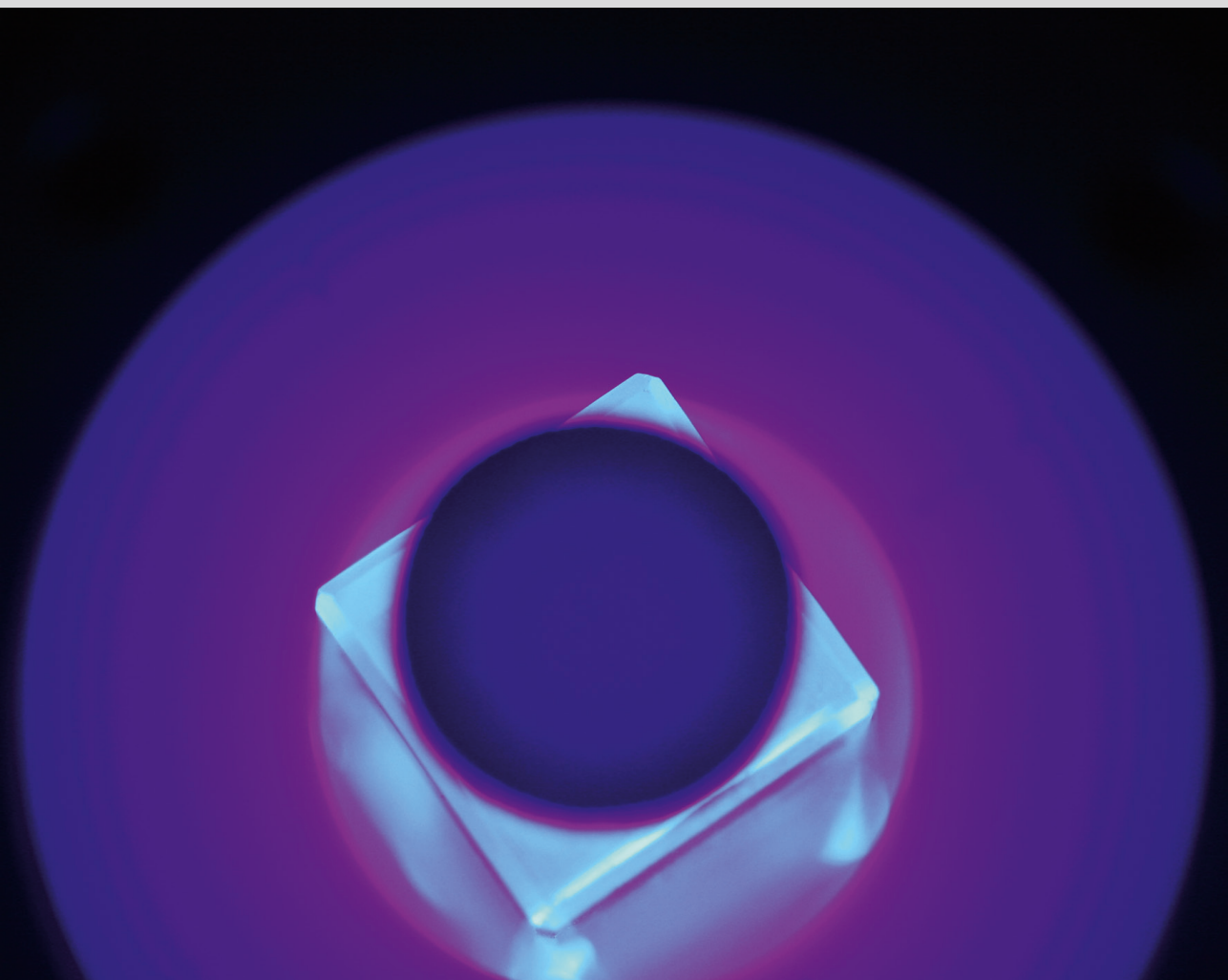


Neue lichtgesteuerte Werkzeuge für biotechnologische und biosynthetische Anwendungen

Claus Bier



Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität
im Forschungszentrum Jülich

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften
IBOC – Bioorganische Chemie

Neue lichtgesteuerte Werkzeuge für biotechnologische und biosynthetische Anwendungen

Claus Bier

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität
im Forschungszentrum Jülich

Band 30

ISBN 978-3-95806-318-1

Inhaltsverzeichnis

1	ALLGEMEINES UND ABKÜRZUNGEN	15
1.1	Allgemeines	15
1.2	Abkürzungen	15
2	ZUSAMMENFASSUNG	19
2.1	Kurzzusammenfassung	19
2.2	Abstract	20
3	THEMA	21
3.1	Einleitung	21
3.2	Aufgabenstellung	23
4	KENNTNISSTAND	25
4.1	Kohlenhydrate	25
4.1.1	ALLGEMEINES	25
4.1.2	MONOSACCHARIDE	25
4.1.3	ANOMERER EFFEKT	27
4.1.4	GRUNDLAGEN DER GLYCOSYLIERUNG	29
4.1.5	KÖNIGS-KNORR-REAKTION	34
4.1.6	FISCHER-HELPERICH-REAKTION	35
4.1.7	TRICHLORACETIMIDAT-METHODE	37
4.2	Grundlagen der Genexpression und Proteinbiosynthese	40
4.2.1	PROTEINBIOSYNTHESE AM BEISPIEL VON <i>E. COLI</i>	40
4.3	<i>Photocaged Compounds</i>	43
4.3.1	PRINZIPIELLE FUNKTIONSWEISE VON <i>PHOTOCAGED COMPOUNDS</i>	43
4.3.2	PHOTOLABILE SCHUTZGRUPPEN	43
4.4	HaloTag-Technologie kombiniert mit chloridsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen zur Untersuchung des Membrantransportprozesses	61
4.4.1	HALOTAG-TECHNOLOGIE	61
4.4.2	CHLORIDSENSITIVE FLUORESZENZFARBSTOFFE	63

