

Photoaktivierbare Verbindungen

DOI: 10.1002/ange.200502411

Ultraschnelle Freisetzung hoher Konzentrationen von cyclischen Nucleotiden aus Cumarylmethylestern durch Ein- und Zweiphotonenphotolyse**

Volker Hagen, Brigitte Dekowski, Vasilica Nache,
Reinhard Schmidt, Daniel Geißler, Dorothea Lorenz,
Jenny Eichhorst, Sandro Keller, Hiroshi Kaneko,
Klaus Benndorf und Burkhard Wiesner*

Biologisch inerte, photoaktivierbare Vorstufen („caged compounds“) von cyclischen Nucleosidmonophosphaten (cNMPs) haben sich als wirkungsvolle Substrate erwiesen, um die Dynamik von Prozessen, die von cyclischen Nucleotiden abhängig sind, raum- und zeitaufgelöst zu untersuchen. Unter den bisher beschriebenen photoaktivierbaren cNMPs sind die (Cumarin-4-yl)methylester der cNMPs am nützlichsten, weil sie keine eigene Bioaktivität aufweisen, hydrolysestabil sind und sich effizient und extrem schnell photolysieren lassen.^[1,2] Kürzlich wurden von uns [7-(Diethylamino)cumarin-4-yl]methyl(DEACM)-Ester von cNMPs als photoaktivierbare Verbindungen eingeführt.^[3,4] Im Vergleich zu anderen photoaktivierbaren Cumaryl methyl-cNMPs setzen die DEACM-Ester die cNMPs mit höherer Photoempfindlichkeit bei langwelliger Anregung (bis zu 436 nm) frei, wodurch die Schädigung von zellulären Komponenten und die Photobleichung von Chromophoren auf ein Minimum reduziert oder sogar verhindert werden.

Wir beschreiben hier die Entwicklung der 7-[Bis(carboxymethyl)amino]-substituierten Cumaryl methyl-Bausteine **1** und **2** (Strukturen siehe Schema 1) für die Maskierung von Phosphaten und anderen funktionellen Gruppen und präsentieren mit den axialen und den äquatorialen Dia-

[*] Dr. V. Hagen, B. Dekowski, D. Geißler, D. Lorenz, J. Eichhorst,

S. Keller, 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

V. Nache, Prof. Dr. K. Benndorf

Institut für Physiologie II

Friedrich-Schiller-Universität Jena (Deutschland)

Prof. Dr. R. Schmidt

Institut für Physikalische und Theoretische Chemie

Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt (Deutschland)

