

## Photoaktivierbare Verbindungen

**(Cumarin-4-yl)methylester als hocheffiziente und ultraschnelle Phototrigger für Protonen und ihre Anwendung zur Oberflächenansäuerung von Membranen\*\***

Daniel Geißler, Yuri N. Antonenko, Reinhard Schmidt,  
Sandro Keller, Oxana O. Krylova, Burkhard Wiesner,  
Jürgen Bendig, Peter Pohl und Volker Hagen\*

Protonen spielen eine Schlüsselrolle bei der zellulären Signaltransduktion. Sie lösen Konformationsänderungen bei Proteinen aus, sind kuppelnde Zwischenprodukte bei der Phosphorylierung, und ihre transmembranalen Gradienten können als Energiequellen oder -speicher fungieren. Kinetische Untersuchungen all dieser Prozesse werden durch photoaktivierbare Vorstufen von Protonen erleichtert, mit deren Hilfe schnelle pH-Sprünge erreicht werden können. Diese maskierten („caged“) Protonen ermöglichen die Steuerung der räumlichen und zeitlichen pH-Verteilung ohne diffusionsbedingte Verzögerungen.<sup>[1,2]</sup> Die meisten maskierten Protonen sind Nitrobenzyldeivate wie 2-Nitrobenzaldehyde<sup>[3–5]</sup> sowie 2-Nitrobenzyl- und/oder 1-(2-Nitrophe-nyl)ethylacetate,<sup>[1]</sup> -phosphate,<sup>[6–8]</sup> -tosylate<sup>[9,10]</sup> und -sulfate.<sup>[7,11]</sup> Ihre Anwendung wird jedoch durch ihre geringe Effizienz bei Anregung im langwelligen UV/Vis-Bereich und die Entstehung reaktiver *o*-Nitrosocarbonyl-Photopro-dukte begrenzt.

Wir führen hier mit (6,7-Dimethoxycumarin-4-yl)methyl(DMCM)-Diethylphosphat (**1**), DMCM-Methansulfonat (**2**), Natrium-DMCM-Sulfat (**3**) sowie [7-(Dimethylamino)cumarin-4-yl]methyl(DMACM)-Diethylphosphat (**4**), DMA- CM-Methansulfonat (**5**) und Natrium-DMACM-Sulfat (**6**)

[\*] D. Geißler, S. Keller, Dr. O. O. Krylova, Dr. B. Wiesner,  
Prof. Dr. P. Pohl,<sup>[†]</sup> Dr. V. Hagen  
Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie  
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)  
Fax: (+49) 30-94793-159  
E-mail: hagen@fmp-berlin.de  
Prof. Dr. Y. N. Antonenko  
A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology  
Moscow State University (Russland)  
Prof. Dr. R. Schmidt  
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main (Deutschland)  
Prof. Dr. J. Bendig  
Institut für Chemie  
Humboldt-Universität zu Berlin (Deutschland)

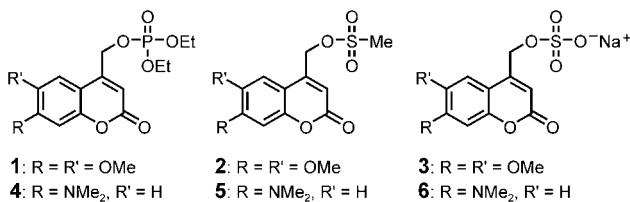
[†] Derzeitige Adresse: Institut für Biophysik  
Johannes Kepler Universität Linz (Österreich)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken B. Gentsch für ihre technische Unterstützung und Dr. E. Krause für die Aufnahme der Massenspektren.



