

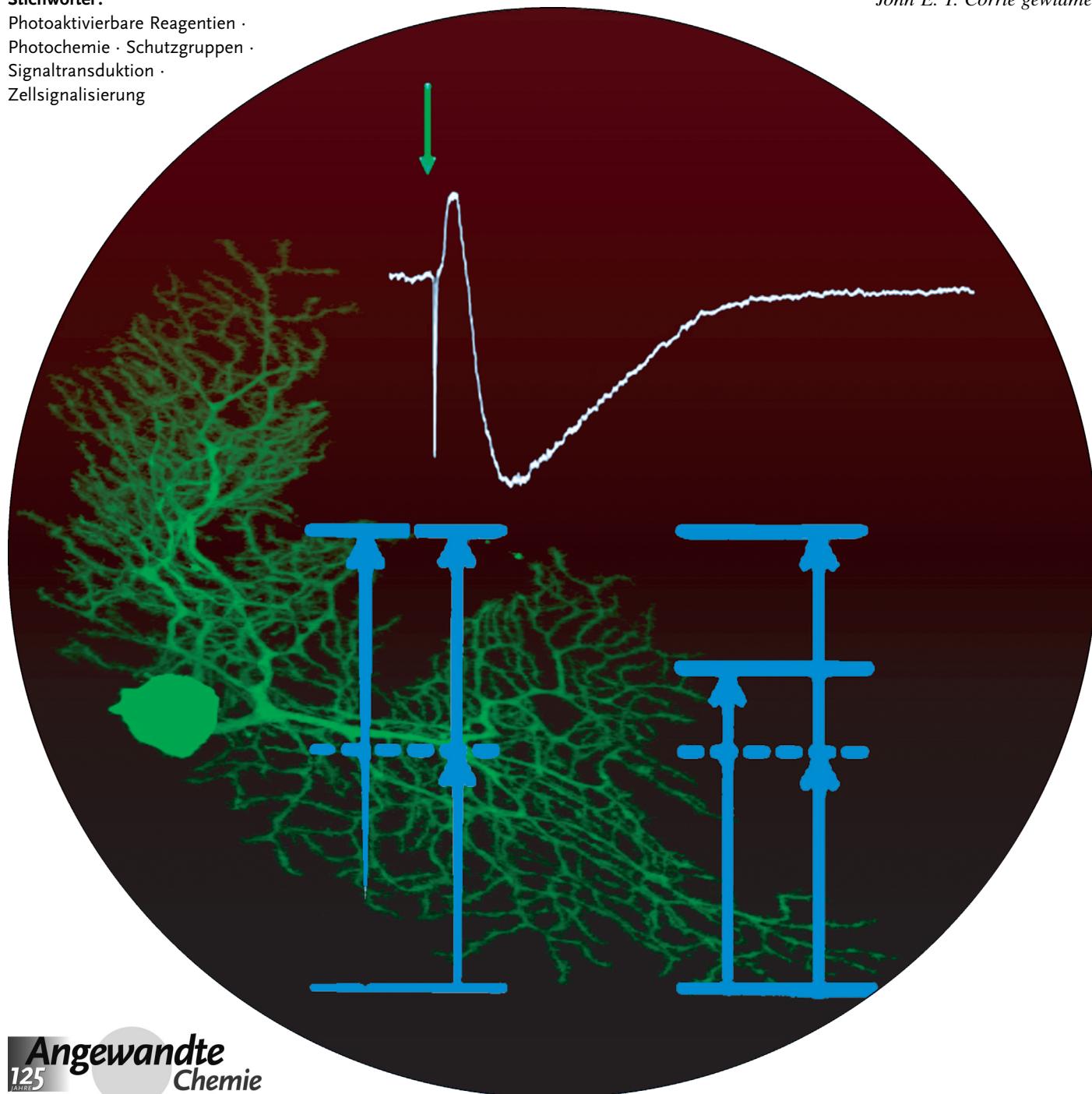
Von Ein- zu Zwei-Photonen-Sonden: photoaktivierbare Reagentien, Aktuatoren und Photoschalter

Guillaume Bort, Thibault Gallavardin, David Ogden* und Peter I. Dalko*

Stichwörter:

Photoaktivierbare Reagentien ·
Photochemie · Schutzgruppen ·
Signaltransduktion ·
Zellsignalisierung

John E. T. Corrie gewidmet



Molekulare Systeme, die mit Licht „ferngesteuert“ werden können, sind von wachsender Bedeutung in der Zellbiologie, der Physiologie und den Neurowissenschaften. Der entscheidende Aspekt hierbei ist die hohe räumliche und zeitliche Präzision, die mit Methoden der Lasermikroskopie erreicht werden kann. Das Verfahren der Zwei-Photonen-Anregung hat signifikante Vorteile bei der Visualisierung biologischer Gewebe, allerdings ist der gezielte Entwurf intelligenter Sonden, die mit der Zellphysiologie kompatibel sind, nicht trivial. Dieser Aufsatz diskutiert die „chemischen“ Herausforderungen bei der Entwicklung von Zwei-Photonen-Sonden.

1. Einleitung

Um entschlüsseln zu können, wie Rezeptoren ihre Liganden erkennen, und um die hierdurch ausgelösten Signallewege zu erforschen, benötigt man experimentelle Eingriffe in Submikrometer- und Submillisekundenauflösung, der typischen räumlich-zeitlichen Skala physiologischer Prozesse wie der synaptischen Transmission und der intrazellulären Signalgebung durch Sekundärbotenstoffe. Für den Experimentator besteht die Aufgabe darin, das biologische System durch einen Konzentrationssprung des physiologischen Liganden oder eines Cofaktors oder Antagonisten aus dem Gleichgewicht zu lenken; Timing und räumliche Dimension des Experiments sind dabei so zu wählen, dass der physiologische Prozess nachempfunden wird. Dieses Vorgehen liefert kinetische und mechanistische Informationen und erlaubt außerdem pharmakologische oder andere Eingriffe, die im Normalfall undurchführbar sind.

In der Photochemie wird die Blitzphotolyse dazu verwendet, Reaktionen auszulösen und deren Kinetik zu untersuchen. Diese Vorgehensweise wird seit 30 Jahren zur Erforschung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen genutzt, wobei am Anfang dieses Gebiets die erste Veröffentlichung über photoaktivierbares („caged“) ATP durch Kaplan et al. stand.^[1] Das Prinzip ist einfach: Die Kompartimente mit den Rezeptoren werden mit einer inerten, aber photolabilen Vorstufe eines Liganden geflutet, und sobald der „Käfig“ (die Ligandenvorstufe) diffusiv äquilibriert ist, wird der Ligand durch einen räumlich definierten Lichtpuls freigesetzt.

Zelluläre physiologische Signalgebungsprozesse erreichen ihre hohe Lokalisierung, Geschwindigkeit und Effizienz dadurch, dass die räumlichen Skalen dieser Prozess auf den Submikrometerbereich reduziert sind. Die moderne Mikroskopie ist soweit fortgeschritten, dass zeitlich festgelegte Lichtpunkte präzise innerhalb eines Gewebes platziert werden können – eine Voraussetzung für die konfokale Laserrastermikroskopie und Zwei-Photonen-Mikroskopie. Infolgedessen lässt sich durch Photolyse („uncaging“) in Kombination mit Zwei-Photonen-Mikroskopie eine hohe räumlich-zeitliche Auflösung erreichen; ein solches Verfahren ist zudem kompatibel mit der Fluoreszenzmikroskopie. Photoaktivierbare Reagentien erlauben die lokalisierte photolytische Freisetzung von Liganden aus biologisch inertem Vorstufen;^[2] Aktuatoren, die Lichtenergie in Bewegung umwandeln, und „Photoschalter“, die in lichtgesteuerte Reze-

toren, Kanäle oder Enzyme eingebaut sind, bieten die Möglichkeit, den zugrundeliegenden biologischen Prozess wechselweise zu initiieren oder zu unterdrücken.^[2,3]

Die photolytische Freisetzung von Liganden wurde früher zumeist bei ihrer Primärwellenlänge (gewöhnlich nahe am UV) durch Ein-Photonen-Anregung (OPE; one-photon excitation) bewerkstelligt. Dieses Vorgehen ist im Allgemeinen genügend effizient, um über den gesamten benötigten Konzentrationsbereich angewendet zu werden. Das Problem der „internen Filterung“ durch die Vorstufenlösung, das bei hohen Konzentrationen und großen Weglängen auftritt, kann leicht umgangen werden, indem man Anregungswellenlängen abseits des spektralen Maximums verwendet und die angelegte Energie erhöht.^[4] Allerdings kommt es bei Tiefen von mehr als 15–20 µm in biologischem Gewebe zu einer beträchtlichen Photolyse durch gestreute Photonen, wodurch die räumliche Lokalisierung stark beeinträchtigt wird. Eine Zwei-Photonen-Anregung (TPE) bietet hier zwei wichtige Vorteile: 1) Die verminderte Streuung der NIR-Photonen (NIR: nahes Infrarot) in trübem biologischem Gewebe gewährt eine zwei- bis dreifach größere Messtiefe im Vergleich zur Nah-UV-Anregung. 2) Zwei-Photonen-Anregung ermöglicht eine präzisere Definition des Fokalpunkts, weil die gestreuten IR-Photonen nicht anregen.^[5] Die Verbesserungen sind beträchtlich; so konnte in Fluoreszenzbildgebungen mittels TPE die fokale Anregung von 20 µm hin zu Tiefen von mehreren hundert µm verbessert werden.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	4623
2. Theoretische Grundlagen der Zwei-Photonen-Absorption	4624
3. Photoaktivierbare Reagentien für die Zwei-Photonen-Anregung	4626
4. Spezifische Anwendungen photoaktivierbarer Reagenzien	4631
5. Reversible Zwei-Photonen-Photoschalter	4631
6. Zusammenfassung	4632

Mit dem jüngsten Aufkommen fs-gepulster Laser hat die Zwei-Photonen-Technologie das Potential, die Zellphysiologie und Neurowissenschaften zu revolutionieren. Anzumerken ist jedoch, dass die Zwei-Photonen-Absorption und -Anregung intrinsisch weniger effizient sind als entsprechende Ein-Photonen-Prozesse, insbesondere bei Verwendung nicht-optimierter Reagentien. Um das Potential der TP-Aktivierung voll ausschöpfen zu können, besteht infolgedessen ein Bedarf an der Entwicklung effizienterer Zwei-Photonen-Sonden für die Photolyse und Photoschaltung.^[2g,i,6] Vor allem gilt es, die Zwei-Photonen-Absorption (TPA) deutlich zu verbessern (in der Größenordnung breit eingesetzter Fluorophore) und dabei das schnelle Ansprechverhalten, die hohe Wasserlöslichkeit, die hydrolytische Stabilität und die biologische Inertheit der Nah-UV-Sonden beizubehalten. Die entsprechenden Ansätze hierfür werden in diesem Aufsatz zusammengefasst.

