

# Biologisch aktive Moleküle mit „Lichtschalter“

Günter Mayer\* und Alexander Heckel\*

**Stichwörter:**

Bioorganische Chemie · Photoaktivierbare Verbindungen · Photochemie · Photoschalter · Schutzgruppen

*Peter Dervan zum 60. Geburtstag gewidmet*



**B**iologisch aktive Verbindungen, die auf Licht reagieren, bieten experimentelle Möglichkeiten, die sonst nur sehr schwierig zu realisieren sind. Da Licht z. B. mit Lasern und (konfokalen) Mikroskopen punktgenau eingesetzt werden kann, sind schnelle Konzentrations-sprünge der aktiven Form von Molekülen mit exakter räumlicher, zeitlicher und dosierungsbezogener Steuerung möglich. Die Entwicklung derartiger Strategien reicht bis in die 70er Jahre zurück. Dieser Aufsatz fasst neue Entwicklungen der letzten fünf Jahre zusammen und behandelt „kleine Moleküle“, Proteine und Nucleinsäuren, die entweder durch Licht irreversibel aktiviert werden („photoaktivierbare Verbindungen“) oder reversibel zwischen einem aktiven und einem inaktiven Zustand geschaltet werden.

## 1. Einleitung

Eine Voraussetzung, um zu verbesserten Modellen der Vorgänge in Einzelzellen und Organismen zu gelangen, besteht in der Erweiterung unseres Repertoires an experimentellen Methoden. Ein wichtiges allgemeines Kriterium ist z. B., wie selektiv eine bestimmte Struktur oder ein Vorgang in einer Zelle oder einem Organismus beeinflusst werden kann. Eine Strategie, um eine räumlich-zeitliche Steuerung zu erreichen oder die Selektivität eines von einer bioaktiven Verbindung hervorgerufenen Effekts zu erhöhen, besteht darin, die Verbindung unter die Kontrolle eines internen oder externen Triggersignals zu bringen. Ein ideales externes Triggersignal ist Licht: Erstens wirkt es in vielen Fällen als orthogonaler Trigger, da die meisten Zellen nicht auf Licht reagieren (ausgenommen hoch spezialisierte Zellen wie Photorezeptoren des Auges oder bestimmte Pflanzenzellen). Außerdem werden die Zellen durch Licht nicht geschädigt, sofern man nicht zu kurze Wellenlängen wählt. Zweitens sind die meisten Zellen, die normalerweise im Laboratorium untersucht werden, transparent. Gleiches gilt für viele Modellorganismen wie den Fadenwurm *C. elegans* oder den Zebrafisch *D. rerio*, die während ihrer gesamten Lebenszeit transparent bleiben, wogegen andere zumindest in bestimmten Stadien ihrer Entwicklung lichtdurchlässig sind (z. B. die Embryonen von *D. melanogaster*). Unter bestimmten Bedingungen ist auch eine Anwendung bei Tieren und Menschen möglich. So wurde vor 20 Jahren über die Behandlung von kutanem T-Zell-Lymphom mit dem Wirkstoff 8-Methoxypsoralen (8-MOP) berichtet, der in Kombination mit einer UV-A-Bestrahlung entweder direkt der Haut oder von temporär entnommenen Blutproben eingesetzt wurde.<sup>[1]</sup> Psoralene wurden sogar schon im antiken Ägypten zur Behandlung der Hautstörung Vitiligo verwendet.<sup>[1]</sup> Drittens sind die Techniken für eine genaue räumlich-zeitlich gesteuerte Anwendung von Licht gut etabliert. Mit (konfokalen) Mikroskopen ist man in der Lage, sowohl Proben zu bestrahlen als auch dadurch ausgelöste Veränderungen zu analysieren, und durch Anwendung der Zweiphotonentechnik gelingt es, den lichtbestrahlten Bereich in einer Probe noch weiter einzugrenzen, bis herab zur zellulären Auflösung.<sup>[2]</sup>

## Aus dem Inhalt

1. Einleitung	5021
2. Photolabile Schutzgruppen und reversible Photoschalter	5023
3. Photoaktivierbare und lichtschaltbare kleine Moleküle	5024
4. Photoaktivierbare und lichtschaltbare Proteine	5029
5. Photoaktivierbare und lichtschaltbare Nucleinsäuren	5034
6. Zusammenfassung und Ausblick	5039

Dieser Aufsatz widmet sich in erster Linie zwei Strategien, um ein biologisch aktives Molekül lichtempfindlich zu machen. Die erste wird gewöhnlich als „caging“ bezeichnet und umfasst die Modifizierung einer bioaktiven Substanz mit einer photolabilen „Schutzgruppe“, um sie temporär zu inaktivieren. Die zweite Strategie verwendet bistabile Photoschalter. Nicht Gegenstand dieses Aufsatzes sind natürlich vorkommende lichtabhängige Moleküle wie Phototropine (von Flavinmononucleotid abhängige lichtaktivierte Kinasen)<sup>[3]</sup> und Photolyasen<sup>[4]</sup> sowie Phänomene wie die Lichtregulation von Photosynthesegenen<sup>[5]</sup> oder andere lichtabhängige Verfahren wie die Photoaffinitätsmarkierung (wenn auch einige Beispiele an passender Stelle erwähnt werden).<sup>[6]</sup> Da der Fokus dieses Aufsatzes auf biologische Vorgänge gerichtet ist, werden auch Materialien wie lichtempfindliche Polymere<sup>[7]</sup> nicht besprochen.

Der Begriff „caging“ wurde 1978 von J. F. Hoffman geprägt.<sup>[8]</sup> Diese Wortwahl ist aus mehreren Gründen nicht ganz unproblematisch: Für Fachfremde impliziert er, dass die besagten Moleküle tatsächlich – im topologischen Sinne – in einem Käfig eingeschlossen sind, z. B. im Inneren eines C<sub>60</sub>-Moleküls. Auch könnte man irrtümlicherweise an den „Käfigeffekt“ erinnert werden, der bei der Rekombination von Radikalen auftritt. Da der Begriff „cage“ in der biochemischen Literatur sehr vielseitig verwendet wird, ist es zudem schwierig, Literaturrecherchen durchzuführen, besonders da wir uns hier mit einem Konzept befassen, das mit vielen unterschiedlichen chemischen Strukturen realisiert werden kann. Andere Autoren vermeiden diesen Begriff völlig und

[\*] Dr. G. Mayer, Dr. A. Heckel  
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)  
Fax: (+49) 228-73-4809  
E-Mail: gmayer@uni-bonn.de  
heckel@uni-bonn.de

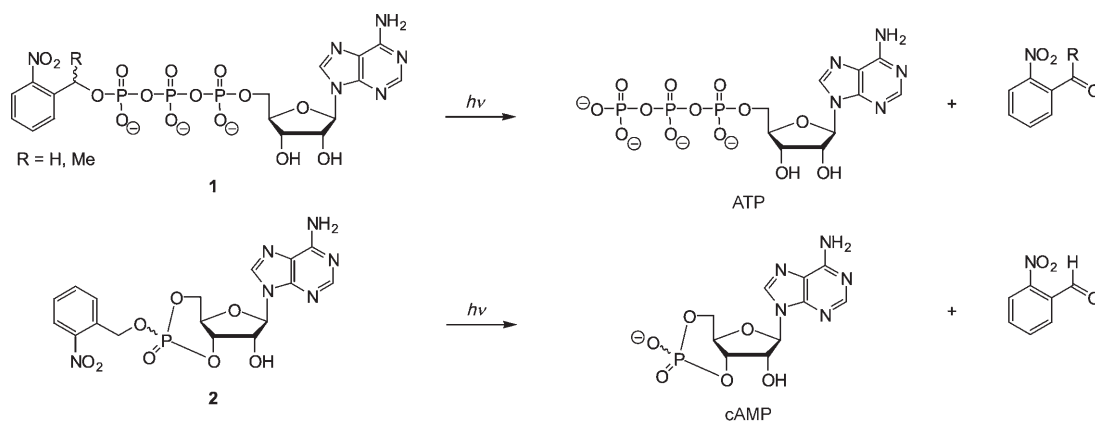
verwenden stattdessen „light-activated“ oder ähnliches, selbst wenn sich diese Bezeichnung auf viel mehr als nur auf „caged“ Moleküle im Sinne der obigen Definition beziehen kann.<sup>[9]</sup> Nach mehr als 30 Jahren ist es jedoch zu spät, um einen neuen Fachbegriff vorzuschlagen.<sup>[10]</sup>

Photoaktivierbare Moleküle können durch Bestrahlung mit Licht irreversibel aktiviert werden, indem die photolabile Gruppe entfernt wird. Idealerweise sind photoaktivierbare Moleküle wasserlöslich und stabil gegen Hydrolyse. Die Entschützung („Photoaktivierung“) sollte mit hoher Quantenausbeute und bei nicht zu kurzen Wellenlängen erfolgen (>300 nm) und nichttoxische Nebenprodukte ergeben.<sup>[11]</sup> Zur Untersuchung lichtinduzierter kinetischer Vorgänge muss die Photoentschützung schneller ablaufen als die zu untersuchende Reaktion.<sup>[12]</sup>

Das erste photoaktivierbare Molekül war das ATP-Derivat **1** (Schema 1),<sup>[8]</sup> das Hoffman et al. in Yale synthetisierten. Zwar hatten bereits ein Jahr davor Engels et al. an der Universität Konstanz das cyclische AMP-Derivat **2** synthetisiert,<sup>[13]</sup> jedoch war die Photoaktivierbarkeit nicht der Hauptfokus der Studie.<sup>[14]</sup> Natürlich waren damals photolabile Schutzgruppen für Synthesezwecke schon bekannt,<sup>[15]</sup> neu war aber die Idee, sie für biochemische Experimente mit

räumlich-zeitlicher Steuerung zu nutzen. Erste Studien mit photoaktivierbarem ATP umfassten beispielsweise Experimente, in denen einzelne Zyklen der Na<sup>+</sup>-Pumpe beobachtet werden konnten.<sup>[16]</sup> Photoaktivierbares ATP ist heute kommerziell erhältlich<sup>[17]</sup> und wurde in einer Vielzahl von Untersuchungen eingesetzt, die hier nicht im Einzelnen erörtert werden können.

Noch vor den Arbeiten von Hoffman und Engels wurde über eine andere, sehr interessante Untersuchungsreihe berichtet. Die Peptidase  $\alpha$ -Chymotrypsin (CT) wurde mit *cis*-Cinnamoylimidazol (**3**) inkubiert,<sup>[18]</sup> was zur Acylierung des aktiven Zentrums von CT führte (Schema 2). Nur das *trans*-cinnamoylierte Addukt kann durch das Enzym gespalten werden, um das aktive Zentrum für einen weiteren Zyklus zu regenerieren. Genau genommen könnte man auch das *cis*-cinnamoylierte CT als „photoaktivierbar“ bezeichnen, da die Cinnamoylgruppe bei Bestrahlung eine *cis-trans*-Isomerisierung eingeht und das aktive Enzym freisetzt. Das *cis*-cinnamoylierte CT hatte keine Peptidaseaktivität mehr und war unter Lichtausschluss mehrere Stunden stabil. Lee et al. erkannten, dass dieser lichtaktivierte Katalysator zur Verstärkung eines Lichtsignals eingesetzt werden kann,<sup>[19]</sup> und zwar durch Kopplung mit einer anderen enzymatischen Reaktion,



**Schema 1.** Oben: Das erste photoaktivierbare Molekül, **1**, für das der Begriff „caged“ verwendet wurde.<sup>[8]</sup> Unten: Das verwandte photoaktivierbare cAMP-Derivat **2**, das schon ein Jahr vorher beschrieben worden war.<sup>[13]</sup> Einzelheiten zum Mechanismus der Photoreaktion finden sich z. B. in Lit. [12].



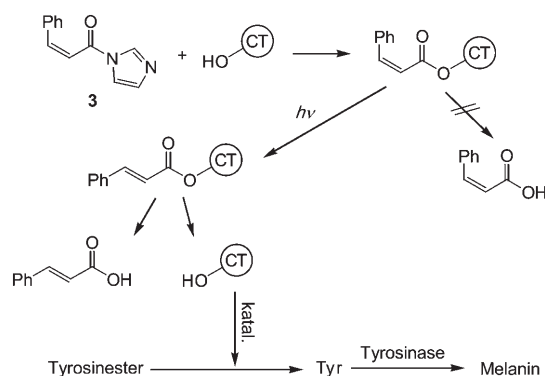
Alexander Heckel, geboren in Lindau, studierte Chemie an der Universität Konstanz. Nach seiner Diplomarbeit (R. R. Schmidt; Oligosaccharid-Festphasensynthese) wechselte er in die Gruppe von D. Seebach an die ETH Zürich und promovierte dort über die enantioselektive heterogene Katalyse mit Taddol und Salen auf Kieselgel. Es folgte ein Postdoc-Aufenthalt am Caltech bei P. B. Dervan, wo er die Erkennung von DNA mit „Dervan-Polyamiden“ untersuchte. Seit 2003 arbeitet er an der Universität Bonn bei M. Famulok an seiner Habilitation. In seiner

Freizeit engagiert er sich als Rettungsassistent und Taucher im Rettungsdienst für das Rote Kreuz.



Günter Mayer, geboren in München, studierte Chemie an der dortigen Ludwig-Maximilians-Universität. Nach dem Diplom (M. Famulok; Selektion von RNA-Aptameren) wechselte er an die Universität Bonn, wo er über die funktionelle Analyse von Cytohesin-1 in T-Zellen mit RNA-Intrameren promovierte. Ab 2001 leitete er die Abteilung für kombinatorische Biotechnologie bei Nasca-Cell (heute NascaCell Technologies AG), deren Mitbegründer er ist. 2004 kehrte er an die Universität Bonn zurück, wo er gegenwärtig in der Gruppe von M. Famulok an seiner Habilitation arbeitet. Seine Forschungen umfassen die räumlich-zeitliche Steuerung der Aptameraktivität und die Entdeckung neuer Proteine durch Aptamerselenktion.

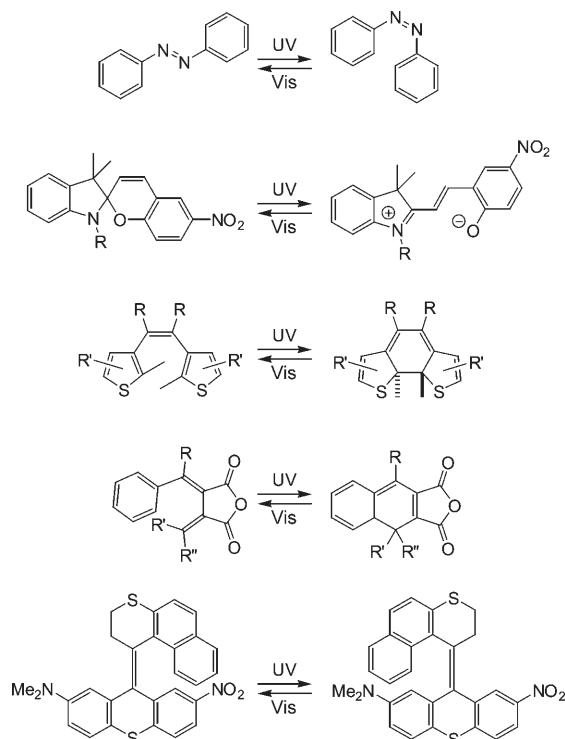




**Schema 2.** Noch bevor der Begriff „caging“ geprägt wurde, gab es eine Studie, in der  $\alpha$ -Chymotrypsin (CT) durch *cis*-Cinnamoylierung vorübergehend deaktiviert wurde.<sup>[18]</sup> Nur bei der Isomerisierung zur *trans*-Form wird die Cinnamoylgruppe abgespalten und das aktive Enzym regeneriert, das anschließend z. B. einen Tyrosinester spalten kann. Das entstehende Tyrosin wird dann durch die Tyrosinase in das Pigment Melanin umgewandelt. Diese Reaktion kann zur Verstärkung schwacher Lichtsignale genutzt werden.<sup>[20]</sup>

in der das durch die CT-Aktivierung freigesetzte Tyrosin von einer Tyrosinase zum Pigment Melanin umgesetzt wird (Schema 2).<sup>[20]</sup>

In den siebziger Jahren gab es auch erste Experimente, in denen die Aktivität von Enzymen mithilfe von Licht reversibel geschaltet wurde.<sup>[21]</sup> Spiropyrane können zwischen zwei Zuständen wechseln (siehe Abschnitt 2 und Schema 3): Bei



**Schema 3.** Überblick über einige bistabile Photoschalter, die (von oben nach unten) auf Azobenzol,<sup>[49]</sup> Spiropyranen,<sup>[50]</sup> Diarylethenen,<sup>[51]</sup> Fulgiden<sup>[52]</sup> und sterisch gehinderten Alkenen<sup>[53]</sup> basieren. Mit einigen dieser Systeme sind biologisch aktive Verbindungen hergestellt worden, die reversibel aktiviert und deaktiviert werden können.

normaler Photochromie öffnet sich der Ring beim Bestrahlen mit UV-Licht und schließt sich wieder im Dunkeln oder nach Bestrahlen mit sichtbarem Licht. Enzyme wie die  $\alpha$ -Amylase wurden (an ihrer Aminogruppe) mit Spiropyran-substituenten modifiziert.<sup>[22]</sup> Die Aktivität des modifizierten Enzyms nahm beim Bestrahlen um ein Drittel ab und stellte sich anschließend im Dunkeln innerhalb einer Stunde wieder her.

