

- Watanabe, M. Naito, T. Oh-hara, Y. Itoh, D. Cohen, T. Tsuruo, *Jpn. J. Cancer Res.* **1996**, 87, 184–193.
- [7] A. Hilgeroth, U. Baumeister, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 588–590; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 576–578.
- [8] a) D. Kessel, *Cancer Commun.* **1989**, 1, 145–149; b) J. L. Weaver, D. Szabo, P. S. Pine, M. M. Gottesmann, S. Goldberg, A. Aszalos, *Int. J. Cancer* **1993**, 54, 456–461; c) D. Sharples, G. Hajos, Z. Riedl, D. Csanyi, J. Molnar, D. Szabo, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2001**, 334, 269–274.
- [9] a) H. L. Pearce, M. A. Winter, W. T. Beck, *Adv. Enzyme Regul.* **1990**, 30, 357–373.
- [10] G. Ecker, M. Huber, D. Schmidt, P. Chiba, *Mol. Pharmacol.* **1999**, 56, 791–796.
- [11] A. Seelig, E. Landwojtowicz, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, 12, 31–40.
- [12] A. Hilgeroth, A. Billich, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1999**, 332, 380–384.
- [13] A. Seelig, L. Blatter, F. Wohnsland, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2000**, 38, 111–121.
- [14] Versuche zur Bestimmung der Aktivitäten der Estergruppen-haltigen Vorstufen **3a–c** scheiterten an ihrer unzureichenden Löslichkeit im Assaysystem.
- [15] A. Hilgeroth, M. Wiese, A. Billich, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4729–4732.
- [16] Assay mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) als Substrat: S. N. Pandeya, D. Sriram, E. De Clercq, C. Pannecouque, M. Witvrouw, *Indian J. Pharm. Sci.* **1998**, 60, 207–212.

Fluoreszenzspektroskopische Quantifizierung der Freisetzung von cyclischen Nucleotiden aus photoaktivierbaren [Bis(carboxymethoxy)-cumarin-4-yl]methylestern in Zellen**

Volker Hagen,* Stephan Frings, Jürgen Bendig, Dorothea Lorenz, Burkhard Wiesner und U. Benjamin Kaupp

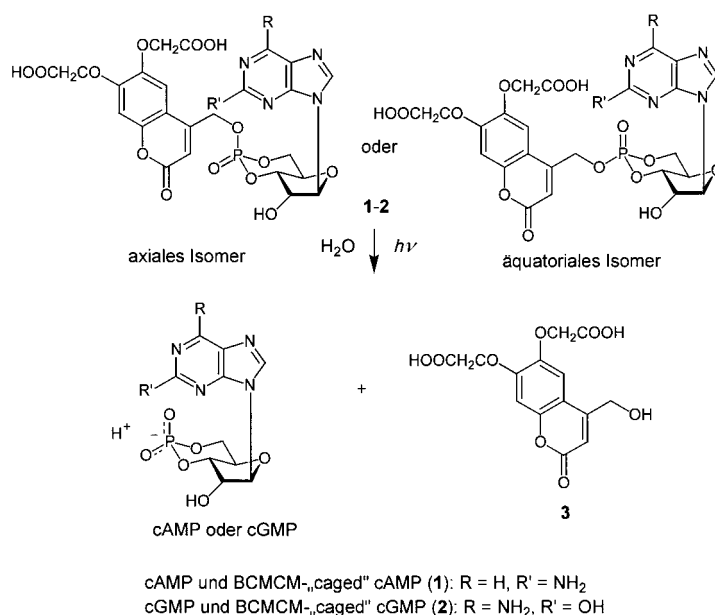
Die Verwendung von photoaktivierbaren („caged“) Verbindungen gilt als elegante Methode zur Erzeugung schneller Konzentrationssprünge von Biomolekülen innerhalb einer Zelle.^[1] Diese Verbindungen sind photolabile inaktive Derivate von biologisch aktiven Molekülen; die biologisch aktive Substanz kann mit Hilfe einer photochemischen Reaktion schnell freigesetzt werden. Mit den inaktivierten Verbindungen wird die zeit- und raum aufgelöste Analyse komplexer biologischer Vorgänge möglich.

[*] Dr. V. Hagen, Dr. D. Lorenz, Dr. B. Wiesner
Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49)30-94793-159
E-mail: hagen@fmp-berlin.de
Priv.-Doz. Dr. S. Frings, Prof. Dr. U. B. Kaupp
Institut für Biologische Informationsverarbeitung,
Forschungszentrum Jülich (Deutschland)
Doz. Dr. J. Bendig
Institut für Chemie
Humboldt-Universität Berlin (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken B. Dekowski und Dr. S. Helm für ihre technische Unterstützung.

