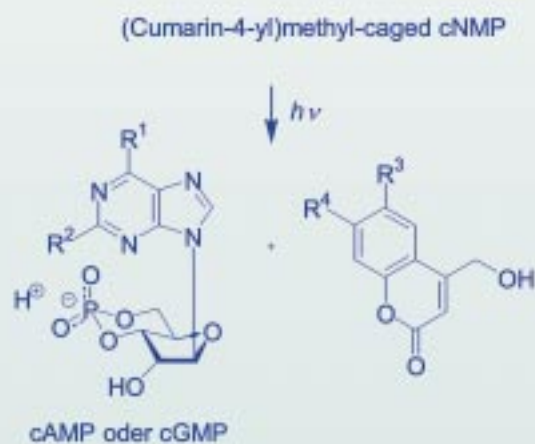
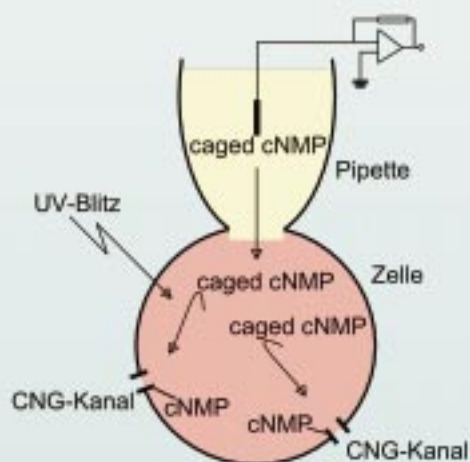
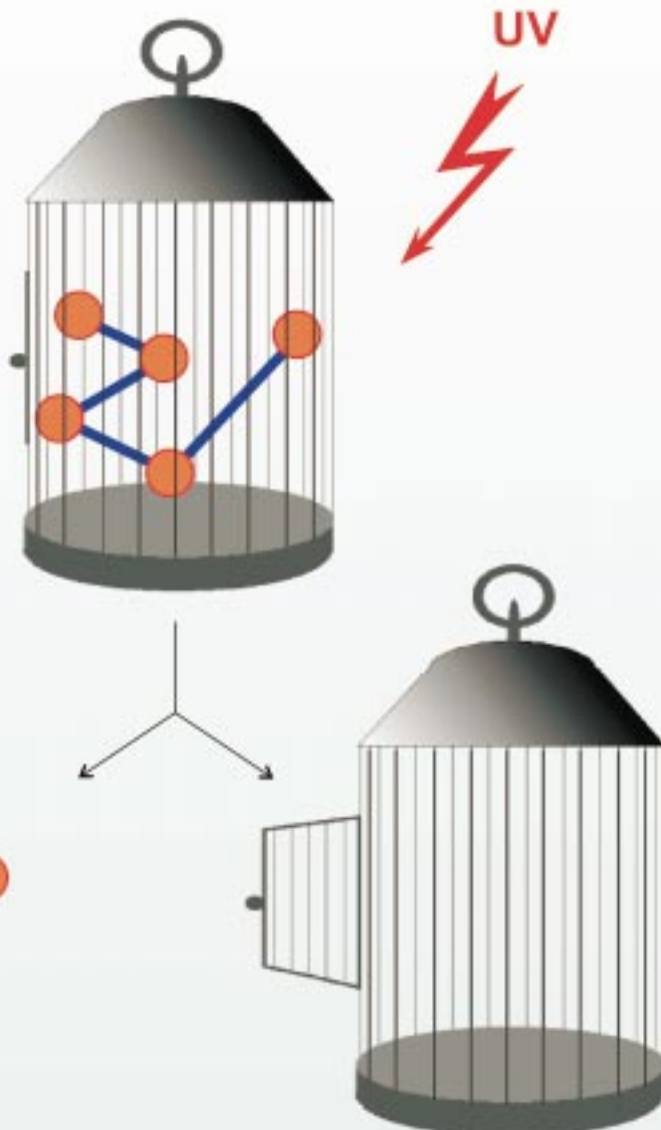


