
PHOTOLABILE SCHUTZGRUPPEN UND IHRE
ANWENDUNG ZUR
WELLENLÄNGENSELEKTIVEN
AKTIVIERUNG UND DEAKTIVIERUNG
EINES ANTIBIOTIKUMS

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich 14

der Goethe-Universität Frankfurt

von

CHAHINEZ ABDELLAOUI

geboren in Algier

Frankfurt am Main 2022

(D 30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang
Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz
1. Gutachter: Prof. Dr. Josef Wachtveitl
2. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Heckel
Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen und Experimentelle Techniken.....	3
2.1	UV/vis-Spektroskopie	4
2.2	IR-Spektroskopie.....	7
2.3	Laser-Spektroskopie.....	9
2.4	Nichtlineare Optik.....	11
2.5	Ultraschnelle Transiente Absorptionsspektroskopie.....	14
2.6.	Quantenchemische Berechnungen.....	17
2.6.1.	Dichtefunktionaltheorie.....	19
3	Photoaktivierbare Verbindungen	23
3.1	Photolabile Schutzgruppen.....	24
3.1.1	Fluorenole.....	26
3.1.2	Cumarine.....	28
3.2	Bioaktive Zielmoleküle	30
3.2.1	Antibiotika.....	30
3.2.2	Neurotransmitter.....	34
4	Material und Methoden.....	35
5	Ergebnisse und Diskussion.....	41
5.1	Fluoren-basierte Schutzgruppen.....	41
5.1.1	Absorptions- und Fluoreszenzspektren	43
5.1.2	Uncaging von Fluoren-basierten Schutzgruppen	45
5.1.3	Dimethylamino-Fluorenylkation.....	49
5.1.4	pH abhängiges Verhalten	63
5.1.5	Photoinduzierter pH-Sprung.....	65

5.1.6	Photodynamik von Fluoren-basierten Schutzgruppen.....	67
5.2	Cyclopentabisthiophen-basierte Schutzgruppen.....	71
5.2.1	Stationäre UV/vis-Experimente.....	73
5.2.2	Ultrakurzzeit Dynamik von CBT.....	74
5.3	Wellenlängenselektives Aktivieren und Deaktivieren von Puromycin.....	76
5.3.1	Nitro-Puromycin.....	79
5.3.2	Cumarin-Derivate.....	83
5.3.3	Thio-DEACM-nitro-Puromycin.....	90
6	Zusammenfassung.....	103
	Literaturverzeichnis.....	107
	Danksagung.....	119
	Publikationen.....	121
	Abkürzungsverzeichnis.....	123
	Abbildungsverzeichnis.....	125
	Eidesstattliche Erklärung.....	135
	Lebneslauf.....	137

1 Einleitung

Die Wissenschaft zielt darauf ab Prozesse und Phänomene in der Natur, im Tier oder Menschen verstehen zu lernen. Aus den gewonnenen Erkenntnissen können Lösungsansätze für bestehende Probleme entwickelt werden, die das Leben verbessern. So hat beispielsweise Wissen aus dem Bereich der Physik zur Entwicklung der Photovoltaik geführt, die heute eine fundamentale Rolle beim Umstieg zu erneuerbaren Energiequellen spielt. Weiterhin ist die moderne Medizin mit all ihren Errungenschaften aus dem gesammelten Wissen aus den Disziplinen Chemie, Biologie und Anatomie entstanden. Trotz des bereits in vielen Bereichen gewonnenen Wissens und der zahlreichen Innovationen, bleiben ungelöste Fragestellungen. Nach wie vor gelten beispielsweise einige Krankheiten, wie Multiple Sklerose, Alzheimer und COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) als unheilbar.^[1-3] Darüber hinaus gilt es bereits etablierte Behandlungsmethoden zu verbessern, da sie teils gravierende Nebenwirkungen aufweisen. Der wohl bekannteste und schwerwiegendste Fall schädlichster Nebenwirkungen tritt bei der Behandlung von Krebserkrankungen auf. Dabei gibt es zwei grundlegende Behandlungsmethoden: entweder mit Zytostatika oder Chemo-Therapie. Keine der beiden Methoden weist eine spezifische Wirkung am Tumor selbst auf, stattdessen beeinträchtigen sie die Zellteilung im gesamten Körper und damit auch an gesundem Gewebe.

Ein vielversprechender Ansatz, um derart unspezifische Therapien zu optimieren und auch neue zu entwickeln, ist die Applikation von Licht als externer Stimulus zur Aktivierung von Wirkstoffen. Licht erweist sich in dieser Beziehung als besonders geeignet, da es aufgrund seiner Eigenschaften nicht-invasiv einsetzbar ist und zugleich ein hohes Maß an Kontrolle in Bezug auf Ort, Zeitpunkt und Dosis erlaubt.

Das Prinzip, chemische Reaktionen durch Licht zu initiieren, ist bereits aus der Natur bekannt. Die Photosynthese stellt beispielsweise die Umwandlung von Sonnenlicht durch Pflanzen, Algen und einige Bakterienarten in chemische Energie dar, die für den Stoffwechsel und das Wachstum der Organismen notwendig ist.^[4,5] Auch der Sehvorgang basiert auf einer lichtinduzierten Reaktion. An der Netzhaut des Auges befinden sich Photorezeptoren, die sogenannten Rhodopsine, in die das lichtempfindliche Retinal eingebettet ist. Durch das einfallende Licht findet eine Umwandlung der molekularen Struktur des Retinals statt, wonach ein elektrisches Signal an das Gehirn weitergegeben und dort ein Bild des Gesehenen erzeugt wird. Derartige natürlich vorkommende Lichtrezeptoren, wie Ionenkanäle und -pumpen, werden im Bereich der Optogenetik verwendet, um sie in Fremdzellen zu exprimieren. Dort kann somit ein Lichtimpuls in ein definiertes

zelluläres Signal umgewandelt werden.^[6-8] Ein verbreitetes Zielsystem innerhalb der Optogenetik sind neuronale Zellen.^[9-11] Hier wurden bereits einige wichtige Erkenntnisse über die Einflussnahme auf Krankheiten wie Parkinson und einige psychische Erkrankungen erhalten.^[12-14]

Eine weitere Methode, um phototherapeutische Anwendungen zu realisieren, wird als Photopharmakologie bezeichnet und ergibt sich aus der Synthese lichtabhängiger molekularer Systeme. Durch die synthetische Chemie bestehen nahezu unerschöpfliche Möglichkeiten zum Design neuer lichtaktivierbarer Wirkstoffe.^[15,16] Dazu können sowohl biologisch aktive Wirkstoffe als Biomoleküle synthetisch durch lichtensitive Struktureinheiten modifiziert werden, sodass sie erst durch einen Lichtimpuls ihre biologisch aktive Zielstruktur einnehmen.^[17-19] Die Konzeptionierung der *Prodrugs*^[20] kann auf drei Arten erfolgen: der photodynamischen Therapie, dem *Photo-Uncaging* und dem *Photo-switching*, wobei die beiden letzten die auf den zwei grundlegenden photochemischen Ansätzen beruhen.^[21]

Grundlage der oben genannten vielversprechenden Ansätze ist die Photochemie, welche eine Subsparte der Chemie darstellt und sich im Allgemeinen mit chemischen Reaktionen beschäftigt, bei denen Licht als Reagenz eingesetzt wird.^[22] Dabei wird Lichtenergie in chemische Reaktionen umgewandelt. In der Photochemie werden die chemischen, physikalischen und elektronischen Veränderungen lichtaktiver Verbindungen untersucht.^[23] In Bezug auf die Photopharmakologie und Optogenetik stellt die Photochemie einen entscheidenden Aspekt zur lichtinduzierten Freisetzung der biologisch aktiven Substanz dar. Auch im Hinblick auf die Materialwissenschaften hat die Photochemie wichtige Beiträge geleistet, wie beispielsweise bei der Entwicklung von Photovoltaikanlagen oder von organischen LEDs für Displays. Prinzipiell gibt es zwei Mechanismen einer photoinduzierten Aktivierung, basierend auf einer Konformationsänderung oder einem Bindungsbruch. Bei letzterem handelt es sich um eine photolabile Schutzgruppe, die zur Freisetzung einer chemischen Gruppe mit bestimmter Funktion führt, was als *Uncaging* bezeichnet wird.^[24,25]

Die Herausforderung bei der Anwendung lichtaktivierbarer Substanzen liegt darin, einerseits genaues Wissen über die ablaufenden Reaktionen und ihre entstehenden Photoprodukte zu erlangen. Andererseits dienen die erhaltenen Erkenntnisse zur Optimierung oder Entwicklung von Anwendungen und zur Verknüpfung mit verschiedenen Gebieten wie der Medizin, Biologie und den Ingenieurwissenschaften.^[26,27]

In dieser Arbeit wird zum einen an das Design und die Weiterentwicklung neuer photolabiler Schutzgruppen beschrieben. Zum anderen wird sich der Verbesserung der selektiven Aktivierung und anschließenden Deaktivierung eines Wirkstoffs gewidmet, um die zeitliche und örtliche Kontrolle in biologischer Umgebung zu gewährleisten.

2 Grundlagen und Experimentelle Techniken

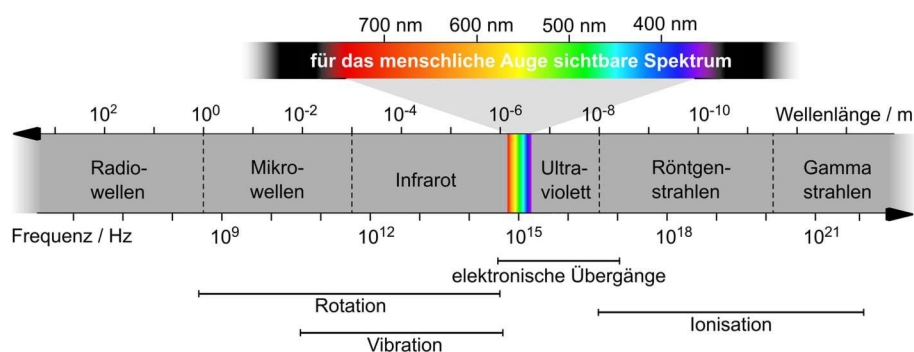


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des elektromagnetischen Spektrums und seiner Unterteilung in die verschiedenen Strahlungsarten inklusive einer Einordnung der möglichen Auswirkung der Strahlung in Wechselwirkung mit einem Molekül.

Licht kann, wie in der Einleitung erwähnt, als Werkzeug genutzt werden, um gezielt Prozesse in einem molekularen System zu steuern. Mit dem Begriff Licht ist dabei der sichtbare Frequenzbereich (vis) des elektromagnetischen (EM) Spektrums gemeint, in welchem die EM-Strahlen nach ihrer Energie bzw. Frequenz in unterschiedliche Abschnitte unterteilt werden (Abb. 2.1). Diese elektromagnetischen Strahlen bestehen aus gekoppelten elektrischen und magnetischen Feldern, die senkrecht zueinander stehen. Dabei werden niederfrequente EM-Strahlen, wie Radio- und Mikrowellen, für verschiedene alltägliche Anwendungen, wie Fernsehen, Radio, Mikrowellenherd, WLAN und Bluetooth genutzt. Andere wichtige technische Einsatzgebiete unterschiedlicher EM-Bereiche gibt es viele, darunter zählen medizinische Analysemethoden, wie die Magnetresonanztomografie und die Röntgendiagnostik, um zwei der bekanntesten zu nennen. In der Natur existieren EM-Felder hauptsächlich in Form von Wärmestrahlung und Licht. Die Sonne stellt dabei die bekannteste natürliche Quelle von EM-Strahlung dar. In der Spektroskopie hingegen kommt der Frequenzbereich von Radio- bis Gammastrahlen zum Einsatz. In dieser Arbeit werden spektroskopische Methoden mit Quellen aus dem infraroten (IR-), vis- und ultravioletten (UV) Bereich eingesetzt, um die ablaufenden Prozesse sowohl untersuchen als auch steuern zu können. Ein Molekül kann durch Wechselwirkung mit der entsprechenden Strahlung in energetisch höhere Zustände angeregt werden. Dazu zählen je nach eingestrahelter Energie verschiedene Arten der Anregung von Rotations- Schwingungs- bis zu elektronischen Übergängen.

2.1 UV/vis-Spektroskopie

Die UV/vis-Spektroskopie umfasst sowohl den ultravioletten Spektralbereich von 200 nm bis 380 nm als auch den sichtbaren Bereich von 380 nm bis 780 nm (Abb. 2.1) und ist eine Methode zur Untersuchung von elektronischen Übergängen. Dabei findet die Absorption eines Lichtquants statt, die ein Elektron von dem elektronischen Grundzustand in einen elektronisch angeregten Zustand befördert. Genauer betrachtet wird ein Valenzelektron von einem bindenden (π) oder nicht-bindenden (n), höchst-besetzten Molekülorbital (HOMO) in ein anti-bindendes (π^*), niedrigstes, unbesetztes Molekülorbital (LUMO) überführt. Dieser Prozess kann nur dann geschehen, wenn die Energie des zu absorbierenden Photons mit der Energiedifferenz ΔE der beiden beteiligten Zustände übereinstimmt (Gl. 2.1).

h : Planck'sches Wirkungsquantum
 ν : Frequenz eines Photons
 c : Lichtgeschwindigkeit

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad [2.1]$$

Neben der Resonanzbedingung (Gl. 2.1) unterliegen solche Übergänge einer Reihe weiterer Bedingungen. Dazu zählen zum einen die Auswahlregeln, wie das Spin-Verbot, welches den Erhalt der Multiplizität M während eines Übergangs vorgibt. Mit $M=2S+1$ ist das nur möglich, wenn der Gesamtspin S des Moleküls gleichbleibt, wodurch nur Singulett-Singulett-Übergänge ($S_0 \rightarrow S_n$) erlaubt sind (Abb. 2.2), während Singulett-Triplett-Übergänge ($S_0 \rightarrow T_n$) verboten sind. Im Grundzustand weist ein Molekül in der Regel einen Gesamtspin von 0 auf, da es sich im Singulett-Zustand (S_0) befindet. Infolge einer Anregung kann jedoch eine Spininversion stattfinden, die einen Gesamtspin von 1 und somit eine Multiplizität von 3 hervorruft. Auf diese Weise gelangt das Molekül in einen Triplett-Zustand, der im Fall des ersten angeregten Triplett-Zustands meist energetisch niedriger liegt als der erste angeregte Singulett-Zustand (Abb. 2.2). Darüber hinaus gilt das Verbot von Übergängen gleicher Parität (Laporte-Verbot), was im Umkehrschluss bedeutet, dass nur Übergänge zwischen Orbitalen unterschiedlicher Symmetrie erlaubt sind.^[28] Das Laporte-Verbot oder auch Paritätsverbot genannt ist im Fall einer Symmetrierniedrigung aufgehoben, die z.B. durch Kernbewegungen hervorgerufen werden kann. In der Regel können nach dem Franck-Condon-Prinzip^[29-31] die Kernkoordinaten eines Moleküls während einer Anregung, welche auf der Atto- bis Femtosekunden Zeitskala stattfindet, als konstant angesehen werden, was in einer senkrechten Darstellung im Jablonski Diagramm^[32] (Abb. 2.2) widerspiegelt wird.

Eine weitere Bedingung für einen erfolgreichen Übergang ist der räumliche Überlapp zwischen den beteiligten Molekülorbitalen. Folglich muss das Überlappintegral des Anfangs- (Ψ_A) und Endzustands (Ψ_E^*) ungleich Null sein (Gl. 2.2).

$$\int \Psi_A \Psi_E^* d\tau \neq 0 \quad [2.2]$$

Dabei ist die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs von dem Ausmaß der Überlappung beider Wellenfunktionen abhängig, welche sich im Experiment in Form der Absorptionsintensität widerspiegelt. Diese wird durch das Übergangsdipolmoment charakterisiert (Gl. 2.3), wobei $\hat{\mu}$ der elektrische Dipoloperator ist.

$$\mu_{EA} = \int \Psi_A \hat{\mu} \Psi_E^* d\tau \quad [2.3]$$

Die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs ist somit auch proportional zum Betragsquadrat des Übergangsdipolmoments $|\mu_{EA}|^2$, welches wiederum proportional zur Oszillatorstärke f (Gl. 2.4) ist.

$$f = \frac{4\pi^2 m_e v}{3 h e^2} |\mu_{EA}|^2 \quad [2.4]$$

Werden alle oben genannten Bedingungen erfüllt, so findet eine elektronische Anregung statt, die eine Abschwächung des eingestrahnten Lichts zur Folge hat. Der Zusammenhang zwischen der Absorption und der Abschwächung elektromagnetischer Wellen durch ein Medium wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben (Gl. 2.5).^[33]

$$\begin{array}{l} c: \text{Konzentration} \\ \varepsilon: \text{Extinktionskoeffizient} \\ d: \text{Schichtdicke der Probe} \end{array} \quad A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} = c \varepsilon d \quad [2.5]$$

Dabei wird die Absorption als der negative dekadische Logarithmus der Transmission T definiert, welche der Quotient aus der Intensität des transmittierten Lichts I und der Intensität des eingestrahnten Lichts I_0 ist. Das Lambert-Beer'sche Gesetz ist jedoch nur unter bestimmten Bedingungen gültig. Dazu zählen zum einen monochromatisches und kollimiertes Licht und zum anderen die Homogenität und niedrige Konzentration der Probe, da die Linearität der Gleichung 2.5 anderenfalls nicht gegeben ist. Bei hohen Konzentrationen können intermolekulare Wechselwirkungen oder Streuung des Lichts in der Lösung zu Effekten führen, die in dem von Lambert-Beer aufgestellten Zusammenhang nicht umfasst werden.

Wie bereits beschrieben sollten die diskreten Energieniveaus eines absorbierenden Moleküls im gemessenen Spektrum in Form einzelner Linien bei der jeweiligen Energie wiedergegeben werden, die dem ΔE aus Gleichung 2.1 entsprechen. Im realen Experiment

jedoch werden Absorptionsbanden gemessen, die sich aus verbreiterten Linien der einzelnen energetisch nahen Übergänge ergeben. Gründe für die sogenannte Linienverbreiterung sind neben der physikalischen Grenze zum einen die Heisenberg'schen Unschärferelation^[34] (Gl. 2.6), nach der die begrenzte Lebensdauer des angeregten Zustands eine natürlichen Linienbreite hervorruft.

$$\Delta E \Delta t \geq \frac{h}{4\pi} \quad [2.6]$$

Zum anderen trägt die Doppler-Verbreiterung^[35] und die Stoßverbreiterung zur beobachteten Linienbreite bei. Letztere entsteht durch die Stöße der in der Lösung befindlichen Teilchen, welche zu geringfügigen Veränderungen ihrer Energieniveaus führt. Der Doppler-Effekt bezieht sich hierbei auf die sich in gleicher oder entgegengesetzter Richtung bewegenden Teilchen im Verhältnis zum einfallenden Photon, wodurch sich im Bezug zum Teilchen die Frequenz des absorbierten Photons ändert. Diese Effekte führen dazu, dass in der UV/vis-Spektroskopie die Information über infolge der Anregung besetzter Schwingungszustände verloren gehen. Eine sogenannte Schwingungsfinestruktur ist nur in wenigen Einzelfällen aufgelöst, wie es in dem untersuchten Fluorenylkation der Fall ist (Kap. 5.1.3).

Befindet sich ein Molekül im angeregten Zustand, gibt es aufgrund der endlichen Lebensdauer solcher Zustände grundsätzlich eine Relaxation zum Grundzustand, welche durch unterschiedliche Deaktivierungspfade erfolgen kann. Anhand des Jablonski-Diagramms

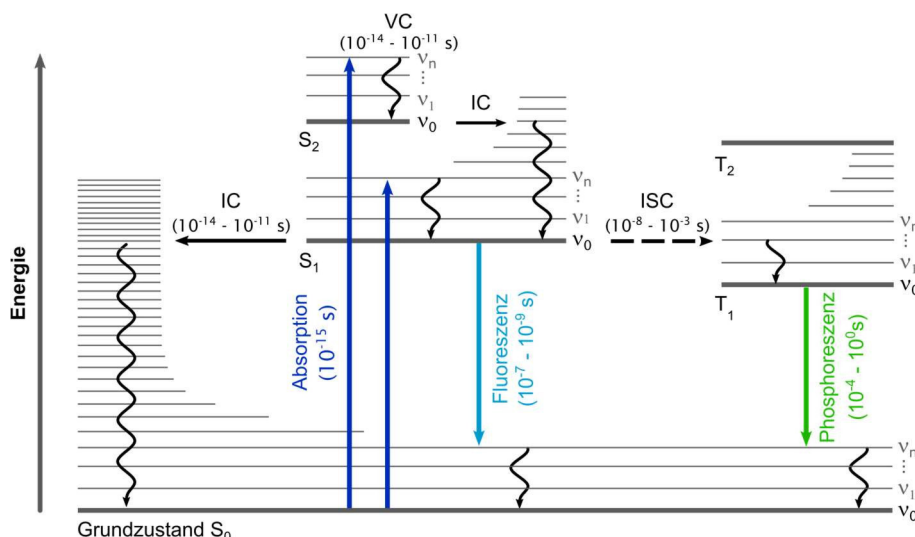


Abbildung 2.2: Das Jablonski-Diagramm fasst alle möglichen Deaktivierungsprozesse nach Photoanregung zusammen. Dabei entsprechen S den Singulett-Zuständen, T den Triplett-Zuständen, IC der inneren Umwandlung, VC der Schwingungsrelaxation und ISC der Interkombination.^[32]

(Abb. 2.2) werden die verschiedenen Relaxationsprozesse schematisch dargestellt.^[32] Ausgehend vom angeregten Zustand findet zunächst eine Schwingungsrelaxation (*vibrational cooling*, VC) in den Schwingungsgrundzustand des jeweiligen elektronisch angeregten Zustands statt. Von dort aus kann eine innere Umwandlung (*internal conversion*, IC) in einen isoenergetischen Schwingungszustand des darunterliegenden elektronischen Zustands erfolgen. Sowohl VC als auch IC findet auf einer Zeitskala von 10^{-14} bis 10^{-11} statt. Nach der Kasha-Regel^[36] fluoresziert eine Substanz nur aus dem v_0 des S_1 , da dieser Zustand oft eine Lebensdauer von 10^{-9} bis 10^{-7} s hat, die langlebiger als der Zeitbereich von IC- und VC-Prozessen ist, was allerdings nicht auf alle Systeme zutrifft (Kap. 5.1.3).^[31] Eine Interkombination (*intersystem crossing*, ISC) zum Triplett kommt, wie oben beschrieben, infolge einer Spinumkehr vor. Nach erneuter VC ist es möglich, dass aus dem v_0 des T_1 eine strahlende Deaktivierung, die sogenannte Phosphoreszenz erfolgt (Abb. 2.2).

2.2 IR-Spektroskopie

Mittels IR-Spektroskopie können Informationen über die Struktur eines Moleküls gewonnen werden. Da die vorliegende Arbeit hauptsächlich von Uncaging handelt, wurde unter der Verwendung von Fourier-Transform Infrarot- (FTIR-) Spektroskopie die Strukturänderung sowohl der Schutzgruppen als auch der Zielmoleküle untersucht. Damit können Übergänge zwischen den Schwingungsniveaus innerhalb eines elektronischen Zustands untersucht werden. Als IR-aktiv gelten Schwingungen, die infolge einer Anregung eine Änderung des Dipolmoments hervorrufen. Die FTIR-Spektroskopie erfolgt durch die Absorption polychromer Strahlung im mittleren infraroten Spektralbereich (Mid-IR), welcher dem Frequenzbereich von 400 bis 4000 cm^{-1} entspricht.^[37,38]

Zur Beschreibung einer Molekülschwingung wird ein einfaches Modell eines zweiatomigen Moleküls herangezogen (Abb. 2.3). Dabei sind die zwei Atome durch Massepunkte

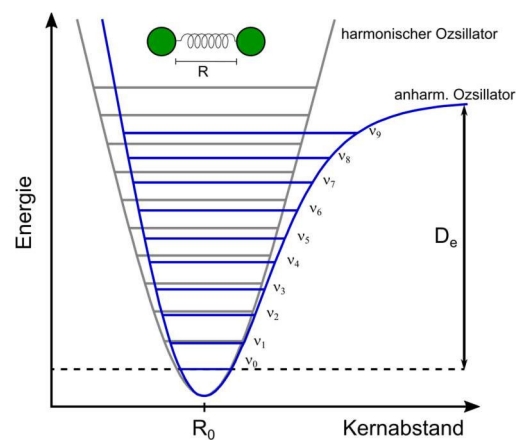


Abbildung 2.3: Darstellung der Energiepotentiale eines harmonischen im Vergleich mit einem anharmonischen Oszillator in Abhängigkeit von dem Kernabstand R und der Schwingung eines zweiatomigen Moleküls als Annäherung an eine Feder.

dargestellt, die durch eine masselose Feder verbunden sind. Eine Auslenkung eines der Massepunkte aus seiner Ruhelage erzeugt dessen Schwingung um die Ruhelage.^[39] Diese Schwingung kann zunächst als quantenmechanischer, harmonischer Oszillator beschrieben werden (Gl. 2.7).

k : Kraftkonstante
 R_0 : Gleichgewichtsabstand

$$V_{\text{harm}}(r) = \frac{1}{2} k (r - R_0)^2 \quad [2.7]$$

Die diskreten Schwingungsenergiewerte die ein Molekül einnehmen kann, ergeben sich als v_n (Gl. 2.8).

$$E = \left(v_n + \frac{1}{2} \right) h v_0 \quad [2.8]$$

Infolge der Näherung durch das harmonische Potential sind lediglich Übergänge gemäß der Auswahlregel erlaubt, wodurch sich für die Energiedifferenzen Gleichung 2.9 ergibt, die einen Schwingungsübergang als proportional zur reduzierten Masse μ und der Kraftkonstanten k beschreibt.

$$\Delta E = h v = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad [2.9]$$

Für eine realistische Beschreibung einer Molekülschwingung ist die Näherung durch den harmonischen Oszillator unzureichend, da hierbei die Rückstellkraft der Atomauslenkung als linear angenommen wird, wodurch Bindungsbrüche bei hoher energetischer Anregung nicht beschrieben werden (Abb. 2.3). Zudem gelten die Energieniveaus als äquidistant. Durch die Einführung des anharmonischen Oszillators (Gl. 2.10) werden die genannten Effekte berücksichtigt.

D_e : Dissoziationsenergie

a : Parameter der Steifigkeit

k_e : Kraftkonst. am Parabelminimum

$$V(r) = D_e [1 - e^{a(R_0 - R)}]^2 \quad \text{mit } a = \sqrt{\frac{k_e}{2D_e}} \quad [2.10]$$

Im sogenannten Morse-Potential nehmen die Abstände der Energieniveaus mit steigender Energie ab. Es gilt (Gl. 2.11):

$$v_2 - v_0 < 2 (v_1 - v_0) \quad [2.11]$$

Zudem sind die Auswahlregeln erweitert, sodass auch Übergänge der Form $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3 \dots$ erlaubt sind.

Ein Molekül mit N Atomen besitzt $3N$ Freiheitsgrade, die anhand der Raumkoordinaten beschrieben werden. Für ein nichtlineares Molekül ergeben sich jeweils 3 Translations- und Rotationsfreiheitsgrade, während im linearen Fall ein Rotationsfreiheitsgrad wegfällt. Folglich besitzt ein nichtlineares Molekül insgesamt $3N-6$ und ein lineares $3N-5$ interne Freiheitsgrade, die sogenannten Normalmoden. Bei der harmonischen Näherung bilden die Normalmoden eine orthogonale Basis zur Lösung der Bewegungsgleichung der Atome und sind somit entkoppelt. Im anharmonischen Bild hingegen entstehen Kopplungen, die zu Resonanzeffekten und Kombinationsschwingungen führen.

Die Schwingungen eines Moleküls werden aufgrund ihrer Änderung des Dipolmoments in unterschiedliche Klassen unterteilt. Dazu zählen Valenzschwingungen (ν), die auf einer Änderung der Bindungslängen beruhen. Die Deformationsschwingungen werden durch eine Änderung der Bindungswinkel hervorgerufen, welche in Auslenkungen innerhalb (δ) und aus der (γ) der Molekülebene unterteilt werden können. Findet eine Verdrillung innerhalb eines Moleküls statt, so handelt es sich um eine Torsionsschwingung (τ).

Die Strukturänderungen einer Verbindung können mittels transientser IR-Spektroskopie noch genauer beobachtet werden, da hierbei eine höhere Zeitauflösung möglich ist. Weitere Verbesserungen zur Aufklärung molekularer Struktur und ihrer Umgebung ist mit der 2D-IR-Spektroskopie möglich, welche durch den Einsatz dreier abgestimmter IR-Laserpulse erreicht wird. Diese Methode bietet mit vergleichbarer Strukturauflösung eine wesentlich bessere Zeitauflösung als die 2D-NMR-Spektroskopie.^[40-42]

2.3 Laser-Spektroskopie

Unter dem Begriff Spektroskopie wird, wie bereits in Kapitel 2.1 und 2.2 beschrieben, die Methode verstanden mithilfe derer die Eigenschaften eines Moleküls in einem bestimmten Spektralbereich, wie beispielsweise im UV/vis- oder IR-Bereich, untersucht werden können. Dies beinhaltet, wie anhand des Jablonski-Diagramms (Kap. 2.1) gezeigt, unterschiedliche Prozesse der Anregung und nachgeschalteter Deaktivierung. Dabei finden die Abläufe auf verschiedenen Zeitskalen $10^{-15} \sim 10^2$ s statt, deren Analyse mit unterschiedlichen Aufbauten realisiert werden. Während das stationäre Verhalten mittels Absorptions- und Fluoreszenz-Spektrometern beobachtet werden kann, benötigt es für die ultrakurzen photochemischen Phänomene das Anrege-Abtast-Messprinzip, welches für die nötige Zeitauflösung mit einem Laser betrieben wird.^[43] Hierzu eignen sich je

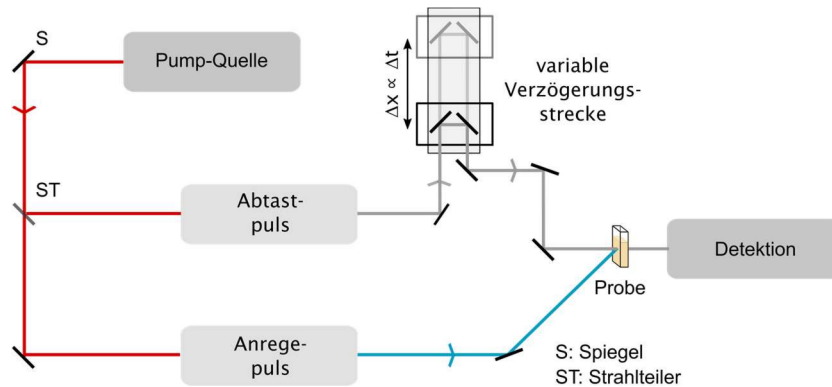


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Messaufbaus der Anrege-Abtast-Spektroskopie.

nach Zielmolekül und zu beobachtendem Prozess Laser mit einer entsprechenden Pulsbreite im Femtosekunden- (fs-Laser) (ultraschnelle Transiente Absorptionsspektroskopie, Messfenster: fs - ns) oder Nanosekunden-Bereich (Blitzlichtphotolyse, Messfenster: μs - s). Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von Lasern ist die hohe spektrale Durchstimmbarkeit.^[44] Zur Untersuchung der verschiedenen Uncaging Prozesse infolge einer Photoanregung wurde sich in dieser Arbeit aller drei zur Verfügung stehenden Messverfahren bedient, um mittels eines möglichst großen Zeitfensters von fs bis h den höchsten Informationsgehalt über die Dynamiken zu erzielen. Bei der Anrege-Abtastspektroskopie werden die Laserpulse der Pump-Quelle mit entsprechender Pulsbreite und Ausgangswellenlänge in einen Anrege- und Abtastpuls unterteilt (Abb. 2.4). Ersterer soll dabei zur Anregung der zu untersuchenden Probe dienen, weshalb er eine Umwandlung in die benötigte Wellenlänge (Kap. 2.4) durchläuft.

Der Abtastpuls wird zunächst je nach Messverfahren in ein Breitbandspektrum oder eine gezielte Abtastwellenlänge umgewandelt und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten bezüglich des Anregepulses durch die Probe gelenkt, um ihr Absorptionsverhalten aufzuzeichnen. Der Abtastpuls gelangt nach der Probe in den Detektor (Abb. 2.4). Anschließend wird die Differenz zwischen dem Absorptionsspektrum vor und nach der Anregung gebildet und gibt Aufschluss über die Absorption und somit über die photochemische Dynamik zur gegebenen Verzögerungszeit. Da es sich bei der ultraschnellen Transienten Absorptionsspektroskopie um die komplexere Messmethode handelt und die Blitzlichtphotolyse als Anrege-Abtast-Spektroskopie bis auf die Lichtquelle einen vereinfachten, aber vergleichbaren Aufbau besitzt, wird der Fokus im Folgenden auf dem Messprinzip und dem Aufbau der ersteren Methode liegen.

2.4 Nichtlineare Optik

Durch die nichtlineare optische Frequenzkonversion lässt sich eine spektrale Durchstimmbarkeit von Laser erreichen, wodurch erst deren Verwendung für eine breite Vielfalt an zu untersuchenden Systemen möglich ist.^[45]

Trifft eine Lichtwelle auf ein Medium so induziert sie eine Wechselwirkung zwischen dem elektromagnetischen Feld, der sich ausbreitenden Photonen und der Elektronen der Atome der Substanz. Modellhaft wird die Änderung des elektromagnetischen Felds der Elektronen als deren Auslenkung aus ihrer Ruhelage betrachtet (ähnlich zum harm. Oszillator: siehe Kap. 2.2).^[46] Das sich ausbreitende oszillierende, elektrische Feld \vec{E} induziert einen oszillierenden, elektrischen Dipol $\vec{\mu}$ im Medium abhängig von seiner Polarisierbarkeit α (Gl. 2.12).

$$\vec{\mu} = \alpha \cdot \vec{E} \quad [2.12]$$

Die Dichte des Dipolmoments wird als Polarisation des Mediums \vec{P} bezeichnet und kann durch Gleichung 2.13 beschrieben werden.

$\langle \vec{\mu} \rangle$: mittleres elektrisches Dipolmoment
 C : Teilchendichte

$$\vec{P} = \langle \vec{\mu} \rangle \cdot C \quad [2.13]$$

Bei geringen Lichtintensitäten besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der erzeugten Polarisation \vec{P} , und dem eingestrahnten elektrischen Feld \vec{E} (Gl. 2.14).

ϵ_0 : elektrische Feldkonstante
 χ : Suszeptibilität des Mediums

$$\vec{P}(t) = \epsilon_0 \cdot \chi \cdot \vec{E}(t) \quad [2.14]$$

Bei hohen Lichtintensitäten hängt die Antwort des Mediums nicht mehr linear vom eingestrahnten elektrischen Feld ab, wodurch die Lichtwellen Wechselwirkungen untereinander eingehen und infolge dessen höhere Ordnungen auftreten. Die Polarisation $\vec{P}(t)$ wird dann durch eine Taylorreihenentwicklung beschrieben (Gl. 2.15).^[43]

$$\vec{P}(t) = \epsilon_0 [\chi^{(1)} \vec{E}(t) + \chi^{(2)} \vec{E}^2(t) + \chi^{(3)} \vec{E}^3(t) \dots] \quad [2.15]$$

Bei der Frequenzmischung handelt es sich um einen nichtlinearen Prozess zweiter Ordnung (Gl. 2.16).^[47]

$$\vec{P}^2(t) = \epsilon_0 \chi^{(2)} \vec{E}^2(t) \quad [2.16]$$

Für die Frequenzmischung werden zwei ebene, elektromagnetische Wellen mit der Ausbreitungsrichtungen \vec{k}_1 und \vec{k}_2 und den Frequenzen ω_1 und ω_2 überlagert, die im Medium ein neues Feld erzeugen (Gl. 2.17).

$$\vec{E} = \vec{E}_1 \cdot \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) + \vec{E}_2 \cdot \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \quad [2.17]$$

Für die induzierte Polarisation des Mediums gilt dann (Gl. 2.18):

$$\begin{aligned} \vec{P}^2 = \varepsilon_0 \cdot \chi^{(2)} \left[\left(\vec{E}_1 \cdot \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) \right)^2 + \left(\vec{E}_2 \cdot \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \right)^2 \right. \\ \left. + 2\vec{E}_1 \vec{E}_2 \cdot \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) \cdot \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \right] \end{aligned} \quad [2.18]$$

Nach Umformung mit $\cos^2(v) = \frac{1}{2}(1 + \cos(2v))$, $\cos(x) \cdot \cos(y) = \frac{1}{2}[\cos(x + y) + \cos(x - y)]$ gilt (Gl. 2.19):

$$\begin{aligned} \vec{P}^2(\vec{E}) = \varepsilon_0 \cdot \chi^{(2)} \left[\frac{1}{2} \vec{E}_1^2 + \frac{1}{2} \vec{E}_2^2 \right. \\ + \frac{1}{2} \vec{E}_1^2 \cdot \cos(2\omega_1 t + 2\vec{k}_1 \vec{z}) + \frac{1}{2} \vec{E}_2^2 \cdot \cos(2\omega_2 t + 2\vec{k}_2 \vec{z}) \\ + \vec{E}_1 \vec{E}_2 \cdot \cos[(\omega_1 + \omega_2) t + (\vec{k}_1 + \vec{k}_2) \vec{z}] \\ \left. + \vec{E}_1 \vec{E}_2 \cdot \cos[(\omega_1 - \omega_2) t + (\vec{k}_1 - \vec{k}_2) \vec{z}] \right] \end{aligned} \quad [2.19]$$

Der Ausdruck der nichtlinearen Polarisation zweiter Ordnung (Gl. 2.19) enthält neben den zwei frequenzunabhängigen Anteilen (Zeile 1 der Gleichung) vier weitere Anteile (Zeilen 2-4). Die Terme in Zeile 2 enthalten jeweils die Frequenzverdopplung (*second harmonic generation*, SHG) der Ursprungsstrahlen (Abb. 2.5a). Die tatsächliche Frequenzmischung steckt in den Termen der Zeilen 3 und 4, wobei es sich im einen Fall um die Addition (Zeile 3) und im anderen um die Subtraktion (Zeile 4) der Ursprungsfrequenzen handelt, welche entsprechend als Summenfrequenz (*sum frequency generation*, SFG) und Differenzfrequenz (*difference frequency generation*, DFG) bezeichnet werden. Dabei wird durch die Energie- und Impulserhaltung (Gl. 2.20 und 2.21) bestimmt, welcher dieser Konversionsprozesse auftritt.

$$\omega_3 = \omega_1 + \omega_2 \quad [2.20]$$

$$\vec{k}_3 = \vec{k}_1 + \vec{k}_2 \quad [2.21]$$

Der nichtkollineare optisch parametrische Verstärker (NOPA) wird verwendet, um mittels der oben beschriebenen Prozesse eine für die Probe passende Anregungswellenlänge zu generieren. Das Prinzip beruht auf der Verstärkung eines gezielten Frequenzbereichs aus einem schwachen Weißlichtkontinuum durch einen intensiven Pumpuls (Abbildung 2.5b).^[48] Hierzu wird zunächst in einem nichtlinearen Kristall die SHG (Pumpuls)

der Fundamentalwellenlänge erzeugt. In den Experimenten zu dieser Arbeit wurde ein β -Bariumborat- (BBO) Kristall verwendet.^[49] Ein anderer Teil der Fundamentalen dient zur Erzeugung des Weißlichtkontinuums (Seedpuls) in einem Saphir-Kristall. Anschließend werden SHG und Weißlicht sowohl örtlich als auch zeitlich in einem weiteren BBO-Kristall überlagert, um die gewünschte Wellenlänge zu verstärken (Abb. 2.5b). Die Auswahl der zu verstärkenden Wellenlänge kann aufgrund der zeitlichen Verteilung der einzelnen Frequenzen innerhalb des Seedpulses (Chirp) durch eine zeitliche Anpassung zwischen Pump- und Seedpuls vorgenommen werden. Dies wird mithilfe einer verstellbaren Verzögerungsstrecke umgesetzt. Zudem sind weitere Parameter wie Kipp- und Schnittwinkel des Kristalls sowie Einstrahlwinkel beider Pulse zueinander anzupassen, sodass ein bestmöglicher Energieübertrag stattfinden kann. Mit diesem Prozess können Wellenlängen von 470 nm bis 750 nm erreicht werden. Neben dem erzeugten Puls mit der entsprechenden Wellenlänge (Signalpuls) resultieren zwei weitere Pulse, dem unkonvertierten Pumpimpuls und einem Idlerpuls, der aufgrund der Energie- und Impulserhaltung niederenergetischer ist und in einem steileren Winkel zum Pumpimpuls austritt. Für den Wellenlängenbereich unterhalb von 470 nm kann mit dem aus dem NOPA erhaltenen Signal eine SFG betrieben werden.

Die Effizienz der genannten Effekte hängt direkt von der konstruktiven Interferenz der beiden zu mischenden Frequenzen ab. Hierzu muss ein Medium mit einem frequenzunabhängigen Brechungsindex verwendet werden, sodass eine destruktive Interferenz unterbunden wird. Um die sogenannte Phasenanpassung zu erfüllen muss ein doppelbrechendes Medium, wie es der BBO-Kristall ist, eingesetzt werden. Dabei wird der Kristall entlang seiner optischen Achse so ausgerichtet, dass die einfallenden Wellen

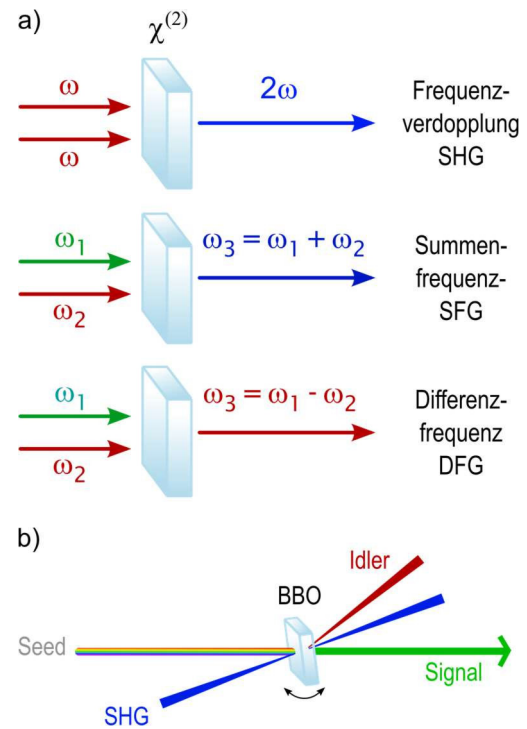


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung linearer Prozesse zweiter Ordnung. Die drei Frequenzkonversionsprozesse SHG, SFG und DFG (a) und der NOPA (b).

in einem zum gewünschten Prozess passenden Phasenanpassungswinkel aufeinander-treffen.

Bei der oben genannten Erzeugung eines Weißlichtkontinuums handelt es sich um einen nicht-linearen Prozess dritter Ordnung ($\chi^{(3)}$, Gl. 2.15). Dabei findet die spektrale Verbreiterung eines spektral schmalen, ultrakurzen Laserpulses statt. Wird im Gegensatz zu den oben genannten nicht linearen Effekten zweiter Ordnung ein isotropes Medium verwendet, so entfallen alle $\chi^{(2)}$ -Prozesse, da $\chi^{(2)} = 0$ ist. Der Brechungsindex des Mediums wird aufgrund von $\chi^{(3)}$ intensitätsabhängig, was als optischer Kerr-Effekt bezeichnet wird. Dieser Effekt führt zur der sogenannten Selbstphasenmodulation und Selbstfokussierung, welche die wichtigsten Anteile sind, die zur Erzeugung eines Weißlichtkontinuums beitragen. Im Zuge der Selbstphasenmodulation bewirkt ein ultrakurzer und intensiver Laserpuls eine zeitliche Abhängigkeit der Frequenz. Dabei entsteht zu Beginn eine Rotverschiebung und zum Ende eine Blauverschiebung der Frequenz.^[48,50,51]

2.5 Ultraschnelle Transiente Absorptionsspektroskopie

Zur Untersuchung der molekularen Dynamik von Uncaging Prozessen wurde die ultraschnelle Transiente Absorptionsspektroskopie verwendet. Der Aufbau wird mit einem Clark MXR CPA-2001 bzw. 2010 Laser betrieben, dessen Fundamentalwellenlänge bei 775 nm liegt. Dabei handelt es sich um einen Diodenlaser (InGaAS), der eine Wellenlänge von 980 nm liefert mit 160 mW Leistung. Dieser dient als Pump-Quelle eines Erbium-Glasfaseroszillators, um die ultrakurzen Pulse mit einer Breite von 100 fs und 1550 nm zu generieren. Der erzeugte Puls durchläuft zunächst eine Frequenzverdopplung in einem Lithiumniobat-Kristall, wodurch die Fundamentalwellenlänge von 775 nm (Seedpuls) erreicht wird.

Für die anschließende Verwendung in der Anlage wird eine hohe Intensität benötigt. Hierzu wird der Laserpuls nach dem *chirped pulse amplification* (CPA) -Prinzip verstärkt. Dazu wird er zunächst zeitlich gestreckt, um die im Laser verwendeten Optiken vor den hohen Intensitäten zu schützen. Anschließend erfolgt die Verstärkung in einem titandotierten Saphir - Kristall (Ti:Sa), indem eine Besetzungsinversion mit einem Nd:YAG-Nanosekundenlaser erzeugten Pumpimpuls erzeugt wird. Die Energie der Emission wird in einem Resonator auf den Seedpuls übertragen wird. Der verstärkte Puls wird daraufhin wieder komprimiert und besitzt eine Pulslänge von 150 fs und eine Pulsenergie

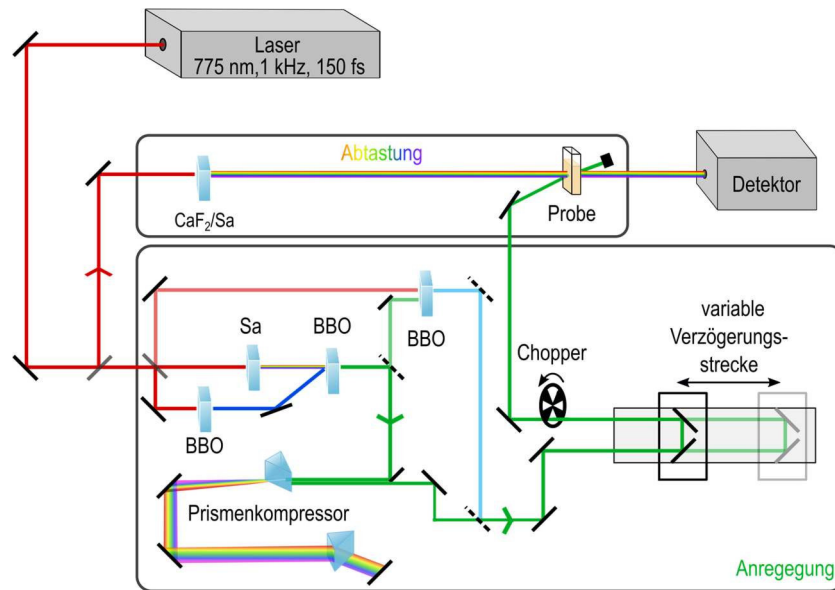


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des verwendeten Messaufbaus zur transienten Absorption inklusive NOPA, SFG und Prismenkompressor.

von $800 \mu\text{J}$ im Falle des CPA-2001 bzw. $1000 \mu\text{W}$ im Falle des CPA-2010. Wie in Kapitel 2.3 beschrieben wird für den experimentellen Aufbau die Fundamentale in einen Anrege- und Abtastpuls aufgeteilt (Abb. 2.6). Letzterer wird in einem CaF_2 - oder Saphir-Kristall geleitet, um in einem nichtlinearen Prozess dritter Ordnung ($\chi^{(3)} \neq 0$, siehe Gl. 2.15) ein Weißlichtkontinuum zu erzeugen. Entscheidend für die Wahl des Kristalls ist der Spektralbereich angepasst an die Fragestellung und zu untersuchende Probe. Der Abtastpuls wird auf einer geraden Strecke auf die Probe fokussiert. Der andere Anteil der Fundamentalen dient zur Generierung der Anregungswellenlänge, die entweder durch den oben beschriebenen NOPA Prozess allein oder einer nachgeschalteten SFG erzeugt wird. Ist die Anregungswellenlänge durch den NOPA erreichbar ($470 - 750 \text{ nm}$), so wird der Puls für eine hohe Zeitauflösung anschließend komprimiert. Hierzu wird ein Prismenkompressor (Abb. 2.6) verwendet, der aus zwei Prismen besteht. Ziel ist es der Gruppengeschwindigkeitsdispersion von einem Lichtbündel, hervorgerufen durch die unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeit durch ein Medium, entgegenzuwirken (Chirp). Dabei breiten sich die langwelligen Anteile des Lichts schneller durch ein Medium aus als die kurzwelligen, was zu einer zeitlichen Verbreiterung des Gesamtpulses führt. Trifft nun der verbreiterte Puls auf das erste Prisma des Kompressors, so wird dieser in seine spektralen Anteile zerlegt. Im zweiten Prisma durchlaufen die langwelligen Anteile eine längere Wegstrecke durch das Glas, wodurch ein negativer Chirp erzeugt wird.