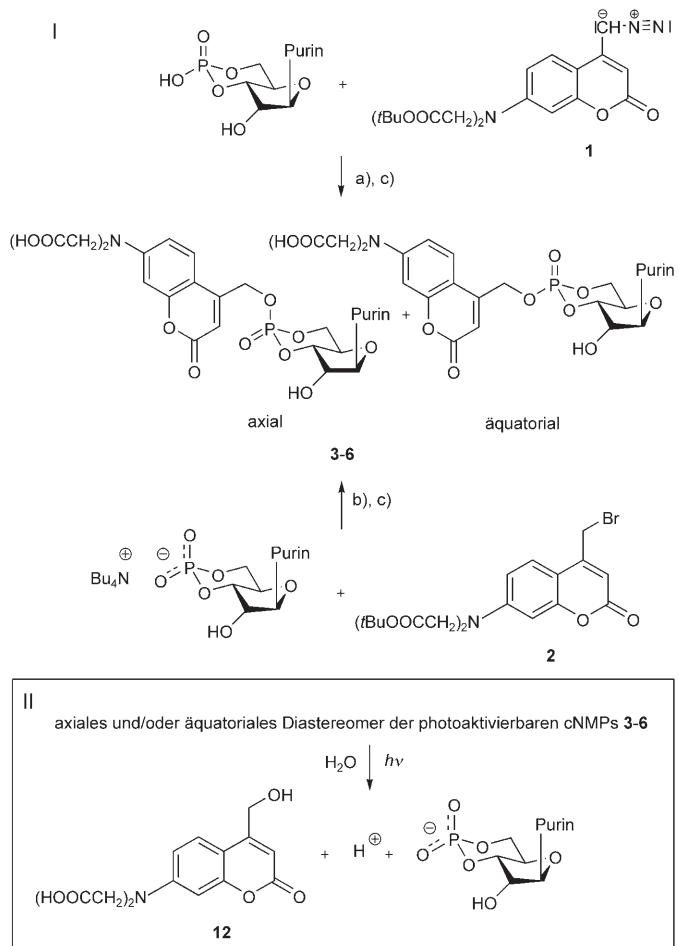
H. Kaneko

Institut für Zoologie

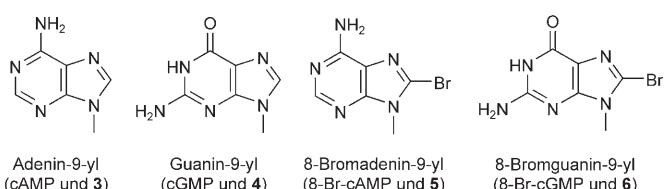
Universität Heidelberg (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Dr. E. Krause für die Aufnahme der Massenspektren und R. Lechner für die NMR-Messungen.

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



Purin:



Schema 1. Synthese (I) und Photolyse (II) von 3–6: a) DMSO/CH₃CN (1:4), 60°C, 24 h; b) CH₃CN, 85°C, 5 h; c) TFA/CH₂Cl₂/H₂O (75:24:1), RT, 20 min.

stereomeren der {7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl}methyl(BCMACM)-Ester von cAMP, cGMP, 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP 3–6 (Schema 1) neue Varianten der photoaktivierbaren DEACM-cNMPs, die deren günstige Eigenchaften aufrechterhalten und durch die Anwesenheit von anionischen Gruppen zusätzlich eine stark erhöhte Löslichkeit in Wasser aufweisen. Weiterhin zeigen wir, dass die neuen photoaktivierbaren Verbindungen die cNMPs nach Ein- und Zweiphotonenanregung freisetzen und dass es möglich ist, quantitativ die Menge des im Zellinneren durch Photolyse freigesetzten cNMP durch Fluoreszenzmessungen zu bestimmen.

Die Verbindungen 3–6 wurden, wie in Schema 1I gezeigt, durch Alkylierung der freien Säuren der entsprechenden

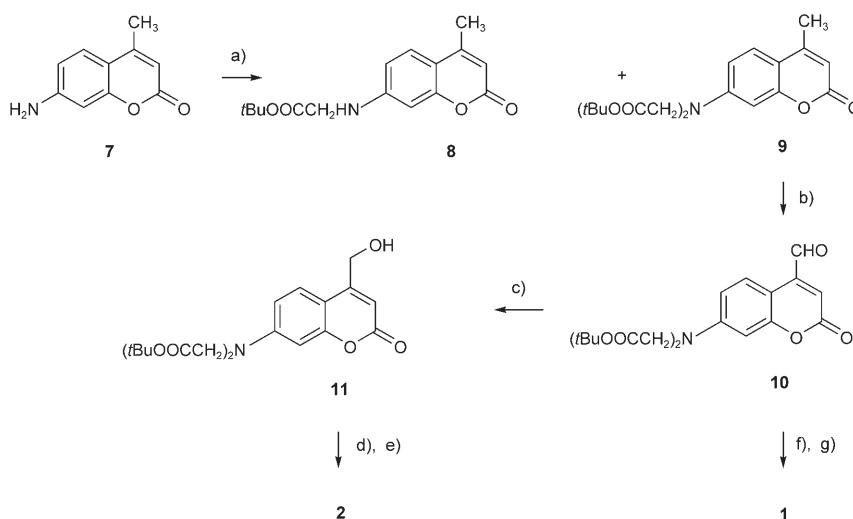
cNMPs mit dem 4-(Diazomethyl)cumarin **1** (Methode A) oder durch Umsetzung der Tetra-*n*-butylammoniumsalze der cNMPs mit dem 4-(Brommethyl)cumarin **2** (Methode B) hergestellt. Die Verfahren sind bereits früher für andere Cumarinylmethylester von cNMPs beschrieben worden.^[5,6] Im letzten Schritt wurden die *tert*-Butoxy-Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure (TFA) abgespalten.

