

„Schreiben“ mit zwei Photonen



Dreidimensionale Proteinnetzwerke durch Zwei-Photonen-Aktivierung**

Volker Gatterdam, Radhan Ramadass, Tatjana Stoess, Manuela A. H. Fichte, Josef Wachtveitl, Alexander Heckel und Robert Tampé*

Abstract: Die präzise räumliche und zeitliche Steuerung biologischer Prozesse spielt eine Schlüsselrolle in den Lebens- und Materialwissenschaften. Wir haben ein photoaktivierbares Glutathion (GSH) synthetisiert, um seine Interaktion mit der Glutathion-S-Transferase (GST) lichtgesteuert mit hoher räumlich-zeitlicher Auflösung zu induzieren. Diese zwei-Photonen-aktivierbare Verbindung zeigt eine schnelle und definierte Umwandlung zu bioaktivem GSH, das in der Folge mit verschiedenen GST-markierten Proteinen interagieren kann. Die Affinität der GSH/GST-Interaktion wird durch Licht über mehrere Größenordnungen bis in den nanomolaren Bereich erhöht. In situ können durch fs-gepulste Zwei-Photonen-Anregung gleichzeitig vielfältige, dreidimensionale Proteinnetzwerke generiert werden. Die Zwei-Photonen-Aktivierung ermöglicht ein „Schreiben“ von dreidimensionalen Proteinstrukturen in Echtzeit mit bisher unerreichter räumlich-zeitlicher Auflösung und öffnet somit neue weitreichende Anwendungen in den Lebens- und Materialwissenschaften.

Ein Ziel der chemischen Biologie besteht darin, Proteininteraktionen oder zelluläres Verhalten durch externe Stimuli zu steuern.^[1] In den Lebenswissenschaften wird daher nach Methoden gesucht, Biomoleküle in drei Dimensionen (3D) zu organisieren und zu manipulieren. Licht wird dabei als optimales Hilfsmittel zum Strukturieren von Biomolekülen erachtet. Entscheidende Vorteile sind hierbei die hohe räumliche wie zeitliche Auflösung in Kombination mit der

Möglichkeit, die Aktivierung durch Photonenintensität oder Wellenlänge zu steuern. Licht ist optimal kompatibel mit Zellen, Geweben und hochentwickelten Lebewesen. Zudem entfallen weitere Inkubations- oder Waschschritte. Kürzlich wurden lichtempfindliche Verbindungen zur Manipulation von biologischen Systemen,^[2] wie reversible Photoschalter^[3] oder gerichtete Trigger,^[4] so genannte photoaktivierbare Verbindungen, beschrieben.^[5] Zweidimensionale (2D-)Strukturen werden durch lithographische Techniken generiert,^[6] wogegen eine 3D-Strukturierung besonders durch den nichtlinearen Zwei-Photonen-Effekt möglich wird.^[7] Im letztgenannten Fall absorbiert das Zielmolekül gleichzeitig

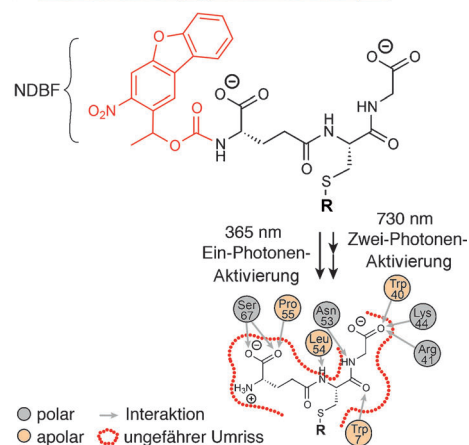
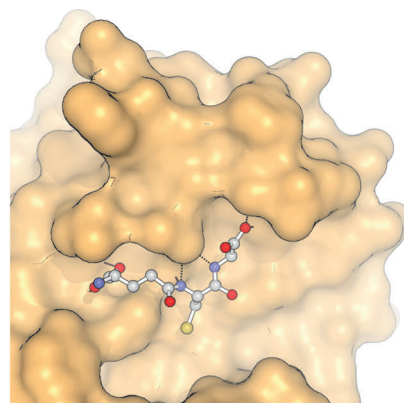


Abbildung 1. Lichtinduzierte GSH/GST-Interaktion. An GST gebundenes GSH (PDB-Code: 1UA5; *Schistosoma japonicum*) wird als Oberflächendarstellung (oben) und Interaktionsdiagramm (unten) gezeigt. Das neue zwei-Photonen-aktivierbare GSH^{NDBF} kann durch Ein- oder Zwei-Photonen-Aktivierung bei 365 bzw. 730 nm in bioaktives GSH umgewandelt werden. Das Thiol, hier durch den Rest R repräsentiert, wird zur Modifikation mit Fluorophoren oder zur Anheftung an 2D- oder 3D-Matrizes verwendet.