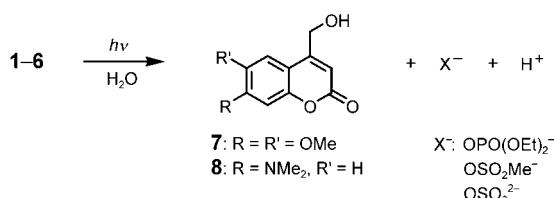
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

eine neue Klasse von maskierten Protonen ein, die die Untersuchung protonenabhängiger biologischer Prozesse ermöglicht (Schema 1). **1** ist z. B. bereits zur Untersuchung der H<sup>+</sup>-Migration entlang von Lipidmembranen verwendet worden.<sup>[12]</sup>



**Schema 1.** Strukturen der Phototrigger 1–6.

Die Photospaltung von **1–6** verläuft effizient und sauber; sie führt zur Freisetzung von  $\text{H}^+$ , dem entsprechenden Säureanion und dem stark fluoreszierenden **7** oder **8** (Schema 2). Die Ester selbst fluoreszieren nur sehr schwach,



**Schema 2.** Photolyse von 1–6

ersichtlich an ihren besonders kleinen Fluoreszenzquantenausbeuten (Tabelle 1). Die DMCM- und die DMACM-Chromophore wurden für die photoreversible Inaktivierung cycli-

**Tabelle 1:** Eigenschaften von 1–6.<sup>[a]</sup>

Photo-trigger	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ [nm]	$\varepsilon^{\text{max}}$ [ $\text{M}^{-1}$ cm $^{-1}$ ]	$\varphi$	$\lambda_{\text{f}}^{\text{max}}$ [nm]	$\varphi_{\text{f}}$	$c_{\text{S}}$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>1<sup>[b]</sup></b>	346	11 400	0.08	447	0.005	> 10 000
<b>2<sup>[c]</sup></b>	348	10 700	0.23	437	0.002	40 <sup>[b]</sup>
<b>3<sup>[d]</sup></b>	345	11 000	0.09	445	0.007	> 10 000
<b>4<sup>[b]</sup></b>	386	16 100	0.36	497	0.006	3700
<b>5<sup>[c]</sup></b>	388	17 100	0.79	487	0.002	100 <sup>[b]</sup>
<b>6<sup>[d]</sup></b>	382	14 700	0.46	506	0.008	> 10 000

[a] Langwelligste Absorptionsmaxima  $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ , Extinktionskoeffizienten  $\epsilon^{\text{max}}$ , photochemische Quantenausbeuten  $\varphi$ , Fluoreszenzmaxima  $\lambda_{\text{f}}^{\text{max}}$ , Fluoreszenzquantenausbeuten  $\varphi_f$  und Sättigungskonzentrationen  $c_s$ . [b] In Acetonitril/HEPES (5:95); pH 7.2. [c] In Acetonitril/HEPES (20:80); pH 7.2. [d] In HEPES; pH 7.2.

scher Nucleosidmonophosphate eingeführt.<sup>[13,14]</sup> Die Analoga (7-Methoxycumarin-4-yl)methyl(MCM)-Diethylphosphat und MCM-Methansulfonat wurden schon früher beschrieben,<sup>[15,16]</sup> aber nicht als Phototrigger für Protonen klassifiziert oder eingesetzt.

Die Verbindungen **1**, **2**, **4** und **5** wurden durch Veresterung der Alkohole **7** oder **8** mit Diethylphosphorsäurechlorid bzw. Methansulfonylchlorid bei 0°C in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in Gegenwart von

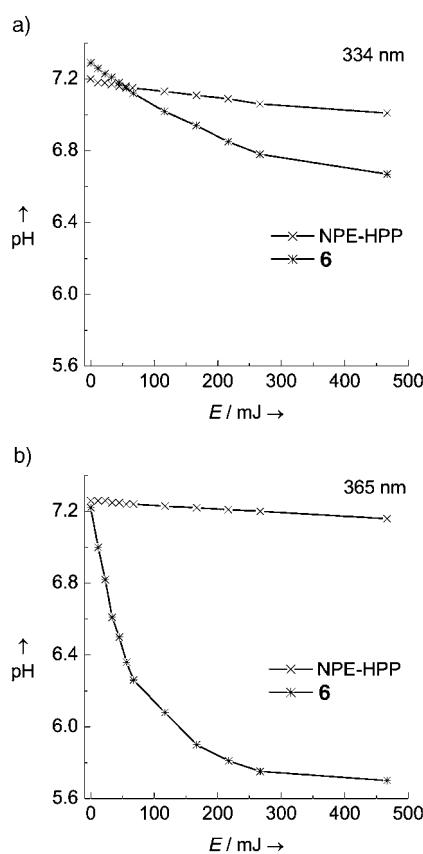
Pyridin oder Triethylamin in Ausbeuten von 53–68 % synthetisiert. Die photoaktivierbaren Sulfate **3** und **6** wurden nach einem Verfahren von Tserng und Klein<sup>[17,11]</sup> durch Umsetzen von **7** oder **8** mit dem Triethylamin-SO<sub>3</sub>-Komplex in Dimethylformamid hergestellt. Die Ausbeuten betragen 77 % für **3** und 16 % für **6** (für präparative Details hierzu sowie die analytische Charakterisierung siehe Hintergrundinformationen).

