

## Proteindimerisierung

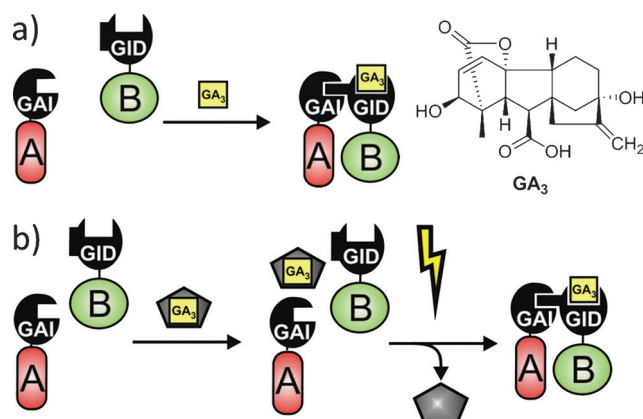
## Lichtinduzierte Proteindimerisierung in lebenden Zellen durch Ein- und Zweiphotonenaktivierung von Gibberellinsäurederivaten\*\*

Korwin M. Schelkle, Tristan Griesbaum, Dirk Ollech, Steffy Becht, Tiago Buckup, Manuel Hamburger und Richard Wombacher\*

**Abstract:** Wir stellen hier ein hocheffizientes Konzept zur lichtinduzierten Proteindimerisierung unter Verwendung photoaktivierbarer Derivate des Phytohormons Gibberellinsäure ( $GA_3$ ) vor. Die entwickelten photoaktivierbaren chemischen Dimerisierungsreagenzien (CIDs) ermöglichen eine präzise räumliche und zeitliche Steuerung intrazellulärer Proteindimerisierungen unter Verwendung von Licht als externem Stimulus. Des Weiteren präsentieren wir eine neue Zweiphotonen(2P)-sensitive Photoschutzgruppe mit außergewöhnlich hohem Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt, welche eine effiziente Freisetzung aktiver  $GA_3$  in lebenden Zellen durch infrarotes Licht erlaubt.

Zelluläre Vorgänge werden durch das räumliche und zeitliche Zusammenspiel von Biomolekülen in hochkomplexen Netzwerken reguliert. Die Fähigkeit, diese Interaktionen schnell und spezifisch zu beeinflussen, ist von zentraler Bedeutung für die Erforschung der Rolle einzelner Biomoleküle im räumlichen und zeitlichen Kontext einer lebenden Zelle oder eines Organismus. Chemische Dimerisierungsreagenzien (CIDs; chemical inducers of dimerization) sind kleine Moleküle, die Proteine in unmittelbare Nähe zueinander

bringen, indem sie an Markierungssequenzen binden, welche mit den Zielproteinen (POI; proteins of interest) fusioniert sind.<sup>[1]</sup> CIDs werden verwendet, um die Interaktion bestimmter Proteine zu erzwingen oder um ein POI seinem subzellulären Wirkungsort zu entziehen, was die spezifische Manipulation zellulärer Prozesse ermöglicht. Kürzlich wurde ein neues CID-System basierend auf dem Diterpen Gibberellinsäure vorgestellt.<sup>[2]</sup> Gibberelline sind Pflanzenhormone, die verschiedene Aspekte des Wachstums und der Entwicklung von Pflanzen regulieren. Die biologisch aktive Gibberellinsäure  $GA_3$  bindet den Rezeptor GID1 („gibberellin insensitive dwarf“)<sup>[3]</sup> und induziert dabei eine Konformationsänderung, die in der Bindung des GID1- $GA_3$ -Komplexes an das Protein GAI („gibberellin insensitive“)<sup>[4]</sup> resultiert (Schema 1 a). So wurde bereits gezeigt, dass ein zellpermea-



**Schema 1.** Induzierte Dimerisierung zweier Proteine A und B, die an GAI bzw. den  $GA_3$ -Rezeptor GID1 gekoppelt sind, durch a) Gibberellinsäure (Strukturformel oben rechts) und b) ein mit einer Photoschutzgruppe versehenes Derivat der Gibberellinsäure, aus welcher durch Lichteinwirkung das aktive Phytohormon freigesetzt wird.

