

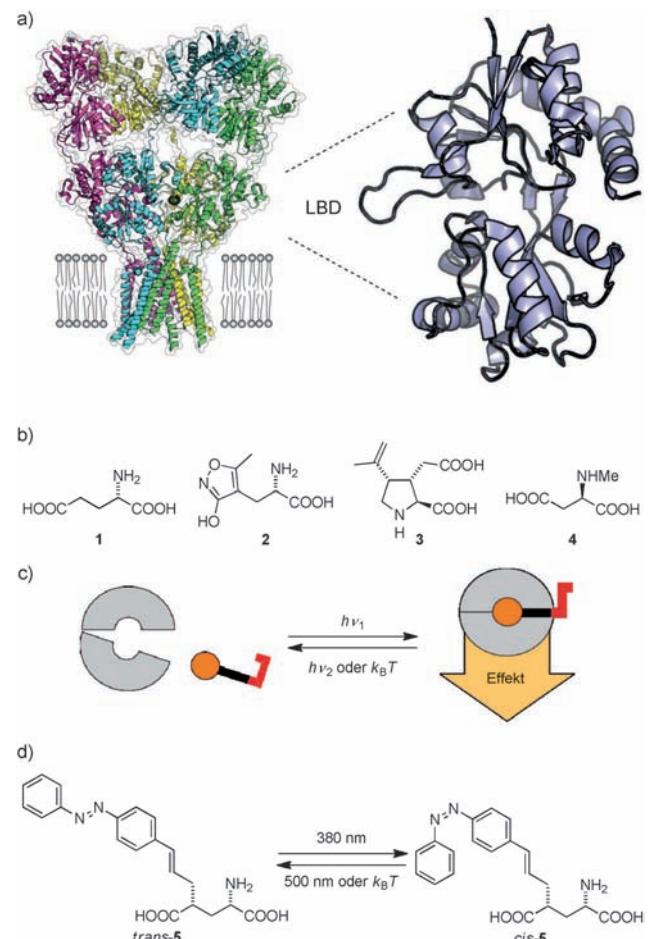
# Ein photochromer Agonist für AMPA-Rezeptoren\*\*

Philipp Stawski, Martin Sumser und Dirk Trauner\*

Die optochemische Genetik verwendet photoschaltbare niedermolekulare Substanzen, um damit neuronale Aktivität zu steuern. Diese können kovalent oder nichtkovalent an Transmembranproteine, welche liganden- oder spannungsabhängige Ionenkanäle sowie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sein können, angebracht werden. Werden diese Hybrid-Photorezeptoren in erregbaren Zellen exprimiert, können ganze neuronale Netzwerke mit einer zeitlichen und räumlichen Auflösung gesteuert werden, die nur mithilfe von Licht erreicht werden kann.<sup>[1]</sup>

Durch ihre zentrale Rolle bei der synaptischen Reizübertragung eignen sich besonders ionotrope Glutamatrezeptoren (iGluRs) für die Anwendung optochemisch-genetischer Werkzeuge. Diese Ionenkanäle werden durch Glutamat (**1**) aktiviert und lassen sich in drei Hauptklassen mit jeweils eigenen pharmakologischen Merkmalen einteilen (Abbildung 1b).<sup>[2]</sup> Die AMPA-Rezeptoren (GluAs), benannt nach dem selektiven Agonisten 2-Amino-3-(5-methyl-3-hydroxyisoxazol-4-yl)propansäure (**2**), können als die „Arbeitspferde“ der Synapsen angesehen werden. Sie bewirken den Großteil der Reizleitung im Zentralnervensystem von Säugern, und sie sind daher auch hauptsächlich im Zentrum der postsynaptischen Dichte anzutreffen. Dagegen sind Kainat-Rezeptoren (GluKs), benannt nach Kainsäure (**3**), am Rand des synaptischen Spalts zu finden und spielen eher eine unterstützende und modulierende Rolle. NMDA-Rezeptoren sind nach ihrer spezifischen Reaktion auf den Agonisten *N*-Methyl-D-aspartat (**4**) benannt und sind sowohl spannungs- als auch ligandengesteuerte Kanäle. Durch diese spezielle Eigenschaft dienen sie zur Detektion von postsynaptischer Depolarisation und gleichzeitiger Glutamatausschüttung (Koinzidenzdetektor).<sup>[3]</sup>

