

Lichtkontrollierte Kontraktion von Muskelfasern**

Christian Hoppmann,* Peter Schmieder, Petra Domaing, Gabriela Vogelreiter, Jenny Eichhorst, Burkhard Wiesner, Ingo Morano, Karola Rück-Braun und Michael Beyermann

Die lichtgesteuerte Inhibierung physiologisch relevanter Protein-Protein-Wechselwirkungen durch geeignete photoresponsive Liganden ermöglicht es, Signalwege mit hoher örtlicher und zeitlicher Auflösung in lebenden Zellen oder kleinen Organen (Skelettmuskelfasern, Gefäße) zu untersuchen. Kürzlich haben wir ein cyclisches Peptid als Mimetikum eines β -Fingermotivs der neuralen NO-Synthase (nNOS) beschrieben, das für deren Bindung an α -1-Syntrophin ausschlaggebend ist.^[1] Durch den Einbau eines molekularen Photoschalters in dieses Modellpeptid erhält man einen Liganden, dessen Bindung an Syntrophin mit Licht in vitro gesteuert werden kann. In der Skelettmuskulatur bindet nNOS über eine PDZ-Domäne an eine PDZ-Domäne von α -1-Syntrophin. Dadurch wird nNOS an den Dystrophin-assoziierten Proteinkomplex in der Plasmamembran gebunden, und es erfolgt die Produktion des sekundären Botenstoffs Stickstoffmonoxid (NO) für die Muskelkontraktion.^[2] Ein Verlust an dieser sarkolemmalen nNOS führt zu einer funktionalen Ischämie im kontrahierenden Muskel, was gewöhnlich bei Muskelerkrankungen wie Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) oder Becker-Muskeldystrophie (BMD) beobachtet wird.^[3] Wir zeigen hier, dass der photoschaltbare Peptidligand **1** (Abbildung 1) in der Lage ist, in die Zelle zu translozieren, dass er unter intrazellulären Bedingungen ausreichend stabil ist und *in vivo* zur Photokontrolle kontrahierender Muskelfasern eingesetzt werden kann.

Als molekularer Photoschalter fungiert im nNOS-basierten, photoschaltbaren Peptidliganden **1** die Azobenzol- ω -Aminosäure 3-((4'-Aminomethyl)phenylazo)benzoësäure (3,4'-AMPB).^[4] In der *trans*-Form des Schalters ergibt sich ein Ligand, der keine Bindung an die PDZ-Domäne von α -1-Syntrophin zeigt, während die Photoisomerisierung zur *cis*-Form zu einer deutlichen Affinität des Peptids an das Zielprotein α -1-Syntrophin führt ($K_D = 10.6 \mu\text{M}$).^[1a] Es stellte sich

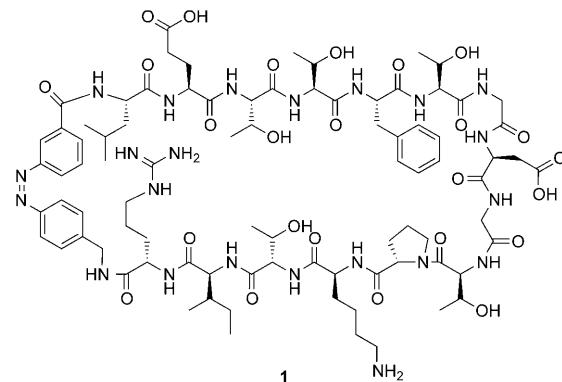


Abbildung 1. Struktur der *cis*-Form des photoschaltbaren Peptidliganden, abgeleitet vom β -Fingerpeptid von nNOS.

damit die Frage, ob der lichtsteuerbare Ligand unter physiologischen Bedingungen zur Beeinflussung nativer Prozesse im lebenden Skelettmuskel genutzt werden kann. Die Bindung der *cis*-Form des photoschaltbaren Liganden **1** an Syntrophin sollte dabei zu einer Inhibition der nativen Syntrophin-nNOS-Bindung im Skelettmuskel führen. Die daraus resultierende Dislokation von nNOS sollte wiederum eine verringerte Bildung von NO in den Skelettmuskelzellen bewirken und folglich zu einer lichtinduzierten Reduktion der Muskelkontraktion führen.