5	EIGENE ERGEBNISSE	65
5.1	<i>Photocaged Compounds</i>	65
5.1.1	ORTHO-NITROBENZYLBASIERTE <i>PHOTOCAGED COMPOUNDS</i>	66
5.1.2	CUMARINBASIERTE <i>PHOTOCAGED COMPOUNDS</i>	120
5.1.3	EINSATZ UND VERWENDUNG DER SYNTHETISIERTEN <i>PHOTOCAGED COMPOUNDS</i>	131
5.2	HaloTag-verknüpfte Chloridsensoren	141
5.2.1	SYNTHESE	141
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	147
6.1	<i>Photocaged Compounds</i>	147
6.1.1	ORTHO-NITROBENZYLBASIERTE <i>PHOTOCAGED COMPOUNDS</i>	148
6.1.2	CUMARINBASIERTE <i>PHOTOCAGED COMPOUNDS</i>	159
6.1.3	HALOTAG-VERKNÜPFTE CHLORIDSSENSOR	162
6.2	Ausblick	164
7	EXPERIMENTELLER TEIL	169
7.1	Allgemeines	169
7.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	175
7.2.1	TAUHLÖSUNGEN FÜR DIE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE	175
7.2.2	HERSTELLUNG VON PUFFER	175
7.3	Piperonyl-Derivate	177
7.4	<i>Photocaged Kohlenhydrate</i>	200
7.4.1	ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN FÜR CAGED ZUCKER	200
AAV 1:	SYNTHESE VON GLYCOSYLBROMIDEN	200
7.5	<i>Photocaged Benzoessäurederivate</i>	243
7.6	Cumarin-Derivate	263
7.7	HaloTag-verknüpfter Chloridsensor	296
7.8	Bestimmung der Löslichkeit	304
7.9	Messungen der Zerfallskinetik von <i>photocaged Compounds</i> und Bestimmung der Halbwertszeit und der Quantenausbeute	317
7.9.1	HERLEITUNG DER QUANTENAUSBEUTENBESTIMMUNG ^[184, 185]	317
7.9.2	MESSUNGEN DER ZERFALLSKINETIK VON <i>PHOTOCAGED COMPOUNDS</i> UND BESTIMMUNG DER HALBWERTSZEIT UND QUANTENAUSBEUTE	321

Inhaltsverzeichnis	13
7.10 Quantifizierung der Bestrahlungsquellen	328
7.10.1 EMISSIONSSPEKTREN DES LUMOS 43	328
7.10.2 MESSUNG DER BESTRAHLUNGSLEISTUNG MIT AKTINOMETRIE UND POWERMETER	331
7.11 Enzymscreening	339
8 LITERATURVERZEICHNIS	341
9 DANKSAGUNG	353
10 CURRICULUM VITAE	355
11 FORMELREGISTER	357
12 ERKLÄRUNG	365

Der Einsatz von lichtgesteuerten Werkzeugen in der Biologie und Medizin gewinnt immer mehr an Bedeutung. Sowohl in der Wissenschaft, als auch in der Industrie können sie bei der Beantwortung molekularbiologischer Fragestellungen und bei der Automatisierung mikrobieller Produktionsprozesse helfen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese und Charakterisierung von neuen lichtgesteuerten Werkzeugen und mit ihrer Verwendbarkeit im Rahmen biotechnologischer und molekular-biologischer Fragestellungen.

Photocaged Compounds bilden eine wichtige Gruppe der lichtgesteuerten Werkzeuge und erlauben die Freisetzung von Effektormolekülen mit einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erfolgreich eine umfangreiche „Werkzeugkiste“ gefüllt mit *photocaged Compounds* synthetisiert, wobei der Schwerpunkt auf *photocaged* Kohlenhydraten und *photocaged* Benzoessäurederivaten lag. Das Design der *photocaged Compounds* zielte auf intrazelluläre in vivo Anwendung ab. Nach der Synthese wurden Methoden zur Bestimmung aller essenziellen Eigenschaften für die praktische Anwendung entwickelt und im Folgenden bestimmt. Im Rahmen der lichtgesteuerten Genexpression wurden sie anschließend erfolgreich in verschiedenen Organismen genutzt und konnten mittels eines Durchsatz-Screenings zur Bestimmung der optimalen Induktionsbedingung eingesetzt werden.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit eine weitere Gruppe von lichtgesteuerten Werkzeugen auf Grundlage einer Markierungsmethode der HaloTag-Technik behandelt. In diesem Zusammenhang wurde ein fluoreszenzbasierter, HaloTag-verknüpfter Chloridsensor entworfen, synthetisiert und charakterisiert. In einer Kooperation wurde dieser Sensor anschließend bei fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen in HEK-Zellen („*Human Embryonic Kidney*“-Zellen) getestet.