Schon seit langem ist unsere Gruppe daran interessiert, iGluRs in lichtgesteuerte Kanäle für optochemische Anwendungen umzubauen. Aufgrund der gut bekannten Architektur ihrer muschelschalenförmigen Ligandenbindedomäne (LBD) und übersichtlichen pharmakologischen Eigenschaften, konzentrierten sich unsere Bemühungen bisher auf Kainat-Rezeptoren (Abbildung 1a). So entwickelten wir LiGluR, einen lichtgesteuerten ionotropen Glutamat-Re-



**Abbildung 1.** a) Allgemeine Struktur eines Glutamat-Rezeptors (in Anlehnung an PDB 3KG2) mit der Nahaufnahme einer LBD (PDB 2P2A). b) Der universelle und die Subtyp-spezifischen Agonisten der iGluRs. c) Schematische Darstellung der Funktionsweise eines PCLs. d) 4-GluAzo (**5**), ein auf Kainat-Rezeptoren wirkender PCL.

zeptor, bei dem ein Glutamatderivat mithilfe eines photoschaltbaren Verbindungsstücks kovalent an die Oberfläche der LBD angebracht wurde (ein „photoswitched tethered ligand“, PTL).<sup>[4]</sup> Kurz darauf stellten wir einen photochromen Liganden (PCL) für Kainat-Rezeptoren vor, der als reversibel photoaktivierbares Glutamat fungiert (Abbildung 1c,d).<sup>[5]</sup> Dabei handelt es sich um 4-GluAzo (**5**) – ein Glutamatderivat, dessen Affinität und Wirksamkeit an GluK1 und GluK2 sich durch Photoisomerisierung ändern. Hierdurch kann **5** zur Steuerung neuronaler Aktivität mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen verwendet werden.

Die rationale Entwicklung geeigneter Photoschalter für AMPA-, Kainat- und NMDA-Rezeptoren wurde durch die Verfügbarkeit zahlloser Röntgenkristallstrukturen enorm erleichtert.<sup>[6]</sup> Die muschelschalenförmige LBD dieser Rezeptoren

[\*] Dipl.-Chem. P. Stawski, Prof. Dr. D. Trauner

Department Chemie und Center for Integrated Protein Science,  
Ludwig-Maximilians-Universität  
Butenandtstraße 5–13 (F4.086), 81377 München (Deutschland)  
E-Mail: dirk.trauner@lmu.de  
Homepage: <http://www.cup.uni-muenchen.de/oc/trauner/>

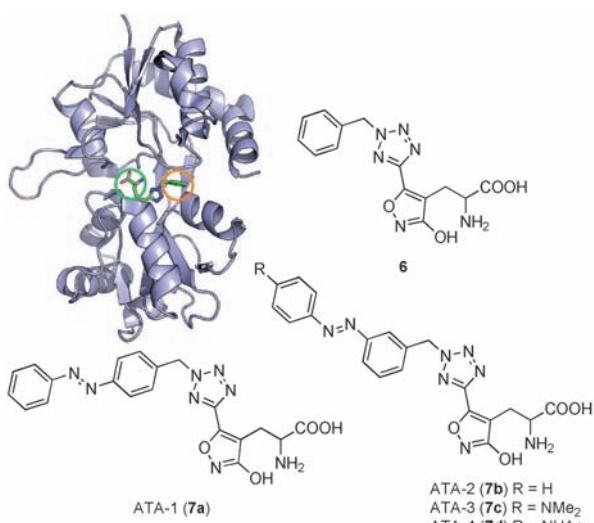
[\*\*] P.S. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Kekulé-Stipendium. Wir danken D. T. Hog, S. Strych, D. Woodmansee und V. Erdmann für hilfreiche Diskussionen. Diese Arbeit wurde durch den SFB 870 und das ERC (Grant Nr. 268795) gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201109265> zu finden.