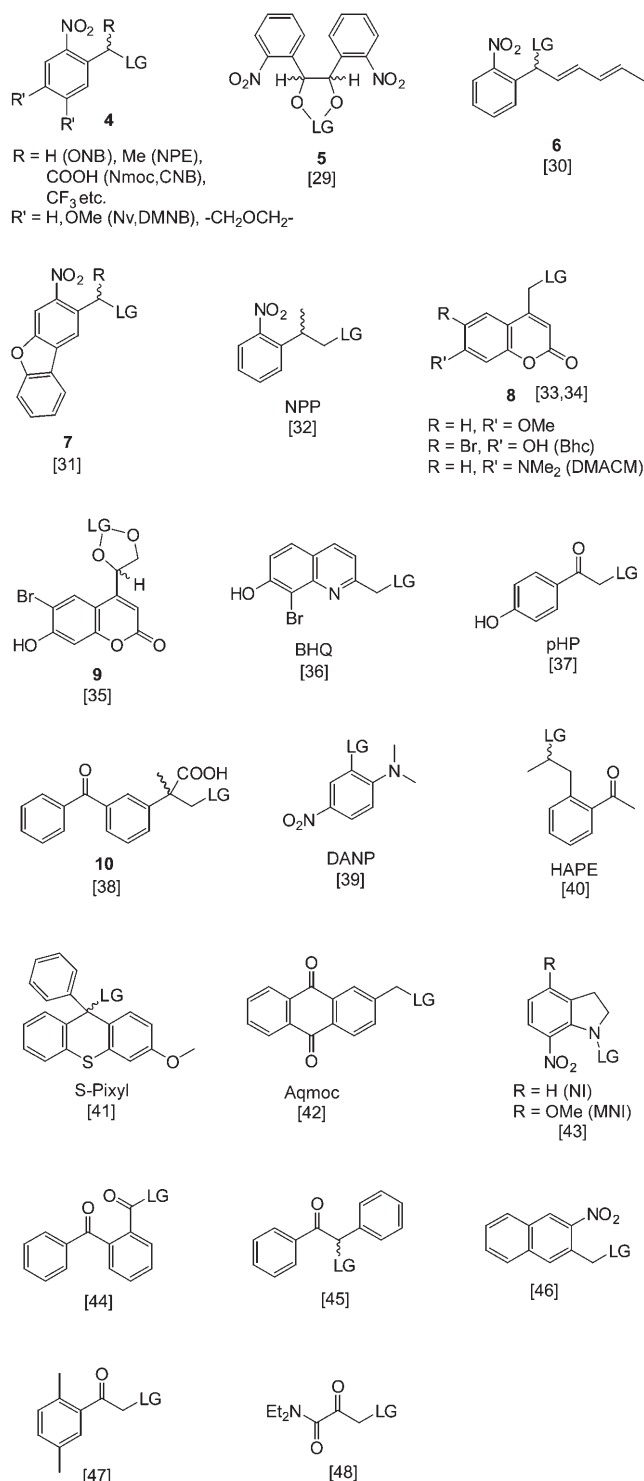
Trotz dieser Beispiele, die die ersten Konzepte zur Steuerung biologischer Aktivität mit Licht erläutern, ist es nicht Ziel dieses Aufsatzes, ausführlich die Anfänge dieses Forschungsgebiets zu beschreiben – es sollen vielmehr die neueren Entwicklungen der letzten fünf Jahre aufgezeigt werden (wobei das Erscheinungsdatum einer Arbeit als nicht zu striktes Kriterium genommen wurde). Seit den Anfängen vor über 30 Jahren ist das Thema natürlich in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefasst worden.<sup>[12,23–25]</sup>

## 2. Photolabile Schutzgruppen und reversible Photoschalter

Eine umfassende Darstellung der bekannten photolabilen Schutzgruppen und reversiblen Photoschalter einschließlich der Synthesen und der Mechanismen der lichtabhängigen Reaktionen würde über den Rahmen dieses Aufsatzes hinausgehen. Daher kann hier nur eine kurze Übersicht der jeweiligen Systeme gegeben werden.<sup>[26]</sup>

Die Begriffe „Caging-Gruppe“ („caging group“) und „photolabile Schutzgruppe“ sind praktisch Synonyme, weil der Hauptunterschied nur darin besteht, welche Absicht mit der Photofreisetzung verfolgt wird. Die am häufigsten verwendete photolabile Schutzgruppe – die *ortho*-Nitrobenzylgruppe mit ihren zahlreichen Derivaten (**4**,  $R = H$ , Schema 4) – war schon zuvor vielfach als „normale“ Schutzgruppe in Synthesen und als photolabiler Linker in Festphasensystemen eingesetzt worden.<sup>[15]</sup> Ein Nachteil der *ortho*-Nitrobenzylgruppe ist, dass bei der Photolyse ein Nitrosoaldehyd gebildet wird, der in biologischer Umgebung schädlich sein kann.<sup>[12,27]</sup> Die Nitrophenylethyl(NPE)-Gruppe (**4**,  $R = Me$ ) kann schneller entschützt werden und ergibt ein Nitrosoketon. Allerdings wird ein neues stereogenes Zentrum in das Molekül eingeführt. Die Absorptionswellenlänge kann durch Einführen von z. B. Dimethoxy-Substituenten am aromatischen Ring genau abgestimmt werden.<sup>[28]</sup> Es existieren Varianten zum Schutz von Carbonylgruppen (**5**)<sup>[29]</sup> sowie auch Modifikationen, um die entstehende Nitrosospezies in einer Hetero-Diels-Alder-Reaktion abzufangen (**6**).<sup>[30]</sup> Vor kurzem wurde der Nitrobenzofuran-Chromophor (**7**) eingeführt, der sehr vielversprechende Eigenschaften aufweist. Zum einen hat diese Verbindung im nahen UV-Bereich, der allgemein zur Photofreisetzung genutzt wird, einen deutlich größeren Extinktionskoeffizienten als die Stammverbindung, zum anderen zeigt sie eine sehr hohe Quantenausbeute in der Entschützungsreaktion und ist für die Zweiphotonenaktivierung geeignet.<sup>[31]</sup> Ein weiteres interessantes Derivat stellten Pfeleiderer et al. mit der NPP-Gruppe vor, die bei Bestrahlung eine weniger schädliche Nitrostyryl-Spezies ergibt.<sup>[32]</sup>

Andere, äußerst vielseitige und schon häufig verwendete photolabile Schutzgruppen basieren auf dem Cumarin-



**Schema 4.** Überblick über photolabile Schutzgruppen (nicht vollständig); nicht alle wurden schon tatsächlich zur Photoaktivierbarkeit biologisch aktiver Verbindungen eingesetzt. LG = Abgangsgruppe, in einigen Fällen einschließlich eines Carbonat- oder Carbamat-Linkers.

System (8).<sup>[33]</sup> Die DMACM-Gruppe z.B. setzt ihre gebundene aktive Komponente innerhalb von Nanosekunden frei.<sup>[34]</sup> Auch hier sind Varianten zum Schützen von Aldehyden und Ketonen (9)<sup>[35]</sup> sowie eng verwandte Analoga (BHQ) verfügbar.<sup>[36]</sup> Eine andere gut untersuchte photolabile

Gruppe ist die pHP-Gruppe.<sup>[37]</sup> Das von Ketoprofen abgeleitete Derivat **10** ist ein „Newcomer“, der ein großes Potenzial haben könnte.<sup>[38]</sup> Schema 4 zeigt auch einige neuere photolabile Gruppen, die noch nicht alle für biologische Anwendungen eingesetzt worden sind.

Der große Pluspunkt photolabiler Schutzgruppen besteht darin, dass sie ein eindeutiges Schaltverhalten ermöglichen: Wenn die photolabile Schutzgruppe richtig positioniert wird, können vollständig inaktive Moleküle erhalten werden. Bei Bestrahlung mit Licht wird dann das unmodifizierte aktive Molekül gebildet. Allerdings ist dies eine irreversible Reaktion, die stöchiometrische Mengen an Abspaltungsprodukten liefert. Eine andere Strategie ist es deshalb, die Moleküle durch bistabile Photoschalter zu kontrollieren. Der Nachteil einer solchen reversiblen Schaltung besteht in der Schwierigkeit, die richtige Position für die Schaltkomponente zu finden. Da sowohl die „aktive“ als auch die „inaktive“ Form Derivate der Stammverbindung sind, wird es schwierig, ein binäres An/Aus-Verhalten zu erreichen, selbst wenn ein ideal schaltbares System verwendet wird. Schema 3 gibt einen Überblick über einige bekannte bistabile Photoschalter, die bisher noch nicht alle in biologischen Anwendungen genutzt wurden.

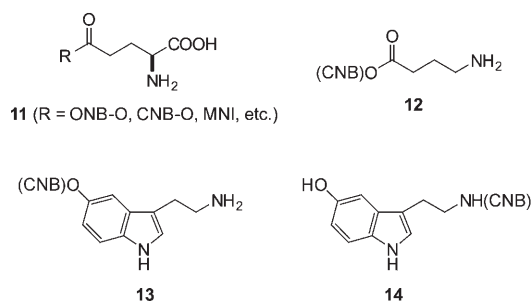
### 3. Photoaktivierbare und lichtschaltbare „kleine Moleküle“

Wie in Abschnitt 1 aufgezeigt wurde, waren die ersten photoaktivierbaren Moleküle solche, die man heutzutage als „kleine Moleküle“ (small molecules) bezeichnen würde. Inzwischen sind viele Klassen photoaktivierbarer kleiner Moleküle bekannt, doch bleibt photoaktivierbares ATP die am häufigsten verwendete Verbindung. Dessen Anwendungen sind so zahlreich, dass wir hier nur auf andere Übersichten verweisen können.<sup>[23,24]</sup> Neben Aminosäuren wurden auch Steroide, sekundäre Botenstoffe, Zucker und Lipide mit photolabilen Gruppen verknüpft und zur Untersuchung biologischer Phänomene eingesetzt.<sup>[54,55]</sup>

#### 3.1. Photoaktivierbare Verbindungen zur Analyse neurologischer Prozesse

Die durch Blitzlichtphotolyse induzierte, räumlich definierte und schnelle Konzentrationsänderung photoaktivierbarer Agonisten oder Antagonisten neuronaler Rezeptoren, mit einer Auflösung bis herab zur Einzelzellebene, ist von großem Nutzen zur Untersuchung kinetischer und mechanistischer Aspekte von Rezeptoren, Transportern und Ionenkanälen.<sup>[56,57]</sup> Folglich wurden Caging-Techniken mit vielen Neurotransmittern, einschließlich Glutamat, Dopamin, Carbamoylcholin und anderen neuroaktiven Aminosäuren erprobt.<sup>[54,56]</sup>

Eine der am genauesten untersuchten Verbindungen ist die Aminosäure Glutamat, zu der schon umfangreiche Literatur vorliegt. Eine Reihe von photoaktivierbaren Glutamatvarianten mit unterschiedlichen photolabilen Gruppen wurde synthetisiert (**11**, Schema 5), und CNB-geschütztes



**Schema 5.** Photoaktivierbare Glutamat- und Serotoninderivate, die in neurologischen Studien verwendet wurden.

Glutamat ist bereits kommerziell erhältlich.<sup>[17]</sup> Photoaktivierbares Glutamat wurde eingesetzt, um Fragen zur Kinetik der neuronalen Signalübertragung und hoch regulierter räumlich-zeitlicher Vorgänge aufzuklären. Außer mit der CNB-Gruppe wurde Glutamat auch mit ONB, MNI und anderen photolabilen Gruppen verknüpft.<sup>[58]</sup> Die erhaltenen Verbindungen wurden genutzt, um die Rezeptorkinetik glutamatgesteuerter Ionenkanäle in neuronalen Zelllinien zu analysieren.<sup>[56]</sup>

Auf diese Weise lokalisierten Shao und Dudek den Ort des exzitatorischen synaptischen Inputs in Pyramidenzellen der CA1-Region.<sup>[59]</sup> Hierzu wurden verschiedene Regionen subikulärer Neuronen durch fokale Blitzlichtphotolyse selektiv angeregt, wodurch die lokale Freisetzung von Glutamat und somit die Zellstimulation ausgelöst wurde. Mit einer Auflösung von ca. 100  $\mu\text{m}$  konnte die Erzeugung postsynaptischer Ströme nach Stimulation der CA1-Pyramidenzellen dem somatodendritischen Bereich zugeordnet werden.

In einer anderen Studie wurden die agonistischen Effekte photoaktivierbarer Verbindungen auf *N*-Methyl-D-aspartat-(NMDA)-Rezeptoren erforscht.<sup>[58]</sup> Die Autoren verglichen die Wirkungen und die Ergebnisse, die mit unterschiedlichen Caging-Strategien erzielt wurden; untersucht wurden MNI-geschütztes Glutamat<sup>[60]</sup> und CNB-geschützte Varianten. Die Versuche ergaben, dass die MNI-geschützten Glutamate wirksame Agonisten der NMDA-Rezeptoren sind, während die Wirkung der CNB-Derivate geringer war. Zudem wurden Inhibitorwirkungen von CNB-geschütztem Glutamat auf NMDA-Rezeptoren beobachtet, die bei den MNI-geschützten Glutamaten nicht auftraten. Dies macht deutlich, dass die Wahl der photolabilen Gruppe entscheidend ist und vom untersuchten System abhängt; sie muss an die zu analysierende biologische Funktion und den Rezeptor sorgfältig angepasst werden. CNB-geschütztes Glutamat wird schnell entschützt ( $t_{1/2} = 21 \mu\text{s}$ ), weshalb es sich sehr gut für kinetische Untersuchungen eignet.<sup>[61]</sup> Mithilfe von CNB-Glutamat-Verbindungen wurde die Kinetik der Kanalöffnung bei mehreren glutamatgesteuerten Ionenkanalrezeptorarten, wie dem ionotropen Glutamat-Rezeptor vom AMPA-Typ ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat), untersucht.<sup>[62]</sup>

Auch die photolabilen NI- und MNI-Gruppen wurden eingesetzt, um die Kinetik der Wechselwirkung metabotroper und ionotroper Rezeptoren (wie NMDA- und AMPA-Rezeptoren) mit Glutamat zu erforschen.<sup>[60,63]</sup> Lowe untersuchte

die Pharmakologie und die Kinetik der Glutamat-Rezeptoren in Mitralzellen mit NI-geschütztem Glutamat.<sup>[64]</sup> Ellis-Davies et al. verwendeten MNI-geschütztes Glutamat, um die Expression postsynaptischer AMPA-Rezeptoren nach der Photofreisetzung des Glutamats in isolierten dendritischen Dornen zu verstärken.<sup>[65]</sup> In einem interessanten Ansatz einer Photoaffinitätsmarkierung verwendeten England et al.<sup>[66]</sup> einen zellpermeablen AMPA-Rezeptor-Antagonisten (anstatt eines Rezeptor-Agonisten) und dessen photoempfindliche Variante (6-Azido-7-nitro-1,4-dihydrochinoxalin-2,3-dion) zur Analyse des AMPA-Umschlags („AMPA trafficking“) bei synaptischer Plastizität mit hoher zeitlicher (Minuten) und räumlicher Auflösung.

Mithilfe eines photoaktivierbaren Glutamatderivats untersuchten Brasnjo und Otis die exzitatorische Aminosäuretransporter(EAAT)-abhängige Glutamataufnahme von Purkinje-Zellen als Reaktion auf Aktionspotentiale einer einzelnen Kletterfaser.<sup>[67]</sup> Eine frühere Studie von Grever und Rauen zeigte, dass die durch den neuronalen Aminosäuretransporter EAAC1 vermittelte Glutamat-Translokation im Zeitraum von Millisekunden stattfindet.<sup>[68]</sup>

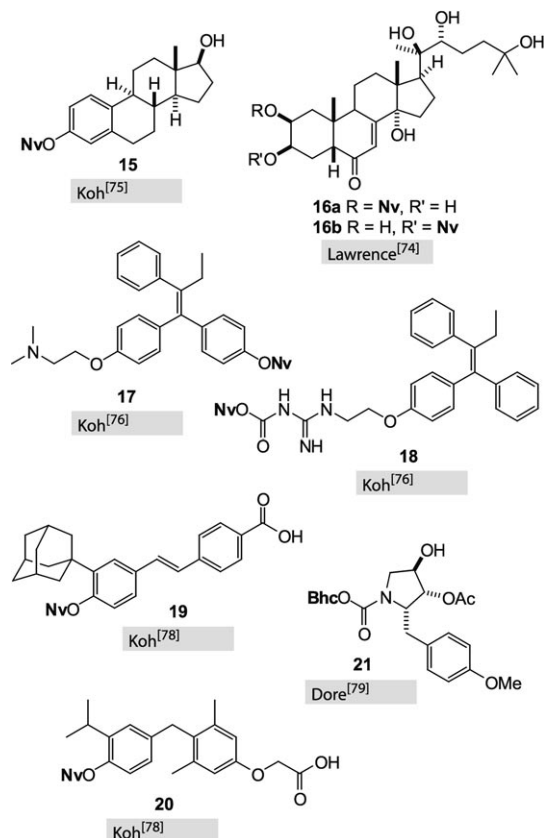
Shimamoto et al. synthetisierten vom Cumarin abgeleitete photoaktivierbare Glutamatderivate und setzten sie zur Untersuchung des Glutamattransports nach Lichtaktivierung ein.<sup>[69]</sup> Jayaraman et al. zeigten, dass die Fourier-Transformations-Infrarot(FTIR)-Spektroskopie eingesetzt werden kann, um die Strukturänderungen nach der Glutamat-Freisetzung aus inaktiven Glutamatvorstufen zu verfolgen.<sup>[70]</sup>

Molnár und Nadler wählten einen anderen Zugang, um Vorgänge im synaptischen Bereich von Neuronen zu erforschen.<sup>[71]</sup> Sie verwendeten ein photoaktivierbares  $\gamma$ -Aminobutyrat (GABA) (**12**; Schema 5) zur Untersuchung der GABA-Rezeptoren. Dieses inhibierte die polysynaptischen inhibitorischen postsynaptischen Ströme (IPSCs), die in Körnerzellen des Gyrus dentatus durch antidrome Stimulation von Moosfasern induziert werden. Dagegen konnte keine Wirkung auf die exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSCs) durch Stimulation des perforanten Pfads beobachtet werden.

Hess et al. beschrieben die Synthese von photoaktivierbarem Serotonin und verglichen für das O-Derivat **13** und das N-Derivat **14** (Schema 5) die Kinetik der Entschützung.<sup>[72]</sup> Das O-Derivat **13** wurde in nur 16  $\mu\text{s}$  entschützt, wohingegen das N-Derivat **14** relativ langsam reagierte (1.2 ms). Wegen seiner guten Löslichkeit (2 mM) in wässrigen Lösungen und der schnellen Entschützung wurde das photoaktivierbare Serotonin als Effektorspeicher verwendet. Die schnelle Freisetzung der aktiven Verbindung durch Laserbestrahlung ermöglicht die Analyse der Rezeptorkinetik der Serotonin-5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in Neuroblastomzellen (NIE-115) der Maus. Lee et al. stellten ein photoaktivierbares Dopamin her, um den Einfluss der Dopaminkonzentration auf die endogene Dopaminfreisetzung festzustellen. Das Experiment ergab, dass die endogene Dopaminfreisetzung durch photoinduzierte Dopaminkonzentrations sprünge unterdrückt werden kann.<sup>[73]</sup>

## 3.2. Steroidhormone, Lipide und Membranen

Hormone und Hormonanaloga können die Genexpression durch Bindung an ihre Rezeptoren steuern und dienen damit zum Aufbau von Genexpressionssystemen.<sup>[74]</sup> Zum Beispiel ändert der Östrogenrezeptor bei der Bindung von Östradiol seine Konformation und bindet dann an Promotorelemente einzelner Gene, womit er die Genexpression initiiert. Koh und Mitarbeiter synthetisierten ein photoaktivierbares Östradiolderivat (**15**, Schema 6) und zeigten, dass



**Schema 6.** Photoaktivierbare Moleküle für die Regulation der Genexpression.

es mit dieser Verbindung gelingt, die hormonabhängige Genexpression durch Licht zu starten.<sup>[75]</sup> Diese Strategie ermöglicht die räumlich-zeitliche Untersuchung der Genexpression und scheint anderen Methoden überlegen, die unspezifisch im Hinblick auf Position und Initiierung der Genexpression sind. Lawrence et al. synthetisierten photoaktivierbares  $\beta$ -Ecdyson-4 (**16a,b**; Schema 6) und verwendeten es (ähnlich der Methode von Koh) zur lichtinduzierten Genexpression.<sup>[74]</sup>

Mit selektiven Östrogenrezeptor(ER)-Antagonisten gelang es Shi und Koh, die ER-vermittelte Genexpression zu induzieren.<sup>[76]</sup> Sie synthetisierten photoaktivierbares 4-Hydroxytamoxifen (**17**) und photoaktivierbares Guanidintamoxifen (**18**) (Schema 6), die beide selektiv der ER $\alpha$ - und ER $\beta$ -vermittelten Transkription entgegenwirken, die durch Östrogenresponselemente (EREs) eingeleitet wird. Das System

wurde in einer kürzlich erschienenen Studie verwendet, um die Rekombination von Genen zu steuern, indem photoaktivierbares **17** auf die Rekombinaseaktivität der ligandgesteuerten Cre-ER<sup>T</sup> (einer Tamoxifen-sensitiven Rekombinasevariante) einwirkte.<sup>[77]</sup> Im Innern von Zellen wird die Cre-ER<sup>T</sup>-Rekombinase nach Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen aktiv, und nach der Rekombination kann die Expression eines Reportergens beobachtet werden. Koh et al. zeigten, dass dieses System mit Verbindung **17** durch Licht reguliert werden kann, wenn auch in irreversibler Weise.

In einer weiteren Studie verwendeten Koh et al. den Retinsäurerezeptor (RAR) und das Schilddrüsenrezeptorsystem (thyroid receptor, TR), um die Dauer der Genantwort nach der Photofreisetzung eines mit einer photolabilen Gruppe derivatisierten Agonisten zu messen.<sup>[78]</sup> Sie synthetisierten photoaktivierbare Analoga bekannter synthetischer Agonisten von RAR und TR (**19** und **20**) (Schema 6) und untersuchten deren Stabilität unter zellulären Bedingungen sowie die photoaktivierte, durch TR und RAR vermittelte Genexpression nach zeitabhängiger Bestrahlung mit Licht. Es wurde nahezu keine unbeabsichtigte Freisetzung der photolabilen Gruppe unter physiologischen Bedingungen beobachtet. Die Genexpression im TR-System konnte bis zu 35 h, im RAR-System aber nur 5 h nach Bestrahlung beobachtet werden. Damit wird deutlich, dass die räumlich-zeitliche Regulation der Genexpression und ihre Dauer nach der Photolyse der photoaktivierbaren Agonisten nukleärer Hormonrezeptoren vom zu untersuchenden System abhängen.

