

# Lichtgesteuerte Werkzeuge

Clara Brieke, Falk Rohrbach, Alexander Gottschalk,\* Günter Mayer\* und Alexander Heckel\*

## Stichwörter:

Bioorganische Chemie · Optogenetik ·  
Photoaktivierbare Verbindungen ·  
Photochemie · Photoschalter

Joachim Engels und Ernst Bamberg gewidmet



**Die zeitliche und räumliche Kontrolle über chemische und biologische Prozesse spielt eine Schlüsselrolle im Leben, wo das Ganze oft viel mehr ist als die Summe seiner Einzelteile. Trivialerweise bilden die Moleküle einer Zelle noch lange kein lebendiges System aus, wenn sie lediglich willkürlich angeordnet werden. Wenn wir diese Zusammenhänge und die Probleme, die durch Fehlfunktionen entstehen, verstehen wollen, benötigen wir Werkzeuge, mit denen wir komplexe Experimente für diese Fragestellungen entwickeln können. Externe Triggersignale, mit denen wir präzise bestimmen können, wo, wann und in welchem Ausmaß ein Prozess gestartet oder gestoppt wird, sind dafür äußerst wertvoll. Licht ist solch ein ideales Triggersignal: Es ist hoch selektiv und bei richtiger Anwendung unschädlich. Es kann mit gut etablierten Techniken erzeugt und manipuliert werden, und viele Ansätze existieren, um Licht in lebenden Systemen anzuwenden – von Zellen bis zu höheren Organismen. Dieser Aufsatz wird sich mit den aktuellen Entwicklungen der letzten sechs Jahre befassen und die zugrundeliegenden Technologien sowie ihre Anwendungen diskutieren.**

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	8573
<b>2. Irreversible Photo(de)aktivierung</b>	8573
<b>3. Reversible Photoschalten</b>	8586
<b>4. Optogenetik</b>	8594
<b>5. Ausblick</b>	8597

## 1. Einleitung

Auch wenn die Idee, Prozesse mit Licht zu regulieren, bei weitem nicht neu ist, gab es in den letzten Jahren einen Boom an verbesserten Technologien und neuen Anwendungen sowie die Entwicklung einer völlig neuen Strategie: Es gibt nun drei prinzipielle Ansätze für eine Regulierung mit Licht. Entweder man verwendet photolabile Schutzgruppen für irreversible Photo(de)aktivierung („uncaging“, Abschnitt 2), Photoschalter für ein reversibles Schalten (Abschnitt 3) oder genetisch kodierte lichtgesteuerte Einheiten (Optogenetik, Abschnitt 4). Jede dieser Strategien hat ihre Vor- und Nachteile, aber mit den jüngsten Entwicklungen in den einzelnen Gebieten werden die Grenzen zwischen ihnen zunehmend vage. Hier geben wir, ohne Anspruch auf Vollständigkeit, einen Überblick über Entwicklungen in den letzten sechs Jahren (der Schwerpunkt bei den erwähnten Anwendungen liegt vor allem auf biologischen Systemen). Für die Zeit davor möchten wir auf frühere Übersichtsartikel verweisen.<sup>[1]</sup> Mehrere Beiträge mit ausgewählten Schwerpunkten sind in den letzten sechs Jahren ebenfalls erschienen.<sup>[2–12]</sup>

## 2. Irreversible Photo(de)aktivierung

### 2.1. Konzepte

#### 2.1.1. Photoaktivierbare Gruppen

Ein Weg, um molekulare Prozesse mit Licht zu regulieren, ist die Verwendung von photolabilen Schutzgruppen an genau der richtigen Stelle in einem Molekül. Im Idealfall ist damit die Aktivität des Moleküls vollständig blockiert, kann aber durch Abspalten der Schutzgruppe mit Licht komplett wiederhergestellt werden. Diese Strategie ist von Natur aus irreversibel. Erste Anwendungen dieses Prinzips reichen zurück bis in das Jahr 1978, als Hoffman et al. ein photo-

aktivierbares Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) herstellten und damit den Mechanismus der Na/K-Pumpe untersuchten.<sup>[13]</sup> Kurz vor dieser Studie hatte Engels ein photoaktivierbares cyclisches 3',5'-Phosphat von Adenosin (cAMP) synthetisiert.<sup>[14]</sup> Hoffman prägte den Begriff „caged“ für biologisch aktive Verbindungen, die mit einer photolabilen Gruppe („cage“ oder „caging group“) inaktiviert wurden. Durch dieses neue Konzept wurden Experimente möglich, die sonst schwer oder gar nicht durchführbar gewesen wären. Der Begriff „caging“ ist allerdings nicht unproblematisch, weil er oft missinterpretiert wird und suggeriert, dass das Molekül sich im Inneren eines Käfigs befindet, der durch Licht geöffnet werden kann. Darüber hinaus sind Literaturrecherchen sehr komplex: Textsuchen ergeben zu viele Ergebnisse, da das Wort „caged“ in etlichen Kontexten erscheint. Das gleiche gilt für eine Suche nach den photolabilen Gruppen, die ebenso in vielen weiteren Kontexten vorkommen. Außerdem besteht die Gefahr, neue Entwicklungen zu verpassen, wenn man nur nach den bekannten Strukturen sucht. Das Unbehagen über den Begriff „cage“ hat darüber hinaus eine Vielfalt von Alternativen hervorgebracht, wie z. B. „photo-

- [\*] C. Brieke, Prof. Dr. A. Heckel  
Goethe-Universität Frankfurt  
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie  
Buchmann-Institut für Molekulare Lebenswissenschaften  
Max-von-Laue-Straße 9, 60438 Frankfurt/Main (Deutschland)  
E-Mail: heckel@uni-frankfurt.de
- Prof. Dr. A. Gottschalk  
Buchmann-Institut für Molekulare Lebenswissenschaften  
Institut für Biochemie  
Max-von-Laue-Straße 15, 60438 Frankfurt/Main (Deutschland)  
E-Mail: a.gottschalk@em.uni-frankfurt.de
- F. Rohrbach, Prof. Dr. G. Mayer  
Universität Bonn, LIMES-Institut  
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)  
E-Mail: gmayer@uni-bonn.de

aktivierbar“, „lichtgesteuert“ oder sogar „photogeschützt“, was eine Textsuche weiter verkompliziert. Schließlich soll auf den feinen Unterschied zwischen den Begriffen „uncaged“ (hiermit beschreibt man den Zustand eines „caged molecule“ nach dem Belichten) und „not caged“ (das unmodifizierte Molekül selbst) hingewiesen werden. Auch wenn beide Begriffe im Idealfall denselben Zustand beschreiben, ist es wichtig, in Berichten über Experimente zwischen den beiden zu differenzieren, da das letztere die Positivkontrolle für das erstere darstellt.

Die Anforderungen an gute photolabile Schutzgruppen sind komplex: Sie sollten leicht einführbar, gut löslich und stabil unter physiologischen (auch intrazellulären) Bedingungen sein. Für eine effiziente Photoaktivierung sollten sie einen großen molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  besitzen. Allerdings genügt es nicht alleine zu beschreiben, wie viel von dem aktivierenden Licht absorbiert wird (um eine unnötig hohe Lichtdosis zu vermeiden), sondern auch der Anteil der Moleküle im angeregten Zustand, die tatsächlich die gewünschte Photoaktivierungsreaktion eingehen, ist wichtig.

Dieser Anteil wird durch die Freisetzungsquantenausbeute  $\Phi$  beschrieben. Zudem sollte die Freisetzungsreaktion schnell und nur entlang des gewünschten Reaktionspfades verlaufen (die primäre Photoreaktion ist üblicherweise innerhalb von Pikosekunden abgeschlossen). Zur Vermeidung von Lichtschäden sollte die Freisetzungsreaktion bei Wellenlängen erfolgen, bei denen die Probe transparent ist und keine unerwünschten Nebenreaktionen ausgelöst werden. Außerdem sollte die photolabile Schutzgruppe mit einer Vielzahl von Abgangsgruppen kompatibel sein. Da bei der Photolyse immer ein Nebenprodukt (das Abspaltprodukt der photolabilen Gruppe) erzeugt wird, ist es wichtig, dass das Nebenprodukt selbst nicht toxisch ist. Des Weiteren sollten diese Nebenprodukte nicht mit den noch geschützten Verbindungen um das Anregungslicht konkurrieren. Es kann aber auch von Vorteil sein, wenn die Freisetzungsreaktion, z. B. durch die Entstehung von Fluoreszenz, verfolgt werden kann. Schließlich kann der Transport der modifizierten Substanz in die Zelle ein Problem darstellen, wobei die photolabile Schutzgruppe darauf sowohl einen positiven als auch negativen Einfluss haben kann. Erfreulicherweise wurden viele Antworten auf diese Anforderungen gefunden, und in der Literatur der letzten 30 Jahre gibt es viele Anwendungen dieses Prinzips. Auch existieren bereits viele gute Übersichtsartikel (siehe oben). Allein für die letzten sechs Jahre haben wir über die Mechanismen der Photolyse oder neue und verbesserte Versionen von photolabilen Schutzgruppen rund 130 Arbeiten gefunden. Daher ist es nicht möglich, eine umfassende Darstellung des Forschungsgebiets zu geben. Stattdessen wollen wir uns im Folgenden auf zwei bestimmte Bereiche konzentrieren, die in unseren Augen besonders in-



Clara Brieke (geb. Menge) studierte Biomedizinische Chemie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz und verfertigte unter der Anleitung von Prof. Dr. Kunz ihre Diplomarbeit über die Synthese von Glycopeptid-Mitogen-Konjugaten als Antitumorvakzine. Seit 2008 promoviert sie bei Prof. Dr. Heckel an der Goethe-Universität Frankfurt. Ihre Forschung beschäftigt sich mit der wellenlängenselektiven Photospaltung von Oligonukleotiden und der Entwicklung neuer photoschaltbarer Nukleinsäureanaloga.



Falk Rohrbach studierte Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Kaiserslautern und der Universität von Murcia. In seiner Diplomarbeit am Novartis-Institut für Biomedizinische Forschung in Basel entwickelte er eine Methode zur Quantifizierung von Biomarkern für oxidativen Stress. Seit 2010 promoviert er bei Prof. Dr. Mayer an der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn und beschäftigt sich mit chemischen Modifizierungen für Aptamerstrategien zur Regulation der Blutgerinnung und der Genexpression.



Alexander Gottschalk studierte Chemie in Frankfurt und Marburg. In seiner Promotion bei Prof. Dr. Lührmann an der Philipps-Universität Marburg charakterisierte er RNA-Protein-Komplexe aus der Hefe. Während seines Postdoc-Aufenthalts bei Prof. Dr. Schafer (UC San Diego) untersuchte er Proteine in *C. elegans*, die mit dem nikotinischen Rezeptor assoziiert sind. 2003 bekam er eine Juniorprofessur an der Goethe-Universität Frankfurt. Zusammen mit Bamberg und Nagel, führte er das Kanalrhodopsin in *C. elegans* ein, um zum ersten Mal lichtreguliertes Verhalten in diesen Tieren zu erhalten. Diesen Ansatz vertiefend, wurde er 2010 Heisenberg-Professor.

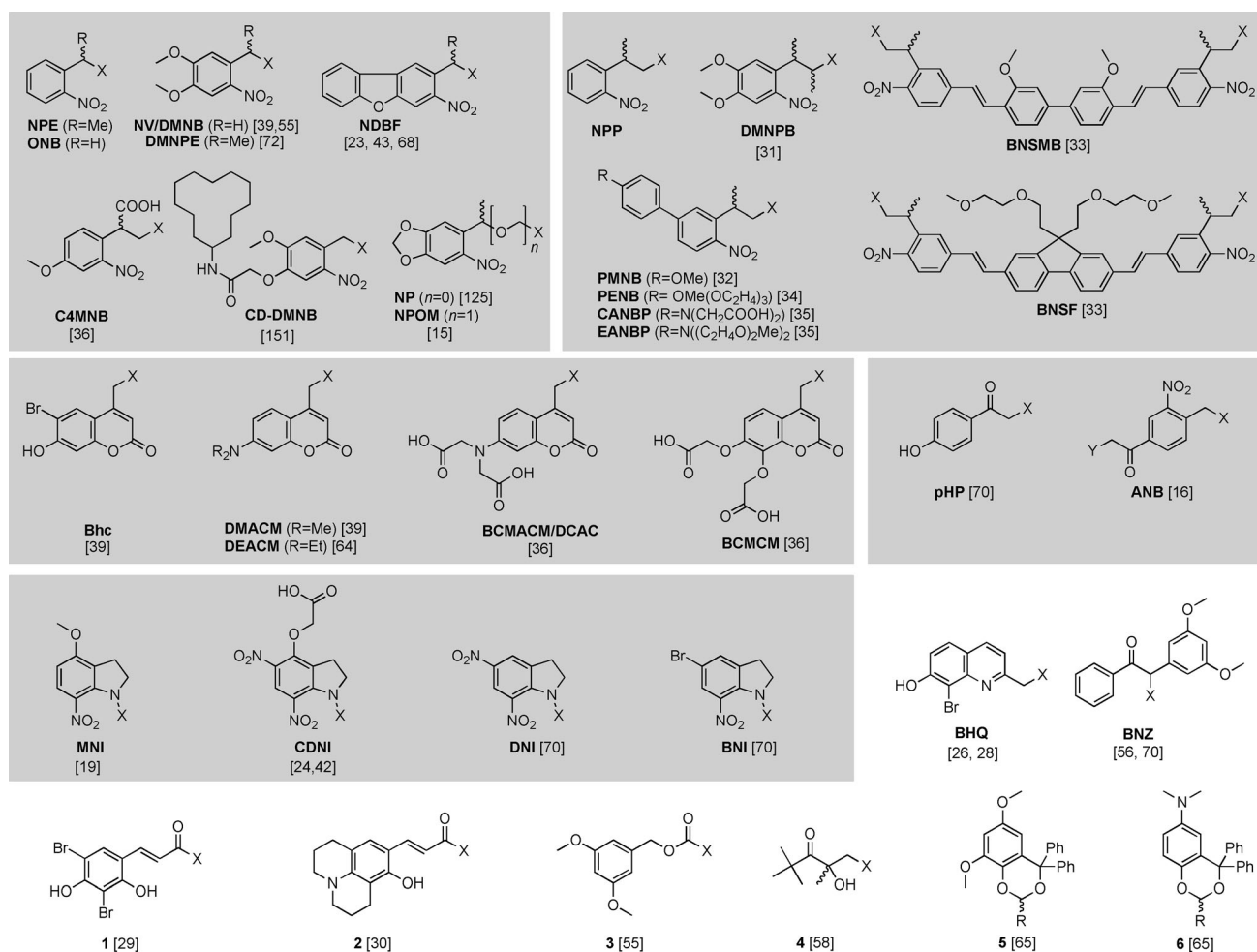


Günter Mayer studierte Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Nach seinem Diplom promovierte er an der Universität Bonn. Von 2001 bis 2004 leitete er in einer Biotech-Firma die Abteilung für kombinatorische Biotechnologie. 2009 erhielt er seine Habilitation in Chemischer Biologie und Biomolekularer Medizin und war von 2009 bis 2010 als Professor für Translationsbiologie an der Universität von Strathclyde, Glasgow, beschäftigt. Seit 2010 ist er Professor für Chemische Biologie und Chemische Genetik am LIMES-Institut der Universität Bonn.



Alexander Heckel studierte Chemie in Konstanz und promovierte bei Prof. Dr. Seebach an der ETH Zürich. Während seines Postdoc-Aufenthalts am Caltech bei Prof. Dr. Dervan beschäftigte er sich mit der Erkennung von DNA mit „Dervan-Polyamiden“. Als Nachwuchsgruppenleiter arbeitete er dann mit einem Liebig- und Emmy-Noether-Stipendium im Umfeld von Prof. Dr. Famulok an der Universität Bonn. Hier wandte er sich der Lichtregulation von Oligonukleotiden zu. 2007 folgte er einem Ruf des Exzellenzclusters für Makromolekulare Komplexe an die Universität Frankfurt, wo er seitdem eine Professur innehat.





**Abbildung 1.** Überblick über verschiedene photoaktivierbare Schutzgruppen. X steht für die Verbindungen (meist über Alkohole, Amine oder Carbonsäuren verknüpft), die bei Lichtbestrahlung freigesetzt werden. Die angegebenen Literaturstellen sind durchaus keine vollständige Auflistung ihrer Verwendungen. Die photaktivierbaren Gruppen sind in Gruppen abgebildet.

teressant und konzeptionell zukunftssträftig sind: Zweiphotonenaktivierung und wellenlängenselektive Photospaltung. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die photolabilen Schutzgruppen, auf die wir in den folgenden Abschnitten eingehen werden, und in Tabelle 1 sind typische photophysikalische Eigenschaften zusammengefasst.

### 2.1.2. Zweiphotonenaktivierung

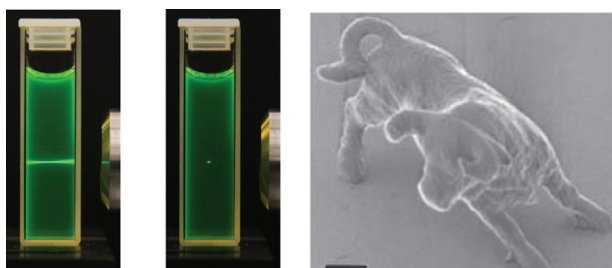
Eine sehr interessante Alternative zur normalen Einphotonenaktivierung einer photolabilen Schutzgruppe stellt die Zweiphotonentechnik dar, bei der mit Licht etwa der doppelten Wellenlänge angeregt wird.<sup>[17,18]</sup> Für eine photolabile Schutzgruppe mit einem Absorptionsmaximum bei 365 nm, kann man beispielsweise versuchen, Licht der Wellenlänge von 730 nm zu verwenden. Da Zweiphotonenaktivierung jedoch ein echter nichtlinearer optischer Effekt ist, findet sie nur bei hohen Lichtintensitäten statt. Daher müssen spezielle Laser-Lichtquellen eingesetzt werden – z. B. gepulste Titan-Saphir-Laser. 80-MHz-Pulse mit einer Breite von 100 fs bei einer mittleren Leistung von 10–25 mW stellen mögliche Bestrahlungsbedingungen dar. Selbst bei 10 mW entspricht

dies einer Leistung von 1250 W für jeden ultrakurzen Puls. Der Vorteil ist, dass die Wahrscheinlichkeit einer Zweiphotonenaktivierung proportional zum Quadrat der lokalen Intensität ist. Daher ist es möglich, die Bestrahlungsbedingungen so zu wählen, dass Aktivierung gezielt nur im Fokus des Laserstrahls erfolgt – womit der räumlichen Auflösung des Photolyse-Bereichs eine dritte Dimension hinzugefügt wird (siehe Abbildung 2 links und in der Mitte). Das Volumen, in dem die Aktivierungsbedingungen erfüllt sind, kann 1 fL oder weniger betragen (siehe z. B. Lit. [19]). Mit einem geeigneten optischen Aufbau war es durch Zweiphotonenaktivierung beispielsweise möglich, beliebig geformte Objekte durch lichtinduzierte Polymerisation (Abbildung 2 rechts) zu generieren. Zweiphotonenaktivierung kann auch für die Zweiphotonenbildgebung eingesetzt werden, bei der Fluorophore, ohne eine Photolysereaktion einzugehen, angeregt werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass das Infrarotlicht tiefer in das Gewebe eindringen kann. Und aufgrund der genannten dreidimensionalen Aktivierung ist es möglich, optische Schnitte ohne Verwendung einer konfokalen Blende zu erhalten. Zu beiden Anwendungsarten sind vor kurzem hervorragende Übersichtsartikel erschienen.<sup>[8,20,21]</sup>

**Tabelle 1:** Beispiele für optische Parameter einiger photolabiler Schutzgruppen.<sup>[a]</sup>

Schutzgruppe	$\lambda_{\max}$ [nm]	$\epsilon$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ] ( $\lambda$ [nm])	$\Phi$	$\epsilon \Phi$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	$\delta_u$ [GM]	Lit.
<b>NPE</b>				240		[22]
<b>NDBF</b>		18 400 (330)	0.7	12 880	0.6	[23]
<b>MNI</b>			0.085		0.06	[19, 22]
<b>CDNI</b>		6400 (330)	0.6	3840		[24]
<b>NV</b>		5000 (350)	0.12	600	0.04	[22, 25]
<b>Bhc</b>		14 800 (365)	0.036		0.72	[26, 27]
<b>BHQ</b>		2580 (365)	0.29		0.59	[26, 28]
<b>1</b>		25 000 (369)	0.05	1250	1.6	[29]
<b>2</b>	370	20 000 (394)	0.03 <sup>[b]</sup>	400	4.7 <sup>[b]</sup>	[30]
<b>DMNPB</b>	350	4500 (350)	0.26		0.17	[31]
<b>PMNB</b>	317	9900 (317)	0.1	990	0.45	[32]
<b>BNSMB</b>	400	39 349 (400)	0.3	11 800	0.9	[33]
<b>BNSF</b>	415	63 960 (415)	0.25	16 000	5.0	[33]
<b>PENB</b>			0.1	1000	3.7	[32, 34]
<b>CANBP</b>	397	7500 (397)	0.15	1100	7.4	[35]
<b>EANBP</b>	397	7500 (397)	0.15	1100	11	[35]
<b>BCMACM</b>	383	18 500 (383)	0.06			[36]
<b>BCMCM</b>	324	11 000 (324)	0.06			[36]

[a] Angegeben wurde der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$ , die Quantenausbeute  $\Phi$  und der Zweiphotonenwirkungsquerschnitt  $\delta_u$  (siehe Abschnitt 2.1.2). Zu den Abkürzungen für die Gruppen siehe Abbildung 1. Es muss betont werden, dass ein Vergleich mit Vorsicht zu genießen ist, da die Parameter signifikant bei unterschiedlichen Abgangsgruppen X oder Substituenten R abweichen und die Messbedingungen nicht einheitlich sind. Diese Tabelle soll daher vielmehr zur groben Orientierung dienen. [b] Für die primäre E/Z-Isomerisierung.



**Abbildung 2.** Mit Zweiphotonenbestrahlung ist es möglich, dreidimensional aufgelöste Anregungsspots (Mitte) zu erhalten, während die Anregung bei normaler Bestrahlung in einem Doppelkegel resultiert (links): Eine Fluoresceinlösung wurde hier mit einem Laserstrahl von 365 nm (links) oder 730 nm (Mitte) angeregt. Nur im Fokus des 730-nm-Strahls ist die Energie für einen nichtlinearen Effekt hoch genug. Rechts: Mit Zweiphotonenanregungstechniken war z. B. die Polymerisation dieser Stier-Figur möglich (Maßstab 2  $\mu$ m, Bild der Lit. [18] entnommen).

Längst nicht alle Chromophore eignen sich zur Zweiphotonenanregung. Zur Charakterisierung einer Reaktion kann der Zweiphotoneneffekt, entsprechend der Verwendung des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  und vor allem des Produkts des Extinktionskoeffizienten mit der Quantenausbeute  $\epsilon \Phi$  (siehe oben), über den Zweiphotonenquerschnitt  $\delta_a$  bzw. den Zweiphotonenwirkungsquerschnitt  $\delta_u = \delta_a \Phi$ , quantifiziert werden. Dessen Einheit lautet Göppert-Mayer (GM), wobei 1 GM  $10^{-50}$  cm<sup>4</sup>s/Photon entspricht. Nach einigen

Autoren ist für biologische Anwendungen ein Zweiphotonenwirkungsquerschnitt von  $>0.1$  GM wünschenswert.<sup>[37]</sup> Eine **NV**-Gruppe verfügt über einen Zweiphotonenwirkungsquerschnitt von 0.035 GM,<sup>[22]</sup> während eine **NPE**- oder eine **NPP**-Gruppe noch einen geringeren Wert aufweisen (für einen Überblick über die photophysikalischen Eigenschaften siehe Tabelle 1, für die Abkürzungen siehe Abbildung 1). Verbindungen mit niedrigen  $\delta_u$  – wie z. B. **MNI**-Glutamat mit 0.06 GM – können trotzdem noch zur Zweiphotonenfreisetzung verwendet werden (siehe z. B. Lit. [38]), und es gibt sogar Berichte von **NV**-geschützten Östrogenrezeptorliganden mit nur 0.004 GM.<sup>[39]</sup> In ähnlicher Weise konnte **NV**-geschützte Retinsäure bei 0.025 GM erfolgreich innerhalb von Zebrafischembryonen freigesetzt werden.<sup>[40]</sup> Interessanterweise gibt es Studien, in denen ein Zweiphotonenwirkungsquerschnitt von 0.23 GM für **NV** berechnet wurde. In dieser Studie wurde ein Aminosäurebaustein vorgestellt, der nach **NV**-Abspaltung durch eine intramolekulare Cyclisierungsreaktion eine Spaltung des Peptids herbeiführt.<sup>[41]</sup> Die Autoren vermuten, dass dieser hohe Wert auf der hohen Effizienz der nachfolgenden intramolekularen Reaktion beruht. Abgesehen von diesem Einzelerfolg, haben auch systematische Studien in den letzten Jahren zur Entwicklung verbesserter Zweiphotonenschutzgruppen geführt.

Goeldner et al. gelang es in einer Reihe von Studien, die Zweiphotoneneigenschaften der **NPP**-Gruppe signifikant zu verbessern: Beispielsweise zeigte die abgeleitete **DMNPB**-Gruppe (für 3-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)-2-butyl) bereits einen  $\delta_u$ -Wert von 0.17 GM bei der Abspaltung von Glutamat.<sup>[31]</sup> Eine Erweiterung des **NPP**-Chromophors führte dann zu der Entwicklung der **PMNB**-Schutzgruppe (3-(2-Propyl)-4'-methoxy-4-nitrobiphenyl), die ebenfalls zur Freisetzung von Glutamat mit verbesserten 0.45 GM genutzt werden kann.<sup>[32]</sup> Auf der Hypothese aufbauend, dass eine weitere Verlängerung des Chromophors und eine dipolare oder quadrupolare Anordnung von Donor- und Akzeptorsubstituenten auf einem linearen Chromophor zu einer Verbesserung der nichtlinearen Eigenschaften führen, entwickelten sie weiterhin die „dimeren“ photolablen Schutzgruppen **BNSMB** (4,4'-Bis-[8-[4-nitro-3-(2-propyl)-styryl]]-3,3'-dimethoxy) und **BNSF** ((2,7-Bis-[4-nitro-8-[3-(2-propyl)-styryl]]-9,9-bis-[1-(3,6-dioxahexyl)]-fluoren). Diese Schutzgruppen zeigten nicht nur die erwartete Rotverschiebung, sondern hatten auch vielversprechende Zweiphotonenwirkungsquerschnitte von 0.9 GM bzw. 5 GM.<sup>[33]</sup> Kürzlich wurde von Goeldner et al. die **PENB**-Gruppe (3-(2-Propyl)-4'-trisethoxy(methoxy)-4-nitrobiphenyl) vorgestellt.<sup>[34]</sup> An das für zelluläre Bildgebung verwendete Acridinon – ein im Roten emittierendes Fluorophor – konjugiert, wurde ein  $\delta_u$ -Wert von 3.7 GM erhalten. In einer aktuellen Studie haben Goeldner und Specht nun die bisher besten Zweiphotonenschutzgruppen präsentiert: die **CANBP**- und die **EANBP**-Gruppe. Für letztere wurde der bemerkenswerte  $\delta_u$ -Wert von 11 GM ermittelt.<sup>[35]</sup>

In einem Versuch, die Zweiphotoneneigenschaften der **MNI**-Schutzgruppe zu verbessern, entwickelten Ellis-Davies et al. die **CDNI**-Gruppe und stellten **CDNI**-geschütztes Glutamat<sup>[42]</sup> und GABA<sup>[24]</sup> her. Ersteres weist eine fünfmal höhere Freisetzungsrates als **MNI**-Glutamat auf (bestimmt

durch Einphotonenphotolyse), allerdings wurden keine klaren Angaben zum Zweiphotonenwirkungsquerschnitt gemacht. Ellis-Davies et al. konnten auch ein vielversprechendes neues Derivat der photolabilen **NPE**-Gruppe vorstellen, das sie mit **NDBF** (für Nitrotribenzofuran) abkürzten. In ihrer ersten Studie benutzten sie **NDBF** zur Freisetzung des Sekundärbotenstoffs  $\text{Ca}^{2+}$  und ermittelten einen Zweiphotonenwirkungsquerschnitt von 0.6 GM.<sup>[23]</sup> In einer Folgestudie wurde **NDBF** zur Maskierung eines anderen Sekundärbotenstoffs – Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) – eingesetzt, wobei, verglichen mit bisherigen photoaktivierbaren Derivaten, im Durchschnitt weitaus weniger Strahlungsenergie zur indirekten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern aufgewendet werden musste.<sup>[43]</sup>

Die **BHQ**-Gruppe wurde von Dore et al. entwickelt und kann Zweiphotonenwirkungsquerschnitte von 0.4 GM bis zu 0.9 GM aufweisen.<sup>[28]</sup> Eine systematische Studie über den Einfluss von Substituenten zeigte hier auch wieder schön, wie schwierig die Optimierung von photophysikalischen Eigenschaften ist. Zwar konnten in einigen Fällen Parameter verbessert werden, allerdings immer nur auf Kosten anderer wichtiger Parameter.<sup>[44]</sup>

Ein interessanter Ansatz zur Verbesserung des Zweiphotonenwirkungsquerschnitts stammt von Pirrung und Dore: Sie verwendeten zur Anregung den Sensibilisator Thioxanthon mit einem Zweiphotonenquerschnitt von 5 GM, wobei anschließend die Energie auf eine **NPP**-Gruppe übertragen wurde.<sup>[45]</sup> Intramolekular sensibilisierte Photofreisetzung, wenn auch nicht mittels Zweiphotonenbestrahlung, war zuvor von Pfeleiderer und Steiner<sup>[46,47]</sup> sowie von Corrie gezeigt worden.<sup>[48,49]</sup> In dem Beitrag von Pirrung und Dore war der Sensibilisator jedoch nicht kovalent mit der photolabilen Gruppe verknüpft worden. Dies resultierte in einem Zweiphotonenwirkungsquerschnitt von 0.86 GM, also einem deutlich höheren Wert als für die **NPP**-Gruppe alleine. In einer ähnlich gearteten Studie konnten Li et al. eine **NPE**-Gruppe von einem Cumarin-Derivat mit einem  $\delta_{\text{a}}$ -Wert von 0.4–1 GM abspalten.<sup>[50,51]</sup> Hierbei sollte das Cumarin zur zellulären Bildgebung freigesetzt werden. Offensichtlich wurde die Abspaltungseffizienz der **NPE**-Gruppe durch Wechselwirkungen zwischen dem Cumarin-Teil des Moleküls und der **NPE**-Gruppe um eine Größenordnung erhöht. In einer anderen Studie konnte allerdings bei der Kombination eines Cumarins mit der photolabilen **DMNPB**-Gruppe nur 0.21 GM erhalten werden.<sup>[52]</sup>

Jullien et al. haben Zweiphotonenaktivierung zur Kontrolle der Proteinaktivität in Zellkulturen und Zebrafisch verwendet. Sie benutzten die **NV**-Gruppe sowie die photolabilen Cumarin-Schutzgruppen **Bhc** und **DEACM** für die Modifizierung von 4-Hydroxycyclofen, einem photostabilen Derivat des Östrogenrezeptorliganden 4-Hydroxytamoxifen.<sup>[39]</sup> In einer weiteren Studie untersuchten Jullien et al. die Verwendung der 3,5-Dibrom-2,4-dihydroxyzimtsäure-Schutzgruppe (**1**), von der Alkohole und Amine aus ihren Estern und Amidinen freigesetzt werden können.<sup>[29]</sup> Bei Bestrahlung isomerisiert die Doppelbindung, und über einen intramolekularen Angriff wird ein (fluoreszierendes) Cumarin-Derivat gebildet, wobei die geschützte Verbindung mit einem  $\delta_{\text{a}}$ -Wert von 1.6 GM freigesetzt wird. In einer nach-

folgenden Studie konnten sie die photolabile Schutzgruppe erfolgreich optimieren und erhielten für die primäre *E/Z*-Isomerisierung der Verbindung **2** Zweiphotonenwirkungsquerschnitte von bis zu 4.7 GM.<sup>[30]</sup>

In einer aktuellen Studie von del Campo et al. wurde ein  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PMe}_3)]$ -Komplex als photolabile Schutzgruppe für ein Aminosilan verwendet, das zur Oberflächenstrukturierung verwendet wurde. Die Aminogruppe konnte durch Bestrahlung bei 460 nm oder 900 nm erhalten werden, es wurden aber keine expliziten Werte für den Zweiphotonenwirkungsquerschnitt angegeben (in anderen Studien war für ähnliche Komplexe ein  $\delta_{\text{a}}$ -Wert von 0.14 GM festgestellt worden).<sup>[53]</sup>

So gab es in den letzten Jahren eine interessante Reihe von Entwicklungen, die zu verbesserten photolabilen Schutzgruppen für die Zweiphotonenanregung geführt haben. Auch „Design-Prinzipien“ bzw. Leitlinien für ein verbessertes nichtlineares optisches Verhalten sind diskutiert worden.<sup>[8,21,33]</sup> Doch während es schon schwierig genug ist, Absorptionseigenschaften genau vorherzusagen, ist es noch deutlich schwieriger, Reaktionswege und somit Quantenausbeuten für die Freisetzung zu prognostizieren. Dabei ist zu beachten, dass viele weitere Möglichkeiten als nur die beabsichtigte Reaktion zur Abführung der Energie in dem System existieren. Während zwar einige der zitierten und auch nichtzitierten Studien Erklärungen bieten, bleibt (nicht-lineares) optisches Verhalten zu häufig immer noch eine „Black Box“, und einige Studien zeigen explizit, wie schwierig es ist, photophysikalische Eigenschaften zu optimieren.<sup>[54]</sup> Daher ist dieses Forschungsgebiet bei weitem nicht ausgereift und die nächsten Jahre werden voraussichtlich noch einiges an Erkenntnisgewinn bringen.