Für viele Anwendungen wäre es äußerst nützlich zu wissen, wie viel von der inaktivierten Verbindung innerhalb der Zelle photolysiert wird. Bisher gelang dies in wenigen Fällen nur über relativ aufwendige Messungen der biologischen Wirkung. Wir zeigen hier am Beispiel der axialen und äquatorialen Diastereomere der [6,7-Bis(carboxymethoxy)cumarin-4-yl]methyl(BCMCM)-Ester von cyclischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) **1** und cyclischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) **2**,^[2] die ausgezeichnete Phototrigger für cyclische Nucleotide darstellen, dass dies auf einfache Weise durch Fluoreszenzmessungen möglich ist.

1 und **2** bilden bei der Bestrahlung mit UV-Licht in wässrigen Pufferlösungen und innerhalb von Zellen sehr schnell – binnen 2–5 Nanosekunden^[3] – cAMP oder cGMP und 6,7-Bis(carboxymethoxy)-4-(hydroxymethyl)cumarin (**3**, BCMCM-OH) (Schema 1). Die Photolyse verläuft kinetisch einheitlich mit Quantenausbeuten von 0.08 bis 0.14^[2] und pro Molekül **3** entsteht 1 Molekül cAMP oder cGMP.



Schema 1. Photolyse von **1** und **2**.

1 und **2** zeigen nur geringe Fluoreszenzquantenausbeuten, während der Alkohol **3** stark fluoresziert (Tabelle 1, vgl. auch Abbildung 1a). Bei der Photolyse beobachtet man daher einen drastischen (in Pufferlösungen ca. 40 bis 50-fachen) Fluoreszenzanstieg (Abbildung 1b). In HEPES-Pufferlösun-

Tabelle 1. Fluoreszenzmaxima $\lambda_{\text{f}}^{\text{max}}$, Fluoreszenzquantenausbeuten φ_{f} und Fluoreszenzlebensdauern τ_{f} der BCMCM-„caged“ cAMPs und cGMPs **1–2** sowie von **3** in HEPES-KOH-Puffer, pH 7.2; $\lambda_{\text{exc}} = 333 \text{ nm}$.

Verbindung	$\lambda_{\text{f}}^{\text{max}}$ [nm]	$\varphi_{\text{f}}^{\text{[a]}}$	τ_{f} [ns]
1 (axial)	440	0.015	n.g.
1 (äquatorial)	439	0.016	< 0.2
2 (axial)	436	0.012	n.g.
2 (äquatorial)	441	0.014	< 0.2
3	431	0.62	3.18

[a] Fehlergrenzen ± 0.002 (**1,2**) bzw. ± 0.01 (**3**); n.g. = nicht gemessen.

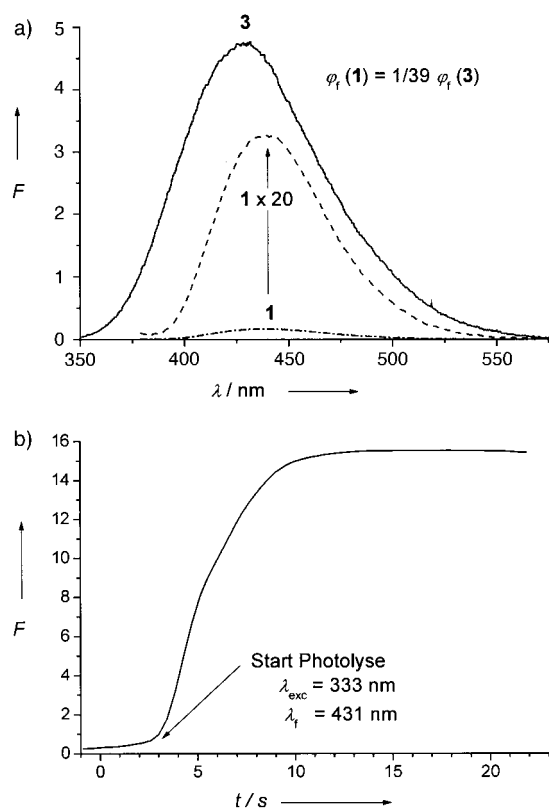


Abbildung 1. a) Fluoreszenzspektren von 50 µM Lösungen des äquatorialen Isomers von **1** und von **3**, F = relative Fluoreszenzintensität; b) Erhöhung der Fluoreszenzintensität einer 50 µM Lösung des äquatorialen Isomers von **1** als Funktion der Bestrahlungszeit, Lösungen in HEPES-KOH-Puffer, pH 7.2.

gen (HEPES = 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure) ergibt sich für alle cyclischen Nucleotide, die BCMCM-„caged“ sind, eine lineare Beziehung zwischen der Fluoreszenzintensität und dem Photolysegrad. Abbildung 2 zeigt dies am Beispiel der äquatorialen Isomere von **1** und **2**, d. h., die Konzentrationsbestimmung des freigesetzten **3** und damit auch die von cAMP oder cGMP ist unter diesen Bedingungen möglich.

