

**Synthese catecholbasierter Linker
zur Biofunktionalisierung von
Titandioxid-Nanoteilchen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich
genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Chem. Bianca Jessica Geiseler

aus

Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Stefan Bräse

Korreferent: Prof. Dr. Michael Meier

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2013

Für meinen Mann Oliver und meine Familie

1	Kurzzusammenfassung	6
2	Einleitung	8
2.1	Synthese der TiO ₂ -Nanopartikel	8
2.1.1	Nanopartikel-Synthese mittels Sol-Gel-Methode	9
2.1.2	Nanopartikel-Synthese mittels Mizellen und inverser Mizellen	10
2.1.3	Nanopartikel-Synthese mittels Hydrothermal-Methode	10
2.2	Eigenschaften und Anwendungen der Titandioxid-Nanoteilchen	11
2.2.1	Solarzellen	13
2.2.2	Photokatalyse	14
2.2.3	Reaktive Sauerstoffspezies und photodynamische Therapie	15
2.2.4	TiO ₂ -Nanoteilchen als Transporter von Wirkstoffen	18
2.2.5	TiO ₂ -Nanoteilchen als Biosensoren	19
2.3	Methoden zur Oberflächenmodifikation der TiO ₂ -Nanoteilchen	21
2.3.1	Bindungen von Liganden über elektrostatische Wechselwirkung an TiO ₂ -Nanopartikel	22
2.3.2	Bindungen von Liganden über Amid-Kupplung an TiO ₂ -Nanopartikel	24
2.3.3	Bindung von Liganden über Thiole an TiO ₂ -Nanopartikel	26
2.3.4	Bindung von Liganden über die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition an TiO ₂ -Nanopartikel	28
2.4	Biofunktionalisierung von TiO ₂ -Nanopartikeln	30
2.4.1	Biofunktionalisierung mit DNA	30
2.4.2	Biofunktionalisierung mit Peptiden	31
2.4.3	Biofunktionalisierung mit Proteinen	32
3	Aufgabenstellung	34
4	Ergebnisse und Diskussion	35
4.1	Synthesen der TiO ₂ -Nanoteilchen	35
4.1.1	Synthese mittels Hochtemperatur-Verfahren – Oleylamin-Methode	35
4.1.2	Sol-Gel-Synthese – Diethylenglykol-Methode	40

4.1.3	Ligandenfreie Synthese	42
4.2	Oberflächenmodifikation der TiO ₂ -Nanopartikel mit Maleinimid (15)	44
4.2.1	Synthese von Dopamin-Maleinimid (15) - bifunktioneller Catechol-Linker.....	44
4.2.2	Modifikationen der Nanopartikel mit Dopamin-Maleinimid (15)	46
4.2.3	Modifikationen der TiO ₂ -Nanopartikel mittels Michael-Addition	51
4.3	Synthese catecholbasierter Linker mit Azid- und Alkinfunktionen.....	82
4.3.1	Synthese des Alkin-Linkers ausgehend von Kaffeesäure 29	82
4.3.2	Synthese des Azid-Linkers ausgehend von Dopamin-Hydrochlorid (9a)	84
4.3.3	Kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition mittels Alkin 36.....	86
4.3.4	Kupferfreie 1,3-dipolare Cycloaddition	114
4.4	Synthese triethylenglykolbasierter Catechol-Linker.....	119
4.4.1	Synthese des catecholbasierten Azid-Linkers	119
4.4.2	Synthese des catecholbasierten Amin-Linkers.....	122
4.4.3	Synthese des catecholbasierten Maleinimid-Linkers	126
4.4.4	Synthese des catecholbasierten Säure-Linkers.....	129
4.4.5	Synthese des catecholbasierten Thiol-Linkers	132
4.4.6	Synthese des catecholbasierten Azidocumarins	134
4.5	Trifunktionelle Linker zur Modifikation der TiO ₂ -Nanopartikel	135
4.5.1	Bindung eines Farbstoffs an trifunktionellen Linker 88	136
4.5.2	Kupferkatalysierte Cycloaddition mit Oligonukleotid.....	138
4.6	Bestimmung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies nach der Bestrahlung der TiO ₂ -Nanoteilchen.....	143
4.6.1	TiO ₂ -Nanopartikel.....	143
4.6.2	Dopaminmodifizierte TiO ₂ -Nanopartikel	145
4.6.3	TiO ₂ -Nanostäbchen	147
4.6.4	Dopaminmodifizierte TiO ₂ -Nanostäbchen.....	148
5	Zusammenfassung und Ausblick	150
5.1	Synthese der TiO ₂ -Nanoteilchen.....	150

5.2	Oberflächenmodifikation der TiO ₂ -Nanoteilchen durch Michael-Additionen .	150
5.3	Oberflächenmodifikation der TiO ₂ -Nanoteilchen durch kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloadditionen.....	151
5.4	Triethylenglykolbasierte Linker.....	152
5.5	Modifikationen von trifunktionellen Linkern	152
5.6	Untersuchung der TiO ₂ -Nanoteilchen auf deren Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies.....	153
5.7	Ausblick	153
6	Experimenteller Teil	155
6.1	Allgemeines	155
6.2	Synthesevorschriften und analytische Daten	159
6.2.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften	159
6.2.2	Synthese der TiO ₂ -Nanopartikel - Diethylenglykol-Methode	160
6.2.3	Synthese der TiO ₂ -Nanoteilchen - Oleylamin-Methode	161
6.2.4	Synthese der TiO ₂ -Nanopartikeln - Ligandenfreie-Methode	161
6.2.5	Synthese und Charakterisierung der catecholbasierenden Verbindungen	161
6.2.6	Synthese und Charakterisierung der triethylenglykolbasierten Linker	177
6.2.7	Reaktionen mit verschiedenen Linkern.....	200
6.3	Reaktionen mit TiO ₂ -Nanoteilchen.....	209
6.3.1	Modifikation der TiO ₂ -Nanopartikel und Nanostäbchen.....	209
6.3.2	1,3-Dipolare Cycloaddition unter Kupferkatalyse auf der TiO ₂ -Nanopartikeloberfläche	214
7	Abkürzungsverzeichnis	217
8	Danksagung.....	220
9	Publikationsliste	222
10	Curriculum Vitae.....	223
11	Literaturverzeichnis	224

1 Kurzzusammenfassung

Titandioxid hat eine Vielzahl verschiedenster Anwendungsmöglichkeiten, sowohl in der Industrie als auch im täglichen Leben. Da es ungiftig ist und dabei chemische Stabilität zeigt, wird Titandioxid vor allem als Pigment in Farben und Lacken eingesetzt.^[1] Durch Reduktion der Größe in den Nanometer-Bereich kommt es zu Veränderungen der physikalischen, optischen und biologischen Eigenschaften.^[2] Aufgrund der vergrößerten Oberfläche der Titandioxid-Nanopartikel im Vergleich zu Titandioxid, weisen die Nanopartikel beispielsweise eine signifikante photokatalytische Eigenschaft auf, die von großer Bedeutung ist und bereits Anwendung in der photodynamischen Therapie findet.^[3] Diese Aktivität lässt sich auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, Singulett-Sauerstoff im Besonderen, zurückführen. Geringe Konzentrationen dieser Radikale sind an gewöhnlichen Zellfunktionen wie Apoptose beteiligt, während große Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies zu oxidativem Stress führen wodurch wichtige Zellkomponenten wie DNA, Proteine oder Lipide beschädigt werden.^[4] Um die Eigenschaft der Radikal-Produktion positiv zu nutzen, wird wasserlösliches und zellgängiges Titandioxid-Nanomaterial benötigt, welches durch Oberflächenmodifikationen zugänglich gemacht werden soll.

In der vorliegenden Arbeit wurden Titandioxid-Nanopartikel durch eine Hochtemperatur-Methode und das Sol-Gel-Verfahren hergestellt, die Variation der Reaktionszeiten der Hochtemperatur-Methode führte zu stabilen und definierten Anatas-Nanostäbchen. Eine ligandenfreie Synthese führte zu Nanopartikeln mit einer Größe zwischen fünf und sieben Nanometer, die trotz fehlender Stabilisierung der Oberfläche für vier Monate bei 5 °C Stabilität aufwiesen. Zur Modifikation der Titandioxid-Nanoteilchen wurden catecholbasierte, bifunktionelle Linker wie das Maleinimid **15** und das Alkin **36** synthetisiert, die durch Ligandenaustausch an die Nanopartikel-Oberfläche gebunden werden konnten. Ebenso konnten Bio-Nanohybride mit einem zellgängigen Peptid hergestellt werden. Zudem konnten sowohl die Michael-Addition^[5] als auch die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition an modifizierten Oberflächen der Titandioxid-Nanoteilchen mit Biomolekülen wie DNA erfolgreich angewendet werden. Die Synthese eines catecholbasierten Azidocumarin-Derivats **58a** führte nach erfolgreicher Reaktion mit DNA zu einem fluoreszierenden Komplex, der als „*self-reporting*“-Linker Verwendung findet. Die Synthese eines catecholbasierten Cyclooctins **63a** wurde realisiert, die kupferfreie Cycloaddition mit einem Oligonukleotid konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden. Ein Zugang zu wasserlöslichen Catechol-Linkern wurde durch den Einbau von Triethylenglykol geschaffen.

So konnte eine Vielzahl an bifunktionellen Molekülen mit unterschiedlichen Funktionalitäten hergestellt werden, die die Wasserlöslichkeit der Nanoteilchen deutlich verbessern. Der trifunktionelle Linker **88** konnte mit einem Farbstoff modifiziert werden und der Linker **47** mittels einer kupferkatalysierter Cycloaddition mit DNA verknüpft werden.

Weiterhin wurde die Fähigkeit der Radikalbildung anhand der Nanopartikel und Nanostäbchen im Vergleich zu kommerziellen Nanopartikeln untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass kleine Nanopartikel bei einer Wellenlänge von 254 nm reaktive Sauerstoffspezies produzieren. Aufgrund ihrer Größe können die Nanostäbchen Radikale bei 366 nm herzustellen, durch die Modifikation mit Dopamin-Hydrochlorid (**9a**) konnte in ersten Versuchen gezeigt werden, dass die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies nahezu komplett unterdrückt werden kann.^[6]

2 Einleitung

Die Nanotechnologie ist eines der sich am schnellsten entwickelnden Forschungsgebiete der heutigen Zeit. Partikel, die kleiner als 100 nm (10^{-7} m) sind, werden als Nanopartikel bezeichnet.^[7] Das Besondere an Nanopartikeln ist die Tatsache, dass sie sich in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften vom grobkörnigen Pendant teilweise stark unterscheiden können. Der Grund hierfür ist, dass sich die Oberfläche im Verhältnis zum Volumen vergrößert, so dass Nanopartikel mit einem Durchmesser von 10 nm 20% aller Atome und Partikel mit 2 nm bereits 80% an der Oberfläche aufweisen.^[2] Daher werden die Eigenschaften der Nanopartikel auch stark von Molekülen, die an die Oberfläche gebunden sind, geprägt. Nanopartikel können aufgrund der Elemente aus denen sie aufgebaut sind in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Unter anderem gibt es metallische Nanopartikel^[8], Quantenpunkte^[9] und metalloxidische^[10] Nanopartikel. Eine interessante Art der Nanopartikel stellt Titandioxid aus der letzten Gruppe da. Die Titandioxid-Nanopartikel (TiO_2) finden angesichts ihrer besonderen physikalischen und chemischen Eigenschaften und der großen Bandlücke (Anatas: 3.2 eV^[11], Rutil: 3.0 eV^[12]), immer größeres Interesse in unterschiedlichen Anwendungsbereichen.^[13] In den folgenden Kapiteln werden bekannte Methoden zur Herstellung von Titandioxid-Nanomaterial und unterschiedliche Anwendungsmöglichkeiten besprochen.

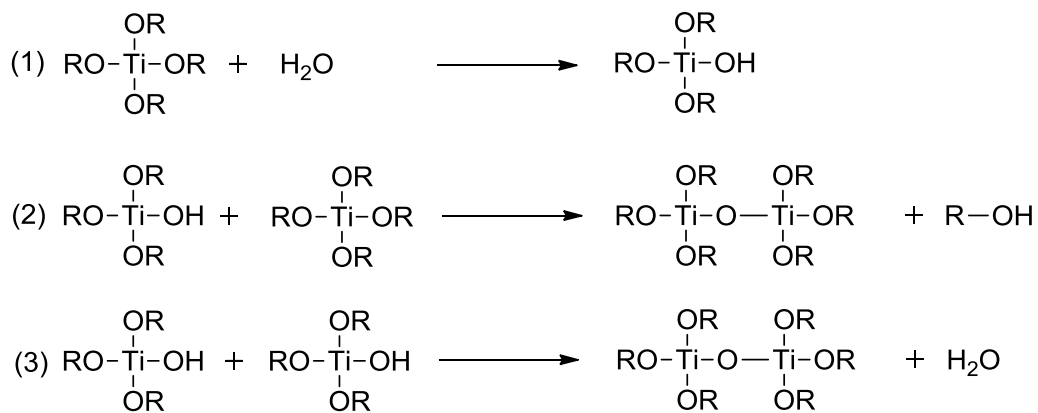
2.1 Synthese der TiO_2 -Nanopartikel

Bei der Synthese von Nanomaterial kann in chemische und physikalische Methoden unterschieden werden. Die physikalischen Verfahren beruhen auf dem „*top-down*“-Prinzip, welches eine Zerkleinerung der Materialien auf den Nanometerbereich beschreibt.^[14] Die chemischen Methoden beruhen auf dem „*bottom-up*“-Prinzip.^[15] Die Nanopartikel entstehen in diesem Fall durch einzelne Atome, die sich durch Selbstorganisation zu größeren funktionellen Einheiten zusammenfügen.^[16] Zur Darstellung der Titandioxid-Nanopartikel durch chemische Methoden wird in den meisten Fällen Titanchlorid oder ein Titanalkoholat als Ausgangsverbindung verwendet, sowie verschiedene Reagenzien zur Kontrolle der Größe und der Qualität der Nanopartikel. Weller *et al.* beispielsweise konnten das Wachstum der Nanokristalle beeinflussen, indem sie die Hydrolyse-Rate angepasst und Ölsäure als Oberflächenstabilisator bei 80 °C verwendet haben.^[11] Jun *et al.* wiederum haben Anatas-

Nanokristalle in nicht-wässrigem Medium mittels einer Hochtemperatursynthese bei 300 °C hergestellt.^[11] Je nach Syntheseart können verschiedene Formen an Nanostrukturen wie Nanostäbchen, Nanoröhren oder auch Nanosphären entstehen.

2.1.1 Nanopartikel-Synthese mittels Sol-Gel-Methode

Die Sol-Gel-Methode basiert auf einer anorganischen Polymerisationsreaktion, hierbei wird das Ausgangsmaterial durch Hydrolyse über ein Sol (kolloidale Dispersion) in ein Gel umgewandelt (Schema 1).^[17] Zur Herstellung der Partikel werden vorwiegend Halogenide oder Alkolate verwendet, wie beispielsweise Titanchlorid oder auch Titanisopropylat.^[18] Da Titanchlorid sehr reaktiv gegenüber Wasser ist, lässt sich der Hydrolyseschritt nur schlecht kontrollieren. Zusätzlich müssen Parameter wie pH-Wert^[19] und Temperatur^[17] konstant gehalten werden, da es sonst zu Veränderungen der Partikelform kommen kann. Untersuchungen von Sugimoto *et al.* zeigten zudem, dass der Ligand ebenfalls einen großen Einfluss auf die Größe und Gestalt der Nanoteilchen auswirken kann.^[20]



R = Alkyl

Schema 1: Allgemeines Schema einer Sol-Gel-Methode zur Synthese von TiO₂-Nanopartikel ausgehend von einem Titanalkoholat. Durch Hydrolyse entsteht ein Sol (1), welches durch anschließende Kondensation zum Gel wird (2-3).

Wie bereits erwähnt, müssen viele Parameter konstant gehalten werden, um gleichmäßige Nanopartikel zu synthetisieren. Aus diesem Grund wurde in den 90er Jahren ein Syntheseweg entwickelt, der nicht auf wässrigen Systemen beruht, sondern auf der Basis von Mizellen.^[21]

2.1.2 Nanopartikel-Synthese mittels Mizellen und inverser Mizellen

Mizellen und inverse Mizellen bilden kugelförmige Aggregate, in denen Nanopartikel entstehen und die Größe beziehungsweise die Form kontrolliert werden können (Abbildung 1).^[22] Grenzflächenaktive (amphiphile) Substanzen bilden in wässrigen Lösungen sphärische Aggregate, deren Oberfläche aus den hydrophilen Kopf und das Innere aus den hydrophoben Schwanz besteht. Im Gegensatz hierzu bilden sich inverse Mizellen indem der hydrophile Kopf nach innen zeigt, die hydrophoben Reste befinden sich außen im nicht-wässrigen Medium.^[23]

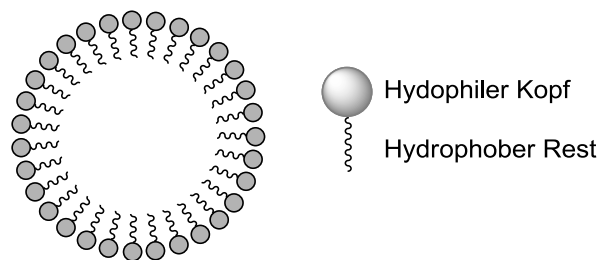


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Mizelle mit hydrophilem Kopf und hydrophobem Rest.

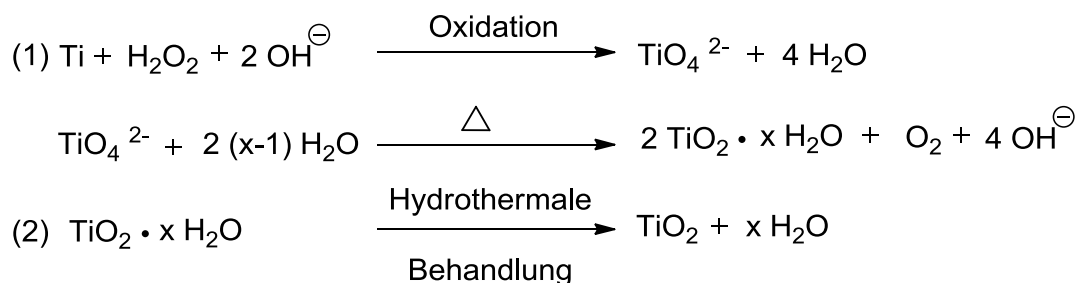
Durch den Raum, der im Inneren der Mizelle entsteht, kann Größe und Form der Nanopartikel kontrolliert werden^[21], zusätzlich dazu lässt sich Aggregation zu größeren Partikeln vermeiden.^[24] Die entstandenen Nanopartikel weisen zunächst amorphe Struktur auf, die durch Erhitzen in kristalline Strukturen überführt werden kann.^[25]

In inversen Mizellen entstehen Titandioxid-Nanopartikel über drei Stufen.^[26] Der erste Schritt ist die Hydrolyse eines Alkoholats in der Umgebung der inversen Mizelle, dabei entsteht durch anorganische Polymerisation ein Gel.^[27] Der nächste Schritt führt zu einer Ablagerung eines Gemischs aus anorganischen/organischen Filmen auf einem festen Substrat.^[25] Um die organischen Lösungsmittel zu entfernen und die finale, kristalline Nanopartikel-Struktur zu erhalten wird auf 450 °C erhitzt.^[26] Anstelle von amphiphilen Molekülen zur Herstellung von Titandioxid-Nanomaterial können auch Autoklaven dienen, die vorwiegend in der Hydrothermal-Methode Anwendung finden.

2.1.3 Nanopartikel-Synthese mittels Hydrothermal-Methode

Bei diesem Verfahren werden monodisperse und homogene Nanopartikel erzeugt. Somit handelt es sich um eine attraktive Technik um Titandioxid-Nanopartikel zu erzeugen, die

vorwiegend in der Keramik-Industrie genutzt wird.^[17] Ionische Lösungen werden erhitzt, wobei es zu einer Verdampfung des Lösungsmittels kommt. Dies wiederum führt zu einer Erhöhung des Drucks innerhalb des Autoklaven.^[28] Dadurch wird die Löslichkeit der Ionen verringert und Kristallisation sowie Keimwachstum finden statt. Durch den Druck und die Konzentration der ionischen Lösung kann die Größe der Nanopartikel kontrolliert werden.^[29] Eine Synthese ohne Autoklav wurde von Molloy *et al.* vorgestellt.^[30] Sie konnten Titandioxid-Pulver durch hydrothermale Wasserstoffperoxid-Oxidation herstellen, hierzu wurde metallisches Titan verwendet. Diese Synthese besteht aus zwei Schritten, der erste führt zur Bildung eines Gels durch Oxidation von Titan mit wässriger Wasserstoffperoxid-Lösung (1) und der hydrothermalen Behandlung (2) unter verschiedenen Bedingungen (Schema 2).



Schema 2: Hydrothermale Synthese von Titandioxid-Nanopartikeln nach Molloy *et al.*^[30]

Durch Verwendung von Säuren oder anorganischen Salzen können anstelle von Nanopartikeln, Nanostäbchen hergestellt werden. Auch in diesem Fall kann die Morphologie durch Zusetzen bestimmter Liganden und Variation der Lösungsmittel kontrolliert werden.^[31] Je nach Art der Synthese können verschiedene Formen, Strukturen und Größen von TiO_2 entstehen, die einen großen Einfluss auf die unterschiedlichen Eigenschaften der Titandioxid-Nanoteilchen ausüben.^[32]

2.2 Eigenschaften und Anwendungen der Titandioxid-Nanoteilchen

Das Element Titan zählt zu den zehn häufigsten Metallen der Erdkruste. Titandioxid existiert hauptsächlich in drei verschiedenen Modifikationen, Anatas (tetragonal, $a = b = 3.78 \text{ \AA}$, $c = 9.50 \text{ \AA}$), Rutil (tetragonal, $a = b = 4.58 \text{ \AA}$, $c = 2.95 \text{ \AA}$) und Brookit (rhomboedrisch, $a = 5.43 \text{ \AA}$, $b = 9.16 \text{ \AA}$, $c = 5.13 \text{ \AA}$) (Abbildung 2).^[33]

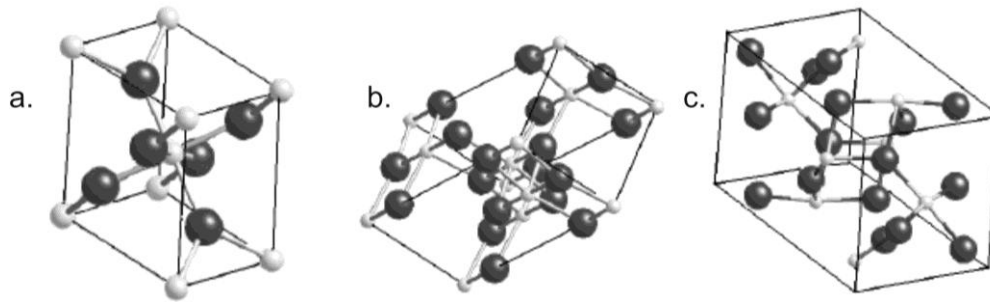


Abbildung 2: Strukturen von Titandioxid mit a. Rutil, b. Anatas und c. Brookit.^[34]

Die stabilste Modifikation ist Rutil, die metastabilen Strukturen Anatas und Brookit können durch Calcinieren bei Temperaturen über 915 °C in die stabile Rutil-Phase überführt werden.^[35] Die Struktur mit der höchsten photokatalytischen Aktivität ist Anatas.^[36] Diese Eigenschaft kann erhöht werden, wenn ein Gemisch aus verschiedenen Kristallstrukturen eingesetzt wird, am besten geeignet ist eine Mischung aus Anatas und Rutil.^[37] Zudem ist Titandioxid ein Halbleiter, die Elektronen im Valenzband sind durch eine Bandlücke vom Leitungsband getrennt. Durch Absorption von Lichtquanten einer Energie die größer ist, als die der Bandlücke, werden Elektronen vom Valenzband in das leere Leitungsband angeregt.^[38] Auf diese Eigenschaft wird in Kapitel 2.2.2 genauer eingegangen.

Aufgrund des geringen Preises und der hohen Stabilität finden die Titandioxid-Nanopartikel viele Anwendungsmöglichkeiten.^[39] Makroskopisches Titandioxid ist ein Material welches umweltschonend, ungiftig und korrosionsbeständig ist, daher wird es beispielsweise in Farben eingesetzt.^[40] Die Bandbreite der Anwendungen ist in den letzten Jahren stark angestiegen, so wird Titandioxid in beschlagverhindernden, selbstreinigenden Materialien verwendet, zudem in Oberflächenbeschichtungen und biomedizinischen Beschichtungen.^[41] Außerdem zählt es zu den am häufigsten verwendeten Weißpigmenten.^[42] Der Grund hierfür liegt an dem hohen Brechungsindex (abhängig von der Kristallform) und der damit verbundenen Deckkraft und einem guten Aufhellungsvermögen.^[43] Eine weitere Eigenschaft ist die Bioverträglichkeit, die Anwendungen in der Medizin ermöglicht. Hier wird Titandioxid in Desinfektionsmitteln und bei diagnostischen Untersuchungen eingesetzt.^[44] Nach Entdeckung der photokatalytischen Eigenschaften von Titandioxid durch Formenti *et al.* in den 90er Jahren findet Nano-Titandioxid Anwendung als Absorber von ultravioletter (UV) Strahlung und wird daher als physikalischer UV-Filter in Sonnencreme eingesetzt.^[45]

Wie bereits erwähnt, finden Anatas-TiO₂-Nanopartikel Anwendung als Photokatalysator. Die Partikel weisen ein höheres Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis als ihr entsprechendes grobkörniges („Bulk“) Material auf. Die große Oberfläche trägt zu einer Verstärkung der photokatalytischen Aktivität bei, diese Eigenschaft wird zum Beispiel zur Luft- oder

Wasserreinigung eingesetzt.^[46] Hierbei werden an der Nanopartikel-Oberfläche nach Absorption von UV-A-Strahlung in wässriger Umgebung Radikale gebildet. Diese reaktiven Spezies, wie beispielsweise Hydroxylradikale, besitzen ein hohes Potential Redoxreaktionen auszulösen und können organische Schadstoffe aus der Luft oder im Wasser oxidativ abbauen.^[47] Daraus resultieren radikalische Prozesse, die bis zur vollständigen Mineralisierung von verschmutztem Wasser führen können. Auf die Bildung und Anwendung der reaktiven Sauerstoffspezies wird in Kapitel 2.2.3 genauer eingegangen.

Eine vielversprechende Anwendung der Titandioxid-Nanopartikel liegt im Bereich der erneuerbaren Energien. Daher wurde die Verwendung der Nanopartikel aufgrund ihrer photokatalytischen Eigenschaften analysiert, um die Effizienz von Solarzellen zu verbessern.^[48]

2.2.1 Solarzellen

Bereits im Jahr 1980 beschrieben Dare-Edwards *et al.*^[49] eine Modifizierung von Titandioxid-Oberflächen mit Rutheniumbipyridyl (Abbildung 3), die sich O'Regan und Grätzel im Jahr 1991 zur Entwicklung einer Farbstoffsolarzelle (engl. *dye-sensitized solar cell* (DSSC)) zunutze machten.^[50]

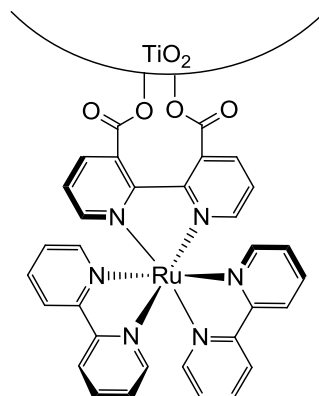


Abbildung 3: Oberflächenmodifikation von Titandioxid mit Rutheniumbipyridyl nach Dare-Edwards *et al.*^[49]

Hierbei bilden TiO₂-Nanopartikel die photoabsorbierende Schicht, die mit einem Ruthenium-Farbstoff modifiziert wurde. Dabei kam es zu einer Verschiebung der Absorption von unter 550 zu 750 Nanometern und es konnte ein Wirkungsgrad der Solarzellen von ungefähr 11% erreicht werden.

Das Prinzip der Farbstoffsolarzellen basiert darauf, dass ein Farbstoff Licht im sichtbaren Bereich absorbiert, was dazu führt, dass Elektronen vom HOMO- in das LUMO-Niveau

wandern. Das angeregte Elektron wird daraufhin in das Leitungsband von Titandioxid abgegeben, die Elektronen wandern zum Kontakt auf der Rückseite der Nanopartikel und der Farbstoff wird durch einen I^-/I_3^- -Elektrolyten wieder hergestellt.^[51] Die Bestrahlung der Titandioxid-Nanopartikel mit ultraviolettem Licht anstelle von sichtbarem Licht führt zu einer wichtigen Eigenschaft der TiO_2 -Nanopartikel, der Photokatalyse.

2.2.2 Photokatalyse

Titandioxid ist in der Lage, Photonen mit einer Energie, die größer als die Bandlücke ist, zu absorbieren. Die Bandlücke ist der energetische Abstand zwischen Valenzband und Leitungsband des Halbleiters. Dabei werden Elektronen aus dem Valenzband in das Leitungsband des Titandioxid-Moleküls befördert, dieser Vorgang hinterlässt ein elektropositives Loch im Valenzband. Durch die Strahlung entstehen sogenannte Elektronen-Loch-Paare, die durch das Material an die Titandioxid-Oberfläche transportiert werden. An der Oberfläche werden die geladenen Elektronen von den elektropositiven Löchern getrennt, wodurch sich separate reduzierende und oxidierende Zentren bilden.^[52]

Wenn sich Titandioxid in einer mit Sauerstoff angereicherten, wässrigen Umgebung befindet, können die Elektronen Sauerstoff zu Superoxid-Anionen reduzieren während die elektropositiven Löcher Hydroxylradikale bilden (Abbildung 4).^[53]

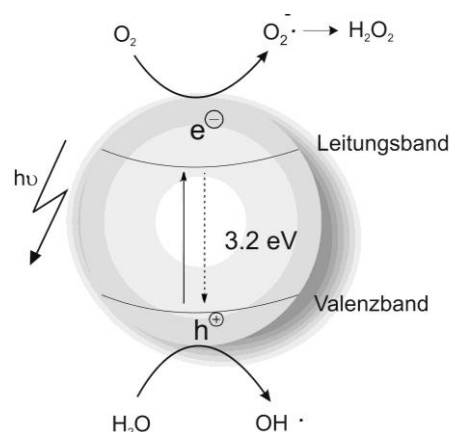


Abbildung 4: Lichtinduzierte Redoxreaktion am Beispiel von Anatas-Titandioxid-Nanopartikeln. Die erzeugten Elektronen-Loch-Paare können oxidierend beziehungsweise reduzierend wirken.

Somit kann die reduktive und oxidative Fähigkeit der Elektron-Loch-Paare zur Herstellung von stark oxidierenden Stoffen führen, die in verschiedenen Anwendungen von chemischer bis mikrobieller Dekontamination verwendet werden.^[54] Die erzeugten Elektronen-Loch-

Paare haben eine Lebensdauer im Nanosekunden-Bereich, diese kann allerdings durch die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff beeinflusst werden.^[55] Das aktive Zentrum der photokatalytischen Reaktion sind Ti^{3+} -Spezies, wenn diese nicht vorhanden ist, ist die Oberfläche der Titandioxid-Nanoteilchen chemisch inert. Diese aktiven Ti^{3+} -Spezies können durch Tempern erzeugt werden, sie sind vergleichbar mit denen, die mittels UV-Licht erzeugt werden.^[56]

Die Begrenzung des photokatalytischen Effekts liegt darin, dass hohe Energien benötigt werden, um eine photokatalytische Antwort auszulösen. Durch die Bandlücke von TiO_2 können Anatas-Kristalle nur Photonen mit einer Wellenlänge kleiner als 388 nm absorbieren, dementsprechend vor allem aus dem ultravioletten Licht. Infolge dessen können TiO_2 -Nanopartikel nur etwa 2-3% der Sonnenlicht-Energie absorbieren. Somit ist eine kommerzielle Anwendung der Titandioxid-Nanopartikel ineffektiv wenn sichtbares Licht verwendet werden soll. Ein Ansatz um die Verwendung von Sonnenlicht zu ermöglichen stellt die Dotierung von Titandioxid dar. Dies wurde anhand von Stickstoff untersucht, eine der ersten Arbeiten hierzu wurde von Asahi *et al.* im Jahr 2001 veröffentlicht.^[57] Daraufhin erfolgten zahlreiche Untersuchungen von Nicht- und Übergangsmetallen, wobei sich herausstellte, dass Chrom und Vanadium ebenfalls vielversprechende Kandidaten zur Dotierung sind.^[58] Bisher ist die Stickstoff-Dotierung, die beispielsweise durch Mahlen von Titandioxid mit Ammoniumnitrat erreicht werden kann,^[59] jedoch die meist untersuchte und verwendete Methode um die Anwendung von Titandioxid zum Beispiel in Photovoltaik-Anlagen zu verbessern.

Wie bereits in Kapitel 2.2 erwähnt, wird die Eigenschaft der Radikalbildung zum Reinigen von Wasser und Luft verwendet.^[60] Im Jahr 1985 konnten Matsunaga *et al.* erstmals zeigen, dass Titandioxid-Nanopartikel nach Bestrahlung in wässriger Umgebung in der Lage sind Bakterienzellen zu töten.^[61] Diese Methode wurde ebenfalls verwendet um Krebszellen mit Titandioxid abzutöten.^[62] Da Krebs heutzutage immer noch eine der häufigsten Todesursachen darstellt, untersuchen seither viele Arbeitsgruppen die photokatalytische Aktivität der Titandioxid-Nanopartikel um den Mechanismus des Zelltods zu erklären und diesen Effekt zur Krebstherapie nutzen zu können.^[63]

2.2.3 Reaktive Sauerstoffspezies und photodynamische Therapie

Titandioxid-Nanopartikeln werden signifikante antibakterielle Aktivität zugeschrieben, die bereits ausgiebig untersucht wurden.^[64] Oxidativer Stress, der von reaktiven Sauerstoffspezies

(ROS) eingeleitet wird und von Nanopartikeln ausgelöst wird, ist der Hauptmechanismus dieser antibakteriellen Wirkung. Die bei der Anregung der TiO₂-Nanopartikel entstandenen Hydroxylradikale sind starke, aber unselektive Oxidationsmittel, die nahezu alle organischen Biomoleküle einschließlich Kohlenhydrate, Nukleinsäuren, Lipide, DNA und Aminosäuren schädigen können.^[65] Titandioxid ist in der Lage neben Hydroxyl- und Superoxidradikalen auch Singulett-Sauerstoff zu erzeugen. Dieser kann Gewebe irreversibel schädigen indem er zur Oxidation und Abbau der Biomembranen führt.^[66] Wenngleich Superoxidradikale keine starken Oxidationsmittel sind, dienen sie doch als Vorstufe für Hydroxylradikale und Singulett-Sauerstoff und weisen somit ebenfalls einen erheblichen Beitrag zur ROS-Produktion.^[67] Cai *et al.* konnten silicatbeschichtete Titandioxid-Nanopartikel in HeLa-Zellen einführen und durch Bestrahlung der Partikel konnte *in vitro* ein deutlicher Anstieg des Zelltods detektiert werden.^[44a] Der Antitumor-Effekt gegen HeLa-Zellen, die in Mäuse transplantiert wurden, wurde untersucht. Der Tumor wurde ohne Partikel bestrahlt, auch die Verwendung der Partikel ohne Bestrahlung führte zu keinem Einfluss auf den Tumorwachstum. Erst nach Bestrahlung der Nanopartikel mit einer Wellenlänge zwischen 300 und 400 nm kam es zu einem signifikanten *in vivo* Antitumor-Effekt.

Von Li *et al.* konnte gezeigt werden, dass das Nanomaterial mehr reaktive Sauerstoffspezies erzeugt als das entsprechende makroskopische Material, somit könnten Titandioxid-Nanopartikel in der Krebsbehandlung Anwendung finden.^[68] Das ist auf die größere Oberfläche der Nanopartikel zurückzuführen, die somit mehr Absorptionsfläche für die Bestrahlung mit UV-Licht zur Verfügung stellen kann. Durch die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies können Titandioxid-Nanopartikel zur Anwendung in der photodynamischen Therapie (PDT) verwendet werden.^[69]

Das Prinzip dieser Therapie basiert auf dem Konzept, dass eine lichtaktivierbare Substanz (Photosensibilisator) unter Licht und Sauerstoff aus dem Gewebe selektiv mit einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt werden kann.^[70] Im Vergleich zu aktuellen Behandlungsmethoden wie Chemotherapie, kann die photodynamische Therapie erkranktes Gewebe zerstören ohne das umliegende gesunde Gewebe zu beschädigen.^[66] Allerdings ist die Aktivierung der Titandioxid-Nanopartikel mit UV-Licht unerwünscht, gerade im Hinblick auf Anwendungen in der Krebsbehandlung. Ultraviolettes Licht selbst ist mutagen und führt somit dazu, dass die Krebszellen aber auch die umliegenden gesunden Zellen beeinflusst werden.^[71] Zudem kann ultraviolettes Licht nicht tief genug in menschliches Gewebe eindringen.^[72]

Ein Ansatz die Bestrahlung mit UV-Licht zu umgehen ist die Verwendung von Ultraschall. Harada *et al.* konnten Mizellen herstellen, in die Titandioxid-Nanopartikel eingebracht wurden.^[72] Diese Nanopartikel wurden mit Pfropfcopolymeren (engl.: *graft copolymer*) gemischt, dabei entstanden Mizellen mit einer Kern-Schale-Struktur. Die Polymer-Einheit stabilisierte hierbei die Oberfläche der Mizellen (Abbildung 5). Durch die Polymere an der Nanopartikel-Oberfläche sind die Mizellen biokompatibel und zeigten eine vernachlässigbare Cytotoxizität. Selbst innerhalb der Mizellen haben die Titandioxid-Nanopartikel ihre Fähigkeit der Radikalbildung beibehalten.

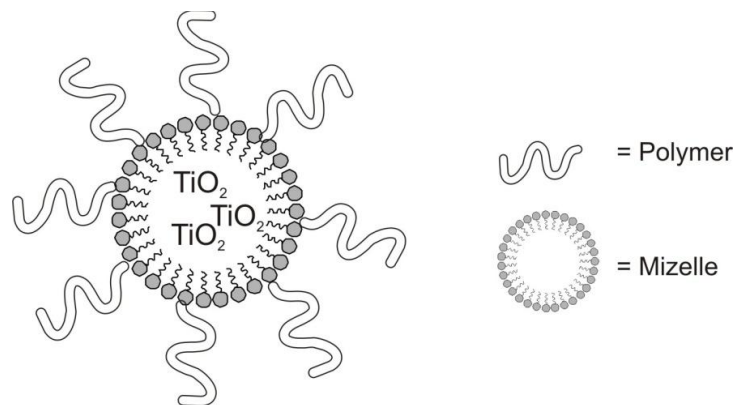


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der polymerbasierten Mizellen mit Titandioxid-Nanopartikel innerhalb der Mizelle nach Harada *et al.*^[72]

Durch die Aufnahme der Nanopartikel-Mizellen in HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Nanopartikel mit Hilfe von Ultraschall bei einer Frequenz die klinische Anwendungen ermöglicht Singulett-Sauerstoff produzieren können. Diese Fähigkeit könnte zur Abtötung der Zellen an dem bestrahlten Bereich führen und umliegende Zellen nicht beeinflussen.

Seit den 1970er Jahren findet Titandioxid im biomedizinischen Feld Anwendung, so wird es beispielsweise in orthopädischen Implantaten verwendet.^[73] Durch die mechanische Festigkeit, Korrosionsbeständigkeit, die geringen cytotoxischen Effekte ist Titan und seine Legierungen das meist verwendete Material für verschiedene Implantate (zum Beispiel im Dentalbereich).^[74] Aufgrund der geringen cytotoxischen Effekte wurde in den letzten Jahren auch eine Anwendung der Titandioxid-Nanoteilchen als Transporter von Wirkstoffen in Betracht gezogen.^[75]

2.2.4 TiO₂-Nanoteilchen als Transporter von Wirkstoffen

Für den Transport von Wirkstoffen eignen sich im besonderen Maße Titandioxid-Nanoröhren. Es sind verschiedene Möglichkeiten bekannt um sogenannte Nanokapseln zu synthetisieren, beispielsweise werden die Wirkstoffe auf biomedizinischen Implantaten beschichtet und freigesetzt.^[51] Die Gruppe von N. Shrestha zeigte, dass es möglich ist, Titandioxid-Nanoröhren mit magnetischen Eisendioxid-Partikeln zu befüllen.^[76] Die Wirkstoffe wurden über Linker an Titandioxid-Nanoröhren gebunden. Durch Magnete konnten die Nanoteilchen an die gewünschten Orte transportiert werden, an denen die Wirkstoffe durch eine photokatalytische Reaktion mittels UV-Licht freigesetzt werden. Mit diesem System kann eine ortsgerichtete Abtötung von Krebszellen ermöglicht werden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass die Freisetzung der Wirkstoffe ebenso durch Röntgenstrahlung erfolgen kann, wodurch eine *in vivo*-Anwendung ermöglicht wird.^[77] Ein anderes System wurde von Schmuki *et al.* vorgestellt.^[78] Sie verwendeten eine amphiphile Schicht, die aus Titandioxid-Nanoröhren hergestellt wurde. Durch eine Monolage aus Octadecylphosphonsäure wurde eine Art Deckel erzeugt, der die Röhren verschließen kann und somit den Wirkstoff Meerrettichperoxidase (engl.: *Horseradish peroxidase*, HRP) von der wässrigen Umgebung abtrennen und schützen sollte. Durch photokatalytische Wechselwirkungen mit UV-Licht wurde der Deckel entfernt und die Wirkstoffe herausgewaschen (Abbildung 6).

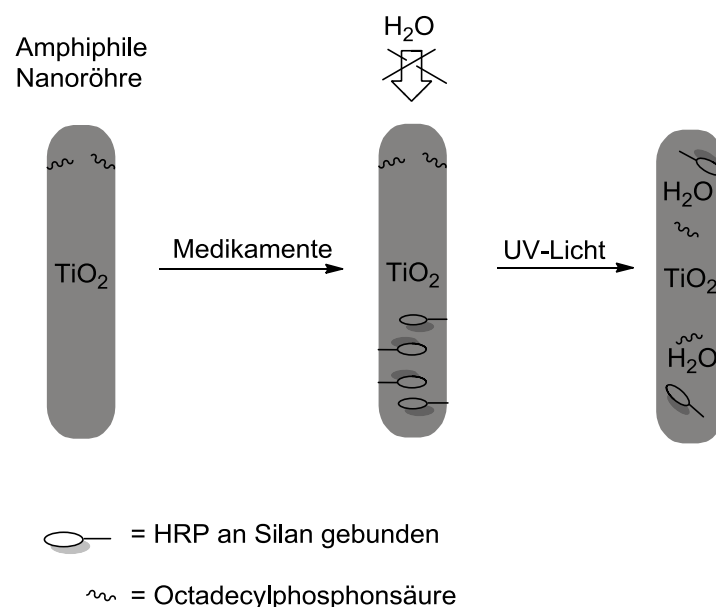


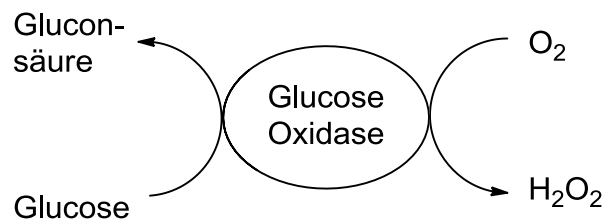
Abbildung 6: Amphiphile Titandioxid-Nanoröhren mit Octadecylphosphonsäure als Deckel welcher mit UV-Licht geöffnet und den Wirkstoff freigegeben kann.^[79]

Im Bezug auf *in vivo*-Anwendungen kann der Deckel nicht nur durch UV-Licht, sondern auch durch Röntgenstrahlung geöffnet werden.

Eine weitere Verwendung der TiO₂-Nanoteilchen, die nicht auf Bestrahlung mit UV-Licht basiert, ist die Nutzung von Titandioxid als Biosensor, um beispielsweise den Glucose-Gehalt im Blut zu bestimmen.^[80]

2.2.5 TiO₂-Nanoteilchen als Biosensoren

Wasserstoffperoxid wird als Oxidations-, Desinfektions- und Bleichmittel in der Industrie und in zahlreichen Haushalten verwendet.^[81] Die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten sowie das häufige Vorkommen von Wasserstoffperoxid erfordert eine Methode zur Detektion sowohl in geringen Mengen als auch in Konzentrationen die typischerweise in Lebensmitteln oder Medikamenten gefunden werden.^[82] Aufgrund der elektrokatalytischen Eigenschaften von Titandioxid-Nanomaterial verwendeten Li *et al.* Nanopartikel zur elektrochemischen Detektion von Wasserstoffperoxid.^[83] Hierzu wurde Glucose-Oxidase an Titandioxid absorbiert. Dieses Enzym ist in der Lage, die Oxidation von Glucose unter Bildung von Wasserstoffperoxid zu katalysieren (Schema 3).^[84]

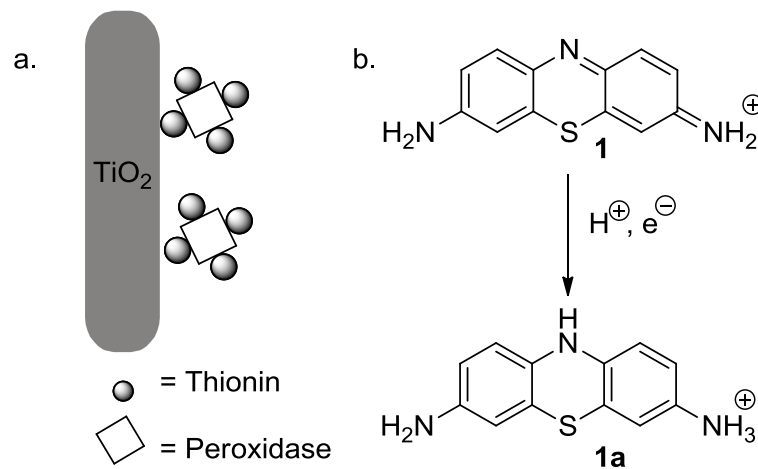


Schema 3: Funktionsweise des Enzyms Glucose-Oxidase.^[85]

Durch die Absorption des Enzyms an die Nanopartikel ist ein Biosensor entstanden, der Glucose schnell und stabil nachweisen kann. 95% des Glucoseanteils konnten bereits in einer Zeit von unter 30 Sekunden detektiert werden. Dabei wurde nachgewiesen, dass das auf der Nanopartikel-Oberfläche immobilisierte Enzym seine ursprüngliche Aktivität beibehalten konnte. Aufgrund der hohen Absorptionsfähigkeit und der Biokompatibilität der Titandioxid-Nanopartikel könnte dieser Sensor Anwendung in der Bioelektrochemie finden.

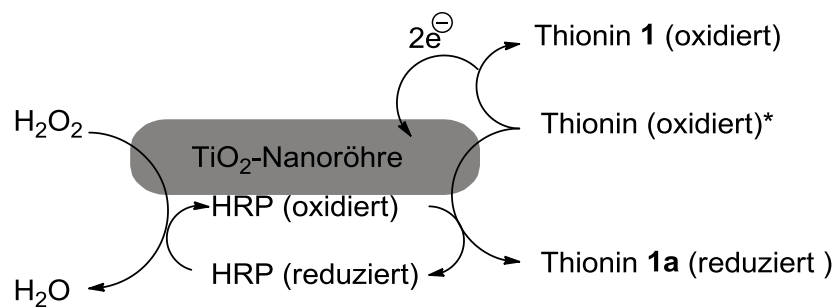
Titandioxid-Nanoröhren weisen aufgrund ihrer großen Oberfläche gute Eigenschaften zum Einsatz als Biosensoren auf, da sie genug Platz für die Bindung vieler Enzyme bieten.^[86] Liu *et al.* konnten durch anodische Oxidation Titandioxid-Nanoröhren mit unterschiedlichen Längen herstellen.^[87] An diese Nanoröhren konnte das Enzym Meerrettichperoxidase sowie

Thionin **1** co-absorbiert werden (Schema 4a.). Thionin **1** kann elektrochemisch reduziert aber nicht wieder oxidiert werden (Schema 4b.).



Schema 4: a. Absorption von Meerrettichperoxidase und Thionin an Titandioxid-Nanoröhren, b. Elektrochemische Reduktion von Thionin **1**.^[87]

Erst die Zugabe von Wasserstoffperoxid in Präsenz von Meerrettichperoxidase an der Nanoröhren-Oberfläche führte über einen angeregten Zustand zur Oxidation des reduzierten Thionins **1a** (Schema 5).



Schema 5: Reduktions- und Oxidationsprozesse von Thionin **1** und dem Enzym Meerrettichperoxidase an der Nanoröhren-Oberfläche.^[88] (*: angeregter Zustand)

So konnte gezeigt werden, dass das Enzym Meerrettichperoxidase seine Bioaktivität auch an der Titandioxid-Oberfläche beibehält. Durch die Absorption des Enzyms und Thionin **1** an die Nanoröhren wurde ebenfalls ein Biosensor mit guter Stabilität und Reproduzierbarkeit entwickelt, der in der Lage ist Wasserstoffperoxid zu detektieren.

In den beiden beschriebenen Biosensoren wurden die Enzyme über Absorption an die Oberfläche der Titandioxid-Nanoteilchen gebunden. Dies ist nur eine Möglichkeit der

Bindung an Titandioxid, im Folgenden sollen weitere Bindungsmöglichkeiten besprochen werden.

2.3 Methoden zur Oberflächenmodifikation der TiO₂-Nanoteilchen

Die photokatalytischen Eigenschaften der Titandioxid-Nanopartikel werden neben Faktoren wie Größe, Form und Kristallstruktur auch von der Art der Liganden auf der Oberfläche beeinflusst. Um Nanopartikel für biologische Anwendungen nutzbar zu machen und um die Löslichkeit in polaren Medien zu verbessern sind Modifikationen der Titandioxid-Oberfläche unerlässlich. Hierzu können verschiedene Gruppen an die Titandioxid-Nanoteilchen gebunden werden, wie beispielsweise Phosphat- oder auch Carboxylgruppen.^[89] Zudem ist bekannt, dass vor allem Endiole an Titandioxid binden können. Die Bindung dieser Liganden führt zu einer zweizähligen Chelatisierung der Titan-Atome auf der Oberfläche. Die Kräfte, die bei der Bindung involviert sind, sind stark genug um eine Deformation der Struktur herbei zu führen. Somit werden die Defekte auf der Oberfläche minimiert und es entsteht eine „Bulk“-artige oktaedrische Struktur (Abbildung 7).^[90] Durch die starken Wechselwirkungen zwischen den Atomen auf der Nanopartikel-Oberfläche und den organischen Liganden werden die Haftstellen an der Oberfläche entfernt und die delokalisierten Bänder der Titandioxid-Nanopartikel werden elektronisch an die organischen Linker gekuppelt.^[91]

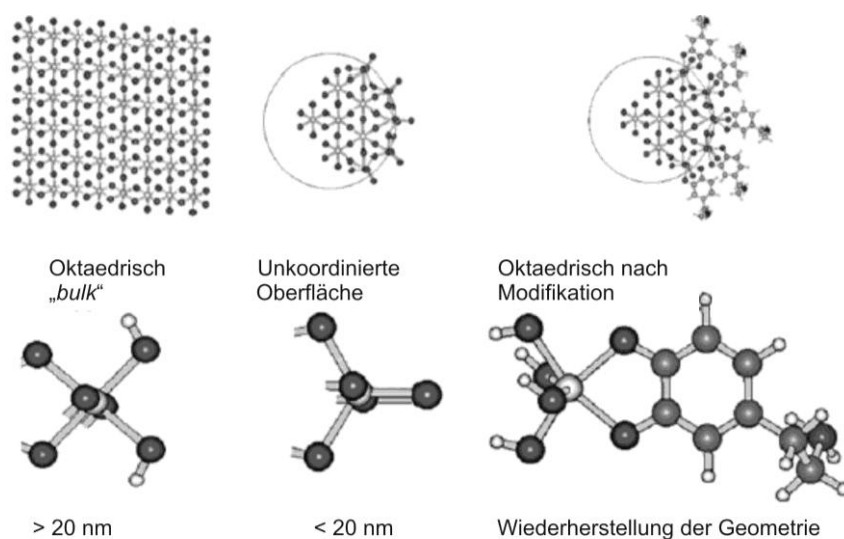


Abbildung 7: Defekte der Titandioxid-Oberfläche ohne und mit Modifikation mit Dopamin **9**.^[92]

Somit werden die optischen Eigenschaften der Nanoteilchen beeinflussbar und eine Verschiebung zum sichtbaren Licht und nahem Infrarotbereich wird durch Oberflächenmodifikationen zugänglich. Die Modifikation mit Dopamin **9** beispielsweise ermöglicht eine Rotverschiebung der Absorption des Halbleiters im Vergleich zu den unmodifizierten Nanopartikeln.^[92] Diese optische Veränderung steht in Zusammenhang mit dem Dipolmoment des Titan-Liganden-Komplexes auf der Partikeloberfläche und nimmt mit der Größe der Moleküle ab.^[93] Durch die Bindung der Liganden wird zusätzlich die Elektronentransferrate vom Leitungsband der Titandioxid-Nanopartikel auf Elektronenakzeptoren in der Lösung erhöht.^[94]

2.3.1 Bindungen von Liganden über elektrostatische Wechselwirkung an TiO₂-Nanopartikel

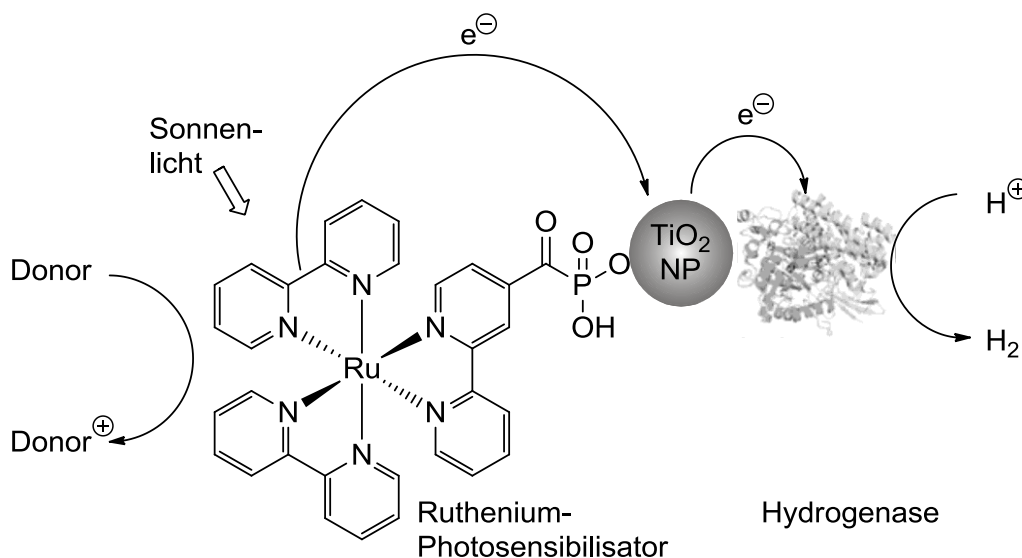
Elektrostatische Bindungen werden bei Titandioxid-Nanopartikeln vor allem dazu verwendet, Hybrid-Systeme mit verschiedenen Arten an Nanopartikeln zu bilden. So konnte gezeigt werden, dass Gold-Nanopartikel an einen Titandioxid-Film über Wechselwirkungen gebunden werden können. Hierbei wurde unter Verwendung von Bisphenol A gezeigt, dass die photokatalytischen Eigenschaften um das 2.5-fache im Vergleich zum reinen Titandioxid-Film verbessert werden konnten. Der Grund hierfür liegt in der physikalischen Separation der Gold-Nanopartikel. Dieser Effekt führt zu einer Vergrößerung der Transfer-Effizienz der photogenerierten Elektronen vom Titandioxid-Film zu Gold. Ein großer Vorteil dieser elektrostatischen Variante ist, dass sie kostengünstig, einfach und skalierbar ist. Durch Variation der Temperatur und des pH-Werts konnten Gold-Titandioxid-Filme mit verschiedenen Größen, Formen und Beschaffenheiten hergestellt werden.^[95]

Durch anionische Moleküle an der Oberfläche von Silber-Nanopartikeln konnten Anatas-Titandioxid-Nanopartikel mit kationischen Oberflächen-Gruppen gebunden werden. Durch die hydrophile/hydrophobe Wechselwirkung entstand ein heterogenes Wachstum der Silber-Nanopartikel auf der Titandioxid-Oberfläche. Diese Hybrid-Partikel zeigten antibakterielle Wirkung gegen gramnegative *Escherichia coli* Bakterien. Dies konnte in Anwesenheit und Abwesenheit von ultraviolettem Licht gezeigt werden. Zudem konnte die photokatalytische Aktivität des Systems gegen Methylenblau in wässrigen Lösungen gesteigert werden. Die Hemmung der Elektronen-Loch-Rekombination und die gesteigerte Absorption des Methylenblau-Farbstoffs in Präsenz der Silber-Nanopartikel sind der Hauptgrund für die verbesserte Photokatalyse des Systems.^[96]

Im Jahr 2009 konnte gezeigt werden, dass Porphyrine mit Ankergruppen wie Sulfonaten oder Carboxylgruppen an Titandioxid absorbiert werden können.^[97] Bei der Wechselwirkung zwischen Porphyrinen und Titandioxid-Nanopartikeln kommt es aufgrund des Elektronentransfers vom angeregten Zustand des Porphyrins in das Leitungsband von Titandioxid zu einer Auslöschung der Fluoreszenz. Dies könnte Anwendung in der Herstellung von photochemischen Zellen finden.

Über elektrostatische Wechselwirkung können nicht nur andere Nanopartikel oder organische Moleküle gebunden werden, sondern auch verschiedene Biomoleküle.

Enzyme wie Hydrogenasen katalysieren in ihren aktiven Zentren, die aus Eisen oder Nickel/Eisen bestehen, die Reduktion von Protonen zu Wasserstoff. Reisner *et al.* haben sich dieses Prinzip zu Nutze gemacht, indem sie eine [NiFeSe]-Hydrogenase aus *Desulfomicrobium baculatum* (*Db*[NiFeSe]-H) und einen synthetischen Ruthenium-Komplex als Photosensibilisator an Titandioxid-Nanopartikel über elektrostatische Wechselwirkungen gebunden haben.^[98] Das Prinzip basiert auf der Anregung des Photosensibilisators durch die Verwendung von sichtbarem Licht, dadurch wandern Elektronen in das Leitungsband von Titandioxid, diese werden mittels Eisensulfid-Cluster zum Enzym transferiert. Dort werden sie durch Protonen aus der wässrigen Umgebung zu Wasserstoff reduziert (Schema 6).



Schema 6: Absorption des rutheniumbasierten Photosensibilisators und der Hydrogenase an Titandioxid-Nanopartikel.^[99]

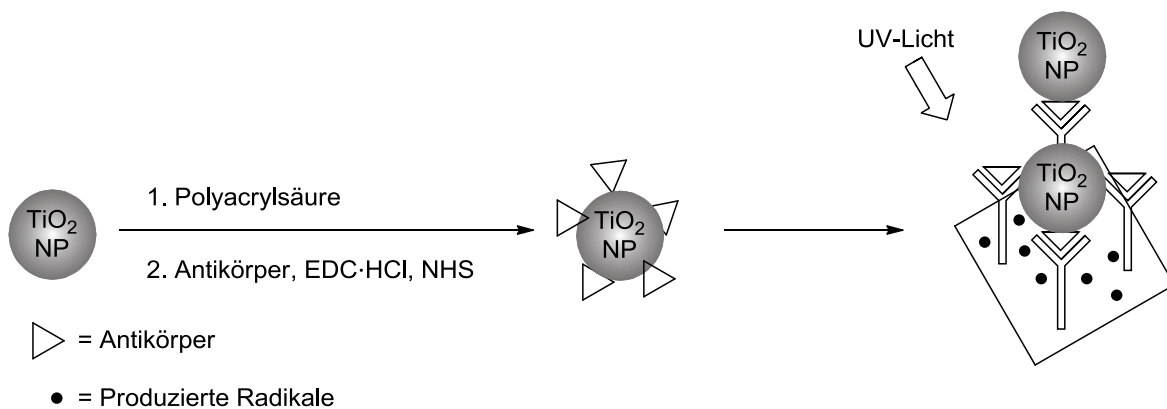
Ein wichtiger Punkt hierbei ist, dass das Enzym-Nanopartikel-Hybrid eine hohe elektrokatalytische Aktivität zeigt und nicht nur unter Luftausschluss, sondern auch unter aeroben Bedingungen angewendet werden kann. Somit ist ein lichtbetriebenes System

entstanden welches unter Verwendung von sichtbarem Licht als Energiequelle in der Lage ist, die kathodische Halbzellenreaktion der Wasserspaltung zu vermitteln.

Wenn absorbierte Moleküle eine Säure- oder Aminofunktion aufweisen, können die zusätzlichen Liganden durch eine Amid-Bindung an die Nanopartikel gebunden werden. Ein Beispiel hierfür ist Dopamin (9), welches durch die Catecholfunktion an Titandioxid binden kann und durch die freie Aminofunktion in der Lage ist einen weiteren Liganden zu binden.^[100]

2.3.2 Bindungen von Liganden über Amid-Kupplung an TiO₂-Nanopartikel

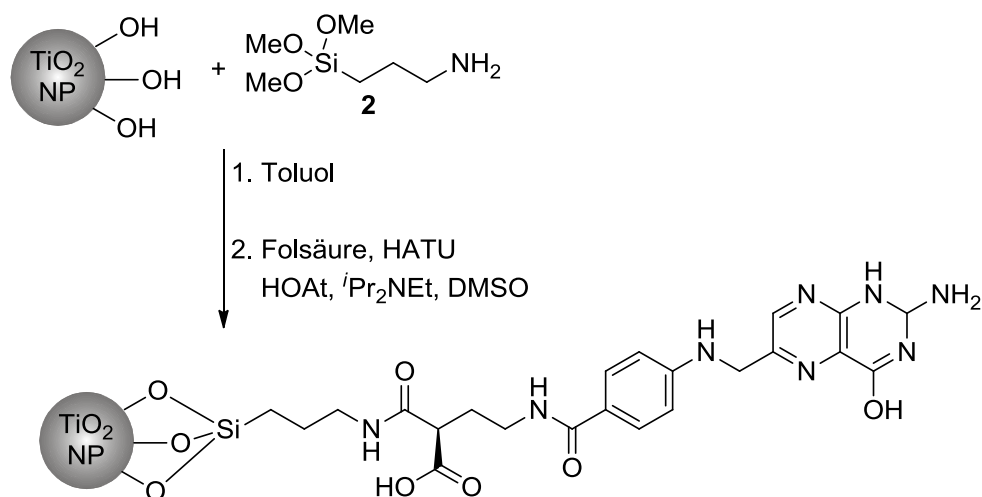
Matsui *et al.* konnten Titandioxid-Nanopartikel mit einer Größe von 30 nm zunächst mit Polyacrylsäure modifizieren und anschließend mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid (EDC·HCl) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) an einen anti-epidermalen Wachstumsrezeptor-Antikörper binden (Schema 7), wobei dieser Antikörper an der Oberfläche von Krebszellen überexprimiert wird.^[101]



Schema 7: Bindung von Antikörpern auf der Titandioxid-Oberfläche mit EDC·HCl und NHS.^[101]

Das Überleben der Zellen wurde nach Zugabe der mit antikörpermodifizierten Nanopartikel nicht beeinflusst wenn keine Bestrahlung erfolgte. Somit zeigten die Partikel bei der verwendeten Konzentration eine sehr geringe Toxizität. Wenn die antikörpermodifizierten Nanopartikel mit ultraviolettem Licht bestrahlt wurden, kam es zu einem Zellsterben von ungefähr 50%. Im Vergleich hierzu zeigten sowohl die reinen Nanopartikel als auch der Antikörper mit und ohne Bestrahlung kein Zellsterben. Durch eine Amid-Bindung konnte ein Antikörper an die Nanopartikel gebunden werden welcher zu einer spezifischen Anhäufung

des Antikörpers in Zellen führt. Aus diesem Grund wird nur eine geringe Konzentration an Nanopartikeln und zudem nur geringe Bestrahlung benötigt um ein Zellsterben einzuleiten. Turkowski *et al.* verwendeten eine Amid-Bindung um einen Farbstoff an Titandioxid-Nanopartikel zu binden.^[102] Die Bindung eines fluoreszierenden Moleküls an Nanopartikel eröffnet viele Anwendungsmöglichkeiten wie beispielsweise die Detektion von verschiedenen Tumoren.^[103] Um Titandioxid kovalent an das fluoreszierende Molekül Folsäure zu binden wurde Aminopropyltrimethoxysilan (**2**) als Verbindungsmolekül zwischen den Nanopartikeln und Folsäure verwendet, die Bindung erfolgte mit (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU) und 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) (Schema 8).



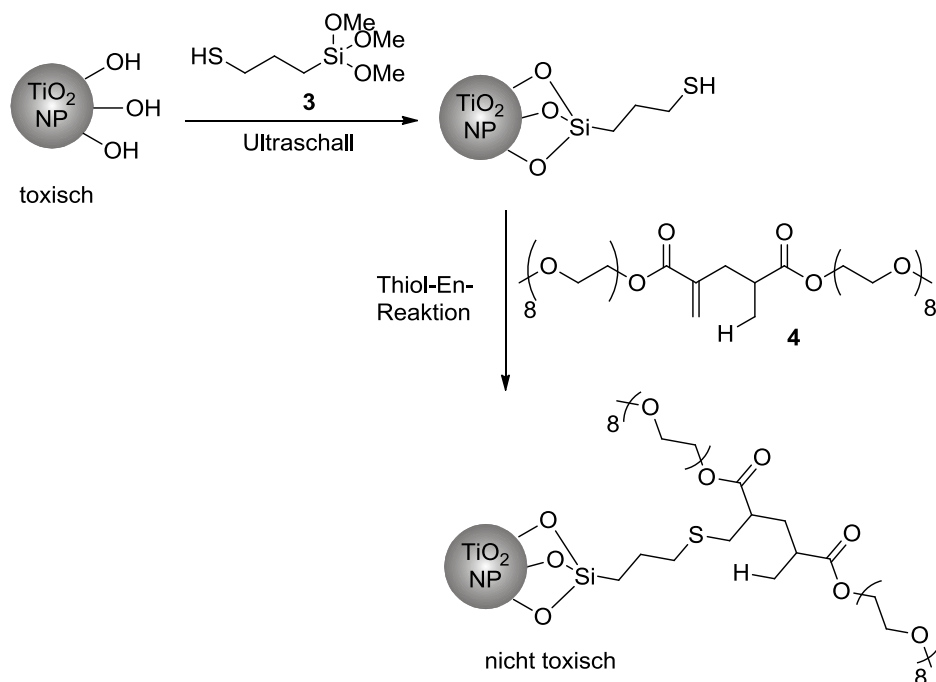
Schema 8: Synthese der folsäuremodifizierten Titandioxid-Nanopartikel unter Verwendung des Silans **2** als Verbindungsmolekül.^[102]

Messungen der Kontrollen, wie der silanmodifizierten Nanopartikel oder der Nanopartikel mit Folsäure zeigten, dass es lediglich zu einer Steigerung der Fluoreszenz-Intensität bei der kovalenten Bindung der Folsäure an die Titandioxid-Nanopartikel kam. Es konnte gezeigt werden, dass die folsäuremodifizierten Nanopartikel eine drastische Steigerung der Photoemission zwischen 500 und 700 nm aufweisen. Durch die Bindung der Nanopartikel an den Farbstoff unter Verwendung des Silans konnten die optischen Eigenschaften des Systems verändert werden. Dies ist auf die Annäherung der aktiven Zustände der verwendeten Moleküle zurückzuführen. Dieses System bietet den Vorteil, dass sowohl das Biomolekül als auch das Silan aufgrund der funktionellen Gruppen im Gegensatz zu anderen Farbstoffen an verschiedene Nanopartikel gebunden werden können.

Eine mildere Methode zur Funktionalisierung der Nanopartikel-Oberflächen stellt die Verwendung von Thiolen dar. Diese können in einer Michael-Addition an eine Maleinimidfunktion oder auch durch eine „Click“-Reaktion, der Thiol-En-Reaktion gebunden werden.^[104] Hierzu werden keinerlei zusätzliche Kupplungsreagenzien wie bei der Amidkupplung benötigt, wodurch die Reaktion biokompatibel ist.^[105]

2.3.3 Bindung von Liganden über Thiole an TiO₂-Nanopartikel

Durch eine Thiol-En-Reaktion konnten Tedja *et al.* Polymere an silanmodifizierte Nanopartikel binden.^[106] Es entstanden definierte Polymer-Titandioxid-Hybride, die zu einer Verringerung der Agglomeration in verschiedenen wässrigen und biologischen Medien führten (Schema 9).

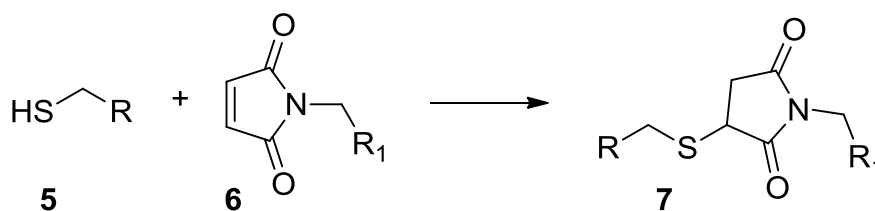


Schema 9: Thiol-En-Reaktion von Polymeren auf der Titandioxid-Oberfläche.^[106]

Durch die Polymere an der Oberfläche konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme in menschliche Lungenzellen im Vergleich zu den unmodifizierten Nanopartikeln reduziert war. Der Grund hierfür scheint die zunehmende Partikelgröße zu sein. Somit spielt die Chemie auf der Oberfläche eine wichtige Rolle bei der Aufnahme der Nanopartikel in Zellen.

Die Verwendung von Maleinimiden zur Bindung von thiolierten Biomolekülen ist bei Nanopartikeln weit verbreitet.^[107] Der Grund hierfür ist die strukturelle Eigenschaft des

Maleinimids, welches als doppelt aktiviertes Michael-System schnell und spezifisch mit Thiolen unter Ausbildung einer stabilen Thioether-Bindung reagieren kann (Schema 10).^[108]



Schema 10: Michael-Addition zwischen einem Thiol **5** und einem Maleinimid **6**.

Diese Eigenschaft nutzten Gao *et al.* indem sie einen Antikörper, den menschlichen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (HER 2) an Nanopartikel binden konnten.^[109] Hierzu wurden zwei verschiedene Arten Nanopartikel verwendet, Quantenpunkte und Eisenoxid-Nanopartikel, die mit einer Maleinimidfunktion modifiziert wurden. An diese wurde durch Michael-Addition ein *N*-terminal mit Cystein modifizierter Antikörper gebunden. So entstanden Nanopartikel-Antikörper-Konjugate die eine hochspezifische Bindung an Krebszellen aufwiesen. Diese könnten Anwendung in der Krebsdiagnose oder auch in der molekularen Bildgebung finden.

Aus Methoxypolyethylenglykol wurden polymerbasierte Nanopartikel aufgebaut, die an der Oberfläche mit einer Maleinimidfunktion modifiziert wurden. An ein globuläres Protein, bovines Serumalbumin wurde eine Thiolfunktion eingeführt und durch Michael-Addition an die Polymer-Partikel gebunden. Diese Nanopartikel zeigten aufgrund der Oberflächenmodifikation mit dem Protein eine geringere Toxizität als andere Nanopartikel. Die Ergebnisse, die durch *in vitro* und *in vivo*-Studien erhalten wurden zeigen, dass die proteinmodifizierten Nanopartikel als Transporter für Medikamente, die gezielt im Gehirn wirken sollen, eingesetzt werden kann.^[110]

In der Gruppe von Mattoussi wurden thiolierte Peptide *via* Michael-Addition an Gold-Nanopartikel gebunden. Hierbei wurde die Anzahl der funktionellen Maleinimid-Gruppen an der Oberfläche der Gold-Partikel zwischen 0 und 30% variiert. Zudem wurden inerte Gruppen mit Methoxyresten eingeführt. Somit konnte die Anzahl der Moleküle pro Gold-Nanopartikel berechnet und die Zahl der immobilisierten Liganden auf der Oberfläche der Nanopartikel kontrolliert werden.^[111]

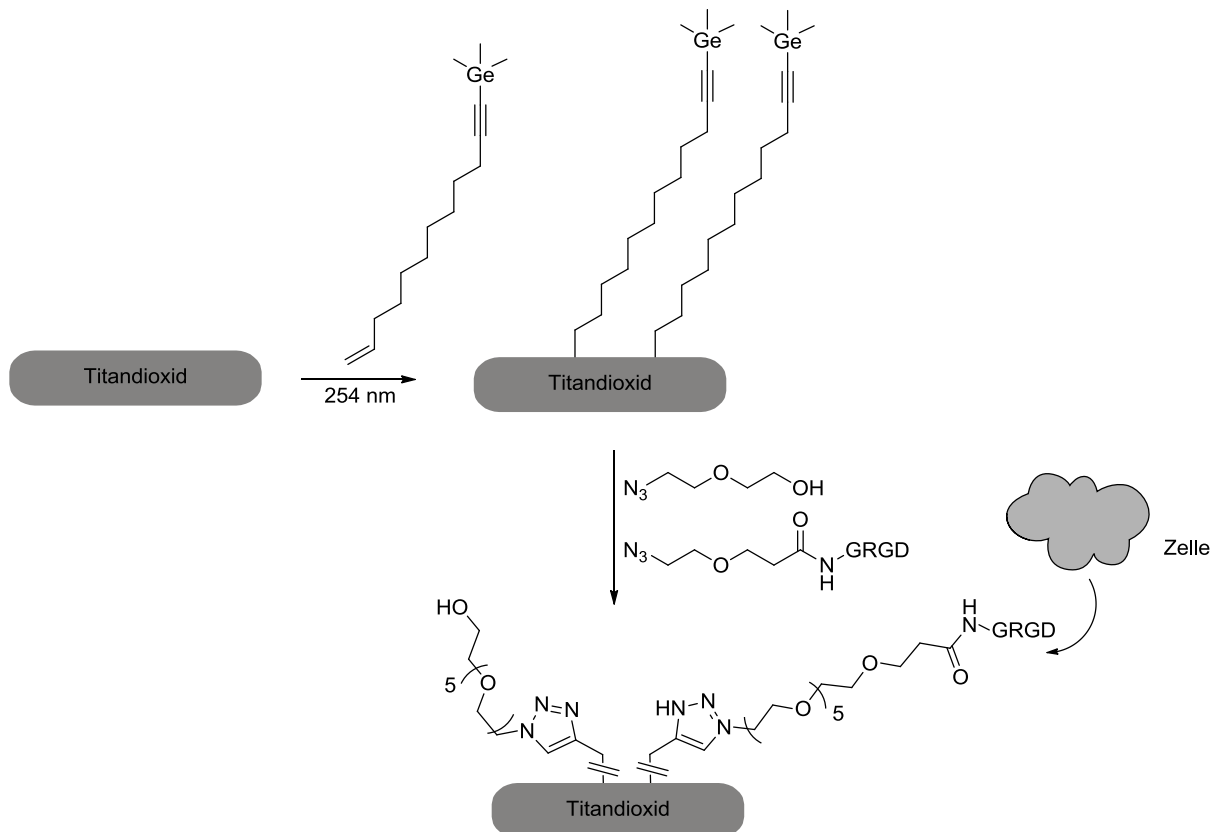
Anhand dieser Beispiele konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Maleinimid-Thiol-Bindung um eine etablierte Methode im Bereich der Nanopartikel handelt. Bisher konnten nur wenige Beispiele für die Anwendung der Michael-Addition bei Titandioxid-Nanopartikeln

gefunden werden. Eine Anwendung der Michael-Addition zwischen maleinimidmodifizierten Titandioxid-Nanopartikeln und verschiedenen Thiolen soll in dieser Arbeit untersucht werden. Nicht nur Thiol-En-Reaktionen und Michael-Additionen zählen zu den sogenannten „Click“-Reaktionen^[112], sondern auch 1,3-dipolare Cycloadditionen, auf die im nächsten Kapitel genauer eingegangen werden soll.

2.3.4 Bindung von Liganden über die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition an TiO₂-Nanopartikel

Die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition wird aufgrund der breiten Anwendungsmöglichkeiten ebenfalls auf der Nanopartikel-Oberfläche verwendet. Hamers *et al.* war es möglich, Zinnoxid-Nanostäbchen mittels einer kupferkatalysierten Cycloaddition an Titandioxid-Nanopartikel zu binden.^[113] Zunächst wurde eine photochemische *Grafting*-Technik verwendet um Hydroxylgruppen einzuführen, hierbei induziert UV-Licht eine Reaktion zwischen den organischen Alkenen und der Zinnoberfläche, dies konnte ebenfalls für Titandioxid gezeigt werden. Die dadurch gebundenen Hydroxylgruppen wurden weiter umgesetzt, sodass azidmodifizierte Zinnoxid-Nanostäbchen erhalten werden konnten. Diese wurden mittels Natriumascorbat, Kupfersulfat und Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin an alkinmodifizierte Titandioxid-Nanopartikel gebunden. Da es schwierig ist kleine Nanopartikel an größere Nanostrukturen zu binden, ohne weiteres Wachstum der kleinen Partikel zu erhalten, stellt diese Methode eine gute Alternative dar um stabile Oxid-Oxid-Heterostrukturen durch chemische Reaktionen zu erzeugen.^[114] Die Gruppe von Hamers hat die kupferkatalysierte Cycloaddition zudem auf Titandioxid-Nanopartikel und Wolframoxid-Nanopartikel angewandt und konnte zeigen, dass die photokatalytische Aktivität des Konstrukts im Vergleich zur Wolframoxid-Oberfläche gesteigert werden konnte.^[115]

Cai *et al.* hat Titandioxid-Substrate mittels einer kupferkatalysierten Cycloaddition erfolgreich biofunktionalisiert.^[116] Hierzu wurde Titandioxid mit einer aliphatischen Kette modifiziert, die innerhalb des Moleküls eine Alkingruppe und am Ende einen Trimethylgermanylrest als Schutzgruppe trägt. An das Alkin wurde mittels Tetrakis(acetonitril-*N*)-kupferhexafluorophosphat und Natriumascorbat azidmodifiziertes Glycin-Arginin-Glycin-Aspartat (GRGD), ein Zelladhensionspeptid, gebunden (Schema 11).



Schema 11: Oberflächenmodifikation von Titandioxid und dem Peptid GRGD *via* kupferkatalysierter Cycloaddition.^[116]

Biologische Tests zeigten, dass das Peptid seine Aktivität bezüglich der Immobilisierung beibehalten hat und somit die Anhaftung und Ausbreitung der AsPC-1-Zellen auf dem Substrat unterstützt.

Anhand der vorgestellten Möglichkeiten der Bindung an die Titandioxid-Oberfläche, wurde bereits ein Einblick über unterschiedliche Moleküle gegeben, die an Titandioxid untersucht wurden. Um Nanoteilchen herzustellen, die in Zellen penetrieren können, ist die Funktionalisierung mit Biomolekülen von entscheidender Bedeutung. Einen Einblick über verschiedene Biomoleküle und deren Anwendung mit Titandioxid soll das folgende Kapitel geben.

2.4 Biofunktionalisierung von TiO₂-Nanopartikeln

2.4.1 Biofunktionalisierung mit DNA

Mit der Nanotechnologie soll die Limitierung der bisher existierenden Technologie zur intrazellulären Manipulation überwunden werden. Daher ist es ein Ziel, chemisch-biologische Nano-Hybrid-Systeme herzustellen, die in der Lage sind in Zellen einzudringen um dort anschließend intrazelluläre Prozesse oder biochemische Reaktionen zu initiieren.

Es gelang Levina *et al.* an negativ geladene Titandioxid-Nanopartikel über elektrostatische Wechselwirkung positiv geladene Polylysine zu binden, an die im Anschluss kovalent DNA gebunden wurde. Dieses Nanokonstrukt wurde zur Hemmung der menschlichen Grippe (Kopie eines H3N2-Virus) eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Nanopartikel in Abwesenheit des Virus eine geringe Toxizität in den getesteten *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) Zellen aufweisen ($TC_{50} \approx 1800 \mu\text{g/mL}$). Nach Zugabe des Virus mit komplementärer RNA zu den modifizierten Nanopartikeln konnte eine hohe antivirale Aktivität nachgewiesen werden (99.9% Inhibierung der Virus Replikation).^[117]

Da bereits gezeigt wurde, dass Catechole an Titandioxid-Nanopartikel binden^[118], nutzte die Gruppe um Woloschak Dopamin (**9**) zur Bindung von DNA an Titandioxid-Nanopartikel.^[100] Hierbei konnte der Einzelstrang mit einem komplementären, radioaktiv markierten Strang hybridisiert werden. Dieses System ist selbst bei 95 °C stabil, was eine Anwendung in der Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht. Hierbei wurde eine lichtinduzierte und kontrollierte Nukleinsäure Endonuklease-Aktivität festgestellt, was Anwendung in der Gentherapie finden könnte.

