

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<sup>[12]</sup> und DMNB-„caged“ 8-Br-cGMP<sup>[11]</sup> in HEK293-Zellen, die cGMP-gesteuerte CNCA2-Kanäle exprimieren, bei  $\lambda = 405$  nm verglichen.

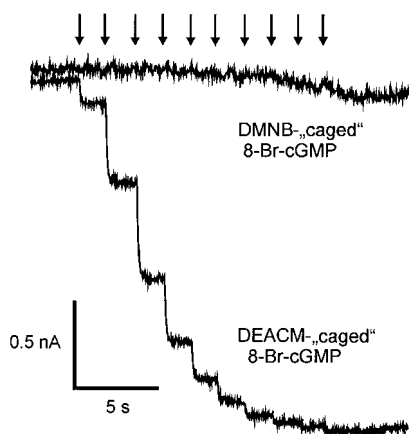


Abbildung 3. Aktivierung von cGMP-gesteuerten Kationenkanälen durch 8-Br-cGMP, freigesetzt aus photolabilen Derivaten durch eine Serie von 5-ms-UV-Blitzen ( $405 \pm 20$  nm; ↓). (Ganzzell-Stromregistrierungen von zwei HEK293-Zellen bei  $-50$  mV mit  $20 \mu\text{M}$  der jeweiligen photoaktivierbaren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

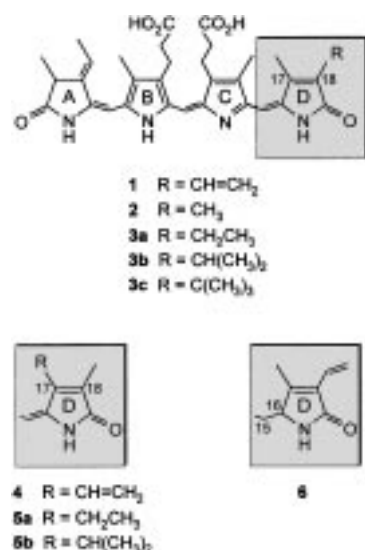
Uwe Robben, Ingo Lindner, Wolfgang Gärtner\* und Kurt Schaffner

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

tem Phytochrom (65-kDa-Hafer-PhyA),<sup>[1, 2]</sup> um die Wechselwirkungen zwischen der Bindungstasche und den Chromophoren Phytochromobilin **1** (Schema 1), Isophytochromobilin



Schema 1. Strukturformeln der natürlich vorkommenden (**1**, **3a**, **6**) und der synthetischen (**2**, **3b**, **c**, **4**, **5a**, **b**) offenkettigen Tetrapyrrole, die mit rekombinantem Apophytochrom aus Hafer assembliert wurden: Phytochromobilin **1**, Phycocyanobilin **3a**, Phycoerythrobilin **6**, Isophytochromobilin **4**, Isophycocyanobilin **5a** sowie das 17,18-Dimethyl- (**2**), das 17-Methyl-18-isopropyl- (**3b**), das 17-Methyl-18-*tert*-butyl- (**3c**) und das 17-Isopropyl-18-methyl-Derivat (**5b**) von **3a**.

**4** und Phycocyanobilin **3a** spektroskopisch zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass der erste nichtnatürliche Chromophor (**4**)<sup>[1]</sup> nach Assemblierung mit rekombinantem Apoprotein (ApophyA65)<sup>[3a]</sup> eine P<sub>r</sub> → P<sub>fr</sub>-Photoisomerisierung<sup>[3b]</sup> durchläuft, die für Phytochrome wie PhyA65-**1** typisch ist. Das Absorptionsmaximum der P<sub>fr</sub>-Form von PhyA65-**4** ist dabei um ca. 14 nm hypsochrom verschoben. Diese deutliche Verschiebung tritt selektiv in der P<sub>fr</sub>-Form auf und ist sogar noch ca. 3 nm größer als bei PhyA65-**3a** (Tabelle 1). In diesem Chromoprotein sind, vermutlich aufgrund der Sättigung der C18-Vinylgruppe, die Absorptionsmaxima von P<sub>r</sub> und P<sub>fr</sub> im Vergleich zu denen von PhyA65-**1** blauverschoben. Unklar war jedoch, in welchem Ausmaß sterische oder elektronische

Effekte für diese Verschiebungen der Maxima verantwortlich sind oder ob möglicherweise beide Eigenschaften hierzu beitragen.