2. Theoretische Grundlagen der Zwei-Photonen-Absorption

Die Zwei-Photonen-Absorption ist ein nichtlinearer Prozess, bei dem zwei Photonen gleichzeitig von einem Molekül absorbiert werden (Abbildung 1). An der TPA ist ein „virtueller Zustand“ beteiligt, dessen Energie ungefähr der Hälfte des finalen erlaubten Zustands entspricht. Der finale Zustand ist S_1 bei nicht-zentrosymmetrischen Verbindungen und S_2 bei zentrosymmetrischen Verbindungen. Der virtuelle Zustand steht in keinem Zusammenhang mit irgendeiner der Resonanzen des Chromophors, und seine Lebensdauer ist sehr kurz, sodass die Wahrscheinlichkeit eines TPA sehr gering ist ($\alpha_2 \ll \alpha_1$). In der Praxis wird dieses Phänomen nur bei sehr hohen Photonenflüssen im Fokus eines Laserstrahls

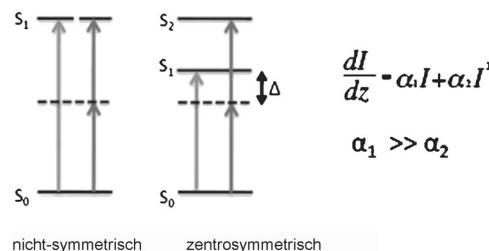


Abbildung 1. Ein-Photonen-Absorption (OPA; blau) und Zwei-Photonen-Absorption (TPA; rot) von dipolaren (nicht-zentrosymmetrischen) Chromophoren und quadrupolaren (zentrosymmetrischen) Chromophoren.

beobachtet. Die simultane Natur der TPA bedingt, dass der Prozess quadratisch von der Lichtintensität abhängt, d.h. von der Wahrscheinlichkeit, dass zwei Photonen im selben begrenzten Raum zur selben Zeit lokalisiert sind. Schließlich sind die TPA-Wellenlängen rotverschoben, wobei die Lage des Maximums von der Symmetrie des Chromophors abhängt. Bei dipolaren nicht-zentrosymmetrischen Chromophoren führen die Ein- und Zwei-Photonen-Übergänge zum gleichen Endzustand, was bedeutet, dass das TPA-Maximum bei der doppelten Wellenlänge des OPA-Maximums liegt; bei symmetrischen quadrupolaren Chromophoren sind die Ein- und Zwei-Photonen-Übergänge verschieden.^[7]

Es gibt eine Reihe von Gründen, weshalb die TPA für die Bildgebung biologischer Materialien und die Aktivierung molekularer Sonden besonders gut geeignet ist. 1) Durch die quadratische Abhängigkeit von der Lichtintensität wird die Anregung auf ein kleines Volumen am Fokalpunkt des Lasers begrenzt. Diese quadratische Abhängigkeit bedeutet auch, dass gestreute Photonen abseits des Fokus nicht anregen. 2) Die rotverschobenen Absorptionsmaxima liegen im Wel-



Guillaume Bort promovierte an der Université Paris VI bei Prof. C. Ferroud und Dr. M. Port. Aktuell absolviert er ein Postdoktorat bei Prof. B. G. Davis an der University of Oxford, Großbritannien.



David Ogden studierte Pharmazie, Biophysik und Neurowissenschaften. Er arbeitete mit David Colquhoun und Rolf Niedergerke am University College London und mit David Trentham und John Corrie am MRC-NIMR London. Seine Forschungen gelten der Entwicklung von Methoden zur Untersuchung von Neurotransmitterrezeptoren und der Signalgebung durch Sekundärbotenstoffe.



Thibault Gallavardin promovierte an der École Normale Supérieure in Lyon bei Dr. C. Andraud und Prof. S. Parola. Aktuell absolviert er ein Postdoktorat in der Gruppe von Dr. P. I. Dalko an der Universität Paris Descartes.



Peter I. Dalko promovierte bei Prof. Derek H. R. Barton und Prof. Y. Kishi in Harvard (USA). Aktuell hat er eine Forschungsstelle an der medizinischen Fakultät der Universität Paris Descartes. Seine Forschungen gelten der Entwicklung von molekularen Objekten für die biomedizinische Forschung.

lenlängenbereich 750–1100 nm; in diesem Bereich sind Gewebe relativ transparent, weil sowohl Gewebeabsorption als auch Streuung minimiert sind. 3) TPA ist weniger effizient als Ein-Photonen-Absorption, und weil nur wenige biologische Chromophore starke Zwei-Photonen-Absorber sind, sollte die Verwendung von TPA in Kombination mit stark absorbierenden Sonden Photoschäden verringern.

Die strukturellen Faktoren, die die Zwei-Photonen-Absorption eines Moleküls beeinflussen, wurden ausführlich untersucht und sind gut verstanden.^[7,8] TPA-Querschnitte können heute mit dem Computer mit recht hoher Präzision vorhergesagt werden.^[9] Die Schlüsselparameter für eine hohe Zwei-Photonen-Absorption sind ausgedehnte Elektronenkonjugation (Abbildung 2) und die Gegenwart von starken

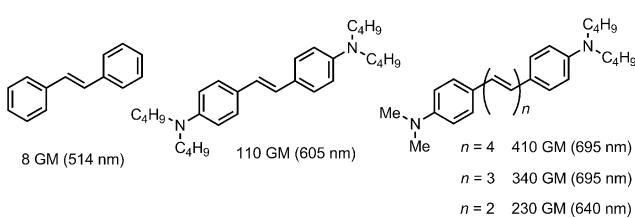


Abbildung 2. Effekt der Donor- und/oder Akzeptorgruppen sowie der Konjugationslänge auf die Zwei-Photonen-Absorption.^[12]

Donor- und/oder Akzeptorpaare, die einen starken internen Ladungstransfer (ICT; internal charge transfer) vermitteln (Abbildung 2).^[10] Die Stärke der Polarisation kann auch mithilfe von Hammett-Parametern ermittelt werden.^[11]

Um eine effiziente Elektronenkonjugation zu erzielen, muss das Molekül möglichst planar sein. Erreichen lässt sich dies durch die Einführung von Ringen oder durch Komplexierung und konformativ Versteifung eines flexiblen Chromophors (Abbildung 3).^[13]

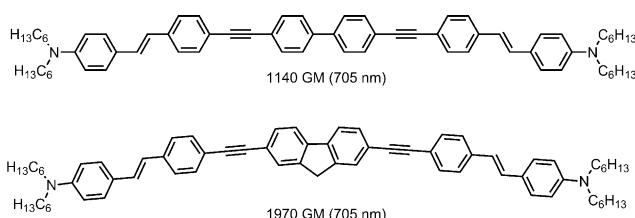


Abbildung 3. Eine Verbesserung der molekularen Planarität führt zu effizienterer Konjugation und π -Elektronendelokalisierung als Voraussetzung für Zwei-Photonen-Absorption.

Andere Parameter sind die Molekülsymmetrie und die Gegenwart von mehrfach verzweigten oder oligomeren Strukturen, die „kooperative Effekte“^[7] und damit eine Verstärkung der TPA induzieren können. Zum Beispiel verstärkt in quadrupolaren Chromophoren der allgemeinen Struktur D- π -D, D- π -A- π -D, A- π -A oder A- π -D- π -A (D: Donor, A: Akzeptor) die Gegenwart des angeregten Zustands S_1 (des ersten angeregten Zustands, der von genau einem Photon besetzt wird) die Zwei-Photonen-Absorption durch einen „Resonanzverstärkungseffekt“, wenn die Energiedifferenz Δ zwischen S_1 und S_2 klein wird (Abbildung 1). Ähnliche „ko-

operative Effekte“ werden häufig zwischen Verzweigungen in mehrfach verzweigten Chromophoren beobachtet.^[8b] Diese Systeme bestehen für gewöhnlich aus monomeren Push-Pull-Chromophoren, die um einen zentralen Akzeptor oder Donor angeordnet sind. Kooperative Effekte können durch „through bond“- oder „through space“-Wechselwirkungen hervorgerufen werden; zum Verständnis dieser Phänomene wurden mehrere Erklärungen vorgeschlagen, z.B. excitonischen Kopplung,^[14] vibronische Kopplung^[15] oder Verlängerung der Elektronenkonjugation.^[10] Klassische mehrfach verzweigte Strukturen sind Tripods,^[16] Oligomere und Dendrimere.^[17]

Moleküle mit hohen TPA-Querschnitten sind normalerweise große, hoch konjugierte hydrophobe Verbindungen. Speziell in den Neurowissenschaften hat die Lipophilie chemischer Spezies Auswirkungen auf die elektrische Erregbarkeit und andere Aspekte der synaptischen Kommunikation. Der Zusammenhang zwischen der Fett/Wasser-Verteilung und der anaesthetischen Aktivität innerhalb von Serien aliphatischer oder aromatischer Reagentien ist gut bekannt. Hohe π -Delokalisation und hohe Wasserlöslichkeit, wie sie für biologische Anwendungen benötigt wird, sind nur schwer miteinander zu kombinieren; Forschungen in diese Richtung galten der Entwicklung von effizienten wasserlöslichen TPA-Chromophoren mit guten Eigenschaften in wässriger Lösung. Andere Ansätze bestanden in der Verwendung hydrophiler Transportreagentien wie Nanopartikel, Micellen und Biopolymere.^[18] In Anwendungen, die eine freie Diffusion zum Erreichen hoher Photolyseraten erfordern (z.B. bei der synaptischen Transmission) oder sterischen Randbedingungen unterliegen, können große Sondenspezies jedoch nachteilig sein, indem etwa die Photolyse verlangsamt oder der Zugang der Sonde zu den erforderlichen Kompartimenten gehindert ist.

Die photochemische Effizienz (δ) eines TPA-Prozesses wird vom Wirkungsquerschnitt der TPA (σ_2) bestimmt, der die Absorptionsrate mit dem Quadrat des Photonenfluxes ins Verhältnis setzt und die Einheit GM besitzt (1 GM = $10^{-50} \text{ cm}^4 \text{s}^{-1} \text{Photonen}^{-1}$; abgeleitet von Maria Göppert-Mayer, die die theoretischen Grundlagen des TPA-Prozesses entwickelte)^[19] und mit der Quantenausbeute (Φ) des Prozesses multipliziert wird; z.B. ist bei photolytischen Freisetzung Φ_v der Bruchteil der angeregten Chromophore, die photolysiert werden und den Liganden freisetzen. Demnach ist die photochemische Effizienz, die vom Wirkungsquerschnitt der Zwei-Photonen-Photolyse bestimmt wird, $\delta = \sigma_2 \Phi$. Die photochemische Effizienz kann direkt als der Wirkungsquerschnitt δ gemessen werden, und zwar durch chemische Analyse der freigesetzten Ligandmoleküle nach standardisierter Lichteinstrahlung. Alternativ kann ein indirektes Messverfahren angewendet werden, bei dem der TPA-Querschnitt und die Quantenausbeute in zwei Schritten unabhängig gemessen werden. Da es schwierig ist, eine Quantenausbeute unter Zwei-Photonen-Bedingungen zu messen, wird der aus einer Ein-Photonen-Photolyse abgeleitete Wert benutzt, mit der Annahme, dass Ein- und Zwei-Photonen-Absorption die gleichen angeregten Zustände besetzen und somit die gleiche Quantenausbeute der photolytischen Freisetzung erzeugen.