Die langwelligsten Absorptionsmaxima der DMACM-Ester **4–6** sind gegenüber denen der DMCM-Derivate **1–3**, die bei ca. 346 nm liegen, intensiver und um etwa 40 nm rotverschoben. Dies ergibt einen optimalen Wellenlängenbereich von 330–365 nm für die Photolyse der DMCM-Ester und von 365–420 nm für die Photolyse der DMACM-Ester. Es wird angenommen, dass die Photospaltung analog zu der photochemischen Umwandlung der MCM-Ester<sup>[16]</sup> nach einem S<sub>N</sub>1-Mechanismus aus dem angeregten Singulett-Zustand heraus über eine Ionenpaarbildung, anschließende Ionenpaartrennung und nachfolgende Hydroxylierung erfolgt. Demzufolge sollten die Reaktionsquantenausbeuten sowohl mit der Elektronendonatorstärke der Substituenten in 7-Position am Cumarinchromophor (Stabilisierung der carbokationischen Cumaryl methyl-Zwischenstufe) als auch mit der Austrittsfähigkeit der Abgangsgruppen korrelieren – die Erwartung war daher, dass die Reaktionsquantenausbeuten für die DMACM-Ester höher als für die DMCM-Ester sein und in der Reihenfolge Diethylphosphate ≈ Sulfate < Methansulfonate ansteigen würden. Diese Vorhersagen wurden durch die gemessenen photochemischen Quantenausbeuten ( $\varphi$ ) für die photolytische Freisetzung der Protonen bestätigt (Tabelle 1).

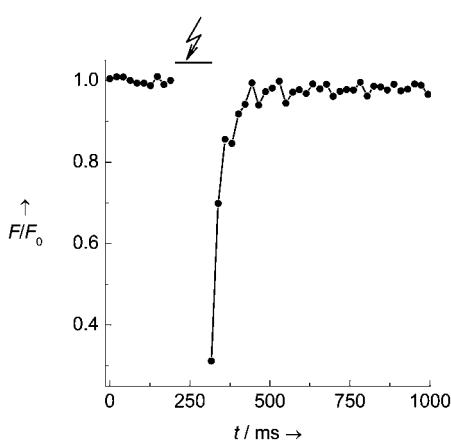
Die hohe Quantenausbeute von **5** ist für photoaktivierbare Verbindungen mit Cumarinylmethyl-Chromophor einzigartig. In Kombination mit dem großen Extinktionskoeffizienten ergibt sich eine beispiellos hohe Photoempfindlichkeit. Das Ergebnis des Produktes aus  $\varphi$  und dem molaren Extinktionskoeffizienten ( $\varepsilon$ ) als Kriterium für die Photoempfindlichkeit der Abspaltungsreaktion<sup>[1]</sup> bestätigt, dass die photoaktivierbaren DMACM-maskierten Protonen **4–6** die empfindlichsten bisher beschriebenen Phototrigger sind: Die  $\varphi\varepsilon^{\max}$ -Werte von 900–2400 M<sup>−1</sup> cm<sup>−1</sup> für **1–3** und von 5800–13 500 M<sup>−1</sup> cm<sup>−1</sup> für **4–6** sind außerordentlich hoch. Zur Verdeutlichung der exzellenten photochemischen Eigenschaften der photoaktivierbaren Cumarinylmethylester wurde die H<sup>+</sup>-Freisetzung aus **6** mit der aus dem kommerziell verfügbaren NPE-HPP (2-(Hydroxyphenyl)-[1-(2-nitrophenyl)ethyl]-phosphat) verglichen (Abbildung 1).