Auf diese Weise sind die langwelligen Anteile relativ zu den kurzwelligen verzögert, diese Überkompensation soll den auftretenden Chirp der restlichen Strecke ausgleichen. Für die SFG wird je nach Zielwellenlänge eine entsprechende Frequenz im NOPA eingestellt und anschließend mit der Fundamentalen zusammen in einem weiteren BBO-Kristall überlagert. Nach Einstellung der Wellenlänge wird der Anregepuls über zwei senkrecht zueinander angeordnete Spiegel, die auf einer elektronisch gesteuerten Verzögerungsstrecke angebracht sind, geleitet (Abb. 2.6). Ein darauffolgendes Rad (Chopper), welches mit angepasster Geschwindigkeit jeden zweiten Anregepuls blockiert, sorgt dafür, dass eine Differenzbildung der Abtastung zwischen der unangeregten und angeregten Probe erfolgen kann (Gl. 2.22).

$$\Delta Abs = Abs_{ang}(t) - Abs_{unang} = = -lg\left(\frac{I_{ang}(t)}{I_{unang}}\right) \quad [2.22]$$

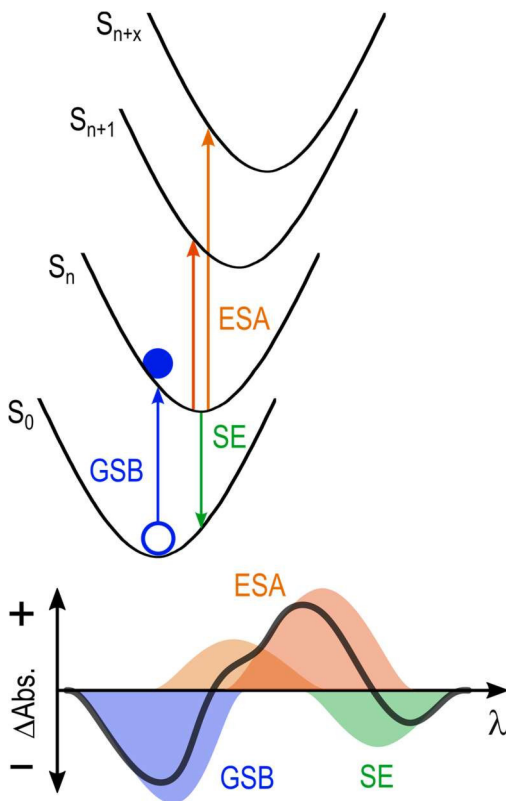


Abbildung 2.7: Darstellung zur Entstehung der Signale aus der transienten Absorptionsmessungen infolge einer photoinduzierten Anregung nach Frank-Condon [29-31] und ihrer resultierenden Darstellung im Differenzspektrum.

Durch die Differenzbildung entsteht an jedem Punkt entlang der Verzögerungsstrecke ein Differenzspektrum ($\Delta Abs.$), welches der spektralen Breite des Abtastpulses entspricht (Abb. 2.7). Die negativen und positiven Signale des Differenzspektrums geben Auskunft über das Absorptions- und Emissionsverhalten der Probe infolge der Anregung. Das Spektrum der unangeregten Probe enthält Informationen über die $S_0 S_n$ - Übergänge, während durch die Anregung die Probe entsprechend der eingestrahlten Wellenlänge (λ_{exc}) in einen angeregten Zustand $S_n \sim \lambda_{exc}$ überführt wird. Gelangt nun der Abtastpuls zu einem gegebenen Zeitpunkt nach der Anregung auf die Probe, so wird die Absorption aus dem entsprechenden Zustand (S_n) heraus abgefragt.

Dieses unterschiedliche Absorptionsverhalten des Grund- und angeregten Zustands ergibt zum einen das negative Signal des Grundzustandsbleichen (GSB), welches aufgrund der Depopulation des Grundzustands entsteht (Abb. 2.7). Ein weiterer Grund für ein negatives Signal ist die durch den Abtastpuls induzierte Emission aus dem angeregten Zustand heraus zurück in den Grundzustand, auch simulierte Emission (SE) genannt (Abb. 2.7). Positive Signale werden hauptsächlich durch die Absorption des Abtastpulses erzeugt, die die Probe aus dem S_n in einen höheren angeregten Zustand befördert (ESA). Einige Proben durchlaufen infolge der Anregung eine chemische Reaktion. Findet diese Photoreaktion innerhalb des Messfensters (< 2 ns) statt, so kann es zu einem weiteren positiven Signal kommen, welches der Absorption eines gebildeten Produkts entspricht.

2.6. Quantenchemische Berechnungen

Durch quantenchemische Berechnungen ist es möglich, gewisse chemische Fragestellungen zu beantworten bzw. verschiedene Eigenschaften chemischer Verbindungen prognostizieren zu können. In dieser Arbeit wurde sich einiger Methoden aus dem Feld bedient, um das photochemische Verhalten der untersuchten Proben mit den experimentellen Ergebnissen abzugleichen. Somit konnten z.B. einige Hypothesen zu den Mechanismen der Photoreaktionen verworfen oder bestätigt werden. In diesem Kapitel werden zunächst die Grundlagen der Quantenmechanik beschrieben und anschließend die für die Berechnungen verwendete Dichtefunktionaltheorie.^[52,53]

Die zeitabhängige Schrödinger-Gleichung (Gl. 2.23) bildet die Grundlage zur vollständigen Beschreibung eines molekularen Systems.

$$i\hbar \frac{d}{dt} \Psi(t) = \hat{H} \Psi(t) \quad [2.23]$$

Dabei ist $\Psi(t)$ die zeitabhängige Wellenfunktion und enthält alle Informationen eines Quantensystems, während \hat{H} als Hamilton-Operator bezeichnet wird, der dessen Gesamtenergie darstellt. In einigen Fällen sind die exakte Wellenfunktion und der entsprechende Hamilton-Operator bekannt, wodurch eine exakte Lösung der Gleichung möglich ist.

Nach dem Separationsansatz folgt die zeitunabhängige Schrödinger-Gleichung (Gl. 2.24),

$$\hat{H} \Psi = \hat{E} \Psi \quad [2.24]$$

für deren Lösung zunächst die Konstruktion einer Wellenfunktion Ψ erforderlich ist. Dabei ist \hat{E} die Gesamtenergie des Systems. Einige Methoden zur Aufstellung einer Wellenfunktion führen zu exakten Lösungen, während mit anderen die Lösung numerisch angenähert wird. Die Wellenfunktion Ψ ist abhängig von den Raum-Spin-Koordinaten \vec{x}_N der Elektronen und den Raumkoordinaten \vec{R}_M der Kerne (Gl. 2.25).

$$\Psi(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N, \vec{R}_1, \vec{R}_2, \dots, \vec{R}_M) \quad [2.25]$$

Der nicht-relativistische Hamilton-Operator \hat{H} eines molekularen Systems mit M Kernen und N Elektronen ist ein Differentialoperator, der sich aus der Summe der kinetischen Energie der Elektronen (\hat{T}_e) und der Kerne (\hat{T}_K) und der potentiellen Energie in Form von Elektron-Kern-Anziehung (\hat{V}_{eK}), Elektron-Elektron-Abstoßung (\hat{V}_{ee}) und Kern-Kern-Abstoßung (\hat{V}_{KK}) zusammensetzt (Gl. 2.26).

$$\begin{aligned} \hat{H} &= \hat{T}_e + \hat{T}_K + \hat{V}_{eK} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{KK} \\ &= -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \frac{1}{2} \sum_{A=1}^M \frac{\nabla_A^2}{M_A} - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \end{aligned} \quad [2.26]$$

Dabei ist ∇^2 der *Laplace-Operator*, M_A der Quotient der Masse vom A -ten Kern und der eines Elektrons ($\frac{m_A}{m_e}$), r_{iA} der Abstand zwischen dem i -ten Elektron und dem A -ten Kern, r_{ij} der Abstand zwischen dem i -ten und dem j -ten Elektron und R_{AB} der Abstand zwischen dem A -ten Kern und dem B -ten Kern.

Der Massenunterschied zwischen dem Kern des leichtesten Elements im Periodensystem H^1 und einem Elektron ist mit einem Faktor von 1800 sehr hoch. Aus diesem Grund kann nach Born-Oppenheimer die Schrödinger-Gleichung vereinfacht werden, sodass die Bewegung der Kerne (\hat{T}_K) im Vergleich zu der der Elektronen als null angenommen wird. Die Elektronen werden als sich in einem Feld aus Kernen mit festen Koordinaten bewegend betrachtet. Daraus folgt, dass $\hat{T}_K = 0$ und \hat{V}_{KK} aufgrund der nicht vorhandenen Kinetik konstant sind. Der oben beschriebene Hamilton-Operator lässt sich anhand dessen zu einem sogenannten elektronischen Hamiltonian vereinfachen (Gl. 2.27).

$$\hat{H}_e = \hat{T}_e + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{eK} \quad [2.27]$$

Die Lösung der Schrödinger-Gleichung mit \hat{H}_e ist die elektronische Wellenfunktion Ψ_e mit der elektronischen Energie E_e (Gl. 2.28). Dabei ist die elektronische Wellenfunktion

sowohl von den Elektronenkoordinaten als auch indirekt von den Kernkoordinaten abhängig. Letztere sind zwar fixiert, dennoch sind die Elektronen abhängig von ihrer Lage, sodass sie einen parametrischen Anteil an Ψ_e haben.

$$\hat{H}_e \Psi_e = E_e \Psi_e \quad [2.28]$$

Damit ergibt sich die Gesamtenergie des Systems (E_{ges}) als Summe aus E_e und dem konstanten Kern-Kern-Abstoßungsterm (E_K) (Gl. 2.29).

$$E_{ges} = E_e + E_K \quad [2.29]$$

Der Erwartungswert des Elektron-Kern-Potentials \hat{V}_{eK} beschreibt die Anziehung der Kerne auf die Elektronen und wird in der Dichtefunktionaltheorie (DFT) als externes Potential V_{ext} bezeichnet.

Die Wellenfunktion Ψ selbst ist nicht observabel, lediglich das Betragsquadrat dieser Funktion lässt sich physikalisch interpretieren (Gl. 2.30) und gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Elektronen 1, 2, ..., N gleichzeitig in den Volumenelementen $d\vec{x}_1, d\vec{x}_2, \dots, d\vec{x}_N$ aufzufinden sind.

$$|\Psi(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N)|^2 d\vec{x}_1, d\vec{x}_2, \dots, d\vec{x}_N \quad [2.30]$$

2.6.1. Dichtefunktionaltheorie

Die Dichtefunktionaltheorie ist ein Ansatz zur Berechnung grundlegender Eigenschaften eines Systems, wie beispielsweise Bindungslängen und Bindungsenergien, die auf der ortsabhängigen Elektronendichte beruht.^[54] Die Elektronendichte ist definiert als multiples Integral der Spin-Koordinaten aller Elektronen und aller Raumvariablen bis auf einer (Gl. 2.31).^[55]

$$\rho(\vec{r}) = N \int \dots \int |\Psi(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N)|^2 ds_1 d\vec{x}_1, d\vec{x}_2, \dots, d\vec{x}_N \quad [2.31]$$

$\rho(\vec{r})$ gibt die Wahrscheinlichkeit an irgendeins der N Elektronen innerhalb des Volumenelements $d\vec{r}_1$, unabhängig von seinem Spin, aufzufinden. Aufgrund der Ununterscheidbarkeit der Elektronen, ist die Wahrscheinlichkeit irgendein Elektron in $d\vec{r}_1$ zu finden gleich der N-fachen Wahrscheinlichkeit ein bestimmtes Elektron im selben Volumenelement zu finden (Gl. 2.32).

$$\int \rho(\vec{r}) d\vec{r}_1 = N \quad [2.32]$$

Im Gegensatz zur Wellenfunktion ist die Elektronendichte observabel und kann mittels Röntgendiffraktometrie gemessen werden. Hohenberg und Kohn lieferten mit der Aufstellung ihrer Theoreme einen Zusammenhang zwischen der Grundzustandselektronendichte und der Grundzustandsenergie eines Systems.^[56] Das erste Theorem besagt, dass das externe Potential $V_{ext}(\vec{r})$ ein eindeutiges Funktional der Elektronendichte $\rho(\vec{r})$ ist. Da es gleichzeitig den Hamiltonoperator \hat{H} bestimmt, ist folglich der Grundzustand eines Mehrteilchensystems ein eindeutiges Funktional der Dichte $\rho(\vec{r})$. Die Grundzustandsenergie ist somit wie folgt definiert (Gl. 2.33).

$$E_0[\rho_0] = T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] + E_{eK}[\rho_0] \quad [2.33]$$

Der Ausdruck in Gleichung 2.33 lässt sich in die systemunabhängigen Terme $T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0]$ und die systemabhängigen Terme $\int \rho(\vec{r}) V_{eK} d\vec{r}$ unterteilen, wobei der systemunabhängige Teil durch das Hohenberg-Kohn-Funktional ($F_{HK}[\rho_0]$) beschrieben wird (Gl. 2.34 und 2.35).

$$E_0[\rho_0] = \int \rho(\vec{r}) V_{eK} d\vec{r} + T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] \quad [2.34]$$

$$E_0[\rho_0] = \int \rho(\vec{r}) V_{eK} d\vec{r} + F_{HK}[\rho_0] \quad [2.35]$$

Ist das Hohenberg-Kohn-Funktional $F_{HK}[\rho_0]$ genau bekannt, könnte die Schrödinger-Gleichung exakt gelöst werden. Allerdings sind die beiden enthaltenen Terme der kinetischen Energie und Elektron-Elektron-Wechselwirkung unbekannt. Der Wechselwirkungsterm der Elektronen kann weiterhin in zwei Terme unterteilt werden (Gl. 2.36):

$$E_{ee}[\rho] = \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\vec{r}_1)\rho(\vec{r}_2)}{r_{12}} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 + E_{nkl}[\rho] = J[\rho] + E_{nkl}[\rho] \quad [2.36]$$

Es resultiert ein klassischer Coulomb-Term $J[\rho]$, der genau berechnet werden kann. Bei $E_{nkl}[\rho]$ handelt es sich um die nichtklassische Elektron-Elektron-Wechselwirkung, die die Selbstwechselwirkung, den Austausch und die Coulomb-Korrelation enthält.

Das zweite Hohenberg-Kohn-Theorem definiert die Grundzustandsenergie als niedrigste Energie eines Systems, welche nur aus der Grundzustandsdichte resultiert. Das sogenannte Variations-Prinzip beschreibt die erhaltene Energie jeder beliebigen Elektronendichte $E[\tilde{\rho}]$ als Obergrenze der wahren Grundzustandsenergie E_0 (Gl. 2.37).

$$E_0 \leq E[\tilde{\rho}] = T[\tilde{\rho}] + E_{ee}[\tilde{\rho}] + E_{eK}[\tilde{\rho}] \quad [2.37]$$

Kohn und Sham haben basierend auf den Hohenberg-Kohn-Theoremen Näherungen für die unbekanntenen Terme des Funktionals $F_{HK}[\rho_0]$ aufgestellt.^[57] Hierzu wurde auf die Ein-

elektronen-Orbitaldarstellung φ_i eines nicht-wechselwirkenden Referenzsystems zurückgegriffen. Zunächst wird der Kohn-Sham-Operator definiert (Gl. 2.38).

$$\hat{f}^{KS} = -\frac{1}{2} \nabla^2 + V_S(\vec{r}) \quad [2.38]$$

Für die kinetische Energie ergibt sich folgender Term (Gl. 2.39):

$$T_S = -\frac{1}{2} \sum_i^N \langle \varphi_i | \nabla^2 | \varphi_i \rangle \quad [2.39]$$

Die kinetische Energie des nichtwechselwirkenden Referenzsystems entspricht der exakten kinetischen Energie eines realen, wechselwirkenden Systems. Dazu wurde das Dichtefunktional wie folgt separiert (Gl. 2.40).

$$E[\rho(\vec{r})] = T_S[\rho(\vec{r})] + J[\rho(\vec{r})] + E_{XC}[\rho(\vec{r})] \quad [2.40]$$

$E_{XC}[\rho(\vec{r})]$ ist die Austausch-Korrelations-Energie, die alle unbekanntenen Terme enthält. Das effektive Potential ($V_{eff}(\vec{r})$), in dem sich die Elektronen bewegen, bestimmt in der Kohn-Sham-Theorie ($V_{eff}(\vec{r})$) die Grundzustandsdichte und beschreibt die Summe der elektrostatischen Wechselwirkung der Elektronen, dem Austausch-Korrelationspotential und dem externen Potential (Gl. 2.41).

$$V_S(\vec{r}) \equiv V_{eff}(\vec{r}) = \int \frac{\rho(\vec{r}_2)}{r_{12}} d\vec{r}_2 + V_{XC}(\vec{r}) - \sum_A^M \frac{Z_A}{r_{1A}} \quad [2.41]$$

Auch in der Kohn-Sham-Theorie werden die Eielektronen-Gleichungen nach dem Variations-Prinzip iterativ gelöst. Dabei ist V_{XC} als Ableitung des Funktionals E_{XC} über die Dichte definiert (Gl. 2.42).

$$V_{XC} \equiv \frac{\delta E_{XC}}{\delta \rho} \quad [2.42]$$

3 Photoaktivierbare Verbindungen

Das aufstrebende Feld der Photopharmakologie beschäftigt sich mit der Verwendung von Licht zur Kontrolle der Wirkstoffaktivierung im biologischen System.^[15-17] Dabei werden photoaktivierbare Verbindungen an gewünschte Zielmoleküle angebracht, die anschließend unter Bestrahlung mit entsprechendem Licht den Wirkstoff bioverfügbar machen. Auch im Einsatz mit körpereigenen Stoffen eignen sich photoaktivierbare Verbindungen besonders gut, um das

Verständnis von komplexen biologischen Prozessen zu erweitern.^[58] Dabei dient das Licht als nicht-invasives Werkzeug mit dem sowohl eine zeitliche als auch örtliche Kontrolle über die ablaufenden Schritte ermöglicht wird.^[23] Zudem kann über die Wahl der Wellenlänge und der Intensität die zugeführte Energie präzise eingestellt werden. Folglich bleibt das behandelte System intakt, wodurch sich ein breites Anwendungsgebiet eröffnet.

Photoaktivierbare Verbindungen können in zwei Klassen unterteilt werden, dabei wird zwischen reversiblen (Photoschalter) und irreversiblen Molekülklassen (photolabile Schutzgruppen) unterschieden (Abb. 3.1). Bei den Photoschaltern handelt es sich um eine Gruppe von Molekülen, die infolge einer Lichteinstrahlung reversibel von einer isomeren Form (A) in die andere (B) überführt werden können.^[59] Anhand der Art der Rückreaktion von B zu A ergeben sich zwei Gruppen der Photoschalter, Typ T (thermisch) und P (photochemisch). Typ T verfügt über eine niedrige Energiebarriere der Rückreaktion, wodurch diese thermisch möglich ist. Der Typ P hingegen ist nur über den photochemischen Weg mit definierter Wellenlänge konvertierbar. Die photoinduzierbare Isomerisierung kann dabei eine *cis-trans*-Konformationsänderung sein, bei der die Verbindung von der stabilen *trans*-Form in das instabile *cis*-Konformer überführt wird. Die wichtigsten

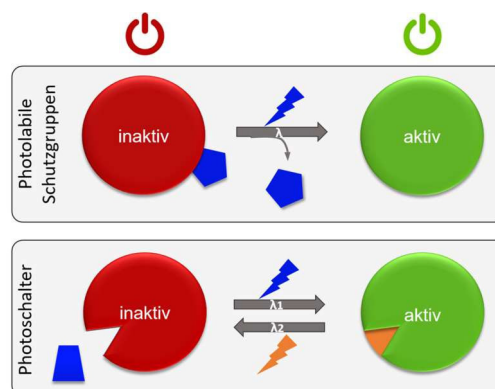


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Photoreaktion von photolabilen Schutzgruppen und eines Photoschalters, der in der Lage ist nach einer reversiblen Formänderung an ein Zielmolekül zu binden.

Vertreter dieser Art sind Azobenzole^[60,61] und Stilbene^[62-64]. Eine weitere Variante der Isomerisierung sind Ringöffnungs- und Ringschlussreaktionen, zu denen die Fulgide^[65-67] und Spiropyrane^[68-70] zählen. Über die Isomerisierung infolge einer Bestrahlung mit Licht können die genannten Verbindungen zwischen einem biologisch aktiven und inaktiven Konformationszustand mehrmals hin und her geschaltet werden (Abb. 3.1).

Im Falle der photolabilen Schutzgruppen wird ein Chromophor an ein Effektormolekül angebracht, welches dadurch an seiner biologischen Wirkung gehindert ist.^[71-73] Aus diesem Grund hat sich der Begriff *Cage* (aus dem Englischen für Käfig) für die photolabile Schutzgruppe (*photolabile protecting group*, PPG) etabliert, während das Konstrukt aus PPG und Effektormolekül als *caged compound* bezeichnet wird. Durch die Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge adressiert an die PPG, wird eine Bindungsspaltung zwischen Schutzgruppe und Effektormolekül induziert (Abb. 3.1). Dieser Schritt, auch als *Uncaging* bezeichnet, legt entweder eine für die biologische Wirkung entscheidende funktionelle Gruppe frei oder gibt dem Effektormolekül seine ursprüngliche Form wieder, wodurch es an die Bindestelle gelangt und dort aktiv sein kann.^[26,74]

3.1 Photolabile Schutzgruppen

Im Jahre 1901 wurde von Ciamician und Silber *ortho*-Nitrobenzylaldehyd (*o*NB) (Abb. 3.2) als erste photolabile Schutzgruppe veröffentlicht.^[75] Dabei beschränkte sich die Anwendung auf die gezielte Blockade bestimmter funktioneller Gruppen während der einzelnen organischen Syntheseschritte. Die Anwendung auf ein Biomolekül wurde erstmals 1962 von Barltop *et al.* gezeigt, in der das Uncaging eines Benzyloxycarbonyl geschützten Glycins mittels Belichtung im UV gelang.^[76] Ein weiterer wichtiger Meilenstein in der Forschung zu photoaktivierbaren Biomolekülen wurde von Engels und Schlaeger gelegt, die 1977 eine *o*NB-Schutzgruppe an den sekundären Botenstoff cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) anbrachten und dessen erfolgreiche Freisetzung zeigten.^[77] Die Freisetzung eines Substrats kann dabei auf zwei verschiedenen Wegen stattfinden, zum einen gibt es infolge der Belichtung die direkte Eliminierung aus einem reaktiven angeregten Zustand. Zum anderen kann die Anregung ein Zwischenprodukt in seinem Grundzustand generieren, welches eine niedrige Energiebarriere zur Freisetzung des Substrats aufweist.^[78] Die *o*NB-Schutzgruppen sind ein Beispiel für die zweite Art der übergeordneten Freisetzungsmechanismen. Dabei findet nach der Photoanregung ein

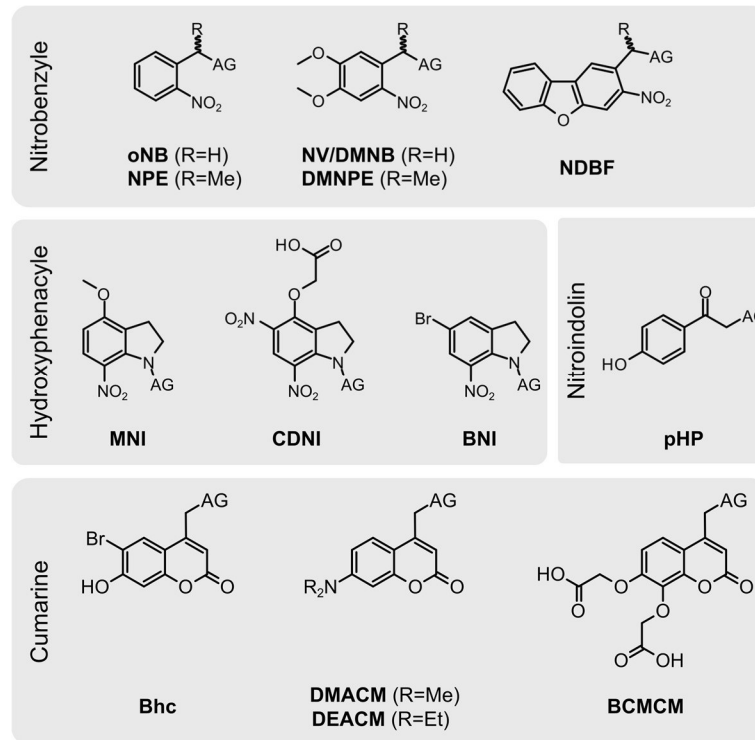


Abbildung 3.2: Strukturformeln verschiedener Klassen von photolabilen Schutzgruppen und einiger ihrer Derivate.

Protonentransfer vom Kohlenstoff an der Benzolposition auf die Nitrogruppe statt, daraus entsteht ein sogenanntes *aci*-Nitro-Intermediat. Infolgedessen durchläuft die PPG eine Umlagerung des Protons an den Sauerstoffatomen der Nitro-Gruppe, was die Bildung eines zyklischen Intermediats hervorruft. Anschließend entsteht unter Abspaltung der geschützten Substanz ein Nitroso-Produkt.^[79,80]

PPGs werden anhand ihrer Effizienz bewertet. Dabei handelt es sich um das Produkt aus der Uncaging-Quantenausbeute Φ und dem Extinktionskoeffizienten ϵ_{exc} der PPG bei der Belichtungswellenlänge. Die Uncaging-Quantenausbeute Φ stellt das Verhältnis der Anzahl der freigesetzten Moleküle zu der Anzahl der absorbierten Photonen dar. Folglich ist neben einer hohen Φ auch ein großes ϵ nötig, um eine PPG mit hoher Effizienz zu erhalten. Weitere Anforderungen an PPGs, insbesondere im Hinblick auf das Design neuer Schutzgruppen, die für die Nutzung in biologischer Umgebung entwickelt werden, sind folgende:

- **Stabilität:** Das geschützte Substrat soll unter physiologischen Bedingungen stabil sein, um ungewollte Zersetzungsreaktionen oder eine frühzeitige Freisetzung zu vermeiden.

- Löslichkeit: Biologische Anwendungsgebiete bedingen eine gute Wasserlöslichkeit der PPG und im Falle eines zellbiologischen Zielgebiets eine Permeabilität durch die Zellmembran.
- Geeigneter Absorptionsbereich: Damit das eingesetzte Licht tatsächlich unschädlich für die biologische Umgebung sein kann, darf die eingesetzte Wellenlänge zur Anregung der PPG und somit die Absorption der PPG nicht mit der Absorption von Biomolekülen oder Wasser überlappen.^[81,82] Dieser Bereich liegt zwischen 290 nm und 900 nm.
- Schnelle Freisetzung: Um einen lichtinduzierten biologischen Prozess untersuchen zu können, muss das Uncaging schneller ablaufen als die zu untersuchende Reaktion.
- Toxizität: Die Zwischen- und Photoprodukte der Uncaging-Reaktion sollten inert und für die Umgebung ungiftig sein.

In den letzten Jahrzehnten wurde neben der Optimierung der Nitrobenzyle durch unterschiedlichste Substitutionen am *o*NB-Grundgerüst viele verschiedene Klassen an photolabilen Schutzgruppen etabliert, dazu zählen die Hydroxyphenacyle, Nitroindoline und Cumarine (Abb. 3.2).

Nicht alle bekannten PPGs erfüllen die genannten Anforderungen gleichermaßen, deshalb sollte bei der Wahl nach einer geeigneten PPG die Kompatibilität mit dem Zielsystem berücksichtigt werden. Zudem ist das Wissen über die photophysikalischen und -chemischen Eigenschaften der verwendeten PPG unabdingbar.

3.1.1 Fluorenole

Die Molekülklasse der Fluorenole galt nicht immer als PPG. Zunächst lag der Fokus der Forschung lange auf der photochemischen Eigenschaft des 9-Fluorenols (F-OH) unter Abgabe eines Hydroxid-Ions (OH⁻) ein Fluorenylkation (F⁺) zu bilden (Abb. 3.3).^[83] Erstmals wurde dies von Wan und Krogh berichtet, die bei der Photolyse in Methanol (MeOH) eine Reaktion des F⁺ mit dem Lösemittel zum Methoxy-Derivat beobachteten. Bei 9-Fluorenol handelt es sich um ein $4n$ π -Elektronensystem, welches nach Hückel die $4n + 2$ π -Elektronenregel eines aromatischen Systems nicht erfüllt, folglich gilt es als antiaromatisch. Es wurde davon ausgegangen, dass eine Heterolyse der C-OH-Gruppe im angeregten Zustand stattfindet, dessen Triebkraft die Bildung eines kationischen 4π -Elektronensystems im angeregten Zustand ist, gefolgt von der Relaxation in seinen

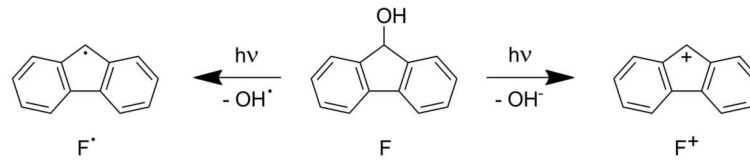


Abbildung 3.3: Homolytische und heterolytische Bindungsspaltung eines Fluorenyl Moleküls nach Photoanregung, resultierend in einem Fluorenyl-Kation (F^+) und einem Fluorenyl-Radikal ($F\cdot$).

Grundzustand. Dies bestätigt sich durch die Tatsache, dass das Biphenyl-2-methanol unter den gleichen Photolysebedingungen nach Anregung vollständig in den Grundzustand der Ausgangsverbindung zurückkehrt.^[83]

Das F-OH rückte nicht nur bezüglich seiner Abgabe von OH^- -Ionen, welche eine schlechte Abgangsgruppe (AG) darstellen, in den Fokus spektroskopischer Untersuchungen. Auch die Stabilität des F^+ war überraschend, da Carbokationen im Grundzustand bekanntlich eine hohe Reaktivität aufweisen. Es folgten mehrere lösungsmittelabhängige Studien, die im Allgemeinen den Schluss zuließen, dass das F^+ in polaren protischen Lösemitteln wie Wasser (H_2O), MeOH und Ethanol (EtOH) instabil ist und eine Lebensdauer von < 25 ps aufweist.^[84-86] Dabei stellte sich eine höhere Stabilität in stark polaren und gleichzeitig wenig nukleophilen Lösungsmitteln wie 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol (HFIP) heraus, was sich in einer Lebensdauer des F^+ von 10 μs widerspiegelt. Bei HFIP handelt es sich um ein Lösungsmittel mit starkem kinetischen Stabilisierungseffekt, welches dabei hilft die photophysikalischen Eigenschaften des F^+ zu untersuchen.^[87]

Zeitgleich zu den Lösungsmittelstudien wurde neben dem Reaktionspfad der heterolytischen Bindungsspaltung von F-OH auch ein homolytischer Pfad entdeckt (Abb. 3.3) und intensiv untersucht. Beide Bindungsbrüche finden simultan statt, jedoch wird je nach Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels einer dem anderen bevorzugt. Dabei stellten sich MeOH und andere schwach polare Lösemittel wie Alkane und Ether als Fluorenylradikal stabilisierende Lösemittel dar.^[85,88]

Während F-OH bei 250 nm absorbiert, gab es zunächst widersprüchliche Zuordnungen der Absorptionsbanden vom F^+ und $F\cdot$. Mecklenburg und Hilinski beobachteten die F^+ -Absorption bei 515 nm und ordneten eine zweite Absorptionsbande bei 500 nm dem $F\cdot$ zu, während Gaillard *et al.* 1989 das Kation als Absorption bei 640 nm identifizierten, was daraufhin wieder korrigiert wurde.^[86,89]

In den Folgejahren wurde auch die Auswirkung verschiedener Substitutionsmuster an der C_9 - Position auf die Stabilität des F^+ untersucht.^[90-92] Redzimski *et al.* erweiterten

beispielsweise das Verständnis des unterschiedlichen Emissionsverhaltens von C₂-substituierten Fluorenolen.^[93]

3.1.2 Cumarine

Cumarine sind Verbindungen mit einem 1,2-Benzopyron-Grundgerüst und stellen eine sehr vielverwendete und gutuntersuchte Klasse der PPG dar, da sie viele der oben genannten Anforderungen erfüllen. Zudem weisen sie eine hohe Kompatibilität mit diversen funktionellen Gruppen wie Phosphate^[94], Carboxylate^[95] und Sulfate^[96] auf. In erster Linie wurden sie jedoch aufgrund ihrer hohen Fluoreszenz über einen langen Zeitraum ausschließlich als Laserfarbstoffe verwendet.^[97-101] Givens und Matuszewski zeigten als erstes den Einsatz eines 4-(Hydroxymethyl)-7-methoxycumarin (MCM) als PPG zum Uncaging von Diethylphosphat.^[94] Somit stellten 7-Alkoxycumarine die erste Generation dieser PPG-Klasse dar, jedoch zeichnete sich diese durch eine geringe Wasserlöslichkeit aus. Daraufhin wurden verschiedene Cumarin-Derivate im Hinblick auf rotverschobene Absorptionsmaxima, hohe Quantenausbeute und Wasserlöslichkeit untersucht. Im Allgemeinen lassen sie sich in vier Unterklassen einteilen, die MCMs, 6,7-Dialkoxy-, 6-Bromo-7-Alkoxy- (Bhc) und 7-Dialkylamino-cumarine (DEACM/ DMACM) (Abb. 3.2).

Eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums hin zu 370 nm gelang Fortuna *et al.* mit dem Einsatz eines elektronenziehenden Substituenten mit einem Schweratomeffekt an der C6-Position von MCM. Zusätzliche Vorteile des 6-Brom-7-hydroxycumarin-4-ylmethyls (Bhc) und dessen Analoga sind eine hohe Quantenausbeute und die Wasserlöslichkeit bzw. Membranpermeabilität.^[102,103]

Weiterhin konnte eine Verbesserung der photochemischen Eigenschaften der Cumarine durch die Einführung der 7-Diethylamino-Derivate (DEACM) erreicht werden. Mit der elektronenschiebenden Gruppe war neben dem Absorptionsmaximum zwischen

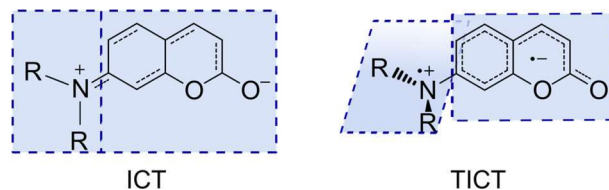


Abbildung 3.4: Grundgerüst eines Dialkylamino-Cumarin in der planaren ICT- und verdrillten TICT-Form.

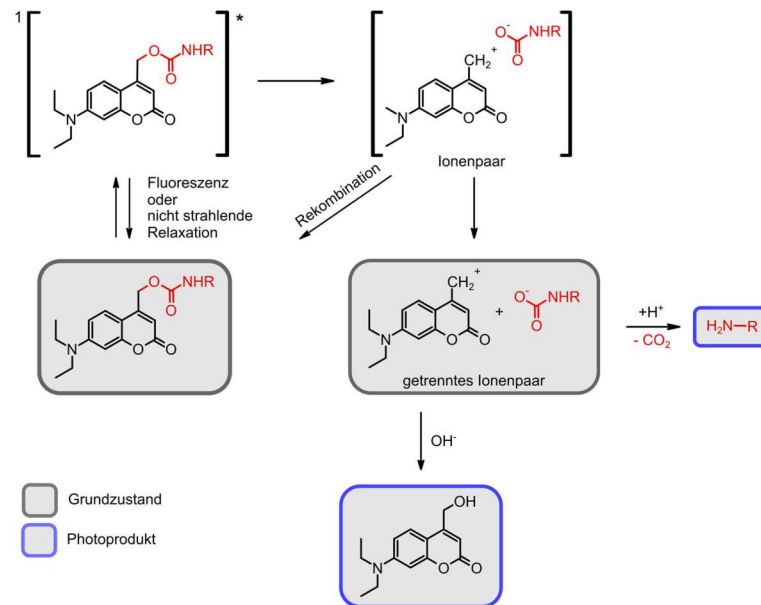


Abbildung 3.5: Uncaging Mechanismus einer Carbamat verknüpften Abgangsgruppe (rot) von einer DEACM-Schutzgruppe infolge einer Photoanregung.^[96]

380 nm und 400 nm auch ein hoher Extinktionskoeffizient sowie eine hohe Quantenausbeute möglich. Aufgrund dieser photochemischen Eigenschaften stellt sich DEACM als gute PPG in der Anwendung für Biomoleküle, wie Nukleobasen^[104], ATP^[105], Aminosäuren^[106], tRNA^[107] und Antibiotika^[108] heraus.

Die Absorptionsspektren von Cumarinen verfügen im Allgemeinen über zwei Absorptionsbanden, wobei die rotverschobene Bande einem $\pi - \pi^*$ -Übergang geschuldet ist, während die energetisch höhere Bande einem $n - \pi^*$ -Übergang zuzuordnen ist. Allerdings sind in vielen Fällen die beiden Übergänge energetisch sehr nah beieinander, sodass die entsprechenden Absorptionsbanden überlagern. In anderen Fällen ist je nach Lösemittel nur einer der beiden Übergänge bevorzugt, wie für das MCM in polaren Lösemittel nur der $n - \pi^*$ - und in unpolaren Lösemittel nur der $\pi - \pi^*$ -Übergang beobachtbar war.^[95,109] Infolge einer Anregung findet ein Übergang vom HOMO und HOMO-1 zum LUMO statt. Dabei erfolgt ein intramolekularer Ladungstransfer (ICT) vom Benzylring zur Pyranon-Einheit (Abb. 3.4), was je nach dem Substitutionsmuster des Cumarin Grundgerüsts verstärkt werden kann. Wichtig hierfür ist der begünstigende Einsatz von elektronenziehenden Substituenten an der C₃-Position und elektronenschiebenden Substituenten an der C₇-Position, wodurch ein sogenanntes Push-Pull-System erzeugt wird.^[110] Vor allem DEACM-Derivate zählen zu den Vertretern mit ausgeprägtem Push-Pull-System. In polaren Lösemittel kann aus dem partiellen Ladungstransfer des ICT-Zustands heraus eine

Verdrillung des Moleküls verursacht werden, die in einem vollständigen Ladungstransfer resultiert und als TICT-Zustand^[111,112] bezeichnet wird (Abb. 3.4).^[109,113-117]

Der Uncaging-Mechanismus von Cumarin-geschützten Verbindungen ist gut untersucht. Nach der Anregung erfolgt eine heterolytische Bindungspaltung zwischen dem benzyli-schen C-Atom und der Abgangsgruppe, wodurch ein Ionenpaar entsteht (Abb. 3.5). Dieses Ionenpaar kann entweder eine Rekombination zum Grundzustand der Ausgangsverbin-dung oder die Ausbildung des Photoprodukts in Form eines Cumarin-Alkohols eingehen. Beide Pfade schließen sich gegenseitig aus und stehen somit in Konkurrenz zueinander. Da die Bildung des Alkohols Lösemittel-assistiert abläuft, wird für ein erfolgreiches Un-caging Wasser benötigt, das mit dem Cumarin-Kation reagiert.^[95,118]

3.2 Bioaktive Zielmoleküle

3.2.1 Antibiotika

Die Entdeckung von Penicillin war ein Meilenstein für die Medizin, der dazu beitrug die durchschnittliche Lebenserwartung des Menschen signifikant zu erhöhen. Dabei hat es mehrere Ansätze benötigt, bis das erste Antibiotikum zum Einsatz kam. Als Erster er-kannte 1874 der Chirurg Billroth den Effekt des Pilzes der Gattung *Penicillium* auf das Wachstum von Bakterien.^[119] Knapp 50 Jahre später gab es einen weiteren Beweis der Wirkung des Antibiotikums auf Streptokokken. Im Jahre 1945 erhielten Alexander Fle-ming, Howard Florey und Ernst Chain den Nobelpreis der Medizin und Physiologie für ihre Arbeit zur Wirkung von Antibiotika.^[120]

Grundsätzlich dienen Antibiotika zur Behandlung von bakteriellen Infektionskrankhei-ten. Dabei sind ihre Angriffspunkte Strukturen, die ausschließlich in Prokaryoten, jedoch nicht in Eukaryoten vorkommen, wie die Zellwand, die Proteinbiosynthese im bakteriel-len 70S Ribosom, das Bakterienchromosom, Folsäuresynthese und die RNA-Poly-merase.^[121] Ursprünglich handelte es sich um natürliche Stoffwechselprodukte nieder-molekularer Pilze und Bakterien.^[122] Heute gibt es eine Vielzahl an verschiedenen natür-lichen, teilsynthetischen und synthetischen Antibiotika, die je nach zu bekämpfendem Bakterium zur Therapie eingesetzt werden. Eine Einteilungsmöglichkeit der unterschied-lichen Antibiotika ist deren Wirkmechanismus im Bakterium. Penicillin beispielsweise stört die Zellwandsynthese der Bakterien, indem es die Quervernetzung der Peptidogly-kane verhindert. Dadurch entstehen löchrige Zellwände und es kommt zur Zellyse.^[121]

Weitere Antibiotika, die die Zellwand angreifen, sind Vancomycin und Fosfomycin. Somit wirken diese Arten der Antibiotika gegen grampositive Bakterien, diese zeichnen sich durch eine dicke Zellwand aus. Im Gegensatz dazu verfügen Bakterien der gramnegativen Klasse lediglich über eine dünne Zellwand mit Peptidoglykan.^[123] Hierfür werden Antibiotika eingesetzt, die mit der Zellmembran interagieren. Die sogenannten Polypeptidantibiotika wirken ausschließlich auf gramnegative Bakterien.

Zu der Gruppe, die gezielt die Proteinbiosynthese von Bakterien hemmt, gehören Chloramphenicol und Tetracyclin.^[124,125] Letzteres bindet an die 30S-Untereinheit des Ribosoms und verhindert dort die Anlagerung der tRNA, wodurch die Translation unterbunden wird.^[126,127] Chloramphenicol blockiert die Peptidyl-Transferase, indem es die Bindung zwischen den Aminosäuren der naszierenden Kette stört.^[128] Andere Vertreter wiederum binden an der 50S-Untereinheit des Ribosoms und hindern auf verschiedene Wirkungsweisen die Translation.^[129]

Puromycin

Puromycin ist ein Antibiotikum, welches aus dem grampositiven Bakterium *Streptomyces Alboniger* isoliert wurde.^[130,131] Es besteht aus einer Aminonukleosid-Einheit, die über eine Amidbindung mit einer Phenylalanin-Einheit verbunden ist (Abb. 3.6). Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zur Tyrosyl-Adenosin-Einheit am 3'-Ende der Tyr-tRNA ist es in der Lage die Proteinbiosynthese zu inhibieren. Dafür bindet das Antibiotikum während der Translation kodonunspezifisch an die A-Seite des Ribosoms (Abb. 3.6). Im Zuge dessen findet ein nukleophiler Angriff der Amino-Gruppe des Puromycins auf den C-Terminus der naszierenden Polypeptidkette, die sich an der ribosomalen P-Stelle befindet, statt. Auf diese Weise wird die Polypeptidkette auf das Puromycin übertragen. Da die Aminonukleosid-Einheit des neuen Konstrukts aufgrund der Amidbindung statt der Ester-Gruppe im Aminoacyl-tRNA spaltbar ist, wird das gebildete Peptidyl-Puromycin vom Ribosom abgestoßen und resultiert in unvollendeten Proteinfragmenten (Abb. 3.6). In niedrigen Konzentrationen eingesetzt kann der Eintritt des Puromycins in das Ribosom nicht mit der Tyr-tRNA konkurrieren und bindet ausschließlich am C-terminalen Ende frisch synthetisierter, vollständiger Proteinketten.

Somit ist das Antibiotikum sowohl als Translationsinhibitor als auch als Marker für Proteine geeignet und bietet damit verschiedene Anwendungsmöglichkeiten.^[132] Unter anderem werden Puromycin und seine synthetischen Derivate als Substratanaloge des

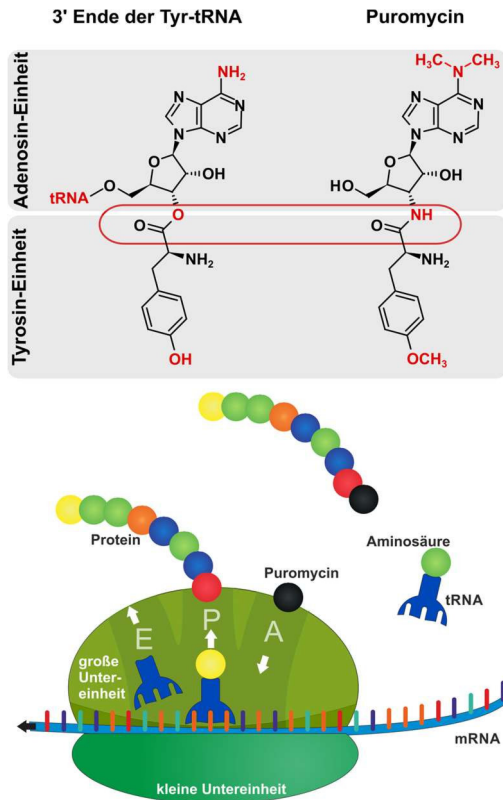


Abbildung 3.6: Strukturelle Unterschiede zwischen dem 3'-Ende der Tyr-tRNA und dem Puromycin, welches im Ribosom auf die naszierende Proteinkette übertragen wird. Das resultierende Puromycin-Protein wird aus dem Ribosom abgestoßen.

Peptidtransferasezentrums (P-Seite) zur Untersuchung der Peptidbindungsbildung verwendet.^[133-135] Des Weiteren spielt Puromycin in der mRNA-Display Technik eine große Rolle, bei der der Einsatz des Antibiotikums die Bindung zwischen dem mRNA-Vorläufer und dem jeweiligen Peptidprodukt als Resultat der Proteinbiosynthese ermöglicht.^[136] Die TRAP-Display Methode (engl.: transcription-translation coupled with association of Puromycin linker) nutzt Puromycin um Polypeptide mit gezielten funktionellen Eigenschaften zu generieren.^[137]

Die dendritische Proteinsynthese ist ein wichtiger Prozess für die Ausbildung der synaptischen Plastizität, welche wiederum eine große Rolle bei kognitiven Fähigkeiten spielt.^[138-140] In den Neurowissenschaften findet sich ein großes Anwendungsfeld für Puromycin, da damit

viele noch offene Fragestellungen zur Proteinbiosynthese der neuronalen Zellen beantwortet werden können. Neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Huntington stehen im Zusammenhang mit dem Proteinabbau und -aggregation in neuronalen Zellen.^[141-144] Durch die Markierung und Beobachtung wichtiger Proteine kann Wissen über deren Bildung und Abbau gewonnen werden, welches wiederum bei der Behandlung genannter Erkrankungen fundamental ist. Dabei können die frisch synthetisierten puromycylierten Proteine durch den Einsatz eines Puromycin-Antikörpers, der wiederum an das Puromycin bindet und infolge dessen fluoresziert, beobachtet und untersucht werden.^[145,146]

Eine zeitliche und räumliche Kontrolle der Puromycin-Aktivität kann durch die Anbringung einer photolabilen Schutzgruppe an das Antibiotikum erreicht werden, dessen Freisetzung anschließend präzise und nicht-invasiv durch einen Lichtpuls steuerbar ist, was eine Erhöhung der Genauigkeit der erhaltenen Ergebnisse gewährleistet.

