



Regulation der Angiogenese durch lichtinduzierbare AntimiRs**

Florian Schäfer, Jasmin Wagner, Andrea Knau, Stefanie Dimmeler* und Alexander Heckel*

MicroRNAs (miRNAs, miRs) sind kleine nichtkodierende RNAs, welche die Genexpression posttranskriptionell entweder durch einen Abbau der mRNA oder durch Repression der Translation regulieren.^[1,2] Die Wirkung einer miRNA auf eine bestimmte mRNA ist zwar oftmals nur gering, durch die Vielzahl der Ziele einer miRNA ist es jedoch möglich, ganz bestimmte Genexpressionsmuster zu regulieren.^[3] MiRs spielen eine entscheidende Rolle bei der Gewebshomöostase, und viele Krankheiten sind mit einem veränderten miR-Expressionsniveau verbunden.^[4,5] Die Angiogenese – der Prozess der Entstehung von neuen Blutgefäßen ausgehend von bereits bestehenden – wird benötigt, um die Sauerstoffzufuhr in Gewebe nach einer Ischämie aufrechtzuerhalten. Dieser Prozess wird von etlichen miRNAs reguliert.^[6] Die proangiogene miR-126 beispielsweise reguliert die Angiogenese, indem sie die Expression negativer Regulatoren des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors hemmt; miRNAs aus dem miR-17-92-Cluster hingegen weisen antiangiogene Eigenschaften auf.^[7,8] Aus diesem Cluster führte im Besonderen die Inhibition von miR-92a durch Antisense-Oligonukleotide zu einer verbesserten Gefäßneubildung und Erholung der Herzfunktion nach einer kritischen Ischämie in Mäusen und großen Tiermodellen.^[8,9]

Die Injektion von Antagomirs und auf LNAs (LNA = „locked“ oder verbrückte Nukleinsäure) basierenden AntimiRs wurde bereits eingesetzt, um die miR-Aktivität in vivo und in vitro zu inhibieren. Diese beiden Arten von Oligonukleotiden werden in fast alle Gewebe aufgenommen und sie haben eine lange Wirkdauer.^[10] Auf LNAs basierende AntimiRs wurden darüber hinaus auch schon in klinischen Studien am Menschen getestet und erwiesen sich als sicher und effizient.^[11,12] Sowohl Antagomirs als auch LNA-AntimiRs gegen miR-92 zeigten vergleichbare therapeutische Wirkung in experimentellen Studien.^[8,9]

Allerdings erschwert die ubiquitäre Expression vieler miRNAs, verbunden mit den vielfältigen Funktionen einer miRNA in den verschiedenen Geweben, eine systemisch Anwendung. Ein externes Auslösesignal zur örtlichen und zeitlichen Beschränkung der AntimiR-Aktivität auf einen definierten zellulären Kontext würde es ermöglichen, die mit einer systemischen Inhibition verbundenen, unerwünschten Wirkungen zu vermeiden. Dies ist besonders deswegen von Interesse, weil miRNAs in unterschiedlichen Geweben zum Teil gegensätzliche Auswirkungen haben können. Licht ist ein geeignetes externes Auslösesignal, weil es zum einen in einer präzise definierten Art und Weise angewendet werden kann und zum anderen bei Verwendung geeigneter Wellenlängen ein orthogonales Signal darstellt, das andere zelluläre Prozesse nicht beeinflusst. Kürzlich wurde über neuartige lichtgesteuerte Applikationen berichtet, die eine Aktivierung bis zu 10 mm tief in biologischem Gewebe erlauben.^[13,14]