Die Belichtung von **1** und **6** bei 728 bzw. 750 nm mit Femtosekunden-Pulsen eines modengekoppelten Ti:Saphir-Lasers rief eine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität von Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-Dextran hervor, was zeigt, dass die Photospaltung auch bei Zweiphotonenanregung möglich ist (Abbildung 2). Eine effiziente Zweiphotonenphotolyse wurde vor einiger Zeit auch für photoaktivierte (6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl-Verbindungen beschrieben.<sup>[18]</sup>

2-Nitrobenzyllderivate als Phototrigger für Protonen ermöglichen die Freisetzung von  $H^+$  mit Geschwindigkeitskonstanten von  $2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$  in nichtgepufferten und mehr als



**Abbildung 1.** Vergleich der Effizienz der photolytischen  $\text{H}^+$ -Freisetzung aus **6** ( $25 \mu\text{M}$ ) und aus NPE-HPP ( $25 \mu\text{M}$ ) in wässriger Lösung (pH 7.2; Reaktionsvolumen:  $2.8 \text{ mL}$ ; a) bei  $334 \text{ nm}$ ; b) bei  $365 \text{ nm}$ .  $E$  = Bestrahlungsenergie.



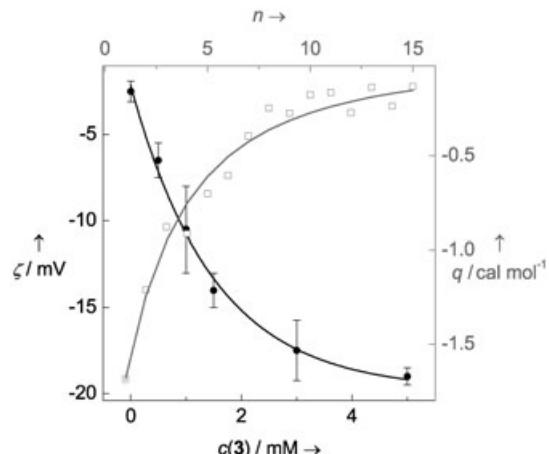
**Abbildung 2.** Photofreisetzung von  $\text{H}^+$  aus **6** nach Zweiphotonenanregung.  $500 \mu\text{M}$  **6** wurden mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzindikator FITC-Dextran ( $750 \text{ nm}$ ) in CAPSO-Pufferlösung (pH 9.0) gemischt und anschließend  $106 \text{ ms}$  bestrahlt (schwarzer Balken; CAPSO = 3-(Cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propansulfonsäure-Natriumsalz). Die Fluoreszenzintensität  $F$  des FITC-Dextrans wurde vor und nach der Belichtung aufgezeichnet. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität auf ihren Anfangswert  $F_0$  ist auf die Wegdiffusion der Protonen zurückzuführen.  $F/F_0$  = relative Fluoreszenzintensität.

$4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$  in gepufferten Lösungen.<sup>[19]</sup> Der Mechanismus der photolytischen Spaltung der Cumarylmethylester lässt darauf schließen, dass mit ihnen signifikant höhere Bildungsgeschwindigkeiten erreicht werden. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden zeitaufgelöste, energieabhängige Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Die Dekonvolution der experimentellen Zerfallskurven, die nach Einzelimpulsanregungen (0.5 ns Halbwertsbreite) von **1**, **3**, **4** und **6** mit hoher Laserintensität aufgenommen wurden, zeigte Fluoreszenzbeiträge der zugehörigen Cumarylalkohole **7** und **8** zum Gesamtignal. Da sowohl **7** als auch **8** innerhalb der Dauer der Anregungsimpulse gebildet wurden, muss die photolytische  $\text{H}^+$ -Freisetzung mit Geschwindigkeitskonstanten von mindestens  $5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$  erfolgen, d.h.,  $\text{H}^+$  wird innerhalb von zwei Nanosekunden oder sogar noch schneller gebildet.