bler Acetoxymethylester der Gibberellinsäure ( $GA_3$ -AM) bei Anwendung auf Säugerzellen durch Esterspaltung mittels endogener Esterasen in seine aktive Form, die freie Gibberellinsäure  $GA_3$ , überführt wird. Des Weiteren ist bekannt, dass die ersten 92 Aminosäuren von GAI ( $GAI_{1-92}$ ) bereits ausreichend für die Ausbildung des stabilen Komplexes zwischen GID1 und GAI sind.<sup>[2b]</sup> Bisher sind die Anwendungsmöglichkeiten von CIDs jedoch aufgrund ihrer unpräzisen regiotemporalen Auflösung limitiert. Photolabile Schutzgruppen, auch bekannt als „Photocaging“-Gruppen, können die biologische Aktivität kleiner Effektormoleküle, mit denen sie verbunden werden, stark beeinflussen.<sup>[5]</sup> Licht er-

[\*] B. Sc. T. Griesbaum,<sup>[†]</sup> M. Sc. D. Ollech, Dr. R. Wombacher  
Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie  
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 364, 69120 Heidelberg (Deutschland)  
E-Mail: wombacher@uni-heidelberg.de

M. Sc. K. M. Schelkle,<sup>[†]</sup> Dr. M. Hamburger  
Organisch-Chemisches Institut  
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 270, 69120 Heidelberg (Deutschland)  
und  
InnovationLab GmbH  
Speyerer Straße 4, 69115 Heidelberg (Deutschland)  
Dipl.-Chem. S. Becht, Dr. T. Buckup  
Physikalisch-Chemisches Institut  
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 229, 69120 Heidelberg (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[\*\*] R.W. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) (SPP1623, WO 1888/1-1) für finanzielle Unterstützung. K.M.S. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Stipendium. Wir danken Prof. U. Müller sowie dem Nikon Imaging Center Heidelberg für die Nutzung der Mikroskope, Dr. C. Tischer und der Advanced Light Microscopy Facility (ALMF) des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) für die Unterstützung bei den 2P-Aktivierungsexperimenten am Fluoreszenzmikroskop sowie M. Best, S. Hauke und M. Petzoldt für die experimentelle Unterstützung.

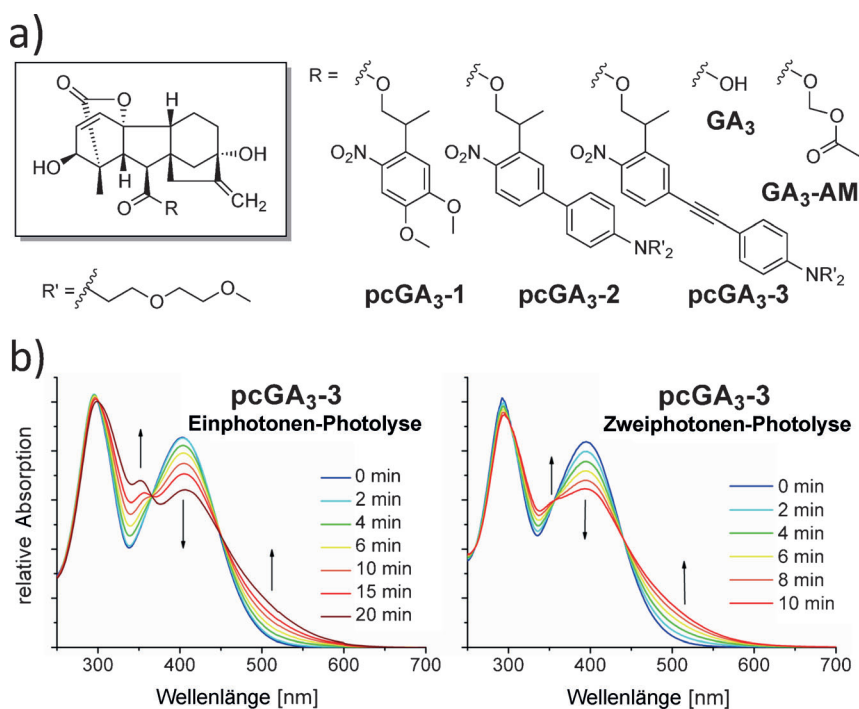


Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201409196> zu finden.

laubt ein hohes Maß an räumlicher und zeitlicher Kontrolle<sup>[6]</sup> und ist somit ein attraktiver, nichtinvasiver externer „Schalter“, der bereits erfolgreich verwendet wurde, um die Lokalisierung,<sup>[7]</sup> Interaktion<sup>[8]</sup> und Aktivität<sup>[7b,9]</sup> von Biomolekülen in lebenden Zellen zu manipulieren. Die hier beschriebene Studie kombiniert die Eigenschaften von GA<sub>3</sub> als CID mit der Anwendung photolabiler Schutzgruppen. Der aus dieser Kombination resultierende photoaktivierbare CID erlaubt eine präzise räumlich-zeitliche Kontrolle der Proteindimerisierung (Schema 1b).