Azobenzoleinheiten wurden vielfach zur Photomodulation der Aktivität von Biomolekülen (Peptiden,^[5] Proteinen^[6] und Nukleinsäuren^[7]) und biologischen Prozessen *in vitro* und *in vivo* (z. B. in Ionenkanälen^[8]) eingesetzt. Die Möglichkeit Azobenzolsysteme zur Lichtsteuerung biologischer Prozesse in lebenden Organismen anzuwenden, wurde durch die Darstellung des Isomerisierungsprozess in Zebrafischen bestätigt.^[9] Ein Nachteil der Anwendung von Azobenzolen in lebenden Zellen beruht auf der relativ leichten Reduzierbarkeit dieser Verbindungen. Die Azo-Einheit kann durch Enzyme^[10] oder Thiole wie Glutathion (GSH), das in den meisten Zellen in millimolarer Konzentration (0.5–10 mM) vorliegt, reduziert werden.^[11] Die Reduktionsgeschwindigkeit des *cis*-Isomers einer *para*-substituierten AMPB-Aminosäure in einem Modelltripeptid ist dabei ungefähr hundertmal größer als die des entsprechenden *trans*-Isomers.^[11b]

Zur Untersuchung der Stabilität der AMPB-Schaltereinheit im Peptidliganden **1** wurde die *cis*-Form im photostationären Gleichgewicht (pss) mit einer Glutathion (10 mM) enthaltenen Pufferlösung (pH 7.5) behandelt. Nach einer Stunde konnte mit LC-MS-Analyse kein reduziertes Peptid nachgewiesen werden (gestrichelte Linie in Abbildung 2). Erst nach 16 h wurden 5% reduziertes Material gefunden

[*] Dr. C. Hoppmann, Dr. P. Schmieder, G. Vogelreiter, J. Eichhorst, Dr. B. Wiesner, Dr. M. Beyermann
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
E-Mail: hoppmann@fmp-berlin.de
Homepage: <http://www.fmp-berlin.de>

Prof. Dr. K. Rück-Braun
Institut für Chemie, TU Berlin
Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin (Deutschland)
P. Domaing, Prof. Dr. I. Morano
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC), Berlin (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Volkswagenstiftung finanziell unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201101398> zu finden.

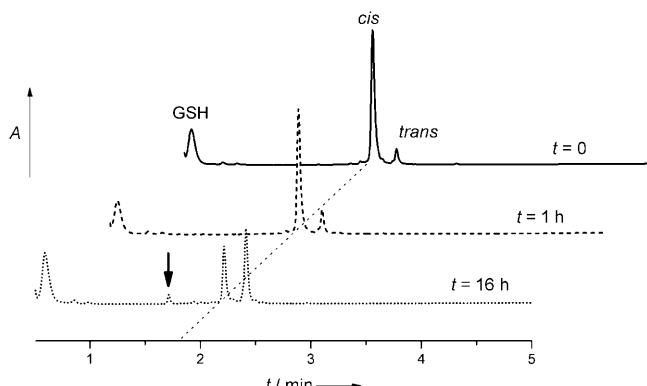


Abbildung 2. RP-HPLC-Profile (220 nm) für die *cis*-Form von **1** (90% *cis*-Gehalt im photostationären Gleichgewicht), die in wässrigem Puffer (pH 7.5) für unterschiedliche Zeit 10 mM GSH ausgesetzt wurde: $t = 0$ (—), 1 (----) und 16 h (*****). Der Anteil des reduzierten Peptidmaterials nach 16 h Inkubation betrug ca. 5% (Pfeil).