Eine Steuerung der Genexpression kann auch durch die Regulation der Translation erreicht werden. Zu diesem Zweck synthetisierten Dore et al. eine photoaktivierbare Variante von Anisomycin (**21**), einer Verbindung, die in den Peptidkuppelungsschritt während der eukaryotischen Translation eingreift. Es wurde gezeigt, dass das Bhc-Anisomycin die Proteinsynthese räumlich-zeitlich inhibiert und dass solche Verbindungen zur Untersuchung lokal stark regulierter neuronaler Prozesse von Bedeutung sein könnten.<sup>[79]</sup>

Furuta et al. beschrieben die Synthese photoaktivierbarer Gallensäuren. Gallensäuren sind Endprodukte des Cholesterin-Stoffwechsels,<sup>[80]</sup> und synthetische Varianten könnten für die Untersuchung biologischer Prozesse, die auf Wechselwirkungen mit Gallensäuren beruhen, wichtig sein. In anderen Studien wurde die Caging-Technik verwendet, um Konformationsänderungen und strukturelle Reorganisation von Lipidmicellen und selbstorganisierten Strukturen auszulösen.<sup>[81]</sup> Photoaktivierbare Cholesterinanaloga fanden mehrere Anwendungsmöglichkeiten,<sup>[82]</sup> überwiegend wurden sie jedoch bei Affinitätsmarkierungen eingesetzt: Mit einem Diazirin-haltigen Cholesterinderivat wurden die Cholesterinbindenden Proteine in neuroendokrinen Zellen und lebenden Organismen wie *C. elegans* identifiziert.<sup>[83]</sup> In Verbindung mit UV-induzierter Vernetzung (UV cross-linking) konnte die Vitellogenin-Proteinfamilie als wichtigster Wechselwirkungspartner des Cholesterins in *C. elegans* identifiziert werden. Diese Proteine sind auch für die richtige Verteilung des Cholesterins zuständig, die bestimmt wurde, indem man die Verteilung und Anreicherung des Cholesterins mit einem fluoreszierenden Cholesterinanalogen, dem Dehydroergosterol, verfolgte. Mit dieser UV-Methode vernetzten Simons



et al. Proteine mit dem photoaktivierbaren Cholesterinanalogen, um die auf Cholesterin beruhende Assoziation des Proteolipidproteins mit einer CHAPS-unlöslichen Membranfraktion (CIMF) geringer Dichte, die in Myelinlipiden von Oligodendrocyten angereichert ist, zu bestimmen.<sup>[84]</sup> Sie identifizierten das Proteolipidprotein als eine Hauptkomponente des Myelins. Dagegen konnte keine Wechselwirkung (UV-induzierte Vernetzung) des Proteolipidproteins mit Phosphatidylcholin nachgewiesen werden.

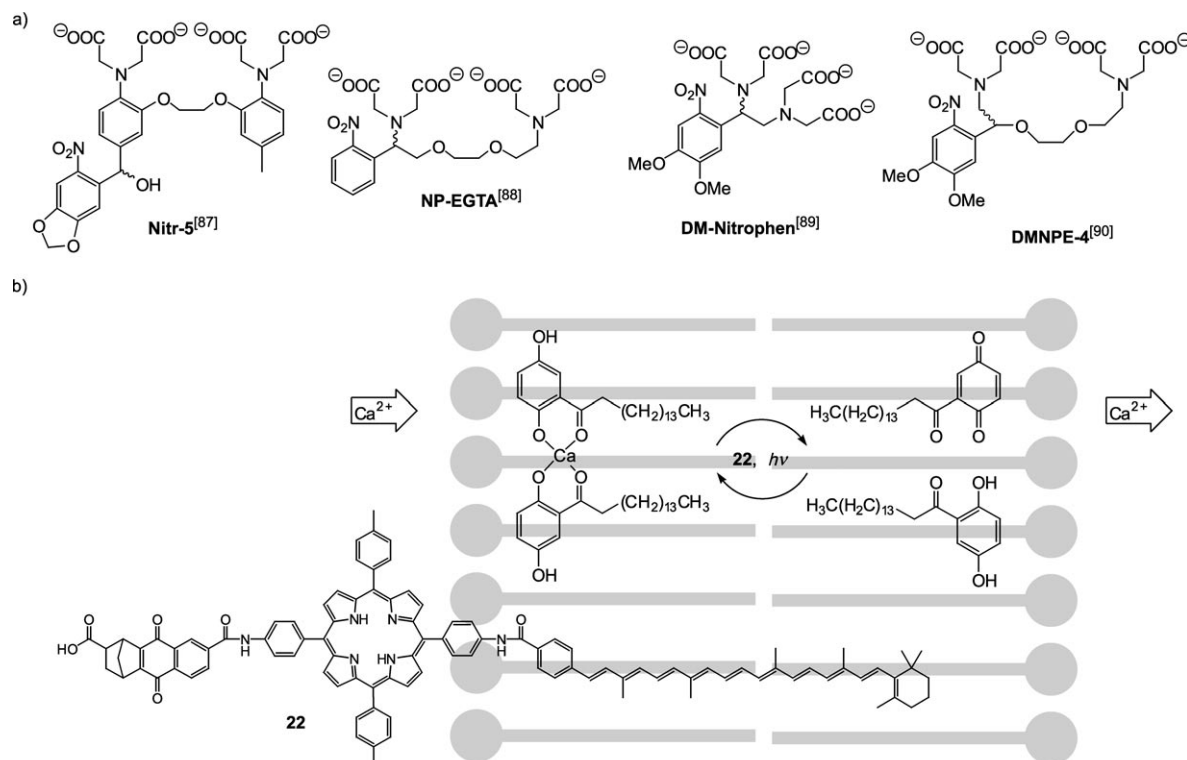
### 3.3. Sekundäre Botenstoffe und zelluläre Signalmoleküle

Etliche Studien befassen sich mit der Anwendung der lichtinduzierten Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Schema 7 zeigt typische Verbindungen. Es handelt sich dabei um Chelatliganden, die bei Bestrahlung entweder ihr Komplexbildungsvermögen ändern (Nitr-5) oder gespalten werden.<sup>[12,23,24]</sup> Wiederum könnte eine umfassende Darstellung der zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten Thema einer eigenen Übersicht sein. Wir beschränken uns daher auf eine repräsentative Untersuchung der photoreversiblen Calciumbindung, auch wenn diese nicht exakt unter die in der Einführung gegebene Definition der reversibel lichtschtbaren Systeme fällt. Gust et al. führten in dieser Studie ein synthetisches, auf Chinon basierendes  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportsystem ein, das in der Lage ist, lichtgesteuerte Ionengradienten innerhalb der Doppellipidschicht von Vesikeln zu errichten.<sup>[85,86]</sup> Dieses

System ist im  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Zustand ungeladen und membranlöslich. Nach der Komplexbildung an der äußeren Membranoberfläche diffundiert es durch die Membran. Die Komplexbildung wird durch Carotinoid-Radikalkationen (die von dem in der Membran eingelagerten photoangeregten Carotinoidporphyrinnaphthochinon **22** erzeugt werden) durch Oxidation des Komplexes zum Chinon unterbrochen. Dadurch werden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an der inneren Membran freigesetzt. Das Shuttle-Molekül wird anschließend regeneriert. Solche Moleküle sind für die Untersuchung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger biologischer Prozesse von Nutzen.

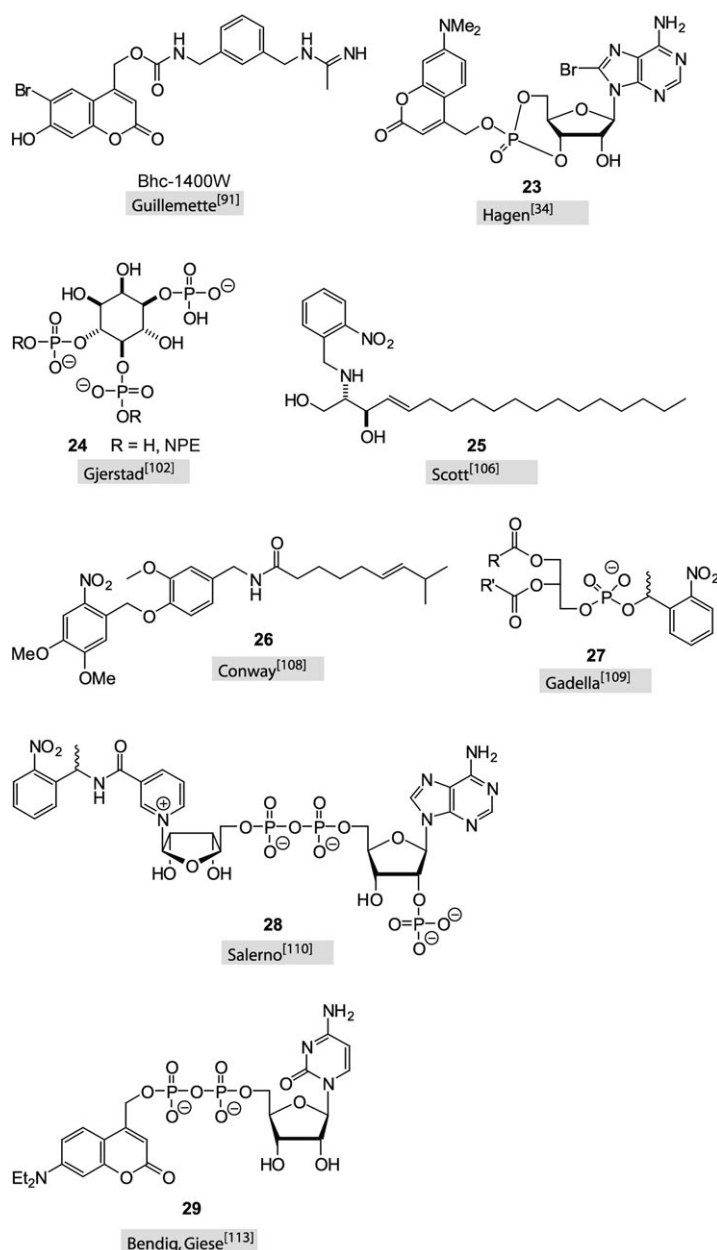
Die Kontrolle des Stickstoffmonoxid(NO)-Spiegels wurde als mögliche Strategie zur Bekämpfung diverser Krankheiten identifiziert. Ein Ansatz ist die Verwendung von inhibierenden Molekülen wie 1400W, die auf Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) einwirken. Kürzlich wurden photoaktivierbare Derivate dieses Inhibitors hergestellt und als photosensitive Wirkstoffe untersucht (z.B. Bhc-1400W, Schema 8).<sup>[91,92]</sup> Die Autoren wiesen nach, dass das Inhibitor-molekül durch Bestrahlung mit Licht effizient aus dem photoaktivierbaren Bhc-1400W freigesetzt wird und dass die NOS-inhibierende Wirkung wiederhergestellt werden kann. Dies zeigt auf, dass photolabile Gruppen als räumlich-zeitlich regulierbare Wirkstoffvorstufen fungieren könnten.

Nach einer anderen Strategie wird durch Bestrahlung direkt NO freigesetzt („photoaktivierbares NO“). Organische Verbindungen, die NO abgeben können, sind schon recht lange bekannt<sup>[93]</sup> und schon besprochen worden.<sup>[12]</sup> In



**Schema 7.** a) Typische Verbindungen für die lichtinduzierte Freisetzung von Calciumionen, die durch Bestrahlung entweder ihre Ligandeneigenschaften verändern (Nitr-5)<sup>[87]</sup> oder gespalten werden (NP-EGTA,<sup>[88]</sup> DM-Nitrophen,<sup>[89]</sup> DMNPE-4<sup>[90]</sup>). b) Ein reversibles System zur Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ , das sich durch Licht zwischen zwei Zuständen schalten lässt; durch unsymmetrische Insertion von Verbindung **22** kann dieses System  $\text{Ca}^{2+}$  durch Lipiddoppelschichten transportieren.<sup>[85]</sup>





**Schema 8.** Photoaktivierbare Derivate eines NO-Synthase-Inhibitors, von sekundären Botenstoffen und Nucleotid-Cofaktoren.

einer neueren Studie verwendete Yip photoaktivierbares Stickstoffmonoxid (Kaliumnitrosylpentachlorruthenat), um NO-abhängige Effekte auf die Flüssigkeitsresorption im proximalen Tubulus zu analysieren. Der Autor konnte nachweisen, dass die Hemmung der proximal-tubulären Resorption von der NO-Dosis abhängt und durch Blitzlichtphotolyse von lunalem photoaktivierbarem NO ausgelöst werden kann.<sup>[94]</sup>

Cyclische Nucleotide sind bereits umfassend untersucht worden,<sup>[23, 95, 96]</sup> und photoaktivierbare Derivate können kommerziell erhalten werden.<sup>[117]</sup> Wir konzentrieren uns hier auf neuere Anwendungen der photoaktivierbaren cyclischen Nucleotidmonophosphate (NMPs) und auf den Einsatz neuer photolabiler Schutzgruppen. Eine jüngste Studie von Harz

et al. zeigte die räumlich-zeitlichen Effekte von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) auf, das auf neuronale Wachstumskegel – die terminalen Strukturen sich verlängernder Neuriten – einwirkte.<sup>[96]</sup> Da die Orientierung des Wachstumskegels durch cAMP gesteuert wird, erzeugten die Autoren einen intrazellulären cAMP-Konzentrationsgradienten durch Bestrahlen der Wachstumskegel sensorischer Neuronen des Huhns mit UV-Licht an unterschiedlichen Stellen, z. B. den Kegeldenden. Mit dieser Versuchsanordnung konnten sie zeigen, dass nur bestimmte cAMP-Freisetzungs-muster in der Lage sind, die Richtungsänderung des Wachstumskegels zu induzieren. Dies weist darauf hin, dass das räumlich-zeitliche Muster der cAMP-Gradienten für die Orientierung der Wachstumskegel entscheidend ist.

Yoshimura und Kato setzten ein photoaktivierbares cAMP-Derivat in Neuronen ein, um die Auswirkungen steigender zellulärer cAMP-Konzentrationen zu untersuchen. Mit dieser Methode gelang es, die synaptische Up- und Down-Regulation der Nachpotentiale nach einer cAMP-Zunahme in Neuronen genau zu lokalisieren. Die synaptische Up-Regulation wurde in AHP-erzeugenden Neuronen detektiert, und eine Down-Regulation konnte in ADP-erzeugenden Neuronen beobachtet werden (AHP = Nachhyperpolarisation, ADP = Nachdepolarisation).<sup>[97]</sup> Scott et al. verglichen die Einwärtsströme, die in Rattenneuronen durch zelluläre Erhöhung der cGMP-Spiegel angeregt und durch Blitzlichtphotolyse von photoaktivierbaren cGMP-Vorstufen aufrechterhalten wurden.<sup>[95]</sup> Sie verwendeten gezüchtete dorsale Wurzelganglion-Neuronen (dorsal root ganglion, DRG) und untersuchten die Wirkung von cGMP auf die Einwärtsströme, wozu sie zwei unterschiedliche photoaktivierbare cGMP-Verbindungen verglichen. Mit dieser Methode detektierten sie in 52 % der DRG-Neuronen einen aktivierten verzögerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtsstrom durch die Bildung cyclischer ADP-Ribose und Mobilisierung von Calcium aus intrazellulären Speichern. Schnell aktivierende Einwärtsströme wurden allerdings nur in einer Subpopulation von 12,5 % der Neuronen hervorgerufen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Einwärtsströme in DRG-Neuronen durch unterschiedliche Mechanismen induziert werden.

Unter Verwendung von photoaktivierbaren cNMP-Molekülen erforschten Takeuchi und Kurahashi auf sekundären Botenstoffen basierende Signaltransduktionswege im olfaktorischen Rezeptorsystem.<sup>[98]</sup> Dabei konnte beobachtet werden, dass die olfaktorische Antwort auf viele Geruchsstoffe durch einen einheitlichen Mechanismus moduliert wird. Lagostena und Menini verwendeten ebenfalls photoaktivierbare Verbindungen, um das olfaktorische System in Neuronen der Maus zu erforschen.<sup>[99]</sup> Mit der Patch-Clamp-Methode wurden die Einwärtsströme gemessen, die durch steigende Konzentrationen von cGMP und cAMP induziert wurden. Die Konzentrationssteigerungen wurden durch Blitzlichtphotolyse der photoaktivierbaren cNMPs entweder im Soma oder lokalisiert auf den Zilien der Neuronen erreicht.

Es gab einige Anstrengungen, neben dem kommerziell erhältlichen photoaktivierbaren cAMP<sup>[117]</sup> weitere photoaktivierbare Derivate der cNMPs zu entwickeln. Die Arbeitsgruppen von Hagen, Tsien und Corrie untersuchten photo-

labile Schutzgruppen wie Cumarin-Derivate und wasserlösliche Derivate Nitrobenzyl-abgeleiteter photoaktivierbarer Gruppen, die eine schnelle und effiziente Photoentschüttung und Freisetzung der cNMPs ermöglichen (z.B. Verbindung **23**, Schema 8).<sup>[34,100]</sup>

Gjerstad et al. verwendeten photoaktivierbare Varianten von Inosit-1,4,5-triphosphat (**24**) (Schema 8),<sup>[101]</sup> um die Effekte von IP<sub>3</sub> in vomeronasalen mikrovillären Rezeptorneuronen des Frosches zu untersuchen. In Ganzellaufnahmen wurde erkannt, dass lokale IP<sub>3</sub>-Moleküle eine vorübergehende Depolarisation auslösen und Aktionspotentiale in Neuronen induzieren können.<sup>[102]</sup> Dank der räumlich lokalisierten Aktivierung von IP<sub>3</sub> in der terminalen Vesikel des Dendriten konnte die Effektorregion lokalisiert werden. Dinkel und Schultz beschrieben die Synthese von photoaktivierbarem myo-Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat.<sup>[103]</sup> Prestwich et al. synthetisierten photoaktivierbares Inositolhexakisphosphat,<sup>[104]</sup> das von Brearley et al. zur Untersuchung der intrazellulären Signalübertragung in Pflanzen eingesetzt wurde.<sup>[105]</sup>

Photoaktivierbares Sphingosin (**25**) (Schema 8) und Dihydrosphingosin wurden bereits synthetisiert und zur Aufklärung neuronaler Einwärtsströme eingesetzt.<sup>[106]</sup> Für Affinitätsmarkierungsexperimente stellten Bittman und Mitarbeiter ein photoaktivierbares Analogon des Lipidmediators und sekundären Botenstoffs Sphingosin-1-phosphat her, wobei sie zwei unterschiedliche photolabile Gruppen, Benzophenon und Diaziriny, verwendeten.<sup>[107]</sup> Mithilfe dieser Moleküle konnten verschiedene Wechselwirkungsmuster mit Proteinen nachgewiesen werden, die die Eignung dieser Verbindungen zur Identifizierung von Proteinbindungsstellen für den Pharmakophor der Sphingosine belegen.

### 3.4. Andere kleine Moleküle

Mehrere andere kleine Moleküle wurden ebenfalls mit photolabilen Gruppen modifiziert und zur Erforschung von Signalübertragungswegen oder Proteinfunktionen eingesetzt. Conway et al. synthetisierten ein photoaktivierbares Capsaicin-Analogon (**26**) (Schema 8), das bei Bestrahlung den Capsaicin-Rezeptor TRPV1 aktivierte.<sup>[108]</sup>

Goedhart und Gadella verwendeten die Phosphatidsäure **27** (Schema 8), um die flagelläre Exzision in Chlamydomonas zu steuern.<sup>[109]</sup> Bei Zugabe der photoaktivierbaren Phosphatidsäure wird zunächst keine Wirkung beobachtet, und erst nach UV-Bestrahlung erfolgt der Geißelabwurf bei Chlamydomonas. Damit bietet sich eine kontrollierte Methode zur Untersuchung Phosphatidsäure-abhängiger Signalwege.

Salerno et al. verwendeten eine kombinierte präparative und enzymatische Synthesestrategie, um die photoaktivierbaren NADP-Cofaktoren **28** (Schema 8) zu erzeugen.<sup>[110,111]</sup> Die synthetischen photoaktivierbaren Nicotinamide eigneten sich als Substrate für die solubilisierte NAD-Glycohydrolase-Transglycosidase-Aktivität und ermöglichten auf diese Weise die Bildung von photoaktivierbaren NADP-Cofaktoren.

Gerwert et al. analysierten den Mechanismus der Ras-GTPase unter Verwendung von photoaktivierbarem GTP.<sup>[112]</sup> Mit der zeitaufgelösten FTIR-Differenzspektroskopie konn-

ten sie den Reaktionsweg von GTP zu GDP mit Millisekundaauflösung überwachen.