In den letzten Jahren wurden etliche Studien zur lichtinduzierten Aktivierung von Nukleinsäuren mit photoaktivierbaren („caged“) Oligonukleotiden veröffentlicht.^[15] In zwei dieser Studien wurde die lichtinduzierte Regulation der miRNA-Expression untersucht. Durch Verwendung lichtaktivierbarer Antagomirs gegen miR-122 und miR-21 in der einen Studie sowie eines lichtaktivierbaren Antisense-Oligonukleotids gegen eine miRNA aus *C. elegans* in der anderen Studie gelang es, die miRNA-Expression in Modellsystemen zu inhibieren.^[16,17] In beiden Studien wurden jedoch nur Reporterproteine oder manipulierte Organismen verwendet. In einer zusätzlichen Studie wurden photoaktivierbare Konstrukte zum An- und Ausschalten der let-7-miRNA in Zebrafischembryonen genutzt.^[18] In zwei der drei Studien wurden nicht-nukleosidische photospaltbare Linker verwendet, die dritte beruhte auf photoaktivierbarem 2'-OME-Uridin. Die letztgenannte Strategie beschränkt die Verwendung auf AntimiR-Sequenzen, die etliche Uridinreste enthalten. Unseres Wissens wurden lichtinduzierbare AntimiRs bis jetzt noch nicht verwendet, um die Expression endogener Zielgene von miRNAs in primären humanen Zellen zu beeinflussen. Auch wurde noch nicht das Ziel verfolgt, mit dieser Strategie ausgehend von einer therapeutischen Motivation physiologische Funktionen zu beeinflussen. In der hier vorgestellten Studie haben wir lichtinduzierbare AntimiRs gegen die antiangiogene miR-92a entwickelt, um die Angiogenese-Aktivität in Endothelzellen zu erhöhen.

Für die Entwicklung einer lichtinduzierbaren AntimiR gegen miR-92a synthetisierten wir 21 Nukleotide lange Oligonukleotide, die 2'-OME-RNA-Nukleotide enthielten, die zum Teil mit 1-(2-Nitrophenyl)ethyl(NPE)-Schutzgruppen an den Nukleobasen modifiziert wurden (Abbildung 1b). Darüber hinaus wurden die Enden mit fünf Phosphorthioat-Verknüpfungen versehen (Abbildung 1a und Tabelle 1 der Hintergrundinformationen). Nach Belichtung (Abbildung 1

[*] F. Schäfer,^[‡] Prof. Dr. A. Heckel
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
Buchmann Institut für Molekulare Lebenswissenschaften
Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 9, 60438 Frankfurt (Deutschland)
E-Mail: heckel@uni-frankfurt.de

Dr. J. Wagner,^[‡] A. Knau, Prof. Dr. S. Dimmeler
Institut für Kardiovaskuläre Regeneration, Zentrum für Molekulare Medizin, Goethe-Universität Frankfurt
Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt (Deutschland)
E-Mail: dimmeler@em.uni-frankfurt.de

[‡] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung im Rahmen des SFB 902 „Molecular principles of RNA-based Regulation“.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201307502> zu finden.