Zwei photoaktivierbare CIDs sind bislang in der Literatur beschrieben worden.<sup>[9a,10]</sup> Beide basieren auf dem bekannten CID Rapamycin,<sup>[1c,11]</sup> wobei einer auf die lichtgesteuerte extrazelluläre Freisetzung von Rapamycin beschränkt ist.<sup>[10b]</sup> Aufgrund des endogenen Zielproteins mTOR („mammalian target of rapamycin“) des Rapamycins ist seine Anwendung in Säugerzellen allerdings nicht unproblematisch. Für das Phytohormon GA<sub>3</sub> hingegen ist bisher kein Zielprotein in Säugetieren bekannt.

Um funktionelle Gruppen der GA<sub>3</sub> zu identifizieren, die sich für eine Modifikation mit einer Photoschutzgruppe eignen, analysierten wir die verfügbare Kristallstruktur des GID1-GA<sub>3</sub>-Komplexes.<sup>[12]</sup> Aus den molekularen Interaktionen des Liganden mit seinem Rezeptor schlossen wir, dass der Carboxylfunktion an C6 eine besondere Bedeutung zukommt. GA<sub>3</sub> ist im GID-GA<sub>3</sub>-Komplex von einer engen Bindetasche umschlossen, sodass auch Modifikationen an anderer Stelle das Bindungsverhalten beeinflussen sollten. Wie Inoue et al. zeigten, wird der Acetoxymethylester GA<sub>3</sub>-AM erst durch die Einwirkung von Esterasen und die damit verbundene Freisetzung von GA<sub>3</sub> biologisch wirksam.<sup>[2b]</sup> Die Synthese eines an der Carboxylfunktion mit einer Photoschutzgruppe versehenen Derivats des Gibberellins GA<sub>4</sub> ist bereits Mitte der 90er Jahre beschrieben worden, hat aber nach unserem Kenntnisstand bisher keine Anwendung gefunden.<sup>[13]</sup> Um zu testen, ob sich GA<sub>3</sub>-Derivate mit photolabiler Modifikation in der C6-Position für die lichtinduzierte Proteindimerisierung eignen, synthetisierten wir die drei GA<sub>3</sub>-Ester pcGA<sub>3</sub>-1, pcGA<sub>3</sub>-2 und pcGA<sub>3</sub>-3, welche sich in der jeweiligen Photoschutzgruppe und ihren spektralen Eigenschaften unterscheiden (Abbildung 1a und Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen). Während pcGA<sub>3</sub>-1 mit der etablierten DMNPP-<sup>[14]</sup> und pcGA<sub>3</sub>-2 mit der kürzlich publizierten EANBP-Photoschutzgruppe<sup>[15]</sup> versehen sind, ist pcGA<sub>3</sub>-3 mit einer neu entwickelten 2-(*o*-Nitrophenyl)propyl-Schutzgruppe derivatisiert, die durch ein erweitertes  $\pi$ -System über ein Absorptionsmaximum bei 400 nm verfügt (Abbildung 1b).



**Abbildung 1.** a) Strukturformeln von GA<sub>3</sub>, dem Acetoxymethylester GA<sub>3</sub>-AM und den photogeschützten Derivaten pcGA<sub>3</sub>-1, pcGA<sub>3</sub>-2 und pcGA<sub>3</sub>-3, die in dieser Arbeit verwendet wurden. b) Links: Veränderung des UV/Vis-Spektrums von pcGA<sub>3</sub>-3 während der Photolyse bei 412 nm (60  $\mu$ M, Phosphatpuffer pH 7.4 mit 3 Vol.-% Dimethylsulfoxid). Rechts: Änderung des UV/Vis-Spektrums von pcGA<sub>3</sub>-3 während der Zweiphotonen-Photolyse bei 800 nm (120  $\mu$ M, Phosphatpuffer pH 7.4 mit 1.1 Vol.-% Acetonitril).