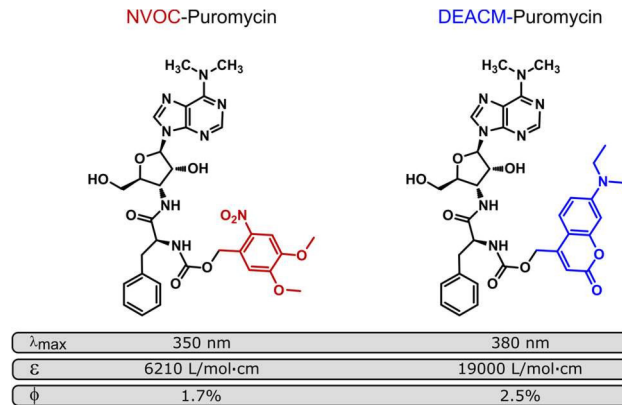


Abbildung 3.7: Strukturformeln von Puromycin, das über einen Carbamat-Linker mit NVOC (rot) und DEACM (blau) geschützt ist und den jeweiligen Absorptionsmaxima, Extinktionskoeffizienten und Uncaging-Quantenausbeuten.

Mit diesem Thema haben sich bereits Jörg Kohl-Landgraf und Lisa Herzig aus dem Arbeitskreis beschäftigt. Jörg Kohl-Landgraf widmete sich der erstmaligen Etablierung eines photolabil geschützten Puromycins widmete, er beschäftigte sich zunächst mit dem Uncaging Mechanismus des NVOC-Puromycins (Abb. 3.7).^[147] Dabei konnte er unterschiedliche Reaktionspfade nach der Photoanregung des geschützten Puromycins identifizieren, wobei nur einer dieser Pfade zur tatsächlichen Freisetzung des Antibiotikums führt.^[80] Das System konnte zudem in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Erin Schuman aus dem Max-Planck-Institut für Hirnforschung in *in-vivo* Experimenten zur Beobachtung von frisch synthetisierten Proteinen in neuronalen Zellen eingesetzt werden.^[148] Lisa Herzig baute auf die Ergebnisse auf und verbesserte die photochemischen Eigenschaften der Freisetzungsreaktion von Puromycin durch den Einsatz einer anderen photolabilen Schutzgruppe.^[149] Das resultierende DEACM-Puromycin, mit einer Uncaging-Quantenausbeute von rund 2.5% und einem Extinktionskoeffizienten von 1900 L/mol·cm (Abb. 3.7), was einem Uncaging-Querschnitt $\Phi \cdot \epsilon$ von 475 L/mol·cm entspricht, läuft um das 4-fache effizienter ab als die Photoreaktion des NVOC-Puromycin ($\Phi \cdot \epsilon$: 106 L/mol·cm).^[150,151]

3.2.2 Neurotransmitter

Neurotransmitter sind Botenstoffe im Nervensystem, die Informationen zwischen den Nervenzellen transportieren. Ihre Funktionen sind dabei sehr breit gefächert, von motorischen Aktionen, emotionaler Stimulierung bis hin zu kreativen Leistungen.^[152] Aus diesem Grund stellen sie eine immens wichtige Substanzklasse des menschlichen Körpers dar. Forschungsergebnisse zeigen, dass viele sowohl psychische als auch physische Krankheitsbilder, wie beispielsweise Depressionen^[153], Alzheimer^[154], Schizophrenie^[155] und Parkinson^[156], mit einem Über-, Unterschuss oder einem Ungleichgewicht an Neurotransmittern in Zusammenhang stehen.

Neurotransmitter werden im Neuron aus entsprechenden Vorstufen synthetisiert und nach dem Ablauf ihrer Funktion wieder abgebaut. Durch einen elektrischen Reiz auf die Dendriten einer Nervenzelle wird ein Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt, der sich zwischen dem Endstück eines Axons und dem Rezeptor befindet. Von dort aus erreichen sie den Rezeptor und lösen einen spezifischen Effekt aus.^[157,158] Es wird zwischen vier Arten von Neurotransmitter unterschieden, den Amininen, Aminosäuren, Neuropeptiden und Gasen.

Serotonin ist der Unterklasse der Amine zu zuordnen und zählt zu den wichtigsten Neurotransmittern im menschlichen Körper. Es handelt sich dabei um 5-Hydroxy-Tryptamin (5-HAT), dessen Trivialname sich aus den beiden Begriffen Serum für Blut und Tonus für Spannung ergibt, was die Beschreibung seiner erstmalig entdeckten Funktion für die Kontraktion von Blutgefäßen ist.^[159]

Im zentralen Nervensystem ist der Neurotransmitter regulatorisch für verschiedene Prozesse, wie die Körpertemperatur, Appetit, Emotionen, Schlaf-Wach-Rhythmus und Schmerzbewertung zuständig. Zudem kommt er auch im Magen-Darm-Trakt, Leber und Auge vor.^[160] Von größtem Interesse ist die Rolle von Serotonin bei psychischen Störungen. Dabei gehen Depressionen, Manie und Angststörungen mit einer verminderten Verfügbarkeit des Botenstoffs im zentralen Nervensystem einher.^[161]

Einen weiteren Neurotransmitter stellt Glutamat dar, welches das Anion der Glutaminsäure ist. Es ist ein wichtiger Baustein bei der Synthese von Proteinen und Peptiden, weshalb es auch eine zentrale Rolle im Stoffwechsel des Gehirns spielt.^[162,163] Es ist in einer höheren Konzentration als jede andere Aminosäure im Gehirngewebe vorzufinden und ist verantwortlich für 90% der synaptischen Verbindungen.^[164,165] In höheren Konzentrationen jedoch wirkt es neurotoxisch und wird daher vom Gehirn sehr stark reguliert.^[166]

4 Material und Methoden

Proben

Die Fluoren-basierten Proben wurden von Matiss Reinfelds aus dem Arbeitskreis von Prof. A. Heckel synthetisiert und aufgereinigt. Die Synthese der Thiophen-basierten Proben erfolgte ebenfalls im AK Heckel von Volker Hermanns. Alle Proben zum doppelt geschützten Puromycin Projekt wurden von Isam Elamri synthetisiert und aufgereinigt.

UV/vis-Spektrometer

Die stationären Absorptionsspektren und Langzeit-Belichtungsexperimente wurden mit zwei kommerziell erhältlichen Spektrometern durchgeführt, dem *Specord S100* und *Specord S600* des Herstellers *Analytik Jena*. Die Absorptionsspektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 200 nm bis 1025 nm aufgenommen. Für den UV-Bereich (200 nm bis 350 nm) ist im Gerät eine Deuteriumdampfampe eingebaut, während für den sichtbaren Bereich (340 nm bis 1025 nm) eine Halogenlampe verwendet wurde. Für die Messungen wurden Quarzglasküvetten mit einem Lichtweg von 10 mm und einer Breite von 10 mm von *Hellma Analytics 110-QS* eingesetzt.

FTIR

Die Messungen der IR-Spektren erfolgte mittels eines Fourier-Transform-Infrarotspektrometers (FTIR). Dabei handelt es sich um ein Michelson-Interferometer des Typs *Vertex 80* von dem Hersteller *Bruker*. Hierzu wurde der DTGS-Detektor (deuteriertes Triglycinsulfat) verwendet. Die Probenkammer wurde kontinuierlich mit Stickstoff geflutet, so dass der Einfluss von Wasserdampf- und Kohlenstoffdioxid-Schwingungen in den IR-Spektren minimiert wurde. Vor Beginn jeder Probenmessung wurde ein Hintergrundspektrum aufgenommen und automatisch von jedem einzelnen gemessenen Spektrum subtrahiert. Es erfolgten Messungen im Wellenzahlbereich von 4000 cm^{-1} bis 800 cm^{-1} mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} . Für die Hintergrund- und Probenmessungen wurden jeweils 64 bzw. 128 Scans durchgeführt. Die Proben wurden in einer *Sandwich*-Küvette,

bestehend aus zwei Calciumfluorid- (CaF₂) Fenstern und einem 50 µm dicken Abstandhalter aus Polytetrafluorethylen (PTFE), angesetzt. Die Auswertung der gemessenen Spektren erfolgte zum Teil mit dem Programm *OPUS* ebenfalls von *Bruker*.

Emissionsspektren

Die Messungen der Fluoreszenzspektren wurden am Spektralfluorimeter FP-8500 von *Jasco* aufgenommen. Die Emission wurde nach Anregung bei 320 nm im Spektralbereich von 300 nm bis 800 nm mit einer Wellenlängenauflösung von 2.5 nm und einer Abtastgeschwindigkeit von 200 nm / min aufgenommen. Für alle Messungen wurde eine 2x10 mm Küvette verwendet, bei der die Anregung entlang der 10 mm und die Abtastung entlang der 2 mm Weglänge stattfand. Um mögliche Reabsorptionseffekte des Emissionslichts durch die Probe zu minimieren, wurde die Probenkonzentration gering gehalten, sodass eine Absorption von ca. 0.1 OD entlang der 10 mm Seite verwendet wurde. Zur Korrektur der Daten wurde das gruppeninterne Programm FluCy^[167] (engl. Fluorescence Correction and quantum Yield) verwendet, welches folgende Schritte durchführt:

- Basislinienkorrektur: Das Spektrum wird zunächst einer Basislinienkorrektur unterzogen, bei der der Mittelwert eines emissionsfreien Spektralbereichs subtrahiert wird (Gl. 4.1).

$$F_{Basis}(\lambda) = F(\lambda) - \frac{1}{n} \left(\sum_{j=1}^n F_i(\lambda_i) \right) \quad [4.1]$$

- Korrektur des Anregungsintensitätsverlusts: Diese Korrektur dient zum Ausgleich der abnehmenden Anregungsintensität bis zum Küvettenmittelpunkt, bei dem der Abfrage stattfindet (wobei x_1 dem Anregungspfad entspricht) (Gl. 4.2).

$$F_{Anreg}(\lambda) = F(\lambda) \cdot 10^{A(\lambda_{Anreg})0.5x_1} \quad [4.2]$$

- Reabsorptionskorrektur: Innerhalb der Küvette können emittierte Photonen auf nicht angeregte Moleküle treffen und absorbiert werden. Die sogenannte Reabsorption kann stattfinden, wenn Absorptions- und Emissionsspektrum einen Überlapp aufweisen (wobei x_2 dem Quotienten aus dem Lichtweg entlang des Emissionspfads und des Lichtwegs bei der Absorptionsmessung entspricht) (Gl. 4.3).

$$F_{Reab}(\lambda) = \frac{F(\lambda)}{10^{-A(\lambda)0.5x_2}} \quad [4.3]$$

- Detektorkurvenkorrektur: Dieser Schritt berücksichtigt die wellenlängenabhängige Empfindlichkeit des Detektors (Gl. 4.4).

$$F_{Det}(\lambda) = \frac{F(\lambda)}{D(\lambda)} \quad [4.4]$$

LEDs

Alle kontinuierlichen Belichtungsexperimente im UV/vis-, IR-Spektralbereich und pH-Messungen erfolgten mit LEDs des Herstellers *Thorlabs GmbH*. Dabei wurden je nach Absorptionsverhalten der entsprechenden Probe folgende Wellenlängen verwendet: 300 nm (M300L4; FWHM: 20 nm), 365 nm (M365L2; FWHM: 7.5 nm), 470 nm (M470L, FWHM: 25 nm).

Flash photolyse

Die Blitzphotolyse-Messungen wurden mit einem Nd:YAG-Laser (SpitLight 600, Innolas Laser) durchgeführt, der als Pumpquelle für einen optischen parametrischen Oszillator (preciScan, GWU-Lasertechnik) diente. Zur Erzeugung der Anregung wurde der OPO auf 355 nm mit einer Leistung von 2 mJ eingestellt. Die Abtastung wurde mit einer Quecksilber-Xenon-Lampe (LC8, Hamamatsu) erzeugt. Anschließend wird das generierte Weißlicht durch zwei Monochromatoren (Photon Technology International) geleitet, wodurch die gewünschte Wellenlänge selektiert und Streulicht von der Anregung blockiert wird. Zur Detektion wurde das transiente Signal durch eine Photomultiplier-Röhre (H6780-02, Hamamatsu) geleitet und mit einem Oszilloskop (DPO 5204-10RL, Tektronix) aufgezeichnet. Die Messungen wurden in einem Zeitfenster zwischen 1 μ s und 1 s bzw. 0.001 s und 1000 s durchgeführt. Zu jedem Zeitpunkt wurden die Transienten 20-mal gemittelt. Für diese Art von Messungen wurde eine 2x10 mm-Quarzküvette verwendet.

Datenanalyse

Die Datenanalyse der transienten Absorptionsmessungen erfolgte mit dem Auswertungsprogramm *OPTIMUS*.^[168] Mithilfe des Programms wurden zunächst Dispersionskorrekturen durchgeführt, die aufgrund des *chirps* des Abtastpulses notwendig sind. Außerdem erfolgte die Korrektur des kohärenten Artefaktes, das als Signal am Zeitnullpunkt erscheint und unter anderem aus den nichtresonanten Wechselwirkungen des Lösungsmittels mit der Laserstrahlung resultiert.^[169,170] Dieses Artefakt ist nicht

probenbezogen und kann somit durch Subtraktion entfernt werden. Anschließend wurde eine Global Lifetime Analysis (GLA) durchgeführt, dabei handelt es sich um ein Fitverfahren, bei dem der Datensatz mit einer definierten Anzahl an exponentiellen Funktionen bestmöglich angepasst wird. Global bezieht sich hierbei auf eine simultane Anpassung über alle Wellenlängen des Datensatzes hinweg. Daraus resultieren zerfallsorientierte Spektren, die die Amplituden der ermittelten Exponentialfunktionen darstellen. Die korrigierten Daten und der Fit können als transiente Absorptionsspektren oder einzelne Transienten der jeweiligen Wellenlängen/Wellenzahlen visualisiert werden.

DFT-Rechnungen

Alle Geometrieoptimierungen wurden mit dem Programm Gaussian 16 durchgeführt.^[171] Die Molekülstrukturen wurden auf dem Theorieniveau B3LYP/cc-pVDZ^[172-174] unter Verwendung eines polarisierbaren Kontinuumsmodells (PCM) mit Methanol als Lösungsmittel optimiert.^[175,176] Zehn angeregte Singulett-Zustände wurden unter Verwendung der zeitabhängigen Dichtefunktionaltheorie (TDDFT) berechnet.

Die Schwingungsmoden wurden nach einer Geometrieoptimierung auf dem B3LYP/cc-pVDZ-Theorieniveau berechnet. IR-Spektren wurden durch Faltung der Stick-Spektren mit Gauß-Funktionen mit einer Halbwertsbreite von 4 cm⁻¹ erhalten.

Quantenausbeuten

Die Quantenausbeute einer lichtinduzierten Reaktion ist definiert als Quotient der Anzahl der abgelaufenen Reaktionen N_{react} und der Anzahl der von der bestrahlten Verbindung absorbierten Photonen N_{abs} ^[177](Gl. 4.5):

$$\Phi = \frac{N_{react}}{N_{abs}} \quad [4.5]$$

Ein Ausdruck für die Anzahl der Freisetzungsreaktionen ergibt sich aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Gl. 4.6):

n : Stoffmenge

V : belichtetes Probenvolumen

A : Absorption der Probe

ε : Extinktionskoeffizient des

Photoprodukts

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} = \frac{n}{V} \quad [4.6]$$

Wird die Stoffmenge n durch den Quotienten aus der Molekülanzahl N_{react} und der Avogadro-Konstante N_A ersetzt, so kann Gleichung 4.6 folgendermaßen umgeformt werden (Gl. 4.7):

$$N_{react} = \frac{A \cdot N_A \cdot V}{\varepsilon \cdot d} \quad [4.7]$$

Da sich die Absorption der Probe infolge der Photoreaktion ändert, muss die Zeitabhängigkeit der Absorption berücksichtigt werden. Hierzu wird lediglich ein Zeitbereich der ersten 100 - 200 s der Messung einbezogen, indem die Absorptionsänderung als nahezu linear betrachtet werden kann.

Zudem wird angenommen, dass in diesem Zeitintervall keine Absorption durch bereits entstandenes Photoprodukt erfolgt und somit alle absorbierten Photonen lediglich vom Edukt aufgenommen wurden. Folglich kann für die zeitabhängige Absorption als eine lineare Funktion mit der Steigung m und der Zeit t in Gleichung 4.3 eingesetzt werden (Gl. 4.8).

$$N_{react} = \frac{m \cdot t \cdot N_A \cdot V}{\varepsilon \cdot d} \quad [4.8]$$

Zunächst wird die Anzahl der eingestrahelten Photonen N_{LED} anhand folgender Gleichung definiert (Gl. 4.9):

$$E = h \cdot \nu \cdot N_{LED} \quad [4.9]$$

Wird die Anregungsenergie E durch das Produkt der Lichtleistung P_0 und der Zeit ersetzt, so ergibt sich folgender Ausdruck für N_{LED} (Gl. 4.10).

$$N_{LED} = \frac{P_0 \cdot t \cdot \lambda}{h \cdot c} \quad [4.10]$$

Die Anzahl der absorbierten Teilchen ist proportional zu der Absorption $A = (1 - 10^{-A_0})$, die von der Absorption bei der Anregungswellenlänge vor der Belichtung A_0 abhängt. Für Gleichung 4.6 ergibt sich demnach (Gl. 4.11):

$$N_{abs} = N_{LED} \cdot (1 - 10^{-A_0}) = \frac{P_0 \cdot t \cdot \lambda}{h \cdot c} \cdot (1 - 10^{-A_0}) \quad [4.11]$$

Die Quantenausbeute ergibt dann als Quotient der beiden Ausdrücke 4.8 und 4.11 (Gl. 4.12):

$$\Phi = \frac{m \cdot N_A \cdot V}{\varepsilon \cdot d} \frac{h \cdot c}{P_0 \cdot \lambda \cdot (1 - 10^{-A_0})} \quad [4.12]$$

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Fluoren-basierte Schutzgruppen

Beim Design von neuen photolabilen Schutzgruppen steht u. a. ihre Effizienz im Fokus. Dazu gehört die Optimierung von photochemischen Parametern wie möglichst rotverschobene Absorptionsmaxima, hohe Extinktionskoeffizienten und Quantenausbeuten. Im Fall der hier behandelten Fluoren-basierten PPG hat der Optimierungsprozess mit bereits literaturbekannten Diethylaminobenzyl (DEAMb)-Schutzgruppen begonnen. Diese wurden als Ausgangsverbindungen verwendet, da sie bekanntlich auch schlechte Abgangsgruppen (AG) wie Alkohole freisetzen können.^[178] Allerdings galt es ihre Absorptionsmaxima vom UV-Bereich (< 330 nm) in den sichtbaren Spektralbereich (> 400 nm) zu verschieben. Der Ansatz dabei war es, das konjugierte π -Orbitalsystem durch einen zweiten Phenylring zu erweitern.

Zunächst wurde die Position des zweiten Rings relativ zur Diethylamino-Gruppe untersucht (Abb. 5.1), wobei sich die *meta*-Position bezüglich der bathochromen Verschiebung der Absorptionsbande als besonders günstig herausstellte.^[179] An dem resultierenden Biphenylsystem wurde im nächsten Schritt der Einfluss unterschiedlicher Substituenten auf die photochemischen Eigenschaften analysiert. Es ergab sich eine klare Beziehung zwischen den elektronenziehenden Substituenten und den Absorptionsmaxima bzw. Quantenausbeuten: Je elektronenziehender der Substituent an der *meta*-Position des DEAMb, desto bathochromer die Absorption und desto geringer die Quantenausbeute. Grund hierfür ist die Verringerung der Orbitalkoeffizienten, die die elektronenziehenden Substituenten an der *meta*-Position verursachen.

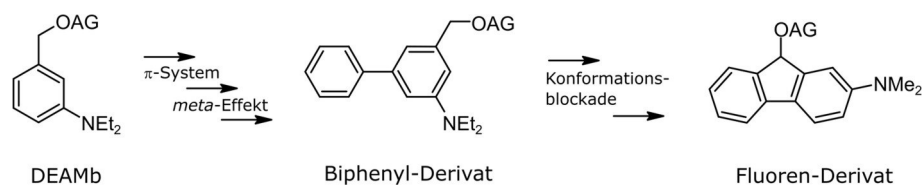


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Optimierungsprozesses einer photolabilen Schutzgruppe anhand der drei an den Pfeilen gekennzeichneten Parameter, bestimmt mittels photochemischer Analysen und quantenmechanischer Rechnungen, beginnend bei dem DEAMb über das Biphenyl-Derivat hin zum Fluoren-Derivat.^[179,181]

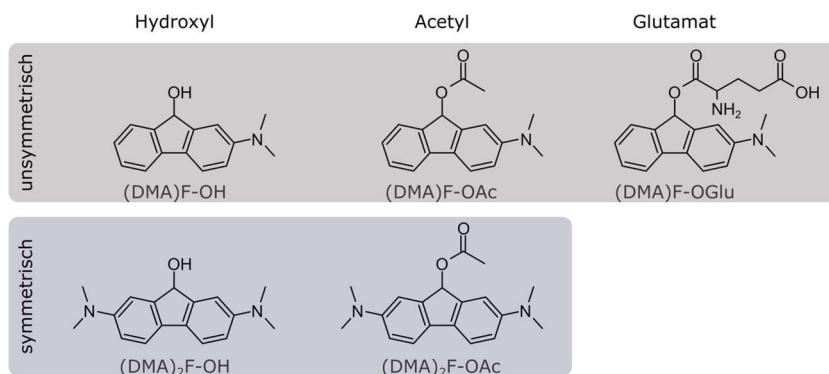


Abbildung 5.2: Strukturformeln der untersuchten Fluoren-Derivate mit unterschiedlichen AGs unterteilt in unsymmetrische (oben) und symmetrische (unten) Schutzgruppen.

Dies steht dem sogenannten Meta-Effekt entgegen, der elektrondonierende Substituenten an der *meta*-Position von DEAMB, auf Grund der erhöhten Elektronendichte im LUMO nach Anregung, die Freisetzung einer AG assistiert.^[180] Folglich ist das Dimethylamino-substituierte Biphenyl mit 42% die Schutzgruppe mit der höchsten Quantenausbeute.^[181]

Quantenmechanische Berechnungen an dem nicht-koplanaren Biphenylsystem (Abb. 5.1) deckte die Rotation um die C-C-Achse als einen zusätzlichen Deaktivierungspfad aus dem angeregten Zustand auf. Jeder weitere Deaktivierungspfad stellt eine Konkurrenz zum Uncaging-Pfad dar und vermindert folglich die Effizienz der Schutzgruppe. Durch eine Konformationssperre entlang der C-C-Achse des Biphenyls kann die Unterbrechung des π -Orbitalsystems durch eine Rotation verhindert und verbesserte photochemische Eigenschaften erreicht werden.^[179] Schließlich sind daraus planare, photolabile Schutzgruppen entstanden, die zur Klasse der Fluorene zählen. Bei vergleichbaren Quantenausbeuten konnten die Extinktionskoeffizienten signifikant gesteigert werden, wodurch sich der Uncaging-Querschnitt deutlich verbessert hat.^[181] Resultierend aus den oben genannten Ergebnissen handelt es sich bei den hier untersuchten Verbindungen um die zwei Schutzgruppen 2-(Dimethylamino)-9H-Fluoren ((DMA)F) und 2,7-Bis(dimethylamino)-9H-Fluoren ((DMA)₂F) mit Hydroxyl, Acetyl und Glutamat als AG (Abb. 5.2). Die verschiedenen Verbindungen lassen sich in unsymmetrische und symmetrische Schutzgruppen unterteilen, wobei sich letztere durch eine zweite Dimethylamino-Gruppe auszeichnen. Die verschiedenen Verbindungen weisen signifikant unterschiedliche Quantenausbeuten auf (Tab. 1).^[179] Die symmetrische Schutzgruppe mit -OH oder Acetyl als AG zeigt vielversprechende Uncaging-Quantenausbeuten (Φ) von 67% bzw. 42%.

Interessanterweise ist Φ bei den Verbindungen (DMA)₂F-OH, (DMA)₂F-OAc und (DMA)₂F-OGlu, die sich lediglich in der fehlenden Dimethylamino-Gruppe von den Symmetrischen unterscheiden, mit 28%, 15% und 25% deutlich geringer. Im Folgenden wird der Zusammenhang zwischen Uncaging-Quantenausbeute und der Struktur dieser Fluoren-Derivate mit spektroskopischen Methoden untersucht.

5.1.1 Absorptions- und Fluoreszenzspektren

Das Absorptionsmaximum aller Fluoren-geschützten Verbindungen liegt um 320 nm. Allerdings lässt sich ein Unterschied zwischen den beiden Schutzgruppen erkennen. In Methanol (Abb. 5.3a) absorbiert die symmetrische Schutzgruppe durchschnittlich um 8 nm bathochrom verschoben im Vergleich zur unsymmetrischen, wobei die Art der AG keinen signifikanten Einfluss zu haben scheint. Die elektronenschiebende Eigenschaft der zusätzlichen Dimethylamino-Gruppe an der symmetrischen Schutzgruppe ist folglich für die Rotverschiebung verantwortlich. In DMSO ist zwar der gleiche Trend bezüglich der beiden Schutzgruppen beobachtbar, jedoch sind zum einen insgesamt alle Absorptionsbanden stärker rotverschoben und zum anderen lässt sich eine Abhängigkeit von der jeweiligen AG erkennen. Grund für die bathochrome Verschiebung der Bande ist der sogenannte negative Solvatochromismus. Dabei bildet das Lösungsmittel Wasserstoffbrücken zu den Dimethylamino-Gruppen der Schutzgruppe im Grundzustand, wodurch dieser stabilisiert und abgesenkt wird.^[182] Die Stabilisierung durch H-Brücken muss im angeregten Zustand schwächer ausgeprägt sein, wodurch die Energie des Übergangs insgesamt erhöht und folglich die Absorptionsbande hypsochrom verschoben wird. Im Falle des aprotischen Lösemittel DMSO führen die fehlenden H-Brücken dementsprechend zu der bathochromen Verschiebung (Abb. 5.3b).

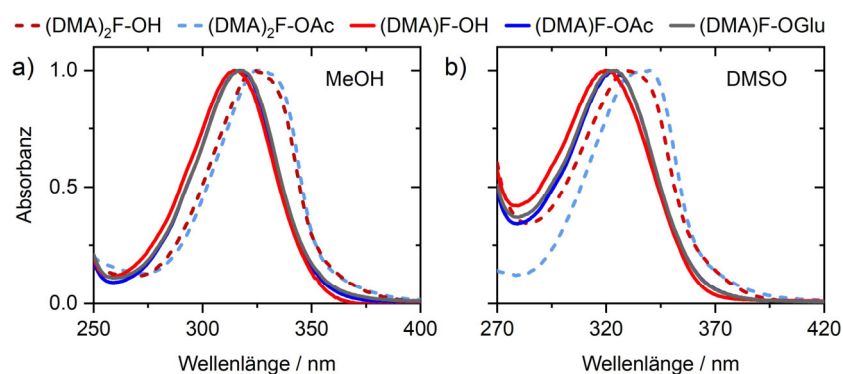


Abbildung 5.3: Absorptionsmaxima der fünf Fluoren-Derivate in Methanol (a) und DMSO (b).

Tabelle 1: Spektroskopische Parameter der Fluoren-Derivate mit verschiedenen AGs.

Verbindung	$\lambda_{\max} / \text{nm}$		$\epsilon (\lambda_{\max})^{[a]}$ / $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{em}} / \text{nm}$		$\Phi^{[a]}$ / %
	MeOH	DMSO		MeOH	DMSO	
(DMA)₂F-OH	325	331	35310	400	412	67
(DMA)₂F-OAc	328	336	27523	416	-	42
(DMA)F-OH	315	320	26913	390	416	28
(DMA)F-OAc	317	323	26805	406	434	15
(DMA)F-OGlu	318	323	24150 ^[b]	408	434	23 ^[b]

[a]: Ergebnisse entnommen aus der Dissertation von Matiss Reinfelds, wobei die Messungen in 0.1 M TEAA Puffer mit 10% MeCN durchgeführt wurden. [b]: Messungen in 0.1 M TEAA Puffer mit 20% MeCN.^[181]

In DMSO lässt sich eine Unterscheidung zwischen den einzelnen AGs erkennen. Dabei fällt grundsätzlich auf, dass Acetyl und Glutamat im Vergleich zu Hydroxyl die Absorptionsbande bathochrom verschieben. Da das C₉ in seiner vierfach gebundenen Form den Ring von der AG elektronisch entkoppelt, kann die Erweiterung des π -Systems am Fluoren-Grundgerüsts durch die Carbonyl-Gruppe nicht der Grund für die bathochrom verschobene Absorptionsbande sein. Vielmehr muss dies an der elektronenziehenden Eigenschaft der Carboxyl-Funktion beider AGs liegen. Im Falle der Glutamat-AG scheint die Verlängerung der Kette keinen weiteren Einfluss auf den push-pull-Effekt des Systems auszuüben, was sich in einer identischen Lage der Absorptionsbanden von Acetyl- und Glutamat-Derivaten auch in DMSO widerspiegelt.

Die Fluoreszenzspektren zeigen für alle Fluoren-Derivate eine Emission im Bereich 400-440 nm. Die Verbindungen mit Hydroxyl als AG weisen innerhalb der symmetrischen bzw. unsymmetrischen Reihe sowohl in MeOH als auch in DMSO eine leichte hypsochrome Verschiebung der Emissionsbande im Vergleich zu den restlichen Verbindungen auf (Tab. 1). Es ergibt sich für OH-Derivate eine Stokes-Verschiebung von 75 nm, während für die Derivate mit den beiden anderen AGs eine Stokes-Verschiebung von etwa 90 nm bestimmt werden kann. Zusätzlich ist Abbildung 5.4 eine wesentlich höhere Fluoreszenzintensität der OH-AG im Vergleich zu den anderen beiden AGs zu entnehmen.

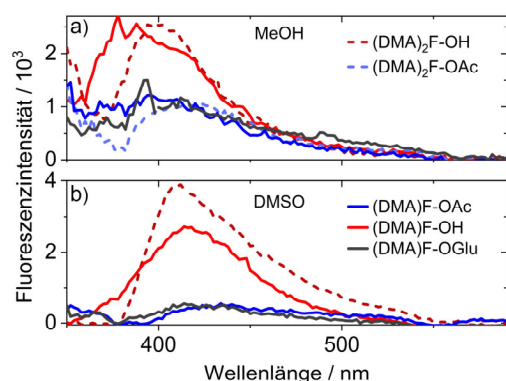


Abbildung 5.4: Fluoreszenzspektren der fünf Fluoren-Derivate in MeOH (a) und DMSO (b) mit einer Anregungswellenlänge von 340 nm.

Typischerweise zeichnet sich eine photolabile Schutzgruppe nach Abspaltung der AG durch eine höhere Fluoreszenz aus als in ihrer Form mit AG. Ein Beispiel hierfür sind Cumarine, die bedingt durch den Uncaging-Mechanismus stets Alkohole als Photoprodukte generieren.^[96] Obwohl im Fall der Fluorenone, wie in Kapitel 5.1.5 noch gezeigt wird, die OH-Gruppe freigesetzt wird und somit als Abgangsgruppe fungiert, scheint auch in diesem Fall der Fluoreszenzpfad als Deaktivierungsprozess stärker ausgeprägt zu sein. Bei Betrachtung der Uncaging-Quantenausbeuten im Vergleich zu den restlichen Derivaten (Tab. 1) wird jedoch klar, dass die höhere Fluoreszenz sich nicht auf den Uncaging-Pfad auswirkt. Demnach muss sich die erhöhte Fluoreszenz zum Nachteil eines nicht-strahlenden Deaktivierungspfades ergeben. Der Vergleich zwischen MeOH und DMSO bestätigt den oben genannten negativen Solvatochromismus, der dementsprechend die bathochrome Verschiebung der Emissionsbanden in DMSO verursacht.

5.1.2 Uncaging von Fluoren-basierten Schutzgruppen

Für die Untersuchung der Uncaging-Reaktionen wurde mittels spektroskopischer Methoden das Verhalten der Verbindungen unter Belichtung analysiert. Quantenmechanische DFT-Rechnungen dienten dabei als Hilfsmittel zur Bestätigung der vermuteten Zwischen- und Photoprodukte. Die Dauerbelichtung von $(DMA)_2F-OH$ in MeOH bei 365 nm führt zu einer Abnahme der Hauptabsorptionsbande bei 320 nm (Abb. 5.5a). Im Zuge dessen bilden sich neue Absorptionsbanden, die bei 60 s ihre maximale Intensität erreichen. Eine der Banden erstreckt sich von 400 nm bis 500 nm und ist durch eine Schwingungsfineinstruktur gekennzeichnet, während drei weitere Banden von 700 nm bis 1000 nm erscheinen.

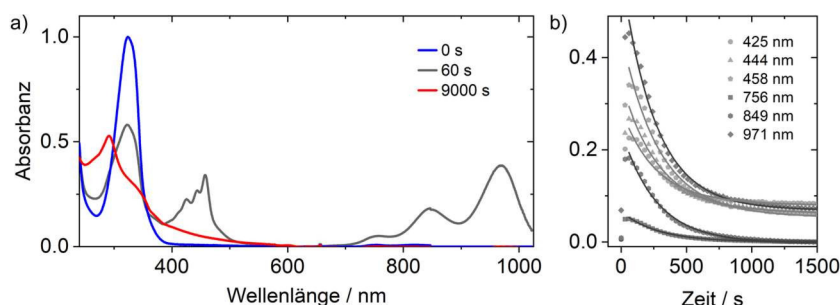


Abbildung 5.5: Absorptionsspektren von $(DMA)_2F-OH$ in MeOH vor und während der Dauerbelichtung mit 365 nm (a). Der zeitliche Verlauf ausgewählter Transienten des entstehenden Intermediats inklusive deren exponentielle Fitkurven nach Erreichen der maximalen Kationintensität (b)

Tabelle 2: Fit-Parameter der im Zuge der Belichtung von (DMA)₂F-OH gebildeten Transienten.

λ	425 nm	444 nm	458 nm	756 nm	849 nm	971 nm
A₁	0.199 ± 0.004 (87%)	0.278 ± 0.005 (92%)	0.389 ± 0.006 (94%)	0.0657 ± 0.0004	0.237 ± 0.014 (96%)	0.507 ± 0.013 (97%)
τ_1 / s	253 ± 9	272 ± 9	279 ± 9	284 ± 3	290 ± 12	255 ± 9
A₂	0.031 ± 0.004 (13%)	0.024 ± 0.003 (8%)	0.025 ± 0.003 (87%)	-	0.01 ± 0.02 (4%)	0.016 ± 0.015 (3%)
τ_2 / s	4175 ± 1740	3119 ± 1592	2897 ± 1835	-	716 ± 501	969 ± 651

Alle Banden oberhalb von 400 nm werden gleichzeitig gebildet und zerfallen mit sehr ähnlichen Zeitkonstanten von durchschnittlich 272 s (Abb. 5.5b, Tab. 2), was darauf hindeutet, dass sie von demselben langlebigen Zwischenprodukt stammen. Da es sich bei dem Experiment um eine Dauerbelichtung handelt ist mit den erhaltenen Zeitkonstanten keine Interpretation der Reaktionskinetik möglich. Die Gründe für den multiexponentiellen Zerfall der Banden sind in diesem Fall vielfältig, neben einem verzweigten Reaktionspfad, ist die Tatsache der dauerhaften, simultanen Anregung von (DMA)₂F-OH und (DMA)₂F⁺ ebenfalls zu berücksichtigen (Abb. 5.7). Allerdings fällt beim Vergleich der Amplituden der geringe Beitrag der τ_2 -Zeiten auf. Zusätzlich fällt die τ_2 -Zeit für die 400 nm Banden weit größer aus als die der Banden ab 700 nm, was der Entstehung der Photoprodukte geschuldet ist, deren Absorptionsbanden u. a. im Bereich zwischen 400 nm und 520 nm liegen (Abb. 5.5a). Für die 756 nm-Transiente war ein monoexponentieller Fit ausreichend, was vermutlich an der sehr schwachen Intensität der entsprechenden Bande liegt.

Fluorenole sind, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, bekannt dafür, infolge einer Anregung die OH-Gruppe abzuspalten und ein Kation zu bilden.^[83,183] Die Besonderheit liegt im Fall der hier untersuchten Verbindungen einerseits darin, die Stoffklasse der Fluorene als Schutzgruppe für unterschiedliche AGs zu verwenden.^[179] Andererseits ist auch das vergleichsweise sehr langlebige Intermediat, welches im folgenden Kapitel als Fluorenylkation identifiziert wird, von besonderem Interesse. Zunächst wird der Fokus jedoch auf die bei kontinuierlicher Belichtung entstehenden Photoprodukte gelegt.

Sowohl in protischen als auch in aprotischen Lösemitteln werden für alle fünf Derivate ähnliche Absorptionsspektren mit Banden bei 290 nm, 350 nm, 420 nm und 550 nm nach Dauerbelichtung gebildet (Abb. 5.6). Mithilfe DFT-berechneter Übergänge (Abb. 5.6a), NMR-Spektren, HPLC-Analytik und anschließender Massenanalyse wurden 2,(7-bis)-(Dimethylamino)-9H-Fluoren ((DMA)₂F), 2,(7-bis)-(Dimethylamino)-9H-Fluorenon

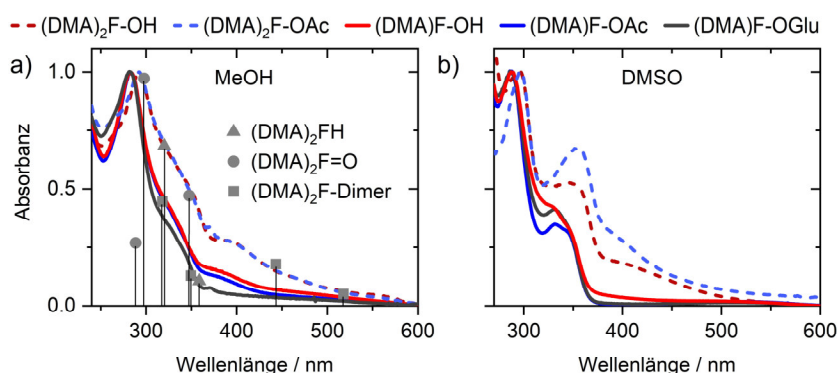


Abbildung 5.6: Absorptionsspektren nach kontinuierlicher Belichtung der fünf Derivate in MeOH (a) und DMSO (b). Zusätzlich sind DFT berechnete Übergänge der angenommenen Photoprodukte $(\text{DMA})_2\text{F-Dimer}$ (Quadrate), $(\text{DMA})_2\text{F=O}$ (Kreise), $(\text{DMA})_2\text{FH}$ (Dreiecke) dargestellt.

$(\text{DMA})_2\text{F=O}$) und 2(,7-bis)-(Dimethylamino)-9H-Fluoren-Dimer ($(\text{DMA})_2\text{F-Dimer}$) den Absorptionsbanden zugeordnet (Abb. 5.6).^[184]

Diese Verbindungen (Abb. 5.7) stimmen mit den literaturbekannten Photoprodukten des monosubstituierten Fluorenols überein^[83,88,89,183,185], somit hat weder die Substitution noch die Art des Lösungsmittels eine Auswirkung auf die entstehenden Photoprodukte. Allerdings ist erkennbar, dass sowohl im protischen als auch im aprotischen Fall die symmetrische Schutzgruppe in höheren Anteilen des Dimer resultiert, was aus den stärkeren 420 nm-Banden geschlossen werden kann. Für die Bildung eines Dimers ist einerseits nicht bekannt aus welchen Ausgangsverbindungen es sich zusammensetzt und zum anderen konnte keine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden, es zeichnet sich jedoch eine Substitutionsabhängigkeit ab. Dies kann anhand der wesentlich schwächer ausgeprägten Absorption ab 390 nm in den Endspektren der unsymmetrischen Verbindungen in DMSO und MeOH geschlossen werden. Zum anderen kann auf Grund der Dimerisierung eine homolytische Spaltung der Ausgangsverbindung $(\text{DMA})_2\text{F-OR}^2$

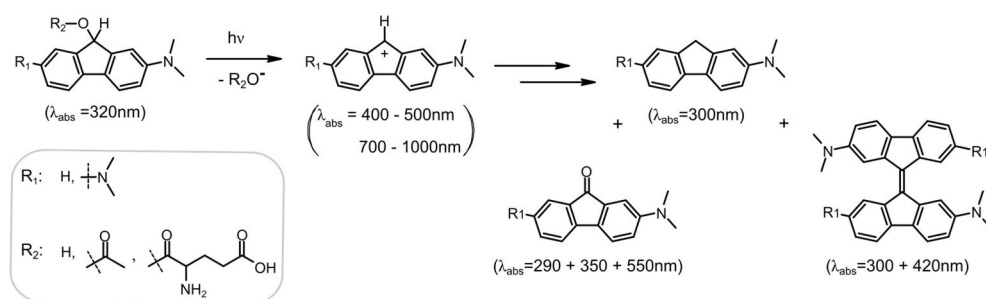


Abbildung 5.7: Schematische Darstellung der photoinduzierten Reaktion eines Dimethylamino-substituierten Fluoren-Derivats $(\text{DMA})_2\text{F-OR}$ über das Kation als Intermediat hin zu den Photoprodukten.

nicht ausgeschlossen werden, da sich aus reinen Fluorenylkationen kein Dimer bilden kann.

Bei Betrachtung entstehender und abnehmender probenspezifischer Schwingungen während der Belichtung kann mittels FTIR-Messungen Aufschluss darüber gegeben werden, ob bei der betrachteten Photoreaktion tatsächlich die gewünschte AG freigesetzt wird. Dazu wurden für alle fünf Derivate unter kontinuierlicher Belichtung IR-Spektren aufgenommen, bis keine Absorptionsänderungen mehr auftraten. Für die Acetyl- und Glutamat-AG kann in den Differenzspektren eine negative Amplitude bei 1740 cm^{-1} beobachtet werden, welche einer Carbonyl-Streckschwingung zugeordnet werden kann. In Kombination mit der positiven Absorptionsänderung bei 1720 cm^{-1} ergibt sich das Bild der freiwerdenden Abgangsgruppe, infolge derer sich die Schwingung der Carbonyl-Gruppe in der Nähe des Bindungsbruchs ändert. Gleichzeitig finden unterhalb von 1650 cm^{-1} Absorptionsänderungen statt, bei denen die negativen mit Hilfe von DFT-gerechneten Schwingungsmoden als Deformationsschwingungen identifiziert werden konnten, an denen das $\text{C}_9\text{-H}$ beteiligt ist (Abb. 5.8). Hierzu zählen die Schwingungsbanden bei 1620 cm^{-1} und 1580 cm^{-1} , die für alle Verbindungen eine Abnahme zeigen. Die unsymmetrischen Schutzgruppen weisen in dem Bereich eine dritte negative Amplitude bei 1610 cm^{-1} auf, welche ebenfalls eine Mode darstellt, an der das H-Atom an Position C_9 beteiligt ist. Ein besonderes Verhalten, welches unabhängig von der AG ist und lediglich

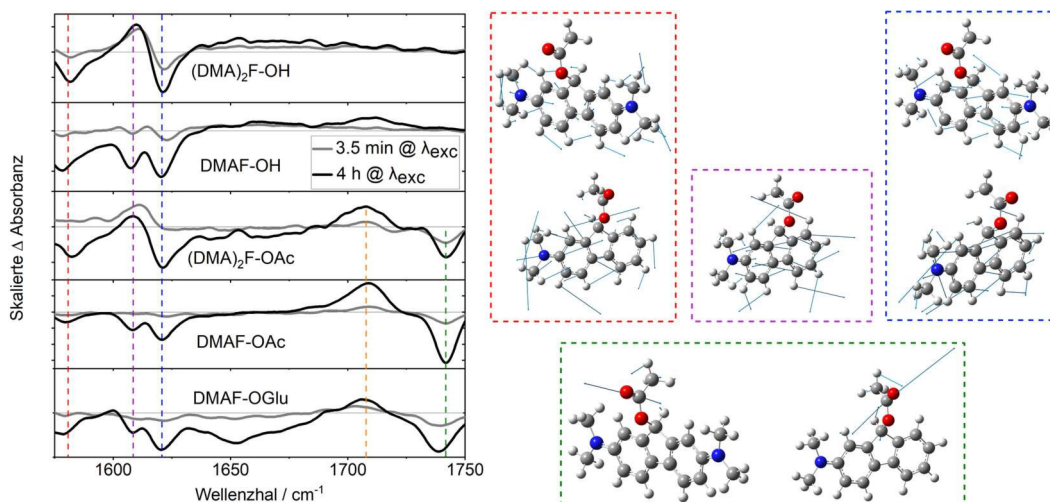


Abbildung 5.8: IR-Differenzspektren von allen fünf Fluoren-Derivaten in MeOH bei Belichtung mit 300 nm , die durch die Subtraktion des Ausgangsspektrums von den Spektren zum gegebenen Zeitpunkt der Belichtung (3.5 min und 4 h) gebildet wurden (a). Darstellung der DFT-berechneten Schwingungsmoden, die den jeweiligen Absorptionsänderungen während der Messung zugeordnet werden konnten (b).

für die symmetrische Schutzgruppe beobachtbar ist, ist die positive Absorptionsänderung bei 1610 cm^{-1} . Dabei fällt im Fall von $(\text{DMA})_2\text{F-OAc}$ der Rückgang dieser Bande im Laufe der Belichtung auf. Diese Schwingung kann, wie im folgenden Kapitel näher beschrieben, dem in den UV/vis-Messungen beobachteten Intermediat zugeordnet werden. Für die OH-Derivate kann das Uncaging nicht direkt anhand der AG verfolgt werden. Allerdings kann auf Grund der gleichen Absorptionsänderungen der Banden, die dem Fluoren-Grundgerüst angehören und der Bildung des Fluorenylkations durch die 1610 cm^{-1} -Bande bei der symmetrischen Schutzgruppe auf die OH-Freisetzung geschlossen werden, was in Kapitel 5.1.5 durch den photoinduzierten pH-Sprung der Verbindungen bestätigt wird.

5.1.3 Dimethylamino-Fluorenylkation

Quantenchemische Rechnungen

Wie bereits in Kapitel 3.1.1 behandelt, ist Fluorenol bekannt dafür, in Folge einer Anregung die OH-Gruppe abzuspalten und ein Kation zu bilden.^[83,183] Demnach liegt es nahe, bei dem hier beobachteten Intermediat von einer kationischen Spezies auszugehen. Die Tatsache, dass Carbokationen besonders reaktiv sind, verkürzt ihre Lebenszeit signifikant im Vergleich zu nicht geladenen Intermediaten, wodurch sie meist nur auf einer Subsekunden-Zeitskala erscheinen.

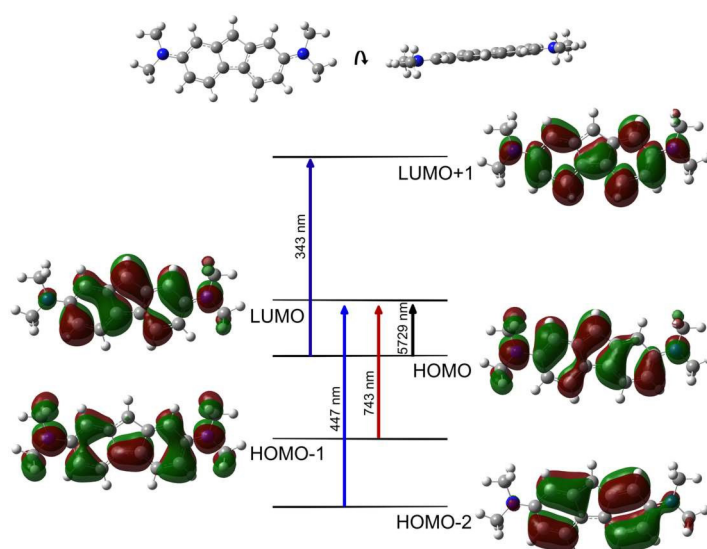


Abbildung 5.9: Struktur des $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ nach der Geometrieoptimierung und die hauptbeitragenden Molekülorbitale, die an den ersten 4 elektronischen Übergängen des $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ beteiligt sind.

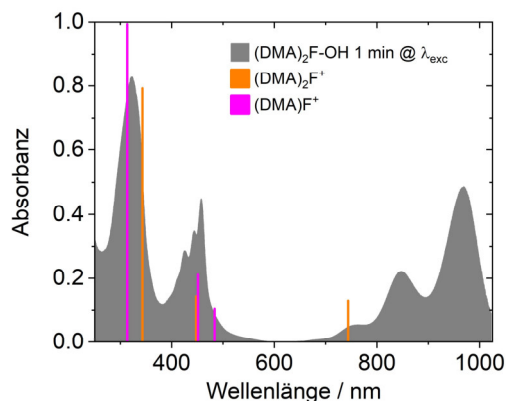


Abbildung 5.10: Absorptionsspektrum des $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ und $(\text{DMA})\text{F}^+$ in MeOH und den DFT berechneten Übergängen der Verbindungen mit B3LYP.