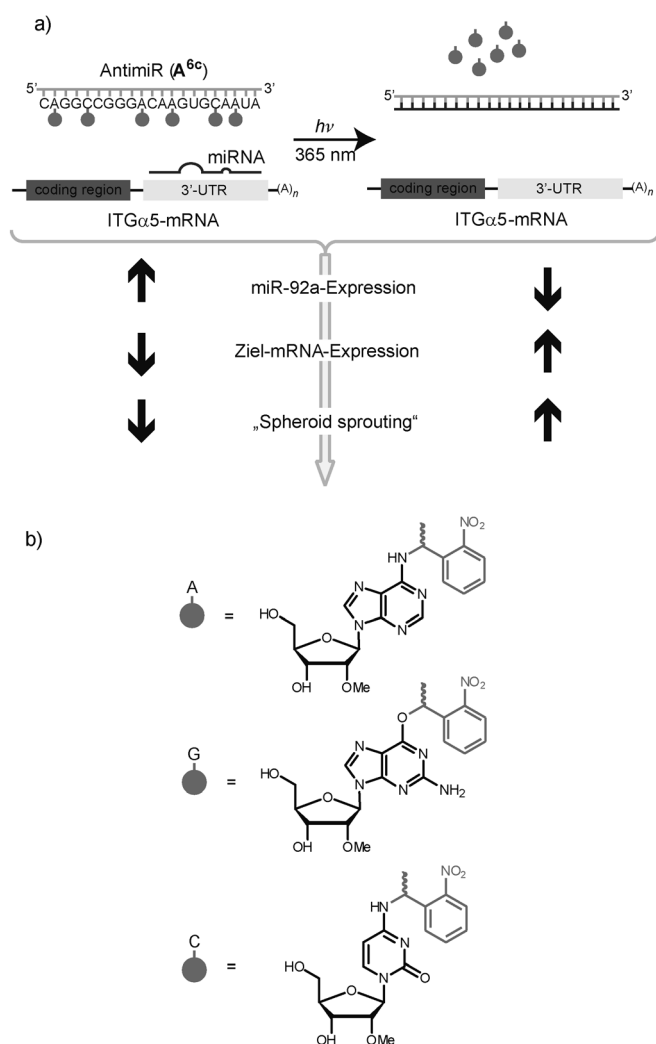


Abbildung 1. a) AntimiRs mit photoaktivierbaren Nukleobasen können nicht an miRNA binden. Nach Entfernen der photolabilen Schutzgruppen mit Licht kommt es zu einer Reduktion der miRNA-Niveaus, zur Derepression der Ziel-mRNA und im Fall der Inhibition von miR-92a zu einer erhöhten Angiogenese-Aktivität. b) Überblick über die für diese Studie verwendeten, an der Nukleobase photolabil geschützten Nukleoside. Synthese siehe Hintergrundinformationen.

der Hintergrundinformationen) können diese AntimiRs mit perfekter Komplementarität einen Duplex mit miR-92a bilden (Tabelle 1 der Hintergrundinformationen). Es wurden drei verschiedene lichtaktivierbare AntimiRs mit drei, fünf und sechs photolabilen Schutzgruppen, verteilt über die gesamte Sequenz, hergestellt. Die entsprechenden photoaktivierbaren 2'-OMe-RNA-Amidite für den spezifischen Einbau der photolabil modifizierten Nukleotide in den Strang wurden ausgehend von geeigneten, kommerziell erhältlichen Vorstufen synthetisiert (Schemata 1–3 der Hintergrundinformationen). Mithilfe der modifizierten Phosphoramidite wurden die photoaktivierbaren Oligonukleotide A^{3c}, A^{5c} und A^{6c} hergestellt. Als Kontrollen fungierten ein nicht photoaktivierbares AntimiR (A^{pos}) gegen miR-92a und ein AntimiR (A^{neg}), das kein endogenes Ziel adressiert und die miR-Expression im Vergleich mit untransfizierten Kontrollzellen nicht beeinflusst (Abbildung 3 der Hintergrundinformatio-

nen). Zusätzlich wurde eine photoaktivierbare Version der Negativkontrolle synthetisiert (A^{negc}). Nach Aufreinigung (Abbildung 1 der Hintergrundinformationen) und Charakterisierung per Massenspektrometrie (Tabelle 2 der Hintergrundinformationen) wurden die AntimiRs in humane Nabelschnurendothelzellen (HUVECs) transfiziert. Vier Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit einem Transilluminator bestrahlt ($\lambda = 365$ nm, 5–6 mW) oder 25 min im Dunkeln belassen. 48 Stunden nach der Bestrahlung wurden die Zellen lysiert, und die miR-92a-Expression wurde mithilfe eines Taqman-microRNA-Assays bestimmt.

