und reduziert die Population der höher liegenden Zustände. Dadurch wird das Verhältnis der Bandenintensitäten zwischen der grünen Bande um 540 nm und der roten Bande um 660 nm  $I_{gr}/I_{rot}$  in Wasser reduziert, oder auch wenn das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses steigt. Letzteres bedeutet, dass größere Partikel ein höheres Verhältnis  $I_{gr}/I_{rot}$  aufweisen und weniger durch Wechselwirkungen mit Lösungsmitteln gequencht werden [157, 158, 163].

Die Kristallstruktur der  $\text{NaYF}_4$ -Grundstruktur hat ebenfalls einen Einfluss auf die Emissionseigenschaften.  $\text{NaYF}_4$  kann in einem symmetrischen, kubisch-flächenzentrierten Fluoritgitter vorliegen, in dem die Natrium- und Lanthanoid-Ionen die Plätze von  $\text{Ca}^{2+}$  einnehmen ( $\alpha\text{-NaYF}_4$ ) oder in einem unsymmetrischen hexagonalen Kristallgitter ( $\beta\text{-NaYF}_4$ ), in dem die Fluor-Ionen eine geordnete hexagonale Struktur aufbauen und die Natrium- und Lanthanoid-Ionen Plätze mit niedriger Symmetrie einnehmen [164]. Hierbei hat sich gezeigt, dass  $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Yb,Er}$ -Nanopartikel ungefähr um das Zehnfache höhere Aufkonvertierungseffizienzen aufweisen [164].

### 2.3.2.2. Synthese von oleatfunktionalisierten UCNP

Aufkonvertierungspartikel (UCNP) können mit zahlreichen Methoden erhalten werden. Hierunter zählen unter anderem die hydrothermischen und solvothermischen Methoden, die unter hohem Druck in wässrigen oder organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden [165, 166]. Eine der am häufigsten angewandten Methoden, welche auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde, ist die thermische Zersetzung von Vorstufen [164, 167–169]. Bei der Methode von *Wang et al.* werden Lanthanoidchloride, stöchiometrische Mengen an  $\text{NH}_4\text{F}$  und  $\text{NaOH}$  als Vorstufen genutzt. Hierbei bestimmt die Menge an eingesetztem Gadolinium, das Teile der Yttrium-Ionen im Kristallgitter ersetzt, über die Größe und Kristallstruktur der Partikel [164]. So wurden erstmals  $\beta\text{-NaYF}_4$ -Nanopartikel mit vergleichsweise geringen Temperaturen und kurzen Reaktionsdauern im Bereich von 2 h erhalten [164]. Hierbei zeigte sich, dass durch Dotierung mit Gadolinium-Ionen die hexagonale Kristallstruktur forciert werden kann, die sonst erst nach teilweise tagelangem Tempern erhalten wurde [164]. In der hexagonalen Phase werden die Elektronenwolken durch die unsymmetrischen Gitterlücken verzerrt [164]. Atome die im Vergleich zu Yttrium große Ionenradien aufweisen, wie zum Beispiel Gadolinium, haben durch eine erhöhte Dipol-Polarisierbarkeit eine hohe Tendenz zu solchen Verzerrungen und favorisieren daher die hexagonale Phase [164]. Bei der Methode von *Na et al.* werden Lanthanoidoleate als Vorstufen genutzt. Hierbei entscheidet sowohl die genutzte Dotierung als auch das Verhältnis des Lösungsmittels 1-Octadecen zum Koordinierenden Liganden Ölsäure über Größe, Form und Kristallstruktur der Partikel [169]. Eine schematische Darstellung eines möglichen Mechanismus ist in Abbildung 2.15 dargestellt. Der



**Abbildung 2.15.** – Schematische Darstellung eines möglichen Mechanismus der Bildung von  $\beta$ - $\text{NaYF}_4$ : Yb, Er-Nanopartikeln durch thermische Zersetzung von Lanthanoidoleatvorstufen und aus  $\text{NaOH}$  und  $\text{NH}_4\text{F}$  gebildetem Natriumfluorid. Für die Erstellung dieser Abbildung wurden Erkenntnisse aus Veröffentlichungen von *Park et al.* über die thermische Zersetzung von Eisenoleaten [167], von *Li et al.* über die thermische Zersetzung von Lanthanoidchloriden [170] sowie von *Mai et al.* über die Zersetzung von  $\text{Ln}(\text{CF}_3\text{COO})_3$  genutzt [171].

Mechanismus für die thermische Zersetzung von Lanthanoidoleatvorstufen ist nach Wissen des Autors noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Lanthanoidoleate scheinen aber thermisch stabiler zu sein als beispielsweise die Lanthanoidchloride, welche sich bereits bei Raumtemperatur zu amorphen  $\text{NaYF}_4$ -Clustern ausbilden [170]. Generell kann aber gesagt werden, dass bei der thermischen Zersetzung die Nukleation und das Partikelwachstum über die Temperatur getrennt sind, da ein signifikantes Wachstum und die Änderung der Kristallstruktur von kubisch zu hexagonal erst oberhalb von  $300\text{ °C}$  stattfinden [168, 170, 171]. Dabei wird in den meisten Fällen angenommen, dass die Partikel über Ostwaldreifung eine sphärische und gleichmäßige Form annehmen [168, 170]. Die resultierenden Partikel sind mit Monolagen aus, über Koordinationsverbindungen gebundene, Ölsäuremoleküle stabilisiert. Für die Nutzung in wässrigen oder physiologischen Lösungen müssen sie daher umfunktionalisiert werden.

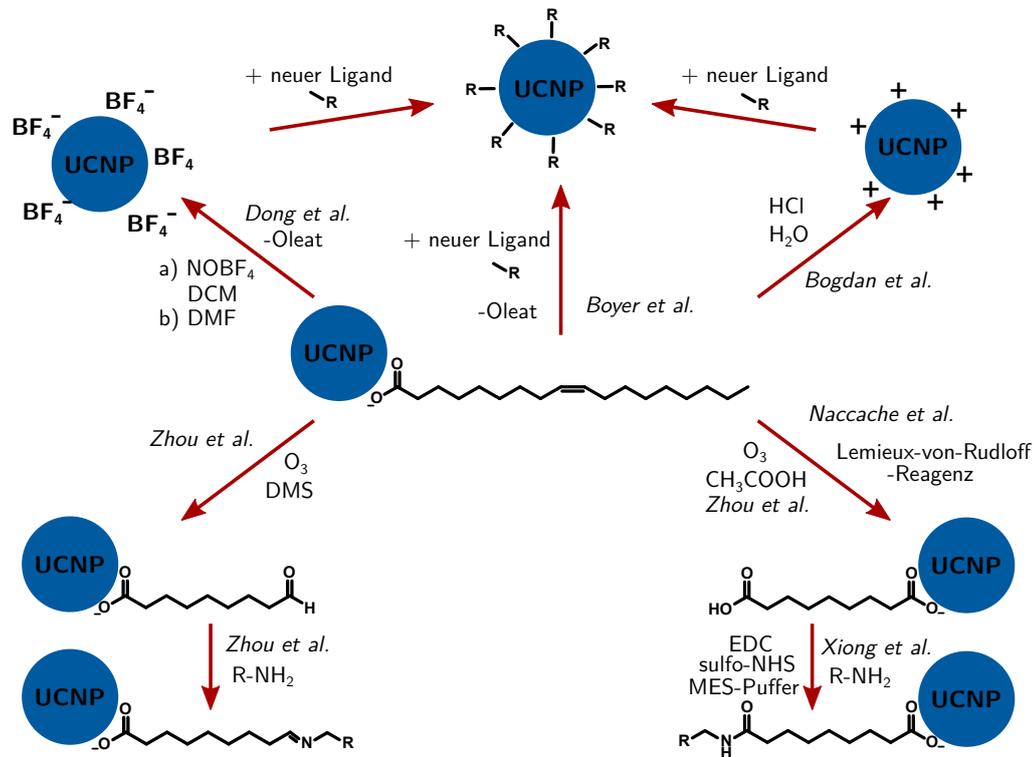
### 2.3.2.3. Umfunktionalisierung von UCNP

Aufkonvertierungsnanopartikel (UCNP) können über Ligandenaustauschreaktionen [172–174], chemische Veränderung [175–177] oder Umhüllung der bereits vorhandenen Liganden umfunktionalisiert werden [168, 178]. Da die Partikel im Rahmen dieser Arbeit als FRET-Donoren dienen sollten, scheidet die letztgenannte Methode der Umhüllung mit beispielsweise einer Silicaschale [178] oder langkettigen PMMA-

Polymeren [168] aus, da der FRET-Prozess äußerst abstandsensitiv ist (vgl. Kap. ??). Zahlreiche Methoden liefern stabile Partikel, die ohne weiteres in physiologischen Lösungen und Puffern stabil sind. Allerdings nutzen diese langkettige Polymere wie Polyethylenglycol [176] oder PMMA [168, 179] aus. Aus diesem Grund kommen nur chemische Reaktionen an den vorhandenen Ölsäureliganden oder ein direkter Ligandenaustausch in Frage. Eine Methode ist die Oxidation der Ölsäure-Doppelbindung, so dass man mit Azelainsäure oder 9-Oxononansäure funktionalisierte Partikel erhält. Im Fall der Azelainsäure können dann über eine Amidbindung [176] und im Fall der 9-Oxononansäure über eine Schiff-Base-Kondensation [177] neue Moleküle auf den Partikeln immobilisiert werden. In Abbildung 2.16 sind einige mögliche Umfunktionalisierungsstrategien schematisch dargestellt. Mit besonders stark bindenden Liganden, wie Phosphaten, ist ein direkter Ligandenaustausch möglich [172]. Eine besonders vielseitige Methode wurde von *Dong et al.* veröffentlicht. Hierbei wird mit  $\text{NOBF}_4$  die Ölsäure in Gegenwart von DMF entfernt, so dass die Partikel anschließend mit dem schwach bindenden Ion  $\text{BF}_4^-$  sowie DMF stabilisiert sind. Mit diesen Partikeln sollen mit zahlreichen Liganden Austauschreaktionen durchführbar sein [173].

## 2.4. Photolabile Schutzgruppen

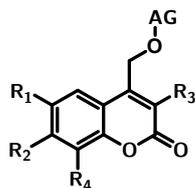
Als Photokäfige werden Moleküle bezeichnet, die mit anderen Molekülen photolabile Bindungen eingehen können [181]. Meist werden aktive Biomoleküle und Wirkstoffe an die Photokäfige gebunden. Durch die Kupplung an den Photokäfig wird das gebundene Molekül inaktiviert oder es wird vor dem Abbau durch Chemikalien oder Enzyme geschützt [36, 38, 42, 181]. Durch die, mit hoher lokaler und zeitlicher Präzision durchführbare, lichtkontrollierte Freisetzung von aktiven Molekülen, können chemische und biologische Prozesse untersucht werden [18, 38, 182]. Die vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten haben in den letzten Jahren zu großem Interesse geführt [36]. Ein Großteil der Forschung beschäftigt sich hierbei mit der Entwicklung von neuen Photokäfigen und der Charakterisierung von Konjugaten aus bekannten Photokäfigen mit neuen Molekülen [42, 182, 183]. Photokäfige, die mittels Zweiphotonenabsorption photolysiert werden können, bilden hierbei eine besondere Klasse [184, 185]. Die besonderen Eigenschaften der Zweiphotonenabsorption (vgl.



**Abbildung 2.16.** – Schematische Darstellung von möglichen Methoden zur Umfunktionalisierung von oleatfunktionalisierten UCNP. Die Doppelbindung der Ölsäure kann durch Oxidation in eine Carbonsäure oder einen Aldehyd umgewandelt werden, so dass eine Weiterreaktion mit Aminen möglich ist [175, 177]. Methoden von *Bogdan et al.* und *Dong et al.* beinhalten das Entfernen der Ölsäure, bzw. den Austausch mit dem schwach bindenden Liganden  $\text{NOBF}_4$ . Anschließend kann ein Austausch mit einem fast beliebigen Liganden erfolgen [173, 180]. Für den direkten Ligandenaustausch nach *Boyer et al.* werden besonders stark bindende Liganden, wie Phosphatliganden, benötigt [172].

Kap. 2.6.2) erweitern die Anwendungsmöglichkeiten der Photokäfige. Durch die lokale Auflösung der Zweiphotonenfreisetzung, die im Bereich von Femtolitern liegt, ist zum Beispiel eine neuartige Erforschung der Signaltransduktion in Nervenzellen möglich [38, 186]. Daher ist die Erforschung von Photokäfigen mit immer größeren Zweiphotonenabsorptionsquerschnitten und -photolyseeffizienzen ein wichtiger Forschungsbereich [184, 185, 187–191].

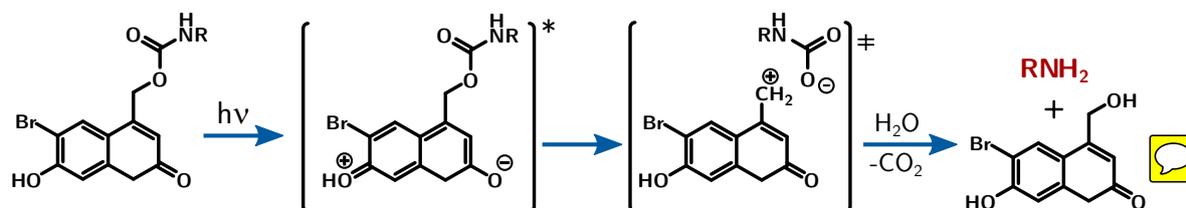
Eine häufig genutzte und untersuchte Gruppe von Photokäfigen, die sich zur Zweiphotonenabsorption eignen, sind photolabile Cumarinschutzgruppen wie das Molekül **BhcOH** (siehe Abb. 2.17) [183, 190, 192–196]. **BhcOH** war einer der ersten Photokäfige, der eine, für Experimente mit Zweiphotonenfreisetzung als nötig



**BhcOH:**  $R_1$ : Br,  $R_2$ : OH,  $R_3 + R_4$ : H

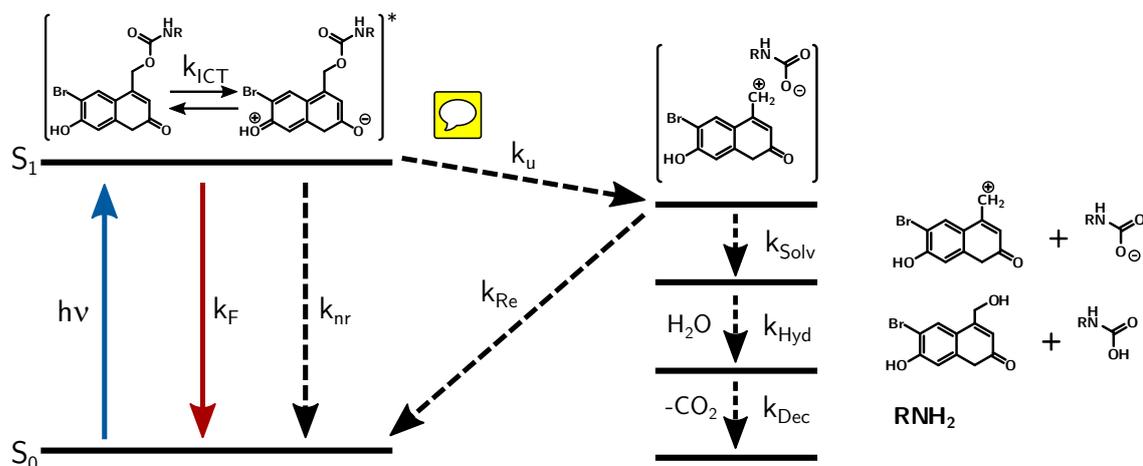
**Abbildung 2.17.** – Allgemeine Strukturformel einer Klasse von Coumarin-Photokäfigen. Die Reste  $R_1$  und  $R_3$  sind häufig mit Brom oder Chlor substituiert [190, 194, 197] wohingegen sich an den Positionen  $R_2$  und  $R_4$  häufig Biomoleküle oder organische Reste befinden [195, 196].

erachtete, Freisetzungseffizienz  $\sigma_{2,u}$  von über 0.1 GM aufwies [190] und ist seitdem vielseitig eingesetzt worden [195, 198–201]. Die Reaktionsgleichung der Photolyse ist in Abbildung 2.18 dargestellt. Es wurden zahlreiche Studien durchgeführt, um den



**Abbildung 2.18.** – Vorgeschlagene Reaktionsgleichung der Photolyse von einem mit **BhcOH** geschützten Amin. Der angeregte Zustand ist mit \* markiert und weist eine ausgeprägte Ladungsverteilung auf. Anschließend bildet sich ein Ionenpaar, das durch Abspalten von  $\text{CO}_2$  und Hydrolyse zu dem Alkohol **BhcOH** und dem freien Amin (rot hervorgehoben) reagiert [196, 198].

Mechanismus der Photolysereaktion zu ermitteln [193, 196, 202]. Es konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden, ob die Photolyse über eine heterolytische Spaltung oder eine homolytische Spaltung erfolgt [193]. Studien von *Herzig et al.* lassen die heterolytische Spaltung als wahrscheinlicher erscheinen [193]. Im Folgenden wird daher der Mechanismus für die heterolytische Photolyse eines mit **BhcOH** geschütztenamins vorgestellt. In Abbildung 2.19 ist hierzu ein Energieschema mit den beteiligten Prozessen, ihrer Geschwindigkeitskonstanten und den Zwischenprodukten dargestellt. Die absoluten Energien der Energieniveaus sind willkürlich gewählt und nur als relativ zu betrachten. Durch die Anregung mit UV-Licht oder durch Zweiphotonenabsorption wird zunächst ein lokal angeregter Zustand bevölkert, welcher dann mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{ICT}$  einen Ladungstransfer durchläuft. Von hier kann das Molekül auf drei Wegen relaxieren: entweder über Emission ( $k_F$ ), über



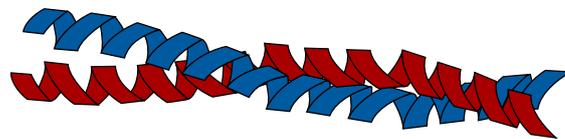
**Abbildung 2.19.** – Vorgeschlagerener Mechanismus der Photolyse von einem mit **BhcOH** geschützten Amin ( $RNH_2$ ). Die Absorption ist als blauer Pfeil, die Fluoreszenz als roter Pfeil und strahlungslose Prozesse als gestrichelte Pfeile dargestellt. Zusammengetragen aus den Referenzen [193, 196, 202]. Weitere Informationen befinden sich im Text.

innere Umwandlung ( $k_{nr}$ ) oder durch Photolyse mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_u$ . Durch die heterolytische Photolyse entsteht ein Ionenpaar. Dieses kann entweder mit der Konstante  $k_{re}$  zum Ausgangsmolekül rekombinieren oder die Ionen trennen sich mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{Solv}$  und werden solvatisiert. Anschließend erfolgt eine Hydratisierung der Ionen ( $k_{Hyd}$ ) und zuletzt eine Decarboxylierung ( $k_{Dec}$ ), bei der Kohlenstoffdioxid abgespalten wird. *Herzig et al.* konnten hierbei zeigen, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Decarboxylierung des Carbamats ist [193].

## 2.5. Peptide

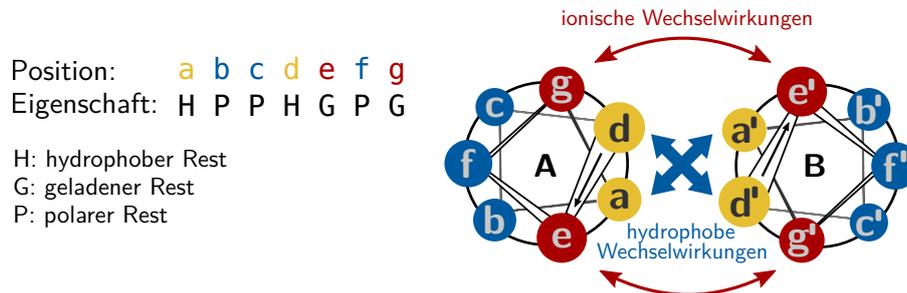
Peptide sind ein essentieller Baustein des Lebens, sie übernehmen zentrale Aufgaben in allen lebenden Organismen und Zellen. Hierunter zählen unter anderem die Signaltransduktion [203] und der Ionentransport [204, 205], sie wirken zudem als Hormone [206] oder als Gift [207]. Peptide sind aus Aminosäuren aufgebaut, deren Reihenfolge die Primärstruktur darstellt. Durch die Aminosäurereste und deren Position in der Sequenz werden die Eigenschaften und Struktur des Peptides bestimmt. Bereiche im Peptid, die eine regelmäßige Struktur aufweisen, werden als Sekundärstruktur

bezeichnet. Hierunter zählen unter anderem die  $\alpha$ -Helix, das  $\beta$ -Faltblatt und das *Random Coil*. Die letztgenannte Sekundärstruktur bezeichnet einen Bereich, der keine definierte Struktur aufweist [208]. Die Tertiärstruktur eines Peptids oder Proteins entspricht der Gesamtkonformation einer Aminosäuresequenz, wohingegen die Quartärstruktur die Gesamtkonformation von Komplexen aus mehreren Aminosäuresequenzen bezeichnet. Beispiele für Quartärstrukturen sind die Tetramere von Concanavalin A [209] und die *Coiled-Coil*-Struktur, welche eine superspiralisierte  $\alpha$ -Helix aus zwei oder mehr  $\alpha$ -helikalen Peptiden darstellt (siehe Abb. 2.20) [47]. Das



**Abbildung 2.20.** – Schematische Darstellung eines *Coiled-Coil*-Heterodimers.

*Coiled-Coil*-Motiv kommt in der Natur häufig vor, ca. 3% bis 5% aller Aminosäuren in Proteinen bilden dieses Motiv [210]. Es wurde von *Crick* im Jahr 1953 beschrieben [211]. Typischerweise werden linkshändige Helices gebildet. Hier ist jede Position in der Sequenz alle zwei Helixwindungen bzw. nach 7 Aminosäuren wieder mit einer ähnlichen Aminosäure besetzt [210]. Diese Abfolge aus 7 Aminosäuren wird auch als Heptadenmuster bezeichnet. Den Positionen in einem Heptadenmuster werden Buchstaben von a bis g zugeordnet (siehe Abb. 2.21). Hierbei werden die Positionen a und d stets mit Aminosäuren besetzt, die einen hydrophoben Rest aufweisen. Die Positionen e und g werden von Aminosäuren mit geladenen Resten eingenommen und die restlichen Positionen von polaren Aminosäuren [210]. In wässriger Lösung ordnen sich zwei oder mehr Peptide so an, dass die hydrophoben Aminosäuren von dem Lösungsmittel abgeschirmt werden und die polaren Aminosäuren zum Lösungsmittel hin ausgerichtet sind. Durch die periodische Anordnung der Aminosäuren wird so die *Coiled-Coil*-Struktur ausgebildet. Die hydrophoben Reste greifen wie in einer Art Reißverschluss ineinander und bilden den Kern der Struktur. Attraktive Wechselwirkungen zwischen den geladenen Aminosäureresten stabilisieren die Struktur zusätzlich (vgl. Abb. 2.21) [210]. Pro Heptadenmuster bilden zwei hydrophobe Aminosäuren (Positionen a, a' und d, d') und zwei geladene Aminosäuren (Positionen g, e' und e, g') Bindungen aus (vgl. Abb. 2.21). Daraus folgt, dass eine sieben Aminosäuren



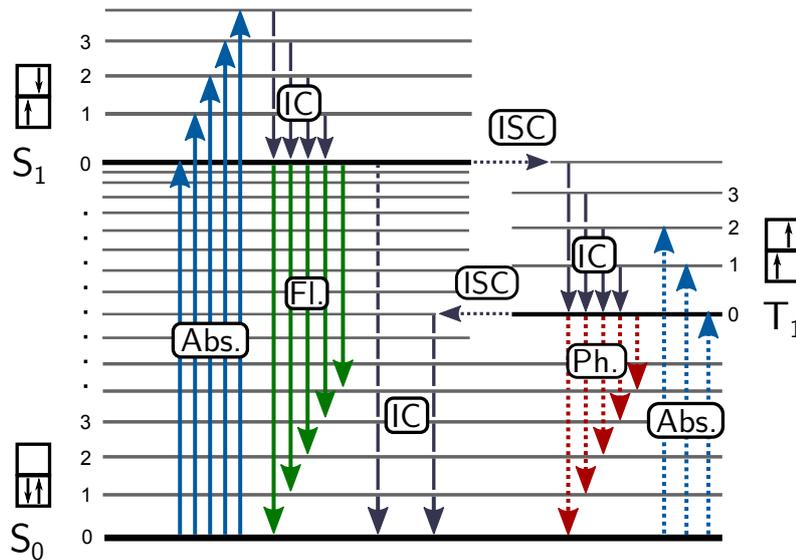
**Abbildung 2.21.** – In *Coiled-Coil*-Peptiden sind die Aminosäuren in einem periodischen Muster von 7 Aminosäuren, welches auch als Heptadenmuster bezeichnet wird, angeordnet. Die Helixrad-Darstellung zeigt die Anordnung der Aminosäuren im *Coiled Coil*. Auf einer spezifischen Position muss sich nicht zwangsläufig die gleiche Aminosäure befinden, es kommt vielmehr auf die Eigenschaft des Restes an [210]. Weitere Informationen sind im Text zu finden.

umfassende Sequenz eine Valenz von 4 aufweist [210]. So kann durch Einstellung der Anzahl der Heptadenmuster die Valenz der Peptide kontrolliert eingestellt werden. Mit Hilfe der geladenen Aminosäuren lassen sich die attraktiven und abstoßenden Wechselwirkungen zwischen zwei Peptiden so einstellen, dass Heterodimer bildende Peptide maßgeschneidert werden können [64].

## 2.6. Methoden

### 2.6.1. UV/VIS- und Fluoreszenzspektroskopie

Optische Spektroskopie beruht auf der Anregung von elektronischen Zuständen mit Licht vom Nahinfrarotbereich bis in den UV-Bereich des Wellenlängenspektrums (ca. 0.5-6 eV). Die typischen elektronischen Übergänge und Relaxationspfade sind in Abbildung 2.22 in Form eines sogenannten Jablonski-Diagramms dargestellt. Man unterscheidet zwischen erlaubten und verbotenen Übergängen. Es sind nur Übergänge erlaubt, bei denen sich der Gesamtspin nicht ändert, wobei diese Regel nur für leichte Systeme streng gilt [84]. Des Weiteren besagt die sogenannte Laporte-Regel, dass bei Atomen und Molekülen mit Inversionszentrum Übergänge mit gleicher Parität verboten sind [213]. Diese Auswahlregeln sowie die Stabilisierung der jeweiligen Zustände, bestimmen über die Anregungs- und Relaxationspfade in einer spezifischen Probe [84, 213, 214]. In typischen Chromophoren werden  $\pi$ -Elektronen ( $\pi$ - $\pi$ -Übergang) oder freie Elektronenpaare (n- $\pi$ -Übergang) durch Absorption von elektromagnetischer



**Abbildung 2.22.** – Darstellung eines Jablonski-Diagramms zur Beschreibung der typischen Anregungs- und Relaxationspfade in der optischen Spektroskopie. Blaue Pfeile beschreiben Absorptionsprozesse, grüne Pfeile Fluoreszenz, rote Pfeile Phosphoreszenz, gestrichelte Linien innere Umwandlung (IC) und gepunktete Linien zeigen an, dass es sich um einen verbotenen Übergang, wie beispielsweise die Interkombination (ISC) vom Singulettzustand  $S_1$  in den Tripletzustand  $T_1$ , handelt. Die Informationen für die Abbildung wurden aus den Referenzen [84] und [212] erhalten.

Strahlung zwischen 190 nm bis 800 nm angeregt [215]. Hierbei werden elektronische Zustände  $S_n$  und deren zahlreiche Schwingungs- und Rotationszustände bevölkert [84, 212, 215]. Nach der Absorption können verschiedene Relaxationsprozesse stattfinden. Bei der inneren Umwandlung (engl. *internal conversion* - IC) wird die Anregungsenergie in Form von Schwingungs- und Rotationsquanten an die Umgebung abgegeben. Dieser Prozess ist in Lösungsmitteln gegenüber der Emission meist bevorzugt, daher ist in der Regel nur Emission aus dem tiefsten elektronisch angeregten Zustand zu beobachten. Dieser Effekt wird auch als Kasha-Regel bezeichnet [84]. Des Weiteren kann ein verbotener Wechsel der Spin-Multiplizität in einen Tripletzustand stattfinden. Dieser Prozess wird als Interkombination (engl. *inter system crossing* - ISC) bezeichnet. Emission aus dem Tripletzustand in den Singulettgrundzustand ist zum Beispiel ebenfalls ein verbotener Übergang und wird als Phosphoreszenz bezeichnet. Aufgrund des Verbots von bestimmten Übergängen ist deren Wahrscheinlichkeit gering, dies führt zu langen Lebensdauern der Relaxationsprozesse sowie meist auch

zu geringen Absorptionsquerschnitten [84, 212, 215].

In der UV/VIS-Spektroskopie werden üblicherweise in einem Lösungsmittel gelöste Chromophore untersucht. Die Absorption der Strahlung durch die Probe kann für verdünnte Lösungen mit dem Lambert-Beerschen-Gesetz beschrieben werden [84, S. 299]:

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon cd . \quad (2.16)$$

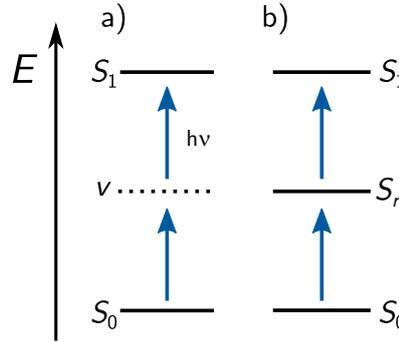
Hierbei ist  $I_0$  die Intensität der auf die Probe eintreffenden Strahlung und  $I$  die Strahlung nach dem Durchleuchten der Probe.  $\epsilon$  ist der molare dekadische Extinktionskoeffizient in  $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ,  $d$  die Länge des optischen Pfads durch die Probe in cm und  $c$  die Konzentration in  $\text{mol L}^{-1}$ . der Ausdruck  $\log(\frac{I_0}{I})$  wird auch als optische Dichte (OD) der Probe bezeichnet.

Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz oder Phosphoreszenz hängt von deren Quantenausbeute  $\Phi$  ab. Diese ist Definiert als der Quotient aus der Anzahl der emittierten Photonen pro Zeiteinheit  $N_P^{em}$  und der Anzahl der absorbierten Photonen pro Zeiteinheit  $N_P^{abs}$  [216]:

$$\Phi = \frac{N_P^{em}}{N_P^{abs}} . \quad (2.17)$$

### 2.6.2. Zweiphotonenabsorption

Die Zweiphotonenabsorption ist ein nichtlinearer Prozess, der erst ab einer gewissen Feldstärke des anregenden Lichtes stattfindet [84]. Sie wurde 1931 von der Physik-Nobelpreis-Trägerin Maria Goeppert-Mayer vorhergesagt [217]. Die für die Zweiphotonenabsorption benötigten Intensitäten betragen ungefähr das  $10^6$ -fache der Intensitäten in der linearen Spektroskopie, welche im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurde [218]. Diese großen Intensitäten werden benötigt, da die zeitgleiche Absorption von zwei Photonen erfolgen muss. Zeitgleich bedeutet hierbei innerhalb eines Zeitraums von ca.  $10^{-18} \text{ s}$  [219], dies entspricht der Zeitskala auf der sich Elektronenbewegungen vollziehen [220]. Die Zweiphotonenabsorption verläuft meistens über virtuelle, in wenigen Fällen aber auch über resonante Zwischenzustände (siehe Abb. 2.23) [221]. Durchleuchtet Licht eine Chromophor-Lösung, kann die Reduktion der Intensität  $\Delta I_2$  durch Zweiphotonenabsorption in Photonen  $\text{cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$



**Abbildung 2.23.** – Schematische Darstellung eines Zweiphotonenprozesses, der über einen virtuellen  $v$  (a) oder resonanten Zwischenzustand  $S_r$  (b) stattfinden kann [221].

mit Gleichung 2.18 beschrieben werden [222]:

$$\Delta I_2 = -\sigma_2 N d I_0^2 . \quad (2.18)$$

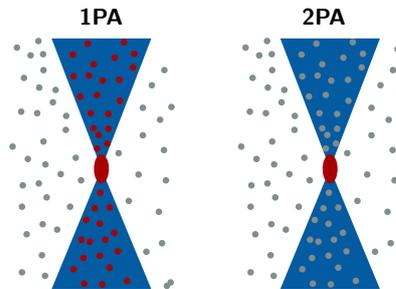
Hierbei ist  $I_0$  die Intensität der einfallenden Strahlung in Photonen  $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $N$  die Anzahl der Moleküle in  $\text{cm}^{-3}$ ,  $d$  der optische Pfad in dem Zweiphotonenabsorption stattfindet und  $\sigma_2$  ist der Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt in  $\text{cm}^4 \text{s}$  [219, 222]. Typische Werte von  $\sigma_2$  liegen in der Größenordnung von  $10^{-50} \text{cm}^4 \text{s}$  [38, 223]. Aus diesem Grund wird die nach Maria Goeppert-Mayer benannte Einheit GM, wobei 1 GM  $10^{-50} \text{cm}^4 \text{s}$  entspricht, verwendet [219]. Da die Absorptionsänderungen auch bei Molekülen mit vergleichsweise hohen Zweiphotonenabsorptionsquerschnitten ( $\sigma_2 \approx 100 \text{GM}$ ) extrem gering sind, ist eine direkte Messung der Absorption äußerst schwierig [222]. Daher wird in den allermeisten Fällen  $\sigma_2$  von Farbstoffen und Photokäfigen über die Fluoreszenz nach Zweiphotonenabsorption ermittelt [38, 222, 224]. Das Fluoreszenzsignal  $F_2$  nach Zweiphotonenabsorption kann mit Gleichung 2.19 beschrieben werden [190]:

$$F_2 = \frac{1}{2} \Phi_G \Phi_F \sigma_2 N \langle I_0^2(t) \rangle \int S^2(r) dV . \quad (2.19)$$

Hierbei sind  $\Phi_G$  die Sammeleffizienz des Detektors,  $\Phi_F$  ist die Fluoreszenzquantenausbeute,  $\langle I_0^2(t) \rangle$  entspricht der quadrierten mittleren Lichtintensität und  $\int S^2(r) dV$  ist eine einheitenlose räumliche Verteilungsfunktion, wobei über das Messvolumen integriert wird [190]. Die Verteilungsfunktion ist nötig, da die Intensität des Anre-

gungslichtes im Fokus stark variiert und dies einen großen Einfluss auf die Absorption hat [190, 225]. Eine ausführliche theoretische Behandlung kann in Ref. [226] und [227] nachgelesen werden. Die absolute Bestimmung von  $\sigma_2$  ist ein äußerst aufwendiger Prozess, daher gibt es nur wenige zuverlässige Quellen für Referenzfarbstoffe [222, 226, 227]. Aus diesem Grund greifen die meisten Forscher auf diese wenigen Referenzwerte zurück [222].

Durch die große Abhängigkeit der Zweiphotonenabsorption von der Intensität des Anregungslichtes, kann dessen Intensität so eingestellt werden, dass nur im Fokus des Anregungsstrahls Licht absorbiert wird. Dies ermöglicht eine hohe räumliche Auflösung von bis zu einem Femtoliter [186]. Dieses Prinzip ist in Abbildung 2.24 skizziert. Durch Anwendung von Laserstrahlung im Nahinfrarotbereich, welches nur gering



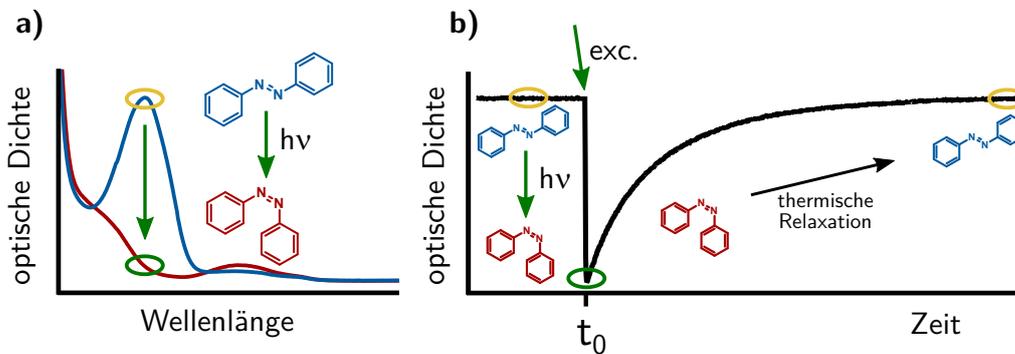
**Abbildung 2.24.** – Schematische Darstellung des Vorteils von Zweiphotonenabsorption, zum Beispiel in der Fluoreszenzmikroskopie. Rote Kreise und Ellipsen repräsentieren fluoreszierende, graue Kreise nicht angeregte und daher nicht fluoreszierende Chromophore. Der Laserfokus ist in Form der blauen Kegel angedeutet.

von biologischem Gewebe gestreut und absorbiert wird sowie keine Autofluoreszenz auslöst, kann so Fluoreszenzmikroskopie mit hoher räumlicher Auflösung durchgeführt werden. Auch die Freisetzung von mit Photokäfigen inaktivierten Molekülen kann so mit hoher Genauigkeit und optischer Kontrolle erfolgen [38].

### 2.6.3. Blitzlichtphotolyse

Die Technik der Blitzlichtphotolyse-Spektroskopie wurde von George Porter und Ronald George Wreyford Norrish entwickelt [228, 229]. Für diese Entwicklung erhielten sie zusammen mit Manfred Eigen 1967 den Chemie-Nobelpreis [230]. Es handelt sich um eine Anregungs-Nachweis-Technik, bei der die Probelösung mit

einem kurzen Lichtpuls angeregt wird und die dadurch induzierte Änderung mit einem Nachweisstrahl abgetastet wird. Hierbei können chemische Reaktionen, Konformationsänderungen oder beliebige andere durch Licht nachverfolgbare Prozesse untersucht werden [230]. Die Anregung kann mit Blitzlichtpulsen, zum Beispiel aus Xenon-Blitzlichtlampen, Nano- Piko- oder Femtosekundenlasern erfolgen. Die Änderungen können mit kontinuierlicher oder gepulster Strahlung nachgewiesen werden. Die zugrunde liegenden physikalischen Gesetze der Anregung und Relaxation wurden bereits in Kapitel 2.6.1 besprochen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die durch UV-Licht ausgelöste Konformationsänderung von Azobenzolen untersucht (vgl. Kap. 2.2.1). In Abbildung 2.25 ist daher das Prinzip der Blitzlichtphotolyse anhand der thermischen Relaxation von Azobenzol schematisch dargestellt. Mit Hilfe eines



**Abbildung 2.25.** – Schematische Darstellung des Prinzips der Blitzlichtphotolyse anhand der thermischen Relaxation von Azobenzol. a) UV/VIS-Spektren von *trans*-Azobenzol (blau) und *cis*-Azobenzol mit entsprechend gefärbten Strukturformeln. Durch Anregung mit UV-Licht wird Azobenzol von der *trans*- in die *cis*-Konfiguration überführt. b) Verlauf der optischen Dichte als Funktion der Zeit bei einer ausgewählten Detektionswellenlänge, wie man ihn in einer Blitzlichtphotolyse-Messung erhält. Die Anregung erfolgt bei der Zeit  $t_0$ , anschließend erfolgt die thermische Relaxation.

Monochromators wird die Detektionswellenlänge gewählt und die Absorption der Probe vor, während und nach der Anregung gemessen. Das erhaltene Messsignal ist proportional zur optischen Dichte der Probe. Durch Anregung mit einem Laserpuls im UV-Bereich, im Fall dieser Arbeit der dritten Harmonischen eines Nd:YAG-Lasers (355 nm), ändert sich die optische Dichte von Azobenzol drastisch (siehe Abb. 2.25a). Da das *cis*-Isomer metastabil ist, relaxiert das Azobenzol bei Raumtemperatur zurück in die *trans*-Konfiguration. Die Änderung der optischen Dichte kann mittels Blitzlichtphotolyse verfolgt werden (siehe Abb. 2.25b). Ist nur dieser Prozess be-

teilt, entspricht der zeitliche Verlauf der Konzentration des *cis*-Isomers  $[AB_{cis}(t)]$  einer monoexponentiellen Kinetik, die mathematisch mit Gleichung 2.20 beschrieben werden kann [231]:

$$[AB_{cis}](t) = [AB_{cis}](t_0)e^{-kt} . \quad (2.20)$$

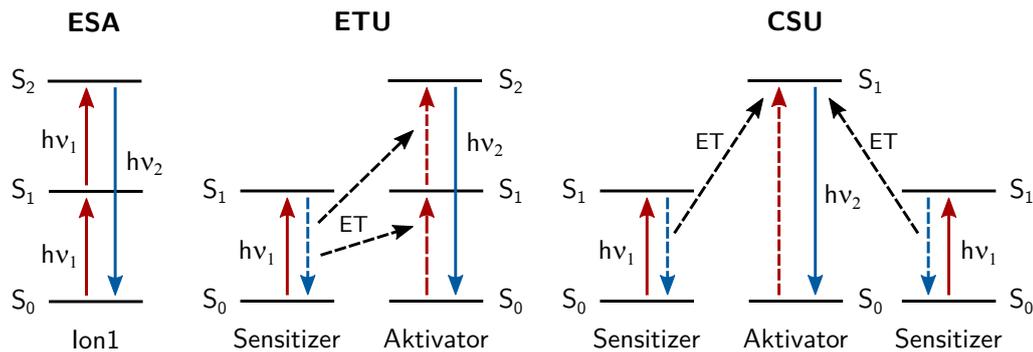
$[AB_{cis}](t_0)$  entspricht der Konzentration des *cis*-Isomers direkt nach der Anregung,  $t$  ist die Zeit und  $k$  die Geschwindigkeitskonstante der thermischen Relaxation. Letztere ist temperaturabhängig und kann mit der Arrhenius-Gleichung beschrieben werden [231]:

$$k(T) = Ae^{-\frac{E_A}{RT}} . \quad (2.21)$$

Hierbei ist  $E_A$  die Aktivierungsenergie,  $R$  die allgemeine Gaskonstante und  $T$  die Temperatur.

### 2.6.4. Aufkonvertierungsmechanismen

Bei der Aufkonvertierung, wie sie zum Beispiel in  $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ -Nanopartikeln stattfindet, handelt es sich im Vergleich zur oben beschriebenen Zweiphotonenabsorption um Prozesse die über reale Zustände erfolgen [162]. Aus diesem Grund sind wesentlich geringere Anregungsintensitäten im Bereich von  $1 \text{ W cm}^{-2}$  nötig [158]. In Abbildung 2.26 sind drei für die hier genutzten Partikel und Anregungsbedingungen wichtigsten Aufkonvertierungsmechanismen schematisch dargestellt. Bei der Anre-

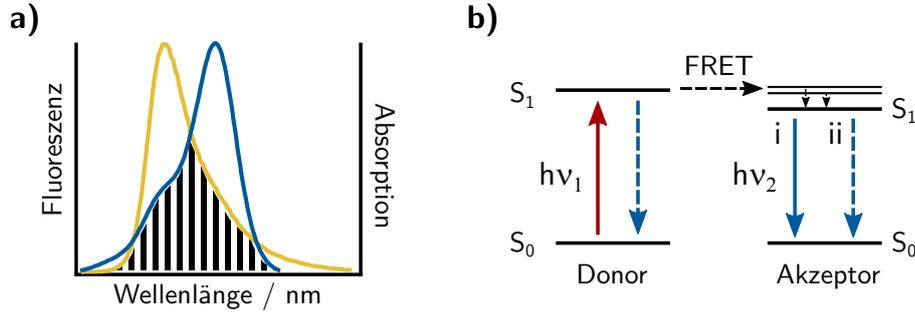


**Abbildung 2.26.** – ESA: Anregung eines angeregten Zustands (engl. *excited state absorption*). ETU: Energietransfer-Aufkonvertierung (engl. *energy transfer upconversion*). CSU: kooperative Aufkonvertierung (engl. *cooperative sensitization upconversion*). Blaue Pfeile stehen für Relaxation, rote Pfeile für Anregung und gestrichelte Linien stehen für strahlungslose Übergänge [159, 232, 233]. Weitere Informationen im Text.

gung eines angeregten Zustands (engl. *excited state absorption* -ESA) wird nur die Beteiligung eines Ions benötigt und ist daher von der Art der Dotierung (Verhältnisse, Konzentration) unabhängig [159, 232]. Die langen Lebensdauern der angeregten Zustände der Lanthanoid-Ionen ermöglichen diesen Prozess. Die Kombination der ESA und einem Energietransfer zwischen zwei benachbarten Ionen wird Energietransfer-Aufkonvertierung (engl. *energy transfer upconversion* - ETU) genannt. ETU ist der wichtigste Prozess der Aufkonvertierung für NaYF<sub>4</sub>: Yb, Er-Nanopartikel [159, 233]. Hier wird ein Ion, der sogenannte *Sensitizer*, über Absorption eines Photons in einen angeregten Zustand versetzt. Anschließend gibt er die Energie an ein benachbartes Ion, den Aktivator, über einen Energietransfer mittels Dipol-Dipol-Wechselwirkungen ab [157, 232]. In NaYF<sub>4</sub>: Yb, Er-Nanopartikeln fungiert Ytterbium als *Sensitizer* und Erbium als Aktivator. Diese Art der Aufkonvertierung hängt von den eingesetzten Verhältnissen der Lanthanoid-Ionen und deren Konzentration ab, da der Energietransfer abstandsabhängig ist [157]. Bei der kooperativen Aufkonvertierung (engl. *cooperative sensitization upconversion* - CSU) müssen zwei *Sensitizer* in der Nähe eines Aktivators vorliegen. So können die *Sensitizer* durch Absorption jeweils eines Photons angeregt werden und geben diese Energie dann simultan über einen Energietransfer an den Aktivator ab [159].

### 2.6.5. Förster-Resonanzenergietransfer

Befindet sich ein Chromophor in einem elektronisch angeregten Zustand  $S_n$ , kann er neben der Emission, der Interkombination und der inneren Umwandlung seine Energie auch über einen strahlungslosen Energietransfer an ein weiteres Molekül abgeben. Dieser Prozess ist nach Theodor Förster als Förster-Energietransfer (FRET) benannt [234]. Der Energietransfer kann stattfinden, wenn das Fluoreszenzspektrum des einen Moleküls, welches als Donor bezeichnet wird, mit dem UV/VIS-Spektrum des anderen, als Akzeptor bezeichneten, Moleküls überlappt [212]. Die Effizienz des Energietransfers hängt vom Grad des spektralen Überlapps, genauer dem Überlappungsintegral, ab [234]. In Abbildung 2.27a sind UV/VIS- und Fluoreszenzspektren eines Akzeptors und eines Donors beispielhaft dargestellt. Der Akzeptor muss selbst nicht fluoreszieren können, zum Beispiel sind auch Goldnanopartikel potentielle FRET-Akzeptoren [235]. Die potentiell ablaufenden Übergänge sind in einem



**Abbildung 2.27.** – a) Fluoreszenzspektrum eines FRET-Donors (gelb) und UV/VIS-Spektrum eines FRET-Akzeptors (blau). Der Überlapp ist schwarz schraffiert dargestellt. b) Energieschema des FRET-Prozesses zwischen Donor und Akzeptor. Der Donor absorbiert Licht (roter Pfeil) und relaxiert (blauer gestrichelter Pfeil) durch FRET (schwarzer gestrichelter Pfeil) hin zum Akzeptor. Nach innerer Umwandlung wird der Schwingungsgrundzustand von  $S_1$  bevölkert. Anschließend kann der Akzeptor relaxieren. Dies kann über Emission (blauer Pfeil) oder strahlungslose Prozesse (blauer gestrichelter Pfeil) geschehen.

Energieschema in Abbildung 2.27b dargestellt. Bei FRET handelt es sich um eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung die äußerst abstands sensitiv ist [212, 234]. Die vom Donor-Akzeptor-Abstand  $r$  abhängige Geschwindigkeitskonstante des Resonanzenergietransfers  $k_T(r)$  kann mit Gleichung 2.22 beschrieben werden [212]:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 . \quad (2.22)$$

Hierbei ist  $\tau_D$  die Fluoreszenzlebensdauer des Donors und  $R_0$  der sogenannte Försterabstand. Er ist aus dem spektralen Überlapp der Spektren von Akzeptor und Donor abgeleitet und zu diesem proportional [212].  $R_0$  ist demnach spezifisch für jedes Donor-Akzeptor-Paar in einem Lösungsmittel [212, 234]. Die Effizienz des Energietransfers  $E_T$  kann mit Gleichung 2.23 beschrieben werden [212]:

$$E_T = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} . \quad (2.23)$$

Anhand von Gleichungen 2.22 und 2.23 lässt sich die große Abhängigkeit des Energietransfers vom Abstand  $r$  erkennen. Der Energietransfer ist nur innerhalb von Abständen effizient in denen  $r \leq R_0$  gilt, wobei typische Werte für  $R_0$  3 nm bis 6 nm betragen [212]. Daher wird FRET auch zum Messen von Abständen im molekularen Bereich genutzt [236] und eignet sich für die Sichtbarmachung von intra- und

intermolekularen Wechselwirkungen [237, 238].

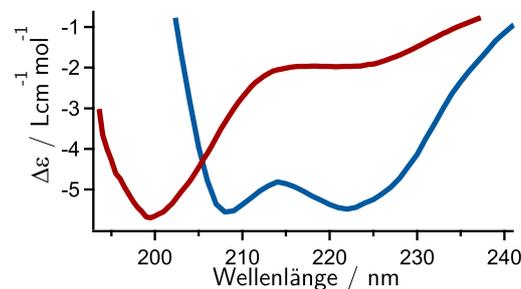
### 2.6.6. Circulardichroismus-Spektroskopie

Optisch aktive (chirale) Moleküle absorbieren links und rechts zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark [239]. Die Absorptionsdifferenz  $\Delta A$  zwischen einem links und einem rechts polarisierten Strahl, welche durch eine optisch aktive Probe fallen, kann abgeleitet nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz mit Gleichung 2.24 beschrieben werden:

$$\Delta A = A_L - A_R = \epsilon_L cd - \epsilon_R cd = \Delta \epsilon cd . \quad (2.24)$$

Hierbei ist  $c$  die Konzentration der Probe,  $d$  die Länge des optischen Pfades und  $A$  die Absorption sowie  $\epsilon$  der molare dekadisch Absorptionskoeffizient der Probe für jeweils links oder rechts zirkular polarisiertes Licht. Per Definition wird die Absorption des rechts polarisierten Lichts von der des links polarisierten abgezogen [240]. Die Auftragung von  $\Delta \epsilon$  gegen die Wellenlänge ergibt das CD-Spektrum. Aus traditionellen Gründen wird teilweise statt der SI-Einheit auch die sogenannte molare Elliptizität  $\theta$ , welche proportional zu  $\Delta \epsilon$  ist genutzt [240]. Der Proportionalitätsfaktor beträgt  $\theta = 3300 \Delta \epsilon$  [240]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde  $\Delta \epsilon$  genutzt.

Da Sekundärstrukturen, wie  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter und ungeordnete Aminosäuresequenzen (*Random Coil*), spezifische CD-Spektren aufweisen, ermöglicht CD-Spektroskopie die Aufklärung der Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen [241, 242]. In Abbildung 2.28 sind beispielhaft die CD-Spektren einer  $\alpha$ -helikalen Struktur sowie einer *Random-Coil*-Struktur dargestellt. CD-Spektren von  $\alpha$ -Helices weisen

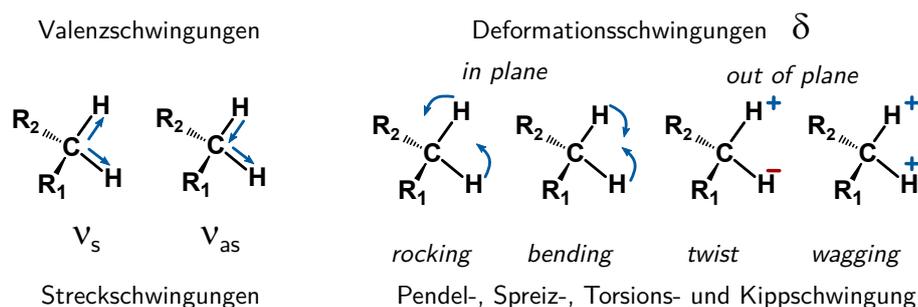


**Abbildung 2.28.** – CD-Spektren von Peptiden, die als *Random Coil* (rot) oder als  $\alpha$ -Helix (blau) vorliegen.

charakteristische Minima bei 208 nm und 222 nm auf, *Random-Coil*-Strukturen haben ein Minimum bei 198 nm bis 200 nm [242, 243]. Da die meisten Biomoleküle, wie Peptide und Proteine, nicht zu 100% in einer Struktur vorliegen, besteht das gemessene CD-Spektrum einer Probe fast immer aus einer additiven Überlagerung der CD-Spektren der reinen Spezies [242, 243]. Aus diesem Grund kann eine Struktur nicht mit absoluter Sicherheit zugeordnet werden. Allerdings sind Veränderungen, wie sie zu beobachten sind, wenn zwei als *Random Coil* vorliegende Peptide ein  $\alpha$ -helikales *Coiled-Coil*-Dimer bilden, leicht nachzuverfolgen [244].

### 2.6.7. Infrarotspektroskopie

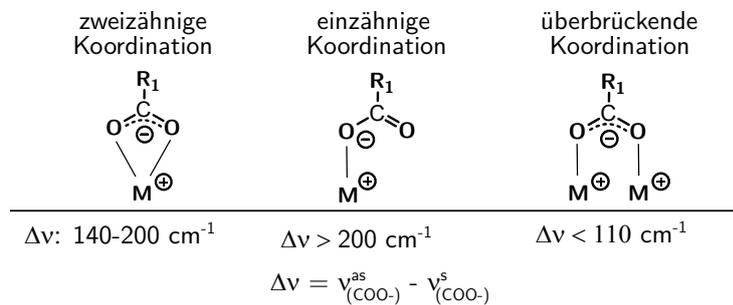
Die Infrarotspektroskopie wird seit initialen Arbeiten von *Lehrer* in den 1940er Jahren als Analysemethode genutzt [245, 246]. Bei der Infrarotspektroskopie (IR-Spektroskopie) wird typischerweise Licht im Wellenlängenbereich von 2500 nm bis 25000 nm genutzt. Die Energie der Strahlung wird hierbei meist in Wellenzahlen angegeben, der oben genannte Wellenlängenbereich entspricht in Wellenzahlen  $\tilde{\nu}$  zwischen  $4000\text{ cm}^{-1}$  und  $400\text{ cm}^{-1}$  [246]. Licht im genannten Energiebereich regt Molekülschwingungen und -rotationen des elektronischen Grundzustands  $S_0$  an. In der Standardmethode, die zur Identifizierung von Molekülen genutzt wird, werden vor allem die Schwingungen registriert. Die typischen angeregten Schwingungen sind in Abbildung 2.29 anhand einer Methylengruppe skizziert. Die Anregung erfolgt über



**Abbildung 2.29.** – Darstellung der Molekülschwingungen anhand einer Methylengruppe. Die Pfeile repräsentieren die Bewegung der Wasserstoffatome in Papierebene (engl. *in plane*), Minus und Plus die Bewegung aus der Papierebene (engl. *out of plane*) hinaus [246].

eine periodische Wechselwirkung des Lichtes mit dem Dipolmoment. Aus diesem Grund können nur diejenigen Schwingungen angeregt werden, bei denen sich das

Dipolmoment ändert [246]. Weist ein Molekül ein Symmetriezentrum auf, so sind die dazu symmetrischen Schwingungen inaktiv [246]. Als Folge der Anregung wird die Strahlung absorbiert, wobei insbesondere funktionelle Gruppen charakteristische Schwingungen und damit Absorptionsbanden aufweisen [246]. Des Weiteren können im Bereich von  $400\text{ cm}^{-1}$  bis  $1000\text{ cm}^{-1}$  Gerüstschwingungen des Moleküls beobachtet werden. Obwohl eine direkte Zuordnung dieses Bereichs zur Molekülstruktur meist nicht möglich oder mit hohem Aufwand verbunden ist, ist dieser Bereich für jedes Molekül einzigartig und kann daher wie ein Fingerabdruck zu dessen Identifikation genutzt werden [246]. Bei chemischen Reaktionen, beispielsweise bei zahlreichen Umfunktionalisierungen von Nanopartikeln, werden oft nur einige funktionelle Gruppen verändert. Diese Änderungen sind dann meist eindeutig im IR-Spektrum zu beobachten [246]. Aus diesem Grund wird diese Methode regelmäßig genutzt, um den Erfolg einer Umfunktionalisierung zu überprüfen [129, 177, 247–250]. Unter anderem können auch Informationen über die Art der Koordination von Liganden auf Nanopartikeln erhalten werden, da diese einen Einfluss auf die an der Koordinationsbindung beteiligten Bindungen aufweist (siehe Abb. 2.30) [248, 250].



**Abbildung 2.30.** – Darstellung von Koordinationsmöglichkeiten einer Carboxylatgruppe mit einem Metall ( $\text{M}^+$ ), z.B. auf einer Nanopartikeloberfläche. Zur Vereinfachung ist das Metall nur einfach geladen. Des Weiteren sind die Differenzen zwischen der symmetrischen und asymmetrischen Streckschwingung der Carboxylatgruppe ( $\nu_{as} \approx 1560\text{ cm}^{-1}$  sowie  $\nu_s \approx 1460\text{ cm}^{-1}$ ) für jede der Koordinationsmöglichkeiten angegeben [248, 250].

### 2.6.8. Dynamische Lichtstreuung

Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung kann der hydrodynamische Durchmesser  $d_h$  sowie die Größenverteilung einer Nanopartikeldispersion ermittelt werden. Die Methode kann für Partikel im Größenbereich von ca. 1 nm bis 1000 nm verwendet

werden. Die Methode ist in besonderem Maße geeignet eine mögliche Aggregation einer Partikeldispersion zu ermitteln. Dies ist von großem Nutzen, da diese Information mit Hilfe der Elektronenmikroskopie nur unzuverlässig ermittelt werden kann. Die Methode beruht auf der Streuung von monochromatischer Laserstrahlung an den dispergierten Partikeln. Aufgrund der Brownschen Bewegung der Partikel fluktuiert das detektierte Streulicht. Die Geschwindigkeit, mit der sich die Partikel in der Flüssigkeit bewegen, hängt von ihrem Diffusionskoeffizienten  $D$  ab, der mit der Stokes-Einstein-Gleichung beschrieben werden kann (siehe Gl. 2.25) [251].

$$D = \frac{k_b T}{3\pi \eta_0 d_h} . \quad (2.25)$$

Hierbei ist  $\eta_0$  die dynamische Viskosität des Lösungsmittels,  $T$  die absolute Temperatur und  $k_b$  die Boltzmann-Konstante. Das heißt, dass die Fluktuation des Streulichtes von der Partikelgröße, bzw. dem hydrodynamischen Durchmesser abhängt. Die Partikelgröße lässt sich für monodisperse Proben mit einer Autokorrelationsfunktion  $g'(\tau)$  ermitteln (siehe Gl. 2.26) [252].

$$g'(\tau) = B e^{-q^2 D \tau} . \quad (2.26)$$

Hierbei ist  $B$  die Amplitude der Funktion,  $\tau$  die Korrelationszeit,  $\mathbf{q}$  der Streuvektor und  $D$  der Diffusionskoeffizient. Für polydisperse Proben muss die Summe der einzelnen, mit der Amplitude  $A_i$  gewichteten Exponentialfunktionen  $g'(\tau)$  berechnet werden:

$$g'(\tau) = B \sum_i A_i e^{-q_i^2 D_i \tau} . \quad (2.27)$$

Es ist zu beachten, dass die Streuintensität proportional zur sechsten Potenz des Partikelradius ist und daher Proben mit zu hoher Polydispersität keine verlässlichen Daten liefern [252]. Es gibt verschiedene Methoden um die Daten auszuwerten. Hierfür kann zum Beispiel die Kumulantenfit-Methode genutzt werden, bei der die Autokorrelationsfunktion logarithmiert und an ein Polynom angepasst wird [252]:

$$\ln(g') = a + b \cdot \Gamma + c \cdot \Gamma^2 + d \cdot \Gamma^3 \dots . \quad (2.28)$$

**Tabelle 2.1.** – Wertebereiche für den Polydispersitätsindex und die zugehörigen Interpretationen [253].

PDI	Interpretation
$0.05 > PDI$	sehr enge Verteilung
$0.05 < PDI < 0.15$	enge Verteilung
$0.15 < PDI < 0.25$	breite Verteilung
$0.25 < PDI < 0.50$	sehr breite Verteilung
$0.50 < PDI$	nicht sinnvoll nutzbar

Hierbei sind die Parameter  $a$ ,  $b$  und  $c$  geräteabhängige Parameter und  $\Gamma$  ist die Abklingrate ( $\Gamma = q^2 D$ ). Der Polydispersitätsindex lässt sich aus dem dritten Term nach Gleichung 2.29 berechnen [252]:

$$PDI = \frac{c}{2\Gamma^2} . \quad (2.29)$$

In Tabelle 2.1 sind Werte für den PDI und die zugehörigen Interpretationen angegeben.

### 2.6.9. Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Methoden wie die Transmissions-, Raster- und Rastertransmissionselektronenmikroskopie (TEM, REM und STEM) werden in der Nanotechnologie unter anderem genutzt, um die Größe und Größenverteilung von Nanopartikeln zu ermitteln. Das Auflösungsvermögen von Mikroskopen ist durch die Wellenlänge der genutzten Strahlung begrenzt [254]. Durch den Welle-Teilchen-Dualismus können Elektronen auch als Welle betrachtet werden, deren Wellenlänge von der Beschleunigungsspannung abhängt [255]. Der Zusammenhang von Wellenlänge  $\lambda_e$  und Beschleunigungsspannung  $U_b$  ist in Gleichung 2.30 dargestellt [255].

$$\lambda_e = \frac{h}{P_e} = \frac{h}{\sqrt{2m_e e U_b}} . \quad (2.30)$$

Mit dem Impuls der Elektronen  $P_e$ , der Elektronenmasse  $m_e$ , der Elementarladung  $e$  und dem Planckschen Wirkungsquantum  $h$ . Der Zusammenhang von Auflösungsvermögen  $d$ , der Wellenlänge und der numerischen Apertur  $NA$  ist in Gleichung 2.31

dargestellt [255]:

$$d = \frac{0.61 \lambda_e}{NA} . \quad (2.31)$$

Daher kann die Auflösung in Elektronenmikroskopen durch Anpassung der Beschleunigungsspannung eingestellt werden. Bei dem in dieser Arbeit genutzten Gerät (Hitachi SU 8030) reichen die Beschleunigungsspannungen von 0.5 kV bis 30 kV, die Elektronen werden über eine kalte Feldemissions-Kathode erzeugt. Die theoretische Auflösung bei 30 kV wäre ca. 0.02 nm, diese wird jedoch durch Abbildungsfehler und Fehler der Elektronenquelle reduziert. In der Probenkammer befindet sich ein Vakuum von  $10^{-4}$  Pa und in der Elektronenquelle ein Vakuum von  $10^{-7}$  Pa. Der Elektronenstrahl wird durch elektromagnetische Linsen auf die Probe fokussiert. Im REM-Modus wird die Probe mit einem fokussierten Elektronenstrahl abgerastert. Hierbei werden die aus der Feldemissions-Kathode kommenden Primärelektronen an der Probe sowohl elastisch (rückgestreute Elektronen, engl. *backscattered electrons* - BSE) als auch inelastisch (Sekundärelektronen) gestreut. Die Sekundärelektronen (SE) weisen eine geringe Energie von einigen eV auf und treten nur aus den äußersten Schichten der Probe aus, daher erscheinen Kanten heller [256, 257]. Im STEM-Modus wird die Probe ebenfalls mit einem fokussierten Elektronenstrahl abgerastert, aber es werden die transmittierten Primärelektronen detektiert [258]. Aufgrund der starken Absorption der Elektronen, dürfen die Proben für diese Methode nicht dicker als ca. 50 nm sein: Aus diesem Grund werden die Proben auf speziell hierfür angefertigten, mit Kohlenstoff-Filmen beschichteten, Kupfernetzen präpariert [255].

### 2.6.10. Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie) ist eine Methode, die es ermöglicht, die Wechselwirkung zwischen Rezeptoren und Liganden ohne Markierung durch Chromophore oder ähnliche Sonden zu verfolgen [259]. Im Folgenden wird die Methode kurz vorgestellt, für eine umfassende Herleitung der physikalischen Grundlagen und Anwendungsmöglichkeiten wird auf das Buch *Handbook of Surface Plasmon Resonance* verwiesen [259].

Die Methode beruht auf der winkelabhängigen Anregung von Oberflächenplasmonen in dünnen Silber- oder Goldschichten mit Licht [259]. Es gibt verschiedene

mögliche Versuchsanordnungen, wobei die sogenannte Kretschmann-Konfiguration häufig anzutreffen ist und daher hier als Beispiel vorgestellt wird [259]. Hierbei wird eine Goldschicht, welche sich auf der Oberseite eines Prismas befindet, von der Unterseite durch das Prisma hindurch, unter Bedingungen der Totalreflexion, mit monochromatischer Strahlung angeregt (siehe Abbildung 2.31a). Hierbei gelangt ein Teil der Strahlung in Form einer evaneszenten Welle in das Metall. Das elektrische Feld kann mit Gleichung 2.32 beschrieben werden [259]:

$$E_t(x, y, z = 0, t) = E_0 e^{-\kappa t} e^{-ik_x x} e^{-i\omega t} . \quad (2.32)$$

Hierbei werden nur die Ausbreitungsrichtungen senkrecht zur Oberfläche ( $y$ ) und in einer Dimension parallel ( $x$ ) zur Oberfläche betrachtet [259].  $E_0$  ist die Amplitude,  $\omega$  die Kreisfrequenz der Strahlung und  $\kappa$  der imaginäre Teil des Wellenvektors der evaneszenten Welle. Die Amplitude der evaneszenten Welle nimmt exponentiell ab und reicht ungefähr über eine Distanz in das Metall hinein, die der Hälfte der Wellenlänge des Lichtes entspricht [259]. Der Wellenvektor des Anregungslichtes  $k_{x,L}$  kann mit Gleichung 2.33 beschrieben werden [259, 260]:

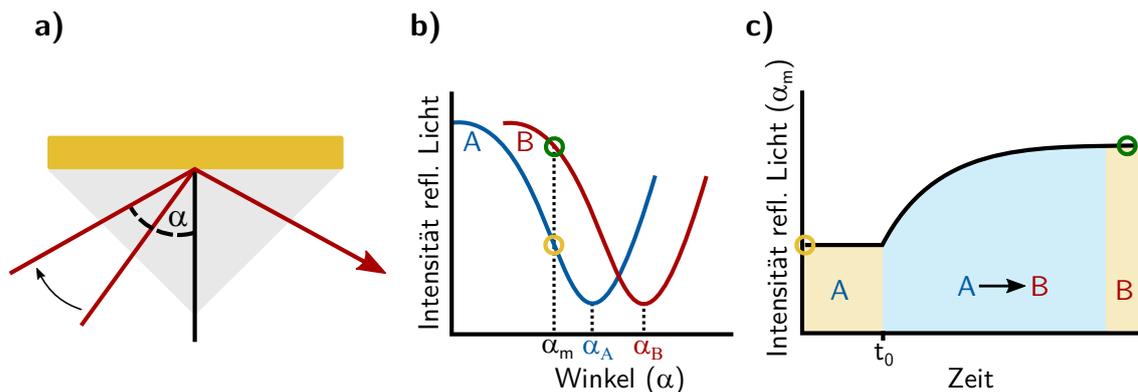
$$k_{x,L} = \frac{\omega}{c_0} \sin(\alpha) \left( \frac{1}{\epsilon_{Prisma}} \right)^{-\frac{1}{2}} . \quad (2.33)$$

$\epsilon_{Prisma}$  ist die Dielektrizitätskonstante des Prismas und  $\alpha$  ist der Eintrittswinkel des Anregungslichtes (vgl. Abb. 2.31). Durch die evaneszente Welle werden Oberflächenplasmonen im Metall angeregt, die ihrerseits ebenfalls eine evaneszente Welle ausbilden, die sich in beide Richtungen senkrecht zur Grenzfläche ausbreitet. Der Wellenvektor der evaneszenten Welle der Oberflächenplasmonen  $k_{x,SPR}$  kann mit Gleichung 2.34 beschrieben werden [259, 260]:

$$k_{x,SPR} = \frac{\omega}{c_0} \left( \frac{1}{\epsilon_{AU}} + \frac{1}{\epsilon_P} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (2.34)$$

$\epsilon_P$  ist die Dielektrizitätskonstante der Probe,  $\epsilon_{AU}$  die Dielektrizitätskonstante des Metalls, in diesem Fall Gold. Stimmen die Kreisfrequenz  $\omega$  und die Wellenvektoren  $k_{x,SPR}$  und  $k_{x,L}$  überein, tritt Resonanz auf und die Absorption der Anregungsstrahlung ist maximal [260]. Anhand von Gleichung 2.33 ist zu erkennen, dass man

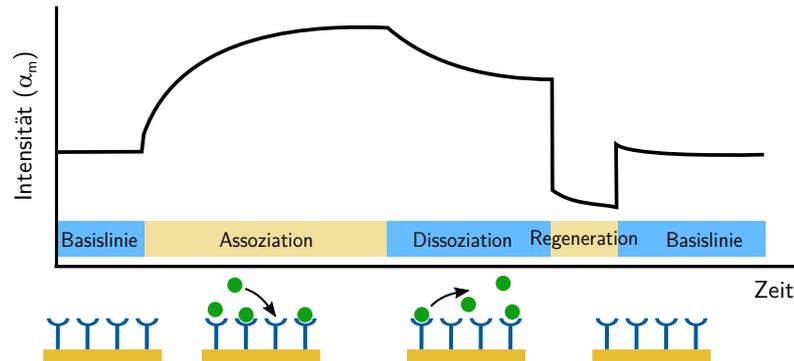
durch Anpassung des Winkels  $\alpha$  die Resonanzbedingungen erfüllen kann [259]. Wird also der Winkel  $\alpha$  des Anregungsstrahls zur Normalen verändert, so ändert sich die Intensität des reflektierten Lichtes und weist ein Minimum beim sogenannten Resonanzwinkel auf (siehe Abb. 2.31b). Anhand von Gleichung 2.34 ist zu erkennen,



**Abbildung 2.31.** – Schematische Darstellungen des Prinzips der SPR-Spektroskopie. a) Der monochromatische Anregungsstrahl trifft in verschiedenen Winkeln  $\alpha$ , unter Bedingungen der Totalreflexion, durch ein Prisma auf die Unterseite einer Goldschicht auf. b) Intensität des reflektierten Lichtes als Funktion des Einfallswinkels  $\alpha$  für zwei verschiedene Systeme A und B, die unterschiedliche Resonanzwinkel  $\alpha_A$  und  $\alpha_B$  aufweisen. In gelb und grün sind die Intensitäten der Kurven bei einem Winkel  $\alpha_m$  gezeigt, der typischerweise für eine zeitabhängige SPR-Messung gewählt werden würde. c) Intensität des reflektierten Lichtes bei festem Winkel  $\alpha_m$  als Funktion der Zeit für ein System A, das in den Zustand B übergeht [259].

dass die Resonanzbedingungen von der Dielektrizitätskonstante der Probe  $\epsilon_P$  und damit vom Brechungsindex in unmittelbarer Umgebung der Oberfläche, also soweit die evaneszente Welle in die Probe hineinreicht, abhängen [259]. Die Intensität des reflektierten Lichtes als Funktion des Winkels  $\alpha$  ist demnach für jede Probe spezifisch (vgl. Abb. 2.31b). Verändert sich die unmittelbare Umgebung der Oberfläche der Goldschicht, zum Beispiel durch das Binden einer Probe, so ändert sich auch die winkelabhängige Reflexion. Beobachtet man die Intensität des reflektierten Lichtes bei einem ausgewählten Winkel, wie in Abbildung 2.31b mit einem gelben und einem grünen Kreis markiert, in Abhängigkeit von der Zeit, so verschiebt sich die Resonanzkurve im Fall eines Bindungsvorgangs und es ist eine Änderung der Intensität zu beobachten (siehe Abb. 2.31c). In einer typischen SPR-Messung, bei der die Wechselwirkung zwischen einem Ligand-Rezeptor-Paar untersucht werden soll, wird eines der Moleküle, zum Beispiel der Rezeptor, auf der Goldschicht immobilisiert.

Üblicherweise wird die Intensität des reflektierten Lichtes bei einem festen Winkel  $\alpha$  gemessen. In Abbildung 2.32 ist der Verlauf einer typischen SPR-Messung, auch als Sensorgramm bezeichnet, zusammen mit einer schematischen Darstellung der Probe gezeigt. Nach der Immobilisierung wird von dem System die Basislinie gemessen.



**Abbildung 2.32.** – Schematische Darstellung eines Sensorgramms in einem SPR-Experiment und Skizzen der zu den Abschnitten zuordenbaren Vorgängen in der Messzelle [259].

Anschließend wird die Lösung mit dem Liganden injiziert, der nun an den Rezeptor bindet. Nach Beenden der Probezufuhr beginnt die Dissoziation, welche nicht immer in praktikablen Zeiten vollständig erfolgt. Daher wird meist eine auf den Rezeptor zugeschnittene Regenerationslösung, welche die Wechselwirkung von Ligand und Rezeptor unterbinden kann und selber leicht entfernbar ist, hinzugegeben [259, 261]. Für eine 1:1-Wechselwirkung der Bildung eines Ligand-Rezeptor-Komplexes AB aus dem Liganden A und dem Rezeptor B kann die Dissoziationskonstante  $K_D$  durch Anpassung des Assoziationsbereichs im Sensorgramm (vgl. Abb. 2.32) mittels Gleichung 2.35 erhalten werden [259].

$$R(t) = \frac{R_{max}[A]}{K_D[A]} \left( 1 - \frac{1}{\exp(k_a[A] + k_d)t} \right) . \quad (2.35)$$

Hierbei ist  $R(t)$  das zeitabhängige Messsignal,  $R_{max}$  ist das maximale Signal bei vollständiger Besetzung aller Rezeptoren,  $k_a$  und  $k_d$  sind die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation und  $[A]$  ist die Konzentration des Liganden A. Analog kann der Dissoziationsbereich des Sensorgramms mit Gleichung 2.36

angepasst werden.  $R_0$  ist hierbei das Messsignal der Basislinie.

$$R(t) = R_0 e^{-k_d t} \quad (2.36)$$

Die Dissoziationskonstante ist ein Maß für die Affinität von Ligand und Rezeptor und wird daher auch als Affinitätskonstante bezeichnet [259].

## 3. Experimentalteil

### 3.1. Methoden und Geräte

#### 3.1.1. Allgemeine Arbeitsvorschriften

Alle Nanopartikelsynthesen und Funktionalisierungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in Standardglasapparaturen durchgeführt. Hierfür wurden in den Apparaturen eventuell vorhandene Nanopartikelreste entweder mit Königswasser (3:1 Mischung aus HCl (37%) und HNO<sub>3</sub> (65%)) oder mit Peroxomonoschwefelsäure (3:1 Mischung aus H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)) entfernt. Lösungsmittel wurden, falls nötig, nach Standardmethoden getrocknet und unter Argon mit 3 Å Molsieb aufbewahrt. Falls nicht anders angegeben, wurde stets durch ein Laborwasseraufbereitungssystem (Milli-Q Academic, Millipore, spezifischer Widerstand 18.2 MΩ cm) aufbereitetes Wasser verwendet. Kommerziell erhaltene Verbindungen wurden ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt (siehe Tab.B).

#### 3.1.2. Festphasenpeptidsynthese

Die Peptide wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Hilfe der bekannten Fmoc-Festphasenpeptidsynthese dargestellt [262]. Hierfür wurden kommerziell verfügbare, vorbeladene Harze des Typs Fmoc-AS-NovaSyn®TGA verwendet. Hierbei steht AS für die Aminosäure, mit dem das Harz beladen ist. Kupplungen wurden in DMF mit Fmoc geschützten Aminosäuren, 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und *N,N'*-diisocarbodiimide (DIC) in achtfachem Überschuss im Vergleich zum Harz durchgeführt. Es wurde je Aminosäure doppelt, mit je einer Stunde Kupplungszeit, gekuppelt. Eine Lösung von 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en (DBU) und Piperidin mit Konzentrationen von je 2 Vol.-% wurde zum Fmoc-Entschützen der Aminosäuren

verwendet. Hierfür wurde das Harz dreimal mit je 2 mL der Entschützungslösung für je 10 min geschüttelt. Zwischen jedem der Schritte wurde das Harz dreimal mit je 6 mL DCM und DMF gewaschen. Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte durch Schütteln des Harzes für drei Stunden mit einer Lösung von Trifluoroessigsäure (TFA) und Wasser im Verhältnis 95 zu 5. Das Harz wurde zweimal mit DCM und TFA gewaschen. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert und das Peptid mit  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Diethylether gefällt. Das ausgefallene Peptid wurde abzentrifugiert und der restliche Ether abgedampft. Im Anschluss wurde das Peptid durch Lyophilisation getrocknet. Die Aufreinigung erfolgte durch präparative Umkehrphasen-Hochleistungschromatographie (engl. *reversed phase high performance liquid chromatography* - RP-HPLC).

#### 3.1.3. Probeabspaltungen

Vor der vollständigen Abspaltung des Peptids und zur Überwachung des Syntheserfolges bei längeren Aminosäuresequenzen wurden Probeabspaltungen durchgeführt. Zur leichteren Detektion in der analytischen HPLC wurden diese vor der Fmoc-Entschützung durchgeführt. Hierfür wurden einige Krümel des Harzes aus dem Reaktor entnommen und mit 200  $\mu\text{L}$  TFA sowie 20  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  in einem Mikroreaktionsgefäß für 2 h geschüttelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel abgedampft und die Peptide mit  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Diethylether gefällt. Nach Abzentrifugieren und dem Abdekantieren des überstehenden Ethers wurden die Peptide für die Analyse mit analytischer HPLC und Massenspektrometrie in einem passenden Lösungsmittel gelöst. Im Fall des kleinen und hydrophoben Peptids AAPV wurde der Fällungsschritt mit Ether nicht durchgeführt, da es in diesem löslich ist.

#### 3.1.4. Lyophilisierung

Die lösungsmittelfreie zu lyophilisierende Verbindung wurde mit etwas Wasser versetzt und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend erfolgte die Gefriertrocknung durch Sublimation des Wassers mit Hilfe eines Alpha 1-2 LD Lyophilisators (Martin Christ GmbH), welcher mit einer Vakuumpumpe (Modell RZ 2, Vacuubrand GmbH + Co. KG) betrieben wurde.

### 3.1.5. Analytische HPLC

Für die analytische HPLC standen mehrere Geräte zur Verfügung, welche im Folgenden einzeln beschrieben werden. Bei allen HPLCs diente die Software EZChrom Elite (Version 3.3.2, Agilent Technologies) zur Steuerung, Datenaufnahme und für erste Datenauswertungen. ACN und H<sub>2</sub>O wurden als Eluenten verwendet. Beide Lösungsmittel enthielten 0.1 Vol.-% TFA. Die Säulen in allen Anlagen wurden mit Säulenöfen auf einer konstanten Temperatur von 24 °C gehalten.

#### 3.1.5.1. LaChrom-Elite HPLC

Das LaChrom-ELITE-HPLC-System (VWR International/Hitachi) für analytische HPLC enthält einen L2200 Autosampler mit 100 µL Probenschleife, zwei L-2130 HPLC-Pumpen mit Lösungsmittelentgaser, einen Säulenofen, einen Diodenarray Flussdetektor (L-2455), einen Fluoreszenzdetektor (L-2485) sowie einen Hochdruckgradientenmischer. Die HPLC wurde in Verbindung mit einer Kinetex C18 Säule 5 µm, 250 Å, 4.6 mm, Phenomenex<sup>®</sup>) genutzt. Die Flussgeschwindigkeit lag bei 1 mL min<sup>-1</sup>.

#### 3.1.5.2. Semi-micro Chromaster

Das Chromaster-600-bar-DAD-System für analytische Chemie arbeitet mit einem Niederdruckgradienten. Es enthält eine HPLC-Pumpe (5160) mit einem 6-Kanal Lösungsmittelentgaser, einen Säulenofen (5310), einen Autosampler (5260) mit 20 µL Probenschleife sowie einen Diodenarray Flussdetektor (5430) mit einer Hochdruck Semi-micro-Flusszelle. Eine Purospher<sup>®</sup>STAR RP-C18 endcapped UHPLC Säule (2 µm, 250 Å, 50 x 2.1 mm, Merck KGaA) wurde in Kombination verwendet. Die Flussgeschwindigkeit lag bei 0.6 mL min<sup>-1</sup>.

#### 3.1.5.3. Primaide™ HPLC

Das Primaide™ DAD System (VWR International/Hitachi) arbeitet mit einem Niederdruckgradienten. Es enthält eine HPLC-Pumpe (1110) mit einem 6-Kanal Lösungsmittelentgaser, einen Autosampler mit einer 100 µL Probenschleife (1210), einen Säulenofen (1310) sowie einen Diodenarraydetektor (1430). Das System wurde

### 3. Experimentalteil

---

in Kombination mit einer LUNA™ C8(2)-Säule (5 µm, 250 Å, 4.6 mm, Phenomenex®) genutzt. Die Flussgeschwindigkeit lag bei 1 mL min<sup>-1</sup>.