[*] Dr. V. Gatterdam, Prof. Dr. R. Tampé
Institut für Biochemie, Biozentrum
Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 9, 60438 Frankfurt am Main (Deutschland)
E-Mail: tampe@em.uni-frankfurt.de
Homepage: <http://www.biochem.uni-frankfurt.de>

Dr. T. Stoess, M. A. H. Fichte, Prof. Dr. A. Heckel
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
Goethe-Universität Frankfurt (Deutschland)

Dr. R. Ramadass, Prof. Dr. J. Wachtveitl
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie
Goethe-Universität Frankfurt (Deutschland)

[**] Wir danken Dr. Ralph Wieneke, Alina Kollmannsperger und Christine Le Gal für hilfreiche Vorschläge zum Manuskript. Die DFG (Exzellenzcluster – Makromolare Komplexe, SFB902 und SPP1623) unterstützte die Arbeit. Tarmo Nuutinen und Dr. Juhani Syväoja (University of East Finland) stellten den GST-eGFP-Vektor zur Verfügung. GST-(PA)mCherry erhielten wir von Prof. Jacob Piehler (Universität Osnabrück). Wir danken Dr. Niyas Yilmaz (Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, München) für großzügige Unterstützung beim Zwei-Photonen-Experiment.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201309930> zu finden.

zwei Photonen, um in den angeregten Zustand zu gelangen. Die erforderliche hohe Photondichte wird durch Fokussierung eines gepulsten Laserstrahls, typischerweise mit der doppelten Wellenlänge des Absorptionsmaximums eines einzigen Photons, und durch Verwenden eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur erreicht. Über 3D-Strukturen aus reaktiven Gruppen zur kovalenten Verknüpfung mit Biomolekülen oder gar die Steuerung von zellulärem Verhalten oder Migration wurde berichtet.^[1b,7a,8] Allerdings sind diese Ansätze von aufeinander folgenden Reaktions-, Inkubations- und Waschschritten abhängig, was einer direkten In-situ-Strukturierung und Manipulation der Proteine im Wege steht. Dieser Nachteil verringert die Anwendbarkeit in zellulären Systemen.

Als wichtiger Redox-Regulator und Radikalfänger reaktiver Sauerstoffverbindungen hat das Pseudo-Tripeptid Glutathion (GSH) eine essenzielle Funktion in der Zelle.^[9] Zusammen mit der Glutathion-S-Transferase (GST) ist es zudem an der xenobiotischen Entgiftung der Zelle beteiligt.^[10] Das GSH/GST-System findet breite Anwendung bei der genomweiten Interaktionsanalyse,^[11] der Proteinreinigung^[12] und der Oberflächenimmobilisierung,^[13] was dieses Interaktionspaar zum idealen Ziel für Photoaktivierung macht.

Hier stellen wir einen neuen und vielseitigen Ansatz zum 3D-Proteinassemblieren mithilfe von Zwei-Photonen-Aktivierung vor. Für anspruchsvolle lichtgesteuerte Anwendungen wurde ein zwei-Photonen-aktivierbares GSH synthetisiert, das mit einer Nitrodibenzofuran (NDBF)-Schutzgruppe maskiert ist. Unter Anwendung eines Zwei-Photonen-Laserrastermikroskops werden Proteine mit hoher räumlich-zeitlicher Auflösung in drei Dimensionen organisiert.

Um ein effizientes Ein- und Multi-Photonen-Entschützen zu erreichen, wurde die photolabile NDBF-Schutzgruppe^[14] an der α -Aminogruppe der γ -L-Glutaminsäure eingefügt. Durch Photoaktivierung wird GSH^{NDBF} in bioaktives GSH umgewandelt. Bemerkenswerterweise kann diese Photoreaktion sowohl durch Ein- als auch durch Multi-Photonen-Anregung ausgelöst werden (Abbildung 1). Der entscheidende Vorteil bei Anwendung des Zwei-Photonen-Effektes ist die hohe räumliche Auflösung, besonders entlang der z -Achse. Dreidimensionale Photoaktivierung erfolgt ausschließlich am Punkt des höchsten Photonenstroms im fokalen Volumen (ca. 1 fl).^[15] Weitere entscheidende Vorteile dieser nichtinvasiven Anwendung sind die verringerte Phototoxizität und Lichtstreuung sowie eine größere Eindringtiefe des langwelligen Lichts.

