



# **Zweiphotonen-induzierte Freisetzung von *Small Molecules* und Fluorophoren**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Goethe-Universität Frankfurt am Main

von

**Rebekka Weber**

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2023

(D30)



Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Prof. Dr. Alexander Heckel angefertigt und vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie als Dissertation angenommen.

**Dekan:** Prof. Dr. Clemens Glaubitz

**1. Gutachter:** Prof. Dr. Alexander Heckel

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Josef Wachtveitl

**Datum der Disputation:** 14.02.2024



## Zusammenfassung

Seit jeher spielt Licht eine entscheidende Rolle in der Natur und wird von verschiedenen Organismen auf unterschiedliche Weise genutzt. Beispiele dafür sind die Photosynthese, bei der Pflanzen mithilfe von Lichtenergie Kohlenstoffdioxid und Wasser in Sauerstoff und Glucose umwandeln oder die Biolumineszenz, bei der bestimmte Organismen zum Zwecke der Anziehung von Beute oder der Kommunikation zwischen Artgenossen Licht erzeugen. Auch der Mensch hat gelernt sich die Verwendung von Licht zu Nutzen zu machen. Aufgrund seiner kombinierten Eigenschaften als Teilchen und Welle, ist es dem Licht möglich auf verschiedene Arten mit Materie zu interagieren und findet somit vielseitigen Einsatz in der Wissenschaft. Die Lichtmikroskopie und im Speziellen die Fluoreszenzmikroskopie sind fundamentale analytische Methoden zur Visualisierung von biologischen Proben. Da Licht bei Auswahl von geeigneten Wellenlängen nicht toxisch ist, eignen sich solche Techniken besonders für die Untersuchung von lebenden Zellen und Gewebe.<sup>[1]</sup> Lichtgestützte bildgebende Verfahren sind somit essentiell für die Aufklärung biologischer Strukturen und das Verständnis von Funktionen und dynamischen Prozessen auf zellulärer und molekularer Ebene.

Seit etwa 50 Jahren gelingt es Wissenschaftler\*innen durch die Entwicklung von lichtaktiven Verbindungen, wie photolabilen Schutzgruppen und Photoschaltern, chemische und biologische Prozesse nicht nur zu beobachten, sondern gezielt mit Licht zu steuern.<sup>[2]</sup> Ein besonderer Fokus der Entwicklung und Optimierung von lichtaktiven Strukturen liegt dabei auf der Erhöhung der Photolyse-Effizienz und der Verschiebung der Anregungswellenlänge in den sichtbaren bzw. den nahinfraroten (NIR-)Bereich, um somit Photoschäden aufgrund anhaltender intensiver Bestrahlung zu minimieren.<sup>[3]</sup> Um dies zu realisieren, wird sich oft das Prinzip der Zweiphotonen-Absorption zu Nutzen gemacht. Durch die nahezu simultane Absorption zweier Photonen, deren Summe die Energie ergibt, die für den entsprechenden Übergang nötig ist, wird die Anregungswellenlänge rotverschoben, wodurch aufgrund des niederenergetischen Lichts eine geringere Phototoxizität und eine tiefere Durchdringung in biologisches Gewebe erzielt werden kann.<sup>[4]</sup> Weiterhin ermöglicht die intrinsische dreidimensionale Auflösung der Zweiphotonen-Absorption eine präzise orts aufgelöste Aktivierung und verhindert somit Nebenreaktion oder Schäden in Bereichen, die sich nicht im Lichtfokus befinden.

Im Zuge dieser Doktorarbeit wurden verschiedene molekulare Systeme untersucht, die aus mehreren Chromophoren bestehen und über einen Zweiphotonen-Prozess aktiviert werden können. Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Verbesserung der Zweiphotonen-Eigenschaften einer bekannten photolabilen Schutzgruppe. Photolabile Schutzgruppen (PPG, *photolabile protecting group*) bzw. Photocages dienen der vorübergehenden Maskierung der biologischen Funktion eines (Makro-) Moleküls.<sup>[5]</sup> Sie können durch Licht geeigneter Wellenlängen abgespalten werden (*uncaging*), wodurch die Aktivität des geschützten Substrats wiederhergestellt wird. Für biologische Anwendungen, bei

denen eine hohe räumlich-zeitliche Auflösung der Substratfreisetzung, sowie die Verwendung von energiearmen Licht vonnöten ist, ist die Abspaltung von PPGs über einen Zweiphotonen-Prozess besonders wünschenswert. Das Design von Zweiphotonen-aktiven PPGs stellt aufgrund der schweren Vorhersagbarkeit der Zweiphotonen-Eigenschaften eine gewisse Herausforderung dar. Außerdem wirkte sich die Erhöhung der Zweiphotonen-Aktivität von etablierten Photocages durch chemische Modifikationen oftmals kontraproduktiv auf andere Parameter, wie die Uncaging-Quantenausbeute aus. Im zugrundeliegenden Lösungsansatz sollte daher ein bestehender Photocage mit einem guten Zweiphotonen-Absorber kovalent verknüpft werden. Dieser dient somit als „Antenne“, die das Licht über einen Zweiphotonen-Prozess einfängt (Donor) und anschließend über einen Energietransfer auf den Photocage (Akzeptor) überträgt. Dieser kann daraufhin das gewünschte Substrat freisetzen.

Im Zuge von Projekt I wurde daher zunächst ein geeigneter Zweiphotonen-Donor ausgewählt. Rhodamin-Fluorophore weisen eine starke Absorption und Emission im sichtbaren Bereich, vielseitige Funktionalisierungsmöglichkeiten und vor allem hohe Zweiphotonen-Einfangquerschnitte auf.<sup>[6]</sup> Mithilfe von TPEF-Messungen wurden Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitte von  $\sigma_2\Phi_F = 80 - 110 \text{ GM}$  im Bereich von 800 – 870 nm für ein synthetisiertes Rhodamin 101-Derivat bestimmt. Als Photocage wurde ein Rotlicht-absorbierendes BODIPY-Derivat gewählt, da dieses eine starke Absorption im Emissionsbereich des Donor-Fluorophors aufweist. Ein 3,5-Distyryl-substituiertes BODIPY wurde somit über einen Alkin-Linker in *meso*-Position mit dem bromierten Rhodamin-Derivat über eine Sonogashira-Kupplung verknüpft. Im Anschluss wurde der Energietransfer innerhalb dieser Donor-Akzeptor-Dyade mithilfe von spektroskopischen Experimenten und theoretischen Berechnungen untersucht. Die transienten UV/vis-Absorptionsspektren zeigten nach Anregung der Rhodamin-Einheit ein schnelles Abklingen der Signale, die den Rhodamin-Dynamiken zugeordnet werden können und eine zeitgleiche Bildung von BODIPY-Signalen. Das wies auf einen rapiden und effizienten Energietransfer etwa 300 fs nach Photoanregung hin. Die theoretische Berechnung des Energietransfers ergab eine Zeitskala von 200 fs und steht somit in guter Übereinstimmung mit dem experimentell bestimmten Wert. Weiterhin wurden die elektronisch angeregten Zustände der Rhodamin-BODIPY-Dyade berechnet und der Zweiphotonen-aktive Zustand ermittelt. Es wurde bestätigt, dass die Photoanregung über einen Zweiphotonen-Prozess in einen angeregten Rhodamin-Zustand ( $S_4$ ) geschieht. Nach schneller internen Konversion in einen Zustand, der ebenfalls auf dem Rhodamin lokalisiert ist ( $S_2$ ), erfolgt der Energietransfer auf das BODIPY ( $S_1$ ). Von dort sind verschiedenen Relaxationspfade, wie die gewünschte Photoreaktion, möglich. Schließlich wurde die Photolyse mithilfe von UV/vis-Absorptionsmessungen untersucht. Dazu wurde die Rhodamin-BODIPY-Dyade mit der aromatischen Abgangsgruppe *para*-Nitroanilin (PNA) ausgestattet und mit einer LED bei 565 nm (Rhodamin-Anregung) bestrahlt. Mit steigender Belichtungsdauer war die Verschiebung einer UV-Bande, die der PNA-Absorption zugeordnet werden kann, zu beobachten. Derselbe Effekt wurde

bei Bestrahlung mit einer 660 nm LED (BODIPY-Anregung) festgestellt, wenn auch mit geringerer Amplitude aufgrund des niedrigeren Extinktionskoeffizienten des BODIPYs im Vergleich zum Rhodamin. Im Kontrollexperiment mit einer Dyade ohne Abgangsgruppe war keine Verschiebung im entsprechenden UV-Bereich zu erkennen.

Zusammenfassend wurden somit Rhodamin- und BODIPY-Derivate synthetisiert und miteinander verknüpft. Die Zweiphotonen-Aktivität des Rhodamin-Fluorophors, der Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor, sowie die Photolyse des BODIPY-Photocages wurden mithilfe von spektroskopischen und theoretischen Methoden untersucht. Es resultierte eine molekulare Dyade, die sowohl über die Zweiphotonen-Anregung des Rhodamins als auch die Einphotonen-Anregung des Rhodamins oder des BODIPYs photolysiert werden und somit über ein breites Spektrum aktiviert werden konnte (Abb. I).

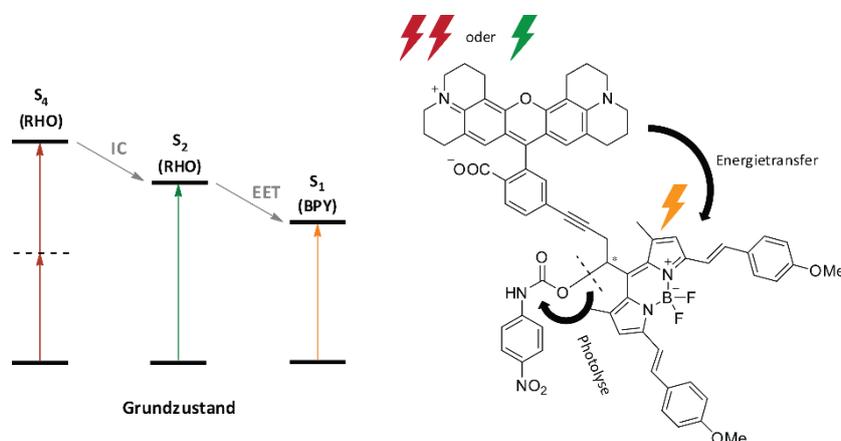


Abbildung I: Molekulare Dyade bestehend aus einem Rhodamin-Fluorophor als Donor und einem BODIPY-Photocage als Akzeptor. Sowohl die Einphotonen- bzw. Zweiphotonen-Anregung des Rhodamins mit anschließendem Energietransfer, als auch die direkte Anregung des BODIPY-Photocages führen zur Photolyse der Abgangsgruppe PNA.

Obwohl die Photolyse der oben gezeigten Rhodamin-BODIPY-Dyade anhand von UV/vis-Absorptionsmessungen qualitativ nachgewiesen werden konnte, wies der verwendete Photocage einige Nachteile auf. Zum einen besitzen Styryl-substituierte BODIPY-Photocages sehr geringe Uncaging-Quantenausbeuten, was maßgeblich durch Energieverluste aufgrund der freien Rotierbarkeit der Styryl-Reste bedingt ist.<sup>[7]</sup> Weiterhin sind die freien Doppelbindungen der Styryle anfällig für photooxidative Spaltungen. Durch die Rigidisierung dieser Substituenten kann sowohl die Uncaging-Quantenausbeute durch die Blockierung kompetitiver strahlungsloser Relaxationspfade verbessert, als auch die Photostabilität durch Verhinderung der Photooxidation erhöht werden.<sup>[8]</sup> Ein solcher Rotlicht-absorbierender BODIPY-Photocage mit starrem Grundgerüst wurde synthetisiert und an einen Rhodamin-Fluorophor geknüpft. Die Photolyse dieser neuen Dyade mit PNA als Abgangsgruppe wurde untersucht und konnte dieses Mal aufgrund der verbesserten Stabilität und Uncaging-Effizienz quantifiziert werden. Somit lieferte die Einphotonen-Photolyse der optimierten Rhodamin-BODIPY-Dyade eine Uncaging-Quantenausbeute von  $\Phi_{\text{rel}} = 1.6\%$  nach Belichtung bei 565 nm (Rhodamin-Anregung) und  $\Phi_{\text{rel}} = 1.0\%$  nach Belichtung mit 625 nm (BODIPY-Anregung).

Das Hauptaugenmerk lag jedoch auf dem Nachweis des Zweiphotonen-Uncagings. Aufgrund des geringen Anregungsvolumen der Zweiphotonen-Absorption handelt es sich hierbei um einen mikroskopischen Effekt. Somit werden zwecks ihrer hohen Sensitivität in der Regel Fluoreszenz-Essays verwendet. Weiterhin können mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops geringe Teile einer Probe ortsaufgelöst aktiviert und beobachtet werden.

Im Fall der optimierten Rhodamin-BODIPY-Dyade wurde beobachtet, dass die Uncaging-Reaktion mit einer deutlichen Änderung der Fluoreszenzeigenschaften einherging. Dadurch war es möglich die Zweiphotonen-induzierte Photolyse mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen. Dafür musste die Probe zunächst immobilisiert werden. Um eine Modifizierung der Dyade aufgrund einer kovalenten Immobilisierung zu vermeiden, wurden die Moleküle in unilamellare Liposomen eingeschlossen. Die Belichtungsexperimente mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop zeigten, dass die erwartete Fluoreszenzänderung aufgrund der Photolyse sowohl durch die Einphotonen-Anregung der Probe bei 561 nm, als auch die Zweiphotonen-Anregung bei 810 nm erzielt werden konnte (Abb. II).

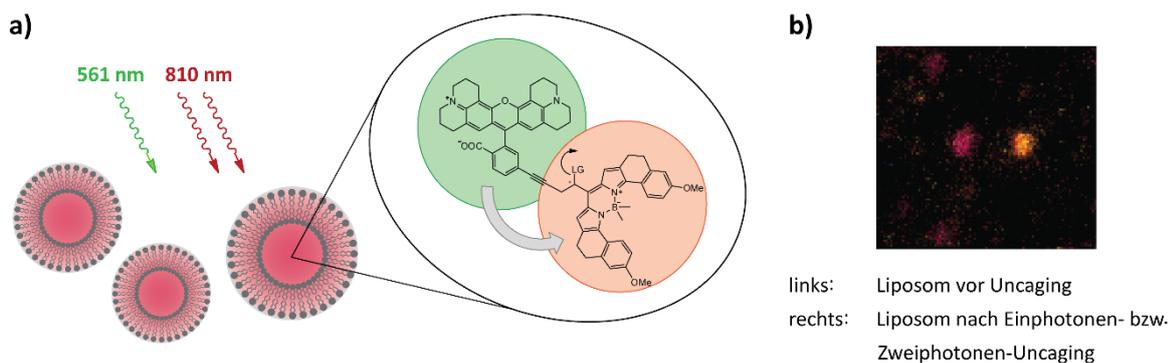


Abbildung II: a) Schematische Darstellung der optimierten Rhodamin-BODIPY-Dyade, eingebettet in Liposomen b) Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines unbelichteten Liposomen (links) und eines durch Einphotonen-Anregung bzw. Zweiphotonen-Anregung photolysierten Liposomen (rechts).

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Synthese eines photoaktivierbaren Fluorophors (PAF). Die Entwicklung von photoaktivierbaren Verbindungen führte zu deutlichen Verbesserungen im Bereich der bildgebenden Verfahren. So stützen sich manche hochauflösende Mikroskopiemethoden auf photoaktivierbare Fluorophore, um das Diffraktions-Limit zu unterlaufen.<sup>[9]</sup> Weiterhin werden PAFs für die Charakterisierung von Belichtungsaufbauten verwendet. Photoaktivierbare Fluorophore emittieren Fluoreszenzsignale nachdem sie durch Licht aktiviert wurden und liefern somit ein direktes Feedback über die Lichtverteilung und –intensität innerhalb einer Probe.<sup>[10]</sup> Folglich können die verwendeten Belichtungsmuster besser optimiert werden. Da viele Belichtungssysteme für die Untersuchung von biologischen Proben verwendet werden, ist das Design von photoaktivierbaren Fluorophoren, die mit sichtbarem Licht aktiviert werden können, besonders wünschenswert. Aufgrund der genannten Vorteile der Zweiphotonen-Absorption, ist es zudem erstrebenswert Zweiphotonen-aktive PAFs zu entwickeln, um somit Zweiphotonen-Anregungsmuster untersuchen zu können.

Rhodamine eignen sich besonders gut als photoaktivierbare Fluorophore, da sie in zwei isomeren Zuständen, einer nicht-fluoreszierenden geschlossenen Form und einer fluoreszierenden offenen Form, vorliegen können. Mithilfe von photolabilen Schutzgruppen kann ein Rhodamin in seine dunkle Lacton-Form gezwungen werden.<sup>[11]</sup> Durch Bestrahlung mit Licht der geeigneten Wellenlänge wird die PPG abgespalten und der Fluorophor kann seine fluoreszierende zwitterionische Form annehmen. Bis dato wurden überwiegend geschützte Rhodamine beschrieben, die mit UV-Licht aktiviert werden können.<sup>[12,13]</sup> In Projekt II sollte daher ein Rhodamin-Fluorophor hergestellt werden, der sowohl mit sichtbarem Licht als auch mit NIR-Licht über einen Zweiphotonen-Prozess aktiviert werden kann.

Im Zuge dessen wurde ein Q-Rhodamin-Derivat synthetisiert und mit einem DEACM<sub>450</sub>-Photocage geschützt, da diese PPG eine hohe Uncaging-Effizienz und gute Zweiphotonen-Eigenschaften aufweist.<sup>[14]</sup> Weiterhin besaß das Rhodamin einen Thiol-Linker, um den Fluorophor an ein Hydrogel binden zu können. Zunächst wurde die Photolyse des geschützten Fluorophors untersucht, indem die Fluoreszenzspektren betrachtet wurden. Im gecageten Zustand wies der Fluorophor ein kaum messbares Fluoreszenzsignal auf. Während der Bestrahlung mit einer 455 nm LED konnte dagegen ein deutlicher Fluoreszenzanstieg beobachtet werden, welcher in einem insgesamt 32-fachen Intensitätsanstieg am Emissionsmaximum des Rhodamins gipfelte. Für die Betrachtung unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurde der PAF zunächst in einem Hydrogel immobilisiert. Anschließend wurden Fluoreszenzbilder vor und nach Photoanregung von bestimmten Regionen des Hydrogels aufgenommen. Durch das Uncaging der Probe konnten helle, definierte Muster geschrieben und ausgelesen werden. Die Photoaktivierung führte dabei sowohl über die Einphotonen-Anregung mit blauem Licht (488 nm) als auch über den Zweiphotonen-Prozess mit NIR-Licht (920 nm) zur Generierung von stabilen, gleichmäßigen Fluoreszenzmustern mit hohem Kontrast (Abb. III).

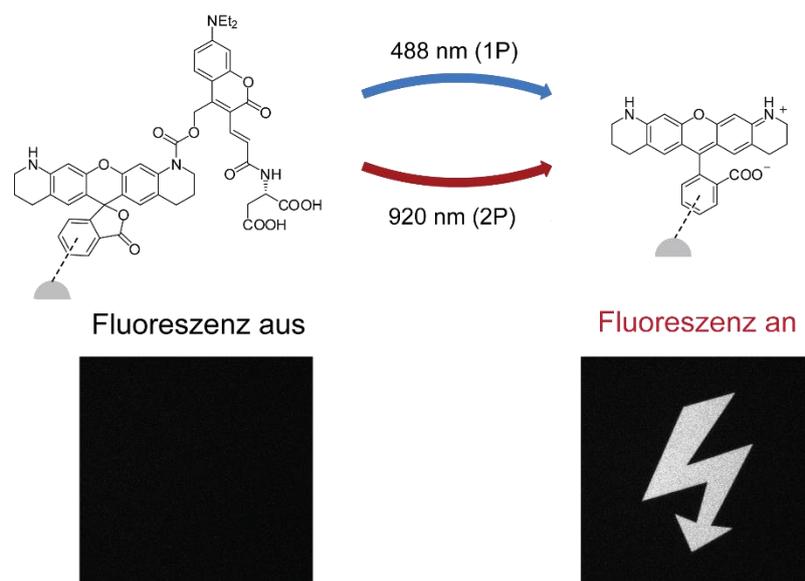


Abbildung III: Ortsaufgelöste Fluoreszenzaktivierung durch Einphotonen- bzw. Zweiphotonen-Uncaging des geschützten immobilisierten Rhodamin-Fluorophors unter dem Fluoreszenzmikroskop.

## Summary

Light has always played a crucial role in nature and is utilized by various organisms in different ways. Examples of this include photosynthesis, where plants convert carbon dioxide and water into oxygen and glucose using light energy, or bioluminescence, where certain organisms produce light to attract prey or communicate with others of their species. Humans have also learned to harness the use of light. Due to its combined properties as both a particle and a wave, light is able to interact with matter in various ways and is therefore widely used in science. Light microscopy, particularly fluorescence microscopy, is a fundamental analytical method for the visualization of biological samples. Since light is not toxic if chosen the right wavelength, such techniques are particularly suitable for studying living cells and tissues.<sup>[1]</sup> Light-based imaging techniques are therefore essential for elucidating biological structures and understanding functions and dynamic processes at cellular and molecular level.

For roughly 50 years, scientists have been able to not only observe but also selectively control chemical and biological processes with light by the development of light-activatable compounds, such as photolabile protecting groups or photoswitches.<sup>[2]</sup> The design and optimization of such light-activatable structures particularly focusses on improving the photolysis efficiency and shifting the excitation wavelength towards the visible and near-infrared (NIR) range, thereby minimizing photodamage due to prolonged intensive irradiation.<sup>[3]</sup> To achieve this, the principle of two-photon absorption is often used. By the nearly simultaneous absorption of two photons, whose sum equals the energy needed for the according transition, the excitation wavelength is shifted into the NIR region. The low-energy light thus provides less phototoxicity and deeper tissue penetration.<sup>[4]</sup> Moreover, the intrinsic three-dimensional resolution of two-photon absorption enables a precise spatially resolved activation and therefore prevents out-of-focus side reactions or damage.

In the course of this doctoral thesis, various molecular systems consisting of multiple chromophores were investigated, which can be activated through a two-photon process. The first part of the work deals with improving the two-photon properties of a known photolabile protecting group. Photolabile protecting groups (PPGs) or photocages are used for the temporary masking of the biological function of a (macro)molecule.<sup>[5]</sup> They can be cleaved off by light of the appropriate wavelength (uncaging), thereby restoring the activity of the protected substrate. For biological applications, which require high spatiotemporal resolution of substrate release, as well as the use of low-energy light, the cleavage of PPGs through a two-photon process is particularly desirable. However, the design of two-photon-activatable PPGs is challenging due to the difficult prediction of two-photon properties. Furthermore, increasing the two-photon activity of established photocages by chemical modifications often had an adverse effect on other parameters such as the uncaging quantum yield. In the underlying approach, an existing photocage should therefore be covalently linked to a good two-photon absorber. This

moiety thus serves as an "antenna" that captures the light through a two-photon process (donor) and then transfers it onto the photocage (acceptor) *via* energy transfer. The photocage can subsequently release the desired substrate.

In the course of project I, an appropriate two-photon donor was initially selected. Rhodamine fluorophores exhibit strong absorption and emission in the visible range, versatile functionalization possibilities and especially high two-photon absorption cross-sections.<sup>[6]</sup> Two-photon action cross-sections of  $\sigma_2\Phi_F = 80 - 110 \text{ GM}$  in the range of 800 - 870 nm were determined for a synthesized rhodamine 101 derivative using TPEF measurements. A red light-absorbing BODIPY derivative was chosen as photocage because it exhibits strong absorption in the emission range of the donor fluorophore. A 3,5-distyryl-substituted BODIPY was thus linked to a brominated rhodamine derivative *via* Sonogashira coupling through an alkyne linker in *meso*-position of the BODIPY. Subsequently, the energy transfer within this donor-acceptor dyad was investigated using spectroscopic measurements and theoretical calculations. Transient UV/vis absorption spectra showed a rapid decay of signals associated with the rhodamine dynamics and a simultaneous formation of BODIPY signals after excitation of the rhodamine unit. This indicated a fast and efficient energy transfer approximately 300 fs after photoexcitation. The theoretical calculation of energy transfer yielded a timescale of 200 fs, which is in good agreement with the experimentally determined value. Furthermore, the electronically excited states of the rhodamine-BODIPY dyad were calculated and the two-photon-active state was determined. It was confirmed that photoexcitation occurs through a two-photon process into an excited rhodamine state ( $S_4$ ). After rapid internal conversion to a state also localized on rhodamine ( $S_2$ ), energy transfer to BODIPY ( $S_1$ ) takes place. From there, various relaxation pathways, such as the desired photoreaction, are possible. Finally, the photolysis was investigated using UV/vis absorption measurements. For this purpose, the rhodamine-BODIPY dyad was equipped with the aromatic leaving group *para*-nitroaniline (PNA) and irradiated with an LED at 565 nm (rhodamine excitation). With increasing illumination time, a shift of a UV band, which can be attributed to PNA absorption, could be observed. The same effect was monitored when irradiated with a 660 nm LED (BODIPY excitation), although with a lower amplitude due to the smaller extinction coefficient of BODIPY compared to rhodamine. In the control experiment with a dyad without leaving group, no shift in the corresponding UV range was observed.

In summary, rhodamine and BODIPY derivatives were synthesized and connected. The two-photon activity of the rhodamine fluorophore, the energy transfer between donor and acceptor, and the photolysis of the BODIPY photocage were investigated using spectroscopic and theoretical methods. This resulted in a molecular dyad that can be photolyzed by both two-photon excitation of the

rhodamine and the one-photon excitation of the rhodamine or BODIPY unit, thus allowing activation over a broad spectrum (Fig. 1).

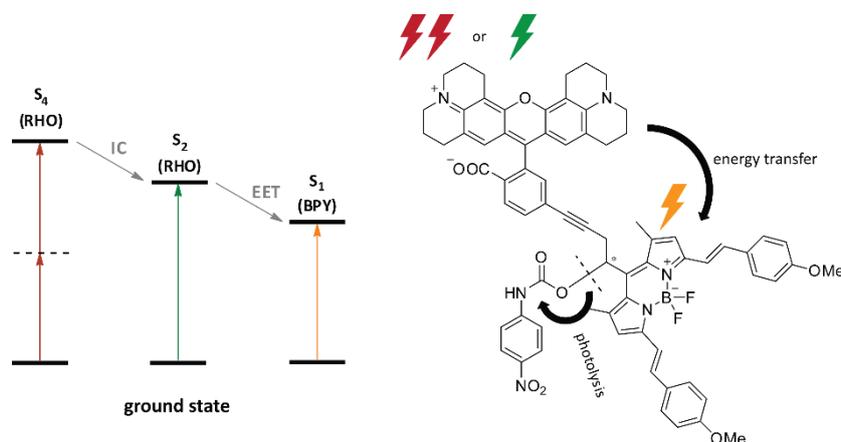


Figure 1: Molecular dyad consisting of a rhodamine fluorophore as donor and a BODIPY photocage as acceptor. Both one- and two-photon excitation of the rhodamine with subsequent energy transfer, as well as the direct excitation of the BODIPY photocage lead to photolysis of the leaving group PNA.

Although the photolysis of the rhodamine-BODIPY dyad shown above could be qualitatively demonstrated through UV/vis absorption measurements, the used photocage had some disadvantages. Firstly, styryl-substituted BODIPY photocages have very low uncaging quantum yields, mainly due to energy loss caused by the free rotation of the styryl groups.<sup>[7]</sup> Secondly, the free double bonds are susceptible to photooxidative cleavage. By rigidifying these substituents, both the uncaging quantum yield can be improved by blocking competitive non-radiative relaxation pathways, and the photostability can be increased by preventing the photooxidation.<sup>[8]</sup> Such a red light-absorbing BODIPY photocage with rigid scaffold was synthesized and attached to a rhodamine fluorophore. The photolysis of this new dyad with PNA as leaving group was investigated and, this time, could be quantified due to the improved stability and uncaging efficiency. Thus, the one-photon photolysis of the optimized rhodamine-BODIPY dyad provided an uncaging quantum yield of  $\Phi_{\text{rel}} = 1.6\%$  upon irradiation at 565 nm (rhodamine excitation) and  $\Phi_{\text{rel}} = 1.0\%$  upon irradiation at 625 nm (BODIPY excitation).

However, the main focus was the verification of two-photon uncaging. Due to the small excitation volume of two-photon absorption, this is a microscopic effect. Therefore, fluorescence assays are typically used for their high sensitivity. Additionally, by using a fluorescence microscope, small parts of a sample can be activated and observed with high spatial resolution. In the case of the optimized rhodamine-BODIPY dyad, it was found that the uncaging reaction was accompanied by a significant change in fluorescence properties. This allowed for the detection of two-photon-induced photolysis by means of fluorescence microscopy. To achieve this, the sample had to be immobilized. To avoid the modification of the dyad due to covalent immobilization, the molecules were encapsulated in unilamellar liposomes. The irradiation experiments with the confocal fluorescence microscope showed

that the expected fluorescence change due to photolysis could be achieved both by one-photon excitation of the sample at 561 nm and by two-photon excitation at 810 nm (Fig. II).

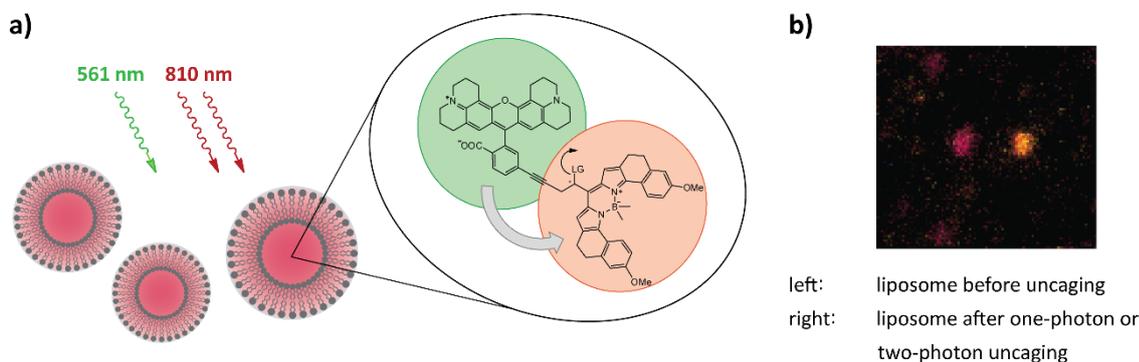


Figure II: a) Schematic depiction of the optimized rhodamine-BODIPY dyad, embedded into liposomes b) Fluorescence microscopic image of a non-irradiated liposome (left) and a liposome photolyzed by either one-photon or two-photon excitation (right).

The second part of this work deals with the synthesis of a photoactivatable fluorophore (PAF). The development of photoactivatable compounds has led to significant improvements in the field of imaging techniques. Some high-resolution microscopy methods rely on photoactivatable fluorophores to surpass the diffraction limit.<sup>[9]</sup> Furthermore, PAFs are used for the characterization of illumination setups. Photoactivatable fluorophores emit fluorescent signals after activation by light, thus providing a direct feedback on the light distribution and intensity within a sample.<sup>[10]</sup> This allows for better optimization of the used illumination patterns. Since many irradiation systems are used for the investigation of biological samples, the design of photoactivatable fluorophores that can be activated with visible light is particularly desirable. Due to the mentioned advantages of two-photon absorption, it is also worthwhile to develop two-photon-activatable PAFs in order to investigate two-photon excitation patterns.

Rhodamines are especially well-suited as photoactivatable fluorophores because they can exist in two isomeric states, a non-fluorescent closed form and a fluorescent open form. By using photolabile protecting groups, a rhodamine can be forced into its dark lactone form.<sup>[11]</sup> Upon irradiation with light of the appropriate wavelength, the PPG is cleaved off and the fluorophore can convert to its fluorescent zwitterionic form. To date, photoactivatable rhodamines that can be activated with UV light have mainly been described.<sup>[12,13]</sup> Therefore, the goal of project II was the development of a caged rhodamine fluorophore that can be activated by both visible light and NIR light by a two-photon process.

As a result, a Q-rhodamine derivative was synthesized and protected with a DEACM<sub>450</sub> photocage, since this PPG exhibits high uncaging efficiency and good two-photon properties.<sup>[14]</sup> Furthermore, the rhodamine possessed a thiol linker to allow the fluorophore to be bound to a hydrogel. Initially, the

photolysis of the caged fluorophore was investigated by monitoring the fluorescence spectra. In the caged state, the fluorophore showed barely measurable fluorescence signal. However, during irradiation with a 455 nm LED, a significant rise of fluorescence was observed, peaking in a 32-fold overall increase in intensity at the emission maximum of the rhodamine. For the investigation under the confocal fluorescence microscope, the PAF was first immobilized in a hydrogel. Subsequently, fluorescence images of specific regions of the hydrogel were taken before and after photoexcitation. It was possible to write and read out bright, defined patterns by photolysis of the sample. The photoactivation occurred through both one-photon excitation with blue light (488 nm) and two-photon excitation with NIR light (920 nm), resulting in the generation of stable and even fluorescence patterns with high contrast (Fig. III).

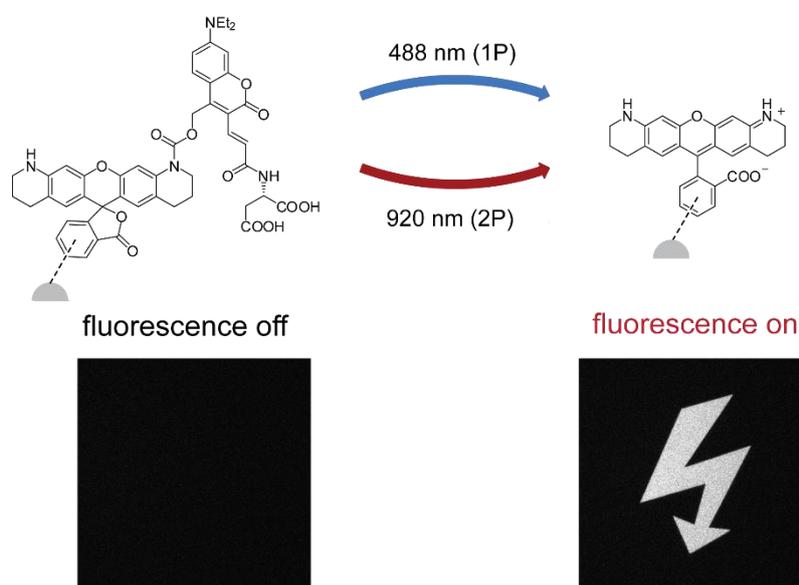


Figure III: Spatially resolved fluorescence activation by one-photon or two-photon excitation of the caged immobilized rhodamine fluorophore under the confocal fluorescence microscope.

## Publikationen

Bei der vorliegenden Doktorarbeit handelt es sich um eine kumulative Dissertation basierend auf folgenden Publikationen:

- I. **Ultrafast and Efficient Energy Transfer in a One- and Two-Photon Sensitized Rhodamine-BODIPY Dyad: A Perspective for Broadly Absorbing Photocages**  
M. Asido\*, C. Hamerla\*, R. Weber\*, M. Horz\*, M. Shyam Niraghatam, A. Heckel, I. Burghardt, J. Wachtveitl, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2022**, *24*, 1795 – 1802, DOI: 10.1039/d1cp04528h.
  
- II. **Rhodamine-Sensitized Two-Photon Activation of a Red Light-Absorbing BODIPY Photocage**  
R. Weber, K. Chok, S. Junek, C. Glaubitz, A. Heckel, *Chem. Eur. J.* **2023**, *29*, e202300149, DOI: 10.1002/chem.202300149.
  
- III. **A Blue Light and Two-Photon Activatable Rhodamine Fluorophore**  
R. Weber, S. Junek, A. Heckel, *Chem. Eur. J.* **2023**, e202300997, DOI: 10.1002/chem.202300997.

(\* Die Anteile dieser Autoren sind als gleichwertig anzusehen.)



## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>I</b>
<b>Summary</b>	<b>VI</b>
<b>Publikationen</b>	<b>XI</b>
<b>1. Theoretischer Hintergrund</b>	<b>1</b>
1.1. Photoaktivierbare Verbindungen	1
1.1.1. Photoschalter und photolabile Schutzgruppen	1
1.1.2. Cumarin-Schutzgruppen	3
1.1.3. BODIPY-Schutzgruppen	5
1.2. Zweiphotonen-Absorption	7
1.2.1. Allgemeine Beschreibung	7
1.2.2. Messmethoden	10
1.2.3. Zweiphotonen-Fluorophore	11
1.2.4. Zweiphotonen-Uncaging	14
1.2.5. Energietransferdyaden für verbessertes 2P-Uncaging	15
1.3. Fluoreszenzmikroskopie	17
1.3.1. Klassische Lichtmikroskopie	17
1.3.2. Fluoreszenz	18
1.3.3. Aufbau und Funktionsweise	20
1.3.4. Hochauflösende Mikroskopiemethoden	21
1.4. Photoaktivierbare Fluorophore	24
1.4.1. Allgemeine Funktion und Beispiele	24
1.4.2. Rhodamine als photoaktivierbare Fluorophore	26
<b>2. Motivation &amp; Zielsetzung</b>	<b>30</b>
2.1. Projekt I: Rhodamin-BODIPY-Dyade für verbessertes 2P-Uncaging	30
2.2 Projekt II: Einphotonen- und Zweiphotonen-Aktivierung eines Rhodamin-Fluorophors	31
<b>3. Ergebnisse &amp; Diskussion</b>	<b>32</b>
3.1. Rhodamin-BODIPY-Dyade für verbessertes Zweiphotonen-Uncaging	32

3.1.1. Synthese & Charakterisierung des Rhodamin-Fluorophors	32
3.1.2. Synthese der Rhodamin-BODIPY-Dyade	35
3.1.3. Spektroskopische & rechnergestützte Untersuchung der Rhodamin-BODIPY-Dyade	39
3.1.4. Photolyse der Rhodamin-BODIPY-Dyade	43
3.2. Optimierung der Rhodamin-BODIPY-Dyade für Zweiphotonen-Uncaging	45
3.2.1. Synthese des verbesserten BODIPY-Photocages und der neuen Dyaden	45
3.2.2. Photophysikalische & photochemische Charakterisierung der neuen Dyaden	47
3.2.3. Zweiphotonen-Uncaging unter dem Fluoreszenzmikroskop	50
3.3. Einphotonen- und Zweiphotonen-Aktivierung eines Rhodamin-Fluorophors	53
3.3.1. Synthese des gecageten Rhodamins	53
3.3.2. Photophysikalische Charakterisierung des gecageten Rhodamins	55
3.3.3. Photolyse des gecageten Rhodamins	57
3.3.4. 1P- und 2P-Aktivierung des gecageten Rhodamins unter dem Fluoreszenzmikroskop	59
<b>4. Fazit</b>	<b>62</b>
<b>5. Anhang</b>	<b>64</b>
5.1. Abkürzungsverzeichnis	64
5.2. Abbildungsverzeichnis	67
5.3. Erklärung zum Urheberrecht und Copyright	70
5.4. Literaturverzeichnis	71
<b>6. Danksagung</b>	<b>79</b>
<b>7. Lebenslauf</b>	<b>81</b>
<b>8. Autorenanteile der Publikationen</b>	<b>8279</b>





## 1. Theoretischer Hintergrund

### 1.1. Photoaktivierbare Verbindungen

#### 1.1.1. Photoschalter und photolabile Schutzgruppen

Die Möglichkeit chemische Prozesse mit Licht zu untersuchen und zu regulieren diente als Wegbereiter für wesentliche Fortschritte in der biologischen und medizinischen Chemie, unter anderem in den Bereichen der hochauflösenden bildgebenden Verfahren,<sup>[15–17]</sup> der photodynamischen Therapie<sup>[18–20]</sup> oder der Wirkstofffreisetzung.<sup>[21–23]</sup> Durch die Verwendung von Licht als externen Auslöser kann eine sehr hohe räumliche und zeitliche Auflösung der Aktivierung einer biologisch relevanten Spezies erzielt werden.<sup>[2]</sup> Die Vorteile von Licht sind eine einfache Dosierbarkeit, die Möglichkeit zur lokalen Anwendung und (bei Auswahl von geeigneten Wellenlängen) eine geringe Toxizität.<sup>[5]</sup> Allgemein werden photoaktivierbare Verbindungen in zwei Klassen unterteilt, Photoschalter und photolabile Schutzgruppen. Photoschalter sind Moleküle, die in zwei oder mehreren isomeren Zuständen, zwischen denen lichtinduziert gewechselt werden kann, vorliegen können. Diese Zustände müssen sich in ihrer biologischen Aktivität unterscheiden, sodass durch das Schalten eine Aktivierung bzw. Desaktivierung erzielt werden kann.<sup>[24]</sup> Es handelt sich somit um einen reversiblen Prozess. Der bekannteste Vertreter der Photoschalter ist das Azobenzol, welches durch Licht der geeigneten Wellenlänge zwischen seiner *trans*- und *cis*-Konfiguration isomerisieren kann. Weitere oft verwendete Photoschalter sind Hemithioindigos, Diarylethene, Spiropyrane oder Fulgide (Abb. 1).<sup>[2,25,26]</sup>

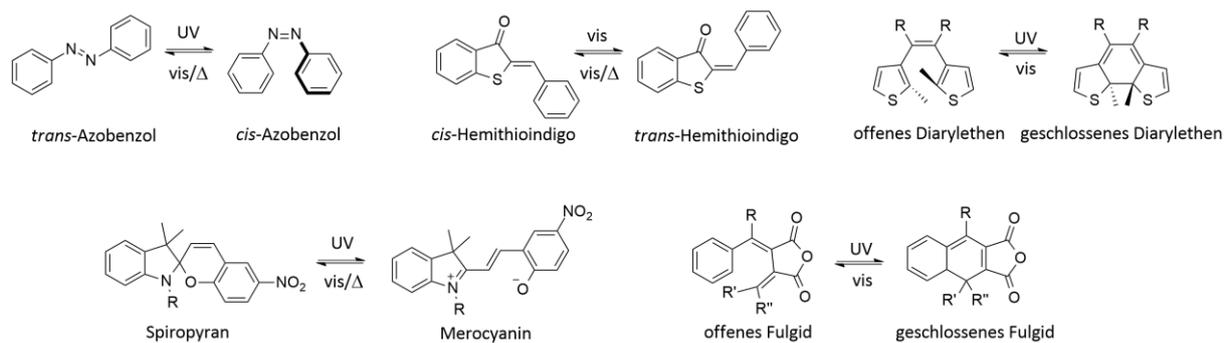


Abbildung 1: Übersicht häufig verwendeter Photoschalter in ihren jeweiligen isomeren Zuständen, darunter Azobenzole, Hemithioindigos, Diarylethene, Spiropyrane und Fulgide.

Der Fokus dieser Doktorarbeit liegt jedoch auf der zweiten Klasse photoaktivierbarer Verbindungen, den photolabilen Schutzgruppen (PPG, *photolabile protecting group*). Es handelt sich hierbei um chemische Modifikationen, die die biologische Aktivität eines Moleküls vorübergehend blockieren. Durch Bestrahlung mit Licht der geeigneten Wellenlänge können PPGs irreversibel abgespalten und die Funktion des maskierten Moleküls wiederhergestellt werden.<sup>[3]</sup>

Die Entwicklung von photolabilen Schutzgruppen für biologische Anwendungen geht auf die Arbeiten von Engels und Schläger 1977 zurück, die ein lichtaktivierbares zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) synthetisierten.<sup>[27]</sup> Kurze Zeit darauf publizierten Hoffman und Kaplan 1978 ein photogeschütztes Adenosintriphosphat (ATP) und etablierten den Begriff *Photocage* für eine chemische Gruppe, die mithilfe von Licht abgespalten werden kann (Abb. 2).<sup>[28]</sup>

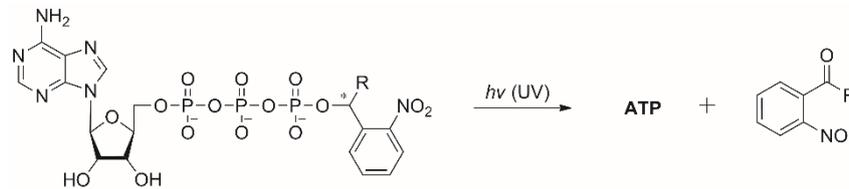


Abbildung 2: Abspaltung einer ortho-Nitrobenzyl-Schutzgruppe von einem gecagten ATP mithilfe von UV-Licht.

Ein effektiver Photocage muss mehrere Anforderungen erfüllen. Wichtig ist eine starke Absorption in einem Wellenlängenbereich, der aus physiologischer Sicht unbedenklich ist ( $\lambda > 400 \text{ nm}$ ).<sup>[29]</sup> UV-Licht kann bei zu langer Einwirkung zellschädigend wirken. Das liegt daran, dass viele Zellbestandteile in diesem Bereich absorbieren, was zu unerwünschten mutagenen Reaktionen, wie Thymin-Dimerisierungen<sup>[30]</sup> oder Deaminierungen<sup>[31]</sup> führen kann. Zudem wird die Eindringtiefe des verwendeten Lichts aufgrund der Absorption oder Streuung durch endogene Biomoleküle, wie Hämoglobin oder Melanin, stark eingeschränkt.<sup>[32]</sup>

Neben einem hohen molaren Absorptionskoeffizienten  $\varepsilon$ , der als Maß für das Absorptionsvermögen eines Chromophors gilt, muss das Molekül auch in der Lage sein, die absorbierten Photonen für einen Bindungsbruch zu nutzen. Dies spiegelt sich in der Uncaging-Quantenausbeute  $\Phi_{\text{rel}}$  wieder. Diese gibt das Verhältnis zwischen dem durch die Photolyse freigesetztem Substrat  $n_{\text{rel}}$  und der Menge an absorbierten Photonen  $n_p$  an (Gl. 1).<sup>[33]</sup>

$$\Phi_{\text{rel}} = n_{\text{rel}}/n_p \quad (1)$$

Die Effizienz einer Uncaging-Reaktion ist demnach durch das Produkt  $\varepsilon\Phi_{\text{rel}}$  gegeben. Um lange Belichtungszeiten zu vermeiden, sollte die Photoreaktion also schnell und effizient ablaufen. Weiterhin sollten durch das Anregungslicht keine unerwünschten Nebenreaktionen ausgelöst werden. Das Photolyseprodukt darf nicht toxisch sein und sollte das Anregungslicht möglichst wenig effizient absorbieren, um kompetitive Absorptionseffekte gering zu halten. Um den Photocage universell anwenden zu können, sollten Synthese und Anbringung des Cages einfach sein und eine Vielzahl an funktionellen Gruppen toleriert werden. Letztlich sollte die PPG für eine Anwendung in biologischem Medium ausreichend wasserlöslich und hydrolysestabil sein.<sup>[34]</sup>

In den letzten Jahrzehnten wurden PPGs hinsichtlich dieser Kriterien stets weiterentwickelt und optimiert, sodass inzwischen das gesamte Spektrum zwischen dem UV- und dem NIR-Bereich

abgedeckt ist (Abb. 3).<sup>[3,34–37]</sup> In den Abschnitten 1.1.2. und 1.1.3. wird im Folgenden speziell auf die Cumarin- und BODIPY-Schutzgruppen eingegangen.

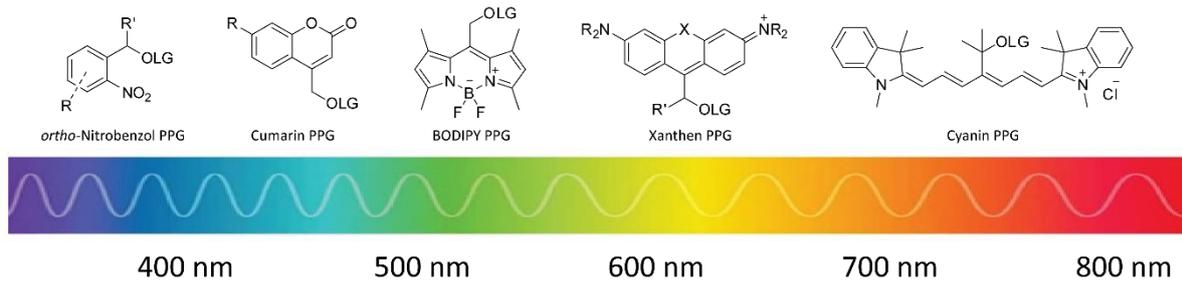


Abbildung 3: Übersicht der Grundgerüste gängiger photolabiler Schutzgruppen: ortho-Nitrobenzol, Cumarin, BODIPY, Xanthen und Cyanin, angeordnet nach der Anregungswellenlänge. LG = Abgangsgruppe (engl.: leaving group).

### 1.1.2. Cumarin-Schutzgruppen

Cumarine gehören strukturell zur Verbindungsklasse der 2H-1-Benzopyran-2-one. Obwohl schon zuvor häufig aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften verwendet, erfolgte die erste Beschreibung als photolabile Schutzgruppe 1984 von Givens und Matuszewski.<sup>[38]</sup> Diese zeigten, dass Cumarinyl-4-methyl-Derivate durch Bestrahlung mit Licht Phosphate freisetzen können. Inzwischen ist der Photolysemechanismus von Cumarin PPGs gut untersucht. Die Anregung des Chromophors geht mit einer Ladungsseparation einher, welche anschließend zu einem heterolytischen Bindungsbruch führt. Alternativ kann der angeregte Zustand durch Fluoreszenz oder strahlungsfreie Relaxation deaktiviert werden. Das bei der gewünschten Heterolyse entstandene Ionenpaar kann theoretisch wieder zum Edukt rekombinieren. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass das Cumarinylkation mit einem nukleophilen Solvensmolekül reagiert, da diese im Überschuss vorliegen (Abb. 4).<sup>[39]</sup>

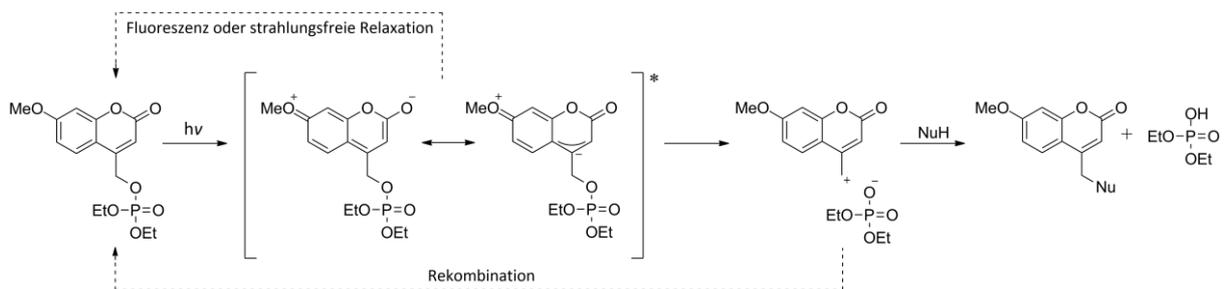


Abbildung 4: Mechanismus der Photolyse eines Cumarinyl-4-methyl-geschützten Phosphats.

Allgemein liegen die Vorteile von Cumarin-basierten PPGs bei hohen molaren Absorptionskoeffizienten im sichtbaren Bereich und guten Uncaging-Quantenausbeuten. Die Photoreaktion weist eine schnelle Kinetik auf und viele Derivate zeigen sogar eine gute Zweiphotonen-Aktivität.<sup>[40]</sup> Zudem besitzen die Moleküle eine hohe thermische Stabilität und können vielseitig synthetisch modifiziert werden. Die strukturelle Variabilität sorgte in den letzten Jahren für eine

umfangreiche Entwicklung im Bereich der Cumarin-Schutzgruppen. Hauptsächlich wurde dabei versucht, das Absorptionsmaximum bathochrom zu verschieben und den molaren Absorptionskoeffizienten, sowie die Uncaging-Quantenausbeute zu erhöhen (Abb. 5).

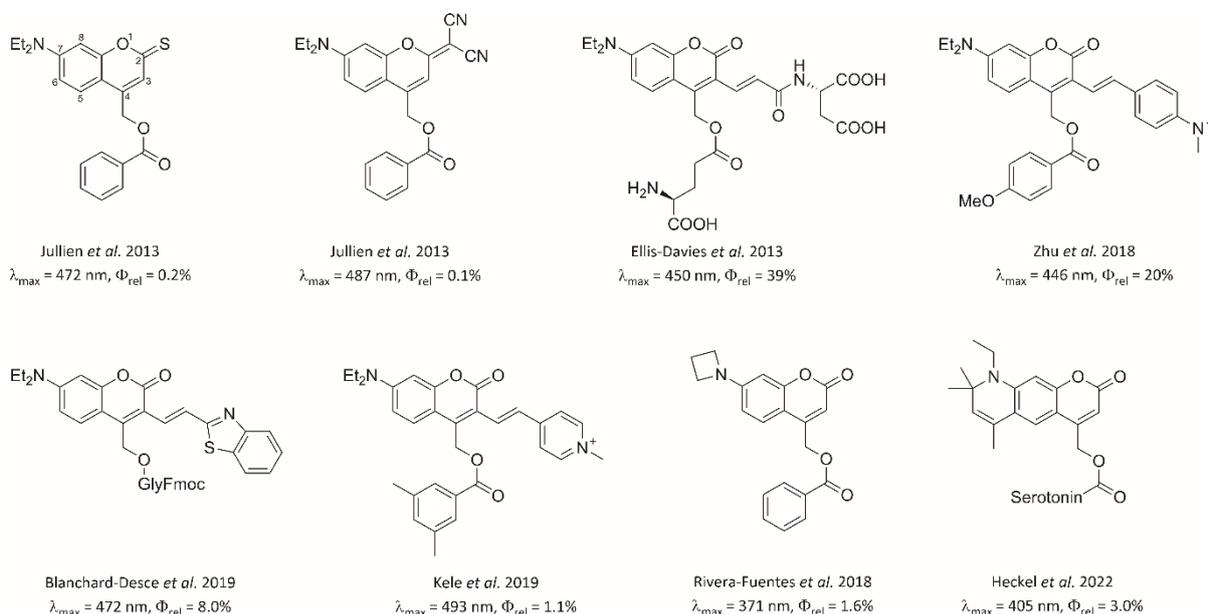


Abbildung 5: Übersicht von Cumarin-Modifikationen zur Verbesserung der photochemischen Eigenschaften.

Es wurde gezeigt, dass elektronenschiebende Substituenten in 7-Position das Absorptionsmaximum in den sichtbaren Bereich verschieben können.<sup>[41,42]</sup> Dazu wurden häufig Methoxy- oder Diethylamino-substituierte Cumarine verwendet.<sup>[43]</sup> Zusätzliche elektronenziehende Reste in 2- oder 3-Position erhöhen den intramolekularen Ladungstransfer-Charakter (ICT, *intramolecular charge transfer*) des Moleküls und bewirken eine weitere Rotverschiebung.<sup>[44]</sup> Jullien *et al.* publizierten 2013 die Synthese neuer Diethylaminocumarin-Derivate (DEACM), die in 2-Position entweder ein Schwefelatomben, welches durch sein leeres 3d-Orbital in einen ICT involviert sein kann, oder eine Malonitril-Gruppe, welche sehr elektronenziehend ist, besitzen und somit effizient zwischen 350 – 400 nm photolysiert werden konnten.<sup>[45]</sup> Die Gruppen von Ellis-Davies,<sup>[14]</sup> Zhu,<sup>[46]</sup> Blanchard-Desce<sup>[47]</sup> und Kele<sup>[48]</sup> spezialisierten sich auf die Erweiterung des konjugierten  $\pi$ -Systems in 3-Position. Dadurch konnten hohe molare Absorptionskoeffizienten, eine Absorption über 450 nm und teilweise sehr gute Zweiphotonen-Aktivität erzielt werden. In einigen Fällen litt allerdings die Uncaging-Quantenausbeute unter diesen Modifikationen, da die freie Doppelbindung auch anfällig für lichtinduzierte *trans/cis*-Isomerisierungen sein kann. Rivera-Fuentes *et al.* verfolgten daher einen anderen Ansatz. Anstatt  $\epsilon$  zu erhöhen, befassten sie sich mit der Optimierung von  $\Phi_{\text{rel}}$ . Sie zeigten, dass die Uncaging-Quantenausbeute von Azetidin-substituierten Cumarinen im Vergleich zu DEACM deutlich erhöht werden konnte, da somit unproduktive Desaktivierungskanäle aus dem angeregten Zustand, wie Wasserstoffbrückenbindungen zu Lösungsmittelmolekülen, blockiert werden konnten.<sup>[49]</sup> Dieser Effekt wurde ebenfalls von unserer

Gruppe untersucht. Durch die Synthese verschiedener ATTO390-Schutzgruppen konnte gezeigt werden, dass die Uncaging-Quantenausbeute sowohl durch die konformationelle Einschränkung der Amino-Substituenten durch rigide Gerüste, als auch durch die Verhinderung von Wasserstoffbrückenbindungen verbessert werden kann.<sup>[50]</sup>

### 1.1.3. BODIPY-Schutzgruppen

Die Synthese des Boron-dipyrrromethen-Grundgerüsts (BODIPY) geht auf die Arbeiten von Treibs und Kreuzer 1968 zurück.<sup>[51]</sup> Die Verwendung als photolabile Schutzgruppe wurde etwa zeitgleich 2015 von den Gruppen Klán,<sup>[52]</sup> Weinstain<sup>[53]</sup> und Winter<sup>[54]</sup> publiziert. Die Idee Fluorophore in Photocages umzuwandeln, war zu diesem Zeitpunkt am Beispiel von Cumarinen oder Xanthenen bereits erprobt. Gemäß Zimmermanns *meta*-Effekt ist ein photoinduzierter heterolytischer Bindungsbruch dann möglich, wenn bei der elektronischen Anregung eine Verschiebung der Elektronendichte zu einem sp<sup>2</sup>-Kohlenstoff erfolgt, welcher in  $\alpha$ -Position eine Abgangsgruppe trägt.<sup>[55]</sup> Das  $\sigma$ -antibindende Orbital der Abgangsgruppe kann demnach mit dem LUMO des Chromophors überlappen, was zur Bindungsspaltung führt. Basierend auf diesem Prinzip wurde mithilfe von Hückel-MO-Berechnungen festgestellt, dass sich die *meso*-Position von BODIPY für die Anbringung einer lichtspaltbaren Abgangsgruppe eignet (Abb. 6a).<sup>[52]</sup> Der Mechanismus der Photolyse verläuft bei BODIPYs demnach ähnlich wie bei den Cumarinen. In einer photochemischen S<sub>N</sub>1-Reaktion führt die elektronische Anregung zu einem Bindungsbruch in *meso*-Position. Das gebildete Carbokation kann anschließend von einem nukleophilen Lösungsmittelmolekül angegriffen werden (Abb. 6b).<sup>[56]</sup> Als stabiles Photolyseprodukt würde dabei in Wasser der *meso*-substituierte Alkohol bzw. in Methanol der Methylether gebildet werden. Allerdings können als Nebenprodukte der Photolyse auch deborylierte Verbindungen oder BODIPY-Dimere entstehen.<sup>[54]</sup>

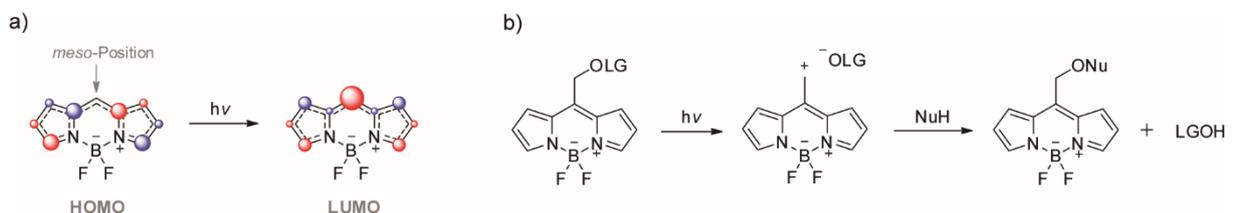


Abbildung 6: a) HOMO-LUMO-Übergang von BODIPY im Hückel-Modell. b) Photolysemechanismus der BODIPY PPG: Nach Anregung erfolgt ein heterolytischer Bindungsbruch in *meso*-Position mit anschließendem Angriff eines Nucleophils.