Bendig und Giese et al. synthetisierten eine photoaktivierbare Variante von Cytidin-5'-diphosphat (**29**, CDP) (Schema 8).<sup>[113]</sup> Sie verknüpften die photolabile Schutzgruppe vom Cumarin-Typ mit der  $\beta$ -Phosphatgruppe von CDP; bei Bestrahlung kann CDP effizient freigesetzt werden.

## 4. Photoaktivierbare und lichtsichtbare Proteine

Die irreversible Photoaktivierung von Proteinen ist für mehrere Proteinklassen einschließlich Hydrolasen, Proteasen, Kinasen, Nucleasen, Toxinen, Zellmatrixproteinen, Rezeptoren, Serumproteinen, Galactosidasen und Antikörpern beschrieben worden.<sup>[114]</sup> Wir konzentrieren uns hier auf neuere Entwicklungen auf diesem Gebiet. Lichtaktivierbare Photoschalter können durch unterschiedliche Verfahren in Proteine eingeführt werden. Bei der einfachsten Methode nutzt man die spezifische Reaktivität funktioneller Gruppen der Aminosäureseitenketten, um Proteine durch Umsetzung mit photolabilen Schutzgruppen statistisch zu modifizieren. Dabei werden z.B. die Cysteinreste von Proteinen mit Sulfhydrylgruppen der photolabilen Schutzgruppen verknüpft. Wenn Untereinheiten eines Proteins präparativ zugänglich sind, können in einem anderen Ansatz die multimeren Eigenschaften eines Proteins zur Herstellung einer photoaktivierbaren Variante genutzt werden. Dadurch kann ein Peptid so synthetisiert werden, dass sich die photoaktivierbare Komponente an einer gewünschten Position befindet. Diese Peptide können dann den Wildtyp bei der Bildung multimerer, nun photoaktivierbarer Proteine ersetzen. Eine elegante Methode wurde von Schultz et al. entwickelt,<sup>[115]</sup> welche ein Nonsense-Codon und eine zugehörige tRNA nutzten, die mit der gewünschten photoaktivierbaren Aminosäure beladen war. Zuvor hatten bereits Endo et al. eine Methode mit einem künstlichen Vierbasen-Codon verwendet.<sup>[116,117]</sup> Mit beiden Methoden gelingt es, photoaktivierbare Aminosäuren ortsspezifisch in größere Proteine einzuführen.

### 4.1. Kinasen

Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) ist an mehreren Signalwegen beteiligt (einschließlich Entwicklungssignalen, neuronaler Plastizität und Hormonsignalen). Ausgehend von der katalytischen Untereinheit des tetrameren Holoenzym (bestehend aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Domänen) wurden photoaktivierbare Varianten entwickelt.<sup>[118,119]</sup> Dazu wurden zwei entscheidende Aminosäurereste der katalytischen PKA-Domäne, Cys199 und Phosphothio-Thr197, mit ONB-Gruppen derivatisiert. Durch UV-Bestrahlung können die photoaktivierbaren Varianten vollständig reaktiviert werden, wohingegen die nichtbestrahlten Proteine annähernd inaktiv waren und eine Restaktivität von nur 5 % zeigten. Bayley et al. berichteten zudem, dass die Wahl der Schutzgruppe sowohl für die Restaktivität des photoaktivierbaren Proteins als auch für die effiziente Reaktivierung durch Photolyse entscheidend ist. In

ihrer Studie zeigte die ONB-Gruppe die besten Ergebnisse, während die CNB- und die Nv-Derivate signifikante Hintergrundaktivitäten aufwiesen. Auf einer nächsten Stufe wurde der Caging-Ansatz genutzt, um das Phospho-Thr197 zu derivatisieren. Hierzu wurde eine Phosphothio-modifizierte Kinase hergestellt, die sich für die Modifizierung mit einer pHP-Gruppe eignete.<sup>[119]</sup> Diese Modifikation resultierte in einem inaktiven PKA-Protein, dessen Aktivität durch Bestrahlung effizient wiederhergestellt werden konnte.

#### 4.2. Ribonucleasen

Strategien zur Inaktivierung von Ribonucleasen wurden durch Hamachi und Mitarbeiter entwickelt. Zum Einsatz kam hierbei eine Synthesemethode für den ortsspezifischen Einbau von *ortho*-Nitrobenzyl-Derivaten. Die Ribonuclease S besteht aus zwei Domänen, dem S-Peptid (1–20) und dem S-Protein (21–124). Durch Festphasensynthese wurden mehrere Positionen des S-Peptids durch Aminosäuren ersetzt, die photolabile Schutzgruppen tragen. Anschließend wurde die Aktivität der photoaktivierbaren und der bestrahlten Peptide bestimmt. Hierdurch wurde gefunden, dass die Positionen Q11 und D14 für eine wirksame Photoaktivierung (**30**, Schema 9) und zur Suppression der RNase-Aktivität geeignet sind. Durch Bestrahlung konnte die RNA-Spaltungsaktivität wiederhergestellt werden.<sup>[120]</sup> In einer anderen Studie führten Hamachi et al. an spezifischen Stellen

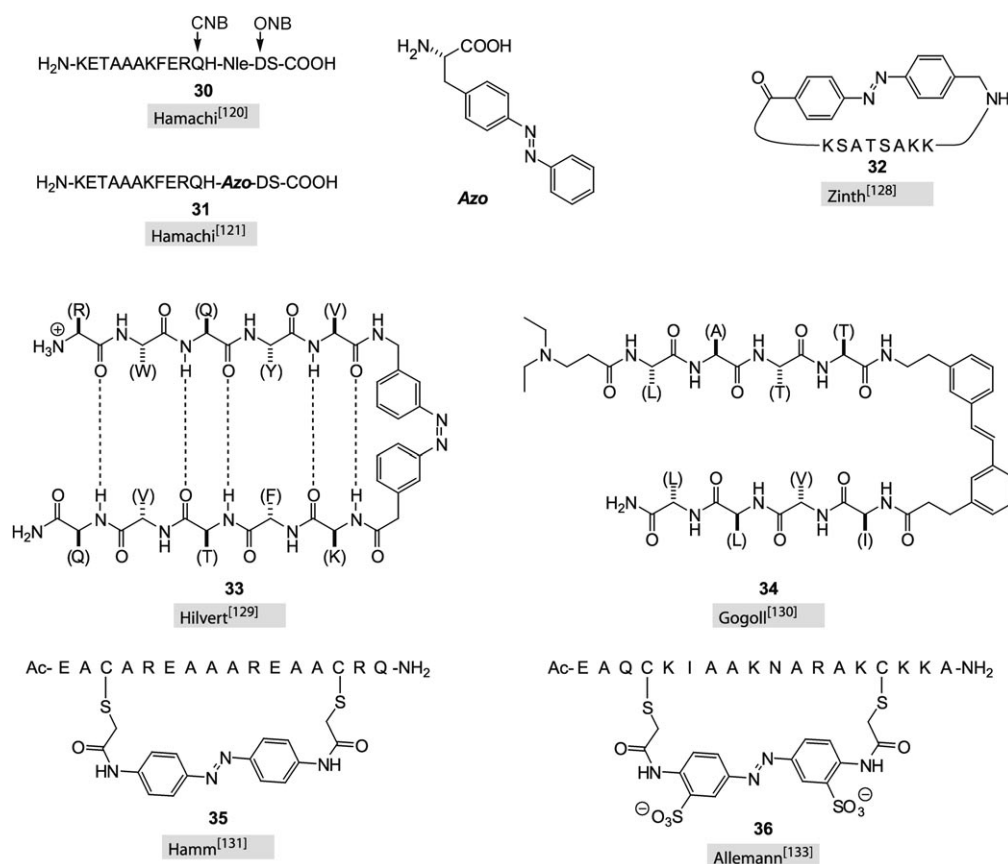
des gleichen S-Peptids (**31**, Schema 9) Phenylazophenylalanin ein und erhielten photoschaltbare An/Aus-Varianten der Ribonuclease S. Eine Ribonucleasevariante, die die Azo-phenylkomponente in enger Nachbarschaft zur entscheidenden Aminosäure His12 des S-Peptids trägt, zeigte nach abwechselnder Bestrahlung mit UV- und sichtbarem Licht ein eindeutiges An/Aus-Verhalten.<sup>[121]</sup>

Woolley et al. verwendeten in einer ähnlichen Studie ebenfalls die photoisomerisierbare Phenylazophenylalanin-Gruppe zur Synthese von S-Peptid-Varianten. Im Einklang mit der Studie von Hamachi et al. stellten sie fest, dass sich die Position 13 des S-Peptids zur effizienten Einführung einer photoschaltbaren Azobenzolgruppe eignet.<sup>[122]</sup>

#### 4.3. Photoaktivierbare Rezeptoren und Rezeptoragonisten

Lestee et al. führten durch Derivatisierung des Tyrosinrestes 242 (Y242) des Kaliumkanals Kir2.1 von *Mus musculus* eine ONB-Gruppe ein.<sup>[123]</sup> Eine photolabile Gruppe an der kritischen Position Y242 erlaubt sowohl die Untersuchung der direkten Phosphorylierung des Rezeptors an dieser Position als auch die Steuerung der Rezeptoraktivität durch Licht. Interessanterweise zeigte sich, dass Y242 nicht durch Tyrosin-Kinasen phosphoryliert wird, sondern sich eher an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt.

Der nicotinische Acetylcholinrezeptor (nAChR), ein ligandengesteuerter Ionenkanal, besteht aus fünf homologen



**Schema 9.** Photoaktivierbare Peptide, die zur Untersuchung von Ribonucleasenfunktionen und Peptidfaltungen verwendet wurden. Die Peptidseitenketten sind mit dem Einbuchstabencode (in Klammern) der jeweiligen Aminosäure abgekürzt. Nle = Norleucin.



Untereinheiten, die ein Pentamer bilden und sich um eine zentrale Pore anordnen. Lester und Mitarbeiter setzten die Nonsense-Suppressions-Technik ein, um photoaktivierbare Tyrosin- und Cysteinreste in Transmembransegmente des nAChR einzuführen.<sup>[124]</sup> In ihrer Studie wiesen sie nach, dass photoaktivierbares Tyrosin durch Lichtbestrahlung effizienter entschützt wird als photoaktivierbares Cystein, und mit den photoaktivierbaren nACh-Rezeptoren konnten sie die Kinetik der Acetylcholin-induzierten Ströme vor und nach der Photolyse analysieren.

Ein anderer Zugang wurde von Trauner, Kramer et al. verfolgt. Sie synthetisierten ein thiolreaktives Azobenzolderivat, das ein tertiäres Amid enthält, und erzeugten damit einen schaltbaren K<sup>+</sup>-Ionenkanal.<sup>[125]</sup> Mit diesem Ansatz gelingt es, neuronale Schaltungen räumlich-zeitlich präzise und reversibel zu steuern und so neuronale Impulse (neuronal firing) zu analysieren.

#### 4.4. Steuerung der Konformation und Funktion von Peptiden

Die Caging-Strategie kann bei Peptiden und Proteinen eingesetzt werden, um die Faltung und Entfaltung von Peptidkonformationen zeitaufgelöst zu analysieren.<sup>[126]</sup> Hierzu verwendeten Chan et al. die 3',5'-Dimethoxybenzoingruppe, um eine Mutante des GCN4-1p-Proteins, bei der die Bildung der superspiralisierten Struktur (Coiled-Coil-Struktur) des Wildtypproteins gestört war, durch eine photolabile Schutzgruppe zu inaktivieren.<sup>[127]</sup> In Gegenwart der Schutzgruppe kann sich die Coiled-Coil-Struktur ausbilden, da die Mutation maskiert und daher ruhiggestellt ist, während bei der Photolyse die  $\alpha$ -Helices, die für die Coiled-Coil-Bildung notwendig sind, wieder unterbrochen werden.

Zinth et al. erhielten mit einer anderen Strategie schaltbare cyclische Peptide. Hierzu führten sie eine Azobenzoleinheit in cyclische bioaktive Peptide bestehend aus acht Aminosäuren ein (**32**, Schema 9).<sup>[128]</sup> Die Faltungskinetik der Peptide bei der photoinduzierten Isomerisierung wurde durch transiente Absorptionsspektroskopie mit Femtosekundenauflösung verfolgt.

Hilvert et al. verwendeten die *meta*-substituierten Azobenzolpeptide **33** (Schema 9) zur Herstellung photoinduzierbarer  $\beta$ -Haarnadeln.<sup>[129]</sup> Lag das Azobenzolderivat in seiner thermodynamisch stabilen *trans*-Form vor, dann konnte keine eindeutige Struktur bestimmt werden. Nach der Photoisomerisierung wurde aber eine gut definierte  $\beta$ -Haarnadelstruktur beobachtet. Die Autoren weisen darauf hin, dass sich diese Methode zur Photoregulation der Peptidhormonaktivität eignen könnte. Eine ähnliche Methode wurde von Gogoll et al. beschrieben. Anstelle des Azobenzols bauten sie Stilben als photoschaltbaren Chromophor in das  $\beta$ -Haarnadelpeptid **34** ein (Schema 9) und wiesen die *cis*- und *trans*-Konformationen des Peptids mit CD-Spektroskopie nach.<sup>[130]</sup>

Woolley und Hamm nutzten ein 16-meres Peptid, das an DNA bindet, in Kombination mit einem intramolekularen Azobenzol als Photoschalter, um die Bildung einer  $\alpha$ -Helix zu analysieren.<sup>[131–133]</sup> Die Azobenzolgruppe wurde zwischen zwei Cysteinreste eingefügt (**35** und **36**, Schema 9), sodass eine Disulfidbrücke nachgeahmt wurde. Wenn die photo-

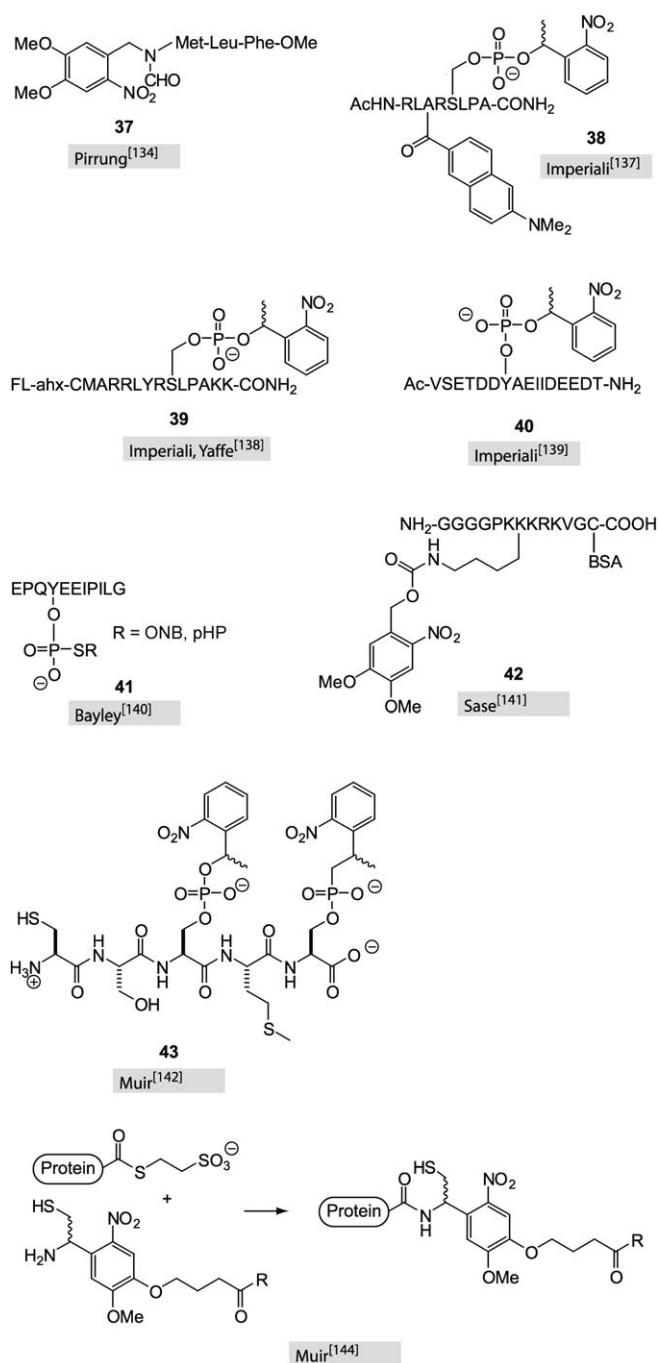
schaltbare Gruppe in der *cis*-Konformation vorliegt, ist die  $\alpha$ -Helix unterbrochen, während durch photoinduzierte Bildung des *trans*-Isomers die  $\alpha$ -Helix zurückgebildet wird und es zur DNA-Bindung kommt.

Die hier beschriebenen Studien zeigen, dass photoaktivierbare Moleküle in Verbindung mit einer kontrollierten Photolyse eingesetzt werden können, um die Faltung von Peptidsekundärstrukturen wie  $\beta$ -Haarnadeln und  $\alpha$ -Helices zu untersuchen und die Bildung von Überstrukturen wie Coiled Coils zu steuern. Da die Strukturen von Peptiden und Proteinen mit ihrer Funktion in Beziehung stehen, kann mit der Caging-Technik die Funktion von Aminosäurepolymeren moduliert werden.<sup>[114]</sup>

Zu diesem Zweck synthetisierten Pirrung et al. photoaktivierbare Peptide, die am chemotaktischen Prozess beteiligt sind.<sup>[134]</sup> Hierzu wurde ein chemotaktisches trimeres Peptid an der N-Formyl-Position mit einer Nitroveratrylgruppe derivatisiert (**37**, Schema 10). Dieses Peptid kann dazu dienen, die Bewegung der Lymphozyten zu untersuchen, die durch die photoaktivierte Konzentrationszunahme eines aktiven Moleküls ausgelöst wird.

Einen anderen Ansatz verfolgten Imperiali et al., die NPE-Gruppen an einer Phosphoserineinheit eines Peptids einführen (**38**, Schema 10).<sup>[114,135–137]</sup> Die photoaktivierbaren Peptidvarianten setzen unter Flash-Hydrolyse Phosphopeptide frei, die den Phosphorylierungszustand eines Proteins nachahmen und daher zur Modulation von Kinase-Signalwegen genutzt werden können. In Kombination mit Fluoreszenzfarbstoffen, die an proximale Peptidseitenketten gebunden werden, lässt sich nach dem beschriebenen Prinzip der Bindungszustand von Phosphopeptiden am Zielprotein verfolgen.<sup>[137]</sup> In einer anderen Studie verwendeten Yaffe und Imperiali diese Methode, um die temporale Funktion des 14-3-3-Proteins beim G1-Arrest und die Kontrollpunktfunktion (checkpoint function) in der S-Phase zuzuordnen.<sup>[138]</sup> Die photoaktivierbaren Peptide **39** (Schema 10) wurden als inaktive Vorstufen in Zellen eingeführt und waren nach der Photoentschätzung in der Lage, Phosphoserin/Phosphothreonin-Bindungsproteine zeitlich kontrolliert zu maskieren.

In einer weiterführenden Studie zeigten Imperiali et al., dass tRNA, die mit photoaktivierbarem Serin, Threonin oder Tyrosin derivatisiert ist, genutzt werden kann, um auch photoaktivierbare Aminosäuren in große Proteine einzubauen. Dies eröffnet einen Zugang zu weiteren Untersuchungen und zur räumlich-zeitlichen Steuerung großer Proteine.<sup>[135]</sup> Die gleichen Autoren verwendeten kürzlich auch das photoaktivierbare Phosphotyrosinpeptid **40** (Schema 10) zur lokalen Analyse der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und der Migration von Tumorzellen.<sup>[139]</sup> Die freigesetzten Peptide können mit autophosphorylierter FAK um die Wechselwirkung mit der SH2-Domäne von Src und Phosphoinositid-3-Kinase konkurrieren und daher das Downstream-Signal stören, was den Arrest der Zellmigration zur Folge hat. Eine ähnliche Methode wurde von Bayley et al. beschrieben. Sie setzten Thiophosphotyrosinreste in Peptidsequenzen ein (**41**, Schema 10) und derivatisierten diese mit zwei unterschiedlichen thiolreaktiven photolabilen Gruppen.<sup>[140]</sup> Unter Verwendung dieser Peptide wurde das Bindungsverhalten an



**Schema 10.** Photoaktivierbare Peptide und Phosphopeptide, die zur funktionalen Charakterisierung und zur Aktivierung von Signalkaskaden eingesetzt wurden. Ahx = Aminohexansäure, FL = Fluorescein-Marker.