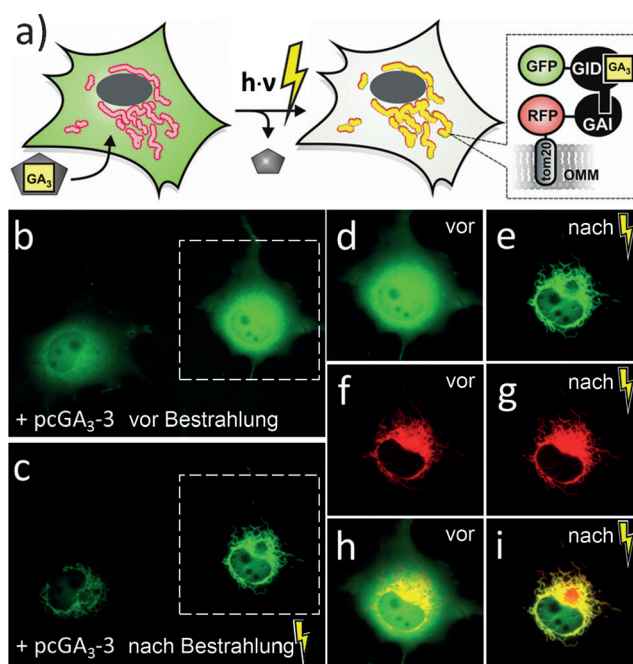
Die Schutzgruppen mit erweiterten  $\pi$ -Systemen wurden ausgehend von 1-Brom-4-nitrobenzol und *N,N*-Bis(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)anilin durch Kreuzkupplung im letzten Schritt synthetisiert, wodurch ein flexibles Protokoll zur Derivatisierung gewährleistet ist. Die Verknüpfung der Photoschutzgruppe mit der Gibberellinsäure erfolgte durch eine Yamaguchi-Veresterung. Die vollständigen Syntheserouten zu den photogeschützten Gibberellinsäurederivaten können den Hintergrundinformationen entnommen werden (Schemata S1–S4).

Die photochemischen Eigenschaften der photolablen Verbindungen wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht (Abbildungen 1b und S1). Die UV/Vis-Spektren, die während der Photolyse von pcGA<sub>3</sub>-3 bei 412 nm aufgenommen wurden, zeigen eine Zunahme der Absorption bei 350 nm sowie zwischen 450 nm und 550 nm, während das anfängliche Absorptionsmaximum bei 400 nm an Intensität verliert. Die beiden isosbestischen Punkte bei 366 nm und 450 nm deuten auf eine selektive und saubere Photolysereaktion hin (Abbildung 1b). Aufgrund ihrer ausgedehnten  $\pi$ -Systeme eignen sich die Photoschutzgruppen von pcGA<sub>3</sub>-2 und pcGA<sub>3</sub>-3 für eine Entschüttung mittels Zweiphotonenabsorption (2PA) bei 800 nm.<sup>[16]</sup> Die EANBP-Schutzgruppe in pcGA<sub>3</sub>-2 wurde vor kurzem zur effizienten 2P-Aktivierung des Neurotransmitters  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) verwendet.<sup>[15]</sup> Die in pcGA<sub>3</sub>-3 verwendete Schutzgruppe mit Diphenylacetylen-Struktur und einer Dialkylaminogruppe in *para*-Position wird hier erstmalig vorgestellt. Die Effizienzen

der 2P-Entschüttung von pcGA<sub>3</sub>-2 und pcGA<sub>3</sub>-3 wurden anhand von Bestrahlungsexperimenten bei 800 nm mit anschließender Umkehrphasen-HPLC-Analyse verglichen, wobei jeweils die Abnahme der Ausgangssubstanzen detektiert wurde (siehe Hintergrundinformationen). Die ermittelte Effizienz der durch Bestrahlung bei 800 nm erreichten Abspaltung der 2P-Schutzgruppe von pcGA<sub>3</sub>-3 war  $1.8(\pm 0.4)$ -fach höher als die der EANBP-Schutzgruppe von pcGA<sub>3</sub>-2.