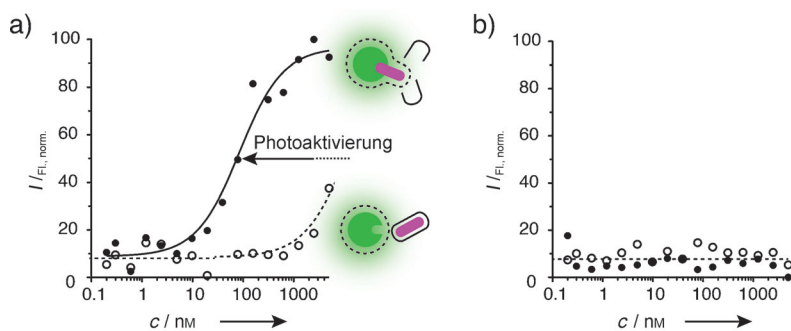


Abbildung 2. Analyse der lichtinduzierten, hochaffinen GSH-GST-Komplexbildung durch MST. Die thermophoretische Mobilität von GST-eGFP wird anhand von Änderungen der Hydrathülle detektiert; dies ist mit den gestrichelten Kreisen angedeutet. a) GST-eGFP (5 nM) wurde mit steigenden Konzentrationen von photoaktivierbarem (\circ) und photoaktiviertem GSH^{NDBF} (\bullet) inkubiert. Zur Photoaktivierung wurden die Proben 2 min bei 365 nm (185 mW cm^{-2}) belichtet, was zu einem K_D -Wert von $(82 \pm 19) \text{ nM}$ führte. Für photoaktivierbares GSH^{NDBF} wurde eine niedrigaffine Interaktion detektiert. b) Das gleiche Experiment wie in (a), allerdings mit einem Überschuss an GSH (5 mM) als Kompetitor durchgeführt, zeigt die Spezifität der Interaktion.