(Pfeil und gepunktete Linie in Abbildung 2, siehe auch Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen). Das Auftreten isosbestischer Punkte in den UV/Vis-Spektren des photoschaltbaren Liganden im Zuge der Photoisomerisierung verdeutlicht die Einheitlichkeit der Umwandlung und damit ebenfalls die Stabilität des 3,4'-AMPB-Schalters im Peptidliganden **1** (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Erwartungsgemäß erfolgte die thermische *cis*→*trans*-Isomerisierung des photoschaltbaren Liganden **1** in Gegenwart von 10 mM Glutathion schneller ($t_{1/2} = 3.1$ h) als ohne GSH ($t_{1/2} = 25$ Tage),^[1a] ein Befund, der auch von anderen Autoren beschrieben worden ist.^[11b,12] Für die beabsichtigte Anwendung im Rahmen unserer Untersuchungen ist mit dieser Halbwertszeit eine ausreichende Stabilität in Gegenwart von GSH gegeben.

Um die Aufnahme des photoschaltbaren Liganden **1** in die Zelle mit bildgebenden Verfahren zu verfolgen, wurde der Fluorophor Nitrobenzoxadiazol (NBD) in die Seitenkette des Lysins eingefügt (Abbildung 3a). NBD wird bei $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ zur Fluoreszenz angeregt, einer Wellenlänge, die nicht mit der Absorption der Azobenzol- ω -Aminosäure interferieren sollte. Sowohl C2C12-Myotuben als auch Skelettmuskelfasern des *Flexor digitorum brevis* (FDB) wurden 15 min bei 37°C in Pufferlösung (pH 7.5) mit dem NBD-markierten Peptidliganden **2** (50 μM) inkubiert. Die Fluoreszenzverteilung belegt für beide Proben, dass das Peptid die Plasmamembran sowohl von differenzierten Mausmuskelzellen (Abbildung 3b) als auch von kleinen Muskelorganen, z. B. die der FDB-Skelettmuskelfasern, überwinden kann (Abbildung 3c).

Mithilfe einer auf der Fluoreszenz von Diaminofluorescein beruhenden Bestimmungsmethode für sehr geringe Mengen von NO^[13] untersuchten wir den Einfluss der Peptidomere auf die nNOS-spezifische Freisetzung von NO in C2C12-Myotuben. Anstatt des häufig verwendeten 4,5-Diaminofluoresceins (DAF-2) verwendeten wir das pH- und photostabilere 4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein (DAF-FM),^[14] um NO im Überstand der C2C12-Myotuben zuverlässig zu bestimmen. Nach Inkubation mit dem photoschaltbaren Liganden **1** (20 µM) in seiner *trans*-Form und

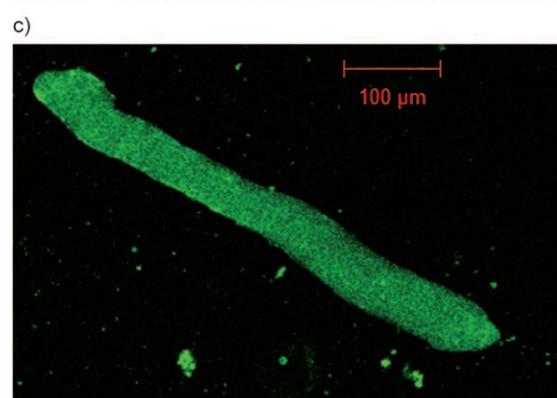
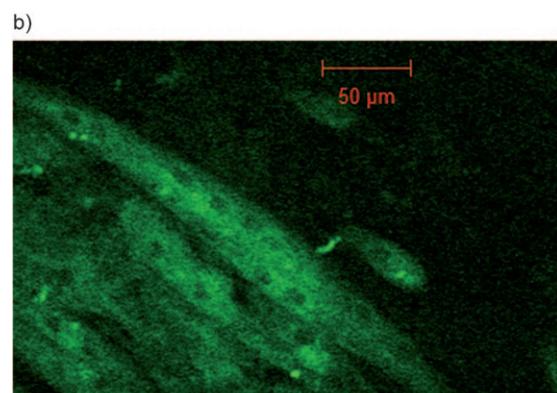
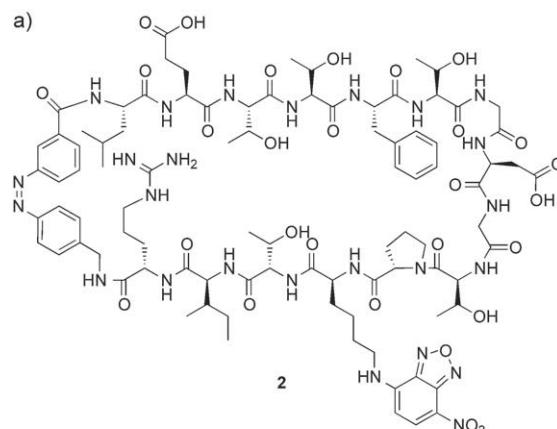