toren wurde zusammen mit einer Vielzahl von Agonisten wie AMPA (**2**) und Domoinsäure, Antagonisten wie DNQX und Modulatoren wie Cyclothiazid kristallisiert. Erst kürzlich wurde die Struktur eines vollständigen, tetrameren GluA2-Rezeptors veröffentlicht.<sup>[7]</sup> Diese bahnbrechende Arbeit gibt nicht nur Einblicke in die Architektur und Symmetrie von GluAs, sondern auch von allen anderen Glutamat-Rezeptoren.

Obwohl sich die LBDs von Kainat- und AMPA-Rezeptoren stark ähneln, existieren kleine Unterschiede, die offenbar verhindern, dass 4*R*-substituierte Glutamat-Derivate wie 4-GluAzo (**5**) als Agonisten fungieren. Ein Grund hierfür könnte sein, dass sich die LBD von AMPA-Rezeptoren in der aktiven Form stärker um den Liganden schließt als bei Kainat-Rezeptoren. Hierdurch können an Glutamat angefügte Seitenketten nicht so leicht im Protein untergebracht werden wie im Fall von GluKs.

Aus diesem Grund wurden Glutamat-Derivate wie 4-GluAzo (**5**) mit einer photoschaltbaren Seitenkette als unpassend für die lichtabhängige Stimulation von AMPA-Rezeptoren befunden, und wir beschlossen, unser Moleküldesign tiefgreifend zu ändern. Wir berichten nun über eine neue Klasse von Molekülen, die wir ATAs (Azobenzol-Tetrazolyl-AMPAs, **7a-d**, Abbildung 2) nennen. Diese Verbindungen sind photochrome Derivate von AMPA und wirken auf in



**Abbildung 2.** Die Struktur von BnTetAMPA (**6**), sein Komplex mit der GluA2-LBD (PDB 2P2A) sowie die Strukturen von ATA-1 (**7a**) und ATA-2–4 (**7b–d**) in ihrer jeweiligen *trans*-Form. Der grüne Kreis zeigt die Lage des alten, der orangefarbene Kreis die des neu identifizierten „Ausgangskanals“.

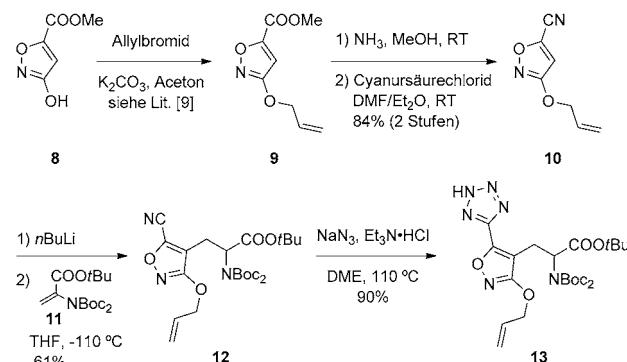
HEK-Zellen oder Neuronen exprimierte GluA-Rezeptoren. Eine davon (**7c**) löst im Dunkeln neuronale Aktivität aus und wird schnell durch Bestrahlung mit blau-grünem Licht inaktiviert. Somit könnte sie als Werkzeug zur Untersuchung von neuronalen Verschaltungen, die durch AMPA-Rezeptoren gesteuert werden, und als vielversprechendes therapeutisches Hilfsmittel, z.B. für die Wiederherstellung des Sehprozesses mithilfe künstlicher Photorezeptoren, dienen.

Unser Design von **7a–d** beruht auf einer vor kurzem veröffentlichten Kristallstruktur der GluA2-LBD in Verbindung mit dem hochwirksamen und selektiven Agonisten BnTetAMPA (**6**).<sup>[8]</sup> Diese Verbindung ist ein Derivat von AMPA, bei dem die Methylgruppe am Isoxazolring durch einen an N2 benzylisierten Tetrazolring ersetzt wurde. Wie aus der Kristallstruktur ersichtlich, füllt der Benzylrest eine Tasche des Rezeptors aus, die sich vom „Ausgangskanal“, den wir bei den Kainat-Rezeptoren verwendeten, unterscheidet (Abbildung 2).

