

Photochrome Liganden für spannungsgesteuerte Kaliumkanäle**

Matthew R. Banghart, Alexandre Mourot, Doris L. Fortin, Jennifer Z. Yao, Richard H. Kramer* und Dirk Trauner*

Photochrome Liganden (PCLs) lassen sich optisch zwischen Isomeren mit unterschiedlicher biologischer Aktivität schalten. Dies ermöglicht es, ligandengesteuerte biologische Prozesse in lichtgesteuerte umzuwandeln, wodurch man eine Vielzahl biologischer Vorgänge mit Licht beeinflussen kann.

PCLs wurden für verschiedene Proteinklassen entwickelt, unter anderem für Enzyme,^[1–3] ligandengesteuerte Ionenkanäle^[4–6] und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.^[7] So wurden z. B. vor mehr als 30 Jahren photochrome Agonisten^[5] und Antagonisten^[8] für nikotinische Acetylcholinrezeptoren beschrieben. Vor kurzem haben wir eine photochrome Version von Glutamat vorgestellt, die als ein PCL für Kainatrezeptoren fungiert und mit der man Aktionspotentiale auslösen kann.^[6] Der PCL-Ansatz kann besonders effektiv in neuronalen Netzwerken angewendet werden, deren nichtlineare Natur relativ schwache Änderungen der intrinsischen Aktivität oder unvollständige Photokonversion zwischen Isomeren akzentuieren kann.

Wir stellen hier eine Familie von amphiphilen Azobenzolen vor, die mit tetrameren, spannungsgesteuerten Ionenkanälen wechselwirken (Abbildung 1). Kanäle dieses Typs werden zwar nicht von extrazellulären Liganden aktiviert, lassen sich aber von niedermolekularen Liganden blockieren,

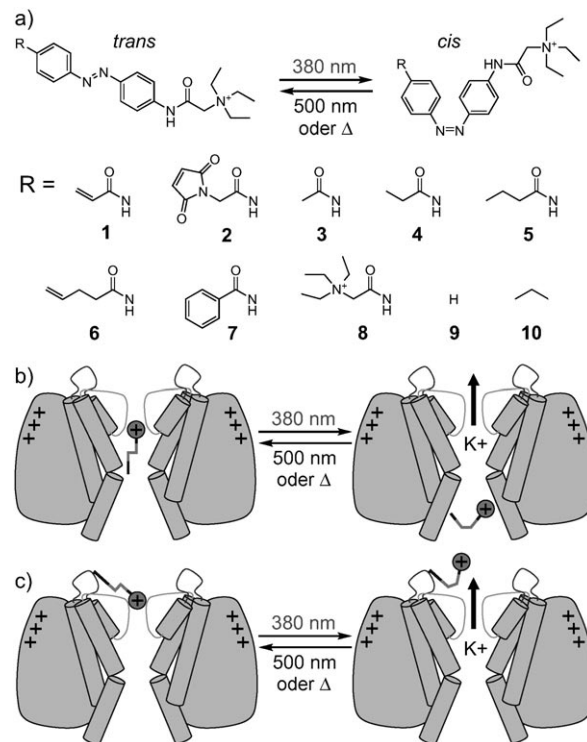


Abbildung 1. Lichtsteuerung von Kaliumkanälen. a) Photoisomerisierung und Strukturen von lichtschaltbaren Kaliumkanalblockern. b) Wirkungsweise eines PCL an der intrazellulären TEA-Bindungsstelle. Das gestreckte *trans*-Isomer ist ein besserer Blocker als das gewinkelte *cis*-Isomer. c) Wirkungsweise eines PTL an der extrazellulären TEA-Bindungsstelle. Das gestreckte *trans*-Isomer bringt die geladene Seitenkette in die Nähe der Kanalöffnung; das gewinkelte *cis*-Isomer ist hierfür zu kurz.

bei denen es sich oft um lipophile Kationen handelt.^[9,10] Unsere Moleküle fungieren als photochrome Blocker von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen und wechselwirken mit der intrazellulären Tetraethylammonium(TEA)-Bindungsstelle (Abbildung 1b). Sie können allerdings von der extrazellulären Seite appliziert werden und haben lang anhaltende Effekte auf Zellen nach einer einzigen, kurzen Applikation. In Neuronen wirken sie als photochrome Neuromodulatoren, womit sie zur optischen Kontrolle neuronaler Aktivität eingesetzt werden können.

