

光敏掩蔽基团在化学生物学中的应用

朱洁平¹ 李 峰¹ 李宜明^{2*}

(¹皖西卫生职业学院, 六安 237005; ²清华大学化学系, 北京 100084)

摘要 光敏掩蔽基团技术是通过运用一种由光子控制的光敏化合物, 在光子激发后, 被该化合物掩蔽处于惰性状态的生物活性分子重新被激活、释放以调节生理功能的化学生物学研究方法, 它对生命活动的控制具有实时、原位、精确、快速的优势。该文综述了不同光敏基团的结构与功能, 包括硝基苄基类、香豆素类、喹啉类、吲哚类、硝基二苯并呋喃类等, 它们通过掩蔽神经递质、钙离子、蛋白质、缩氨酸、核苷酸、遗传物质等重要的生理活性物质来高选择性地调控不同的生物学过程。

关键词 光子; 光敏掩蔽基团; 生物活性分子; 光子激发

为了能够在较为精确的时间与空间位置调控活细胞或组织中的生物学过程(包括小分子与生物大分子间相互作用、生物大分子与生物大分子间相互作用以及分子在细胞内及细胞表面的分布及运动), 就需要发展一些能够使用物理方法来进行选择性激活的掩蔽基团。这种基团是一种可将生物活性分子掩蔽的光敏探针, 使其处于惰性状态, 通过选择性的光子激活使这些惰性分子瞬时地转化到活性状态, 随后处于活性状态的分子能够实时、原位地刺激或抑制某一生理过程^[1]。使用这种可调控探针技术, 我们可以主动地在活体细胞或分子水平对有关生物信号转导的研究获取较为直接和准确的可观测信息, 并且有目的性地调控不同生命活动的过程。

近期, 这种使用物理手段选择性激活掩蔽生物活性分子基团的技术已日趋成为化学生物学研究的热点, 已有报道的基团包括硝基苄基类(NBB)^[2]、香豆素类(coumarin)^[3]、喹啉类(quinoline)^[4]、吲哚类(MNI-X)^[5]和硝基二苯并呋喃类(NDBF)^[6]等几种。而对探针的激活主要依赖于传统的单光子激光和具有深度穿透能力、生理兼容性以及精确原位控制的双光子激光技术。目前, 较为重要的控制生命活动的生物分子和第二信使主要包括钙离子、神经递质、核苷酸、蛋白质、缩氨酸以及mRNA、DNA等, 除钙离子外, 所有这些分子都是通过共价键的形式与掩蔽基团相结合。随着掩蔽基团的日趋完善以及双光子技术越来越广泛的应用, 这种化学生物学研究手段已经被更多地运用到对生物学活动规律的解释中,

本文主要对近年来应用较为广泛的光敏基团及运用光子探针技术对生命活动规律的研究进行了综述。

1 光敏基团介绍

1.1 硝基苄基类光敏基团

Barltrop等^[7]在1966年就报道了通过光解硝基苄酯可以生成安息香酸。从那时开始, 硝基苄基类掩蔽基团就被广泛应用于一系列的生物学研究中, 并在研究中发现了一系列的硝基苯类光敏剂, 包括ONB(邻硝基甲苯)类、NBB(2-硝基苄基溴)类、CNB(α -羧基-2-硝基苄基)类、NPE(2-硝基苯乙基)类、DANP(2-(二甲氨基)-5-硝基苯基)类等, 见图1。这一类光敏基团在过去几十年中主要被用于掩蔽Ca²⁺^[8]、羧酸类神经传递素^[9]、谷氨酸酯^[11]、cAMP^[10]、cGMP^[10]和 β -丙氨酸^[11]。但由于其光子截面较小、量子产量不高、水溶性较差且具有一定的生物毒性, 在很多方面限制了它们的应用。

1.2 香豆素类光敏基团

香豆素也是被广泛应用于生物学研究中的一种光敏基团。其光解效率明显高于其它类光敏基团, 在光解时, 对激光强度的要求较低。这就能在保持高的时空分辨率的前提下, 减少对活性细胞的伤害。目前主要的香豆素光敏基团包括HCM(7-羟基-4-甲基香豆素)类、ACM(7-乙酰基-4-甲基香豆素)类、

收稿日期: 2011-04-19 接受日期: 2011-09-29

国家自然科学基金(No.90713009)资助项目

*通讯作者。Tel: 010-62767433, E-mail: lym2007@mail.ustc.edu.cn

MCM (7-甲氧基-4-甲基香豆素)类、DMCM (6,7-二甲氧基-4-甲基香豆素)、Bhc (6-溴-7-4-甲基羟基香豆素)及其派生物DMACM、DEACM、BCMACM等, 见图2。香豆素目前已被成功用于隐蔽磷酸盐类^[12]、羧基化合物^[13]、硫酸盐类^[14]、磺酸盐类^[14]、二醇^[15]和羰基化合物等一系列生物活性物质。