Die Schlüsselverbindungen **1** und **2** waren zuvor nach Schema 2 synthetisiert worden. 7-Amino-4-methylcumarin (**7**) wurde in Gegenwart von Diisopropylethylamin mit einem Überschuss an Bromessigsäure-*tert*-butylester zu einem Gemisch aus **8** und **9** umgesetzt, das durch Flash-Chromatographie getrennt wurde. Die Ausbeuten betragen 27% für **8** und 31% für **9**. Oxidation von **9** mit SeO₂ ergab den entsprechenden Aldehyd **10** mit einer Ausbeute von 80%. Die Kondensation von **10** mit Tosylhydrazid lieferte das entsprechende Hydrazon (84% Ausbeute), das anschließend mit Triethylamin durch Bamford-Stevens-Reaktion in **1** überführt wurde (87% Ausbeute). **2** wurde am besten (81% Ausbeute) aus dem Alkohol **11**, der mit 74% Ausbeute aus **10** durch Reduktion mit NaBH₄ erhalten wurde, durch Mesylierung und nachfolgende Bromierung mit LiBr in THF hergestellt. Versuche, **9** direkt durch Umsetzung mit *N*-Bromsuccinimid in **2** umzuwandeln, waren nicht erfolgreich und führten hauptsächlich zur Bromsubstitution in Position 3 am Cumarinrest.

Die Alkylierung der cNMPs nach Methode A ergab relativ niedrige Produktausbeuten für die *tert*-Butoxy-geschützten Derivate **3** (12%) und **6** (7%), aber eine akzeptable Ausbeute für das entsprechende Analogon von **4** (25%). Die Reaktion von **1** mit 8-Br-cAMP lieferte **5** nur in Spuren. Die Veresterung nach Methode B ergab relativ hohe Produktausbeuten für die *tert*-Butoxy-geschützten Derivate von **3** (38%) und **5** (49%), eine akzeptable Ausbeute für das entsprechende Derivat von **6** (18%), aber nur Spuren des Analogons von **4**. Verglichen mit anderen photoaktivierbaren cNMPs^[2,3,7] können die Verbindungen **3–6** mit guten Ausbeuten hergestellt werden, wobei zur Synthese von **4** die Methode A und von **3, 5** und **6** die Methode B genutzt werden sollte. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass die Produktausbeuten nicht unter optimalen, sondern eher unter typischen Bedingungen ermittelt wurden.

Beide Syntheseverfahren ergaben Diastereomerenmixturen der *tert*-Butoxy-geschützten photoaktivierbaren Verbindungen. Die Diastereomerenverhältnisse axial/äquatorial lagen bei 2:3 (Methode A) oder 2–4:1 (Methode B). Die Diastereomeren trennung erfolgte durch präparative Umkehrphasen-HPLC. Die axialen Isomere zeigten stets niedrigere Retentionszeiten als die äquatorialen Isomere. Die Abspaltung der *tert*-Butoxy-Gruppen der Diastereomeren Ester mit TFA lieferte die reinen axialen und äquatorialen Isomere von **3–6** mit nahezu quantitativen Ausbeuten (präparative Details hierzu sowie die analytische Charakterisierung sind in den Hintergrundinformationen hinterlegt). Die Isomerenzuordnung erfolgte ³¹P-NMR-spektroskopisch.^[8,9]

Wie auch andere photoaktivierbare Cumarinylmethyl-cNMPs sind die Verbindungen **3–6** sehr hydrolysestabil. HPLC-Untersuchungen der reinen Diastereomere der photoaktivierbaren Verbindungen in wässriger HEPES-Puffer-



Schema 2. Synthese von **1** und **2**: a) $\text{BrCH}_2\text{COOtBu}$ (3 Äquiv.), $i\text{Pr}_2\text{EtN}$, NaI , CH_3CN , Rückfluss, 24 h; b) SeO_2 , *p*-Xylol, Rückfluss, 6 h; c) NaBH_4 , MeOH , RT, 2 h; d) $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$, $i\text{Pr}_2\text{EtN}$, CH_2Cl_2 , 5°C, 20 min; e) LiBr , THF , RT, 1.5 h; f) *p*-Tosylhydrazid, EtOH , RT, 1.5 h; g) $i\text{Pr}_2\text{EtN}$, MeOH , RT, 3 h.

lösungen (pH 7.2, RT) ergaben, dass sie innerhalb von 24 h zu weniger als 0.5% zu den freien cNMPs hydrolysiert werden (HEPES = 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure). Alle Verbindungen lösen sich gut in wässrigen HEPES-Pufferlösungen bei pH 7.2 (Tabelle 1), womit eine Voraussetzung dafür erfüllt ist, dass hohe Konzentrationen der Phototrigger innerhalb von Zellen und auch an kleinen Membranstücken an der Spitze von Glaspipetten bei der Anwendung der Patch-Clamp-Methode eingesetzt werden können. Erwartungsgemäß binden die hydrophilen photoaktivierbaren cNMPs bei pH 7.2 nicht messbar an Modelllipidmembranen, was sich darin äußert, dass bei Titration von **3** und **5** mit Lipidvesikeln bei verschiedenen Temperaturen keine Reaktionswärme nachgewiesen wurde (Details siehe

Hintergrundinformationen). Trotzdem treten die photoaktivierbaren Verbindungen schnell durch die Zellmembran in Zellen ein, wahrscheinlich mithilfe von Transportproteinen oder durch Endozytose. Beispielsweise konnten HEK293-Zellen durch Inkubation mit einer 50 μM gepufferten Lösung bei pH 7.2 mit **6** beladen werden.