Abbildung 3. Aufnahme des a) NBD-markierten photoschaltbaren Liganden 2 (50 µM) in b) C2C12-Myotuben und in c) einer einzelnen Skelettmuskelfaser des *Flexor digitorum brevis* einer 12 Wochen alten Maus (Wildtyp). Anregung von NBD (Nitrobenzoxadiazol) wurde bei der Wellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = \text{BP}505\text{--}550 \text{ nm}$ durchgeführt. BP = Bandpassfilter.

Bestrahlung bei $\lambda = 366$ nm ($100 \mu\text{W cm}^{-2}$) wurden die Zellen mit dem Calciumionophor A23187 ($1 \mu\text{M}$) stimuliert und anschließend mit DAF-FM ($0.1 \mu\text{M}$) behandelt. Die C2C12-Myotuben setzten in Gegenwart der *cis*-Form des photoschaltbaren Liganden **1** weniger NO frei als die Zellen, die der *trans*-Form ausgesetzt waren (Abbildung 4). Die Verringerung der NO-Produktion durch die *cis*-Form entsprach derjenigen, die in Gegenwart des nNOS-spezifischen Inhibitors 3-Brom-7-nitroindazol ($20 \mu\text{M}$) in einem parallelen Versuch beobachtet wurde. Somit wird nur der von nNOS pro-

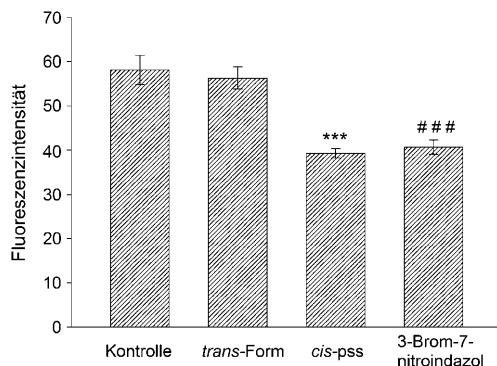


Abbildung 4. NO-Freisetzung aus C2C12-Myotuben, gemessen über die DAF-FM-Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$); Zellen, die 15 min Licht der Wellenlänge $\lambda = 366 \text{ nm}$ oder 3-Brom-7-nitroindazol ausgesetzt wurden, setzten geringere Mengen von NO durch nNOS frei als Zellen in Gegenwart der *trans*-Form (Wiederholungen $n = 13$ –14). Die Signifikanzanalyse wurde mithilfe der Student-t-Verteilung durchgeführt. *** $P < 0.001$ (verglichen mit der *trans*-Form und Kontrolle); # # # $P < 0.001$ (verglichen mit der *trans*-Form und Kontrolle)

duzierte NO-Anteil abgeschaltet, während eine verminderte NO-Produktion durch Aktivität der beiden anderen NOS-Iso-Enzyme eNOS und iNOS erfolgt, die in C2C12-Myotuben ebenfalls exprimiert werden.^[15] Diese NO-Studien lassen darauf schließen, dass der zellpermeable, photoschaltbare Peptidligand **1** die Aktivität von sarkolemmaler nNOS in Skelettmuskelzellen der Maus selektiv und spezifisch durch die lichtgesteuerte Bindung an α -1-Syntrophin kontrolliert, indem die native Wechselwirkung zwischen Syntrophin und nNOS gestört wird.