Während die AntimiR mit drei photolabilen Schutzgruppen (A^{3c}) auch ohne Bestrahlung noch eine Restaktivität hatte und die miR-92a-Expression teilweise inhibierte, wies die AntimiR mit sechs photolabilen Schutzgruppen (A^{6c}) keinerlei Aktivität mehr auf, und es kam zu keiner Verminderung der miR-92a-Expression (Abbildung 2a). Dies ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass für den Duplex A^{6c}/miR-92a ein deutlich niedrigerer Schmelzpunkt gemessen wurde als für A^{3c}/miR-92a (Tabelle 3 der Hintergrundinformationen). Durch Bestrahlung der mit A^{3c}, A^{5c} und A^{6c} transfizierten HUVECs wurde eine lichtinduzierte Aktivierung der inhibitorischen Aktivität der photoaktivierbaren AntimiRs erreicht. Dies äußerte sich in einer signifikanten Senkung der miR-92a-Niveaus, die genauso ausgeprägt wie bei der Transfektion der Positivkontrolle A^{pos} war (Abbildung 2a). Die lichtinduzierte Aktivierung der AntimiR A^{6c} konnte bereits nach fünfminütiger Bestrahlung beobachtet werden, aber nach 25 min wurde eine höhere Effizienz erreicht (Abbildung 2b).

Um auszuschließen, dass die Bestrahlung selbst eine Auswirkung auf die miR-92a-Expression hat, wurden auch A^{pos}-, A^{neg}- und A^{negc}-transfizierte Zellen bestrahlt. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede zu den nicht bestrahlten Proben festgestellt, was darauf schließen lässt, dass die Bestrahlung selbst keinerlei Auswirkungen auf die miR-92a-Expression hat (Abbildung 2a). Darüber hinaus wurden keine Unterschiede in der Zellmorphologie zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen beobachtet. Der beobachtete Effekt ist zudem sequenzspezifisch, wie aus der Tatsache, dass weder A^{pos} noch A^{6c} mit und ohne Bestrahlung eine Auswirkung auf die miR-126-Expression haben, hervorgeht (Abbildung 2 der Hintergrundinformationen).

Als nächstes untersuchten wir, ob auch endogene mRNAs, die ein Zielgen der miR-92a sind, durch unsere lichtinduzierbaren AntimiRs reguliert werden können. Die Expression von ITGα5, einem bekannten Zielgen von miR-92a in Endothelzellen, war 1.6-mal höher, wenn die miR-92a-Niveaus durch die aktive Kontroll-AntimiR A^{pos} reduziert wurden. Im Unterschied dazu führte die Transfektion von A^{neg} weder zu einer Beeinflussung der miR-92a-Expression noch einer Wirkung auf die ITGα5-mRNA-Expression (Abbildung 2c). Im Fall der photoaktivierbaren AntimiRs führte nur A^{3c}, in Übereinstimmung mit der halbmaximalen Inhibition der miR-92a-Expression (Abbildung 2a) durch Transfektion dieser AntimiR, bereits ohne Bestrahlung zu einer signifikanten Erhöhung der ITGα5-mRNA-Expression (Abbildung 2c). Im Unterschied dazu war nach Transfektion von A^{5c} nur eine leichte Erhöhung der ITGα5-mRNA-Expression