Die Photoaktivierung der axialen oder der äquatorialen Diastereomere von **3–6** durch Bestrahlung mit Licht im Wellenlängenbereich von 330–430 nm in wässrigen Pufferlösungen führt zu dem Cumarin **12**, einem Proton und dem entsprechenden „freien“ cNMP-Anion (Schema 1 II). Die Photoreaktion verläuft effizient und sauber und liefert etwa 90–95 % des jeweiligen cNMP. Es gab keine Hinweise für eine nennenswerte Population von Triplet-Zuständen. Tatsächlich sind die Lebensdauern des niedrigsten angeregten Singulett-Zu-

stands S_1 mit etwa 0.1 ns extrem kurz (Tabelle 1). Es wird angenommen, dass die photochemische Umwandlung nach einem Photo- S_N1 -Mechanismus (lösungsmittelgestützte Photoheterolyse) aus S_1 heraus über ein Singulett-Ionenpaar verläuft. Dieses Ionenpaar geht hauptsächlich durch Rekombination wieder in den Singulett-Grundzustand über.^[10] In Konkurrenz dazu treten zum einen die Trennung des Ionenpaares durch das polare Lösungsmittel (Bildung des cNMP-Anions) mit anschließender Hydrolyse des Cumaryl-methyl-Carbokations oder zum anderen die direkte Reaktion eines Wassermoleküls aus dem Lösungsmittelkäfig des Ionenpaares mit seinem Carbokation mit nachfolgendem sehr schnellem Deprotonierungsschritt.^[10,11] Ein derartiger Photolysemechanismus impliziert, dass die Produktbildung sehr schnell erfolgt. Bei zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen der axialen Diastereomere von **3** und **4** wurden nach Einzelimpulsanregung (0.5 ns Halbwertsbreite, 337 nm) auch Fluoreszenzbeiträge von **12** gefunden. Da reine Lösungen der photoaktivierbaren Verbindungen bestrahlt wurden, muss **12** innerhalb der Dauer des Anregungsimpulses freigesetzt und angeregt worden sein. Die Dekonvolution der Fluoreszenzsignale mit einer biexponentiellen Zerfallsfunktion ergab, dass die Fluoreszenz von **12** bei den axialen Diastereomeren von **3** und **4** ungefähr nach 0.7 bzw. 0.4 ns auftritt. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Freisetzung der cNMPs sind die Quotienten aus den Effizienzen der Produktbildung aus den Ionenpaaren und der Fluores-

Tabelle 1: Langwelligste Absorptionsmaxima ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$), Extinktionskoeffizienten (ϵ^{max}), photochemische Quantenausbeuten (ϕ_{chem}), Fluoreszenzmaxima (λ_f^{max}), Fluoreszenzquantenausbeuten (ϕ_f), Lebensdauern der niedrigsten angeregten Singulett-Zustände (τ) und Löslichkeiten (s) der BCMAC-Ester **3–6** und von **12** in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{HEPES-KCl}$ -Puffer (5:95), pH 7.2.

Verbindung	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ [nm]	ϵ^{max} [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	$\phi_{\text{chem}}^{[a]}$	λ_f^{max} [nm]	$\phi_f^{[b]}$	τ [ns]	s [mM]
3 (axial)	384	17000	0.26	483	0.007	0.07 ^[c]	>2
3 (äquatorial)	383	17900	0.30	484	0.007	0.06 ^[c]	>1
4 (axial)	386	18000	0.25	482	0.008	0.07 ^[c]	>2
4 (äquatorial)	383	18700	0.30	480	0.011	0.10 ^[c]	>1
5 (axial)	384	18500	0.23	486	0.012	0.11 ^[c]	≈1
5 (äquatorial)	383	18100	0.26	483	0.025	0.23 ^[c]	≈1
6 (axial)	387	18100	0.25	479	0.015	0.13 ^[c]	≈1
6 (äquatorial)	282	18400	0.29	487	0.023	0.21 ^[c]	≈1
12	376	18400		479	0.17	1.59 ^[d]	