Aufgrund dieser Struktur nahmen wir an, dass eine Erweiterung des Benzolrings zu einer Azobenzoleinheit es dem Molekül gestatten sollte, zur wasserexponierten Oberfläche vorzudringen, ohne das Schließen der Ligandenbindedomäne und somit die Aktivierung des Rezeptors zu verhindern. Ebenso konnten wir ableiten, dass hierfür eine *meta*-Substitution in Bezug auf den ersten Benzolring nötig wäre.

Um unsere Hypothese zu überprüfen, dass ATAs als photochrome Liganden fungieren, synthetisierten wir die vier Varianten **7a–d** (Abbildung 2). Diese Verbindungen weisen unterschiedliche Substitutionsmuster auf und haben aufgrund des Vorhandenseins oder Fehlens eines Substituenten in 4'-Stellung der Azobenzoleinheit unterschiedliche photophysikalische Eigenschaften. Die Dimethylaminogruppe in **7c** verschiebt beispielsweise das Absorptionspektrum des *trans*-Isomers bathochrom ( $\lambda_{\text{max}} = 456 \text{ nm}$ ) und ermöglicht dadurch die Verwendung höherer Wellenlängen, die bei längerer Bestrahlung von Zellen im allgemeinen besser verträglich sind.

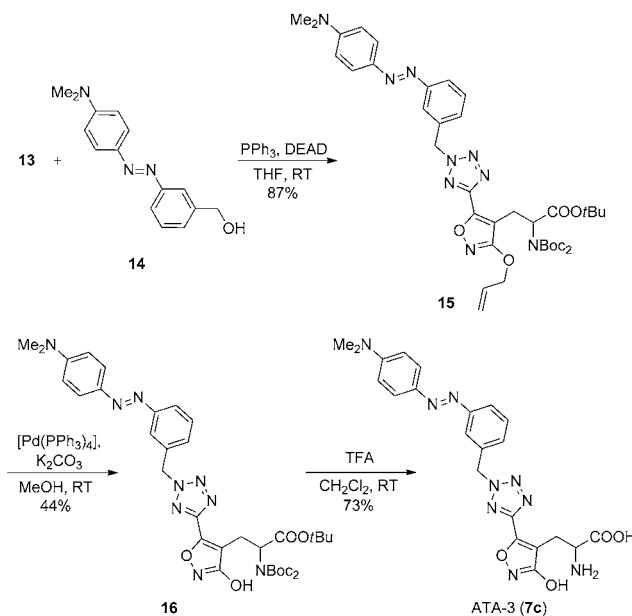
Als Vorbild für die Synthese von ATA-3 (**7c**) diente die veröffentlichte Route zu BnTetAMPA (**6**),<sup>[8]</sup> deren Schutzgruppenstrategie optimiert wurde (Schemata 1 und 2). Unser Weg begann mit dem bekannten Hydroxyisoxazol **8**,<sup>[9]</sup> das als Allylether geschützt wurde.<sup>[10]</sup> Der resultierende Methylester



**Schema 1.** Synthese des racemischen Schlüsselintermediats **13**.

**9** wurde in zwei Schritten in das Nitril **10** überführt.<sup>[11]</sup> Eine Lithiierung von **10**, gefolgt von konjugierter Addition an das Dehydroalanin **11**, ergab dann das racemische AMPA-Derivat **12**. Dieser Schritt musste sorgfältig optimiert werden, konnte aber bei sehr tiefen Temperaturen zuverlässig in großem Maßstab durchgeführt werden. Eine 1,3-dipolare Cycloaddition von Stickstoffwasserstoffsäure an das Nitril **12** ergab schließlich das Tetrazol **13**, das als gemeinsames Intermediat für die Synthese aller ATAs **7a–d** diente.

