

ESTRATEGIAS FOTOQUÍMICAS PARA EL CONTROL NEURONAL

RAMOS GUERRA, CRISTIAN¹, ESCOLANO MIRÓN CARMEN

Departamento de Farmacología, Toxicología y Química Terapéutica,
Laboratorio de Química Farmacéutica,
Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación
Universidad de Barcelona.

Abstract

Biological processes are regulated with high spatial and temporal resolution. In order to manipulate them and understand the function of certain neural circuits, neuroscience goes beyond classical techniques in search of new methods, to answer questions that could not otherwise be solved. Light is the only external element that allows us to regulate these processes with precise control of essential parameters, such as space, time, and amplitude. The key element of these techniques lies in the photomodulator, as from its molecular design we can determine significant parameters for regulation, such as the bioactive half-life and the wavelength absorbed by the system. This paper looks at the azobenzene molecule, and explains the characteristics that can be modified in order to determine the parameters discussed.

Keywords: photochemistry, photogenetics, azobenzene

Resumen

Los procesos biológicos son regulados con una elevada resolución espacial y temporal. Con la finalidad de manipularlos y poder entender la función de determinados circuitos neuronales, la neurociencia escapa de las técnicas clásicas en búsqueda de nuevas oportunidades, para dar respuesta a incógnitas que no podemos alcanzar con estas estrategias. La luz es el único elemento externo que nos permite regular estos procesos con un control preciso de parámetros esenciales como son el espacio, el tiempo y la amplitud. El elemento clave de estas técnicas radica en el fotomodulador, ya que a partir de su diseño molecular podemos determinar parámetros importantes para la regulación como son el tiempo de semivida de la forma bioactiva y la longitud de onda que absorbe el sistema. En este trabajo nos centraremos en la molécula de azobenceno y explicaremos las características que podemos modificar con la finalidad de determinar los parámetros comentados.

Palabras clave: fotoquímica, fotogenética, azobenceno.

Resum

Els processos biològics són regulats amb una gran resolució espacial i temporal. Amb la finalitat de manipular-los i poder entendre la funció de determinats circuits neuronals, la neurociència escapa de les tècniques clàssiques en la recerca de noves oportunitats per donar resposta a incògnites que no podem resoldre amb aquestes estratègies. La llum és l'únic element extern que ens permet regular aquests processos amb un control precís de paràmetres essencials com són l'espai, el temps i l'amplitud. L'element clau d'aquestes tècniques és el fotomodulador, ja que gràcies al seu disseny molecular ens permet determinar paràmetres importants per a la regulació, com el temps de semivida de la forma bioactiva i la longitud d'ona que absorbeix el sistema. En aquest treball ens centrarem en la molècula d'azobenzè i explicarem les característiques que podem modificar-ne per determinar els paràmetres comentats.

Paraules clau: fotoquímica, fotogenètica, azobenzè.

¹ Doctorando en Química Farmacéutica, Facultat de Farmàcia y Ciencias de la Alimentación. Graduado en Farmacia. (cristianrague7@hotmail.com)

1. Introducción

Entender el papel que ejercen las neuronas en los distintos circuitos neuronales en el control de la homeostasis de nuestro organismo y como puede influir y condicionar un descontrol de estos circuitos a sufrir ciertas enfermedades mentales tipo esquizofrenia o Alzheimer es una de las incógnitas hacia donde se enfocan los objetivos de la neurociencia.

Con el propósito de intervenir en los distintitos procesos biológicos, con la finalidad de variar y determinar una respuesta concreta, la farmacología convencional nos ha aportado gran cantidad de moléculas activas que interaccionan con diversos canales o receptores neuronales pero mantiene muchas limitaciones.