Geschätzte durchschnittliche Unsicherheit: [a] 15 %, [b] 8 %. [c] Berechnet nach $\tau = \tau_{12} \phi_f / \phi_f^{12}$,^[13] τ_{12} = Fluoreszenzlebensdauer von **12**, ϕ_f^{12} = Fluoreszenzquantenausbeute von **12**. [d] Gemessene Fluoreszenzlebensdauer von **12**.

zenzanstiegszeit von **12**.^[10] Betrachtet man die entsprechenden Effizienzen der Produktbildung von 0.27 für **3** und 0.26 für **4**, erhält man für die Geschwindigkeitskonstanten Werte von 4×10^8 bzw. $6 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$. Da die Quantenausbeuten ϕ_{chem} und ϕ_f nicht sehr variieren (Tabelle 1), wird erwartet, dass die äquatorialen Diastereomere von **3** und **4** wie auch die Diastereomere von **5** und **6** die cNMPs mit einer ähnlichen Geschwindigkeit freisetzen.

Die photochemischen Charakteristika der BCMACM-Ester in HEPES-Puffer (pH 7.2) sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Absorptions- und die Fluoreszenzspektren zeigen Maxima bei 382–387 nm bzw. 479–487 nm und entsprechen annähernd denen der DEACM-Ester. Sowohl die photochemischen Quantenausbeuten bei Einphotonenanregung, ϕ_{chem} , als auch die Extinktionskoeffizienten, ϵ^{\max} , sind für photoaktivierbare Verbindungen vergleichsweise hoch, was zu einer exzellenten Photoempfindlichkeit bei langwelliger Anregung führt. Im Ergebnis ist eine moderate UV/Vis-Belichtung ausreichend, um große Mengen an freiem cNMP zu erhalten.

Außerdem gestattet die Kombination aus hoher Photoempfindlichkeit und guter Löslichkeit der Verbindungen **3–6** die sofortige Erzeugung großer cNMP-Konzentrationssprünge. Demonstriert wurde dies an CNG-Ionenkanälen (CNG=cyclic-nucleotide gated) des Sehstäbchen-Photorezeptors, die durch cGMP aktiviert werden. Die CNGA1-Untereinheit dieser Kanäle wurde heterolog in *Xenopus*-Oocyten exprimiert, und der durch diese Kanäle geleitete Strom wurde in Inside-Out-Patches (d.h. aus der Membran gerissenen Membranflecken) mit der Patch-Clamp-Methode gemessen. Mit $400 \mu\text{M}$ **4** in der Badlösung konnte beispielsweise durch einen Lichtblitz von $150 \mu\text{s}$ ein Konzentrationsprung an freiem cGMP von 0 auf $72 \mu\text{M}$ erzeugt werden. Abbildung 1 illustriert die sich daraus ergebenden Aktivie-

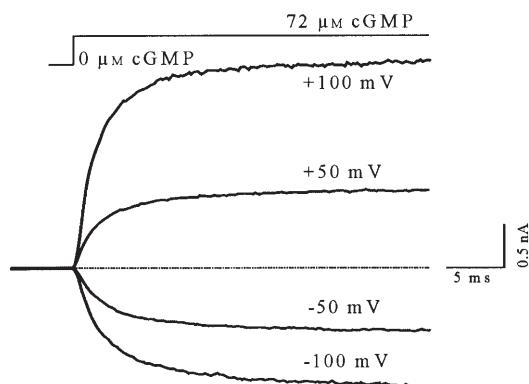


Abbildung 1. Aktivierung der homotetrameren CNGA1-Kanäle durch einen sprunghaften Anstieg der cGMP-Konzentration nach Photolyse von **4** (axiales Isomer). Die Kanäle wurden heterolog in *Xenopus*-Oocyten exprimiert, und die Messungen wurden mit Inside-Out-Patches durchgeführt, die eine große Zahl von Kanälen enthielten. Die Konzentration an freiem cGMP wurde aus dem stationären Strom der Kurven bezogen auf den stationären Strom bei Sättigung mit cGMP und der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für diese Kanäle bestimmt.^[15] Vor dem Lichtblitz floss kein Strom. Die vier Kurven wurden bei den angegebenen Spannungen aus dem gleichen Membranfleckchen (patch) aufgezeichnet und um kleine Leckströme durch Subtraktion der Kurven ohne cyclisches Nucleotid korrigiert.

rungszeitverläufe bei vier Transmembranspannungen. Die Zeitverläufe sind hochauflösend und deshalb besonders gut geeignet, um Informationen über die molekularen Mechanismen der zugrundeliegenden Steuerung der Aktivierung dieser Kanäle zu gewinnen. Bei maximalen Konzentrationen konnten mit **4** größere Konzentrationssprünge an cGMP als mit dem DEACM-Ester von cGMP erzielt werden.