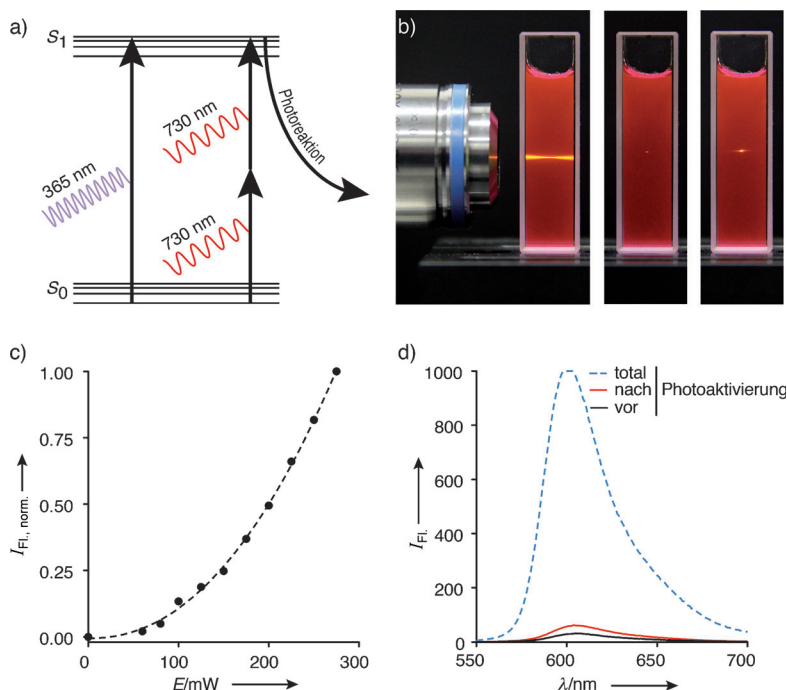


Abbildung 3. Zwei-Photonen-Effekt der GSH^{NDBF}-Photoaktivierung und deren Abhängigkeit von der Belichtungsintensität. a) Das Jablonski-Diagramm zeigt den Vergleich der Ein- und Zwei-Photonen-Anregung sowie die resultierende Photoreaktion. Eine Zwei-Photonen-Aktivierung ist nur in einem räumlich definierten Punkt mit hoher Photondichte möglich. b) Darstellung des Zwei-Photonen-Effekts in einer Lösung von ATTO565-markiertem GSH^{NDBF} ($10 \mu\text{M}$). Die Ein- (links) und Zwei-Photonen-Anregung (Mitte) wird durch den gleichen Versuchsaufbau gezeigt. Eine Zwei-Photonen-Anregung mit zu hoher Laserleistung führt zu einem Verlust in der z -Auflösung (rechts). c) Änderung der Fluoreszenzintensität von ATTO565 nach dem Entfernen der löslichen NDBF-Gruppe durch Zwei-Photonen-Anregung. Die Photoaktivierung wurde mit einem Infrarotlaser bei 730 nm mit unterschiedlichen Belichtungsintensitäten durchgeführt. Die Daten wurden mit der Gleichung $y = A + Bx^C$ angepasst, wobei der Parameter C für die Abhängigkeit der Lichtintensität bei Zwei-Photonen-Anregung zu 2.17 ermittelt wurde, was den Zwei-Photonen-Prozess bestätigt. d) Fluoreszenzspektren von ATTO565-markiertem GSH zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Experiments (c). Die Ergebnisse zeigen, dass weniger als 3% der gesamten GSH^{NDBF}-Population photoaktiviert wurden und dass sich die Gesamtkonzentration an GSH^{NDBF} während des Experiments nicht signifikant änderte.

Nach fünf Synthesestufen und der anschließenden Charakterisierung (siehe Hintergrundinformationen (SI)) verfolgten wir die Photoreaktion von GSH^{NDBF} mithilfe von Umkehrphasen- C_{18} -HPLC (Abbildung SI3). Die Photoaktivierung zeigt eine monoexponentielle Abnahme von GSH^{NDBF} , die direkt mit monoexponentieller Bildung von bioaktivem GSH korreliert. Die Photoaktivierung von GSH^{NDBF} ist dreimal schneller als die von GSH mit einer Nitrophenylpropyl(NPP)-Schutzgruppe, die zwei-Photonen-inaktiv ist.^[3d] Der primären Photoreaktion, die innerhalb von Pikosekunden abläuft, folgt eine langsamere Decarboxylierung im Bereich von Mikro- bis Millisekunden.^[16] Die Effizienz der Photoaktivierung, definiert als das Produkt $\epsilon\phi$ aus dem Extinktionskoeffizienten und der Quantenausbeute, wurde für GSH^{NDBF} und GSH^{NPP} zu 1600 bzw. $100 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt.^[17] Ähnliche Tendenzen waren zuvor schon für photomaskierte Oligonukleotide beobachtet worden.^[18]

Zunächst analysierten wir die lichtinduzierte Interaktion zwischen GSH und GST-fusioniertem, grün fluoreszierendem Protein (GST-eGFP) mit Microscale-Thermophorese (MST). Vor der Belichtung konnte nur eine sehr schwache Interaktion detektiert werden (Abbildung 2a). Nach Photoaktivierung wurde eine hochaffine Interaktion mit $K_D = (82 \pm 19) \text{ nm}$ ermittelt, die durch einen Überschuss an GSH blockiert werden kann (Abbildung 2b). Die lichtinduzierte Wechselwirkung wurde anhand von resonantem Förster-Energie-transfer (FRET) von GST-eGFP und ATTO565-markiertem GSH^{NDBF} als Donor-Akzeptor-Paar untersucht. Die FRET-Analyse lieferte eine Gleichgewichtsdissociationskonstante $K_D > 4 \mu\text{m}$ vor und $K_D = (0.28 \pm 0.02) \mu\text{m}$ nach Belichtung (siehe Abbildung SI5).

Für den Nachweis des Zwei-Photonen-Prozesses wurde ATTO565-markiertes GSH^{NDBF} bei 730-nm-fs-gepulster Laseranregung aktiviert (Abbildung 3). Als Nebeneffekt wird der Fluorophor durch die NDBF-Schutzgruppe wahrscheinlich durch Kontakt oder photoinduzierten Elektronentransfer (PET) gelöscht.^[19] Daraufhin verfolgten wir die Photoaktivierung von GSH^{NDBF} direkt über die Zunahme der ATTO565-Fluoreszenz. Die Fluoreszenz zeigte eine quadratische Abhängigkeit von der Laserleistung bei 730 nm, was einen formalen Beleg für den Zwei-Photonen-Effekt liefert (Abbildung 3c). Der Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt des Chromophors von NDBF wurde im Kontext von Ca^{2+} -Komplex-bildendem NDBF (EGTA = Ethylenglycol-bis(aminoethylether)tetraessigsäure) zu $0.6 \times 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s}^{-1} \text{ Photon}^{-1}$ (0.6 Goeppert-Mayer) bestimmt.^[14] Um sicher zu gehen, dass der Verbrauch der geschützten Verbindung vernachlässigbar gering ist, wurden zu jedem Zeitpunkt des Experimentes Fluoreszenzspektren zur Kontrolle aufgenommen (Abbildung 3d).