Eine Mitsunobu-Kopplung von **13** mit dem Azobenzol **14**<sup>[13]</sup> ergab das N2-alkylierte Tetrazol **15** als Hauptprodukt (Schema 2). Das unerwünschte N1-alkylierte Regioisomer konnte nach Entfernen der Allylgruppe unter milden Be-



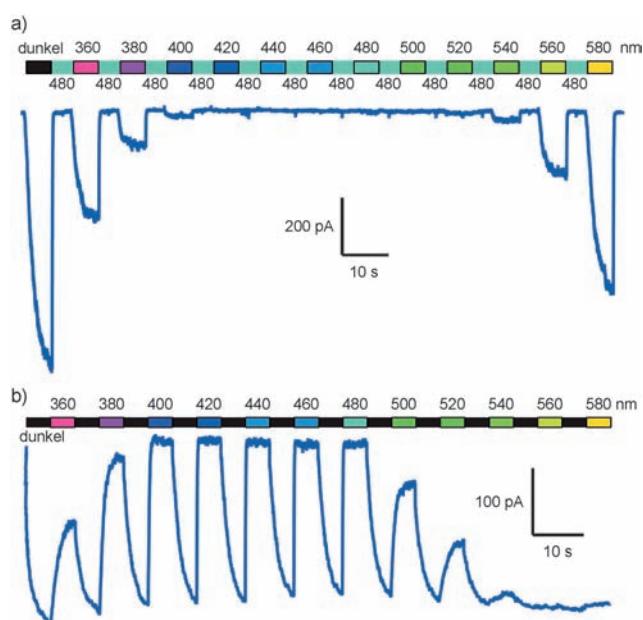
**Schema 2.** Synthese des PCLs ATA-3 (**7c**). DEAD = Diethylazodicarboxylat.

dingungen<sup>[12]</sup> mithilfe von HPLC abgetrennt werden, wodurch man das isomerenreine Hydroxyisoxazol **16** erhielt. Die anschließende globale Entschützung mit Trifluoressigsäure (TFA) ergab die freie Aminosäure **7c** nach Umkehrphasen-Säulenchromatographie. **7b** und **7d** sowie die *para*-substituierte Kontrollverbindung **7a** wurden analog synthetisiert.<sup>[13]</sup>

Wie erwartet, zeigten ATA-3 (**7c**) und ATA-4 (**7d**) im Vergleich zu ATA-1 (**7a**) und ATA-2 (**7b**) deutlich rotverschobene Absorptionsspektren.<sup>[13]</sup> Durch vollständiges Überlappen der  $\pi-\pi^*$ - und  $n-\pi^*$ -Banden in physiologischer Pufferlösung konnte **7c** im Gegensatz zu seinen Artverwandten nicht aktiv aus der *cis*- in die *trans*-Konfiguration überführt werden. Allerdings erwies sich die thermische Relaxation als hinreichend schnell unter diesen Bedingungen.

Die biologische Aktivität von **7a-d** wurde an Mauskortexschnitten und HEK293T-Zellen mithilfe der elektrophysiologischen Ganzzellenableitung untersucht (Abbildung 3 und 4). Während **7a** in keiner der Präparationen Aktivität zeigte und **7b** keine eindeutigen Ergebnisse lieferte, erwiesen sich **7c** und **7d** als effektive *trans*-Agonisten von in HEK293T-Zellen exprimierten GluA2-Rezeptoren. Somit zeigte sich die *meta*-Substitution bezüglich des Azobenzols als notwendiges Strukturmotiv.

Da **7c** die höchste Aktivität und die besten kinetischen Merkmale aufwies, konzentrierten wir unsere weiteren Untersuchungen auf diesen PCL. Sein Aktionsspektrum an GluA2-Rezeptoren, exprimiert in HEK293T-Zellen, ist in Abbildung 3 zu sehen.