Um den Einfluss der lichtinduzierten Inhibition der Syntrophin-nNOS-Bindung in einem komplexeren biologischen System zu untersuchen, haben wir die Verkürzung der Sarkomerlänge von Skelettmuskelfasern des FDB von drei Monate alten Mäuse gemessen. FDB ist der Skelettmuskel in der Fußsohlenmitte, in dem NO als sekundärer Botenstoff mit der Muskelkontraktion gekoppelt ist.^[16] Diese schnell zuckenden FDB-Fasern werden bei 1 Hz zur Kontraktion angeregt, wobei sie sehr ermüdungsresistent sind. Nach Erreichen einer stabilen Kontraktionsfrequenz, die durch eine konstante Amplitude der Verkürzung der Sarkomerlänge von ca. 0.20 μm zu erkennen ist (Abbildung 5a), wurde die *trans*-Form des photoschaltbaren Liganden **1** (50 μM) zur Badlösung gegeben. Während der darauffolgenden Inkubationszeit wurde keine signifikante Veränderung der Verkürzungsamplitude der Sarkomerlänge beobachtet (Abbildung 5a). Die anschließende Bestrahlung der Fasern bei $\lambda = 365 \text{ nm}$ führte aber zu einer deutlichen Inhibition der Kontraktilität der Fasern, erkennbar an der verringerten Amplitude der Verkürzung (96 % zur basalen Verkürzungsamplitude; Abbildung 5b). Die Amplitude wurde im gleichen Maß vermindert, wenn die Fasern mit dem nNOS-Inhibitor 3-Brom-7-nitroindazol (Daten nicht gezeigt) behandelt wurden, was auf eine Behinderung des Signalübertragungswegs und der Aktivität von nNOS hinweist. Während der ganzen Behandlung zeigten die Muskelfasern weder Hyperkontraktion noch Schäden an Sarkomeren. Entsprechende Kontrollexperimente mit Fasern ohne Peptid bestätigten, dass die Bestrahlung bei $\lambda =$

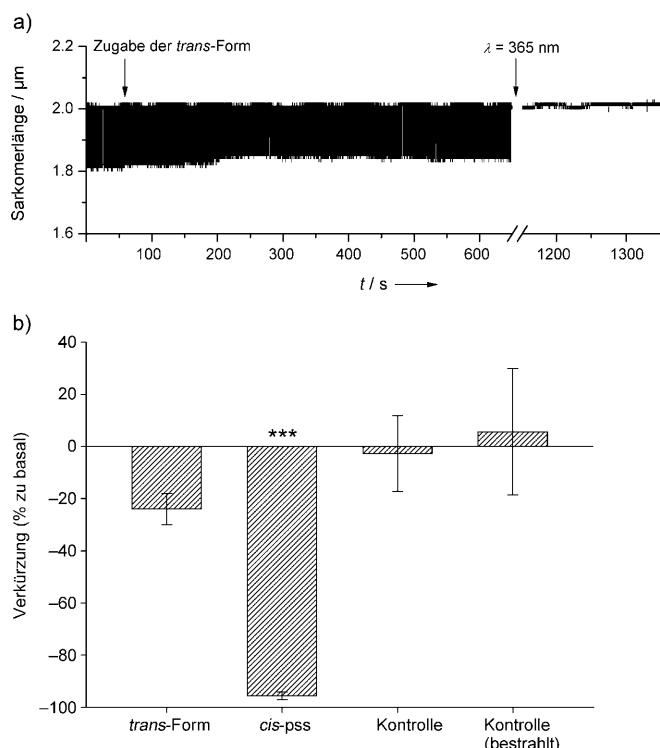


Abbildung 5. Funktionelle Effekte des zellpermeablen photoschaltbaren Liganden **1** in elektrisch stimulierten (1 Hz), lebenden Skelettmuskelfasern: a) Originalaufnahme der Sarkomerlängenkurzung in Gegenwart der *trans*-Form und nach 15-minütiger Bestrahlung bei $\lambda = 365 \text{ nm}$. b) Statistische Auswertung des Schalteleffektes auf die Verkürzung (dargestellt in Prozent der basalen Verkürzung vor Inkubation mit dem Peptid): Die Verkürzung nach Bildung der *cis*-Form ist deutlich verringert (96 % zu basal), während die Gegenwart der *trans*-Form nahezu keine Wirkung hat (24 % zu basal) ($n = 6$). Als Kontrolle wurden Fasern in Gegenwart von DMSO (0.1 %) mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 365 \text{ nm}$ bestrahlt ($n = 4$). Die Signifikanzanalyse wurde mithilfe der Student-t-Verteilung durchgeführt. *** $P < 0.001$ (verglichen mit der *trans*-Form, Kontrolle und Kontrolle (bestrahlt)).