Die photoaktivierbaren BCMACM-cNMPs sprechen nicht nur auf Ein-, sondern auch auf Zweiphotonenanregung an. In den Abbildungen 2 und 3 wird gezeigt, wie konfokale

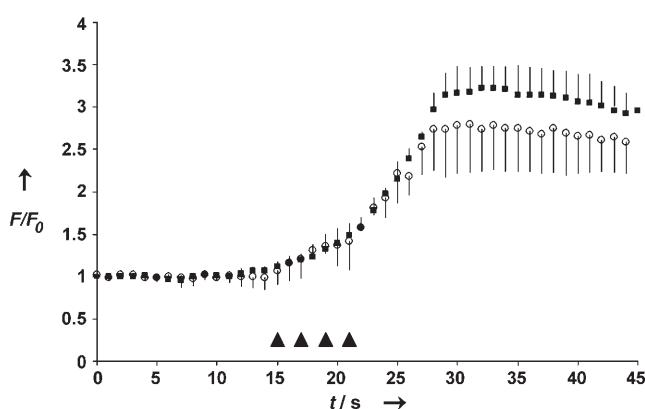


Abbildung 2. Zeitverlauf des Ca^{2+} -Einstroms durch CNG-Kanäle in HEK293-Zellen, die den CNGA3-Kanal exprimieren, nach Photofreisetzung von 8-Br-cGMP aus **6** (axiales Isomer) durch Anregung mit UV-Licht (364 nm, Einphotonenanregung, ■) oder IR-Licht (745 nm, Zweiphotonenanregung, ○). Die Zellen wurden mit $4 \mu\text{M}$ FLUO-4/AM (30 min) und $50 \mu\text{M}$ **6** (20 min) präinkubiert. Die Fluoreszenzintensität F des Ca^{2+} -Indikators FLUO-4 wurde vor und nach der Bestrahlung (▲) aufgezeichnet. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kurven. F/F_0 =relative Fluoreszenzintensität (Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei Zellen).

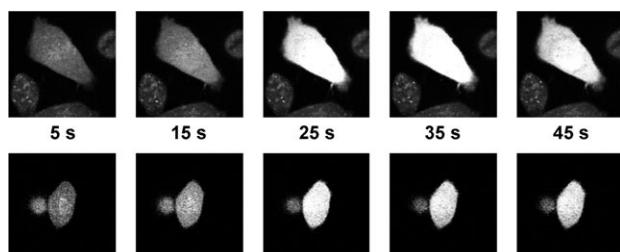


Abbildung 3. Fluoreszenzintensität des Ca^{2+} -Indikators FLUO-4 in zwei CNGA3-transfizierten HEK293-Zellen vor und nach der Photofreisetzung von 8-Br-cGMP aus **6** (axiales Isomer) durch Bestrahlung mit UV-Licht (364 nm, obere Reihe) oder IR-Licht (745 nm, untere Reihe). Die Zellen wurden mit $4 \mu\text{M}$ FLUO-4/AM (30 min) und $50 \mu\text{M}$ **6** (20 min) präinkubiert. Die angegebenen Zeiten entsprechen denen in Abbildung 2. Die Fluoreszenzintensität ist in einer 8-Bit-Crauskala dargestellt.

Laser-Rastermikroskopie nach Photolyse von **6** den 8-Br-cGMP-vermittelten Eintritt von Ca^{2+} -Ionen in HEK293-Zellen sichtbar macht, die den cGMP-gesteuerten Ionenkanal des Sehzapfen-Photorezeptors (CNGA3) exprimieren. Sowohl UV- (Argonlaser, 364 nm) als auch IR-Licht (Cameleon-Dioden-gepumpter Laser, 745 nm) rufen eine Erhöhung