Eines unserer Moleküle, AAQ („acrylamide-azo-quaternary ammonium“, **1**), wurde bereits als ein Reagens vorgestellt, das Wildtyp-Kaliumkanäle lichtempfindlich machen kann.^[11] In unserer ursprünglichen Publikation hatten wir vermutet, dass AAQ als kovalent gebundener, photoschaltbarer Ligand (photoswitchable tethered ligand, PTL) für die externe TEA-Bindungsstelle fungiert, der über Affinitätsmarkierung mit nativen Aminosäureresten reagiert (Abbil-

[*] Dr. A. Mourot,^[†] Dr. D. L. Fortin, Prof. R. H. Kramer
Department of Molecular and Cellular Biology
University of California, Berkeley
Berkeley, CA 94720 (USA)
Fax: (+1) 510-643-6791
E-Mail: rhkramer@berkeley.edu

Prof. D. Trauner
Department für Chemie und Biochemie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13 (F4.086), 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-77972
E-Mail: dirk.trauner@cup.uni-muenchen.de

Dr. M. R. Banghart,^[†] J. Z. Yao, Prof. D. Trauner
Department of Chemistry, University of California, Berkeley
Berkeley, CA 94720 (USA)

[†] Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] Die vorliegende Arbeit wurde durch einen Laboratory Directed Research Development Award des Lawrence Berkeley National Laboratory (R.K.), ein NSF-DGF-Stipendium CHE0724214 (D.T.), das National Institutes of Health Nanomedicine Development Center for the Optical Control of Biological Function (SPN2EY018241; R.K. und D.T.) und ein Stipendium des Human Frontier Science Program (RGP23-2005) (R.K. und D.T.) unterstützt. Wir danken F. Tombola und E. Isacoff für hilfreiche Diskussionen, den Gruppen um Isacoff und Yellen für Shaker Klone sowie T. Fehrentz für zusätzliche Experimente, die an dieser Stelle nicht diskutiert werden.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200904504> zu finden.

dung 1 c). Allerdings gelang es uns nie, die kovalente Bindung an dieser Stelle eindeutig nachzuweisen (Abbildungen S1 und S2 in den Hintergrundinformationen). Stattdessen zeigen unsere neuen mechanistischen Studien, dass AAQ nichtkovalent gebunden ist, und zwar als PCL an der internen TEA-Bindungsstelle (Abbildung 1 b).

Alkylammonium-Ionen können Kaliumkanäle nicht nur über die extrazellulär zugängliche TEA-Bindungsstelle, sondern auch durch Bindung an den intrazellulär zugänglichen Selektivitätsfilter blockieren.^[12–15] Elektrisch geladene Blocker, die nur an der intrazellulären TEA-Bindungsstelle ihre Wirksamkeit entfalten, zeigen eine Offenkanalblockierung (open-channel block), die sich allerdings erst nach der spannungsabhängigen Aktivierung des Kanals bildet.^[9,10,16] Diesen Effekt kann man am einfachsten in Shaker-IR (Sh-IR) und anderen Kanälen, denen das schnell inaktivierende N-terminale Peptid fehlt, beobachten.^[17,18] Diese Kanäle zeigen bei einer schrittweisen Depolarisierung kurzzeitig einen Strom, der nach der Bindung des Blockers innerhalb von wenigen Millisekunden abklingt.

Abbildung 2a zeigt eine spannungsabhängige Stromantwort einer Sh-IR exprimierenden HEK293-Zelle in Gegenwart von 400 μM AAQ. Bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 380 nm sind die Kanäle durch AAQ nicht blockiert (graue Spur), dagegen führt die Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 500 nm zu einer AAQ-abhängigen Blockierung; dabei resultiert eine kurzzeitige Stromantwort (I_{pk}), die schnell abklingt, wobei letztlich nur ein sehr kleiner Steady-State-Strom (I_{ss}) zurückbleibt (schwarze Spur). Dieser Effekt findet sich nicht bei der Blockierung von SPARK-Kanälen,^[19] die über einen extrazellulären Cysteinrest kovalent das Ma-

leinsäureimid-Analogon MAQ („maleimide-azo-quaternary ammonium“, 2) binden (Abbildung 2 b).