Für die Untersuchung raum- und zeit- aufgelöster Aspekte der Signaltrans- duktion durch von cyclischen Nucleotiden gesteuerte (CNG) Ionenkanäle sind sehr schnelle intrazelluläre Konzen- trationserhöhungen der cyclischen Nucleotidmonophosphate (cNMPs) erforderlich. Durch Veresterung der cNMPs mit photosensitiven Schutz- gruppen zu biologisch inaktiven („caged“) cNMPs, deren Einschleusen in Zellen und Freisetzung der cNMPs durch Blitzlichtphotolyse wird dies auf elegante Weise erreicht.

Als Phototrigger für die cNMPs sind neue substituierte Cumarinylmethyl- ester der cNMPs besonders geeignet.

Mehr dazu auf den folgenden Seiten.



Langwellig UV/Vis-anregbare, hocheffiziente und ultraschnelle Phototrigger für cAMP und cGMP**

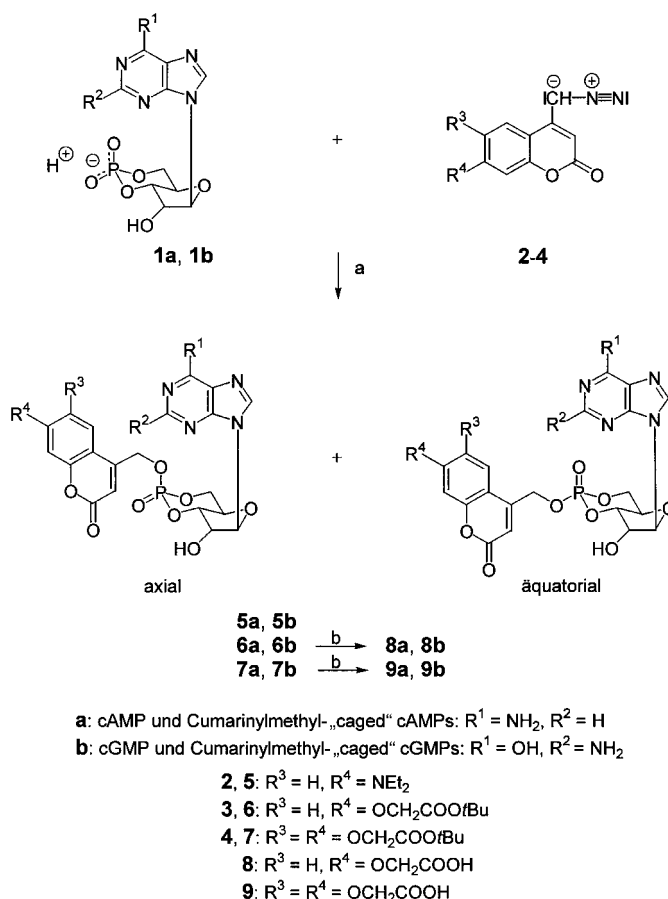
Volker Hagen,* Jürgen Bendig, Stephan Frings, Torsten Eckardt, Siegrun Helm, Dirk Reuter und U. Benjamin Kaupp

Die Freisetzung der Botenstoffe cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) **1a** und cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) **1b** aus inaktivierten („caged“) Vorstufen hat sich als sehr nützlich erwiesen, um von cyclischen Nucleotiden abhängige zelluläre Prozesse in situ zu untersuchen.^[1] Im Falle von cAMP und cGMP bedeutet „caged“, dass deren biologische Aktivität durch Veresterung der Phosphatgruppierung mit einer photolabilen Schutzgruppe („caging group“) blockiert ist. Solche Biomoleküle können in Zellen eingeführt werden, ohne eine biologische Antwort auszulösen. Durch Blitzlichtphotolyse wird dann die photolabile Gruppe abgespalten und das biologisch aktive cyclische Nucleotid freigesetzt. Dadurch kann ein schneller intrazellulärer Anstieg der Konzentration von cAMP oder cGMP ausgelöst werden.