1.3 喹啉类光敏基团

Dore等^[16]于2002年报导了新一代喹啉型双光子光敏基团BHQ, 见图3。该分子带有吡啶环, 因而自身荧光较弱, 而水溶性较好, 中性条件的稳定性较理想, 较适合用于生物学研究。2006年, Dore等^[4]进一

步探讨了BHQ络合磷酸类、二醇类活性分子在生物体内的应用。

1.4 吲哚类光敏基团

MNI-X类双光子光敏基团由Corrie等^[17]于1999年发现, 迄今已被成功用于掩蔽谷氨酸等神经递质, 成为研究神经信号转导的有效工具。遗憾的是, 第一代MNI-X分子的双光子截面非常差。2005年, Ellis-Davies等^[5]在MNI-X上增加了一个硝基和甲氨基, 发现其效果有了不少改进, 见图4。目前, 应用MNI类光子探针对神经系统中信号传导的研究是最为广泛和深入的。

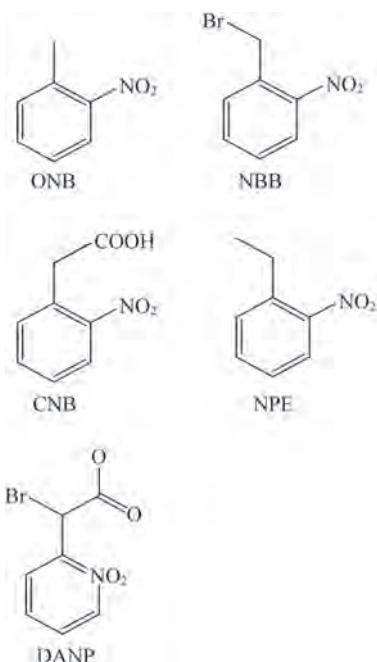


图1 硝基苄基类光敏基团

Fig.1 The photosensitive compound of nitrobenzyl

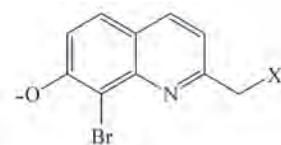


图3 喹啉类光敏基团

Fig.3 The photosensitive compound of quinoline

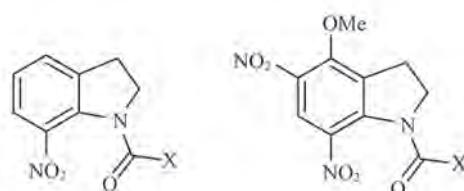


图4 吲哚类光敏基团

Fig.4 The photosensitive compound of indole

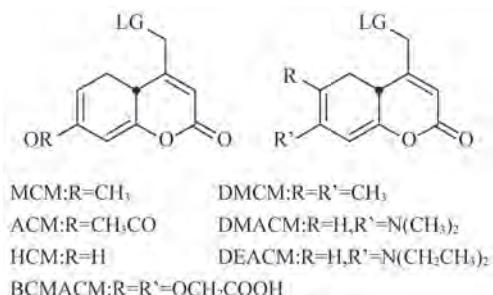


图2 香豆素类光敏基团

Fig.2 The photosensitive compound of coumarin

1.5 硝基二苯并呋喃类光敏基团

Ellis-Davies等^[18]于2006年报道了一类由硝基苯衍生出来的光敏基团, 主要反应生成NDBF-EGTA, 见图5。这是第一类用来掩蔽钙离子的双光子光敏基团, 具有较高的量子产率、足够大的光子截面以及较好的水溶性。NDBF-EGTA的合成方法也为其它金属离子掩蔽基团的发展提供了一种可参考的模式。