Um eine lokalisierte und schnelle photolytische Freisetzung zu erreichen, benötigt man oft hohe Lichtintensitäten und eine hohe Konzentration des photoaktivierbaren Reagens (im mm-Bereich). Diese Anforderungen können verschiedene Probleme bereiten, z.B. im Zusammenhang mit Phototoxizität und unerwünschten Effekten des photoaktivierbaren Reagens auf den Zielrezeptor und andere Arten von Rezeptoren. Die Mindesteffizienz wird durch die maximale Lichtintensität bestimmt, die das System toleriert. Tolerierbare Intensitäten bei Ein-Photonen-Anregungen sind $5\text{--}10 \text{ mW } \mu\text{m}^{-2}$ für kurze Submillisekundenpulse in intrazellulären Photolyseexperimenten. Die benötigte Intensität für die vollständige Umsetzung eines häufig verwendeten photoaktivierbaren Reagens, MNI-Glutamat, mit OPE wurde auf $0.4 \text{ mW } \mu\text{m}^{-2}$ bei 360 nm und $2 \text{ mW } \mu\text{m}^{-2}$ bei 405 nm in $0.1\text{-ms-Pulsen geschätzt;}$ ^[4,20] dies ist deutlich unterhalb der Toxizitätsgrenze. Für die tolerierte Intensität bei Zwei-Photonen-Anregungen unter Photolyse- oder Imaging-Bedingungen wurde ebenfalls ein Wert von ungefähr 5 mW ermittelt (mit Ti:S-Laser unter Standardbedingungen und hoher numerischer Apertur des Mikroskopobjektivs mit Submikrometerfokus). Die Studien zeigen außerdem eine scharfe Toxizitätsschwelle und eine Multiphotonenabhängigkeit.^[21] Der Multiphotonencharakter der Phototoxizität lässt vermuten, dass längere Laserpulse mit geringerer Peakintensität bei vergleichbarem Fluoreszenzniveau weniger schädlich sind; der Effekt könnte gleichermaßen für die Photolyse gelten. In entwicklungsbiologischen Experimenten, bei denen die Zeitskala der Experimente sehr viel länger ist, wurde über Phototoxizität bei niedrigeren Intensitäten berichtet, hier ist aber die zeitliche Auflösung weniger wichtig als die räumliche.

Die Zwei-Photonen-Anregung ist inhärent ineffizient und wird – bei nicht-toxischen Intensitäten – nur bei hohen numerischen Aperturen im Fokalvolumen beobachtet. Bei Femtolitervolumina hat der diffusive Austausch zwischen dem Anregungsvolumen und der umgebenden Lösung eine charakteristische Zeitkonstante im Bereich $100\text{--}400 \mu\text{s}$, abhängig vom Diffusionskoeffizienten des photoaktivierbaren Reagens im Gewebe. Die Diffusion bestimmt die Geschwindigkeit, mit der photoaktivierbare Moleküle im Zwei-Photonen-Volumen ersetzt werden, und sie bestimmt auch die Geschwindigkeit, mit der aktivierte Zwischenstufen und Produkte verlorengehen. Da der maximale nicht-toxische Photonenzfluss bekannt ist, kann der Wirkungsquerschnitt der Zwei-Photonen-Photolyse, der für 50 % Umsatz des photoaktivierbaren Reagens im Volumen mindestens benötigt wird, berechnet werden. Es wurden Werte von $3\text{--}30 \text{ GM}$ ermittelt, abhängig vom Diffusionskoeffizienten des photoaktivierbaren Reagens. Damit die Photolysereaktion im Anregungsvolumen lokalisiert bleibt, muss die Produktfreisetzung durch die Fragmentierungsreaktion schneller sein als die Diffusion, was Geschwindigkeiten von 10000 s^{-1} oder höher erfordert. Einstrahlungsdauern länger als die Diffusionszeitkonstante führen zur Delokalisierung des freigesetzten Liganden in benachbarte Regionen.^[21,22]

Es gibt eine breite Auswahl von Reagentien, die durch Ein-Photonen-Anregung im Nah-UV effizient photoaktivierbar sind. Jedoch sind deren TPA-Querschnitte im Allge-

meinen kleiner als 0.1 GM , und die Geschwindigkeit der Dunkelfragmentierung ist in vielen Fällen zu gering, um eine Lokalisierung im Anregungsvolumen sicherzustellen. In den folgenden Abschnitten werden diese Parameter mit Bezug auf derzeit verfügbare photoaktivierbare Reagentien diskutiert.

3. Photoaktivierbare Reagentien für die Zwei-Photonen-Anregung

Die photoaktivierbaren Reagentien, die gegenwärtig in der Zwei-Photonen-Photolyse eingesetzt werden, sind von photochemischen Reaktionen abgeleitet, die für Nah-UV-absorbierende Schutzgruppen entwickelt wurden. Zwar sind etliche photosensitive Schutzgruppen an zellphysiologische Bedingungen angepasst worden, keine davon erfüllt aber in befriedigender Weise die Kriterien für einen Einsatz unter biologischen Bedingungen und in der Zwei-Photonen-Photolyse. Die Eigenschaften dieser photoaktivierbaren Gruppen werden hier betrachtet.

3.1. Nitrobenzyle

Nitrobenzyl-Spezies (**NB**, **1a**, Abbildung 4) waren die ersten photoaktivierbaren Reagentien zur Freisetzung bioaktivierbarer Liganden unter Nah-UV-Photolyse im Wel-

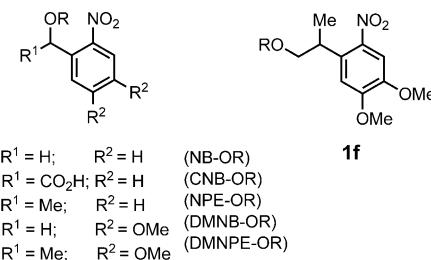


Abbildung 4. Einige der gegenwärtig eingesetzten Nitrobenzyl-Schutzgruppen.

lenlängenbereich $300\text{--}400 \text{ nm}$.^[23] Einige der gegenwärtig eingesetzten NB-Schutzgruppen sind in Abbildung 4 dargestellt. Sie wurden zur Freisetzung von Phosphaten, Carbonsäuren, Amiden, Alkoholen und Carbonylfunktionen angewendet, sowie auch, mittels photolabiler Chelatbildern, zur Freisetzung von Metallionen; mehrere Derivate sind kommerziell erhältlich. Unter TPA-Bedingungen zeigen diese Spezies jedoch schlechte Eigenschaften, mit $\delta_u < 0.1 \text{ GM}$ bei $710\text{--}740 \text{ nm}$. Die Effizienz von **1a** wurde durch Ersetzen der Benzyl- durch eine Homobenzylfunktion verbessert, z.B. in **1f**,^[24] oder durch Einführung einer elektronenziehenden Gruppe wie der Tribrom- oder Trifluormethylgruppe in die benzyliche Position.^[25] Diese Modifikationen verbesserten die Photolyseeffizienz um einen Faktor bis 3. Die Einführung von Methoxygruppen, wie in **1d-f**, führte zu einer Rotverschiebung der Absorption und einer Verringerung der Photolysequantenausbeute Φ_u um ungefähr eine Größenordnung

im Vergleich zu NB. Die Gegenwart der Methoxygruppen beschleunigte die Dunkelfragmentierung in der Photolyse.^[26]

Neuroaktive NB-abgeleitete photoaktivierbare Aminosäuren zeigen im Allgemeinen geringe hydrolytische Stabilität. Eine Carbamat-Brücke zwischen der Alkohol- und Amino-gruppe erzeugt stabile, effizient aktivierbare Aminosäuren für die OPE, mit einer allerdings langsamen Fragmentierungskinetik bei pH 7.4 von 20 s⁻¹; ihre Anwendung bleibt somit auf langsame Signalprozesse beschränkt.^[23]

Nitrobenzyl-basierte Chelatbildner spielten eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Ca²⁺-selektiven photoaktivierbaren Reagentien (Abbildung 5).^[27] Der Chelatbildner

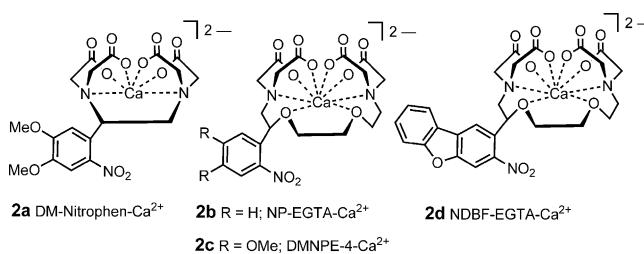


Abbildung 5. Nitrobenzyl-Chelatbildner für Ca²⁺.

wird durch Photolyse gespalten und ergibt hauptsächlich Iminodiacetat-Produkte mit einer sehr viel geringeren Affinität für Ca²⁺. Vor kurzem wurde auch ein Tricarboxylat mit mittlerer Affinität für Ca²⁺ beschrieben, das durch die Photolyse von DM-Nitrophen gebildet wird.^[28] Ein Vorteil der EGTA-Derivate wie **2b,c** gegenüber den EDTA-Derivaten **2a** ist die niedrigere Affinität für Mg²⁺-Ionen unter physiologischen Bedingungen (Abbildung 5); die Ca²⁺-Affinität ändert sich dagegen nur gering. Diese Verbindungen haben niedrige Wirkungsquerschnitte in der Zwei-Photonen-Photolyse (im Bereich von 0.01 GM) und werden im Allgemeinen im Nah-UV angeregt. Das Nitrobifenzofuran-EGTA **2d** (NDBF-EGTA)^[29] ist eine Ausnahme, mit $\delta_u = 0.6$ GM bei 710 nm. Der NDBF-Chromophor wurde auch zur Schützung von Eisenzentren,^[30] Nukleotiden^[31] und IP₃^[32] verwendet.