Wir haben diese Fragestellung weiter untersucht, indem wir ApophyA65 mit den offenkettigen Tetrapyrrolen **2**, **3b**, **c** und **5a**, **b** assembliert haben, bei denen die sterischen Ansprüche der Alkylsubstituenten an Ring D (C17 und C18) systematisch variiert wurden. Die P<sub>r</sub>/P<sub>fr</sub>-Absorptionsspektren, die Einbaukinetik und die Kinetik der thermischen Rückreaktion von P<sub>fr</sub> zu P<sub>r</sub> wurden als Funktion der verschiedenen C17- und C18-Substituenten untersucht, um den Einfluss der Modifikationen auf die konformativ bedingten Protein-Chromophor-Wechselwirkungen zu ermitteln, die bei der Photoisomerisierung der C15-C16-Doppelbindung auftreten. Die Ergebnisse vervollständigen frühere Studien mit den Tetrapyrrolen **1**, **3a** und **4**<sup>[1]</sup> und ergänzen den Datensatz zu den beiden homologen Reihen **2/3a/3b/3c** und **2/5a/5b**.

Alle neuen Chromoproteine, PhyA65-**2**, **-3b**, **c** und **-5a**, **b**, durchlaufen den Phytochrom-Photocycus (Tabelle 1 und Abbildung 1). Die Chromoproteine der Reihe der C18-modifizierten Tetrapyrrole, PhyA65-**2** und **-3a–c**, weisen

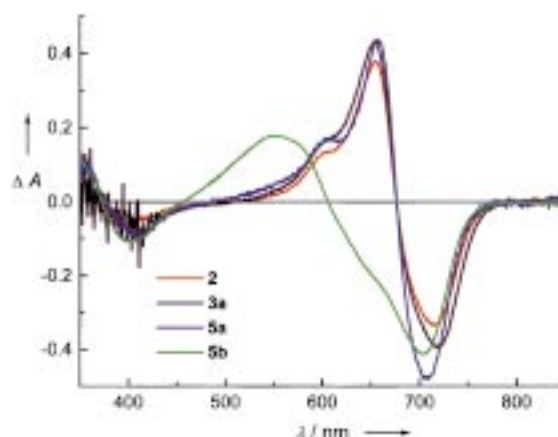


Abbildung 1. Differenzspektren  $A(P_r) - A(P_{fr})$  von rekombinantem Hafer-PhyA65, assembliert mit Phycocyanobilin **3a** und dessen 17,18-Dimethyl- (**2**), 17-Ethyl-18-methyl- (**5a**) und 17-Isopropyl-18-methyl-Derivat (**5b**).

dabei alle sehr ähnliche P<sub>r</sub>- und P<sub>fr</sub>-Absorptionsmaxima auf. Dagegen finden sich deutliche Unterschiede in den Absorptionen der C17-Ethyl- und C17-Isopropyl-Homologen PhyA65-**5a** bzw. **-5b**: Während die P<sub>r</sub>-Form von PhyA65-**5a** noch im Bereich der P<sub>r</sub>-Formen von PhyA65-**2** und **-3b**, **c** absorbiert, sind alle anderen Absorptionsmaxima merklich zu kürzeren Wellenlängen verschoben. Die Verschiebungen der P<sub>fr</sub>-ähnlichen Formen von PhyA65-**5a** und **-5b** betragen ca. 10 nm, das Maximum der P<sub>r</sub>-ähnlichen Form von PhyA65-**5b** weist überdies eine extreme Verschiebung von 100 nm auf.