Die gleiche Arbeitsgruppe entwickelte 2007 ein System aus gadoliniummodifizierten DNA-TiO₂-Halbleiter-Nanopartikeln.^[119] Hierzu wurde ebenfalls Dopamin (**9**) mit dem kommerziell erhältlichen Aktivester 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7-tetraessigsäure umgesetzt (Abbildung 8).

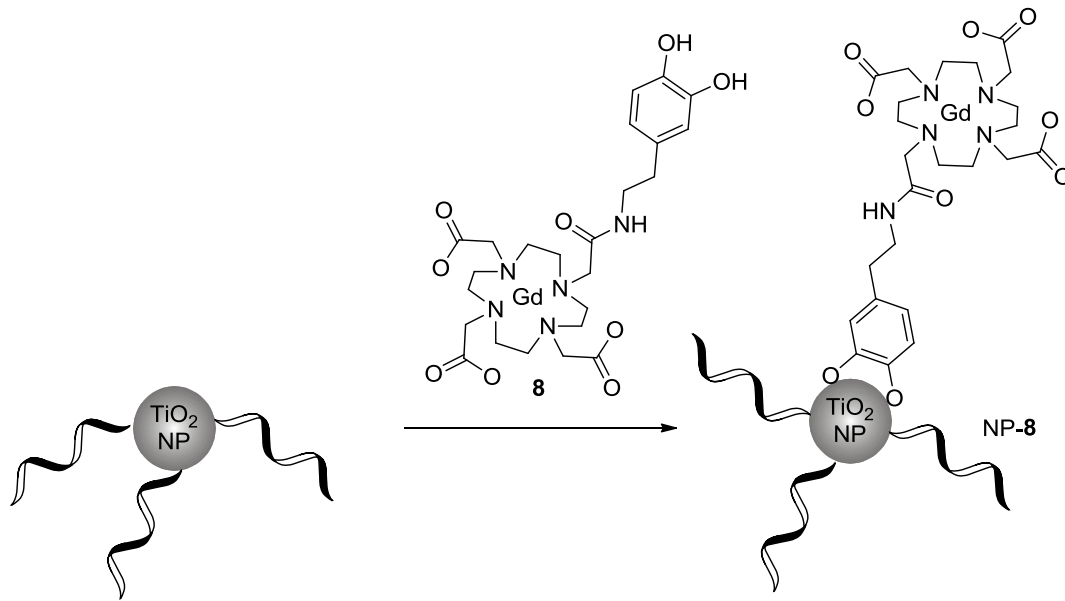


Abbildung 8: Oberflächenmodifikation der DNA-modifizierten Titandioxid-Nanopartikel unter Verwendung eines Gadolinium-Derivats **8**.^[119]

Dieses Produkt wurde zu Dopamin-DNA-modifizierten Titandioxid-Nanopartikel gegeben und es entstand ein gemischtes System aus Gadolinium- und oligonukleotidmodifizierten Nanopartikeln. Die verwendete DNA entsprach einem mitochondrialen Genom, wodurch sich die Partikel vorwiegend an bestimmten Positionen in der Zelle anhaften. Durch die Gadolinium-Modifizierung können die Titandioxid-Nanopartikel durch Magnetresonanztomographie innerhalb der Zelle sichtbar gemacht werden.^[119]

2.4.2 Biofunktionalisierung mit Peptiden

Eine wichtige Anwendung der Titandioxid-Nanopartikel ist, wie bereits erwähnt, die Nutzung für die photodynamische Therapie (Kapitel 2.2.3). Dies ist auch Bestandteil der aktuellen Forschung, so konnte von Yin *et al.* gezeigt werden, dass es möglich ist Titandioxid-Nanopartikel mit einem Peptid, Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC), zu modifizieren.^[120] Genotoxische Experimente zeigten, dass die DNA innerhalb der Zellen von unmodifiziertem Titandioxid selbst ohne Verwendung von UV-A-Strahlung (320-400 nm) zerstört wurde. Wenn bestrahlt wurde, stieg die Schädigung der DNA signifikant. Peptidmodifizierte Nanopartikel führten zu weniger Beschädigung der Plasmid-DNA als unmodifizierte Titandioxid-Nanopartikel. Daraus kann gefolgert werden, dass unmodifizierte Nanopartikel mehr reaktive Sauerstoffspezies produzieren als modifizierte Partikel. Der Grund hierfür ist die Oberflächenbeschichtung des Peptids was zu einer Blockierung des photokatalytischen

Effekts führt. Daraus lässt sich schließen, dass die funktionalisierten Nanopartikel weniger schädlich für DNA sind als reine Partikel. Trotz dieser Ergebnisse zeigte peptidmodifiziertes Titandioxid eine erhöhte Sterberate der HeLa-Zellen im Vergleich zu unmodifizierten Titandioxid-Nanopartikeln unabhängig von der UV-A-Strahlung. Dieser Widerspruch zwischen Genotoxizität und Cytotoxizität von peptidmodifiziertem Titandioxid lässt vermuten, dass die Fähigkeit in Zellen einzudringen eine wichtige Rolle für die Cytotoxizität spielt. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wäre RGDC-Titandioxid ein potentieller Kandidat für die Anwendung in der photodynamischen Therapie.

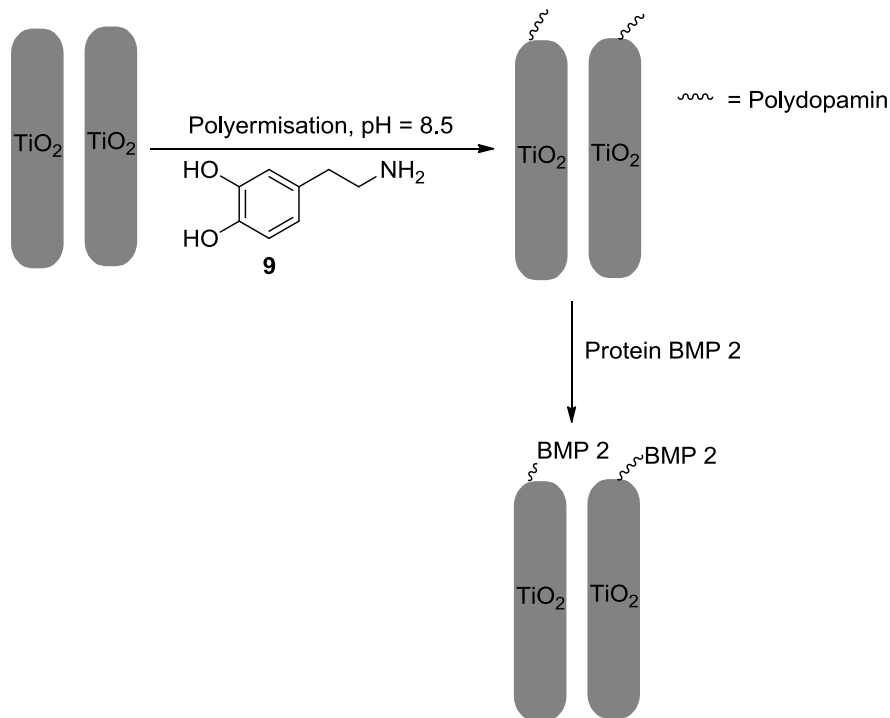
Ma *et al.* konnten durch Verwendung einer einfachen vakuumunterstützten, physikalischen Absorptions-Methode Titandioxid-Nanoröhren mit einem wirksamen antimikrobiellen Peptid (HH-36, KRWWKWWRR) beladen.^[121] Es wurde gezeigt, dass Anatas-Titandioxid mehr Peptid binden kann als amorphes Titandioxid. Antimikrobielle Aktivitätstests gegen grampositive Bakterien vom Typ *Staphylococcus aureus*, zeigten, dass die peptidbeladenen Nanoröhren in der Lage sind 99.9% der Bakterien abzutöten. Zudem konnte die Oberflächen-Adhäsion der Bakterien bereits nach vier Stunden reduziert werden.

Neben Peptiden sind Proteine ebenfalls eine wichtige Stoffklasse; diese sind typischerweise länger, tragen Ladung und weisen einen hohen biologischen Stellenwert auf.^[122]

2.4.3 Biofunktionalisierung mit Proteinen

Von Peng *et al.* wurden Titandioxid-Nanoröhren in unterschiedlichen Größen hergestellt um die Kinetik der Eluierung von verschiedenen Molekülen zu untersuchen.^[123] Die Röhren wurden hierzu mit einem globulären Protein, *bovines Serumalbumin*, beladen. Die Eluierung des Proteins wurde in regelmäßigen Abständen untersucht. Dadurch wurde herausgefunden, dass die Abgabe des Proteins von der Länge der Röhren abhängig ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Titandioxid-Nanoröhren in der Lage sind, den Transport von größeren Molekülen wie Proteinen über einen Zeitraum von 30 Tagen zu kontrollieren. Mit kleineren Molekülen wie dem Chemotherapeutikum Paclitaxel, ist das zwischen sieben und vierzehn Tagen möglich. Diese Studie zeigt, dass es möglich ist, Titandioxid-Nanoröhren für eine Langzeit-Medikamenten-Eluation einzusetzen.

Um das Verhalten von Titandioxid-Nanomaterial auf Stammzellen zu untersuchen, verwendeten Lai *et al.* TiO₂-Nanoröhren mit einer Größe von 30, 60 und 100 nm.^[124] Um das Protein BMP 2, das die Knochenbildung anregt, an die Nanoröhren zu binden, wurde Polydopamin als Verbindung zwischen Titandioxid und dem Protein verwendet (Schema 12).



Schema 12: Biofunktionalisierung von Titandioxid-Nanoröhren mit Protein BMP 2.^[124]

Das Protein liefert biochemische Impulse für das Zellwachstum von Mesenchym-Stammzellen, die eine große Rolle bei der Knochen- und Knorpelbildung spielen.^[125] Die Ergebnisse der Zellstudien zeigten, dass proteinmodifizierte Nanoröhren zu einem erhöhten Zellwachstum führten. Zudem wiesen die Stammzellen, die auf proteinmodifizierten Nanopartikeln entstanden sind, eine verbesserte Lebensfähigkeit auf als die Zellen, die an unmodifizierten Titandioxid-Nanoröhren gewachsen sind. Diese Methode könnte Anwendung bei der Entwicklung von titandioxidbasierten Implantaten finden, die bei Knochenerkrankungen eingesetzt werden.

Obwohl es bereits viele Veröffentlichungen über die Verwendung von Titandioxid-Nanomaterial gibt, sind die Biofunktionalisierung und nanomedizinische Anwendungen noch im Anfangsstadium. Daher basiert diese Arbeit auf der Untersuchung der Fähigkeit, verschiedene Liganden an die Titandioxid-Nanoteilchen zu binden. Dies soll einerseits die Nanopartikel und Nanostäbchen stabilisieren und andererseits die Bindung weiterer Moleküle an die Oberfläche zu ermöglichen, was sich auf die Eigenschaften der Nanoteilchen auswirken könnte.

3 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Titandioxid-Nanopartikel und –Nanostäbchen synthetisiert werden, die durch verschiedene Biomoleküle modifiziert werden können. Somit sollten auf Nanopartikel basierende Biosensoren entwickelt werden.

Die Michael-Addition ist eine etablierte Methode zur Verknüpfung von Maleinimiden und thiolierten Molekülen. Die Maleinimidfunktion sollte an einem Endiol-Liganden eingeführt werden und somit die Bindung einer Vielzahl thiolierter Biomoleküle an der Oberfläche der Titandioxid-Nanopartikel und -stäbchen ermöglichen.

Insbesondere die Einführung verschiedener Funktionalitäten an die Liganden steht im Vordergrund, dadurch tolerieren Nanopartikel eine Vielzahl funktioneller Gruppen biologischer Moleküle. Aus diesem Grund sollten catecholbasierte Moleküle mit Alkin-beziehungswise Azidfunktionen synthetisiert werden, die als bifunktionelle Linker einerseits an Titandioxid-Nanopartikel und andererseits weitere Moleküle binden können. Durch Verwendung der kupferkatalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition sollten unterschiedliche Biomoleküle an die modifizierten Nanoteilchen gebunden werden. Zudem sollte ein „*self-reporting*“-Linker auf Basis von Cumarin hergestellt werden, der in der Lage ist an Titandioxid zu binden und den Erfolg der Reaktion durch Fluoreszenz sichtbar zu machen.

Um die Azid-Alkin-Cycloaddition für die Anwendung in Zellen nutzen zu können, sollte eine kupferfreie Methode entwickelt werden. Die Anwendung der Nanoteilchen ist durch deren Löslichkeit meist stark eingeschränkt, daher sollten wasserlösliche Linker mit verschiedenen Funktionalitäten synthetisiert werden, dies sollte durch die Einführung von Triethylenglykol realisiert werden.

Analog zu den bifunktionellen Linkern sollten trifunktionelle Liganden hergestellt werden, die die Grundlage der Entwicklung von Biosensoren bilden. Durch diese Linker entsteht die Möglichkeit, sowohl Biomoleküle als auch Farbstoffe über die verschiedenen Funktionalitäten an die Nanoteilchen zu binden. Der Farbstoff dient zur Lokalisierung der Nanopartikel innerhalb der Zellen. Hierzu sollten Modifizierungen wie die Amid-Kupplung angewendet werden. Zusätzlich sollten die hergestellten Titandioxid-Nanopartikel und Nanostäbchen auf ihre Fähigkeit, reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren untersucht werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Synthesen der TiO₂-Nanoteilchen

Die Gleichmäßigkeit der Titandioxid-Nanopartikel ist von großer Wichtigkeit, da diese direkt in Beziehung zu den außergewöhnlichen Eigenschaften, wie der photokatalytischen Aktivität, stehen. Daher ist es von entscheidender Bedeutung wie die Nanoteilchen hergestellt werden. So erhält man beispielsweise mittels einer nicht-wässrigen Methode Nanopartikel, die unlöslich in Wasser sind. Dadurch ist deren Anwendung zur Funktionalisierung mit Biomolekülen stark begrenzt.^[126] Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Methoden untersucht, um kristalline und möglichst monodisperse Nanopartikel zu synthetisieren.

4.1.1 Synthese mittels Hochtemperatur-Verfahren – Oleylamin-Methode

Zunächst wurden die Nanopartikel in einem Hochtemperatur-Verfahren hergestellt, hierbei entstehen nach Modifikation mit wasserlöslichen Molekülen biokompatible Anatas-Nanopartikel. Die Synthese der Titandioxid-Nanopartikel (TiO₂-NP) erfolgte nach einer Vorschrift von Seo *et al.* Hierzu wurde eine Suspension aus Titanchlorid, Ölsäure und Oleylamin für zehn Minuten auf 270 °C erhitzt.^[63a] Die Kristallstruktur von Titandioxid hängt zum einen von der Synthesemethode und zum anderen von der Temperatur ab, welche wiederum für die Form des Nanomaterials verantwortlich ist. Durch Temperaturerhöhung können Strukturtransformationen stattfinden.^[17] Daher wurde die Temperatur mit einem Fühler im Kolben konstant auf 270 °C gehalten, um Schwankungen der Größe zu verhindern. Nach Zugabe von Titanchlorid war ein Farbumschlag von gelb nach blau zu erkennen. Diese blaue Farbe lässt sich dadurch erklären, dass es entweder zu Fehlstellen im Kristallgitter kommt oder dass Ti³⁺ und Ti⁴⁺ Zwischengitterplätze besetzen.^[127]

Zur Stabilisierung der Nanopartikel wurden Ölsäure (**10**) und Oleylamin (**11**) verwendet (Abbildung 9), die an die Oberfläche der Nanopartikel binden und dadurch vor Agglomeration der Nanopartikel schützen. Beide Moleküle weisen eine Siedetemperatur von über 300 °C auf und sind daher für das Hochtemperatur-Verfahren gut geeignet.

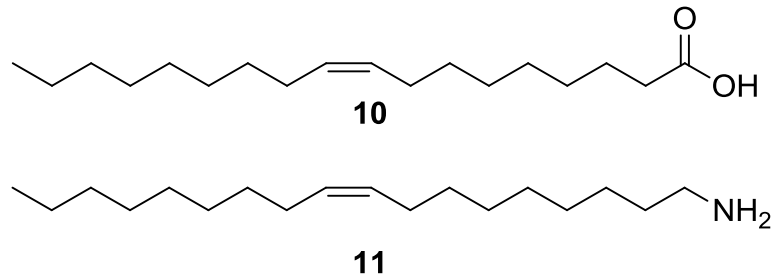


Abbildung 9: Struktur von Ölsäure (**10**) und Oleylamin (**11**) zur Stabilisierung der Titandioxid-Nanopartikel.

Ölsäure (**10**) und Oleylamin (**11**) weisen eine Kettenlänge von 18 Kohlenstoffatomen und eine *cis*-Doppelbindung am C-9 auf. Werden Moleküle mit abnehmender Kettenlänge verwendet, verringert sich der Abstand zwischen den Nanopartikeln und die Wechselwirkung zwischen den Partikeln nimmt zu. Daher hat sich die Kombination von Oleylamin (**11**) mit Ölsäure (**10**) als Stabilisatoren zu einer Standardmethode entwickelt.^[128] Beide Moleküle binden über ihren hydrophilen Teil reversibel an die Oberfläche der Nanopartikel.

Nach Ausfällen wurde ein weißes Pulver aus Titandioxid-Nanopartikeln erhalten. Die Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahmen (TEM) zeigten, dass mittels dieser Hochtemperatur-Methode sphärische Nanopartikel entstanden sind, die einen Durchmesser von ungefähr fünf Nanometern aufwiesen (Abbildung 10a.). Durch Röntgenbeugungsanalyse konnte gezeigt werden, dass es sich bei den synthetisierten Nanopartikeln um Anatas handelt (Abbildung 10b.). Aufgrund der geringen Größe der Partikel sind die entstandenen Signale etwas breit. Einige Studien zeigen, dass die Partikel einen Durchmesser von 40 nm aufweisen sollten, um gute Ergebnisse in der Röntgenbeugungsanalyse zu erzielen.^[129]

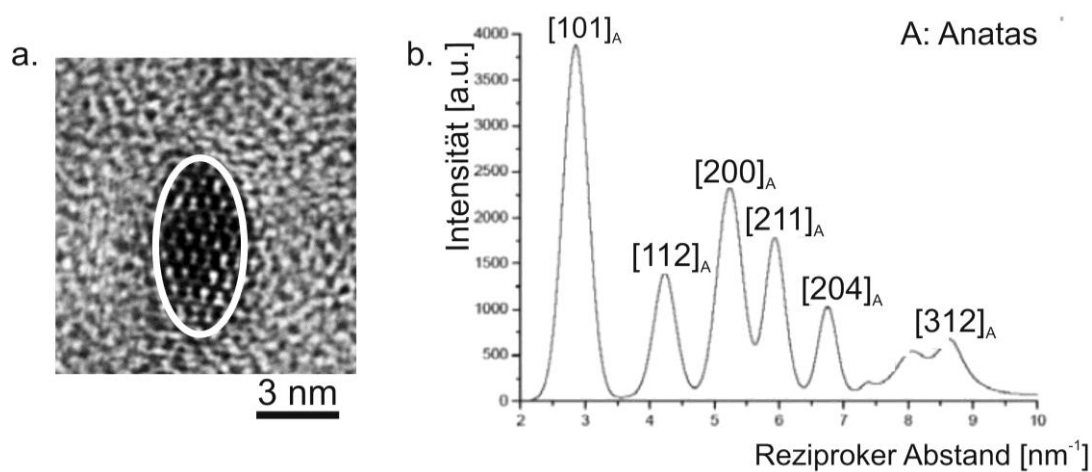


Abbildung 10: a. TEM-Aufnahmen der Titandioxid-Nanopartikel in Toluol nach Seo *et al.*^[63a], b. Röntgenstrukturanalyse der Nanopartikel.

Um den Einfluss der Reaktionslaufzeit auf die Größe und Kristallinität der Nanopartikel zu untersuchen, wurden die Reaktionszeiten der Hochtemperatur-Methode variiert. Zunächst wurde die Reaktion von zehn Minuten auf eine halbe Stunde verlängert. Dies führte zu einer Vergrößerung des Durchmessers von fünf auf sechs Nanometer und nach einer Stunde auf sieben Nanometer (Abbildung 11).

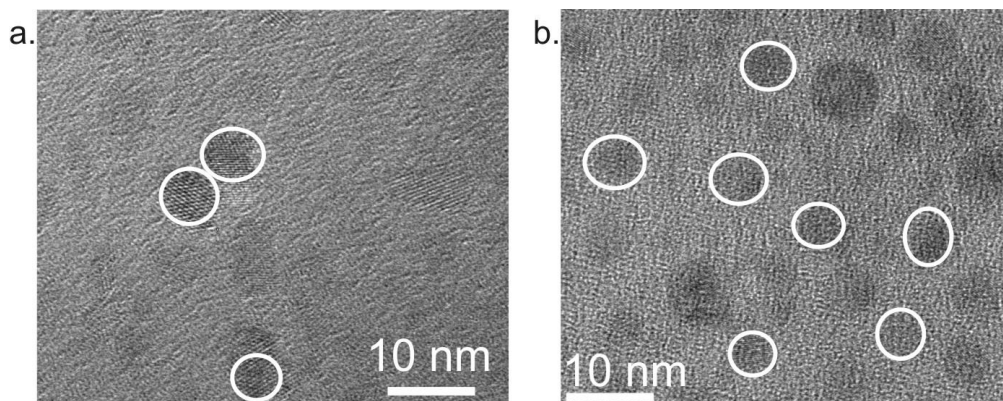


Abbildung 11: TEM-Aufnahmen der Titandioxid-Nanopartikel nach a) einer halben Stunde und b) nach einer Stunde bei 270 °C in Toluol.

Die Reaktionszeit wurde auf 2.5 Stunden verlängert, wobei es zu einer Änderung der Form kam, es entstanden regelmäßige Nanostäbchen. Da dies nicht zu erwarten war, wurden die Reaktionszeiten weiter variiert, auf vier, sechs und acht Stunden; dabei entstanden ebenfalls definierte Nanostäbchen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Einfluss der Reaktionszeiten auf die Form der Titandioxid-Nanoteilchen.

Reaktionszeit [h]	Form
0.5	Sphärische Nanopartikel
1	Sphärische Nanopartikel
2.5	Nanostäbchen
4	Nanostäbchen
6	Nanostäbchen
8	Nanostäbchen

Zur Charakterisierung wurden TEM-Aufnahmen durchgeführt (Abbildung 12(a-d)), die Debye-Röntgenstrukturanalyse hat gezeigt, dass die erhaltenen Nanopartikel der Anatas-Form entsprechen.

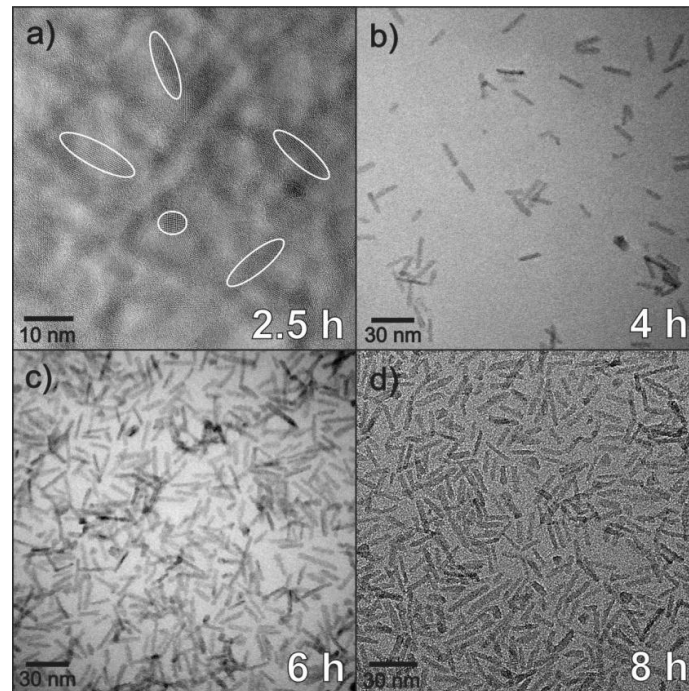


Abbildung 12: TEM-Aufnahmen von Titandioxid-Nanoteilchen nach a) 2.5 Stunden, b) 4 Stunden, c) 6 Stunden und d) 8 Stunden bei 270 °C in Toluol.

Die Länge und der Durchmesser der Nanostäbchen wurden manuell mittels *Image J* ermittelt, indem 100 Stäbchen jeder Probe gemessen und der Durchschnitt gebildet wurde (Tabelle 2). Es ist ersichtlich, dass die Stäbchen mit einer Größe von 17 nm bereits nach zweieinhalb Stunden gebildet werden und mit steigender Reaktionszeit kein wesentlicher Unterschied in Größe oder Durchmesser erkennbar ist. Eine weitere Zugabe von Titanchlorid nach vier Stunden zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Größe oder den Durchmesser.

Tabelle 2: Größe und Durchmesser der mittels Hochtemperatur-Verfahren hergestellten Titandioxid-Nanoteilchen.

Reaktionszeit [h]	Länge [nm]	Durchmesser [nm]
2.5	17.0 ± 5.0	3.20 ± 1.2
4.0	17.0 ± 4.0	3.20 ± 0.6
6.0	17.0 ± 4.0	3.60 ± 0.6
8.0	16.0 ± 4.0	3.60 ± 0.6

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der in der Literatur berichteten Methode von Ge *et al.*^[130], hierbei kam es zur Bildung größerer, nadelähnlicher TiO₂-Partikel bei längeren Reaktionszeiten. Dabei wurden jedoch verschiedene Lösungsmittel und unterschiedliche Ausgangsstoffe verwendet um Stäbchen zu erzeugen. Die Gruppe um Ge verwendete Wasser

und Titansulfat während in der hier berichteten Methode Ölsäure (**10**)/Oleylamin (**11**) und Titanchlorid zum Einsatz kamen, die zu einem veränderten Kristallwachstum führten.

Anschließend wurden die synthetisierten Nanostäbchen mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Aus Abbildung 13 ist zu erkennen, dass die Stäbchen ein breites Signal um 270 nm aufweisen.

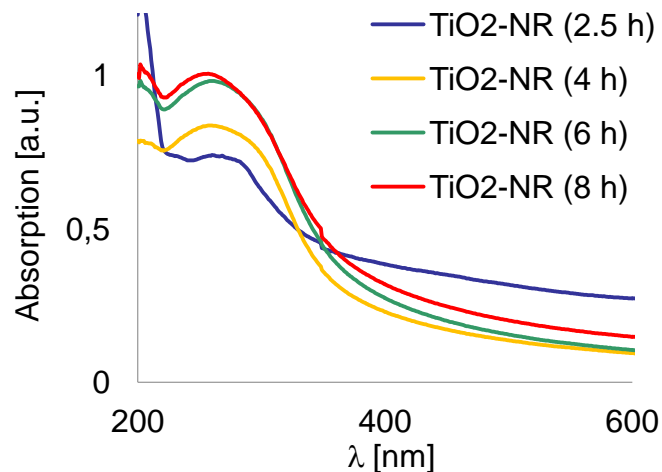


Abbildung 13: UV/Vis-Spektrum der Titandioxid-Nanostäbchen (NR) in Methanol, die durch Variation der Reaktionszeit hergestellt wurden.

Zetapotential-Messungen zeigten, dass das Potential mit steigender Reaktionszeit abnimmt, was durch eine erhöhte Anzahl negativer Ladungen mit steigender Heizperiode verursacht wird (Tabelle 3). Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass mehr Ölsäure (**10**) anstelle von Oleylamin (**11**) an die Nanostäbchen bindet oder, dass es mehr negativ geladene Gruppen von Titandioxid an der Oberfläche gibt. Das Zetapotential ist ein Indikator für die Stabilität von Dispersionen. Aufgrund der gegenseitigen Abstoßung durch die Partikelladung gelten Dispersionen mit einem Zetapotential oberhalb von 30 mV beziehungsweise unterhalb von -30 mV als stabil und neigen nicht zur Agglomeration. Es konnte gezeigt werden, dass die Stabilität der Stäbchen mit längerer Reaktionszeit steigt, somit weisen die Nanostäbchen nach acht Stunden eine gute Stabilität auf.

Tabelle 3: Zetapotentiale der Titandioxid-Nanostäbchen bei verschiedenen Reaktionszeiten.

Reaktionszeit [h]	Zetapotential [mV]
2.5	13.1 ± 0.6
4.0	-6.50 ± 0.1
6.0	-22.5 ± 0.8
8.0	-39.4 ± 0.5

Die Bildung der Nanostäbchen beansprucht ein anisotropes Kristallwachstum, welches dadurch realisiert wird, das sich die freie Oberflächenenergie der verschiedenen kristallographischen Ebenen stark voneinander unterscheidet. Ein „*oriented mechanism*“ (OA) kann die Bildung von komplizierten Strukturen kontrollieren.^[44a] Im OA-Mechanismus werden zwei kleine Nanopartikel zu einem großen Partikel kombiniert, wobei beide Nanopartikel eine adäquate Orientierung zueinander aufweisen sollten. Zusätzlich haben organische Moleküle, wie oberflächenaktivierende Stoffe, die Möglichkeit, Form und Größe der wachsenden Partikel zu kontrollieren.^[131]

Aufgrund einzigartiger Eigenschaften hat das Interesse an anisotropen Nanostrukturen, wie Nanostäbchen, Würfeln oder Prismen in den letzten Jahren immer mehr zugenommen.^[132] So war es beispielsweise möglich, eine Anordnung von Nanostäbchen herzustellen, die an den Spitzen verknüpft sind.^[133] Durch ihre Form könnten sich die Nanostäbchen besonders gut dazu eignen, als Transport-Sonden Zellmembranen zu passieren.^[134]

Für weitere Untersuchungen wurden aufgrund der Kristallinität und der Stabilität die Nanostäbchen verwendet, die mit einer Reaktionszeit von acht Stunden bei 270 °C hergestellt wurden.

4.1.2 Sol-Gel-Synthese – Diethylenglykol-Methode

Um hochkristalline Nanopartikel herzustellen werden meist hohe Temperaturen und Drücke^[135] oder auch längere Reaktionszeiten benötigt.^[136] Zudem entstehen durch stark bindende Liganden wie Ölsäure (**10**) Nanopartikel mit einer hydrophoben Oberfläche, obwohl die meisten Anwendungen in wässrigen Lösungen stattfinden.^[137] Um wasserlösliche Nanopartikel herzustellen, wurde daher auf eine Synthese von Wang *et al.* zurückgegriffen.^[138] Diese wurde dahingehend variiert, als dass Titanchlorid anstelle von Titanisopropoxid als Vorstufe bei 60 °C in Diethylenglykol eingesetzt wurde. Die erhaltene Suspension wurde auf 75 °C erhitzt und Wasser wurde zugegeben. Das Gemisch wurde für

drei Stunden bei 160 °C gerührt, nach zwei Tagen bei Raumtemperatur wurden die Nanopartikel durch Zugabe von Aceton ausgefällt. Es wurde ein weißes Pulver bestehend aus Anatas-Titandioxid erhalten. Der Mechanismus der Synthese ist in Abbildung 14a. dargestellt, die TEM-Aufnahmen zeigten sphärische Nanopartikel mit einer Größe von drei bis vier Nanometern (Abbildung 14b.). Im Vergleich zu den Nanopartikeln nach Wang *et al.*^[138] zeigen diese eine verbesserte Löslichkeit in Wasser und sind bei Lagerung unter 8 °C über einen Zeitraum von einem Jahr stabil und weisen keine Agglomeration auf.

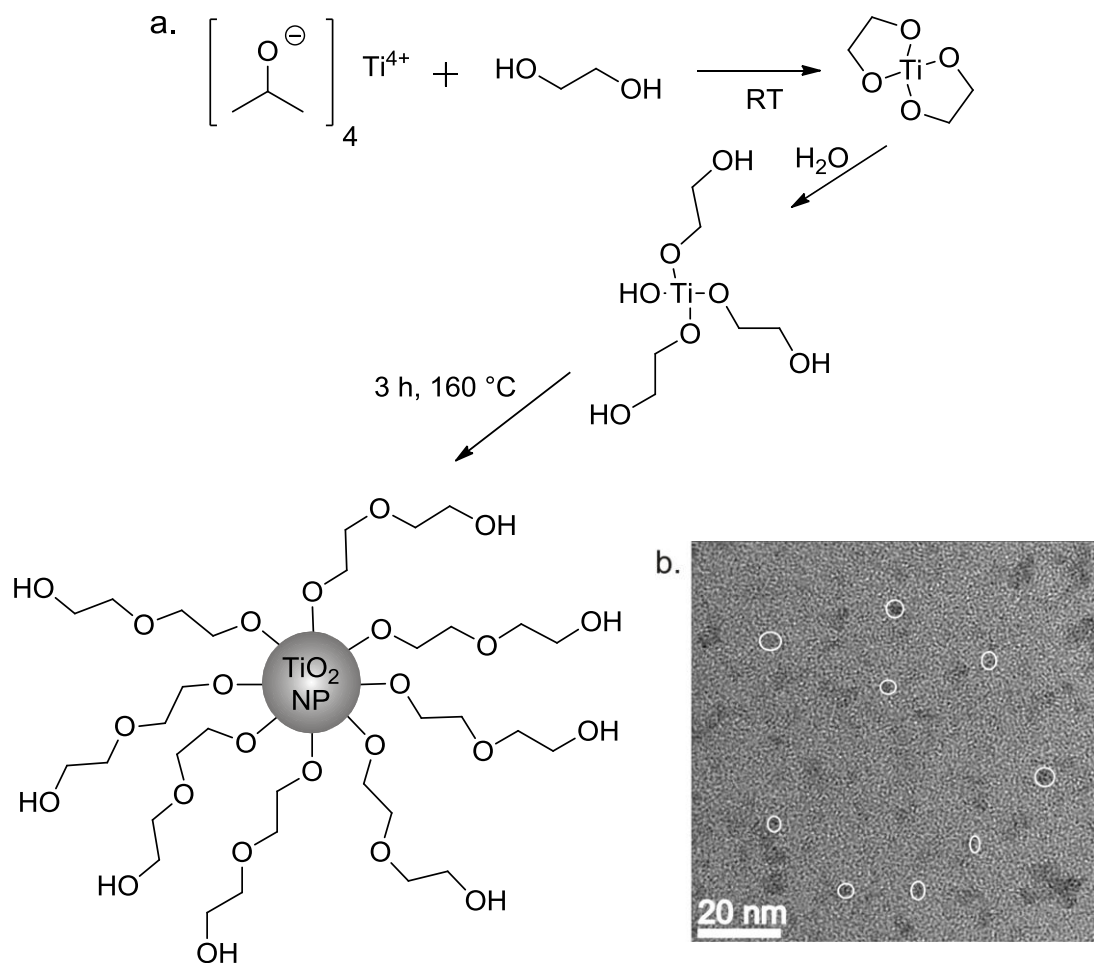


Abbildung 14: a. Vorgeschlagerener Mechanismus der Synthese der Titandioxid-Nanopartikel nach Wang *et al.*^[138] und b. die zugehörigen TEM-Aufnahmen der Titandioxid-Nanopartikel.

Anschließend wurde untersucht, ob es zu einer Änderung der Größe oder der Kristallinität der Nanopartikel kommt, wenn die Reaktionszeiten variiert werden. Zunächst wurde die Reaktionszeit von drei auf sechs Stunden verlängert, hierbei wurde festgestellt werden, dass sowohl Rutil als auch Anatas als Strukturtyp vorhanden ist (Abbildung 15a.). Nach Reinigung der Nanopartikel konnte fast ausschließlich Rutil als Strukturtyp detektiert werden, im

Vergleich zu den Nanopartikeln nach drei Stunden, die Anatas-Struktur aufwiesen (Abbildung 15b.).

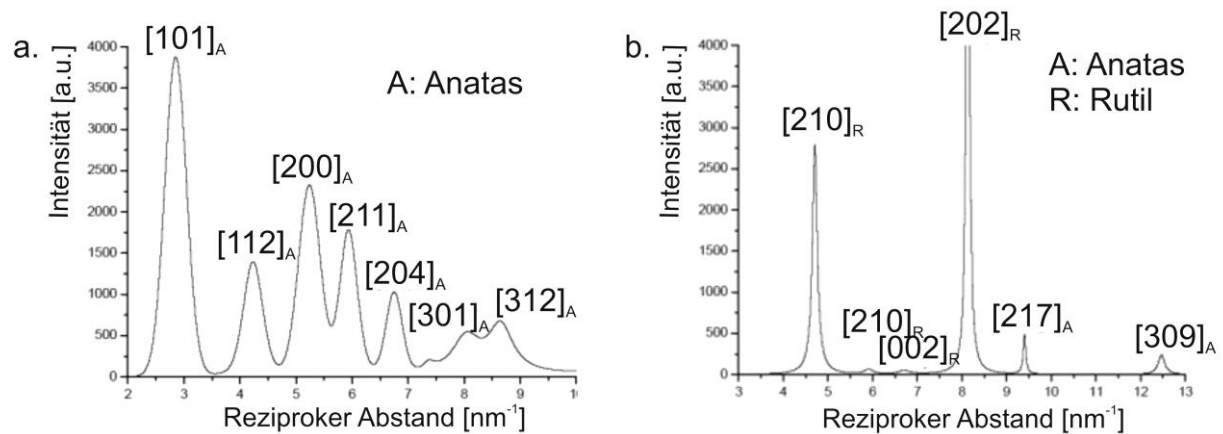


Abbildung 15: Röntgenstrukturanalyse der diethylenglykolstabilisierten Titandioxid-Nanopartikel a. vor und b. nach der Reinigung mittels Zentrifugation.

Eine weitere Verlängerung der Reaktionslaufzeit führte zu keinem Unterschied in Größe oder Struktur. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Ansätzen die Nanopartikel verwendet, die nach einer Reaktionszeit von sechs Stunden erhalten wurden. Diese werden in den folgenden Kapiteln mit DEG-NP abgekürzt.

4.1.3 Ligandenfreie Synthese

Um größere Nanopartikel zu synthetisieren, wurden die Titandioxid-Nanopartikel nach einer Vorschrift von Rajh *et al.* hergestellt.^[139] Zudem wurden während der Synthese keine oberflächenstabilisierenden Liganden zugegeben; somit sollte ein späterer Ligandenaustausch erleichtert werden.

Es wurde Titanchlorid bei 5 °C in Wasser getropft, die erhaltene Suspension wurde für eine Stunde gerührt bis eine vollständige Entfärbung auftrat.^[140] Das farblose Gemisch wurde gegen Natriumhydrogenphosphat (pH = 6.5) dialysiert. Die Anatas-Nanopartikel wurden als weiße Suspension erhalten. Die TEM-Aufnahmen zeigten eine polydisperse Mischung aus sphärischen Nanopartikel mit einer Größe zwischen drei und sieben Nanometer (Abbildung 16); exemplarisch wurden einige Nanopartikel in der TEM-Aufnahme markiert.

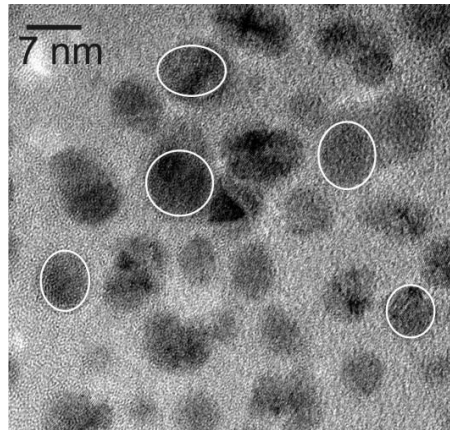


Abbildung 16: TEM-Aufnahmen der Titandioxid-Nanopartikel nach Rajh *et al.* in Wasser.

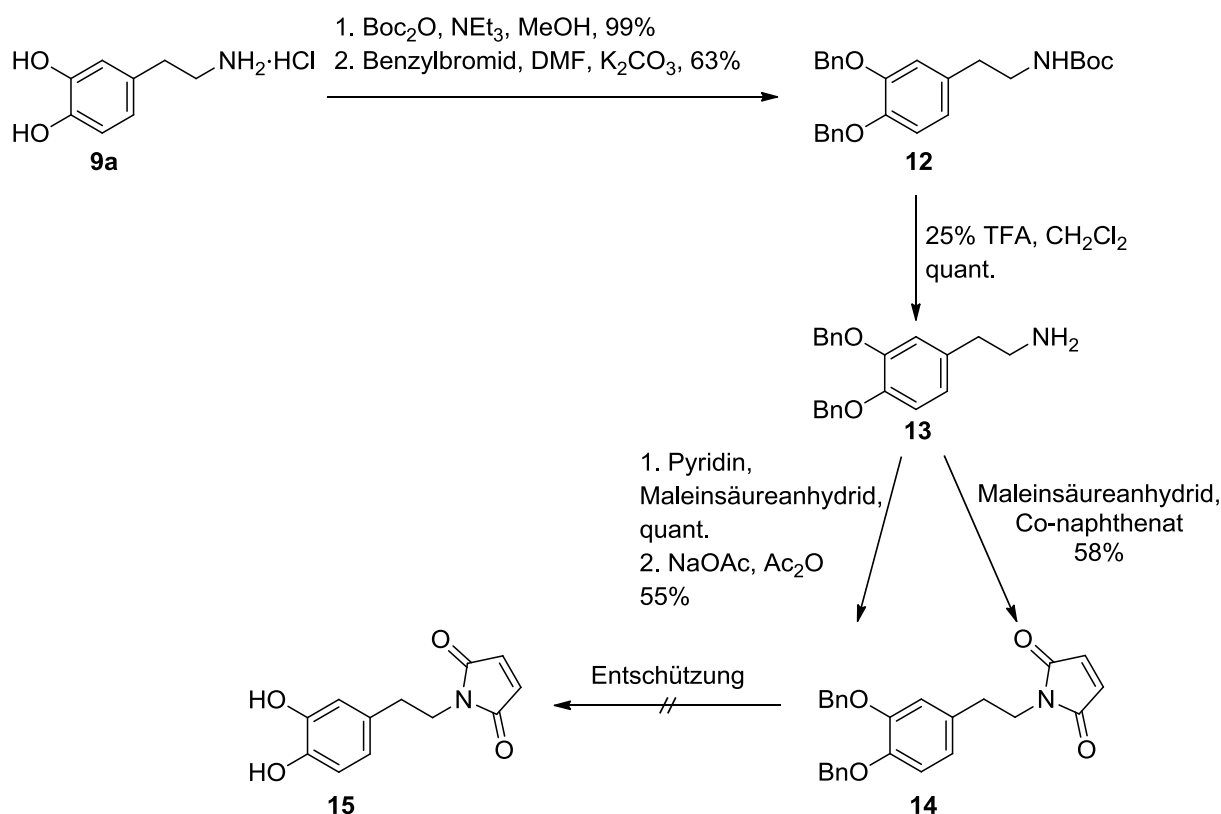
Um eine längere Stabilität der Nanopartikel zu gewährleisten, wurde ein Teil der Nanopartikel nach der Dialyse mittels Isopropylether modifiziert. Dieser Ether bindet schwach an die Partikel und kann daher durch stärker bindende Moleküle ausgetauscht werden.^[100] Die unmodifizierten Nanopartikel waren über einen Zeitraum von vier Monaten bei 5 °C, die mit Ether modifizierten Nanopartikel über zwei Jahre stabil.

4.2 Oberflächenmodifikation der TiO₂-Nanopartikel mit Maleinimid (15)

Zur Funktionalisierung der Nanopartikel sollte ein Molekül dienen, welches in der Lage ist verschiedene biologische Moleküle an die Oberfläche zu binden. Natürlich vorkommende Endiol-Liganden wie Dopamin (**9**) sind dafür besonders geeignet, da sie einen Charge-Transfer-Komplex mit Titandioxid bilden.^[141] Hierbei führt die Absorption bei 440 nm zur Anregung von Elektronen des Liganden direkt in das Leitungsband von Titandioxid. Dieser Effekt wurde bereits verwendet, um DNA-TiO₂-Hybridsysteme zu untersuchen, wie beispielsweise die photokatalytische Spaltung von DNA durch ultraviolette Strahlung.^[100] Die starke Charge-Transfer-Komplex-Bildung ist ein Grund weshalb aus natürlich vorkommendem und wasserlöslichem Dopamin (**9**) ein Maleinimid hergestellt wurde um die Nanoteilchen zu modifizieren. Da Thiole häufig in Biomolekülen wie Proteinen und Peptiden durch die Aminosäure Cystein enthalten sind, bietet sich die Michael-Addition zur Modifizierung der Nanopartikel an. Zudem ist die Kupplung von Maleinimiden an Thiole eine der meist verwendeten Methoden um DNA, Proteine oder Peptide mit Farbstoffen zu modifizieren. Der Grund hierfür liegt in der Effizienz und der Spezifität der Reaktion.^[142]

4.2.1 Synthese von Dopamin-Maleinimid (**15**) - bifunktioneller Catechol-Linker

Als Startmaterial für die Synthese eines bifunktionellen, catecholbasierten Maleinimid-Linkers wurde Dopamin (**9**) verwendet. Ausgehend von Dopamin-Hydrochlorid (**9a**) wurde zunächst die Aminogruppe mittels Di-*tert*-butyldicarbonat und anschließend die Catecholfunktion mittels Benzyl-Gruppen geschützt. Nach der Entschützung der Aminofunktion konnte in einer Eintopfsynthese oder auch über zwei Stufen mittels Maleinsäureanhydrid und anschließender Cyclisierung das gewünschte Maleinimid **14** erhalten werden.^[143] Die darauffolgende Entschützung der Catecholfunktion für die Bindung an die Titandioxid-Nanopartikel verlief nicht zufriedenstellend (Schema 13, Tabelle 4).

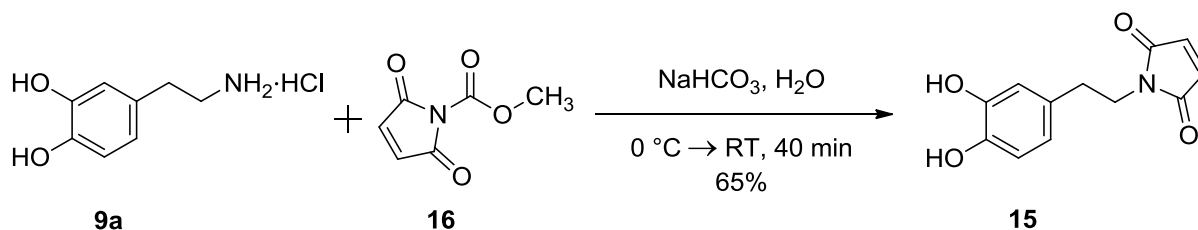


Schema 13: Synthese von Dopamin-Maleinimid **14** mittels Benzylschutzgruppen.

Tabelle 4: Reaktionsbedingungen der Entschützung des benzylgeschützten Maleinimids **14**.

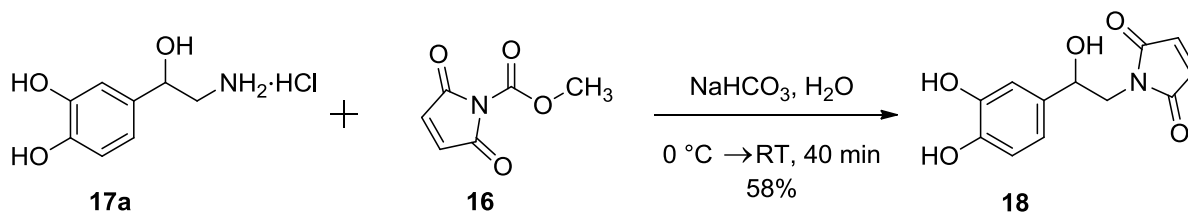
Eintrag	Bedingungen	Produkt
1	H_2 , 5 mol% Pd/C, THF, 3 h	-
2	10.0 Äq. 1,4-Cyclohexadien, 20 mol% Pd/C, EtOH, 3 h, Argon	-
3	28.0 Äq. BBr_3 , CH_2Cl_2 , 14 h	-

Da die Entschützung unter Verwendung verschiedener Bedingungen nicht erfolgreich verlief, wurde die Methode von Keller *et al.*^[144] angewendet. Hierbei wurde *N*-Methoxycarbonylmaleinimid (**16**) verwendet, um maleinimidmodifizierte Aminosäuren herzustellen.^[144] Dopamin-Hydrochlorid (**9a**) wurde in gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst und bei 0 °C wurde *N*-Methoxycarbonylmaleinimid (**16**) zugegeben (Schema 14). Das Produkt **15** konnte nach Rühren bei Raumtemperatur für 40 Minuten und anschließender säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 65% erhalten werden.



Schema 14: Synthese von Dopamin-Maleinimid (**15**) mittels *N*-Methoxycarbonylmaleinimid (**16**).

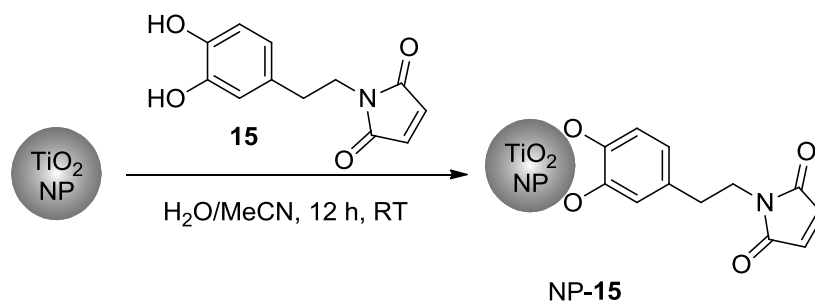
Ein großer Vorteil dieser Reaktion ist, dass sie im basischen Medium abläuft, somit stört es nicht, dass Dopamin (**9**) als Hydrochlorid vorliegt. Ein weiterer Vorteil ist, dass eine Schützung der Catecholgruppen nicht notwendig war, daher konnte Dopamin-Maleinimid (**15**) in einer Stufe und in guten Ausbeuten erhalten werden. Die synthetische Methode wurde ebenfalls auf das Dopamin-Derivat Norepinephrin (**17**) angewendet (Schema 15). Um die Ausbeute zu verbessern wurde das Edukt **17a** zunächst aus Ethanol und Diethylether umkristallisiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das gewünschte Maleinimid **15** in einer Ausbeute von 58% erhalten werden.



Schema 15: Synthese von Norepinephrin-Maleinimid (**18**) mittels *N*-Methoxycarbonylmaleinimid (**16**).

4.2.2 Modifikationen der Nanopartikel mit Dopamin-Maleinimid (**15**)

Die Oberfläche der Nanopartikel oder auch Nanostäbchen ist, anhängig von der verwendeten Methode, mit schwach bindenden Liganden wie beispielsweise Diethylenglykol oder Ölsäure (**10**) stabilisiert. Um andere Moleküle an die Oberfläche binden zu können, muss man Verbindungen mit einer stärkeren Affinität zu TiO₂ wählen, um einen Ligandenaustausch durchführen. Die Oberflächenmodifikation mit Dopamin-Maleinimid (**15**) ist exemplarisch anhand der diethylenglykolstabilisierten Nanopartikel gezeigt (Schema 16).



Schema 16: Oberflächenmodifikation der Titandioxid-Nanopartikel mit Dopamin-Maleinimid (**15**).

Die farblosen Nanopartikel (DEG-NP) wurden zu einer gelben Maleinimid-Lösung **15** gegeben, was direkt nach der Zugabe zu einem Farbumschlag nach orange-braun führte. Diese Farbänderung ist durch die Bildung eines Charge-Transfer-Komplexes verursacht, welcher auf die erfolgreiche Bindung des Catechols **15** an die Nanopartikel deutet.

Um den Ligandenaustausch zu bestätigen, wurden die hydrodynamischen Radien der reinen Nanopartikel und mit maleinimidmodifizierten Nanopartikel (NP-**15**) mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt (Tabelle 5). Die Ergebnisse für die reinen Nanopartikel stimmen mit ungefähr fünf Nanometern gut mit den Ergebnissen aus den TEM-Aufnahmen überein (Kapitel 3.1.2). Nach der Oberflächenmodifikation mit dem Maleinimid **15** kommt es zu einer Vergrößerung des hydrodynamischen Radius auf circa 34 nm, dies spricht für einen erfolgreichen Ligandenaustausch. Durch die Messungen des hydrodynamischen Radius ist erkennbar, dass es zu keiner Agglomeration nach der Oberflächenmodifikation kommt. TEM-Messungen nach drei Monaten zeigten Vergrößerungen des hydrodynamischen Radius der maleinimidmodifizierten Nanopartikel im Bereich von 34.2 ± 2 nm.

Tabelle 5: Ergebnisse der DLS-Messungen der maleinimidmodifizierten Titandioxid-Nanopartikel (NP-**15**).

Eintrag	Radius [nm]
TiO ₂ -NP	5.13 ± 0.050
NP- 15	34.2 ± 0.395

Zusätzlich wurden die Nanopartikel mittels UV/Vis-Messungen charakterisiert (Abbildung 17). Das Spektrum des reinen Maleinimids **15** weist ein Maximum bei 281 nm auf, der Charge-Transfer-Komplex ist im Bereich zwischen 370 und 530 nm deutlich sichtbar. Somit konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Maleinimids **15** an die Nanopartikel erfolgreich verlief.

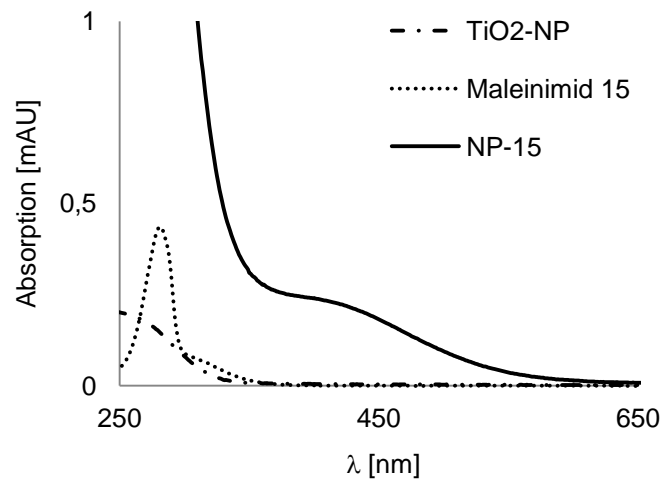


Abbildung 17: UV/Vis-Spektrum der maleinimidmodifizierten Titandioxid-Nanopartikel (NP-15).

Das UV/Vis-Spektrum kann dazu verwendet werden, die Energie der Bandlücke von Hybrid-Systemen zu bestimmen.^[145] Diese wurden mit folgender Formel berechnet:

$$E \text{ [eV]} = \frac{1240}{\lambda \text{ [nm]}}$$

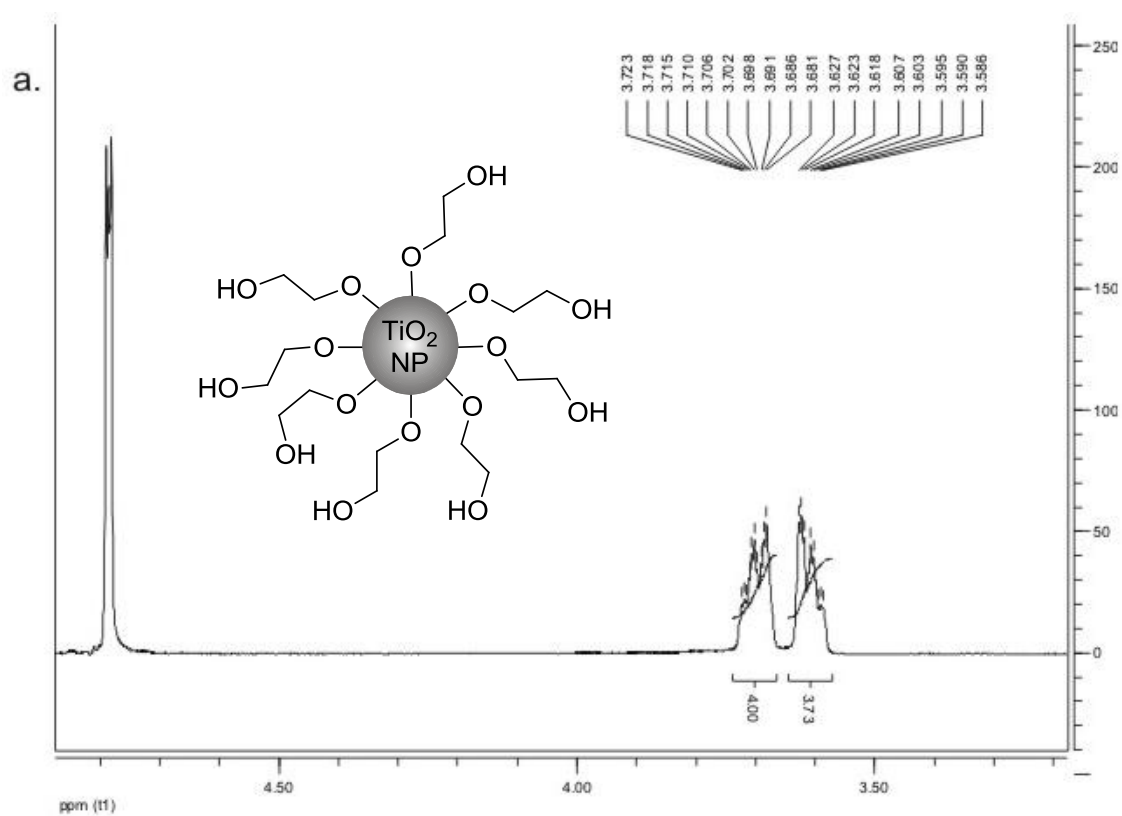
wobei λ die Wellenlänge der Bandlücke darstellt. Hierzu wurde ein Bereich im Spektrum zwischen 300 und 400 nm gewählt, um die Wellenlänge zu bestimmen in der die Ausgleichsgerade einen Schnittpunkt mit der x-Achse hat. Nach Einsetzen des erhaltenen Werts für die Wellenlänge in die oben gezeigte Formel kommt es zu einer Erniedrigung der Energie nach der Liganden-Addition um 0.4 eV im Vergleich zu den unmodifizierten Nanopartikeln (Tabelle 6). Je höher die Bandlücke, desto mehr Energie (ultraviolettes Licht) wird benötigt, um Elektronen-Loch-Paare zu bilden, die mit Sauerstoff- und Wassermolekülen aus der Umgebung des Halbleiters rekombinieren, um reaktive Sauerstoffspezies zu bilden.^[146] Die berechneten Ergebnisse zeigen, dass die modifizierten Nanopartikel niedrigere Energien und somit weniger energetisches Licht benötigen, um diese anzuregen als die unmodifizierten Nanopartikel.

Tabelle 6: Bandlückenenergie und Maxima der Charge-Transfer-Komplexe der maleinimidmodifizierten Titandioxid-Nanopartikel (NP-15).

Eintrag	λ_b [nm]	E_b [eV]	λ_{ct} [nm]
TiO ₂ -NP	322	3.85	-
NP-15	359	3.45	389

b: Bandlücke; ct: Charge-Transfer

Weiterhin wurde die Präsenz von Dopamin-Maleinimid (**15**) auf der Nanopartikel-Oberfläche mittels $^1\text{H-NMR}$ bestätigt (Abbildung 18). Hierzu wurden die modifizierten Nanopartikel nach zweimaligem zentrifugieren in deuteriertem Acetonitril aufgenommen. Diese Reinigungsschritte wurden durchgeführt, um nicht gebundenes Maleinimid **15** zu entfernen. Die unmodifizierten Nanopartikel zeigen in deuteriertem Wasser zwei Multipletts bei 3.69-3.72 und zwischen 3.59 und 3.63 ppm, die die vier CH_2 -Gruppen des Diethylenglykol widerspiegeln.



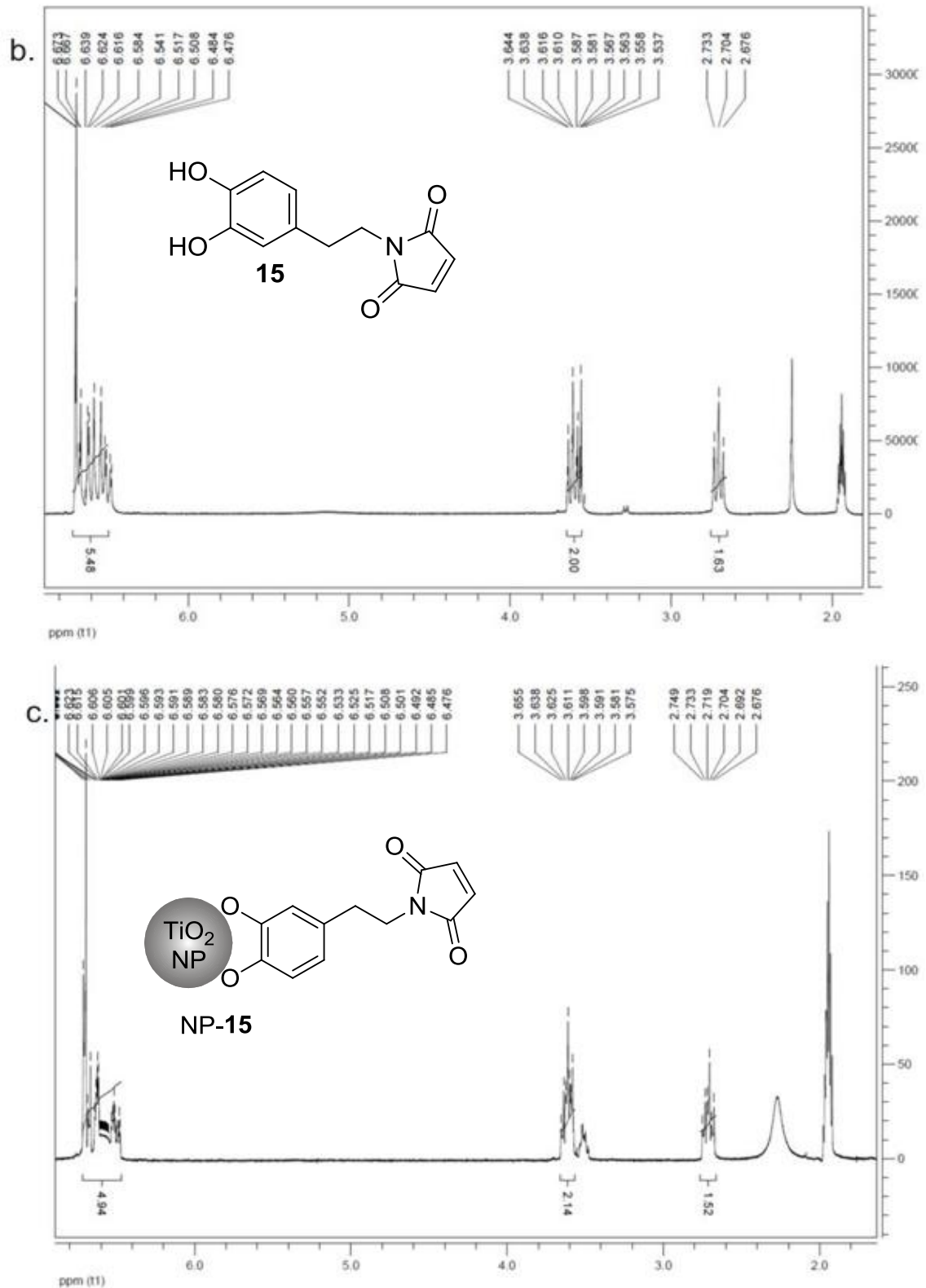


Abbildung 18: ¹H-NMR von a. diethylenglykolmodifizierten Titandioxid-Nanopartikeln, b. Dopamin-Maleinimid (**15**) und c. der Titandioxid-Nanopartikel modifiziert mit Dopamin-Maleinimid (NP-15).

Aus Abbildung 18c. ist ersichtlich, dass die beiden Multipletts des Diethylenglykols nicht mehr vorhanden sind, was zeigt, dass die Modifizierung der Nanopartikel-Oberfläche

erfolgreich verlief. Ebenso zeigt das Spektrum des Maleinimids **15** im Vergleich zu TiO₂-**15** definierte Signale, was den erfolgreichen Ligandenaustausch nochmals verdeutlicht.

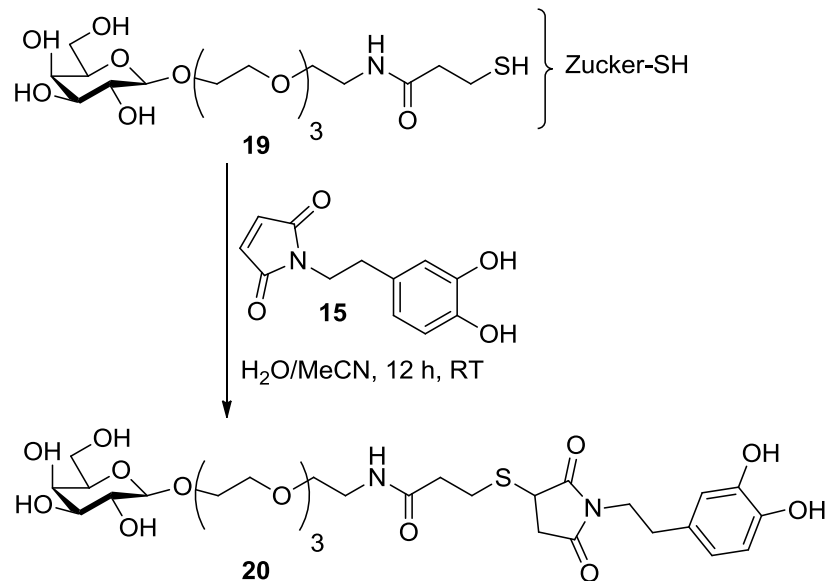
4.2.3 Modifikationen der TiO₂-Nanopartikel mittels Michael-Addition

Titandioxid-Nanopartikel können die Beschaffenheit von biologischen Membranen beeinflussen und die biologische Aktivität mittels Wechselwirkungen mit Lipiden, Proteinen oder auch DNA verändern.^[147] Viele toxikologische Effekte der Nanopartikel sind direkt mit der Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verbunden, die zu dauerhaften Schädigungen der Zellen und bei erhöhten Konzentrationen zum Zelltod führen können.^[148] Um diese Fähigkeiten positiv nutzen zu können, benötigt man wasserlösliche, stabile, fein verteilte und zellgängige Nanoteilchen, die eine direkte und kontrollierbare Aufnahme in Zellen ermöglichen. Eine große Herausforderung, um die ROS-produzierenden Nanopartikel nutzen zu können, ist die Herstellung eines effektiven Nanopartikel-Systems, welches zellgängig ist. Dafür können beispielsweise zuckermodifizierte Nanopartikel dienen, die eine Bindung der Nanopartikel an die Zelloberfläche ermöglichen. Weiterhin können auch andere Biomoleküle wie DNA oder kleine Peptide verwendet werden, um Bio-Nanohybride herzustellen, die in unterschiedlichen biomedizinischen Bereichen Anwendungen finden könnten. In den folgenden Kapiteln werden unterschiedliche Ansätze beschrieben, um diese TiO₂-Hybride mittels Michael-Addition herzustellen. Die Reaktionen wurden zunächst in Lösung untersucht um die Bedingungen für die Bindung des Biomoleküls zu optimieren und diese dann auf die Nanopartikel übertragen zu können.

4.2.3.1 Thiolierter Zucker zur Herstellung von TiO₂-Nanopartikel-Hybriden

Das Interesse Kohlenhydrate an Nanopartikel zu binden steigt, da in den letzten Jahren bereits viele unterschiedliche biomedizinische Anwendungen gezeigt wurden.^[149] Durch die vielen Hydroxylgruppen der Zucker-Moleküle entstehen Nanopartikel mit der einzigartigen Möglichkeit Wasserstoffbrücken beim Aufbau supramolekularer Strukturen auszubilden.^[150] Um die Kohlenhydrate an die Titandioxid-Nanopartikel binden zu können, wurden thiolierter Zuckermoleküle verwendet, die von Dr. Christine Richter in der Arbeitsgruppe Biskup (KIT) hergestellt wurden und die mittels einer Michael-Addition an Dopamin-Maleinimid (**15**) gebunden werden sollten. Der thiolierter Zucker **19** wurde in einem Wasser/Acetonitril-

Gemisch mit dem Maleinimid **15** umgesetzt, um catecholmodifizierte Zucker herzustellen (Schema 17).



Schema 17: Michael-Addition zwischen dem thiolierten Zucker **19** und Dopamin-Maleinimid (**15**).

Die Reinigung erfolgte mittels HPLC (Abbildung 19) und aus dem Chromatogramm ist zu erkennen, dass ein neues Signal mit einer Retentionszeit von 12.7 Minuten entstanden ist. Die Masse des neuen Signals wurde mittels MALDI-TOF bestimmt.

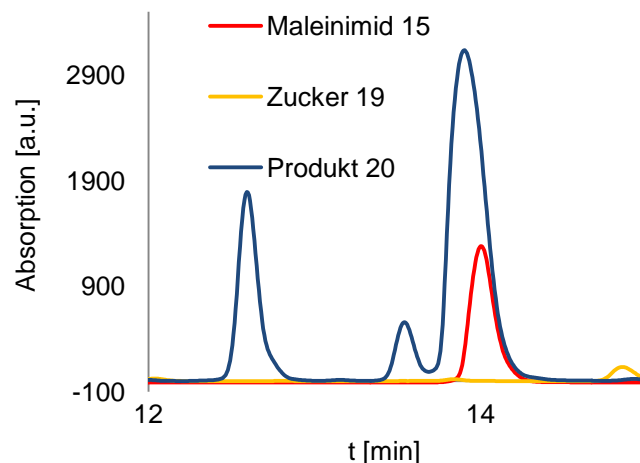


Abbildung 19: HPLC-Chromatogramm der Michael-Addition zwischen dem thiolierten Zucker **19** und Dopamin-Maleinimid (**15**) bei 260 nm.

Aus den Messungen wurde die Masse des Produkts **20** ($M+\text{Na}^+$ 713 g/mol, $M+\text{K}^+$ 729 g/mol) detektiert. Zusätzlich wurden UV/Vis-Messungen durchgeführt, die in Abbildung 20 dargestellt sind.

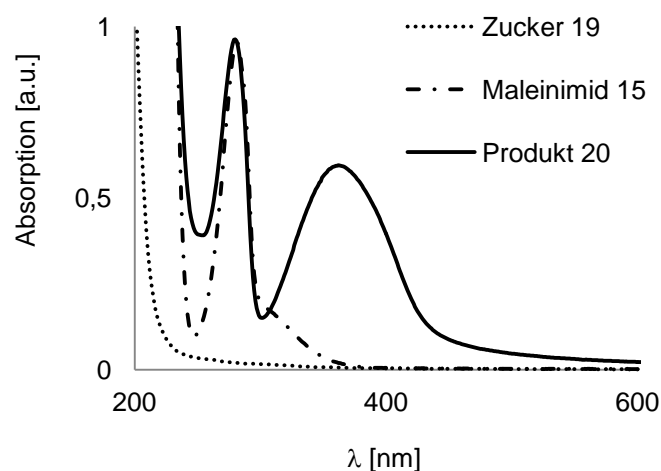
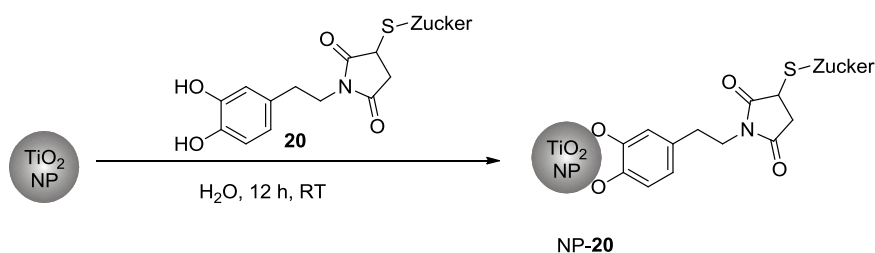


Abbildung 20: UV/Vis-Spektrum der Michael-Addition zwischen dem thiolierten Zucker **19** und Dopamin-Maleinimid (**15**).

Aus dem UV/Vis-Spektrum ist zu erkennen, dass das Zuckermolekül **19** keine Absorption zeigt, Dopamin-Maleinimid hingegen (**15**) absorbiert bei 283 nm und das Produkt der Reaktion weist zwei Maxima auf, das erste bei 281 nm und das zweite bei 366 nm. Das Maximum bei 281 nm entspricht dem des Maleinimids **15**, das bei 366 nm zeigt das entstandene Produkt **20**.

Nach Zugabe des Produkts **20** zu den Titandioxid-Nanopartikeln (Ligandenfreie NP) kam es zu einer Farbänderung von farblos zu gelb (Schema 18).



Schema 18: Oberflächenmodifikation der Titandioxid-Nanopartikel mit maleinimidmodifiziertem Zucker **20** nach HPLC-Reinigung.

Die Farbänderung deutet darauf hin, dass es zu einer erfolgreichen Bindung des modifizierten Zuckers **20** auf die Nanopartikel kam. Als Negativkontrolle wurde der thiolierter Zucker **19** ohne Maleinimid **15** zu den Nanopartikeln gegeben, um auszuschließen, dass dieser über die Hydroxylgruppen an die Nanopartikel bindet, hierbei kam es zu keiner Farbänderung.

Weiterhin wurde das TiO₂-**20**-Hybrid mittels UV/Vis-Spektroskopie charakterisiert (Abbildung 21).

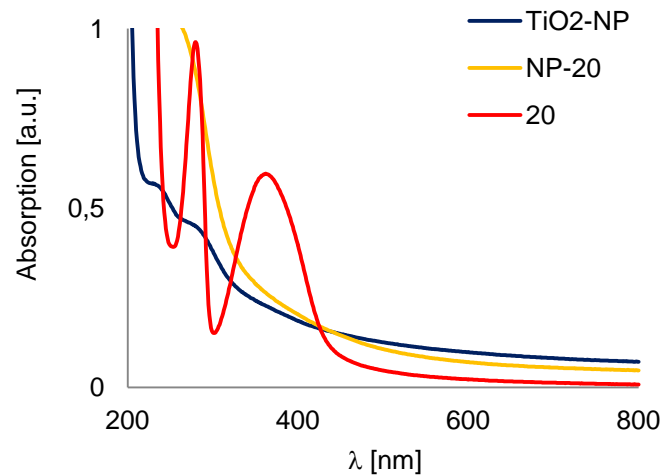


Abbildung 21: UV/Vis-Spektrum der zuckermodifizierten Titandioxid-Nanopartikel (NP-20).

Aus dem UV/Vis-Spektrum ist erkennbar, dass es zu einer Auslöschung des Maximums bei 366 nm kam, was dem Produkt **20** entsprach. Stattdessen ist ein breites Signal entstanden, welches auf die erfolgreiche Bindung von **20** an die Nanopartikel hindeutet. Zusätzlich wurden die zuckermodifizierten Nanopartikel mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt (Abbildung 22). Die Negativkontrolle, Nanopartikel mit thiolisiertem Zucker **19**, wurde ebenfalls mittels Größenausschlusschromatographie untersucht.

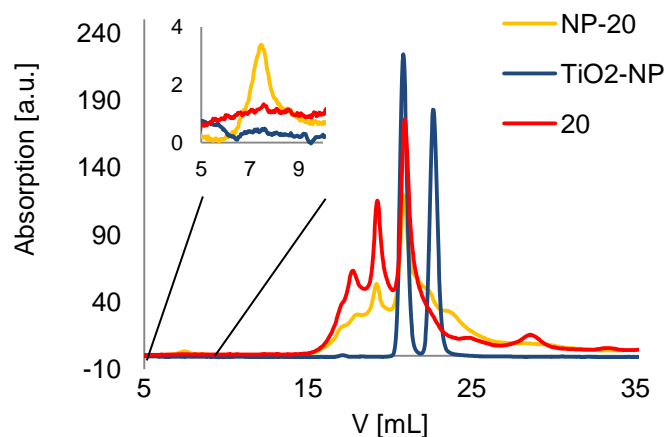


Abbildung 22: Größenausschlusschromatogramm der zuckermodifizierten Nanopartikel (NP-20) bei 280 nm.

Die zuckermodifizierten Nanopartikel (NP-20) weisen mehrere Signale im Bereich zwischen 15 und 25 Millilitern auf. Zudem ist ein neues Signal nach 7,30 Millilitern entstanden, dieses ist weder im reinen Zucker sichtbar, noch bei der Negativkontrolle ohne Dopamin-Maleinimid (**15**). Aufgrund der geringen Retentionszeit könnte dieses Signal den modifizierten Nanopartikeln entsprechen. Durch die Bildung des Charge-Transfer-Komplexes (UV/Vis-Messungen) und das Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie kann

geschlossen werden, dass die zuckermodifizierten Nanopartikel erhalten wurden. Aufgrund fehlender weiterführender Analytik wie die Verwendung von Lektinen oder DLS-Messungen kann keine eindeutige Aussage über den Erfolg der Reaktion getroffen werden, auch wenn die erhaltenen Ergebnisse darauf hin deuten.

4.2.3.2 Thiolierte Peptide zur Herstellung von TiO₂-Nanopartikel-Hybriden

Durch die Verschiebung der Seitenketten der Peptide vom α -Kohlenstoffatom an das Stickstoffatom erhält man ein *N*-substituiertes Oligoglycin, wodurch die entstandenen Peptide vor Abbau durch Proteasen geschützt werden.^[151] Die Peptide sollten an die Nanoteilchen gebunden werden, um TiO₂-Peptoid-Hybride herzustellen, die zellgängig sind und nach Bestrahlung ROS produzieren.

Die zellpenetrierenden Peptide (Abbildung 23) wurden von Dr. Sidonie Vollrath und Dominik Kölmel im Arbeitskreis Bräse synthetisiert, sodass sie jeweils ein Thiol und einen Rhodamin-Farbstoff enthalten. Rhodamin sollte zur Detektion des TiO₂-Peptoid-Hybrids innerhalb der Zellen dienen.

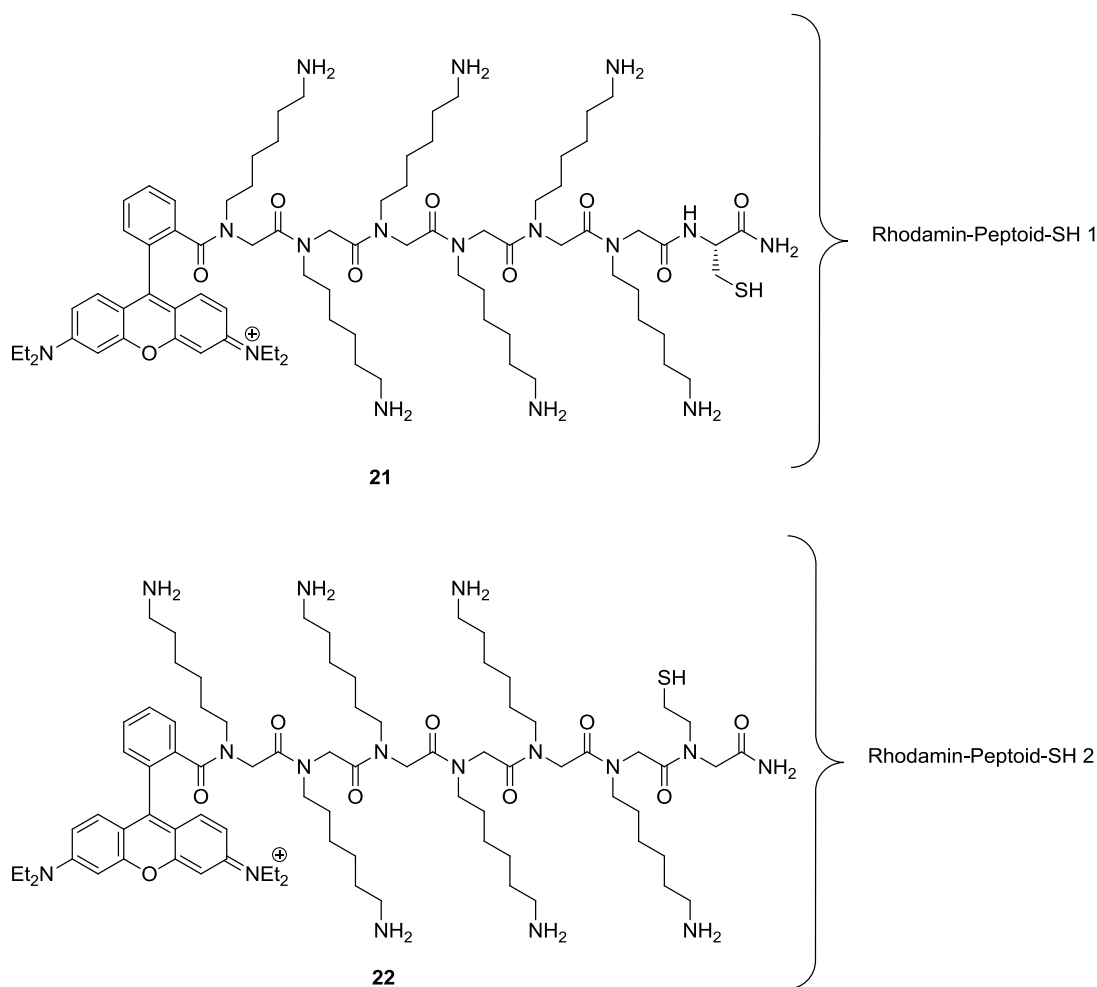
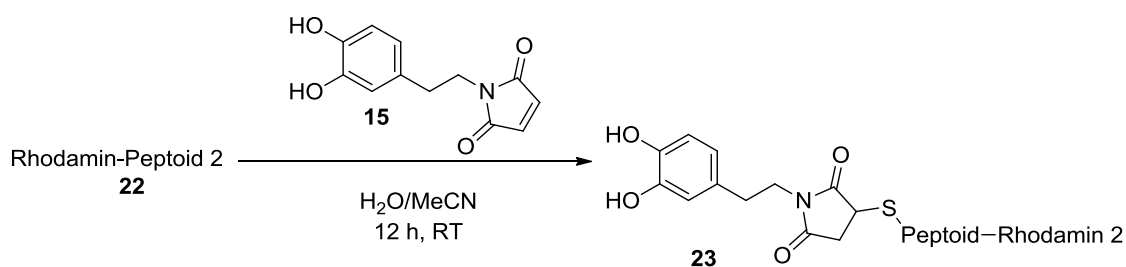


Abbildung 23: Strukturen der verwendeten Peptide **21** und **22**.