Durch die Entwicklung von BODIPY-Cages wurde eine Photoaktivierung mit grünem Licht ermöglicht. Das Grundgerüst des Chromophors weist ein Absorptionsmaximum bei 510 nm auf. Allerdings kann die Absorption durch einfache chemische Modifikationen bis in den roten Spektralbereich verschoben werden. BODIPYs weisen hohe molaren Absorptionskoeffizienten ( $\epsilon = 50000 - 120000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )<sup>[57]</sup> auf,

sowie hohe Fluoreszenzquantenausbeuten (i.d.R.  $\Phi_F > 0.5$ ).<sup>[58]</sup> Die lange Fluoreszenzlebensdauer ( $\tau \approx 5\text{-}6\text{ ns}$ )<sup>[59]</sup> könnte dabei von Vorteil für photochemische Reaktionen sein, da die beiden Prozesse auf ähnlichen Zeitskalen ablaufen. BODIPYs weisen weiterhin eine hohe thermische Stabilität, sowie eine hohe Photostabilität auf. Die photochemischen Eigenschaften sind wenig sensitiv bezüglich Polarität und pH-Wert der Umgebung. Weitere Vorteile sind die geringe Toxizität, die einfache synthetische Zugänglichkeit und die vielseitigen Funktionalisierungsmöglichkeiten des BODIPY-Grundgerüsts.<sup>[60]</sup>

Ein großer Nachteil der Verwendung von BODIPYs als photolabile Schutzgruppe liegt jedoch in der niedrigen Uncaging-Quantenausbeute. Für das klassische BODIPY liegt  $\Phi_{\text{rel}}$  für eine gute Abgangsgruppe wie  $\text{OAc}^-$  nur bei 0.1% (**BPY-I**).<sup>[57]</sup> Bei den bathochrom verschobenen Derivaten mit Styryl-Substituenten (**BPY-II & BPY-III**) sinkt  $\Phi_{\text{rel}}$  sogar noch weiter (Abb. 7). Es wurde gezeigt, dass die Abspaltung der Abgangsgruppe sowohl aus dem  $S_1$ - als auch  $T_1$ -Zustand erfolgen kann. Dies wurde als Ansatz zur Verbesserung von  $\Phi_{\text{rel}}$  genutzt. In einer gemeinsamen Struktur-Reaktivitätsstudie von Klán, Weinstain und Winter wurde festgestellt, dass die Erhöhung der ISC-Rate (*intersystem crossing*) durch die Einführung von Schweratomen in 2,6-Position die Uncaging-Quantenausbeute verbessert.<sup>[56]</sup> Die Abspaltung der Abgangsgruppe ist zwar aus dem Triplett-Zustand nicht unbedingt effizienter als aus dem Singulett-Zustand, allerdings begünstigt die deutlich längere Lebensdauer des  $T_1$  die Photoreaktion.<sup>[61]</sup> Eine weitere Verbesserung von  $\Phi_{\text{rel}}$  wurde durch die Methylierung des Boratoms erzielt. Die Alkylreste erhöhen die Elektronendichte auf dem Chromophor und erleichtern die Photoreaktion durch die Stabilisierung des intermediären Carbokations.<sup>[7]</sup> Diese Effekte ausnutzend

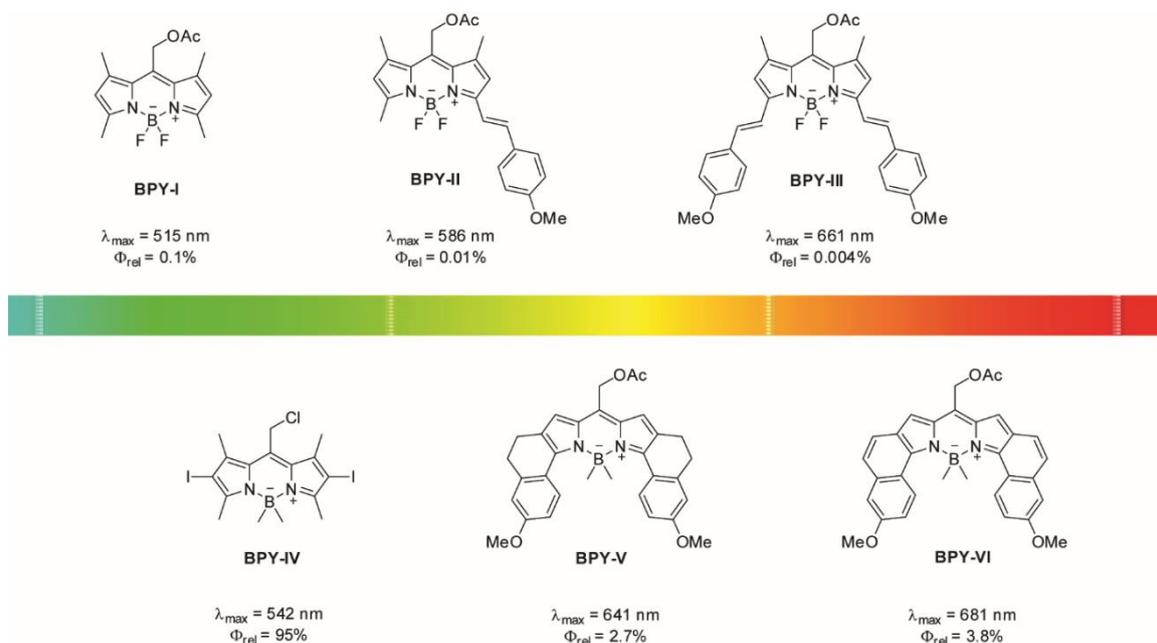


Abbildung 7: Erste Generation Grün-, Gelb- und Rotlicht-absorbierender BODIPY PPGs mit sinkender Uncaging-Quantenausbeute (oben). BODIPY-Derivate mit verbesserter Uncaging-Quantenausbeute durch Halogenierung, Bor-Methylierung und/oder Rigidisierung des Grundgerüsts (unten).

wurde ein BODIPY-Derivat synthetisiert (**BPY-IV**), das eine Uncaging-Quantenausbeute von 95% aufwies.<sup>[56]</sup> Verbesserungen von  $\Phi_{\text{rel}}$  gab es auch im Bereich der Rotlicht-absorbierenden BODIPY-Cages. Die bathochrome Verschiebung wurde bislang durch Styryl-Substituenten in 3,5-Position realisiert.<sup>[62,63]</sup> Die geringen Uncaging-Quantenausbeuten dieser Verbindungen resultierten hauptsächlich aus der erhöhten strahlungslosen Relaxationsrate aufgrund der freien Rotierbarkeit der Styryl-Doppelbindung. Um diesen unproduktiven Desaktivierungskanal zu blockieren, synthetisierten Winter *et al.* neue konformationell eingeschränkte BODIPY-Derivate (**BPY-V & BPY-IV**).<sup>[8]</sup> Durch die Rigidisierung des Grundgerüsts wurden somit zum einen Energieverluste durch strahlungslose Relaxationspfade vermindert. Zum anderen wurde die oxidative Spaltung der Styryl-Doppelbindung unterbunden, die aus der Bildung von Singulett-Sauerstoff im angeregten Zustand resultierte.<sup>[34]</sup>

Weiterhin wurde die Wasserlöslichkeit von BODIPY-Photocages optimiert. Die Probleme der meisten (vor allem Rotlicht-absorbierenden) photolabilen Schutzgruppen sind eine intrinsische Hydrophobie aufgrund von großen organischen Molekülstrukturen, sowie eine veränderte Photochemie in wässriger Umgebung. Eine gute Wasserlöslichkeit ist jedoch für biologische Anwendungen, wie z.B. Zellstudien, unabdingbar. Weinstain *et al.* zeigten, dass eine direkte Sulfonierung des BODIPY-Grundgerüsts den photoinduzierten C-O-Bindungsbruch aufgrund seiner elektronenziehenden Eigenschaften hindert.<sup>[64]</sup> Stattdessen konnten MESNA-substituierte BODIPY-Derivate die Wasserlöslichkeit deutlich verbessern, ohne dabei die Photochemie zu kompromittieren. Slanina *et al.* entwickelten wasserlösliche Rotlicht-absorbierende BODIPY-Photocages durch die Einführung hydrophiler Reste an den Styryl-Substituenten. Damit gelang die Freisetzung von Lipid-Signalmolekülen in HeLa-Zellen durch die Bestrahlung mit 632 nm Licht.<sup>[65]</sup>

## 1.2. Zweiphotonen-Absorption

### 1.2.1. Allgemeine Beschreibung

Die Zweiphotonen-Absorption (2PA) beschreibt einen nichtlinearen optischen Prozess, innerhalb dessen zwei Photonen nahezu simultan absorbiert werden.<sup>[66]</sup> Die Summe der Energien der Photonen entspricht dabei der Gesamtenergie, die für den quantenmechanischen Übergang erforderlich ist. Die Anregung erfolgt in zwei Schritten, allerdings ist der Zustand, der nach Absorption des ersten Photons erreicht wird so kurzlebig ( $< 1$  fs), dass er als virtuelles Energieniveau bezeichnet wird.<sup>[4]</sup> Die 2PA erfolgt somit nicht-resonant, wobei die beiden Photonen entweder energiegleich (degenerative 2PA) oder energieungleich (nicht-degenerative 2PA) sein können. Allerdings wurde auch bereits die resonante 2PA beschrieben, bei der die nichtlineare Absorption zweier Photonen über ein reelles Zwischenniveau erfolgt (Abb. 8).<sup>[67-69]</sup>

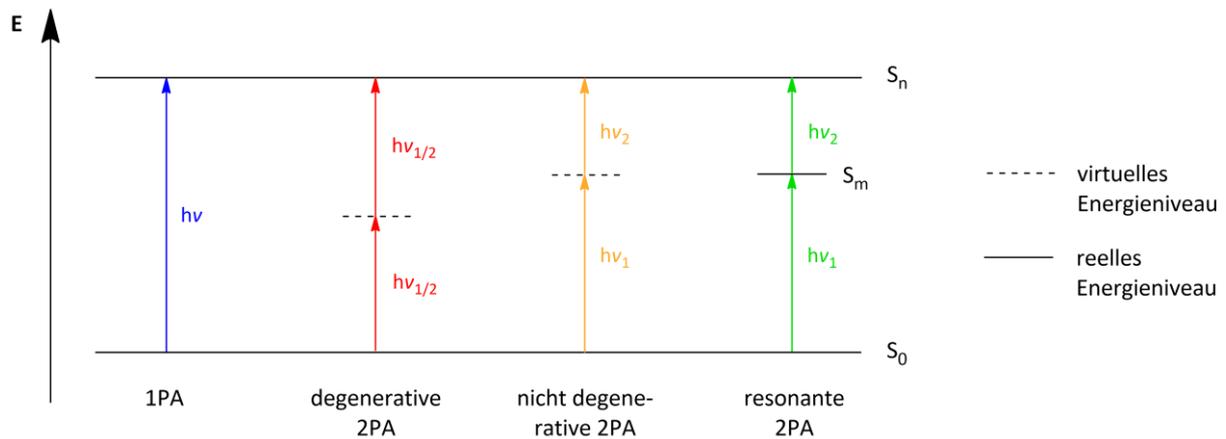


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung eines elektronischen Übergangs aus dem Grundzustand ( $S_0$ ) in einen angeregten Zustand ( $S_n$ ) mittels Einphotonen-Absorption (1PA, blau), Zweiphotonen-Absorption zweier energiegleicher Photonen (degenerative 2PA, rot) bzw. zweier energieungleicher Photonen (nicht-degenerative 2PA, gelb) oder mittels Zweiphotonen-Absorption über ein reelles Zwischenniveau  $S_m$  (resonante 2PA, grün) im Jablonski-Diagramm.

Die erste theoretische Beschreibung der 2PA erfolgte 1931 von Maria Goeppert-Mayer.<sup>[70]</sup> Mit der Entwicklung gepulster Hochleistungslaser konnte der Prozess 1961 von Kaiser und Garrett experimentell nachgewiesen werden.<sup>[71]</sup> Zweiphotonen- bzw. Multiphotonen-Methoden gewannen seitdem immer mehr an wissenschaftlichem Interesse, unter anderem aufgrund der Entwicklung der Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie 1990 von Webb *et al.*<sup>[72]</sup>

Da bei der Zweiphotonen-Absorption für den elektronischen Übergang zwei Photonen etwa der halben Energie benötigt werden, ist die Aktivierungswellenlänge der 2PA deutlich rotverschoben im Vergleich zum entsprechenden Einphotonen-Prozess (Abb. 9a).<sup>[73]</sup> Weiterhin hängt im Gegensatz zur Einphotonen-Absorption (1PA), die eine lineare Proportionalität zur Lichtintensität aufweist, die Wahrscheinlichkeit der 2PA quadratisch von der Intensität ab.<sup>[74]</sup> Somit werden nicht wie bei der 1PA alle Moleküle im Strahlengang angeregt, da für die 2PA eine sehr hohe Photonendichte vonnöten ist. Diese ist im Fokuspunkt eines Lasers am höchsten und sinkt entlang der z-Achse, wodurch sich ein Anregungsvolumen von etwa 1 fl ergibt (Abb. 9b).<sup>[75]</sup>

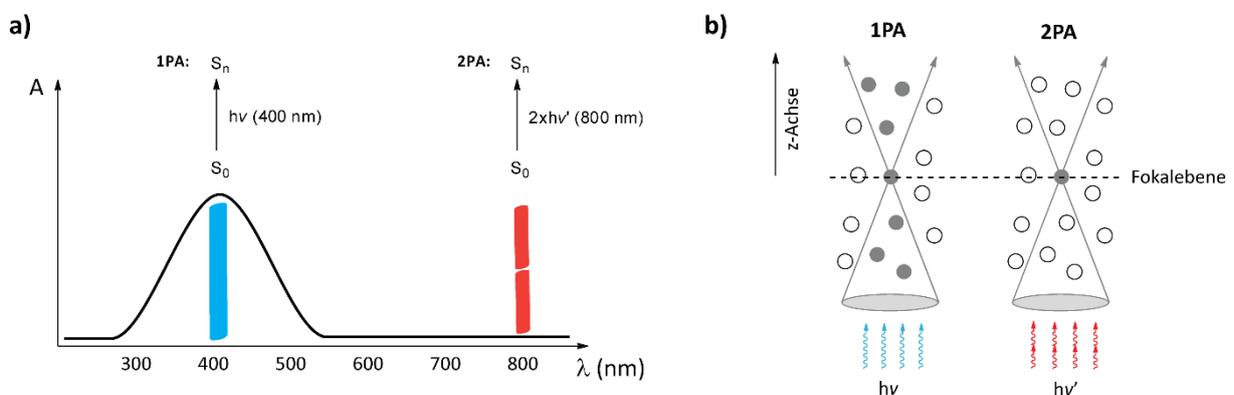


Abbildung 9: a) Absorptionsspektrum eines Blaulicht-absorbierenden nicht-zentrosymmetrischen Chromophors, das mittels 1PA oder 2PA angeregt werden kann. b) Schematische Darstellung der Lichtintensitäts-Abhängigkeit; bei der 1PA werden alle Moleküle im Strahlengang angeregt, während das Anregungsvolumen bei der 2PA auf den Fokuspunkt beschränkt ist (weiß: Moleküle im Grundzustand; grau: Moleküle im angeregten Zustand).

Während die Effektivität der 1PA durch den molaren Absorptionskoeffizienten  $\epsilon$  quantifiziert wird, gilt als Maß für die 2PA der Zweiphotonen-Einfangquerschnitt  $\sigma_2$ , welcher in der Einheit Goeppert-Mayer (GM) angegeben wird. 1 GM entspricht dabei  $10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s Photon}^{-1} \text{ Moleküle}^{-1}$ .<sup>[76]</sup> Will man die Effizienz eines photophysikalischen Prozesses beschreiben, der durch 2PA induziert wird, wird der Zweiphotonen-Einfangquerschnitt mit einer Quantenausbeute multipliziert, wobei der Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt  $\delta$  ebenfalls in der Einheit GM erhalten wird (Gl. 2).

$$\delta_x = \sigma_2 * \Phi_x \quad (2)$$

Wie für alle quantenmechanischen Übergänge gelten für die 2PA gewisse Auswahlregeln. Allgemein geben Auswahlregeln an, ob ein physikalisches System seinen Zustand ändern kann, also im Falle der Lichtabsorption, ob ein elektronischer Übergang in einen angeregten Zustand stattfinden kann. Die Wahrscheinlichkeit eines solchen Übergangs ist dabei abhängig vom Übergangsdipolmoment. Lichtabsorption kann prinzipiell stattfinden, wenn das Übergangsdipolmoment zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand größer als Null ist.<sup>[77]</sup> Je nach Molekülsymmetrie gelten unterschiedliche Auswahlregeln für die 2PA. Für zentrosymmetrische Moleküle, bei denen statische Dipolmomente vernachlässigt werden können, gilt, dass ein elektronischer Übergang mit einer Inversion der Orbitalsymmetrie einhergehen muss, um „erlaubt“ zu sein. Genauer gesagt sind nur Übergänge von *geraden* Zuständen zu *ungeraden* Zuständen und andersherum erlaubt, während Übergänge zwischen Zuständen gleicher Parität, also gleichen Symmetrieeigenschaften, verboten sind.<sup>[78]</sup> Im Vergleich zur 1PA ergeben sich hier für die 2PA neue Übergangsmöglichkeiten, da dieser Prozess über ein virtuelles Energieniveau verläuft, bei dem die Wellenfunktion unverändert bleibt, die Orbitalsymmetrie jedoch invertiert wird. Somit werden Übergänge von *gerade* zu *gerade* ermöglicht, während Übergänge von *gerade* zu *ungerade* verboten sind.<sup>[79]</sup> Bei nicht-zentrosymmetrischen Molekülen weist das gesamte Molekül einen dipolaren Charakter auf. Ein Übergang von *gerader* zu *ungerader* Parität (oder umgekehrt) ist dann nicht mehr nur über einen 1PA-Prozess, sondern auch mittels 2PA möglich (Abb. 10).<sup>[78]</sup>

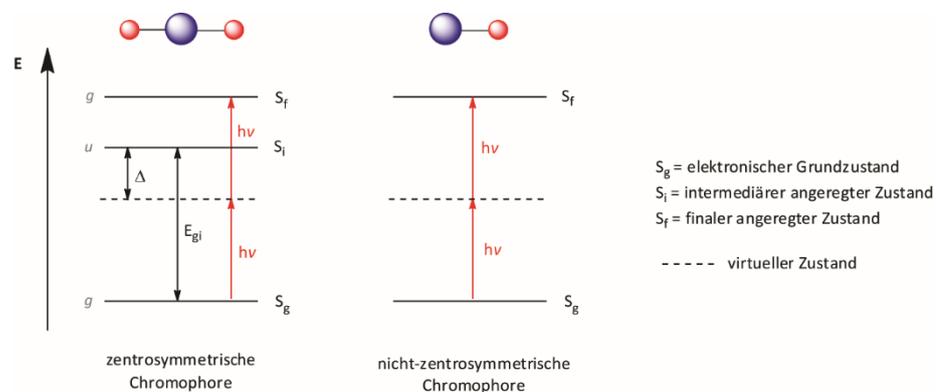


Abbildung 10: Darstellung der Auswahlregeln im Jablonski-Diagramm. Bei zentrosymmetrischen Chromophoren ist der Übergang  $S_g \rightarrow S_i$  (gerade zu ungerade) 1P-erlaubt, während der Übergang  $S_g \rightarrow S_f$  (gerade zu gerade) 2P-erlaubt ist. Bei nicht-zentrosymmetrischen Chromophoren ist der Übergang  $S_g \rightarrow S_f$  (gerade zu ungerade) sowohl 1P- als auch 2P-erlaubt.

Techniken, die auf 2PA basieren, finden heutzutage unter anderem Anwendung in hochauflösender Mikroskopie,<sup>[80,81]</sup> photodynamischer Therapie (PDT),<sup>[82,83]</sup> Mikrofabrikationsverfahren,<sup>[84]</sup> optischer Datenspeicherung<sup>[85]</sup> oder lokalisierter Wirkstofffreisetzung.<sup>[21,86]</sup> In den Abschnitten 1.2.3., 1.2.4. und 1.2.5. wird ein besonderer Fokus auf Zweiphotonen-Fluorophore und Zweiphotonen-Uncaging gelegt.

### 1.2.2. Messmethoden

Bei der experimentellen Bestimmung des Zweiphotonen-Einfangquerschnitts kann zwischen direkten und indirekten Messmethoden unterschieden werden. Ein Beispiel für eine direkte Methode ist der Z-Scan, welcher von Sheik-Bahae *et al.*<sup>[87]</sup> zur Charakterisierung von nichtlinearen optischen Medien entwickelt wurde. Das Prinzip des Z-Scans ähnelt dem der Einphotonen-Absorptionsmessung: Die Probe wird mithilfe einer Lichtquelle, welche in diesem Fall ein fokussierter Laser sein muss, um die nötige Intensität für die 2PA zu erreichen, angeregt und die Änderung des transmittierten Lichts wird von einem Detektor erfasst. Während des Experiments bleibt die Energie des Laserstrahls konstant und die Probe wird longitudinal entlang der z-Achse durch den Laserfokus bewegt (Abb. 11a).<sup>[88]</sup> Da die Probe somit ortsabhängig einen unterschiedlichen Strahlendurchmesser erfährt, kann im Anschluss die Lichtintensität am Detektor als Funktion der Probenposition aufgetragen werden. Bedingt durch die quadratische Abhängigkeit zur Lichtintensität sollte 2PA nur im Laserfokus auftreten. Demnach beträgt die Transmission 1 (bei offener Apertur), wenn sich die Probe außerhalb des Fokus befindet und sinkt, wenn sie sich dem Fokus nähert. Am Fokuspunkt, an dem die Wahrscheinlichkeit der 2PA am höchsten ist, verläuft die Messkurve durch ein Minimum. Hier wird  $z$  – also der Abstand der Probe zum Fokus – als 0 definiert. Wird die Probe weiterbewegt, verlässt sie den Fokus und die Transmission steigt wieder (Abb. 11b). Der Nachteil der Z-Scan-Methode ist, dass eine hohe Laserintensität benötigt wird, um ein messbares 2PA Signal zu generieren. Dabei können wiederum ungewünschte Effekte, wie ESA (*excited state absorption*) oder Photobleichen auftreten, die die Auswertung der Messung erschweren bzw. die Messwerte verfälschen können.<sup>[89]</sup> Aus diesem Grund wird zur Bestimmung der Zweiphotonen-Eigenschaften häufig auf indirekte Methoden zurückgegriffen.

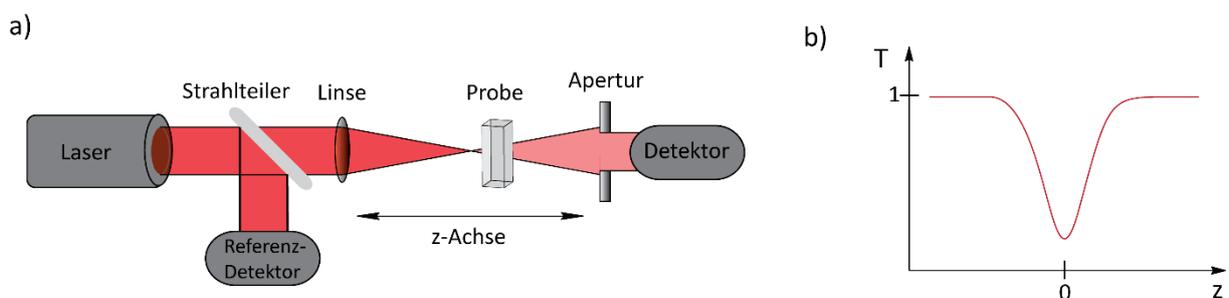


Abbildung 11: a) Versuchsaufbau eines Z-Scan Experiments. Der Laserstrahl wird mithilfe eines Strahlteilers zum Teil auf einen Referenzdetektor geleitet und zum Teil durch eine Linse fokussiert. Die Probe wird entlang der z-Achse durch den Laserfokus bewegt. Die Intensitätsänderung des transmittierten Lichts wird am Detektor erfasst. b) Transmission in Abhängigkeit der Probenposition. Die Kurve erreicht das Minimum im Laserfokus ( $z = 0$ ).

Bei einer indirekten Methode wird nicht das Absorptionsereignis an sich detektiert, sondern ein Prozess, der durch die 2PA induziert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Zweiphotonen-angeregte Fluoreszenz (TPEF, *two-photon excited fluorescence*). Voraussetzung für diese Messmethode ist, dass die untersuchte Verbindung in der Lage ist zu fluoreszieren. Durch das Anregungslicht werden die Fluorophore über einen 2PA Prozess in einen angeregten Singulett-Zustand  $S_n$  überführt. Die Relaxation in den niedrigsten Schwingungszustand des ersten angeregten Zustandes (IC, *internal conversion*) wird aufgrund der sehr schnellen Zeitskala ( $\sim 1$  ps), auf der sie abläuft, vernachlässigt.<sup>[90]</sup> Die aus dem  $S_1$ -Zustand emittierte Fluoreszenz kann anschließend detektiert werden. Anhand dieses Fluoreszenzsignals lässt sich der Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt  $\delta_F$  bestimmen, aus dem gemäß Gleichung (2) durch Division mit der Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$  der Zweiphotonen-Einfangquerschnitt  $\sigma_2$  erhalten werden kann.<sup>[89]</sup> Hierbei wird näherungsweise die Fluoreszenzquantenausbeute nach 1PA und 2PA gleichgesetzt, da davon ausgegangen wird, dass die Fluoreszenz unabhängig der Anregung aus dem  $S_1$ -Zustand erfolgt (Kasha-Regel)<sup>[91]</sup>. Bei einem TPEF-Experiment sollten immer zunächst leistungsabhängige Fluoreszenzmessungen durchgeführt werden, um die quadratische Lichtabhängigkeit, die für die 2PA charakteristisch ist, zu überprüfen. Andernfalls könnten die gemessenen  $\delta$ -Werte durch Einphotonen-Fluoreszenzbeiträge überschätzt werden.<sup>[78]</sup> Fluoreszenzbasierte Methoden haben den Vorteil sehr sensitiv zu sein. Der Nachteil von TPEF ist, dass sich absolute  $\sigma_2$ -Werte nur sehr aufwendig bestimmen lassen, da die Absorptionsrate stark von der örtlichen und zeitlichen Kohärenz des Anregungsstrahls abhängig ist.<sup>[92]</sup> Da die Bestimmung dieser Parameter nicht trivial ist, werden statt absoluten häufig relative  $\sigma_2$ -Werte ermittelt. Dafür wird die gemessene Fluoreszenzintensität mit der eines Referenz-Fluorophors, dessen 2PA Eigenschaften bekannt sind, verglichen und aus dem Verhältnis der endgültige Einfangquerschnitt berechnet. Relative TPEF-Messungen sind heutzutage durch das Vorhandensein verschiedener Datenbanken sehr gut zugänglich. Eine der bekanntesten wurde von Xu und Webb erstellt und umfasst etwa zwölf Fluorophore im Anregungsbereich zwischen 690 – 1050 nm.<sup>[89,92]</sup>

### 1.2.3. Zweiphotonen-Fluorophore

Durch die Kombination von TPEF mit der Laser-Scanning-Mikroskopie, entwickelten Webb *et al.* 1990 die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie.<sup>[72]</sup> Diese wies signifikante Vorteile gegenüber der konventionellen Konfokal-Fluoreszenzmikroskopie auf. Die quadratische Lichtabhängigkeit der 2PA sorgt für eine dreidimensionale Auflösung. Da die Probe nur im Fokuspunkt angeregt wird, kann „out-of-focus“-Fluoreszenz vermieden werden und somit ein höherer Kontrast und eine bessere Auflösung des Bildes erzielt werden.<sup>[75]</sup> Das energieärmere NIR-Licht ermöglicht zudem eine höhere Eindringtiefe in biologisches Gewebe, da der Streukoeffizient von Licht mit zunehmender Wellenlänge abnimmt.<sup>[93]</sup>

Weiterhin tritt im NIR-Bereich so gut wie keine Absorption von zellulären Bestandteilen, sowie keine Autofluoreszenz von endogenen Fluorophoren, wie Flavinen, Porphyrinen oder Kollagenen auf.<sup>[75]</sup> Aufgrund dieser verminderten Absorptions- und Streueffekte kann beispielsweise 600 nm Licht etwa 2–3 mm und 800 nm Licht sogar 4-5 mm tief in menschliches Gewebe eindringen.<sup>[34]</sup> Das niederenergetische Licht sorgt weiterhin für eine geringere Phototoxizität und weniger Photobleichen, wodurch längere Belichtungszeiten realisiert werden können. Der Wellenlängenbereich zwischen 650 – 850 nm wird demnach auch „phototherapeutisches Fenster“ genannt (Abb. 12).<sup>[94]</sup>

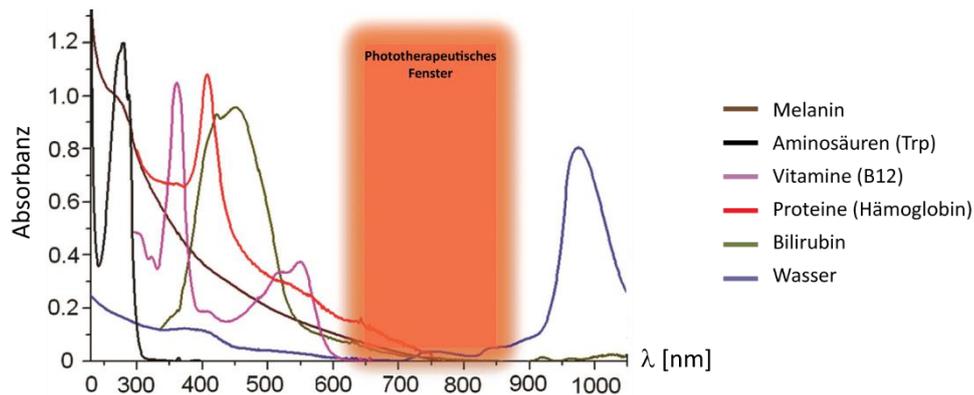


Abbildung 12: Phototherapeutisches Fenster (modifizierte Abbildung nach Dabrowski<sup>[94]</sup>©Royal Society of Chemistry, 2015).

Die essentiellen Vorteile, die die Zweiphotonen-Mikroskopie mit sich bringt, führte in den letzten Jahren zu einer stetigen Entwicklung und Verbesserung von 2P-aktivierbaren Fluorophoren. Die Optimierung der Fluorophore erfolgt dabei hinsichtlich ihrer Helligkeit  $\sigma_2\Phi_F$ , d.h. der Zweiphotonen-Einfangquerschnitt und/oder die Fluoreszenzquantenausbeute sollten erhöht werden. Um ausreichend helle Bilder zu erhalten, ohne dabei Photoschäden zu generieren, wurde eine Mindesthelligkeit von 50 GM postuliert.<sup>[95]</sup>

Im Allgemeinen sind die Zweiphotonen-Eigenschaften eines Chromophors nur schwer vorherzusagen. Trotzdem lassen sich einige Trends feststellen, die beim Moleküldesign berücksichtigt werden können. Erstens spielt die Länge des konjugierten Systems eine große Rolle. Das Übergangsdipolmoment  $\mu$  ist abhängig von der Strecke, über die die Ladung während des elektronischen Übergangs delokalisiert ist.<sup>[78]</sup> Daher ist zu erwarten, dass  $\mu$  proportional mit zunehmender Anzahl an konjugierten Doppelbindungen in einem linearen Molekül zunimmt. Ein Beispiel für diesen Trend ist in Abbildung 13 gezeigt. Benzol besitzt praktisch keine 2PA Fähigkeiten (0 GM). Die Erweiterung um einen weiteren aromatischen Ring, wie beim Naphthalin, führt zu einer Erhöhung des Zweiphotonen-Einfangquerschnitts auf 0.9 GM.<sup>[76]</sup> Die Einführung einer linearen konjugierten Kette im Stilben zeigt einen deutlichen Anstieg des Einfangquerschnitts auf 12 GM.<sup>[96]</sup> Die Verbesserung der 2PA gilt natürlich nur bis zu einer gewissen Kettenlänge, da ab einer bestimmtem Molekülgröße die Planarität abnimmt und die Elektronen nicht mehr über das gesamte  $\pi$ -System delokalisiert werden können.<sup>[78]</sup>

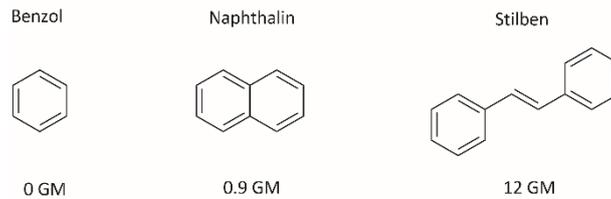


Abbildung 13: Erhöhung des Zweiphotonen-Einfangquerschnitts durch Erweiterung des konjugierten  $\pi$ -Systems.

Weiterhin hat sich gezeigt, dass der ICT-Charakter (*intramolecular charge transfer*) eines Moleküls einen großen Einfluss auf die 2P-Eigenschaften hat. Durch die Einführung von elektronenschiebenden und -ziehenden Substituenten, also die Bildung eines dipolaren Donor-Akzeptor-Systems (D- $\pi$ -A), kann sowohl eine bathochrome Verschiebung erzielt, als auch die 2PA drastisch verbessert werden.<sup>[97]</sup> In Abbildung 14a ist zu sehen, dass das substituierte Molekül einen etwa 10x höheren  $\sigma_2$ -Wert als das einfache Stilben hat. Noch größere Zweiphotonen-Einfangquerschnitte können durch quadrupolare Systeme (D- $\pi$ -A- $\pi$ -D bzw. A- $\pi$ -D- $\pi$ -A) (Abb. 14b) oder oktupolare Systeme (D(- $\pi$ -A)<sub>3</sub> bzw. A(- $\pi$ -D)<sub>3</sub>) (Abb. 14c) erreicht werden.<sup>[98]</sup> Allerdings geht eine Verstärkung des ICT-Charakters oftmals mit einer Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeute einher, da energetisch niedrigere ICT-Zustände häufig strahlungslos deaktiviert werden (*energy gap law*).<sup>[99]</sup> Um eine möglichst hohe Helligkeit des Fluorophors zu erzielen, ist es daher wichtig sowohl  $\sigma_2$  als auch  $\Phi_F$  zu optimieren. Ein weiterer Widerspruch, der das Design von guten 2P-Absorbern verkompliziert, ist die steigende Hydrophobie von organischen Verbindungen bei zunehmender Molekülgröße.<sup>[100]</sup> Für Experimente im biologischen Kontext ist jedoch die Wasserlöslichkeit der Chromophore ein wichtiger Aspekt. Schlussendlich muss bei der Entwicklung und Optimierung von Zweiphotonen-Fluorophoren ein Kompromiss der genannten Parameter gefunden werden, der am besten den experimentellen Anforderungen gerecht wird. Zu den typischen Vertretern von Zweiphotonen-Fluorophoren gehören Fluoresceine,<sup>[89]</sup> Rhodamine,<sup>[6,101]</sup> Pyrene,<sup>[102]</sup> Naphthalimide,<sup>[103]</sup> Porphyrine<sup>[104]</sup> oder Fluorene.<sup>[105,106]</sup>

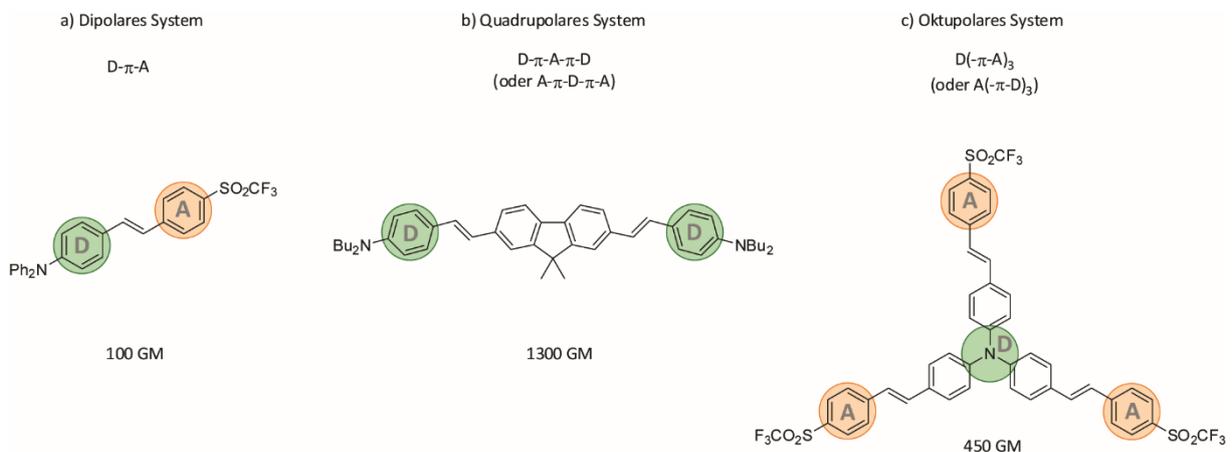


Abbildung 14: Verbesserte Zweiphotonen-Einfangquerschnitte in a) dipolaren Systemen, b) quadrupolaren Systemen und c) oktupolaren Systemen. Abbildung in Anlehnung an Abe et al.<sup>[76]</sup>

## 1.2.4. Zweiphotonen-Uncaging

Wie bereits in Abschnitt 1.1.1. beschrieben können durch Licht als harmlosen externen Stimulus biologisch relevante Substrate freigesetzt werden. Es wurde viel Optimierungsarbeit geleistet, um photolabile Schutzgruppen in den phototherapeutischen Bereich zu verschieben. Die Effektivität dieser Photocages nahm allerdings während dieses Prozesses häufig ab, da die Energie von rotem Licht geringer ist, wodurch der photochemische Bindungsbruch erschwert wird und man zum Beispiel auf die Verwendung von selbst-immolativen Linkern zurückgreifen musste.<sup>[107]</sup>

Mit der Entwicklung der Zweiphotonen-Mikroskopie in der 90er Jahren kam auch die Erkenntnis, dass sich durch die Kombination der Zweiphotonen-Technik mit dem Uncaging-Mechanismus ganz neue Möglichkeiten für die präzise Freisetzung von biologischen Effektormolekülen ergeben. Zum einen kann auf energiearmes NIR-Licht zurückgegriffen werden, um den gewünschten angeregten Zustand zu erreichen, und zum anderen wird dadurch eine tiefere Eindringung in biologisches Gewebe erwirkt.<sup>[74]</sup>

Erste Anwendungen fand das Zweiphotonen-Uncaging 1994 durch Denk *et al.*,<sup>[108]</sup> die allerdings nur einfache *ortho*-Nitrobenzyl-Derivate verwendeten, welche eine ineffektive Photolyse bei 640 nm zeigten oder 1998 durch Lipp und Niggli, die Ca<sup>2+</sup>-Ionen durch die Photolyse von Dimethoxy-Nitrophen-Ca-Komplexen freisetzten.<sup>[86]</sup> In den Folgejahren wurde der Fokus auf die Freisetzung von Neurotransmittern, wie Glutamat oder GABA, gelegt. 2001 gelang Kasai *et al.* erstmals das 2P-Uncaging von MNI-geschütztem Glutamat in Neuronen bei 720 nm.<sup>[109]</sup> In diesem Feld sind klar die Vorteile des 2P-Uncagings zu erkennen, da durch das geringe Anregungsvolumen der 2PA Neurotransmitter-Konzentrationen in einzelnen Synapsen gesteuert werden können. Zu den häufig verwendeten 2P-Photocages zählen Dimethoxy-*ortho*-Nitrobenzyle, Cumarine (z.B. BHc<sup>[110]</sup> oder DEACM<sub>450</sub><sup>[14]</sup>), Methoxy-Nitroindole (MNI)<sup>[111]</sup> oder Chinoline (Abb. 15).<sup>[112]</sup>

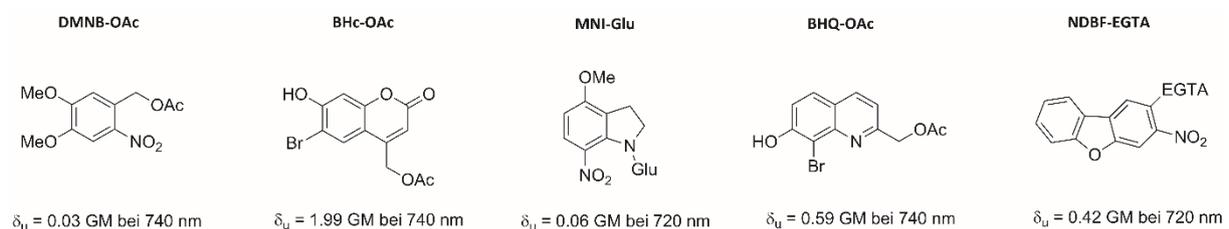


Abbildung 15: Übersicht 2P-aktiver Photocages, darunter Dimethoxy-*ortho*-Nitrobenzol (DMNB),<sup>[110]</sup> 7-Hydroxy-6-bromocumarin (BHc),<sup>[110]</sup> Methoxy-Nitroindol (MNI),<sup>[109]</sup> 8-Bromo-7-hydroxychinolin (BHQ)<sup>[112]</sup> und Nitrodibenzofuran (NDBF).<sup>[113]</sup>

Unsere Gruppe publizierte 2018 einen interessanten Fall von anregungsspezifischer Photochemie durch die Synthese eines neuen DMA-NDBF-Photocages, der ausschließlich durch 2P-Licht angeregt werden und somit orthogonal zu einem strukturell ähnlichen NDBF-Photocage, welcher 1P-aktiv ist, aktiviert werden konnte.<sup>[114]</sup>

Es wurde postuliert, dass für biologische Anwendungen ein Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt  $\delta_u$  von mindestens 3 GM benötigt wird, um eine ausreichende Substratfreisetzung bei einer Laserleistung, die nicht zellschädigend ist, zu garantieren.<sup>[115]</sup> Dieser Wert kann zwar je nach Publikation variieren, trotzdem stellt die Erhöhung von  $\delta_u$  eine aktuelle Aufgabe in der Photochemie dar. Eine Möglichkeit die Zweiphotonen-Eigenschaften einer photolabilen Schutzgruppe zu erhöhen ist die Modifikation des Photocage-Grundgerüsts, z.B. durch die Erweiterung des konjugierten  $\pi$ -Systems oder die Einführung von Push-Pull-Substituenten (vgl. Abschnitt 1.2.3.). Da hierbei aber die elektronische Struktur des Moleküls verändert wird, sind die Änderungen der photophysikalischen Eigenschaften oftmals unvorhersehbar oder sogar kontraproduktiv. Ein alternativer Ansatz zur Verbesserung des Zweiphotonen-Uncagings, bei dem die Struktur des Photocages erhalten bleibt, wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

#### 1.2.5. Energietransferdyaden für verbessertes 2P-Uncaging

Die Effektivität einer 2P-induzierten Uncaging-Reaktion ist wie in Abschnitt 1.2.1. beschrieben abhängig vom Zweiphotonen-Einfangquerschnitt und der Uncaging-Quantenausbeute ( $\delta_u = \sigma_2 \Phi_{rel}$ ). Es wurden demnach 2P-aktivierbare photolabile Schutzgruppen entwickelt, bei denen diese beiden Faktoren ausgeprägt waren. Allerdings hat sich hierbei häufig gezeigt, dass die Verbesserung des einen Parameters zur Verschlechterung des anderen führen kann.

Aus diesem Grund wurde als alternativer Lösungsansatz der Absorptionsprozess vom Uncaging-Prozess separiert. Dies wurde durch die Entwicklung von Energietransferdyaden realisiert. Prinzipiell können damit Chromophore mit unterschiedlichen photophysikalischen Eigenschaften, z.B. ein guter Zweiphotonen-Absorber ( $\sigma_2 \uparrow$ ) und ein guter Photocage ( $\Phi_{rel} \uparrow$ ), in einem molekularen System vereint werden.<sup>[116]</sup> Der 2P-Absorber (i.d.R. ein Fluorophor) fungiert in diesem Fall als Donor und überträgt das (über einen Zweiphotonen-Prozess) absorbierte Licht durch einen Energietransfer auf einen kovalent verknüpften Photocage (Akzeptor), was anschließend zum Bindungsbruch und somit zur Freisetzung des geschützten Substrats führt (Abb. 16).

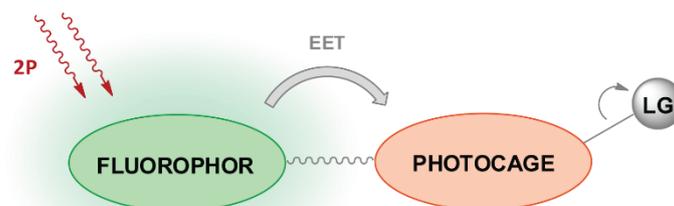


Abbildung 16: Schematische Darstellung einer Energietransferdyade. Das Licht wird von einem geeigneten Fluorophor über einen Zweiphotonen-Prozess absorbiert. Die Anregungsenergie wird anschließend auf einen Photocage übertragen (EET = excitation energy transfer), was zur Abspaltung des Substrats (LG, leaving group) führt.

Die Art des Energietransfers kann dabei unterschiedlicher Natur sein. Bei einem PET (*photoinduced electron transfer*) wird ein Elektron im angeregten Zustand von einem Donor auf einen Akzeptor übertragen. Anderson *et al.* zeigten, dass Carbonsäuren durch einen 2P-induzierten Elektronentransfer von einem Fluoren-Donor auf ein Pyridiniumsalz-Akzeptor freigesetzt werden können.<sup>[117]</sup> Chromophore mit hoher ISC-Rate können Energie über einen TT-ET (*triplet triplet energy transfer*) übertragen. Dieser Mechanismus ist für Photocages relevant, die ihre Abgangsgruppe aus dem T<sub>1</sub>-Zustand abspalten können, wie z.B. MNI.<sup>[118]</sup> Einer der bekanntesten Energietransfers ist der FRET (*fluorescence resonance energy transfer*).<sup>[119–121]</sup> Bei einem solchen wird die Energie eines angeregten Donor-Farbstoffes strahlungsfrei auf einen Akzeptor-Farbstoff übertragen. Voraussetzung für den Transfer sind ein spektraler Überlapp des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Da es sich um eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung handelt, spielt auch das Übergangsdipolmoment eine wichtige Rolle. Somit müssen die Schwingungsebenen von Donor und Akzeptor parallel ausgerichtet sein, damit FRET stattfinden kann. Diese Voraussetzung wird vor allem bei intramolekularen Systemen wichtig, bei dem Donor und Akzeptor nicht frei beweglich sind. Weiterhin ist eine räumliche Nähe der beiden Chromophore (1 - 10 nm) vonnöten, da die FRET-Effizienz mit der sechsten Potenz des Abstands von Donor und Akzeptor abnimmt. Es handelt sich also hierbei um einen sogenannten „through-space“ Energietransfer, d.h. Donor und Akzeptor können durch einen nicht-konjugierten Linker miteinander verbunden sein. Sind die Moleküle einer Dyade durch einen konjugierten Linker verbrückt, kann die Energie zusätzlich durch einen „through-bond“ Energietransfer (wie z.B. Dexter-Transfer) übertragen werden.<sup>[122]</sup> Blanchard-Desce *et al.* publizierten 2013 ein 2P-sensitives Kombinationssystem aus einem quadrupolaren Fluoren-Derivat als starken 2P-Absorber und zwei kovalent verknüpften MNI-Photocages (Abb. 17). Damit gelang die 2P-induzierte Freisetzung von Glutamat bei 730 nm mit einem Wirkungsquerschnitt von  $\delta_u = 0.5 \text{ GM}$ .<sup>[123]</sup> Durch die Optimierung des Systems konnte anschließend sogar eine Erhöhung von  $\delta_u$  auf 20 GM erzielt werden.<sup>[124]</sup>

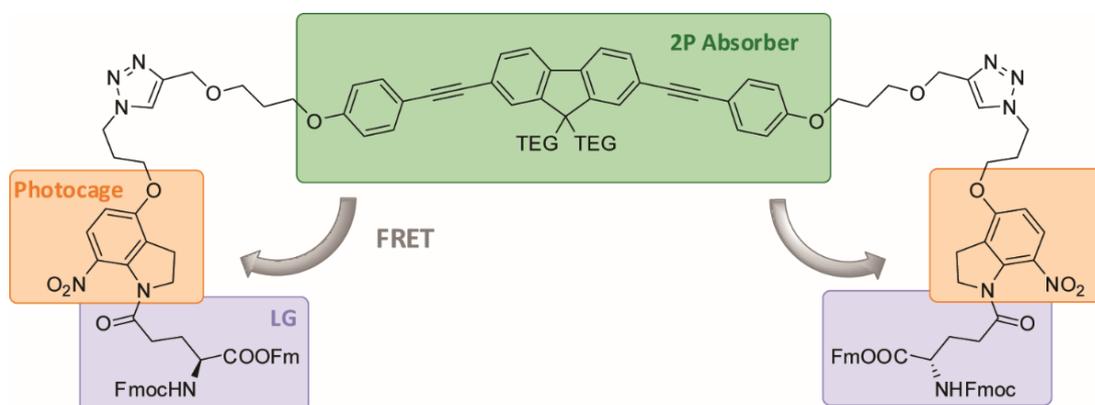


Abbildung 17: Beispiel für eine FRET-basierte molekulare Dyade bestehend aus einem Fluoren-Derivat als 2P-Absorber, zwei MNI-Photocages und geschütztem Glutamat als Abgangsgruppe von Blanchard-Desce *et al.*<sup>[123]</sup>

### 1.3. Fluoreszenzmikroskopie

#### 1.3.1. Klassische Lichtmikroskopie

In einem Lichtmikroskop können kleine Strukturen mithilfe von Licht stark vergrößert werden. Dies geschieht durch die Zusammensetzung mehrerer konvexer Linsen, die zunächst ein reelles vergrößertes Zwischenbild des betrachteten Objekts erstellen, welches anschließend durch das Okular, in dem sich eine weitere Linse befindet, wie durch eine Lupe weiter vergrößert wird. Der Betrachter sieht somit ein vergrößertes virtuelles Abbild in der Ferne (Abb. 18).<sup>[125]</sup> Die Durchleuchtung des Präparats mit Licht dient dabei zur Kontrastbildung, um Bildstrukturen klar erkennen zu können.

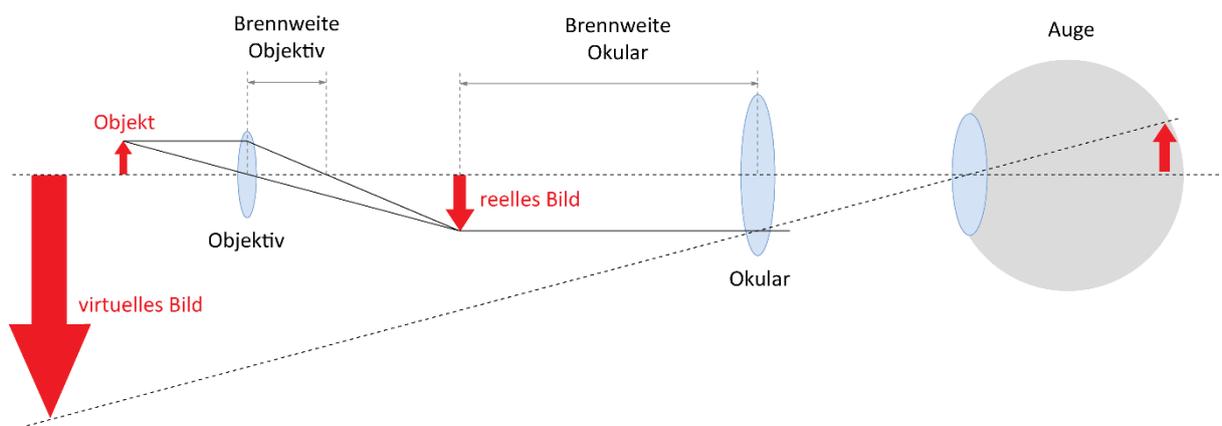


Abbildung 18: Linsenaufbau in einem Lichtmikroskop zur Bildvergrößerung eines Objektes. Abbildung in Anlehnung an S. Schmitz & C. Desel.<sup>[125]</sup>

Die Qualität der Bildgebung wird durch die Auflösung eines mikroskopischen Verfahrens bestimmt. Die Auflösung gibt den Mindestabstand ( $d$ ) zweier Strukturen an, um diese noch getrennt wahrnehmen zu können. Sie hängt von der Wellenlänge ( $\lambda$ ) des verwendeten Lichts, sowie von der numerischen Apertur (NA) des Mikroskops ab (Gl. 3). Die NA fasst dabei objektivspezifische Parameter, wie dem Brechungsindex ( $n$ ) des umgebenden Mediums und dem Öffnungswinkel ( $\alpha$ ) des Objektivs, zusammen (Gl. 4).<sup>[126]</sup>

$$d = \lambda \cdot NA \quad (3)$$

$$NA = n \cdot \sin(\alpha) \quad (4)$$

Anhand dieser Faktoren ergibt sich aufgrund der Beugung des Lichts am abzubildenden Objekt eine Auflösungsgrenze, die sich für die Lichtmikroskopie bei ca. 200 nm befindet. Diese Grenze wird auch als Abbé-Limit bezeichnet, namensgebend durch Ernst Abbé, der diesen Zusammenhang erstmals beschrieben hat.<sup>[127]</sup>

Eine leichte Verbesserung der optischen Auflösung konnte durch die Entwicklung der Konfokalmikroskopie erzielt werden. Hierbei handelt es sich um eine spezielle Form der

Lichtmikroskopie, bei der das Bild Stück für Stück durch eine Lochblende abgerastert und das Gesamtbild am Ende zusammengesetzt wird.<sup>[128]</sup> Die Lochblende sorgt dabei dafür, dass nur Licht aus einem kleinen Volumen an den Detektor gelangt. Dadurch kann ein besserer Kontrast erzeugt und eine höhere Bildschärfe erzielt werden.

Ein alternatives Verfahren zur Lichtmikroskopie, mit dem die Bildauflösung verbessert werden kann, ist die Elektronenmikroskopie (EM). Aufgrund der deutlich geringeren Wellenlänge von Elektronen im Vergleich zu sichtbarem Licht, kann mit dieser Technik eine sehr hohe Auflösung auf atomarem Level erzielt werden.<sup>[129]</sup> Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Elektronen mit dem abzubildenden Präparat interagieren können. Das sorgt zum einen für eine geringe Eindringtiefe und zum anderen für eine mögliche Veränderung der Probe durch die Reaktion mit den Elektronen. EM-Messungen müssen daher im Vakuum und bei tiefen Temperaturen (Kryo-EM) durchgeführt werden.<sup>[17]</sup>

Maßgebliche Durchbrüche zur Verbesserung der optischen Auflösung gab es in den 90er Jahren durch die Entwicklung von mikroskopischen Verfahren, die das Abbé-sche Beugungslimit deutlich unterliefen. Diese Techniken basieren auf der Fluoreszenzmikroskopie. Dabei handelt es sich um eine spezielle Form der Lichtmikroskopie, bei der eine Probe angeregt und das von ihr emittierte Licht detektiert wird. Dafür müssen die abzubildenden Strukturen in der Lage sein zu fluoreszieren. Um den Prozess der Fluoreszenz zu erklären, wird im folgenden Abschnitt betrachtet, was bei der elektronischen Anregung eines Systems geschieht.

### 1.3.2. Fluoreszenz

Licht kann auf verschiedene Weisen mit Materie interagieren. So kann es zum Beispiel reflektiert, gebeugt oder gestreut werden. Entspricht die Photonenenergie der Differenz zweier Energieniveaus, spricht man von Absorption, d.h. die Energie wird von dem System (Atom oder Molekül) aufgenommen. Dadurch können Elektronen aus ihrem Grundzustand ( $S_0$ ) in einen angeregten Zustand ( $S_1, S_2, \dots, S_n$ ) angehoben werden. Dieser und die darauffolgenden Vorgänge können am besten in einem Jablonski-Diagramm dargestellt werden (Abb. 19).<sup>[130]</sup> Der Absorptionsprozess erfolgt auf einer sehr kurzen Zeitskala ( $10^{-15}$  s). Da Atomkerne vergleichsweise langsam schwingen, können die elektronische Anregung und die anschließende Atombewegung im Molekül getrennt voneinander betrachtet werden (Franck-Condon-Prinzip).<sup>[131]</sup> Für einen elektronischen Zustand existieren mehrere Schwingungszustände. Da Übergänge in verschiedene Schwingungszustände möglich sind, resultieren verbreiterte Spektren. Nach Anregung in einen angeregten Schwingungszustand erfolgt eine schnelle Absenkung in den Schwingungsgrundzustand des erreichten elektronischen Zustands (vibronische Relaxation). Höhere elektronische Zustände als der  $S_1$  werden meistens durch innere Umwandlung

(IC, *internal conversion*) desaktiviert. Dabei findet eine strahlungslose Relaxation in einen Schwingungszustand des elektronisch niedrigeren Zustands statt. Schwingungsrelaxation und IC sind sehr schnelle Prozesse ( $10^{-12}$  s) und werden daher oft vernachlässigt, sodass hauptsächlich Pfade aus dem ersten angeregten Zustand ( $S_1$ ) betrachtet werden.<sup>[90]</sup> Hier können verschiedene Prozesse ablaufen. Zum einen kann erneut eine strahlungslose Desaktivierung erfolgen, wobei die Lichtenergie in Schwingungs-, Rotations- oder Translationsenergie umgewandelt wird. Wird beim Rückgang in den Grundzustand Licht emittiert, spricht man von Lumineszenz. Diese kann in zwei Klassen unterteilt werden, Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Bei der Fluoreszenz handelt es sich um die spontane Emission eines Photons aus einem angeregten Singulett-Zustand. Dieser Prozess ist Spin-erlaubt und erfolgt auf einer Zeitskala von  $10^{-8}$  –  $10^{-9}$  s. Aufgrund der zuvor beschriebenen schnellen Desaktivierung eines höher angeregten Zustands  $S_n$  in den  $S_1$ , besagt die Kasha-Regel, dass Fluoreszenz immer aus dem ersten angeregten Zustand erfolgt.<sup>[91]</sup> Es wurden allerdings auch schon Ausnahmen von dieser Regel beschrieben.<sup>[132,133]</sup> Da bei der Relaxation in den  $S_1$  ein Teil der Energie strahlungslos abgegeben wird, ist die Fluoreszenz stets rotverschoben im Vergleich zur Absorption. Der spektrale Abstand zwischen dem Absorptions- und dem Emissionsmaximum wird Stokes-Verschiebung genannt.