In der biexponentiellen Kinetik des Chromophoreinbaus spiegelt sich auf ähnliche Weise der Einfluss von Position und Größe der Substituenten wieder (Tabelle 1). Das natürlich vorkommende 17-Methyl-18-ethyl-Derivat **3a** wird – nach **1** – am schnellsten eingebaut. Während die 17,18-Dimethylverbindung **2** in Bezug auf  $\tau_1$  nur unwesentlich langsamer als **3a** eingebaut wird, nehmen die Einbaugeschwindigkeiten  $\tau_1$  und

Tabelle 1. Einbaukinetiken<sup>[a]</sup> von rekombinantem Apophytochrom aus Hafer, ApophyA65, mit den offenkettigen Tetrapyrrolen und PhyA65-Absorptionsmaxima  $\lambda_{max}$  der assemblierten Holoenzyme.

Tetrapyrrolkomponente	$\tau_1$ <sup>[a]</sup> [min]	$\tau_2$ <sup>[a]</sup> [min]	$\lambda_{max}(P_r)$ [nm]	$\lambda_{max}(P_{fr})$ [nm]
Phytochromobilin <b>1</b>	0.38	2.93	665 <sup>[b]</sup>	728 <sup>[b]</sup>
Isophytochromobilin <b>4</b>	3.02	19.6 <sup>[b]</sup>	663 <sup>[b]</sup>	714 <sup>[b]</sup>
17,18-Dimethyl-Derivat <b>2</b>	1.62	10.8	655	714
Phycocyanobilin <b>3a</b>	0.88	10.6	653 <sup>[b]</sup>	717 <sup>[b]</sup>
17-Methyl-18-isopropyl-Derivat <b>3b</b>	6.14	51.6	650	718
17-Methyl-18- <i>tert</i> -butyl-Derivat <b>3c</b>	13.2	58.6	651	719
17-Ethyl-18-methyl-Derivat <b>5a</b>	7.64	43.8	658	707
17-Isopropyl-18-methyl-Derivat <b>5b</b>	10.5	156	550	705
Phycoerythrobilin <b>6</b>	— <sup>[c]</sup>	— <sup>[c]</sup>	576 <sup>[d]</sup>	n.v. <sup>[d]</sup>

[a] An die gemessenen Absorptionszunahmen (bei  $\lambda_{max}$ ) wurde eine biexponentielle Kinetik angepasst.  $\tau = 1/k$ . [b] Aus Lit. [1]. [c] Zur Einbaukinetik von **6** mit ApophyA124 siehe Lit. [6] [d] Aus Lit. [6]. n.v. = nicht vorhanden.

$\tau_2$  mit zunehmendem sterischem Anspruch in beiden homologen Reihen, **2/3b/3c** und **2/5a/5b**, ab, wobei der Isopropylsubstituent an C17 den stärksten Effekt bezüglich  $\tau_2$  hervorruft. In jedem Fall lässt sich aber die  $P_{fr}$ -Form durch Belichten wieder in die  $P_r$ -Form überführen. Obgleich einige der spektralen Veränderungen in der Reihe der homologen Chromoproteine sehr groß sind, lassen sich diese gut mit der Annahme in Einklang bringen, dass die Ursache dafür eher in unterschiedlichen Chromophor-Protein-Wechselwirkungen zu suchen ist als in stereochemisch bedingten Unterschieden bei der Knüpfung der kovalenten Bindung zum Protein.

Die thermisch bedingte Rückisomerisierung der photochemisch gebildeten  $P_{fr}$ -Form zur  $P_r$ -Form<sup>[4]</sup> zeigt ebenfalls eine Abhängigkeit von der Größe der Substituenten an Ring D der Chromophore. Das thermisch stabilste Chromoprotein ist dasjenige mit dem sperrigsten Substituenten, 18-*tert*-Butyl (PhyA65-**3c**), während die an C17 modifizierten Chromophore **5a** und **5b** die thermische Rückreaktion zu  $P_r$  merklich beschleunigen (Abbildung 2).