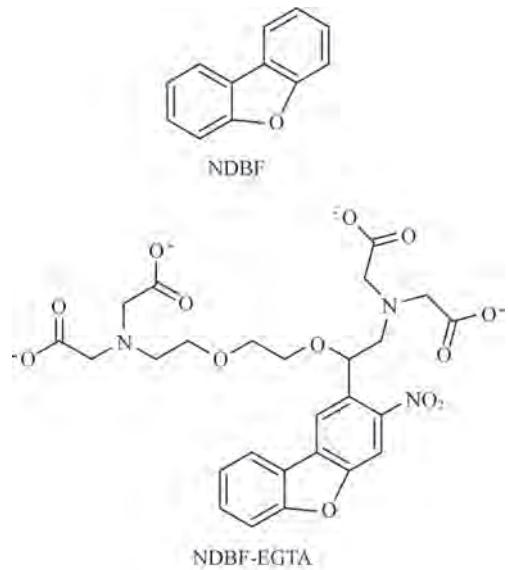


图5 硝基二苯并呋喃类光敏基团

Fig.5 The photosensitive compound of nitrodibenzofuran

2 光子探针在生物学中的应用

2.1 神经递质掩蔽探针

谷氨酸盐(glutamine)是一种兴奋性的神经递质, 在中枢神经系统内突触的兴奋性传递过程中起重要作用, 谷氨酸掩蔽探针已经被生物学家广泛应用到研究神经系统的过程中。1999年, 将被香豆素掩蔽的谷氨酸(Bhc-glu)应用于小鼠的大脑皮层和海马区神经元^[3], 通过双光子激发, 经测定, 大脑皮层出现明显的外向电流, 且电流强度与激发光强和作用时间成正比, 说明释放的谷氨酸与皮层中的感受器结合。同时, 对海马神经元的成像也表明光子探针Bhc-glu具有精确定位、三维成像的特征。初步证明了Bhc是一种具有一定效率的谷氨酸掩蔽基团。同年, MNI-X类光敏基团也被合成用于掩蔽谷氨酸类神经递质^[17], 在与原代培养的大鼠小脑颗粒神经元作用后, 经双光子激发, 使用膜片钳技术测得的内向电流增高, 说明被掩蔽的谷氨酸得到释放并作用于皮层感受器。

2001年, Ellis-Davies等^[19]用MNI-X类光敏基团来定位大脑树突棘的结构和功能的关系, 通过激发被吖噪掩蔽的谷氨酸(MNI-glu), 可以在单一突触水平确定谷氨酸受体的功能, 经分析海马CA1区锥体神经元棘揭示AMPA型谷氨酸受体在蘑菇型棘(mushroom spines)区较充足, 而在丝状伪足和细棘

(thin spines)区分布较为稀疏, 而后者对突触间的信号传递起重要作用。同时, 功能性AMPA受体的分布和棘的几何学形状有紧密的关系。可以推测, 树突棘在脑部皮层的几何学分布是决定突触效率的关键因素, 而且受体的活动被单一棘的水平所控制。同年, 被硝基苯类化合物掩蔽的谷氨酸又被作用于鱿鱼的脑部切片以确定大脑突触处神经递质的传递效率。

2004年, Ellis-Davies等^[20]第一次使用双光子技术激发MNI-glu研究大脑中学习和记忆产生的机制。双光子光敏基团的使用较好地提升了光子探针的效率和应用范围, 尤其是在三维空间提高了探针定位的精确性, 并使得生命活性物质在光子的长时间激发下自身机能不会受到严重的损伤。众所周知, 大脑皮层中锥体神经元的树突会经历活动依赖性的结构重塑, 而这种结构的变化是学习和记忆的细胞学基础^[21]。将MNI-glu作用于已转染入EGFP的海马CA1区锥体神经元棘, 经过910 nm双光子激发, 被刺激的棘在形态学上出现快速的选择性放大, 而这种变化在蘑菇型棘中比较短暂而在小棘(small spines)处较为持久。同时发现棘的这种增大是与被刺激的突触中AMDA受体调节的电流的增强相关的, 并依赖于NMDA (N-甲基-D-天门冬氨酸)受体、钙调蛋白和肌动蛋白的聚合。这就说明单个神经元棘的活动对学习和记忆的产生具有重要的意义, 其中小棘是产生长期突触强化现象的主要位点, 而大棘(large spines)则是产生长期记忆的重要区域, 进一步证实了之前的推测。同年Ellis-Davies等^[5]又在MNI-X上增加了一个硝基和甲氨基得到被修饰的吖噪类掩蔽基团(MDNI-glu), 用来掩蔽谷氨酸类神经递质。将MDNI-glu作用于小鼠脑部海马组织, 经激发活化星状角质细胞内的代谢型谷氨酸感受器, 使组织内的钙离子浓度升高, 以调节机体内钙离子的变化。

天冬氨酸(aspartate)是另一种重要的神经递质, 其D型异构体可以被高亲合力的钠—钾依赖性谷氨酸盐转运体有效的传输, 也是NMDA感受器的高效率配体。为了分析这些蛋白的调控作用, 2005年, Huang等^[27]将MDNI-aspartate作用于贝格曼神经角质细胞和浦野神经元, 结果显示MDNI-aspartate可以用来监控、调节大脑不同区域内谷氨酸盐转运体的作用效率。此外, MDNI-aspartate并未活化神经元