In einigen Fällen wurde über unerwartet hohe δ_u -Werte für NB-Chromophore berichtet. Für NP-geschützte Cumari-

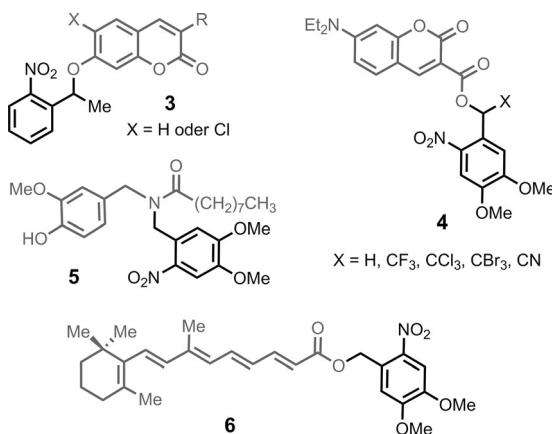


Abbildung 6. Nitrobenzylreagentien für die substratunterstützte Photolyse.

ne (**3–4**, Abbildung 6) wurde ein $\delta_u \leq 0.68$ GM beobachtet. Der Effekt wurde einer photochemischen Kooperation zwischen dem photoaktivierbaren Molekül und seiner Abgangsgruppe zugeschrieben und als „substratunterstützte Photolyse“ bezeichnet.^[33] Mechanistisch wurde ein reverser Energietransfer (d.h. von einem niedrigeren in ein höheres Energieniveau) vom Cumarin auf die NB-Gruppe vorgeschlagen.

Eine ähnliche Kooperativität wurde bei der Photolyse von DMNB-geschütztem N-Vanillylnonanoylamid (**5**, $\delta_u \leq 0.25$ GM, Abbildung 6)^[33] und DMNB-geschützter Retinsäure (**6**, Abbildung 6) beobachtet.^[34] In ähnlicher Weise wird für NPE-geschützte Hydroxypyrentrisulfonsäure (HPTS; ein grüner Fluorophor, der von der NPE-Gruppe vollständig gelöscht wird) die höchste Photolyseeffizienz bei 405 nm anstatt im Nah-UV beobachtet, wie es bei NP-Chromophoren normalerweise der Fall ist. Darüber hinaus unterscheiden sich die Photolysemechanismen der Ein- und Zwei-Photonen-Anregung: Bei der TPA ist die Fragmentierung schneller und der Prozess ist pH-unabhängig, im Gegensatz zur starken pH-Abhängigkeit der Ein-Photonen-Fragmentierung.^[21]

Der Einfluss der Konjugationslänge des π -Systems auf den Wirkungsquerschnitt der TPA (σ_2) wurde untersucht.^[25] Obwohl NB-Derivate wie **7** hohe Absorptionsquerschnitte bei 730 nm und 800 nm zeigten ($\sigma_2 = 20\text{--}50$ GM), waren die Wirkungsquerschnitte der Fragmentierung (δ_u) vergleichbar mit denen der NB-Stammverbindungen. Die Ursache hierfür könnte sein, dass mit größerer Konjugationslänge auch konkurrierende Relaxationspfade auftreten, z.B. Fluoreszenzemission. Bessere Ergebnisse wurden mit dem 3-(2-Propyl)-4'-methoxy-4-nitrobiphenyl(PMNB)-Derivat **8a** sowie mit dem wasserlöslicheren Triethylenglycol-Derivat **8b** erhalten, das einen TPA-Querschnitt von 0.45 GM bei 800 nm zeigte (Abbildung 7).^[35] Der Austausch der Alkoxy-Donorgruppe

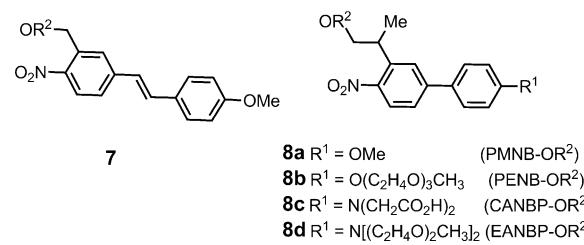


Abbildung 7. Nitrobenzylreagentien mit erweitertem π -System.

gegen eine funktionisierte Dialkylaminogruppe, wie in **8c** (CANBP) oder in **8d** (EANBP), führte zu ungewöhnlich hohen Wirkungsquerschnitten der Zwei-Photonen-Fragmentierung von bis zu 11 GM bei 800 nm bei zudem verbesserter Wasserlöslichkeit der Verbindung (bis zu 10 mM).^[36] Die Zwei-Photonen-Photolyse von CANBP-GABA und EANBP-GABA ermöglichte die schnelle und räumlich kontrollierte Freisetzung von GABA in intakten Gehirnschnitten.^[36a]

Eine andere erfolgreiche Modifikation von NB-Reagentien wurde mit dem Aufbau einer quadrupolaren Struktur an

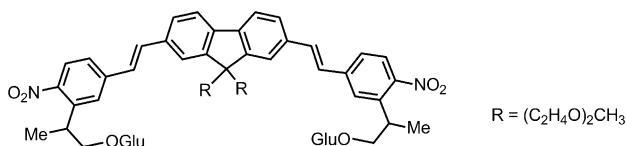


Abbildung 8. Das symmetrische quadrupolare NPE-Analogon BNSF-Glu₂.^[35]

einem Fluoren-Kern realisiert (BNSF-Glu₂, Abbildung 8). Für das BNSF-geschützte Glutamat wurde ein Wirkungsquerschnitt der Zwei-Photonen-Fragmentierung von 5 GM bei 800 nm beobachtet – einer der höchsten je gefundenen Werte.^[37] Der Hauptbeitrag des erhöhten Lichtsammelvermögens stammt höchstwahrscheinlich vom planaren Fluoren-Kern. Allerdings erlaubt das BNSF-Glu₂-Reagens aufgrund eines konkurrierenden Photoabbaumechanismus keine quantitative Freisetzung des Neurotransmitters (60 %) und ist außerdem schlecht wasserlöslich (0.1 mM). Ferner verhindert die geringe Geschwindigkeit der Dunkelfragmentierung von 1000 s⁻¹ der 2-(*o*-Nitrophenyl)propyl-Serie eine vernünftige Lokalisierung im Anregungsvolumen.

3.2. Nitroindoline

7-Nitroindoline (NI) wurden durch Amit et al. Mitte der 90er Jahre als Carboxyl-Schutzgruppen zur Verwendung in aprotischen Lösungsmitteln eingeführt.^[38] Corrie und Mitarbeiter entwickelten später photoaktivierbare Carbonsäuren für die Photolyse in wässriger Lösung und speziell zur Freisetzung neuroaktiver Aminosäuren.^[23, 39] Bedeutsam ist, dass die NI-geschützten Aminosäuren im Unterschied zu den Nitrobenzyl- und Cumarin-Analoga gut hydrolysestabil bei physiologischem pH sind. Weitere Charakteristika sind hohe Fragmentierungsgeschwindigkeiten ($5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, Halbwertszeit 150 ns; schnell im Vergleich zu den Aktivierungskinetiken der neuroaktiven Aminosäurerzeptoren), eine Quantenausbeute von 0.085 und eine bezogen auf den Reagensverbrauch stöchiometrische Freisetzung. Der Effekt von Substitutionen am Indol wurde untersucht, und man fand eine maximale Photolyseeffizienz für 4-Methoxy-7-nitroindolinyl (MNI)-Derivate.^[39b] Mechanistische Untersuchungen zeigten, dass das Produkt der Photolyse von 7-Nitroindolinen vom Reaktionsmedium abhängt; unterschiedliche Produkte wurden gefunden, wenn die Reaktion in aprotischem Lösungsmittel oder in Wasser ausgeführt wurde. In aprotischem Lösungsmittel mit 1 % Wasser entstand 7-Nitroindolin über einen lösungsmittelunterstützten Mechanismus, während in Wasser, ohne Beteiligung des Lösungsmittels, substituiertes 7-Nitrosoindol erhalten wurde (Schema 1).^[39a] Studien unter

Verwendung von Triplett-Sensibilisatoren zeigten, dass die Photospaltung über einen Triplett-Zustand des carboxylierten nitronischen Anhydrid-Intermediats verläuft. Die anschließende Freisetzung geschieht durch Hydrolyse in organischen Medien oder durch Deprotonierung des Wasserstoffs an C(2) in wässriger Lösung; letztere Reaktion führt dann zur Bildung des stabilen Nitrosoindol-Produkts in physiologischer Umgebung.

Modifikationen des Nitroindolinchromophors mit Substituenten, die dessen photochemische Eigenschaften unbbeeinflusst lassen, wurden systematisch studiert, um pharmakologische Wirkungen der NI-GABA- und NI-Glycin-Reagentien auf die Zielrezeptoren zu minimieren. Die Studien führten zu den NI-geschützten inhibitorischen Transmittern DPNI-GABA und DPNI-Glycin mit Alkylbisphosphonat-Substituenten in 4-Position.^[39c]

4-Methoxy-7-nitroindolinylglutamat (MNI-Glu, Abbildung 9) findet verbreiteten Einsatz in den Neurowissenschaften als Reagens für die Ein- und Zwei-Photonen-Photolyse. Der Wirkungsquerschnitt der Zwei-Photonen-Photo-

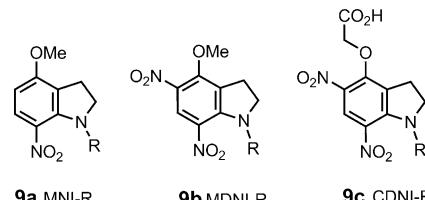
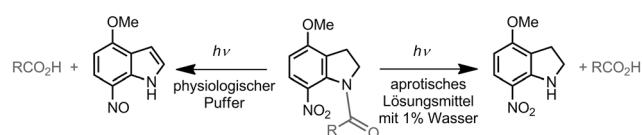


Abbildung 9. Von 7-Nitroindolin abgeleitete Reagentien.

lyse ist zwar niedrig (0.06 GM bei 720 nm), dafür sind die NI-geschützten L-Glutamate genügend inert gegenüber Glutamatrezeptoren, um in hohen Konzentrationen eingesetzt werden zu können. Die Reagentien wurden in vielen Studien der Glutamatignalgebung in Neuronen genutzt.^[40]

5,7-Dinitroindolinyl-L-glutamate wie z.B. 4-Methoxy-5,7-dinitroindolinylglutamat (MDNI-Glu, **9b**) und 4-Carboxymethyl-5,7-dinitroindolinylglutamat (CDNI-Glu, **9c**) (Abbildung 9) wurden in zwei unabhängigen Studien untersucht.^[41] Die Zwei-Photonen-Anregung beider Verbindungen im Nah-UV war doppelt effizient wie die von MNI-Glutamat. Allerdings betrug die Stöchiometrie der L-Glutamat-Freisetzung nur 0.7, und es wurde eine Mischung aus Nitro- und Nitroso-Photoprodukten erhalten. Zum Vergleich lieferten Mononitroindoline in wässriger Lösung fast ausschließlich das Nitroso-Produkt.^[41b] Die beschleunigte Photoaktivierung wurde in einer der Studien der höheren Quantenausbeute^[41a] und in der anderen dem größeren Absorptionskoeffizienten zugeschrieben.^[41b] Obwohl die photolytische Effizienz der Dinitroindoline 3.5-fach höher ist als die der Mononitroderivate, stellt die reduzierte Stöchiometrie einen Unsicherheitsfaktor für ihren Einsatz dar.^[41b, 42]

Obwohl MNI-Glutamat das am häufigsten eingesetzte Reagens für die Zwei-Photonen-Photolyse ist, bedeutet der geringe Wirkungsquerschnitt von ungefähr 0.06 GM einen beträchtlichen Nachteil; die Wirkungsquerschnitte der analogen Dinitroderivate sind ungefähr dreimal größer. Ein in-



Schema 1. Unterschiedlicher Verlauf der Photolyse MNI-geschützter Carboxylate in aprotischem Lösungsmittel und in Wasser.

teressanter Ansatz, um die Effizienz der Nitroindolin-Photolyse zu verbessern, ist die Einführung eines intramolekularen Triplet-Sensibilisators, eines Benzophenons, am Nitroindolin.^[43] Diese Maßnahme erhöhte die Effizienz der Ein-Photonen-Photolyse beträchtlich, verschob aber das spektrale Maximum der OPA nach 300 nm und der TPA nach 580 nm, also außerhalb des Wellenlängenbereichs von Ti:S-Lasern. Dennoch ist dies eine vielversprechende Strategie für die Verbesserung der TPE von Nitroindolin-Reagentien.