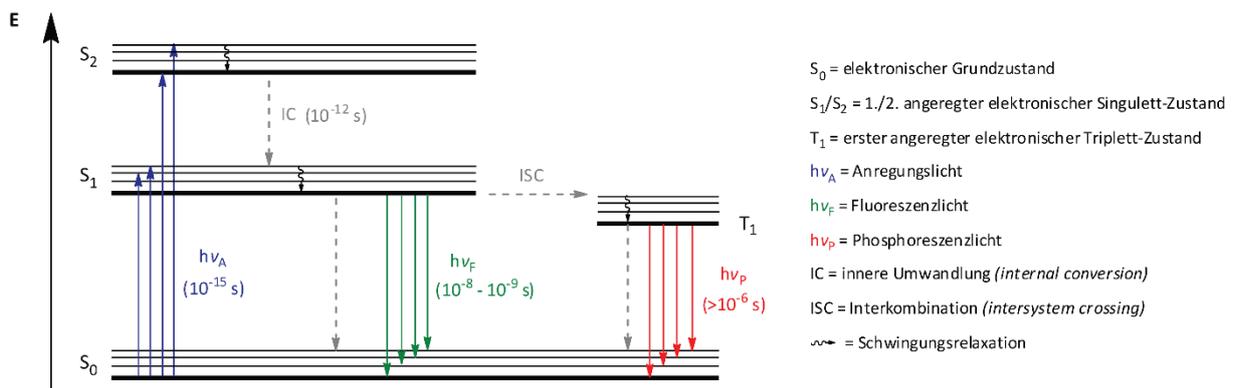


Abbildung 19: Beispielhaftes Jablonski-Diagramm: Nach elektronischer Anregung erfolgt eine schnelle Schwingungsrelaxation und inneren Umwandlung in den  $S_1$ . Von dort kann das System auf verschiedenen Wegen, wie strahlungsloser Relaxation, Fluoreszenz oder Phosphoreszenz in den Grundzustand zurückkehren.

Erfolgt die Lumineszenz aus einem angeregten Triplett-Zustand spricht man von Phosphoreszenz. Den strahlungslosen Übergang von elektronischen Anregungszuständen unterschiedlicher Multiplizitäten (z.B.  $S_1 \rightarrow T_1$ ) nennt man Interkombination bzw. *intersystem crossing* (ISC). Bei diesem Vorgang wird der Elektronen-Spin invertiert. Dieser (zwar nach optischen Auswahlregeln verbotene) Prozess ist dann möglich, wenn es zu einer starken Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Moment des Spins und dem zugehörigen Orbital (Spin-Bahn-Kopplung) bzw. bei Diradikalen zwischen zwei Elektronen-Spins (Spin-Spin-Kopplung) kommt.<sup>[134]</sup> Im vibronischen Grundzustand des angeregten Triplett-Zustands besitzt der Elektronen-Spin folglich dieselbe Orientierung wie der Spin im Grundzustand, d.h. dieser Übergang ist erneut „verboten“. Daraus resultiert die deutlich längere Lebenszeit von Phosphoreszenz im Millisekunden- bis Sekundenbereich.<sup>[90]</sup>

Nicht im Jablonski-Diagramm dargestellt können alternativ zur Lumineszenz und zur strahlungslosen Relaxation nach elektronischer Anregung natürlich eine Reihe an photochemischer bzw. photophysikalischer Mechanismen ablaufen, wie Bindungsbrüche, Isomerisierungen, Redox-Reaktionen, (De-)Protonierungen oder Energieüberträge. Diese Prozesse laufen in der Regel aus dem  $S_1$  oder  $T_1$  ab und bilden die Grundlage für die Steuerung von biologischen und chemischen Prozessen mit Licht.

### 1.3.3. Aufbau und Funktionsweise

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden die fluoreszierenden Eigenschaften von Molekülen ausgenutzt. Der typische Aufbau besteht aus einer Lichtquelle, aus der die gewünschte Wellenlänge durch einen Anregungsfilter selektiert wird. Das Licht wird von einem dichroitischen Spiegel auf das Objektiv reflektiert und damit auf die Probe fokussiert. Diese wird folglich angeregt und das Emissionslicht, welches rotverschoben gegenüber dem Anregungslicht ist, kann nun den dichroitischen Spiegel transmittieren, um zum Detektor zu gelangen (Abb. 20).<sup>[130]</sup> Für die Fluoreszenzmikroskopie gilt dasselbe Diffraktions-Limit wie für die klassische Lichtmikroskopie. Allerdings konnten Methoden entwickelt werden, die die Auflösungsgrenze deutlich herabsenken.

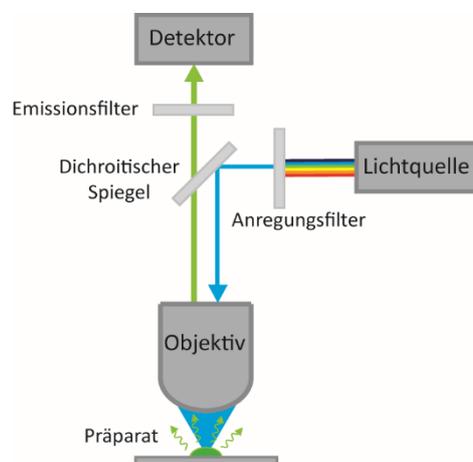


Abbildung 20: Typischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.

Aufgrund des Wellencharakters von Licht können die Signale von einzelnen emittierenden Molekülen nur als verschwommene Punkte detektiert werden, die begrenzt nah aneinander liegen können, um getrennt wahrnehmbar zu sein. Das Aussehen dieser Punkte wird mathematisch durch die Punktspreizfunktion (PSF, *point spread function*) dargestellt. Diese beschreibt somit die Unschärfe, mit der ein punktförmiges Objekt durch ein optisches System aufgrund von Beugungseffekten abgebildet wird.<sup>[17]</sup> Die Fluoreszenzmikroskopie wird also dann informativ, wenn nicht die gesamte Probe fluoresziert, sondern nacheinander immer nur ein geringer Teil davon. Der Abstand von zwei hellen

Fluorophoren wäre somit höher als die Auflösungsgrenze und das Gesamtbild kann am Ende durch die Überlagerung aller Signale erhalten werden. Alternativ können modifizierte Anregungsmuster verwendet werden, um die optische Auflösung zu verbessern, wie bei STED oder SIM (siehe Abschnitt 1.3.4.).

Als fluoreszente Marker werden in der Regel fluoreszierende Proteine (FPs) oder organische Farbstoffe eingesetzt.<sup>[135]</sup> Der Vorteil von FPs ist, dass sie in der zu untersuchenden biologischen Probe selbst exprimiert werden können, wodurch ein spezifisches Labeling garantiert ist.<sup>[136]</sup> Der wohl bekannteste Vertreter ist das *Green Fluorescent Protein* (GFP), ein Protein, das ursprünglich aus der Quallenart *Aequorea victoria* stammt und mit beliebigen anderen Proteinen Gen-spezifisch fusioniert werden kann, wodurch es häufig als Zellmarker verwendet wird.<sup>[137]</sup> Der Nachteil von FPs ist jedoch, dass sie relativ schnell photobleichen, sodass sie sich eher für Experimente auf kürzeren Zeitskalen eignen.<sup>[138]</sup>

Da für die meisten Fluoreszenzmikroskopieverfahren jedoch eine hohe Photostabilität vonnöten ist, werden hierfür eher organische Fluorophore verwendet. Zusätzlich besitzen solche in der Regel höhere molare Absorptionskoeffizienten und Fluoreszenzquantenausbeuten als FPs. Die photophysikalischen Eigenschaften eines Fluorophors, wie Absorptions- und Emissionswellenlänge, Quantenausbeute oder Lebensdauer des angeregten Zustandes hängen von seiner elektronischen Struktur ab und können durch chemische Modifikationen beeinflusst werden. Organische Fluorophore können demnach gemäß den Anforderungen des gewünschten Experiments synthetisch optimiert werden.<sup>[139]</sup>

#### 1.3.4. Hochauflösende Mikroskopiemethoden

In diesem Abschnitt werden drei wichtige hochauflösende Mikroskopiemethoden erläutert, die STED-Mikroskopie, die Mikroskopie mit struktureller Beleuchtung (3D-SIM) und die Lokalisationsmikroskopie.

Die Gruppe von Stefan Hell entwickelte Anfang der 90er Jahre eine der ersten Methoden, mit denen die Beugungsgrenze deutlich untergangen werden konnte, die STED-Mikroskopie.<sup>[140]</sup> 2014 erhielt er dafür den Nobelpreis in Chemie. STED steht für *stimulated emission depletion*, also die Auslöschung durch stimulierter Emission. Das Prinzip der stimulierten Emission ist die Basis der Funktionsweise von Lasern. Durch Lichtabsorption wird ein angeregter Zustand des quantenmechanischen Systems besetzt. Trifft nun ein weiteres Photon ein, dessen Energie der Energiedifferenz zwischen dem besetzten Zustand und dem Grundzustand entspricht, werden zur Folge zwei Photonen dergleichen Phase, Richtung und Energie entsandt.<sup>[141]</sup>

Bei STED wird die Laser-Scanning-Methode verwendet, d.h. die Probe wird mit einem fokussierten Laserstrahl abgerastert. Zusätzlich zu diesem Anregungsstrahl gibt es allerdings noch einen zweiten

Laser, der den STED-Strahl generiert. Dieser ist rotverschoben im Vergleich zum Anregungslicht und sorgt mittels stimulierter Emission für eine schnelle Rückkehr der angeregten Fluorophore in den Grundzustand. Aufgrund der Donat-artigen Form des STED-Pulses verbleibt nach der Fluoreszenzauslöschung nur noch ein kleiner runder Spot, aus dem spontanes Emissionslicht detektiert werden kann (Abb. 21). Durch das „Ausschalten“ der Fluoreszenz wird das Problem umgangen, dass der Anregungsstrahl beugungsbedingt nicht beliebig klein fokussiert werden kann. Bei den herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopiemethoden wurden stets alle Moleküle im Anregungsfokus aktiviert und die Fluoreszenz von einzelnen Emittoren war räumlich nicht mehr unterscheidbar. Bei der STED-Technik kann durch die steigende Intensität des Auslöschungsstrahls die Größe des fluoreszierenden Bereichs reduziert werden, d.h. die optische Auflösung ist theoretisch nicht begrenzt. Allerdings tritt bei hohen Laserintensitäten auch Photobleichen auf, d.h. Fluorophore müssen für STED-Anwendungen besonders photostabil sein. Tatsächlich konnte die Auflösung mithilfe dieser Anwendung auf bis zu 10 nm reduziert werden.<sup>[16]</sup>

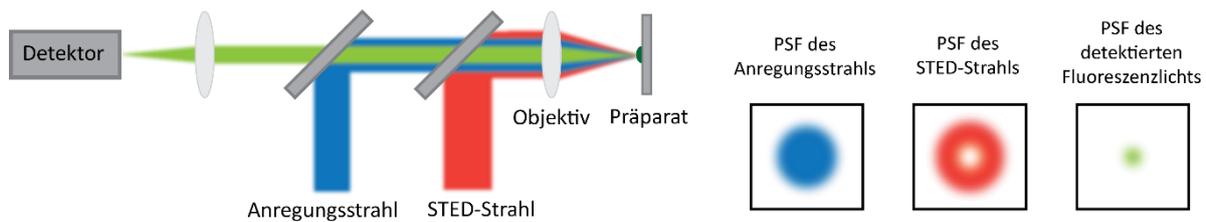


Abbildung 21: Aufbau eines STED-Mikroskops und Darstellung der jeweiligen zweidimensionalen Intensitätsprofile (PSF) von Anregungsstrahl, STED-Strahl und des resultierenden Fluoreszenzsignals.

Ähnlich wie bei der STED-Mikroskopie, wird bei der 3D-SIM mit modifizierten Laseranregungsmustern gearbeitet. Die Abkürzung SIM steht für Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (*structured illumination microscopy*).<sup>[142]</sup> Bei dieser Technik wird ein strukturiertes Beleuchtungsmuster (i.d.R. ein Gittermuster) zur Fluoreszenzanregung verwendet. Es werden mehrere Bilder für verschiedene Ebenen eines dreidimensionalen Volumens unter Verschiebung dieses Gitters aufgenommen. Dabei interferiert das hochfrequente Gittermuster mit den unbekanntem Gitterstrukturen der Probe, wobei sogenannte Moiré-Bilder entstehen. Schlussendlich kann durch die Dekonvolution dieser Bilder eine hochaufgelöste Abbildung erhalten werden, indem das unbekanntem Probenmuster vom bekannten Anregungsmuster mathematisch extrahiert wird. Durch diese Methode kann eine Auflösung von etwa 100 nm erzielt werden.<sup>[16]</sup>

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Methoden, die modifizierte Belichtungsmuster nutzen, um die PSF zu reduzieren, können bei der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie (*single molecule localization microscopy, SMLM*) einzelne Emittoren orts aufgelöst detektiert werden.<sup>[143]</sup> Die zu

untersuchende Probe muss dafür mit Fluorophoren ausgestattet sein, die in der Lage sind zwischen einem emittierenden („hellen“) und einem nicht-emittierenden („dunklen“) Zustand wechseln zu können. Im Verlauf des Experiments wird jeweils ein geringer Teil der Fluorophoren zum Leuchten gebracht. Dadurch besitzen diese einen Abstand zueinander, der größer als das Diffraktions-Limit ist und können somit mit hoher örtlichen Präzision detektiert werden. Nach Deaktivierung der hellen Fluorophore wird der Vorgang so oft wiederholt, bis schließlich durch Überlagerung der einzelnen Bilder ein hochaufgelöstes Gesamtbild rekonstruiert werden kann (Abb. 22).<sup>[135]</sup> Mithilfe von SMLM-Methoden konnte die optische Auflösung auf 10 – 20 nm reduziert werden.<sup>[16,144]</sup>

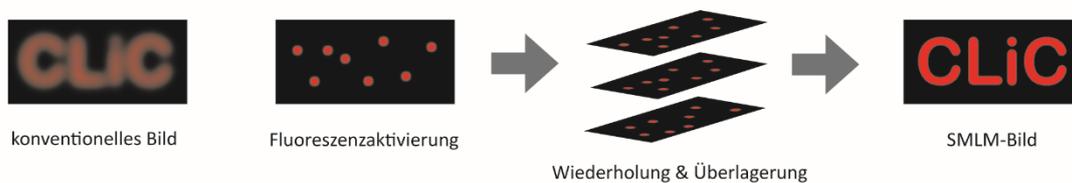


Abbildung 22: Prinzip der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie. Durch die sequentielle orts aufgelöste Detektion einer Teilmenge an Emittlern kann durch die Überlagerung der Bilder ein hochaufgelöstes SMLM-Bild erstellt werden. Abbildung in Anlehnung an Vaughan et al.<sup>[135]</sup>

Es wurden verschiedene SMLM-Methoden entwickelt, die sich in der Art der Fluoreszenzaktivierung unterscheiden. Bei der stochastischen optischen Rekonstruktionsmikroskopie (STORM, *stochastic optical reconstruction microscopy*) werden Fluorophore verwendet, die mit Lasern verschiedener Wellenlängen reversibel zwischen einem hellen und einem dunklen Zustand geschaltet werden können.<sup>[144]</sup> Bei jeder Belichtung wird nur eine zufällige Teilmenge der Fluorophore aktiviert. Dieser Vorgang des „Blinkens“ wird solange wiederholt, bis ein hochaufgelöstes Gesamtbild rekonstruiert werden kann. Für den Schaltvorgang kann die Lösungsmittelpolarität bzw. der pH-Wert der Umgebung oder die Zugabe von Additiven eine wichtige Rolle spielen.<sup>[145]</sup> Diese Faktoren ausnutzend gibt es auch spontan blinkende fluorogene Proben, die ohne Bestrahlung ihren Zustand ändern können. Allerdings stellt bei solchen die Einstellung eines Gleichgewichts, bei dem nur ein Bruchteil der Fluorophore leuchtet, eine Herausforderung dar.<sup>[146]</sup>

Eine höhere Spezifität der Fluoreszenzaktivierung besteht bei der photoaktivierten Lokalisationsmikroskopie (PALM, *photoactivated localization microscopy*).<sup>[9]</sup> Hier befinden sich alle Fluorophore zu Beginn des Experiments in einem nicht-emittierenden Zustand. Durch die Aktivierung mit einem Laser, können die Fluorophore irreversibel in ihre fluoreszierende Form überführt werden. Die Desaktivierung erfolgt hierbei durch Photobleichen aufgrund anhaltender Bestrahlung. Folglich werden für PALM-Experimente fluorogene Proben benötigt, die durch Licht aktiviert werden können. Im nächsten Kapitel werden solche photoaktivierbaren Fluorophore und deren Anwendungen neben hochauflösenden Mikroskopiemethoden beschrieben.

## 1.4. Photoaktivierbare Fluorophore

### 1.4.1. Allgemeine Funktion und Beispiele

Bei photoaktivierbaren Fluorophoren (PAFs) handelt es sich um Moleküle, die durch eine photochemische Umwandlung von einem nicht-fluoreszierenden in einen fluoreszierenden Zustand überführt werden können.<sup>[10]</sup> In seiner geschützten Form ist die Verbindung schwach oder nicht-fluoreszent, weil entweder das Absorptionsspektrum signifikant von der freien Form abweicht oder eine strahlungslose Desaktivierung aus dem angeregten Zustand begünstigt wird.<sup>[147]</sup> Bei Bestrahlung mit Licht der geeigneten Aktivierungswellenlänge  $\lambda_{ac}$  wird das Molekül in seine emittierende Form umgewandelt und liefert ein Fluoreszenzsignal  $\lambda_{em}$ , wenn es mit der Anregungswellenlänge  $\lambda_{ex}$  bestrahlt wird (Abb. 23).

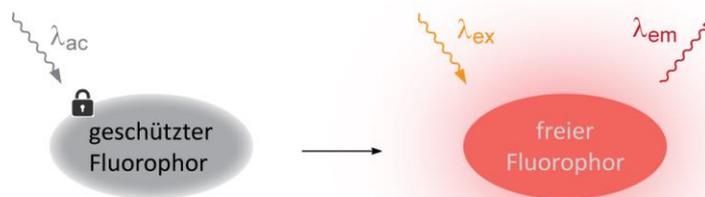


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Fluoreszenzaktivierung eines photogeschützten Fluorophors. Durch Bestrahlung mit der Aktivierungswellenlänge  $\lambda_{ac}$  wird das Molekül in seine freie Form überführt und liefert ein Fluoreszenzsignal  $\lambda_{em}$  nach Bestrahlung mit der Anregungswellenlänge  $\lambda_{ex}$ .

Für eine effiziente Fluoreszenzaktivierung müssen PAFs bestimmte Kriterien erfüllen.<sup>[10,148,149]</sup> Die Photolyse sollte schnell ablaufen, um lange Belichtungszeiten zu vermeiden. Für biologische Anwendungen sollte die Aktivierungswellenlänge über 400 nm liegen, aufgrund der Phototoxizität und der geringen Eindringtiefe von UV-Licht (vgl. Abschnitt 1.1.1.). Darüber hinaus sollte der freie Fluorophor einen hohen molaren Absorptionskoeffizienten und eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute bei der Anregungswellenlänge aufweisen. Die Uncaging-Reaktion muss eine signifikante Veränderung der Fluoreszenzintensität bewirken, um einen guten Kontrast zu bieten. Schließlich sollte der Fluorophor eine hohe Photostabilität aufweisen, um Intensitätsverluste durch Photobleichen zu vermeiden. Photoaktivierbare fluoreszierende Sonden umfassen organische Farbstoffe,<sup>[150,151]</sup> fluoreszierende Proteine<sup>[152–154]</sup> oder Quantenpunkte.<sup>[155,156]</sup> Organische Fluorophore sind aufgrund ihrer hohen Helligkeit und Photostabilität besonders gut geeignet. Da ihre elektronische Struktur maßgeblich die photophysikalischen Eigenschaften beeinflusst, können sie anhand von chemischen Modifikationen optimiert werden.

Zur Unterdrückung der Fluoreszenz können verschiedene Strategien verfolgt werden. Oftmals werden photolabile Schutzgruppen verwendet, um den Fluorophor strukturell oder elektronisch in eine nicht-

emittierende Form zu zwingen. Beispiele dafür sind *o*NB-geschützte Cumarine<sup>[157]</sup> oder Rhodamine<sup>[158]</sup> (Abb. 24a). Eine weitere Möglichkeit ist die Anbringung eines Quenchers in räumlicher Nähe. Unsere Gruppe publizierte 2015 die Synthese eines ATTO565-Derivats, das über einen photolabilen Linker mit einer NDBF-Gruppe verknüpft ist, welche gleichzeitig als PPG und Quencher fungiert (Abb. 24b).<sup>[159]</sup> Weiterhin können lichtinduzierte Oxidationsreaktionen in manchen Chromophoren zu einem deutlichen Fluoreszenzanstieg führen (Abb. 24c). So kann zum Beispiel die Einführung von Thiocarbonylen aufgrund von photoinduziertem Elektronentransfer den Verlust der Fluoreszenz bewirken, welche anschließend durch die Oxidation dieser Gruppe wiederhergestellt werden kann.<sup>[160]</sup> Ein anderes Beispiel ist die Fluoreszenzaktivierung eines Phenothiazin-Derivats durch die Oxidation des Schwefel-Atoms.<sup>[161]</sup> Winter *et al.* zeigten, dass manche BODIPY-Derivate anfällig für lichtinduzierte Substitutionsreaktionen sind.<sup>[162]</sup> So führte die Bestrahlung eines Bor-alkylierten BODIPYs mit grünem Licht in Methanol zur Bildung des Methoxy-substituierten Analogons, welches eine erhöhte Fluoreszenz aufwies (Abb. 24d). Rivera-Fuentes *et al.* stellten eine Kombinationsstrategie aus Belichtung und enzymatischer Aktivität vor. Das verwendete Rhodamin-Fluorophor konnte hierbei nur bei Bestrahlung in Anwesenheit bestimmter Enzyme in seine emittierende Form umgewandelt werden (Abb. 24e).<sup>[163]</sup>

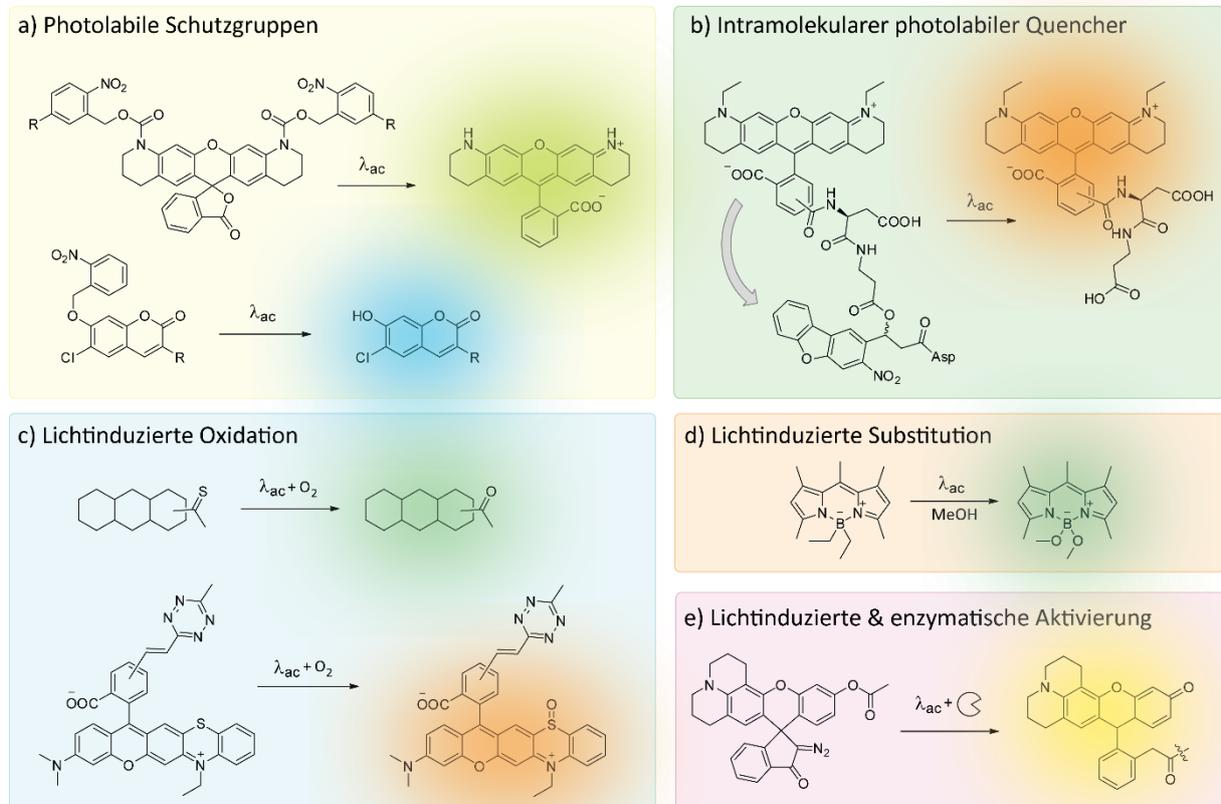


Abbildung 24: Übersicht verschiedener Strategien zur lichtinduzierten Fluoreszenzaktivierung bei unterschiedlichen Chromophoren, darunter Rhodamine, Cumarine, BODIPYs und Phenothiazine.

Die orts- und zeitaufgelöste Aktivierung von Fluoreszenz ist für verschiedene Anwendungen vorteilhaft. Wie bereits beschrieben wird sie bei hochauflösenden Mikroskopiemethoden, wie PALM, für die Abbildungen von Strukturen unterhalb des Diffraktions-Limits genutzt (vgl. Abschnitt 1.3.4.). Weiterhin können dynamische biologische Prozesse durch die lichtgesteuerte Aussendung von Fluoreszenzsignalen besser visualisiert werden. Somit konnte beispielsweise in Zusammenarbeit mit unserer Gruppe die Bewegung von mRNA in Neuronen über einen Beobachtungszeitraum von mehreren Stunden verfolgt werden, ohne Zellschäden zu generieren.<sup>[164]</sup> Viel allgemeiner dienen photoaktivierbare Fluorophore als Kalibrierungsstandards für optische Set-Ups. Experimente zur Untersuchung und Regulierung von Proben mit Licht benötigen oftmals spezielle Belichtungsmuster. Für eine optimale Anwendung muss das Belichtungssystem dafür möglichst gut charakterisiert sein. Photoaktivierbare Fluorophore können gezielt mit Licht aktiviert werden. Sie liefern demnach Informationen über die räumliche und zeitliche Intensitätsverteilung von Fluoreszenzsignalen, sowie die Effektivität von Anregungsprozessen und dienen somit der Veranschaulichung und Optimierung von Belichtungsmustern.<sup>[10]</sup>

Es wurden bereits eine Vielzahl an photoaktivierbaren Fluorophoren beschrieben, darunter Acridone,<sup>[165]</sup> Xanthone,<sup>[166]</sup> Cumarine,<sup>[157]</sup> BODIPYs,<sup>[167]</sup> Fluoresceine<sup>[168]</sup> oder Rhodamine<sup>[12]</sup> (sowie Carbo<sup>[169]</sup>- oder Silicorhodamine<sup>[170]</sup>). Im nächsten Abschnitt wird im Besonderen auf die Verwendung von Rhodaminen als PAFs eingegangen.

### 1.4.2. Rhodamine als photoaktivierbare Fluorophore

Bei den Rhodaminen handelt es sich um eine Farbstoffklasse, die aus einem Xanthen-Grundgerüst mit Amino-Substituenten und einem perpendicular dazu stehenden *ortho*-Carboxyphenyl bestehen.<sup>[171]</sup> Aufgrund ihrer herausragenden photophysikalischen Eigenschaften sind sie besonders gut als fluorogene Proben geeignet.<sup>[172]</sup> Sie weisen eine starke Absorption und Emission im sichtbaren Bereich, sowie eine hohe Photostabilität auf. Weiterhin sind sie biokompatibel und synthetisch leicht herzustellen und zu modifizieren. Der Einfluss verschiedener chemischer Modifikationen ist bereits gut untersucht. So weiß man zum Beispiel, dass Alkyl-Substituenten am Amin die Fluoreszenzquantenausbeute aufgrund eines lichtinduzierten Elektronentransfers, einem sogenannten TICT (*twisted intramolecular charge transfer*), verringern. Substituenten, die dagegen ein starres Gerüst mit dem Stickstoff bilden, wie im Azetidin oder Julolidin, verhindern diesen Mechanismus und erhöhen die Fluoreszenzquantenausbeute.<sup>[139]</sup> Die spektralen Eigenschaften werden weiterhin durch das verbrückende Heteroatom beeinflusst. Durch den Austausch des Sauerstoffs mit beispielsweise Kohlenstoff, Germanium oder Silizium konnte das Absorptionsspektrum bathochrom verschoben werden.<sup>[173]</sup> Rhodamine können somit durch geringfügige chemische

Modifikationen hinsichtlich der Anforderungen ihrer Anwendung angepasst und optimiert werden (Abb. 25).

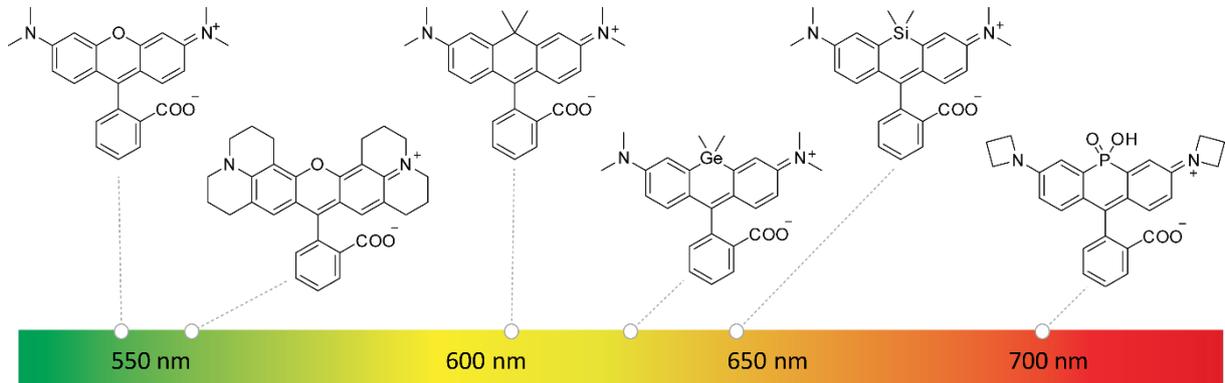


Abbildung 25: Rotverschiebung der Rhodamin-Absorption durch unterschiedliche chemische Modifikationen.

Der größte Vorteil für die Verwendung von Rhodaminen als PAFs ist jedoch, dass sie in zwei isomeren Formen vorkommen: eine geschlossene nicht-fluoreszierende Lacton-Form und eine offene fluoreszierende Zwitterion-Form (Abb. 26). Das dynamische Gleichgewicht hängt hauptsächlich von Umweltfaktoren, wie der Polarität bzw. des pH-Werts des Lösungsmittels, ab. Die geschlossene Lacton-Form liegt hauptsächlich in unpolaren aprotischen Lösungsmitteln vor, während die zwitterionische Form nur in polaren protischen Lösungsmitteln existiert. Strenggenommen gibt es noch ein drittes Isomer, die kationische Form, bei der die Carboxy-Gruppe protoniert ist und welche nur in saurem Milieu vorkommt.<sup>[174]</sup>



Abbildung 26: Rhodamin-Struktur in seinen verschiedenen isomeren Zuständen.

Die Isomerisierung kann jedoch auch durch intrinsische Faktoren beeinflusst werden. So fördern elektronenschiebende Substituenten am Xanthen und elektronenziehende Substituenten am Carboxyphenyl die Ringöffnung, also die zwitterionische Form. Andersherum zwingen elektronenziehende Gruppen an den Aminen das Molekül in seine Lacton-Form.<sup>[175]</sup> Dieser Umstand wurde sich für das Design von photoaktivierbaren Rhodamin-Fluorophoren zu Nutze gemacht (Abb. 27). Es gibt eine Vielzahl an Beispielen in der Literatur, bei denen *ortho*-Nitrobenzyl-Derivate über Carbamat-Linker an die Amino-Gruppen von Rhodaminen angebracht wurden.<sup>[11,151,158]</sup> Carbamate als selbst-immolative Linker wurden dabei zum einen aufgrund ihrer elektronenziehenden Eigenschaften gewählt, die das Rhodamin in seine nicht-emittierende Form zwingen. Zum anderen

erleichtern sie die Anbringung der Schutzgruppe, da der Rhodamin-Stickstoff eine sehr geringe Nucleophilie aufweist. Lavis *et al.* erhöhten die Effektivität dieser Reaktion, in dem sie zunächst das Rhodamin reduzierten und somit die Nucleophilie an den Aminen steigerten.<sup>[11]</sup>

Bei Bestrahlung solcher Proben werden die Photocages abgespalten und das Rhodamin kann seine fluoreszierende Form annehmen. Da bisher allerdings hauptsächlich *o*NB-Schutzgruppen verwendet wurden, muss UV-Licht für die Aktivierung verwendet werden (Abb. 27a). Hell *et al.* synthetisierten sogenannte Rhodamin-NN-Farbstoffe (Abb. 27b).<sup>[13]</sup> Diese besitzen eine Diazoketon-Schutzgruppe, die in das Spiro-Xanthen eingebaut ist. Bei Bestrahlung wird Stickstoff freigesetzt und ein fluoreszierendes Rhodamin-Produkt gebildet. Dieser Ansatz ist besonders elegant, da mit Stickstoff ein kleines, nicht-

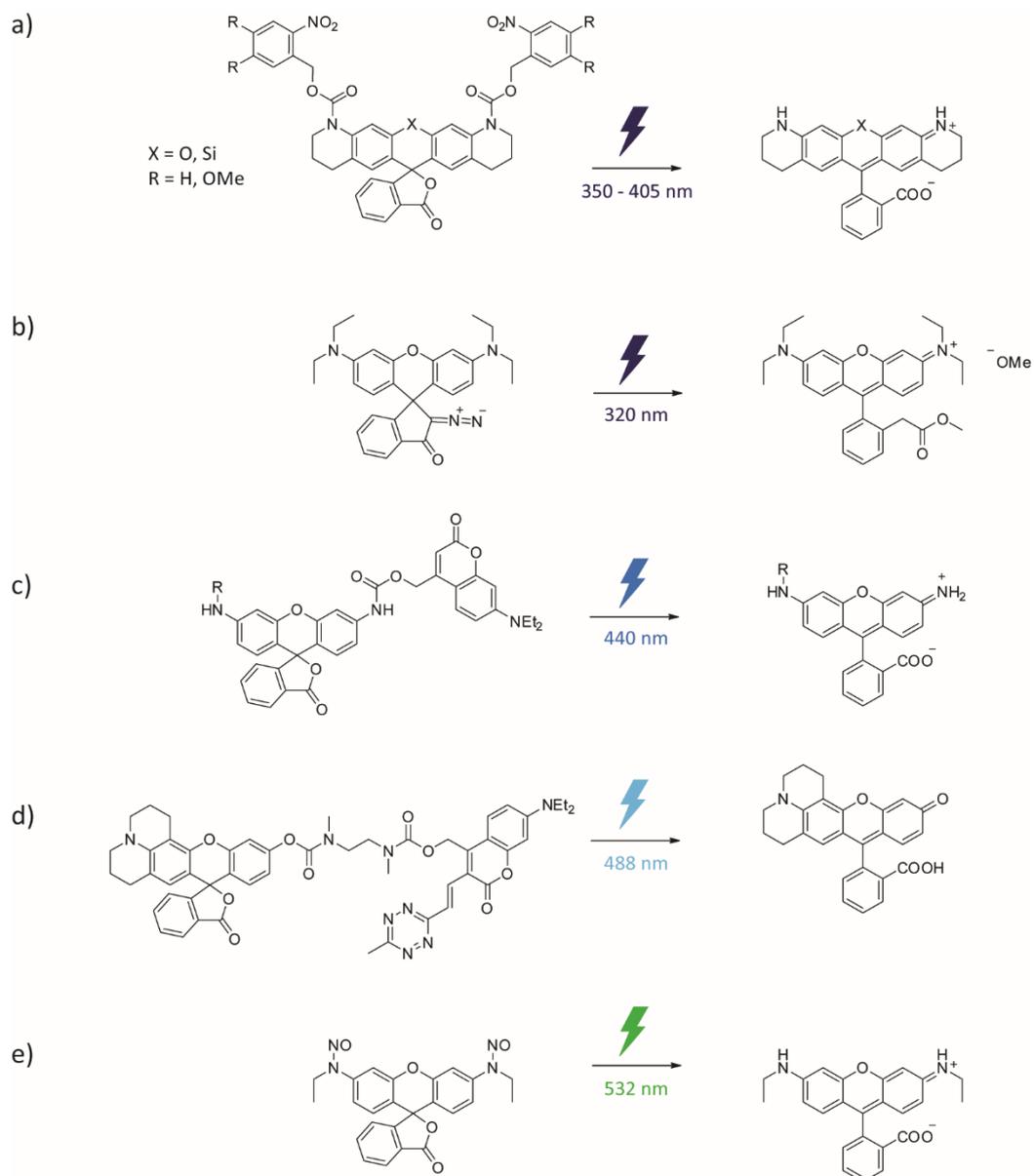


Abbildung 27: Übersicht photoaktivierbarer Rhodamin-Derivate, deren Aktivierungswellenlängen vom UV-Bereich bis in den sichtbaren grünen Bereich reicht.

toxisches Molekül bei der Photolyse entsteht, welches spektral nicht mit dem verwendeten Licht interferiert. Allerdings wird auch hier wieder UV-Licht benötigt, welches für biologische Anwendungen nicht gut geeignet ist.

Es gibt nur wenige Beispiele von Rhodaminen die mit sichtbarem Licht aktiviert werden können. Das liegt daran, dass Photocages außer *ortho*-Nitrobenzol oftmals sterisch anspruchsvoll und die synthetische Einführung schwierig ist. Lawrence *et al.* zeigten, dass eine Fluoreszenzaktivierung bei Rhodamin-Derivaten bei 440 nm möglich ist, in dem sie DEACM als Schutzgruppe verwendeten (Abb. 27c).<sup>[176]</sup> Auch Kele *et al.* präsentierten die Aktivierung eines Cumarin-geschützte Rhodol-Derivats mit blauem Licht (Abb. 27d).<sup>[177]</sup> Weiterhin wurde von Xiao *et al.* gezeigt, dass durch die Verwendung von Nitroso-Substituenten sogar eine Fluoreszenzaktivierung mit grünem Licht erzielt werden kann (Abb. 27e).<sup>[178]</sup>

## 2. Motivation & Zielsetzung

### 2.1. Projekt I: Rhodamin-BODIPY-Dyade für verbessertes 2P-Uncaging

Das Zweiphotonen-Uncaging bietet wesentliche Vorteile für biologische Anwendungen. Durch die Verwendung von energiearmen NIR-Licht kann eine geringe Phototoxizität und eine tiefe Durchdringung in durchblutetem Gewebe erzielt werden.<sup>[179]</sup> Das kleine Anregungsvolumen der 2PA, welches aus der quadratischen Lichtabhängigkeit des Prozesses resultiert, sorgt für eine dreidimensionale Ortsauflösung der Aktivierung. Somit können mithilfe von Zweiphotonen-Uncaging biologisch relevante Substrate mit hoher Präzision und geringer Invasivität freigesetzt werden.<sup>[21]</sup>

Leider weisen viele der bekannten Einphotonen-Schutzgruppen nur eine geringe bis mäßige Zweiphotonen-Aktivität auf. Das Design von neuen 2P-Schutzgruppen stellt aufgrund der schwierigen Vorhersagbarkeit der Zweiphotonen-Eigenschaften eine Herausforderung dar. Oftmals führten Modifikationen eines Photocages, die die 2PA verbessern sollten, zur Verschlechterung von anderen Parametern, wie der Uncaging-Quantenausbeute. Aus diesem Grund wurde ein Ansatz entwickelt, der den Absorptionsprozess vom Uncaging-Prozess separiert. Durch die Verknüpfung eines guten Zweiphotonen-Absorbers mit einem effektiven Photocage in einer Energietransferdyade, sollte eine Verbesserung des Zweiphotonen-Uncagings realisiert werden (Abb. 28).

Im Zuge dieses Projekts sollte eine solche molekulare Dyade synthetisiert werden. Dazu musste zunächst ein Donor-Molekül gewählt werden, welches eine herausragende Zweiphotonen-Aktivität aufweist. Im Anschluss sollte dieses kovalent an einen geeigneten Akzeptor-Photocage gebunden werden. Um die Funktionalität der Dyade zu belegen, sollten anhand von spektroskopischen und theoretischen Untersuchungen die 2PA des Donors, der Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor, sowie die Photolyse des Akzeptor-Photocages nachgewiesen werden. Eine weitere Herausforderung besteht im Nachweis von Zweiphotonen-Uncaging-Reaktionen, da es sich aufgrund der minimalen räumlichen Beschränkung des Anregungsvolumens um einen mikroskopischen Effekt handelt. Hierzu sollte eine Methode entwickelt werden, um die Freisetzung einer Modell-Abgangsgruppe durch Zweiphotonen-Anregung der Dyade qualitativ nachweisen zu können.

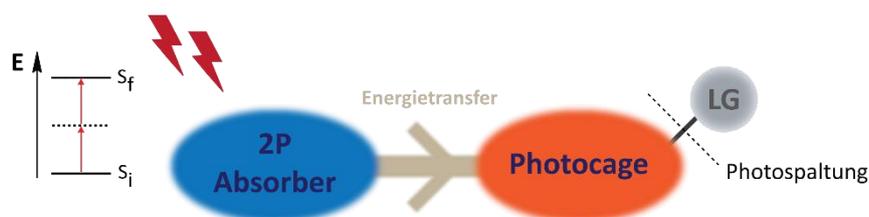


Abbildung 28: Schematische Darstellung einer Energietransferdyade bestehend aus einem 2P-Absorber als Donor, einem Photocage als Akzeptor und einer Abgangsgruppe (LG, leaving group).

## 2.2 Projekt II: Einphotonen- und Zweiphotonen-Aktivierung eines Rhodamin-Fluorophors

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine fundamentale analytische Methode in der Biochemie, da es sich um eine sensitive, nicht-invasive Technik handelt, um dynamische biologische Prozesse zu verfolgen oder hochaufgelöste Bilder zu generieren. Solche Anwendungen setzen eine gründliche Charakterisierung der verwendeten Belichtungsmuster voraus. Mithilfe von photoaktivierbaren Fluorophoren (PAFs) ist es möglich, die Fluoreszenzverteilung räumlich und zeitlich zu kontrollieren und somit Informationen über die Lichtdistribution in der Probe zu erhalten.<sup>[147]</sup>

Oftmals werden Rhodamin-Fluorophore als PAFs verwendet. Allerdings können diese meistens nur mit UV-Licht aktiviert werden.<sup>[11,13]</sup> Da mikroskopische Set-Ups aber besonders für die Untersuchung biologischer Proben genutzt werden, ist die Verwendung von UV-Licht ungünstig, da es Photoschäden hervorrufen kann und somit zelltoxisch wirkt. Folglich war die erste Voraussetzung an das Design des photoaktivierbaren Fluorophors, dass er mit sichtbarem Licht, im Besonderen mit 488 nm, aktivierbar ist, da es sich dabei um eine typische Wellenlänge im biologischen Kontext, z.B. für die Anregung von *GFP*, handelt.<sup>[137]</sup> Des Weiteren sollte der PAF über Zweiphotonen-Anregung im NIR-Bereich aktivierbar sein. Die Möglichkeit Zweiphotonen-Anregungsmuster zu charakterisieren ist aufgrund der intrinsischen dreidimensionalen Auflösung des 2PA-Prozesses und der Verwendung von energiearmen NIR-Licht besonders erstrebenswert für biologische Anwendungen.

Die Anforderungen an die photophysikalischen Eigenschaften des PAFs waren eine hohe Aktivierungseffizienz, sowie eine hohe Helligkeit des freien Fluorophors, um einen starken Kontrast zu generieren. Weiterhin musste der Fluorophor möglichst photostabil sein, um ein beständiges Fluoreszenzsignal nach Aktivierung zu emittieren. Zuletzt sollte das Molekül eine Funktionalität besitzen, die eine Immobilisierung ermöglicht. Ziel des Projekts war somit die Synthese und photophysikalische Charakterisierung eines PAFs, der die genannten Anforderungen erfüllt (Abb. 29).

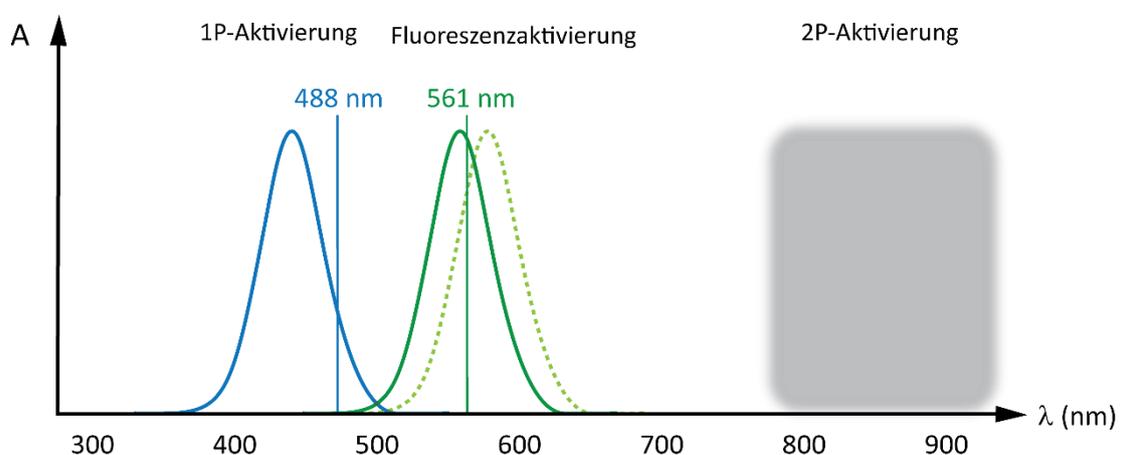


Abbildung 29: Schematische Darstellung der spektralen Anforderungen an das Design des photoaktivierbaren Fluorophors.

### 3. Ergebnisse & Diskussion

#### 3.1. Rhodamin-BODIPY-Dyade für verbessertes Zweiphotonen-Uncaging

Wie in Kapitel 1.2.5. beschrieben, können photolabile Schutzgruppen für Zweiphotonen-Absorption sensibilisiert werden, indem sie mit einem guten 2P-Donor verknüpft werden. In diesem Kapitel wird die Synthese und die Untersuchung der photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften von Energietransferdyaden bestehend aus einem Rhodamin-Fluorophor und einem BODIPY-Photocage für verbessertes Zweiphotonen-Uncaging beschrieben. Die folgenden Ergebnisse wurden in Publikation I (Asido *et al.* 2022) aus der vorangestellten Liste veröffentlicht.<sup>[180]</sup>

##### 3.1.1. Synthese & Charakterisierung des Rhodamin-Fluorophors

Im ersten Schritt wurde sich für einen Rhodamin-Fluorophor als 2P-Donormolekül entschieden, da diese Farbstoffklasse literaturbekannt hohe Zweiphotonen-Einfangquerschnitte besitzt.<sup>[92,181]</sup> Es existieren zwar Chromophore basierend auf quadrupolaren oder oktopolaren Systemen, die deutlich höhere  $\sigma_2$ -Werte aufweisen, allerdings handelt es sich dabei um große organische und somit in der Regel hydrophobe Molekülstrukturen. Aus Sicht einer möglichen Anwendung im biologischen Kontext sind jedoch eine leichte synthetische Zugänglichkeit und eine gute Wasserlöslichkeit erforderlich. Rhodamine bieten diesbezüglich einen guten Kompromiss.

Weiterhin kann das Rhodamin-Grundgerüst vielseitig funktionalisiert und somit leicht den Anwendungsanforderungen angepasst werden. Da die Amino-Substituenten einen großen Einfluss auf

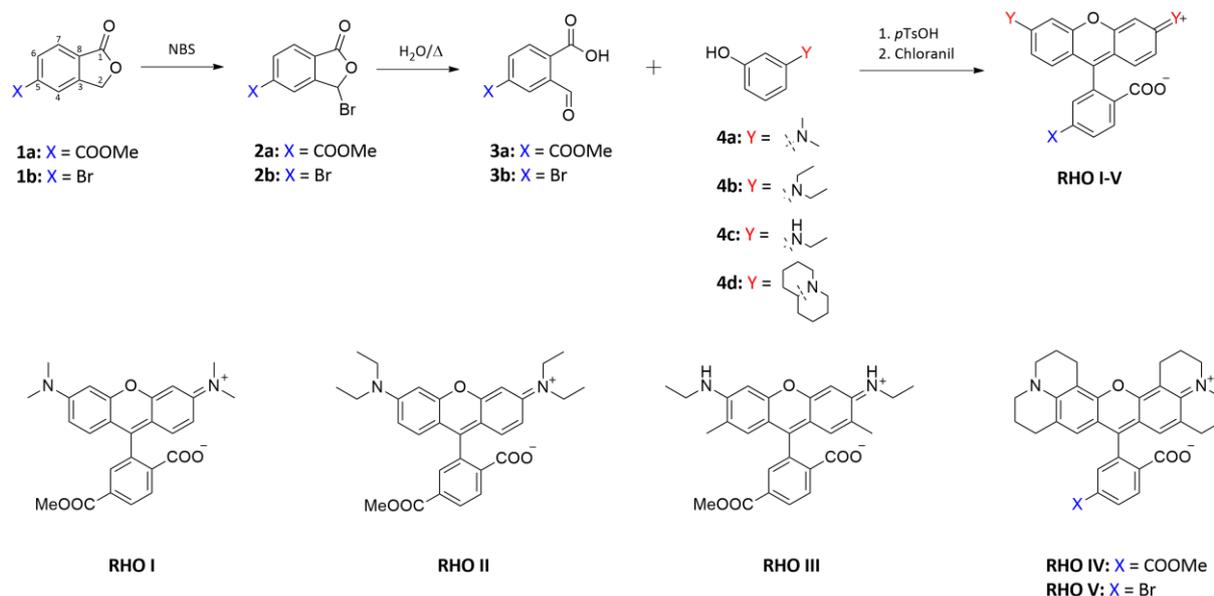


Abbildung 30: Syntheseroute und Übersicht der Rhodamin-Derivate RHO I-V.

die photophysikalischen Eigenschaften ausüben, wurden verschiedene Derivate synthetisiert, um deren Zweiphotonen-Fähigkeiten zu vergleichen. Die Synthese erfolgte nach Auer *et al.*,<sup>[182]</sup> wodurch isomerenreine 5'-funktionalisierte Rhodamine erhalten wurden. (Die Nomenklatur bezieht sich hierbei auf die Nummerierung im Phthalsäureanhydrid, siehe Struktur **1** in Abb. 30.) Das Vorläufermolekül **3** wurde durch die Bromierung des entsprechenden Phthalsäureanhydrids **1** und anschließender thermischer Hydrolyse erhalten (**2**). Der Aufbau des Rhodamin-Grundgerüsts erfolgte in einem Schritt durch die Reaktion von **3** mit dem jeweiligen Aminophenol **4** unter sauren Bedingungen und anschließender Oxidation. Somit wurden die Rhodamin-Derivate **RHO I-V** erhalten (Abb. 30).

Im Anschluss wurden die photophysikalischen Eigenschaften der Methylester-substituierten Derivate **RHO I-IV** untersucht, wobei zunächst die Einphotonen-Absorption betrachtet wurde. Die Verbindungen absorbieren im grünen spektralen Bereich (520 – 570 nm), weisen einen kleinen Stokes-Shift auf und emittieren somit im grüngelben Bereich (550 – 600 nm). Die molaren Absorptionskoeffizienten und die Fluoreszenzquantenausbeuten, sowie die Fluoreszenzlebensdauern wurden von Dr. Marvin Asido aus dem AK Wachtveitl der Goethe-Universität bestimmt. Alle Derivate weisen hohe molare Absorptionskoeffizienten ( $\epsilon > 60000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) auf, wobei **RHO IV** mit  $\epsilon = 116780 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  besonders hervortritt. Die Fluoreszenzquantenausbeuten sind moderat für **RHO I** (41%) und **RHO II** (47%). Es ist bekannt, dass der angeregte Zustand bei Chromophoren mit alkylierten Amino-Substituenten strahlungsfrei über einen sogenannten TICT (*twisted intramolecular charge transfer*) deaktiviert werden kann. Dabei handelt es sich um einen Elektronentransfer aufgrund einer starken Polaritätsänderung im angeregten Zustand, der mit einer Rotation des Substituenten um die C-N-Einfachbindung einhergeht.<sup>[183]</sup> Da dieser Mechanismus in Konkurrenz zur Fluoreszenz steht, liegt eine verminderte Fluoreszenzquantenausbeute vor. Für die anderen beiden Derivate ist  $\Phi_F$  dagegen sehr hoch, besonders für **RHO III** (91%). Bei **RHO III** handelt es sich um ein Rhodamin 6G-Derivat, welches aufgrund seiner hohen Helligkeit auch oft als Laserfarbstoff verwendet wird. **RHO IV** weist mit  $\tau = 4.98 \text{ ns}$  die längste Fluoreszenzlebensdauer der vier Derivate auf. Ein langes Bestehen des angeregten Zustandes kann hierbei von Vorteil für die spätere Anwendung als Donor-Molekül in einer Energietransferdyade sein. Die Einphotonen-Eigenschaften der Rhodamin-Derivate **RHO I-IV** sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

	$\lambda_{\text{abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{flu}}$ [nm]	$\epsilon$ [ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]	$\Phi_F$ [%]	$\tau$ [ns]
<b>RHO I</b>	542	573	86540	41	2.66
<b>RHO II</b>	549	581	67190	47	2.25
<b>RHO III</b>	519	555	69860	91	4.16
<b>RHO IV</b>	572	602	116780	83	4.98

Tabelle 1: Übersicht der Einphotonen-Eigenschaften der synthetisierten Rhodamin-Derivate RHO I-IV.

Im nächsten Schritt wurden die Zweiphotonen-Eigenschaften untersucht. Hierfür wurden die Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitte  $\delta_F$  von **RHO I-IV** von Dr. Marvin Asido aus dem AK Wachtveitl mittels TPEF-Messungen bestimmt. Zunächst wurden leistungsabhängige Fluoreszenzmessungen (hier am Beispiel von **RHO IV**) durchgeführt. Dafür wurde die Probe in Methanol gelöst und bei 850 nm mit steigender Laserleistung zwischen 40 mW und 600 mW bestrahlt (Abb. 31a). Das Fluoreszenzsignal liegt etwas über 600 nm (wird also erwartungsgemäß aus dem  $S_1$ -Zustand generiert) und nimmt mit steigender Laserleistung an Intensität zu. Der Plot der Fluoreszenzintensität gegen die eingesetzte Leistung verdeutlicht den exponentiellen Anstieg (Abb. 31b, links). Die logarithmische Auftragung lieferte eine Geradensteigung, die näherungsweise 2 beträgt (Abb. 31b, rechts). Dies dient als Beweis für die quadratische Abhängigkeit zur Lichtintensität, welche charakteristisch für die 2PA ist. Somit wurden anschließend die Fluoreszenzsignale der Rhodamin-Derivate **RHO I-IV** nach Zweiphotonen-Anregung zwischen 800 nm und 870 nm gemessen (Abb. 31c). Es wurde schließlich ermittelt, dass **RHO IV** die stärkste Zweiphotonen-Antwort zeigt mit 2P-Wirkungsquerschnitten  $\delta_F = 80 - 110$  GM im gemessenen Spektralbereich. Diese hohen Werte gehen auf den zugrundeliegenden  $S_0$ - $S_2$ -Übergang zurück, welcher aus Symmetriegründen bei den betrachteten Rhodaminen 1P-verboden und somit verstärkt 2P-aktiv ist. **RHO IV** bzw. sein bromiertes Derivat **RHO V** wurde aufgrund der überlegenen Zweiphotonen-Eigenschaften im weiteren Verlauf des Projekts als Zweiphotonen-Donormolekül verwendet.