365 nm keinen Einfluss auf die Kontraktion hat, was im Gegensatz zur glatten Muskulatur von Aorten steht, für die bei Bestrahlung mit Licht im nahen UV-Bereich (ca. 310 nm) Photorelaxation induziert werden kann.^[17] Unsere Befunde lassen darauf schließen, dass durch die Störung der Syntrophin-nNOS-Wechselwirkung nNOS vom Sarkolemma dissoziiert, wodurch eine deutlich verminderte Muskeltätigkeit hervorgerufen wird. Die Bestrahlung der Muskelfasern in Gegenwart der *cis*-Form mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 435 \text{ nm}$, um die Photoisomerisierung zur *trans*-Form von **1** zu bewirken, führte entgegen unserer Erwartung nicht zur Wiederbelebung der Muskelfaserkontraktion. Da die Bestrahlung der *cis*-Form bei ca. 435 nm nur zu etwa 75 % wieder die *trans*-Form erzeugt, könnte die Restkonzentration von 12.5 μM der verbliebenen *cis*-Form noch ausreichend sein, um die Syntrophin-nNOS-Komplexbildung zu verhindern. Deshalb haben wir das System *in vivo* bei einer deutlich verringerten Anfangskonzentration von **1** (12.5 μM) untersucht. Obwohl die gebildete *cis*-Form unter diesen Bedingungen eine nur noch unvollständige Inhibition der Muskelkontraktion zeigte (Daten nicht gezeigt), war wiederum zu

beobachten, dass die Photoisomerisierung bei $\lambda = 435$ nm keine Wiederherstellung der Faserkontraktilität bewirkte. Unter der Annahme, dass die Bindung von **1** an Syntrophin in vivo, so wie in vitro gezeigt, reversibel ist (Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen), beruht die fehlende Reversibilität des biologischen Systems in vivo wahrscheinlich auf unumkehrbaren Ereignissen in den Fasern, die eine Folge der Dissoziation des Syntrophin-nNOS-Komplexes sind.

Die Befunde verdeutlichen, dass unser kürzlich beschriebener photoschaltbarer Peptidligand, der an die PDZ-Domäne von α -1-Syntrophin in der *cis*-, aber nicht in der *trans*-Form des eingebetteten Azobenzolschalters bindet, auch in lebenden Systemen wie den Skelettmuskelfasern genutzt werden kann. Unter physiologischen Bedingungen erwies sich der Peptidligand als ausreichend stabil, und Photoisomerisierung der *trans*- in die *cis*-Form führte zu einer fast vollständigen Inhibierung der elektrisch stimulierten Faserkontraktion, während die *trans*-Form die Verkürzung der Muskelfasern nicht beeinflusst. Die lichtgesteuerte Bildung der *cis*-Form des photoschaltbaren Liganden führt erwartungsgemäß zu dessen Bindung an das Syntrophin und zur Inhibierung der Syntrophin-nNOS-Wechselwirkung im Skelettmuskel, gefolgt von der Dislokation von nNOS vom Sarcolema, was wiederum eine Verringerung der NO-Bildung in den Skelettmuskelzellen bewirkt. Die Tatsache, dass die Muskelkontraktion über den photoschaltbaren Liganden mit Licht gesteuert werden kann, unterstreicht die Bedeutung der Lokalisation von nNOS durch α -1-Syntrophin für die Muskelaktivität. Wege, die es ermöglichen, Aktivität und Lokalisation von nNOS örtlich und zeitlich zu steuern, können sehr hilfreich bei der Erforschung von Muskelerkrankungen und der Untersuchung von Erkrankungen wie dem Schlaganfall sein. So wurde kürzlich beschrieben, dass eine Inhibierung der PDZ/PDZ-Wechselwirkung von nNOS zu PSD-95 durch Schmelzen der β -Fingerstruktur in nNOS genutzt werden kann, um den Gehirnschlag zu behandeln.^[18] So könnte nNOS auch als therapeutisches Target zunehmend interessant werden.