In diesem Kapitel sollen die Eigenschaften des Fluorenylkations genauer behandelt werden. Die quantenmechanische Geometrieoptimierung der kationischen Strukturen wurde auf dem Theorielevel B3LYP mit dem cc-PVDZ-Basissatz durchgeführt, wobei MeOH als implizites Lösemittel unter Verwendung des Conductor-like Polarizable Continuum Modells^[186] (CPCM) auf Grundlage der UV/vis-Absorptionsexperimente ausgewählt wurde. Das Resultat für das

$(\text{DMA})_2\text{F}^+$ ist ein planares Fluorenyl-Grundgerüst, bei dem lediglich die H-Atome der Methyl-Gruppen am N-Atom aus der Ebene herausragen (Abb. 5.9). Es findet folglich eine Planarisierung des H-Atoms an der C_9 -Position im Zuge der Freisetzung der AG statt. Des Weiteren liegt eine Verteilung der π -Elektronen vor, die sich auch über die N-Atome der Substituenten erstreckt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Stabilität des Kations durch die Existenz der beiden Dimethylamino-Gruppen begründet ist und somit die beobachtete Langlebigkeit im Vergleich zu den literaturbekannten und auch der hier untersuchten unsymmetrischen Fluorenylkationen erklärt.^[90-93,187-190]

Für die Berechnung der elektronischen Übergänge wurde zunächst dasselbe Funktional und derselbe Basissatz verwendet (Abb. 5.10). Bei dem reinen HOMO-LUMO Übergang handelt es sich um einen sehr schwachen Übergang, der bei 5729 nm liegt und mit einer Oszillatorstärke von $8 \cdot 10^{-4}$ nahezu verboten ist. Bei einer Oszillatorstärke $< 10^{-4}$ wird ein Übergang als verboten angesehen.^[191] Eine genauere Betrachtung der beiden Zustände liefert eine gleiche Anzahl an Knotenebenen und einen sehr geringen Energieabstand von 0.22 eV zum Grundzustand, was sehr außergewöhnlich niedrig ist.

Der Übergang in den zweiten angeregten Zustand ($\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_2$) liegt bei 743 nm mit einer Oszillatorstärke von 0.162 und ist somit der erste erlaubte Übergang mit π - π^* -Charakter. Bei dem HOMO-1 liegt keine Elektronendichte an der C_9 -Position vor, wodurch der Zustand dem Kation direkt nach der Abspaltung der AG gleicht, bei dem die Ladungsumverteilung noch nicht stattgefunden hat. Durch die Anregung in das LUMO findet ein Ladungstransfer von einer Dimethylamino-Gruppe auf das C_9 statt. Infolge eines HOMO-2 \rightarrow LUMO-

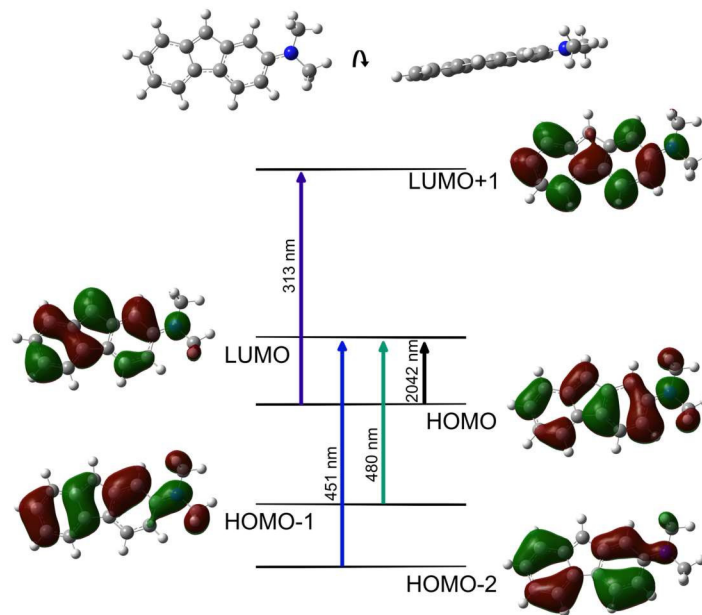


Abbildung 5.11: Struktur des (DMA)F⁺ nach der Geometrieoptimierung und die hauptbeitragenden Molekülorbitale, die an den ersten 4 elektronischen Übergängen des (DMA)F⁺ beteiligt sind.

Übergang wird der dritte angeregte Zustand besetzt, welcher bei 447 nm liegt und eine Oszillatorstärke von 0.179 aufweist. Der stärkste Übergang ist der $S_0 \rightarrow S_4$ mit 343 nm und einer Oszillatorstärke von 0.991 und stimmt somit auch sehr gut mit den experimentellen Spektren überein (Abb. 5.9).

Im Gegensatz zur symmetrischen Schutzgruppe ergibt die Simulation des Absorptionsspektrums des (DMA)F⁺ ein völlig anderes Ergebnis (Abb. 5.11). Statt den beiden Übergängen bei 447 nm und 743 nm sind zwei Übergänge bei 480 nm und 451 nm vorhanden. Das unsymmetrische Kation besitzt einen energetisch niedrig liegenden LUMO-Zustand, der allerdings lediglich einen Abstand von 2042 nm zum HOMO-Zustand aufweist und mit einer Oszillatorstärke von 0.017 durchaus erlaubt ist. Eine starke Ähnlichkeit der Elektronenverteilung weisen die HOMO-2-Zustände der beiden Kationen auf, die sich daraus ergibt, dass im symmetrischen Fall kaum Elektronendichte auf der zweiten Dimethylamino-Gruppe zu finden ist (Abb. 5.9 und Abb. 5.11). In Kombination mit den ebenfalls ähnlichen LUMO-Zuständen liegt der entsprechende $S_0 \rightarrow S_3$ -Übergang für die beiden Fluorenylkationen bei ca. 450 nm. Daraus folgend muss für den $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang das HOMO-1 des symmetrischen Kations trotz der ausgeprägter Delokalisierung der positiven Ladung durch die zweite Dimethylamino-Gruppe energetisch höher liegen, was sich

anhand der berechneten ersten beiden Übergänge ((DMA)₂F⁺: 5729 nm und 743 nm; (DMA)F⁺: 2042 nm und 480 nm) belegt lässt.

Wie anhand Abbildung 5.10 zu entnehmen, sind mit der verwendeten Methode die Energien für die Übergänge überschätzt worden, wodurch sich leicht verschobene Übergänge im Vergleich zum experimentellen Absorptionsspektrum ergaben. Grund dafür ist das B3LYP-Funktional, welches für die Berechnung von Übergängen geladener Spezies nicht optimal ist. In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Dreuw konnte durch Anwendung deren neu etablierten Methode ADC2^[192] der S₀ → S₂ - Übergang für die symmetrische Schutzgruppe bei 912 nm und für die unsymmetrische bei 524 nm berechnet werden, wodurch eine akkurate Übereinstimmung mit den experimentellen Absorptionsspektren des Fluorenylkations erreichbar war.

Stationäres Absorptions- und Emissions-Verhalten

Um die thermische Weiterreaktion ausgehend vom Kation genauer zu untersuchen, wurde (DMA)₂F-OH bis zur Bildung der maximalen Absorptionsintensität der entsprechenden Banden (1 min) bestrahlt und anschließend ohne weitere Belichtung Spektren aufgenommen (Abb. 5.12). In der Dunkelreaktion werden zunächst wie bei dem kontinuierlichen Belichtungsexperiment die Absorptionsbanden oberhalb von 400 nm abgebaut. Der Unterschied liegt jedoch in den Zerfallszeiten des Intermediats, welche mit durchschnittlich 1240 s ca. um den Faktor 5 größer sind (Tab. 3) als bei Dauerbelichtung. Außerdem findet teilweise eine Regeneration der 320 nm Bande statt. Dies bedeutet, dass ohne eine kontinuierliche Belichtung eine andere Reaktion abläuft. Dabei kann es entweder zu einer Rekombination der Ausgangsverbindung (DMA)₂F-OH kommen oder ein anderes Photoprodukt wird gebildet, welches auch bei 320 nm absorbiert. Da die Bande des Endspektrums eine geringere Absorbanz aufweist als die des Anfangsspektrums, müsste das neue Photoprodukt einen geringeren Extinktionskoeffizienten besitzen oder die Rekombination zum (DMA)₂F-OH nicht quantitativ stattfinden. Die leichte Verbreiterung dieser 320 nm Bande nach 46 Minuten deutet jedoch auf ein Gemisch aus (DMA)₂F-OH und ein ähnlich absorbierendes Photoprodukt hin. Es ist bekannt, dass Fluorenole in Methanol bei kurzen Belichtungszeiten zunächst zu einem Methoxy-Derivat reagieren.^[88] DFT-berechnete UV/vis-Spektren von (DMA)₂F-OH und 2,7-Bis(dimethylamino)-9H-fluoren-9-methoxy (DMA)₂F-OMe bestätigen, dass beide Verbindungen sehr ähnliche Absorptionsmaxima aufweisen (Abb. 5.12a).

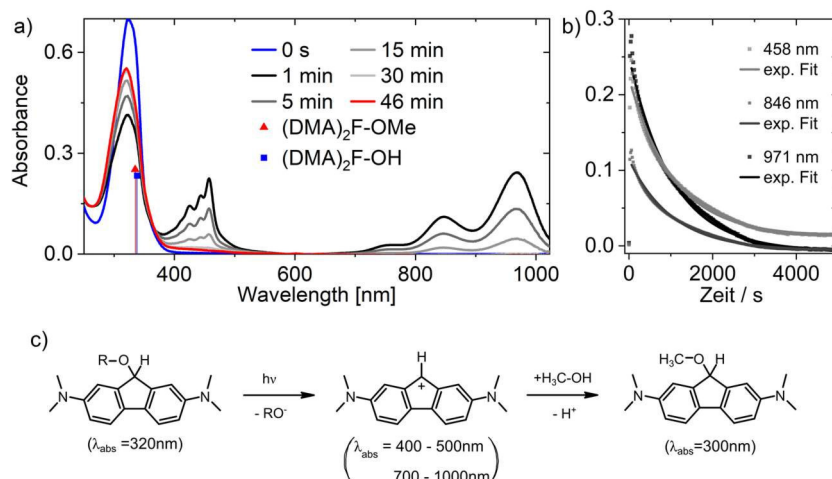


Abbildung 5.12: Absorptionsspektren von (DMA)₂F-OH in MeOH vor und nach 1 Minute Belichtung mit 365 nm und die stärksten DFT-berechneten Übergänge der Ausgangsverbindung und (DMA)₂F-OMe (a). Der zeitliche Verlauf ausgewählter Transienten des entstehenden Intermediats in MeOH (b). Photoinduzierte Reaktion von (DMA)₂F-OH (c).

Messungen in EtOH und H₂O zeigen ebenfalls die Bildung des Kations mit dem charakteristischen Absorptionmuster im NIR-Bereich. Eine hypsochrome Verschiebung der Absorptionsbande des Ausgangsmaterials von EtOH, MeOH zu H₂O (Abb. 5.13a) ist auf negative Solvatochromie zurückzuführen. Die Zerfallszeiten des Kations in EtOH weichen für die beiden Transienten etwas voneinander ab (Tabelle 3), während τ₁ der 457 nm Bande bei 73 s liegt, beträgt sie für 971 nm 29 s. Grundsätzlich beschreiben beide Zeiten einen wesentlich schnelleren Zerfall des Kations in EtOH im Vergleich zu MeOH und H₂O. Letzteres Lösemittel hingegen scheint einen besonderen stabilisierenden Einfluss auf das Fluorenylkations auszuüben. Trotz der Zerfallszeit von ca. 3 h ist auch nach 18 Stunden eine geringe Absorption des (DMA)₂F⁺ messbar.

Tabelle 3: Fit-Parameter jeweils einer vis- und NIR-Transiente von (DMA)₂F-OH in verschiedenen Lösemitteln.

λ	EtOH		MeOH		H ₂ O	
	457 nm	971 nm	457 nm	971 nm	457 nm	971 nm
A₁	0.138 ± 0.003 (83%)	0.24 ± 0.01 (74%)	0.088 ± 0.003 (32%)	0.11 ± 0.004 (32%)	0.1188 ± 0.0013	0.36 ± 0.04
τ₁ / s	73 ± 3	29 ± 2	122 ± 6	120 ± 7	5952 ± 204	6593 ± 765
A₂	0.028 ± 0.002 (17%)	0.083 ± 0.004 (26%)	0.19 ± 0.001 (69%)	0.230 ± 0.002 (68%)	-	-
τ₂ / s	570 ± 6	166 ± 6	1261 ± 11	1216 ± 11	-	-

Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen, die das Lösungsmittel aufbauen kann, eine stabilisierende Wirkung auf das Kation haben und schließlich seine Lebensdauer verlängern können. Ein ähnliches Verhalten bezüglich der Bildung und der Lage der Absorptionsbanden wurde zwar für 2,7-Diamino-9H-Fluorenol beobachtet, diese waren jedoch nur in den stark polaren Lösemitteln HFIP und TFE und auch nur im Mikrosekundenbereich vorhanden.^[193] Der Austausch der Amino-Gruppen durch Dimethylamino-Gruppen scheint ein weiterer Faktor für die erhöhte Stabilität des Kations zu sein.

Bei der Betrachtung von Abbildung 5.13 lassen sich weitere Unterschiede in den Absorptionsspektren von $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ in den verschiedenen Lösungsmitteln feststellen. Die Schwingungsfinestruktur im Bereich von 400-500 nm ist in EtOH und H_2O weniger gut aufgelöst. Insbesondere in H_2O ist dieser Bereich verbreitert, zudem scheint eine zusätzliche Bande um 680 nm zu existieren. Es lässt sich ein klarer Trend erkennen: Je höher die Polarität des Lösungsmittels, desto stärker ist die beobachtete Absorptionsänderung nach einer Minute Bestrahlung. Folglich wird die größte Menge des Kations in H_2O gebildet. Dies stützt die Annahme, dass der polare Charakter des Intermediats durch starke H-Brücken und die außerordentliche Polarität von H_2O stabilisiert wird. Die DFT-Rechnungen zum Absorptionsspektrum des $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ ergaben jeweils nur einen Übergang bei 400 nm und 900 nm. Dies stützt die Annahme, dass es sich nicht nur bei der Bande im sichtbaren Spektralbereich um eine Auflösung der Schwingungsfinestruktur handelt, sondern auch bei der Bande im NIR-Bereich. Die Schwingungsfinestruktur in Methanol ist am besten aufgelöst und gibt Aufschluss über die Lage der Minima der Potentialflächen (S_0 , S_2 und S_3) zueinander, welche demnach eine nur sehr geringe Verschiebung entlang der Kernabstandscoordinate haben müssten.

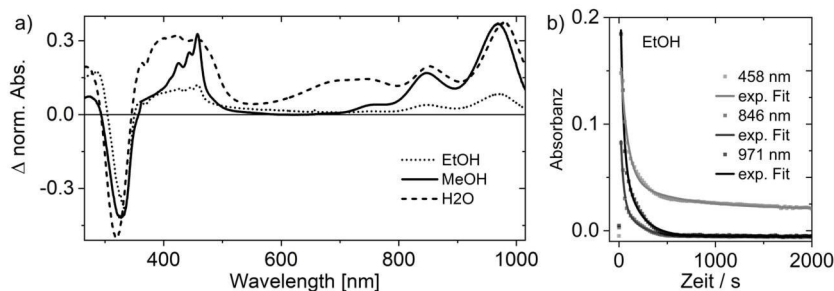


Abbildung 5.13: Differenzspektren von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ in MeOH, EtOH und H_2O nach 1 min Belichtung der Probe (a). Der zeitliche Verlauf ausgewählter Transienten des entstehenden Intermediats in EtOH inklusive der exponentiellen Fitkurven der Dunkelreaktion (b).

Im blauen vis-Bereich sind insgesamt 4 Übergänge aufgelöst, wobei jeweils zwei spektral enger bei einander liegen. Es wird angenommen, dass diese Übergänge zwei verschiedenen Koordinaten zuzuordnen sind. Die Differenz zwischen erster und dritter Bande beträgt ca. 1699 cm^{-1} , während der Abstand zwischen zweiter und vierter bei ca. 1647 cm^{-1} liegt. Bei den drei NIR-Banden handelt es sich auch um eine Schwingungsprogression mit gleichmäßigen Abständen von ca. 1460 cm^{-1} . Zur Zuordnung dieser Schwingungen wurden DFT-Rechnungen vorgenommen, bei denen zunächst Geometrieoptimierungen im S_2 - und S_3 -Zustand nach vertikalen elektronischen Übergängen (Abb. 5.14) und anschließend die

Schwingungen im jeweiligen Zustand berechnet wurden. Die Geometrien der beiden angeregten Zustände weisen lediglich einen Unterschied in den Doppelbindungen auf. Während es im Grundzustand (S_0) drei fixe Doppelbindungen gibt, sind im S_2 -Zustand nur noch zwei Doppelbindungen fix, während im S_3 -Zustand alle delokalisiert vorliegen. Für die IR-Spektren ergaben sich wesentliche Unterschiede der angeregten Zustände im Vergleich zum Grundzustand (Abb. 5.14). Im Bereich um 1600 cm^{-1} ergaben sich im S_3 -Zustand zwei Schwingungsmoden, wobei eine der beiden das im Kation planare H-Atom an der C_9 -Position enthält, während die zweite eine symmetrische Mode mit einer Achse durch das C_9 -Atom ist. Die Schwingungsfeinstruktur im S_2 -Zustand stimmt sehr gut mit der berechneten Mode bei 1456 cm^{-1} überein, die ebenfalls das H-Atom an der C_9 -Position beinhaltet. Grundsätzlich nimmt im angeregten Zustand die Bindungsstärke im Molekül meist ab, was zu einer Verlängerung der Bindungslängen und folglich der Energieabsenkung der Schwingungsmoden führt.^[191] Da hier eine große Änderung der Bindungslängen anhand der Schwingungsfeinstruktur ausgeschlossen werden kann, rühren die Unterschiede der Schwingungen im Grund- und angeregten Zustand hauptsächlich aus Positionen der lokalisierten und delokalisierten π -Elektronen her.

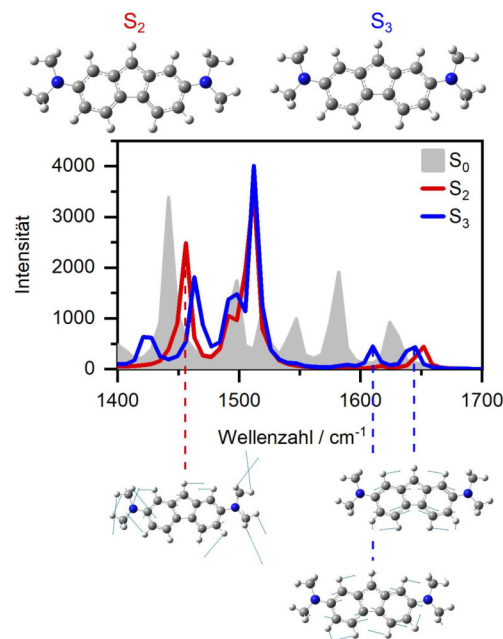


Abbildung 5.14: Berechnete IR-Spektren von (DMA)2F+ im Grundzustand (S_0) und den beiden angeregten Zuständen S_2 und S_3 und ihren entsprechenden geometrie-optimierten Strukturen. Eine visuelle Darstellung ausgewählter Schwingungsmoden der angeregten Zustände.

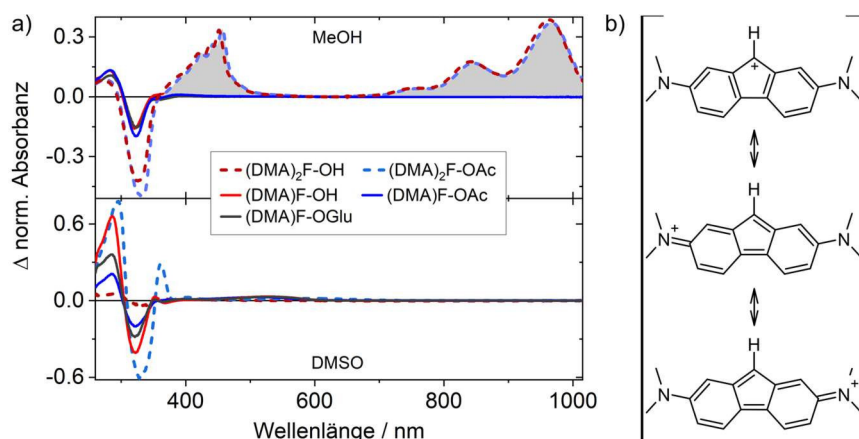


Abbildung 5.15: UV/vis-Differenzspektren von allen fünf Fluorenderivaten in MeOH und DMSO nach einer Minute Belichtung mit 365 nm (a). Strukturformeln des Fluorenylkations in seinen mesomeriestabilisierten Formen (b).

Erkennbar wird dies an der berechneten symmetrischen Schwingung im S_3 – Zustand bei 1642 cm^{-1} , welche identisch zur der Mode im S_2 – Zustand bei 1642 cm^{-1} ist. Im Grundzustand allerdings ist eine solche Schwingungsmode über den gesamten Spektralbereich nicht vorhanden.

Unter Einbeziehung der restlichen vier Fluoren-Derivate lassen sich wesentliche Unterschiede der beiden Schutzgruppen (DMA)F und (DMA)₂F feststellen. Überraschenderweise ist für Derivate mit nur einer Dimethylamino-Gruppe kein Intermediat im vis/NIR-Bereich in Methanol zu beobachten (Abb. 5.15a). Demnach ist die zweite Dimethylamino-Gruppe entscheidend für die Stabilisierung des Kations, was durch die elektondonierenden Effekte des zusätzlichen Substituenten in einer erweiterten Mesomeriestruktur resultiert (Abb. 5.15b). Außerdem ist in dem polaren aprotischen Lösemittel DMSO für keine der Verbindungen die Absorptionsbanden des Kations sichtbar (Abb. 5.15a). Dies bedeutet, dass das Kation nicht nur durch die zweite Dimethylamino-Gruppe stabilisiert wird, sondern auch die Beteiligung von Wasserstoffbrückenbindungen des Lösemittels erfordert. Die AG scheint keinen Einfluss auf die Bildung oder Lebensdauer des Intermediats zu haben. Allerdings ist die Quantenausbeute von der Art der AG abhängig (Tab. 1). Demnach ist die Freisetzung der OH-Gruppe am effizientesten, trotz ihrer schlechten Eigenschaften als AG. Der Vergleich der Quantenausbeuten innerhalb der Verbindungen mit asymmetrischer Schutzgruppe zeigt, dass die Hydroxyl-Gruppe trotz ihrer schlechten Eigenschaft als AG am effizientesten abgespalten wird. Weiterhin besteht für die Acetyl- und Glutamat-Verbindungen ein Trend zu besseren

Abgangsgruppen. Im Allgemeinen weisen die Verbindungen mit symmetrischer Schutzgruppe eine wesentlich höhere Quantenausbeute auf als die mit asymmetrischer Schutzgruppe, was in unmittelbarem Zusammenhang mit der Stabilität des Fluorenylkations steht. Die Schlussfolgerung lautet: Je stabiler das Fluorenylkation, desto höher die Uncaging-Quantenausbeute, was eine wichtige Erkenntnis für das zukünftige Design optimierter Fluoren-basierter PPG darstellt.

Aus dem angeregten Zustand des Fluoren-Derivats erfolgt die Abspaltung der AG und somit die Bildung des angeregten Fluorenylkations. Diese Reaktion wird aufgrund der angestrebten Aromatizität des Systems favorisiert (Kap. 3.1.1), denn im Vergleich zu antiaromatischen Fluorenol-Derivaten im GZ ist die kationische Spezies im angeregten Zustand mit $4n+2$ π -Elektronen ein Hückel-Aromat. Die Besonderheit des hier behandelten Systems ist, dass das Kation selbst nach Relaxation in den GZ und somit dem Verlust der Aromatizität eine ungewöhnlich und bis dato für Fluorene unbeobachtet lange Lebensdauer vorweist.

Die Fluoreszenzspektren vor und nach der Belichtung von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ in MeOH unterscheiden sich stark voneinander (Abb. 5.16a). Zum einen liegt die Emissionsbande der belichteten Verbindung, welches wie oben beschrieben im entsprechenden Kation resultiert, bei 375 nm. Somit ist sie um 25 nm hypsochrom zur Emissionsbande der Ausgangsverbindung $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ verschoben (vergl. Abb. 5.4). Zum anderen ist die Fluoreszenzintensität des Fluorenylkations um drei Größenordnungen stärker als die des $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$. Die starke Fluoreszenz des Kations steht im Einklang mit seiner geringen Reaktivität und somit langen Lebensdauer, da der Fluoreszenzpfad immer auch eine Konkurrenz zum Reaktionspfad, in diesem Fall dem Abreagieren zum Methoxy-Derivat, darstellt.

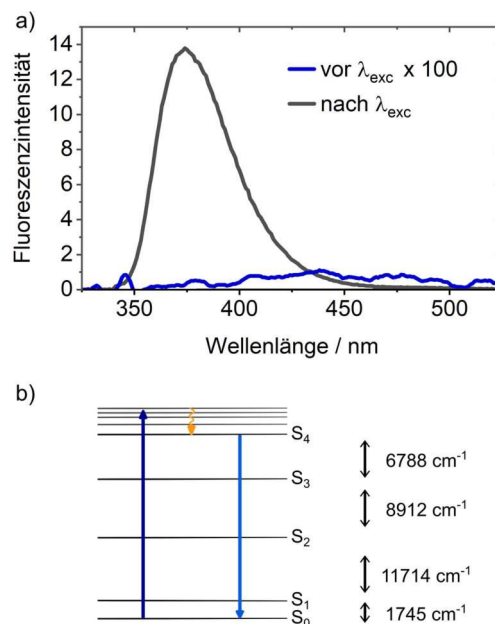


Abbildung 5.16: Emissionsspektren von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ in MeOH (grau) und derselben Probe nach 1 min Belichtung mit 365 nm (blau) (a). Vereinfachtes Energieschema des Grundzustands und der ersten 4 angeregten Zustände anhand derer die Absorption (dunkel blau), Schwingungsrelaxation (gelb) und Fluoreszenz direkt aus dem S_4 (hell blau) dargestellt wird (b).

Da die Emissionsbande unter Einbeziehung der gemessenen und berechneten Absorptionsbanden stark blauverschoben ist, stellt sich die Frage, woher diese stammt. Anhand der DFT-Rechnungen wird für das $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ klar, dass die gemessene Emission bei 380 nm nicht der Fluoreszenz aus dem S_1 entsprechen kann, da der $S_0 \rightarrow S_1$ bei 5729 nm liegt. Folglich erfüllt das Bis-dimethylamino-Fluorenylkation nicht die Kasha-Regel (Abb. 5.16b) und stellt damit eine weitere Besonderheit in ihren spektroskopischen Eigenschaften dar, was für das $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ mit einem gemessenen Stokes-shift von 75 nm nicht der Fall ist. Sogenanntes Anti-Kasha-Verhalten kann aus zwei Gründen erfolgen: Erstens kann die Energiedifferenz zwischen dem S_n und S_{n-1} -Zustand sehr groß sein. In typischen organischen Verbindungen beträgt der $S_n - S_{n-1}$ -Abstand $< 3000 \text{ cm}^{-1}$,^[194] was um ein vielfaches kleiner ist als die hier berechneten Abstände des $S_1 - S_2$ -Übergangs von rund 12000 cm^{-1} , des $S_2 - S_3$ -Übergangs von rund 9000 cm^{-1} und des $S_3 - S_4$ -Übergangs von rund 7000 cm^{-1} für das $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ (Abb. 5.16b). Zweitens kann die IC aus dem angeregten Zustand $S_{n>1}$ vergleichsweise langsam sein, denn im Falle einer Emission nach Kasha sollten alle IC- und VR-Prozesse von $S_n \rightarrow S_1$ wesentlich schneller ablaufen als die Emission oder Photoreaktion.^[36] Zudem kann die Lebenszeit des $S_{n>1}$ -Zustands verhältnismäßig klein sein, während die Raten der photochemischen Reaktion aus diesem Zustand sehr schnell sind. Die langsame Relaxation zum S_1 -Zustand kann neben dem großen Energieabstand der darüber liegenden Zustände auch durch einen verbotenen Übergang zwischen zwei Zuständen begründet sein, was die IC im allgemeinen verringert und die Lebensdauer des jeweiligen höher liegenden Zustands verlängert.^[195] Da in diesem Fall der $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang als verboten angesehen werden kann (Kap. 5.1.3), kann selbst wenn die Energieabstände der S_4 bis S_1 -Zustände nicht groß gewesen wären, wahrscheinlich keine Emission aus dem S_1 stattfinden.

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, sind Fluorenylkationen dafür bekannt in MeOH durch das Lösemittel abzureagieren. Dabei entsteht ein Methoxy-Derivat. Dies wird auch als Reaktion für das $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ angenommen und wird deutlich, indem sich bei kurzer Belichtungszeit die Absorptionsbande bei 320 nm regeneriert. Eine Rekombination zum $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ muss aufgrund der langen Lebensdauer des Kations infolge der Dissoziation von OH^- sehr schwach ausgeprägt sein. Dennoch stellt sich die Frage, wie die Diskrepanz zwischen dem endgültigen Absorptionsspektrum nach kurzer Belichtungsdauer und kontinuierlicher Belichtung zu erklären ist. Antwort hierauf liefert die Wiederanregung des $(\text{DMA})_2\text{F-OMe}$ bei 365 nm.

Abbildung 5.18 zeigt die Bildung des Kations ausgehend von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$, welche durch die Entstehung der 971 nm Bande gekennzeichnet ist, begleitet von der Abnahme der Hauptabsorptionsbande bei 325 nm. Nach ca. 1500 s ist das $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ endgültig zum $(\text{DMA})_2\text{F-OMe}$ abreagiert. Es folgt eine erneute Anregung der Probe, die wieder das $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ entstehen lässt.

Folglich ist das Fluorenylkation auch aus dem Methoxy-Derivat generierbar (Abb. 5.18). Interessant ist jedoch der weitere Verlauf des Experiments mit wiederholter Anregung des aus dem Fluorenylkation gebildetem $(\text{DMA})_2\text{F-OMe}$. Es kann zwischen

den beiden Zuständen $(\text{DMA})_2\text{F-OMe} \leftrightarrow (\text{DMA})_2\text{F}^+$ geschaltet werden, wobei die Reaktion zum Methoxy-Derivat thermisch abläuft (Abb. 5.18). Die Schaltamplitude nimmt über mehrere Zyklen ab, was anhand der stetigen Abnahme der erreichbaren Intensitäten beider Banden erkennbar ist. Dies deutet auf einen kontinuierlichen Abbau der $(\text{DMA})_2\text{F-OMe}$ Konzentration in der Probe hin, was wiederum auf die Existenz eines zweiten Reaktionspfads ausgehend vom Fluorenylkation hindeutet. Die Bestrahlung in die 450 nm - Absorptionsbande des Fluorenylkations bewirkt ebenfalls eine Abnahme der vis- und NIR-Banden, was in einem Absorptionsspektrum resultiert, das dem $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ und $(\text{DMA})_2\text{F-OMe}$ gleicht (Abb. 5.19a). Eine Rekombination zum $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ wird aus den gleichen Gründen wie im thermischen Reaktionspfad ausgeschlossen.

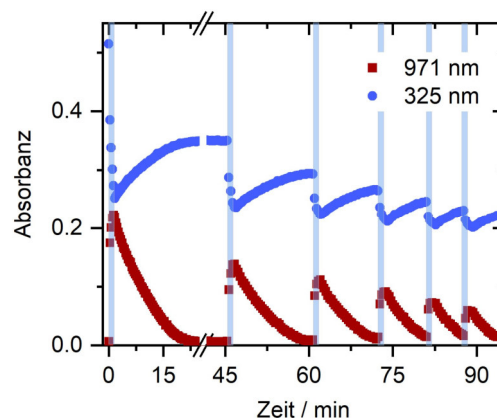


Abbildung 5.18: Ausgehend vom $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ wird der zeitliche Verlauf zweier Absorptionsbanden während (blau hinterlegter Bereich) und nach der Belichtung mit 365 nm dargestellt. Dabei zeigt die 971 nm - Transiente Bildung und Rückgang des $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ und die 325 nm - Transiente den entgegengesetzten Verlauf des $(\text{DMA})_2\text{F-OMe}$.

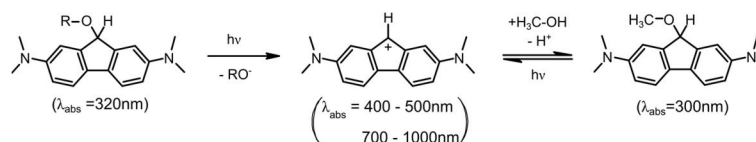


Abbildung 5.17: Schematische Darstellung der photoinduzierten Reaktion einer symmetrischen Schutzgruppe mit beliebiger AG $(\text{DMA})_2\text{F-OR}$ zum Kation $(\text{DMA})_2\text{F}^+$, welches im Lösemittel MeOH in einer Dunkelreaktion zum Methoxy-Derivat $(\text{DMA})_2\text{F-OMe}$ abreagiert. Vom $(\text{DMA})_2\text{F-OMe}$ ausgehend kann durch erneute Bestrahlung das $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ wiederholt erzeugt werden und abermals thermisch zum Methoxy-Derivat abreagieren.

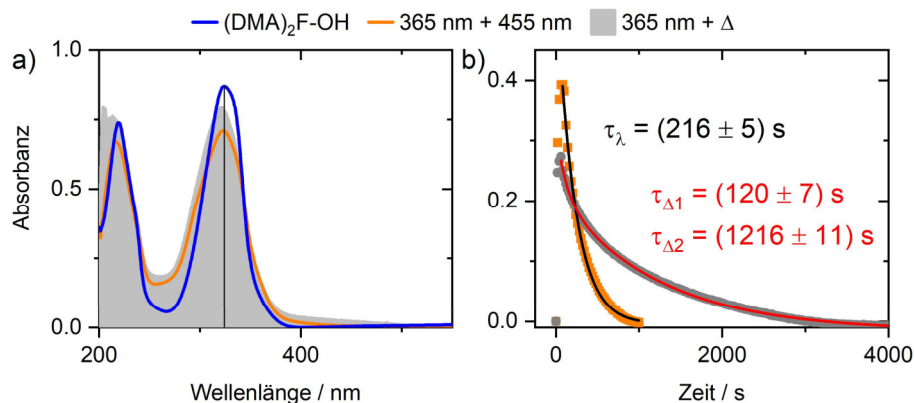


Abbildung 5.19: Absorptionsspektren von (DMA)₂F-OH in MeOH vor der Belichtung (blau), nach den Belichtungen mit 365 nm und anschließender thermischer Dunkelreaktion (grau) und nach Belichtung zunächst mit 365 nm zur Bildung des (DMA)₂F⁺ und anschließend mit 455 nm (orange) (a). Der zeitliche Verlauf der Bande bei 971 nm beider Belichtungskonzepte mit dem entsprechende exponentiellen Fit (b).

Ferner liegt die Annahme nahe, dass eine Reaktion mit dem vorliegenden Lösungsmittel zum (DMA)₂F-OMe stattfindet. Allerdings zeigt der Vergleich zum thermisch entstandenen Endspektrum sowohl eine schwächere batho-chrome Verschiebung als auch eine niedrigere Absorption bei 400 nm. Beides lässt den Schluss zu, dass der Nebenpfad zu den Photoprodukten (DMA)₂F, (DMA)₂F=O und (DMA)₂F-Dimer bei der Wiederanregung mit 455 nm einen geringeren Anteil ausmacht. Dies bestätigt sich bei der Betrachtung der exponentiellen Fitkurven zum Zerfall des Kations im thermischen und photoinduzierten Fall (Abb. 5.18b). Während bei der Dunkelreaktion für die Zerfallskurve des Kations ein biexponentieller Fit benötigt wird, ist der photochemisch erzeugte Zerfall mit einem monexponentiellen Fit sehr gut dargestellt. Ein weiterer wichtiger Punkt bei dem Vergleich der beiden Kurven sind die Zerfallszeiten an sich. Mit τ_λ von 216 s ist der Zerfall des Fluorenylkations um eine Größenordnung schneller als der langsame Beitrag im thermischen Fall. Somit kann von einer Art Schaltreaktion gesprochen werden, in der eine Umwandlung zwischen dem (DMA)₂F⁺ und dem (DMA)₂F-OMe lichtinduziert kontrolliert werden kann. Dies kann so oft wiederholt betrieben werden, bis alle vorhandenen Moleküle zu den genannten Photoprodukten abreagiert haben.

FTIR an Fluorenylkationen

Die Bildung und der Zerfall des $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ kann im IR-Spektralbereich genauer verfolgt werden. Die IR-Bande bei 1610 cm^{-1} wurde bereits einer Schwingungsmode des planaren Kations zugeordnet (Kap. 5.1.2). Durch den Vergleich von FTIR-Messungen einer symmetrisch und unsymmetrisch geschützten Probe infolge einer kurzen Belichtungszeit von 3 min wird der Unterschied der beiden Schutzgruppen deutlicher. Im Fall von $(\text{DMA})_2\text{F-OAc}$ kann anhand der Absolutspektren neben der Freisetzung der Abgangsgruppe durch die Signatur bei 1710 cm^{-1} und 1740 cm^{-1} auch eine Verschiebung der Bande bei 1620 cm^{-1} nach 1611 cm^{-1} während der Belichtung beobachtet werden (Abb. 5.20a). Nach Abbruch der Belichtung nimmt die verschobene Bande bei 1611 cm^{-1} wieder ab. Durch diese Dynamik ist zunächst die Planarisierung des H-Atoms an Position 9 infolge der Abspaltung der AG und somit der Bildung von $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ verfolgbar, während nach Belichtungsstopp das Kation thermisch zu den verschiedenen Photoprodukten abreagiert. Für das unsymmetrische $(\text{DMA})\text{F-OAc}$ hingegen läuft die Freisetzung der Abgangsgruppe ohne die Bildung einer neuen Bande in dem Spektralbereich zwischen 1640 cm^{-1} bis 1590 cm^{-1} ab (Abb. 5.20b). Lediglich die Intensität der beiden Banden bei 1620 cm^{-1} und 1608 cm^{-1} nimmt während der Belichtung zunächst ab und im Anschluss wieder zu. Bei Betrachtung der entsprechenden Transienten (Abb. 5.20c) über einen längeren Zeitraum im Dunkeln wird deutlich, dass bei der Entwicklung der Banden bei 1620 cm^{-1} und 1608 cm^{-1} keine signifikante Änderung mehr stattfindet, was auch für die 1708 cm^{-1} - Bande zutrifft. Die Intensitätszunahme bis 371 s ist hierbei dem zugrundeliegenden Rauschen geschuldet.

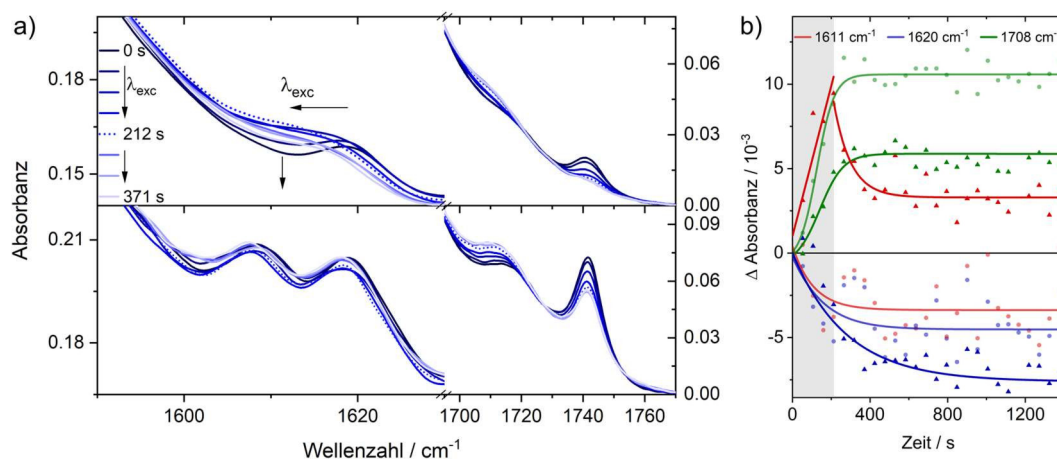


Abbildung 5.20: FTIR-Spektren von $(\text{DMA})_2\text{F-OAc}$ und $(\text{DMA})\text{F-OAc}$ vor (0 s), während (bis 212 s) und nach der Belichtung bei 300 nm in MeOH (a). Der zeitliche Verlauf ausgewählter Schwingungsbänder beider Verbindungen: $(\text{DMA})_2\text{F-OAc}$ (Dreiecke) und $(\text{DMA})\text{F-OAc}$ (Kreise) während und nach der Belichtung (b).

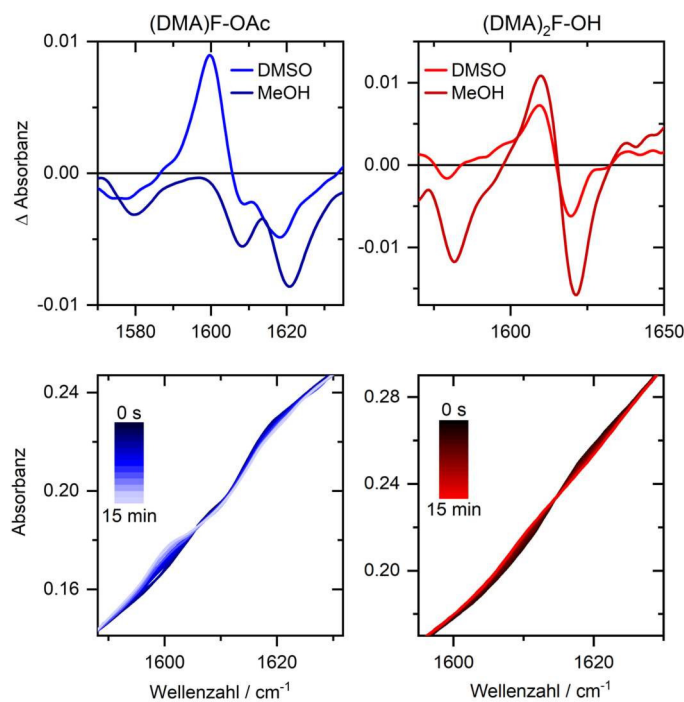


Abbildung 5.21: FTIR-Differenzspektren einer unsymmetrischen (blau) und symmetrischen (rot) Schutzgruppe in MeOH und DMSO (a). Ausschnitt der Absolutspektren in DMSO im Bereich von 1590 cm^{-1} bis 1630 cm^{-1} (b).

Die IR-Daten bestätigen, dass bei der Uncaging-Reaktion der unsymmetrischen Schutzgruppe kein langlebiges Intermediat gebildet wird, welches eine nachgeschaltete Reaktion eingeht. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der 1611 cm^{-1} -Bande der symmetrischen Schutzgruppe nach dem Belichtungsstopp ein exponentieller Zerfall (Abb. 5.20b). Auch die Transiente bei 1620 cm^{-1} zeigt anders als im unsymmetrischen Fall eine im Dunkeln andauernde Abnahme. Beides bestätigt die Weiterreaktion ausgehend vom photoinduzierten $(\text{DMA})_2\text{F}^+$.

Im aprotischen Lösemittel DMSO findet auch bei der symmetrischen Schutzgruppe keine Bildung des langlebigen Kations statt. In DMSO sind die IR-Banden vergleichsweise leicht zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben. Anders als in MeOH bildet sich allerdings sowohl im symmetrischen als auch unsymmetrischen Fall während der Belichtung eine neue Bande im Bereich um 1600 cm^{-1} aus, was anhand der positiven Absorptionsänderung in Abbildung 5.21 zu erkennen ist. Die neue Bande befindet sich mit 1600 cm^{-1} bei $(\text{DMA})\text{F-OAc}$ und 1610 cm^{-1} bei $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ zwischen den Schwingungsmoden, der $\text{C}_9\text{-OR}$ -Gruppe. Dies weist darauf hin, dass diese Bande einem der Photoprodukte zu zuordnen ist. Insbesondere bei der symmetrischen Verbindung $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$

liegt die Bande mit 1610 cm^{-1} exakt über der des Kations, was zunächst für dessen Bildung sprechen könnte. Allerdings kann bei genauer Betrachtung (Abb. 5.21) ein isosbestischer Punkt zwischen den jeweiligen Banden der Ausgangsverbindungen und den neu entstehenden Banden (1620 cm^{-1} und 1610 cm^{-1} für $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$; 1608 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} für $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$) identifiziert werden. Wie oben beschrieben findet bei der Bildung des Kations eine Planarisierung der C-H-Gruppe im Zuge der Belichtung statt, was sich anders als in DMSO in der Verschiebung der Bande widerspielt. Folglich deutet die Existenz des isosbestischen Punkts in Kombination mit den UV/vis-Daten auf die Bildung eines der Photoprodukte hin, welches ebenfalls eine Schwingungsmode bei 1610 cm^{-1} aufweist.

5.1.4 pH abhängiges Verhalten

Fluorenol Verbindungen können laut Literatur im Zuge einer Photoanregung simultan sowohl eine homolytische als auch eine heterolytische C-O-Bindungsspaltung eingehen.^[89,196] Im Rahmen der bisher dargestellten Ergebnisse ließ sich nur das Kation als langlebiges Zwischenprodukt identifizieren, was lediglich den heterolytischen Uncaging-Pfad bestätigt. Zur Untersuchung der Radikalhypothese wurden zwei verschiedene Ansätze umgesetzt. Zum einen wurde versucht das photoinduzierbare Absorptionsspektrum des beobachteten Intermediats durch die Zugabe eines Radikalstarters zur symmetrischen Verbindung zu reproduzieren^[185], was jedoch keine entsprechenden Banden ergab. Zum anderen haben auch die EPR-Messungen der belichteten Probe das Vorhandensein eines Radikals nicht bestätigt. Daher konnte der Radikalcharakter des beobachteten Zwischenprodukts ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz ist die Bildung eines Radikals mit kürzerer Lebensdauer möglich, wodurch die Möglichkeit der homolytischen und heterolytischen Bindungsspaltung für diesen Fall nicht gänzlich widerlegt werden kann.

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel beschrieben konnte das Absorptionsspektrum des erzeugten Intermediats mittels quantenchemischer Rechnungen eindeutig dem Kation zugeordnet werden. Fluorenyl-Kationen lassen sich allerdings auch unter sauren Bedingungen erzeugen (Abb. 5.22a,e).^[188] Um dies zu überprüfen, wurde $(\text{DMA})_2\text{F-OAc}$ mit HCl versetzt.