### 2.1.3. Wellenlängenselektive Photospaltung

Nach dem vorigen Abschnitt über Zweiphotonenaktivierung wollen wir nun eine andere interessante Entwicklung zu dem simplen Prinzip der Photospaltung und gleichzeitig einen relativ neuen Trend diskutieren: Zwar ist die lichtinduzierte Freisetzung eine leistungsfähige Methode zur Gewinnung induzierbarer Systeme, und es ist relativ leicht, ein gutes binäres An/Aus-Verhalten zu erreichen. Allerdings bleibt die Photospaltung von Natur aus irreversibel. Mit diesem Prinzip könnten aber weitaus komplexere lichtinduzierte Szenarien dargestellt werden. Dazu müsste es möglich sein, mit mehreren photolabilen Schutzgruppen in einem System zu arbeiten, wenn diese individuell mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen angesprochen werden könnten.

Frühe Vorarbeiten dazu stammen aus der Gruppe von Bochet, die als erste die Freisetzung von Estern aus den Schutzgruppen **3** bzw. **NV**-Carbamate studierten und beim Vergleich von Proben mit jeweils nur einer der beiden Verbindungen Geschwindigkeitskonstanten im Verhältnis von 30:1 bei 254 nm und 1:100 bei 350 nm feststellten.<sup>[55]</sup> Das Verhältnis verschlechterte sich jedoch, wenn beide Verbindungen zusammen in einer Lösung untersucht wurden. Dieses Phänomen der Interaktion wurde jedoch nur mit einem Schutzgruppenpaar beobachtet. Untersuchungen mit Wellenlängen von 254 nm bis 419 nm bei alleinigem Ändern des

Substitutionsmusters an photolabilen *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppen führten nur zu bescheidenen Verhältnissen der Geschwindigkeitskonstanten. Daher stellte Bochet die folgenden Regeln auf, dass für die wellenlängenselektive Photospaltung a) die intrinsische Stabilität jeder Schutzgruppe bei verschiedenen Wellenlängen sehr unterschiedlich sein sollte, b) die Energieübertragung zwischen einem angeregten Chromophor und seinem Nachbarn im Grundzustand unterdrückt werden sollte und c) die Spaltung bei hoher Energie (z.B. bei 254 nm) sehr schnell erfolgen sollte, um Photoreaktionen von ansonsten empfindlichen Gruppen zu vermeiden.<sup>[56]</sup> In der Tat konnte beim Vergleich von Mischungen aus einem **NV**-Ester mit einem Ester der Benzoin-artigen **BNZ**-Schutzgruppe Selektivitäten von 90:10 (bei 254 nm) und 15:85 (bei 420 nm) in einer Acetonitrillösung erreicht werden. Es war sogar möglich, diese beiden Gruppen selektiv im gleichen Molekül abzuspalten. In Analogie zur „chemischen Orthogonalität“ wurde der Begriff „chromatische Orthogonalität“ vorgeschlagen.<sup>[57]</sup> Giese und Bochet fanden dann mit der **NV**-Gruppe und dem *tert*-Butylketon-Derivat **4** ein weiteres selektiv photospaltbares Paar und konnten es in einer Festphasenpeptidsynthese anwenden, wobei **4** Teil des Linkers war.<sup>[58]</sup> Hierbei diente **NV** als transiente Schutzgruppe, die bei 360 nm entfernt wurde, während der Linker bei 305 nm gespalten wurde. Das Modell-Pentapeptid Leu-Enkephalin konnte somit unter nahezu neutralen Reaktionsbedingungen synthetisiert werden. Mithilfe eines kinetischen Isotopeneffekt war eine weitere Feinabstimmung möglich: Die Photolyse von *o*-Nitrobenzylgruppen verläuft durch Anregung der Nitrogruppe in den Triplett-Zustand über eine  $\gamma$ -Abstraktion des benzyllischen Wasserstoffatoms. Wegen der erhöhten Stabilität der C-D-Bindung gegenüber der C-H-Bindung blieben daher *o*-Nitrobenzyl-geschützte Ester mit zwei benzyllischen Deuteriumatomen in der Gegenwart von undeuterten Analoga unversehrt bei der Photolyse mit 420 nm (Selektivitäten bis 8:1).<sup>[59]</sup> Dieser Effekt konnte durch Desymmetrisierung mit unterschiedlichen Substituenten an den beiden *o*-Nitrobenzylgruppen noch verbessert werden.<sup>[60]</sup> Die Ergebnisse bis zu diesem Zeitpunkt wurden auch in zwei detaillierteren Übersichtsartikeln zusammengefasst.<sup>[61,62]</sup>

Das **NV/BNZ**-Paar wurde von del Campo und Jonas für die Photostrukturierung von Glas- und Quarzoberflächen mit orthogonal photosensitiven Silanen verwendet.<sup>[63]</sup> Später führte del Campo, wiederum zur Photostrukturierung, das **NV/DEACM**-Paar für sequenzielle Spaltungen ein – zuerst die **DEACM**-Gruppe bei 412 nm und anschließend die **NV**-Gruppe bei 345 nm.<sup>[64]</sup> Bei diesem Paar werden zwar beide Schutzgruppen bei 345 nm gespalten, aber es ist ein schönes Beispiel dafür, dass eine sequenzielle Adressierbarkeit völlig ausreichend sein kann. Ein anderes Paar zur sequenziellen Spaltung wurde mit den Schutzgruppen **5** und **6** für Carbonylgruppen von Wang et al. untersucht. Bestrahlung mit Licht von  $\geq 350$  nm führte zu einer sauberen Photospaltung der letzteren, während beide gleichzeitig mit einer Pyrex-gefilterten Hg-Lampe gespalten werden konnten.<sup>[65]</sup>

In einer äußerst interessanten Studie gelang Hagen et al. die wellenlängenselektive Photospaltung von peptidischen Thiolgruppen in Wasser. Dies wurde möglich durch die Ein-

führung der neuen Cumarin-Schutzgruppen **BCMCM** und **BCMCM** sowie des **NPE**-Derivats **C4MNB**, das eine verbesserte Wasserlöslichkeit aufweist.<sup>[36]</sup> Die beiden neuen von Cumarin abgeleiteten photolabilen Gruppen wurden über einen Oxycarbonyllinker mit dem Thiol verknüpft. Während die **BCMCM**-Gruppe noch eine signifikante Absorption bei 450 nm aufwies, war die Absorption der **BCMCM**-Gruppe bei 360 nm bereits sehr niedrig. Zum Beispiel konnte bei der Kombination von **C4MNB** und **BCMCM** im gleichen Tetradecapeptid letztere Schutzgruppe durch Bestrahlung mit Licht  $\geq 430$  nm entfernt werden und die andere danach bei Licht von  $\geq 325$  nm.

Ellis-Davies et al. kombinierten Zweiphotonenabsorption mit dem Ansatz der wellenlängenselektiven Photospaltung und konnten mit **CDNI**-modifiziertem Glutamat und **BCMCM**-geschützter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) Zweifarben-Zweiphotonen-Spaltung in Hirnschnitten der Ratte zeigen.<sup>[66]</sup> Die **CDNI**-Gruppe konnte bei 720 nm photolysiert werden, während die **BCMCM**-Photoschutzgruppe bei 830 nm abgespalten wurde. Somit konnte die Freisetzung von zwei Neurotransmittern mit Kontrolle über Raum, Zeit und Dosis orthogonal gesteuert werden. In einer ähnlichen Studie haben Lawrence et al. **BCMCM**-geschütztes 8-Brom-cAMP in Gegenwart der *o*-Nitrobenzyl-geschützter Proteinkinase PKG (an einem Cysteinrest modifiziert) verwendet. Entweder wurde die Cumarin-Gruppe selektiv bei 440 nm oder aber beide zusammen bei 360 nm photolysiert.<sup>[67]</sup> Somit gelang es ihnen, zwei verschiedene Knotenpunkte eines Signalweges wellenlängenselektiv zu adressieren.

In unseren eigenen Beiträgen zu diesem Thema haben wir das Prinzip der wellenlängenselektiven Photospaltung auf Nukleinsäuren übertragen und konnten zeigen, dass es möglich ist, **NDBF**-geschütztes Desoxyadenosin oder Cytidin sowie **DEACM**-geschützte Desoxyguanosin-Reste in Gegenwart ihrer **NPE**- bzw. **NPP**-Analoga bei  $>400$  nm zu photolysieren.<sup>[68,69]</sup> In letzterem Beispiel konnten für die sequenzielle Freisetzung Selektivitäten von bis zu 80 erhalten werden.

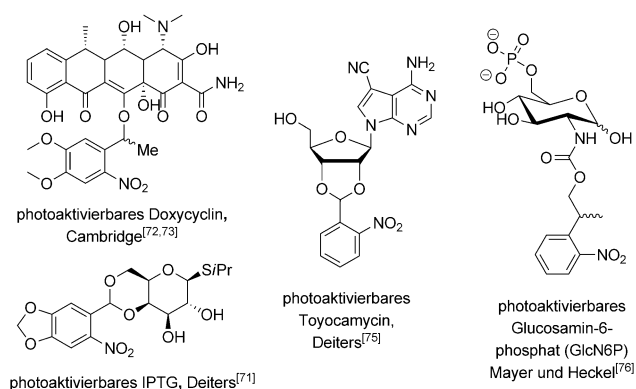
Bochet und del Campo gingen vor kurzem der Frage nach, wie viele funktionelle Ebenen bei der wellenlängenselektiven Photospaltung möglich sind.<sup>[70]</sup> Sie konnten mit den photolabilen Schutzgruppen **NV**, **NPP**, **BNZ**, **DEACM**, **DNI**, **BNI** und **PHP** auf Amin-, Thiol- oder Carbonsäure-terminierten Silanen zur Modifizierung von Oberflächen zeigen, dass mit dem Stand der Technik bis zu vier verschiedene und unabhängig adressierbare Funktionsebenen realisiert werden können. Allerdings wurden in dieser Studie auch Wellenlängen unterhalb von 300 nm eingesetzt, und es ist fraglich, wie gut diese in einem biologischen System anwendbar sind. Auch wenn diese Vielfalt schon erstaunlich ist, ist es sicher richtig zu sagen, dass das Konzept der wellenlängenselektiven Photospaltung nach wie vor ein aufstrebendes Gebiet ist, das erst in jüngster Zeit bei Anwendungen auf Oberflächen oder Biomolekülen verwirklicht wurde, und es wird wiederum spannend sein, den Fortschritt in den kommenden Jahren zu beobachten.



## 2.2. Photoaktivierbare kleine Moleküle

### 2.2.1. Verbindungen für die Genexpression

Die Regulation der Genexpression spielt eine wichtige Rolle in mehreren Forschungsgebieten, wie z.B. in der molekularen Systembiologie, und photolabile Verbindungen ermöglichen die Kontrolle dieser Prozesse auf einer weiteren Ebene – nämlich mit räumlicher und zeitlicher Auflösung. Methoden zur Regulierung der Genexpression mit kleinen Molekülen sind derzeit für fast alle Zelltypen vorhanden. Ansätze, diese Systeme durch photoaktivierbare Verbindungen zu kontrollieren, wurden auch auf mehreren Wegen erreicht. Young und Deiters setzten z. B. Nitropiperonal ein, um eine photoaktivierbare Version von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG) herzustellen, welches eine Freisetzung des Laktose-Repressors vom Lac-Operator bewirkt und daher Gentranskription ermöglicht (Abbildung 3). In *Escherichia coli* ermöglichte die Anwendung dieser Verbindung somit lichtinduzierte Expression eines Reportergens.<sup>[71]</sup>



**Abbildung 3.** Überblick über photoaktivierbare Verbindungen zur Regulation der Genexpression mit Licht.

Cambridge et al. verwendeten für die Erzeugung licht-induzierter eukaryotischer Genexpression das berühmte Tetracyclin-on-System (Tet-on) und synthetisierten eine **DMNPE**-geschützte Version von Doxycyclin (Abbildung 3). In Eierstöcken des chinesischen Hamsters, in Maus-Embryonen und *Xenopus-laevis*-Kaulquappen konnten sie durch Zweiphotonenaktivierung von Doxycyclin die Expression von grün fluoreszierendem Protein (GFP) in einer Auflösung von einzelnen Zellen induzieren.<sup>[72,73]</sup> Nach einem ähnlichen Ansatz benutzten Koh et al. **NV**-geschütztes Doxycyclin, um Ephrin A5 in NIH-3T3-Zellen zu exprimieren und damit die Anordnung von Zellen in einer lebenden Zellmonoschicht zu steuern (Abbildung 3).<sup>[74]</sup>

Nicht nur kleine Moleküle als Effektoren von Proteinen, sondern auch Verbindungen, welche die Aktivität von Ribozymen regulieren, wurden untersucht, um lichtinduzierte Genexpression zu erreichen. Ribozyme sind z.B. sich selbst schneidende RNA-Elemente und können bei Integration in eine mRNA verwendet werden, um die Genexpression zu kontrollieren. Deiters et al. synthetisierten eine dioxolanartig **ONB**-geschützte Version von Toyocamycin, einem Inhibitor

des Hammerhead-Ribozyms (Abbildung 3).<sup>[75]</sup> Photofreisetzung des Toyocamycins in HEK-293T-Säugetierzellen, denen ein Plasmid mit dem Reportergen der Luciferase – allerdings unter der Kontrolle des Hammerhead-Ribozyms – transfiziert worden war, führte zu einer Erhöhung der Luciferase-Aktivität. In unserem eigenen Beitrag nutzten wir das Ribozym *glmS* zur Steuerung der GFP-Translation in Retikulozyten-Lysaten und konnten mit einer **NPP**-geschützten Version des Ribozym-Cofaktors Glucosamin-6-phosphat Lichtregulation der GFP-Produktion erreichen.<sup>[76]</sup> Die Anwendung dieses Ansatzes beschränkt sich derzeit auf zellfreie Systeme, da der hochpolare Cofaktor nicht die Lipid-Doppelschicht von eukaryotischen Zellen passieren kann.

### 2.2.2. Verbindungen für die Neurobiologie und für Signaltransduktionswege

Neuronen kommunizieren mithilfe der Aminosäure Glutamat und anderer Effektormoleküle über Synapsen miteinander. Vor allem Glutamat wurde schon mit verschiedenen photolabilen Schutzgruppen versehen. Insbesondere die Kommerzialisierung von **MNI**-Glutamat hat verschiedene Untersuchungen in den Neurowissenschaften mittels Zweiphotonenanregung, selbst für Wissenschaftler ohne Syntheselabor, ermöglicht.<sup>[77–83]</sup> Bemerkenswert war eine Anwendung von **MNI**-Glutamat in vivo, bei der räumlich-zeitliche Struktur-Funktions-Beziehungen von im Neocortex lokalisierten dendritischen Dornfortsätzen aufgezeigt werden konnten.<sup>[38]</sup> Mit einer räumlichen Auflösung für die Photofreisetzung von 0.8  $\mu$ m konnten einzelne Nervenzellausläufer mit Glutamat angeregt werden, was zu einem vorübergehenden Strom im lebenden Gehirn der Maus führte.

**CDNI**-Glu und **CDNI**-GABA, also die zweite Generation Nitroindolinyngeschützter Neurotransmitter, haben sich als effektivere Aktivierer bzw. Blockierer von Aktionspotentialen in Neuronen des Hippocampus erwiesen. Die Verwendung beider photoaktivierbaren Neurotransmitter erlaubten es Ellis-Davies et al., durch Zweiphotonenanregung bei einer axialen Auflösung von etwa 2  $\mu$ m in lebenden Hirnschnitten der Ratte eine hochaufgelöste Kartierung der funktionellen GABA-A- und AMPA-Rezeptoren zu erstellen.<sup>[24,42,84,85]</sup> Dank der **CDNI**-Gruppe wurde durch Kombination von **CDNI**-Glu mit **DCAC**-GABA die multimodulare optische Kontrolle des Membranpotentials einer einzelnen Synapse ermöglicht. Dabei wurde ersteres bei 720 nm und das zweite bei 830 nm demaskiert.<sup>[66]</sup> Vor kurzem haben Goeldner et al. neue photoaktivierbare Derivate von GABA, **CANBP**- und **EANBP**-GABA, synthetisiert, die bei 800 nm photoaktiviert werden können und zur GABA-Freisetzung in Hirnschnitten verwendet wurden.<sup>[35]</sup>

Vanilloid-Derivate können eine Membrandepolarisation von nozizeptiven Neuronen durch wärmeempfindliche Transduktionskanäle induzieren. Verschiedene photoaktivierbare Liganden des Vanilloid-Rezeptors wurden synthetisiert, um diese Ereignisse mit örtlicher und zeitlicher Auflösung zu untersuchen. Kao et al. demonstrierten extrazelluläre Rezeptor-Aktivierung durch Zweiphotonenanregung (720 nm) der **NV**-Variante.<sup>[86]</sup> In ähnlichen Experimenten erreichten Frings et al. eine reduzierte intrazelluläre Rezeptor-

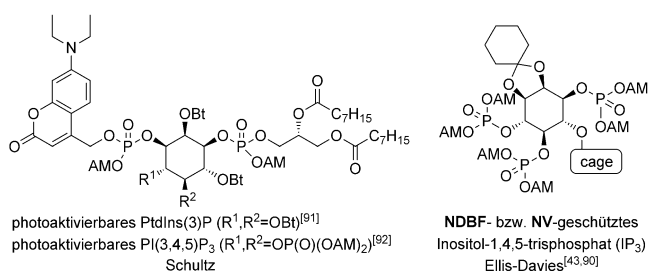


Empfindlichkeit durch Photospaltung der **BCMACM**-Variante.<sup>[87]</sup>

Cyclische Nukleotide sind Botenstoffe, die an vielen verschiedenen Signalwegen beteiligt sind und daher intensiv untersucht wurden. Photoaktivierbare Versionen können seit mehr als einem Jahrzehnt kommerziell erworben werden und haben dazu geführt, dass vor allem photoaktivierbares cGMP zu einer Standardmethode für Signalstudien geworden ist. Kürzlich konnten Kaupp et al. durch Photospaltung von **DEACM**-cGMP Spannungsantworten in cyclischen Nukleotid-gesteuerten Kanälen des Spermien-Flagellums von wirbellosen Meerestieren induzieren. Durch diese Anwendung einer photoaktivierbaren Verbindung konnten somit bahnbrechende Erkenntnisse über die Signalwege von Lockstoffen gewonnen werden.<sup>[88]</sup>

Phosphoinositole (IPs) stellen wichtige Komponenten des intrazellulären Signaltransduktionsnetzwerkes dar und weisen verschiedene Phosphorylierungsmuster auf. Eine **NPE**-geschützte Variante von 1,4,5-IP<sub>3</sub> ist käuflich erhältlich und **NV**-geschütztes IP<sub>4</sub> wird für die Untersuchung von intrazellulären Signalübertragungen seit mehr als einem Jahrzehnt eingesetzt. Durch bioaktivierbare Schutzgruppen können diese Phosphoinositol-Derivate zellmembranpermeabel gemacht werden. In den vergangenen Jahren haben Ellis-Davies und Mitarbeiter neue photolabil geschützte Varianten von 1,4,5-IP<sub>3</sub>, **NV**-IP<sub>3</sub> und **NDBF**-IP<sub>3</sub> hergestellt.<sup>[22,43,89]</sup> Mit dem ersten konnten durch Zweiphotonenanregung (720 nm) neue Einblicke für das Verständnis der Synapsenkommunikation von Astrozyten erhalten werden.<sup>[90]</sup> Für das zweite konnte eine fünfmal höhere Quantenausbeute als für **NV**-IP<sub>3</sub> festgestellt werden und führt daher eventuell zu einer erhöhten Calcium-Mobilisierung in Nervenzellen.

Schultz et al. haben **DEACM**-geschützte Versionen der Phosphatidylinositol-3-phosphate PtdIns(3)P und PI(3,4,5)P<sub>3</sub> hergestellt (Abbildung 4).<sup>[91,92]</sup> Diese Verbindungen werden,



**Abbildung 4.** Überblick über photoaktivierbare Phosphoinositole für das lichtinduzierte Triggern zellulärer Signalwege. AM = Acetoxymethyl, für den Zelltransport, Bt = Butyryl.

ähnlich wie andere photoaktivierbare Phosphoinositide, durch weitere Schutzgruppen membranpermeabel, wobei bei der Metabolisierung durch endogene Enzyme diese Schutzgruppen abgespalten werden. Photoaktivierbares PtdIns(3)P wurde verwendet, um die endosomale Fusion in HeLa-Zellen räumlich und zeitlich zu regulieren, wobei Phosphatidylinositol-3-phosphatidylmonophosphat sich als ein Bindeglied zwischen dem endosomalen und dem Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase-Signalweg herausstellte.

Diacylglycerol ist neben IP<sub>3</sub> ein weiterer Sekundärbotenstoff, der durch die Phospholipase C hydrolysiert wird. Die Rolle von Diacylglycerol in T-Zellen, bei der transienten Ausrichtung des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums hin zu einer Antigen-präsentierenden Zelle, wurde von Huse und Mitarbeitern mit einer **Bhc**-geschützten Version untersucht.<sup>[93]</sup>

Calcium ist der wichtigste chemische Informationsträger und reguliert ein breites Spektrum an Zellfunktionen. Vor allem in der Neurobiologie werden schon seit Jahrzehnten photoaktivierbare chelatierende Liganden eingesetzt, die Ca<sup>2+</sup>-Ionen durch Bestrahlung freigeben. Ein umfassender Übersichtsartikel zu diesen Liganden und ihren Funktion ist kürzlich erschienen.<sup>[94]</sup>

Bittman et al. haben **DEACM**- und 4-Bromo-5-hydroxy-2-nitrobenzhydryl-geschützte Varianten von Ceramid und Ceramid-1-phosphat, die wichtige Komponenten in der Zellmembran und Signalmoleküle sind, synthetisiert.<sup>[95,96]</sup> Diese Sphingolipide wurden von Makrophagen aufgenommen, und nach ihrer Freisetzung mit Licht konnte Zellproliferation beobachtet werden.

Die von Rapamycin eingeleitete Heterodimerisierung des FK-506-bindenden und FKBP-Rapamycin-bindenden Proteins wurde in mehreren Studien mit **NV**-geschütztem Rapamycin untersucht. Woolley et al. konnten durch Photoaktivierung des Rapamycins die Wechselwirkung von FKBP und mTORC1 zeitlich aufgelöst induzieren und unterbanden damit mTORC1-Signalweiterleitung in HeLa-Zellen.<sup>[97]</sup> Umeda et al. fusionierten YFP und Tiam1, einem spezifischen Guaninaustauschfaktor für Rac, mit FKBP.<sup>[98]</sup> Die Dimerisierung des FK-506-bindenden Proteins mit YFP-FKBP-Tiam1, durch die Freisetzung von Rapamycin mit Licht getriggert, ermöglichte eine lokale Rac-Aktivierung und Faltungsbildung in NIH-3T3-Zellen. Deiters und Mitarbeiter benutzten in einem ähnlichen Ansatz diese Heterodimerisierung zur Lichtaktivierung einer konstruierten Proteinkinase.<sup>[99]</sup> Sie verbanden diese Proteinkinase mit einer modifizierten Version von FKBP und konnten durch Photoaktivierung von Rapamycin die lokale Kontrolle der Faltungsbildung in HeLa-Zellen erreichen.

### 2.2.3. Verbindungen mit hormonellen Funktionen

Hormone und ihre Rezeptor-bindenden Analoga regulieren vielfältige Funktionen in lebenden Systemen. Photoaktivierbare Versionen mehrerer Vertreter dieser Klasse wurden zur Regulation der Genexpression hergestellt. Vor kurzem haben Jullien und Mitarbeiter eine **DMACM**-geschützte Version der Retinsäure hergestellt, die während der Embryogenese ein wichtiges Signalmolekül ist.<sup>[40]</sup> Die Freisetzung der Verbindung durch Zweiphotonenanregung führte in Zebrafischembryonen zu einer Fehlbildung der Retina. Die gleiche Gruppe stellte auch eine **NV**-geschützte Variante des Induktors der Östrogenrezeptorliganden-Bindungsdomäne (ER<sup>T2</sup>) 4-Hydroxytamoxifen her.<sup>[39]</sup> ER<sup>T2</sup> wurde mit GFP fusioniert und durch einen Chaperonkomplex inaktiviert. Durch Ein- oder Zweiphotonenfreisetzung des Liganden konnte Fluoreszenz im Embryo induziert werden. Koh et al. stellten ein **NV**-geschütztes Vitamin-D-Analogon her.<sup>[100]</sup>

Durch Freisetzung des Liganden mit Licht konnte Vitamin-D-Rezeptor-vermittelte Luciferasereporteraktivierung in HEK-293T-Zellen beobachtet werden. **Bhc**-geschütztes Progesteron wurde zur Untersuchung seines raschen nicht-genomischen Effekts auf humanes Sperma eingesetzt.<sup>[101]</sup> Ein- und Zweiphotonenspaltung verursachte eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenfreisetzung und eine Änderung im Schwimmverhalten der Spermienzellen.

#### 2.2.4. Andere Verbindungen

Neben der Freisetzung stabiler Moleküle aus geschützten Vorläufern wurden photoaktivierbare Verbindungen auch zur Erzeugung von Spezies wie Stickstoffmonoxid (NO) oder Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), welche an oxidativen Prozessen beteiligt sind, verwendet. Miyata et al. haben über die NO-Bildung durch Zweiphotonenanregung von mit 2,6-Dimethylnitrobenzol verknüpftem Fluorescein berichtet.<sup>[102]</sup> Chang et al. stellten photoaktivierbares 1,2,4-Trihydroxybenzol her, das molekularen Sauerstoff zu Superoxid reduziert und somit  $\text{H}_2\text{O}_2$  bildet.<sup>[103]</sup>  $\text{H}_2\text{O}_2$  aktiviert Cofilin – ein Faktor, der die Depolymerisierung von Aktinfilamenten in HeLa-Zellen bewirkt. Photoaktivierung von 1,2,4-Trihydroxynitrobenzol setzte diese Reaktion in physiologisch ausreichenden Mengen in Gang, was mit GFP-fusioniertem Cofilin beobachtet werden konnte.