3.3. Bromhydroxycumarine^[44]

Die ersten photoaktivierbaren Reagenzien mit einem Wirkungsquerschnitt der Zwei-Photonen-Freisetzung $\delta_u \geq 1$ GM waren 6-Brom-7-hydroxycumarin-4-ylmethyl(Bhc)-Derivate (Abbildung 10).^[45] Der Verlauf der Photolyse kann

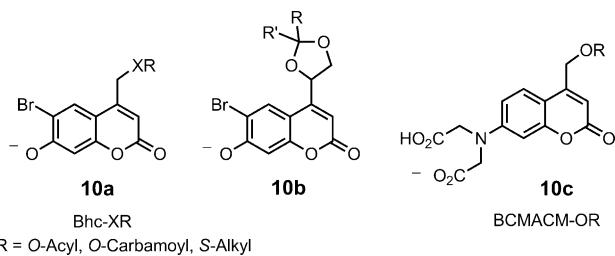


Abbildung 10. Von Bromhydroxycumarin (Bhc) und Aminocumarin (AC) abgeleitete photoaktivierbare Reagenzien.

leicht durch photometrische Messung verfolgt werden, da das Cumarin-Photoprodukt stark fluoresziert. Allerdings erwiesen sich die Esterderivate als hydrolytisch instabil unter physiologischen Bedingungen. Zwar bewirkte ein Carbamat-Spacer eine höhere Stabilität^[45] bei gleichem Wirkungsquerschnitt der Photolyse, führte aber zu einer langsameren Glutamat-Freisetzung (einige ms bei pH 7.2) und folglich einer schlechteren Lokalisierung. Di- und trihalogenierte Cumarinderivate zeigten verbesserte Wirkungsquerschnitte, bei jedoch unsauberer Fragmentierungsreaktion. Nach dem vorgeschlagenen Mechanismus könnte der Brom-Substituent den pK_s -Wert des Phenols erniedrigen und so die Bildung des stärker absorbierenden Anions vermitteln sowie die Lipophilie der Verbindung verringern.^[46] Zuletzt errangen 7-Aminocumarin-Phototrigger aufgrund ihrer hohen Photolyseeffizienzen, langwelligen Absorption und effizienten Fluoreszenzvisualisierung beträchtliche Aufmerksamkeit.^[34, 47]

Die Vielseitigkeit der Cumarin-Reagenzien wurde anhand der Freisetzung von Alkoholen,^[48a] Diolen^[48b] und Thiolen^[48c] demonstriert.^[48] Eine dreidimensionale chemische Strukturierung von Aminen in einem Agarose-Hydrogel wurde durch die photolytische Abspaltung des Bhc durch Zwei-Photonen-Anregung realisiert.^[48d] Aldehyde und Ketone konnten auch aus den entsprechenden Acetalen und Ketalen freigesetzt werden.^[48e] Auch eine Photosäure (eine Verbindung, die bei Bestrahlung stark sauer wird) wurde aus aminosubstituiertem Cumarin entwickelt und unter TPA-Bedingungen untersucht. Die Protonenfreisetzung wurde mit

pH-empfindlichem Fluoresceinisothiocyanatdextran verfolgt.^[48f]

Bhc-Derivate wurden in verschiedenen Studien als zellmembrangängige Reagentien eingesetzt: für die intrazelluläre TP-Photolyse von cyclischen Nukleotid-Sekundärbotenstoffen;^[49] für die Freisetzung von GABA in pyramidalen CA1-Zellen des Hippocampus;^[50] für die Inhibition der Proteinsynthese durch die In-vivo-Freisetzung von Anisomycin;^[51] für die Photolyse von Bhc-abgeleiteten Progesteron-Regiosomeren;^[52] und für die In-vivo-Aktivierung eines kompetitiven Inhibitors der induzierbaren Stickoxid-Synthase (iNOS).^[53] Das wasserlöslichere **10c** (BCMACM) wurde für die Freisetzung eines cGMP-Analogs zur Auslösung des Ca^{2+} -Einstroms in CNG-transfizierte HEK293-Zellen verwendet.^[54]

Bhc-Reagenzien haben hohe Wirkungsquerschnitte der TP-Photolyse von $\delta_u \leq 2.28$ GM und schnelle Photolysekinetiken. Das Cumarin-Photoprodukt ist stark fluoreszierend, was einerseits zur gezielten Verfolgung der Photolysereaktion genutzt werden kann, andererseits aber eine gemeinsame Verwendung dieser Verbindungen mit Fluoreszenzindikatoren verhindert.

Je nach Substrat und Bedingungen kann die Photolyse von Bhc-Reagenzien zur Bildung beträchtlicher Mengen an Nebenprodukten führen.^[48e] Esterderivate sind zudem meist hydrolyseempfindlich, was ihre Verwendung unter physiologischen Bedingungen stark einschränkt.

Mit dem Ziel, den Wirkungsquerschnitt der Zwei-Photonen-Anregung zu verbessern, wurden konjugierte Cumarin-Reagenzien mit *p*-substituierten Styrylgruppen an C(7) hergestellt; die resultierenden Verbindungen zeigten langwelligere Absorptionen und höhere δ_u -Werte als analoge NB-Reagenzien.^[55] Während hohe TPE-Querschnitte σ_2 bei 800 nm erhalten wurden, ging das *p*-Ethoxyderivat **12a** keine Fragmentierung ein, und die Effizienz δ_u der *p*-Dimethylaminoderivate **12b** war doppelt so hoch (bis zu 0.26 GM im Vergleich zu 0.12 GM) als die des Stamm-Cumarinderivats **11** ohne Styrylgruppe (Abbildung 11).

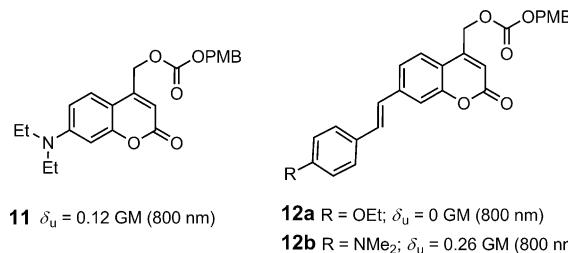


Abbildung 11. Cumarin-basierte Zwei-Photonen-Phototrigger mit *p*-Styrylsubstituenten. PMB = *p*-Methoxybenzyl.

In einer weiteren Studie wurde ein Zwei-Photonen-initierter Selbstverstärkungsansatz entwickelt und mittels einer Bhc-abgeleiteten Dendrimerstruktur realisiert, die ein einzelnes Auslöseereignis in eine Kaskade von molekularen Umwandlungen übersetzt.^[17b] Die Methode ermöglichte die Freisetzung mehrerer terminaler Gruppen. Der Kaskadenprozess ist insgesamt recht langsam, weil die Umlagerungen

seriell ablaufen. Dennoch ist dies eine nützliche Strategie zur Steigerung des Ansprechverhaltens biologischer Systeme auf Licht und zum Erreichen einer anhaltenden Freisetzung.

3.4. *o*-Hydroxycinnamate

o-Hydroxycinnamate (OHC) wurden durch Porter et al. 1988 eingeführt^[56] und zur Photoaktivierung von Alkoholen weiterentwickelt.^[57] Sie zeigen besonders hohe Wirkungsquerschnitte der Photolyse ($\delta_u \leq 4.7$ GM bei 750 nm in Acetonitril, Abbildung 12). Für physiologische Experimente

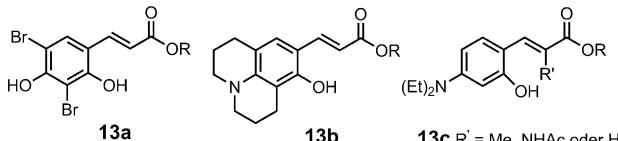


Abbildung 12. Photoaktivierbare *o*-Hydroxycinnamate.

wurde das wasserlöslichere 3,5-Dibrom-2,4-dihydroxycinnamat **13a** verwendet ($\delta_u = 1.6$ GM bei 750 nm), das an einem embryonalen Zebrafischmodell validiert wurde (60 min Bestrahlung bei 750 nm und < 5 mW Maximalleistung in 10 μm wässriger Lösung).^[57b] Bemerkenswerterweise haben viele *o*-Hydroxycinnamate hohe Zellmembranpermeabilität; dadurch ist es möglich, die Zwei-Photonen-Anregung auf einzelne Zellen zu lokalisieren.

o-Hydroxycinnamate wie **13a–c** (Abbildung 12) gehen unter Bestrahlung und anschließender thermischer Lactonisierung *E/Z*-Photoisomerisierung ein, um unter Cumarin-Bildung das Substrat (ROH) freizusetzen. Eine kinetische Analyse unter OPA-Bedingungen zeigte, dass die *E/Z*-Photoisomerisierung und die thermische Umwandlung des *ortho*-Halbesters in das Cumarin die langsamsten Schritte der Photoaktivierung sind.^[57a] Substitution an der Cinnamat-Doppelbindung ($R^1 = \text{Me}$ oder NHCOMe) beschleunigte die Fragmentierungsreaktion um ungefähr eine Größenordnung. Unter TPA-Bedingungen ist der thermische Prozess beträchtlich schneller als die Photoisomerisierung. Allerdings war die Substratfreisetzung unter In-vivo-Bedingungen langsam, im Bereich 10^{-2} – 10^{-3} s⁻¹ bei 750 nm und 4.5 mW Maximalleistung.