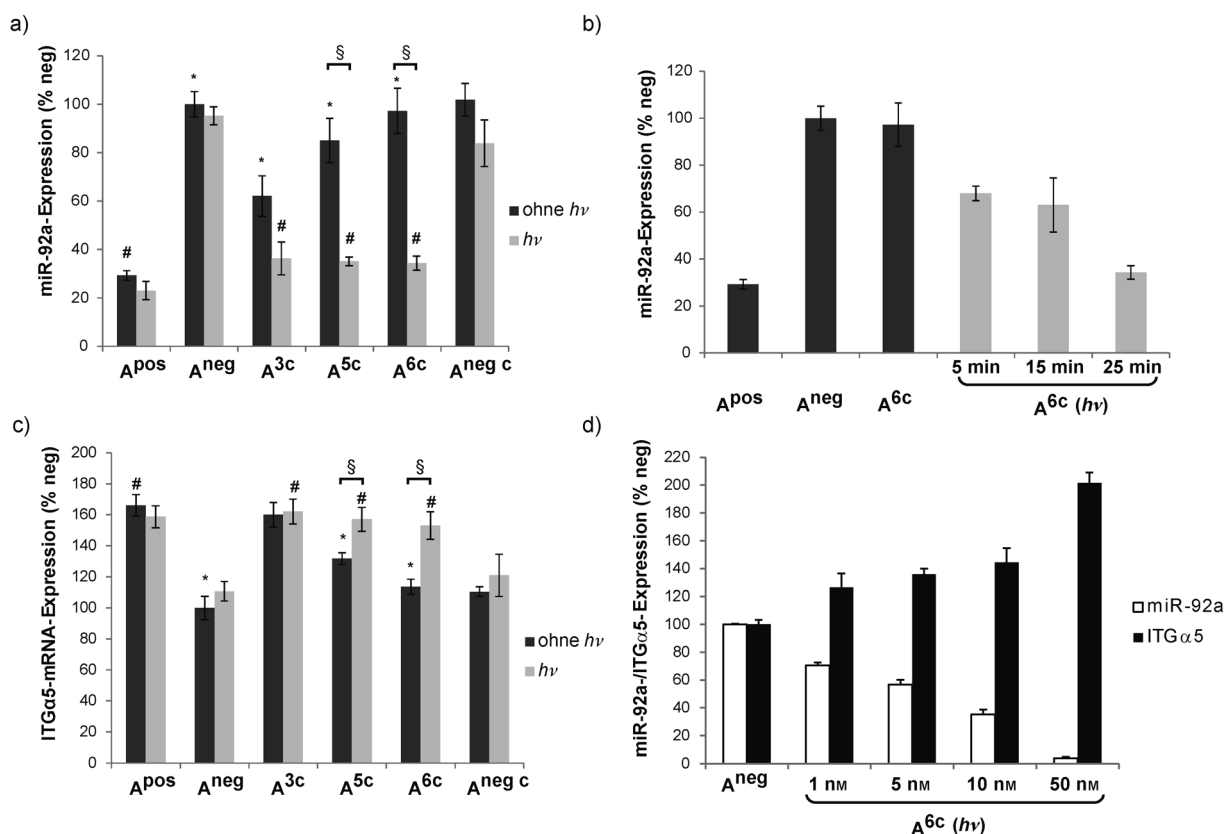


Abbildung 2. Aktivierung von AntimiRs gegen miR-92a durch Licht. a) MiR-92a-Expression nach Transfektion verschiedener AntimiRs (10 nM) in HUVECs und 25-minütiger Bestrahlung der Zellen (hellgraue Balken) oder ohne Bestrahlung (dunkelgraue Balken). b) MiR-92a-Expression nach Transfektion von HUVECs mit AntimiR A^{6c} oder der Negativkontrolle A^{neg} und Bestrahlung der Zellen für verschiedene Zeiten (5, 15, 25 min; hellgraue Balken) oder ohne Bestrahlung (dunkelgraue Balken). c) ITG α 5-mRNA-Expression nach Transfektion verschiedener AntimiRs (10 nM) in HUVECs und 25-minütiger Bestrahlung der Zellen (hellgraue Balken) oder ohne Bestrahlung (dunkelgraue Balken). d) MiR-92a- (weiße Balken) und ITG α 5-mRNA-Expression (schwarze Balken) nach Transfektion von AntimiR A^{6c} in verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 10, 50 nM) sowie Transfektion von A^{neg} in HUVECs und anschließender 25-minütiger Bestrahlung. Alle Daten sind relativ zur Negativkontrolle A^{neg} angegeben. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts (SEM), $n = 4$. # $p < 0.01$ verglichen mit A^{neg}, * $p < 0.05$ verglichen mit A^{pos}, § $p < 0.05$ (t-Test).

festzustellen, und A^{6c} hatte keinerlei Effekt, wenn die Zellen nicht bestrahlt wurden. Nach Bestrahlung jedoch war die ITG α 5-mRNA-Expression bei HUVECs, die mit A^{5c} und A^{6c} transfiziert wurden, deutlich erhöht und vergleichbar mit dem Niveau, das mit der Positivkontrolle A^{pos} erzielt wurde (Abbildung 2c).