Die klassischen photoaktivierbaren Verbindungen werden kovalent mit einer photolabilen Schutzgruppe verbunden. Mokhir und Mitarbeiter haben ein beachtenswertes System zur Photofreisetzung eines Zielmoleküls entwickelt.<sup>[104]</sup> Sie verknüpften zwei sich gegenseitig quenchende Fluorophore über den Singulett-Sauerstoff( $^1\text{O}_2$ )-sensiblen Linker 1,9-Dialkoxyanthracen. Belichtung mit Licht erzeugte in vitro einen Photosensibilisator aus Triplett-Sauerstoff  $^1\text{O}_2$ , was zur Spaltung des Linkers und zur Freisetzung der Fluorophore führte. Mit dem System wurden  $^1\text{O}_2$ -Konzentrationen in HeLa-Zellen überwacht.

### 2.3. Photo(de)aktivierbare Peptide und Proteine

#### 2.3.1. Photoaktivierbare Peptide

Peptide werden in der molekularen Biologie meistens zur Aktivierung bzw. Inhibierung von Proteinfunktionen eingesetzt. Photoschutzgruppen können verwendet werden, um das Binden oder die natürliche Funktion der kurzen Aminosäuresequenzen an ihrem Ziel zu verhindern. Kinasen phosphorylieren infolge spezifischer Aktivierungssignale ihre Zielsubstrate. Bresnick, Lawrence und Mitarbeiter nutzten diesen Tatbestand zur Aktivierung eines Peptidsubstrats für die Proteinkinase C (PKC), das durch Phosphorylierung seine Fluoreszenz ändert.<sup>[105]</sup> Eine **DMNB**-Gruppe an einem bestimmten Rest des Peptids verhinderte Phosphorylierung. Somit konnte durch Photospaltung die PKC-Aktivität in PtK2-Zellen während der Mitose zeitaufgelöst beobachtet werden.

In einem ausgeklügelten Ansatz entwickelten Lawrence und Mitarbeiter ein Kinase-inhibierendes Photoaktivierungsreagens. Dieses Reagens bestand aus zwei Teilen, die

über einen photospaltbaren **DMNPE**-Linker verbunden waren.<sup>[106]</sup> Der eine Teil dieses Reagens enthielt eine Maleimidgruppe und einen TAMRA-Fluorophor. Die andere Hälfte enthielt einen Quencher und ein inhibierendes Peptid, das an das aktive Zentrum der PKC bindet. Über das Maleimid wurde das gebundene inhibierende Peptid intramolekular mit der PKC verknüpft. Bestrahlung in REF52-Zellen führte zu einer Spaltung des Konstrukts und so zu einer Freisetzung des inhibierenden Peptids und des Quenchers. Somit wurden PKC-Aktivität und Fluoreszenz (als Erkennungssignal dafür) wiederhergestellt.

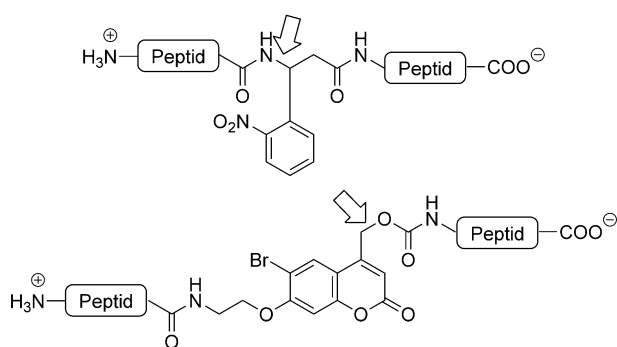
Das Fibronectin Epitop RGDS (Arginin-Glycin-Aspartat-Serin), ein kurzes Peptid, das die Integrin-vermittelte Zelladhäsion fördert, wurde auf verschiedene Weisen photoaktivierbar gemacht, um die Zelladhäsion an Oberflächen mit Licht zu steuern. Stupp et al. synthetisierten ein RGDS-Peptid mit einem Palmitoylschwanz und einer **ONB**-Gruppe am N-Terminus.<sup>[107]</sup> Das Molekül lagerte sich zu Nanokugeln zusammen, bildete nach UV-Bestrahlung aber Nanofasern. Mit diesem photoaktivierbaren Peptid inkubierte NIH/3T3-Fibroblasten von Mausembryonen zeigten nach Bestrahlung als Anzeichen für eine erhöhte Bioaktivität eine erhöhte Expression des Zytoskelettproteins Vinculin, das in Adhäsionsplaques vorkommt. In einem ähnlichen Ansatz von del Campo et al. wurde ein **DMNPB**-geschütztes Apsartat in ein cyclisches RGD-Peptid eingebaut und dieses Peptid über einen difunktionellen Tetra(ethylenglycol)-Linker auf einer Silicioberfläche immobilisiert.<sup>[108]</sup> Cao et al. bauten eine RGDS-Variante mit einem **ONB**-geschützten Glycinrest in ein Hyaluronsäure-Gel ein.<sup>[109]</sup> In beiden Fällen führte die Photospaltung zu einer Adhäsion von Fibroblasten.

Kikuchi und Mitarbeiter verwendeten ein bakterielles Liposom als Molekülfreisetzungssystem, das durch ein Liposom-abbauendes antimikrobielles Peptid (AMP) geöffnet werden konnte.<sup>[110]</sup> Der dreizehnte Aminosäurerest dieses AMP, ein Lysin, wurde mit **Bhc** geschützt. Unilamellare Vesikel, gefüllt mit Carboxyfluorescein, konnten somit schnell durch AMP-Freisetzung mit UV-Licht abgebaut werden.

Kuner et al. verwendeten ebenfalls einen geschützten Lysinrest in einem inhibierenden Peptid des *N*-Ethylmaleimid-sensitiven Faktors, um den zeitlichen Ablauf der Neurotransmitterfreisetzung zu untersuchen.<sup>[111]</sup> Mikroinjektion des Peptids in das präsynaptische Ende der Tintenfisch-Riesensynapse und Photolyse der ((5-Carboxymethoxy-2-nitrobenzyl)oxy)carbonyl-Schutzgruppe mit UV-Licht führten zu einer Inhibierung der Bildung des SNARE-Komplexes (soluble *N*-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor).

#### 2.3.2. Photospaltbare Peptide

Die Funktionalisierung eines Peptides mit einer photolabilen Gruppe kann nicht nur in einer Inhibierung seiner Funktion und anschließenden Reaktivierung durch Bestrahlung resultieren. Es können auch photoaktivierbare Peptide mit intakter Funktion erzeugt werden, bei denen Photospaltung zu einem Funktionsverlust führt (Abbildung 5). Kron et al. führten das Nitrophenylaminosäurederivat (2-Nitro)- $\beta$ -phenylalanin in das Rückgrat des Pheromon- $\alpha$ -Faktors von



**Abbildung 5.** Zwei Ansätze für photospaltbare Peptide mit einer **NPE**- (oben)<sup>[112–115]</sup> oder einer **Bhc**-basierten Strategie (unten).<sup>[116]</sup> Die photospaltbare Bindung ist mit einem Pfeil markiert.

*Saccharomyces cerevisiae* ein.<sup>[112]</sup> Dieses photospaltbare Peptid aktivierte wie die unmodifizierte Version Paarungssignalwege und hielt den Zellzyklus in der G1-Phase fest. Wie mit einem  $\alpha$ -Faktor/Nocodazol-Trap-Assay und Flusszytometrie gezeigt wurde, bewirkte UV-Bestrahlung eine Aufhebung der G1-Arretierung.

Ovaa, Schumacher und Mitarbeiter synthetisierten eine Version des großen Histokompatibilitäts-I-Komplexes (MHC) mit einer von **ONB** abgeleiteten Aminosäure.<sup>[113]</sup> Dieses photospaltbare Peptid aus neun Aminosäuren hielt den biotinylierten MHC in der stabilen Peptid-gebundenen Form. UV-Bestrahlung löste diesen Komplex auf und ermöglichte die Assoziation biologischer Zielliganden mit dem MHC. Dieses Neubeladen mit verschiedenen wählbaren Epitopen ermöglichte die Verfolgung Antigen-spezifischer T-Zell-Antworten in einem Hochdurchsatz-Screening.

Piehler et al. stellten lichtfragmentierbare Oligohistidin-Peptide her, um die Position von His-Tagged-Proteinen auf Oberflächen mit Licht zu regulieren.<sup>[114]</sup> Das Peptid, in dem eine von **ONB** abgeleitete photospaltbare Aminosäure eingebaut war, blockierte tris-NTA-funktionalisierte Oberflächen. Durch Bestrahlung konnten die His-Tag-bindenden Einheiten aber freigesetzt werden.

Lawrence et al. entwickelten einen zweiwertigen photospaltbaren Inhibitor für das aktive Zentrum sowie für die regulatorische Domäne (SH2) der Src-Tyrosinkinase.<sup>[115]</sup> Photolyse der beide Domänen verbindenden **ONB**-Gruppe führte zu einer Wiederherstellung der Src-Kinase-Aktivität in vitro.

Für eine höhere photolytische Effizienz bauten Nagamune und Mitarbeiter die **Bhc**-Gruppe als einen Linker in Modellpeptide ein (Abbildung 5).<sup>[116]</sup> Im Vergleich zu **ONB**-geschützten Linkern konnte die Photosensitivität deutlich gesteigert werden. Smith, Hochstrasser und Mitarbeiter stellten ein cyclisches Peptid mit einem Tetrazin-Linker her.<sup>[117]</sup> Dieser ultraschnelle chemische Trigger konnte komplett mit Blitzbelichtung bei 256 nm und auch – langsamer – mit sichtbarem Licht abgespalten werden, womit frühe Ereignisse in der Peptidfaltung initiiert werden können.

### 2.3.3. Photoaktivierbare genetisch kodierte Proteine

Die Entwicklung neuer orthogonaler Aminoacyl-tRNA-Synthetase/tRNA-Paare hat die Einführung verschiedener photoaktivierbarer Aminosäuren in Proteine durch Änderung des genetischen Codes von *Escherichia coli*, Hefe und Säugetierzellen ermöglicht.<sup>[118]</sup> Vor kurzem wurden Anwendungen für **ONB**-geschütztes Tyrosin und Fluorotyrosin, **DMNB**-geschütztes Serin und **NPOM**-geschütztes Lysin berichtet.

Deiters et al. führten in *Escherichia coli* genetisch kodierte **ONB**-geschütztes Tyrosin in die Hydrolase  $\beta$ -Galactosidase und die DNA-Polymerase I von *Thermus aquaticus* ein. Dadurch wurde lichtinduzierbare DNA-Polymerisation und  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität erhalten.<sup>[119,120]</sup> Mit dem gleichen Expressionssystem konnten die Topoisomerase Cre-Rekombinase, die T7-RNA-Polymerase und eine Zinkfinger-Nuklease mit photolabil geschützten Aminosäureresten erzeugt werden, diesmal in HEK-293T-Säugetierzellen. Daher konnten GFP-Fluoreszenz, vermittelt durch die wiederhergestellte Rekombinase-Aktivität, T7-Promoter-vermittelte Gentranskription und dank der Zinkfinger-Proteasen positionsspezifische Doppelstrangbrüche beobachtet werden, die zu einer Reporterogenaktivität führten.<sup>[121–123]</sup>

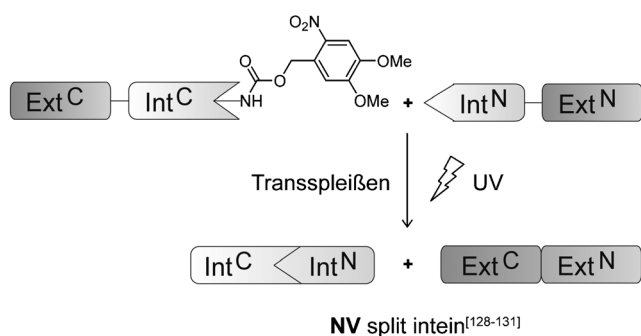
Außerdem wurde ein Pyrrolsyt-tRNA-System entwickelt, mit dem **NP**-geschütztes Lysin in HEK-293T-Zellen kodiert werden konnte. Der Tumorsuppressor p53 und die Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1 (MEK-1) wurden mit dieser photoaktivierbaren Aminosäure in ihren aktiven Zentren exprimiert. Dadurch konnte nach Bestrahlung die Lokalisation von EGFP-fusioniertem p53 beobachtet werden und die Aktivität von MEK-1 durch extrazellulär signalregulierte Kinasephosphorylierung gemessen werden.<sup>[124,125]</sup>

**DMNB**-geschütztes Serin wurde von Schultz und Mitarbeitern in den Transkriptionsfaktor Pho4 in *Saccharomyces cerevisiae* eingebaut.<sup>[126]</sup> Photolyse bei 405 nm führte zu einer Phosphorylierung von Pho4 durch den Cyclin-Cyclin-abhängigen Kinasekomplex und zu einem Transport aus dem Nukleus in das Cytosol. Nicht nur proteinogene Aminosäuren, funktionalisiert mit photolabilen Gruppen, wurden verwendet. Das Aminoacyl-tRNA-Synthetasesystem akzeptiert auch andere modifizierte photoaktivierbare Aminosäuren, was Deiters, Cropp und Mitarbeiter dazu genutzt haben, durch Expression in *E. coli* positionsspezifisch ein Fluorotyrosin in EGFP einzuführen, um die elektronischen Eigenschaften des Chromophors zu ändern.<sup>[127]</sup>

### 2.3.4. Photomodulation von Protein-Spleißen

Als Protein-Spleißen bezeichnet man das autokatalytische Herausschneiden interner Proteindomänen (Int) aus einer Peptidsequenz, gefolgt von der Ligation der angrenzenden Regionen (Ext).<sup>[128]</sup> Muir et al. haben eine Version des getrennten Inteins (split intein) *Ssp* DnaE mit einem **NV**-Rest an der  $\alpha$ -Aminofunktion von Ser35 synthetisiert.<sup>[129]</sup> Nach Abspaltung der Gruppe mit UV-Licht konnte in vitro das Spleißprodukt ähnlich effektiv wie bei unmodifizierten Proteinen gebildet werden, wie eine Western-Blot-Quantifizierung ergab (Schema 1). Camarero verwendete einen ähnli-





**Schema 1.** Strategie für das lichtregulierte Spleißen von Proteinen.

chen Ansatz, in dem er eine **NV**-Gruppe in das Peptidrückgrat des Inteins einführte.<sup>[130]</sup> Die lichtkontrollierte Bildung des Maltose-bindenden Proteins als Modellsystem durch Proteinspleißen konnte mithilfe eines Fluorophor-Markierung am C-Intein durch Messung von Änderungen der Fluoreszenzanisotropie verfolgt werden. Mootz et al. stellten ein Intein mit **NV**-geschützter Diaminopropansäure her, die isoster zu Cystein ist.<sup>[131]</sup> Durch die Verwendung von Prothrombin als Extein konnten sie die Blutgerinnung in humanem Blutplasma mit Licht induzieren.

### 2.3.5. Andere Anwendungen

Für die räumlich und zeitlich gesteuerte Adressierung von Fluorophoren in bestimmten Proteinen, z. B. für Mikroskopieanwendungen, fusionierten Johnsson und Mitarbeiter die *O*<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (SNAP-Tag) mit einem Zielprotein und eine SNAP-Tag-reaktive Einheit mit einem photoaktivierbaren Fluorophor. Durch Photospaltung eines Linkers zwischen dem Fluorophor und einem Quencher oder durch Photolyse eines photolabil geschützten Fluorophors, konnte ein fluoreszierendes SNAP-markiertes Protein sowohl in Säugetierzellen als auch im Zebrafisch erzeugt werden.<sup>[132–134]</sup>

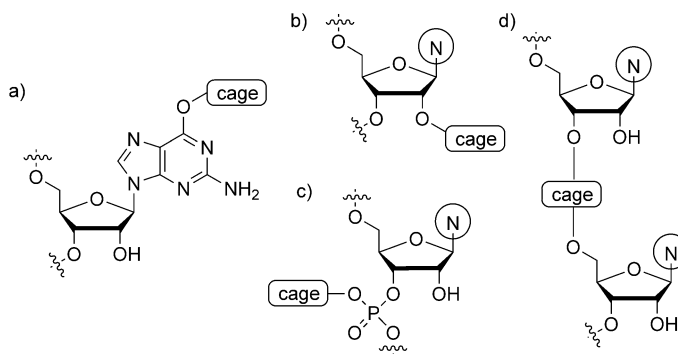
Untersuchungen zur Ubiquitylierung von Proteinen sind für das Verständnis von Zellprozessen, wie dem proteosomalen Proteinabbau oder der Gentranskriptionsregulierung, essentiell. Daher haben Muir und Mitarbeiter ein gut durchdachtes exprimiertes Proteinligationsystem entwickelt, das für eine positionsspezifische Ubiquitylierung ein photospaltbares Ligationsauxiliar enthält.<sup>[135,136]</sup> Ein C-terminales Peptid des Histons H2B wurde mit **ONB**-Gruppen geschützt, und Ubiquitin wurde positionsspezifisch durch Auxiliär-vermittelte exprimierte Proteinligation angehängt. Danach wurden die Schutzgruppen mit Licht abgespalten, und der N-Terminus des H2B-Proteins wurde an das Peptid ligiert. Mit diesem auf chemische Weise ubiquityliertem H2B (uH2B) konnten sie die direkte Stimulation der K79-spezifischen Methyltransferase hDOT1L durch uH2B nachweisen, die eine Histon-H3-Methylierung katalysiert.

In einigen der bisher beschriebenen Ansätze wurde das Zielprotein an einer Aminosäure, die in das aktive

Zentrum ragt und durch ihren natürlichen Aktivator phosphoryliert werden soll, modifiziert. Imperiali und Mitarbeiter wählten einen anderen Ansatz, indem sie über Festphasensynthese direkt photoaktivierbare phosphorylierte Aminosäuren in Peptide und Proteine einführten.<sup>[137]</sup> Sie bauten **DEACM**- und **NPE**-geschützte Versionen von phosphoryliertem Serin in ein Substrat und einen Inhibitor der Wip1-Phosphatase ein, womit sie wellenlängenselektive Aktivierung und Inaktivierung des Phosphorylierungsweges zeigen konnten.<sup>[138]</sup> Weiterhin wurde ein **NPE**-geschütztes phosphoryliertes Serin in die leichte regulatorische Kette von Myosin eingeführt, wodurch mit Photolyse die Freisetzung von aktiviertem Myosin räumlich kontrolliert in COS7-Zellen erzielt werden konnte.<sup>[139]</sup>

### 2.4. Photo(de)aktivierbare Oligonukleotide

Photoaktivierbare Derivate von DNA, RNA und ihrer Analoga wurden im Gegensatz zur reversibel photoschaltbaren DNA erst relativ spät entwickelt. Für eine Übersicht über diese Anfänge verweisen wir auf unseren früheren Übersichtsartikel.<sup>[1]</sup> Verständlicherweise gab es daher in den letzten sechs Jahren eine Reihe an Neuanwendungen. Grundsätzlich kann die photolabile Schutzgruppe entweder an der Nukleobase zur Verhinderung der Watson-Crick-Basenpaarung, an der Ribose, dem Phosphodiester-Rückgrat oder als interner photospaltbarer Linker eingeführt werden (Abbildung 6). Der Effekt der Nukleobasenmodifizierung auf die Duplexstabilität wurde systematisch untersucht.<sup>[140]</sup> Ein photospaltbarer Linker kann auch an dem 5'- oder 3'-Ende eingesetzt werden. Während die Modifikationen des Typs (a), (b) und (d) (Abbildung 6) normalerweise mit geeigneten Bausteinen in der Festphasensynthese hergestellt werden, wird Typ (c) durch eine (unspezifische, statistische) Alkylierung der Oligonukleotide mit einem Diazoderivat der Schutzgruppe erhalten.

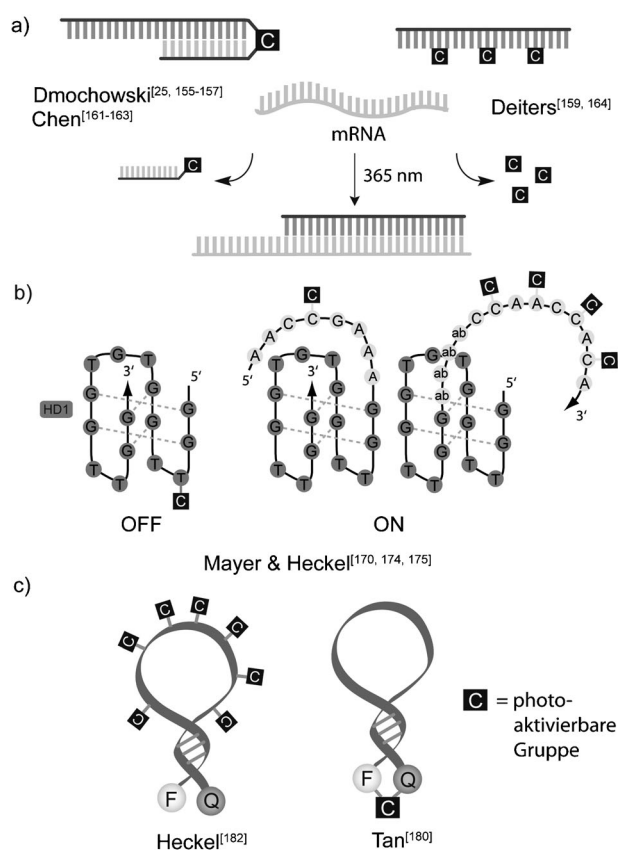


**Abbildung 6.** Überblick über die Konzepte zur Photoaktivierung von DNA oder – wie hier – RNA. Die photolabile Gruppe kann entweder a) die Watson-Crick-Basenpaarungsstellen, b) die 2'-OH-Gruppen der RNA,<sup>[141]</sup> c) Reste des Phosphodiester-Rückgrates blockieren oder d) als photospaltbarer Linker zwischen zwei Nukleosiden bzw. am 5'- oder 3'-Ende sitzen.

#### 2.4.1. Lichtregulation der Genexpression

Die Mehrheit der Studien hat sich mit der Regulation der Genexpression befasst und wurde schon zusammenfassend diskutiert.<sup>[142–146]</sup> Eine der wahrscheinlich interessantesten Arten zur Genregulation ist die Verwendung der RNA-Interferenz, bei der kurze RNA-Stränge (small interfering RNAs, „siRNAs“) die Hauptakteure darstellen. Wie in unserem eigenen Beitrag gezeigt, können sie etwa durch das Schützen der Nukleobasen im Zentrum des sogenannten Führungsstranges lichtregulierbar gemacht werden.<sup>[147]</sup> Friedman et al. hatten als erste lichtinduzierbare siRNAs durch Modifizierung des Phosphatrückgrates hergestellt (Abbildung 6c),<sup>[148]</sup> allerdings wurde kein vollständiges An/Aus-Verhalten erzielt. In dem Versuch, dies zu verbessern, modifizierten sie das 5'-Ende des Führungsstranges mit einer photolabilen Gruppe, erreichten aber erneut nur unvollständiges An/Aus-Verhalten.<sup>[149]</sup> Das stand im Gegensatz zur damaligen Literatur, in der davon ausgegangen wurde, dass jede 5'-Modifikation RNAi-Aktivität verhindert. In einer weiteren Studie bezüglich der Modifizierung von Oligonukleotiden mit Diazoderivaten fanden sie heraus, dass – entgegen der Erwartungen – die terminalen Phosphatgruppen deutlich einfacher zu modifizieren sind als interne Phosphodiester.<sup>[150]</sup> Zur Optimierung ihres Ansatzes der terminalen Photoaktivierung wechselten sie zur sterisch anspruchsvolleren Gruppe **CD-DMNPE** und erzeugten somit ein verbessertes lichtreguliertes Verhalten.<sup>[151]</sup> Da die Stabilität des photoaktivierbaren Konstrukts bis zur Aktivierung ebenfalls eine Rolle spielt, stellten sie photoaktivierbare siRNAs mit Phosphorothioatbrücken her, die eine erhöhte Serumstabilität aufwiesen.<sup>[152]</sup> Eine ähnliche Studie führten Monroe et al. mit 2'-Fluor-modifizierten siRNAs durch – sowohl in der Zellkultur als auch in Zebrafischembryonen.<sup>[153]</sup> Die Blockierung des 5'-Endes im Antisense-Strang wurde von McMaster et al. als Strategie verfolgt. Sie konnten erfolgreich – sogar dosisabhängig – und ohne Nebenwirkungen eine Anzahl von Genen herunterregulieren.<sup>[154]</sup>

Der traditionellere Ansatz zur Regulation der Genexpression nutzt Antisense-Oligonukleotide, die entweder die mRNA blockieren oder das Schneiden durch die RNase H induzieren. In mehreren Studien stellten Dmochowski et al. lichtaktivierbare Antisensereagentien her, z. B. durch Modifizierung des Antisense-Oligonukleotids gegen die *c-myc*-RNA mit einem photospaltbaren Linker und einem zum Teil komplementären Sense-Strang (Abbildung 7a). Durch Photospaltung dieser intramolekularen Haarnadel konnte das Antisensereagens wieder freigesetzt werden.<sup>[25, 155–157]</sup> Mokhir et al. stellten für eine derartige Anwendung einen mit rotem Licht spaltbaren Linker vor, dessen Funktionsweise auf der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch einen Sensibilisator beruhte.<sup>[158]</sup> Deiters et al. wiederum nutzten an den Nukleobasen modifizierte Phosphorothioat-Antisenseverbindungen, die in Mausfibroblasten nur nach Photospaltung mit der Ziel-mRNA hybridisierten.<sup>[159]</sup> Später wiesen sie mit einem Konstrukt aus Oligonukleotid, einem photospaltbaren Linker und Polyethylenglycol (PEG) die lichtregulierte Desaktivierung einer Antisenseverbindung nach.<sup>[160]</sup> Das PEG schützte die DNA-Antisenseverbindung



**Abbildung 7.** Einige Anwendungen photo(de)aktivierbarer Oligonukleotide: a) Lichtregulation der Genexpression mit photoaktivierbaren Antisenseoligonukleotiden; b) Regulation der Aptameraktivität; c) photoaktivierbare Molecular Beacons.

bis zur Photospaltung vor Exonukleasenabbau. „Morpholinos“ stellen eine spezielle Sorte von Antisensereagentien dar, in denen für eine erhöhte Stabilität in Zellen die Ribose durch einen Morpholinring ersetzt wird. Chen et al. führten lichtaktivierbare Morpholinos ein, die ebenfalls aus einem Antisense-Strang und einem photospaltbaren Linker bestanden.<sup>[161–163]</sup> Mit diesem System konnten sie das „no tail“-Gen in Zebrafischembryonen mit Licht regulieren. Deiters und Yoder zeigten anhand der Regulierung der *chordin*-Expression in Zebrafischen, dass es auch über eine Photoaktivierung von Nukleobasen funktioniert.<sup>[164]</sup>

„Antimirs“ stellen Antisense-Oligonukleotide gegen microRNAs (miRNAs) dar. Durch Verwendung eines photospaltbaren Linkers stellten Li et al. erfolgreich die ersten photoaktivierbaren Antimirs her und wendeten sie in *C. elegans* an.<sup>[165]</sup> Transkriptionsfaktor-regulierte Gene können auch mit „Ködern“ reguliert werden – zusätzlichen Kopien der Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors an der dsDNA. Deiters et al. wiesen durch das Schützen der Nukleobasen Inaktivierung der Köder nach, und regulierten die Aktivierung von NF-κB durch Photospaltung.<sup>[166]</sup> Die Translation eines Plasmids konnte von Nagame durch die positionsspezifische Einführung eines photoaktivierbaren Restes während der PCR-Reaktion reguliert werden.<sup>[167]</sup> Durch das Verbinden zweier kurzer Antisense-Stränge über einen photospaltbaren

Linker erzeugten Dmochowski et al. „RNA bandages“, die die ribosomale Translation blockierten.<sup>[168]</sup> Photospaltung des Linkers setzte die Translation wieder in Gang.