Wir verfolgten zwei Ansätze, um das lichtinduzierte Assemblieren von GST-markierten Proteinen zu zeigen. Die Maskenlithographie wurde verwendet, um mit GSH^{NDBF} und biokompatiblen Polyethylenglycol funktionalisierte Oberflächen zu photoaktivieren. Nach Bindung von GST-eGFP (grün) oder GST, markiert mit photoaktivierbarem (PA)mCherry (rot), wurden die Strukturen mit einem konfokalen Laserrastermikroskop (CLSM) aufgenommen. GST-eGFP

wurde selbst in einem kompletten Zelllysatz zu wohldefinierten Proteinstrukturen assembliert, was die Spezifität der lichtgesteuerten Interaktion demonstriert (Abbildung 4a und Abbildung SI4). Durch Photostrukturierung konnte das dreifach schnellere Proteinassamblieren bestätigt werden (siehe Abbildung SI7).

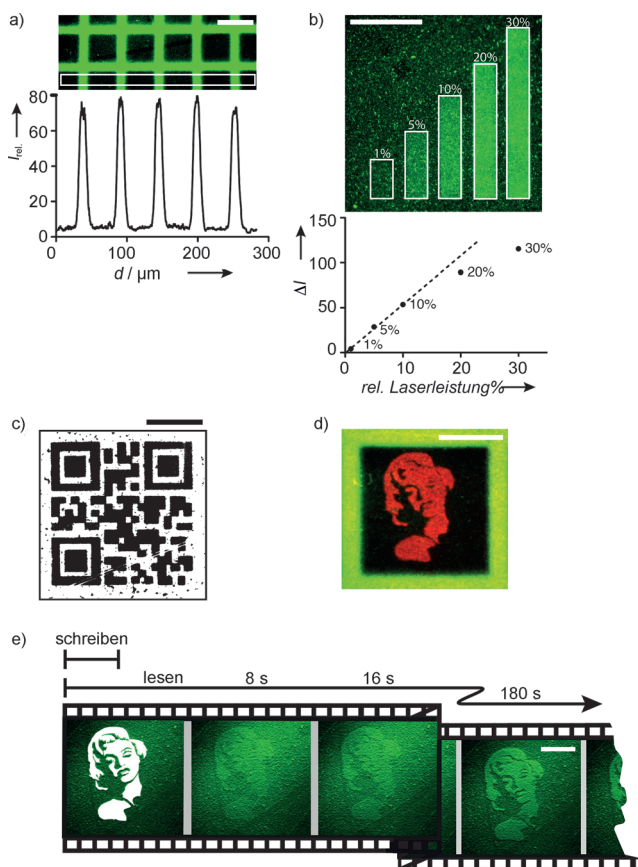


Abbildung 4. In-situ-Proteinassamblieren in 2D. a) Maskenlithographie einer Gitterstruktur durch ein 365-nm-UV-LED-System (75 mW cm^{-2} ; $2.3 \text{ mmol Photonen}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) für 5 s. Das Intensitätsprofil der markierten Regionen zeigt einen hervorragenden Kontrast zwischen belichteten und nicht belichteten Regionen. Das Lysat von GST-eGFP-exprimierenden *E. coli* wurde zur Strukturierung mit Protein verwendet. b) Änderungen der Laserintensität und der entsprechenden Lichtdosis der aktivierten Regionen. Bei geringen Intensitäten kann eine lineare Abhängigkeit zwischen Proteindichte und Lichtdosis beobachtet werden. c) Assemblieren komplexer Strukturen, beispielsweise eines QR-Codes, produziert durch Laserrastermikroskopie. Die Abbildung wird zur besseren Erkennbarkeit in invertierten Graustufen dargestellt. Die gespeicherte Information codiert für das Wort „Glutathion“. d) Der grüne Rahmen wurde durch Maskenlithographie und Inkubation mit *E. coli*-Lysat generiert, das GST-eGFP enthält. In einer zweiten Runde der GSH^{NDBF} -Aktivierung wurde Marilyn Monroe mit einem Laserrastermikroskop geschrieben und mit GST-(PA)mCherry sichtbar gemacht. e) In-situ-Aktivierung von photoaktivierbarem GSH in Gegenwart von GST-eGFP (500 nm). Nach Photoaktivierung bei 450 nm für 2 s (Schreiben) wurde das Assemblieren von GST-eGFP fluoreszenzmikroskopisch verfolgt (Lesen). Die geschriebene Struktur kann schon wenige Sekunden nach Photoaktivierung beobachtet werden (siehe SI Film 1). Der Maßstabsbalken entspricht bei allen Abbildungen 50 μm .