Die hohen Wirkungsquerschnitte und gute Zugänglichkeit der OHC-Derivate aus einfachen Synthons sind wichtige Vorteile dieser Systeme.^[58] Ihr Einsatz ist jedoch auf Anwendungen beschränkt, bei denen die langsame Substratfreisetzung kein Problem darstellt.

3.5. Bromhydroxychinoline

8-Brom-7-hydroxychinoline (BHQ) wurden durch Fedoryak und Dore eingeführt.^[59,60] BHQ-OAc (**14a**, Abbildung 13) hat einen δ_u -Wert von 0.59 GM bei 740 nm in gepufferter wässriger Lösung, vergleichbar mit Bhc-OAc ($\delta_u = 0.72$ GM) unter ähnlichen Photolysebedingungen; allerdings hat BHQ-OAc den Vorteil einer höheren Wasserlöslichkeit

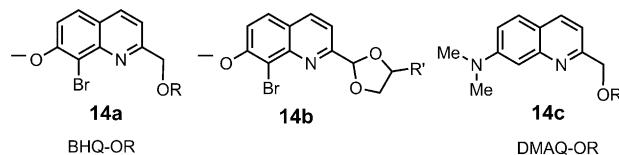


Abbildung 13. Bromhydroxychinoline (BHQ).

als Bhc-OAc und ist weniger fluoreszierend, was die gemeinsame Verwendung mit Fluoreszenzindikatoren erlaubt. Über die Photolyse von Carboxylaten ($\delta_u = 0.64$ –0.76 GM), Phosphaten ($\delta_u = 0.43$ GM) und Diolen (**6b**, $\delta_u = 0.78$ –0.90 GM) wurde berichtet.^[46a] BHQ-OAc photolysierte schneller als Bhc-OAc unter UV-Bestrahlung und war hydrolytisch stabil genug für die Verwendung in physiologischen Experimenten.

Der Austausch des Bromsubstituenten an C(8) gegen einen Nitro-, Cyano- oder Chlorsubstituenten oder der Austausch der phenolischen Hydroxygruppe gegen eine Dimethylamino- (**14c**) oder Sulfhydrylgruppe führte zu verringerten Ein- und Zwei-Photonen-Effizienzen im Vergleich zur Stammverbindung BHQ-OAc.^[61]

Es wird angenommen, dass die Photolyse der BHQ-Reagentien über einen angeregten Singulett-Zustand in einer lösungsmittelunterstützten Photoheterolyse (S_N1) verläuft und die Fragmentierung auf der Submikrosekunden-Zeitskala erfolgt.^[46a] Folglich könnte der Austausch des Broms gegen andere elektronenziehende Gruppen, die nicht das Intersystem-Crossing (ISC) erleichtern, aber den pK_S -Wert des phenolischen Protons erniedrigen, eine gute Strategie für den Entwurf von Analoga sein.

3.6. Rutheniumbipyridyl-Komplexe

In Rutheniumbipyridyl(RuBiPy)-Komplexen (Abbildung 14) evolviert der anfängliche photoangeregte Zustand rasch in einen dissoziativen Zustand, was für eine saubere und schnelle Photoaktivierung sorgt.^[62] RuBiPy-Komplexe wurden zur Schützung von Amingruppen in verschiedenen Molekülen eingesetzt.^[63] Reagenzien dieser Art, z.B. **17a**, wurden zur Freisetzung des Kaliumkanalblockers 4-Aminopyridin verwendet.^[64]

Das strukturell ähnliche RuBi-Glutamat^[65] **17b** und geschütztes GABA, RuBi-GABA (**17c**).^[66] wurden zur optischen Kartierung von glutamergischen bzw. GABAergischen

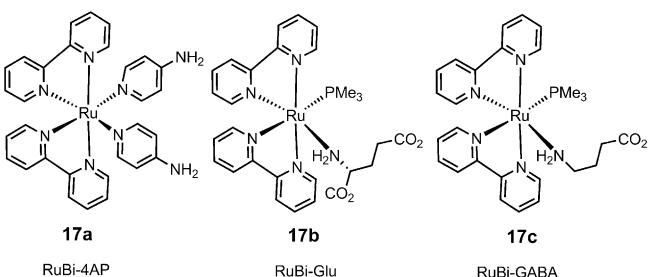


Abbildung 14. RuBiPy-geschützte Liganden.

Rezeptoren unter Ein- und Zwei-Photonen-Anregung verwendet. Für die Wirkungsquerschnitte der TP-Photolyse wurde durch Vergleich mit MNI-Glutamat der Wert 0.1 GM bestimmt. Ähnlich wie beim MNI-Glutamat beschränken antagonistische Effekte an GABA-Rezeptoren und der niedrige Wirkungsquerschnitt die Verwendung von RuBi-GABA. Neuronale Studien ergaben, dass hohe Intensitäten und lange Bestrahlungszeiten nötig waren, um Spiking der Ziel-Neuronen auszulösen.^[65]

3.7. Verschiedene Reagentien

Diverse andere TP-sensitive photoaktivierbare Reagenzien wie der Azid-abgeleitete Calcium-Käfig^[67] oder ein TP-sensitiver 2,6-Dimethylnitrobenzol-basierter NO-Donor (Flu-DNB) wurden entwickelt.^[68] Eine Variante der NO-freisetzenden Reagentien wurde auch aus Fe₂S₂(NO)₄-Clustern hergestellt.^[69] Die Anwendungsbreite dieser Verbindungen muss aber erst noch studiert werden.

4. Spezifische Anwendungen photoaktivierbarer Reagentien

4.1. Dynamische Studien zur zeitlichen und räumlichen Verfolgung von Diffusion und Trafficking

Die Photoaktivierung von geschützten Fluorophoren und photoaktivierbaren genetisch kodierten fluoreszierenden Proteinen^[70] kann genutzt werden, um die Diffusion und die Stoffwechselwege markierter Moleküle zu verfolgen.^[71] Diese Technik bietet zwei Vorteile gegenüber den konventionelleren FRAP-Techniken („fluorescence recovery after photobleaching“). Erstens haben die Messungen ein intrinsisch höheres Signal-Rausch-Verhältnis, da die meisten photoaktivierbaren fluoreszierenden Proteine vor der Photoaktivierung wenig Fluoreszenz erzeugen. Zweitens sollten bei einer Photoaktivierung weniger freie Radikale entstehen als bei der Photobleichung, was eine geringere Phototoxizität zur Folge hat. Der Ansatz wurde verwendet, um die diffusive Spine/Dendrit-Kopplung mit PA-GFP und NPE-HPTS mittels Zwei-Photonen-Anregung zur schnellen Freisetzung des kleinen Fluorophors HPTS (Pyranin) zu messen.

4.2. Synchronie Aktivierung mehrerer Stellen: strukturierte Aktivierung

Die Fähigkeit zur strukturierten, annähernd synchronen Aktivierung mehrerer Stellen, wie z.B. dendritischer Spines, ermöglicht Studien der zeitlich-räumlichen Integration synaptischer Signale. Dies kann entweder durch schnelles Abtasten in zwei Raumrichtungen oder durch holographische Anregung in drei Dimensionen realisiert werden. Zum Beispiel wurde die Photofreisetzung von Glutamat mit elektrophysiologischen Verfahren kombiniert, um mittels Ein-^[72] oder Zwei-Photonen-Anregung^[73,74] und unter Einsatz eines räumlichen Lichtmodulators (SLM) Studien an Gehirn-

schnitten durchzuführen.^[73] Solche Rastermethoden in Kombination mit Zwei-Photonen-Anregung eröffneten auch Möglichkeiten für die Untersuchung von nichtlinearen Antworten auf synaptische Signalmuster.^[40a,b] Hinderlich bei diesem Ansatz sind die hohen, toxischen Konzentrationen des photoaktivierbaren Reagens und die langen Bestrahlungszeiten, die infolge der niedrigen Photolysequerschnitte der verfügbaren Reagentien (z.B. MNI-Glutamat) erforderlich sind. Verbesserungspotential gibt es daher bei den Wirkungsquerschnitten der TP-Photolyse, um die Bestrahlungszeiten und Konzentrationen auf ein nichttoxisches Niveau unter Beibehaltung einer präzisen Lokalisierung zu bringen.^[75]

4.3. Multimodale Photoregulation

Die Aktivität von zwei oder mehr molekularen Spezies kann basierend auf der wellenlängenselektiven Antwort mehrerer verschiedener Chromophore unabhängig photo-reguliert werden.^[76] Die selektive Aktivierung könnte mit Reagentien erreicht werden, die sich in ihren photolytischen Quantenausbeuten, ihren Wirkungsquerschnitten der Zwei-Photonen-Photolyse oder basierend auf ihrer Wellenlängen-sensitivität charakteristisch unterscheiden. Im Ein-Photonen-Experiment wurde eine multimodale Photolyse durch Kon-trolle der Wellenlänge im UV/Vis-Bereich erreicht,^[76b,77] al-lerdings ist die Realisierung einer selektiven Zwei-Photonen-Anregung schwieriger, weil TP-Absorptionsspektren oft breiter sind und überlappen. Die Zwei-Farben-TP-Freiset-zung von Glutamat und GABA mit Einzelsynapsenpräzision wurde durch die selektive Aktivierung von CDNI-Glutamat und einer Aminocumarin-geschützten γ -Aminobutyrsäure erreicht. Selektivität in solchen Experimenten wurde durch Kombination der Lichtwellenlänge mit anderen experimen-tellen Parametern wie der Laserleistung und der Reagens-konzentration erzielt;^[76a] CDNI-Glu wurde bei 720 nm 38-mal effizienter photolysiert als bei 830 nm, während N-DCAC-GABA bei 830 nm effizienter war und in der dop-pelten Konzentration eingesetzt wurde. Obwohl eine unab-hängige Freisetzung von L-Glutamat und GABA erfolgreich realisiert werden konnte, waren die experimentellen Bedin-gungen kritisch, und die Lokalisierung war durch das langsam freisetzende GABA-Reagens beeinträchtigt.