#### 2.4.2. Lichtregulation von Aptameren

Eine andere sehr nützliche Anwendung von Oligonukleotiden ist ihre Verwendung als Aptamere, etwa zur Regulation der Proteinfunktion.<sup>[169]</sup> Aptamere werden in einem evolutionären Selektionsprozess, der SELEX, erzeugt, indem die Zielsubstanz mit einer umfangreichen DNA- oder RNA-Bibliothek inkubiert wird. Ohne dass Hintergrundwissen dazu notwendig ist, wie die Zielsubstanz gebunden wird, werden Aptamere durch mehrere Zyklen, in denen ungebundenes Material gewaschen und gebundenes über PCR amplifiziert wird, identifiziert. Aptamere können unter anderem auch in der Diagnostik Verwendung finden. Daher ist es von Interesse, ihre Funktion mit Licht zu steuern. Das erste lichtaktivierbare Aptamer wurde von unseren Gruppen vorgestellt:<sup>[170]</sup> Wir wiesen nach, dass die Aktivität des HD1-Aptamers, das eine G-Quadruplexstruktur bildet und die Serinprotease Thrombin inhibiert, durch die Modifizierung einer einzelnen bei der Strukturbildung beteiligten Thymidin-Nukleobase mit Licht reguliert werden kann (Abbildung 7b). Molekulardynamiksimulationen klärten den Einfluss der photolabilen Gruppe auf.<sup>[171]</sup> Guo und Shi zeigten später am gleichen Aptamer, dass eine Modifizierung des Rückgrats ebenso funktioniert.<sup>[172,173]</sup> Da dieses Aptamer als Blutgerinnungshemmer von therapeutischem Interesse ist, zeigten wir anschließend die Möglichkeit auf, dass die Aktivität dieses Aptamers auch mithilfe einer intramolekularen Antisense-(Antidot)-Strategie ausgeschaltet werden kann.<sup>[174]</sup> Nach der Freisetzung mit Licht zerstört der Antisense-Strang durch Basenwechselwirkungen mit der Aptamersequenz die aktive G-Quadruplex-Konformation. Es stellte sich als sehr wichtig heraus, ob der Antisense-Strang an das 5'- oder 3'-Ende angefügt wird, und letzteres führte sogar zu einer verstärkten Blutgerinnungshemmung – ein Effekt, der noch nicht ganz verstanden ist.<sup>[175]</sup> Zwar war es hilfreich, eine Kristallstruktur von **HD1** und Thrombin zu haben, zur Auffindung geeigneter Modifizierungspositionen ist dies aber nicht notwendig. Einfache sekundäre Strukturbestimmungen können vollkommen ausreichend sein, wenn man die aktive Konformation eines Aptamers mit einer photoaktivierbaren Nukleobase verhindern möchte.<sup>[176]</sup> Da Aptamere gegen verschiedene regulatorische Proteindomänen erzeugt werden können, konnten wir auch domänenspezifische Lichtregulation der Proteinfunktion, durch die Verwendung zweiwertiger Aptamere mit photolabilen Schutzgruppen in den verschiedenen funktionellen Aptamerhälften, zeigen.<sup>[177]</sup> In einem kürzlich erschienenen Beitrag verwendeten wir photoaktivierbare Aptamere zur funktionellen Detektion von Proteinen in einem Prozess, der apta-PCR genannt wird und daraus besteht, ein diagnostisches Aptamer, nach Freisetzung von seiner Zielverbindung, mit quantitativer PCR zu quantifizieren und zu analysieren.<sup>[178]</sup>

#### 2.4.3. Andere Anwendungen

Eine neuere Entwicklung stellen photoaktivierbare Molecular Beacons dar.<sup>[179]</sup> Als Molecular Beacons bezeichnet man diagnostische Oligonukleotide, die eine Stammschleifenstruktur aufweisen und an je einem Ende einen Quencher und ein Fluorophor tragen. In diesem Zustand fluoresziert der Beacon durch den FRET-Effekt (resonanter Fluoreszenzenergietransfer) nicht. Die Anlagerung einer Ziel-mRNA an die Schleifenregion führt jedoch zu einer Öffnung der Stammschleife, und der Beacon fluoresziert – als Anzeichen für die Anwesenheit der gesuchten RNA. Photoaktivierbare Molecular Beacons benötigen für diesen Vorgang einen zusätzlichen Lichttrigger. Dadurch können sie in lebenden Zellen zur Einzelmoleküldetektion in Echtzeit von RNA mit minimalem Hintergrundrauschen verwendet werden, indem sie nur an gewünschten Stellen mit einem fokussierten Laser zur RNA-Erkennung aktiviert werden. Dafür gibt es bisher zwei Ansätze (Abbildung 7): Tan et al. zeigten, dass ein solcher Effekt durch das Verknüpfen der Beacon-Enden mit einem photospaltbaren Linker verwirklicht werden kann.<sup>[180]</sup> In unserem Beitrag konnten wir diesen Effekt durch den Erhalt eines fast vollständigen binären An-/Aus-Verhaltens optimieren, indem in der Schleifenregion mehrere Nukleobasen mit photolabilen Gruppen versehen wurden, die trotzdem effizient abgespalten werden konnten.<sup>[181]</sup> Abe und Ito et al. konnten einen ähnlichen Effekt mit einem photoaktivierbaren Fluorophor erreichen.<sup>[182]</sup> Allerdings leuchtete hier die Probe auch in der Abwesenheit der Ziel-RNA.

Die Echtzeitsequenzierung zählt zu den vielen Ansätzen für Sequenzierungstechnologien der zweiten Generation.<sup>[183]</sup> Sie stellt eigentlich eine Primerverlängerungstechnologie dar, bei der durch reversible Terminatoren in jedem Zyklus ein (fluoreszierender) Rest eingefügt wird. Welche Base das dann ist, kann an der eingebauten Farbe erkannt werden. Anschließend werden der reversible Terminator und das Fluorophor entfernt und der nächste Zyklus startet. Natürlich stellt die Photoaktivierung dafür eine elegante Methode dar. In einem Beitrag von Metzker et al. wird gezeigt, dass eine Modifizierung der exocyclischen Aminofunktion von Adenosin schon für eine effektive reversible Termination der Primerverlängerung ausreicht.<sup>[184]</sup> Das Triphosphat konnte von mehreren Polymerasen eingebaut werden, die Verlängerung war aber erst nach der Photospaltung möglich. In einer anderen Studie nutzten sie **ONB**-geschütztes 5'-Hydroxymethyl-2'-desoxyuridintriphosphat (**HOMedUTP**).<sup>[185]</sup> Dieses Thymidin-Analogon ließ sich ebenfalls als ein photospaltbarer am 3'-OH nicht-blockierter reversibler Terminator verwenden. In einer aktuellen Studie konnten sie nun ihr Set an photoaktivierbaren reversiblen Terminatoren vervollständigen.<sup>[186]</sup>

In mehreren Studien verwendeten Komiyama und Kuzuya et al. das Konzept der Nukleobasen-modifizierten Nukleotide für PCR-Reaktionen. So konnten sie mit einem photoaktivierbaren **dt<sup>NPP</sup>** im DNA-Templat die Primerverlängerung des Gegenstranges an der Position gegenüber der modifizierten Base stoppen. Damit konnten sie nach der Photolyse Doppelstränge mit Einzelstrangüberhängen (sticky



ends) herstellen, die direkt zur Ligation in einen Plasmidvektor verwendet werden konnten.<sup>[187–190]</sup> Deiters et al. erweiterten den Anwendungsbereich, indem sie zeigten, dass auf diese Weise elegant positionsspezifische Mutationen oder Deletionen in Plasmid-DNA erzeugt werden können.<sup>[191]</sup> Sie konnten auch die PCR-Reaktion auf unterschiedliche Weise mit Licht kontrollieren: Zur Lichtaktivierung der Primerhybridisierung verwendeten sie Primer mit drei photoaktivierbaren Gruppen, die die Anlagerung des Templats verhinderten. Eine Deaktivierung der PCR-Reaktion konnte durch die Verwendung von Primern mit photolabil geschützten Antisenseregionen, die nach Bestrahlung Haarnadelstrukturen bildeten und somit die Dehybridisierung vom Templat bewirkten, erreicht werden.<sup>[192]</sup>

Deiters et al. wiesen auch nach, dass die Aktivität von Ribozymen mit Licht gesteuert werden kann: Ribozyme sind katalytisch aktive RNA-Moleküle, die z. B. das Schneiden einer Phosphodiesterbindung katalysieren. Verschiedene Substratspezifitäten und weitere Funktionen können maßgeschneidert werden, wie z. B. das Erkennen von kleinen Molekülen. Theophyllin ist ein derartiges Molekül, das eine künstliche Variante des Hammerhead-Ribozyms reguliert. Für ein lichtaktivierbares Ribozym synthetisierten Deiters et al. nun ein photolabil geschütztes Theophyllin.<sup>[193]</sup> Zwar hätte diese Studie im Abschnitt 2.2 zu photoaktivierbaren kleinen Molekülen erwähnt werden können, aber die Autoren fuhren dann fort mit der Einführung Nukleobase-geschützter Reste in zwei DNAzymen (besteht aus DNA, statt aus RNA) und konnten damit die Kontrolle ihrer Funktion mit Licht zeigen.<sup>[194,195]</sup> Mit einem Antisense-Ansatz konnte die Photoregulation von DNAzymen ebenfalls verwirklicht werden.<sup>[196]</sup> Dabei wurde ein photolabil geschütztes DNA-Analogon (Köder) der zu schneidenden RNA eingesetzt. Nach der Photoaktivierung band es an das DNAzym, stellte aber kein Substrat zum Schneiden dar. Ein derartiger geschützter Antisense-Strang kann auch als intramolekulare Verlängerung des DNAzyms vorliegen. In einem ähnlichen Ansatz schalteten Dmochowski et al. ein 10- bis 23-DNAzym mit Licht an oder aus, indem sie einen photoschaltbaren Linker als Rest in das DNAzym einführten, der das DNAzym entweder durch Schneiden deaktiviert oder durch das Abspalten blockierender DNA-Stränge mit Licht aktiviert.<sup>[197]</sup> Jäschke et al. verwendeten eine photolabil geschützte Nukleobase für die Photoaktivierung eines ganz anderen Ribozyms, das in dem Fall die Diels-Alder-Reaktion zweier kleiner organischer Moleküle katalysierte.<sup>[198]</sup>

All diese Ansätze können nur mit einem tieferen Verständnis der DNA- und speziell der RNA-Faltung verbessert werden. Schwalbe et al. führen eine Reihe von Studien an, in denen Laserlichtquellen für detaillierte Struktur- und Dynamikuntersuchungen von Nukleinsäuren an die NMR-Spektroskopie gekoppelt werden. Zum Beispiel wurde die  $Mg^{2+}$ -Abhängigkeit der Hammerhead-Ribozym-Aktivität untersucht und ein Mechanismus zur Verbesserung der katalytischen Effizienz vorgeschlagen.<sup>[199]</sup> Das reversible konformative Schalten von RNA ist speziell für die Aktivität von RNA-Schaltern („riboswitches“) wichtig – regulatorischen RNA-Elementen, die die Translation kontrollieren und vielleicht zu den schönsten und kompliziertesten Anwendungen der

RNA-Faltung gehören. Auch hier sind konformative Gleichgewichte, etwa zwischen bistabilen RNAs, wichtig und wurden mit lichtaktiviert zeitaufgelöster NMR-Spektroskopie von Schwalbe und Pitsch untersucht.<sup>[200,201]</sup> Für weitere Details verweisen wir auf zwei exzellente Übersichtsartikel.<sup>[202,203]</sup>

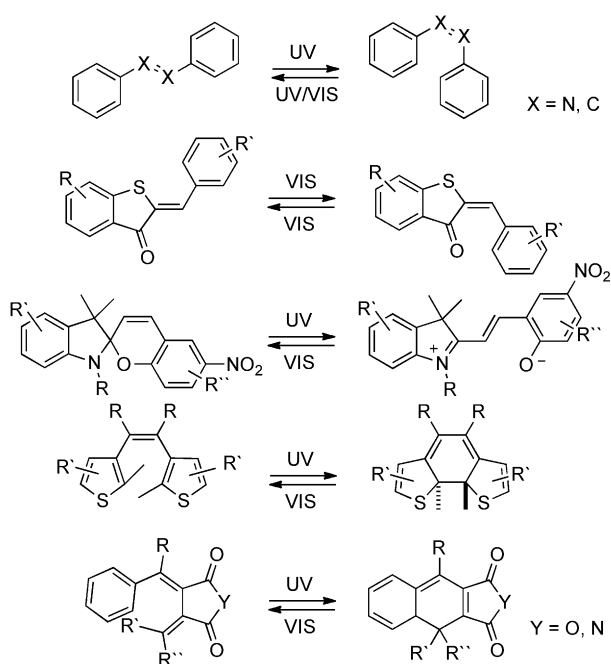
In der DNA-basierten Nanotechnologie<sup>[204]</sup> ist das Erzeugen verschiedener funktioneller Zustände ein wichtiges Forschungsfeld. Oft werden die entwickelten „Walker“ und Motoren durch eine manuelle Änderung der Umgebungsbedingungen oder durch Zugabe von Kontroll-Oligonukleotiden gesteuert. Da solche Energiequellen zu „Verunreinigungen“ führen, ist die Verwendung von Licht zur Erzeugung der zu den Änderungen treibenden Zustände verlockend. Während mit reversibel photoschaltbaren Oligonukleotiden in den letzten Jahren schon ausgeklügelte Ansätze entwickelt wurden (siehe Abschnitt 3.4), gibt es nur wenige Studien mit photoaktivierbaren Oligonukleotiden. So verfolgten Luke-man et al. einen Ansatz, bei dem die Kontroll-Oligonukleotide an einer Oberfläche durch dichte Immobilisierung über 5'-photospaltbare Linker und die Bildung einer intramolekularen Haarnadel abgeschirmt wurden.<sup>[205]</sup> Mit Licht konnten verschiedene Kontrollstränge freigesetzt werden und betrieben cyclisch eine Modellmaschine. In unserem Beitrag wurden photoaktivierbare Einzelstrangüberhänge zur Lichtregulation der Wechselwirkungen von DNA-Ringen verwendet.<sup>[206]</sup>

### 3. Reversibles Photoschalten

Photoschalter haben gerade an der Grenzfläche von Lebens- und Materialwissenschaften eine breite Anwendung gefunden,<sup>[207,208]</sup> und eine umfassende Übersicht würde den Rahmen dieses Aufsatzes sprengen. Themen wie Zelltransport, Oberflächenregulierung, lightsensitive Polymere oder photoregulierte Katalysatoren, sowie die große Menge an Literatur zu sterisch gehinderten Alkenen (die nach unserem Wissen bisher auch noch keine Anwendung in einem biologischen Kontext gefunden haben) werden hier nicht diskutiert.

#### 3.1. Konzepte

Bereits in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts wurde das Phänomen der lichtinduzierten Farbänderung beobachtet.<sup>[209]</sup> Hirshberg prägte 1950 den Begriff Photochromie für dieses Verhalten.<sup>[210]</sup> Aber erst während der letzten 20 Jahre wurden bistable, photoschaltbare Verbindungen mehr und mehr als nützliche Werkzeuge für die Adressierung biologischer Fragestellungen wahrgenommen. Man kann organische photochrome Systeme in verschiedene Klassen unterteilen: Entweder wird eine Isomerisierung von Doppelbindungen oder eine unimolekulare pericyclische Reaktion durchlaufen (Schema 2). Sie können auch nach der Art der Änderung, die durch Licht bewirkt wird, klassifiziert werden. Die Azobenzol-, Stilben-, Spiropyran- und Hemithioindigo(HTI)-Systeme erzeugen durch das Schalten sterische Änderungen, und



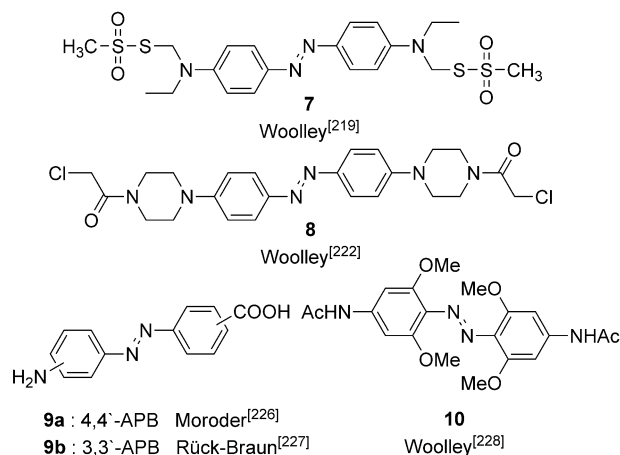
**Schema 2.** Überblick über bistabile Photoschalter basierend auf Azobenzol ( $X=N$ ), Stilben ( $X=C$ ), Hemithioindigo, Spiropyran, Diarylethen, Fulgid ( $Y=O$ ) und Fulgidim ( $Y=N$ ) (von oben nach unten).

speziell Azobenzole und Spiropyrane eignen sich gut, um reversibel eine sterische Störung hervorgerufen. Eine Änderung in der konformativen Flexibilität kann durch das Schalten des Diarylethen (DET)- oder des Fulgid-Systems erzeugt werden. Die photochemischen Eigenschaften dieser Schalter in organischen Lösungsmitteln wurden während der letzten 50 Jahre ausführlich untersucht. Allerdings können diese Eigenschaften und auch die Stabilität der Photoschalter enorm durch die wässrigen und teilweise reduzierenden Bedingungen, die in biologischen Systemen vorherrschen, verändert werden. Daher soll im folgenden Abschnitt ein Überblick über diese Systeme und ihr Verhalten unter wässrigen Bedingungen gegeben werden.

### 3.1.1. Von Azobenzol abgeleitete Photoschalter

Die bei weitem am meisten verwendete Klasse von Photoschaltern basiert auf Azobenzol, das eine lichtinduzierte *cis-trans*-Isomerisierung der  $N=N$ -Doppelbindung eingeht. Dies resultiert in einem Wechsel von dem stabileren und planaren *trans*-Azobenzol zu *cis*-Azobenzol, bei dem die beiden Hälften des Moleküls um  $55^\circ$  zueinander gekippt sind.<sup>[5,211,212]</sup> Ebenso erfolgt dabei eine Änderung des Dipolmoments von 0.5 D zu ca. 3.1 D und eine Verkleinerung des End-zu-End-Abstandes um ca.  $3.5 \text{ \AA}$ .<sup>[213]</sup> Die Isomerisierung von *trans* zu *cis* erfolgt üblicherweise bei 350 nm ( $\pi-\pi^*$ -Übergang), während *cis* in *trans* entweder bei 450 nm ( $n-\pi^*$ -Übergang) oder thermisch überführt werden kann. Da sich die UV/Vis-Spektren beider Spezies deutlich überlagern, ist eine vollständige Überführung von *trans* zu *cis* photochemisch nicht möglich, und in der Regel wird durch Bestrahlung ein photostationärer Zustand mit nicht mehr als 80 % *cis* er-

zeugt. Umgekehrt kann bei der Photoisomerisierung von *cis* zu *trans* nur bis zu 95 % des *trans*-Isomers erhalten werden.<sup>[212,214]</sup> Demgegenüber kann eine thermische Rückisomerisierung > 99.99 % des *trans*-Isomers liefern.<sup>[215]</sup> Bei Raumtemperatur stellt sich bei unmodifizierten Azobenzolen<sup>[214]</sup> diese thermische Relaxation innerhalb von 3 bis 4 Tagen ein, allerdings hängt sie stark von verschiedenen Parametern ab. Da der Übergangszustand der Isomerisierung einen dipolaren Charakter aufweist,<sup>[216]</sup> verkürzt eine hohe Polarität des Lösungsmittels die Halbwertszeit für die thermische Relaxation.<sup>[217–219]</sup> Ebenso wird die thermische Isomerisierung durch niedrigen pH beschleunigt, da eine Protonierung der Azobindung die Aktivierungsbarriere erniedrigt.<sup>[220]</sup> Elektronengebende und/oder elektronenziehende Gruppen in *para*-Position stabilisieren durch Verringerung des  $N=N$ -Doppelbindungscharakters den Übergangszustand und führen somit zu einer beschleunigten Relaxation.<sup>[221]</sup> Woolley und Mitarbeiter haben dies zur Maximierung der Schaltungsgeschwindigkeit verwendet, indem thermische Relaxation zum Zurückschalten eingesetzt wurde. Die Azobenzolderivate **7**<sup>[219]</sup> und **8**<sup>[222]</sup> wiesen Halbwertszeiten von ca. 25 ms bzw. 1 s auf (Abbildung 8). Außerdem konnten für die



**Abbildung 8.** Strukturen einiger von Azobenzol abgeleiteter Photoschalter, die sich durch zum Teil rotverschobene Absorptionseigenschaften für das *trans*-Isomer bzw. erhöhte thermische Stabilitäten für das *cis*-Isomer auszeichnen.

Absorptionsbanden der *trans*-zu-*cis* Umwandlung Rotverschiebungen mit  $\lambda_{\max}$  bei 480 nm für Azobenzol **7** und ca. 450 nm für Azobenzol **8** erreicht werden, was die Nutzung weniger schädlicher Wellenlängen mit erhöhter Penetrationstiefe in Zellen ermöglicht. Als nachteilig erwies sich, dass hohe Strahlungsintensitäten, die zu Zell- oder Gewebeschäden führen können, verwendet werden mussten, um *cis*-Azobenzol in ausreichenden Konzentrationen zu erhalten.

Der *cis*-Zustand kann durch Substitutionen in den *ortho*- oder *meta*-Positionen stabilisiert werden. Für ein 2,2'-Dimethyl-substituiertes Azobenzol haben Asanuma et al. über Halbwertszeiten für die thermische Relaxation von > 200 h bei  $37^\circ\text{C}$  berichtet (siehe **23** in Abbildung 14).<sup>[223]</sup> Diese Stabilisierung beruht auf einer sterischer Hinderung durch die

raumausfüllenden *ortho*-Substituenten, was eine Inversion bzw. Rotation der Azogruppe während der *cis-trans*-Isomerisierung erschwert. Außerdem wird angenommen, dass die *ortho*-Substituenten eine hydrophobe Tasche um die Azogruppe bilden, die zum einen die *cis*-Struktur stabilisiert und zum anderen den polaren Übergangszustand destabilisiert.<sup>[221,224]</sup> Eine *meta*-Substitution reduziert mesomere Wechselwirkungen des Substituenten mit der Azogruppe.<sup>[225]</sup> Daher wurden deutlich unterschiedliche Halbwertszeiten für die von Azobenzol abgeleiteten  $\omega$ -Aminosäuren 4,4'-APB ((Aminophenylazo)benzoyl) **9a** ( $t_{1/2} \approx 10$  min)<sup>[226]</sup> und 3,3'-APB **9b** ( $t_{1/2} \approx 42$  h)<sup>[227]</sup> in DMSO berichtet. Das Azobenzol-derivat **10**, substituiert mit Methoxygruppen in allen vier *ortho*-Positionen, ist erst kürzlich von Woolley et al. vorgestellt worden.<sup>[228]</sup> Dieses Substitutionsmuster resultierte in einem thermisch stabilen *cis*-Isomer mit einer Halbwertszeit von 2.4 Tagen in wässriger Lösung. Ein anderer interessanter Effekt bestand in einer starken Rotverschiebung der  $n-\pi^*$ -Bande des *trans*-Isomers, was eine Trennung der  $n-\pi^*$ -Banden beider Isomere zur Folge hatte. Somit konnte *trans*-zu-*cis*-Photoschaltung bei blauem Licht (530–560 nm) und die Rückschaltung bei 460 nm erreicht werden, also ohne jegliches UV-Licht. Leider wurde aber eine verminderte Stabilität gegenüber Reduktion (Glutathion) festgestellt.

Da Azobenzole anfällig für eine Reduktion durch Thiole sind, wurde ihre Stabilität gegenüber Reduktion durch das für das intrazelluläre Redoxpotential verantwortliche Tripeptid Glutathion (GSH)<sup>[229]</sup> diskutiert. Moroder et al. haben die Reduktion einer auf Azobenzol basierenden  $\omega$ -Aminosäure durch GSH genauer studiert<sup>[230]</sup> und einen Mechanismus vorgeschlagen, in dem die Thiolgruppe von GSH die Azobindung angreift. Interessanterweise erfolgt dieser Angriff hauptsächlich am *cis*-Isomer, bei dem die Azobindung durch die nicht-planare Struktur weniger resonanzstabilisiert ist. Daher stabilisieren elektronenziehende Reste Azobenzol gegenüber einer Reduktion durch GSH.<sup>[222,224]</sup> Unabhängig davon wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von GSH eine Beschleunigung der thermischen Relaxation bei weniger elektronenreichen Azobenzolen induziert.<sup>[230,231]</sup> Daher untersuchten Woolley und Mitarbeiter die Eignung von Azobenzol für intrazelluläre Photoregulation in lebenden Organismen, indem sie ein mit Azobenzol vernetztes fluoreszierendes Reporterpeptid in Zebrafischembryonen injizierten. Die Azobenzol-Isomerisierung konnte durch Aufnahme der durch das Schalten induzierten Fluoreszenzänderung beobachtet werden. Mindestens 30 Schaltzyklen konnten verlustfrei ausgeführt werden, und das Fluoreszenzsignal blieb 2 Tage stabil *in vivo*. Es wurden auch keine toxischen Nebenwirkungen in der Entwicklung des Embryos beobachtet.<sup>[232]</sup>

Gerade bei der Kontrolle der Sekundärstruktur und Funktion von Peptiden und Proteinen spielt die photochemisch induzierte Änderung des End-zu-End-Abstands eine wichtige Rolle für die funktionellen Veränderungen im Zielmolekül. Deshalb gab es Bestrebungen, diesen End-zu-End-Abstand, ohne zuviel Flexibilität in das Molekül einzuführen, zu vergrößern. Eine Strategie zur Maximierung des Isomerisierungseffekts, die Vergrößerung des Schalters mit Acetyleneinheiten, wurde von Moroder und Mitarbeitern

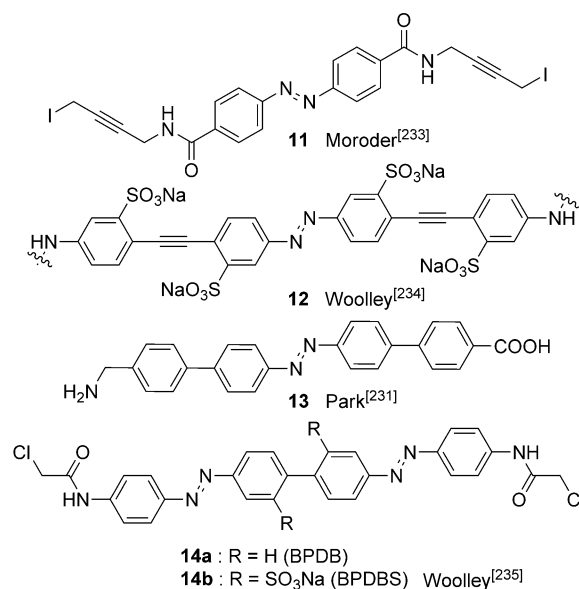


Abbildung 9. Azobenzol-Photoschalter mit einem erweiterten End-zu-End-Abstand.

vorgestellt (Verbindung **11** in Abbildung 9).<sup>[233]</sup> Woolley et al. haben durch die Einführung starrer Phenylethynyl-Einheiten an beiden Seiten einen wasserlöslichen Schalter mit einem End-zu-End-Abstand von 13 Å entwickelt (**12**).<sup>[234]</sup> Leider war die photochemische Umwandlung von *trans* zu *cis* wohl wegen elektronischer Wechselwirkungen mit den Phenylethynyl-Einheiten stark vermindert. Die Einführung von Biphenyl-Einheiten wurde als eine weitere Strategie zur Vergrößerung des End-zu-End-Abstands von Standard und Park verfolgt.<sup>[231]</sup> Ihr Derivat **13** zeigte gute photochemische Eigenschaften und Molecular Modeling ergab eine Änderung des End-zu-End-Abstandes von 13 Å. In einer aktuellen Studie haben Woolley et al. zwei Azobenzol-Einheiten über eine Biphenyl-Brücke verknüpft, was in einer Vergrößerung des End-zu-End-Abstandes von maximal 23 Å resultierte.<sup>[235]</sup> Da Bestrahlung aber sowohl *cis/trans*-Isomere als auch *cis/cis*-Isomere erzeugt, ist es schwieriger, konformative Auswirkungen dieser Schalter auf ein Zielmolekül vorherzubestimmen. Mit ihrem BPDPS-Derivat **14b** (Abbildung 9) mit Sulfonsäuregruppen in *ortho*-Position konnten sie allerdings bis zu 80 % *cis/cis* im photochemischen Gleichgewicht erreichen. Einer aktuellen Studie von Hecht et al. zufolge beruht dies auf einem durch die *ortho*-Substituenten vergrößerten Diederwinkel zwischen den Azobenzol-Einheiten.<sup>[236]</sup> Das direkte Aneinanderreihen von Azobenzol-Einheiten in *para*-Position führt normalerweise durch eine erweiterte elektronische Konjugation zu einer drastischen Abnahme der Photoreaktivität des Schalters.<sup>[237]</sup> Durch die Einführung eines großen Diederwinkels können die beiden Einheiten jedoch elektronisch entkoppelt werden, was zu einer deutlichen Verbesserung der photochemischen Eigenschaften führt (Abbildung 9). Ein ausführlicher Übersichtsartikel zu Azobenzolen als Photoschalter für Biomoleküle ist kürzlich von Beharry und Woolley erschienen, den wir ausdrücklich empfehlen wollen.<sup>[5]</sup>

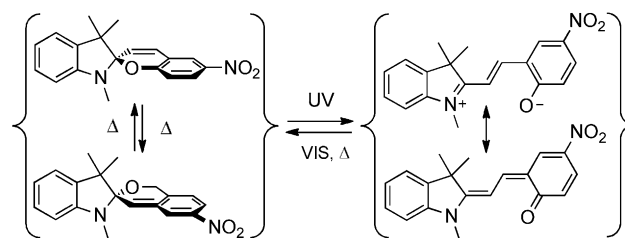


Stilbene zeichnen sich im Vergleich mit Azobenzolen durch einige Vorteile aus, wie thermische Stabilität des *cis*-Isomers und Stabilität gegenüber reduzierenden Bedingungen.<sup>[238]</sup> Allerdings ist die Notwendigkeit von UV-Licht sowohl für die *trans*→*cis*- (300 nm) als auch für die *cis*→*trans*-Umwandlung (280 nm) ein großer Nachteil für den Einsatz von Stilbenen in biologischen Anwendungen.