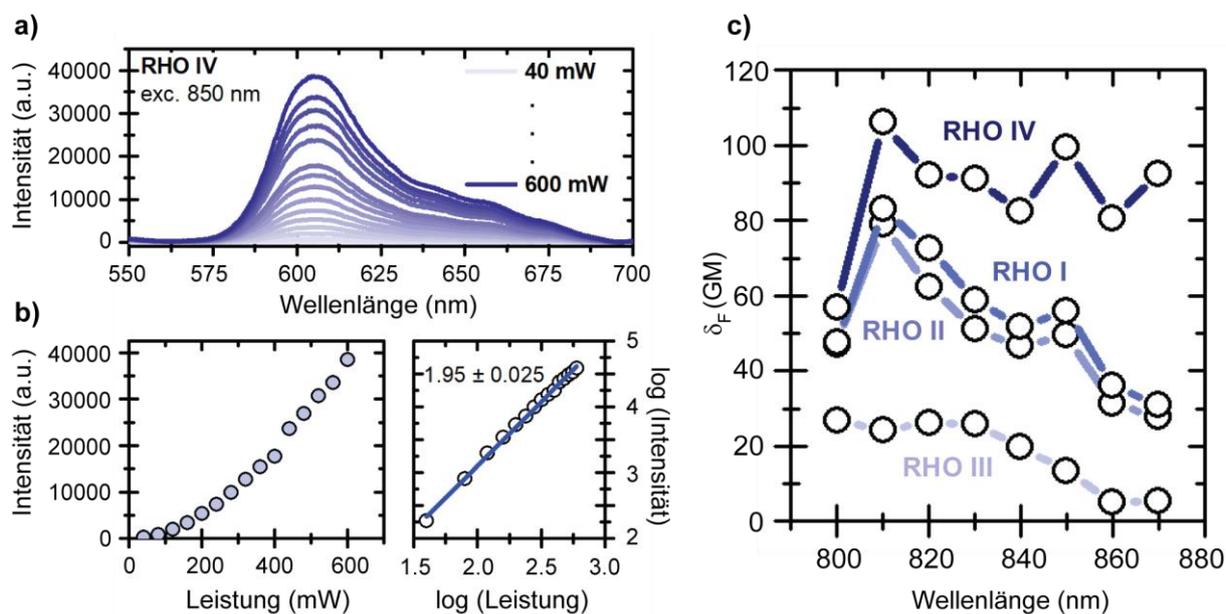


Abbildung 31: a) Fluoreszenzspektren von RHO IV nach Zweiphotonen-Anregung bei 850 nm bei variierender Laserleistung (40 – 600 mW). b) Exponentieller Anstieg der Fluoreszenzintensität von RHO IV in Abhängigkeit der Laserleistung, sowie die logarithmische Auftragung dieses Zusammenhangs. c) Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitte von RHO I-IV in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge. Modifizierte Abbildung entnommen aus Asido et al. 2022.<sup>[180]</sup>

## 3.1.2. Synthese der Rhodamin-BODIPY-Dyade

Im nächsten Schritt sollte der 2P-Donor mit einer photolabilen Schutzgruppe verknüpft werden. BODIPY wurde als Photocage gewählt, da diese Chromophore eine starke Absorption im sichtbaren Bereich aufweisen und sich vielseitig funktionalisieren lassen. Das Grundgerüst konnte in einem Schritt aus 2,4-Dimethylpyrrol und Acetoxyacetylchlorid und anschließender Umsetzung mit Bortrifluoridiethyletherat unter basischen Bedingungen aufgebaut werden (Abb. 32).<sup>[184]</sup> Ausgehend von Verbindung **5** wurden verschiedene Funktionalisierungen durchgeführt, um das BODIPY-Molekül an den Rhodamin-Fluorophor binden zu können. Die 2,6-Positionen sind besonders elektronenreich und können somit mit verschiedenen Elektrophilen umgesetzt werden.<sup>[60]</sup> Die Reaktion mit Phosphoroxychlorid und DMF in einer Vilsmeier-Haack-Reaktion lieferte das formylierte BODIPY **6**.<sup>[59]</sup> Der Aldehyd konnte anschließend mit Wasserstoffperoxid und Natriumchlorit zur Carbonsäure **7** oxidiert werden. Weiterhin können die 2,6-Positionen halogeniert werden. Die Reaktion mit *N*-Iodsuccinimid (NIS) lieferte das iodierte BODIPY **8**. Dieses wurde anschließend über eine Sonogashira-Kupplung mit Trimethylsilylacetylen bzw. *N*-Boc-Propargylamin umgesetzt und anschließend mit TBAF bzw. TFA entschützt, um die Verbindungen mit freiem Alkin (**9**) bzw. mit freiem Amin (**10**) zu erhalten. Allerdings gingen die Sonogashira-Reaktionen mit dem Verlust der

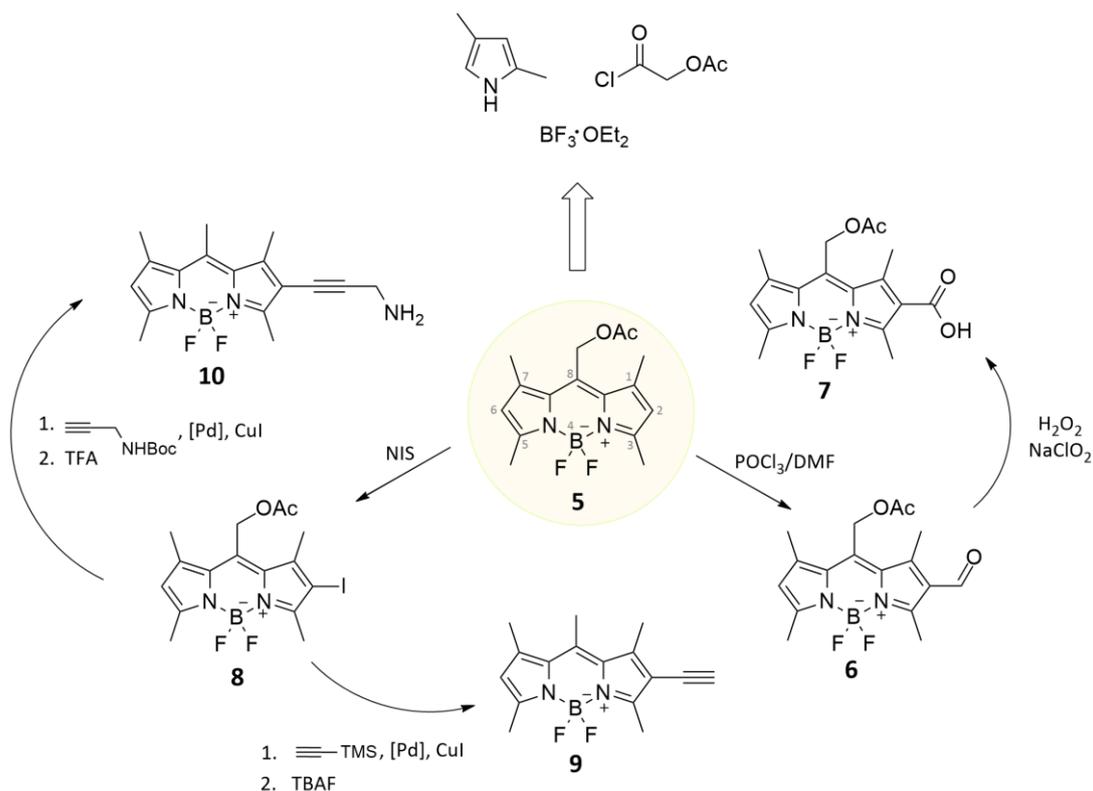


Abbildung 32: Schematische Darstellung des Aufbaus des BODIPY-Grundgerüsts (**5**), sowie Übersicht der durchgeführten Funktionalisierungen, z.B. der Formylierung (**6**) mit anschließender Oxidation (**7**) oder der Halogenierung (**8**) mit anschließender Einführung eines Alkins (**9**) bzw. eines Amins (**10**).

Acetoxygruppe einher. Acetoxygruppen sind unter Wahl der richtigen Reaktionsbedingungen stabil in Übergangsmetall-katalysierten Kreuzkupplungen.<sup>[185]</sup> Da hier milde Temperaturen und nicht-nukleophile Basen verwendet wurden, ist eine Abspaltung der Schutzgruppe aufgrund dieser Faktoren unwahrscheinlich. Trotzdem könnte die Fähigkeit der Acetoxy-Gruppe Palladium zu komplexieren zu der unerwünschten Reduktion geführt haben.

Bevor der Einsatz anderer Schutzgruppen erwägt wurde, wurde anhand der alkylierten Verbindung **9** getestet, ob sich diese über eine weitere Sonogashira-Reaktion an ein Rhodamin kuppeln lässt. Allerdings wurde bei der Reaktion von **9** mit dem bromierten Rhodamin **11** unter den entsprechenden Bedingungen keine Produktbildung festgestellt (Abb. 33a). Auch unter Verwendung der umgekehrten Funktionalitäten (iodiertes BODIPY **8** und alkyliertes Rhodamin **12**) fand keine Reaktion statt (Abb. 33b). Dasselbe Ergebnis trat bei der Untersuchung anderer Reaktionstypen auf. Die Amidkupplung zwischen BODIPY **10** mit freiem primärem Amin und dem Carboxy-substituierten Rhodamin **13** mit HATU als Kupplungsreagenz war erfolglos (Abb. 33c). Ebenso zeigte die Reaktion von BODIPY **7** mit Carbonsäure-Funktion und Rhodamin **14** mit Amino-Substituent unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 1-Hydroxybenzotriazol (BtOH) als Kupplungsreagenzien keinen Umsatz (Abb. 33d).

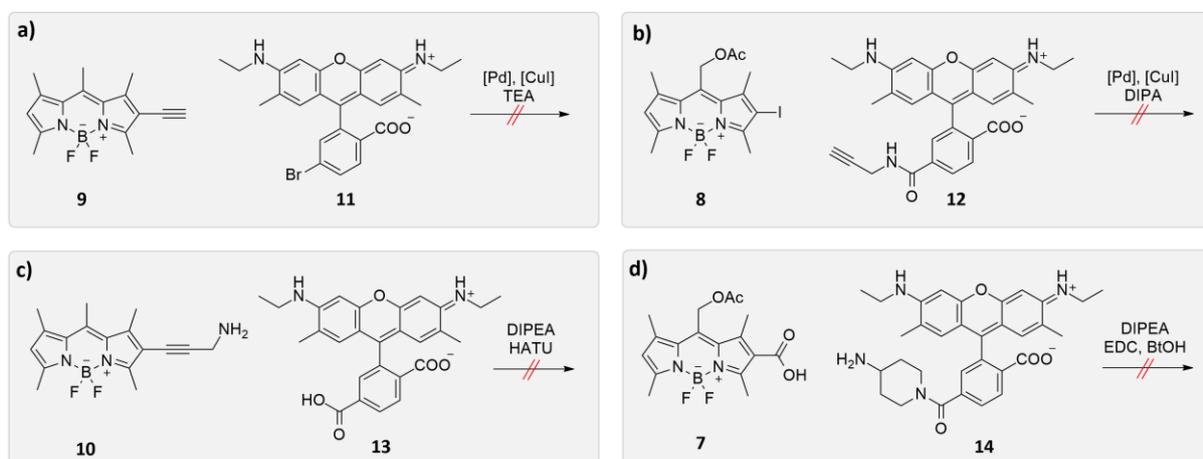


Abbildung 33: Getestete Strategien zur Verknüpfung des BODIPY- und des Rhodamin-Chromophors unter Anwendung von Sonogashira-Reaktionen (a, b) und Amid-Kupplungen (c, d).

Da es sich bei den getesteten Reaktionen um etablierte Protokolle handelt, wurde in Erwägung gezogen, dass die Molekülposition nicht für die Kupplung geeignet sein könnte. Es ist bekannt, dass Chromophore untereinander  $\pi$ -stacken können. Dabei handelt es sich um nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen aromatischen Verbindungen, die auftreten, wenn die planaren  $\pi$ -Elektronensysteme der Moleküle in der Nähe zueinander liegen und überlappen können.<sup>[186]</sup> Sollte diese Anziehung im Falle der obigen Chromophore besonders stark sein, könnte es sein, dass sie in einer bestimmten Orientierung zueinander *stacken*, bei der die relevanten funktionellen Gruppen voneinander weg zeigen. Daher wurde statt den 2,6-Positionen die *meso*-Position im BODIPY für die

Funktionalisierung gewählt. Die anschließenden Testreaktionen zeigten, dass tatsächlich eine Positionsabhängigkeit vorliegt. Der bromierte TAMRA-Fluorophor **15** wurde unter den gleichen Reaktionsbedingungen einmal mit dem 2-alkinylierten BODIPY **9** und einmal mit dem *meso*-alkinylierten BODIPY **16** umgesetzt (Abb. 34). Nur bei der Reaktion mit Verbindung **16** konnte das gewünschte Produkt **17** mit einer sehr hohen Ausbeute von 93% isoliert werden.

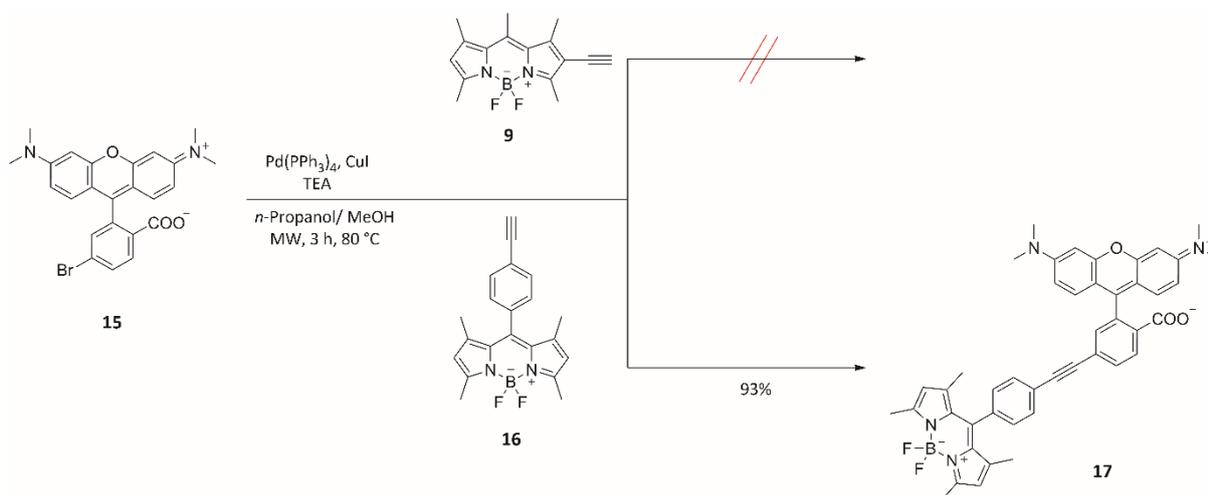


Abbildung 34: Testreaktionen eines bromierten Rhodamin-Fluorophors mit an verschiedenen Positionen alkinylierten BODIPYs über eine Sonogashira-Kupplung, welche nur in einem Fall zur Bildung der gewünschten Dyade führt.

Da sich bei einem BODIPY-Photocage die Abgangsgruppe ebenfalls in *meso*-Position befindet, musste eine Synthesestrategie gewählt werden, die sowohl die Anbringung der gecageten Spezies, als auch die Kupplung an den Fluorophor an dieser Stelle ermöglicht (Abb. 35). Dazu wurde BODIPY **5** zunächst mit Natriumhydroxid hydrolysiert. Der entstandene Alkohol **18** wurde anschließend mit Dess-Martin-Periodinan (DMP) zum Aldehyd **19** oxidiert.<sup>[184]</sup> Dieser konnte dann in einer Barbier-Reaktion<sup>[187]</sup> mit Zink und Propargylbromid, welche ein eher mildes Metallorganyl bilden, zum Alkohol **20** umgesetzt werden. An dieser Stelle wurde sich bewusst für einen kurzen starren Alkin-Linker entschieden, um die beiden Chromophore zu verbinden, damit elektronische Interaktionen der Verbindungen durch  $\pi$ -stacking vermieden werden. Um die Absorption des Photocages bathochrom in einen spektralen Bereich zu verschieben, der mit der Emission des Donor-Fluorophors überlappt, wurde das konjugierte  $\pi$ -System des BODIPYs an den 3,5-Positionen mithilfe einer Knoevenagel-Kondensation erweitert.<sup>[57]</sup> Dazu wurde Verbindung **20** mit Piperidin und einem Überschuss *para*-Anisaldehyd umgesetzt, sodass das Distyryl-substituierte BODIPY **21** erhalten wurde. Im Anschluss wurde die Abgangsgruppe angebracht. Dabei wurde sich für *para*-Nitroanilin (PNA) entschieden, da es sich um eine häufig verwendete Abgangsgruppe für BODIPY-Photocages handelt und sich ihre Abspaltung gut über die UV-Absorption verfolgen lässt.<sup>[53]</sup> Der *meso*-Alkohol am BODIPY ist nur wenig nukleophil, trotzdem ließ sich die Abgangsgruppe mit guter Ausbeute über eine Isocyanat-Gruppe anbringen. Somit war PNA über einen selbst-immolativen Carbamat-Linker an das BODIPY gebunden (**22**). Schließlich konnte das

alkinylierte BODIPY **22** mit dem bromierten Rhodamin **RHO V** in einer Sonogashira-Reaktion verknüpft werden (**RHO-BPY-PNA**). Um ein Referenz-System untersuchen zu können, wurde eine zusätzliche Dyade ohne Abgangsgruppe aus BODIPY **21** und **RHO V** synthetisiert (**RHO-BPY-OH**).

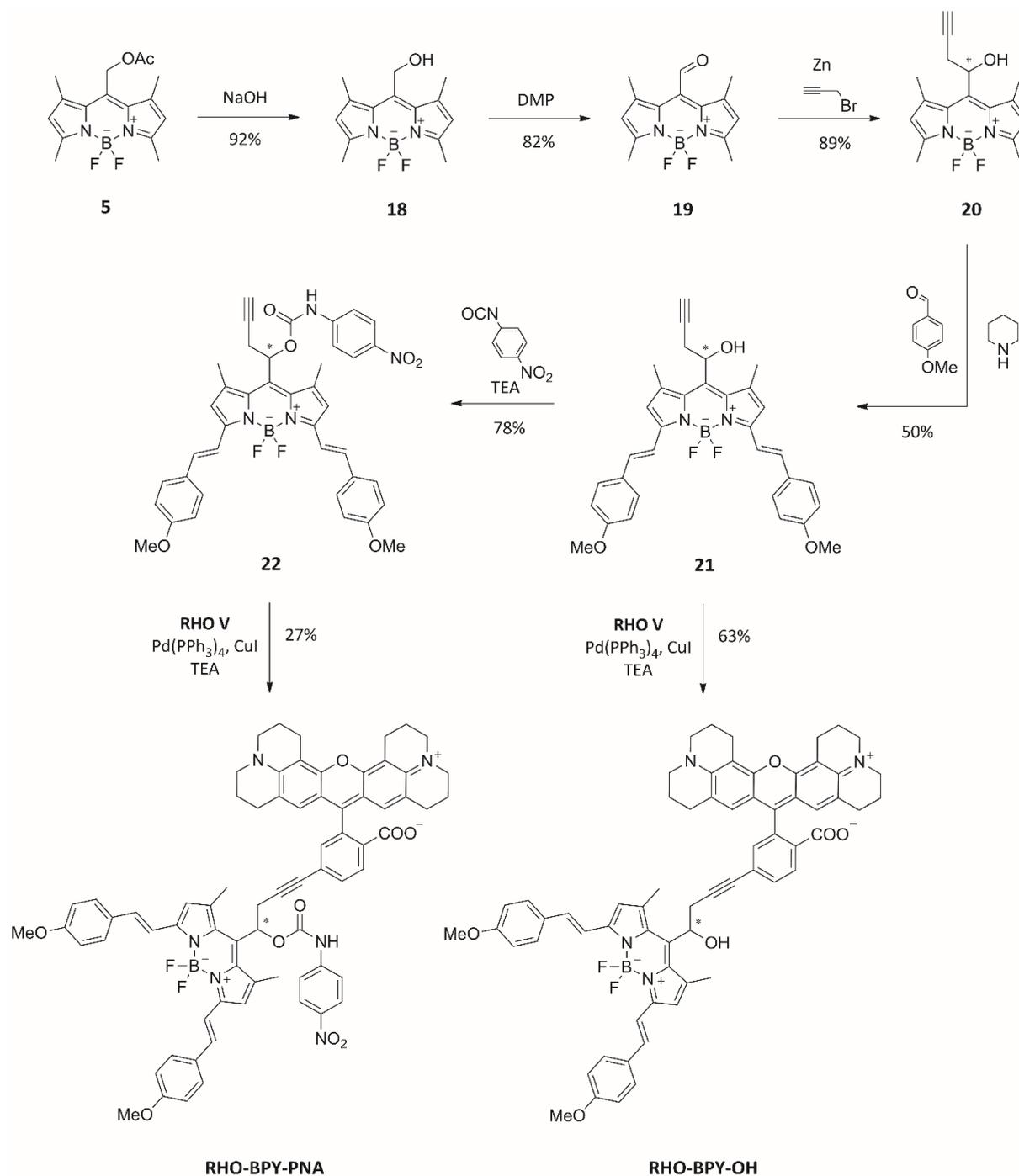


Abbildung 35: Syntheseroute der Darstellung von **RHO-BPY-PNA** und **RHO-BPY-OH** ausgehend von BODIPY-OAc (**5**). Durch basische Hydrolyse, Oxidation mit DMP und anschließender Barbier-Reaktion wurde der Alkohol **20** mit Alkin-Linker erhalten. Dieser wurde über eine Knoevenagel-Kondensation um zwei Styryl-Reste erweitert. Die Anbringung der Abgangsgruppe PNA über einen Carbamat-Linker erfolgte mit 4-Nitrophenylisocyanat. Die Verbindungen **21** und **22** wurden jeweils mit **RHO V** mittels Sonogashira-Kupplung zu den gewünschten Produkten umgesetzt.

## 3.1.3. Spektroskopische &amp; rechnergestützte Untersuchung der Rhodamin-BODIPY-Dyade

Zunächst wurden die Absorptionsspektren der zu untersuchenden Verbindungen in Methanol betrachtet (Abb. 36). Da nicht von allen Verbindungen die molaren Absorptionskoeffizienten bestimmt wurden, sind die Absorptionen auf eine OD von 1 am Maximum normiert. Die Dyaden **RHO-BPY-PNA** und **RHO-BPY-OH** weisen zwei ausgeprägte Banden im sichtbaren Bereich auf. Diese können der Rhodamin-Absorption ( $\sim 560$  nm) und der BODIPY-Absorption ( $\sim 660$  nm) zugeordnet werden. Eine weitere deutliche Bande bei 370 nm handelt sich um einen höheren Übergang im BODIPY. Zum Vergleich sind die Absorptionsspektren der einzelnen Chromophore **RHO V** (blau gepunktet) und BODIPY **21** (rot gepunktet) dargestellt. Die klare Separation der Rhodamin- und BODIPY-Bande in der Dyade und deren Übereinstimmung mit den Spektren der Einzelverbindungen spricht dafür, dass es sich in der Dyade trotzdem noch um getrennte chromophore Systeme handelt, die nicht – beispielsweise durch  $\pi$ -stacking – elektronisch miteinander interagieren. **RHO-BPY-PNA** weist im Vergleich zu **RHO-BPY-OH** eine etwas rotverschobene Absorption bei 300 – 320 nm auf. In diesem Bereich liegt die Absorption der Abgangsgruppe PNA.

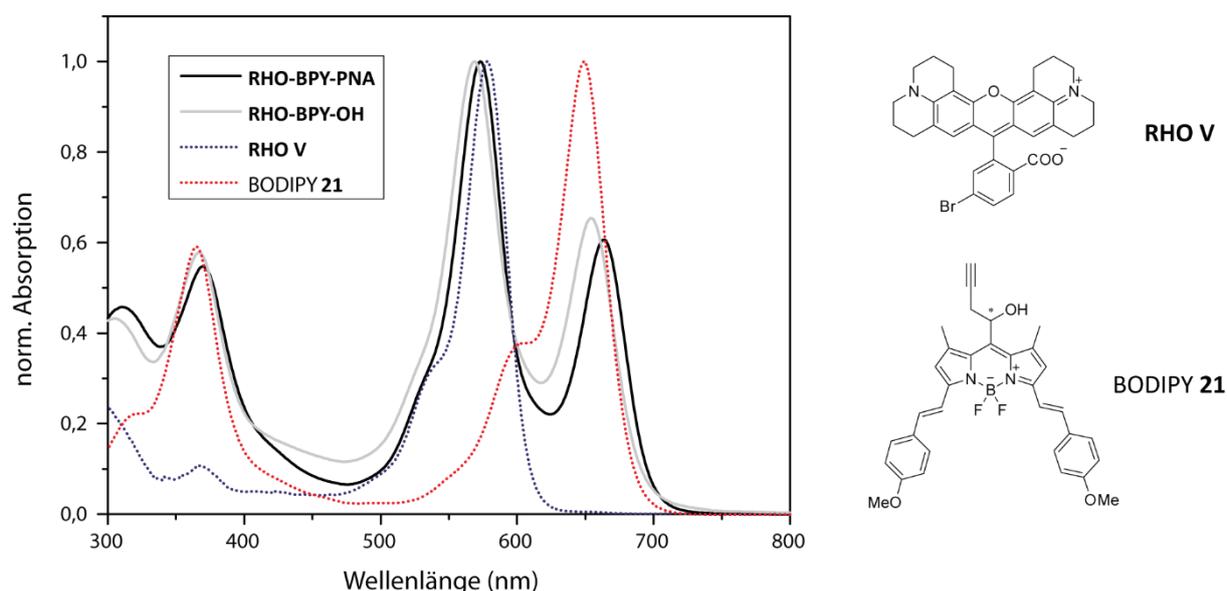


Abbildung 36: Normierte Absorptionsspektren der Dyaden **RHO-BPY-PNA** und **RHO-BPY-OH**, sowie der einzelnen Chromophore **RHO V** und **BODIPY 21** in Methanol.

Im nächsten Schritt wurde der gewünschte Energietransfer zwischen der Rhodamin- und der BODIPY-Einheit untersucht. Um die Dynamiken im angeregten Zustand zeitaufgelöst zu verfolgen, wurden von Dr. Marvin Asido aus dem AK Wachtveitl transiente UV/vis-Absorptionsmessungen anhand von **RHO-BPY-OH** durchgeführt. Zunächst wurden dazu die einzelnen Chromophore **RHO IV** und BODIPY **21** betrachtet (Abb. 37). **RHO IV** weist recht einfache Dynamiken nach Anregung bei 565 nm auf, mit einem deutlichen GBS-Signal (*ground state bleach*) und einem sich bildenden SE-Signal (*stimulated emission*). Weiterhin wurde eine typische ESA-Bande (*excited state absorption*) bei 470 nm

beobachtet. Der langanhaltende GSB spricht für eine langsame Desaktivierung des angeregten Zustandes, welche im Einklang mit der Fluoreszenzlebensdauer ist, die für dieses Rhodamin-Derivat mittels TCSPC-Messungen bestimmt wurde (vgl. Tabelle 1). Im Vergleich dazu besitzt der angeregte Zustand beim BODIPY eine kürzere Lebensdauer, erkennbar an dem früher rückgängigen GSB-Signal nach Anregung bei 660 nm. Weiterhin sind zwei ESA-Banden bei 575 nm und 460 nm zu sehen.

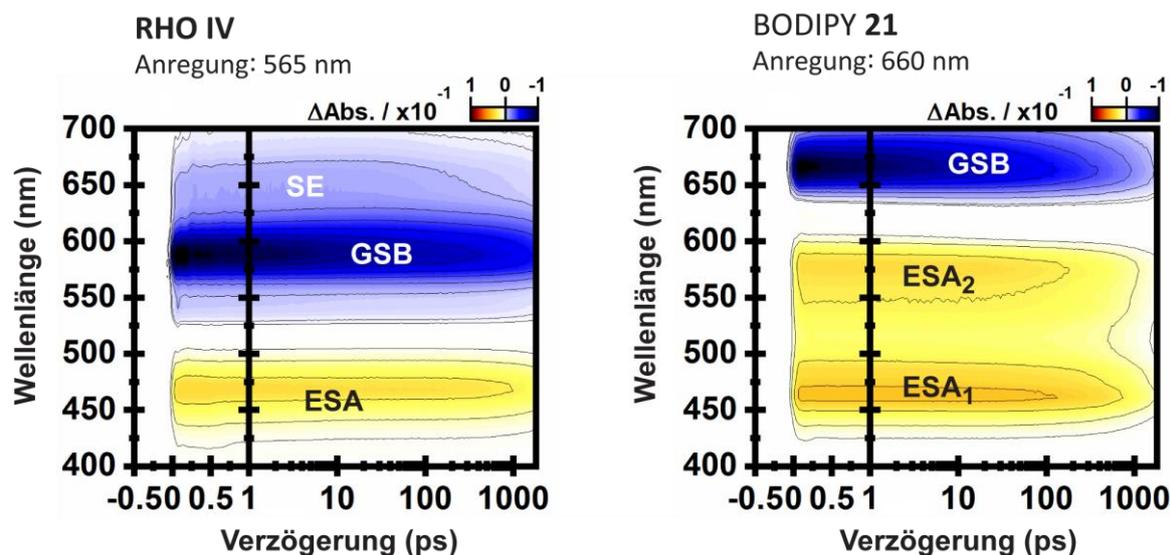


Abbildung 37: Transiente Absorptionsmessungen von RHO IV nach Anregung bei 565 nm (links) und BODIPY 21 nach Anregung bei 660 nm (rechts). GSB = Ground State Bleach, SE = Stimulierte Emission, ESA = Excited State Absorption. Modifizierte Abbildung entnommen aus Asido et al. 2022.<sup>[180]</sup>

Im Anschluss wurden die Kurzzeitdynamiken der Dyade betrachtet. Dafür wurde **RHO-BPY-OH** mit 560 nm (Rhodamin-Bande) angeregt (Abb. 38a). GSB<sub>1</sub> und ESA<sub>1</sub> können der Rhodamin-Einheit zugeordnet werden. Die Signale nehmen bereits im 200 – 500 fs Bereich wieder ab. Zeitgleich werden zwei neue Banden gebildet, GSB<sub>2</sub> und ESA<sub>2</sub>, die dem BODIPY zugeordnet werden können. Abbildung 38b zeigt die beiden Transienten bei 575 nm (GSB<sub>1</sub>) und 670 nm (GSB<sub>2</sub>). Das GSB<sub>1</sub>-Signal nimmt in den ersten 300 fs nach Anregung etwa um die Hälfte ab. Auf derselben Zeitskala erreicht das GSB<sub>2</sub>-Signal mehr als 90% seines maximalen Werts. Dies weist auf einen effizienten Energietransfer im < 500 fs-Bereich hin, bis sich schließlich ein Gleichgewicht zwischen dem angeregten Zustand des Rhodamins und des BODIPYs einstellt. ESA<sub>1</sub> zerfällt nicht auf derselben Zeitskala wie GSB<sub>1</sub>. Das liegt allerdings daran, dass ESA<sub>1</sub> nicht allein dem Rhodamin zuzuordnen ist. BODIPY weist zwei ESA-Banden bei 470 nm und 570 nm auf (vgl. Abb. 37, rechts). Bei der vorliegenden ESA<sub>1</sub>-Bande handelt es sich also um eine Überlagerung der abnehmenden Rhodamin-ESA und der sich bildenden BODIPY-ESA. Insgesamt besteht der angeregte Zustand für etwa 1 ns.

Um mögliche elektronische Interaktionen der beiden Chromophore zu untersuchen, wurde **RHO-BPY-OH** zusätzlich bei 655 nm (BODIPY-Bande) angeregt (Abb. 38c). In diesem Fall werden die Dynamiken des angeregten Zustandes hauptsächlich durch das BODIPY bestimmt. Es ist zwar eine

schwache GSB-Bande bei 570 nm zu sehen, die dem Bleichen des Rhodamin-Grundzustandes zuzuordnen ist (GSB<sub>2</sub>), allerdings geht diese wahrscheinlich auf eine schwache Restabsorption des Rhodamins bei 655 nm zurück. Diese Bande sollte bereits auf einer kürzeren Zeitskala als hier zu sehen bei 10 – 100 ps erscheinen, allerdings überlappt sie möglicherweise mit dem ESA<sub>2</sub>-Signal und wird von diesem kompensiert. Auch die Transienten der beobachteten GSB- und ESA-Banden zeigen, dass die Anregung von **RHO-BPY-OH** bei 655 nm zu einem lokal angeregten Zustand des BODIPYs führt und keine Wechselwirkung der Chromophore im angeregten Zustand vorliegt (Abb. 38d).

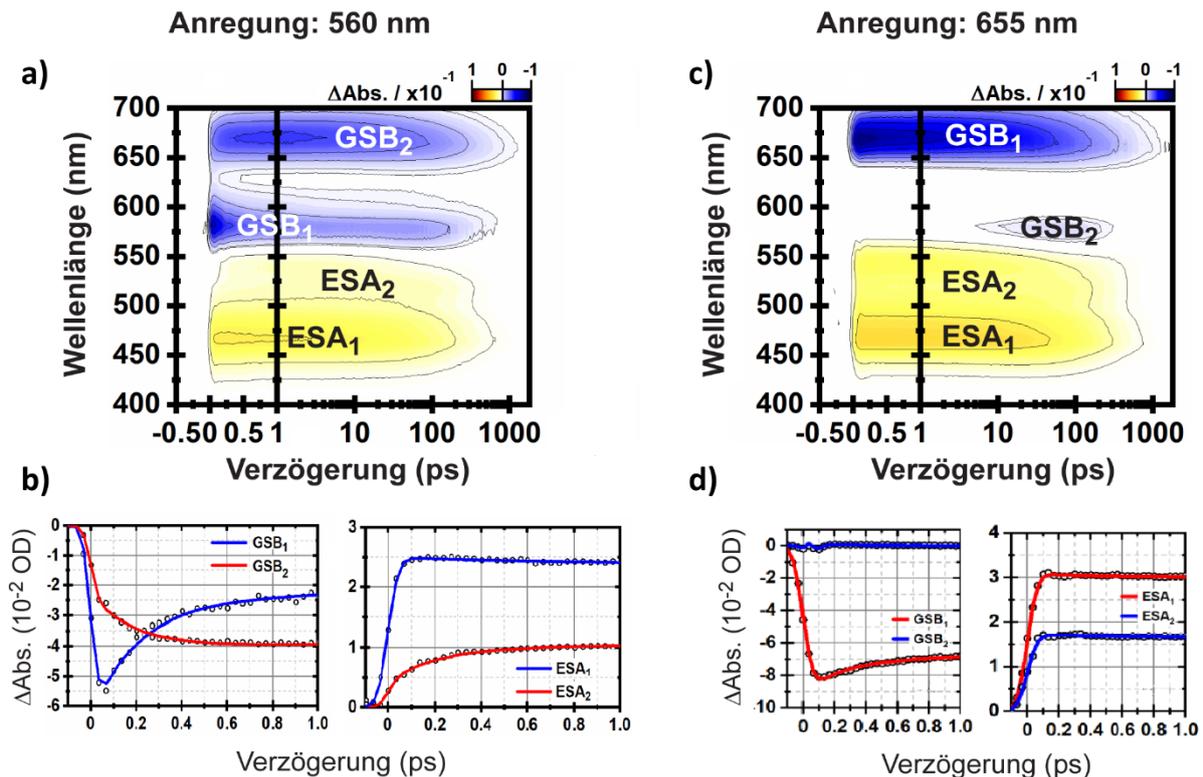


Abbildung 38: a) Transiente Absorptionsmessung von RHO-BPY-OH nach Anregung bei 560 nm. b) Transienten der GSB- bzw. der ESA-Signale nach Anregung bei 560 nm. Die Spektren indizieren einen schnellen Energietransfer unter 500 fs. c) Transiente Absorptionsmessung von RHO-BPY-OH nach Anregung bei 655 nm. d) Transienten der GSB- bzw. der ESA-Signale nach Anregung bei 655 nm. Hier ist keine Wechselwirkung zwischen dem Rhodamin und dem BODIPY zu erkennen. Modifizierte Abbildung entnommen aus Asido et al. 2022.<sup>[180]</sup>

Des Weiteren wurden die Ergebnisse der Kurzzeitmessungen durch theoretische Berechnungen gestützt, die im AK Burghardt der Goethe-Universität von Carsten Hamerla, Maximiliane Horz und Dr. Madhava Shyam Niraghatam durchgeführt wurden. Mithilfe von zeitaufgelöster Dichtefunktionaltheorie wurden die elektronischen Übergänge in der Dyade **RHO-BPY-OH** betrachtet. Abbildung 39a zeigt die Grenzorbitale der relevanten angeregten Zustände der Dyade. Es existieren drei Einphotonen-zugängliche helle Zustände mit den Anregungsenergien 2.14 eV (579 nm, S<sub>1</sub>), 2.86 eV (434 nm, S<sub>2</sub>) und 3.43 eV (362 nm, S<sub>3</sub>), gefolgt von einem dunklen Zustand bei 3.51 eV (354 nm, S<sub>4</sub>). S<sub>1</sub> und S<sub>3</sub> sind auf dem BODIPY lokalisiert, während S<sub>2</sub> und S<sub>4</sub> auf dem Rhodamin lokalisiert sind. Beim S<sub>4</sub> handelt es sich um den Zweiphotonen-aktiven Zustand. Abbildung 39b zeigt die Abläufe im angeregten

Zustand, die mithilfe von *quadratic response calculations* analysiert wurden. Die Photoanregung führt zu einem Übergang in den  $S_4$ -Zustand über einen Zweiphotonen-Prozess. Von dort findet eine schnelle interne Konversion innerhalb des Rhodamin-Fragments in den  $S_2$ -Zustand statt. Eine Beteiligung des  $S_3$ -Zustandes an diesem Schritt wurde nicht gefunden. Es folgt schließlich der Energietransfer (EET = *excitation energy transfer*) in den  $S_1$  (BODIPY). Von dort können photochemische Prozess, wie die gewünschte Uncaging-Reaktion, stattfinden.

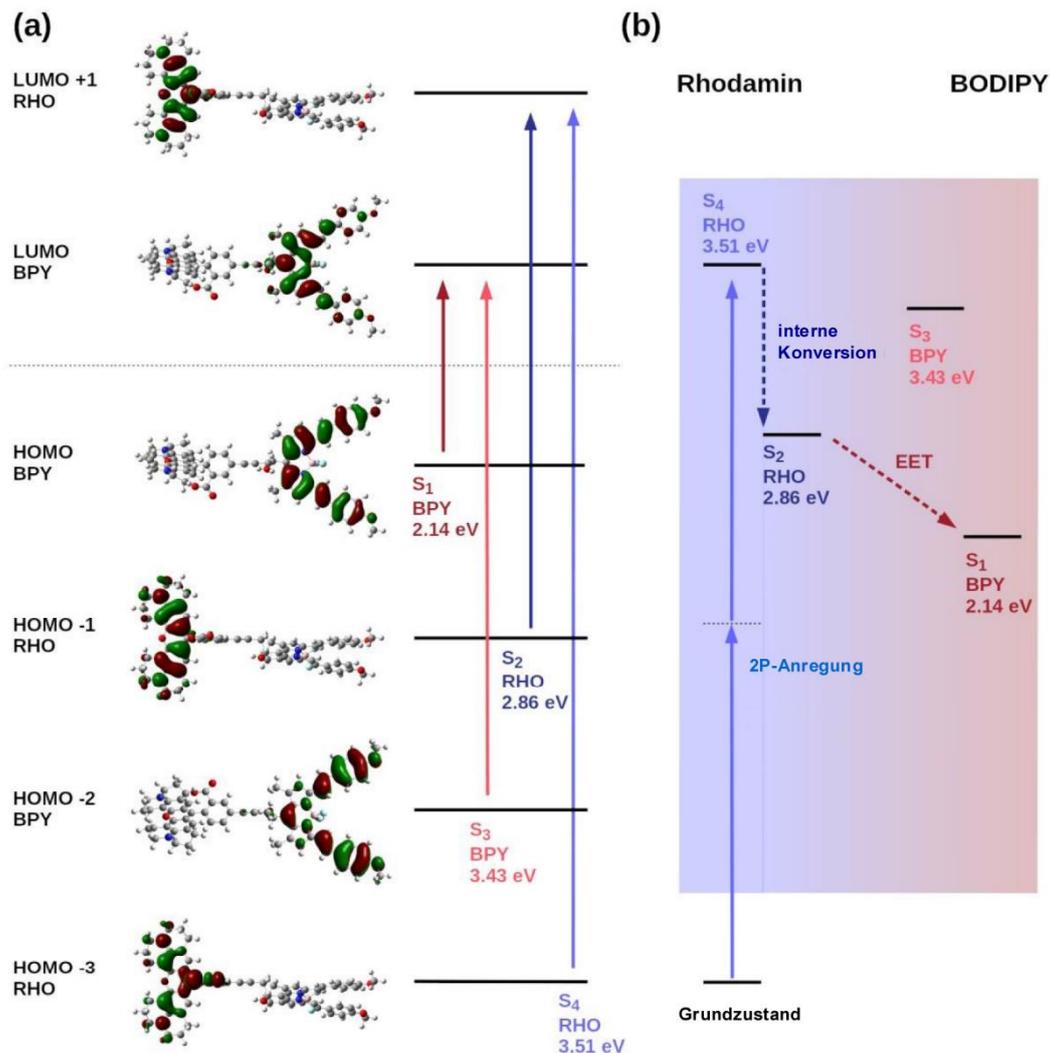


Abbildung 39: a) Grenzorbitale der relevanten angeregten Zustände von RHO-BPY-OH. b) Darstellung der Abläufe im angeregten Zustand nach Zweiphotonen-Anregung von RHO-BPY-OH. Modifizierte Abbildung entnommen aus Asido et al. 2022.<sup>[180]</sup>

Weiterhin wurden Berechnungen zur Bestimmung der Zeitskala, auf der der Energietransfer stattfindet, durchgeführt. Die interne Konversion wurde hierfür vernachlässigt, da angenommen wurde, dass dieser Prozess innerhalb weniger Femtosekunden abläuft. Die quanten-dynamische Analyse ergab, dass sich der Energietransfer von Rhodamin zu BODIPY auf einer Zeitskala von 200 fs ereignet. Dies steht in gutem Einklang mit der Zeitskala, die mithilfe der experimentellen

spektroskopischen Messungen gefunden bestimmt wurde (300 fs). Es handelt sich somit um einen sehr schnellen und effizienten Energieübertrag. Da die Zeitskala von FRET typischerweise im ps – ns-Bereich liegt, wird hier von einer anderen Art an Energietransfer im angeregten Zustand ausgegangen.<sup>[188]</sup> Aus diesem Grund wurde die allgemeine Bezeichnung EET (*excitation energy transfer*) gewählt.

#### 3.1.4. Photolyse der Rhodamin-BODIPY-Dyade

Im letzten Schritt des Projekts wurde die Photolyse der synthetisierten Dyade von Dr. Marvin Asido aus dem AK Wachtveitl untersucht. Dazu wurde **RHO-BPY-PNA** mit einer LED bei 565 nm in Methanol bestrahlt. Abbildung 40a-c zeigt die Änderung der Absorption während der Belichtung. Im Bereich 300 – 400 nm, sowie 580 – 700 nm, welche beide zur BODIPY-Absorption gehören, ist ein deutliches Photobleichen zu sehen. Die Rhodamin-Bande bei 560 nm bleibt dagegen während der Bestrahlung bestehen. Im UV-Bereich (bei ca. 300 nm) entsteht eine neue Bande, die entweder dem bei der Photolyse freigesetzten PNA oder dem Photoprodukt der Dyade zuzuordnen ist.

Weiterhin wurde die Photolyse durch die direkte Anregung des BODIPY-Photocages getestet. Die Bestrahlung von **RHO-BPY-PNA** mit einer 660 nm LED lieferte vergleichbare Spektren wie bei der Belichtung mit 565 nm, allerdings mit einer geringeren Amplitude (Abb. 40d-f). Somit führt sowohl die Anregung des Rhodamins als auch des BODIPYs zur gewünschten Freisetzung des Substrats. Die etwa 3-fach höhere Amplitude bei der 565 nm Anregung im Vergleich zur 660 nm Anregung zeigt zum einen, dass das Rhodamin aufgrund seines außerordentlich hohen molaren Absorptionskoeffizienten besser als das BODIPY in der Lage ist, Photonen aufzunehmen und zum anderen wird der effiziente Energietransfer untermauert, der der BODIPY Photolyse nach Rhodamin-Anregung zugrunde liegt.

Zuletzt wurde **RHO-BPY-OH** als Kontrolle bestrahlt, da hier keine Photolyse zu beobachten sein sollte (Abb. 40g-i). Das Differenzspektrum weicht deutlich von **RHO-BPY-PNA** ab. Eine Verschiebung der Bande um 300 nm, die der Abspaltung von PNA zugeordnet war, ist erwartungsgemäß nicht zu sehen. Bei 360 nm und 660 nm liegen die gleichen negativen Banden wie bei der Dyade mit Abgangsgruppe vor, die auf ein Bleichen des BODIPYs hinweisen. Allerdings entstehen diesmal zeitgleich zwei neue Signale im Bereich 250 – 290 nm und 500 – 600 nm. Es ist aus der Literatur bekannt, dass die Doppelbindungen von Styryl-substituierten BODIPYs lichtinduziert oxidativ gespalten werden können.<sup>[57]</sup> Das Entstehen von Absorptionsbanden um 580 nm (eine Styryl-Gruppe weniger) und 520 nm (zwei Styryl-Gruppen weniger) würde dafürsprechen, dass die Anregungsenergie im Falle der Dyade ohne Abgangsgruppe (statt zu einer Uncaging-Reaktion) zur Spaltung des BODIPY-Photocages durch eine Photooxidation führt.

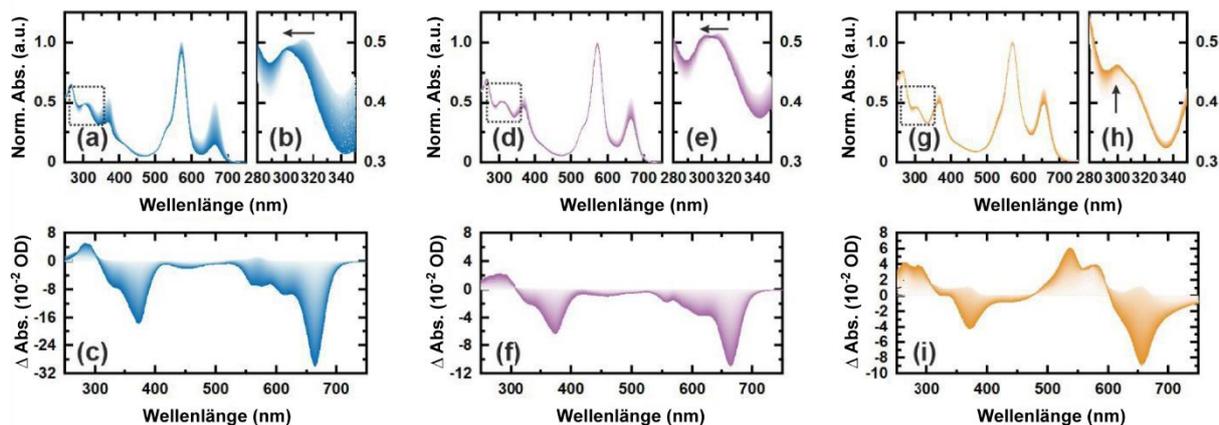


Abbildung 40: Belichtung von RHO-BPY-PNA bei 565 nm (a-c) und 660 nm (d-f), sowie Belichtung von RHO-BPY-OH bei 565 nm (g-i). Normalisierte Absorptionsspektren im Verlauf der Photolyse (a, d, g) mit Zoom in den Bereich 280 – 340 nm (b, e, h). Differenzspektren in Relation zur anfänglichen Dunkelmessung (c, f, i). Die Spektren wurden in Methanol in 30 s Intervallen innerhalb eines gesamten Belichtungszeitraums von 6000 s gemessen. Modifizierte Abbildung entnommen aus Asido et al. 2022.<sup>[180]</sup>

Zusammenfassend wurde im Zuge dieses Projekts eine molekulare Dyade bestehend aus einem Rhodamin-Fluorophor und einem BODIPY-Photocage für verbessertes Zweiphotonen-Uncaging synthetisiert. Die Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitte des Donor-Fluorophors wurden durch TPEF-Messungen bestimmt. Der Energietransfer zwischen dem Rhodamin-Donor und dem BODIPY-Akzeptor wurde mittels transientser Ultrakurzzeit-Spektroskopie und quantenmechanischen Berechnungen untersucht. Beide Methoden bestätigten einen sehr schnellen Energieübertrag unterhalb von 500 fs. Die Freisetzung der Abgangsgruppe PNA konnte sowohl nach Einphotonen-Anregung des Rhodamins als auch des BODIPYs mithilfe von UV/vis-Absorptionsmessungen qualitativ nachgewiesen werden.

Eine Quantifizierung des Uncaging-Prozesses war allerdings anhand der Absorptionsmessungen nicht möglich, da im UV-Bereich mehrere Absorptionen überlappen. Außerdem war der beobachtete Effekt sehr gering, was wahrscheinlich an der niedrigen Uncaging-Quantenausbeute des verwendeten BODIPY-Photocages lag ( $\Phi_{\text{rel}} = 0.004\%$  für eine vergleichbare BODIPY PPG mit Acetat als Abgangsgruppe, vgl. Kapitel 1.1.3.). Außerdem ist bekannt, dass Styryl-substituierte BODIPYs lichtinduziert oxidativ gespalten werden können, ein Effekt, der bei Bestrahlung von **RHO-BPY-OH** beobachtet wurde. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Reaktion auch in geringerem Maß bei der Dyade mit Abgangsgruppe aufgetreten ist.

Bei der Weiterführung des Projekts wurde der Fokus auf die Verbesserung der Stabilität und der Photolyse-Effizienz des Photocages gelegt. Dies sollte eine Quantifizierung der Uncaging-Reaktion ermöglichen. Weiterhin wurde nach Möglichkeiten gesucht, das Uncaging nach Zweiphotonen-Anregung nachzuweisen, da bisher nur die Einphotonen-Photolyse betrachtet wurde. Die Umsetzung dieser Ziele wird im nächsten Kapitel beschrieben.

### 3.2. Optimierung der Rhodamin-BODIPY-Dyade für Zweiphotonen-Uncaging

Im vorherigen Kapitel wurde ein Distyryl-substituierter BODIPY-Photocage für das Rhodaminsensibilisierte Zweiphotonen-Uncaging von PNA verwendet. Allerdings erschwerten die niedrige Uncaging-Quantenausbeute und die geringe Photostabilität dieser PPG die Untersuchung der Uncaging-Reaktion. In diesem Kapitel wird die Synthese einer optimierten Rhodamin-BODIPY-Dyade, die Quantifizierung der Einphotonen-Photolyse, sowie der qualitative Nachweis des Zweiphotonen-Uncagings beschrieben. Die folgenden Ergebnisse wurden in Publikation II (Weber *et al.* 2023) aus der vorangestellten Liste veröffentlicht.<sup>[189]</sup>

#### 3.2.1. Synthese des verbesserten BODIPY-Photocages und der neuen Dyaden

Wie bereits in Kapitel 1.1.3. beschrieben, publizierten Winter *et al.* 2020 die Synthese von konformationell eingeschränkten, Rotlicht-absorbierenden BODIPY-Derivaten. Durch die Rigidisierung des Grundgerüsts wurde sowohl die oxidative Spaltung der Doppelbindungen, als auch unproduktive Relaxationspfade aus dem angeregten Zustand durch die freie Rotierbarkeit dieser Substituenten unterbunden. Daraus resultieren eine höhere Photostabilität und eine um den Faktor  $10^3$  verbesserte Uncaging-Quantenausbeute. BODIPY **26** wurde somit nach Vorschrift von Winter *et al.* synthetisiert (Abb. 41).<sup>[8]</sup>

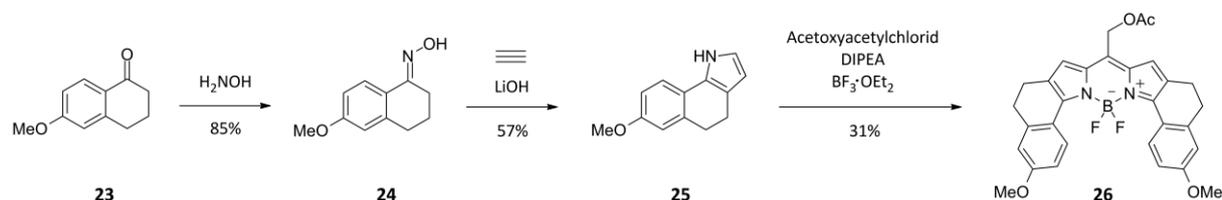


Abbildung 41: Reaktionsschema der Synthese des neuen BODIPY-Photocages.

Im ersten Schritt wurde aus 6-Methoxytetralon (**23**) durch die Reaktion mit Hydroxylamin unter Wasserabscheidung das entsprechende Oxim gebildet (**24**). Dieses wurde anschließend in einer Trofimov-Reaktion mit Acetylen und Lithiumhydroxid umgesetzt.<sup>[190]</sup> Der Mechanismus dieser Reaktion ist in Abbildung 42 dargestellt. Wichtig ist hierbei das Lösungsmittel DMSO. Dieses bildet einen Komplex mit dem Lithiumoximat **24a**. Durch das DMSO wird das Kontaktionenpaar (Lithiumkation und Oxim-Anion) separiert, was deren elektrostatische Anziehung vermindert (**24b**). Die Basizität des Oxim-Anions nimmt dementsprechend zu und ermöglicht einen nukleophilen Angriff an das Acetylen. Der aromatische Ring des Tetralons kann hierbei vorteilig sein, indem er das Acetylen-Molekül präkoordiniert. Das gebildete *O*-Vinyl-Oxim **24c** unterläuft eine 1,3-H-Verschiebung zum Enamin **24d** und eine anschließende [3,3]-Umlagerung zum Aldehyd **24e**. Dieser kann dann unter Bildung des Fünfrings **24f** kondensieren. Er erfolgt eine Wasserabspaltung (**24g**) und eine weitere 1,3-

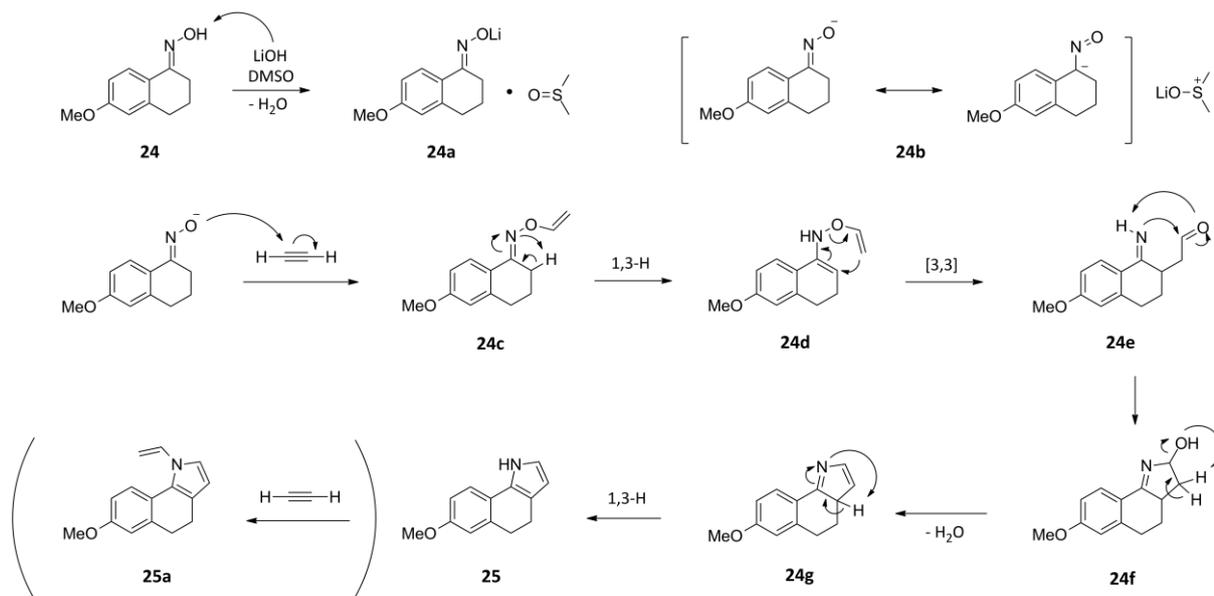


Abbildung 42: Reaktionsmechanismus der Trofimov-Reaktion von 6-Methoxytetralon mit Acetylen und LiOH in DMSO.

H-Verschiebung, sodass schließlich das gewünschte Pyrrol **25** gebildet wird. Da das Acetylen im Überschuss vorliegt, kann der Stickstoff von Pyrrol **25** mit diesem weiterreagieren, sodass zum Teil auch das Vinyl-substituierte Nebenprodukt **25a** entstanden ist. Pyrrol **25** wurde unter den bereits beschriebenen Bedingungen mit Acetoxyacetylchlorid, DIPEA und Bortrifluoriddiethyletherat zum BODIPY-Photocage **26** umgesetzt.

Als nächstes sollte der neue BODIPY-Photocage wieder an einen 2P-Donorfluorophor geknüpft werden. Aufgrund der bereits erfolgten photophysikalischen Charakterisierung und den hervorragenden Zweiphotonen-Eigenschaften, wurde dasselbe Rhodamin-Derivat wie im vorigen Projekt gewählt (siehe Abschnitt 3.1.1). Zunächst wurde BODIPY **26** mit einem Überschuss Methylmagnesiumiodid umgesetzt. Dadurch wurde zum einen die Acetylgruppe hydrolysiert und zum anderen wurden die Fluoride am Bor durch Methylgruppen substituiert. Diese Modifikation sorgt dafür, dass sich die Uncaging-Quantenausbeute aufgrund der Erhöhung der Elektronendichte auf dem Chromophor verbessert (vgl. Kapitel 1.1.3.). Der Alkohol **27** wurde mit Dess-Martin-Periodinan zum Aldehyd **28** oxidiert, wodurch anschließend wieder der Alkin-Linker durch eine Barbier-Reaktion mit Zink und Propargylbromid eingeführt werden konnte. Es wurde sich erneut für *para*-Nitroanilin (PNA) als Abgangsgruppe entschieden. Analog zur Synthese von **RHO-BPY-OH** und **RHO-BPY-PNA** aus dem vorherigen Projekt wurden mit dem neuen Photocage wieder zwei Dyaden ausgehend von BODIPY **29** (ohne Abgangsgruppe) bzw. BODIPY **30** (mit Abgangsgruppe) durch die Sonogashira-Kupplung mit **RHO V** synthetisiert. Somit wurden **RHO-BPY'-OH** und **RHO-BPY'-PNA** in guten Ausbeuten erhalten (Abb. 43). **RHO-BPY'-OH** entspricht dem Photolyseprodukt von **RHO-BPY'-PNA** in wässriger Umgebung und dient somit als Referenzsystem.

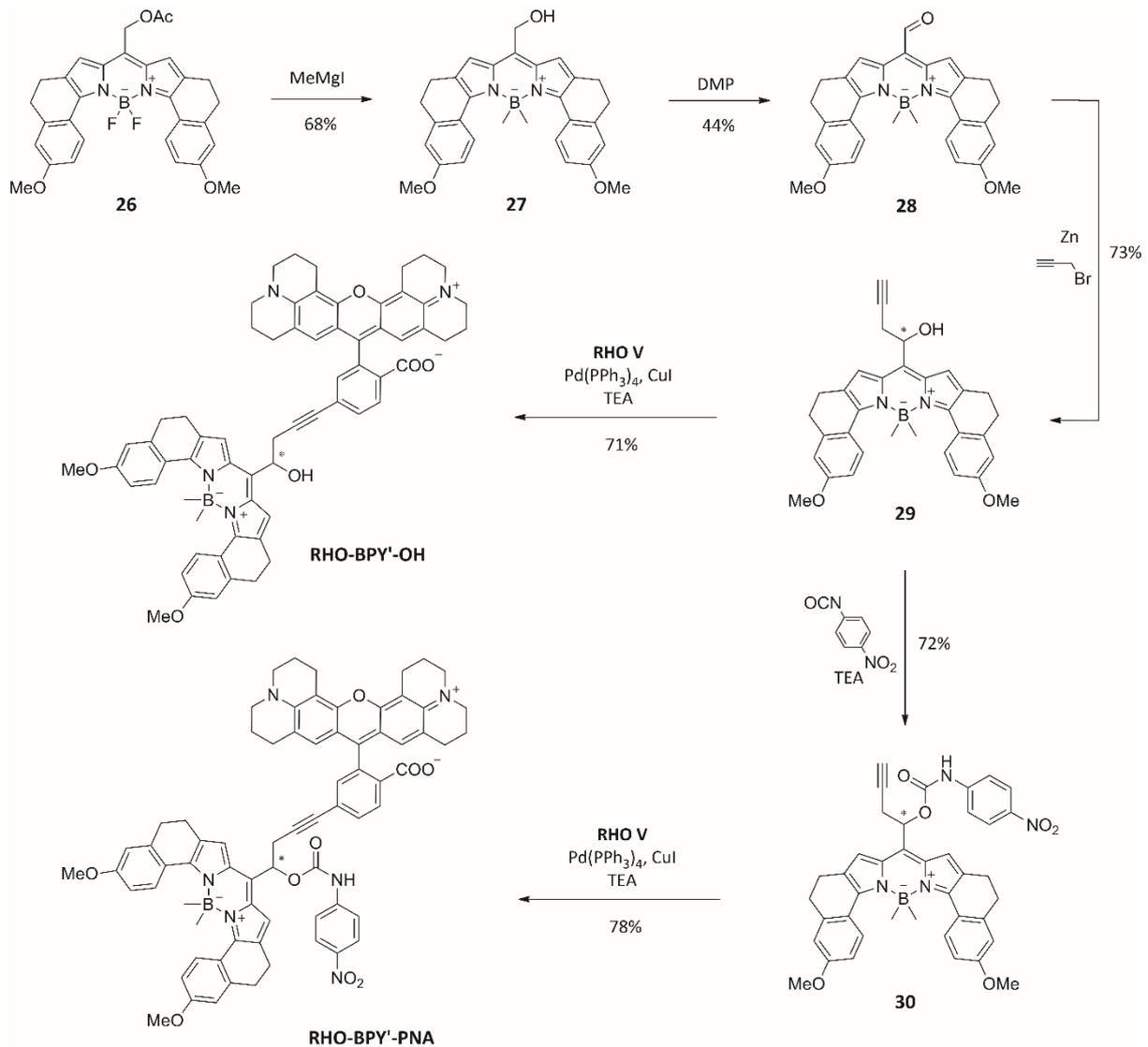


Abbildung 43: Syntheseroute der Darstellung der Dyaden **RHO-BPY'-OH** und **RHO-BPY'-PNA** mit neuem BODIPY-Photocage.