Zunächst wurde mit dem Peptoid-Peptid-Hybrid **21** (Rhodamin-Peptoid-SH 1) gearbeitet, welches in Wasser/Acetonitril gelöst wurde. Um das Peptoid **21** mit Catecholgruppen zu modifizieren wurde es mit drei Äquivalenten Dopamin-Maleinimid (**15**) in Acetonitril umgesetzt. Durch MALDI-TOF-Messungen konnte festgestellt werden, dass diese Reaktionsbedingungen nicht zum gewünschten Konjugat führten, daher wurde die Menge des Dopamin-Maleinimid (**15**) auf 30 Äquivalente erhöht. Auch in diesem Fall konnte kein Produkt erhalten werden. Die Zugabe von katalytischen Mengen an Triethylamin als Base zeigten die MALDI-TOF-Messungen ebenfalls das reine Peptoid **21**, nach vier Monaten war das Peptoid aufgrund der labilen Struktur zerfallen.

Aus diesem Grund wurde mit dem Peptoid **22** (Rhodamin-Peptoid-SH 2) gearbeitet. Um die Trifluoressigsäure-Reste der Reinigung mittels HPLC zu entfernen, wurde das Peptoid mittels einer NAP5-Säule, nach Anleitung des Herstellers, mit Wasser eluiert. Nach Zugabe von 30 Äquivalenten Dopamin-Maleinimid (**15**) wurde das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt (Schema 19).



Schema 19: Michael-Addition zwischen dem thiolierten Peptoid **22** und Dopamin-Maleinimid (**15**).

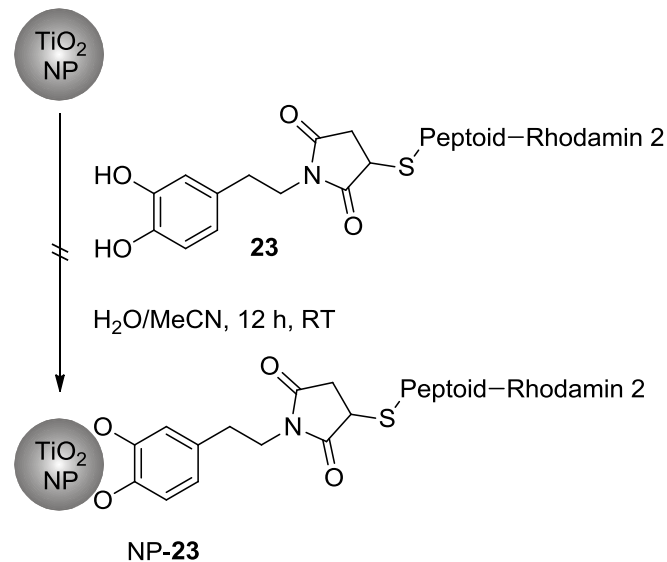
Anschließende MALDI-TOF-Messungen zeigten, dass das Produkt **23** vorhanden war, zusätzlich zeigte das Peptoid eine Mehrfachbeladung mit Dopamin-Maleinimid (**15**) (Tabelle 7).

Tabelle 7: MALDI-TOF-Ergebnisse der Michael-Reaktion zwischen dem Peptoid **22** und Maleinimid **15**.

Eintrag	Masse _{Soll} [g/mol]	Masse _{Ist} [g/mol]
Peptoid 22	1497	1497
Produkt 23	1730	1731

Die Masse von 1963.8 g/mol zeigt die zweifache Beladung des Peptoids **22** mit Dopamin-Maleinimid (**15**), 2196.7 g/mol die dreifache Beladung, 2429.8 g/mol die vierfache Beladung. Der Grund für die Mehrfachbindung an das Peptoid **22** könnte darin liegen, dass Dopamin-Maleinimid (**15**) ebenfalls über die Aminofunktion des Peptoids binden kann. Daher wurde die Reaktionszeit auf acht Stunden verkürzt und lediglich drei Äquivalente des Maleinimids **15** zugesetzt. Dadurch konnte bei MALDI-TOF-Messungen ausschließlich die Masse des gewünschten Produkts **23** und keine Mehrfachbeladung des Peptoids mehr detektiert werden.

Nach Reinigung mittels HPLC wurde das Peptoid-Maleinimid-Konjugat **23** zu wasserlöslichen Nanopartikeln (DEG-NP) und zu Nanostäbchen (TiO₂-NR) gegeben. Die Reaktion ist anhand der Nanopartikel in Schema 20 dargestellt. Ein Charge-Transfer-Komplex konnte aufgrund der intensiven Färbung des Rhodamin-Farbstoffs visuell nicht nachgewiesen werden. Daher wurde eine Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie durchgeführt, hierbei konnte das Produkt aufgrund starker Wechselwirkungen zwischen dem Farbstoff und Säulenmaterial nicht eluiert werden. Somit war es nicht möglich die Nanopartikel auf diese Weise zu reinigen oder den positiven Verlauf der Reaktion zu detektieren. Die Proben wurden auf ein 1.5%iges Agarose-Gel aufgebracht, welches keine Verschiebung zwischen reinem Peptoid und modifizierten Nanopartikeln mit Peptoid-Maleinimid **23** zeigte.



Schema 20: Oberflächenmodifikation der Titandioxid-Nanoteilchen mit Peptoid-Maleinimid **23**.

Im Rahmen der Diplomarbeit von Delia Braun (Arbeitskreis Prof. Bräse, KIT) konnte festgestellt werden, dass eine Bindung der Peptide an Gold-Nanopartikel am ehesten im basischen pH-Bereich stattfindet.^[152] Aus diesem Grund wurde der pH-Wert nach Zugabe des Peptoids zu TiO₂-Nanopartikel mit 0.1 molarer Natriumhydroxid-Lösung auf circa 10 eingestellt und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Im UV/Vis-Spektrum der Nanopartikel ist ein Charge-Transfer-Komplex zwischen 320 und 400 nm zu erkennen (Abbildung 24). Ebenso ist im Spektrum der Nanostäbchen eine Veränderung des Spektrums im Vergleich zu den reinen Komponenten sichtbar, was auf eine erfolgreiche Bindung des Peptoids **23** an die TiO₂-Oberfläche sprechen könnte.

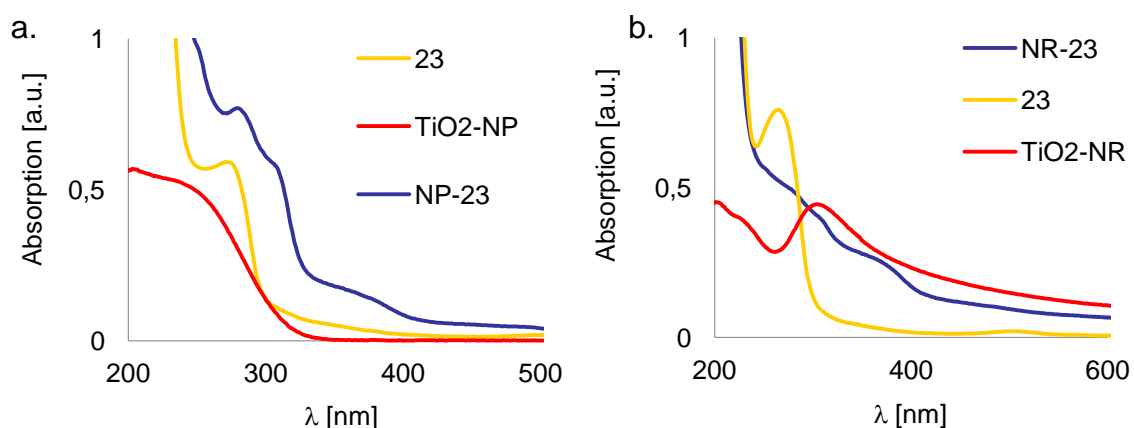


Abbildung 24: UV/Vis-Spektren des Peptoid-Maleinimids **23** a. auf Titandioxid-Nanopartikel (DEG-NP) und b. auf Titandioxid-Nanostäbchen (8 Stunden).

Um die Bindung des Peptoids **23** an die Nanopartikel-Oberfläche weiter zu untersuchen, wurde ein Agarose-Gel angefertigt (Abbildung 25). Aus dem Gel in Abbildung 25a. ist zu erkennen, dass bei den modifizierten Nanostäbchen (Spur 3) eine schwache Bande des modifizierten Peptoids **23** (Spur 2) sichtbar ist und bei den modifizierten Nanopartikeln (Spur 4) das Peptoid in der Tasche ausgefallen ist.

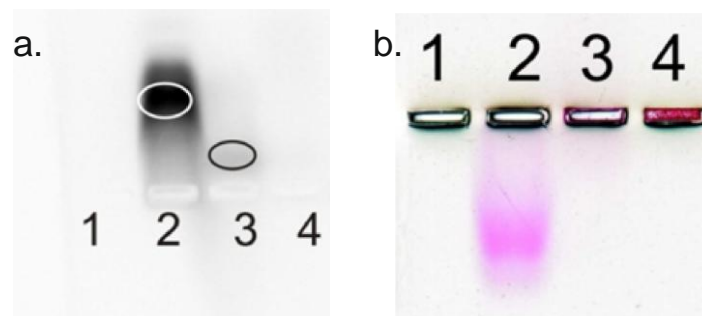


Abbildung 25: a. Fluoreszenz-Aufnahme (UV-Licht) des einprozentigen Agarose-Gels mit Peptoid-modifizierten Nanopartikeln und -nanostäbchen. b. Fluoreszenz-Aufnahme (Tageslicht) bei einem pH-Wert von 10. Spur 1: TiO₂-Nanopartikel, Spur 2: modifiziertes Peptoid **23**, Spur 3: NR-**23**, Spur 4: NP-**23**.

Durch Gelelektrophorese konnte somit kein eindeutiges Ergebnis zur Bindung des maleinimidmodifizierten Peptoids **23** an die TiO₂-Nanopartikel erhalten werden.

Um zu untersuchen, ob die Bindung des Peptoids pH-abhängig ist, wurde der pH-Wert der TiO₂-Nanostäbchen, mit 0.1 molarer Natriumhydroxid-Lösung auf 8 eingestellt. Der pH-Wert des Peptoids wurde ebenfalls mit Natriumhydroxid-Lösung beziehungsweise mit 0.1 molarer Salzsäure-Lösung variiert. Der pH-Wert wurde auf pH = 8, 10, 12 und auf pH = 1, 3 und 5 eingestellt. Die verschiedenen Proben wurden zu den Nanostäbchen gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Ausschließlich bei einem pH-Wert von 1 blieb die Farbe des Rhodamin-Farbstoffes erhalten, selbst nach der Zugabe zu den Nanostäbchen. Die Proben mit basischen pH-Wert sind ausgefallen und konnten nicht wieder vollständig in Lösung gebracht werden. Zur Auswertung wurden alle Proben auf ein einprozentiges Agarose-Gel aufgetragen (Abbildung 26).

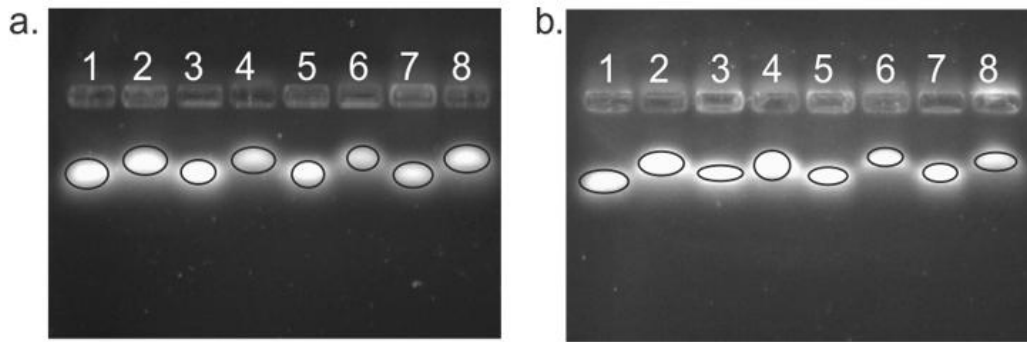


Abbildung 26: Fluoreszenz-Aufnahme eines 1% Agarose Gel mit peptoidmodifizierten TiO₂-Nanostäbchen a) im basischen und b) im sauren pH-Bereich. a. Spur 1: Peptoid **22** (pH = 8), Spur 2: NR-**23**, Spur 3: Peptoid **23** (pH = 10), Spur 4: NR-**23**, Spur 5: Peptoid **23** (pH = 12), Spur 6: NR-**23**, Spur 7: Peptoid **23**, Spur 8: NR-**23**. b. Spur 1: Peptoid **23**, Spur 2: NR-**23**, Spur 3: Peptoid **23** (pH = 1), Spur 4: NR-**23**, Spur 5: Peptoid **23** (pH = 3), Spur 6: NR-**23**, Spur 7: Peptoid **23** (pH = 5), Spur 8: NR-**23**.

Es wurden jeweils das Peptoid mit verändertem pH-Wert und daneben die zugehörigen modifizierten Nanostäbchen aufgetragen. Auf beiden Gelen ist zu erkennen, dass es bei allen Proben zu einer kleinen Verschiebung zwischen dem Peptoid **23** und den modifizierten Nanoteilchen kommt. Das spricht dafür, dass die Verschiebung lediglich auf den Einfluss des pH-Wertes und nicht auf die Bindung des modifizierten Peptoids **23** zurückzuführen ist. Da der pH-Wert der Reaktionslösung sowohl von den Nanostäbchen als auch von der Peptoidlösung beeinflusst wird, wird eine Verschiebung des Peptoids **23** zu dem Peptoid, welches mit Nanostäbchen inkubiert wurde, beobachtet. Um das zu überprüfen, wurde das Zetapotential der modifizierten Nanostäbchen bestimmt, die Daten sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Im sauren pH-Bereich (pH = 2–6) tragen die Nanopartikel ein positives Zetapotential, im basischen Milieu ein negatives Zetapotential. Das ist durch die ionische Struktur des Peptoids **23** in wässrigen Lösungen zu erklären. In saurem Milieu bilden die Peptide kationische und im basischen anionische Strukturen, was mit den Daten aus Tabelle 8 übereinstimmt.

Tabelle 8: Zetapotential der peptoidmodifizierten Nanostäbchen (NR-**23**) bei verschiedenen pH-Werten.

Eintrag	pH-Wert	Zetapotential [mV]
1	2	45.5 ± 0.57
2	4	39.4 ± 1.30
3	6	33.2 ± 0.78
4	8	-35.4 ± 1.90
5	10	-31.8 ± 2.78
6	12	-48.8 ± 0.45
7	-	18.4 ± 0.36

Diese Studie zeigt, dass der pH-Wert im Fall der TiO₂-Nanostäbchen nur einen geringen Einfluss hat. Aus diesem Grund wurde die Reaktion ebenfalls ohne Änderung des pH-Wertes durchgeführt. Hierzu wurde das Peptoid **23** mittels Gelfiltration in Wasser umgepuffert und über Nacht zu den Nanopartikel- und stäbchen gegeben. Die Analyse erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese, das einprozentige Gel ist in Abbildung 27 dargestellt. In diesem Fall scheinen die Nanostäbchen (Spur 3) keinen Einfluss auf das Peptoid zu haben, da diese die gleiche Mobilität wie das reine Peptoid aufweisen (Spur 1). Die Nanopartikel-Probe (Spur 2) ist wie bei der Änderung des pH-Wertes ausgefallen.

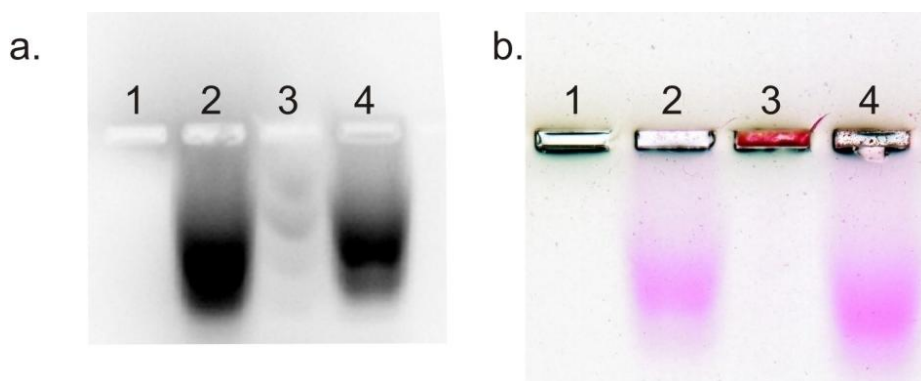


Abbildung 27: a. Fluoreszenz-Aufnahme (UV-Licht) des einprozentigen Agarose-Gels mit peptoidmaleinimid-modifizierten Nanopartikeln und –nanostäbchen. b. Fluoreszenz-Aufnahme (Tageslicht). a. Spur 1: Peptoid **23**, Spur 2: NP-**23**, Spur 3: NR-**23**, Spur 4: TiO₂-Nanopartikel. b. Spur 1: TiO₂-Nanopartikel, Spur 2: NR-**23**, Spur 3: NP-**23**, Spur 4: modifiziertes Peptoid **23**.

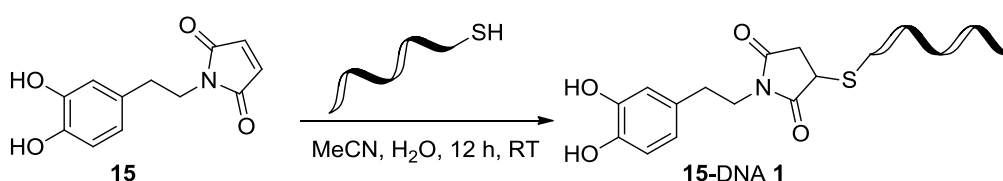
Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass eine Bindung der thiolierten Peptide an die TiO₂-Nanopartikel nicht möglich war. Die Michael-Addition des Peptoids **22** an Dopamin-Maleinimid (**15**) konnte in Lösung durchgeführt werden, der anschließende Ligandenaustausch des modifizierten Peptoids an der Nanoteilchen-Oberfläche war allerdings

nicht erfolgreich. Der Grund hierfür liegt in der Ladung der Peptide, die zusätzlich einen Farbstoff besitzen, der ebenfalls Ladung trägt.

4.2.3.3 Thiolierter Oligonukleotide zur Herstellung von TiO₂-Nanopartikel-Hybriden

Bisher ist nur wenig Literatur veröffentlicht, in der DNA an Titandioxid-Nanopartikel gebunden werden konnte.^[100] Dabei wurden Nanopartikel-DNA-Hybride bereits für viele Anwendungen genutzt, wie beispielsweise Gold-Nanopartikel, die zur Herstellung von Biosensoren^[153] oder zur DNA-Nanostrukturierung dienen.^[154] Aus diesem Grund ist es interessant, Oligonukleotide an die Nanoteilchen zu binden und diese auf ihre Eigenschaften zu untersuchen. In der Arbeitsgruppe von Rajh *et al.* konnten TiO₂-DNA-Hybride mittels einer Amid-Bindung zwischen carboxymodifizierter DNA und Dopamin-Hydrochlorid (**9a**) hergestellt werden.^[100] Um eine milde und einfache Methode zu entwickeln, Oligonukleotide an Titandioxid zu binden, wurde die Verwendung von Dopamin-Maleinimid (**15**) und thiolierter DNA untersucht.

Zu Beginn wurde eine Michael-Addition mit thioliertem Oligonukleotid und Dopamin-Maleinimid (**15**) in Lösung durchgeführt. Hierzu wurde das thiolierte 22-mer Oligonukleotid DNA **1** mittels Dithiothreitol (DTT) für zwei Stunden bei 37 °C reduziert um die Disulfid-Brücken zu zerstören. Anschließend wurde DNA **1** mittels Gelfiltration gereinigt und Maleinimid **15** im 150-fachen Überschuss zugegeben. Das Gemisch wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt (Schema 21).



Schema 21: Michael-Addition zwischen Dopamin-Maleinimid (**15**) und thioliertem Oligonukleotid DNA **1**.

Nach Reinigung mittels HPLC konnte nur reines Maleinimid **15** detektiert werden. Mit einem dreifachen Überschuss an Maleinimid **15** wurde nach HPLC-Reinigung die gewünschte Masse des Maleinimid-Oligonukleotid-Konjugats **15-DNA 1** erhalten (Abbildung 28a.). Signal 1 der HPLC-Reinigung zeigte die Masse des reinen Oligonukleotids DNA **1**, Signal 2 mit einer Retentionszeit von 19.1 Minuten wiederum zeigte die Masse des gewünschten Konjugats **15-DNA 1** (Tabelle 9).

Ein weiterer Ansatz war, DNA markiert mit dem fluoreszierenden Farbstoff TAMRA, einem Rhodamin-Derivat, zu verwenden. Somit kann die Detektion in Zellen direkt über die Fluoreszenz der DNA erfolgen. Zunächst wurden ebenfalls drei Äquivalente Dopamin-Maleinimid (**15**) zu der reduzierten DNA **2** gegeben und über Nacht inkubiert. Nach Reinigung mittels HPLC war aus dem Chromatogramm ersichtlich, dass die Reaktion zwar erfolgreich verlief, aber auch noch freies Oligonukleotid vorhanden war. Somit wurde die Zugabe des Maleinimids **15** auf 30 Äquivalente erhöht, was zu einer verbesserten Ausbeute führte (Abbildung 28b., Signal 1).

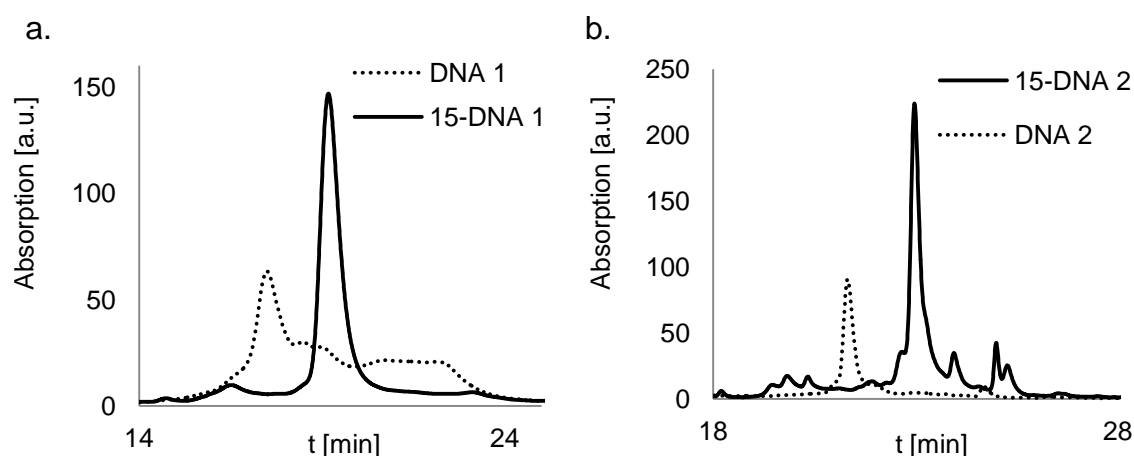


Abbildung 28: HPLC-Chromatogramm der Reaktion von Dopamin-Maleinimid (**15**) mit a. DNA **1** und b. DNA **2** bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Mit einer Retentionszeit von 23.0 Minuten konnte das Oligonukleotid-Maleinimid-Konjugat **15-DNA 2** nach der Reinigung mittels HPLC erhalten werden (Abbildung 28b.). Durch MALDI-TOF-Messungen konnte dies bestätigt werden (Tabelle 9).

Tabelle 9: MALDI-TOF-Resultate der Reaktion zwischen Dopamin-Maleinimid (**15**) und verschiedenen thiolierten Oligonukleotiden.

Eintrag	M_{Soll} [g/mol]	M_{Ist} [g/mol]
DNA 1	7008	7009
15-DNA 1	7241	7244
DNA 2	4557	4557
15-DNA 2	4790	4789

Zusätzlich wurde Gelelektrophorese verwendet, um nachzuweisen, dass DNA **2** erfolgreich modifiziert wurde. Hierzu wurde ein einprozentiges Agarose-Gel angefertigt, eine Färbung des Gels war nicht notwendig, da der TAMRA-Farbstoff als Marker diente (Abbildung 29). Es war zu erwarten, dass das Konjugat **15-DNA 2** (Spur 1) eine geringere elektrophoretische

Mobilität aufgrund der höheren Masse im Vergleich zu der reinen DNA aufweist (Spur 2), dies lässt sich aus dem Gel erkennen.

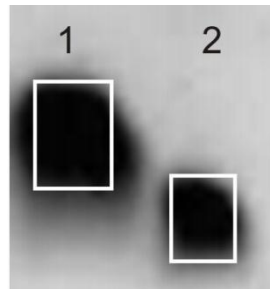


Abbildung 29: Fluoreszenz-Aufnahme des einprozentigen Agarose-Gels mit **15-DNA 2**. Spur 1: Gereinigtes DNA-Dopamin-Maleinimid-Konjugat **15-DNA 2**; Spur 2: DNA **2**.

Nach der Charakterisierung des **15-DNA 2**-Konjugats wurde die gereinigte Lösung zu TiO_2 -Nanopartikeln, die sowohl mittels der Diethylenglykol-Methode als auch der Hochtemperatur-Methode hergestellt wurden, gegeben. Ein Charge-Transfer war aufgrund der intensiven Färbung des Rhodamin-Farbstoffs nicht sichtbar gemacht werden. Aus diesem Grund wurde zur Charakterisierung der Bindung an die Nanopartikel-Oberfläche ein einprozentiges Agarose-Gel verwendet (Abbildung 30). Es ist zu erkennen, dass es keine Verschiebung zwischen der **15-DNA 2** (Spur 2 und 6) und den modifizierten Nanopartikeln (Spur 4 und 5) gibt.

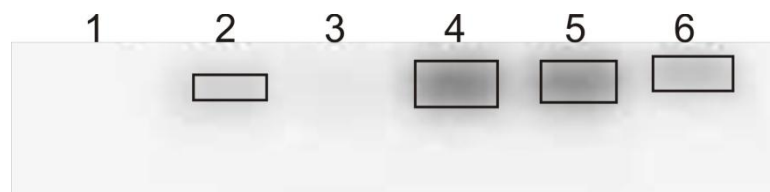
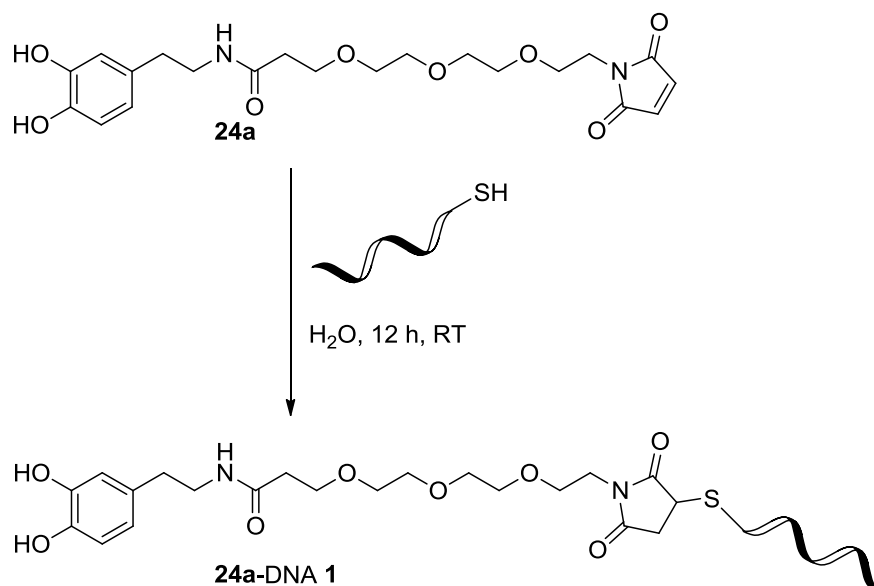


Abbildung 30: a) Fluoreszenz-Aufnahme des einprozentigen Agarose-Gels mit DNA **2**-modifizierten Nanoteilchen. Spur 1: Titandioxid-Nanopartikel (DEG-NP), Spur 2: DEG-NP-**15-DNA 2**, Spur 3: Hochtemperatur-Nanopartikel, Spur 4: Hochtemperatur-Nanopartikel-**15-DNA 2**, Spur 5: DEG-NP-**15**, Spur 6: **15-DNA 2**.

Ein Grund dafür, dass die Bindung an die Nanopartikel nicht erfolgreich war, kann die negative Ladung des Oligonukleotids sein. Da die Nanopartikel ebenfalls negativ geladen sind, kann es zu einer Abstoßung anstelle der Bindung zwischen den beiden Komponenten kommen. Ein weiterer Grund könnte die zusätzliche Ladung des TAMRA-Farbstoffs sein. Wie bereits bei den Peptoiden gezeigt werden konnte (Kapitel 4.2.3.2), verhindert der Rhodamin-Farbstoff die Bindung der Peptoide an die Nanoteilchen. Zudem kann es zu einer

sterischen Hinderung der DNA-Stränge untereinander kommen, wenn mehrere Oligonukleotide an die Nanopartikel-Oberfläche binden. Der Grund hierfür ist das kleine Dopamin-Maleinimid (**15**), welches nicht für ausreichend Abstand zwischen den DNA-Strängen sorgen kann und es somit zu einer sterischen Hinderung kommen kann.

Aus diesem Grund wurde ein Dopamin-Maleinimid synthetisiert, welches eine Triethylenglykol-Einheit aufweist, um das Molekül einerseits wasserlöslich zu machen und somit optimal für biologische Zwecke verwendet werden kann, andererseits führt die Glykol-Einheit zu mehr Distanz zwischen den DNA-Stränge. Dieses Maleinimid **24a** wurde zunächst ebenfalls in Lösung mit thioliertem Oligonukleotid umgesetzt, hierzu wurde ein Überschuss von drei Äquivalenten **24a** zu thioliertem Oligonukleotid DNA **1** gegeben (Schema 22).



Schema 22: Michael-Addition zwischen dem thiolierten Oligonukleotid DNA **1** und Maleinimid **24**.

Die Reinigung erfolgte mittels HPLC (Abbildung 31), es ist zu erkennen, dass das Reaktionsgemisch zwei Signale zeigt, reines Oligonukleotid DNA **1** ist kaum noch vorhanden. Das modifizierte Oligonukleotid **24a-DNA 1** (Retentionszeit von 20.1 Minuten) konnte mittels MALDI-TOF-Messungen nachgewiesen werden (Tabelle 10).

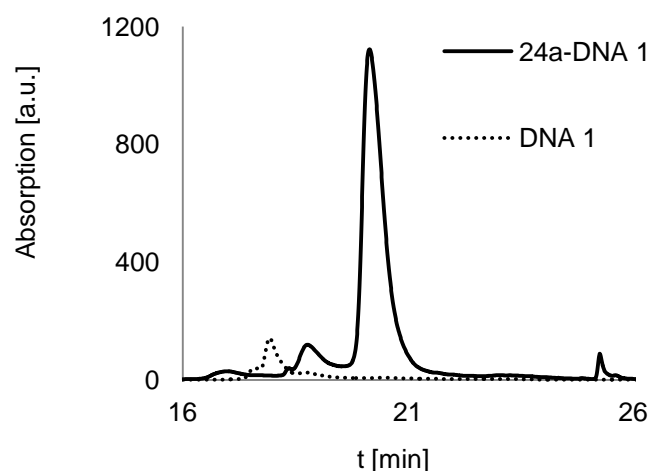
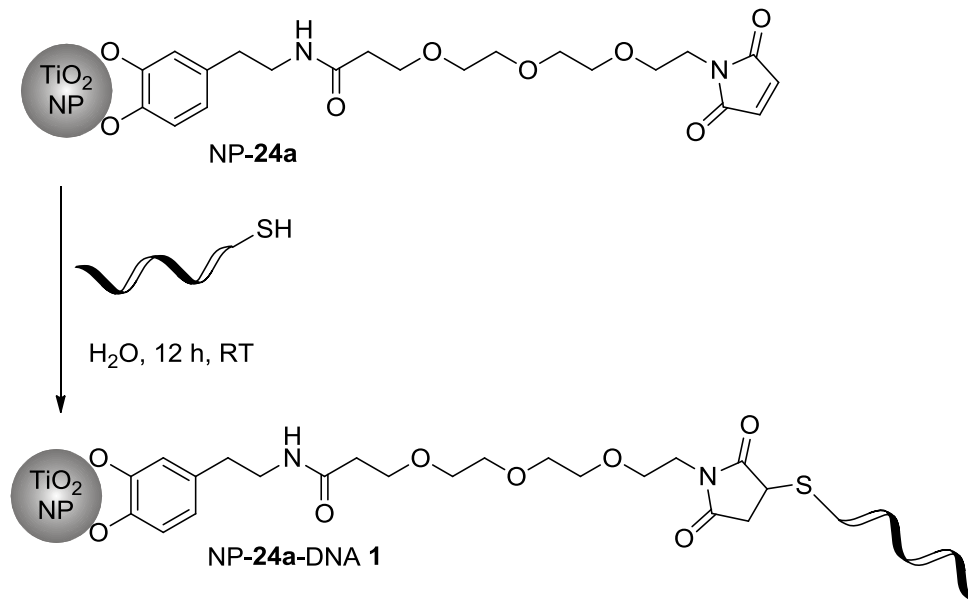


Abbildung 31: HPLC-Chromatogramm der Michael-Addition zwischen DNA **1** und Maleinimid **24a** bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Tabelle 10: MALDI-TOF-Resultate der Michael-Addition zwischen DNA **1** und dem Maleinimid **24**.

Eintrag	M_{Soll} [g/mol]	M_{Ist} [g/mol]
DNA 1	7008	7009
24a-DNA 1	7444	7443

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Michael-Addition mit Dopamin-Maleinimid **24a** in Lösung erfolgreich verlief, wurden die Bedingungen direkt auf der Oberfläche der TiO_2 -Nanopartikel untersucht. Zunächst wurden Maleinimid-Nanopartikel hergestellt (NP-**24a**). Die Reaktion wurde ebenfalls auf Titandioxid-Nanostäbchen und auf kommerziell erhältlichen TiO_2 -Nanopartikeln durchgeführt. Da die Michael-Addition bevorzugt bei einem pH-Wert zwischen 7 und 8 stattfindet, wurden die maleinimidmodifizierten Nanopartikel und Nanostäbchen über Gelfiltration mit Phosphat-Puffer auf $\text{pH} = 7.5$ eingestellt. Das Oligonukleotid DNA **1** wurde für zwei Stunden bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ mit DTT behandelt, über Gelfiltration gereinigt und direkt zu den maleinimidmodifizierten Nanoteilchen gegeben (Schema 23). Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend wurde Gel-Elektrophorese durchgeführt (Abbildung 32).



Schema 23: Oberflächenmodifikation der Titandioxid-Nanopartikel mit Maleinimid **24a** und anschließend Michael-Addition mit thioliertem Oligonukleotid DNA **1**.

In Spur 1 und 2 befinden sich maleinimidmodifizierte Nanopartikel und Nanostäbchen, der pH-Wert wurde bei diesen Proben ebenfalls auf 7.5 eingestellt. Es ist zu erkennen, dass im Vergleich hierzu bei den Nanopartikeln und -stäbchen nach der Michael-Addition in Spur 3 und 4 zwei Banden sichtbar sind. Die Bande mit der geringeren Mobilität entspricht den maleinimidmodifizierten Nanoteilchen, die Bande mit der höheren Mobilität könnte mit DNA-modifizierte Nanoteilchen darstellen. Um zu untersuchen, ob es sich bei den neu entstandenen Banden um Nanoteilchen-Oligonukleotid handelt, wurde das Gel mit SybrGold[®] angefärbt, welches spezifisch Einzelstrang-DNA anfärbt (Abbildung 32b.). Aus dem Gel lässt sich erkennen, dass nur eine breite Bande fluoresziert, was darauf hindeutet, dass es sich hierbei um Nanoteilchen-DNA handelt. Im Vergleich zu diesen beiden Banden weist das Produkt in Lösung (Spur 6) eine höhere elektrophoretische Mobilität auf. Daher handelt es sich bei den Banden in Spur 3 und 4 um TiO₂-DNA-Hybride. In Spur 5 befinden sich kommerziell erhältliche Nanopartikel nach der Michael-Addition. Es ist zu erkennen, dass in der Tasche ein Rückstand ist, dies sind die kommerziellen Nanopartikel, die nicht in das Gel laufen. Die untere Bande befindet sich auf gleicher Höhe mit der Reaktion in Lösung (Spur 6). Daher wird vermutet, dass das Maleinimid **24a** nicht an die kommerziellen Nanopartikel gebunden hat und die Reaktion ausschließlich in Lösung stattgefunden hat. Der Grund für das Misslingen der Reaktion auf den kommerziellen Nanopartikeln könnte darin liegen, dass einerseits der pH-Wert in diesem Fall nicht eingestellt wurde und andererseits die

Bindung aufgrund der Größe der Partikel (~20 nm) länger benötigt als bei den kleinen Nanoteilchen.

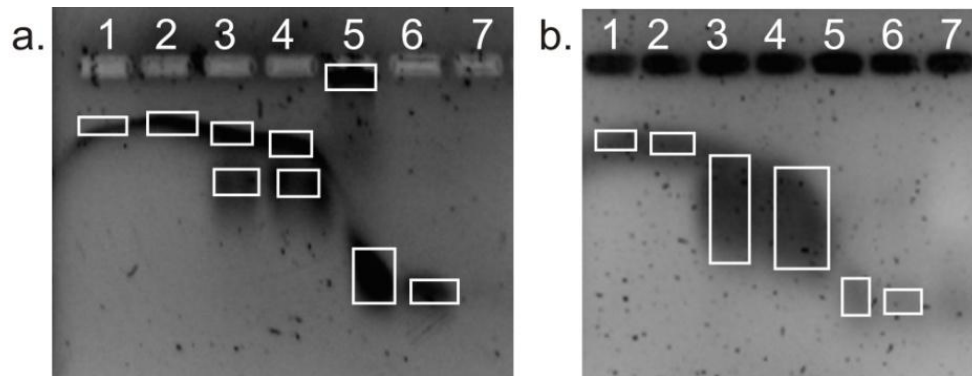


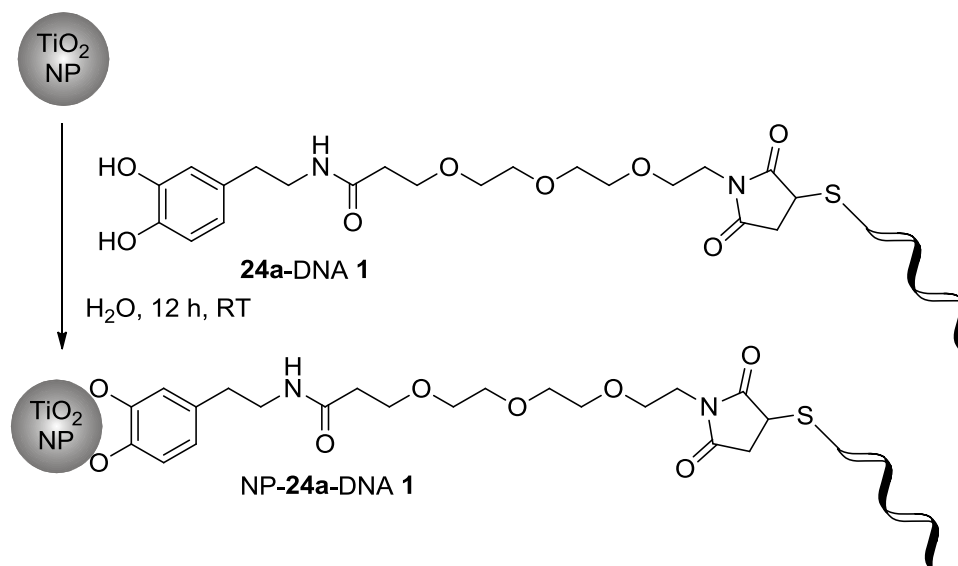
Abbildung 32: a. Fluoreszenz-Aufnahme des einprozentigen Agarose-Gels mit DNA-modifizierten Nanoteilchen. b. Aufnahme nach der Färbung mit SybrGold®. Spur 1: TiO₂-NP-**24a**, Spur 2: TiO₂-NR-**24a**, Spur 3: TiO₂-NP-**24a**-DNA-**1**, Spur 4: TiO₂-NR-**24a**-DNA-**1**, Spur 5: kommerzielle NP-**24a**-DNA-**1**, Spur 6: HPLC-gereinigtes Konjugat **24a**-DNA **1**.

Zusätzlich wurde von den DNA-modifizierten Nanopartikeln (NP-**24a**-DNA **1**) das Zetapotential bestimmt (Tabelle 11). Die maleinimidmodifizierten Nanopartikel (pH = 7.5) weisen ein schwach negatives Zetapotential auf. Wie zu erwarten war, zeigten die mit DNA-modifizierten Nanopartikel hingegen eine Steigerung des Zetapotentials auf, was die Stabilität des Hybrids **24a**-DNA **1** zeigt und die Bindung des Oligonukleotids nochmals bestätigt.

Tabelle 11: Zetapotentiale der Titandioxid-Nanopartikel mit und ohne Oligonukleotid.

Eintrag	Zetapotential [mV]
NP- 24a	-6.64 ± 2.04
NP- 24a -DNA 1	-22.6 ± 3.65

Um festzustellen, ob es möglich ist, das modifizierte Oligonukleotid an die Titandioxid-Nanopartikel zu binden, wurde das Konjugat **24a**-DNA **1** nach der HPLC-Reinigung zu den DEG-NP gegeben und über Nacht inkubiert (Schema 24). Es kam zu einer Farbänderung, dies spricht für einen Charge-Transfer-Komplex und somit für eine erfolgreiche Bindung.



Schema 24: Oberflächenmodifikation der Titandioxid-Nanopartikel mit DNA-Maleinimid **24a-DNA 1**.

Die Charakterisierung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abbildung 33). Bei den modifizierten Nanopartikeln (Spur 3) sind zwei fluoreszierende Banden erkennbar, die untere entspricht dem gereinigten Konjugat **24a-DNA 1**, die obere ließ sich nicht mit SybrGold[®] anfärben und zeigt somit, dass es sich hierbei nicht um DNA-modifizierte Nanopartikel handelt.

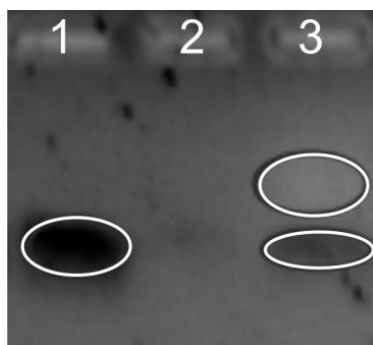


Abbildung 33: Fluoreszenz-Aufnahme des einprozentigen Agarose-Gels mit DNA-modifizierten Nanopartikeln nach Färbung mit SybrGold[®]. Spur 1: Gereinigtes DNA-Maleinimid **24a-DNA 1**, Spur 2: leer, Spur 3: TiO₂-NP mit gereinigtem **24a-DNA 1**.

Die Farbänderung spricht für die Bildung eines Charge-Transfer-Komplexes und somit für eine erfolgreiche Bindung der modifizierten DNA. Im Gegensatz dazu zeigt die Agarose-Gelelektrophorese keine Verschiebung zwischen dem Konjugat **24a-DNA 1** und den modifizierten Nanopartikeln. Somit kann durch die erhaltenen Ergebnisse keine eindeutige Aussage über den Erfolg der Reaktion getroffen werden. Die Färbung mit SybrGold[®] bei Agarose-Gelen mit Nanopartikel-Hybriden ist nicht trivial, es bilden sich meist breite Banden,

die nicht einfach zuzuordnen sind. Daher ist es möglich, dass die Färbung in diesem Fall nicht die optimale Methode zum Nachweis der DNA-Bindung darstellt. Eine andere Herangehensweise könnte die Größenausschlusschromatographie oder die Hybridisierung mittels einer fluoreszierenden komplementären DNA darstellen.

4.2.3.4 Thiolierter Peptide zur Herstellung von TiO₂-Nanopartikel-Hybriden

Die Bindung eines thiolierten Peptids sollte zunächst an einem kommerziell erhältlichen Peptid **25**, bestehend aus einer kurzen Sequenz, Lysin-Glycin-Glycin-Glycin-Lysin und einem Fluorescein-Farbstoff (Abbildung 34) untersucht werden.

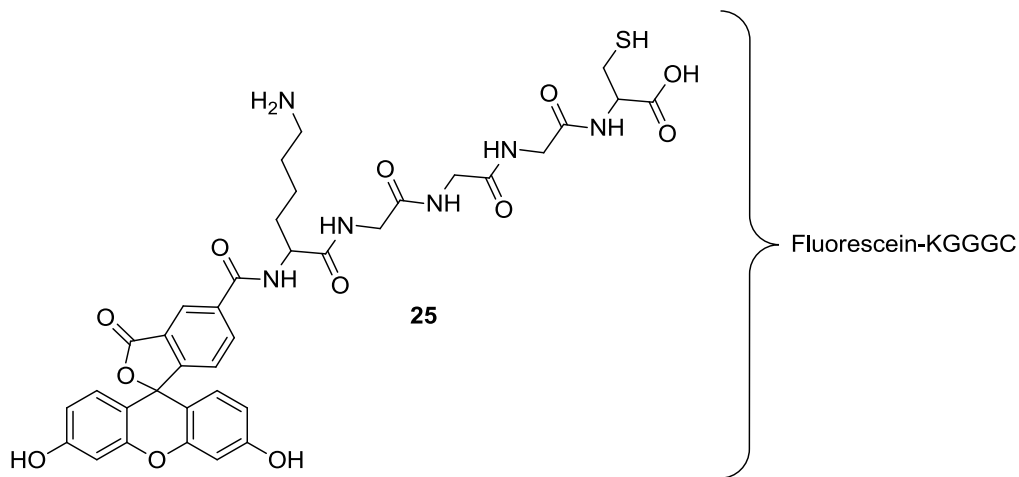
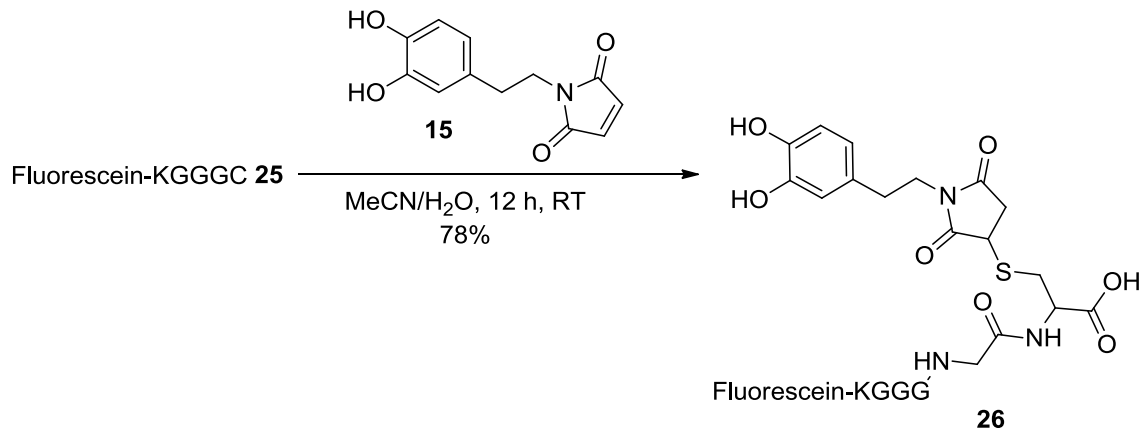


Abbildung 34: Struktur des kommerziell erhältlichen Peptids Fluorescein-KGGGC **25**.

Dopamin-Maleinimid (**15**) wurde mit drei Äquivalenten des Modellpeptids Fluorescein-KGGGC **25** in einem Wasser/Acetonitril-Gemisch (1:1) über Nacht geschüttelt und mittels HPLC gereinigt (Schema 25).



Schema 25: Michael-Addition zwischen der thiolierten Peptidsequenz **25** und Dopamin-Maleinimid (**15**).

Das HPLC-Chromatogramm der Reinigung des Dopamin-Maleinimid-Peptids **26** ist in Abbildung 35a. dargestellt. Aus dem Chromatogramm ist zu erkennen, dass noch reines Peptid in der Reaktionslösung enthalten ist (Signal 1). Ein größerer Überschuss an Maleinimid **15** könnte somit zu einer verbesserten Ausbeute (78%) führen.

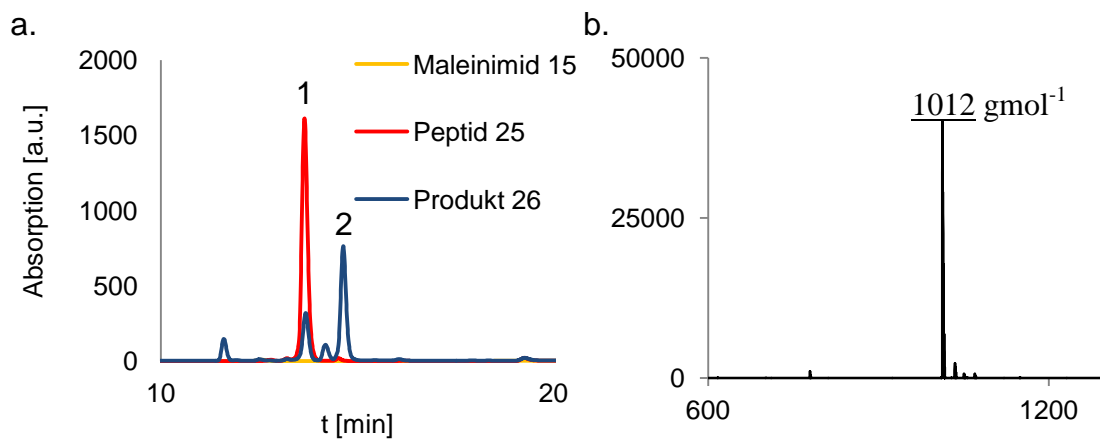


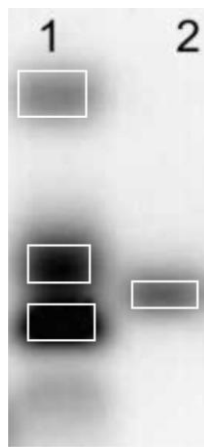
Abbildung 35: a. HPLC-Chromatogramm des Reaktionsgemisches aus Dopamin-Maleinimid **15** und Peptid **25**: Signal 1 zeigt das reine Peptid **25**; Signal 2 das Konjugat **26**. b. MALDI-TOF-Resultat von Signal 2.

Die anschließenden MALDI-TOF-Messungen zeigten die gewünschte Masse von 1012 g/mol (Abbildung 35b. und Tabelle 12). Zur Überprüfung der Reaktion zwischen dem Peptid **25** und Dopamin-Maleinimid (**15**) wurden die Proben auf ein Agarose-Gel aufgetragen, welches in Abbildung 36 dargestellt ist.

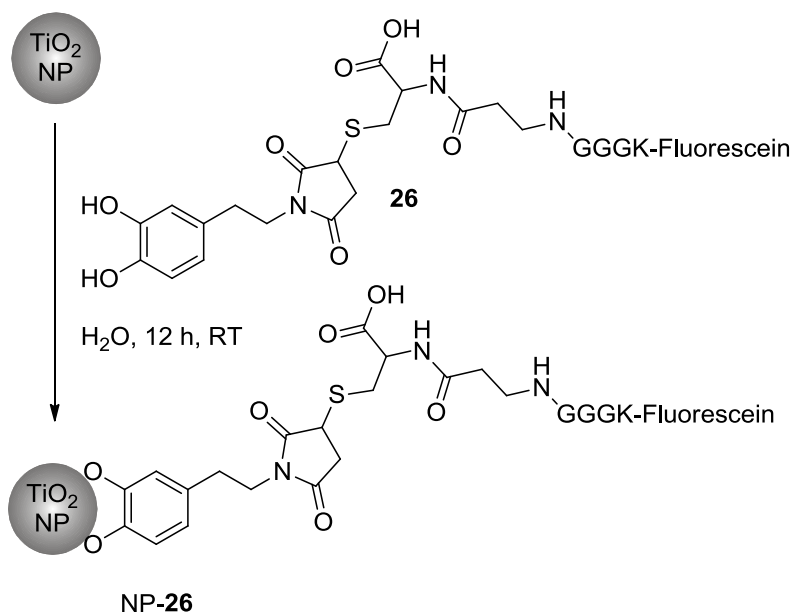
Tabelle 12: MALDI-TOF-Resultate des Dopamin-Maleinimid-Peptid-Konjugats **26**.

Eintrag	M_{Soll} [g/mol]	M_{Ist} [g/mol]
Peptid 25	779	780
Produkt 26	1012	1013

Im Vergleich zum reinen Peptid (Spur 1) weist das Konjugat **26** (Spur 2) eine abweichende elektrophoretische Mobilität auf. Eine Färbung des Gels war nicht notwendig, da an das Peptid ein Carboxyfluorescein-Farbstoff gebunden wurde und somit die Fluoreszenz des Peptids im Gel sichtbar ist.

**Abbildung 36:** Fluoreszenz-Aufnahme des 0.60%igen Agarose-Gels mit Peptid und maleinimidmodifiziertem Peptid **26**. Spur 1: Reines Peptid **25**, Spur 2: Maleinimid-Peptid **26** nach Reinigung mittels HPLC.

Das gereinigte Linker-Peptid-Konjugat **26** wurde zu Titandioxid-Nanopartikeln (DEG-NP) gegeben (Schema 26). Nach der Zugabe war eine Farbänderung von gelb nach orange-braun zu sehen. Diese ist allerdings nicht auf die Bildung eines Charge-Transfer-Komplexes zurückzuführen, sondern auf die Änderung des pH-Wertes, welcher Einfluss auf den Carboxyfarbstoff ausübt.



Schema 26: Oberflächenmodifikation der Titandioxid-Nanopartikel mit Dopamin-Maleinimid-Peptid **26**.

Um zu prüfen ob das Konjugat **26** auf der Nanopartikel-Oberfläche gebunden hat, wurde zunächst die Absorption der modifizierten Nanopartikel gemessen. Das Spektrum ist in Abbildung 37 dargestellt. Die Kurve im Bereich zwischen 400 und 550 nm hat sich verschoben, was zeigt, dass das modifizierte Peptid **26** an die Nanopartikel gebunden hat. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass Farbstoffe wie Rhodamin- aber auch Fluoresceinfarbstoffe unter bestimmten Bedingungen direkt an Titandioxid-Partikel binden können.^[155] Aus diesem Grund wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, indem fluoreszierendes Peptid ohne Dopamin-Maleinimid (**15**) zu den TiO₂-Nanopartikeln gegeben wurde.

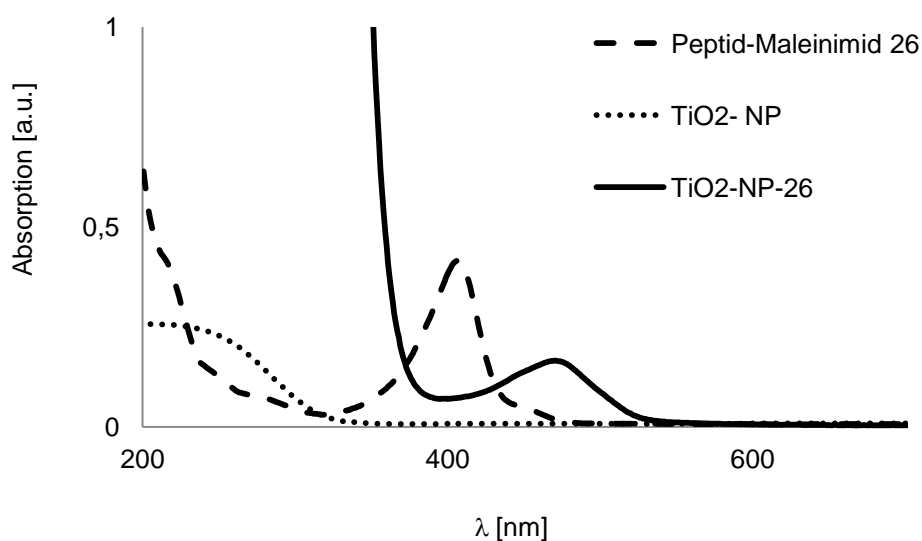


Abbildung 37: UV/Vis-Spektrum der NP-26 im Vergleich zu maleinimidmodifiziertem Peptid **26**.

Auch in diesem Fall kam es zu einer Farbänderung nach orange. Um auszuschließen, dass das Peptid über den Farbstoff an die Nanopartikel bindet, wurde ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) mit den entsprechenden Proben gemacht (Abbildung 38a.). Ein Teil der modifizierten Nanopartikel (Spur 3) wandert nicht in das Gel, sondern bleibt oben an der Tasche haften. Um zu zeigen, dass Natriumdodecylsulfat aus dem SDS-Gel keinen Einfluss auf die Wanderung der Nanopartikel im Gel aufweist, wurde ein weiteres Gel, ein Tris-Borat-EDTA-Gel (TBE), verwendet (Abbildung 38b.). Aus dem TBE-Gel ist erkennbar, dass sich die modifizierten Nanopartikel ebenfalls nicht in das Gel bewegen (Spur 5). Da die Ergebnisse vergleichbar waren, konnte gezeigt werden, dass Natriumdodecylsulfat keinen Einfluss auf die Wanderung der Nanopartikel hat. Aus dem SDS-Gel ist zu erkennen, dass die Negativkontrolle, Nanopartikel mit Peptid ohne Maleinimid NP-25 (Spur 5), keine Banden in der Tasche des Gels aufweisen. Zudem gibt es keinen Unterschied zwischen dem fluoreszierenden Peptid (Spur 4) und dem Peptid, das ohne Maleinimid 15 zu den Nanopartikeln gegeben wurde (Spur 5). Somit kommt es zu keiner Bindung des Peptids ohne Dopamin-Maleinimid (15).

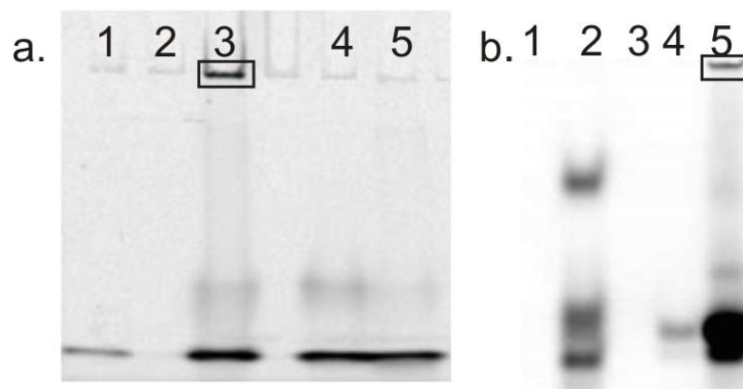


Abbildung 38: a) Fluoreszenz-Aufnahme des 12% SDS-Polyacrylamid-Gels. Spur 1: Gereinigtes Linker-Peptid-Konjugat **26**, Spur 2: Reine TiO₂-NP, Spur 3: NP-**26**, Spur 4: Unmodifiziertes Peptid **25**, Spur 5: NP-**25**. b) UV-Aufnahme eines TBE-Gels. Spur 1: Reine TiO₂-NP, Spur 2: Unmodifiziertes Peptid **25**, Spur 3: Dopamin-Maleinimid **15**, Spur 4: Gereinigtes Linker-Peptid-Konjugat **26**, Spur 5: NP-**26**.

Die obere Bande aus Spur 3 wurde aus dem SDS-Gel geschnitten und TEM-Aufnahmen angefertigt (Abbildung 39a.). Um sicher zu gehen, dass es sich bei den Partikeln um Titandioxid handelt, wurden EDXS-Messungen getätigt (Abbildung 39b.). Durch die Messungen konnte gezeigt werden, dass die Partikel Titandioxid entsprechen. Neben Titan und Sauerstoff ist auch Kohlenstoff detektiert worden, dabei handelt es sich um Artefakte des verwendeten Kohlenstoff-Films.

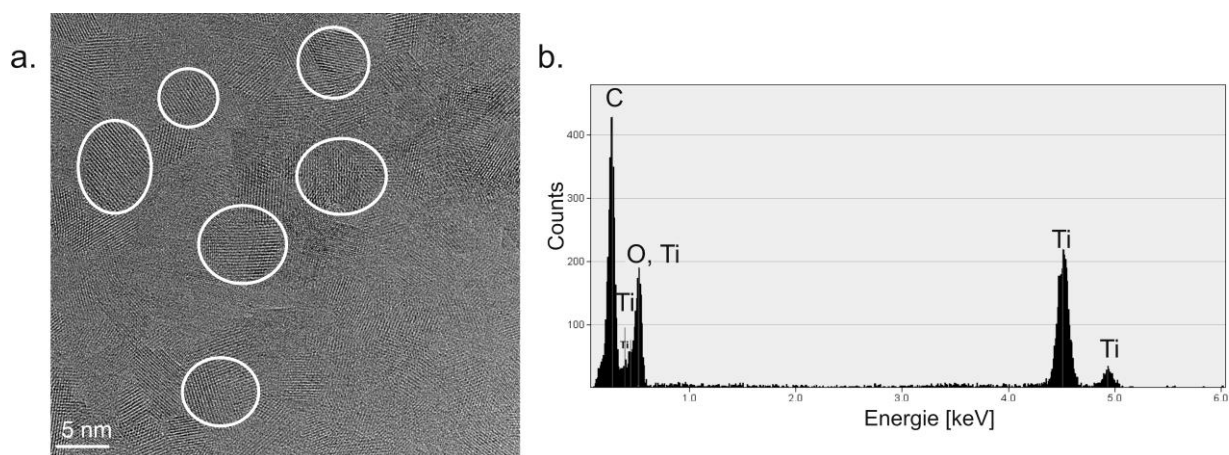


Abbildung 39: a. TEM-Aufnahme der modifizierten TiO₂-Nanopartikel, die aus dem SDS-Gel ausgeschnitten wurden (Spur drei) und b. EDXS-Diagramm der Nanopartikel, welches die Präsenz von Titandioxid zeigt.

Zusätzlich wurde die Größe der modifizierten TiO₂-Nanopartikel mit dynamischer Lichtstreuung bestimmt. Aus Tabelle 13 ist zu erkennen, dass die modifizierten Nanopartikel größer als die reinen Nanopartikel sind. Zudem ist ersichtlich, dass die Negativkontrolle, Nanopartikel mit reinem Peptid, keine Veränderung der Größe aufzeigt. Somit konnte nochmals bestätigt werden, dass das Peptid ohne Dopamin-Maleinimid (**15**) nicht an die Nanopartikel-Oberfläche binden kann. Die reinen Nanopartikel wurden in Wasser gemessen, die maleinimidmodifizierten Partikel in Acetonitril und die peptidmodifizierten Nanopartikel in Acetonitril/Wasser (1:1). Die Unterschiede zwischen den Messungen lassen sich durch die verschiedenen Lösungsmittel erklären, da der hydrodynamische Radius von der Viskosität des Lösungsmittels abhängt.

Tabelle 13: Hydrodynamischer Radius der peptidmodifizierten TiO₂-Nanopartikel (NP-26).

Eintrag	Radius [nm]
NP	5.13 ± 0.050
NP-15	34.2 ± 0.395
NP-25 (Kontrolle)	4.20 ± 0.246
NP-26	62.3 ± 2.050

Die Reinigung der peptidmodifizierten Nanopartikel (NP-26) erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie, da eine Reinigung durch Zentrifugation zu einem großen Verlust an Produkt führte. Die entsprechenden Chromatogramme sind in Abbildung 40 dargestellt.

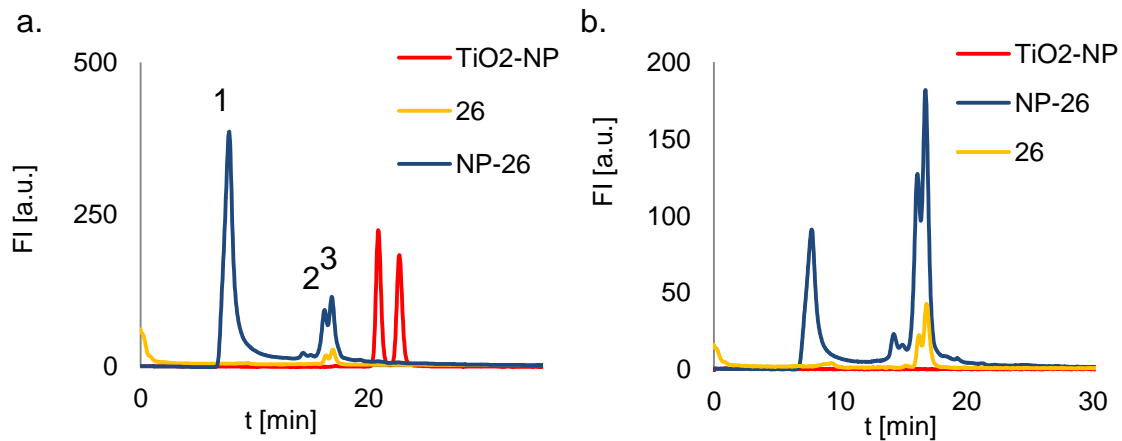


Abbildung 40: Größenausschlusschromatographie der peptidmodifizierten Nanopartikel NP-26; a. Chromatogramm bei 280 nm und b. bei 490 nm.

Es konnten drei Hauptfraktionen erhalten werden (Abbildung 40). Signal zwei und drei stammen von Peptid-Maleinimid **26**, was zeigt, dass noch ungebundenes Konjugat vorhanden ist. Das lässt sich durch die Zugabe eines Überschusses an modifiziertem Peptid **26** erklären. Das Chromatogramm bei 490 nm spiegelt die Fluoreszenz des Carboxyfarbstoffs wieder. Die Signale bei 280 nm der reinen TiO₂-Nanopartikel stammen von Diethylenglykol, den Oberflächenmolekülen, die die Nanopartikel vor Agglomeration schützen. Aus Abbildung 40a. wird ersichtlich, dass die Signale der Nanopartikel (Diethylenglykol) verschwunden sind, stattdessen ist ein neues Signal nach circa sieben Minuten entstanden. Dieses Signal wurde gesammelt und TEM-Aufnahmen wurden angefertigt (Abbildung 41). Die modifizierten Nanopartikel sind im Vergleich zu den reinen Nanopartikeln etwas größer geworden, was zeigt, dass das Linker-Peptid-Konjugat **26** an der Oberfläche der Nanopartikel gebunden hat.

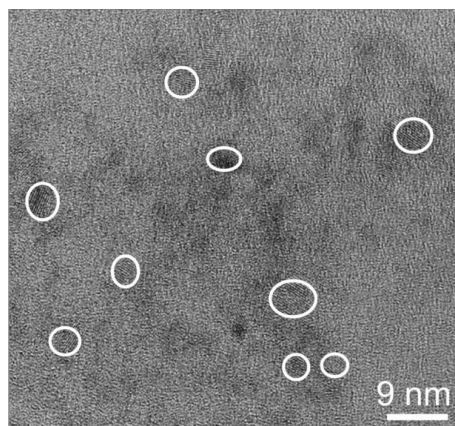


Abbildung 41: TEM-Aufnahme der peptidmodifizierten Titandioxid-Nanopartikel (NP-26) nach Größenausschlusschromatographie.

Die Negativkontrolle, Nanopartikel mit Peptid, wurden ebenfalls mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die entsprechenden Chromatogramme beider Wellenlängen 280 und 490 nm sind in Abbildung 42 dargestellt.

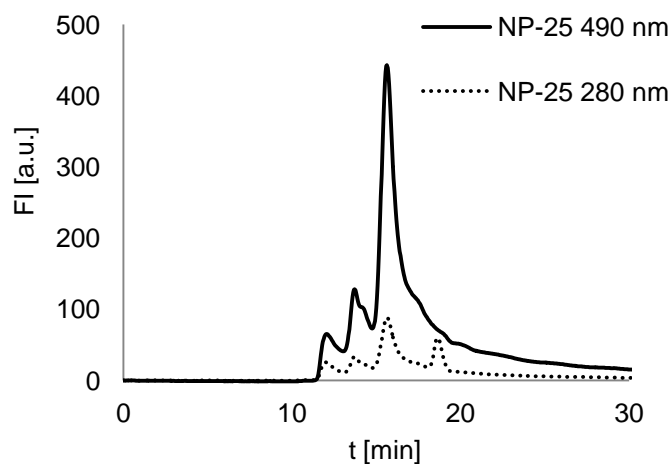
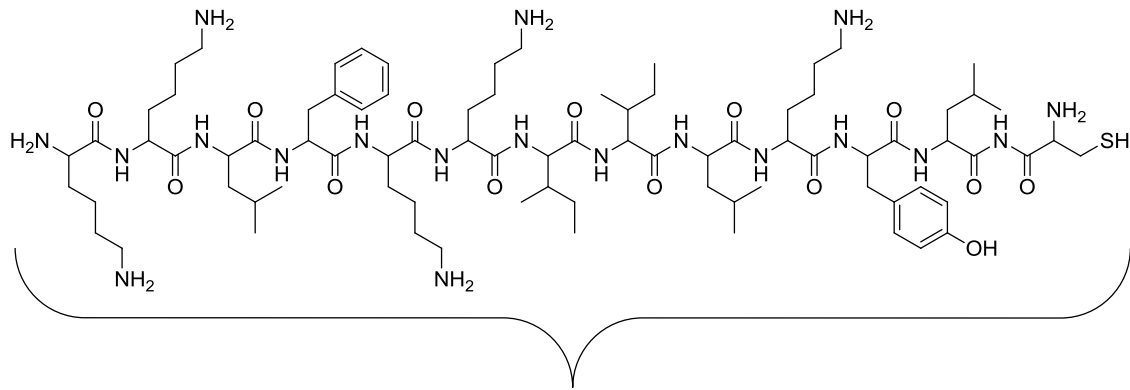


Abbildung 42: Größenausschlusschromatographie der Negativkontrolle, Nanopartikel mit reinem Peptid (NP-25). Abgebildet sind die Wellenlängen 280 und 490 nm.

In diesem Fall ist kein neues Signal im Bereich zwischen fünf und zehn Minuten sichtbar, was bestätigt, dass das unmodifizierte Peptid nicht über den Farbstoff an die Nanopartikel binden kann. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten des SDS-Polyacrylamid-Gels und den DLS-Messungen überein.

Eine Bindung des Maleinimids **15** an die Nanopartikel und die anschließende Michael-Addition des Peptids **25** führten nicht zu der gewünschten Bindung des Peptids, lediglich die Modifizierung der Titandioxid-Nanopartikel über Ligandenaustausch war erfolgreich.

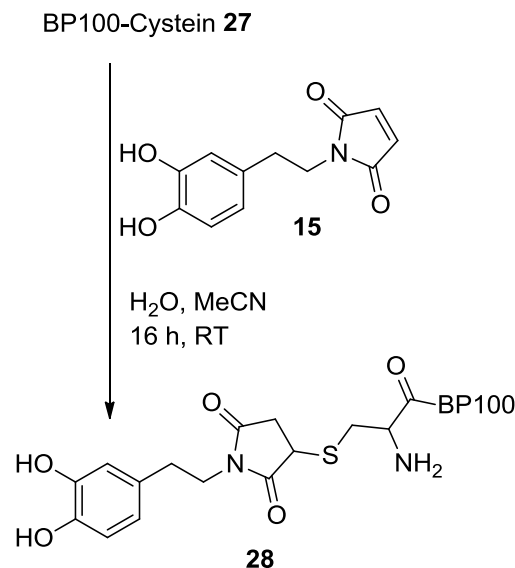
Da die Reaktion mit dem Modell-Peptid erfolgreich verlief, wurde das zellgängige Peptid BP100-Cystein **27** insofern modifiziert, als dass es an TiO_2 binden kann. BP100 ist ein antimikrobielles Peptid mit der Sequenz KKLFFKILKYL- NH_2 , welches von Dr. Parvesh Wadhvani (Arbeitskreis Prof. A. Ulrich, KIT) zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Peptid wurde durch eine Mutation von Pep3 (WKLFKKILKVL- NH_2) und Melittin (membranpermeabilisierende Komponente aus Bienengift) erhalten.^[156] Das rhodaminmodifizierte Peptid BP100 ist in der Lage als molekularer Transporter zu agieren und somit schnell und effektiv beispielsweise in Tabakzellen einzudringen.^[157] Mittels Peptid-Synthese wurde *N*-terminal Cystein eingefügt (Abbildung 43), um eine Bindung zwischen dem Peptid und Dopamin-Maleinimid (**15**) zu ermöglichen.



BP100-Cystein 27

Abbildung 43: Struktur des verwendeten BP100-Cystein **27**.

Zunächst wurde der pH-Wert des Peptids **27** auf circa acht eingestellt und über Nacht mit einem Überschuss an Dopamin-Maleinimid (**15**) geschüttelt (Schema 27). Die Reinigung erfolgte mittels HPLC, das Chromatogramm der Reaktion ist in Abbildung 44 dargestellt.



Schema 27: Michael-Addition zwischen BP100-Cystein **27** und Dopamin-Maleinimid (**15**).

Aus dem Chromatogramm ist zu erkennen, dass sich neue Signale gebildet haben. Mittels MALDI-TOF-Messungen konnte das Produkt **28** mit einer Retentionszeit von circa 15.5 Minuten detektiert werden (Signal 1, Abbildung 44).

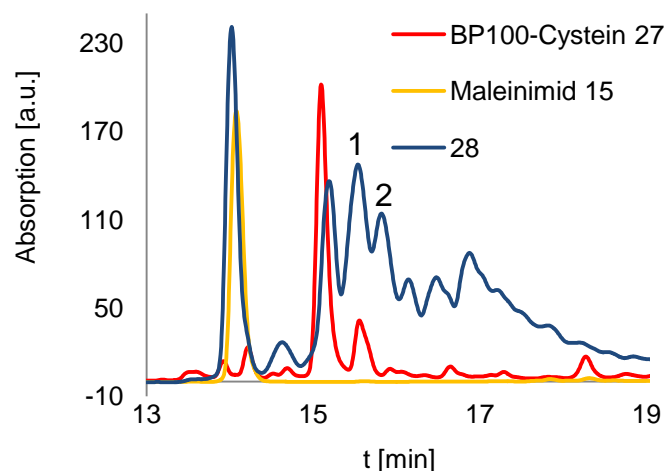


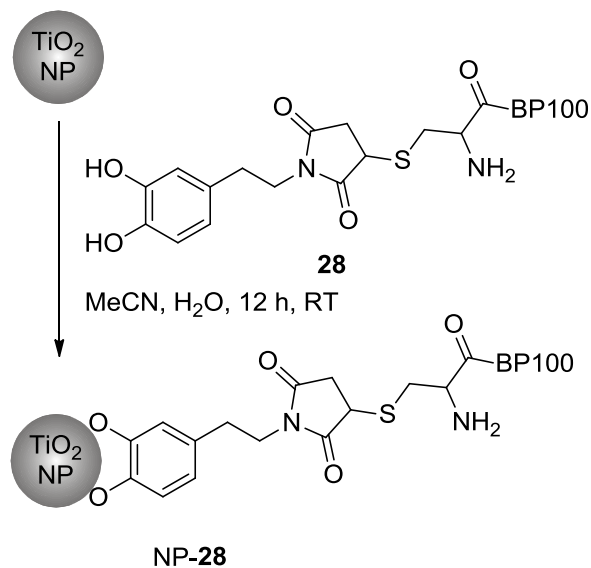
Abbildung 44: HPLC-Chromatogramm der Reaktion des BP100-Cystein **27** und Maleinimids **15** bei 260 nm.

Die Ergebnisse der MALDI-TOF-Messungen sind in Tabelle 14 dargestellt. Es ist zu beobachten, dass es zu einer Bindung von zwei Molekülen Dopamin-Maleinimid (**15**) kommt, dies ist in Signal 2 bei circa 15,8 Minuten mit der Masse von 1990 g/mol ersichtlich.

Tabelle 14: MALDI-TOF-Resultate der Reaktion zwischen BP100-Cystein **27** und Dopamin-Maleinimid (**15**).

Eintrag	Masse _{Soll} [g/mol]	Masse _{Ist} [g/mol]
BP100-Cystein 27	1524	1524
Produkt 28a Signal 1	1757	1757
Produkt 28b Signal 2	1757	1990

Das modifizierte Peptid **28** (Produkt mit einem Dopamin-Maleinimid **28a** und mit zwei Maleinimid-Molekülen **28b**) wurde zu Titandioxid-Nanopartikel (Ligandenfreie NP) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt (Schema 28).



Schema 28: Oberflächenmodifikation der Titandioxid-Nanopartikel mit maleinimidmodifiziertem BP100-Cystein **28**.

Bei Zugabe des mit einem maleinimidmodifizierten BP100-Cysteins **28a** war eine Farbänderung von farblos nach gelb sichtbar. Bei Zugabe des mit zwei maleinimidmodifizierten BP100-Cysteins **28b** war die Farbänderung stärker ausgeprägt. Um die Bindungen zu bestätigen wurden nach Zentrifugation der modifizierten Nanopartikel UV/Vis Messungen durchgeführt (Abbildung 45). Das Signal des modifizierten Peptids **28a** ist bei der Bindung eines Dopamin-Maleinimids **15** nicht mehr vorhanden, es kommt zur Bildung eines breiten Signals. Daher ist es schwierig, Aussagen über eine erfolgreiche Bindung des einfach modifizierten BP100-Cystein treffen zu können. Bei der Verwendung des doppelt-modifizierten Peptids **28b** ist das Signal des Edukts noch vorhanden und zusätzlich ein breites Signal zwischen 317 und 383 nm (Abbildung 45). Bei diesem Signal handelt es sich um den Charge-Transfer-Komplex der modifizierten Nanopartikel. Somit konnte gezeigt werden, dass die Bindung des BP100-Cystein mit zwei Dopamin-Maleinimid-Molekülen erfolgreich verlief.

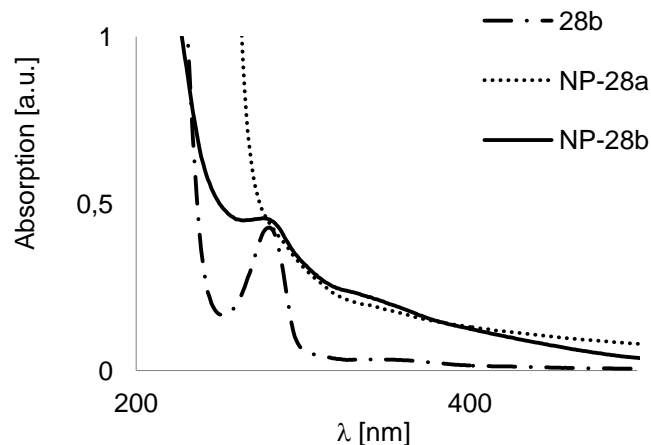


Abbildung 45: UV/Vis-Messungen der BP100-Cystein-modifizierten Nanopartikel mit einfach **28a** und doppelt modifiziertem BP100-Cystein **28b** nach der Reinigung.

Schließlich wurde rhodaminbasiertes BP100-Cystein verwendet, um die Charakterisierung zu vereinfachen. Die Bindung des maleimidmodifizierten Peptids war allerdings nicht erfolgreich. Wie bei den Peptoiden und der TAMRA-DNA war es nicht möglich, ein geladenes Molekül, das zusätzliche Ladung durch den Farbstoff trägt, an die Nanoteilchen zu binden. Das erfolgreich hergestellte TiO₂-Peptid-Hybrid NP-**28** soll demnächst in Zellstudien im Arbeitskreis von Prof. P. Nick (KIT) untersucht werden.