In der Folge verwendeten wir einen 405-nm-Rasterlaser zur Etablierung eines frei gewählten Musters durch Licht (Abbildung 4b–d). Eine effiziente Photoaktivierung erfolgt innerhalb weniger Millisekunden bis Sekunden, abhängig von der Größe der geschriebenen Struktur. Durch Variierung der Lichtdosis konnten definierte Proteindichten generiert werden, die bei geringen Intensitäten eine lineare Abhängigkeit widerspiegeln (Abbildung 4b). Ein lichtgeschriebener QR-Code wird als Beispiel für ein komplexes Muster GSH-markierter Proteine gezeigt (Abbildung 4c). Dies belegt, dass sogar Informationen eines binären Codes in Proteinstrukturen gespeichert werden können. Des Weiteren erfolgte die Realisierung eines Multiprotein-Arrays durch Wiederholen eines zweiten Zyklus von Photoaktivierung und Binden eines anderen Proteins (Abbildung 4d). Das In-situ-Assemblieren von GST-markierten Proteinen wurde mithilfe eines CLSM in Echtzeit verfolgt (Abbildung 4e, SI Film 1). Nach einem kurzen 450-nm-Scan (Schreiben: 2 s) wurde das Zusammenlagern von GST-eGFP per CLSM aufgenommen (Lesen: 0–180 s). Das In-situ-Assemblieren der Zielproteine erfolgte sehr schnell und erreichte Sättigung nach wenigen Sekunden.

Zur Demonstration des Proteinassamblierens in 3D durch das Schreiben eines Zwei-Photonen-Lasers entwickelten wir biokompatible, transparente Hydrogele, die mit GSH^{NDBF} funktionalisiert wurden (siehe Hintergrundinformationen). Die gewünschten 3D-Strukturen wurden durch Zwei-Photonen-Aktivierung bei 730 nm mit einem fspulsten Rasterlaser im konfokalen Mikroskop generiert; dies ermöglicht die Belichtung räumlich definierter Regionen. Die Entstehung der 3D-Proteinstrukturen wurde entweder nach Waschen oder direkt in Echtzeit während des Proteinassamblierens verfolgt. Die Organisation von Proteinen in 3D mit hohem Signal/Rausch-Verhältnis wird in Abbildung 5a und im SI Film 2 gezeigt. Die Belichtungszeit betrug, abhängig vom Volumen der Aktivierung, Sekunden bis Minuten. Multiplex- und 3D-Assemblieren unterschiedlicher Zielproteine wurden durch aufeinander folgendes Binden von GST-eGFP und GST-(PA)m-Cherry erreicht (SI Film 3).

Schließlich konnten die In-situ-Zwei-Photonen-Aktivierung und das Echtzeit-3D-Assemblieren von GST-eGFP demonstriert werden (Abbildung 5b; SI Film 4). Gleichzeitige Photoaktivierung und Aufnahme der Fluoreszenz zeigten, dass bereits eine Minute nach Zwei-Photonen-Aktivierung Proteinstrukturen beobachtet werden können. Die Zwei-Photonen-Aktivierung führt zu Mustern mit einer z-Auflösung von 8 μm (Halbwertsbreite, FWHM), die nahe am theoretischen Limit liegt (Abbildung 5c). Dieser Ansatz ermöglicht somit die Aktivierung und das In-situ-Proteinassamblieren auf schnellem und direktem Wege.