### 3.2.2. Photophysikalische & photochemische Charakterisierung der neuen Dyaden

Die Absorptionsspektren von **RHO-BPY'-PNA** und **RHO-BPY'-OH** wurden in einem 7:3-Gemisch aus Acetonitril und 0.1 M TEAA-Puffer aufgenommen (Abb. 44a). Beide Spektren weisen zwei deutliche Banden im sichtbaren Bereich auf, die der Rhodamin-Absorption ( $\sim 570$  nm) und der BODIPY-Absorption ( $\sim 630$  nm) zugeordnet werden können. Zum Vergleich sind die Spektren der beiden einzelnen Chromophore **RHO V** (blau gepunktet) und BODIPY **29** (rot gepunktet) dargestellt. Die gemessenen molaren Absorptionskoeffizienten der Dyaden betragen  $65250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei 571 nm und  $41120 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei 638 nm für **RHO-BPY'-PNA**, sowie  $60140 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei 569 nm und  $42730 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei 629 nm für **RHO-BPY'-OH**. Die lichtinduzierte Freisetzung von PNA wurde zunächst über den Einphotonen-Prozess untersucht. Dafür wurde eine  $10 \mu\text{M}$  Lösung aus **RHO-BPY'-PNA** in ACN/TEAA

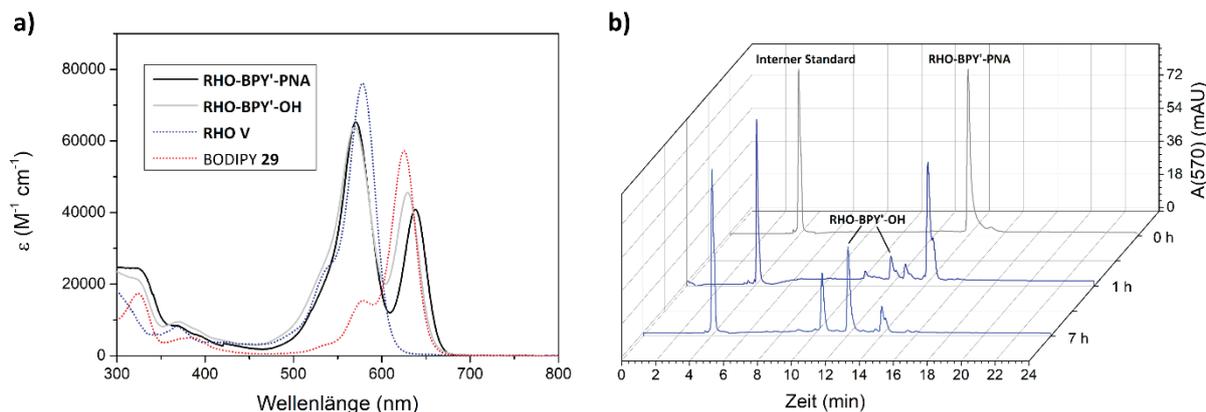


Abbildung 44: a) Absorptionsspektren der neuen Dyaden RHO-BPY'-PNA und RHO-BPY'-OH, sowie der einzelnen Chromophore RHO V und BODIPY 29 in ACN/TEAA (7:3). b) HPLC-Chromatogramme des Verlaufs der Photolyse von RHO-BPY'-PNA in ACN/TEAA (7:3) bei 0 h, 1 h und 7 h bei Bestrahlung mit 565 nm.

(7:3) mit einer LED bei 565 nm bestrahlt. Bei der ursprünglichen Dyade **RHO-BPY-PNA** (BODIPY mit Styryl-Substituenten) war eine Verfolgung der Photoreaktion über die HPLC nicht möglich. Aufgrund der geringen Uncaging-Quantenausbeute wurde viel Licht benötigt, um einen nachweisbaren Effekt hervorzurufen. Dies führte jedoch aufgrund der geringeren Stabilität des verwendeten BODIPYs zu erhöhtem Photobleichen.

Im Fall der optimierten Dyade **RHO-BPY'-PNA** hingegen, konnte die Abnahme des Startmaterials und die Bildung von Photoprodukten im Zuge der Belichtung mithilfe der HPLC verfolgt werden (Abb. 44b). Beim Hauptprodukt der Photolyse handelte es sich um **RHO-BPY'-OH**, was durch hochaufgelöste Massenspektrometrie und den Vergleich der HPLC-Retentionszeit mit der synthetisierten Dyade ohne Abgangsgruppe bestätigt wurde. Ein weiteres Produkt (bei ca. 10 min Retentionszeit) war nicht eindeutig zu identifizieren. Da es erst im späteren Verlauf der Belichtung entsteht, ist davon auszugehen, dass es sich nicht um eine Konkurrenzreaktion der Photolyse, sondern um eine Weiterreaktion von **RHO-BPY'-OH** handelt. Auch die Retentionszeit spricht dafür, dass sich die Abgangsgruppe PNA nicht mehr an diesem Molekül befindet. Die Absorptionen zeigten, dass beide Chromophore noch intakt sind und die Masse weist darauf hin, dass sie auch noch miteinander verknüpft sind. Das charakteristische Muster des Massensignals zeigt, dass ein Bor-Atom vorhanden ist, sodass eine Deborylierung ausgeschlossen ist. Somit ist von einer lichtinduzierten Substitution am Bor auszugehen, die auch schon in der Literatur beschrieben wurde.<sup>[162]</sup>

Um die Quantenausbeute der Photoreaktion zu bestimmen, wurden 50  $\mu$ l Aliquote von **RHO-BPY'-PNA** in 10  $\mu$ M ACN/TEAA (7:3) zu unterschiedlichen Belichtungszeiten unter Zugabe eines internen Standards über die HPLC betrachtet. Die Abnahme des Startmaterials wurde dabei über das Peakintegral in Relation zum internen Standard bestimmt. Die Messungen zu jeder Belichtungszeit wurden dreimal wiederholt und gemittelt. Die Parameter der entstandenen Photolysekurve wurden

anschließend verwendet, um die Uncaging-Quantenausbeute mithilfe der Arbeitskreis-internen Software *PHITS* zu berechnen. Dafür wurde ebenfalls der Photonenfluss der verwendeten LEDs benötigt, welcher mithilfe eines Fulgid-Photoschalters als chemisches Aktinometer ermittelt wurde.<sup>[191]</sup> Unter Verwendung einer 565 nm LED wurde schließlich eine Quantenausbeute von  $\Phi_{\text{rel}} = 1.6\%$  bestimmt. Zusätzlich wurden Belichtungsexperimente mit einer 625 nm LED durchgeführt (direkte Anregung des BODIPY-Photocages). Hierbei betrug die Uncaging-Quantenausbeute  $\Phi_{\text{rel}} = 1.0\%$ . Der 1.6-fache Anstieg von  $\Phi_{\text{rel}}$  bei Bestrahlung mit 565 nm im Vergleich zu 625 nm entspricht auch dem Verhältnis der molaren Absorptionskoeffizienten bei diesen Wellenlängen (und somit der besseren Fähigkeit des Rhodamins Photonen einzufangen), was einen effektiven Energietransfer von Rhodamin zu BODIPY indiziert.

	$\lambda_{\text{abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{flu}}$ [nm]	$\epsilon$ [ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]	$\Phi_{\text{rel}}$ [%]
<b>RHO-BPY'-PNA</b>	571	603	65250	1.6 (565 nm)
	638	648	41120	1.0 (625 nm)
<b>RHO-BPY'-OH</b>	569	598	60140	-
	629	639	42730	-

Tabelle 2: Übersicht der photophysikalischen und –chemischen Eigenschaften von **RHO-BPY'-PNA** und **RHO-BPY'-OH**.

In Tabelle 2 sind die ermittelten photophysikalischen und photochemischen Parameter der Dyaden **RHO-BPY'-PNA** und **RHO-BPY'-OH** zusammengefasst. Es wurde eine Besonderheit in Bezug auf die Fluoreszenzeigenschaften der beiden Dyaden gefunden. Dafür sind die Fluoreszenzspektren nach 530 nm Anregung von je 1  $\mu\text{M}$  Lösungen aus **RHO-BPY'-PNA** bzw. **RHO-BPY'-OH** in ACN/TEAA (7:3) aufgenommen worden (Abb. 45). Das Spektrum von **RHO-BPY'-PNA** weist zwei schwache Fluoreszenzbanden auf, die der Rhodamin- und der BODIPY-Emission zugeordnet werden können. Die rotverschobene Bande (BODIPY) ist dabei etwas stärker ausgeprägt. Da das BODIPY bei der Anregungswellenlänge so gut wie keine Absorption aufweist, muss das Fluoreszenzsignal aus einem Energietransfer nach Rhodamin-Anregung resultieren. Die geringe Intensität dieser Bande könnte dabei auf ein Fluoreszenz-Quenchen durch die Abgangsgruppe PNA zurückzuführen sein. Es ist aus der Literatur bekannt, dass elektronenarme Aromaten wie PNA mittels PET (*photoinduced electron transfer*) als Quencher für BODIPYs wirken können.<sup>[167]</sup> Das Spektrum von **RHO-BPY'-OH** dagegen weist eine intensive Bande im Wellenlängenbereich der Rhodamin-Fluoreszenz auf. Falls BODIPY-Fluoreszenz vorliegt, ist diese sehr schwach und wird von dem Rhodamin-Signal überlagert. Im Fall von **RHO-BPY'-OH** scheinen somit die Dynamiken im angeregten Zustand nicht von dem Energietransfer auf das BODIPY, sondern von der hohen Fluoreszenzquantenausbeute des Rhodamins geprägt zu sein. Für die Photoreaktion ergibt sich hierdurch ein wertvolles Charakteristikum. Da es sich bei **RHO-BPY'-OH** um das Hauptprodukt der Photolyse von **RHO-BPY'-PNA** handelt, bedeutet dies, dass

der Uncaging-Prozess mit einem deutlichen Fluoreszenzanstieg bei 600 nm einhergeht. Dadurch ergaben sich neue Möglichkeiten für den Nachweis von Zweiphotonen-Uncaging mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops, welche im nächsten Kapitel beschrieben werden.

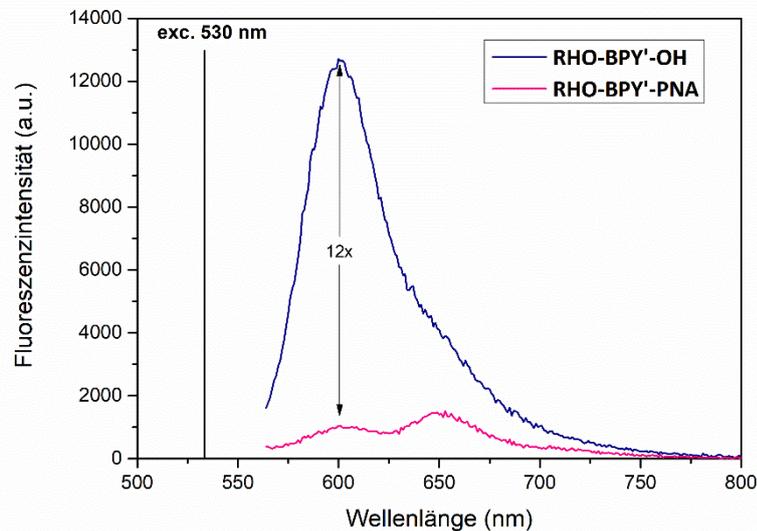


Abbildung 45: Fluoreszenzspektren von RHO-BPY'-OH und RHO-BPY'-PNA, je 1  $\mu\text{M}$  in ACN/TEAA (7:3) nach Anregung (exc. = excitation) bei 530 nm. Bei 600 nm liegt ein etwa 12-facher Anstieg der Fluoreszenzintensität vor. Entnommen aus Weber et al. 2023.<sup>[189]</sup>

### 3.2.3. Zweiphotonen-Uncaging unter dem Fluoreszenzmikroskop

Der Nachweis von Zweiphotonen-Uncaging stellt generell eine gewisse Herausforderung dar, da es sich um einen mikroskopisch kleinen Effekt handelt. Aufgrund des geringen Anregungsvolumens von 2PA ( $\sim 1$  fl) ist die Belichtung der Probe in einer Küvette oder ähnlichem Behältnis schwierig, da eine homogene Aktivierung der Probe kaum zu realisieren wäre. Somit werden für den Nachweis von Zweiphotonen-Uncaging in der Regel Fluoreszenz-Essays entwickelt.<sup>[192]</sup> Fluoreszenzbasierte Methoden haben den Vorteil sehr sensitiv zu sein. Weiterhin können mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops geringe Teile einer Probe orts aufgelöst aktiviert und beobachtet werden.

Erfreulicherweise wurde beobachtet, dass die Photolyse von RHO-BPY'-PNA zu RHO-BPY'-OH mit einer deutlichen Änderung des Fluoreszenzspektrums einhergeht. Dies ermöglichte einen qualitativen Nachweis des Zweiphotonen-induzierten Uncagings mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Für eine solche Anwendung ist allerdings eine Immobilisierung der Probe vonnöten, um die Diffusion der aktivierten Moleküle zu vermeiden. Eine Möglichkeit der Immobilisierung wäre, die Chromophore mithilfe eines Linkers kovalent an einer Oberfläche, wie z.B. einem Hydrogel, zu befestigen. Da die Einführung eines Linkers allerdings sowohl mit einem erneuten Synthesaufwand einherginge, als auch der Einfluss dieses Linkers auf die elektronische Struktur und somit das photophysikalische Verhalten der Dyade unvorhersehbar war, wurde sich dafür entschieden nach einer Immobilisierungsmethode

zu suchen, die keine Modifikation des bestehenden Systems voraussetzte. Somit wurde entschieden, die Moleküle in Liposomen einzubetten.

Die Präparation der Liposomen wurde von Kerby Chok aus dem AK Glaubitz der Universität Frankfurt durchgeführt. **RHO-BPY'-PNA** wurde in unilamellare DOPC-Liposomen mit einer durchschnittlichen Größe von je 300 – 400 nm eingebaut. Die Anzahl der Dyaden-Moleküle pro Vesikel wurde auf etwa 20000 berechnet. Die Liposomen wurden in PBS-Puffer suspendiert und konnten in dieser Form für die fluoreszenzmikroskopischen Experimente verwendet werden.

Die entsprechende Untersuchung der Proben mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde von Dr. Stephan Junek, dem Leiter der Abteilung für Mikroskopie des Max-Planck-Instituts für Hirnforschung, durchgeführt. Es wurde ein konfokales Fluoreszenzmikroskop verwendet, um die Emissionsspektren von jedem Punkt der Probe abrastern zu können. Die Fluoreszenzanregung für die Abbildung der Liposomen erfolgte bei 561 nm mit geringer Laserleistung (5  $\mu$ W). In Abbildung 46 sind die aufgenommenen Bilder dargestellt. Die einzelnen Liposomen erscheinen als rote runde Punkte. Es wurde jeweils ein Zielliposom (grün eingekreist), das für das Uncaging verwendet wurde, und ein Referenzliposom (orange eingekreist), das nicht bestrahlt wurde, betrachtet. Vor dem Uncaging weisen beide Liposomen eine rote Fluoreszenz auf, genauer gesagt eine sehr schwache Bande bei 600 nm und ein deutliches Signal bei 660 nm (Abb. 46a). Dies stimmt mit dem zuvor aufgenommenen Fluoreszenzspektrum von **RHO-BPY'-PNA** überein (vgl. Abb. 45), auch wenn das Intensitätsverhältnis der beiden Banden abweicht. Anschließend wurde das Zielliposom zunächst im Einphotonen-Experiment mit 561 nm bestrahlt. Für das Uncaging wurde eine deutlich höhere Laserleistung verwendet (1000  $\mu$ W) als für die Fluoreszenzanregung. Das Emissionsspektrum des bestrahlten Liposoms weist eine Verschiebung zu 600 nm auf und folglich einen 16-fachen Intensitätsanstieg bei dieser Wellenlänge, was sich auch sichtbar durch die gelb-orangefarbene Fluoreszenz äußert (Abb. 46b). Das Spektrum stimmt somit mit dem von **RHO-BPY'-OH** überein und dient als Nachweis einer stattgefundenen Photolyse. Das Emissionsspektrum des nicht bestrahlten Referenzliposoms blieb wie erwartet unverändert. Als nächstes wurde das Zweiphotonen-Experiment durchgeführt. Dafür wurde ein neu ausgewähltes Liposom mit 810 nm bestrahlt (3000  $\mu$ W). Es wurde dasselbe Verhalten wie im vorigen Experiment gefunden. Vor Bestrahlung weisen sowohl Ziel- als auch Referenzliposom ein rotes Fluoreszenzsignal um 660 nm auf (Abb. 46c). Nach Uncaging mit 810 nm zeigt das Zielliposom die erwartete Verschiebung zu 600 nm (Abb. 46d). Somit konnte gezeigt werden, dass die Dyade **RHO-BPY'-PNA** sowohl durch Einphotonen- als auch durch Zweiphotonen-Anregung des Rhodamin-Moleküls die Abgangsgruppe PNA freisetzen kann.

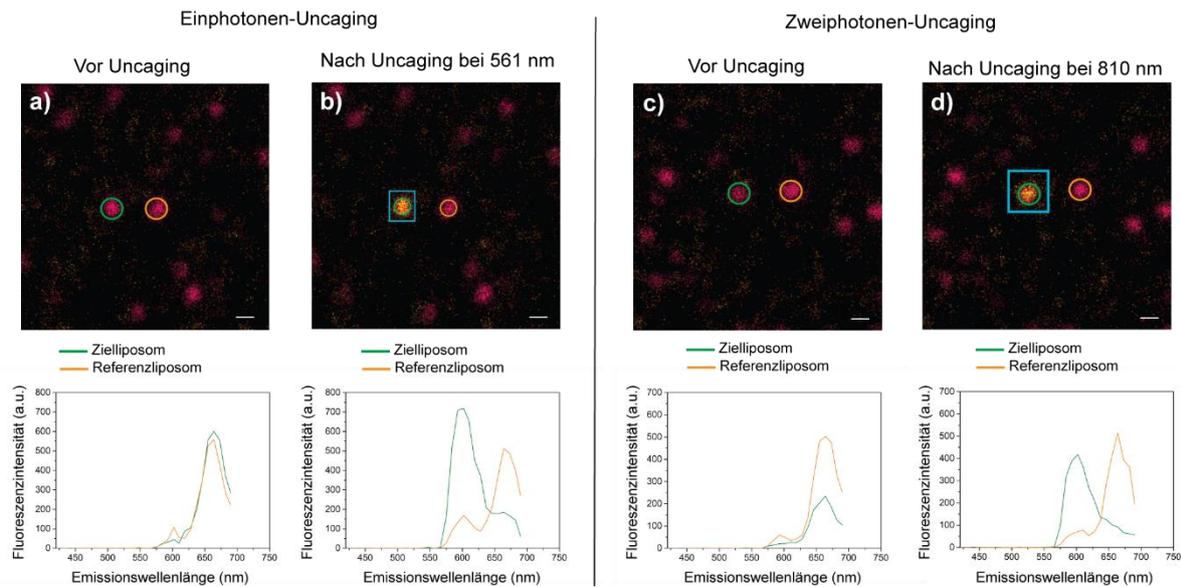


Abbildung 46: Photolyse-Experimente der immobilisierten Dyade RHO-BPY'-PNA unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Emissionsspektren eines Ziel- und eines Referenzliposoms a) vor und b) nach Bestrahlung bei 561 nm (Einphotonen-Uncaging), sowie Emissionsspektren eines Ziel- und eines Referenzliposoms c) vor und d) nach Bestrahlung bei 810 nm (Zweiphotonen-Uncaging). Entnommen aus Weber et al. 2023.<sup>[189]</sup>

Zusammenfassend wurde im Zuge dieses Projekts eine optimierte molekulare Dyade bestehend aus einem Rhodamin-Fluorophor und einem BODIPY-Photocage für verbessertes Zweiphotonen-Uncaging synthetisiert. Durch die Wahl eines neuen Rotlicht-absorbierenden BODIPY-Photocages konnte eine höhere Photostabilität und eine verbesserte Uncaging-Quantenausbeute realisiert werden. Die Freisetzung der Abgangsgruppe PNA konnte sowohl bei Bestrahlung mit 565 nm (Rhodamin-Anregung), als auch mit 660 nm (BODIPY-Anregung) nachgewiesen werden. Für die jeweiligen Prozesse wurde eine Uncaging-Quantenausbeute von  $\Phi_{\text{rel}} = 1.6\%$  (565 nm) bzw.  $\Phi_{\text{rel}} = 1.0\%$  (625 nm) bestimmt.

Bei der Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften wurde herausgefunden, dass die Dyade mit Abgangsgruppe (**RHO-BPY'-PNA**) eine deutlich rotverschobene Fluoreszenz im Vergleich zu seinem Photolyseprodukt ohne Abgangsgruppe (**RHO-BPY'-OH**) aufweist. Die Änderung des Fluoreszenzsignals ermöglichte einen qualitativen Nachweis des Zweiphotonen-Uncagings mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Zu diesem Zweck wurde **RHO-BPY'-PNA** immobilisiert, indem es in Liposomen eingebettet wurde. Die Belichtungsexperimente unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop zeigten schließlich, dass die gewünschte Fluoreszenzänderung sowohl durch die Bestrahlung der Liposomen mit 561 nm, als auch mit 810 nm stattfindet. Somit wurde bewiesen, dass die verwendete BODIPY PPG sowohl durch die Einphotonen- als auch die Zweiphotonen-Anregung des kovalent verknüpften Rhodamin-Fluorophors photolysiert werden kann.

### 3.3. Einphotonen- und Zweiphotonen-Aktivierung eines Rhodamin-Fluorophors

In diesem Kapitel wird die Synthese eines photoaktivierbaren Rhodamin-Fluorophors beschrieben. Die Fluoreszenzaktivierung konnte dabei mit blauem Licht (1P-Anregung) und NIR-Licht (2P-Anregung) erzielt werden. Die folgenden Ergebnisse wurden in Publikation III (Weber *et al.* 2023) aus der vorangestellten Liste veröffentlicht.<sup>[193]</sup>

#### 3.3.1. Synthese des gecageten Rhodamins

Eine gängige Strategie zur Fluoreszenzunterdrückung bei Rhodaminen ist die Anbringung von photolabilen Schutzgruppen an den Amino-Substituenten. Befinden sich an diesen Stellen elektronenziehende Gruppen, wird das Rhodamin in seine geschlossene, nicht-fluoreszierende Lacton-Form gezwungen. Bei Bestrahlung mit Licht der geeigneten Wellenlänge, werden die PPGs abgespalten und das Rhodamin kann seine zwitterionische fluoreszente Form annehmen (vgl. Kapitel 1.4.2.).

Für dieses Projekt sollte ein Photocage gewählt werden, der sowohl mit sichtbarem Licht als auch über einen Zweiphotonen-Prozess mit NIR-Licht abgespalten werden kann. Es wurde sich somit für den DEACM<sub>450</sub>-Photocage entschieden. Diese PPG besitzt ein Absorptionsmaximum bei 450 nm, einen hohen molaren Absorptionskoeffizienten ( $\epsilon = 43000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und vor allem eine sehr hohe Uncaging-Quantenausbeute ( $\Phi_{\text{rel}} = 0.39$ ). Weiterhin zeigt sie eine gute Zweiphotonen-Aktivität über 900 nm ( $\delta_{\text{u}} = 0.5 \text{ GM}$ ). Diese Werte beziehen sich auf die Publikation von Ellis-Davies *et al.*, die diesen Photocage entwickelt haben.<sup>[14]</sup>

Somit wurde DEACM<sub>450</sub> ausgehend von dem 4-Methylcumarin **31** synthetisiert (Abb. 47). Die ersten drei Syntheseschritte erfolgen nach Weinrich *et al.*<sup>[194]</sup> Die Umsetzung von **31** mit DMF-DMA lieferten das Enamin **32**. Dieses konnte anschließend mit Natriumperodat zum Aldehyd **33** oxidativ gespalten werden. Die Bildung des Alkohols **34** erfolgte durch eine Reduktion mit Natriumborhydrid. Von da an wurde der Synthesevorschrift von Ellis-Davis *et al.*<sup>[14]</sup> gefolgt. Die Hydroxygruppe wurde zunächst mit TBDMS geschützt (**35**). Anschließend folgte eine Bromierung in 3-Position mit *N*-Bromsuccinimid. Das bromierte Cumarin **36** konnte somit in einer Palladium-katalysierten Heck-Kupplung mit *tert*-Butylacrylat umgesetzt werden, um das Cumarin **37** mit erweitertem  $\pi$ -System zu erhalten. Durch die Umsetzung mit TFA wurde die *tert*-Butyl-Schutzgruppe entfernt. Das Molekül mit freier Carbonsäure **38** konnte dann im nächsten Schritt in einer Amidkupplung mit EDC mit einer Carboxygeschützten L-Asparaginsäure reagieren (**39**). Schließlich lieferte die Umsetzung mit TBAF den Alkohol **40**. Die Carboxygruppen wurden zunächst nicht entschützt, wie es beim eigentlichen DEACM<sub>450</sub> der Fall ist, um die weitere Synthese zu erleichtern.

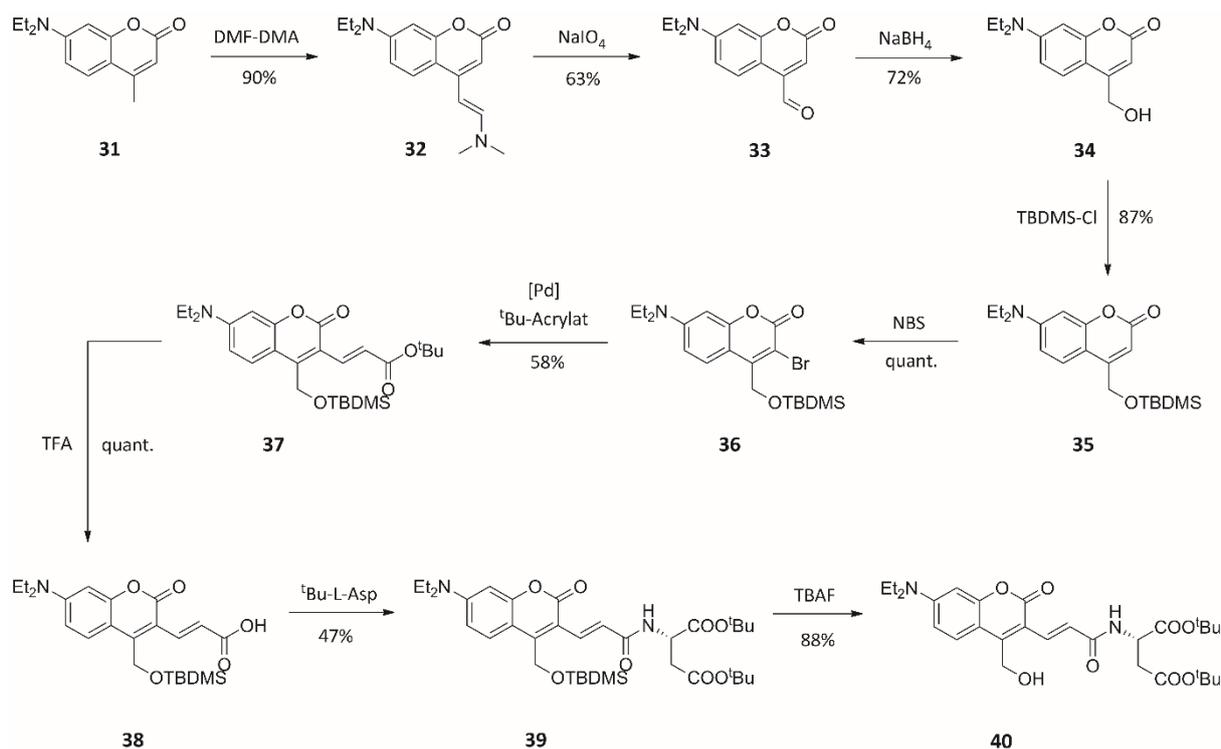


Abbildung 47: Syntheschema der Darstellung des DEACM<sub>450</sub>-Photocages ausgehend von 7-Diethylamino-4-methylcoumarin.

Die Anforderung an den Rhodamin-Fluorophor war, dass er eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute besitzt und sich über 500 nm (außerhalb des Absorptionsbereiches des Photocages) anregen lässt. Weiterhin durften nur primäre oder sekundäre Amino-Substituenten verwendet werden, um eine freie Reaktionsstelle für den Photocage zu bieten. Aus diesen Gründen wurde das Q-Rhodamin-Grundgerüst gewählt. Dieses wurde gemäß der bekannten Synthese nach Auer *et al.*<sup>[182]</sup> aufgebaut (Abb. 48). Der Methyl ester am *ortho*-Carboxyphenylring wurde gewählt, um später einen Linker zur Immobilisierung des Fluorophors einführen zu können. Zunächst wurde dieser Methyl ester von Q-Rhodamin **43** mit Natriumhydroxid zur Carbonsäure **44** hydrolysiert. Anschließend wurde mithilfe von HATU in einer Amidkupplung ein einseitig Boc-geschütztes Ethylendiamin eingeführt. Im nächsten Schritt erfolgte die Anbringung der photolabilen Schutzgruppe. Aufgrund der geringen Nukleophilie der Rhodamin-Stickstoffe müssen gute Elektrophile als Reaktionspartner gewählt werden. Dazu wurde der DEACM<sub>450</sub>-Alkohol **40** mit Triphosgen aktiviert. Das gebildete Chloroformat **41** ist elektrophil genug, um mit Q-Rhodamin **45** unter basischen Bedingungen zum gecageten Rhodamin **46** zu reagieren. Interessanterweise wurde trotz des Überschusses an **41** nur ein Photocage pro Rhodamin-Molekül gebunden. Der Erfolg der Reaktion hängt nicht nur von der Anwesenheit guter Elektrophile, sondern auch von den Substituenten am Rhodamin-Gerüst ab, die die Nukleophilie des Moleküls beeinflussen. So führte zum Beispiel die Reaktion von Q-Rhodamin **44** (freie Carbonsäure) mit dem aktivierten Photocage **41** zu keiner Produktbildung. Das gecagete Rhodamin **46** wurde anschließend mit TFA umgesetzt, wodurch die Aminogruppe und die Carboxygruppen entschützt wurden. Somit wurde das gecagete Rhodamin **cQRho** erhalten. Um dieses im späteren Verlauf an ein Hydrogel binden zu können

wurde eine Thiol-Funktionalität benötigt. Dazu wurde **cQRho** mit 3-Mercaptopropansäure in einer Amidkupplung umgesetzt, wodurch das SH-reaktive gecagete Rhodamin **cQRho-SH** erhalten wurde.

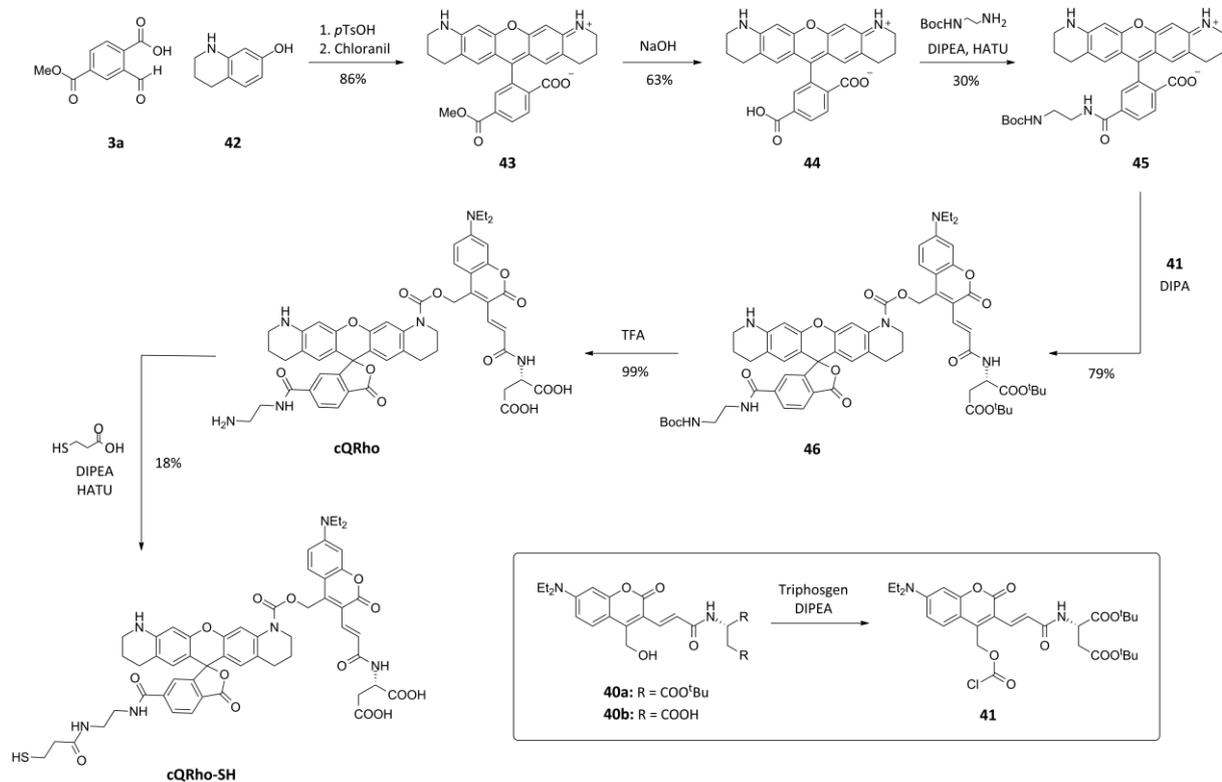


Abbildung 48: Syntheseroute der Darstellung des DEACM<sub>450</sub>-geschützten Q-Rhodamins mit Thiol-Linker (**cQRho-SH**).

### 3.3.2. Photophysikalische Charakterisierung des gecageten Rhodamins

Die Untersuchung der photophysikalischen Eigenschaften und die Photolyseexperimente wurden mit **cQRho** statt mit **cQRho-SH** durchgeführt, da letzteres zur Bildung von Disulfidbrücken neigt und somit Fluorophor-Dimere entstehen können, die die Fluoreszenzsignale verfälschen.<sup>[195]</sup> Zunächst wurde ein Absorptionsspektrum von **cQRho** in ACN/0.1 M TEAA-Puffer (7:3) aufgenommen (Abb. 49a). Es besteht aus zwei deutlichen Banden im sichtbaren Bereich, die der Cumarin-Absorption (~450 nm) und der Rhodamin-Absorption (~550 nm) zugeordnet werden können. Zum Vergleich sind die Absorptionsspektren der einzelnen Chromophore dargestellt, die auch den Photolyseprodukten der Uncaging-Reaktion von **cQRho** in wässriger Umgebung entsprechen. DEACM<sub>450</sub> **40b** wurde durch die Entschützung von Verbindung **40a** erhalten, während das „uncagete“ Rhodamin **ucQRho** durch die Abspaltung der Boc-Gruppe von Q-Rhodamin **45** gebildet wurde (Strukturformeln in Abb. 50 gezeigt). Die molaren Absorptionskoeffizienten von **cQRho** betragen 20100 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bei 455 nm und 19010 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bei 558 nm. Die einzelnen Chromophore DEACM<sub>450</sub> **40b** (23400 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bei 435 nm)

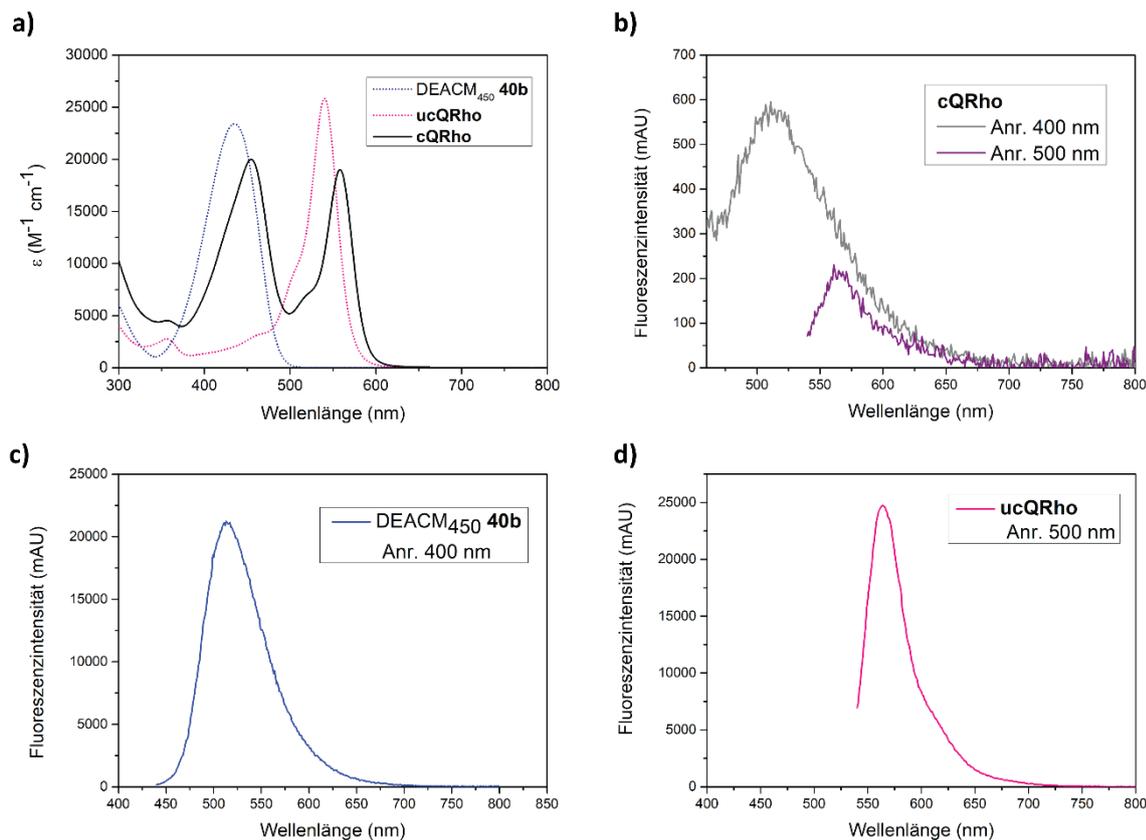


Abbildung 49: a) Absorptionsspektren von **cQRho**, **DEACM<sub>450</sub> 40b** und **ucQRho** in ACN/TEAA (7:3). b) Fluoreszenzspektren von **cQRho** nach Anregung bei 400 nm (Cumarin-Bande) und 500 nm (Rhodamin-Bande) in ACN/TEAA (7:3). Fluoreszenzspektren der Photolyseprodukte c) **DEACM<sub>450</sub> 40b** und d) **ucQRho** in ACN/TEAA (7:3). Modifizierte Abbildung aus Weber et al. 2023.<sup>[193]</sup>

und **ucQRho** ( $25800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei 540 nm) besitzen etwas höhere molare Absorptionskoeffizienten. Die Fluoreszenzspektren der Einzelchromophore zeigen, dass sowohl **DEACM<sub>450</sub> 40b** als auch **ucQRho** ein starkes Fluoreszenzsignal aufweisen (Abb. 49c & d). Das Cumarin besitzt dabei einen deutlichen höheren Stokes-Shift (78 nm) als das Rhodamin (23 nm). Die Anregung von **cQRho** bei 500 nm lieferte dagegen ein kaum messbares Fluoreszenzsignal (Abb. 49b). Obwohl in der Literatur häufig publiziert ist, dass beide Rhodamin-Stickstoffe geschützt sein müssen (bzw. elektronenziehende Reste tragen müssen), um die Fluoreszenz zu unterdrücken,<sup>[11,158,170]</sup> scheint bei diesem Derivat eine einseitige Schützung ausreichend zu sein, um das Rhodamin in seine nicht-fluoreszierende Form zu zwingen. Zusätzlich wurde **cQRho** bei 400 nm angeregt (Cumarin-Bande). Auch die Cumarin-Fluoreszenz ist in diesem Molekül weitestgehend unterdrückt. Während die Fluoreszenzunterdrückung im Fall des Rhodamins konformationell bedingt ist, handelt es sich beim Cumarin vermutlich um einen Quenching-Effekt durch das Rhodamin. Weiterhin wurden die Fluoreszenzquantenausbeuten dieser Verbindungen von Dr. Marvin Asido aus dem AK Wachtveitl der Goethe-Universität bestimmt. Das freie Rhodamin **ucQRho** weist eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute von  $\Phi_F = 73\%$  auf. Für **cQRho** konnte dagegen keine Fluoreszenzquantenausbeute mittels integrierender Methoden bestimmt werden, da sie annähernd null beträgt. Dieser Kontrast bestätigt, dass es sich um eine gute Auswahl des Fluorophors

handelt und dass die Fluoreszenzunterdrückung durch die photolabile Schutzgruppe erfolgreich war. Die photophysikalischen Eigenschaften des gecageten Rhodamins **cQRho**, sowie dessen Photolyseprodukte DEACM<sub>450</sub> **40b** und **ucQRho** sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

	$\lambda_{\text{abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{flu}}$ [nm]	$\epsilon$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	$\Phi_{\text{F}}$ [%]
<b>cQRho</b>	455	511	20100	-
	558	564	19010	-
DEACM <sub>450</sub> <b>40b</b>	435	513	23400	29
<b>ucQRho</b>	540	563	25800	73

Tabelle 3: Photophysikalische Eigenschaften des gecageten Rhodamins **cQRho** und dessen Photolyseprodukte DEACM<sub>450</sub> **40b** und **ucQRho** gemessen in ACN/TEAA (7:3).

### 3.3.3. Photolyse des gecageten Rhodamins

Zunächst wurde die Einphotonen-Photolyse des gecagten Rhodamins untersucht. Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, sollte durch die Bestrahlung von **cQRho** in wässriger Umgebung das offene Rhodamin **ucQRho**, sowie der freie Photocage DEACM<sub>450</sub> **40b** entstehen (Abb. 50).

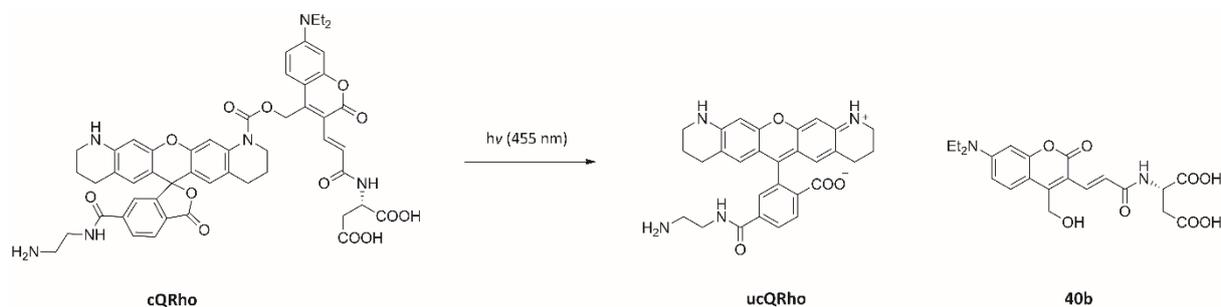


Abbildung 50: Schematische Darstellung der Photolyse von **cQRho** bei 455 nm unter Bildung von **ucQRho** und DEACM<sub>450</sub> **40b**.

Das gecagete Rhodamin **cQRho** wurde in ACN/TEAA (7:3) gelöst und mit einer LED bei 455 nm bestrahlt. Die Bildung des entschützten Rhodamins **ucQRho** wurde mittels HPLC und hochaufgelöster Massenspektrometrie bestätigt. Die Photolyse ging weiterhin mit einem deutlichen Fluoreszenzanstieg einher. Dieser ist in Abbildung 51a grafisch dargestellt. Im dunklen Zustand ist das Rhodamin praktisch nicht-fluoreszent nach Anregung bei 500 nm. Mit steigender Belichtungszeit konnte eine Erhöhung der Rhodamin-Fluoreszenz beobachtet werden, welche schließlich an seiner Obergrenze einen 32-fachen Intensitätsanstieg im Vergleich zum dunklen Zustand aufwies. Da die HPLC-Analyse ergeben hatte, dass es sich um eine saubere Photoreaktion ohne die Bildung von Nebenprodukten handelt, konnte annähernd davon ausgegangen werden, dass die gesamte Stoffmenge an **cQRho** im Zuge der Photolyse in **ucQRho** umgewandelt wird. Da somit die Fluoreszenzintensität näherungsweise proportional zur Konzentration des gebildeten Rhodamins ist, wurde die Uncaging-Quantenausbeute der Photolyse von

**cQRho** anhand der Fluoreszenzspektren bestimmt. Dazu wurden je 50  $\mu\text{l}$  Aliquote einer 2  $\mu\text{M}$  Lösung aus **cQRho** in ACN/TEAA (7:3) unterschiedlich lang bei 455 nm bestrahlt und die gemessenen Fluoreszenzintensitäten am Maximum ( $\lambda_{\text{flu}} = 563 \text{ nm}$ ) gegen die Belichtungszeit aufgetragen (Abb. 51b). Der Verlauf entspricht einer Kinetik Pseudo 1. Ordnung, die typisch für eine A $\rightarrow$ B Photoreaktion ohne konkurrierende Chromophore ist.<sup>[196]</sup> Bei der Sättigung des Fluoreszenzsignals konnte von einem kompletten Umsatz von **cQRho** zu **ucQRho** ausgegangen werden und die Intensitäten wurden in Konzentrations-Einheiten übertragen. An dieser Stelle wurden eventuelle Fluoreszenzminderungen durch Photobleichen vernachlässigt, da zum einen die Absorption von **ucQRho** bei der Belichtungswellenlänge sehr gering ist und zum anderen entsprechende Stabilitätstest mit dem synthetisch hergestellten **ucQRho** gezeigt hatten, dass der Fluorophor im betrachteten Zeitfenster photostabil ist. Die Uncaging-Quantenausbeute wurde anhand der Parameter der Photolysekurve der Bildung von **ucQRho** mithilfe der Software *PHITS* bestimmt. Die Photonenmenge der verwendeten LED wurde erneut mit dem Fulgid-Photoschalter als chemisches Aktinometer ermittelt. Somit wurde eine Quantenausbeute von  $\Phi_{\text{rel}} = 0.01\%$  berechnet. Dieser Wert ist deutlich niedriger als publizierte Uncaging-Quantenausbeuten für diesen Photocage.<sup>[14]</sup> Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass es sich generell um eine andere Abgangsgruppe und speziell um ein Chromophor als Abgangsgruppe handelt. Aufgrund der räumlichen Nähe und der teilweise überlappenden Spektren des Photocages und des Fluorophors wäre eine Interaktion der beiden Chromophore im angeregten Zustand denkbar. Es wurde zusätzlich zum Fluoreszenzanstieg des Rhodamins auch die Fluoreszenzänderung des Cumarin Photocages durch eine Anregung der Probe bei 400 nm während der Photoreaktion betrachtet. Hier war ebenfalls ein Anstieg der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Belichtungszeit zu beobachten. Dies spricht dafür, dass die Cumarin-Fluoreszenz im gecageten Molekül **cQRho** durch die Anwesenheit des Rhodamins gequenchet wird und ansteigt, wenn das Photolyseprodukt DEACM<sub>450</sub> **40b** gebildet wird. Solche Quenching-Effekte,

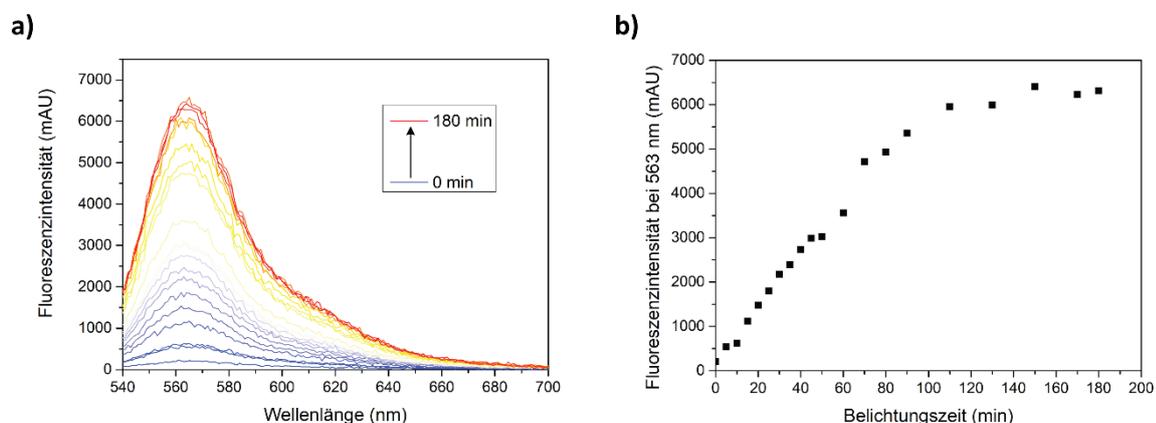


Abbildung 51: a) Anstieg der Fluoreszenzintensität einer 2  $\mu\text{M}$  Lösung aus **cQRho** in ACN/TEAA (7:3) mit zunehmender Belichtungszeit von 0 bis 180 min bei 455 nm aufgrund der Bildung von **ucQRho**. b) Fluoreszenzintensität bei 563 nm in Abhängigkeit der Belichtungszeit. Modifizierte Abbildung aus Weber et al. 2023.<sup>[193]</sup>

die zu einer strahlungslosen Desaktivierung des angeregten Zustands führen, könnten mit der Photoreaktion konkurrieren und somit die geringe Uncaging-Quantenausbeute erklären. Der Fokus des Projekts lag allerdings nicht auf der Optimierung der Photoreaktion, sondern auf der Anwendung des gecageten Rhodamins zur Charakterisierung von optischen Set-Ups. Zu diesem Zweck wurde die Fluoreszenzaktivierung von **cQRho** durch Einphotonen- bzw. Zweiphotonen-Uncaging mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht und im folgenden Abschnitt beschrieben.

### 3.3.4. 1P- und 2P-Aktivierung des gecageten Rhodamins unter dem Fluoreszenzmikroskop

Für die Experimente unter dem Fluoreszenzmikroskop musste das gecagete Rhodamin zunächst immobilisiert werden. Dazu wurde **cQRho-SH** in ACN/TEAA (7:3) zusammen mit einem Hydrogel-Puffer ( $\text{pH} = 7.2$ ) und PVA inkubiert. Dabei handelt es sich um ein lineares PVA-Polymer (Polyvinylalkohol), welches mit Thiol-Gruppen funktionalisiert ist. Das im Überschuss vorliegende **cQRho-SH** kann somit über die Bildung von Disulfidbrücken an das Polymer gebunden werden. Anschließend wurde die Lösung mit dem zweiten Polymer vermischt. Dazu wurden lineare PEG-Polymere (Polyethylenglycol), die an den Enden jeweils Thiol-Gruppen tragen, verwendet. Sie binden an die restlichen SH-Gruppen des PVAs und bilden die Quervernetzung zwischen den Polymeren, um das dreidimensionale Hydrogel aufzubauen. Von diesem Hydrogel wurde ein Brechungsindex von 1.353 gemessen, welcher ähnlich zu den Werten von Wasser (1.333) und biologischem Gewebe (1.37 – 1.40) ist.

Die Experimente mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden von Dr. Stephan Junek, Leiter der Abteilung für Mikroskopie des Max-Planck-Instituts für Hirnforschung, durchgeführt. Dazu wurde das Hydrogel direkt auf den Objektträger pipettiert und mit einem Abdeckglas bedeckt. Um zu testen, ob die orts aufgelöste Fluoreszenzaktivierung funktioniert, wurden Bilder durch die Fluoreszenzanregung mit grünem Licht (561 nm, 7.5  $\mu\text{W}$ ) vor und nach der Photoaktivierung aufgenommen (Abb. 52). Die Photoaktivierung wurde mit blauem Licht (488 nm, 6.6 mW) in einer benutzerdefinierten Region (Pfeil

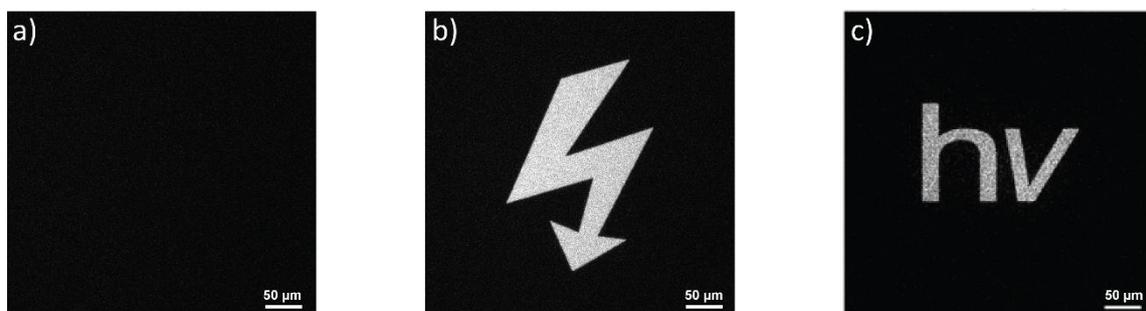


Abbildung 52: Mikroskopiebilder des Hydrogels nach Fluoreszenzanregung bei 561 nm a) vor Photoaktivierung und nach Photoaktivierung mit 488 nm einer benutzerdefinierten Region in Form eines b) Pfeils oder c) hv-Schriftzugs. Der Maßstab beträgt 50  $\mu\text{m}$ . Modifizierte Abbildung aus Weber et al. 2023.<sup>[193]</sup>

bzw. hv-Schriftzug) durchgeführt. Es wurden stabile Fluoreszenzmuster mit hoher räumlicher Präzision generiert, die eine gleichmäßige Verteilung an Fluorophoren und einen hohen Kontrast (ca. 13-facher Fluoreszenzintensitätsanstieg) aufwiesen. Die 488 nm repräsentieren dabei eine häufig verwendete Anregungswellenlänge für biologische Anwendungen, wie z.B. die Anregung von *GFP*,<sup>[137]</sup> GCaMP-Derivate<sup>[197]</sup> oder ChR2.<sup>[198]</sup>

Besonders interessant war jedoch die Fragestellung, ob sich entsprechende Fluoreszenzmuster auch durch Zweiphotonen-Aktivierung generieren lassen, was die Darstellung von dreidimensionalen Strukturen erlauben würde. Hierzu wurden erneut Fluoreszenzbilder mit 561 nm vor und nach der Photoaktivierung aufgenommen (Abb. 53). Für die Photolyse wurden zwei quadratische Flächen des Hydrogels mit 488 nm (1P-Anregung) und 920 nm (2P-Anregung) bestrahlt. In beiden Fällen konnte eine gleichmäßige Fluoreszenzaktivierung mit hohem Kontrast beobachtet werden. Zusätzlich wurde ein Bilderstapel aufgenommen, indem der Abstand zwischen dem Objektiv und der Probe nach jeder Aufnahme eines Fluoreszenzbildes variiert wurde. Dadurch wurden Informationen über die Fluoreszenzaktivierung in z-Richtung erhalten. Abbildung 53c zeigt die Seitenansicht (x/z-Ansicht) der in Abbildung 53b dargestellten Quadrate. Im Fall der Einphotonen-Anregung werden alle Fluorophore im Strahlengang des Lasers aktiviert. Der helle Doppelkegel, dessen Öffnungswinkel durch die

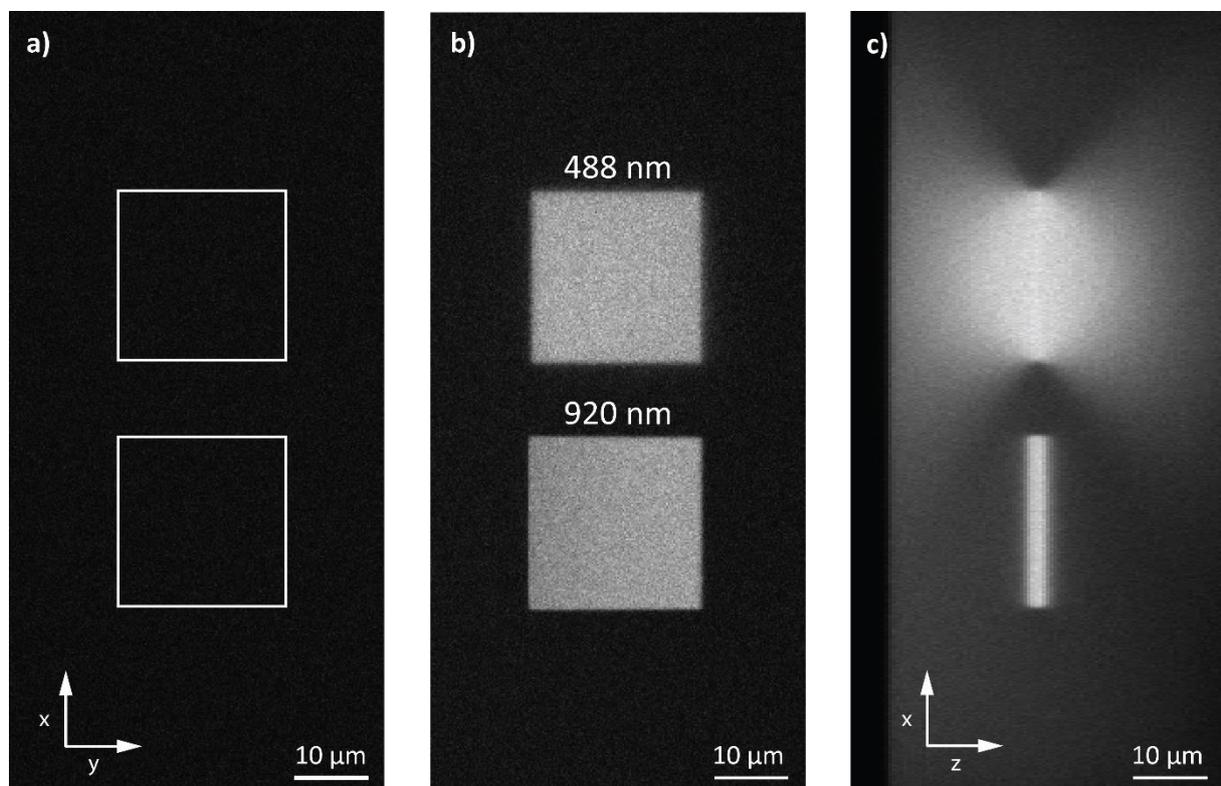


Abbildung 53: Fluoreszenzbilder a) vor und b) nach Photoaktivierung zweier quadratischer Regionen mit 488 nm (oben) und 920 nm (unten). c) Überlagerter Bilderstapel in x/z-Richtung nach Photoaktivierung. Im Falle der 1P-Anregung (488 nm) werden alle Moleküle im Strahlengang angeregt, während das Aktivierungsvolumen bei der 2P-Anregung auf einen schmalen Bereich in z-Richtung begrenzt ist. Der Maßstab beträgt 10 µm. Modifizierte Abbildung aus Weber et al. 2023.<sup>[193]</sup>

numerische Apertur des Mikroskops bestimmt wird, visualisiert die Lichtverbreitung im Hydrogel. Die Photoaktivierung nach Zweiphotonen-Anregung ist dagegen auf einen schmalen Bereich in z-Richtung begrenzt. Obwohl die Moleküle oberhalb und unterhalb dieses Bereichs von dem Laserstrahl getroffen werden, werden sie aufgrund der intrinsischen dreidimensionalen Auflösung des nichtlinearen 2P-Anregungsprozesses nicht angeregt. Es wurde somit gezeigt, dass durch die Aktivierung des im Hydrogel immobilisierten gecageten Rhodamins sowohl nach Einphotonen-Anregung (488 nm) als auch nach Zweiphotonen-Anregung (920 nm) stabile orts aufgelöste Fluoreszenzmuster geschrieben und ausgelesen werden konnten.