Das Fluoreszenzverhalten von **1**, **2** und **3** in Zellen ist ähnlich dem der entsprechenden Substanz in wässrigen Lösungen, d. h. **3**, das mit einer Pipette in HEK293-Zellen eingeschleust wurde, fluoresziert stark (Abbildung 3a), im Unterschied zu 7-Methoxy-^[4] und auch 6,7-Dimethoxy-4-(hydroxymethyl)cumarin (DMCM-OH),^[5] deren Fluoreszenz in HEK293-Zellen vollständig gelöscht wird.^[6] Offenbar verhindern die hydrophilen Carboxymethoxy-Reste in **3** die Löschung der Fluoreszenz des lipophilen Cumarinchromophors durch Zellinhaltsstoffe. Die intrazelluläre Blitzlicht-photolyse von BCMCM-„caged“ cyclischen Nucleotiden führt deshalb, wie in Abbildung 3b am Beispiel von **1** gezeigt, zu einem konzentrationsabhängigen Fluoreszenzanstieg. Die aus der lichtinduzierten Zunahme der Fluoreszenz ermittelte Konzentration an **3** und damit an cAMP steigt nahezu linear mit der Konzentration des eingesetzten **1** an (Abbildung 3c).

Abbildung 4a demonstriert die lichtinduzierte Zunahme der intrazellulären Fluoreszenzintensität von **1** und des

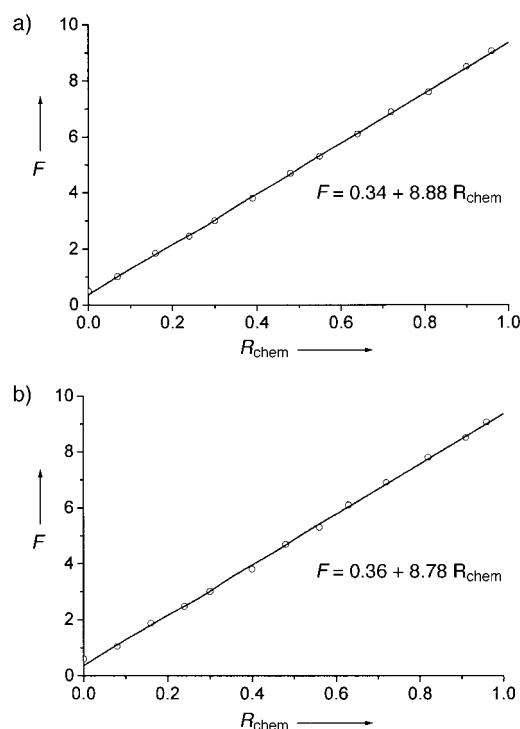


Abbildung 2. Korrelation zwischen dem Anstieg der relativen Fluoreszenz und dem Photolysegrad (R_{chem}) für 50 µM Lösungen der äquatorialen Isomere von **1** (a) und **2** (b) in HEPES-KOH-Puffer, pH 7.2.

cAMP-induzierten Stroms in HEK293-Zellen, die cAMP-gesteuerte Kanäle (CNGA2) aus Riechzellen exprimieren. Mit jedem Blitz steigen Fluoreszenz und Strom deutlich an. Die freigesetzte Menge an **3**, die der freigesetzten Menge an cAMP entspricht, lässt sich aus der Fluoreszenzänderung berechnen (Abbildung 3). Sie stimmt sehr gut mit der freigesetzten cAMP-Menge überein,^[7] die unabhängig aus der Kanalaktivierung ermittelt wurde (Abbildung 4b). Gleiches gilt auch für die cGMP-Photofreisetzung aus **2** und die Freisetzung von 8-substituierten cyclischen Nucleotiden aus entsprechenden BCMCM-inaktivierten Verbindungen.

Die Versuche zeigen, dass mit BCMCM-inaktivierten cyclischen Nucleotiden prinzipiell über Fluoreszenzmessungen die Freisetzung des cyclischen Nucleotids innerhalb von Zellen gesteuert und quantitativ verfolgt werden kann. Die Übertragbarkeit auf andere BCMCM-inaktivierten Verbindungen, deren Fluoreszenz sich gleichfalls deutlich von der ihrer Photolyseprodukte unterscheidet, ist möglich.