der Fluoreszenzintensität des Ca^{2+} -Indikators FLUO-4 bis zur Sättigung hervor, was den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen durch CNG-Kanäle anzeigen. Die Zugabe von Mg^{2+} -Ionen im Überschuss zu dem verwendeten Puffer blockierte den Ca^{2+} -Einstrom, und eine UV- oder IR-Bestrahlung in Abwesenheit von **6** ergab keine Änderungen des Fluoreszenzsignals der Zellen (nicht gezeigt). Eine hochempfindliche Zweiphotonenphotolyse wurde früher für photoaktivierbare (6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl-Verbindungen^[2,12] und vor einiger Zeit auch für (6,7-Dimethoxycumarin-4-yl)methyldiethylphosphat und Natrium-[7-(dimethylamino)cumarin-4-yl]methylsulfat beschrieben.^[13] Der direkte Vergleich der Zeitverläufe der Zweiphotonenphotolyse von **6** (axiales Isomer) und *N*-(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxy-carbonyl-*L*-glutaminsäure (Bhc-Glu)^[12] zeigt, dass **6** im Initialbereich unter identischen Bedingungen 1.3-mal schneller als Bhc-glu gespalten wird (Abbildung 4). Da Bhc-glu bei 740 nm eine Zweiphotonenempfindlichkeit („uncaging action cross-section“) δ_u von etwa $10^{-50} \text{ cm}^4 \text{s photon}^{-2}$ aufweist,^[12] sollte δ_u für **6** etwas größer als $10^{-50} \text{ cm}^4 \text{s photon}^{-2}$ sein. Ähnliche Werte für δ_u werden für das äquatoriale Isomer von **6** und für die Diastereomeren von **3–5** erwartet.

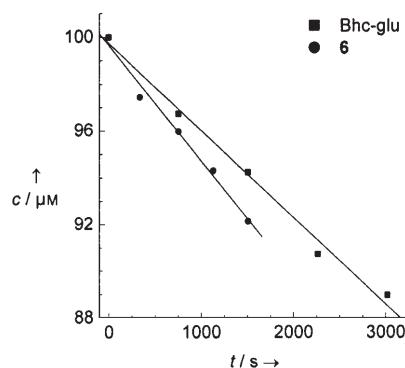


Abbildung 4. Zeitverlauf der Initialphase der Zweiphotonenphotolyse von **6** (axiales Isomer) und Bhc-glu in HEPES-Puffer, pH 7.2, bei einer Anregungswellenlänge von 740 nm. Die Konzentrationen von **6** und Bhc-glu (Anfangskonzentrationen 100 μM) wurden durch HPLC bestimmt. —: Regressionsgeraden: **6**: $c/\mu\text{M} = -0.0049 \text{ t/s} + 99.65$ ($R^2 = 0.987$); Bhc-glu: $c/\mu\text{M} = -0.0037 \text{ t/s} + 99.74$ ($R^2 = 0.991$). c = Konzentrationen der photoaktivierbaren Verbindungen.

Die Fluoreszenzquantenausbeuten ϕ_f von **3–6** sind etwa eine Größenordnung kleiner als die des bei der Photolyse freigesetzten Alkohols **12** (Tabelle 1). Im Unterschied zu 7-(Diethylamino)-4-(hydroxymethyl)cumarin, dessen Fluoreszenz innerhalb von HEK293-Zellen vollständig gelöscht wird,^[4] fluoresziert **12** auch innerhalb von Zellen (siehe Hintergrundinformationen). Somit ist, wie in Abbildung 5 demonstriert wird, die fluoreszenzspektroskopische Visualisierung des Verlaufs der Photofreisetzung aus photoaktivierbaren BCMACM-cNMPs in Zellen möglich. Die Freisetzung von 8-Br-cGMP aus **6** wurde in CNGA3-transfizierten HEK293-Zellen gleichzeitig durch Registrierung des Stroms, der bei der Aktivierung des CNG-Kanals entsteht, und der Fluoreszenz, die von dem freigesetzten Photoprodukt

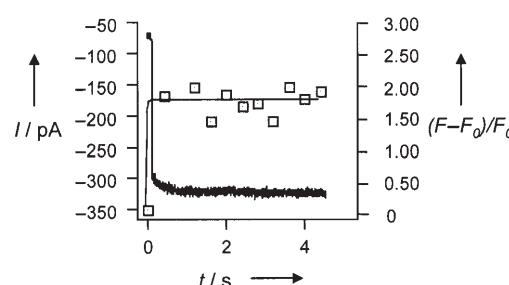


Abbildung 5. Verfolgung der Photofreisetzung von 8-Br-cGMP aus **6** in einer CNGA3-transfizierten HEK293-Zelle durch Messung des Ganzzell-Stromes und der Fluoreszenz, die von **12** nach Anregung bei 360 nm freigesetzt wird. Die Zelle wurde in der Ganzzell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik mit 80 μM **6** beladen und bestrahlt. Die Änderung der Stromamplitude und die Erhöhung der Fluoreszenzintensität (□) belegen die photolytische Freisetzung von 8-Br-cGMP.