中的 α -氨基羟甲基恶唑丙酸/红藻氨酸感受器和代谢型谷氨酸感受器, 但可以选择性地瞬间活化小鼠海马锥体神经元的NMDA感受器。同时, 在NMDA感受器被活化的过程中可以产生持久的电流, 但缺乏顺势清晰度, 并会产生神经元脱敏现象, 说明掩蔽基团的一些特性还有待改进。

近期, Nikolenko等^[22]使用相似的激发探针对单个细胞间的突触连接进行三维高清晰度的研究, 通过谷氨酸盐在机体神经元细胞中的释放, 观察到了大脑皮层中单细胞间兴奋性的连接过程, 确定了准确的释放部位, 建立了一种研究神经通路活动中单个神经元细胞功能的新思路, 可以从三维空间高清晰度地研究神经递质的释放、传递过程。双光子释放技术成为了一种独特的阐述神经元和细胞运动的分子动力学工具^[23]。

2.2 核苷酸掩蔽探针

核苷酸是一种重要的第二信使, 可以控制细胞的生长、分化、运动以及基因表达。同时, 在调节各项机体功能的过程中起关键的作用。cAMP、cNMP是细胞内的生物活性物质, 对细胞许多代谢过程有重要的调节作用, 被认为是研究核苷酸循环时间、空间动力学的重要工具^[24]。核苷掩蔽探针最早被应用于生物学过程是在1996年, Furuta等^[25]使用基团ACM、MCM掩蔽cAMP, 将其作用于鱼类的载黑素细胞, 在光子激发下释放cAMP驱散黑素细胞, 调节细胞内的活动。2002年, Fedoryak等^[16]合成了效率较高的掩蔽基团BHQ (8-溴基-偏苯三酚), BHQ可以较好地掩蔽调节生理活动的生物活性信使, 瞬时控制组织和细胞中的生物活性信使的释放以及检验两者之间亲和力的变化。

2003年, Hagen等^[26]合成了双光子激发的掩蔽基团DEACM。同年, 将DEACM用于掩蔽调节生理代谢的重要活性物质8-溴-环磷酸鸟苷(8-Br-cGMP), 将DEACM-8-Br-cGMP作用于HEK-293细胞, 经双光子激发后细胞内钙离子浓度升高。同时, 使用膜片钳技术测得8-Br-cGMP具有高效的光释放率。2005年, DEACM又被用于掩蔽cNMP以研究核苷酸循环过程时一空动力学, 在对卵母细胞和HEK-293细胞的研究中发现, 经双光子激发后, 细胞膜电压显著升高^[27], 说明被掩蔽的cNMP迅速释放能促进钙离子分泌以升高膜电压。掩蔽基团DEACM显示出较高的

光敏感性和较好的水溶性, 保证了其调节体内生理功能的可靠性和稳定性。

ATP作为细胞内能量传递的“分子通货”, 负责储存和传递化学能。众所周知, ATP在核酸合成中也具有重要作用, 参与体内脂肪、蛋白质、糖、核酸及核苷酸的代谢, 同时又是体内能量的主要来源。因此, 实时、原位地调节机体内ATP的变化对研究一些生理活动的规律具有积极的意义。2000年, Sven Geibel等^[28]用光敏基团PHP (P3-[2-(4-hydroxyphenyl)-2-oxo])掩蔽ATP去研究钠, 钾-ATP酶的电荷迁移动力学。在光学激发后, 原先失活的ATP得以活化释放, 使得钠, 钾-ATP酶活化进而产生瞬间的电流, 动力学参数与使用平行截流实验获得的结果相似, 说明在正常生理学条件或轻微的偏酸或偏碱的条件下, 分子探针PHP-ATP是一种快速、有效且具有生物相容性的研究ATP驱动的生物学系统的工具。2003年, 适合双光子激发的掩蔽基团DMACM被用来掩蔽ATP、ADP分子^[29], DMACM-ATP、ADP作用于星型角质细胞后, 经双光子激发, 细胞内的钙离子浓度迅速升高, 提示了ATP的大量释放。说明该分子探针具有较好的释放效率, 能用于时间、空间的范围去研究依赖于ATP、ADP的细胞动力学过程。