Durch die erhaltenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, Dopamin-Maleinimid (**15**) mit verschiedenen thiolierten Biomolekülen in Lösung zu modifizieren. Eine Funktionalisierung der Nanopartikel beziehungsweise der Nanostäbchen führte mit Oligonukleotid DNA **1**, dem Modellpeptid KGGGC **25** und BP100-Cystein **27** zum Erfolg. Es war nicht möglich Moleküle an Nanoteilchen zu binden, die einen Rhodamin –oder rhodaminbasierten Farbstoff aufwiesen. Diese zusätzliche Ladung verhinderte einen Ligandenaustausch. Bei der Reaktion mit dem thiolierten Zucker **19** konnte aufgrund fehlender Charakterisierungsmethoden keine eindeutige Aussage über den Erfolg der Reaktion getroffen werden, jedoch sind der Charge-Transfer und das Größenausschlusschromatogramm vielversprechende Resultate.

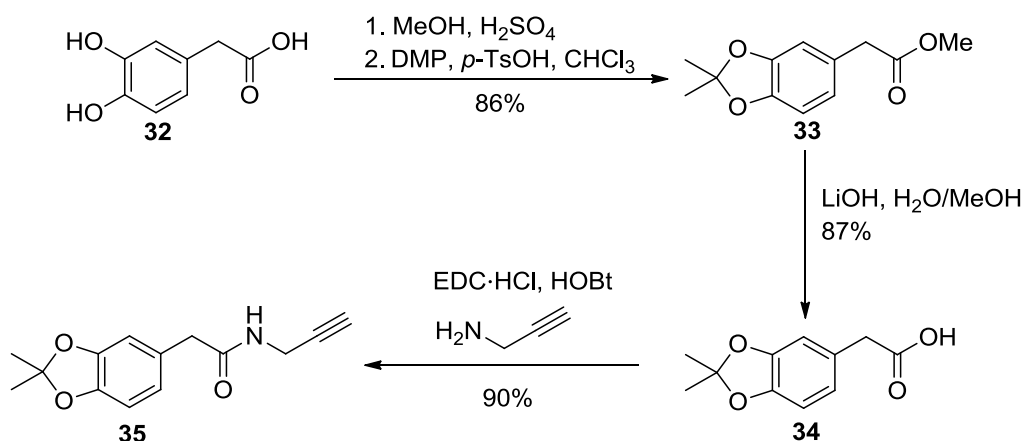
Um die Modifizierung der Titandioxid-Nanoteilchen erweitern zu können, sollten bifunktionelle Linker mit verschiedenen funktionellen Gruppen synthetisiert werden.

Tabelle 15: Bedingungen der Kupplungsreaktion zwischen Kaffeesäure **29** und Propargylamin **30**.

Eintrag	Reagenzien	Temperatur	Lösungsmittel	Produkt
1	1.20 Äq. EDC·HCl, 0.503 Äq. HOBt	23 °C	DMF	-
2	1.20 Äq. EDC·HCl, 0.503 Äq. HOBt, 2.00 Äq. NMM	0 °C	THF	-
3	1.20 Äq. EDC·HCl, 0.503 Äq. HOBt, 2.00 Äq. NMM	23 °C	DMF	-
4	1.40 Äq. NMM, 0.503 Äq. Chlorameisensäureisobutylester, 1.38 Äq. Propargylamin	-10 °C → RT	DMF	-

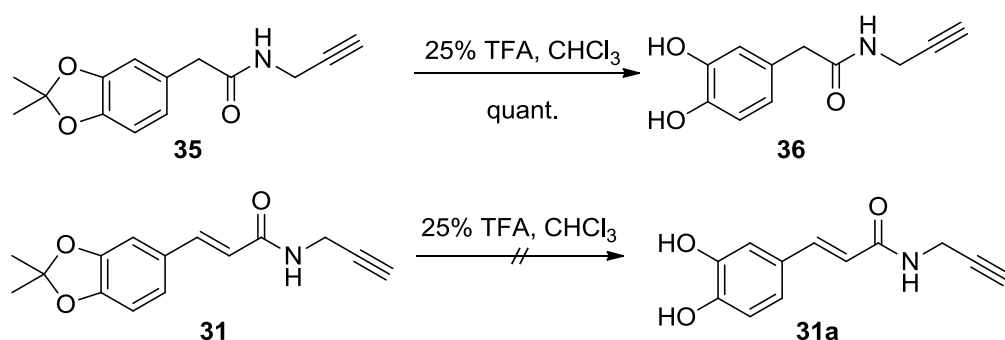
Die Reaktion konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden, Variation der Lösungsmittel oder Zugabe von Base führten nicht zum gewünschten Alkin **31a**.

Aus diesem Grund wurde eine Schutzgruppe für die Catecholfunktion eingeführt. Ausgehend von 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (**32**) und Kaffeesäure (**29**) wurden in vier Stufen geschützte Catechole mit terminaler Alkinfunktion synthetisiert. Zunächst wurden die Carboxylfunktionen durch Veresterung mit Methanol unter Säurekatalyse geschützt, beide Produkte konnten in quantitativer Ausbeute erhalten werden. Im nächsten Schritt wurden die Catecholfunktionen durch Bildung eines cyclischen Acetals mittels 2,2-Dimethoxypropan und *para*-Toluolsulfonsäure modifiziert. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnten 72% des Methylesters **33** und 50% des Produkts **91** erhalten werden. Die Säurefunktionen konnten durch basische Verseifung mit Lithiumhydroxid entschützt werden. Dies gelang in einer Ausbeute von 87% für **34** und 58% für die catecholgeschützte Kaffeesäure **92**. An die freie Säurefunktion wurde mittels EDC·HCl und HOBt Propargylamin (**30**) gebunden, wobei das Produkt **35** der Phenylelessigsäure in einer Ausbeute von 90% und das der Kaffeesäure **93** in einer Ausbeute von 89% erhalten werden konnten. Die beschriebenen Reaktionen sind anhand der 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (**32**) in Schema 30 dargestellt.



Schema 30: Synthese des catecholbasierten Alkins **35** am Beispiel von 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure (**32**).

Die anschließende Entschützung mittels Trifluoressigsäure in Chloroform führte bei **35** zu einer quantitativen Ausbeute des Catechols **36**, das Produkt **31b** der Kaffeesäure konnte nicht erhalten werden (Schema 31). Ein Grund hierfür könnte sein, dass sich Trifluoressigsäure an die Doppelbindung lagert.^[160]



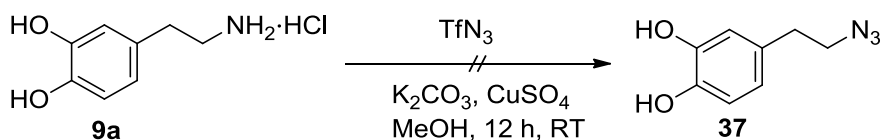
Schema 31: Untersuchte Reaktion zur Entschützung der Catecholfunktion von **35** und **31a**.

4.3.2 Synthese des Azid-Linkers ausgehend von Dopamin-Hydrochlorid (**9a**)

Die Azidfunktion weist im Vergleich zu anderen funktionellen Gruppen interessante Eigenschaften, wie beispielsweise eine ausgezeichnete Stabilität gegen Dimerisierung und Hydrolyse auf.^[112] Zudem sollte eine Variation an funktionellen Gruppen für die kupferkatalysierte Cycloaddition synthetisiert werden.

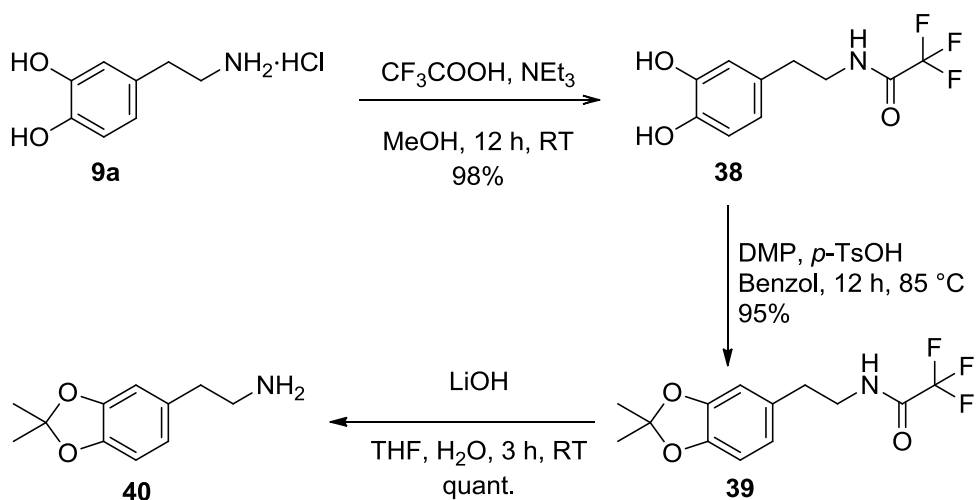
Zunächst sollte die Aminofunktion des Dopamin-Hydrochlorids (**9a**) direkt zum Azid umgesetzt werden. Hierzu wurde *in situ* Triflylazid aus Natriumazid und Trifluormethansulfonanhydrid in Acetonitril hergestellt. Da dieses Produkt explosiv ist,

wurde Triflylazid ohne Entfernen des Lösungsmittels direkt zu Dopamin-Hydrochlorid (**9a**) zugegeben und für zwei Stunden bei 0 °C gerührt (Schema 32). Das gewünschte Azid **37** konnte nicht erhalten werden.^[161]



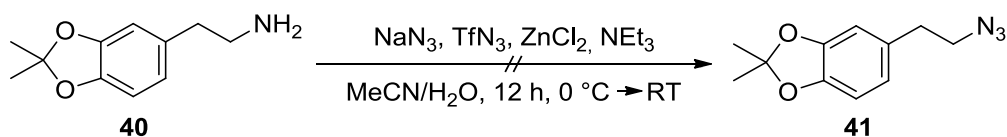
Schema 32: Synthesestrategie zur Herstellung von Dopamin-Azid **37**.

Da die Synthese nicht erfolgreich verlief, wurde die Catecholfunktion des Dopamin-Hydrochlorids (**9a**) ebenfalls durch ein cyclisches Acetal geschützt. Dopamin-Hydrochlorid **9a** wurde mit Trifluoressigsäure und Triethylamin in Methanol in guter Ausbeute (98%) zum Trifluoroacetamid **38** umgesetzt. Das vollständig geschützte Molekül **39** wurde durch Zugabe von 2,2-Dimethoxypropan und *para*-Toluolsulfonsäure in Benzol in einer Soxhlet-Apparatur über Nacht bei 85 °C erhalten. Die Entschützung der Aminofunktion erfolgte mit Lithiumhydroxid in einem Wasser/Tetrahydrofuran-Gemisch, die Ausbeute konnte im Vergleich zur Literatur von 87% auf eine quantitative Ausbeute verbessert werden (Schema 33).^[162]



Schema 33: Synthese des catecholgeschützten Dopamins **40**.

Die Reaktion des geschützten Dopamins **40** mit Triflylazid, Zinkchlorid und Triethylamin in einem Wasser/Acetonitril-Gemisch führte nicht zum gewünschten Azid **41** (Schema 34).



Schema 34: Untersuchte Reaktion zur Synthese des catecholgeschützten Azids **41**.

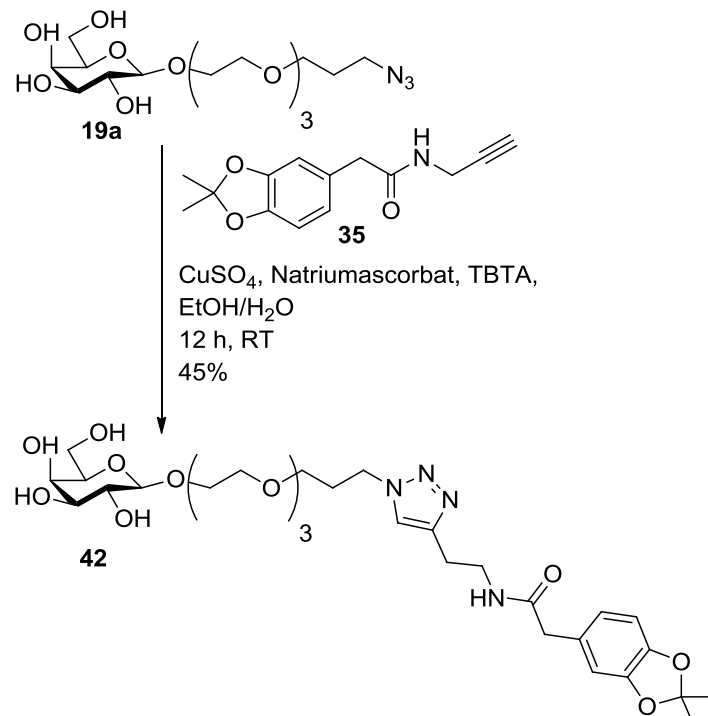
Somit führte die Schützung der Catecholfunktion ebenfalls nicht zum catecholbasierten Azid. Aus diesem Grund wurden die kupferkatalysierten Reaktionen zunächst mit dem catecholbasierten Alkin **36** durchgeführt.

4.3.3 Kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition mittels Alkin **36**

Die klassische Azid-Alkin Huisgen-Cycloaddition findet meist bei erhöhten Temperaturen statt und es können zwei Regioisomere, das 1,4-disubstituierte und das 1,5-disubstituierte 1,2,3-Triazol, gebildet werden. Die Verwendung von Kupfer um die Reaktion zu katalysieren ist eine Weiterentwicklung der klassischen 1,3-dipolaren Huisgen Cycloaddition. Diese kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) verläuft regioselektiv und um einiges schneller als die klassische Huisgen-Cycloaddition, zudem wird lediglich das 1,4-Isomer des Triazols gebildet.^[163] Diese „Click“-Reaktion sollte es ermöglichen, bifunktionelle und catecholbasierte Linker mit verschiedenen Biomolekülen zu verknüpfen. Die Reaktionen wurden zunächst in Lösung untersucht um die Bedingungen für eine Bindung des Biomoleküls zu optimieren und diese auf die Nanopartikel übertragen zu können.

4.3.3.1 Azidmodifizierter Zucker zur Herstellung von TiO₂-Nanopartikel-Hybriden

Der Zucker **19a** wurde ebenfalls von Dr. Christine Richter der Arbeitsgruppe Biskup (KIT) mit einer Azidfunktion modifiziert. Somit konnte eine CuAAC mit dem catecholbasierten Alkin **35** unter Verwendung von Kupferbromid und Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin (TBTA) in einem Gemisch aus Wasser, *tert*-Butanol und Dimethylsulfoxid durchgeführt werden. Dabei ist das geschützte Alkin **35** ausgefallen und konnte auch durch weitere Zugabe von Lösungsmittel nicht wieder vollständig gelöst werden. Aus diesem Grund wurde eine andere Variante genutzt, indem Kupfersulfat anstelle von Kupferbromid, TBTA und Natriumascorbat für die Reaktion verwendet wurden (Schema 35).



Schema 35: 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen dem Zucker **19a** und dem geschützten Alkin **35** unter Kupferkatalyse.

Das HPLC-Chromatogramm der Reaktion ist in Abbildung 46 dargestellt, es sind zwei neue Signale entstanden. Signal 1 weist eine Retentionszeit von 14.6 Minuten und Signal 2 von 20.2 Minuten auf.

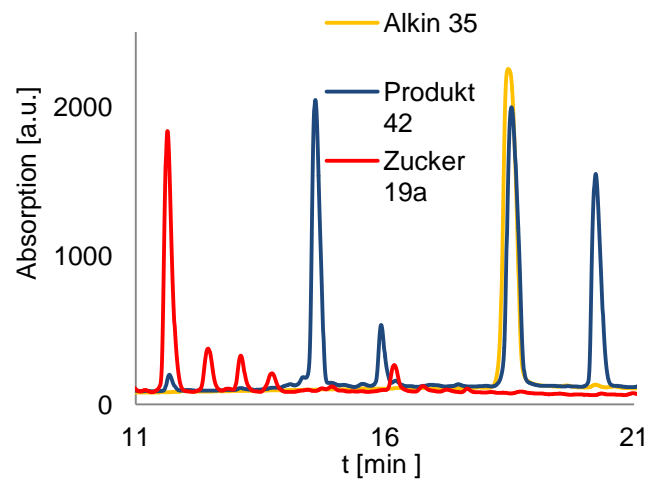


Abbildung 46: HPLC-Chromatogramm der 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen dem Zucker **19a** und dem Alkin **35** bei 210 nm.

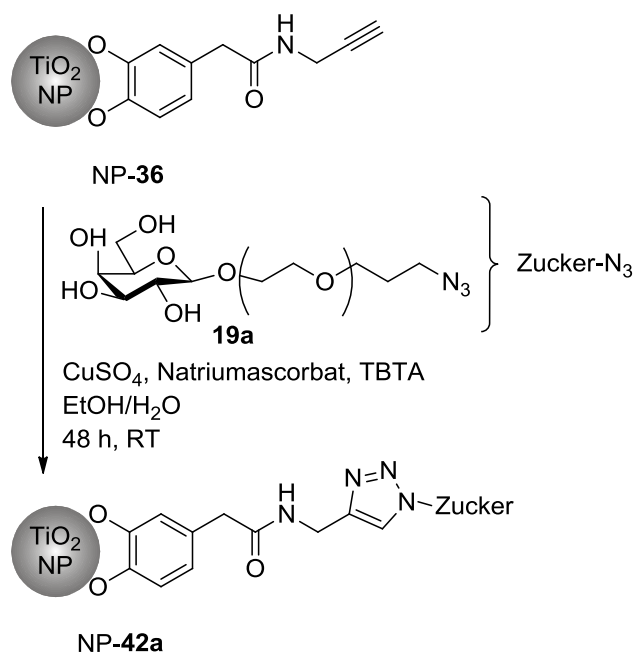
Anschließende MALDI-TOF-Messungen zeigten, dass das Produkt mit einer Retentionszeit von 14.6 Minuten (Signal 1) das gewünschte Produkt **42** enthält (Tabelle 16). Das Produkt mit

der Retentionszeit von 20.2 Minuten (Signal 2) zeigte nicht die gewünschte Masse des Produkts **42**.

Tabelle 16: MALDI-TOF-Resultate der CuAAC zwischen dem Zucker **19a** und dem Alkin **35**.

Eintrag	M _{Soll} [g/mol]	M _{Ist} [g/mol]
Produkt 42 Signal 1 (+ Na)	641 (664)	663
Produkt 42 Signal 2 (+ Na)	641 (664)	-

Da die Reaktion in Lösung zum gewünschten Produkt **42** führte, wurden die Bedingungen auf die Oberfläche der TiO₂-Nanopartikel übertragen. Hierzu wurde zunächst alkinmodifizierte Nanopartikeln (NP-**36**) über Nacht hergestellt. Es kam direkt nach der Zugabe zu einer Farbänderung von braun nach orange. Dieser Charge-Transfer-Komplex zeigt, dass der Ligandenaustausch erfolgreich verlief. Der pH-Wert der alkinmodifizierten Nanopartikel wurde auf 7.5 eingestellt, daraufhin wurden Kupfersulfat, Natriumascorbat, TBTA und der azidmodifizierte Zucker **19a** zugegeben (Schema 36).



Schema 36: Oberflächenmodifikation der Titandioxid-Nanopartikel mit dem Alkin **36** und anschließender Cycloaddition mit Zucker **19a** unter Kupferkatalyse.

Das Gemisch wurde für zwei Tage bei Raumtemperatur geschüttelt. Eine Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie war aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit nicht möglich. Daher erfolgten UV/Vis-Messungen, die in Abbildung 47 dargestellt sind. Das Alkin **36** zeigt ein Maximum bei 288 nm, das Produkt der Cycloaddition in Lösung besitzt ein

Maximum bei 286 nm, die Reaktion auf der Nanopartikel-Oberfläche weist ein Maximum bei 274 nm, zudem ist ein breites Signal zwischen 300 und 335 nm sichtbar, dies zeigt den Charge-Transfer-Komplex der Bindung des Alkins **36**.

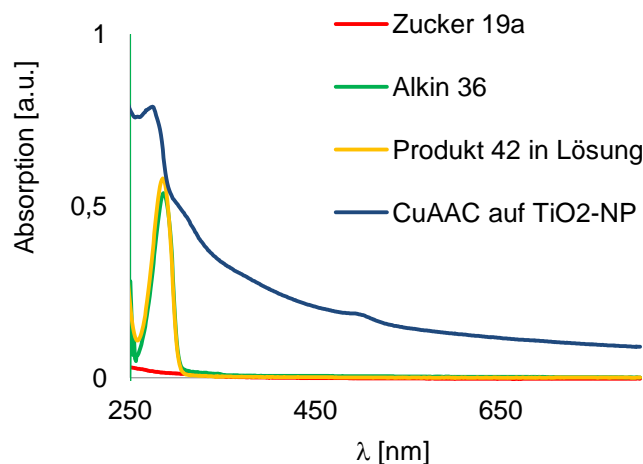


Abbildung 47: UV/Vis-Spektrum der 1,3-dipolaren Cycloaddition der alkinmodifizierten Nanopartikel (NP-36) mit Zucker-Azid **19a** unter Kupferkatalyse.

Durch die UV/Vis-Messungen kann keine eindeutige Aussage über den Erfolg der Reaktion getroffen werden. Um zu untersuchen, ob sich die Zuckermoleküle an der Partikel-Oberfläche befinden, sollten beispielsweise fluoreszierende Lektine verwendet werden, die spezifisch an die Zucker binden und diese durch den Farbstoff sichtbar machen. Dies wurde bisher nicht weiter untersucht.

4.3.3.2 Alkinmodifiziertes Peptoid zur Herstellung von TiO₂-Nanopartikel-Hybriden

Da die Michael-Addition des Peptoids **22** an Dopamin-Maleinimid (**15**) erfolgreich verlief (Kapitel 4.2.3.2), wurde die kupferkatalysierte Cycloaddition ebenfalls mit einem alkinmodifizierten Peptoid untersucht. Dieses Peptoid **43** wurde von Dominik Kölmel der Arbeitsgruppe Bräse zur Verfügung gestellt, in diesem Fall wurde anstelle des Rhodamin-Farbstoffs, der zu keiner Bindung an die Nanoteilchen führte, ein Fluorescein-Farbstoff eingeführt (Abbildung 48).

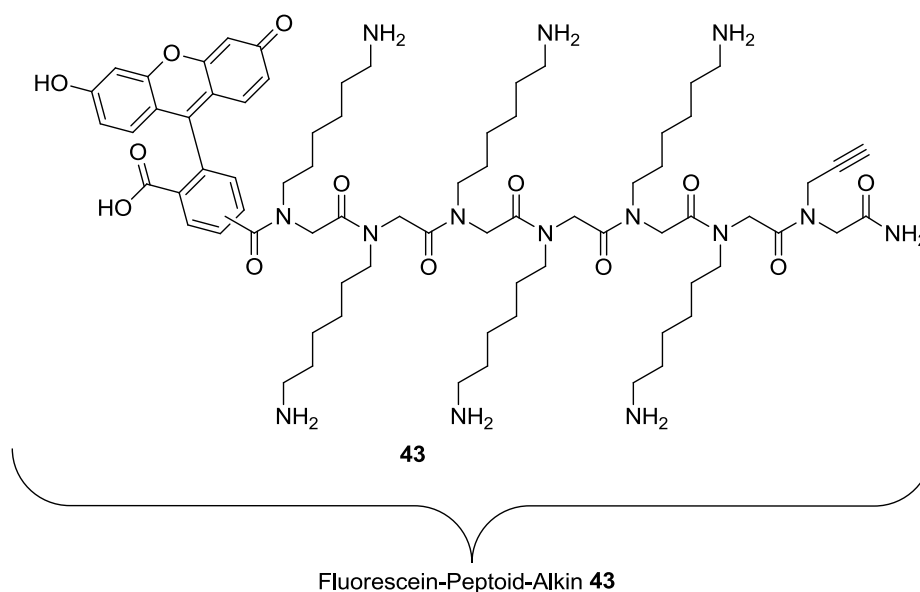
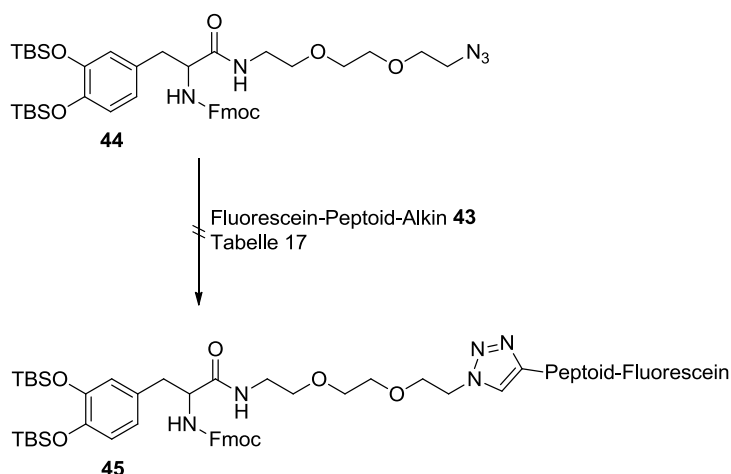


Abbildung 48: Struktur des verwendeten alkinmodifizierten Peptoids **43**.

Die Cycloaddition wurde mit einem wasserlöslichen trifunktionellen Linker untersucht, der von Dr. Ishtiaq Ahmed synthetisiert wurde. Dieser Azid-Linker **44** ist einerseits in der Lage, über die Catecholfunktion an die Titandioxid-Nanopartikel zu binden, andererseits besitzt das Molekül eine Aminofunktion, welche für weitere Funktionalisierungen zur Verfügung steht. Die dritte Gruppe stellt eine Azidfunktion zur 1,3-dipolaren Cycloaddition dar. Es wurde das geschützte Amin **44** verwendet, um zu vermeiden, dass Kupfer einen Komplex mit dem freien Amin bildet (Schema 37).^[164]



Schema 37: Reaktion zwischen dem alkinmodifizierten Peptoid **43** und dem trifunktionellen Linker **44** unter Kupferkatalyse.

Es wurde jeweils ein Äquivalent des Peptoids **43** und ein Äquivalent des trifunktionellen Alkins **44** verwendet und, wenn nicht anders angegeben, 0.20 Äquivalente der Liganden. In

Tabelle 17 befindet sich eine Übersicht der Bedingungen, die für die kupferkatalysierte Cycloaddition untersucht wurden.

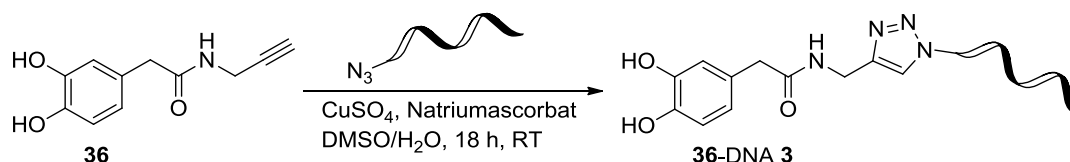
Tabelle 17: Reaktionsbedingungen der CuAAC zwischen dem Peptoid **43** und dem Azid **44**.

Eintrag	Ligand 1	Ligand 2	Lösungsmittel	Produkt
1	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Natriumascorbat	H ₂ O/MeCN	-
2	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,6-Lutidin	H ₂ O/MeCN	-
3	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,6-Lutidin	DMSO/MeCN	-
4	Cu(MeCN) ₄ PF ₆	2,6-Lutidin	H ₂ O/MeCN	-
5	Cu(MeCN) ₄ PF ₆	-	H ₂ O/MeCN	-
6	Cu(MeCN) ₄ PF ₆	2,6-Lutidin	MeOH/CH ₂ Cl ₂	-

Zunächst wurde die Reaktion mit Kupfersulfat und Natriumascorbat in einem Wasser/Acetonitril-Gemisch durchgeführt. Mittels anschließender HPLC-Reinigung konnte kein Produkt nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde 2,6-Lutidin als Ligand für die kupferkatalysierte Cycloaddition verwendet. Lutidin wurde bereits erfolgreich bei Reaktionen mit Peptoiden eingesetzt.^[165] Unter Verwendung dieses Liganden konnte ebenfalls kein Produkt erhalten werden. Der Grund könnte darin liegen, dass 2,6-Lutidin vorwiegend für intramolekulare Cycloadditionen verwendet wird und nicht, wie in diesem Fall für intermolekulare Reaktionen. Ebenso führten Variationen des Kupfersalzes und des Lösungsmittels nicht zum Erfolg der Reaktion. Die sterische Hinderung der Alkinfunktion innerhalb des Peptoids **43** könnte eine Reaktion mit dem Azid **44** verhindern.

4.3.3.3 Azidmodifizierte Oligonukleotide zur Herstellung von TiO₂-Nanopartikel-Hybriden

Um zu zeigen, dass es möglich ist, weitere azidmodifizierte Moleküle außer Zucker **19a** an das Alkin **35** zu binden und zu untersuchen, ob es möglich ist DNA-TiO₂-Hybride herstellen, wurde ein azidmodifiziertes Oligonukleotid (DNA **3**) verwendet und die kupferkatalysierte Cycloaddition mittels Natriumascorbat und Kupfersulfat durchgeführt. Da das entschützte Alkin **36** eine verbesserte Löslichkeit in Wasser aufweist, als die geschützte Variante, wurde das Alkin **35** mittels Trifluoressigsäure entschützt und die 1,3-dipolare Cycloaddition mit Kupfersulfat, Natriumascorbat und dem Oligonukleotid DNA **3** über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt (Schema 38).



Schema 38: 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen DNA 3 und entschütztem Alkin 36 unter Kupferkatalyse.

Die Reinigung des Reaktionsgemisches erfolgte mittels HPLC (Abbildung 49), es sind zwei Signale entstanden. Signal 1 weist eine Retentionszeit von 20.0 Minuten auf, Signal 2 eine Retentionszeit von 20.4 Minuten. Im Vergleich hierzu besitzt das reine Oligonukleotid DNA 3 eine Retentionszeit von 20.8 Minuten.

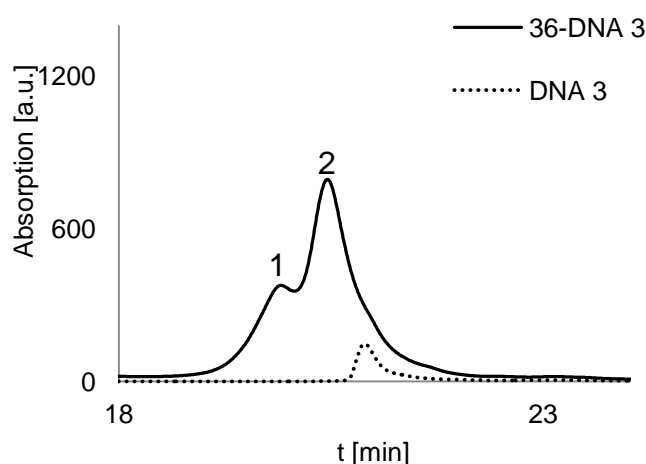


Abbildung 49: HPLC-Chromatogramm der kupferkatalysierten Cycloaddition zwischen DNA 3 und dem Alkin 36 bei 260 nm.

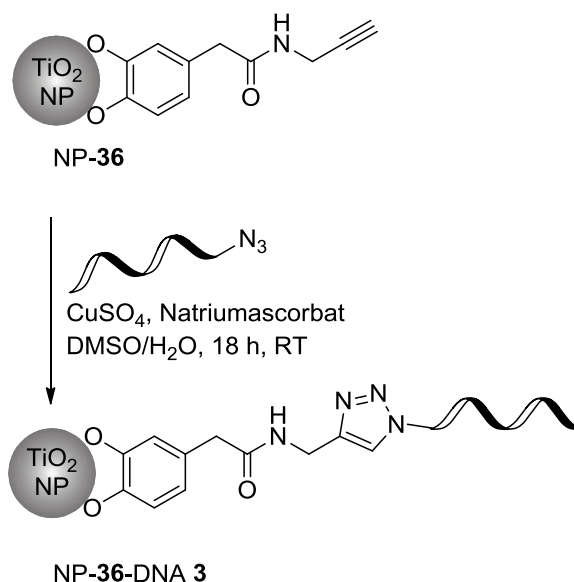
Von beiden Signalen 1 und 2 wurden MALDI-TOF-Messungen durchgeführt (Tabelle 18), das Signal mit einer Retentionszeit von 20.4 Minuten (Signal 1) zeigte nicht die Masse des Produkts, in Signal 2 mit einer Retentionszeit von 20.8 Minuten konnte die Masse des gewünschten Produkts 36-DNA 3 detektiert werden.

Tabelle 18: MALDI-TOF-Resultate der CuAAC zwischen DNA 3 und dem Alkin 36.

Eintrag	M_{Soll} [g/mol]	M_{Ist} [g/mol]
DNA 3	7524	7525
36-DNA 3 Signal 1 (+2 K)	7729 (7807)	-
36-DNA 3 Signal 2 (+2 K)	7729 (7807)	7731 (7810)

Es konnte gezeigt werden, dass die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition mit azidmodifizierter DNA in Lösung erfolgreich war, daher wurden die Reaktionsbedingungen

auf Titandioxid-Nanopartikel und -Nanostäbchen übertragen. Hierzu wurden die Nanoteilchen zunächst mit dem entschützten Alkin **36** über Nacht bei Raumtemperatur modifiziert. Es kam zu einer Farbänderung von farblos nach orange, was auf eine erfolgreiche Bindung hinweist. Daraufhin wurden DNA **3**, Kupfersulfat und Natriumascorbat zugegeben und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt (Schema 39).



Schema 39: Oberflächenmodifikation der Titandioxid-Nanopartikel mit dem Alkin **36** und anschließender Cycloaddition mit DNA **3** unter Kupferkatalyse.

Die Auswertung erfolgte mittels eines Agarose-Gels, welches in Abbildung 50 dargestellt ist. Zudem wurde das gereinigte Produkt nach der Reaktion in Lösung zu den Titandioxid-Nanopartikeln gegeben (DEG-NP). Bei der Zugabe konnte keine Farbänderung erkannt werden, was auf die geringe Konzentration der modifizierten DNA zurückzuführen ist. Um zu überprüfen, ob die Bindung erfolgreich war, wurden die Proben ebenfalls auf das Gel aufgetragen, welches in Abbildung 50 a. dargestellt ist.

In Spur 1 und 2 sind die alkinmodifizierten Nanopartikel und Nanostäbchen aufgetragen, die aufgrund fehlender Fluoreszenz nicht sichtbar sind. Die Nanopartikel und -stäbchen nach der kupferkatalysierten Cycloaddition (Spur 3 und 4) zeigen Fluoreszenz, die entsteht, wenn sich der Triazol-Ring gebildet und die Reaktion erfolgreich verlief. Die elektrophoretische Mobilität der modifizierten Nanoteilchen unterscheidet sich von der Mobilität der Reaktion in Lösung (Spur 6). Dies spricht ebenfalls für eine Reaktion auf der Oberfläche der Titandioxid-Nanoteilchen. Um zu überprüfen, ob es sich bei der Bande in den beiden Spuren 3 und 4 um DNA-modifizierte Nanoteilchen handelt, wurde das Gel mit SybrGold[®] angefärbt (Abbildung 50b.). Es ist zu erkennen, dass sich in Spur 3 und 4 eine breite Bande gebildet hat,

die nicht von den alkinmodifizierten Nanopartikeln und Nanostäbchen stammt, da in Spur 1 und 2 keine fluoreszierenden Banden sichtbar sind.

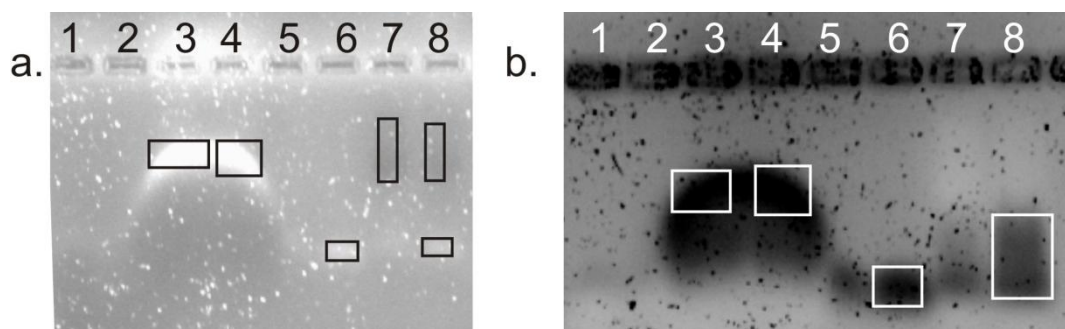


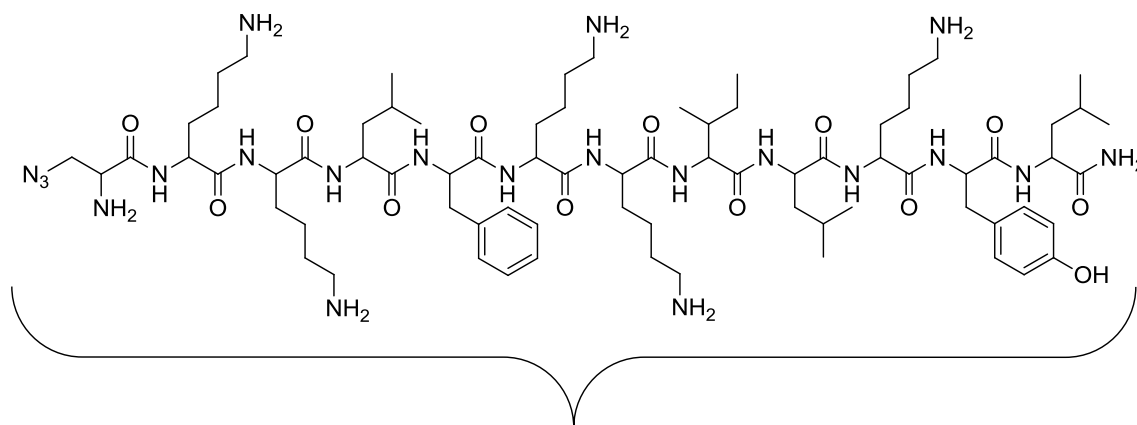
Abbildung 50: a. Fluoreszenz-Aufnahme eines einprozentigen Agarose Gels mit alkinmodifizierten Nanopartikeln (NP-**36**) und -Nanostäbchen (NR-**36**) der Cycloaddition mit DNA **3** unter Kupferkatalyse und b. Fluoreszenz-Aufnahme nach SybrGold[®]-Färbung. Spur 1: NP-**36**, Spur 2: NR-**36**, Spur 3: NP-**36**-DNA **3**, Spur 4: NR-**36**-DNA **3**, Spur 5: leer, Spur 6: Gereinigtes Produkt der Reaktion in Lösung **36**-DNA **3**, Spur 7: NP, Spur 8: Nanopartikel+**36**-DNA **3**.

Die Zugabe des Produkts **36**-DNA **3** in Lösung (Spur 6) zu den Nanopartikeln führte zu keiner Verschiebung im Gel (Spur 8). Somit konnte gezeigt werden, dass der Ligandenaustausch mittels modifiziertem Catechol **36**-DNA **3** nicht möglich war. Ein Grund hierfür könnte die negative Ladung der DNA und der Nanopartikel sein, die sich somit gegenseitig abstoßen.

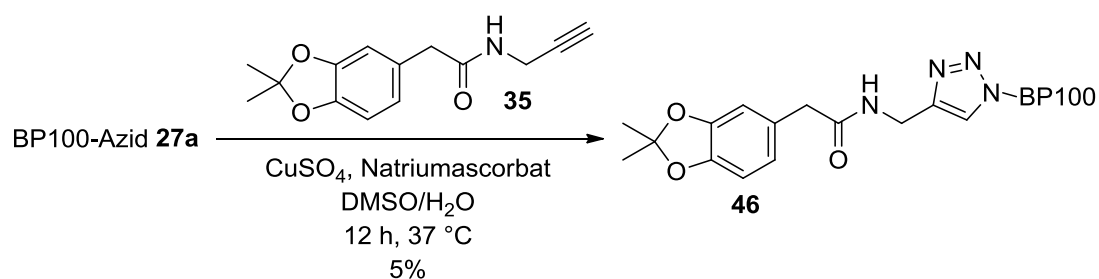
Die Ergebnisse des Gels sehen für die Reaktion auf der Nanoteilchen-Oberfläche vielversprechend aus. Aufgrund fehlender weiterführender Analytik kann jedoch keine eindeutige Aussage über den Verlauf der Reaktion getroffen werden. Möglich wäre eine Hybridisierung mit einer fluoreszierenden, komplementären DNA um die erfolgreiche Reaktion detektieren zu können.

4.3.3.4 Azidmodifiziertes Peptid BP100 zur Herstellung von TiO₂-Nanopartikel-Hybriden

Die Michael-Addition des BP100-Cysteins **27** an Dopamin-Maleinimid (**15**) verlief erfolgreich (Kapitel 4.2.3.4), daher wurde die kupferkatalysierte Cycloaddition ebenfalls mit einem alkinmodifizierten BP100 **27a** (Abbildung 51) untersucht. Die Modifikation mit einer Azidfunktion wurde von Dr. Parvesh Wadhvani durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

BP100-Azid **27a****Abbildung 51:** Struktur des verwendeten BP100-Azids **27a**.

Die 1,3-dipolare Cycloaddition wurde zunächst mit dem geschützten Alkin **35** und BP100-Azid **27a** unter Verwendung von Kupfersulfat und Natriumascorbat in einem Dimethylsulfoxid/Wasser-Gemisch bei 37 °C durchgeführt (Schema 40).

**Schema 40:** 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen BP100-Azid **27a** und dem geschützten Alkin **35** unter Kupferkatalyse.

Nach Reinigung mittels HPLC (Abbildung 52) konnte das Produkt durch MALDI-TOF-Messungen nachgewiesen werden. Hierbei wurde die Masse des Produkts **46** 1778 g/mol, die Masse mit Natrium (1801 g/mol) und mit Kalium (1817 g/mol) detektiert.

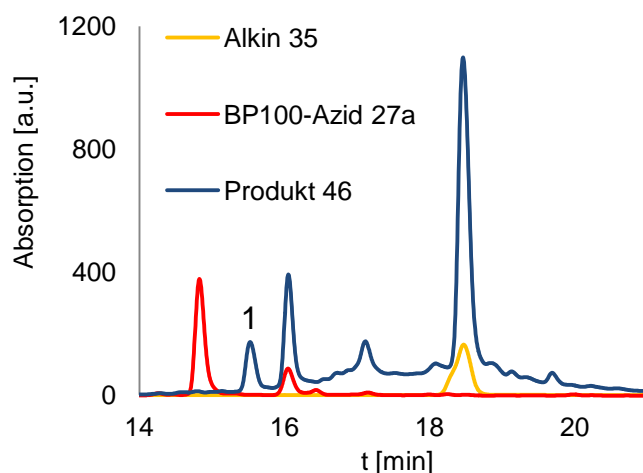


Abbildung 52: HPLC-Chromatogramm der CuAAC von BP100-Azid **27a** und dem Alkin **35** bei 280 nm.

Das Produkt konnte mit einer Retentionszeit von 15,5 Minuten detektiert werden. Zusätzlich wurden UV/Vis-Messungen des Produkts **46** durchgeführt, diese sind in Abbildung 53 dargestellt. Das geschützte Alkin **35** weist ein Maximum bei 278 nm, das Peptid BP100-Azid **27a** bei 288 nm und das Produkt **46** ein Maximum bei 282 nm auf. Es kommt zu einer Verschiebung des Maximums des Produkts **46**, was ebenfalls einen Hinweis darauf gibt, dass die Reaktion erfolgreich verlief.

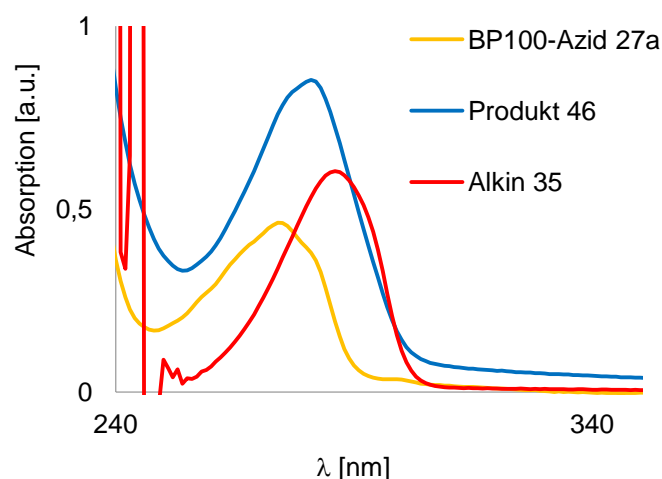
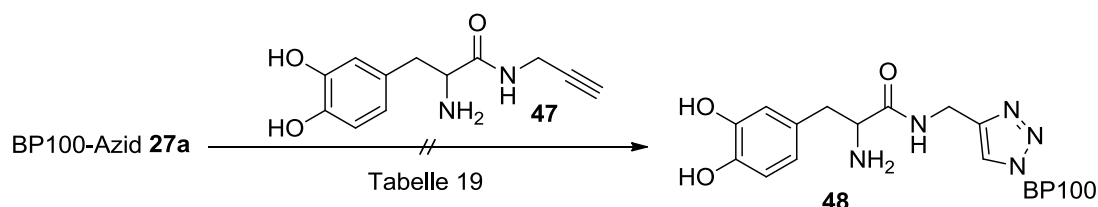


Abbildung 53: UV/Vis-Spektrum der 1,3-diploaren Cycloaddition zwischen BP100-Azid **27a** und dem geschützten Alkin **35**.

Da die kupferkatalysierte Cycloaddition unter Verwendung des geschützten Alkins **35** erfolgreich verlief, wurden die Bedingungen am trifunktionellen Linker **47** untersucht, der von Dr. Ishtiaq Ahmed zur Verfügung gestellt wurde. Hierzu wurde die kupferkatalysierte Cycloaddition zwischen dem trifunktionellen Alkin **47** und BP100-Azid **27a** unter Verwendung der oben erwähnten Bedingungen bei 37 °C durchgeführt (Schema 41,

Tabelle 19, Eintrag 1). In diesem Fall konnte nach der Reinigung mittels HPLC kein neues Signal und auch durch MALDI-TOF-Messungen nicht die Masse des gewünschten Produkts **48** detektiert werden. Zugabe von 125 Äquivalenten Natriumascorbat oder auch ein zusätzlicher Ligand (TBTA) führten nicht zum Produkt der Reaktion (Tabelle 19, Eintrag 2 und 3).



Schema 41: Synthesestrategie der 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen BP100-Azid **27a** und dem trifunktionellen Alkin **47** unter Kupferkatalyse.

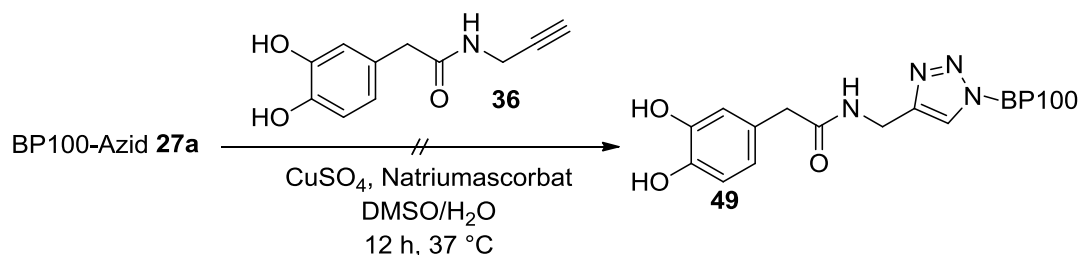
Weiterhin wurden einwertige Kupfersalze wie Kupferiodid mit Base (Tabelle 19, Eintrag 4) oder Kupferbromid mit *N,N,N',N',N''*-Pentamethyldiethylentriamin (PMDETA) verwendet (Tabelle 19, Eintrag 6). Diese Zusätze führten ebenfalls nicht zum gewünschten Erfolg der Reaktion.

Tabelle 19: Reaktionsbedingungen der CuAAC zwischen BP100-Azid **27a** und dem trifunktionellen Alkin **47**.

Eintrag	Ligand 1	Ligand 2	Ligand 3	Lösungs- mittel	Produkt
1	20.0 Äq. CuSO ₄ ·5H ₂ O	10.0 Äq. NaAsc	-	H ₂ O/DMSO	-
2	10.0 Äq. CuSO ₄ ·5H ₂ O	125 Äq. NaAsc	-	^t BuOH/H ₂ O	-
3	10.0 Äq. CuSO ₄ ·5H ₂ O	125 Äq. NaAsc	70.0 Äq. TBTA	^t BuOH/ H ₂ O/DMSO	-
4	1.00 Äq. DIPEA	0.1200 Äq. CuI	-	H ₂ O/MeCN	-
5	0.05 Äq. CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.20 Äq. NaAsc	-	H ₂ O/DMSO	-
6	2.20 Äq. CuBr	2.30 Äq. PMDETA	-	THF/H ₂ O	-

Ein Unterschied zwischen dem auf L-DOPA basierenden Linker **47** und auf 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure basierenden Linker **35** besteht darin, dass die Catecholfunktion des Alkins **35** geschützt vorlag. Um zu untersuchen, ob die Hydroxylfunktionen einen Einfluss auf die kupferkatalysierte Cycloaddition haben, wurde das

Alkin **35** mit Trifluoressigsäure entschützt und die kupferkatalysierte Cycloaddition unter denselben Bedingungen (Tabelle 19, Eintrag 1) mit dem ungeschützten Alkin **36** wiederholt (Schema 42).



Schema 42: Synthesestrategie der 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen BP100-Azid **27a** und dem entschützten Alkin **36** unter Kupferkatalyse.

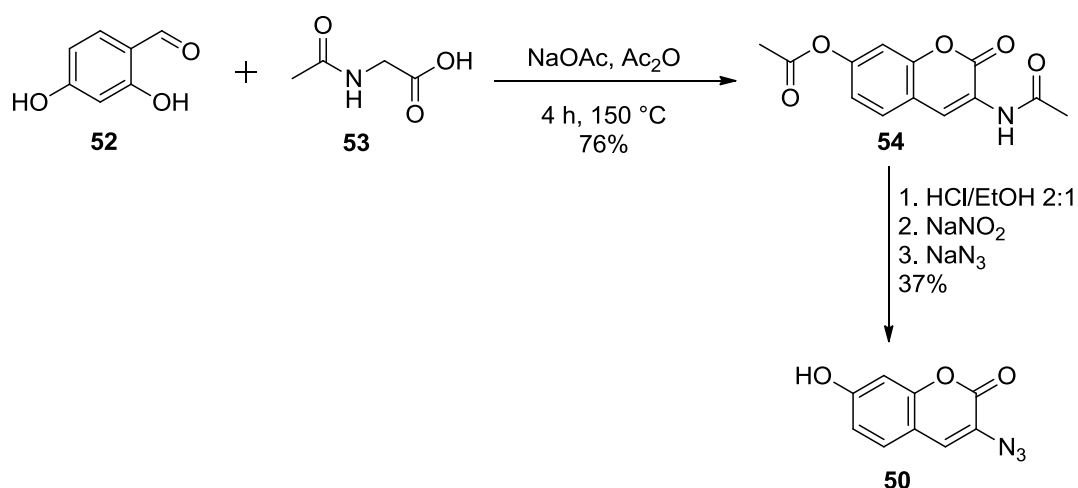
Mit dem ungeschützten Alkin **36** konnte nach der Reinigung mittels HPLC kein neues Signal und auch keine Masse des gewünschten Produkts **49** detektiert werden.

Somit kann bestätigt werden, dass in diesem Fall das ungeschützte Catechol einen Einfluss auf die kupferkatalysierte Cycloaddition ausübt. Es wird vermutet, dass es bei den Hydroxylgruppen, ähnlich wie bei der Aminofunktion, zu einer Komplexbildung mit dem Kupfersalz kommen kann und daher nicht genug Kupfer für die Reaktion zur Verfügung steht.

4.3.3.5 3-Azido-7-hydroxycumarin (**50**) zur Herstellung von TiO_2 -Nanopartikel-Hybriden

2H-1-Benzopyran-2-on (Cumarin) (**51**) ist ein natürlich vorkommender, sekundärer Pflanzenmetabolit, der einerseits Grundkörper zahlreicher Naturstoffe ist und andererseits als Duftstoff in der Kosmetik verwendet wird.^[166] Zudem sind Cumarine wegen ihrer pharmakologischen Aktivität und ihrer Anwendung als Laserfarbstoff interessante Moleküle.^[167] Sie werden aber auch als Fluoreszenzmarker in biologischen Anwendungen genutzt.^[168] Cumarin ist biokompatibel und sollte synthetisch einfach zu modifizieren sein. Zudem ist bekannt, dass Substitutionen an der 3- und 7-Position einen großen Einfluss auf die Fluoreszenz des Cumarins besitzen^[169]. So zeigt das Molekül an sich keine Fluoreszenz, diese entsteht erst nach der erfolgreichen kupferkatalysierten Cycloaddition. Der Grund hierfür ist ein Auslöschung der Fluoreszenz durch die elektronenreichen Stickstoff-Atome.^[170]

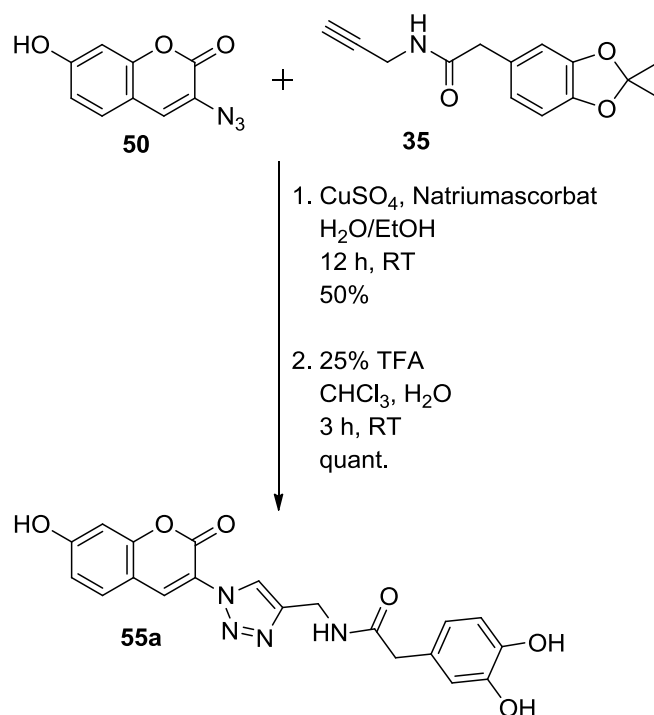
Die Synthese des Azidocumarins **50** erfolgte ausgehend von 2,4-Dihydroxybenzaldehyd (**52**), *N*-Acetylglycin (**53**) und wasserfreiem Natriumacetat in Essigsäureanhydrid.^[171] Das diacetylierte Intermediat **54** konnte nach Filtration in einer Ausbeute von 76% erhalten und direkt weiter zum Azid **50** umgesetzt werden. Hierzu wurden die Schutzgruppen mit konzentrierter Salzsäure in Ethanol entschützt und das Azid **50** mittels Natriumnitrit und Natriumazid synthetisiert. 3-Azido-7-hydroxycumarin (**50**) konnte in einer Ausbeute von 37% über drei Stufen erhalten werden (Schema 43).



Schema 43: Synthese von 3-Azido-7-hydroxycumarin (**50**).

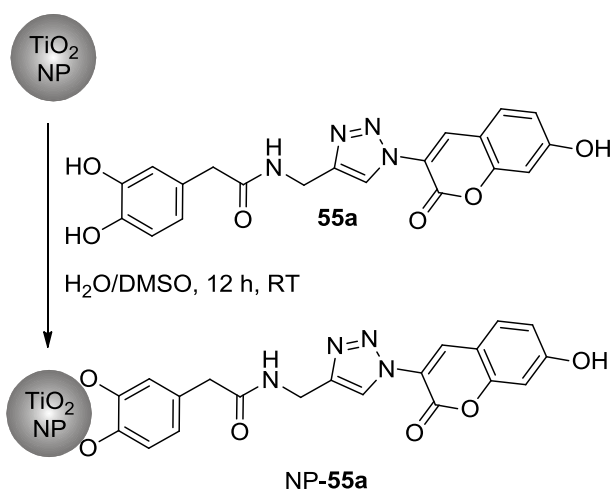
Mit diesem Cumarin-Derivat **50** wurden im Folgenden kupferkatalysierte Cycloadditionen durchgeführt. Cumarin **50** wurde als „*self-reporting*“-Linker eingesetzt, da der Erfolg der Reaktion durch die entstandene Fluoreszenz direkt sichtbar wird.

Es wurden 3-Azido-7-hydroxycumarin (**50**) und das geschützte Alkin **35** mittels Natriumascorbat und Kupfersulfat in einem Wasser/Ethanol-Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur zum gewünschten Produkt **55** in einer Ausbeute von 50% umgesetzt. Nach der Entschützung mit Trifluoressigsäure in Chloroform konnte das catecholmodifizierte Cumarin **55a** in quantitativer Ausbeute erhalten werden (Schema 44).



Schema 44: 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen 3-Azido-7-hydroxycumarin (**50**) und dem geschützten Alkin **35** unter Kupferkatalyse und anschließender Entschützung der Catecholfunktion.

Das entschützte Produkt **55a** wurde zu den Titandioxid-Nanopartikeln (DEG-NP) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Hierbei kam es direkt nach der Zugabe zu einer Farbänderung von hellbraun nach dunkelbraun, was auf einen erfolgreichen Ligandenaustausch hindeutet (Schema 45).



Schema 45: Oberflächenmodifikation der Titandioxid-Nanopartikel mittels Produkt **55a**.

Nach Reinigung wurden die modifizierten Nanopartikel in Dimethylsulfoxid gelöst und UV/Vis-Messungen durchgeführt (Abbildung 54). Zum Vergleich wurde ebenfalls die Absorption des Produkts **55a** bestimmt.

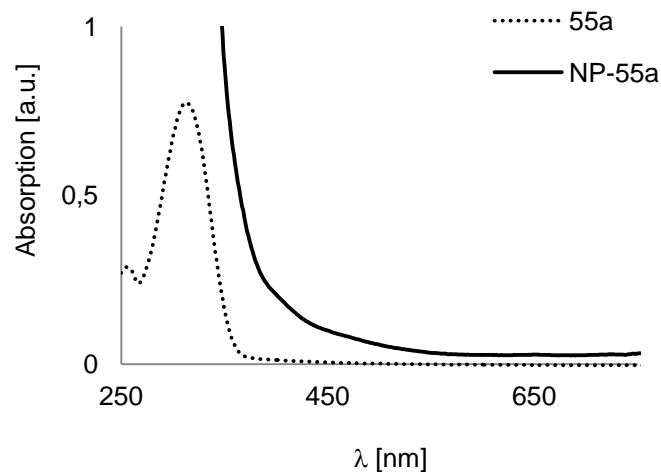


Abbildung 54: UV/Vis-Spektrum der kupferkatalysierten Cycloaddition von **55a** und NP-**55a**.

Aus dem Spektrum ist zu erkennen, dass das Produkt der Cycloaddition ein Maximum bei 348 nm aufweist. Der Charge-Transfer-Komplex der Farbänderung wird im UV/Vis-Spektrum durch ein breites Signal zwischen 390 und 430 nm sichtbar. Somit konnte gezeigt werden, dass die kupferkatalysierte Cycloaddition in Lösung erfolgreich verlief und es möglich ist, das Produkt **55a** dieser Reaktion anschließend an die Oberfläche der Titandioxid-Nanopartikel mittels Ligandenaustausch zu binden.

Um zu zeigen, dass es ebenso möglich ist, kleine Moleküle ohne Ladung an Titandioxid-Nanopartikel binden, wurde im nächsten Schritt die kupferkatalysierte Cycloaddition an der Nanopartikel-Oberfläche durchgeführt.

Hierzu wurde die Titandioxid-Nanopartikel (DEG-NP) zunächst mit dem entschützten Alkin **36** über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, wobei es zu einer Farbänderung von rot nach braun kam (Abbildung 55a.). Dieser Charge-Transfer-Komplex ist im UV/Vis im Bereich zwischen 388 und 475 nm sichtbar (Abbildung 55b.).

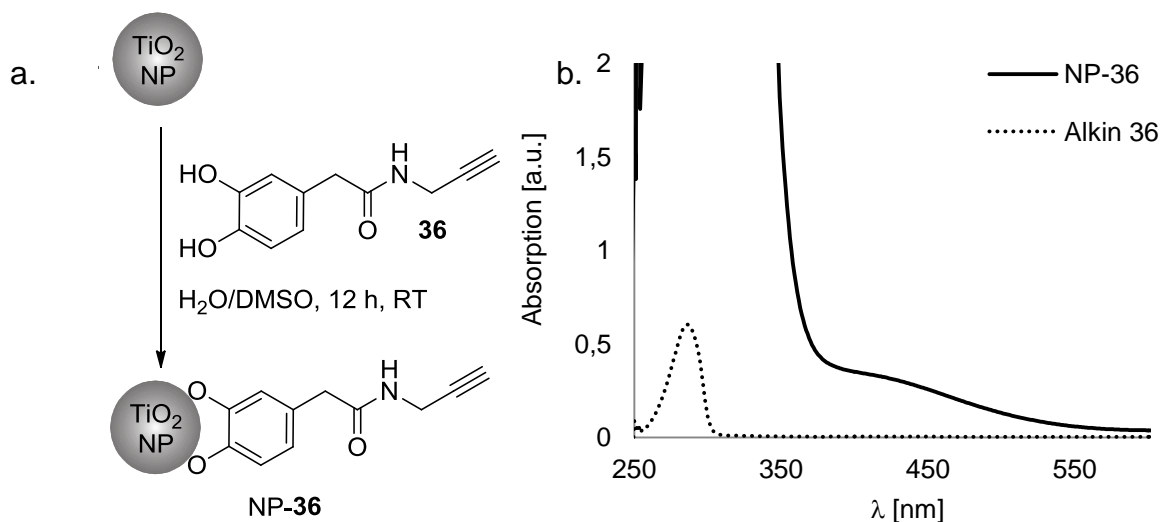


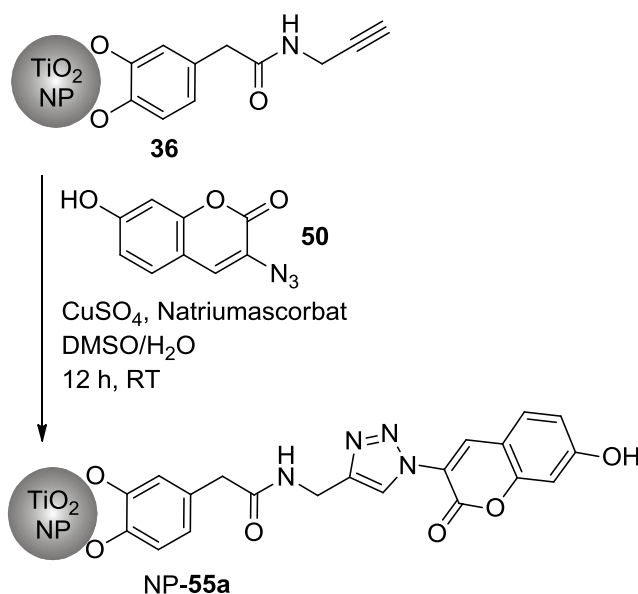
Abbildung 55: a. Oberflächenmodifikation der Titandioxid-Nanopartikel mit Alkin **36**, b. UV/Vis-Spektrum des reinen Alkins **36** und der alkinmodifizierten Nanopartikel (NP-**36**).

Mit Hilfe des UV/Vis Spektrums konnte die Bandlücke der modifizierten Nanopartikel im Vergleich zur Bandlücke der unmodifizierten Nanopartikel berechnet werden (Tabelle 20). Diese ist von 322 nm vor dem Ligandenaustausch auf 388 nm nach dem Austausch verschoben, dadurch veränderte sich ebenfalls die Energie der Bandlücke.

Tabelle 20: Wellenlänge, Energie der Bandlücke E_b und Radius der TiO_2 -Nanopartikel vor und nach der Modifikation mit dem Alkin **36**.

Eintrag	λ_b [nm]	E_b [eV]	Radius [nm]
NP	322	3.85	5.13 ± 0.050
NP- 36	388	3.20	20.0 ± 3.180

Nach Zentrifugation wurde der Rückstand, der aus alkinbeschichteten Nanopartikeln bestand, in Dimethylsulfoxid gelöst. Daraufhin wurden DLS-Messungen durchgeführt. Zum Vergleich wurde der Radius der unmodifizierten Nanopartikel ebenfalls bestimmt. Aus Tabelle 20 ist zu erkennen, dass es zu einer Vergrößerung des hydrodynamischen Radius von fünf auf 20 nm kam. Dies zeigt, dass das Alkin **36** an die Nanopartikel-Oberfläche gebunden ist. Im nächsten Schritt wurden 7-Hydroxy-3-azidocumarin (**50**), Kupfersulfat und Natriumascorbat in Wasser zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt (Schema 46).



Schema 46: Oberflächenmodifikation der Titandioxid-Nanopartikel mit dem Alkin **36** und anschließender Cycloaddition mit 3-Azido-7-hydroxycumarin (**50**) unter Kupferkatalyse.

Nach Zentrifugation wurde der Rückstand in Dimethylsulfoxid gelöst und UV/Vis- sowie Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, diese sind in Abbildung 56 dargestellt.

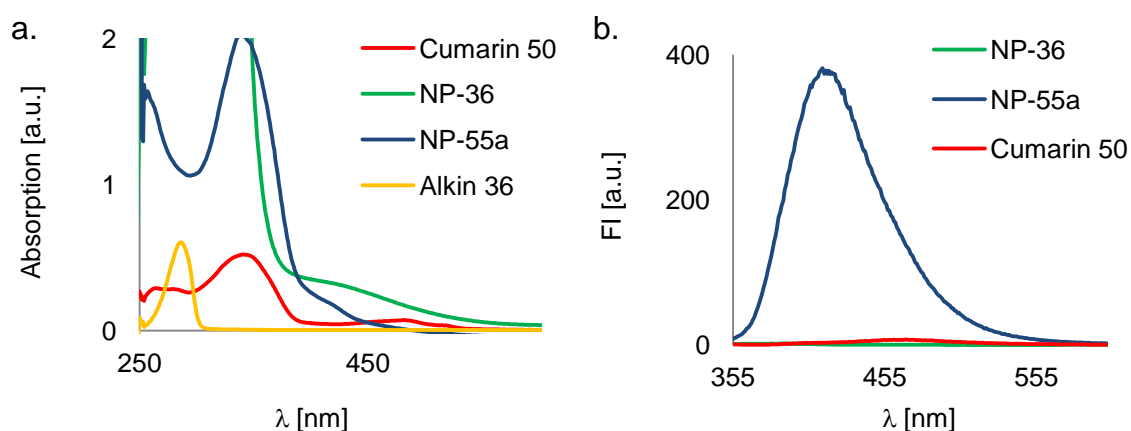


Abbildung 56: a. UV/Vis- und b. Fluoreszenz-Spektrum der CuAAC auf alkinmodifizierten Nanopartikeln (NP-36) mit 3-Azido-7-hydroxycumarin (**50**).

Aus Abbildung 56b. ist erkennbar, dass das Cumarin-Derivat **50** keine Fluoreszenz aufgrund des Quenching-Effekts des elektronenreichen α -Stickstoffatoms der Azidogruppe aufweist. Erst nach erfolgreich durchgeführter Cycloaddition ist Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 346 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{em}} = 413 \text{ nm}$) sichtbar, da die Bildung des Triazolrings zu einem Quenching-Effekt führt. Somit konnte gezeigt werden, dass die kupferkatalysierte Cycloaddition auf der Nanopartikel-Oberfläche erfolgreich verlief.

Zudem zeigten DLS-Messungen einen deutlichen Unterschied nach der Reaktion im Vergleich zu den alkinmodifizierten Nanopartikeln (Tabelle 21). Die großen Unterschiede in den Ergebnissen der dynamischen Lichtstreuung zwischen den alkinmodifizierten Nanopartikeln (NP-36) (20 nm) und den Nanopartikeln nach der Cycloaddition (102 nm) kommen dadurch zustande, dass verschiedene Lösungsmittel verwendet wurden. Die Cycloaddition wurde in Dimethylsulfat/Wasser gemessen, was den hydrodynamischen Radius aufgrund der Viskosität erhöht. Im Vergleich dazu wurden die alkinmodifizierten Nanopartikel (NP-36) in Acetonitril gemessen, was zu keiner Anlagerung an die Nanopartikel führen sollte.

Tabelle 21: DLS-Ergebnisse der CuAAC auf alkinmodifizierten Nanopartikeln mit 3-Azido-7-hydroxycumarin (**50**).

Eintrag	Radius [nm]
NP-36	20.0 ± 3.18
NP-55a	102 ± 1.92

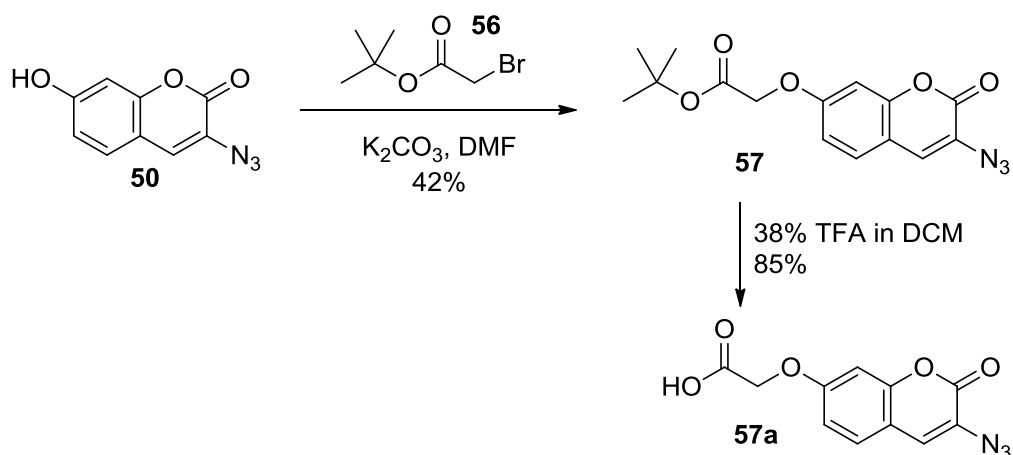
Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die kupferkatalysierte Cycloaddition sowohl in Lösung als auch auf der Nanopartikel-Oberfläche erfolgreich verlief. Dies beweist, dass es möglich ist, kleine Moleküle ohne Ladung direkt und indirekt an TiO₂-Nanopartikel zu binden. Dieses Resultat bestätigt ebenfalls die Hypothese, dass die Ladung der biologischen Moleküle schwierig mit der Ladung der Nanopartikel-Oberfläche zu vereinbaren ist. Daher wäre es sinnvoll, den isoelektrischen Punkt der Titandioxid-Nanoteilchen zu bestimmen um eine Ladung unterdrücken zu können.^[172]

4.3.3.6 Dopamin-Cumarin **56a** zur Herstellung von TiO₂-Nanopartikel-Hybriden

Um das azidmodifizierte Cumarin **50** als „*self-reporting*“-Linker für die TiO₂-Nanopartikel anwenden zu können, ist es notwendig eine Catecholfunktion einzuführen.

Die Gruppe von Berg *et al.* veröffentlichte 2007 eine Methode in der 3-Azido-7-hydroxycumarin (**50**) mit einer Säurefunktion modifiziert wurde um diese mittels einer Festphasenreaktion an ein Peptid zu binden.^[171] Diese Methode wurde angewendet um Dopamin (**9**) an das Cumarin **50** binden zu können. Zunächst wurde 3-Azido-7-hydroxycumarin (**50**) mit Bromessigsäure-*tert*-butylester (**56**) und Kaliumcarbonat für eine Stunde bei 50 °C erhitzt. Hierbei konnte das gewünschte Produkt **57** nach

säulenchromatographischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 42% erhalten werden (Schema 47).



Schema 47: Synthese des Coumarin-Derivates **57** und anschließender Entschützung des *tert*-Butylesters **57** mittels Phosphorsäure.

Die anschließende Entschützung wurde, entsprechend der Literatur, mit Trifluoressigsäure durchgeführt.^[173] Nachdem per Dünnschichtchromatografie nach zwei Stunden der komplette Umsatz des Edukts **57** festgestellt wurde, konnten nach Aufarbeitung lediglich Zersetzungsprodukte erhalten werden. Auch eine Entschützung mit 20% Phosphorsäure führte zur Zersetzung des Moleküls. Aus diesem Grund wurde eine Studie zur Entschützung des *tert*-Butylesters **57** durchgeführt, hierzu wurde das Volumen von Trifluoressigsäure im Verhältnis zu Dichlormethan variiert (Tabelle 22).

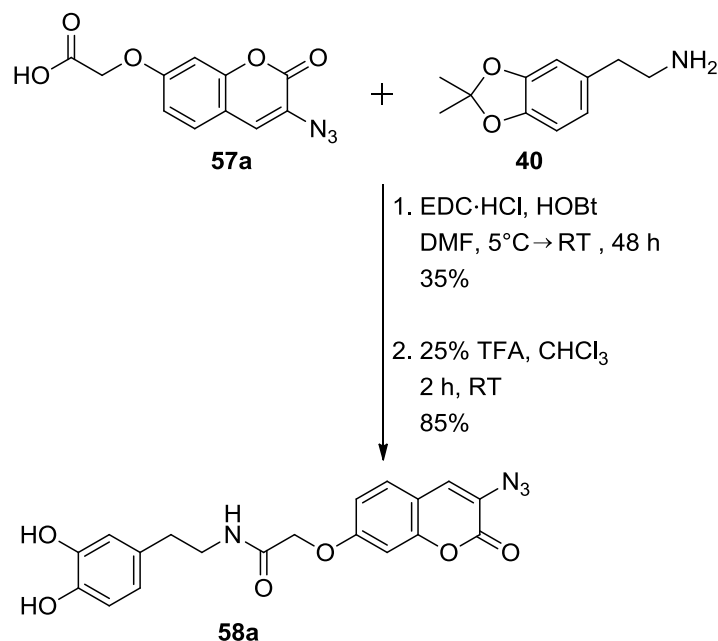
Tabelle 22: Entschützungsstudie der geschützten Säure **57** mittels Trifluoressigsäure in Dichlormethan.

Eintrag	TFA [mL]	CH ₂ Cl ₂ [mL]	Produkt
1	3.00	7.00	-
2	0.500	10.0	-
3	10.0	11.0	8%
4	1.25	2.00	85%

Aus Tabelle 22 wird ersichtlich, dass ein Verhältnis von 1.25 mL TFA zu 2.00 mL CH₂Cl₂ zur Entschützung der Säurefunktion führte. Nach Entfernen des Lösungsmittels konnte die gewünschte Säure **57a** in guter Ausbeute von 85% erhalten werden.

Zunächst wurde Dopamin-Hydrochlorid (**9a**) durch Verwendung von EDC·HCl und HOBt in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) an das Coumarin-Derivat **57a** gekuppelt. Nach 48 Stunden bei Raumtemperatur konnte kein Produkt isoliert werden.

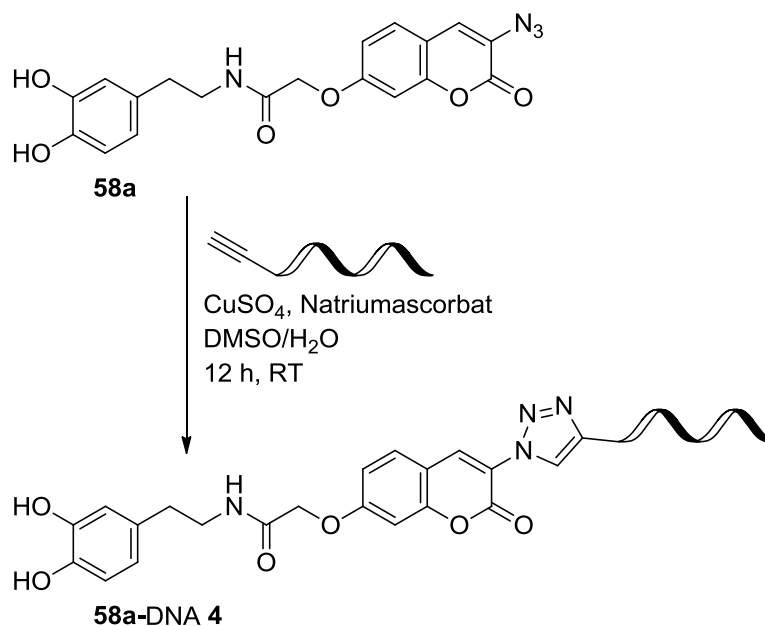
Aus diesem Grund wurde geschütztes Dopamin **40** unter den oben genannten Bedingungen verwendet. In diesem Fall konnte das geschützte Dopamin-Cumarin-Azid **58** in einer Ausbeute von 35% erhalten werden (Schema 48).



Schema 48: Einführung und anschließende Entschützung der Catecholfunktion des Cumarin-Derivats **58a**.

Die anschließende Entschützung der Catecholfunktion wurde mit 25% Trifluoressigsäure in Dichlormethan durchgeführt (Schema 48). Nach zwei Stunden konnte mittels Dünnschichtchromatographie festgestellt werden, dass das Edukt bereits komplett umgesetzt war. Nach Entfernen des Lösungsmittels und mehrmaligem Coevaporieren mit Chloroform wurde Dopamin-Cumarin-Azid **58a** in guter Ausbeute (85%) erhalten.

Anschließend wurde eine 1,3-dipolare Cycloaddition mit dem Cumarin-Derivat **58a** und einem Oligonukleotid DNA **4** unter Kupferkatalyse durchgeführt. Hierzu wurden Kupfersulfat und Natriumascorbat in einem Wasser/Dimethylsulfoxid-Gemisch (1:1) verwendet (Schema 49). Bereits nach 15 Minuten bei Raumtemperatur war Fluoreszenz unter der UV-Lampe sichtbar, was zeigt, dass sich der Triazol-Ring gebildet hat und die Reaktion erfolgreich verlief. Wie bereits erwähnt zeigt 3-Azido-7-hydroxycumarin (**50**) keine Fluoreszenz. Vergleichbares gilt auch für das catecholbasierte Cumarin-Derivat **58a**, erst nach erfolgreicher Reaktion wird starke Fluoreszenz sichtbar, die durch die Bildung des Triazol-Rings und somit der Änderung der elektronischen Struktur ausgelöst wird.^[174]



Schema 49: 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen dem Cumarin-Derivat **58a** und DNA **4** unter Kupferkatalyse.

Das Reaktionsgemisch wurde mittels HPLC gereinigt, das Chromatogramm bei 260 nm ist in Abbildung 57 dargestellt. Aus dem Chromatogramm ist ersichtlich, dass noch reines Oligonukleotid DNA **4** vorhanden ist (Signal 1), die Zugabe von zwei Äquivalenten des Azids **58a** führten ebenfalls nicht zu vollständigem Umsatz. Das Produkt mit einer Retentionszeit von 21.7 Minuten (Signal 2) wurde mittels MALDI-TOF charakterisiert. Aus Tabelle 23 ist zu erkennen, dass die Masse des Konjugats **58a-DNA 4** detektiert werden konnte.

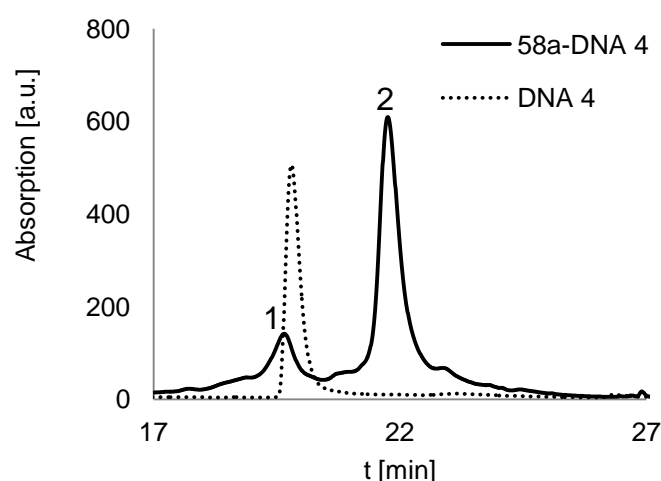


Abbildung 57: HPLC-Chromatogramm der Reaktion zwischen dem Cumarin-Derivat **58a** und DNA **4** bei 260 nm.

Es wurde eine weitere Oligonukleotid-Sequenz verwendet, die kürzer ist und aus 15 Basenpaaren besteht. Diese Sequenz wurde verwendet, da es mit längeren Sequenzen zu Faltungen kommen kann und dadurch das Alkin nicht mehr zugänglich sein könnte. Mit dieser kurzen Sequenz wurden, ebenfalls unter den oben verwendeten Bedingungen, eine kupferkatalysierte Cycloaddition durchgeführt. Das HPLC-Chromatogramm bei 260 nm ist in Abbildung 58 dargestellt, die zugehörigen MALDI-TOF-Ergebnisse in Tabelle 23.