SH2-Domänen, die an feste Harze gebunden waren, vor und nach der Bestrahlung untersucht.

Sase et al. inaktivierten ein an das BSA-Protein (42, Schema 10) gebundenes peptidisches Kernlokalisierungssignal (peptidic nuclear localization signal) und erreichten damit eine lichtinduzierte Kerndelokalisation.<sup>[141]</sup> Wie erwartet, wurde das photoaktivierbare Peptid ausschließlich im Cytoplasma von HeLa-Zellen gefunden, während nach Bestrahlung die Translokation in den Kern beobachtet wurde. Für

eine ähnliche Studie, bei der es um die Multimerisierung von Proteinen ging, konstruierten Hahn und Muir ein photoaktivierbares Smad2-MH2/SARA-SBD-Protein durch chemische Ligation mit dem Peptid 43 (Schema 10).<sup>[142]</sup> Nach der Bestrahlung setzt das inaktivierte Protein die SARA-SBD-Einheit frei und induziert damit die Bildung eines Homotrimeren, das sich anschließend in den Zellkern verlagert. Diese Methode eröffnet einen eleganten Zugang zur kinetischen Charakterisierung von Proteinimport- und/oder Proteinexportvorgängen des Zellkerns. Bereits in einer früheren Studie konstruierten Muir et al. durch Einbau eines Fluoreszenzfarbstoffs in Nachbarschaft zu einem fluoreszenzlöschenden Molekül und einer photoreaktiven Gruppe Smad2-Derivate, deren Photoreaktivität über den Anstieg der Fluoreszenzsignale verfolgt werden kann.<sup>[143]</sup> Dies ermöglicht eine direkte Korrelation zwischen den Fluoreszenzsignalen und der Entschützungseffizienz.

#### 4.5. Verschiedene photoaktivierbare Proteine und ihre Anwendungen

Muir et al. verwendeten eine native chemische Ligationsstrategie, um photosensitive Proteine zu erhalten, die eine räumlich-zeitliche Steuerung der Proteinfunktion ermöglichen (Schema 10, unten).<sup>[144]</sup> Hierzu wurde ein chimäres Protein konstruiert, das aus EGFP-NLS und einem Dipeptid mit einem Palmitoylrest bestand. Ziel dieses Entwurfs war es, eine lichtinduzierte Trennung der beiden Komponenten zu erreichen. Wie erwartet, können nach Einführung der Chimäre in lebende Zellen Fluoreszenzsignale detektiert werden, und zwar vor der Bestrahlung nahe bei der Membran und nach der Bestrahlung intrazellulär verteilt. Mit dieser Methode gelingt es, zwei Komponenten mithilfe von Licht räumlich-zeitlich zu trennen und die Lokalisierung von Proteinen innerhalb der Zellen zu überwachen.

Die Arbeitsgruppen von Endo und Majima verwendeten ein künstliches Vierbasen-Codon, um photoreaktive Einheiten in Restriktionsenzyme und Caspasen ortsspezifisch einzuführen.<sup>[116,117]</sup> Auf diese Weise wurde eine inaktive Procaspase-3 erhalten, die, ähnlich wie bei der endogenen Aktivierung durch die Protease Caspase-8, durch Bestrahlung mit Licht aktiviert werden konnte.

Die Restriktionsendonuclease BamHI wurde so derivatisiert, dass die Dimerbildung des Proteins gesteuert werden konnte. Dazu wurde eine Nitroveratryl- oder eine Azobenzolgruppe an Aminosäuren in der Dimerisierungsregion von BamHI gebunden. Die Autoren beobachteten, dass die Position der photoreaktiven Einheit wichtig ist. Die Positionierung hat den stärksten Effekt, wenn Aminosäuren inaktiviert werden, die an der Ausbildung von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Monomeren beteiligt sind. Auf diese Weise gelang es, die Aktivität des Restriktionsenzyms durch Licht zu steuern.<sup>[117]</sup>

Fournier et al. stellten mit einem photoaktivierbaren Urotensin-II-Peptid photoschaltbare Vasokonstriktoren her. Die Photolyse eines photoaktivierbaren Urotensin-II-Peptids verlief schnell, und es konnte eine photoabhängige Kontraktion der Brustaaortenringe erreicht werden.<sup>[145]</sup> Günstigerweise

war die photolabile Schutzgruppe unter pharmakologischen Bedingungen sehr stabil – eine Voraussetzung für die In-vivo-Anwendung von photoaktivierbaren Peptiden.

Cofilin induziert die Bildung überhängender Enden in Actinfilamenten, und seine Aktivität kann durch die LIM-Kinase reguliert werden. Das phosphorylierte Cofilin ist inaktiv und kann durch Dephosphorylierung in eine aktive Form überführt werden. Condeelis und Lawrence et al. verwendeten eine photoaktivierbare Variante einer konstitutiv aktiven Cofilinmutante (die einen Cysteinrest anstelle eines Serinrestes trägt), die in Gegenwart der photolabilen Schutzgruppe, CNB, inaktiv ist und durch Licht aktiviert werden kann.<sup>[146]</sup>

In einer neueren Studie wurde gezeigt, dass eine reversible Lichtaktivierung zur Untersuchung von Kanalproteinen genutzt werden kann. Hierbei wurde ein mechanosensitiver Kanal von *E. coli* auf Basis eines Spiropyran-Merocyanin-Photoschalters entwickelt und in Liposomen eingebettet (Schema 11 a).<sup>[147]</sup> Durch Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) ließ sich der Kanal öffnen und durch erneute Bestrahlung mit sichtbarem Licht bei Wellenlängen über 460 nm wieder schließen. Dieses System könnte genutzt werden, um bioaktive Moleküle lichtgesteuert bereitzustellen.

In einer weiteren Studie wurde die Herstellung eines photoaktivierbaren Antikörpers (mAb) beschrieben, von dem bekannt war, dass er an den hirnstämmigen neurotro-

phen Faktor (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) bindet. Die Autoren befassten sich mit der Frage, ob Neurotrophine nur als Cofaktoren oder direkt als Vermittler der synaptischen Verstärkung fungieren.<sup>[148]</sup> Mithilfe der Caging-Methode gelang es, die Inhibitoreigenschaften von mAb zeitlich aufgelöst anzuregen. Die Aktivierung von mAb während der Induktion der synaptischen Verstärkung führt zur Hemmung des endogenen BDNF und zu einer Abnahme des synaptischen Potentials nach Stimulation in der CA1-Region akuter Hippocampuschnitte. Dies zeigt deutlich die Rolle von BDNF bei der Manifestation der frühen Induktion synaptischer Plastizität.

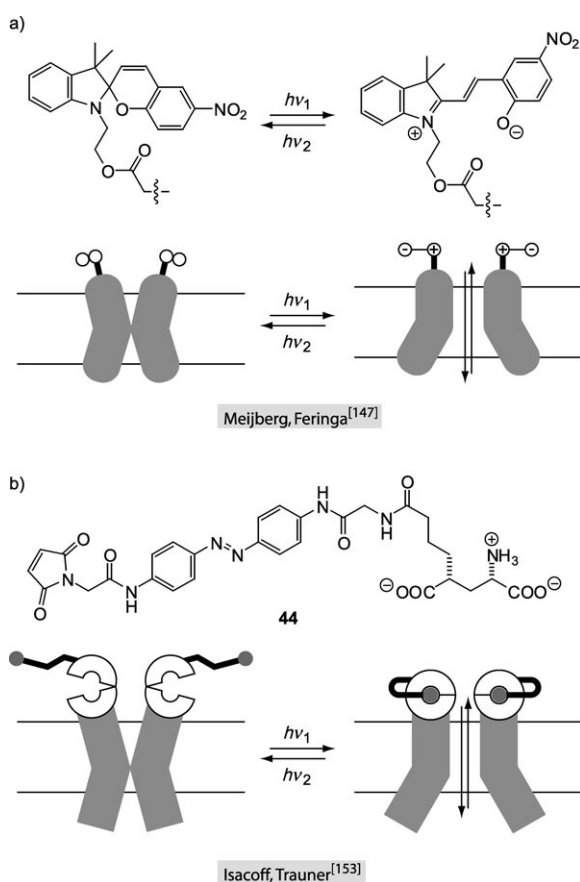
Jacobson et al. untersuchten die Zellfortbewegung mithilfe von photoaktivierbarem Thymosin  $\beta$ 4 (T $\beta$ 4). T $\beta$ 4 wurde durch Behandlung mit (*N*-Nitroveratryloxy)chlorcarbamat inaktiviert, und die Autoren konnten in vitro nachweisen, dass das photoaktivierte T $\beta$ 4 die Actinpolymerisation inhibiert, die photoaktivierbare Variante aber nicht.<sup>[149]</sup> Ebenfalls untersucht wurde die Wirkung von lokal aktiviertem T $\beta$ 4 in Lamellipodien beweglicher Keratinozyten, wobei eine spezifische Bewegungsänderung an den Photolyseorten beobachtet wurde. Aufgrund dieser Befunde wurde ein mechanistisches Modell für das Richtungsänderungsverhalten von Keratinozyten als Antwort auf T $\beta$ 4 vorgeschlagen.

Bedel-Cloutour et al. untersuchten photoaktivierbares Rinderhämoglobin in Enzymassays zur Analyse der ABTS-Oxidation (2,2-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)).<sup>[150]</sup> Hierzu wurde Hämoglobin unspezifisch mit NPE-Gruppen inaktiviert, und es gelang zumindest teilweise, die enzymatische Aktivität durch zeitabhängige Photolyse wiederherzustellen. Da jedoch nur ein Teil der Enzyme reaktiviert werden konnte, scheint diese Methode weniger effektiv zu sein als Verfahren, die auf der Schätzung einzelner Aminosäurereste beruhen (z.B. Techniken auf der Basis von Nonsense-Codons).

Durch ortsspezifischen Einbau von Phenylazophenylalanin stellten Sisido et al. Varianten der Meerrettich-Peroxidase her.<sup>[151]</sup> Sie konstruierten ein an- und ausschaltbares Proteinderivat und konnten die entscheidenden Positionen bestimmen, die für die Schätzung und Photoaktivierung am besten geeignet sind.

Goeldner et al. verwendeten *N*-Methyl-*N*-(2-nitrophenyl)carbamoylchlorid, um eine derivatisierte und inaktivierte Butyrylcholinesterase (BChE) zu erzeugen.<sup>[152]</sup> Dieses Reagens erwies sich als reaktiv gegenüber Alkoholen, und die entstehende photolabile Gruppe konnte durch Photolyse effizient gespalten werden. Die Struktur der photoaktivierbaren BChE wurde aufgeklärt und ermöglichte einen detaillierten Einblick in die Koordination des geschützten Moleküls und die strukturellen Grundlagen der BChE-Inaktivierung.

In einem sehr interessanten Fall nutzten Isacoff und Trauner et al. die Verbindung **44** (Schema 11 b), um einen Cysteinrest im ionotropen Glutamatrezeptor (iGluR) zu modifizieren und das Substrat des Rezeptors, Glutamat, kovalent daran anzubinden. Die *cis*- oder *trans*-Konformation des Linkers – die durch Licht gesteuert werden kann – legt fest, ob das auslösende Glutamat tatsächlich am aktiven Zentrum gebunden ist oder nicht.<sup>[153]</sup> Auf diese Weise wurde



**Schema 11.** Reversibles lichtgesteuertes Öffnen und Schließen von Kanälen in Lipiddoppelschichten.



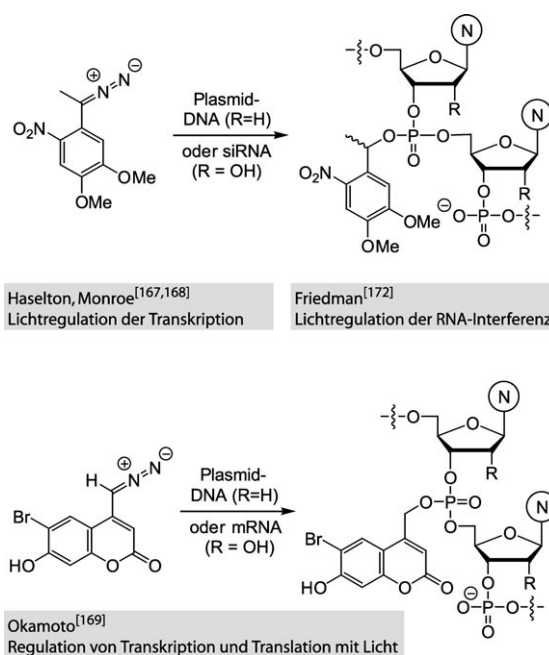
ein reversibel lichtgesteuerter iGluR entwickelt, dessen Aktivität zeitaufgelöst gesteuert werden konnte. Die regulatorische Kontrolle über die Kanalaktivität könnte zur Aufklärung biologischer Phänomene und für Biosensoranwendungen genutzt werden.

## 5. Photoaktivierbare und lichtsichtbare Nucleinsäuren

Verglichen mit den bisher besprochenen Verbindungsklassen ist das Gebiet der photoaktivierbaren und lichtsichtbaren Nucleinsäuren relativ neu. Abgesehen davon, dass Nucleinsäuren die zellulären Informationsträger sind, bieten sie zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten wie Genregulation (RNA-Interferenz,<sup>[154]</sup> Mikro-RNAs,<sup>[155]</sup> RNA-Schalter,<sup>[156]</sup> Antisensetechnik,<sup>[157]</sup> DNAzyme<sup>[158]</sup>), Modulation der Proteinfunktion (Aptamere,<sup>[159]</sup> DNA/RNA-Köder („DNA/RNA decoys“)<sup>[160]</sup>), molekulare Diagnostik (Mikroarrays)<sup>[161]</sup> oder die Verwendung als Katalysatoren<sup>[162]</sup> sowie als Struktur- oder Funktionseinheiten im Nanometerbereich.<sup>[163]</sup> Es sollte an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass eine Modifizierung der beteiligten Nucleinsäurekomponenten nicht der einzige Weg ist, um die obigen Systeme und Anwendungen lichtempfindlich zu machen. Um die Genexpression mit Licht zu steuern, kann man z.B. auch photoaktivierbare Hormone verwenden (siehe Abschnitt 3). Weitere Alternativen sind die Verwendung lichtregulierbarer Promotorsysteme von Pflanzen,<sup>[164]</sup> das Caging von GAL4VP16 (einem Protein-basierten Transkriptionsaktivator)<sup>[165]</sup> oder lichtabhängige Wirkstofftransportstrategien wie die „photochemische Internalisierung“,<sup>[166]</sup> bei der Photosensibilisatoren eingesetzt werden, um die endosomale Freisetzung endocytisierter Moleküle zu erleichtern.

Eine der Strategien zur Herstellung von photoaktivierbaren Nucleinsäuren beruht auf der statistischen Rückgratmodifizierung mit photolabilen Schutzgruppen („statistical backbone caging“). In einer bahnbrechenden Untersuchung von Haselton et al. wurden Plasmid-DNAs, die für Luciferase oder GFP codieren, mit Nv-Gruppen modifiziert (Schema 12).<sup>[167]</sup> Dazu wurde die Plasmid-DNA unter Benzylierungsbedingungen umgesetzt. Wegen dieser unselektiven Bedingungen ergab die Reaktion der Plasmide mit den photolabilen Schutzgruppen eine statistische Verteilung der modifizierten Positionen – wohl hauptsächlich Rückgrat-Phosphatgruppen. Das für GFP codierende Plasmid wurde z.B. mit ungefähr 270 Nv-Gruppen modifiziert. Die modifizierten Plasmide wurden entweder in Hautzellen einer Ratte oder HeLa-Zellen eingeschleust und waren vor der Aktivierung mit Licht transkriptionell inaktiv. Bestrahlung mit einem Laser bei 355 nm induzierte eine von der Strahlungsdosis abhängige Transkription. Die volle Transkriptionsaktivität konnte jedoch nicht wiederhergestellt werden.

In einer neueren Arbeit haben Haselton und Monroe den Einfluss derart modifizierter DNA auf die Hybridisierung untersucht.<sup>[168]</sup> In diesen Studien wurde eine photoaktivierbare 20-mer Sonden-DNA mit 14 bis 16 Nv-Gruppen und ein 30-meres Signalmolekül (molecular beacon) verwendet. Die Hybridisierung der beiden Komponenten war deutlich



**Schema 12.** Eine Strategie, um eine lichtabhängige Genregulation zu erzielen, ist die statistische Modifizierung der Rückgrat-Phosphatgruppen von Plasmid-DNA, mRNA oder siRNA mit photolabilen Schutzgruppen. N = Nucleobase.

abgeschwächt, wenn die Sonden-DNA inaktiviert war, und nach Bestrahlung blieben zwei bis vier photolabile Schutzgruppen zurück. Diese sind für die unvollständige Wiederherstellung der Hybridisierung im Vergleich zur unmodifizierten Kontroll-DNA verantwortlich.

Die gleiche Strategie der Rückgrat-Modifizierung wurde von Okamoto und Mitarbeitern verwendet, um Bhc-geschützte GFP-mRNA (ca. 30 Stellen in einer 1-kb-RNA) zu erzeugen (Schema 12).<sup>[169]</sup> Die Bhc-geschützte mRNA wurde in Zebrafischembryonen im Einzellstadium injiziert und stellte sich als bemerkenswert stabil heraus. Die modifizierte mRNA war vor der Photofreisetzung translationell fast inaktiv. Wieder konnte durch Bestrahlung die Translationsaktivität im bestrahlten Teil des Embryos teilweise zurückgewonnen werden, ungeachtet der bekannten Tatsache, dass im Einzellstadium injizierte mRNA überall im gesamten embryonalen Körper verteilt wird. In dieser Studie wurde auch Bhc-geschützte Plasmid-DNA hergestellt und im Einzellstadium injiziert, aber anders als die photoaktivierbare mRNA war die photoaktivierbare DNA nicht gleichmäßig in allen Zellen verteilt, sondern mosaikartig. Dennoch wurde auch in diesem Fall eine Expression fast ausschließlich nach der Aktivierung mit Licht beobachtet. In Folgeuntersuchungen befasste sich die gleiche Arbeitsgruppe mit der Verbesserung des Herstellungsverfahrens und der Handhabbarkeit.<sup>[170]</sup> Erste Versuche, diese Methode zur Untersuchung der Hirnentwicklung in Zebrafischembryonen zu nutzen, sind bereits durchgeführt worden.<sup>[169,171]</sup>

Die Strategie der statistischen Rückgratphosphatmodifizierung mit photolabilen Schutzgruppen wurde kürzlich von Friedman et al. auf kurze interferierende RNA (short interfering RNA, siRNA) angewendet (Schema 12).<sup>[172]</sup> siRNA-

Moleküle sind die Schlüsselkomponenten bei der RNA-Interferenz, einer sehr leistungsfähigen und allgemein anwendbaren Methode zur Genregulation.<sup>[154]</sup> Die doppelsträngige siRNA wechselwirkt mit dem RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC), der dann zelluläre mRNA, die die gleiche Sequenz wie einer der siRNA-Stränge aufweist, abbaut. Der Ansatz von Friedman und Mitarbeitern zielt darauf, die Wechselwirkung zwischen der photoaktivierbaren siRNA und dem RISC-Komplex zu verhindern. Die eingesetzte photoaktivierbare siRNA enthielt im Mittel 1.4 photolabile Schutzgruppen pro Duplex. Als Modellsystem wurde die Down-Regulation der GFP-Expression in HeLa-Zellen gewählt. Es zeigte sich, dass die photoaktivierbare siRNA nicht völlig inaktiv war, aber durch Bestrahlung vollständig aktiviert werden konnte. Durch Einführung von mehr photolabilen Schutzgruppen wurde die siRNA inaktiv, allerdings konnte nun durch Bestrahlung nicht mehr die volle Aktivität wiederhergestellt werden.