2.3 钙离子掩蔽探针

钙离子广泛存在于细胞内、外液, 是重要的生理活性物质。作为第二信使, 钙离子在调节细胞信号传导、肌肉收缩、神经突触传递的过程中起重要作用。由于钙离子无法和光敏基团通过共价键结合, 一些对钙离子具有高度亲和力螯合剂BAPTA、EDTA、EGTA等被使用, 这些基团在光子激发下会迅速将螯合的钙离子释放。1997年, Adams等^[6]使用基团Azid-1对钙离子进行掩蔽, 将其与浦横野细胞作用后, 通过光子激发使得钙离子释放, 用来取代正常通过去极化诱导的钙离子释放, 以研究小脑神经突触可塑性的机制及长期抑制效应, 而这种效应是学习和记忆产生的神经元基础。结果显示Azid-1可以作为一种有效的工具在空间和时间层面上去控制钙离子浓度的变化。1999年, 钙离子掩蔽探针也被用来研究细胞质中的ATP在胰腺B细胞中胰岛素胞外分泌的作用^[30]。这种钙离子掩蔽探针的应用为研究一些钙依赖性生物活动提供了新思路。

2006年, 新型双光子控制的钙离子释放探针

NBDF-EGTA^[31]的出现加快了对钙离子掩蔽基团在生命活动中调控作用的研究, 该探针与以往的依靠单光子激发探针相比具有高消光系数、较高的量子产率、较大的光子截面、较快的钙离子释放速度等优势。在生物活体实验中将NBDF-EGTA与豚鼠的贲门肌细胞作用, 在使用双光子激发前加入咖啡因, 使得肌浆网中原有的钙离子释放, 此后, 运用双光子激发含有NBDF-EGTA的心肌组织, 在钙离子指示剂的作用下发现荧光明显增强, 且与光子激发的时间和强度成比例, 说明NBDF-EGTA中掩蔽的钙离子得到释放。同时, 对钙离子释放引起的肌紧张度变化进行了测定, 通过与单光子探针NP-EGTA的比较, 说明在相同的光子能量作用下, 前者引起的肌紧张度约为后者的一倍, 说明探针NBDF-EGTA在生物体内同样具有较好的钙离子释放效率, 适合于将其进一步应用于调节心肌细胞功能的研究中。

2.4 DNA、mRNA掩蔽探针

实时控制基因的表达对于在整个有机体内研究蛋白质功能是非常有意义的, 这也就使得DNA、mRNA掩蔽基团的使用显得非常必要, 它们可以有效地控制DNA、mRNA的表达情况。

1999年, 光敏基团DMNPE被Monroe等^[32]合成用以掩蔽遗传物质。在活体试验中将含有DMNPE掩蔽的编码荧光素酶的质粒转染进入大鼠的皮肤, 在正常情况下荧光素酶不能表达, 在经光子激发后出现荧光, 显示质粒被释放。同样的情况也出现在转染了DMNPE-质粒的HeLa细胞中, 提示: DNA的表达在转录水平被抑制是因为质粒中的mRNA被DMNPE所掩蔽, 只有在光激活的情况下被掩蔽的DNA才能恢复功能。

2001年, Ando等^[12]将基团Bhc-diazo用于掩蔽mRNA。他们将被Bhc掩蔽的GFP mRNA通过显微注射的方式注入斑马鱼胚胎内翻译表达, 用以在三维空间中瞬时、高清晰度地研究基因在胚胎中的表达情况。在测试mRNA体外翻译为蛋白质的实验中, 与正常mRNA可以翻译为蛋白质相比, 被Bhc掩蔽的mRNA未显示翻译后的蛋白质条带, 说明其不能在体外正常翻译。而经光子激发后开始出现蛋白质条带, 且条带的亮度与光子作用时间成正比关系。说明光子可以实时控制mRNA的体外翻译。在体内试验中, 将经Bhc掩蔽的GFP mRNA通过显微注射的方

式进入斑马鱼的胚胎细胞后, 编码GFP的mRNA不能正常表达为绿色荧光蛋白。同样经光子激发后, 细胞显示出荧光信号, 表示GFP mRNA已经部分正常翻译。同样, Bhc-diazo也可被用以掩蔽DNA的功能。以上结果说明使用Bhc掩蔽遗传物质的策略可以实时、原位地控制其功能。

在初步验证了Bhc-diazo的掩蔽效率后, 探针被用于掩蔽*Engrailed-2a* (*Eng2a*)基因^[33]以控制斑马鱼胚胎细胞的发育。*Eng2a*主要表达在围绕中脑和后脑的三角区域, 过量的*Eng2a*在胚胎中的表达会损害眼部的发育, 含有Bhc-*Eng2a* mRNA的胚胎细胞在经光激发后, 胚胎眼部的发育受到影响, 与正常胚胎相比眼部形状明显缩小, 同时诱导了间脑异位顶盖的形成, 说明*Eng2a*的释放影响了胚胎脑部的发育。同时, 经Bhc掩蔽的mRNA也提高了自身在体内的稳定性。这一系列研究说明DNA、mRNA掩蔽探针是一种简单、快速、有效地调节机体生理活动的工具。