Das Ausmaß der Derepression der Zielgen-Expression war klar dosisabhängig und korrelierte invers mit der miR-92a-Inhibition. Eine maximale Wirkung konnte bei einer Konzentration von 50 nM A^{6c} erzielt werden (Abbildung 2d sowie Abbildungen 4 und 5 der Hintergrundinformationen). Erneut konnte keinerlei Auswirkung der Bestrahlung selbst auf die mRNA-Expression nachgewiesen werden. Dies bestätigt, dass eine Bestrahlung mit UV-Licht dieser Wellenlänge den Zellen nicht schadet und dass die beobachteten Effekte sequenzspezifisch sind (Abbildung 2c).

Es ist bekannt, dass miR-92a in Endothelzellen den Prozess der Angiogenese reguliert.^[8] Um zu untersuchen, ob die lichtaktivierbaren AntimiRs über eine biologische Aktivität in Endothelzellen verfügen, wurde die Angiogenese-Aktivität in HUVECs nach Transfektion der AntimiRs mithilfe des

„Spheroid sprouting assay“ bestimmt.^[19,20] In Übereinstimmung mit ihrer antiangiogenen Aktivität führte die Inhibition von miR-92a durch A^{pos} zu einer erhöhten Aussprossung (Abbildung 3a,b). Die AntimiR mit drei photoaktivierbaren Nukleotiden A^{3c} führte in Übereinstimmung mit der bereits zuvor beobachteten, unvollständigen Inaktivierung auch ohne Bestrahlung zu einer erhöhten Aussprossung. Im Unterschied dazu konnten bei Verwendung von A^{6c} mit sechs modifizierten Einheiten keinerlei Auswirkungen auf die Angiogenese-Aktivität festgestellt werden, und die Gesamtlänge der Aussprossungen war ohne Bestrahlung gleich hoch wie bei Transfektion der Negativkontrolle A^{neg} (Abbildung 3a). In bestrahlten und mit A^{6c} transfizierten Zellen wurde jedoch eine erhöhte Angiogenese-Aktivität beobachtet, die gleich groß wie die der Positivkontrolle A^{pos} war. Zusammengefasst illustrieren diese Daten, dass die Angiogenese in vitro durch lichtinduzierbare AntimiRs gegen miR-92a reguliert werden kann.

Wir konnten hier zeigen, dass sich die miR-Aktivität in Endothelzellen durch Verwendung photoaktivierbarer AntimiRs mit Licht regulieren lässt. Für das vollständige Aus-