Diese Daten lassen darauf schließen, dass AAQ überwiegend an der intrazellulär zugänglichen TEA-Bindungsstelle von Sh-IR wirkt, wogegen MAQ die extrazelluläre Bindungsstelle von SPARK-Kanälen besetzt.^[20,21] Eine ausführliche Charakterisierung der AAQ-vermittelten Offenkanalblockierung ist in Abbildung S3 der Hintergrundinformationen gegeben. Diese Experimente zeigen die Notwendigkeit des Öffnens der Kanäle, damit AAQ die Pore besetzen kann, und belegen, dass die Porenbesetzung mit der Frequenz der Kanalöffnung korreliert.

Des Weiteren spricht für einen intrazellulären Wirkmechanismus, dass die AAQ-Blockierung spannungsabhängig ist. Anhand der Strom-Spannungs-Kurve in Abbildung 2c ist gezeigt, dass bei stärker depolarisierenden Potentialen die I_{ss} -Blockierung wesentlich effektiver ist. Bei 380 nm nimmt der gemessene Strom nach vollständiger Aktivierung des Kanals mit steigender Spannung linear zu (graue Linie). Bei 500 nm ist der Strom bei allen Haltepotentialen nahezu komplett blockiert (schwarze Linie). Dagegen findet man bei 420 nm und einer nur partiellen Umwandlung in das *cis*-Isomer eine spannungsabhängige Blockierung (gestrichelte Linie) mit einer I_{ss} -Abnahme bei Haltepotentialen $> +10$ mV (Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen zeigt die Rohdaten des Experiments). Dieser Effekt ist charakteristisch für positiv geladene intrazelluläre Kaliumkanalblocker.^[10,22] Gerade wenn die Depolarisierung genügend Triebkraft für den nach außen gerichteten Strom positiv geladener Kaliumionen bietet, docken Alkylammonium-Ionen an die intrazelluläre Bindungsstelle innerhalb des elektrischen Feldes der Membran und blockieren umso effektiver, je stärker die Membran depolarisiert wird.

Kaliumkanäle lassen nur ein Kaliumion nach dem anderen passieren, weshalb eine hohe Konzentration von extrazellulären Kaliumionen ($[\text{K}^+]_{\text{o}}$) durch elektrostatische Abstoßung die Austauschrate der geladenen Blocker an der Bindungsstelle erhöht und dadurch deren Wirksamkeit herabsetzt.^[23,24] Dementsprechend korreliert das Ausmaß der Blockierung umgekehrt proportional mit der extrazellulären Kaliumkonzentration $[\text{K}^+]_{\text{o}}$. Abbildung 2d zeigt diese Korrelation. Nach Herstellung der Ganzzelleableitung (voltage clamp) in extrazellulärem Standardpuffer ($[\text{K}^+]_{\text{o}} = 1.5$ mM) wurde I_{ss} bei 380 und 500 nm gemessen. Die identischen Messungen wurden bei lokaler Perfusion mit $[\text{K}^+]_{\text{o}} = 0.3$ und 20 mM durchgeführt. Der Referenzmaximalstrom, der sich aufgrund der unterschiedlichen elektrochemischen K^+ -Triebkraft verändert, wurde durch Messung des Stroms bei 380 nm, d.h. bei nicht blockierten Kanälen, in der Analyse berücksichtigt. Der Trend der geringeren Wirksamkeit bei höheren $[\text{K}^+]_{\text{o}}$ -Werten blieb bei verschiedenen Spannungen, die Sh-IR aktivieren, konstant (Abbildung S4 der Hintergrundinformationen).

Übereinstimmend mit dieser Wirkungsweise findet bei direkter Applikation von AAQ bei Inside-out-Patches (Abbildung 3) und Ganzzelleableitungen (Abbildung S5 der Hintergrundinformationen) eine lichtschaltbare Offenkanalblockierung statt. Da bei einem normalen Patch-Experiment die intrazelluläre Lösung nicht ohne Weiteres ausgetauscht