Nach Zugabe von 0.1 Äquivalenten HCl weist das dazugehörige Absorptionsspektrum bereits die entsprechenden Banden des $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ auf. Mit steigendem HCl Gehalt steigt auch die Konzentration an $(\text{DMA})_2\text{F}^+$, allerdings wird insgesamt der Anteil, welcher bei der photoinduzierten Reaktion entsteht, nie erreicht. Dies hindeutet darauf hin, dass der

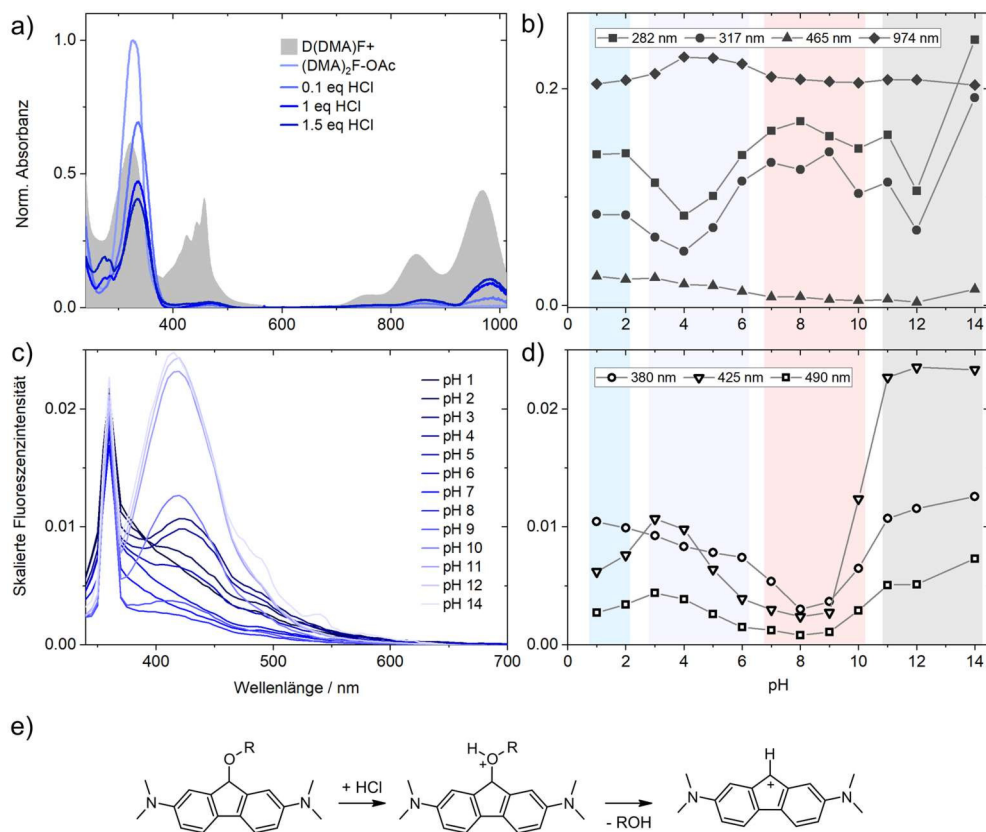


Abbildung 5.22: Absorptionsspektren von $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ in MeOH und $(\text{DMA})_2\text{F-OAc}$ vor und nach der Zugabe von unterschiedlichen Äquivalenten an HCl (a). Ausgewählte Absorptionsbanden von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ in H_2O in Abhängigkeit vom pH-Wert (b). Emissionsspektren (c) und ausgewählte Emissionsbanden (d) von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ in H_2O in Abhängigkeit von dem pH-Wert. Reaktionsschema eines $(\text{DMA})_2\text{F-OR}$ Derivats mit HCl über die Protonierung des Sauerstoffatoms hin zur Bildung von $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ (e).

photochemische Pfad der effizientere ist. Da der Grundzustand des Fluorenylkations antiaromatisch ist, sind für seine Bildung stark saure Bedingungen notwendig.^[197] Über einem Äquivalent HCl bildet sich zusätzlich eine Bande bei 280 nm, die mit der Protonierung einer oder beider Dimethylamino-Gruppen erklärt werden kann. Dieser Pfad ist photochemisch nicht zugänglich.

Eine genauere Betrachtung der $(\text{DMA})_2\text{F-OR}$ Verbindung offenbart neben dem Sauerstoffatom (Abb. 5.22e) zwei weitere potenzielle Protonierungsstellen, die beiden Dimethylamino-Gruppen. Die Auswertung der pH-abhängigen Absorptions- und Emissionstransienten (Abb. 5.22b) können grundsätzlich 4 Spezies identifiziert werden (Spezies 1: pH 1-2, Spezies 2: pH 3-6, Spezies 3: pH 7-10, Spezies 4: pH 11-14). Anhand der 457 nm und 971 nm Transienten kann der Bereich pH 3-6 dem Kation $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ zugeordnet wer-

den, was mit der Abnahme der 317 nm-Bande einhergeht und mit den bisherigen Ergebnissen im Einklang steht. Es weist eine Emissionsbande bei 420 nm auf, deren Intensität mit steigendem pH-Wert abnimmt. Spezies 3 ist der neutralen Ausgangsverbindung $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ zu zuordnen, da in diesem Milieu das Absorptionsspektrum keine Auffälligkeiten aufweist. Zudem stimmen die Emissionsbanden bei pH 8 und 9 mit dem Maximum bei 410 nm mit den Fluoreszenzspektren der Ausgangsverbindung überein. An den Rändern der gezeigten pH-Regime liegen Mischungen aus zwei oder mehr Spezies vor, was sich in der Ähnlichkeit der Fluoreszenzspektren von pH 2 und 3, pH 6 und 7 und pH 10 und 11 niederschlägt. Unterhalb von pH 3 wird eine Spezies angenommen, in der eine oder beide Dimethylamino-Gruppen protoniert sind, was in der Ausbildung der neuen Absorptionsbande bei 280 nm und Emissionsbande bei 380 nm resultiert. Für die pH-Werte oberhalb von 10 verschiebt sich die Fluoreszenz wieder leicht hypsochrom zu 415 nm und steigt stark an Intensität, letzteres gilt auch für das Intensitätsverhalten der Absorptionsbanden bei 317 nm und 282 nm. Eine Spezies kann jedoch diesem pH-Bereich nicht zugeordnet werden.

5.1.5 Photoinduzierter pH-Sprung

Aus den Uncaging-Experimenten folgt, dass im Laufe der Photoanregung von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ und $(\text{DMA})\text{F-OH}$ die Abgangsgruppe in Form von OH^- frei wird. Anders als bei den $-\text{OAc}$ und $-\text{OGlu}$ Derivaten, konnte in den FTIR-Daten kein direkter Beleg für die Hydroxid-Freisetzung beobachtet werden. Um dies jedoch endgültig zu bestätigen, wurden Messungen durchgeführt, bei denen der pH-Wert während der Belichtung der jeweiligen Probe erfasst wurde.

Für $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ ist bei der Belichtung innerhalb von 10-30 s ein pH-Sprung von 1.5 bis 2 Einheiten messbar (Abb. 5.23), was die Freisetzung von OH^- bestätigt. Bei der unsymmetrischen Verbindung $(\text{DMA})\text{F-OH}$ war keine photoinduzierte pH-Änderung messbar. Aus diesen Beobachtungen folgt, dass die unterschiedliche Lebensdauer des symmetrischen und unsymmetrischen Kations direkt mit der der OH^- -Ionen korreliert. In MeOH konnte ein pH-Sprung von 8 auf fast 9.5 für das $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ erzeugt werden. Nach ca. 17 Minuten im Dunkeln fällt der pH-Wert annähernd zurück auf den Ausgangspunkt (Abb. 5.23, hellblaue Kurve). Die Lebensdauer des generierten pH-Sprungs stimmt sehr genau mit der des Kations in MeOH überein.

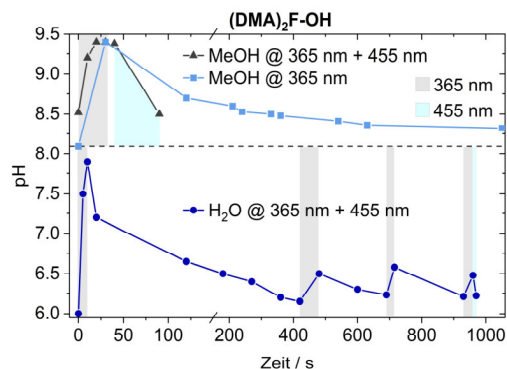


Abbildung 5.23: pH-Sprung während der Belichtung mit 365 nm (grauer Bereich) von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ in MeOH (pH 8-9.5) und H_2O (pH 6-8) und anschließender thermischer Relaxation. Photoinduzierter pH-Sturz mittels einer zweiten Belichtung bei 455 nm (blauer Bereich).

Analog zum $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ ist es möglich die Lebensdauer der OH^- -Ionen durch eine zweite Belichtung bei 455 nm deutlich zu verkürzen. Der Zusammenhang zwischen den beiden ionischen Spezies liegt darin begründet, dass bei Anregung von $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ das Abreagieren mit dem vorliegenden Lösungsmittel beschleunigt wird (Kap. 5.1.3), was im Fall von MeOH in $(\text{DMA})\text{F-OMe}$ resultiert und ein Proton zur Neutralisation des OH^- -Ions freisetzt. In Wasser konnte je nach Konzentration sogar ein pH-Sprung über 3 Einheiten er-

reicht werden. Da die Reaktion mit dem Lösungsmittel die Ausgangsverbindung $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ ergibt, sind wiederholte pH-Sprünge durch erneute Belichtung mit 365 nm möglich (Abb. 5.23, dunkelblaue Kurve). Ein pH-Wert von ca. 8 war jedoch nicht mehr erreichbar, da zum einen 60-80% der $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ -Moleküle den Reaktionspfad zum $(\text{DMA})_2\text{F-OR}_{\text{sol}}$ einschlagen (Kap. 5.1.3). Zum anderen fand die Wiederanregung statt bevor der Ausgangs pH-Wert gänzlich erreicht war. Auch in Wasser ist es möglich die Reaktion zum ursprünglichen pH-Wert durch Belichtung bei 455 nm zu beschleunigen. Allerdings konnte festgestellt werden, dass bei längerer Belichtung mit 365 nm, auch eine pH-Abnahme stattfand. Dies liegt daran, dass das $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ auch bei 320 nm eine Absorptionsbande aufweist. Folglich wird sobald ein 1:1 Verhältnis von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ und $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ erreicht ist, statistisch auch das Kation angeregt. Das wiederum bedeutet, dass maximal 50% der eingesetzten Moleküle zum pH-Sprung beitragen können.

5.1.6 Photodynamik von Fluoren-basierten Schutzgruppen

Transiente Absorptionsstudien geben ein besseres Verständnis über das unterschiedliche Verhalten der beiden Schutzgruppen. Die transienten Spektren werden von einem breiten positiven Signal dominiert, das für (DMA)F-OH im Vergleich zu (DMA)₂F-OH hypsochrom verschoben ist (Abb. 5.24). Diese Absorption aus dem angeregten Zustand (ESA₁^{un-sym}: 350 – 570 nm) hat eine ausgeprägtere rote Flanke als ihr symmetrisches Gegenstück (ESA₁^{sym}: 370 – 600 nm). Zusätzlich ist eine weitere ESA oberhalb von 600 nm für die unsymmetrische Schutzgruppe vorhanden (Abb. 5.24b). Für das (DMA)₂F-OH ist ebenfalls ein positiver Beitrag >650 nm sichtbar ist, was annehmen lässt, dass die symmetrische Schutzgruppe auch eine ESA₂ hat, die sich außerhalb des Messfensters befindet.

Bei beiden Schutzgruppen ist eine Flanke des GSB Signals bis 350 nm sichtbar, wobei die Intensität im unsymmetrischen Fall aufgrund der Kompensation durch ESA₁ schwächer ist. Die angeregten Zustände beider Proben zerfallen mit τ_1 , was zur Bildung eines heißen Grundzustands führt, der mit τ_2 relaxiert. Beide Prozesse laufen im unsymmetrischen Fall langsamer ab. Nach etwa 10 ps werden in beiden Messungen neue Absorptionsbanden im Bereich von 350 – 550 nm sichtbar. Trotz recht ähnlicher Signale zu den frühen Zeiten (bis zu 10 ps), zeigen die Produktabsorptionen der symmetrischen und unsymmetrischen Schutzgruppen unterschiedliche Beiträge (Abb. 5.24 und Abb. 5.25).

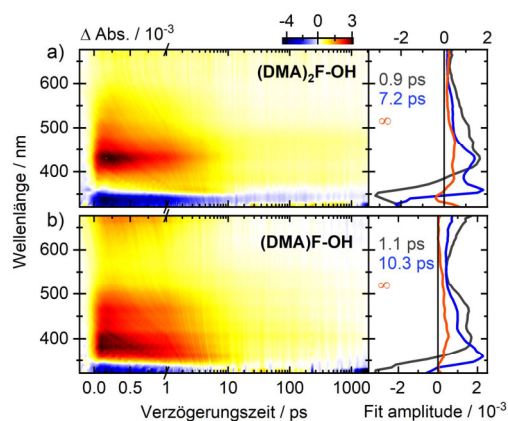


Abbildung 5.24: Transiente UV/vis-Spektren und zerfallsassoziierte Spektren (erhalten aus der globalen Analyse) von (DMA)₂F-OH (a) und (DMA)F-OH (b) in MeOH mit 90 nJ Anregungsleistung bei 315 nm.

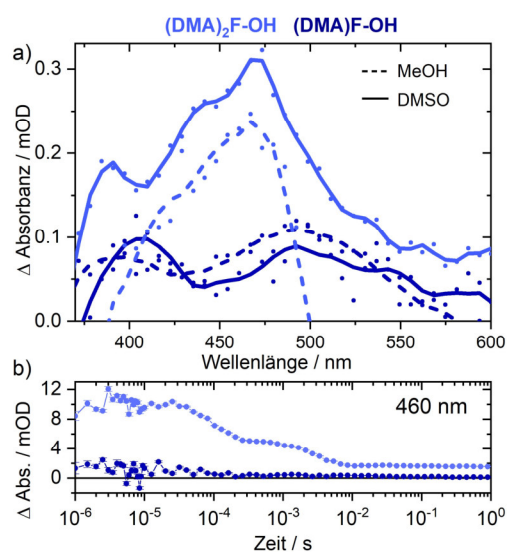


Abbildung 5.25: Zeitschnitte bei 1900 ps der Messungen von (DMA)₂F-OH und (DMA)F-OH in MeOH und DMSO (a). Flash-Photolyse-Messung bei 460 nm der gleichen Verbindungen in MeOH (b).

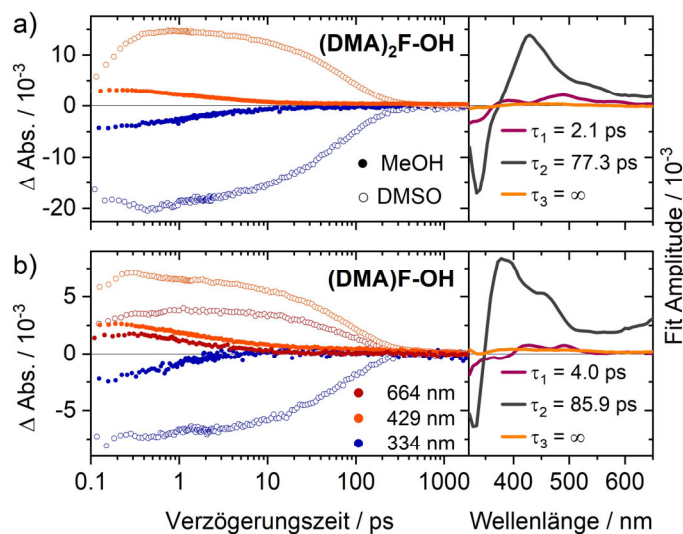


Abbildung 5.26: Zeitlicher Verlauf ausgewählter Transienten von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ (a) und $(\text{DMA})\text{F-OH}$ (b) in MeOH und DMSO und der entsprechenden Fit Amplituden in DMSO.

Bei $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ kann dies direkt dem Fluorenyl-Kation zugeordnet werden, dessen Lebensdauer in MeOH mehrere Minuten und in H_2O sogar einige Stunden beträgt. Nach Gurzadyan *et al.* erfolgt die Photolyse in Lösemitteln geringer Polarität, einschließlich MeOH, durch homolytische Spaltung.^[85] Für die symmetrische Schutzgruppe $(\text{DMA})_2\text{F}$ kann jedoch mit Hilfe der stationären UV/vis-Belichtungsexperimente (Kap. 5.1.3), der säureerzeugten Spektren (Kap. 5.1.4) und der ultraschnellen Zeitskalendaten (Abb. 5.25) gezeigt werden, dass in H_2O , MeOH, EtOH und DMSO das gleiche Zwischenprodukt, nämlich das Kation, gebildet wird.

Die Uncaging-Reaktion der unsymmetrischen Schutzgruppe läuft vermutlich ebenfalls über ein Kation, das nicht nur deutlich andere Absorptionsbanden (400 nm und 500 nm) aufweist, die mit dem berechneten $(\text{DMA})\text{F}^+$ -Spektrum (Kap. 5.1.3, Abb. 5.10) übereinstimmen, sondern auch eine um viele Größenordnungen kürzere Lebensdauer hat. Dies wird aus dem Vergleich der beiden Signalintensitäten bei 1900 ps (Abb. 5.25a) und der Tatsache deutlich, dass bei 1 μs keine Absorption dieses Zwischenprodukts (bei 460 nm) nachweisbar ist (Abb. 5.25b). Daher wird für die unsymmetrische Schutzgruppe derselbe Reaktionsweg über ein Methoxy-Derivat wie für die symmetrische angenommen (Abb. 5.27), welches jedoch aufgrund der kürzeren Lebensdauer des $(\text{DMA})\text{F}^+$ zwischen 2 ns und 1 μs mit dem MeOH abreagiert. In DMSO treten für beide Schutzgruppen auf einer Piko-sekunden-Zeitskala die gleichen Signale auf wie in MeOH (Abb. 5.25a). Die Dynamik der angeregten Zustände ist jedoch wesentlich langsamer.

Hier wird der lokal angeregte Zustand mit τ_1 verlassen und der angeregte Zustand zerfällt mit τ_2 (Abb. 5.26). Somit ist der angeregte Zustand in DMSO im Vergleich zu MeOH als Lösungsmittel um einen Faktor von fast 100 verlängert. Dies steht im Einklang mit der Feststellung, dass die S_1 -Lebensdauer in schwach polaren Lösungsmitteln länger ist, was bei der Polarität von DMSO mit 0.444 vergleichsweise zu der von MeOH mit 0.762 der Fall ist.^[85] In beiden Lösungsmitteln werden die gleichen Intermediate gebildet, jedoch mit deutlich unterschiedlichen Effizienzen, was beim Vergleich der Signalstärken der MeOH und DMSO Messungen bei 1 ps (Abb. 5.26) und denen bei 1900 ps (Abb. 5.25a) deutlich wird. Folglich ist die Uncaging-Quantenausbeute in DMSO geringer. Wie bei der unsymmetrischen Schutzgruppe in MeOH zerfallen die kationischen Intermediate in DMSO vermutlich auf einer Zeitskala von Nano- bis Mikrosekunden.

Zusammenfassung

Anhand der dargestellten Ergebnisse kann das gesamte Reaktionsschema der untersuchten Verbindungen in Abbildung 5.27 zusammengefasst werden. Sowohl die symmetrische als auch unsymmetrische Schutzgruppe ist in der Lage infolge einer Photoanregung zwischen 300 nm und 365 nm die entsprechende AG freizusetzen und dabei ein Kation zu bilden. Ausgehend von dieser intermediären Verbindung reagieren beide Strukturen zu den gleichen 3 Photoprodukten $(DMA)_{(2)}F=O$, $(DMA)_{(2)}F$ -Dimer und $(DMA)_{(2)}F$ ab. Zusätzlich konnte für die symmetrische Schutzgruppe in Alkoholen (MeOH und EtOH) und Wasser ein Nebenpfad identifiziert werden, der mit großer Wahrscheinlichkeit auch für das unsymmetrische Kation existiert, da das Abreagieren des Fluorenylkations mit dem Lösungsmittel MeOH bereits für viele Derivate literaturbekannt ist. Dabei verhält sich

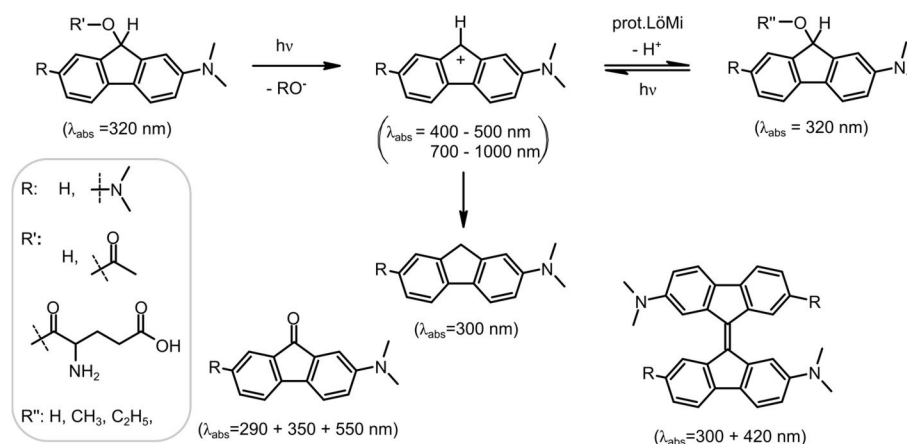


Abbildung 5.27: Reaktionsschema von Dimethylamino-Fluoren-Derivaten in protischen und aprotischen Lösungsmitteln.

das entstehende Alkoxy-Derivat $(\text{DMA})_2\text{F-OR}^+$ unter Belichtung wie die anderen Ausgangsverbindungen $(\text{DMA})_2\text{F-OR}'$. Die Besonderheit liegt in der ungewöhnlichen Langlebigkeit des $(\text{DMA})_2\text{F}^+$. Dabei sind die Absorptionsspektren und vor allem die Lebensdauer des Kations der beiden Schutzgruppen sehr unterschiedlich. Während das unsymmetrische $(\text{DMA})\text{F}^+$ bei ca. 500 nm die energetisch niedrigste Bande aufweist und dessen Lebensdauer zwischen 2 ns und 1 μs liegt, ist das Absorptionsspektrum des symmetrischen Kations mit einer weiteren Bande im NIR-Spektralbereich (ca. 700-1000 nm), sowie einer Lebensdauer von bis zu 8 Stunden ausgezeichnet. Diese außerordentliche Langlebigkeit ist für Fluorenylkationen bis dato unbeobachtet. Zwar konnten stabile Indenofluoren-basierte Radikalkationen mit ähnlichen NIR-Absorptionsbanden erzeugt werden, allerdings handelt es sich dabei um chemisch generierte und nicht photoinduzierte Spezies. Zudem liegen keine genaueren Informationen über deren Lebensdauer vor.^[198] Die Lebensdauer des symmetrischen Kations kann zudem durch Anregung mit 455 nm auf ca. ein Sechstel verkürzt werden, wodurch eine bessere zeitliche Kontrolle für mögliche Anwendungen gegeben ist.

Im Fall der symmetrischen Verbindungen in protischen Lösungsmitteln erfolgt die Reaktion zu den endgültigen Photoprodukten über das Alkoxy-Derivat, welches bei wiederholender Anregung erneut das Kation erzeugt. Da ausgehend von dem Kation ca. 70% zum Alkoxy-Derivat führen, lässt sich das Schalten zwischen dem Kation und Alkoxy-Derivat über mehrere Zyklen wiederholen. Anders als in der Literatur, wo das Methoxy-Derivat unter Bildung eines Radikals weiterreagiert^[88,89], zeigt hier die symmetrische Verbindung erneut eine Besonderheit. Das $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ ist extrem stabil, wodurch es stets bevorzugt zu sein scheint. Die Stabilität des Kations muss demnach neben der Wahl des Lösungsmittels in der Anwesenheit der zweiten Dimethylamino-Gruppe begründet zu sein. Der Vergleich mit dem Diamino-Derivat^[193] zeigt weiterhin, dass die Methyl-Gruppen der entscheidende Faktor für die beobachtete Langlebigkeit sind. Durch die zwei Dimethylamino-Substituenten ergibt sich eine Mesomerie-stabilisierte Struktur, die zu einer besseren Verteilung der positiven Ladung beiträgt als im monosubstituierten $(\text{DMA})\text{F}^+$.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ zur photoinduzierten Hydroxid-freisetzung verwendet werden kann. Dies resultiert in einem messbaren pH-Sprung von bis zu 3 Einheiten. Durch die Freisetzung eines Hydroxids stellt das $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ zum einen eine Besonderheit innerhalb der Klasse der Photobasen dar, die sich im klassischen Sinne durch die Aufnahme eines Protons auszeichnen. Im Zusammenhang mit

der Lebensdauer des entsprechenden Kations, stellt die Langlebigkeit des pH-Sprungs einen zusätzlichen Vorteil unter den literaturbekannten Hydroxid-freisetzenden Verbindungen dar, von denen viele aufgrund von schneller Rekombination der Ionen eine lediglich kurzfristige pH-Änderung erzeugen.^[199-202] Analog zum Verhalten des Kations kann der pH-Sprung nach dem Abklingen mit erneuter Belichtung über mehrere Zyklen hin und her geschaltet werden. Des Weiteren ist eine Aufhebung des erzeugten pH-Sprungs mit 455 nm möglich. Folglich ist mit $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ nicht nur eine Erweiterung der kleinen Gruppe an bekannten Hydroxid-freisetzenden Photobasen, sondern auch ein zeitlich kontrollierbarer pH-Sprung gelungen.

5.2 Cyclopentabisthiophen-basierte Schutzgruppen

Für die Weiterentwicklung von photolabilen Schutzgruppen gibt es eine Vielzahl an Parametern, an denen Optimierungen angestrebt werden können. Dazu zählen beispielsweise die Wasserlöslichkeit und rotverschobene Absorptionsmaxima, um das physiologische Fenster für die biologische Anwendung zu erreichen, Effizienz der Freisetzungsgleichung usw. (Kap. 3.1). Aus den Ergebnissen der Fluoren-basierten Schutzgruppen, konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden, die bei der Konzeptionierung neuer Grundgerüste für die zweite Generation von photolabilen Schutzgruppen helfen. Als photochemisches Analogon zur Hückel-Regel postulierte N. Colin Baird 1971 die Aromatizität im angeregten Zustand für Annulene, die im Grundzustand antiaromatisch sind. Des Weiteren kehrt sich für aromatische Systeme im Grundzustand die Aromatizität durch Anregung um.^[203] Dieses Verhalten zeigte Baird für die Besetzung des $\pi\pi^*$ -Triplet-

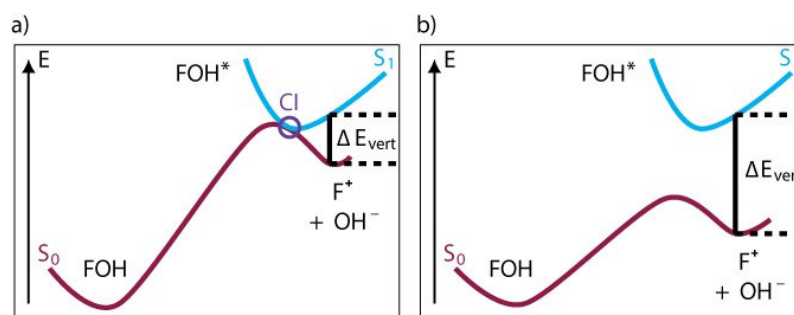


Abbildung 5.28: Schematische Darstellung des Screening-Verfahrens für Fluorenol-basierte Verbindungen (FOH).^[202] Eine effiziente photolabile Schutzgruppe verfügt über einen konischen Schnittpunkt (CI) in den Produktzustand (F^+ + OH^-) (a), was in einer geringen ΔE_{vert} resultiert. Eine ineffiziente photolabile Schutzgruppe weist mit einem energetisch niedrigen Produkt keinen CI und folglich ein großes ΔE_{vert} auf (b).^[200]

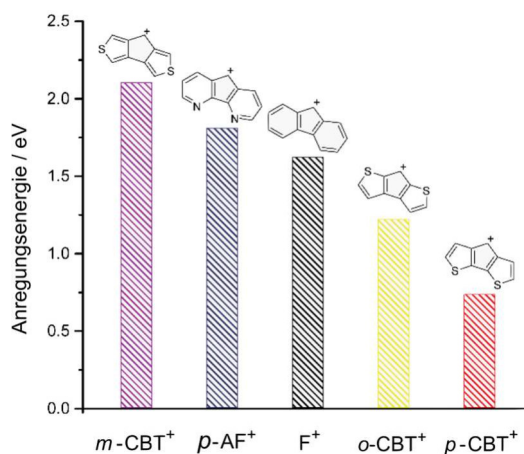


Abbildung 5.29: Berechnete vertikale Absorptionsenergien verschiedener kationischer Derivate.^[200]

im angeregten Zustand zu erzeugen, wodurch sie sich sehr gut zur Anwendung als photolabile Schutzgruppen eignen. Ziel dieses Projekts war es, dieses Konzept für das Design neuer PPGs umzusetzen. In Zusammenarbeit mit Maximilian Scheuer (AK Dreuw, Uni Heidelberg) wurde zunächst versucht, mehrere zyklische Strukturen mit rechnerischen Methoden zu optimieren, während einige dieser Verbindungen von Volker Hermanns (AK Heckel, Uni Frankfurt) synthetisiert und charakterisiert wurden. Dabei lag der Fokus auf heteroatomaren Substitutionen an verschiedenen Ringgrößen, wie dem Fluoreno- und Cyclopenta-bisthiophen (CBT).^[207] Die photoinduzierte Heterolyse solcher Verbindungen verläuft nach Winter *et al.* über einen konischen Schnittpunkt zwischen dem niedrigsten angeregten Singulett-Zustand und dem Grundzustand.^[208] Dies beruht auf der Annahme, dass eine effiziente photolabile Schutzgruppe infolge einer Photonabsorption vom elektronischen Grundzustand S_0 zum ersten angeregten Singulett-Zustand S_1 angehoben wird (FOH^*) und anschließend über einen konischen Schnittpunkt (CI) in den Produktzustand ($\text{F}^+ + \text{OH}^-$) gelangt.

Dieser Ablauf ist aufgrund eines stabilisierten angeregten Zustands und eines energetisch hochliegenden Produktzustands möglich. Daher dürfte die vertikale Absorptionsenergie des Produkts ΔE_{vert} gering sein. Im Gegensatz dazu hat eine ineffiziente photolabile Schutzgruppe mit einem energetisch niedrigliegenden Photoprodukt keinen CI zwischen S_0 und S_1 und weist folglich ein großes ΔE_{vert} auf. Das Vorhandensein eines produktiven konischen Schnittpunkts lässt sich durch die Berechnung der vertikalen Absorptionsenergie der kationischen Spezies nachweisen (Abb. 5.28). Eine geringe vertikale Anregungsenergie der kationischen Zwischenspezies kann also auf ein produktives

Zustands. Basierend darauf konnte vor einigen Jahren dieser Ansatz auch auf den niedrigsten Singulett-Zustand ausgedehnt werden.^[204]

Die (Anti-)Aromazität hat neuesten Erkenntnissen zufolge einen bedeutenden Einfluss auf die photochemische Anwendung.^[205,206] Verbindungen, die im Grundzustand antiaromatisch sind, präferieren nach der Anregung die Spaltung einer bestimmten Bindung, um das aromatische System

Photoheterolyse-Verhalten hindeuten, was eine effiziente Selektion und Bewertung verschiedener Gerüste ermöglicht. Die berechneten vertikalen Anregungsenergien der Fluoren-artigen kationischen Spezies in Abbildung 5.29 zeigen, dass die höchsten Werte sich für die kationische Zwischenprodukte des *meta*-Schwefel-Cyclopenta-Dithiophen und das Aza-Fluorenlgerüsts ergaben.^[207] Auch das Fluorenylkation weist eine relativ hohe vertikale Anregungsenergie von etwa 1.61 eV auf. Im Vergleich dazu zeigen das *ortho*- und *para*-Schwefel-Cyclopenta-Dithiophen-Derivat eine deutlich niedrigere Anregungsenergie. Somit scheint auf der Grundlage der Berechnungsergebnisse das *para*-Schwefel-Cyclopentadithiophen-Derivat mit einer ΔE_{vert} von 0.73 eV der vielversprechendste Kandidat für das Uncaging zu sein.

5.2.1 Stationäre UV/vis-Experimente

Im Folgenden werden verschiedene Derivate des *p*-CBT-Grundgerüsts bezüglich ihres spektroskopischen Verhaltens infolge einer Anregung bei entsprechender Wellenlänge diskutiert, da sich neben den quantenchemischen Rechnungen auch die Quantenausbeuten der *para*-substituierten Thiophene als besonders vielversprechend erwiesen ($\Phi_{\text{p-CBT-OAc}}$: 52%, $\Phi_{(\text{OMe-Ph})_2\text{p-CBT-OAc}}$: 11%)^[207]. Die Absorptionsmaxima von *p*-CBT-OAc und *p*-CBT-OH sind mit 326 nm bzw. 328 nm und 323 nm fast identisch (Abb. 5.30a). Die Verbindung CBT-5HT verfügt neben der Absorptionsbande bei 327 nm über zwei weitere Banden bei 315 nm und 280 nm. Diese beiden Banden sind der Serotonin-AG zuzuordnen. Eine stark bathochrome Absorptionsbande bei 405 nm ergibt sich für die OMe-Ph-substituierte Verbindung. Infolge der Belichtung mit

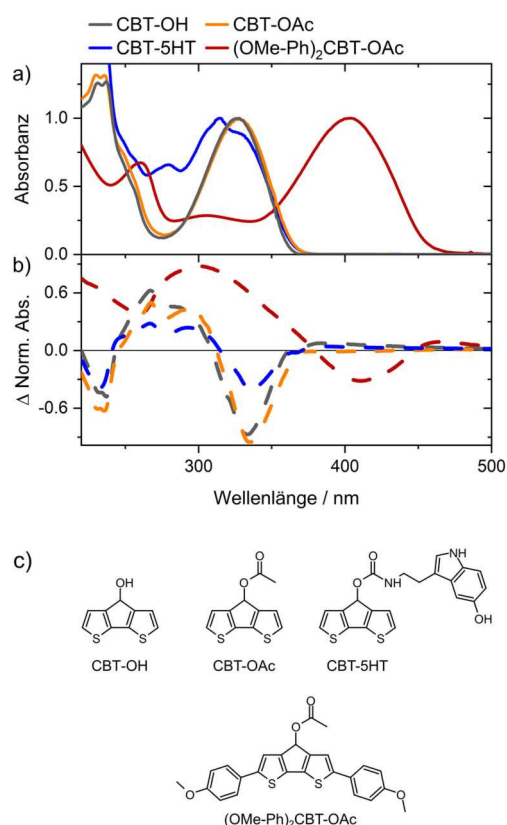


Abbildung 5.30: Absorptionsspektren der *p*-CBT-Derivate in MeOH (a). Differenzspektren der belichteten Derivate: CBT-OH, CBT-OAc und CBT-5HT bei 365 nm und (OMePh)₂CBT-OAc bei 405 nm (b). Strukturformeln der jeweiligen *p*-CBT-Derivate (c).

365 nm findet die Freisetzung der AG statt, welche sich bei allen drei unsubstituierten Schutzgruppen in der hypsochromen Verschiebung der 327 nm Bande zu 309 nm und der Abnahme der 233 nm Bande widerspiegelt (Abb. 5.30b).

Zusätzlich bildet sich eine neue Absorptionsbande bei 266 nm. Anhand der Intensität der Absorptionsänderungen kann auf Grund der Tatsache, dass alle drei Verbindungen unter den gleichen Bedingungen (Anregungswellenlänge, LED-Stärke und Probenkonzentration) belichtet wurden, eine Aussage über die unbekanntenen Quantenausbeuten getroffen werden. Demnach liegt ϕ von CBT-OH knapp unter 52%, während CBT-5HT im Vergleich dazu eine wesentlich geringere ϕ aufweist. Das symmetrisch substituierte OMe-Ph-Derivat durchläuft ebenfalls eine hypsochrome Absorptionsverschiebung der Hauptbande bei 405 nm um 20 nm. Die bereits vor der Belichtung vorhandenen Banden bei 304 nm und 260 nm nehmen zu. Diese Verbindung eignet sich mit ihrem hohem Uncaging-Querschnitt von $2012 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und dem Absorptionsmaximum im sichtbaren Spektralbereich besonders gut für potentielle biologische Anwendungen.^[207]

5.2.2 Ultrakurzzeit Dynamik von CBT

Auf ultrakurzer Zeitskala sind klarere Unterschiede zwischen den drei unsubstituierten CBT-Derivaten erkennbar. Das zeitaufgelöste UV/vis-Spektrum (Abb. 5.31) der CBT-OH Verbindung wird von einer ESA bei 480 nm (ESA_2) dominiert, während eine zweite, intensitätsschwächere ESA bei 390 nm (ESA_1) sichtbar ist.

Beide Signale erscheinen direkt nach der Anregung und halten bis 20 ps an. Ähnliches ist bei CBT-OAc und CBT-5HT beobachtbar, allerdings sind die Intensitätsverhältnisse von ESA_1 zu ESA_2 für die beiden Verbindungen anders. In der CBT-OAc-Messung ist die Signalstärke beider ESA vergleichbar, während für CBT-5HT ESA_1 deutlich intensiver ist. Da sich alle drei Verbindungen lediglich in der AG unterscheiden, muss dies der Grund für die genannten Unterschiede sein. Von -OH über -OAc hin zum Carbamat-verbrückten Serotonin wird das System länger, wobei im Fall von CBT-5HT das Serotonin vom restlichen System elektronisch entkoppelt ist. Zum anderen weist ESA_1 eine Struktur auf, die anhand der DAS auch für CBT-OH erkennbar ist (Abb. 5.31). Die zerfallsassoziierten Spektren zeigen, dass für alle drei Verbindungen der lokal angeregte Zustand mit 0.8 ps verlassen wird, infolge dessen eine hypsochrome Verschiebung der ESA_1 stattfindet.

Das unterschiedliche Intensitätsverhältnis der ESA ist dabei sehr gut anhand der beiden Zerfallszeiten τ_1 und τ_2 erkennbar. Mit rund 5 bis 8 ps findet der Zerfall der beiden Signale

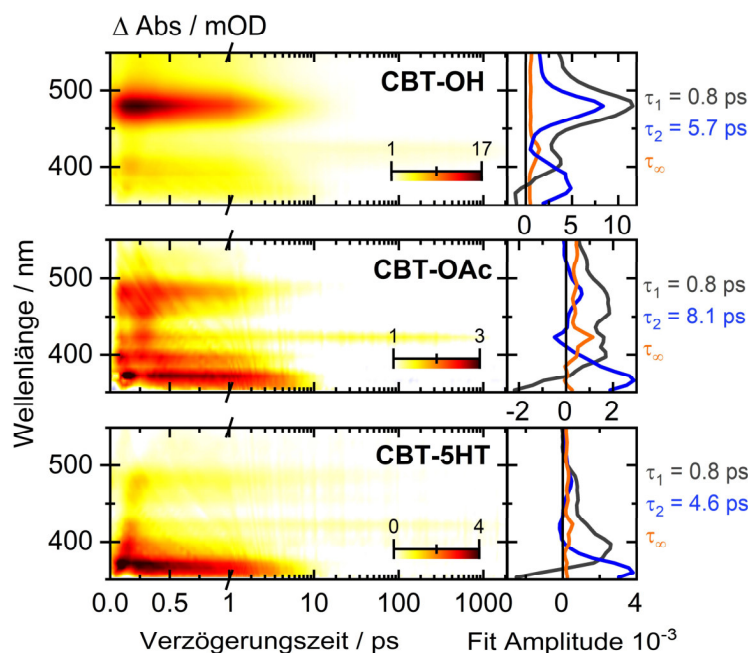


Abbildung 5.31: Zeitaufgelöste UV/vis-Messungen inklusive der zerfallsassoziierten Spektren von CBT-OH (a), CBT-OAc (b) und CBT-5HT (c) in MeOH mit einer Anregungswellenlänge von 335 nm.

statt, was gleichbedeutend mit dem Zerfall des angeregten Zustands ist. Übrig bleibt ein positives Signal bei 423 nm (τ_3), bei dem es sich um ein Intermediat handeln sollte, da es sich anhand der stationären UV/vis-Uncaging-Messungen keinem Photoprodukt zuordnen lässt. Im Zusammenhang mit den berechneten Anregungsenergien der kationischen Spezies (p -CBT⁺) und den Ergebnissen der Fluorenyl-Kationen aus den vorherigen Kapiteln, kann angenommen werden, dass es sich bei den gebildeten Produktabsorptionsbanden um die des Kations handelt. Zwar würde der energetisch kleinste Übergang des p -CBT⁺ mit 0.73 eV bei rund 1700 nm liegen, allerdings sind Übergänge in höhere Zustände, wie es bei dem (DMA)₍₂₎F⁺ der Fall ist, möglich.

Eine signifikant andere Dynamik zeigt das (OMePh)₂CBT-OAc (Abb. 5.32). Jeweils zwei positive und zwei negative Signale entstehen infolge der Anregung bei 388 nm. Der GSB erstreckt sich bis 450 nm und hält bis zum Ende des Messfensters an. ESA₁ beginnt bei 550 nm mit einem Maximum über 750 nm, erscheint direkt zum Zeitnullpunkt und dauert bis ca. 1500 ps an.

Anders als bei den unsubstituierten Schutzgruppen, ist hier die SE bei 500 nm erkennbar und stark ausgeprägt. Diese wird gegen 450 ps von einem positiven Signal überlagert, welches sich spektral von 450 nm bis 570 nm erstreckt.

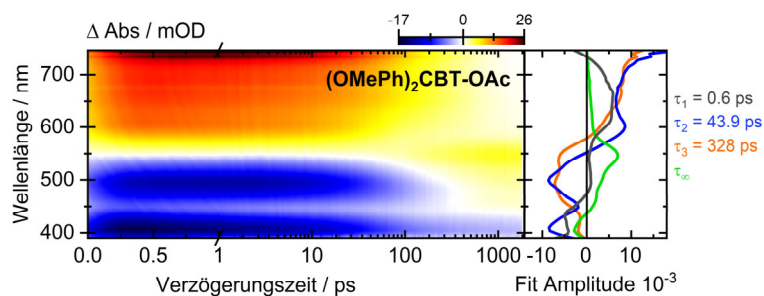


Abbildung 5.32: Transiente UV/vis-Messungen inklusive der zerfallsassoziierten Spektren von $(\text{OMePh})_2\text{CBT-OAc}$ in MeOH mit einer Anregungswellenlänge von 388 nm.

Die Zerfallskonstante τ_1 beschreibt die bathochrome Verschiebung der ESA_1 . Mit 44 ps findet eine erneute Verschiebung der ESA_1 statt, gleichzeitig zerfällt die SE. Folglich wird mit τ_2 auch eine partielle Repopulation des GZ beschrieben. Zudem zerfällt ESA_2 ebenfalls mit 44 ps (Abb. 5.32). Die Entstehung des positiven Signals bei 500 nm findet mit 328 ps statt, simultan zu dieser Bildung zerfällt ESA_1 , was die Bande als Intermediat des Uncaging identifiziert. Die Zerfallszeit τ_∞ beschreibt das Vorhandensein des Intermediats und des damit verbundenen nicht zurück gebildeten Grundzustands in Form des verbleibenden GSB. Auch hier kann es sich bei dem Photoprodukt bei 550 nm um ein kationisches Intermediat handeln.

5.3 Wellenlängenselektives Aktivieren und Deaktivieren von Puromycin

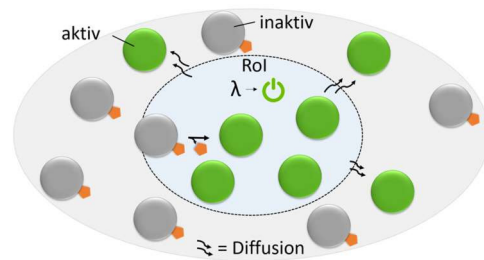
Das Antibiotikum Puromycin kann, wie bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben, mit einer photolabilen Schutzgruppe versehen werden, um dessen biologische Aktivität zu unterdrücken. Dadurch kann keine Inhibierung der Proteinbiosynthese stattfinden. Zu einem beliebigen Zeitpunkt wird durch die Bestrahlung des Moleküls mit Licht einer bestimmten Wellenlänge die Schutzgruppe entfernt, folglich ist die Inhibierung der Proteinbiosynthese aktiviert. In Kapitel 3.1 wurde ebenfalls beschrieben, dass es sich bei der Entfernung einer photolabilen Schutzgruppe um einen irreversiblen Prozess handelt. Dies bedeutet im Falle des geschützten Puromycins, dass die zuvor aktivierte Inhibierung nicht mehr aufgehoben werden kann. Dies kann in der biologischen Anwendung dann problematisch werden, wenn durch Diffusionsprozesse das aktivierte Antibiotikum in nicht gewünschte Regionen gelangt (Abb. 5.33). Somit würde einer der Vorteile, nämlich die

räumliche Kontrolle, mit der die Anwendung von photolabilen Schutzgruppen häufig beworben wird, wegfallen.

In dieser Arbeit wird sich der Lösung dieses Problems gewidmet. Dabei wird eine zweite photolabile Schutzgruppe eingesetzt, die nach erfolgreicher photoinduzierten Aktivierung des Biomoleküls die erneute Blockade der Inhibierung der Proteinbiosynthese ermöglicht. In der Umsetzung bedeutet dies die Suche nach zwei Schutzgruppen, welche beide an das Puromycin angebracht und selektiv abgespalten werden können. Konkret soll PPG 1 mit einer bestimmten Wellenlänge λ_1 entfernt werden, wodurch das Puromycin aktiv wird. Mit einer anderen Wellenlänge λ_2 soll die Deaktivierung desselben Antibiotikums initiiert werden, die je nach Anforderung an das System entweder simultan auf den Bereich außerhalb der *region of interest* (RoI) (Abb. 5.33a) oder sukzessiv zu einem beliebigen Zeitpunkt auf die RoI und außerhalb angewendet werden kann. Dabei ergaben sich mehrere Anforderungen an die Schutzgruppen, welche es zu erfüllen galt:

1. PPG 1 muss die biologische Aktivität des Puromycins blockieren.
2. Das Puromycin muss mit angebrachter PPG 2 immer noch die Proteinbiosynthese inhibieren können, d.h. PPG 2 darf die chemische Struktur des Puromycin daher nur marginal verändern.
3. PPG 1 muss unabhängig von PPG 2 entfernbare sein.
4. Durch das Entfernen von PPG 2 muss das Puromycin strukturell zerstört oder so stark verändert werden, dass es nicht mehr inhibierend auf die Proteinbiosynthese wirkt.
5. Das doppelt geschützte Puromycin muss im Falle der Diffusion außerhalb des gewünschten Wirkungsbereichs mit dem Licht, welches für PPG 2 vorgesehen ist, deaktiviert werden können. Dies bedeutet entweder beide Schutzgruppen müssen mit λ_2 entfernbare sein oder lediglich PPG 2.

a) Problem: Diffusion des aktivierten Moleküls



b) Lösung: Deaktivierung durch eine zweite Schutzgruppe

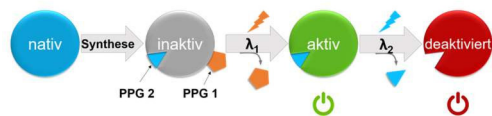


Abbildung 5.33: Schematische Darstellung eines einfach geschützten Biomoleküls (grau mit orangener Schutzgruppe), welches nach dem Entfernen der Schutzgruppe (grün) außerhalb der RoI diffundiert (a). Konzept des doppelt geschützten Biomoleküls und den folgenden Schritten zur aktivierten (grün) und deaktivierten (rot) Form (b).

6. Die Photolyse-Quantenausbeute der beiden PPGs sollte annähernd gleich sein, um bei dem Einsatz der energetisch höheren λ_2 eine ungewollte Präferenz in der Abspaltung von PPG 1 zu vermeiden.

Der Vergleich der oben genannten Anforderungen an die beiden PPGs zeigt, dass vor allem die Wahl von PPG 2 besonders eingeschränkt ist. Bei der Betrachtung der Struktur von Puromycin in Zusammenhang mit den in 3.1 vorgestellten Klassen an PPGs geht hervor, dass in erster Linie Nitrobenzyl-basierte PPGs in Frage kommen. Diese sind strukturell besonders simpel, wodurch sie Potenzial vorweisen sich in das Puromycin integrieren zu lassen, ohne dessen biologische Aktivität zu stören. Der zunächst evidente Versuch lag darin, eine Nitrobenzyl-Gruppe an den Phenylalanin-Abschnitt anzubringen (Abb. 5.34). Zwar war das photochemische Uncaging dieser Vorgänger-Verbindung erfolgreich, allerdings entstand im Zuge der Photolyse ein Produkt, welches dem nativen Puromycin zu sehr ähnelt und höchstwahrscheinlich auch biologisch aktiv ist (Abb. 5.34). Folglich wäre die vierte Bedingung nicht erfüllt.