#### 3.1.5.4. Gradienten für die analytische HPLC

In den folgenden Tabellen 3.1 bis 3.4 sind die verschiedenen, in der analytischen HPLC zur Verwendung gekommenen, Gradienten dargestellt. Die Buchstaben A (H<sub>2</sub>O + 0.1 Vol.-% TFA) und B (ACN + 0.1 Vol.-% TFA) stehen hierbei für die jeweiligen Eluenten, deren Konzentration über die Dauer der Trennung variieren.

**Tabelle 3.1.** – Gradient AG1.

Zeit in min	A in %	B in %	Fluss in mL min <sup>-1</sup>
0	95	5	1
18	30	70	1
18.5	0	100	1
20	0	100	1
21	95	5	1
24	95	5	1

**Tabelle 3.2.** – Gradient AG2.

Zeit in min	A in %	B in %	Fluss in mL min <sup>-1</sup>
0	95	5	0.5
5	95	5	1
30	30	70	1
32	0	100	1
35	0	100	1
36	95	5	1
40	95	5	1

**Tabelle 3.3.** – Gradient AG3.

Zeit in min	A in %	B in %	Fluss in mL min <sup>-1</sup>
0	95	5	1
18	30	70	1
19	0	100	1
21	0	100	1
21.5	95	5	1
30	95	5	1

**Tabelle 3.4.** – Gradient AG4.

Zeit in min	A in %	B in %	Fluss in mL min <sup>-1</sup>
0	95	5	1
5	30	70	1
5.5	0	100	1
6	0	100	1
9	95	5	1

#### 3.1.6. Präparative HPLC

Für die präparative HPLC wurde ein Knauer-Niederdruck-HPLC-System (Knauer GmbH) genutzt. Es verwendet eine LaPrep Sigma Pumpe (LP1200), einen dreifachen Niederdruckgradienten, eine dynamische Mischzelle, ein 6-fach-3-Kanal-Injektionsventil mit automatischer 10 mL Probenschleife, einen LaPrep-Sigma-Standard-Einkanal-UV-Detektor (LP3101), eine 0.5 mm Flusszelle sowie ein 16-fach LaPrep-Sigma-Fraktionsventil (LP2016). Es wurde eine Vorsäule des Typs Security Guard™ PREP Catride Holder Kit 21.20 mm, ID, Phenomenex®) verwendet. Als Säule diente eine Kinetex RP-C18 endcapped (5 µm, 100 Å, 250 x 21.2 mm, Phenomenex®). ACN und H<sub>2</sub>O wurden als Eluenten verwendet. Beide Lösungsmittel enthielten 0.1 Vol.-%

**Tabelle 3.5.** – Gradient PG1.

Zeit in min	A in %	B in %	Fluss in mL min <sup>-1</sup>
0	95	5	10
5	95	5	10
30	30	70	20
32	0	100	20
35	0	100	20
36	95	5	20
40	95	5	20

TFA. Es wurde das UV-Absorptionssignal bei 220 nm detektiert. Die Steuerung der Anlage und Datenaufnahme erfolgte mit der Software EZChrom Elite (Version 3.3.2, SP2, Agilent Technologies). Der für die präparative HPLC verwendete Gradient ist in Tabelle 3.5 dargestellt.

### 3.1.7. Circular dichroismus-Spektroskopie

CD-Spektren wurden an einem Jasco J-810 Spektropolarimeter (JASCO Inc.), ausgestattet mit einem Peltierthermostaten (PTC-348W1, JASCO Inc.) bei 24 °C in 2 mm QS Küvetten der Firma Hellma Analytics aufgenommen. Nach einer Hintergrundkorrektur mit reinem Lösungsmittel wurden die Spektren über drei Messungen gemittelt ( $\lambda = 195\text{-}240$  nm, 0.5 nm Intervalle, 2 nm Bandbreite, 4 s Ansprechzeit, 100 nm min<sup>-1</sup> Abtastgeschwindigkeit). Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm IGOR Pro (Wavemetrics Inc.).

### 3.1.8. Dialyse zur Nanopartikelaufarbeitung

Die Dialyse von wasserlöslichen Nanopartikeln wurde in einem Dialyseschlauch (Cellulose, Durchmesser 16 mm, Sigma Aldrich) mit einem MWCO (*engl.: molecular weight cut-off*) von 12000 Da durchgeführt. Der Schlauch wurde in die für das aufzuarbeitende Volumen passende Länge zurechtgeschnitten und mit Klammern verschlossen. Anschließend wird der Schlauch 20 min in Wasser aufgeweicht und gewaschen. Nun wurde die zu dialysierende Nanopartikeldispersion in den Schlauch gegeben und der Schlauch verschlossen. Anschließend wurde der Schlauch in ein mit 2 L Wasser gefülltes Becherglas gegeben, so dass sich der gesamte Schlauch

unter der Wasseroberfläche befand. Nun wurde mit minimaler Geschwindigkeit mit einem Magnetrührer gerührt und für mindestens 48 h alle 10 h bis 14 h das Wasser ausgetauscht.

#### **3.1.9. Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES)**

Das Verhältnis der Lanthanoide in den fertigen UCNPs wurde mit Hilfe der ICP-OES (ICP-OES - *engl. inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*) ermittelt. Zur Messung wurde das Gerät ICAP™ 6300 Duo von Thermo Scientific™ verwendet. Die Nanopartikel wurden in Königswasser (37 Gew.% Salzsäure und 65 Gew.% Salpetersäure im Volumenverhältnis 1 : 3) in der Siedehitze (15 Minuten) gelöst und mit Wasser auf eine errechnete Lanthanoidkonzentration im Bereich von 1 bis 100 µg L<sup>-1</sup> verdünnt.

#### **3.1.10. Massenspektrometrie**

Die Identifizierung der dargestellten Peptide erfolgte hauptsächlich durch Massenspektrometrie. Hierfür wurde ein Elektrospray-Ionisation-Flugzeit-Massenspektrometer (*engl. electrospray ionization time-of-flight mass spectrometer* - ESI-TOF MS) der Firma Agilent Technologies verwendet. Für Moleküle mit Massen über 1000 g/mol wurde die Düsenspannung auf 4000 V gestellt und die Fragmentorspannung auf 300 V. Im Fall der Messung von kleineren Molekülen wurde die Düsenspannung auf 1000 V und die Fragmentorspannung auf 150 V gestellt. Die Gastemperatur wurde auf 300 °C gesetzt. Die Flussrate des Trocknungsgases wurde auf 5 L min<sup>-1</sup> eingestellt. Die Proben wurden vor der Messung mit 0.2 µm Spritzenfiltern filtriert und verdünnt. Um Sättigungseffekte zu vermeiden wurde die Lösung verdünnt, bis das Signal der stärksten Masseladungsverhältnisse kleiner oder gleich einer Zählrate von 10<sup>6</sup> Zähler pro Sekunde betrug. Die Probe wurde mit Geschwindigkeiten von 10 µL min<sup>-1</sup> bis 30 µL min<sup>-1</sup> in das Gerät injiziert.

### **3.1.11. Fluoreszenzspektroskopie**

Fluoreszenzspektren wurden mit einem Fluoromax-4 Spektrofluorometer der Firma HORIBA Jobin Yvon aufgenommen. Hierfür wurden Fluoreszenzküvetten mit Schichtdicken von 10 mm x 10 mm, 1 mm x 10 mm und 2 mm x 10 mm aus Quarzglas (Suprasil) der Firma Hellma-Analytics verwendet. Routinemessungen in nicht aggressiven Lösungsmitteln wurden, wenn möglich, in Einmalküvetten aus Polystyrol (PS) oder Polymethylmethacrylat (PMMA), in den Größen 10 mm x 10 mm und 5 mm x 10 mm der Firma VWR, durchgeführt.

### **3.1.12. UV/VIS Absorptionsspektroskopie**

#### **3.1.12.1. PerkinElmer UV/VIS/NIR Spektrometer**

Stationäre UV/VIS-Absorptionsspektren wurden an einem Lambda 19 UV-VIS-NIR-Spektrometer der Firma PerkinElmer, Inc. durchgeführt. Hierfür wurden Quarzglasküvetten mit 1 mm, 2 mm und 10 mm Schichtdicke der Firma Hellma-Analytics verwendet.

#### **3.1.12.2. Jasco UV/VIS/NIR Spektrometer**

Für Routinemessungen wurden die stationären UV/VIS-Absorptionsspektren an einem V-750 UV-VIS-NIR-Spektrometer der Firma JASCO Inc. aufgenommen. Es wurden Quarzglasküvetten mit 1 mm, 2 mm und 10 mm Schichtdicke der Firma Hellma-Analytics verwendet. Messungen in nicht aggressiven Lösungsmitteln wurden, wenn möglich, in Einmalküvetten aus Polystyrol (PS) oder Polymethylmethacrylat (PMMA) in den Größen 10 mm x 10 mm und 5 mm x 10 mm der Firma VWR durchgeführt.

### **3.1.13. Elektronenmikroskopie (REM und STEM)**

Elektronenmikroskopiebilder wurden mit einem SU8030 Rasterelektronenmikroskop von Hitachi erhalten. Dieses Gerät wurde in den meisten Fällen im Transmissionsmodus bei Beschleunigungsspannungen um 30 kV betrieben. Für die Probenbereitung

wurden 5  $\mu\text{L}$  bis 15  $\mu\text{L}$  der zu messenden Nanopartikeldispersion auf kohlenstoffbeschichtete Kupfergrids (Quantifoil Micro Tools GmbH) pipetiert und im Anschluss an Luft getrocknet. Für REM-Bilder von Goldnanopartikeln mit Durchmessern größer als 50 nm wurden die Proben auf Siliziumwaver aufgetragen und an Luft getrocknet. Die Bilder wurden mit dem Programm ImageJ des National Institutes of Health ausgewertet [263, 264].

#### 3.1.14. Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die hydrodynamischen Durchmesser der hergestellten Nanopartikel wurden mit einem Delsa Nano C Particle Analyzer (Beckmann Coulter) gemessen. Hierfür wurden die zuvor zur Staubentfernung filtrierten Dispersionen in Küvetten aus Quarzglas (Hellma-Analytix, 10 mm x 10 mm) gegeben. Die Filtration erfolgte mit Spritzenvorsatzfiltern (0.2  $\mu\text{m}$ , 0.45  $\mu\text{m}$ ) aus Polytetrafluorethylen (PTFE), Nylon oder regenerierter Cellulose der Firma VWR. Die Küvetten wurden vor der Befüllung mit filtriertem Lösungsmittel ausgespült. Im Fall von Nanopartikeln, die in nicht aggressiven Lösungsmitteln dispergierbar waren, wurden die Messungen, in PS- oder PMMA-Einmalküvetten in den Größen 10 mm x 10 mm und 5 mm x 10 mm der Firma VWR durchgeführt.

#### 3.1.15. Infrarotspektroskopie

Infrarotspektren wurden mit einem FT-IR 4100 Spektrometer (JASCO Deutschland GmbH) gemessen. Es handelt sich hierbei um ein ATR-Infrarotspektrometer (engl. *attenuated total reflection* - abgeschwächte Totalreflexion). Molekulare Proben wurden als Feststoff direkt auf den Diamanten des Spektrometers gegeben. Im Fall von Nanopartikeln wurden die Partikel zunächst in einem möglichst volatilen Lösungsmittel dispergiert, aufkonzentriert und anschließend als Dispersion auf den Diamanten gegeben. Die Spektren wurden dann nach dem Verdampfen des Lösungsmittels aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm IGOR Pro (Wavemetrics Inc.).

## 3.2. Messung der thermischen Relaxation von Azobenzolen

### 3.2.1. Das Blitzlichtphotolyseexperiment

Der hier vorgestellte experimentelle Aufbau eines Laserblitzlichtphotolyseexperimentes wurde im Rahmen dieser Arbeit erstellt. In diesem Experiment wurde die Transmissionsänderung von kontinuierlichem, monochromatischem Licht (Abtastlicht) durch eine flüssige Probe nach Anregung durch einen 6 ns langen Laserpuls mit 355 nm Zentralwellenlänge beobachtet.

Das Abtastlicht wurde mit Hilfe einer 75 Watt Xenon-Kurzbogenlampe (Gehäuse Modell A-1010B, PTI, Lampe Typ XBO 75 W/2 OFR, OSRAM GmbH) erzeugt. Das durch die Lampe erzeugte intensive Infrarotlicht wurde durch einen luftgekühlten Bandbreitenfilter (FGS580, Thorlabs), sowie zwei Strahlteiler ( $T_{\text{avg}} > 85\%$  600-1200 nm;  $R_{\text{avg}} > 90\%$  325-475 nm, FM04, Thorlabs) abgetrennt. Anschließend wurde das Licht über eine Linse (Quarzglas,  $f = 150$  mm) auf den Eintrittspalt eines analogen Monochromators (Modell H20, HORIBA Jobin Yvon) fokussiert, mit dem die Wellenlänge des Abtastlichtes ausgewählt werden konnte (FWHM ca. 2 nm). Nun wurde das Licht mit Hilfe einer weiteren Linse (Quarzglas,  $f = 200$  mm) parallelisiert und über mehrere Aluminiumspiegel (PF10-03-F01, Thorlabs) sowie einer Linse (Quarzglas,  $f = 100$  mm) in die Probe fokussiert. Diese befand sich in einer Quarzglasküvette (QS, 10 x 10 mm, Hellma-Analytics), in einem selbst erstellten temperierbaren Halter mit Magnetprüher. Der Fokus des Lichtes befand sich in Strahlrichtung mittig, in Bezug auf den Anregungsstrahl jedoch möglichst dicht am Eintrittsfenster der Küvette, so dass der Anregungsstrahl so wenig wie möglich von nicht durchleuchteter Probe absorbiert wurde. Hinter der Probe wurde das transmittierte Licht zunächst parallelisiert und anschließend mit einer Linse (Quarzglas,  $f = 100$  mm) auf den Eintrittspalt einer Quarzfaser (Modell 77403 SMA, Oriel Instruments) fokussiert. Über die Quarzfaser gelangte das Licht in einen iHR550 Monochromator (HORIBA Jobin Yvon), der mit zwei Gittern (1200 Linien/mm und 300 Linien/mm) sowie einer CCD (Symphony II CCD, HORIBA Jobin Yvon) und einem Photomultiplier (Modell R6060, Hamamatsu Photonics) ausgestattet war. Es war möglich zwischen den Detektoren zu wechseln. Zeitabhängige Messungen

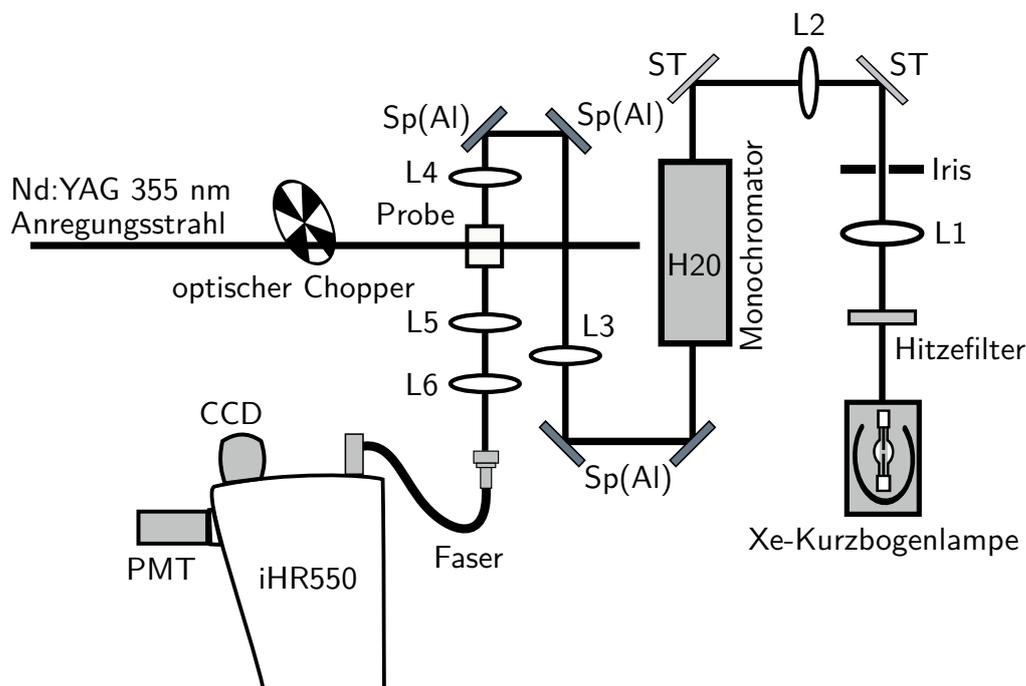
### 3. Experimentalteil

---

**Tabelle 3.6.** – Erwartete Lebensdauer  $\tau$  des zu messenden transienten Prozesses, dazu passende an das digitale Speicheroszilloskop extern angelegte Widerstände bei einem internen Eingangswiderstand von  $1\text{ M}\Omega$  sowie der jeweils resultierende Eingangswiderstand. Durch Anpassung an den jeweiligen transienten Prozess konnte so ein ideales Signal-Rausch-Verhältnis bei ausreichender Zeitaufösung erhalten werden.

erwartete Lebensdauer $\tau$	externer Widerstand	Innenwiderstand
$\tau \geq 10\text{ ms}$	keiner	$1\text{ M}\Omega$
$\tau = 1\text{ ms bis } 10\text{ ms}$	$150\text{ k}\Omega$	$130\text{ k}\Omega$
$\tau = 200\text{ }\mu\text{s} - 1\text{ ms}$	$18.0\text{ k}\Omega$	$17.7\text{ k}\Omega$
$\tau \leq 200\text{ }\mu\text{s}$	$1.0\text{ k}\Omega$	$1.0\text{ k}\Omega$

wurden jedoch mit Hilfe des Photomultipliers durchgeführt. Die so erzeugten Daten wurden mit Hilfe eines digitalen Speicheroszilloskops (Waverunner 6100A, Teledyne LeCroy) und IGOR Pro (Wavemetrics Inc.) aufgenommen und ausgewertet. Das Oszilloskop konnte mit Eingangswiderständen von  $50\text{ }\Omega$  sowie  $1\text{ M}\Omega$  betrieben werden. Ein höherer Eingangswiderstand liefert intensivere Signale, so dass kürzere Messzeiten möglich sind, die Zeitaufösung ist jedoch geringer als bei einem niedrigen Eingangswiderstand. Bei einem Eingangswiderstand von  $50\text{ }\Omega$  waren lange Integrationszeiten nötig, um zufriedenstellende Kinetiken zu erhalten. Durch Parallelschaltung von externen Widerständen an den  $1\text{ M}\Omega$ -Eingang konnte der Eingangswiderstand auf den optimalen Wert für das Gleichgewicht zwischen Signal-Rausch-Verhältnis und Zeitaufösung eingestellt werden. Je länger die Lebensdauer des zu messenden transienten Prozesses ist, desto größer darf der Eingangswiderstand sein. In Tabelle 3.6 sind extern angelegte Widerstände und der daraus resultierende Eingangswiderstand mit den dazu messbaren Lebensdauerbereichen dargestellt. Der Monochromator und die CCD wurden über das Programm LabSpec (HORIBA Jobin Yvon) gesteuert. Die zur Anregung genutzten Laserpulse wurden mit einem Nd:YAG-Laser (Spectron Laser Systems SL456G, Polytec GmbH) erzeugt und wiesen eine Pulslänge von 6 ns Halbwertsbreite (FWHM) auf. Die Zentralwellenlänge betrug  $1064\text{ nm}$  und wurde über zwei BBO-Kristalle durch Frequenzverdreifung auf eine Zentralwellenlänge von  $355\text{ nm}$  gebracht. Die Wiederholungsrate lag bei  $10\text{ Hz}$  und konnte auf  $1.25\text{ Hz}$  reduziert werden. Durch einen selbst erstellten optischen Chopper, der durch den Lasertrigger und ein mit der Software LabView (National Instruments) selbst erstelltes Programm gesteuert wurde, konnte die Wiederholungsrate bei Bedarf weiter



**Abbildung 3.1.** – Schematische Darstellung des Laserflashphotolyseexperimentes.

reduziert werden. Die maximal mögliche Pulsenergie lag bei  $20 \mu\text{J}/\text{Puls}$  (355 nm). Die Anregungspulse wurden über Aluminiumspiegel (PF10-03-F01, Thorlabs) unfokussiert im  $90^\circ$ -Winkel in Bezug auf das Abtastlicht in die Probe gelenkt und mit dem Fokus des Abtastlichtes überlappt. Der Strahldurchmesser des Anregungslichtes betrug ca. 8 mm und war über eine Größenordnung größer als der Fokus des Anregungslichtes. So wurde sichergestellt, dass sich der Abtaststrahl im angeregten Probenvolumen befindet. Hinter der Probe wurde der Anregungsstrahl mit möglichst geringer Streulichterzeugung geblockt. Das restliche Streulicht wurde durch einen 355 nm Notchfilter (Modell #67-106, Edmund Optics Inc.), welcher vor der Faser positioniert wurde, abgetrennt.

## 3.2.2. Die Messungen

### 3.2.2.1. Probenpräparation

Die Proben wurden, wenn nicht anders erwähnt, in Fluoreszenzküvetten der Firma Hellma Analytics (QS, 10 x 10 mm) durchgeführt. Die Konzentration der Proben

wurde, wenn nicht anders angegeben, auf Werte um  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  eingestellt (OD ca. 0.4 im *trans*-Zustand). Für die meisten Messungen in organischen Lösungsmitteln wurden die Proben in mit Kaliumhydrogenphthalat gesättigtem Methanol (KHP/MeOH) sowie in  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  3-(N-Morpholino)propansulfonsäure in DMSO (MOPS/DMSO) durchgeführt. Messungen in wässriger Umgebung wurden ebenfalls in gepufferten Lösungen durchgeführt. Je nach pH Wert wurden verschiedene Puffer verwendet (siehe Tab. 3.7). Die Puffer für den pH Bereich zwischen 2 und 8 wurden nach *McIlwaine et al.* hergestellt [265]. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der gemessenen Kinetiken, wurden mindestens drei Messungen unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

**Tabelle 3.7.** – Für Messungen bei verschiedenen pH Werten in wässrigen Lösungen verwendete Puffer.

pH Wert	Puffer
2.21	0.4 mL 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + 19.6 mL 0.1 M Citronensäure
3.01	4.11 mL 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + 15.89 mL 0.1 M Citronensäure
4.01	7.71 mL 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + 12.29 mL 0.1 M Citronensäure
5.01	10.30 mL 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + 9.70 mL 0.1 M Citronensäure
6.00	12.63 mL 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + 7.37 mL 0.1 M Citronensäure
7.00	16.47 mL 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + 3.53 mL 0.1 M Citronensäure
8.01	19.45 mL 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + 0.55 mL 0.1 M Citronensäure
8.75	91 mL 0.1 M $\text{NaHCO}_3$ + 9 mL 0.1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3$
10.04	100 mL 0.05 M $\text{NaHCO}_3$ + 21.4 mL 0.1 M NaOH
11.04	100 mL 0.05 M $\text{NaHCO}_3$ + 45.4 mL 0.1 M NaOH
12.02	100 mL 0.05 M $\text{NaHCO}_3$ + 53.8 mL 0.1 M NaOH

#### 3.2.2.2. Messungen für lange Relaxationszeiten

Die thermische Relaxation von Azobenzolen, welche in Zeitskalen von Stunden abliefern, wurde nach Anregung mit dem in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Lasersystem ( $15 \mu\text{J}/\text{Puls}$  für 30 min) mit einem konventionellen UV/VIS Spektrometer (siehe Kap. 3.1.12.1) verfolgt. Die Photoschalter wurden vor der Anregung auf die Zieltemperatur gebracht. Zwischen Messintervallen wurden die Proben temperiert und im Dunklen aufbewahrt und im Dunklen in den temperierten Probenhalter des Spektrometers platziert. Die Messintervalle wurden an die jeweilige Relaxationsgeschwindigkeit angepasst. Hierfür wurden zunächst Messungen in kurzen Zeitabständen von wenigen Minuten durchgeführt und daraus anschließend die Größenordnung der Lebensdauer abgeschätzt.

### 3.2.2.3. Messungen für kurze Relaxationszeiten

Für die Messung von kurzen Relaxationszeiten wurde der in Kapitel 3.2.1 beschriebene Aufbau genutzt. Für Hintergrundkorrekturen wurden Messungen ohne Probe und mit reinem Lösungsmittel unter gleichen Bedingungen aufgenommen. Die Spalte des iHR550-Monochromators wurden für maximale Sensitivität auf 2 mm eingestellt. Wenn nicht explizit anders angegeben, wurde der Photomultiplier bei -1000 V betrieben, die Pulsenergie wurde auf 10  $\mu$ J (bei 355 nm) eingestellt, die Proben wurden auf 25 °C temperiert und für jede Kinetik wurden 100 Messungen gemittelt. Die Wiederholungsrate des Lasers wurde auf die Relaxationsdauer eingestellt. Vor den Blitzlichtphotolysemessungen wurden die Spektren der *trans*-Proben unter statischen Bedingungen mit Hilfe des PerkinElmer UV/VIS Spektrometers (siehe Kap. 3.1.12.1) ermittelt.

## 3.3. Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

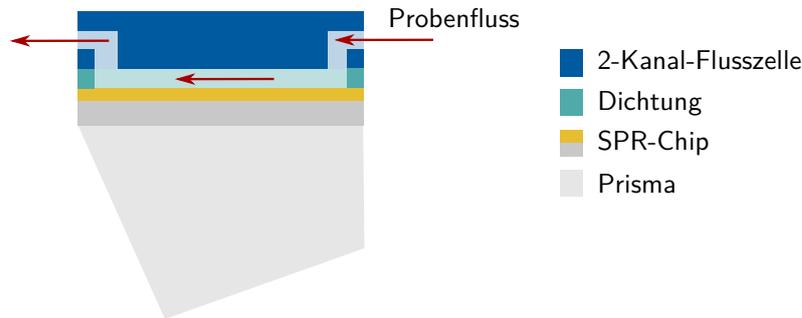
Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*engl. surface plasmon resonance spectroscopy* - SPR-Spektroskopie) wurde an zwei unterschiedlichen Geräten durchgeführt. Erste Messungen wurden mit einem Biosuplar 400T der Firma MIVITEC GmbH durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein primitives Gerät, an dem reproduzierbare Messungen nur schwer möglich sind. An späteren Zeitpunkten wurden daher Messungen mit einem hochentwickelten Gerät (Biacore X100) der Firma GE Healthcare Europe durchgeführt. Im Ergebnisteil (siehe. Kap. 4.2.4) ist kenntlich gemacht, mit welchem der Geräte die jeweils präsentierten Ergebnisse erhalten wurden.

### 3.3.1. Biosuplar 400T

Das Biosuplar 400T (MIVITEC GmbH) wurde mit der Software Plasmon06 (MIVITEC GmbH) gesteuert. Die Messzelle, bestehend aus einer 2-Kanal-Flusszelle mit Anschlüssen für Schläuche, dem SPR-Chip, einer Dichtung und einem Prisma (F1-65), ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Ein SPR-Chip besteht aus einem Glasblättchen, welches mit einer 50 nm dicken Goldschicht beschichtet ist. Die gelieferten SPR-Chips mussten zunächst funktionalisiert werden. Zur Reinigung wurden die

### 3. Experimentalteil

---



**Abbildung 3.2.** – Schematische Darstellung der Messzelle des Biosuplar 400T Instruments. Das Prisma ist am Gerät befestigt, die anderen Bauteile wurden auf dem Prisma angeordnet und über einen Hebel leicht angepresst. Zwischen Prisma und SPR-Chip wurde Immersionsöl gegeben.

SPR-Chips für 20 s in frisch hergestellte Peroxomonoschwefelsäure getaucht und anschließend sofort mit Wasser abgespült und getrocknet. Im Anschluss wurden die SPR-Chips über Nacht in einer  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  Lösung von Mercaptoundecansäure in Ethanol eingetaucht. Anschließend wurden die Blättchen mit reinem Ethanol gespült und getrocknet. Die so präparierten SPR-Chips wurden mit den oben genannten Komponenten zur kompletten Messzelle zusammengesetzt. Hierbei wurde Immersionsöl ( $n_{D20} = 1.6100 \pm 0.002$ , Cargille Labs) zwischen den SPR-Chip und das Prisma gegeben. Anschließend wurde der Aufbau auf Dichtigkeit geprüft und mit  $140 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $200 \text{ mmol L}^{-1}$  sowie  $346 \text{ mmol L}^{-1}$  NaCl-Lösungen kalibriert. Die Probenlösungen wurden über Schläuche (TYGON®-Schlauch 2001 Peristaltik/gelbbau, ProLiquid GmbH) mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (REGLO Analog, ISM 795, ISMATEC®, Cole-Parmer GmbH) durch die Flusszelle gepumpt ( $300 \mu\text{L min}^{-1}$ ). Im Anschluss konnte eine Immobilisierung mit Concanavalin A (ConA) erfolgen. Hierfür wurden 10 mg ConA in 10 mL einer NaCl-Lösung ( $140 \text{ mmol L}^{-1}$ ) gelöst. Zunächst wurde eine Basislinie mit einer NaCl-Lösung ( $140 \text{ mmol L}^{-1}$ ) gemessen, bis diese stabil war. Anschließend wurden 500 mg EDC in die ConA-NaCl-Lösung gegeben und gelöst. Diese Lösung wurde nun in die Flusszelle gepumpt. Nach ca. 45 min wurde das Signal stabil und die Lösung wurde gegen eine  $140 \text{ mmol L}^{-1}$  NaCl-Lösung ausgetauscht. Anschließend konnten die Probenlösungen gemessen werden. Vor jeder Probenmessung wurde zunächst Wasser, dann mindestens eine NaCl-Lösung mit einer der genannten Konzentrationen gemessen. Im Anschluss wurde zunächst der reine SPR-Puffer, in dem auch die Probe gelöst ist, durch die Zelle geleitet. Danach

wurde die Probe durch die Zelle gepumpt, bis das Signal stabil war, nachfolgend wurde wieder zum reinen SPR-Puffer gewechselt. Als Regenerationslösung wurde 0.8 M Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid verwendet. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit dem Programm IGOR Pro (Wavemetrics Inc.).

#### 3.3.2. Biacore X100

Die Messungen am Biacore X100 Instrument (GE Healthcare Europe) wurden mit HEPES-Ca-Mn Puffer durchgeführt, bei dem der Gehalt an NaCl im Vergleich zu üblichen Mengen reduziert wurde (pH 7.4, 20 mmol L<sup>-1</sup> HEPES, 0.5 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, 0.1 mmol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mmol L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>), da höhere NaCl-Konzentrationen die Nanopartikel ausfallen lassen. Für die Messungen wurde ein Streptavidin-Sensorchip verwendet (Sensor chip SA, GE Healthcare). Dieser weist eine mit Streptavidin funktionalisierte Carboxymethyl-Dextran-Matrix auf. Über diese Matrix wurde mit Biotin gekoppeltes ConA (Vector Labs, Biozol) auf den Sensorchip gebunden, so dass eine mit ConA funktionalisierte Dextran-Matrix vorlag. Der Referenzkanal blieb unfunktionalisiert. Nach der Immobilisierung betrug das zur Beladung proportionale SPR-Signal 2450 RU (Resonance Units - RU, willkürliche, zur Brechungsindex proportionale Einheit (vgl. Kap. 4.2.4)). Jeder Messzyklus bestand aus 60 s Phase mit Probenkontakt (Assoziationsphase), darauffolgendem Spülen mit reinem Puffer für 220 s (Dissoziationsphase), einer Regenerationsphase mit 0.8 M Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid (80 s) und 200 s reinem HEPES-Puffer und einer abschließenden zweiten Regenerationsphase mit 80 s 10 mmol L<sup>-1</sup> MES-Puffer (pH 6.1, 1 mmol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> + 1 mmol L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>) und 90 s HEPES-Puffer. Die in Wasser vorliegenden, mit Citrat und GlyAzoThiolen funktionalisierten, AuNP wurden im Verhältnis 1:1 mit HEPES-Puffer (pH 7.4, 40 mmol L<sup>-1</sup> HEPES, 1 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, 0.2 mmol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>) gemischt, so dass die finale Pufferkonzentration mit der Konzentration des Messpuffers übereinstimmt. Die Partikel waren unter diesen Bedingungen für ca. eine Woche stabil und ohne Einschränkungen schaltbar. Anschließend wurden zunächst Messungen der ungeschalteten Nanopartikel durchgeführt. Parallel dazu wurden 2 mL der in Puffer vorliegenden Partikel für 30 min mit 355 nm Pulsen (10 mJ/Puls) geschaltet. Die Partikel wurden im Dunklen bei Raumtemperatur aufbewahrt und 1100  $\mu$ L davon in das SPR-System gegeben. Anschließend wurden alle 30 min 30

Messpunkte über einen Zeitraum von 15 h durchgeführt.

## 3.4. Synthese von Nanopartikeln

### 3.4.1. Synthese von Citrat funktionalisierten Goldnanopartikeln

Die Darstellung der Goldnanopartikel mit Durchmessern zwischen 15 nm und 35 nm erfolgte durch die Citratreduktionsmethode nach einer Vorschrift von *Frens* [131]. Die Synthese von Nanopartikeln mit 5 nm sowie 50 nm bis 100 nm erfolgte nach der Vorschrift von *Haiss et al.* [117].

#### 3.4.1.1. AuNP mit 5 nm Durchmesser

Die Synthese erfolgt in Anlehnung an die Literatur [117].

Eine Mischung aus 90 mL einer wässrigen  $\text{HAuCl}_4$ -Lösung (0.01 Gew.-%,  $254 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) und 2 mL einer Natriumcitrat-Lösung (1 Gew.-%,  $38.8 \text{ mmol L}^{-1}$ ) wurde in einem Rundkolben vorgelegt und bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 7.5 mg  $\text{NaBH}_4$  ( $198 \mu\text{mol}$ ) in 10 mL Citratlösung (1 Gew.-%,  $38.8 \text{ mmol L}^{-1}$ ) gelöst. Von dieser Lösung wurde 1 mL mit Hilfe einer Pipette so schnell wie möglich in die Goldlösung gegeben. Die zunächst blassgelbe Lösung schlug sofort zu einem tiefen Weinrot um. Anschließend wurde für 5 min bei Raumtemperatur gerührt.

#### 3.4.1.2. AuNP mit 14 nm Durchmesser

Die Synthese erfolgte nach einer Vorschrift aus der Literatur [31].

Es wurden 200 mL einer wässrigen Lösung von  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$  (0.079 g, 0.2 mmol) in einem 500 mL Rundhalskolben unter Rückfluss und starkem Rühren zum Sieden gebracht. Anschließend wurden 20 mL auf  $60^\circ\text{C}$  erwärmte Citratlösung (1 Gew.-%,  $38.8 \text{ mmol L}^{-1}$ ) schnellstmöglich in die siedende Goldlösung gegeben. Im Anschluss wurde für 30 min weiter unter Rückfluss gerührt. Die blassgelbe Goldlösung wechselte nach Zugabe des Citrats zunächst ins Farblose, dann zu einer tiefblauen Farbe und zum Schluss nahm die Reaktionslösung ein tiefes Weinrot an. Die so hergestellten Partikel wurden vor eventuellen Ligandenaustauschreaktionen durch Zugabe von Wasser um den Faktor 1:10 verdünnt.

#### 3.4.1.3. AuNP mit 30 nm Durchmesser

Die Synthese erfolgte nach einer Vorschrift aus der Literatur [131].

Es wurden 200 mL einer wässrigen Lösung von  $\text{HAuCl}_4$  (0.01 Gew.-%,  $254 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) in einem 500 mL Rundhalskolben unter Rückfluss und starkem Rühren zum Sieden gebracht. Anschließend wurden 12.5 mL auf  $60^\circ\text{C}$  erwärmte Citratlösung (1 Gew.-%,  $38.8 \text{ mmol L}^{-1}$ ) schnellstmöglich in die siedende Goldlösung gegeben. Im Anschluss wurde für 30 min weiter unter Rückfluss gerührt. Die blassgelbe Goldlösung wechselte nach Zugabe des Citrats zunächst ins Farblose, dann zu einer tiefblauen Farbe und zum Schluss nahm die Reaktionslösung ein tiefes Weinrot an.

#### 3.4.1.4. AuNP mit 50-100 nm Durchmesser

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Literatur [117].

Bei dieser Synthese wurden nach *Frens* [131] dargestellte Goldnanopartikel mit Durchmessern um 30 nm als Wachstumskeime (*engl. Seeds*) verwendet. Hierfür wurden 30 mL der unaufgereinigten Goldnanopartikel mit 270 mL Wasser in einem Rundkolben bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde eine 0.2 M Hydroxylaminhydrochloridlösung hergestellt, indem 41.7 mg  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$  (0.6 mmol) in 3 mL Wasser gelöst wurden. Diese Lösung wurde zu den Seedpartikeln gegeben. Nun wurden unter starkem Rühren bei Raumtemperatur 2.5 mL einer frisch präparierten  $\text{HAuCl}_4$ -Lösung (1 Gew.-%,  $25.4 \text{ mmol L}^{-1}$ ) hinzugegeben. Nach ca. 5 min Rühren wurden Partikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm erhalten. Um größere Partikel zu erhalten, wurden diese Partikel wieder unaufgereinigt als Seedpartikel verwendet und die Wachstumsprozedur wiederholt. Die einzige Änderung war, dass dann nicht mehr mit Wasser verdünnt wurde, da sich die Partikelkonzentration durch das Wachstum nicht änderte.

#### 3.4.1.5. Teilfunktionalisierung der AuNP mit MUA

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Literatur [139].

Es wurden 5 mL einer nicht aufgereinigten Dispersion von Citrat funktionalisierten Goldnanopartikeln in einem Rundkolben vorgelegt. Anschließend wurden unter Rühren 10  $\mu\text{L}$  einer  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  Lösung von Mercaptoundecansäure in Ethanol

(10000-facher Überschuss) sowie 20  $\mu\text{L}$  einer Ammoniaklösung (25%) hinzugegeben. Die Dispersion wurde für ca. 5 min in einem Ultraschallbad behandelt und dabei geschüttelt. Nach ca. 18 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit Hilfe von Dialyse aufgereinigt. Der erfolgreiche teilweise Austausch der Liganden wurde mit Hilfe von Infrarotspektroskopie nachgewiesen.

#### 3.4.1.6. Teilfunktionalisierung der AuNP mit Photoschaltern

Die frisch hergestellten, mit Citrat-Molekülen geschützten Goldnanopartikel mit Konzentrationen zwischen  $0.2 \text{ g L}^{-1}$  und  $1 \text{ g L}^{-1}$  wurden durch Zentrifugation (702 g) und Redispersion in DMSO überführt. Parallel dazu wurden Stammlösungen mit Konzentrationen von  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  der von der AG Lindhorst (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) erhaltenen Glycoazobenzol-Photoschalter (**GlyAzoThiol(3)**, **GlyAzoThiol(5)**, **GlyAzoThiol(6)**) in DMSO hergestellt. Anschließend wurden 5 mL der in DMSO dispergierten Goldnanopartikel in einem 10 mL Rundkolben vorgelegt und 70-1500  $\mu\text{L}$  der **GlyAzoThiol(n)**-Stammlösung hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Volumen der zugegebenen Photoschalterstammlösung wurde so berechnet, dass der Photoschalter in einem Überschuss von 10:1 in Relation zu den auf den Ausgangspartikeln befindlichen Citratmolekülen vorlag. Die Konzentration der Ausgangspartikel wurde gravimetrisch und nach *Haiss et al.* mit Hilfe von UV/VIS-Absorptionsspektroskopie ermittelt [117]. Zur Berechnung der Stoffenge von Citrat in der Dispersion wurde angenommen, dass ein Citratmolekül eine Fläche von  $0.2 \text{ nm}^2$  einnimmt [78]. Anschließend wurden die teils mit den Photoschaltern und teils mit Citrat funktionalisierten Nanopartikel (**(Citrat)(GlyAzoThiol(n))@AuNP**) durch Dialyse gegen Wasser aufgereinigt und wieder in Wasser überführt.

#### 3.4.1.7. Darstellung von PEG-geschützten GlycoAzo-AuNP

Es wurden 1.5 mL einer wässrigen Lösung HS-PEG<sub>5</sub>-OH mit einer Konzentration von 1 Gew.-% hergestellt. Anschließend wurden 130  $\mu\text{L}$  einer zuvor hergestellten Stammlösung von **GlyAzoThiol(5)** ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , DMSO) mit 1 mL DMSO gemischt. Nun wurden die beiden Lösungen gründlich vermischt. In einem Rundkolben wurden 5 mL unaufgereinigte, mit Citrat funktionalisierte, Goldnanopartikel

(5 nmol L<sup>-1</sup> bis 10 nmol L<sup>-1</sup>) vorgelegt und die Lösung mit der zuvor hergestellten Mischung aus den neuen Liganden langsam unter Rühren bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nach 48 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurden die ((HO-PEG<sub>5</sub>-SH)(GlyAzoThiol(5))@AuNP) durch Dialyse aufgereinigt und wieder in Wasser überführt.

### 3.4.2. Synthese von Aufkonvertierungsnanopartikeln (UCNP)

#### 3.4.2.1. Darstellung von Lanthanoidoleaten

Die Lanthanoidoleate wurden nach modifizierten Vorschriften von *Na et al.* und *Park et al.* hergestellt [167, 169]. Sowohl die Kristallstruktur als auch die Partikelgröße sind vom Molverhältnis der jeweils eingesetzten Lanthanoidoleate abhängig (siehe Kap. 2.3.2.2) [164, 169]. Im Folgenden ist die Synthese für einen typischen Fall gezeigt (sphärische 40 nm UCNP mit hexagonalem Kristallgitter). Im Kapitel 4.4.2.1 können die Verhältnisse für weitere Partikelgrößen nachgeschlagen werden. Für die Darstellung des Natriumoleates wurden zunächst 40 mmol (11.3 g) Ölsäure in einem Gemisch aus 80 mL Ethanol und 80 mL Wasser in einem Rundkolben suspendiert und unter Rühren auf 50 °C erwärmt. Anschließend wurden 80 mL einer wässrigen 0.5 M NaOH-Lösung (40 mmol NaOH) zugegeben. Daraufhin bildete sich eine klare farblose Lösung, die für 2 h bei 50 °C gerührt wird. Für die Lanthanoidlösung wurden YCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (3.28 g, 10.8 mmol), YbCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (1.00 g, 2.59 mmol), ErCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (0.11 g, 0.29 mmol) und GdCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (0.27 g, 0.72 mmol) in einer Mischung aus 80 mL EtOH und 80 mL H<sub>2</sub>O im Ultraschallbad gelöst. Anschließend wurde die auf Raumtemperatur abgekühlte Natriumoleatlösung unter Rühren zur Lanthanoidlösung hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt war ein wachsartiger, leicht gelblicher Niederschlag. Die Reaktionsprodukte wurden durch Erwärmen mit einer Mischung aus Ethanol, Hexan und warmem Wasser in einen Schütteltrichter überführt und ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde verworfen und die organische Phase wurde dreimal mit *circa* 300 mL, 50 °C warmem Wasser ausgeschüttelt. Die organischen Lösungsmittel wurden anschließend an einem Rotationsverdampfer entfernt. Restliches Wasser wurde durch Lyophilisation über Nacht entfernt und man erhielt typischerweise die farblose, hygroskopische und wachsartige Produktmischung mit einer Ausbeute von 80% (11 g). Das tatsächliche

Verhältnis der Lanthanoide im Produkt wurde erst in den Nanopartikeln mit Hilfen von ICP-OES ermittelt.

#### 3.4.2.2. Synthese von Oleat-funktionalisierten UCNP

Die Darstellung der mit Oleat-Molekülen geschützten  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er,Gd-UCNP erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift nach *Na et al.* [169]. Ausgangsmaterial für die Synthese waren die zuvor hergestellten, möglichst wasserfreien Lanthanoidoleate. Die Synthese kann mit verschiedenen Verhältnissen von den beteiligten Lösungsmitteln Ölsäure und 1-Octadecen erfolgen um die Form und Größe der Partikel zu beeinflussen (siehe Kap. 2.3.2.2) [169]. Hier wird die Synthese beispielhaft für das Verhältnis 5/16 (Ölsäure/Octadecen) beschrieben, die mit den im Kapitel 3.4.2.1 beschriebenen Lanthanoidoleaten als Edukt, Nanopartikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 40 nm liefert. In einem typischen Ansatz wurden die Lanthanoidoleate (4.77 g, 5 mmol), Ölsäure (22.25 g, 25 mL) und 1-Octadecen (63.12 g, 80 mL) in einen Dreihalskolben eingewogen und auf 40 °C erwärmt. Die Suspension wurde zunächst für 10 min mit Argon gespült, anschließend wurde für 10 min Vakuum angelegt. Nach wiederholtem 10 minütigem Spülen mit Argon wurde die Suspension unter Vakuum langsam auf 120 °C erwärmt. Nachdem die Suspension aufhörte zu sieden, wurde mit Argon gespült und unter Argon für 30 min bei 150 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit einem Wasserbad auf 30-40 °C abgekühlt und eine Lösung von NH<sub>4</sub>F (0.74 g, 20 mmol) und NaOH (0.50 g, 12.5 mmol) in 50 mL MeOH so schnell wie möglich unter starkem Rühren hinzugegeben. Die neu gebildete farblose, trübe Suspension wurde für 40 min bei 40 °C unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung zunächst auf 50 °C erwärmt und das Methanol vorsichtig unter Vakuum entfernt. Zum Schluss wurde die Temperatur auf 70 °C erhöht und gerührt, bis die Suspension zu sieden aufhört. Anschließend wurde die Reaktion abwechselnd für je 10 min mit Argon gespült und evakuiert. Nach zwei Wechseln wurde die Suspension unter Vakuum auf 120 °C erwärmt und für 30 min gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktion unter Argon mit einer Rate von 10 °C/min auf 300 °C erwärmt und nach 1.5 h rühren wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Im Anschluss wurden die Nanopartikel durch Zugabe eines Überschusses von Ethanol gefällt, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die gebildeten

Nanopartikelpellets in n-Hexan oder Toluol redispergiert. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt. Typischerweise wurden so 100 mL UCNP-Dispersion mit Konzentrationen von  $3\text{-}11\text{ g L}^{-1}$  (entspricht Ausbeuten von 30-70%) erhalten.

#### 3.4.2.3. Darstellung von Aldehyd-funktionalisierten UCNP

Die Umfunktionalisierung der mit Oleatmolekülen funktionalisierten UCNP erfolgte nach der Vorschrift von *Zhou et al.* [177]. Die in Hexan vorliegenden UCNP wurden in einem 250 mL Zweihalskolben auf eine Konzentration von  $1\text{ g L}^{-1}$  auf ein Volumen von 100 mL verdünnt und unter schwachem Rühren in einem Ethanol/Trockeneisbad auf  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Anschließend wurde mit Argon gespült, um Stickstoff aus dem Kolben zu entfernen. Anschließend wurde für 1 h Ozon ( $c_{\text{O}_3} = 0.12\text{ g L}^{-1}$ , 2 L/h, Labor-Ozonisator 301.19, Erwin Sander Elektroapparatebau GmbH) durch die Dispersion geleitet. Nach kurzer Zeit konnte bereits eine intensive Blaufärbung der klaren Dispersion beobachtet werden. Anschließend wurde der Ozonisator abgeschaltet und für 10 min reiner Sauerstoff und dann Argon durch die Lösung gespült, bis die Blaufärbung vollständig verschwand. Nachdem die Dispersion Raumtemperatur erreichte, wurden 100  $\mu\text{L}$  DMS hinzugegeben und für 3 h gerührt. Die bei der Umfunktionalisierung ausgefallenen Partikel wurden nach Abtrennen des überstehenden Lösungsmittels in 100 mL EtOH redispergiert und über Nacht gerührt. Die Partikel wurden durch dreimaliges Zentrifugieren und Redispergieren in EtOH aufgereinigt. Es wurden 100 mL Aldehyd-UCNP mit einer Konzentration von  $0.4\text{-}0.9\text{ g L}^{-1}$  (Ausbeute 20%) erhalten.

#### 3.4.2.4. Thiolisierung der UCNP

Die Thiolisierung der Aldehyd-funktionalisierten UCNP erfolgte nach einer Vorschrift von *Zhou et al.* [177]. Es wurden 50 mL der in Ethanol vorliegenden, mit Aldehyd funktionalisierten UCNP mit 50  $\mu\text{L}$  einer Lösung von Cysteamin-Hydrochlorid in EtOH ( $0.4\text{ g L}^{-1}$ ) versetzt und für 48 h unter Rückfluss gekocht. Anschließend wurden die Partikel durch Zentrifugieren und Redispergieren in Ethanol aufgereinigt. Es wurden 40 mL Thiol/Aldehyd-UCNP in Ethanol ( $c_{\text{CHO}} = 32.6\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $c_{\text{SH}} = 1.7\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ) mit einer Konzentration von  $0.1\text{-}0.2\text{ g L}^{-1}$  (Ausbeute 23%) erhalten.

#### 3.4.2.5. Peptidkupplung der UCNP

Direkt vor der Kupplung wurden 0.7 mg des nach Kapitel 3.1.2 hergestellten Peptids **JK-LE**, welches eine Thiolgruppe am N-Terminus aufweist, in ein Mikroreaktionsgefäß eingewogen. Um die gebildeten Disulfidbrücken zu brechen, wurden 75  $\mu\text{L}$  Mercaptoethanol und 1425  $\mu\text{L}$  EtOH hinzugegeben und für 20 min geschüttelt. Anschließend wurde sowohl das EtOH als auch das Mercaptoethanol im Vakuum entfernt und das Peptid in 1500  $\mu\text{L}$  EtOH gelöst. Nun wurden 5 mL der zuvor hergestellten Thiol/Aldehyd-UCNP in einem 10 mL Kolben vorgelegt und für 10 min reiner Sauerstoff durch die Dispersion gespült sowie 25  $\mu\text{L}$  DDQ hinzugegeben. Anschließend wurde die Peptidlösung hinzugegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Partikel wurden durch Zentrifugation und Redispersion aufgereinigt und zum Schluss in Ethanol redispersiert, um eine geschätzte Peptidkonzentration von  $5.2 \mu\text{mol L}^{-1}$  zu erhalten ( $c_{\text{UCNP}} = 0.6 \text{ g L}^{-1}$ ).

### 3.5. Synthese der Peptide für die FRET-Experimente

Die mit den Fluoreszenzfarbstoffen TAMRA oder Fluorescein markierten Peptide wurden nach der bereits beschriebenen Methode (siehe Kap. 3.1.2) synthetisiert. Einige Ansätze der Peptide wurden mit Hilfe eines Activo-P11 automatisierten Peptidsynthesizers der Firma Activotec dargestellt. Es wurden Fmoc-Alanin-Wang-LL-Harz (für Peptide **JK-LE** und **JK-LK1**, Beladung 0.32 mmol/g) und Fmoc-Valin-Wang-LL-Harz (Beladung 0.6 mmol/g) der Firma Merck Millipore verwendet. Der Farbstoff TAMRA für das Referenzpeptid **JK-LA** und das Peptid **JK-LK1** wurde an der gewünschten Position über ein an der Seitenkette mit der 4-Methyltrityl-Schutzgruppe (Mtt) geschütztes Lysin eingeführt. Hierfür wurde N- $\alpha$ -Fmoc-N- $\epsilon$ -4-methyltrityl-L-Lysin (Fmoc-Lys(Mtt)-OH) im vierfachen Überschuss im Vergleich zum Harz für je 2 h gekuppelt. Nach Fertigstellung der gesamten Aminosäuresequenz wurde zunächst die Mtt-Schutzgruppe abgespalten. Hierfür wurde 1 min mit 2 mL 1% TFA in DCM geschüttelt und sofort danach mit DCM gewaschen. Dies wurde wiederholt bis die durch das Mtt-Spaltprodukt gelb gefärbte Waschlösung nicht mehr gelb erschien. Anschließend wurde gründlich mit DCM und DMF gespült. Im Fall des mit Fluorescein markierten **JK-LE** wurde der

Tabelle 3.8. – Synthetisierte Peptide

Peptid	Ladung	$m_{\text{calc}}$ in m/z	$m_{\text{obs}}$ in m/z	$t_{\text{R}}$ in min	HPLC + Gradient
JK-LE	+3	1038.5883	1038.5882		LaChrom-Elite
	+4	779.1932	779.1995	15.83	C18
	+5	623.5561	623.5568		AG1
JK-LK1	+3	1141.6327	1141.6382		LaChrom-Elite
	+4	856.4765	856.4788	25.40	C18
	+5	685.3827	685.3824		AG2
JK-LA	+3	1141.6327	1141.6304		LaChrom-Elite
	+4	856.4765	856.4758	15.10	C18
	+5	685.3827	685.3825		AG4
JK-LE2	+3	1123.6012	1123.6012		LaChrom-Elite
	+4	842.9528	842.9534	23.60	C18
	+5	674.5638	674.5649		AG1

Farbstoff am N-Terminus nach der üblichen Fmoc-Abspaltung angekuppelt. Für die Farbstoffkupplung wurden NHS-Ester der Farbstoffe verwendet (TAMRA-NHS und FAM-NHS). Für die Kupplung wurden im Vergleich zum Peptid 5.5 Äquivalente DIPEA und 1.2 Äquivalente des Farbstoffes in 1 mL DMF gelöst und zum Harz hinzugegeben. Anschließend wurde über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde aufgefangen und das gekuppelte Harz mit DCM und DMF gewaschen. Der Erfolg der Kupplung wurde mit einer Probeabspaltung überprüft. Im Falle des am N-Terminus markierten Peptids konnte nun die Vollabspaltung erfolgen. Im Fall der an den Seitenketten markierten Peptide erfolgte die Vollabspaltung erst nach der Fmoc-Abspaltung.

### 3.5.1. Konzentrationsbestimmung der Peptide

Die hergestellten Peptide wurden in Form von Hexafluorisopropanol-Stammlösungen verwendet, da die jeweils benötigten Mengen für direkte Einwaagen zu gering waren. Die Konzentration dieser Stammlösungen wurde mit Hilfe von UV/VIS-Absorptionsspektroskopie ermittelt. Im Fall der mit Farbstoff markierten Peptiden wurden hierfür Eichkurven von Farbstoff-markierten Aminosäuren genutzt. Für das mit Fluorescein markierte Peptid wurde eine Eichkurve in Form einer linearen

### 3. Experimentalteil

---

Geradengleichung (siehe Gleichung 3.1) bei pH 7.4 in 50 mM PBS-Puffer genutzt:

$$OD(280\text{ nm}) = 0.002 \cdot c(\text{in } \mu\text{M}) - 0.007. \quad (3.1)$$

Für die mit TAMRA markierten Peptide wurde eine Eichkurve in Form einer linearen Geradengleichung (siehe Gleichung 3.2) in 50 mM TRIS/HCl-Puffer (10 mM MgCl<sub>2</sub>) bei pH 7.5 genutzt:

$$OD(355\text{ nm}) = 0.00529 \cdot c(\text{in } \mu\text{M}) - 0.0044. \quad (3.2)$$

Mit Hilfe dieser Gleichungen ist es möglich aus der optischen Dichte bei 355 nm bzw. 280 nm der entsprechend präparierten Messlösungen die Konzentration der Peptidlösungen zu ermitteln. Für Peptide ohne Farbstoffe wurde ein selbst erstelltes Pythonskript verwendet, das den Extinktionskoeffizienten bei 214 nm (in 20 Vol.-% ACN in H<sub>2</sub>O und 0.1 Vol.-% Ameisensäure) des Peptids nach der Methode von *Kuipers et al.* [266] anhand der Aminosäuresequenz berechnete. Für die Hexafluorisopropanol-Stammlösungen wurden einige Milligramm des lyophilisierten Peptids in ein Mikroreaktionsgefäß eingewogen und mit 1 mL Hexafluorisopropanol gelöst. Die Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden drei verschiedene Volumina der Stammlösung in Mikroreaktionsgefäße gegeben, das Lösungsmittel restlos abgedampft und die Peptide anschließend mit dem benötigten Puffer aufgelöst, so dass drei Lösungen, deren Konzentrationen im Bereich der Eichkurven lagen (5-400 μM), resultierten. Anschließend wurden die Lösungen mit dem PerkinElmer UV/VIS Absorptionsspektrometer untersucht. Aus den hintergrundkorrigierten UV/VIS-Spektren wurde die optische Dichte bei der entsprechenden Wellenlänge genutzt, um mit der Eichkurve die Konzentration zu ermitteln. Zur Verwendung der Peptide konnte dann die gewünschte Menge Stammlösung entnommen werden. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels konnte das Peptid im gewünschten Lösungsmittel gelöst werden.

## 3.6. Synthese des photolabilen **N**-(6-Bromo-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl-AAPV (**Bhc**AAPV)

### 3.6.1. Synthese des Peptids AAPV

Das kurze, bioaktive Peptid AAPV wurde nach der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Methode synthetisiert. Die Beladung des Harzes betrug  $0.18 \text{ mmol g}^{-1}$ , die Ansatzgröße betrug  $0.05 \text{ mmol}$  (entspricht  $277.7 \text{ mg}$  Fmoc-Val-NovaSyn®TGA). Die einzige Besonderheit in diesem Fall war, dass das Peptid zunächst nicht vom Harz abgespalten wurde. Der Grund hierfür war, dass die folgende Kupplung an die photoaktive Schutzgruppe 6-Bromo-7-hydroxy-4-hydroxymethylcumarin (*Bhc*OH) an der festen Phase durchgeführt wurde, um die anschließende Aufreinigung erheblich zu erleichtern.

### 3.6.2. NHS-Aktivierung von **Bhc**OH

Die Aktivierung sowie die Darstellung des Konjugates **Bhc**AAPV wurde nach einer Adaption der Vorschrift von *Marter et al.* durchgeführt [195]. Zunächst erfolgte eine NHS-Aktivierung des *Bhc*OH. Hierfür wurden  $8.9 \text{ mg}$  *Bhc*OH ( $33 \text{ }\mu\text{mol}$ ) in einen  $10 \text{ mL}$  Spitzkolben mit Rührfisch eingewogen. Anschließend wurde  $1 \text{ mL}$  trockenes Dimethylformamid (DMF) hinzugegeben und gerührt. Die Temperatur wurde mit Hilfe eines Heizbades konstant auf  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  gehalten. In einem  $1.5 \text{ mL}$  Mikroreaktionsgefäß wurden  $12.8 \text{ mg}$  *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat (DSC,  $50 \text{ }\mu\text{mol}$ ) eingewogen und  $300 \text{ }\mu\text{L}$  trockenes DMF hinzugegeben und durch vortexen vermischt. Nun wurden  $25.2 \text{ }\mu\text{L}$  ( $182 \text{ }\mu\text{mol}$ ) frisch über Natriumhydroxid destilliertes, trockenes Triethylamin ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) in den Spitzkolben gegeben. Die zuvor farblose, leicht trübe Lösung klärte sich und wurde gelb. Vor dem Hinzugeben der DSC-Lösung musste der Kolben vor Licht geschützt werden, da die aktivierte Verbindung photolabil und hochreaktiv ist. Nun erfolgte die Zugabe der DSC-Lösung bei ausgeschaltetem Raumlicht (Nutzung einer Gelblichtlampe). Der Kolben wurde mit Argon gespült und mit einem Argon gefüllten Ballon verschlossen. Die Reaktion wurde über Nacht für mindestens  $12 \text{ h}$  unter Argon bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  im Dunklen gerührt. Nach erfolgter Reaktion wurden  $5 \text{ }\mu\text{L}$  der

Reaktionslösung entnommen und durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  ACN verdünnt. Von dieser Probe wurde eine analytische HPLC-Analyse angefertigt, der Hauptpeak aufgefangen und die erfolgreiche Aktivierung mit Massenspektroskopie bestätigt.

#### 3.6.3. Kupplung von AAPV an BhcOH

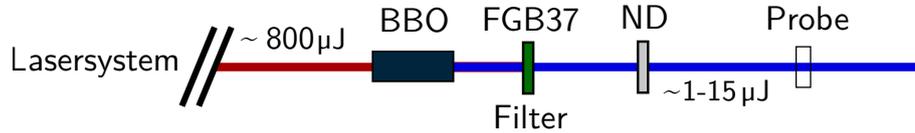
Die anschließende Kupplung nach Adaption der Vorschrift von *Marter et al.* wurde in einem vor Licht geschützten Reaktor für Festphasenpeptidsynthese durchgeführt [195]. Hierfür wurden 32.33 mg (entspricht 2.07 mg bzw. 5.8  $\mu\text{mol}$  AAPV) des am Harz befindlichen Peptids in den Reaktor eingewogen und mit Hilfe von 6 mL DMF für 30 min gequollen. Nach dem Quellen wurde das DMF entfernt, das Peptid noch dreimal mit je 6 mL DMF gewaschen. Anschließend wurde die über Nacht gerührte, frisch aktivierte, BhcOH-Lösung im Dunklen in den Reaktor gegeben und über Nacht für mindestens 12 h bei Raumtemperatur (*circa* 20 °C) geschüttelt. Nach der Kupplung wurde die Reaktionslösung zum Rückerhalten von nicht reagiertem BhcOH in ein Gefäß gespült. Anschließend wurde das am Harz befindliche Kupplungsprodukt gründlich mit DCM und DMF gewaschen und eine Probeabspaltung (siehe Kap. 3.1.3) durchgeführt. Nach Bestätigung des Kupplungserfolges wurde eine Vollabspaltung unter Gelblight durchgeführt und das Produkt mit HPLC aufgereinigt, lyophilisiert und in einem dunklen Mikroreaktionsgefäß beim -20 °C aufbewahrt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 11% (0.45 mg) erhalten.

## 3.7. Freisetzungsexperimente nach Einphotonenabsorption

### 3.7.1. Experimenteller Aufbau

Der für die Einphotonenfreisetzung verwendete Aufbau ist in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt. Als Strahlungsquelle diente das in Kapitel 3.8.1 beschriebene Femtosekundenlasersystem. Die Pulse mit einer Zentralwellenlänge von ca. 800 nm wurden mit Hilfe eines BBO-Kristalls ( $\beta\text{-BaB}_2\text{O}_4$ ) auf ca. 400 nm frequenzverdoppelt. Anschließend wurde das Anregungslicht mit Neutraldichtefiltern auf die gewünschte

Anregungsenergie eingestellt. Um in diesem Fall unerwünschte Zweiphotonenabsorption zu vermeiden, wurde das Licht nicht fokussiert und direkt in die Probe gelenkt.



**Abbildung 3.3.** – Schematische Darstellung des Experimentes zur Messung der Freisetzung von AAPV nach Einphotonenabsorption. Das Licht wurde durch einen BBO-Kristall frequenzverdoppelt, die fundamentale Laserstrahlung mit einem Farbfiler (FGB37, Schott) abgetrennt. Mit einem Neutraldichtefilter (ND) kann die Anregungsenergie eingestellt werden.

### 3.7.2. Messung der Einphotonenfreisetzung von AAPV

Um die Anregungsintensität ( $I_0$ ) in  $\text{mols}^{-1}$  des Aufbaus zu ermitteln, wurde die sogenannte Ferrioxalataktinometrie durchgeführt [267, 268]. Hierfür wurde aus dem frisch hergestellten Ferrioxalat (siehe Kap. 3.7.3) eine 6 mM Lösung von Kaliumferrioxalat in 50 mL Schwefelsäure sowie eine 0.1 Gew.% Lösung von 1,10-Phenantrolin in einem Puffer aus 0.5 M Schwefelsäure und 1.6 M Natriumacetat hergestellt. Jeweils 200  $\mu\text{L}$  der Ferrioxalatlösung wurden unter den gleichen Bedingungen wie nachfolgend das **BhcAAPV** mit einer Energie von 200 nJ/Puls bestrahlt. Nach verschieden langen Bestrahlzeiten wurde die Lösung mit 33  $\mu\text{L}$  der Phenantrolinlösung gemischt und in einer 1 mm QS-Küvette am PerkinElmer UV/VIS-Spektrometer (Kap. 3.1.12) vermessen. Die für die Kalibrierung notwendige Anregungsintensität  $I_0$  wurden durch Auslesen der optischen Dichte des Gemisches bei einer Wellenlänge von 510 nm entsprechend Gleichung 3.3 erhalten:

$$I_0 = \frac{\Delta A^{510nm} \cdot V_1 \cdot V_2}{\Delta t \cdot 1000 \cdot \phi^\lambda \cdot \epsilon^{510nm} \cdot V_2 \cdot l(1 - 10^{-A_\lambda})}. \quad (3.3)$$

Hierbei entsprechen  $\Delta A^{510nm}$  der Differenz der optischen Dichten der bestrahlten und einer unbestrahlten Referenz 510 nm,  $\Delta t$  der Bestrahlungsdauer,  $l$  der Pfadlänge der Küvette,  $A_\lambda$  der Absorption der Probe bei der Anregungswellenlänge,  $\phi^\lambda$  der literaturbekannten Quantenausbeute des Prozesses bei der Anregungswellenlänge  $\lambda$  und  $\epsilon^{510nm}$  dem molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten der Lösung bei 510 nm

in  $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .  $V_1$  ist das Volumen der bestrahlten Lösung,  $V_2$  ist das aus der bestrahlten Lösung entnommene Volumen, welches mit der Phenantrolin-Lösung vermischt wird und  $V_3$  entspricht dem Gesamtvolumen der Messlösung. Die Quantenausbeute von Ferrioxalat beträgt bei 400 nm 1.14 [267, 269]. Anschließend wurde unter gleichen Anregungsbedingungen eine 50  $\mu\text{M}$  **BhcAAPV**-Lösung bestrahlt und jeweils 30  $\mu\text{L}$  Proben in variierenden Zeitabständen entnommen und mit Hilfe der Primaide™ HPLC (siehe Kap. 3.1.5) analysiert. Hierbei wurde der Gradient AG1 (siehe Tab. 3.1) verwendet. Zur Kalibrierung wurden Chromatogramme von **BhcAAPV** bei definierten Konzentrationen aufgenommen. Hauptmerkmal der Freisetzung war das Verschwinden des Konjugatpeaks im Chromatogramm.

#### 3.7.3. Darstellung Ferrioxalat

Um die Anregungsbedingungen bei der Einphotonenabsorptionsfreisetzung zu ermitteln, wurde die sogenannte Ferrioxalataktinometrie angewendet [268, pp. 601–616]. Aufgrund seiner Instabilität muss das dafür benötigte Kaliumferrioxalat frisch hergestellt werden [270]. Hierfür wurden zunächst eine 1.5 molare  $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ -Lösung sowie eine 1 molare  $\text{FeCl}_3$ -Lösung hergestellt. In einer typischen Reaktion wurden dann 250 mL der Kaliumoxalatlösung in einem 500 mL Erlenmeyerkolben vorgelegt und stark gerührt. Anschließend wurden 83.3 mL der Eisenchloridlösung unter Lichtschutz zugegeben, so dass ein 4.5-facher Überschuss an Kaliumoxalat vorlag und es wurde für eine Stunde im Dunklen bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt fiel als grüner, kristalliner Feststoff aus. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei 4 °C gelagert und am folgenden Tag filtriert und dreimal aus heißem Wasser umkristallisiert. Nach Lyophilisation unter Lichtschutz wurden 8.5 g (21%)  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  erhalten.

## 3.8. Experiment zur Messung von Fluoreszenz nach Zweiphotonenabsorption

### 3.8.1. Das Femtosekundenlasersystem

Die für die Zweiphotonenabsorption (2PA) nötigen ultrakurzen Strahlungspulse wurden in einem Femtosekundenlasersystem von Coherent erzeugt (siehe Abb. 3.4).

Dieses besteht aus einem modengekoppelten Titan-Saphir-Oszillator, welcher die Pulse erzeugt (Vitesse-800, Coherent) und einem regenerativen Verstärker, der die Pulse verstärkt (Hidra-25, Coherent). Der Vitesse-800 wird kontinuierlich von einem Nd:YVO<sub>4</sub>-Laser (Neodym-Yttrium-Orthovanadat, Verdi, Coherent) gepumpt. Die im Vitesse-800 erzeugten Pulse haben eine Zentralwellenlänge von ca. 800 nm, eine Dauer von *circa* 85 fs und eine Wiederholungsrate von 80 MHz. Im Hidra-25 werden die Pulse anschließend mit Hilfe der *Chirped-Pulse-Amplification (CPA)* Methode verstärkt. Der Verstärker besteht aus einem Ti:Saphir-Oszillator und wird durch einen Nd:YLF-Laser (Neodym-Yttrium-Lithium-Fluorid, Evolution 15, Coherent) mit einer Wiederholungsrate von 1 kHz gepumpt. Die so erzeugten Pulse weisen eine Wiederholungsrate von 1 kHz auf, haben eine Pulsdauer von *circa* 85 fs und Pulsenergien von bis zu 1 mJ.

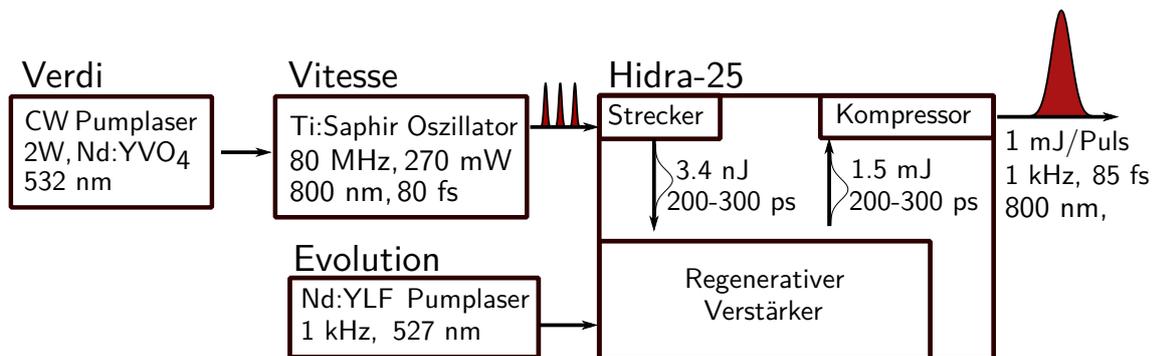


Abbildung 3.4. – Schematische Darstellung des verwendeten Femtosekundenlasersystems.

### 3.8.2. Experimenteller Aufbau

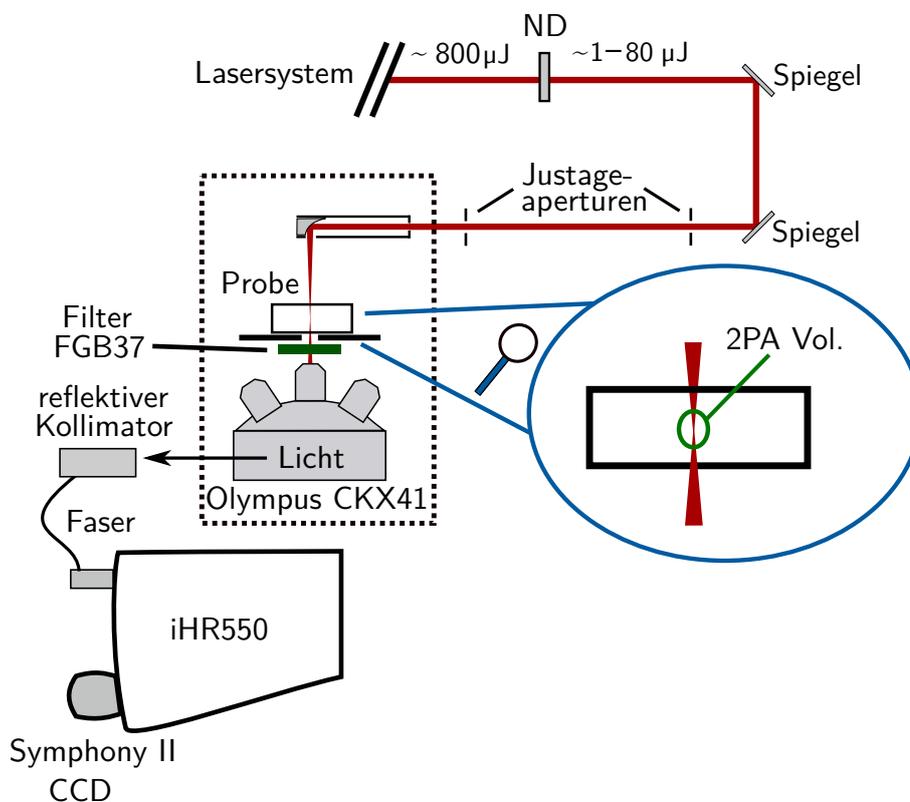
Der hier vorgestellte Aufbau zur Messung von Fluoreszenzspektren nach Zweiphotonenabsorption wurde im Rahmen dieser Arbeit erstellt. Ein schematischer Überblick des Aufbaus ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Damit die Zweiphotonenabsorption ausschließlich im Bereich des fokussierten Lichtes stattfindet, dürfen die bereitgestellten Laserpulse nicht zu hohe Energien aufweisen (siehe Kap. 2.6.2). Im Fall des hier verwendeten Aufbaus und Lasersystems wurde ein Grenzwert von ca. 15  $\mu$ J/Puls ermittelt. Die aus dem Lasersystem kommenden Pulse wurden mit Hilfe von Neutraldichtefiltern auf die gewünschte Pulsenergie eingestellt. Anschließend wurden

sie durch zwei Aperturen geleitet, so dass der Fokus in der Probe exakt reproduzierbar eingestellt werden konnte. Anschließend wurden die Pulse mit Hilfe eines Off-Axis-Parabolspiegels mit Silberbeschichtung (MPD129-P01, Thorlabs) in den Strahlengang eines Olympus CKX41 Mikroskops eingekoppelt, so dass sich der Fokus in der Mitte der Probe befand. Hinter der Probe wurden die Pulse der fundamentalen Laserstrahlung mit Hilfe eines Kurzpassfilters (Cut-Off 750 nm, FESH0750, Thorlabs) von der emittierten Strahlung abgetrennt. Das von der Probe emittierte Licht wurde von einem MPLN10x Objektiv (NA 0.25, Feldzahl 22, FL 18 mm, Arbeitsabstand 10.6 mm) eingesammelt. Ein an Stelle eines Okulars eingebauter, reflektiver Kollimator (RC08SMA-P01, Thorlabs) koppelte das Fluoreszenzlicht in eine optische Faser (105  $\mu\text{m}$  Kern, NA = 0.22, M15L05, Thorlabs) ein. Diese leitete das Licht in ein iHR550 Spektrometer (HORIBA Jobin Yvon), welches mit einer Symphony II CCD Kamera (HORIBA Jobin Yvon) ausgestattet war. Für die Datenaufnahme wurde das Programm LabSpec (HORIBA Jobin Yvon) genutzt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm IGOR Pro (Wavemetrics Inc.).

## 3.9. Zweiphotonenabsorptionsmessungen

### 3.9.1. Messung der Zweiphotonenabsorptionsquerschnitte

Die zu messenden Proben wurden in Küvetten aus Quarzglas gefüllt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen in den verschlossenen Küvetten verblieben. Es wurden Küvetten mit 200  $\mu\text{L}$  Volumen verwendet, um den Probenverbrauch zu reduzieren. Der optische Pfad betrug 10 mm. Die Konzentration der Proben wurde am Jasco UV/VIS Spektrometer (siehe Kap. 3.1.12.2) so eingestellt, dass die optische Dichte *circa* 0.1 auf 10 mm betrug, um Reabsorption des emittierten Lichtes zu vermeiden. Die Messungen wurden bei verschiedenen Pulsenergien durchgeführt, um die Nichtlinearität des Prozesses sicherzustellen. Die Messungen wurden bei  $-90^\circ\text{C}$  Detektortemperatur und ausgeschaltetem Raumlicht durchgeführt. Die Zweiphotonenfluoreszenzspektren wurden im Bereich von 400 nm bis 700 nm aufgenommen. Der Eintrittspalt des iHR550 wurde für maximale Empfindlichkeit auf 2 mm eingestellt. Die Integrationszeit betrug 5 s. Es wurden immer je zwei Zweiphotonenfluoreszenzspektren gemittelt, so dass durch kosmische Strahlung bedingte Artefakte durch



**Abbildung 3.5.** – Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Messung von Fluoreszenzspektren nach Zweiphotonenabsorption.

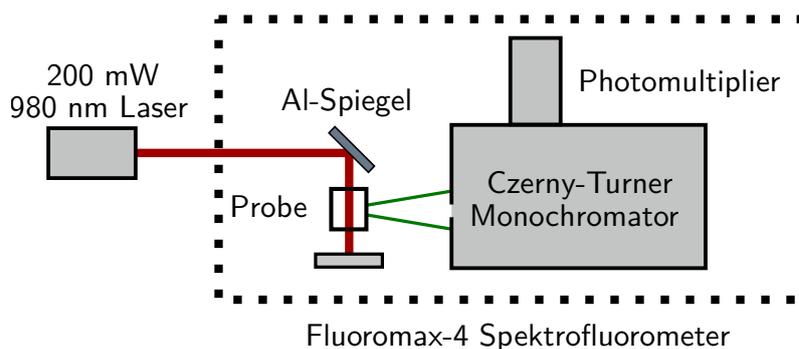
automatische Spike-Korrektur entfernt werden konnten.

### 3.9.2. Messung der Zweiphotonenfreisetzung von AAPV

Die Freisetzung von AAPV nach Zweiphotonenabsorption wurde mit dem in Kapitel 3.9.1 beschriebenen Aufbau in Kombination mit HPLC untersucht. Die Messlösungen mit Konzentrationen von  $40 \mu\text{M}$  wurden mit Anregungsenergien von  $3.0 \mu\text{J}/\text{Puls}$  bestrahlt. Nach steigenden Bestrahlungsdauern wurden je  $30 \mu\text{L}$  der Lösung entnommen und mit Hilfe der Primaide™ HPLC (siehe Kap. 3.1.5) analysiert. Hierbei wurde der Gradient AG1 (siehe Tab. 3.1) verwendet. Zur Kalibrierung wurden Chromatogramme von **BhcAAPV** bei definierten Konzentrationen aufgenommen. Hauptmerkmal der Freisetzung war das Verschwinden des Konjugatpeaks im Chromatogramm.

### 3.10. Aufkonvertierungsspektroskopie

Aufkonvertierungsspektren wurden mit einem modifizierten Fluoromax-4 Spektrofluorometer (siehe. Kap. 3.1.11) aufgenommen. Eine schematische Darstellung des Aufbaus ist in Abb. 3.6 gezeigt. Der konventionelle Anregungsstrahlengang des Spektrofluorometers wurde deaktiviert und durch einen Diodenlaser (980 nm Zentralwellenlänge, 200 mW optische Leistung, Intensität  $4.2 \text{ W/m}^2$ ) ersetzt, dessen Strahl über einen Aluminiumspiegel eingekoppelt wird. Der Strahlengang hinter der Probe ist nicht modifiziert. Es wurden Fluoreszenzküvetten mit Schichtdicken von  $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$  aus Quarzglas (Suprasil) der Firma Hellma-Analytics verwendet. Routinemessungen in nicht aggressiven Lösungsmitteln wurden, wenn möglich, in Einmalküvetten aus Polystyrol (PS) oder Polymethylmethacrylat (PMMA) in den Größen  $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$  und  $5 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$  der Firma VWR durchgeführt.



**Abbildung 3.6.** – Schematische Darstellung des Experimentes zur Messung von Aufkonvertierungsspektren. Der Photomultiplier sowie der Monochromator sind Bauteile des Fluoromax-4 Spektrofluorometers der Firma HORIBA Jobin Yvon.

