

Eine neue Klasse photoaktivierbarer, Carben- erzeugender Reagenzien extrem hoher spezifischer Radioaktivität Synthese, Charakterisierung und Anwendungen

Doctoral Thesis

Author(s):

Weber, Thomas

Publication date:

1994

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000943960>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Diss. ETH- Nr. 10639

**Eine neue Klasse photoaktivierbarer,
Carben-erzeugender Reagenzien
extrem hoher spezifischer Radioaktivität**

Synthese, Charakterisierung und Anwendungen

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von
Thomas Weber
Dipl. Naturwissenschaftler ETH
geboren am 14. April 1965
von Gächlingen (SH)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. G. Semenza, Referent
Prof. Dr. F. Diederich, Korreferent
PD Dr. J. Brunner, Korreferent

Zürich, 1994

6. Zusammenfassung

Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung neuer photoaktivierbarer Vernetzungs- und Markierungs-Reagenzien, die sich sowohl durch günstige photochemische Eigenschaften auszeichnen als auch mit extrem hoher spezifischer Radioaktivität herstellen lassen. Eine Schlüsselverbindung in der Synthese dieser Reagenzien war der 2-Tributylzinn-4-(3-trifluormethyl-3H-diazirin-3-yl)-benzylalkohol. Diese Vorstufe lässt sich mühelos in Ester überführen, die anschliessend unter milden Reaktionsbedingungen radioiodiert werden können.

Wie Arbeiten mit einer Modellverbindung zeigten, entstehen bei der Photolyse von 2-Iod-4-(3-trifluormethyl-3H-diazirin-3-yl)-benzylestern hochreaktive Carbene, die sich glatt in paraffinische CH-Bindungen einschleiben. Ebenso wichtig ist die Tatsache, dass unter den Bedingungen der Diazirin-Photolyse keine nachweisbare Abspaltung von Iod erfolgt. Somit sind zwei Grundvoraussetzungen für Photoreagenzien erfüllt.

Es wurden verschiedene photoaktivierbare, radioiodierte Phospholipide hergestellt und deren Eigenschaften durch Markierung verschiedener Membransysteme (Erythrozyten, Influenza Viren) evaluiert. Ausserdem sind Arbeiten eingeleitet worden, diese Lipide zur Charakterisierung der Interaktion verschiedener Proteine (beschrieben sind Experimente mit MARCKS) mit Membranen einzusetzen. Im weiteren wurden drei Vertreter einer neuen Klasse von eigentlichen Marker-Transfer-Reagenzien (zwei thioispezifische und ein aminospezifisches) entwickelt. Die Einsatzmöglichkeiten dieser Reagenzien werden gegenwärtig untersucht. Schliesslich wurde ein photoaktivierbares, radioiodiertes Ceramid hergestellt. Das Ziel ist die Photoaffinitätsmarkierung des postulierten zellulären Ceramid-Rezeptors. Erste vielversprechende Versuche in diese Richtung wurden hier beschrieben.

Wir sind überzeugt, dass die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden und Reagenzien wertvolle Werkzeuge darstellen, die neuartige Möglichkeiten zur Untersuchung biochemischer und zellbiologischer Phänomene öffnen.

Summary

The main object of this work was the development of new photocrosslinking and labeling reagents which show favourable photochemical properties and can be synthesised in an extremely high specific radioactivity. A key compound in the syntheses of these reagents was 2-tributyltin-4-(3-trifluoromethyl-3H-diazirin-3-yl)-benzyl alcohol. Esters of this alcohol can be easily radioiodinated at a specific radioactivity of >2000 Ci/mmol under mild conditions.

By experiments with a model compound it was shown that 2-iodo-4-(3-trifluoromethyl-3H-diazirin-3-yl)-benzyl esters, upon photolysis, generate highly reactive (singlet) carbenes capable of inserting into paraffinic CH-bonds. Equally important, there is no indication of loss of iodine under the photolysis conditions applied. Therefore two key requirements for photolabeling reagents are fulfilled.

Several photoactivatable radioiodinated phospholipids have been synthesised. Their properties have been evaluated by labeling of the membranes of intact erythrocytes and influenza viruses. Currently these lipids are used to study the interaction of various proteins (shown are experiments with MARCKS) with membranes. Furthermore a new class of actual label transfer crosslinkers (two thiol specific and one amino specific) have been developed. The range of potentialities of these reagents is currently being investigated. Finally a photoactivatable radioiodinated ceramide analogue suitable as a photoaffinity crosslinker has been developed with the goal of identifying the putative receptor of this second messenger-like lipid. Preliminary studies towards this goal are described.

We are convinced that the reagents and methods presented in this work are valuable tools, and that they will find widespread use in future cell-biological and biochemical research.