An photoaktivierbare Signalmoleküle („caged compounds“) werden spezielle Anforderungen gestellt. Sie sollten in wässrigem Milieu gut löslich, solvolysestabil und biologisch inert sein. Außerdem sollten sie schnell und mit hoher Effizienz photochemisch reagieren und hohe Extinktionen bei Wellenlängen > 300 nm aufweisen. Die bisher eingeführten photoaktivierbaren cAMPs und cGMPs genügen diesen Ansprüchen nicht. Die 2-Nitrobenzyl-,^[2] 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl(DMNB)-^[3] und 1-(2-Nitrophenyl)ethyl(NPE)-Ester^[4] werden relativ langsam photolysiert und zeigen ziemlich geringe Photoeffizienzen.^[5] Desoxybenzoinyl-(Desyl)-cAMP^[6] ist in wässrigen Pufferlösungen sehr solvolyseempfindlich,^[7] und die (7-Methoxycumarin-4-yl)methylester von cAMP und cGMP^[7,8] sind nicht ausreichend löslich.^[9]

Wir beschreiben hier photoaktivierbare Vorstufen von cAMP und cGMP mit beispielloser günstigen Eigenschaften. Es sind die (7-Diethylaminocumarin-4-yl)methyl(DEACM)-, (7-Carboxymethoxycumarin-4-yl)methyl(CMCM)- und [6,7-Bis(carboxymethoxy)cumarin-4-yl)methyl(BCMCM)-Ester von cAMP und cGMP, **5a,b**, **8a,b** und **9a,b**. Ihre Synthese

(Schema 1) erfolgte durch Umsetzung von **1a** bzw. **1b** mit den Diazoalkanen **2–4**, anschließende Diastereomerentrennung durch präparative Umkehrphasen-HPLC und nachfolgende Abspaltung der *tert*-Butoxy-Gruppen mit Trifluoressigsäure (nur im Falle der *tert*-Butylester). Die Ausbeuten betrugen 11 bis 34 %, wobei das Diastereomenverhältnis axial:äquatorial bei 45:55 lag. Die Isomerenzuordnung erfolgte ³¹P-NMR-spektroskopisch (für präparative Details hierzu sowie die spektroskopische Charakterisierung siehe Hintergrundinformationen).



Schema 1. Synthese von **5–9**: a) DMSO/CH₃CN (1:4), 60 °C, 24 h; b) TFA/CH₂Cl₂/H₂O (75:24:1), RT, 20 min. TFA = Trifluoressigsäure.

Die CMCM- und BCMCM-Gruppen zeichnen sich besonders durch ihre hydrophilen Eigenschaften aus, was zu einer guten Wasserlöslichkeit der entsprechenden photoaktivierbaren cyclischen Nucleotide führt und für die Einführung in Zellen, z. B. mittels der Patch-Clamp-Technik, vorteilhaft ist. Andererseits weist die DEACM-Schutzgruppe hervorragende photochemische Eigenschaften auf. Alle neuen photoaktivierbaren Signalmoleküle lassen sich sehr schnell – innerhalb weniger Nanosekunden – freisetzen^[10] und zeigen, bedingt durch hohe Quantenausbeuten und relativ intensive Absorptionen > 300 nm (Tabelle 1), eine sehr hohe Effizienz der Photospaltung in das cyclische Nucleotid und das entsprechende stark fluoreszierende 4-(Hydroxymethyl)cumarin (Schema 2).

[*] Priv.-Doz. Dr. V. Hagen, Dipl.-Chem. T. Eckardt
Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-94793-159
E-mail: hagen@fmp-berlin.de

Doz. Dr. J. Bendig, Dr. S. Helm
Institut für Chemie der Humboldt-Universität Berlin (Deutschland)
Priv.-Doz. Dr. S. Frings, Dr. D. Reuter, Prof. Dr. U. B. Kaupp
Institut für Biologische Informationsverarbeitung
Forschungszentrum Jülich (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Europäischen Union und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken B. Dekowski und J. Loßmann für ihre technische Unterstützung.