### 3.11. FRET Experimente

FRET Experimente wurden am Fluoromax-4 Spektrofluorometer (siehe Kap. 3.1.11) der Firma HORIBA Jobin Yvon durchgeführt. Als FRET-Donor wurden sowohl das mit Fluorescein markierte Peptid **JK-LE2**, als auch das mit UCNP markierte Peptid **JK-LE@UCNP** verwendet. Das Experiment mit dem Donor **JK-LE@UCNP**, wurde mit der für Upconversionspektroskopie modifizierten Version des Spektrometers durchgeführt (siehe Kap. 3.6). Als Akzeptor wurden die mit TAMRA markierten

Peptide **JK-LK1** sowie **JK-LA** verwendet, wobei letzteres das Referenzpeptid darstellt. Die Konzentration der mit Peptid funktionalisierten UCNP wurde auf  $16 \mu\text{mol}$  Peptid pro Liter, eingestellt. Die Konzentration von **JK-LE2** wurde auf  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  eingestellt. Zunächst wurden alle Lösungen mit UV/VIS- CD- und Fluoreszenzspektroskopie einzeln gemessen. Fluoreszenzspektren der Akzeptor-Lösungen wurden sowohl mit Anregung im für TAMRA korrekten Wellenlängenbereich ( $545 \text{ nm}$ ), als auch unter FRET-Experiment-Bedingungen (Anregung bei  $980 \text{ nm}$  für UCNP und  $450 \text{ nm}$  für Fluorescein) aufgenommen. Für das FRET Experiment wurden  $1.5 \text{ mL}$  der Donorlösung in einer QS Fluoreszenzküvette (Hellma-Analytics) vorgelegt und im Probenhalter des Fluoreszenzspektrometers mit Hilfe eines Magnetrührers bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. Nun wurde nochmals ein Fluoreszenzspektrum bei der Donorwellenlänge ( $980 \text{ nm}$  bzw.  $450 \text{ nm}$ ) aufgenommen. Anschließend wurden schrittweise kleine Volumina ( $5\text{-}25 \mu\text{L}$ ) der Akzeptorlösung hinzugegeben und Fluoreszenzspektren im Bereich von  $450 \text{ nm}$  bis  $700 \text{ nm}$  aufgenommen (Anregung bei Donorwellenlänge). Bei Messungen mit UCNP wurden die Spektren auf deren spektrale Bande um  $660 \text{ nm}$  flächennormiert. Sobald Donor- und Akzeptorpeptid die gleiche Konzentration erreichten ( $12.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), wurde ein CD-Spektrum der Lösung aufgenommen. Spektren mit Fluorescein als Donor wurden auf das Fluoreszenzmaximum normiert. Die Messungen mit UCNP wurden in Ethanol durchgeführt, die Messungen ohne Nanopartikel wurden in  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-Puffer ( $\text{pH } 7.4$ ) durchgeführt.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Thermische Relaxation von Glycoazobenzolen

#### 4.1.1. Einführung

Die Erforschung von Photoschaltern hat, seit der Entdeckung von gegen Ausbleichen resistenten Systemen, in den achtziger Jahren ein stetig steigendes Interesse gefunden [44]. Unter den photoschaltbaren Molekülen erhält insbesondere die Klasse der Azobenzolphotoschalter aufgrund ihrer hohen Resistenz gegen Ausbleichen und der deutlichen geometrischen und spektralen Änderung nach Photoisomerisation große Beachtung [78, 271, 272]. Sie werden unter anderem genutzt um Rezeptoren zu aktivieren und deaktivieren [273, 274], die Proteinkonformation zu kontrollieren [275], die DNA-Transkription zu steuern [276] sowie die Aktivität von Katalysatoren für chemische Reaktionen zu kontrollieren [277]. Hierfür werden immer komplexere Photoschalter entwickelt, um die Eigenschaften auf die jeweilige Anwendung maßzuschneidern [271, 272]. Das *cis*-Isomer von Azobenzol und seinen meisten Derivaten ist thermodynamisch nicht stabil, so dass bei Raumtemperatur eine spontane Relaxation in das stabile *trans*-Isomer erfolgt (siehe auch Kap. 2.2.2). Die Geschwindigkeit dieser thermischen Relaxation ist von Parametern wie Druck, Lösungsmittelpolarität, pH-Wert und Substituenten abhängig [88, 91, 96, 97]. Dieser Umstand kann für Anwendungen in der Signalübertragung von Vorteil sein, bei der die Relaxation möglichst schnell verlaufen soll [278]. Für andere Anwendungen, wie der Katalysekontrolle, ist eine langsame oder auch gar keine thermische Relaxation von Vorteil, damit nicht permanent bestrahlt werden muss [277]. Glycoazobenzole sind vielversprechende Azobenzolderivate, die auf Protein-Zucker-Wechselwirkungen zurechtgeschnitten sind. Hierbei sollen sie unter anderem die Kontrolle der Adhäsion von Bakterien auf Oberflächen ermöglichen [45]. Im Rahmen dieses Projektes wurden solche Gly-

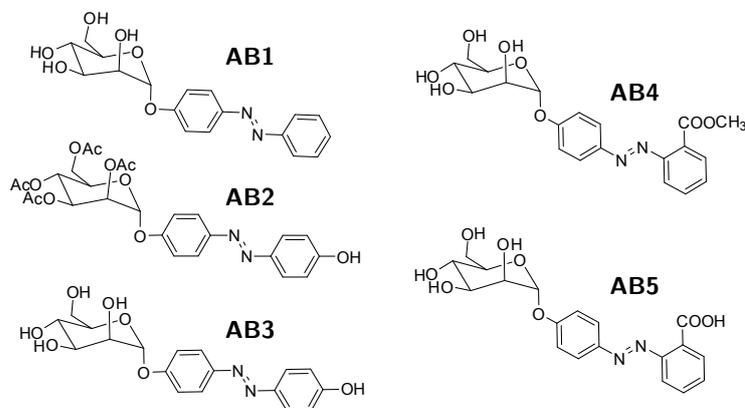
coazobenzole spektroskopisch untersucht. Diese mit  $\alpha$ -D-Mannose funktionalisierten Azobenzolderivate sind Vorläufer von Schaltern, die mit Hilfe von Thiol-Linkern auf Goldnanopartikeln gebunden werden sollen, um schaltbare multivalente Systeme für die Untersuchung der Thermodynamik von multivalenten Wechselwirkungen zu erhalten (siehe auch Kap. 4.2). Für diese Studien sind langsam schaltende Systeme von Vorteil, damit während der Messungen möglichst geringe Valenzänderungen durch thermische Relaxation auftreten.

Die Untersuchung der thermischen Relaxation von neuen Azobenzolphotoschaltern ist aufgrund der oben genannten Umstände ein obligatorischer Schritt. Im Rahmen der hier vorgestellten Ergebnisse wurden fünf verschieden substituierte, neuartige Glycoazobenzolphotoschalter spektroskopisch untersucht. Einige der Photoschalter weisen so kurze thermische Relaxationszeiten auf, dass sie mit Hilfe von Blitzlichtphotolyse spektroskopie untersucht werden mussten. Die Funktionalisierung mit  $\alpha$ -D-Mannose verleiht den Schaltern einzigartige Eigenschaften, die mit Hilfe von stationärer Spektroskopie sowie zeitaufgelösten Messungen ergründet werden sollen.

#### 4.1.2. Die Photoschalter

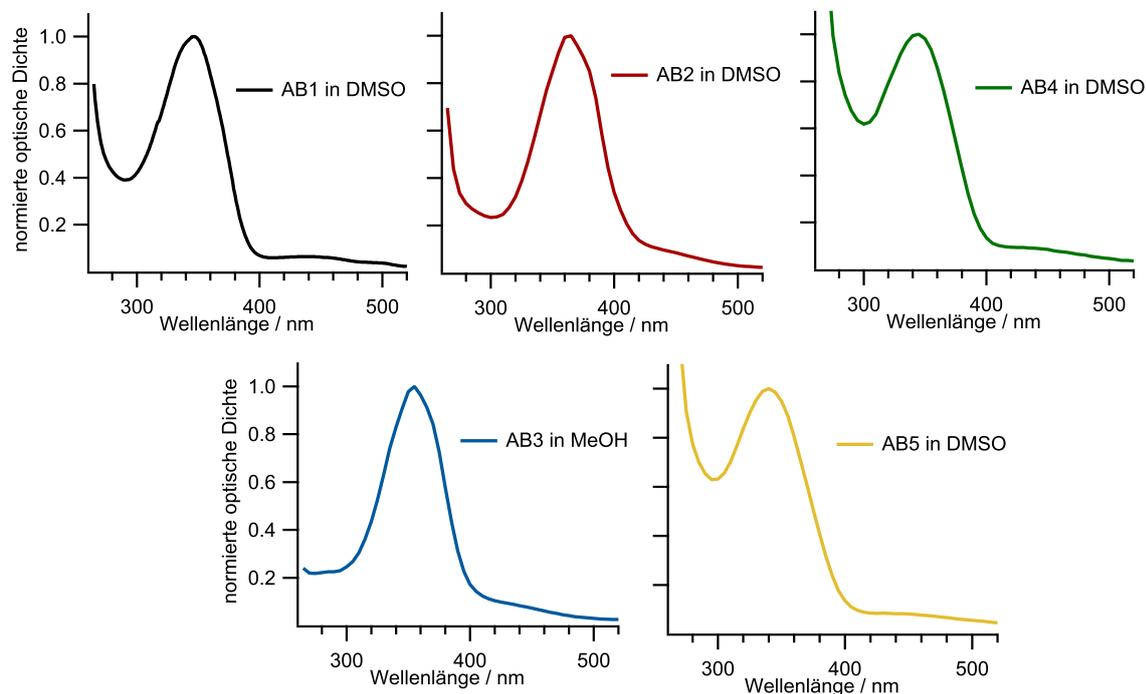
Nach Anregung mit Licht im Wellenlängenbereich von ca. 360 nm tritt, von wenigen Ausnahmen [279] abgesehen, bei allen Azobenzolen die Photoisomerisation von der *trans*-Konfiguration in die *cis*-Konfiguration auf (vgl. Kap. 2.2.2). Aufgrund des signifikanten Unterschieds der UV/VIS-Absorptionsspektren der beiden Isomere bietet sich die Absorptionsspektroskopie als ideale Methode an, um der Isomerisation zu folgen. Je nach Geschwindigkeit der Isomerisation können entweder statische Spektroskopie oder Methoden wie die Laserflashphotolyse verwendet werden. Im vorliegenden Abschnitt werden fünf verschiedene, mit  $\alpha$ -D-Mannose funktionalisierte Azobenzolderivate mit statischer Absorptionsspektroskopie sowie Laserflashphotolyse untersucht. Die Strukturformeln der untersuchten Photoschalter sind in Abbildung 4.1 dargestellt. Die Schalter unterscheiden sich grundsätzlich in ihrer Zweitsubstitution am sonst unfunktionalisierten Phenylring. **AB1** weist keinen Zweitsubstituenten auf und kann so als die Basisstruktur angesehen werden. Der in *para*-Position mit einer Hydroxygruppe funktionalisierte Schalter **AB3** unterscheidet sich im Vergleich zu **AB2** darin, dass die Hydroxygruppen der  $\alpha$ -D-Mannose durch

Acetylgruppen geschützt sind. **AB4** ist mit einer Methyl estergruppe, **AB5** mit einer Carboxygruppe in *ortho*-Position funktionalisiert. Aus der Literatur ist bekannt,



**Abbildung 4.1.** – Strukturformeln der in diesem Projekt untersuchten Glycoazobenzole **AB1-AB5**.

dass *ortho*-Substituenten an Azobenzolderivaten bei weitem nicht die immensen Auswirkungen auf die Zeiten der thermischen Relaxation aufweisen wie Substituenten in *para*-Position [89, 91]. Dies ist auf die eingeschränkten Möglichkeiten zur Delokalisierung möglicher Ladungen der Substituenten (-M-Effekt und +M-Effekt, siehe Kap. 2.2.2) zurückzuführen. Aus diesem Grund erwartet man kürzere Relaxationsdauern für **AB2** und **AB3** und längere für die restlichen Schalter. Die Photoschalter wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. T. K. Lindhorst synthetisiert [46, 77, 85]. Sie stellen Vorläufer zu Glycoazobenzolen dar, welche verwendet wurden, um Bakterien kontrolliert auf Oberflächen anheften zu lassen und wieder freizusetzen [280]. Die langsam schaltenden Azobenzole **AB1**, **AB4** und **AB5** wurden bereits in DMSO mit stationärer UV/VIS-Absorptionsspektroskopie sowie NMR-Spektroskopie untersucht [46, 85]. Die in diesem Projekt vorgestellten Messungen konzentrieren sich hauptsächlich auf die schnell schaltenden Azobenzole **AB2** und **AB3**, wobei jedoch auch die bereits in DMSO gemessenen Schalter in weiterführenden Experimenten auf ihre speziellen Eigenschaften hin untersucht und in Bezug auf ihre Unterschiede der Substitution mit den schnellen Schaltern verglichen werden. In Abbildung 4.2 sind die UV/VIS-Absorptionsspektren der fünf Schalter dargestellt. Die Spektren zeigen die typische, intensive Bande des  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergangs im Bereich von 340 nm bis 370 nm sowie eine ebenfalls typische schwach ausgeprägte Bande des verbotenen  $n$ - $\pi^*$ -Übergangs um 450 nm. Die Position des Maximums der  $\pi$ - $\pi^*$ -Bande variiert



**Abbildung 4.2.** – UV/VIS-Absorptionsspektren der in diesem Projekt untersuchten Glycoazobenzole **AB1-AB5** in DMSO. Von **AB3** ist das Spektrum aufgrund der besseren Löslichkeit in MeOH dargestellt.

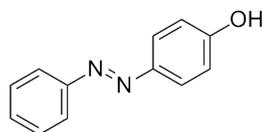
je nach Zweitsubstitution um bis zu 25 nm im Fall von **AB2** im Vergleich zu **AB4**. Das Maximum des durch in *para*-Position mit einer Hydroxygruppe substituierten und damit polaren **AB2** bei 365 nm liegt am weitesten im langwelligen Bereich und das Maximum des in *ortho*-Position mit einem Methyl ester substituierten und damit weniger polaren **AB4** bei 345 nm liegt am weitesten im kurzwelligen Bereich. Die Maxima der nicht in *para*-Position substituierten **AB1**, **AB4** und **AB5** liegen recht nahe beieinander.

### 4.1.3. Reproduzierbarkeit der thermischen Relaxation

Die ersten Messungen des schnellen Schalters **AB2** mit dem Blitzlichtphotolyseaufbau (siehe Kap. 3.2.1) ergaben große Probleme reproduzierbare Messergebnisse zu erhalten. Die ersten Messungen wurden in Methanol sowie DMSO durchgeführt und es wurden zunächst keinem Messparameter zuordenbare, teils extreme Schwankungen der Relaxationsdauern erhalten. Aus diesem Grund wurde zunächst 4-Hydroxyazobenzol

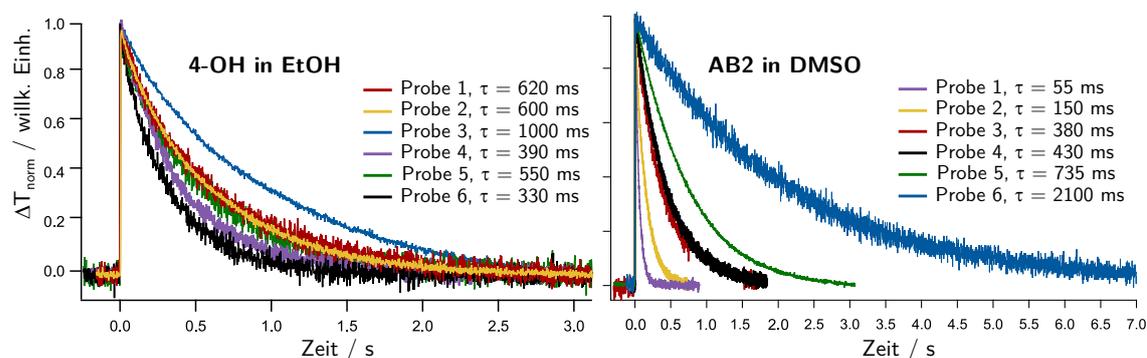
#### 4. Ergebnisse und Diskussion

(**4OH**, siehe Abb. 4.3) als Referenzphotoschalter, der aus der Literatur bekannt ist, hinzugezogen [96]. Auch hier zeigten sich Schwankungen der erhaltenen Rela-



**Abbildung 4.3.** – Strukturformel des als Referenz genutzten, kommerziell erhältlichen Photoschalters 4-Hydroxyazobenzol **4OH**.

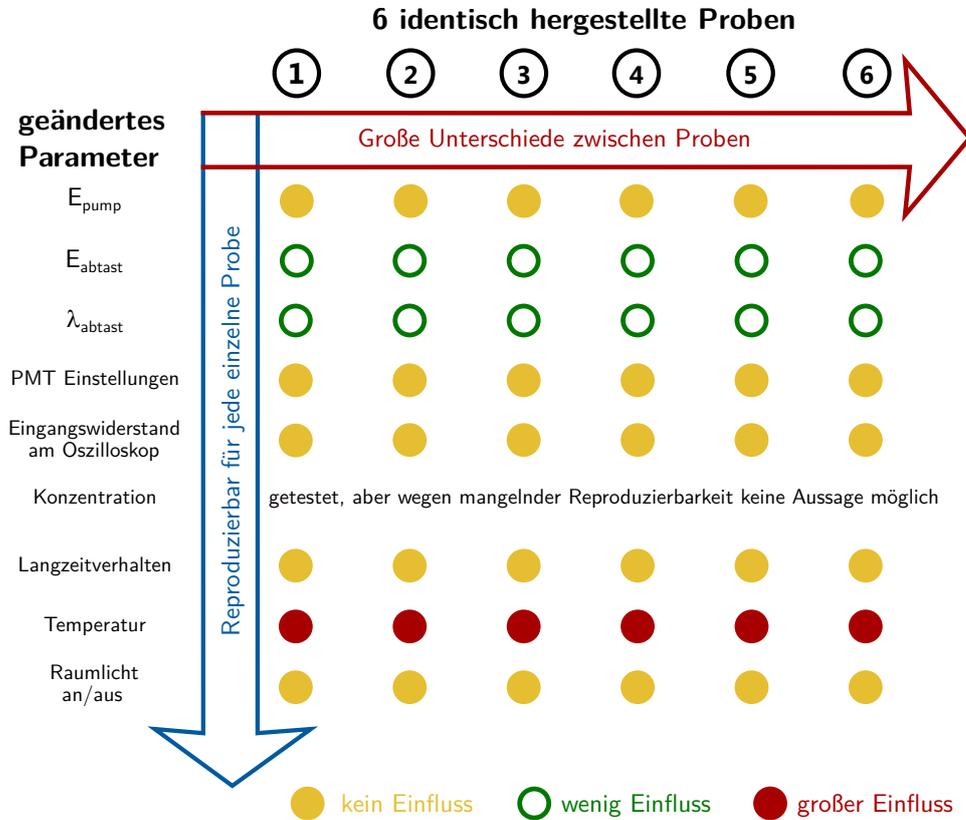
xationsdauern, wobei diese nicht so extrem ausfielen wie bei **AB2** und **AB3**. Zur Verdeutlichung der Schwankungen sind je sechs typische Messungen von **AB2** in DMSO und **4OH** in Ethanol in Abbildung 4.4 dargestellt. Da der Aufbau zur Messung



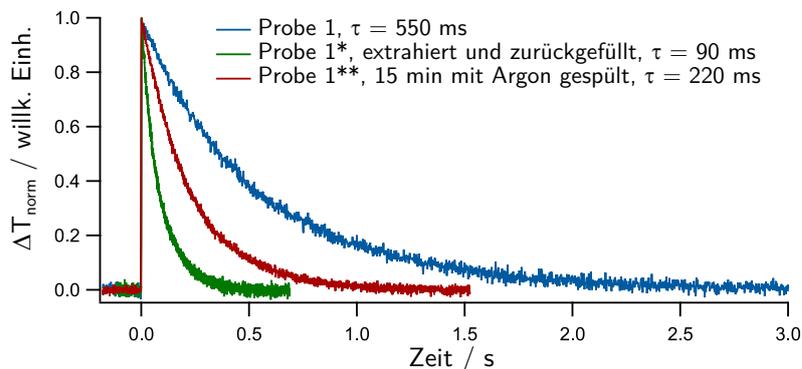
**Abbildung 4.4.** – Beispielhaft gezeigte Kinetiken der thermischen Relaxation um die extremen Schwankungen (118% Standardabweichung) der Relaxationsdauern von **AB2** in DMSO und den geringeren Schwankungen (41% Standardabweichung) von **4OH** in EtOH zu zeigen.

der schnellen Relaxationszeiten komplett von Grund auf neu erstellt wurde, konnte zunächst nicht ausgeschlossen werden, dass ein Geräteparameter Ursache für diese Schwankungen war. Aus diesem Grund wurden im nächsten Schritt systematisch relevante Geräteparameter und ihr möglicher Einfluss auf die gemessenen Kinetiken untersucht. Die Ergebnisse dieser an sechs identisch hergestellten Proben durchgeführten Messungen sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Eine Besonderheit, die sofort ins Auge fällt ist, dass die ermittelten Daten für jede einzelne Messlösung reproduzierbar waren. Solange die Messlösung nicht manipuliert wurde (z.B. durch Änderung der Konzentration), blieben die erhaltenen Kinetiken auch über Tage hinweg konstant. Dies gilt auch für die gefundene und erwartete Temperaturabhängigkeit der thermi-

**Tabelle 4.1.** – Initiale Testergebnisse für mögliche (Geräte)Ursachen der Relaxationsdauerschwan-  
kungen.



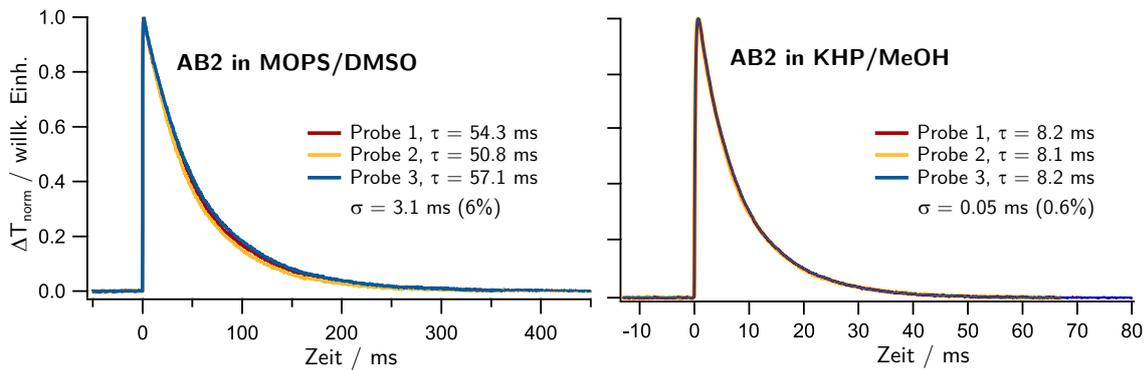
schen Relaxation. Die Ergebnisse zeigen also, dass der Messaufbau nicht Ursache für die Schwankungen sein kann. Da im Zuge dieser Experimente das Entnehmen und sofortige wieder Zurückfüllen der Messlösungen mit einer Pipette die Kinetik drastisch änderte, wurde zunächst ein Einfluss von Luftsauerstoff vermutet. Diese Vermutung wurde zunächst bestärkt, da das Spülen der Messlösungen mit Argon die Kinetik ebenfalls änderte (siehe Abb.4.5). Die Vermutung, dass Sauerstoff einen Einfluss auf die thermische Relaxation haben könnte, wurde bereits in der Literatur erwähnt [91, 281–283]. Weitere Untersuchungen, unter anderem die Präparation der Messlösungen mit entgasten Lösungsmitteln in einer Glovebox brachte zwar für **4OH** reproduzierbare Ergebnisse, allerdings keinen Erfolg für **AB2** und **AB3**. In der jüngeren Literatur zur thermischen Relaxation von **4OH** [96] ist nichts zu eventuellen Problemen bei der Messung der Kinetiken zu finden. Aber bereits im Jahr 1938



**Abbildung 4.5.** – Beispiel der Änderung der Relaxationsdauer einer Probe, die zunächst nur aus der Küvette entnommen und wieder zurückgefüllt wurde und anschließend für 15 min mit Argon gespült wurde.

berichtete *Hartley* von einer Säure-Base-Katalyse einiger Azobenzolderivate, darunter auch **4OH** [79]. Hier entdeckte er auch eine Autokatalyse durch die moleküleigene Hydroxygruppe, also eine Konzentrationsabhängigkeit in Benzol, welche jedoch nicht in polaren Lösungsmitteln gefunden wurde [79, 89]. Eben diese Säure-Base-Katalyse war Ursache für Probleme mit nicht reproduzierbaren Messungen [79, 89]. Die geringe Reproduzierbarkeit von Messungen der thermischen Relaxation wurde auch für weitere Azobenzolderivate und Photoschalter gefunden, teils so ausgeprägt, dass keine reproduzierbaren Daten erhalten wurden [89, 91, 98]. Die grundsätzlichen Ursachen für diese pH-Abhängigkeit sind in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Eine in der Literatur beschriebene Möglichkeit reproduzierbare Daten zu erhalten ist, Piperidin in die Messlösungen zu geben um eventuell aus der Atmosphäre gelöstes  $\text{CO}_2$  zu neutralisieren [79, 89]. Diese Methode ist jedoch nicht besonders genau, da der Gehalt an  $\text{CO}_2$  und eventuell vorhandenen weiteren Protonenquellen nicht bekannt ist. Ein Grund hierfür ist, dass der pH-Wert in organischen Lösungsmitteln nicht ohne großen apparativen Aufwand bestimmbar ist [284]. Aus diesem Grund wurden die Messungen der Photoschalter **AB2** und **AB3** in gepufferten Lösungen durchgeführt. So konnten die ersten reproduzierbaren Messungen durchgeführt werden. Für Messungen in Methanol wurde die Puffersubstanz Kaliumhydrogenphthalat (KHP) in Sättigung verwendet. Für Messungen in DMSO wurde die Puffersubstanz 3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure (MOPS) mit einer Konzentration von 20 mM genutzt. Hierbei sollte angemerkt werden, dass Puffer in organischen Lösungsmitteln mangels der Möglich-

keit zur pH-Einstellung nicht unbedingt so funktionieren müssen wie in Wasser. Die Bezeichnung "gepufferte Messlösungen" wird der Einfachheit halber dennoch genutzt. Die Stabilität der Kinetiken gegenüber dem pH-Wert konnte jedoch bestätigt werden und stützt die Nutzung dieses Ausdrucks. Beispiele für reproduzierbare Kinetiken bei Raumtemperatur in den so gepufferten Messlösungen sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Insbesondere in mit KHP gesättigtem MeOH (KHP/MeOH) ist die Stan-



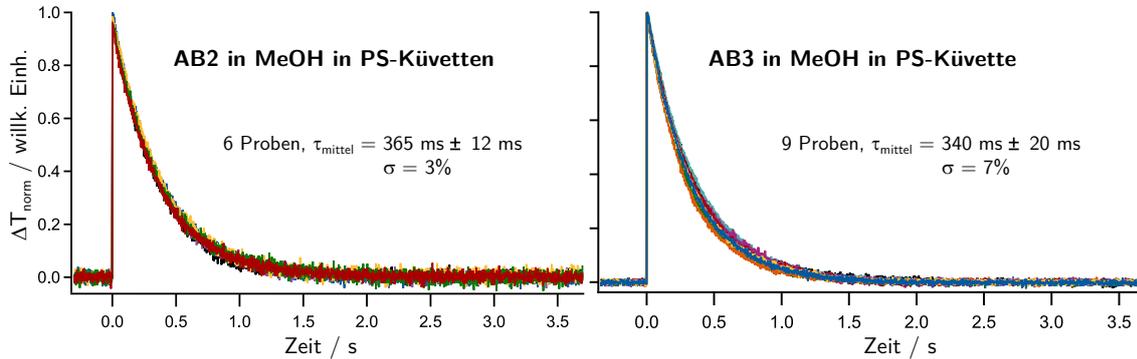
**Abbildung 4.6.** – Reproduzierbare Kinetiken der thermischen Relaxation von **AB2** in mit KHP gesättigtem MeOH sowie in 20 mM MOPS in DMSO. Die Konzentration von **AB2** beträgt in beiden Fällen  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

dardabweichung der erhaltenen Relaxationsdauern von drei identisch hergestellten Proben mit unter einem Prozent bemerkenswert niedrig. Auch die Standardabweichung von 6% in  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  MOPS in DMSO (MOPS/DMSO) ist zufriedenstellend. Zusätzlich zu Messungen in gepuffertem MeOH und DMSO wurden auch reproduzierbare Messungen in wässrigen Pufferlösungen im pH-Bereich von 2 bis 12 (siehe Kap. 3.2.2 Tabelle 3.7) erhalten.

Obwohl mit gepufferten Messlösungen reproduzierbare Messungen erhalten wurden, stellt sich die Frage, wie die für die geringe Reproduzierbarkeit ursächlichen pH-Wert-Schwankungen auftreten konnten. Auch nach Erhalt von reproduzierbaren Ergebnissen wurde daher im Anschluss in dieser Hinsicht weiter untersucht. Die Küvetten wurden außerordentlich gründlich gereinigt, mit Wasser gespült (der pH Wert des Spülwassers wurde ebenfalls gemessen), getrocknet und nochmals mit entsprechender Messlösung gespült, ohne Erfolg. Die "pH-Werte" der Messlösungen wurden mit einem pH-Meter gemessen, ohne dass diese eine messbare Variation zeigen. Es wurden Messungen mit kontrolliert zugegebenen Mengen 1 M HCl und 1 M NaOH

durchgeführt (siehe folgender Abschnitt). Die Schwankungen der Relaxationsdauern können mit einer Zugabe von 0.3-1  $\mu\text{L}$  1 M HCl bzw. NaOH erklärt werden. Diese Mengen sind zwar gering und als Verunreinigung nicht auszuschließen, allerdings aufgrund der äußerst umsichtigen Küvettenvorbereitung und Probenpräparation recht unwahrscheinlich. Eine unzureichende Trocknung als Ursache ist auch eher auszuschließen, da *Wildes et al.* den Einfluss vom Wassergehalt auf die thermische Relaxation unter anderem von **4OH** untersuchten und ein Einfluss erst oberhalb von 1% Wassergehalt beobachteten [91]. Dies entspräche mehreren, gut sichtbaren, Tropfen Wasser.

Diesen Überlegungen folgend, wird die These vorgeschlagen, dass die Schwankungen nicht direkt auf in Lösung vorkommenden  $\text{H}^+$ - und  $\text{OH}^-$ -Ionen, sondern möglicherweise auf Wechselwirkungen der Analyten mit der Küvette selber zurückzuführen sind. Dass Analyten mit der Küvettenoberfläche interagieren können und so die Messungen beeinflusst werden, ist bekannt [285–288]. Insbesondere Lösungen mit hohen oder niedrigen pH-Werten können die Oberfläche von Quarzglas verändern [289, 290]. Da die in diesem Projekt verwendeten Küvetten in einem Kolloidchemielabor verwendet wurden, mussten sie vor vielen Messungen mit starken Säuren wie Königswasser oder Peroxomonoschwefelsäure gereinigt werden. Andere Küvetten wurden in Peptidlaboren verwendet und mit konzentrierter  $\text{HNO}_3$  gereinigt. Da die Prozesse, welche zur Veränderung der Oberfläche führen hochkompliziert sind, ist es wahrscheinlich, dass die Küvettenoberflächen durch anschließende Spülprozesse nicht unbedingt identische Zustände aufweisen [289]. Um diesen Umstand zu testen, wurden Messungen von **AB2** sowie **AB3** in ungepuffertem MeOH in Einwegküvetten aus Polystyrol durchgeführt. Es zeigt sich, dass die so erhaltenen Kinetiken der thermischen Relaxation zufriedenstellende Standardabweichungen von 3% bis 7% aufweisen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Daraus lässt sich schließen, dass die Probleme der Reproduzierbarkeit weder auf Verunreinigungen der Photoschalter, aus der Atmosphäre absorbiertes  $\text{CO}_2$  noch auf Einträge von Verunreinigungen während der Probenpräparation zurückzuführen sind. Es sollte jedoch angemerkt werden, dass diese Ergebnisse die oben vorgestellte These nicht endgültig untermauern können. Dies liegt daran, dass Säurereste aus der Reinigung der Quarzküvetten durch Nutzung von Einwegküvetten ebenfalls ausgeschlossen würden.

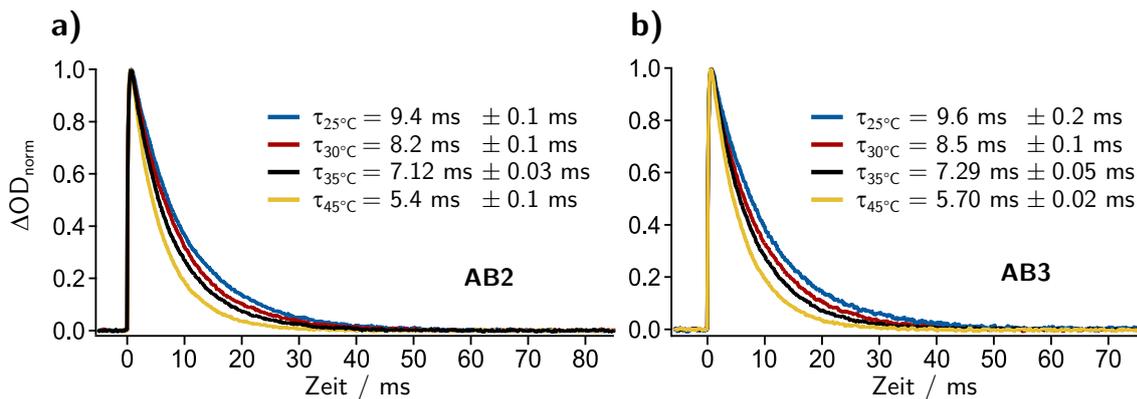


**Abbildung 4.7.** – In Polystyrol-Einwegküvetten erhaltene, reproduzierbare Kinetiken der thermischen Relaxation von **AB2** und **AB3** in MeOH.

Die langsamen Photoschalter haben, trotz vom pH-Wert abhängigen Relaxationsdauern, keine Probleme mit reproduzierbaren Messungen bereitet.

#### 4.1.4. Allgemeine Charakterisierung der thermischen Relaxation von **AB2** und **AB3**

Nachdem reproduzierbare Kinetiken der Azobenzole erhalten werden konnten, wurden zunächst die thermodynamischen Relaxationseigenschaften untersucht. In Abbildung 4.8 sind die für **AB2** und **AB3** in KHP/MeOH erhaltenen temperaturabhängigen Kinetiken dargestellt. Die aus sechs Einzelmessungen erhaltenen Mittelwerte der



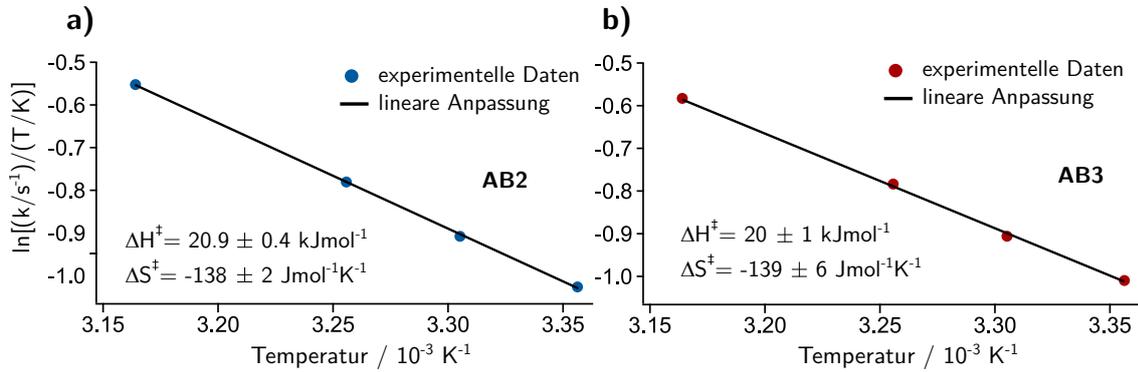
**Abbildung 4.8.** – In KHP/MeOH erhaltene reproduzierbare, temperaturabhängige Kinetiken der thermischen Relaxation von a) **AB2** und b) **AB3**.

Lebensdauern weisen geringe Standardabweichungen im Bereich von 1% auf. Hierbei

sind die Lebensdauern von **AB3** etwas länger als von **AB2**, teilweise jedoch nur im Fehlerintervall. Die Acetylschützung der Mannose in **AB3** scheint demnach keinen großen Einfluss auf die thermische Relaxation zu haben. Eine besondere Eigenschaft von Azobenzolen mit *para*-ständigen funktionellen Gruppen, welche einen ausgeprägten M-Effekt, wie zum Beispiel **4OH** aufweisen, ist ihre geringe Aktivierungsenergie  $E_a$  [80, 96, 103]. Typische Aktivierungsenergien für Hydroxyazobenzole und ähnliche Schalter liegen im Bereich von  $20 \text{ kJ mol}^{-1}$  bis  $40 \text{ kJ mol}^{-1}$  [80, 96]. Diese Eigenschaft wurde unter anderem von *Wildes et al.* als Indiz für einen Rotationsmechanismus der thermischen Relaxation gedeutet [91]. Die Aktivierungsenergie für eine Rotation um die nicht geschwächte Azobindung wird mit  $230 \text{ kJ mol}^{-1}$  angegeben [90]. Daher muss für diesen Mechanismus eine deutliche Schwächung über Resonanzstrukturen oder generelle Strukturelle Veränderungen erfolgen. Um die Aktivierungsenergie  $E_a$ , die Aktivierungsenthalpie  $\Delta H^\ddagger$  und die Aktivierungsentropie  $\Delta S^\ddagger$  zu ermitteln, muss die thermische Relaxation, wie in Abbildung 4.8 gezeigt, bei verschiedenen Temperaturen gemessen werden. Um zunächst die beiden letztgenannten Parameter zu erhalten, muss nach Gleichung 4.1 der Term  $\ln\left(\frac{k}{T}\right)$  gegen die inverse Temperatur aufgetragen werden [96]. Hierbei sind  $k_B$  die Boltzmann-Konstante,  $R$  die allgemeine Gaskonstante und  $h$  das Plancksche Wirkungsquantum.

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{-\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T}. \quad (4.1)$$

In Abbildung 4.9 sind die für **AB2** (Abb. 4.9 a)) und **AB3** (Abb. 4.9 b)) in KHP/MeOH erhaltenen, sogenannten Eyring-Diagramme dargestellt. Die Fehler der Aktivierungsparameter wurden unter Einbeziehung der Fehler der Geschwindigkeitskonstanten in die Kurvenanpassung und anschließende Fehlerfortpflanzung erhalten. Die Ergebnisse zeigen in dieser Darstellung einen linearen Verlauf und ergeben für **AB2** Aktivierungsparameter von  $\Delta H^\ddagger = (20.9 \pm 0.4) \text{ kJ mol}^{-1}$  und  $\Delta S^\ddagger = (-138 \pm 2) \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  sowie für **AB3**  $\Delta H^\ddagger = (20 \pm 1) \text{ kJ mol}^{-1}$  und  $\Delta S^\ddagger = (-139 \pm 6) \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ . Diese Werte liegen in der korrekten Größenordnung. *Garcia-Amorós et al.* veröffentlichten für **4OH** in Ethanol Werte von  $\Delta H^\ddagger = (15 \pm 1) \text{ kJ mol}^{-1}$  und  $\Delta S^\ddagger = (-186 \pm 1) \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  [96]. Die Aktivierungsenergie  $E_a$  erhält man über die Arrhenius-Gleichung (siehe Gl. 4.2) durch die Auftragung der logarithmierten

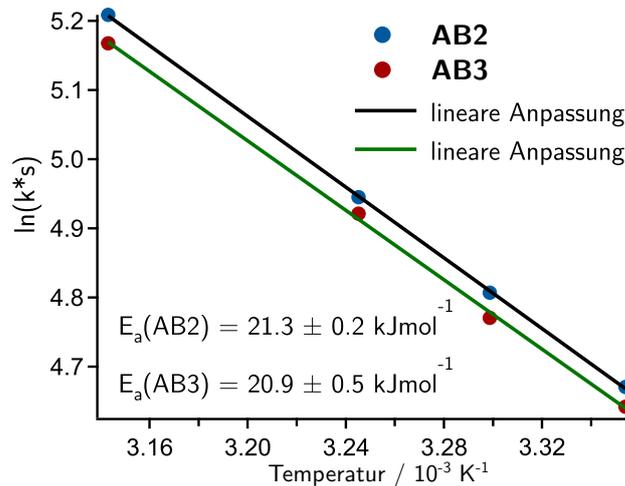


**Abbildung 4.9.** – In KHP/MeOH erhaltene Eyring-Diagramme inklusive ermittelten Aktivierungsparametern  $\Delta H^\ddagger$  und  $\Delta S^\ddagger$  von a) **AB2** und b) **AB3**. Der Umfang der Punkte ist größer als die Fehlerbalken.

Geschwindigkeitskonstanten gegen den Kehrwert der Temperatur. Hierbei ist  $A$  der Frequenzfaktor und  $R$  die allgemeine Gaskonstante.

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \quad (4.2)$$

Die erhaltenen Diagramme sowie Aktivierungsenergien für **AB2** und **AB3** in KHP/MeOH sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Die beiden erhaltenen Geraden verlaufen



**Abbildung 4.10.** – In KHP/MeOH erhaltene Arrhenius-Diagramme inklusive ermittelten Aktivierungsenergien für **AB2** (experimentelle Daten blaue Punkte, lineare Anpassung schwarze Gerade) und für **AB3** (experimentelle Daten rote Punkte, lineare Anpassung grüne Gerade).

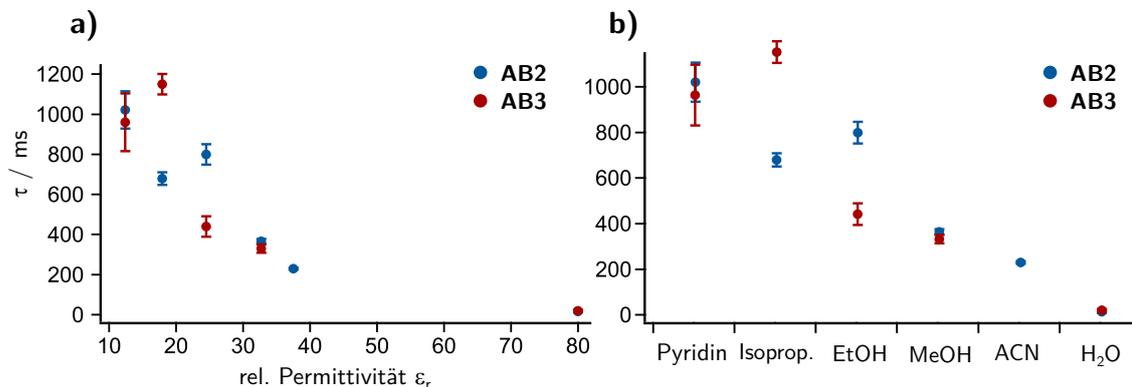
parallel sowie dicht beieinander und ergeben entsprechend in den Fehlerintervallen übereinstimmende Aktivierungsenergien. Diese betragen ca.  $21 \text{ kJ mol}^{-1}$  und liegen damit weit unter dem Wert für die Rotation um eine nicht geschwächte Azobindung. Die ermittelten Frequenzfaktoren liegen in der Größenordnung von  $A \approx 10^5 \text{ s}^{-1}$ . Der typische Bereich für Frequenzfaktoren von Azobenzolen liegt zwischen  $10^5 \text{ s}^{-1}$  und  $10^{12} \text{ s}^{-1}$  [103]. Damit liegen die hier ermittelten Frequenzfaktoren also am unteren Ende dieser Skala. Dies spricht nach *Calvin et al.* für die Beteiligung eines Triplettzustandes an der Relaxationsreaktion [291]. Nach *Nishimura et al.* spricht dies bei Azobenzolen für den Rotationsmechanismus [103].

In Zahlreichen Studien wurde die Lösungsmittelabhängigkeit der thermischen Relaxation von Azobenzolen untersucht [79, 80, 91, 103]. Grundlage für das Interesse war und ist auch hier, Informationen zum Mechanismus der Relaxation zu erhalten. Eine Abhängigkeit von der Lösungsmittelpolarität wird generell mit einem Rotationsmechanismus in Zusammenhang gebracht [91]. Fehlt eine Abhängigkeit von der Lösungsmittelpolarität, wird dies üblicherweise mit einem Inversionsmechanismus in Verbindung gebracht [91, 103]. Dies liegt daran, dass polare Übergangszustände durch polare Lösungsmittel stabilisiert werden und damit die thermische Relaxation beschleunigen [91, 92, 103, 292]. Diese polaren Übergangszustände werden in vielen Veröffentlichungen mit einem Rotationsmechanismus in Zusammenhang gebracht [91, 92, 292–294]. Man sollte jedoch anmerken, dass es auch Veröffentlichungen gibt, die polare Übergangszustände eher für einen Inversionsmechanismus wahrscheinlich halten [103]. Über Messung der Abhängigkeit von der Lösungsmittelpolarität lässt sich demnach zumindest sicher herausfinden, ob die untersuchten Azobenzole über einen polaren oder unpolaren Übergangszustand relaxieren. Aus diesem Grund wurden die Azobenzole **AB2** und **AB3** in verschiedenen Lösungsmitteln in Einwegküvetten untersucht. Die Resistenz der Einwegküvetten gegenüber den jeweiligen Lösungsmitteln hat deren Auswahl eingeschränkt und einige Messungen durch eine kurze Haltbarkeit erschwert. Messungen mit Einwegküvetten in DMSO waren zum Beispiel aufgrund sofortiger Zersetzung der Küvettenoberfläche nicht möglich. Zum Grund für die Nutzung von Einwegküvetten sei auf das vorhergehende Kapitel 4.1.3 verwiesen. In Tabelle 4.2 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Fehler der Lebensdauern sind aus der Standardabweichung von sechs Einzelmessungen erhalten worden. Die Photoschalter weisen je nach Lösungsmittel über einen großen Bereich reichende Lebensdauern von

**Tabelle 4.2.** – Lebensdauern der Photoschalter **AB2** und **AB3** in verschiedenen Lösungsmitteln, aufgenommen in Einwegküvetten. Zusätzlich sind die relative Permittivität  $\epsilon_r$ , das Dipolmoment  $\mu$  sowie der pKs-Wert der jeweiligen Lösungsmittel angegeben (entnommen aus Ref, [295, 296]). \*Der pKs-Wert von neutralem Pyridin ist nicht bekannt, er ist aber aufgrund des elektronenarmen Rings mit Sicherheit höher als der von Benzol (pKa 43) [297]. \*\*Die Lebensdauern in Wasser sind aus Messungen in gepuffertem Lösung pH 6-7 abgeleitet.

Lösungsmittel	$\tau_{(AB2)}$ in ms	$\tau_{(AB3)}$ in ms	$\epsilon_r$	$\mu$ in D	pKs
Pyridin	1020 ± 90	960 ± 140	12.4	2.37	>40*
Isopropanol	680 ± 30	1150 ± 50	17.9	1.66	17.1
Ethanol	800 ± 50	440 ± 50	24.5	1.69	16
Methanol	365 ± 12	330 ± 20	32.7	1.7	15.2
Acetonitril	230 ± 5	–	37.5	3.45	25
Wasser**	18 ± 5	20 ± 5	80	1.85	14

einer Sekunde bis unter 20 ms auf. Auffallend ist, dass es bedeutende Unterschiede zwischen den beiden Schaltern im jeweils gleichen Lösungsmittel gibt. Vor allem in Isopropanol und Ethanol unterscheiden sich die Lebensdauern nahezu um den Faktor Zwei. Ein Grund hierfür kann mit den vorliegenden Daten nicht erklärt werden. Messungen in Wasser wurden nicht durchgeführt. Zum Vergleich wurden die Daten aus Kapitel 4.1.5 für gepuffertes Wasser (von Werten pH 6-7 interpoliert) als Schätzwert herangezogen. Die Ergebnisse in Tabelle 4.2 sind nach aufsteigender relativer Permittivität sortiert, da hier der einzige stetige Zusammenhang beobachtet werden konnte (siehe auch Abb. 4.11). Eine höhere Relaxationsgeschwindigkeit in Lösungsmitteln mit einer höheren relativen Permittivität, welche proportional zur Lösungsmittelpolarität ist, spricht, wie oben beschrieben, für einen polaren Übergangszustand. Dieser wird durch ein polares Lösungsmittel stabilisiert, so dass die Aktivierungsenergie gesenkt wird [91, 103]. Die beobachteten Lebensdauern weisen eine hohe Streuung auf, sinken aber eindeutig mit steigender relativer Permittivität  $\epsilon_r$ . Nach Gleichung 4.3 ist es möglich durch auftragen der logarithmierten Geschwindigkeitskonstanten gegen den Term  $(\epsilon_r - 1)/(\epsilon_r + 1)$  eine Geradengleichung zu erhalten



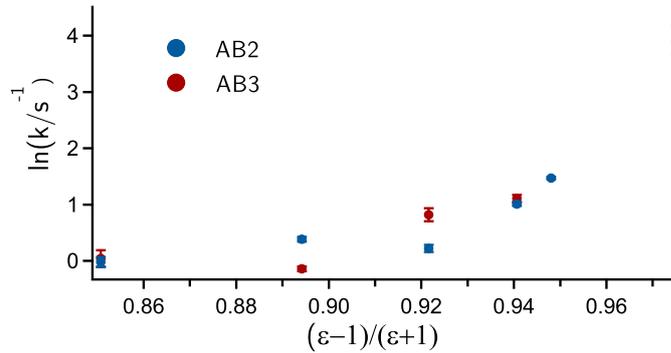
**Abbildung 4.11.** – a) Lebensdauern von **AB2** (blaue Punkte) und **AB3** (rote Punkte) gegen die relative Permittivität  $\epsilon_r$ . Die Lebensdauer sinkt mit steigender Permittivität. b) Zur Übersicht nochmals gezeigte Lebensdauern gegen den Lösungsmittelnamen.

aus der man das Dipolmoment des Übergangszustandes  $\mu_{\ddagger}$  erhalten kann [103].

$$\ln(k) = \ln(k_0) + \frac{3}{8k_B T} \left( \frac{\mu_{\ddagger}^2}{r_{\ddagger}^3} - \frac{\mu^2}{r^3} \right) \left( \frac{\epsilon_r - 1}{\epsilon_r + 1} \right) \quad (4.3)$$

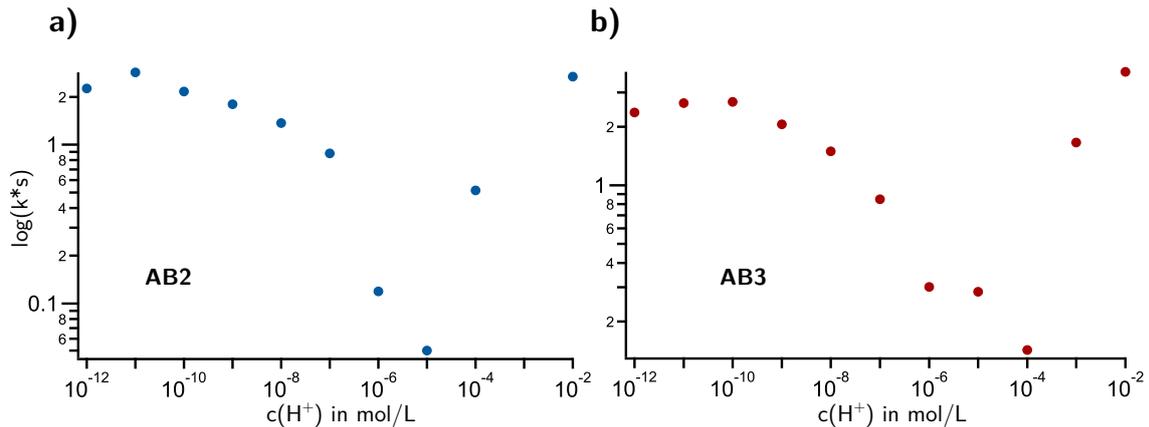
Hierbei sind  $\mu$  das Dipolmoment des *cis*-Isomers,  $r$  und  $r_{\ddagger}$  der Abstand der 4,4'-Positionen im *cis*-Isomer und im Übergangszustand,  $T$  die Temperatur,  $k_B$  die Boltzmann-Konstante und  $k_0$  die Geschwindigkeitskonstante in einem Medium mit  $\epsilon = 1$ . Um zu testen, ob das Dipolmoment des Übergangszustands nach Gleichung 4.3 ermittelt werden kann, wurden in Abbildung 4.12 die logarithmierten Geschwindigkeitskonstanten von **AB2** und **AB3** in den in Tabelle 4.2 gezeigten Lösungsmitteln gegen  $(\epsilon_r - 1)/(\epsilon_r + 1)$  aufgetragen. Man kann erkennen, dass die Daten nicht linear verlaufen, so dass keine zuverlässigen Werte für das Dipolmoment des Übergangszustandes ermittelt werden können. Die Daten sprechen für kompliziertere Lösungsmittelwechselwirkungen als in dem der Gleichung 4.3 zugrundeliegenden Annahmen [103]. Generell kann allerdings die Steigung der Kurven in Abbildung 4.12 auf eine Änderung der Ladungsverteilung während der Aktivierung zurückgeführt werden [103].

Da im vorhergehenden Kapitel eine große Abhängigkeit von der  $H^+$ -Konzentration für die mangelnde Reproduzierbarkeit als Ursache gefunden werden konnte, wurde unter anderem untersucht, wie die kontrollierte Zugabe von HCl oder NaOH die Kinetiken in Methanol beeinflussen. Die hierzu erhaltenen Ergebnisse sind in



**Abbildung 4.12.** – Darstellung der logarithmierten Geschwindigkeitskonstanten (**AB2** blaue, **AB3** rote Punkte) gegen den Term  $(\epsilon_r - 1)/\epsilon_r + 1$  von verschiedenen Lösungsmitteln. Die Daten verlaufen nicht wie erwartet linear.

Abbildung 4.13 gezeigt. Es sollte hierzu angemerkt werden, dass das Konzept des



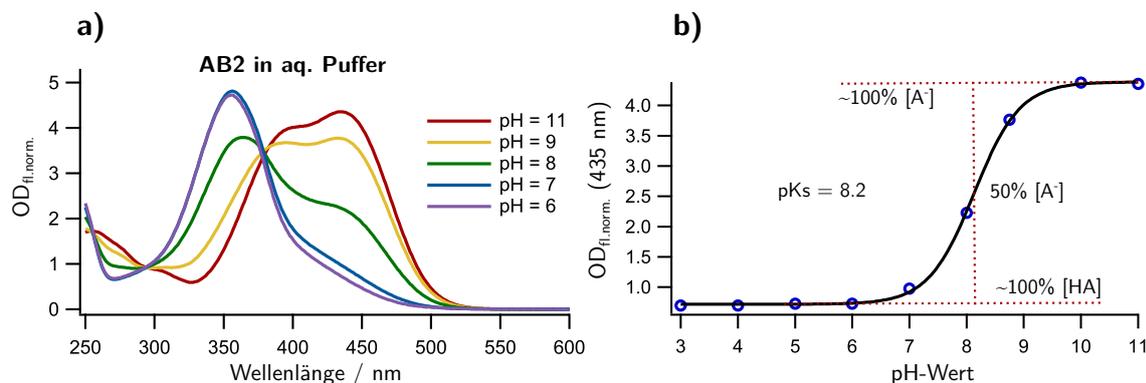
**Abbildung 4.13.** – Lebensdauern von **AB2** (a) und **AB3** (b) in MeOH mit verschiedenen  $H^+$ -Konzentrationen durch Zugabe von HCl und NaOH. Die Daten sind nur als qualitativ anzusehen und weisen daher auch keine Fehlerbalken auf (mehr dazu im Text).

pH-Wertes nur für Wasser definiert ist und daher in diesem Fall nicht genutzt werden kann. Des Weiteren ist das Wirken von  $OH^-$  und  $H^+$  in Methanol nicht ohne weiteres mit dem in Wasser vergleichbar. Daher sind die hier gezeigten Werte nur als qualitativ anzusehen. Des Weiteren sind die Ergebnisse für jede einzelne Messreihe zwar reproduzierbar gewesen, aber wie im vorhergehenden Kapitel 4.1.3 beschrieben, reichte diese einfache Zugabe von HCl und NaOH nicht aus, um die Konzentrationen präzise genug einzustellen um zwischen Messreihen reproduzierbare Daten zu

erhalten. Qualitativ ist jedoch eine starke Abhängigkeit von der  $H^+$ -Konzentration zu beobachten. Die Geschwindigkeitskonstanten sind im Bereich der in Wasser pH-Werten von 4 bis 6 entsprechen würde am niedrigsten und steigen sowohl oberhalb von "pH 8 als auch unterhalb von "pH 4 in hohem Maße an. Die erhaltenen Kurven sind denen von *Dunn et al.* über **4OH** in Wasser veröffentlichten Daten äußerst ähnlich [97]. Aus diesem Grund wurden weitere Messungen zur pH-Abhängigkeit in wässrigen Puffern durchgeführt, so dass reproduzierbare und belastbare Daten erhalten werden konnten. Die Ergebnisse zu diesen Untersuchungen finden sich im folgenden Abschnitt.

#### 4.1.5. pH-Abhängigkeit der thermischen Relaxation

Im vorhergehenden Abschnitt wurde eine hohe pH-Abhängigkeit der thermischen Relaxation der Azobenzole **AB2** und **AB3** festgestellt (Strukturformeln der Schalter siehe Abb. 4.1). Aber auch die übrigen Azobenzole zeigen vom pH-Wert abhängige Relaxationsdauern, auch wenn sie nicht so außerordentlich empfindlich auf  $H^+$ - und  $OH^-$ -Ionen reagieren. Zunächst wurden die UV/VIS-Spektren der Azobenzole **AB1** bis **AB5** bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Hierbei zeigten nur die Azobenzole **AB2** und **AB3** sowie in geringem Maß **AB5** signifikante Änderungen (siehe für **AB2** Abb. 4.14 a)). Das Maximum der UV/VIS-Spektren von **AB2** und **AB3** verschiebt sich zwischen pH 7 und pH 9 von 355 nm auf 450 nm. Dies ist auf die Deprotonierung der *para*-Hydroxygruppe zurückzuführen. Im Fall von **AB5** ist eine Änderung im pH-Bereich von 3 bis 5 zu beobachten. Dies ermöglicht die Bestimmung der pKs-Werte der Hydroxygruppen von **AB2** und **AB3** sowie der Carbonsäuregruppe von **AB5** [97, 298]. In Abbildung 4.14 ist anhand von **AB2** beispielhaft gezeigt, wie die Bestimmung mit Hilfe von UV/VIS-Absorptionsspektroskopie erfolgte. Hierbei wird der Fehler des pH-Wertes ( $\Delta pH$  des pH-Meters  $< 0.1$ ) als vernachlässigbar angesehen, da kein Einfluss auf die Kurvenanpassungsergebnisse festgestellt wurde. Die Ungenauigkeit der verwendeten Intensitäten wird zu 2.5% abgeschätzt. Einbeziehung der Fehler in die Kurvenanpassung liefert die Fehler der ermittelten pKs-Werte. In Tabelle 4.3 sind die so ermittelten pKs-Werte dargestellt. Die pKs-Werte von  $8.2 \pm 0.2$  für **AB2** und  $8.1 \pm 0.2$  für **AB3** stimmen innerhalb des Fehlers mit einem *Dunn et al.* sowie *Klotz et al.* angegebenen pKs-Wert von 8.2 für **4OH** überein [97, 299].



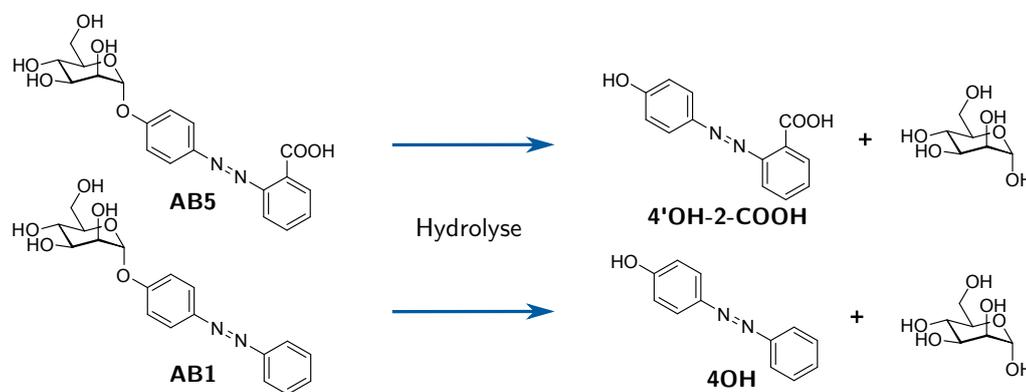
**Abbildung 4.14.** – An **AB2** beispielhaft dargestellte Methode zur Ermittlung des pKs-Wertes. a) Es werden Absorptionsspektren in gepufferten Lösungen über einen weiten pH-Bereich aufgenommen. Hierbei wird angenommen, dass in den Extrembereichen jeweils die protonierte Spezies [HA] bzw. die deprotonierte Spezies [A<sup>-</sup>] zu 100% vorliegen. b) Die Auftragung der optischen Dichte bei 435 nm (blaue Kreise, Umfang ist größer oder gleich den Fehlerbalken) ergibt eine sigmoidale Kurve. Eine Kurvenanpassung (schwarze Linie) liefert den pKs-Wert, welcher am Wendepunkt der Kurve liegt.

**Tabelle 4.3.** – Die mit Hilfe von UV/VIS-Spektroskopie ermittelten pKs-Werte von **AB2**, **AB3** und **AB5**.

Verbindung	pKs-Wert
<b>AB2</b>	$8.2 \pm 0.2$
<b>AB3</b>	$8.1 \pm 0.2$
<b>AB5</b>	$4.2 \pm 0.5$

Der pKs-Wert der Carbonsäuregruppe von **AB5** liegt bei  $4.2 \pm 0.5$  und stimmt damit mit dem Literaturwert von Benzoesäure (pKs 4.20) überein [300]. Der Fehler für den pKs-Wert von **AB5** ist etwas höher, da die spektrale Änderung geringer ausgeprägt ist. Der Literatur-pKs-Wert von der in 4'-Position vorliegenden  $\alpha$ -D-Mannose liegt bei 12.08 [295]. Aus diesem Grund ist in dem hier untersuchten pH-Bereich kein signifikanter Einfluss dieser Hydroxygruppen über intermolekulare Wechselwirkungen zu erwarten. Bei einem pH-Wert von 11 liegen demnach nur 8%, bei pH 12 ca. 45% der Zuckerhydroxygruppen dissoziiert vor. Die UV/VIS-Spektren von **AB2** bei pH 12 zeigen keine signifikanten Unterschiede zu den von *Dunn et al.* zu **4OH** veröffentlichten, daher kann ein Einfluss der  $\alpha$ -D-Mannose auf die UV/VIS-Spektren ausgeschlossen werden [97]. Da die Estergruppen in **AB3** bei pH-Werten höher als pH 9 und die Estergruppe in **AB4** bei pH Werten unter pH 4

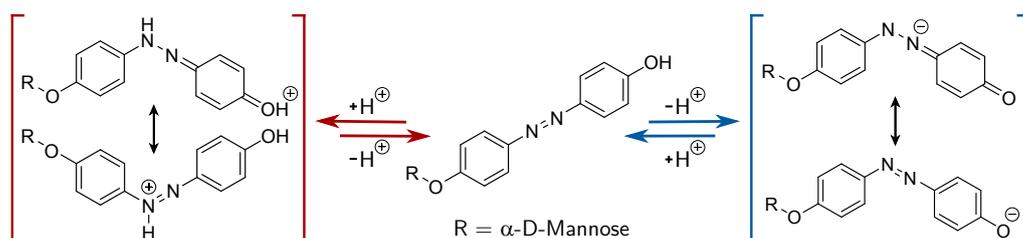
und über pH 11 nicht stabil sind (saure bzw. basische Esterhydrolyse), wurden keine weiteren pH-Abhängigen Messungen dieser Moleküle vorgenommen [301]. Zudem wurde beobachtet, dass die glycosidische Bindung zwischen Mannose und Azobenzol (Acetal) bei allen untersuchten Azobenzolen nach einigen Wochen gespalten wird. Die Zersetzung ist besonders gut bei den langsam schaltenden Azobenzolen **AB1** und **AB5** zu beobachten, da durch die Zersetzung eine *para*-ständige Hydroxygruppe resultiert. So entsteht aus **AB1** zum Beispiel auf diese Weise **4OH** (siehe Abb. 4.15). Dies ist sofort eindeutig durch die Reduktion der Relaxationsdauern von vielen Stunden hin zu Mikrosekunden beobachtbar. Bei höheren pH-Werten ab pH 8 ändert sich auch das UV/VIS-Spektrum analog wie in Abbildung 4.14 gezeigt.



**Abbildung 4.15.** – Beispiel für die Hydrolyse der glycosidischen Bindung von **AB1** und **AB5**, welche schnell schaltende Hydroxyazobenzole zur Folge hat.

Anschließend wurde die pH-Abhängigkeit der Relaxationsdauer der drei Azobenzole untersucht. Nach einer von *Dunn et al.* veröffentlichten Studie sind besonders kurze Relaxationsdauern auf protonierte Spezies zurückzuführen [97]. Die Protonierung erfolgt hierbei am in Bezug auf die Hydroxygruppe *para*-ständigen Stickstoffatom (im Folgenden Azostickstoff genannt, siehe Abb. 4.16) [299]. Dieser Azostickstoff ist im unsubstituierten Azobenzol eine schwache Base mit einem  $pK_b$ -Wert von 16.6 [302] und kann im hier untersuchten pH-Bereich nicht protoniert werden. Aufgrund der +M-Effekte der Hydroxygruppe und des Acetals ist der  $pK_b$ -Wert von **4OH** laut *Klotz et al.* niedriger, allerdings immer noch bei 14.93 [299]. Das bedeutet, bei einem pH-Wert von 2 liegen nur 0.25% aller Moleküle protoniert vor. Die in Abb. 4.14 a) dargestellten Spektren zeigen, für alle Azobenzole mit Ausnahme von

**AB5**, auch keine Veränderung im sauren Bereich. Die spektrale Veränderung im Fall von **AB5** ist auf die Carbonsäurefunktion zurückzuführen, deren -M-Effekt sich durch Protonierung vergrößert [301]. Trotz dieser Beobachtungen gehen *Dunn et al.* in ihrer 2009 veröffentlichten Studie von einem Säure-Base-Mechanismus aus, der vorschlägt, dass die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der thermischen cis-trans Relaxation auf ein Gleichgewicht zwischen neutraler Spezies, protonierter und deprotonierter Spezies zurückzuführen ist. Dieses Modell zur Erklärung und

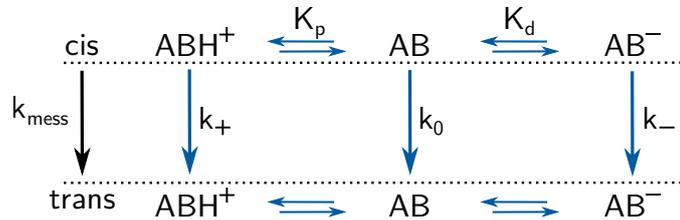


**Abbildung 4.16.** – Strukturformeln von **AB2** im Neutralen, Sauren sowie Basischen mit mesomeren Grenzformeln der protonierten und dissoziierten Form.

Vorhersage der thermischen Relaxation von Azobenzolen in wässriger Lösung wurde von anderen Gruppen mehrfach zitiert und als Basis für weitere Argumentationen genutzt [43, 303]. Aus diesem Grund werden die hier ermittelten Messergebnisse von **AB2** und **AB5** nach diesem Modell ausgewertet. Die bei den jeweiligen pH-Werten ermittelten Relaxationszeiten der beiden Azobenzole sowie von **AB1** sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Die Fehler wurden aus der Streuung der ermittelten Kinetiken der thermischen Relaxation abgeschätzt. Die Relaxationsdauer von **AB2** liegt im Bereich von Mikro- bis Millisekunden. Die Relaxationsdauern von **AB1** sowie **AB5** liegen in der Größenordnung von Stunden bis Wochen. Die in Bezug auf die Azobindung *ortho*-ständige Carbonsäuregruppe scheint die Relaxation signifikant zu verlangsamen. Dies ist entgegen der Erwartung, da der -M-Effekt der Gruppe den +M-Effekt des glycosidischen Acetals im gegenüberliegenden Ring verstärken sollte [80, 90, 91]. Es könnte sein, dass die Carbonsäuregruppe durch die Nähe zum Azostickstoff eine Lösungsmittelwechselwirkung abschirmt, welche in der Literatur ebenfalls für beschleunigte Relaxationsdauern verantwortlich gemacht wird [94, 97, 304]. In Abbildung 4.17 ist ein Schema zur Verdeutlichung des von *Dunn et al.* vorgeschlagenen Mechanismus dargestellt. Die gemessene Geschwindigkeitskonstante  $k_{mess}$  setzt sich additiv aus den Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Spezies,

**Tabelle 4.4.** – Die ermittelten pH-abhängigen Lebensdauern der thermischen Relaxation von **AB1**, **AB2** und **AB5**.

pH-Wert	$\tau(\mathbf{AB1})$ in h	$\tau(\mathbf{AB2})$ in $\mu\text{s}$	$\tau(\mathbf{AB5})$ in h
2	0.4	2.9	1.2
3	1.3	4.4	2.2
4	16	9.4	94
5	32	34	199
6	45	21	-
7	65	8.2	295
8	77	7.9	423
8.75	80	43	-
9	-	-	477
10	82	370	451
11	76	1810	509
12	82	21000	440
<i>Fehler</i>	7%	8%	12%



**Abbildung 4.17.** – Schema zur Verdeutlichung des Säure-Base-Gleichgewichtes von Azobenzolen und dessen Einfluss auf die gemessene Geschwindigkeitskonstante  $k_{mess}$  der thermischen Relaxation. Nach Ref. [97].

also der protonierten, deprotonierten und der neutralen Form, zusammen (siehe Gleichung 4.4)

$$k_{mess} = \alpha_+ k_+ + \alpha_0 k_0 + \alpha_- k_- \quad (4.4)$$

Hierbei sind  $\alpha_i$  die Anteile der jeweiligen Form bei einem gegebenen pH-Wert. Sie ergeben sich nach der bekannten Henderson-Hasselbalch-Gleichung aus den pKs-Werten der Substanz und dem pH-Wert bzw. den Säurekonstanten  $K_p$  und  $K_d$  sowie

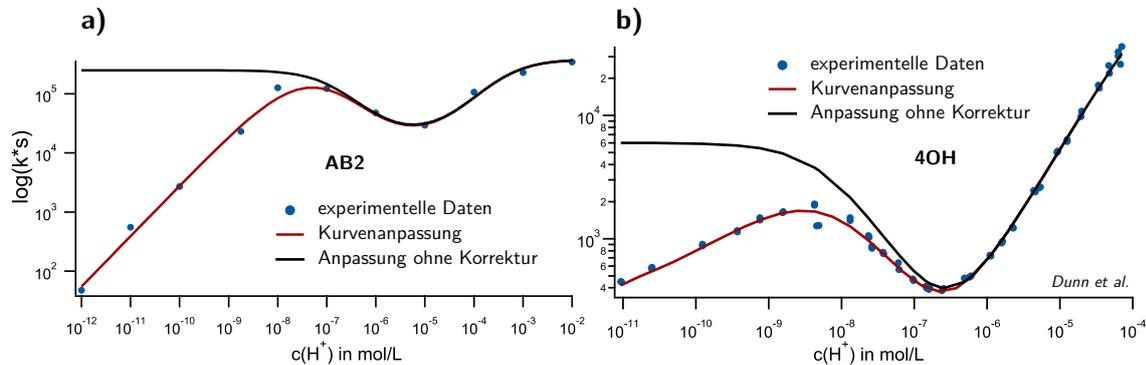
der Wasserstoffionenkonzentration  $c(H^+)$ :

$$\alpha_+ = \frac{c(H^+)}{c(H^+) + K_p} \quad (4.5)$$

$$\alpha_0 = \frac{K_p}{c(H^+) + K_p} - \frac{K_d}{c(H^+) + K_d} \quad (4.6)$$

$$\alpha_- = \frac{K_d}{c(H^+) + K_d}. \quad (4.7)$$

Die Säurekonstante  $K_p$  stellt, wie in Abb. 4.17 zu sehen, die Konstante für die Protonierung des Azostickstoffs dar.  $K_d$  stellt die Säurekonstante für die Deprotonierung der Hydroxygruppe oder im Fall von **AB5** der COOH-Gruppe dar. Trägt man nun die gemessene Geschwindigkeitskonstante  $k_{mess}$  gegen die Protonenkonzentration auf, sollte die erhaltene Kurve mit Hilfe von Gleichung 4.4 angepasst werden können. Aus einer solchen Anpassung erhält man die Geschwindigkeitskonstanten  $k_+$ ,  $k_0$  und  $k_-$ . Die ebenfalls erhaltenen Werte für  $K_p$  und  $K_d$  sollten dem pKs-Wert der Hydroxygruppe bzw. der COOH-Gruppe sowie der konjugierten Säure  $ABH^+$  entsprechen. In Abbildung 4.18 a) ist eine solche Auswertung für **AB2** dargestellt. Zusätzlich sind zum Vergleich die Literaturdaten für **4OH** dargestellt (Abb. 4.18 b)) [97]. Bei einem Vergleich der Literaturdaten mit den für **AB2** erhaltenen Er-



**Abbildung 4.18.** – Darstellung der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten (blaue Punkte) gegen die Protonenkonzentration und Kurvenanpassungen nach dem Säure-Base-Gleichgewichtsmodell mit (rote Linien) und ohne (schwarze Linien) Korrekturterm für a) erhaltene Daten für **AB2** (der Punkturnfang entspricht Fehlerbalken von k) und zum Vergleich b) von *Dunn et al.* veröffentlichte Daten für **4OH** [97].

gebnissen kann man zunächst Ähnlichkeiten im Verlauf erkennen. Dies ist durchaus

**Tabelle 4.5.** – Die erhaltenen Parameter  $k_+$ ,  $k_0$  und  $k_-$  sowie  $K_p$  und  $K_d$  aus der Darstellung von  $k_{mess}$  vs  $c(H^+)$  für **AB2** und **4OH**. Die Fehler wurden durch einbeziehen der Fehler der Geschwindigkeitskonstanten in die Kurvenanpassungen abgeschätzt.

Konstante	<b>AB2</b>	<b>4OH</b> aus Ref.[97]
$k_+$	$(3.8 \pm 0.3) \cdot 10^5 s^{-1}$	$2 \cdot 10^5 s^{-1}$
$k_0$	$(2.1 \pm 0.4) \cdot 10^4 s^{-1}$	$108 s^{-1}$
$k_-$	$(2.5 \pm 0.2) \cdot 10^5 s^{-1}$	$6000 s^{-1}$
$K_p$	$(4.5 \pm 0.5) \cdot 10^{-4}$ ( $\hat{=}$ pKs $3.3 \pm 0.1$ )	$3.76 \cdot 10^{-4}$ ( $\hat{=}$ pKs 3.4)
$K_d$	$(1.5 \pm 0.5) \cdot 10^{-7}$ ( $\hat{=}$ pKs $6.8 \pm 0.2$ )	$7.0 \cdot 10^{-9}$ ( $\hat{=}$ pKs 8.2)

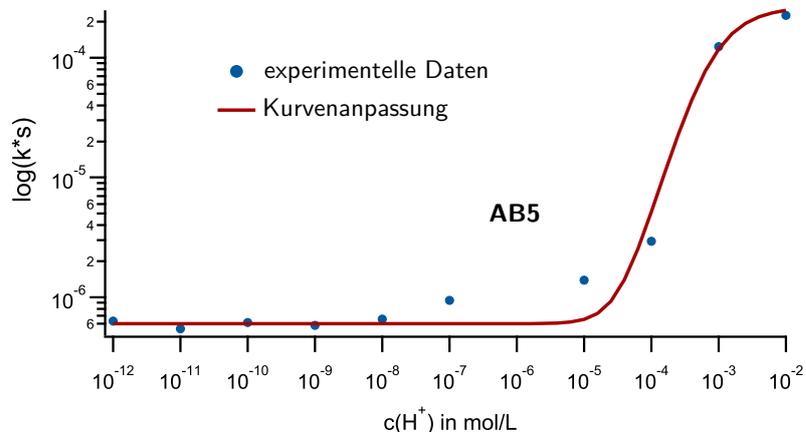
zu erwarten, da die chromophoren Systeme der Moleküle ähnlich sind [80]. Die Geschwindigkeit der thermischen Relaxation ist im sauren Bereich am höchsten, wird dann im neutralen Bereich langsamer und steigt im Bereich des pKs-Wertes der Hydroxygruppe zunächst an, um anschließend wieder zu fallen. Diese Reduktion der Geschwindigkeit oberhalb eines pH-Wertes von 8 folgt einem exponentiellen Verlauf und erscheint in der logarithmischen Darstellung in Abb. 4.18 daher linear. Der Anstieg bei steigendem pH-Wert im Bereich des pKs-Wertes legt eine höhere Geschwindigkeitskonstante für die deprotonierte im Vergleich zur neutralen Form ( $k_- > k_0$ ) nahe. Das Säure-Base-Modell sagt daher voraus, dass sich die beobachtete Geschwindigkeitskonstante bei hohen pH-Werten der Konstante der deprotonierten Form annähert ( $k_- = k_{mess}$ ), da bei pH 12 ca. 99.99% der Moleküle deprotoniert vorliegen. Die aus den Anpassungen erhaltenen Werte sind in Tabelle 4.5 dargestellt. Auffallend ist, dass sowohl für **AB2** als auch **4OH** die Vorhersage des Modells (schwarze Kurven in Abb. 4.18) im basischen Bereich große Abweichungen zu den gemessenen Werten aufweist. Aufgrund dieser Abweichungen im pH-Bereich ab pH 8 muss ein Korrekturterm eingeführt werden, um die Modellkurven anzupassen. Es ist anzumerken, dass die Korrekturterme keine physikalisch zuordenbare Bedeutung aufweisen [97]. Dies gilt sowohl für den in der Literatur angewendeten Term als auch für den hier verwendeten Term. Unterstützt wird diese Tatsache dadurch, dass mit dem Term aus der Literatur keine Erfolgreiche Anpassung der Daten von **AB2** erfolgen konnte. Beide Terme sorgen dafür, dass die Geschwindigkeitskonstante  $k_-$  mit sinkender  $H^+$ -Konzentration bzw. steigender  $OH^-$ -Konzentration inhibiert wird. Der Term für **4OH** aus der Literatur ist in Gleichung 4.8, der Term für **AB2** aus

dieser Arbeit ist in Gleichung 4.9 dargestellt.

$$k_{-}^{korr}(\mathbf{4OH}) = \frac{k_{-}}{\left(1 + \left(K_{inh}/\sqrt{c(H^{+}) + c(H^{+})_{inh}}\right)\right)} \quad (4.8)$$

$$k_{-}^{korr}(\mathbf{AB2}) = \frac{k_{-}}{\left(1 + A \cdot e^{\frac{pH-pH_0}{\tau}}\right)} \quad (4.9)$$

Die Konstanten  $\tau$  und  $K_{inh}$  spiegeln die Rate wider mit der  $k_{-}$  inhibiert wird. Die Konstanten  $c(H^{+})_{inh}$  und  $pH_0$  sowie  $A$  kontrollieren, dass  $k_{-}$  nicht zu früh inhibiert wird. Sowohl in der Literatur für **4OH** als auch für **AB2** sind die experimentellen Daten im sauren Bereich nach diesem Modell nur anzupassen, wenn der pKs-Wert für die Protonierung des Azostickstoffs zwischen 3 und 4 liegt. Dieser Wert ist in Bezug auf die Ionenkonzentration vier Größenordnungen höher als der von *Klotz et al.* veröffentlichte Wert ( $pKs(\mathbf{4OH}) = -0.93$ ) [299]. Die Abweichungen im basischen Bereich werden in der Literatur auf nicht näher definierte Lösungsmittelwechselwirkungen zurückgeführt. Der Umstand, dass die Geschwindigkeitskonstante im sauren Bereich (pH 4) bereits signifikant ansteigt, obwohl nach dem pKs-Wert von *Klotz et al.* hier 99.999% aller Moleküle in neutraler Form vorliegen müssen, legt nahe, dass die beobachtete Geschwindigkeitskonstante auch im sauren Bereich durch Lösungsmittelwechselwirkungen in Form von Wasserstoffbrücken und dazu konkurrierenden Wechselwirkungen mit  $OH^{-}$ -Ionen und nicht durch eine Protonierung erklärt werden muss. Noch deutlicher untermauert wird diese Annahme, wenn man die Daten für **AB5** mit diesem Modell anpassen möchte (siehe Abb. 4.19). Die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten sind wie für die anderen Azobenzole im sauren Bereich am höchsten und sinken dann zwischen pH 3 und pH 4 um zwei Größenordnungen ab. Anschließend erfolgt ein langsamer Abstieg bis pH 8. Ab diesem pH-Wert entspricht die gemessene Geschwindigkeitskonstante der deprotonierten Form ( $k_{mess} = k_{-}$ ). Die als rote Linie dargestellte Kurvenanpassung in Abb. 4.19 ergibt analog zu den oben beschriebenen Anpassungen einen pKs-Wert für die Protonierung von  $3 \pm 0.2$ . Der pKs-Wert für die Deprotonierung der Carbonsäure ist mit  $3.4 \pm 0.6$  etwas geringer als der mit Hilfe von UV/VIS-Spektroskopie ermittelte Wert von  $4.2 \pm 0.5$ . Die Herausforderung die Daten anzupassen liegt vor allem daran, dass oberhalb von pH 5 bereits 99.98% der Moleküle dissoziiert vorliegen sollten, dementsprechend  $k_{mess} = k_{-}$ .



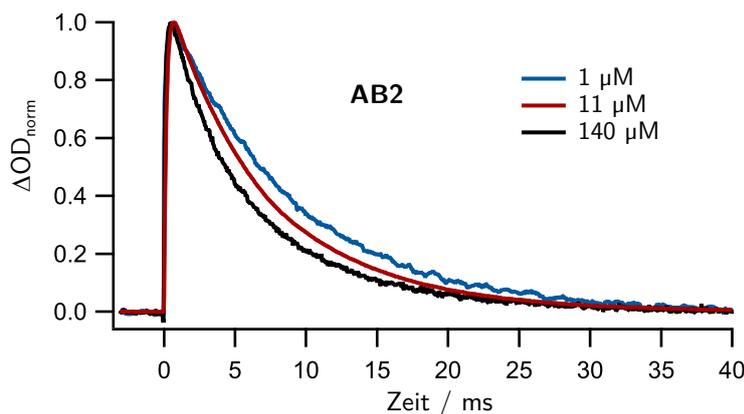
**Abbildung 4.19.** – Darstellung der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten (blaue Punkte) gegen die Protonenkonzentration und Kurvenanpassung nach dem Säure-Base-Gleichgewichtsmodell (rote Linie) für **AB5**.

gelten sollte, aber der Wert von  $k_-$  noch nicht erreicht ist. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass der von *Dunn et al.* postulierte Säure-Base-Mechanismus zumindest für Hydroxyazobenzole nicht geeignet ist, um die thermische Relaxation in wässrigem Medium vorauszusagen.

*Kojima et al.* haben für Hydroxyazobenzole in organischen Lösungsmitteln eine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt, unter anderem auch für **4OH** [94, 304]. Sie erklären diese Konzentrationsabhängigkeit durch Wasserstoffbrückenaggregate, die für eine Zunahme der Relaxationsgeschwindigkeit sorgen. Dieses Aggregationsverhalten wurde in protischen Lösungsmitteln wie Methanol nicht beobachtet, da die Lösungsmittel die einzelnen Moleküle abschirmen. Allerdings ist Letzteres in Wasser kaum möglich. Bei steigenden Protonenkonzentrationen kann es zu einer verstärkten Wechselwirkung zwischen diesen Ionen und dem Azostickstoff kommen, ohne dass eine Protonierung nötig ist. Diese Wechselwirkung kann nach diesem Modell also statt einer Protonierung für die beobachtete pH-Abhängigkeit der thermischen Relaxation ursächlich sein. Aus diesem Grund wurde auch die Konzentrationsabhängigkeit der fünf vorliegenden Azobenzole untersucht.