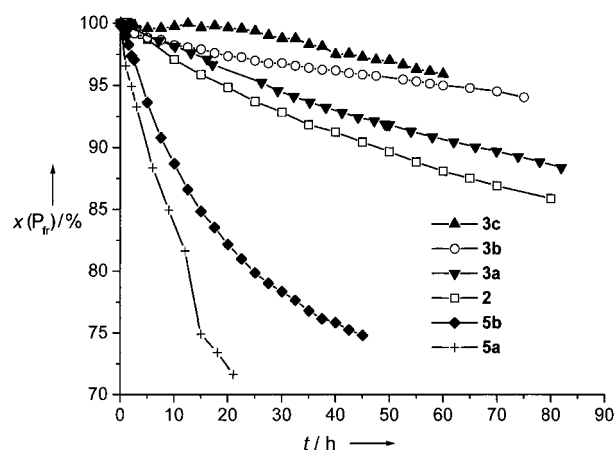


Abbildung 2. Kinetik der thermischen  $P_{fr} \rightarrow P_r$ -Isomerisierung von rekombinanten PhyA65-**2**-, **-3a-c**- und **-5a,b**-Phytochromen bei Raumtemperatur. Die  $P_{fr}$ -Proben wurden durch sättigende Belichtung der entsprechenden  $P_r$ -Formen präpariert.

Die sterischen Wechselwirkungen zwischen dem Ring D der Chromophore und den Aminosäuren der Proteintasche haben einen signifikanten Einfluss auf die Kinetik des Chromophoreinbaus in das Apoprotein und die thermische Rückreaktion von  $P_{fr}$  zu  $P_r$ . Relativ zu Phytochromen mit einem natürlich vorkommenden Chromophor, der einen  $C_1$ -Substituenten an C17 und einen  $C_2$ -Substituenten an C18 aufweist (PhyA65-**1** und **-3a**), hängt der Wechsel der Reaktivität von der Position des modifizierten Substituenten – C17 oder C18 – ab, wobei C17 die empfindlichere Position zu sein scheint. So ist die Assemblierung der 17-Ethyl- und 17-Isopropyl-Homologen **5a** und **5b** deutlich langsamer als die der strukturierten C18-substituierten Derivate **3a** und **3b**. Die extreme Blauverschiebung der  $P_r$ -Form von PhyA65-**5b** ( $\lambda_{max} = 550$  nm) weist möglicherweise auf einen besonders starken sterischen Zwang durch das Protein hin, der den D-Ring aus der durch die Ringe A bis C gegebenen Ebene dreht, was eine Unterbrechung in der Konjugation des  $\pi$ -Systems zur Folge hat.<sup>[5]</sup> Eine fast ebenso große Blauverschiebung im Absorptionsmaximum ( $\lambda_{max} = 576$  nm) wurde

für PhyA124-**6** beobachtet,<sup>[6]</sup> bei dem die Unterbrechung der Konjugation durch die Sättigung der C15-C16-Brücke des Phycoerythrobilin-Chromophors **6** hervorgerufen wird. Während **6** aufgrund der gesättigten Bindung zwischen C15 und C16 keine  $P_{fr}$ -Form bilden kann, finden wir für die  $P_{fr}$ -Form von **5b** ein nur moderat blauverschobenes Maximum (Tabelle 1). Als einen weiteren Grund für die Blauverschiebung könnte man eine Schwächung des protonierten Zustandes anführen, der durch eine Vergrößerung des Abstandes zwischen einem Protonendonator und dem Chromophor hervorgerufen wird. In diesem Fall würde man infolge der Deprotonierung eine die Blauverschiebung begleitende Abnahme der Absorption erwarten, wie sie beim Übergang vom 17-Ethyl- (**5a**) zum 17-Isopropyl-Isomer (**5b**) auftritt.