### 3.1.2. Andere Photoschalter

Die Gruppe der Hemithioindigo(HTI)-basierten Photoschalter könnte sich zu einer vielversprechenden Alternative zu den Azobenzolen entwickeln. Isomerisierung des thermodynamisch stabileren *Z*-Isomers zum *E*-Isomer erfolgt durch Bestrahlung bei 400 nm in Ausbeuten um die 80 %. Beide Isomere besitzen eine planare und spannungsfreie Struktur.<sup>[239]</sup> Daher besitzt das *E*-Isomer grundsätzlich auch eine höhere thermische Stabilität als *cis*-Azobenzol. Reisomerisierung zum *Z*-Isomer erfolgt bei Wellenlängen um 480 nm. Die *Z/E*-Absorptionbanden sind mehr separiert als bei Azobenzolen, und in organischen Lösungsmitteln wurden höhere photochemische Stabilitäten als für Azobenzole und Fulgide festgestellt.<sup>[240,241]</sup> HTI-basierte  $\omega$ -Aminosäuren mit sehr hohen Isomerisationsgeschwindigkeiten < 10 ps wurden vorgestellt.<sup>[242–244]</sup> Bisher hat aber die Labilität der HTIs gegenüber typischen Bedingungen für die Peptidfestphasensynthese ihren Einsatz als konformative Schalter für Peptide stark beeinträchtigt.<sup>[239,245–247]</sup>

Vom Spiropyran abgeleitete Photoschalter wurden neben den Azobenzolen bisher am meisten in biologischen Anwendungen eingesetzt. Zwar ist ihr photochemisches Verhalten schwerer vorherzusagen und auch mehr durch die Umgebung beeinflussbar als bei Azobenzolen. Dafür sind die durch das Photoschalten bewirkten Änderungen in der Geometrie und Polarität deutlich ausgeprägter als für Azobenzole. Konjugation an ein Biomolekül erfolgt meistens über das N-Atom der Indolhälft eines Spiropyrans, allerdings können auch andere Stellen des Moleküls modifiziert werden, was eine Orientierungskontrolle des Schalters im Biokonjugat zulässt.<sup>[248]</sup> UV-Bestrahlung eines Spiropyrans überführt durch Ringöffnung die räumlich anspruchsvolle, farblose Spiroform (SP) in die planare und farbige Merocyaninform (MC). Die große sterische Änderung wird von einer Zunahme der Polarisierung von 2–5 D für die SP-Form zu 20 D für das offene Merocyanin begleitet.<sup>[249,250]</sup> Am Spirokohlenstoff besitzt die SP-Form ein chirales Zentrum, wodurch mehrere stabile Isomere durch *cis/trans*-Isomerisierung um die zentrale Doppelbindung für die MC-Form möglich sind. Außerdem kann für die offene Form neben der zwitterionischen auch eine chinoide Grenzstruktur formuliert werden, die vor allem in unpolarer Umgebung vorliegen soll (Schema 3). Der Ringschluss erfolgt, abhängig vom Lösungsmittel, thermisch nur sehr langsam, wird hingegen durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht (ca. 550 nm) deutlich beschleunigt. Wegen der gut getrennten Absorptionsbanden der SP- und der MC-Form, ist ein sauberes Schalten zwischen beiden Isomeren möglich. Normalerweise stellt die geschlossene SP-Form die thermodynamisch stabilere Form dar, allerdings können polare Substituenten wie Carboxy-, Nitro-

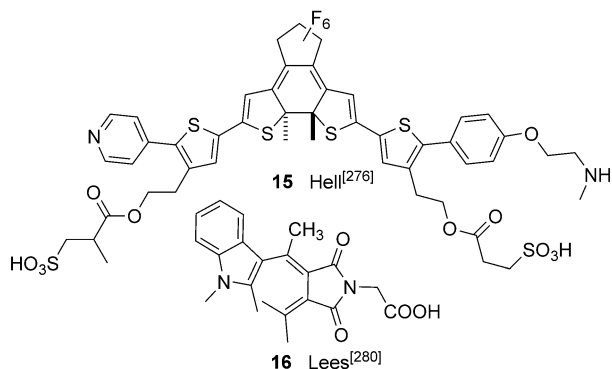


**Schema 3.** Isomerisierung eines Spiropyrans und mesomere Grenzstrukturen der Merocyanin-Form.

oder Sulfonatgruppen und eine polare Umgebung – vor allem wässrige Lösungsmittel – die MC-Form dermaßen stabilisieren, dass sie die thermodynamisch begünstigte Form im Dunklen darstellt (negative Photochromie).<sup>[209,251,252]</sup> Einige andere Aspekte müssen beim Gebrauch von Spiropyranen unter wässrigen Bedingungen beachtet werden: Die Quantenausbeute für den SP-zu-MC-Übergang nimmt mit zunehmender Polarität des Solvens ab,<sup>[253]</sup> aber auch die direkte Umgebung in biologischen Systemen hat großen Einfluss auf die Schalteffizienz. So wurden Quantenausbeuten, die mit Werten in hydrophoben Lösungsmitteln vergleichbar sind, für auf einer Proteinoberfläche immobilisierte Schalter ermittelt.<sup>[254,255]</sup> Andererseits haben Koçer et al. von einer reduzierten Schalteffizienz eines in ein Kanalprotein integrierten Spiropyrans berichtet.<sup>[256]</sup> Die Konjugation eines Nitrospiropirans an ein Oligonukleotid – entweder über einen Linker an das 5'-Ende<sup>[257]</sup> oder intern an ein 2'-OH<sup>[258]</sup> (siehe **28** in Abbildung 14) – resultierte in einem Verlust der Photoaktivität für das Schalten der SP- in die MC-Form. Demgegenüber beobachteten Andréasson et al. nicht nur Photoaktivität, sondern nach UV-Bestrahlung auch Interkalation der MC-Form in eine DNA-Doppelhelix, wenn sie Kalb-Thymus-DNA mit einem Nitrospiropiran-Derivat inkubierten.<sup>[259]</sup> Daher kann es schwierig sein, das photochemische Verhalten von Spiropyranen vorherzusagen. Weiterhin wird die Hydrolysestabilität von Spiropyranen als nachteilig für biologische Anwendungen angesehen, da für Spiropyrane ein schneller Abbau bei 60 °C in wässrigem Puffer<sup>[260]</sup> und unter wässrig-basischen Bedingungen<sup>[257,258]</sup> festgestellt wurde. Hydrolyse erfolgt hauptsächlich an der offenen Merocyanin-Form in einer Retroaldolreaktion. Allerdings legen andere Studien, in denen reversibles Photoschalten von Spiropyranen mehr als zehnmals ohne erkennbaren Abbau sowohl *in vitro*<sup>[254]</sup> als auch *in vivo*<sup>[261]</sup> gezeigt wurde, nahe, dass diese Rate wohl auch sehr umgebungsabhängig ist. Eine aktuelle Studie von Giordani et al.<sup>[262]</sup> hat sich mit der Toxizität von Spiropyranen beschäftigt und ergab, dass mikromolare Spiropyran-Konzentrationen nur geringe zelltoxische Auswirkungen auf verschiedene Zelllinien hatten. Im Gegensatz zur polaren MC-Form kann die hydrophobe SP-Form durch Zellmembranen diffundieren.<sup>[263,264]</sup> Marriott et al. haben berichtet, dass es effizient möglich ist, die SP-Form von Nitrospiropirans mit Zweiphotonenanregung bei 720 nm in die MC-Form zu überführen.<sup>[265,266]</sup> Dies ist ein wichtiger Unterschied zu den Azobenzolen, die nur geringe Zweiphotonenquerschnitte haben, und könnte eine Anwendung von Spiropyran-basierten Photoschaltern in Gewebeproben und Tieren ermöglichen.

Diarylethene und Fulgide/Fulgimide sind Hexatrienderivate, die lichtinduziert reversible electrocyclic Ringchluss- bzw. Ringöffnungsreaktionen eingehen.<sup>[267,268]</sup> Beide Klassen zeichnet vernachlässigbare thermische Relaxation und hohe Ermüdungsresistenz aus, letzteres besonders bei den Diarylethenen. Erst seit kurzem rücken Diarylethene und Fulgimide in den Fokus für biologische Anwendungen – die Diarylethene vor allem für hochauflösende Mikroskopie. Dank sehr unterschiedlicher Absorptionsspektren der beiden Isomere von Diarylethenen, sind für die Überführung der farblosen und flexiblen offenen in die wegen Delokalisation der Elektronen tieffarbigen und starren geschlossenen Form Schaltraten von über 90 % üblich.<sup>[269]</sup> Cyclisierung und/oder Cycloreversion kann bei manchen Diarylethenen zusätzlich elektrochemisch induziert werden,<sup>[270]</sup> und das synthetisch unkomplizierte spektrale Einstellen mit unterschiedlichen Substituenten ermöglicht das Verschieben der Wellenlänge für die Cycloreversion in einem Bereich von etwa 500 nm bis 700 nm.<sup>[271]</sup>

Aktuelle Studien belegen, dass die exzellente Ermüdungsresistenz und hohe thermische Stabilität von Diarylethenen ebenfalls im Wässrigen erhalten bleiben.<sup>[272,273]</sup> Allerdings kann die geringe Wasserlöslichkeit ein Problem darstellen. Daher wurden Diarylethene mit amphiphilen Seitenketten hergestellt,<sup>[274,275]</sup> die aber zu einer Aggregation der Moleküle in wässrigen Lösungen führten. Vor kurzem haben Hell et al. das wasserlösliche Diarylethen **15** vorgestellt, das gute Schalteigenschaften aufweist und die Möglichkeit zur Konjugation mit anderen gewünschten Molekülen über eine sekundäre Aminofunktion bietet (Abbildung 10).<sup>[276]</sup>



**Abbildung 10.** Wasserlösliche Diarylethen- und Fulgimid-basierte Photoschalter.

Bei Fulgiden durchläuft durch UV-Bestrahlung das farblose Isomer in der *E*-Konformation einen Ringschluss zur farbigen geschlossenen Form, die sich durch ein ausgeweitetes  $\pi$ -System und eine fast planare Struktur auszeichnet.<sup>[268,277]</sup> Durch UV-Bestrahlung kann auch *E/Z*-Isomerisierung der Doppelbindung auftreten. Da der Ringschluss aber nur vom *E*-Isomer aus erfolgen kann, ist das ein Nachteil bei Fulgiden. Vollständige Cycloreversion wird durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht bei 500 nm erreicht und erfolgt, wie auch der Ringschluss, in einem Zeitrahmen von ps. In polaren

Lösungsmitteln fallen die Quantenausbeuten allerdings niedriger aus.<sup>[278–280]</sup> Fulgide werden im Wässrigen wegen ihrer Anhydrid-Struktur hydrolysiert, weswegen vorzugsweise die Hydrolyse-resistenten Fulgimide für biologische Anwendungen eingesetzt werden. Dank der Succinimid-Einheit kann der Photoschalter auch leicht funktionalisiert werden. Noch gibt es aber nur wenige Studien zu den Eigenschaften von Fulgimiden im Wässrigen. In einer frühen Studie modifizierten Willner et al. Concanavalin A mit einem Fulgimid-Derivat, das in wässriger Lösung bei 25 °C für 48 h stabil war und zweimal hin und her geschaltet werden konnte.<sup>[281]</sup> 2004 zeigten Rentzepis und Mitarbeiter, dass ein in der offenen Form fluoreszierendes Indolylfulgid durch Zellmembranen diffundieren konnte.<sup>[278]</sup> Hin- und Herschalten konnte mindestens siebenmal *in vivo* durchgeführt werden. Erst vor kurzem unternahm die Arbeitsgruppe von Lees Anstrengungen, Fulgimide für wässrige Systeme zu optimieren.<sup>[280,282]</sup> Fulgimid **16** zeigte beispielsweise in Puffer bei 37 °C eine hervorragende thermische Stabilität mit nur ca. 3 % Abbau der offenen und ca. 20 % Zersetzung der geschlossenen Form nach 500 h. Photochemisch induzierte Cyclisierung der Verbindung **16** erzeugte bis zu 87 % des geschlossenen Isomers, und der Zyklus konnte 80-mal wiederholt werden, bevor das Molekül zu 20 % abgebaut war. Obwohl Fulgimide noch keine breite Verwendung finden, zeigen diese Beispiele durchaus ihre Eignung für Anwendungen in einem biologischen Kontext.

### 3.2. Photoschaltbare kleine Moleküle

Moleküle zur reversiblen Regulation der Enzymaktivität mit Licht wurden für die Möglichkeit einer differenzierteren Kontrolle von Organismen entwickelt. Kuhn und Mitarbeiter erkannten die Ähnlichkeit eines Hemithioindigos mit einigen Inhibitoren der 12/15-Lipoxygenasen (LOXs). Die inhibierende Wirkung des *E*-Isomers auf Hasen-12/15 LOX erwies sich als 33-mal höher als für das *Z*-Isomer. Wegen des hohen  $IC_{50}$ -Wertes (0.021 mM) für das *E*-Derivat war es allerdings nur begrenzt als LOX-Inhibitor einsetzbar.<sup>[283]</sup> Alac-Aceto-genin, ein Inhibitor des Komplexes I in der mitochondrialen Atmungskette, wurde mit Azobenzol modifiziert (**17**, Abbildung 11).<sup>[284]</sup> Es konnten reversible Änderungen in der Enzymaktivität beobachtet werden, jedoch war es wegen der unvollständigen *cis-trans*-Isomerisierung nicht möglich, die Aktivität wieder komplett herzustellen. Das reversible Photoschalten eines an einer Oberfläche verankerten Azobenzols, das mit einem von Phenylalanin abgeleiteten Trifluormethylketoninhibitor modifiziert war, ermöglichte lichtreguliertes Binden von  $\alpha$ -Chymotrypsin an der Oberfläche.<sup>[285]</sup> Fischer et al. konnten zeigen, dass der Einfluss der Bestrahlung auf die Inhibierungseffizienz eines mit Azobenzol modifizierten immunsuppressiven Cyclosporin A durch Vergrößerung der strukturellen Änderungen zwischen den photoschaltbaren Konformeren mithilfe der „protein borrowing“-Strategie optimiert werden kann.<sup>[286,287]</sup> Benzolsulfonamid, der Inhibitor der humanen Carboanhydrase I (hCAI), und ein  $Cu^{2+}$ -Iminodiacetat(IDA)-Komplex, der an Histidinreste in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms

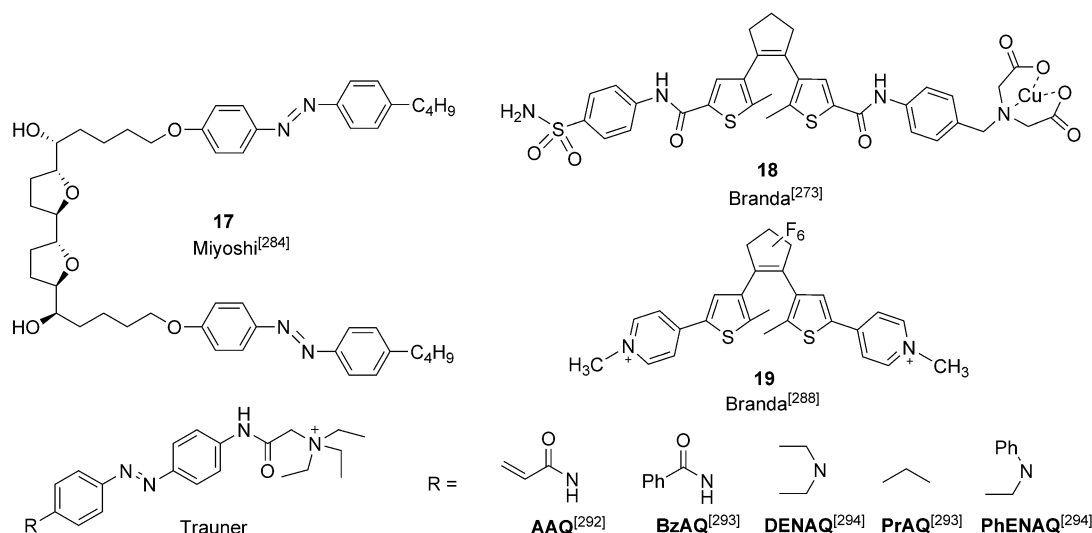


Abbildung 11. Photoschaltbare Inhibitoren und Regulatoren.

bindet, wurden über einen DET-Schalter miteinander verbunden (**18**).<sup>[273]</sup> Durch Überführung der geschlossenen in die offene Form mit sichtbarem Licht, konnte in vitro wiederholt der IC<sub>50</sub>-Wert um das 55-fache auf 8 nM gesenkt werden. Das DET-Derivat **19** wurde in einer anderen Studie von Branda et al. *C. Elegans* oral verabreicht und behielt seine Photoaktivität innerhalb der Nematoden für mindestens drei Zyklen bei. Wegen ihres niedrigeren Reduktionspotentials, das wohl zu einer Störung des metabolischen Elektronenflusses führte, verursachte die geschlossene Form eine Paralyse der Nematoden. Die Beweglichkeit der Organismen konnte aber durch Schalten zur offenen Form wieder hergestellt werden.<sup>[288]</sup>

Trauner und Mitarbeiter haben sich der Regulierung der Zellkommunikation mit Azobenzolen zugewandt.<sup>[289,290]</sup> Sie entwickelten eine ganze Klasse von nicht-kovalent verknüpften photochromen Liganden (PCLs), um das Aktionspotential ionotroper Glutamaterezeptoren und spannungsgesteuerter K<sup>+</sup>-Kanäle zu regulieren. Mit einem mit Azobenzol substituierten Glutamatagonisten konnten sie die Aktivierung von iGluR5- und iGluR6-Rezeptoren in HEK293-Zellen lichtabhängig steuern.<sup>[291]</sup> Die Klasse der membranpermeablen, mit einer quartären Ammoniumgruppe versehenen Azobenzole, die das Derivat QX-314 des Analgetikums Lidocain imitieren, bindet an die interne Tetraethylammonium(TEA)-Bindungsstelle des Kanalproteins und funktioniert somit als Offene-Kanal-Blocker (siehe Abbildung 11). Die Schalter können entweder in *trans* (**AAQ**,<sup>[292]</sup> **BzAQ**,<sup>[293]</sup> **DENAQ**<sup>[294]</sup>) oder in *cis* (**PrAQ**,<sup>[293]</sup> **PhENAQ**<sup>[294]</sup>) blockieren. Damit ließ sich die photochemische Kontrolle über K<sup>+</sup>-Kanäle in HEK293-Zellen, Purkinje-Neuronen und in Interneuronen des zentralen Mustergenerators (HN-Zellen), die die Frequenz der Herzkontraktion regulieren, erreichen.<sup>[293]</sup>

Die Funktion von Oligonukleotiden hängt stark von ihrer Sekundärstruktur ab. Daher wurden Photoschalter zur Bindung an DNA oder RNA und zur Modulierung ihrer Struktur verwendet. Baigl et al. entwickelten eine Gruppe von grenz-

flächenaktiven kationischen Azobenzolen als sequenzunabhängige Kondensationsvermittler für DNA,<sup>[295,296]</sup> die in *trans* ein Verdichten und in *cis* ein Entfalten der DNA bewirken sollten. Mit diesen Molekülen konnte in vitro die Regulation sowohl der Transkription als auch der Translation von GFP gezeigt werden.<sup>[297]</sup> Liganden, die bestimmte Fehlpaarungen erkennen, wurden von Nakatani und Mitarbeitern als reversible molekulare Kleber für die DNA-Hybridisierung eingesetzt (Abbildung 12). Diese Liganden bestehen aus zwei

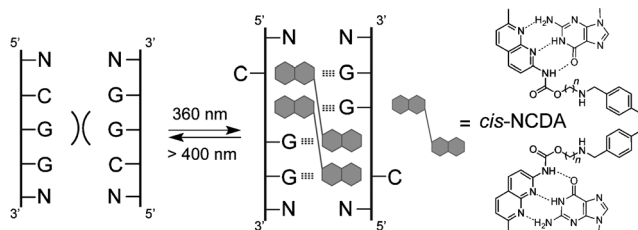


Abbildung 12. Photoschalten der DNA-Hybridisierung mit dem molekularen Azobenzol-Kleber NCDA ( $n = 2, 3, 4$ ).<sup>[298–300]</sup>

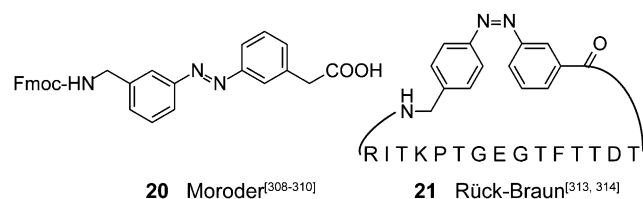
über ein Azobenzol verknüpften basenerkennenden, von Naphthyridinen und eventuell Azachinolonen abgeleiteten Elementen. In der *cis*-Form kann der Ligand durch die Anlagerung an GG- oder GA-Fehlpaarungen Hybridisierung der Stränge bewirken. Ein Schalten zu *trans*-Azobenzol ändert die Orientierung der basenbindenden Einheiten und resultiert in einer Dehybridisierung.<sup>[298–300]</sup> Mit dem Ziel, reversible lichtschaltbare Genelemente zu entwickeln, wurden Selektionsstudien für kurze Oligonukleotide, die eines der beiden Isomere eines Photoschalters binden – sogenannte Aptamere<sup>[169]</sup> –, im SELEX-Verfahren<sup>[169]</sup> durchgeführt. Es konnten zwar Aptamere für Nitrospirobenzopyran,<sup>[301]</sup> ein Arginin-substituiertes Azobenzolderivat<sup>[302,303]</sup> und Dihydropyren<sup>[304]</sup> gewonnen werden, aber die erhaltenen  $K_D$ -Werte lagen leider noch im niedrigen  $\mu$ M-Bereich. Im letzten



Fall wurde das Aptamer auch in das Hammerhead-Motiv eingebaut, um ein lichtregulierbares Ribozym zu erhalten.

### 3.3. Photoschaltbare Peptide und Proteine

Photoschalter, vor allem Azobenzole, wurden viel für die Analyse des Faltens und Entfaltens von Peptidkonformationen mittels CD-, NMR-, zeitaufgelöster optischer Spektroskopie und MD-Simulationen eingesetzt.<sup>[5,305–307]</sup> Neue Arbeiten zur Regulierung von  $\beta$ -Haarnadelstrukturen sind seit 2006 dazugekommen. Moroder und Mitarbeiter untersuchten mit Azobenzol **20**, das in der *cis*-Form eine  $\beta$ -I'-Kehre nachahmt, die Faltung der  $\beta$ -Haarnadel des Tryptophan-Zipper-Motivs (Abbildung 13).<sup>[308–310]</sup> Mit diesem Azobenzol-Linker



**Abbildung 13.** Von Azobenzol abgeleitete Aminosäure für die Analyse der  $\beta$ -Haarnadelfaltung und ein die PDZ-Domäne imitierendes Peptid zur Photoregulation der NO-Synthase/Synthrophin-Wechselwirkung.

konnte auch die Gruppe von Hilvert die Haarnadelfaltung eines 36er Derivats des pankreatischen Polypeptids von Vögeln effizient regulieren.<sup>[311]</sup> Durch die Vernetzung der Thiolgruppen eines Kollagenpeptids mit der rigiden Azobenzolkammer **11** konnten Moroder et al. das Falten und Entfalten einer Tripelhelix mit Licht regulieren.<sup>[233,312]</sup>

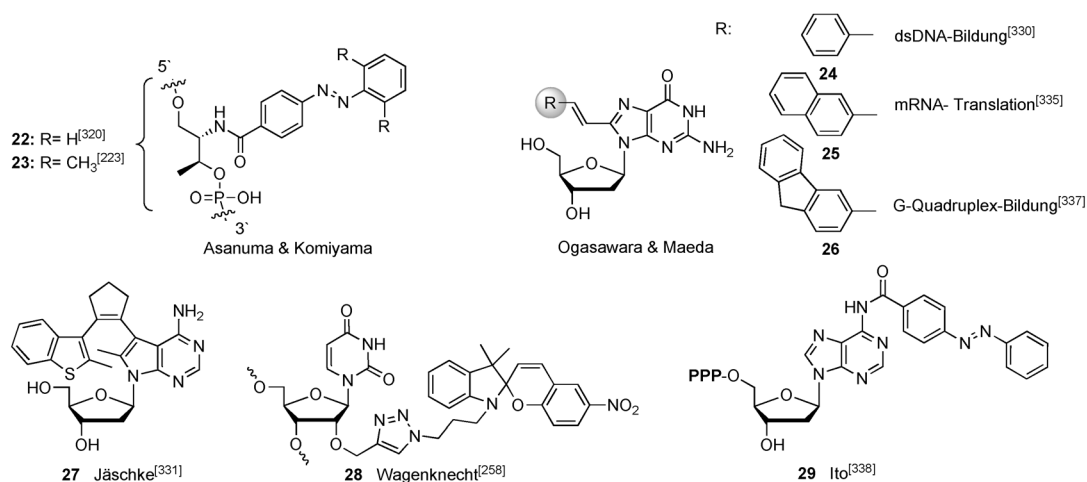
Rück-Braun und Beyermann haben Azobenzol in ein cyclisches Peptid eingebaut, das das  $\beta$ -Finger-Motiv der neuronalen NO-Synthase imitiert (siehe Abbildung 13). Dieses Motiv ist für die Wechselwirkung mit der PDZ-Domäne von  $\alpha$ -1-Synthrophin notwendig. *trans*-**21** besaß keine Affinität für die PDZ-Domäne, während nach Isomerisierung

zu *cis* eine beachtliche Affinität des Peptids zu Synthrophin festgestellt werden konnte ( $K_D = 10.6 \mu\text{M}$ ).<sup>[313]</sup> Die Inhibition der Wechselwirkung zwischen der NO-Synthase und Synthrophin durch *cis*-**21** ermöglichte, durch eine Verminderung der NO-Abgabe der Skelettmuskelzellen, eine lichtkontrollierte Muskelfaserkontraktion, was auch eindrucksvoll in vivo gezeigt werden konnte.<sup>[314]</sup>

2009 bewiesen Woolley et al. anhand der FynSH3-Domäne, dass das Screening von Proteinkristallstrukturen nach geeigneten Stellen zur Mutation und Vernetzung eine sehr effektive Methode für die Regulation größerer Peptide oder sogar globulärer Proteine mit einem Azobenzolschalter sein kann.<sup>[315]</sup> In der Gruppe von Trauner werden ebenfalls häufig Vernetzungsstellen (cross-linking sites) in spannungsgesteuerte Ionenkanäle oder ionotrope Glutamat-Rezeptoren eingebaut, um die Rezeptorfunktionen eindrucksvoll mit Agonisten, die über einen Azobenzol-Linker kovalent verknüpft wurden, mit Licht zu regulieren. Zu diesem Thema verweisen wir auf einen Übersichtsartikel, der kürzlich von der Gruppe veröffentlicht wurde.<sup>[316]</sup> Pingoud et al. stellten photoschaltbare Varianten der Restriktionsenzyme *scPvuII*<sup>[317]</sup> und *SsoII*<sup>[318]</sup> her. Durch Einführung eines Maleimidoazobenzols in die Nähe des aktiven Zentrums konnte durch Bestrahlung für *PvuII* eine 16-fache Zunahme an DNA-Schneidaktivität erreicht werden. Driessen, Feringa und Mitarbeiter beschrieben eine reversible Regulierung der Proteintranslokation mit Licht, indem sie die laterale Pforte (lateral gate) des Kanalproteins *SecYEG* mit einem Azobenzol-Linker vernetzten.<sup>[319]</sup>

### 3.4. Photoschaltbare Oligonukleotide und Nukleinsäuren

In den meisten Fällen wurde Azobenzol zur reversiblen Photoregulation von Oligonukleotiden verwendet. Vor allem das System von Asanuma und Komiyama, bei dem Azobenzol über D-Threoninol als Rückgrat in DNA<sup>[320]</sup> und RNA<sup>[321]</sup> (**22**, Abbildung 14) eingebaut werden kann, hat weite Verwendung gefunden, wie z.B. zur Lichtregulation der Transkription<sup>[322,323]</sup> oder DNA-Ligation.<sup>[324]</sup> Der Baustein für die



**Abbildung 14.** Reversibel photoschaltbare Nukleotidsatz-Bausteine zur Photoregulation der Oligonukleotid-Hybridisierung.

Festphasensynthese von Oligonukleotiden ist inzwischen kommerziell erhältlich. Der Ansatz basiert auf der zusätzlichen Einfügung des Restes **22** in die Basenstapelung, ohne die anderen Reste zu verdrängen. Während *trans*-Azobenzol den DNA-Duplex durch Stapelwechselwirkungen stabilisiert,<sup>[325]</sup> führt eine Isomerisierung in die *cis*-Form zu einer Duplex-Destabilisierung, was an einer erniedrigten Schmelztemperatur für den Duplex erkannt werden kann. Für eine effiziente Regulation der Duplex-Dissoziation mit Licht müssen mehrere Reste eingeführt werden (z. B. 9 Reste für ein 20-meres Oligonukleotid).<sup>[326]</sup> Asanuma et al. haben für die UV-Isomerisierung auch die Bedeutung der Temperatur hervorgehoben, da die Photoisomerisierungsraten für die eingebauten Schalter nur moderat ausfallen. Arbeitstemperaturen, die zwischen den Schmelztemperaturen des Duplex in der *trans*- und der *cis*-Form liegen, optimieren die Effektivität.<sup>[327]</sup> Tan et al. stellten eine andere Strategie vor, um die Effizienz der Photoisomerisierung zu steigern. Die Zugabe von Silber-Nanopartikeln erhöhte für ihren mit **22** modifizierten DNA-Nanomotor<sup>[328]</sup> die Umwandlung von geschlossen nach offen von 20 % auf bis zu 85 %.<sup>[329]</sup> Durch die Verwendung eines 2',6'-Dimethylazobenzol-Restes (**23**) anstatt des unmodifizierten Azobenzols konnten Asanuma und Mitarbeiter die Halbwertszeit der *cis*-Form um das zehnfache (siehe Abschnitt 3.1) und auch  $\Delta T_m$  um das dreifache erhöhen.<sup>[223]</sup>

Es wurden auch Versuche unternommen, andere photoschaltbare Systeme zur reversiblen Regulation der Duplex-Hybridisierung zu nutzen. Von Ogasawara und Maeda stammen photoschaltbare Desoxyguanosin-Derivate, die am C8 mit Arylvinyl-Substituenten modifiziert sind (**24–26**, Abbildung 14). Damit werden bei diesem Ansatz keine zusätzlichen Reste in ein Oligonukleotid eingefügt. Die Vergrößerung der aromatischen Substituenten ergab eine vorteilhafte Rotverschiebung für die *trans/cis*-Isomerisierung. Allerdings führte schon das Derivat **24** mit einem Styryl-Substituent in der *trans*-Form zu einer leichten Duplex-Destabilisierung.<sup>[330]</sup> Das Diarylethen-funktionalisierte 7-Deazaadenosin-Derivat **27** wurde von Jäschke et al. hergestellt, aber noch nicht für den Einbau in DNA verwendet.<sup>[331]</sup> Über Klick-Chemie gelang Beyer und Wagenknecht die Einführung eines Spiropyrans in DNA (**28**, Abbildung 14), allerdings zeigte es kein photochemisches Verhalten mehr.<sup>[258]</sup>

Stafforst und Hilvert konnten mit Azobenzol-modifizierten Peptidnukleinsäuren (PNAs) die PNA/DNA-Hybridisierung regulieren. Mit triplexbildenden PNAs gelang ihnen die lichtregulierte Inhibierung der DNA-Transkription.<sup>[332]</sup> Es wurden auch zwei neue interessante Ansätze zum reversibel mit Licht regulierten Schneiden von RNA veröffentlicht. Komiyama und Kuzuya wiesen nach, dass das durch Acridin unterstützte Schneiden von RNA durch  $\text{Lu}^{3+}$ -Ionen mit Licht reguliert werden kann, indem Acridin und benachbart Azobenzol in den Gegenstrang integriert werden.<sup>[333]</sup> Stapelwechselwirkungen des Acridins mit dem Azobenzol in *trans* verringerten die positionssensitive Aktivierung der RNA, durch ein Schalten zum *cis*-Isomer wurden diese Wechselwirkungen jedoch aufgehoben. Dadurch konnte eine ca. 14,5-fach höhere intrinsische Aktivität für das *cis*-Isomer bestimmt werden. Vollständiges An- und Ausschalten des RNA-Schneidens mit Licht gelang Asanuma und Mitarbeitern mit

einem anderen Design.<sup>[334]</sup> Sie fügten an beide Enden eines DNAzyms komplementäre Azobenzol-haltige Sequenzen an. Durch Hybridisierung bildeten diese Stränge einen verkeilten Duplex, der die Schneidstelle des DNAzyms maskierte. Durch *trans-cis*-Isomerisierung der Azobenzolreste wurde dieser Duplex geöffnet und die Aktivität des DNAzyms wieder hergestellt.