### 4.1.6. Konzentrationsabhängigkeit der thermischen Relaxation

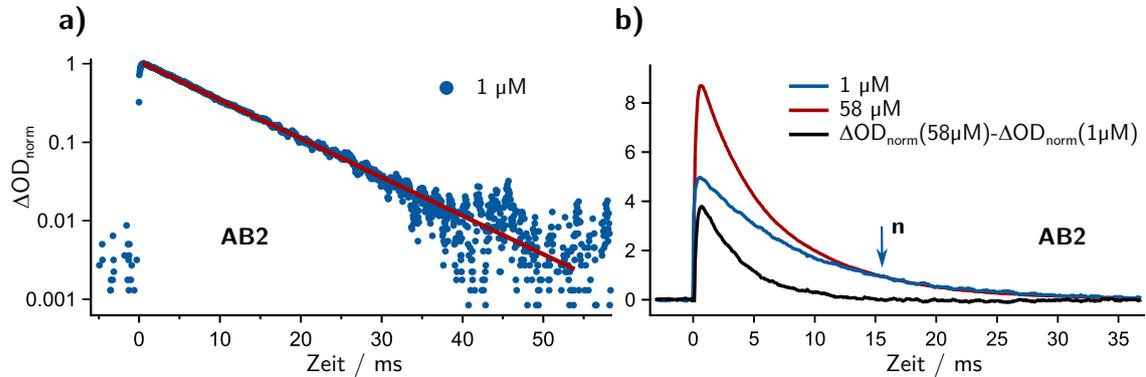
Während der Messungen von **AB2** und **AB3** in mit KHP gepuffertem Methanol wurde eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der Lebensdauern der thermischen Relaxation festgestellt. In Abb. 4.20 sind Messergebnisse für **AB2** in KHP/MeOH bei drei verschiedenen Konzentrationen zur Veranschaulichung dargestellt. Bei der



**Abbildung 4.20.** – Darstellung der Änderung der normierten optischen Dichte  $\Delta OD_{\text{norm}}$  gegen die Zeit bei drei verschiedenen Konzentrationen am Beispiel von **AB2** in mit KHP gepuffertem Methanol.

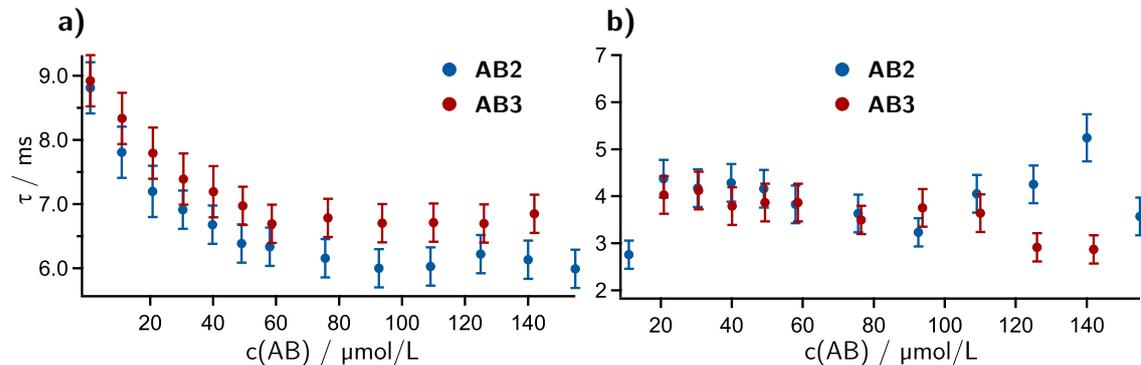
niedrigsten Konzentration von  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  ist die Kinetik in logarithmischer Darstellung linear (siehe Abb. 4.21 a)), wohingegen dies bei höheren Konzentrationen nicht mehr der Fall ist. Dies spricht zunächst einmal dafür, dass nicht mehr nur ein Prozess an der Relaxation der Moleküle beteiligt ist. Durch Normierung der Kinetiken bei ausreichend hohen Relaxationszeiten, bei denen nur noch der ursprüngliche, lange Prozess einen Beitrag zum Signal liefert, kann man anschließend durch Subtraktion der Kinetiken bei den höheren Konzentrationen von der Kinetik bei  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  die Transienten des kürzeren Prozesses erhalten. Dies ist in Abbildung 4.21 b) für eine ausgewählte Konzentration beispielhaft dargestellt. Die so neu erhaltenen extrahierten Kinetiken sind alle in logarithmischer Darstellung linear und weisen keine signifikante Konzentrationsabhängigkeit auf. Die beobachtete Lebensdauer wird demnach kürzer je größer der Beitrag des neuen Prozesses ist. Die ermittelten Lebensdauern von **AB2** und **AB3** in KHP/MeOH sind in Abbildung 4.22 a) dargestellt. Die exakten Ergebnisse mit Fehlergrenzen sind im Anhang in Tabelle A.1 gezeigt. Die Fehler entsprechen der Standardabweichung von mindestens sechs Ein-

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.21.** – a) logarithmische Darstellung der normierten Transmissionsänderung gegen die Zeit für die geringste Konzentration von **AB2** in KHP/MeOH. Die rote Gerade verdeutlicht die Linearität der Daten bei dieser Konzentration. b) am mit dem blauen Pfeil gekennzeichneten Punkt normierte Kinetiken bei  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  (blaue Kurve) und  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  (rote Kurve). Die Subtraktion liefert eine neue Transmissionsänderung (schwarze Kurve).

zelmessungen. Der Photoschalter **AB3**, der im Zucker geschützte Hydroxygruppen aufweist, zeigt, abgesehen von geringfügig längeren beobachteten Lebensdauern, die gleiche Konzentrationsabhängigkeit wie **AB2**. Die in Abbildung 4.22 b) gezeigten Lebensdauern der extrahierten Relaxationsprozesse von **AB2** und **AB3** stimmen für die meisten Konzentrationen im Rahmen der Fehlergrenzen überein. Der Mittelwert dieser Lebensdauern beträgt für **AB2**  $4.0 \pm 0.6 \text{ ms}$  und für **AB3**  $3.6 \pm 0.4 \text{ ms}$ . Dies

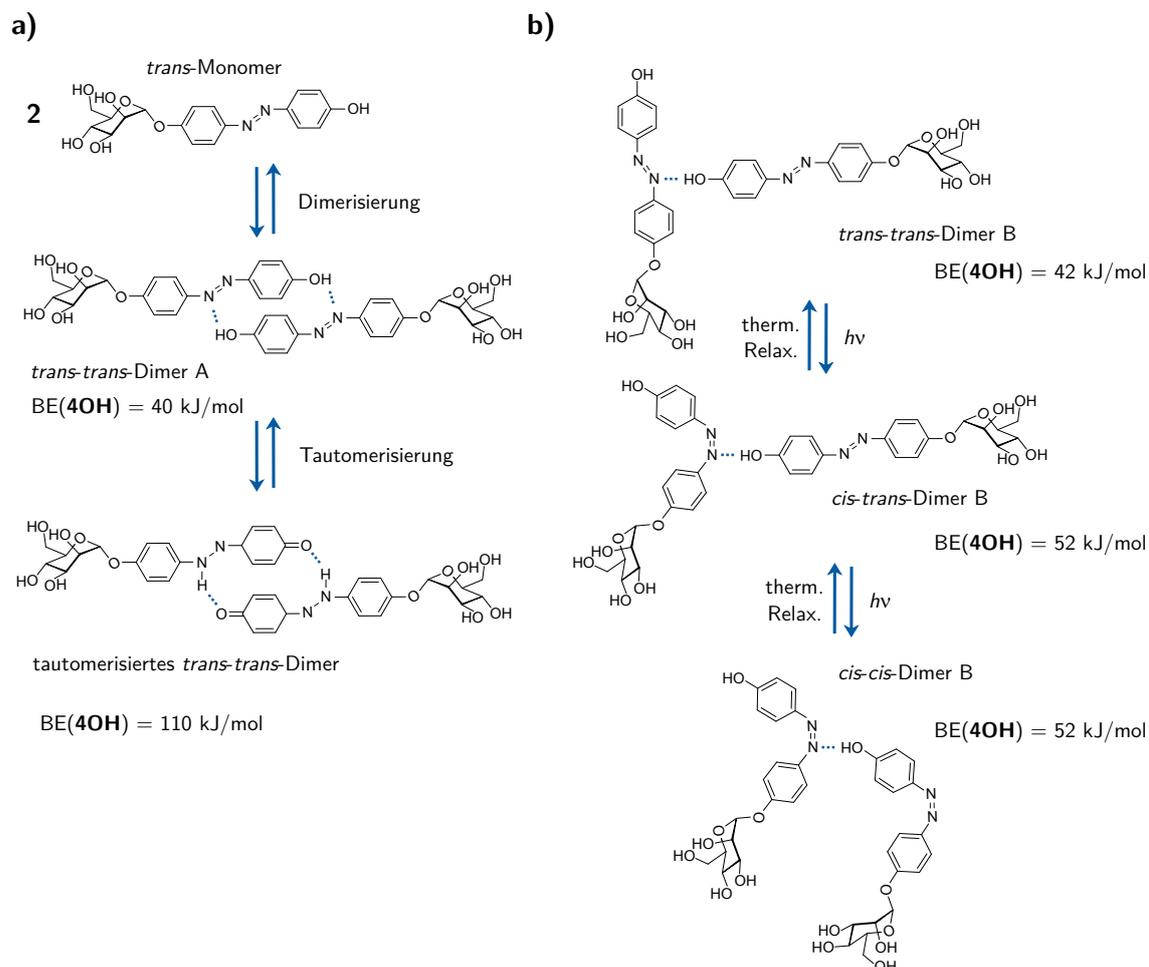


**Abbildung 4.22.** – a) gemessene Lebensdauern und b) extrahierte Lebensdauern von **AB2** (blaue Punkte) und **AB3** (rote Punkte) bei verschiedenen Konzentrationen in KHP/MeOH.

spricht zunächst einmal gegen einen Einfluss der Mannose-Hydroxygruppen auf den Mechanismus, welcher zu dem neuen, schnelleren Relaxationsprozess führt.

In der Literatur ist bereits seit langer Zeit bekannt, das Hydroxyazobenzole wie

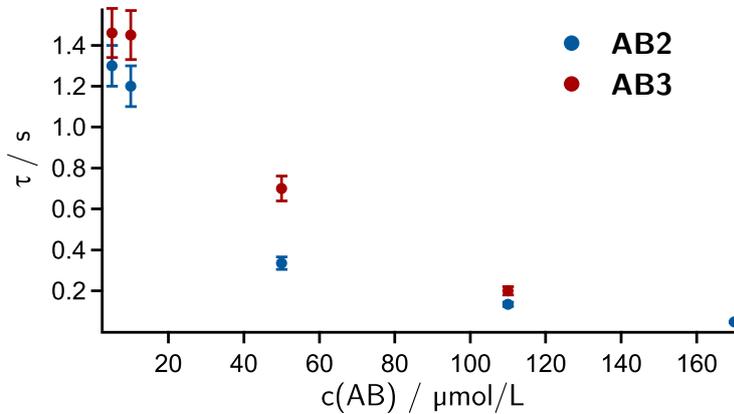
**4OH** in organischen Lösungsmitteln wie Cyclohexan oder Benzol konzentrationsabhängige Lebensdauern der thermischen Relaxation zeigen [101, 305]. Dies wurde durch die Bildung von Dimeren oder Aggregaten erklärt, welche in hydrophoben Lösungsmitteln durch Wasserstoffbrücken entstehen. Diese Wasserstoffbrücken-Dimere senken durch die Erleichterung einer Tautomerisierung der Moleküle und damit einer Schwächung der Azobindung, die Barriere für die thermische Relaxation [94, 101, 304–306]. Hier wird wieder ein Rotationsmechanismus als Grundlage angenommen [101, 306]. In Abbildung 4.23 a) ist ein Beispiel für die Dimerisierung von zwei **AB2** Molekülen und die anschließende Tautomerisierung dargestellt. In Abbildung 4.23 b) ist anhand eines weiteren möglichen Dimers die schrittweise Photoisomerisierung zunächst zu einem *cis-trans*-Dimer und schlussendlich zu einem *cis-cis*-Dimer schematisch gezeigt. Es gibt eine Vielzahl an möglichen weiteren Dimeren, für einige dieser haben *Kurita et al.* die Bindungsenergien quantenmechanisch berechnet [307]. Für das tautomerisierte **4OH** haben sie eine signifikante Bindungsenergie von  $110 \text{ kJ mol}^{-1}$  berechnet. Bei den in Abb. 4.23 gezeigten Wasserstoffbrücken-Dimeren kann eines der beteiligten Moleküle auch mit einem protischen Lösungsmittelmolekül ausgetauscht werden. *Kojima et al.* haben in theoretischen Berechnungen für Methanolkomplexe mit dem Molekül **4OH** Bindungsenergien um  $40 \text{ kJ mol}^{-1}$  bis  $42 \text{ kJ mol}^{-1}$  angegeben [94]. Diese Lösungsmittelkomplexe wurden von *Kojima et al.* dafür verantwortlich gemacht, dass keine Konzentrationsabhängigkeit in protischen Lösungsmitteln wie Methanol festgestellt wurde, da diese mit der Dimerisierung konkurrieren [94, 96, 304]. Es könnte daher sein, dass die Mannosemoleküle zwar keinen direkten Einfluss auf die Relaxationsgeschwindigkeit haben, aber sehr wohl die Entstehung der verantwortlichen Dimere wesentlich erleichtern, so dass auch in protischen Lösungsmitteln wie KHP/MeOH eine Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten ist. Zucker wie Glucose und Mannose sind dafür bekannt, dass sie in wässriger Lösung Aggregate bilden können und werden unter anderem als entscheidende funktionelle Gruppen in Hydrogel bildenden Molekülen eingesetzt [308]. In Kombination mit Azobenzolmolekülen konnten schaltbare Gelbildner erhalten werden [309]. Dies ist auf die vielen Hydroxygruppen in den Zuckermolekülen zurückzuführen, welche Wasserstoffbrücken zwischen den Zuckern ausbilden können [309]. So ist es also vorstellbar, dass die Zucker das Zusammentreffen von zwei Azobenzolmolekülen unterstützen und auch selber Wasserstoffbrücken zu einem Azostickstoff ausbilden.



**Abbildung 4.23.** – Schematische Darstellung nach Ref. [94] von einigen möglichen Wasserstoffbrücken-Dimeren. a) Entstehung eines *trans-trans*-Dimers und anschließende, durch die Wasserstoffbrücken erleichterte, Tautomerisierung der beteiligten Moleküle. b) Beispiel der Schrittweisen Photoisomerisation eines weiteren möglichen Dimers. Die angegebenen Bindungsenergien gelten für das Molekül **4OH** und sind aus Ref. [307] entnommen.

Da in der Literatur von *Sanchez et al.* ein Einfluss der Pufferkonzentration auf die thermische Relaxation von Methylorange beobachtet wurde, ist es möglich, dass die Beobachtungen auf die Anwesenheit des Puffers zurückzuführen sind [310]. Um einen Einfluss des Puffermoleküls zu ermitteln, wurden daher Messungen in reinem Methanol in Einwegküvetten durchgeführt (siehe Kap. 4.1.3). Die Ergebnisse dieser Messungen für **AB2** und **AB3** in reinem, wasserfreiem Methanol sind in Abbildung 4.24 dargestellt. Alle Ergebnisse mit Fehlergrenzen befinden sich im

Anhang in Tabelle A.2. In Methanol ist eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit für

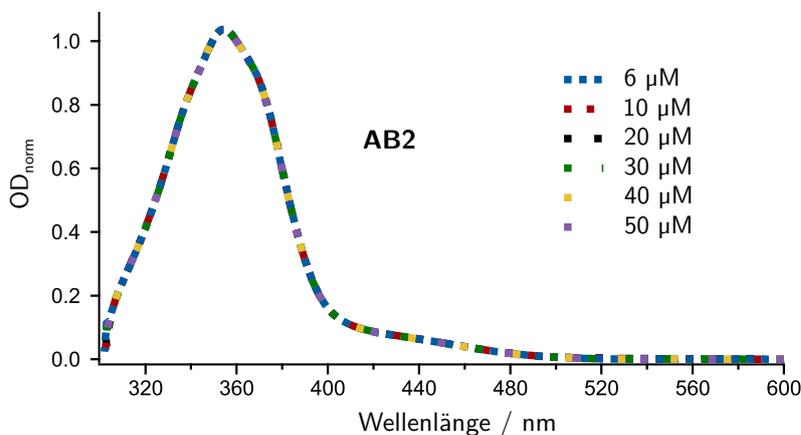


**Abbildung 4.24.** – Gemessene Lebensdauern von **AB2** (blaue Punkte) und **AB3** (rote Punkte) in reinem Methanol. Die Konzentrationsabhängigkeit ist stärker ausgeprägt als in KHP/MeOH.

beide untersuchten Photoschalter zu erkennen. Die Messergebnisse weisen aufgrund der höheren Streuung in den Einwegküvetten eine größere Schwankung auf. Die Lebensdauern sind deutlich länger und die Konzentrationsabhängigkeit ist wesentlich größer als in gepufferter Lösung. Die Abnahme der Lebensdauer in gepufferter Lösung beträgt für **AB2** maximal 32% und in reinem Methanol 96%. Dies spricht dafür, dass der Puffer nicht Ursache für die Konzentrationsabhängigkeit ist. Es scheint eher so, als ob die Puffermoleküle den Effekt schwächen. Dies ist auch nicht unwahrscheinlich, da ein Effekt, analog zu dem von *Kojima et al.* beschriebenen Lösungsmittelleffekt, wirken könnte [94]. Kaliumhydrogenphthalat ist eine schwache Säure und damit kann es möglicherweise wesentlich stabilere Dimere bilden als Methanol. So ist eine effektivere Abschirmwirkung des mit KHP gepufferten Methanols im Vergleich zu reinem Methanol wahrscheinlich.

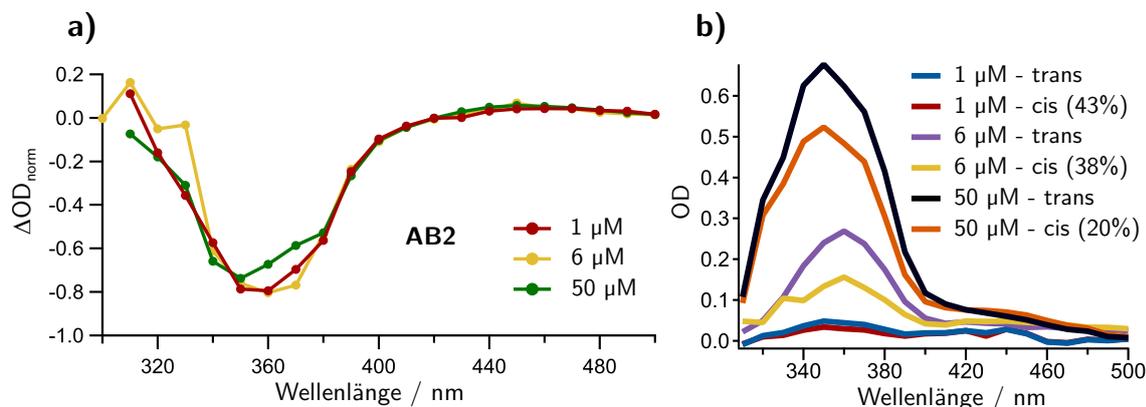
In einigen Veröffentlichungen zur Konzentrationsabhängigkeit von **4OH** wurde von spektralen Veränderungen berichtet [101], wenn auch nur bei Temperaturen unter  $-60^\circ\text{C}$ . Wohingegen in anderen Veröffentlichungen diese Beobachtungen wiederum nicht gemacht wurde [94]. Aus diesem Grund wurden UV/VIS-Spektren von **AB2** und **AB3** bei verschiedenen Konzentrationen in KHP/MeOH aufgenommen. Die ermittelten UV/VIS-Spektren von **AB2** sind in Abbildung 4.25 dargestellt. Es ist keine Veränderung der UV/VIS-Spektren zu erkennen. Es sollte angemerkt werden, dass man unterhalb einer Wellenlänge von ca. 310 nm keine Absorption von

Azobenzol beobachten kann, da KHP in diesem Bereich intensiv absorbiert. Um



**Abbildung 4.25.** – UV/VIS-Spektren von **AB2** in KHP/MeOH bei verschiedenen Konzentrationen. Es ist keine Konzentrationsabhängigkeit der Spektren des *trans*-Isomers zu erkennen.

auszuschließen, dass sich Dimere nur im Spektrum der *cis*-Isomere zeigen oder sich nur Dimere von *cis*-Isomeren bilden, wurde die aufwändige Prozedur unternommen mit dem Blitzlichtphotolyseaufbau transiente Spektren aufzunehmen. Da in diesem Aufbau kein Kamerasystem vorhanden ist, welches kurze Aufnahmezeiten ermöglicht, mussten für jede Wellenlänge einzelne Relaxationen gemessen werden. Diese Prozedur wurde bei drei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt, um eventuelle konzentrationsabhängige Änderungen in den transienten Spektren, bzw. in den Spektren der *cis*-Isomere von **AB2** zu finden. Die so erhaltenen transienten Spektren sind in Abbildung 4.26 a), die Spektren der *cis*- und zugehörigen *trans*-Isomere in Abbildung 4.26 b) dargestellt. Eventuelle Änderungen wären aufgrund der hohen Schwankungen und geringen Auflösung besser in den transienten Spektren zu erkennen. Abgesehen von einigen als Ausreißer angenommenen Werten, stimmen die Spektren bei den drei Konzentrationen überein. Es ist keine Bandenverschmälerung oder Verbreiterung zu erkennen. Die leichten Abweichungen für die Konzentration bei  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  können aber nicht mit absoluter Gewissheit als einfache Ausreißer angenommen werden. Es sollte noch angemerkt werden, dass die in Abb. 4.26 b) gezeigten Spektren für die höchste Konzentration (schwarze und orange Linie) für eine bessere Darstellung um den Faktor 4 skaliert wurden. Die ermittelten Spektren liefern auch die Möglichkeit, durch Integration der  $\pi$ - $\pi^*$ -Bande den Anteil an geschalteten

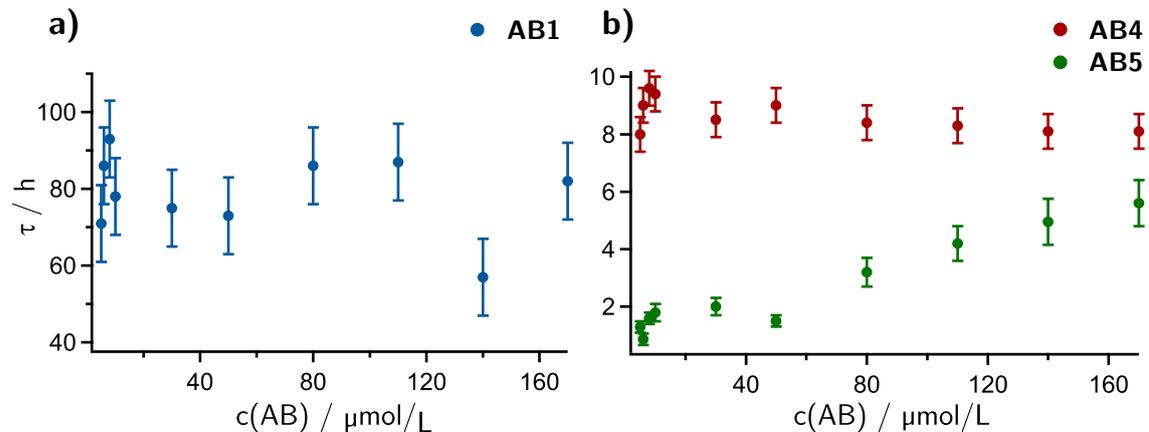


**Abbildung 4.26.** – a) transiente Spektren von **AB2** in KHP/MeOH bei drei verschiedenen Konzentrationen. Die Konzentration scheint keinen Einfluss auf die Spektren zu haben. b) die *trans*- und *cis*-Spektren, welche zur Ermittlung der transienten Spektren genutzt wurden. Aus diesen lässt sich der Anteil an geschalteten Molekülen, welche in *cis*-Konformation vorliegen, schätzen. Die jeweiligen Werte für diesen Anteil sind in Klammern angegeben.

Molekülen abzuschätzen. Die Isomerisierungsrate ist mit 43% bei der niedrigsten Konzentration am höchsten und bei der Lösung mit der höchsten Konzentration mit 20% am geringsten. Da die Isomerisierungsrate von der Pulsenergie abhängig sein sollte, die beobachteten Lebensdauern, aber keine Abhängigkeit von der Pulsenergie zeigen (siehe Kap. 4.1.3, Tab. 4.1) kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass die Anzahl der *cis*-Isomere bei Start der Relaxation keinen signifikanten Einfluss auf die thermische Relaxation aufweist.

Von den Azobenzolen **AB1** und **AB4** wird keine signifikante Konzentrationsabhängigkeit erwartet, wohingegen für **AB5** aufgrund der Carbonsäuregruppe durchaus eine solche erwartet werden kann. *Chandrasekaran et al.* haben für **AB5** in einer 2014 veröffentlichten Studie bereits die Bildung von Aggregaten mit Hilfe von NMR-Spektroskopie nachgewiesen [46]. Die Diskrepanz der Ergebnisse für den photo-stationären Zustand (PSS) in DMSO, welcher mit Hilfe von UV/VIS-Spektroskopie ( $c = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , PSS *trans/cis* = 25:75) und mit NMR-Spektrometrie ( $c > 1 \text{ mmol L}^{-1}$ , PSS *trans/cis* = 85:15) ermittelt wurde, ließ eine Konzentrationsabhängige thermische Relaxation als wahrscheinlich erscheinen [46]. In dieser Studie wurde für das ebenfalls untersuchte **AB4** keine Aggregation mit NMR-Spektrometrie festgestellt. NMR-Spektrometrie ist jedoch eine vergleichsweise unempfindliche Methode. Aus diesem Grund waren die genutzten Konzentrationen auch wesentlich höher als in den

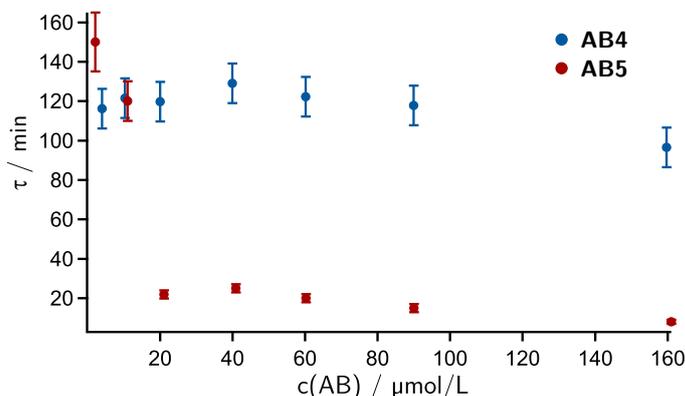
UV/VIS-Studien. Es ist daher möglich, dass eventuell gebildete Aggregate von **AB4** nicht detektiert wurden, weil sie nicht in ausreichender Menge für die Messmethode vorlagen. Um die Vermutung bezüglich **AB1** und **AB4** zu bestätigen und tiefer gehende Daten zur Konzentrationsabhängigkeit der thermischen Relaxation von **AB5** zu erhalten, wurden auch diese Photoschalter untersucht. Zunächst wurden die Photoschalter zur besseren Vergleichbarkeit ebenfalls in KHP/MeOH untersucht. Die Ergebnisse für die Lebensdauern bei verschiedenen Konzentrationen sind für **AB1** in Abbildung 4.27 a) und für **AB4** und **AB5** in Abbildung 4.27 b) dargestellt. Alle ermittelten Daten und ihre Fehlergrenzen sind im Anhang in Tabelle A.3 gezeigt. Die Lebensdauern von **AB1** liegen im Bereich von 60 bis 90 Stunden, schwanken also in hohem Maße, zeigen aber keine nachvollziehbare Abhängigkeit von der Konzentration. Es wird daher angenommen, dass die ermittelten Lebensdauern mit einer Standardabweichung von 10 h um einen Mittelwert von 80 h streuen. Für die Fehler der Lebensdauern von **AB5**, wurden die Schwankungen der verwendeten Intensitäten in die Kurvenanpassungen einbezogen und der Fehler auf 15% abgeschätzt. Die



**Abbildung 4.27.** – a) Lebensdauern von **AB1** in KHP/MeOH bei verschiedenen Konzentrationen. Trotz großer Streuung der Werte ist keine Abhängigkeit erkennbar. b) Lebensdauern bei verschiedenen Konzentrationen von **AB4** (rote Punkte) und **AB5** (grüne Punkte) in KHP/MeOH. **AB4** zeigt keine Konzentrationsabhängigkeit, wohingegen **AB5** eine unerwartete Verlangsamung der thermischen Relaxation mit steigender Konzentration zeigt.

Lebensdauern von **AB4** (Abb. 4.27 b), rote Punkte) zeigen keine Konzentrationsabhängigkeit und liegen bei einer mittleren Lebensdauer von  $8.6 \text{ h} \pm 0.6 \text{ h}$ . Eine völlig unerwartete Abhängigkeit von der Konzentration zeigt **AB5** in KHP/MeOH.

Die Lebensdauern steigen zusammen mit der Konzentration an (siehe Abb. 4.27 b), grüne Punkte). Die Lebensdauer bei geringen Konzentrationen liegt im Bereich von zwei Stunden und steigt oberhalb einer Konzentration von  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  um fast das dreifache auf  $5.6 \text{ h} \pm 0.8 \text{ h}$  an. Eine Erhöhung der **AB5** Konzentration sollte auch die Konzentration von Wasserstoffionen steigern. Dieser Effekt sollte durch KHP abgeschwächt werden, könnte aber im Prinzip auch eine Verlangsamung nicht erklären, da die thermische Relaxation bei höheren  $H^+$ -Konzentrationen schneller werden sollte (siehe Kap. 4.1.5, Abb. 4.19). Da sich die Carbonsäuregruppe direkt in Nachbarschaft zum Azostickstoff befindet, sollte diese größere Moleküle von Wechselwirkungen abschirmen [103]. Aus diesem Grund kann mit der vorliegenden Datenlage keine zufriedenstellende Erklärung für diese Beobachtung vorgestellt werden. Da sowohl Wechselwirkungen des Puffermoleküls selber mit **AB5** als auch eine puffernde Wirkung von KHP einen komplexen Einfluss auf die Relaxation nehmen können, sind die Beobachtungen nicht als Indiz für oder gegen das vorgestellte Modell zu werten. Die Schalter **AB4** und **AB5** wurden wie in der Literatur ebenfalls in DMSO untersucht, mit dem Unterschied, dass die Konzentrationsabhängigkeit in der hier vorgestellten Arbeit detailliert untersucht wurde [46]. Die ermittelten Ergebnisse sind in Abbildung 4.28 dargestellt. Die Ergebnisse inklusive Fehlergrenzen sind im Anhang in Tabelle A.5 zu finden. **AB4** zeigt wie erwartet eine nicht konzentrationsabhängige



**Abbildung 4.28.** – Lebensdauern bei verschiedenen Konzentrationen von **AB4** (blaue Punkte) und **AB5** (rote Punkte) in reinem DMSO. **AB4** zeigt keine Konzentrationsabhängigkeit, wohingegen **AB5** eine große Beschleunigung der thermischen Relaxation mit steigender Konzentration zeigt.

Lebensdauer von  $120 \text{ min} \pm 10 \text{ min}$ . Der Wert weicht signifikant vom Literaturwert von 5 h ab. Dieser wurde allerdings bei einer Temperatur von  $18^\circ\text{C}$  ermittelt, wohin-

gegen die hier präsentierten Daten bei 25 °C gemessen wurden (siehe Kap. 3.2.2.3). Es ist zu erwarten, dass die thermische Relaxation bei höheren Temperaturen schneller verläuft (siehe auch Kap.4.1.4, Abb. 4.8). **AB5** zeigt konzentrationsabhängige Lebensdauern. Bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  beträgt die Lebensdauer 150 min und sinkt dann schon bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  auf ca. 20 min ab. Der in der Literatur bei 18 °C gemessene Wert für eine Konzentration von 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  liegt viel höher bei 2 h [46]. Auch hier kann die Abweichung möglicherweise durch die Temperaturdifferenz erklärt werden. Anhand der hier präsentierten Ergebnisse ist jedoch klar ersichtlich, dass die recht lang dauernden NMR-Messungen von Proben mit einer Konzentration von über 1  $\text{mmol L}^{-1}$  NMR-Spektren von bereits signifikant relaxierten Proben zeigen. Dies erklärt die bereits erwähnte Diskrepanz des mit unterschiedlichen Methoden ermittelten photostationären Zustands von **AB5** in Ref. [46]. Die Konzentrationsabhängigkeit von **AB5** in reinem DMSO kann über die Ergebnisse der pH-Abhängigkeit und damit Wechselwirkungen des Azostickstoffs mit  $H^+$ -Ionen erklärt werden, da deren Konzentration aufgrund der COOH-Gruppe mit der Konzentration von **AB5** steigt. Die Reduktion der Lebensdauern bei höheren pH-Werten (in den meisten Fällen oberhalb von pH 8-9), welche in im Kapitel 4.1.5 beobachtet wurde, kann mit dem hier vorgeschlagenen Mechanismus erklärt werden. Der für die Relaxationsgeschwindigkeit wichtige Azostickstoff ist eine leichte Base und wechselwirkt dementsprechend mit gebundenem Wasserstoff, wie in Hydroxygruppen oder schwachen Carbonsäuren oder mit  $H^+$ - bzw.  $H_3O^+$ -Ionen. Bei hohen  $OH^-$ -Konzentrationen, also niedrigen  $H^+$ -Konzentrationen, ist eine solche Wechselwirkung erstens reduziert und zweitens können die elektronegativen  $OH^-$ -Ionen selber nicht auf diese Art mit dem ebenfalls elektronegativen Stickstoff wechselwirken.

#### 4.1.7. Zusammenfassung

In Kapitel 4.1 wurde die thermische Relaxation von in 4'-Position glycosilierten Azobenzolen mit variierender Substitution am Phenylring mit Hilfe von Blitzlichtphotolyse- und UV/VIS-Absorptionsspektroskopie eingehend untersucht. Die in 4-Position mit einer Hydroxygruppe substituierten Azobenzole **AB2** und **AB3** relaxieren je nach Lösungsmittel im Bereich von Sekunden bis Mikrosekunden und weisen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber der  $H^+$ -Konzentration auf, so dass in organischen

Lösungsmitteln zunächst keine reproduzierbaren Lebensdauern der thermischen Relaxation erhalten werden konnten. Die Substitution der 4'-Position mit  $\alpha$ -D-Mannose scheint die Empfindlichkeit im Vergleich zum bereits in der Literatur untersuchten monosubstituierten **4OH** in hohem Maß zu steigern [94, 96]. Hierbei zeigte sich, dass die Acetylschützung der Zuckerhydroxygruppen nur in einigen ausgewählten Lösungsmitteln, wie Isopropanol, einen Einfluss aufweist. Die pH-Abhängigkeit der Schalter **AB1**, **AB2** und **AB5** wurde in gepufferten, wässrigen Lösungen untersucht. Es konnten mit der Literatur übereinstimmende experimentelle Ergebnisse erhalten werden [97]. Der von *Dunn et al.* vorgestellte Säure-Base-Mechanismus, mit dem die pH-abhängigen Lebensdauern vorhergesagt werden, kann nach den hier erhaltenen Ergebnissen zumindest für Hydroxyazobenzole mit einiger Sicherheit ausgeschlossen werden [97]. Vielmehr wird eine alternative Erklärung der Beobachtungen vorgeschlagen, die sich mit der ebenfalls beobachteten Konzentrationsabhängigkeit verträgt. Hierbei wird nicht die Protonierung der Azobenzole, sondern eine Wechselwirkung über Wasserstoffbrücken zwischen Hydroniumionen und dem Azostickstoff für die Beobachtungen verantwortlich gemacht. Des Weiteren wurde die Konzentrationsabhängigkeit der thermischen Relaxation für alle vorgestellten Azobenzole untersucht. **AB1** und **AB4**, die keine chromophore protische Substitution aufweisen, zeigen, unabhängig vom Lösungsmittel, keine konzentrationsabhängige thermische Relaxation. Das in 2-Position mit einer Carbonsäure substituierte **AB5** zeigt in DMSO und Methanol mit der Konzentration sinkende, in mit KHP gepuffertem Methanol steigende Lebensdauern. **AB2** und **AB3** zeigen unabhängig vom Lösungsmittel sinkende Lebensdauern mit steigender Konzentration. Für die zuletzt genannten Schalter kann die Beschleunigung der Relaxation zufriedenstellend über die durch Dimerisierung erfolgende Wasserstoffbrücken-Wechselwirkung von Hydroxygruppen mit dem Azostickstoff erklärt werden. Diese Wechselwirkungen favorisieren mesomere Grenzformeln oder sogar eine Tautomerisierung, welche eine Relaxation erleichtern [94, 307]. Dies heißt, dass die Wechselwirkung von Hydroxygruppen, Hydroniumionen oder anderen Wasserstoffbrückendonoren mit dem Azostickstoff sowohl für die Beobachtung der pH-Abhängigkeit als auch für die Konzentrationsabhängigkeit herangezogen werden kann. Dies erklärt auch die Konzentrationsabhängigkeit der schwachen Säure **AB5** sowie die, mit dem Säure-Base-Modell nicht erklärbare, Reduktion der Relaxationsgeschwindigkeit, welche in Kapitel 4.1.5 sowie von *Dunn et*

*al.* bei pH-Werten oberhalb von pH 8-9 beobachtet wurde [97]. Durch Messungen der Relaxation in Lösungsmitteln mit variierender relativer Permittivität, konnte eine große Änderung der Ladungsverteilung bei der Aktivierung des *cis*-Isomers hin zum Übergangszustand in Lösungsmitteln wie Wasser und Methanol nachgewiesen werden. Diese Beobachtung untermauert die hier vorgestellte Erklärung. Es zeigte sich, dass die Acetylschützung der Zuckerhydroxygruppen keinen signifikanten Einfluss auf das konzentrationsabhängige Relaxationsverhalten aufweist, die Zuckergruppen aber aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens im Vergleich zu **4OH** offensichtlich einen verstärkenden Einfluss auf die Dimerisierung haben.

## 4.2. Darstellung und Studien mit schaltbaren, glycosilierten Goldnanopartikeln

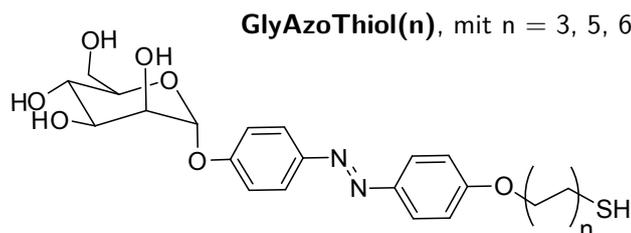
### 4.2.1. Einführung

Um die Thermodynamik von multivalenten Wechselwirkungen zu untersuchen, wird ein System mit systematisch veränderbarer Valenz benötigt. So kann die Änderung zum Beispiel von Bindungsvorgängen zwischen Liganden und Substrat systematisch in Abhängigkeit ihrer Valenz untersucht werden [23]. Eine Möglichkeit hierbei stellen Nanopartikel dar, welche auf ihrer Oberfläche gebundene Liganden präsentieren [24]. Hierbei kann die Anzahl der präsentierten Liganden über die Beladungsdichte der bindenden Liganden, die Größe der Partikel oder über ein- und ausschalten der Bindungsaktivität der einzelnen Liganden realisiert werden. In den hier vorgestellten Ergebnissen sollte ein System synthetisiert werden, welches mit Hilfe von Azobenzolphotoschaltern die Möglichkeit bietet, die Valenz der Partikel mit Hilfe von Licht zu steuern. Des Weiteren sollten Partikel unterschiedlicher Größe, aber mit gleicher Beladungsdichte hergestellt werden, um zusätzlich eine Variation der Valenz über die Nanopartikelgröße zu erhalten. Nach Erhalt einer solchen Bibliothek aus photoschaltbaren, multivalenten Goldnanopartikeln sollten Studien zur thermischen Relaxation der immobilisierten Azobenzole im Vergleich zu den frei in Lösung vorliegenden Schaltern sowie Bindungsstudien dieser Partikel in Abhängigkeit der Größe und des Schaltzustands durchgeführt werden.

### 4.2.2. Synthese der GlyAzoThiol funktionalisierten Goldnanopartikel

Multivalente Wechselwirkungen zeichnen sich durch reversible Wechselwirkungen zwischen mehreren einzelnen schwachen Liganden mit Substraten aus (siehe auch Kap. 2.1). Für dieses Projekt wurde  $\alpha$ -D-Mannose als schwach an das Protein Concanavalin A (Con A) bindender Ligand ausgewählt. Nur bei einer hohen Valenz erfolgt eine signifikante Bindung zwischen zwei Oberflächen welche dieses Ligand-Substrat-Paar präsentieren [45]. Durch Konjugation der Mannose an einen Azobenzolphotoschalter, welcher zusätzlich über einen Thiol-Linker auf Goldoberflächen

gebunden werden kann, wird ein schaltbarer Ligand erhalten, der auf Goldnanopartikel gebunden, ein durch Licht kontrollierbares multivalentes System ergibt. Die verwendeten glycosilierten Azobenzolphotoschalter wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lindhorst in Kiel hergestellt. Die Strukturformeln dieser Schalter sind in Abbildung 4.29 dargestellt. Die drei Schalter unterscheiden sich nur in der Länge



**Abbildung 4.29.** – Strukturformeln der in diesem Projekt verwendeten glycosilierten Azobenzolthiole **GlyAzoThiol(n)**. (**n**) entspricht der Anzahl der Ethylengruppen zwischen dem Azobenzol und der an die Partikel bindenden Thiolgruppe.

des sogenannten Linkers, also der Anzahl von  $\text{CH}_2$ -Gruppen zwischen Azobenzol und Thiolgruppe. Hierdurch sollte eine Abhängigkeit der Schalteffizienz der auf den Goldnanopartikeln immobilisierten Liganden untersucht werden.

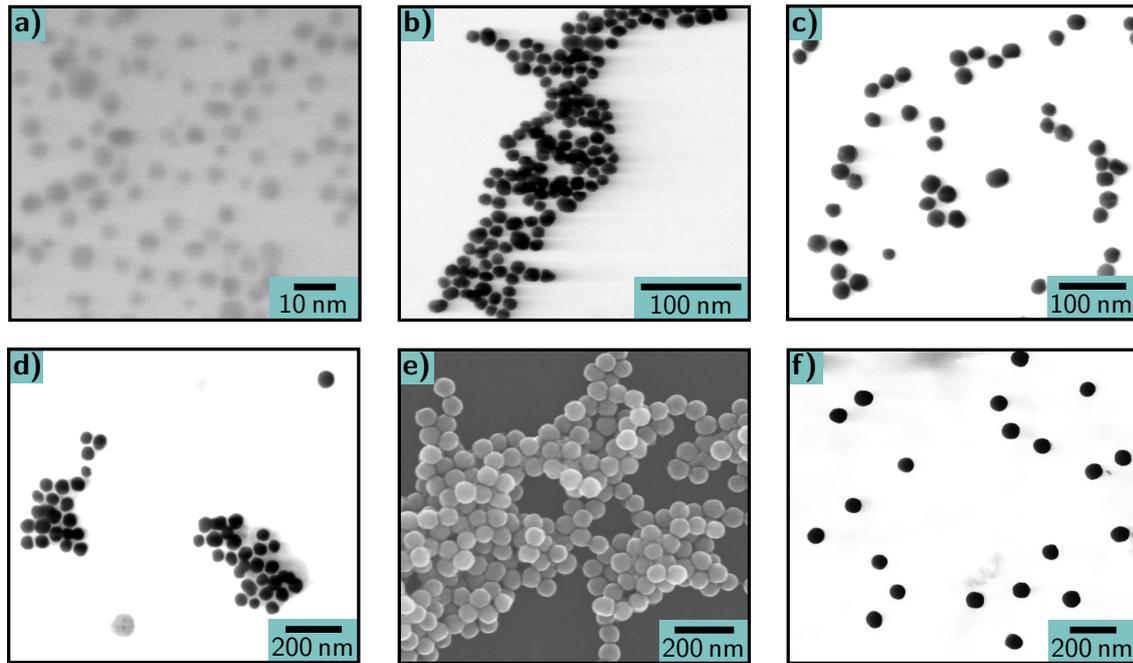
Um schaltbare Glyconanopartikel zu erhalten, wurde die Methode des partiellen Ligandenaustausches gewählt (siehe auch Kap. 2.3.1.4). Hierbei ist das Ziel eine gemischte, selbst angeordnete Monolage (*engl. mixed self assembled monolayer* - kurz mSAM) aus den initial vorhandenen Liganden und den GlyAzoThio-Liganden. So kann sichergestellt werden, dass die immobilisierten Azobenzole ausreichend Raum für die Isomerisierung haben [78].

##### 4.2.2.1. Synthese der Goldnanopartikel

Als Grundlage für die schaltbaren, multivalenten Nanopartikel wurden zunächst herkömmliche, mit Citrat stabilisierte Goldnanopartikel dargestellt. Je nach gewünschter Größe, wurden hierfür drei verschiedene in der Literatur bekannte Vorschriften verwendet. Für die Synthese von Goldpartikeln in der Größenordnung von 15 nm bis 40 nm wurde die Methode nach *Frens* verwendet [131]. Um kleine Partikel mit einem Durchmesser von 5 nm darzustellen, wurde eine von *Haiss et al.* beschriebene Vorschrift verwendet. Als letzte Methode für Partikel mit Durchmessern über 40 nm

## 4.2. Darstellung und Studien mit schaltbaren, glycosilierten Goldnanopartikeln

wurde die von *Brown et al.* entwickelte, sogenannte Seeded-Growth-Methode genutzt, die ebenfalls aus der Veröffentlichung von *Haiss et al.* entnommen wurde [117]. Die dargestellten, aufgereinigten Partikel wurden mit Hilfe von TEM und DLS untersucht. In Abbildung 4.30 sind TEM-Aufnahmen der dargestellten Goldnanopartikel gezeigt. In Tabelle 4.6 sind die mit Hilfe der TEM-Bilder ermittelten Durchmesser,



**Abbildung 4.30.** – Ausgewählte STEM-Aufnahmen der nach *Frens* [131] und *Haiss et al.* [117] hergestellten mit Citrat stabilisierten Goldnanopartikel. a) 5 nm AuNP, b) 14 nm AuNP, c) 27 nm AuNP, d) 56 nm AuNP, e) REM-Abbildung der 69 nm AuNP, f) 79 nm AuNP.

Maxima der Oberflächenplasmonenresonanz-Banden (SPR-Banden) in den UV/VIS-Absorptionsspektren und der mit DLS-Messungen ermittelten hydrodynamischen Durchmesser dargestellt. Hierbei ist anzumerken, dass die DLS keine verlässlichen Ergebnisse für die **AuNP1** liefert, da diese aufgrund ihrer geringen Größe zu wenig Streulicht generieren, so dass das erhaltene Messsignal für eine Größenbestimmung nicht ausreicht. Eine eventuelle Aggregation der Partikel würde im Gegenzug angezeigt werden, da die Aggregate wieder eine detektierbare Größe aufweisen würden. Die angegebenen Größenverteilungen sind aus der Standardverteilung von 50-200 Partikeln pro Bild aus den TEM-Aufnahmen ermittelt worden und anschließend über drei bis sechs solcher Abbildungen gemittelt worden. Die angegebenen Polydispersi-

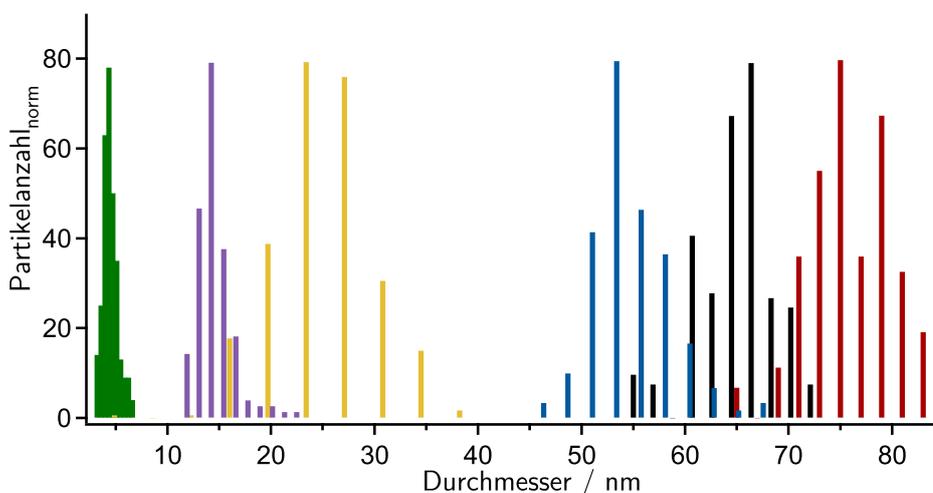
**Tabelle 4.6.** – Ergebnisse der mit STEM ermittelten Durchmesser und Größenverteilungen (in Form von  $\pm$  angegeben) sowie der mit DLS ermittelten hydrodynamischen Durchmesser und Polydispersitätsindices (PDI) der nach *Frens* [131] und *Haiss et al.* [117] hergestellten mit Citrat stabilisierten Goldnanopartikel. Zusätzlich sind die Maxima der SPR-Bande angegeben.

Probe	STEM/REM Durchmesser / nm	Elliptizität G	DLS Durchmesser / nm	PDI	$\lambda_{max}$ (SPR) / nm
<b>AuNP1</b>	$4.7 \pm 0.7$	$1.07 \pm 0.06$	-	-	512
<b>AuNP2</b>	$14 \pm 2$	$1.16 \pm 0.11$	$19 \pm 1$	0.1	519
<b>AuNP3</b>	$27 \pm 4$	$1.13 \pm 0.09$	$31 \pm 2$	0.1	521
<b>AuNP4</b>	$56 \pm 4$	$1.07 \pm 0.04$	$57 \pm 2$	0.04	530
<b>AuNP5</b>	$69 \pm 5$	$1.09 \pm 0.06$	$71 \pm 1$	0.05	540
<b>AuNP6</b>	$79 \pm 4$	$1.08 \pm 0.06$	$82 \pm 2$	0.06	545

tätsindices (PDI) sind aus den DLS-Messungen erhalten worden. Es wurden sechs Ansätze mit jeweils unterschiedlichem Durchmesser im Bereich von 5 nm bis 80 nm hergestellt. Alle dargestellten Partikel weisen eine für die jeweilige Synthesvorschrift typische Größenverteilung auf [117, 131]. Die UV/VIS-Absorptionsmaxima der Partikel stimmen mit den von *Haiss et al.* angegebenen Werten überein [117]. Wie von *Brown et al.* beschrieben, erhalten die Ausgangspartikel (**AuNP3** in Abbildung 4.30 c)) bei der Seeded-Growth-Methode durch die Wachstumsschritte eine engere Größenverteilung [134]. Die Elliptizität G der Partikel, welche durch den Quotienten der längeren durch die kürzere Nanopartikelachse berechnet wird, ist im Rahmen der Fehler für alle Partikel übereinstimmend im Bereich von  $G \approx 1.1$ . Die Elliptizität der einzelnen Partikel wurde im Rahmen der Ermittlung der Durchmesser bestimmt, die angegebenen Fehler entsprechen jeweils der Standardabweichung aus einem Satz von 100-300 Nanopartikeln. In Abbildung 4.31 sind die Größenverteilungen der hergestellten Citrat-AuNP in Form von Histogrammen dargestellt.

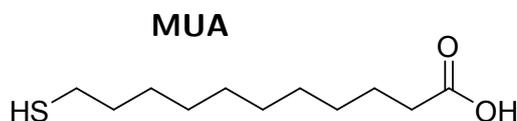
#### 4.2.2.2. Darstellung von mSAM-AuNP mit MUA und Citrat

Für die Darstellung der mit den Glycoazobenzolphotoschaltern funktionalisierten Goldnanopartikel wurde ein partieller Ligandenaustausch von einem Teil der Citrat-Liganden mit den Glycoazobenzolthiolen durchgeführt. Hierfür wurden zwei bereits bestehende Vorschriften kombiniert. Einerseits die Methode des vollständigen Ligandenaustausches von auf den Goldnanopartikeln gebundenen Citratmolekülen mit



**Abbildung 4.31.** – Normierte Histogramme zur Darstellung der Größenverteilung der synthetisierten Goldnanopartikel **AuNP1** (grün), **AuNP2** (violett), **AuNP3** (gelb), **AuNP4** (blau), **AuNP5** (schwarz), **AuNP6** (rot).

Thiolen, wie Mercaptoundecansäure (MUA) oder Mercaptobernsteinsäure (MSA) [139, 141, 142] und andererseits der Methode des partiellen Ligandenaustausches eines schwach Bindenden Liganden mit stärker bindenden Thioliganden wie, sie von *Klajn et al.* beschrieben wurde [147]. Eine Vorschrift für einen partiellen Ligandenaustausch in wässrigem Medium konnte in der Literatur nicht gefunden werden. Aufgrund von nur in geringen Mengen verfügbaren Glycoazobenzolschaltern wurden zunächst Testreaktionen eines partiellen Austauschs von Citrat-Liganden mit MUA durchgeführt (siehe auch Kapitel 3.4.1.5). Die Strukturformel von MUA ist in Abbildung 4.32 dargestellt. Die Testreaktionen wurden mit **AuNP2** als Ausgangspartikel



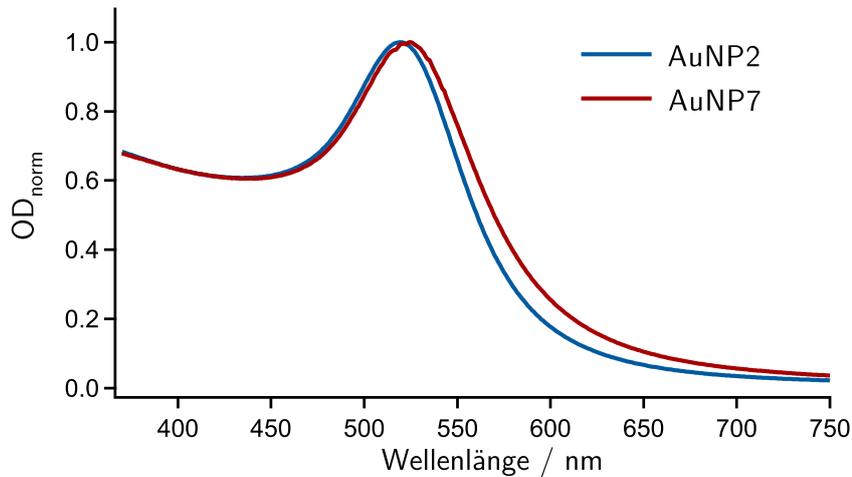
**Abbildung 4.32.** – Strukturformel des in den Testreaktionen für den partiellen Ligandenaustausch verwendeten Liganden Mercaptoundecansäure (MUA).

durchgeführt. Der Erfolg der Reaktionen wurde mit DLS, UV/VIS-Absorptions- und Infrarotspektroskopie überprüft. Im Laufe der Experimente wurde festgestellt, dass der Erfolg der Austauschreaktion entscheidend von der Ausgangskonzentration der

**Tabelle 4.7.** – Ergebnisse der mit DLS ermittelten hydrodynamischen Durchmesser und Polydispersitätsindices (PDI) von **AuNP7** nach erfolgreichem partiellen Ligandenaustausch und der Ausgangspartikel **AuNP2** sowie Position des Maximums  $\lambda_{max}$  und FWHM der Plasmonenresonanz im UV/VIS-Absorptionsspektrum.

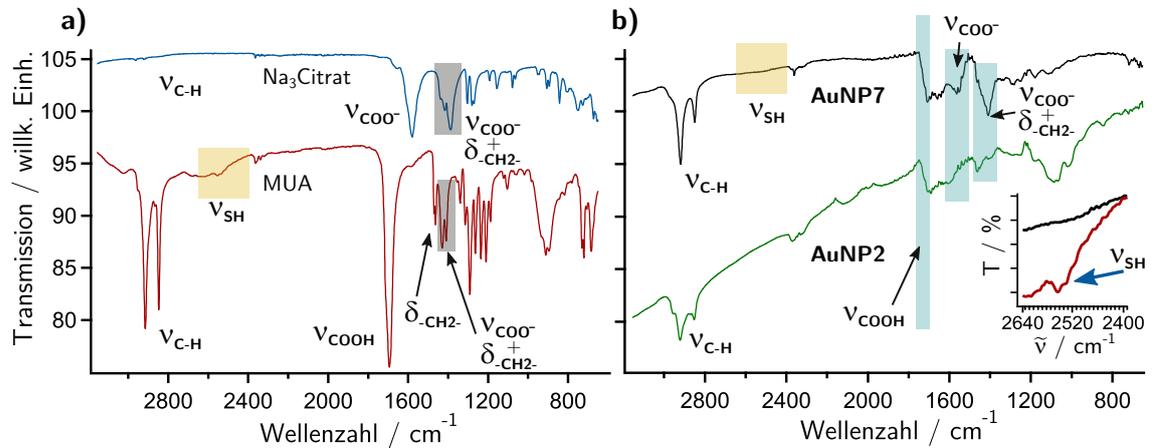
Probe	DLS Durchmesser / nm	PDI	$\lambda_{max}$ (SPR) / nm	FWHM / nm
<b>AuNP2</b>	$19 \pm 1$	0.1	519	83
<b>AuNP7</b>	$27 \pm 1$	0.1	524	89

Goldnanopartikel abhängt. Die Nanopartikelkonzentration sollte nicht viel höher als  $1 \text{ nmol L}^{-1}$  betragen, andernfalls ist mit einer Aggregation der Dispersion zu rechnen. In Tabelle 4.7 sind die Ergebnisse der DLS Messungen des erfolgreichen partiellen Austausches (**AuNP7**) zusammen mit den DLS Ergebnissen der Ausgangspartikel dargestellt. Der hydrodynamische Durchmesser der mit MUA teilfunktionalisierten Partikel ist wie zu erwarten signifikant größer als von den Citrat-AuNP. Die unveränderte Größenverteilung und der unveränderte Polydispersitätsindex zeigen zweifelsfrei an, dass der gestiegene Durchmesser nicht auf eine eventuelle Aggregation zurückzuführen ist, sondern auf das, im Vergleich zum Citrat längere MUA sowie eine weiter ausgedehnte Hydrathülle zurückzuführen ist. In Abbildung 4.33 sind die UV/VIS Absorptionsspektren der Ausgangspartikel und der umfunktionalisierten Partikel dargestellt. Das Maximum der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) ist durch die Bindung der Thiolgruppen signifikant um  $5 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$  rotverschoben (siehe Tab. 4.7). Dies wurde ebenfalls in der Literatur berichtet und ist auf die stärkeren Bindung zwischen Thiol und Gold und der damit einhergehenden Reduktion der Elektronendichte in den AuNP zurückzuführen (siehe auch Kap. 2.3.1.1) [128, 139]. Dies ist ein Hinweis auf eine erfolgreiche Bindung der Thioliganden auf die AuNP. Die Ergebnisse für die Maxima der Plasmonenresonanzen von **AuNP2** und **AuNP7** sowie deren Halbwertsbreiten (FWHM) sind ebenfalls in Tabelle 4.7 dargestellt. Die nach *Nath et al.* ermittelten Halbwertsbreiten liegen unter 90 nm und deuten damit auf eine enge Größenverteilung hin [122]. Um die Anwesenheit einer mSAM aus Citrat-Molekülen und MUA nachzuweisen, wurden die Partikel mit Infrarotspektroskopie untersucht. In Abbildung 4.34 sind Infrarotspektren der Ausgangspartikel **AuNP2**, der mSAM-Partikel **AuNP7** (Abb. 4.34b) sowie zum Vergleich Infrarotspektren der freien Liganden Natriumcitrat und MUA dargestellt



**Abbildung 4.33.** – UV/VIS-Absorptionsspektren der mit Citrat funktionalisierten **AuNP2** (blaue Linie) und der partiell mit Citrat und MUA funktionalisierten **AuNP7** (rote Linie).

(Abb. 4.34a). Die mit gelben Quadraten markierten Abschnitte der Spektren von MUA und **AuNP7** sind in Abb. 4.34b als Vergrößerung eingefügt. In diesem isolierten Bereich treten die S-H-Streckschwingungen der Thiolgruppe in Form einer schwachen Bande auf [129]. Durch Binden der Thioliganden auf die Goldnanopartikeloberfläche verschwindet diese Streckschwingung, dies ist in der eingefügten Vergrößerung in Abb. 4.34b auch zu sehen [129, 151]. Bei freiem Natriumcitrat sind die Banden der C-H-Streckschwingungen im Bereich von  $3000\text{ cm}^{-1}$  nur sehr schwach ausgeprägt. Durch binden auf AuNP werden diese Banden signifikant intensiver [311]. Die Banden dieser Schwingungen sind im freien MUA als auch in mit MUA funktionalisierten AuNP noch wesentlich deutlicher ausgeprägt. Dieser Unterschied ist in den Infrarotspektren von **AuNP2** und **AuNP7** zu beobachten. Ein deutlicher Hinweis auf eine gemischte Ligandenhülle ist der Bereich zwischen  $1400\text{ cm}^{-1}$  und  $1750\text{ cm}^{-1}$ . In mit MUA funktionalisierten Metallnanopartikeln ist die Streckschwingung der Carbonsäuregruppe bei  $1710\text{ cm}^{-1}$  nicht zu beobachten, da durch die Bindung alle Carbonsäuregruppen dissoziiert vorliegen [129, 151]. In Citrat funktionalisierten Goldnanopartikeln hingegen liegen die Carbonsäuregruppen zum teil dissoziiert und zum teil als Säure vor, so dass in Infrarotspektren eine Bande bei  $1710\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten ist [311]. In dem Infrarotspektrum von **AuNP7** ist eine Bande bei  $1710\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten und zusätzlich eine, im Vergleich zum Spektrum von **AuNP2** wesentlich



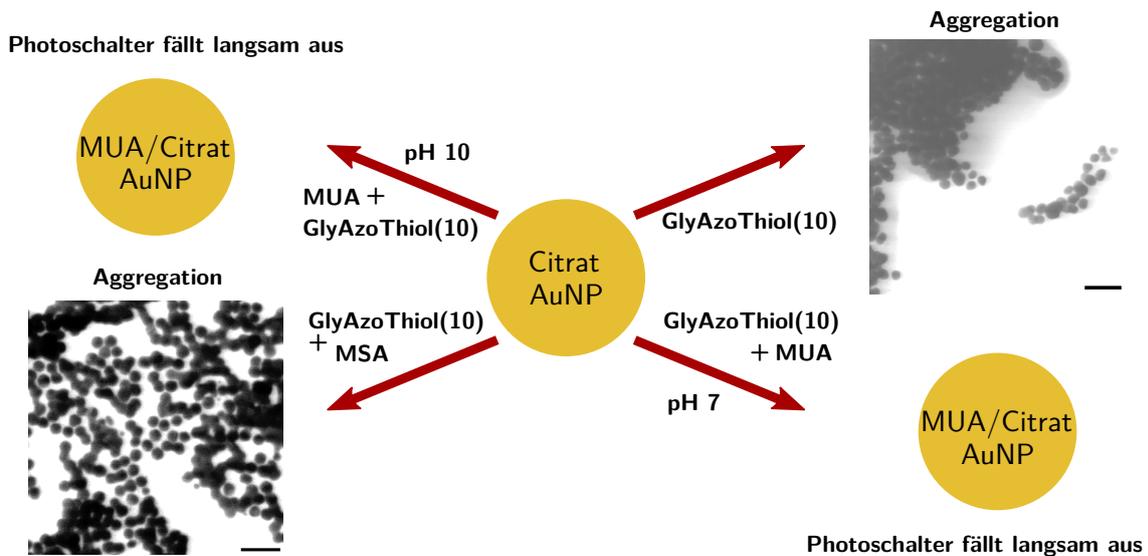
**Abbildung 4.34.** – Infrarotspektren von a) freiem Natriumcitrat (blaue Linie) und MUA (rote Linie) sowie b) getrockneten **AuNP2** (grüne Linie) und getrockneten **AuNP7** (schwarze Linie). Die eingefügten Spektren von freiem MUA (rot) und **AuNP7** (schwarz) in Abbildung b) zeigen den Bereich um  $2500\text{ cm}^{-1}$  vergrößert (in den Spektren gelb Markiert), um das Verschwinden der Thiolstrettschwingung durch das Binden auf die Goldoberfläche zu zeigen.

intensivere Bande, bei  $1560\text{ cm}^{-1}$ . Letztere ist auf die symmetrische Streckschwingung der Carboxylatgruppe zurückzuführen und spricht für die Anwesenheit von MUA, wohingegen die Bande bei  $1710\text{ cm}^{-1}$  auf Citratmoleküle hinweist [129, 151, 311]. Schlussendlich ist auch eine breite, intensive Bande im Bereich von  $1400\text{ cm}^{-1}$  bis  $1460\text{ cm}^{-1}$  im Spektrum von **AuNP7** zu beobachten, die eine Überlagerung von Deformationsschwingungen von Methylgruppen und der symmetrischen Streckschwingung der Carboxylatgruppe darstellt [129, 311]. Diese ist aufgrund der zahlreichen Methylgruppen von MUA wesentlich intensiver und deutlicher zu beobachten als bei ausschließlich mit Citrat funktionalisierten AuNP. Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Partikel **AuNP7** mit einer mSAM aus Citrat- und MUA-Liganden funktionalisiert sind. Aus diesem Grund wurde die in diesen Experimenten erarbeitete Vorschrift für die ersten Ligandenaustauschversuche mit den GlyAzoThiolen verwendet.

#### 4.2.2.3. Darstellung von mSAM-AuNP mit GlyAzoThiolen und Citrat

Die ersten Versuche mSAM-AuNP mit den GlyAzoThiolen und Citrat darzustellen wurden auf Basis der oben beschriebenen Experimente mit MUA und den Partikeln **AuNP2** durchgeführt. Hierbei wurde MUA im Syntheseprotokoll durch eines der

GlyAzoThiole ( $n = 5$ ) ausgetauscht. Die Konzentration der Photoschalter betrug dabei  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Zusätzlich wurden auch Ligandenaustauschreaktionen mit 1:1 Mischungen aus MUA und Photoschalter sowie MSA und Photoschalter durchgeführt. Alle nach dieser Vorschrift durchgeführten Austauschreaktionen sowie Variationen mit unterschiedlichen pH-Werten der Dispersionen blieben ohne Erfolg (siehe Abb. 4.35). Die Austauschreaktionen mit **GlyAzoThiol(5)** sowie mit einer Mischung von MSA

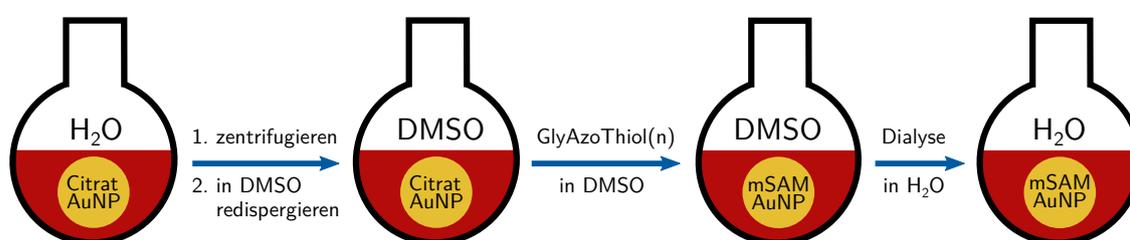


**Abbildung 4.35.** – Schematische Darstellung der durchgeführten Variationen des partiellen Ligandenaustausches von Citrat-AuNP mit **GlyAzoThiol(5)** im wässrigem Medium. Die Maßstabsbalken in den STEM-Abbildungen sind 50 nm lang.

und **GlyAzoThiol(5)** lieferten aggregierte Partikel, wohingegen Austauschreaktionen mit Mischungen aus **GlyAzoThiol(5)** und MUA unabhängig vom pH-Wert zwar nicht zur Aggregation führten, aber auch nicht zu mSAMs mit Photoschalter. Am Ende der Reaktionszeit und während der Dialyse konnte ein langsames Ausfallen eines Feststoffes beobachtet werden, der mit Hilfe von UV/VIS-Spektroskopie eindeutig als **GlyAzoThiol(5)** identifiziert werden konnte. Die erhaltenen Nanopartikeldispersionen zeigten hingegen keine, dem Photoschalter zuordenbare Bande im UV/VIS-Spektrum (Spektren nicht gezeigt). Dies lässt den Schluss zu, dass die Photoschalter die in wässriger Lösung vorliegenden Partikel zur Aggregation bringen. Des Weiteren scheint MUA schneller als die Schalter an die Partikel zu binden, so dass die Nanopartikel mit MUA funktionalisiert und vor der Aggregation geschützt

werden. Aufgrund der Tatsache, dass der Photoschalter in den Versuchen mit MUA langsam ausfiel, wurde geschlossen, dass die Aggregation auf die schwere Löslichkeit der Schalter in Wasser zurückzuführen ist. Zwar ist auch MUA in Wasser nicht löslich, aber anscheinend reagiert es schnell genug mit den Partikeln, so dass die hydrophobe Alkankette keine Probleme bereitet. Des Weiteren besteht der hydrophobe Teil der Photoschalter nicht nur aus einer Alkankette, sondern zusätzlich auch aus dem aromatischen Azobenzol (siehe auch Abb. 4.29).

Aufgrund der Annahme, dass die mangelnde Löslichkeit der GlyAzoThiole in Wasser der Grund für die fehlgeschlagenen Austauschreaktionen ist, wurde ein alternativer Weg für einen Ligandenaustausch erstellt (siehe Abb. 4.36). Hierbei



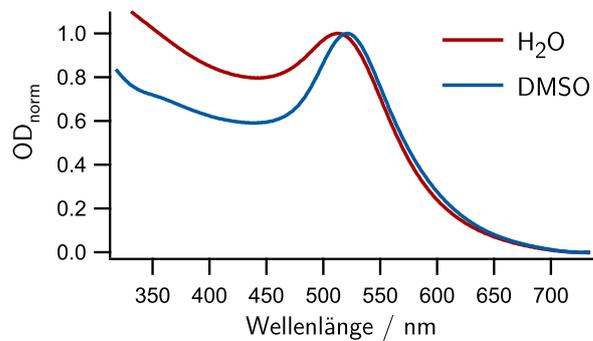
**Abbildung 4.36.** – Schematische Darstellung der neuen Syntheseroute für die Darstellung von Goldnanopartikeln mit einer mSAM aus GlyAzoThiolen und Citratmolekülen.

wurden die Citrat-AuNP zunächst in DMSO überführt und der Austausch nun in DMSO durchgeführt. Anders als in der von *Techane et al.* übernommenen Vorschrift für den Austausch in Wasser, wurde der Photoschalter nun ebenfalls in DMSO gelöst und zugegeben. Zusätzlich wurde auch kein Ammoniak in die Reaktion gegeben, die Reaktion findet also ausschließlich in DMSO statt. Nach erfolgtem Austausch wurden die Partikel, in der Annahme, dass die hydrophoben Abschnitte der Schalter durch die Immobilisation in Form einer mSAM ausreichend vom Wasser abgeschirmt werden, in Wasser überführt. Zunächst wurden die in DMSO überführten Partikel mit Hilfe von DLS und UV/VIS-Spektroskopie untersucht. Insbesondere mit Hilfe der DLS-Messungen sollte ermittelt werden, ob die Partikel in DMSO stabil vorliegen, da nur unter diesen Umständen die Durchführung des Ligandenaustausches sinnvoll wäre. Die Ergebnisse der DLS-Messungen sind in Tabelle 4.8 dargestellt. Die Partikel bilden mit DMSO stabile Dispersionen. Auch nach mehreren Wochen Lagerung wurde keine Veränderung der Dispersionen mit DLS beobachtet. In Abbildung 4.37 sind beispielhaft für die Probe **AuNP1** UV/VIS-Spektren dargestellt. Das Maximum der

**Tabelle 4.8.** – Ergebnisse der mit DLS ermittelten hydrodynamischen Durchmesser und Polydispersitätsindices (PDI) der in DMSO überführten **AuNP1** bis **AuNP6**.

Probe	DLS Durchmesser / nm	PDI
<b>AuNP1</b>	-	-
<b>AuNP2</b>	18 ± 1	0.1
<b>AuNP3</b>	30 ± 2	0.1
<b>AuNP4</b>	59 ± 2	0.08
<b>AuNP5</b>	72 ± 1	0.05
<b>AuNP6</b>	82 ± 3	0.06

SPR-Bande im UV/VIS-Spektrum dieser Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 5 nm liegt bei 512 nm und weist eine Halbwertsbreite von 110 nm auf. Nach der Überführung der Partikel in DMSO verschiebt sich das Maximum auf 521 nm und die FWHM reduziert sich auf 98 nm. Die Veränderungen sind auf die Abhängigkeit der Oberflächenplasmonenresonanz von der relativen Permittivität des Dispersionsmittels zurückzuführen (siehe auch Kap. 2.3.1.1). Wasser hat bei 20 °C mit  $\epsilon_m = 80.1$  eine fast doppelt so hohe relative Permittivität wie DMSO ( $\epsilon_m = 47.2$ ) [312]. Diese Ergebnisse

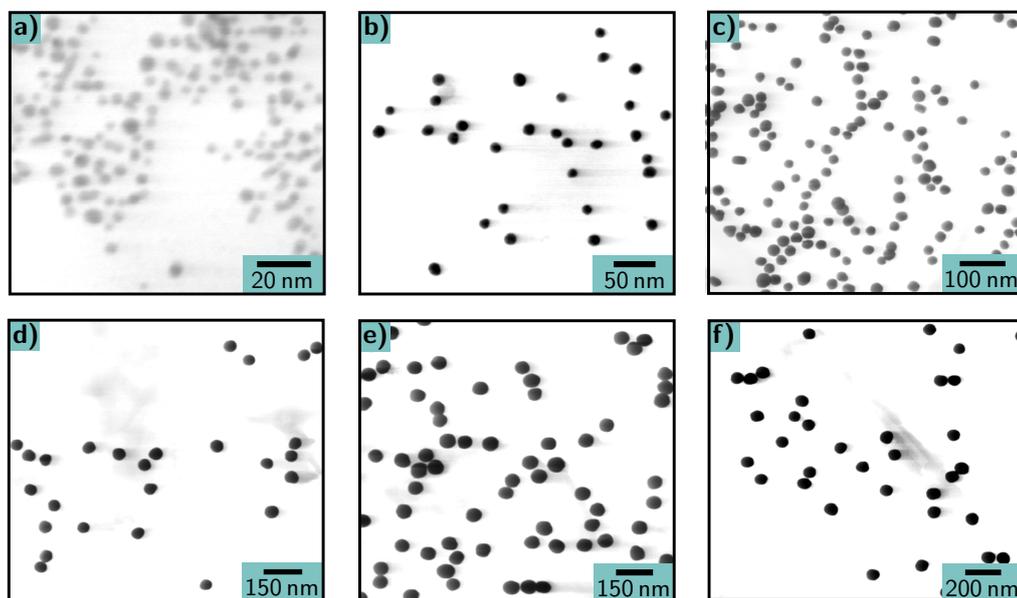


**Abbildung 4.37.** – UV/VIS-Spektren der Probe **AuNP1** in Wasser (rote Linie) und DMSO (blaue Linie). Das Maximum der SPR-Bande in DMSO ist im Vergleich zu den Partikeln in Wasser um 9 nm rotverschoben. Die FWHM der Resonanzbande ist mit 98 nm in DMSO kleiner als in Wasser mit 110 nm.

zeigen, dass ein Ligandenaustausch in DMSO prinzipiell möglich sein sollte.

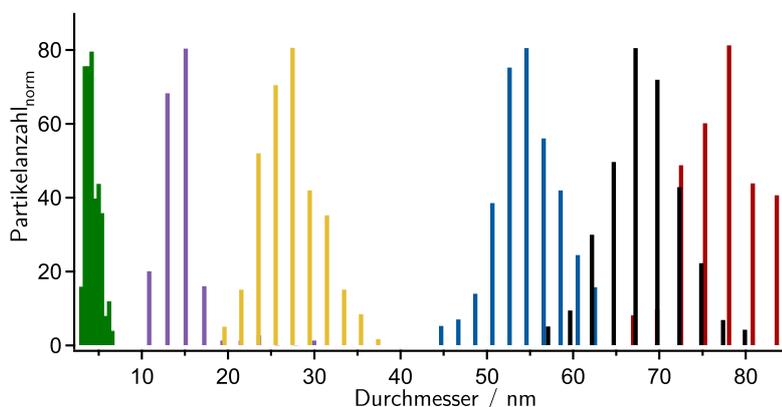
Bei den anschließend durchgeführten Ligandenaustauschreaktionen konnte weder ein Ausfallen eines Niederschlages noch eine Aggregation der Partikel beobachtet werden. Die Dispersionen wurden nach Aufreinigung durch Dialyse gegen Wasser zunächst

mit DLS, STEM und UV/VIS-Spektroskopie untersucht. Die STEM-Abbildungen sind in Abbildung 4.38 dargestellt. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen



**Abbildung 4.38.** – Ausgewählte STEM-Aufnahmen der über einen partiellen Ligandenaustausch in DMSO hergestellten AuNP, welche mit einer mSAM aus Citratmolekülen und **GlyAzoThiol(5)** funktionalisiert sind. a) **AuNP8** (5 nm), b) **AuNP9** (15 nm), c) **AuNP10** (28 nm), d) **AuNP11** (56 nm), e) **AuNP12** (69 nm), f) **AuNP13** (79 nm).

der aufgereinigten AuNP zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den mit Citrat funktionalisierten Partikeln (siehe zum Vergleich Abb. 4.30). Zur Darstellung der Größenverteilung der unfunktionalisierten Partikel sind die mit STEM ermittelten Durchmesser von jeweils 100 bis 600 Partikeln in Abbildung 4.39 als normierte Histogramme dargestellt. Auch die so ermittelte Größenverteilung der Partikel hat sich für keinen der Ansätze signifikant verändert (siehe zum Vergleich Abb. 4.31). Die Partikel liegen gut separiert vor, Aggregate sind nicht zu beobachten. Die mit STEM und DLS ermittelten Durchmesser, Größenverteilungen, Elliptizitäten und PDI sind in Tabelle 4.9 dargestellt. Es fällt sofort auf, dass die mit DLS ermittelten hydrodynamischen Durchmesser wesentlich größer sind als für die mit Citrat funktionalisierten AuNP in Wasser (siehe Tab. 4.6), und auch in DMSO (siehe Tab. 4.8) oder auch die mit MUA und Citrat funktionalisierten Partikel **AuNP7** (siehe Tab. 4.7). Eine Aggregation scheint allerdings nicht vorzuliegen, da die PDI im Bereich von 0.1 bis 0.3 liegen und die STEM-Abbildungen keine Aggregate zeigen.



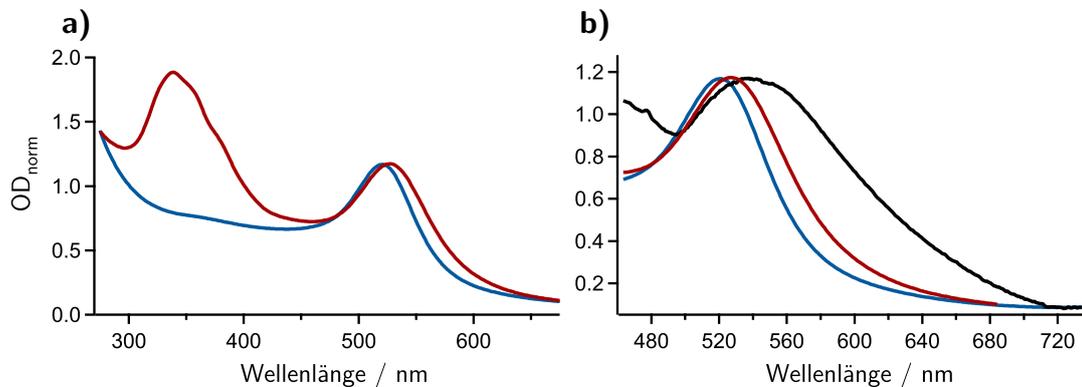
**Abbildung 4.39.** – Normierte Histogramme zur Darstellung der Größenverteilung der synthetisierten Goldnanopartikel **AuNP8** (grün), **AuNP9** (violett), **AuNP10** (gelb), **AuNP11** (blau), **AuNP12** (schwarz), **AuNP13** (rot).