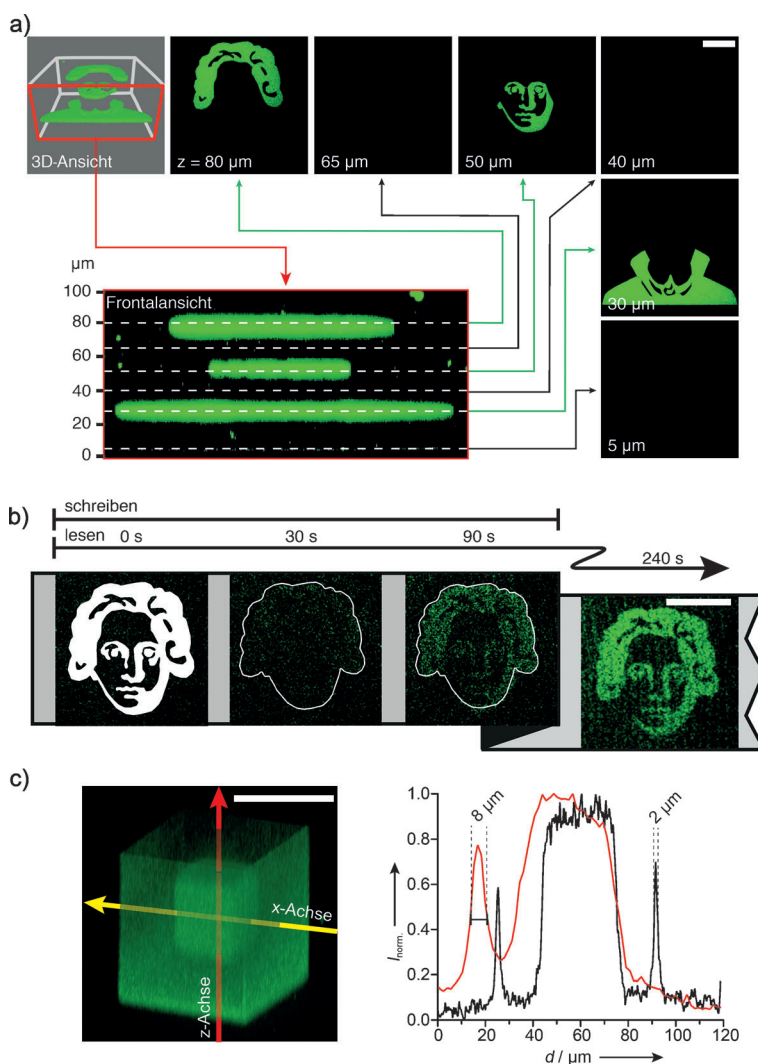


Abbildung 5. Der Aufbau von 3D-Proteinnetzwerken durch Zwei-Photonen-Aktivierung. In GSH^{NDBF}-funktionalisierten Hydrogelen wurde eine Struktur aktiviert, die den Kopf von Johann Wolfgang Goethe zeigt. a) Die 3D-Struktur wurde durch das Assemblieren von GST-eGFP sichtbar gemacht. Die Abbildungen wurden anhand einer Zeitserie von z-Stapelaufnahmen rekonstruiert. b) In-situ-Zwei-Photonen-Aktivierung von GSH^{NDBF} und Strukturierung von GST-eGFP (50 nM). Die Zwei-Photonen-Aktivierung bei 730 nm erfolgte 90 s bei 7-mW-Laserintensität, während die eGFP-Fluoreszenz gleichzeitig mithilfe konfokaler Spinning-Disk-Mikroskopie aufgenommen wurde (siehe SI Film 3). Zur optimalen Darstellung wird die Änderung der Fluoreszenz durch Abzug des Hintergrundsignals zum Zeitpunkt null gezeigt. c) Räumlich verschachtelte Würfelstrukturen. Rechts sind die Intensitätsprofile von eGFP in x- und z-Richtung graphisch dargestellt. Gemessen am unteren Rand der äußeren Box beträgt die Auflösung (FWHM) 8 μm und 2 μm in z- und x-Richtung. Der Maßstabsbalken entspricht bei allen Abbildungen 50 μm .

Mit der neuen GSH^{NDBF}-Verbindung können Proteinwechselwirkungen mit höchster räumlich-zeitlicher Auflösung induziert und gesteuert werden. GSH^{NDBF} weist eine schnelle und wohldefinierte Photoaktivierung auf. Das GSH/GST-Interaktionspaar kann über mehrere Größenordnungen bis in den nanomolaren Bereich durch Licht gesteuert werden. Mithilfe schneller Photoaktivierung in definierten Regionen wurden durch Verwendung von biokompatiblen Hydrogelen unter physiologischen Bedingungen in Zelllysaten 3D-Proteinnetzwerke assembliert. Proteinnetzwerke

können somit unseres Wissens erstmals durch Zwei-Photonen-Aktivierung assembliert und in Echtzeit verfolgt werden, ohne dass zusätzliche Schritte benötigt werden. Auf der Basis einer universellen Funktion und einer breiten Anwendung des GST/GSH-Interaktionspaares kann dieser optochemische Ansatz zukünftig für vielfältige Anwendungen zur Zellmanipulation verwendet werden. Diese Anwendbarkeit des Hydrogelansatzes wurde gerade durch eine aktuelle Arbeit belegt.^[20] Durch Zwei-Photonen-Laseraktivierung können Membran-assoziierte Rezeptoren oder Adhäsionsmoleküle in lebenden Zellen, die in Hydrogele eingebettet werden, organisiert werden. Dadurch können Signalwege auf Wunsch durch Licht angeschaltet und mit bisher unerreichter räumlicher wie zeitlicher Auflösung untersucht werden. Zelladhäsion, -morphologie und -vernetzung könnten durch In-situ-„Photo-Schreiben“ von dafür verantwortlichen Faktoren gesteuert werden.