Die  $pK_S$ -Werte der entsprechenden Säuren des Sulfat- (1.98),<sup>[20]</sup> Diethylphosphat- (0.71)<sup>[21]</sup> oder Methansulfonat-Anions (-1.54)<sup>[22]</sup> implizieren, dass **1–3** in wässrigen Lösungen bis zu ca. pH 2 bzw. pH 1 wirksame  $\text{H}^+$ -Quellen sind. Im Fall der maskierten Protonen **4–6** ist die pH-Abnahme durch die Photolyse wegen der Pufferwirkung der Dimethylaminogruppen in **4–6** oder im freigesetzten Alkohol **8** ( $pK_S = 2.0$ ) etwas verringert, allerdings nicht merklich, solange der pH-Wert höher als 2 ist. Demzufolge lassen sich mit allen vorgestellten Verbindungen große pH-Sprünge erreichen; z.B. sank der pH-Wert einer  $200 \mu\text{M}$  wässrigen Lösung von **6** nach der Photolyse von pH 7 auf pH 4 (Daten nicht gezeigt).

Trotz ihrer ausgezeichneten Photocharakteristika sind **2** und **5** weniger nützliche Phototrigger für Protonen, weil die Halbwertszeit ihrer Hydrolyse in wässrigen Pufferlösungen (pH 7.2,  $25^\circ\text{C}$ ) lediglich 26.8 bzw. 28.6 h beträgt. Im Unterschied dazu werden **1**, **3**, **4** und **6** HPLC-Untersuchungen zufolge in HEPES-Pufferlösungen (pH 7.2,  $25^\circ\text{C}$ ) innerhalb von 24 h zu weniger als 0.5 % hydrolysiert (HEPES = 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure). Die Anwendung von **3** und **6** (sehr gute Löslichkeit in HEPES-Puffer; Tabelle 1) sowie von **1** und **4** (akzeptable Löslichkeit in Acetonitril/HEPES 5:95; Tabelle 1) scheint daher für biophysikalische Untersuchungen am vielversprechendsten.

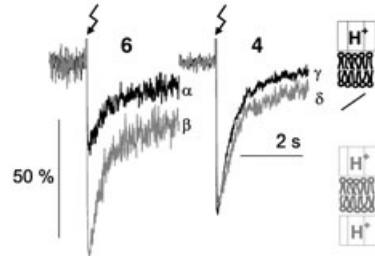
Durch isotherme Titrationskalorimetrie konnte nachgewiesen werden, dass die Phototrigger **1**, **3**, **4** und **6** an Membranen adsorbieren (Details siehe Hintergrundinformationen). Abbildung 3 zeigt die Verdünnungswärme-korrigierten Messdaten von **1**, aus denen die Adsorptionskonstante<sup>[23]</sup> ermittelt wurde. Für **1** und **4** beträgt  $K = 300 \pm 150 \text{ M}^{-1}$ , die beiden ionischen Spezies **3** und **6** binden mit  $K = 100 \pm 50 \text{ M}^{-1}$  etwas schwächer. Die kalorimetrischen Daten sind im Einklang mit elektrophoretischen Mobilitätsmessungen, die annähernd die gleichen Adsorptionskonstanten lieferten (Abbildung 3). Die durch die Adsorption von **3** hervorgerufene negative Aufladung der ansonsten neutralen Diphytanoyl-phosphatidylcholin(DPhPC)-Vesikel wurde elektrophoretisch verfolgt und zur Berechnung des elektrischen Potentials ( $\zeta$ ) an der Scherebene der Vesikel herangezogen.<sup>[24,25]</sup> Mit zunehmender Konzentration von **3** näherte sich das  $\zeta$ -Potential asymptotisch an -20 mV an (in 20 mM NaCl). Demnach umfasst die Bindungsstelle für ein Molekül **3** mindestens 20 Lipidmoleküle.