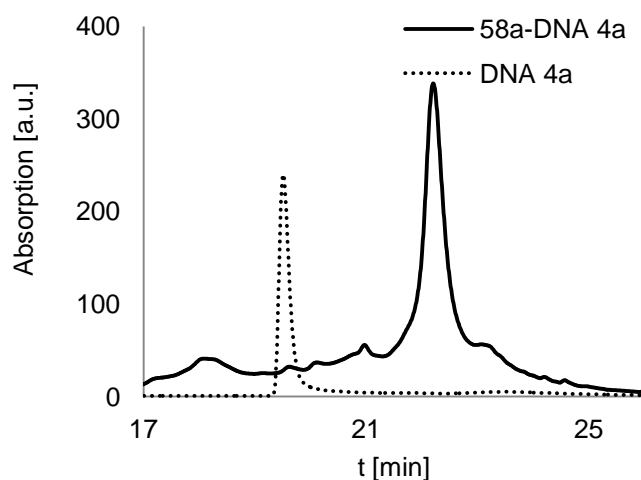


Abbildung 58: HPLC-Chromatogramm der CuAAC von DNA **4a** mit Cumarin **58a** bei 260 nm.

Aus dem Chromatogramm ist ersichtlich, dass die Ausbeute bei der kürzeren Sequenz DNA **4a** im Vergleich zu der längeren Sequenz DNA **4** verbessert werden konnte. In diesem Fall ist kein reines Oligonukleotid DNA **4a** mehr vorhanden. Das Produkt konnte nach einer Retentionszeit von 22,2 Minuten erhalten werden.

Tabelle 23: MALDI-TOF-Resultate der CuAAC zwischen DNA **4** und dem Cumarin-Derivat **58a**.

Eintrag	M_{Soll} [g/mol]	M_{Ist} [g/mol]
DNA 4	7367	7363
58a-DNA 4 (+2 K)	7759 (7837)	7838 [M+2 K]
DNA 4a	4628	4629
58a-DNA 4a (+2 K)	5025 (5103)	5103 [M+2 K]

Zusätzlich wurden UV/Vis-Messungen durchgeführt, diese sind exemplarisch für DNA **4** gezeigt, da die Ergebnisse beider Oligonukleotide vergleichbar waren (Abbildung 59a.). Das Maximum des Oligonukleotids DNA **4** liegt bei 265 nm, das Azidderivat **58a** zeigt ein Maximum bei 342 nm. Das Produkt der Reaktion weist zwei Maxima auf, eines bei 268 nm, welches dem Oligonukleotid entspricht, und ein weiteres bei 346 nm. Letzteres zeigt die

Absorption des Cumarin-Derivats **58a**. Anschließend wurden Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die in Abbildung 59b. dargestellt sind. Aus dem Diagramm ist ersichtlich, dass das Cumarin-Derivat **58a** eine geringe Fluoreszenz zeigt, das Produkt **58a**-DNA **4** hingegen zeigt eine starke Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 346 nm ($\lambda_{em} = 415$ nm).

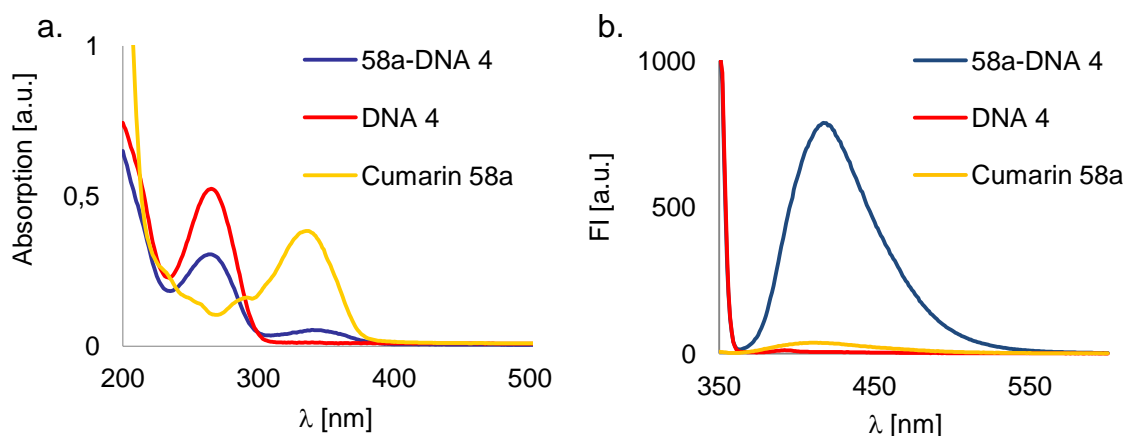
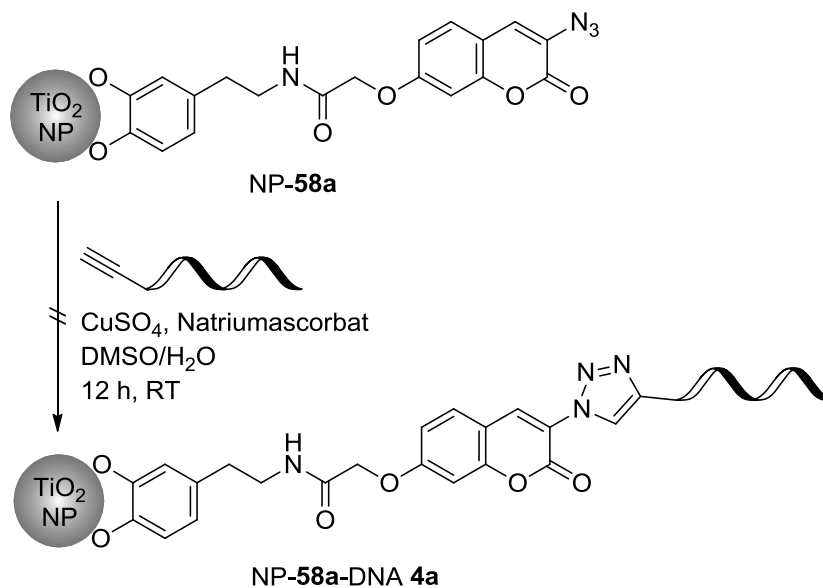


Abbildung 59: a. UV/Vis- und b. Fluoreszenz-Messungen der Reaktion zwischen DNA **4** und dem Cumarin-Derivat **58a**.

Es konnte gezeigt werden, dass das Cumarin-Derivat **58a** unter Kupferkatalyse an die Oligonukleotide DNA **4** und DNA **4a** gebunden werden konnte.

Daher wurden die Bedingungen auf die Nanopartikel-Oberfläche übertragen. Hierzu wurde zunächst das Cumarin-Derivat **58a** zu Titandioxid-Nanopartikeln (DEG-NP) gegeben, wobei es zu einer Farbänderung von hellbraun nach dunkelbraun kam. Dies zeigt die erfolgreiche Bindung des Azids **58a** an die Nanopartikel. Nach Inkubation über Nacht wurde das Oligonukleotid DNA **4a**, Kupfersulfat und Natriumascorbat zugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht geschüttelt (Schema 50).



Schema 50: Oberflächenmodifikation der Titandioxid-Nanopartikel mit Cumarin-Derivat **58a** und anschließender Cycloaddition mit DNA **4a** unter Kupferkatalyse.

Fluoreszenz war auch in diesem Fall nach einer Stunde bei einer Wellenlänge von 366 nm sichtbar. Um zu untersuchen ob die Reaktion nur in Lösung oder auch auf der Partikel-Oberfläche erfolgreich verlief, wurden die Proben auf ein einprozentiges Agarose-Gel aufgetragen (Abbildung 60). Die kupferkatalysierte Cycloaddition auf den TiO₂-Nanopartikeln (Spur 2) zeigt zwei fluoreszierende Banden, die Bande mit der höheren Mobilität entspricht der Reaktion in Lösung (Spur 1). Um zu überprüfen, ob die Bande mit der geringeren elektrophoretischen Mobilität der Reaktion auf den Nanopartikeln entspricht, wurde das Gel mit SybrGold[®] angefärbt (Abbildung 60b.). Durch die Färbung wird deutlich, dass die kupferkatalysierte Cycloaddition ausschließlich in Lösung und nicht auf den Nanopartikel stattgefunden hat. Die Bande mit der geringeren elektrophoretischen Mobilität entspricht daher den cumarinmodifizierten Nanopartikeln (NP-**58a**), die sich nicht mit SybrGold[®] anfärben ließen (Spur 4).

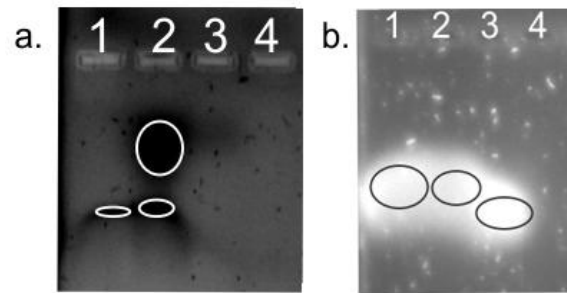


Abbildung 60: Fluoreszenz-Aufnahme eines einprozentigen Agarose-Gels mit cumarinmodifizierten Nanopartikeln nach der Cycloaddition mit DNA **4** unter Kupferkatalyse. Spur 1: Produkt **58a**-DNA **4a**, Spur 2: NP-**58a**-DNA **4a**, Spur 3: Reine DNA **4a**, Spur 4: Nanopartikel-**58a**.

Durch die negative Ladung der Nanopartikel und der Oligonukleotide kann es zu einer Abstoßung kommen, die eine Bindung verhindert. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass die Reaktion auf der Nanopartikel-Oberfläche nicht erfolgreich verlief. Um die Ladung zu verringern, wurde DNA **4a** mit einem fluoreszierenden, komplementären Strang cDNA **4a** hybridisiert. Zur Hybridisierung wurden zwei Äquivalente des farbstoffmodifizierten Strangs cDNA **4a** mit einem Äquivalent DNA **4a** über Nacht in Phosphatpuffer mit 150 mM Magnesiumchlorid bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Hybridisierung wurde mittels TBE-Gel detektiert (Abbildung 61). Es ist zu erkennen, dass bei der Hybridisierung in Spur 1 zwei Banden entstanden sind, die Bande mit der höheren elektrophoretischen Mobilität entspricht der fluoreszierenden cDNA **4a** (Spur 2). Nach der Färbung mit Ethidiumbromid, die spezifisch Doppelstrang-DNA sichtbar macht, wurde die Bande mit der geringeren Mobilität fluoreszierend, das Produkt der Hybridisierung der beiden DNA-Stränge (Abbildung 61b.) darstellt. Somit konnte gezeigt werden, dass die Hybridisierung erfolgreich verlief.

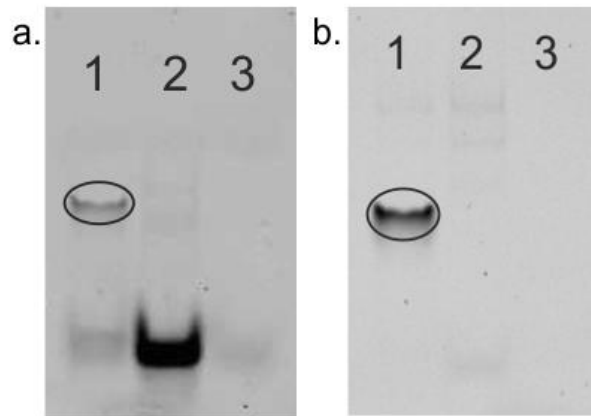
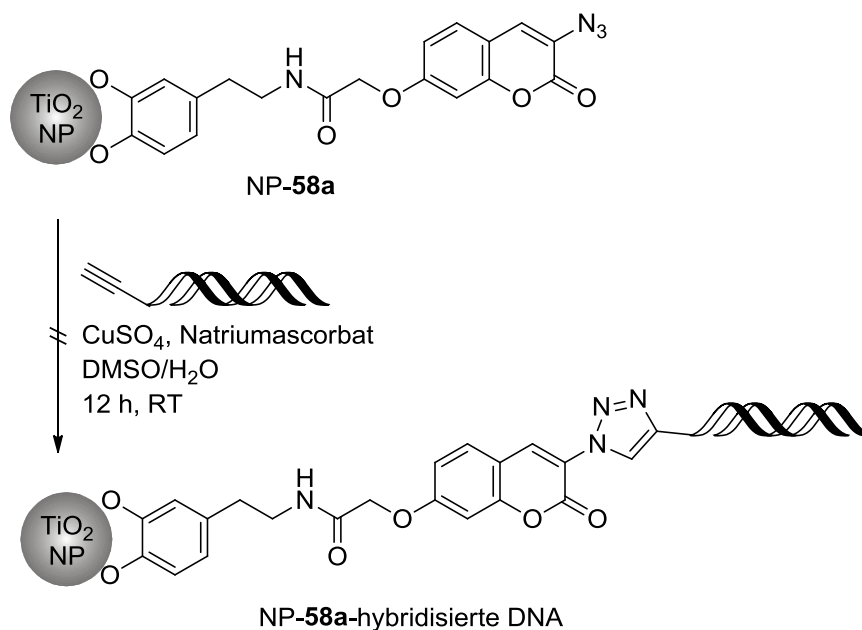


Abbildung 61: Fluoreszenz-Aufnahme eines 21%igen TBE-Gels a. vor und b. nach der Färbung mit Ethidiumbromid mit der Hybridisierung von DNA **4a** und cDNA **4a**. Spur 1: Hybridisierungsreaktion, Spur 2: cDNA **4a**, Spur 3: DNA **4a**.

Die kupferkatalysierte Cycloaddition wurde mit azidmodifizierten Nanopartikeln und Nanostäbchen unter den zuvor verwendeten Bedingungen über Nacht durchgeführt (Schema 51). Um den Verlauf der Reaktion zu untersuchen, wurde ebenfalls ein einprozentiges Agarose-Gel durchgeführt, dieses ist in Abbildung 62 dargestellt.



Schema 51: Oberflächenmodifikation der Titandioxid-Nanopartikel mit Cumarin-Derivat **58a** und anschließender Cycloaddition mit hybridisierter DNA unter Kupferkatalyse.

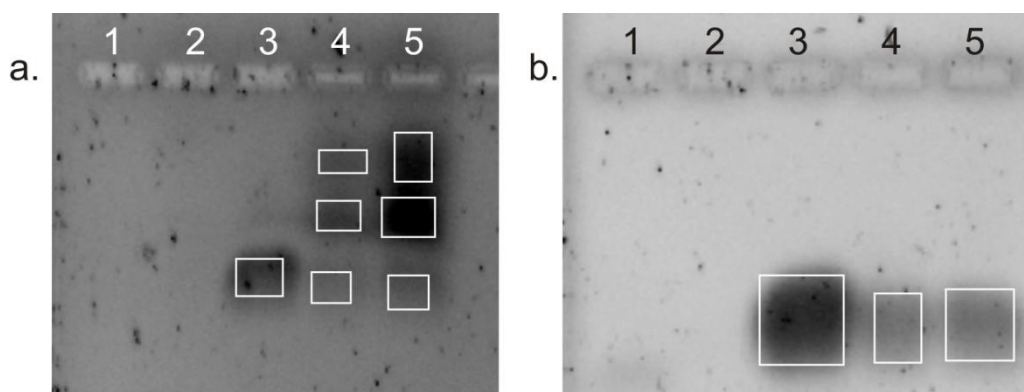


Abbildung 62: Fluoreszenz-Aufnahme eines 1%igen Agarose-Gels der Cycloaddition zwischen NP-**58a** und hybridisierter DNA. Spur 1: DNA **4a**, Spur 2: cDNA **4a**, Spur 3: Hybridisierung in Lösung, Spur 4: NP-**58a**-hybridisierte DNA, Spur 5: NR-**58a**-hybridisierte DNA.

Es ist zu erkennen, dass die Partikel und Stäbchen drei fluoreszierende Banden aufweisen (Spur 4 und 5). Die untere Bande entspricht der Hybridisierung in Lösung. Die beiden oberen Banden wurden durch Färbung mit SybrGold[®] allerdings sichtbar, sodass es sich bei den Banden nicht um das Produkt der Cycloaddition handelt. Die kupferkatalysierte Cycloaddition mit hybridisierter DNA konnte somit auf der Oberfläche der Nanoteilchen nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Wenn mehrere DNA-Stränge an ein Nanoteilchen binden, führt dies zu einer hohen Anzahl an negativen Ladungen auf einem Partikel. Durch die Abstoßung der Ladungen ist es möglich, dass die Oligonukleotide nicht an die Nanoteilchen binden können. Aus diesem Grund wurde ein „inertes“ Linker eingesetzt, hierzu diente der Methylester **59** (Abbildung 63).

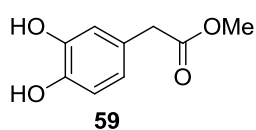


Abbildung 63: Struktur des verwendeten „inerten“ Linkers **59**.

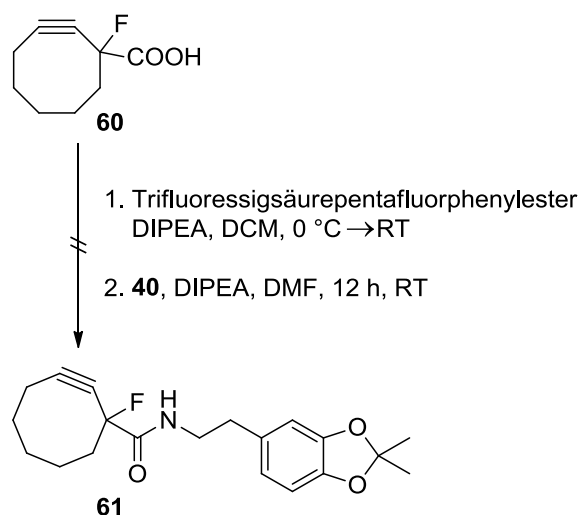
Dieser wurde im Überschuss im Vergleich zum Cumarin-Derivat **58a** eingesetzt, somit sollte sich die Anzahl der funktionellen Gruppen auf einem Partikel stark reduzieren und die Bindung einzelner Oligonukleotide auf einem Partikel ermöglicht werden. Allerdings konnte auch in diesem Fall keine Reaktion auf der Oberfläche der Nanoteilchen detektiert werden. Die Zugabe eines Liganden zur Stabilisierung der Kupferspezies, TBTA, führte ebenfalls nicht zum gewünschten Erfolg. Da die Michael-Addition durch das Einstellen des pH-Wertes erfolgreich verlief, wurde die Änderung des pH-Wertes ebenfalls untersucht. Mittels Dialyse

wurde pH-Wert auf 6.5 eingestellt, allerdings konnte auch dadurch kein Erfolg der Reaktion festgestellt werden.

4.3.4 Kupferfreie 1,3-dipolare Cycloaddition

Die Anwendung der bereits erwähnten CuAAC ist durch die Cytotoxizität des Kupfers vor allem in biologischen Systemen nicht möglich. Aus diesem Grund wurden einige Kupfer(I)-stabilisierende Katalysatoren entwickelt, wie beispielsweise Tris(benzyltriazolylmethyl)amin.^[175] In den letzten Jahren stieg das Interesse daran, salzfreie 1,3-dipolare Cycloadditionen durchzuführen. Hierzu eignen sich im besonderen Maß verschiedene Cyclooctin-Derivate, deren Ringspannung zur Aktivierung der Alkine ausgenutzt wird.^[176]

Um diese kupferfreie Cycloaddition an der Titandioxid-Oberfläche durchführen zu können, sollte ein Catechol an Cyclooctin **60** gebunden werden. Hierzu wurde zunächst die Säurefunktion mit Trifluoressigsäurepentafluorphenylester aktiviert, dieser Ester wurde im nächsten Schritt mit dem Amin **40** umgesetzt (Schema 52).



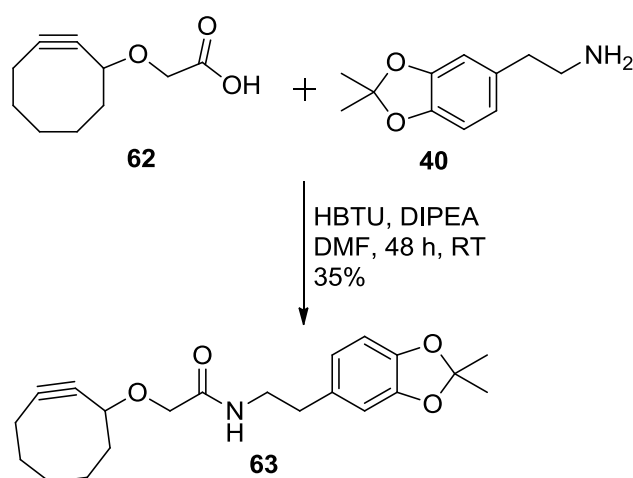
Schema 52: Reaktion zwischen dem geschütztem Dopamin **40** und fluoriertem Cyclooctin **60**.

Nach säulenchromatographischer Reinigung konnten lediglich die Edukte isoliert werden. Auch eine Variation der Base und des Lösungsmittels führte nicht zum gewünschten Produkt **61** (Tabelle 24).^[177]

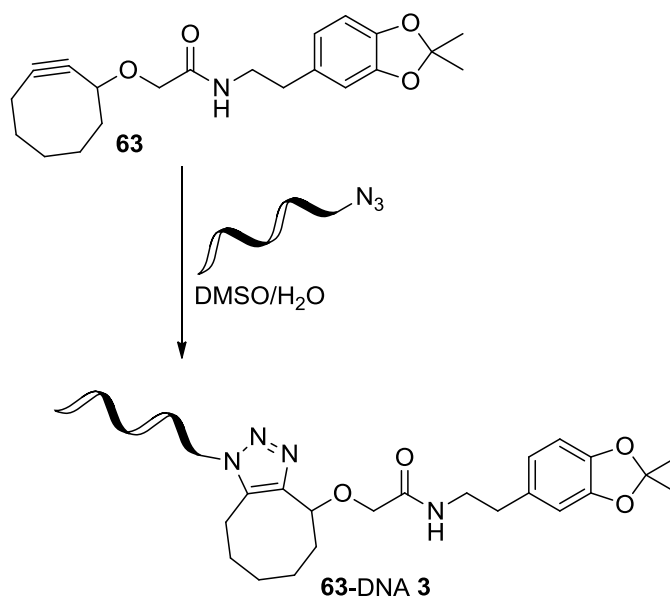
Tabelle 24: Reaktionsbedingungen der Reaktion zwischen Cyclooctin **60** und Dopamin **40**.

Eintrag	Äq. Dopamin 40	Base	Lösungsmittel	Produkt
1	1.00	Diisopropylethylamin	CH ₂ Cl ₂ /DMF	-
2	4.50	Triethylamin	Pyridin/CH ₂ Cl ₂	-

Nach einer Vorschrift von Carroll *et al.* wurde nicht-fluoriertes Cyclooctin **62** mit dem Amin **40** unter Verwendung von HBTU und DIPEA als Base umgesetzt (Schema 53).^[178] Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das catecholmodifizierte Cyclooctin **63** in einer Ausbeute von 35% erhalten werden.

**Schema 53:** Synthese des catecholgeschützten Cyclooctins **63**.

Die anschließende Entschützung wurde in Chloroform/Wasser mit 25% Trifluoressigsäure durchgeführt. Das ungeschützte Cyclooctin **63a** konnte massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden. Eine Zugabe des Cyclooctins **63a** zu den Titandioxid-Nanopartikeln (DEG-NP) führte zu einer Farbänderung, die zeigte, dass die Catecholfunktion ungeschützt vorlag. Aus diesem Grund wurde eine 1,3-dipolare Cycloaddition mit dem Oligonukleotid DNA **3** durchgeführt, die nach einer Reinigung mittels HPLC ausschließlich reine DNA lieferte. Um zu überprüfen, ob das Derivat **63a** über eine ausreichende Ringspannung verfügt, wurde das geschützte Produkt **63** zur Cycloaddition verwendet. Das Oligonukleotid DNA **3** wurde zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt (Schema 54).



Schema 54: Kupferfreie 1,3-dipolare Cycloaddition von geschütztem Cyclooctin **63** mit DNA **3**.

In diesem Fall konnte das Produkt **63-DNA 3** der kupferfreien Cycloaddition in geringer Ausbeute erhalten werden, was aus dem HPLC-Chromatogramm in Abbildung 64 hervorgeht.

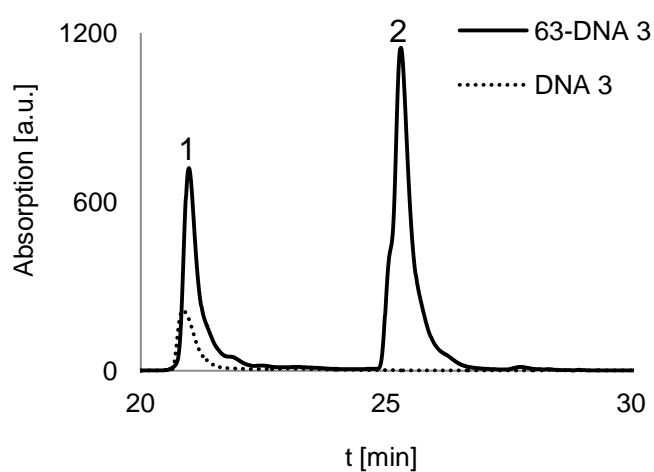


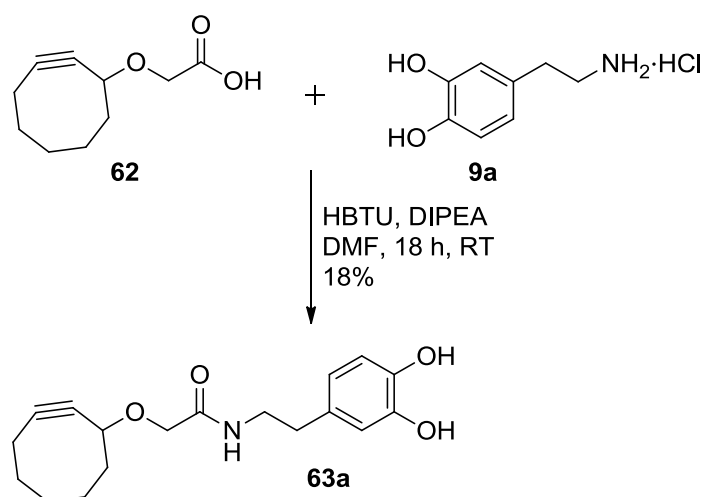
Abbildung 64: HPLC Chromatogramm der Reaktion von Cyclooctin **63** und DNA **3** bei 260 nm.

Ein neues Signal mit einer Retentionszeit von 25.3 Minuten ist entstanden, allerdings ist auch Signal 1 mit einer Retentionszeit von 20.9 Minuten sichtbar. Dieses entspricht dem reinen Oligonukleotid DNA **3**. Zusätzlich wurden MALDI-TOF-Messungen des Produkts mit einer Retentionszeit von 25.3 Minuten durchgeführt, diese sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25: MALDI-TOF-Resultate der kupferfreien Cycloaddition zwischen Cyclooctin **63** und DNA **3**.

Eintrag	M _{Soll} [g/mol]	M _{Ist} [g/mol]
DNA 3	7524	7525
63 -DNA 3	7881	7884

Somit konnte gezeigt werden, dass eine kupferfreie Cycloaddition mit dem geschützten Produkt **63** möglich ist, nicht aber nach der Entschützung. Die Struktur des Cyclooctins **63a** wurde, wie aus dem ¹H-NMR und Messungen der Masse zu erkennen ist, bei der Entschützung mit Trifluoressigsäure zerstört. Da eine Entschützung des Acetonids **63** nicht möglich war, ohne die Struktur des Moleküls zu zerstören, wurde die Reaktion mit Dopamin-Hydrochlorid (**9a**) durchgeführt (Schema 55). Dies wurde zunächst nicht untersucht, da das in der Literatur verwendete Edukt an der Hydroxylgruppe geschützt wurde.^[178] Zudem konnte in vorrausgegangenen Experimenten gezeigt werden, dass für Kupplungsreaktionen meist nur für den Fall des geschützten Catechols das gewünschte Produkt erhalten werden konnte.

**Schema 55:** Synthese des catecholbasierten Cyclooctins **63a**.

Die Reaktion verlief erfolgreich, das gewünschte Cyclooctin **63a** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 18% erhalten werden. Im nächsten Schritt wurde die kupferfreie Cycloaddition mit dem Oligonukleotid DNA **3** über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC, das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 65 zu sehen.

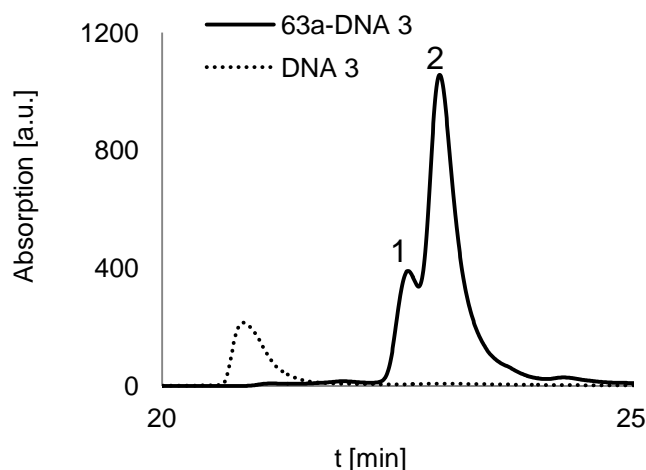


Abbildung 65: HPLC-Chromatogramm der kupferfreien Cycloaddition zwischen Cyclooctin **63a** und DNA **3** bei 260 nm.

Aus dem Spektrum ist zu erkennen, dass sich zwei neue Signale mit einer Retentionszeit von 22,6 und 23,0 Minuten gebildet haben, im Vergleich dazu weist das reine Oligonukleotid DNA **3** eine Retentionszeit von 20,8 Minuten auf und ist im Reaktionsgemisch nicht mehr vorhanden. Anschließende MALDI-TOF-Messungen bestätigten, dass die Reaktion erfolgreich verlief, die Masse des Produkts **63a-DNA 3** konnte in beiden Signalen detektiert werden (Tabelle 26).

Tabelle 26: MALDI-TOF-Resultate der kupferfreien Cycloaddition zwischen Cyclooctin **63a** und DNA **3**.

Eintrag	M_{Soll} [g/mol]	M_{Ist} [g/mol]
DNA 3	7524	7525
63a-DNA 3 Signal 1	7841	7841
63a-DNA 3 Signal 2	7841	7841

Es konnte gezeigt werden, dass die kupferfreie Cycloaddition mit dem catecholbasierten Cyclooctin **63a** erfolgreich verlief. Ein nächster Schritt wäre, die Reaktion auf den Titandioxid-Nanoteilchen zu untersuchen.

4.4 Synthese triethylenglykolbasierter Catechol-Linker

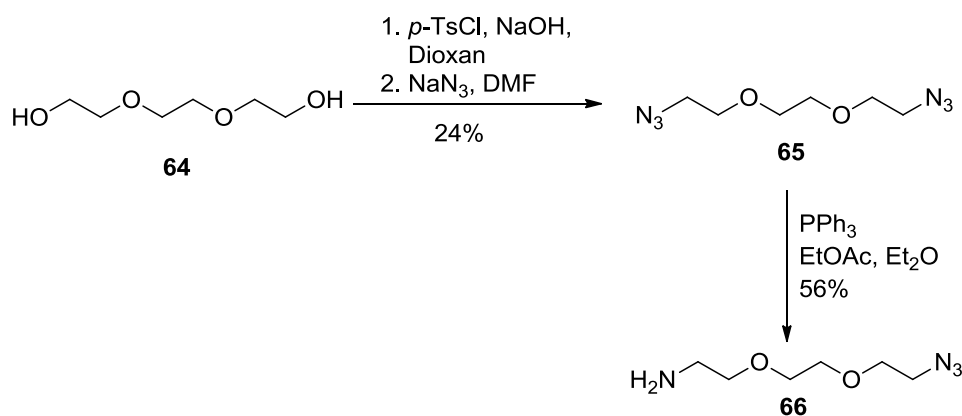
Aufgrund der unzureichenden Löslichkeit der bifunktionellen Linker in Wasser, sollte solche Linker synthetisiert werden, die Reaktionen mit Biomolekülen in Puffersystemen vereinfachen. Die Einführung einer Triethylenglykol-Einheit innerhalb der catecholbasierten Linker mit verschiedenen Funktionalitäten führt durch den stark polaren Charakter der Ethyleneinheit zu einer verbesserten Löslichkeit der Produkte in wässrigen Systemen.^[179]

Durch die Bindung der triethylenglykolbasierten Linker an die Nanopartikel-Oberfläche verbessert sich ebenfalls deren Löslichkeit, was die biologische Anwendung vereinfacht. Zudem ist die Wahl der Lösungsmittel wichtig für die Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies. So führt Dimethylsulfoxid beispielsweise zu einer Auslöschung der Radikale^[180], die Verwendung von wässrigen Lösungsmitteln, andererseits begünstigt die Bildung der durch Bestrahlung entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies.

Um eine Vielzahl an Linkern zu erhalten, wurden wasserlösliche triethylenglykolbasierte Moleküle mit verschiedenen funktionellen Gruppen synthetisiert.

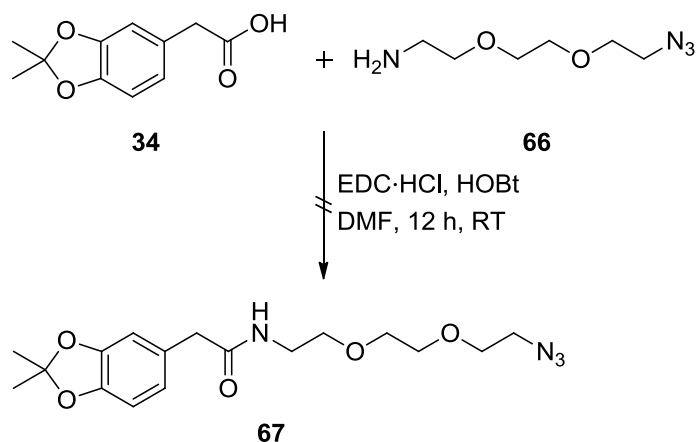
4.4.1 Synthese des catecholbasierten Azid-Linkers

Zunächst wurde das zu kuppelnde Azid **66** mit einer Diethylenglykol-Einheit synthetisiert. Hierzu wurden die Hydroxylgruppen von Triethylenglykol **64** in der ersten Stufe mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid tosyliert, das Produkt wurde in einer Ausbeute von 47% erhalten. In der nächsten Stufe wurde das Diazid **65** mittels Natriumazid in einer guten Ausbeute von 84% erhalten. Dieses wurde anschließend selektiv mit Triphenylphosphin zum 1-Amino- ω -azido-Linker **66** reduziert (Schema 56).



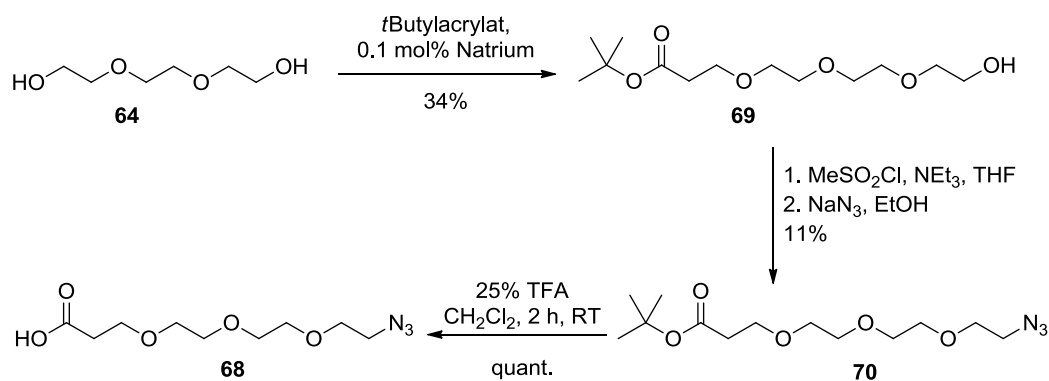
Schema 56: Synthese des 1-Amino- ω -azido-Linkers **66**.

Geschützte 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (**34**) wurde mit EDC·HCl und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) als Kupplungsreagenzien mit dem Monomer **66** in DMF umgesetzt (Schema 57).^[181] Das gewünschte Produkt **67** konnte nicht erhalten werden, der Grund hierfür könnte darin liegen, dass EDC als Carbodiimid vorwiegend in wässriger Lösung verwendet wird und die Kupplungsreaktion aufgrund der Löslichkeit des Catechols **34** in DMF durchgeführt werden musste.^[182]



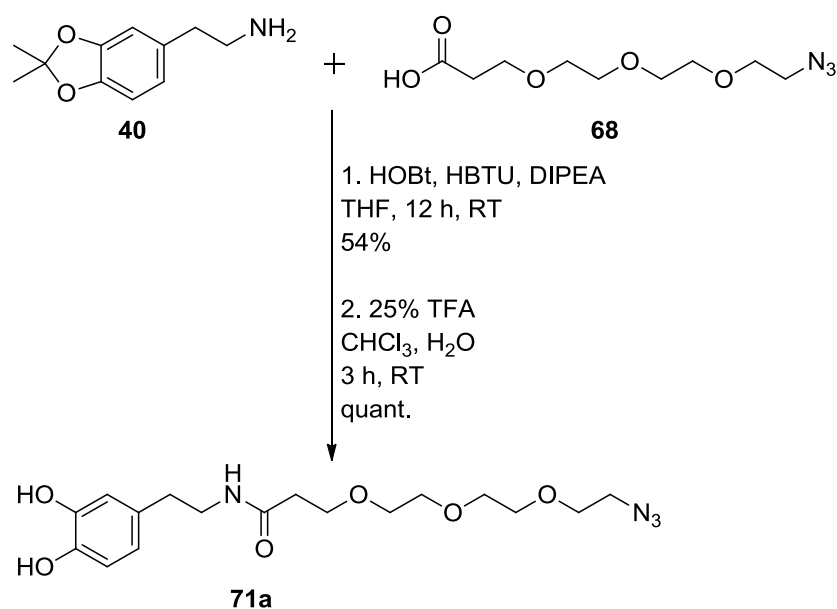
Schema 57: Synthesestrategie zur Herstellung des catecholgeschützten Azids **67**.

Die Zugabe einer Base, *N*-Methylmorpholin, in Tetrahydrofuran führte ebenfalls nicht zum gewünschten Erfolg. Nach Schladt *et al.* wurde die ungeschützte Säure **32** in DMF gelöst, als Kupplungsreagenzien dienten *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS).^[183] Auch in diesem Fall konnte das gewünschte Produkt nicht erhalten werden. Stattdessen wurde geschütztes Dopamin **40** anstelle der Säure **34** verwendet, um die Catechol-Gruppe einführen zu können. Hierzu musste ein Ethylenglykol-Linker, *tert*-Butyl-3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)propanat **68** hergestellt werden. Ausgehend von Triethylenglykol **64** wurde selektiv eine Hydroxylgruppe mittels *tert*-Butylacrylat und Natrium zu der geschützten Säure **69** in einer Ausbeute von 34% umgesetzt.^[184] In einer zweistufigen Synthese konnte das gewünschte Azid **70** mittels Methansulfonylchlorid, Triethylamin und Natriumazid in einer Ausbeute von 11% erhalten werden (Schema 58).



Schema 58: Synthese von 3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure (**68**).

Die Carboxylfunktion des Azids **70** wurde mit Trifluoressigsäure entschützt und die freie Säure konnte in quantitativer Ausbeute erhalten werden. Diese Säure **68** wurde im nächsten Schritt mit *O*-(1 *H*-Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU), HOBt und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) als Kupplungsreagenzien mit geschütztem Dopamin **40** umgesetzt (Schema 59). Nach 48 Stunden konnte vollständiger Umsatz festgestellt werden und die Reaktion wurde daraufhin beendet. Nach säulenchromatischer Reinigung konnte das geschützte Produkt **71** in einer Ausbeute von 54% erhalten werden.



Schema 59: Synthese des Azids **71a**.

Nach Entschützung der Catecholfunktion mit Trifluoressigsäure in Chloroform/Wasser konnte das gewünschte catecholbasierte Triethylenglykol-Azid **71a** in quantitativer Ausbeute erhalten werden.

Die Aminofunktion des Dopamins **9a** oder **40** konnte, wie in Kapitel 4.3.2 gezeigt wurde, nicht direkt in das gewünschte Azid überführt werden. Durch die Einführung der Triethylenglykol-Einheit konnte das catecholbasierte Azid **71a** allerdings erhalten werden.

4.4.2 Synthese des catecholbasierten Amin-Linkers

Wie bereits in vorhergehenden Synthesen gezeigt werden konnte (Kapitel 3.3), sind Reaktionen mit ungeschütztem Dopamin **9** nur in wenigen Fällen erfolgreich. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Kupplungsreaktionen catecholgeschütztes Dopamin **40** verwendet. Dieses wurde an den kommerziell erhältlichen Säuren **72** und **72a**, die in Abbildung 66 dargestellt sind, untersucht.

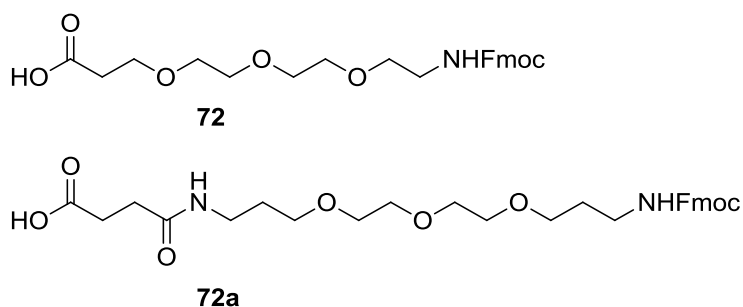
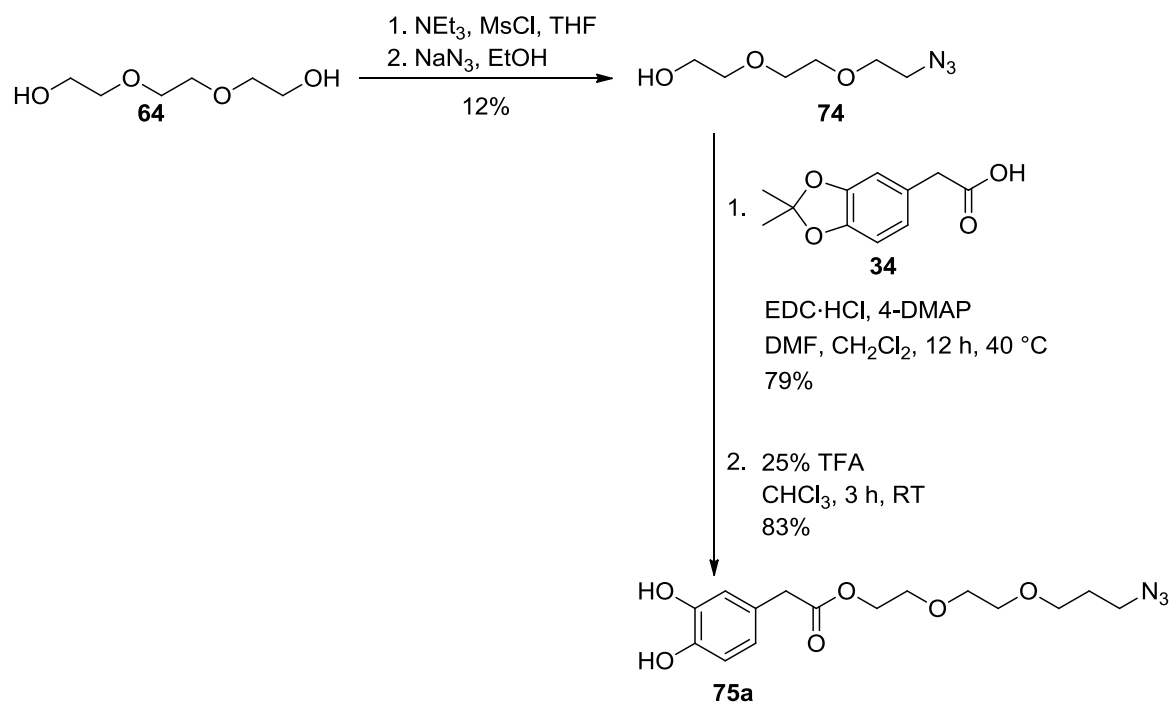


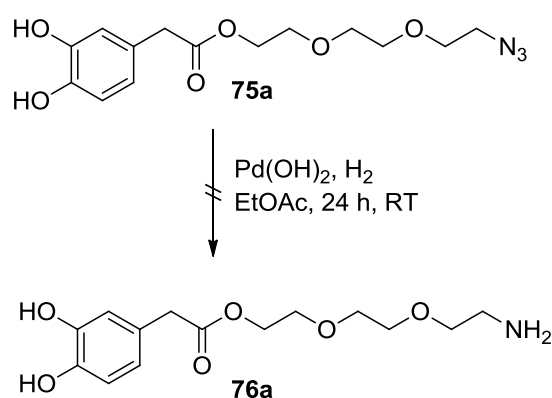
Abbildung 66: Struktur der verwendeten Säuren **72** und **72a** zur Synthese eines triethylenglykolbasierten Amin-Linkers .

Die Kupplung wurde unter Verwendung von HOBt, HBTU und DIPEA durchgeführt. Die Reaktion ist anhand des Amins **72a** in Schema 60 dargestellt. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das vollständig geschützte Produkt in sehr guten Ausbeuten (85% beziehungsweise 92%) erhalten werden.



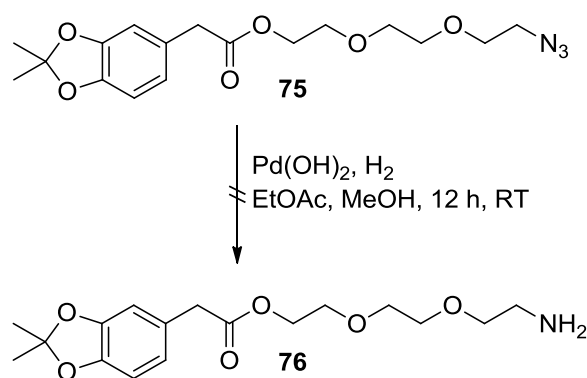
Schema 61: Synthese von 2-(2-(3-Azidopropoxy)ethoxy)ethyl-2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetat (**75a**).

Durch palladiumkatalysierte Hydrogenolyse sollte das Azid **75a** zum Amin **76a** reduziert werden (Schema 62). Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, da nach zwei Stunden noch kein vollständiger Umsatz zu erkennen war. Nach Aufarbeitung konnte das gewünschte Produkt massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden, es wurden lediglich Zersetzungsprodukte erhalten.



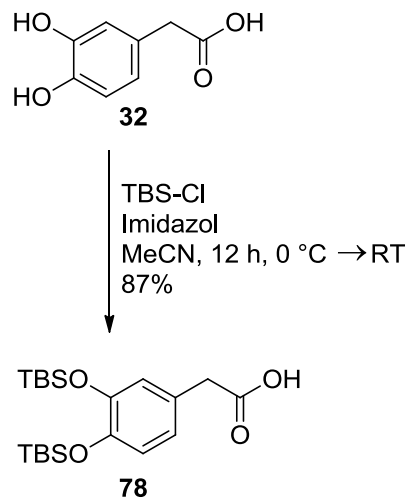
Schema 62: Synthesestrategie der Reduktion des Azids **75a** mit Palladiumhydroxid.

Da die Verwendung von Palladium nicht zur Reduktion des Azids **75a** führte, wurde das geschützte Azid **75** verwendet und ebenfalls mit der milderen Variante, Palladiumhydroxid und Wasserstoff, reduziert (Schema 63).



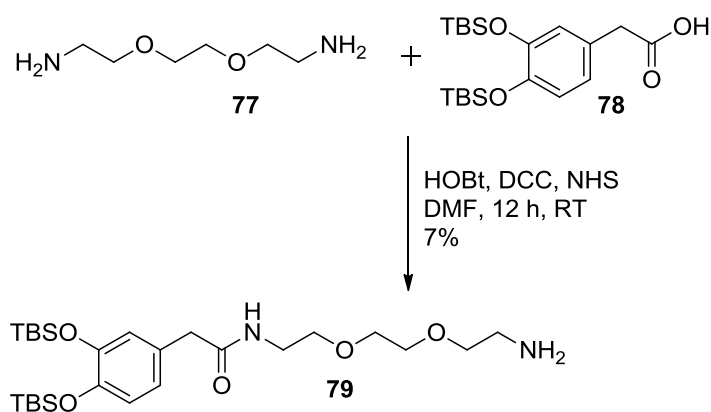
Schema 63: Synthesestrategie der Reduktion des geschützten Azids **75** mit Palladiumhydroxid.

Auch in diesem Fall konnte massenspektrometrisch lediglich Zersetzungsprodukte detektiert werden. Somit führte diese Variante nicht zu dem gewünschten Amin. Ein weiterer Ansatz war, kommerziell erhältliches 2,2'-(Ethyldioxy)bis(ethylamin) **77** an 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (**32**) zu binden. Hierzu wurde die geschützte Säure **78** unter Verwendung von *tert*-Butyldimethylsilylchlorid synthetisiert. Diese Schützung ist einstufig und somit eine weniger aufwendige Variante als die Schützung der Catecholgruppen mittels Acetonid **34**, die über drei Stufen verläuft (Schema 64).



Schema 64: Schützung von 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (**32**) mittels *tert*-Butyldimethylsilylchlorid.

Die catecholgeschützte Säure **78** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 87% erhalten werden und wurde im nächsten Schritt mit dem Diamin **77** unter Verwendung von HOBT, DCC und NHS gekuppelt (Schema 65)^[183].

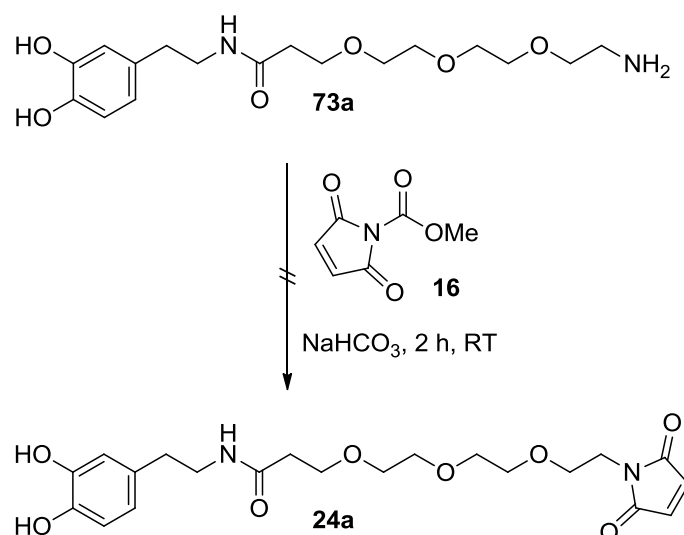


Schema 65: Synthese des geschützten Catechol-Amins **79**.

Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **79** in einer Ausbeute von 7% erhalten werden. Somit konnte durch die Verwendung des Diamins **77** die Ausbeute des Amin-Linkers ebenfalls nicht verbessert werden, zudem führte die Entschützung der *tert*-Butyldimethylsilyl-Schutzgruppe nach säulenchromatographischer Reinigung nicht zu vollständig sauberem Produkt.

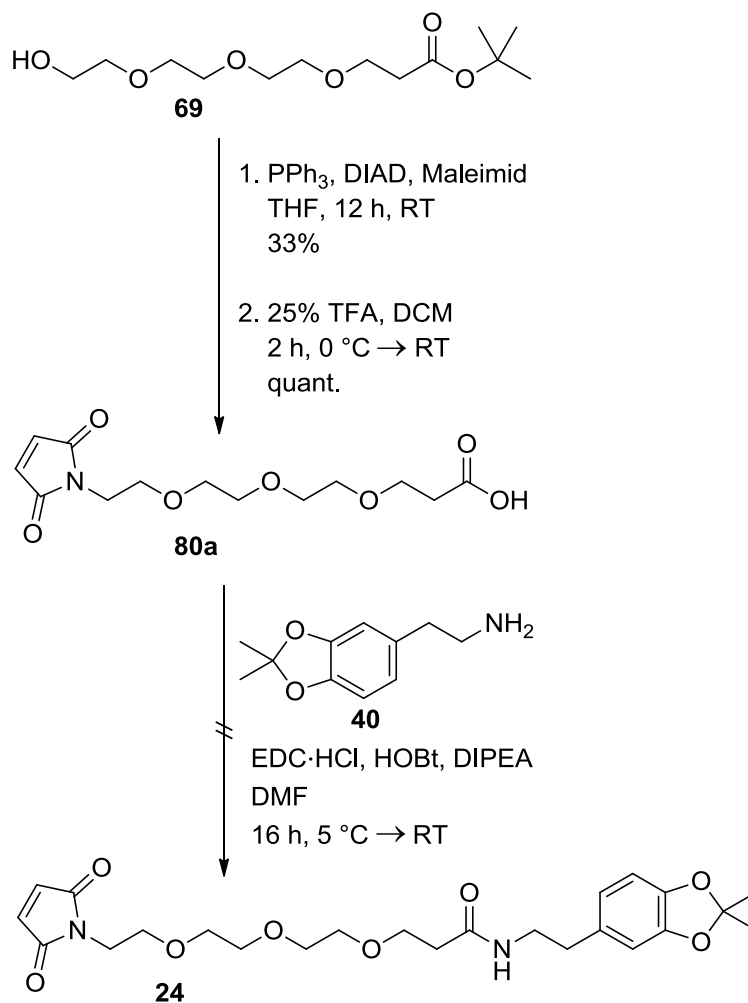
4.4.3 Synthese des catecholbasierten Maleinimid-Linkers

Um eine catecholbasierte Maleinimidfunktion einzuführen, hat sich die Synthese nach Keller *et al.* bewährt^[144]. Aus diesem Grund wurde diese auch für die Synthese des ethylenglykolbasierten Linkers gewählt. Da die Reaktion in wässriger Lösung durchgeführt werden sollte, wurde das komplett entschützte Amin **73a** verwendet. Dieses wurde in wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung mit *N*-Methoxycarboxycarbonylmaleinimid (**16**) umgesetzt (Schema 66).



Schema 66: Synthesestrategie zur Einführung einer Maleinimidfunktion.

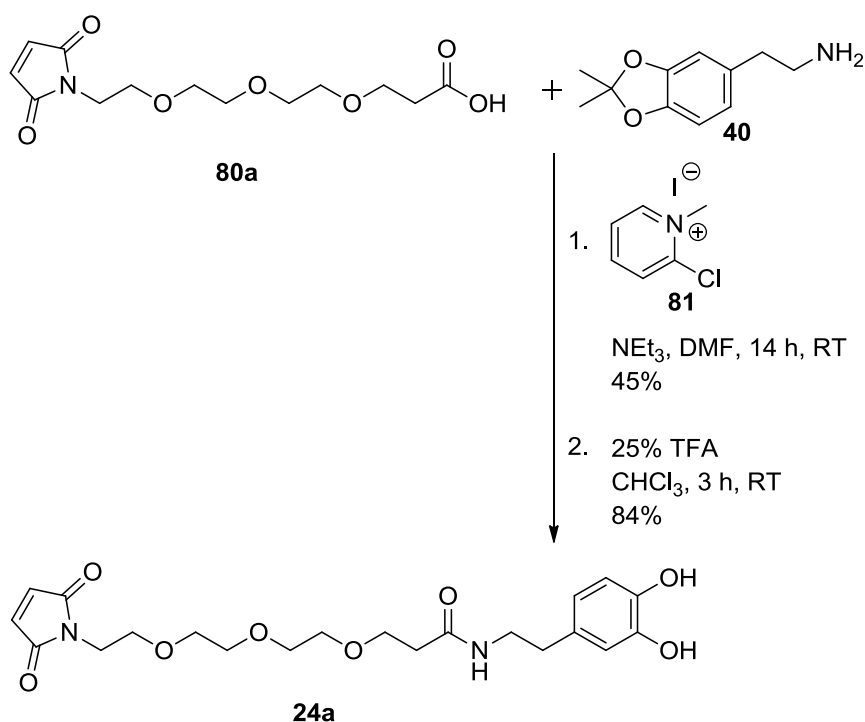
Nach Reinigung konnten lediglich Edukte reisoliert werden, daraufhin wurde ein anderer Ansatz gewählt. Zunächst wurde *tert*-Butyl-3-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoat **69** in einer Mitsunobu-Reaktion mit Triphenylphosphin, Azodicarbonsäurediisopropylester (DIAD) und Maleinimid in Tetrahydrofuran zum Maleinimid **80** umgesetzt. Anschließend wurde durch Entschützung der *tert*-Butylesterfunktion mit Trifluoressigsäure die freie Säure **80a** in quantitativer Ausbeute erhalten und das Produkt mit geschütztem Dopamin **40** unter Verwendung von EDC·HCl, HOBt und DIPEA umgesetzt (Schema 67).^[185]



Schema 67: Synthese des triethylglykolbasierten Maleinimids **24**.

Es konnte kein Produkt erhalten werden, der Grund hierfür könnte die geringe Löslichkeit des Maleinimids **80a** in DMF sein. Die Verwendung von Dopamin-Hydrochlorid (**9a**) führte ebenfalls nicht zum gewünschten Produkt.

Ein weiterer Ansatz war die Verwendung des Mukaiyama-Reagenzes, welches auf der *in situ*-Aktivierung von Carbonsäuren basiert.^[186] Hierzu wurden geschütztes Dopamin **40**, Triethylamin und Mukaiyama-Reagenz **81** in DMF über Nacht bei Raumtemperatur gerührt (Schema 68).



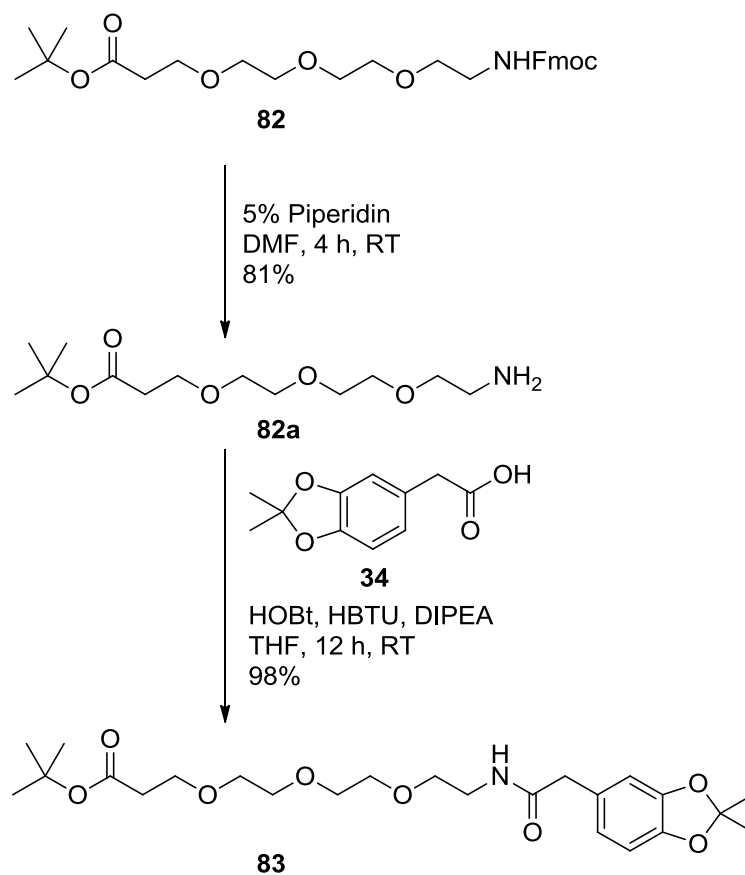
Schema 68: Synthese des Maleinimids **24** unter Verwendung des Mukajama Reagenz **81**.

Das catecholgeschützte Maleinimid **24** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 45% erhalten werden, die Entschützung der Hydroxylfunktionen mittels Trifluoressigsäure in Chloroform führte zum gewünschten Maleinimid **24a** in einer Ausbeute von 84% (Schema 68).

Durch die Verwendung des Mukaiyama-Reagenz konnte das triethylglykolbasierte Maleinimid **80a** an Dopamin **40** gebunden und somit das gewünschte Catechol **24a** mit einer Maleinimidfunktion und einer Triethylglykol-Einheit synthetisiert werden.

4.4.4 Synthese des catecholbasierten Säure-Linkers

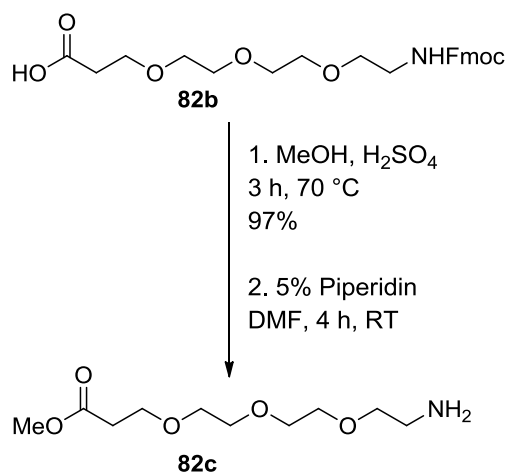
Um einen catecholbasierten Säure-Linker herzustellen, wurde von einem kommerziell erhältlichen Triethylglykol **82**, bei dem Säure- und Aminofunktion geschützt sind, ausgegangen. Zunächst wurde die Aminofunktion mit Piperidin entschützt, nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das freie Amin **82a** in einer Ausbeute von 81% erhalten werden. Im nächsten Schritt wurde das Produkt **82a** mit der geschützten Säure **34** unter Verwendung von HOBt, HBTU und DIPEA umgesetzt (Schema 69). Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das geschützte Produkt **83** in einer Ausbeute von 98% erhalten werden.



Schema 69: Synthese der geschützten triethylglykolbasierten Säure **83**.

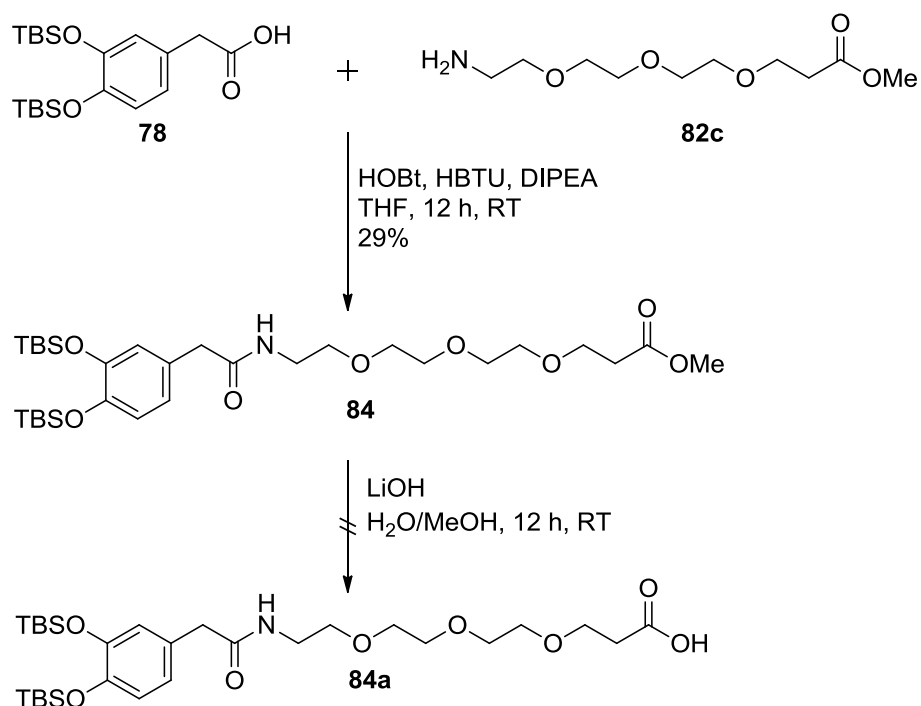
Die Entschützung des *tert*-Butylesters **83** verlief sowohl mit 25% Trifluoressigsäure, als auch mit einer milderen Variante unter Verwendung von Phosphorsäure ohne Erfolg.

Aus diesem Grund wurde eine weitere Variante zur Synthese der Säurefunktion untersucht, die ebenfalls auf einem kommerziell erhältlichen Triethylglykol-Derivat **82b** basiert. Zunächst wurde **82b** als Methylester mit Schwefelsäure in Methanol geschützt (97% Ausbeute). Im nächsten Schritt wurde mit Piperidin in DMF die Aminofunktion entschützt, eine anschließende säulenchromatographische Reinigung verlief ohne Erfolg. Das Amin **82c** konnte allerdings vor der Reinigung mittels FAB-Messungen detektiert werden (Schema 70).



Schema 70: Synthese der geschützten Säure **82c**.

Da das freie Amin **82c** keine ausreichende Stabilität zeigte, um säulenchromatographisch gereinigt zu werden, wurde die Aminofunktion entschützt und das Rohprodukt ohne Reinigung in einer weiteren Reaktion umgesetzt. Hierzu wurde das Molekül **78** in Tetrahydrofuran mit HOBt, HBTU, DIPEA und der geschützten Säure **82c** umgesetzt. Das vollständig geschützte Produkt **84** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 29% erhalten werden. Eine anschließende Entschützung mit Lithiumhydroxid in einem Wasser/Methanol-Gemisch führte nicht zum gewünschten Produkt **84a** (Schema 71).

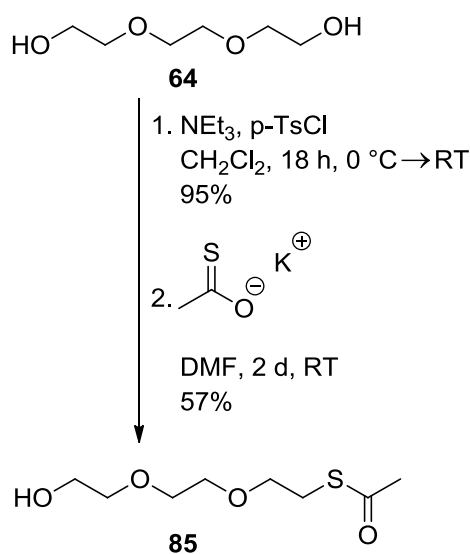


Schema 71: Synthese des vollständig geschützten Linkers **84** und anschließende Entschützung.

Somit konnte auch mit dieser Variante kein triethylenglykolbasierter Linker mit einer freien Carboxylfunktion erhalten werden. Ein weiterer Ansatz der untersucht werden könnte, wäre die Reaktion von Maleinsäureanhydrid mit den Aminen **73a** oder **79** um die freie Säure zu synthetisieren zu können.

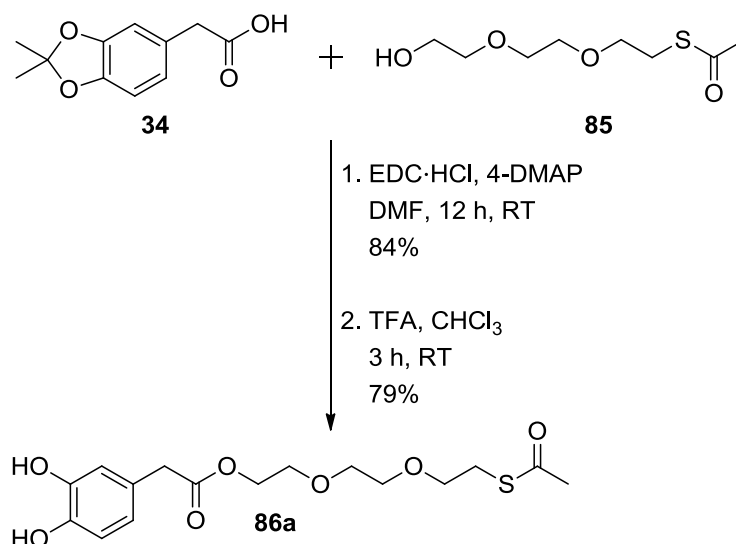
4.4.5 Synthese des catecholbasierten Thiol-Linkers

Um einen Thiol-Linker synthetisieren zu können, wurde zunächst die Hydroxylgruppe von Triethylenglykol mittels *para*-Toluolsulfonsäurechlorid in eine gute Abgangsgruppe überführt. Das Triethylenglykol-Derivat **64a** wurde im darauffolgenden Schritt mit Kaliumthioacetat für zwei Tage in DMF bei Raumtemperatur gerührt, das Produkt **85** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 57% erhalten werden (Schema 72).



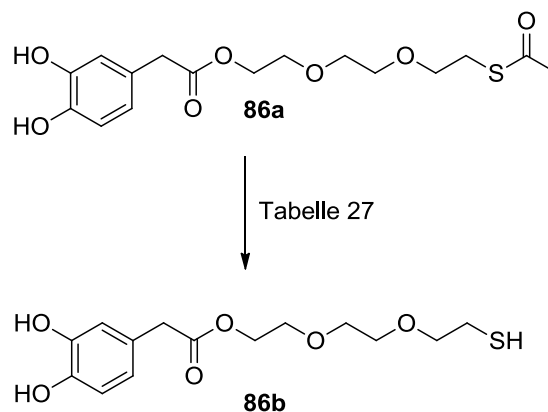
Schema 72: Synthese des triethylenglykolbasierten geschützten Thiols **85**.

Im nächsten Schritt wurde das Thioacetat **85** mittels EDC·HCl und 4-DMAP an die geschützte Säure **34** gebunden, das vollständig geschützte Produkt **86** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer guten Ausbeute von 84% erhalten werden. Im nächsten Schritt wurde das Catechol mittels Trifluoressigsäure in Chloroform/Wasser entschützt, das Produkt **86a** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 79% erhalten werden (Schema 73).



Schema 73: Synthese des geschützten Thiols **86a**.

Nach einer Vorschrift von Wendeln *et al.* wurde das Thiol **86a** mit Natriummethanolat in Methanol entschützt.^[187] Nach 15 Minuten kam es zu einer Farbänderung von gelb zu braun, auf dem Dünnschichtchromatogramm war kein Edukt mehr sichtbar. Nach Aufarbeitung konnten lediglich Zersetzungsprodukte erhalten werden. Da die Variante mit Natriummethanolat nicht zum gewünschten Erfolg führte, wurde die Entschützung mit Natriumborhydrid in Ethanol durchgeführt (Schema 74, Tabelle 27).^[188]



Schema 74: Entschützung der Thiolfunktion **86a**.

Tabelle 27: Bedingungen zur Entschützung des Thiols **86a**.

Eintrag	Bedingungen	Ausbeute [%]
1	NaOMe, MeOH	-
2	NaBH ₄ , EtOH	93

Nach Aufarbeitung konnte das triethylenglykolbasierte Thiol **86b** in einer sehr guten Ausbeute von 93% erhalten werden.

4.4.6 Synthese des catecholbasierten Azidocumarins

Die Reaktionen vieler Biomoleküle sowie Proteine oder Oligonukleotide laufen bevorzugt in wässrigen Systemen ab. Bei der Cycloaddition zwischen dem Cumarin-Derivat **58a** und DNA **4** muss, aufgrund der schlechten Löslichkeit des Azids **58a**, in einem Wasser/Dimethylsulfoxid-Gemisch gearbeitet werden. Um die Löslichkeit des Cumarin-Derivats **58a** zu verbessern, sollte dieses ebenfalls mit einer Ethylenglykol-Einheit modifiziert werden. Das hätte nicht nur Vorteile für die Reaktivität der kupferkatalysierten Cycloaddition, sondern auch auf die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies. Um den gewünschten Linker herzustellen, wurde das geschützte Amin **79** verwendet und mittels EDC·HCl und 4-DMAP an das Cumarin-Derivat **58a** gekuppelt (Tabelle 28). Nach der Reinigung konnte das gewünschte Produkt nicht nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte die Labilität des Amins **79** darstellen.

Aus diesem Grund wurde die Verwendung des triethylenglykolbasierten Amins **73a** untersucht. Dieses wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an 3-Azido-7-(carboxymethoxy)cumarin (**50**) über die Säurefunktion ebenfalls mittels EDC·HCl und 4-DMAP gekuppelt, das gewünschte Produkt konnte auch in diesem Fall nicht isoliert werden (Tabelle 28).

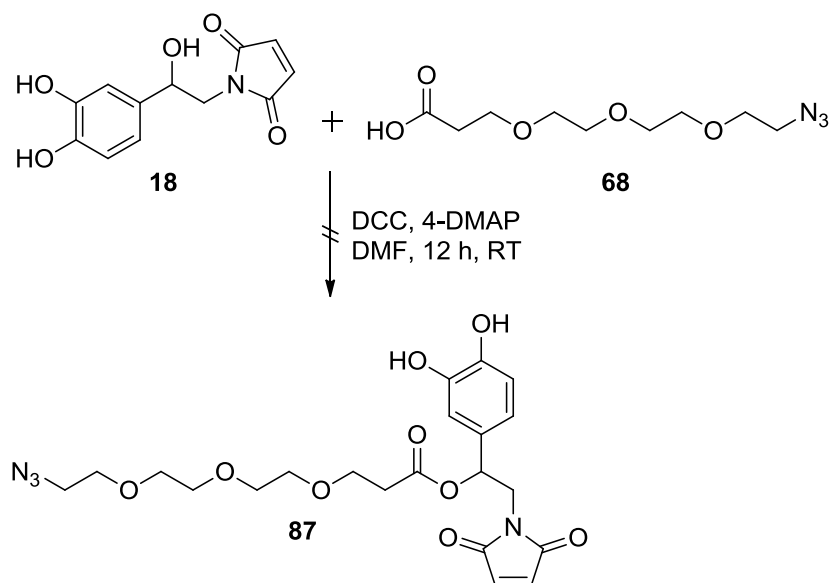
Tabelle 28: Verwendete Amine zur Kupplung des Cumarin-Derivats.

Eintrag	Amin	Produkt
1	79	-
2	73a	-

Somit war es nicht möglich, unter Verwendung von EDC·HCl und 4-DMAP eine Triethylenglykol-Einheit an das Azidocumarin **50** zu binden. Daher sollten weitere Kupplungsreagenzien zur Reaktion der beiden Edukte **73a** und **79** verwendet werden, aus zeitlichen Gründen konnte dies bisher nicht weiter verfolgt werden.

4.5 Trifunktionelle Linker zur Modifikation der TiO₂-Nanopartikel

Bisher sind einige bifunktionelle Linker bekannt, die zum einen an Nanoteilchen binden und zum anderen eine freie Funktionalität zur Bindung von beispielsweise Biomolekülen aufweisen.^[189] Auch in dieser Arbeit wurden einige catecholbasierte bifunktionelle Linker synthetisiert und erfolgreich zur Anbindung von Biomolekülen verwendet (siehe 4.2 und 4.3). Von großem Interesse sind trifunktionelle Linker, da diese eine dritte Funktionalität aufweisen, an die ein Farbstoff zur Detektion innerhalb von Zellen gebunden werden kann. Dies stellt ein interessantes Feld mit vielen unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten dar. Der erste Ansatz einen trifunktionellen Linker zur Modifizierung der TiO₂-Nanoteilchen zu synthetisieren wurde ausgehend von Norepinephrin-Maleinimid (**18**) untersucht. An die Hydroxylfunktion des Linkers **18** sollte ein triethylenglykolbasiertes Azid **68** gebunden werden, wobei dieses zur 1,3-dipolaren Huisgen-Cycloaddition dienen könnte und Triethylenglykol die Wasserlöslichkeit des Linkers verbessert (Schema 75).



Schema 75: Synthesestrategie zur Herstellung des trifunktionellen Linkers **87**.

Die Synthese des trifunktionellen Linkers **87** war nicht erfolgreich, nach der Kupplung mittels DCC und 4-DMAP und nach Aufarbeitung konnten lediglich die Edukte isoliert werden. Die erfolgreiche Anwendung der verwendeten Reaktionsbedingungen konnte sowohl für Produkt **75a** als auch für **86b** gezeigt werden (Kapitel 4.4.2 und 4.4.5). Die sterische Hinderung der Hydroxylgruppe könnte ein Grund dafür sein, dass die Reaktion nicht erfolgreich verlief. Die Synthese des Linkers **87** wurde nicht weiter verfolgt, stattdessen

wurden zwei catecholbasierte Alkine **88** und **47** von Dr. Ishtiaq Ahmed zur Verfügung gestellt, um weitere Modifikationen durchzuführen (Abbildung 67).

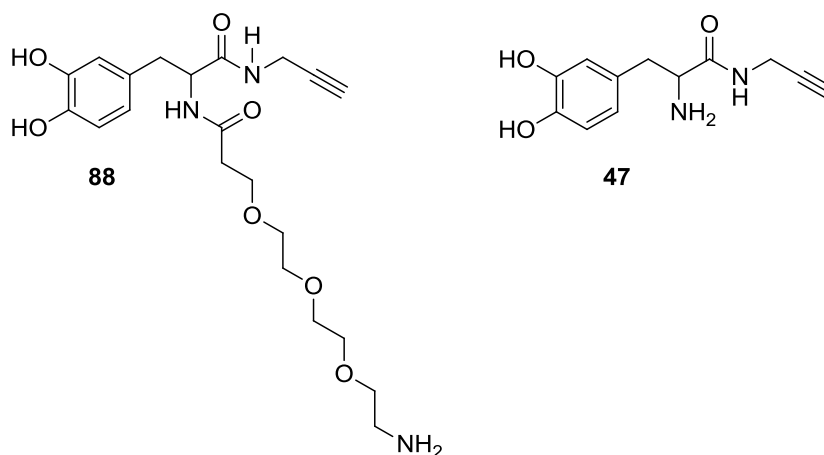
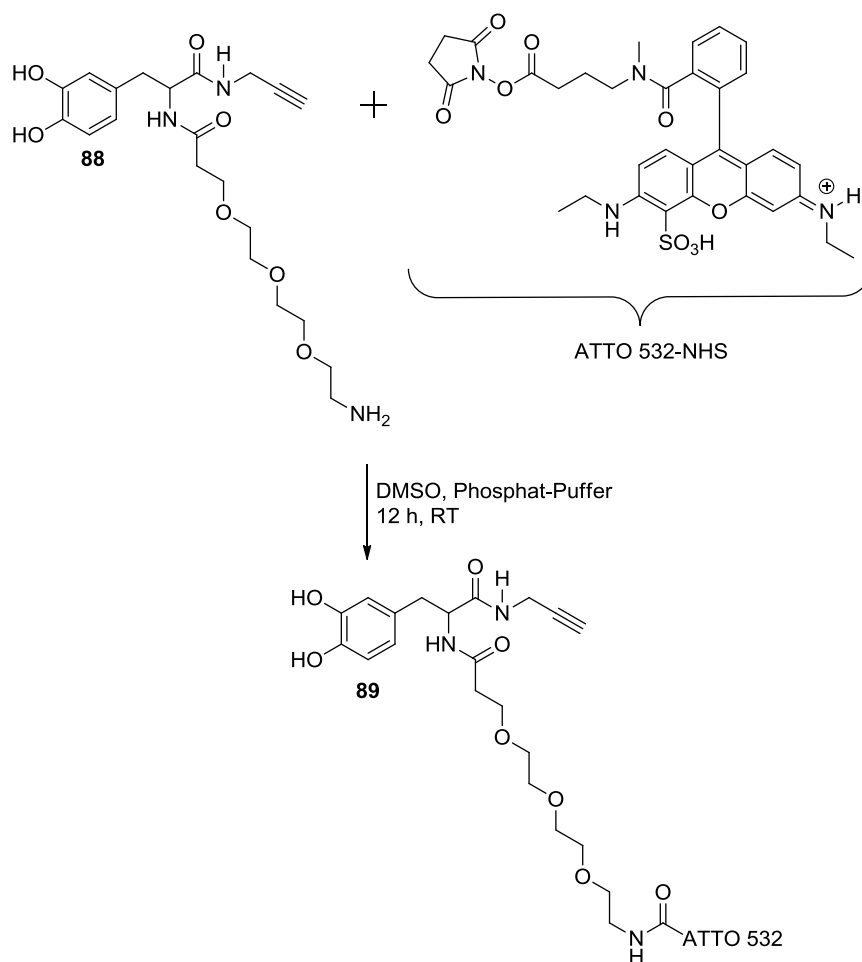


Abbildung 67: Strukturen der trifunktionellen Alkin-Linker **88** und **47** basierend auf L-DOPA.

4.5.1 Bindung eines Farbstoffs an trifunktionellen Linker **88**

Da es zur Komplexierung des freien Amins **88** während der kupferkatalysierten Cycloaddition kommen könnte, sollte vor der Addition eines weiteren Moleküls, ein Farbstoff an das freie Amin gebunden werden. Hierzu diente ein fluoreszierendes ATTO-Derivat, ATTO 532 mit einer *N*-Hydroxysuccinimid-Gruppe, welche mit dem trifunktionellen Linker **88** in Phosphat-Puffer (pH = 8) umgesetzt wurde (Schema 76).



Schema 76: Bindung des NHS-ATTO 532-Farbstoffs an den trifunktionellen Linker **88** mittels Amidkupplung.

Die Reinigung von **89** erfolgte mittels HPLC (Abbildung 68). Aus dem Chromatogramm ist ersichtlich, dass ein neues Signal mit einer Retentionszeit von 14.7 Minuten entstanden ist, welches bei 532 nm absorbiert.