Die Methode erlaubt zum erstenmal, quantitative Dosis-Wirkungs-Beziehungen für zelluläre Reaktionen aufzustellen, die von cyclischen Nucleotiden gesteuert werden. Kürzlich wurde berichtet, dass sich Adenylylcyclasen, die cAMP synthetisieren, und cAMP-gesteuerte Ionenkanäle in einem Subkompartiment der Zelle befinden; der Diffusionsaustausch von cAMP zwischen diesem Subkompartiment und dem Cytoplasma der Zelle scheint behindert zu sein.^[8] Wir konnten keinen Unterschied feststellen zwischen der zellulären cAMP-Konzentration, die durch das Fluoreszenzsignal angezeigt wird und der „lokalen“ cAMP-Konzentration in unmittelbarer Nähe des CNGA2-Kanals. Das hier vorgestellte Verfahren ermöglicht es, die Hypothese von Subkomparti-

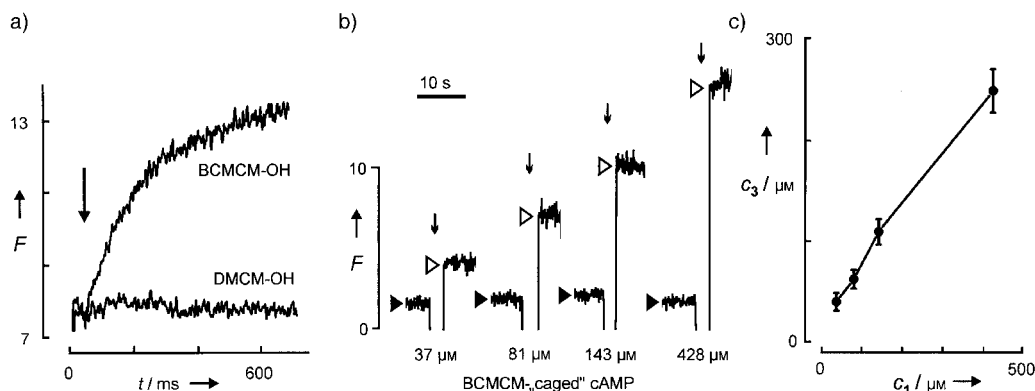


Abbildung 3. Messung der photolytisch freigesetzten Konzentration von **3** in HEK293-Zellen. a) Darstellung der Beladung einer HEK293-Zelle durch die Patch-Pipette mit $100\ \mu\text{M}$ **3** (DMCM-OH) anhand der Messung der Fluoreszenzintensität (Anregung: $340\ \text{nm}$, Emission: $>420\ \text{nm}$, Skalierung in counts ms^{-1}). b) Bestimmung der Konzentration von **3** nach Photolyse von **1** in vier HEK293-Zellen, die mit der jeweils angegebenen Konzentration von **1** sowie mit $35\ \mu\text{M}$ **3** zur internen Eichung der Fluoreszenz geladen wurden. Die Eichfluoreszenz F_C (geschlossene Pfeilspitzen) wurde nach Subtraktion des Hintergrundlichtes ermittelt. Nach Belichtung (Pfeile, $t = 2\ \text{s}$, $\lambda = 365\ \text{nm}$) steigt die Fluoreszenz auf den Wert F_1 (offene Pfeilspitzen). Die daraus berechnete Konzentration von photolytisch freigesetztem **3** [$c = (F_1 - F_C)/F_C \cdot 35\ \mu\text{M}$] ergab jeweils $49\ \mu\text{M}$, $96\ \mu\text{M}$, $148\ \mu\text{M}$ und $271\ \mu\text{M}$. c) Intrazellulär photolytisch freigesetzte Konzentration von **3** aufgetragen gegen die Konzentration von eingesetztem **1** (Belichtungszeit: $2\ \text{s}$, $\lambda = 365\ \text{nm}$); Mittelwerte (\pm SA) von 5 Zellen pro Konzentration. c_1 = Konzentration von **1**, c_3 = Konzentration an freigesetztem **3**.

