

Zusammenfassung

Licht ist ein wertvolles Werkzeug zur Regulation biochemischer Reaktionsabläufe. Denn die Applikation von Licht erlaubt eine sehr präzise Einflussnahme auf den Ort und den Startzeitpunkt der zu untersuchenden Reaktionen. Als nichtinvasives Medium bietet die Lichtkontrolle bei der Wahl einer geeigneten Anregungswellenlänge den Vorteil nur minimal in einen lebenden Organismus einzugreifen. Um eine solche lichtbasierte Kontrolle für biologische Anwendungen zu realisieren, ist die Anwesenheit einer lichtsensitiven Verbindung nötig. Ein Konzept der lichtsensitiven Verbindungen ist die sogenannte photolabile Schutzgruppe. Im Allgemeinen handelt es sich hierbei um einen Chromophor der temporär an ein Biomolekül angebracht wurde, um dessen biologische Aktivität zu unterdrücken.

In dieser Arbeit wurde dieses Konzept auf das Antibiotikum Puromycin angewendet, welches durch das synthetische Anbringen der Cumarin-Schutzgruppe DEACM in seiner biologischen Aktivität behindert und durch einen Lichtpuls wieder freigesetzt wurde. DEACM ist eine photolabile Schutzgruppe mit breitem Anwendungsspektrum, da es im Vergleich zu anderen Cumarin-Derivaten vorteilhafte photophysikalische Eigenschaften aufweist. Zum einen ist durch den 7-Diethylamino-Substituenten das Absorptionsmaximum dieser Verbindung um etwa 20 nm bathochrom verschoben. Zum anderen zeichnet sich dieses Derivat durch einen erheblich erhöhten Extinktionskoeffizienten aus, sodass eine Freisetzungreaktion mit einer geringeren Lichtdosis induziert werden kann, was weniger Stress für die Zellen in lebenden Systemen bedeutet.

Die antibiotische Wirkung von Puromycin beruht auf der strukturellen Ähnlichkeit zum 5'-Ende von Tyrosyl-tRNA, wodurch sich das Antibiotikum kondonunspezifisch während der Translation der Proteinsynthese an das Ribosom anlagern kann. Anschließend wird die naszierende Polypeptidkette auf das Puromycin transferiert. Da diese neue Bindung unter biologischen Bedingungen nicht spaltbar ist, führt dies zu einer verfrühten Freisetzung des Polypeptid-Puromycin-Fragments. Schließlich ist die Proteinsynthese vollständig abgebrochen.

Die Motivation zur photoinduzierten Kontrolle von Puromycin besteht in der Vielzahl an biologischen Applikationsmöglichkeiten, da die lichtregulierte Freisetzung der biologischen Aktivität als Trigger für sich anschließende biochemische Abläufe verwendet werden kann. Durch das hier gezeigte System kann in Kombination mit anderen Techniken (z.B. NMR) die posttranslationale Proteinfaltung beobachtet werden, welche als hochgradig komplexer Prozess bisher nicht verstanden ist. Eine weitere Motivationsgrundlage ist die Anwendung von DEACM-puromycin in Nervenzellen. Hier kann durch die Photofreisetzung die Proteinsynthese in den Dendriten der Neuronen beobachtet werden, wodurch Rückschlüsse auf neurodegenerative Krankheiten möglich sein sollten, wie z.B. Alzheimer-Krankheit.

In dieser Arbeit konnte *in-vitro* nachgewiesen werden, dass die antibiotische Wirkung von Puromycin mittels Licht kontrollierbar ist. Aus der photophysikalischen Grundcharakterisierung ging hervor, dass DEACM-puromycin einen hohen Extinktionskoeffizienten bei Wellenlängen größer als 380 nm aufweist. Folglich kann zur Induktion der Photo-

lyse eine geringere Lichtdosis mit energieärmerer Strahlung als bei dem Vorläufersystem NVOC-puromycin verwendet werden, angesichts dessen ist das hier vorgestellte DEACM-puromycin für Anwendungen in Zellen zu empfehlen.

Über die Kombination von quantenchemischen Rechnungen und spektroskopischen Methoden konnten die frühen Schritte der Freisetzungsreaktion bestimmt und quantifiziert werden. Zudem zeigte sich ein Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung auf die *Uncaging*-Schritte. In Gegenwart eines protischen Lösungsmittels wird der zum *Uncaging* in Konkurrenz stehende Prozess der Fluoreszenz unterdrückt, wodurch die Freisetzungsschritte effektiver werden. Zudem führt die Präsenz von Protonen zu einer Stabilisierung des ionischen Intermediates, sodass die Bildung dessen beschleunigt ablaufen kann. Die Spaltung der photolabilen Schutzgruppen vom Puromycin findet mit einer Rate von $0,71 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ statt, welche im Vergleich zu Vorgängersystem um eine Größenordnung größer ist. Die Wiederherstellung der biologischen Aktivität resultiert aber erst nach einem anschließenden Decarboxylierungsschritt. Mithilfe von IR-Messungen konnte die Decarboxylierung beobachtet und daraus die Quantenausbeute zu 2,5% determiniert werden. Die so bestimmte Quantenausbeute entspricht etwa dem Zweifachen von NVOC-puromycin, sodass die hier untersuchte Verbindung eindeutig als das effizientere System zu betrachten ist.

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass DEACM-puromycin vorteilhafte photophysikalische Eigenschaften aufweist, die diese Verbindung zu einem wertvollen Hilfsmittel für eine Vielzahl von lichtkontrollierten Untersuchungen in biologischer Umgebung macht. Zudem wurden Einblicke in den Reaktionsmechanismus gegeben, die das Verständnis der photolytischen Spaltung von Carbamat-geschützten Cumarinen erstmals auf der ultrakurzen Zeitskala ermöglicht.