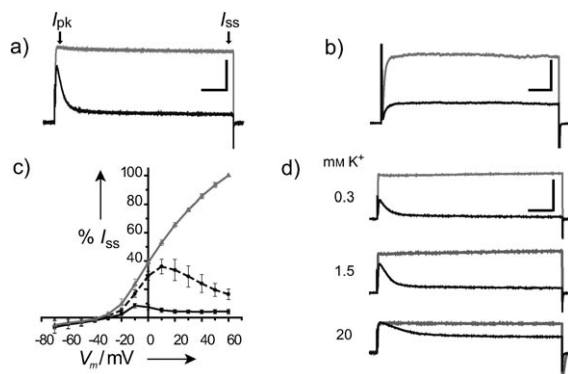


Abbildung 2. AAQ ist ein Offenkanalblocker der intrazellulären TEA-Bindungsstelle von Sh-IR. a,b) Stromantworten (Ganzzelleableitung) auf 200 ms lange depolarisierende Spannungsänderungen von -70 bis $+40$ mV bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 380 (grau) oder 500 nm (schwarz). a) AAQ vermittelt die schnelle Inaktivierung von Sh-IR (Maßstab: 6 nA, 25 ms). b) MAQ zeigt keine schnelle Inaktivierung in SPARK-Kanälen (Maßstab: 0.5 nA, 25 ms). c) Steady-State- I - V -Kurven bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 380 (grau), 420 (gestrichelt) und 500 nm (schwarz). I - V -Kurven von jeder der vier Zellen wurden auf den bei 380 nm und $+60$ mV gemessenen Strom normalisiert. d) Abhängigkeit der AAQ-Blockierung von $[\text{K}^+]_{\text{o}}$. Stromantworten (Ganzzelleableitung) einer Zelle auf depolarisierende Spannungsänderungen von -70 bis $+40$ mV bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 380 (grau) oder 500 nm (schwarz) und angegebenem $[\text{K}^+]_{\text{o}}$ -Wert. Ähnliche Ergebnisse wurden mit zwei weiteren Zellen erhalten (Maßstab: 5 nA, 50 ms).

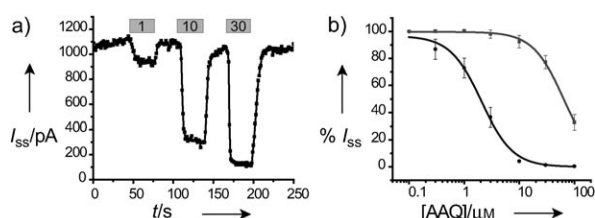


Abbildung 3. AAQ ist ein PCL der intrazellulären TEA-Bindungsstelle von Sh-IR. a) Messung des I_{ss} in Inside-out-Patches in Gegenwart von AAQ in angegebenen Konzentrationen (in μM). b) Dosis-Wirkungs-Beziehung von AAQ an Inside-out-Patches bei Bestrahlung mit 380 (grau) und 500 nm (schwarz).

werden kann, wurden Inside-out-Patches von Sh-IR exprimierenden HEK293-Zellen gezogen. Dies ermöglicht die Applikation und das Auswaschen von AAQ direkt an der internen TEA-Bindungsstelle. Die AAQ-vermittelte Blockierung der Stromantwort in Inside-out-Patches konnte innerhalb weniger Sekunden nach dem Auswaschen aufgehoben werden (Abbildung 3a), was eindeutig auf eine nichtkovalente Bindung unter diesen Bedingungen schließen lässt. Durch Bestrahlung der Patches mit Licht der Wellenlänge 380 oder 500 nm bei unterschiedlichen Konzentrationen von AAQ konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung aufgestellt werden. In Abbildung 3b ist das unterschiedliche Ausmaß der Blockierung von photostationären Zuständen zusammengefasst, die mehrheitlich *cis*- oder *trans*-AAQ enthalten [IC_{50} (500 nm) = $(2.0 \pm 0.2) \mu\text{M}$; IC_{50} (380 nm) = $(64 \pm 2.1) \mu\text{M}$; $n = 3-5$]. Aufgrund der Tatsache, dass die lichtschaltbare Blockierung keine Anzeichen einer kovalenten Modifikation aufweist, zeigen diese Experimente, dass AAQ als ein PCL an der intrazellulären TEA-Bindungsstelle wirkt.