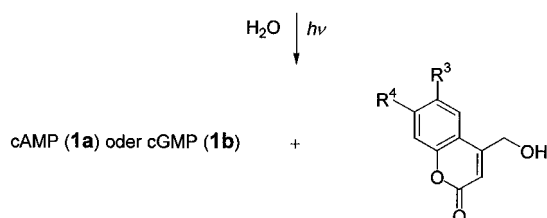
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder vom Autor anzufordern.

Tabelle 1. Langwelligste Absorption (λ_{\max}), Quantenausbeute Φ der Photolyse und Löslichkeit s der Cumarinylmethyl-derivate **5a,b**, **8a,b** und **9a,b**.

Verbindung	λ_{\max} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$])	$\Phi^{[d]}$	s [μM]
5a (axial) ^[a]	402 (18 600)	0.21 ^[c]	135
5a (äquatorial) ^[a]	396 (20 200)	0.23 ^[c]	15
5b (axial) ^[a]	403 (19 300)	0.25 ^[c]	120
5b (äquatorial) ^[a]	396 (19 100)	0.26 ^[c]	15
8a (axial) ^[b]	326 (12 500)	0.12	900
8a (äquatorial) ^[b]	324 (12 400)	0.10	200
8b (axial) ^[b]	326 (11 700)	0.16	350
8b (äquatorial) ^[b]	325 (11 200)	0.10	> 1000
9a (axial) ^[b]	346 (10 700)	0.10	500
9a (äquatorial) ^[b]	347 (12 400)	0.08	1000
9b (axial) ^[b]	348 (11 000)	0.14	550
9b (äquatorial) ^[b]	347 (11 200)	0.09	> 1000

[a] In Acetonitril-HEPES-KCl-Puffer (5:95), pH 7.2; $\lambda_{\text{exc}} = 333$ nm. [b] In HEPES-KCl-Puffer, pH 7.2; $\lambda_{\text{exc}} = 333$ nm. [c] In MeOH-HEPES-KCl-Puffer (20:80). [d] Fehlergrenze ± 0.01 .

„caged“ cAMPs (**5a**, **8a**, **9a**) oder „caged“ cGMPs (**5b**, **8b**, **9b**)
axial oder äquatorial



Schema 2. Photolyse von **5a,b**, **8a,b** und **9a,b**.

Gegenüber **8a,b** sind bei **9a,b** die langwelligsten Absorptionsmaxima um 20 nm und bei **5a,b** sogar um ca. 70 nm rotverschoben. Dies ergibt optimale Wellenlängen für die Photolyse von 300–340 nm für **8a,b**, 330–370 nm für **9a,b** und 360–440 nm für **5a,b**. Insgesamt ist die Adaption an die gängigen CW- und Laserlichtquellen unproblematisch. Die Solvolysstabilität der neuen photoaktivierbaren Signalmoleküle ist mit Halbwertszeiten > 1000 h in HEPES-Pufferlösungen bei pH 7.2 sehr bemerkenswert (HEPES = 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure). Die entsprechenden Diastereomere der neuen Cumarinylmethyl-derivate unterscheiden sich lediglich in den Löslichkeiten in wässrigen Pufferlösungen (Tabelle 1), was zumindest bei **5a,b** den bevorzugten Einsatz des besser löslichen Isomers erfordert.

In Tabelle 2 ist die Effizienz der Photofreisetzung der axialen Isomere von **5b**, **8b** und **9b** und die von DMNB- und NPE-„caged“ cGMP in wässrigen Pufferlösungen bei ver-

schiedenen Wellenlängen vergleichend aufgeführt. Man erkennt, dass die Cumarinylmethyl- den Nitrobenzyl-derivaten weit überlegen sind. Bei wichtigen Wellenlängen wird die höchste Freisetzung von cGMP mit folgenden photoaktivierbaren Signalmolekülen erzielt: bei 337 nm (HBO, Stickstofflaser) mit **8b**, bei 365 nm (HBO, Argonionenlaser) mit **9b** und **5b** und bei 405 nm (HBO) mit **5b** (HBO = Hochdruckbrenner Osram).