Ogasawara und Maeda konnten die mRNA-Translation von GFP effizient mit einem photoreaktiven 8-Naphthylvinylguanosin-5'-Cap regulieren.<sup>[335]</sup> In der *trans*-Form unterdrückte dieses Cap vollständig die Translation, da der substituierte Rest das aktive Zentrum des eukaryotischen Initiationsfaktors 4E blockierte. Nach Erzeugung der *cis*-Form mit Licht von 410 nm erfolgte die GFP-Translation mit der gleichen Effizienz wie mit einem normalen 5'-Cap.

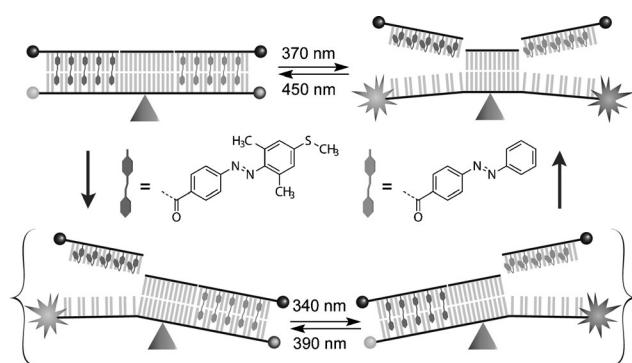
Lichtreaktive Oligonukleotide eignen sich auch zur Kontrolle von G-Quadruplex-Strukturen und wurden daher für die Regulierung eines Thrombin-bindenden DNA-Aptamers verwendet (siehe auch Abschnitt 2.4.2). Dieses Aptamer bildet in seiner aktiven Form ein G-Quadruplex und inhibiert die Thrombin-vermittelte Koagulation durch Binden an dessen Exosite 1. Tan et al. konjugierten einen komplementären Azobenzol-modifizierten DNA-Strang über einen Polyethylen-Linker an die Aptamersequenz.<sup>[336]</sup> In *trans* hybridisierte die komplementäre Domäne mit der Aptamersequenz, wodurch die G-Quadruplex-Struktur und somit die Funktion des Aptamers zerstört wurde. Durch das Schalten der Azobenzole in die *cis*-Form wurde die Aptamerstruktur wieder hergestellt und die Blutgerinnung unterdrückt. Durch Substitution eines dG in der Quadruplexstruktur mit 8-Fluorenylvinyl-2'-desoxyguanosin **26** konnten Ogasawara und Maeda ebenfalls die Thrombin/Aptamer-Wechselwirkung reversibel mit Licht regulieren.<sup>[337]</sup>

In einem interessanten Beitrag benutzten Ito et al. statt des natürlichen ATP für die In-vitro-Selektion eines RNA-Aptamers gegen Hämin das photoreaktive Adenosintriphosphat **29**.<sup>[338]</sup> Mit der Isolierung einer Hämin-bindenden Aptamersequenz wiesen sie nach, dass Verbindung **29** ein geeignetes Substrat für die T7-RNA-Polymerase darstellt und die resultierende RNA auch als Templat für reverse Transkription dienen kann. Allerdings ließ sich das Bindungsverhalten nur mäßig mit Licht regulieren, was auf eine unvollständige *trans-cis*-Isomerisierung zurückgeführt wurde.

DNA als selbstorganisierendes (self-assembling) Material ist auch zunehmend interessanter für die Entwicklung „smarter“ Nanostrukturen und Nanomaschinen geworden. Normalerweise muss, um strukturelle Änderungen oder dreidimensionale Bewegungen in diesen Systemen zu bewirken, ein externer Trigger, wie z. B. DNA-Kontrollstränge oder die Hydrolyse von ATP, zugefügt werden, was ungünstigerweise Abfall produziert. Als Lösung dieses Problems, und wegen ihrer hohen räumlichen und zeitlichen Regulierbarkeit, wurden auch hierfür photoreaktive Oligonukleotide eingesetzt. Tanaka und Mitarbeiter stellten lichtkontrollierbare DNA-Kapseln her, indem sie Azobenzole in die Einzelstrangüberhänge von dreizackigen Sternmotiven einbauten. Diese Kapselstrukturen wurden durch Stapelwechselwirkungen der Azobenzole stabilisiert, brachen jedoch durch Lichtisomerisierung zusammen.<sup>[339]</sup> Tan et al. konnten durch

das lichtregulierte Binden eines Azobenzol-modifizierten Einzelstrangs an eine im Tetraeder interne Haarnadelstruktur die Erweiterung und Kontraktion einer tetraedrischen DNA-Struktur kontrollieren.<sup>[340]</sup> Die gleiche Gruppe wies auch nach, dass mit der lichtregulierten Hybridisierung komplementärer Azobenzol-modifizierter Oligonukleotide die Orientierung und der Abstand von Enzymverbänden moduliert werden können. Dies wurde beispielhaft für das Glucose-oxidase/Meerrettichperoxidase (HRP)-Multienzym-System und für die Verknüpfung der Glucoseoxidase mit dem HRP-DNAzym demonstriert.<sup>[341]</sup>

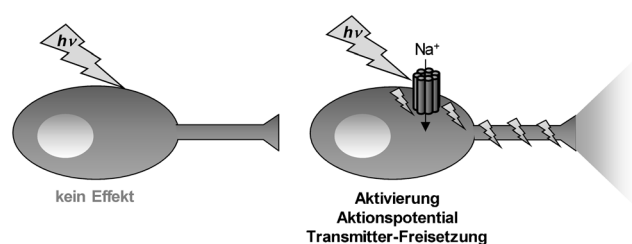
Ein weiterer Schritt zur Entwicklung hochkomplizierter photoschaltbarer Nanomaschinen gelang kürzlich Asanuma et al.<sup>[342]</sup> Sie kombinierten zwei unterschiedlich substituierte Azobenzole in einem DNA-Nanokonstrukt, mit dem sie durch Bestrahlung bei verschiedenen Wellenlängen wippende Bewegungen erzeugen konnten (Abbildung 15). Nach unserem Kenntnisstand ist das hiermit das erste Beispiel für wellenlängenselektives Schalten verschiedener Azobenzole innerhalb einer Probe.



**Abbildung 15.** In einer mit Licht betriebenen DNA-Nanomaschine konnten Schaukelbewegungen durch den Einbau zweier unterschiedlicher Azobenzole induziert werden. Die *trans*-2,6-Dimethyl-4-(methylthio)azobenzol-4'-carbonsäure photoisomerisiert mit sichtbarem Licht, während für die unsubstituierte *trans*-Azobenzol-4'-carbonsäure UV-Licht benötigt wird. Vollständige Dissoziation und Rehybridisierung erfolgen mit Licht bei 370 nm und 450 nm.<sup>[342]</sup>

#### 4. Optogenetik

Die Optogenetik vereint eine Reihe von in den letzten Jahren entwickelten Techniken, mit denen zum einen durch Licht („Opto“) und zum anderen mithilfe von genetisch kodierten photosensitiven Triggerproteinen („Genetik“, Abbildung 16) die Kontrolle über Zellaktivitäten, vor allem in Nervenzellen, erlangt werden kann. Dies steht im Gegensatz zu den in den Abschnitten 2 und 3 beschriebenen Methoden, für die chemische Synthese notwendig ist. Allerdings wurde diese Abgrenzung durch den Ansatz der „optochemischen Genetik“, die quasi eine Kombination beider Welten darstellt, aufgeweicht. Für eine tiefere Auseinandersetzung mit diesem Thema verweisen wir auf aktuelle Übersichtsartikel.<sup>[316,343]</sup> Aufgrund ihres vollkommen unterschiedlichen Ansatzes macht die Optogenetik deutlich andere Bereiche zugänglich. Zum Beispiel erlaubt die Optogenetik, bei sich

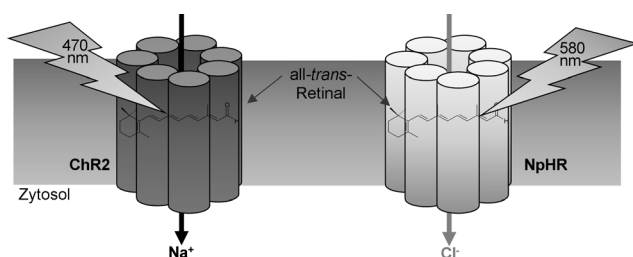


**Abbildung 16.** Prinzip der Optogenetik: Heterologe Zellen, zum Teil Nervenzellen, die normalerweise nicht auf Licht reagieren (links), werden durch die gezielte Expression eines photosensitiven Proteins heterologen Ursprungs („Genetik“) lichtsensitiv („Opto“, rechts) gemacht. In dem Fall hier verursacht ein lichtaktivierter Kationenkanal durch Depolarisation der Zelle das Feuern eines Aktionspotentials und als Folge die Freisetzung eines Transmitters.

frei verhaltenden Tieren die Rolle einzelner Nervenzellen oder neuronaler Ensembles für die Kontrolle des Verhaltens oder dessen Aspekte zu ermitteln. Die Fähigkeit der genetischen Kodierung lichtsensitiver Proteine gestattet es, spezifisch nur die Zellen von Interesse, ja sogar einzelne in einem dichten Netzwerk von Neuronen eingebettete Nervenzellen anzusprechen. Auch wenn es durch Gentechnik nicht möglich sein sollte, das optogenetische Protein nur in der Zielzelle zu exprimieren, ermöglicht der technische Fortschritt, die Bestrahlung auf diese Zelle oder Zelltyp zu beschränken bzw. das Licht mit Mikrofasern tief ins Gewebe zu transportieren. Es sollte nicht unerwähnt bleiben, dass auch die Bildgebung von Zellaktivitäten mit genetisch kodierten Photosensoren häufig zu dem Konzept der Optogenetik gezählt wird. Da Bildgebung allerdings nicht in diesem Aufsatz behandelt wird, verweisen wir den Leser auf eine Reihe exzellenter Übersichtsartikel zu diesem Thema.<sup>[344–346]</sup>

Die Grundidee zur Optogenetik wurde von mehreren Forschern verfolgt, und mehrere Ansätze zur Lösung des Problems wurden entwickelt.<sup>[343,347,348]</sup> Die prominentesten und wegen ihrer Einfachheit am häufigsten verwendeten Werkzeuge für die Kontrolle des Membranpotentials stellen natürliche Photosensorproteine der Rhodopsin-Familie dar. Vor allem das Kanalrhodopsin-2 (ChR2), ein durch blaues Licht gesteuerter Kationenkanal,<sup>[349]</sup> und die durch gelbes Licht gesteuerte  $\text{Cl}^-$ -Pumpe Halorhodopsin<sup>[350]</sup> werden eingesetzt, um Photodepolarisation bzw. Photohyperpolarisation zu erhalten (Abbildung 17). Nachdem deutsche Wissenschaftler in 2002 und 2003 die ersten Beweise dafür lieferten, dass Kanalrhodopsine direkt durch Licht gesteuerte Ionenkanäle sind,<sup>[349,351]</sup> erschienen 2005 die ersten technischen Grundlagenuntersuchungen, die die Nützlichkeit von ChR2 zur Depolarisation von Neuronen in der Zellkultur<sup>[352]</sup> sowie in lebenden Tieren,<sup>[353,354]</sup> bei denen sogar ein Verhalten verursacht werden konnte,<sup>[355]</sup> zeigten. Inzwischen werden diese Werkzeuge, vor allem in den Neurowissenschaften, weitverbreitet angewendet und weiter modifiziert (siehe unten). In einer Anzahl von Veröffentlichungen wurden zusätzliche optogenetische Werkzeuge zur Beeinflussung des Membranpotentials, von Protein-Protein-Wechselwirkungen oder der intrazellulären Signalgebung eingeführt.<sup>[356–363]</sup> Wie schon zuvor erwähnt, werden bei dem komplementären Ansatz der „optochemischen Genetik“ mithilfe der chemischen Biologie





**Abbildung 17.** Kanalrhodopsin (ChR2) und Halorhodopsin (NpHR) sind häufig verwendete mikrobielle Rhodopsine, um exogene multimodale Kontrolle über neuronale Aktivität zu erlangen. Der Kationenkanal Kanalrhodopsin, der unter physiologischen Bedingungen vor allem  $\text{Na}^+$  transportiert, bewirkt eine Blaulicht-vermittelte Photodepolarisation (links). Dagegen ist Halorhodopsin eine durch gelbes Licht getriebene, einwärts gerichtete  $\text{Cl}^-$ -Pumpe und ermöglicht somit Photohyperpolarisation. Beide benötigen all-*trans*-Retinal als Chromophor.

lichtschaltbare Liganden an genetisch modifizierte Ionenkanäle angebracht, um eine optische Kontrolle zu erhalten – gut beschrieben in aktuellen Übersichtsartikeln<sup>[316,343]</sup> und nicht Teil dieses Abschnitts. Als Essenz hat die Optogenetik also kein geringeres Ziel als das Verständnis der Rolle von Neuronen in Schaltkreisen, bei der Beeinflussung des Verhaltens oder im Rahmen höherer Gehirnfunktionen, durch die Stimulierung bzw. Inhibition bestimmter Neuronen oder Neuronenverbände mit Licht, und zwar im Wesentlichen nicht-invasiv und auf neuronalen Zeitskalen. Die Beobachtung neuronaler Aktivität mithilfe genetisch kodierter Sensoren erlaubt das parallele Aufzeichnen der Aktivität vieler Neuronen und kann zum Teil mit optischen Methoden zur Manipulation der Zellaktivität kombiniert werden. Daher hat die Optogenetik in den letzten Jahren die Forschung in den Neurowissenschaften (bzgl. der Übertragung an Synapsen, neuronaler Schaltkreise, ganzer Nervensysteme und des Verhaltens) und auch darüber hinaus in der allgemeineren Zellbiologie revolutioniert. Veröffentlichungen, in denen optogenetische Techniken verwendet werden, nehmen rasant zu (> 300 zum Zeitpunkt des Verfassens dieses Aufsatzes). Daher ist hier eine umfassende Beschreibung des Gebiets nicht möglich und wir bitten daher alle Kollegen, deren Arbeit eventuell unerwähnt bleibt, um Nachsicht.

#### 4.1. Methoden zur Stimulation oder Inhibition von Neuronen durch Änderung des Membranpotentials mithilfe genetisch kodierter Sensoren heterologen Ursprungs

##### 4.1.1. Die *Drosophila*-Photorezeptor-Kaskade und das Phototriggern von Liganden für orthogonale Rezeptoren

Miesenböck und Mitarbeiter brachten 2002 eine Veröffentlichung heraus, die vielleicht als die Geburt der Optogenetik, wie wir sie heute verstehen, betrachtet werden kann.<sup>[364]</sup> Sie „transplantierten“ die Photorezeptorkaskade aus den Augen von *Drosophila* in Wirbeltierneurone. Bei den ersten Versuchen wurden 10 verschiedene Gene transferiert, während man später das zur Stimulierung von Zellen notwendige Set auf die Coexpression von Arrestin, Rhodopsin und der zugehörigen  $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren Gq-Proteins

(„chARGe“) einschränken konnte. In Wirbeltierneuronen reagierte dieses System auf Licht mit der Aktivierung von Rhodopsin, welches dann das *Drosophila*-Gaq-Protein zusammen mit den Wirbeltier-G $\beta$ - und - $\gamma$ -Untereinheiten rekrutierte. Die aktivierten G-Proteine induzierten wohl durch Kopplung an die Phospholipase C die Erzeugung der Sekundärbotenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG), die einen Membranstrom (Depolarisation der Zelle) und eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bewirkten und damit die Ausschüttung synaptischer Transmitter triggerten. Diese bahnbrechende Arbeit demonstrierte zum ersten Mal das Prinzip der Optogenetik. Allerdings fand das System noch keine breite Verwendung und war, mit der Erzeugung neuronaler Pulse erst nach einigen Sekunden, noch vergleichsweise langsam. Auch ebte die neuronale Aktivität in der Dunkelheit nur langsam ab. Um diese Mängel zu überwinden und trotzdem Licht als einen schnellen Trigger für Nervenzellen zu verwenden, sowie die genetische Kodierbarkeit zu erhalten, exprimierten Miesenböck und Mitarbeiter fremde ligandengesteuerte Ionenkanäle in den Wirtorganismus (Wirbeltierneurone und Fruchtfliegen). Hierbei handelt es sich um purinerge  $\text{P}_2\text{X}_2$ -Rezeptoren oder Vanilloid-Rezeptor-Kanäle der TRP-Familie (TRPV), und sie setzten dann die Liganden dieser Kanäle (ATP bzw. Capsaicin) mit Licht frei. Damit konnten Aktionspotentiale und sogar Verhalten rasch hervorgerufen werden.<sup>[362,363]</sup> Da es allerdings notwendig ist, die photolabil geschützten Liganden in lebende Tiere einzubringen, ist die Anwendbarkeit dieser Methode beschränkt.

##### 4.1.2. Mikrobielle Rhodopsine

In 2002 und in 2003 wiesen Nagel, Hegemann, Bamberg und Mitarbeiter nach, dass mikrobielle Rhodopsine von *Chlamydomonas reinhardtii*, wegen ihrer Bedeutung für die Phototaxis dieser grünen Algen bekannt, direkt als lichtgesteuerte Kationenkanäle arbeiten.<sup>[349,351]</sup> Daher wurden die zwei Proteine in Kanalrhodopsine (ChRs) umgetauft; ChR1 zeigte eine höhere Durchlässigkeit für Protonen und ChR2 zeigte zusätzlich eine deutliche Leitfähigkeit für  $\text{Na}^+$  und zu geringen Teilen für  $\text{Ca}^{2+}$ , wobei beide am besten mit blauem Licht aktiviert werden konnten (ChR1  $\approx 500$  nm; ChR2  $\approx 470$  nm). Während diese Funde zunächst auf große Skepsis stießen, wurde doch schnell ihre Bedeutung erkannt, da sie das gesamte Gebiet der Optogenetik erst breit anwendbar und experimentell leicht durchführbar machten. Besonders ChR2, das auch nach Kappung bei Aminosäure 315 als ligandengesteuerter Kanal agiert, ließ sich gut in heterologen Zellen exprimieren. Nagel und Mitarbeiter konnten dann auch für „fremde“ Systeme wie *Xenopus*-Oocyten und HEK293-Zellen zeigen, dass sie durch die Expression von ChR2 photo-depolarisierbar gemacht werden können (Abbildung 17).<sup>[349]</sup> Außerdem benötigen ChRs einzig all-*trans*-Retinal als Cofaktor, von dem sich herausstellte, dass er in Säugetierzellen ausreichend vorhanden ist oder leicht dem Kulturmedium für Zellen oder ganze Tiere (Nematoden, Fliegenlarven) zugefügt werden kann. Daher prognostizierten Nagel et al. schon 2003, dass „... expression of ChR2 in oocytes or mammalian cells may be used as a powerful tool to

increase cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration or to depolarize the cell membrane, simply by illumination.“<sup>[349]</sup>

Die große Nützlichkeit von Kanalrhodopsin-2 zur Photostimulation von Neuronen wurde von mehreren Forschern in den Neurowissenschaften erkannt, und die ersten erfolgreichen Anwendungen in Nervenzellen erschienen in 2005: Boyden und Deisseroth publizierten einen Beitrag im Sommer 2005,<sup>[352]</sup> in dem sie von einer Photodepolarisation von Nagetierneuronen, die die Zellen zum Feuern veranlasste, sowohl in der Zellkultur als auch in Gehirnschnitten berichteten. Im Dezember 2005 zeigten Hegemann, Landmesser und Herlitze in Neuronen des Hippocampus, aus dem Rückenmark von Hühnern und sogar in Embryonen, einen ähnlichen Effekt und sogar die Erregung von Muskelzuckungen,<sup>[353]</sup> und Nagel, Bamberg und Gottschalk konnten ebenfalls im Dezember 2005 mit ChR2 die Lichtkontrolle von Muskeln, Neuronen und des Verhaltens in dem Nematoden *C. elegans* demonstrieren.<sup>[355]</sup> 2006 bewiesen Yawo und Mitarbeiter, dass die Photoaktivierung von ChR2 zu einer Depolarisierung von Neuronen in der lebendigen Maus führen kann,<sup>[354]</sup> und Pan und Mitarbeiter gelang die Expression von ChR2 in den inneren Retinalneuronen (bipolare Zellen und retinale Ganglienzellen) eines Mausmodells der *Retinitis pigmentosa*.<sup>[365]</sup> Diese Tiere sind aufgrund der Degeneration ihrer Photorezeptorzellen blind. Durch die Anwendung von Licht in der ChR2-transgenen Retina wurden allerdings Signale zum optischen Cortex weitergeleitet, was auf eine teilweise Wiederherstellung der optischen Signaltransduktion in das Zentralnervensystem schließen ließ. Die erste Anwendung von ChR2 in *Drosophila*-Larven, ebenso 2006, zeigte die Möglichkeit auf, durch Optogenetik Lernverhalten zu induzieren,<sup>[366]</sup> und 2008 wurden in einer Publikation von Engert und Mitarbeitern ChR2-induzierte Verhaltensweisen in Zebrafärbchen nachgewiesen.<sup>[367]</sup>

Weitere bedeutende Anwendungen von ChR2 im Nagehirn folgten. 2007 berichtete Feng et al. von einer transgenen Maus, die ChR2 in verschiedenen Nervenpopulationen exprimiert, und von der ersten Anregung von (olfaktorischen) Neuronen in einer lebenden Maus.<sup>[368]</sup> Svoboda und Mitarbeiter benutzten ChR2 zur Stimulierung von Neuronen in Mäusehirnschnitten, um weitreichende funktionelle Verbindungen zu kartieren,<sup>[369]</sup> und Oertner et al. konnten mit Licht synaptische Plastizität bewirken.<sup>[370]</sup> Weiterhin wurde von einer Anwendung zu Stimulierung von Neuronen des primären Motorcortex berichtet, bei der unter der Verwendung von Mikofasern das Licht in den Tierschädel gebracht wurde – mit spektakulären Effekten: Auf wenig verstandene Weise führte die Photoaktivierung von Zellen der rechten Hemisphäre des Motorcortex dazu, dass die Maus sich im Uhrzeigersinn drehte, während eine Bestrahlung der linken Hemisphäre solange eine Drehung gegen den Uhrzeigersinn verursachte, bis die Bestrahlung beendet wurde.<sup>[371]</sup>

2007 wurde ein weiterer Meilenstein für die Optogenetik beschrieben: Zwei Berichte, einer von Boyden et al.,<sup>[372]</sup> der andere als Ergebnis einer gemeinsamen Studie der Gruppen von Bamberg, Gottschalk und Deisseroth,<sup>[350]</sup> zeigten den Nutzen von Halorhodopsin (NpHR) aus *Natronomonas pharaonis*, einer durch gelbes Licht regulierten  $\text{Cl}^-$ -Pumpe, zur Hyperpolarisierung von Neuronen in Kultur, in Hirn-

schnitten und in lebendigen *C. elegans*. Hierdurch ließen sich unmittelbar durch das Neuron bewirkte Verhaltensweisen blockieren (Abbildung 17). Weiterhin wurde gezeigt, das NpHR und ChR2 gleichzeitig, jedoch unabhängig voneinander, zur Hyper- bzw. Depolarisation ein- und derselben Zelle genutzt werden können, und somit bidirektionale Kontrolle ermöglichen. Halorhodopsin wurde seitdem in mehreren eleganten Studien eingesetzt, z.B. bei der Erzeugung einer transgenen Maus, die permanent eine Halorhodopsin-Variante mit verbesserter Membraninsertion exprimiert,<sup>[373]</sup> sowie in der Retina von *Retinitis-pigmentosa*-Mäusen, wo NpHR eine Hyperpolarisation der übrig gebliebenen Photorezeptoren bewirkte und somit die natürliche Reaktion auf Licht nachstellte.<sup>[374]</sup> Als eine Erweiterung des Sets an hyperpolarisierenden optogenetischen Werkzeugen wurde von der Boyden-Gruppe die Verwendung von mikrobiellen auswärts gerichteten Protonenpumpen etabliert, im Speziellen Archaeorhodopsin („Arch“) aus *Halorubrum sodomense*, sowie die Protonenpumpe des Pilzes *Leptosphaeria maculans* („Mac“).<sup>[375]</sup> Schließlich wurden auch optogenetische Werkzeuge für die Expression in Primaten erzeugt, die neuronales Feuere aktivieren oder inhibieren können, aber bisher keine makroskopischen Verhaltensänderungen bewirkten.<sup>[376,377]</sup>

Die Nützlichkeit dieses optogenetischen Rüstzeugs hat großen Eindruck hinterlassen, sodass viele Forscher anfangen, es für verschiedene Zwecke, nicht nur zur Zellaktivierung, sondern auch zur Untersuchung der synaptischen Plastizität<sup>[370]</sup> oder der chemischen Übertragungen an Synapsen,<sup>[378,379]</sup> einzusetzen. Bei der Verwendung mikrobieller Rhodopsine wurde schnell erkannt, dass dieses Set nicht perfekt ist und dass weitere Werkzeuge nützlich wären. Daher haben einige Forscher im Fundus der Natur nach weiteren Rhodopsinen, mit z.B. anderen spektralen Eigenschaften gesucht, um eine Rotverschiebung der Anregung zu erreichen.<sup>[380,381]</sup> Weiterhin wurde ChR2 modifiziert und mutiert, um Proteine mit anderen Kinetiken,<sup>[382–385]</sup> Ionenleitfähigkeiten für z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ ,<sup>[386]</sup> oder einer verbesserten Leitfähigkeit bzw. Expression zu erhalten.<sup>[387]</sup> Vor kurzem konnte die funktionelle Fusion zweier Rhodopsine verwirklicht werden, die hochpräzise die optische Anregung und Inhibierung in der gleichen Zelle erlaubt, da die relativen Expressionsmengen der Auslöser der De- und Hyperpolarisation konstant bleiben.<sup>[388]</sup> Die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur einer Chimäre aus ChR1 und ChR2 dürfte die Entwicklung weiterer ChR-Varianten, mit veränderten Ionenleitfähigkeiten oder -spezifitäten bzw. spektralen und kinetischen Eigenschaften, befördern.<sup>[389]</sup>

Viele technisch versierte Berichte befassen sich mit verschiedenen Aspekten der Nutzung von Optogenetik basierend auf Rhodopsinen: Die Einbringung von Licht bei Neuronen in tiefen Bereichen des Nagergehirns wurde durch Implantierung dünner Lichtfasern<sup>[371,390]</sup> sowie komplizierter Apparaturen, die Licht an verschiedene Stellen und Tiefen im Gehirn transportieren können,<sup>[391]</sup> ermöglicht. Um tiefer in lebendes Gewebe einzudringen, wäre eine Anregung mit Rot- oder IR-Licht wünschenswert, daher befassen sich einige Arbeiten mit der Zweiphotonenanregung von ChR2.<sup>[392,393]</sup> Andere Wissenschaftler haben Methoden zur Anregung individueller Neuronen in frei beweglichen trans-

parenten Nematoden erarbeitet, um (einzel-)zellspezifische Verhaltenseffekte hervorzurufen.<sup>[394,395]</sup> Komplexe Belichtungsmuster wurden in Säugetierneuronen verwendet, um nur Teile einer Zelle zu stimulieren oder um so viele Rezeptoren wie möglich in der kleinen Fläche des Zellkörpers einer Nervenzelle anzuregen.<sup>[392,393,396]</sup>

Schließlich wurden die therapeutische Anwendbarkeit von Rhodopsinen und ihre Brauchbarkeit als Werkzeuge für die medizinische Forschung untersucht. Erste Versuche, eine visuelle Prothese auf Kanal- oder Halorhodopsin basierend in dem Modell von *Retinitis pigmentosa* zu entwickeln, wurden vorgestellt.<sup>[365,374,397]</sup> Mithilfe von optogenetischen Mitteln konnten Neuronen identifiziert werden, mit deren Stimulation im Nagermodell die Milderung von Parkinson-Symptomen,<sup>[398]</sup> die Wiederherstellung der Atmung nach Rückenmarksverletzungen<sup>[399]</sup> und die Frequenzsteuerung von Herzmuskelgewebe mit Licht<sup>[400]</sup> gezeigt werden konnten.