Nach der erfolgreichen Synthese von drei photolabilen Derivaten der Gibberellinsäure untersuchten wir deren Verwendung für die lichtinduzierte Proteindimerisierung in lebenden Zellen. Hierfür benutzten wir ein fluoreszenzbasiertes Reportersystem aus zytosolisch lokalisiertem EGFP-GID1 (EGFP = „enhanced“ grün fluoreszierendes Protein) und an der äußeren Mitochondrienmembran verankertem TOM20-mCherry-GAI. In Anwesenheit von freiem GA<sub>3</sub> sollte es zur Bildung des EGFP-GID1-GA<sub>3</sub>-Komplexes und dessen Bindung an TOM20-mCherry-GAI<sub>1-92</sub> kommen. Dies könnte durch eine Kolokalisierung der Fluoreszenzsignale von EGFP und mCherry an der Mitochondrienmembran experimentell nachverfolgt werden (Abbildung 2a). Die Zugabe von GA<sub>3</sub>-AM, dem zellpermeablen Acetoxymethylester, führte, wie zuvor beschrieben, binnen weniger Sekunden zu Kolokalisation (selbst unter Verwendung einer Konzentrationen von 100 nM in Komplettmedium). GA<sub>3</sub> hingegen rief diesen Effekt nicht hervor, was den Schluss zulässt, dass freies GA<sub>3</sub> nicht in der Lage ist, die Plasmamembran zu überwinden.<sup>[2b]</sup> Gleichzeitig wurde das als Hinweis darauf gedeutet, dass Ester der Gibberellinsäure im Allgemeinen eine gute Zellpermeabilität aufweisen und wir selbiges für die photolabilen GA<sub>3</sub>-Ester erwarten konnten. Der Acetoxymethylester GA<sub>3</sub>-AM wird innerhalb der Zelle binnen kürzester Zeit von endogenen Esterasen zu aktivem GA<sub>3</sub> umgesetzt. Um die Stabilität der photogeschützten GA<sub>3</sub>-Ester gegenüber Esterasen zu untersuchen, synthetisierten wir den 2-Phenylpropan-1-olester der Gibberellinsäure (GA<sub>3</sub>-PP, Abbildung S3). Diese Verbindung ist in ihrer Struktur nahe mit pcGA<sub>3</sub>-1 verwandt, ihr fehlt allerdings die *o*-Nitrogruppe, wodurch sie unempfindlich gegenüber Licht ist. Dreistündige Inkubation von COS-7-Zellen, die EGFP-GID1 sowie TOM20-mCherry-GAI<sub>1-92</sub> exprimierten, mit GA<sub>3</sub>-PP (1  $\mu$ M) rief keine sichtbare Kolokalisation hervor. Dies legt nahe, dass auch die photogeschützten GA<sub>3</sub>-Ester schlechte Substrate für endogene Esterasen darstellen. Weiterhin konnten wir ausschließen, dass im zeitlichen Rahmen unserer Experimente spontane Hydrolyse die Freisetzung signifikanter Mengen an GA<sub>3</sub> verursacht (Abbildung S3).

Die biologische Aktivität von GA<sub>3</sub> wird in Pflanzen über eine Reihe verschiedener Signalwege reguliert. Einer davon bedient sich der Methylierung der C6-Carboxylfunktion.<sup>[17]</sup> So konnte gezeigt werden, dass *Arabidopsis thaliana* Gene für Gibberellin-Methyltransferasen (GAMTs) besitzt, welche die Methylierung der C6-Carboxylgruppe der Gibberelline katalysieren,<sup>[18]</sup> um diese in ihre inaktive C6-Methylester-Form zu überführen. Somit erhalten wir durch die Veresterung der C6-Carboxylgruppe photoaktivierbare CIDs unter Ausnutzung einer natürlich entwickelte Struktur-Wirkungs-Beziehung der Gibberelline.



**Abbildung 2.** Lichtinduzierte Proteindimerisierung unter Verwendung des photogeschützten Gibberellinsäurederivats pcGA<sub>3</sub>-3. a) Schematische Darstellung des Fluoreszenzsignals bei lichtinduzierter Proteindimerisierung. Die Zugabe photolabiler Gibberellinsäureester bleibt wirkungslos, bis Licht einer geeigneten Wellenlänge verwendet wird, um den aktiven CID GA<sub>3</sub> freizusetzen. b–i) Epifluoreszenzaufnahmen lichtinduzierter Proteindimerisierung in COS-7-Zellen, die EGFP-GID1 und TOM20-mCherry-GAI<sub>1-92</sub> exprimieren und 15 min mit pcGA<sub>3</sub>-3 (1  $\mu$ M, in Komplettmedium (0.001 % Dimethylsulfoxid) bei 37 °C) inkubiert wurden. Die Aufnahmen zeigen die Lokalisation von EGFP-GID1 nach der Inkubation mit pcGA<sub>3</sub>-3 sowie vor und nach 10 s Bestrahlung mit DAPI-gefiltertem Licht (377/50 nm). b) Aufnahme des GFP-Kanals nach der Inkubation mit pcGA<sub>3</sub>-3 vor Bestrahlung mit DAPI-gefiltertem Licht und c) nach Bestrahlung mit DAPI-gefiltertem Licht. d, f, h) Vergrößerungen des weißen Kastens in (b); d) grüner Kanal, vor Belichtung; f) roter Kanal, vor Belichtung; h) Überlagerung beider Kanäle (d) und (f), vor Belichtung. e, g, i) Vergrößerungen des weißen Kastens in (c); e) grüner Kanal, nach Belichtung; g) roter Kanal, nach Belichtung; i) Überlagerung beider Kanäle (e) und (g) nach Belichtung.