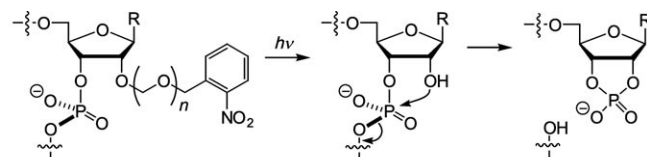
Der größte Vorzug der Methode der statistischen Rückgratmodifizierung mit photolabilen Schutzgruppen besteht zweifelsohne in der einfachen Ausführung. Jedoch konnte ein eindeutiges An/Aus-Verhalten bislang nicht realisiert werden – zumindest nicht mit den bisher eingesetzten Modifizierungsreaktionen und photolabilen Schutzgruppen.

Ein alternativer Ansatz, der diese Nachteile vermeidet, besteht darin, photoaktivierbare Gruppen an definierten Positionen in Nucleinsäuren einzuführen. Tatsächlich verwendeten MacMillan et al. schon ein Jahr vor den oben beschriebenen Experimenten von Haselton et al. 2'-modifizierte RNA, um die Reaktion eines Ribozyms mit Licht zu steuern (Schema 13).<sup>[173]</sup> Ribozyme sind RNA-Sequenzen mit katalytischer Aktivität.<sup>[162]</sup> Im vorliegenden Fall wurde das Hammerhead-Ribozym verwendet, das RNA spalten kann.<sup>[174]</sup> Dazu ordnet es die Substrat-RNA durch Basenpaarung so an, dass der Angriff einer der 2'-OH-Gruppen im Substrat auf den benachbarten 3'-Phosphatdiester begünstigt wird. Über die Bildung einer cyclischen Phosphatspezies wird der Substrat-RNA-Strang gespalten. Die nucleophile 2'-OH-Gruppe im Substrat, die für die Spaltungsreaktion essenziell ist, wurde in dieser Studie mit einer Nitrobenzylgruppe blockiert, und tatsächlich wurde das photoaktivierbare Substrat nicht mehr durch das Ribozym umgesetzt. Nach der Photolyse wurde das photoaktivierbare Substrat im gleichen Ausmaß gespalten

wie das unmodifizierte Substrat. In einer späteren Untersuchung verwendeten MacMillan et al. diese Technik zur Untersuchung des Spliceosom-Mechanismus.<sup>[175]</sup> Das Spliceosom verarbeitet die prä-mRNA, die unmittelbar nach der Transkription gebildet wird, indem es deren Introns (Teile der prä-mRNA, die nicht den Zellkern verlassen werden) entfernt. Da sich das Spliceosom, das aus mehreren proteinogenen Untereinheiten und RNA-Untereinheiten besteht, nur um die betreffende prä-mRNA herum anordnet (ATP-abhängig und schrittweise), ist es normalerweise nicht möglich, seinen Zusammenbau unabhängig von seiner katalytischen Reaktion zu untersuchen. Durch Schützen einer erneut als Schlüsselnucleophil fungierenden 2'-OH-Gruppe im prä-mRNA-Substrat mit einer photolabilen Gruppe, gelang es, einen Haltepunkt in der sonst konzertiert ablaufenden Reaktion einzuführen und den Zusammenbau des Spliceosoms isoliert zu untersuchen.

Für Anwendungen in der Synthese untersuchten Pitsch und Mitarbeiter verschiedene Schutzgruppen für die 2'-OH-Gruppe der RNA. In den Tests zeigte sich unter anderem, dass 2'-O-[(Triisopropylsilyl)oxy]methyl (TOM) als Schutzgruppe der etablierten (*tert*-Butyl)dimethylsilyl(TBDMS)-Schutzgruppe überlegen ist.<sup>[176]</sup> Als eine Alternative zu Silyl-Schutzgruppen für die 2'-OH-Gruppen wurden auch photolabile Schutzgruppen wie die NPEOM-Gruppe ([1-(2-Nitrophenyl)ethoxy]methyl) identifiziert (Schema 13).<sup>[177]</sup> Dabei wurde nicht übersehen, dass diese Derivate – abgesehen von ihrem Einsatz in der Synthese – auch verwendet werden können, um RNA lichtaktivierbar zu machen. Als Testsystem fungierte wiederum eine Ribozymreaktion, und mit dem geschützten Substrat fand keine Reaktion statt. Nach der Photolyse war das Ribozym vollständig aktiv. Für die 2'-Position der RNA ist die NPEOM-Gruppe eine bessere Schutzgruppe als Nitrobenzyl, weil sie chemisch orthogonal zu den Silyl-Schutzgruppen für die 2'-Positionen der anderen Nucleobasen ist. Diese werden nach der RNA-Festphasensynthese mit Fluorid entschützt, wobei auch die Nitrobenzylgruppen teilweise gespalten werden.

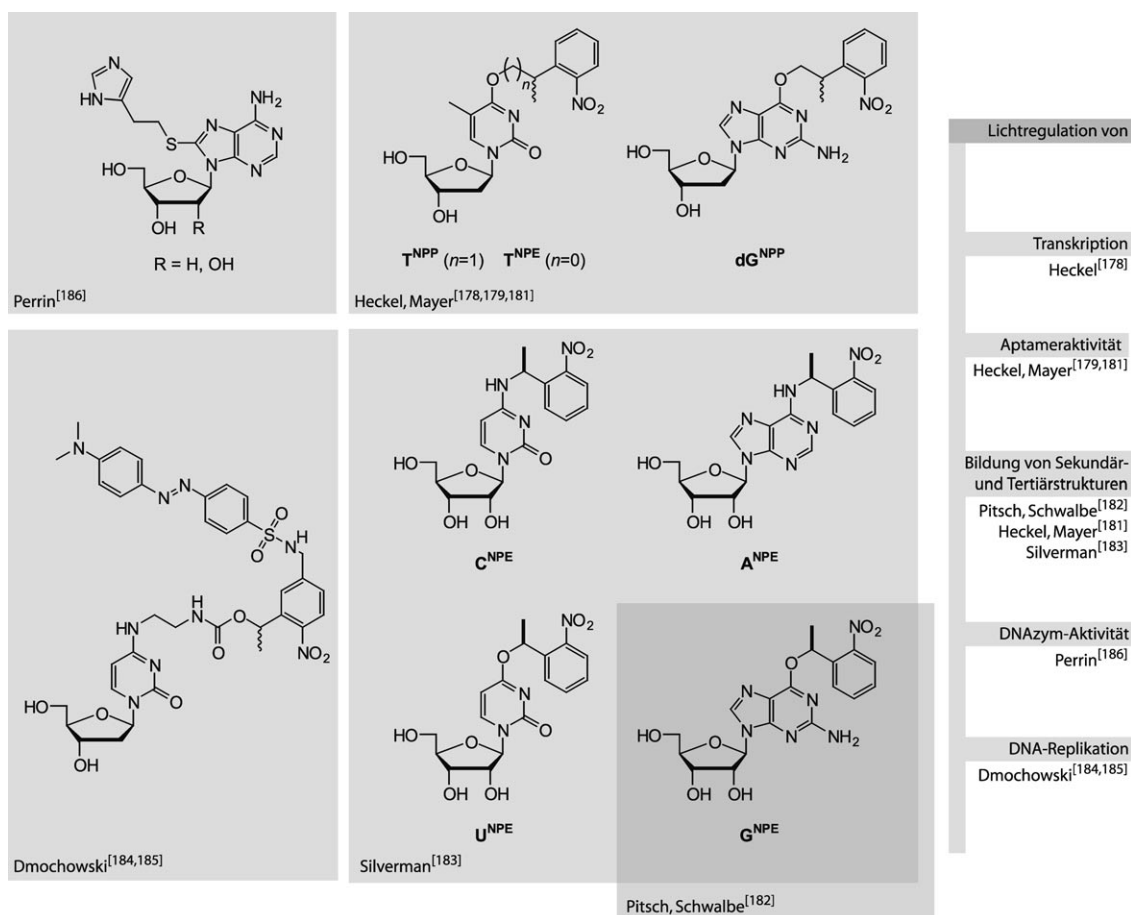
Die Beispiele von MacMillan und Pitsch zeigen schon sehr deutlich, dass ein ortsspezifischer Einbau photolabiler Gruppen ein „binäres“ Aus/An-Verhalten vor und nach Bestrahlung ermöglicht – bei einem etwas höheren Synthesaufwand –, sie ließen aber noch die charakteristische Eigenschaft der Nucleinsäuren intakt: die Fähigkeit, Watson-Crick-Wechselwirkungen einzugehen. Nach unserer Auffassung spielen die Nucleobasen bei der Mehrzahl der DNA- und RNA-basierten Anwendungen die zentrale Rolle – aus dem einfachen Grund, weil in ihnen die in der Nucleinsäure enthaltene Information codiert ist. Daher haben wir damit begonnen, photoaktivierbare Nucleinsäuren herzustellen und zu erforschen. In einer ersten Studie modifizierten wir ein Thymin an der O<sup>4</sup>-Position mit einer photolabilen NPP-Gruppe (T<sup>NPP</sup>) und führten es in ein DNA-Oligonucleotid ein (Schema 14, oben rechts).<sup>[178]</sup> Die modifizierte Position kann als eine temporäre Fehlpaarung (mismatch) angesehen werden. Wir konnten nachweisen, dass es mit nur einer derartigen lokalen Störung gelingt, die T7-RNA-Polymerase daran zu hindern, ihre Promotorregion in der Duplex-DNA zu erkennen, und damit die Transkription der DNA völlig zu



MacMillan<sup>[173,175]</sup> ( $n = 0$ ,  $R = \text{Adenin}$ ), Pitsch<sup>[177]</sup> ( $n = 1$ ,  $R = \text{Cytosin}$ )  
Lichtregulation einer Ribozymreaktion mit einem photoaktivierbaren Substrat

**Schema 13.** Zwei ähnliche Ansätze wurden beschrieben, um die RNA-Spaltung durch ein Ribozym durch Schützen der Substrat-RNA mit einer photolabilen Gruppe lichtabhängig zu machen.<sup>[173,177]</sup> MacMillan et al. nutzten diese Methode, um die Anordnung des Spliceosom-Komplexes zu untersuchen.<sup>[175]</sup>

lytischer Aktivität.<sup>[162]</sup> Im vorliegenden Fall wurde das Hammerhead-Ribozym verwendet, das RNA spalten kann.<sup>[174]</sup> Dazu ordnet es die Substrat-RNA durch Basenpaarung so an, dass der Angriff einer der 2'-OH-Gruppen im Substrat auf den benachbarten 3'-Phosphatdiester begünstigt wird. Über die Bildung einer cyclischen Phosphatspezies wird der Substrat-RNA-Strang gespalten. Die nucleophile 2'-OH-Gruppe im Substrat, die für die Spaltungsreaktion essenziell ist, wurde in dieser Studie mit einer Nitrobenzylgruppe blockiert, und tatsächlich wurde das photoaktivierbare Substrat nicht mehr durch das Ribozym umgesetzt. Nach der Photolyse wurde das photoaktivierbare Substrat im gleichen Ausmaß gespalten



**Schema 14.** Bausteine zur Herstellung von Nucleinsäuren, die photolabile Gruppen an den Nucleobasen tragen. Die resultierende modifizierte DNA oder RNA wurde für die auf der rechten Seite angegebenen Anwendungen eingesetzt.

unterbinden. Nach der Photolyse wurde die gleiche Menge an RNA-Transkripten gebildet, wie es bei der unmodifizierten DNA der Fall war. Der gleiche inaktivierte T<sup>NPP</sup>-Rest wurde dann in ein DNA-Aptamer eingeführt, das selektiv Thrombin (eine der Schlüsselsubstanzen in der Blutgerinnungskaskade) bindet und inhibiert.<sup>[179]</sup> DNA- oder RNA-Aptamere sind einzelsträngige Nucleinsäuren, die durch evolutionäre Methoden erhalten werden und maßgeschneiderte Eigenschaften wie die selektive Bindung und Hemmung von Proteinen aufweisen können.<sup>[180]</sup> Im Aptamer war das photoaktivierbare Thymidin nicht mehr für spezifische Wechselwirkungen mit dem Thrombin verfügbar, auch wenn die Sekundärstruktur, ein G-Quadruplex, unversehrt geblieben war. Die Auswahl der zu modifizierenden Position war möglich, weil die an der Wechselwirkung mit der Zielverbindung Thrombin beteiligten Positionen gut bekannt waren. In einer weiteren Studie verwendeten wir den photoaktivierbaren dG<sup>NPP</sup>-Rest (Schema 14, oben rechts), um DNA-Oligonucleotide, die eine G-Quadruplexstruktur bilden können, zu modifizieren.<sup>[181]</sup> Mit diesem Ansatz lassen sich ansonsten aktive Nucleinsäuren auf sehr einfache Weise temporär blockieren. Um die exakte Lage des aktiven Zentrums zu ermitteln sind normalerweise sehr aufwändige Strukturuntersuchungen nötig, sodass es oft leichter ist, Sekundärstrukturelemente zu bestimmen und wenige photolabile Schutzgruppen an Schlüs-

selpositionen einzuführen, um die Nucleinsäure daran zu hindern, ihre aktive Konformation einzunehmen.

In einer ähnlichen Studie, und etwa zur selben Zeit, verwendeten Schwalbe und Pitsch den G<sup>NPE</sup>-Rest (Schema 14, unten rechts), um die Kinetik der Tertiärstrukturfaltung einer bistabilen 20-meren RNA-Sequenz mit NMR-Spektroskopie in Echtzeit zu verfolgen.<sup>[182]</sup> Dieser Ansatz wurde von Silverman et al. weiterentwickelt, die als erste einen vollständigen Satz von photoaktivierbaren RNA-Resten synthetisierten, in denen die Nucleobasen an ihrer Watson-Crick-Wasserstoffbrückenwechselwirkungsfläche jeweils mit NPE-Gruppen modifiziert waren (Schema 14, unten rechts).<sup>[183]</sup> Wiederum wurden diese photoaktivierbaren Reste eingesetzt, um die Faltung der RNA zur Tertiärstruktur zu untersuchen.

Nucleinsäuren mit geschützten Nucleobasen wurden auch in der Arbeitsgruppe um Dmochowski erforscht.<sup>[184]</sup> Ihr Ansatz bestand darin, einen Cytidinrest mit einem Fluoreszenzlöcher (DABSYL) über einen photolabilen, von NPE abgeleiteten Rest zu modifizieren (Schema 14, unten links). In diesem Fall ist die photolabile Schutzgruppe nicht nur für die Modulation des Wechselwirkungsvermögens der Nucleinsäure zuständig, sondern sie löst außerdem die Fluoreszenz bei einem basenmodifizierten benachbarten Cytidin aus, das eine Fluoresceineinheit trägt. Der Vorteil dieses Systems ist,



dass das Ergebnis der Photofreisetzung z.B. unter einem konfokalen Mikroskop direkt beobachtet werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass sich dieses System zur Photo-modulation einer Primerverlängerungsreaktion eignet.<sup>[185]</sup>

Die Arbeitsgruppe von Perrin setzte schließlich einen äußerst unkonventionell inaktivierten Adenosinrest ein, um die Aktivität eines DNAzyms zu photomodulieren (Schema 14, oben links).<sup>[186]</sup> Dabei handelt es sich um einen der seltenen Fälle einer spurlosen („traceless“) photoakti-vierbaren Schutzgruppe, die nach der Spaltung nur eine C-H-Bindung zurücklässt.

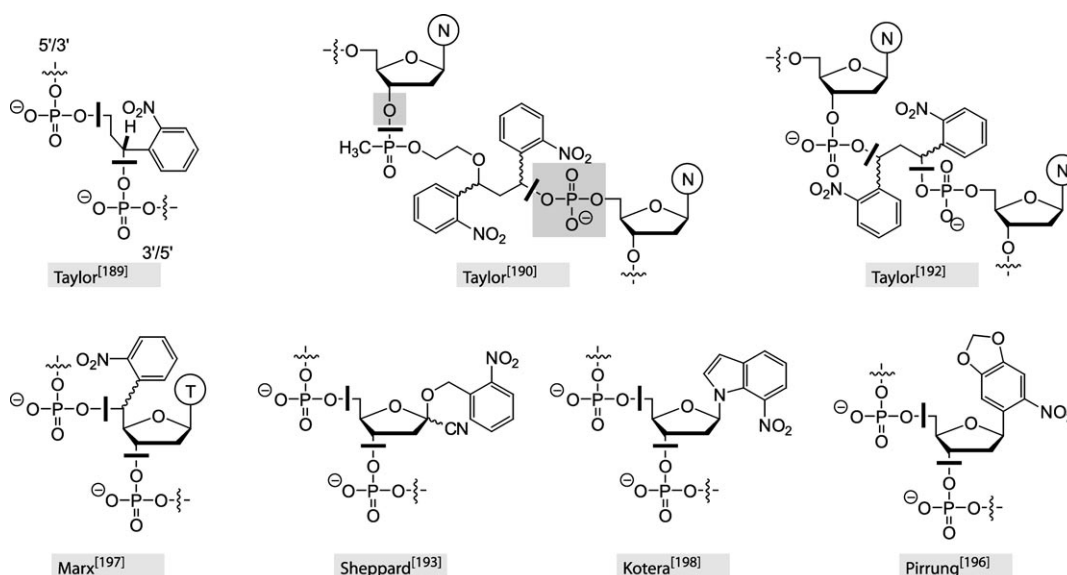
Interessanterweise hatten Rebek et al. schon vor längerer Zeit ein photoaktivierbares Adenosinderivat hergestellt und zur Lichtmodulation der Selbstreplikation verwendet; aller-dings führten sie dieses Derivat nicht in Nucleinsäuren ein.<sup>[187]</sup>

Während die oben beschriebenen Untersuchungen eine zeitweilige Maskierung der Nucleinsäureaktivität zum Ziel haben, existiert auch eine recht umfangreiche Literatur über eine als „photoaktivierbare Strangbrüche“ („caged strand breaks“) bezeichnete Methode. Die Idee, durch Bestrahlung Einzelstrangbrüche (nicks) in die DNA einzuführen, ist nicht neu,<sup>[188]</sup> jedoch wurde die Technik unter anderem durch die Arbeiten von Taylor et al. deutlich verbessert. In einer sehr frühen Studie wurde der in Schema 15 (oben links) gezeigte *ortho*-Nitrobenzol-Rest für die photoinduzierte DNA-Hy-bridisierung verwendet.<sup>[189]</sup> Die gleichen Autoren entwickel-ten später einen anderen Rest (Schema 15, oben Mitte), der nach lichtinduziertem Strangbruch 3'-Hydroxy- und 5'-Phos-phat-terminierte Stränge erzeugen kann, die – nach einer möglichen Umgruppierung – für eine nachfolgende Ligation verfügbar sind.<sup>[190]</sup> Wieder andere Reste (z.B. in Schema 15 oben links und rechts) liefern durch Bestrahlung sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende Phosphatgruppen.<sup>[191,192]</sup> Inzwischen sind viele andere Methoden entwickelt worden, um photo-aktivierbare Strangbrüche zu realisieren (Schema 15 gibt eine

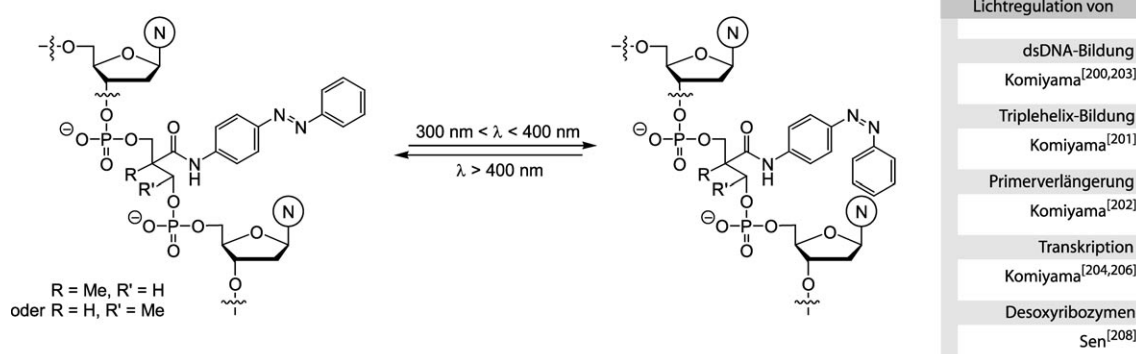
Übersicht). In dem von Sheppard et al. eingeführten System wird nach der Photoaktivierung ein 2'-Desoxyribonolacton gebildet, das weiter eliminieren kann.<sup>[193,194]</sup> Zur Bildung einer abasischen Stelle in der RNA ist ein ähnliches System vor-handen.<sup>[195]</sup> Einige Systeme erfordern eine zusätzliche Be-handlung nach der Photoaktivierung.<sup>[196–198]</sup>

Ein an spezifischen Stellen durch Licht induzierter DNA-Strangbruch gelang auch mit einem völlig anderen Ansatz, bei dem photoaktivierbares  $Mg^{2+}$  (in Form eines DM-Nitro-phen-Komplexes, siehe Abschnitt 3 und Schema 7) zusam-men mit dem Restriktionsenzym Sma I (das  $Mg^{2+}$  für seine Restriktionsaktivität benötigt) und freiem Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA) eingesetzt wurde.<sup>[199]</sup> Gestreckte DNA-Doppelstränge wurden unter einem Mikroskop lokal be-strahlt, wodurch ein kurzer „Blitz“ von  $Mg^{2+}$ -Ionen freige-setzt wurde, die dann wieder durch EDTA komplexiert wurden. Während dieser Zeit konnte das Restriktionsenzym die DNA schneiden – aber nur in der bestrahlten Region. Der Radius dieser aktiven Region konnte über die EDTA-Kon-zentration eingestellt werden.