Die herausragenden Eigenschaften der neuen photoaktivierbaren Signalmoleküle bestätigen sich in Untersuchungen an durch cyclische Nucleotide gesteuerten Kanälen (CNG-Kanälen) mit der Patch-Clamp-Methode. In HEK293-Zellen, die cAMP-gesteuerte Kanäle (CNCa3) exprimieren, wurde mit **9a** und Blitzlichtphotolyse bei 360 nm eine partielle Aktivierung bereits nach 20 ms und eine volle Aktivierung der Kanäle nach 100 ms Bestrahlung erreicht (Abbildung 1). Abbildung 2 vergleicht die Photofreisetzung von cyclischen Nucleotiden aus **9a** und DMNB-„caged“ cGMP in HEK293-Zellen, die cAMP-gesteuerte (CNCa3) oder cGMP-gesteuerte Kanäle (CNCa2) exprimieren. Die Zellen wurden mit 500 μM des äquatorialen Isomers von **9a** bzw. 200 μM (maximale Löslichkeit) des axialen Isomers von DMNB-„caged“ cGMP über eine Patch-Pipette beladen und mit UV-Blitzen bestrahlt. Die Konzentration an freigesetztem Nucleotid wurde über die Aktivität der cAMP- bzw. cGMP-gesteuerten Ionenkanäle bestimmt.^[11] Das Experiment verdeutlicht, dass **9a** das cyclische Nucleotid um eine Größenordnung effizienter freisetzt als das DMNB-Derivat und dass nur **9a** in der Lage ist, in akzeptablen Zeiten hohe Konzentrationen des

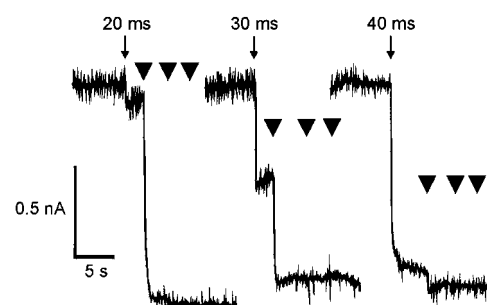


Abbildung 1. Bestimmung der Konzentration von photolytisch freigesetztem cAMP anhand der Aktivierung von cAMP-gesteuerten Ionenkanälen in HEK293-Zellen. (Ganzzell-Stromregistrierungen bei -70 mV von drei Zellen, die mit 500 μM des äquatorialen Isomers von **9a** geladen waren.) Kurze UV-Blitze (20–40 ms, \downarrow) setzen nicht genug cAMP frei, um die Kanäle maximal zu aktivieren. Längere Blitze (100 ms, ∇) induzieren maximale Kanalaktivierung. Aus der relativen Stromamplitude bei submaximaler Aktivierung wird mit Hilfe der bekannten Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Kanalaktivierung durch cAMP die freigesetzte cAMP-Konzentration berechnet.^[11]

Tabelle 2. Vergleich der Effizienz der Bildung von cGMP aus photoaktivierbaren Verbindungen (axiale Isomere) nach unterschiedlichen Bestrahlungszeiten bei verschiedenen Wellenlängen (in %).

Verbindung	t ($\lambda_{\text{exc}} = 333$ nm)			t ($\lambda_{\text{exc}} = 365$ nm)			t ($\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm)		
	6 s	60 s	600 s	6 s	60 s	600 s	6 s	60 s	600 s
NPE-Ester ^[a]	2	7	38	< 1	2	10	< 1	< 1	1
DMNB-Ester ^[a]	< 1	3	10	< 1	3	11	< 1	< 1	< 1
5b (DEACM-Ester) ^[a]	3	15	75	16	80	> 98	38	98	> 98
8b (CMCM-Ester) ^[b]	16	75	> 98	4	19	93	< 1	1	3
9b (BCMCM-Ester) ^[b]	10	51	98	12	65	> 98	1	3	20

[a] $c = 25$ μM in MeOH:HEPES (1:4). [b] $c = 25$ μM in HEPES.