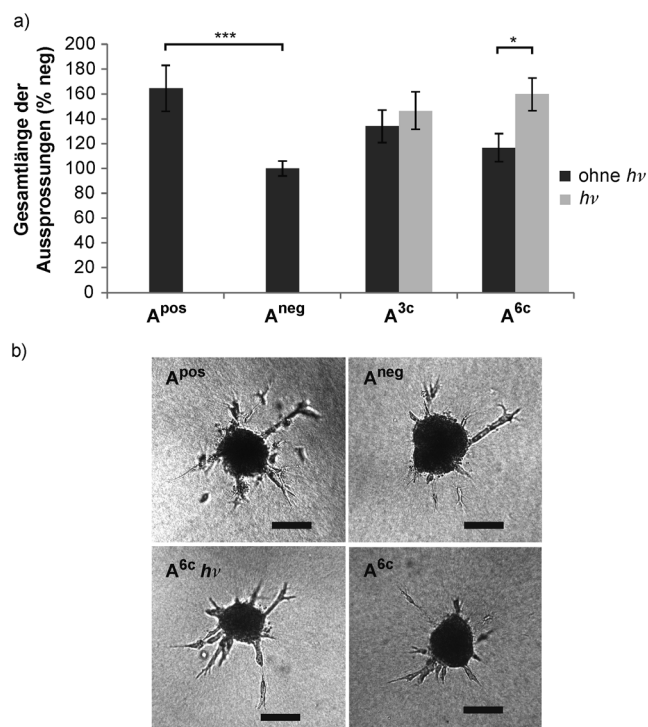


Abbildung 3. Wirkung lichtinduzierbarer AntimiRs auf die Angiogenese in Endothelzellen. a) Länge aller Sphäroid-Aussprossungen (Mittelwert aus zehn Sphäroiden pro Bedingung). Die Sphäroide wurden aus HUVECs hergestellt, die mit verschiedenen AntimiRs (10 nm) transfiziert und anschließend entweder bestrahlt (hellgraue Balken) oder im Dunkeln belassen wurden (dunkelgraue Balken). Aus den transfizierten Zellen wurden 24 h nach Bestrahlung die Sphäroide generiert. Die Länge der Aussprossungen wurde 72 h nach der Transfektion bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts (SEM), $n=5$. * $p<0.05$, *** $p<0.001$ (Anova Bonferroni's multiple comparison test). b) Repräsentative Mikroskopaufnahmen verschiedener Sphäroide für die Bedingungen A^{pos} (oben links), A^{neg} (oben rechts), A^{6c} nach Bestrahlung (unten links) und A^{6c} ohne Bestrahlung (unten rechts). Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 100 μm .

schalten der Aktivität der AntimiRs waren fünf bis sechs photolabile Schutzgruppen nötig. Es ist erwähnenswert, dass die photoaktivierbaren Oligonukleotide mindestens drei Tage in Zellkultur stabil sind, was nahe legt, dass die photolabilen Schutzgruppen nicht von Reparaturenzymen entfernt werden. Durch Bestrahlung der Zellen ließ sich die biologische Aktivität der AntimiRs vollständig wiederherstellen. Dies zeigte sich in einer effizienten Inhibition der miR-92a-Expression und der Derepression des miR-92a-Zielgens ITG α 5. Wir konnten darüber hinaus zum ersten Mal zeigen, dass die Angiogenese-Aktivität endothelialer Zellen durch die Verwendung lichtaktivierbarer AntimiRs erhöht werden kann.

Unsere Befunde implizieren, dass lichtaktivierbare AntimiRs über ein therapeutisches Potenzial verfügen. AntimiRs wurden bereits in verschiedenen Mausmodellen und einigen vorklinischen Studien in größeren Tieren als Therapeutikum eingesetzt.^[9,21,22] Zudem wurde in einer kürzlich publizierten Studie über die sichere und effiziente Verwendung von AntimiRs gegen miR-122 im Menschen berichtet.^[12] Während

die systemische Inhibition von miRNAs wegen deren unterschiedlichen Funktionen in verschiedenen Geweben zu unerwünschten Nebenwirkungen oder onkogenen Effekten führen kann, könnte unser hier vorgestellter Ansatz eine lokale Aktivierung für eine örtlich beschränkte Wirkung der AntimiRs ermöglichen. Dies wäre besonders für die Behandlung von Oberflächengewebe wie der Haut von Interesse. Hier ließe sich beispielsweise eine Unterstützung der Wundheilung durch eine Erhöhung der Angiogenese-Aktivität erzielen. Außerdem sollte auch eine lokale Applikation während Operationen z.B. durch Katheter möglich sein. In vorangegangenen Experimenten wurde bereits gezeigt, dass sich eine Reihe unterschiedlicher photolabiler Schutzgruppen mit verschiedenen Absorptionseigenschaften verwenden lässt.^[15] Durch Verwendung von rotem oder IR-Licht und mithilfe der Zweiphotonenbestrahlung oder aufkonvertierender Nanopartikel könnten sich Eindringtiefen in biologisches Gewebe von bis zu 10 mm erzielen lassen.^[13,14,23,24]