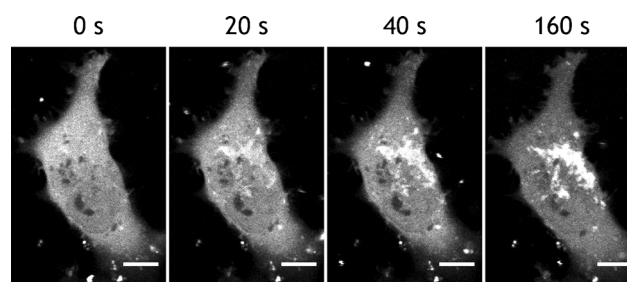
Da sich keine Kolokalisation von GID1 und GAI<sub>1-92</sub> bei Zugabe der photogeschützten Gibberellinsäurederivate beobachten ließ, testeten wir, ob sich die biologische Aktivität von GA<sub>3</sub> durch Belichtung wiederherstellen lässt. Dazu inkubierten wir COS-7-Zellen, welche EGFP-GID1 und TOM20-mCherry-GAI<sub>1-92</sub> exprimierten, mit dem DMNPP-geschützten Derivat pcGA<sub>3</sub>-1 für 5 min und belichteten anschließend für 3 s mit einer Standard-Quecksilberhalogenidlampe und konventionellem DAPI-Anregungsfilter (377/50 nm) (DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol). Unmittelbar nach der Belichtung konnte die Translokation von EGFP-GID1 an die Mitochondrien beobachtet werden (Film S1 und Abbildung S4), was innerhalb von Sekunden zur vollständigen Sequestrierung führte. Die Kolokalisation der EGFP- und mCherry-Signale an den Mitochondrien lässt auf die effiziente Freisetzung ausreichender Mengen biologisch aktiver GA<sub>3</sub> schließen.



Die Verwendung von pcGA<sub>3</sub>-1 als photoaktivierbarem CID in lebenden Zellen erlaubt somit eine hohe zeitliche Kontrolle der Verfügbarkeit der aktiven GA<sub>3</sub>. Darüber hinaus kann Licht als externer Stimulus auch räumlich sehr präzise kontrolliert werden. Um diese räumliche Auflösung für die Anwendung der photoaktivierbaren Gibberellinsäure zu demonstrieren, aktivierten wir pcGA<sub>3</sub>-1 in einer einzelnen Zelle, indem wir mit Laserlicht der Wellenlänge 405 nm einen klar definierten Bereich (ROI; region of interest) bestrahlten. Zwei positiv transfizierte Zellen innerhalb des Sichtfeldes wurden ausgewählt und zunächst ein ROI innerhalb einer dieser beiden Zellen belichtet. Dies hatte die mitochondriale Translokation von EGFP-GID1 in dieser Zelle, nicht aber in der ihr benachbarten zur Folge. Die anschließende Aktivierung von pcGA<sub>3</sub>-1 in der Nachbarzelle führte gleichermaßen zu einer Rekrutierung von zytosolischem EGFP-GID1 an die Mitochondrien und verdeutlicht die hohe räumliche Auflösung der hier vorgestellten photoaktivierbaren CIDs (Abbildung S5).

Als nächstes testeten wir die photogeschützten Gibberelline pcGA<sub>3</sub>-2 und pcGA<sub>3</sub>-3 unter den gleichen experimentellen Bedingungen. Beide Verbindungen können innerhalb von Sekunden effektiv durch Epifluoreszenz-DAPI-Beleuchtung aktiviert werden (Abbildung 2b–i). Da beide Verbindungen gegenüber pcGA<sub>3</sub>-1 rotverschobene Absorptionsspektren (Abbildung S1) aufweisen, konnten wir feststellen, dass bereits eine Belichtung von 10 s mit GFP-gemittelterm Licht die Freisetzung signifikanter Mengen an GA<sub>3</sub> zur Folge hatte (Abbildung S6). Dies muss bedacht werden, wenn pcGA<sub>3</sub>-2 oder pcGA<sub>3</sub>-3 in Kombination mit GFP Anwendung finden sollen. Gleichwohl ist die rotverschobene Absorption beider Photoschutzgruppen von Vorteil, da sie die chromatisch orthogonale Photoaktivierung von pcGA<sub>3</sub>-2 oder pcGA<sub>3</sub>-3 in Kombination mit anderen photoaktivierbaren Effektoren erlaubt, welche unempfindlich gegenüber Licht der Wellenlänge 470 nm sind.<sup>[6,19]</sup> Des Weiteren wollten wir von den hervorragenden 2P-Absorptionseigenschaften von pcGA<sub>3</sub>-3 Gebrauch machen, um aktives GA<sub>3</sub> in lebenden Zellen durch nahinfrarote Bestrahlung bei 800 nm freizusetzen. Zu diesem Zweck verwendeten wir einen experimentellen Aufbau, der die Aktivierung in einem gegebenen ROI mit einem Femtosekunden-Titan-Saphir-Laser erlaubt, während die Bildaufnahme durch reguläre konfokale Einphotonen-Fluoreszenzmikroskopie erfolgte.