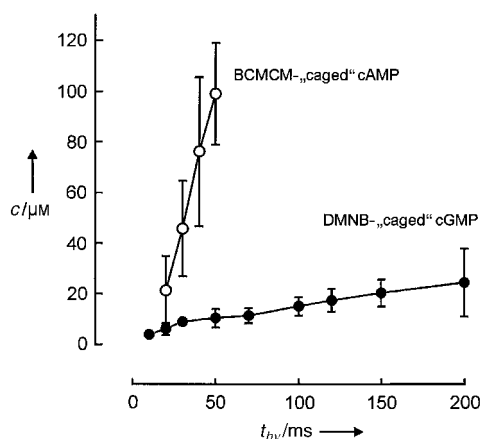


Abbildung 2. Vergleich der photolytischen Freisetzung cyclischer Nucleotide aus **9a** und DMNB-„caged“ cGMP in HEK293-Zellen bei unterschiedlicher Belichtungsdauer. Aufgrund besserer Löslichkeit und höherer Quantenausbeute können zehnfach höhere Konzentrations sprünge mit BCMCM-Derivaten erreicht werden. c = Konzentration an freigesetztem Nucleotid, t_{hv} = Blitzdauer.

wird freien cAMP in der Zelle zu erzeugen. In Abbildung 3 wird die Photofreisetzung von 8-Br-cGMP aus den axialen Isomeren von DEACM-„caged“ 8-Br-cGMP^[12] und DMNB-„caged“ 8-Br-cGMP^[11] in HEK293-Zellen, die cGMP-gesteuerte CNCA2-Kanäle exprimieren, bei $\lambda = 405$ nm verglichen.

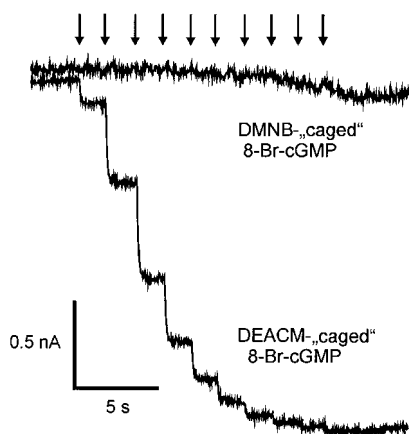


Abbildung 3. Aktivierung von cGMP-gesteuerten Kationenkanälen durch 8-Br-cGMP, freigesetzt aus photolabilen Derivaten durch eine Serie von 5-ms-UV-Blitzen (405 ± 20 nm; ↓). (Ganzzell-Stromregistrierungen von zwei HEK293-Zellen bei -50 mV mit $20 \mu\text{M}$ der jeweiligen photoaktivierbaren Verbindung.)

Während jeder Lichtblitz annähernd $0.5 \mu\text{M}$ 8-Br-cGMP aus dem DEACM-Derivat freisetzt, wird bei dem DMNB-Derivat keine messbare Freisetzung beobachtet.

Die Eigenschaften der photoaktivierbaren Signalmoleküle in der Zelle und in Lösung stimmen gut miteinander überein und bestätigen, dass die neuen Cumarinylmethylester hoch-effiziente Phototrigger für cAMP und cGMP darstellen. Die Vorteile der Carboxymethoxy-substituierten Cumarinylmethylester **8a,b** und **9a,b** liegen in ihrer sehr guten Löslichkeit, die die sofortige Freisetzung hoher Konzentrationen an cyclischem Nucleotid ermöglicht. Die DEACM-Derivate **5a** und **5b** gestatten die effiziente Freisetzung der cyclischen

Nucleotide unter besonders zellschonenden Bestrahlungsbedingungen. Insgesamt haben die neuen photoaktivierbaren cyclischen Nucleotide ein großes Potential für die Untersuchung raum- und zeitaufgelöster Aspekte der zellulären Signaltransduktion auf einer quantitativen Stufe.