Auch wenn die Eindringtiefe von Licht in Gewebe der Anwendung zurzeit noch Grenzen setzt, können Wirkstoffe, die mit Licht aktiviert oder freigesetzt werden, ganz neue Möglichkeiten bieten, lokale Behandlungen von Erkrankungen nichtinvasiv durchzuführen.

Experimentelles

Der photoschaltbare Peptidligand **1** wurde durch Festphasenpeptidsynthese hergestellt (Hintergrundinformationen von Lit. [1a]). Die NBD-Markierung^[19] wurde durch Zugabe von 0.10 mg 4-Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (50 μ mol) in MeOH (4.0 mL) zu einer Lösung aus 1.0 mg Peptid **1** (50 μ mol) in NaHCO₃ bei pH 8.5 (1.0 mL) realisiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf 55°C erwärmt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerüttelt. Nach Einengen und Ansäuern des Ansatzes auf pH 1.5 mit Trifluoressigsäure (1.0 mL) wurde das Peptid in kaltem Et₂O ausgefällt. Die Identität des NBD-markierten Peptids **2** wurde mit ESI-MS (ES+) bestätigt. [M+2H]²⁺: ber.: 1009.9650 (monoisotopisch); gef.: 1009.9237.

Eingegangen am 24. Februar 2011,
veränderte Fassung am 18. Mai 2011
Online veröffentlicht am 7. Juli 2011

Stichwörter: Azobenzol · Inhibitoren · Isomerisierungen · Protein-Protein-Wechselwirkungen · Stickstoffmonoxid

- [1] a) C. Hoppmann, S. Seedorff, A. Richter, H. Fabian, P. Schmieder, K. Rück-Braun, M. Beyermann, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6763–6766; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6636–6639; b) S. Seedorff, C. Appelt, M. Beyermann, P. Schmieder, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *395*, 535–539.
- [2] a) J. E. Brenman, D. S. Chao, S. H. Gee, A. W. McGee, S. E. Craven, D. R. Santillano, Z. Wu, F. Huang, H. Xia, M. F. Peters, S. C. Froehner, D. S. Bredt, *Cell* **1996**, *84*, 757–767; b) B. J. Hillier, K. S. Christopherson, K. E. Prehoda, D. S. Bredt, W. A. Lim, *Science* **1999**, *284*, 812–815; c) A. Abdelmoity, R. C. Padre, K. E. Burzynski, J. T. Stull, K. S. Lau, *FEBS Lett.* **2000**, *482*, 65–70; d) G. D. Thomas, P. W. Shaul, I. S. Yuhanna, S. C. Froehner, M. E. Adams, *Circ. Res.* **2003**, *92*, 554–560.
- [3] a) W. J. Chang, S. T. Iannaccone, K. S. Lau, B. S. Masters, T. J. McCabe, K. McMillan, R. C. Padre, M. J. Spencer, J. G. Tidball, J. T. Stull, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 9142–9147; b) M. Sander, B. Chavoshan, S. A. Harris, S. T. Iannaccone, J. T. Stull, G. D. Thomas, R. G. Victor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13818–13823; c) J. E. Brenman, D. S. Chao, H. Xia, K. Aldape, D. S. Bredt, *Cell* **1995**, *82*, 743–752; d) D. S. Chao, J. R. Gorospe, J. E. Brenman, J. A. Rafael, M. F. Peters, S. C. Froehner, E. P. Hoffman, J. S. Chamberlain, D. S. Bredt, *J. Exp. Med.* **1996**, *184*, 609–618; e) Y. M. Kobayashi, E. P. Rader, R. W. Crawford, N. K. Iyengar, D. R. Thedens, J. A. Faulkner, S. V. Parikh, R. M. Weiss, J. S. Chamberlain, S. A. Moore, K. P. Campbell, *Nature* **2008**, *456*, 511–515.
- [4] K. Rück-Braun, S. Kempa, B. Priesisch, A. Richter, S. Seedorff, L. Wallach, *Synthesis* **2009**, 4256–4267.
- [5] a) C. Renner, L. Moroder, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 868–878; b) G. A. Woolley, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 486–493; c) A. Aemissegger, V. Krautler, W. F. van Gunsteren, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2929–2936; d) U. Kusebauch, S. A. Cadamuro, H.-J. Musiol, M. O. Lenz, J. Wachtveitl, L. Moroder, C. Renner, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7170–7173; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7015–7018; e) Y. Zhang, F. Erdmann, G. Fischer, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 724–726; f) R. Behrendt, C. Renner, M. Schenk, F. Wang, J. Wachtveitl, D. Oesterhelt, L. Morder, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2941–2943; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2771–2774; g) L. G. Ulysee, Jr., J. Chmielewski, *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67*, 127–136; h) L. Ulysse, J. Cubillos, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8466–8467.
- [6] a) F. Zhang, A. Zarrine-Afsar, M. S. Al-Abdul-Wahid, R. S. Prosser, A. R. Davidson, G. A. Woolley, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2283–2289; b) F. Zhang, K. A. Timm, K. M. Arndt, G. A. Woolley, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 4035–4038; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3943–3946; c) B. Schierling, A. J. Noël, W. Wende, L. T. Hien, E. Volkov, E. Kubareva, T. Oretskaya, M. Kokkinidis, A. Rompp, B. Spengler, A. Pingoud, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1361–1366.
- [7] a) T. Stafforst, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 10195–10198; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9998–10001; b) M. Zhou, X. Liang, T. Mochizuki, H. Asanuma, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2213–2216; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2167–2170.
- [8] a) M. R. Banghart, A. Mourot, D. L. Fortin, J. Z. Yao, R. H. Kramer, D. Trauner, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9261–9265; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9097–9101; b) M. Volgraf, P. Gorostiza, R. Numano, R. H. Kramer, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 47–52; c) H. Janovjak, S. Szobota, C.