**Abbildung 3.** Adsorption der Phototrigger für Protonen an Membranoberflächen. Durch Titration von **1** ( $20 \mu\text{M}$ ) in CAPSO-Pufferlösung (10 mM CAPSO; 100 mM NaCl; pH 9.0; 25 °C) mit 20  $\mu\text{L}$ -Aliquots DPhPC (40 mM) wurde die Reaktionswärme  $q$  (Quadrat) gemessen, die dann bezüglich der molaren Injektionsmenge normiert und gegen die Zahl der Injektionen  $n$  aufgetragen wurde. Die beste Anpassung (graue Linie) ergab  $\Delta H \approx -1$ ,  $\Delta G^0 \approx -6$ ,  $\Delta S^0 \approx 0.016 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ . **3** und **6** (nicht gezeigt):  $\Delta H \approx -2$ ,  $\Delta G^0 \approx -5$  und  $\Delta S^0 \approx 0.010 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ . Die Adsorption von **3** erhöhte die elektrophoretische Mobilität (bestimmt mit einem Partikelektrophorese-Gerät, Modell DELSA 440 SX, Coulter Electronics, USA) von großen unilamellaren DPhPC-Vesikeln (suspendiert in HEPES-Pufferlösung: 10 mM HEPES; 20 mM NaCl; pH 7.1; 23 °C), die zur Berechnung ihres  $\zeta$ -Potentials (Kreise mit Standardabweichungen) verwendet wurden.

Protonenfreisetzung aus membranadsorbierten Cumarylmethylderivaten ist ein ausgezeichnetes Mittel zur Untersuchung der Kinetik von  $\text{H}^+$ -sensitiven Membrananälen oder anderer Prozesse, die an der Membran-Wasser-Phasengrenze stattfinden, z.B. der Protonenwanderung entlang der Membranoberfläche.<sup>[12]</sup> Um die Oberflächenansäuerung von Membranen zu quantifizieren, wurden ebene Lipiddoppelschichten, die fluoresceinmarkierte Lipide enthielten, mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop untersucht.<sup>[12]</sup> Nach Blitzlichtexposition der Membran wurde die Antwort des pH-sensitiven Fluoreszenzindikators (*N*-(Fluorescein-5-thiocarbamoyl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin) verfolgt; sie entstammt nur einer Monoschicht für membranimpermeable und beiden Monoschichten für membranpermeable photoaktivierbare  $\text{H}^+$ -Vorstufen.

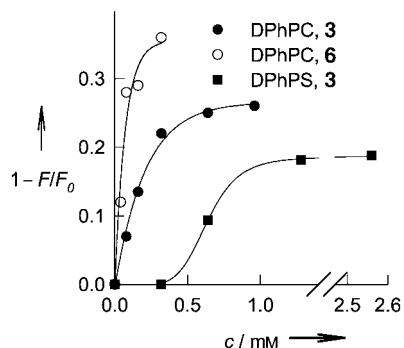
Die Membrandiffusion geladener Verbindungen ist mit einer hohen Energiebarriere verbunden, weshalb die Photolyse von **6** einen auf nur eine Seite der Membran beschränkten Fluoreszenzabfall verursachte (Abbildung 4α). Durch die anschließende Diffusion der Protonen aus dem belichteten Bereich stieg die Fluoreszenz wieder auf ihren Ausgangswert. Die Zugabe von **6** zur wässrigen Lösung auf beiden Seiten der Membran verdoppelte die Fluoreszenzabnahme, da beide Phasengrenzflächen angesäuert wurden (Abbildung 4β). Anders als die geladenen Verbindungen **3** und **6** sollten die hydrophoben Diethylphosphate **1** und **4** membranpermeabel sein. In Übereinstimmung damit induzierte die UV-Belichtung von **4** dieselbe pH-Herabsetzung unabhängig davon, ob **4** in ein Kompartiment oder in beide Kompartimente gegeben