2.5 蛋白质、缩氨酸掩蔽探针

蛋白质和缩氨酸是构成生物体的最基本单位, 其结构、功能的变化直接影响着一系列重要的生命活动。肌动蛋白是最早被用来掩蔽的蛋白分子, 运用相似的掩蔽方法, 蛋白激酶A和丝切蛋白也被用于调节生物学活动。

1999年, Walker等^[34]使用氟石胺酸掩蔽缩氨酸来研究其调节细胞内活动的功能。在光激活作用下, 释放的缩氨酸可以阻碍肌浆球蛋白轻链聚合酶和钙-钙调素的活动, 由于这两个因素对细胞的功能起决定性作用, 他们可以控制平滑肌的收缩、调节纤维原细胞的运动。因此, 缩氨酸的释放效率可以用光激发前后对蛋白轻链聚合酶和钙-钙调素的作用效果来判断。将掩蔽的缩氨酸注射进入极化的嗜曙红细胞, 光激活后就会阻碍细胞的运动, 说明细胞中的肌浆球蛋白轻链聚合酶和钙-钙调素的活动较好地被缩氨酸所抑制。

为了进一步探讨细胞的运动规律, 2004年, 另一种光敏基团BNPA被Ghosh等^[35]用来掩蔽一种变异的丝切蛋白S3C。将BNPA-S3C通过显微注射的方式注入细胞内并使其保持活性, 用来研究丝动蛋白在指导细胞运动性方面的功能。在光子激发作用下, 被掩蔽的丝动蛋白恢复活性进而与肌动蛋白结合, 这种结合改变了细胞的极性, 决定了细胞运动的

方向, 说明S3C是指导细胞动力学的一种重要工具。这种掩蔽蛋白的技术提供了一种新颖的方法在时空范围内评定蛋白在完整细胞内的多种功能。

2.6 国内研究动态

近期, 中国科学技术大学的郭庆祥研究小组^[37-38]基于香豆素和喹啉类掩蔽基团设计合成了一系列光敏掩蔽化合物, 并将其用于实时、原位地控制生物活性物质的释放。针对Bhc双光子吸收截面不够大、光解速度慢、水溶性较差及自身荧光强的缺点, 设计合成了新型的喹啉类光敏掩蔽基团, 其水溶性和光解速度有了很大的提高, 具有更低的自身荧光, 更适合应用于生物体系^[36]。在将掩蔽基团成功地应用于模型化合物后, 该研究组首次尝试将新合成的香豆素和喹啉类双光子掩蔽基团应用于实时、原位地控制凝血酶适体(5'-GGT TGG TGT GGT TGG-3')在生命体系中的功能。结果表明, 掩蔽基团可以通过简便、快速的生物正交反应高效地与适体连接以控制适体与特异性靶标蛋白的结合, 并具有较高的掩蔽及恢复效率。此外, 郭庆祥研究小组还成功地将掩蔽的适体应用于在活细胞内控制胞内靶标蛋白的功能^[39]。

3 结语

近年来, 掩蔽基团的运用为在特定的空间-时间角度, 实时、原位地调控生命活动提供了一种有效、快速的手段。尤其是在双光子技术日趋成为研究的主要手段后, 使得研究过程更加精确、深入。然而, 目前应用的主要基团都还存在着水溶性差、双光子吸收截面低、光解量子产率低、光解速度慢等缺陷^[36], 这就使得探针的广泛应用受到了一定的局限。同时, 目前主要用来被掩蔽的分子类型还比较有限, 且对其调控生理机能的研究还不够深入^[40], 仅局限在神经系统、肌肉组织和能量代谢的过程。而一些对生理活动具有调节作用的离子包括钠、钾、镁、锌的研究仍属空白。因此, 寻找性质更加优越的双光子光敏基团、更巧妙地设计其掩蔽探针分子的结合过程, 同时, 将探针分子更加广泛地应用于动态的调节、控制细胞、组织的生理活动将成为今后研究的主要方向。

参考文献 (References)