#### 4.2. Methoden zur Beeinflussung intrazellulärer Signalwege und von Sekundärbotenstoffen

Der anfängliche Erfolg der Optogenetik mit Rhodopsinen und anderen lichtsensitiven Proteinen heterologen Ursprungs entfachten eine Suche nach weiteren natürlichen Proteinen, mit denen zelluläre Prozesse in heterologen Zellen beeinflusst werden können. Sekundärbotenstoffe und ihre Signalwege spielen eine entscheidende Rolle für unzählige Prozesse in der Zellbiologie, von der Einstellung des Membranpotentials, von Ionenkonzentrationen und der Zellmotilität, bis hin zur Genexpression und dem Wachstum bzw. der Teilung der Zelle. Dies geschieht meist als Reaktion auf exogene Signalmoleküle. Daher wurden diese Signalwege mit optogenetischen Methoden untersucht. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) aktivieren in der Regel intrazelluläre heterotrimere G-Proteine, die dann zur Erzeugung von Sekundärbotenstoffen Effektorproteine aktivieren. Rhodopsin, der natürliche Photosensor der Retina, zählt zu den GPCRs. Daher wurde es benutzt, um in Zellen, die diesen Photorezeptor normalerweise nicht besitzen, Signalwege zu regulieren, die auf eine Aktivierung durch das gleiche  $G\alpha(G_{i/o})$ -Protein reagieren, an welches auch Rhodopsin koppelt.<sup>[353]</sup> Später wurde dieses Konzept erweitert: Die cytosolischen Rhodopsindomänen wurden mit entsprechenden Domänen weiterer GPCRs, die an andere G-Proteine koppeln, ausgetauscht, wodurch sogenannte „opto-X-Rs“ erzeugt wurden.<sup>[358]</sup>

Ein anderer optogenetischer Ansatz benutzt lichtaktivierbare Enzyme, die direkt Sekundärbotenstoffe, nämlich cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), erzeugen. Diese photoaktivierbare Adenylatcyclase (PAC) wurde zum Induzieren neuronaler Antworten in der Fruchtfliege und zum Verstärken der synaptischen Übertragung in *C. elegans* verwendet. Im Unterschied zu der starken Photostimulation durch ChR2 wird dabei bemerkenswerterweise das „intrinsische“ Programm des Nervensystems nicht komplett überlagert, sondern nur verstärkt, was somit eine zusätzliche Qualität an optogenetischer Kontrolle darstellt.<sup>[356,357]</sup> Inzwischen wurde eine wirksamere photostimulierte Adenylatcyclase

entdeckt und in Säugetierneuronen verwendet.<sup>[401]</sup> Ein ähnliches Enzym für die Produktion von cGMP konnte erzeugt, aber noch nicht in Tierzellen getestet werden.<sup>[402]</sup>

Intrazelluläre Signalwege, die als Antwort auf extrazelluläre Liganden in Gang gesetzt werden, involvieren häufig Protein-Protein-Wechselwirkungen. Solche Wechselwirkungen konnten lichtregulierbar gemacht werden, indem die entsprechende Protein-Wechselwirkungsdomäne mit einer konformationell photoschaltbaren Proteindomäne, der LOV-Domäne (light, oxygen, voltage) maskiert wurde.<sup>[359]</sup> Diese kleine Proteindomäne enthält einen durch blaues Licht anregbaren Flavin-Chromophor, der durch Bestrahlung eine Konformationsänderung bewirkt, bei der die Bindung einer  $\alpha$ -Helix an die Flavin-Bindungsdomäne aufgehoben wird. Dies kann z.B. dazu dienen, eine Wechselwirkungsdomäne bei einem Protein freizulegen, das über diese  $\alpha$ -Helix mit der LOV-Domäne fusioniert wurde. So konnten die kleinen G-Proteine rac und cdc42, die beide an der Steuerung der Zellbeweglichkeit und dem Umbau des Zytoskeletts beteiligt sind, adressiert werden, wodurch eine Kontrolle über zelluläre Bewegungen und Struktur erreicht wurde.<sup>[359]</sup> Auch wurde dieser Ansatz erfolgreich benutzt, um ein lichtreguliertes Einkomponenten-Genexpressionssystem zu erhalten.<sup>[403]</sup> Zudem wurden andere photosensitive, genetisch kodierte Systeme erzeugt, die die Kontrolle von Protein-Protein- und Protein-Ligand-Wechselwirkungen in vivo erlauben.<sup>[360,361]</sup>

#### 5. Ausblick

Wie wir gezeigt haben, gibt es drei grundlegend verschiedene Strategien für die Regulation von (bio)molekularen Prozessen mit Licht, und alle haben ihre eigenen Vor- und Nachteile. Photoaktivierung („uncaging“) ist zumindest theoretisch einfach zu realisieren, jedoch inhärent irreversibel. Wenn man jedoch die funktionellen Gruppen in einem Molekül, die für dessen Aktivität verantwortlich sind, vollständig mit photolabilen Schutzgruppen modifiziert, und wenn deren Abspaltung gut funktioniert, sind hervorragende An/Aus-Verhältnisse möglich. Photoschalten ist reversibel, aber es ist schwierig, für die Einführung des reversiblen Photoschalters genau das richtige Konzept zu finden, denn dieser muss mit seiner Photoisomerisierung die zu regulierende Aktivität vollständig dominieren. Ferner wurde der ideale Photoschalter vermutlich noch nicht gefunden. Ein solcher könnte ohne Ermüdungserscheinungen in Wasser arbeiten, könnte vollständig zwischen den beiden Photoisomeren hin und her geschaltet werden, und die beiden Isomere hätten große Unterschiede in ihrer Polarität, Leitfähigkeit oder ihren mechanischen Eigenschaften z.B. als Scharnier. Trotz dieser Probleme auf beiden Feldern wurden bereits ausgeklügelte Experimente durchgeführt, wie wir hoffentlich hier zeigen konnten. Darüber hinausgehend wurden gerade in den letzten Jahren intelligente Konzepte entwickelt, die die Grenzen zwischen diesen Ansätzen anfangen aufzuheben – so wie wir es in den Abschnitten 2.1.2 und 2.1.3 zu den Themen Zweiphotonen- und wellenlängenselektive Photoaktivierung gezeigt haben. Der Optogenetik-Ansatz ist insofern völlig



andere, als er nicht auf chemische Synthese sondern auf endogen exprimierbaren Systemen aufbaut. Vorteile sind, dass optogenetische Proteine Zell(typ)-spezifisch adressierbar sind und kaum andere zelluläre Prozesse behindern. Allerdings lassen sich optogenetische Werkzeuge nicht auf bestimmte Zellkompartimente beschränken, weswegen die erzeugten Signaleffekte sich deutlich von Signalen unterscheiden können, die von endogenen, lokalisierten Ionenkanälen vermittelt werden. Da die Optogenetik sich nicht nur auf Ionenkanäle oder -pumpen beschränkt und die Natur außerordentlich reich an lichtsensitiven Proteinen ist, wartet diese Ressource geradezu darauf, in neuen optogenetischen Ansätzen Verwendung zu finden. Auch was die Optogenetik betrifft, wurden die Grenzen zu den anderen beiden Gebieten durch Ansätze wie die optochemische Genetik aufgeweicht. Es wird spannend sein, zu sehen wie weitere dieser verbrückenden Konzepte in der Zukunft entwickelt werden, so wie z. B. in einer sehr neuen Studie von Moore et al. Photoaktivierung „ohne Licht“ tief in einem Organismus durch Cherenkov-Strahlung von 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]-D-glucose realisiert wurde.<sup>[404]</sup> Die große Herausforderung in allen drei Domänen liegt unserer Meinung nach in deren Interdisziplinarität, und sie sind alle auf einen intensiven Austausch zwischen theoretischen Vorhersagen, Optik und Spektroskopie, präparativer Chemie, Biochemie, Biologie oder sogar Medizin angewiesen. Da diese Spanne schwer zu überbrücken ist, bleiben allzu oft brillante Konzepte nach einer Grundsatzstudie stehen. Es ist unsere Hoffnung, dass dieser Aufsatz dazu beitragen kann, dass der Faden solcher Studien wieder aufgenommen wird. Auf jeden Fall sind wir davon überzeugt, dass wir in eine leuchtende Zukunft blicken, mit ständig raffinierter und subtiler werdenden Werkzeugen für das Studium von (biologischen) Prozessen.

Eingegangen am 17. März 2012

Online veröffentlicht am 24. Juli 2012

- [1] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020–5042; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921.
- [2] U. Krauss, T. Drepper, K.-E. Jäger, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2552–2560.
- [3] T. Drepper, U. Krauss, S. Meyer zu Berstenhorst, J. Pietruszka, K.-E. Jäger, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 23–40.
- [4] S. Silvi, M. Venturi, A. Credi, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2483–2489.
- [5] A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422–4437.
- [6] F. Erdmann, Y. Zhang, *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 2103–2109.
- [7] A. Deiters, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 47–53.
- [8] A. Specht, F. Bolze, Z. Omran, J.-F. Nicoud, M. Goeldner, *HFSP J.* **2009**, *3*, 255–264.
- [9] H.-M. Lee, D. R. Larson, D. S. Lawrence, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 409–427.
- [10] R. H. Kramer, D. L. Fortin, D. Trauner, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2009**, *19*, 544–552.
- [11] G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619–628.
- [12] W. R. Browne, B. L. Feringa, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1*, 25–35.
- [13] J. H. Kaplan, B. Forbush III, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929–1935.
- [14] J. Engels, E.-J. Schlaeger, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 907–911.
- [15] H. Lusic, A. Deiters, *Synthesis* **2006**, 2147–2150.
- [16] L. Kammari, T. Šolomek, B. P. Ngoy, D. Heger, P. Klán, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11431–11433.
- [17] W. R. Zipfel, R. M. Williams, W. W. Webb, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1369–1377.
- [18] C. N. LaFratta, J. T. Fourkas, T. Baldacchini, R. A. Farrer, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6352–6374; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6238–6258.
- [19] M. Matsuzaki, G. C. R. Ellis-Davies, T. Nemoto, Y. Miyashita, M. Iino, H. Kasai, *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 1086–1092.
- [20] G. C. R. Ellis-Davies, *ACS Chem. Neurosci.* **2011**, *2*, 185–197.
- [21] D. Warther, S. Gug, A. Specht, F. Bolze, J.-F. Nicoud, A. Mourot, M. Goeldner, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7753–7758.
- [22] S. Kantevari, C. J. Hoang, J. Ogronnik, M. Egger, E. Niggli, G. C. R. Ellis-Davies, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 174–180.
- [23] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 35–40.
- [24] M. Matsuzaki, T. Hayama, H. Kasai, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 255–257.
- [25] X. Tang, S. Maegawa, E. S. Weinberg, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11000–11001.
- [26] O. D. Fedoryak, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3419–3422.
- [27] M. Lu, O. D. Fedoryak, B. R. Moister, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2119–2122.
- [28] Y. Zhu, C. M. Pavlos, J. P. Toscano, T. M. Dore, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4267–4276.
- [29] N. Gagey, P. Neveu, L. Jullien, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2519–2521; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2467–2469.
- [30] N. Gagey, P. Neveu, C. Benbrahim, B. Goetz, I. Aujard, J.-B. Baudin, L. Jullien, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9986–9998.
- [31] A. Specht, J.-S. Thomann, K. Alarcon, W. Wittayanan, D. Ogden, T. Furuta, Y. Kurakawa, M. Goeldner, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1690–1695.
- [32] S. Gug, S. Charon, A. Specht, K. Alarcon, D. Ogden, B. Zietz, J. Leonard, S. Haacke, F. Bolze, J.-F. Nicoud, M. Goeldner, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1303–1307.
- [33] S. Gug, F. Bolze, A. Specht, C. Bourgogne, M. Goeldner, J.-F. Nicoud, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9667–9671; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9525–9529.
- [34] D. Warther, F. Bolze, J. Leonard, S. Gug, A. Specht, D. Puliti, X.-H. Sun, P. Kessler, Y. Lutz, J.-L. Vonesch, B. Winsor, J.-F. Nicoud, M. Goeldner, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2585–2590.
- [35] L. Donato, A. Mourot, C. M. Davenport, C. Herbivo, D. Warther, J. Léonard, F. Bolze, J.-F. Nicoud, R. H. Kramer, M. Goeldner, A. Specht, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1876–1879; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1840–1843.
- [36] N. Kotzur, B. Briand, M. Beyerle, V. Hagen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16927–16931.
- [37] M. Goeldner, R. Givens, *Dynamic Studies in Biology: Photo-triggers, Photoswitches and Caged Biomolecules*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [38] J. Noguchi, A. Nagaoka, S. Watanabe, G. C. R. Ellis-Davies, K. Kitamura, M. Kano, M. Matsuzaki, H. Kasai, *J. Physiol.* **2011**, *589*, 2447–2457.
- [39] D. K. Sinha, P. Neveu, N. Gagey, I. Aujard, C. Benbrahim-Bouzi, T. Le Saux, C. Rampon, C. Gauron, B. Goetz, S. Du-bruille, M. Baaden, M. Volovitch, D. Bensimon, S. Vriz, L. Jullien, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 653–663.
- [40] P. Neveu, I. Aujard, C. Benbrahim, T. Le Saux, J.-F. Allemand, S. Vriz, D. Bensimon, L. Jullien, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3804–3806; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3744–3746.
- [41] A. Shigenaga, J. Yamamoto, Y. Sumikawa, T. Furuta, A. Otaka, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2868–2871.
- [42] G. C. R. Ellis-Davies, M. Matsuzaki, M. Paukert, H. Kasai, D. E. Bergles, *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 6601–6604.
- [43] S. Kantevari, Y. Buskila, G. C. R. Ellis-Davies, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 508–513.

- [44] M. J. Davis, C. H. Kragor, K. G. Reddie, H. C. Wilson, Y. Zhu, T. M. Dore, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1721–1729.
- [45] M. C. Pirrung, T. M. Dore, Y. Zhu, V. S. Rana, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5313–5315.
- [46] D. Wöll, J. Smirnova, W. Pfeleiderer, U. E. Steiner, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3042–3045; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2975–2978.
- [47] D. Wöll, S. Laimgruber, M. Galetskaya, J. Smirnova, W. Pfeleiderer, B. Heinz, P. Gilch, U. E. Steiner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12148–12158.
- [48] G. Papageorgiou, M. Lukeman, P. Wan, J. E. T. Corrie, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 366–373.
- [49] G. Papageorgiou, D. Ogden, J. E. T. Corrie, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7228–7233.
- [50] K. Dakin, W. Li, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 959.
- [51] Y. Zhao, Q. Zheng, K. Dakin, K. Xu, M. L. Martinez, W.-H. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4653–4663.
- [52] C. Orange, A. Specht, D. Puliti, E. Sakr, T. Furuta, B. Winsor, M. Goeldner, *Chem. Commun.* **2008**, 1217–1219.
- [53] M. San, M. Alvarez, O. Filevich, R. Etchenique, A. del Campo, *Langmuir* **2012**, *28*, 1217–1221.
- [54] I. Aujard, C. Benbrahim, M. Gouget, O. Ruel, J.-B. Baudin, P. Neveu, L. Jullien, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6865–6879.
- [55] C. G. Bochet, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6341–6346.
- [56] C. G. Bochet, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2140–2142; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2071–2073.
- [57] A. Blanc, C. G. Bochet, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5567–5577.
- [58] M. Kessler, R. Glatthar, B. Giese, C. G. Bochet, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1179–1181.
- [59] A. Blanc, C. G. Bochet, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7174–7175.
- [60] A. Blanc, C. G. Bochet, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2649–2651.
- [61] C. G. Bochet, *Synlett* **2004**, 2268–2274.
- [62] C. G. Bochet, *Pure Appl. Chem.* **2006**, *78*, 241–247.
- [63] A. del Campo, D. Boos, H. W. Spiess, U. Jonas, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4785–4791; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4707–4712.
- [64] P. Stegmaier, J. M. Alonso, A. del Campo, *Langmuir* **2008**, *24*, 11872–11879.
- [65] P. Wang, Y. Wang, H. Hu, C. Spencer, X. Liang, L. Pan, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6152–6157.
- [66] S. Kantevari, M. Matsuzaki, Y. Kanemoto, H. Kasai, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 123–125.
- [67] M. A. Priestman, L. Sun, D. S. Lawrence, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 377–384.
- [68] F. Schäfer, K. B. Joshi, M. A. H. Fichte, T. Mack, J. Wachtveitl, A. Heckel, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1450–1453.
- [69] C. Menge, A. Heckel, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4620–4623.
- [70] M. San, C. G. Bochet, A. del Campo, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5380–5388.
- [71] D. D. Young, A. Deiters, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4368–4370; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4290–4292.
- [72] S. B. Cambridge, D. Geissler, F. Calegari, K. Anastasiadis, M. T. Hasan, A. F. Stewart, W. B. Huttner, V. Hagen, T. Bonhoeffer, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 527–531.
- [73] S. B. Cambridge, D. Geissler, S. Keller, B. Cürten, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2287–2289; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2229–2231.
- [74] D. J. Sauers, M. K. Temburni, J. B. Biggins, L. M. Ceo, D. S. Galileo, J. T. Koh, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 313–320.
- [75] D. D. Young, R. A. Garner, J. A. Yoder, A. Deiters, *Chem. Commun.* **2009**, 568–570.
- [76] B. Wulffen, M. C. R. Buff, M. Pofahl, G. Mayer, A. Heckel, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 489–492.
- [77] A. Nomura, T. Q. P. Uyeda, N. Yumoto, Y. Tatsu, *Chem. Commun.* **2006**, 3588–3590.
- [78] B. Asrican, J. Lisman, N. Otmakhov, *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 14007–14011.
- [79] G. M. Shankar, B. L. Bloodgood, M. Townsend, D. M. Walsh, D. J. Selkoe, B. L. Sabatini, *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 2866–2875.
- [80] Y.-P. Zhang, N. Holbro, T. G. Oertner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 12039–12044.
- [81] M. Heine, L. Groc, R. Frischknecht, J.-C. Beique, B. Lounis, G. Rumbaugh, R. L. Huganir, L. Cognet, D. Choquet, *Science* **2008**, *320*, 201–205.
- [82] R. J. Richardson, J. A. Blundon, I. T. Bayazitov, S. S. Zakharrenko, *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 6406–6417.
- [83] S. Remy, J. Csicsvari, H. Beck, *Neuron* **2009**, *61*, 906–916.
- [84] G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 314–326.
- [85] M. Matsuzaki, G. C. R. Ellis-Davies, H. Kasai, *J. Neurophysiol.* **2008**, *99*, 1535–1544.
- [86] J. Zhao, T. D. Gover, S. Muralidharan, D. A. Auston, D. Weinreich, J. P. Y. Kao, *Biochemistry* **2006**, *45*, 4915–4926.
- [87] D. Gilbert, K. Funk, B. Dekowski, R. Lechler, S. Keller, F. Mohrlen, S. Frings, V. Hagen, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 89–97.
- [88] T. Strünker, I. Weyand, W. Bonigk, Q. Van, A. Loogen, J. E. Brown, N. Kashikar, V. Hagen, E. Krause, U. B. Kaupp, *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 1149–1154.
- [89] S. Kantevari, G. R. J. Gordon, B. A. MacVicar, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 327–337.
- [90] G. R. J. Gordon, K. J. Iremonger, S. Kantevari, G. C. R. Ellis-Davies, B. A. MacVicar, J. S. Bains, *Neuron* **2009**, *64*, 391–403.
- [91] D. Subramanian, V. Laketa, R. Müller, C. Fischer, S. Zerbaksh, R. Pepperkok, C. Schultz, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 324–326.
- [92] M. Mentel, V. Laketa, D. Subramanian, H. Gillandt, C. Schultz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3895–3898; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3811–3814.
- [93] E. J. Quann, E. Merino, T. Furuta, M. Huse, *Nat. Immunol.* **2009**, *10*, 627–635.
- [94] G. C. R. Ellis-Davies, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1603–1613.
- [95] Y. A. Kim, D. M. C. Ramirez, W. J. Costain, L. J. Johnston, R. Bittman, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 9236–9238.
- [96] R. S. Lankalapalli, A. Ouro, L. Arana, A. Gómez-Muñoz, R. Bittman, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8844–8847.
- [97] O. Sadoski, A. S. I. Jaikaran, S. Samanta, M. R. Fabian, R. J. O. Dowling, N. Sonenberg, G. A. Woolley, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7746–7752.
- [98] N. Umeda, T. Ueno, C. Pohlmeier, T. Nagano, T. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12–14.
- [99] A. V. Karginov, Y. Zou, D. Shirvanyants, P. Kota, N. V. Dokholyan, D. D. Young, K. M. Hahn, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 420–423.
- [100] J. B. Biggins, A. Hashimoto, J. T. Koh, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 799–803.
- [101] F. Kilic, N. D. Kashikar, R. Schmidt, L. Alvarez, L. Dai, I. Weyand, B. Wiesner, N. Goodwin, V. Hagen, U. B. Kaupp, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4027–4030.
- [102] K. Hishikawa, H. Nakagawa, T. Furuta, K. Fukuhara, H. Tsutomoto, T. Suzuki, N. Miyata, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7488–7489.
- [103] E. W. Miller, N. Taulet, C. S. Onak, E. J. New, J. K. Lanselle, G. S. Smelick, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17071–17073.
- [104] D. Arian, L. Kovbasyuk, A. Mokhir, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3972–3980.
- [105] Z. Dai, N. G. Dulyaninova, S. Kumar, A. R. Bresnick, D. S. Lawrence, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 1254–1260.
- [106] H.-M. Lee, W. Xu, D. S. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2331–2333.
- [107] T. Muraoka, C.-Y. Koh, H. Cui, S. I. Stupp, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6060–6063; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5946–5949.

- [108] S. Petersen, J. M. Alonso, A. Specht, P. Duodu, M. Goeldner, A. del Campo, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3236–3239; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3192–3195.
- [109] C. Goubko, S. Majumdar, A. Basak, X. Cao, *Biomed. Micro-devices* **2010**, *12*, 555–568.
- [110] S. Mizukami, M. Hosoda, T. Satake, S. Okada, Y. Hori, T. Furuta, K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9524–9525.
- [111] T. Kuner, Y. Li, K. R. Gee, L. F. Bonewald, G. J. Augustine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 347–352.
- [112] L. L. Parker, J. W. Kurutz, S. B. H. Kent, S. J. Kron, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6470–6473; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6322–6325.
- [113] M. Toebes, M. Coccoris, A. Bins, B. Rodenko, R. Gomez, N. J. Nieuwkoop, W. van de Kastele, G. F. Rimmelzwaan, J. B. A. G. Haanen, H. Ovaa, T. N. M. Schumacher, *Nat. Med.* **2006**, *12*, 246–251.
- [114] M. Bhagawati, S. Lata, R. Tampe, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5932–5933.
- [115] H. Li, J.-M. Hah, D. S. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10474–10475.
- [116] K. Katayama, S. Tsukiji, T. Furuta, T. Nagamune, *Chem. Commun.* **2008**, 5399–5401.
- [117] M. J. Tucker, J. R. Courter, J. Chen, O. Atasoylu, A. B. Smith, R. M. Hochstrasser, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3694–3698; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3612–3616.
- [118] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 413–444.
- [119] A. Deiters, D. Groff, Y. Ryu, J. Xie, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2794–2797; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2728–2731.
- [120] C. Chou, D. D. Young, A. Deiters, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6064–6067; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5950–5953.
- [121] W. F. Edwards, D. D. Young, A. Deiters, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 441–445.
- [122] C. Chou, D. D. Young, A. Deiters, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 972–977.
- [123] C. Chou, A. Deiters, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6971–6974; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6839–6842.
- [124] A. Gautier, A. Deiters, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2124–2127.
- [125] A. Gautier, D. P. Nguyen, H. Lusic, W. An, A. Deiters, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4086–4088.
- [126] E. A. Lemke, D. Summerer, B. H. Geierstanger, S. M. Brittain, P. G. Schultz, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 769–772.
- [127] B. J. Wilkins, S. Marionni, D. D. Young, J. Liu, Y. Wang, S. Di, A. Deiters, T. A. Cropp, *Biochemistry* **2010**, *49*, 1557–1559.
- [128] C. Ludwig, D. Schwarzer, H. D. Mootz, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 25264–25272.
- [129] M. Vila-Perelló, Y. Hori, M. Ribó, T. W. Muir, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7878–7881; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7764–7767.
- [130] L. Berrade, Y. Kwon, J. A. Camarero, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1368–1372.
- [131] J. Binschik, J. Zettler, H. D. Mootz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3307–3310; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3249–3252.
- [132] S. Banala, D. Maurel, S. Manley, K. Johnsson, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 289–293.
- [133] C. Campos, M. Kamiya, S. Banala, K. Johnsson, M. González-Gaitán, *Dev. Dyn.* **2011**, *240*, 820–827.
- [134] D. Maurel, S. Banala, T. Laroche, K. Johnsson, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 507–516.
- [135] R. K. McGinty, J. Kim, C. Chatterjee, R. G. Roeder, T. W. Muir, *Nature* **2008**, *453*, 812–816.
- [136] C. Chatterjee, R. K. McGinty, J.-P. Pellois, T. W. Muir, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2872–2876; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2814–2818.
- [137] A. Aemissegger, C. N. Carrigan, B. Imperiali, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6185–6190.
- [138] B. N. Goguen, A. Aemissegger, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11038–11041.
- [139] B. N. Goguen, B. D. Hoffman, J. R. Sellers, M. A. Schwartz, B. Imperiali, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5785–5788; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5667–5670.
- [140] A. Rodrigues-Correia, M. B. Koepfel, F. Schäfer, K. B. Joshi, T. Mack, A. Heckel, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 441–447.
- [141] S. G. Chaulk, A. M. MacMillan, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1052–1058.
- [142] I. J. Dmochowski, X. Tang, *BioTechniques* **2007**, *43*, 161–171.
- [143] X. Tang, I. J. Dmochowski, *Mol. BioSyst.* **2007**, *3*, 100–110.
- [144] A. Deiters, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 678–686.
- [145] J. P. Casey, R. A. Blidner, W. T. Monroe, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 669–685.
- [146] L. M. Ceo, J. T. Koh, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 511–513.
- [147] V. Mikat, A. Heckel, *RNA* **2007**, *13*, 2341–2347.
- [148] S. Shah, S. Rangarajan, S. H. Friedman, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1352–1356; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1328–1332.
- [149] S. Shah, S. H. Friedman, *Oligonucleotides* **2007**, *17*, 35–43.
- [150] S. Shah, P. K. Jain, A. Kala, D. Karunakaran, S. H. Friedman, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 4508–4517.
- [151] P. K. Jain, S. Shah, S. H. Friedman, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 440–446.
- [152] A. Kala, S. H. Friedman, *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 3050–3057.
- [153] R. A. Blidner, K. R. Svoboda, R. P. Hammer, W. T. Monroe, *Mol. BioSyst.* **2008**, *4*, 431–440.
- [154] Q. N. Nguyen, R. V. Chavli, J. T. Marques, P. G. Conrad II, D. Wang, W. He, B. E. Belisle, A. Zhang, L. M. Pastor, F. R. Witney, M. Morris, F. Heitz, G. Divita, B. R. G. Williams, G. K. McMaster, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2006**, *1758*, 394–403.
- [155] X. Tang, I. J. Dmochowski, *Nat. Protoc.* **2007**, *1*, 3041–3048.
- [156] X. Tang, I. J. Dmochowski, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3603–3606; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3523–3526.
- [157] X. Tang, J. Swaminathan, A. M. Gewirtz, I. J. Dmochowski, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 559–569.
- [158] A. Rotaru, J. Kovacs, A. Mokhir, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4336–4338.
- [159] D. D. Young, H. Lusic, M. O. Lively, J. A. Yoder, A. Deiters, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2937–2940.
- [160] J. M. Govan, A. L. McIver, A. Deiters, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2136–2142.
- [161] I. A. Shestopalov, S. Sinha, J. K. Chen, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 650–651.
- [162] X. Ouyang, I. A. Shestopalov, S. Sinha, G. Zheng, C. L. W. Pitt, W.-H. Li, A. J. Olson, J. K. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13255–13269.
- [163] I. A. Shestopalov, J. K. Chen, *Methods Cell Biol.* **2011**, *104*, 151–172.
- [164] A. Deiters, R. A. Garner, H. Lusic, J. M. Govan, M. Dush, N. M. Nascone-Yoder, J. A. Yoder, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15644–15650.
- [165] G. Zheng, L. Cochella, J. Liu, O. Hobert, W. Li, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1332–1338.
- [166] J. M. Govan, M. O. Lively, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13176–13182.
- [167] S. Yamaguchi, Y. Chen, S. Nakajima, T. Furuta, T. Nagamune, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2244–2246.
- [168] J. L. Richards, X. Tang, A. Turetsky, I. J. Dmochowski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6255–6258.
- [169] M. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3715–3743.
- [170] A. Heckel, G. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 822–823.
- [171] P. Jayapal, G. Mayer, A. Heckel, F. Wennmohs, *J. Struct. Biol.* **2009**, *166*, 241–250.