**Abbildung 4.** Asymmetrie der  $\text{H}^+$ -Freisetzung nach Blitzlichtphotolyse. Die Zugabe von **6** (α) und von **4** (γ) ausschließlich in das Kompartiment oberhalb der Membran induzierte nach Bestrahlung einen schnellen Abfall der Fluoreszenz (von  $F_0$  auf  $F$ ) des Fluoreszenzindikators. Anders als bei **4** (δ) verdoppelten sich bei **6** die Fluoreszenzabnahme (β) bei Zugabe auf beiden Membranseiten. Nach jeder  $\text{H}^+$ -Freisetzung stieg die Fluoreszenz wieder auf den Ausgangswert an, zurückzuführen auf die Pufferwirkung des Mediums (0.1 mM CAPSO; 100 mM NaCl; pH 9.0) und Diffusion. Die Membranen wurden aus einer Mischung von DPhPC mit dem Fluoreszenzindikator (Massenverhältnis 95:5) in *n*-Decan hergestellt. Die Fluoreszenz wurde von der zentralen Membranregion, in der die  $\text{H}^+$ -Freisetzung durch einen UV-Blitz erfolgte, aufgezeichnet.

wurde (Abbildung 4γ, δ). Im Unterschied zu **4** kann das membranimpermeable **6** also zur Generierung von transmembranalen pH-Gradienten genutzt werden.

Die Experimente in Abbildung 4 implizieren, dass die in wässriger Lösung befindlichen Phototrigger nur in vernachlässigbarem Ausmaß zur Ansäuerung der Membranoberfläche beitragen. Diese Hypothese wird dadurch bestätigt, dass die mit **3** erzielbare pH-Änderung nicht beobachtet wurde, wenn dessen Konzentration  $c_i$  an der Membran von ca. 0.3 auf ca. 0.04 mM gesenkt wurde, während die Konzentration in der wässrigen Phase (0.3 mM) konstant blieb. Für dieses Experiment wurde eine geladene Membran generiert, die zu 50 Mol-% das negativ geladene Lipid Diphytanoyl-phosphati-



**Abbildung 5.** Die Erhöhung der  $\text{H}^+$ -Konzentration an der Oberfläche der Doppelschicht wird ausschließlich durch die Photolyse der Phototrigger hervorgerufen, die an die Membran gebunden sind. Die durch die Photolyse von **3** bedingte relative Fluoreszenzabnahme ist an negativ geladenen DPhPS-Doppelschichten (Quadrate) geringer als an neutralen DPhPC-Membranen (Kreise), zurückzuführen auf die elektrostatische Abstoßung der negativ geladenen Verbindung **3** (gefüllte Symbole). Wegen der höheren Quantenausbeute wird der pH-Wert durch Photolyse von **6** (nichtgefüllte Symbole) stärker als durch Photolyse von **3** abgesenkt. Für experimentelle Bedingungen und Definition von  $F$  und  $F_0$  siehe Abbildung 4.

dylserin (DPHPS) enthielt. Zur Kompensation des negativen Oberflächenpotentials von  $-50\text{ mV}$  sollte gemäß der Boltzmann-Verteilung<sup>[26]</sup> die Volumenkonzentration auf  $2\text{ mM}$  erhöht werden müssen, um die ursprüngliche Konzentration  $c_i$  wiederherzustellen. Die experimentelle Bestätigung dieser Überlegungen, die analog auch für das Sulfat **6** gelten, ist in Abbildung 5 dargestellt. Wegen der höheren Quantenausbeute ruft **6** einen höheren pH-Sprung bei gleicher Konzentration hervor.