Der Zuwachs im Durchmesser kann aber auch nicht alleine auf die im Vergleich zu Citrat und MUA größere Länge des Liganden zurückzuführen sein, da die GlyAzoThiole mit 5 Ethylengruppen-Linker nur ca. 3.3 nm lang sind. Im Vergleich dazu haben *Park et al.* 2014 die Struktur von Citrat funktionalisierten Goldnanopartikeln untersucht und entdeckt, dass diese Partikel eine mehrschichtige Ligandenhülle mit einer Ausdehnung von ca. 1 nm aufweisen [311]. Der Unterschied kann also nicht durch die Moleküllänge verursacht worden sein. Bei Thioliganden ist eine mehrlagige Ligandenhülle nicht zu erwarten [142]. Allerdings zeigen auch die mit einer mSAM aus MUA und Citrat funktionalisierten Partikel **AuNP7** einen um 8 nm größeren hydrodynamischen Durchmesser (siehe Tab. 4.7). Dies ist auch signifikant mehr als durch die im Vergleich zum Citrat gesteigerte Moleküllänge. Die für GlyAzoThiol funktionalisierte AuNP wesentlich größeren hydrodynamischen Durchmesser sind ohne Ausnahme in allen Ligandenaustauschansätzen beobachtet worden. Die Ergebnisse zur Konzentrationsabhängigkeit der thermischen Relaxation der glycosilierten Azobenzole im vorhergehenden Kapitel 4.1 liefern einen Erklärungsansatz. Es ist durchaus möglich, dass die Mannosemoleküle durch ihre zahlreichen Hydroxygruppen eine wesentlich weiter in die Lösung ragende Hydrathülle ausbilden. Da die glycosilierten Schalter in Kapitel 4.1 ebenfalls ein konzentrationsabhängiges reversibles Verhalten, welches auf Aggregation schließen lässt zeigten, ist es möglich, dass die in glycosilierten Partikel reversibel und temporär Dimere und Agglomerate bilden

**Tabelle 4.9.** – Ergebnisse der mit DLS ermittelten hydrodynamischen Durchmesser und PDI sowie der mit STEM ermittelten Durchmesser und Größenverteilungen (in Form von  $\pm$  angegeben) der AuNP mit einer mSAM aus **GlyAzoThiol(5)** und Citratmolekülen.

Probe	STEM/REM Durchmesser / nm	Elliptizität G	DLS Durchmesser / nm	PDI
<b>AuNP8</b>	$5 \pm 1$	$1.05 \pm 0.07$	$110 \pm 4$	0.3
<b>AuNP9</b>	$15 \pm 2$	$1.14 \pm 0.14$	$103 \pm 6$	0.3
<b>AuNP10</b>	$28 \pm 3$	$1.13 \pm 0.09$	$110 \pm 5$	0.2
<b>AuNP11</b>	$56 \pm 4$	$1.08 \pm 0.04$	$140 \pm 3$	0.2
<b>AuNP12</b>	$69 \pm 4$	$1.09 \pm 0.05$	$195 \pm 5$	0.1
<b>AuNP13</b>	$79 \pm 5$	$1.08 \pm 0.04$	$224 \pm 2$	0.1

[313, 314]. Solche Dimere würden einen signifikanten Einfluss auf den ermittelten hydrodynamischen Durchmesser haben, da dieser mit der Potenz  $d^6$  in das Streulichtsignal eingeht (siehe Kap. 2.6.8). Weitere Hinweise auf eine mögliche Aggregation der Partikel kann die UV/VIS-Spektroskopie liefern. In Abbildung 4.40a sind die UV/VIS-Absorptionsspektren der mit Citrat funktionalisierten Partikel **AuNP3** sowie die aus diesen hergestellten Partikel **AuNP10** dargestellt. Die Position des

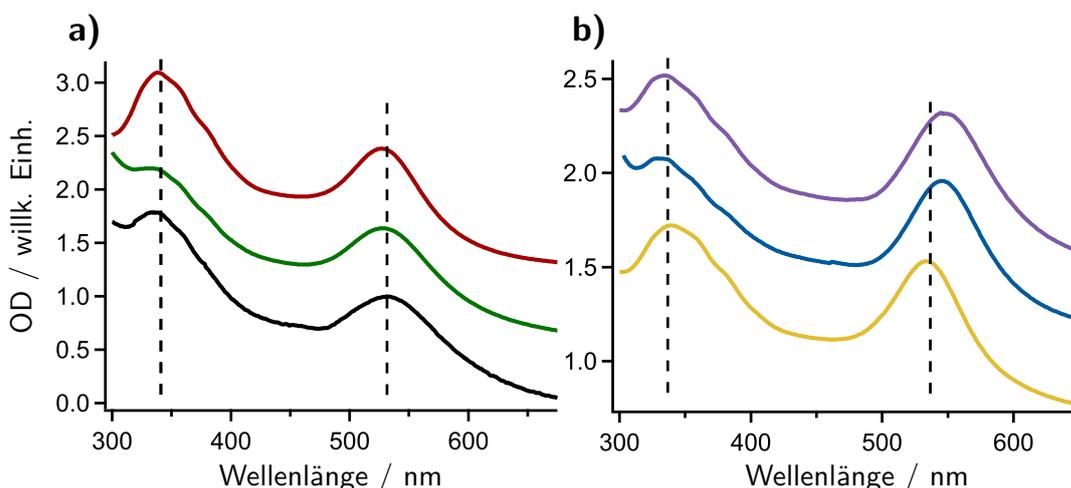


**Abbildung 4.40.** – a) UV/VIS-Absorptionsspektren der mit Citrat funktionalisierten Ausgangspartikel **AuNP3** (blaue Linie) und die aus diesen Partikeln hergestellten Partikel **AuNP10** (rote Linie) mit einem Durchmesser von 28 nm. b) Vergrößerung des Bereichs der SPR-Banden (gleiche Linienfarben wie bei a)) und ein zusätzlich eingefügtes Spektrum von in einem fehlgeschlagenen Ligandenaustausch aggregierten AuNP (schwarze Linie).

Maximums der SPR-Bande verschiebt sich um 6 nm. Die Halbwertsbreite vergrößert sich von 76 nm auf 90 nm. Beide Beobachtungen liegen im typischen Bereich für Ligandenaustauschreaktionen von Citrat funktionalisierten Goldpartikeln mit Thiolen [139,

315]. Die Spektren zeigen keine auf Aggregation hindeutende Verbreiterung. Um diese Behauptung zu untermauern, ist in Abbildung 4.40b eine Vergrößerung des Bereiches der SPR-Banden, welche in Abb 4.40a gezeigt sind, sowie während des Austausches aggregierter AuNP dargestellt. Die SPR-Bande der aggregierten Nanopartikel ist bei gleichem Partikeldurchmesser im Vergleich zu den Ausgangspartikeln um 16 nm rotverschoben und verbreitert sich von 76 nm auf eine Halbwertsbreite von 164 nm. Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, dass die Ligandenaustauschreaktionen erfolgreich verliefen. Die dargestellten Dispersionen waren bei Lagerung im Dunkeln über mehrere Wochen stabil.

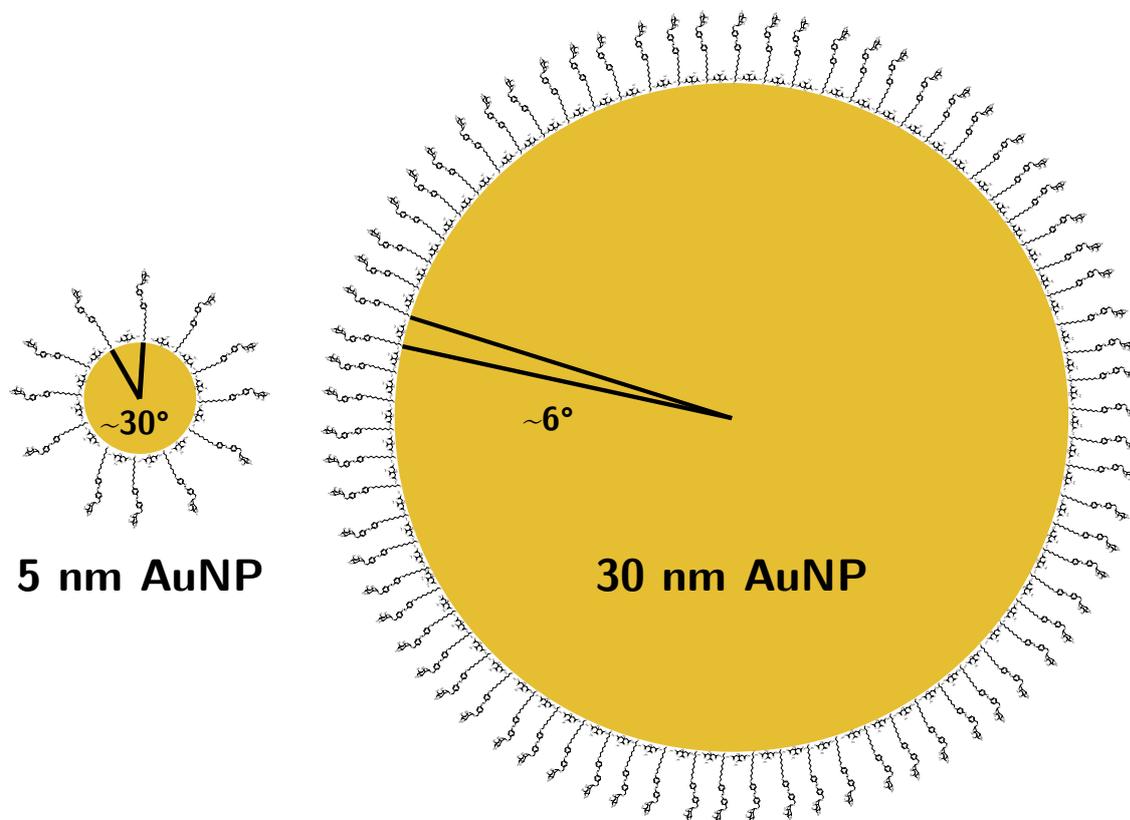
In Abbildung 4.41 sind die UV/VIS-Absorptionsspektren aller mit einer mSAM aus Citrat und **GlyAzoThiol(5)** funktionalisierten AuNP dargestellt. Zur Veran-



**Abbildung 4.41.** – UV/VIS-Absorptionsspektren der mit einer mSAM aus Citrat und **GlyAzoThiol(5)** funktionalisierten Goldnanopartikel. a) **AuNP8** (schwarze Linie), **AuNP9** (grüne Linie) und **AuNP10** (rote Linie). b) **AuNP11** (gelbe Linie), **AuNP12** (blaue Linie) und **AuNP13** (violette Linie) in wässriger Lösung.

schaulichung der Positionsunterschiede der SPR-Banden sowie der in allen Fällen sichtbaren Bande des  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergangs der immobilisierten Photoschalter, sind vertikale Linien in die Abbildung eingefügt. Die Partikel wurden gründlich über Dialyse gegen Wasser aufgereinigt, so dass keine nicht immobilisierten Photoschalter in der Lösung vorkommen (siehe Kap. 3.1.8). Zwar wurde in den Ligandenaustauschreaktionen die zugegebene Menge an Photoschalter entsprechend der jeweiligen Gesamtoberfläche und Konzentration der Ausgangspartikel berechnet, so dass die Photoschalter in

einem Überschuss von 1:10 vorliegen. In Abbildung 4.41 ist jedoch zu sehen, dass die Menge an immobilisierten Photoschaltern variiert. Die Partikel **AuNP8** mit 5 nm und **AuNP9** 15 nm Durchmesser weisen signifikant weniger intensive Banden im Bereich des  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergangs auf als die größeren Partikel. Es ist bereits aus der Literatur bekannt, dass im Fall von Ligandenaustauschreaktionen, bei denen ein bereits immobilisierter Ligand mit einem neuen Liganden teilweise ausgetauscht wird oder mit einer Mischung aus zwei neuen Liganden vollständig ausgetauscht wird, das Verhältnis der beteiligten Liganden in den wenigsten Fällen das Verhältnis der Liganden nach erfolgtem Austausch widerspiegelt [78, 316]. Dies hängt sowohl von der Art Liganden als auch von der Art Partikeln und ihrer initialen Funktionalisierung ab [78]. Die verschiedenen großen Partikel bieten durch ihre unterschiedliche Krümmung eine variierende sterische Umgebung für den Ligandenaustausch, daher kann es auch trotz der hier gleich funktionalisierten Ausgangspartikel und gleichen, neu eingeführten Liganden durchaus zu Unterschieden kommen. Insbesondere bei kleinen Partikeln kann die Krümmung einen Einfluss haben. In Abbildung 4.42 ist eine Skizze von Nanopartikeln mit 5 nm und 30 nm Durchmesser mit Citrat- und Photoschalterliganden gezeigt, in der die Größenverhältnisse, wie Bindungslängen und Partikeldurchmesser, korrekt dargestellt sind. Diese Abbildung soll verdeutlichen, dass der Unterschied der Ausrichtung der Liganden und damit der sterischen Umgebung für Reaktionen an der Oberfläche, bei gleicher Funktionalisierung groß sein kann, wenn der Partikeldurchmesser und damit die Oberflächenkrümmung variiert wird. Ein Beispiel hierfür ist, dass in Partikeln mit geringen Durchmessern von ca. 3 nm auch mit homogenen Monolagen aus Photoschaltern schaltbare Systeme erhalten werden, da durch die Krümmung der Oberfläche ausreichend Platz für die Isomerisierung vorliegt [146, 317, 318]. Es muss jedoch auch angemerkt werden, dass die zur Ansatzberechnung verwendete Partikelkonzentration vor dem Lösungsmittelwechsel von Wasser zu DMSO ermittelt werden musste, da sich das für die Ermittlung nach *Haiss et al.* benötigte UV/VIS-Spektrum in DMSO signifikant von dem in Wasser unterscheidet (siehe Abb. 4.37) und die gravimetrische Bestimmung aufgrund des äußerst schwer flüchtigen DMSOs keine verlässlichen Ergebnisse lieferte. Daher sind systematische Variationen der Schalter-Beladungsdichte durch Partikelverluste während des Lösungsmittelwechsels möglich. Die Position der SPR-Bande, Maximum der Bande des  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergangs der immobilisierten Schalter sowie die aus



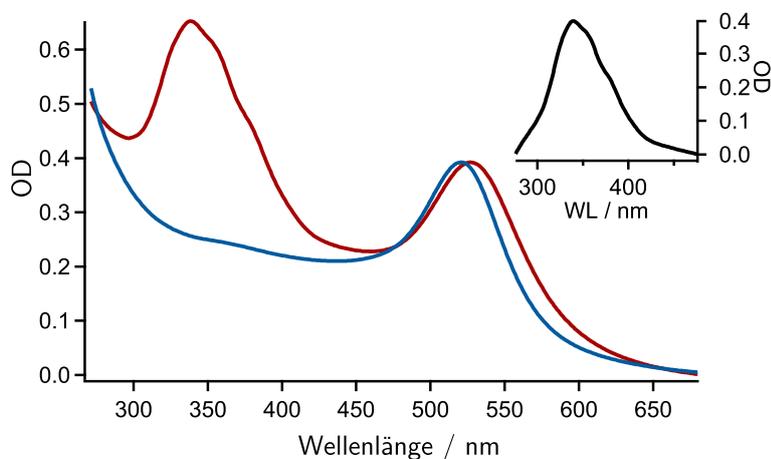
**Abbildung 4.42.** – Schematische Darstellung mit maßstabgerechten Größenverhältnissen von Bindungslängen und Partikeldurchmesser von Goldnanopartikeln mit 5 nm und 30 nm Durchmesser. Der Winkel zwischen den Liganden im Fall der 5 nm AuNP liegt in der Größenordnung von  $30^\circ$ , im Fall von den 30 nm AuNP bei ca.  $6^\circ$ . Diese unterschiedliche Konfiguration kann für unterschiedliche sterische Bedingungen für Ligandenaustauschreaktionen sorgen.

den UV/VIS Spektren ermittelte, genäherte Beladungsdichte mit **GlyAzoThiol(5)** sind in Tabelle 4.10 dargestellt. Die Maxima der immobilisierten Photoschalter im Bereich der  $\pi$ - $\pi^*$ -Bande liegen für die Partikel im Bereich von 340 nm und variieren nicht signifikant. Die SPR-Banden der Partikel unterscheiden sich für die kleineren Partikel, insbesondere für die Partikel mit 5 nm und 15 nm Durchmesser erheblich von den mit Citrat funktionalisierten Partikeln. Mit steigender Partikelgröße wird die Differenz geringer. Da, wie bereits beschrieben, die Änderung der Plasmonenresonanz nach einem Ligandenaustausch mit Thiolen durch einen Einfluss der Thiolgruppe auf die Elektronendichte der Partikel verursacht wird, ist diese Beobachtung zu erwarten. Mit zunehmender Partikelgröße vergrößert sich der festkörper-artige

**Tabelle 4.10.** – UV/VIS-Absorptionsmaxima der immobilisierten Photoschalter und der SPR-Bande der mit einer mSAM aus Citrat und **GlyAzoThiol(5)** funktionalisierten Goldnanopartikel. Des Weiteren die ermittelten Halbwertsbreiten (FWHM) der SPR-Banden und die Schalter-Beladungsdichte der Partikel.

Probe	$\lambda_{max}$ (SPR) / nm	FWHM (SPR) / nm	$\lambda_{max}$ (Schalter) / nm $\pi$ - $\pi^*$ -Bande	Beladungsdichte Schalter pro nm <sup>2</sup>
<b>AuNP8</b>	530	114	341	0.7 ± 0.1
<b>AuNP9</b>	528	100	341	0.9 ± 0.1
<b>AuNP10</b>	526	90	339	5.4 ± 1.1
<b>AuNP11</b>	534	72	341	4.7 ± 1.2
<b>AuNP12</b>	542	76	338	3.7 ± 0.9
<b>AuNP13</b>	547	84	337	3.5 ± 0.9

Anteil der Partikel, welcher nicht mehr durch die Funktionalisierung beeinflusst wird, so dass auch die Plasmonenresonanz weniger durch die Liganden beeinflusst wird. In Abbildung 4.42 ist daher der Unterschied der Größe zwischen 5 nm und 30 nm AuNP maßstabsgerecht. Die Schalter-Beladungsdichte, welche der Anzahl an immobilisierten Photoschaltern pro nm<sup>2</sup> entspricht, wurde aus den UV/VIS-Spektren in Abbildung 4.41 näherungsweise ermittelt. Hierbei wurde das Spektrum des Photoschalters im Bereich des  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergangs mit Hilfe der UV/VIS-Absorptionsspektren der Ausgangspartikel aus den Spektren extrahiert (siehe hierzu Abb. 4.43). Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von **GlyAzoThiol(5)** in wässriger Lösung ( $\epsilon_{340} = (7540 \pm 330) \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und den extrahierten UV/VIS-Spektren der immobilisierten Photoschalter, wurde die Konzentration der Schalter in der Dispersion ermittelt. Aus dieser Konzentration und der Nanopartikelkonzentration, wurde die Anzahl an Photoschaltern pro Partikel ermittelt. Hierbei muss angemerkt werden, dass es sich nur um einen Näherungswert handelt. Der Extinktionskoeffizient der Photoschalter frei in Lösung kann sich von dem der immobilisierten Schalter unterscheiden und die Ermittlung der Konzentration der Nanopartikeldispersion nach *Haiss et al.* ist nur für mit Citrat funktionalisierte Goldnanopartikel veröffentlicht worden [117]. Die in Tabelle 4.10 angegebenen Fehlerwerte für die Beladungsdichte wurden über den Einfluss von Schwankungen der Nanopartikelkonzentration auf die Beladungsdichte und dem Fehler des ermittelten Extinktionskoeffizienten geschätzt. Alternative Methoden zur Ermittlung der Nanopartikelkonzentration, wie Atomabsorptionsspektroskopie oder

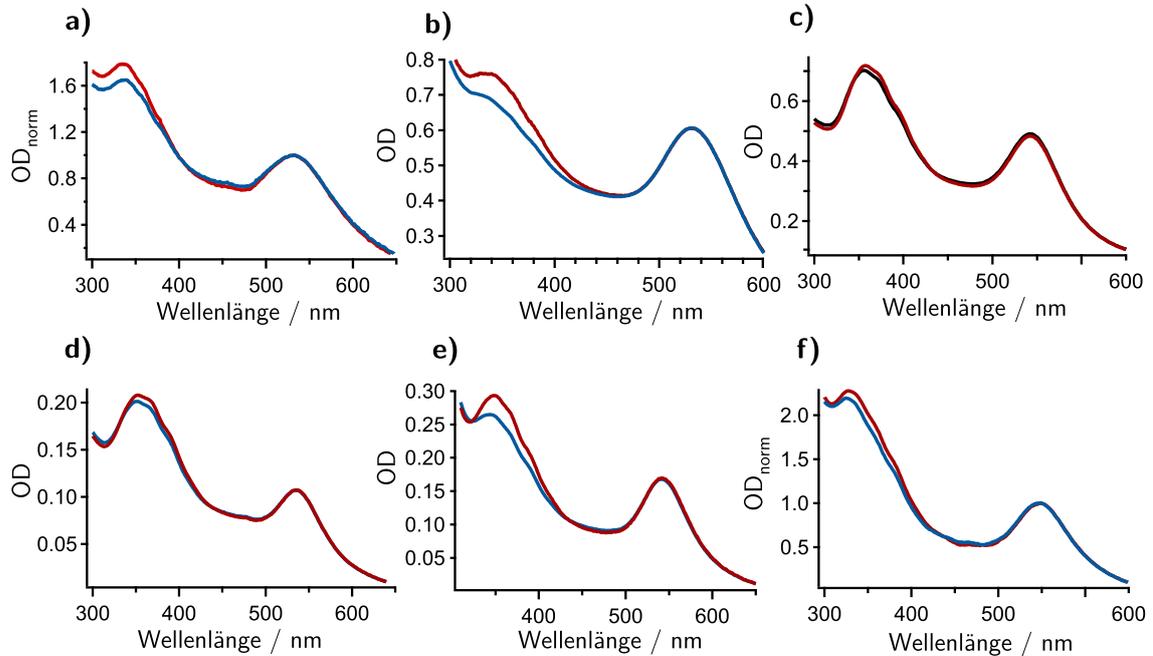


**Abbildung 4.43.** – Anhand der UV/VIS-Spektren der mSAM-AuNP **AuNP10** (rote Linie) und deren Ausgangspartikeln **AuNP3** (blaue Linie) beispielhaft gezeigte Methode der Extraktion des UV/VIS-Spektrums der immobilisierten Photoschalter (eingefügtes Spektrum, schwarze Linie). Das UV/VIS-Spektrum der Probe **AuNP3** wird auf das UV/VIS-Spektrum der Probe **AuNP10** skaliert und anschließend abgezogen. Die Differenz im Bereich von 280 nm bis 490 nm wird ausschließlich dem immobilisierten Schalter zugeordnet.

eine gravimetrische Bestimmung sowie Methoden zur Ermittlung der Stoffmenge der Schalter in der Dispersion, zum Beispiel nach *Choo et al.* über Auflösung mit Iod und Analyse mit NMR-Spektroskopie, sind destruktive Methoden, die zusätzlich hohe Mengen an Probe benötigen [146, 152]. Aufgrund von äußerst geringen Mengen von verfügbaren Photoschaltern, wurden solche Methoden für die mit **GlyAzoThiol(5)** funktionalisierten mSAM-Partikel daher nicht verwendet.

Die ermittelten Beladungsdichten liegen im Bereich von 0.7 Schaltern pro  $\text{nm}^2$  bis 5.4 Schaltern pro  $\text{nm}^2$ . *Klajn et al.* haben aus der Literatur zusammengetragen, dass erst ab ca. 2.5 Schaltern pro  $\text{nm}^2$  und weniger ausreichend Platz zur Isomerisation vorliegt [78]. Dies würde nach den ermittelten Werten in Tabelle 4.10 bedeuten, dass die Partikel **AuNP10**, **AuNP11** keine Schaltbarkeit aufweisen sollten und **AuNP12** sowie **AuNP13** nur möglicherweise schaltbar sind. Aus diesem Grund wurden zunächst Messungen zur generellen Schaltbarkeit der Partikel durchgeführt. Hierfür wurden die Nanopartikeldispersionen mit Hilfe der dritten Harmonischen (355 nm) eines Nd:YAG-Lasers angeregt, bis keine weitere Isomerisierung mehr beobachtet wurde. Die Dispersionen befinden sich demnach im photostationären Zustand (PSS). Die Proben wurden anschließend mit UV/VIS-Spektroskopie untersucht. Die

Stabilität der Partikeldispersionen wurde durch die Bestrahlung nicht beeinflusst. Die erhaltenen UV/VIS-Spektren der geschalteten Dispersionen sowie zum Vergleich von den Dispersionen vor der Bestrahlung sind in Abbildung 4.44 gezeigt. Aus der Ände-



**Abbildung 4.44.** – UV/VIS-Spektren der geschalteten (blaue Linien) und ungeschalteten (rote Linien) mSAM-AuNP. a) **AuNP8**, b) **AuNP9**, c) **AuNP10**, d) **AuNP11**, e) **AuNP12** und f) **AuNP13**. Es handelt sich um die maximal möglichen Photoisomerisationsgleichgewichte bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm (photostationäre Zustände).

rung der optischen Dichte und den zuvor extrahierten Photoschalterspektren (siehe Abb. 4.43), kann der Anteil der geschalteten Moleküle näherungsweise bestimmt werden. Die erhaltenen optischen Dichten der immobilisierten, ungeschalteten sowie im PSS befindlichen Photoschalter und der daraus berechnete prozentuale Anteil an *cis*-Isomeren im PSS sind in Tabelle 4.11 dargestellt. Die UV/VIS-Spektren von den Proben **AuNP10** und **AuNP11** zeigen nur eine sehr geringe Veränderung durch die Bestrahlung. Die für diese beiden Proben berechneten Beladungsdichten von  $\approx 5$  Schaltern/nm<sup>2</sup> haben auf eine vollständige Unfähigkeit zur Photoisomerisation hingewiesen. Dies trifft zwar nicht in vollem Maß zu. Die erreichten Isomerisierungsgrade sind jedoch mit  $5\% \pm 1\%$  und  $7\% \pm 1\%$  gering. Die beste Schaltbarkeit weisen die Partikel **AuNP9** auf. Hier werden mit  $44\% \pm 13\%$  nahezu die Hälfte aller im-

**Tabelle 4.11.** – Optische Dichten der immobilisierten Photoschalter im ungeschalteten Zustand (*trans*-Isomer) sowie im Photostationären Zustand (PSS) und daraus näherungsweise berechneter Anteil an *cis*-Isomeren im PSS in Prozent. Zum Vergleich der Schaltbarkeit mit der Beladungsdichte ist dies hier nochmals aufgeführt.

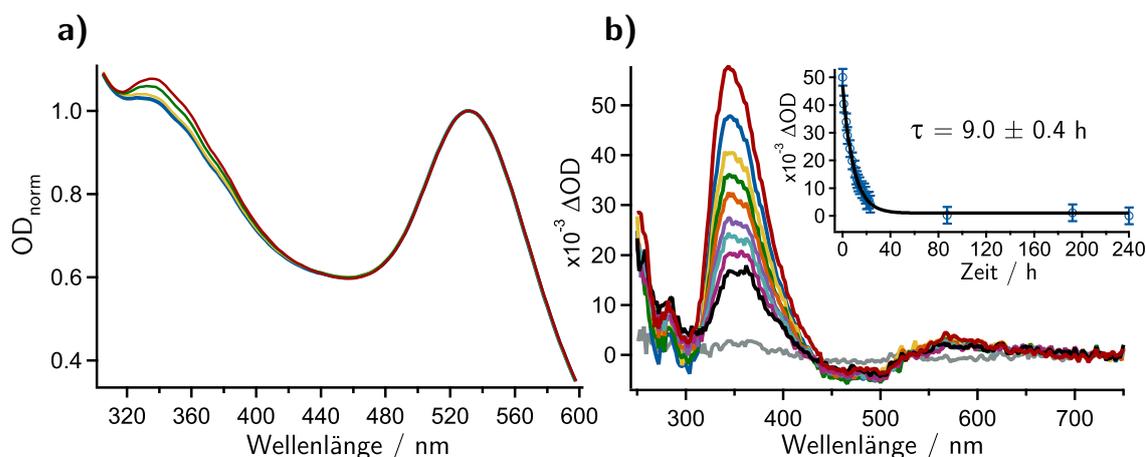
Probe	OD(350 nm) trans-Isomer	OD(350 nm) PSS	Anteil cis-Isomer in %	Beladungsdichte Schalter pro nm <sup>2</sup>
<b>AuNP8</b>	0.036 ± 0.004	0.029 ± 0.004	19 ± 4	0.7 ± 0.1
<b>AuNP9</b>	0.17 ± 0.02	0.10 ± 0.02	44 ± 13	0.9 ± 0.1
<b>AuNP10</b>	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	5 ± 1	5.4 ± 1.1
<b>AuNP11</b>	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	7 ± 1	4.7 ± 1.2
<b>AuNP12</b>	0.12 ± 0.01	0.09 ± 0.01	28 ± 7	3.7 ± 0.9
<b>AuNP13</b>	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.02	12 ± 3	3.3 ± 0.9

immobilisierten Schalter isomerisiert. Dies sollte für eine signifikante Änderung der Valenz sorgen. Diese Beobachtung passt auch mit der bestimmten Beladungsdichte von  $0.9 \pm 0.1$  Schaltern/nm<sup>2</sup> zusammen, wohingegen die Partikel **AuNP8** mit einer berechneten Beladungsdichte von  $0.7 \pm 0.1$  Schaltern/nm<sup>2</sup> nur einen *cis*-Anteil von  $19\% \pm 4\%$  im PSS aufweisen. Die Partikel mit 80 nm Durchmesser weisen mit  $12\% \pm 3\%$  *cis*-Anteil nur eine geringe Schaltbarkeit auf. Die Partikel der Probe **AuNP12** weisen die zweithöchste Isomerisierungsrate ( $28\% \pm 7\%$  *cis*-Isomer) auf. Um Informationen darüber zu erhalten, ob die teils geringen Isomerisierungsraten der dargestellten mSAM-AuNP eine steuerbare Valenz ermöglichen, müssen diese in Bindungsstudien untersucht werden. Zunächst wurde jedoch die thermische Relaxation der immobilisierten Photoschalter untersucht und mit der von in freier Lösung vorliegenden GlyAzoThiolen verglichen.

### 4.2.3. Thermische Relaxation der mSAM-AuNP mit GlyAzoThiolen und Citrat

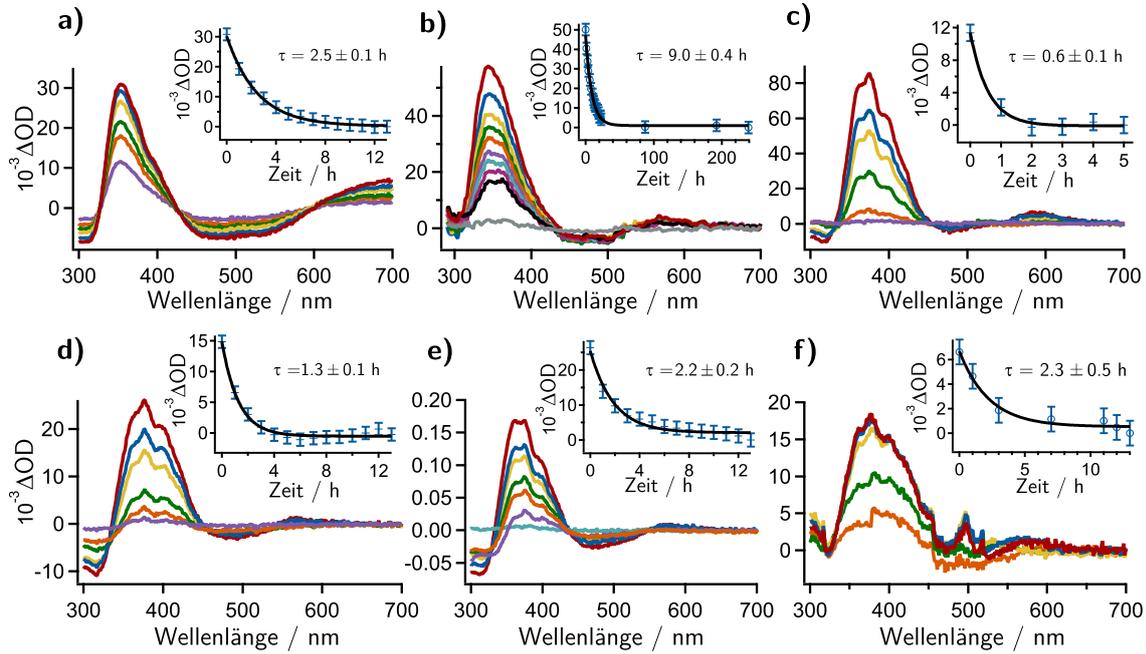
Nach Erhalt und grundlegender Charakterisierung von stabilen Dispersionen von mit GlyAzoThiolen funktionalisierten Goldnanopartikeln wurden Untersuchungen zur thermischen Relaxation der immobilisierten Photoschalter durchgeführt. Die nach Photoisomerisation erhaltene *cis*-Konfiguration relaxiert spontan zurück in die *trans*-Konfiguration. Dieses Verhalten kann mit Hilfe von UV/VIS-Spektroskopie beobachtet werden (siehe Kap. 2.2.2). Hierfür wurden die Nanopartikeldispersio-

nen mit Hilfe der dritten Harmonischen (355 nm) eines Nd:YAG-Lasers angeregt und anschließend in regelmäßigen Abständen UV/VIS-Spektren gemessen, bis diese keine weitere Änderung mehr zeigten. Alle dargestellten mSAM-AuNP, welche mit **GlyAzoThiol(5)** funktionalisiert wurden, zeigen eine für Azobenzole typische reversible Photoisomerisation. In Abbildung 4.45a sind beispielhaft anhand der Partikel **AuNP9** UV/VIS-Spektren zu verschiedenen Relaxationszeiten dargestellt. Aus dem Verlauf der optischen Dichte im Bereich der  $\pi$ - $\pi^*$ -Bande, deren Intensität



**Abbildung 4.45.** – a) Normierte UV/VIS-Spektren von geschalteten, relaxierenden Partikel **AuNP9** zu unterschiedlichen Relaxationszeiten ( $t = 0$  h in blau,  $t=239$  h in rot). b) Transiente Absorptionsspektren der Probe **AuNP9** zu verschiedenen Relaxationszeiten ( $t = 0$  h in rot,  $t = 192$  h in grau) und eingefügter Graph des Verlauf der Absorptionsänderung als Funktion der Zeit, aus der die Relaxationsdauer von  $9.0 \pm 0.4$  h für die Partikel **AuNP9** ermittelt wurde.

für das *cis*-Isomer auf nahezu Null abfällt, kann die Lebensdauer der thermischen Relaxation ermittelt werden (vgl. Kap. 2.2.1). In Abbildung 4.45b sind die aus den UV/VIS-Spektren ermittelten transienten Absorptionsspektren der Partikel **AuNP9** dargestellt sowie im eingefügten Graphen der aus den transienten Spektren erhaltene Verlauf der Änderung der optischen Dichte bei 340 nm. In Abbildung 4.46 sind die ermittelten transienten Absorptionsspektren und die aus diesen erhaltenen Kinetiken der thermischen Relaxation aller mit **GlyAzoThiol(5)** und Citrat funktionalisierten mSAM-AuNP gezeigt. Die angegebenen Fehlerwerte der Lebensdauern wurden durch einbeziehen der Messunsicherheit der Absorptionsänderung (Fehlerbalken der Kinetiken in Abb. 4.46) in die Kurvenanpassung erhalten und entsprechen der Standardabweichung. Die ermittelten Lebensdauern der thermischen Relaxation liegen



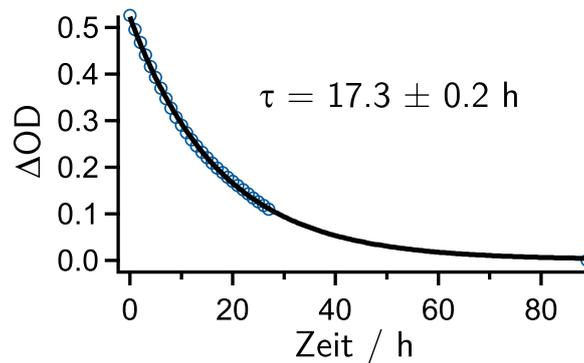
**Abbildung 4.46.** – Transiente Absorptionsspektren der mit Citrat und **GlyAzoThiol(5)** funktionalisierten mSAM-AuNP zu verschiedenen Relaxationszeiten ( $t = 0$  h in rot) und als eingefügte Graphen die jeweils zugehörigen Kinetiken der Absorptionsänderung (blaue Symbole und Fehlerbalken) als Funktion der Zeit mit exponentieller Kurvenanpassung (schwarze Linien). a) **AuNP8**, b) **AuNP9**, c) **AuNP10**, d) **AuNP11**, e) **AuNP12** und f) **AuNP13**.

im Bereich zwischen 0.6 h und 9.0 h und variieren damit signifikant. Da für die untersuchten Partikel **AuNP8** bis **AuNP13** der gleiche Photoschalter verwendet wurde, erscheint dies zunächst unerwartet, kann jedoch erklärt werden. Hierzu sind in Tabelle 4.12 die ermittelten Lebensdauern der jeweiligen Photoschalter-Beladungsdichte gegenübergestellt. Die Lebensdauern zeigen eine Korrelation mit der Beladungsdichte. Die Lebensdauern sinken mit steigender Beladungsdichte. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die thermische Relaxation von immobilisierten Azobenzolen signifikant schneller abläuft als bei frei in Lösung vorkommenden Schaltern [78, 317]. Erklärt wird dies mit  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen, welche dafür sorgen, dass von bereits relaxierten Azobenzolen umgebene Photoschalter durch Wechselwirkungen zwischen den aromatischen  $\pi$ -Systemen bevorzugt relaxieren [78, 156]. Da bei geringeren Beladungsdichten die Wechselwirkungen zwischen Schaltern weniger relevant sind, kann man davon ausgehen, dass dieser Effekt mit geringer werdender Beladungsdichte sinkt und sich die beobachteten Relaxationsdauern dem Wert der frei in Lösung

**Tabelle 4.12.** – Ergebnisse zu den Lebensdauern der thermischen Relaxation der Partikel **AuNP8** bis **AuNP13** im Vergleich mit den Beladungsdichten. Die Lebensdauern zeigen, mit einer Ausnahme, eine Korrelation mit den berechneten Beladungsdichten (mehr dazu siehe Text).

Probe	Relaxationsdauer $\tau$ in h	Beladungsdichte Schalter pro $\text{nm}^2$
<b>AuNP8</b>	$2.5 \pm 0.1$	$0.7 \pm 0.1$
<b>AuNP9</b>	$9.0 \pm 0.4$	$0.9 \pm 0.1$
<b>AuNP10</b>	$0.6 \pm 0.1$	$5.4 \pm 1.1$
<b>AuNP11</b>	$1.3 \pm 0.1$	$4.7 \pm 1.2$
<b>AuNP12</b>	$2.2 \pm 0.2$	$3.7 \pm 0.9$
<b>AuNP13</b>	$2.3 \pm 0.5$	$3.5 \pm 0.9$

vorliegenden Schalter annähern. Die Lebensdauer der thermischen Relaxation der frei in Lösung vorliegenden Photoschalter liegt bei  $\tau = 17.3 \pm 0.2 \text{ h}$  und ist damit höher als die der immobilisierten Schalter. In Abbildung 4.47 ist die Kinetik der freien Photoschalter in Lösung dargestellt. Ausnahme der Korrelation bilden die Ergebnisse



**Abbildung 4.47.** – Verlauf der Absorptionsänderung (blaue Kreise) als Funktion der Zeit mit exponentieller Kurvenanpassung (schwarze Linie) der Photoschalter frei in Lösung. Die Messgenauigkeit der Absorptionsänderung wird durch den Durchmesser der Kreise repräsentiert.

der Partikel **AuNP8**. Wie schon bei den Ergebnissen zum photostationären Zustand dargestellt (siehe Tab. 4.11), entspricht der ermittelte Wert der Lebensdauer einer höheren Beladungsdichte als sie berechnet wurde. Dies legt die Vermutung nahe, dass die ermittelte Konzentration der Probe **AuNP8** höher ist als in der Realität, demnach ist dann auch die Beladungsdichte signifikant höher als  $0.7 \text{ Schalter}/\text{nm}^2$ . Die ermittelten Relaxationsdauern sind für Bindungsstudien relevant, da eine typische

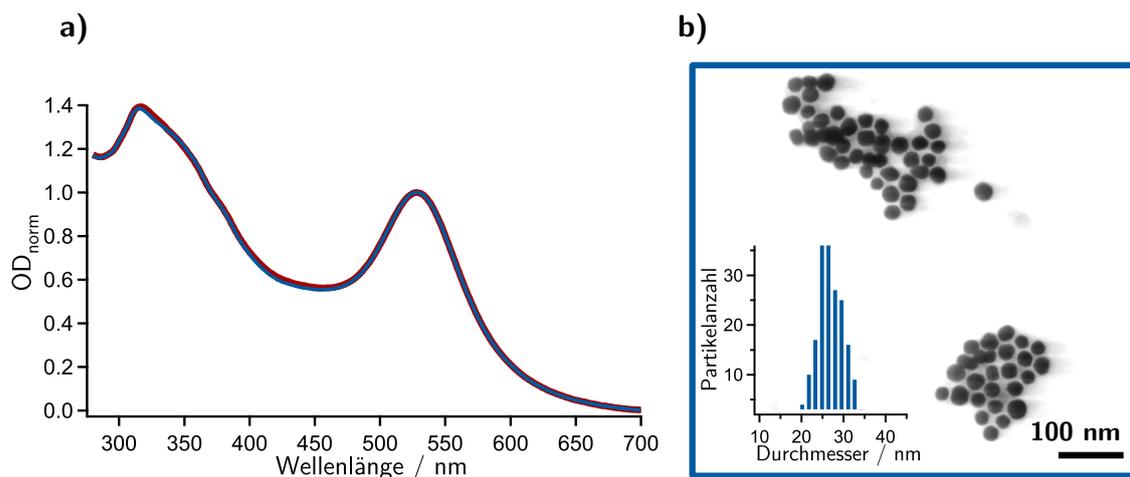
SPR-Messung im Rahmen einer solchen Studie eine Zeit von 10 min bis 20 min dauert. Möchte man die Affinität der Partikel in verschiedenen Schaltzuständen messen und vergleichen, muss der Isomerisationszustand zu jedem Zeitpunkt bekannt sein. Zudem sollte sich die Konfiguration für wenigstens 5 min nicht signifikant ändern. Langsamer schaltende Proben, wie die Probe **AuNP9** erleichtern solche Studien daher erheblich, da man die Proben nur einmalig anregen muss und dann in definierten Zeitabständen verschieden relaxierte und damit verschieden valente Systeme untersuchen kann. Im Fall der geringsten ermittelten Lebensdauer der Partikel **AuNP10** mit  $0.6 \pm 0.1$  h ist diese vermutlich zu gering, um solche Messungen durchführen zu können. Hierbei muss man dann in Betracht ziehen, dass sich der Schaltzustand der Probe innerhalb der SPR-Messung um ca. ca. 16% verändert. Im Vergleich dazu verändern sich die Partikel **AuNP9** um 0.9% und die anderen Partikel um ca. 5%. Es wird angenommen, dass eine Veränderung des Schaltzustands um 5% tolerierbar ist.

### 4.2.3.1. Vergleich der Linkerlänge

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Untersuchung, ob die Anzahl der Ethylengruppen zwischen der Azobenzoleinheit und dem Goldnanopartikel einen signifikanten Einfluss auf Schaltverhalten, Stabilität, Relaxation und Affinität gegenüber mit ConA beschichteten Oberflächen aufweist. Die bisherigen Ergebnisse zeigen ausschließlich Partikel, welche mit dem Schalter **GlyAzoThiol(5)** funktionalisiert wurden. Dies entspricht einem Linker mit fünf Ethylengruppen. Es standen noch ein Photoschalter mit drei und einer mit sechs Ethylengruppen zur Verfügung. Mit diesen wurde versucht, analog zu den Partikeln **AuNP8** bis **AuNP13**, mSAM-AuNP herzustellen. Der zuerst entdeckte Unterschied zwischen den Schaltern ist deren Löslichkeit. Es stellte sich heraus, dass der Schalter **GlyAzoThiol(6)** in Wasser und Methanol schwerer löslich ist als die Schalter mit kürzeren Alkanketten. **GlyAzoThiol(3)** ist etwas besser in Wasser löslich als **GlyAzoThiol(5)**.

Es wurden auf analoge Weise, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, Ligandenaustauschreaktionen zum teilweisen Austausch von Citratmolekülen mit Photoschaltern durchgeführt. Im Fall von **GlyAzoThiol(3)** wurden stabile Dispersionen von den Partikeln **AuNP3** mit einer mSAM aus Citrat und immobilisierten Photoschaltern erhalten (**AuNP14**). Es stellte sich jedoch heraus, dass diese keine

Photoisomerisation nach Anregung mit 355 nm eines Nd:YAG-Lasers oder mit 365 nm einer Xenon-Hochdrucklampe zeigen. Die UV/VIS-Spektren vor und nach Anregung sowie eine STEM-Abbildung mit eingefügtem Histogramm der Größenverteilung sind in Abbildung 4.48 dargestellt. Die fehlende Schaltbarkeit kann durch die kürzere



**Abbildung 4.48.** – a) UV/VIS-Spektren der mit Citrat und **GlyAzoThiol(n3)** funktionalisierten Partikeln **AuNP14**. Ungeschaltete Partikel (rote Linie) sowie nach Anregung für 30 min mit 355 nm (blaue Linie). b) STEM-Abbildung der Probe **AuNP14** sowie eingefügtes Histogramm der Größenverteilung. Die Partikel wurden aus den 28 nm messenden Partikeln **AuNP3** dargestellt.

Distanz zwischen Azobenzoleinheit und Goldnanopartikeloberfläche erklärt werden. Es ist bekannt, dass die Schalteffizienz mit sinkendem Abstand von Azobenzol und AuNP abnimmt [78, 319]. *Zhang et al.* berichteten, dass bei einer Alkankette, welche aus 3 Ethylengruppen besteht, die Effizienz um das 15fache geringer ist als die des Photoschalter in Lösung [319]. Betrachtet man die, schon im Fall von den mit **GlyAzoThiol(5)** funktionalisierten Nanopartikeln geringen Isomerisierungsraten, kann dies das Verhalten der Probe **AuNP14** erklären.

Die in Kapitel 4.2.2.3 beschriebene Synthesemethode hat im Fall des Schalters **GlyAzoThiol(6)** keine stabilen Dispersionen ergeben. Alle Versuche führten im Laufe der Überführung in eine wässrige Dispersion zu aggregierten Partikeln. Es wird vermutet, dass der Ligand mit dem hydrophoben Abschnitt zu weit in die Lösung ragt, ohne von den Citrat Hintergrundliganden abgeschirmt zu werden, so dass die Partikel bei der Überführung in Wasser anfangen auszufallen.

#### 4.2.4. SPR-Untersuchungen

Um die Wechselwirkung der multivalenten glycosilierten Goldnanopartikel mit dem Protein Concanavalin A zu untersuchen, wurden SPR-Messungen durchgeführt. Hierfür standen zwei verschiedene Geräte zur Verfügung, welche genutzt wurden. Bei dieser Untersuchungsmethode werden die Proteine auf einer Goldoberfläche immobilisiert. Diese Oberfläche bildet den Boden einer Flusszelle, durch die die Nanopartikeldispersion geleitet wird. Die Aktivität der Proteine hängt direkt mit ihrer Tertiärstruktur zusammen, welche wiederum von dem Lösungsmittel abhängt [320]. Daher müssen die Messungen in Pufferlösungen bei einem pH-Wert von 7.4 durchgeführt werden. Die Nanopartikel müssen daher unter diesen Bedingungen stabil sein. Aus diesem Grund wurden die Partikel zunächst auf ihre Stabilität gegenüber dem typischerweise für SPR-Messungen mit ConA genutzten HEPES-Puffer untersucht [261]. Die Zusammensetzung dieses Puffers ist in Tabelle 4.13 gezeigt. Die zweiwertigen Metallionen Calcium und Mangan sind für die Struktur und damit die Aktivität von ConA notwendig, Natriumchlorid sorgt für physiologische Bedingungen [321]. Die Partikel sind unter diesen Bedingungen nicht stabil und aggregieren sofort irreversibel. Es ist bekannt, dass mit Citrat funktionalisierte Goldnanopartikel durch NaCl-Zugabe ausgefällt werden können [322]. Aus diesem Grund wurde die NaCl-Konzentration von Null ausgehend schrittweise erhöht, bis die Partikel instabil wurden. Bereits oberhalb einer NaCl-Konzentration von  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  aggregierten die Partikel über einen Zeitraum von 12 h. Aus diesem Grund wurden die Messungen in Puffer mit  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  NaCl durchgeführt. Die reduzierte NaCl-Konzentration verhindert nicht die Wechselwirkungen zwischen Protein und Zucker, kann aber zu einem höheren Anteil an unspezifischen Bindungen führen [323]. Ein eventuell auftretendes nicht spezifisches Binden kann über einen zweiten Messkanal (Referenzkanal), welcher nicht mit ConA funktionalisiert ist, detektiert werden.

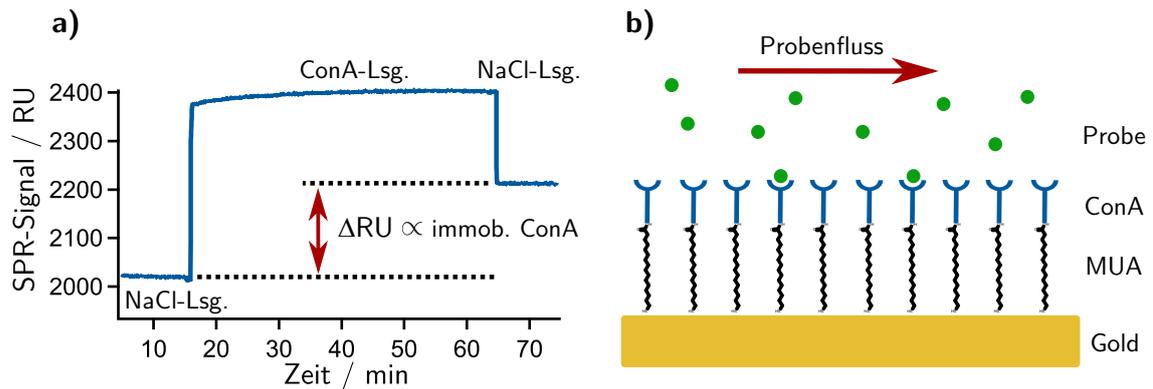
Die ersten SPR-Messungen wurden mit den Partikeln **AuNP9** durchgeführt, da diese den höchsten Anteil an *cis*-Isomeren im PSS aufweisen und daher am wahrscheinlichsten eine unterschiedliche Affinität zwischen geschaltetem und ungeschaltetem Zustand aufweisen. Die ersten Experimente wurden an einem Biosuplar400T SPR-Spektrometer durchgeführt. Hierfür wurden die vergoldeten Objektträger, auf denen das ConA immobilisiert wird (im Folgenden als SPR-Chip bezeichnet), mit Monolagen

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4.13.** – Zusammensetzung eines für SPR-Messungen mit ConA typischen sowie des in dieser Arbeit genutzten Puffers. Der pH Wert wurde mit NaOH auf  $7.4 \pm 0.1$  eingestellt.

Verbindung	Standard-Puffer c in $\text{mmol L}^{-1}$	genutzter Puffer c in $\text{mmol L}^{-1}$
HEPES	20	20
NaCl	150	0.5
MnCl <sub>2</sub>	0.1	0.1
CaCl <sub>2</sub>	0.1	0.1

aus MUA beschichtet und anschließend mit ConA beladen. Für die Installation eines SPR-Chips muss hierbei die gesamte Messzelle neu zusammengesetzt werden (siehe Kap. 3.3.1). Dadurch ist jeder neu hergestellte SPR-Chip in Bezug auf den Immobilisierungsgrad und seine Empfindlichkeit einzigartig. Eine Messung des SPR-Signals als Funktion der Zeit (im Folgenden als Sensorgramm bezeichnet) einer solchen Beladung mit ConA ist in Abbildung 4.49a dargestellt. Die Differenz der Basislinie vor und nach

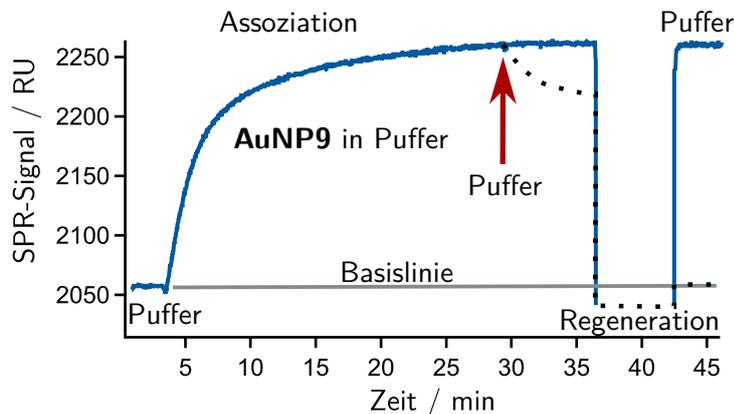


**Abbildung 4.49.** – a) Typische SPR-Messung (Sensorgramm) einer ConA-Immobilisierung auf einen MUA beschichteten Gold-Chip. b) Schematische Darstellung eines solchen, fertig beladenen SPR-Chips.

der Beladung zeigt, dass die Immobilisierung erfolgreich war. Die willkürliche Einheit RU steht für *engl. resonance units*, auf Deutsch Resonanzeinheiten und verhält sich proportional zur Änderung des Brechungsindex (siehe Kap. 2.6.10). Der Proportionalitätsfaktor muss für jeden SPR-Chip neu bestimmt werden. Da ein SPR-Chip für mehrere Messungen genutzt werden kann, aber eventuell an Empfindlichkeit verliert, sollte eine solche Kalibrierung regelmäßig durchgeführt werden. Diese kann durch Messen einer NaCl-Lösung bekannter Konzentration und mit bekanntem Brechungs-

index durchgeführt werden. Kennt man den Brechungsindex des SPR-Puffers, kann auch dieser genutzt werden. In Abbildung 4.49b ist eine schematische Darstellung eines nach der oben beschriebenen Methode beladenen SPR-Chips dargestellt. Die immobilisierten Proteine bilden eine zweidimensionale Oberfläche mit denen darüber vorbeifließende Proben interagieren können.

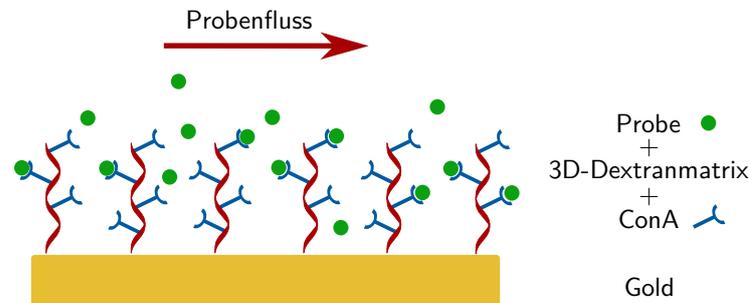
Nach erfolgreicher Immobilisierung von ConA, können anschließend Affinitätsmessungen durchgeführt werden. Hierfür wurden die in Wasser dispergierten Partikel **AuNP9** im Verhältnis 1:1 mit einer Stammlösung des SPR-Puffers vermischt. Die Partikel lagen anschließend in einer Konzentration von  $21 \text{ nmol L}^{-1}$  vor. Der sogenannte Laufpuffer, der vor und nach der Probe durch die Messzelle läuft, wurde aus der gleichen Stammlösung durch 1:1 Verdünnung mit Wasser erhalten. So wurde eine



**Abbildung 4.50.** – Sensorgramm der Probe **AuNP9** in SPR-Puffer am Biosuplar 400T (blaue Linie). Nach einer Assoziation der Partikel an das Substrat, wird nach ca. 30 min zu reinem Laufpuffer gewechselt (roter Pfeil). Es ist keine Dissoziation vom Substrat und generell nicht der erwartete Verlauf (gepunktete schwarze Linie) zu beobachten. Auch die Anwendung der Regenerationslösung kann die Partikel nicht vom Substrat lösen.

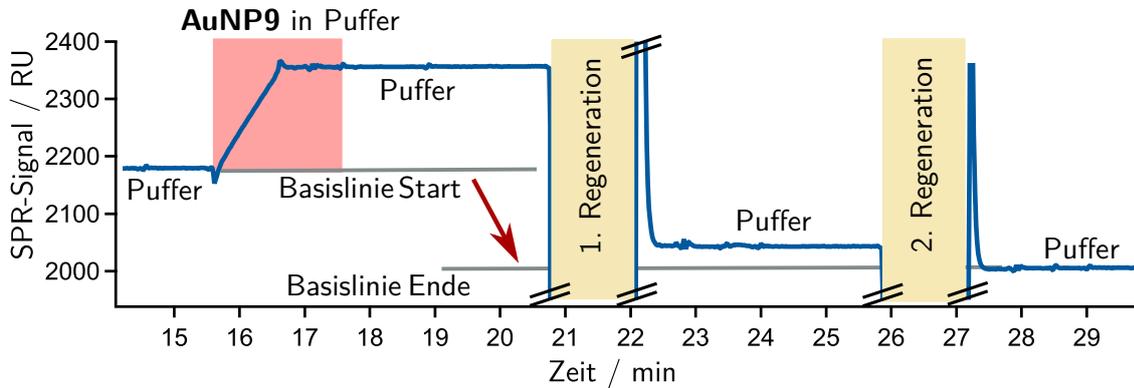
konsistente Basislinie gewährleistet. In Abbildung 4.50 ist ein typisches Sensorgramm der ungeschalteten Partikel **AuNP9** dargestellt. Die Partikel binden zunächst an das ConA-Substrat, allerdings erfolgt keine Dissoziation, nachdem anschließend reiner Laufpuffer durch die Messzelle geleitet wird. Eine anschließende Regeneration mit einer Lösung von Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid ( $0.8 \text{ mol L}^{-1}$ ) kann die Partikel ebenfalls nicht lösen. Dies bedeutet, dass die Partikel entweder sehr stark, an das Substrat binden oder ausgefallen sind. Des Weiteren verstopften die Kanäle kurze Zeit nach diesen Beobachtungen regelmäßig. Nach zahlreichen Fehlschlägen dieser

Art mit dem Biosuplar 400T wurden die Experimente auf dieser Plattform eingestellt und zu einem höher entwickelten SPR-Spektrometer, einem Biacore X100, gewechselt. Für dieses Instrument werden bereits mit Liganden funktionalisierte SPR-Chips genutzt. Ein Zusammensetzen von Einzelteilen ist hier nicht nötig. Das Einbringen der SPR-Chips in das Gerät ist einfach, so dass hier reproduzierbare Ergebnisse einfacher generiert werden können. Für die hier gezeigten Ergebnisse wurde ein SA-Sensorchip verwendet, welcher mit einer dreidimensionalen Carboxymethyl-Dextranmatrix funktionalisiert ist, auf der bereits Streptavidin immobilisiert ist. Streptavidin ermöglicht die Immobilisierung von kommerziell erhältlichem mit Biotin konjugiertem ConA. In Abbildung 4.51 ist eine schematische Darstellung eines solchen SPR-Chips gezeigt. Durch die dreidimensionale Präsentation des ConAs wird des Weiteren die Empfind-



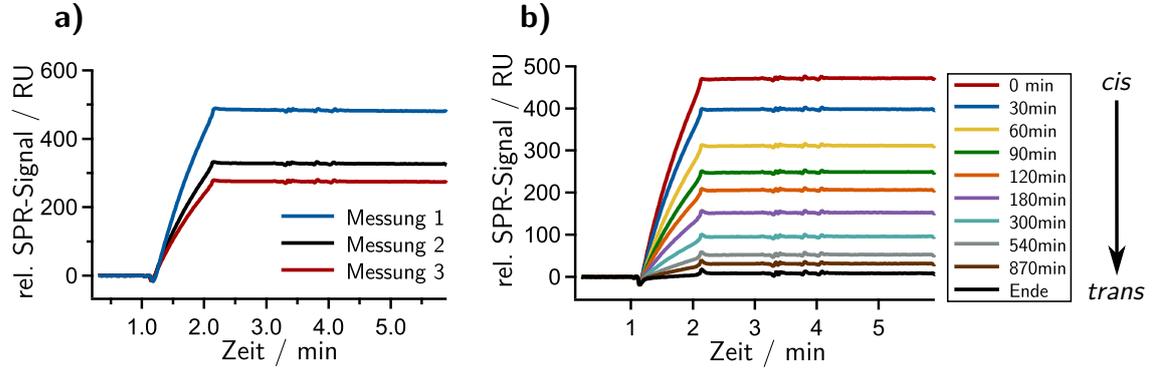
**Abbildung 4.51.** – Schematische Darstellung eines SA-Sensorchips für das Biacore X100. Die dreidimensionale Dextranmatrix (rot) bietet eine erhöhte Empfindlichkeit als SPR-Chips mit direkt an MUA konjugiertem ConA [324].

lichkeit der Messung erhöht. Zunächst wurde ein Testexperiment mit ungeschalteten **AuNP9**-Partikeln gestartet, um die Regenerationsbedingungen zu überprüfen. Das erhaltene Sensorgramm ist in Abbildung 4.52 dargestellt. Auch in diesem Fall zeigen die **AuNP9**-Partikel zunächst, dass sie mit dem Substrat binden. Eine Dissoziation bei Wechsel zum Laufpuffer ist nicht zu erkennen. Der erste Regenerationsschritt erfolgt mit Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid ( $0.8 \text{ mol L}^{-1}$ ), der zweite mit  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  MES-Puffer (pH 6.1), welcher zusätzlich  $\text{Mn}^{2+}$  sowie  $\text{Ca}^{2+}$  mit jeweils einer Konzentration von  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  enthält. Die Regenerationsschritte scheinen die Partikel von dem Substrat entfernen zu können, allerdings ist die Basislinie nach erfolgter Regeneration um 200 RU gesunken. Dies kann für eine Degeneration des Chips sprechen. Eine mögliche Degeneration des SPR-Chips durch die Regenerationslösungen



**Abbildung 4.52.** – Sensorgramm einer Testmessung von **AuNP9**-Partikeln mit dem SPR-Spektrometer Biacore X100 und SA-Sensorchips. Der rot markierte Bereich zeigt die Assoziationsphase während der die Partikel binden, anschließend ist keine signifikante Dissoziation zu erkennen. Im Anschluss werden zwei Regenerationsschritte durchgeführt (gelb markiert). Der rote Pfeil hebt den Abfall der Basislinie hervor.

ist jedoch unwahrscheinlich, da diese in der Literatur erfolgreich in Kombination mit ConA funktionalisierten SA-Sensorchips genutzt werden [261]. Die Ergebnisse des Tests sind dennoch ausreichend positiv, um weitergehende Studien durchzuführen. Daher wurde im Anschluss ein Experiment mit geschalteten **AuNP9**-Partikeln durchgeführt. Zunächst wurden zwei Dispersionen der Nanopartikel in SPR-Puffer angefertigt. Die erste diente als ungeschaltete Vergleichsprobe, die zweite wurde direkt vor ihrer Vermessung für 30 min mit 355 nm Strahlung eines Nd:YAG Lasers isomerisiert. Das Gerät verfügt über einen temperierbaren, vor Licht geschützten Autosampler, in dem beide Proben aufbewahrt wurden und jeweils kleine Volumina zur Messung entnommen wurden. Es wurden zunächst parallel zur Bestrahlung der zweiten Probe drei Messungen der ungeschalteten Probe durchgeführt. Anschließend wurden 30 Messungen der geschalteten Probe im Abstand von 30 min durchgeführt. Zum Schluss der Messung wurde nochmals die ungeschaltete Probe gemessen. Die Ergebnisse dieser 34 Messungen sind in Abbildung 4.53 dargestellt. Es handelt sich hierbei um die Differenz zwischen dem Signal des Probe- und Referenzkanals, um eventuelle unspezifische Bindungen herauszufiltern. Bereits die Messungen der ungeschalteten **AuNP9**-Partikel zeigen ein sinkendes Bindungssignal. Die direkt im Anschluss durchgeführten Messungen der relaxierenden Probe zeigen ein mit der Relaxation schwächer werdendes Bindungssignal. Diese Beobachtung ist gegensätzlich

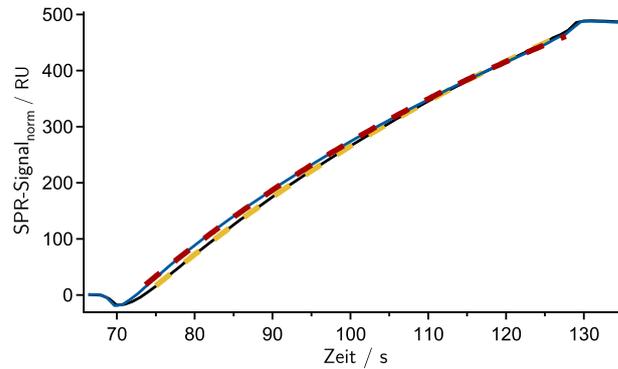


**Abbildung 4.53.** – a) Drei sequentiell aufgenommene differentielle Sensorgramme der **AuNP9**-Partikel im Assoziations- und Dissoziationsbereich. b) Sensorgramme der geschalteten Probe **AuNP9** zu verschiedenen Zeitpunkten. Frisch geschaltete Probe nahe dem PSS (rote Linie), die ungeschaltete Probe nach abgeschlossener Messung der relaxierenden Probe zum Vergleich (schwarze Linie).

zur Erwartung, dass die geschalteten Partikel eine geringere Valenz und damit eine geringere Wechselwirkung mit dem ConA aufweisen. Die nach den Voruntersuchungen gemachte Vermutung, dass der SPR-Chip im Laufe der sequentiellen Messungen degeneriert, wird durch diese Ergebnisse und weitere, die im Folgenden vorgestellt werden, bekräftigt. Aufgrund des degenerierenden SPR-Chips konnten keine weiteren Messungen durchgeführt werden, welche nötig wären, um ausreichend Informationen für die belastbare Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation ( $k_d$ ), der Assoziation ( $k_a$ ) und der daraus resultierenden Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) zu erhalten. Um dennoch einen Hinweis auf einen möglichen Unterschied in der Assoziationskinetik zu erhalten, wurden die Sensorgramme der ersten Messungen der *trans*- sowie *cis*-**AuNP9**-Partikel verglichen (siehe Abb. 4.54). Es handelt sich um die Messungen Nr. 1 und Nr. 4 in Abbildung 4.55. Trägt man das SPR-Signal  $R_t$  als Funktion der Zeit  $t$  auf, kann man mit Hilfe von Gleichung 4.10 den Assoziationsbereich der Sensorgramme anpassen [324, 325].

$$R_t = \frac{k_a \cdot c_{(AuNP)} \cdot R_{max}}{k_d + c_{(AuNP)}} \cdot (1 - \exp(-(k_a \cdot c_{(AuNP)} + k_d) \cdot t)) \quad (4.10)$$

Hierbei ist  $c_{(AuNP)}$  die Nanopartikelkonzentration und  $R_{max}$  das maximale Signal, welches man erhalten würde, wenn alle Bindungsseiten besetzt sind. Man kann einen geringen Unterschied zwischen den beiden Assoziationsbereichen der Sensorgramme



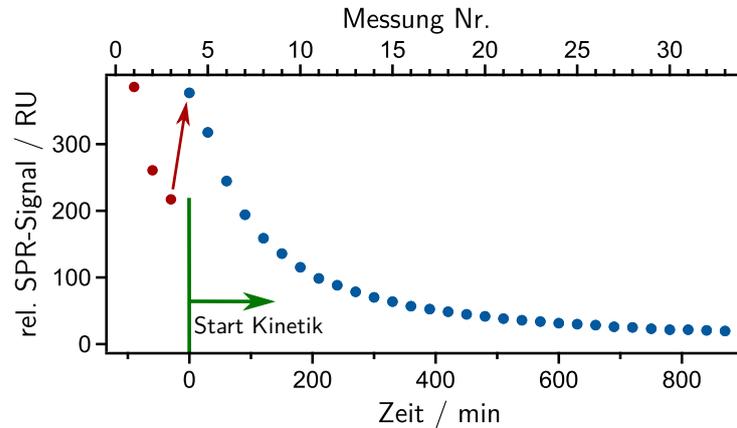
**Abbildung 4.54.** – Sensorgramme der geschalteten (blaue Linie) sowie ungeschalteten (schwarze Linie) **AuNP9**-Partikel als Funktion der Zeit im Bereich der Assoziation. Die Ergebnisse der Kurvenanpassungen sind als gestrichelte Linien für die geschaltete Probe in rot und für die ungeschaltete Probe in gelb dargestellt.

erkennen. Dieser ist allerdings so gering, dass die nach Gleichung 4.10 durchgeführten Kurvenanpassungen keinen signifikanten Unterschied der ermittelten Konstanten ( $k_d$ ), ( $k_a$ ) und  $K_D$  ergaben. Insbesondere die Degeneration und damit einhergehende Instabilität von  $R_{max}$  sorgen zudem für Fehler in der Größenordnung der Werte (siehe Tab. 4.14).

**Tabelle 4.14.** – Ergebnisse der durch Anpassung an Gl. 4.10 erhaltenen Kurvenanpassungen von den in Abb. 4.54 gezeigten Sensorgrammen.

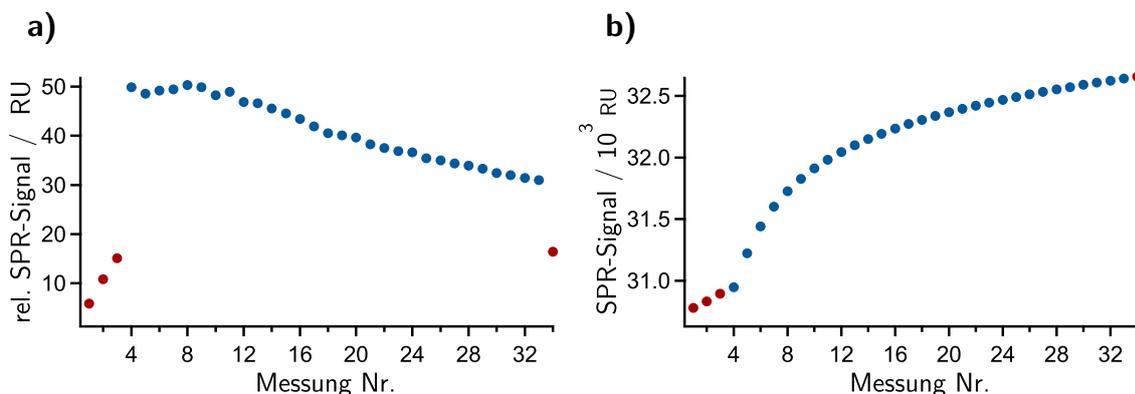
Konstante	<i>trans</i> - <b>AuNP9</b>	geschaltete <b>AuNP9</b>
$k_a$	$(1.2 \pm 0.7) \cdot 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$(1.2 \pm 0.7) \cdot 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$k_d$	$0.010 \pm 0.08 \text{ s}^{-1}$	$0.011 \pm 0.08 \text{ s}^{-1}$
$K_D$	$(1.0 \pm 0.5) \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$	$(1.0 \pm 0.5) \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$

Obwohl die Kurvenanpassungen keine verwertbaren Ergebnisse liefern, können aus den durchgeführten Messungen qualitative Schlüsse gezogen werden. Hierfür sind die jeweiligen ermittelten maximal erreichten Signalintensitäten der Messungen in Abbildung 4.55 gegenübergestellt. Aus dieser Abbildung kann man trotz der mutmaßlichen Degeneration des SPR-Chips die wichtige Erkenntnis erhalten, dass die geschaltete *cis*-Probe anscheinend etwas stärker an das Substrat bindet als die *trans*-**AuNP9**-Partikel. Nachdem das Signal innerhalb der ersten drei Messungen der ungeschalteten Probe schwächer wird, erreicht es bei der Messung der frisch geschalteten Partikel nahezu die Bindungsstärke der ersten Messung. Dies kann



**Abbildung 4.55.** – Darstellung der maximal erreichten Signalintensitäten der geschalteten **AuNP9**-Partikel als Funktion der Zeit sowie gegen die Messnummer (blaue Kreise) und der ungeschalteten Probe gegen die Messnummer (rote Kreise) in der Einheit RU. Man erkennt bereits in den ersten drei Messungen der ungeschalteten Probe eine Schwächung der Bindung. Die vierte Messung, welche der frisch geschalteten Probe entspricht, zeigt jedoch wieder eine stärkere Bindung (roter Pfeil).

entweder darauf zurückzuführen sein, dass die geschalteten Partikel besser mit dem ConA wechselwirken oder, dass die geschalteten Partikel instabiler sind und mit der Dextranmatrix reagieren. Nähere Informationen über die Vorgänge kann man durch betrachten des Messsignals im Referenzkanal erhalten. Dieser weist nur die mit Streptavidin vorbeladene Dextranmatrix auf und sollte daher nicht spezifisch mit den Nanopartikeln wechselwirken. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 4.56a dargestellt. Für die ungeschalteten Partikel ist eine geringe, unspezifische Bindung an die Dextranmatrix des Referenzkanals zu beobachten. Diese beträgt im Vergleich zum Probenkanal zunächst unter 5% und steigt von 5 auf 15 RU an. Die geschalteten Proben zeigen dagegen eine intensivere Wechselwirkung, die im Verlaufe der thermischen Relaxation der Probe geringer wird, ohne einen exponentiellen Verlauf dieser. Da die Wechselwirkung der Probe mit dem Referenzkanal die Empfindlichkeit beeinflussen kann, lassen sich aus dieser Beobachtung keine weiteren Schlüssen ziehen. Die Daten zeigen, dass die Partikel in unspezifischer Weise mit dem Substrat wechselwirken. Es ist anzunehmen, dass diese Wechselwirkung für die im Probekanal mit der Anzahl der Messungen beobachtete Signalreduktion verantwortlich ist. In Abbildung 4.56b ist das absolute Signal der Basislinie des Probekanal für die 34 Messungen aufgetragen. Das Signal steigt im Verlauf der Messungen an, für die geschalteten **AuNP9**-Partikel



**Abbildung 4.56.** – a) Bindung der ungeschalteten (rote Kreise) und geschalteten (blaue Kreise) Proben als Funktion der Anzahl der Messungen. Mit steigender Messnummer nimmt der Anteil der in *cis*-Konfiguration vorliegenden Photoschaltern ab (gilt nur für blaue Punkte). b) Absolutes Signal der Basislinie für die durchgeführten Messungen (rot: ungeschaltet, blau: geschaltet). Die Änderung der Basislinie weist für die geschalteten **AuNP9**-Partikel eine höhere Steigung auf.

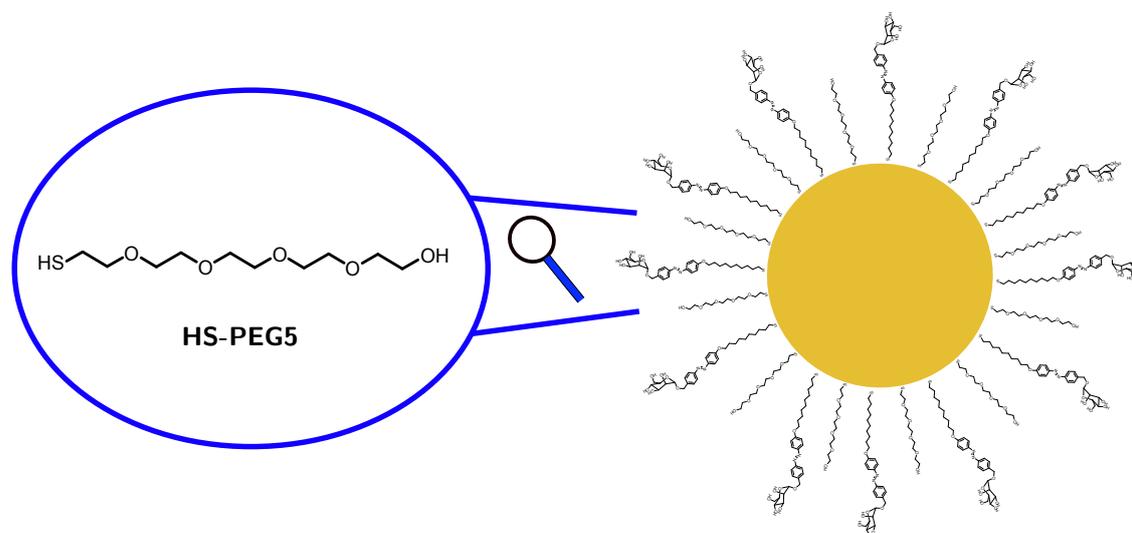
ist der Anstieg signifikant größer und scheint einer Sättigung entgegen zu gehen. Da die letzten Messungen fast kein Signal mehr zeigen, spricht dies für eine vollständige Degeneration des SPR-Chips.

Es wurden zusätzlich SPR-Experimente mit den **AuNP8**-Partikeln durchgeführt, welche vergleichbare Resultate zeigten (Daten nicht gezeigt). Daher wird aus den Ergebnissen der durchgeführten SPR-Experimente geschlossen, dass die dargestellten mit Citrat und **GlyAzoThiol(5)** funktionalisierten Goldnanopartikel nicht für diese Art der Experimente geeignet sind. Die Signalreduktion mit jeder weiteren Messung und der Anstieg der Basislinie in Abbildung 4.56b legen nahe, dass die Partikel irreversibel mit Dextranmatrix interagieren und so weitere Wechselwirkungen verhindern. Da die Mannosemoleküle auf den Nanopartikeln ausschließlich reversible Wechselwirkungen eingehen und die Citratmoleküle keine feste Bindung mit der Goldoberfläche eingehen, wird daraus geschlossen, dass die Goldoberfläche mit der Matrix reagiert [311, 326]. Es ist vorstellbar, dass die mit ConA funktionalisierte Dextranmatrix die Citratmoleküle verdrängt und auf die Goldoberfläche bindet [311, 327]. Die für die Partikelstabilität nötige geringe NaCl-Konzentration kann dies zusätzlich fördern [323]. Aus diesen Überlegungen heraus wurde daher die schwache Bindung der Citratliganden für die fehlgeschlagenen SPR-Experimente verantwortlich gemacht. Aus diesem Grund wurde nach neuen Hintergrundliganden mit einer

stabileren Bindung zur Goldnanopartikeloberfläche gesucht.

#### 4.2.5. mSAM-AuNP mit HS-PEG-Hintergrundliganden

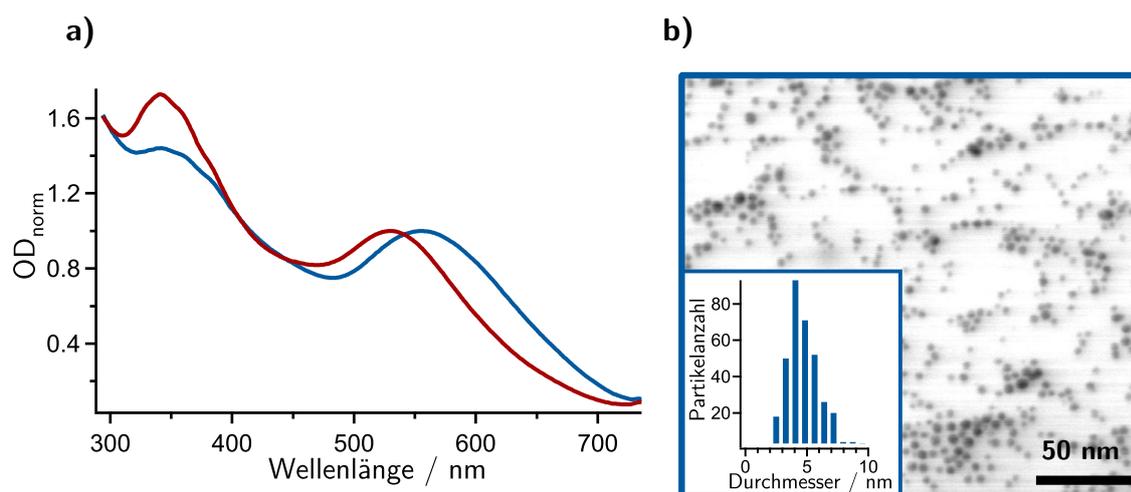
Da aus den SPR-Experimenten mit Citrat und **GlyAzoThiol(5)** funktionalisierten Goldnanopartikeln geschlossen wurde, dass die Bindung der Citratmoleküle zur Goldoberfläche zu schwach und damit die stabilisierende Wirkung gegenüber der Funktionalisierung der SPR-Chips mangelhaft war, wurden alternative Hintergrundliganden gesucht. Diese sollten mit Hilfe einer Thiol-Gruppe auf die Oberfläche binden, da diese Bindung vergleichsweise stabil ist [328]. Des Weiteren sind mit Polyethylenglycol (PEG) funktionalisierte Goldnanopartikel gegenüber wässrigen Salz- und Pufferlösungen wesentlich stabiler als mit Citrat oder Alkanthiolen funktionalisierte [329, 330]. Aus diesen Gründen wurden für die nächsten mSAM-AuNP Thiol-Liganden mit kurzen PEG-Ketten als Hintergrundliganden ausgewählt (siehe Abb. 4.57). Als Ausgangspartikel wurden die Partikel **AuNP1** mit 5 nm Durchmes-



**Abbildung 4.57.** – Darstellung der Strukturformel des genutzten PEG-Thiols sowie schematische Darstellung der aus diesen dargestellten mSAM-AuNP.

ser genutzt. Die mSAM-Partikel wurden in einem Schritt über einen vollständigen Ligandenaustausch von Citrat-Liganden gegen eine Mischung aus **GlyAzoThiol(n)** und HS-PEG5 erhalten (siehe Kap. 3.4.1.7). Die erhaltenen Nanopartikel wiesen eine erhöhte Stabilität gegen NaCl-Lösungen ( $150 \text{ mmol L}^{-1}$ ), dem SPR-Puffer mit

150 mmol L<sup>-1</sup> NaCl sowie gegen hohe Zentrifugiergeschwindigkeiten auf. Es konnten, neben mit **GlyAzoThiol(5)** funktionalisierten AuNP, auch mit dem längeren Photoschalter **GlyAzoThiol(6)** funktionalisierte Nanopartikel erhalten werden. Dies wird auf die weiter in die Lösung reichenden Hintergrundliganden zurückgeführt, welche eine hohe Stabilität gegenüber physiologischen Lösungen mit hohen Ionenstärken aufweisen [329, 330]. Die längeren, hydrophoberen Photoschalter mit 6 Ethylengruppen zwischen Azobenzol und Thiol-Gruppe werden so besser vor der hydrophilen Lösung abgeschirmt (siehe Abb. 4.57). Es stellte sich jedoch heraus, dass die in vielen Bereichen wesentlich stabileren Partikel, die Bestrahlung mit intensiver UV-Strahlung, welche für die Photoisomerisation notwendig ist, nicht überstehen. In Abbildung 4.58 sind beispielhaft UV/VIS-Spektren sowie STEM-Abbildung von mit **GlyAzoThiol(6)** und HS-PEG5 funktionalisierten **AuNP15**-Partikeln dargestellt. Man kann anhand der  $\pi$ - $\pi^*$ -Bande der vollständig aufgereinigten Partikel erkennen,



**Abbildung 4.58.** – a) UV/VIS-Spektren der mit **GlyAzoThiol(6)** und HS-PEG5 funktionalisierten **AuNP15**-Partikel im ungeschalteten (rote Linie) und geschalteten Zustand (blaue Linie). b) STEM-Abbildung und eingefügtes Histogramm der Größenverteilung der **AuNP15**-Partikel.

dass erfolgreich Photoschalter immobilisiert werden konnten. Diese lassen sich durch Bestrahlung auch schalten. Allerdings verbreitert und verschiebt sich die SPR-Bande der Goldnanopartikel um über 25 nm in den roten Bereich. Dies ist ein eindeutiger Hinweis auf eine Aggregation der Partikel, welche auch mit bloßem Auge, zunächst durch eine Verfärbung der Lösung von weinrot nach violett und anschließend durch Ausfallen von schwarzem Feststoff zu beobachten ist. Die STEM-Abbildung mit

eingefügtem Histogramm der Größenverteilung zeigt, dass die Partikel vor der Bestrahlung gut separiert mit einem mittleren Durchmesser von  $5 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$  vorlagen (siehe Abb. 4.58b). Es konnte keine Ursache für das beobachtete Verhalten bei Photoisomerisation gefunden werden.