- 1 Ellis-Davies GCR. Caged compounds: Photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nat Methods* 2007; 4(8): 619-28.
- 2 Pan P, Bayley H. Caged cysteine andthiophosphoryl peptides. *Febs Lett* 1997; 405(1): 81-5.
- 3 Furuta T, Wang SS, Dantzker JL, Dore TM, Bybee WJ, Callaway EM, et al. Brominate 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls: Photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two photon photolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(4): 1193-200.
- 4 Zhu Y, Pavlos CM, Toscano JP, Dore TM. 8-bromo-7-hydroxy-quinoline as a photoremoveable protecting group for physiological use: Mechanism and scope. *J Am Chem Soc* 2006; 128(13): 4267-76.
- 5 Fedoryak OD, Sul JY, Haydon PG, Ellis-Davies GC. Synthesis of a caged glutamate for efficient one- and two-photon photorelease on living cells. *Chem Commun* 2005; (29): 3664-66.
- 6 Adams SR, LevRam V, Tsien RY. A new caged Ca^{2+} , azid-1, is far more photosensitive than nitrobenzyl-basedchelators. *Chem Biol* 1997; 4(11): 867-78.
- 7 Barltrop JA, Plant PJ, Schofield P. Photosensitive protective groups. *Chem Commun* 1966(29): 3664-6.
- 8 Adam W, Moorthy JN, Nau WM, Scaiano JC. Photoreduction of azoalkanes by direct hydrogenab straction from1, 4-cyclohexadiene, alcohols, stannanes, and silanes. *J Org Chem* 1997; 62(23): 8082-90.
- 9 Grewer C, Jager J, Carpenter BK, Hess GP. A new photolabile precursor of glycine with improved properties: A tool for chemical kinetic investigations of the glycine receptor. *Biochemistry* 2000; 39(8): 2063-70.
- 10 Hagen V, Dzeja C, Frings S, Bendig J, Krause E, Kaupp UB. Caged compounds of hydrolysis-resistant analogues of cAMP and cGMP: Synthesis and application to cyclic nucleotide-gated channels. *Biochemistry* 1996; 35(24): 7762-71.
- 11 Niu L, Wieboldt R, Ramesh D, Carpenter BK, Hess GP. Synthesis and characterization of a caged receptor ligand suitable forchemical kinetic investigations of the glycine receptor in the 3-mus time domain. *Biochemistry* 1996; 35(25): 8136-42.
- 12 Ando H, Furuta T, Tsien RY, Okamoto H. Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos. *Nat Genet* 2001; 28(4): 317-25.
- 13 Schade B, Hagen V, Schmidt R, Herbrich R, Krause E, Eckardt T, et al. Deactivation behavior and excited-state properties of (coumarin-4-yl) methyl derivatives. Photocleavage of (7-methoxyxycoumarin-4-yl) methyl-caged acids with fluorescence enhancement. *J Org Chem* 1999; 64(25): 9109-17.
- 14 Geissler D, Antonenko YN, Schmidt R, Keller OO, Krylova B, Wiesner J, et al. (Coumarin-4-yl) methyl esters as highly efficient, ultrafast phototriggers for protons and their application to acidifying membrane surfaces. *Angew Chem Int Edit* 2005; 44(8): 1195-8.
- 15 Lin WY, Lawrence DS. A strategy for the construction of caged