- [172] Y. Li, J. Shi, Z. Luo, H. Jiang, X. Chen, F. Wang, X. Wu, Q. Guo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5368–5371.
- [173] Y. M. Li, J. Shi, R. Cai, X. Chen, Z. F. Luo, Q. X. Guo, *J. Photochem. Photobiol. A* **2010**, *211*, 129–134.
- [174] A. Heckel, M. C. R. Buff, M. L. Raddatz, J. Müller, B. Pötzsch, G. Mayer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6900–6902; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6748–6750.
- [175] M. C. R. Buff, F. Schäfer, B. Wulffen, J. Müller, B. Pötzsch, A. Heckel, G. Mayer, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 2111–2118.
- [176] G. Mayer, A. Lohberger, S. Butzen, M. Pofahl, M. Blind, A. Heckel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6561–6564.
- [177] G. Mayer, J. Müller, T. Mack, D. F. Freitag, T. Höver, B. Pötzsch, A. Heckel, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 654–657.
- [178] A. Pinto, S. Lennarz, A. Rodrigues-Correia, A. Heckel, C. K. O'Sullivan, G. Mayer, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 360–366.
- [179] A. Marx, O. Seitz, *Molecular Beacons*, Springer, Berlin, **2008**.
- [180] C. Wang, Z. Zhu, Y. Song, H. Lin, C. J. Yang, W. Tan, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5708–5710.
- [181] K. B. Joshi, A. Vlachos, V. Mikat, T. Deller, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2746–2748.
- [182] K. Furukawa, H. Abe, S. Tsuneda, Y. Ito, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2309–2311.
- [183] M. L. Metzker, *Genome Res.* **2005**, *15*, 1767–1776.
- [184] W. Wu, B. P. Stupi, V. A. Litosh, D. Mansouri, D. Farley, S. Morris, S. Metzker, M. L. Metzker, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 6339–6349.
- [185] V. A. Litosh, W. Wu, B. P. Stupi, J. Wang, S. E. Morris, M. N. Hersch, M. L. Metzker, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, e39.
- [186] B. P. Stupi, H. Li, J. Wang, W. Wu, S. E. Morris, V. A. Litosh, J. Muniz, M. N. Hersch, M. L. Metzker, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1756–1759; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1724–1727.
- [187] K. Tanaka, H. Katada, N. Shigi, A. Kuzuya, M. Komiyama, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2120–2126.
- [188] K. Tanaka, A. Kuzuya, M. Komiyama, *Chem. Lett.* **2008**, *37*, 584–585.
- [189] A. Kuzuya, F. Okada, M. Komiyama, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1924–1929.
- [190] A. Kuzuya, K. Tanaka, H. Katada, M. Komiyama, *Molecules* **2011**, *17*, 328–340.
- [191] D. D. Young, H. Lusic, M. O. Lively, A. Deiters, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e58/1–e58/8.
- [192] D. D. Young, W. F. Edwards, H. Lusic, M. O. Lively, A. Deiters, *Chem. Commun.* **2008**, 462–464.
- [193] D. D. Young, A. Deiters, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2658–2661.
- [194] H. Lusic, D. D. Young, M. O. Lively, A. Deiters, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1903–1906.
- [195] H. Lusic, M. O. Lively, A. Deiters, *Mol. Biosyst.* **2008**, *4*, 508–511.
- [196] D. D. Young, M. O. Lively, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6183–6193.
- [197] J. L. Richards, G. K. Seward, Y.-H. Wang, I. J. Dmochowski, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 320–324.
- [198] A. Nierth, M. Singer, A. Jäschke, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7975–7977.
- [199] B. Fürtig, C. Richter, P. Schell, P. Wenter, S. Pitsch, H. Schwalbe, *RNA Biol.* **2008**, *5*, 41–48.
- [200] P. Wenter, B. Fürtig, A. Hainard, H. Schwalbe, S. Pitsch, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 417–420.
- [201] B. Fürtig, P. Wenter, L. Reymond, C. Richter, S. Pitsch, H. Schwalbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 16222–16229.
- [202] B. Fürtig, J. Buck, V. Manoharan, W. Bermel, A. Jaeschke, P. Wenter, S. Pitsch, H. Schwalbe, *Biopolymers* **2007**, *86*, 360–383.
- [203] B. Fürtig, P. Wenter, S. Pitsch, H. Schwalbe, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 753–765.
- [204] N. C. Seeman, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 65–87.
- [205] A. K. Mok, N. A. Kedzierski, P. N. Chung, P. S. Lukeman, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4905–4907.
- [206] T. L. Schmidt, M. B. Koeppel, J. Thevarpadam, D. P. N. Gonçalves, A. Heckel, *Small* **2011**, *7*, 2163–2167.
- [207] M.-M. Russew, S. Hecht, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 3348–3360.
- [208] D. Bléger, Z. Yu, S. Hecht, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12260–12266.
- [209] H. Duerr, H. Bouas-Laurent, *Photochromism: Molecules and Systems*, rev. ed., Elsevier, Amsterdam, **2003**.
- [210] Y. Hirshberg, *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **1950**, *231*, 903–904.
- [211] J. Griffiths, *Chem. Soc. Rev.* **1972**, *1*, 481–493.
- [212] H. Rau in *Photochromism: Molecules and Systems*, rev. ed. (Hrsg.: H. Dürr, H. Bouas-Laurent), Elsevier, Amsterdam, **2003**.
- [213] D. J. W. Bullock, C. W. N. Cumper, A. I. Vogel, *J. Chem. Soc.* **1965**, 5316–5323.
- [214] D. A. James, D. C. Burns, G. A. Woolley, *Protein Eng.* **2001**, *14*, 983–991.
- [215] N. Pozhidaeva, M.-E. Cormier, A. Chaudhari, G. A. Woolley, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1297–1303.
- [216] N. Nishimura, T. Tanaka, M. Asano, Y. Sueishi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1986**, 1839–1845.
- [217] W. R. Brode, J. H. Gould, G. M. Wyman, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 1856–1859.
- [218] K. S. Schanze, T. F. Mattox, D. G. Whitten, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2808–2813.
- [219] L. Chi, O. Sadovski, G. A. Woolley, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 670–676.
- [220] W. A. Sokalski, R. W. Góra, W. Bartkowiak, P. Kobylinski, J. Sworakowski, A. Chyla, J. Leszczynski, *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 5504–5508.
- [221] N. Nishimura, T. Sueyoshi, H. Yamanaka, E. Imai, S. Yamamoto, S. Hasegawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, *49*, 1381–1387.
- [222] A. A. Beharry, O. Sadovski, G. A. Woolley, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4323–4332.
- [223] H. Nishioka, X. Liang, H. Kashida, H. Asanuma, *Chem. Commun.* **2007**, 4354–4356.
- [224] O. Sadovski, A. A. Beharry, F. Zhang, G. A. Woolley, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1512–1514; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1484–1486.
- [225] H. Asanuma, X. Liang, M. Komiyama, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1055–1058.
- [226] R. Behrendt, C. Renner, M. Schenk, F. Wang, J. Wachtveitl, D. Oesterheld, L. Moroder, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2941–2943; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2771–2774.
- [227] K. Rueck-Braun, S. Kempa, B. Prievisch, A. Richter, S. Seedorff, L. Wallach, *Synthesis* **2009**, 4256–4267.
- [228] A. A. Beharry, O. Sadovski, G. A. Woolley, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19684–19687.
- [229] A. Meister, M. E. Anderson, *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 711–760.
- [230] C. Bouléque, M. Löweneck, C. Renner, L. Moroder, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 591–594.
- [231] R. F. Standaert, S. B. Park, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7952–7966.
- [232] A. A. Beharry, L. Wong, V. Tropepe, G. A. Woolley, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1361–1363; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1325–1327.
- [233] 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.
- [234] F. Zhang, O. Sadovski, G. A. Woolley, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2147–2154.
- [235] S. Samanta, G. A. Woolley, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1712–1723.
- [236] D. Bléger, J. Dokic, M. Peters, L. Grubert, P. Saalfrank, S. Hecht, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 9930–9940.

- [237] F. Cisnetti, R. Ballardini, A. Credi, M. T. Gandolfi, S. Masiero, F. Negri, S. Pieraccini, G. P. Spada, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2011–2021.
- [238] D. H. Waldeck, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 415–436.
- [239] T. Loughheed, V. Borisenko, T. Hennig, K. Rueck-Braun, G. A. Woolley, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2798–2801.
- [240] T. Yamaguchi, T. Seki, T. Tamaki, K. Ichimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, *65*, 649–656.
- [241] T. Seki, T. Tamaki, T. Yamaguchi, K. Ichimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, *65*, 657–663.
- [242] S. Herre, W. Steinle, K. Rueck-Braun, *Synthesis* **2005**, 3297–3300.
- [243] T. Schadendorf, C. Hoppmann, K. Rueck-Braun, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 9044–9047.
- [244] T. Cordes, C. Elsner, T. T. Herzog, C. Hoppmann, T. Schadendorf, W. Summerer, K. Rueck-Braun, W. Zinth, *Chem. Phys.* **2009**, *358*, 103–110.
- [245] M. Erdélyi, M. Varedian, C. Skold, I. B. Niklasson, J. Nurbo, A. Persson, J. Bergquist, A. Gogoll, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4356–4373.
- [246] M. Varedian, V. Langer, J. Bergquist, A. Gogoll, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6033–6035.
- [247] N. J. V. Lindgren, M. Varedian, A. Gogoll, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 501–505.
- [248] T. Sakata, Y. Yan, G. Marriott, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2009–2013.
- [249] M. Bletz, U. Pfeifer-Fukumura, U. Kolb, W. Baumann, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 2232–2236.
- [250] R. Guglielmetti in *Photochromism: Molecules and Systems*, rev. ed. (Hrsg.: H. Dürr, H. Bouas-Laurent), Elsevier, Amsterdam, **2003**.
- [251] Y. Shiraishi, M. Itoh, T. Hirai, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 13737–13745.
- [252] C. P. McCoy, C. Rooney, C. R. Edwards, D. S. Jones, S. P. Gorman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9572–9573.
- [253] H. Görner, *Chem. Phys.* **1997**, *222*, 315–329.
- [254] T. Sakata, Y. Yan, G. Marriott, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 4759–4764.
- [255] G. Marriott in *Photosensitive Molecules for Controlling Biological Function* (Hrsg.: J. J. Chambers, R. H. Kramer), Springer, New York, **2011**, S. 213–231.
- [256] A. Kocer, M. Walko, W. Meijberg, B. L. Feringa, *Science* **2005**, *309*, 755–758.
- [257] H. Asanuma, K. Shirasuka, T. Yoshida, T. Takarada, X. Liang, M. Komiyama, *Chem. Lett.* **2001**, 108–109.
- [258] C. Beyer, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2010**, 1371–1376.
- [259] J. Andersson, S. Li, P. Lincoln, J. Andréasson, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11836–11837.
- [260] T. Stafforst, D. Hilvert, *Chem. Commun.* **2009**, 287–288.
- [261] T. Sakata, D. K. Jackson, S. Mao, G. Marriott, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 227–233.
- [262] D. Movia, A. Prina-Mello, Y. Volkov, S. Giordani, *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1459–1466.
- [263] N. Shao, J. Jin, H. Wang, J. Zheng, R. Yang, W. Chan, Z. Abliz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 725–736.
- [264] J. R. Nilsson, S. Li, B. Onfelt, J. Andreasson, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11020–11022.
- [265] S. Mao, R. K. P. Benninger, Y. Yan, C. Petchprayoon, D. Jackson, C. J. Easley, D. W. Piston, G. Marriott, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 4515–4524.
- [266] G. Marriott, S. Mao, T. Sakata, J. Ran, D. K. Jackson, C. Petchprayoon, T. J. Gomez, E. Warp, O. Tulyathan, H. L. Aaron, E. Y. Isacoff, Y. Yan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17789–17794.
- [267] M. Irie, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1685–1716.
- [268] Y. Yokoyama, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1717–1740.
- [269] M. Irie in *Molecular Switches* (Hrsg.: B. L. Feringa), Wiley-VCH, Weinheim, **2001**, S. 37–62.
- [270] A. Peters, N. R. Branda, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3404–3405.
- [271] S. Pu, C. Zheng, Z. Le, G. Liu, C. Fan, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2576–2585.
- [272] M. Takeshita, M. Irie, *Chem. Commun.* **1997**, 2265–2266.
- [273] D. Vomasta, C. Högner, N. R. Branda, B. König, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7756–7759; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7644–7647.
- [274] T. Hirose, K. Matsuda, M. Irie, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7499–7508.
- [275] T. Hirose, M. Irie, K. Matsuda, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 2137–2141.
- [276] S. M. Polyakova, V. N. Belov, M. L. Bossi, S. W. Hell, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3301–3312.
- [277] Y. Yokoyama in *Molecular Switches* (Hrsg.: B. L. Feringa), Wiley-VCH, Weinheim, **2001**, S. 107–121.
- [278] Y. Liang, A. S. Dvornikov, P. M. Rentzepis, *J. Photochem. Photobiol. A* **1999**, *125*, 79–84.
- [279] S. Draxler, T. Brust, S. Malkmus, F. O. Koller, B. Heinz, S. Laimgruber, C. Schulz, S. Dietrich, K. Rueck-Braun, W. Zinth, M. Braun, *J. Mol. Liq.* **2008**, *141*, 130–136.
- [280] X. Chen, N. I. Islamova, R. V. Robles, W. J. Lees, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 1023–1029.
- [281] I. Willner, S. Rubin, J. Wonner, F. Effenberger, P. Baeuerle, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3150–3151.
- [282] X. Chen, N. I. Islamova, S. P. Garcia, J. A. DiGirolamo, W. J. Lees, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6777–6783.
- [283] S. Herre, T. Schadendorf, I. Ivanov, C. Herrberger, W. Steinle, K. Rueck-Braun, R. Preissner, H. Kuhn, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1089–1095.
- [284] D. Fujita, M. Murai, T. Nishioka, H. Miyoshi, *Biochemistry* **2006**, *45*, 6581–6586.
- [285] D. Pearson, A. J. Downard, A. Muscroft-Taylor, A. D. Abell, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14862–14863.
- [286] R. Briesewitz, G. T. Ray, T. J. Wandless, G. R. Crabtree, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1953–1958.
- [287] Y. Zhang, F. Erdmann, G. Fischer, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 724–726.
- [288] U. Al-Atar, R. Fernandes, B. Johnsen, D. Baillie, N. R. Branda, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15966–15967.
- [289] M. R. Banghart, M. Volgraf, D. Trauner, *Biochemistry* **2006**, *45*, 15129–15141.
- [290] P. Gorostiza, E. Y. Isacoff, *Science* **2008**, *322*, 395–399.
- [291] M. Volgraf, P. Gorostiza, S. Szobota, M. R. Helix, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 260–261.
- [292] 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.
- [293] 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.
- [294] A. Mourot, M. A. Kienzler, M. R. Banghart, T. Fehrentz, F. M. E. Huber, M. Stein, R. H. Kramer, D. Trauner, *ACS Chem. Neurosci.* **2011**, *2*, 536–543.
- [295] M. Sollogoub, S. Guieu, M. Geoffroy, A. Yamada, A. Estévez-Torres, K. Yoshikawa, D. Baigl, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1201–1206.
- [296] A. Diguët, N. K. Mani, M. Geoffroy, M. Sollogoub, D. Baigl, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 11890–11896.
- [297] A. Estévez-Torres, C. Crozatier, A. Diguët, T. Hara, H. Saito, K. Yoshikawa, D. Baigl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 12219–12223.
- [298] C. Dohno, S. Uno, K. Nakatani, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11898–11899.

- [299] C. Dohno, S. Uno, S. Sakai, M. Oku, K. Nakatani, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2536–2543.
- [300] C. Dohno, T. Yamamoto, K. Nakatani, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4051–4058.
- [301] D. D. Young, A. Deiters, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1225–1228.
- [302] G. Hayashi, M. Hagihara, C. Dohno, K. Nakatani, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8678–8679.
- [303] G. Hayashi, M. Hagihara, K. Nakatani, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 424–432.
- [304] H.-W. Lee, S. G. Robinson, S. Bandyopadhyay, R. H. Mitchell, D. Sen, *J. Mol. Biol.* **2007**, *371*, 1163–1173.
- [305] G. A. Woolley, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 486–493.
- [306] C. Renner, L. Moroder, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 868–878.
- [307] P. Hamm, J. Helbing, J. Bredenbeck, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2008**, *59*, 291–317.
- [308] S.-L. Dong, M. Loeweneck, T. E. Schrader, W. J. Schreier, W. Zinth, L. Moroder, C. Renner, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1114–1120.
- [309] T. E. Schrader, W. J. Schreier, T. Cordes, F. O. Koller, G. Babbitzki, R. Denschlag, C. Renner, M. Loeweneck, S.-L. Dong, L. Moroder, P. Tavan, W. Zinth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15729–15734.
- [310] T. E. Schrader, T. Cordes, W. J. Schreier, F. O. Koller, S.-L. Dong, L. Moroder, W. Zinth, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 5219–5226.
- [311] S. Jurt, A. Aemissegger, P. Güntert, O. Zerbe, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6445–6448; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6297–6300.
- [312] U. Kusebauch, S. A. Cadamuro, H.-J. Musiol, L. Moroder, C. Renner, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2966–2973.
- [313] C. Hoppmann, S. Sedorff, A. Richter, H. Fabian, P. Schmieder, K. Rueck-Braun, M. Beyermann, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6763–6766; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6636–6639.
- [314] C. Hoppmann, P. Schmieder, P. Domaing, G. Vogelreiter, J. Eichhorst, B. Wiesner, I. Morano, K. Rueck-Braun, M. Beyermann, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7841–7845; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7699–7702.
- [315] 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.
- [316] T. Fehrentz, M. Schoenberger, D. Trauner, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12362–12390; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12156–12182.
- [317] B. Schierling, A.-J. Noel, W. Wende, L. T. Hien, E. Volkov, E. Kubareva, T. Oretskaya, M. Kokkinidis, A. Roempp, B. Spengler, A. Pingoud, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1361–1366.
- [318] L.-T. Hien, T. S. Zatsepin, B. Schierling, E. M. Volkov, W. Wende, A. Pingoud, E. A. Kubareva, T. S. Oretskaya, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1366–1373.
- [319] F. Bonardi, G. London, N. Nouwen, B. L. Feringa, A. J. M. Driessen, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7392–7396; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7234–7238.
- [320] H. Asanuma, T. Ito, T. Yoshida, X. Liang, M. Komiyama, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2547–2549; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2393–2395.
- [321] H. Ito, X. Liang, H. Nishioka, H. Asanuma, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5519–5524.
- [322] M. Liu, H. Asanuma, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1009–1015.
- [323] J. Chen, T. Serizawa, M. Komiyama, *Chem. Lett.* **2011**, *40*, 482–483.
- [324] X. Liang, K. Fujioka, H. Asanuma, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 10388–10396.
- [325] X. Liang, H. Asanuma, H. Kashida, A. Takasu, T. Sakamoto, G. Kawai, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16408–16415.
- [326] H. Asanuma, D. Matsunaga, M. Komiyama, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2005**, *49*, 35–36.
- [327] H. Asanuma, X. Liang, H. Nishioka, D. Matsunaga, M. Liu, M. Komiyama, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 203–212.
- [328] H. Kang, H. Liu, J. A. Phillips, Z. Cao, Y. Kim, Y. Chen, Z. Yang, J. Li, W. Tan, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2690–2696.
- [329] Q. Yuan, Y. Zhang, Y. Chen, R. Wang, C. Du, E. Yasun, W. Tan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 9331–9336.
- [330] S. Ogasawara, M. Maeda, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8971–8974; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8839–8842.
- [331] M. Singer, A. Jaeschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8372–8377.
- [332] T. Stafforst, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 10195–10198; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9998–10001.
- [333] A. Kuzuya, K. Tanaka, M. Komiyama, *J. Nucleic Acids* **2011**, *2011*, 162452.
- [334] M. Zhou, X. Liang, T. Mochizuki, H. Asanuma, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2213–2216; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2167–2170.
- [335] S. Ogasawara, M. Maeda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5457–5459.
- [336] Y. Kim, J. A. Phillips, H. Liu, H. Kang, W. Tan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 6489–6494.
- [337] S. Ogasawara, M. Maeda, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6799–6802; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6671–6674.
- [338] M. Liu, H. Jinmei, H. Abe, Y. Ito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2964–2967.
- [339] F. Tanaka, T. Mochizuki, X. Liang, H. Asanuma, S. Tanaka, K. Suzuki, S. Kitamura, A. Nishikawa, K. Ui-Tei, M. Hagiya, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3560–3565.
- [340] D. Han, J. Huang, Z. Zhu, Q. Yuan, M. You, Y. Chen, W. Tan, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4670–4672.
- [341] M. You, R.-W. Wang, X. Zhang, Y. Chen, K. Wang, L. Peng, W. Tan, *ACS Nano* **2011**, *5*, 10090–10095.
- [342] H. Nishioka, X. Liang, T. Kato, H. Asanuma, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1191–1194; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1165–1168.
- [343] P. Gorostiza, E. Isacoff, *Mol. Biosyst.* **2007**, *3*, 686–704.
- [344] M. Mank, O. Griesbeck, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1550–1564.
- [345] I. T. Li, E. Pham, K. Truong, *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 1971–1982.
- [346] L. L. Looger, O. Griesbeck, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2012**, *22*, 18–23.
- [347] G. Miesenböck, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2004**, *14*, 395–402.
- [348] L. Fénno, O. Yizhar, K. Deisseroth, *Annu. Rev. Neurosci.* **2011**, *34*, 389–412.
- [349] G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann, E. Bamberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13940–13945.
- [350] F. Zhang, L. P. Wang, M. Brauner, J. F. Liewald, K. Kay, N. Watzke, P. G. Wood, E. Bamberg, G. Nagel, A. Gottschalk, K. Deisseroth, *Nature* **2007**, *446*, 633–639.
- [351] G. Nagel, D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A. M. Musti, E. Bamberg, P. Hegemann, *Science* **2002**, *296*, 2395–2398.
- [352] E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, K. Deisseroth, *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 1263–1268.
- [353] X. Li, D. V. Gutierrez, M. G. Hanson, J. Han, M. D. Mark, H. Chiel, P. Hegemann, L. T. Landmesser, S. Herlitze, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17816–17821.
- [354] T. Ishizuka, M. Kakuda, R. Araki, H. Yawo, *Neurosci. Res.* **2006**, *54*, 85–94.
- [355] G. Nagel, M. Brauner, J. F. Liewald, N. Adeishvili, E. Bamberg, A. Gottschalk, *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 2279–2284.
- [356] S. Schröder-Lang, M. Schwarzel, R. Seifert, T. Strunker, S. Kateriya, J. Looser, M. Watanabe, U. B. Kaupp, P. Hegemann, G. Nagel, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 39–42.



- [357] S. Weissenberger, C. Schultheis, J. F. Liewald, K. Erbguth, G. Nagel, A. Gottschalk, *J. Neurochem.* **2011**, *116*, 616–625.
- [358] R. D. Airan, K. R. Thompson, L. E. Fenno, H. Bernstein, K. Deisseroth, *Nature* **2009**, *458*, 1025–1029.
- [359] Y. I. Wu, D. Frey, O. I. Lungu, A. Jaehrig, I. Schlichting, B. Kuhlman, K. M. Hahn, *Nature* **2009**, *461*, 104–108.
- [360] M. J. Kennedy, R. M. Hughes, L. A. Peteya, J. W. Schwartz, M. D. Ehlers, C. L. Tucker, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 973–975.
- [361] A. Levskaya, O. D. Weiner, W. A. Lim, C. A. Voigt, *Nature* **2009**, *461*, 997–1001.
- [362] S. Q. Lima, G. Miesenbock, *Cell* **2005**, *121*, 141–152.
- [363] B. V. Zemelman, N. Nesnas, G. A. Lee, G. Miesenbock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1352–1357.
- [364] B. V. Zemelman, G. A. Lee, M. Ng, G. Miesenbock, *Neuron* **2002**, *33*, 15–22.
- [365] A. Bi, J. Cui, Y. P. Ma, E. Olshevskaya, M. Pu, A. M. Dizhoor, Z. H. Pan, *Neuron* **2006**, *50*, 23–33.
- [366] C. Schroll, T. Riemensperger, D. Bucher, J. Ehmer, T. Voller, K. Erbguth, B. Gerber, T. Hendel, G. Nagel, E. Buchner, A. Fiala, *Curr. Biol.* **2006**, *16*, 1741–1747.
- [367] A. D. Douglass, S. Kraves, K. Deisseroth, A. F. Schier, F. Engert, *Curr. Biol.* **2008**, *18*, 1133–1137.
- [368] B. R. Arenkiel, J. Peca, I. G. Davison, C. Feliciano, K. Deisseroth, G. J. Augustine, M. D. Ehlers, G. Feng, *Neuron* **2007**, *54*, 205–218.
- [369] L. Petreanu, D. Huber, A. Sobczyk, K. Svoboda, *Nat. Neurosci.* **2007**, *10*, 663–668.
- [370] Y. P. Zhang, T. G. Oertner, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 139–141.
- [371] V. Gradinaru, K. R. Thompson, F. Zhang, M. Mogri, K. Kay, M. B. Schneider, K. Deisseroth, *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 14231–14238.
- [372] X. Han, E. S. Boyden, *PLoS ONE* **2007**, *2*, e299.
- [373] S. Zhao, C. Cunha, F. Zhang, Q. Liu, B. Gloss, K. Deisseroth, G. J. Augustine, G. Feng, *Brain Cell Biol.* **2008**, *36*, 141–154.
- [374] V. Busskamp, J. Duebel, D. Balya, M. Fradot, T. J. Viney, S. Siebert, A. C. Groner, E. Cabuy, V. Forster, M. Seeliger, M. Biel, P. Humphries, M. Paques, S. Mohand-Said, D. Trono, K. Deisseroth, J. A. Sahel, S. Picaud, B. Roska, *Science* **2010**, *329*, 413–417.
- [375] B. Y. Chow, X. Han, A. S. Dobry, X. Qian, A. S. Chuong, M. Li, M. A. Henninger, G. M. Belfort, Y. Lin, P. E. Monahan, E. S. Boyden, *Nature* **2010**, *463*, 98–102.
- [376] I. Diester, M. T. Kaufman, M. Mogri, R. Pashaie, W. Goo, O. Yizhar, C. Ramakrishnan, K. Deisseroth, K. V. Shenoy, *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 387–397.
- [377] X. Han, X. Qian, J. G. Bernstein, H. H. Zhou, G. T. Franzesi, P. Stern, R. T. Bronson, A. M. Graybiel, R. Desimone, E. S. Boyden, *Neuron* **2009**, *62*, 191–198.
- [378] J. F. Liewald, M. Brauner, G. J. Stephens, M. Bouhours, C. Schultheis, M. Zhen, A. Gottschalk, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 895–902.
- [379] Q. Liu, G. Hollopeter, E. M. Jorgensen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 10823–10828.
- [380] F. Zhang, M. Prigge, F. Beyrière, S. Tsunoda, J. Mattis, O. Yizhar, P. Hegemann, K. Deisseroth, *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 631–633.
- [381] O. Yizhar, L. E. Fenno, T. J. Davidson, M. Mogri, K. Deisseroth, *Neuron* **2011**, *71*, 9–34.
- [382] A. Berndt, O. Yizhar, L. A. Gunaydin, P. Hegemann, K. Deisseroth, *Nat. Neurosci.* **2009**, *12*, 229–234.
- [383] L. A. Gunaydin, O. Yizhar, A. Berndt, V. S. Sohal, K. Deisseroth, P. Hegemann, *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 387–392.
- [384] J. Y. Lin, M. Z. Lin, P. Steinbach, R. Y. Tsien, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 1803–1814.
- [385] L. Wen, H. Wang, S. Tanimoto, R. Egawa, Y. Matsuzaka, H. Mushiaki, T. Ishizuka, H. Yawo, *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12893.
- [386] S. Kleinlogel, K. Feldbauer, R. E. Dempksi, H. Fotis, P. G. Wood, C. Bamann, E. Bamberg, *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 513–518.
- [387] F. Zhang, J. Vierock, O. Yizhar, L. E. Fenno, S. Tsunoda, A. Kianianmomeni, M. Prigge, A. Berndt, J. Cushman, J. Polle, J. Magnuson, P. Hegemann, K. Deisseroth, *Cell* **2011**, *147*, 1446–1457.
- [388] S. Kleinlogel, U. Terpitz, B. Legrum, D. Gokbuget, E. S. Boyden, C. Bamann, P. G. Wood, E. Bamberg, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 1083–1088.
- [389] H. E. Kato, F. Zhang, O. Yizhar, C. Ramakrishnan, T. Nishizawa, K. Hirata, J. Ito, Y. Aita, T. Tsukazaki, S. Hayashi, P. Hegemann, A. D. Maturana, R. Ishitani, K. Deisseroth, O. Nureki, *Nature* **2012**, *482*, 369–374.
- [390] P. Anikeeva, A. S. Andalman, I. Witten, M. Warden, I. Goshen, L. Grosenick, L. A. Gunaydin, L. M. Frank, K. Deisseroth, *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 163–170.
- [391] J. G. Bernstein, X. Han, M. A. Henninger, E. Y. Ko, X. Qian, G. T. Franzesi, J. P. McConnell, P. Stern, R. Desimone, E. S. Boyden, *Proc. Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng.* **2008**, *6854*, 68540H.
- [392] J. P. Rickgauer, D. W. Tank, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 15025–15030.
- [393] E. Papagiakoumou, F. Anselmi, A. Begue, V. de Sars, J. Gluckstad, E. Y. Isacoff, V. Emiliani, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 848–854.
- [394] J. N. Stirman, M. M. Crane, S. H. Husson, S. Wabnig, C. Schultheis, A. Gottschalk, H. Lu, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 153–158.
- [395] A. M. Leifer, C. Fang-Yen, M. Gershow, M. J. Alkema, A. D. Samuel, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 147–152.
- [396] B. K. Andrasfalvy, B. V. Zemelman, J. Tang, A. Vaziri, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11981–11986.
- [397] P. S. Lagali, D. Balya, G. B. Awatramani, T. A. Munch, D. S. Kim, V. Busskamp, C. L. Cepko, B. Roska, *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 667–675.
- [398] V. Gradinaru, M. Mogri, K. R. Thompson, J. M. Henderson, K. Deisseroth, *Science* **2009**, *324*, 354–359.
- [399] W. J. Alilain, X. Li, K. P. Horn, R. Dhingra, T. E. Dick, S. Herlitze, J. Silver, *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 11862–11870.
- [400] T. Bruegmann, D. Malan, M. Hesse, T. Beiert, C. J. Fuegmann, B. K. Fleischmann, P. Sasse, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 897–900.
- [401] M. Stierl, P. Stumpf, D. Udvari, R. Gueta, R. Hagedorn, A. Losi, W. Gartner, L. Petereit, M. Efetova, M. Schwarzel, T. G. Oertner, G. Nagel, P. Hegemann, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 1181–1188.
- [402] M. H. Ryu, O. V. Moskvina, J. Siltberg-Liberles, M. Gomelsky, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 41501–41508.
- [403] X. Wang, X. Chen, Y. Yang, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 266–269.
- [404] C. Ran, Z. Zhang, J. Hooker, A. Moore, *Mol. Imaging Biol.* **2011**, *1*–7.