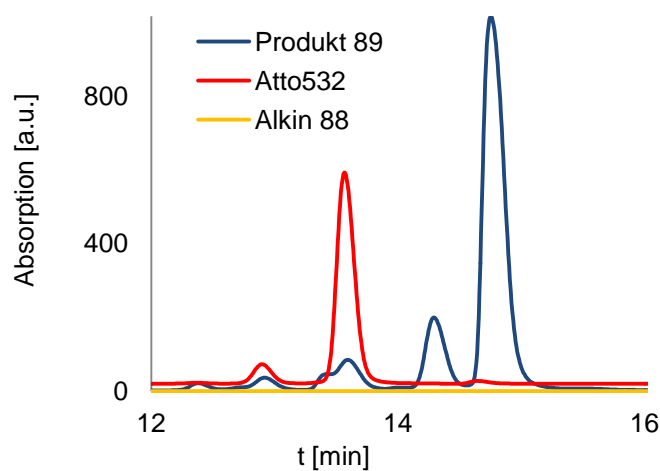


Abbildung 68: HPLC-Chromatogramm der Reaktion des trifunktionellen Alkins **88** mit ATTO 532 bei 532 nm.

Um zu überprüfen, ob die Reaktion auf Titandioxid-Nanopartikeln (DEG-NP) und Nanostäbchen durchgeführt werden kann, wurden zunächst alkinmodifizierte Partikel (NP-**88**) und Stäbchen (NR-**88**) hergestellt. Anschließend wurden diese über Nacht unter den oben genannten Bedingungen mit dem Farbstoff ATTO 532 inkubiert. Eine Reinigung mittels Zentrifugation war aufgrund der geringen Konzentration nicht möglich, daher wurden die modifizierten Nanopartikel und –stäbchen auf ein einprozentiges Agarose-Gel aufgetragen (Abbildung 69). Die Reaktion auf der Nanopartikel- und Nanostäbchen-Oberfläche zeigt zwei Banden im Gel (Spur 3 und 4), die Bande mit der geringeren elektrophoretischen Mobilität entspricht der Reaktion in Lösung (Spur 6). Die Bande mit der höheren elektrophoretischen Mobilität liegt zwischen reinem Farbstoff (Spur 7) und dem Reaktionsprodukt **89** in Lösung. Dies zeigt eine erfolgreiche Bindung des Farbstoffs, da die Nanostäbchen und Nanopartikel keine Fluoreszenz aufweisen wie aus den Spuren 1 und 2 zu erkennen ist. Die höhere Mobilität der modifizierten Nanopartikel und –stäbchen ist durch die zusätzliche Ladung des ATTO-Farbstoffs 532 zu erklären.

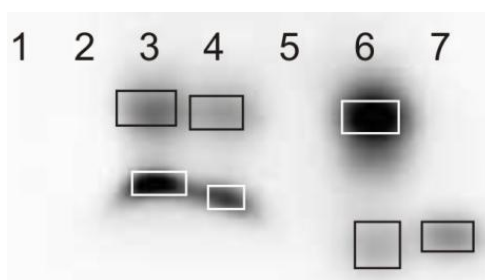


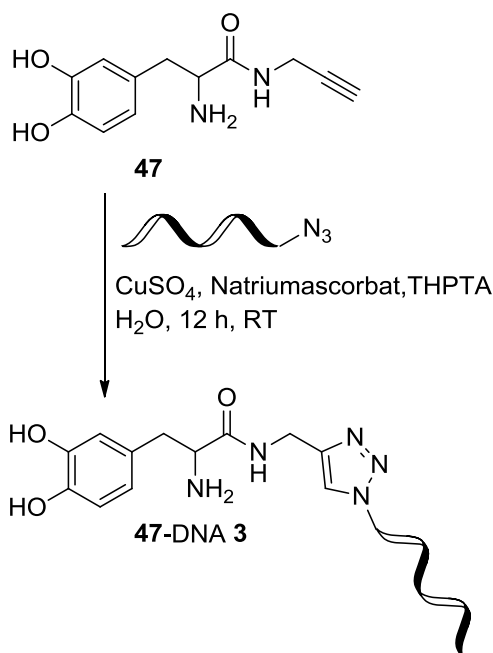
Abbildung 69: Fluoreszenz-Aufnahme eines einprozentigen Agarose-Gels mit alkinmodifizierten Nanopartikeln (NP-**89**) und Nanostäbchen (NR-**88**) mit ATTO-Farbstoff 532. Spur 1: NR-**88**, Spur 2: NP-**88**, Spur 3: Farbstoffmodifizierte Stäbchen (NR-**89**), Spur 4: Farbstoffmodifizierte Partikel (NP-**89**). Spur 5: leer, Spur 6: ungereinigte Lösung aus Alkin mit Farbstoff **89**, Spur 7: reiner ATTO 532-Farbstoff.

Somit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist an den trifunktionellen Linker **88** einen ATTO-Farbstoff sowohl in Lösung als auch auf der Oberfläche der modifizierten Nanoteilchen zu binden.

4.5.2 Kupferkatalysierte Cycloaddition mit Oligonukleotid

Um zu prüfen, ob die Modifizierung der Alkingruppe des trifunktionellen Linkers **47** mit DNA mittels der 1,3-dipolaren Cycloaddition möglich ist, wurde die Reaktion mit dem Alkin **47** und azidmodifizierter DNA **3** in Lösung durchgeführt. Die Reaktion wurde zunächst

unter den Standardbedingungen mit Kupfersulfat und Natriumascorbat durchgeführt.^[190] MALDI-TOF-Messungen zeigten jedoch lediglich die Masse des Ausgangsoligonukleotids und nicht die Masse des DNA-modifizierten Linkers. Aus diesem Grund wurde ein zusätzlicher Ligand, Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin **90** (THPTA) verwendet (Schema 77), welcher bereits erfolgreich bei mehreren anspruchsvollen 1,3-dipolaren Cycloadditionen in biologischen Systemen angewendet wurde.^[191]



Schema 77: 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen dem Alkin **47** und DNA **3** unter Verwendung von THPTA.

Die Reinigung erfolgte mittels HPLC und es ist ersichtlich, dass es zur Bildung eines breiten Signals mit einer Retentionszeit von 20.0 Minuten kommt (Abbildung 70). Im Vergleich dazu weist das reine Oligonukleotid DNA **3** eine Retentionszeit von 20.8 Minuten auf.

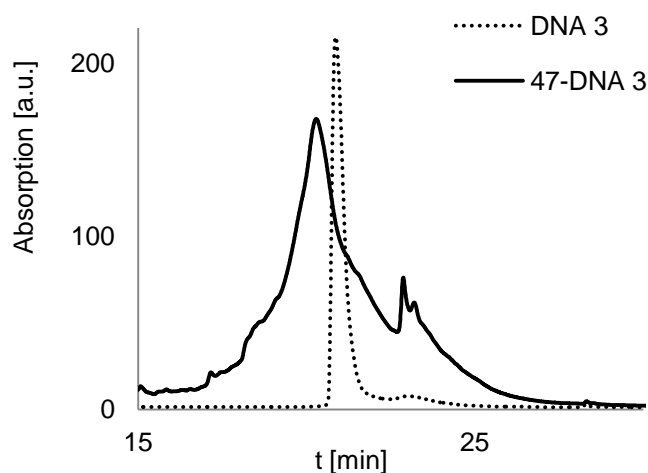


Abbildung 70: HPLC-Chromatogramm der 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen Alkin **47** und DNA **3** bei 260 nm.

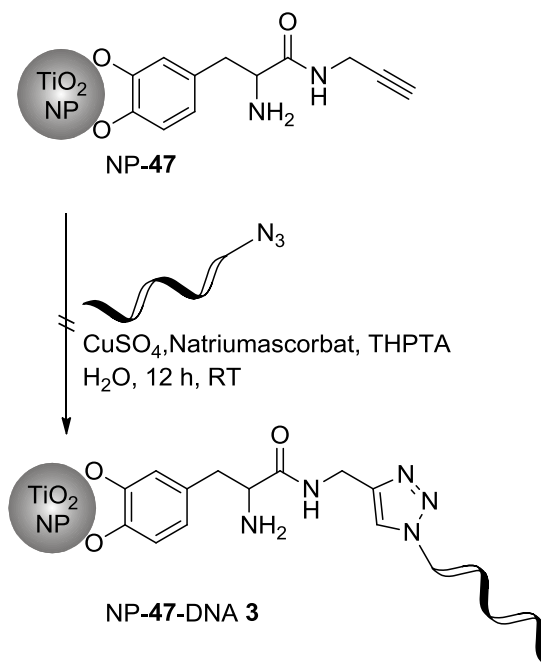
Es kommt folglich zu einer Verschiebung, die durch Größe und Ladung des trifunktionellen Alkins **47** verursacht wird. Um zu zeigen, dass die Reaktion zwischen Azid-DNA **3** und dem trifunktionellen Linker **47** erfolgreich war, wurden MALDI-TOF-Messungen durchgeführt (Tabelle 29).

Tabelle 29: MALDI-TOF Ergebnisse der Reaktion von trifunktionellem Linker **47** mit DNA **3**.

Eintrag	M_{Soll} [g/mol]	M_{Ist} [g/mol]
DNA 3	7524	7525
47-DNA 3	7758	7759

Das neu entstandene Signal weist die Masse des gewünschten DNA-modifizierten Linkers **47-DNA 3** auf, so konnte mit diesen Ergebnissen gezeigt werden, dass diese Reaktion erfolgreich verlief. Daher wurde die kupferkatalysierte Cycloaddition auch zur Bindung von DNA auf der Nanopartikel-Oberfläche durchgeführt.

Bei der Modifizierung der Nanopartikel und Nanostäbchen mit dem Alkin **47** kam es zu einer Farbänderung von orange zu braun, was einen erfolgreichen Ligandenaustausch aufzeigt. Im nächsten Schritt wurde der pH-Wert auf 7.5 eingestellt. Daraufhin wurde die Cycloaddition mit dem Azid-Oligonukleotid DNA **3** mittels Kupfersulfat, Natriumascorbat und THPTA über Nacht durchgeführt, dies ist anhand der Nanopartikel in Schema 78 dargestellt.



Schema 78: Oberflächenmodifikation der Titandioxid-Nanopartikel mit Alkin **47** und anschließender Cycloaddition mit DNA **3** unter Kupferkatalyse.

Um die Bindung des Oligonukleotids nachzuweisen, wurden mehrfach einprozentige Agarose-Gele angefertigt, was erfolglos blieb. Eine Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie war ebenfalls nicht möglich. Somit kann keine Aussage über den erfolgreichen Verlauf der Reaktion getroffen werden. Ein Grund der dafür sprechen könnte, dass die Reaktion erfolglos verlief, könnte der kupferstabilisierende Ligand **90** sein. THPTA **90** ist durch seine Struktur ebenfalls in der Lage mittels der Hydroxylgruppen an Titandioxid zu binden (Abbildung 71).

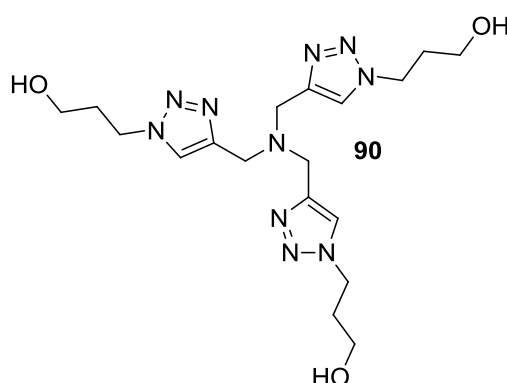


Abbildung 71: Struktur des Liganden Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA) **90**.

Da nicht von einer Sättigung der Oberfläche mit Alkin **47** ausgegangen werden kann, sollte ein Überschuss des kupferstabilisierenden Liganden **90** verwendet werden, dies wurde jedoch bisher nicht untersucht.

Eine weitere Anwendung der ATTO-modifizierten Nanopartikel und -stäbchen wäre die kupferkatalysierte Cycloaddition mit DNA **3**. Dies wurde aufgrund der Schwierigkeiten Oligonukleotide an die Titandioxid-Nanoteilchen mittels einer kupferkatalysierten Cycloaddition zu binden nicht weiter verfolgt.

4.6 Bestimmung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies nach der Bestrahlung der TiO₂-Nanoteilchen

Wie eingangs erwähnt, produzieren Titandioxid-Nanostrukturen je nach Größe und Strukturtyp in wässriger Umgebung unter Bestrahlung von UV-Licht reaktive Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species*, ROS). ROS spielen sowohl bei der Aktivierung als auch der Desaktivierung von bestimmten Molekülen eine wichtige Rolle, zudem sind sie von großer Bedeutung bei Signalwegen auf der Zellebene.^[4] Daher ist es vor allem in der Biochemie und der Bionanotechnologie wichtig, die ROS-Aktivität zu untersuchen und zu kontrollieren.

Um die hergestellten Nanopartikel und Nanostäbchen auf ihre ROS-Produktion zu überprüfen, wurde eine enzymbasierte Methode entwickelt und angewendet.

4.6.1 TiO₂-Nanopartikel

Für die Messungen der reaktiven Sauerstoffspezies wurde ein Protokoll verwendet, welches von Fruk *et al.* für Quantenpunkte beschrieben wurde.^[192] Es basiert auf der Aktivierung von Meerrettichperoxidase (engl.: *Horseradishperoxidase*, HRP) in Gegenwart des Substrats 10-Acteyl-3,7-dihydroxyphenoxazin (Ampliflu Red[®]). Dieses farblose, nicht-fluoreszierende Substrat wird von HRP in der Präsenz von Wasserstoffperoxid oxidiert, dabei entsteht fluoreszierendes Resorufin (Abbildung 72), welches mittels Fluoreszenz-Messungen ($\lambda_{\text{ex}} = 540$, $\lambda_{\text{em}} = 585$ nm) nachgewiesen werden kann.

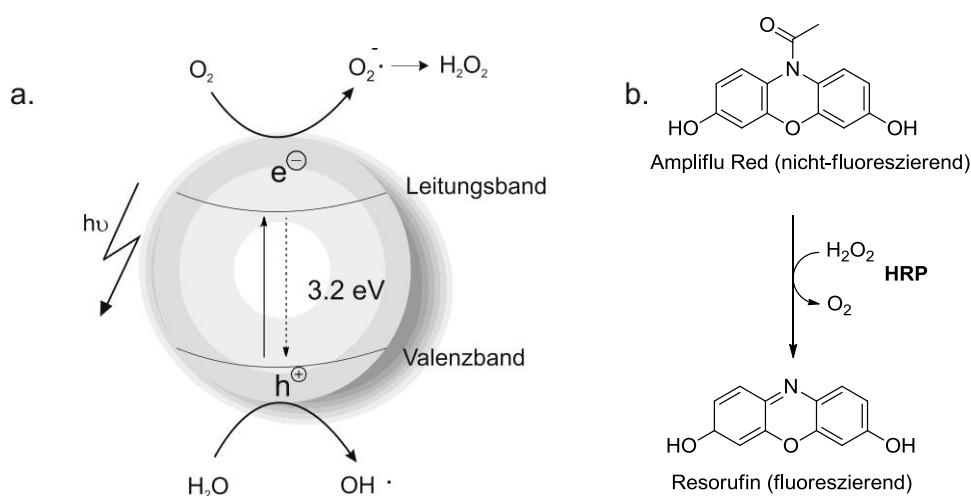


Abbildung 72: a. Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies unter Bestrahlung von Titandioxid-Nanopartikeln und b. Bildung des fluoreszierenden Resorufins mittels Meerrettichperoxidase ausgehend von Ampliflu Red.

Für die Messungen der reaktiven Sauerstoffspezies wurden unterschiedliche Volumina an Nanopartikeln (0, 1, 50 und 100 μL) für 30 Minuten bei 366 nm bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden HRP und Ampliflu Red nacheinander zugegeben, das Gemisch wurde für fünf Minuten geschüttelt bevor die Fluoreszenz-Messungen durchgeführt wurden. Es wurden die mittels Diethylenglykol-Methode (DEG-NP), die mittels des Hochtemperatur-Verfahrens hergestellten (TiO_2 -NP Hochtemp) und kommerziell erhältliche Nanopartikel (TiO_2 -NP komm) für die Messungen verwendet und verglichen (Abbildung 73).

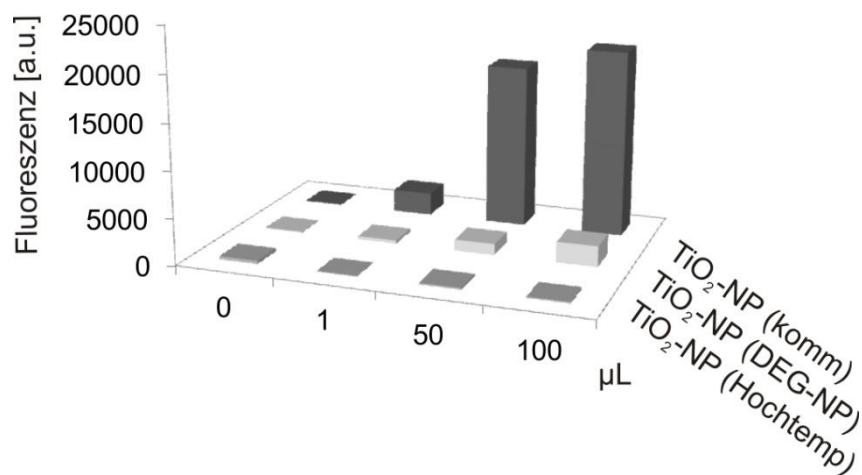


Abbildung 73: Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies der drei Arten an Titandioxid-Nanopartikeln unter Verwendung einer Lichtquelle mit 366 nm.

Es ist zu erkennen, dass lediglich die kommerziell erhältlichen Nanopartikel (NP-komm) eine starke Fluoreszenz des Resorufins aufweisen. Die Nanopartikel, die mittels der Diethylenglykol-Methode und des Hochtemperatur-Verfahrens hergestellt wurden, zeigen nahezu keine Änderung. Ein Grund für die geringe Fluoreszenz bei den Nanopartikeln, DEG-NP ist, dass die hergestellten Nanopartikel zum großen Teil Rutil als Strukturtyp aufweisen. Somit kann die geringe ROS-Produktion durch den Strukturtypen erklärt werden, da in der Literatur gezeigt werden konnte, dass Anatas mehr Radikale als Rutil erzeugen kann.^[36] Die Verwendung einer höheren Konzentration an TiO_2 -Nanopartikel führte zu einem Anstieg der Fluoreszenz, wie ebenfalls aus Abbildung 73 erkennbar ist.

Da aus den Berechnungen der Bandlücke (Kapitel 4.2.2) zu schließen war, dass diese bei den kleinen Nanopartikeln größer ist als die der kommerziellen Nanopartikel, wurde eine energetischere Lichtquelle mit 254 nm verwendet, allerdings ist eine Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 254 nm nicht wünschenswert, da es dadurch zu einem schnellen Abbau und zu einer möglichen Deaktivierung der biologischen Moleküle kommen kann. Die Nanopartikel wurden wie oben beschrieben bestrahlt (Abbildung 74). Die Fluoreszenz wurde

korrigiert, indem die Substanzen mit und ohne Bestrahlung gemessen wurden und diese voneinander subtrahiert wurden. Es ist zu erkennen, dass es mit dieser Lichtquelle zu einer Steigerung der Fluoreszenz für alle drei Arten der Nanopartikel kommt.

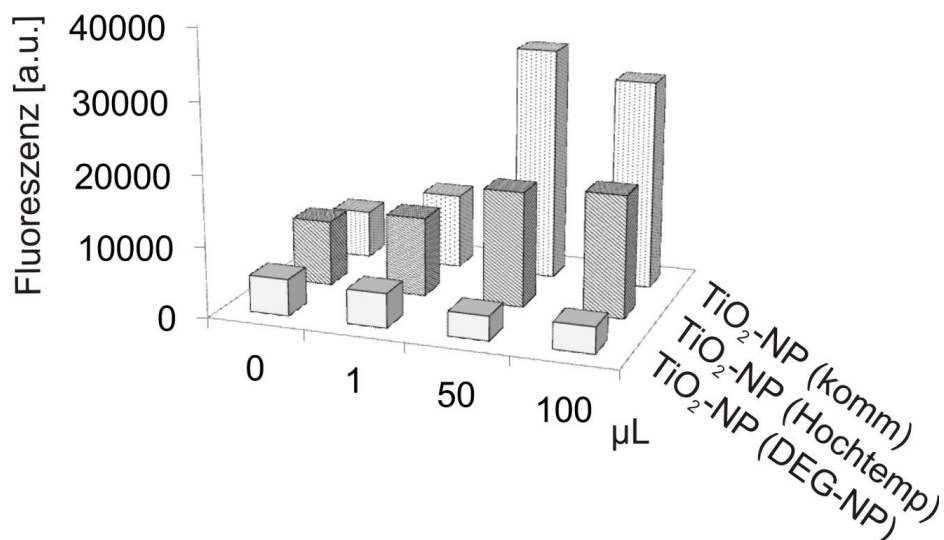


Abbildung 74: Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies der drei Arten an Titandioxid-Nanopartikeln unter Verwendung einer Lichtquelle mit 254 nm.

Interessanterweise kommt es im Fall der mittels Diethylenglykol-Methode hergestellten Nanopartikeln zu einer Verringerung der Fluoreszenz bei Erhöhung der Partikelkonzentration. Das spricht für einen Effekt, der auf Diethylenglykol zurückzuführen ist und einen starken Einfluss auf die ROS-Produktion aufweist. Eine mögliche Hypothese ist, dass Diethylenglykol während der Bestrahlung mit UV-Licht abgebaut wird und die entstandenen Produkte als Radikalfänger agieren können und somit die Enzymaktivität eingeschränkt wird.^[193] Mit höheren Energien können die Nanopartikel mit einer Größe um fünf Nanometer aktiviert werden.

4.6.2 Dopaminmodifizierte TiO₂-Nanopartikel

Dopamin (**9**) ist dafür bekannt, ein effektives Antioxidans zu sein.^[194] Zudem konnte gezeigt werden, dass das Amin **9** Nervenzellen vor oxidativem Stress schützen kann, indem es als Radikalfänger agiert.^[195] Die Produktion der Radikale ist stark von der Dopamin-Konzentration abhängig, so wirkt es als Antioxidans bei physiologisch relevanten Konzentrationen, bei höheren Konzentrationen hat es eine prooxidative Wirkung.^[196] Es konnte gezeigt werden, dass es bei hohen Dopamin-Konzentrationen zu einer erhöhten

Bildung von Superoxid und Wasserstoffperoxid kommt, dafür sind die Catechol- und die Aminofunktion verantwortlich.^[194-195]

Die dopaminmodifizierten Nanopartikel NP-9 wurden untersucht, um den Einfluss des Oberflächenliganden auf die ROS-Produktion festzustellen. Abbildung 75 zeigt, dass Dopamin (9) bei den kommerziellen Nanopartikeln keinen Einfluss ausübt.

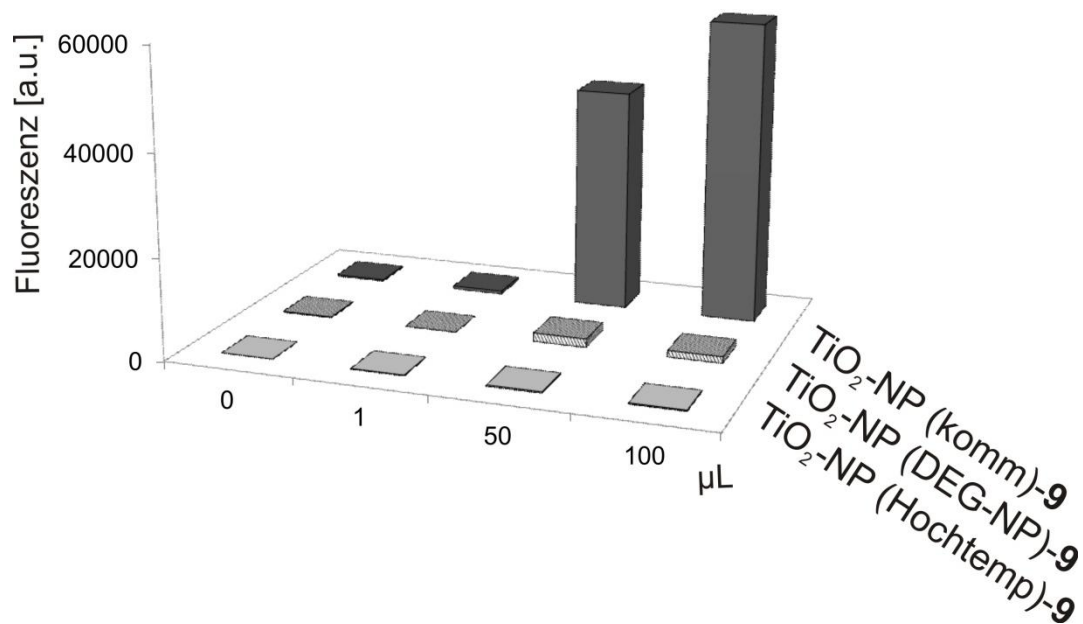


Abbildung 75: Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies der drei Arten an dopaminmodifizierten Titandioxid-Nanopartikeln NP-9 bei 366 nm.

Die Bindung von Endiol-Liganden an die Oberfläche ist effektiver wenn die Partikel kleiner als 20 nm sind^[197], somit könnte die Bindung des Dopamins (9) an die kommerziellen Nanopartikel erschwert sein und der Charge-Transfer-Komplex nicht vollständig ausgebildet werden. Das könnte zur Folge haben, dass Dopamin (9) zusätzlich in Lösung vorhanden ist, was die Konzentration erhöht und somit ein Grund für die steigende Fluoreszenz darstellen könnte. Auf die synthetisierten Nanopartikel trifft dies nicht zu, es ist nahezu keine Fluoreszenz messbar, die auf eine Aktivierung des Enzyms durch die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies deuten würde. Dieses Ergebnis zeigt, dass Dopamin (9) einen synergetischen Effekt auf der Oberfläche der Nanopartikel aufweist. Vergleichbare Ergebnisse wurden erhalten, wenn die Nanopartikel mit 254 nm bestrahlt wurden (Abbildung 76).

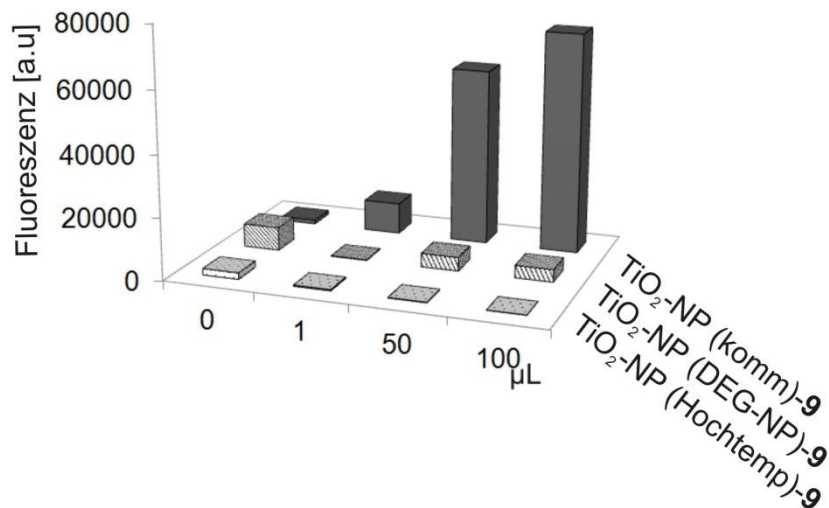


Abbildung 76: Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies der drei Arten an dopaminmodifizierten Titandioxid-Nanopartikeln (NP-9) unter Verwendung einer Lichtquelle mit 254 nm.

4.6.3 TiO₂-Nanostäbchen

Für die Messungen der reaktiven Sauerstoffspezies der Nanostäbchen (NR) wurden dieselben Bedingungen die für die Nanopartikel verwendet wurden, untersucht. Aus Abbildung 77 ist zu erkennen, dass die Nanostäbchen in der Lage sind, unter Bestrahlung das Enzym HRP zu aktivieren. Die Effizienz steigt mit der Reaktionszeit, die höchste Aktivität wiesen die Stäbchen auf, die acht Stunden refluxiert wurden. Der Grund hierfür liegt in der steigenden Kristallinität der Nanostäbchen, dadurch sinkt die Zahl der Defekte und somit steigt die Fähigkeit der ROS-Produktion.^[198] Zudem ist zu erkennen, dass es mit erhöhtem Volumen an Titandioxid ebenfalls zu einem Anstieg der Fluoreszenz kommt, somit ist eine Konzentrationsabhängigkeit vorhanden.

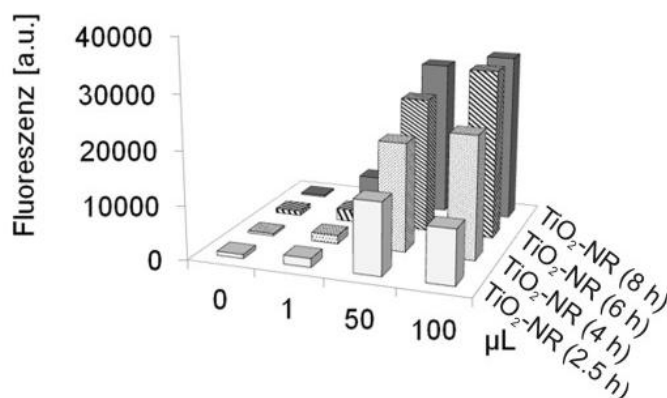


Abbildung 77: Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies durch Bestrahlung der Titandioxid-Nanostäbchen bei 366 nm.

Um festzustellen, ob die Aktivität des Enzyms HRP kontrolliert werden kann, wurden die Nanostäbchen mit HRP und Ampliflu Red[®] in einer Quarzküvette gemischt und die Fluoreszenz von Resorufin nach der Bestrahlung bestimmt (Abbildung 78).

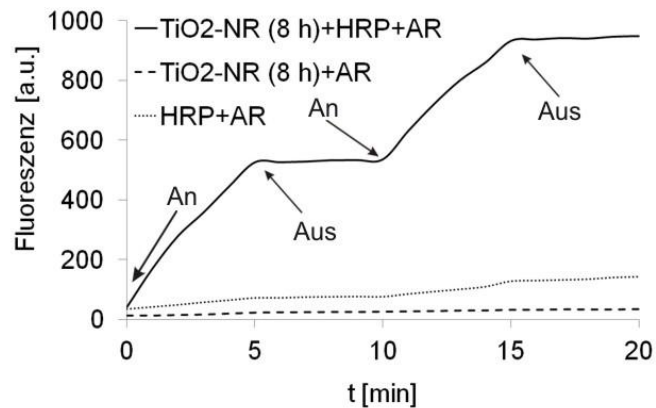


Abbildung 78: Lichtinduzierte Erzeugung der Peroxidase-Aktivität mittels Titandioxid-Nanostäbchen.

Zu Beginn der Bestrahlung steigt die Fluoreszenz, nach fünf Minuten wurde die Lichtquelle entfernt und für fünf Minuten unter Lichtausschluss gelagert. In dieser Zeit kam es zu keinem weiteren Anstieg der Fluoreszenz. Die darauffolgende Bestrahlung führt wieder zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Die beiden Kontrollen, HRP mit Ampliflu Red[®] (AR) und Nanostäbchen mit HRP und AR zeigten diesen Effekt nicht. Dies belegt, dass die Enzymaktivität durch die Anwesenheit von Licht und Titandioxid-Nanostäbchen an- und ausgeschaltet werden kann.

4.6.4 Dopaminmodifizierte TiO₂-Nanostäbchen

Die Bestrahlung der dopaminmodifizierten Nanostäbchen wurde wie bereits erwähnt durchgeführt. Im Vergleich zu den reinen Nanostäbchen weisen die dopaminmodifizierten Stäbchen einen erheblichen Einfluss auf die ROS-Produktion auf. Die Messungen sind in Abbildung 79 dargestellt, hierbei wurden die Proben mit und ohne Licht gemessen. Die Fluoreszenz im Dunkeln wurde von der mit Licht subtrahiert, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

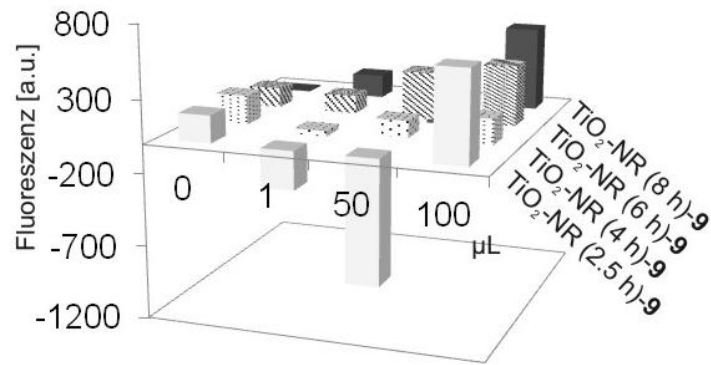


Abbildung 79: Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies durch Bestrahlung der dopaminmodifizierten Titandioxid-Nanostäbchen NR-9.

Wie bereits erwähnt hat Dopamin (9) abhängig von der Konzentration die Fähigkeit ROS zu zerstören, da es als Radikalfänger wirkt. Durch ihre große Oberfläche können die Nanostäbchen viel Dopamin (9) binden und daher als effektive Radikalfänger dienen. Diese Versuche haben gezeigt, dass die Untersuchung des Ligandeneinflusses sehr wichtig ist um neue, effektive Nanohybride herzustellen. Dadurch eröffnet sich ein neuer Bereich der Forschung.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Synthese der TiO₂-Nanoteilchen

Die Synthese der Titandioxid-Nanopartikel anhand der Hochtemperatur-Methode wurde eingehend untersucht. Hierbei konnte durch Variation der Reaktionszeiten festgestellt werden, dass bereits nach 2.5 Stunden definierte Titandioxid-Nanostäbchen erhalten wurden, nach acht Stunden konnten stabile Anatas-Nanostäbchen hergestellt werden. Die Sol-Gel-Methode wurde insofern variiert, als dass die Wasserlöslichkeit im Vergleich zu den nach Wang *et al.* hergestellten Nanopartikeln verbessert wurde.^[199] Zudem wurde beobachtet, dass durch Variation der Reaktionszeiten Rutil- oder Anatas-Nanopartikel erhalten werden. Durch die ligandenfreie Synthese sollten Titandioxid-Nanopartikel synthetisiert werden, die größer als die zuvor hergestellten Nanopartikel waren. Die erhaltenen Teilchen wiesen eine Größe von 5-7 nm auf und waren auch ohne oberflächenstabilisierende Liganden äußerst stabil.

5.2 Oberflächenmodifikation der TiO₂-Nanoteilchen durch Michael-Additionen

Die Synthese des catecholbasierten Maleinimids **15** konnte ausgehend von Dopamin-Hydrochlorid (**9a**) in einer Stufe durchgeführt werden. Die Modifikation der Titandioxid-Nanopartikel mit Maleinimid **15** konnte anhand von DLS-, UV/Vis- sowie NMR-Messungen und Berechnungen der Bandlücke im Vergleich zu den unmodifizierten Nanopartikel belegt werden. Der thiolierter Zucker **19** wurde in einer Michael-Addition erfolgreich an das Maleinimid **15** gebunden, das gereinigte Konjugat **20** wurde zu Titandioxid-Nanopartikeln gegeben. Die bisher erhaltenen Ergebnisse sprechen für eine erfolgreiche Bindung, es bedarf jedoch weiterer Analytik um Aussagen über den positiven Verlauf der Reaktion treffen zu können.

Ebenso konnte thiolierter Peptoid **22** an das Maleinimid **15** gebunden werden, der anschließende Ligandenaustausch auf der Nanopartikel-Oberfläche konnte aufgrund der zusätzlichen Ladung des Farbstoffs nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Anhand zweier tholierter DNA-Stränge wurde die Bindung zwischen Maleinimid **15** und DNA **1** beziehungsweise **2** gezeigt. Durch Änderung des pH-Werts auf 7.5 konnte die Michael-Reaktion erstmals an maleinimidmodifizierten Nanopartikeln NP-**24a** erfolgreich durchgeführt werden. Somit konnte ein Zugang zu Titandioxid-DNA-Hybriden mittels

Michael-Addition geschaffen werden. Die Bindung eines Modellpeptids **25** an das Maleinimid **15** wurde ebenfalls durchgeführt, ein anschließender Ligandenaustausch an der Nanopartikel-Oberfläche war erfolgreich. Die Bindung des Peptids an Titandioxid wurde sowohl durch UV/Vis- und DLS-Messungen, Gelelektrophorese als auch mit Größenausschlusschromatographie bestätigt. Die Reaktion zwischen BP100-Cystein **27** und dem Maleinimid **15** führte zu einerseits zu einer Bindung von einem Dopamin-Maleinimid **28a** und weiterhin zu einer Bindung von zwei Dopamin-Maleinimid-Molekülen **28b**. Anhand der UV/Vis-Messungen der Oberflächenmodifikation mit **28b** kann von einer erfolgreichen Bindung an die Titandioxid-Nanopartikel ausgegangen werden, somit konnte ein Peptid-TiO₂-Nanopartikel-Hybrid aufgebaut werden, welches durch die Modifikation des catecholbasierten Peptids **28** zellgängig ist.

5.3 Oberflächenmodifikation der TiO₂-Nanoteilchen durch kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloadditionen

Ausgehend von 3,4-Dihydroxymzimtsäure (**29**) und 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (**32**) wurden die geschützten Catechole **31** und **35** mit einer Alkinfunktion erhalten. Die Entschützung des Alkins **31** lieferte nicht das gewünschte Produkt, das catecholbasierte Alkin **36** wurde erfolgreich synthetisiert. Das entsprechende Azid **37** konnte nicht erhalten werden. Die anschließenden kupferkatalysierten Azid-Alkin-Cycloadditionen des Alkins **36** mit Biomolekülen wie Zucker **19a**, DNA **3** und BP100-Azid **27a** wurden erfolgreich in Lösung durchgeführt.

Die Reaktion mit alkinmodifiziertem Peptoid **43** scheiterte aufgrund der sterischen Hinderung des Peptoids. Daher sollte für zukünftige Cycloadditionen ein „Spacer“-Molekül zwischen dem Peptoid und der Alkinfunktion eingebaut werden.

Bei der Reaktion der alkinmodifizierten Nanopartikel NP-**36** mit Zucker-Azid **19a** konnte aufgrund fehlender Analyse-Methoden keine eindeutige Aussage für den Erfolg der Reaktion getroffen werden.

Ein weiteres Titandioxid-DNA-Hybrid konnte erstmals durch Verwendung der kupferkatalysierten Cycloaddition von DNA **3** und alkinmodifizierten Nanopartikeln NP-**36** erhalten werden.

Durch Studien wurde gezeigt, dass die 1,3-dipolare Cycloaddition mit BP100-Azid **27a** nur abläuft, wenn die Catecholfunktionen der Alkine geschützt vorliegen. Die kupferkatalysierte Cycloaddition zwischen dem Alkin **36** und Azidocumarin **50** konnte sowohl in Lösung als

auch auf den alkinmodifizierten Titandioxid-Nanopartikeln durchgeführt werden. Dies wurde anhand von UV/Vis- und Fluoreszenz-Messungen nachgewiesen. Der „*self-reporting*“-Linker **58a**, welcher durch Fluoreszenz den erfolgreichen Verlauf der Reaktion anzeigt, wurde erfolgreich synthetisiert. Die anschließende kupferkatalysierte Cycloaddition des Cumarin-Derivats **58a** und DNA **3** führte in Lösung zum gewünschten Produkt, auf der Nanopartikel-Oberfläche war dies nicht möglich. Eine Hybridisierung der DNA **3** mit einem komplementären, fluoreszierenden Strang führte ebenfalls nicht zum gewünschten Hybrid. Zu einer kupferfreien 1,3-dipolaren Cycloaddition wurde ein catecholbasiertes Cyclooctin-Derivat **63a** synthetisiert, welches in Lösung mit DNA umgesetzt werden kann.

5.4 Triethylenglykolbasierte Linker

Um die Löslichkeit der bifunktionellen Catechol-Linker zu verbessern und somit das Arbeiten in Puffersystemen mit Biomolekülen und den Nanopartikeln zu ermöglichen, wurden Triethylenglykol-Einheiten an die Catechole gebunden und verschiedene funktionelle Gruppen eingeführt. So wurden wasserlösliche Linker mit einer Amino **73a**-, einer Maleinimid **24**- und einer Thiolfunktion **86b** hergestellt. Es war nicht möglich Azidocumarin **50** mit einer Triethylenglykol-Einheit zu synthetisieren. Das triethylenglykolmodifizierte Azid **75a** wurde im Gegensatz zum Azid **37** ohne polare Ethylenglykol-Einheit in guten Ausbeuten erhalten.

5.5 Modifikationen von trifunktionellen Linkern

Die kupferkatalysierte Cycloaddition wurde mit dem Alkin **47** unter Verwendung von Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (**90**) erfolgreich durchgeführt, auf der Titandioxid-Oberfläche war dies jedoch nicht möglich. Die freie Aminogruppe des trifunktionellen Linkers **88** wurde mit einem ATTO-Farbstoff funktionalisiert. Die Reaktion wurde ebenfalls auf Titandioxid-Nanoteilchen durchgeführt und resultierte in fluoreszierenden Nanoteilchen.

5.6 Untersuchung der TiO₂-Nanoteilchen auf deren Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies

Die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies wurde anhand der Nanopartikel, die mittels Diethylenglykol- und Hochtemperatur-Methode hergestellt wurden, untersucht. Als Vergleich dienten kommerziell erhältliche Titandioxid-Nanopartikel. Bei einer Bestrahlung mit UV-Licht bei 366 nm wurde nahezu keine ROS-Produktion bei den synthetisierten Nanopartikel detektiert. Aufgrund der geringeren Größe der Nanopartikel im Vergleich zu den kommerziellen Nanopartikeln benötigen die kleinen Nanopartikel Licht mit höherer Energie um Radikale zu produzieren. Dies wurde anhand einer Lichtquelle mit einer Wellenlänge von 254 nm untersucht, was bei allen drei Typen an Nanopartikeln zu einer erhöhten Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies führte. Die Nanopartikel, die mittels der Sol-Gel-Methode hergestellt wurden, bestehen aus Rutil, weshalb sie weniger Radikale produzieren als die Partikel, die mittels der Hochtemperatur-Methode hergestellt wurden. Eine Modifizierung mit Dopamin-Hydrochlorid (**9a**) führte bei den kleineren Nanopartikeln zur erwarteten Auslöschung der Radikalbildung. Bei den kommerziellen Nanopartikeln wurde kein Einfluss von Dopamin (**9**) detektiert. Bei den Nanostäbchen konnte, ebenso wie bei den Nanopartikeln, eine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden. Je höher die Konzentration der Nanoteilchen, umso höher war die Fluoreszenz-Intensität, die durch radikalgesteuerte Aktivität des Enzyms Meerrettichperoxidase erhalten wurde. Die Nanostäbchen wiesen eine gute Radikal-Produktion auf, am besten geeignet waren die Stäbchen, die nach acht Stunden erhalten wurden. Zudem wurde beobachtet, dass sich die Enzym-Aktivität der Titandioxid-Nanoteilchen durch die Lichtquelle kontrollieren lässt. Durch Modifikation der Nanostäbchen mit Dopamin-Hydrochlorid (**9a**) konnte die Produktion der Radikale nahezu komplett ausgelöscht werden.

5.7 Ausblick

Nachdem die Zucker **19** und **19a** an die jeweiligen Linker **15** und **35** gebunden werden konnten, wäre der nächste Schritt, eine Nachweismethode zu finden mit der sich eine Bindung an die Titandioxid-Nanopartikel bestätigen lässt. Hierzu sollte die Verwendung von fluoreszierenden Lektinen in Betracht gezogen werden, ebenso hilfreich wäre die Bestimmung der hydrodynamischen Radien im Vergleich zu den unmodifizierten Nanopartikeln.

Im Bezug auf die Peptide sollte für zukünftige Modifikationen ein Carboxyfluorescein-Farbstoff anstelle des Rhodamin-Farbstoffs untersucht werden. Zur kupferkatalysierten Cycloaddition sollte ein „Spacer“-Molekül zwischen dem Peptid und der Alkinfunktion eingebaut werden und die sterische Hinderung des Alkins zu verringern.

Des Weiteren wäre es aufschlussreich, den Effekt der Titandioxid-DNA- und Titandioxid-Peptid-Hybride auf deren Produktion der reaktiven Sauerstoffproduktion *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen.

In Bezug auf die 1,3-dipolare Cycloaddition sollte der Fokus auf die kupferfreie Cycloaddition mit dem catecholbasierten Cyclooctin **63a** gelegt werden, um diese Reaktion an der Oberfläche der Titandioxid-Nanoteilchen in Zellen zu untersuchen.

Der Ligand Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (**90**) ist aufgrund seiner Struktur ebenfalls in der Lage ist an Titandioxid zu binden. Daher sollte für die kupferkatalysierte Cycloaddition zwischen alkinmodifizierten Nanopartikeln und DNA mit einem Überschuss des kupferstabilisierenden Liganden untersucht werden. Ebenso sollte die kupferkatalysierte Cycloaddition mit DNA **3** auf den mit Farbstoff modifizierten Titandioxid-Nanopartikeln (NP-**89**) durchgeführt werden.

Durch die Bindung der unterschiedlichen Catechole an Titandioxid eröffnet sich ein neues Feld der Hybrid-Nanopartikel, welches beispielsweise die kupferfreie Cycloaddition innerhalb der Zellen ermöglichen könnte. Zudem ist die Untersuchung der ROS-Produktion der unterschiedlichen Linker ein interessanter Ansatz für die photodynamische Therapie.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeines

Präparatives Arbeiten

Bei der Durchführung von Reaktionen mit luft- und/oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden die Glasgeräte vor Verwendung ausgeheizt, mehrmals evakuiert und mit Argon belüftet. Für alle Reaktionen, die unter Argonatmosphäre durchgeführt wurden, wurde die übliche Schlenktechnik verwendet. Flüssige und gelöste Substanzen wurden mit Hilfe von Kunststoffspritzen und V2A-Stahlkanülen durch die Septumkappe überführt, für größere Substanzmengen wurden Tropftrichter benutzt, Feststoffe wurden in pulverisierter Form verwendet. Reaktionen bei 0 °C wurden mit einer Kältemischung Eis/H₂O gekühlt. Lösungsmittel wurden generell bei möglichst tiefer Temperatur (40 °C) am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Wurden Lösungsmittelgemische eingesetzt, so wurden die verwendeten Lösungsmittel einzeln volumetrisch abgemessen. Wenn nicht anders angegeben, sind Lösungen anorganischer Salze gesättigte wässrige Lösungen.

Lösungsmittel und Chemikalien

Alle technischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destillativ gereinigt. Die absoluten Lösungsmittel und die der Qualität *p.a.* (*pro analysi*), CHROMASOLV[®] sowie alle Chemikalien waren kommerziell erhältlich (Firmen: *Sigma-Aldrich, Acros Organics, Fisher Scientific, Merck, Carl Roth, Bachem, abcr, AlfaAesar*) und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Das verwendete fluoreszenzmarkierte Peptid wurde von *PANATecs GmbH* erhalten, das Peptid ohne Farbstoff und die Peptide BP100 wurden von Dr. Parvesh Wadhvani zur Verfügung gestellt. Die modifizierten BP100-Peptide wurden ebenfalls von Dr. Parvesh Wadhvani hergestellt. Die Zucker-Moleküle wurden von Dr. Christine Richter modifiziert. Die verwendeten Peptide wurden von Dr. Sidonie Vollrath und Dominik Kölmel zur Verfügung gestellt. Die Oligonukleotide wurden bei *Sigma-Aldrich, atdbio* und *Baseclick* erworben.

Analytik

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden auf folgenden Geräten aufgenommen:

- ^1H -NMR 250 MHz, ^{13}C -NMR 63 MHz: *Bruker AC 250*
 ^1H -NMR 300 MHz, ^{13}C -NMR 75 MHz: *Bruker AVANCE 300*
 ^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -NMR 101 MHz: *Bruker AVANCE 400*
 ^1H -NMR 500 MHz, ^{13}C -NMR 126 MHz: *Bruker AVANCE DRX 500*

Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen. Die erhaltenen Spektren wurden anhand charakteristischer Lösungsmittelsignale kalibriert. Die chemische Verschiebung δ ist in [ppm], die Kopplungskonstanten J in [Hz] angegeben. Charakterisierung der Signalaufspaltung: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, bs = breites Singulett, m = Multiplett, dd = Dublett vom Dublett. Die Spektren wurden nach 1. Ordnung ausgewertet. Sämtlichen Kopplungskonstanten wurden als Betrag in Hertz (Hz) angegeben. Die Multiplizität der Signalen in ^{13}C -NMR-Spektren wurde durch die DEPT-Technik (DEPT = *Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer*) bestimmt.

Massenspektrometrie (MS)

Die Proben wurden entweder mittels EI-MS (Elektronenstoß-Ionisationsmassenspektrometrie) oder FAB-MS (*fast atom bombardment mass spectrometry*) gemessen. EI- und FAB-Massenspektren wurden auf dem Gerät *Finnigan MAT 95* aufgenommen. Die MALDI-TOF-Messungen wurden an einem Auto Flex III von *Bruker* durchgeführt. Die Angabe der Molekülfragmente erfolgte als Masse/Ladungsverhältnis m/z ; die Intensität der Signale wurde in Prozent relativ zur Intensität des Basissignals (100%) angegeben.

EI-MS: Für das Molekülion wurde die Abkürzung $[\text{M}^+]$ verwendet.

FAB-MS: Für das protonierte Molekülion wurde die Abkürzung $[\text{M}+\text{H}]^+$ verwendet.

MALDI-TOF: Für das Molekülion wurde die Abkürzung $[\text{M}]$ verwendet.

Infrarotspektroskopie (IR)

Die aufgezeichneten Infrarotspektren wurden an den Geräten *Bruker* „IFS-88“ oder *Bruker* ALPHA in Form von DRIFT- oder ATR-Messungen aufgenommen. Feststoffe wurde als Reinsubstanz oder KBr-Presslinge, Öle und Flüssigkeiten als Film auf KBr vermessen. Die Lage der Absorptionsbanden ist in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ in der Einheit [cm^{-1}] angegeben.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Reinigung von DNA oder Peptiden, sowie organischer Verbindungen wurde eine analytische Hochdruckflüssigkeitschromatographie (engl. *High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC) von *Agilent* der 1200 Serie mit einem G11311A-Entgaser, einer G1311A-Pumpe, einem G1329A-Fraktionssammler, einem G1316A-Säulenofen, einem G1315D-Diodenarray- und Multiwellendetektor und einem G1321A-Fluoreszenzdetektor verwendet.

Zur Auftrennung von Peptiden sowie organischer Verbindungen wurde die Säule EC 125/4,6 Nucleodur C-18 Gravity (5 μm) von *Macherey-Nagel* verwendet. Zur Auftrennung von Oligonukleotiden wurde die Säule Zorbax Eclipse XDB C-18 (4.6·150 mm) von *Agilent* verwendet.

Flussrate: 1 mL/min

Größenausschlusschromatographie (FPLC)

Es wurde ein Äktaexplorer System von *GE Healthcare* mit einer P-900-Pumpe, einem Frac950-Autosampler und einem UV900 bzw. pH/C-900-Detektor verwendet. Für die Messungen wurde eine Superdex 200 10/300 GL Säule (13 μm) verwendet.

Flussrate: 0.2-0.5 mL/min

Laufmittel: HEPES-Puffer, pH = 7.4

Schüttler

Es wurde ein Schüttler mit Heizblock des Typs Thermomixer Comfort 5355 V2.12 der Firma *Eppendorf* eingesetzt. Die Frequenz betrug 400 rpm.

Zentrifugen

Es wurden Zentrifugen von *Eppendorf* des Typs Centrifuge 5415 R und Centrifuge 5804 R verwendet.

Dünnschichtchromatographie

Es wurden DC-Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator der Firma *Merck* (Kieselgel 60, F₂₅₄, Schichtdicke: 0.25 mm) verwendet. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzlöschung unter UV-Licht bei $\lambda = 254$ nm und bei $\lambda = 366$ nm mit einer UV-Lampe des Typs Nu-4 KL der Firma *Benda Quarzlampen GmbH*. Zur Entwicklung diente Seebach-Reagenz (2.50 % Phosphormolybdänsäure, 1.00 % Cer(IV)sulfat-Tetrahydrat, 6.00 % konz. Schwefelsäure, 90.5 % H₂O, Tauchlösung), Kaliumpermanganat-Lösung (1.00 g Kaliumpermanganat, 2.00 g Essigsäure, 5.00 g Natriumhydrogencarbonat in 100 ml H₂O, Tauchlösung) oder eine 0.2 %ige ethanolische Ninhydrin-Lösung mit anschließender Erwärmung im Heißluftstrom.

Säulenchromatographie

Die Trennungen wurden nach dem von Still^[200] erarbeiteten Verfahren mit Kieselgel 60 der Firma *Merck*, Seesand (geglüht, mit Salzsäure gereinigt) der Firma *Merck* sowie vordestillierten Lösungsmitteln durchgeführt.

Absorptions- und Emissionsspektren

Für die Aufnahme der Absorptionsspektren wurde ein Cary 300 Scan von *Varian* verwendet. Die Spektren wurden in einem Bereich von 200–800 nm aufgenommen. Soweit nicht anders angegeben, wurde H₂O als Basislinie verwendet. Die Aufnahme von Emissionsspektren erfolgte an einem Cary Eclipse von *Varian*.

Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zetapotential

Die Aufnahme der Größenverteilung und der Oberflächenladung der Nanopartikel erfolgte an einem DLS Scattering Instrument von *Malvern*. Die Messungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in H₂O durchgeführt.

Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

Die mikroskopischen Bestimmungen wurden mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops der Firma *Philips*, CM200 FEG/ST durchgeführt, das mit einer Beschleunigungsspannung von 200 kV betrieben wurde.

6.2 Synthesevorschriften und analytische Daten

6.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV1: Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 zur Synthese von TiO₂-Nanopartikeln

Diethylenglykol-Methode^[201]

Es wurden 6 mL (6.72 g, 63.3 mmol, 1.00 Äq.) Diethylenglykol auf 60 °C erhitzt und 200 µL (346 mg, 1.84 mmol, 0.03 Äq.) TiCl₄ zugetropft. Die leicht gelbe Lösung wurde auf 75 °C erhitzt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 100 µL H₂O. Die Lösung wurde für die jeweils angegebene Reaktionszeit auf 160 °C erhitzt. Über Nacht wurde bei RT gerührt, die Nanopartikel wurden mittels Zugabe von 10 mL Aceton ausgefällt und 40 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Die Reinigung der Nanopartikel erfolgte durch Zugabe von Aceton und anschließender Zentrifugation. Diese Schritte wurden dreimal wiederholt. Die Charakterisierung erfolgte mittels TEM und UV/Vis-Spektroskopie.

AAV2: Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 zur Synthese von TiO₂-Nanomaterial

Oleylamin-Methode^[63a]

Es wurden 2.85 g (10.0 mmol, 2.00 Äq.) Ölsäure (**10**) und 24.8 g (65.0 mmol, 13.0 Äq.) Oleylamin (**11**) vorgelegt und auf 230 °C erhitzt. Tropfenweise wurden 554 µL (0.958 g, 5.00 mmol, 1.00 Äq.) TiCl₄ zugegeben und bei verschiedenen Reaktionszeiten auf 270 °C erhitzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6 mL Toluol gestoppt und auf RT abgekühlt. Die weißen Nanoteilchen wurden durch Zugabe von Aceton (20 mL) ausgefällt und 20 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Die Reinigung erfolgte durch Lösen der Nanoteilchen in Toluol, Ausfällen mit EtOH und anschließender Zentrifugation. Die Waschschrte wurden dreimal wiederholt. Die Charakterisierung erfolgte mittels TEM, DLS und UV/Vis-Spektroskopie.

AAV3: Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 zur Entschützung der Catecholfunktion^[162]

Eine Lösung aus 1.00 Äq. Catechol in trockenem CHCl_3 (2 mL/1.16 mmol) wurde zu einem Gemisch aus 2 mL trockenem CHCl_3 , 25mol% TFA und 1mol% H_2O zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei RT gerührt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und dreimal mit CHCl_3 coevaporiert.

AAV4: Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 zur Synthese der Triethylenglykol basierenden Linker 67, 68, 71-73, 75, 79, 83, 84, 86, 95^[202]

Es wurden 1.20 Äq. des entsprechenden Amins in THF (5 mL /384 μmol Amin) gelöst und anschließend 1.20 Äq. HBTU, 1.20 Äq. HOBt und 3.60 Äq. DIPEA zugegeben. Es wurde für 15 min gerührt, dann erfolgte die Zugabe von 1.00 Äq. der jeweiligen Säure, das Gemisch wurde für 12 h bei RT gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1 \rightarrow 9:1).

AAV5: Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 zur Modifikation von 1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion 15

Zu 1.00 Äq. Biomolekül in H_2O (100 μL /100 μM) wurden 3.00 Äq. 1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (**15**) in 100 μL MeCN gegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC (Tabelle 44).

AAV6: Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 zur Oberflächenmodifikation von TiO_2 Nanopartikel und -stäbchen

Zu 1.00 mg TiO_2 Nanoteilchen wurden 3.00 mg Catechol zugegeben. Es wurde über Nacht bei RT geschüttelt. Die Reinigung erfolgte mittels dreimaliger Zentrifugation (jeweils 10 min bei 1200 rpm).

6.2.2 Synthese der TiO_2 -Nanopartikel - Diethylenglykol-Methode

Nach AAV1 wurden die Komponenten für 3 h, 6 h und 13 h auf 160 °C erhitzt. Es konnten TiO_2 -Nanopartikel in einer Größe zwischen 3 und 4 nm hergestellt werden.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, D_2O , δ): 3.68-3.72 (m, 4 H, $2\times\text{CH}_2$), 3.59-3.63 (m, 4 H, $2\times\text{CH}_2$).

6.2.3 Synthese der TiO₂-Nanoteilchen - Oleylamin-Methode

Nach AAV2 wurden die Komponenten für 10 min, 2.5 h, 4 h, 6 h und 8 h auf 270 °C erhitzt. Nach 10 min wurden 10 nm TiO₂-Nanopartikel erhalten, nach 2.5 h, 4 h, 6 h und 8 h konnten TiO₂-Nanostäbchen erhalten werden. Die Nanostäbchen, die nach einer Reaktionszeit von 8 h hergestellt wurden, wurden mit IR-Spektroskopie charakterisiert.

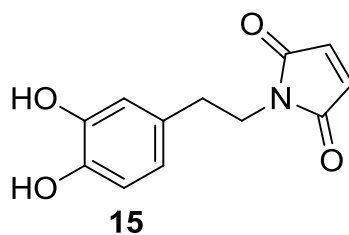
IR (KBr) $\tilde{\nu}$: 3251, 2968, 2921, 2852, 1637, 1454, 1376, 1088, 1047 cm⁻¹.

6.2.4 Synthese der TiO₂-Nanopartikeln - Ligandenfreie-Methode

Zu 20 mL H₂O wurden bei 4 °C 500 μ L TiCl₄ unter Argonatmosphäre zugetropft. Nach 2 h wurde die Lösung klar und die Partikel wurden mittels Dialyse-Membran (NaH₂PO₄, pH = 6.5) gereinigt und ausgefällt. Die entstandenen Nanopartikel wurden mittels TEM charakterisiert.

6.2.5 Synthese und Charakterisierung der catecholbasierenden Verbindungen

1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**15**)



Es wurden 1.00 g (5.27 mmol, 1.00 Äq.) Dopamin-Hydrochlorid (**9a**) in 30 mL ges. NaHCO₃-Lösung gelöst und auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren wurden 817 mg (5.27 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Methoxycarbonylmaleinimid (**16**) zugegeben. Nach 10 min wurde die Lösung durch Zugabe von 100 mL H₂O verdünnt und für 40 min bei RT gerührt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit konz. H₂SO₄ auf 2 eingestellt und dreimal mit je 50 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde

säulenchromatographisch gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH 20:1). Es wurden 798 mg (3.43 mmol, 65%) 1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**15**) in Form eines gelben Feststoffs erhalten ($R_f = 0.24$, CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD, δ): 6.74 (s, 2 H, $H_{\text{Maleinimid}}$), 6.66–6.15 (m, 3 H, H_{Ar}), 3.67–3.60 (m, 2 H, CH₂NH), 2.70 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 2 H, CH₂Ar).

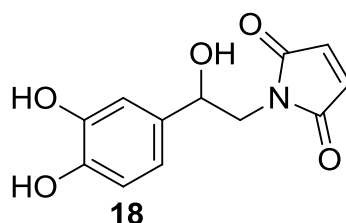
¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ): 172.4 (2×C), 146.3 (C), 145.0 (C), 134.5 (2×CH), 130.7 (C), 121.0 (C), 116.9 (C), 116.2 (C), 40.4 (CH₂), 34.7 (CH₂).

MS (FAB, 3-NBA): 234 (40) [M+H]⁺, 233 (50), 138 (80), 137 (82), 107 (22).

HR-MS ([¹²C₁₂¹H₁₁¹⁵N¹⁶O₄]⁺, FAB): ber.: 234.0766 amu; gef.: 234.0765 amu.

IR (ATR) $\tilde{\nu}$: 3457, 3105, 2952, 1683, 1605, 1516, 1456, 1443, 1408, 1351, 1321, 1302, 1282, 1261, 1193, 1166, 1137, 1107, 1058, 1028, 965, 944, 879, 821, 789, 769, 689, 643, 605, 540, 454, 400 cm⁻¹.

1-(2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-hydroxyethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**18**)^[144]



Nach Umkristallisieren aus EtOH und Et₂O wurden 512 mg (2.49 mmol, 1.00 Äq.) Norepinephrin (**17a**) in 20 mL ges. NaHCO₃-Lösung gelöst und auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren wurden 381 mg (2.49 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Methoxycarbonylmaleinimid (**16**) zugegeben. Nach 10 min wurde die Lösung durch Zugabe von 70 mL H₂O verdünnt und für 40 min bei RT gerührt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit konz. H₂SO₄ auf 2 eingestellt und dreimal mit je 30 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH 20:1). Es wurden 358 mg (1.44 mmol, 58%) 1-(2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-hydroxyethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**18**) in Form eines gelben Feststoffs erhalten ($R_f = 0.23$, CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

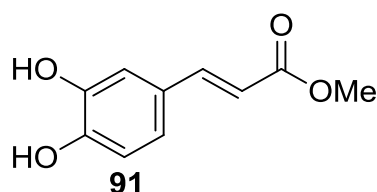
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 8.88 (s, 1 H, OH), 8.75 (s, 1 H, OH), 6.99 (s, 2 H, $H_{\text{Maleinimid}}$), 6.72 (s, 1 H, H_{Ar}), 6.63 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1 H, H_{Ar}), 6.50 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1 H, H_{Ar}), 5.34 (d, $^3J = 4.2$ Hz, 1 H, CH), 4.61–4.56 (m, 1 H, CH₂), 3.53–3.47 (m, 1 H, CH₂).

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , δ): 170.9 (C), 144.9 (C), 144.4 (C), 134.4 (CH), 133.4 (C), 116.7 (CH), 115.1 (CH), 113.2 (CH), 69.1 (CH), 45.0 (CH_2).

MS (FAB, 3-NBA): 250 (62) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 107 (22), 89 (21).

HR-MS ($[\text{C}_{12}^{12}\text{H}_{11}\text{N}^{15}\text{O}_5]^+$, FAB): ber.: 258.1130 amu; gef.: 258.1133 amu.

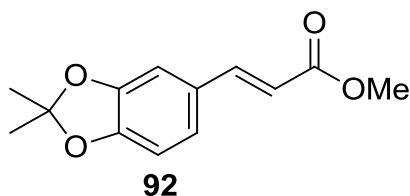
(*E*)-(3,4-Dihydroxyphenyl)propensäuremethylester (**91**)^[203]



Zu einer Lösung aus 2.00 g (11.1 mmol, 1.00 Äq.) (3,4-Dihydroxyphenyl)propensäure (**29**) in 180 mL MeOH wurden unter Argonatmosphäre 500 μL konz. H_2SO_4 gegeben. Die gelbe Lösung wurde für 2 h bei 70 °C zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der gelbe Rückstand wurde in 50 mL EtOAc gelöst und zweimal mit je 20 mL ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 20 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 20 mL ges. NaCl -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 2.00 g (10.3 mmol, 93%) (3,4-Dihydroxyphenyl)propensäuremethylester (**91**) in Form eines hellgelben Feststoffs erhalten.

^1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6 , δ): 7.48 (d, $^3J = 16.0$ Hz, 1 H, CH), 7.05–6.98 (m, 2 H, H_{Ar}), 6.76 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 1 H, H_{Ar}), 6.27 (d, $^3J = 16.0$ Hz, 1 H, CH), 3.68 (s, 3 H, CH_3).

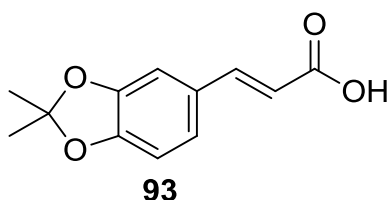
(*E*)-2-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)propensäuremethylester (**92**)^[203]



Unter Argonatmosphäre wurden zu einer Lösung aus 2.09 g (10.7 mmol, 1.00 Äq.) (3,4-Dihydroxyphenyl)propensäuremethylester (**91**) in 150 mL wasserfreiem CHCl_3 9.81 g (94.2 mmol, 8.77 Äq.) 2,2-Dimethoxypropan und 330 mg (1.74 mmol, 0.100 Äq.) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat gegeben. Es wurde für 16 h zum Sieden erhitzt. Die gelbbraune Lösung wurde mit 20 mL ges. NaHCO_3 -Lösung neutralisiert und die wässrige Phase dreimal mit je 50 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (c-Hexan/Et₂O 30:1→9:1). Es wurden 1.25 g (5.34 mmol, 50%) 2-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)propensäuremethylester (**92**) in Form eines gelben Öls erhalten ($R_f = 0.25$, c-Hexan/Et₂O 20:1).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl_3 , δ): 7.59 (d, $^3J = 15.9$ Hz, 1 H, CH), 6.98–6.94 (m, 2 H, H_{Ar}), 6.74–6.70 (m, 1 H, H_{Ar}), 6.24 (d, $^3J = 15.9$ Hz, 1 H, CH), 3.79 (s, 3 H, CH_3), 1.67 (s, 6 H, $2 \times \text{CH}_3$).

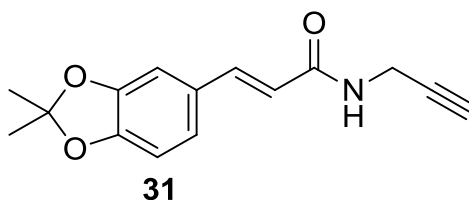
(*E*)-2-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)propensäure (**93**)^[162]



Es wurden 1.25 g (5.34 mmol, 1.00 Äq.) 2-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)propensäuremethylester (**92**) in 27 mL H_2O und 30 mL MeOH suspendiert. Anschließend wurden 260 mg (10.7 mmol, 2.00 Äq.) LiOH zugegeben. Die Suspension wurde über Nacht bei RT gerührt. Methanol wurde unter vermindertem Druck entfernt, der wässrige Rückstand mit 0.1 M HCl angesäuert (pH = 5-6), dreimal mit je 50 mL EtOAc extrahiert und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, es wurden 678 mg (3.10 mmol, 58%) 2-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)propensäure (**93**) in Form eines gelben Öls erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ): 7.69 (d, $^3J = 15.8$ Hz, 1 H, CH), 7.01–6.95 (m, 2 H, H_{Ar}), 6.73 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, H_{Ar}), 6.25 (d, $^3J = 15.8$ Hz, 1 H, CH), 1.70 (s, 6 H, $2 \times \text{CH}_3$).

(*E*)-3-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)acrylamid (**31**)^[181]



Es wurden 680 mg (3.09 mmol, 1.00 Äq.) 2-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)propensäure (**93**) in 10 mL DMF gelöst. Zur orangenen Lösung wurden 710 mg (3.71 mmol, 1.20 Äq.) EDC·HCl, 210 mg (1.55 mmol, 0.50 Äq.) HOBt und 200 µL (170 mg, 3.09 mmol, 1.00 Äq.) Propargylamin zugegeben. Das Gemisch wurde 2 d bei RT gerührt und der vollständige Umsatz der Reaktion mittels DC (c-Hexan/EtOAc 1:1) überprüft. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (c-Hexan/EtOAc 3:1→1:1). Es wurden 704 mg (2.75 mmol, 89%) (*E*)-3-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)acrylamid (**31**) in Form eines hellgelben Feststoffes erhalten ($R_f = 0.34$, c-Hexan/EtOAc 1:1).

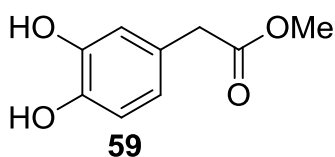
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 7.56 (d, ³*J* = 15.5 Hz, 1 H, *CH*), 6.96–6.89 (m, 2 H, *H*_{Ar}), 6.71 (d, ³*J* = 7.9 Hz, 1 H, *H*_{Ar}), 6.18 (d, ³*J* = 15.5 Hz, 1 H, *CH*), 5.71 (bs, 1 H, *NH*), 4.20–4.11 (m, 2 H, *CH*₂), 2.27–2.23 (m, 1 H, *CH*), 1.69 (s, 6 H, 2×*CH*₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 159.4 (C), 143.0 (C), 141.9 (C), 127.8 (CH), 125.2 (CH), 123.6 (C), 118.3 (CH), 117.1 (CH), 110.8.1 (CH), 108.3 (CH), 106.1 (CH), 71.6 (CH), 55.8 (CH), 29.3 (CH₂), 25.8 (CH₃), 25.5 (CH₃).

MS (FAB, 3-NBA): 259 (22) [M+H]⁺, 258 (100) [M]⁺, 203 (31).

HR-MS ([¹²C₁₅¹H₁₆²⁹N¹⁶O₃]⁺, FAB): ber.: 258.1130 amu; gef.: 258.1128 amu.

(3,4-Dihydroxyphenyl)essigsäuremethylester (**59**)^[203]

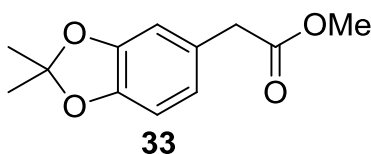


Zu einer Lösung aus 1.50 g (8.93 mmol, 1.00 Äq.) (3,4-Dihydroxyphenyl)essigsäure (**32**) in 150 mL MeOH wurden 500 µL konzentrierte H₂SO₄ gegeben. Die farblose Lösung wurde für

2 h zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der gelbliche Rückstand in 50 mL EtOAc gelöst. Die Lösung wurde dreimal mit je 20 mL ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen und die wässrige Phase dreimal mit je 20 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 1.63 g (8.93 mmol, quant.) (3,4-Dihydroxyphenyl)essigsäuremethylester (**59**) in Form eines gelben Öls erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.^[203]

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ): 6.78–6.75 (m, 2 H, H_{Ar}), 6.68–6.64 (dd, ³J = 2.0 Hz, 1 H, H_{Ar}), 5.75 (bs, 2 H, OH), 3.71 (s, 3 H, CH₃), 3.52 (s, 2 H, CH₂).

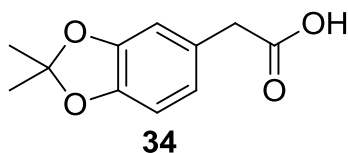
2-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)essigsäuremethylester (**33**)^[203]



Unter Argonatmosphäre wurden 1.67 g (9.17 mmol, 1.00 Äq.) (3,4-Dihydroxyphenyl)essigsäuremethylester (**59**) in 150 mL wasserfreiem CHCl₃ gelöst. 8.37 g (80.4 mmol, 8.77 Äq.) 2,2-Dimethoxypropan und 280 mg (1.48 mmol, 0.100 Äq.) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat wurden zugegeben und für 16 h zum Sieden erhitzt. Die rotbraune Lösung wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung neutralisiert und die wässrige Phase dreimal mit je 50 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (c-Hexan/Et₂O 30:1→9:1). Es wurden 1.47 g (6.62 mmol, 72%) 2-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)essigsäuremethylester (**33**) in Form eines gelben Öls erhalten (R_f = 0.26, c-Hexan/Et₂O 20:1). Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.^[203]

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ): 6.69–6.66 (m, 3 H, H_{Ar}), 3.69 (s, 3 H, CH₃), 3.52 (s, 2 H, CH₂), 1.66 (s, 6 H, 2×CH₃).

2-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)essigsäure (**34**)^[162]



Es wurden 1.47 g (6.62 mmol, 1.00 Äq.) 2-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)essigsäuremethylester (**33**) in 27 mL H₂O und 30 mL MeOH gelöst. Anschließend wurden 320 mg (13.2 mmol, 2.00 Äq.) LiOH zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Methanol wurde unter vermindertem Druck entfernt, der wässrige Rückstand mit 0.1 M HCl angesäuert (pH = 5-6), dreimal mit je 50 mL EtOAc extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 1.26 g (5.78 mmol, 87%) 2-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)essigsäure (**34**) in Form eines gelben Öls erhalten.

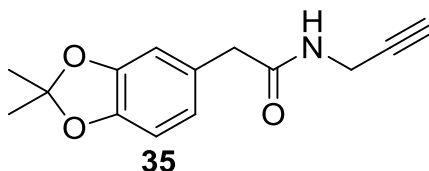
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 6.68–6.65 (m, 3 H, *H*_{Ar}), 3.54 (s, 2 H, CH₂), 1.66 (s, 6 H, 2×CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆, δ): 172.8, 146.6, 145.4, 127.9, 121.7, 117.6, 109.5, 107.6, 40.1, 25.4 (2×C).

MS (EI): 222 (58), 208 (26) [M]⁺, 207 (100) [M], 193 (28).

HR-MS ([¹²C₁₁¹H₁₂¹⁶O₄], EI): ber.: 208.0736 amu; gef.: 208.0739 amu.

2-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)acetamid (**35**)^[181]



Es wurden 1.26 g (5.78 mmol, 1.00 Äq.) 2-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)essigsäure (**34**) in 10 mL DMF gelöst. Zur orangenen Lösung wurden 1.33 g (6.93 mmol, 1.20 Äq.) EDC·HCl, 390 mg (2.90 mmol, 0.500 Äq.) HOBt und 370 µL (320 mg, 5.78 mmol, 1.00 Äq.) Propargylamin **30** zugegeben. Die Mischung wurde 2 d bei RT gerührt und der vollständige Umsatz der Reaktion mittels DC (c-Hexan/EtOAc 1:1) überprüft. Nach

Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (c-Hexan/EtOAc 5:2→1:1). Es wurden 1.26 g (5.15 mmol, 89%) 2-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)acetamid (**35**) in Form eines hellgelben Feststoffs erhalten ($R_f = 0.25$, c-Hexan/EtOAc 1:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6 , δ): 8.41 (bs, 1 H, *NH*), 6.73–6.61 (m, 3 H, H_{Ar}), 3.85–3.82 (m, 2 H, NHCH_2), 3.33 (s, 2 H, ArCH_2), 3.11–3.10 (m, 1 H, *CH*), 1.61 (s, 6 H, $2\times\text{CH}_3$).

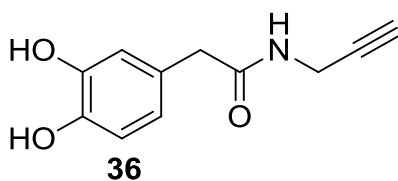
$^{13}\text{C-NMR}$ (60 MHz, DMSO- d_6 , δ): 169.9, 146.6, 145.4, 128.9, 121.3, 117.4, 109.1, 107.6, 81.1, 72.9, 41.5, 27.9, 25.5 ($2\times\text{C}$).

MS (FAB, 3-NBA): 246 (51) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 154 (100), 137 (62).

HR-MS ($^{12}\text{C}_{14}^1\text{H}_{16}^{15}\text{N}^{16}\text{O}_3^+$, FAB): ber.: 246.1130 amu; gef.: 246.1131 amu.

IR (ATR) $\tilde{\nu}$: 3281, 3251, 3066, 2999, 2939, 1667, 1644, 1547, 1493, 1414, 1380, 1367, 1337, 1280, 1222, 1160, 1114, 1070, 1022, 978 948, 920, 883, 870, 856, 834, 816, 778 cm^{-1} .

2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)acetamid (**36**)



Nach AAV3 wurden unter Argonatmosphäre 7 mL entgastes CHCl_3 , 2.37 mL TFA und 95.0 μL H_2O zu einer Lösung aus 100 mg (408 μmol , 1.00 Äq.) 2-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)acetamid (**35**) in 7 mL entgastem CHCl_3 gegeben. Es wurden 88.6 mg (408 μmol , quant.) 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)acetamid (**36**) in Form eines orangenen Öls erhalten.

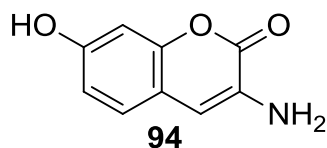
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6 , δ): 8.62 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2 H, H_{Ar}), 6.47 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 1 H, H_{Ar}), 3.84–3.81 (m, 2 H, NHCH_2), 3.20 (s, 2 H, ArCH_2), 3.10–3.08 (m, 1 H, *CH*).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6 , δ): 170.4 (C), 144.8 (C), 143.7 (C), 126.7 (C), 119.7 (C), 116.3 (C), 115.2 (C), 81.2 (C), 72.9 (CH), 41.4 (CH_2), 27.9 (CH_2).

MS (FAB, 3-NBA): 137 (62), 154 (99), 246 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 163 (82), 123 (22),

HR-MS ($^{12}\text{C}_{11}^1\text{H}_{13}^{15}\text{N}^{16}\text{O}_3^+$, FAB): ber.: 246.1130 amu; gef.: 246.1131 amu.

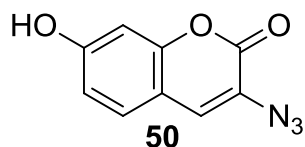
IR (ATR) $\tilde{\nu}$: 3281, 2971, 2463, 2123, 1630, 1599, 1514, 1439, 1346, 1279, 1195, 1151, 1116, 1025, 965, 873, 819, 794, 645, 454 cm^{-1} .

3-Amino-7-hydroxycumarin (**94**)^[170]

Es wurden 2.76 g (20 mmol, 1.00 Äq.) 2,4-Dihydroxybenzaldehyd (**52**), 2.34 g (20 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Acetylglycin (**53**) und 5.22 g (20 mmol, 1.00 Äq.) wasserfreies Natriumacetat in 100 mL Essigsäureanhydrid suspendiert und für 4 h bei 145 °C zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde die braune Lösung auf 100 mL Eis gegeben und über Nacht bei 5 °C stehen gelassen. Das geschützte Zwischenprodukt **54** wurde filtriert, es wurden 20 mL konzentrierter HCl und 10 mL Ethanol zum Rückstand gegeben und für 1 h bei 85 °C zum Sieden erhitzt. Nach Abfiltrieren und waschen mit H₂O wurden 2.20 g (12.4 mmol, 62%) 3-Amino-7-hydroxycumarin (**94**) in Form eines braunen Feststoffs erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆, δ): 7.41–7.37 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 1 H, *H*_{Ar}), 7.23 (s, 1 H, *H*_{Ar}), 6.79–6.73 (m, 2 H, *H*_{Ar}), 6.37 (bs, 2 H, NH₂).

MS (FAB, 3-NBA): 178 (42) [M+H]⁺, 155 (26), 107 (22).

3-Azido-7-hydroxycumarin (**50**)^[170]

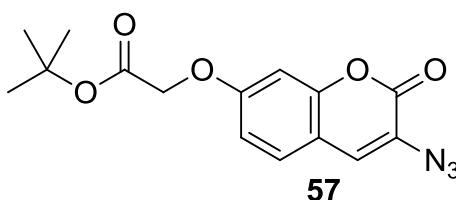
Es wurden 2.76 g (20.0 mmol, 1.00 Äq.) 2,4-Dihydroxybenzaldehyd (**52**), 2.34 g (20.0 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Acetylglycin (**53**) und 5.22 g (20.0 mmol, 1.00 Äq.) trockenes Natriumacetat in 100 mL Essigsäureanhydrid suspendiert und für 6 h zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das diacylierte Zwischenprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Heptan/EtOAc 1:1). Es wurden 3.10 g (15.2 mmol, 76%) 3-Acetamido-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl-acetat (**54**) in Form eines gelben Feststoffes erhalten (*R*_f = 0.35, Heptan/EtOAc 1:1).

Das Zwischenprodukt wurde in 20 mL konzentrierter HCl und 10 mL Ethanol für 1 h zum Sieden erhitzt. Nach Zugabe von 40 g Eis wurde die Suspension auf 0 °C gekühlt und 2.76 g (40 mmol, 1.00 Äq.) Natriumnitrit zugegeben. Nach 15 min wurden portionsweise 3.90 g (60 mmol, 1.50 Äq.) Natriumazid zugegeben und für weitere 20 min gerührt. Das Produkt wurde filtriert und mit mehrmals mit je 100 mL H₂O gewaschen. Es wurden 2.18 g (7.40 mmol, 37%) 3-Azido-7-hydroxycumarin (**50**) in Form eines braunen Feststoffes erhalten ($R_f = 0.45$, Heptan/EtOAc 1:2). Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆, δ): 10.5 (s, 1 H, OH), 7.60 (s, 1 H, H_{Ar}), 7.50–7.46 (m, 1 H, H_{Ar}), 6.83–6.76 (m, 2 H, H_{Ar}).