Eingegangen am 26. August 2013

Online veröffentlicht am 31. Oktober 2013

Stichwörter: Angiogenese · AntimiR · Caging · Photolyse · RNA

- [1] H. Siomi, M. C. Siomi, *Nature* **2009**, 457, 396–404.
- [2] D. P. Bartel, *Cell* **2004**, 116, 281–297.
- [3] M. Selbach, B. Schwanhauser, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin, N. Rajewsky, *Nature* **2008**, 455, 58–63.
- [4] S. Dimmeler, P. Nicotera, *EMBO Mol. Med.* **2013**, 5, 180–190.
- [5] M. V. Iorio, C. M. Croce, *EMBO Mol. Med.* **2012**, 4, 143–159.
- [6] A. Bonauer, R. A. Boon, S. Dimmeler, *Curr. Drug Targets* **2010**, 11, 943–949.
- [7] J. E. Fish, M. M. Santoro, S. U. Morton, S. Yu, R.-F. Yeh, J. D. Wythe, K. N. Ivey, B. G. Bruneau, D. Y. R. Stainier, D. Srivastava, *Dev. Cell* **2008**, 15, 272–284.
- [8] A. Bonauer, G. Carmona, M. Iwasaki, M. Mione, M. Koyanagi, A. Fischer, J. Burchfield, H. Fox, C. Doebele, K. Ohtani, E. Chavakis, M. Potente, M. Tjwa, C. Urbich, A. M. Zeiher, S. Dimmeler, *Science* **2009**, 324, 1710–1713.
- [9] R. Hinkel, D. Penzkofer, S. Zühlke, A. Fischer, W. Husada, Q.-F. Xu, E. Baloch, E. van Rooij, A. M. Zeiher, C. Kupatt, S. Dimmeler, *Circulation* **2013**, 128, 1066–1075.
- [10] J. Krützfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nature* **2005**, 438, 685–689.
- [11] J. Stenvang, A. Petri, M. Lindow, S. Obad, S. Kauppinen, *Silence* **2012**, 3, 1.
- [12] H. L. A. Janssen, H. W. Reesink, E. J. Lawitz, S. Zeuzem, M. Rodriguez-Torres, K. Patel, A. J. van der Meer, A. K. Patick, A. Chen, Y. Zhou et al., *N. Engl. J. Med.* **2013**, 368, 1685–1694.
- [13] Y. Yang, Q. Shao, R. Deng, C. Wang, X. Teng, K. Cheng, Z. Cheng, L. Huang, Z. Liu, X. Liu, B. Xing, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 3179–3183; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 3125–3129.
- [14] J. Wang, F. Wang, C. Wang, Z. Liu, X. Liu, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 10553–10556; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 10369–10372.
- [15] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 8572–8604; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 8446–8476.
- [16] C. M. Connelly, R. Uprety, J. Hemphill, A. Deiters, *Mol. Biosyst.* **2012**, 8, 2987–2993.
- [17] G. Zheng, L. Cochella, J. Liu, O. Hobert, W. Li, *ACS Chem. Biol.* **2011**, 6, 1332–1338.

- [18] J. C. Griepenburg, B. K. Ruble, I. J. Dmochowski, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 6198–6204.
 - [19] T. Korff, H. G. Augustin, *J. Cell Biol.* **1998**, *143*, 1341–1352.
 - [20] F. Diehl, L. Rössig, A. M. Zeiher, S. Dimmeler, C. Urbich, *Blood* **2007**, *109*, 1472–1478.
 - [21] T. Thum, *EMBO Mol. Med.* **2012**, *4*, 3–14.
 - [22] T. G. Hullinger, R. L. Montgomery, A. G. Seto, B. A. Dickinson, H. M. Semus, J. M. Lynch, C. M. Dalby, K. Robinson, C. Stack, P. A. Latimer, J. M. Hare, E. N. Olson, E. van Rooij, *Circ. Res.* **2012**, *110*, 71–81.
 - [23] P. Theer, M. Hasan, W. Denk, *Opt. Lett.* **2003**, *28*, 1022–1024.
 - [24] W. R. Zipfel, R. M. Williams, W. W. Webb, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1369–1377.
-