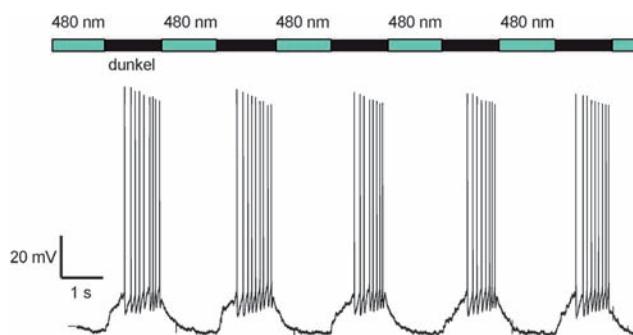
**Abbildung 3.** a) Aktionsspektrum von ATA-3 (**7c**) an in HEK-Zellen exprimierten GluA2-Rezeptoren. b) Aktionsspektrum, aufgenommen an einer anderen Zelle mit absatzweiser Dunkelheit ( $c=50 \mu\text{M}$ ).

Wie geplant, zeigte **7c** den stärksten Einwärtsstrom im dunkeladaptierten *trans*-Zustand. Bei Bestrahlung mit Licht wechselnder Wellenlängen ergaben sich photostationäre Zustände, die zu weniger oder gar keinem Strom führten (Abbildung 3 a). Zusätzlich bestimmten wir die Kinetik der Ströme in Gegenwart von **7c** im Dunkeln und bei verschiedenen Wellenlängen (Abbildung 3 b). Es zeigte sich, dass der schnellste Abfall des Stroms beim Schalten von Dunkelheit zu Licht mit  $\lambda=480 \text{ nm}$  erreicht wird [ $\tau_{\text{off}}=(47.2 \pm 7.7) \text{ ms}$ ].<sup>[13]</sup> Als wir **7c** an GluK2 testeten, zeigte sich hingegen keine Wirkung (weder agonistisch noch antagonistisch).<sup>[13]</sup> Dies verdeutlicht die Selektivität des ATA-Chemotyps für AMPA- gegenüber Kainat-Rezeptoren.

Als letzten Schritt der Charakterisierung in nichterregbaren Zellen bestimmten wir die Wirksamkeit von **7c** an GluA2, exprimiert in HEK293T-Zellen. Die Verbindung ist ein partieller Agonist mit  $\text{EC}_{50}=24 \mu\text{M}$  im Dunkeln und ist praktisch inaktiv bei Bestrahlung mit 480 nm.<sup>[13]</sup> Es ist allerdings anzunehmen, dass enantiomerenreines Material, wie auch bei anderen AMPA-Derivaten,<sup>[14]</sup> eine erheblich höhere Aktivität zeigen wird.

Als nächstes untersuchten wir die Fähigkeit von **7c**, Aktionspotentiale in erregbaren Zellen zu steuern. Aktionspotentiale wurden von Schicht-2/3-Neuronen in einem kortikalen Hirnschnitt der Maus aufgenommen. Durch Gabe von **7c** in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  konnten verlässlich Aktionspotentiale durch Schalten von Licht (480 nm) zu Dunkelheit erzeugt werden (Abbildung 4). Da für die Aufnahmen nur moderate Lichtintensitäten verwendet wurden ( $20 \text{ mW m}^{-2} \text{ m}^{-2}$ ),<sup>[13]</sup> konnten diese über einen längeren Zeitraum ohne ersichtliche Photoschädigung der Zellen durchgeführt werden.

Des Weiteren wurde die Aktivität von **7c** in neuronalen Netzwerken anhand bekannter pharmakologischer Verfahren



**Abbildung 4.** Reversible Erzeugung von Aktionspotentialen durch **7c** an Mauskortikalneuronen (gehalten bei  $-65\text{ mV}$ ).

für Glutamatrezeptoren untersucht. GYKI-52466,<sup>[15]</sup> ein AMPA-selektiver Antagonist, unterdrückte den Effekt des PCLs ebenso wie der AMPA/Kainat-Antagonist CNQX. Weitere Experimente mit dem selektiven NMDA-Antagonisten AP5<sup>[16]</sup> jedoch konnten das Feuern von Aktionspotentialen nicht unterbinden.<sup>[13]</sup> Somit zeigte sich, dass **7c** zwischen allen drei Glutamatrezeptortypen unterscheiden kann und selektiv auf AMPA-Rezeptoren wirkt.