Eingegangen am 15. November 2013,
veränderte Fassung am 23. Januar 2014
Online veröffentlicht am 11. April 2014

Stichwörter: Immobilisierung · Oberflächenchemie · Photochemie · Protein-Protein-Wechselwirkungen · Zwei-Photonen-Aktivierung

- [1] a) R. G. Wylie, S. Ahsan, Y. Aizawa, K. L. Maxwell, C. M. Morshead, M. S. Shoichet, *Nat. Mater.* **2011**, *10*, 799–806; b) C. A. DeForest, K. S. Anseth, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 925–931.
- [2] G. Bort, T. Gallavardin, D. Ogden, P. I. Dalko, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 4622–4634; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4526–4537.
- [3] a) R. H. Kramer, J. J. Chambers, D. Trauner, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 360–365; b) P. Gorostiza, E. Y. Isacoff, *Science* **2008**, *322*, 395–399; c) A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422–4437; d) V. Gatterdam, T. Stoess, C. Menge, A. Heckel, R. Tampé, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4027–4030; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3960–3963.
- [4] a) A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 441–458; b) X. Tang, I. J. Dmochowski, *Mol. Biosyst.* **2007**, *3*, 100–110; c) C. Grunwald, K. Schulze, A. Reichel, V. U. Weiss, D. Blaas, J. Piehler, K. H. Wiesmuller, R. Tampé, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 6146–6151; d) N. Labòria, R. Wienneke, R. Tampé, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 880–886; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 848–853.
- [5] a) G. C. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619–628; b) H. M. Lee, D. R. Larson, D. S. Lawrence, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 409–427; c) G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020–5042; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921.
- [6] a) J. D. Hoff, L. J. Cheng, E. Meyhofer, L. J. Guo, A. J. Hunt, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 853–857; b) D. Ryan, B. A. Parviz, V. Linder, V. Semetey, S. K. Sia, J. Su, M. Mrksich, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2004**, *20*, 9080–9088.
- [7] a) S. H. Lee, J. J. Moon, J. L. West, *Biomaterials* **2008**, *29*, 2962–2968; b) J. Fischer, M. Wegener, *Laser Photonics Rev.* **2013**, *7*, 22–44.
- [8] Y. Luo, M. S. Shoichet, *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 249–253.
- [9] V. B. Djordjevic, *Int. Rev. Cytol.* **2004**, *237*, 57–89.
- [10] J. D. Hayes, L. I. McLellan, *Free Radical Res.* **1999**, *31*, 273–300.
- [11] a) K. R. Bhushan, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1857–1859; b) J. W. Jung, S. H. Jung, H. S. Kim, J. S. Yuk, J. B. Park, Y. M. Kim, J. A. Han, P. H. Kim, K. S. Ha, *Proteomics* **2006**, *6*, 1110–1120.
- [12] D. B. Smith, K. S. Johnson, *Gene* **1988**, *67*, 31–40.
- [13] C. M. Kolodziej, C.-W. Chang, H. D. Maynard, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 1457–1461.
- [14] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti, G. C. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 35–40.
- [15] a) W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, *Science* **1990**, *248*, 73–76; b) G. C. Ellis-Davies, *ACS Chem. Neurosci.* **2011**, *2*, 185–197.
- [16] a) G. Papageorgiou, J. E. T. Corrie, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3917–3932; b) A. G. Russell, M. E. Ragoussi, R. Ramalho, C. W. Wharton, D. Carteau, D. M. Bassani, J. S. Snaith, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4648–4651; c) J. E. Corrie, V. R. Munasinghe, D. R. Trentham, A. Barth, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 84–97.
- [17] Die Quantenausbeuten der Photoaktivierung wurden zu 0.15 und 0.34 für GSH^{NDBF} bzw. GSH^{NPP} bestimmt.
- [18] F. Schäfer, K. B. Joshi, M. A. Fichte, T. Mack, J. Wachtveitl, A. Heckel, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1450–1453.
- [19] S. Doose, H. Neuweiler, M. Sauer, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 1389–1398.
- [20] C. A. DeForest, K. S. Anseth, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1852–1855; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1816–1819.