Der zweite Ansatz basiert darauf, den bereits vorhandenen Benzolring des Phenylalanins als Grundgerüst einer PPG zu nutzen. In Anlehnung an Peters *et al.*^[209] wurde die Methoxybenzyl-Gruppe an *para*-Position durch eine Nitrobenzyl-Gruppe an der *ortho*-Position ausgetauscht. Die Photolyse läuft über eine basisch katalysierte intramolekulare Zyklisierung der *ortho*-Nitro-Gruppe und dem N-terminalen Amid ab zu dem Heteroaromaten Cinnolin (Abb. 5.35). Diese Reaktion bindet die Amino-Gruppe mit ein, die für die Bindung des Puromycins an die naszierende Proteinkette im Ribosom verantwortlich ist. Dies führt unmittelbar zur Deaktivierung der Translationsinhibierung. Zudem stellt die Nitro-Gruppe eine minimale Änderung an der chemischen Struktur des

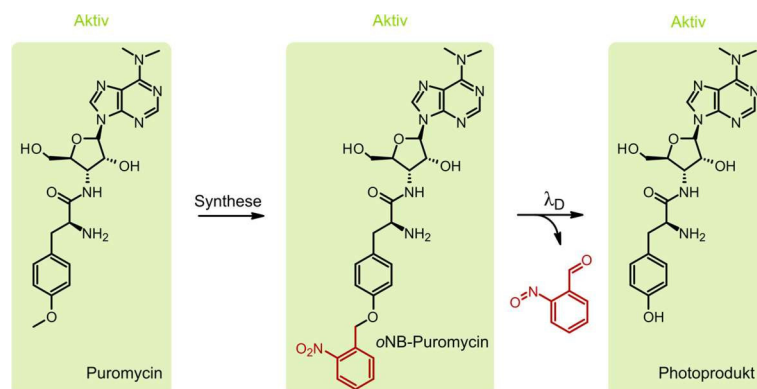


Abbildung 5.34: Schematische Darstellung des Puromycins und der Photoreaktion des oNB-Puromycins unter der Bildung eines aktiven Photoprodukts.

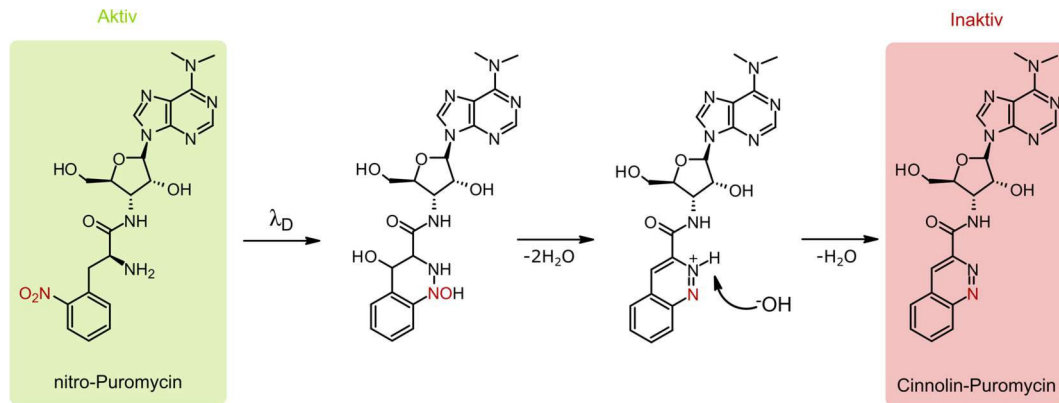


Abbildung 5.35: Vorgeschlagener Mechanismus zur Deaktivierung von nitro-Puromycin über eine Photozyklisierung zum Cinnolin-Derivat in Anlehnung an Peters *et al.*.^[209]

Puromycins dar, wodurch die biologische Aktivität des Antibiotikums, wie im folgenden Kapitel gezeigt wird, unbeeinträchtigt bleibt. Demnach sind die Bedingungen 2 und 4 erfüllt.

5.3.1 Nitro-Puromycin

Die Inhibierung der Proteinbiosynthese durch das Puromycin muss mit integrierter PPG 2 möglich sein. Zudem soll nach photoinduziertem Entfernen dieser PPG 2 die biologische Aktivität des Antibiotikums blockiert werden. Im folgenden Abschnitt soll belegt werden, dass das nitro-Puromycin die beiden genannten Anforderungen erfüllt. Abbildung 5.36 ist zu entnehmen, dass nitro-Puromycin eine Absorptionsbande bei 275 nm aufweist (Abb. 5.36, grünes Spektrum), welche im Laufe der Belichtungsdauer zunächst an Intensität zunimmt. Zusätzlich entstehen zwei neue Absorptionsbanden bei 240 nm und 320 nm (Abb. 5.36, graues Spektrum). Die Abnahme der Bande bei 320 nm im weiteren Verlauf der Belichtung (Abb. 5.36, rotes Spektrum) weist darauf hin, dass die Photoreaktion über ein Intermediat abläuft, welches neben der Bande bei 275 nm (mit höherem Extinktionskoeffizienten als das nitro-Puromycin) eine weitere Bande bei 320 nm aufweist.

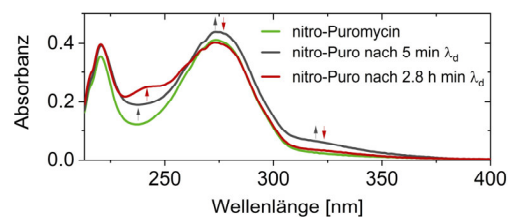


Abbildung 5.36: Absorptionsspektrum von nitro-Puromycin vor der Belichtung (grün) nach 5 Minuten (grau) und 2.8 Stunden (rot) Belichtung mit der Deaktivierungswellenlänge $\lambda_D = 365$ nm.

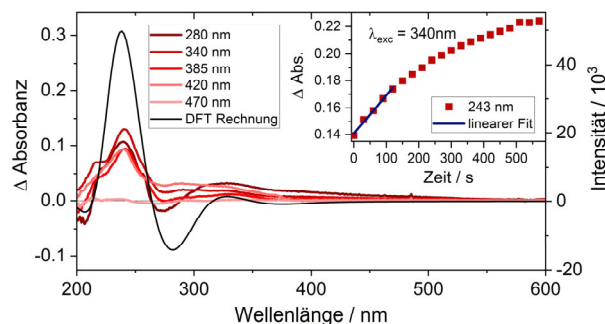


Abbildung 5.37: Differenzspektren von nitro-Puromycin nach Belichtung mit verschiedenen Wellenlängen von 280 nm bis 470 nm und das DFT-berechnete Differenzspektrum, gebildet aus den berechneten Einzelspektren von nitro-Puromycin und dem photozyklisierten Cinnolinprodukt (schwarz). Transiente von nitro-Puromycin bei 243 nm während der Belichtung mit 340 nm zur Berechnung der Reaktionsquantenausbeute ($\phi_{\text{NO}_2\text{-puro}} = 2,5\%$).

Das endgültige Photoprodukt enthält eine ausgeprägte Absorptionsbande bei 240 nm, die im Gegensatz zu den anderen beiden Banden stetig zunimmt. Mit Hilfe von DFT-Rechnungen ließ sich diese neue Bande wie folgt zuordnen. Gemäß dem im vorherigen Kapitel vorgeschlagenen Deaktivierungsmechanismus wurden die Absorptionsspektren von nitro-Puromycin und Cinnolin-Puromycin berechnet. Das Differenzspektrum aus den beiden Rechnungen stellt die Abnahme des nitro-Puromycins als negativen und die Bildung des Cinnolin-Puromycins als positiven Beitrag dar. Der Vergleich des berechneten Differenzspektrums mit dem experimentellen bestätigt die Annahme der Zyklisierungsreaktion des nitro-Puromycins hin zum Cinnolin-Produkt (Abb. 5.37). Folglich war die Integration der PPG 2 in die Struktur des Puromycins erfolgreich.

Der Beleg des Cinnolin-Puromycins als Photoprodukt dieser Reaktion ließ die Prognose zu, dass die Translationsinhibierung des Antibiotikums damit deaktiviert ist. Des Weiteren kann diese Deaktivierungsreaktion mit unterschiedlichen Wellenlängen von 280 nm bis zu 420 nm durchgeführt werden, obwohl das Absorptionsspektrum von nitro-Puromycin oberhalb von 325 nm nur geringe Absorbance aufweist (Abb. 5.36). Der rotverschobene Bereich an Deaktivierungswellenlängen ist von besonderer Wichtigkeit für die wellenlängenselektive Steuerung des Systems, da sich dadurch einerseits eine gewisse Flexibilität bei der Suche nach einer geeigneten PPG 1 ergibt und andererseits UV-Licht in biologischer Anwendung zu vermeiden ist. Zusätzlich konnte für die Zyklisierungsreaktion eine Quantenausbeute von 2,5% bestimmt werden (Abb. 5.37, Transiente bei 243 nm).

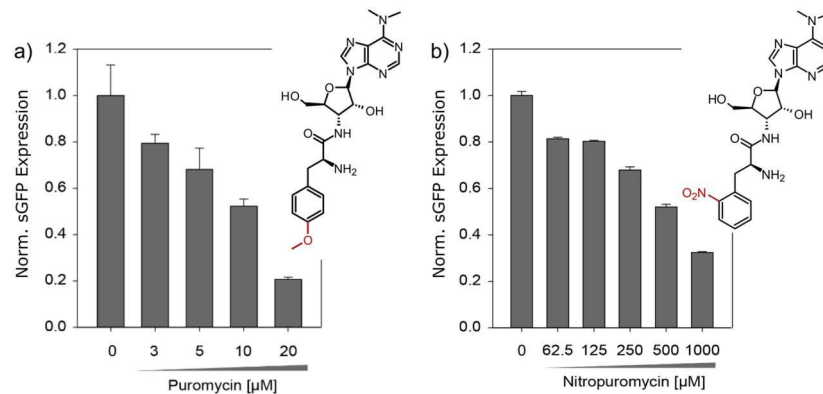


Abbildung 5.38: Zellfreies sGFP Translationsexperiment zur Untersuchung der Inhibierung der Proteinbiosynthese von nativem Puromycin (a) im Vergleich zum nitro-Puromycin (b).^[213] Die Messungen wurden von Jasleen Kaur Bains (AK Schwalbe) durchgeführt.

Die biologische Aktivität des nitro-Puromycins konnte mittels zellfreier sGFP Translation nachgewiesen werden. Bei dieser Methode handelt es sich um ein Proteinexpressionsverfahren, das die Herstellung des sGFP Proteins ohne lebende Zellen ermöglicht. Dabei enthält das System alle nötigen Bestandteile zur Transkription, Translation und Proteinfaltung wie z. B. Ribosome, tRNA, Enzyme, Aminosäuren und Plasmid-DNA. Allerdings fehlt die Zellmembran, wodurch sich viele Vorteile gegenüber der *in-vivo* Proteinsynthese ergeben. Der größte Vorteil ist dabei die Schnelligkeit zur Erzeugung des gewünschten Proteins, wodurch die Intaktheit der Proteinexpression direkt ermittelt werden kann. Liegt aktives Puromycin vor, gelangt es an das Ribosom und hemmt die sGFP Expression.

Durch das Auslesen der sGFP Fluoreszenz kann der Grad der Inhibierung der Proteinbiosynthese durch das Antibiotikum ermittelt werden. Abbildung 5.38 zeigt die Fluoreszenz des sGFP in Abhängigkeit von der Konzentration des nitro-Puromycins (b) und des Vergleichssystems, dem nativen Puromycin (a). Beide Experimente zeigen, dass mit steigender Antibiotikumkonzentration die sGFP Expression abnimmt. Offenbar wird die 50-fache Konzentration an nitro-Puromycin benötigt, um die gleiche Inhibierung wie mit nativem Puromycin zu erzielen. Nichtsdestotrotz ist das nitro-Puromycin in der Lage die Proteinbiosynthese zu inhibieren, folglich ist die Integration der PPG 2 auch in Bezug auf die Erhaltung der biologischen Aktivität des Antibiotikums (Anforderung 2) erfolgreich.

Zeitaufgelöste UV/vis-Messungen

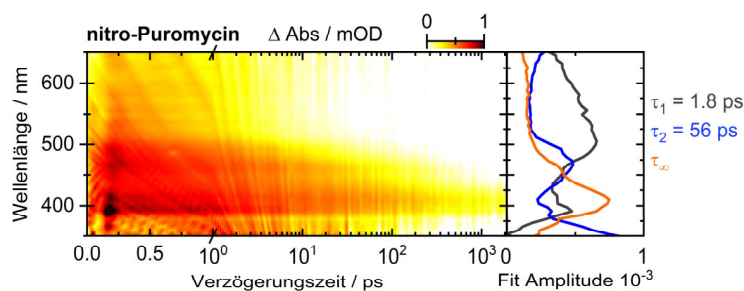


Abbildung 5.39: Transiente UV/vis-Absorptionsmessungen von nitro-Puromycin in MeCN/H₂O nach Anregung mit 315 nm.

Auf ultrakurzer Zeitskala weist nitro-Puromycin eine breite ESA₂ zwischen 350 nm und 550 nm auf und eine weitere oberhalb von 600 nm (ESA₁), deren Ausläufer bei 550 nm zu erkennen sind und mit ESA₂ überlagern. Die bathochrome Flanke von ESA₂ um 500 nm zerfällt mit einer Zeitkonstanten von 1.8 ps, was durch eine Relaxation aus dem Franck-Condon-Bereich verursacht wird. Schließlich zerfällt diese ESA₂-Bande mit 56 ps (Abb. 5.39). Anhand der ansteigenden Amplitude von $\tau_2 > 600$ nm, kann gefolgert werden, dass simultan der Zerfall von ESA₁ stattfindet.

Zum Ende des Messfensters bleibt ein positiver Beitrag bei 400 nm übrig, der keiner Produktabsorption aus den stationären UV/vis-Experimenten zugeordnet werden kann. Folglich handelt es sich dabei um ein Zwischenprodukt der Uncaging-Reaktion, welches sich allerdings von dem mit der Absorption bei 320 nm unterscheidet (Abb. 5.36). Anders als es für das *ortho*-nitro-Benzyl-Derivat (*o*NB) geschützte Puromycin der Fall ist, ist hier kein Triplett-Übergang beobachtbar. Dieser hat sich für das NVOC-Puromycin durch eine spektral sehr breite ESA von 380 – 600 nm definiert ohne Substruktur, welche bis 10 ps anklingt und bis zum Ende des Messfenster kein Signalabfall aufweist.^[80] Aus dem Unterschied zwischen dem Verhalten der beiden Verbindungen kann geschlussfolgert werden, dass trotz der strukturellen Ähnlichkeit das Uncaging des nitro-Puromycins über einen anderen Mechanismus abläuft. Für *o*NB-Schutzgruppen ist bekannt, dass sie über die Bildung eines *aci*-Nitro-Intermediats von einem Singulett in einen Triplett-Zustand übergehen. Das Fehlen einer Triplett-Signatur in den nitro-Puromycin-Messungen schließt diesen Pfad aus und bestätigt im Umkehrschluss den oben vorgeschlagenen Mechanismus.

5.3.2 Cumarin-Derivate

Nitro-Puromycin ist wie im vorherigen Kapitel beschrieben eine erfolgreiche Lösung zur photoinduzierten Deaktivierung des Puromycins. Da vor allem die Auswahl dieser PPG 2 besonders eingeschränkt war, gilt es PPG 1 angepasst daran auszusuchen. Aufgrund der verschiedenen in Kapitel 3.1.2 genannten Vorteile von Cumarin-Schutzgruppen und des bereits spektroskopisch gut untersuchten DEACM-Puromycins^[149] lag der Fokus hierbei auf Cumarin-Derivaten. Zunächst lag es nahe, das DEACM-OH als PPG 2 zu

verwenden. Allerdings stellte die Absorption des DEACM-OH, welches neben nitro-Puromycin ein Photoprodukt der Aktivierungsreaktion ist, ein Hindernis für die darauf folgende Deaktivierung dar. Dabei wurde das Deaktivierungslicht vom DEACM-OH absorbiert und führte zu einer Nebenreaktion mit unbekanntem Photoprodukt.

Aus diesem Grund wurden verschiedene Cumarin-Derivate synthetisiert. Anhand ihrer Absorptionsspektren wird nach einem Derivat gesucht, welches -wie aus den vorherigen Kapiteln hervor geht- zum einen ein rotverschobenes Absorptionsmaximum zum nitro-Puromycin und zum anderen keine Absorption zwischen 280 – 420 nm aufweist. Abbildung 5.40 zeigt die Absorptionsspektren unterschiedlicher Cumarin-Derivate. Das Vorhandensein eines zweiten *tert*-Butylesters an der Amino-Gruppe in Position 7 von 7-di-*tert*-Butoxymethylamino-Cumarin-4-yl-methyl (DBMAC) hat keinen erhöhten Elektromendonator-Effekt, da sich das Absorptionsmaximum im Vergleich zum monoacetylierten (BMAC) kaum verändert.

Das Derivat 7-Di-Carboxymethylamino-Cumarin-4-yl-methyl (DCMAC), das keine *tert*-Butyl-Gruppe enthält, zeigt jedoch eine leichte bathochrome Verschiebung, während die Diethyl-Gruppen am DEACM-OH die bathochrome Verschiebung aufgrund des Push-Pull-Effekts stärker unterstützen. Darüber hinaus verschiebt das Vorhandensein des elektronenziehenden Broms an Position 3 (BDEACM) das Absorptionsmaximum im Vergleich zu DEACM bathochrom um 26 nm. Das rotverschobene Absorptionsmaximum

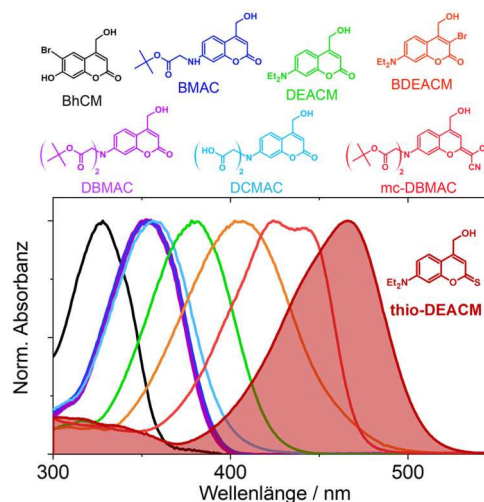


Abbildung 5.40: Absorptionsspektren von verschiedenen Cumarin-Derivaten.

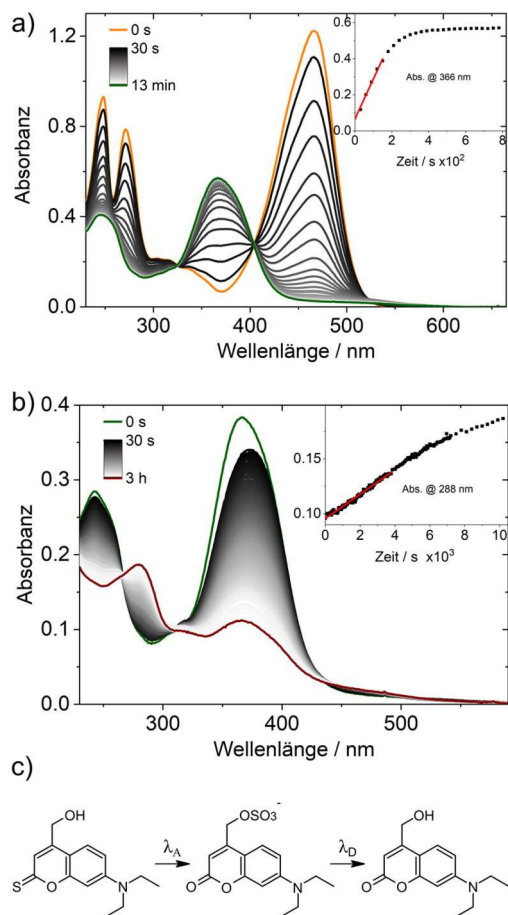


Abbildung 5.41: Absorptionsspektren von thio-DEACM-OH vor (orange) und während der Belichtung mit 470 nm (a). Absorptionsspektren des zuvor mit 470 nm belichteten thio-DEACM vor (grün) und während der anschließenden Belichtung mit 365 nm (b). Strukturformel der PPG thio-DEACM-OH und seiner Photolyseprodukte nach der Belichtung mit λ_A (470 nm) und λ_D (365 nm) (c).

von Diethylamino-Cumaryl-idenmalonitrilmethyl (mc-DBMAC) im Vergleich zu unsubstituiertem DBMAC, das sich nur durch die Substitution des Sauerstoffatoms an Position 2 durch die Vinylmalonitril-Gruppe unterscheidet, kann auf den elektronenziehenden Effekt der letzteren zurückgeführt werden. Schließlich vereint Diethylamino-thiocumaryl-methyl (thio-DEACM) die Vorteile der verschiedenen Derivate, da es eine Diethylamino-Gruppe an Position 7 und eine starke elektronenziehende Gruppe an Position 2 aufweist. Der Einbau von thio-DEACM würde somit eine Anregung der ersten PPG bzw. eine Aktivierung des

ersten PPG bzw. eine Aktivierung des thio-DEACM-nitro-Puromycins mit visuellem Licht ermöglichen. Von besonderer Bedeutung für die An-/Aus-Funktionalität ist die Absorptionslücke um 370 nm (Abb. 5.40, roter Bereich). Diese Eigenschaft ist im Hinblick auf den anschließenden Deaktivierungsschritt vorteilhaft, da für diesen zweiten Photolyseschritt eine signifikante Absorption der ersten photolabilen Schutzgruppe (PPG 1) vermieden werden sollte. Somit ergibt sich für die Aktivierung eine Wellenlänge von $\lambda_A = 470$ nm, während die Deaktivierung auf Grund der Absorptionslücke von thio-DEACM und der Zyklisierung von nitro-Puromycin mit Wellenlängen bis zu 420 nm auf $\lambda_D = 365$ nm festgelegt wird.

Um die anschließende Aktivierungs- und Deaktivierungsreaktionen zu verstehen, musste zunächst die ausgewählte PPG 2 separat untersucht werden. Unter Belichtung des thio-DEACM-OH bei $\lambda_A = 470$ nm findet eine Photolyse statt, bei der die Absorptionsbande bei 470 nm verschwindet und sich eine neue Bande bei 365 nm mit einer Schulter an der

roten Flanke bildet (Abb. 5.41a). Zusätzlich nehmen die beiden schmalen Banden unterhalb von 300 nm ab, zurück bleibt eine breitere Absorptionsbande bei 245 nm. Jullien *et al.* berichten von der Bildung von DEACM-OH als Produkt dieser Photolyse, wobei sie weitere Nebenprodukte nicht ausschließen können.^[81] Die beiden Absorptionsbanden zwischen 320 und 420 nm bestätigen das Vorhandensein des DEACM-OH und eines weiteren Photoprodukts. Letzteres wurde durch Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie identifiziert. Die Analysen ergaben die Bildung eines Coumarylmethylhydrogensulfat-Derivats DEACM-OSO₃⁻ als Hauptphotoprodukt von photolysiertem thio-DEACM-OH. In Anbetracht der Banden im Bereich unter 300 nm bestätigt sich, dass DEACM-OH lediglich in geringen Mengen vorliegen muss, da die Schutzgruppe eine zusätzliche Absorptionsbande bei 280 nm vorweist, welche hier nur sehr gering ausgeprägt ist. Diese Photolyse findet mit einer Quantenausbeute von 1.1 % statt.

Um das Verhalten des thio-DEACMs während der zweistufigen Belichtung zu analysieren, wurde dieselbe Probe, welche bereits mit 470 nm belichtet wurde, anschließend mit der Deaktivierungswellenlänge 365 nm bestrahlt (Abb. 5.41b). Dabei fanden weitere spektrale Veränderungen statt, welche jedoch einen anderen Bereich betreffen, als unter Bestrahlung mit der Aktivierungswellenlänge. Folglich durchlaufen die beiden zuvor gebildeten Photoprodukte DEACM-OH und DEACM-OSO₃⁻ ihrerseits eine Photolyse (Abb. 5.41c). Im UV/vis-Bereich wird eine starke Abnahme der 365 nm und 245 nm Banden beobachtet, begleitet von einer Zunahme der 280 nm Bande.

Letztere ist wie bereits diskutiert dem DEACM-OH zuzuordnen. Es wurde eine Reaktionsquantenausbeute von 0.1 % bestimmt. Hierbei handelt es sich um die Photolyse-Schritte der freien Schutzgruppe, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass diese als Nebenreaktion während der Photoreaktion des doppelt geschützten Puromycins stattfinden. Die sehr geringe Quantenausbeute unter Belichtung mit 365 nm ist, wie sich im folgenden Kapitel zeigen wird, besonders nützlich für den Deaktivierungsschritt des doppelt geschützten Puromycins, da in diesem Schritt das DEACM-OSO₃⁻ als Nebenprodukt des Aktivierungsschritts vorliegt.

Zeitaufgelöste UV/vis-Absorption an Cumarin-Derivaten

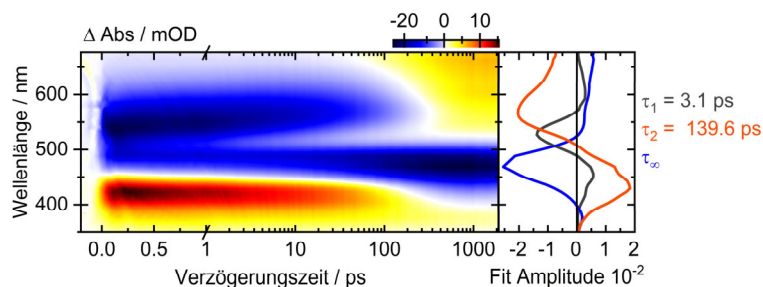


Abbildung 5.42: Zeitaufgelöste UV/vis-Absorptionsmessung von thio-DEACM-OH in MeCN:H₂O (1:1) mit einer Anregungswellenlänge von 470 nm.

Femtosekunden UV/vis-Messungen geben einen tieferen Einblick in die Dynamik der Cumarin-Derivate. Direkt nach dem Anregungspuls bei 470 nm entstehen zum Zeitnullpunkt simultan zwei negative und ein positives Signal (Abb. 5.42). Bei dem negativen Signal bei 470 nm handelt es sich um das GSB, welches bis 130 ps stark von der positiven Bande bei 423 nm überlagert wird.

Jenseits der 130 ps bleibt der GSB bis zum Ende des Messfensters von knapp 2 ns vorhanden. Dies bedeutet, dass der Grundzustand des thio-DEACM-OH auch 2 ns nach der Anregung nicht repopuliert wird. Die positive Bande bei 423 nm entsteht durch die Absorption aus dem angeregten Zustand (ESA). Diese erreicht ihre maximale Amplitude bei 0.3 ps und nimmt anschließend bis 130 ps ab. Bei genauerer Betrachtung fällt eine leichte hypsochrome Verschiebung dieses Signals auf. Ein weiteres dominantes Signal ist die stimulierte Emissionsbande bei 550 nm, welche direkt nach der Anregung die maximale Intensität aufweist und bis 130 ps abnimmt. In dieser Zeitspanne findet eine bathochrome Verschiebung des SE-Signals statt. Grund hierfür könnte einerseits die Reorientierung des Lösungsmittels oder andererseits ein intramolekularer Ladungstransfer (ICT) sein. Für letzteren sind DEACM-Derivate bekannt, dabei findet ein Elektrontransfer von dem freien Elektronenpaar des Stickstoffs an Position 7 hin zum Cumaringerüst statt.^[210] Der ICT wird durch polare Lösungsmittel assistiert, was auf den Fall dieser Messung zutrifft. Aus dem ICT kann durch eine Verdrillung der Diethylamino-Gruppe aus der Cumarin-Ebene heraus ein sogenannter TICT entstehen, welcher durch die Anwesenheit von Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel unterstützt wird.^[110-113,115,211] Die Verschiebung der SE wird mit einer Zeitkonstanten von 3.1 ps beschrieben, dies lässt sich aus der sigmoidalen Form der Zerfallskonstante entnehmen.

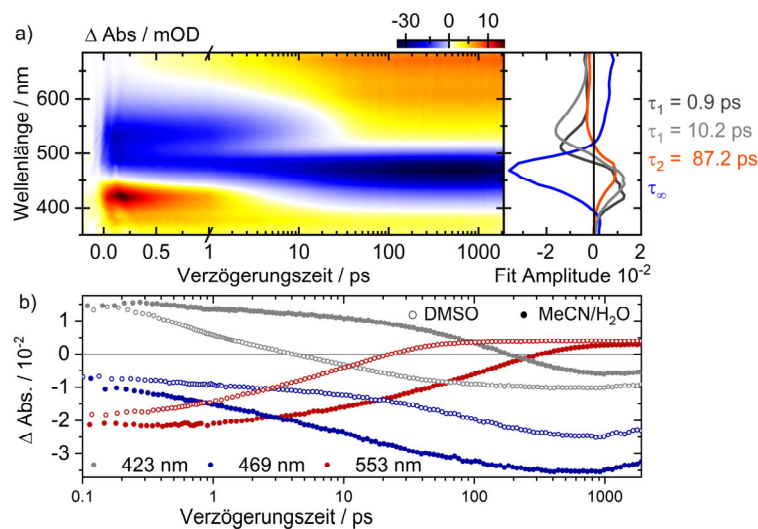


Abbildung 5.43: Zeitaufgelöste UV/vis-Absorptionsmessung von thio-DEACM-OH in DMSO mit einer Anregungswellenlänge von 470 nm mit den zugehörigen zerfallsassoziierten Spektren (a). Zeitaufgelöste Einzeltransienten der thio-DEACM-OH UV/vis-Messungen in DMSO (leere Kreise) und 1:1 MeCN:H₂O (gefüllte Kreise) (b).

Allerdings erstreckt sich die Verschiebung über die gesamte Lebensdauer des Signals (bis 300 ps). Eine Lösungsmittelreorientierung bzw. die Relaxation aus dem Franck-Condon Bereich hingegen findet für gewöhnlich innerhalb weniger ps statt. Da die SE nur aus dem angeregten S_1 -Zustand heraus stattfinden kann und die ESA_1 die gleiche Dynamik bezüglich Entstehung und Abnahme vorweist, beschreibt die Zerfallszeit von beiden mit 140 ps die Depopulation des S_1 -Zustands. Infolge dessen erscheint ein viertes Signal, welches sich spektral von 525 nm bis zum Ende des Messfensters erstreckt. Der spektrale Verlauf von τ_∞ zeigt, dass das Maximum dieses Signals bei ≥ 690 nm liegt. Der Zerfall des S_1 weist in Kombination mit dem nicht repopulierten Grundzustand und dem Erscheinen des positiven Signals auf eine Reaktion aus dem angeregten Zustand heraus. Hierbei würde es sich um eine ESA des DEACM-OSO₃⁻ oder eines Zwischenprodukts der Umwandlung (Abb. 5.41c) handeln. Diese Annahme bestätigt sich durch den positiven Restbeitrag bei 375 nm nach dem Zerfall der ESA, welcher aufgrund der Übereinstimmung mit der resultierenden Absorptionsbande aus den Dauerbelichtungsexperimenten von thio-DEACM-OH der Produktabsorption (PA) von DEACM-OSO₃⁻ (Kap. 5.3.2) zugeordnet wird. Zur genaueren Untersuchung des TICT wurde die oben gezeigte Messung in einem rein polaren, aprotischen Lösemittel wiederholt (Abb. 5.43a).

Zunächst sind in DMSO die gleichen Signale wie in der obigen Messung zu erkennen. Erste Unterschiede zeigen sich in der Lebensdauer des SE und ESA_1 -Signals, die bereits

mit einer Zeitkonstante von 10.2 ps zerfallen. Die bathochrome Verschiebung der SE, welche von der hypsochromen Verschiebung der ESA begleitet wird, findet mit 0.9 ps ebenfalls um ein vielfaches früher statt und ist deutlich schwächer ausgeprägt. Durch den schnelleren Zerfall der beiden Signale gewinnt der GSB zu früheren Verzögerungszeiten an Intensität (Abb. 5.43b). Weiterhin zeigt sich anhand der Form dieses positiven Signals oberhalb von 650 nm ab 0.3 ps, dass es nicht erst nach dem Abklingen der SE und somit aus dem Zerfalls des S_1 -Zustands gebildet, sondern lediglich von der SE überlagert wird. Aufgrund der Unabhängigkeit seiner Lebensdauer von dem angeregten Zustand des thio-DEACM-OH, muss dieses Signal einer anderen Spezies angehören. Zusätzlich ist in dieser Messung eine klare PA Bande unterhalb von 400 nm zu erkennen, deren Intensität bis zum Ende des Messfensters anhält.

Der Vergleich der beiden Messungen zeigt eine stärkere Rotverschiebung der SE im protischen Lösungsmittel, was die Stabilisierung eines TICT-Zustands durch Wasserstoffbrücken bestätigen würde. Grundsätzlich scheint die Dynamik in DMSO schneller abzulaufen, was gegensätzlich zu dem Verhalten ist, welches für das strukturell sehr ähnliche DEACM-OH beobachtet wurde. Im Fall von DEACM-OH wird zwar die bathochrome Verschiebung der SE durch protische Lösungsmittel verstärkt, allerdings verkürzt sich gleichzeitig die Lebensdauer des S_1 -Zustands.^[108]

Neben der Hypothese, dass es sich bei dem positiven Signal oberhalb von 650 nm aufgrund seiner verzögerten Bildung um eine ESA des Zwischenprodukts oder DEACM-OSO₃⁻ handelt, kommt die mögliche Bildung eines Triplett-Zustands aufgrund des Schweratomeffekts^[212] hinzu. Letztere ist durch eine breite positive Signatur gekennzeichnet. Eine Antwort hierauf gibt die Messung des Photolyseprodukts von thio-DEACM-OH. Hierzu wurde thio-DEACM-OH vorerst so lange der Bestrahlung mit 470 nm ausgesetzt, bis die entsprechende Absorptionsbande gänzlich verschwunden war. Anschließend wurde die Probe für die zeitaufgelöste UV/vis-Messung mit 350 nm angeregt. Abbildung 5.44 zeigt zwei positive und zwei negative Signale, die alle direkt zum Zeitnullpunkt vorhanden sind. Bei dem negativen Signal unterhalb von 400 nm handelt es sich um das GSB-Signal, das bis zum Ende des Messfensters erhalten bleibt und mit der PA Bande aus der thio-DEACM-OH Messung (Abb. 5.42 und Abb. 5.43) übereinstimmt. Eine SE erscheint als weiteres negatives Signal um 450 nm und ist nach 1700 ps ebenfalls noch nicht verschwunden.

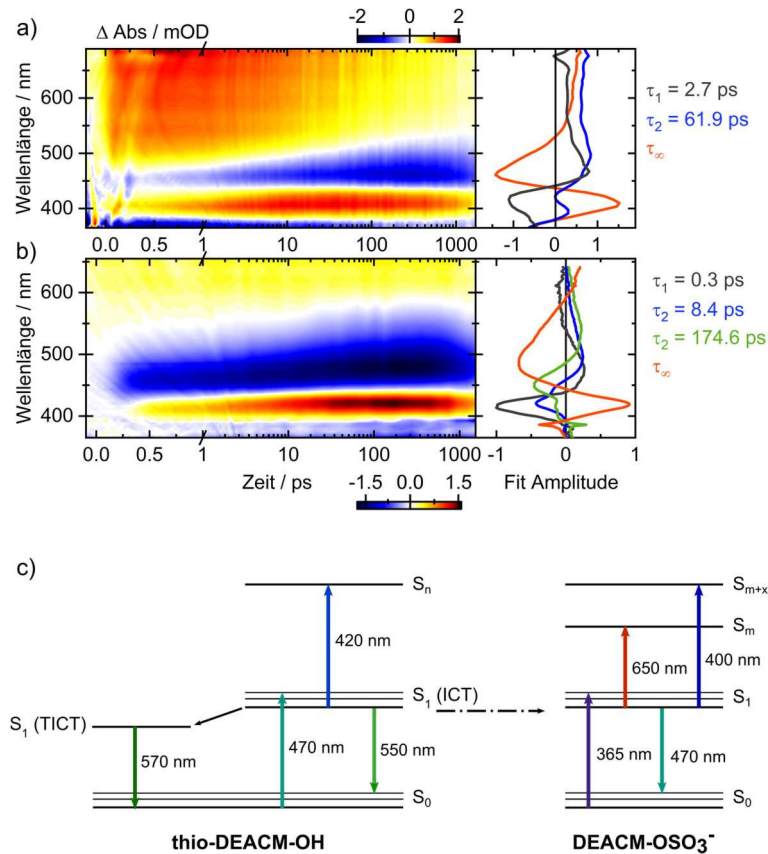


Abbildung 5.44: Zeitaufgelöste UV/vis-Absorptionsmessung von DEACM-OSO₃⁻ in 1:1 MeCN:H₂O mit einer Anregungswellenlänge von 350 nm (a) und DEACM-OH in 1:4 DMSO:H₂O mit Anregungswellenlänge von 388 nm (b) und den entsprechenden zerfallsassoziierten Spektren (rechts). Energieschema der elektronischen Übergänge von thio-DEACM-OH nach Anregung zum DEACM-OSO₃⁻ (c).

Im Zusammenhang mit der ESA₂ ab 470 nm kann das entsprechende Signal aus der thio-DEACM-OH Probe einer ESA des Photolyseprodukts DEACM-OSO₃⁻ zugeordnet werden. Folglich findet ein Übergang aus dem S₁ des thio-DEACM-OH in einen angeregten Zustand des DEACM-OSO₃⁻ statt, wodurch sich eine Reaktion auf einer Pikosekunden Zeitskala ergibt. Gegensätzlich zum GSB und ESA₂ scheinen SE und ESA₁ nicht direkt zum Zeitnullpunkt das Maximum erreicht zu haben, sondern intensivieren sich mit 2.7 ps. Während die beiden ESA und der GSB mit ca. 62 ps zerfallen, schiebt die SE mit der gleichen Zeitkonstanten bathochrom, was auch hier auf einen Übergang in den TICT-Zustand hindeutet. DEACM-OH schließlich weist ähnliche Signale auf wie das DEACM-OSO₃⁻, mit insgesamt leicht bathochrom verschobenen Signalen bei der DEACM-OH Probe. Zusätzlich unterscheiden sich die beiden zum einen in der stärker ausgeprägten

SE der DEACM-OH Messung, die sich von 430 nm bis 600 nm erstreckt und eine deutliche bathochrome Verschiebung innerhalb der 1.7 ns aufweist. Diese Verschiebung zeigt, dass von allen drei Verbindungen das DEACM-OH den stärksten TICT aufweist. Zum anderen ist die ESA₂ signifikant schwächer in der Intensität und erscheint deshalb spektral schmaler (> 550 nm). SE und ESA₁ intensivieren sich bis 200 ps. Dieses Phänomen inklusive der bathochromen Verschiebung der SE wird durch die ersten drei Zeitkonstanten beschrieben.

5.3.3 Thio-DEACM-nitro-Puromycin

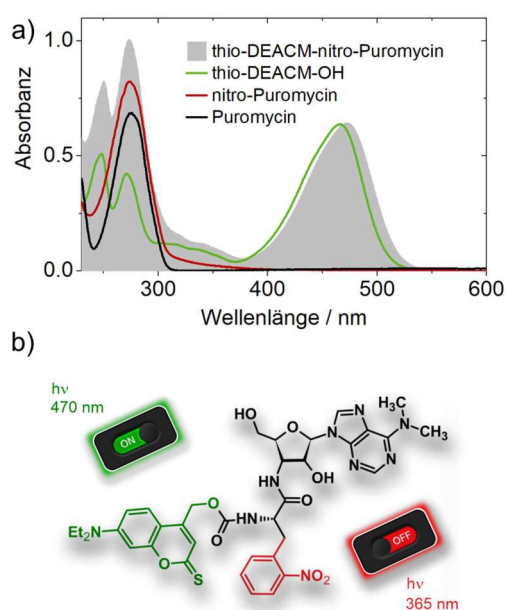


Abbildung 5.45: Absorptionsspektren von thio-DEACM-nitro-Puromycin und den einzelnen Fragmenten der Verbindung (a). Strukturformel des thio-DEACM-nitro-Puromycins (b).

In den vorherigen Kapiteln wurden die beiden verwendeten PPGs in Bezug auf ihre Kompatibilität für die Aktivierung und Deaktivierung des Antibiotikums ausgewählt und untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das nitro-Puromycin als auch die thio-DEACM Schutz-gruppe den Anforderungen (Kap. 5.3) gerecht werden. Nun gilt es, das doppelt geschützte Puromycin (Abb. 5.45b) als Ganzes zu betrachten und die Wellenlängenselektivität unter Beweis zu stellen. Hierzu wurde das thio-DEACM-nitro-Puromycin zunächst sukzessiv der Aktivierungs- und der Deaktivierungswellenlänge ausgesetzt, während die Pho-

toreaktionen sowohl im UV/vis- als auch im IR-Bereich untersucht wurden. Abbildung 5.45 zeigt, wie sich das Absorptionsspektrum des thio-DEACM-nitro-Puromycins aus den einzelnen Fragmenten zusammensetzt. Daraus wird ersichtlich, dass die Betrachtung der Photolyseschritte im UV/vis-Spektralbereich allein eine Zuordnung der Photoprodukte kaum möglich macht. Zusätzlich laufen, wie aus dem vorherigen Kapitel zu entnehmen ist, die Photolysen des thio-DEACM parallel zu dem Aktivierungs- und

Deaktivierungsschritt ab. Um die unterschiedlichen parallel ablaufenden Prozesse analysieren zu können, wurden unterschiedliche Methoden (UVvis-, IR-Spektroskopie und DFT-Rechnungen) eingesetzt.

Aktivierung

Das zweifach geschützte Puromycin ist in seiner biologischen Aktivität gehindert (Kap. 5.3). Der Schritt hin zur Inhibierung der Proteinbiosynthese wird hier als Aktivierung bezeichnet. Dabei wird durch das Entfernen der thio-DEACM-Schutzgruppe die Amino-Gruppe des Phenylalaninabschnitts freigelegt, wodurch das Antibiotikum die Fähigkeit wiedererlangt, im Ribosom an die naszierende Proteinkette zu binden (Kap. 3.2.1).

Bei der Bestrahlung des thio-DEACM-nitro-Puromycins mit der Aktivierungswellenlänge (λ_A) wird im UV/vis-Spektralbereich zunächst ein Verhalten beobachtet, welches der Photolyse der freistehenden Schutzgruppe thio-DEACM-OH gleicht (Differenzspektrum, Abb. 5.46). Allerdings wird abseits von der identischen Abnahme der 470 nm und der Bildung der 370 nm Absorptionsbande ein signifikanter Unterschied im Bereich unterhalb von 300 nm sichtbar (Abb. 5.46). Anders als bei der Photolyse von thio-DEACM-OH bleibt im Fall des doppelt geschützten Puromycins eine Bande bei 271 nm zurück, welche dem nitro-Puromycin zugeordnet werden kann. Mit Hilfe der Ergebnisse aus den thio-DEACM-OH Untersuchungen (Kap. 5.3.2) können die restlichen Absorptionsänderung als Nebenreaktion des Photoprodukts zum DEACM-OSO₃⁻ eingestuft werden. Welche Bindungsspaltung stattfindet und ob der Nebenpfad des thio-DEACM-OH die Effizienz der Aktivierungsreaktion behindert, kann mit FTIR-Daten beantwortet werden (Abb. 5.47a). Die entstehende positive Absorptionsbande bei 2337 cm⁻¹ während der Belichtung in Kombination mit der abnehmenden Carbonyl-Valenzschwingungsbande bei 1728 cm⁻¹ zeigt die Freisetzung von solubilisiertem CO₂ aus dem Carbamat-Linker.

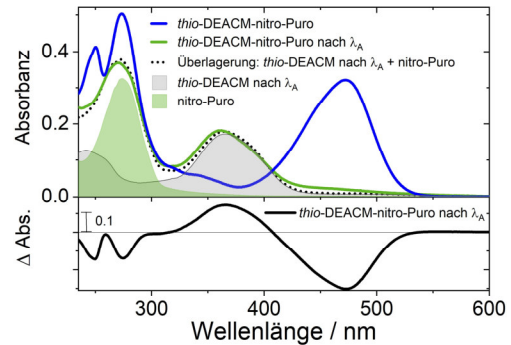


Abbildung 5.46: Absorptionsspektrum des thio-DEACM-nitro-Puromycins vor (blau) und nach der Belichtung (grüne Linie) mit λ_A , inklusive Differenzspektrum (schwarz). Rekonstruktion des Spektrums nach der Belichtung (graue Punkte) durch die Addition der Spektren von nitro-Puromycin (grüne Fläche) und dem mit λ_A belichteten thio-DEACM-OH (graue Fläche).

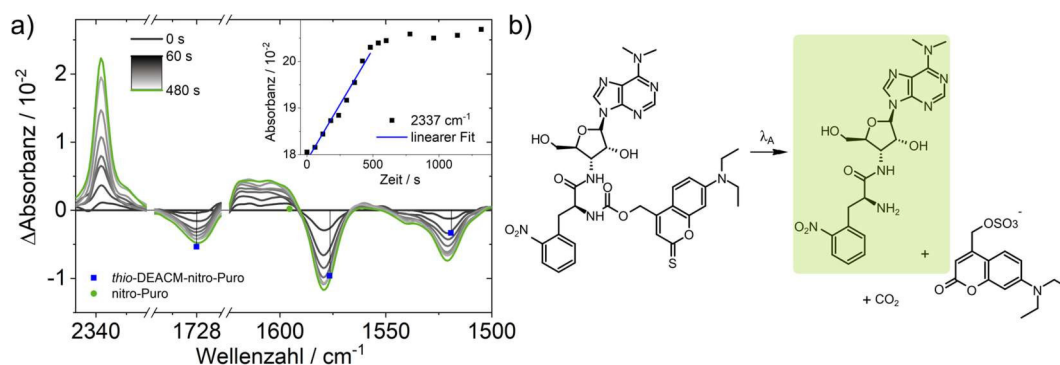


Abbildung 5.47: FTIR-Differenzspektren, gemessen alle 60 s in DMSO während der kontinuierlichen Belichtung von thio-DEACM-nitro-Puromycin mit λ_A (470 nm). DFT-berechnete Schwingungsmoden als Sticks von thio-DEACM-nitro-Puromycin (blaue Quadrate) und *o*-Nitro-Puromycin (grüner Kreis). Und der Bestimmung der Quantenausbeute durch lichtinduzierte Absorptionsänderungen, die die photoinduzierte Freisetzung von CO_2 bei Bestrahlung von thio-DEACM-nitro-Puromycin bei 2337 cm^{-1} mit einer Fitkurve durch die ersten 8 Datenpunkte (500 s Belichtung) (a). b) Reaktionsschema des Aktivierungsschritts unter Freisetzung von nitro-Puromycin und CO_2 (b).

Dem Reaktionsmechanismus zufolge sollte dies nur im letzten Schritt des Uncagings infolge einer Decarboxylierung geschehen (Kap. 3.1.2). Somit konnte die CO_2 -Bande zur Bestimmung der Uncaging-Quantenausbeute von 1,7% verwendet werden. In Kombination mit dem hohen Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{474 \text{ nm}} = 17464 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ergibt dies einen Uncagingquerschnitt von $\Phi \cdot \epsilon = 297 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Zwei weitere auffällige Absorptionsänderungen bei 1579 cm^{-1} und 1522 cm^{-1} können auf Ringschwingungen des Cumarins zurückgeführt werden, was dessen Photolyse bestätigt. Schließlich belegt die positive Bande bei ca. 1600 cm^{-1} die Freilegung der entscheidenden Amino-Gruppe des Antibiotikums, wodurch die Translationsinhibition der Proteinbiosynthese reaktiviert wird.

Deaktivierung

Für den Deaktivierungsschritt wurde die zuvor aktivierte Probe verwendet, um analysieren zu können, ob die vorliegenden Nebenprodukte des Aktivierungsschritts die Deaktivierung behindern würden. Bei der Belichtung mit 365 nm nimmt die Absorptionsbande um 370 nm, die während der Aktivierung gebildet wurde, kontinuierlich ab. Gleichzeitig erfährt die Bande im UV-Bereich eine bathochrome Verschiebung, was auf die Bildung eines Cinnolin-Produkts hinweist, wie es aus DFT-Berechnungen bekannt ist (Kap. 5.3.1). Ungeachtet der Tatsache, dass die thio-DEACM-Nebenprodukte bei der Deaktivierungswellenlänge (λ_D) absorbieren, zeigen die UV/vis-Experimente eindeutig, dass der Deaktivierungsschritt nicht inhibiert wird.