MS (ED): 203 (30) [M^+], 177 (30), 175 (25), 147 (100), 131 (21), 130 (26), 119 (60), 76 (21).

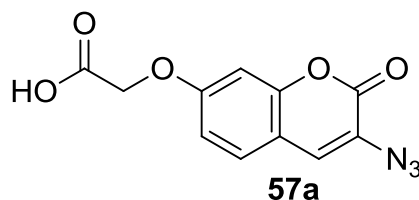
3-Azido-7-(*tert*-butylcarboxymethoxy)chromen-2-on (**57**)^[170]



Es wurden 190 mg (440 μ mol, 1.00 Äq.) 3-Azido-7-hydroxycumarin (**50**) in 5 mL trockenem DMF unter Argonatmosphäre gelöst und 61.2 mg (440 μ mol, 1.00 Äq.) K₂CO₃ zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 min bei RT gerührt und 138 μ L (86.4 mg, 443 μ mol, 1.00 Äq.) Bromessigsäure-*tert*-butylester (**56**) wurden zugetropft. Die Reaktion wurde für 3 h auf 40 °C erhitzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Heptan/EtOAc 1:1). Es wurden 109 mg (420 μ mol, 95%) 3-Azido-7-(*tert*-butylcarboxymethoxy)chromen-2-on (**57**) in Form eines gelben Feststoffes erhalten ($R_f = 0.70$, Heptan/EtOAc 1:1).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ): 7.54 (d, ³ $J = 8.55$, 1 H, H_{Ar}), 6.99–6.92 (m, 3 H, H_{Ar}), 4.78 (s, 2 H, CH₂), 1.43 (s, 9 H, 3×CH₃).

2-((3-Azido-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)essigsäure (**57a**)^[171]



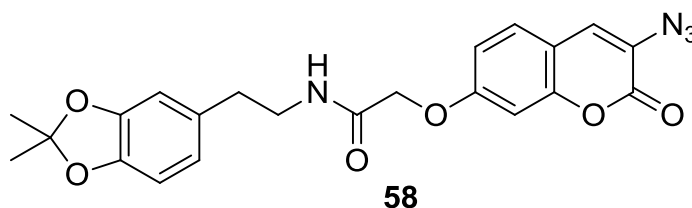
Es wurden 179 mg (564 μmol) 3-Azido-7-(*tert*-butylcarboxymethoxy)chromen-2-on (**57**) in 15.5 mL CH_2Cl_2 gelöst und 6.60 mL TFA zugegeben. Nach 1 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 90.0 mg (345 μmol , 61%) 2-((3-Azido-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)essigsäure (**57a**) in Form eines gelben Feststoffs erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ): 7.36–7.33 (m, 1 H, H_{Ar}), 6.92 (s, 1 H, H_{Ar}), 6.89–6.81 (m, 2 H, H_{Ar}), 4.63 (s, 2 H, CH_2).

MS (FAB, 3-NBA): 279 (42), 273 (42), 270 (38), 262 (64) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 259 (42), 253 (30).

IR (ATR) $\tilde{\nu}$: 2919, 2128, 1724, 1617, 1507, 1425, 1379, 1327, 1247, 1148, 1060, 979, 909, 842, 808, 782, 757, 678, 616, 597, 582, 562, 518, 438, 409 cm^{-1} .

2-((3-Azido-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)-*N*-(2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)acetamid (**58**)^[171]



Es wurden 154 mg (580 μmol , 1.00 Äq.) 2-((3-Azido-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)essigsäure (**57a**), 79.0 mg (409 μmol , 0.700 Äq.) 2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethanamin (**40**) und 125 mg (1.23 mmol, 2.08 Äq.) 4-DMAP unter Argonatmosphäre in 3 mL trockenem CHCl_3 gelöst und auf 0 °C gekühlt. Daraufhin wurden 120 mg (626 μmol , 1.06 Äq.) EDC·HCl zugegeben und für 3 d bei RT gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1→9:1). Es wurden 78.0 mg (179 μmol , 30%) 2-((3-Azido-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)-*N*-(2-(2,2-dimethylbenzo-

[d][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)acetamid (**58**) in Form eines braunen Feststoffs erhalten ($R_f = 0.31$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ): 7.38–7.25 (m, 1 H, H_{Ar}), 6.98–6.94 (m, 2 H, H_{Ar}), 6.85–6.55 (m, 4 H, H_{Ar}), 4.61 (s, 2 H, CH_2O), 3.63 (t, $^3J = 6.6$ Hz, 2 H, CH_2NH), 2.83 (t, $^3J = 6.6$ Hz, 2 H, ArCH_2), 1.75 (s, 6 H, $2 \times \text{CH}_3$).

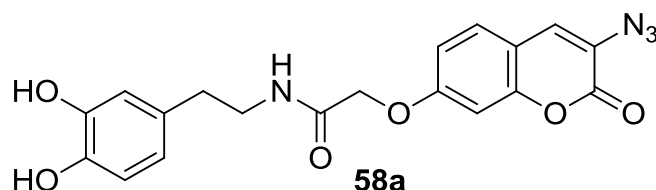
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6 , δ): 166.9 (C), 162.5 (CH), 158.9 (CH), 157.3 (CH), 152.6 (CH), 147.6 (CH), 131.4 (CH), 129.7 (CH), 128.5 (CH), 125.8 (CH), 124.1 (CH), 121.2 (CH), 117.9 (CH), 112.6 (CH), 108.8 (CH), 102.3 (CH), 67.5 (CH), 66.9 (CH_2), 41.2 (CH_2), 36.4 (CH_2), 30.9 ($2 \times \text{CH}_3$).

MS (FAB, 3-NBA): 437 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 421 (32), 409 (90), 394 (30), 380 (82), 371 (78), 369 (50), 341 (36), 340 (42), 325 (38), 313 (46), 390 (36).

HR-MS ($[\text{C}_{22}^{12}\text{H}_{23}^{15}\text{N}_4^{16}\text{O}_6]^+$, FAB): ber.: 437.1461 amu; gef.: 437.1466 amu.

IR (ATR) $\tilde{\nu}$: 3388, 3066, 2988, 2930, 2122, 1716, 1673, 1615, 1540, 1493, 1433, 1375, 1326, 1250, 1229, 1141, 1119, 1055, 1037, 978, 939, 906, 834, 807, 785, 758, 734, 700, 658 cm^{-1} .

2-((3-Azido-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)-*N*-(3,4-dihydroxyphenethyl)acetamid (**58a**)



Nach AAV3 wurden unter Argonatmosphäre 3 mL entgastes CHCl_3 , 625 μL TFA und 25 μL H_2O zu einer Lösung aus 83.0 mg (190 μmol , 1.00 Äq.) 2-((3-Azido-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)-*N*-(2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)acetamid (**58**) in 3 mL entgastem CHCl_3 gegeben. Es wurden 85.0 mg (190 μmol , quant.) 2-((3-Azido-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)-*N*-(3,4-dihydroxyphenethyl)acetamid (**58a**) in Form eines braun-grünen Feststoffs erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$, δ): 7.43 (s, 1 H, H_{Ar}), 7.40–7.36 (m, 1 H, H_{Ar}), 6.88–6.82 (m, 2 H, H_{Ar}), 6.69–6.61 (m, 2 H, H_{Ar}), 6.50–6.43 (m, 1 H, H_{Ar}), 4.49 (s, 2 H, CH_2O), 3.47 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 2 H, CH_2NH), 2.67 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 2 H, ArCH_2).

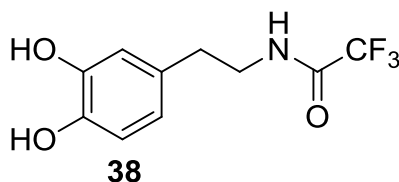
^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$, δ): 170.9 (C), 162.1 (C), 160.8 (C), 155.5 (C), 147.7 (C), 146.2 (C), 133.1 (C), 131.5 (C), 129.5 (C), 126.8 (CH), 122.9 (CH), 118.3 (CH), 118.1 (CH), 116.7 (CH), 115.9 (CH), 104.9 (CH), 70.1 (CH_2), 43.2 (CH_2), 37.3 (CH_2).

MS (FAB, 3-NBA): 420 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 397 (82) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 380 (38), 369 (50), 368 (60), 357 (44).

HR-MS ($^{12}\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_6^+$, FAB): ber.: 397.1148 amu; gef.: 397.1146 amu.

IR (ATR) $\tilde{\nu}$: 3365, 2917, 2849, 2105, 1781, 1740, 1647, 1605, 1558, 1508, 1430, 1377, 1353, 1328, 1276, 1249, 1163, 1137, 1058, 103, 951, 888, 870, 834, 806, 758, 701, 670, 631, 597, 563, 509, 460, 435 cm^{-1} .

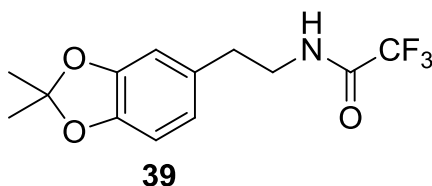
N-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-2,2,2-trifluoracetamid (**38**)^[162]



Eine Lösung aus 5.00 g (26.4 mmol, 1.00 Äq.) Dopamin-Hydrochlorid (**9a**) in 60 mL Methanol wurde 30 min mit Argon entgast und mit 730 μL (108 mmol, 4.11 Äq.) Triethylamin und 15.0 mL (54.1 mmol, 2.05 Äq.) Methyltrifluoacetat versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit 1 M HCl-Lösung auf pH = 1 eingestellt und dreimal mit je 50 mL EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit 50 mL H_2O gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 6.49 g (26.1 mmol, 99%) *N*-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (**38**) in Form eines weißen Feststoffs erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[162]

^1H -NMR (250 MHz, DMSO-d_6 , δ): 9.43 (bs, 1 H, NH), 8.75 (bs, 2 H, OH), 6.62 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1 H, H_{Ar}), 6.56 (d, $^4J = 2.0$ Hz, 1 H, H_{Ar}), 6.41 (dd, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, 1 H, H_{Ar}), 3.29 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2.58 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$).

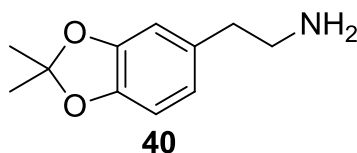
N-(2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)-2,2,2-trifluoracetamid (**39**)^[162]



Eine Lösung aus 6.32 g (25.4 mmol, 1.00 Äq.) *N*-(3,4-Dihydroxy-phenethyl)-2,2,2-trifluoracetamid (**38**) in 200 mL Benzol wurde mit 12.4 mL (101 mmol, 3.98 Äq.) 2,2-Dimethoxypropan versetzt. An den Kolben mit der Reaktionsmischung wurde eine Soxhlet-Extraktionsapparatur angebracht; die Extraktionshülse wurde mit ca. 28.0 g Calciumchlorid befüllt. Nach Entgasen wurde die Mischung 5 min unter Rückfluss zum Sieden erhitzt und 217 mg (1.14 mmol, 4.5 mol%) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen wurde die Lösung über eine Säule, gefüllt mit Kieselgel, filtriert und mehrmals mit CH₂Cl₂ nachgespült. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der hellbraune Feststoff wurde aus CH₂Cl₂/c-Hexan umkristallisiert. Es wurden 5.86 mg (20.3 mmol, 80%) *N*-(2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)-2,2,2-trifluoracetamid (**39**) in Form eines weißen Feststoffs erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ): 6.66 (s, 1 H, *H*_{Ar}), 6.58–6.56 (m, 2 H, *H*_{Ar}), 6.26 (bs, 1 H, NH), 3.57 (q, ³*J* = 6.7 Hz, 2 H, CH₂CH₂NH), 2.78 (t, ³*J* = 6.7 Hz, 2 H, CH₂CH₂NH), 1.67 (s, 6 H, 2×CH₃).

2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethanamin (**40**)^[162]

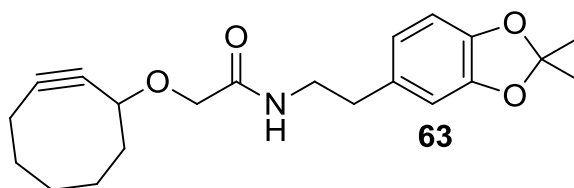


Zu einer Lösung aus 5.86 g (20.3 mmol, 1.00 Äq.) *N*-(2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)-2,2,2-trifluoracetamid (**39**) in 180 mL THF wurde eine Lösung aus 960 mg (40.1 mmol, 1.98 Äq.) Lithiumhydroxid in 60 mL H₂O zugegeben. Die Reaktionsmischung

wurde über Nacht bei RT gerührt. Das organische Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die wässrige Phase wurde mit 1 M HCl-Lösung bis zu einem pH-Wert von 2 – 3 angesäuert, mit 50 mL CH₂Cl₂ gewaschen, mit ges. NaHCO₃-Lösung auf pH = 8 eingestellt und dreimal mit je 50 mL EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde dreimal mit je 50 mL H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 3.63 g (18.9 mmol, 93%) 2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethanamin (**40**) in Form eines braunen Feststoffs erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[162]

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ): 6.67–6.58 (m, 3 H, *H*_{Ar}), 3.11 (t, ³*J* = 7.3 Hz, 2 H, CH₂CH₂NH), 2.85 (t, ³*J* = 7.3 Hz, 2 H, CH₂CH₂NH), 1.65 (s, 6 H, 2×CH₃).

2-(Cyclooctin-1-yloxy)-*N*-(2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)-acetamid (**63**)



Es wurden 49.0 mg (269 μmol, 1.00 Äq) 2-(Cyclooct-2-in-1-yloxy)essigsäure (**62**) in 2 mL trockenem DMF gelöst. Zu der farblosen Lösung wurden 10.8 μL (538 μmol, 2.00 Äq) DIPEA und 23.4 mg (538 μmol, 2.00 Äq) HBTU zugegeben und für 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 71.4 mg (369 μmol, 1.40 Äq.) 2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethanamin (**40**) zugegeben und für 2 d bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH 20:1). Es wurden 34.0 mg (94.2 μmol, 35%) 2-(Cyclooctin-1-yloxy)-*N*-(2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)-acetamid (**63**) in Form eines braunen Öls erhalten (*R*_f = 0.89, CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ): 6.67–6.54 (m, 3 H, *H*_{Ar}), 4.21–3.79 (m, 2 H, CH₂, *H*_{Cyclooctin}), 3.53–3.44 (m, 2 H, CH₂), 2.72 (t, ³*J* = 6.9 Hz, 2 H, CH₂), 2.22–1.84 (m, 11 H, *H*_{Cyclooctin}), 1.66 (s, 6×CH₃).

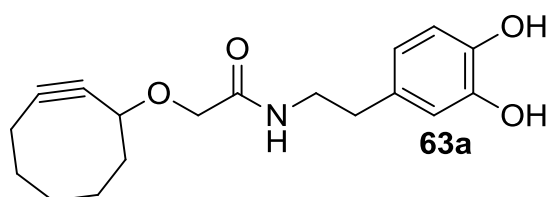
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 169.4 (C), 147.6 (C), 146.0 (C), 131.8 (C), 121.0 (C), 117.7 (CH), 108.9 (CH), 108.1 (CH), 101.6 (CH), 91.2 (CH₂), 73.0 (CH₂), 68.4 (CH₂), 42.1 (CH₂),

40.0 (CH₂), 35.4 (CH₂), 34.2 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 26.1 (CH₂), 25.8 (CH₃), 20.6 (CH₂).

MS (FAB, 3-NBA): 358 (100) [M+H]⁺, 275 (28), 251 (62), 228 (30), 214 (36), 205 (38).

HR-MS ([¹²C₂₁¹H₂₈¹⁵N¹⁶O₄⁺], FAB): ber.: 358.2018 amu; gef.: 358.2015 amu.

2-(Cyclooctin-1-yloxy)-*N*-(3,4-dihydroxyphenethyl)acetamid (**63a**)



Es wurden 19.4 mg (106 μmol, 1.00 Äq) 2-(Cyclooctin-1-yloxy)essigsäure (**62**) in 1 mL trockenem DMF gelöst. Zu der farblosen Lösung wurden 4.28 μL (21.3 μmol, 0.200 Äq) DIPEA und 9.26 mg (21.3 μmol, 0.200 Äq) HBTU zugegeben und für 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 27.7 mg (149 μmol, 1.40 Äq.) Dopamin-Hydrochlorid (**9a**) zugegeben und für 18 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH 20:1). Es wurden 6.00 mg (18.9 μmol, 18%) 2-(Cyclooctin-1-yloxy)-*N*-(3,4-dihydroxyphenethyl)acetamid (**63a**) in Form eines braunen Feststoffs erhalten (R_f = 0.35, CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

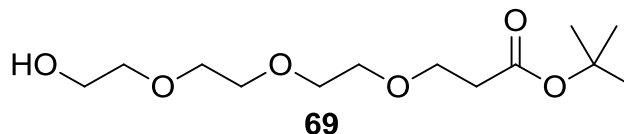
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ): 6.81–6.57 (m, 3 H, H_{Ar}), 2.72–2.63 (m, 2 H, CH₂), 3.53–3.44 (m, 2 H, CH₂), 2.24–1.90 (m, 5 H, 2×CH₂, 1×CH), 1.86–1.66 (s, 8×CH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 170.0 (C), 143.3 (C), 130.7 (C), 120.1 (C), 115.6 (C), 115.3 (C), 101.8 (CH), 91.2 (CH), 73.2 (CH), 68.2 (CH), 42.1 (CH₂), 40.9 (CH₂), 34.9 (CH₂), 34.2 (CH₂), 33.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 26.1 (CH₂), 20.7 (CH₂).

MS (FAB, 3-NBA): 317 (40) [M+H]⁺, 212 (40), 153 (50), 137 (70), 135 (100), 106 (80), 90.9 (82).

HR-MS ([¹²C₁₈¹H₂₄¹⁵N¹⁶O₄⁺], FAB): ber.: 318.1705 amu; gef.: 318.1703 amu.

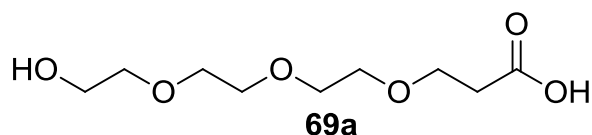
6.2.6 Synthese und Charakterisierung der triethylenglykolbasierten Linker

3-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure-*tert*-butylester (**69**)^[204]

Zu einer Lösung aus 1.00 g (6.66 mmol, 1.00 Äq.) 2,2'-(Ethylendioxy)diethanol (**64**) in 10 mL trockenem THF wurden 15.2 mg (666 μ mol, 0.100 Äq.) Natrium zugegeben. Nachdem sich das Natrium vollständig gelöst hat, wurden 341 μ L (99 mg, 2.33 mmol, 0.350 Äq.) *tert*-Butylacrylat zur Mischung gegeben. Die Lösung wurde anschließend für weitere 20 h gerührt und anschließend durch Zugabe von 1 M HCl neutralisiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels bei vermindertem Druck wurde der Rückstand in 50 mL ges. NaCl-Lösung aufgenommen und dreimal mit je 20 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 20 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 160 mg (575 μ mol, 9%) 3-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure-*tert*-butylester (**69**) in Form eines gelben Öls erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[204]

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ): 4.10–4.02 (m, 2 H, CH_2OH), 3.72–3.38 (m, 8 H, CH_2O), 2.31 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 6 H), 1.41 (s, 9 H, $3 \times \text{CH}_3$).

MS (FAB, 3-NBA): 279 (25) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 222 (90), 204 (59), 153 (37), 135 (39), 116 (31), 98 (100).

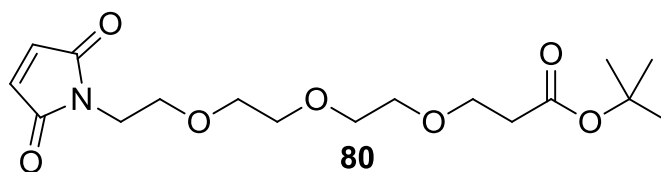
3-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure (**69a**)^[204]

Es wurden 160 mg (575 μ mol, 1.00 Äq.) 3-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure-*tert*-butylester (**69**) in 1 mL CH_2Cl_2 gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der farblosen Lösung wurde 1.00 mL TFA zugetropft und für 2 h bei RT gerührt. Das

Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und dreimal mit je 50 mL CH₂Cl₂ coevaporiert. Es wurden 127 mg (575 μmol, quant.) 3-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure (**69a**) in Form eines braunen Öls erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.^[204]

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ): 4.48–4.45 (m, 2 H, CH₂OH), 3.81–3.74 (m, 6 H, H_{TEG}), 3.68–3.65 (m, 6 H, H_{TEG}), 2.63 (t, ³J = 6.2 Hz, 2 H, CH₂COOH).

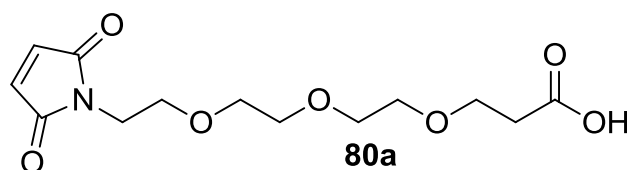
3-(2-(2-(2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure-*tert*-butylester (**80**)^[205]



Zu einer Lösung aus 500 mg (1.80 mmol, 1.00 Äq.) 3-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure-*tert*-butylester (**64**) in 3 mL THF wurden unter Argonatmosphäre 518 mg (1.98 mmol, 1.10 Äq.) PPh₃, 194 mg (1.99 mmol, 1.11 Äq.) Maleinimid und 440 mg (2.17 mmol, 1.21 Äq.) DIAD zugegeben. Die schwarze Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (c-Hexan/EtOAc 5:1→3:1). Es wurden 214 mg (594 μmol, 33%) 3-(2-(2-(2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure-*tert*-butylester (**80**) in Form eines hellgelben Öls erhalten (R_f = 0.20, c-Hexan/EtOAc 3:1). Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.^[205]

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ): 6.68 (s, 2 H, H_{Mal}), 3.70–3.57 (m, 14 H, H_{TEG}), 2.50 (t, ³J = 6.6 Hz, 2 H, CH₂CO), 1.42 (s, 9 H, 3×CH₃).

3-(2-(2-(2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure (**80a**)^[206]

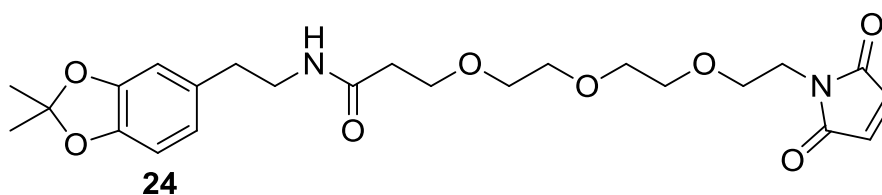


Zu einer Lösung aus 640 mg (1.79 mmol) 3-(2-(2-(2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure-*tert*-butylester (**80**) in 9 mL CH₂Cl₂ wurden bei 0 °C 9 mL TFA zugegeben und für 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und dreimal mit 20 mL CH₂Cl₂ coevaporiert. Es wurden 539 mg (1.79 mmol, quant.) 3-(2-(2-(2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure (**80a**) in Form eines braunen Öls erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.^[206]

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ): 6.71 (s, 2 H, *H*_{Mal}), 3.79–3.61 (m, 14 H, *H*_{TEG}), 2.65 (t, ³*J* = 6.2 Hz, 2 H, CH₂CO).

MS (FAB, 3-NBA): 302 (40) [M+H]⁺, 135 (56), 109 (60), 95 (98), 83 (30), 82 (72).

N-(2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)-3-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)propanamid (**24**)



Zu einer Lösung aus 23.1 mg (121 μmol, 1.00 Äq.) 2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethanamin (**40**), 55.0 mg (183 μmol, 1.50 Äq.) 3-(2-(2-(2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)-ethoxy)propansäure (**80a**) und 50.7 μL (365 μmol, 3.00 Äq.) Triethylamin in 3 mL DMF wurden 46.8 mg (183 μmol, 1.50 Äq.) Mukaiyama-Reagenz **81** zugegeben. Die gelbe Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurden 25.9 mg (54.5 μmol, 45%) *N*-(2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)-3-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-

2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-ethoxy)ethoxy)ethoxy)propanamid (**24**) in Form eines braunen Feststoffes erhalten.

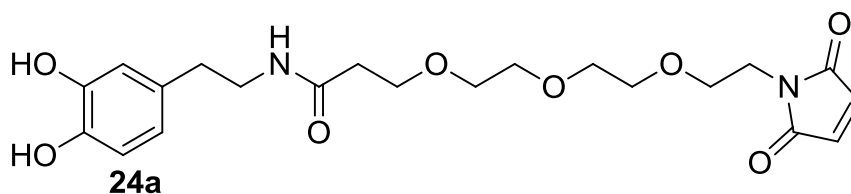
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ): 6.63–6.51 (m, 5 H, *H*_{Ar}, *H*_{Mal}), 3.52–3.74 (m, 14 H, 7×CH₂), 3.42 (t, ³*J* = 7.1 Hz, 2 H, CH₂), 2.72 (t, ³*J* = 5.8 Hz, 2 H, CH₂), 2.41 (t, ³*J* = 5.8 Hz, 2 H, CH₂), 1.62 (s, 6 H, 2×CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 171.5 (C), 170.4 (2×C), 147.3 (C), 145.7 (C), 133.9 (2×CH), 132.0 (C), 120.7 (C), 117.4 (C), 108.7 (C), 107.8 (C), 70.2 (CH₂), 70.1 (CH₂), 69.9 (CH₂), 69.8 (CH₂), 67.6 (CH₂), 67.0 (CH₂), 40.5 (CH₂), 38.3 (CH₂), 36.8 (CH₂), 35.1 (CH₂), 25.6 (2×CH₃).

MS (FAB, 3-NBA): 670 (60), 564 (82), 562 (100), 532 (77), 477 (58) [M+H]⁺, 464 (77), 397 (52).

HR-MS ([¹²C₂₄¹H₃₃¹⁵N₂¹⁶O₈]⁺, FAB): ber.: 477.2237 amu; gef.: 477.2234 amu.

N-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-3-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy)-ethoxy)ethoxy)ethoxy)propanamid (**24a**)



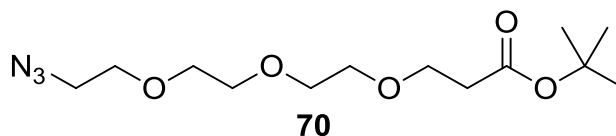
Nach AAV3 wurden unter Argonatmosphäre 2 mL entgastes CHCl₃, 1.60 mL TFA und 27.8 µL H₂O zu einer Lösung aus 25.9 mg (54.5 µmol, 1.00 Äq.) *N*-(2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)-3-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)propanamid (**24**) in 2 mL entgastem CHCl₃ gegeben. Es wurden 20.0 mg (45.8 µmol, 84%) *N*-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-3-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy)-ethoxy)ethoxy)ethoxy)propanamid (**24a**) in Form eines braunen Öls erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ): 6.68-6.58 (m, 5 H, *H*_{Ar}, *H*_{Mal}), 3.76-3.53 (m, 16 H, 8×CH₂), 3.26 (t, ³*J* = 7.1 Hz, 2 H, CH₂), 2.65 (t, ³*J* = 5.8 Hz, 2 H, CH₂), 2.60 (t, ³*J* = 5.8 Hz, 2 H, CH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 174.1 (C), 170.9 (C), 144.0 (C), 142.9 (C), 134.0 (2×CH), 130.7 (C), 120.7 (C), 115.8 (C), 115.5 (C), 70.1 (CH₂), 70.0 (CH₂), 69.9 (CH₂), 69.8 (CH₂), 67.8 (CH₂), 66.6 (CH₂), 41.1 (CH₂), 38.7 (CH₂), 37.0 (CH₂), 35.8 (CH₂), 34.1 (CH₂).

MS (FAB, 3-NBA): 437 (100) $[M+H]^+$, 154 (26), 137 (38), 124 (30), 99 (24).

3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure-*tert*-butylester (**70**)^[207]

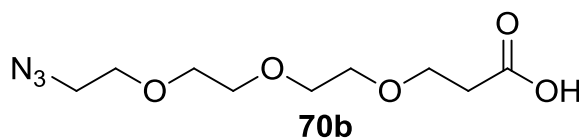


Es wurden 160 mg (575 μ mol, 1.00 Äq.) 3-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure-*tert*-butylester (**64**) in 1 mL trockenem THF gelöst und 44.5 μ L (65.8 mg, 575 μ mol, 1.00 Äq.) Mesylchlorid zugetropft. Daraufhin wurden 159 μ L (116 mg, 1.15 mmol, 2.00 Äq.) NEt_3 zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht gerührt und das Lösungsmittel wurde eingeeengt. Anschließend wurde das Rohprodukt (64.0 mg, 180 μ mol, 0.313 Äq.) weiter umgesetzt, **70a** in 50 mL trockenem EtOH gelöst und mit 11.7 mg (180 μ mol, 0.313 Äq.) Natriumazid versetzt. Die Lösung wurde über Nacht zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde der Rückstand in 20 mL Et_2O aufgenommen und dreimal mit je 30 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen sowie das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (c-Hexan/EtOAc 1:1). Es wurden 61.0 mg (201 μ mol, 35% über 2 Stufen) 3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure-*tert*-butylester (**70**) in Form eines gelben Öls erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ): 3.93–3.50 (m, 8 H, $4 \times \text{OCH}_2\text{CH}_2$), 3.45–3.30 (m, 4 H, CH_2N_3 , CH_2COO), 2.77–2.40 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.42 (s, 9 H, $3 \times \text{CH}_3$).

MS (FAB, 3-NBA): 279 (25) $[M+H]^+$, 222 (90), 204 (59), 153 (37), 135 (39), 116 (31), 98 (100).

3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure (**70b**)^[207]

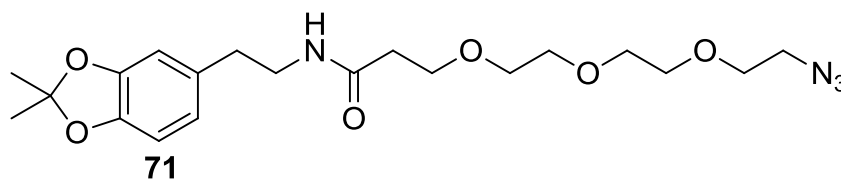


Es wurden 532 mg (1.75 mol, 1.00 Äq.) 3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure-*tert*-butylester (**70**) in 6 mL CH₂Cl₂ gelöst. Zu der gelben Lösung wurden 1.50 mL TFA zugetropft und für 3 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und dreimal mit 20 mL CH₂Cl₂ coevaporiert. Es wurden 434 mg (1.75 mmol, quant.) 3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure (**70b**) in Form eines gelben Öls erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[207]

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 9.23 (bs, 1 H, OH), 3.81–3.76 (t, ³J = 6.1, 2 H, CH₂), 3.69–3.62 (m, 10 H, H_{TEG}), 3.40 (t, ³J = 5.0, 2 H, CH₂), 2.70 (t, ³J = 6.1, 2 H, CH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 174.7 (C), 70.5 (2×CH₂), 70.3 (2×CH₂), 70.0 (CH₂), 66.3 (CH₂), 50.6 (CH₂), 34.7 (CH₂).

3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)-*N*-(2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)-propanamid (**71**)

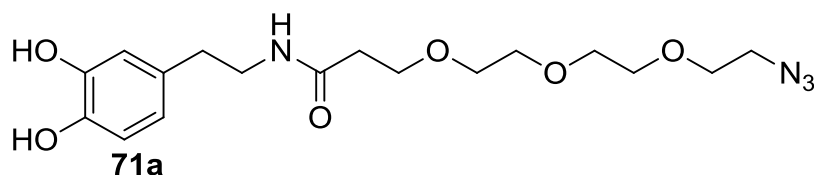


Es wurden 74.0 mg (384 μmol, 1.00 Äq.) 2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethanamin (**40**), 62.3 mg (461 μmol, 1.20 Äq.) HOBt, 175 mg (461 μmol, 1.20 Äq.) HBTU und 241 μL (179 mg, 1.38 mmol, 3.60 Äq.) DIPEA analog AAV4 umgesetzt. Nach 15 min erfolgte die Zugabe von 95.0 mg (384 μmol, 1.00 Äq.) 3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure (**70b**). Es wurden 87.0 mg (206 μmol, 54%) 3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)-*N*-(2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)-propanamid (**71**) in Form eines braunen Öls erhalten (*R*_f = 0.21, CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ): 6.65–6.62 (m, 3 H, H_{Ar}), 6.45 (bs, 1 H, NH), 3.70–3.56 (m, 12 H, H_{TEG}), 3.47–3.32 (m, 4 H, 2×CH₂), 2.69 (t, ³J = 7.1 Hz, 2 H, CH₂), 2.42 (t, ³J = 5.8 Hz, 2 H, CH₂), 1.64 (s, 6 H, 2×CH₃).

MS (FAB, 3-NBA): 423 (40) [M+H]⁺, 292 (30), 177 (100), 167 (86), 137 (40), 119 (28), 95 (38), 85 (40).

HR-MS ([¹²C₂₀¹H₃₁¹⁵N₄¹⁶O₆⁺], FAB): ber.: 423.2244 amu; gef.: 423.2245 amu.

3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)-*N*-(3,4-dihydroxyphenethyl)propanamid (**71a**)

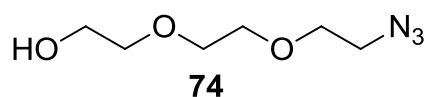
Nach AAV3 wurden unter Argonatmosphäre 7 mL entgastes CHCl_3 , 2.24 mL TFA und 98.6 μL H_2O zu einer Lösung aus 229 mg (542 μmol , 1.00 Äq.) 3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)-*N*-(2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)propanamid (**71**) in 7 mL CHCl_3 gegeben. Es wurden 207 mg (542 μmol , quant.) 3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)-*N*-(3,4-dihydroxyphenethyl)propanamid (**71a**) in Form eines braunen Öls erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ): 10.72 (s, 2 H, OH), 6.83–6.72 (m, 2 H, H_{Ar}), 6.61–6.57 (m, 1 H, H_{Ar}), 3.69–3.49 (m, 14 H, H_{TEG}), 3.38 (t, $^3J = 5.5$ Hz, 2 H, CH_2), 2.55 (t, $^3J = 6.6$ Hz, 2 H, CH_2), 2.48 (t, $^3J = 5.2$ Hz, 2 H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ): 174.7 (C), 143.8 (C), 142.9 (C), 130.6 (C), 121.0 (CH), 115.9 (CH), 115.7 (CH), 77.4 (2 $\times\text{CH}_2$), 77.1 (2 $\times\text{CH}_2$), 76.7 (CH_2), 66.3 (CH_2), 50.5 (CH_2), 41.3 (CH_2), 38.8 (CH_2), 35.5 (CH_2).

MS (FAB, 3-NBA): 383 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 154 (40), 137 (98), 117 (80), 91 (42).

HR-MS ($[\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_6]^+$, FAB): ber.: 383.1931 amu; gef.: 383.1926 amu.

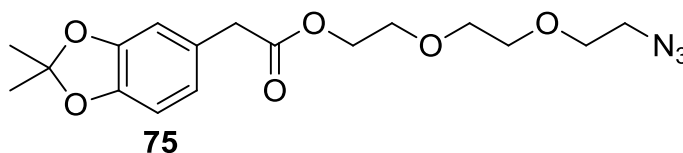
2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethanol (**74**)^[208]

Eine Lösung aus 21.0 g (140 mmol, 1.00 Äq.) Triethylenglykol **64** und 15 mL Triethylamin in 100 mL THF wurde auf 0 °C gekühlt. Tropfenweise wurden 3.87 mL (50.0 mmol, 0.360 Äq.) Methansulfonylchlorid zugegeben, auf RT erwärmt und über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 100 mL EtOH aufgenommen und 6.50 g (100 mmol, 0.71 Äq.) Natriumazid zugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel unter

vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 250 mL Et₂O aufgenommen und zweimal mit je 100 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (c-Hexan/EtOAc 1:1). Es wurden 2.50 g (14.3 mmol, 10%, über 2 Stufen) 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethanol (**74**) in Form eines gelben Öls erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ): 3.85 (bs, 1 H, OH), 3.57–3.41 (m, 10 H, 5×CH₂), 3.23 (t, ³J = 4.7 Hz, 2 H, CH₂).

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl-2-(2,2-dimethylbenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)acetat (**75**)^[209]



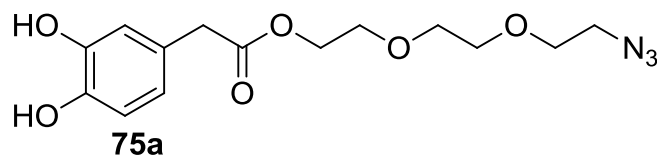
Unter Argonatmosphäre wurden 150 mg (720 μmol, 1.00 Äq.) 2-(2,2-Dimethylbenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)essigsäure (**34**) in 5 mL trockenem DMF gelöst. Zur braunen Lösung wurden 166 mg (865 μmol, 1.20 Äq.) EDC·HCl, 19.6 mg (0.161 mmol, 0.223 Äq.) 4-DMAP und 126 mg (720 μmol, 1.00 Äq.) 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethanol (**74**) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). Es wurden 216 mg (569 μmol, 79%) 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl-2-(2,2-dimethylbenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)acetat (**75**) in Form eines braunen Feststoffs erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ): 6.66–6.62 (m, 3 H, H_{Ar}), 4.24–4.20 (m, 2 H, CH₂), 3.71–3.51 (m, 10 H, 5×CH₂), 3.37 (t, ³J = 5.5 Hz, 2 H, CH₂), 1.62 (s, 6 H, 2×CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 171.7 (C), 147.4 (C), 146.4 (C), 126.7 (C), 121.7 (C), 117.8 (CH), 109.4 (CH), 107.9 (CH), 72.4 (CH₂), 70.5 (CH₂), 70.2 (CH₂), 69.9 (CH₂), 61.6 (CH₂), 50.5 (CH₂), 40.7 (CH₂), 25.7 (2×CH₃).

MS (FAB, 3-NBA): 365 (38) [M+H]⁺, 235 (23), 190 (58), 163 (100).

HR-MS ([¹²C₁₇¹H₂₄¹⁵N₃¹⁶O₆⁺], FAB): ber.: 365.1587 amu; gef.: 365.1588 amu.

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl-2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetat (**75a**)

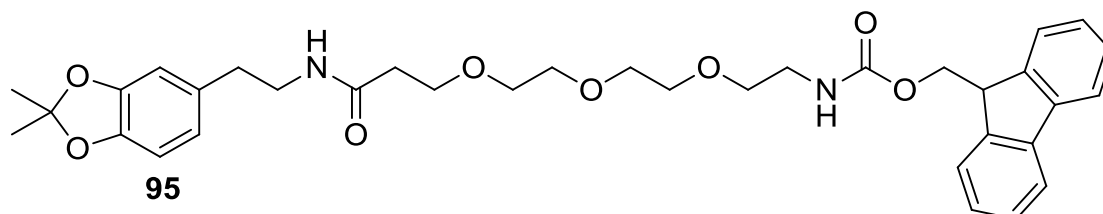
Nach AAV3 wurden unter Argonatmosphäre 2.50 mL entgastes CHCl_3 , 781 μL TFA und 300 μL H_2O zu einer Lösung aus 15.0 mg (56.5 μmol , 1.00 Äq.) 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl-2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)acetat (**75**) in 2.50 mL entgastem CHCl_3 gegeben. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1). Es wurden 15.3 mg (47.0 μmol , 83%) 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl-2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetat (**75a**) in Form eines gelben Öls erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ): 6.88–6.87 (m, 1 H, H_{Ar}), 6.80–6.77 (m, 1 H, H_{Ar}), 6.68–6.64 (m, 1 H, H_{Ar}), 4.31–4.27 (m, 2 H, CH_2), 3.74–3.64 (m, 8 H, $4 \times \text{CH}_2$), 3.52 (s, 2 H, CH_2), 3.46–3.42 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2 H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ): 171.9 (C), 145.5 (C), 143.3 (C), 126.2 (C), 121.7 (CH), 115.6 (CH), 115.1 (CH), 70.8 (CH_2), 70.2 (CH_2), 70.0 (CH_2), 69.1 (CH_2), 63.7 (CH_2), 50.5 (CH_2), 40.7 (CH_2).

HR-MS ($[\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_6]^+$, FAB): ber.: 325.1274 amu; gef.: 325.1271 amu.

IR (ATR) $\tilde{\nu}$: 3255, 2913, 2107, 17799, 1607, 15583 1444, 1399, 1349, 1285, 1149, 810, 781, 699, 598, 557, 518, 437, 407 cm^{-1} .

(9*H*-Fluoren-9-yl)methyl-(15-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-12-oxo-3,6,9-trioxa-13-azapentadecyl)carbammat (**95**)

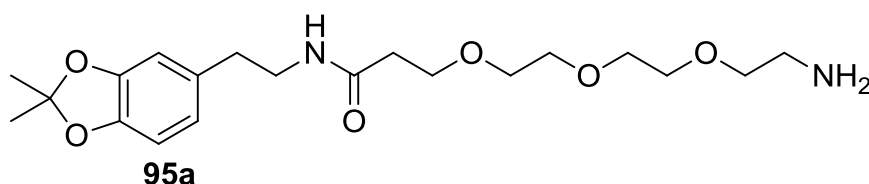
Es wurden 515 mg (2.67 mmol, 1.00 Äq.) 2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethanamin (**40**), 1.21 g (3.20 mmol, 1.20 Äq.) HBTU, 432 mg (3.20 mmol, 1.20 Äq.) HOBt und 1.67 mL (9.60 mmol, 3.60 Äq.) DIPEA analog AAV4 umgesetzt. Nach 15 min erfolgte die Zugabe von 1.18 g (2.67 mmol, 1.00 Äq.) 1-(9*H*-Fluoren-9-yl)-3-oxo-2,7,10,13-tetraoxa-4-aza-hexadecansäure (**72**). Es wurden 141 mg (2.27 mmol, 85%) (9*H*-Fluoren-9-yl)methyl (15-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-12-oxo-3,6,9-trioxa-13-azapentadecyl)-carbammat (**95**) in Form eines braunen Feststoffes erhalten. ($R_f = 0.23$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ): 7.62 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{Fmoc}), 7.36 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{Fmoc}), 7.36–7.26 (m, 4 H, H_{Fmoc}), 6.60–6.55 (m, 3 H, H_{Ar}), 4.35 (d, $^3J = 6.9$ Hz, 2 H, H_{Fmoc}), 4.18 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 1 H, H_{Fmoc}), 3.70–3.50 (m, 12 H, H_{TEG}), 3.40–3.35 (m, 2 H, CH_2), 3.17–3.14 (m, 4 H, $2 \times \text{CH}_2$), 2.68 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 2 H, CH_2), 2.38 (t, $^3J = 5.7$ Hz, 2 H, CH_2), 1.61 (s, 6 H, $2 \times \text{CH}_3$).

MS (FAB, 3-NBA): 663 (42), 620 (30), 619 (40) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 423 (40).

IR (ATR) $\tilde{\nu}$: 3423, 3198, 2989, 2942, 2726, 1716, 1642, 1529, 1495, 1449, 1385, 1254, 1132, 980, 915, 840, 763, 742, 621, 557 cm^{-1} .

3-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)-*N*-(2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)-propanamid (**95a**)^[210]



Es wurden 100 mg (162 μmol , 1.00 Äq.) (9*H*-Fluoren-9-yl)methyl(15-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-12-oxo-3,6,9-trioxa-13-azapentadecyl)carbammat (**95**) in 2 mL DMF gelöst. Nach Zugabe von 100 μL (5 mol%) Piperidin wurde für 4 h bei RT gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MeOH} \rightarrow \text{MeOH} + 20\%$ Ammoniak). Es wurden 39.0 mg (98.4 μmol , 61%) 3-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)-*N*-(2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)propanamid (**95a**) in Form eines gelben Feststoffes erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6 , δ): 6.69–6.68 (m, 2 H, H_{Ar}), 6.61–6.56 (m, 1 H, H_{Ar}), 3.60–3.48 (m, 12 H, H_{TEG}), 3.18 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2 H, CH_2), 2.84 (t, $^3J = 5.4$ Hz, 2 H, CH_2), 2.57 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 2 H, CH_2), 2.29 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2 H, CH_2), 1.61 (s, 6 H, $2 \times \text{CH}_3$).

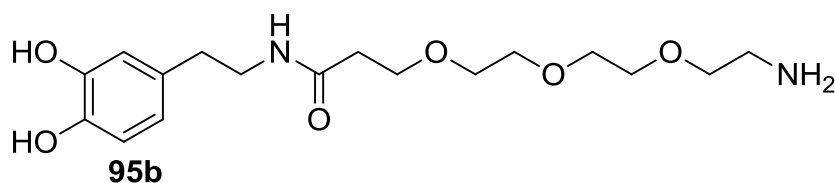
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6 , δ): 169.9 (C), 146.7 (C), 145.1 (C), 132.6 (C), 120.9 (C), 117.4 (CH), 108.7 (CH), 107.7 (CH), 69.6 (CH_2), 69.6 (CH_2), 69.4 (CH_2), 68.8 (CH_2), 66.8 (CH_2), 40.4 (CH_2), 40.1 (CH_2), 36.0 (CH_2), 34.8 (CH_2), 25.5 (CH_3).

MS (FAB, 3-NBA): 397 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 242 (90), 176 (24), 154 (38), 147 (36), 136 (89), 95 (70), 81 (74).

HR-MS ($[\text{C}_{20}^{12}\text{H}_{33}\text{N}_2^{15}\text{O}_6]^+$, FAB): ber.: 397.2339 amu; gef.: 397.2337 amu.

IR (ATR) $\tilde{\nu}$: 3207, 2872, 1734, 1643, 1547, 1495, 1405, 1252, 1233, 1075, 978, 836, 759, 713, 608, 497 cm^{-1} .

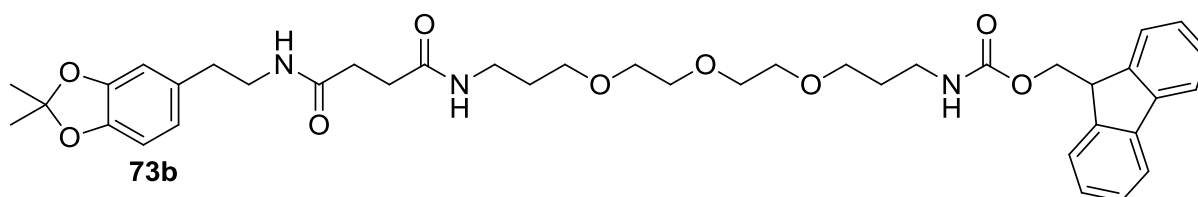
3-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)-*N*-(3,4-dihydroxyphenethyl)propanamid (**95b**)



Nach AAV3 wurden unter Argonatmosphäre 500 μL entgastes CHCl_3 , 156 μL TFA und 6.25 μL H_2O zu einer Lösung aus 15.0 mg (37.8 μmol , 1.00 Äq.) 3-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)-*N*-(2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)propanamid (**95a**) in 500 μL entgastem CHCl_3 gegeben. Es wurden 9.00 mg (25.3 μmol , 67%) 3-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)-*N*-(3,4-dihydroxyphenethyl)-propanamid (**95b**) in Form eines orangenen Öls erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6 , δ): 6.64–6.61 (m, 2 H, H_{Ar}), 6.43–6.40 (m, 1 H, H_{Ar}), 3.58–3.49 (m, 14 H, H_{TEG}), 3.17 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2 H, CH_2), 2.99 (t, $^3J = 5.3$ Hz, 2 H, CH_2), 2.29 (t, $^3J = 5.7$ Hz, 2 H, CH_2).

(9*H*-Fluoren-9-yl)methyl(1-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-4,7-dioxo-12,15,18-trioxa-3,8-diazahenicosan-21-yl)carbammat (**73b**)



Es wurden 700 mg (3.62 mmol, 1.20 Äq.) 2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethanamin (**40**), 1.37 g (3.62 mmol, 1.20 Äq.) HBTU, 489 µg (3.62 mmol, 1.20 Äq.) HOBt und 1.89 mL (10.9 mmol, 3.60 Äq.) DIPEA analog AAV4 umgesetzt. Nach 15 min erfolgte die Zugabe von 1.64 g (3.02 mmol, 1.00 Äq.) *N*¹-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-1,13-diamino-4,7-10-trioxatridecansuccinamidsäure (**72a**). Es wurden 1.62 mg (1.39 mmol, 62%) (9*H*-Fluoren-9-yl)methyl (1-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-4,7-dioxo-12,15,18-trioxa-3,8-diazahenicosan-21-yl)carbammat (**73b**) in Form eines gelben Öls erhalten ($R_f = 0.47$, CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ): 7.74 (d, ³*J* = 7.2 Hz, 2 H, *H*_{Fmoc}), 7.58 (d, ³*J* = 7.2 Hz, 2 H, *H*_{Fmoc}), 7.40–7.26 (m, 4 H, *H*_{Fmoc}), 6.71 (bs, 1 H, *NH*), 6.62–6.53 (m, 3 H, *H*_{Ar}), 6.45 (bs, 1 H, *NH*), 5.61 (bs, 1 H, *NH*), 4.35 (d, ³*J* = 6.8 Hz, 2 H, *H*_{Fmoc}), 4.21–4.14 (m, 1 H, *H*_{Fmoc}), 3.72–3.24 (m, 12 H, *H*_{TEG}), 3.25–3.44 (m, 2 H, CH₂), 2.67 (t, ³*J* = 7.3 Hz, 2 H, ArCH₂), 2.65 (s, 4 H, COCH₂CH₂), 1.79–1.64 (m, 8 H, 4×CH₂), 1.63 (s, 6 H, 2×CH₃).

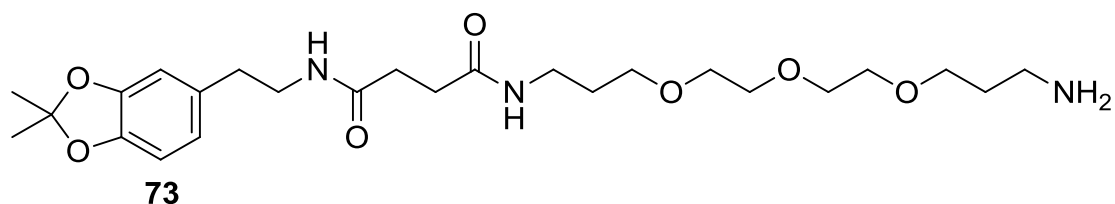
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 172.3 (C), 172.2 (C), 156.5 (C), 147.4 (C), 145.8 (C), 143.9 (C), 141.1 (C), 131.8 (CH), 127.5 (CH), 126.9 (CH), 125.0 (CH), 120.8 (CH), 119.8 (CH), 117.6 (CH), 108.7 (CH), 107.8 (CH), 70.3 (CH₂), 70.3 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.9 (CH₂), 69.5 (CH₂), 69.2 (CH₂), 66.3 (CH₂), 47.1 (CH), 41.0 (CH₂), 38.5 (CH₂), 35.2 (CH₂), 31.7 (CH₂), 31.6 (CH₂), 29.3 (CH₂), 28.7 (CH₂), 25.7 (CH₃).

MS (FAB, 3-NBA): 718 (13) [M+H]⁺, 176 (22), 130 (100).

HR-MS ([¹²C₄₀¹H₅₂¹⁵N₃¹⁶O₉⁺], FAB): ber.: 718.3704 amu; gef.: 718.3702 amu.

IR (ATR) $\tilde{\nu}$: 3425, 3320, 2941, 2875, 2726, 1705, 1651, 1537, 1495, 1448,3 1385, 1254, 1130, 1032, 980, 843, 762, 742, 621, 558, 427 cm⁻¹.

N-(3-(2-(2-(3-Aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-*N'*-(2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]-dioxol-5-yl)ethyl)succinamid (**73**)^[210]



Es wurden 412 mg (574 μmol , 1.00 Äq.) (9*H*-Fluoren-9-yl)methyl(1-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-4,7-dioxo-12,15,18-trioxa-3,8-diazahenicosan-21-yl)carbamat (**73b**) in 8 mL DMF gelöst. Nach Zugabe von 400 μL (5 mol%) Piperidin wurde für 4 h bei RT gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MeOH} \rightarrow \text{MeOH} + 20\%$ Ammoniak). Es wurden 128 mg (258 μmol , 45%) *N*-(3-(2-(2-(3-Aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-*N'*-(2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl)succinamid (**73**) in Form eines gelblichen Feststoffs erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ): 7.56 (bs, 1 H, *NH*), 7.13 (bs, 1 H, *NH*), 6.56–6.51 (m, 3 H, H_{Ar}), 5.97–5.76 (bs, 1 H, *NH*), 3.52 (s, 12 H, H_{TEG}), 3.34–3.22 (m, 4 H, $2 \times \text{CH}_2$), 3.25–2.96 (m, 2 H, CH_2), 2.61 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2 H, CH_2), 2.47 (s, 4 H, $2 \times \text{CH}_2$), 1.75 (t, $^3J = 5.8$ Hz, 2 H, CH_2), 1.73–1.70 (m, 2 H, CH_2), 1.60 (s, 6 H, $2 \times \text{CH}_3$).

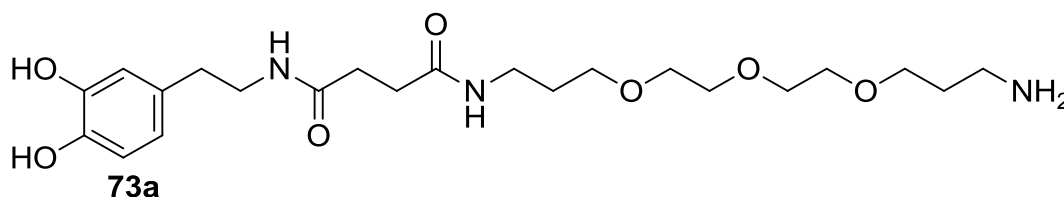
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ): 178.2 ($2 \times \text{C}$), 154.2 (CH), 152.5 (CH), 139.5 (CH), 127.9 (C), 124.4 (CH), 115.9 (CH), 114.8 (CH), 85.6 (CH_2), 85.2 (CH_2), 84.9 (CH_2), 74.2 ($2 \times \text{CH}_2$), 73.9 ($2 \times \text{CH}_2$), 73.2 ($2 \times \text{CH}_2$), 47.0 (CH_2), 46.8 ($2 \times \text{CH}_2$), 46.6 (CH_2), 32.7 ($2 \times \text{CH}_3$).

MS (FAB, 3-NBA): 497 (28), 496 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 176 (23).

HR-MS ($[\text{C}_{40}^{12}\text{H}_{52}^{15}\text{N}_3^{16}\text{O}_9]^+$, FAB): ber.: 496.3021 amu; gef.: 496.3023 amu.

IR (ATR) $\tilde{\nu}$: 3302, 3077, 2932, 2864, 1626, 1541, 1499, 1445, 1375, 1338, 1259, 1216, 1091, 984, 860, 838, 818, 771, 672, 613, 512, 470, 428 cm^{-1} .

N^1 -(3-(2-(2-(3-Aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)- N^4 -(3,4-dihydroxyphenethyl)-succinamid (**73a**)



Nach AAV3 wurden unter Argonatmosphäre 3 mL entgastes CHCl_3 , 957 μL TFA und 38 μL H_2O zu einer Lösung aus 92.0 mg (186 μmol , 1.00 Äq.) N -(3-(2-(2-(3-Amino-propoxy)-ethoxy)ethoxy)propyl)- N' -(2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-ethyl)-succinamid (**73**) in 3 mL entgastem CHCl_3 gegeben. Es wurden 61.0 mg (134 μmol , 72%) N^1 -(3-(2-(2-(3-Aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)- N^4 -(3,4-dihydroxyphenethyl)succinamid (**73a**) in Form eines braunen Öls erhalten.

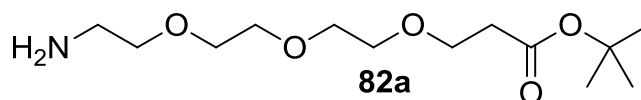
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ): 8.61 (bs, 1 H, NH), 7.50 (bs, 2 H, NH_2), 6.52–6.47 (m, 2 H, H_{Ar}), 6.28–6.24 (m, 1 H_{Ar}), 3.43–2.99 (m, 20 $\times\text{CH}_2$), 2.23 (s, 4 H, 2 $\times\text{CH}_2$), 1.56–1.40 (m, 4 H, 2 $\times\text{CH}_2$). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ): 171.8 (C), 171.5 (C), 143.8 (C), 142.4 (C), 129.8 (C), 118.9 (CH), 115.2 (CH), 114.6 (CH), 69.2 (2 $\times\text{CH}_2$), 67.6 (2 $\times\text{CH}_2$), 43.5 (2 $\times\text{CH}_2$), 43.4 (2 $\times\text{CH}_2$), 35.5 (CH_2), 30.3 (CH_2), 29.1 (CH_2), 28.9 (CH_2), 21.4 (CH_2).

MS (FAB, 3-NBA): 303 (24), 321 (26), 456 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HR-MS ($[\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_7]^+$, FAB): ber.: 456.2710 amu; gef.: 456.2713 amu.

IR (ATR) $\tilde{\nu}$: 2937, 2872, 1777, 1655, 1438, 1385, 1289, 1143, 797, 702, 594, 518, 437, 410 cm^{-1} .

3-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure-*tert*-butylester (**82a**)^[210]

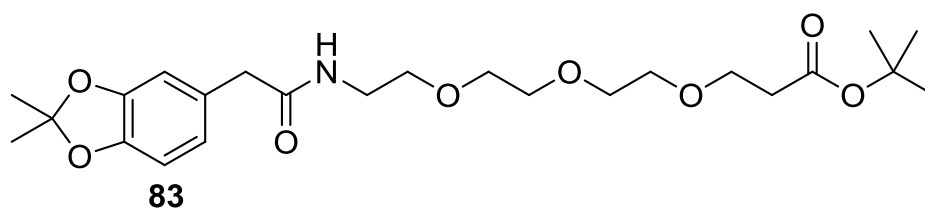


Es wurden 434 mg (870 μmol , 1.00 Äq.) 1-(9*H*-Fluoren-9-yl)-3-oxo-2,7,10,13-tetraoxa-4-azahexadecan-16-säure-*tert*-butylester (**82**) in 2 mL DMF gelöst. Nach Zugabe von 100 μL (5 mol%) Piperidin wurde für 4 h bei RT gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MeOH} \rightarrow \text{MeOH} + 20\%$ Ammoniak). Es

wurden 90 mg (324 μmol , 37%) 3-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure-*tert*-butylester (**82a**) in Form eines gelben Öls erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[210]

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ): 3.75–3.58 (m, 12 H, H_{TEG}), 3.16 (m, 2 H, CH_2NH_2), 2.57 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2 H, CH_2CO), 1.42 (s, 9 H, $3\times\text{CH}_3$).

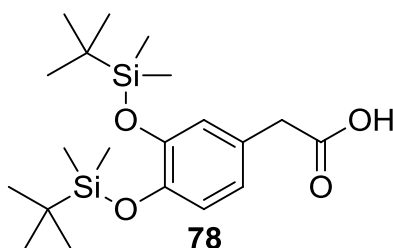
1-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azapentadecansäure-*tert*-butylester (**83**)



Es wurden 48.0 mg (173 μmol , 1.00 Äq.) 3-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure-*tert*-butylester (**82a**), 79.0 mg (208 μmol , 1.20 Äq.) HBTU, 28.0 mg (208 μmol , 1.20 Äq.) HOBt und 109 μL (9.60 mmol, 3.60 Äq.) DIPEA in 5 mL THF gelöst. Nach 15 min bei RT wurden 36.0 mg (173 μmol , 1.00 Äq.) 2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)essigsäure (**34**) zugegeben und die Suspension wurde für 12 h bei RT gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 30:1 \rightarrow 9:1). Es wurden 66.0 mg (140 μmol , 81%) 1-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azapentadecansäure-*tert*-butylester (**83**) in Form eines gelben Öls erhalten ($R_f = 0.37$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ): 6.63–6.60 (m, 3 H, H_{Ar}), 6.20 (bs, 1 H, NH), 3.65 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2 H, CH_2), 3.63–3.37 (m, 14 H, H_{TEG}), 2.44 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 1 H, 2 H, CH_2), 1.39 (s, 6 H, $2\times\text{CH}_3$), 1.38 (s, 9 H, $3\times\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ): 171.3 (C), 170.8 (C), 147.5 (C), 146.5 (C), 128.0 (CH), 121.8 (C), 117.9 (CH), 109.4 (CH), 108.2 (CH), 80.5 (C), 77.4 ($2\times\text{CH}_2$), 77.1 (CH_2), 76.7 (CH_2), 66.8 (CH_2), 43.2 (CH_2), 39.3 (CH_2), 28.0 ($2\times\text{CH}_3$), 25.8 ($3\times\text{CH}_3$).

2-(3,4-Bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)essigsäure (**78**)

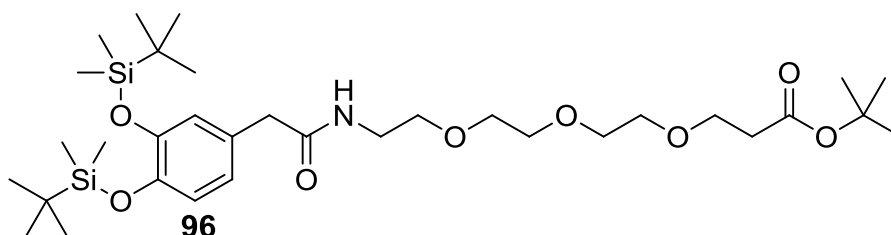
In 40 mL Acetonitril wurden 2.00 g (11.9 mmol, 1.00 Äq.) 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (**32**) gelöst. Nach Zugabe von 2.43 g (35.7 mmol, 3.00 Äq.) Imidazol wurde die Lösung auf 0 °C gekühlt, anschließend wurden 5.38 g (35.7 mmol, 3.00 Äq.) TBDMS-Cl zugegeben und auf RT erwärmt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 50 mL EtOAc aufgenommen und dreimal mit je 20 mL H₂O gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). Es wurden 3.23 g (8.14 mmol, 87%) 2-(3,4-Bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)essigsäure (**78**) in Form eines weißen Feststoffs erhalten ($R_f = 0.32$, CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 6.78–6.72 (m, 3 H, H_{Ar}), 3.50 (s, 2 H, CH₂), 0.98 (s, 18 H, 6×CH₃), 0.19 (s, 12 H, 4×CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 178.0 (C), 146.7 (C), 146.1 (C), 126.2 (C), 122.3 (CH), 122.2 (CH), 120.9 (CH), 40.5 (CH₂), 25.9 (2×CH₃), 18.4 (6×CH₃).

MS (FAB, 3-NBA): 339 (32), 351 (100), 352 (30), 397 (26) [M+H]⁺.

HR-MS ([¹²C₂₀¹H₃₇²⁹Si₂¹⁶O₄]⁺, FAB): ber.: 397.2230 amu; gef.: 397.2231 amu.

1-(3,4-Bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azapentadecansäure-*tert*-butylester (**96**)

Es wurden 312 mg (1.12 mmol, 1.00 Äq.) 3-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäure-*tert*-butylester (**82a**), 512 mg (1.35 mmol, 1.20 Äq.) HBTU, 182 mg (1.35 mmol, 1.20 Äq.) HOBt und 705 μ L (4.05 mmol, 3.60 Äq.) DIPEA analog AAV4 umgesetzt. Nach 15 min bei RT wurden 446 mg (1.12 mmol, 1.00 Äq.) 2-(3,4-Bis((*tert*-butyldimethylsilyl)-oxy)phenyl)essigsäure (**78**) zugegeben. Es wurden 734 mg (1.12 mmol, quant.) 1-(3,4-Bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azapentadecansäure-*tert*-butylester (**96**) in Form eines gelben Öls erhalten ($R_f = 0.33$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1).

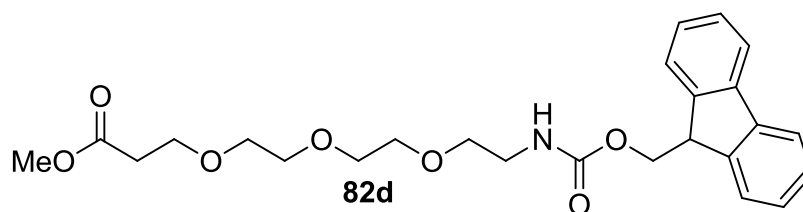
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ): 6.78–6.65 (m, 3 H, H_{Ar}), 6.02 (bs, 1 H, NH), 3.71–3.42 (m, 16 H, H_{TEG}), 2.46 (t, $^3J = 6.5$ Hz, 2 H, CH_2), 1.42 (s, 9 H, $3 \times \text{CH}_3$), 0.96 (s, 18 H, $6 \times \text{CH}_3$), 0.17 (s, 12 H, $4 \times \text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ): 171.5 (C), 170.9 (C), 147.0 (C), 146.2 (C), 127.9 (C), 122.4 (C), 122.3 (C), 121.3 (C), 80.6 (C), 70.5 (CH_2), 70.3 (CH_2), 70.2 (CH_2), 69.8 ($2 \times \text{CH}_2$), 66.8 (CH_2), 43.8 (CH_2), 43.0 (CH_2), 38.6 (CH_2), 30.9 ($3 \times \text{CH}_3$), 28.1 ($2 \times \text{C}$), 25.6 ($6 \times \text{CH}_3$).

MS (FAB, 3-NBA): 678 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 657 (18) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 656 (20), 600 (32), 542 (30), 422 (26), 221 (30), 179 (64), 130 (100).

HR-MS ($[^{12}\text{C}_{33}^{1}\text{H}_{62}^{29}\text{N}^{16}\text{O}_8^{29}\text{Si}_2]^+$, FAB): ber.: 656.4014 amu; gef.: 656.4017 amu.

1-(9*H*-Fluoren-9-yl)-3-oxo-2,7,10,13-tetraoxa-4-azahexadecansäuremethylester (**82d**)^[203]



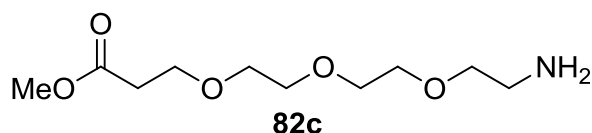
Zu einer Lösung aus 968 mg (2.18 mmol, 1.00 Äq.) 1-(9*H*-Fluoren-9-yl)-3-oxo-2,7,10,13-tetraoxa-4-azahexadecansäure (**82b**) in 50 mL MeOH wurden unter Argonatmosphäre 100 mL konz. H_2SO_4 gegeben. Die Lösung wurde für 3 h bei refluxiert. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der gelbe Rückstand wurde in 50 mL EtOAc gelöst und mit 20 mL ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 20 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 20 mL ges. NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 860 mg (1.88 mmol, 86%) 1-(9*H*-

Fluoren-9-yl)-3-oxo-2,7,10,13-tetraoxa-4-azahexadecansäuremethylester (**82d**) in Form eines gelben Feststoffs erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ): 7.70 (d, $^3J = 7.1$ Hz, 2 H, H_{Fmoc}), 7.41 (d, $^3J = 7.1$ Hz, 2 H, H_{Fmoc}), 7.34–7.28 (m, 4 H, H_{Fmoc}), 5.47 (bs, 1 H, NH), 4.40 (d, $^3J = 6.9$ Hz, 2 H, H_{Fmoc}), 4.25–4.19 (m, 1 H, H_{Fmoc}), 3.75–3.73 (m, 2 H, CH_2), 3.71 (s, 2 H, CH_2), 3.66–3.61 (m, 11 H, $4 \times \text{CH}_2$, $1 \times \text{CH}_3$), 3.39–3.37 (m, 2 H, CH_2), 2.56 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2 H, CH_2).

MS (FAB, 3-NBA): 458 (16) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 236 (20), 179 (100).

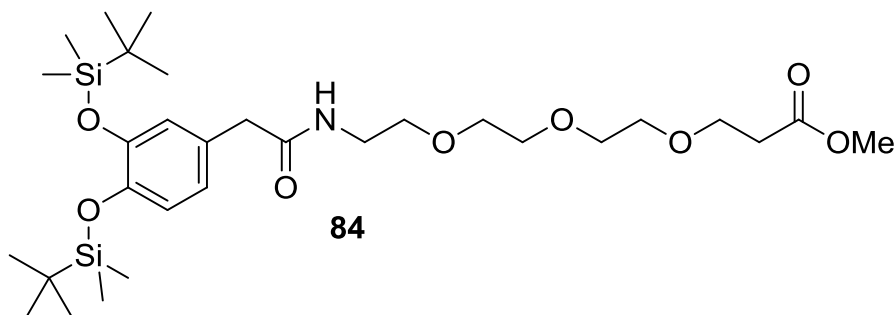
3-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäuremethylester (**82c**)^[210]



Es wurden 860 mg (1.88 mmol, 1.00 Äq.) 1-(9*H*-Fluoren-9-yl)-3-oxo-2,7,10,13-tetraoxa-4-azahexadecansäuremethylester (**82d**) in 6 mL DMF gelöst. Nach Zugabe von 300 μL (5 mol%) Piperidin wurde für 4 h bei RT gerührt. Das Produkt konnte nicht säulenchromatographisch gereinigt werden und wurde daher ohne Reinigung direkt weiter umgesetzt. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[210]

MS (FAB, 3-NBA): 414 (100), 248 (40), 236 (78), 179 (50) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 178 (42) $[\text{M}+\text{H}]$, 165 (20), 98 (22).

1-(3,4-Bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azapentadecan-15-säuremethylester (**84**)

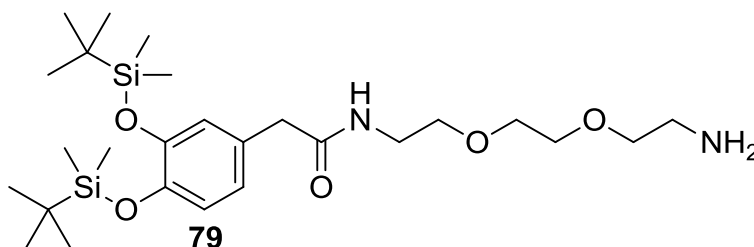


Es wurden 621 mg (1.57 mmol, 1.00 Äq.) 2-(3,4-Bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-essigsäure (**78**), 712 mg (1.88 mmol, 1.20 Äq.) HBTU, 254 mg (1.88 mmol, 1.20 Äq.) HOBt und 982 μL (728 mg, 5.64 mmol, 3.60 Äq.) DIPEA analog AAV4 umgesetzt. Nach 15 min bei RT wurden 442 mg (1.12 mmol, 1.00 Äq.) 3-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)propansäuremethylester (**82c**) zugegeben. Es wurden 274 mg (446 μmol , 29%) 1-(3,4-Bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azapentadecan-15-säuremethylester (**84**) in Form eines gelben Öls erhalten ($R_f = 0.33$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ): 8.05 (bs, 1 H, *NH*), 6.69–6.64 (m, 3 H, H_{Ar}), 3.58–3.53 (m, 13 H, $1 \times \text{CH}_3$, $5 \times \text{CH}_2$), 3.09–3.06 (m, 2 H, CH_2), 2.58–2.39 (m, 2 H, CH_2), 0.87 (s, 18 H, $6 \times \text{CH}_3$), 0.08 (s, 12 H, $4 \times \text{CH}_3$).

MS (FAB, 3-NBA): 614 (30) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 470 (20), 453 (44), 454 (20), 422 (24), 405 (25), 397 (100) $[\text{M}-\mathbf{78}]^+$, 396 (70) $[\mathbf{78}+\text{H}]$.

N-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethyl)-2-(3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-acetamid (**79**)^[183]



Es wurden 1.00 g (2.52 mmol, 1.00 Äq.) 2-(3,4-Bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-essigsäure (**78**) und 347 mg (2.57 mmol, 1.02 Äq.) HOBt in 2 mL wasserfreiem DMF gelöst. Nach 10 min bei RT wurden 531 mg (2.57 mmol, 1.02 Äq.) DCC in 1 mL wasserfreiem DMF zugegeben und für weitere 10 min bei RT gerührt. Über einen Zeitraum von 10 min wurden 296 mg (2.57 mmol, 1.02 Äq.) NHS in 2 mL wasserfreiem DMF zugetropft, die Suspension wurde für 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Aktivester zu einer Lösung aus 374 mg (2.52 mmol, 1.00 Äq.) 2,2'-(Ethan-1,2-diylbis(oxy))diethanamin (**77**) in 5 mL wasserfreiem DMF zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Nach Abfiltrieren wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MeOH} \rightarrow \text{MeOH} + 20\% \text{ Ammoniak}$). Es wurden 107 mg (203 μmol ,

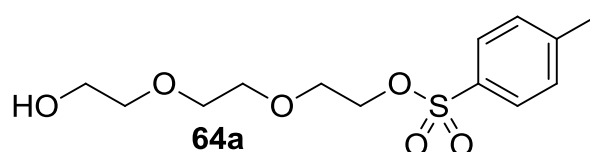
8%) *N*-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethyl)-2-(3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-acetamid (**79**) in Form eines braunen Feststoffs erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ): 6.77–6.51 (m, 3 H, H_{Ar}), 6.49 (bs, 1 H, NH), 3.60–3.34 (m, 14 H, $7\times\text{CH}_2$), 0.97 (s, 18 H, $6\times\text{CH}_3$), 0.17 (s, 12 H, $4\times\text{CH}_3$).

MS (FAB, 3-NBA): 527 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 221 (20), 178 (48), 149 (30), 106 (28).

HR-MS ($[\text{C}_{26}^{12}\text{H}_{51}^{29}\text{N}_2^{16}\text{O}_5^{29}\text{Si}_2^+]$, FAB): ber.: 527.3337 amu; gef.: 527.3338 amu.

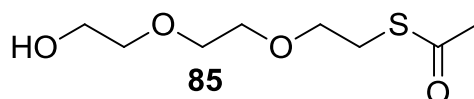
2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzolsulfonat (**64a**)^[211]



Zu einer Lösung aus 28.3 g (18.8 mmol, 1.00 Äq.) Triethylenglykol **64** in 85 mL CH_2Cl_2 wurden 2.87 g (28.3 mmol, 1.50 Äq.) Triethylamin zugegeben. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und 3.60 g (18.8 mmol, 1.00 Äq.) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid wurden zugegeben. Die Lösung wurde auf RT erwärmt und für 18 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand wurde in 50 mL CH_2Cl_2 gelöst, dreimal mit je 20 mL H_2O und dreimal mit je 20 mL 2% Essigsäure gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 5.44 g (17.9 mmol, 95%.) 2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzolsulfonat (**64a**) in Form eines weißen Feststoffs erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[211]

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, Aceton- d_6 , δ): 7.74 (d, 2 H, H_{Ar}), 7.30 (d, 2 H, H_{Ar}), 4.09 (m, 2 H, CH_2), 3.67–3.60 (m, 4 H, CH_2), 3.55–3.46 (m, 6 H, CH_2), 2.40 (s, 3 H, CH_3), 1.99 (s, 1 H, OH).

S-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl)ethanthioacetat (**85**)^[187]

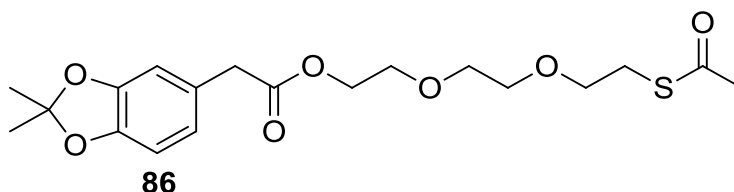


Es wurden 200 mg (631 μmol , 1.00 Äq.) 2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzolsulfonat (**64a**) in 5 mL DMF unter Argon gelöst und 113 mg (947 μmol , 1.50 Äq.) Kaliumthioacetat zugegeben. Die Suspension wurde für 2 d bei RT gerührt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1). Es wurden 75.0 mg (360 μmol , 57%) *S*-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl)ethanthioacetat (**85**) in Form eines braunen Öls erhalten ($R_f = 0.24$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1). Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[187]

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ): 3.69–3.54 (m, 10 H, H_{TEG}), 3.05 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2 H, CH_2), 2.64 (bs, 1 H, OH), 2.29 (s, 3 H, CH_3).

MS (FAB, 3-NBA): 209 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 148 (38) $[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2\text{S}]^+$, 136 (24), 135 (20), 102 (44), 86 (42).

2-(2-(2-(Acetylthio)ethoxy)ethoxy)ethyl-2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-acetat (**86**)



Zu einer Lösung aus 100 mg (480 μmol , 1.00 Äq.) 2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)essigsäure (**34**) in 2 mL wasserfreiem DMF wurden 111 mg (576 μmol , 1.20 Äq.) EDC·HCl, 13.1 mg (107 μmol , 0.223 Äq.) 4-DMAP und 100 mg (480 μmol , 1.00 Äq.) *S*-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl)ethanthioacetat (**85**) zugegeben. Die Suspension wurde über Nacht bei RT gerührt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1). Es wurden 166 mg (402 μmol , 84%) 2-(2-(2-(Acetylthio)ethoxy)ethoxy)ethyl-2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]-dioxol-5-yl)acetat (**86**) in Form eines gelben Öls erhalten ($R_f = 0.88$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1).

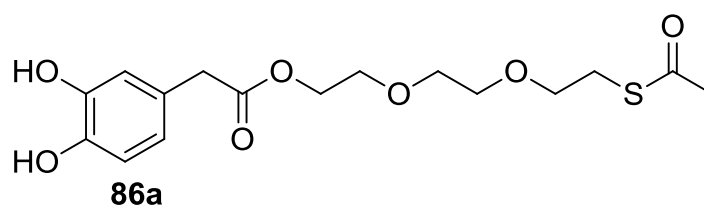
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ): 6.69–6.66 (m, 3 H, H_{Ar}), 4.27–4.23 (m, 2 H, CH_2), 3.74–3.51 (m, 10 H, H_{TEG}), 3.12–3.07 (m, 2 H, CH_2), 2.33 (s, 3 H, CH_3), 1.66 (s, 6 H, $2 \times \text{CH}_3$).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ): 195.5 (C), 171.8 (C), 143.8 (C), 147.5 (C), 146.5 (C), 126.8 (C), 121.7 (C), 117.9 (CH), 109.4 (CH), 108.0 (CH), 70.5 (CH_2), 70.3 (CH_2), 69.8 (CH_2), 69.1 (CH_2), 63.9 (CH_2), 40.8 (CH_2), 30.5 (CH_3), 28.8 (CH_2), 25.8 (CH_3).

MS (FAB, 3-NBA): 398 (30) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 358 (22), 235 (28), 191 (70), 164 (100), 137 (52), 110 (50), 96 (80), 82 (82).

HR-MS ($[\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{SO}_7]^+$, FAB): ber.: 398.1399 amu; gef.: 398.1397 amu.

2-(2-(2-Mercaptoethoxy)ethoxy)ethyl-2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)acetat (**86a**)



Nach AAV3 wurden unter Argonatmosphäre 4 mL entgastes CHCl_3 , 1.25 mL TFA und 500 μL H_2O zu einer Lösung aus 160 mg (402 μmol , 1.00 Äq.) 2-(2-(2-(Acetylthio)ethoxy)ethoxy)ethyl-2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)acetat (**86**) in 1.25 mL entgastem CHCl_3 gegeben. Es wurden 914 mg (318 μmol , 79%) 2-(2-(2-Mercaptoethoxy)ethoxy)ethyl-2-(2,2-dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)acetat (**86a**) in Form eines braunes Öls erhalten.

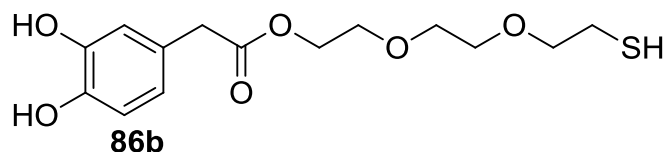
^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3 , δ): 6.84–6.75 (m, 2 H, H_{Ar}), 6.65–6.61 (m, 1 H, H_{Ar}), 4.26 (t, $^3J = 4.5$ Hz, 2 H, CH_2), 3.74–3.57 (m, 12 H, H_{TEG}), 3.08 (t, $^3J = 6.6$ Hz, 2 H, CH_2), 2.38 (s, 3 H, CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ): 196.1 (C), 171.9 (C), 143.7 (C), 143.4 (C), 126.0 (C), 121.5 (CH), 115.6 (CH), 115.0 (CH), 72.3 (CH_2), 70.4 (CH_2), 70.1 (CH_2), 63.7 (CH_2), 61.7 (CH_2), 40.7 (CH_2), 30.5 (CH_2), 28.4 (CH_3).

MS (FAB, 3-NBA): 359 (35) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 195 (84), 149 (64), 122 (78), 102 (80).

HR-MS ($[\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_7\text{S}]^+$, FAB): ber.: 358.1086 amu; gef.: 258.1088 amu.