5. Reversible Zwei-Photonen-Photoschalter

Jüngste Fortschritte in der Fluoreszenzphotoschaltung profitierten von der Einführung der Superresolutionsmikroskopie,^[78a] von Bildgebungsverfahren mit optischer Lock-in-Detektion (OLID),^[78] die durch Modulation der Fluoreszenzemission eine Kontrastverbesserung erlauben, und von gentechnisch erzeugten lichtgesteuerten Proteinen in der Molekularbiologie.^[21] Eine allgemeine Strategie zum Entwurf von Photoschaltern ist die nichtkovalente (interkalierende) oder kovalente Kupplung eines photoisomerisierbaren Mo-leküls (des „Photoschalters“) mit einem Biomolekül wie DNA, einem Enzym, einem Ionenkanal oder einem Rezep-

tor, um dieses lichtsensitiv zu machen. Der Photoschalter kann so angebunden werden, dass die Photoisomerisierung eine Konformation gegenüber einer anderen bevorzugt, wodurch ein lichtgesteuerter Konformationswechsel („Schaltung“) zwischen aktiven/inaktiven oder offenen/geschlossenen Formen erzeugt wird.^[79] Alternativ dazu könnte die Photoisomerisierung einen Liganden an das Bindungszentrum eines Ionenkanals oder Rezeptors koordinieren oder davon abspalten und damit dessen Aktivität regulieren.^[2j] Mehrere chemische Photoschalter wurden getestet, und am besten für biologische Anwendungen erwiesen sich Azobenzolderivate. Über die Zwei-Photonen-Anregung von Azobenzolderivaten wurde nicht berichtet,^[79a] aber Spiropyrane wurden kürzlich untersucht. Spiropyrane (SPs) sind molekulare Photoschalter und wurden zur Herstellung photochromer Materialien, einschließlich organischer Polymere und organisch-anorganischer Dünnfilme breit eingesetzt. Spyropiran(SP)-Merocyanin(MC)-Systeme wurden bei 780 nm mit TPA und bei 488 nm mit OPA aktiviert, um eine reversible An/Aus-Fluoreszenzbildgebung von photoschaltbaren immuntargetierenden Nanopartikeln zu induzieren.^[80]

6. Zusammenfassung

Die Zwei-Photonen-Aktivierung geschützter Liganden, Aktuatoren und Photoschalter in Verbindung mit der Miroskopie ist ein leistungsfähiges experimentelles Verfahren zur Untersuchung von Signalmechanismen mit hoher räumlich-zeitlicher Präzision. Im Vergleich zur Ein-Photonen-Anregung besteht der Vorteil darin, dass die TPA ein tieferes Eindringen in lebendes Gewebe, z.B. des Gehirns, ermöglicht. Hinzu kommt, dass die benötigte Photonik hauptsächlich in Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopen für die tiefe Bildgebung lebender Geweben entwickelt wurde. Obwohl bei den Methoden der Ein-Photonen-Photolyse stetige Fortschritte erzielt worden sind, hat man sich beim Entwurf und der Implementierung von Zwei-Photonen-Sonden mit hohen Photolysequerschnitten und guten biologischen Eigenschaften lange Zeit schwergetan. Verglichen mit der Situation bei TP-Fluorophoren sind die Grundregeln für ein rationales Design photoaktivierbarer TP-Reagentien weit weniger gut entwickelt. Eine Reihe von photosensitiven Gruppen wurden als Schutzgruppen eingeführt, keine dieser Spezies erfüllt jedoch in befriedigender Weise die Kriterien einer Anwendung in biologischen Umgebungen und für die effiziente Zwei-Photonen-Aktivierung. Aus Gründen der Phototoxizität ist die Zwei-Photonen-Bestrahlung mit ultraschnellen gepulsten Lasern auf ungefähr 5 mW Leistung limitiert.^[21] Berücksichtigt man die Strahlparameter üblicher Ti:S-Laser und die Anforderung einer Lokalisierung der Reaktion auf das Anregungsvolumen, so kann man abschätzen, dass Wirkungsquerschnitte der Zwei-Photonen-Photolyse im Bereich mehrerer GM sowie Fragmentierungsgeschwindigkeiten > 10000 s⁻¹ benötigt werden. Derzeit verfügbare Reagentien haben deutlich geringere Wirkungsquerschnitte im Bereich 0.01–0.1 GM bei 720 nm und typische Fragmentierungsgeschwindigkeiten unter 10000 s⁻¹. Eine Steigerung der Wirkungsquerschnitte wird wahrscheinlich die Größe und Lipo-

philie der Reagensmoleküle erhöhen, was wiederum Strategien zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit erfordern wird. Eine nächste Generation von Zwei-Photonen-Sonden, die diese Anforderungen erfüllen, könnte der räumlich auflösenden Submikrometerphotochemie Auftrieb geben und tiefgehendere Untersuchungen schneller, lokalisierter Prozesse in biologischen Netzwerken erlauben.

Die Autoren danken dem EU-Projekt „Photolysis“ (LSHM-CT-2007-037765), der ANR (ANR-2010-BLAN-1436-01) und dem CNRS.

Eingegangen am 30. Mai 2012,
veränderte Fassung am 7. September 2012
Online veröffentlicht am 18. Februar 2013

- [1] J. H. Kaplan, B. Forbush III, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929–1935.
- [2] a) *Dynamic Studies in Biology* (Hrsg.: M. Goeldner, R. Givens), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**; b) Sonderheft „Photoremovable Protecting Groups: Development and Applications“, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 433–600; c) G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020–5042; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921; d) H.-M. Lee, D. R. Larson, D. S. Lawrence, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 409–427; e) A. Specht, F. Bolze, Z. Omran, J.-F. Nicoud, M. Goeldner, *HFSP J.* **2009**, *3*, 255–264; f) D. Warther, S. Gug, A. Specht, F. Bolze, J.-F. Nicoud, A. Mourot, M. Goeldner, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7753–7758; g) C. W. Riggsbee, A. Deiters, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 468–475; h) G. C. R. Ellis-Davies, *ACS Chem. Neurosci.* **2011**, *2*, 185–197; i) J. Jerome, D. H. Heck, *Front. Neural Circuits* **2011**, *5*, 95; j) C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8572–8604; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476; k) für einen historischen Überblick siehe: G. C. R. Ellis-Davies, E. N. Pugh, Jr., *J. Gen. Physiol.* **2011**, *138*, 1–11.
- [3] a) G. Knör, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 568–578; b) M. A. Priestman, D. S. Lawrence, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2010**, *1804*, 547–558; c) Y.-C. Li, C. Qi, S.-H. Li, H.-J. Zhang, C.-H. Sun, Y.-Z. Yu, S.-P. Pang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12172–12173; d) S. Szobota, E. Y. Isacoff, *Annu. Rev. Biophys.* **2010**, *39*, 329–348; e) T. Fehrentz, M. Schönberger, D. Trauner, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12362–12390; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12156–12182.
- [4] F. F. Trigo, J. E. T. Corrie, D. Ogden, *J. Neurosci. Methods* **2009**, *180*, 9–21.
- [5] M. Oheim, E. Beaurepaire, E. Chaigneau, J. Mertz, S. Charpak, *J. Neurosci. Methods* **2001**, *111*, 29–37.
- [6] a) D. L. Pettit, G. J. Augustine in *Imaging in Neuroscience and Development* (Hrsg.: R. Yuste, A. Konnerth), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, **2005**; b) T. M. Dore, H. C. Wilson, *Photosensitive Molecules for Controlling Biological Function*, Vol. 55, Springer, Heidelberg, **2011**, S. 57–92.
- [7] M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning, H. L. Anderson, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3292–3316; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3244–3266.
- [8] a) G. S. He, L.-S. Tan, Q. Zheng, P. N. Prasad, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1245–1330; b) C. Andraud, R. Fortrie, C. Barsu, O. Stéphan, H. Chermette, P. L. Baldeck in *Photoresponsive Polymers II*, Vol. 214 (Hrsg.: S. R. Marder, K. S. Lee), Springer, Berlin, **2008**, S. 149–203.
- [9] A. Dreuw, M. A. Polkhn, R. Binder, A. Heckel, S. Knippenberg, *J. Comput. Chem.* **2012**, *33*, 1797–1805.