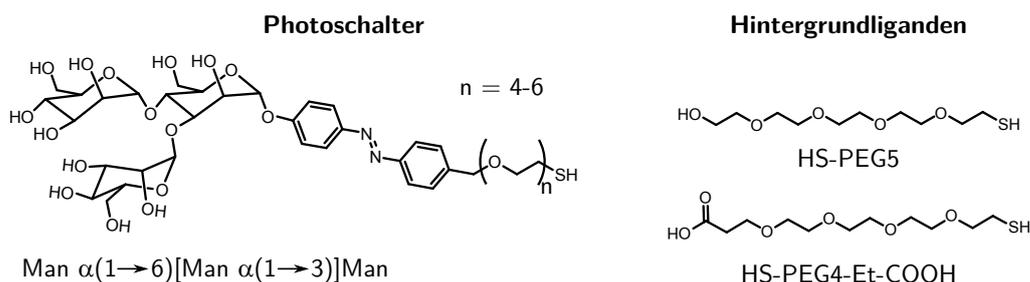
Die Aggregation während der Photoisomerisation verhindert die Untersuchung von schaltbarer Multivalenz mit SPR-Spektroskopie. Da mit der Darstellung dieser Partikel die letzten Mengen an GlyAzoThiolen verbraucht wurden, konnten keine weiteren glycosilierten, schaltbaren Goldnanopartikel hergestellt werden.

#### 4.2.6. Zusammenfassung und Ausblick

In den hier vorgestellten Ergebnissen wurden erfolgreich schaltbare glycosilierte Goldnanopartikel in einem Größenbereich von 5 nm bis 80 nm dargestellt. Nach bestem Wissen wurde hierbei eine neue Methode der Umfunktionalisierung für mit Citrat funktionalisierte Goldnanopartikel angewandt, wobei hydrophobe Liganden über einen partiellen Ligandenaustausch auf den Partikeln immobilisiert wurden. Es konnten Messungen zur thermischen Relaxation der immobilisierten Azobenzole durchgeführt werden. Die hierbei ermittelten Lebensdauern konnten mit der Beladungsdichte in Zusammenhang gebracht werden. Hierbei ergab sich, dass eine erhöhte Schalter-Beladungsdichte die Lebensdauer der thermischen Relaxation verkürzt. Dies wird auf kooperative Effekte über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zurückgeführt [78, 156]. In SPR-Experimenten wurde gezeigt, dass die so dargestellten mSAM-AuNP nicht die ausreichende Stabilität für die Messbedingungen aufweisen.

Aus den hier präsentierten Ergebnissen wird geschlossen, dass die Darstellung von sowohl in Bezug auf die Messbedingungen als auch auf die Photoisomerisation stabilen Nanopartikeln der Schlüsselpunkt für weitere Studien darstellen sollte. Es wird vor allem ein Faktor für die präsentierten Ergebnisse verantwortlich gemacht. Hierbei handelt es sich um den Linker zwischen Azobenzol und Thiol-Gruppe. Erfolgreiche Studien von glycosilierten Goldnanopartikeln, teils schaltbar und teils ohne Schaltfunktion, welche unter physiologischen Bedingungen stabil vorliegen, haben gemeinsam, dass sie entweder im Linker PEG-Gruppen aufweisen [31], über eine große Anzahl von Zuckereinheiten verfügen [331] oder mit anderen hydrophilen Biomolekülen, wie Peptiden konjugiert sind [332]. Auch bei Studien mit funktionalisierten

Oberflächen werden PEG-Linker genutzt, damit es zu keinen unerwünschten Wechselwirkungen zwischen Analyt und Ligand kommt [45]. Die Instabilität der in diesem Projekt hergestellten Partikel wird daher auf die größtenteils hydrophoben Photoschalter zurückgeführt. Diese weisen nur ein Mannosemolekül auf, dem ein hydrophobes Azobenzol und eine hydrophobe Alkankette gegenüberstehen. In Abbildung 4.59 wird ein glycosilierter Azobenzolphotoschalter vorgestellt, der erfolgversprechendere Ergebnisse erzielen sollte. Die gezeigte Struktur weist drei wesentliche Unterschiede



**Abbildung 4.59.** – Strukturformel eines erfolgversprechenderen glycosilierten Azobenzolphotoschalters und zwei mögliche Hintergrundliganden.

zu den in diesem Projekt verwendeten Photoschaltern auf. Als Linker wird ein aus vier bis sechs Einheiten bestehendes PEG vorgeschlagen, diese Länge hat sich in der Literatur als ausreichend stabil erwiesen [31]. Des Weiteren wird vorgeschlagen, statt eines Monosaccharids, das Trisaccharid  $\text{Man } \alpha(1 \rightarrow 6)[\text{Man } \alpha(1 \rightarrow 3)]\text{Man}$  zu verwenden. Dieses weist eine wesentlich höhere Affinität zu ConA auf als das Monomer [333–335]. Zudem würde es die Hydrophilie des Moleküls weiter erhöhen. Ein weiteres Projekt könnte hierbei sein, den Unterschied der isomerabhängigen Wechselwirkung mit ConA, zwischen Mono-, Di- und Trisacchariden zu ermitteln. Als dritte und vielleicht nicht zentrale Variation wird vorgeschlagen, die Bindung von Linker zu Azobenzol nicht über eine Etherbindung, sondern über einen Kohlenstoff zu realisieren. Hierdurch wird die sonst vorkommende Verzerrung durch das freie Elektronenpaar des Sauerstoffs verhindert, welche zu einer weniger optimalen Ausrichtung der Azobenzoleinheiten führt [336]. Als Hintergrundliganden sollten PEG-Thiole oder MSA verwendet werden, um die Stabilität der Partikel in physiologischen Lösungen zu erhöhen. Auf diese Weise sollten mSAM-AuNP erhalten werden, die sowohl schaltbar als auch stabil sind.

## 4.3. Lichtkontrollierte Freisetzung von AAPV durch Zweiphotonenabsorption einer photolabilen Cumarinschutzgruppe

### 4.3.1. Einleitung

Neben der Kontrolle von chemischen und biologischen Prozessen mit Photoschaltern, wie sie in Kapiteln 4.1 oder 4.2 vorgestellt wurde, gibt es noch zahlreiche weitere Systeme und Methoden die ablaufenden Prozesse mit Licht zu kontrollieren [12, 16, 337]. Eine in den letzten Jahren mit zunehmendem Interesse untersuchte Methode ist die durch Licht gesteuerte irreversible Freisetzung von chemisch oder biologisch aktiven Molekülen, welche durch Bindung an photolabile Schutzgruppen inaktiv vorliegen [38, 42, 181, 182, 193]. Der Vorteil der Nutzung von Licht ist auch bei diesen Methoden, dass es nicht invasiv ist, also auf ein geschlossenes System angewandt werden kann, und eine große zeitliche und räumliche Kontrolle ermöglicht [16]. Insbesondere die Nutzung der nicht-linearen Zweiphotonenabsorption nutzt diese Vorteile aus, da hierbei nur im Laserfokus ein ausreichend hoher Photonenfluss für diesen Prozess zur Verfügung steht (siehe Kap. 2.6.2). So kann eine hohe räumliche Auflösung von bis unter 1 fL erreicht werden [186, 338]. Des Weiteren wird Licht aus dem Nahinfrarotbereich verwendet, welches eine größere Penetrationstiefe in biologischem Gewebe ermöglicht sowie geringere Streuung und Autofluoreszenz als sichtbares Licht aufweist [219, 339]. In Kombination mit photolabilen Schutzgruppen, auch Photokäfige genannt, ermöglicht die Zweiphotonenabsorption Untersuchungen von biologischen Prozessen, wie die Auswirkung von Wirkstoffen auf Zellen [38] oder die Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen von neuronalen Rezeptoren [338] mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung [18, 187].

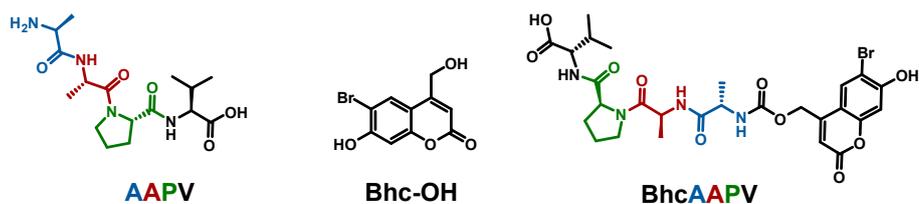
Im Rahmen der hier vorgestellten Ergebnisse sollte das Tetra-Peptid **AAPV**, welches therapeutischen Nutzen bei der Behandlung von Psoriasis aufweist [183, 340], zunächst synthetisiert und dann an die photolabile Schutzgruppe **6-Bromo-4-Chloromethyl-7-Hydroxycumarin (BhcOH)** gekuppelt und die optischen Eigenschaften des resultierenden Konjugats ermittelt werden. Hierbei sollte die Freisetzung von **AAPV** mittels Ein- sowie Zweiphotonenabsorption untersucht werden. Des Weiteren

### 4.3. Lichtkontrollierte Freisetzung von AAPV durch Zweiphotonenabsorption einer photolabilen Cumarinschutzgruppe

sollte der hierfür benötigte Messaufbau zur Messung von Zweiphotonenfluoreszenzspektren erstellt werden.

#### 4.3.2. Synthese des photolabil geschützten Peptids BhcAAPV

Die Strukturformeln des Peptids **AAPV**, der photolabilen Schutzgruppe **BhcOH** sowie des zu synthetisierenden Konjugats aus diesen sind in Abbildung 4.60 dargestellt. Die Aminosäuresequenz des Peptids **AAPV** bildet bestimmte Aminosäuresequenzen von Elastin nach und wird daher von der Humanen Leukozyten Elastase (HLE) erkannt [340, 341]. Elastin ist ein in der Haut vorkommendes für deren Stabilität mitverantwortliches vernetztes Protein, welches in Entzündungsprozessen von HLE zersetzt wird [341, 342]. **AAPV** ist imstande, die Aktivität der HLE zu inhibieren und ist daher ein potentiell Mittel, um bei der Behandlung von Psoriasis zu helfen, bei deren Auftreten eine krankhaft hohe HLE-Aktivität beobachtet wird [183, 340–344]. Wie bei vielen medizinisch wirksamen Peptiden erschweren der schnelle Abbau der Peptide im Körper sowie die schlechte Hautpenetration eine medizinische Anwendung [340, 344]. Die Kupplung von AAPV an Penetrationsverstärker ist Gegenstand von zahlreichen Studien [340, 344, 345]. Eine Möglichkeit stellen hierbei photolabile Schutzgruppen dar, welche einerseits den Abbau der Peptide verlangsamen und andererseits die Penetration der Hautbarriere verbessern können [183]. Die hier vorgestellte Schutzgruppe **BhcOH** ist nicht für eine optimale Hautpe-



**Abbildung 4.60.** – Strukturformeln des Tetrapeptids **AAPV**, der photolabilen Cumarinschutzgruppe **BhcOH** sowie des im Rahmen dieser Ergebnisse dargestellten Konjugats **BhcAAPV**.

netration modifiziert, könnte diese jedoch durch eine gewisse Erhöhung der Lipophilie erhöhen [346, 347]. Die meisten Moleküle, welche die Haut penetrieren können, weisen Molmassen unterhalb von  $500 \text{ g mol}^{-1}$  auf, diese Beobachtung ist als 500-Da-Regel bekannt [Bos2000]. Eine große Molmasse ist aber keinesfalls ein Ausschlusskriterium

für einen wirksamen Hautpenetrationsverstärker, es sind zahlreiche Penetrationsverstärker mit höheren Molmassen bekannt [Billich2005, 346, 348–350]. Da die Molmasse durch die Kupplung von **BhcOH** mit **AAPV** erhöht wird, müsste die resultierende Haut-Penetrationsfähigkeit in nachfolgenden Studien untersucht werden. Die Kupplung von **AAPV** an **BhcOH** kann das Peptid vor einem schnellen Abbau durch Proteolyse schützen und ermöglicht über Zweiphotonenfluoreszenz die Lokalisierung des Wirkstoffs mit hoher Ortsauflösung und in größere Tiefen als mit Einphotonenfluoreszenz möglich wäre [224]. Die Kenntnis der bevorzugten Lokalisierung der Wirkstoffe sowie ihr Penetrationspfad sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen [351–354]. Aus diesem Grund stellt das Konjugat **BhcAAPV** einen vielversprechenden Kandidaten dar, um mittels Zweiphotonenabsorption Penetrationsstudien durchzuführen. Da die Effizienz der durch Zweiphotonenabsorption ausgelösten Freisetzung von Photokäfigen in hohem Maße von der Abgangsgruppe, hier **AAPV**, abhängt, ist hierfür eine Untersuchung der optischen Eigenschaften des Konjugats von Interesse und Gegenstand der hier vorgestellten Ergebnisse [16]. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Synthese des Konjugats **BhcAAPV** dargestellt.

##### 4.3.2.1. Synthese von **AAPV**

Die Synthese des Tetrapeptids **AAPV** erfolgte nach der Fmoc-Festphasenpeptidsynthese in den Laboren der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beate Kokschi [262]. Das Peptid wurde nach der Synthese für die Kupplung am Harz belassen und wurde daher nicht aufgereinigt. Die Charakterisierung erfolgte über eine Probeabspaltung mittels ESI-TOF-Massenspektrometrie und HPLC. Das erhaltene Chromatogramm ist in Abbildung 4.61 dargestellt. Die berechneten und gemessenen Massen sowie die mittels analytischer HPLC ermittelte Retentionszeit sind in Tabelle 4.15 gezeigt.

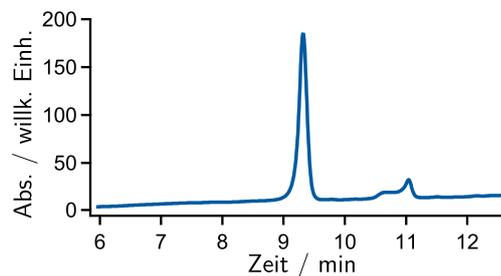
##### 4.3.2.2. Synthese von **BhcAAPV**

Die Kupplung des Peptids an den Photokäfig erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von *Marter et al.*, wurde aber an der festen Phase durchgeführt [195]. Die Reaktion ist schematisch in Abbildung 4.62 dargestellt. Das Cumarin **BhcOH** ist nicht kommerziell erhältlich und wurde von Dr. Kristin Folmert in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beate Kokschi synthetisiert. Es lag jedoch noch als Rohprodukt vor und musste mittels

### 4.3. Lichtkontrollierte Freisetzung von AAPV durch Zweiphotonenabsorption einer photolabilen Cumarinschutzgruppe

**Tabelle 4.15.** – Analyseergebnisse des Peptides **AAPV**.

Peptid	<b>AAPV</b>
<b>m<sub>calc</sub> in m/z</b>	357.2137
<b>m<sub>obs</sub> in m/z</b>	357.2129
<b>t<sub>R</sub> in min</b>	9.33
<b>HPLC</b>	LaChrom-Elite
<b>Gradient, Säule</b>	AG1, C18

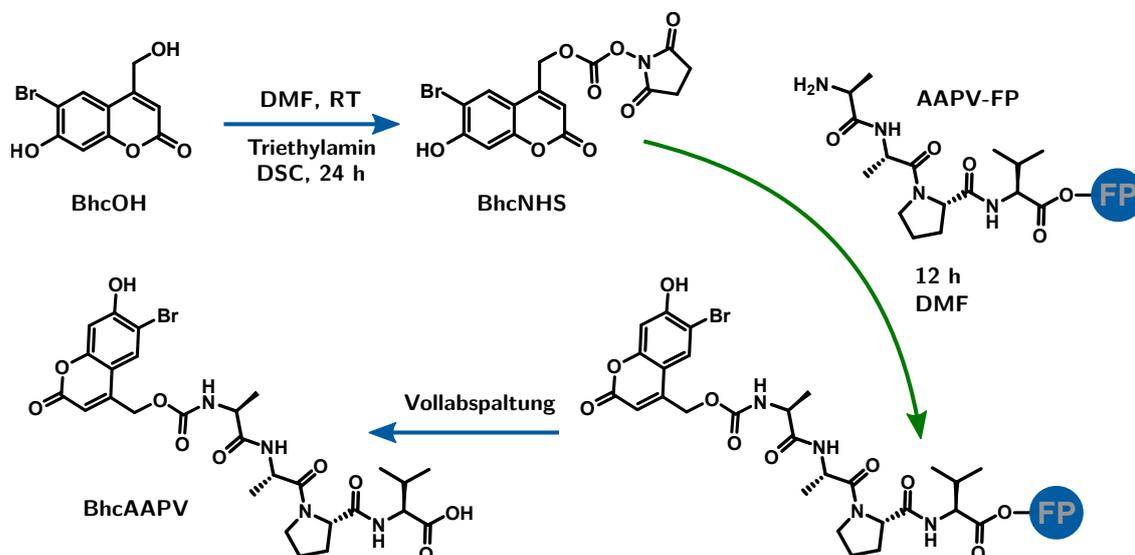


**Abbildung 4.61.** – Normiertes Chromatogramm bei 220 nm des Tetrapeptids **AAPV** nach einer Probeabspaltung.

**Tabelle 4.16.** – Ergebnisse der mittels ESI-TOF-Massenspektrometrie ermittelten Masse sowie der mit analytischer HPLC erhaltenen Retentionszeiten des NHS-Carbonsäureesters **BhcNHS** sowie des fertigen Kupplungsproduktes **BhcAAPV**.

Peptid	Ladung	m <sub>calc</sub> in m/z	m <sub>obs</sub> in m/z	t <sub>R</sub> in min	HPLC + Gradient
<b>BhcNHS</b>	+1 ( <sup>79</sup> Br)	411.9663	411.9654		Primaide™HPLC
	+1 ( <sup>81</sup> Br)	413.9642	413.9634	16.36	C8, AG1
<b>BhcAAPV</b>	+1 ( <sup>79</sup> Br)	653.1453	653.1480		Primaide™HPLC
	+1 ( <sup>81</sup> Br)	655.1465	655.1465	14.06	C8, AG1

präparativer HPLC aufgereinigt werden. Während der darauffolgenden Aktivierung und bei allen Syntheseschritten und Messungen musste im Dunkeln oder unter Gelblichtbedingungen gearbeitet werden, da die Konjugate lichtempfindlich sind. Für die Aktivierung wird es mit der Base Triethylamin und N,N'-Disuccinimidyl-Carbonat zu einem hochreaktiven NHS-Carbonsäureester (**BhcNHS**) umgesetzt. Diese reaktive Verbindung wird direkt vor der Kupplung über Nacht dargestellt und der Erfolg der Aktivierung mittels analytischer HPLC und Massenspektrometrie überprüft. Für die Kupplung wird die Lösung mit der aktivierten Verbindung zum an der festen Phase (FP) gebundenen Peptid gegeben. Das Kupplungsprodukt **BhcAAPV** wurde nach der Vollabspaltung mittels präparativer HPLC aufgereinigt und mit analytischer HPLC sowie ESI-TOF-Massenspektroskopie identifiziert. Die erhaltenen Retentionszeiten und ermittelten Massen von **BhcNHS** sowie **BhcAAPV** sind in Tabelle 4.16 dargestellt. In Abbildung 4.63 sind die normierten Chromatogramme bei einer Detektionswellenlänge von 220 nm von **BhcOH**, **BhcNHS** sowie **BhcAAPV** gezeigt. Das Chromatogramm des aktivierten Photokäfigs **BhcNHS** zeigt mehrere



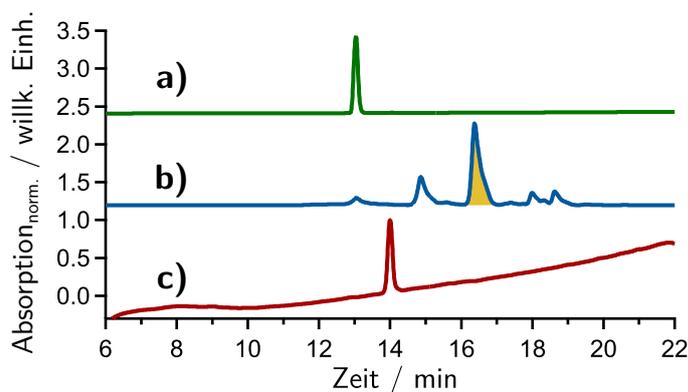
**Abbildung 4.62.** – Schematische Darstellung der Synthese von **BhcAAPV**. Hierfür wird **BhcOH** zunächst mit Hilfe von N,N'-Disuccinimidyl-Carbonat (DSC) aktiviert und anschließend mit dem an der festen Phase befindlichen **AAPV** konjugiert.

Peaks mit einem Hauptpeak bei 16.36 min, der mittels Massenspektrometrie der Masse von **BhcNHS** zugeordnet werden konnte. Das Chromatogramm des fertig aufgereinigten **BhcAAPV** zeigt keine Verunreinigungen. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse zur spektroskopischen Untersuchung dieser Spezies dargestellt.

### 4.3.3. Ein- und Zweiphotonenabsorption von **BhcAAPV**

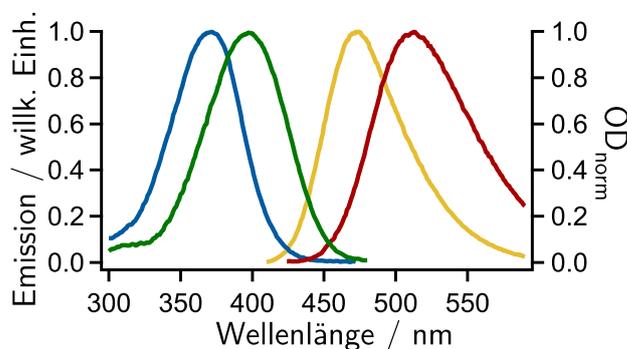
Für eine Anwendung im Bereich der Zweiphotonenmikroskopie und andere Anwendungen, muss der entsprechende Farbstoff einen ausreichend hohen Absorptionsquerschnitt für die Absorption von zwei Photonen  $\sigma_2$  verfügen. Typische Werte für solche Farbstoffe reichen von 5 GM bis weit über 100 GM [12, 16, 38, 219, 224]. Die Einheit GM (1 GM entspricht  $10^{-50} \text{cm}^4 \text{s}$ ) steht hierbei für Goeppert-Mayer in Gedenken an die Physik-Nobelpreisträgerin Maria Goeppert-Mayer, welche die Multiphotonenabsorption 1931 voraussagte [217]. Um die potentielle Anwendbarkeit als Photokäfig für **AAPV** zu ermitteln, ist die Bestimmung des Zweiphotonenabsorptionsquerschnitts notwendig. Zunächst wurde **BhcAAPV** mit konventioneller Fluoreszenz- und UV/VIS-Absorptionsspektroskopie untersucht, um die Fluoreszenz-

### 4.3. Lichtkontrollierte Freisetzung von AAPV durch Zweiphotonenabsorption einer photolabilen Cumarinschutzgruppe



**Abbildung 4.63.** – Normierte Chromatogramme a) der aufgereinigten Ausgangsverbindung **BhcOH** ( $t_R$ : 13.04 min, Primaide™HPLC, AG1), b) des NHS-Carbonsäureesters **BhcNHS** (der gelb markierte Peak im Chromatogramm wurde mittels Massenspektrometrie dem **BhcNHS**-Ester zugeordnet) sowie c) des fertigen Kupplungsproduktes **BhcAAPV** (rot).

quantenausbeute sowie den Extinktionskoeffizienten für Einphotonenabsorption zu ermitteln. Normierte Fluoreszenz- und Absorptionsspektren sind in Abbildung 4.64 dargestellt. Das Absorptionsmaximum von **BhcAAPV** in Ethanol liegt bei 370 nm,



**Abbildung 4.64.** – Normierte UV/VIS-Spektren von **BhcAAPV** in Ethanol (blau) und dem als Referenz zur Ermittlung der Quantenausbeute sowie des Zweiphotonenabsorptionsquerschnitts genutzten Farbstoff **Cumarin 152** in Methanol (grün) sowie die normierten Fluoreszenzspektren der beiden Verbindungen (**BhcAAPV**: gelb, **Cumarin 152**: rot). Die Fluoreszenzspektren wurden durch Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 400 nm erhalten.

das Emissionsmaximum der Fluoreszenz liegt bei 472 nm. Diese Werte stimmen mit Literaturwerten von vergleichbaren Verbindungen, das heißt mit **BhcOH** geschützten Molekülen, überein [190, 192]. Die in Abb. 4.64 gezeigten Spektren von **Cumarin 152** in Methanol stimmen ebenfalls mit der Literatur überein [355]. Der

Laserfarbstoff **Cumarin 152** wurde als Referenzfarbstoff für die Ermittlung der Fluoreszenzquantenausbeute nach Einphotonenabsorption  $\Phi_{F,P}(1PA)$  [355] sowie ebenfalls als Referenz für die Ermittlung des Zweiphotonenabsorptionsquerschnitts  $\sigma_2$  [226] verwendet. Die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$  von **BhcAAPV** wurde mit Hilfe von Gleichung 4.11 bestimmt [356].

$$\Phi_{F,P}(1PA) = \Phi_{F,R} \cdot \frac{F_P}{F_R} \cdot \frac{f_R(\lambda_{ex})}{f_P(\lambda_{ex})} \cdot \frac{n_P^2}{n_R^2} \quad (4.11)$$

Hierbei stehen die Indices P für Probe und R für Referenz.  $\Phi_{F,R}$  ist die Quantenausbeute von **Cumarin 152**,  $F_P$  und  $F_R$  die Integrale der korrigierten Fluoreszenzspektren,  $n_P$  und  $n_R$  die Brechungsindices der verwendeten Lösungsmittel sowie  $f(\lambda_{ex})$  die Absorptionsfaktoren der Substanzen bei der Anregungswellenlänge  $\lambda_{ex}$ . Die Absorptionsfaktoren wurden aus der optischen Dichte  $OD(\lambda_{ex})$  der Messlösungen nach Gleichung 4.12 berechnet [356]:

$$f(\lambda_{ex}) = 1 - 10^{-OD(\lambda_{ex})}. \quad (4.12)$$

Die ermittelte Fluoreszenzquantenausbeute von  $0.27 \pm 0.03$  liegt im Bereich von für BhcOH-Konjugate veröffentlichten Werten, die, je nach Abgangsgruppe, zwischen 0.2 und 0.4 betragen [190, 192]. Der Extinktionskoeffizient bei der Anregungswellenlänge (400 nm) beträgt  $(1400 \pm 100) \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Die aus den Messungen erhaltenen Werte sind zusätzlich am Ende des Kapitels in Tabelle 4.17 dargestellt. Des Weiteren sind dort entsprechende Literaturwerte zum Vergleich angegeben.

Im Anschluss sollten die Zweiphotonenabsorptionsquerschnitte bestimmt werden. Die Bestimmung erfolgte nach einer von *Makarov et al.* publizierten Methode [226, 227]. Es handelt sich, analog zur Bestimmung der Quantenausbeute der Einphotonenfluoreszenz, um eine relative Bestimmung über einen Standard. *Makarov et al.* publizierten 2008 und 2011 zahlreiche Referenzspektren der Zweiphotonenabsorptionsquerschnitte über einen weiten Wellenlängenbereich [226, 227]. Mit Hilfe des Referenzwertes von **Cumarin 152** in Methanol für eine Absorptionswellenlänge von 800 nm (2PA) kann der Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt  $\sigma_{2,P}$  über Gleichung 4.13

ermittelt werden [226]:

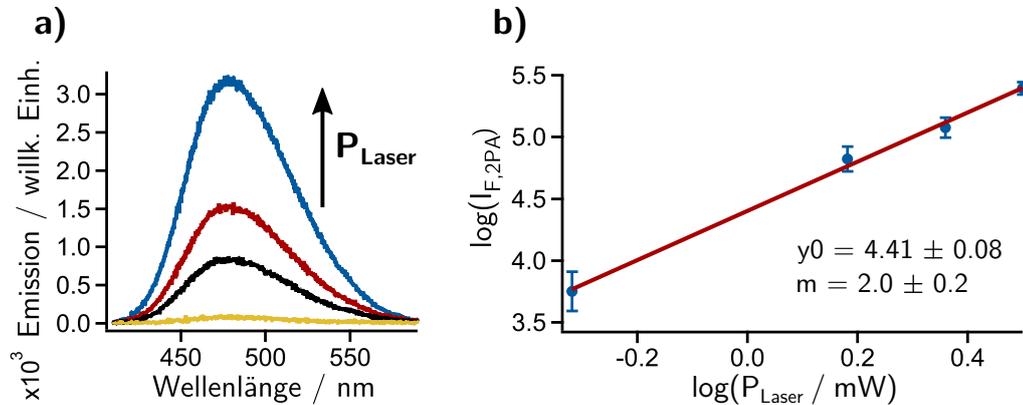
$$\sigma_{2,P} = \sigma_{2,R} \cdot \frac{F_{2,P}(\lambda_D)c_R\Phi_R(\lambda_D)}{F_{2,R}(\lambda_D)c_P\Phi_P(\lambda_D)}. \quad (4.13)$$

Hierbei sind  $F_2(\lambda_D)$  die Fluoreszenzintensitäten nach Zweiphotonenabsorption in einem schmalen Wellenlängenintervall  $\lambda_D$  (3 nm),  $c$  die Konzentrationen der Messlösungen und  $\Phi(\lambda_D)$  die differentiellen Quantenausbeuten der Einphotonenfluoreszenz. Letztere sind nach *Makarov et al.*, wie in Gleichung 4.14 als Quotient dargestellt, definiert [227]:

$$\frac{\Phi_R(\lambda_D)}{\Phi_P(\lambda_D)} = \frac{F_{1,R}(\lambda_D)}{1 - 10^{-OD_{1,R}}} \cdot \frac{1 - 10^{-OD_{1,P}}}{F_{1,P}(\lambda_D)}. \quad (4.14)$$

$F_1(\lambda_D)$  sind Fluoreszenzintensitäten nach Einphotonenabsorption in demselben Wellenlängenintervall wie bei der Zweiphotonenmessung und  $OD_1$  sind die optischen Dichten der Messlösungen bei der Einphotonen-Anregungswellenlänge. *Makarov et al.* konnten in ihrer Veröffentlichung 2008 zeigen, dass durch die Integration der Fluoreszenzspektren über einen kleinen Wellenlängenbereich und die Nutzung des Quotienten der Differentiellen Quantenausbeute in Gleichung 4.14, Faktoren im experimentellen Aufbau zur Messung der Zweiphotonenfluoreszenz, wie die Detektoreffizienz, Fokusbereich, Pulsdauer des Lasers sowie eventuell unterschiedlichen Brechungsindizes der verwendeten Lösungsmittel, keinen signifikanten Einfluss auf die aus Gleichung 4.13 ermittelten Werte haben [226]. Es handelt sich hierbei um die Standardmethode zur Ermittlung von Zweiphotonenabsorptionsquerschnitten [12, 222, 224]. Um Artefakte durch eventuelle Einphotonenabsorption oder Dreiphotonenabsorption auszuschließen, muss zunächst überprüft werden, ob die beobachtete Fluoreszenz durch Absorption von zwei Photonen ausgelöst wurde [222, 226, 227]. Hierfür wurden Fluoreszenzspektren durch Anregung mit 800 nm Femtosekundenpulsen bei verschiedenen Pulsenergien aufgenommen. Die Pulsenergien variierten dabei von 0.5  $\mu\text{J}/\text{Puls}$  bis 4  $\mu\text{J}/\text{Puls}$ . Bei Pulslängen von ca. 85 fs Halbwertsbreite und einem Fokusbereich von 8  $\mu\text{m}$  in der Probe entsprechen diese Werte Intensitäten von  $(1 \cdot 10^{13} - 8.5 \cdot 10^{13}) \text{ W cm}^{-2}$ . In Abbildung 4.65a sind Zweiphotonenfluoreszenzspektren von **BhcAAPV** in Ethanol im oben genannten Anregungsenergiebereich dargestellt. Stellt man den Logarithmus der Integrale der korrigierten Fluoreszenzspektren als Funktion des Logarithmus der mittleren Laserleistung dar,

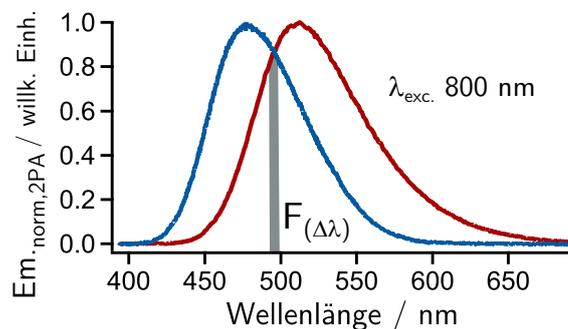
erhält man eine Gerade, deren Steigung im Fall eines Zweiphotonenprozesses zwei entsprechen sollte (siehe Abb. 4.65b) [12, 226, 357]. Die über eine lineare Anpass-



**Abbildung 4.65.** – a) Zweiphotonenfluoreszenzspektren von **BhcAAPV** in Ethanol bei verschiedenen Anregungsleistungen. Die mittleren Leistungen sind 0.5 mW (gelb), 1.5 mW (schwarz), 2.3 mW (rot), 3.2 mW (blau). b) Logarithmus der Fluoreszenzintensitäten als Funktion des Logarithmus der mittleren Anregungsleistung (blaue Kreise mit Fehlerbalken) sowie lineare Anpassungsfunktion mit erhaltenen Parametern.

sungsfunktion erhaltene Steigung beträgt gerundet  $2.0 \pm 0.2$  und bestätigt einen reinen Zweiphotonenprozess. Die weiteren Messungen wurden bei einer Pulsenergie von  $3.0 \mu\text{J}/\text{Puls}$  (ca.  $6.4 \cdot 10^{13} \text{ W cm}^{-2}$ ) durchgeführt. Zur Ermittlung des Zweiphotonenabsorptionsquerschnitts wurden, wie oben beschrieben, UV/VIS-Spektren, Ein- sowie Zweiphotonenfluoreszenzspektren aufgenommen. Die linearen Spektren sind bereits in Abbildung 4.64 gezeigt worden, in Abbildung 4.66 sind die Zweiphotonenfluoreszenzspektren von **BhcAAPV** in Ethanol und **Cumarin 152** in Methanol dargestellt. Der ermittelte Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt  $\sigma_2$  von **BhcAAPV** in Ethanol ist in Tabelle 4.17 zusammen mit Literaturdaten von vergleichbaren mit **BhcOH** geschützten Molekülen sowie dem als Referenz genutzten **Cumarin 152** dargestellt. Der erhaltene Wert von  $(25 \pm 5) \text{ GM}$  liegt zwischen den von *Furuta et al.* publizierten Werten von mit **BhcOH** geschützter Glutaminsäure (**BhcGlu**) und Essigsäure (**BhcOH**) und dem als Referenz genutzten Farbstoff **Cumarin 152**. Es ist dabei anzumerken, dass *Furuta et al.* die Daten in wässrigem KMOPS Puffer erhielten sowie eine Unsicherheit von Faktor zwei angaben. Als Grund für die große Unsicherheit wurde die unbekannte Fluoreszenzsammleffizienz des Aufbaus genannt, die wegen eines Mangels an Referenzsubstanzen als grob abgeschätzter Korrekturfak-

### 4.3. Lichtkontrollierte Freisetzung von AAPV durch Zweiphotonenabsorption einer photolabilen Cumarinschutzgruppe



**Abbildung 4.66.** – Zweiphotonenfluoreszenzspektren von **BhcAAPV** in Ethanol und **Cumarin 152** in Methanol nach Anregung mit einer Spitzenleistung von ca.  $6.4 \cdot 10^{13} \text{ W cm}^{-2}$  bei einer Zentralwellenlänge von 800 nm und Laserpulsen mit einer Halbwertsbreite von ca. 85 fs. Der grau markierte Bereich zeigt das zur Integration genutzte Wellenlängenintervall im Bereich zwischen den Maxima der beiden Spektren bei 495-497 nm.

**Tabelle 4.17.** – Erhaltene Ergebnisse zum Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt  $\sigma_2$  sowie dem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{1PA}$  und der Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_{F,1PA}$  von **BhcAAPV**. Des Weiteren sind Literaturwerte von den vergleichbaren Verbindungen **BhcOAc** und **BhcGlu** zum Vergleich dargestellt. Ebenso sind Literaturwerte von dem als Referenz genutzten Cumarin 152 gezeigt.

Probe	$\epsilon_{1PA}(400 \text{ nm})$ $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\Phi_{F,1PA}$	$\sigma_2$ $\text{GM} (10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s Photon}^{-1})$	Quelle
<b>BhcAAPV</b>	$1400 \pm 100$	$0.27 \pm 0.03$	$25 \pm 5$	diese Arbeit
<b>BhcOAc</b>	5000	0.22	6-11 ( $\pm 100\%$ )	[190, 192, 194]
<b>BhcGlu</b>	5,400	0.38	6-20 ( $\pm 100\%$ )	[190]
<b>Cumarin 152</b>	19400 [358]	0.09 [355]	$37 \pm 6$ [226]	[226, 355, 358]

tor einbezogen wurde [190]. Diese Werte werden in der Literatur aber trotz allem häufig als Referenzwerte genutzt [16, 188, 359, 360]. Die Referenzwerte von *Makarou et al.* wurden mit wesentlich fortgeschritteneren Methoden ermittelt [190, 226, 227]. Nach dem erfolgreich der Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt  $\sigma_2$  von **BhcAAPV** ermittelt werden konnte, sollten als nächstes Freisetzungsstudien nach Ein- und Zweiphotonenanregung durchgeführt werden.

### 4.3.4. Freisetzung durch Ein- und Zweiphotonenabsorption von **BhcAAPV**

Zunächst wurde die Freisetzung (im Folgenden auch als Photolyse bezeichnet) von **AAPV** nach Einphotonenanregung untersucht. Dies ermöglicht die präzise Ermittlung der Quanteneffizienz der Photolyse  $\Phi_u$ . Allgemein wird angenommen, dass sich die Quanteneffizienzen für die verschiedenen Relaxationspfade nach der Anregung, wie zum Beispiel die Fluoreszenz oder die Photolyse, für Ein- und Zweiphotonenabsorption nicht unterscheiden (vgl. Kap. 2.6.2) [190, 226, 361–364]. Dies ermöglicht die Berechnung des Photolyseabsorptionsquerschnitts nach Zweiphotonenanregung  $\sigma_{u,2}$  über den Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt  $\sigma_2$  nach Gleichung 4.15 [361, 363, 364]:

$$\sigma_{u,2} = \Phi_u \cdot \sigma_2. \quad (4.15)$$

Aus diesem Grund wird zunächst die Quantenausbeute der Photodissoziation  $\Phi_u$ , welche im Fall von Photokäfigen auch als *uncaging quantum yield* bezeichnet wird, über Freisetzungsstudien nach Einphotonenanregung ermittelt. Die Quantenausbeute der Photolyse entspricht dem Quotienten aus der Anzahl der freigesetzten **AAPV**-Moleküle, bzw. dissoziierten **BhcAAPV**-Molekülen pro Zeiteinheit  $N_P$  und der Anzahl der absorbierten Photonen pro Zeiteinheit  $I_{abs}$  (siehe Gleichung 4.16).

$$\Phi_u = \frac{N_P}{I_{abs}} \quad (4.16)$$

Die Anzahl der gebildeten Produkte pro Zeiteinheit  $N_p$  kann über die Gleichung 4.17 ermittelt werden [185, 365]:

$$N_P = k_P c V N_A, \quad (4.17)$$

mit der Geschwindigkeitskonstanten der Photolyse  $k_P$ , der Konzentration  $c$  und dem Volumen  $V$  der Photolyselösung sowie der Avogadro-Konstanten  $N_A$ . Die Anzahl der absorbierten Photonen pro Sekunde  $I_{abs}$  wird in Anlehnung an das Lambert-Beer Gesetz bestimmt [365]:

$$I_{abs} = I_0 \cdot (1 - 10^{-OD}) \quad (4.18)$$

Um die Anzahl der absorbierten Photonen zu ermitteln, muss demnach die Anzahl der auf die Probe treffenden Photonen pro Zeiteinheit  $I_0$  ermittelt werden. Eine

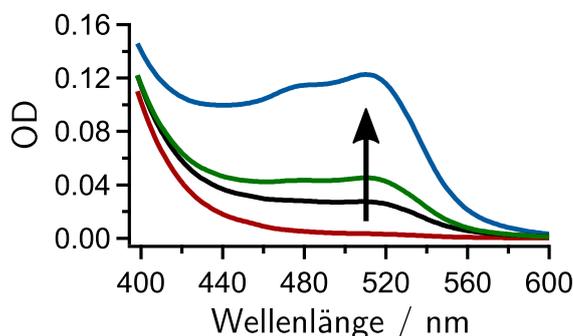
### 4.3. Lichtkontrollierte Freisetzung von AAPV durch Zweiphotonenabsorption einer photolabilen Cumarinschutzgruppe

---

zuverlässige und weit verbreitete Methode stellt hierfür die chemische Aktinometrie dar [190, 267, 269]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die sogenannte Ferrioxalataktinometrie genutzt um  $I_0$  zu bestimmen [269]. Hierfür wurde die Ferrioxalataktinometrie unter exakt den gleichen Bedingungen wie bei den späteren Freisetzungsstudien mit **BhcAAPV** durchgeführt (vgl. Kap. 3.7.2). So ergeben sich aus den Gleichungen 4.16 bis 4.18 die zur Bestimmung von  $\Phi_u$  genutzte Gleichung 4.19 [185, 365]:

$$\Phi_u = \frac{k_P c V N_A}{I_0 \cdot (1 - 10^{-OD})}. \quad (4.19)$$

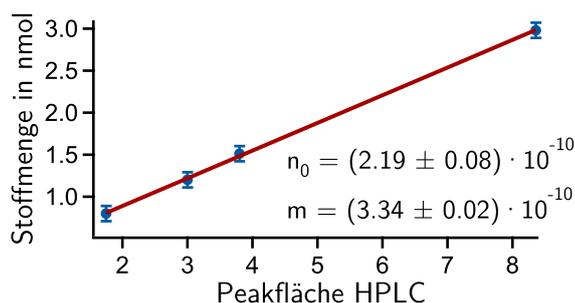
Die Photooxidation von Ferrioxalat wird durch Komplexation mit 1,10-Phenantrolin sichtbar gemacht [267]. Da pro absorbierten Photon zwei Eisenionen entstehen, ist die Quantenausbeute der Reaktion größer als 1, für die im Rahmen dieser Arbeit genutzte Wellenlänge von 400 nm beträgt der Literaturwert 1.14 [267, 269]. In Abbildung 4.67 sind UV/VIS-Spektren der Komplex-Lösung nach verschiedenen Bestrahlzeiten dargestellt. Für die Ermittlung von  $I_0$  wurde eine Bestrahlzeit von 60 s



**Abbildung 4.67.** – UV/VIS-Spektren einer mit 1,10-Phenantrolin komplexierten  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösung nach verschiedenen Bestrahlzeiten (rot: 0 s), (schwarz: 10 s), (grün: 20 s) und (rot: 60 s).

gewählt, hier ist die optische Dichte bereits ausreichend, ohne dass der Umsatz bereits so groß ist, dass die bestrahlte Eisenoxalatlösung zu viele Photoprodukte enthält, welche die Bestrahlung beeinflussen könnten [267]. Bei unfokussierten Laserpulsen mit 400 nm Zentralwellenlänge und einer Pulsenergie von 200 nJ, wurde eine Anzahl von  $(1.29 \pm 0.04)$  nmol Photonen/s erhalten. Zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten der Photolyse  $k_P$  sollte eine Lösung von **BhcAAPV** in Ethanol unter exakt den gleichen Bedingungen wie bei der Ferrioxalatreaktion bestrahlt werden

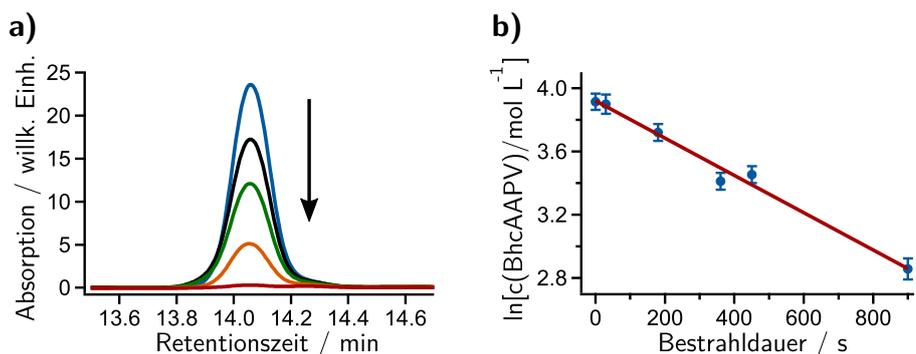
und nach verschiedenen Bestrahlzeiten mittels HPLC untersucht werden. Um die Konzentration aus den Peakflächen der Chromatogramme von **BhcAAPV** ermitteln zu können, musste zunächst eine Kalibrierung durchgeführt werden. Hierfür wurden Lösungen von **BhcAAPV** in Ethanol mit aufsteigender Konzentration hergestellt und Chromatogramme mit der HPLC, Methode und Säule, welche später für die Freisetzungsexperimente genutzt wurde, aufgenommen (siehe Abb. 4.68). Anschlie-



**Abbildung 4.68.** – In die HPLC injizierte Stoffmengen von **BhcAAPV** als Funktion der Peakfläche zur Kalibrierung der mittels HPLC aufgenommenen Chromatogramme (vgl. Kap. 3.7).

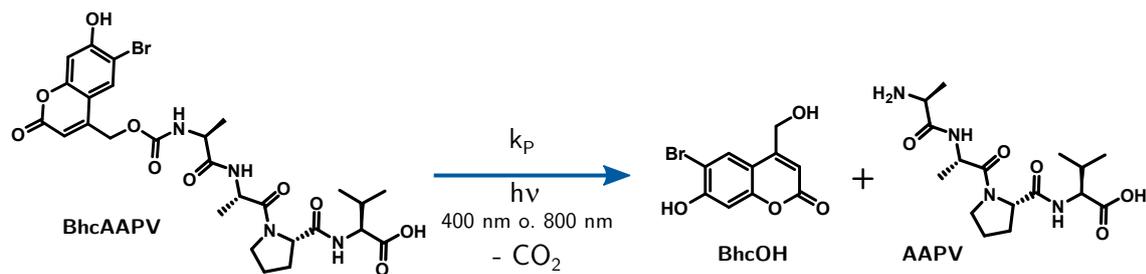
ßend wurden die Freisetzungsexperimente mit **BhcAAPV** in Ethanol durchgeführt. Der Reaktionsfortschritt wurde über das Verschwinden des Peaks von **BhcAAPV** im Chromatogramm nachverfolgt. Es ist dabei anzumerken, dass die Freisetzung von **AAPV** innerhalb dieser Experimente aufgrund der geringen Konzentration sowie UV/VIS-Absorption des freien Peptides nicht möglich war. Hierfür wurde eine gesonderte Messung mit der 10fachen Menge **BhcAAPV** durchgeführt und die gesamte Lösung nach vollständiger Umsetzung mittels HPLC untersucht und mit ESI-TOF-Massenspektrometrie die Freisetzung von **AAPV** nachgewiesen. Aufgrund von nur geringen verfügbaren Mengen des Ausgangsmaterials, konnten diese großen Mengen nicht für die Untersuchungen der Photolysekinetik genutzt werden. In Abbildung 4.69a sind Chromatogramme einer ethanolischen Lösung **BhcAAPV** nach unterschiedlichen Bestrahlzeiten dargestellt. Es konnte in diversen Studien gezeigt werden, dass die Bildung von Nebenprodukten, insbesondere bei Cumarin-Photokäfigen, welche über eine Carbamatbindung mit der Abgangsgruppe verbunden sind, vernachlässigbar gering ist [193, 202, 366, 367]. In den hier durchgeführten Experimenten konnten ebenfalls keine Nebenprodukte identifiziert werden. Aus diesem Grund wird von einer Reaktion erster Ordnung entsprechend Abbildung 4.70 ausge-

### 4.3. Lichtkontrollierte Freisetzung von AAPV durch Zweiphotonenabsorption einer photolabilen Cumarinschutzgruppe



**Abbildung 4.69.** – a) Mittels HPLC aufgenommene Chromatogramme von **BhcAAPV** in Ethanol nach Einphotonenanregung (400 nm, 200 nJ/Puls) mit Bestrahlungsdauern von 0 s (blau), 180 s (schwarz), 450 s (grün), 900 s (orange) und 3320 s (rot). b) Logarithmus der Konzentration von **BhcAAPV** in der bestrahlten Lösung als Funktion der Bestrahlungsdauer (blaue Kreise mit Fehlerbalken) und lineare Anpassung (rote Linie).

gangen [185, 269]. Nach dem logarithmierten, integrierten Geschwindigkeitsgesetz in



**Abbildung 4.70.** – Reaktionsgleichung der Photolysereaktion nach Anregung mit Ein- oder Zweiphotonenabsorption.

Gleichung 4.20 kann durch Auftragung der logarithmierten Konzentration  $[A]$  des Ausgangsmoleküles **BhcAAPV** als Funktion der Bestrahlungsdauer die Geschwindigkeitskonstante aus der Steigung einer linearen Kurvenanpassung ermittelt werden (siehe Abb. 4.69b).

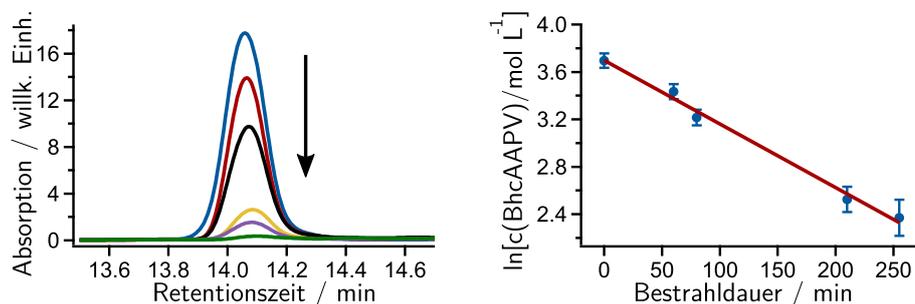
$$\ln([A]_t) = \ln([A]_0) - kt. \quad (4.20)$$

Es wurde eine Geschwindigkeitskonstante von  $(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  für die Freisetzung von **AABV** durch Einphotonenabsorption bei einem Photonenfluss von  $(1.29 \pm 0.04) \text{ nmol Photonen/s}$  ermittelt. Dies liegt im Bereich von veröffentlichten Geschwindigkeitskonstanten, welche zwischen  $1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  [194] und  $4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  [183] betragen. Hierbei muss aber angemerkt werden, dass in den allermeisten Veröffent-

lichungen der Photonenfluss nicht angegeben wird, der allerdings einen Einfluss auf die ermittelte Geschwindigkeitskonstante haben kann. Mit Hilfe der ermittelten Geschwindigkeitskonstante sowie dem Photonenfluss wurde anschließend die Quantenausbeute der Photodissoziation  $\Phi_u$  nach Gleichung 4.19 berechnet. Der ermittelte Wert beträgt  $0.033 \pm 0.003$  und liegt damit zwischen den von *Furuta et al.* veröffentlichten Werten für **BhcOAc** (0.037) und **BhcGlu** (0.019) [190]. Anschließend wurde der Photolyseabsorptionsquerschnitt nach Zweiphotonenanregung  $\sigma_{u,2}$  über Gleichung 4.15 berechnet. Dieser ist mit einem Wert von  $(0.8 \pm 0.2)$  GM ca. doppelt so groß wie die von *Furuta et al.* veröffentlichten Werte von **BhcOAc** ( $0.42 \pm 0.01$ ) GM und **BhcGlu** ( $0.37 \pm 0.06$ ) GM [190]. Hierbei sollte beim Vergleich der Werte angegeben werden, dass die von *Furuta et al.* angegebenen Fehlerwerte erstaunlich gering im Vergleich zur bereits im Kapitel 4.3.3 angesprochenen Unsicherheit bei der Bestimmung des Korrekturfaktors für die Sammeleffizienz des Fluoreszenzlichtes im Aufbau von *Furuta et al.* sind. Die ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 4.18 zusammengefasst und mit Literaturwerten zum Vergleich angegeben.

Anschließend wurde die Kinetik der Freisetzung von **AAPV** nach Zweiphotonenabsorption untersucht. Die Messungen wurden hierbei analog zu den Einphotonenexperimenten durchgeführt. Im Vergleich zu der innerhalb von Sekunden bis einigen Minuten ablaufenden Einphotonenphotolyse läuft die Zweiphotonenfreisetzung wesentlich langsamer ab. Die erhaltenen Chromatogramme sowie die ermittelte Auftragung der logarithmierten Konzentration von **BhcAAPV** als Funktion der Bestrahlungsdauer sind in Abbildung 4.71 dargestellt. Aus der linearen Kurvenanpassung wurde eine Geschwindigkeitskonstante der Zweiphotonenphotolyse  $k_{2PA}$  von  $(8.9 \pm 0.4) 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  ermittelt. Dieser Wert liegt zwischen in der Literatur angegebenen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{2PA}$ , welche sich im Bereich von  $4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  [194] und  $9 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  [184] befinden. Die ermittelte Geschwindigkeitskonstante ist ebenfalls in Tabelle 4.18 angegeben. Die niedrigen Geschwindigkeitskonstanten widersprechen einer sinnvollen Anwendung in der Forschung nicht unbedingt, da hier häufig nicht die Geschwindigkeit, sondern der vermiedene Gewebeschaden von Bedeutung ist [184, 186, 338, 359]. Die ermittelten Absorptionsquerschnitte der Ein- und Zweiphotonenphotolyse liegen im Bereich der Literaturwerte ähnlicher Verbindungen, welche von *Furuta et al.* sowie *Fedoryak et al.* veröffentlicht wurden. Im Vergleich zu den neuesten und spezifisch für hohe Zweiphotonenabsorptionsquerschnitte maßgeschneiderten,

### 4.3. Lichtkontrollierte Freisetzung von AAPV durch Zweiphotonenabsorption einer photolabilen Cumarinschutzgruppe



**Abbildung 4.71.** – a) Mittels HPLC aufgenommene Chromatogramme von **BhcAAPV** in Ethanol nach Zweiphotonenanregung (800 nm, 3  $\mu\text{J}/\text{Puls}$ ) mit Bestrahlungsdauern von 0 min (blau), 60 min (rot), 80 min (schwarz), 210 min (gelb), 255 min (violett) und 370 min (grün). b) Logarithmus der Konzentration von **BhcAAPV** in der bestrahlten Lösung als Funktion der Bestrahlungsdauer (blaue Kreise mit Fehlerbalken) und lineare Anpassung (rote Linie).

**Tabelle 4.18.** – Erhaltene Geschwindigkeitskonstanten  $k_{1PA}$ ,  $k_{2PA}$  sowie Photolyseabsorptionsquerschnitte  $\sigma_{u,1}$  und  $\sigma_{u,2}$  der Ein- und Zweiphotonenphotolyse sowie die Photolysequantenausbeute  $\Phi_u$  von **BhcAAPV** in Ethanol. Des Weiteren sind Literaturwerte von den vergleichbaren Verbindungen **BhcOAc** und **BhcGlu** zum Vergleich dargestellt.

Probe	$k_{1PA}$ $10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$\Phi_u$	$\sigma_{u,1}$ $10^{-19} \text{ cm}^2$	$k_{2PA}$ $10^{-5} \text{ s}^{-1}$	$\sigma_{u,2}$ GM	Quelle
<b>BhcAAPV</b>	$(1.2 \pm 0.1)$	$0.033 \pm 0.003$	$(1.7 \pm 0.2)$	$(8.9 \pm 0.4)$	$0.8 \pm 0.2$	diese Arbeit
<b>BhcOAc</b>	0.60	0.037	6.88	35	$0.42 \pm 0.01$	[190, 192]
<b>BhcGlu</b>	-	0.019	3.92	-	$0.37 \pm 0.06$	[190]

allerdings auch komplexen, Molekülen sind die Werte der Cumarin-Schutzgruppe **BhcOH** und seiner Konjugate **BhcAAPV** oder auch **BhcGlu** eher gering [16, 219, 224]. Allerdings sind die Werte mehr als ausreichend, um das Konjugat für weitere Studien nutzen zu können [16].

#### 4.3.5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen des hier vorgestellten Studien konnte das für die Behandlung von Psoriasis in Frage kommende Tetrapeptid **AAPV** erfolgreich synthetisiert und an die photolabile Schutzgruppe **BhcOH** konjugiert werden. Das Konjugat wurde mittels konventioneller UV/VIS- und Fluoreszenzspektroskopie sowie Zweiphotonenfluoreszenzspektroskopie untersucht. Hierbei konnten der Extinktionskoeffizient, die Fluoreszenzquantenausbeute und der Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt ermittelt werden. Des Weiteren wurden Freisetzungsstudien nach Ein- und Zweiphotonenab-

sorption in Kombination mit HPLC durchgeführt. Hieraus konnten die Quantenausbeute der Photolysereaktion sowie die Photolyseabsorptionsquerschnitte nach Ein- und Zweiphotonenabsorption ermittelt werden. Die Werte sind in Tabelle 4.17 und 4.18 dargestellt. Die ermittelten Werte liegen im Bereich von Literaturwerten der ähnlichen Verbindungen **BhcOAc** und **BhcGlu**. Der für die Zweiphotonenexperiment benötigte Aufbau wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit erstellt und charakterisiert.

Nach der hier vorgestellten erfolgreichen Synthese und umfassenden Charakterisierung von **BhcAAPV**, wäre als nächster Schritt die Untersuchung der Hautpenetration des Konjugats von großem Interesse. Die Kombination des medizinisch wirksamen Peptides mit der, im Nahinfrarotbereich photolytisch spaltbaren und mikroskopierbaren, Schutzgruppe **BhcOH**, könnte aufschlussreiche Studien zur lokalen Verteilung der Substanz in der Haut ermöglichen [16, 368]. Besonders attraktiv wäre die Kombination des hier vorgestellten Konjugats mit Acyllipidierung. Für diese Art der Funktionalisierung konnte im Zusammenhang mit **AAPV** bereits die Hautpenetration und Wirksamkeit verbessernde Effekte gezeigt werden [344]. Ebenfalls interessant wäre die Untersuchung, inwieweit die Kupplung von **AAPV** an **BhcOH** die Proteolyse des Peptides unter physiologischen Bedingungen verbessert.

Das Thema der Zweiphotonenmikroskopie, die Forschung nach neuen, effektiveren Zweiphotonenfarbstoffen sowie photolabilen Schutzgruppen ist ein in den letzten Jahren zunehmend wachsendes Gebiet [12, 16, 36, 38, 42, 182, 364]. Für zukünftige Arbeiten kann der hier vorgestellte Aufbau zur Messung von Zweiphotonenfluoreszenz weiter optimiert werden. Zum Beispiel könnte die Empfindlichkeit mit einem Objektiv, welches eine möglichst große numerische Apertur aufweist, signifikant verbessert werden. Eine speziell auf die vertikale Messkammer ausgerichtete Küvette und Küvettenhalter, würden die Messungen erheblich vereinfachen. Ein Umbau in ein vollwertiges Zweiphotonenmikroskop wäre zwar ein komplexes, jedoch lohnendes Unterfangen und wäre für die Messung von Tiefenprofilen in Haut notwendig [219, 369].

## 4.4. Untersuchung von multivalenten Wechselwirkungen zwischen Peptiden mit Hilfe des Förster-Resonanzenergietransfers

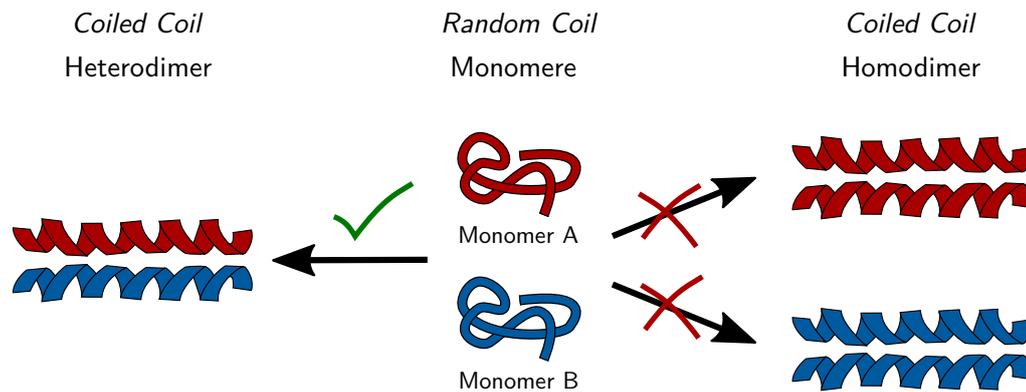
### 4.4.1. Einführung

Möchte man multivalente Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen untersuchen und dabei den Einfluss der Valenz auf diese Wechselwirkungen ermitteln, benötigt man ein System bei dem diese systematisch verändert werden kann [23]. Hierfür eignen sich biologische Modellsysteme wie Peptide, die eine Vielzahl an Formen und Funktionen aufweisen können und bei nicht zu langer Aminosäuresequenz vergleichsweise einfach maßgeschneidert synthetisiert werden können [262, 370]. Peptide, welche die in der Natur häufig vorkommende *Coiled-Coil*-Struktur bilden, waren bereits Gegenstand zahlreicher Studien [47, 371, 372]. Unter anderem sind sie auch Gegenstand von Untersuchungen im Forschungsbereich der Multivalenz [63, 64]. Die *Coiled-Coil*-Struktur wird aus zwei oder mehr Peptidmonomeren gebildet, und stellt eine superspiralisierte  $\alpha$ -Helix dar [47]. Die Monomere bilden diese Struktur hierbei über schwache Wechselwirkungen zwischen spezifischen hydrophoben sowie gegensätzlich geladenen Domänen der Helices [47]. Aus diesem Grund ist die Bildung von *Coiled-Coil*-Dimeren in sich ein multivalenter Prozess, bei dem die Valenz über die Anzahl der Bindungsdomänen und damit die Länge der Monomere bestimmt wird. In den hier vorgestellten Ergebnissen sollen *Coiled-Coil*-Heterodimer bildende Peptide als biologische Modellsysteme genutzt werden, um ein System zur Untersuchung von multivalenten Wechselwirkungen zu erhalten. Hierbei soll der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zur Sichtbarmachung der multivalenten Wechselwirkung genutzt werden. Als Donor sollen Aufkonvertierungsnanopartikel (*engl. upconversion nanoparticles* - UCNP) genutzt werden, die eine nahezu hintergrundfreie Detektion der über FRET erzeugten Emission ermöglichen [373, 374].

### 4.4.2. Synthese von mit Peptid funktionalisierten UCNP

Das zu untersuchende biologische Modellsystem wird durch zwei Peptide, die *Coiled-Coil*-Heterodimere bilden, dargestellt. Die Peptide liegen in Lösung jeweils als Mo-

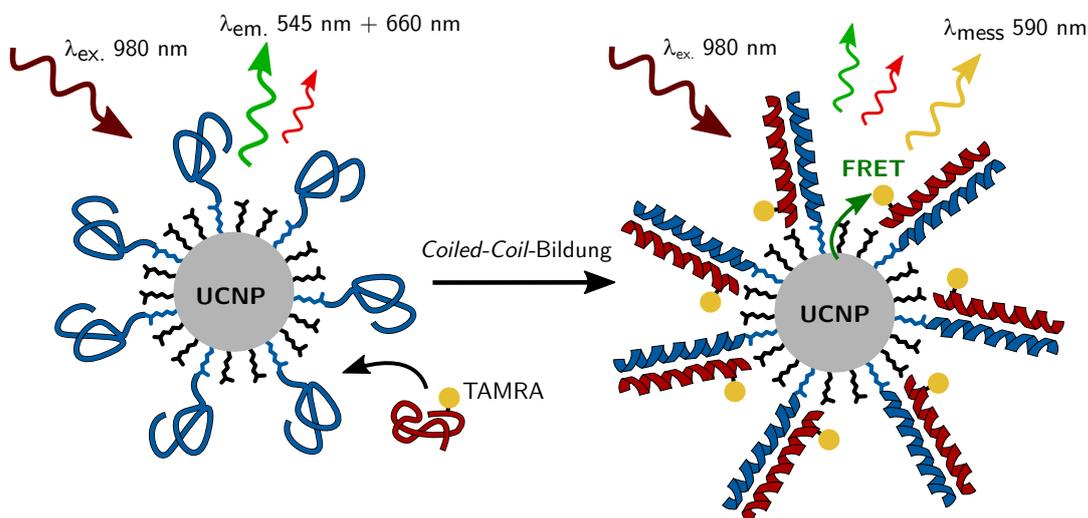
nomere vor. Die Aminosäuresequenzen der Peptide sind so maßgeschneidert, dass sich ausschließlich Heterodimere und keine Homodimere bilden, sobald die Monomer-Lösungen vermischt werden (siehe Abb. 4.72 und Kap. ??). Die Valenz wird über die Länge eines der Peptide (Monomer A) eingestellt. Diese Konstruktion der Peptide



**Abbildung 4.72.** – Schematische Darstellung des multivalenten biologischen Modellsystems, welches aus zwei Peptiden besteht die *Coiled-Coil*-Heterodimere bilden. Die Länge und damit die Valenz der Peptide kann variiert werden. Die Peptide sind so maßgeschneidert, dass keine Bildung von Homodimeren möglich ist. Die Monomere sollen als ungeordnete Strukturen (*Random Coil*) vorliegen. Dies ermöglicht unter anderem die Verfolgung der *Coiled-Coil*-Bildung mittels CD-Spektroskopie [375].

verhindert, dass unspezifische Wechselwirkungen zwischen zwei gleichen Monomeren die geplanten Messungen stören. Um die Bildung der *Coiled-Coil*-Struktur mit Hilfe des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) verfolgen zu können, müssen die Peptide mit entsprechenden FRET-Markern funktionalisiert werden [373]. Ein Marker wirkt als FRET-Donor und einer als FRET-Akzeptor (vgl. Kap. 2.6.5). Im Rahmen dieser Ergebnisse werden zunächst Aufkonvertierungsnanopartikel (im Folgenden als UCNP bezeichnet) als Donor verwendet. Auf diesen soll eines der Peptide (Monomer B) immobilisiert werden, so dass es auf der Nanopartikeloberfläche präsentiert wird. Das zweite Peptid (Monomer A) soll mit dem Fluoreszenzfarbstoff TAMRA markiert werden, dessen Absorptionsspektrum mit der Emissionsbande bei 545 nm der UCNP überlappt (siehe Kap.2.3.2.1). Wird die UCNP-Dispersion mit eine Lösung von Monomer A vermischt, bilden sich *Coiled-Coil*-Heterodimere auf der UCNP-Oberfläche und die TAMRA-Moleküle geraten in die Nähe der UCNP, so dass ein Förster-Resonanzenergietransfer stattfinden kann. Werden die Partikel nun bei 980 nm angeregt, wird nur Emission von TAMRA beobachtet, wenn FRET zwischen

den UCNP und TAMRA stattfindet, da letzterer nicht bei 980 nm absorbiert. In Abbildung 4.73 ist dieses Konzept schematisch dargestellt. Wird die Zunahme der durch



**Abbildung 4.73.** – Schematische Darstellung des Konzeptes zur Sichtbarmachung der multivalenten Wechselwirkung zwischen zwei Peptiden. Peptid B (blau) wird über Linker (blau) auf den UCNP (grau) immobilisiert. Die Dispersion wird mit Laserstrahlung der Wellenlänge 980 nm angeregt. Die UCNP emittieren Strahlung mit 545 nm und 660 nm Wellenlänge. Das mit TAMRA (gelb) markierte Peptid A (rot) wird zur Dispersion gegeben und bildet daraufhin *Coiled-Coil*-Heterodimere. Wird die Lösung wieder mit 980 nm angeregt findet FRET zwischen den UCNP (Donor) und TAMRA (Akzeptor) statt. Die Emission von TAMRA mit einem Maximum bei 590 nm kann nahezu untergrundfrei detektiert werden.

FRET induzierten Emission von TAMRA als Funktion der Zeit gemessen, kann eine Geschwindigkeitskonstante für die Bildung der verschiedenen valenten Heterodimere erhalten werden [237, 376]. Zur Realisierung dieser Studien müssen UCNP mit den passenden optischen Eigenschaften dargestellt werden und so funktionalisiert werden, dass die Peptide immobilisiert werden können. In den folgenden Kapiteln wird die Synthese der UCNP-Kerne, deren Umfunktionalisierung, die Synthese der Peptide und die anschließende Immobilisierung des Peptids **JK-LE** auf diesen Partikeln vorgestellt.

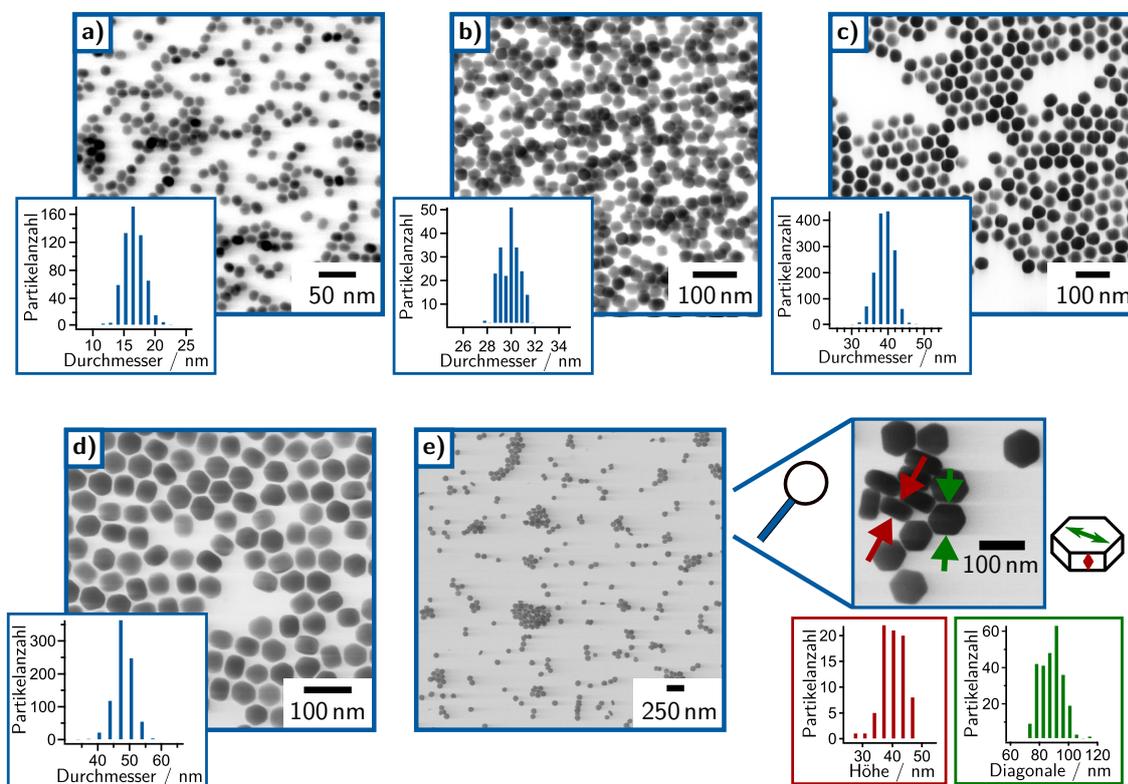
#### 4.4.2.1. Synthese von $\text{NaYF}_4$ : Yb, Er, Gd-UCNP

Es existieren ein Vielzahl an verschiedenen UCNP, die sich sowohl in ihrer Zusammensetzung der Grundstruktur als auch in ihrer Dotierung unterscheiden [164, 180,

233]. UCNP mit einer Grundstruktur aus  $\text{NaYF}_4$  sind die am häufigsten genutzten Partikel, da sie eine Vielzahl an Dotierungen ermöglichen und dabei eine effiziente Aufkonvertierung und keine Absorption im sichtbaren Bereich aufweisen (vgl. Kap. 2.3.2.1) [233]. Mit Ytterbium und Erbium dotierte  $\text{NaYF}_4$ -Partikel weisen die für dieses Projekt nötigen optischen Eigenschaften auf, da sie eine herausragend intensive Bande mit einem Maximum bei 545 nm aufweisen [164, 233]. Eine zusätzliche Dotierung mit Gadolinium ermöglicht in Kombination mit weiteren Reaktionsbedingungen die präzise Einstellung von Form, Größe und Kristallstruktur der Partikel [164, 169]. Für die Synthese der Ausgangspartikel wurden die Vorschriften von *Na et al.* (**UCNP1-UCNP4**) sowie von *Wang et al.* (**UCNP5**) als Grundlage genutzt [164, 169]. Es handelt sich in beiden Fällen um die Synthese der Partikel über eine thermische Zersetzung von Vorstufen [167]. Bei der Methode von *Wang et al.* werden Lanthanoidchloride, stöchiometrische Mengen an  $\text{NH}_4\text{F}$  und  $\text{NaOH}$  als Vorstufen genutzt. Hierbei bestimmt die Menge an eingesetztem Gadolinium, welches Teile der Yttrium-Ionen im Kristallgitter ersetzt, über die Größe und Kristallstruktur der Partikel [164]. Im Unterschied dazu werden bei der Methode von *Na et al.* Lanthanoidoleate genutzt. Hierbei entscheidet sowohl die genutzte Dotierung als auch das Verhältnis des Lösungsmittels 1-Octadecen zum Koordinierenden Liganden Ölsäure über Größe, Form und Kristallstruktur gebildeten der Partikel [169]. Im Rahmen der hier vorgestellten Ergebnisse wurden verschiedene, teils neuartige Kombinationen dieser Syntheseparameter angewendet.

Im Rahmen der hier vorgestellten Ergebnisse wurden weit über 20 Ansätze von mit Oleat funktionalisierten UCNP-Ausgangspartikeln dargestellt. Im Folgenden wird eine Auswahl von fünf Proben mit verschiedenen Größen vorgestellt. Die dargestellten Partikel wurden zunächst mit STEM sowie UC-Emissionsspektroskopie untersucht. Die erhaltenen STEM-Abbildungen sowie die Histogramme der Größenverteilung der Proben **UCNP1** bis **UCNP5** sind in Abbildung 4.74 dargestellt. In Tabelle 4.19 sind die aus diesen Abbildungen erhaltenen Partikel-Durchmesser, deren Größenverteilung sowie die Anisotropie als Quotient der jeweils längeren durch die kürzere Nanopartikelachse dargestellt. Die Partikel der Probe **UCNP5** weisen eine hexagonal prismatische Form auf. Aus diesem Grund sind für diese Probe zwei Längenangaben (Diagonale des Hexagons  $d$  und Höhe des Prismas  $h$ ) mit jeweiliger Größenverteilung angegeben. Zusätzlich sind in Tabelle 4.19 die auf ein Gesamtvolumen von 21 mL

4.4. Untersuchung von multivalenten Wechselwirkungen zwischen Peptiden mit Hilfe des Förster-Resonanzenergietransfers



**Abbildung 4.74.** – STEM-Abbildungen und Histogramme der Größenverteilungen einer Auswahl von im Rahmen dieses Projektes dargestellten Aufkonvertierungsnanopartikeln (UCNP). Für die Proben a) **UCNP1**, b) **UCNP2**, c) **UCNP3**, d) **UCNP4** und e) **UCNP5**. Die Probe **UCNP5** weist eine hexagonale prismatische Form auf. Um dies zu verdeutlichen ist eine STEM-Aufnahme vergrößert dargestellt und bei einem auf der flachen Seite liegenden Prisma die Diagonale grün markiert und bei einem auf der Kante liegenden Prisma die Höhe rot markiert.

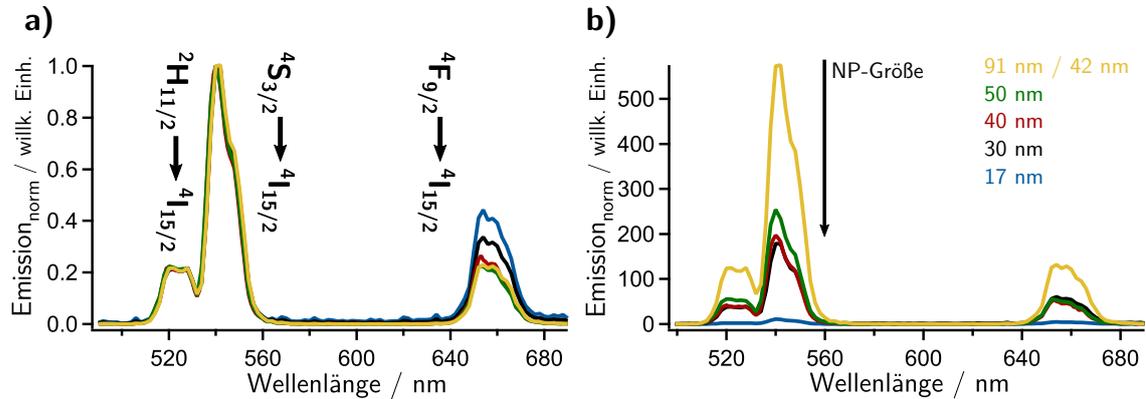
berechneten eingesetzten Volumina von Ölsäure (OA) und 1-Octadecen (ODE) sowie die eingesetzte Menge an Gadolinium-Ionen angegeben. Dies dient dem Vergleich der Synthesebedingungen untereinander und mit der Vorschrift von *Na et al.*, welche alle Synthesen mit 21 mL Gesamtvolumen ( $V_{OA} + V_{ODE}$ ) durchführten. Für alle nach *Na et al.* dargestellten Partikel gilt, dass diese signifikant größer sind als nach den Literaturangaben zu erwarten ist. Die Probe **UCNP1** ist als einzige der hier gezeigten Proben exakt nach einer in der Literatur angegebenen Zusammensetzung dargestellt worden. Mit einem  $Gd^{3+}$ -Anteil von 20% und einem Volumenverhältnis von Ölsäure zu Octadecen von 19 mL zu 2 mL sind nach *Na et al.* sphärische Partikel mit 14 nm Durchmesser zu erwarten. Hierbei ist zu beachten, dass ab einem Volumenverhältnis,

**Tabelle 4.19.** – Angaben der für die Größe und Form der UCNP wichtigen Syntheseparameter sowie der aus diesen resultierenden ermittelten Größen. Wichtige Parameter sind der Anteil an  $\text{Gd}^{3+}$ -Ionen, welcher einen entsprechenden Anteil an  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen substituiert sowie das Verhältnis von eingesetzter Ölsäure (OA) zu 1-Octadecen (ODE), welches hier auf ein wie in der Literatur genutztes Gesamtvolumen von 21 mL berechnet wurde [169]. Angabe der mit STEM ermittelten Durchmesser der Proben **UCNP1** - **UCNP4** sowie die Diagonale  $d$  und Höhe  $h$  der hexagonalen Prismen **UCNP5**. Des Weiteren ist die Anisotropie der Partikel angegeben sowie das Intensitätsverhältnis der Banden um 545 nm und um 660 nm ( $I_{gr}/I_{rot}$ ).