Um die Freisetzung von pcGA<sub>3</sub>-3 durch Einphotonenabsorption im Zuge der Fluoreszenzauslesung zu vermeiden, ersetzten wir EGFP in EGFP-GID1 durch das Fluoreszenzprotein mPlum und entfernten mCherry aus dem mitochondrial lokalisierten Konstrukt. Licht der Wellenlänge 594 nm, welches für die Anregung von mPlum verwendet wird, ist nicht in der Lage, die Photoschutzgruppe von pcGA<sub>3</sub>-3 abzuspalten. Wir inkubierten COS-7-Zellen, die mPlum-GID1 und TOM20-GAI<sub>1-92</sub> exprimierten, 5 min mit pcGA<sub>3</sub>-3 und belichteten anschließend einen ROI innerhalb einer einzelnen Zelle mit einem Titan-Saphir-Laser bei 800 nm und 80 mW. Aufnahmen vor und nach der 2P-Aktivierung zeigten eine mit der Zeit zunehmende Akkumulation von zuvor gleichmäßig verteiltem mPlum-GID1 an den Mitochondrien, was auf eine effektive 2P-vermittelte Freisetzung von GA<sub>3</sub>



**Abbildung 3.** Die effiziente Photoaktivierung von pcGA<sub>3</sub>-3 durch 2P-Absorption induziert die Translokation von mPlum-GID1 an die Mitochondrien binnen Sekunden. Konfokalaufnahmen einer COS-7-Zelle, welche mPlum-GID1 und TOM20-GAI<sub>1-92</sub> exprimiert und 5 min mit pcGA<sub>3</sub>-3 (20 μM, in Komplettmedium (0.1 % Dimethylsulfoxid)) inkubiert wurde. Die Aktivierung erfolgte durch einen Titan-Saphir-Laser, der auf 800 nm bei 80 mW eingestellt wurde (siehe Hintergrundinformationen für weitere Einzelheiten). Die Aufnahmen zeigen die zelluläre Verteilung von mPlum-GID1 vor der Aktivierung sowie 20 s, 40 s und 160 s nach der Aktivierung (Maßstab 10 μm).

zurückzuführen ist (Abbildung 3 und Film S2). Da Licht der Wellenlänge 800 nm eine tiefe Gewebepenetration erlaubt und die 2P-Absorption eine hohe räumliche Auflösung in z-Richtung ermöglicht, sind diese Resultate wegweisend für die Anwendung photoaktivierbarer CIDs in Zellkultur bis hin zur Anwendung in Gewebe und lebenden Tieren.<sup>[20]</sup>

Zusammenfassend haben wir photogeschützte Gibberellinderivate für die lichtinduzierte Proteindimerisierung in lebenden Zellen vorgestellt. Die neuartigen photoaktivierbaren CIDs können durch Licht unterschiedlicher Wellenlängen mit hoher räumlicher und zeitlicher Präzision aktiviert werden. Im Kollokalisationsversuch beobachteten wir keine Basalaktivität der GA<sub>3</sub>-Ester, was ein entscheidendes Kriterium für die Anwendung photogeschützter Effektormoleküle darstellt. Weiterhin zeigten wir die Freisetzung von GA<sub>3</sub> durch Ein- und Zweiphotonenabsorption, was das Spektrum potentieller Anwendungen der hier vorgestellten lichtaktivierbaren CIDs erweitert.