- diols using a photolabile protecting group. *J Org Chem* 2002; 67(8): 2723-6.
- 16 Fedoryak OD, Dore TM. Brominated hydroxyquinolines as a photolabile protecting group with sensitivity to multiphoton excitation. *Org Lett* 2002; 4(20): 3419-22.
- 17 Papageorgiou G, Ogden DC, Barth A, Corrie JET. Photorelease of carboxylic acids from 1-acyl-7-nitroindolines in aqueous solution: Rapid and efficient photorelease of L-glutamate. *J Am Chem Soc* 1999; 121(27): 6503-4.
- 18 Momotake A, Lindegger N, Niggli E, Barsotti RJ, Ellis-Davies GCR. The nitrodibenzofuran chromophore: A new caging group for ultra-efficient photolysis in living cells. *Nat Methods* 2006; 3(1): 35-40.
- 19 Matsuzaki M, Ellis-Davies GCR, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 2001; 4(11): 1086-92.
- 20 Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 2004; 429(6993): 761-6.
- 21 Martens HJ, Hansen M, Schulz A. Caged probes: A novel tool in studying symplasmic transport in plant tissues. *Protoplasma* 2004; 223(1): 63-6.
- 22 Nikolenko V, Poskanzer KE, Yuste R. Two-photon photostimulation and imaging of neural circuits. *Nat Methods* 2007; 4(11): 943-50.
- 23 Noguchi J, Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Kasai H. Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca^{2+} signaling in dendrites. *Neuron* 2005; 46(4): 609-22.
- 24 Watanabe S, Hiratsuka R, Kasai Y, Munakata K, Takahashi Y, Iwamura M. Caged compounds with a steroid skeleton: Synthesis, liposome-formation and photolysis. *Tetrahedron* 2002; 58(9): 1685-91.
- 25 Furuta T, Momotake A, Sugimoto M, Hatayama M, Torigai H, Iwamura M. Acyloxy-coumarinylmethyl-caged cAMP, the photolabile and membrane-permeable of cAMP that effectively stimulates pigment-dispersion response of melanophores. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 228(1): 193-8.
- 26 Hagen V, Frings S, Wiesner B, Helm S, Kaupp UB, Bendig J. [7-(dialkylamino) coumarin-4-yl] methyl-Caged compounds as ultrafast and effective long-wavelength phototriggers of 8-bromo-substituted cyclic nucleotides. *Chem Biol Chem* 2003; 4(5): 434-42.
- 27 Huang YH, Muralidharan S, Sinha SR, Kao JP, Bergles DE. Ncm-D-aspartate: A novel caged D-aspartate suitable for activation of glutamate transporters and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in brain. *Neuropharmacology* 2005; 49(6): 831-42.
- 28 Sven Geibel AB. P3-[2-(4-hydroxyphenyl)-2-oxo] ethyl ATP for the rapid activation of the Na^+ , K^+ -ATPase. *Biophysical J* 2000; 79(3): 1346-57.
- 29 Geissler D, Kresse W, Wiesner B, Bendig J, Kettnermann H, Hagen V. DMACM-caged adenosine nucleotides: Ultrafast phototriggers for ATP, ADR and AMP activated by long-wavelength irradiation. *Chembiochem* 2003; 4(2/3): 162-70.
- 30 Takahashi N, Kadowaki T, Yazaki Y, Ellis-Davies GC, Miyashita Y, Kasai H. Post-priming actions of ATP on Ca^{2+} -dependent exocytosis in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(6): 760-5.
- 31 Ellis-Davies GC. DM-nitrophen AM is caged magnesium. *Cell Calcium* 2006; 39(6): 471-3.
- 32 Monroe WT, McQuain MM, Chang MS, Alexander JS, Haselton FR. Targeting expression with light using caged DNA. *J Biol Chem* 1999; 274(30): 20895-900.
- 33 Fjose A, Njolstad PR, Nornes S, Molven A, Krauss S. Structure and early embryonic expression of the *Zebrafish* engrailed-2 gene. *Mech Dev* 1992; 39(1/2): 51-62.
- 34 Walker JW. Caged lipid and peptide probes of cell signaling. *J Gen Physiol* 1999; 114(1): 1a-23a.
- 35 Ghosh M, Song XY, Mouneimne G, Sidani M, Lawrence DS, Cond-eelis JS. Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* 2004; 304(5671): 743-74.
- 36 Li YM, Shi J, Cai R, Chen XY, Guo QX, Liu L. Development of new quinoline-based photo-labile groups for photo-regulation of bioactive molecules. *Tetrahedron Lett* 2010; 51(12): 1609-12.
- 37 Li YM, Shi J, Luo ZF, Jiang H, Chen XY, Wang FL, et al. Photo-regulation of thrombin aptamer activity using Bhc caging strategy. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19(18): 5368-71.
- 38 Li YM, Shi J, Cai R, Chen XY, Luo ZF, Guo QX. New quinoline-based caging groups synthesized for photo-regulation of aptamer activity. *J Photochem Photobiol A: Chem* 2010; 211(2/3), 129-34.
- 39 Zhang ZP, Li YM, Chen XY, Guo QX. Photoregulation of protein plasmid expression *in vitro* and *in vivo* using BHQ caging group. *Chin Chem Lett* 2011; 22(3): 338-41.
- 40 Haydon PG, Ellis-Davies GCR. Ultrahigh-speed photochemical stimulation of neurons. *Nat Methods* 2005; 2(11): 811-2.

The Application of Photo Caging Group in Chemical Biology

Zhu Jieping¹, Li Feng¹, Li Yiming^{2*}

(¹West Anhui Health Vocational College, Liuan 237005, China; ²Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract The technology of photo-caging group is a novel Chemical-Biology approach, which was used to regulate the mechanism of life science. The term “caging” refers to installation of a photoremovable group on a biologically active molecule and encapsulates molecule in an inactive form. Irradiation with light removes the caging group and restores biological activity. This method provides unique possibilities for controlling bio-molecular function with high spatial and temporal resolution. This paper summarizes the structure and function of these light-sensitive compounds including nitrobenzyl, coumarin, quinoline, indole, nitrodibenzofuran. They adjust diverse biological processes selectively by caging physiological functional molecule such as neurotransmitter, calcium, protein, peptide, nucleotide and germ plasm.

Key words photon; photo caging group; bio-active molecule; light-activated

Received: April 19, 2011 Accepted: September 29, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.90713009)

*Corresponding author. Tel: 86-10-62767433, E-mail: lym2007@mail.ustc.edu.cn