Als ein Acrylamid enthält AAQ eine elektrophile funktionelle Gruppe. Unsere Daten deuten allerdings darauf hin, dass analoge Moleküle ohne ein Elektrophil auf eine ähnliche Art wirken. Verschiedene Analoga wurden synthetisiert, um dieses Modell zu testen und um andere photochrome Blocker mit verbesserten biophysikalischen Eigenschaften zu identifizieren (Abbildung 1a; **3–10**). Um die Verteilung der Analoga in der Membran zu erleichtern, wurden einige davon mit einer aliphatischen Seitenkette mit zunehmender Hydrophobie versehen (**3–7**). Im Unterschied dazu sollte das doppelt geladene Molekül **8** durch eine geringe Membranpenetration gekennzeichnet sein. Bei anderen Molekülen wurde die Amidseitenkette entweder komplett entfernt (**9**) oder durch eine Propylgruppe ersetzt (**10**). Diese hat ungefähr die gleiche Länge wie der entsprechende Rest von **3**, dem kürzesten Amid. Vor Beginn des Screening-Prozesses wurde durch UV/Vis-Spektroskopie bestätigt, dass bei Bestrahlung mit Licht von 380 oder 500 nm Wellenlänge photostationäre Zustände mit wenigstens 80 % *cis*- oder *trans*-Anteil für jede Verbindung vorliegen (Daten nicht gezeigt). (Die Synthesvorschrift ist in den Hintergrundinformationen zu finden.)

Bemerkenswerterweise blockierten nach einer kurzen extrazellulären Applikation sämtliche Moleküle mit einer hydrophoben Seitenkette (**3–7**, **9**, **10**) als Offenkanalblocker den Sh-IR-Strom über die gesamte Messperiode (gewöhnlich

5 min). In Abbildung 4a–c sind I_{ss} -Messungen von mit AAQ (**1**), **7** oder **10** behandelten Zellen, die abwechselnd mit 380- oder 500-nm-Licht bestrahlt wurden, gezeigt. In Abbildung S5 der Hintergrundinformationen werden die Antworten von Zellen auf eine Spannungsänderung in Gegenwart von jeweils einer neuen Verbindung gezeigt.

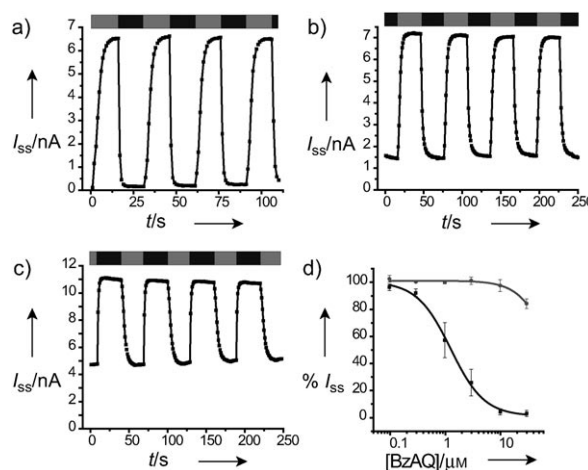


Abbildung 4. PCLs machen Sh-IR anhaltend lichtschaltbar. Messung von I_{ss} in Abhängigkeit von der Zeit. Die Zelle wurde folgendermaßen behandelt: a) 400 μM AAQ, b) 20 μM BzAQ und c) 40 μM PrAQ bei Bestrahlung mit 380 (graue Balken) und 500 nm (schwarze Balken). d) Dosis-Wirkungs-Beziehung für BzAQ in Inside-out-Patches bei Bestrahlung mit 380 (grau) und 500 nm (schwarz).

Interessanterweise ist die Wirksamkeit der Verbindungen mit ihrer Seitenkettenlänge und Hydrophobie korreliert. Tabelle 1 zeigt die Konzentration, die benötigt wird, um eine 95-proz. Blockierung des I_{ss} bei +40 mV zu erreichen. Das doppelt geladene **8** zeigte bei extrazellulärer Applikation keinerlei blockierende Wirkung (getestet wurden Konzentrationen bis 2 mM). Dagegen konnte bei intrazellulärer Applikation durch die Patch-Pipette eine lichtschaltbare Blockierung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Benzoyl-Azo-QA (BzAQ, **7**) zeigte schon bei einer Konzentration von 25 μM eine 95-proz. Blockierung. Die Dosis-Wirkungs-Kurve, die mit Inside-out-Patches erstellt wurde (Abbildung 4d), zeigt, dass *trans*-BzAQ eine zu *trans*-AAQ vergleichbare Affinität aufweist [IC_{50} (500 nm) = $(1.3 \pm 0.2) \mu\text{M}$; IC_{50} (380 nm) = $(83 \pm 20) \mu\text{M}$; $n = 4$], wenn es direkt an der internen TEA-Bindungsstelle appliziert wird. Demnach ist die erhöhte Wirksamkeit eher auf die bessere Membrangängigkeit als auf eine erhöhte Affinität für die TEA-Bindungsstelle zurückzuführen.