12 nach Anregung bei 360 nm entsteht, sichtbar gemacht. Da das Fluoreszenzsignal kalibriert werden kann,^[14] ist es möglich, die cNMP-Freisetzung aus den BCMACM-Estern der cNMPs fluoreszenzspektroskopisch zu quantifizieren. Die Möglichkeit der Visualisierung und Quantifizierung des Freisetzungsprozesses innerhalb von Zellen ist, zusätzlich zu der hohen Löslichkeit in wässrigen Pufferlösungen, ein weiterer wichtiger Vorteil der photoaktivierbaren BCMACM-cNMPs gegenüber den DEACM-Analoga.

Zusammenfassend haben wir eine photolabile Cumarylmethyle-Schutzgruppe entwickelt, die einen dianionischen Substituenten trägt, und diese Schutzgruppe zur Maskierung von cNMPs eingesetzt. Die photoaktivierbaren cNMPs zeigen bei langwelliger Bestrahlung hohe Photoempfindlichkeiten und ermöglichen sowohl nach Ein- als auch Zweiphotonenanregung sofortige große Konzentrationssprünge der cNMPs in Zellen unter physiologischen Bedingungen. Sie erweitern damit die Palette an verfügbaren Reagentien für die raum- und zeitaufgelöste Untersuchung von durch cNMPs ausgelösten Prozessen. Schließlich sollten die neuen Schutzgruppen auch für die Maskierung und Demaskierung anderer Biomoleküle mit Phosphat-, Carboxylat- und anderen Funktionalitäten nützlich sein. Beispielsweise wurde bereits der BCMACM-Ester der Phenylsäure hergestellt. Die photoaktivierbare Verbindung ist sehr gut in wässrigen Pufferlösungen löslich und lässt sich schnell und effizient ($\phi_{\text{chem}} = 0.02$, $\epsilon^{\max} = 20000$) durch Bestrahlung mit Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich photolysieren.

Eingegangen am 11. Juli 2005,
veränderte Fassung am 22. August 2005
Online veröffentlicht am 4. November 2005

Stichwörter: Ionenkanäle · Nucleotide · Photoaktivierbare Verbindungen · Photolyse · Signaltransduktion

- [1] V. Hagen, K. Benndorf, U. B. Kaupp in *Dynamic Studies in Biology: Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules* (Hrsg.: M. Goeldner, R. S. Givens), Wiley-VCH, Weinheim, 2005, S. 155–178.

- [2] T. Furuta, H. Takeuchi, M. Isozaki, Y. Takahashi, M. Kanehara, M. Sugimoto, T. Watanabe, K. Noguchi, T. M. Dore, T. Kurashiki, M. Iwamura, R. Y. Tsien, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1119–1128.
- [3] 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.
- [4] V. Hagen, S. Frings, B. Wiesner, S. Helm, U. B. Kaupp, J. Bendig, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 434–442.
- [5] T. Furuta, M. Iwamura, R. Y. Tsien, *Methods Enzymol.* **1998**, *291*, 50–63.
- [6] V. Hagen, J. Bendig, S. Frings, B. Wiesner, B. Schade, S. Helm, D. Lorenz, U. B. Kaupp, *J. Photochem. Photobiol. B* **1999**, *53*, 91–102.
- [7] L. Wang, J. E. T. Corrie, J. F. Wootton, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3474–3478.
- [8] J. Engels, E. J. Schlaeger, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 907–911.
- [9] J. Engels, *Bioorg. Chem.* **1979**, *8*, 9–16.
- [10] R. Schmidt, D. Geißler, V. Hagen, J. Bendig, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 5000–5004.
- [11] B. Schade, V. Hagen, R. Schmidt, R. Herbrich, E. Krause, T. Eckardt, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9109–9117.
- [12] 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.
- [13] D. Geißler, Y. N. Antonenko, R. Schmidt, S. Keller, O. O. Krylova, B. Wiesner, J. Bendig, P. Pohl, V. Hagen, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1219–1223; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1195–1198.
- [14] V. Hagen, S. Frings, J. Bendig, D. Lorenz, B. Wiesner, U. B. Kaupp, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3775–3777; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3625–3628.
- [15] V. Nache, J. Kusch, V. Hagen, K. Benndorf, unveröffentlichte Ergebnisse.