- [10] M. Albota, D. Beljonne, J.-L. Bredas, J. E. Ehrlich, J.-Y. Fu, A. A. Heikal, S. E. Hess, T. Kogej, M. D. Levin, S. R. Marder, D. McCord-Maughon, J. W. Perry, H. Röckel, M. Rumi, G. Subramaniam, W. W. Webb, X.-L. Wu, C. Xu, *Science* **1998**, *281*, 1653–1656.
- [11] W.-H. Lee, H. Lee, J.-A. Kim, J.-H. Choi, M. Cho, S.-J. Jeon, B. R. Cho, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10658–10667.
- [12] M. Rumi, J. E. Ehrlich, A. A. Heikal, J. W. Perry, S. Barlow, Z. Hu, D. McCord-Maughon, T. C. Parker, H. Röckel, S. Thayumanavan, S. R. Marder, D. Beljonne, J.-L. Brédas, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9500–9510.
- [13] O. Mongin, L. Porrès, M. Charlot, C. Katan, M. Blanchard-Desce, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 1481–1498.
- [14] R. Fortrie, R. Anémian, O. Stéphan, J.-C. Mulatier, P. L. Baldeck, C. Andraud, H. Chermette, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 2270–2279.
- [15] P. Macak, Y. Luo, P. Norman, H. Agren, *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 7055–7062.
- [16] S.-J. Chung, K.-S. Kim, T.-C. Lin, G. S. He, J. Swiatkiewicz, P. N. Prasad, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 10741–10745.
- [17] a) M. Drobizhev, A. Karotki, Y. Dzenis, A. Rebane, Z. Suo, C. W. Spangler, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 7540–7543; b) N. Fomina, C. L. McFearin, A. Almutairi, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 9138–9140.
- [18] a) S. Kim, T. Y. Ohulchanskyy, H. E. Pudavar, R. K. Pandey, P. N. Prasad, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2669–2675; b) T. Gallavardin, M. Maurin, S. Marotte, T. Simon, A.-M. Gabudean, Y. Bretonnière, M. Lindgren, F. Lerouge, P. L. Baldeck, O. Stéphan, Y. Leverrier, J. Marvel, S. Parola, O. Maury, C. Andraud, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 1216–1225; c) S. Biswas, X. Wang, A. R. Morales, H.-Y. Ahn, K. D. Belfield, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 441–449.
- [19] a) M. Göppert, *Naturwissenschaften* **1929**, *17*, 932; b) M. Göppert-Mayer, *Ann. Phys.* **1931**, *401*, 273–294.
- [20] D. A. DiGregorio, J. S. Rothman, T. A. Nielsen, R. A. Silver, *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 8344–8357.
- [21] N. I. Kiskin, R. Chillingworth, J. A. McCray, D. Piston, D. Ogden, *Eur. Biophys. J.* **2002**, *30*, 588–604.
- [22] N. I. Kiskin, D. Ogden, *Eur. Biophys. J.* **2002**, *30*, 571–587.
- [23] J. E. T. Corrie in *Dynamic Studies in Biology* (Hrsg.: M. Goeldner, R. Givens), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, S. 1–28.
- [24] a) S. Bühler, I. Lagoja, H. Giegrich, K.-P. Stengele, W. Pfleiderer, *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 620–659; b) A. Specht, J.-S. Thomann, K. Alarcon, W. Wittayanam, D. Ogden, T. Furuta, Y. Kurakawa, M. Goeldner, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1690–1695.
- [25] I. Aujard, C. Benbrahim, M. Gouget, O. Ruel, J.-B. Baudin, P. Neveu, L. Jullien, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6865–6879.
- [26] S. Kantevari, C. J. Hoang, J. Ogródnik, M. Egger, E. Niggli, G. C. R. Ellis-Davies, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 174–180.
- [27] G. C. R. Ellis-Davies, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1603–1613.
- [28] A. Barth, S. R. Martin, J. E. T. Corrie, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 107–115.
- [29] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 35–40.
- [30] D. P. Kennedy, D. C. Brown, S. C. Burdette, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4486–4489.
- [31] a) H. Lusic, R. Upadhyay, A. Deiters, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 916–919; b) F. Schäfer, K. B. Joshi, M. A. Fichte, T. Mack, J. Wachtveitl, A. Heckel, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1450–1453.
- [32] S. Kantevari, Y. Buskila, G. C. R. Ellis-Davies, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 508–513.
- [33] Y. R. Zhao, Q. Zheng, K. Dakin, K. Xu, M. L. Martinez, W.-H. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4653–4663.
- [34] P. Neveu, I. Aujard, C. Benbrahim, T. L. Saux, J.-F. Allemand, S. Vriz, D. Bensimon, L. Jullien, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3804–3806; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3744–3746.
- [35] 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.
- [36] a) 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; b) A. Specht, F. Bolze, L. Donato, C. Herbivo, S. Charon, D. Warther, S. Gug, N. Jean-François, M. Goeldner, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 578–586.
- [37] 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.
- [38] B. Amit, D. A. Ben-Efraim, A. Patchornik, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 843–844.
- [39] a) G. Papageorgiou, D. C. Ogden, A. Barth, J. E. T. Corrie, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6503–6504; b) J. Morrison, P. Wan, J. E. T. Corrie, G. Papageorgiou, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 960–969; c) G. Papageorgiou, J. E. T. Corrie, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8197–8205; d) M. Canepari, L. Nelson, G. Papageorgiou, J. E. T. Corrie, D. Ogden, *J. Neurosci. Methods* **2001**, *112*, 29–42; e) F. F. Trigo, G. Papageorgiou, J. E. T. Corrie, D. Ogden, *J. Neurosci. Methods* **2009**, *181*, 159–169; f) G. Papageorgiou, M. Beato, D. Ogden, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 5228–5234.
- [40] a) S. Gasparini, J. C. Magee, *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 2088–2100; b) A. Losonczy, J. C. Magee, *Neuron* **2006**, *50*, 291–307; c) V. Nikolenko, K. E. Poskanzer, R. Yuste, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 943–950; d) M. Matsuzaki, G. C. R. Ellis-Davies, H. Kasai, *J. Neurophysiol.* **2008**, *99*, 1535–1544.
- [41] a) O. D. Fedoryak, J.-Y. Sul, P. G. Haydon, G. C. R. Ellis-Davies, *Chem. Commun.* **2005**, 3664–3666; b) G. Papageorgiou, D. Ogden, G. Kelly, J. E. T. Corrie, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 887–896.
- [42] G. C. R. Ellis-Davies, M. Matsuzaki, M. Paukert, H. Kasai, D. E. Bergles, *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 6601–6604.
- [43] a) G. Papageorgiou, M. Lukeman, P. Wan, J. E. T. Corrie, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 366–373; b) G. Papageorgiou, D. Ogden, J. E. T. Corrie, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7228–7233.
- [44] R. S. Givens, M. Rubina, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 472–488.
- [45] T. Furuta, S. S. H. Wang, J. L. Dantker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1193–1200.
- [46] a) Y. Zhu, C. M. Pavlos, J. P. Toscano, T. M. Dore, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4267–4276; b) H.-Y. An, C. Ma, J. L. Nganga, Y. Zhu, T. M. Dore, D. L. Phillips, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 2831–2837.
- [47] a) J. Babin, M. Pelletier, M. Lepage, J. Allard, D. Morris, Y. Zhao, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3379–3382; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3329–3332; b) M. Noguchi, M. Skwarczynski, H. Prakash, S. Hirota, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5389–5397; c) Q. Lin, Q. Huang, C. Li, C. Bao, Z. Liu, F. Li, L. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10645–10647; d) Q. Lin, C. Bao, G. Fan, S. Cheng, H. Liu, Z. Liu, L. Zhu, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 6680–6688.
- [48] a) A. Z. Suzuki, T. Watanabe, M. Kawamoto, K. Nishiyama, H. Yamashita, M. Ishii, M. Iwamura, T. Furuta, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4867–4870; b) W. Lin, D. S. Lawrence, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2723–2726; c) D. Abate-Pella, N. A. Zeliadt, J. D. Ochocki, J. K. Warmka, T. M. Dore, D. A. Blank, E. V. Wattenberg, M. D. Di Stefano, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1009–1016; d) R. G. Wylie, M. S. Shoichet, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 2716–2721; e) M. Lu, O. D. Fedoryak, B. R. Moister, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2119–2122; f) D. Geißler, Y. N. Antonenko, R. Schmidt, S. Keller, O. O. Krylova, B. Wiesner, J. Bendig, P. Pohl, V. Hagen,

- Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1219–1223; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1195–1198.
- [49] T. Furuta, H. Takeuchi, M. Isozaki, Y. Takahashi, M. Kanehara, M. Sugimoto, T. Watanabe, K. Noguchi, T. M. Dore, T. Kurashiki, M. Iwamura, R. Y. Tsien, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1119–1128.
- [50] Y. Kanemoto, M. Matsuzaki, S. Morita, T. Hayama, J. Noguchi, N. Senda, A. Momotake, T. Arai, H. Kasai, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22652.
- [51] M. Goard, G. Aakalu, O. D. Fedoryak, C. Quinonez, J. S. Julien, S. J. Poteet, E. M. Schuman, T. M. Dore, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 685–693.
- [52] 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. Correction: 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*, 9463–.
- [53] a) H. J. Montgomery, B. Perdicakis, D. Fishlock, G. A. Lajoie, E. Jervis, J. G. Guillemette, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1919–1927; b) B. Perdicakis, H. J. Montgomery, G. L. Abbott, D. Fishlock, G. A. Lajoie, J. G. Guillemette, E. Jervis, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 47–57.
- [54] a) V. Hagen, B. Dekowski, V. Nache, R. Schmidt, D. Geißler, D. Lorenz, J. Eichhorst, S. Keller, H. Kaneko, K. Benndorf, B. Wiesner, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 8099–8104; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7887–7891.
- [55] C. Bao, G. Fan, Q. Lin, B. Li, S. Cheng, Q. Huang, L. Zhu, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 572–575.
- [56] A. D. Turner, S. V. Pizzo, G. Rozakis, N. A. Porter, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 244–250.
- [57] a) N. Gagey, P. Neveu, C. Benbrahim, B. Goetz, I. Aujard, J.-B. Baudin, L. Jullien, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9986–9998; b) N. Gagey, P. Neveu, L. Jullien, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2519–2521; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2467–2469.
- [58] N. Gagey, M. Emond, P. Neveu, C. Benbrahim, B. Goetz, I. Aujard, J.-B. Baudin, L. Jullien, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2341–2344.
- [59] T. M. Dore in *Dynamic Studies in Biology* (Hrsg.: M. Goeldner, R. Givens), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, S. 435–460.
- [60] O. D. Fedoryak, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3419–3422.
- [61] M. J. Davis, C. H. Kragor, K. G. Reddie, H. C. Wilson, Y. Zhu, T. M. Dore, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1721–1729.
- [62] L. Zayat, C. Calero, P. Albores, L. Baraldo, R. Etchenique, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 882–883.
- [63] V. San Miguel, M. Álvarez, O. Filevich, R. Etchenique, A. del Campo, *Langmuir* **2012**, *28*, 1217–1221.
- [64] V. Nikolenko, R. Yuste, L. Zayat, L. M. Baraldo, R. Etchenique, *Chem. Commun.* **2005**, 1752–1754.
- [65] E. Fino, R. Araya, D. S. Peterka, M. Salierro, R. Etchenique, R. Yuste, *Front. Neural Circuits* **2009**, *3*, 1–9.
- [66] E. M. R. Verde, L. Zayat, R. Etchenique, R. Yuste, *Front. Neural Circuits* **2008**, *2*, 2.
- [67] E. B. Brown, J. B. Shear, S. R. Adams, R. Y. Tsien, W. W. Webb, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 489–499.
- [68] K. Hishikawa, H. Nakagawa, T. Furuta, K. Fukuhara, H. Tsuimoto, T. Suzuki, N. Miyata, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7488–7489.
- [69] a) S. R. Wecksler, A. Mikhailovsky, D. Korystov, F. Buller, R. Kannan, L.-S. Tan, P. C. Ford, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 395–402; b) Q. Zheng, A. Bonoiu, Y. Ohulchansky, G. S. He, P. N. Prasad, *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 389–398.
- [70] K. A. Lukyanov, D. M. Chudakov, S. Lukyanov, V. V. Verkusha, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2005**, *6*, 885–891.
- [71] B. L. Bloodgood, B. L. Sabatini, *Science* **2005**, *310*, 866–869.
- [72] a) C. Lutz, T. S. Otis, V. DeSars, S. Charpak, D. A. DiGregorio, V. Emiliani, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 821–827; b) S. Yang, E. Papanikoumou, M. Guillou, V. de Sars, C. M. Tang, V. Emiliani, *J. Neural Eng.* **2011**, *8*, 046002.
- [73] V. Nikolenko, B. O. Watson, R. Araya, A. Woodruff, D. S. Peterka, R. Yuste, *Front. Neural Circuits* **2008**, *2*, 5.
- [74] B. E. Losavio, V. Iyer, P. Saggau, *J. Biomed. Opt.* **2009**, *14*, 064033.
- [75] B. Judkewitz, A. Roth, M. Häusser, *Neuron* **2006**, *50*, 180–183.
- [76] a) S. Kantevari, M. Matsuzaki, Y. Kanemoto, H. Kasai, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 123–125; b) V. San Miguel, C. G. Bochet, A. del Campo, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5380–5388.
- [77] a) H. A. Wegner, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4869–4871; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4787–4788; b) M. A. Priestman, L. Sun, D. S. Lawrence, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 377–384.
- [78] a) 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. L. Yan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17789–17794; e) Y. L. Yan, M. E. Marriott, C. Petchprayoon, G. Marriott, *Biochem. J.* **2011**, *433*, 411–422.
- [79] a) G. Sandoz, J. Levitz, R. H. Kramer, E. Y. Isacoff, *Neuron* **2012**, *74*, 1005–1014; b) L. Liu, S. C. Kohout, Q. Xu, S. Müller, C. R. Kimberlin, E. Y. Isacoff, D. L. Minor, Jr., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 633–641.
- [80] M.-Q. Zhu, G.-F. Zhang, C. Li, M. P. Aldred, E. Chang, R. A. Dreze, A. D. Q. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 365–372.