Anders als die Amide **3–7** zeigt **9** eine vergleichbare Wirksamkeit in seiner *cis*- und *trans*-Form (Abbildung S5 der Hintergrundinformationen). Dies lässt vermuten, dass Wechselwirkungen der Seitenkette mit dem Kanalprotein für die Unterschiede in der Affinität der Isomere verantwortlich sind. Tatsächlich blockiert Propyl-Azo-QA (PrAQ, **10**) bevorzugt in der *cis*-Form (Abbildung 4c). Die externe Applikation von 40 μM **10** führte zu einer ca. 50-proz. Blockierung von I_{ss} in der *cis*-Form, ohne eine Wirkung (sprich eine

Tabelle 1: Struktur-Aktivitäts-Beziehungen.

	Konz. [μM] ^[a]	Blockierung [%] ^[b]	aktives Isomer
1 (AAQ)	400	> 95	<i>trans</i>
2 (MAQ)	400 ^[c]	0	–
3	1000	> 95	<i>trans</i>
4	800	> 95	<i>trans</i>
5	300	> 95	<i>trans</i>
6	200	> 95	<i>trans</i>
7 (BzAQ)	25	> 95	<i>trans</i>
8	2000	0	<i>trans</i>
9	1000	ND ^[d]	<i>trans</i> = <i>cis</i>
10 (PrAQ)	40	≈ 50	<i>cis</i>

[a] Die angegebenen Konzentrationen von 1–6 und 8 wurden durch die Dosis bestimmt, die eine Blockierung von > 95 % erzielte. Die Konzentrationen wurden dann in 100- μM -Schritten reduziert, bis die Blockierung < 95 % betrug. Für 7 und 10 reichten 5- μM -Schritte zur Feststellung der Werte. Jede Konzentration wurde in 3–5 Zellen auf getrennt behandelten Deckgläsern bestimmt. [b] Für 1–9 wurde die Blockierung aus dem gemessenen I_{ss} bei 500 nm (Blockierung) im Vergleich zum I_{ss} bei 380 nm (Referenz) in Prozent berechnet. Für 10 wurden die Wellenlängen vertauscht. Die Aufhebung der Blockierung wurde als komplett angenommen, wenn keine Offenkanalblockierung vorlag (Abbildung S5 der Hintergrundinformationen). [c] Die Anwendung von > 400 μM MAQ ließ keine stabilen Messungen in HEK293-Zellen zu. [d] Zwar konnte eine gewisse Offenkanalblockierung beobachtet werden, allerdings war ihre prozentuale Berechnung nicht möglich, da bei keiner der beiden Wellenlängen eine Aufhebung der Blockierung stattfand.

schnelle Abnahme des Stroms) in der *trans*-Form zu zeigen. Bei höheren Konzentrationen jedoch konnte eine Blockierung durch das *trans*-Isomer beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Da das thermisch stabilere *trans*-Isomer inaktiv ist, könnte ein optimiertes Analogon von PrAQ, das in der *cis*-Form blockiert, den zellulären Stress unter UV-Bestrahlung reduzieren, da es die unerwünschte Blockierung während der PCL-Applikation im Dunkeln umgehen würde.

Für einen Vergleich der Wirkmechanismen dieser neuen PCLs mit dem von AAQ konzentrierten wir uns auf das wirksamste Analogon, BzAQ (7), und untersuchten dieses in dissoziierten hippokampalen Zellkulturen. Das entsprechende Präparat zeigte bei Inkubation mit 300 μM AAQ eine lichtabhängige Steuerung von endogenen Kaliumkanälen.^[11] Die Strom-Spannungs-Kurven, die per Ganzzellableitung (Voltage-Clamp-Konfiguration) der Neuronen erstellt wurden, zeigten, dass Kaliumkanäle, die zum I_{ss} in Neuronen beitragen, durch extrazelluläre Applikation von 20 μM BzAQ moduliert werden (Abbildung 5 a). Beim Vergleich zwischen 380 und 500 nm zeigte sich, dass der I_{ss} bei +40 mV zu $(35.5 \pm 4.7) \%$ ($n = 10$) durch BzAQ blockiert wird. In der Current-Clamp-Konfiguration, welche die Aufzeichnung von Aktionspotentialen ermöglicht, erzeugte BzAQ nach Umwandlung von der *cis*- in die *trans*-Form eine Depolarisierung der Zelle, die ausreichend war, um Aktionspotentiale auszulösen (Abbildung 5 b). Dagegen hatte BzAQ, wie auch schon AAQ,^[11] keinen Einfluss auf depolarisierende Na^+ -Ströme in Neuronen (Daten nicht gezeigt). Außerdem konnten GH3-Zellen, die Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle exprimieren, nicht lichtschaltbar gemacht werden (Abbildung S6 der Hintergrundinformationen). Insgesamt zeigen diese Daten, dass BzAQ ein effektiver lichtsteuerbarer Neuromodulator mit ähnlichen