Zusammenfassend wurde im Zuge dieses Projektes ein Q-Rhodamin-Derivat hergestellt, dessen Fluoreszenz durch die Anbringung eines DEACM<sub>450</sub>-Photocages unterdrückt wurde. Die Synthese des gecageten Fluorophors **cQRho**, sowie dessen photophysikalischen Eigenschaften wurden in diesem Kapitel beschrieben. Im Gegensatz zu zahlreichen Beispielen aus der Literatur, bei denen Rhodamine beidseitig geschützt wurden, war bei der hier dargestellten Verbindung ein Photocage ausreichend, um die gewünschte Fluoreszenzunterdrückung zu erzielen. Bei der Photolyse von **cQRho** mit einer 455 nm LED wurde die Bildung des freien Rhodamins **ucQRho** nachgewiesen. Wie erwartet ging die Photolyse mit einem deutlichen Fluoreszenzanstieg bei ~560 nm einher. Anhand des Verlaufs des Anstiegs der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Belichtungszeit konnte eine Uncaging-Quantenausbeute von  $\Phi_{\text{rel}} = 0.01\%$  bestimmt werden.

Mit dem Hauptziel der Charakterisierung von Belichtungsapparaturen wurde das gecagete Rhodamin unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dafür wurde es zunächst über einen Thiol-Linker in einem Hydrogel immobilisiert, um die Diffusion der Fluorophore zu vermeiden und somit scharfe, orts aufgelöste Signale zu erhalten. Im gecageten Zustand konnten keine Fluoreszenz nach Anregung mit grünem Licht detektiert werden. Durch die Photoaktivierung der Probe konnten jedoch helle, definierte Muster in das Hydrogel geschrieben und ausgelesen werden. Die Photoaktivierung führte dabei sowohl über die Einphotonen-Anregung mit blauem Licht (488 nm) als auch über den Zweiphotonen-Prozess mit NIR-Licht (920 nm) zur Generierung von stabilen, gleichmäßigen Fluoreszenzmustern mit hohem Kontrast. Im Falle der Zweiphotonen-Anregung konnte die axiale Beschränkung der Photoaktivierung in z-Richtung durch die seitliche Ansicht des aufgenommenen Bilderstapels visualisiert werden. Die Möglichkeit Zweiphotonen-Anregungsmuster zu charakterisieren ist aufgrund der intrinsischen dreidimensionalen Auflösung des 2PA-Prozesses und der Verwendung von energieärmerer NIR-Strahlung besonders wünschenswert für Abbildungsverfahren im biologischen Kontext.

#### 4. Fazit

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden zwei Projekte behandelt, die sich mit der Einphotonen- und Zweiphotonen-Aktivierung von molekularen Systemen, die aus mehreren Chromophoren bestehen, beschäftigen.

Im ersten Projekt wurde eine Energietransferdyade, bestehend aus einem Rhodamin-Fluorophor als Zweiphotonen-Donor und einem BODIPY-Photocage als Akzeptor für verbessertes Zweiphotonen-Uncaging synthetisiert und photophysikalisch und –chemisch charakterisiert. Die Darstellung eines Rhodamin 101-Derivats, welches über einen starren Alkin-Linker mit verschiedenen Rotlicht-absorbierenden BODIPY-Derivaten verknüpft wurde und *para*-Nitroanilin (PNA) als Abgangsgruppe trägt, wurde ausführlich beschrieben. Die Zweiphotonen-Absorption des Rhodamin-Fluorophors, der Energietransfer zwischen Donor- und Akzeptor-Molekül, sowie die Photolyse des BODIPY-Photocages wurden mithilfe von spektroskopischen Methoden und quantenmechanischen Berechnungen untersucht.

Die spektralen Eigenschaften eines Chromophors werden maßgeblich durch seine elektronische Struktur beeinflusst. So können selbst kleine Veränderungen des molekularen Grundgerüsts die Dynamiken im angeregten Zustand verändern. Noch komplexer ist die Anwesenheit eines zweiten Chromophors in räumlicher Nähe, wodurch inter- oder intramolekulare Wechselwirkungen wie Energietransfers oder Quenching-Effekte auftreten können. Umso wichtiger ist es, ein besseres Verständnis solcher Wechselwirkungen zu erlangen. In diesem Projekt wurden durch transiente UV/vis-Absorptionsmessungen und quanten-dynamische Berechnungen eine detaillierte Einsicht in die Prozesse erhalten, die in der vorliegenden Rhodamin-BODIPY-Dyade zwischen der Zweiphotonen-Absorption und der Photolyse der Abgangsgruppe auftraten. Die enorme strukturelle Variabilität von Chromophoren und der damit verbundene unterschiedliche Einfluss auf deren Photochemie sorgt dafür, dass sich immer mehr organisch-chemische Labore beim Moleküldesign auf die Vorhersage bestimmter spektraler Eigenschaften durch rechnergestützte Methoden verlassen. Erfreulicherweise konnte in unseren Experimenten bezüglich des Energietransfers eine hohe Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der spektroskopischen und der theoretischen Methoden erzielt werden.

Weiterhin wurde ein besonderer Fokus auf die Photolyse der Abgangsgruppe gelegt. Die Effizienz der Uncaging-Reaktion konnte im Zuge des Projekts gesteigert werden, sodass schließlich ein quantitativer Nachweis der Einphotonen-Photolyse, sowie ein qualitativer Nachweis der Zweiphotonen-Photolyse realisiert werden konnte. Für die Untersuchung von Zweiphotonen-induzierten Uncaging-Reaktionen gibt es in Photochemiekreisen keine standardisierten Methoden, da das kleine Anregungsvolumen der 2PA und die hohen benötigten Laserleistungen eine apparative Herausforderung darstellen. Viele Nachweismethoden basieren auf Fluoreszenz-Essays, da solche sehr sensitiv sind und

Belichtungsexperimente unter dem Fluoreszenzmikroskop eine örtliche Aktivierung und Detektion von Zweiphotonen-Effekten ermöglichen. Auch in unserem Fall war eine Untersuchung der Zweiphotonen-Photolyse der Rhodamin-BODIPY-Dyade unter dem Fluoreszenzmikroskop möglich, da die Uncaging-Reaktion mit einer deutlichen Änderung der Fluoreszenzeigenschaften der Dyade einherging. Für diese Anwendung war eine Immobilisierung der untersuchten Moleküle notwendig. Hier war eine nicht-kovalente Immobilisierung wünschenswert, da somit keine weitere Modifikation der bestehenden Dyade vonnöten war. Folglich wurden die zu untersuchenden Moleküle in unilamellare DOPC-Liposomen eingeschlossen. Liposomen dienen hauptsächlich zum Transport und zur Erhöhung der Stabilität von Wirkstoffen,<sup>[199–201]</sup> genetischem Material<sup>[202–204]</sup> oder sonstigen Inhaltsstoffen.<sup>[205–207]</sup> Hier wurde stattdessen eine Immobilisationsmethode für organische Moleküle mithilfe von Lipidvesikeln für die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung einer Zweiphotonen-induzierten Uncaging-Reaktion etabliert.

Im zweiten Projekt wurde ein photoaktivierbarer Fluorophor (PAF) für die Charakterisierung von optischen Belichtungsmustern dargestellt. Immobilisierte PAFs eignen sich besonders gut für solche Anwendungen, da sie bei Bestrahlung durch das generierte Fluoreszenzsignal ein direktes Feedback über die Lichtverteilung und -intensität innerhalb des belichteten Bereichs geben.

Die Synthese und die photophysikalische und –chemische Charakterisierung eines Cumarin-geschützten Q-Rhodamin-Fluorophors wurden ausführlich beschrieben. Photoaktivierbare Rhodamine sind zwar in der Literatur schon weitgehend bekannt, allerdings zeigt sich dort auch, dass die Fluoreszenzaktivierung je nach Derivat und Substituenten abweichen und somit noch viel Optimierungsarbeit geleistet werden kann. Da viele der bekannten photoaktivierbaren Rhodamine nur mit UV-Licht aktiviert werden können, sei an dieser Stelle hervorzuheben, dass im Zuge unseres Projekts ein Rhodamin-Derivat hergestellt wurde, das durch die Schützung mit einem DEACM<sub>450</sub>-Photocage sowohl mit sichtbarem Licht (1P-Anregung) als auch mit NIR-Licht (2P-Anregung) aktiviert werden konnte. Weiterhin war das Molekül mit einem Thiol-Linker ausgestattet, wodurch es in einem Hydrogel immobilisiert werden konnte. Für die Photolyse des Cumarin-Photocages bei 455 nm wurde zwar eine geringe Uncaging-Quantenausbeute bestimmt. Trotzdem konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgreich gleichmäßige stabile Fluoreszenzmuster mit hohem Kontrast durch die Aktivierung des Fluorophors bei 488 nm (Einphotonen-Anregung) oder 920 nm (Zweiphotonen-Anregung) in das Hydrogel geschrieben und ausgelesen werden.

## 5. Anhang

## 5.1. Abkürzungsverzeichnis

1PA	Einphotonen-Absorption	DMSO	Dimethylsulfoxid
2PA	Zweiphotonen-Absorption	DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
A	Akzeptor	$\varepsilon$	molarer Absorptionskoeffizient
A, Abs	Absorption	E	Energie
Abb.	Abbildung	EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbo-diimid
ACN	Acetonitril	EET	<i>excitation energy transfer</i> , Energietransfer im angeregten Zustand
AK	Arbeitskreis	EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Asp	Asparaginsäure	EM	Elektronenmikroskopie
ATP	Adenosintriphosphat	ESA	<i>excited state absorption</i> , Absorption des angeregten Zustands
a.u.	<i>arbitrary unit</i> , willkürliche Einheit	<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.), und andere
BHc	7-Hydroxy-6-bromo-cumarin	Et	Ethyl
BHQ	8-Bromo-7-hydroxychinolin	eV	Elektronenvolt
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	exc	<i>excitation</i> , Anregung
BODIPY	Borondipyromethen (auch BPY abgekürzt)	$\Phi$	Quantenausbeute
BtOH	1-Hydroxybenzotriazol	fl	Femtoliter
bzw.	beziehungsweise	Fm	Fluorenylmethyl
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
ChR2	Channelrhodopsin-2	FP	fluoreszierendes Protein
cm	Zentimeter	FRET	Förster-Resonanzenergietransfer bzw. Fluoreszenzresonanzenergietransfer
$\Delta$	Temperaturzufuhr	fs	Femtosekunde
d	optische Auflösung	g	gerade
D	Donor	GABA	<i>gamma aminobutyric acid</i> , $\gamma$ -Aminobuttersäure
$\delta_u$	Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt	GCaMP	<i>genetically encoded calcium indicator modified protein</i> , Genetisch kodierter Calcium-Indikator modifiziertes Protein
DEACM	7-Diethylaminocumarin	GFP	grün fluoreszierendes Protein
d.h.	das heißt	GM	Goeppert-Mayer
DIPA	Diisopropylamin	GSB	<i>ground state bleach</i> , Grundzustandsbleichung
DIPEA	Diisopropylethylamin	<i>h</i>	Planck-Konstante
DMA	Dimethylamin		
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid		
DMF-DMA	Dimethylformamid-Dimethylacetal		
DMNB	Dimethoxy-Nitrobenzol		
DMP	Dess-Martin Periodinan		

h	Stunde	v	Frequenz
HATU	Hexafluorophosphorsäuretriamidimidazolylester	n	Brechungsindex
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i> , Höchstes besetztes Molekülorbital	n	Stoffmenge
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatography	NA	Numerische Apertur
IC	<i>internal conversion</i> , innere Umwandlung	NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
ICT	<i>intramolecular charge transfer</i> , Intramolekulare Ladungsübertragung	NDBF	Nitrodibenzofuran
i.d.R.	in der Regel	NIR	Nahinfrarot
ISC	<i>intersystem crossing</i> , Interkombination	NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
$\lambda$	Wellenlänge	nm	Nanometer
$\lambda_{ac}$	Aktivierungswellenlänge	ns	Nanosekunde
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge	Nu	Nukleophil
$\lambda_{ex}$	Anregungswellenlänge	OAc	Acetoxy
LED	<i>light-emitting diode</i> , Leuchtdiode	OD	optische Dichte
LG	<i>leaving group</i> , Abgangsgruppe	<i>o</i> NB	<i>ortho</i> -Nitrobenzol
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i> , Niedrigstes unbesetztes Molekülorbital	PAF	photoaktivierbarer Fluorophor
$\mu$	Übergangsdipolmoment	PALM	<i>photoactivated localization microscopy</i> , photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie
$\mu$ l	Mikroliter	PBS	<i>phosphate buffer saline</i> , Phosphatge- pufferte Salzlösung
$\mu$ m	Mikrometer	PDT	photodynamische Therapie
$\mu$ M	mikromolar	PEG	Polyethylenglycol
$\mu$ W	Mikrowatt	PET	photoinduzierter Elektronentransfer
M	molar	PNA	<i>para</i> -Nitroanilin
mAU	<i>milli-absorbance units</i> , Maß für die Absorbanz	PPG	<i>photolabile protecting group</i> , photolabile Schutzgruppe
MeO	Methoxy	ps	Pikosekunde
MeOH	Methanol	PSF	Punktspreizfunktion
MESNA	2-Mercaptoethansulfonat-Natrium	<i>p</i> TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
min	Minute	PVA	Polyvinylalkohol
mm	Millimeter	quant.	quantitativ(er Umsatz)
MNI	Methoxy-Nitroindol	s	Sekunde
MO	Molekülorbital	S	Singulett-Zustand
mW	Milliwatt	$\sigma_2$	Zweiphotonen-Einfangsquerschnitt
MW	Mikrowelle	SE	<i>stimulated emission</i> , stimulierte Emission
		SIM	<i>structured illumination microscopy</i> , Mi- kroskopie mit strukturierter Beleuchtung

SMLM	<i>single molecule localization microscopy</i> , Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie	TEAA	Triethylammoniumacetat
S <sub>N</sub> 1	nukleophile Substitution 1. Ordnung	TEG	Triethylenglycol
STED	<i>stimulated emission depletion</i> , Auslöschung durch stimulierte Emission	TFA	Trifluoressigsäure
STORM	<i>stochastic optical reconstruction microscopy</i> , stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie	TICT	<i>twisted intramolecular charge transfer</i> , Verdrehte intramolekulare Ladungsübertragung
τ	Fluoreszenzlebensdauer	TMS	Trimethylsilyl
T	Transmission	TPEF	<i>two-photon excited fluorescence</i> , Zweiphotonen-angeregte Fluoreszenz
T	Triplett-Zustand	Trp	Tryptophan
TAMRA	Tetramethylrhodamin	TT-ET	Triplett-Triplett-Energietransfer
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid	u	ungerade
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl	UV	Ultraviolett
<sup>t</sup> Bu	<i>tert</i> -Butyl	vgl.	vergleiche
TCSPC	<i>time-correlated single photon counting</i> , Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung	vis	sichtbarer Spektralbereich
TEA	Triethylamin	z	Abstand auf der z-Achse
		z.B.	zum Beispiel

## 5.2. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung I:</b> Molekulare Dyade bestehend aus einem Rhodamin-Fluorophor als Zweiphotonen-Donor und einem BODIPY-Photocage als Akzeptor. Sowohl die Einphotonen- bzw. Zweiphotonen-Anregung des Rhodamins mit anschließendem Energietransfer, als auch die direkte Anregung des BODIPY-Photocages führen zur Photospaltung der Abgangsgruppe PNA. IC = <i>internal conversion</i> ; EET = <i>excitation energy transfer</i> . ....III	III
<b>Abbildung II:</b> a) Schematische Darstellung der optimierten Rhodamin-BODIPY-Dyade, eingebettet in Liposomen b) Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines unbelichteten Liposomen (links) und eines durch 1P-Anregung bzw. 2P-Anregung photolysierten Liposomen (rechts). Modifizierte Abbildung entnommen aus Weber <i>et al.</i> <sup>[189]</sup> .....IV	IV
<b>Abbildung III:</b> Ortsaufgelöste Fluoreszenzaktivierung durch 1P- bzw. 2P-Uncaging des geschützten immobilisierten Rhodamin-Fluorophors unter dem Fluoreszenzmikroskop. Modifizierte Abbildung entnommen aus Weber <i>et al.</i> <sup>[193]</sup> .....V	V
<b>Abbildung 1:</b> Übersicht häufig verwendeter Photoschalter in ihren jeweiligen isomeren Zuständen, darunter Azobenzole, Hemithioindigos, Diarylethene, Spiropyrane und Fulgide. ....1	1
<b>Abbildung 2:</b> Abspaltung einer <i>ortho</i> -Nitrobenzyl-Schutzgruppe von einem gecagten ATP mithilfe von UV-Licht. ....2	2
<b>Abbildung 3:</b> Übersicht der Grundgerüste gängiger photolabiler Schutzgruppen: <i>ortho</i> -Nitrobenzol, Cumarin, BODIPY, Xanthen und Cyanin, angeordnet nach der Anregungswellenlänge. LG = Abgangsgruppe (engl.: <i>leaving group</i> ). ....3	3
<b>Abbildung 4:</b> Mechanismus der Photolyse eines Cumarinyl-4-methyl-geschützten Phosphats. ....3	3
<b>Abbildung 5:</b> Übersicht von Cumarin-Modifikationen zur Verbesserung der photochemischen Eigenschaften. ....4	4
<b>Abbildung 6:</b> a) HOMO-LUMO-Übergang von BODIPY im Hückel-Modell. b) Photolysemechanismus der BODIPY PPG: Nach Anregung erfolgt ein heterolytischer Bindungsbruch in <i>meso</i> -Position mit anschließendem Angriff eines Nucleophils. ....5	5
<b>Abbildung 7:</b> Erste Generation Grün-, Gelb- und Rotlicht-absorbierender BODIPY PPGs mit sinkender Uncaging-Quantenausbeute (oben). BODIPY-Derivate mit verbesserter Uncaging-Quantenausbeute durch Halogenierung, Bor-Methylierung und/oder Rigidisierung des Grundgerüsts (unten). ....6	6
<b>Abbildung 8:</b> Vereinfachte Darstellung eines elektronischen Übergangs aus dem Grundzustand ( $S_0$ ) in einen angeregten Zustand ( $S_n$ ) mittels Einphotonen-Absorption (1PA, blau), Zweiphotonen-Absorption zweier energiegleicher Photonen (degenerative 2PA, rot) bzw. zweier energieungleicher Photonen (nicht-degenerative 2PA, gelb) oder mittels Zweiphotonen-Absorption über ein reelles Zwischenniveau $S_m$ (resonante 2PA, grün) im Jablonski-Diagramm. ....8	8
<b>Abbildung 9:</b> a) Absorptionsspektrum eines Blaulicht-absorbierenden nicht-zentrosymmetrischen Chromophors, das mittels 1PA oder 2PA angeregt werden kann. b) Schematische Darstellung der Lichtintensitäts-Abhängigkeit; bei der 1PA werden alle Moleküle im Strahlengang angeregt, während das Anregungsvolumen bei der 2PA auf den Fokuspunkt beschränkt ist (weiß: Moleküle im Grundzustand; grau: Moleküle im angeregten Zustand). Abbildung angelehnt an Abe <i>et al.</i> <sup>[76]</sup> .....8	8
<b>Abbildung 10:</b> Darstellung der Auswahlregeln im Jablonski-Diagramm. Bei zentrosymmetrischen Chromophoren ist der Übergang $S_g \rightarrow S_i$ (gerade zu ungerade) 1P-erlaubt, während der Übergang $S_g \rightarrow S_f$ (gerade zu gerade) 2P-erlaubt ist. Bei nicht-zentrosymmetrischen Chromophoren ist der Übergang $S_g \rightarrow S_f$ (gerade zu ungerade) sowohl 1P- als auch 2P-erlaubt. Angelehnt an Anderson <i>et al.</i> <sup>[78]</sup> .....9	9
<b>Abbildung 11:</b> a) Versuchsaufbau eines Z-Scan Experiments. Der Laserstrahl wird mithilfe eines Strahlteilers zum Teil auf einen Referenzdetektor geleitet und zum Teil durch eine Linse fokussiert. Die Probe wird entlang der z-Achse durch den Laserfokus bewegt. Die Intensitätsänderung des transmittierten Lichts wird am Detektor erfasst. b) Transmission in Abhängigkeit der Probenposition. Die Kurve erreicht das Minimum im Laserfokus ( $z = 0$ ). ....10	10
<b>Abbildung 12:</b> Phototherapeutisches Fenster (modifizierte Abbildung nach Dabrowski <i>et al.</i> <sup>[94]</sup> (© 2015, Royal Society of Chemistry, Nachdruck mit Erlaubnis). ....12	12
<b>Abbildung 13:</b> Erhöhung des Zweiphotonen-Einfangquerschnitts durch Erweiterung des konjugierten $\pi$ -Systems. Abbildung in Anlehnung an Abe <i>et al.</i> <sup>[76]</sup> .....13	13
<b>Abbildung 14:</b> Verbesserte Zweiphotonen-Einfangquerschnitte in a) dipolaren Systemen, b) quadrupolaren Systemen und c) oktopolaren Systemen. Abbildung in Anlehnung an Abe <i>et al.</i> <sup>[76]</sup> .....13	13
<b>Abbildung 15:</b> Übersicht 2P-aktiver Photocages, darunter Dimethoxy- <i>ortho</i> -Nitrobenzol (DMNB), <sup>[110]</sup> 7-Hydroxy-6-bromo-cumarin (BHc), <sup>[110]</sup> Methoxy-Nitroindol (MNI), <sup>[109]</sup> 8-Bromo-7-hydroxychinolin (BHQ) <sup>[112]</sup> und Nitrodibenzofuran (NDBF). <sup>[113]</sup> .....14	14
<b>Abbildung 16:</b> Schematische Darstellung einer Energietransferdyade. Das Licht wird von einem geeigneten Fluorophor über einen Zweiphotonen-Prozess absorbiert. Die Anregungsenergie wird anschließend auf einen Photocage übertragen (EET = <i>excitation energy transfer</i> ), was zur Abspaltung des Substrats (LG, <i>leaving group</i> ) führt. ....15	15

<b>Abbildung 17:</b> Beispiel für eine FRET-basierte molekulare Dyade bestehend aus einem Fluoren-Derivat als 2P-Absorber, zwei MNI-Photocages und geschütztem Glutamat als Abgangsgruppe von Blanchard-Desce <i>et al.</i> <sup>[123]</sup>	<b>16</b>
<b>Abbildung 18:</b> Linsenaufbau in einem Lichtmikroskop zur Bildvergrößerung eines Objektes. Abbildung in Anlehnung an S. Schmitz & C. Desel, <i>Der Experimentator Zellbiologie</i> , 2018 Springer Spektrum, S. 54 <sup>[125]</sup>	<b>17</b>
<b>Abbildung 19:</b> Beispielhaftes Jablonski-Diagramm: Nach elektronischer Anregung erfolgt eine schnelle Schwingungsrelaxation und inneren Umwandlung in den $S_1$ . Von dort kann das System auf verschiedenen Wegen, wie strahlungsloser Relaxation, Fluoreszenz oder Phosphoreszenz in den Grundzustand zurückkehren.	<b>19</b>
<b>Abbildung 20:</b> Typischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.	<b>20</b>
<b>Abbildung 21:</b> Aufbau eines STED-Mikroskops und Darstellung der jeweiligen zweidimensionalen Intensitätsprofile (PSF) von Anregungsstrahl, STED-Strahl und des resultierenden Fluoreszenzsignals.	<b>22</b>
<b>Abbildung 22:</b> Prinzip der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie. Durch die sequentielle orts aufgelöste Detektion einer Teilmenge an Emitttern kann durch die Überlagerung der Bilder ein hochaufgelöstes SMLM-Bild erstellt werden. Abbildung in Anlehnung an Vaughan <i>et al.</i> <sup>[135]</sup>	<b>23</b>
<b>Abbildung 23:</b> Schematische Darstellung der Fluoreszenzaktivierung eines photogeschützten Fluorophors. Durch Bestrahlung mit der Aktivierungswellenlänge $\lambda_{ac}$ wird das Molekül in seine freie Form überführt und liefert ein Fluoreszenzsignal $\lambda_{em}$ nach Bestrahlung mit der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex}$ .	<b>24</b>
<b>Abbildung 24:</b> Übersicht verschiedener Strategien zur lichtinduzierten Fluoreszenzaktivierung bei unterschiedlichen Chromophoren, darunter Rhodamine, Cumarine, BODIPYs und Phenothiazine.	<b>25</b>
<b>Abbildung 25:</b> Rotverschiebung der Rhodamin-Absorption durch unterschiedliche chemische Modifikationen.	<b>27</b>
<b>Abbildung 26:</b> Rhodamin-Struktur in seinen verschiedenen isomeren Zuständen.	<b>27</b>
<b>Abbildung 27:</b> Übersicht photoaktivierbarer Rhodamin-Derivate, deren Aktivierungswellenlängen vom UV-Bereich bis in den sichtbaren grünen Bereich reicht.	<b>28</b>
<b>Abbildung 28:</b> Schematische Darstellung einer Energietransferdyade bestehend aus einem 2P-Absorber als Donor, einem Photocage als Akzeptor und einer Abgangsgruppe (LG, <i>leaving group</i> ).	<b>30</b>
<b>Abbildung 29:</b> Schematische Darstellung der spektralen Anforderungen an das Design des photoaktivierbaren Fluorophors.	<b>31</b>
<b>Abbildung 30:</b> Syntheseroute und Übersicht der Rhodamin-Derivate <i>RHO I-V</i> .	<b>32</b>
<b>Abbildung 31:</b> a) Fluoreszenzspektren von <i>RHO IV</i> nach Zweiphotonen-Anregung bei 850 nm bei variierender Laserleistung (40 – 600 mW). b) Exponentieller Anstieg der Fluoreszenzintensität von <i>RHO IV</i> in Abhängigkeit der Laserleistung, sowie die logarithmische Auftragung dieses Zusammenhangs. c) Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitte von <i>RHO I-IV</i> in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge. Modifizierte Abbildung entnommen aus Asido <i>et al.</i> <sup>[180]</sup>	<b>34</b>
<b>Abbildung 32:</b> Schematische Darstellung des Aufbaus des BODIPY-Grundgerüsts (5), sowie Übersicht der durchgeführten Funktionalisierungen, z.B. der Formylierung (6) mit anschließender Oxidation (7) oder der Halogenierung (8) mit anschließender Einführung eines Alkins (9) bzw. eines Amins (10).	<b>35</b>
<b>Abbildung 33:</b> Getestete Strategien zur Verknüpfung des BODIPY- und des Rhodamin-Chromophors unter Anwendung von Sonogashira-Reaktionen (a, b) und Amid-Kupplungen (c, d).	<b>36</b>
<b>Abbildung 34:</b> Testreaktionen eines bromierten Rhodamin-Fluorophors mit an verschiedenen Positionen alkylierten BODIPYs über eine Sonogashira-Kupplung, welche nur in einem Fall zur Bildung der gewünschten Dyade führt.	<b>37</b>
<b>Abbildung 35:</b> Syntheseroute der Darstellung von <i>RHO-BPY-PNA</i> und <i>RHO-BPY-OH</i> ausgehend von BODIPY-OAc (5). Durch basische Hydrolyse, Oxidation mit DMP und anschließender Barbier-Reaktion wurde der Alkohol 20 mit Alkin-Linker erhalten. Dieser wurde über eine Knoevenagel-Kondensation um zwei Styryl-Reste erweitert. Die Anbringung der Abgangsgruppe PNA über einen Carbamat-Linker erfolgte mit 4-Nitrophenylisocyanat. Die Verbindungen 21 und 22 wurden jeweils mit <i>RHO V</i> mittels Sonogashira-Kupplung zu den gewünschten Produkten umgesetzt.	<b>38</b>
<b>Abbildung 36:</b> Normierte Absorptionsspektren der Dyaden <i>RHO-BPY-PNA</i> und <i>RHO-BPY-OH</i> , sowie der einzelnen Chromophore <i>RHO V</i> und <i>BODIPY 21</i> in Methanol.	<b>39</b>
<b>Abbildung 37:</b> Transiente Absorptionsmessungen von <i>RHO IV</i> nach Anregung bei 565 nm (links) und BODIPY 21 nach Anregung bei 660 nm (rechts). GSB = <i>Ground State Bleach</i> , SE = <i>Stimulated Emission</i> , ESA = <i>Excited State Absorption</i> . Modifizierte Abbildung entnommen aus Asido <i>et al.</i> <sup>[180]</sup>	<b>40</b>
<b>Abbildung 38:</b> a) Transiente Absorptionsmessung von <i>RHO-BPY-OH</i> nach Anregung bei 560 nm. b) Transienten der GSB- bzw. der ESA-Signale nach Anregung bei 560 nm. Die Spektren indizieren einen schnellen Energietransfer unter 500 fs. c) Transiente Absorptionsmessung von <i>RHO-BPY-OH</i> nach Anregung bei 655 nm. d)	

Transienten der GSB- bzw. der ESA-Signale nach Anregung bei 655 nm. Hier ist keine Wechselwirkung zwischen dem Rhodamin und dem BODIPY zu erkennen. Modifizierte Abbildung entnommen aus Asido <i>et al.</i> <sup>[180]</sup> .....	41
<b>Abbildung 39:</b> a) Grenzorbitale der relevanten angeregten Zustände von <i>RHO-BPY-OH</i> . b) Darstellung der Abläufe im angeregten Zustand nach Zweiphotonen-Anregung von <i>RHO-BPY-OH</i> . Modifizierte Abbildung entnommen aus Asido <i>et al.</i> <sup>[180]</sup> .....	42
<b>Abbildung 40:</b> Belichtung von <i>RHO-BPY-PNA</i> bei 565 nm (a-c) und 660 nm (d-f), sowie Belichtung von <i>RHO-BPY-OH</i> bei 565 nm (g-i). Normalisierte Absorptionsspektren im Verlauf der Photolyse (a, d, g) mit Zoom in den Bereich 280 – 340 nm (b, e, h). Differenzspektren in Relation zur anfänglichen Dunkelmessung (c, f, i). Die Spektren wurden in Methanol in 30 s Intervallen innerhalb eines gesamten Belichtungszeitraums von 6000 s gemessen. Modifizierte Abbildung entnommen aus Asido <i>et al.</i> <sup>[180]</sup> .....	44
<b>Abbildung 41:</b> Reaktionsschema der Synthese des neuen BODIPY-Photocages nach Winter <i>et al.</i> <sup>[8]</sup> .....	45
<b>Abbildung 42:</b> Reaktionsmechanismus der Trofimov-Reaktion von 6-Methoxytetralon mit Acetylen und LiOH in DMSO. ....	46
<b>Abbildung 43:</b> Syntheseroute der Darstellung der Dyaden <i>RHO-BPY'-OH</i> und <i>RHO-BPY'-PNA</i> mit neuem BODIPY-Photocage. ....	47
<b>Abbildung 44:</b> a) Absorptionsspektren der neuen Dyaden <i>RHO-BPY'-PNA</i> und <i>RHO-BPY'-OH</i> , sowie der einzelnen Chromophore <i>RHO V</i> und BODIPY 29 in ACN/TEAA (7:3). b) HPLC-Chromatogramme des Verlaufs der Photolyse von <i>RHO-BPY'-PNA</i> in ACN/TEAA (7:3) bei 0 h, 1 h und 7 h bei Bestrahlung mit 565 nm. ....	48
<b>Abbildung 45:</b> Fluoreszenzspektren von <i>RHO-BPY'-OH</i> und <i>RHO-BPY'-PNA</i> , je 1 µM in ACN/TEAA (7:3) nach Anregung (exc. = <i>excitation</i> ) bei 530 nm. Bei 600 nm liegt ein etwa 12-facher Anstieg der Fluoreszenzintensität vor. Modifizierte Abbildung entnommen aus Weber <i>et al.</i> <sup>[189]</sup> .....	50
<b>Abbildung 46:</b> Photolyse-Experimente der immobilisierten Dyade <i>RHO-BPY'-PNA</i> unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Emissionsspektren eines Ziel- und eines Referenzliposoms a) vor und b) nach Bestrahlung bei 561 nm (Einphotonen-Uncaging), sowie Emissionsspektren eines Ziel- und eines Referenzliposoms c) vor und d) nach Bestrahlung bei 810 nm (Zweiphotonen-Uncaging). Modifizierte Abbildung entnommen aus Weber <i>et al.</i> <sup>[189]</sup> .....	52
<b>Abbildung 47:</b> Syntheschema der Darstellung des DEACM <sub>450</sub> -Photocages ausgehend von 7-Diethylamino-4-methylcumarin. ....	54
<b>Abbildung 48:</b> Syntheseroute der Darstellung des DEACM <sub>450</sub> -geschützten Q-Rhodamins mit Thiol-Linker ( <i>cQRho-SH</i> ). ....	55
<b>Abbildung 49:</b> a) Absorptionsspektren von <i>cQRho</i> , DEACM <sub>450</sub> <i>40b</i> und <i>ucQRho</i> in ACN/TEAA (7:3). b) Fluoreszenzspektren von <i>cQRho</i> nach Anregung bei 400 nm (Cumarin-Bande) und 500 nm (Rhodamin-Bande) in ACN/TEAA (7:3). Fluoreszenzspektren der Photolyseprodukte c) DEACM <sub>450</sub> <i>40b</i> und d) <i>ucQRho</i> in ACN/TEAA (7:3). Modifizierte Abbildung entnommen aus Weber <i>et al.</i> 2023. <sup>[193]</sup> .....	56
<b>Abbildung 50:</b> Schematische Darstellung der Photolyse von <i>cQRho</i> bei 455 nm unter Bildung von <i>ucQRho</i> und DEACM <sub>450</sub> <i>40b</i> . ....	57
<b>Abbildung 51:</b> a) Anstieg der Fluoreszenzintensität einer 2 µM Lösung aus <i>cQRho</i> in ACN/TEAA (7:3) mit zunehmender Belichtungszeit von 0 bis 180 min bei 455 nm aufgrund der Bildung von <i>ucQRho</i> . b) Fluoreszenzintensität bei 563 nm in Abhängigkeit der Belichtungszeit. Modifizierte Abbildung entnommen aus Weber <i>et al.</i> 2023. <sup>[193]</sup> .....	58
<b>Abbildung 52:</b> Mikroskopiebilder des Hydrogels nach Fluoreszenzanregung bei 561 nm a) vor Photoaktivierung und nach Photoaktivierung mit 488 nm einer benutzerdefinierten Region in Form eines b) Pfeils oder c) hv-Schriftzugs. Der Maßstab beträgt 50 µm. Modifizierte Abbildung entnommen aus Weber <i>et al.</i> 2023. <sup>[193]</sup> .....	59
<b>Abbildung 53:</b> Fluoreszenzbilder a) vor und b) nach Photoaktivierung zweier quadratischer Regionen mit 488 nm (oben) und 920 nm (unten). c) Überlagerter Bilderstapel in x/z-Richtung nach Photoaktivierung. Im Falle der 1P-Anregung (488 nm) werden alle Moleküle im Strahlengang angeregt, während das Aktivierungsvolumen bei der 2P-Anregung auf einen schmalen Bereich in z-Richtung begrenzt ist. Der Maßstab beträgt 10 µm. Modifizierte Abbildung entnommen aus Weber <i>et al.</i> 2023. <sup>[193]</sup> .....	60

### 5.3. Erklärung zum Urheberrecht und Copyright

Die vorliegende Dissertation und die darin beschriebenen Arbeiten wurden von mir, Rebekka Weber, am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main durchgeführt und verfasst.

Alle Arbeiten, die von anderen Personen durchgeführt wurden, bzw. Abbildungen oder Textstellen, die sich auf fremde Veröffentlichungen beziehen, sind als solche gekennzeichnet. Auf Abbildungen, die aus eigenen bzw. fremden Publikationen entnommen wurden, wird im Folgenden verwiesen.

Als Autor:

Die Publikation Asido *et al.* 2022<sup>[180]</sup> wurde von der *Royal Society of Chemistry* und die beiden Publikationen Weber *et al.* 2023<sup>[189,193]</sup> wurden von dem *Wiley-VCH* Verlag herausgegeben. Bei beiden Herausgebern verbleiben die Urheberrechte von Abbildungen, Diagrammen und Tabellen beim Autor. Entnommene Inhalte dieser Publikationen sind als solche in den Abbildungsunterschriften gekennzeichnet. Im Folgenden sind die Hyperlinks für die entsprechenden Publikationen angegeben:

**Royal Society of Chemistry:** <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2022/cp/d1cp04528h>

**Wiley-VCH:** <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/chem.202300149>

<https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/chem.202300997>

Als Nicht-Autor:

Es wurden Abbildungen der folgenden Herausgeber in dieser Arbeit genutzt und an der entsprechenden Stelle ein Verweis zur Erstpublikation und zum Urheberrecht gegeben.

- Abbildung 12: Erstpublikation von Dąbrowski *et al.*<sup>[94]</sup> © 2015 *Royal Society of Chemistry*. Erlaubnis zum Nachdruck über das *Copyright Clearance Center (CCC)* eingeholt am 24.05.2023.

## 5.4. Literaturverzeichnis

- [1] I. M. Welleman, M. W. H. Hoorens, B. L. Feringa, H. H. Boersma, W. Szymański, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 11672–11691.
- [2] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476.
- [3] 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.
- [4] P. A. Shaw, E. Forsyth, F. Haseeb, S. Yang, M. Bradley, M. Klausen, *Front. Chem.* **2022**, *10*, 1–33.
- [5] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921.
- [6] A. Nag, D. Goswami, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2009**, *206*, 188–197.
- [7] P. Shrestha, D. Kand, R. Weinstein, A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 17497–17514.
- [8] P. Shrestha, K. C. Dissanayake, E. J. Gehrman, C. S. Wijesooriya, A. Mukhopadhyay, E. A. Smith, A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 15505–15512.
- [9] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 4258–4272.
- [10] F. M. Raymo, *ISRN Phys. Chem.* **2012**, *2012*, 1–15.
- [11] L. M. Wysocki, J. B. Grimm, A. N. Tkachuk, T. A. Brown, E. Betzig, L. D. Lavis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11206–11209.
- [12] S. Banala, D. Maurel, S. Manley, K. Johnsson, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 289–293.
- [13] V. N. Belov, C. A. Wurm, V. P. Boyarskiy, S. Jakobs, S. W. Hell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3520–3523.
- [14] J. P. Olson, H. B. Kwon, K. T. Takasaki, C. Q. Chiu, M. J. Higley, B. L. Sabatini, G. C. R. Ellis-Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5954–5957.
- [15] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, *313*, 1642–1645.
- [16] M. Fernández-Suárez, A. Y. Ting, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 929–943.
- [17] B. O. Leung, K. C. Chou, *Appl. Spectrosc.* **2011**, *65*, 967–980.
- [18] T. Dougherty, C. Gomer, B. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, *JNCI* **1998**, *90*, 889–905.
- [19] D. W. Felsher, *Nat. Rev.* **2003**, *3*, 375–380.
- [20] A. Kamkaew, S. H. Lim, H. B. Lee, L. V. Kiew, L. Y. Chung, K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 77–88.
- [21] G. C. R. Ellis-Davies, *Acc. Chem. Res.* **2020**, *53*, 1593–1604.
- [22] I. Elamri, C. Abdellaoui, J. K. Bains, K. F. Hohmann, S. L. Gande, E. Stirnal, J. Wachtveitl, H. Schwalbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 10596–10603.
- [23] Y. Zhang, C. Xu, X. Yang, K. Pu, *Adv. Mater.* **2020**, *32*, 1–19.
- [24] A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422–4437.
- [25] W. Szymański, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker, W. A. Velema, B. L. Feringa, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6114–6178.
- [26] J. Volarić, W. Szymanski, N. A. Simeth, B. L. Feringa, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 12377–12449.
- [27] J. Engels, E. J. Schlaeger, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 907–911.
- [28] J. H. Kaplan, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929–1935.

- [29] T. J. McMillan, E. Leatherman, A. Ridley, J. Shorrocks, S. E. Tobi, J. R. Whiteside, *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *60*, 969–976.
- [30] J. R. Pehrson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 9149–9153.
- [31] Y. Barak, O. Cohen-Fix, Z. Livneh, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24174–24179.
- [32] V. V. Tuchin, *Physi. Usp.* **1997**, *40*, 495–515.
- [33] J. C. Scaiano, *Chem. Soc. Rev.* **2023**, DOI 10.1039/d3cs00453h.
- [34] P. Štacko, T. Šolomek, *Chimia* **2021**, *75*, 873–881.
- [35] L. Josa-Culleré, A. Llebaria, *ChemPhotoChem* **2021**, *5*, 298–316.
- [36] K. Colas, S. Doloczki, M. Posada Urrutia, C. Dyrager, *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 2133–2144.
- [37] R. Weinstain, T. Slanina, D. Kand, P. Klán, *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 13135–13272.
- [38] R. S. Givens, B. Matuszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6860–6861.
- [39] B. Schade, V. Hagen, R. Schmidt, R. Herbrich, E. Krause, T. Eckardt, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9109–9117.
- [40] J. M. Amatrudo, J. P. Olson, G. Lur, C. Q. Chiu, M. J. Higley, G. C. R. Ellis-Davies, *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 64–70.
- [41] D. Geißler, W. Kresse, B. Wiesner, J. Bendig, H. Kettenmann, V. Hagen, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 162–170.
- [42] V. Hagen, B. Dekowski, V. Nache, R. Schmidt, D. Geißler, D. Lorenz, J. Eichhorst, S. Keller, H. Kaneko, K. Benndorf, B. Wiesner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7887–7891.
- [43] V. Hagen, S. Frings, B. Wiesner, S. Helm, U. B. Kaupp, J. Bendig, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 434–442.
- [44] J. Donovalová, M. Cigáň, H. Stankovičová, J. Gašpar, M. Danko, A. Gáplovský, P. Hrdlovič, *Molecules* **2012**, *17*, 3259–3276.
- [45] L. Fournier, I. Aujard, T. Le Saux, S. Maurin, S. Beaupierre, J. B. Baudin, L. Jullien, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17494–17507.
- [46] Q. Lin, L. Yang, Z. Wang, Y. Hua, D. Zhang, B. Bao, C. Bao, X. Gong, L. Zhu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 3722–3726.
- [47] M. Klausen, V. Dubois, G. Clermont, C. Tonnelé, F. Castet, M. Blanchard-Desce, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 4209–4219.
- [48] M. Bojtár, A. Kormos, K. Kis-Petik, M. Kellermayer, P. Kele, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 9410–9414.
- [49] G. Bassolino, C. Nançoz, Z. Thiel, E. Bois, E. Vauthey, P. Rivera-Fuentes, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 387–391.
- [50] R. Klimek, M. Asido, V. Hermanns, S. Junek, J. Wachtveitl, A. Heckel, *Chem. Eur. J.* **2022**, *28*, e202200647.
- [51] T. A. F. Kreuzer, *Liebigs Ann. Chem.* **1968**, *718*, 208–223.
- [52] T. Šolomek, J. Wirz, P. Klán, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 3064–3072.
- [53] N. Rubinstein, P. Liu, E. W. Miller, R. Weinstain, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6369–6372.
- [54] P. P. Goswami, A. Syed, C. L. Beck, T. R. Albright, K. M. Mahoney, R. Unash, E. A. Smith, A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3783–3786.
- [55] H. E. Zimmerman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8988–8991.
- [56] T. Slanina, P. Shrestha, E. Palao, D. Kand, J. A. Peterson, A. S. Dutton, N. Rubinstein, R. Weinstain, A. H. Winter, P. Klán, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 15168–15175.
- [57] J. A. Peterson, C. Wijesooriya, E. J. Gehrman, K. M. Mahoney, P. P. Goswami, T. R. Albright, A. Syed, A.

- S. Dutton, E. A. Smith, A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 7343–7346.
- [58] A. Maity, A. Sarkar, A. Sil, S. B. Shivakiran, S. K. Patra, *New J. Chem.* **2017**, *41*, 2296–2308.
- [59] C. N. Paulson, X. Guan, A. M. Ayoub, A. Chan, R. M. Karim, W. C. K. Pomerantz, E. Schönbrunn, G. I. Georg, J. E. Hawkinson, *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 1223–1229.
- [60] A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932.
- [61] J. Zhao, K. Xu, W. Yang, Z. Wang, F. Zhong, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8904–8939.
- [62] S. Zhu, J. Zhang, G. Vegesna, A. Tiwari, F. T. Luo, M. Zeller, R. Luck, H. Li, S. Green, H. Liu, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 404–407.
- [63] J. L. Donnelly, D. Offenbartl-Stiegert, J. M. Marín-Beloqui, L. Rizzello, G. Battaglia, T. M. Clarke, S. Howorka, J. D. Wilden, *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 863–872.
- [64] D. Kand, P. Liu, M. X. Navarro, L. J. Fischer, L. Rousso-Noori, D. Friedmann-Morvinski, A. H. Winter, E. W. Miller, R. Weinstain, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 4970–4974.
- [65] A. Poryvai, M. Galkin, V. Shvadchak, T. Slanina, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202205855.
- [66] C. Morville, J. Chaud, F. Bolze, A. Specht, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2021**, DOI 10.1007/s10847-021-01071-9.
- [67] J. D. Guo, C. K. Wang, Y. Luo, H. Ågren, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5*, 3869–3873.
- [68] H. S. Moon, H.-R. Noh, *Opt. Express* **2013**, *21*, 7447.
- [69] F. Glaser, C. Kerzig, O. S. Wenger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 10266–10284.
- [70] M. Göppert-Mayer, *Ann. Phys.* **1931**, *401*, 273–294.
- [71] W. Kaiser, C. G. B. Garrett, *Phys. Rev. Lett.* **1961**, *7*, 229–231.
- [72] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, *Science* **1990**, *248*, 73–76.
- [73] G. Bort, T. Gallavardin, D. Ogden, P. I. Dalko, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 4622–4634.
- [74] S. Piant, F. Bolze, A. Specht, *Opt. Mater. Express* **2016**, *6*, 1679.
- [75] P. A. Shaw, E. Forsyth, F. Haseeb, S. Yang, M. Bradley, M. Klausen, *Front. Chem.* **2022**, *10*, 1–33.
- [76] M. Abe, Y. Chitose, S. Jakkampudi, P. T. T. Thuy, Q. Lin, B. T. Van, A. Yamada, R. Oyama, M. Sasaki, C. Katan, *Synth.* **2017**, *49*, 3337–3346.
- [77] S. Franzen, *LibreTexts Chemistry*  
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Spectroscopy/Fundamentals\\_of\\_Spectroscopy/Selection\\_rules\\_and\\_transition\\_moment\\_integral](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Fundamentals_of_Spectroscopy/Selection_rules_and_transition_moment_integral) (abgerufen am 13.09.23).
- [78] M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning, H. L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3244–3266.
- [79] N. S. Makarov, M. Drobizhev, G. Wicks, E. A. Makarova, E. A. Lukyanets, A. Rebane, *J. Chem. Phys.* **2013**, *138*, 1–8.
- [80] F. Helmchen, W. Denk, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 932–940.
- [81] K. Svoboda, R. Yasuda, *Neuron* **2006**, *50*, 823–839.
- [82] F. Bolze, S. Jenni, A. Sour, V. Heitz, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 12857–12877.
- [83] J. D. Bhawalkar, N. D. Kumar, C.-F. Zhao, P. N. Prasad, *J. Clin. Laser Med. Surg.* **1997**, *15*, 201–204.
- [84] C. N. LaFratta, J. T. Fourkas, T. Baldacchini, R. A. Farrer, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6352–6374.
- [85] S. Kawata, Y. Kawata, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1777–1788.

- [86] P. Lipp, E. Niggli, *J. Physiol.* **1998**, *508*, 801–809.
- [87] M. Sheik-bahae, A. A. Said, E. W. Van Stryland, *Opt. Lett.* **1989**, *14*, 955.
- [88] L. Pálfalvi, B. C. Tóth, G. Almási, J. A. Fülöp, J. Hebling, *Appl. Phys. B Lasers Opt.* **2009**, *97*, 679–685.
- [89] M. A. Albota, C. Xu, W. W. Webb, *Appl. Opt.* **1998**, *37*, 7352.
- [90] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Baltimore, **2006**, S. 1–5.
- [91] Kasha Michael, *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, *9*, 14–19.
- [92] C. Xu, W. W. Webb, *J. Opt. Soc. Am. B* **1996**, *13*, 481.
- [93] L. A. Sordillo, Y. Pu, S. Pratavieira, Y. Budansky, R. R. Alfano, *J. Biomed. Opt.* **2014**, *19*, 056004.
- [94] J. M. Dąbrowski, L. G. Arnaut, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 1765–1780.
- [95] H. M. Kim, B. R. Cho, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 5014–5055.
- [96] R. J. M. Anderson, G. R. Holtom, W. M. McClain, *J. Chem. Phys.* **1979**, *70*, 4310–4315.
- [97] M. Albota, D. Beljonne, J. L. Brédas, J. E. Ehrlich, J. Y. Fu, A. A. Heikal, S. E. Hess, T. Kogej, M. D. Levin, S. R. Marder, D. McCord-Maughon, J. W. Perry, H. Röckel, M. Rumi, G. Subramaniam, W. W. Webb, X. L. Wu, C. Xu, *Science* **1998**, *281*, 1653–1656.
- [98] H. Myung Kim, B. Rae Cho, *Chem. Commun.* **2009**, 153–164.
- [99] R. Englman, J. Jortner, *Mol. Phys.* **1970**, *18*, 285–287.
- [100] G. Bort, T. Gallavardin, D. Ogden, P. I. Dalko, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4526–4537.
- [101] J. P. Hermann, J. Ducuing, *Opt. Commun.* **1972**, *6*, 101–105.
- [102] C. Z. Wang, R. Zhang, K. Sakaguchi, X. Feng, X. Yu, M. R. J. Elsegood, S. J. Teat, C. Redshaw, T. Yamato, *ChemPhotoChem* **2018**, *2*, 749–756.
- [103] J. Zhang, C. Wang, L. Zhang, H. Wu, Y. Xiao, Y. Xu, X. Qian, W. Zhu, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 71324–71627.
- [104] N. Aratani, D. Kim, A. Osuka, *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 1172–1182.
- [105] C. D. Andrade, C. O. Yanez, L. Rodriguez, K. D. Belfield, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3975–3982.
- [106] S. Yao, B. Kim, X. Yue, M. Y. Colon Gomez, M. V. Bondar, K. D. Belfield, *ACS Omega* **2021**, *1*, 1149–1156.
- [107] A. P. Gorka, R. R. Nani, J. Zhu, S. Mackem, M. J. Schnermann, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14153–14159.
- [108] W. Denk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 6629–6633.
- [109] M. Matsuzaki, G. C. R. Ellis-Davies, T. Nemoto, Y. Miyashita, M. Iino, H. Kasai, *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 1086–1092.
- [110] T. Furuta, S. S. H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 1193–1200.
- [111] G. Papageorgiou, D. Ogden, G. Kelly, J. E. T. Corrie, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 887–896.
- [112] Y. Zhu, C. M. Pavlos, J. P. Toscano, T. M. Dore, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4267–4276.
- [113] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 35–40.
- [114] Y. Becker, E. Unger, M. A. H. Fichte, D. A. Gacek, A. Dreuw, J. Wachtveitl, P. J. Walla, A. Heckel, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 2797–2802.
- [115] A. I. Ciuciu, K. A. Korzycka, W. J. M. Lewis, P. M. Bennett, H. L. Anderson, L. Flamigni, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 6554–6564.

- [116] C. A. Hammer, K. Falahati, A. Jakob, R. Klimek, I. Burghardt, A. Heckel, J. Wachtveitl, *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 1448–1453.
- [117] K. A. Korzycka, P. M. Bennett, E. J. Cueto-Diaz, G. Wicks, M. Drobizhev, M. Blanchard-Desce, A. Rebane, H. L. Anderson, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2419–2426.
- [118] G. Papageorgiou, M. Lukeman, P. Wan, J. E. T. Corrie, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 366–373.
- [119] T. Förster, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1948**, *437*, 55–75.
- [120] R. B. Sekar, A. Periasamy, *J. Cell Biol.* **2003**, *160*, 629–633.
- [121] K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562–4589.
- [122] C. W. Wan, A. Burghart, J. Chen, F. Bergström, L. B. Johansson, M. F. Wolford, T. G. Kim, M. R. Topp, R. M. Hochstrasser, K. Burgess, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4430–4441.
- [123] S. Picard, E. J. Cueto-Diaz, E. Genin, G. Clermont, F. Acher, D. Ogden, M. Blanchard-Desce, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10805–10807.
- [124] E. Cueto Diaz, S. Picard, M. Klausen, V. Hugues, P. Pagano, E. Genin, M. Blanchard-Desce, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 10848–10859.
- [125] S. Schmitz, C. Desel, *Der Experimentator Zellbiologie*, Springer Spektrum, Berlin, **2018**, S. 54.
- [126] C. Cremer, *Phys. unserer Zeit* **2011**, *42*, 21–29.
- [127] E. Abbé, *Arch. für mikroskopische Anat.* **1873**, *9*, 418–440.
- [128] A. Singh, K. P. Gopinathan, *Curr. Sci.* **1998**, *74*, 841–851.
- [129] M. Winey, J. B. Meehl, E. T. O’Toole, T. H. Giddings, *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*, 319–323.
- [130] J. W. Lichtman, J. A. Conchello, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 910–919.
- [131] S. E. Schwartz, *J. Chem. Educ.* **1973**, *50*, 608–610.
- [132] D. Malpicci, E. Lucenti, C. Giannini, A. Forni, C. Botta, E. Cariati, *Molecules* **2021**, *26*, 6999.
- [133] A. P. Demchenko, V. I. Tomin, P. T. Chou, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 13353–13381.
- [134] C. M. Marian, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2*, 187–203.
- [135] H. Li, J. C. Vaughan, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 9412–9454.
- [136] D. M. Chudakov, M. V. Matz, S. Lukyanov, K. A. Lukyanov, *Physiol. Rev.* **2010**, *90*, 1103–1163.
- [137] G. H. Patterson, S. M. Knobel, W. D. Sharif, S. R. Kain, D. W. Piston, *Biophys. J.* **1997**, *73*, 2782–2790.
- [138] P. J. Cranfill, B. R. Sell, M. A. Baird, J. R. Allen, Z. Lavagnino, H. M. De Gruiter, G. J. Kremers, M. W. Davidson, A. Ustione, D. W. Piston, *Nat. Methods* **2016**, *13*, 557–562.
- [139] J. B. Grimm, B. P. English, J. Chen, J. P. Slaughter, Z. Zhang, A. Revyakin, R. Patel, J. J. Macklin, D. Normanno, R. H. Singer, T. Lionnet, L. D. Lavis, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 244–250.
- [140] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780.
- [141] M. V. Sednev, V. N. Belov, S. W. Hell, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, DOI 10.1088/2050-6120/3/4/042004.
- [142] R. Heintzmann, C. G. Cremer, *Opt. Biopsies Microsc. Tech. III* **1999**, *3568*, 185–196.
- [143] M. Sauer, M. Heilemann, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7478–7509.
- [144] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–795.
- [145] S. Van De Linde, U. Endesfelder, A. Mukherjee, M. Schüttpelz, G. Wiebusch, S. Wolter, M. Heilemann, M. Sauer, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 465–469.

- [146] Weijie Chi, D. Tan, Q. Qiao, Z. Xu, X. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, e202306061.
- [147] F. M. Raymo, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 14840–14850.
- [148] W. H. Li, G. Zheng, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 460–471.
- [149] Y. Zhang, F. M. Raymo, *Methods Appl. Fluoresc.* **2020**, *8*, 32002.
- [150] E. A. Halabi, D. Pinotsi, P. Rivera-Fuentes, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–10.
- [151] M. Weber, T. A. Khan, L. J. Patalag, M. Bossi, M. Leutenegger, V. N. Belov, S. W. Hell, *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 451–458.
- [152] S. H. Lee, J. Y. Shin, A. Lee, C. Bustamante, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 17436–17441.
- [153] S. Duwé, E. De Zitter, V. Gielen, B. Moeyaert, W. Vandenberg, T. Grotjohann, K. Clays, S. Jakobs, L. Van Meervelt, P. Dedecker, *ACS Nano* **2015**, *9*, 9528–9541.
- [154] A. Tao, R. Zhang, J. Yuan, *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124*, 1892–1897.
- [155] G. Han, T. Mokari, C. Ajo-Franklin, B. E. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15811–15813.
- [156] S. Jung, J. Park, J. Bang, J. Kim, C. Kim, Y. Jeon, S. H. Lee, H. Jin, S. Choi, B. Kim, W. J. Lee, C. Pack, J. Lee, N. K. Lee, S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 7603–7615.
- [157] Y. R. Zhao, Q. Zheng, K. Dakin, K. Xu, M. L. Martinez, W. H. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4653–4663.
- [158] K. R. Gee, E. S. Weinberg, D. J. Kozlowski, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2181–2183.
- [159] F. Friedrich, K. Klehs, M. A. H. Fichte, S. Junek, M. Heilemann, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 15382–15385.
- [160] J. Tang, M. A. Robichaux, K. L. Wu, J. Pei, N. T. Nguyen, Y. Zhou, T. G. Wensel, H. Xiao, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 14699–14706.
- [161] A. Kormos, D. Kern, A. Egyed, B. Söveges, K. Németh, P. Kele, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 5425–5428.
- [162] C. S. Wijesooriya, J. A. Peterson, P. Shrestha, E. J. Gehrman, A. H. Winter, E. A. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 12685–12689.
- [163] E. A. Halabi, Z. Thiel, N. Trapp, D. Pinotsi, P. Rivera-Fuentes, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 13200–13207.
- [164] R. Klimek, P. G. Donlin-Asp, C. Polisseni, V. Hanff, E. M. Schuman, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 12683–12686.
- [165] D. Warther, F. Bolze, J. Léonard, S. Gug, A. Specht, D. Puliti, X. H. Sun, P. Kessler, Y. Lutz, J. L. Vonesch, B. Winsor, J. F. Nicoud, M. Goeldner, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2585–2590.
- [166] J. A. Blake, M. Lukeman, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *93*, 4127–4135.
- [167] T. Kobayashi, T. Komatsu, M. Kamiya, C. Campos, M. González-Gaitán, T. Terai, K. Hanaoka, T. Nagano, Y. Urano, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11153–11160.
- [168] G. A. Krafft, W. R. Sutton, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 301–303.
- [169] J. B. Grimm, A. J. Sung, W. R. Legant, P. Hulamm, S. M. Matlosz, E. Betzig, L. D. Lavis, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1303–1310.
- [170] J. B. Grimm, T. Klein, B. G. Kopek, G. Shtengel, H. F. Hess, M. Sauer, L. D. Lavis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1723–1727.
- [171] W. Zhao, Q. Xia, *Comput. Theor. Chem.* **2014**, *1050*, 1–6.
- [172] H. Zheng, X. Q. Zhan, Q. N. Bian, X. J. Zhang, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 429–447.
- [173] L. Wang, M. S. Frei, A. Salim, K. Johnsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 2770–2781.
- [174] M. Beija, C. A. M. Afonso, J. M. G. Martinho, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2410–2433.