Der Vergleich der Uncaging-Quantenausbeuten beider Verbindungen ($\Phi_{\text{nitro-Puro/Cinnolin}} = 2,5\%$ und $\Phi_{\text{DEACM-OSO}_3^-/\text{DEACM-OH}} = 0,1\%$) zeigt, dass die Deaktivierung von nitro-Puromycin gegenüber der Photolyse von DEACM-OSO₃⁻ begünstigt wird. Das resultierende Absorptionsspektrum (Abb. 5.48a) kann durch additive Überlagerung der Einzelspektren nach Belichtung von nitro-Puromycin und dem Photolyseprodukt von thio-DEACM mit 365 nm rekonstruiert werden. Dies bestätigt auch die anschließende Nebenreaktion des thio-Cumarin-Photoprodukts. Bei der Deaktivierung bei 365 nm ändert sich die Struktur der Absorptionsbande, die nach dem Aktivierungsschritt entsteht und neben dem Absorptionsmaximum bei 365 nm eine Schulter bei 375 nm aufweist. Es bleibt nur eine Absorptionsbande in diesem Wellenlängenbereich übrig, die DEACM-OH zugeordnet wird. Zusätzlich kann die abnehmende Bande bei 1390 cm⁻¹ der Nitrofunktionalität zugeordnet werden, was einen erfolgreichen zweiten Uncagingschritt bestätigt (Abb. 5.48b). In Kombination mit dem Verlust der symmetrischen Streckschwingung der Amino-Gruppe bei 3516 cm⁻¹ bestätigen die IR-Differenzspektren die Deaktivierung der für Translationsinhibierung entscheidenden funktionellen Gruppe von Puromycin. Die Bildung des Zyklierungsprodukts kann durch die positiven Banden bei 1139 cm⁻¹ und 1165 cm⁻¹ verifiziert werden, die gemäß den mit DFT berechneten Moden den Schwingungen des Cinnolin-Anteils einschließlich der N=N-Doppelbindung zugeordnet werden können. Für den angenommenen Deaktivierungsmechanismus muss im letzten Schritt Wasser eliminiert werden. Auch dies wird durch die positive Absorptionsänderung bei 3569 cm⁻¹ bestätigt. Für den Fall, dass ein doppelt geschütztes Molekül zum Beispiel durch Diffusion außerhalb der RoI gelangt, muss es unter Belichtung mit λ_D deaktiviert werden. Die ausschließliche Abspaltung der Cumarin-Schutzgruppe würde das aktive nitro-Puromycin ergeben und wäre folglich für die biologische Anwendung ungünstig.

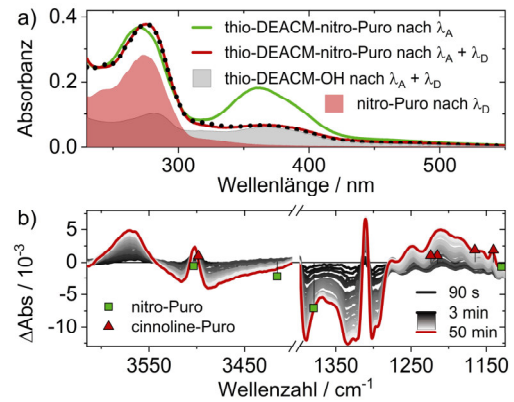


Abbildung 5.48: UV/vis-Spektren während der Deaktivierung. Ausgangsmaterial ist die aktivierte Probe einschließlich der Nebenprodukte (grüne Linie). Nach Belichtung bei 365 nm ergibt sich ein Spektrum (rote Linie), das durch Überlagerung (schwarz gestrichelte Linie) von belichtetem nitro-Puromycin (roter Bereich) und dem mit 365 nm belichteten thio-DEACM (grauer Bereich) rekonstruiert werden kann (a). Differenz-IR-Spektren während der Belichtung mit 365 nm von der zuvor aktivierten Probe. DFT-berechnete Schwingungsmoden als Sticks von nitro-Puromycin (grüne Quadrate) und Cinnolin-Puromycin (rote Dreiecke) (b).

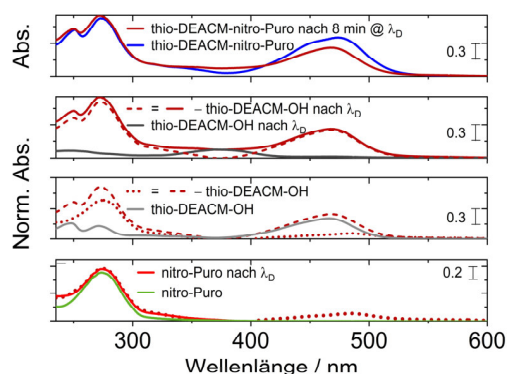


Abbildung 5.49: UV/vis-Absorptionsspektren von thio-DEACM-nitro-Puromycin vor (blau) und nach der Belichtung mit 365 nm (rot). Letzteres wird mehreren Subtraktionsschritten unterzogen, in denen alle bekannten anfallenden Photoprodukte (thio-DEACM-OH, DEACM-OSO₃⁻, DEACM-OH und nitro-Puromycin) subtrahiert werden.

Ein doppeltes Uncaging kann direkt bei 365 nm durchgeführt werden. Die Analyse der Absorptionsänderungen während der ersten acht Minuten zeigt, dass sowohl die Aktivierung als auch die Deaktivierung bis zu einem gewissen Grad gleichzeitig stattfinden. Dies lässt sich belegen, indem das Absorptionsspektrum isoliert vom Aktivierungsschritt und allen ablaufenden Nebenreaktionen betrachtet wird. Abbildung 5.49 zeigt, dass die Belichtung der Probe eine Abnahme der Absorptionsbande bei 470 nm hervorruft, begleitet von der Zunahme der Absorption um 370 nm. Beide Änderungen sind der Photolyse des Cumarins zuzuordnen, welche wie aus den bisherigen Ergebnissen bekannt, nur ausgehend vom thio-DEACM-OH stattfinden kann. Da die Verbindung erst nach erfolgreichem Uncaging vorliegt, kann hier zunächst davon ausgegangen werden, dass mit λ_D auch PPG 1 entfernt wird. Obwohl es sich dabei um den Aktivierungsschritt handelt, ist dies nur problematisch, wenn festgestellt werden würde, dass der zweite Uncagingschritt ausbleibt. Nach Subtraktion der Nebenprodukte der Cumarin-Schutzgruppe (thio-DEACM-OH, DEACM-OSO₃⁻ und DEACM-OH) (Abb. 5.49) stimmt das resultierende Absorptionsspektrum mit dem des zyklisierten nitro-Puromycins unterhalb von 400 nm überein. Die geringe Absorption bei ca. 480 nm ist der Subtraktion der Cumarin-Derivate geschuldet, die aufgrund der Komplexität der Nebenreaktion nicht exakt durchgeführt werden konnte. Zusätzlich zeigt der Vergleich mit dem Spektrum des reinen nitro-Puromycins die Zunahme im Bereich um 240 nm, welche mit Hilfe von DFT gerechneten Absorptionsspektren bereits dem Cinnolin-Puromycin zugeordnet werden konnte (Kap. 5.3.1).

Ein doppeltes Uncaging kann direkt bei 365 nm durchgeführt werden. Die Analyse der Absorptionsänderungen während der ersten acht Minuten zeigt, dass sowohl die Aktivierung als auch die Deaktivierung bis zu einem gewissen Grad gleichzeitig stattfinden. Dies lässt sich belegen, indem das Absorptionsspektrum isoliert vom Aktivierungsschritt und allen ablaufenden Nebenreaktionen betrachtet wird. Abbildung 5.49 zeigt, dass die Belichtung der Probe eine Abnahme der Absorptionsbande bei 470 nm hervorruft, begleitet von der Zunahme der Absorption um 370 nm. Beide Änderungen sind der Photolyse des Cumarins zuzuordnen, welche wie aus den bisherigen Ergebnissen bekannt, nur ausgehend vom thio-DEACM-OH stattfinden kann. Da die Verbindung erst nach erfolgreichem Uncaging vorliegt, kann hier zunächst davon ausgegangen werden, dass mit λ_D auch PPG 1 entfernt wird. Obwohl es sich dabei um den Aktivierungsschritt handelt, ist dies nur problematisch, wenn festgestellt werden würde, dass der zweite Uncagingschritt ausbleibt. Nach Subtraktion der Nebenprodukte der Cumarin-Schutzgruppe (thio-DEACM-OH, DEACM-OSO₃⁻ und DEACM-OH) (Abb. 5.49) stimmt das resultierende Absorptionsspektrum mit dem des zyklisierten nitro-Puromycins unterhalb von 400 nm überein. Die geringe Absorption bei ca. 480 nm ist der Subtraktion der Cumarin-Derivate geschuldet, die aufgrund der Komplexität der Nebenreaktion nicht exakt durchgeführt werden konnte. Zusätzlich zeigt der Vergleich mit dem Spektrum des reinen nitro-Puromycins die Zunahme im Bereich um 240 nm, welche mit Hilfe von DFT gerechneten Absorptionsspektren bereits dem Cinnolin-Puromycin zugeordnet werden konnte (Kap. 5.3.1).

Ultrakurzzeit-Messungen am thio-DEACM-nitro-Puromycin

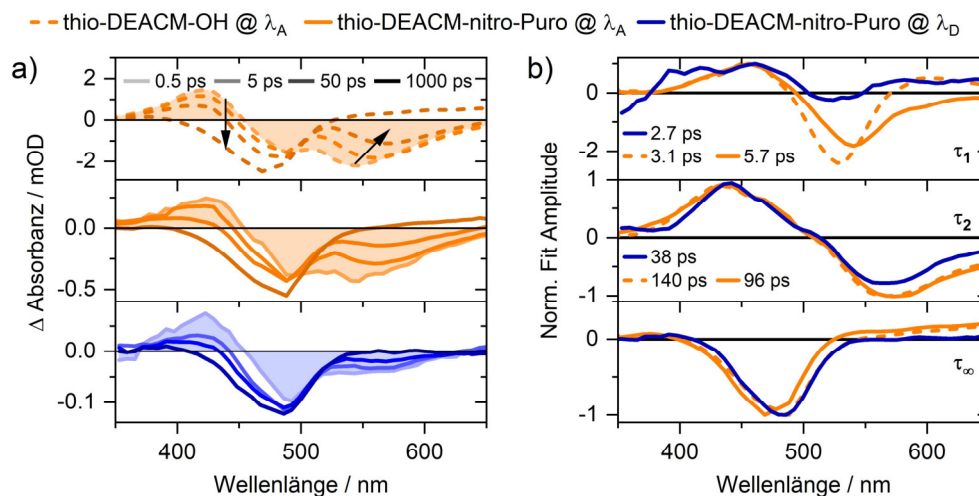


Abbildung 5.50: Zeitschnitte der transienten UV/vis-Messungen von thio-DEACM-OH (gestrichelte Linien) und thio-DEACM-nitro-Puromycin (durchgezogene Linien) in MeCN/H₂O bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen ($\lambda_A = 470$ nm und $\lambda_D = 315$ nm) (a) und den entsprechenden zerfallsassoziierte Spektren (b).

Das doppelt geschützte Puromycin zeigt nach Anregung mit 470 nm und 315 nm die gleichen Signale wie die einfache Schutzgruppe thio-DEACM-OH (Abb. 5.50a), folglich wird die Dynamik der gesamten Verbindung von der angeregten Schutzgruppe dominiert. Allerdings können Unterschiede in der SE zwischen den einzelnen Messungen ausgemacht werden. Zum einen nimmt die Intensität der SE im Verhältnis zum GSB bei der doppelt geschützten Verbindung ab, was insbesondere bei der 315 nm Anregung deutlich wird. Im Falle der 470 nm Anregung von thio-DEACM-nitro-Puromycin liegt diese Abnahme in den alternativen Relaxationspfaden, zu denen das Uncaging und die Rekombination des Ionenpaares zählen (Abb. 3.5), begründet. Bei der Anregung mit der Deaktivierungswellenlänge ist die wesentlich schwächere Intensität durch das zusätzliche Uncaging von PPG2 zu erklären, denn Fluoreszenz stellt auch immer einen Konkurrenzpfad zum Uncaging dar. Zudem wird eine bathochrome Verschiebung der SE deutlich, welche mit der Zeitkonstante τ_1 beschrieben wird (Abb. 5.50b) und für alle drei Messungen in derselben Größenordnung liegt. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass das Cumarin sowohl im freien als auch gebundenen Zustand einen TICT durchläuft, wobei anhand der τ_1 nicht festgestellt werden kann, ob das Uncaging- oder der TICT stattfindet.

Größere Unterschiede können den Zerfallszeiten τ_2 entnommen werden, anhand denen der Zerfall des S_1 -Zustands im Fall des thio-DEACM-nitro-Puromycin nach λ_A mit 96 ps schneller abläuft (Abb. 5.50b) als bei thio-DEACM-OH. Auf Grund der Tatsache, dass in

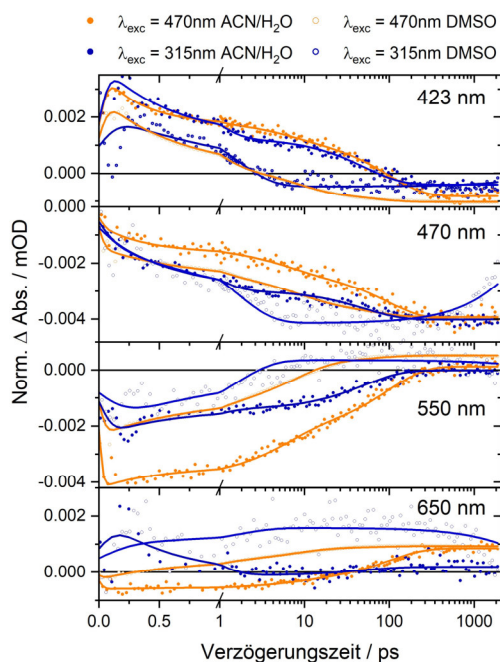


Abbildung 5.51: Ausgewählte Transienten der UV/vis-Messungen auf ultrakurzer Zeitskala von thio-DEACM-nitro-Puromycin in 1:1 MeCN:H₂O und DMSO.

beiden Fällen der Grundzustand nicht repopuliert wird, bestätigt dies bei der doppelt geschützten Verbindung einen zusätzlichen Pfad, welcher die Bindungsspaltung hin zum aktiven nitro-Puromycin ist. Bei der Anregung mit λ_D beschreibt τ_2 mit 38 ps ebenfalls den Zerfall des S_1 -Zustands, was durch die identische Struktur der Fit-Amplitude im Vergleich zu den beiden anderen deutlich wird. Die deutliche Verkürzung der Lebensdauer des angeregten Zustands könnte einerseits das Ergebnis einer Mischdynamik aus den Signalen beider PPGs sein, die aufgrund der breiten ESA des nitro-Puromycins in dem betrachteten Spektralbereich zu einer Kompensation der Signale des thio-

DEACM führt. Dies sollte sich jedoch lediglich auf die negativen Signale auswirken, während sich die Lebensdauer der ESA_1 bei 420 nm der doppelt geschützten Verbindung verlängern müsste. Ein anderer Grund könnte mit dem zusätzlichen Relaxationspfad zusammenhängen, welcher sich mit dem simultanen Uncaging der zweiten PPG ergibt und folglich sich die Lebensdauer des S_1 -Zustands verkürzt.

Im aprotischen Lösemittel DMSO finden alle Prozesse wesentlich schneller statt (Abb. 5.51), wie es auch für das thio-DEACM-OH zu beobachten war (Kap. 5.3.2). In der Literatur wird eine Beschleunigung der Dynamik in polaren protischen Lösemittel beschrieben, da durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zum DEACM-Gerüst die Ausbildung des TICT-Zustands unterstützt wird, was hier nicht der Fall zu sein scheint. In erster Linie kann davon ausgegangen werden, dass DMSO die Reaktion des thio-DEACM-OH aus dem angeregten Zustand hin zum DEACM-OSO₃⁻ beschleunigt, weil die Umorientierung zum TICT-Zustand nicht assistiert wird.

Auch nach vorausgegangener Abspaltung der ersten Schutzgruppe mit 470 nm ist die anschließend erfolgte Ultrakurzzeitmessung nach Anregung mit 315 nm zunächst von der Dynamik des Cumarins dominiert. Dabei entstehen zwei positive und zwei negative Signale, welche auch von ihrem zeitlichen Verhalten denen des freien DEACM-OSO₃⁻ sehr

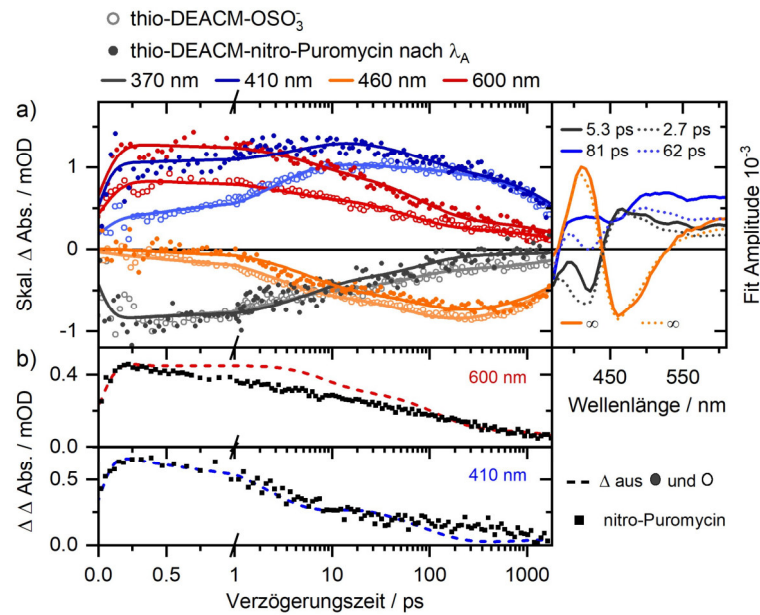


Abbildung 5.52: Ausgewählte Transienten von dem doppelt geschützten Puromycin nach dem Aktivierungsschritt bei 470 nm bei einer Anregungswellenlänge von 315 nm in MeCN/H₂O und den zerfallsassoziierten Spektren der Messung im Vergleich zur Messungen des reinen thio-DEACM-OSO₃⁻ (a). Differenzen aus thio-DEACM-nitro-Puromycin nach λ_A und dem reinen thio-DEACM-OSO₃⁻ der beiden positiven Transienten verglichen mit den Transienten von nitro-Puromycin (b).

ähneln (Abb. 5.52). Wie anhand der stationären UV/vis- und IR-Daten ermittelt werden konnte, findet während des Deaktivierungsschritts ebenfalls eine Reaktion des abgespaltenen Cumarins als Nebenreaktion statt. Die lässt sich anhand der transienten Absorptionsmessung im Vergleich zu dem reinen thio-DEACM-OH nach Belichtung mit λ_A erkennen. Durch das Skalieren beider Messungen anhand des Maximums der GSB-Signale, können die anderen drei Signale der beiden Verbindungen verglichen werden. Auf den ersten Blick fällt auf, dass die SE bei 460 nm im Fall des geschützten Puromycins nur geringfügig schwächer ist, während die anderen beiden positiven Signale bei 410 nm und 600 nm wesentlich intensiver sind. Auch das GSB scheint ab 10 ps schneller zu repopulieren. Angenommen wird hierbei, dass die Dynamik des vorliegenden nitro-Puromycins darunterliegt, welches die negativen Signale abschwächt und die positiven intensiviert. Nach Abzug der Signale der reinen Schutzgruppe (thio-DEACM-OSO₃⁻) bestätigt sich diese Annahme. Für alle drei Transienten bleiben positive Beiträge übrig, die mit den beiden ESAs der reinen nitro-Puromycin-Messung (Kap. 5.3.1) übereinstimmen. Zusätzlich legt der Vergleich mit den entsprechenden Transienten der nitro-Puromycin Messung nahe, dass auch die Lebensdauern sich gleichen. Die beiden bathochromen Transienten

weisen einen Zerfall um ca. 10 ps auf und erreichen bis zum Ende des Messfensters gänzlich die Null, während das 410 nm-Signal Unterschiede aufweist. Allerdings zeigt es tendenziell die geringste Abnahme im zeitlichen Verlauf bis 1.9 ns, was wiederum den beobachteten Intermediatsbanden des nitro-Puromycins zugeordnet werden kann. Die drei benötigten Zeitkonstanten für den Fit der Messung sind spektral denen der thio-DEACM-OSO₃⁻ nahezu identisch, da die Dynamik vom Cumarin dominiert wird, wohingegen die darunterliegenden Signale des nitro-Puromycins deutlich schwächer sind. Zum einen sind die Zeiten der geschützten Verbindung größer, folglich sind die Prozesse langsamer. Dies verdeutlicht die vorliegende Mischdynamik der beiden Verbindungen. Zum anderen fällt auf, dass vor allem τ_1 und τ_2 unterhalb von 470 nm bathochrom verschoben zu den entsprechenden Konstanten der freien Schutzgruppe liegen. Grund dafür ist auch hier die ESA₂ des nitro-Puromycins, welche durch die Verstärkung der positiven und Abschwächung der negativen Signale zu einer scheinbaren spektralen Verschiebung führt.

Reversible Inhibierung der Proteinbiosynthese von sGFP

Aus den vorherigen Kapiteln geht hervor, dass sowohl im Zuge der sukzessiven Aktivierung und Deaktivierung des Puromycin-Derivats, als auch durch die direkte Deaktivierung die erforderlichen Photoprodukte erfolgreich generiert werden. Konkret entstehen während der einzelnen Belichtungsschritte die Photoprodukte, bei denen die ausschlaggebende Amino-Gruppe entweder frei vorliegt oder blockiert ist. Im Falle des geschützten Derivats nitro-Puromycin konnte die Inhibierung der Proteinbiosynthese bereits in Kapitel 5.3.1 belegt werden. Nun gilt es, das vorgestellte System bezüglich der Inhibierungsfähigkeit der Translation zu testen. Dabei sollte einerseits abschließend geklärt werden, ob und wie sich die, aus den spektroskopischen Untersuchungen bekannten, entstehenden Nebenprodukte auf die biologische Anwendung auswirken. Andererseits ist zu prüfen, ob das Cinnolin-Puromycin tatsächlich nicht mehr in der Lage ist die Proteinbiosynthese zu inhibieren.

Die Analyse erfolgte mittels zellfreier sGFP Translation (Kap. 5.3.1). Die sGFP Kontrolle zeigt, dass die Expression im unbehandelten System bei 100% liegt (Abb. 5.53a). Folglich kann die Biosynthese des sGFPs unbeeinträchtigt ablaufen. Durch Zugabe des mit λ_A belichteten thio-DEACM-nitro-Puromycins sinkt die sGFP Expression auf unterhalb 30%, was für die erfolgreiche Inhibierung der Proteinbiosynthese spricht. Die Zugabe der mit

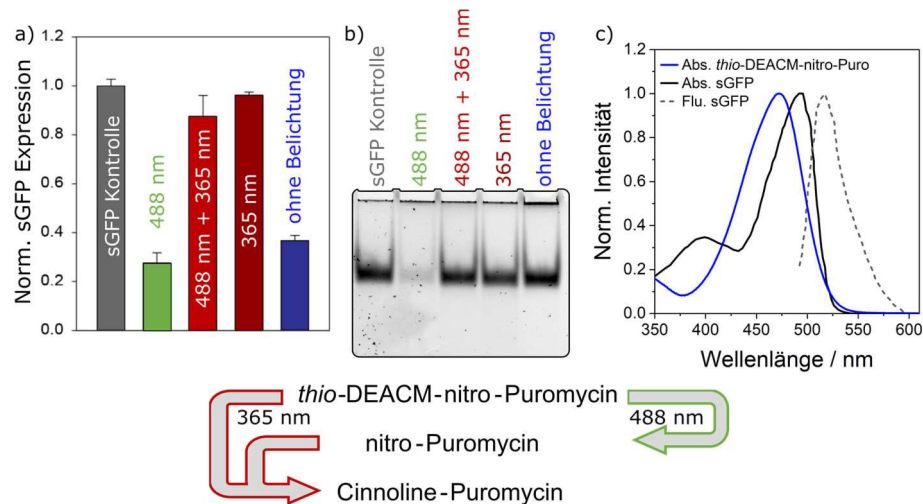


Abbildung 5.53: Inhibierung der sGFP-Expression nach der Zugabe von thio-DEACM-nitro-Puromycin und der Belichtung mit 488 nm, 488 nm und anschließend 365 nm und direkt 365 nm im Vergleich zur Kontrolle mit reinem sGFP: a) Indikation durch Fluoreszenz und b) über native PAGE Analyse. c) Überlapp der Absorptionsbanden und Fluoreszenzbanden von thio-DEACM-nitro-Puromycin und sGFP. Die Messungen wurden von Jasleen Kaur Bains durchgeführt.

λ_A und λ_D belichteten Probe hingegen weist keinen signifikanten Verlust der sGFP Expression auf. Auch die direkte Belichtung mit λ_D zeigt eine nahezu 100%ige sGFP Expression. Somit ist belegt, dass sowohl der sukzessive als auch der direkte Deaktivierungsweg das gewünschte Cinnolin-Puromycin generieren, welches nicht mehr in der Lage ist die Proteinbiosynthese zu inhibieren.

Bei der unbelichteten Probe, zeigt sich allerdings ebenfalls eine starke Senkung der sGFP Expression. Dies sollte nicht der Fall sein, da es sich bei der unbelichteten Probe um das inaktive, doppelt geschützte thio-DEACM-nitro-Puromycin handelt. Hierzu muss die Methode zum Auslesen der sGFP Expression genauer betrachtet werden. Das sogenannte grün fluoreszierende Protein hat eine Absorptionsbande mit einem Maximum bei 490 nm (Abb. 5.53c), welche stark mit der des Cumarin-Anteils im thio-DEACM-nitro-Puromycin überlagert. Im Zuge der Anregung des sGFPs ist eine Abspaltung der thio-DEACM-Schutzgruppe und somit die Aktivierung des Puromycins unumgänglich. Aus diesem Grund wurde eine Gelelektrophorese mittels nativer PAGE durchgeführt (Abb. 5.53b). Dieser ist zu entnehmen, dass in Anwesenheit der unbelichteten Probe die sGFP Bande genauso, wie in den beiden Deaktivierungsfällen und der Kontrolle, vorhanden ist. Lediglich bei der zuvor aktivierten Probe ist keine sGFP Bande zu erkennen, folglich ist die Proteinbiosynthese inhibiert.

Mit Hilfe der Erkenntnisse aus den spektroskopischen Untersuchungen und den DFT-gerechneten Spektren konnten die identifizierten Photoprodukte der beiden Belichtungsschritte bezüglich ihrer biologischen Aktivität getestet werden. Dabei zeigt sich, dass der Aktivierungsschritt trotz der entstehenden Photoprodukte das nitro-Puromycin generiert, welches die Proteinbiosynthese inhibiert. Weiterhin erfolgt aus der anschließenden Deaktivierung, sowie aus der direkten Deaktivierung, das Cinnolin-Puromycin, das in seiner biologischen Aktivität gehindert ist.

Zusammenfassung

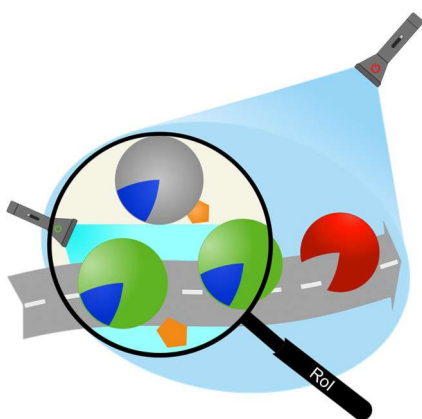


Abbildung 5.54: Bildliche Darstellung einer räumlich kontrollierten Aktivität eines Biomoleküls innerhalb und außerhalb einer Rol durch zwei verschiedene Belichtungsmasken mit entsprechenden Wellenlängen.

Bei der Umsetzung des wellenlängenselektiven Uncaging eines doppelt geschützten Puromycin^[213] (Abb. 5.54) wurden verschiedene Zwischenschritte abgearbeitet. Zum einen musste eine geeignete Schutzgruppe gefunden werden, bei der im gebundenen Zustand das Puromycin seine inhibierende Wirkung auf die Proteinbiosynthese beibehält. Dabei erwies sich die Verwendung des Benzylrings im Phenylalanin-Abschnitts als ideal. Durch minimale Veränderung konnte in die Grundstruktur des Puromycins eine oNB Schutzgruppe integriert werden, die allerdings einen anderen Reaktionsmechanismus vorweist als es für die PPG-Klasse normalerweise der Fall ist. Über einen photoinduzierten Ringschluss der Schutzgruppe wird die funktionelle Gruppe des Antibiotikums blockiert.

Über einen photoinduzierten Ringschluss der Schutzgruppe wird die funktionelle Gruppe des Antibiotikums blockiert.

Während das Photoprodukt durch spektroskopische Methoden belegt werden konnte, erfolgte der Nachweis über die biologische Aktivität des neuen Puromycin-Derivats (nitro-Puromycin) vor und nach der Belichtung durch die sGFP-Expression. Dabei wird die Expression von sGFP durch das nitro-Puromycin inhibiert, jedoch nicht von dessen Photoprodukt nach entsprechender Bestrahlung mit der Deaktivierungswellenlänge.

Die Wahl der zweiten Schutzgruppe fiel nach einer ausführlichen Rasterung unterschiedlicher Cumarin-basierter PPGs auf das thio-DEACM, welches sich zum einen durch das bathochrom verschobene Absorptionsmaximum bei 470 nm und zum anderen durch

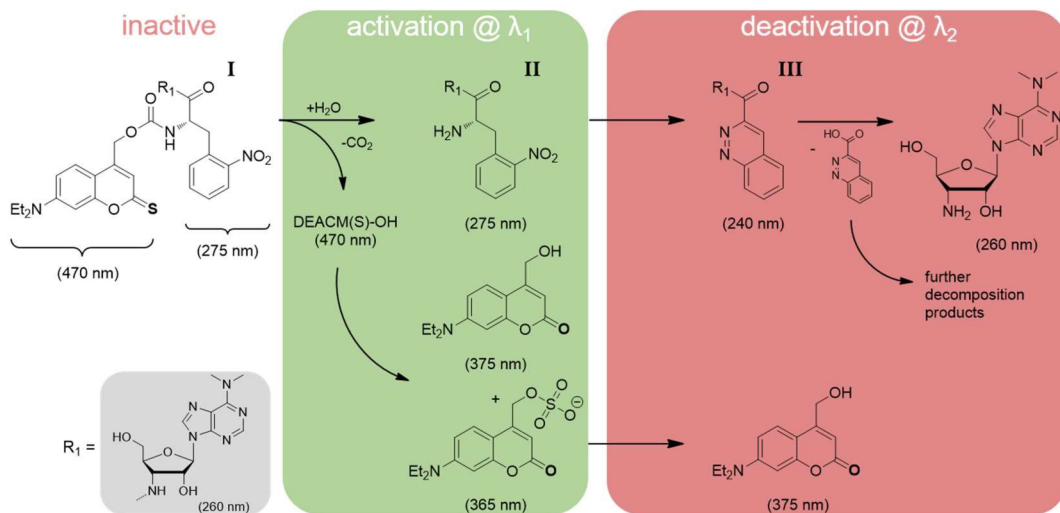


Abbildung 5.55: Zusammenfassung des Reaktionsablaufs ausgehend vom biologisch inaktiven thio-DEACM-nitro-Puromycin hin zum nitro-Puromycin und dem thio-DEACM-OH als unmittelbarem Nebenprodukt nach Belichtung mit der Aktivierungswellenlänge λ_A . Ausgehend von der Aktivierung kann durch λ_D die Zyklisierung des nitro-Puromycins zum Cinnolin-Produkt initiiert werden, deren Folgereaktion eine Zersetzung unter Abspaltung der Adenosin-Einheit ist. Zusätzlich ist die Nebenreaktion der ersten Schutzgruppe während der beiden Belichtungsschritte zum DEACM-OSO₃⁻ und DEACM-OH dargestellt.

eine Absorptionslücke im Spektralbereich auszeichnet, welche die Adressierung der ersten PPG ermöglicht.

Bei dem thio-DEACM-nitro-Puromycin konnte sowohl die biologische Inaktivität hinsichtlich der Inhibierung der Proteinbiosynthese als auch eine selektive Aktivierung infolge der Abspaltung des Cumarin-Cage mit 470 nm belegt werden. Das freigesetzte nitro-Puromycin kann zu einem beliebigen Zeitpunkt in einer nachgeschalteten Deaktivierung der photoinduzierten Zyklisierungsreaktion unterzogen werden. Die simultan ablaufenden Nebenreaktionen des Cumarin-Derivats wurden untersucht, die entstehenden Zwischenprodukte identifiziert (Abb. 5.55) und als potentielle Konkurrenzpfade zur Freisetzungsausreaktion ausgeschlossen.

Da die Anwendung von Antibiotika vor allem in biologischen Umgebungen stattfindet und diese beispielsweise durch Diffusionsprozesse dynamische Systeme darstellen, muss für den Fall, dass das doppelt geschützte Molekül die RoI verlässt, die Deaktivierung gewährleistet werden. Hierzu müssten unter der Deaktivierungswellenlänge beide Schutzgruppen adressierbar sein. Zum einen konnte durch eine Untersuchung auf ultrakurzer Zeitskala von thio-DEACM-nitro-Puromycin die simultane Anregung beider Schutzgruppen durch die Deaktivierungswellenlänge gezeigt und zum anderen durch statische

Absorptionsspektren die entsprechenden Photoprodukte identifiziert werden, die eine Deaktivierung belegen.

Im Vergleich zu den von Jörg Kohl-Landgraf und Lisa-Marie Herzig etablierten Modellen NVOG-Puromycin mit 1.3% und DEACM-Puromycin mit 2.1% sind die in dieser Arbeit erreichten Quantenausbeuten von 1.7% für die Aktivierung und 2.5% für die Deaktivierung des Puromycins durchaus angemessene Werte. Vor allem angesichts der erfolgreichen bathochromen Verschiebung der Anregungswellenlängen neben der deutlichen Weiterentwicklung des Systems für die biologische Anwendung durch die selektive An- /Aus - Kontrolle (Kontrolle über Aktivierung und Deaktivierung) stellt dies einen deutlichen Mehrwert dar.

6 Zusammenfassung

Die Verwendung von photolabilen Schutzgruppen zur nicht-invasiven Kontrolle von Systemen birgt ein großes Potential für verschiedenste Anwendungsgebiete, die von der Erforschung und Regulation biologischer Prozesse, über den Einsatz in medizinischer Therapie bis hin zur Verwendung als molekulare Datenspeicher reichen. Für diese Umsetzung benötigt es allerdings eine breite Auswahl an entsprechenden PPGs und das Wissen über ihre Reaktionsmechanismen. Im Allgemeinen lässt sich die Konzeptionierung von PPGs in drei Prozesse einteilen, beginnend bei dem Design und der Synthese einer neuen PPG. Bei diesem Schritt liegt der Fokus auf ein oder zwei besonderen Eigenschaften, wie beispielsweise einer Absorptionswellenlänge in einem bestimmten Spektralbereich oder einer hohen Uncaging-Quantenausbeute. Im zweiten Schritt folgt die Untersuchung der PPG bezüglich spektroskopischer und mechanistischer Eigenschaften und ggf. anschließender Optimierung auf synthetischer Ebene. Die so gewonnenen Informationen sind dann hilfreich bei dem letzten Schritt, bei dem es um den Einsatz der PPG in einem entsprechenden System geht. Hierbei müssen die verwendeten PPGs genau auf das Zielsystem abgestimmt sein, dazu zählen verschiedenste Parameter wie Anregungswellenlänge, Extinktionskoeffizient, Art und Struktur der Photoprodukte sowie Uncaging-Effizienz und Geschwindigkeit.

In der vorliegenden Arbeit wurde über die drei vorgestellten Projekte mittels spektroskopischer Methoden zu allen drei genannten Stadien zur Konzeptionierung von PPGs ein Beitrag geleistet. Dazu zählt die Entwicklung der CBT-basierten PPGs, die Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung von (DMA)₂F-PPGs und die Etablierung einer wellenlängenselektiven An-/Aus-Funktionalität eines Antibiotikums. In enger interdisziplinärer Zusammenarbeit zwischen theoretischen, synthetischen und biologischen Teilgebieten konnte jedes Projekt innerhalb der jeweiligen Entwicklungsstufe erfolgreich abgeschlossen werden.

Mithilfe des relativ neuen Ansatzes, bei dem durch quantenmechanische Berechnungen der vertikalen Anregungsenergie von der kationischen Spezies einer PPG-Grundstruktur eine Aussage über ihre Qualität postuliert werden kann, konnte ausgehend von der Fluoren-Grundstruktur eine neue Klasse von PPGs gefunden werden. Dabei erwies sich die

CBT-Struktur mit den Schwefelatomen an der para-Position als besonders geeignet. Insbesondere konnte die Grundstruktur durch die (OMePh)₂-Substitution, welche in einer signifikanten bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums resultierte, optimiert werden. Die Untersuchung der Ultrakurzzeit-Dynamik beider *p*-CBT Strukturen gab Aufschluss über die unterschiedlichen photochemischen Eigenschaften als PPG.

Für die Stoffklasse der Dimethylamino-Fluorene wurde ein wichtiger Unterschied zwischen den einfach- und zweifach-substituierten Derivaten aufgedeckt, der entscheidend für einen signifikanten Uncaging-Effizienzunterschied ist. Dabei stellt sich die Stabilität des symmetrisch-substituierten Fluorenyl-Kations als der wichtigste Faktor bezüglich der Uncaging-Quantenausbeuten heraus. Beide Schutzgruppen sind in der Lage photoinduziert eine AG freizusetzen, wobei der Reaktionsmechanismus über die kationische Spezies (DMA)₂F⁺ abläuft. Der Unterschied hierbei liegt in der Lebensdauer der beiden Kationen, die im Falle der symmetrischen PPG stark lösungsmittelabhängig ist und bis zu mehreren Stunden betragen kann, was bis dato das langlebigste Kation dieser Molekülklasse darstellt. Für die zukünftige Optimierung dieser PPG-Klasse ist die Erkenntnis über die Gründe für die Stabilität des Kations von großem Vorteil. Der stabilisierende Faktor ist zum einen die zweite Dimethylamino-Gruppe der symmetrischen Verbindung, welche durch die Erweiterung der Mesomerie zur besseren Verteilung der positiven Ladung im Molekül führt. Zum anderen spielt das Lösungsmittel eine entscheidende Rolle. Dabei bieten protische, polare Medien eine zusätzliche Stabilisierung, die notwendig für die Langlebigkeit des Kations ist. Die Lebensdauer des Kations war zudem durch eine zweite Bestrahlungswellenlänge kontrollierbar. Ausgehend vom Kation konnte eine reversible Nebenreaktion in protischen Lösungsmitteln identifiziert werden, die einen Austausch der AG durch das Lösungsmittel darstellt.

Zusätzlich konnte die kleine Stoffklasse der bisher bekannten Photobasen durch die Verbindung (DMA)₂F-OH erweitert werden. Genauer betrachtet handelt es sich dabei um eine photoinduzierte Hydroxidfreisetzung, wodurch je nach eingesetzter Konzentration ein pH-Sprung von bis zu drei Einheiten erreicht werden konnte. Dabei stellt sich die Lebensdauer des pH-Sprungs als ein entscheidender Parameter für Photobasen dar, welcher sich für die hier untersuchte Verbindung aufgrund der besonderen Stabilität des entsprechenden Kations, im Vergleich zu einigen der bereits bekannten Verbindungen, als besonders langlebig herausgestellt hat. Ein weiterer Vorteil des Einsatzes von (DMA)₂F-OH als Photobase ist die Möglichkeit den pH-Sprung durch zwei verschiedene

Wellenlängen sowohl zeitlich als auch örtlich zu kontrollieren, indem die Verbindung zwischen den zwei Spezies $(DMA)_2F-OH$ und $(DMA)_2F^+$ geschaltet werden kann.

Im Hinblick auf die Anwendungen von PPGs zur verbesserten zeitlichen und örtlichen Kontrolle biologischer Zielsysteme ist im Rahmen dieser Arbeit das Prinzip vom wellenlängenselektiven Uncaging zweier PPGs an einem Molekül (*two-PPG-one-molecule*, TPOM) etabliert worden. Das Zielmolekül war hier das Antibiotikum Puromycin, welches durch seine Fähigkeit an das Ribosom zu binden, die Proteinbiosynthese inhibieren kann. Dabei wurden zwei verschiedene PPGs gefunden, die sowohl aufeinander als auch auf das Biomolekül selbst abgestimmt sind. Im Ausgangszustand sind beide PPGs am Puromycin angebracht, wodurch es in seiner biologischen Wirkung inaktiv ist. Befindet sich das doppelt geschützte Puromycin in der ROI, so kann es durch die Bestrahlung mit einer bestimmten Wellenlänge infolge des ersten Uncaging-Schritts aktiviert werden. Da biologische Systeme nicht statisch sind, können aktivierte Moleküle stets von der gewünschten ROI nach außen gelangen, wodurch der Anspruch der räumlichen Kontrolle nicht erfüllt wird. In diesem Fall kann durch die TPOM-Umsetzung die zweite Bestrahlungswellenlänge auf den entsprechenden Bereich angewendet werden, wodurch das Uncaging der zweiten PPG initiiert und folglich das Puromycin deaktiviert wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Deaktivierungswellenlänge auch in der Lage ist beide PPGs zu entfernen, wodurch eine vollständige Inaktivierung des Puromycins außerhalb der ROI garantiert werden kann.

Ist die Proteinbiosynthese längerfristig blockiert, führt das schließlich zum Zelltod. Ein großes Anwendungsgebiet dieses Antibiotikums sind die Neurowissenschaften. Aufgrund der Tatsache, dass Puromycin keine Unterscheidung zwischen eukaryotischen und prokaryotischen Zellen macht, findet es keine Anwendung in der Medizin. Eine zeitliche und örtliche Kontrolle seiner Wirkung könnte den Anwendungsbereich dieses Antibiotikums evtl. ausweiten. Das wohl naheliegendste wäre der Einsatz bei Tumorzellen, deren Behandlung durch Zytostatika auf den gesamten Körper wirken und dadurch viele schwere Nebenwirkungen verursachen.

Wie bereits weiter oben beschrieben muss für jedes Biomolekül und das entsprechende Wirkzentrum die Auswahl des passenden PPG-Paares einzeln abgestimmt werden. Dennoch lässt sich anhand des hier etablierten Systems ein Konzept für die erfolgreiche Umsetzung zukünftiger TPOM-Systeme an anderen biomolekularen Wirkstoffen zusammenfassend formulieren.

- Der erste Schritt sollte die Betrachtung des Wirkzentrums des zu modifizierenden Biomoleküls sein: Welche funktionelle Gruppe bzw. Gruppen sind entscheidend für die Bindetasche oder -stelle? Dieser Bereich des Biomoleküls soll im Zuge des Uncagings entweder blockiert oder abgespalten werden. In der unmittelbaren Nähe muss die PPG1 angebracht werden.
- Bei der Wahl von PPG1 ist das wichtigste Kriterium, dass das Biomolekül mit enthaltener Schutzgruppe in seiner Wirkung unbeeinträchtigt bleibt. Dies schränkt die Auswahl beträchtlich ein. Eine mögliche Umsetzung wäre die Anbringung einer Nitro-Gruppe falls vorhanden an einen Benzolring, welcher sich im Fall eines großen Biomoleküls in der Nähe der wichtigen funktionellen Stelle befindet.
- Die zweite PPG (PPG2), deren photoinduzierte Abspaltung zur Aktivierung des Wirkstoffs führen soll, kann strukturell frei gewählt werden. Das Auswahlkriterium hierbei ist das Absorptionsspektrum. Hierbei sollte das Absorptionsmaximum rotverschoben zur PPG1 sein, um eine unerwünschte Abspaltung zu vermeiden. Außerdem darf keine signifikante Absorption von PPG2 bei der Uncaging-Wellenlänge von PPG1 vorhanden sein.
- Beide PPGs sollten eine ähnliche Uncaging-Quantenausbeute vorweisen, um im Deaktivierungsschritt der doppelt geschützten Verbindung durch das höher energetische Licht keine Bevorzugung einer einzelnen Schutzgruppe zu riskieren.

Anhand der erarbeiteten Herangehensweise können weitere Wirkstoffe oder Biomoleküle hin zu einer An- / Aus-Funktionalität modifiziert werden. Mit der Umsetzung des TPOM-Konzepts kann eine Verbesserung der örtlichen und zeitlichen Kontrolle der Aktivität eines Antibiotikums erreicht werden. Für die Anwendung in biologischer Umgebung ist diese präzise Kontrolle essentiell, um unerwünschte Nebenwirkungen an gesundem Gewebe zu verhindern.

Literaturverzeichnis

- [1] U. K. Zettl, M. Hecker, O. Aktas, T. Wagner, P. S. Rommer, *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2018**, *14*, 137–153.
- [2] R. Ullah, T. J. Park, X. Huang, M. O. Kim, *Ageing Res. Rev.* **2021**, *71*, 101451.
- [3] N. Aloufi, A. Alluli, D. H. Eidelman, C. J. Baglole, N. ; Aloufi, A. ; Alluli, D. H. ; Eidelman, C. J. Baglole, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11963.
- [4] G. 1945- Fuchs, H. G. 1924-2013 Schlegel, T. 1961- Eitingen, *Allgemeine Mikrobiologie*, Thieme Verlag, Stuttgart, **2007**.
- [5] J. Barber, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 185–196.
- [6] E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, K. Deisseroth, *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 1263–1268.
- [7] K. Deisseroth, G. Feng, A. K. Majewska, G. Miesenböck, A. Ting, M. J. Schnitzer, *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 10380–10386.
- [8] L. Fenno, O. Yizhar, K. Deisseroth, *Annu. Rev. Neurosci.* **2011**, *34*, 389–412.
- [9] R. Chen, F. Gore, Q. A. Nguyen, C. Ramakrishnan, S. Patel, S. H. Kim, M. Raffiee, Y. S. Kim, B. Hsueh, E. Krook-Magnusson, I. Soltesz, K. Deisseroth, *Nat. Biotechnol.* **2021**, *39*, 161–164.
- [10] C. K. Kim, A. Adhikari, K. Deisseroth, *Nat. Rev. Neurosci.* **2017**, *18*, 222–235.
- [11] E. A. Ferenczi, J. Vierock, K. Atsuta-Tsunoda, S. P. Tsunoda, C. Ramakrishnan, C. Gorini, K. Thompson, S. Y. Lee, A. Berndt, C. Perry, S. Minniberger, A. Vogt, J. Mattis, R. Prakash, S. Delp, K. Deisseroth, P. Hegemann, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–20.
- [12] J. A. Cardin, M. Carlén, K. Meletis, U. Knoblich, F. Zhang, K. Deisseroth, L. H. Tsai, C. I. Moore, *Nature* **2009**, *459*, 663–667.
- [13] A. V. Kravitz, B. S. Freeze, P. R. L. Parker, K. Kay, M. T. Thwin, K. Deisseroth, A. C. Kreitzer, *Nature* **2010**, *466*, 622–626.
- [14] H. C. Tsai, F. Zhang, A. Adamantidis, G. D. Stuber, A. Bond, L. De Lecea, K. Deisseroth, *Science* **2009**, *324*, 1080–1084.
- [15] M. M. Lerch, M. J. Hansen, G. M. van Dam, W. Szymanski, B. L. Feringa,

- Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, *55*, 10978–10999.
- [16] K. Hüll, J. Morstein, D. Trauner, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 10710–10747.
- [17] J. Broichhagen, J. A. Frank, D. Trauner, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1947–1960.
- [18] P. Sarma, B. Medhi, *Indian J. Pharmacol.* **2017**, *49*, 221–222.
- [19] M. Sharma, S. H. Friedman, *ChemPhotoChem* **2021**, *5*, 611–618.
- [20] J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Järvinen, J. Savolainen, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 255–270.
- [21] M. J. Fuchter, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 11436–11447.
- [22] N. Hoffmann, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1052–1103.
- [23] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476.
- [24] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119–191.
- [25] A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 441–458.
- [26] G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619–628.
- [27] D. Cambié, T. Noël, *Top. Curr. Chem.* **2018**, *376*, 45.
- [28] O. Laporte, W. F. Meggers, *J. Opt. Soc. Am.* **1925**, *11*, 459–463.
- [29] J. Franck, E. G. Dymond, *Trans. Faraday Soc.* **1926**, *21*, 536–542.
- [30] E. Condon, *Phys. Rev.* **1926**, *28*, 1182–1201.
- [31] E. U. Condon, *Phys. Rev.* **1928**, *32*, 858.
- [32] A. Jabłoński, *Nature* **1933**, *131*, 839–840.
- [33] A. Beer, *Ann. Phys.* **1852**, *162*, 78–88.
- [34] W. Heisenberg, *Zeitschrift für Phys.* **1927**, *43*, 172–198.
- [35] C. Doppler, *Ueber Das Farbige Licht Der Doppelsterne Und Einiger Anderer Gestirne Des Himmels*, **1848**.
- [36] M. Kasha, *Discuss. Faraday Society* **1950**, *9*, 14–19.
- [37] A. Fadini, M. Schnepel, *Schwingungsspektroskopie: Methoden – Anwendungen*, Wiley, **1985**.
- [38] S. E. W. Norman B. Colthup, Lawrence H. Daly, *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, Elsevier Science, **1990**.
- [39] B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals And Applications*, Wiley, **2004**.