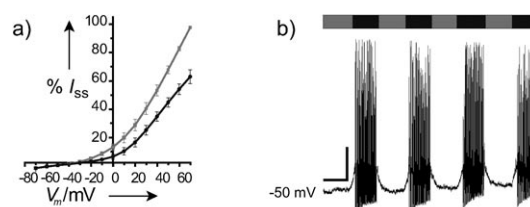


Abbildung 5. BzAQ moduliert neuronale Aktivität, indem es endogene Kaliumkanäle in dissoziierten Hippokampus-Neuronen lichtschaltbar macht. a) Steady-State-I-V-Kurven bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 380 nm (grau) und 500 nm (schwarz), gemessen in Neuronen, inkubiert mit 20 μM BzAQ. Messungen von vier einzelnen Zellen wurden auf den gemessenen Strom bei 380 nm und +70 mV normalisiert. b) Current-Clamp-Messungen eines Neurons zeigen die Auslösung von Aktionspotentialen als Antwort auf einen 500-nm-Lichtpuls (schwarz). Maßstab: 10 mV, 10 s. Ähnliche Ergebnisse wurden mit drei weiteren Zellen erhalten.

Eigenschaften wie AAQ ist. Ein entscheidender Vorteil gegenüber AAQ ist jedoch seine erhöhte Wirksamkeit, durch die die potenzielle Toxizität und Immunogenität reaktiver Verbindungen vermieden werden.

HEK293T-Zellen, die SH-IR exprimieren, bleiben nach Applikation von AAQ etwas länger als eine Stunde lichtschaltbar, während bei dissoziierten Hippokampus-Neuronen eine lichtabhängige Aktivierung auch noch nach 24 Stunden beobachtet werden kann (Abbildung S7 der Hintergrundinformationen). Die hier präsentierten Befunde erklären aber nicht, warum unsere Moleküle so lange in Zellen wirksam sind. Es ist wahrscheinlich, dass die Halbwertszeit der Moleküle in den Zellen durch die enge Assoziation mit der Plasmamembran bestimmt wird, wie es auch für die strukturell verwandten Styryl-Fluorophore, die den endosomalen Marker FM1-43^[25] und viele spannungsabhängige Fluoreszenzindikatoren enthalten,^[26] der Fall ist. Auch der Weg, über den klassische Lokalanästhetika ihre Wirkung entfalten, scheint über intrazelluläre Bindungsstellen von spannungsabhängigen Natriumkanälen zu verlaufen,^[27] was unsere Hypothese stützt. Unabhängig vom exakten Mechanismus ist das Phänomen der lang anhaltenden Blockierung nicht auf unsere PCLs beschränkt. Bei vielen hydrophoben Ammoniumionen, z. B. dem Lidocain-Derivat Tonocain und Tetrapentylammonium (TPEA) wurde gezeigt, dass sie sich nach der Durchquerung der Zellmembran anreichern und spannungsabhängige Natrium- und Kaliumkanäle auch mehrere Minuten nach dem Auswaschen noch blockieren können.^[28,29]

AAQ wurde ursprünglich für die kovalente Bindung an die extrazelluläre TEA-Bindungsstelle entworfen. Zwar schließen unsere hier gezeigten Befunde eine kovalente Modifikation von Sh-IR Kanälen nicht völlig aus, allerdings scheint AAQ primär als PCL an der internen TEA-Bindungsstelle zu wirken. Dieser Umstand ermöglichte es uns, eine neue Klasse von photochromen Liganden zu definieren und deren Funktionsweisen und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen im Detail zu untersuchen. Da spannungsabhängige Ionenkanäle viele strukturelle, funktionelle und pharmakologische Gemeinsamkeiten aufweisen, sollten es die in dieser Studie etablierten Grundsätze ermöglichen, zusätzliche PCLs für Natrium- und Calciumkanäle zu entwickeln. Unsere

photochromen Neuromodulatoren haben sich bereits als nützliche Hilfsmittel für die Neurobiologie erwiesen und könnten auch therapeutisch anwendbar sein, z.B. bei der Wiederherstellung des Sehprozesses.