Das Konzept der reversiblen Photoschalter wurde eben-falls schon auf Nucleinsäuren übertragen – vornehmlich durch Komiyama et al. In einer Reihe von Untersuchungen wurde der in Schema 16 gezeigte Nucleosidersatz verwendet, der mit einer Azobenzolgruppe derivatisiert ist.<sup>[200–206]</sup> Durch Bestrahlen der *trans*-konfigurierten Form konnte bei einem oktameren Poly-dA die Schmelztemperatur des Duplexes mit einem T<sub>g</sub>-Gegenstrang um 8.9°C verringert werden. Durch Bestrahlen mit sichtbarem Licht wurde der Effekt vollständig umgekehrt.<sup>[200]</sup> Mit dieser Technik ist es möglich, die DNA-Duplex- oder sogar DNA-Triplexbildung<sup>[201]</sup> reversibel zu stören. Ein derartig modifiziertes Oligodesoxynucleotid kann z.B. als lichtabhängiger Modulator einer DNA-Polymerase-reaktion fungieren: Durch Anbindung eines modifizierten Oligodesoxynucleotids in der Primerverlängerungsregion ließ



**Schema 15.** Überblick über unterschiedliche Ansätze zur Erzeugung von DNA-Strangbrüchen durch Bestrahlung. Die schwarzen Balken markieren, welche Bindung letztlich gebrochen wird (manchmal nach einer zusätzlichen Behandlung). Die Strategie in der Mitte oben liefert ligierbare 3'-Hydroxy-terminierte und 5'-phosphorylierte Enden. N = Nucleobase.

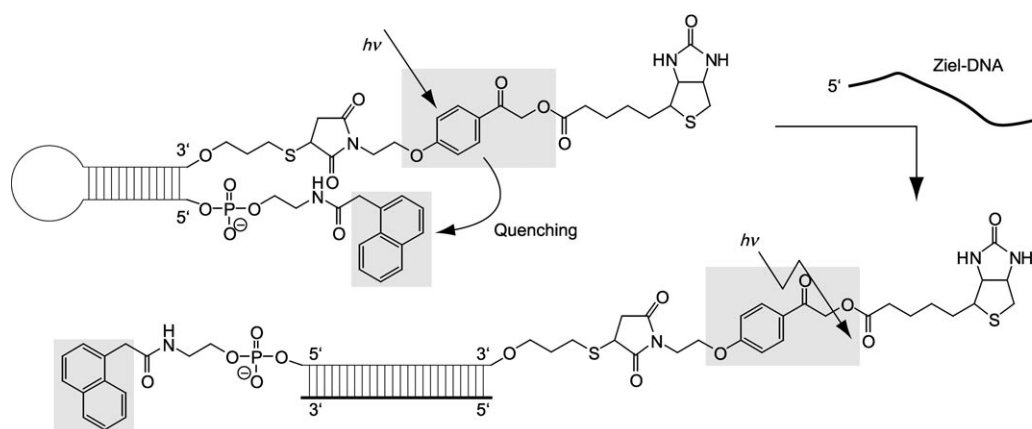


**Schema 16.** Reversibel photoschaltbarer Nucleotidersatz mit einer Azobenzolgruppe. N = Nucleobase.

sich die Primerverlängerung am 5'-Ende anhalten (die verwendete T7-DNA-Polymerase hat keine 5'→3'-Exonucleaseaktivität).<sup>[202]</sup> Während sich die planare *trans*-Azobenzoleinheit gut innerhalb der DNA-Doppelhelix stapeln kann, hat das durch die Bestrahlung gebildete *cis*-Isomer eine helicale Form und schwächt die Basenpaarung am 5'-Ende des als Modulator wirkenden Oligodesoxynucleotids, sodass die Polymerase imstande ist, den Modulator zu verdrängen. Abhängig von der Konformation des Modulators wurde daher entweder ein Produktstrang in voller Länge oder ein verkürzter Strang gebildet. Desgleichen war es möglich, die Transkription mit T7-RNA-Polymerase<sup>[204]</sup> oder SP6-RNA-Polymerase<sup>[206]</sup> durch Einschleusen des Azobenzol-Rests in den doppelsträngigen Promotor oder in die TATA-Box-Region durch Licht zu steuern.

Etwa zeitgleich zu der Veröffentlichung von Komiyama und Mitarbeitern zeigten Lewis et al., dass ein durch einen Stilbendiether verknüpft Bisoligonucleotidkonjugat die Bildung von DNA-Haarnadeln induzieren kann.<sup>[207]</sup> Vor kurzem verwendeten Sen et al. die Komiyama-Methode, um ein lichtregulierbares RNA-spaltendes Desoxyribozym herzustellen;<sup>[208]</sup> durch Bestrahlen mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen erzeugten sie Katalysegeschwindigkeiten, die sich um das fünf- bis sechsfache unterschieden.

Zum Abschluss sollen zwei weitere Anwendungsmöglichkeiten besprochen werden, auch wenn es sich dabei genommen nicht um photoaktivierbare Nucleinsäuren handelt. Zwar sind die Nucleinsäuren in diesen Systemen ebenfalls mit einer photolabilen Gruppe modifiziert, es ist aber nicht die Nucleinsäure, die durch Bestrahlung freigesetzt wird. Saito et al. verwendeten hierbei eine Molecular-Beacon-Strategie zur bedingten Photofreisetzung (Schema 17).<sup>[209]</sup> Hierfür wurde eine Einzelstrang-DNA, die eine Stamm-Schleife-Struktur bildet, am 5'-Ende mit einem Naphthalin-Quencher und am 3'-Ende mit einer photospaltbaren pHP-Gruppe, die mit Biotin als Wirkstoffmodell verbunden war, modifiziert. In diesem Stamm-Schleife-Zustand befindet sich der Fluoreszenzlöcher in unmittelbarer Nähe der photoaktivierbaren Gruppe, weshalb bei Bestrahlung keine Bindungsspaltung stattfindet. In Gegenwart eines komplementären DNA-Strangs wird die Stamm-Schleife-Struktur geöffnet, sodass sich der Fluoreszenzlöcher von der *p*-Hydroxyphenacyl-Einheit wegbewegt, die nun wie gewöhnlich bei Bestrahlung zerfällt und den gebundenen Wirkstoff freisetzt. In einer ähnlichen Studie kombinierten Tanabe und Nishimoto einen photospaltbaren *ortho*-Nitrobenzyl-Linker mit einem Naphthylamin-Quencher, der auf langwelligeres und damit weniger schädliches Licht anspricht.<sup>[210]</sup>



**Schema 17.** Beispiel für bedingte Photofreisetzung; ohne modulierende Ziel-DNA befindet sich der Fluoreszenzlöcher in der unmittelbaren Umgebung des photolabilen Linkers und blockiert die Bindungsspaltung.<sup>[209]</sup>

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Verwendung photolabiler Gruppen hat sich von einer organischen Synthesestrategie zu einer wertvollen Methode zur Untersuchung biologischer Vorgänge entwickelt. Obwohl schon vor 30 Jahren über die Caging-Technik berichtet wurde, haben die Forschungen besonders während der letzten fünf Jahre eine rasante Entwicklung erfahren. Eine Anzahl neuerer Arbeiten widmet sich der Untersuchung von photoaktivierbaren Biomolekülen wie Peptiden, Proteinen und Nucleinsäuren. Etliche Studien befassten sich außerdem mit der neuronalen Signalübertragung mit photoaktivierbaren Effektormolekülen, wobei dieser Ansatz bereits Einblicke in die Biologie der Rezeptoren und Ionenkanäle gibt und die räumlich-zeitliche Zuordnung neuronaler Aktivierungsstellen sowie die Verfolgung synaptischer Ströme ermöglicht. Niedermolekulare photoaktivierbare Effektoren sind bereits kommerziell erhältlich, was deren Anwendung ungemein erleichtert. In den nächsten Jahren wird es spannend sein zu sehen, wie der Caging-Ansatz dazu beitragen kann, neue Prinzipien und Funktionen von Biomolekülen zu entdecken.

Weiterentwicklungen von Synthesestrategien, z.B. die Synthese neuer photolabiler Einheiten, die perfekt an die zelluläre Umgebung angepasst sind, und die Verfügbarkeit hoch entwickelter Analyseinstrumente ermöglichen die genaue Untersuchung biologischer Funktionen hinsichtlich Zeit und Ort. Wir sind davon überzeugt, dass eine fruchtbare Zusammenarbeit von Syntheschemikern und Biologen zu raschen Fortschritten auf diesem Gebiet führen wird. Die Caging-Technik könnte sich zu einer unschätzbaren Methode zur räumlich-zeitlichen Aufklärung von Signalkaskaden entwickeln.

Eingegangen am 30. Januar 2006

Online veröffentlicht am 7. Juli 2006

Übersetzt von Dr. Margit Knauer, Bensheim

- [1] R. L. Edelson, *Sci. Am.* **1988**, 259, 50–57.
- [2] T. M. Dore in *Dynamic Studies in Biology* (Hrsg.: M. Goeldner, R. Givens), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, S. 435–459.
- [3] S. M. Harper, L. C. Neil, K. H. Gardner, *Science* **2003**, 301, 1541–1544.
- [4] T. Carell, L. T. Burgdorf, L. M. Kundu, M. Cichon, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 491–498.
- [5] K. Kloppstech, *Physiol. Plant.* **1997**, 100, 739–747.
- [6] D. A. Fancy, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 28–33.
- [7] a) T. J. Trout, J. J. Schmieg, W. J. Gambogi, A. M. Weber, *Adv. Mater.* **1998**, 10, 1219–1224; b) A. Lendlein, H. Jiang, O. Jünger, R. Langer, *Nature* **2005**, 434, 879–882; c) Y. Yu, M. Nakano, T. Ikeda, *Nature* **2003**, 425, 145.
- [8] J. H. Kaplan, B. Forbush III, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, 17, 1929–1935.
- [9] Für diesen Aufsatz mussten mehrere Stichwortsuchen ausgeführt werden, die mehr als 20000 Treffer ergaben, die manuell nach bestimmten Kriterien sortiert wurden. Auch wenn dies mit großer Sorgfalt geschehen ist, können wir nicht garantieren, dass wir nicht einige Arbeiten übersehen haben.
- [10] Im Deutschen hat sich anstelle einer wörtlichen Übersetzung von „caged“ der Begriff „photoaktivierbar“ durchgesetzt, der auch in diesem Aufsatz verwendet wird.
- [11] R. S. Givens, J. F. W. Weber, A. H. Jung, C.-H. Park, *Methods Enzymol.* **1998**, 291, 1–29.
- [12] A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, 1, 441–458.
- [13] J. Engels, E.-J. Schlaeger, *J. Med. Chem.* **1977**, 20, 907–911.
- [14] Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass die Arbeit von Engels et al.<sup>[13]</sup> in der Veröffentlichung von Hoffman et al.<sup>[8]</sup> korrekt zitiert wurde.
- [15] Siehe z.B. den folgenden Übersichtsartikel: V. N. R. Pillai, *Synthesis* **1980**, 1–26.
- [16] B. Forbush III, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 81, 5310–5314.
- [17] Siehe z.B. <http://www.molecularprobes.com>.
- [18] K. Martinek, S. D. Varfolomeyev, I. V. Berezin, *Eur. J. Biochem.* **1971**, 19, 242–249.
- [19] Siehe z.B. den folgenden Übersichtsartikel: K. Martinek, I. V. Berezin, *Photochem. Photobiol.* **1979**, 29, 637–649.
- [20] K. Kuan, Y. Y. Lee, L. Tebbetts, P. Melius, *Biotechnol. Bioeng.* **1979**, 21, 443–459.
- [21] D. H. Hug, P. S. O'Donnell, J. K. Hunter, *Photochem. Photobiol.* **1980**, 32, 841–848.
- [22] M. Aizawa, K. Namba, S. Suzuki, *Arch. Biochem. Biophys.* **1977**, 180, 41–48.
- [23] M. Goeldner, R. Givens, *Dynamic Studies in Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [24] G. Marriott, *Methods in Enzymology*, Vol. 291, Academic Press, San Diego, **1998**.
- [25] H. Morrison, *Bioorganic Photochemistry*, Vol. 2, Wiley, New York, **1993**; S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Physiol.* **1993**, 55, 755–784.
- [26] Übersichten über photolabile Gruppen finden sich in den oben genannten Aufsätzen [12, 23–25].
- [27] J. E. T. Corrie, A. Barth, V. R. N. Munasinghe, D. R. Trentham, M. C. Hutter, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8546–8554.
- [28] S. R. Adams, J. P. Y. J. Kao, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 7957–7968.
- [29] A. Blanc, C. G. Bochet, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 1138–1141.
- [30] M. C. Pirrung, Y. R. Lee, K. Park, J. B. Springer, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 5042–5047.
- [31] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2006**, 3, 35–40.
- [32] S. Walbert, W. Pfeleiderer, U. E. Steiner, *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 1601–1611.
- [33] a) T. Furuta, M. Iwamura, *Methods Enzymol.* **1998**, 291, 50–63; b) T. Furuta, S. S. H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 1193–1200; c) A. Z. Suzuki, T. Watanabe, M. Kawamoto, K. Nishiyama, H. Yamashita, M. Ishii, M. Iwamura, T. Furuta, *Org. Lett.* **2003**, 5, 4867–4870.
- [34] V. Hagen, S. Frings, B. Wiesner, S. Helm, U. B. Kaupp, J. Bendig, *ChemBioChem* **2003**, 4, 434–442.
- [35] M. Lu, O. D. Fedoryak, B. R. Moister, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2003**, 5, 2119–2122.
- [36] O. D. Fedoryak, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2002**, 4, 3419–3422.
- [37] a) C.-H. Park, R. S. Givens, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2453–2463; b) K. Zhang, J. E. T. Corrie, V. R. N. Munasinghe, P. Wan, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5625–5632; c) P. G. Conrad II, R. S. Givens, J. F. Weber, K. Kandler, *Org. Lett.* **2000**, 2, 1545–1547.
- [38] M. Lukeman, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7698–7699.
- [39] A. Banerjee, C. Grewer, L. Ramakrishnan, J. Jäger, A. Gameiro, H.-G. A. Breiter, K. R. Gee, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 8361–8367.
- [40] W. N. Atemnkeng, L. D. Louisiana II, P. K. Yong, B. Vottero, A. Banerjee, *Org. Lett.* **2003**, 5, 4469–4471.
- [41] M. P. Coleman, M. K. Boyd, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 7641–7648.



- [42] T. Furuta, Y. Hirayama, M. Iwamura, *Org. Lett.* **2001**, 3, 1809–1812.
- [43] G. Papageorgiou, A. Barth, J. E. T. Corrie, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, 4, 216–220.
- [44] J. Pika, A. Konosonoks, R. M. Robinson, P. N. D. Singh, A. D. Gudmundsdottir, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 1964–1972.
- [45] T. Furuta, H. Torigai, M. Sugimoto, M. Iwamura, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 3953–3956.
- [46] A. K. Singh, P. K. Khade, *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 1286–1291.
- [47] a) P. Klán, A. P. Pelliccioli, T. Pospíšil, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, 1, 920–923; b) P. Klán, M. Zabadal, D. Heger, *Org. Lett.* **2000**, 2, 1569–1571.
- [48] C. C. Ma, M. G. Steinmetz, Q. Cheng, V. Jayaraman, *Org. Lett.* **2003**, 5, 71–74.
- [49] J. A. Delaire, K. Nakatani, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1817–1846.
- [50] G. Berkovic, V. Krongauz, V. Weiss, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1741–1753.
- [51] M. Irie, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1685–1716.
- [52] Y. Yokoyama, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1717–1739.
- [53] B. L. Feringa, R. A. van Delden, N. Koumura, E. M. Geertsema, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1789–1816.
- [54] G. Dormán, G. D. Prestwich, *Trends Biotechnol.* **2000**, 18, 64–77.
- [55] a) O. Srinivas, N. Mitra, A. Surolia, N. Jayaraman, *Glycobiology* **2005**, 15, 861–873; b) O. Srinivas, N. Mitra, A. Surolia, N. Jayaraman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2124–2125; c) T. A. Kale, C. Raab, N. Yu, D. C. Dean, M. D. Distefano, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4373–4381; d) J. Juodaityte, N. Sewald, *J. Biotechnol.* **2004**, 112, 127–138.
- [56] E. M. Callaway, R. Yuste, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2002**, 12, 587–592.
- [57] E. Korkotian, D. Oron, Y. Silberberg, M. Segal, *J. Neurosci. Methods* **2004**, 133, 153–159.
- [58] W. Maier, J. E. T. Corrie, G. Papageorgiou, B. Laube, C. Grewer, *J. Neurosci. Methods* **2005**, 142, 1–9.
- [59] L.-R. Shao, F. E. Dudek, *J. Neurophysiol.* **2004**, 93, 3007–3011.
- [60] M. Canepari, L. Nelson, G. Papageorgiou, J. E. T. Corrie, D. Ogden, *J. Neurosci. Methods* **2001**, 112, 29–42.
- [61] a) Q. Cheng, M. G. Steinmetz, V. Jayaraman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 7676–7677; b) R. Wieboldt, K. R. Gee, L. Niu, D. Ramesh, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 8752–8756.
- [62] a) G. Li, L. Niu, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 3990–3997; b) G. Li, Z. Y. Sheng, Z. Huang, L. Niu, *Biochemistry* **2005**, 44, 5835–5841; c) G. Li, W. M. Pei, L. Niu, *Biochemistry* **2003**, 42, 12358–12366; d) G. Li, R. E. Oswald, L. Niu, *Biochemistry* **2003**, 42, 12367–12375.
- [63] a) G. Papageorgiou, D. C. Ogden, A. Barth, J. E. T. Corrie, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6503–6504; b) G. Papageorgiou, J. E. T. Corrie, *Synth. Commun.* **2002**, 32, 1571–1577; c) G. Papageorgiou, M. Lukeman, P. Wan, J. E. T. Corrie, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 3, 366–373; d) G. Papageorgiou, D. Ogden, J. E. T. Corrie, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7228–7233; e) M. Canepari, G. Papageorgiou, J. E. T. Corrie, C. Watkins, D. Ogden, *J. Physiol.* **2001**, 533, 765–772.
- [64] G. Lowe, *J. Neurophysiol.* **2003**, 90, 1737–1746.
- [65] M. A. Smith, G. C. R. Ellis-Davies, J. C. Magee, *J. Physiol.* **2003**, 548, 245–258.
- [66] J. J. Chambers, H. Gouda, D. M. Young, I. D. Kuntz, P. M. England, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13886–13887.
- [67] G. Brasnjo, T. S. Otis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 6273–6278.
- [68] C. Grewer, N. Watzke, M. Wiessner, T. Rauen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 9706–9711.
- [69] a) K. Takaoka, Y. Tatsu, N. Yumoto, T. Nakajima, K. Shimamoto, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 965–970; b) K. Takaoka, Y. Tatsu, N. Yumoto, T. Nakajima, K. Shimamoto, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 3687–3694.
- [70] V. Jayaraman, S. Thiran, D. R. Madden, *FEBS Lett.* **2000**, 475, 278–282.
- [71] P. Molnár, J. V. Nadler, *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, 391, 255–262.
- [72] H.-G. A. Breiting, R. Wieboldt, D. Ramesh, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *Biochemistry* **2000**, 39, 5500–5508.
- [73] T. H. Lee, K. R. Gee, C. Davidson, E. H. Ellinwood, *Neuroscience* **2002**, 112, 647–654.
- [74] W. Y. Lin, C. Albanese, R. G. Pestell, D. S. Lawrence, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 1347–1353.
- [75] F. G. Cruz, J. T. Koh, K. H. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8777–8778.
- [76] Y. H. Shi, J. T. Koh, *ChemBioChem* **2004**, 5, 788–796.
- [77] K. H. Link, Y. H. Shi, J. T. Koh, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13088–13089.
- [78] K. H. Link, F. G. Cruz, H.-F. Ye, K. E. O'Reilly, S. Dowdell, J. T. Koh, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 5949–5959.
- [79] M. Goard, G. Aakalu, O. D. Fedoryak, C. Quinonez, J. St. Julien, S. J. Poteet, E. M. Schuman, T. M. Dore, *Chem. Biol.* **2005**, 12, 685–693.
- [80] Y. Hirayama, M. Iwamura, T. Furuta, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 905–908.
- [81] a) S. Yagai, T. Karatsu, A. Kitamura, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 4054–4063; b) J. Q. Jiang, X. Tong, Y. Zhao, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 8290–8291; c) D. F. O'Brien, D. A. Tirrell in *Bioorganic Photochemistry*, Vol. 2 (Hrsg.: H. Morrison), Wiley, New York, **1993**, S. 111–167; d) S. Watanabe, R. Hiratsuka, Y. Kasai, K. Munakata, Y. Takahashi, M. Iwamura, *Tetrahedron* **2002**, 58, 1685–1691; e) P. Shum, J.-M. Kim, D. H. Thompson, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 53, 273–284; f) R. H. Bisby, C. Mead, C. C. Morgan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 276, 169–173.
- [82] a) J. C. Cruz, M. Thomas, E. Wong, N. Ohgami, S. Sugii, T. Curphey, C. C. Y. Chang, T.-Y. Chang, *J. Lipid Res.* **2002**, 43, 1341–1347; b) A. Specht, M. Goeldner, J. Wirz, L. Peng, *Synlett* **1999**, 981–983; c) E. A. Mintzer, B.-L. Waarts, J. Wilschut, R. Bittman, *FEBS Lett.* **2002**, 510, 181–184.
- [83] a) C. Thiele, M. J. Hannah, F. Fahrenholz, W. B. Huttner, *Nat. Cell Biol.* **2000**, 2, 42–49; b) V. Matyash, C. Geier, A. Henske, S. Mukherjee, D. Hirsh, C. Thiele, B. Grant, F. R. Maxfield, T. V. Kurzchalia, *Mol. Biol. Cell* **2001**, 12, 1725–1736.
- [84] M. Simons, E.-M. Krämer, C. Thiele, W. Stoffel, J. Trotter, *J. Cell Biol.* **2000**, 151, 143–153.
- [85] I. M. Bennett, H. M. V. Farfano, F. Bogani, A. Primak, P. A. Liddell, L. Otero, L. Sereno, J. J. Silber, A. L. Moore, T. A. Moore, D. Gust, *Nature* **2002**, 420, 398–401.
- [86] D. H. Thompson, *Nat. Mater.* **2002**, 1, 214–215.
- [87] S. R. Adams, J. P. Y. Kao, G. Grynkiewicz, A. Minta, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 3212–3220.
- [88] F. DelPrincipe, M. Egger, G. C. Ellis-Davies, E. Niggli, *Cell Calcium* **1999**, 25, 85–91.
- [89] J. H. Kaplan, G. C. Ellis-Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 6571–6575.
- [90] G. C. Ellis-Davies, J. H. Kaplan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 187–191.
- [91] H. J. Montgomery, B. Perdicakis, D. Fishlock, G. A. Lajoie, E. Jervis, J. G. Guillemette, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 1919–1927.
- [92] B. Perdicakis, H. J. Montgomery, G. L. Abbott, D. Fishlock, G. A. Lajoie, J. G. Guillemette, E. Jervis, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 47–57.
- [93] L. R. Makings, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 6282–6285.
- [94] K. P. Yip, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2005**, 289, R620–R626.
- [95] J. Pollock, J. H. Crawford, J. F. Wootton, J. E. T. Corrie, R. H. Scott, *Neurosci. Lett.* **2003**, 338, 143–146.