- [175] W. Chi, Q. Qi, R. Lee, Z. Xu, X. Liu, *J. Phys. Chem. C* **2020**, *124*, 3793–3801.
- [176] M. A. Priestman, T. A. Shell, L. Sun, H. M. Lee, D. S. Lawrence, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7684–7687.
- [177] M. Bojtár, K. Németh, F. Domahidy, G. Knorr, A. Verkman, M. Kállay, P. Kele, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 15164–15171.
- [178] Y. Zheng, Z. Ye, Z. Liu, W. Yang, X. Zhang, Y. Yang, Y. Xiao, *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 7833–7842.
- [179] C. Morville, J. Chaud, F. Bolze, A. Specht, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2021**, *101*, 291–304.
- [180] M. Asido, C. Hamerla, R. Weber, M. Horz, M. S. Niraghatam, A. Heckel, I. Burghardt, J. Wachtveitl, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2022**, *24*, 1795–1802.
- [181] F. Bestvater, E. Spiess, G. Stobrawa, M. Hacker, T. Feurer, T. Porwol, U. Berchner-Pfannschmidt, C. Wotzlav, H. Acker, *J. Microsc.* **2002**, *208*, 108–115.
- [182] G. Mudd, I. P. Pi, N. Fethers, P. G. Dodd, O. R. Barbeau, M. Auer, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, DOI 10.1088/2050-6120/3/4/045002.
- [183] Z. R. Grabowski, J. Dobkowski, *Pure Appl. Chem.* **1983**, *55*, 245–252.
- [184] K. Krumova, G. Cosa, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17560–17569.
- [185] F. Doria, M. Nadai, G. Costa, G. Sattin, C. Gallati, G. Bergamaschi, F. Moraca, S. Alcaro, M. Freccero, S. N. Richter, *European J. Org. Chem.* **2016**, 4824–4833.
- [186] S. M. Melikova, A. P. Voronin, J. Panek, N. E. Frolov, A. V. Shishkina, A. A. Rykounov, P. Y. Tretyakov, M. V. Vener, *RSC Adv.* **2020**, *10*, 27899–27910.
- [187] G. W. Breton, J. H. Shugart, C. A. Hughey, B. P. Conrad, S. M. Perala, *Molecules* **2001**, *6*, 655–662.
- [188] S. Padilla-Parra, M. Tramier, *BioEssays* **2012**, *34*, 369–376.
- [189] R. Weber, K. Chok, S. Junek, C. Glaubitz, A. Heckel, *Chem. Eur. J.* **2023**, e202300149.
- [190] B. A. Trofimov, A. I. Mikhaleva, E. Y. Schmidt, A. M. Vasil’Tsov, A. V. Ivanov, N. I. Protsuk, O. A. Ryapolov, *Dokl. Chem.* **2010**, *435*, 307–310.
- [191] M. Reinfelds, V. Hermanns, T. Halbritter, J. Wachtveitl, M. Braun, T. Slanina, A. Heckel, *ChemPhotoChem* **2019**, *3*, 441–449.
- [192] E. Abou Nakad, J. Chaud, C. Morville, F. Bolze, A. Specht, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2020**, *19*, 1122–1133.
- [193] R. Weber, S. Junek, A. Heckel, *Chem. Eur. J.* **2023**, e202300997.
- [194] T. Weinrich, M. Gränz, C. Grünewald, T. F. Prisner, M. W. Göbel, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 491–496.
- [195] R. J. Christie, C. J. Tadiello, L. M. Chamberlain, D. W. Grainger, *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 476–480.
- [196] S. R. Logan, *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 1303.
- [197] H. Dana, Y. Sun, B. Mohar, B. K. Hulse, A. M. Kerlin, J. P. Hasseman, G. Tsegaye, A. Tsang, A. Wong, R. Patel, J. J. Macklin, Y. Chen, A. Konnerth, V. Jayaraman, L. L. Looger, E. R. Schreiter, K. Svoboda, D. S. Kim, *Nat. Methods* **2019**, *16*, 649–657.
- [198] G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann, E. Bamberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 13940–13945.
- [199] T. M. Allen, *Drugs* **1997**, *54*, 8–14.
- [200] J. S. Kim, *J. Pharm. Investig.* **2016**, *46*, 387–392.
- [201] H. Daraee, A. Etemadi, M. Kouhi, S. Alimirzalu, A. Akbarzadeh, *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*

- 2016**, *44*, 381–391.
- [202] D. A. Balazs, W. Godbey, *J. Drug Deliv.* **2011**, *2011*, 1–12.
- [203] G. Y. W. Tseu, K. A. Kamaruzaman, *Molecules* **2023**, *28*, DOI 10.3390/molecules28031498.
- [204] E. J. Sayour, H. R. Mendez-Gomez, D. A. Mitchell, *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, DOI 10.3390/ijms19102890.
- [205] S. Emami, S. Azadmard-Damirchi, S. H. Peighambaroust, H. Valizadeh, J. Hesari, *J. Exp. Nanosci.* **2016**, *11*, 737–759.
- [206] H. R. Ahmadi Ashtiani, P. Bishe, N.-A. Lashgari, M. A. Nilforoushzadeh, S. Zare, *J. Ski. Stem Cell* **2016**, *3*, e65815.
- [207] A. Meybeck, *Liposome Dermatics* **1992**, 341–345.

## 8. Autorenanteile der Publikationen

### I. Ultrafast and Efficient Energy Transfer in a One- and Two-Photon Sensitized Rhodamine-BODIPY Dyad: A Perspective for Broadly Absorbing Photocages

M. Asido\*, C. Hamerla\*, R. Weber\*, M. Horz\*, M. Shyam Niraghatam, A. Heckel, I. Burghardt, J. Wachtveitl, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2022**, 24, 1795 – 1802, DOI: 10.1039/d1cp04528h.

#### Beiträge der einzelnen Autoren:

Dr. Marvin Asido

- Durchführung der TPEF-Messungen, transienten UV/vis-Absorptionsmessungen und der Photolyse-Experimente
- Schreiben & Editieren des Manuskripts
- Erstellung von Abbildung 1b, 2 & 4

Carsten Hamerla, Maximiliane Horz & Dr. Madhava Shyam Niraghatam

- Durchführung der theoretischen Berechnungen (*electronic structure calculations, excited state analysis, quadric response calculations, quantum dynamical analysis*)
- Schreiben & Editieren des Manuskripts
- Erstellung von Abbildung 3

Rebekka Weber

- Entwurf & chemische Synthese der untersuchten molekularen Dyaden
- Schreiben & Editieren des Manuskripts
- Erstellung von Abbildung 1a

Prof. Alexander Heckel, Prof. Irene Burghardt & Prof. Josef Wachtveitl

- Projektbetreuung
- Editieren des Manuskripts



Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2022, **24**, 1795

## Ultrafast and efficient energy transfer in a one- and two-photon sensitized rhodamine-BODIPY dyad: a perspective for broadly absorbing photocages†

Marvin Asido,<sup>‡</sup> Carsten Hamerla,<sup>‡</sup> Rebekka Weber,<sup>‡</sup> Maximiliane Horz,<sup>‡</sup> Madhava Shyam Niraghatam,<sup>§</sup> Alexander Heckel,<sup>‡</sup> Irene Burghardt<sup>‡</sup> and Josef Wachtveitl<sup>‡</sup>

In view of the demand for photoactivatable probes that operate in the visible (VIS) to near infrared (NIR) region of the spectrum, we designed a bichromophoric system based on a rhodamine fluorophore and a BODIPY photocage. Two-photon excited fluorescence (TPEF) measurements and quantum chemical calculations reveal excellent two-photon properties of the employed rhodamine derivative. Excitation of the rhodamine unit via a one- or two-photon process leads to excitation energy transfer (EET) onto the BODIPY part, which is followed by the liberation of the leaving group. Ultrafast transient absorption spectroscopy provides evidence for a highly efficient EET dynamics on a sub-500 femtosecond scale. Complementary quantum dynamical calculations using the multi-layer multiconfiguration time-dependent Hartree (ML-MCTDH) approach highlight the quantum coherent character of the EET transfer. Photorelease of *p*-nitroaniline (PNA) was investigated by UV/vis absorption spectroscopy by either excitation of the rhodamine or the BODIPY moiety. Even though a quantitative assessment of the PNA yield could not be achieved for this particular BODIPY cage, the present study provides a design principle for a class of photocages that can be broadly activated between 500 and 900 nm.

Received 3rd October 2021,  
Accepted 17th December 2021

DOI: 10.1039/d1cp04528h

rsc.li/pccp

### Introduction

The possibility to control chemical processes with light paved the way for numerous innovations in biological and medical science ranging from high resolution imaging techniques<sup>1</sup> to photodynamic therapy<sup>2–4</sup> and drug release.<sup>5,6</sup> Such applications favor excitation light of the so called “phototherapeutic window” (600–1000 nm) which provides less phototoxicity and deep tissue penetration due to little light scattering and competitive absorption.<sup>7</sup> Photolabile Protecting Groups (PPGs) that

operate in this area are rare and mainly include BODIPY-, xanthene- or cyanine-derived structures.<sup>8,9</sup> However, while demonstrating strong absorption, these compounds often lack efficient photorelease quantum yields.

Alternatively, photoactivation in the NIR region can be realized by two-photon absorption (2PA).<sup>10,11</sup> The tight spatial focus of 2PA (due to the quadratic dependence on the intensity of the incident light) offers a particular advantage for photorelease reactions in a physiological context since biological signaling molecules can be liberated with very high precision.<sup>12,13</sup> Unfortunately, most of the established PPGs show only little 2P response.<sup>14</sup> Efforts have been made to convert these compounds into better 2P absorbers by structural modifications, which resulted in the development of a number of 2P activatable photocages including *ortho*-nitrobenzyl,<sup>15,16</sup> coumarinyl,<sup>17,18</sup> nitroindolinyl<sup>19,20</sup> or quinoline<sup>21,22</sup> based chromophores. However, improvement of the 2P cross section  $\sigma_{2P}$  by such structural alterations often has an adverse effect on the photorelease quantum yield  $\Phi_{rel}$ .<sup>23</sup> Therefore high 2P action cross sections  $\delta_u$  (with  $\delta_u$  being the product of  $\sigma_{2P}$  and  $\Phi_{rel}$ )<sup>24</sup> are difficult to achieve. The idea to separate the absorption process from the uncaging process was realized by the development of cooperative dyads based on photoinduced electron

<sup>a</sup> Institute of Physical and Theoretical Chemistry, Goethe University Frankfurt, Max-von-Laue Straße 7, 60438 Frankfurt am Main, Germany.

E-mail: burghardt@chemie.uni-frankfurt.de, wveitl@theochem.uni-frankfurt.de

<sup>b</sup> Institute of Organic Chemistry and Chemical Biology, Goethe University Frankfurt, Max-von-Laue Straße 7, 60438 Frankfurt am Main, Germany

E-mail: heckel@uni-frankfurt.de

† Electronic supplementary information (ESI) available: General procedures; chemical synthesis; experimental details; steady-state absorption/fluorescence experiments; two-photon excitation fluorescence (TPEF) experiments of rhodamine compounds using rhodamine 6G as reference; fluorescence lifetimes of rhodamine compounds; ultrafast transient absorption measurements; electronic structure calculations; excited state analysis; electronic coupling analysis; NMR- & mass spectra of new compounds. See DOI: 10.1039/d1cp04528h

‡ These authors contributed equally.

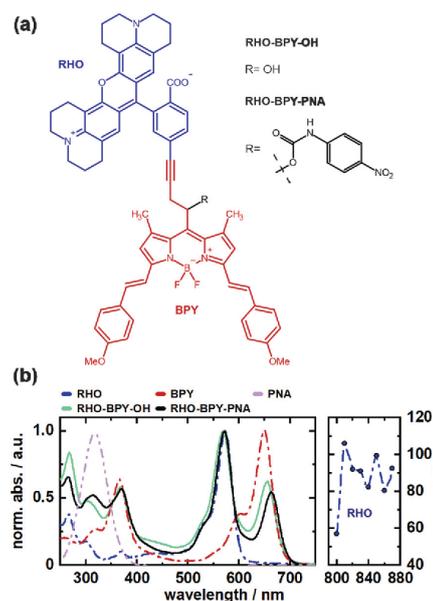


Fig. 1 (a) Molecular structure of RHO-BPY-OH and RHO-BPY-PNA with rhodamine part (RHO) labeled blue and BODIPY part (BPY) labeled red. (b) Corresponding 1P absorption spectra of RHO-BPY-OH and RHO-BPY-PNA, as well as their corresponding individual constituents (left) and 2P absorption cross section of RHO (right) in MeOH.

transfer (PET),<sup>25</sup> fluorescence resonance energy transfer (FRET)<sup>26</sup> or triplet-triplet energy transfer (TT-ET).<sup>27</sup> In 2013 the Blanchard-Desce group introduced a FRET-based tandem system for enhanced two-photon uncaging which was further optimized to reach record two-photon action cross section of estimated 20 GM at 710 nm.<sup>28</sup> In 2018 we presented a related system with special focus put on the electronic interactions between the coactive chromophores.<sup>29</sup>

In this work we investigate the excitation energy transfer (EET) dynamics in a one- and two-photon sensitive uncaging system based on covalently linked rhodamine (RHO) and BODIPY (BPY) chromophores (Fig. 1a). Rhodamine was chosen as 2P donor molecule since this class of fluorophores features high stability and brightness as well as outstanding 2PA properties.<sup>30,31</sup> In our experiments, the conformationally rigid X-type rhodamine showed superior 2PA response between 810 and 870 nm compared to other alkylated rhodamines (Fig. S3, ESI†). A styryl-substituted BODIPY photocage with red-shifted absorption served as suitable EET acceptor. The two chromophores were connected *via* a rigid alkyne linker to prevent electronic interactions due to  $\pi$ -stacking. This dyad system undergoes an ultrafast EET on the sub-500 fs scale with high efficiency, which was shown by ultrafast transient absorption spectroscopy. Given that the transfer dynamics falls into a

non-Förster regime, high-dimensional quantum dynamical calculations were carried out which are in agreement with the observed time scale and provide an interpretation of the quantum coherent EET step.

To test the suitability of the dyad for an application as a PPG, *p*-nitroaniline (PNA) was inserted as model leaving group. Details of the synthesis of the depicted compounds can be found in the ESI.†

The absorption spectra of both, RHO-BPY-OH as well as RHO-BPY-PNA, reflect well the main bands of their individual constituents (Fig. 1b), which absorb from 500–600 nm (RHO) and 570–700 nm (BPY). In the UV region below 400 nm the spectral components are more overlapping. For both dyads the bands at around 250 nm can be attributed to a higher order transition of RHO, whereas the bands at 380 nm mostly originate from BPY. In contrast to RHO-BPY-OH, the dyad with an attached leaving group (PNA) has a broader and slightly red-shifted absorption around 300–320 nm. The spectrum of the sensitizer (RHO) extends into the NIR region by considering 2PA effects. With 2P action cross sections ( $\sigma_{2P}\Phi_F$ ) of 80–110 GM in the range of 810–870 nm, RHO shows excellent 2PA abilities similar to the values of other rhodamines found in the literature.<sup>32–35</sup> Such high GM values for rhodamines are usually explained by the corresponding  $S_0$ - $S_2$  transition, which is 1P forbidden due to its symmetry, and in turn strongly 2P active.<sup>36,37</sup>

## Results and discussion

### Time-resolved spectroscopy

In order to investigate the ultrafast dynamics of all compounds we employed UV/vis transient absorption spectroscopy. In the initial experiment on RHO-BPY-OH we used pump pulses with a central wavelength of 560 nm to account for an excitation of RHO. The bleaching of the RHO ground state (GSB<sub>1</sub>) is reflected in the negative signal around 550–620 nm (Fig. 2a). Correspondingly, the excited state of RHO becomes populated, which leads to an excited state absorption (ESA<sub>1</sub>) with a central wavelength of 470 nm. The rise of these signals is faster than the temporal resolution of this experiment, which is around 75 fs.

The decay, however, begins to occur on the 200–500 fs timescale, as can be seen in the lifetime density analysis (LDA) of the dataset. Simultaneously one can observe the rise of an additional bleaching signal (GSB<sub>2</sub>) centered at 670 nm, which corresponds to the BPY ground state absorption. This is easily visualized by comparing the transients at 575 nm and 670 nm (Fig. 2c). The bleaching signal at 575 nm decreases to 50% of its initial value in the first 300 fs after photoexcitation. On the same timescale GSB<sub>2</sub> reaches more than 90% of its maximum value. Hence we assume an efficient EET from RHO to BPY, which then levels off once an equilibrium with the locally excited RHO is formed.

In the same manner we can identify a delayed excited state absorption at 525 nm (ESA<sub>2</sub>) with a similar rise time as GSB<sub>2</sub>,

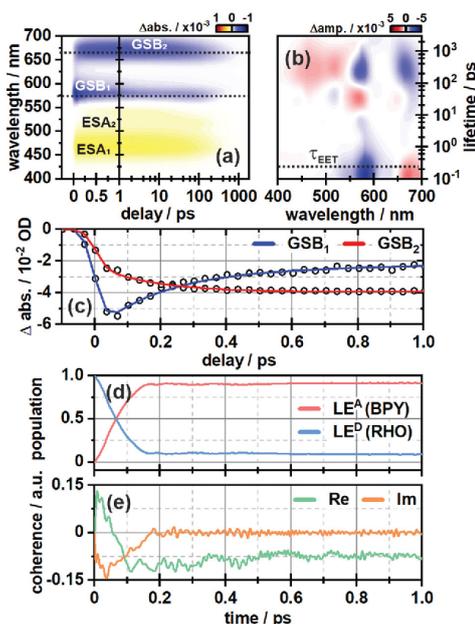


Fig. 2 (a) Ultrafast transient absorption dataset of RHO-BPY-OH (in MeOH) and (b) its corresponding lifetime density analysis. The time of energy transfer  $\tau_{\text{EET}}$  is highlighted by the dashed line. (c) Transients of GSB<sub>1</sub> and GSB<sub>2</sub>, which are indicative for the EET from RHO to BPY. (d) Population of the locally excited states at the BODIPY (LE<sup>A</sup>) and the rhodamine moiety (LE<sup>B</sup>) as a function of time derived from quantum dynamical calculations. (e) Corresponding coherences according to eqn (3).

which indicates an excited state absorption of BPY. Unlike GSB<sub>1</sub>, ESA<sub>1</sub> does not show a corresponding decay component. This can be explained by comparing the excited state dynamics of the isolated RHO and BPY, respectively (Fig. S5, ESI†). Whereas the ESA of RHO is centered around 470 nm (Fig. S5a, ESI†), BPY has a rather broad ESA with two main bands at 470 nm and 570 nm (Fig. S5c, ESI†). Therefore, the ESA<sub>1</sub> band of RHO-BPY-OH is actually a superposition of the RHO and BPY excited state absorptions. ESA<sub>2</sub> can then be considered as the residual shoulder of the BPY band at 570 nm, which partly overlaps with the GSB<sub>1</sub> signal.

In order to determine the possibility of electronic coupling, we also excited RHO-BPY-OH with 655 nm pulses, which should mainly target the BPY part of the molecule. Indeed, in this case the photophysics of RHO-BPY-OH is dominated by the ultrafast dynamics of BPY (Fig. S6, ESI†). However, one can also observe an additional bleaching component of RHO at 575 nm, which occurs on the 10–100 ps timescale. This could stem from a slight spectral overlap of the RHO absorption and the excitation pulses. On the earlier timescale, this band overlaps with (and is compensated by) the red shoulder of the BPY excited state

absorption, which is also apparent in the corresponding LDM (Fig. S6b, ESI†).

### Computational analysis

To interpret the spectroscopic finding of an ultrafast energy transfer from the donor fragment RHO to the acceptor fragment BPY, electronic structure calculations and a quantum dynamical analysis were performed for the considered dyad. Time-dependent density functional theory (TD-DFT) was employed to study the low-lying singlet excitations of the dyad. For the quantum-dynamical calculations, the multi-layer multi-configuration time-dependent Hartree (ML-MCTDH) method<sup>38–40</sup> was employed, based upon a linear vibronic coupling (LVC) Hamiltonian for two electronic states and 266 vibrational modes. Due to the ultrafast transfer dynamics, conventional FRET rates are not expected to give reliable results.

All electronic structure calculations were performed using DFT and TD-DFT as implemented in the Gaussian16 package.<sup>41</sup>

The ground state geometry was optimized using the B3LYP functional<sup>42,43</sup> and 6-31G\* basis.<sup>44</sup> Other functionals yielded implausible ground state geometries where the carboxylate group of the respective rhodamine fragment formed a lactone type ring with the  $\pi$ -system, leading to a loss of planarity, as discussed in the Fig. S8 (ESI†). The minimum geometry based on B3LYP was confirmed using the Hessian. Solvent effects (here, methanol) were accounted for by the Polarizable Continuum Model (PCM).<sup>45,46</sup>

Excited state calculations were performed by means of TD-DFT with the long-range corrected CAM-B3LYP functional<sup>47</sup> and 6-31G\* basis set. Quadratic response calculations using the same functional were carried out with the DALTON program package.<sup>48</sup> As detailed in the Table S2 (ESI†), benchmark calculations with other functional and basis set combinations were performed, from which we concluded that CAM-B3LYP/6-31G\* yields the most accurate description of the system with respect to state energies and two-photon absorption properties as compared to the experimental findings. This functional was also employed in ref. 49, where 2PA spectra of rhodamine 6G were computed.<sup>49</sup>

The excited state analysis of the RHO-BPY-OH dyad (Table 1) shows three spectroscopic (one-photon) bright states with excitation energies of 2.14 eV (579 nm), 2.86 eV (434 nm) and 3.43 eV (362 nm) followed by a dark state at 3.51 eV (354 nm). The first bright excited state (S<sub>1</sub>), is localized on the acceptor BPY fragment whereas the S<sub>2</sub> state is localized on the donor RHO fragment. The S<sub>3</sub> state is another BPY centered state while the subsequent dark state (S<sub>4</sub>), at 3.51 eV is again localized at the RHO fragment. The latter state (S<sub>4</sub>), is the two-photon active state as further explained below. These four excited states S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> and S<sub>4</sub> are illustrated in Fig. 3a.

For the quadratic response calculations, a smaller model system was used; *i.e.*, a slightly adapted dyad (referred to as “model” system (M) in the following, see ESI† Table S3) consisting of a dimethyl substituted Rho1 moiety and a BPY1 fragment without the *ortho*-methoxyphenyl substituent linked

**Table 1** Excited state energies, oscillator strengths and two-photon cross-sections for the four relevant states of RHO-BPY-OH and the model system Rho1-BPY1-OH, respectively, using the CAM-B3LYP functional and 6-31G\* basis

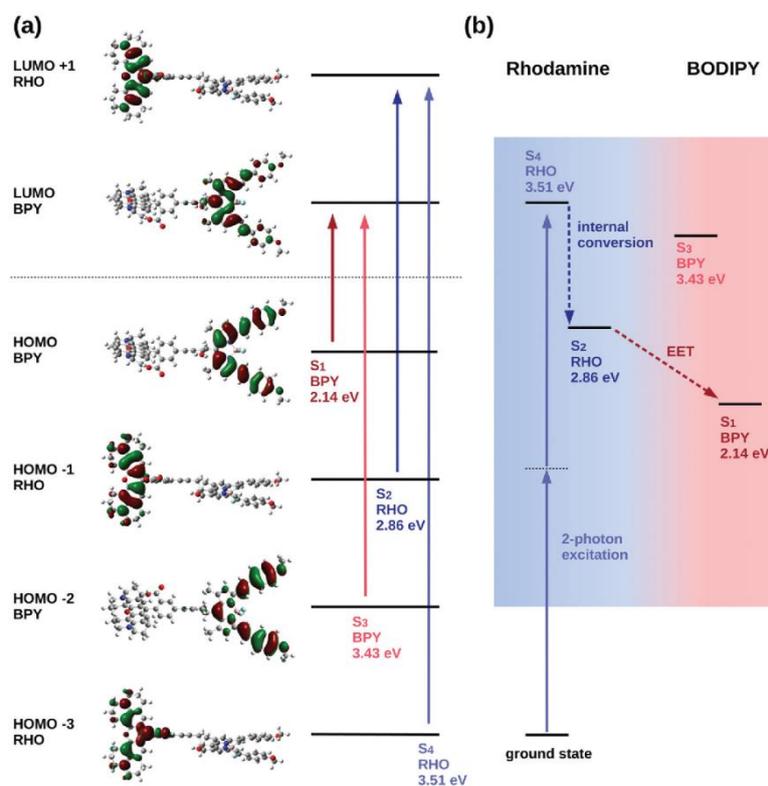
System		RHO-BPY-OH	Rho1-BPY1-OH (M)
S <sub>1</sub>	Excitation Energy [eV]	2.1413	2.8611
	Oscillator strength f	1.1307	0.5711
	$\sigma_{2P}$ [GM]		3.0
S <sub>2</sub>	Excitation Energy [eV]	2.8624	3.0616
	Oscillator strength f	1.0555	0.9615
	$\sigma_{2P}$ [GM]		27.5
S <sub>3</sub>	Excitation Energy [eV]	3.4293	3.5648
	Oscillator strength f	1.6060	0.3422
	$\sigma_{2P}$ [GM]		175
S <sub>4</sub>	Excitation Energy [eV]	3.5065	3.7837
	Oscillator strength f	0.0788	0.0559
	$\sigma_{2P}$ [GM]		5.1

through an acetylene bond. The excited state analysis of the model system turns out to be very similar to the original RHO-BPY system and exhibits the same orbital transitions contributing to the respective states (Fig. S11 and S12, ESI†). The S<sub>1</sub><sup>M</sup> state

is a bright state at 2.86 eV (433 nm) localized on the BPY1 moiety, the S<sub>2</sub><sup>M</sup> state is another bright state at 3.06 eV (405 nm) localized on the Rho1 fragment and the subsequent state, the S<sub>3</sub><sup>M</sup> state, is a dark state at 3.56 eV (348 nm), also localized on the Rho1 fragment.

The quadratic response calculation shows that the S<sub>3</sub><sup>M</sup> state has the highest two-photon absorption cross-section. That is, the S<sub>3</sub><sup>M</sup> state has a two-photon cross section  $\sigma_{2P}$  of 175 GM, whereas the S<sub>1</sub><sup>M</sup> and the S<sub>2</sub><sup>M</sup> states have two-photon cross-sections of 3 GM and 28 GM, respectively. The S<sub>3</sub><sup>M</sup> state exhibits the same orbital transitions as the S<sub>4</sub> state of RHO-BPY-OH and is, hence, considered the equivalent state in the model system. We therefore conclude that the S<sub>4</sub> state of RHO-BPY-OH is the two-photon active state.

From the assignments above, the following picture of the photochemical process results: following excitation by a two-photon pulse the molecule is first directly excited to the S<sub>4</sub> state in the case of RHO-BPY-OH (or the S<sub>3</sub><sup>M</sup> state in case of the model system Rho1-BPY1-OH). This is followed by internal conversion (IC) to the S<sub>2</sub>/S<sub>2</sub><sup>M</sup> state within the RHO/Rho1 fragment, and



**Fig. 3** (a) Frontier molecular orbitals involved in the excited electronic states of interest in RHO-BPY-OH. (b) Schematic illustration of the processes triggered by two-photon excitation of RHO-BPY-OH.

subsequently the energy is transferred *via* EET to the  $S_1/S_1^M$  state on the BPY/BPY1 fragment. A scheme representing these steps following the initial two-photon excitation is shown in Fig. 3b. The next higher state involving a transition on the BPY fragment is the  $S_3$  state of RHO-BPY-OH, also shown in Fig. 3. This state features a negligible admixture of transitions on the RHO fragment, such that there is no indication that the  $S_3$  state is involved in the IC step. Indeed, the IC can be understood as an intramolecular process within the RHO fragment, involving the  $S_4 \rightarrow S_2$  transition. In the following we assume that the IC and EET steps are sequential, but a more detailed analysis would allow for temporal overlap of these steps.

In the quantum dynamical analysis, we focus on the EET step, assuming that the preceding IC happens within tens of femtoseconds. Here, too, we refer to the smaller model system permitting to include the full set of  $N = 266$  vibrational modes; details are given in the ESI† (Sec. Excited state analysis of Rho1-BPY1-OH). An LVC model was parameterized based upon the electronic structure calculations complemented by excited state gradients. The LVC Hamiltonian reads as follows, using mass- and frequency weighted coordinates

$$\hat{H} = \sum_{i=1}^N \left( \frac{\omega_i}{2} (\hat{q}_i^2 + \hat{p}_i^2) + \sum_j \kappa_{i,j} \hat{q}_i |LE^j\rangle \langle LE^j| \right) + j_{DA} (|LE^A\rangle \langle LE^D| + |LE^D\rangle \langle LE^A|) + \Delta E \quad (1)$$

with  $\hat{q}_i$  being the position operator, the momentum operator  $\hat{p}_i = -i\hbar \frac{\partial}{\partial q_i}$ , the vibronic couplings  $\kappa_{i,j}$ , Coulombic EET coupling  $j_{DA}$  and the electronic offset  $\Delta E$ .

The Hamiltonian encompasses two diabatic electronic states, which here correspond to locally excited states (denoted  $LE^A$  and  $LE^D$ ). These locally excited (diabatic) states correspond to a very good approximation to the adiabatic  $S_1^M$  and  $S_2^M$  state of the Rho1-BPY1 model dyad obtained by the above electronic structure calculations. Furthermore, the Hamiltonian includes  $N = 266$  normal modes, among which  $N_A = 117$  modes are localized on the BPY1 (acceptor) fragment and  $N_D = 149$  modes are localized on the Rho1 (donor) fragment, respectively. The vibronic coupling constants  $\{\kappa_{i,j}\}$  are computed by projecting the gradient of the two relevant excited states at the Franck-Condon geometry onto the ground state normal modes. For this purpose, the CAM-B3LYP method had to be consistently used for the ground state geometry optimization and the excited state gradient calculation; thus, a constraint was introduced in order to match the CAM-B3LYP optimized geometry with the B3LYP reference geometry (see Fig. S14, ESI†). The normal-mode frequencies  $\{\omega_i\}$  were obtained by normal mode analysis for the donor and acceptor fragment respectively. Analysis of the spectral densities (that can be computed from the vibronic couplings, see ESI† eqn (S9)) shows, that the normal modes are localized either on the Rho1 or BPY1 fragment and only couple to one of the locally excited states  $LE^A$  or  $LE^D$  respectively. The electronic coupling  $j_{DA}$  (0.024 eV) was determined using a transition density cube (TDC) procedure,<sup>50</sup>

implemented in an in-house code as detailed in the ESI†. The coupling derives from the respective transition densities as follows<sup>51</sup>

$$j_{DA} = \iint \rho_D^{\text{el}}(\vec{r}_d) \frac{1}{|\vec{r}_d - \vec{r}_a|} \rho_A^{\text{el}}(\vec{r}_a) d\vec{r}_d d\vec{r}_a \quad (2)$$

with the transition densities  $\rho_D^{\text{el}}(\vec{r}_d) = \Psi_{D_g}(\vec{r}_d) \Psi_{D_e}^*(\vec{r}_d)$  and  $\rho_A^{\text{el}}(\vec{r}_a) = \Psi_{A_g}(\vec{r}_a) \Psi_{A_e}^*(\vec{r}_a)$ , where  $\Psi_{D_g}$ ,  $\Psi_{D_e}$ ,  $\Psi_{A_g}$  and  $\Psi_{A_e}$  are the donor and acceptor ground (g) and excited state (e) wavefunctions and  $\vec{r}_d$  and  $\vec{r}_a$  are the electron coordinates on the donor and acceptor fragment. The energy difference between the two relevant electronic states  $\Delta E$  (0.25 eV) was taken from the experimental absorption spectrum.

Fig. 2d shows the time-evolving diabatic populations of the two relevant states  $LE^A$  and  $LE^D$  and Fig. 2e depicts the time-evolving diabatic electronic coherence  $\rho_{DA}(t)$ . The latter was obtained by taking the trace over the electronic and vibrational degrees of freedom of the density operator  $\hat{\rho}(t) = |\Psi(t)\rangle \langle \Psi(t)|$  of the full electronic-vibrational system.

$$\rho_{DA}(t) = \text{Tr}\{|LE^A\rangle \langle LE^D| \hat{\rho}(t)\} \quad (3)$$

From the quantum dynamical analysis, an initial decay to the  $LE^A$  state mainly “localized” on the acceptor fragment BPY1, is found on a time scale of 200 fs. Although a bit faster than the experiment this is in good agreement with the time-resolved spectroscopic measurements where the energy transfer occurs on a 300 fs timescale (Fig. 2a–c). The coherence decays on a similar time scale; more precisely, the transient state-to-state population flux (corresponding to the imaginary part of the coherence), decays to zero, while the persistent real part indicates that the system tends towards a coherent superposition involving a non-zero admixture of the  $LE^D$  state ( $P_D \sim 0.1$ ) to the mainly populated  $LE^A$  state ( $P_A \sim 0.9$ ). The equilibrated donor population is possibly underestimated as compared with experiment, one of the reasons being that solvent effects were not explicitly included.

### Analysis of photocleavage

In order to investigate the proposed system in terms of photocleavage, we performed illumination experiments with high-power LEDs of 565 nm and 660 nm central wavelength, respectively. Irradiation of RHO-BPY-PNA with 565 nm light (Fig. 4a–c) results in a strong photobleaching at 300–400 nm and 580–700 nm, which correspond to the absorption bands of the BPY scaffold (see Fig. 1b). In contrast, the main absorption band of RHO at around 560 nm remains mostly intact. At the blue end of the spectrum, a new absorption feature at 300 nm arises. This difference band could indeed originate from liberated PNA, which is expected to absorb at 250–380 nm (Fig. 1b) and/or a blue shift due to the formation of a stable (leaving group free) photoproduct (Fig. 4b). The latter argument can be rationalized by the red-shifted absorption of RHO-BPY-PNA compared to the leaving group free reference compound RHO-BPY-OH in the spectral range of 280–350 nm (Fig. 1b).

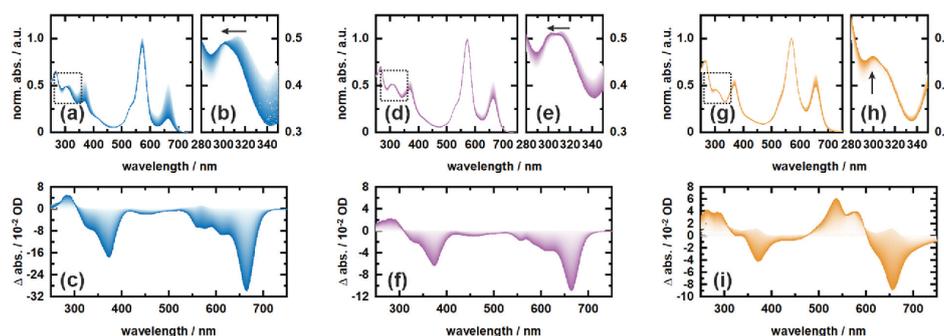


Fig. 4 Irradiation experiments of RHO-BPY-PNA (in MeOH) with 565 nm light (a–c) and 660 nm light (d–f), as well as irradiation of RHO-BPY-OH (in MeOH) with 565 nm light (g–i). (a), (d) and (g) depict the respective normalized spectra with a closer zoom in (b), (e) and (h) as indicated by the dashed boxes. (c), (f) and (i) show the respective difference spectra referenced to the initial dark measurement. The spectra were recorded in 30 s intervals in a total timeframe of 6000 s.

Strikingly, the illumination of the same sample with 660 nm light (Fig. 4d–f) leads to the same difference spectrum, albeit with a significantly weaker amplitude compared to the 565 nm illumination. On the one hand this underlines that direct excitation of either the RHO or BPY scaffold leads to the same photochemistry. On the other hand it further underlines the remarkable ability of RHO to collect photons due to its high extinction coefficient, as well as its very efficient energy transfer to BPY, which is reflected in the almost 3-fold signal amplitude upon excitation with 565 nm light. Unfortunately, the direct observation, and therefore a quantitative assessment, of PNA photorelease is challenging due to the strong spectral overlap of the PNA absorption with the relatively strong BPY band in the UV.

Therefore, we also irradiated RHO-BPY-OH with 565 nm light (Fig. 4g–i) as a control to substantiate our observation of photocleavage. The resulting difference spectrum (Fig. 4i) clearly differs from Fig. 4c and f. The two bleaching bands centered at 360 nm and 660 nm, which are again mainly due to BPY contributions, are each accompanied by a rise of a blue shifted absorption at 250–300 nm and 500–600 nm, respectively. Unlike RHO-BPY-PNA (Fig. 4b and e), no spectral blue-shift of the band around 300 nm is observed (Fig. 4h). The shapes of the difference bands in Fig. 4i also indicate a significant spectral overlap between reactant and product, which further underlines a different photochemistry compared to the illumination of RHO-BPY-PNA. Here, we assume that the excitation energy is mainly funneled into the cleavage or a disruption of the conjugation of the styryl-residues, which consequently leads to an intact but blue shifted BPY scaffold due to its reduced  $\pi$ -electron system. This is in contrast to results reported by Peterson *et al.*,<sup>52</sup> which show such a cleavage of a styryl residue only as a result of actual cargo release. However, they investigated a BODIPY system with a different leaving group and no additional rhodamine attached, which makes a direct comparison difficult.

## Conclusions

In conclusion, we developed a cooperative dyad based on a rhodamine fluorophore and a BODIPY photocage for one- or two-photon induced uncaging between 500 and 900 nm. This broad spectral window could be advantageous for applications and studies, which demand the usage of different excitation sources. The utilized X-rhodamine derivative displays high two-photon action cross sections ( $\sigma_{2P}\Phi_F$ ) of around 100 GM between 810 and 870 nm, covering parts of the phototherapeutic window. Investigation of the energy transfer from rhodamine to BODIPY by ultrafast transient absorption spectroscopy and quantum dynamics simulations revealed a very fast and efficient EET on the sub-500 fs timescale. Photolysis experiments were performed at 565 and 660 nm using *p*-nitroaniline as a leaving group. It can be deduced from the UV/vis spectra that PNA is released upon illumination. However, the quantification of the uncaging reaction remained challenging due to overlapping bands in the spectrum. Moreover, the employed BODIPY derivative is known for low uncaging quantum yields and photodecomposition, which can partly be compensated by the large extinction coefficient of rhodamine. Future work will therefore focus on identifying variants of the BODIPY moiety which improve its uncaging properties.

## Conflicts of interest

The authors declare no competing financial interest.

## Acknowledgements

We thank Jan von Cosel and Konstantin Falahati for providing the in-house implementation used to compute the electronic TDC coupling and Francesco Di Maiolo for useful discussions and help with preparing the figures. We gratefully acknowledge funding of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)

through the research training group “CLiC” (GRK 1986, Complex Light Control).

## Notes and references

- 1 W. Denk, J. H. Strickler and W. W. Webb, *Science*, 1990, **248**, 73–76.
- 2 J. D. Bhawalkar, N. D. Kumar, C.-F. Zhao and P. N. Prasad, *J. Clin. Laser Med. Surg.*, 1997, **15**, 201–204.
- 3 P. Majumdar, R. Nomula and J. Zhao, *J. Mater. Chem. C*, 2014, **2**, 5982–5997.
- 4 A. M. Durantini, L. E. Greene, R. Lincoln, S. R. Martínez and G. Cosa, *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, **138**, 1215–1225.
- 5 M. Matsuzaki, G. C. R. Ellis-Davies, T. Nemoto, Y. Miyashita, M. Iino and H. Kasai, *Nat. Neurosci.*, 2001, **4**, 1086–1092.
- 6 I. Elamri, C. Abdellaoui, J. K. Bains, K. F. Hohmann, S. L. Gande, E. Stirnal, J. Wachtveitl and H. Schwalbe, *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, **143**, 10596–10603.
- 7 C. Morville, J. Chaud, F. Bolze and A. Specht, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.*, 2021, **101**, 291–304.
- 8 R. Weinstein, T. Slanina, D. Kand and P. Klán, *Chem. Rev.*, 2020, **120**, 13135–13272.
- 9 L. Josa-Culleré and A. Llebaria, *ChemPhotoChem*, 2021, **5**, 298–316.
- 10 W. Denk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1994, **91**, 6629–6633.
- 11 P. Lipp and E. Niggli, *J. Physiol.*, 1998, **508**, 801–809.
- 12 G. C. R. Ellis-Davies, *Front. Synaptic Neurosci.*, 2019, **10**, 1–13.
- 13 G. C. R. Ellis-Davies, *Acc. Chem. Res.*, 2020, **53**, 1593–1604.
- 14 T. Furuta, S. S. H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk and R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, **96**, 1193–1200.
- 15 A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti and G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods*, 2006, **3**, 35–40.
- 16 Y. Becker, S. Roth, M. Scheurer, A. Jakob, D. A. Gacek, P. J. Walla, A. Dreuw, J. Wachtveitl and A. Heckel, *Chem. – Eur. J.*, 2021, **27**, 2212–2218.
- 17 J. P. Olson, H. B. Kwon, K. T. Takasaki, C. Q. Chiu, M. J. Higley, B. L. Sabatini and G. C. R. Ellis-Davies, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 5954–5957.
- 18 M. Bojtár, A. Korimos, K. Kis-Petik, M. Kellermayer and P. Kele, *Org. Lett.*, 2019, **21**, 9410–9414.
- 19 J. Morrison, P. Wan, J. E. T. Corrie and G. Papageorgiou, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, **1**, 960–969.
- 20 G. C. R. Ellis-Davies, M. Matsuzaki, M. Paukert, H. Kasai and D. E. Bergles, *J. Neurosci.*, 2007, **27**, 6601–6604.
- 21 Y. Zhu, C. M. Pavlos, J. P. Toscano and T. M. Dore, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 4267–4276.
- 22 C. Tran, T. Gallavardin, M. Petit, R. Slimi, H. Dhimane, M. Blanchard-Desce, F. C. Acher, D. Ogden and P. I. Dalko, *Org. Lett.*, 2015, **17**, 402–405.
- 23 I. Aujard, C. Benbrahim, M. Gouget, O. Ruel, J. B. Baudin, P. Neveu and L. Jullien, *Chem. – Eur. J.*, 2006, **12**, 6865–6879.
- 24 M. Abe, Y. Chitose, S. Jakkampudi, P. T. T. Thuy, Q. Lin, B. T. Van, A. Yamada, R. Oyama, M. Sasaki and C. Katan, *Adv. Synth. Catal.*, 2017, **49**, 3337–3346.
- 25 K. A. Korzycka, P. M. Bennett, E. J. Cueto-Diaz, G. Wicks, M. Drobizhev, M. Blanchard-Desce, A. Rebane and H. L. Anderson, *Chem. Sci.*, 2015, **6**, 2419–2426.
- 26 S. Picard, E. J. Cueto-Diaz, E. Genin, G. Clermont, F. Acher, D. Ogden and M. Blanchard-Desce, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 10805–10807.
- 27 G. Papageorgiou, M. Lukeman, P. Wan and J. E. T. Corrie, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, **3**, 366–373.
- 28 E. Cueto Diaz, S. Picard, M. Klausen, V. Hugues, P. Pagano, E. Genin and M. Blanchard-Desce, *Chem. – Eur. J.*, 2016, **22**, 10848–10859.
- 29 C. A. Hammer, K. Falahati, A. Jakob, R. Klimek, I. Burghardt, A. Heckel and J. Wachtveitl, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2018, **9**, 1448–1453.
- 30 M. Beija, C. A. M. Afonso and J. M. G. Martinho, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 2410–2433.
- 31 A. Nag and D. Goswami, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2009, **206**, 188–197.
- 32 C. Xu and W. W. Webb, *J. Opt. Soc. Am. B*, 1996, **13**, 481.
- 33 C. Xu, R. M. Williams, W. Zipfel and W. W. Webb, *Bioimaging*, 1996, **4**, 198–207.
- 34 M. A. Albota, C. Xu and W. W. Webb, *Appl. Opt.*, 1998, **37**, 7352–7356.
- 35 D. A. Oulianov, I. V. Tomov, A. S. Dvornikov and P. M. Rentzepis, *Opt. Commun.*, 2001, **191**, 235–243.
- 36 C. B. Milojevich, D. W. Silverstein, L. Jensen and J. P. Camden, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 14590–14592.
- 37 C. B. Milojevich, D. W. Silverstein, L. Jensen and J. P. Camden, *J. Phys. Chem. C*, 2013, **117**, 3046–3054.
- 38 H. Wang, *J. Phys. Chem. A*, 2015, **119**, 7951–7965.
- 39 M. H. Beck, A. Jäckle, G. A. Worth and H.-D. Meyer, *Phys. Rep.*, 2000, **324**, 1–105.
- 40 G. A. Worth, M. H. Beck, A. Jäckle and H.-D. Meyer, *MCTDH Package, Version 8.5.5*, Heidelberg University, 2016, <http://www.mctdh.uni-hd.de>.
- 41 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman and D. J. Fox, *Gaussian, Inc.*, Wallingford CT, 2016.
- 42 A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 5648.
- 43 P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski and M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**, 11623–11627.

- 44 W. J. Hehre, R. Ditchfield and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.*, 1972, **56**, 2257–2261.
- 45 S. Miertuš, E. Scrocco and J. Tomasi, *Chem. Phys.*, 1981, **55**, 117–129.
- 46 S. Miertus and J. Tomasi, *Chem. Phys.*, 1982, **65**, 239–245.
- 47 T. Yanai, D. P. Tew and N. C. Handy, *Chem. Phys. Lett.*, 2004, **393**, 51–57.
- 48 K. Aidas, C. Angeli, K. L. Bak, V. Bakken, R. Bast, L. Boman, O. Christiansen, R. Cimraglia, S. Coriani, P. Dahle, E. K. Dalskov, U. Ekström, T. Enevoldsen, J. J. Eriksen, P. Ettenhuber, B. Fernández, L. Ferrighi, H. Fliegl, L. Frediani, K. Hald, A. Halkier, C. Hättig, H. Heiberg, T. Helgaker, A. C. Hennum, H. Hettema, E. Hjertenæs, S. Høst, I.-M. Høyvik, M. F. Iozzi, B. Jansík, H. J. A. Jensen, D. Jonsson, P. Jørgensen, J. Kauczor, S. Kirpekar, T. Kjærgaard, W. Klopper, S. Knecht, R. Kobayashi, H. Koch, J. Kongsted, A. Krapp, K. Kristensen, A. Ligabue, O. B. Lutnæs, J. I. Melo, K. V. Mikkelsen, R. H. Myhre, C. Neiss, C. B. Nielsen, P. Norman, J. Olsen, J. M. H. Olsen, A. Osted, M. J. Packer, F. Pawłowski, T. B. Pedersen, P. F. Provasi, S. Reine, Z. Rinkevicius, T. A. Ruden, K. Ruud, V. V. Rybkin, P. Salek, C. C. M. Samson, A. S. de Merás, T. Saue, S. P. A. Sauer, B. Schimmelpfennig, K. Sneskov, A. H. Steindal, K. O. Sylvester-Hvid, P. R. Taylor, A. M. Teale, E. I. Tellgren, D. P. Tew, A. J. Thorvaldsen, L. Thøgersen, O. Vahtras, M. A. Watson, D. J. D. Wilson, M. Ziolkowski and H. Ågren, *WIREs Comput. Mol. Sci.*, 2014, **4**, 269–284.
- 49 R. Di Remigio, T. Giovannini, M. Ambrosetti, C. Cappelli and L. Frediani, *J. Chem. Theory Comput.*, 2019, **15**, 4056–4068.
- 50 B. P. Krueger, G. D. Scholes and G. R. Fleming, *J. Phys. Chem. B*, 1998, **102**, 5378–5386.
- 51 H. Tamura, J.-M. Mallet, M. Oheim and I. Burghardt, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 7548–7552.
- 52 J. A. Peterson, C. Wijesooriya, E. J. Gehrmann, K. M. Mahoney, P. P. Goswami, T. R. Albright, A. Syed, A. S. Dutton, E. A. Smith and A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**, 7343–7346.

## II. Rhodamine-Sensitized Two-Photon Activation of a Red Light-Absorbing BODIPY Photocage

R. Weber, K. Chok, S. Junek, C. Glaubitz, A. Heckel, *Chem. Eur. J.* **2023**, *29*, e202300149, DOI: 10.1002/chem.202300149.

### Beiträge der einzelnen Autoren:

Rebekka Weber

- Entwurf & chemische Synthese der untersuchten Moleküle
- Photophysikalische & photochemische Charakterisierung der untersuchten Moleküle
- Interpretation der Mikroskopiebilder
- Schreiben & Editieren des Manuskripts
- Erstellung der Abbildungen, Schemata und Tabellen

Kerby Chok

- Präparation der Liposomen
- Schreiben eines Teils der SI

Dr. Stephan Junek

- Aufnahme der fluoreszenzmikroskopischen Bilder
- Schreiben eines Teils der SI

Prof. Clemens Glaubitz

- Projektbetreuung

Prof. Alexander Heckel

- Projektbetreuung
- Editieren des Manuskripts

VIP  
Special  
Collection

# Rhodamine-Sensitized Two-Photon Activation of a Red Light-Absorbing BODIPY Photocage

Rebekka Weber,<sup>[a]</sup> Kerby Chok,<sup>[b]</sup> Stephan Junek,<sup>[c]</sup> Clemens Glaubitz,<sup>[b]</sup> and Alexander Heckel<sup>\*[a]</sup>

**Abstract:** Two-photon (2P) activatable probes are of high value in biological and medical chemistry since near infrared (NIR) light can penetrate deeply even in blood-perfused tissue and due to the intrinsic three-dimensional activation properties. Designing two-photon chromophores is challenging. However, the two-photon absorption qualities of a photocage can be improved with an intramolecular sensitizer, which transfers the absorbed light onto the cage. We herein present the synthesis and photophysical characterization of a

2P-sensitive uncaging dyad based on rhodamine 101 as donor fluorophore and a redshifted BODIPY as acceptor photocage. Liberation of *p*-nitroaniline (PNA) upon one-photon photolysis was confirmed by HPLC analysis. The photoreaction was found to be accompanied by a considerable change of the fluorescence properties of the chromophores. The possibility of a fluorescent read-out enabled the detection of two-photon induced uncaging by confocal fluorescence microscopy.

## Introduction

Photocaging is a well-established technique for the investigation and regulation of chemical and biological processes.<sup>[1]</sup> Photolabile protecting groups (PPGs), also called photocages, are chemical modifications used to suppress the activity of target compounds, like small molecules,<sup>[2]</sup> fluorophores,<sup>[3]</sup> neurotransmitter,<sup>[4]</sup> nucleic acids<sup>[5]</sup> or proteins.<sup>[6]</sup> By choosing the right wavelength,<sup>[7]</sup> light can act as harmless, non-invasive stimulus to restore their function, providing a high spatiotemporal control over the activation step.<sup>[8]</sup> Commonly used PPGs include *ortho*-nitrobenzyles,<sup>[9]</sup> coumarines,<sup>[10]</sup> quinolines,<sup>[11]</sup> BODIPYs,<sup>[12]</sup> xanthenes<sup>[13]</sup> and cyanines,<sup>[14]</sup> covering the whole UV/vis spectrum.

However, while being good one-photon absorbers, many of these structures lack sufficient two-photon absorption qualities. Two-photon absorption (2PA) offers the advantage of an

intrinsic three-dimensional resolution of the photoactivation and uses light in the NIR region, which provides deep tissue penetration and little phototoxicity.<sup>[15]</sup> The 2PA abilities of one-photon PPGs can be improved by certain chemical modifications.<sup>[16,17]</sup> Such alterations have, however, sometimes proven disadvantageous for other photophysical properties like the uncaging quantum yield.<sup>[18]</sup> In addition, reports of two-photon activation of BODIPY photocages are rare. This is due to the fact that water absorbs light beyond 1000 nm which would be required for the two-photon excitation of BODIPY.

In order to make an existing photocage, even BODIPY, accessible for 2PA without changing its core structure, it can be equipped with a suitable sensitizer which exhibits superior two-photon properties. In such cooperative multichromophoric systems, the two-photon donor is supposed to transfer the absorbed NIR light onto the photocage, which subsequently leads to an uncaging reaction (Figure 1).<sup>[19]</sup> Following this approach, 2P-sensitized photocages based on photoinduced electron transfer (PET),<sup>[20]</sup> triplet-triplet energy transfer (TT-ET)<sup>[21]</sup> or fluorescence energy transfer (FRET)<sup>[22]</sup> have previously been described. It has also been shown that the introduction of a

[a] R. Weber, Prof. Dr. A. Heckel  
Goethe University Frankfurt  
Institute for Organic Chemistry and Chemical Biology  
Max-von-Laue-Str. 7, 60438 Frankfurt am Main (Germany)  
E-mail: heckel@uni-frankfurt.de

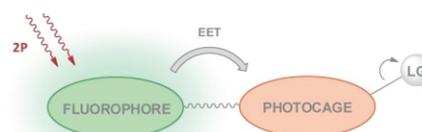
[b] K. Chok, Prof. Dr. C. Glaubitz  
Goethe University Frankfurt  
Institute for Biophysical Chemistry  
Max-von-Laue-Str. 9, 60438 Frankfurt am Main (Germany)

[c] Dr. S. Junek  
Max Planck Institute for Brain Research  
Max-von-Laue-Str. 4, 60438 Frankfurt am Main (Germany)

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/chem.202300149>

This manuscript is part of an Indo-German special collection.

© 2023 The Authors. Chemistry - A European Journal published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



**Figure 1.** Schematic depiction of a 2P-sensitized uncaging system. Two-photon (2P) absorption of the donor fluorophore is followed by intramolecular excitation energy transfer (EET) onto the photocage, which leads to the liberation of a leaving group (LG).

two-photon donor can have a positive effect on the one-photon uncaging quantum yield of a photocage.<sup>[23]</sup>

In the literature, there is only one example of a rhodamine photocage.<sup>[24]</sup> However, we considered rhodamines to be excellent candidates for two-photon donors in synergistic uncaging dyads, because they possess high two-photon absorption cross-sections while retaining relative small molecular size and providing good water solubility.<sup>[25]</sup> The advantage of their absorption behavior is that 2PA in higher electronic states than  $S_1$  is possible, enabling two-photon activation between 700 and 900 nm.

In our previous work, we presented a molecular dyad consisting of a rhodamine as two-photon donor fluorophore and a styryl-substituted red-absorbing BODIPY as acceptor photocage.<sup>[26]</sup> Two-photon excited fluorescence (TPEF) measurements indicated excellent 2PA properties of the used rhodamine derivative. A fast and efficient excitation energy transfer (EET) from rhodamine to BODIPY was confirmed by ultrafast transient absorption measurements and quantum dynamical calculations. Irradiation with yellow or red light led to the liberation of the leaving group, which could be verified qualitatively by UV/vis absorption measurements. However, quantification of the photorelease efficiency was difficult due to the low uncaging quantum yield of the utilized BODIPY photocage. Additionally, photodecomposition of the cage, which is known to occur to styryl-substituted BODIPYs due to photooxidation of the double bond, complicated the read-out.<sup>[27]</sup> These limitations further impeded the analysis of the two-photon uncaging properties of our previous dyad. In this study, we present an optimized rhodamine-BODIPY dyad with higher stability and improved uncaging efficiency.

We furthermore address the difficulty of measuring two-photon uncaging. In general, the characterization of two-photon induced effects is challenging since 2PA is a microscopic event confined to an activation volume of few femtoliters.<sup>[28]</sup> Most analytical methods require a far larger sample amount. Yet a fast enough movement of the laser beam through the sample to prevent illumination of already activated areas is hardly feasible.<sup>[29]</sup> As a consequence, inhomogeneity of uncaged regions and photodamage due to extensive two-photon irradiation would complicate the interpretation of such experiments.

Therefore, laser scanning fluorescence microscopy is often the method of choice since fluorescent signals are very sensitive and small areas of a sample can be activated and monitored. However, the observed structures need to be locally fixed in order to prevent diffusion out of the narrow activation window of 2PA. Molecular immobilization techniques range from chemical bond formation to non-covalent interactions.<sup>[30]</sup> A favored way to immobilize biomolecules for fluorescence microscopy is to integrate them into hydrogels because the components of the gel do not exhibit comparative absorption in the UV/vis. Therefore, a linker to covalently bind to the polymers of the hydrogel is needed, which is not always easy to implement. Indeed, our own studies have shown that the addition of a linker can even inadvertently interfere with the photophysical properties of a chromophore.

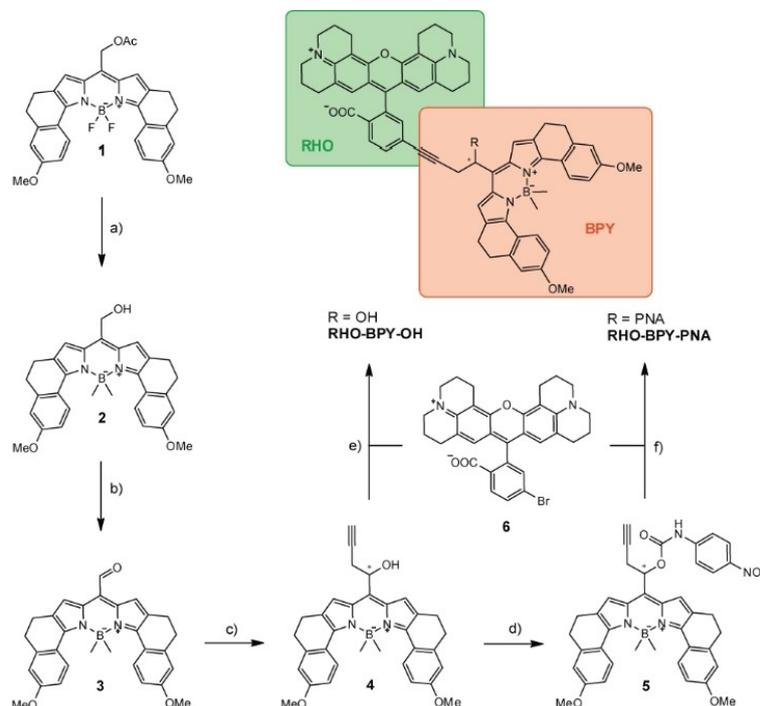
Hence, we were searching for immobilization methods, which would neither require chemical modification, nor affect the function of our uncaging dyad. Consequently, we asked ourselves if our compounds can be embedded in liposomes for the detection of two-photon uncaging of small molecules under the microscope.