Zusammenfassend haben wir einen AMPA-spezifischen photochromen Liganden entwickelt, der Neuronen im Dunkeln stimuliert, bei Bestrahlung mit blau-grünem Licht mittlerer Intensität jedoch schnell inaktiviert. ATA-3 (**7c**) nutzt einen neuen „Ausgang“, mit dessen Hilfe es möglich sein sollte neue, hoch AMPA-spezifische Liganden, die nicht notwendigerweise auch photochrom sein müssen, zu entwerfen. Aufgrund der Bedeutung von AMPA-Rezeptoren bei der synaptischen Reizleitung könnte sich diese Verbindung als nützliches Werkzeug zur Steuerung der unterschiedlichsten neuronalen Netzwerke mit Licht erweisen. In seiner Funktionsweise ähnelt es der Logik von OFF-Bipolar-Zellen, und entsprechend auch retinalen OFF-Ganglion-Zellen, die ihre Aktivität im Dunkeln erhöhen und diese verringern, wenn Licht auf ihr rezeptives Feld trifft. Somit könnte **7c** auch nützlich für unseren Bemühungen sein, das Sehvermögen mit

lichtschaltbaren niedermolekularen Substanzen wiederherzustellen.

Eingegangen am 31. Dezember 2011  
Online veröffentlicht am 19. April 2012

**Stichwörter:** Bioorganische Chemie · Diazoverbindungen · Optochemische Genetik · Photopharmakologie · Rezeptoren

- [1] T. Fehrentz, M. Schönberger, D. Trauner, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12362–12390; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12156–12182.
- [2] S. F. Traynelis, L. P. Wollmuth, C. J. McBain, F. S. Menniti, K. M. Vance, K. K. Ogden, K. B. Hansen, H. Yuan, S. J. Myers, R. Dingledine, D. Sibley, *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62*, 405–496.
- [3] R. W. Gereau, G. Swanson, *The Glutamate Receptors*, Humana, Totowa, **2008**.
- [4] M. Volgraf, P. Gorostiza, R. Numano, R. H. Kramer, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 47–52.
- [5] M. Volgraf, P. Gorostiza, S. Szobota, M. R. Helix, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 260–261.
- [6] P. Stawski, H. Janovjak, D. Trauner, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7759–7772.
- [7] A. I. Sobolevsky, M. P. Rosconi, E. Gouaux, *Nature* **2009**, *462*, 745–756.
- [8] S. B. Vogensen, R. P. Clausen, J. R. Greenwood, T. N. Johansen, D. S. Pickering, B. Nielsen, B. Ebert, P. Krosgaard-Larsen, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3438–3442.
- [9] M. Frey, V. Jäger, *Synthesis* **1985**, 1100–1104.
- [10] R. Riess, M. Schon, S. Laschat, O. Jäger, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 473–479.
- [11] O. Satoru, I. Koji, T. Koj, O. Masaki, B. Yoshihiro, T. Hiroyuki, Y. Taihei (U.S.T.P. Office), USA, US-Patent 20040082607, **2004**.
- [12] P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4. Aufl., Wiley, Hoboken, **2006**.
- [13] Siehe die Hintergrundinformationen.
- [14] a) T. B. Stensbøl, L. Borre, T. N. Johansen, J. Egebjerg, U. Madsen, B. Ebert, P. Krosgaard-Larsen, *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *380*, 153–162; b) S. B. Vogensen, H. S. Jensen, T. B. Stensbøl, K. Frydenvang, B. Bang-Andersen, T. N. Johansen, J. Egebjerg, P. Krosgaard-Larsen, *Chirality* **2000**, *12*, 705–713.
- [15] S. Donevan, M. Rogawski, *Neuron* **1993**, *10*, 51–59.
- [16] R. H. Evans, A. A. Francis, A. W. Jones, D. A. S. Smith, J. C. Watkins, *Br. J. Pharmacol.* **1982**, *75*, 65–75.