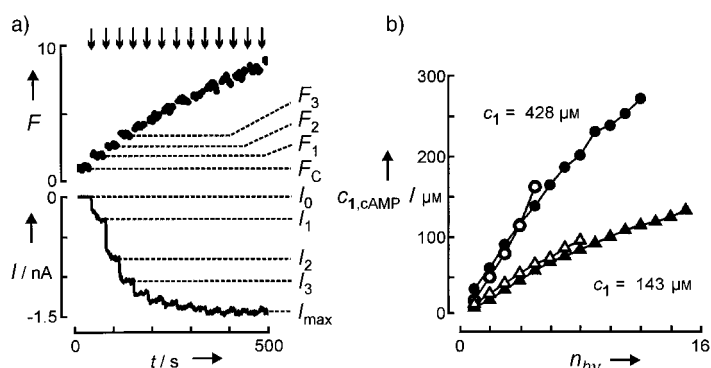


Abbildung 4. Messung der photolytischen Freisetzung von **3** und von cAMP aus **1**. a) Eine HEK293-Zelle, die CNGA2-Kanäle exprimiert, wurde mit $428\ \mu\text{M}$ **1** sowie $35\ \mu\text{M}$ **3** zur internen Fluoreszenzeichnung beladen. Die Fluoreszenzregistrierung (oben) zeigt die Freisetzung von **3** während einer Serie von UV-Blitzen ($t = 20\ \text{ms}$, $\lambda = 365\ \text{nm}$). Die Stromregistrierung (unten) zeigt die Aktivierung der CNGA2-Kanäle durch das photolytisch freigesetzte cAMP. Fluoreszenz- und Stromwerte können zur Berechnung der Freisetzung verwendet werden. b) Berechnung der Freisetzung von **3** mit Hilfe der Fluoreszenzänderung und der Freisetzung von cAMP mit der Hill-Gleichung aus dem relativen Strom $I_{\text{rel}} = I/I_{\text{max}}$.^[9] Die Ergebnisse der Quantifizierung der Photolyse aus Fluoreszenz- (geschlossene Dreiecke, geschlossene Kreise) und Stromwerten (offene Dreiecke, offene Kreise) stimmen gut überein. Die Stromkurve kann nur bis zur maximalen Aktivierung der Kanäle bei ca. $150\ \mu\text{M}$ cAMP angewendet werden, die Fluoreszenzeichnung dagegen auch bei höheren Konzentrationen. I = Strom; n = Anzahl der Blitze; c = Konzentration freigesetztes cAMP.

menten, in denen die Diffusion von zellulären Botenstoffen eingeschränkt ist, experimentell zu überprüfen.

Eingegangen am 10. April 2002 [Z19070]

- [1] A. M. Gurney, H. A. Lester, *Physiol. Rev.* **1987**, *67*, 583–617; „Photochemical Probes in Biochemistry“: J. F. Wootton, D. R. Trentham, *NATO ASI Ser. C* **1989**, *272*, 277–296; 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; J. E. T. Corrie, D. R. Trentham, *Bioorganic*

Photochemistry: Biological Applications of Photochemical Switches, Wiley, Chichester, **1993**, S. 243–305; G. P. Hess, *Biochemistry* **1993**, *32*, 989–1000; Ed. G. Marriott, *Methods Enzymol.* **1998**, *291*.

- [2] V. Hagen, J. Bendig, S. Frings, T. Eckardt, S. Helm, D. Reuter, U. B. Kaupp, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1078–1080; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1046–1048.
[3] J. Bendig, S. Helm, R. Schmidt, C. Schweitzer, V. Hagen, *J. Phys. Chem.*, in Vorbereitung.
[4] J. M. Sehgal, T. R. Seshadri, *J. Sci. Ind. Res.* **1953**, *12B*, 346–349.
[5] T. Eckardt, V. Hagen, B. Schade, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 703–710.
[6] V. Hagen, J. Bendig, S. Frings, B. Wiesner, B. Schade, S. Helm, D. Lorenz, U. B. Kaupp, *J. Photochem. Photobiol. B* **1999**, *42*, 91–102.
[7] V. Hagen, C. Dzeja, S. Frings, J. Bendig, E. Krause, U. B. Kaupp, *Biochemistry* **1996**, *35*, 7762–7771.
[8] T. R. Rich, K. A. Fagan, H. Nakata, J. Schaack, D. M. F. Cooper, J. W. Karpen, *J. Gen. Physiol.* **2000**, *116*, 147–161.
[9] Hill-Gleichung: I_{max} ist der Strom bei maximaler Kanalaktivierung, $K_{1/2}$

$$c_{\text{cAMP}} = K_{1/2} \cdot n \sqrt{\frac{I_{\text{rel}}}{1 - I_{\text{rel}}}}$$

die cAMP-Konzentration für die halb-maximale Kanalaktivierung ($45\ \mu\text{M}$) und n der Hill-Koeffizient (1.8), W. Bönigk, J. Bradley, F. Sesti, F. Müller, I. Boekhoff, G. V. Ronnett, U. B. Kaupp, S. Frings, *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 5332–5347.