Eingegangen am 17. September 2014,  
veränderte Fassung am 28. November 2014  
Online veröffentlicht am 13. Januar 2015

**Stichwörter:** Chemische Dimerisierungsreagentien · Photoaktivierbare Verbindungen · Photolyse · Protein-Protein-Interaktionen · Zweiphotonenaktivierung

- [1] a) J. F. Amara, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 10618–10623; b) R. DeRose, T. Miyamoto, T. Inoue, *Pfluegers Arch.* **2013**, 465, 409–417; c) M. Putyrski, C. Schultz, *FEBS Lett.* **2012**, 586, 2097–2105; d) V. M. Rivera, et al., *Nat. Med.* **1996**, 2, 1028–1032.
- [2] a) Y. C. Lin, Y. Nihongaki, T. Y. Liu, S. Razavi, M. Sato, T. Inoue, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 6450–6454; *Angew. Chem.* **2013**, 125, 6578–6582; b) T. Miyamoto, R. DeRose, A. Suarez, T. Ueno, M. Chen, T. P. Sun, M. J. Wolfgang, C. Mukherjee, D. J. Meyers, T. Inoue, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 465–470.
- [3] M. Ueguchi-Tanaka, et al., *Nature* **2005**, 437, 693–698.
- [4] M. Ueguchi-Tanaka, et al., *Plant Cell* **2007**, 19, 2140–2155.

- [5] a) C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8572–8604; b) C. W. Riggsbee, A. Deiters, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 468–475; c) S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Physiol.* **1993**, *55*, 755–784; d) J. Engels, E. J. Schlaeger, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 907–911; e) J. H. Kaplan, B. Forbush 3rd, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929–1935.
- [6] A. Gautier, C. Gauron, M. Volovitch, D. Bensimon, L. Jullien, S. Vriz, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 533–541.
- [7] a) A. Gautier, D. P. Nguyen, H. Lusic, W. An, A. Deiters, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4086–4088; b) D. P. Nguyen, M. Mahesh, S. J. Elsassner, S. M. Hancock, C. Uttamapinant, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2240–2243.
- [8] a) S. B. Cambridge, D. Geissler, F. Calegari, K. Anastasiadis, M. T. Hasan, A. F. Stewart, W. B. Huttner, V. Hagen, T. Bonhoeffer, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 527–531; b) S. B. Cambridge, D. Geissler, S. Keller, B. Curten, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2229–2231; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2287–2289; c) D. J. Sauers, M. K. Temburni, J. B. Biggins, L. M. Ceo, D. S. Galileo, J. T. Koh, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 313–320.
- [9] a) A. V. Karginov, K. M. Hahn, A. Deiters, *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1148*, 31–43; b) G. Marriott, J. Ottl, M. Heidecker, D. Gabriel, *Methods Enzymol.* **1998**, *291*, 95–116.
- [10] a) A. V. Karginov, Y. Zou, D. Shirvanyants, P. Kota, N. V. Dokholyan, D. D. Young, K. M. Hahn, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 420–423; b) N. Umeda, T. Ueno, C. Pohlmeier, T. Nagano, T. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12–14.
- [11] a) M. Nguyen, G. Huan-Tu, M. Gonzalez-Edick, V. M. Rivera, T. Clackson, K. U. Jooss, T. C. Harding, *Mol. Ther.* **2007**, *15*, 912–920; b) R. Pollock, R. Issner, K. Zoller, S. Natesan, V. M. Rivera, T. Clackson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13221–13226.
- [12] A. Shimada, M. Ueguchi-Tanaka, T. Nakatsu, M. Nakajima, Y. Naoe, H. Ohmiya, H. Kato, M. Matsuoka, *Nature* **2008**, *456*, 520–523.
- [13] J. L. Ward, M. H. Beale, *Phytochemistry* **1995**, *38*, 811–816.
- [14] A. Specht, J. S. Thomann, K. Alarcon, W. Wittayanan, D. Ogden, T. Furuta, Y. Kurakawa, M. Goeldner, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1690–1695. DMNPP = 2-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)propyl.
- [15] L. Donato, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1840–1843; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1876–1879. EANBP = (2-(4'-Bis((2-methoxyethoxy)ethyl)amino)-4-nitro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-1-ol).
- [16] M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning, H. L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3244–3266; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3292–3316.
- [17] S. Yamaguchi, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 225–251.
- [18] M. Varbanova, et al., *Plant Cell* **2007**, *19*, 32–45.
- [19] a) J. P. Olson, M. R. Banghart, B. L. Sabatini, G. C. Ellis-Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15948–15954; b) J. P. Olson, H. B. Kwon, K. T. Takasaki, C. Q. Chiu, M. J. Higley, B. L. Sabatini, G. C. Ellis-Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5954–5957; c) V. San Miguel, C. G. Bochet, A. del Campo, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5380–5388.
- [20] a) D. K. Sinha, et al., *ChemBioChem* **2010**, *11*, 653–663; b) D. K. Sinha, et al., *Zebrafish* **2010**, *7*, 199–204.