- [96] S. Munck, P. Bedner, T. Bottaro, H. Harz, *Eur. J. Neurosci.* **2004**, *19*, 791–797.
- [97] H. Yoshimura, N. Kato, *J. Physiol.* **2000**, *522*, 417–426.
- [98] H. Takeuchi, T. Kurahashi, *J. Gen. Physiol.* **2003**, *122*, 557–567.
- [99] L. Lagostena, A. Menini, *Chem. Senses* **2003**, *28*, 705–716.
- [100] a) V. Hagen, C. Dzeja, S. Frings, J. Bendig, E. Krause, U. B. Kaupp, *Biochemistry* **1996**, *35*, 7762–7771; b) V. Hagen, S. Frings, J. Bendig, D. Lorenz, B. Wiesner, U. B. Kaupp, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3775–3777; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3625–3628; c) V. Hagen, J. Bendig, S. Frings, T. Eckardt, S. Helm, D. Reuter, U. B. Kaupp, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1077–1080; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1045–1048; d) V. Hagen, J. Bendig, S. Frings, B. Wiesner, B. Schade, S. Helm, D. Lorenz, U. B. Kaupp, *J. Photochem. Photobiol. B* **1999**, *53*, 91–102; e) L. J. Wang, J. E. T. Corrie, J. F. Wootton, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3474–3478; f) T. Furuta, H. Takeuchi, M. Isozaki, Y. Takahashi, M. Kanehara, M. Sugimoto, T. Watanabe, K. Noguchi, T. M. Dore, T. Kurahashi, M. Iwamura, R. Y. Tsien, *Chem-BioChem* **2004**, *5*, 1119–1128.
- [101] J. W. Walker, A. V. Somlyo, Y. E. Goldman, A. P. Somlyo, D. R. Trentham, *Nature* **1987**, *327*, 249–252.
- [102] J. Gjerstad, E. C. Valen, D. Trotier, K. Døving, *Neuroscience* **2003**, *119*, 193–200.
- [103] C. Dinkel, C. Schultz, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1157–1159.
- [104] J. A. Chen, G. D. Prestwich, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 969–972.
- [105] F. Lemtiri-Chlieh, E. A. C. MacRobbie, A. A. R. Webb, N. F. Manison, C. Brownlee, J. N. Skepper, J. Chen, G. D. Prestwich, C. A. Brearley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10091–10095.
- [106] R. H. Scott, J. Pollock, A. Ayar, N. M. Thatcher, U. Zehavi, *Methods Enzymol.* **2000**, *312*, 387–400.
- [107] X. Q. Lu, S. Cseh, H.-S. Byun, G. Tigyi, R. Bittman, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7046–7050.
- [108] J. L. Carr, K. N. Wease, M. P. Van Ryssen, S. Paterson, B. Agate, K. A. Gallagher, C. T. A. Brown, R. H. Scott, S. J. Conway, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 208–212.
- [109] J. Goedhart, T. W. J. Gadella, Jr., *Biochemistry* **2004**, *43*, 4263–4271.
- [110] C. P. Salerno, D. Magde, A. P. Patron, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3971–3981.
- [111] C. P. Salerno, M. Resat, D. Magde, J. Kraut, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3403–3404.
- [112] a) C. Allin, M. R. Ahmadian, A. Wittinghofer, K. Gerwert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 7754–7759; b) C. Allin, K. Gerwert, *Biochemistry* **2001**, *40*, 3037–3046.
- [113] R. O. Schönleber, J. Bendig, V. Hagen, B. Giese, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 97–101.
- [114] D. M. Rothman, M. D. Shults, B. Imperiali, *Trends Cell Biol.* **2005**, *15*, 502–510.
- [115] a) N. Wu, A. Deiters, T. A. Cropp, D. King, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14306–14307; b) L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 34–68; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 34–66.
- [116] M. Endo, K. Nakayama, Y. Kaida, T. Majima, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5761–5763; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5643–5645.
- [117] a) M. Endo, K. Nakayama, T. Majima, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4292–4298; b) K. Nakayama, M. Endo, T. Majima, *Chem. Commun.* **2004**, 2386–2387.
- [118] C.-Y. Chang, T. Fernandez, R. Panchal, H. Bayley, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7661–7662.
- [119] K. Y. Zou, S. Cheley, R. S. Givens, H. Bayley, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8220–8229.
- [120] T. Hiraoka, I. Hamachi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 13–15.
- [121] I. Hamachi, T. Hiraoka, Y. Yamada, S. Shinkai, *Chem. Lett.* **1998**, 537–538.
- [122] D. A. James, D. C. Burns, G. A. Woolley, *Protein Eng.* **2001**, *14*, 983–991.
- [123] Y. Tong, G. S. Brandt, M. Li, G. Shapovalov, E. Slimko, A. Karschin, D. A. Dougherty, H. A. Lester, *J. Gen. Physiol.* **2001**, *117*, 103–118.
- [124] a) J. C. Miller, S. K. Silverman, P. M. England, D. A. Dougherty, H. A. Lester, *Neuron* **1998**, *20*, 619–624; b) K. D. Philpison, J. P. Gallivan, G. S. Brandt, D. A. Dougherty, H. A. Lester, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2001**, *281*, C195–206.
- [125] M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. Trauner, R. H. Kramer, *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 1381–1386.
- [126] a) G. A. Woolley, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 486–493; b) C. Renner, U. Kusebauch, M. Lowenack, A. G. Milbradt, L. Moroder, *J. Pept. Res.* **2005**, *65*, 4–14.
- [127] R. S. Rock, K. C. Hansen, R. W. Larsen, S. I. Chan, *Chem. Phys.* **2004**, *307*, 201–208.
- [128] H. Satzger, C. Root, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, J. Wachtveitl, W. Zinth, *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *396*, 191–197.
- [129] A. Aemissegger, V. Kräutler, W. F. van Gunsteren, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2929–2936.
- [130] M. Erdélyi, A. Karlén, A. Gogoll, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 403–412.
- [131] J. Bredenbeck, J. Helbing, J. R. Kumita, G. A. Woolley, P. Hamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 2379–2384.
- [132] V. Borisenko, G. A. Woolley, *J. Photochem. Photobiol. A* **2005**, *173*, 21–28.
- [133] L. Guerrero, O. S. Smart, G. A. Woolley, R. K. Allemann, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15624–15629.
- [134] M. C. Pirrung, S. J. Drabik, J. Ahamed, H. Ali, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 679–681.
- [135] D. M. Rothman, E. J. Petersson, M. E. Vázquez, G. S. Brandt, D. A. Dougherty, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 846–847.
- [136] a) D. M. Rothman, E. M. Vázquez, E. M. Vogel, B. Imperiali, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2865–2868; b) D. M. Rothman, M. E. Vázquez, E. M. Vogel, B. Imperiali, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6795–6798.
- [137] M. E. Vázquez, M. Nitz, J. Stehn, M. B. Yaffe, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10150–10151.
- [138] A. Nguyen, D. M. Rothman, J. Stehn, B. Imperiali, M. B. Yaffe, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 993–1000.
- [139] D. Humphrey, Z. Rajfur, M. E. Vázquez, D. Scheswohl, M. D. Schaller, K. Jacobson, B. Imperiali, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 22091–22101.
- [140] K. Y. Zou, W. T. Miller, R. S. Givens, H. Bayley, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3139–3141; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3049–3051.
- [141] Y. Watai, I. Sase, H. Shiono, Y. Nakano, *FEBS Lett.* **2001**, *488*, 39–44.
- [142] M. E. Hahn, T. W. Muir, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5924–5927; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5800–5803.
- [143] J.-P. Pellois, M. E. Hahn, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7170–7171.
- [144] J. P. Pellois, T. W. Muir, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5859–5863; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5713–5717.
- [145] S. Bourgault, M. Létourneau, A. Fournier, *Peptides* **2005**, *26*, 1475–1480.
- [146] M. Ghosh, I. Ichetovkin, X. Song, J. S. Condeelis, D. S. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2440–2441.
- [147] A. Koçer, M. Walko, W. Meijberg, B. L. Feringa, *Science* **2005**, *309*, 755–758.
- [148] A. H. Kossel, S. B. Cambridge, U. Wagner, T. Bonhoeffer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 14702–14707.
- [149] P. Roy, Z. Rajfur, D. Jones, G. Marriott, L. Loew, K. Jacobson, *J. Cell Biol.* **2001**, *153*, 1035–1048.

- [150] L. Bédouet, H. Adenier, S. Pulvin, C. Bedel-Cloutour, D. Thomas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 320, 939–944.
- [151] N. Muranaka, T. Hohsaka, M. Sisido, *FEBS Lett.* **2002**, 510, 10–12.
- [152] S. Loudwig, Y. Nicolet, P. Masson, J. C. Fontecilla-Camps, S. Bon, F. Nachon, M. Goeldner, *ChemBioChem* **2003**, 4, 762–767.
- [153] M. Volgraf, P. Gorostiza, R. Numano, R. H. Kramer, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 47–52.
- [154] Y. Dorsett, T. Tuschl, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, 3, 318–329.
- [155] D. P. Bartel, *Cell* **2004**, 116, 281–297.
- [156] M. Mandal, R. R. Breaker, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5, 451–463.
- [157] S. T. Crooke, *Curr. Mol. Med.* **2004**, 4, 465–487.
- [158] C. R. Dass, *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, 25, 395–397.
- [159] M. Famulok, S. Verma, *Trends Biotechnol.* **2002**, 20, 462–466; D. S. Wilson, J. W. Szostak, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 611–647.
- [160] Y. S. Cho-Chung, Y. G. Park, Y. N. Lee, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **1999**, 1, 386–392.
- [161] M. C. Pirrung, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1326–1341; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1276–1989.
- [162] J. A. Doudna, T. R. Cech, *Nature* **2002**, 418, 222–228.
- [163] N. C. Seeman, *Nature* **2003**, 421, 427–431.
- [164] a) S. Shimizu-Sato, E. Huq, J. M. Tepperman, P. H. Quail, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 1041–1044; b) M. Chen, J. Chory, C. Fankhauser, *Annu. Rev. Genet.* **2004**, 38, 87–117; c) G. Argüello-Astorga, L. Herrera-Estrella, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, 49, 525–555; d) W. B. Terzaghi, A. R. Cashmore, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1995**, 46, 445–474; e) H.-M. Li, T. Washburn, J. Chory, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1993**, 5, 455–460.
- [165] J. Minden, R. Namba, J. Merigliano, S. Cambridge, *Sci. STKE* **2000**, 2000, PL1.
- [166] A. Høgset, L. Prasmickaite, P. K. Selbo, M. Hellum, B. O. Engesæter, A. Bonsted, K. Berg, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, 56, 95–115.
- [167] W. T. Monroe, M. M. McQuain, M. S. Chang, J. S. Alexander, F. R. Haselton, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 20895–20900.
- [168] B. Ghosn, F. R. Haselton, K. R. Gee, W. T. Monroe, *Photochem. Photobiol.* **2005**, 81, 953–959.
- [169] H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien, H. Okamoto, *Nat. Genet.* **2001**, 28, 317–325.
- [170] a) H. Ando, H. Okamoto, *Methods Cell Sci.* **2003**, 25, 25–31; b) H. Ando, T. Furuta, H. Okamoto, *Methods Cell Biol.* **2004**, 77, 159–171.
- [171] a) H. Okamoto, Y. Hirate, H. Ando, *Front. Biosci.* **2004**, 9, 93–99; b) H. Ando, M. Kobayashi, T. Tsubokawa, K. Uyemura, T. Furuta, H. Okamoto, *Dev. Biol.* **2005**, 287, 456–468.
- [172] S. Shah, S. Rangarajan, S. H. Friedman, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 1352–1356; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1328–1332.
- [173] S. G. Chaulk, A. M. MacMillan, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 3173–3178.
- [174] O. C. Uhlenbeck, *Nature* **1987**, 328, 596–600.
- [175] S. G. Chaulk, A. M. MacMillan, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2207–2210; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2149–2152.
- [176] S. Pitsch, P. A. Weiss, L. Jenny, A. Stutz, X. L. Wu, *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 3773–3795.
- [177] S. Pitsch, P. A. Weiss, X. L. Xu, D. Ackermann, T. Honegger, *Helv. Chim. Acta* **1999**, 82, 1753–1761.
- [178] L. Kröck, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 475–477; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 471–473.
- [179] A. Heckel, G. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 822–823.
- [180] M. Famulok, G. Mayer, *ChemBioChem* **2005**, 6, 19–26.
- [181] G. Mayer, L. Kröck, V. Mikat, M. Engeser, A. Heckel, *ChemBioChem* **2005**, 6, 1966–1970.
- [182] P. Wenter, B. Furtig, A. Hainard, H. Schwalbe, S. Pitsch, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2656–2659; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2600–2603.
- [183] C. Höbartner, S. K. Silverman, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7471–7475; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7305–7309.
- [184] X. J. Tang, I. J. Dmochowski, *Org. Lett.* **2005**, 7, 279–282.
- [185] X. J. Tang, J. L. Richards, A. E. Peritz, I. J. Dmochowski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 5303–5306.
- [186] R. Ting, L. Lermer, D. M. Perrin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12720–12721.
- [187] J.-I. Hong, Q. Feng, V. Rotello, J. Rebek, Jr., *Science* **1992**, 255, 848–850.
- [188] M. L. Dodson Jr., R. Hewitt, M. Mandel, *Photochem. Photobiol.* **1972**, 16, 15–25.
- [189] P. Ordoukhanian, J.-S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9570–9571.
- [190] K. J. Zhang, J.-S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11579–11580.
- [191] P. Ordoukhanian, J.-S. Taylor, *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 94–103.
- [192] K. Zhang, J.-S. Taylor, *Biochemistry* **2001**, 40, 153–159.
- [193] H. J. Lenox, C. P. McCoy, T. L. Sheppard, *Org. Lett.* **2001**, 3, 2415–2418.
- [194] Y. Zheng, T. L. Sheppard, *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, 17, 197–207.
- [195] J. D. Trzupke, T. L. Sheppard, *Org. Lett.* **2005**, 7, 1493–1496.
- [196] M. C. Pirrung, X. D. Zhao, S. V. Harris, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2067–2071.
- [197] A. Dussy, C. Meyer, E. Quennet, T. A. Bickle, B. Giese, A. Marx, *ChemBioChem* **2002**, 3, 54–60.
- [198] C. Crey-Desbiolles, J. Lhomme, P. Dumy, M. Kotera, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9532–9533.
- [199] V. Namasivayam, R. G. Larson, D. T. Burke, M. A. Burns, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 4188–4194.
- [200] H. Asanuma, T. Ito, T. Yoshida, X. G. Liang, M. Komiyama, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2547–2549; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2393–2395.
- [201] H. Asanuma, X. G. Liang, T. Yoshida, A. Yamazawa, M. Komiyama, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1372–1374; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1316–1318.
- [202] A. Yamazawa, X. G. Liang, H. Asanuma, M. Komiyama, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 2446–2447; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2356–2357.
- [203] H. Asanuma, T. Takarada, T. Yoshida, D. Tamaru, X. G. Liang, M. Komiyama, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2743–2745; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2671–2673.
- [204] H. Asanuma, D. Tamaru, A. Yamazawa, M. Z. Liu, M. Komiyama, *ChemBioChem* **2002**, 3, 786–789.
- [205] X. G. Liang, H. Asanuma, H. Kashida, A. Takasu, T. Sakamoto, G. Kawai, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 16408–16415.
- [206] M. Z. Liu, D. Tamaru, H. Asanuma, M. Komiyama, *Chem. Lett.* **2003**, 32, 1174–1175.
- [207] F. D. Lewis, X. Y. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11928–11929.
- [208] Y. Liu, D. Sen, *J. Mol. Biol.* **2004**, 341, 887–892.
- [209] A. Okamoto, K. Tanabe, T. Inasaki, I. Saito, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 2606–2608; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2502–2504.
- [210] K. Tanabe, H. Nakata, S. Mukai, S. Nishimoto, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3893–3897.