- [40] J. Bredenbeck, *Nachr. Chem.* **2006**, *54*, 104–108.
- [41] C. Lauterwasser, P. Hamm, W. Zinth, *Opt. Lett. Vol. 18, Issue 22, pp. 1943-1945* **1993**, *18*, 1943–1945.
- [42] P. I. Haris, D. Chapman, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 328–333.
- [43] W. Demtröder, *Laserspektroskopie*, Springer-Verlag, Berlin, **2011**.
- [44] M. Eichhorn, *Laserphysik: Beispiele Für Laser Und Deren Anwendungen*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2013**.
- [45] G. I. Stegeman, R. A. Stegeman, *Nonlinear Optics : Phenomena, Materials, and Devices*, Wiley, **2012**.
- [46] D. Meschede, *Optik, Licht und Laser*, Vieweg+Teubner Verlag / GWV Fachverlage GmbH Wiesbaden, Wiesbaden, **2008**.
- [47] R. W. Boyd, *Nonlinear Optics*, Elsevier/Academic Press, Amsterdam, **2008**.
- [48] G. A. Reider, in *Photonik*, Springer-Verlag, Wien, **2012**.
- [49] K. Kato, *J. Quantum Electron.* **1986**, *22*, 1013–1014.
- [50] R. R. Alfano, *The Supercontinuum Laser Source: The Ultimate White Light*, Springer Verlag, **2016**.
- [51] S. Uhlig, *Self-Organized Surface Structures with Ultrafast White-Light : First Investigation of LIPSS with Supercontinuum*, Springer Fachmedien Wiesbaden, **2015**.
- [52] W. Koch, *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [53] W. Kutzelnigg, *Einführung in die Theoretische Chemie*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2002**.
- [54] R. Parr, W. Yang, *Int. J. Quantum Chem.* **1993**, *47*, 101–101.
- [55] A. Szabo, N. S. Ostlund, *Modern Quantum Chemistry*, Dover Publications, Newburyport, **2012**.
- [56] P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev.* **1964**, *136*, B864.
- [57] W. Kohn, L. J. Sham, *Phys. Rev.* **1965**, *140*, A1133.
- [58] H. Asanuma, X. Liang, H. Nishioka, D. Matsunaga, M. Liu, M. Komiyama, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 203–212.
- [59] M. W. Urban, Ed, P. Samori, F. Cacialli, A. Albin, M. Fagnoni, V. Balzani, A. Credi, M. Venturi, *Molecular Switches, Second Edition*, Wiley-VCH, **2011**.

- [60] H. M. D. Bandara, S. C. Burdette, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1809–1825.
- [61] A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422–4437.
- [62] S. J. Wezenberg, B. L. Feringa, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 324–327.
- [63] S. Takeuchi, S. Ruhman, T. Tsuneda, M. Chiba, T. Taketsugu, T. Tahara, *Science* **2008**, *322*, 1073–1077.
- [64] D. H. Waldeck, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 415–436.
- [65] C. Slavov, N. Bellakbil, J. Wahl, K. Mayer, K. Rück-Braun, I. Burghardt, J. Wachtveitl, M. Braun, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 14045–14053.
- [66] M. Seibold, H. Port, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *252*, 135–140.
- [67] A. Tomoda, A. Kaneko, H. Tsuboi, R. Matsushima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, *65*, 1262–1267.
- [68] J. Kohl-Landgraf, M. Braun, C. Özçoban, D. P. N. Gonçalves, A. Heckel, J. Wachtveitl, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 14070–14077.
- [69] B. Seefeldt, R. Kasper, M. Beining, J. Mattay, J. Arden-Jacob, N. Kemnitzer, K. H. Drexhage, M. Heilemann, M. Sauer, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 213–20.
- [70] C. Beyer, H. A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2752–2755.
- [71] C. G. Bochet, *J. Chem. Soc. Perkin 1* **2002**, *2*, 125–142.
- [72] H. Yu, J. Li, D. Wu, Z. Qiu, Y. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 464–473.
- [73] J. M. Nerbonne, *Curr. Opin. Neurobiol.* **1996**, *6*, 379–386.
- [74] H.-M. Lee, D. R. Larson, D. S. Lawrence, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 409–427.
- [75] G. Ciamician, P. Silber, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1901**, *34*, 2040–2046.
- [76] J. A. Barltrop, P. J. Plant, P. Schofield, *Chem. Commun.* **1966**, 822–823.
- [77] J. Engels, E. J. Schlaeger, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 907–911.
- [78] A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 441–458.
- [79] K. Schaper, M. Etinski, T. Fleig, *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 1075–1081.
- [80] J. Kohl-Landgraf, F. Buhr, D. Lefrancois, J.-M. Mewes, H. Schwalbe, A. Dreuw, J. Wachtveitl, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 3430–3438.
- [81] L. Fournier, I. Aujard, T. Le Saux, S. Maurin, S. Beaupierre, J.-B. Baudin, L. Jullien, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17494–17507.
- [82] I. Aujard, C. Benbrahim, M. Gouget, O. Ruel, J.-B. Baudin, P. Neveu, L. Jullien,

- Chemistry* **2006**, *12*, 6865–6879.
- [83] P. Wan, E. Krogh, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, *17*, 1207.
- [84] R. A. McClelland, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 6823–6858.
- [85] G. G. Gurzadyan, S. Steenken, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1808–1815.
- [86] S. L. Mecklenburg, E. F. Hilinski, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5471–5472.
- [87] M. A. Matesich, J. Knoefel, H. Feldman, D. Fennell Evans, *J. Phys. Chem.* **1973**, *77*, 366–369.
- [88] P. Wan, E. Krogh, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4887–4895.
- [89] E. Gaillard, M. A. Fox, P. Wan, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2180–2186.
- [90] S. Ward, T. Messier, M. Lukeman, *Can. J. Chem.* **2010**, *88*, 493–499.
- [91] H. Afifi, A. Mikhailine, G. Mladenova, A. Chtchemelinine, I. Sultana, T. Dyblenko, E. Danilov, R. Fournier, E. Lee-Ruff, *ARKIVOC* **2012**, *vi*, 343–354.
- [92] U. Hou, C. Y. Meyers, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1186–1195.
- [93] T. Redzinski, J. R. Heldt, *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 723–731.
- [94] R. S. Givens, B. Matuszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6860–6861.
- [95] B. Schade, V. Hagen, R. Schmidt, R. Herbrich, E. Krause, T. Eckardt, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9109–9117.
- [96] R. Schmidt, D. Geissler, V. Hagen, J. Bendig, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 5000–5004.
- [97] C. M. Ferrar, *IEEE J. Quantum Electron.* **1969**, *QE-5*, 550–551.
- [98] K. H. Drexhage, G. R. Erikson, G. H. Hawks, G. A. Reynolds, *Opt. Commun.* **1975**, *15*, 399–403.
- [99] R. Von Trebra, T. H. Koch, *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *93*, 315–317.
- [100] R. J. Von Trebra, T. H. Koch, *Appl. Phys. Lett.* **1998**, *42*, 129.
- [101] R. P. Mahoney, T. H. Koch, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1991**, *61*, 389–397.
- [102] T. Furuta, K. Noguchi, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 511–519.
- [103] T. Furuta, H. Takeuchi, M. Isozaki, Y. Takahashi, M. Kanehara, M. Sugimoto, T. Watanabe, K. Noguchi, T. M. Dore, T. Kurahashi, M. Iwamura, R. Y. Tsien, *Chembiochem* **2004**, *5*, 1119–1128.
- [104] T. Furuta, *J. Synth. Org. Chem. Japan* **2012**, *70*, 1164–1169.
- [105] A. Pinheiro, P. Baptistap, J. C. Lima, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, DOI

- 10.1093/NAR/GKN415.
- [106] B. N. Goguen, A. Aemissegger, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11038–11041.
- [107] T. Ohtsuki, S. Kanzaki, S. Nishimura, Y. Kunihiro, M. Sisido, K. Watanabe, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 1–7.
- [108] L.-M. Herzig, I. Elamri, H. Schwalbe, J. Wachtveitl, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 14835–14844.
- [109] T. Eckardt, V. Hagen, B. Schade, R. Schmidt, C. Schweitzer, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 703–710.
- [110] M. Cigáň, J. Donovalová, V. Szöcs, J. Gaspar, K. Jakusová, A. Gáplovský, *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 4870–4883.
- [111] Z. R. Grabowski, J. Dobkowski, *Pure Appl. Chem.* **1983**, *55*, 245–252.
- [112] Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, A. Siemiarczuk, *J. Lumin.* **1979**, *18/19*, 420–424.
- [113] A. Barik, M. Kumbhakar, S. Nath, H. Pal, *Chem. Phys.* **2005**, *315*, 277–285.
- [114] A. Nag, T. Kundu, K. Bhattacharyya, *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *160*, 257–260.
- [115] B. R. B., T. S. Varadarajan, *J. Phys. Chem.* **2002**, *98*, 8903–8905.
- [116] S. Nad, M. Kumbhakar, H. Pal, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 4808–4816.
- [117] U. S. Raikar, C. G. Renuka, Y. F. Nadaf, B. G. Mulimani, A. M. Karguppikar, M. K. Soudagar, *Spectrochim. Acta Part A* **2006**, *65*, 673–677.
- [118] R. Schmidt, D. Daniel Geissler, A. Volker Hagen, J. Bendig, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 5768–5774.
- [119] I. Yamazaki, H. Takeda, H. Baba, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1980**, *53*, 541–542.
- [120] J. Porter, R.; von Engelhardt, D.; Wissmann, *Die Kunst Des Heilens. Eine Medizinische Geschichte Der Menschheit von Der Antike Bis Heute*, Spektrum, Hiedelberg, **2003**.
- [121] M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, J. J. Collins, *Nat. Publ. Gr.* **2010**, *8*, 423–435.
- [122] J. H. Bailey, C. J. Cavallito, *Annu. Rev. Microbiol.* **1948**, *2*, 143–182.
- [123] J. M. 1958- Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto jr., L. Stryer, A. Held, G. Maxam, L. Seidler, B. Hacker, B. Jarosch, Springer-Verlag GmbH, *Stryer Biochemie*, Springer Spektrum, Heidelberg, **2018**.
- [124] H. M. Feder, C. Osier, E. G. Maderazo, *Rev. Infectious Diseases* **1981**, *3*, 479–

- 791.
- [125] I. Chopra, M. Roberts, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, *65*, 232–260.
- [126] I. Chopra, P. M. Hawkey, M. Hinton, *J. Antimicrob. Chemother.* **1992**, *29*, 245–277.
- [127] D. Schnappinger, W. Hillen, *Arch. Microbiol.* **1996**, *165*, 359–369.
- [128] A. A. Yunis, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1988**, *28*, 83–100.
- [129] H. E. Carter, J. H. Ford, *Annu. Rev. Biochem.* **1950**, *19*, 487–516.
- [130] M. B. Yarmolinsky, G. L. D. L. Haba, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1959**, *45*, 1721–1729.
- [131] C. W. Waller, P. W. Fryth, B. L. Hutchings, J. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2025–2025.
- [132] E. K. Schmidt, C. Clavarina, M. Ceppi, P. Pierre, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 275–277.
- [133] V. I. Katunin, G. W. Muth, S. A. Strobel, W. Wintermeyer, M. V. Rodnina, *Mol. Cell* **2002**, *10*, 339–346.
- [134] I. Wohlgemuth, S. Brenner, M. Beringer, M. Rodnina, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 32229–32235.
- [135] A. A. Krayevsky, M. K. Kukhanova, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1980**, *23*, 1–51.
- [136] R. W. Roberts, J. W. Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 12297–12302.
- [137] T. Ishizawa, T. Kawakami, P. C. Reid, H. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5433–5440.
- [138] K. C. Martin, A. Casadio, H. Zhu, E. Yaping, J. C. Rose, M. Chen, C. H. Bailey, E. R. Kandel, *Cell* **1997**, *91*, 927–938.
- [139] K. M. Huber, M. S. Kayser, M. F. Bear, *Science* **2000**, *288*, 1254–1256.
- [140] S. Miller, M. Yasuda, J. K. Coats, Y. Jones, M. E. Martone, M. Mayford, *Neuron* **2002**, *36*, 507–519.
- [141] D. M. Smith, *J. Exp. Neurosci.* **2018**, *12*, 1179069518794675.
- [142] D. C. Rubinsztein, *Nature* **2006**, *443*, 780–786.
- [143] A. M. Gorman, *J. Cell. Mol. Med.* **2008**, *12*, 2263–2280.
- [144] M. Takalo, A. Salminen, H. Soininen, M. Hiltunen, A. Haapasalo, *Am. J. Neurodegener. Dis.* **2013**, *2*, 1.
- [145] S. Tom Dieck, L. Kochen, C. Hanus, M. Heumüller, I. Bartnik, B. Nassim-Assir,

- K. Merk, T. Mosler, S. Garg, S. Bunse, D. A. Tirrell, E. M. Schuman, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 411-414.
- [146] E. K. Schmidt, G. Clavarino, M. Ceppi, P. Pierre, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 275-277.
- [147] J. Kohl-Landgraf, Dissertation: Zeitaufgelöste Spektroskopie von Lichtgesteuerten Prozessen: Photochromie Und Photofreisetzung, Goethe Universität Frankfurt am Main, **2013**.
- [148] F. Buhr, J. Kohl-Landgraf, S. tom Dieck, C. Hanus, D. Chatterjee, A. Hegelein, E. M. Schuman, J. Wachtveitl, H. Schwalbe, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54*, 3717-3721.
- [149] L.-M. Herzig, Dissertation: Molekulare Dynamik Der Freisetzung Eines Photolabil Geschützten Antibiotikums, Goethe-Universität Frankfurt, **2018**.
- [150] L. M. Herzig, I. Elamri, H. Schwalbe, J. Wachtveitl, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 14835-14844.
- [151] I. Elamri, M. Heumüller, L. M. Herzig, E. Stirnal, J. Wachtveitl, E. M. Schuman, H. Schwalbe, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 2458-2464.
- [152] W. Birkmayer, P. Riederer, *Neurotransmitter Und Menschliches Verhalten*, Springer-Verlag, Wien New York, **1986**.
- [153] M. Naoi, W. Maruyama, M. Shamoto-Nagai, *J. Neural Transm.* **2017**, *125*, 53-66.
- [154] S. G. Snowden, A. A. Ebshiana, A. Hye, O. Pletnikova, R. O'Brien, A. Yang, J. Troncoso, C. Legido-Quigley, M. Thambisetty, *J. Alzheimer's Dis.* **2019**, *72*, 35-43.
- [155] M. Carlsson, A. Carlsson, *Schizophr. Bull.* **1990**, *16*, 425-432.
- [156] F. Di Michele, S. Luchetti, G. Bernardi, E. Romeo, P. Longone, *Front. Neuroendocrinol.* **2013**, *34*, 132-142.
- [157] L. L. Iversen, *Br. J. Pharmacol.* **1971**, *41*, 571.
- [158] B. I. Kanner, S. Schuldiner, *Crit. Rev. Biochem.* **1987**, *22*, 1-38.
- [159] M. M. Rapport, A. A. Green, P. I. H., *J Biol Chem.* **1948**, *176*, 1243-1251.
- [160] L. F. Mohammad-Zadeh, L. Moses, S. M. Gwaltney-Brant, *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2008**, *31*, 187-199.
- [161] K. E., in *Princ. Neural Sci.*, New York, **2001**, pp. 1209-1225.

- [162] H. A. Krebs, *Biochem. J.* **1935**, *29*, 1951–1969.
- [163] S. Berl, A. Lajtha, H. Waelsch, *J. Neurochem.* **1961**, *7*, 186–197.
- [164] L. L. Moroz, K. M. Kocot, M. R. Citarella, S. Dosung, T. P. Norekian, I. S. Povolotskaya, A. P. Grigorenko, C. Dailey, E. Berezikov, K. M. Buckley, A. Ptitsyn, D. Reshetov, K. Mukherjee, T. P. Moroz, Y. Bobkova, F. Yu, V. V. Kapitonov, J. Jurka, Y. V. Bobkov, J. J. Swore, D. O. Girardo, A. Fodor, F. Gusev, R. Sanford, R. Bruders, E. Kittler, C. E. Mills, J. P. Rast, R. Derelle, V. V. Solovyev, F. A. Kondrashov, B. J. Swalla, J. V. Sweedler, E. I. Rogaev, K. M. Halanych, A. B. Kohn, *Nature* **2014**, *510*, 109–114.
- [165] B. S. Meldrum, *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1007S–1015S.
- [166] Q. R. Smith, *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1016S–1022S.
- [167] D. Du Tran, Dissertation: Spectroscopic Studies on Photosensitive Probes, Goethe-Universität Frankfurt, **2019**.
- [168] C. Slavov, H. Hartmann, J. Wachtveitl, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 2328–2336.
- [169] B. Dietzek, T. Pascher, V. Sundström, A. Yartsev, *Laser Phys. Lett.* **2007**, *4*, 38–43.
- [170] M. Lorenc, M. Ziolk, R. Naskrecki, J. Karolczak, J. Kubicki, A. Maciejewski, *Appl. Phys. B* **2002**, *74*, 19–27.
- [171] D. J. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratch, *Gaussian 16*, Wallingford CT, **2016**.
- [172] A. D. Becke, *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098.
- [173] C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.
- [174] T. H. D. Jr., *J. Chem. Phys.* **1998**, *90*, 1007.
- [175] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999–3093.
- [176] B. Mennucci, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2*, 386–404.
- [177] J. Polster, *Reaktionskinetische Auswertung Spektroskopischer Meßdaten*, Vieweg+Teubner Verlag, **1995**.
- [178] P. Wang, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2017**, *335*, 300–310.
- [179] M. Reinfelds, J. von Cosel, K. Falahati, C. Hamerla, T. Slanina, I. Burghardt, A. Heckel, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 13026–13035.

- [180] H. E. Zimmerman, V. R. Sandel, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 915–922.
- [181] M. Reinfelds, Dissertation: Design and Synthesis of New Photolabile Protecting Groups, Goethe University Frankfurt, **2018**.
- [182] T. Redzinski, J. R. Heldt, *J. Fluoresc.* **2003**, *13*, 393–401.
- [183] P. Wan, E. Krogh, B. Chak, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4073–4074.
- [184] C. Abdellaoui, V. Hermanns, M. Reinfelds, M. Scheurer, A. Dreuw, A. Heckel, J. Wachtveitl, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2022**, *24*, 5294–5300.
- [185] R. A. McClelland, F. L. Cozens, J. Li, S. Steenken, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **21996**, *8*, 1531–1543.
- [186] V. Barone, M. Cossi, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1995–2001.
- [187] F. L. Cozens, N. Mathivanan, R. A. McClelland, S. Steenken, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **21992**, *2*, 2083–2090.
- [188] G. Mladenova, L. Chen, C. F. Rodriguez, K. W. M. Siu, L. J. Johnston, A. C. Hopkinson, E. Lee-Ruff, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 1109–1114.
- [189] M. A. O'Neill, F. L. Cozens, N. P. Schepp, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6969–6977.
- [190] C. S. Q. Lew, R. A. McClelland, L. J. Johnston, N. P. Schepp, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **21994**, *2*, 395–397.
- [191] N. J. Turro, V. Ramamurthy, J. C. Scaiano, *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*, University Science Books & U.S., **2010**.
- [192] A. L. Dempwolff, A. M. Belogolova, T. Sommerfeld, A. B. Trofimov, A. Dreuw, *J. Chem. Phys.* **2021**, *155*, 054103.
- [193] D. Zivkovic, Dissertation: Investigations on 2,7-Diamino-9-Fluorenl Photochemistry, University Basel, **2007**.
- [194] A. P. Demchenko, V. I. Tomin, P. T. Chou, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 13353–13381.
- [195] B. D. Wagner, D. Tittelbach-Helmrich, R. P. Steer, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 7904–7908.
- [196] A. Blazek, M. Pungente, E. Krogh, P. Wan, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1992**, *64*, 315–327.
- [197] D. Duvinage, S. Mebs, J. Beckmann, *Chem. Eur. J.* **2021**, *77*, 1–6.
- [198] M. A. Christensen, C. R. Parker, T. J. Sørensen, S. De Graaf, T. J. Morsing, T. Brock-Nannestad, J. Bendix, M. M. Haley, P. Rapta, A. Danilov, S. Kubatkin, O. Hammerich, M. B. Nielsen, *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2*, 10428–10438.

- [199] R. E. Minto, P. K. Das, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8858–8866.
- [200] M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *105*, 2078–2079.
- [201] A. J. Ackmann, J. M. J. Fréchet, *Chem. Commun.* **1996**, 605–606.
- [202] D. Zhou, R. Khatmullin, J. Walpita, N. A. Miller, H. L. Luk, S. Vyas, C. M. Hadad, K. D. Glusac, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11301–11303.
- [203] N. Colin Baird, *Mol. Photochem* **1971**, *93*, 53.
- [204] P. B. Karadakov, *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 7303–7309.
- [205] M. Rosenberg, C. Dahlstrand, K. Kilså, H. Ottosson, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 5379–5425.
- [206] L. J. Karas, C.-H. Wu, H. Ottosson, J. I. Wu, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 10071–10077.
- [207] V. Hermanns, M. Scheurer, N. F. Kersten, C. Abdellaoui, J. Wachtveitl, A. Dreuw, A. Heckel, *Chem. – A Eur. J.* **2021**, *27*, 14121–14127.
- [208] A. T. Buck, C. L. Beck, A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8933–8940.
- [209] F. B. Peters, A. Brock, J. Wang, P. G. Schultz, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 148–52.
- [210] L. Cong, H. Yin, Y. Shi, M. Jin, D. Ding, *RSC Adv.* **2014**, *5*, 1205–1212.
- [211] T. López Arbeloa, F. López Arbeloa, M. J. Tapia, I. López Arbeloa, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 4704–4707.
- [212] S. P. McGlynn, J. Daigre, F. J. Smith, *J. Chem. Phys.* **2004**, *39*, 675.
- [213] I. Elamri, C. Abdellaoui, J. Kaur Bains, K. Felicitas Hohmann, S. Lakshmi Gande, E. Stirnal, J. Wachtveitl, H. Schwalbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 10596–10603.

Publikationen

Elamri, I.*; Abdellaoui, C.*; Kaur Bains, J.; Felicitas Hohmann, K.; Lakshmi Gande, S.; Stirnal, E.; Wachtveitl, J.; Schwalbe, H. Wavelength-Selective Uncaging of Two Different Photoresponsive Groups on One Effector Molecule for Light-Controlled Activation and Deactivation. *JACS* **2021**, *143*, 10596-10603

Hermanns, V.; Scheurer, M.; Kersten, N. F.; Abdellaoui, C.; Wachtveitl, J.; Dreuw, A.; Heckel, A. Rethinking Uncaging: A New Antiaromatic Photocage Driven by a Gain of Resonance Energy. *Chem. – A Eur. J.* **2021**, *27*(56), 14121–14127

Abdellaoui, C.; Hermanns, V.; Reinfelds, M.; Scheurer, M.; Dreuw, A.; Heckel, A.; Wachtveitl, J. A Long-Lived Fluorenyl Cation: Efficiency Booster for Uncaging and Photobase Properties. *PCCP* **2022**, *24*, 5294-5300

Abkürzungsverzeichnis

Abs	Absorbanz	h	Stunden (engl.: hours)
BBO	β -Barium-Borat-Kristall	HFIP	Hexafluoroisopropanol
CaF ₂	Calciumfluorid	IC	Interne Umwandlung (engl.: internal conversion)
CPA	Chirped Pulse Amplification	IR	Infrarot
DAS	Zerfallsassoziertes Spektrum (engl.: <i>decay associated spectrum</i>)	ISC	Intersystem Crossing
DEACM	Diethylamino Cumarin	LED	Licht emittierende Diode
DFG	Differenzfrequenzerzeugung (engl.: <i>difference frequency generation</i>)	LUMO	Niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (engl.: lowest unoccupied molecular orbital)
DFT	Dichtefunktionaltheorie	MeOH	Methanol
DMSO	Dimethylsulfoxid	min	Minute
ESA	Absorption im angeregten Zustand (engl.: excited state absorption)	NOPA	Nicht-kollinearer optisch parametrischer Verstärker (engl.: <i>non-collinear optical parametric amplifier</i>)
EtOH	Ethanol	ns	Nanosekunde
exc.	Anregung (engl.: <i>Excitation</i>)	oNB	<i>ortho</i> -Nitrobenzyl
ps	Pikosekunden	PCM	Polarizable Continuum Model
FluCy	Fluorescence Correction and quantum Yield	RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
fs	Femtosekunden	RoI	Bereich von Interesse (engl.: <i>Region of Interest</i>)
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektrometer	s	Sekunden
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	SE	Stimulierte Emission (engl.: <i>stimulated emission</i>)

Abkürzungsverzeichnis

SFG	Summenfrequenzerzeugung (engl.: sum frequency generation)
UV	Ultraviolett
Vis	Sichtbar (engl.: Visible)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des elektromagnetischen Spektrums und seiner Unterteilung in die verschiedenen Strahlungsarten inklusive einer Einordnung der möglichen Auswirkung der Strahlung in Wechselwirkung mit einem Molekül.....	3
Abbildung 2.2: Das Jablonski-Diagramm fasst alle möglichen Deaktivierungsprozesse nach Photo-anregung zusammen. Dabei entsprechen S den Singulett-Zuständen, T den Triplett-Zuständen, IC der inneren Umwandlung, VC der Schwingungsrelaxation und ISC der Interkombination. ^[32]	6
Abbildung 2.3: Darstellung der Energiepotentiale eines harmonischen im Vergleich mit einem anharmonischen Oszillator in Abhängigkeit von dem Kernabstand R und der Schwingung eines zweiatomigen Moleküls als Annäherung an eine Feder.....	7
Abbildung 2.4: Schematischer Darstellung des Messaufbaus der Anrege-Abtast-Spektroskopie.....	10
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung linearer Prozesse zweiter Ordnung. Die drei Frequenz-konversionsprozesse SHG, SFG und DFG (a) und der NOPA (b).....	13
Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des verwendeten Messaufbaus zur transienten Absorption inklusive NOPA, SFG und Prismenkompressor.....	15
Abbildung 2.7: Darstellung zur Entstehung der Signale aus der transienten Absorptionsmessungen infolge einer photoinduzierten Anregung nach Frank-Condon ^[29-31] und ihrer resultierenden Darstellung im Differenzspektrum.	16
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Photoreaktion von photolabilen Schutzgruppen und eines Photoschalters, der in der Lage ist nach einer reversiblen Formänderung an ein Zielmolekül zu binden.....	23
Abbildung 3.2: Strukturformeln verschiedener Klassen von photolabilen Schutzgruppen und einiger ihrer Derivate.....	25
Abbildung 3.3: Homolytische und heterolytische Bindungsspaltung eines Fluorenol Moleküls nach Photoanregung, resultierend in einem Fluorenyl-Kation (F^+) und einem Fluorenyl-Radikal (F^\cdot).....	27
Abbildung 3.4: Grundgerüst eines Dialkylamino-Cumarin in der planaren ICT- und verdrillten TICT-Form.....	28

Abbildung 3.5: Uncaging Mechanismus einer Carbamat verknüpften Abgangs-gruppe (rot) von einer DEACM-Schutzgruppe infolge einer Photoanregung ^[96]	29
Abbildung 3.6: Strukturelle Unterschiede zwischen dem 3'-Ende der Tyr-tRNA und dem Puromycin, welches im Ribosom auf die naszierende Proteinkette übertragen wird. Das resultierende Puromycin-Protein wird aus dem Ribosom abgestoßen.	32
Abbildung 3.7: Strukturformeln von Puromycin, das über einen Carbamat-Linker mit NVOC (rot) und DEACM (blau) geschützt ist und den jeweiligen Absorptionsmaxima, Extinktionskoeffizienten und Uncaging-Quantenausbeuten.	33
Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Optimierungsprozesses einer photolabilen Schutzgruppe anhand der drei an den Pfeilen gekennzeichneten Parameter, bestimmt mittels photochemischer Analysen und quantenmechanischen Rechnungen, beginnend bei dem DEAMb über das Biphenyl-Derivat hin zum Fluoren-Derivat. ^[179,181]	41
Abbildung 5.2: Strukturformeln der untersuchten Fluoren-Derivate mit unterschiedlichen AGs unterteilt in unsymmetrische (oben) und symmetrische (unten) Schutzgruppen.	42
Abbildung 5.3: Absorptionsmaxima der fünf Fluoren-Derivate in Methanol (a) und DMSO (b).....	43
Abbildung 5.4: Fluoreszenzspektren der fünf Fluoren-Derivate in MeOH (a) und DMSO (b) mit einer Anregungswellenlänge von 340 nm.	44
Abbildung 5.5: Absorptionsspektren von (DMA) ₂ F-OH in MeOH vor und während der Dauerbelichtung mit 365 nm (a). Der zeitliche Verlauf ausgewählter Transienten des entstehenden Intermediats inklusive deren exponentielle Fitkurven nach Erreichen der maximalen Kationintensität (b).....	45
Abbildung 5.6: Absorptionsspektren nach kontinuierlicher Belichtung der fünf Derivate in MeOH (a) und DMSO (b). Zusätzlich sind DFT berechnete Übergänge der angenommenen Photoprodukte (DMA) ₂ F-Dimer (Quadrate), (DMA) ₂ F=O (Kreise), (DMA) ₂ FH (Dreiecke) dargestellt.....	47
Abbildung 5.7: Schematische Darstellung der photoinduzierten Reaktion eines Dimethylamino-substituierten Fluoren-Derivats (DMA) ₂ F-OR über das Kation als Intermediat hin zu den Photoprodukten.....	47
Abbildung 5.8: IR-Differenzspektren von allen fünf Fluoren-Derivaten in MeOH bei Belichtung mit 300 nm, die durch die Subtraktion des Ausgangsspektrums von den Spektren zum gegebenen Zeitpunkt der Belichtung (3.5 min und 4 h) gebildet wurden (a).	

Darstellung der DFT-berechneten Schwingungsmoden, die den jeweiligen Absorptionsänderungen während der Messung zugeordnet werden konnten (b).....	48
Abbildung 5.9: Struktur des $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ nach der Geometrieoptimierung und die hauptbeitragenden Molekülorbitale, die an den ersten 4 elektronischen Übergängen des $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ beteiligt sind.	49
Abbildung 5.10: Absorptionsspektrum des $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ und DMAF^+ in MeOH und den DFT berechneten Übergängen der Verbindungen mit B3LYP.....	50
Abbildung 5.11: Struktur des $(\text{DMA})\text{F}^+$ nach der Geometrieoptimierung und die hauptbeitragenden Molekülorbitale, die an den ersten 4 elektronischen Übergängen des $(\text{DMA})\text{F}^+$ beteiligt sind.....	51
Abbildung 5.12: Absorptionsspektren von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ in MeOH vor und nach 1 Minute Belichtung mit 365 nm und die stärksten DFT-berechneten Übergänge der Ausgangsverbindung und $(\text{DMA})_2\text{F-OMe}$ (a). Der zeitliche Verlauf ausgewählter Transienten des entstehenden Intermediats in MeOH (b). Photoinduzierte Reaktion von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ (c).....	53
Abbildung 5.13: Differenzspektren von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ in MeOH, EtOH und H_2O nach 1 min Belichtung der Probe (a). Der zeitliche Verlauf ausgewählter Transienten des entstehenden Intermediats in EtOH inklusive der exponentiellen Fitkurven der Dunkelreaktion (b).....	54
Abbildung 5.14: Berechnete IR-Spektren von $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ im Grundzustand (S_0) und den beiden angeregten Zuständen S_2 und S_3 und ihren entsprechenden geometrie-optimierten Strukturen. Eine visuelle Darstellung ausgewählter Schwingungsmoden der angeregten Zustände.	55
Abbildung 5.15: UV/vis-Differenzspektren von allen fünf Fluorenderivaten in MeOH und DMSO nach einer Minute Belichtung mit 365 nm (a). Strukturformeln des Fluorenylkations in seinen mesomeriestabilisierten Formen (b).	56
Abbildung 5.16: Emissionsspektren von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ in MeOH (grau) und derselben Probe nach 1 min Belichtung mit 365 nm (blau) (a). Vereinfachtes Energieschema des Grundzustands und der ersten 4 angeregten Zustände anhand derer die Absorption (dunkel blau), Schwingungsrelaxation (gelb) und Fluoreszenz direkt aus dem S_4 (hell blau) dargestellt wird b).....	57
Abbildung 5.17: Schematische Darstellung der photoinduzierten Reaktion einer symmetrischen Schutzgruppe mit beliebiger AG $(\text{DMA})_2\text{F-OR}$ zum Kation $(\text{DMA})_2\text{F}^+$, welches im Lösemittel MeOH in einer Dunkelreaktion zum Methoxy-Derivat $(\text{DMA})_2\text{F-}$	

OMe abreagiert. Vom $(\text{DMA})_2\text{F-OMe}$ ausgehend kann durch erneute Bestrahlung das $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ wiederholt erzeugt werden und abermals thermisch zum Methoxy-Derivat abreagieren.....	59
Abbildung 5.18: Ausgehend vom $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ wird der zeitliche Verlauf zweier Absorptionsbanden während (blau hinterlegter Bereich) und nach der Belichtung mit 365 nm dargestellt. Dabei zeigt die 971 nm - Transiente Bildung und Rückgang des $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ und die 325 nm - Transiente den entgegengesetzten Verlauf des $(\text{DMA})_2\text{F-OMe}$.	59
Abbildung 5.19: Absorptionsspektren von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ in MeOH vor der Belichtung (blau), nach den Belichtungen mit 365 nm und anschließender thermischer Dunkelreaktion (grau) und nach Belichtung zunächst mit 365 nm zur Bildung des $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ und anschließend mit 455 nm (orange) (a). Der zeitliche Verlauf der Bande bei 971 nm beider Belichtungskonzepte mit dem entsprechende exponentiellen Fit (b).	60
Abbildung 5.20: FTIR-Spektren von $(\text{DMA})_2\text{F-OAc}$ und $(\text{DMA})\text{F-OAc}$ vor (0 s), während (bis 212 s) und nach der Belichtung bei 300 nm in MeOH (a). Der zeitliche Verlauf ausgewählter Schwingungsbanden beider Verbindungen: $(\text{DMA})_2\text{F-OAc}$ (Dreiecke) und $(\text{DMA})\text{F-OAc}$ (Kreise) während und nach der Belichtung (b).	61
Abbildung 5.21: FTIR-Differenzspektren einer unsymmetrischen (blau) und symmetrischen (rot) Schutzgruppe in MeOH und DMSO (a). Ausschnitt der Absolutspektren in DMSO im Bereich von 1590 cm^{-1} bis 1630 cm^{-1} (b).	62
Abbildung 5.22: Absorptionsspektren von $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ in MeOH und $(\text{DMA})_2\text{F-OAc}$ vor und nach der Zugabe von unterschiedlichen Äquivalenten an HCl (a). Ausgewählte Absorptionsbanden von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ in H_2O in Abhängigkeit vom pH-Wert (b). Emissionsspektren (c) und ausgewählte Emissionsbanden (d) von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ in H_2O in Abhängigkeit von dem pH-Wert. Reaktionsschema eines $(\text{DMA})_2\text{F-OR}$ Derivats mit HCl über die Protonierung des Sauerstoffatoms hin zur Bildung von $(\text{DMA})_2\text{F}^+$ (e).	64
Abbildung 5.23: PH-Sprung während der Belichtung mit 365 nm (grauer Bereich) von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ in MeOH (pH 8-9.5) und H_2O (pH 6-8) und anschließender thermischer Relaxation. Photoinduzierter pH-Sturz mittels einer zweiten Belichtung bei 455 nm (blauer Bereich).	66
Abbildung 5.24: Transiente UV/vis-Spektren und zerfallsassoziierte Spektren (erhalten aus der globalen Analyse) von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ (a) und $(\text{DMA})\text{F-OH}$ (b) in MeOH mit 90 nJ Anregungsleistung bei 315 nm.	67

Abbildung 5.25: Zeitschnitte bei 1900 ps der Messungen von (DMA)F-OH und (DMA)F-OH in MeOH und DMSO (a). Flash-Photolyse-Messung bei 460 nm der gleichen Verbindungen in MeOH (b).....	67
Abbildung 5.26: Zeitlicher Verlauf ausgewählter Transienten von (DMA) ₂ F-OH (a) und (DMA)F-OH (b) in MeOH und DMSO und der entsprechenden Fit Amplituden in DMSO.	68
Abbildung 5.27: Reaktionsschema von Dimethylamino-Fluoren-Derivaten in protischen und aprotischen Lösungsmitteln.	69
Abbildung 5.28: Schematische Darstellung des Screening-Verfahrens für Fluorenol-basierte Verbindungen (FOH). ^[202] Eine effiziente photolabile Schutzgruppe verfügt über einen konischen Schnittpunkt (CI) in den Produktzustand (F ⁺ + OH ⁻) (a), was in einer geringen ΔE_{vert} resultiert. Eine ineffiziente photolabile Schutzgruppe weist mit einem energetisch niedrigen Produkt keinen CI und folglich ein großes ΔE_{vert} auf (b). ^[200]	71
Abbildung 5.29: Berechnete vertikale Absorptionsener-gien verschiedener kationischer Derivate. ^[200]	72
Abbildung 5.30: Absorptionsspektren der <i>p</i> -CBT-Derivate in MeOH (a). Differenzspektren der belichteten Derivate: CBT-OH, CBT-OAc und CBT-5HT bei 365 nm und (OMePh) ₂ CBT-OAc bei 405 nm (b). Strukturformeln der jeweiligen <i>p</i> -CBT-Derivate (c).	73
Abbildung 5.31: Zeitaufgelöste UV/vis-Messungen inklusive der zerfallsassozierten Spektren von CBT-OH (a), CBT-OAc (b) und CBT-5HT (c) in MeOH mit einer Anregungswellenlänge von 335 nm.	75
Abbildung 5.32: Transiente UV/vis-Messungen inklusive der zerfallsassozierten Spektren von (OMePh) ₂ CBT-OAc in MeOH mit einer Anregungswellenlänge von 388 nm.	76
Abbildung 5.33: Schematische Darstellung eines einfach geschützten Biomoleküls (grau mit orangener Schutzgruppe), welches nach dem Entfernen der Schutzgruppe (grün) außerhalb der RoI diffundiert (a). Konzept des doppelt geschützten Biomoleküls und den folgenden Schritten zur aktivierten (grün) und deaktivierten (rot) Form (b).	77
Abbildung 5.34: Schematische Darstellung des Puromycins und der Photoreaktion des oNB-Puromycins unter der Bildung eines aktiven Photoprodukts.	78
Abbildung 5.35: Vorgeschlagener Mechanismus zur Deaktivierung von nitro-Puromycin über eine Photozyklisierung zum Cinnolin-Derivat in Anlehnung an Peters <i>et al.</i> ^[209]	79

Abbildung 5.36: Absorptionsspektrum von nitro-Puromycin vor der Belichtung (grün) nach 5 Minuten (grau) und 2.8 Stunden (rot) Belichtung mit der Deaktivierungswellenlänge $\lambda_D = 365$ nm.	79
Abbildung 5.37: Differenzspektren von nitro-Puromycin nach Belichtung mit verschiedenen Wellenlängen von 280 nm bis 470 nm und das DFT-berechnete Differenzspektrum, gebildet aus den berechneten Einzelspektren von nitro-Puromycin und dem photozyklisierten Cinnolinprodukt (schwarz). Transiente von nitro-Puromycin bei 243 nm während der Belichtung mit 340 nm zur Berechnung der Reaktionsquantenausbeute ($\varphi_{\text{NO}_2\text{-puro}} = 2,5$ %).	80
Abbildung 5.38: Zellfreies sGFP Translationsexperiment zur Untersuchung der Inhibierung der Proteinbiosynthese von nativem Puromycin (a) im Vergleich zum nitro-Puromycin (b). ^[213] Die Messungen wurden von Jasleen Kaur Bains (AK Schwalbe) durchgeführt.....	81
Abbildung 5.39: Transiente UV/vis-Absorptionsmessungen von nitro-Puormycin in MeCN/H ₂ O nach Anregung mit 315 nm.	82
Abbildung 5.40: Absorptionsspektren von verschiedenen Cumarin-Derivaten.	83
Abbildung 5.41: Absorptionsspektren von thio-DEACM-OH vor (orange) und während der Belichtung mit 470 nm (a). Absorptionsspektren des zuvor mit 470 nm belichteten thio-DEACM vor (grün) und während der anschließenden Belichtung mit 365 nm (b). Struktur-formel der PPG thio-DEACM-OH und seiner Photolyseprodukte nach der Belichtung mit λ_A (470 nm) und λ_D (365 nm) (c).....	84
Abbildung 5.42: Zeitaufgelöste UV/vis-Absorptionsmessung von thio-DEACM-OH in MeCN:H ₂ O (1:1) mit einer Anregungswellenlänge von 470 nm.	86
Abbildung 5.43: Zeitaufgelöste UV/vis-Absorptionsmessung von thio-DEACM-OH in DMSO mit einer Anregungswellenlänge von 470 nm mit den zugehörigen zerfallsassoziierten Spektren (a). Zeitaufgelöste Einzeltransienten der thio-DEACM-OH UV/vis-Messungen in DMSO (leere Kreise) und 1:1 MeCN:H ₂ O (gefüllte Kreise) (b).	87
Abbildung 5.44: Zeitaufgelöste UV/vis-Absorptionsmessung von DEACM-OSO ₃ ⁻ in 1:1 MeCN:H ₂ O mit einer Anregungswellenlänge von 350 nm (a) und DEACM-OH in 1:4 DMSO: H ₂ O mit Anregungswellenlänge von 388 nm (b) und den entsprechenden zerfallsassoziierten Spektren (rechts). Energieschema der elektronischen Übergänge von thio-DEACM-OH nach Anregung zum DEACM-OSO ₃ ⁻ (c).	89

Abbildung 5.45: Absorptionsspektren von thio-DEACM-nitro-Puromycin und den einzelnen Fragmenten der Verbindung(a). Strukturformel des thio-DEACM-nitro-Puromycins (b).	90
Abbildung 5.46: Absorptionsspektrum des thio-DEACM-nitro-Puromycins vor (blau) und nach der Belichtung (grüne Linie) mit λ_A , inklusive Differenzspektrum (schwarz). Rekonstruktion des Spektrums nach der Belichtung (graue Punkte) durch die Addition der Spektren von nitro-Puromycin (grüne Fläche) und dem mit λ_A belichteten thio-DEACM-OH (graue Fläche).....	91
Abbildung 5.47: FTIR-Differenzspektren, gemessen alle 60 s in DMSO während der kontinuierlichen Belichtung von thio-DEACM-nitro-Puromycin mit λ_A (470 nm). DFT-berechnete Schwingungsmoden als Sticks von thio-DEACM-nitro-Puromycin (blaue Quadrate) und <i>o</i> -Nitro-Puromycin (grüner Kreis). Und der Bestimmung der Quantenausbeute durch lichtinduzierte Absorptionsänderungen, die die photoinduzierte Freisetzung von CO ₂ bei Bestrahlung von thio-DEACM-nitro-Puromycin bei 2337 cm ⁻¹ mit einer Fitkurve durch die ersten 8 Datenpunkte (500 s Belichtung) (a). b) Reaktionsschema des Aktivierungsschritts unter Freisetzung von nitro-Puromycin und CO ₂ (b).....	92
Abbildung 5.48: UV/vis-Spektren während der Deaktivierung. Ausgangsmaterial ist die aktivierte Probe einschließlich der Nebenprodukte (grüne Linie). Nach Belichtung bei 365 nm ergibt sich ein Spektrum (rote Linie), das durch Überlagerung (schwarz gestrichelte Linie) von belichtetem nitro-Puromycin (roter Bereich) und dem mit 365 nm belichteten thio-DEACM (grauer Bereich) rekonstruiert werden kann (a). Differenz-IR-Spektren während der Belichtung mit 365 nm von der zuvor aktivierten Probe. DFT-berechnete Schwingungsmoden als Sticks von nitro-Puromycin (grüne Quadrate) und Cinnolin-Puromycin (rote Dreiecke) (b).	93
Abbildung 5.49: UV/vis-Absorptionsspektren von thio-DEACM-nitro-Puromycin vor (blau) und nach der Belichtung mit 365 nm (rot). Letzteres wird mehreren Subtraktionsschritten unterzogen, in denen alle bekannten anfallenden Photoprodukte (thio-DEACM-OH, DEACM-OSO ₃ ⁻ , DEACM-OH und nitro-Puromycin) subtrahiert werden.	94
Abbildung 5.50: Zeitschnitte der transienten UV/vis-Messungen von thio-DEACM-OH (gestrichelte Linien) und thio-DEACM-nitro-Puromycin (durchgezogene Linien) in MeCN/H ₂ O bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen (λ_A = 470 nm und λ_D = 315 nm) (a) und den entsprechenden zerfallsassoziierte Spektren (b).....	95

Abbildung 5.51: Ausgewählte Transienten der UV/vis-Messungen auf ultrakurzer Zeitskala von thio-DEACM-nitro-Puromycin in 1:1 MeCN:H ₂ O und DMSO.....	96
Abbildung 5.52: Ausgewählte Transienten von dem doppelt geschützten Puromycin nach dem Aktivierungsschritt bei 470 nm bei einer Anregungswellenlänge von 315 nm in MeCN/H ₂ O und den zerfallsassoziierten Spektren der Messung im Vergleich zur Messungen des reinen thio-DEACM-OSO ₃ ⁻ (a). Differenzen aus thio-DEACM-nitro-Puromycin nach λ_A und dem reinen thio-DEACM-OSO ₃ ⁻ der beiden positiven Transienten verglichen mit den Transienten von nitro-Puromycin (b).	97
Abbildung 5.53: Inhibierung der sGFP-Expression nach der Zugabe von thio-DEACM-nitro-Puromycin und der Belichtung mit 488 nm, 488 nm und anschließend 365 nm und direkt 365 nm im Vergleich zur Kontrolle mit reinem sGFP: a) Indikation durch Fluoreszenz und b) über native PAGE Analyse. c) Überlapp der Absorptionsbanden und Fluoreszenzbanden von thio-DEACM-nitro-Puromycin und sGFP. Die Messungen wurden von Jasleen Kaur Bains durchgeführt.....	99
Abbildung 5.54: Bildliche Darstellung einer räumlich kontrollierten Aktivität eines Biomoleküls innerhalb und außerhalb einer ROI durch zwei verschiedene Belichtungsmasken mit entsprechenden Wellenlängen.....	100
Abbildung 5.55: Zusammenfassung des Reaktionsablaufs ausgehend vom biologisch inaktiven thio-DEACM-nitro-Puromycin hin zum nitro-Puromycin und dem thio-DEACM-OH als unmittelbarem Nebenprodukt nach Belichtung mit der Aktivierungswellenlänge λ_A . Ausgehend von der Aktivierung kann durch λ_D die Zyklisierung des nitro-Puromycins zum Cinnolin-Produkt initiiert werden, deren Folgereaktion eine Zersetzung unter Abspaltung der Adenosin-Einheit ist. Zusätzlich ist die Nebenreaktion der ersten Schutzgruppe während der beiden Belichtungsschritte zum DEACM-OSO ₃ ⁻ und DEACM-OH dargestellt.....	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Spektroskopische Parameter der Fluoren-Derivate mit verschiedenen AGs.

Tabelle 2: Fit-Parameter der im Zuge der Belichtung von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ gebildeten Transienten.

Tabelle 3: Fit-Parameter jeweils einer vis- und NIR-Transiente von $(\text{DMA})_2\text{F-OH}$ in verschiedenen Lösemitteln.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Chahinez Abdellaoui, erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Fakultät der Goethe-Universität zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

„Photolabile Schutzgruppen und ihre Anwendung zur wellenlängenselektiven Aktivierung und Deaktivierung eines Antibiotikums“

Im Institut für Physikalische und Theoretische Chemie unter der Anleitung und Betreuung durch Prof. Dr. Josef Wachtveitl ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

- Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.
- Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.
- Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der Goethe-Universität ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 15 (Aberkennung des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Ort, Datum

Unterschrift