(Cumarinylmethyl)diethylphosphate und (Cumarinylmethyl)sulfate sind also sehr empfindliche und ultraschnelle Phototrigger für Protonen und können große pH-Sprünge induzieren. Ihre Membranaffinität ermöglicht es zu untersuchen, welche Bedeutung der pH-Wert an der Membranoberfläche für Signaltransduktion, Faltung und Transport hat. Jede der beiden Membranmonoschichten kann durch die Wahl membranpermeabler (**1**, **4**) oder membranimpermeabler photoaktivierbarer Verbindungen (**3**, **6**) gezielt adressiert werden. Darüber hinaus werden **1**, **3**, **4** und **6** das Repertoire an verfügbaren  $\text{H}^+$ -Phototriggern zur Untersuchung orts- und zeitabhängiger Aspekte von anderen  $\text{H}^+$ -gesteuerten Prozessen entscheidend erweitern. Die biologische Anwendung wird durch ihre Aktivierbarkeit mithilfe langwelliger UV/Vis-Strahlung erleichtert, die zellschädigende Nebeneffekte auf ein Minimum reduziert.

Eingegangen am 6. August 2004

**Stichwörter:** Membranen · Photoaktivierbare Verbindungen · Photolyse · Protonen · Schutzgruppen

- [1] H. A. Lester, J. M. Nerbonne, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1982**, *11*, 151–175.
- [2] M. Gutman, E. Nachliel, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1015*, 391–414.
- [3] G. Bonetti, A. Vecli, C. Viappiani, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *269*, 268–273.
- [4] C. Viappiani, S. Abbruzzetti, J. R. Small, L. J. Libertini, E. W. Small, *Biophys. Chem.* **1998**, *73*, 13–22.
- [5] K. Janko, J. Reichert, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *905*, 409–416.
- [6] J. H. Kaplan, B. Forbush, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929–1935.
- [7] J. E. T. Corrie, B. C. Gilbert, V. R. N. Munasinghe, A. C. Whitwood, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, 2483–2491.
- [8] S. Khan, F. Castellano, J. L. Spudich, J. A. McCray, R. S. Goody, G. P. Reid, D. R. Trendham, *Biophys. J.* **1993**, *65*, 2368–2382.
- [9] F. M. Houlihan, A. Shugard, R. Gooden, E. Reichmanis, *Macromolecules* **1988**, *21*, 2001–2006.
- [10] F. M. Houlihan, O. Nalamasu, J. M. Kometani, E. Reichmanis, *J. Imaging Sci. Technol.* **1997**, *41*, 35–40.
- [11] A. Barth, J. E. Corrie, *Biophys. J.* **2002**, *83*, 2864–2871.
- [12] S. Serowy, S. M. Saparov, Y. N. Antonenko, W. Kozlovsky, V. Hagen, P. Pohl, *Biophys. J.* **2003**, *84*, 1031–1037.
- [13] T. Eckardt, V. Hagen, B. Schade, R. Schmidt, C. Schweitzer, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 703–710.
- [14] V. Hagen, S. Frings, B. Wiesner, S. Helm, U. B. Kaupp, J. Bendig, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 434–442.
- [15] R. S. Givens, B. Matuszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6860–6871.
- [16] B. Schade, V. Hagen, R. Schmidt, R. Herbrich, E. Krause, T. Eckardt, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9109–9117.

- [17] K.-Y. Tserng, P. D. Klein, *J. Lipid Res.* **1977**, *18*, 491–495.
- [18] 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.
- [19] M. Schwörer, J. Wirz, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1441–1458.
- [20] CRC Handbook of Chemistry and Physics (Hrsg.: D. R. Lide), CRC, Boca Raton, **1994**, S. 8–44.
- [21] V. I. Galkin, R. D. Sayakhov, A. R. Garifzyanov, R. A. Cherkasov, A. N. Pudovik, *Dokl. Chem. (Engl. Transl.)* **1991**, *318*, 114–116.
- [22] N. C. Marziani, M. Sampoli, M. Gonizzi, *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 4347–4353.
- [23] H. Heerklotz, *J. Phys. Condens. Matter* **2004**, *16*, R441–R467.
- [24] T. I. Rokitskaya, M. Block, Y. N. Antonenko, E. A. Kotova, P. Pohl, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 2572–2580.
- [25] E. E. Pohl, U. Peterson, J. Sun, P. Pohl, *Biochemistry* **2000**, *39*, 1834–1839.
- [26] R. M. Peitzsch, M. Eisenberg, K. A. Sharp, S. McLaughlin, *Biophys. J.* **1995**, *68*, 729–738.