## Results and Discussion

The synthesis of the fluorophore-photocage dyads is shown in Scheme 1. Rhodamine 101 was chosen as donor fluorophore since high two-photon action cross-sections ( $\sigma_{2p}\Phi_F$ ) of 80–110 GM between 810 and 870 nm have previously been determined via TPEF measurements.<sup>[26]</sup> The bromo-substituted rhodamine scaffold **6** was synthesized according to literature.<sup>[31]</sup> Winter et al. recently published the development of a new kind of red-absorbing BODIPY photocages with improved uncaging quantum yield by blocking unproductive deactivation channels by means of a rigidized molecular scaffold.<sup>[32]</sup> These compounds show up to 10<sup>3</sup>-fold increased uncaging quantum yield and higher photostability compared to their styryl-substituted predecessors due to the lack of free double bonds. The synthesis of BODIPY **1** was performed according to literature.<sup>[32]</sup> Reaction with methylmagnesium iodide yielded the boron-methylated BODIPY alcohol **2**, which was subsequently oxidized with Dess-Martin periodinane to produce aldehyde **3**. The introduction of the alkyne linker was done by Barbier reaction with zinc and propargyl bromide yielding intermediate **4**. *Para*-nitroaniline (PNA) was incorporated as leaving group (**5**) prior to the connection of the BODIPY and rhodamine unit via Sonogashira coupling, producing RHO-BPY-PNA. Additionally, a compound without leaving group RHO-BPY-OH was synthesized for comparison since it also represents the photolysis product of the caged dyad in aqueous solution. Detailed description of the synthetic procedure can be found in the Supporting Information.

The absorption spectra of the two dyads, measured in a 7:3 mixture of ACN and 0.1 M TEAA aqueous buffer are shown in Figure 2a. Each spectrum features two distinctive bands which can be assigned to the rhodamine absorption (~570 nm) and the BODIPY absorption (~630 nm), respectively. For comparison, the absorption spectra of the single chromophores are depicted in green (rhodamine **6**) and orange (BODIPY **4**). The molar absorption coefficients  $\epsilon$  were determined to be 65250 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> and 41120 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> at 571 nm and 638 nm, respectively, for RHO-BPY-PNA and 60140 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> and 42730 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> at 569 nm and 629 nm for RHO-BPY-OH (see Table 1).

One-photon irradiation experiments were performed with an LED at 565 nm. To this end, RHO-BPY-PNA was dissolved in a mixture of ACN/TEAA (7:3) at a concentration of 10  $\mu$ M. When stored in the dark, the chromophores remained stable in solution up to months. Upon illumination, the consumption of the starting material as well as the formation of photoproducts could be monitored via HPLC. The main photoproduct was identified as RHO-BPY-OH by comparing the HPLC retention



**Scheme 1.** Synthesis of the rhodamine-BODIPY dyads. a)  $\text{CH}_3\text{MgI}$  (10 equiv.), DCM rt, 1 h, 68%; b) Dess-Martin periodinane (1.3 equiv.), DCM, 0 °C, 1 h, 44%; c) Zn (10 equiv.), propargyl bromide (2.0 equiv.), DMF, 0 °C, 2 h, 73%; d) 4-nitrophenyl isocyanate (5.0 equiv.), TEA, toluene, 50 °C, 12 h, 72%; e) **6** (1.0 equiv.), **4** (1.4 equiv.),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0.1 equiv.), CuI (0.2 equiv.), TEA, n-propanol/MeOH, 80 °C, 3 h, 71%; f) **6** (1.0 equiv.), **5** (1.5 equiv.),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0.2 equiv.), CuI (0.4 equiv.), TEA, n-propanol/MeOH 80 °C, 3 h, 78%.

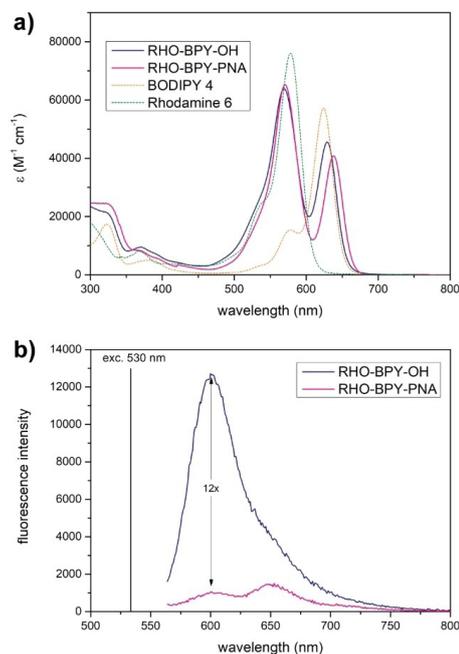
time and by high resolution mass spectrometry. Furthermore, the uncaging quantum yield of the photorelease of PNA was measured for RHO-BPY-PNA. The decrease of the starting material was monitored by HPLC at different time points with the addition of an internal standard. The photon flux of the employed LED was determined using a fulgide photoswitch as chemical actinometer.<sup>[33]</sup> With that, an uncaging quantum yield of  $\Phi_{\text{rel}} = 1.6\%$  was calculated for the irradiation at 565 nm (irradiation into the rhodamine band) and  $\Phi_{\text{rel}} = 1.0\%$  when irradiated at 625 nm (BODIPY band). These values are roughly in the same range as previously reported quantum yields for a similar BODIPY photocage.<sup>[32]</sup> The 1.6-fold increase of the uncaging quantum yield at 565 nm compared with 625 nm is in line with the ratio of the molar absorption coefficients at the

respective wavelengths (and therefore the better capability of rhodamine to collect photons), which indicates an efficient energy transfer from rhodamine to BODIPY.

An interesting feature of the dyads was found concerning their fluorescence properties. Figure 2b shows the fluorescence spectra of RHO-BPY-PNA and RHO-BPY-OH in ACN/TEAA (7:3) when excited at 530 nm (rhodamine band). The spectrum of RHO-BPY-PNA (pink line) displays two weak fluorescence bands, of which the red-shifted BODIPY fluorescence is a bit stronger. The appearance of BODIPY emission after rhodamine excitation proves an energy transfer between the two chromophores. The weakness of the signal is a result of fluorescence quenching by the leaving group. The fact that electron deficient aromatic moieties like PNA can act as quencher for BODIPY

**Table 1.** Photophysical properties of RHO-BPY-PNA and RHO-BPY-OH.

	$\lambda_{\text{abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{fl}}$ [nm]	$\epsilon$ [ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]	$\Phi_{\text{rel}}$ [%]
RHO-BPY-PNA	571 638	603 648	65250 (571) 41120 (638)	1.6 (565) 1.0 (625)
RHO-BPY-OH	569 629	598 639	60140 (569) 42730 (629)	–



**Figure 2.** a) Absorption spectra of RHO-BPY-OH (blue), RHO-BPY-PNA (pink), BODIPY 4 (dashed orange) and rhodamine 6 (dashed green) in ACN/TEAA (7:3). b) Fluorescence spectra of RHO-BPY-OH and RHO-BPY-PNA, each  $1 \mu\text{M}$  in ACN/TEAA (7:3), after excitation at 530 nm.

dyes as a consequence of PET has been reported in the literature.<sup>[27,34]</sup> Interestingly, the RHO-BPY-OH spectrum (blue line) shows only one band, which can be attributed to the rhodamine emission. In this dyad, the energy transfer seems to be suppressed and the excited state dynamics are dominated by the high fluorescence quantum yield of the rhodamine. Since RHO-BPY-OH is the main product of the photolysis of RHO-BPY-PNA, a considerable change in fluorescence intensity at 600 nm can be expected during the uncaging reaction. This change in fluorescence is a highly desirable feature in a photocage, as it can serve as an intrinsic feedback mechanism for the primary uncaging process for example in microscopy settings and for correlation with a different, possibly also fluorescent, reporter for the subsequent biological effect. It also encouraged us to perform two-photon uncaging experiments under a fluorescence microscope.

In order to investigate two-photon induced effects under the microscope, the sample needs to be immobilized due to the small activation volume of 2PA. One possibility is the covalent attachment of the chromophore to a surface or a hydrogel, for which a suitable linker is needed. However, our experience has shown, that such chemical modifications can have a huge influence on the photophysical properties of a

chromophore, possibly leading to divergent spectroscopic behavior. Searching for immobilization methods that are not based on direct attachment, but rather spatial confinement of molecules, we came up with the idea to embed our dyad in vesicles. RHO-BPY-PNA was successfully incorporated into unilamellar DOPC liposomes, yielding vesicles with a size of approximately 300–400 nm, each containing about 20.000 photocages (see Supporting Information).

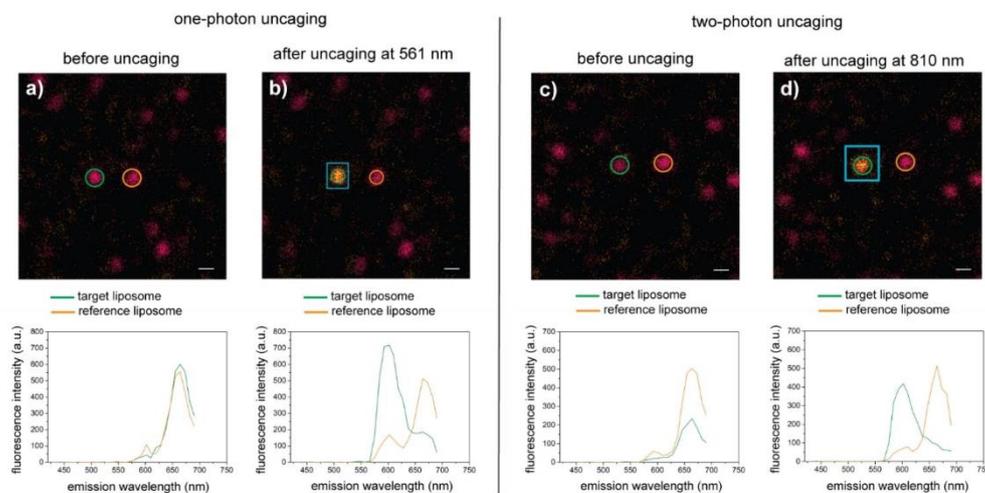
Subsequently, a suspension of RHO-BPY-PNA-containing liposomes in PBS buffer was subjected to confocal fluorescence microscopy (Zeiss LSM880 Examiner) using the spectral detector (Quasar detector) in “Lambda mode” to record the emission spectra of each pixel with a resolution of 8.6 nm. Selected liposomes were imaged using excitation at 561 nm ( $5 \mu\text{W}$ ,  $1 \mu\text{s}$  pixel dwell time).

The spectra in Figure 3 each include the emission spectra of a target liposome (green circle) used for irradiation and a reference liposome (orange circle). Figure 3a and 3c show that the fluorescence spectra before uncaging are in accordance with the previously recorded one (pictured in Figure 2b) featuring a weak band around 600 nm (rhodamine fluorescence) and a stronger one at 660 nm (BODIPY fluorescence). First, the one-photon uncaging experiment was performed. Therefore, a selected part of the sample (blue box in Figure 3b) was scanned with high intensity 561 nm light ( $1000 \mu\text{W}$ ,  $1 \mu\text{s}$  pixel dwell time). This was followed by a second acquisition of a fluorescence image (same settings as used for the first image). The expected shift of the fluorescence band towards 600 nm upon photolysis could be observed (Figure 3b) displaying a 16-fold fluorescence increase at this wavelength. For the two-photon experiment, a different liposome was irradiated at 810 nm ( $3000 \mu\text{W}$ ,  $4 \mu\text{s}$  pixel dwell time). Again, the desired fluorescence shift could be monitored, producing a 20-fold fluorescence intensity increase at 600 nm (Figure 3d). In summary, these experiments reveal that an uncaging reaction of our dyad occurs after both one- and two-photon activation of the rhodamine moiety.

## Conclusion

Two-photon activation of photolabile protecting groups is of high relevance since the cargo of interest can be released with three-dimensional precision using harmless NIR light that can penetrate deeply into even blood-perfused tissue. The two-photon uncaging ability of a photocage can be largely enhanced by the introduction of a suitable 2P donor. Rhodamines are excellent chromophores with many favorable properties, such as good photostability, water-solubility and high two-photon absorption cross-sections.

We know of only one example in which a rhodamine is used directly as photocage. On the other hand, BODIPY two-photon activation is not practical due to the high absorbance of water in the required spectral range. In the present study, we developed a combination of the best of both chromophore systems in the form of a dyad consisting of rhodamine



**Figure 3.** Confocal fluorescence microscope images of liposomes containing RHO-BPY-PNA. The spectra each display the emission of a target region used for irradiation (green circle) and a reference area (orange circle). The blue box indicates the area which was irradiated with high intensity light. a, b) One-photon photolysis (561 nm). c, d) Two-photon photolysis (810 nm). Scale bar 0.5  $\mu\text{m}$ .

101 as donor chromophore and a red-shifted BODIPY as acceptor photocage bearing PNA as a model leaving group.

Both one-photon irradiation into the rhodamine as well as the BODIPY chromophore result in release of PNA with the typical quantum yields for structurally similar BODIPY photocages. Interestingly, due to specific spectroscopic properties (for details see above) the fluorescence changes significantly in the uncaging process. This is a highly desirable spectroscopic readout that allows following the uncaging process for example in a microscope. This allowed us to demonstrate that uncaging of the rhodamine-sensitized BODIPY is indeed possible under two-photon conditions after immobilization in liposomes.

## Experimental Section

**Chemical synthesis:** Reagents and solvents were purchased from commercial suppliers. If not stated otherwise, reactions were performed under argon atmosphere and in dry solvents. Microwave reactions were conducted in a Biotage Initiator EXP EU microwave system using sealed microwave vials. Synthetic procedures of new compounds and their characterization can be found in the Supporting Information. NMR spectra were recorded at a 500 MHz device from Bruker. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained from a MALDI LTQ Orbitrap XL instrument from ThermoScientific.

**Absorption and fluorescence spectra:** Absorbance spectra were measured at a Jasco V-650 UV/vis absorption spectrometer in quartz cuvettes with a path length of 1 cm. The samples were diluted in ACN/TEAA (7:3) to yield an optical density between 0.1 and 1. Fluorescence spectra were obtained from a Tecan Infinite M200 Pro Plate Reader device. The measurements were

performed in black 96 well plates with a sample volume of 100  $\mu\text{L}$  (chromophore concentration 1–5  $\mu\text{M}$  in ACN/TEAA 7:3).

**Determination of uncaging quantum yields:** A stock solution of RHO-BPY-PNA was prepared by diluting the dyad in ACN/TEAA (7:3) to yield a concentration of 10  $\mu\text{M}$ . 2-Desoxyuridin was added as internal standard. The photolysis was performed with a 565 nm L3 LED (1000 mA, 60 mW) and a 625 nm L3 LED (1000 mA, 10 mW) from Thorlabs. The photon flux was determined using a fulgide photoswitch as chemical actinometer and in-house programmed software PHITS for data evaluation.<sup>[33]</sup> The course of photolysis was followed by irradiation of 50  $\mu\text{L}$  of stock solution at different time points and analysis by RP-HPLC with an Agilent 1260 Infinity device. The decrease of starting material was determined by the ratio of the peak area of the educt and the internal standard. The measurement at each time point was repeated three times and averaged. The parameters of the fitted photolysis curve were used to calculate the uncaging quantum yield.

**Liposome preparation:** Unilamellar vesicles (liposomes) were used to immobilize RHO-BPY-PNA. DOPC lipid bilayers containing the photocage were prepared by first mixing the chloroform-solubilized DOPC with the methanol-solubilized photocage at molar lipid to photocage ratio of 1000:1, yielding ~20.000 photocages per liposome. The mixture was dried under a stream of nitrogen gas followed by vacuum rotor evaporation. The dried lipid film was hydrated with PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) for 2 h at 32  $^\circ\text{C}$  and extruded 11 times at 24  $^\circ\text{C}$  through 200 nm polycarbonate membranes (Avanti Polar lipids). To remove unincorporated photocage, the liposomes were pelleted at 118.000  $\times g$  for 20 min. The supernatant was decanted and the pellet was resuspended in 1 ml of PBS. The liposomes were further diluted to a final concentration of  $\sim 10^9$  liposomes/ml and used for microscopy immediately.

**Confocal fluorescence microscopy:** Confocal fluorescence microscopy and laser-scanned uncaging was carried out on a Zeiss LSM880 Examiner equipped with a Ti: Sapphire laser for two-photon excitation (MaiTai HP DS, Newport) using a Zeiss C-Apochromat 40×/1.2 W objective. Spectrally resolved emission was acquired using the microscope's 32-channel GaAsP Quasar detector at a resolution of 8.6 nm. Images from this detector are displayed by merging the 32 channels according to their "natural" hue (Figure 3).

### Acknowledgements

We gratefully acknowledge funding of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) through the research training group "CLIC" (GRK 1986, Complex Light-Control). Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

### Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available in the supplementary material of this article.

**Keywords:** BODIPY · fluorescence spectroscopy · liposomes · rhodamine · two-photon uncaging

- [1] I. M. Welleman, M. W. H. Hoorens, B. L. Feringa, H. H. Boersma, W. Szymański, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 11672–11691.
- [2] G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619–628.
- [3] F. M. Raymo, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 14840–14850.
- [4] G. C. R. Ellis-Davies, *Acc. Chem. Res.* **2020**, *53*, 1593–1604.
- [5] B. K. Ruble, S. B. Yeldell, I. J. Dmochowski, *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *150*, 182–188.
- [6] T. Courtney, A. Deiters, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *46*, 99–107.
- [7] R. Klimek, P. G. Donlin-Asp, C. Polisseni, V. Hanff, E. M. Schuman, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 12683–12686.
- [8] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8572–8604.
- [9] I. Aujard, C. Benbrahim, M. Gouget, O. Ruel, J. B. Baudin, P. Neveu, L. Jullien, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6865–6879.
- [10] R. S. Givens, B. Matuszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6860–6861.
- [11] Y. Zhu, C. M. Pavlos, J. P. Toscano, T. M. Dore, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4267–4276.

- [12] T. Slanina, P. Shrestha, E. Palao, D. Kand, J. A. Peterson, A. S. Dutton, N. Rubinstein, R. Weinstain, A. H. Winter, P. Klán, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 15168–15175.
- [13] P. Šebej, J. Wintner, P. Müller, T. Slanina, J. Al Anshori, L. A. P. Antony, P. Klán, J. Wirz, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 1833–1843.
- [14] A. P. Gorika, R. R. Nani, J. Zhu, S. Macken, M. J. Schnermann, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14153–14159.
- [15] M. Abe, Y. Chitose, S. Jakkampudi, P. T. T. Thuy, Q. Lin, B. T. Van, A. Yamada, R. Oyama, M. Sasaki, C. Katan, *Synthesis* **2017**, *49*, 3337–3346.
- [16] M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning, H. L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3244–3266; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3292–3316.
- [17] Y. Becker, E. Unger, M. A. H. Fichte, D. A. Gacek, A. Dreuw, J. Wachtveitl, P. J. Walla, A. Heckel, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 2797–2802.
- [18] M. Klausen, V. Dubois, G. Clermont, C. Tonnelé, F. Castet, M. Blanchard-Desce, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 4209–4219.
- [19] M. Klausen, V. Dubois, J. B. Verlhac, M. Blanchard-Desce, *ChemPlusChem* **2019**, *84*, 589–598.
- [20] K. A. Korzycka, P. M. Bennett, E. J. Cueto-Diaz, G. Wicks, M. Drobizhev, M. Blanchard-Desce, A. Rebane, H. L. Anderson, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2419–2426.
- [21] G. Papageorgiou, M. Lukeman, P. Wan, J. E. T. Corrie, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 366–373.
- [22] S. Picard, E. J. Cueto-Diaz, E. Genin, G. Clermont, F. Acher, D. Ogden, M. Blanchard-Desce, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10805–10807.
- [23] C. A. Hammer, K. Falahati, A. Jakob, R. Klimek, I. Burghardt, A. Heckel, J. Wachtveitl, *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 1448–1453.
- [24] A. Paul, R. Mengji, M. Bera, M. Ojha, A. Jana, N. D. P. Singh, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 8412–8415.
- [25] A. Nag, D. Goswami, *J. Photochem. Photobiol. A* **2009**, *206*, 188–197.
- [26] M. Asido, C. Hamerla, R. Weber, M. Horz, M. S. Niraghatam, A. Heckel, I. Burghardt, J. Wachtveitl, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2022**, *24*, 1795–1802.
- [27] J. A. Peterson, C. Wijesooriya, E. J. Gehrmann, K. M. Mahoney, P. P. Goswami, T. R. Albright, A. Syed, A. S. Dutton, E. A. Smith, A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 7343–7346.
- [28] P. A. Shaw, E. Forsyth, F. Haseeb, S. Yang, M. Bradley, M. Klausen, *Front. Chem.* **2022**, *10*, 1–33.
- [29] M. A. H. Fichte, X. M. M. Weyel, S. Junek, F. Schäfer, C. Herbivo, M. Goeldner, A. Specht, J. Wachtveitl, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8948–8952; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 9094–9098.
- [30] M. Asal, Ö. Özen, M. Şahinler, H. T. Baysal, İ. Polatoğlu, *Sens. Rev.* **2019**, *39*, 377–386.
- [31] G. Mudd, I. P. Pi, N. Fethers, P. G. Dodd, O. R. Barbeau, M. Auer, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, DOI:10.1088/2050-6120/3/4/045002.
- [32] P. Shrestha, K. C. Dissanayake, E. J. Gehrmann, C. S. Wijesooriya, A. Mukhopadhyay, E. A. Smith, A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 15505–15512.
- [33] M. Reinfelds, V. Hermanns, T. Halbritter, J. Wachtveitl, M. Braun, T. Slanina, A. Heckel, *ChemPhotoChem* **2019**, *3*, 441–449.
- [34] T. Kobayashi, T. Komatsu, M. Kamiya, C. Campos, M. González-Gaitán, T. Terai, K. Hanaoka, T. Nagano, Y. Urano, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11153–11160.

Manuscript received: January 16, 2023

Accepted manuscript online: February 14, 2023

Version of record online: ■■, ■■

### III. A Blue Light and Two-Photon Activatable Rhodamine Fluorophore

R. Weber, S. Junek, A. Heckel, *Chem. Eur. J.* **2023**, e202300997, DOI: 10.1002/chem.202300997.

#### Beiträge der einzelnen Autoren:

Rebekka Weber

- Entwurf & chemische Synthese der untersuchten Moleküle
- Photophysikalische & photochemische Charakterisierung der untersuchten Moleküle
- Schreiben & Editieren des Manuskripts
- Erstellung von Abbildung 1&2, Schema 1 und Tabelle 1

Dr. Stephan Junek

- Belichtungsexperimente unter dem Fluoreszenzmikroskop
- Projektentwurf
- Schreiben & Editieren des Manuskripts
- Erstellung von Abbildung 3

Prof. Alexander Heckel

- Projektbetreuung
- Editieren des Manuskripts

Special  
Collection

## A Blue Light and Two-Photon Activatable Rhodamine Fluorophore

Rebekka Weber,<sup>[a]</sup> Stephan Junek,<sup>[b]</sup> and Alexander Heckel<sup>\*[a]</sup>

**Abstract:** Photoactivatable fluorophores (PAFs) are powerful tools for biological imaging applications because they provide spatiotemporal control of fluorescence distribution. Many of the existing PAFs can only be activated by UV irradiation. In our study, we present a blue light (1P) and NIR light (2P) activatable rhodamine fluorophore. Next to the description of

the synthesis and the investigation of the photoreaction, we demonstrate the use of our PAF in the context of laser scanning microscopy. By immobilization of our PAF in a hydrogel, we were able to write and read spatially resolved illumination patterns with excellent contrast after both one-photon and two-photon excitation.

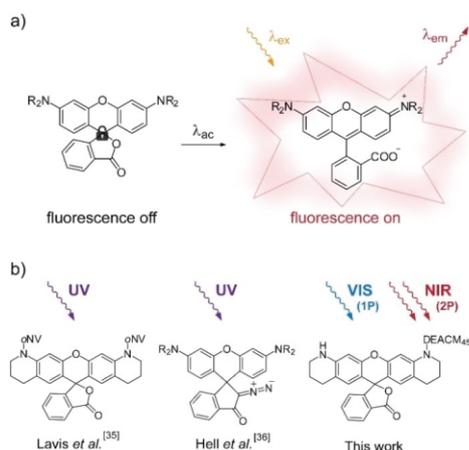
## Introduction

Experiments in life sciences frequently use light to investigate and manipulate biological specimen.<sup>[1,2]</sup> Many applications require very specific spatiotemporal illumination patterns. For this reason, optical setups, including microscopes, use a growing variety of ways to deliver the light, for example in form of focused laser beams,<sup>[3]</sup> TIRF illumination,<sup>[4]</sup> optical fibers<sup>[5]</sup> or by holographic projections.<sup>[6]</sup> A characterization of the intensity distribution is crucial for a well-controlled application of the illumination system. In many cases, this requires the direct integration of an (additional) imaging system,<sup>[6]</sup> which is often cumbersome or even impossible. We present a solution in the form of a photoactivatable fluorophore (PAF), immobilized in a hydrogel. After “writing” the illumination pattern into the hydrogel, it can be read out by any existing imaging system. Uncaging wavelengths in the visible range and a low refractive index (close to the one of water or biological samples) make the presented procedure particularly suited for illumination systems used for biological samples.

PAFs are molecules, which can be triggered to change from a nonemissive to an emissive form by means of a photochemical conversion.<sup>[7]</sup> This can for example be accomplished by the attachment of a photolabile protecting group (PPG) to

the fluorophore.<sup>[8]</sup> In the “caged” state, the molecule is weakly or not fluorescent because either its absorption spectrum differs significantly from the uncaged species or a radiationless decay from the excited state is favoured.<sup>[9]</sup> Upon illumination with the right activation wavelength  $\lambda_{ac}$ , the molecule is converted to its emissive form, delivering a fluorescent signal  $\lambda_{em}$ , when irradiated with the excitation wavelength  $\lambda_{ex}$  (Figure 1a).<sup>[10]</sup>

Light-activatable fluorescent probes include organic dyes,<sup>[11,12]</sup> fluorescent proteins<sup>[13,14]</sup> or quantum dots.<sup>[15,16]</sup> Organic fluorophores are especially well suited due their high brightness and photostability while retaining compact molecular size.<sup>[17]</sup> Since their electronic structure highly influences their photophysical properties, they can readily be optimized by chemical modifications.<sup>[18]</sup> To this end, photoactivatable acridinones,<sup>[19]</sup>



**Figure 1.** a) Schematic depiction of fluorescence activation. In the “caged” state, the rhodamine is locked in its nonemissive form. Upon illumination with  $\lambda_{ac}$  photochemical conversion to the zwitterionic form leads to a fluorescent signal  $\lambda_{em}$  after excitation with  $\lambda_{ex}$ . b) Examples of photoactivatable rhodamines from the literature and from this work.

[a] R. Weber, Prof. Dr. A. Heckel  
Department of Organic Chemistry and Chemical Biology  
Goethe University Frankfurt  
Max-von-Laue-Str. 7, 60438 Frankfurt am Main (Germany)  
E-mail: heckel@uni-frankfurt.de

[b] Dr. S. Junek  
Max Planck Institute for Brain Research  
Max-von-Laue-Str. 4, 60438 Frankfurt am Main (Germany)

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/chem.202300997>

This manuscript is part of an Indo-German special collection.

© 2023 The Authors. Chemistry – A European Journal published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

xanthenes,<sup>[20]</sup> coumarins,<sup>[21]</sup> BODIPYs,<sup>[22]</sup> fluoresceins,<sup>[23]</sup> carbopyronines<sup>[24]</sup> and rhodamines<sup>[25]</sup> as well as their carbo-<sup>[26]</sup> and silicon-substituted<sup>[27]</sup> derivatives have, amongst others, been described.

Rhodamine-related structures have proven to be superior candidates for photoactivatable fluorescent probes because they feature desirable characteristics like strong absorption and emission in the visible region, high photostability, good biocompatibility and versatile functionalization potential.<sup>[28]</sup> However, their main advantage is, that they exist in two isomeric forms: a closed nonfluorescent spirolactone and an open fluorescent zwitterion.<sup>[29]</sup> The dynamic equilibrium between the two forms is dependent on environmental conditions like solvent polarity and pH.<sup>[30]</sup>

However, there are also intrinsic factors influencing the ring-opening/-closing mechanism. It has been shown that different substituents on both the xanthene moiety as well as the *meso*-phenyl ring can direct the isomerisation reaction.<sup>[31]</sup> To this end, it is possible to force the molecule in one conformation by means of chemical modifications.

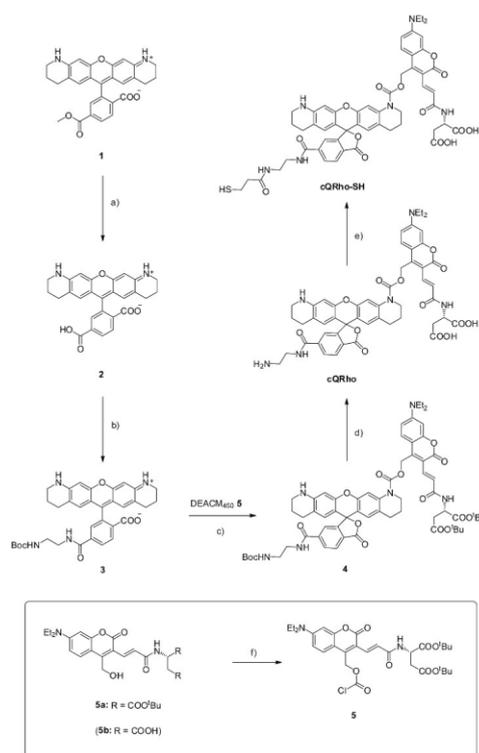
Following this concept, some light-activatable rhodamines have been developed before (Figure 1b). In most cases, *ortho*-nitrobenzyl type photocages are attached to the rhodamine nitrogen atoms via carbamate linkers.<sup>[32–34]</sup> The electron-withdrawing nature of these functionalities prevents the rhodamine from ring-opening, locking the molecule in its nonemissive form. Lavis et al. established an efficient synthetic route to *o*NV-caged 5(6)-carboxy-Q-rhodamines and successfully applied them to super-resolution microscopy.<sup>[35]</sup> However, UV light is needed for the photoactivation, which can be detrimental in a biological context. The group of Hell had developed rhodamine NN dyes.<sup>[36]</sup> They feature a diazoketone caging group incorporated into the spiro-xanthene fragment. Irradiation of these compounds leads to the liberation of nitrogen and the formation of a bright rhodamine derivative. Yet again, UV light is needed for the photoactivation. For biological applications, the activation wavelength should be well above 400 nm due to phototoxicity and low penetration depth of UV light and autofluorescence of cellular components.<sup>[37,38]</sup> Hence, it is much more important to characterize the intensity distribution of the visible light sources in a microscope. However, reports on visible light activatable rhodamines are quite rare. Lawrence et al. demonstrated fluorescence activation of rhodamine derivatives at 440 nm and 560 nm using a DEACM and a cobalamine caging group, respectively,<sup>[39]</sup> while Kele et al. presented a combination of click chemistry and blue light illumination (488 nm) of a vinyltetrazine-derivatized coumarin cage to activate a rhodol fluorophore.<sup>[40]</sup> Nevertheless, photocages other than *ortho*-nitrobenzyles are often bulky, rather lipophilic and require difficult synthesis protocols.<sup>[41]</sup> Moreover, the photocage and its photolysis by-products need to be spectrally distinguishable from the fluorophore so they do not interfere with the fluorescence read-out, which can be difficult to realise. Although not further discussed, there are also other approaches for fluorescence activation of rhodamine derivatives using visible light that deviate from the typical caging group-

based strategy, relying for example on light-induced oxidation<sup>[42]</sup> or enzymatic activity.<sup>[43]</sup>

Another way to circumvent the need for short-wavelength light in biology is two-photon excitation (TPE).<sup>[44]</sup> In order to be able to characterize TPE patterns it would be desirable to activate the PAF via TPE. For this purpose, we developed a photoactivatable rhodamine fluorophore, which can be triggered by both blue light (one-photon activation) and NIR light (two-photon activation), rendering spatially controlled fluorescent signals with three-dimensional precision.

## Results and Discussion

The synthesis of the photoactivatable rhodamine is shown in Scheme 1. The Q-rhodamine scaffold was chosen because it can be readily modified at the nitrogen atoms. Rhodamine **1** was built up according to an established rhodamine synthesis.<sup>[45]</sup> It



**Scheme 1.** Synthetic route of the formation of the photoactivatable fluorophore. a) NaOH, rt, 4 h, 63%; b) *N*-Boc-ethylenediamine, DIPEA, HATU, 0 °C → rt, 2 h, 30%; c) DIPA, 70 °C, 2 h, 79%; d) TFA, rt, 16 h, 99%; e) 3-mercaptopropionic acid, DIPEA, HATU, 0 °C → rt, 1 h, 18%; f) triphosgene, DIPEA, rt, 3 h.

features a methyl ester in 6'-position, which was subsequently hydrolysed with sodium hydroxide.

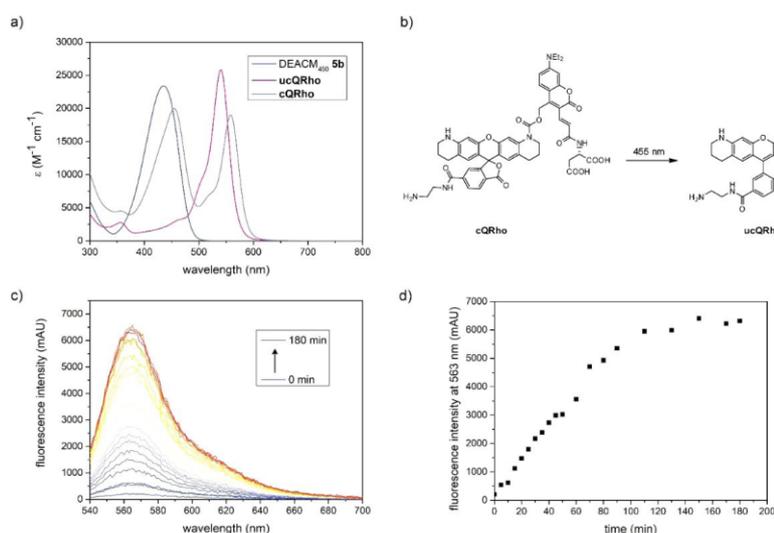
The resulting carboxyl substituent of rhodamine **2** offers broad possibilities for bioconjugation. In our case, a thiol linker was desired for the immobilisation of our compounds in a hydrogel. Subsequently, rhodamine **2** was reacted with *N*-Boc-ethylenediamine, forming rhodamine **3**. In the next step, the fluorophore was equipped with the photocage. DEACM<sub>450</sub> was selected as PPG since it features superior photophysical properties like a high molar absorption coefficient and uncaging quantum yield, providing excellent uncaging efficiency in the visible region. More importantly, this cage shows good two-photon absorption abilities, enabling activation with three-dimensional precision beyond 900 nm.<sup>[46]</sup> The DEACM<sub>450</sub> chloroformate intermediate was prepared from its 4-hydroxymethyl precursor **5a**, which was synthesized according to literature.<sup>[47]</sup> Activation with triphosgene yielding DEACM<sub>450</sub> **5** and direct reaction with rhodamine **3** under basic conditions produced the caged Q-rhodamine fluorophore **4**. Interestingly, only one photocage was attached to the rhodamine despite the excess of coumarin. In general, the introduction of caging groups to rhodamines is challenging due to the poor nucleophilicity of the nitrogen atoms. This is why strong electrophiles like chloroformates are needed.

The nature of substituents at the rhodamine scaffold further influences its reactivity, possibly hampering the installation of the cage. For instance, the reaction of carboxyl-substituted rhodamine **2** with DEACM<sub>450</sub> **5** showed no conversion at all. Next, compound **4** was reacted with trifluoroacetic acid for amine and carboxyl deprotection, yielding the caged rhod-

amine **cQRho**. For the immobilization of our photoactivatable fluorophore in a hydrogel, a thiol functionality was needed. Therefore, **cQRho** was reacted with 3-mercaptopropionic acid, producing **cQRho-SH**. Detailed description of the synthetic procedures can be found in the Supporting Information.

Subsequently, the photophysical properties of the caged rhodamine were investigated. **cQRho-SH** was used for this purpose, since the free thiol group of the latter is prone to oxidation (formation of disulfide bonds), leading to fluorophore dimers which can falsify the fluorescent read-out. Figure 2(a) displays the absorption spectrum of **cQRho** measured in a 7:3 mixture of ACN and 0.1 M TEAA aqueous buffer. It consists of two distinctive bands, which can be assigned to the coumarin absorption (~450 nm) and the rhodamine absorption (~550 nm). The spectra of the single chromophores **ucQRho** and DEACM<sub>450</sub> **5b**, which also represent the photolysis products of **cQRho**, are shown for comparison. The molar absorption coefficients of **cQRho** were determined to be 20100 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> at 455 nm and 19010 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> at 558 nm, respectively. The single chromophores **ucQRho** (25800 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> at 540 nm) and DEACM<sub>450</sub> **5b** (23400 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> at 435 nm) exhibit slightly higher molar absorption coefficients. For **cQRho**, a fluorescence quantum yield could not be determined by integrative methods, since it approaches zero. In contrast, the high fluorescence quantum yield of **ucQRho** ( $\Phi_f = 73\%$ ) indicates that the fluorophore is well suited for this application. The photophysical properties are summarized in Table 1.

Next, the uncaging reaction was investigated. Figure 2(b) is a schematic depiction of the photolysis of **cQRho**. Formation of **ucQRho** upon illumination at 455 nm was confirmed by HPLC



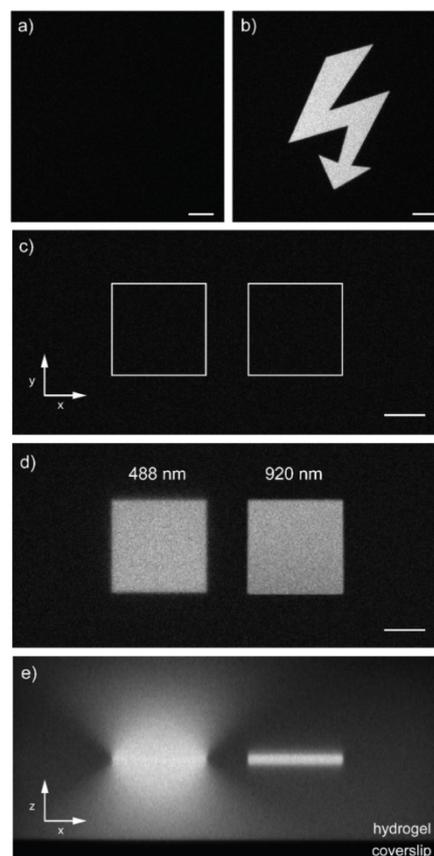
**Figure 2.** a) Absorption spectra of DEACM<sub>450</sub> **5b**, **ucQRho** and **cQRho** in ACN/TEAA (7:3). b) Schematic depiction of the uncaging reaction of **cQRho** forming uncaged fluorophore **ucQRho**. c) Photolysis of **cQRho** (2  $\mu$ M in ACN/TEAA 7:3) at 455 nm; fluorescence intensity in dependence of the irradiation time (fluorescence excitation at 500 nm). d) Fluorescence intensity at the maximum ( $\lambda_{fl}$  563 nm) in dependence of the irradiation time.

	$\lambda_{\text{abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{flu}}$ [nm]	$\epsilon$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	$\Phi_{\text{F}}$ [%]	$\Phi_{\text{rel}}$ [%]
cQRho	455	511	20100	–	0.01
	558	564	19010	–	
ucQRho	540	563	25800	73	–
DEACM <sub>450</sub> 5b	435	513	23400	29	–

analysis and high-resolution mass spectrometry. The course of the photoreaction could be monitored by fluorescence increase.

Therefore, a 2  $\mu\text{M}$  solution of cQRho in ACN/TEAA 7:3 was irradiated with an LED at 455 nm and fluorescence spectra were measured at different time points. In the dark (“caged”) state, the rhodamine is practically nonfluorescent after excitation at 500 nm. This is an important feature for the later application. With increasing irradiation time, a rise in fluorescence intensity could be observed, resulting in an overall 32-fold fluorescence increase (Figure 2c). The fluorescence intensities at the maxima ( $\lambda_{\text{flu}}=563$  nm) were plotted against the irradiation time (Figure 2d), displaying a pseudo first order kinetic, which is typical for clean A→B photoreactions without competing chromophore systems. Using in-house programmed software *PHITS* for data evaluation, an uncaging quantum yield of  $\Phi_{\text{rel}}=0.01\%$  was determined. This value is lower compared to uncaging quantum yields of other DEACM<sub>450</sub>-caged compounds reported in the literature.<sup>[47]</sup> We measured an additional fluorescence spectrum of the caged fluorophore cQRho after excitation into the coumarin band at 400 nm (Figure S6). It features a weak emission band around 510 nm, which can be attributed to the fluorescence of the coumarin caging group. During the photoreaction, not only a rise in rhodamine fluorescence was observed (compare Figure 2c), but also the coumarin emission increased when excited at 400 nm. This indicates that in the caged state, the fluorescence of the coumarin caging group is quenched by the rhodamine moiety and rises when the free coumarin photoproduct DEACM<sub>450</sub> 5b is formed.

However, the main objective was to demonstrate the use of our photoactivatable fluorescent probe in the context of high-resolution microscopy by “writing” and “reading” spatial patterns. For this purpose, we attached cQRho-SH to a thiol-reactive PVA-PEG hydrogel. We measured the refractive index of this hydrogel to be 1.353, i.e. close to the refractive index of water (1.333) and biological tissue (1.37–1.40). The hydrogel was then “sandwiched” between a microscope slide and a coverslip and placed under the objective of a laser-scanning microscope (LSM980 Observer, Zeiss). A fluorescent image was acquired using green excitation (561 nm) before and after photoactivation (Figure 3a and b). For photoactivation a user-defined region (arrow shape) was illuminated with blue light (488 nm) using the microscope’s scanning system. 488 nm was chosen as it is one of the most commonly used wavelengths in life sciences (e.g., used for the excitation of GFP,<sup>[48]</sup> GCaMP variants,<sup>[49]</sup> ChR2<sup>[50]</sup>). The photoactivation generated a stable fluorescent pattern with high spatial accuracy, even distribution



**Figure 3.** a) Confocal fluorescence image acquired before and b) after photoactivation. An arrow-shape was “written” into the hydrogel using the microscope’s laser-scanning unit. Images were acquired using excitation at 561 nm while 488 nm light was used for the photoactivation. Scale bar 50  $\mu\text{m}$ . c) Confocal fluorescence image acquired before and d) after photoactivating two square regions with 488 nm (left) or 920 nm (right) light. e) Confocal image stack acquired after photoactivation, shown in *x/z* view at the same scale and orientation as the image above (i.e., photoactivation pattern from 488 nm and 920 nm illumination left and right, respectively). The photoactivation with blue light follows the light propagation throughout the hydrogel, while the two-photon activation is restricted to a thin sheet around the focal plane of the objective. Scale bar 10  $\mu\text{m}$ .

of fluorophores and high contrast (approximately 13-fold increase in fluorescence).

We next investigated the possibility to read out activation patterns in 3D while at the same time testing whether the photoactivation can be achieved via two-photon excitation. We used a laser-scanning microscope (LSM880 Examiner, Zeiss) equipped with lasers for both one- and two-photon excitation for local photoactivation and fluorescent read-out. Using the

microscope's laser-scanning unit, two regions were illuminated, one with 488 nm light (for one-photon activation) and the other with 920 nm (for two-photon activation). 920 nm was chosen as it is probably the most commonly used wavelength for two-photon excitation in the life sciences.<sup>[49,51]</sup> The laser focus was positioned about 20  $\mu\text{m}$  below the coverslip. Fluorescent images taken by confocal scanning with excitation at 561 nm before and after photoactivation are shown in Figure 3(c and d). The fluorescence in the region illuminated with 920 nm demonstrates that photoactivation can also be achieved with high spatial precision using two-photon excitation at a wavelength relevant for biological imaging applications.

Following the acquisition of the image shown in Figure 3(d), an image stack was acquired by changing the distance between objective and sample after each frame (fluorescence excitation at 561 nm). The optical sectioning of the confocal microscope enables a precise mapping of photoactivated fluorophores in three dimensions. Figure 3(e) shows a "side-view" ( $x/z$ -view) of the acquired image volume (averaged across 8  $\mu\text{m}$  in the  $y$ -direction). In the case of one-photon excitation the photoactivation affected molecules throughout the hydrogel, resulting in a visualization of the light propagation through the sample. This results in the appearance of a double cone, whose opening angle is determined by the numerical aperture of the microscope's objective. In contrast, photoactivation by two-photon excitation is limited axially to a thin sheet of 3  $\mu\text{m}$  (slightly more than the 1.5  $\mu\text{m}$  predicted by the diffraction limit). Molecules below and above this sheet are not affected by the activation light due to the intrinsic axial confinement of the non-linear two-photon excitation. The immobilized PAF is thus suitable for generating stable patterns using both one- and two-photon excitation with wavelengths relevant for biological imaging and illumination systems.

## Conclusions

Fluorescence microscopy is an indispensable analytical tool in life sciences, for example enabling the observation of dynamic biological processes<sup>[52,53]</sup> or providing high-resolution images.<sup>[54–56]</sup> A thorough characterization of the required illumination pattern is crucial for such applications. To this end, photoactivatable fluorophores (PAFs) have proven very valuable, since they are able to deliver spatially resolved fluorescent signals triggered by light irradiation. We herein present the synthesis and photophysical characterization of a photoactivatable rhodamine fluorophore. In contrast to many established PAFs, which bear UV photocages, our compound can be activated by both 488 nm (one-photon activation) and 920 nm (two-photon activation), two very commonly used laser wavelengths for biological imaging and photomanipulation experiments.

We developed the DEACM<sub>450</sub>-caged Q-rhodamine derivative cQRho. In the caged state, the compound did not produce any considerable fluorescence after excitation into the rhodamine band. Upon illumination with blue light, however, a 32-fold increase in fluorescence intensity was observed and formation

of uncaged rhodamine ucQRho could be confirmed. We furthermore applied our PAF to confocal fluorescence microscopy. By immobilisation of our compound to a hydrogel, we were able to "write" and "read" spatial patterns. Fluorescence activation was achieved by both blue light (one-photon excitation) and NIR light (two-photon excitation). The ability to characterize TPE patterns is especially desirable for biological imaging applications due to the intrinsic three-dimensional resolution of the two-photon process and the usage of low-energy NIR light, which can penetrate deeply even into blood-perfused tissue.

## Experimental Section

**Chemical synthesis:** Reagents and solvents were purchased from commercial suppliers. If not stated otherwise, reactions were performed under argon atmosphere and in dry solvents. Microwave reactions were conducted in a *Biotage Initiator EXP EU* microwave system using sealed microwave vials. Synthetic procedures of new compounds and their characterization can be found in the Supporting Information. NMR spectra were recorded at a 500 MHz device from *Bruker*. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained from a MALDI *LTQ Orbitrap XL* instrument from *Thermo-Scientific*.

**Absorption and fluorescence spectra:** Absorption spectra were measured at a *Jasco V-650 UV/vis* absorption spectrometer in quartz cuvettes with a path length of 1 cm. The samples were diluted in ACN/TEAA (7:3) to yield an optical density between 0.1 and 1. Fluorescence spectra were obtained from a *Tecan Infinite M200 Pro Plate Reader* device. The measurements were performed in black 96 well plates with a sample volume of 50  $\mu\text{L}$  (chromophore concentration 2  $\mu\text{M}$  in ACN/TEAA 7:3).

**Determination of the uncaging quantum yield:** A 2  $\mu\text{M}$  stock solution of cQRho in ACN/TEAA (7:3) was prepared. The photolysis was conducted with a 455 nm L3 LED (1000 mA) from *Thorlabs*. The photon flux was determined using a fulgide photoswitch as chemical actinometer.<sup>[57]</sup> The course of the photoreaction was followed by irradiation of 50  $\mu\text{L}$  of the stock solution and measurement of a fluorescence spectrum at each time point. Data evaluation was performed by in-house programmed software PHITS.

**Confocal imaging and photoactivation:** A 120  $\mu\text{m}$  thick spacer was glued to a microscope slide, 12.4  $\mu\text{L}$  of the hydrogel were placed into the spacer and covered with a standard coverslip. Photoactivation and fluorescence imaging was carried out on confocal microscopes: Data for Figure 3(a and b) were acquired on a *LSM980 Observer (Zeiss)* with a *Plan-Apochromat 20x/0.8* objective. Photoactivation parameters: 488 nm, 6.6 mW, 8.2  $\mu\text{s}$  pixel dwell time, 0.4  $\mu\text{m}$  pixel pitch. Imaging parameters: 561 nm, 7.5  $\mu\text{W}$ , 1  $\mu\text{s}$  pixel dwell time, 0.4  $\mu\text{m}$  pixel pitch. Data for Figure 3(c–e) were acquired on a *LSM880 Examiner (Zeiss)* equipped with a Ti:Sa laser for two-photon excitation (*MaiTai HPDS, Spectra Physics*) and a *Zeiss C-Apochromat 40x/1.2 W* objective. Photoactivation parameters: 1P: 488 nm, 60  $\mu\text{W}$ , 45  $\mu\text{s}$  pixel dwell time, 0.11  $\mu\text{m}$  pixel pitch; 2P: 920 nm, 2.5 mW, 360  $\mu\text{s}$ , 0.11  $\mu\text{m}$  pixel pitch. Imaging parameters: 561 nm, 2  $\mu\text{W}$ , 2.3  $\mu\text{s}$  pixel dwell time, 0.11  $\mu\text{m}$  pixel pitch, thickness of optical sections 1  $\mu\text{m}$ , separation of optical sections 0.5  $\mu\text{m}$ .

## Acknowledgements

We gratefully acknowledge funding of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) through the research training group "CLIC" (GRK 1986, Complex Light-Control). Also, we thank Dr. Marvin Asido for the help in measuring fluorescence quantum yields. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

## Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interest.

## Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available in the supplementary material of this article.

**Keywords:** coumarin · fluorescence · photochemistry · rhodamine · two-photon excitation

- [1] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476.
- [2] R. Weinstein, T. Slanina, D. Kand, P. Klán, *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 13135–13272.
- [3] A. Singh, K. P. Gopinathan, *Curr. Sci.* **1998**, *74*, 841–851.
- [4] A. L. Mattheyses, S. M. Simon, J. Z. Rappoport, *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 3621–3628.
- [5] L. C. Moreaux, D. Yatsenko, W. D. Sacher, J. Choi, C. Lee, N. J. Kubat, R. J. Cotton, E. S. Boyden, M. Z. Lin, L. Tian, A. S. Tolia, J. K. S. Poon, K. L. Shepard, M. L. Roukes, *Neuron* **2020**, *108*, 66–92.
- [6] O. Hernandez, E. Papagiakoumou, D. Tanese, K. Fidelin, C. Wyart, V. Emiliani, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, DOI:10.1038/ncomms11928.
- [7] Z. Thiel, P. Rivera-Fuentes, *Chimia* **2018**, *72*, 764–770.
- [8] L. Zhou, X. Zhang, Y. Lv, C. Yang, D. Lu, Y. Wu, Z. Chen, Q. Liu, W. Tan, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 5626–5631.
- [9] F. M. Raymo, *ISRN Phys. Chem.* **2012**, *2012*, 1–15.
- [10] F. M. Raymo, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 14840–14850.
- [11] E. A. Halabi, D. Pinotsi, P. Rivera-Fuentes, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–10.
- [12] M. Weber, T. A. Khan, L. J. Patalag, M. Bossi, M. Leutenegger, V. N. Belov, S. W. Hell, *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 451–458.
- [13] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 4258–4272.
- [14] A. Tao, R. Zhang, J. Yuan, *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124*, 1892–1897.
- [15] G. Han, T. Mokari, C. Ajo-Franklin, B. E. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15811–15813.
- [16] S. Jung, J. Park, J. Bang, J. Kim, C. Kim, Y. Jeon, S. H. Lee, H. Jin, S. Choi, B. Kim, W. J. Lee, C. Pack, J. Lee, N. K. Lee, S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 7603–7615.
- [17] E. Kozma, P. Kele, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 215–233.
- [18] J. B. Grimm, B. P. English, H. Choi, A. K. Muthusamy, B. P. Mehl, P. Dong, T. A. Brown, J. Lippincott-Schwartz, Z. Liu, T. Lionnet, L. D. Lavis, *Nat. Methods* **2016**, *13*, 985–988.
- [19] D. Warther, F. Bolze, J. Léonard, S. Gug, A. Specht, D. Puliti, X. H. Sun, P. Kessler, Y. Lutz, J. L. Vonesch, B. Winsor, J. F. Nicoud, M. Goeldner, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2585–2590.
- [20] J. A. Blake, M. Lukeman, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4127–4135.
- [21] Y. R. Zhao, Q. Zheng, K. Dakin, K. Xu, M. L. Martínez, W. H. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4653–4663.
- [22] T. Kobayashi, T. Komatsu, M. Kaniya, C. Campos, M. González-Gaitán, T. Terai, K. Hanaoka, T. Nagano, Y. Urano, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11153–11160.
- [23] G. A. Krafft, W. R. Sutton, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 301–303.
- [24] K. Kolmakov, C. Wurm, M. V. Sednev, M. L. Bossi, V. N. Belov, S. W. Hell, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 522–532.
- [25] S. Banala, D. Maurel, S. Manley, K. Johnsson, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 289–293.
- [26] J. B. Grimm, A. J. Sung, W. R. Legant, P. Hulamm, S. M. Matlosz, E. Betzig, L. D. Lavis, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1303–1310.
- [27] J. B. Grimm, T. Klein, B. G. Koepke, G. Shtengel, H. F. Hess, M. Sauer, L. D. Lavis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1723–1727.
- [28] J. B. Grimm, A. N. Tkachuk, L. Xie, H. Choi, B. Mohar, N. Falco, K. Schaefer, R. Patel, Q. Zheng, Z. Liu, J. Lippincott-Schwartz, T. A. Brown, L. D. Lavis, *Nat. Methods* **2020**, *17*, 815–821.
- [29] L. Wang, M. Tran, E. D'Este, J. Roberti, B. Koch, L. Xue, K. Johnsson, *Nat. Chem.* **2020**, *12*, 165–172.
- [30] W. Zhao, Q. Xia, *Comput. Theor. Chem.* **2014**, *1050*, 1–6.
- [31] W. Chi, Q. Qi, R. Lee, Z. Xu, X. Liu, *J. Phys. Chem. C* **2020**, *124*, 3793–3801.
- [32] A. N. Butkevich, M. Weber, A. R. Cereceda Delgado, L. M. Ostersehl, E. D'Este, S. W. Hell, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 18388–18393.
- [33] K. R. Gee, E. S. Weinberg, D. J. Kozlowski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2181–2183.
- [34] S. Hauke, A. Von Appen, T. Quidwai, J. Ries, R. Wombacher, *Chem. Sci.* **2016**, *8*, 559–566.
- [35] L. M. Wysocki, J. B. Grimm, A. N. Tkachuk, T. A. Brown, E. Betzig, L. D. Lavis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11206–11209.
- [36] V. N. Belov, C. A. Wurm, V. P. Boyarskiy, S. Jakobs, S. W. Hell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3520–3523.
- [37] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921.
- [38] C. Morville, J. Chaud, F. Bolze, A. Specht, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2021**, *101*, 291–304.
- [39] M. A. Priestman, T. A. Shell, L. Sun, H. M. Lee, D. S. Lawrence, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7684–7687.
- [40] M. Bojtár, K. Németh, F. Domahidy, G. Knorr, A. Verkman, M. Kállay, P. Kele, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 15164–15171.
- [41] V. N. Belov, G. Y. Mitronova, M. L. Bossi, V. P. Boyarskiy, E. Hebisch, C. Geisler, K. Kolmakov, C. A. Wurm, K. I. Willig, S. W. Hell, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 13162–13173.
- [42] A. Kormos, D. Kern, A. Egyed, B. Söveges, K. Németh, P. Kele, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 5425–5428.
- [43] E. A. Halabi, Z. Thiel, N. Trapp, D. Pinotsi, P. Rivera-Fuentes, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 13200–13207.
- [44] P. A. Shaw, E. Forsyth, F. Haseeb, S. Yang, M. Bradley, M. Klausen, *Front. Chem.* **2022**, *10*, 1–33.
- [45] G. Mudd, I. P. Pi, N. Fethers, P. G. Dodd, O. R. Barbeau, M. Auer, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, DOI:10.1088/2050-6120/3/4/045002.
- [46] J. M. Amatruddo, J. P. Olson, G. Lur, C. Q. Chiu, M. J. Hingley, G. C. R. Ellis-Davies, *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 64–70.
- [47] J. P. Olson, H. B. Kwon, K. T. Takasaki, C. Q. Chiu, M. J. Hingley, B. L. Sabatini, G. C. R. Ellis-Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5954–5957.
- [48] G. H. Patterson, S. M. Knobel, W. D. Sharif, S. R. Kain, D. W. Piston, *Biophys. J.* **1997**, *73*, 2782–2790.
- [49] H. Dana, Y. Sun, B. Mohar, B. K. Hulse, A. M. Kerlin, J. P. Hasseman, G. Tsegaye, A. Tsang, A. Wong, R. Patel, J. J. Macklin, Y. Chen, A. Konnerth, V. Jayaraman, L. L. Looger, E. R. Schreier, K. Svoboda, D. S. Kim, *Nat. Methods* **2019**, *16*, 649–657.
- [50] G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann, E. Bamberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13940–13945.
- [51] J. P. Rickgauer, D. W. Tank, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 15025–15030.
- [52] R. Klimek, P. G. Donlin-Asp, C. Polissenj, V. Hanff, E. M. Schuman, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 12683–12686.
- [53] K. Dakin, Y. R. Zhao, W. H. Li, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 55–62.
- [54] M. Fernández-Suárez, A. Y. Ting, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 929–943.
- [55] B. O. Leung, K. C. Chou, *Appl. Spectrosc.* **2011**, *65*, 967–980.
- [56] E. Wegel, A. Göhler, B. C. Lagerholm, A. Wainman, S. Uphoff, R. Kaufmann, I. M. Dobbie, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–13.
- [57] M. Reinfelds, V. Hermanns, T. Halbritter, J. Wachtveitl, M. Braun, T. Slanina, A. Heckel, *ChemPhotoChem* **2019**, *3*, 441–449.

Manuscript received: March 29, 2023

Accepted manuscript online: April 25, 2023

Version of record online: May 17, 2023