Eingegangen am 22. November 2000 [Z16158]

- [1] M. Korth, J. Engels, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1979**, *310*, 103–111; J. Nargeot, J. M. Nerbonne, J. Engels, H. A. Lester, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 2395–2399; A. M. Gurney, H. A. Lester, *Physiol. Rev.* **1987**, *67*, 583–617; J. H. Kaplan, A. P. Somlyo, *Trends Neurosci.* **1989**, *12*, 54–58; J. P. Y. Kao, S. R. Adams, *Optical Microscopy: Emerging Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, **1993**, S. 27–85; S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Physiol.* **1993**, *55*, 755–784; B. Wiesner, J. Weiner, R. Middendorff, V. Hagen, U. B. Kaupp, I. Weyand, *J. Cell Biol.* **1998**, *142*, 473–484; C. Dzeja, V. Hagen, U. B. Kaupp, S. Frings, *EMBO J.* **1999**, *18*, 131–144; S. Frings, D. H. Hackos, C. Dzeja, T. Ohshima, V. Hagen, U. B. Kaupp, J. Korenbrot, *Methods Enzymol.* **2000**, *315*, 797–817.
- [2] J. Engels, R. Reidys, *Experientia* **1978**, *34*, 14–15.
- [3] J. M. Nerbonne, S. Richard, J. Nargeot, H. A. Lester, *Nature* **1984**, *310*, 74–76.
- [4] „Photochemical Probes in Biochemistry“: J. F. Wootton, D. R. Trentham, *NATO ASI Ser. Ser. C* **1989**, *272*, 277–296.
- [5] J. E. T. Corrie, D. R. Trentham in *Bioorganic Photochemistry Vol. 2: Biological Applications of Photochemical Switches* (Hrsg.: H. Morrison), Wiley, New York, **1993**, S. 243–305.
- [6] R. S. Givens, P. S. Athey, B. Matuszewski, L. W. Kueper III, J. Y. Xue, T. Fister, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6001.
- [7] T. Furuta, H. Torigai, M. Sugimoto, M. Iwamura, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3953–3956.
- [8] T. Furuta, M. Iwamura, *Methods Enzymol.* **1998**, *291*, 50–63; B. Schade, V. Hagen, R. Schmidt, R. Herbrich, E. Krause, T. Eckardt, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9109–9117.
- [9] In Acetonitril-HEPES-KCl-Puffer (5.95) fanden wir für alle Isomere Löslichkeiten $< 25 \mu\text{M}$.
- [10] J. Bendig, S. Helm, R. Schmidt, C. Schweitzer, V. Hagen, *J. Phys. Chem.*, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [11] V. Hagen, C. Dzeja, S. Frings, J. Bendig, E. Krause, U. B. Kaupp, *Biochemistry* **1996**, *35*, 7762–7771.
- [12] Hergestellt analog **5b** aus 8-Br-cGMP und **2**.

Analyse der Topologie der Chromophor-Bindungstasche von Phytochrom durch Variation des Chromophor-Substitutionsmusters

Uwe Robben, Ingo Lindner, Wolfgang Gärtner* und Kurt Schaffner

Professor Henning Hopf zum 60. Geburtstag gewidmet

Kürzlich berichteten wir über den Einsatz von synthetischen, offenkettigen Tetrapyrrolen mit verschiedenen Substitutionsmustern an Ring D als Chromophore in rekombinan-

[*] Prof. Dr. W. Gärtner, Dr. U. Robben, Dr. I. Lindner, Prof. Dr. K. Schaffner
Max-Planck-Institut für Strahlenchemie
Postfach 101365, 45413 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)
Fax: (+49) 208-306-3951
E-mail: gaertner@mpi-muelheim.mpg.de