Probe	Anteil $\text{Gd}^{3+}$	$V_{\text{OA}} : V_{\text{ODE}}$	STEM	Anisotropie	
		in mL auf $V_{\text{ges}} = 21 \text{ mL}$	Durchmesser / nm	AI	$I_{gr}/I_{rot}$
<b>UCNP1</b>	20%	19 : 2	$17 \pm 2$	$1.19 \pm 0.10$	$2.2 \pm 0.3$
<b>UCNP2</b>	5%	8 : 13	$30 \pm 1$	$1.11 \pm 0.11$	$2.8 \pm 0.4$
<b>UCNP3</b>	5%	6 : 15	$40 \pm 3$	$1.10 \pm 0.09$	$3.7 \pm 0.6$
<b>UCNP4</b>	5%	6 : 15	$50 \pm 3$	$1.16 \pm 0.04$	$4.3 \pm 0.6$
<b>UCNP5</b>	5%	6.3 : 14.7	$d \ 91 \pm 9, h \ 42 \pm 3$	$2.13 \pm 0.06$	$4.1 \pm 0.5$

welches größer als 6/15 ist, ohne Gadoliniumdotierung Nanopartikelstäbchen zu erwarten sind [169]. Die Gadoliniumdotierung sorgt dafür, dass die Partikel wieder sphärisch werden, zudem sinkt der Durchmesser der Partikel mit steigendem Gadoliniumanteil (vgl. Kap. 2.3.2.2) [164, 169]. Die in Abbildung 4.74a gezeigten Partikel **UCNP1** weisen einen um 21% größeren Durchmesser von  $17 \pm 2 \text{ nm}$  auf und sind mit einer Anisotropie von  $1.19 \pm 0.10$  nahezu sphärisch. Im Fall der anderen Proben ist nur ein indirekter Vergleich möglich, da *Na et al.* Gadoliniumdotierungen mit nur einem Volumenverhältnis ( $V_{\text{OA}}/V_{\text{ODE}}$ : 19/2) durchgeführt haben und die hier dargestellten Partikel mit Volumenverhältnissen von 6/15 (**UCNP3** und **UCNP4**) und 8/13 (**UCNP2**) durchgeführt wurden. Das für die Probe **UCNP2** genutzte Volumenverhältnis ist hierbei erstmalig angewendet worden [169]. Die sphärischen Partikel mit einer Anisotropie von  $1.11 \pm 0.11$  weisen einen Durchmesser von  $30 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$  auf. Dies zeigt, dass schon eine Dotierung mit nur 5%  $\text{Gd}^{3+}$  für sphärische Partikel sorgen kann. Die Partikel **UCNP3** und **UCNP4** wurden mit gleichen Syntheseparametern dargestellt, weisen aber mit Durchmessern von  $40 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$  und  $50 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$  signifikant unterschiedliche Durchmesser auf. *Na et al.* erhielten mit gleichem Volumenverhältnis ( $V_{\text{OA}}/V_{\text{ODE}}$ : 6/15) ohne  $\text{Gd}^{3+}$ -Dotierung sphärische Partikel mit  $24 \text{ nm}$  Durchmesser [169]. Da eine Dotierung mit  $\text{Gd}^{3+}$  den Durchmesser senkt, sind diese Ergebnisse unerwartet. Diese Beobachtungen könnten darauf

schließen lassen, dass der Anteil an  $\text{Gd}^{3+}$  zu gering ist. Eine Messung der **UCNP3** mit Hilfe von ICP-OES ergab für die Zusammensetzung der Partikel eine korrekte  $\text{Gd}^{3+}$ -Dotierung von 5%. Die Partikel **UCNP5** wurden nach der Vorschrift von Wang *et al.* mit einer  $\text{Gd}^{3+}$ -Dotierung von  $5.0\% \pm 0.5\%$  dargestellt. Nach der Vorschrift sind sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 20 nm zu erwarten [164]. Wie in Abbildung 4.74e dargestellt ist, wurden hexagonale Prismen mit einer Diagonale von  $91 \text{ nm} \pm 9 \text{ nm}$  und einer Höhe von  $42 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$  erhalten. Interessant hierbei ist, dass Na *et al.* beschreiben, dass  $\text{Cl}^-$ -Ionen ab einer Konzentration von  $1.2 \text{ mmol L}^{-1}$  das Wachstum entlang der  $\{0001\}$ -Fläche der hexagonalen  $\text{NaYF}_4$ -Kristalle verlangsamen und daher hexagonale Prismen bilden (siehe Kap. 2.3.2.2) [169]. Diese  $\text{Cl}^-$ -Konzentration wird durch den Einsatz von Lanthanoidchloriden bei der Synthese nach Wang *et al.* erreicht [164]. Da es zahlreiche Parameter gibt, die das Ergebnis der Partikelgröße und Form beeinflussen können, ist es schwer auszumachen, aus welchem Grund die erhaltenen Partikel nicht exakt wie in der Literatur beschrieben realisiert werden konnten. Ein kritischer Faktor ist mit Sicherheit das Ölsäurevolumen in der Lösung und auch die Qualität dieser. Während der Synthesen wurde beobachtet, dass bei der Nutzung bestimmter Chargen Ölsäure keine monodispersen Partikel erhalten werden konnten. Da die Partikel für mehrstufige Umfunktionalisierungen genutzt werden sollten, wurden vier- bis sechsfache Ansatzgrößen gewählt. Es wurde beobachtet, dass dies die Zeit verlängerte bis die benötigte Temperatur von  $300^\circ\text{C}$  erreicht wurde. Des Weiteren wurde ein geringer, aber nicht vermeidbarer Verlust von Lösungsmittel durch Evaporation im Argonstrom beobachtet. Dies kann die Abweichungen zwischen einzelnen Synthesen und die Unterschiede zur Literatur durchaus erklären, da schon vor Erreichen von  $300^\circ\text{C}$  eine Nukleation stattfinden kann [164]. Da die erhaltenen Partikel stabil und monodispers vorlagen, sind sie für die geplanten Experimente hervorragend geeignet, vorausgesetzt sie weisen die Fähigkeit zur Aufkonvertierung auf. Die nach Anregung mit 980 nm Laserstrahlung ( $4.2 \text{ W cm}^{-2}$ ) erhaltenen Emissionsspektren (im Folgenden als UC-Spektren bezeichnet) der Partikel **UCNP1** bis **UCNP5** sind in Abbildung 4.75 dargestellt. Alle dargestellten Partikel zeigen für FRET-Experimente ausreichende Emission, dies wird im Folgenden dargestellt. In Abbildung 4.75a sind die UC-Spektren auf das Maximum der Bande bei 542 nm normiert, so dass die unterschiedlichen Intensitäten der Bande bei 660 nm hervorgehoben werden. Man kann erkennen, dass die Bande

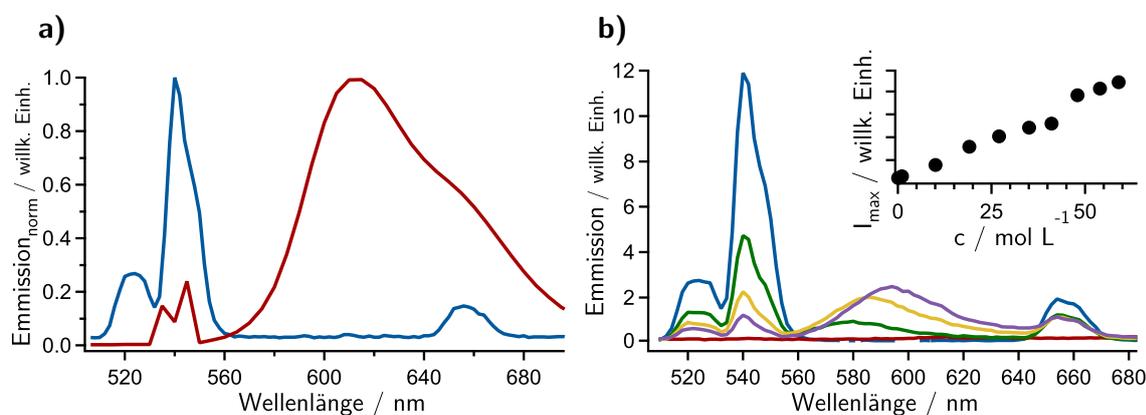


**Abbildung 4.75.** – a) Auf die Bande im Bereich von 545 nm normierte UC-Spektren der Proben **UCNP1** (blau), **UCNP2** (schwarz), **UCNP3** (rot), **UCNP4** (grün) und **UCNP5** (gelb) sowie die zu den Banden führenden atomaren Übergänge in  $\text{Er}^{3+}$ . b) Die unter a) gezeigten UC-Spektren mit gleicher Farbzuordnung auf die Konzentration (g/L) der gemessenen Proben normiert. Die Durchmesser der Proben **UCNP1** bis **UCNP4** sowie die Diagonale und Höhe der **UCNP5**-Partikel sind zum Vergleich mit den Intensitäten der Spektren in jeweils der passenden Farbe dargestellt.

im Bereich von 660 nm für die kleinen Partikel **UCNP1**, relativ betrachtet am intensivsten ist und mit steigender Partikelgröße schwächer wird. Es ist bekannt, dass das Intensitätsverhältnis der „grünen“ Bande im Bereich von 545 nm zu der „roten“ Bande im Bereich von 660 nm ( $I_{gr}/I_{rot}$ ) mit steigender Partikelgröße ebenso wie die Effizienz der Aufkonvertierung steigt [157, 163, 168, 377]. Die aus diesen UC-Spektren ermittelten Intensitätsverhältnisse sind in Tabelle 4.19 dargestellt. Die Beobachtungen sind auf das erhöhte Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis zurückzuführen, welches mit sinkender Partikelgröße steigt, wodurch sich die Anzahl von Oberflächendefekten steigert, welche die Aufkonvertierungseffizienz mindern [157]. Des Weiteren spielen bei einem hohen Verhältnis von Oberfläche zu Volumen auch Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel eine steigende Rolle. Da Carbonsäureschwingungen und Schwingungen von Kohlenwasserstoffen im gleichen Energiebereich ( $2800\text{ cm}^{-1}$ -  $3600\text{ cm}^{-1}$ ) liegen wie einige Übergänge in  $\text{Er}^{3+}$ , kann die Energie bei einer hohen Oberfläche effizient über die Liganden abgegeben werden [157, 163]. Dies gilt insbesondere für den strahlungslosen Übergang  ${}^4I_{11/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ , welcher entscheidend an der Population des mit 660 nm strahlenden Übergangs  ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$  beteiligt ist (siehe Kap. 2.3.2.1) [163]. Aus diesem Grund sinkt das Verhältnis  $I_{gr}/I_{rot}$  mit sinkender Partikelgröße und wenn die Partikel in stärker Wechselwirkende Lösungsmittel wie z.B. Wasser

überführt werden [163, 168]. In Abbildung 4.75b sind die Spektren der Partikel auf ihre Konzentration normiert dargestellt, so dass der oben beschriebene Effekt der Partikelgröße auf die Aufkonvertierungseffizienz beobachtet werden kann. Die hexagonalen Prismen **UCNP5** weisen die intensivste Emission auf, welche dann für die anderen Partikel mit sinkendem Durchmesser sinkt.

Um die Eignung der Partikel für FRET-Messungen zu überprüfen, wurden zunächst FRET-Experimente mit freien Farbstoffen und den am schwächsten leuchtenden Partikeln **UCNP1** durchgeführt. In Abbildung 4.76a sind normierte Emissionsspektren der Probe **UCNP1** sowie des Laserfarbstoffs Rhodamin 101 als einzelne Lösungen in Chloroform dargestellt. In Abbildung 4.76b sind Emissionsspektren von



**Abbildung 4.76.** – a) Emissionsspektrum von Rhodamin 101 in Chloroform nach Anregung mit 545 nm (rot) sowie UC-Spektrum der Probe **UCNP1** in Chloroform nach Anregung mit 980 nm ( $4.2 \text{ W cm}^{-2}$ ) (blau). b) Emissionsspektren von einer Dispersion der Partikel **UCNP1** mit verschiedenen Konzentrationen von Rhodamin 101 (Rh101) in Chloroform nach ausschließlicher Anregung mit 980 nm Strahlung. Reine **UCNP1**-Partikel (blau), reiner Farbstoff Rh101 (rot),  $c(\text{Rh101})$ :  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  (grün),  $c(\text{Rh101})$ :  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  (gelb),  $c(\text{Rh101})$ :  $90 \mu\text{mol L}^{-1}$  (violett). Im eingefügten Grafen sind die Maxima des FRET-Signals als Funktion der Farbstoffkonzentration aufgetragen.

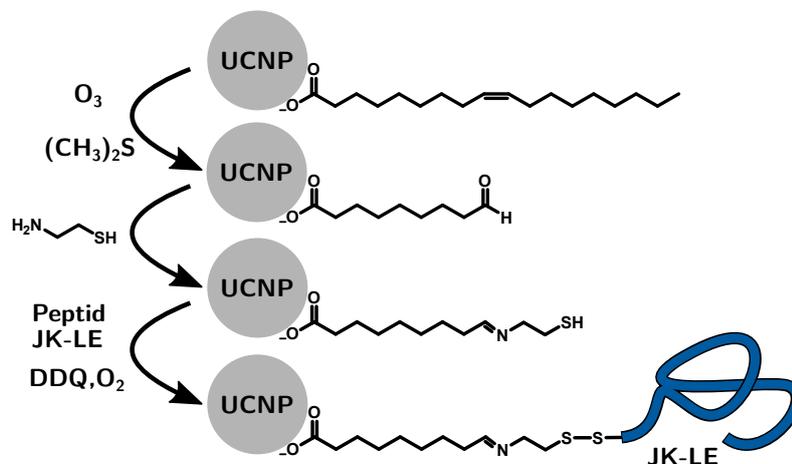
Mischungen der Probe **UCNP1** mit unterschiedlichen Konzentrationen von Rhodamin 101 nach ausschließlicher Anregung mit 980 nm Laserstrahlung ( $4.2 \text{ W cm}^{-2}$ ) dargestellt. Zusätzlich ist auch das Emissionsspektrum von reinem Rhodamin 101 nach Anregung mit 980 nm Laserstrahlung in Abbildung 4.76b dargestellt (rote Linie). In Abwesenheit von Aufkonvertierungspartikeln ist keine Emission zu beobachten. In Anwesenheit von UCNP ist mit zunehmender Konzentration von Rhodamin 101 eine zunehmende Emissionsbande im Bereich zwischen den UC-Banden zu beob-

achten, welche dem Farbstoff zugeordnet werden kann. Diese Emission wird auf FRET zwischen den UCNP und dem Farbstoff zurückgeführt und steigt linear mit der Konzentration des Farbstoffes an (siehe eingefügter Graph in Abb. 4.76b). Das hier gezeigte Experiment beweist, dass auch die am schwächsten Leuchtenden Partikel **UCNP1** als FRET-Donoren geeignet sind. Aus diesem Grund können die hier gezeigten Partikel alle als potentielle Kandidaten für die Peptidfunktionalisierung genutzt werden. Im folgenden Abschnitt sollen die Partikel so umfunktionalisiert werden, dass ein am N-Terminus mit Cystein funktionalisiertes Peptid über eine Disulfidbrücke konjugiert werden kann.

#### 4.4.2.2. Umfunktionalisierung der UCNP

Es gibt zahlreiche Möglichkeiten, Aufkonvertierungspartikel umzufunktionalisieren. Möglichkeiten stellen unter anderem Ligandenaustauschreaktionen [173, 174, 180, 378] oder das Umschließen der bereits bestehenden Ligandenhülle mit neuen Liganden dar [168]. Letztere Möglichkeit ist für FRET-Experimente jedoch nicht geeignet, da der Abstand zwischen Donor und Akzeptor durch die neuen Liganden signifikant vergrößert wird [168]. Eine weitere Möglichkeit stellt die chemische Veränderung der bereits gebundenen Liganden dar [177, 379]. Mit Ölsäure funktionalisierte Partikel bieten die Möglichkeit, chemische Reaktionen an der Doppelbindung durchzuführen [177, 379]. *Zhou et al.* veröffentlichten 2009 eine Methode um mit Ölsäure funktionalisierte  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ -Partikel mit Ozonolyse in ein reaktives Aldehyd umzufunktionalisieren und danach in situ mit Cysteamin über eine kovalente Kupplung zwischen Amin und Aldehyd Partikel mit Thiol-Gruppen auf der Oberfläche zu erhalten [177]. Die Peptide sollen im Rahmen dieser Ergebnisse zur Vermeidung einer umständlichen Schutzgruppenchemie, welche im Fall einer Kupplung über eine Peptidbindung notwendig wäre, über Disulfidbrücken konjugiert werden. Aus diesem Grund wurde die Methode der chemischen Umfunktionalisierung der Ölsäure auf den Partikeln nach *Zhou et al.* gewählt. In Abbildung 4.77 ist das Konzept der Umfunktionalisierung, ausgehend von den mit Ölsäure funktionalisierten Partikeln, hin zu den mit Peptid funktionalisierten Aufkonvertierungspartikeln schematisch dargestellt. Die reduktive Aufarbeitung nach der Ozonolyse ermöglicht es, die Oxidation auf der Stufe eines Aldehydes zu stoppen und so 9-Oxononansäure zu erhalten [177]. Der Aldehyd ist

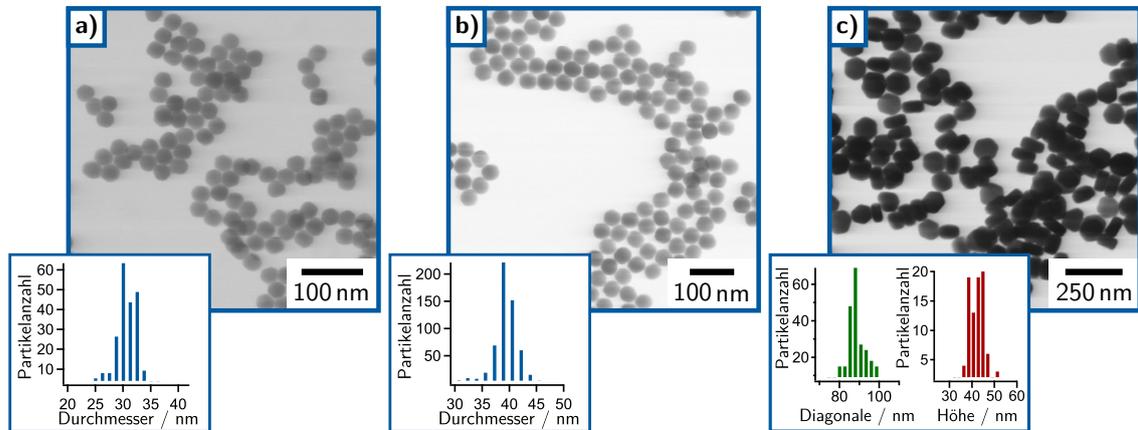
4.4. Untersuchung von multivalenten Wechselwirkungen zwischen Peptiden mit Hilfe des Förster-Resonanzenergietransfers



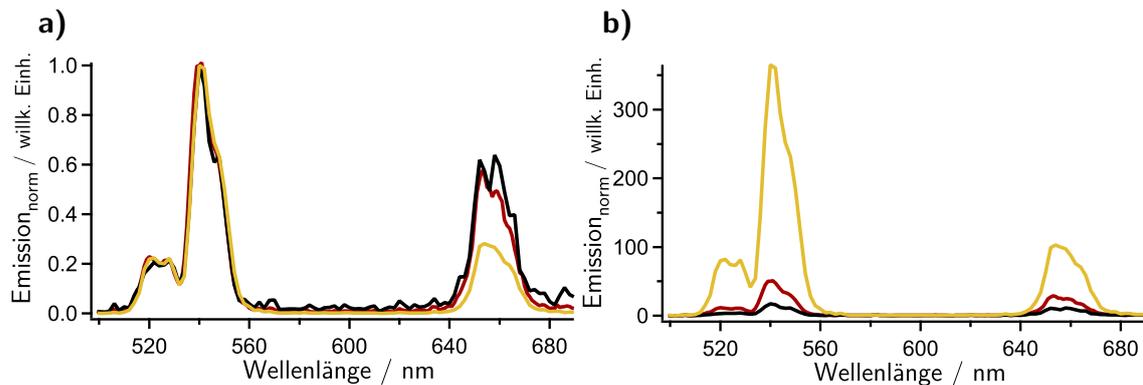
**Abbildung 4.77.** – Konzept der Umfunktionalisierung der UCNP, ausgehend von Ölsäureliganden, hin zu einer Teilfunktionalisierung mit dem Peptid **JK-LE**. Die reduktive Aufarbeitung mit Dimethylsulfid nach der Ozonolyse liefert den Aldehyd 9-Oxononansäure, der mit nicht stöchiometrischen Mengen Cysteamin eine kovalente Bindung durch Bildung einer Schiffsbasis eingeht [177]. Die Peptidkonjugation erfolgt über Disulfidbrücken und liefert mSAM-Partikel.

gegenüber Aminen reaktiv und kann mit Cysteamin eine Schiffsbasis bilden, so dass die Liganden nun dem Lösungsmittel eine Thiol-Gruppe präsentieren [177]. Da die Peptide auf der Partikeloberfläche ausreichend Platz benötigen, um mit dem freien Peptid-Monomer Heterodimere bilden zu können, sollen nicht alle Liganden mit Peptid konjugiert werden. Daher werden nicht stöchiometrische Mengen der Aldehyde (ca. 1/20) mit Cysteamin funktionalisiert. Die Bildung der Disulfidbrücke zwischen Peptid und Partikel wird durch Zugabe des Oxidationsmittels 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (DDQ) beschleunigt [380]. In Abbildung 4.78 sind STEM-Aufnahmen von den Partikeln **UCNP2**, **UCNP3** und **UCNP5** nach erfolgter Ozonolyse zusammen mit Histogrammen der Größenverteilung dargestellt. Die als Proben **UCNP6**, **UCNP7** und **UCNP8** benannten Partikel wurden mit Ausbeuten von  $20\% \pm 2\%$  erhalten und weisen in den STEM-Abbildungen keine signifikanten Unterschiede zu den Ausgangspartikeln auf. Die nun mit Aldehyd funktionalisierten Partikel wurden in Ethanol redispergiert, welches durch die Schwingungen der OH-Gruppe einen größeren Einfluss auf die Aufkonvertierungsprozesse hat als die zuvor genutzten Lösungsmittel Hexan und Cyclohexan [163, 168]. Dieser Effekt ist in den UC-Spektren in Abbildung 4.79 dargestellt. Anhand der auf die Bande bei 542 nm normierten UC-Spektren in Abbildung 4.79a kann beobachtet werden, dass die Intensitätsver-

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.78.** – STEM-Abbildungen und Histogramme der Größenverteilungen der durch Ozonolyse erhaltenen Aufkonvertierungspartikel a) **UCNP6**, **UCNP7** und b) **UCNP8**.



**Abbildung 4.79.** – a) Auf die Bande bei 542 nm normierte UC-Spektren der Partikel **UCNP6** (schwarz), **UCNP7** (rot) und **UCNP8** (gelb) in Ethanol. b) Auf die Konzentration normierte UC-Spektren derselben Proben mit gleicher Farbzueordnung.

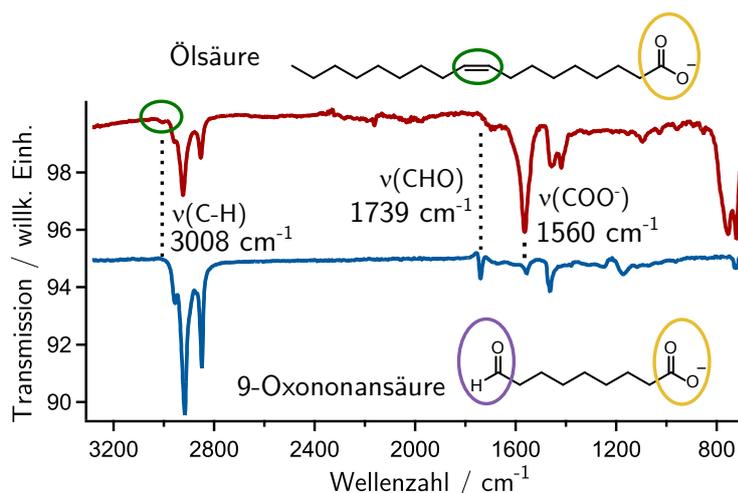
hältnisse ( $I_{gr}/I_{rot}$ ) im Vergleich zu denen der mit Oleat funktionalisierten Partikel abnehmen. Zudem ist anhand der auf die Konzentration normierten Spektren in Abbildung 4.79b zu erkennen, dass die Intensitäten geringer geworden sind. Insbesondere gilt dies für die kleineren Partikel **UCNP6** und **UCNP7**, die ein erhöhtes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis aufweisen und so stärker durch Ethanol gequencet werden [163]. Die erhaltenen Ergebnisse zu Durchmessern, Größenverteilungen, ( $I_{gr}/I_{rot}$ ) und Konzentrationen sind in Tabelle 4.20 dargestellt. Um die Umfunktionalisierung nachzuweisen wurden die Partikel mit IR-Spektroskopie untersucht. Diese Methode benötigt im Vergleich zu Thermogravimetrie wesentlich geringere Mengen an Pro-

#### 4.4. Untersuchung von multivalenten Wechselwirkungen zwischen Peptiden mit Hilfe des Förster-Resonanzenergietransfers

**Tabelle 4.20.** – Konzentrationen der erhaltenen Dispersionen und die mit Hilfe von STEM ermittelten Durchmesser der Proben **UCNP6** und **UCNP7** sowie die Diagonale  $d$  und Höhe  $h$  der hexagonalen Prismen **UCNP8** mit ermittelter Größenverteilung. Des Weiteren sind die Intensitätsverhältnisse der Banden um 545 nm und um 660 nm ( $I_{gr}/I_{rot}$ ) der ozonolysierten Partikel sowie zum Vergleich der entsprechenden Ausgangspartikel dargestellt.

Probe	STEM Durchmesser / nm	Konzentration $\text{g L}^{-1}$	$I_{gr}/I_{rot}$	$I_{gr}/I_{rot}$ Ausgangspartikel
<b>UCNP6</b>	$31 \pm 2$	$0.4 \pm 0.1$	$1.3 \pm 0.2$	$2.8 \pm 0.2$
<b>UCNP7</b>	$40 \pm 2$	$0.9 \pm 0.1$	$1.7 \pm 0.2$	$3.7 \pm 0.2$
<b>UCNP8</b>	$d 89 \pm 6, h 43 \pm 4$	$0.4 \pm 0.1$	$3.3 \pm 0.4$	$4.1 \pm 0.4$

be und wird häufig zur Untersuchung von auf Oberflächen adsorbierten Liganden genutzt [177, 248–250, 381]. In Abbildung 4.80 sind beispielhaft IR-Spektren der Ausgangspartikel **UCNP2** und der aus diesen erhaltenen mit Aldehyd funktionalisierten Partikel **UCNP6** dargestellt. Die Schwingungen der funktionellen Gruppen,



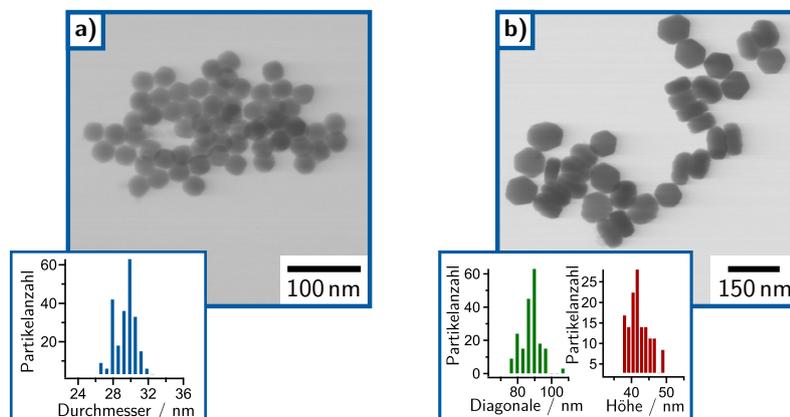
**Abbildung 4.80.** – IR-Spektren der mit Oleat funktionalisierten Partikel **UCNP1** (rote Linie) sowie der aus diesen dargestellten Partikel **UCNP3** (blaue Linie). Die für das Nachvollziehen der Umfunktionalisierung wichtigen Schwingungen und funktionelle Gruppen sind farbig markiert.

die durch die Umfunktionalisierung verschwinden oder ihre Position ändern sind in der Abbildung farbig markiert und zeigen den Erfolg der Umfunktionalisierung. Durch die Ozonolyse wird die Doppelbindung der Ölsäure gebrochen. Da die C-H Streckschwingung der Doppelbindung ( $\nu =\text{C-H}$ ) bei  $3008 \text{ cm}^{-1}$  nach der Ozonolyse nicht mehr zu beobachten ist, deutet dies auf einen Erfolg der Reaktion hin. Im

IR-Spektrum der Ausgangspartikel ist keine Schwingung einer freien Carbonsäure, welche im Bereich von  $1710\text{ cm}^{-1}$  bis  $1760\text{ cm}^{-1}$  zu erwarten wäre, zu beobachten. Dies zeigt, dass keine freie Ölsäure in der Dispersion vorliegt. Nach der Ozonolyse ist eine Schwingung in diesem Bereich zu beobachten, welche der Streckschwingung der neu entstandenen Aldehydgruppe ( $\nu_s$   $1739\text{ cm}^{-1}$ , CHO) zugeordnet wird [177, 382]. In beiden Proben sind die symmetrische und asymmetrische Streckschwingung der Carboxylatgruppe ( $\nu_{as}$   $1560\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{COO}^-$  sowie  $\nu_s$   $1460\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{COO}^-$ ) zu beobachten, welche mit Metallionen auf der Partikeloberfläche koordiniert sind [248]. Mit Hilfe der Energiedifferenz zwischen den Carboxylat-Streckschwingungen können Informationen über die Art der Koordination der Liganden auf die Partikeloberfläche erhalten werden [248, 381]. Die symmetrische Streckschwingung ist allerdings von Deformationsschwingungen der  $\text{CH}_2$ -Gruppen bei  $1459\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{as}$ ) überlagert und sorgt so für eine gewisse Unsicherheit der Bestimmung der Energiedifferenz [248]. Die ermittelte Energiedifferenz liegt im Fall der Probe **UCNP2** bei  $105\text{ cm}^{-1} \pm 10\text{ cm}^{-1}$  und für die Probe **UCNP6** bei  $95\text{ cm}^{-1} \pm 10\text{ cm}^{-1}$  und spricht für eine zweizählige Koordination der Carboxylatgruppe mit einem Metallion auf der Partikeloberfläche [248, 381]. Eine überbrückende Koordination in der eine Carboxylatgruppe mit zwei Metallionen koordiniert ist, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden und kann auch parallel vorliegen [248]. Ausgeschlossen werden kann aber eine einzählige Koordination, welche Energiedifferenzen von über  $200\text{ cm}^{-1}$  zur Folge hätte [248]. Diese Ergebnisse zeigen den Erfolg der Umfunktionalisierung, so dass anschließend die Teilfunktionalisierung der Partikel mit Thiolen durchgeführt wurde.

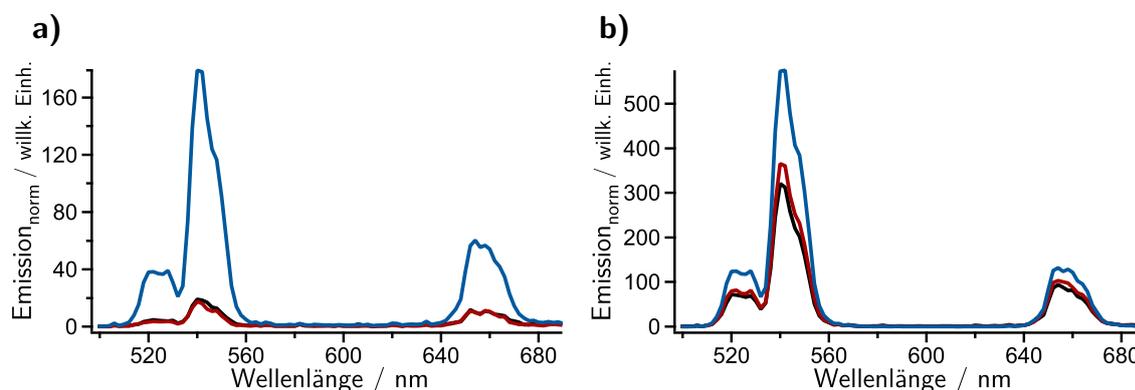
Zunächst wurden die Partikel **UCNP6** mit Cysteamin zu den Partikeln **UCNP9** umgesetzt. Zu einem späteren Zeitpunkt, d.h. direkt vor der Peptidkonjugation wurden auch die Partikel **UCNP8** zu den Partikeln **UCNP10** umgesetzt. Die Partikel wurden in Ausbeuten von  $23\% \pm 2\%$  erhalten und in Ethanol redispersiert. Die Ausbeute der gesamten Umfunktionalisierung beträgt damit ca. 5% und veranschaulicht, dass große Ansätze für die mit Oleat funktionalisierten Partikel notwendig sind [168]. Die STEM-Aufnahmen der Proben **UCNP9** und **UCNP10**, einschließlich von Histogrammen der Größenverteilung sind in Abbildung 4.81 dargestellt. Die Partikel zeigen keine signifikanten Änderungen von Größe und Form in Bezug auf ihre Ausgangspartikel. Die UC-Spektren der Partikel haben sich im Vergleich zu den mit Aldehyd funktionalisierten Partikeln nicht signifikant verändert. In Abbil-

4.4. Untersuchung von multivalenten Wechselwirkungen zwischen Peptiden mit Hilfe des Förster-Resonanzenergietransfers



**Abbildung 4.81.** – STEM-Abbildungen und Histogramme der Größenverteilungen der mit Thiol teilfunktionalisierten Partikel a) UCNP9 und b) UCNP10.

Abbildung 4.82 zeigt auf die Konzentration normierte UC-Spektren der beiden mit Thiol funktionalisierten Partikel jeweils zusammen mit den UC-Spektren der beiden Vorgängerpartikel dargestellt. Die Intensitäten der konzentrationsnormierten UC-Spektren



**Abbildung 4.82.** – a) Auf die Konzentration normierte UC-Spektren der Partikel UCNP2 in n-Hexan (blaue Linie), UCNP6 in Ethanol (rote Linie) und UCNP9 in Ethanol. b) Auf die Konzentration normierte UC-Spektren der Partikel UCNP5 in n-Hexan (blaue Linie), UCNP8 in Ethanol (rote Linie) und UCNP10 in Ethanol.

der mit Thiolen funktionalisierten Partikel (schwarze Linien, Abb. 4.82), stimmen im Rahmen der Fehlergrenzen der bestimmten Konzentrationen (siehe Tabelle 4.21) mit den ozonolysierten Partikeln (rote Linien, Abb. 4.82) überein. Sowohl für die Partikel UCNP2 mit 30 nm Durchmesser (Abb. 4.82a) als auch für die hexagonalen Prismen UCNP5 (Abb. 4.82b) ist eine deutliche Abnahme der Emissionsintensität durch

**Tabelle 4.21.** – Konzentration der erhaltenen Dispersionen und die mit Hilfe von STEM ermittelten Durchmesser der Probe **UCNP9** sowie die Diagonale d und Höhe h der hexagonalen Prismen **UCNP10** mit ermittelter Größenverteilung. Des Weiteren sind die Intensitätsverhältnisse der Banden um 545 nm und um 660 nm ( $I_{gr}/I_{rot}$ ) dargestellt.

Probe	STEM Durchmesser / nm	Konzentration g L <sup>-1</sup>	$I_{gr}/I_{rot}$
<b>UCNP9</b>	31 ± 2	0.10 ± 0.05	1.5 ± 0.2
<b>UCNP10</b>	d 89 ± 6, h 43 ± 3	0.20 ± 0.05	3.2 ± 0.3

Quenching von Ethanol bei den umfunktionalisierten Partikeln zu beobachten. Der Unterschied der Integrale im Bereich von 505 nm bis 565 nm in den UC-Spektren der Partikel vor und nach Umfunktionalisierung und Redispergieren in Ethanol beträgt für die kleineren Partikel **UCNP2** 91% ± 18% und für die Probe **UCNP5** 37% ± 7%. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Annahme, dass die größeren Partikel **UCNP5** aufgrund ihres geringeren Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses weniger durch Quenching von Prozessen an der Oberfläche beeinflusst werden [157, 163, 168]. Anhand der Probe **UCNP9** wurde beobachtet, dass die Partikel nach ca. zwei Tagen anfangen zu aggregieren. Dies wurde an weiteren Ansätzen (Daten nicht gezeigt) beobachtet und wird auf Disulfidbrückenbildung zwischen den Partikeln zurückgeführt. Eine Reduktion der Disulfide mit TCEP oder Mercaptoethanol konnte die Partikel nicht wieder redispergieren. Aus diesem Grund wurden die Partikel **UCNP10** erst nach Fertigstellung des Peptids **JK-LE** kurz vor der Kupplung dargestellt.

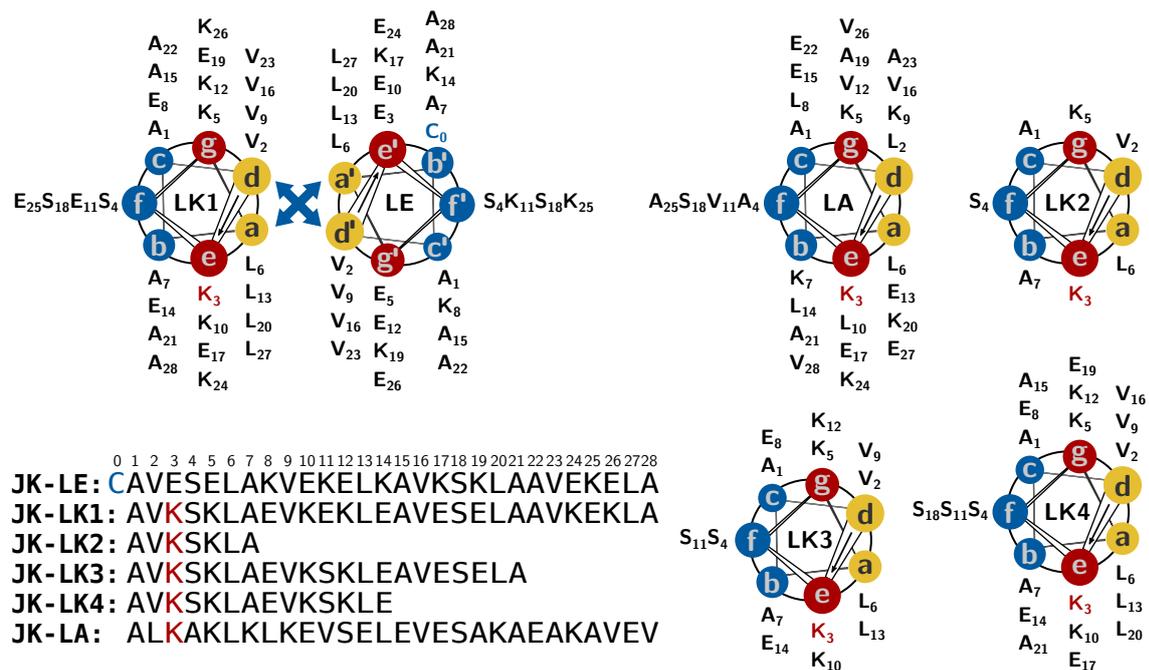
Im Folgenden Abschnitt wird zunächst die Synthese und Charakterisierung der Peptide für die Partikelkonjugation (**JK-LE**), das bindende Monomer mit maximaler Valenz (**JK-LK1**) sowie das Referenzpeptid, welches keine Dimere mit **JK-LE** bilden kann (**JK-LA**) beschrieben.

#### 4.4.2.3. Design, Synthese und Charakterisierung der Peptide

Die für dieses Projekt herzustellenden Peptide (siehe Abb. 4.83) müssen eine Vielzahl von Anforderungen erfüllen. Zunächst müssen sie, bis auf das Referenzpeptid **JK-LA**, alle in der Lage sein, *Coiled-Coil*-Heterodimere zu bilden, aber keine Homodimere. Des Weiteren müssen die freien Peptide **JK-LKx** mit TAMRA markiert werden und das für die Immobilisierung bestimmte Peptid **JK-LE**, muss Cystein aufweisen, um an die Partikel konjugiert werden zu können. Damit die Heterodimerbildung mittels CD-

4.4. Untersuchung von multivalenten Wechselwirkungen zwischen Peptiden mit Hilfe des Förster-Resonanzenergietransfers

Spektroskopie verfolgt werden kann, sollen die Peptidmonomere in einer ungeordneten Struktur (*Random Coil*) vorliegen (siehe Kap. 2.6.6). Diese Anforderungen erfordern ein spezifisches Peptid-Design, welches in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Beate Kokschi an der Freien Universität Berlin von Dr. Kristin Folmert erstellt wurde. In Abbildung 4.83 sind die Aminosäuresequenzen und Helixrad-Darstellungen der Peptide gezeigt. In diesen Darstellungen wird jede Position alle zwei Helixwindungen



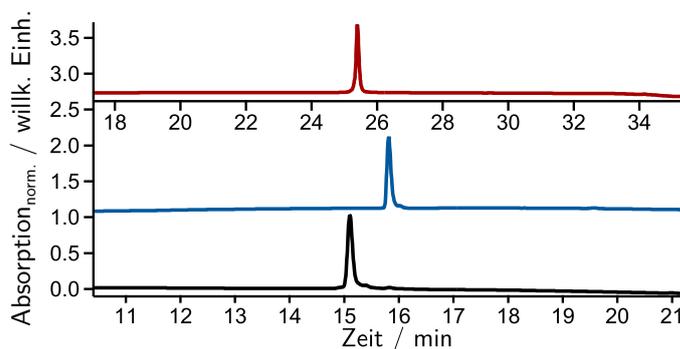
**Abbildung 4.83.** – Aminosäuresequenzen in Einbuchstabencode und sogenannte Helixrad-Darstellungen des für die Partikelimmobilisierung bestimmten Peptids **JK-LE**, des nicht wechselwirkenden Referenzpeptids **JK-LA** sowie der Heterodimer bildenden Peptide mit unterschiedlicher Länge und Valenz (n) **JK-LK1** (n: 16), **JK-LK2** (n: 4), **JK-LK3** (n: 8) sowie **JK-LK4** (n: 12). Das zur Kupplung an die Partikel genutzte Cystein von **JK-LE** ist blau, die zur Markierung mit TAMRA genutzten Lysine sind rot hervorgehoben.

bzw. nach 7 Aminosäuren wieder mit einer ähnlichen Aminosäure besetzt. Zum Beispiel bilden die gelb markierten Positionen (a, a', d und d') den hydrophoben Kern der Peptide, in dem die Seitenketten der verwendeten Aminosäuren Leucin und Valin durch hydrophobe Wechselwirkungen, wie in einer Art Reißverschluss die *Coiled-Coil*-Struktur stabilisieren und so zur Dimerisierung beitragen [210]. Je zwei dieser hydrophoben intermolekularen Wechselwirkungen werden pro 7 Aminosäuren ausgebildet. Die in den Helixrad-Darstellungen rot markierten Positionen (e, e',

g und g') werden durch die geladenen Aminosäuren Lysin (positiv geladen) und Glutaminsäure (negativ geladen) besetzt. Diese sind in den Peptiden **JK-LE** und **JK-LKx** invers angeordnet, so dass sich zwei gleiche Moleküle **JK-LE** oder **JK-LKx** sowohl in paralleler als auch in antiparalleler Ausrichtung abstoßen (Homodimere werden verhindert). Im Gegensatz dazu werden ein Peptid **JK-LE** und ein Peptid **JK-LKx** voneinander angezogen (Heterodimere werden gebildet). Pro 7 Aminosäuren werden so zwei ionische Bindungen ausgebildet [210]. Daraus folgt, dass eine sieben Aminosäuren umfassende Sequenz, welche auch als Heptadenmuster bezeichnet wird, eine Valenz von 4 aufweist. Die Peptide **JK-LKx** sind daher in vielfachen von 7 Aminosäuren aufgebaut. Die in den Helixrad-Darstellungen blau markierten Positionen sind für die Wechselwirkungen nicht maßgeblich relevant und sind in den *Coiled-Coil*-Dimeren zum Lösungsmittel hin ausgerichtet. Daher bestimmen sie die Löslichkeit der Peptide und werden des Weiteren genutzt, um mit den entsprechenden Aminosäuren, die Ladung der Aminosäuren in Position e und g bzw. e' und g' auszugleichen (Positionen 25, 14, 11, 8, vgl. Abb. 4.83). In den kürzeren Peptiden **JK-LK4**, **JK-LK3** ist die Aminosäure Glutaminsäure in Position 11 gegen die, die Löslichkeit verbessernde Aminosäure Serin, ausgetauscht. Im Peptid **JK-LE** befindet sich am N-Terminus ein Cystein für die Kupplung an die Partikel, in allen anderen Peptiden befindet sich in Position 3 ein mit TAMRA markiertes Lysin. Das Referenzpeptid **JK-LA** ist aus den gleichen Aminosäuren wie **JK-LK1** zusammengesetzt, weist jedoch eine willkürliche Aminosäuresequenz auf, die keine *Coiled-Coil*-Struktur begünstigt.

Die Synthese der Peptide wurde nach der Fmoc-Festphasenpeptidsynthese vom Autor in den Laboren der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beate Koksich durchgeführt [262]. Es wurden zunächst nur die Peptide **JK-LE**, **JK-LK1** und **JK-LA** vollständig dargestellt, um mit diesen einen Machbarkeitsnachweis zu erhalten. Die Peptide mit geringerer Valenz wurden noch nicht mit TAMRA markiert und wurden an der festen Phase belassen. Die dargestellten Peptide wurden nach der Vollabspaltung von der festen Phase zunächst mit präparativer HPLC aufgereinigt und anschließend mit analytischer HPLC untersucht. Die erhaltenen Chromatogramme der drei Peptide sind in Abbildung 4.84 gezeigt. Die in den Chromatogrammen zu sehenden Peaks wurden mit Hilfe von ESI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert und den Peptiden zugeordnet. Die Reinheit wurde aus dem Verhältnis der Peakfläche des jeweiligen Peptids im

4.4. Untersuchung von multivalenten Wechselwirkungen zwischen Peptiden mit Hilfe  
des Förster-Resonanzenergietransfers



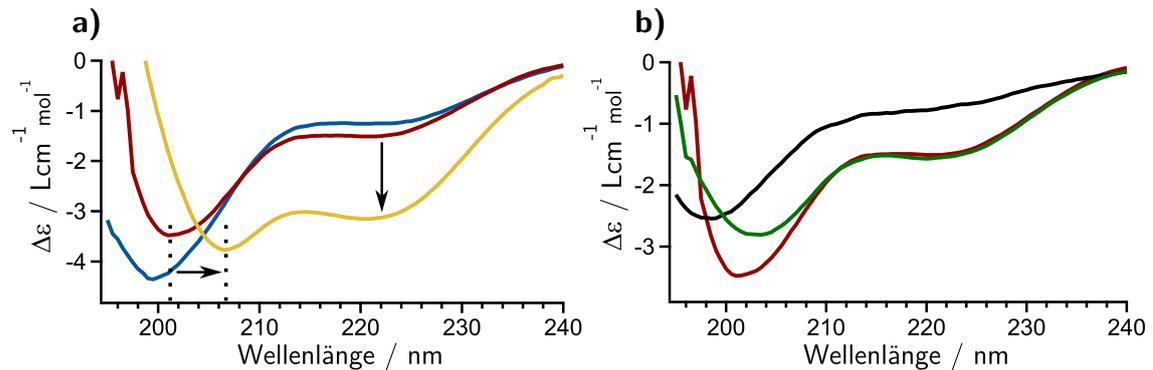
**Abbildung 4.84.** – Chromatogramme der Peptide **JK-LE** (blau), **JK-LA** (schwarz) und **JK-LK1** (rot) bei einer Detektionswellenlänge von 220 nm.

**Tabelle 4.22.** – Mit ESI-TOF-Massenspektrometrie ermittelte Massen sowie die mit HPLC erhaltenen Retentionszeiten der Peptide **JK-LE**, **JK-LK1** und **JK-LA**. Die Retentionszeiten  $t_R$  sind von den genutzten HPLC-Geräten und Gradienten (AGx, siehe Kap. 3.1.5.4) abhängig.

Peptid	Ladung	$m_{\text{calc}}$ in m/z	$m_{\text{obs}}$ in m/z	$t_R$ in min	HPLC + Gradient
JK-LE	+3	1038.5883	1038.5882		LaChrom-Elite
	+4	779.1932	779.1995	15.83	C18
	+5	623.5561	623.5568		AG1
JK-LK1	+3	1141.6327	1141.6382		LaChrom-Elite
	+4	856.4765	856.4788	25.40	C18
	+5	685.3827	685.3824		AG2
JK-LA	+3	1141.6327	1141.6304		LaChrom-Elite
	+4	856.4765	856.4758	15.10	C18
	+5	685.3827	685.3825		AG1

Vergleich zu der Summe aller Peakflächen im Chromatogramm abgeschätzt und ist in allen Fällen größer als 95%. Die mit ESI-TOF-Massenspektrometrie ermittelten Massen sowie die in den HPLC-Messungen ermittelten Retentionszeiten der Peptide **JK-LE**, **JK-LK1** und **JK-LA** sind in Tabelle 4.22 dargestellt. Um den Erfolg des Peptid-Designs zu überprüfen, wurden die Peptide mittels CD-Spektroskopie untersucht. Die Messlösungen wurden hierfür aus Stammlösungen hergestellt, deren Konzentration mittels UC/VIS-Absorptionsspektroskopie ermittelt wurde (vgl. Kap. 3.5.1). Es wurden CD-Spektren der einzelnen Peptide in Puffer (50 mmol L<sup>-1</sup> Tris-Puffer, pH 7.4) sowie von Mischungen aus dem Peptid **JK-LE** mit dem *Coiled Coil* bildenden **JK-LK1** oder dem Referenzpeptid **JK-LA** aufgenommen. Hierbei wurde beobachtet, dass das thiolhaltige Peptid **JK-LE** wahrscheinlich Dimere über

Disulfidbrücken ausbildet, welche helikale Strukturen aufweisen. Daher war es nötig, das Reduktionsmittel TCEP zur Messlösung hinzuzufügen ( $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ ), um die Disulfidbrücken zu reduzieren. Diese Erkenntnis ist für die Kupplung des Peptids an die Nanopartikel von allergrößter Wichtigkeit, da die Disulfidbrücken vor der Kupplung gespalten werden müssen (vgl. Kap.4.4.2.4). Die erhaltenen CD-Spektren sind in Abbildung 4.85 dargestellt. In Abbildung 4.85a sind die *Coiled Coil* bildenden Peptide



**Abbildung 4.85.** – a) CD-Spektren der Peptide **JK-LE** (rot) und **JK-LK1** (blau) ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) in Tris-Puffer ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7.4,  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  TCEP) sowie eine 1:1-Mischung aus den Peptiden (gelb). Die Pfeile und gepunkteten Linien verdeutlichen die auf eine Helixbildung hinweisenden Veränderungen in den Spektren. b) CD-Spektren der Peptide **JK-LE** (rot) und **JK-LA** (schwarz) ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) in Tris-Puffer ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7.4,  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  TCEP) sowie eine 1:1-Mischung aus den Peptiden (grün). Es ist keine signifikante Änderung der CD-Spektren durch das Mischen der Peptide zu beobachten.

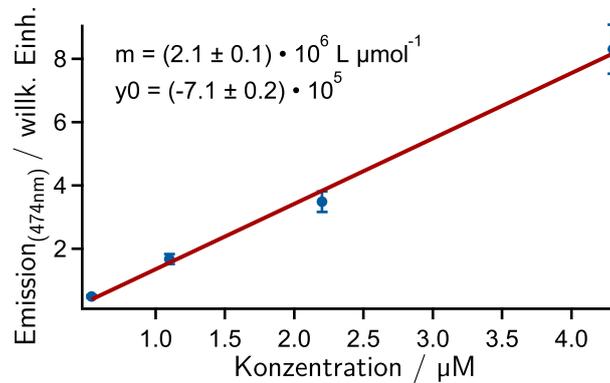
**JK-LE** (rotes Spektrum), **JK-LK1** (blaues Spektrum) sowie eine 1:1-Mischung aus diesen (gelbes Spektrum) gezeigt. Das Peptid **JK-LK1** weist ein für *Random Coil* typisches Minimum bei  $199 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$  auf [242, 383]. Das CD-Spektrum von **JK-LE** hat ein etwas weiter rotverschobenes Minimum bei  $201 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$ . Dies kann auf einen geringen Gehalt an  $\alpha$ -Helices hinweisen [242, 243, 383]. Das CD-Spektrum der Mischung aus den beiden Peptiden weist ein Minimum bei  $206.5 \text{ nm} \pm 0.5 \text{ nm}$  auf, des Weiteren kann die Bildung eines neuen Minimums bei  $221 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$  beobachtet werden. Dies sind Hinweise auf die Bildung von helikalen Strukturen und damit auf eine Bildung von *Coiled-Coil*-Heterodimeren [210, 242, 243]. In Abbildung 4.85b sind die CD-Spektren von **JK-LA** (schwarzes Spektrum), **JK-LE** (rotes Spektrum) sowie einer 1:1-Mischung aus den beiden Peptiden (grünes Spektrum) dargestellt. **JK-LA** liegt einzeln als *Random-Coil* vor, wie an dem charakteristischen Minimum

bei  $198 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$  zu beobachten ist. Die Mischung von **JK-LE** mit dem Referenzpeptid zeigt keine signifikante Änderung auf. Daraus wird geschlossen, dass **JK-LA**, wie beabsichtigt, keine *Coiled-Coil*-Dimere mit **JK-LE** bildet und daher als Referenz für die FRET-Untersuchungen genutzt werden kann.

Nachdem die Charakterisierung der Peptide den Erfolg des Peptid-Designs und der Peptidsynthese zeigen konnte, wurde anschließend die Kupplung des Peptids **JK-LE** an die Aufkonvertierungsnanopartikel durchgeführt.

#### 4.4.2.4. Peptidkupplung an die UCNP

Das am N-Terminus mit einem Cystein funktionalisierte Peptid **JK-LE** wurde über Disulfidbrücken an die mit Thiol teilfunktionalisierten Partikel **UCNP10** konjugiert. Die Bildung der Disulfidbrücken wurde durch eine Sättigung der Reaktionslösung mit Sauerstoff und Zugabe von DDQ unterstützt. Vor der Reaktion mussten die zwischen den einzelnen **JK-LE**-Molekülen ausgebildeten Disulfidbrücken gespalten werden (vgl. Kap. 4.4.2.3). Hierfür müssen die Peptide mit einem Reduktionsmittel versetzt werden [384]. Da im Anschluss jedoch wieder eine oxidative Disulfidbrückenbildung durchgeführt werden sollte, muss das Reduktionsmittel schnell und möglichst vollständig entfernt werden können. Aus diesem Grund wurde hierfür Mercaptoethanol gewählt, da dieses im Vakuum entfernt werden kann. Nach erfolgter Kupplung und Aufreinigung durch wiederholtes Zentrifugieren und Redispergieren, wurden die Partikel zunächst in Ethanol redispergiert und eine Bestimmung des Peptid-Gehaltes auf den Nanopartikeln mittels Fluorescamin-Analyse durchgeführt [385]. Fluorescamin reagiert hierbei kovalent mit Aminen zu einer fluoreszierenden Verbindung, welche die Detektion von einzelnen Aminosäuren bis in den nanomolaren Konzentrationsbereich ermöglicht [385, 386]. Hierfür wurden Fluoreszenzspektren von Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen des Peptids **JK-LE** in Ethanol in Gegenwart von Fluorescamin aufgenommen und daraus eine Kalibrierkurve erstellt (siehe Abb. 4.86). Anschließend wurde eine Lösung der Partikel **UCNP11** mit Fluorescamin versetzt und ebenfalls Fluoreszenzspektren gemessen. Die Konzentration von **JK-LE** in der Nanopartikeldispersion beträgt nach diesen Messungen  $(1.6 \pm 0.2) \mu\text{mol L}^{-1}$ . Mit einer Nanopartikelkonzentration von  $0.6 \text{ g L}^{-1}$  ( $0.75 \text{ nm}$ ) ergibt sich eine Peptid-Beladungsdichte von  $(0.08 \pm 0.01)$  Peptiden pro  $\text{nm}^2$  bzw. eine freie Fläche von



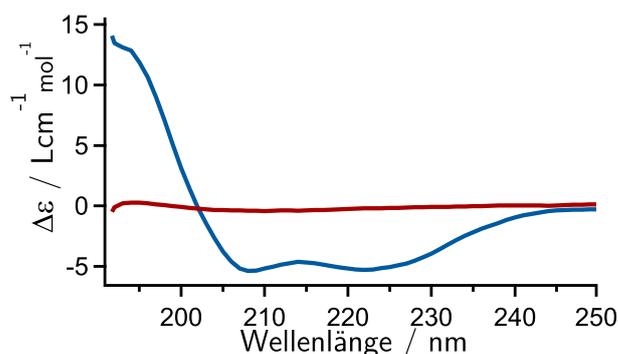
**Abbildung 4.86.** – Kalibrierkurve zur Konzentrationsbestimmung von **JK-LE** (experimentelle Daten blaue Kreise mit Fehlerbalken, lineare Anpassung in rot). Aufgetragen ist das Emissionssignal bei 470 nm von Lösungen des Peptids **JK-LE**, welche mit Überschüssen von Fluorescamin versetzt wurden.

**Tabelle 4.23.** – Konzentration der Partikel **UCNP11**, des auf den Partikeln immobilisierten Peptids **JK-LE** sowie die Beladungsdichte des Peptids auf den Partikeln. Die Konzentration wurde für die FRET- und CD-Messungen um das Zehnfache erhöht.

Probe	Konzentration $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; ( $\text{g L}^{-1}$ )	Peptide pro $\text{nm}^2$
<b>UCNP11</b>	$(7.5 \pm 1) \cdot 10^{-4}$ ; $(0.6 \pm 0.1)$	$0.008 \pm 0.01$
<b>JK-LE@NP</b>	$1.6 \pm 0.2$ ; $(5.0 \pm 0.3) \cdot 10^{-3}$	-
<b>UCNP11</b> <sub>CD/FRET</sub>	$(7.5 \pm 1) \cdot 10^{-3}$ ; $(6 \pm 1)$	$0.008 \pm 0.01$
<b>JK-LE@NP</b> <sub>CD/FRET</sub>	$16 \pm 2$ ; $(5.0 \pm 0.3) \cdot 10^{-2}$	-

$(13 \pm 2) \text{ nm}^2$  pro Peptid und einem mittleren Abstand zwischen den Peptiden von  $(2.0 \pm 0.3) \text{ nm}$ . Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4.23 zusammengetragen. Der Abstand zwischen benachbarten Peptiden, die auf Oberflächen bzw. makromolekularen Grundgerüsten präsentiert werden, ist von Bedeutung, da sich gezeigt hat, dass bei Heterodimer bildenden Peptiden durch zu hohe lokale Konzentration aufgrund von geringen Abständen zwischen den Monomeren, die abstoßenden Effekte übertröfen werden und sich Homodimere bilden [64]. Die ermittelte Peptidkonzentration von  $1.6 \mu\text{mol L}^{-1}$  ist zu gering um CD-Spektren aufnehmen zu können, aus diesem Grund wurden die Partikel durch Zentrifugieren und Abnehmen des Überstands auf eine Nanopartikelkonzentration von  $6 \text{ g L}^{-1}$  ( $7.5 \text{ nmol L}^{-1}$ ) und eine Peptidkonzentration von  $16 \mu\text{mol L}^{-1}$  gebracht. Höhere Konzentrationen waren nicht möglich, da nicht genug Partikel zur Verfügung standen. Der Erfolg der Kupplung wurde des Weiteren mittels

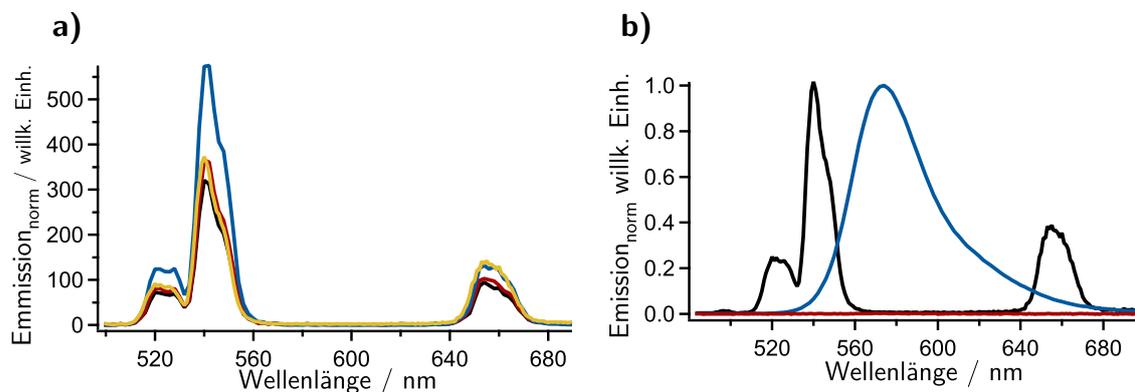
CD-Spektroskopie nachgewiesen. In Abbildung 4.87 sind CD-Spektren der Partikel vor der Kupplung (rotes Spektrum) sowie nach der Kupplung (blaues Spektrum) in Ethanol dargestellt. Die Partikel zeigen vor der Kupplung keine optische Aktivität,



**Abbildung 4.87.** – CD-Spektren der mit **JK-LE** teilfunktionalisierten Partikel **UCNP11** (blau) sowie der Partikel **UCNP10** (rot) in Ethanol.

wohingegen nach der Kupplung ein CD-Spektrum mit Minima bei  $208 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$  und  $222 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$  zu beobachten ist. Dies deutet auf eine helikale Struktur hin, welche in Ethanol induziert wird [387]. Das UC-Spektrum der Partikel **UCNP11** hat sich durch die Peptidkupplung nur gering geändert (siehe Abb. 4.88). Das Verhältnis der „grünen“ zur „roten“ Bande  $I_{gr}/I_{rot}$  hat sich von  $3.2 \pm 0.3$  auf  $2.6 \pm 0.3$  reduziert. Anhand der in Abbildung 4.88a gezeigten UC-Spektren der verschiedenen Synthesestufen der Partikel von oleatfunktionalisierten **UCNP5**-Partikeln bis hin zu den mit Peptiden teilfunktionalisierten **UCNP11**-Partikeln kann beobachtet werden, dass die Intensitäten der auf die Konzentration normierten UC-Spektren beim Wechsel vom Dispersionsmittel n-Hexan zu Ethanol abnehmen, sich in Ethanol durch die weiteren Umfunktionalisierungen aber nicht in signifikantem Maß weiter ändern. In Abbildung 4.88b ist ein normiertes UC-Spektrum der Probe **UCNP11** sowie ein normiertes Fluoreszenzspektrum nach Anregung bei 545 nm des Peptids **JK-LK1** gezeigt. Des Weiteren ist ein UC-Spektrum derselben Peptidlösung nach Anregung mit 980 nm Laserstrahlung ( $4.2 \text{ W cm}^{-2}$ ) dargestellt. Die Emission des Peptids liegt zwischen den Banden (545 nm und 660 nm) der Aufkonvertierungspartikel und das Peptid zeigt keine Emission durch Anregung mit 980 nm Laserstrahlung.

Nachdem erfolgreich mit Peptid teilfunktionalisierte Aufkonvertierungspartikel



**Abbildung 4.88.** – a) Auf die Konzentration normierte UC-Spektren der Partikel **UCNP5** in n-Hexan (blau), **UCNP8** in Ethanol (rot), **UCNP10** in Ethanol (schwarz) und **UCNP11** in Ethanol (gelb). b) UC-Spektrum der mit **JK-LE** teilfunktionalisierten Partikel **UCNP11** (schwarz), Fluoreszenzspektrum des Peptids **JK-LK1** nach Anregung mit 545 nm (blau) sowie mit 980 nm Laserstrahlung angeregte Lösung des Peptids (rot).

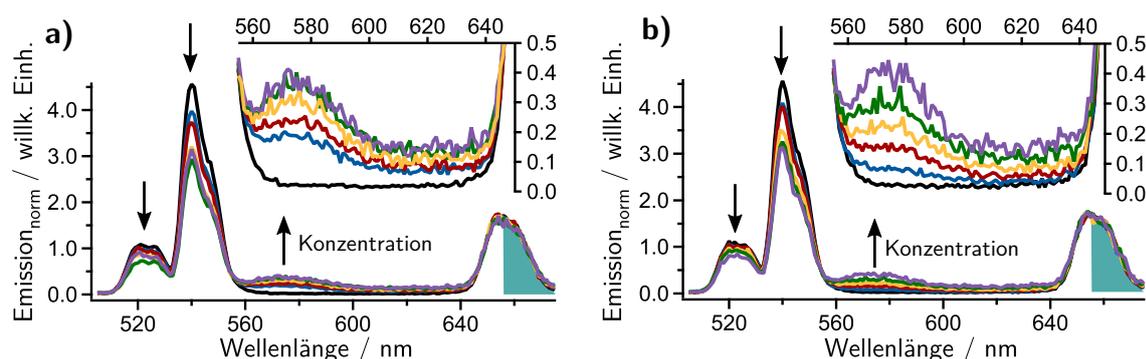
dargestellt werden konnten, sollte zur Vorbereitung auf die FRET-Experimente die Heterodimerbildung zwischen dem Peptid **JK-LK1** und den Partikeln **UCNP11** mittels CD-Spektroskopie verfolgt werden. Hierfür war es erforderlich, die Partikel in einen wässrigen Puffer mit pH 7.4 zu überführen, da die spezifischen Wechselwirkungen, welche zu Heterodimeren führen, Lösungsmittel- und pH-abhängig sind [388]. Hierbei stellte sich heraus, dass die Partikel, trotz der Funktionalisierung mit dem Peptid **JK-LE**, nicht in Tris-, Phosphatpuffer oder Wasser stabil sind. Da die Peptide in Ethanol in helikaler Form vorliegen, ist eine Verfolgung der Dimerbildung mittels CD-Spektroskopie nicht möglich [387].

#### 4.4.3. FRET Experimente

Die FRET-Experimente zwischen den mit dem Peptid **JK-LE** teilfunktionalisierten Partikeln **UCNP11** und dem Heterodimer bildenden Peptid **JK-LK1** sowie dem Referenzpeptid **JK-LA** wurden in Ethanol durchgeführt (siehe Kap. 4.4.2.4). Die Partikel **UCNP11** wurden hierfür in einer Küvette vorgelegt und UC-Spektren unter Anregung mit 980 nm Laserstrahlung ( $4.2 \text{ W cm}^{-2}$ ) aufgenommen. Es wurden schrittweise Volumina einer Lösung eines der mit TAMRA markierten Peptide hinzugegeben. Die Anfangskonzentration des Peptids **JK-LE** betrug  $16 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Die Volumina der zugegebenen Peptide wurden so gewählt, dass die Konzentration

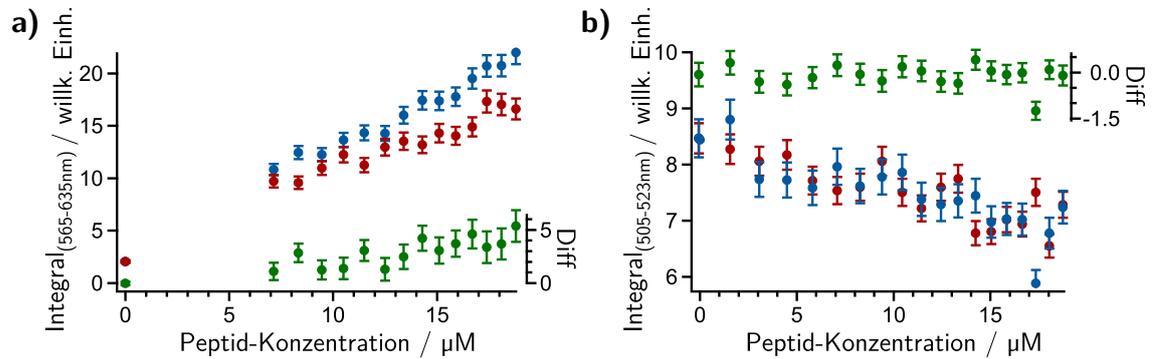
#### 4.4. Untersuchung von multivalenten Wechselwirkungen zwischen Peptiden mit Hilfe des Förster-Resonanzenergietransfers

dieser in der Messlösung zunächst unterhalb der des Peptids **JK-LE** lag, schrittweise größer wurde und zuletzt oberhalb von  $16 \mu\text{mol L}^{-1}$  lag. Die sinkende Konzentration der Partikellösung und eventuelle Variationen in der Laserintensität wurden über eine Flächennormierung der roten Bande der UC-Spektren (vgl. Abb. 4.89, türkise Färbung) korrigiert. Die so erhaltenen UC-Spektren sind in Abbildung 4.89 dargestellt. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen Probe und Referenz in der



**Abbildung 4.89.** – Flächennormierte UC-Spektren der Probe **UCNP11** mit verschiedenen Konzentrationen (schwarze Linien  $c = 0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , violette Linien  $c = 18 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) von mit TAMRA markiertem Peptid a) **JK-LK1** und b) dem Referenzpeptid **JK-LA**. Die zur Normierung genutzte Fläche ist türkise markiert und liegt in einem Bereich, in dem die Emission von TAMRA vernachlässigt werden kann (vgl. Abb. 4.88b).

Zunahme der Emission im Bereich von 565 nm bis 635 nm zu beobachten. Sowohl im Fall des Peptids **JK-LK1** in Abbildung 4.89 als auch für das Referenzpeptid **JK-LA** in Abbildung 4.89b ist eine Zunahme der Fluoreszenzintensität im oben genannten Wellenlängenbereich zu erkennen. Da diese nicht ausschließlich durch FRET entstehen muss, sondern auch durch konventionelle Lichtabsorption der Partikelemission entstehen kann (Innerer-Filter-Effekt) [157], wurde zusätzlich zum Fluoreszenzsignal von TAMRA auch die Abnahme der Bande um 520 nm beobachtet. Diese wird nämlich nicht von der Emission von TAMRA überlagert (vgl. Abb. 4.88b) und Verluste durch andere Effekte als FRET werden als vernachlässigbar angenommen. Für eine genauere Untersuchung der Spektren wurden daher sowohl der Bereich der grünen Bande von 505 nm bis 523 nm als auch der Bereich der Emission von TAMRA zwischen 565 nm und 635 nm integriert und als Funktion der Konzentration des zugegebenen Peptids aufgetragen. Die so erhaltenen Graphen sind in Abbildung 4.90 dargestellt. Im Fall der integrierten Fluoreszenzsignale von TAMRA (Abb. 4.90a)

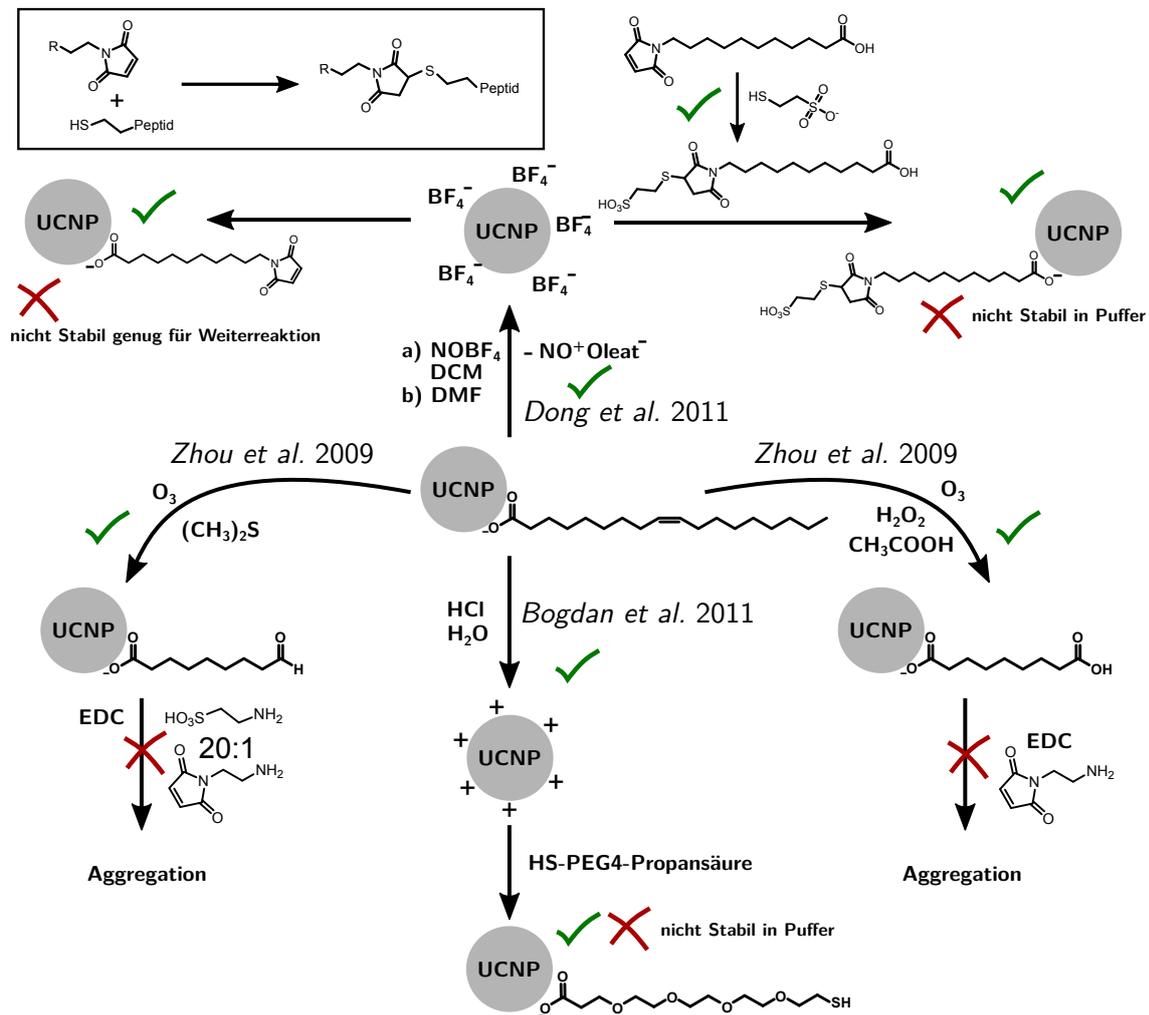


**Abbildung 4.90.** – a) Integral der Emission von TAMRA im Bereich von 565 nm bis 635 nm als Funktion der Peptidkonzentration von **JK-LK1** (blaue Kreise), **JK-LA** (rote Kreise) sowie der Differenz dieser Werte (grüne Kreise), erhalten nach Anregung der Probe **UCNP11** mit 980 nm Laserstrahlung ( $4.2 \text{ W cm}^{-2}$ ). b) Integrale der abnehmenden Emission der **UCNP11** zwischen 505 nm und 523 nm als Funktion der Konzentration der Peptide sowie die Differenz von Probe und Referenz. Die Farbzuzuordnung ist wie bei a).

zeigt die Differenz von Probe und Referenz, welche einer spezifischen Wechselwirkung zwischen den Peptiden **JK-LK1** und **JK-LE** entspricht, einen leichten Anstieg mit steigender Peptidkonzentration. Allerdings ist ein solcher Anstieg des Differenzsignals in der grünen Bande (Abb. 4.90b) nicht zu verzeichnen. Da das Differenzsignal in Abbildung 4.90a nur gering ist und in Abb. 4.90b innerhalb der Fehler Null beträgt, wird eine spezifische Wechselwirkung als nicht signifikant angenommen. Es ist wahrscheinlich, dass dies auf das Lösungsmittel Ethanol zurückzuführen ist, da das Peptid-Design auf Lösungsmittelwechselwirkungen basiert und eine wässrige Lösung bei pH 7.4 zugrunde gelegt wurde [47, 210, 388].

Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, dass die Funktionalisierung von UCNP mit Peptiden, mit einer für die geplanten Experimente ausreichend geringen Beladungsdichte, nicht ausreicht, um die Stabilität der Partikel in wässrigen oder gar Pufferlösungen zu gewährleisten. Des Weiteren sind die Wechselwirkungen zwischen den Peptiden in Ethanol unspezifisch und bieten daher nicht die Möglichkeit der Untersuchung der multivalenten Wechselwirkungen welche zu *Coiled-Coil*-Dimeren führen. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden anschließend zahlreiche Versuche unternommen, bereits vor der Funktionalisierung mit dem Peptid **JK-LE**, in Puffer stabile Partikel darzustellen (siehe Abb. 4.91). Hierbei sollte die Kupplung weiterhin über das Cystein im Peptid **JK-LE** erfolgen. Aufgrund der im Vergleich zu Disulfidbrücken

4.4. Untersuchung von multivalenten Wechselwirkungen zwischen Peptiden mit Hilfe des Förster-Resonanzenergietransfers

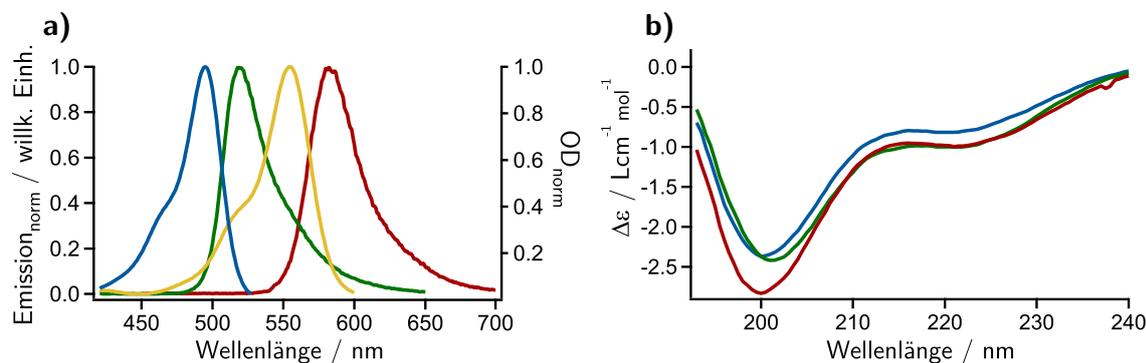


**Abbildung 4.91.** – Ein schematischer Überblick weiterer Versuche in Tris- oder Phosphatpuffer stabile UCNP zu erhalten, die eine Möglichkeit zur Kupplung über ein Maleimid an das Peptid **JK-LE** bieten (siehe Kasten links oben). Alle Versuche gingen von mit Ölsäure funktionalisierten UCNP aus (Mitte der Grafik). Es wurden Ligandenaustauschreaktionen nach *Dong et al.* [173] und *Bogdan et al.* [180] durchgeführt. Des Weiteren wurden alternative Umfunktionalisierungen von nach *Zhou et al.* dargestellten mit Aldehyd oder Carbonsäure funktionalisierten Partikeln getestet.

stärkeren Bindung, wurde hierfür Maleimid als funktionelle Gruppe gewählt. Es ist anzumerken, dass es zahlreiche Möglichkeiten gibt, in Puffern stabile UCNP zu erhalten, die jedoch keine funktionelle Gruppe aufweisen, welche mit Thiolen kovalente Bindungen eingehen [168, 172]. Die einzigen bekannten Funktionalisierungen, welche wahrscheinlich chemische Reaktionen mit geringer Aggregationsgefahr

ermöglichen, sind mit langkettigen Polymeren verbunden, wie beispielsweise Polyacrylsäure [389, 390]. Diese bilden undefinierte, viele Nanometer in die lösungreichende Schichten um die Partikel, welche zwar die Stabilität erhöhen, jedoch für abstandssensitive FRET-Experimente nicht geeignet sind [168]. Aus diesem Grund wurden Versuche unternommen, selbst dargestellte und kommerzielle Liganden über Ligandenaustauschreaktionen auf den Partikeln zu immobilisieren. Des Weiteren wurden Umfunktionalisierungen nach *Zhou et al.* über chemische Reaktionen an ozonolysierten Partikeln getestet. Hierbei wurde auch die Ozonolyse zu mit Azelainsäure funktionalisierten UCNP durchgeführt. Da alle durchgeführten Versuche in Puffer stabile UCNP, mit einer Thiol bindenden funktionellen Gruppe zu erhalten, fehlschlagen, werden die Ergebnisse dieser Versuche hier nicht im Detail gezeigt. Als Überblick über die zahlreichen getesteten Syntheserouten sind diese in Abbildung 4.91 schematisch dargestellt.

Da der Versuch UCNP als nahezu untergrundfreien FRET-Donor zu nutzen nicht erfolgreich war, wurde anschließend in kurzer Zeit ein neues Peptid mit nahezu gleicher Sequenz wie **JK-LE** dargestellt, welches statt dem Cystein am N-Terminus, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein markiert ist (**JK-LE2**). In Abbildung 4.92a sind die UV/VIS-Absorptionsspektren sowie die Fluoreszenzspektren der Peptide **JK-LE2** sowie **JK-LK1** dargestellt. Das Fluoreszenzspektrum von Fluorescein überlappt mit dem Absorptionsspektrum von TAMRA, wobei eine Überlappung der beiden Fluoreszenzspektren gering ist. Man kann das Fluorescein bei einer Wellenlänge von 445 nm bis 450 nm anregen, dort liegt ein Minimum der Absorption von TAMRA (vgl. Abb. 4.92a). Daher ist diese Farbstoffkombination für FRET-Experimente geeignet. In Abbildung 4.92b sind die CD-Spektren der einzelnen Lösungen von **JK-LE2** und **JK-LK1** mit jeweils  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  sowie eine 1:1-Mischung aus diesen in Phosphatpuffer ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7.4) dargestellt. Alle drei CD-Spektren weisen für *Random-Coil*-Strukturen typische Minima um 200 nm auf. Dies bedeutet, dass die Peptide **JK-LE2** und **JK-LK1** nicht wie beabsichtigt Heterodimere bilden [210]. Da die einzige Änderung zu **JK-LE** in dem Fluorescein besteht, wird diese Beobachtung auf den Farbstoff zurückgeführt. Es kann sein, dass der Farbstoff die Dimerbildung sterisch behindert [375]. Eine Untersuchung der multivalenten Wechselwirkungen, welche zu *Coiled-Coil*-Dimeren führen ist so auch mit diesem System nicht möglich.



**Abbildung 4.92.** – a) Normierte Fluoreszenzspektren der Peptide **JK-LE2** (Fluorescein, grün) und **JK-LK1** (TAMRA, rot) sowie der UV/VIS-Absorptionsspektren dieser blau (**JK-LE2**), gelb (**JK-LK1**). b) CD-Spektren der Peptide **JK-LE2** ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , blau), **JK-LK1** ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , rot) und einer 1:1-Mischung aus diesen (grün) in Phosphatpuffer ( $100 \text{mmol L}^{-1}$ , pH 7.4).