- Wyart, D. Trauner, E. Y. Isacoff, *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 1027–1032.
- [9] A. A. Beharry, L. Wong, V. Tropepe, G. A. Woolley, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1361–1363; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1325–1327.
- [10] a) S. Zbaida, *Drug Metab. Rev.* **1995**, *27*, 497–516; b) A. Ryan, N. Laurieri, I. Westwood, C.-J. Wang, E. Lowe, E. Sim, *J. Mol. Biol.* **2010**, *400*, 24–37.
- [11] a) O. Diels, C. Wulff, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1924**, *437*, 309–318; b) C. Boulègue, M. Löweneck, C. Renner, L. Moroder, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 591–594.
- [12] R. F. Standaert, S. B. Park, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7952–7966.
- [13] a) J. F. Leikert, T. R. Rathel, C. Müller, A. M. Vollmar, V. M. Dirsich, *FEBS Lett.* **2001**, *506*, 131–134; b) T. R. Räthel, J. F. Leikert, A. M. Vollmar, V. M. Dirsich, *Biol. Proced. Online* **2003**, *5*, 136–142.
- [14] H. Kojima, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi, Y. Hirata, T. Nagano, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3419–3422; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3209–3212.
- [15] D. Blottner, G. Lück, *Cell Tissue Res.* **1998**, *292*, 293–302.
- [16] a) L. Kobzik, M. B. Reid, D. S. Bredt, J. S. Stamler, *Nature* **1994**, *372*, 546–548; b) D. M. Patwell, A. McArdle, J. E. Morgan, T. A. Partridge, M. J. Jackson, *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *37*, 1064–1072; c) D. Pye, J. Palomero, T. Kabayo, M. J. Jackson, *J. Physiol.* **2007**, *581*, 309–318.
- [17] R. F. Furchtgott, S. J. Ehrreich, E. Greenblatt, *J. Gen. Physiol.* **1961**, *44*, 499–519.
- [18] L. Zhou, F. Li, H.-B. Xu, C.-X. Luo, H.-Y. Wu, M.-M. Zhu, W. Lu, X. Ji, Q.-G. Zhou, D.-Y. Zhu, *Nat. Med.* **2010**, *16*, 1439–1443.
- [19] M. Ahnoff, I. Grundevik, A. Arfwidsson, J. Fönselius, B. A. Persson, *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 485–489.