2-(2-(2-Mercaptoethoxy)ethoxy)ethyl-2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetat (**86b**)^[187]



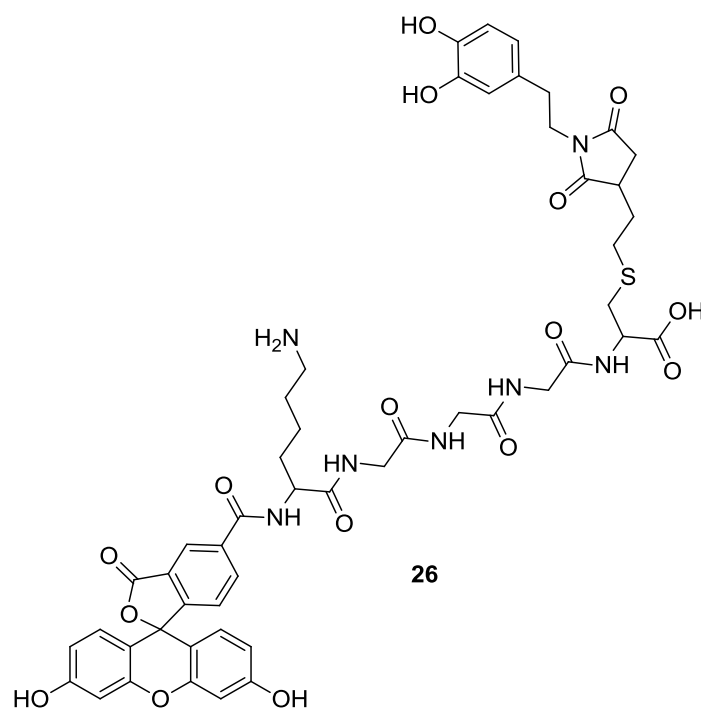
Es wurden 304 mg (848 μmol , 1.00 Äq.) Thioester **86a** unter Argon in 24 mL trockenem Ethanol gelöst, danach wurden 27 mL entgastes H_2O zugegeben. 64.2 mg (1.70 mmol, 2.00 Äq) NaBH_4 wurden zu der Lösung gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Danach erfolgte die Zugabe von weiteren 32.1 mg (848 μmol , 1.00 Äq.) NaBH_4 , es wurde für 3 h bei RT gerührt. Daraufhin wurden 100 mL Et_2O und 100 mL 1 M HCl zugegeben und für 30 min gerührt. Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase vom Lösungsmittel befreit. Es wurden 249 mg (789 μmol , 93%) 2-(2-(2-Mercaptoethoxy)ethoxy)ethyl-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-acetat (**86b**) in Form eines weißen Feststoffs erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6$, δ): 6.68–6.62 (m, 2 H, H_{Ar}), 6.62–6.48 (m, 1 H, H_{Ar}), 3.62–3.33 (m, 12 H, H_{TEG}), 2.81–2.77 (m, 2 H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6 , δ): 176.2 (C), 143.8 (C), 144.5 (C), 127.3 (C), 122.2 (CH), 117.9 (CH), 116.9 (CH), 72.8 (CH_2), 70.8 (CH_2), 70.6 (CH_2), 70.5 (CH_2), 69.4 (CH_2), 41.3 (CH_2), 32.5 (CH_2).

HR-MS ($[\text{}^{12}\text{C}_{14}\text{}^1\text{H}_{20}\text{}^{17}\text{S}\text{}^{16}\text{O}_6]^+$, FAB): ber.: 316.0980 amu; gef.: 316.0979 amu.

6.2.7 Reaktionen mit verschiedenen Linkern

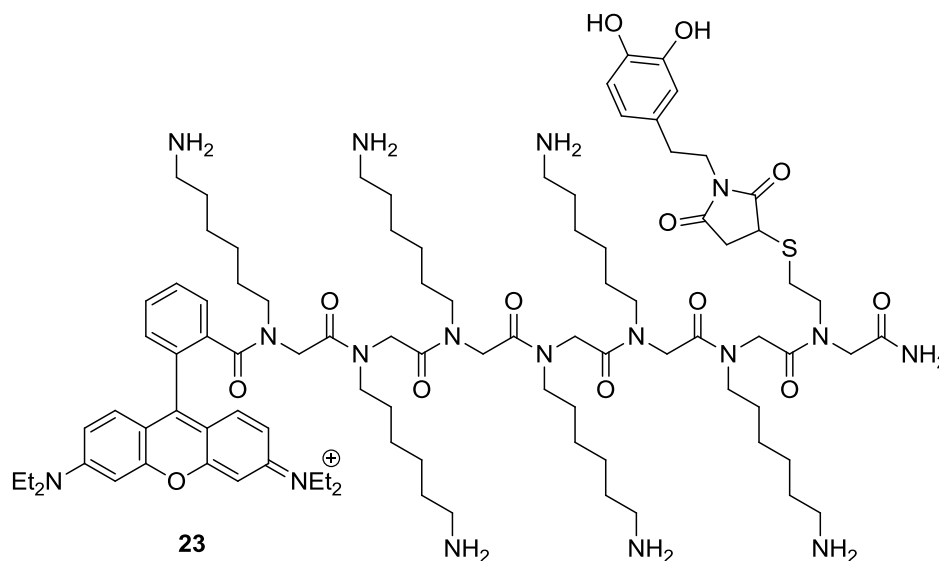
6.2.7.1 Michael-Additionen mit 1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**15**)1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion-Peptid KGGGC (**26**)

Es wurden 2.95 mg (3.78 mmol, 1.00 Äq.) Peptid KGGGC **25** in 200 μ L H₂O gelöst und 2.65 mg (11.1 mmol, 2.94 Äq.) 1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**15**) in 200 μ L Acetonitril wurden analog AAV5 umgesetzt. Es wurden 3.00 mg (2.88 mmol, 78%) Linker-Peptid **26** in Form eines gelben Feststoffes erhalten. Das Produkt **26** wurde mittels HPLC gereinigt, die Charakterisierung erfolgte durch UV/Vis und MALDI-TOF (Tabelle 30).

UV/Vis (H₂O): λ_{\max} (log ϵ) = 412 (0.38) nm.

Tabelle 30: MS (MALDI-TOF, DHB) Ergebnisse der Reaktion zwischen 1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**15**) und Peptid **25**.

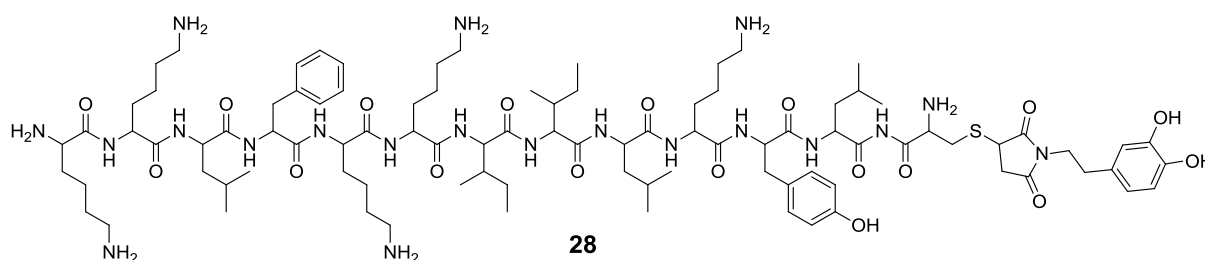
Eintrag	M _{Soll} [g/mol]	M _{Ist} [g/mol]
Peptid 25	779	780
Dopamin-Maleinimid-Peptid 26	1012	1013

1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion-Peptoid (**23**)

Es wurden 2.09 mg (1.40 mmol, 1.00 Äq.) Peptoid **22** in 500 μL H_2O gelöst. Diese wurden mittels einer NAP5-Säule in H_2O umgepuffert. Das Volumen wurde auf 200 μL reduziert und 977 μg (4.19 mmol, 3.00 Äq.) 1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**15**) in 200 μL MeCN wurden analog AAV5 zugegeben. Das Produkt **23** wurde mittels HPLC gereinigt, die Charakterisierung erfolgte durch MALDI-TOF (Tabelle 31).

Tabelle 31: MS (MALDI-TOF, DHB) Ergebnisse der Reaktion zwischen 1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**15**) und Peptoid **22**.

Eintrag	Masse _{Soll} [g/mol]	Masse _{Ist} [g/mol]
Peptoid 22	1497	1497
Produkt 23	1730	1731

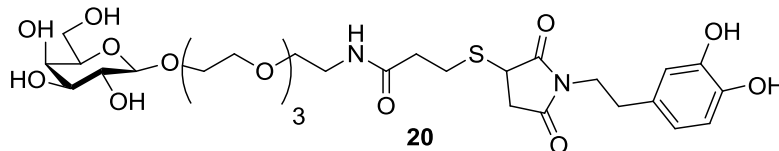
1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion-BP100-Cystein **28**

Eine Lösung aus 2.55 mg (1.67 μmol , 1.00 Äq.) BP100-Cystein **27** in 200 μL H_2O wurde mit 1 M NaOH auf pH = 7 eingestellt. Zu der Lösung wurden 780 μg (3.35 μmol , 2.00 Äq.) 1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**15**) analog AAV5 gegeben. Das Produkt wurde mittels HPLC gereinigt, die Charakterisierung erfolgte durch MALDI-TOF (Tabelle 32).

Tabelle 32: MS (MALDI-TOF, DHB) Ergebnisse der Reaktion zwischen 1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**15**) und dem Peptid BP100-Cystein **27**.

Eintrag	Masse _{Soll} [g/mol]	Masse _{Ist} [g/mol]
BP100-Cystein 27	1524	1524
Produkt 28 Signal 1	1757	1757
Produkt 28 Signal 2	1758 (1990)	1990

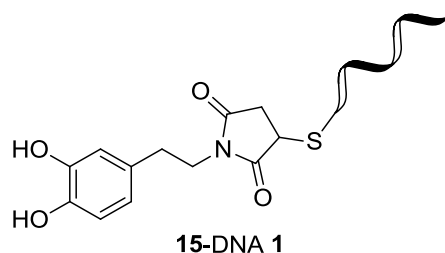
3-((1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)thio)-*N*-(14-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy))-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)propanamid (**20**)



Es wurden 3.17 mg (6.93 μmol , 1.00 Äq.) Zucker **19** in 200 μL H_2O gelöst und 4.85 mg (20.8 μmol , 3.00 Äq.) 1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**15**) analog AAV5 zugegeben. Das Produkt **20** wurde mittels HPLC gereinigt, die Charakterisierung erfolgte durch MALDI-TOF (Tabelle 33).

Tabelle 33: MS (MALDI-TOF, DHB) Ergebnisse der Reaktion zwischen 1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**15**) und Zucker **19**.

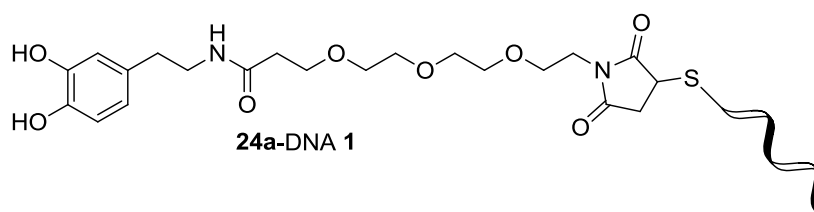
Eintrag	M _{Soll} [g/mol]	M _{Ist} [g/mol]
Produkt 20 (+Na)	691 (714)	713

1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion-Oligonukleotid DNA **1** und DNA **2**

Es wurden 100 μL einer 100 μM Oligonukleotid-Lösung mit 60 μL einer 1.00 M DTT-Lösung für 2 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ reduziert. Nach Reinigung mittels NAP5 und NAP10 wurde die Oligonukleotid-Lösung zu 100 μL 300 μM 1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**15**) in 100 μL MeCN zugetropft und 2 h bei RT geschüttelt. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC, die Charakterisierung durch MALDI-TOF (Tabelle 34).

Tabelle 34: MS (MALDI-TOF, 3-HPA) der Reaktion zwischen 1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**15**) und verschiedenen thiolierten Oligonukleotiden.

Eintrag	M_{Soll} [g/mol]	M_{Ist} [g/mol]
15-DNA 1	7241	7244
15-DNA 2	4790	4789

N-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-3-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)propanamid-Oligonukleotid DNA **1**

Es wurden 100 μL einer 100 μM Oligonukleotid-Lösung mit 60 μL einer 1.00 M DTT-Lösung für 2 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ reduziert. Nach Reinigung mittels NAP5 und NAP10 wurde die Oligonukleotid-Lösung zu 100 μL 3 mM *N*-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-3-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)propanamid (**24a**) in H_2O zugetropft und über Nacht bei RT geschüttelt. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC (Tabelle 43), die Charakterisierung durch MALDI-TOF (Tabelle 35) und UV/Vis.

UV/Vis (H₂O, DNA **1**): λ_{\max} (log ϵ) = 256 (1.00) nm.

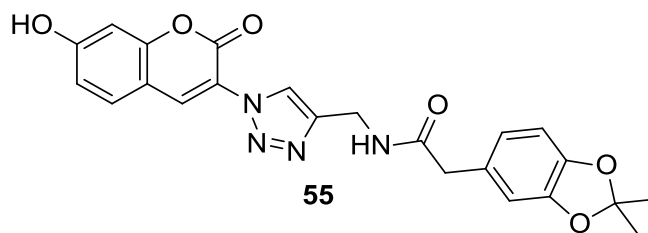
Tabelle 35: MS (MALDI-TOF, 3-HPA) der Reaktion zwischen thiolierter DNA **1** und dem Maleinimid (**24a**).

Eintrag	M _{Soll} [g/mol]	M _{Ist} [g/mol]
24a-DNA 1	7444	7442

6.2.7.2 1,3-Dipolare Cycloadditionen

a. Unter Kupferkatalyse

2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-*N*-((1-(7-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)acetamid (**55**)



In einer 10 mL H₂O/EtOH-Mischung (1:1) wurden 50.0 mg (246 μ mol, 1.00 Äq.) 3-Azido-7-hydroxycumarin (**50**) und 60.0 mg (246 μ mol, 1.00 Äq.) 2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)acetamid (**35**) gelöst. Zur braunen Lösung wurden 9.00 mg (49.2 μ mol, 0.20 Äq.) Natriumascorbat und 3.00 mg (12.3 μ mol, 5 mol%) CuSO₄·5 H₂O zugegeben. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 20 mL H₂O gelöst und abfiltriert. Nach Trocknen an der Luft wurden 55.2 mg (123 μ mol, 50%) 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-*N*-((1-(7-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)acetamid (**55**) in Form eines braunen Feststoffs erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 10.9 (bs, 1 H, *NH*), 8.58 (s, 1 H, *H*_{Triazol}), 8.36 (s, 1 H, *H*_{Olefin}), 7.74 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 1 H, *H*_{Ar}), 6.92–6.64 (m, 5 H, *H*_{Ar}), 4.38 (s, 2 H, *NHCH*₂), 3.34 (s, 2 H, *ArCH*₂), 1.60 (s, 6 H, 2×*CH*₃).

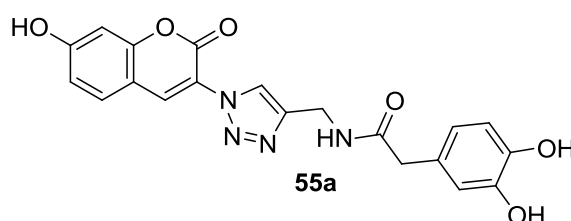
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 170.0 (C), 162.3 (C), 156.1 (C), 154.5 (C), 146.6 (C), 145.3 (C), 135.9 (CH₂), 130.8 (CH₂), 129.1 (C), 123.6 (CH₂), 121.3 (CH₂), 119.2 (C), 117.5

(C), 114.1 (CH₂), 110.2 (2×C), 109.1 (CH₂), 107.6 (CH₂), 102.0 (CH₂), 41.6 (CH₂), 34.0 (CH₂), 25.4 (2×CH₃).

MS (FAB, 3-NBA): 449 (100) [M+H]⁺, 293 (25), 214 (32), 163 (73), 136 (80), 123 (32), 107 (30), 91 (23).

HR-MS (C₂₃H₂₁N₄O₆⁺, FAB): ber.: 449.1461 amu; gef.: 449.1464 amu.

2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-*N*-((1-(7-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)acetamid (**55a**)



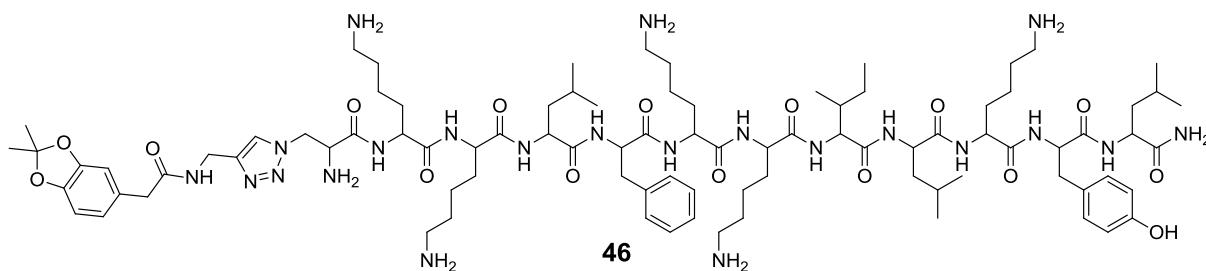
Nach AAV3 wurden unter Argonatmosphäre 2 mL entgastes CHCl₃, 596 µL TFA und 23.8 µL H₂O zu einer Lösung aus 100 mg (408 µmol, 1.00 Äq) 2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)acetamid (**55**) in 2 mL entgastem CHCl₃ gegeben. Es wurden 83.3 mg (204 µmol, quant.) 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-*N*-((1-(7-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)acetamid (**55a**) in Form eines braunen Öls erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 8.35 (t, ³*J* = 5.0 Hz, 1 H, NH), 6.66–6.61 (m, 2 H, H_{Ar}), 6.49 (dd, ³*J* = 5.0 Hz, ³*J* = 2.0 Hz, 5 H, H_{Ar}), 3.84–3.82 (m, 2 H, NHCH₂), 3.22 (s, 2 H, ArCH₂), 3.08 (t, ³*J* = 3.0 Hz, 1 H, CH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 170.5 (C), 162.2 (C), 156.1 (C), 154.4 (C), 144.7 (2×C), 143.7 (C), 135.9 (CH₂), 130.8 (CH₂), 126.7 (CH₂), 119.6 (C), 119.2 (C), 116.3 (C), 115.1 (C), 114.1 (C), 110.2 (2×C), 102.0 (C), 41.5 (CH₂), 40.3 (2×CH₂).

MS (FAB, 3-NBA): 409 (35) [M+H]⁺, 408 (18) [M⁺-H].

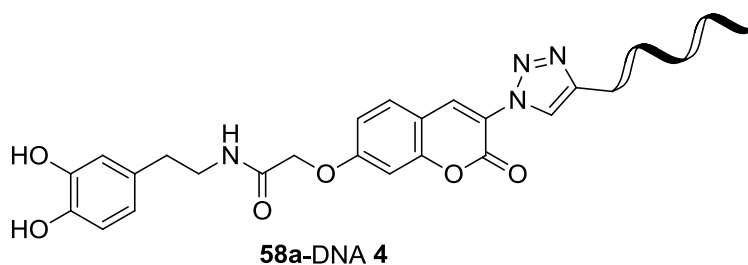
HR-MS (C₂₀H₁₇N₄O₆⁺, FAB): ber.: 409.1148 amu; gef.: 409.1150 amu.

2-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)acetamid-BP100-Azid **46**

Es wurden 300 µg (1.22 µmol, 1.00 Äq.) 2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)acetamid (**35**) in 200 µL DMSO gelöst. Zu der Lösung wurden nacheinander 1.87 mg (1.22 µmol, 1.00 Äq.) BP100-Azid **27a** in 150 µL H₂O, 20.0 µg (80.0 nmol, 5 mol%) CuSO₄·5 H₂O in 25 µL H₂O und 50.0 µg (25.2 nmol, 0.207 Äq.) Natriumascorbat in 25 µL H₂O zugegeben. Die farblose Lösung wurde über Nacht bei 37 °C geschüttelt, die Reinigung erfolgte mittels HPLC. Die Masse wurde mittels MALDI-TOF (Tabelle 36) detektiert.

Tabelle 36: MS (MALDI-TOF, DHB) der Reaktion zwischen Alkin **35** und BP100-Azid **27a**.

Eintrag	M _{Soll} [g/mol]	M _{Ist} [g/mol]
BP100-Azid 27a	1532	1532
Produkt 46 (+Na, +K)	1778 (1801, 1871)	1778, 1801, 1871

N-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-2-((3-(4-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)acetamid-DNA **4**

Zu einer 100 µL 100 µM DNA **4(a)**-Lösung in H₂O wurde eine 100 µL 100 µM *N*-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-2-((3-(4-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)acetamid (**58a**) in DMSO gegeben. Daraufhin erfolgte die Zugabe einer 100 µL 2 mM Natriumascorbat-Lösung in H₂O und einer 100 µL 1 mM CuSO₄·5 H₂O-Lösung ebenfalls in

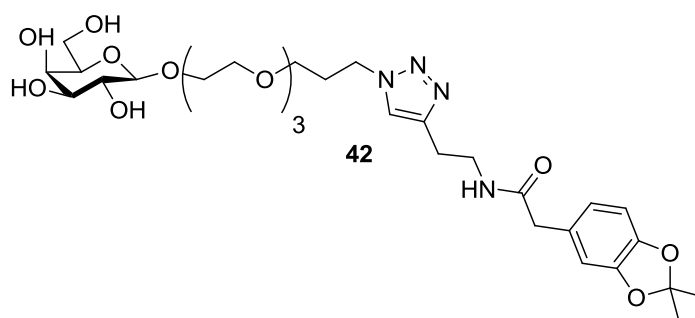
H₂O. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei RT geschüttelt. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC (Tabelle 43), das Produkt wurde durch UV/Vis und MALDI-TOF charakterisiert (Tabelle 37).

UV/Vis (H₂O): λ_{\max} (log ϵ) = 345 (0.09), 268 (0.83) nm.

Tabelle 37: MS (MALDI-TOF, DHB) der Reaktion zwischen Azid **58a** und DNA **4(a)**.

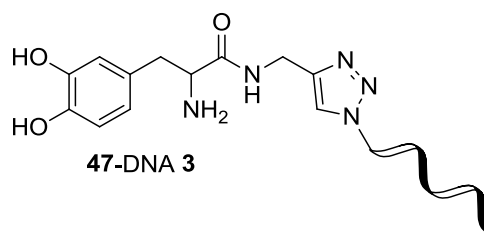
Eintrag	M _{Soll} [g/mol]	M _{Ist} [g/mol]
58a-DNA 4	7759 [7837, M+2 K]	7838 [M+2 K]
58a-DNA 4a	5025[5103, M+2 K]	5103 [M+2 K]

2-(2,2-Dimethylbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)-*N*-(2-(1-(1-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)ethyl)acetamid **42**



Es wurden 20.4 mg (51.5 nmol, 1.00 Äq.) (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-((15-Azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecyl)oxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol (**19a**) und 25.7 μ g (51.5 nmol, 0.100 Äq.) CuSO₄·5 H₂O in 200 μ L H₂O/EtOH (1:1) gelöst. Dazu wurde eine Lösung aus 12.6 mg (51.5 nmol, 1.00 Äq.) geschützten 2-(2,2-Dimethylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)-*N*-(prop-2-in-1-yl)acetamid (**35**), 1.39 mg (2.58 nmol, 5 mol%) TBTA und 1.02 mg (2.58 nmol, 5 mol%) Natriumascorbat in 400 μ L H₂O/EtOH (1:1) zugegeben und über Nacht bei RT geschüttelt. Es wurden 14.9 mg (23.3 nmol, 45%) catecholmodifizierter Zucker **42** in Form eines braunen Öls erhalten. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC.

MS (FAB, 3-NBA): 737 (38), 663 (42) [M+Na], 641 (61) [M+H]⁺, 479 (100), 439 (30), 246 (98) [36]⁺, 206 (21), 163 (92), 131 (61), 123 (43).

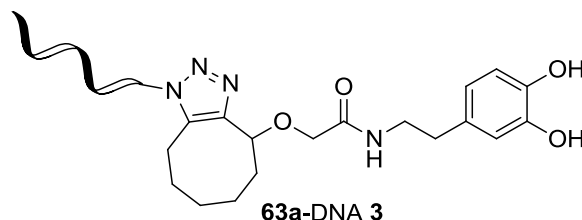
2-Amino-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-*N*-((1-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)propanamid-
DNA 3

Es wurden 50 μL einer 100 μM Lösung aus 2-Amino-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-*N*-((1-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)propanamid (**47**) in H_2O zu 50 μL einer 100 μM Lösung DNA **3** gegeben. Eine frisch hergestellte Lösung aus 0.700 μM THPTA, 1.00 μmol Natriumascorbat und 0.100 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in einer 200 μM NaCl-Lösung wurde zur der Alkin-Azid-Lösung gegeben und über Nacht geschüttelt. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC (Tabelle 43), das Produkt wurde durch MALDI-TOF charakterisiert (Tabelle 38).

Tabelle 38: MALDI-TOF Ergebnisse der Reaktion von trifunktionellem Linker **47** mit DNA **3**.

Eintrag	M_{Soll} [g/mol]	M_{Ist} [g/mol]
DNA 3	7524	7525
47-DNA 3	7758	7759

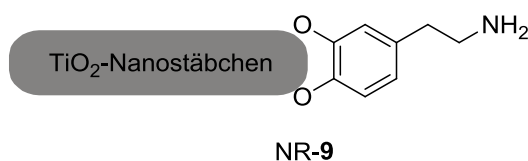
b. Kupferfreie Cycloaddition

2-(Cyclooct-2-in-1-yloxy)-*N*-(3,4-dihydroxyphenethyl)acetamid (**63a**)-DNA **3**

Es wurden 100 μL einer 100 μM Lösung aus 2-(Cyclooct-2-in-1-yloxy)-*N*-(3,4-dihydroxyphenethyl)acetamid (**63a**) in H_2O zu 50 μL einer 100 μM Lösung DNA **3** gegeben und über Nacht geschüttelt. Die Reinigung erfolgte mittels HPLC (Tabelle 43), das Produkt wurde durch MALDI-TOF charakterisiert (Tabelle 39).

Tabelle 39: MALDI-TOF-Resultate der kupferfreien Cycloaddition zwischen Cyclooctin **63a** und DNA **3**.

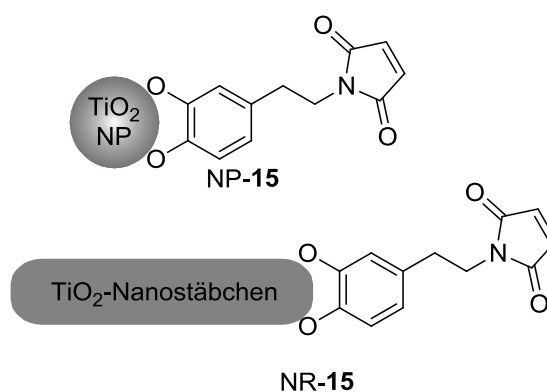
Eintrag	M_{Soll} [g/mol]	M_{Ist} [g/mol]
DNA 3	7524	7525
63a-DNA 3 Signal 1	7841	7841
63a-DNA 3 Signal 2	7841	7841

6.3 Reaktionen mit TiO_2 -Nanoteilchen6.3.1 Modifikation der TiO_2 -Nanopartikel und Nanostäbchena. Dopamin-Hydrochlorid (**9a**)

Nach AAV6 wurden 1.00 mg TiO₂-Nanostäbchen in 100 µL MeOH suspendiert und 3.00 mg Dopamin-Hydrochlorid (**9a**) in 100 µL H₂O zugegeben. Nach der wurde ein IR-Spektrum aufgenommen um die Oberflächenmodifikation nachzuweisen.

IR (ATR) $\tilde{\nu}$: 3247, 2920, 28253 1630, 1485, 1427, 1267, 1122, 1025 cm⁻¹.

b. 1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**15**)

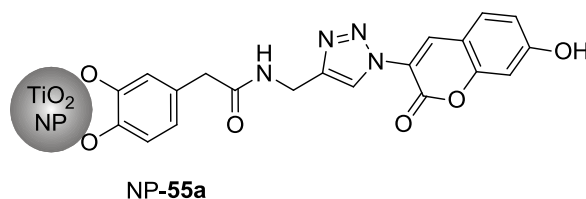


Nach AAV6 wurden 1.00 mg TiO₂-Nanopartikel und Nanostäbchen in je 100 µL MeOH suspendiert und 3.00 mg 1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrol-2,5-dion (**15**) in 100 µL Acetonitril zugegeben. Nach der Reinigung wurde für die Nanopartikel ein ¹H-NMR, für die Nanostäbchen ein IR-Spektrum aufgenommen um die Oberflächenmodifikation nachzuweisen.

¹H-NMR (250 MHz, CD₃CN₃, δ): 6.67–6.71 (m, 2 H, *H*_{Mal}), 6.48–6.64 (m, 3 H, *H*_{Ar}), 3.58–3.66 (m, 2 H, CH₂NH), 2.68–2.75 (m, 2 H, CH₂Ar).

IR (KBr) $\tilde{\nu}$: 3338, 3098, 2925, 2853, 2254, 1770, 1692, 1603, 1500, 1440, 1406, 1358, 1280, 1139, 1041, 945, 824 cm⁻¹.

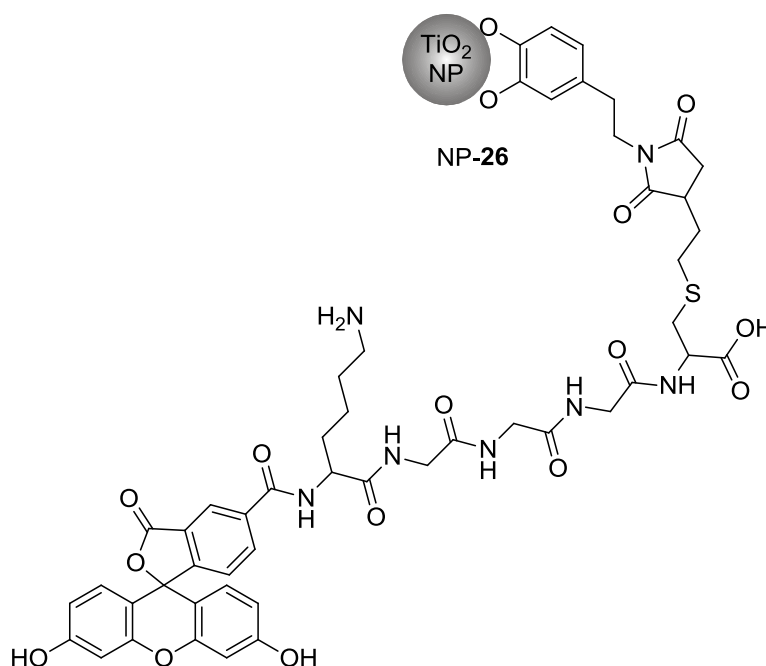
c. 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-*N*-((1-(7-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)acetamid (**55a**)



Nach AAV6 wurden 3.00 mg 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-*N*-((1-(7-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)acetamid (**55a**) in 200 μ L H₂O gelöst und die hellbraune Lösung zu 500 ng TiO₂-Nanopartikeln in 200 μ L H₂O gegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT geschüttelt. Die modifizierten Nanopartikel wurden über Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die Auswertung erfolgte mittels UV/Vis-Messungen.

UV/Vis (DMSO): λ_{\max} (log ϵ) = 346 (0.68), 290 (0.26) nm.

- d. 3-(4-Aminobutyl)-1-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3*H*-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl)-15-(((1-(3,4-dihydroxyphenethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)thio)methyl)-1,4,7,10,13-pentaoxo-2,5,8,11,14-pentaazahexadecansäure **26**

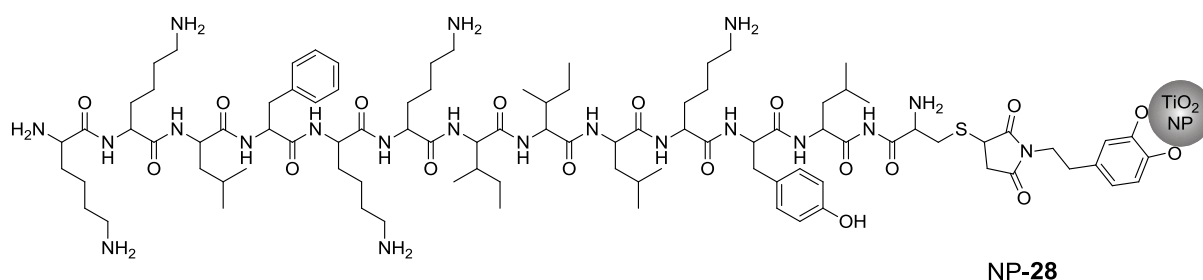


Nach AAV6 wurden 3.00 mg des modifizierten Peptids **26** in 200 μ L H₂O gelöst und die gelbe Lösung zu 1.00 mg TiO₂-Nanopartikeln in 200 μ L H₂O gegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT geschüttelt. Die modifizierten Nanopartikel wurden über Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die Auswertung erfolgte mittels UV/Vis-Spektroskopie, Gelelektrophorese und DLS-Messungen (Tabelle 40).

UV/Vis (DMSO): λ_{\max} (log ϵ) = zwischen 400 und 550 nm.

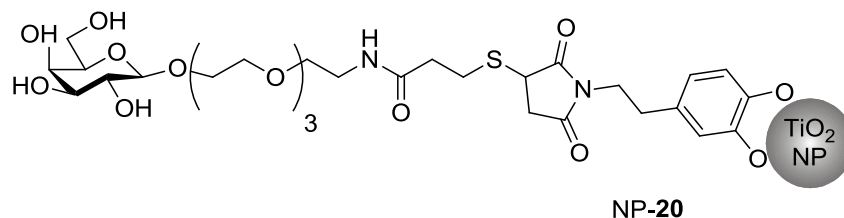
Tabelle 40: Hydrodynamischer Radius der peptidmodifizierten TiO₂-Nanopartikel.

Eintrag	Radius [nm]
NP-15	34.2 ± 0.395
NP-26	62.3 ± 2.050

e. 1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-1*H*-pyrrole-2,5-dion-BP100-Cystein **28**

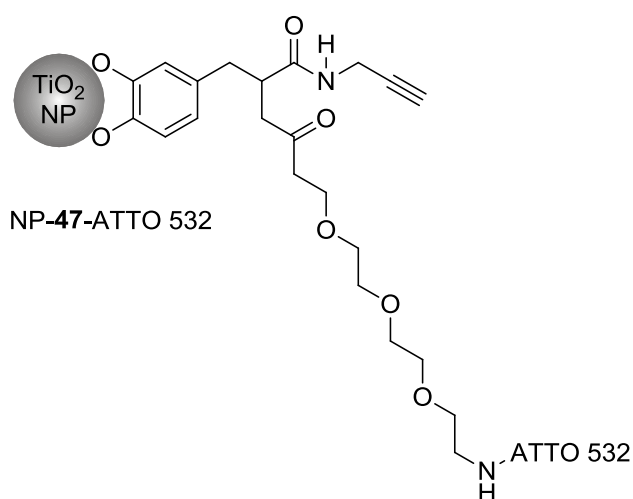
Nach AAV6 wurden 500 µg des modifizierten BP100-Cystein **28** in 200 µL H₂O gelöst und die farblose Lösung zu 1.00 mg TiO₂-Nanopartikeln in 200 µL H₂O gegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT geschüttelt. Die modifizierten Nanopartikel wurden über Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die Auswertung erfolgte mittels UV/Vis-Spektroskopie.

UV/Vis (H₂O): λ_{\max} (log ϵ) = zwischen 342 und 580 nm, 278 (0.86).

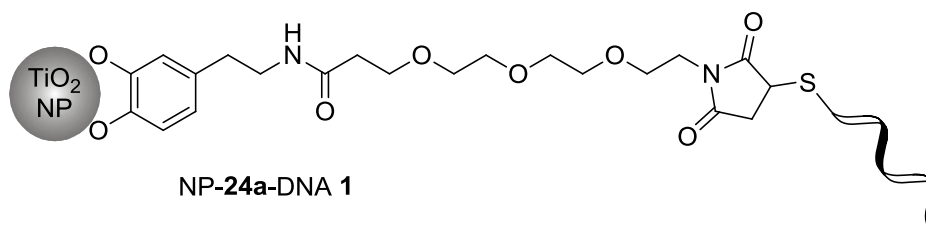
f. 13-((1-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)thio)-*N*-(14-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)propanamid (**20**)

Nach AAV6 wurden 200 µg des modifizierten Zuckers **20** in 100 µL H₂O gelöst und die farblose Lösung zu 1.00 mg TiO₂-Nanopartikeln in 100 µL H₂O gegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT geschüttelt. Die Auswertung erfolgte mittels UV/Vis-Spektroskopie.

UV/Vis (H₂O): λ_{\max} (log ϵ) = zwischen 317 und 383 nm, 280 (0.45).

g. 2-Amino-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-*N*-(prop-2-in-1-yl)propanamid-ATTO 532

Nach AAV6 wurden 100 μL 300 μM Alkin **47** in 100 μL Phosphat-Puffer (pH = 8.4) gelöst und die farblose Lösung zu 1.00 mg TiO_2 -Nanopartikeln in 100 μL H_2O gegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT geschüttelt. Es wurden 100 μL 300 μM ATTO 532 in DMSO zugegeben und über Nacht geschüttelt. Der Nachweis der Bindung auf die Nanopartikel erfolgte mittels Gelelektrophorese.

6.3.1.1 Michael-Addition auf der TiO_2 -Nanopartikeloberflächea. *N*-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-3-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)propanamid-DNA **1**

Nach AAV6 wurden 100 μL 100 μM Maleinimid **24a** in 100 μL H_2O gelöst und die farblose Lösung zu 1.00 mg TiO_2 -Nanopartikeln in 100 μL H_2O gegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT geschüttelt. Die Reinigung erfolgte mittels einer NAP5-Säule (Phosphat-Puffer, pH = 7.5).

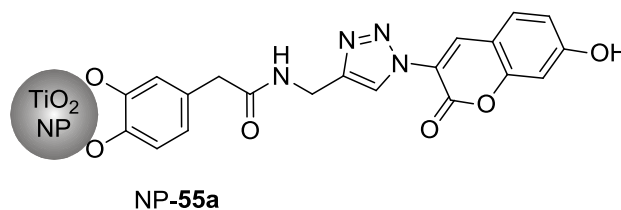
Es wurden 100 μL einer 100 μM Oligonukleotid-Lösung mit 60 μL einer 1.00 M DTT-Lösung für 2 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ reduziert. Nach Reinigung mittels NAP5 und NAP10 wurde die Oligonukleotid-Lösung zu den maleinimidmodifizierten Nanopartikeln (NP-24a) in 100 μL H_2O zugetropft und über Nacht bei RT geschüttelt. Der Nachweis der Bindung auf die Nanopartikel erfolgte mittels Gelelektrophorese und Zetapotential-Messungen (Tabelle 41).

Tabelle 41: Zetapotentiale der Titandioxid-Nanopartikel mit und ohne Oligonukleotid.

Eintrag	Zetapotential [mV]
NP-24a	-6.64 ± 2.04
NP-24a-DNA 1	-22.6 ± 3.65

6.3.2 1,3-Dipolare Cycloaddition unter Kupferkatalyse auf der TiO_2 -Nanopartikeloberfläche

a. 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-*N*-(prop-2-in-1-yl)acetamid (**55a**)



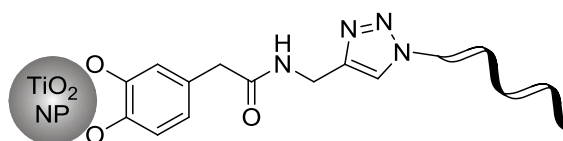
Nach AAV6 wurden 3.00 mg des 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-*N*-(prop-2-in-1-yl)acetamid (**36**) in 200 μL MeCN gelöst und die gelbe Lösung zu 1.00 mg TiO_2 -Nanopartikeln in 200 μL H_2O gegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT geschüttelt. Die alkinmodifizierten Nanopartikel wurden gereinigt. Anschließend wurden sie in 100 μL DMSO gelöst, 30.0 mg (123 μmol , 1.00 Äq.) 3-Azido-7-hydroxycoumarin (**50**), 540 mg (24.6 nmol, 0.20 Äq.) Natriumascorbat und anschließend 180 mg (61.5 nmol, 5 mol%) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Zentrifugation (zweimal) wurden die modifizierten TiO_2 -Nanopartikel in DMSO aufgenommen und UV/Vis-, Fluoreszenz und DLS-Messungen (Tabelle 42) durchgeführt.

UV/Vis (DMSO): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 346 (0.80), 290 (0.25) nm.

Tabelle 42: DLS-Ergebnisse der kupferkatalysierten Cycloaddition auf alkinmodifizierten Nanopartikeln (NP-36) mit 3-Azido-7-hydroxycumarin (50).

Eintrag	Radius [nm]
NP-36	20.0 ± 3.18
NP-55a	102 ± 1.92

b. 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-*N*-(prop-2-in-1-yl)acetamid-DNA **3**



NP-36-DNA **3**

Nach AAV6 wurden 100 μL 100 μM 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-*N*-(prop-2-in-1-yl)acetamid (**36**) in MeCN gelöst und die Lösung zu 1.00 mg TiO_2 -Nanopartikeln in 100 μL H_2O gegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT geschüttelt. Die alkinmodifizierten Nanopartikel wurden gereinigt. Daraufhin wurden sie in 100 μL DMSO gelöst, 100 μL 100 μM DNA **3**, 100 μL 2.00 mM Natriumascorbat und anschließend 100 μL 1.00 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei RT geschüttelt. Die Auswertung erfolgte anhand eines Agarose-Gels.

Tabelle 43: Standardgradient für die Analyse und Reinigung von Oligonukleotiden mittels HPLC. Verwendete Lösungsmittel waren A: 0.1 M NH₄OAc in H₂O und B: CH₃CN.

Zeit [min]	Anteil B [%]
0	0
10	5
15	10
20	15
25	30
32	80
40	100
45	0

Tabelle 44: Standardgradient für die Analyse und Reinigung von Peptiden sowie organischen Verbindungen mittels HPLC. Verwendete Lösungsmittel waren A: H₂O + 0.1 % TFA, B: CH₃CN + 0.1% TFA.

Zeit [min]	Anteil B [%]
0	0
3	0
33	100
35	100
38	0
40	0

Tabelle 45: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz
DNA 1	[ThioC6]GGTCCGGTCATAAAGCGATAAG
DNA 2	[ThioC6]GGTGAAGAGATC[TAM]
DNA 3	Azid-TTTTTTTTTTTTTGATCTCTTCACC
DNA 4	Hexynyl-TTTTTTTTTTTTTGATCTCTTCACC
DNA 4a	Hexynyl-TTGATCTCTTCACC
cDNA 4a	GGTGAAGAGATC[Cy5]

7 Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac	Acetyl
Äq.	Äquivalent(e)
Ar	Aromat(isch)
ATR	<i>attenuated total reflection</i>
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
bs	breites Singulett
<i>c</i>	cyclo (als Präfix), Konzentration
CuAAC	<i>copper-catalyzed azide-alkyne-cycloaddition</i>
d	Tag(e)
δ	chemische Verschiebung
DC	Dünnschichtchromatografie
DLS	<i>dynamic light scattering</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRIFT	<i>diffuse reflectance infrared fourier transform</i>
EDC·HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EI	Elektronenstoßionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
Et	Ethyl
eV	Elektronenvolt
FAB	<i>fast atom bombardement</i>
gef.	gefunden
g	Gramm
h	Stunde(n)
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium- hexafluorophosphat
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium- hexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>

HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hz	Hertz
IBX	1-Hydroxy-1,2-benziodoxol-3(1 <i>H</i>)-on-1-oxid
IR	Infrarotspektroskopie, -spektrum
<i>J</i>	Kopplungskonstante
kg	Kilogramm
kJ	Kilojoule
L	Liter
λ	Wellenlänge
M	molar
Me	Methyl
μ	Mikro
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
μ L	Mikroliter
mL	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NP	Nanopartikel
NR	<i>nanorods</i>
p.a.	<i>pro analysi</i>
ppm	<i>parts per million</i>
quant	quantitativ
R_f	<i>ratio of fronts</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
TBTA	Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin)
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin

TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOF	<i>time of flight</i> , Flugzeitdetektor
UV	Ultraviolett
Vis	<i>visible</i>

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei all denen danken, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt zunächst Dr. Ljiljana Fruk für die spannende und fordernde Aufgabenstellung. Zudem für die freundliche Aufnahme in ihrem Arbeitskreis, die Freiheit und die sehr gute Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bräse, der die Betreuung meiner Arbeit übernommen hat und bei Fragen und Problemen immer ein kompetenter Ansprechpartner war.

Für die Übernahme des Korreferats möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Meier bedanken.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe von Dr. Ljiljana Fruk, Dr. Daniel Fritz, Dr. Martina Altemöller, Dr. Andre Petershans, Dr. Sinem Engin, Dr. Ishtiaq Ahmed, Marko Miljevic, Dennis Bauer, Cheng Chen, Antonina Vigovskaya, Ramona Ring und Philipp Biegger, möchte ich mich für sehr das angenehme Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft bedanken. Besonders bedanke ich mich bei Lukas Stolzer, der meine Launen ertragen hat und mir immer ein Lächeln entlocken konnte. Dania danke ich von ganzem Herzen, dass sie eine gute Freundin ist.

Ebenfalls danken möchte ich meinen Forschungspraktikanten Yvonne Geiger, Anna Petri und Larissa Geiger, die ebenso zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Bei den Kooperationspartnern, Dr. Sidonie Vollrath, Dominik Kölmel, Tobias Hagendorn, Dr. Christine Richter und Dr. Parwesh Wadhvani möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Ein weiterer Dank geht an die Sportler, die mich zum Laufen bewegt haben und mir eine Abwechslung im Laboralltag ermöglicht haben: Dr. Daniel Fritz, Karolin Niessner, Dr. Nicole Volz und Dr. Oliver Geiseler.

Den Mitarbeitern der Analytikabteilung des Instituts für Organische Chemie, Angelika Kernert, Annelie Kuiper, Pia Lang, Tanja Ohmer und Ingrid Rossnagel möchte ich für die

schnelle und kompetente Messung der NMR, MS, HR-MS und IR-Spektren danken. Annette Hochgesand und Karolin Niessner möchte ich für die MALDI-TOF-Messungen danken. Weiterhin möchte ich den Werkstätten, Richard von Budberg und Jakob Mayer danken.

Für die kritische Korrektur und die guten Anmerkungen möchte ich Antonina Vigovskaya, Lukas Stolzer und Dr. Oliver Geiseler danken.

Den Sekretärinnen Ursula Mösle, Renate Bender, Gerda Reichert und Désirée Witt danke ich nicht nur für ihre stets freundliche und unkomplizierte Hilfsbereitschaft bei allen Formalitäten, sondern auch für die netten Gespräche. Ein großes Dankeschön geht an Andreas Elkeries, der bei jeglichen Computerproblemen immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Dr. Radian Popescu, Dr. Dimitri Litvinov, Andreas Lefahrt und Philipp Müller möchte ich für die angefertigten TEM-Aufnahmen danken. PD Dr. rer. nat. habil. Reinhard Schneider möchte ich für die Messungen am FEI Titan³ 80-300 kV danken.

Der größte Dank geht an meine Eltern und Geschwister und an meine Schwiegereltern, die immer an mich geglaubt und mich unterstützt haben.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Mann Oliver, der bei allen Entscheidungen und schwierigen Zeiten an meiner Seite stand und mir Kraft gegeben hat.

9 Publikationsliste

Originalarbeiten

- B. Geiseler, L. Fruk, *Bifunctional Catechol Based Linkers for Modification of TiO₂ Surfaces*, *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 735-741.
- B. Geiseler, M. Miljevic, L. Fruk, P. Müller, *Phototriggered Production of Reactive Oxygen Species by TiO₂ Nanospheres and Rods*, *Journal of Nanomaterials* **2012**, doi:10.1155/2012/708519.

Posterbeiträge und Konferenzen

- B. Geiseler, L. Fruk, *Biofunctionalization of Titanium dioxide Nanoparticles*, Nanocon 2011, Brno, Tschechische Republik, Oktober 2011.
- B. Geiseler, L. Fruk, *Biofunctionalization of Titanium dioxide Nanoparticles*, CFN Summer School 2011 on Nano-Biology, Bad Herrenalb, Deutschland, September 2011.
- CFN Summer School 2009 on Nano-Biology, Bad Herrenalb, Deutschland, September 2009.

10 Curriculum Vitae

In der elektronischen Version nicht vorhanden

11 Literaturverzeichnis

- [1] B. Grzmil, B. Kic, M. Rabe, *Chemical Papers-Chemicke Zvesti* **2004**, 58, 410-414.
- [2] H. Goesmann, C. Feldmann, *Angew. Chem.* **2010**, 49, 1362-1395.
- [3] W. Chen, J. Zhang, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, 6, 1159-1166.
- [4] S. H. Lee, M. K. Gupta, J. B. Bang, H. Bae, H.-J. Sung, *Advanced Healthcare Materials* **2013**, 1-8.
- [5] B. Geiseler, L. Fruk, *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 735-741.
- [6] B. Geiseler, M. Miljevic, P. Muller, L. Fruk, *Journal of Nanomaterials* **2012**.
- [7] L. P. Balogh, *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **2010**, 6, 397-398.
- [8] V. V. Mody, R. Siwale, A. Singh, H. R. Mody, *J. Pharm. Bioallied. Sci.* **2010**, 2, 282-289.
- [9] D. Bera, L. Qian, T. K. Tseng, P. H. Holloway, *Materials* **2010**, 3, 2260-2345.
- [10] G. Oskam, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2006**, 37, 161-164.
- [11] P. D. Cozzoli, A. Kornowski, H. Weller, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14539-14548.
- [12] J. Pascual, J. Camassel, H. Mathieu, *Physical Review B* **1978**, 18, 5606-5614.
- [13] a. A. Fujishimaa, X. Zhangb, D. A. Tryk, *Surf. Sci. Rep.* **2008**, 63, 515-582; b. H. Tang, K. Prasad, R. Sanjinès, P. E. Schmid, F. Lévy, *J. Appl. Phys.* **1994**, 75, 2042-2048.
- [14] P. Garrigue, M. H. Delville, C. Labrugere, E. Cloutet, P. J. Kulesza, J. P. Morand, A. Kuhn, *Chem. Mater.* **2004**, 16, 2984-2986.
- [15] Y. L. Wang, Y. N. Xia, *Nano Lett.* **2004**, 4, 2047-2050.
- [16] G. M. Whitesides, J. P. Mathias, C. T. Seto, *Science* **1991**, 254, 1312-1319.
- [17] X. Chen, S. S. Mao, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2007**, 107, 2891-2959.
- [18] X. B. Chen, S. S. Mao, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, 6, 906-925.
- [19] T. Sugimoto, X. P. Zhou, A. Muramatsu, *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, 259, 43-52.
- [20] a. T. Sugimoto, K. Okada, H. Itoh, *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, 193, 140-143; b. T. Sugimoto, X. Zhou, *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, 252, 347-353; c. T. Sugimoto, X. Zhou, A. Muramatsu, *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, 259, 43-52.
- [21] E. Stathatos, P. Lianos, F. Del Monte, D. Levy, D. Tsiourvas, *Langmuir* **1997**, 13, 4295-4300.
- [22] I. W. Hamley, *Nanotechnology* **2003**, 14, R39-R54.
- [23] M. P. Pileni, *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 6961-6973.
- [24] A. R. Kortan, R. Hull, R. L. Opila, M. G. Bawendi, M. L. Steigerwald, P. J. Carroll, L. E. Brus, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1327-1332.
- [25] J. Lin, Y. Lin, P. Liu, M. J. Meziani, L. F. Allard, Y. P. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11514-11518.
- [26] E. Stathatos, P. Lianos, F. DelMonte, D. Levy, D. Tsiourvas, *Langmuir* **1997**, 13, 4295-4300.
- [27] C. Guizard, A. Larbot, L. Cot, S. Perez, J. Rouviere, *J. Chim. Phys.* **1990**, 87, 1901.
- [28] C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, M. A. El-Sayed, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2005**, 105, 1025-1102.
- [29] T. Trindade, P. O'Brien, N. L. Pickett, *Chem. Mater.* **2001**, 13, 3843-3858.

- [30] S. Molloy, A. Ersahin, Y. J. Qian, J. B. Wallis, J. W. Hicks, *Circulation* **1993**, 88, 638-638.
- [31] a. S. Yang, L. Gao, *Chem. Lett.* **2005**, 34; b. S. Yang, L. Gao, *Chem. Lett.* **2005**, 34, 1044-1045.
- [32] V. F. Stone, R. J. Davis, *Chem. Mater.* **1998**, 10, 1468-1474.
- [33] S. C. Pillai, P. Periyat, R. George, D. E. McCormack, M. K. Seery, H. Hayden, J. Colreavy, D. Corr, S. J. Hinder, *J. Phys. Chem. C* **2007**, 114, 1605-1611.
- [34] J. A. Stride, *Solid State Phenomena* **2010**, 162, 261-294.
- [35] M. Rezaee, S. M. M. Khoie, *J. Alloys Compd.* **2010**, 507, 484-488.
- [36] C. Jin, Y. Tang, F. G. Yang, X. L. Li, S. Xu, X. Y. Fan, Y. Y. Huang, Y. J. Yang, *Biol. Trace Elem. Res.* **2011**, 141, 3-15.
- [37] E. Y. Chen, M. Garnica, Y. C. Wang, A. J. Mintz, C. S. Chen, W. C. Chin, *Part Fibre Toxicol.* **2012**, 9, 2.
- [38] S. Sakthivel, H. Kisch, *Angew. Chem.* **2003**, 42, 4908-4911.
- [39] K. Hashimoto, H. Irie, A. Fujishima, *Japanese Journal of Applied Physics Part 1- Regular Papers Brief Communications & Review Papers* **2005**, 44, 8269-8285.
- [40] A. Markowska-Szczupak, K. Ulfig, A. W. Morawski, *Catal. Today* **2011**, 169, 249-257.
- [41] a. R. Wang, K. Hashimoto, A. Fujishima, M. Chikuni, E. Kojima, A. Kitamura, M. Shimohigoshi, T. Watanabe, *Nature* **1997**, 388, 431-432; b. H. Gerischer, *Electrochim Acta* **1995**, 40, 1277-1281; c. A. Ghicov, P. Schmuki, *Chem. Commun.* **2009**, 2791-2808; dP. Roy, D. Kim, K. Lee, E. Spiecker, P. Schmuki, *Nanoscale* **2011**, 3, 5180-5180; eH. Gerischer, *Electrochim. Acta* **1995**, 40, 1277-1281.
- [42] C. O. Robichaud, A. E. Uyar, M. R. Darby, L. G. Zucker, M. R. Wiesner, *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43, 4227-4233.
- [43] P. Gross, J. Schmelzer, *Macromol. Symp.* **2002**, 187, 641-650.
- [44] a. R. X. Cai, Y. Kubota, T. Shuin, H. Sakai, K. Hashimoto, A. Fujishima, *Cancer Res.* **1992**, 52, 2346-2348; b. H. P. Wu, T. L. Cheng, W. L. Tseng, *Langmuir* **2007**, 23, 7880-7885.
- [45] M. Formenti, F. Juillet, Meriaude.P, S. J. Teichner, *Chem. Technol.* **1971**, 680-&.
- [46] a. D. Bahnemann, A. Cassano, *Journal of Advanced Oxidation Technologies* **2002**, 5, 3-3; b. A. L. Linsebigler, G. Q. Lu, J. T. Yates, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **1995**, 95, 735-758.
- [47] A. Fujishima, H. Kenichi, *Nature* **1972**, 238, 37-38.
- [48] J. Manassen, G. Hodes, D. Cahen, *Chemtech.* **1981**, 11, 112-117.
- [49] M. P. Dareedwards, J. B. Goodenough, A. Hamnett, K. R. Seddon, R. D. Wright, *Faraday Discuss.* **1980**, 70, 285-298.
- [50] B. Oregan, M. Gratzel, *Nature* **1991**, 353, 737-740.
- [51] P. Roy, S. Berger, P. Schmuki, *Angew. Chem.* **2011**, 50, 2904-2939.
- [52] A. Fujishima, K. Honda, *Nature* **1972**, 238, 37-38.
- [53] D. M. Blake, P. C. Maness, Z. Huang, E. J. Wolfrum, J. Huang, W. A. Jacoby, *Sep. Purif. Methods* **1999**, 28, 1-50.
- [54] T. J. Battin, F. V. D. Kammer, A. Weilhartner, S. Ottofuelling, T. Hofmann, *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43, 8098-8104.

- [55] D. W. Bahnemann, M. Hilgendorff, R. Memming, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 4265-4275.
- [56] T. Berger, M. Sterrer, O. Diwald, E. Knozinger, D. Panayotov, T. L. Thompson, J. T. Yates, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 6061-6068.
- [57] R. Asahi, T. Morikawa, T. Ohwaki, K. Aoki, Y. Taga, *Science* **2001**, *293*, 269-271.
- [58] a. W. F. Zhou, Q. J. Liu, Z. Q. Zhu, J. Zhang, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2010**, *43*; b. Y. H. Peng, G. F. Huang, W. Q. Huang, *Adv. Powder Technol.* **2012**, *23*, 8-12.
- [59] S. Yin, H. Yamaki, Q. Zhang, M. Komatsu, J. Wang, Q. Tang, F. Saito, T. Sato, *Solid State Ionics* **2004**, *172*, 205-209.
- [60] M. Kalbacova, J. M. Macak, F. Schmidt-Stein, C. T. Mierke, P. Schmuki, *Physica Status Solidi-Rapid Research Letters* **2008**, *2*, 194-196.
- [61] T. Matsunaga, R. Tomoda, T. Nakajima, H. Wake, *FEMS Microbiol. Lett.* **1985**, *29*, 211-214.
- [62] M. Kalbacova, J. M. Macak, F. Schmidt-Stein, C. T. Mierke, P. Schmuki, *physica status solidi (RRL) - Rapid Research Letters* **2008**, *2*, 194-196.
- [63] a. J. W. Seo, H. Chung, M. Y. Kim, J. Lee, I. H. Choi, J. Cheon, *Small* **2007**, *3*, 850-853; b. T. Saito, T. Iwase, J. Horie, T. Morioka, *J. Photochem. Photobiol., B-Biology* **1992**, *14*, 369-379.
- [64] a. L. Brunet, D. Y. Lyon, E. M. Hotze, P. J. J. Alvarez, M. R. Wiesner, *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 4355-4360; b. C. Wei, W. Y. Lin, Z. Zainal, N. E. Williams, K. Zhu, A. P. Kruzic, R. L. Smith, K. Rajeshwar, *Environ. Sci. Technol.* **1994**, *28*, 934-938.
- [65] J. Du, J. M. Gebicki, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 2334-2343.
- [66] S. Z. Wang, R. M. Gao, F. M. Zhou, M. Selke, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 487-493.
- [67] I. Fridovich, *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *247*, 1-11.
- [68] Y. Li, W. Zhang, J. F. Niu, Y. S. Chen, *ACS Nano* **2012**, *6*, 5164-5173.
- [69] J. Y. Li, X. M. Wang, H. Jiang, X. H. Lu, Y. D. Zhu, B. A. Chen, *Nanoscale* **2011**, *3*, 3115-3122.
- [70] a. D. E. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 380-387; b. B. C. Wilson, *Can. J. Gastroenterol.* **2002**, *16*, 393-396; c. M. B. Vrouenraets, G. W. Visser, G. B. Snow, G. A. van Dongen, *Anticancer Res.* **2003**, *23*, 505-522.
- [71] K. Kamps, R. Leek, L. Luebke, R. Price, M. Nelson, S. Simonet, D. J. Eggert, T. A. Atesin, E. M. Brown, *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro* **2012**, *5*, 133-143.
- [72] A. Harada, M. Ono, E. Yuba, K. Kono, *Biomaterials Science* **2013**, *1*, 65-73.
- [73] E. Ghedini, V. Nichele, M. Signoretto, G. Cerrato, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 10653-10660.
- [74] a. M. N. Helmus, D. F. Gibbons, D. Cebon, *Toxicol. Pathol.* **2008**, *36*, 70-80; b. M. Long, H. J. Rack, *Biomaterials* **1998**, *19*, 1621-1639.
- [75] C. A. Grimes, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 1451-1457.
- [76] N. K. Shrestha, J. M. Macak, F. Schmidt-Stein, R. Hahn, C. T. Mierke, B. Fabry, P. Schmuki, *Angew. Chem.* **2009**, *48*, 969-972.
- [77] B. M. Silverman, K. A. Wieghaus, J. Schwartz, *Langmuir* **2005**, *21*, 225-228.
- [78] Y. Y. Song, F. Schmidt-Stein, S. Bauer, P. Schmuki, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4230-4232.

- [79] Y. Y. Song, F. Schmidt-Stein, S. Bauer, P. Schmuki, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4230-4232.
- [80] K. J. Cash, H. A. Clark, *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 584-593.
- [81] a. B. E. Watt, A. T. Proudfoot, J. A. Vale, *Toxicological Reviews* **2004**, *23*; bD. Harms, R. Than, U. Pinkernell, M. Schmidt, B. Krebs, U. Karst, *Analyst* **1998**, *123*, 2323-2327.
- [82] S. A. Kumar, P. H. Lo, S. M. Chen, *Nanotechnology* **2008**, *19*.
- [83] Q. W. Li, G. A. Luo, J. Feng, Q. Zhou, L. Zhang, Y. F. Zhu, *Electroanalysis* **2001**, *13*, 413-416.
- [84] S. Y. Lim, J. S. Lee, C. B. Park, *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *105*, 210-214.
- [85] M. Zayats, R. Baron, I. Popov, I. Willner, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 21-25.
- [86] C. X. Guo, F. P. Hu, C. M. Li, P. K. Shen, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 819-824.
- [87] S. Q. Liu, A. C. Chen, *Langmuir* **2005**, *21*, 8409-8413.
- [88] G. Y. Zhao, X. J. Zhan, W. C. Dou, *Anal. Biochem.* **2011**, *408*, 53-58.
- [89] C. T. Chen, Y. C. Chen, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5912-5919.
- [90] B. M. Rabatic, N. M. Dimitrijevic, R. E. Cook, Z. V. Saponjic, T. Rajh, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1033-1037.
- [91] Z. V. Saponjic, N. M. Dimitrijevic, D. M. Tiede, A. J. Goshe, X. Zuo, L. X. Chen, A. S. Barnard, P. Zapol, L. A. Curtiss, T. Rajh, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 965-971.
- [92] T. Rajh, L. X. Chen, K. Lukas, T. Liu, M. C. Thurnauer, D. M. Tiede, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 10543-10552.
- [93] T. Rajh, Z. Saponjic, J. Q. Liu, N. M. Dimitrijevic, N. F. Scherer, M. Vega-Arroyo, P. Zapol, L. A. Curtiss, M. C. Thurnauer, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1017-1023.
- [94] J. Moser, S. PUNCHIHewa, P. P. Infelta, M. Gratzel, *Langmuir* **1991**, *7*, 3012-3018.
- [95] P. F. Fu, P. Y. Zhang, *Appl. Catal., B-Environmental* **2010**, *96*, 176-184.
- [96] W. C. Lin, C. N. Chen, T. T. Tseng, M. H. Wei, J. H. Hsieh, W. J. Tseng, *J. Eur. Ceram. Soc.* **2010**, *30*, 2849-2857.
- [97] A. Kathiravan, P. S. Kumar, R. Renganathan, S. Anandan, *Colloids Surf., A-Physicochemical and Engineering Aspects* **2009**, *333*, 175-181.
- [98] E. Reisner, D. J. Powell, C. Cavazza, J. C. Fontecilla-Camps, F. A. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18457-18466.
- [99] T. W. Woolerton, S. Sheard, E. Reisner, E. Pierce, S. W. Ragsdale, F. A. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2132-2133.
- [100] T. Paunesku, T. Rajh, G. Wiederrecht, J. Maser, S. Vogt, N. Stojicevic, M. Protic, B. Lai, J. Oryhon, M. Thurnauer, G. Woloschak, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 343-346.
- [101] K. Matsui, M. Karasaki, M. Segawa, S. Y. Hwang, T. Tanaka, C. Ogino, A. Kondo, *Medchemcomm.* **2010**, *1*, 209-211.
- [102] V. Turkowski, S. Babu, D. Le, A. Kumar, M. K. Haldar, A. V. Wagh, Z. Hu, A. S. Karakoti, A. J. Gesquiere, B. Law, S. Mallik, T. S. Rahman, M. N. Leuenberger, S. Seal, *ACS Nano* **2012**, *6*, 4854-4863.
- [103] X. G. Shi, S. H. Wang, S. Meshinchi, M. E. Van Antwerp, X. D. Bi, I. H. Lee, J. R. Baker, *Small* **2007**, *3*, 1245-1252.
- [104] C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angew. Chem.* **2010**, *49*, 1540-1573.
- [105] B. D. Mather, K. Viswanathan, K. M. Miller, T. E. Long, *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 487-531.

- [106] R. Tedja, A. H. Soeriyadi, M. R. Whittaker, M. Lim, C. Marquis, C. Boyer, T. P. Davis, R. Amal, *Polym. Chem.* **2013**, *3*, 2743-2751
- [107] a. K. D. Hartlen, H. Ismaili, J. Zhu, M. S. Workentin, *Langmuir* **2012**, *28*, 864-871; b. H. N. Jeon, K. Ha, *Polymer-Korea* **2012**, *36*, 668-676.
- [108] a. D. G. Smyth, A. Nagamatsu, J. S. Fruton, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4600-4604; b. D. G. Smyth, W. Konigsberg, O. O. Blumenfeld, *Biochem. J.* **1964**, *91*, 589-590.
- [109] J. H. Gao, K. Chen, Z. Miao, G. Ren, X. Y. Chen, S. S. Gambhir, Z. Cheng, *Biomaterials* **2011**, *32*, 2141-2148.
- [110] W. Lu, Y. Zhang, Y. Z. Tan, K. L. Hu, X. G. Jiang, S. K. Fu, *J. Controlled Release* **2005**, *107*, 428-448.
- [111] E. Oh, K. Susumu, J. B. Blanco-Canosa, I. L. Medintz, P. E. Dawson, H. Mattoussi, *Small* **2010**, *6*, 1273-1278.
- [112] C. R. Becer, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Angew. Chem.* **2009**, *48*, 4900-4908.
- [113] a. R. A. Franking, E. C. Landis, R. J. Hamers, *Langmuir* **2009**, *25*, 10676-10684; b. Y. Li, M. R. Zhao, J. Wang, K. Liu, C. Z. Cai, *Langmuir* **2011**, *27*, 4848-4856.
- [114] S. Shah, M. C. Benson, L. M. Bishop, A. M. Huhn, R. E. Ruther, J. C. Yeager, Y. Z. Tan, K. M. Louis, R. J. Hamers, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 11561-11567.
- [115] A. C. Cardiel, M. C. Benson, L. M. Bishop, K. M. Louis, J. C. Yeager, Y. Z. Tan, R. J. Hamers, *ACS Nano* **2012**, *6*, 310-318.
- [116] Y. Li, M. R. Zhao, J. Wang, K. Liu, C. Z. Cai, *Langmuir* **2011**, *27*, 4848-4856.
- [117] A. S. Levina, M. N. Repkova, Z. R. Ismagilov, N. V. Shikina, E. G. Malygin, N. A. Mazurkova, V. V. Zinov'ev, A. A. Evdokimov, S. I. Baiborodin, V. F. Zarytova, *Sci Rep-Uk* **2012**, *2*.
- [118] P. Persson, R. Bergstrom, S. Lunell, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 10348-10351.
- [119] P. J. Endres, T. Paunesku, S. Vogt, T. J. Meade, G. E. Woloschak, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15760-15761.
- [120] Y. Yin, W. W. Zhu, L. P. Guo, R. Yang, X. S. Li, Y. Jiang, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 125-131.
- [121] M. H. Ma, M. Kazemzadeh-Narbat, Y. Hui, S. S. Lu, C. F. Ding, D. D. Y. Chen, R. E. W. Hancock, R. Z. Wang, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2012**, *100A*, 278-285.
- [122] D. J. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, A. Beck-Sickinger, U. Hahn, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Auflage: 2. Auflage* **2002**.
- [123] L. L. Peng, A. D. Mendelsohn, T. J. LaTempa, S. Yoriya, C. A. Grimes, T. A. Desai, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 1932-1936.
- [124] M. Lai, K. Cai, L. Zhao, X. Chen, Y. Hou, Z. Yang, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1097-1105.
- [125] V. Karageorgiou, L. Meinel, S. Hofmann, A. Malhotra, V. Volloch, D. Kaplan, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2004**, *71A*, 528-537.
- [126] J. Joo, S. G. Kwon, T. Yu, M. Cho, J. Lee, J. Yoon, T. Hyeon, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 15297-15302.
- [127] A. Teleki, S. E. Pratsinis, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 3742-3747.
- [128] H. Althues, *Dissertation im Fach Chemie* **2007**, Technische Universität Dresden.
- [129] Y. A. Akimov, W. S. Koh, S. Y. Sian, S. Ren, *Appl Phys Lett* **2010**, *96*.
- [130] L. Ge, M. X. Xu, M. Sun, H. B. Fang, *J Sol-Gel Sci Techn* **2006**, *38*, 47-53.

- [131] F. Huang, H. Z. Zhang, J. F. Banfield, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 373-378.
- [132] E. Hao, G. C. Schatz, J. T. Hupp, *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 331-341.
- [133] N. M. Dimitrijevic, Z. V. Saponjic, B. M. Rabatic, T. Rajh, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1344-1345.
- [134] A. M. Alkilany, P. K. Nalaria, C. R. Hexel, T. J. Shaw, C. J. Murphy, M. D. Wyatt, *Small* **2009**, *5*, 701-708.
- [135] Z. H. Zhang, X. H. Zhong, S. H. Liu, D. F. Li, M. Y. Han, *Angew. Chem.* **2005**, *44*, 3466-3470.
- [136] X. L. Li, Q. Peng, J. X. Yi, X. Wang, Y. D. Li, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 2383-2391.
- [137] S. Sakthivel, H. Kisch, *Angew. Chem.* **2003**, *42*, 4908-4911.
- [138] I. E. Pacios, B. Lindman, K. Thuresson, *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *319*, 330-337.
- [139] T. Rajh, D. M. Tiede, M. C. Thurnauer, *J. Non-Cryst. Solids* **1996**, *205-2007*, 815-820.
- [140] T. Rajh, D. M. Tiede, M. C. Thurnauer, *J. Non-Cryst. Solids* **1996**, *207*, 815-820.
- [141] K. Syres, A. Thomas, F. Bondino, M. Malvestuto, M. Gratzel, *Langmuir* **2010**, *26*, 14548-14555.
- [142] a. Y. G. Kim, S. O. Ho, N. R. Gassman, Y. Korlann, E. V. Landorf, F. R. Collart, S. Weiss, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 786-791; b. G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques* **2008**, Academic Press.
- [143] a. L. Fruk, *Dissertation im Fach Chemie* **2004**, Universität von Strathclyde; b. L. Fruk, D. Graham, *Heterocycles* **2003**, *60*, 2305-2313.
- [144] O. Keller, J. Rudinger, *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*, 531-541.
- [145] M. Ziolk, I. Tacchini, M. T. Martinez, X. C. Yang, L. C. Sun, A. Douhal, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 4032-4044.
- [146] N. Serpone, D. Lawless, R. Khairutdinov, *J. Phys. Chem-Us* **1995**, *99*, 16646-16654.
- [147] B. Wang, L. F. Zhang, S. C. Bae, S. Granick, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 18171-18175.
- [148] M. A. Dobrovolskaia, S. E. Mcneil, *Nat Nanotechnol* **2007**, *2*, 469-478.
- [149] a. B. S. Kim, D. J. Hong, J. Bae, M. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16333-16337; b. A. G. Barrientos, J. M. de la Fuente, T. C. Rojas, A. Fernandez, S. Penades, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1909-1921; c. J. M. de la Fuente, P. Eaton, A. G. Barrientos, M. Menendez, S. Penades, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6192-6197.
- [150] K. K. Katti, V. Kattumuri, S. Bhaskaran, K. V. Katti, R. Kannan, *Int. J. Green Nanotechnol. Biomed.* **2009**, *1*, B53-B59.
- [151] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1993**, *32*, 543-544.
- [152] D. Braun, *Diplomarbeit* **2012**, Karlsruhe Institut für Technologie (KIT).
- [153] S. F. Liu, J. Liu, L. Wang, F. Zhao, *Bioelectrochemistry* **2010**, *79*, 37-42.
- [154] a. A. Kuzyk, R. Schreiber, Z. Y. Fan, G. Pardatscher, E. M. Roller, A. Hogege, F. C. Simmel, A. O. Govorov, T. Liedl, *Nature* **2012**, *483*, 311-314; b. X. B. Shen, C. Song, J. Y. Wang, D. W. Shi, Z. A. Wang, N. Liu, B. Q. Ding, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 146-149.
- [155] D. El Mekkawi, M. S. A. Abdel-Mottaleb, *Int. J. Photoenergy* **2005**, *7*, 95-101.
- [156] R. Ferre, M. N. Melo, A. D. Correia, L. Feliu, E. Bardaji, M. Planas, M. Castanho, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 1815-1827.

- [157] K. Eggenberger, C. Mink, P. Wadhvani, A. S. Ulrich, P. Nick, *Chembiochem.* **2011**, *12*, 132-137.
- [158] a. H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *40*, 2004-2021; b. J. Lahann, *Wiley* **2009**.
- [159] N. W. Li, W. H. Binder, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 16717-16734.
- [160] E. D. Korniets, L. K. Kedrova, N. I. Pavlenko, *Bulletin of the Academy of Sciences of the Ussr Division of Chemical Science* **1986**, *35*, 2114-2118.
- [161] R. B. Yan, F. Yang, Y. F. Wu, L. H. Zhang, X. S. Ye, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8993-8995.
- [162] Z. Q. Liu, B. H. Hu, P. B. Messersmith, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2403-2405.
- [163] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [164] a. R. D. Hancock, *Inorganica Chimica Acta-Articles* **1981**, *49*, 145-148; b. R. Tauler, E. Casassas, M. J. A. Rainer, B. M. Rode, *Inorganica Chimica Acta-Articles and Letters* **1985**, *105*, 165-170; c. R. Tauler, E. Casassas, B. M. Rode, *Inorg. Chim. Acta* **1986**, *114*, 203-209.
- [165] R. Jagasia, J. M. Holub, M. Bollinger, K. Kirshenbaum, M. G. Finn, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2964-2974.
- [166] G. Eisenbrand, M. Otteneder, W. C. Tang, *Toxicology* **2003**, *190*, 249-258.
- [167] a. K. R. Romines, J. K. Morris, W. J. Howe, P. K. Tomich, M. M. Horng, K. T. Chong, R. R. Hinshaw, D. J. Anderson, J. W. Strohbach, S. R. Turner, S. A. Mizsak, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4125-4130; b. R. S. Koefod, K. R. Mann, *Inorg Chem* **1989**, *28*, 2285-2290.
- [168] K. H. Shaughnessy, P. Kim, J. F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2123-2132.
- [169] M. S. Schiedel, C. A. Briehn, P. Bauerle, *Angew. Chem.* **2001**, *40*, 4677-4680.
- [170] K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4603-4606.
- [171] R. I. Jolck, H. H. Sun, R. H. Berg, T. L. Andresen, *Chem. Eur. J* **2011**, *17*, 3326-3331.
- [172] a. K. Suttiponparnit, J. K. Jiang, M. Sahu, S. Suvachittanont, T. Charinpanitkul, P. Biswas, *Nanoscale Res. Lett.* **2011**, *6*; b. D. Lee, D. Omolade, R. E. Cohen, M. F. Rubner, *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 1427-1433; c. Q. F. Zhang, G. Z. Cao, *Nano Today* **2011**, *6*, 91-109.
- [173] A. J. Dirks, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1129-1138.
- [174] R. K. O'Reilly, M. J. Joralemon, C. J. Hawker, K. L. Wooley, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6776-6786.
- [175] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.
- [176] a. J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16793-16797; b. S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, *320*, 664-667.
- [177] P. V. Chang, J. A. Prescher, E. M. Sletten, J. M. Baskin, I. A. Miller, N. J. Agard, A. Lo, C. R. Bertozzi, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1821-1826.

- [178] H. L. Evans, R. L. Slade, L. Carroll, G. Smith, Q. D. Nguyen, L. Iddon, N. Kamaly, H. Stockmann, F. J. Leeper, E. O. Aboagye, A. C. Spivey, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 991-993.
- [179] C. A. Traina, R. C. Bakus, G. C. Bazan, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 12600-12607.
- [180] S. R. Husain, J. Cillard, P. Cillard, *Phytochemistry* **1987**, 26, 2489-2491.
- [181] R. J. Amir, E. Danieli, D. Shabat, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 812-821.
- [182] L. A. Carpino, A. El-Faham, *Tetrahedron* **1999**, 55, 6813-6830.
- [183] T. D. Schladt, K. Schneider, M. I. Shukoor, F. Natalio, H. Bauer, M. N. Tahir, S. Weber, L. M. Schreiber, H. C. Schroder, W. E. G. Muller, W. Tremel, *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 8297-8304.
- [184] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 813-826.
- [185] C. Wendeln, S. Rinnen, C. Schulz, T. Kaufmann, H. F. Arlinghaus, B. J. Ravoo, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 5880-5888.
- [186] D. B. Boggian, E. G. Mata, *QSAR Comb. Sci.* **2008**, 27, 823-825.
- [187] M. J. Stefanko, Y. K. Gun'ko, D. K. Rai, P. Evans, *Tetrahedron* **2008**, 64, 10132-10139.
- [188] B. J. Adzima, Y. H. Tao, C. J. Kloxin, C. A. DeForest, K. S. Anseth, C. N. Bowman, *Nat. Chem.* **2011**, 3, 256-259.
- [189] a. V. Voliani, S. Luin, F. Ricci, F. Beltram, *Nanoscale* **2010**, 2, 2783-2789; b. W. R. Algar, D. E. Prasuhn, M. H. Stewart, T. L. Jennings, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, I. L. Medintz, *Bioconjug. Chem.* **2011**, 22, 825-858.
- [190] A. H. El-Sagheer, A. P. Sanzone, R. Gao, A. Tavassoli, T. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, 108, 11338-11343.
- [191] a. Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3192-3193; b. F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14397-14402; c. H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discov Today* **2003**, 8, 1128-1137.
- [192] L. Fruk, V. Rajendran, M. Spengler, C. M. Niemeyer, *ChemBiochem.* **2007**, 8, 2195-2198.
- [193] M. Suthanthiran, S. D. Solomon, P. S. Williams, A. L. Rubin, A. Novogrodsky, K. H. Stenzel, *Nature* **1984**, 307, 276-278.
- [194] G. C. Yen, C. L. Hsieh, *Biosci. Biotechnol., Biochem.* **1997**, 61, 1646-1649.
- [195] C. Iuga, J. R. Alvarez-Idaboy, A. Vivier-Bunge, *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 12234-12246.
- [196] Z. W. Yang, L. D. Asico, P. Y. Yu, Z. Wang, J. E. Jones, C. S. Escano, X. Y. Wang, M. T. Quinn, D. R. Sibley, G. G. Romero, R. A. Felder, P. A. Jose, *Am. J. Physiol-Reg I* **2006**, 290, R96-R104.
- [197] K. T. Thurn, H. Arora, T. Paunesku, A. G. Wu, E. M. B. Brown, C. Doty, J. Kremer, G. Woloschak, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2011**, 7, 123-130.
- [198] Y. Liu, J. I. Dadap, D. Zimdars, K. B. Eisenthal, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 2480-2486.
- [199] P. Wang, D. J. Wang, H. Y. Li, T. F. Xie, H. Z. Wang, Z. L. Do, *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, 314, 337-340.
- [200] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923-2925.

- [201] P. Wang, D. J. Wang, H. Y. Li, T. F. Xie, H. Z. Wang, Z. L. Do, *J. Colloid. Interf. Sci.* **2007**, *314*, 337-340.
- [202] T. Platen, T. Schuler, W. Tremel, A. Hoffmann-Roder, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3878-3887.
- [203] A. Gambacorta, D. Tofani, R. Bernini, A. Migliorini, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3386-3391.
- [204] S. Dziadek, S. Jacques, D. R. Bundle, *Chem. Eur J.* **2008**, *14*, 5908-5917.
- [205] M. A. Walker, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 665-668.
- [206] M. A. Walker, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 665-668.
- [207] S. W. Jeong, D. F. O'Brien, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4799-4802.
- [208] M. Goncalves, K. Estieu-Gionnet, T. Berthelot, G. Lain, M. Bayle, X. Canron, N. Betz, A. Bikfalvi, G. Deleris, *Pharm. Res-Dordr* **2005**, *22*, 1411-1421.
- [209] N. Vundyala, C. Sun, F. Sidime, W. Shi, W. L'Amoreaux, K. Raja, R. M. Peetz, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6386-6389.
- [210] X. X. Zhang, C. A. H. Prata, T. J. McIntosh, P. Barthelemy, M. W. Grinstaff, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 988-993.
- [211] F. Schmidt, I. C. Rosnizeck, M. Spoerner, H. R. Kalbitzer, B. Konig, *Inorg. Chim. Acta* **2011**, *365*, 38-48.