### Experimentelles

#### Synthese der offenkettigen Tetrapyrrole **2**, **3b**, **c** und **5a**, **b**:

Die Totalsynthese der neuen Tetrapyrrole folgte dem bereits beschriebenen, konvergenten Prinzip  $A-B + C-D \rightarrow A-B-C-D$ .<sup>[7]</sup> Die Einführung der verschiedenen Substituenten an Ring D gelang durch Adaption einer früher entwickelten Pyrrolsynthese,<sup>[8]</sup> die auf der Addition eines Aldehyds an ein Nitroalkan und dem anschließenden Ringschluss mit einem Isocyanessigsäure-*tert*-butylester basiert.

Die Oxidation der 2,5-unsubstituierten Pyrrole zu Pyrrol-2-onen<sup>[9]</sup> war nicht regiospezifisch. Die beiden Regioisomere konnten nach chromatographischer Trennung für die Synthese der beiden homologen Reihen der Tetrapyrrole genutzt werden.

Während sich die 4-Methylpyrrol-2-one mit der C-Ring-Komponente in guten Ausbeuten kuppeln ließen, führte die sterisch anspruchsvollere Gruppe des 4-Isopropyl-Derivats zu einer merklichen Verringerung der Ausbeute. Der Versuch, das 4-*tert*-Butyl-Derivat mit der C-Ring-Komponente zu verknüpfen, gelang nicht.

Eingegangen am 9. Oktober 2000 [Z15920]

- [1] I. Lindner, B. Knipp, S. E. Braslavsky, W. Gärtner, K. Schaffner, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1943–1946; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1843–1846.
- [2] Weitere Literatur über Phytochrom: *Photomorphogenesis in Plants* (Hrsg.: R. E. Kendrick, G. H. M. Kronenberg), 2. Aufl., Kluwer, Dordrecht, **1994**; S. E. Braslavsky, W. Gärtner, K. Schaffner, *Plant Cell Environ.* **1997**, *20*, 700–706.
- [3] a) Die rekombinante, N-terminale Hälfte von PhyA aus Hafer (Aminosäuren 1 bis 595) weist sämtliche photochemischen und spektroskopischen Eigenschaften des Holoproteins auf; D. Mozley, A. Remberg, W. Gärtner, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *66*, 710–715. b)  $P_r$  und  $P_{fr}$  stehen für die thermisch stabilen Formen im Photocycclus des Phytochroms ( $r$  = red,  $fr$  = far red).
- [4] Zur thermisch initiierten  $P_{fr} \rightarrow P_r$ -Isomerisierung siehe A. Remberg, A. Ruddat, S. E. Braslavsky, W. Gärtner, K. Schaffner, *Biochemistry* **1998**, *37*, 9983–9990.
- [5] Die Konformation des freien Chromophors **5b** in Lösung (Methanol/0.5% Triethylamin) wird offensichtlich nicht signifikant durch den sterischen Anspruch der C17-Isopropylgruppe beeinflusst, denn die Absorptionsmaxima betragen 360, 587 und 631 nm und ähneln damit denen von **2**, **3a-c** und **5b**.
- [6] L. Li, J. T. Murphy, J. C. Lagarias, *Biochemistry* **1995**, *34*, 7923–7930.
- [7] Siehe dazu Lit. [1] sowie die darin zitierte Literatur. Ein ausführlicher Bericht über die Synthese der neuen Tetrapyrrole **2**, **3b**, **c** und **5a**, **b** ist in Vorbereitung; siehe dazu auch I. Lindner sowie U. Robben, Dissertationen, Max-Planck-Institut für Strahlenchemie, Mülheim an der Ruhr, Gerhard-Mercator-Universität, Duisburg, **2000**.
- [8] K. Kohori, M. Hashimoto, H. Kinoshita, K. Inomata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67*, 3088–3093; M. A. Drinan, T. D. Lash, *J. Heterocycl. Chem.* **1994**, *31*, 255–257.
- [9] J. A. de Groot, R. van den Steen, R. Fokkens, J. Lugtenburg, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1982**, *101*, 35–40.