Eingegangen am 12. August 2009

Online veröffentlicht am 30. Oktober 2009

Stichwörter: Azoverbindungen · Ionenkanäle · Kanalblocker · Photochromie · Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

- [1] H. Kaufman, S. M. Vratsanos, B. F. Erlanger, *Science* **1968**, 162, 1487–1489.
- [2] M. A. Wainberg, B. F. Erlanger, *Biochemistry* **1971**, 10, 3816–3819.
- [3] A. J. Harvey, A. D. Abell, *Tetrahedron* **2000**, 56, 9763–9771.
- [4] W. J. Deal, Jr., B. F. Erlanger, D. Nachmansohn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, 64, 1230–1234.
- [5] E. Bartels, N. H. Wassermann, B. F. Erlanger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, 68, 1820–1823.
- [6] M. Volgraf, P. Gorostiza, S. Szobota, M. R. Helix, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 260–261.
- [7] J. Nargeot, H. A. Lester, N. J. Birdsall, J. Stockton, N. H. Wassermann, B. F. Erlanger, *J. Gen. Physiol.* **1982**, 79, 657–678.
- [8] M. E. Krouse, H. A. Lester, N. H. Wassermann, B. F. Erlanger, *J. Gen. Physiol.* **1985**, 86, 235–256.
- [9] C. M. Armstrong, *J. Gen. Physiol.* **1969**, 54, 553–575.
- [10] R. J. French, J. J. Shoukimas, *Biophys. J.* **1981**, 34, 271–291.
- [11] D. L. Fortin, M. R. Banghart, T. W. Dunn, K. Borges, D. A. Wagenaar, Q. Gaudry, M. H. Karakossian, T. S. Otis, W. B. Kristan, D. Trauner, R. H. Kramer, *Nat. Methods* **2008**, 5, 331–338.
- [12] C. M. Armstrong, L. Binstock, *J. Gen. Physiol.* **1965**, 48, 859–872.
- [13] C. M. Armstrong, *Nature* **1968**, 219, 1262–1263.
- [14] K. L. Choi, C. Mossman, J. Aube, G. Yellen, *Neuron* **1993**, 10, 533–541.
- [15] M. Zhou, J. H. Morais-Cabral, S. Mann, R. MacKinnon, *Nature* **2001**, 411, 657–661.
- [16] B. Hille, *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3. Aufl., Sinauer, Sunderland, MA, **2001**.
- [17] G. Yellen, M. E. Jurman, T. Abramson, R. MacKinnon, *Science* **1991**, 251, 939–942.
- [18] T. Hoshi, W. N. Zagotta, R. W. Aldrich, *Science* **1990**, 250, 533–538.
- [19] M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. Trauner, R. H. Kramer, *Nat. Neurosci.* **2004**, 7, 1381–1386.
- [20] R. MacKinnon, G. Yellen, *Science* **1990**, 250, 276–279.
- [21] R. O. Blaustein, P. A. Cole, C. Williams, C. Miller, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 309–311.
- [22] C. M. Armstrong, *J. Gen. Physiol.* **1971**, 58, 413–437.
- [23] C. M. Armstrong, *J. Gen. Physiol.* **1966**, 50, 491–503.
- [24] S. D. Demo, G. Yellen, *Neuron* **1991**, 7, 743–753.
- [25] Y. Zhu, C. F. Stevens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 18018–18022.
- [26] D. Zecevic, M. Djuricic, L. B. Cohen, S. Antic, M. Wachowiak, C. X. Falk, M. R. Zochowski, *Curr. Protoc. Neurosci.* **2003**, Unit 6.17.
- [27] B. Hille, *J. Gen. Physiol.* **1977**, 69, 497–515.
- [28] G. K. Wang, C. Quan, M. Vladimirov, W. M. Mok, J. G. Thalhammer, *Anesthesiology* **1995**, 83, 1293–1301.
- [29] M. Taghialatela, A. M. J. Vandongen, J. A. Drewe, R. H. Joho, A. M. Brown, G. E. Kirsch, *Mol. Pharmacol.* **1991**, 40, 299–307.