
Uncaging strategies based on the VIPER approach

Dissertation von Daniela Kern-Michler November 2019

Um ein besseres Verständnis für die komplexen Vorgänge in biologischen Systemen erlangen zu können, ist die gleichzeitige Kontrolle über mehrere parallel ablaufende Prozesse entscheidend. Zu diesem Zweck wurde selektives Uncaging entwickelt. Bei einem Uncaging Experiment wird ein Molekül synthetisch inaktiviert und durch die Bestrahlung mit Licht wieder aktiviert. Bei selektivem Uncaging werden mehrere Moleküle inaktiviert und können unabhängig voneinander, normalerweise durch Licht verschiedener Wellenlänge, freigesetzt werden. Es gibt jedoch ernstzunehmende Einschränkungen in der Umsetzung dieser Idee. Eine große Herausforderung ist die spektrale Breite der UV-Vis Absorptionen der üblicherweise verwendeten Moleküle. Die Banden sind so breit, dass sie außer in wenigen Ausnahmen, überlappen und durch die Beleuchtung fast immer mehrere simultan angeregt werden. Dies limitieren auch die Anzahl der unabhängigen Cages stark.

Deshalb ist es das Ziel dieser Doktorarbeit die **V**ibrationally **P**romoted **E**lectronic **R**esonance (VIPER) 2D-IR Pulssequenz als eine Alternative für selektives Uncaging einzuführen.

Die VIPER 2D-IR Pulssequenz ist ein spektroskopisches Werkzeug, welches erlaubt 2D-IR Signale zu erzeugen, deren Lebensdauer unabhängig von der Schwingungslebensdauer ist. Die Pulssequenz besteht aus einem schmalbandigen infraroten Anregepuls, einem darauffolgenden UV-Vis Anregepuls und einem breitbandigen infraroten Abfragepuls. Der UV-Vis Anregepuls ist nicht resonant mit der UV-Vis Absorptionsbande. Die elektronische Anregung wird nur möglich, wenn der infrarote Anregepuls den UV-Vis Übergang der schwingungsangeregten Moleküle moduliert. Diese Modulation bringt den UV-Vis Übergang in Resonanz mit dem UV-Vis Anregepuls. Auf diese Weise können nur die Moleküle, die mit dem infraroten Anregepuls vorangeregt wurden, elektronisch angeregt werden.

Der schmalbandige infrarote Anregepuls kann verwendet werden, um selektiv ein Subensemble von Molekülen in einen elektronisch angeregten Zustand zu bringen. In Kombination mit der gezielten Einführung von Isotopmarkierungen, die zu Veränderungen im Infrarotspektrum führen, kann die größere Selektivität des Infrarotbereichs für die Entwicklung eines alternativen selektiven Uncagingansatzes verwendet werden. In diesem sogenannten VIPER Uncaging selektiert der infrarote Anregepuls die Spezies und der darauffolgende UV-Vis Anregepuls liefert die Energie für die elektronische Anregung, die die Grundlage für eine Photoreaktion ist.

Ein Coumarinmolekül (7-Diethylaminocoumarin), welches eine Azidgruppe freisetzen kann, wurde als erstes Testmolekül für VIPER Uncaging ausgewählt. Aus-

gewählte Isotopomere wurden charakterisiert, um geeignete spektroskopische Marker für die erfolgreiche Freisetzung der Abgangsgruppen zu bestimmen. Außerdem wurden geeignete experimentelle Bedingungen, wie etwa eine geeignete UV-Vis Wellenlänge oder ein passendes Abfragefenster, gesucht. Für das VIPER Uncaging Experiment in einer Mischung wurden zwei Isotopomere mit jeweils einem ^{13}C Atom an verschiedenen Positionen ausgewählt. In einer der beiden Spezies ist die Infrarotabsorption der Ringmode des Coumarins durch das ^{13}C Atom verändert. Im anderen Isotopomer wird die Carbonylstreckschwindung beeinflusst. Die Veränderung im Ringmodenbereich erlaubt die Selektion einer Spezies mit der infraroten Voranregung. Aufgrund von experimentellen Schwierigkeiten konnten nur Isotopomere mit der gleichen Abgangsgruppe verwendet werden. Die erfolgreiche selektive elektronische Anregung der einzelnen Isotopomere in der Mischung konnte durch die Abfrage in der Carbonylregion verfolgt werden.

Als zweiter VIPER Cage wurde *para*-hydroxyphenacyl (*p*HP) ausgewählt. Die Abgangsgruppe ist eine Thiocyanatgruppe. Die ausgewählten *p*HP Isotopologe wurden charakterisiert. Die Mischung für das VIPER Experiment besteht aus zwei Isotopologen. Für eine Spezies sind alle Kohlenstoffatome im Ring durch ^{13}C Atome ersetzt. Für die andere ist die Thiocyanatabgangsgruppe isotopenmarkiert. In diesem Fall konnte die Freisetzung der unterschiedlichen Abgangsgruppen, markiert und nicht markiert, selektiv beobachtet werden. Das zeigt, dass es möglich ist, selektiv ein Molekül in einer Mischung freizusetzen indem die VIPER Pulssequenz eingesetzt wird.

Die in der Arbeit gezeigten Experimente sind ein wichtiger Schritt zum Erlangen der Kontrolle über Photoreaktionen in Mischungen. Neben dem selektiven Uncaging von Isotopomeren und Isotopologuen, sollte es möglich sein zu entscheiden welches Isomer in einer Mischung reagieren soll oder selektiv verschiedene Grundzustände in einem Protein anzuregen.

Betrachtet man die Selektivität des VIPER Uncaging Ansatzes, so ist diese im Moment hauptsächlich durch die Intensität des infraroten Anregepulses beschränkt. Um diese zu steigern, wurden die ersten Schritte zu einer alternativen Infrarotlichterzeugung unternommen. In diesem Ansatz wird das Infrarotlicht direkt durch eine Differenzfrequenzgeneration zwischen dem Laseroutput, d.h. der intensiven 800 nm Fundamentalen, und dem Output eines nicht-linearen optischen parametrischen Verstärkers (NOPA) erzeugt. Der NOPA ist aufgebaut und das Mischen wurde in einem vorläufigen Kristallmedium getestet.

Andere Möglichkeiten, um den Kontrast zum unspezifischen Hintergrund durch die direkte Anregung durch das UV-Vis Licht zu verbessern, werden diskutiert. Für die Anwendung von VIPER Uncaging könnte zum Beispiel auf die Detektion mittels fs-Laserspektroskopie verzichtet werden.