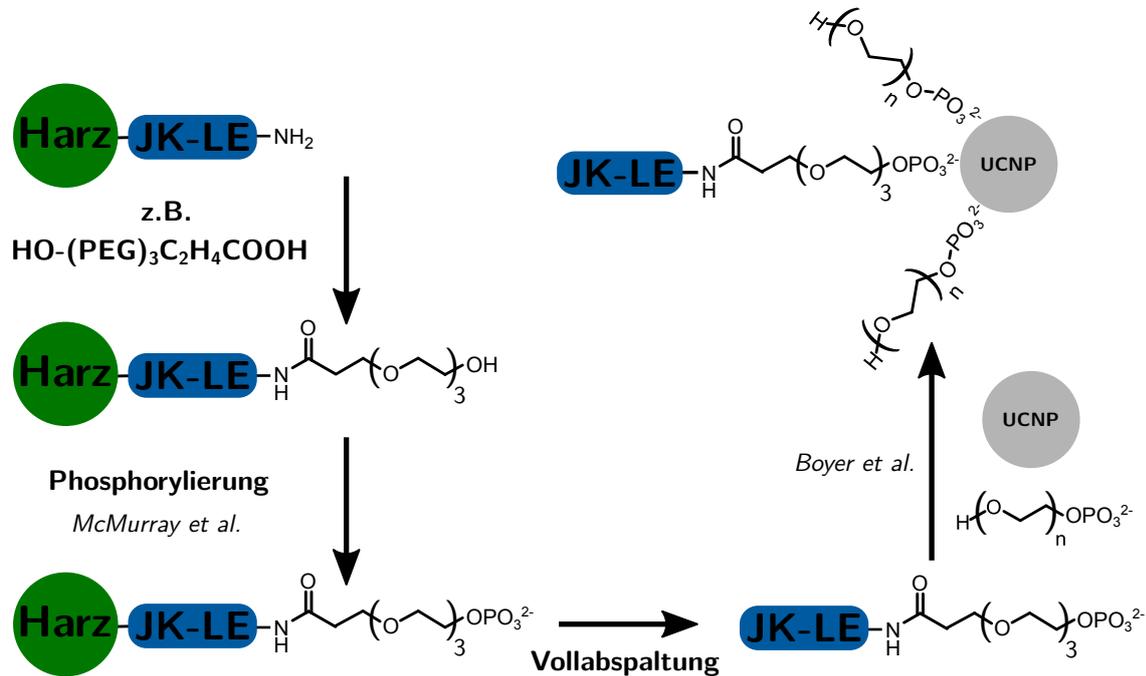
#### 4.4.4. Zusammenfassung und Ausblick

In den hier vorgestellten Ergebnissen wurden erfolgreich Aufkonvertierungsnanopartikel mit Durchmessern von 17 nm bis 50 nm sowie hexagonale Prismen mit Diagonalen von 90 nm und einer Höhe von 42 nm in Anlehnung an *Na et al.* dargestellt [169]. Diese Partikel wiesen teilweise neuartige Zusammensetzungen auf und zeigten eine intensive Aufkonvertierungsemission. In einer mehrstufigen Umfunktionalisierung der Partikel über ein Brechen der Doppelbindung der Ölsäure mit Hilfe von Ozonolyse und einer anschließenden Thiolisierung der Partikel in Anlehnung an *Zhou et al.*, konnten erfolgreich mit dem Peptid **JK-LE** teilfunktionalisierte UCNPs erhalten werden. Die Beladungsdichte der Partikel mit dem Peptid konnte mittels Fluorescamin-Analyse auf einen Wert von  $(0.008 \pm 0.01)$  Peptiden pro  $\text{nm}^2$  bestimmt werden. Des Weiteren konnten das Peptid für die Kupplung an die Partikel **JK-LE**, das Heterodimer bildende, mit TAMRA markierte Peptid **JK-LK1** sowie das ebenfalls mit TAMRA markierte Referenzpeptid **JK-LA** mit Festphasenpeptidsynthese erfolgreich dargestellt und charakterisiert werden. Mit Hilfe von CD-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die Peptide **JK-LE** und **JK-LK1** entsprechend ihres Designs Heterodimere bilden und das Referenzpeptid **JK-LA** keine spezifischen Wechselwirkungen zeigt. Die mit Peptid funktionalisierten Partikel **UCNP11** waren jedoch nicht in Wasser oder Puffer stabil und Experimente in Ethanol zeigten, dass die Peptide in diesem Lösungsmittel keine spezifischen Wechselwirkungen eingehen.

Daher war es nicht möglich, multivalente Wechselwirkungen, welche zur Bildung von *Coiled-Coil*-Dimeren führen, zu untersuchen. Weitere Versuche, in Puffer stabile, mit Peptid **JK-LE** teilfunktionalisierte UCNP zu erhalten, blieben erfolglos. Um dennoch die geplanten Untersuchungen durchführen zu können, wurde ein weiteres Peptid, **JK-LE2**, synthetisiert. Dieses ist am N-Terminus mit dem Farbstoff Fluorescein markiert, welcher die UCNP als Donor ersetzen sollte. In Untersuchungen mittels CD-Spektroskopie stellte sich jedoch heraus, dass die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff wahrscheinlich eine Dimerbildung verhindert und daher auch mit diesem System keine Untersuchungen der multivalenten Wechselwirkungen möglich waren.

Da das *Coiled-Coil*-Strukturmotiv in der Natur ubiquitär verbreitet und in zahlreichen wichtigen Prozessen von zentraler Bedeutung ist [47, 210], werden weitere Versuche, ein funktionierendes System zur exakten Untersuchung der Dimerbildung mit Hilfe von FRET-Experimenten zu erhalten, als lohnenswert angesehen. Die Nutzung von Aufkonvertierungspartikeln zu diesem Zweck stellt jedoch eine große Herausforderung dar. Ein, aufgrund des hohen Aufwands und mangelnder Zeit im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr getestetes Konzept mit möglicherweise größerer Erfolgswahrscheinlichkeit ist eine direkte Bindung der Peptide auf die Partikel. Eine der stärksten Bindungen von Liganden auf die Oberfläche von Aufkonvertierungspartikeln ist die Phosphatgruppe [172]. Hierfür müssten speziell maßgeschneiderte phosphorylierte Liganden am N-Terminus des Peptids eingeführt werden. Führt man einen Ligandenaustausch von mit Ölsäure funktionalisierten UCNP mit einer Mischung aus solchen Peptiden und einem ebenfalls mit Phosphatgruppen ausgestatteten Hintergrundliganden durch, könnten stabile UCNP mit Peptid erhalten werden [172]. In Abbildung 4.93 ist eine mögliche Synthese für solche Partikel dargestellt. Hierbei wird das Peptid **JK-LE**, bis auf das Cystein, über Fmoc-Festphasenpeptidsynthese dargestellt. Vor der Vollabspaltung, wird in zwei Schritten ein Linker mit einer Phosphatgruppe eingeführt. Zunächst wird nach dem Festphasensyntheseprotokoll die kommerziell erhältliche **HO-PEG<sub>3</sub>-Propansäure** an die feste Phase gekuppelt. Diese weist eine Alkoholgruppe auf, welche, nach Standardverfahren für Phosphorylierungen an der festen Phase, phosphoryliert werden kann [391, 392]. Mit Phosphatliganden können direkt Ligandenaustauschreaktionen an ölsäurefunktionalisierten UCNP vorgenommen werden [172]. Wird ein Ligandenaustausch mit einem Gemisch aus Peptid und

4.4. Untersuchung von multivalenten Wechselwirkungen zwischen Peptiden mit Hilfe des Förster-Resonanzenergietransfers



**Abbildung 4.93.** – Schematische Darstellung des Peptids **JK-LE** mit einem Phosphat-Linker. Die Phosphorylierung an der festen Phase ist ein Standardverfahren [391]. *Boyer et al.* haben einen erfolgreichen Ligandenaustausch von langkettigen Polyethylenglycol-Phosphaten publiziert [172]. In diesem Fall sollte die Anzahl (*n*) an PEG-Einheiten wesentlich geringer sein (*n* ca. 3-5) als in der Literatur (*n* ca. 20 und 50), um die Peptidwechselwirkungen nicht sterisch zu behindern.

Hintergrundliganden (siehe Abb. 4.93) durchgeführt, können teilfunktionalisierte Partikel erhalten werden. Die stärkere Bindung der Phosphatliganden sowie besser geeignete Hintergrundliganden können hierbei dafür sorgen, dass in Puffer stabile Partikel erhalten werden. Ein Vorteil gegenüber den im Rahmen der hier vorgestellten Experimente wäre, dass die problematische mehrstufige Umfunktionalisierung umgangen wird.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einerseits verschiedene Systeme für die Kontrolle von biologischen Modellsystemen mit Licht untersucht sowie andererseits die Möglichkeit der hintergrundfreien Detektion von multivalenten Wechselwirkungen erforscht. Im ersten Kapitel des Ergebnisteils wurde das Schaltverhalten von glycosilierten Photoschaltern, welche genutzt werden können um schaltbare multivalente Systeme zu erhalten, mit einem hierfür erstellten Blitzlichtphotolyseexperiment untersucht. Im nächsten Abschnitt der Arbeit wurden solche Systeme in Form von photoschaltbaren glycosilierten Goldnanopartikeln hergestellt und deren Schaltverhalten ermittelt sowie getestet, ob sich diese zur Kontrolle von multivalenten Wechselwirkungen eignen. Im dritten Kapitel des Ergebnisteils, wurde ein medizinisch gegen Psoriasis wirksames Tetrapeptid an eine photolabile Cumarinschutzgruppe gekuppelt und die nichtlinearen optischen Eigenschaften mit einem eigens hierfür erstellten Aufbau charakterisiert. Im vierten Abschnitt wurden unter anderem Aufkonvertierungspartikel synthetisiert und mit einem Peptid funktionalisiert, um zu testen, ob sich dieses System für die hintergrundfreie Detektion von der multivalenten Bildung von *Coiled-Coil*-Heterodimeren eignet. Im Folgenden sind die Ergebnisse der einzelnen Kapitel zusammengefasst.

Im ersten Kapitel des Ergebnisteils wurde die thermische Relaxation von in 4'-Position glycosilierten Azobenzolen mit variierender Substitution am Phenylring mittels Blitzlichtphotolysespektroskopie und UV/VIS-Absorptionsspektroskopie untersucht. Dabei zeigte sich, dass die am Phenylring mit protischen funktionellen Gruppen funktionalisierten Azobenzole vom pH-Wert und von der Konzentration abhängige Relaxationsdauern aufweisen. Insbesondere im Fall der in 4-Position mit einer Hydroxygruppe funktionalisierten Azobenzole war die Dimerisierung so empfindlich, dass reproduzierbare Messungen nur in gepufferten Lösungen durchgeführt werden konnten. Ein in der Literatur vorgeschlagener Säure-Base-Mechanismus [97]

---

konnte aufgrund der erhaltenen Ergebnisse mit einiger Sicherheit ausgeschlossen werden. Vielmehr wurde eine alternative Erklärung vorgeschlagen, welche sowohl die beobachtete pH- als auch Konzentrationsabhängigkeit erklären kann. Hierbei begünstigen Wasserstoffbrücken zwischen Hydroniumionen oder Hydroxygruppen und dem Azostickstoff mesomere Grenzformeln oder sogar eine Tautomerisierung, welche die thermische Relaxation beschleunigen. Weiterhin konnte durch Messungen in Lösungsmitteln mit variierender relativer Permittivität eine signifikante Änderung der Ladungsverteilung bei Aktivierung des *cis*-Isomers hin zum Übergangszustand nachgewiesen werden. Dies untermauert einen Rotationsmechanismus der thermischen Relaxation und damit das hier vorgeschlagene Erklärungsmodell. Bei einem Vergleich zwischen geschützten und ungeschützten Hydroxygruppen der Mannose konnte kein signifikanter Einfluss auf das konzentrationsabhängige Relaxationsverhalten beobachtet werden. Für zukünftige Studien wäre eine weitere Untersuchung des konzentrationsabhängigen Schaltverhaltens interessant. Es könnten beispielsweise Derivate der hier untersuchten Azobenzole mit aprotischen Substituenten, die den Azostickstoff wirkungsvoll vor Lösungsmittelwechselwirkungen abschirmen, untersucht werden. So könnte das hier vorgeschlagene Modell weitgehend überprüft werden.

Im zweiten Kapitel des Ergebnisteils wurde eine Bibliothek an photoschaltbaren mit  $\alpha$ -D-Mannose glycosilierten Goldnanopartikeln im Größenbereich von 5 nm bis 80 nm synthetisiert und deren Schaltverhalten ermittelt sowie getestet, ob sich diese Partikel zur Kontrolle von multivalenten Wechselwirkungen eignen. Nach Wissen des Autors wurde hierfür eine neue Methode der Umfunktionalisierung angewandt, um citratfunktionalisierte Goldnanopartikel mit schwer wasserlöslichen Liganden zu modifizieren. Es wurden Messungen zur thermischen Relaxation der immobilisierten Azobenzole durchgeführt. Hierbei konnte ein Zusammenhang der Schalterbeladungsdichte mit dem Schaltverhalten ermittelt werden. Die Lebensdauern der thermischen Relaxation sinken mit sinkender Beladungsdichte und nähern sich dem Wert der frei in Lösung vorliegenden Schalter an. Dieses Verhalten wurde auf kooperative Effekte über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen von benachbarten Azobenzolen auf der Nanopartikeloberfläche zurückgeführt. In SPR-Experimenten wurde gezeigt, dass die mit Citratmolekülen und glycosilierten Photoschaltern funktionalisierten Goldnanopartikel nicht über eine ausreichende Stabilität für die notwendigen Messbedingungen

aufweisen. Aus den Ergebnissen wird daher geschlossen, dass ein Schlüsselpunkt für weitere Studien die Synthese von Partikeln, die in Puffern mit hohen Ionenstärken stabil sind, darstellen sollte. Da sich in den hier durchgeführten Arbeiten gezeigt hat, dass die Partikel durch Isomerisierung in die *cis*-Konfiguration weiter an Stabilität verlieren, wurden Möglichkeiten für ein optimiertes Ligandendesign vorgeschlagen.

Im dritten Kapitel des Ergebnisteils wurde das Peptid **AAPV**, das therapeutischen Nutzen bei der Behandlung von Psoriasis aufweist, synthetisiert und an die photolabile Cumarinschutzgruppe BhcOH konjugiert. Die Verbindung des Peptids zu diesem auch als Photokäfig bezeichneten Molekül ermöglicht die über Licht kontrollierte Freisetzung mit hoher zeitlicher und lokaler Auflösung. Zunächst wurden die optischen Eigenschaften wie der Extinktionskoeffizient, die Fluoreszenzquantenausbeute sowie der Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt ermittelt. Für die Ermittlung des Letzteren wurde ein Experiment zur Messung von Zweiphotonenfluoreszenzspektren nach Anregung mit einem Femtosekundenlasersystem aufgebaut. Anschließend wurden erfolgreich Freisetzungsstudien nach Ein- und Zweiphotonenabsorption in Kombination mit HPLC durchgeführt. Aus diesen Studien konnte die Quanteneffizienz der Freisetzungsreaktion sowie die Photolyseabsorptionsquerschnitte nach Ein- und Zweiphotonenabsorption ermittelt werden. Die ermittelten Werte liegen im Bereich von Literaturwerten der ähnlichen Verbindungen **BhcOAc** und **BhcGlu** und zeigen, dass das Konjugat für Studien mit lichtkontrollierter Freisetzung von **AAPV** geeignet ist. Für zukünftige Studien sind Untersuchungen der Hautpenetration des Konjugats im Vergleich zum freien Peptid sowie zur lokalen Verteilung des Konjugats in der Haut interessant.

Im vierten Kapitel des Ergebnisteils wurde die Möglichkeit untersucht, multivalente Wechselwirkungen zwischen Peptiden, die *Coiled-Coil*-Heterodimere bilden, mittels hintergrundfreiem FRET zu verfolgen. Als FRET-Donor wurden NaYF<sub>4</sub>: Yb, Er, Gd-Partikel, als FRET-Akzeptor der Fluoreszenzfarbstoff TAMRA genutzt. Es wurden erfolgreich sphärische, monodisperse Aufkonvertierungsnanopartikel im Größenbereich von 17 nm bis 50 nm Durchmesser sowie hexagonale Prismen mit 42 nm Höhe und 90 nm Diagonale synthetisiert. Hierfür wurden teils neuartige Elementzusammensetzungen und Syntheseparameter genutzt. Des Weiteren wurde ein Peptid zur Immobilisierung auf die Nanopartikel, ein mit diesem Heterodimere bildendes Peptid sowie ein nicht bindendes Referenzpeptid synthetisiert. In einer mehrstufigen

---

Umfunktionalisierung konnten anschließend erfolgreich mit Peptid teilfunktionalisierte Aufkonvertierungspartikel, mit Emission, im für die FRET-Experimente nötigen Wellenlängenbereich, erhalten werden. Die Peptid-Beladungsdichte wurde über eine Fluorescamin-Analyse bestimmt und ergab einen mittleren Abstand von  $(2.0 \pm 0.3)$  nm zwischen benachbarten Peptiden. Die mit Peptid funktionalisierten Partikel waren jedoch nicht in wässrigen Pufferlösungen stabil. Die aus diesem Grund in Ethanol durchgeführten FRET-Experimente zeigten keinen Unterschied zwischen Probe- und Referenzpeptid. Daraus wurde geschlossen, dass die *Coiled-Coil*-Bildung in Ethanol nicht spezifisch ist. Um dennoch die Bildung der Dimere über FRET untersuchen zu können, wurde ein zweites Peptid synthetisiert, welches mit Fluorescein als FRET-Donor markiert war. In Untersuchungen mit CD-Spektroskopie zeigte sich jedoch, dass die Dimerbildung wahrscheinlich durch den Farbstoff verhindert wurde. Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass speziell auf eine erhöhte Nanopartikelstabilität ausgerichtete Liganden nötig sind, um die Studien, wie ursprünglich geplant, durchführen zu können. Es wurde ein Konzept für einen optimierten Peptid-PEG-Phosphat-Liganden vorgeschlagen, der über einen direkten Ligandenaustausch mit ölsäurefunktionalisierten Aufkonvertierungspartikeln stabile Partikel liefern könnte.



# Literatur

- [1] S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 991–1003.
- [2] J. V. Barth, G. Costantini, K. Kern, *Nature* **2005**, *437*, 671–679.
- [3] W. Lu, C. M. Lieber, *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 841–850.
- [4] W. R. Browne, B. L. Feringa, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1*, 25–35.
- [5] N. Koumura, Zijlstra, Robert W. J., van Delden, Richard A., N. Harada, B. L. Feringa, *Nature* **1999**, *401*, 152–155.
- [6] Jiménez, Dietrich-Buchecker, Sauvage, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 3284–3287.
- [7] R. A. Bissell, E. Córdova, A. E. Kaifer, J. F. Stoddart, *Nature* **1994**, *369*, 133–137.
- [8] D. A. Leigh, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 14506–14508.
- [9] N. Ankenbruck, T. Courtney, Y. Naro, A. Deiters, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 2768–2798.
- [10] M. Qiu, D. Wang, W. Liang, L. Liu, Y. Zhang, X. Chen, D. K. Sang, C. Xing, Z. Li, B. Dong, F. Xing, D. Fan, S. Bao, H. Zhang, Y. Cao, *PNAS* **2018**, *115*, 501–506.
- [11] J. Chen, F. K.-C. Leung, Stuart, Marc C. A., T. Kajitani, T. Fukushima, van der Giessen, Erik, B. L. Feringa, *Nature Chem.* **2017**, *10*, 132–138.
- [12] F. Bolze, S. Jenni, A. Sour, V. Heitz, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 12857–12877.
- [13] L. Jiang, X. Yuan, G. Zeng, Z. Wu, J. Liang, X. Chen, L. Leng, H. Wang, H. Wang, *Appl. Catal. B* **2018**, *221*, 715–725.
- [14] Z. Yin, H. Li, H. Li, L. Jiang, Y. Shi, Y. Sun, G. Lu, Q. Zhang, X. Chen, H. Zhang, *ACS Nano* **2011**, *6*, 74–80.

- [15] K. Wang, W. Zhang, Z. Gao, Y. Yan, X. Lin, H. Dong, C. Zhang, W. Zhang, J. Yao, Y. S. Zhao, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 13147–13150.
- [16] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476.
- [17] O. Sadovski, A. S. Jaikaran, S. Samanta, M. R. Fabian, R. J. Dowling, N. Sonenberg, G. A. Woolley, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7746–7752.
- [18] S. Piant, F. Bolze, A. Specht, *Opt. Mater. Express* **2016**, *6*, 1679–1691.
- [19] M. Natali, S. Giordani, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4010.
- [20] L.-N. Fu, B. Leng, Y.-S. Li, X.-K. Gao, *Chin. Chem. Lett.* **2016**, *27*, 1319–1329.
- [21] E. Wagner-Wysiecka, N. Łukasik, J. F. Biernat, E. Luboch, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2018**, *90*, 189–257.
- [22] D. Liu, Y. Xie, H. Shao, X. Jiang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4406–4408.
- [23] M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794.
- [24] C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Kokschi, J. Dervedde, C. Graf, E.-W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10472–10498.
- [25] P. I. Kitov, D. R. Bundle, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16271–16284.
- [26] J. D. Badjic, A. Nelson, S. J. Cantrill, W. B. Turnbull, J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 723–732.
- [27] C. A. Hunter, H. L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7488–7499.
- [28] A. Bernardi u. a., *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4709–4727.
- [29] Y. Wen, J. H. Collier, *Curr. Opin. Immunol.* **2015**, *35*, 73–79.
- [30] D. Pagé, D. Zanini, R. Roy, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1949–1961.
- [31] M. B. Thygesen, J. Sauer, K. J. Jensen, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1649–1660.

- 
- [32] F. Manea, C. Bindoli, S. Fallarini, G. Lombardi, L. Polito, L. Lay, R. Bonomi, F. Mancin, P. Scrimin, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4348–4352.
- [33] R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2013–2025.
- [34] S. Eustis, M. A. El-Sayed, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 209–217.
- [35] H. H. Gorris, U. Resch-Genger, *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 5875–5890.
- [36] Y. Yang, J. Mu, B. Xing, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**, *9*, e1408 (19 Seiten).
- [37] Q. Su, W. Feng, D. Yang, F. Li, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 32–40.
- [38] N. Asad, D. Deodato, X. Lan, M. B. Widegren, D. L. Phillips, L. Du, T. M. Dore, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 12591–12600.
- [39] T.-D. Kim, K.-S. Lee, *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, *36*, 943–958.
- [40] M. Marazzi, H. Gattuso, A. Monari, X. Assfeld, *Front. Chem.* **2018**, *6*, 269 (19 Seiten).
- [41] L. Guo, M. S. Wong, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 5400–5428.
- [42] Y. Becker, E. Unger, Fichte, Manuela A. H., D. A. Gacek, A. Dreuw, J. Wachtveitl, P. J. Walla, A. Heckel, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 2797–2802.
- [43] J. Garcia-Amorós, S. Nonell, D. Velasco, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3421–3423.
- [44] M. M. Russev, S. Hecht, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 3348–3360.
- [45] T. Weber, V. Chandrasekaran, I. Stamer, M. B. Thygesen, A. Terfort, T. K. Lindhorst, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14583–14586.
- [46] V. Chandrasekaran, E. Johannes, H. Kobarg, F. D. Sönnichsen, T. K. Lindhorst, *ChemistryOpen* **2014**, *3*, 99–108.
- [47] B. Apostolovic, M. Danial, H.-A. Klok, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3541–3575.
- [48] D. N. Reinhoudt, M. Crego-Calama, *Science* **2002**, *295*, 2403–2407.
- [49] G. Ercolani, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16097–16103.
- [50] G. Ercolani, C. Piguët, M. Borkovec, J. Hamacek, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 12195–12203.

- [51] R. A. Copeland, *Enzymes*, 2. Aufl., Wiley-VCH, New York und Toronto, **2002**.
- [52] von Krbek, Larissa K. S., C. A. Schalley, P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2622–2637.
- [53] D. J. Diestler, E. W. Knapp, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 178101 (4 Seiten).
- [54] A. K. Adak, H.-J. Lin, C.-C. Lin, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5563–5573.
- [55] A. S. Perelson, *Math. Biosci.* **1981**, *53*, 1–39.
- [56] J. M. Belitsky, A. Nelson, J. D. Hernandez, L. G. Baum, J. F. Stoddart, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 1140–1151.
- [57] van Dongen, Mallory A., C. A. Dougherty, Banaszak Holl, Mark M., *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 3215–3234.
- [58] C. Chittasupho, *Ther. Deliv.* **2012**, *3*, 1171–1187.
- [59] L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 696–703.
- [60] J. E. Gestwicki, W. Christopher, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922–14933.
- [61] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 836–863.
- [62] W. B. Turnbull, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 267–268.
- [63] E. Zacco, C. Anish, C. E. Martin, H. v. Berlepsch, E. Brandenburg, P. H. Seeberger, B. Kokschi, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 2188–2197.
- [64] Gerling-Driessen, Ulla I. M., N. Mujkic-Ninnemann, D. Ponader, D. Schöne, L. Hartmann, B. Kokschi, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 2394–2402.
- [65] J. Dervedde, A. Rausch, M. Weinhardt, S. Enders, R. Tauber, K. Licha, M. Schirner, U. Zugel, A. v. Bonin, R. Haag, *PNAS* **2010**, *107*, 19679–19684.
- [66] I. Papp, J. Dervedde, S. Enders, R. Haag, *Chem. Commun.* **2008**, *3*, 5851–5853.
- [67] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2348–2368.

- [68] Á. G. Barrientos, de la Fuente, Jesús M., T. C. Rojas, A. Fernández, S. Penadés, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1909–1921.
- [69] Y.-Y. Chien, M.-D. Jan, A. K. Adak, H.-C. Tzeng, Y.-P. Lin, Y.-J. Chen, K.-T. Wang, C.-T. Chen, C.-C. Chen, C.-C. Lin, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1100–1109.
- [70] I. Papp, C. Sieben, K. Ludwig, M. Roskamp, C. Böttcher, S. Schlecht, A. Herrmann, R. Haag, *Small* **2010**, *6*, 2900–2906.
- [71] R. S. Kane, *Langmuir* **2010**, *26*, 8636–8640.
- [72] N. Katsonis, M. Lubomska, M. M. Pollard, B. L. Feringa, P. Rudolf, *Prog. Surf. Sci.* **2007**, *82*, 407–434.
- [73] F. L. Callari, S. Petralia, S. Conoci, S. Sortino, *New J. Chem.* **2008**, *32*, 1899–1903.
- [74] M. Loweneck, A. G. Milbradt, C. Root, H. Satzger, W. Zinth, L. Moroder, C. Renner, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 2099–2108.
- [75] R. Klajn, P. J. Wesson, K. J. M. Bishop, B. A. Grzybowski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7035–7039.
- [76] E. Orgiu, N. Crivillers, M. Herder, L. Grubert, M. Pätzelt, J. Frisch, E. Pavlica, D. T. Duong, G. Bratina, A. Salleo, S. Hecht u. a., *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 675–679.
- [77] V. Chandrasekaran, K. Kolbe, F. Beiroth, T. K. Lindhorst, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 223–233.
- [78] R. Klajn, *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82*, 2247–2279.
- [79] G. S. Hartley, *J. Chem. Soc.* **1938**, 633–642.
- [80] N. Nishimura, T. Sueyoshi, H. Yamanaka, E. Imai, S. Yamamoto, S. Hasegawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, *49*, 1381–1387.
- [81] C. J. Brown, *Acta Cryst.* **1966**, *21*, 146–152.
- [82] A. Mostad, C. Rømming, S. Hammarström, Lousberg, R. J. J. C., U. Weiss, *Acta Chem. Scand.* **1971**, *25*, 3561–3568.

- [83] Tan, Eric M. M., S. Amirjalayer, S. Smolarek, A. Vdovin, F. Zerbetto, W. J. Buma, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 5860 (7 Seiten).
- [84] H. Haken, C. Wolf, *Molekülphysik und Quantenchemie: Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen*, 5. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **2006**.
- [85] V. Chandrasekaran, T. K. Lindhorst, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 7519–7521.
- [86] T. Nägele, R. Hoche, W. Zinth, J. Wachtveitl, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *272*, 489–495.
- [87] D. L. Beveridge, H. H. Jaffé, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 1948–1953.
- [88] Le Fèvre, R. J. W., J. Northcott, *J. Chem. Soc.* **1953**, *0*, 867–870.
- [89] D. Schulte-Frohlinde, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1958**, *612*, 138–152.
- [90] E. R. Talaty, J. C. Fargo, *Chem. Commun.* **1967**, *0*, 65–66.
- [91] P. D. Wildes, J. G. Pacifici, G. Irick, D. G. Whitten, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2004–2008.
- [92] K. S. Schanze, T. F. Mattox, D. G. Whitten, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1733–1735.
- [93] A. M. Sanchez, R. H. Rossi, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2974–2976.
- [94] M. Kojima, S. Nebashi, K. Ogawa, N. Kurita, *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18*, 994–1000.
- [95] E. Titov, L. Lysyakova, N. Lomadze, A. V. Kabashin, P. Saalfrank, S. Santer, *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 17369–17377.
- [96] J. Garcia-Amorós, A. Sánchez-Ferrer, W. A. Massad, S. Nonell, D. Velasco, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 13238–13242.
- [97] N. J. Dunn, W. H. Humphries, A. R. Offenbacher, T. L. King, J. A. Gray, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 13144–13151.
- [98] D. Gegiou, K. A. Muszkat, E. Fischer, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 3907–3918.
- [99] C. Wang, R. G. Weiss, *Macromolecules* **2003**, *36*, 3833–3840.

- 
- [100] J. Toullec in *The chemistry of enols*, (Hrsg.: Z. Rappoport), John Wiley & Sons, Inc, Chichester, **1990**, S. 323–398.
- [101] G. Gabor, Y. F. Frei, E. Fischer, *J. Phys. Chem.* **1968**, *72*, 3266–3272.
- [102] S. Monti, G. Orlandi, P. Palmieri, *Chem. Phys.* **1982**, *71*, 87–99.
- [103] N. Nishimura, S. Kosako, Y. Sueishi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1984**, *57*, 1617–1625.
- [104] S. Kobayashi, H. Yokoyama, H. Kamei, *Chem. Phys. Lett.* **1987**, *138*, 333–338.
- [105] International Organization for Standardization, *Technical Specification: Nanotechnologies - Vocabulary - Part 2: Nano-objects*, ISO/TS 80004-2:2015.
- [106] R. Nagarajan, T. A. Hatton, *Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization*, Bd. 996, 1. Aufl., American Chemical Society, Washington, DC, **2008**.
- [107] C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, M. A. El-Sayed, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1025–1102.
- [108] Y. Yang, X.-K. Cui, M. Zhong, Z.-J. Li, *Carbohydr. Res.* **2012**, *361*, 189–194.
- [109] L. Hu, H. Wu, C. Cai, T. Xu, B. Zhang, S. Jin, Z. Wan, X. Wei, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 11283–11291.
- [110] G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster, *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113*, 823–839.
- [111] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, Chan, Warren C. W., *Nano Lett.* **2006**, *6*, 662–668.
- [112] A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, Hoek, Eric M. V., P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543–557.
- [113] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, E. Duguet, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2161–2175.
- [114] F. Wang, D. Banerjee, Y. Liu, X. Chen, X. Liu, *Analyst* **2010**, *135*, 1839–1854.
- [115] M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293–346.
- [116] M. Faraday, *Philos. Trans. R. Soc. London* **1857**, *147*, 145–181.

- [117] W. Haiss, Thanh, N. T. K., J. Aveyard, D. G. Fernig, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4215–4221.
- [118] Y.-J. Lee, N. B. Schade, L. Sun, J. A. Fan, D. R. Bae, M. M. Mariscal, G. Lee, F. Capasso, S. Sacanna, V. N. Manoharan, G.-R. Yi, *ACS Nano* **2013**, *7*, 11064–11070.
- [119] H. Liao, J. H. Hafner, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 4636–4641.
- [120] S. Mayilo, M. A. Kloster, M. Wunderlich, A. Lutich, T. A. Klar, A. Nichtl, K. Kürzinger, F. D. Stefani, J. Feldmann, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 4558–4563.
- [121] S. Zeng, K.-T. Yong, I. Roy, X.-Q. Dinh, X. Yu, F. Luan, *Plasmonics* **2011**, *6*, 491–506.
- [122] N. Nath, A. Chilkoti, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5370–5378.
- [123] G. Mie, *Ann. Phys.* **1908**, *330*, 377–445.
- [124] L. M. Liz-Marzán, *Mater. Today* **2004**, *7*, 26–31.
- [125] L. Genzel, T. P. Martin, *Phys. Status Solidi B* **1972**, *51*, 91–99.
- [126] P. Mulvaney, *Langmuir* **1996**, *12*, 788–800.
- [127] P. Zijlstra, M. Orrit, *Rep. Prog. Phys.* **2011**, *74*, 106401(55 Seiten).
- [128] P. Zijlstra, Paulo, Pedro M. R., K. Yu, Q.-H. Xu, M. Orrit, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8352–8355.
- [129] B. M. Amoli, S. Gumfekar, A. Hu, Y. N. Zhou, B. Zhao, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 20048–20056.
- [130] Rao, C. N. Ramachandra, G. U. Kulkarni, P. J. Thomas, P. P. Edwards, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 27–35.
- [131] G. Frens, *Nat. Phys. Sci.* **1973**, *241*, 20–22.
- [132] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55–75.
- [133] S. Kumar, K. S. Gandhi, R. Kumar, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46*, 3128–3136.
- [134] K. R. Brown, D. G. Walter, M. J. Natan, *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 306–313.

- 
- [135] T. Laaksonen, P. Ahonen, C. Johans, K. Kontturi, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 2143–2149.
- [136] V. Biju, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 744–764.
- [137] Z. Wang, B. Tan, I. Hussain, N. Schaeffer, M. F. Wyatt, M. Brust, A. I. Cooper, *Langmuir* **2007**, *23*, 885–895.
- [138] C. Pfeiffer, C. Rehbock, D. Huhn, C. Carrillo-Carrion, de Aberasturi, D. J., V. Merk, S. Barcikowski, W. J. Parak, *J. R. Soc. Interface* **2014**, *11*, 20130931 (13 Seiten).
- [139] S. D. Techane, L. J. Gamble, D. G. Castner, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 9432–9441.
- [140] C. L. Schofield, A. H. Haines, R. A. Field, D. A. Russell, *Langmuir* **2006**, *22*, 6707–6711.
- [141] S.-Y. Lin, Y.-T. Tsai, C.-C. Chen, C.-M. Lin, C.-h. Chen, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 2134–2139.
- [142] C. S. Weisbecker, M. V. Merritt, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1996**, *12*, 3763–3772.
- [143] A. Caragheorgheopol, V. Chechik, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 5029–5041.
- [144] R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533–3539.
- [145] D. J. Lavrich, S. M. Wetterer, S. L. Bernasek, G. Scoles, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3456–3465.
- [146] R. Klajn, J. F. Stoddart, B. A. Grzybowski, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2203–2237.
- [147] R. Klajn, K. J. M. Bishop, B. A. Grzybowski, *PNAS* **2007**, *104*, 10305–10309.
- [148] C. Raimondo, N. Crivillers, F. Reinders, F. Sander, M. Mayor, P. Samori, *PNAS* **2012**, *109*, 12375–12380.
- [149] Y. Ma, F. You, K. Promthaveepong, N. Li, *Sens. Actuators B* **2017**, *245*, 369–374.
- [150] Z. Qian, D. S. Ginger, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 5266–5276.

- [151] S. Chen, K. Kimura, *Langmuir* **1999**, *15*, 1075–1082.
- [152] H. Choo, E. Cutler, Y.-S. Shon, *Langmuir* **2003**, *19*, 8555–8559.
- [153] C.-C. Lin, Y.-C. Yeh, C.-Y. Yang, C.-L. Chen, G.-F. Chen, C.-C. Chen, Y.-C. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3508–3509.
- [154] M. Hartmann, P. Betz, Y. Sun, S. N. Gorb, T. K. Lindhorst, A. Krueger, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6485–6492.
- [155] L. Bhattacharyya, C. F. Brewer, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *176*, 207–212.
- [156] G. Pace, V. Ferri, C. Grave, M. Elbing, C. v. Hanisch, M. Zharnikov, M. Mayor, M. A. Rampi, P. Samori, *PNAS* **2007**, *104*, 9937–9942.
- [157] U. Resch-Genger, H. H. Gorris, *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 5855–5874.
- [158] X. Liu, R. Deng, Y. Zhang, Y. Wang, H. Chang, L. Huang, X. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, Journal Article, 1479–1508.
- [159] K. Lingeshwar Reddy, R. Balaji, A. Kumar, V. Krishnan, *Small* **2018**, *14*, 1801304.
- [160] T. Sun, F. Ai, G. Zhu, F. Wang, *Chem. Asian J.* **2018**, *13*, 373–385.
- [161] S. M. Saleh, R. Ali, T. Hirsch, O. S. Wolfbeis, *J. Nanopart. Res.* **2011**, *13*, 4603–4611.
- [162] C. F. Gainer, G. S. Joshua, De Silva, Channa R., M. Romanowski, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 18530–18533.
- [163] K. Zheng, W. Song, C. Lv, Z. Liu, W. Qin, *CrystEngComm* **2014**, *16*, 4329–4337.
- [164] F. Wang, Y. Han, C. S. Lim, Y. Lu, J. Wang, J. Xu, H. Chen, C. Zhang, M. Hong, X. Liu, *Nature* **2010**, *463*, 1061–1065.
- [165] Q. Huang, J. Yu, E. Ma, K. Lin, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 4719–4724.
- [166] L. Wang, Y. Li, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1645–1649.
- [167] J. Park, K. An, Y. Hwang, J.-G. Park, H.-J. Noh, J.-Y. Kim, J.-H. Park, N.-M. Hwang, T. Hyeon, *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 891–895.

- 
- [168] S. Wilhelm, M. Kaiser, C. Würth, J. Heiland, C. Carrillo-Carrion, V. Muhr, O. S. Wolfbeis, W. J. Parak, U. Resch-Genger, T. Hirsch, *Nanoscale* **2015**, *7*, 1403–1410.
- [169] H. Na, K. Woo, K. Lim, H. S. Jang, *Nanoscale* **2013**, *5*, 4242–4251.
- [170] Z. Li, Y. Zhang, *Nanotechnology* **2008**, *19*, 345606–345611.
- [171] H.-X. Mai, Y.-W. Zhang, L.-d. Sun, C.-H. Yan, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 13730–13739.
- [172] J.-C. Boyer, M.-P. Manseau, J. I. Murray, van Veggel, Frank C. J. M., *Langmuir* **2010**, *26*, 1157–1164.
- [173] A. Dong, X. Ye, J. Chen, Y. Kang, T. Gordon, J. M. Kikkawa, C. B. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 998–1006.
- [174] A. Sedlmeier, H. H. Gorris, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1526–1560.
- [175] R. Naccache, F. Vetrone, V. Mahalingam, L. A. Cuccia, J. A. Capobianco, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 717–723.
- [176] L. Xiong, Z. Chen, Q. Tian, T. Cao, C. Xu, F. Li, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 8687–8694.
- [177] H.-P. Zhou, C.-H. Xu, W. Sun, C.-H. Yan, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 3892–3900.
- [178] H. Hu, L. Xiong, J. Zhou, F. Li, T. Cao, C. Huang, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3577–3584.
- [179] J. C. Boyer, N. J. J. Johnson, F. C. J. M. van Veggel, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 2010–2012.
- [180] N. Bogdan, F. Vetrone, G. A. Ozin, J. A. Capobianco, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 835–840.
- [181] Ellis-Davies, Graham C R, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619–628.
- [182] H. Yu, J. Li, D. Wu, Z. Qiu, Y. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 464–473.
- [183] F. C. Santos, Soares, Ana M. S., Gonçalves, M. Sameiro T., Costa, Susana P. G., *Amino Acids* **2017**, *49*, 1077–1088.

- [184] N. Komori, S. Jakkampudi, R. Motoishi, M. Abe, K. Kamada, K. Furukawa, C. Katan, W. Sawada, N. Takahashi, H. Kasai, B. Xue, T. Kobayashi, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 331–334.
- [185] K. A. Korzycka, P. M. Bennett, E. J. Cueto-Diaz, G. Wicks, M. Drobizhev, M. Blanchard-Desce, A. Rebane, H. L. Anderson, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2419–2426.
- [186] E. B. Brown, J. B. Shear, S. R. Adams, R. Y. Tsien, W. W. Webb, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 489–499.
- [187] Corrie, J. E. T., Y. Katayama, G. P. Reid, M. Anson, D. R. Trentham, Cruickshank, Durward William John, J. R. Helliwell, L. N. Johnson, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* **1992**, *340*, 233–244.
- [188] S. Gug, F. Bolze, A. Specht, C. Bourgogne, M. Goeldner, J.-F. Nicoud, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9525–9529.
- [189] T. Šolomek, J. Wirz, P. Klán, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 3064–3072.
- [190] T. Furuta, S. S.-H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *PNAS* **1999**, *96*, 1193–1200.
- [191] M. M. Mahmoodi, D. Abate-Pella, T. J. Pundsack, C. C. Palsuledesai, P. C. Goff, D. A. Blank, M. D. Distefano, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5848–5859.
- [192] O. D. Fedoryak, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3419–3422.
- [193] L.-M. Herzig, I. Elamri, H. Schwalbe, J. Wachtveitl, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 14835–14844.
- [194] M. Lu, O. D. Fedoryak, B. R. Moister, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2119–2122.
- [195] K. Marter, J. Wetzels, J. Eichhorst, N. Eremina, G. Lebouille, A. Barth, B. Wiesner, D. Eisenhardt, *ChemistrySelect* **2017**, *2*, 6212–6217.
- [196] R. Schmidt, D. Geissler, V. Hagen, J. Bendig, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 5768–5774.
- [197] H. Takano, T. Narumi, N. Ohashi, A. Suzuki, T. Furuta, W. Nomura, H. Tamamura, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 4400–4404.
- [198] T. Furuta, *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **2012**, *70*, 1164–1169.

- 
- [199] S. Mizukami, M. Hosoda, T. Satake, S. Okada, Y. Hori, T. Furuta, K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9524–9525.
- [200] T. Furuta, T. Watanabe, S. Tanabe, J. Sakyo, C. Matsuba, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4717–4720.
- [201] M. Goard, G. Aakalu, O. D. Fedoryak, C. Quinonez, J. St. Julien, S. J. Poteet, E. M. Schuman, T. M. Dore, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 685–693.
- [202] B. Schade, V. Hagen, R. Schmidt, R. Herbrich, E. Krause, T. Eckardt, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9109–9117.
- [203] L. Birnbaumer, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1990**, *30*, 675–705.
- [204] N. Gamper, M. S. Shapiro, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 921–934.
- [205] K. Begum, B. Li, R. W. Beeman, Y. Park, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *39*, 717–725.
- [206] C. A. Ryan, G. Pearce, J. Scheer, D. S. Moura, *Plant Cell* **2002**, *14*, S251–S264.
- [207] O. Khamessi, H. Ben Mabrouk, H. Othman, R. ElFessi-Magouri, M. d. Waard, M. Hafedh, N. Marrakchi, N. Srairi-Abid, R. Kharrat, *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *120*, 1777–1788.
- [208] H. P. Latscha, U. Kazmaier, H. A. Klein, *Organische Chemie, Chemie-Basiswissen II*, 6. Aufl., Springer, Berlin und Heidelberg, **2008**.
- [209] J. W. Becker, G. N. Reeke, J. L. Wang, B. A. Cunningham, G. M. Edelman, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 1513–1524.
- [210] J. M. Mason, K. M. Arndt, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 170–176.
- [211] F. H. C. Crick, *Acta Cryst.* **1953**, *6*, 689–697.
- [212] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Owner: Janis Added to JabRef: 2012.04.25, Springer Science + Business Media, LLC, New York, **2006**.

- [213] M. Fink, R.-D. Heuer, H. Kleinpoppen, K.-P. Lieb, N. Risch, P. Schmüser, *Bergmann Schaefer Lehrbuch der Experimentalphysik: Bestandteile der Materie Atome, Moleküle, Atomkerne, Elementarteilchen, Bd. 4*, (Hrsg.: W. Raith), Walter de Gruyter, Berlin, New York, **2003**.
- [214] H. Mustroph, S. Ernst, *Chem. unserer Zeit* **2011**, *45*, 256–269.
- [215] *Strukturanalytik organischer und anorganischer Verbindungen*, (Hrsg.: C. Elschenbroich, F. Hensel, H. Hopf), unter Mitarb. von C. Elschenbroich, F. Hensel, H. Hopf, B.G. Teubner Verlag, Wiesbaden, **2007**.
- [216] C. Würth, D. Geißler, T. Behnke, M. Kaiser, U. Resch-Genger, *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 59–78.
- [217] M. Göppert-Mayer, *Ann. Phys.* **1931**, *401*, 273–294.
- [218] M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning, H. L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3244–3266.
- [219] R. K. Benninger, D. W. Piston, *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2013**, *59*, 4.11.24 (36 Seiten).
- [220] T. Gaumnitz, A. Jain, Y. Pertot, M. Huppert, I. Jordan, F. Ardana-Lamas, H. J. Wörner, *Opt. Express* **2017**, *25*, 27506.
- [221] W. Demtröder, *Laserspektroskopie Grundlagen und Techniken*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **2007**.
- [222] S. d. Reguardati, J. Pahapill, A. Mikhailov, Y. Stepanenko, A. Rebane, *Opt. Express* **2016**, *24*, 9053–9066.
- [223] G. Liu, C. E. Conn, C. J. Drummond, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15949–15959.
- [224] H.-W. Liu, Y. Liu, P. Wang, X.-B. Zhang, *Methods Appl. Fluoresc.* **2017**, *5*, 012003 (24 Seiten).
- [225] L. Shi, A. Rodríguez-Contreras, R. R. Alfano, *J. Biomed. Opt.* **2014**, *19*, 126006 (5 Seiten).
- [226] N. S. Makarov, M. Drobizhev, A. Rebane, *Opt. Express* **2008**, *16*, 4029–4047.

- 
- [227] N. S. Makarov, J. Campo, J. M. Hales, J. W. Perry, *Opt. Mater. Express* **2011**, *1*, 551–563.
- [228] G. Porter, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1950**, *200*, 284–300.
- [229] Edgecombe, F. H. C., Norrish, R. G. W., B. A. Thrush, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1957**, *243*, 24–32.
- [230] J. van Houten, *J. Chem. Educ.* **2002**, *79*, 548–550.
- [231] G. Stark, P. Lauger, G. Adam, *Physikalische Chemie und Biophysik*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2009**.
- [232] F. Auzel, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 139–174.
- [233] J. Chen, J. X. Zhao, *Sensors* **2012**, *12*, 2414–2435.
- [234] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, *437*, 55–75.
- [235] E. Oh, M. Y. Hong, D. Lee, S. H. Nam, H. C. Yoon, H. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3270–3271.
- [236] I. H. Stein, V. Schüller, P. Böhm, P. Tinnefeld, T. Liedl, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 689–695.
- [237] S. Chakraborty, D. Nunez, S.-Y. Hu, M. P. Domingo, J. Pardo, A. Karmenyan, A. Chiou, S. D’Auria, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102572 (13 Seiten).
- [238] M. Lessard-Viger, M. Rioux, L. Rainville, D. Boudreau, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 3066–3071.
- [239] H. Ripperger, *Z. Chem.* **1966**, *6*, 161–171.
- [240] A. F. Drake, *J. Phys. E: Sci. Instrum.* **1986**, *19*, 170–181.
- [241] L. Whitmore, B. A. Wallace, *Biopolymers* **2008**, *89*, 392–400.
- [242] N. J. Greenfield, *Nat. Protoc.* **2007**, *1*, 2876–2890.
- [243] A. Micsonai, F. Wien, . Bulyaki, J. Kun, . Moussong, Y.-H. Lee, Y. Goto, M. Refregiers, J. Kardos, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W315–W322.
- [244] S. Beychok, *Annu. Rev. Biochem.* **1968**, *37*, 437–462.
- [245] E. Lehrer, *Z. Techn. Phys.* **1942**, *23*, 169–176.

- [246] M. H. Gey, *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen*, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2008**.
- [247] W. Kong, T. Sun, B. Chen, X. Chen, F. Ai, X. Zhu, M. Li, W. Zhang, G. Zhu, F. Wang, *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 872–877.
- [248] L. M. Bronstein, X. Huang, J. Retrum, A. Schmucker, M. Pink, B. D. Stein, B. Dragnea, *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 3624–3632.
- [249] C. Fang, N. Bhattarai, C. Sun, M. Zhang, *Small* **2009**, *5*, 1637–1641.
- [250] A. L. Willis, N. J. Turro, S. O'Brien, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 5970–5975.
- [251] W. Schmickler, M. Lingner, *Grundlagen der Elektrochemie*, 1. Aufl., Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, **1996**, xi, 214.
- [252] R. Pecora, *Dynamic Light Scattering, Applications of Photon Correlation Spectroscopy*, 1. Aufl., Plenum Press, New York und London, **1985**.
- [253] Malvern Instruments Ltd, *Zetasizer Nano Series User Manual*, MANO317, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire UK, **2004**.
- [254] E. Abbe, *Archiv f. mikrosk. Anatomie* **1873**, *9*, 413–418.
- [255] L. Reimer, H. Kohl, *Transmission electron microscopy, Bd. 36*, 5. Aufl., Springer, New York, **2010**.
- [256] D. McMullan, *Scanning* **1995**, *17*, 175–185.
- [257] S. L. Flegler, J. W. Heckman, K. L. Klomparens, *Elektronenmikroskopie, Grundlagen, Methoden, Anwendungen*, Spektrum, Heidelberg, **1995**.
- [258] A. V. Crewe, *J. Microsc.* **1974**, *100*, 247–259.
- [259] R. B. M. Schasfoort, A. J. Tudos, *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2008**.
- [260] E. Kretschmann, H. Raether, *Z. Naturforsch. A: Phys. Sci.* **1968**, *230*, 2135–2136.
- [261] S. Ehrmann, C.-W. Chu, S. Kumari, K. Silberreis, C. Böttcher, J. Dervedde, B. J. Ravoo, R. Haag, *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 4216–4222.

- [262] R. Behrendt, P. White, J. Offer, *J. Pept. Sci.* **2016**, *22*, 4–27.
- [263] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675.
- [264] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682.
- [265] T. C. McIlvaine, *J. Biol. Chem.* **1921**, *49*, 183–186.
- [266] Kuipers, Bas J. H., H. Gruppen, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5445–5451.
- [267] H. J. Kühn, S. E. Braslavsky, R. Schmidt, *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 2105–2146.
- [268] M. Montalti, A. Credi, L. Prodi, M. T. Gandolfi, J. Michl, V. Balzani, *Handbook of photochemistry*, 3. Aufl., CRC Press, Boca Raton, **2006**.
- [269] F. F. Marafatto, M. L. Strader, J. Gonzalez-Holguera, A. Schwartzberg, B. Gilbert, J. Peña, *PNAS* **2015**, *112*, 4600–4605.
- [270] C. G. Hatchard, C. A. Parker, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1956**, *235*, 518–536.
- [271] M. Dong, A. Babalhavaeji, S. Samanta, A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2662–2670.
- [272] A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422–4437.
- [273] E. Bartels, N. H. Wassermann, B. F. Erlanger, *PNAS* **1971**, *68*, 1820–1823.
- [274] M. Volgraf, P. Gorostiza, R. Numano, R. H. Kramer, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *2*, 47–52.
- [275] F. Zhang, A. Zarrine-Afsar, M. S. Al-Abdul-Wahid, R. S. Prosser, A. R. Davidson, G. A. Woolley, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2283–2289.
- [276] M. Liu, H. Asanuma, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1009–1015.
- [277] A. Telleria, van Leeuwen, P. W. N. M., Z. Freixa, *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 3569–3578.

- [278] J. Garcia-Amorós, S. Nonell, D. Velasco, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4022.
- [279] R. Siewertsen, H. Neumann, B. Buchheim-Stehn, R. Herges, C. Näther, F. Renth, F. Temps, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15594–15595.
- [280] V. Chandrasekaran, H. Jacob, F. Petersen, K. Kathirvel, F. Tuczec, T. K. Lindhorst, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 8744–8752.
- [281] E. Fischer, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 796–797.
- [282] L. B. Jones, G. S. Hammond, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4219–4220.
- [283] J. Griffiths, *Chem. Soc. Rev.* **1972**, *1*, 481–493.
- [284] D. Himmel, S. K. Goll, I. Leito, I. Krossing, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6885–6888.
- [285] J. Kalmár, G. Lente, I. Fábián, *Dyes Pigm.* **2016**, *127*, 170–178.
- [286] A. Castillo, A. F. Roig-Navarro, O. J. Pozo, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1172*, 179–185.
- [287] L. Cattoir, V. Pede, A.-S. Decavele, De Buyzere, Marc L., M. M. Speeckaert, D. Secombe, V. Boterberg, P. Dubruel, F. d. Bisschop, J. R. Delanghe, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2013**, *51*, 2109–2114.
- [288] M. Predotova, R. Kretschmann, J. Gebauer, A. Buerkert, *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **2011**, *174*, 347–349.
- [289] V. V. Yaminsky, B. W. Ninham, R. M. Pashley, *Langmuir* **1998**, *14*, 3223–3235.
- [290] S. H. Behrens, D. G. Grier, *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 6716–6721.
- [291] M. Calvin, H. W. Alter, *J. Chem. Phys.* **1951**, *19*, 768–770.
- [292] K. S. Schanze, T. F. Mattox, D. G. Whitten, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2808–2813.
- [293] T. Asano, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 1205–1206.
- [294] T. Asano, T. Okada, S. Shinkai, K. Shigematsu, Y. Kusano, O. Manabe, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5161–5165.

- [295] L. Bhattacharyya, J. S. Rohrer, *Applications of Ion Chromatography for Pharmaceutical and Biological Products*, 1. Aufl., John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, **2012**.
- [296] Z. Rappoport, *Handbook of tables for organic compound identification*, 3. Aufl., CRC Press, Cleveland, **1985**, 563 s.
- [297] J. Clayden, *Organic chemistry*, 1. Aufl., Oxford University Press, New York, **2000**.
- [298] E. Klotz, R. Doyle, E. Gross, B. Mattson, *J. Chem. Educ.* **2011**, *88*, 637–639.
- [299] I. M. Klotz, H. A. Fiess, Chen Ho, J. Y., M. Mellody, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 5136–5140.
- [300] E. A. Braude, F. C. Nachod, *Determination of Organic Structures by Physical Methods*, 1. Aufl., Academic Press, New York, **1955**.
- [301] P. Y. Bruice, *Organic Chemistry*, 7. Aufl., Pearson, Boston, **2014**.
- [302] G. E. Lewis, *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 2193–2195.
- [303] G. Féraud, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvét, E. Marceca, *J. Phys. Chem. A* **2016**, *120*, 3897–3905.
- [304] M. Kojima, T. Takagi, T. Karatsu, *Chem. Lett.* **2000**, *29*, 686–687.
- [305] G. Gabor, Y. Frei, D. Gegiou, M. Kaganowitch, E. Fischer, *Isr. J. Chem.* **1967**, *5*, 193–211.
- [306] A. Yano, Y. Konno, E. Kinoshita, R. Yano, *J. Photochem. Photobiol. A* **2017**, *346*, 411–415.
- [307] N. Kurita, S. Nebashi, M. Kojima, *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *408*, 197–204.
- [308] J. Cui, J. Zheng, W. Qiao, X. Wan, *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *326*, 267–274.
- [309] Y. Ogawa, C. Yoshiyama, T. Kitaoka, *Langmuir* **2012**, *28*, 4404–4412.
- [310] A. M. Sanchez, M. Barra, R. H. d. Rossi, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1604–1609.
- [311] J.-W. Park, J. S. Shumaker-Parry, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 1907–1921.

- [312] D. R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 84. Aufl., CRC Press, Boca Raton, **2004**.
- [313] R. Esfandiary, A. Parupudi, J. Casas-Finet, D. Gadre, H. Sathish, *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*, 577–586.
- [314] B. Demeule, C. Palais, G. Machaidze, R. Gurny, T. Arvinte, *mAbs* **2009**, *1*, 142–150.
- [315] K. Vasilev, *Fluorophores near metal interfaces*, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle-Wittenberg.
- [316] K. Heister, D. L. Allara, K. Bahnck, S. Frey, M. Zharnikov, M. Grunze, *Langmuir* **1999**, *15*, 5440–5443.
- [317] K. Shin, E. J. Shin, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2008**, *29*, 1259–1262.
- [318] M. Suda, N. Kameyama, M. Suzuki, N. Kawamura, Y. Einaga, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 160–163.
- [319] J. Zhang, J. K. Whitesell, M. A. Fox, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 2323–2331.
- [320] P. Grunwald, *Handbook of carbohydrate-modifying biocatalysts*, 1. Aufl., Pan Stanford Publishing, Singapur, **2012**.
- [321] S. Kaushik, D. Mohanty, A. Surolia, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 21–34.
- [322] C. Sicard-Roselli, E. Brun, M. Gilles, G. Baldacchino, C. Kelsey, H. McQuaid, C. Polin, N. Wardlow, F. Currell, *Small* **2014**, *10*, 3338–3346.
- [323] D. E. Dietrich, A. D. Martin, K. A. Brogden, *Peptides* **2014**, *53*, 265–269.
- [324] Biacore, *Biacore Assay Handbook*, Bd. 29-0194-00, Auflage AA, General Electric Company, Uppsala, **2012**.
- [325] I. Lundström, *Biosens. Bioelectron.* **1994**, *9*, 725–736.
- [326] O. Srinivas, N. Mitra, A. Surolia, N. Jayaraman, *Glycobiology* **2005**, *15*, 861–873.
- [327] I. Ojea-Jiménez, V. Puentes, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13320–13327.
- [328] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, *0*, 801–802.

- [329] J. Manson, D. Kumar, B. J. Meenan, D. Dixon, *Gold Bull.* **2011**, *44*, 99–105.
- [330] F. Schulz, T. Vossmeier, N. G. Bastús, H. Weller, *Langmuir* **2013**, *29*, 9897–9908.
- [331] A. L. Parry, N. A. Clemson, J. Ellis, S. S. R. Bernhard, B. G. Davis, N. R. Cameron, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9362–9365.
- [332] J. Kuil, L. van Wandelen, N. J. d. Mol, R. M. J. Liskamp, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 685–691.
- [333] R. Roy, D. Page, S. Figueroa Perez, V. Verez Bencomo, *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 251–263.
- [334] C. F. Brewer, L. Bhattacharyya, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 7306–7310.
- [335] I. J. Goldstein, H. C. Winter, R. D. Poretz in *Glycoproteins II*, New Comprehensive Biochemistry, Elsevier, **1997**, S. 403–474.
- [336] S. Krakert, A. Terfort, *Aust. J. Chem.* **2010**, *63*, 303.
- [337] S. Silvi, M. Venturi, A. Credi, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2483–2489.
- [338] M. Matsuzaki, Ellis-Davies, Graham C. R., T. Nemoto, Y. Miyashita, M. Iino, H. Kasai, *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 1086–1092.
- [339] W. Denk, J. Strickler, W. Webb, *Science* **1990**, *248*, 73–76.
- [340] S. Namjoshi, I. Toth, J. T. Blanchfield, N. Trotter, R. L. Mancera, H. A. E. Benson, *Pharm. Res.* **2014**, *31*, 3304–3312.
- [341] O. Wiedow, F. Wiese, E. Christophers, *Arch. Dermatol. Res.* **1995**, *287*, 632–635.
- [342] O. Wiedow, F. Wiese, V. Streit, C. Kalm, E. Christophers, *J. Invest. Dermatol.* **1992**, *99*, 306–309.
- [343] U. Meyer-Hoffert, J. Wingerts Zahn, O. Wiedow, *J. Invest. Dermatol.* **2004**, *123*, 338–345.
- [344] R. Caccetta, J. Ross, P. Murray, D. Rocco, *Drug Des. Dev. Ther.* **2016**, *10*, 2203–2209.
- [345] I. Toth, M. Christodoulou, K. Bankowsky, N. Flinn, W. A. Gibbons, G. Godeau, E. Moczar, W. Hornebeck, *Int. J. Pharm.* **1995**, *125*, 117–122.

- [346] M. E. Lane, *Int. J. Pharm.* **2013**, *447*, 12–21.
- [347] T.-L. Pan, P.-W. Wang, I. A. Aljuffali, Y.-L. Leu, Y.-Y. Hung, J.-Y. Fang, *Toxicol. Lett.* **2014**, *226*, 173–181.
- [348] S. Heuschkel, A. Goebel, R. H. Neubert, *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 603–631.
- [349] E. Touitou, B. Godin, Y. Karl, S. Bujanover, Y. Becker, *J. Control. Release* **2002**, *80*, 1–7.
- [350] A. Naik, L. A. Pechtold, R. O. Potts, R. H. Guy, *J. Control. Release* **1995**, *37*, 299–306.
- [351] K. Yamamoto, R. Flesch, T. Ohigashi, S. Hedtrich, A. Klossek, P. Patoka, G. Ulrich, S. Ahlberg, F. Rancan, A. Vogt, U. Blume-Peytavi, P. Schrade, S. Bachmann, M. Schäfer-Korting, N. Kosugi, E. Rühl, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 6173–6179.
- [352] H. Marwah, T. Garg, A. K. Goyal, G. Rath, *Drug Deliv.* **2014**, *23*, 564–578.
- [353] L. D. Simonetti, G. M. Gelfuso, J. C. Barbosa, R. F. Lopez, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *73*, 90–94.
- [354] M. Sznitowska, S. Janicki, A. C. Williams, *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 1109–1114.
- [355] S. Nad, M. Kumbhakar, H. Pal, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 4808–4816.
- [356] K. Rurack, M. Spieles, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1232–1242.
- [357] J.-C. Diels, W. Rudolph, *Ultrashort Laser Pulse Phenomena*, 2. Aufl., Elsevier Inc., Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Sydney, Tokyo, **2006**.
- [358] A. Fischer, C. Cremer, Stelzer, E. H. K., *Appl. Opt.* **1995**, *34*, 1989–2003.
- [359] L. Donato, A. Mourot, C. M. Davenport, C. Herbivo, D. Warther, J. Léonard, F. Bolze, J.-F. Nicoud, R. H. Kramer, M. Goeldner, A. Specht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1840–1843.
- [360] D. Warther, F. Bolze, J. Léonard, S. Gug, A. Specht, D. Puliti, X.-H. Sun, P. Kessler, Y. Lutz, J.-L. Vonesch, B. Winsor, J.-F. Nicoud, M. Goeldner, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2585–2590.

- [361] L.-C. Cheng, N. G. Horton, K. Wang, S.-J. Chen, C. Xu, *Biomed. Opt. Express* **2014**, *5*, 3427–3433.
- [362] G. A. Blab, P. H. Lommerse, L. Cognet, G. S. Harms, T. Schmidt, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *350*, 71–77.
- [363] A. S. Melnikov, P. Y. Serdobintsev, A. D. Vedyaykin, M. A. Khodorkovskii, *J. Phys.: Conf. Ser.* **2017**, *917*, 062029 (6 Seiten).
- [364] S. Banala, M. C. Arvin, N. M. Bannon, X.-T. Jin, J. J. Macklin, Y. Wang, C. Peng, G. Zhao, J. J. Marshall, K. R. Gee, D. L. Wokosin, V. J. Kim, J. M. McIntosh, A. Contractor, H. A. Lester, Y. Kozorovitskiy, R. M. Drenan, L. D. Lavis, *Nat. Methods* **2018**, *15*, 347–350.
- [365] J. Goedhart, Gadella, T. W. J., *Biochemistry* **2004**, *43*, 4263–4271.
- [366] T. Eckardt, V. Hagen, B. Schade, R. Schmidt, C. Schweitzer, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 703–710.
- [367] P. T. Wong, E. W. Roberts, S. Tang, J. Mukherjee, J. Cannon, A. J. Nip, K. Corbin, M. F. Krummel, S. K. Choi, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 1001–1010.
- [368] K. König, M. Speicher, R. Bückle, J. Reckfort, G. McKenzie, J. Welzel, M. J. Koehler, P. Elsner, M. Kaatz, *J. Biophoton.* **2009**, *2*, 389–397.
- [369] K. Svoboda, R. Yasuda, *Neuron* **2006**, *50*, 823–839.
- [370] J. A. Falenski, U. I. Gerling, B. Koksich, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3703–3706.
- [371] S. C. Wagner, M. Roskamp, M. Pallerla, R. R. Araghi, S. Schlecht, B. Koksich, *Small* **2010**, *6*, 1321–1328.
- [372] Á. Piñeiro, A. Villa, T. Vagt, B. Koksich, A. E. Mark, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 3701–3713.
- [373] S. Jiang, Y. Zhang, *Langmuir* **2010**, *26*, 6689–6694.
- [374] M. Haase, H. Schäfer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 5808–5829.
- [375] K. Pagel, K. Seeger, B. Seiwert, A. Villa, A. E. Mark, S. Berger, B. Koksich, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1189–1194.

- [376] S. Perumal, A. Hofmann, N. Scholz, E. Rühl, C. Graf, *Langmuir* **2011**, *27*, 4456–4464.
- [377] J.-C. Boyer, F. C. J. M. van Veggel, *Nanoscale* **2010**, *2*, 1417–1419.
- [378] F. Wang, R. Deng, J. Wang, Q. Wang, Y. Han, H. Zhu, X. Chen, X. Liu, *Nat. Mater.* **2011**, *10*, 968–973.
- [379] F. Wang, X. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 976–989.
- [380] J. K. Vandavasi, W.-P. Hu, C.-Y. Chen, J.-J. Wang, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8895–8901.
- [381] Y. Lu, J. D. Miller, *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *256*, 41–52.
- [382] H.-M. Hung, Y. Katrib, S. T. Martin, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 4517–4530.
- [383] N. J. Greenfield, G. D. Fasman, *Biochemistry* **1969**, *8*, 4108–4116.
- [384] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 3. Aufl., Elsevier, Amsterdam, **2013**.
- [385] S. Udenfriend, S. Stein, P. Bohlen, W. Dairman, W. Leimgruber, M. Weigele, *Science* **1972**, *178*, 871–872.
- [386] H. Nakamura, Z. Tamura, *Anal. Chem.* **2002**, *52*, 2087–2092.
- [387] M. Kinoshita, Y. Okamoto, F. Hirata, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2773–2779.
- [388] B. Apostolovic, H.-A. Klok, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3173–3180.
- [389] C. Liu, H. Wang, X. Li, D. Chen, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 3546–3553.
- [390] C. Liu, Z. Wang, X. Wang, Z. Li, *Sci. China Chem.* **2011**, *54*, 1292–1297.
- [391] J. S. McMurray, D. R. Coleman, W. Wang, M. L. Campbell, *Biopolymers* **2004**, *60*, 3–31.
- [392] G. Stærkær, M. H. Jakobsen, C. E. Olsen, A. Holmb, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5389–5392.

# A. Tabellen - thermische Relaxation von Glycoazobenzolen

**Tabelle A.1.** – Lebensdauern der Photoschalter **AB2** und **AB3** in mit KHP gepuffertem Methanol. Zusätzlich sind die aus den bei höheren Konzentrationen nicht linearen Verläufen der thermischen Relaxation extrahierten zweiten Transienten angegeben.

c in $\mu\text{mol L}^{-1}$	$\tau_{(\text{AB2 in KHP/MeOH})}$ in ms	$\tau_{(\text{AB2 extrahiert})}$ in ms	$\tau_{(\text{AB3 in KHP/MeOH})}$ in ms	$\tau_{(\text{AB3 extrahiert})}$ in ms
1	$8.8 \pm 0.4$	N.A.	$8.9 \pm 0.4$	N.A.
11	$7.8 \pm 0.4$	$2.8 \pm 0.3$	$8.3 \pm 0.4$	—
21	$7.2 \pm 0.4$	$4.4 \pm 0.4$	$7.8 \pm 0.4$	$4.0 \pm 0.4$
30	$6.9 \pm 0.3$	$4.2 \pm 0.4$	$7.4 \pm 0.4$	$4.1 \pm 0.4$
40	$6.7 \pm 0.3$	$4.3 \pm 0.4$	$7.2 \pm 0.4$	$3.8 \pm 0.4$
49	$6.4 \pm 0.3$	$4.2 \pm 0.4$	$7.0 \pm 0.3$	$3.9 \pm 0.4$
58	$6.3 \pm 0.3$	$3.8 \pm 0.4$	$6.7 \pm 0.3$	$3.9 \pm 0.4$
76	$6.2 \pm 0.3$	$3.6 \pm 0.4$	$6.8 \pm 0.3$	$3.9 \pm 0.3$
93	$6.0 \pm 0.3$	$3.2 \pm 0.3$	$6.7 \pm 0.3$	$3.8 \pm 0.4$
109	$6.0 \pm 0.3$	$4.1 \pm 0.4$	$6.7 \pm 0.3$	$3.6 \pm 0.4$
125	$6.2 \pm 0.3$	$4.3 \pm 0.4$	$6.7 \pm 0.3$	$2.9 \pm 0.3$
140	$6.1 \pm 0.3$	$5.2 \pm 0.5$	$6.9 \pm 0.3$	$2.9 \pm 0.3$
155	$6.0 \pm 0.3$	$3.6 \pm 0.4$	—	—

**Tabelle A.2.** – Lebensdauern der Photoschalter **AB2**, **AB3** und **AB5** in reinem Methanol.

c in $\mu\text{mol L}^{-1}$	$\tau_{(\text{AB2 in MeOH})}$ in ms	$\tau_{(\text{AB3 MeOH})}$ in ms	$\tau_{(\text{AB5 in MeOH})}$ in min
1	—	—	1200 $\pm$ 400
5	1300 $\pm$ 100	1460 $\pm$ 120	—
10	1200 $\pm$ 100	1450 $\pm$ 120	450 $\pm$ 150
21	—	—	450 $\pm$ 150
41	—	—	210 $\pm$ 80
50	340 $\pm$ 30	700 $\pm$ 60	—
60	—	—	410 $\pm$ 150
90	—	—	280 $\pm$ 100
110	135 $\pm$ 10	200 $\pm$ 20	—
162	—	—	220 $\pm$ 80
170	49 $\pm$ 4	—	—

**Tabelle A.3.** – Lebensdauern der langsamen Photoschalter **AB1**, **AB4** und **AB5** in mit KHP gepuffertem Methanol.

c in $\mu\text{mol L}^{-1}$	$\tau_{(\text{AB1 in KHP/MeOH})}$ in h	$\tau_{(\text{AB4 in KHP/MeOH})}$ in h	$\tau_{(\text{AB5 in KHP/MeOH})}$ in h
5	70 $\pm$ 10	8.0 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.2
6	90 $\pm$ 10	9.0 $\pm$ 0.6	0.9 $\pm$ 0.2
8	90 $\pm$ 10	9.6 $\pm$ 0.6	1.6 $\pm$ 0.2
10	80 $\pm$ 10	9.4 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.3
30	80 $\pm$ 10	8.5 $\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 0.3
50	70 $\pm$ 10	9.0 $\pm$ 0.6	1.5 $\pm$ 0.2
80	90 $\pm$ 10	8.4 $\pm$ 0.6	3.2 $\pm$ 0.5
110	90 $\pm$ 10	8.3 $\pm$ 0.6	4.2 $\pm$ 0.6
140	60 $\pm$ 10	8.1 $\pm$ 0.6	5.0 $\pm$ 0.8
170	80 $\pm$ 10	8.1 $\pm$ 0.6	5.6 $\pm$ 0.8

**Tabelle A.4.** – Lebensdauern des Photoschalters **AB2** in mit MOPS gepuffertem DMSO.

$c$ in $\mu\text{mol L}^{-1}$	$\tau_{(\text{AB2 in MOPS/DMSO})}$ in ms
19	$54 \pm 3$
30	$50 \pm 3$
40	$45 \pm 3$
50	$42 \pm 3$
80	$35 \pm 3$

**Tabelle A.5.** – Lebensdauern der Photoschalter **AB4** und **AB5** in reinem DMSO.

$c$ in $\mu\text{mol L}^{-1}$	$\tau_{(\text{AB4 in DMSO})}$ in min	$\tau_{(\text{AB5 DMSO})}$ in min
2	$120 \pm 10$	$150 \pm 15$
11	$120 \pm 10$	$120 \pm 10$
21	$120 \pm 10$	$22 \pm 2$
41	$130 \pm 10$	$25 \pm 2$
60	$120 \pm 10$	$20 \pm 2$
90	$120 \pm 10$	$15 \pm 2$
160	$100 \pm 10$	$8 \pm 1$



## B. Verwendete Chemikalien

Verbindung	Abkürzung	Hersteller	Qualität
Aceton	-	Sigma Aldrich	HPLC grade
Acetonitril	ACN	VWR Chemicals	HPLC grade
Ameisensäure	-	Acros Organics	99%
Ammoniak (25%ig)	-	Carl Roth	reinst%
Ammoniumfluorid	NH <sub>4</sub> F	Sigma Aldrich	99.99%
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich	99.0%
6-Carboxyfluorescein Succinimidylester	FAM-NHS	Lumiprobe GmbH	95%
5(6)-Carboxytetra- methylrhodamin Succinimidylester	TAMRA	Lumiprobe GmbH	95%
Citronensäure	-	Sigma Aldrich	95%
Concanavalin A	ConA	Sigma Aldrich	90-100%
Biotinyliertes Concanavalin A	-	Vector Laboratories	98%
Cysteamin Hydrochlorid	-	FLUKA	98%
1,8-diazabicyclo[5,4,0]- undec-7-en	DBU	Alfa Aesar	99%
Dichlormethan	DCM	Merck Millipore	p.a.
2,3-Dichlor-5,6-dicyano- 1,4-benzochinon	DDQ	Acros Organics	98%
Diethylether	-	VWR International	p.a.
<i>N, N'</i> -Diisopropylcarbo- diimide	DIC	Alfa Aesar	99%
Dimethylformamid	DMF	Acros Organics	p.a.
Dimethylsulfid	DMS	Sigma Aldrich	99%
Dimethylsulfoxid, wasserfrei	DMSO	Sigma Aldrich	99.9%

B. Verwendete Chemikalien

Verbindung	Abkürzung	Hersteller	Qualität
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck Millipore	Ph. Eur.
<i>N, N'</i> -Disuccinimidylcarbonat	DSC	Sigma Aldrich	95%
Eisen(III)Chlorid-Hexahydrat	FeCl <sub>3</sub>	Sigma Aldrich	99%
Erbium(III)Chlorid-Hexahydrat	ErCl <sub>3</sub>	Sigma Aldrich	99.9%
Ethanol (unvergällt)	EtOH	VWR Chemicals	96%
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid	EDC	Sigma Aldrich	99%
Fmoc-Aminosäuren	-	ORPEGEN Peptide Chemicals GmbH	99.5%
Gadolinium(III)Chlorid-Hexahydrat	GdCl <sub>3</sub>	Sigma Aldrich	99.999%
Fmoc-AS-Wang LL Harze (AA = Alanin o. Valin), 100-200 mesh	-	Merck Millipore	99.5%
Fmoc-Val-NovaSyn®TGA	-	Merck Millipore	99.5%
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES	Sigma Aldrich	99.5%
Hexafluorisopropanol	HFIP	Sigma Aldrich	99%
<i>n</i> -Hexan	-	Sigma Aldrich	HPLC gr.
Hydrogentetrachloraurat(III)-Trihydrat	-	Acros Organics	99.9%
1-Hydroxybenzotriazol	HOBt	TCI America	97.0%

Verbindung	Abkürzung	Hersteller	Qualität
Hydroxylaminhydrochlorid	NH <sub>2</sub> OH · HCl	Sigma Aldrich	99.0%
Kaliumoxalat-Monohydrat	K <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Sigma Aldrich	98.5%
Kaliumhydrogenphthalat	KHP	FLUKA	p.a.
Mangan(II)Chlorid	MnCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich	98%
Mercaptobernsteinsäure	MSA	Acros Organics	99%
Mercaptotetraethylenglycol	HS-PEG4-OH	PurePEG, LLC	95%
Mercaptopentaethylenglycol	HS-PEG5-OH	PurePEG, LLC	95%
Mercaptotriethylenglycolpropionsäure	HS-PEG3COOH	PurePEG, LLC	95%
Mercaptotetraethylenglycolpropionsäure	HS-PEG4COOH	PurePEG, LLC	95%
11-Mercaptoundecansäure	MUA	Sigma Aldrich	95%
Methanol	MeOH	Sigma Aldrich	HPLC grade
Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid	-	Sigma Aldrich	99%
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	MES	Sigma Aldrich	99%
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure	MOPS	Merck Millipore	99.5%
Natriumacetat	-	Merck Millipore	98%
Natriumborhydrid	NaBH <sub>4</sub>	Sigma Aldrich	99%
Natriumchlorid	NaCl	Carl Roth	99%
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Citrat	Merck Millipore	99%
Natriumhydroxid	NaOH	Grüssing	99%

B. Verwendete Chemikalien

Verbindung	Abkürzung	Hersteller	Qualität
Natriumoleat	-	abcr GmbH	99%
Natriumhydrogen- carbonat	NaHCO <sub>3</sub>	Merck Millipore	p.a.
Natriumcarbonat- Monohydrat	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	VEB Vereinigte Sodawerke	p.a.
N,N- Diisopropylethylamin	DIPEA	Sigma Aldrich	99%
Ölsäure	-	Sigma Aldrich	90%
1-Octadecen	-	abcr GmbH	90%
1,10-Phenantrolin	-	Sigma Aldrich	99%
Piperidin	-	Sigma Aldrich	99.5%
Pyridin	-	abcr GmbH	99.5%
Salpetersäure	HNO <sub>3</sub>	Grüssing	65%
Salzsäure	HCl	Grüssing	37%
Schwefelsäure	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Grüssing	95-97%
Tetrachlormethan	CCl <sub>4</sub>	Merck Millipore	p.a.
Tofacitinib-Citrat	Tofa-Citrat	Sigma Aldrich	98%
Toluol	-	Sigma Aldrich	99.5%
Triethylamin	Et <sub>3</sub> N	VWR Chemicals	99.6%
Trifluoroessigsäure	TFA	VWR International	99.8%
Trinatriumcitrat- Dihydrat	-	Grüssing	95%
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan	TRIS	Sigma Aldrich	99.8%
Wasserstoffperoxid	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Carl Roth	30%
Ytterbium(III)Chlorid- Hexahydrat	YbCl <sub>3</sub>	Sigma Aldrich	99.9%
Yttrium(III)Chlorid- Hexahydrat	YCl <sub>3</sub>	Sigma Aldrich	99.99%

## C. Liste der Veröffentlichungen

### Tagungsbeiträge

- S.-H. Kung, X. Gong,<sup>1</sup> S. Perumal, J.M. Berkemeyer, A. Sahraneshin, A. Bilal, C. Graf, M. Tazarek, H.-U. Reißig,<sup>2</sup> D. Schöne, B. Kokschi, P.A. Primus, M.U. Kumke, E. Rühl, *Thermodynamics and Kinetics of Multivalent Interaction with Interfaces*, 2. International Symposium of the Collaborative Research Center (SFB) 765, Berlin, **2012**
- J. Berkemeyer, D. Schöne, N. Tetzlaff, B. Kokschi, E. Rühl, *Background free detection of multivalent interactions by optical spectroscopy*, 3. International Symposium of the Collaborative Research Center (SFB) 765, Berlin, **2014**
- J. Berkemeyer, V. Chandrasekaran, M. Starke, T. K. Lindhorst, E. Rühl, *Thermal relaxation of azobenzene glycosides*, Bunsentagung, Hamburg, **2014**

## D. Danksagung

Prof. Dr. Eckart Rühl danke ich für die Bereitstellung der interessanten Themen dieser Arbeit sowie für die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Prof. Dr. Beate Koksch möchte ich für die Unterstützung im Rahmen der beiden Peptidstudien danken, dass ich in ihren Laboren arbeiten durfte und natürlich auch für ihre Tätigkeit als Zweitgutachterin.

Frau Prof. Dr. Thisbe Lindhorst und Dr. Vijayanand Chandrasekaran (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) danke ich für die Synthese der Photoschalter und die guten wissenschaftlichen Diskussionen.

Christian Kühne (Freie Universität Berlin und Charité Universitätsmedizin Berlin) und Dr. Jens Darnedde (Charité Universitätsmedizin Berlin) gilt mein Dank für die Zusammenarbeit und Aufnahme von SPR-Messungen.

Frau Iris Pieper (Technische Universität Berlin) möchte ich für die ICP-OES-Messungen danken.

Frau Anke Schindler und Christian Goroncy danke ich für die Aufnahme von Elektronenmikroskopiebildern.

Bei Stefan Thierbach möchte ich mich ganz besonders für die Unterstützung in technischen Fragestellungen bedanken.

Bei Dr. Jürgen Plenge bedanke ich mich herzlich für die anfängliche Hilfe im Laserlabor, private und wissenschaftliche Gespräche.

Mein besonderer Dank gilt dem Femtoteam Ina Halfpap, Chrisopher Raschpichler und Valerie Mondes sowie meinen Studenten Marian Starke, Nadine Tetzlaff, Katrin Dettweiler, Zhengchao You, Shu Wang, Marleen Hußmann und Jian Liang Low.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten AG Rühl, AG Graf und AG Koksch für die inspirierende Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit bedanken.

Dem durch die DFG geförderten Sonderforschungsbereich 765 danke ich für die finanzielle Unterstützung.

---

Meiner Familie und Freunden bin ich sehr dankbar für das viele Verständnis und die Liebe, welche sie mir stets entgegenbringen.

Mein größter Dank geht an meine Verlobte Dr. Kristin Folmert, die mich während meines gesamten Studiums und der Dissertation begleitet hat, mir trotz eigener Doktorarbeit die Peptidsynthese beibrachte sowie Kooperationspartnerin bei den beiden Peptidstudien war.