En primer lugar, su administración a estructuras neuronales intactas es lenta e **imprecisa**. En segundo lugar, las moléculas no son totalmente específicas para un subtipo de canal o receptor, ya que tienen **falta de selectividad** hacia una determinada diana por lo que no podemos aislar únicamente un circuito neuronal de otro. Por último, no son capaces de distinguir entre el mismo receptor expresado en distintos tipos de neuronas especialmente entre circuitos entrelazados. (Kramer, Mouro and Adesnik, 2013)

Para saber qué receptores o canales determinados conducen a un circuito neuronal, necesitamos herramientas con una **gran resolución** para interrumpir determinadas conexiones para aislar y entender la función, el mecanismo de acción y la regulación de una proteína específica. La ciencia básica busca la innovación hacia otros métodos externos para modular la actividad de una proteína determinada y observar los efectos producidos cuando se procede a la activación o desactivación intencionadas.

En este contexto, la luz representa el único elemento para el control externo ofreciendo oportunidades incomparables frente a otros métodos de regulación: los fotones como fuente de energía como activadores de procesos fotoquímicos no causan contaminación hacia el objeto de estudio y tienen muy baja o **nula toxicidad** (Velema, Szymanski and Feringa, 2014). Esta técnica no invasiva ofrece una **resolución espacio-temporal muy alta** (Hüll, Morstein and Trauner, 2018), necesaria para el control de compuestos bioactivos y, por último, la regulación de sistemas biológicos puede ser de forma **cuantitativa** como **cualitativa** dependiendo de la intensidad y longitud de onda de los fotones, respectivamente (Velema, Szymanski and Feringa, 2014).

Las estrategias que permiten obtener las numerosas ventajas que ofrece la fotoquímica se clasifican en tres grupos, la fotogenética, la fotofarmacología y la farmacología fotogenética (Figura 1).

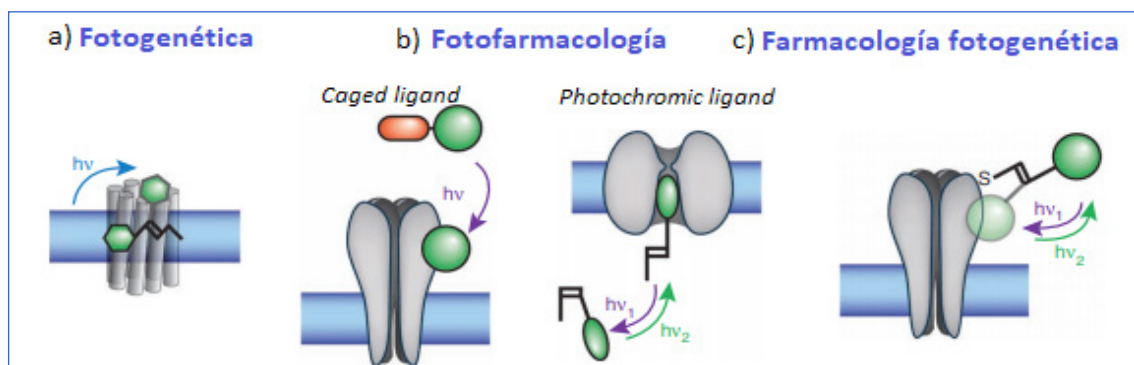


Figura 1. Herramientas foto-químicas para el control neuronal. **a) Fotogenética:** opsina exógena + fotomodulador endógeno. **b) Fotofarmacología:** canal endógeno + fotomodulador exógeno. **c) Farmacología fotogenética:** canal genéticamente modificado + fotomodulador exógeno. Adaptado de Velema, Szymanski and Feringa, 2014.

2. Resultados y desarrollo

2.1. Fotogenética

La base de la fotogenética fue descubierta por Deisseroth y sus colaboradores en 2005. En sus experimentos modificó genéticamente, a partir de un *Lentivirus*, neuronas de mamíferos incorporando en su DNA un gen proteico de siete proteínas transmembrana del canal Rhodopsina-2 (Boyden *et al.*, 2005).

La rodopsina es una proteína transmembrana formada por una parte proteica llamada opsina y una parte no proteica que es un cromóforo de tipo retinal, un derivado de la vitamina A. Éste es capaz de absorber la luz y provocar un cambio conformacional que permite regular la actividad de las neuronas **modificadas genéticamente**. En los estudios demostró una gran resolución espacio temporal reflejada en un control a escala de milisegundos de la transmisión sináptica excitatoria e inhibitoria de la espina neuronal, mostrando un gran potencial para alterar procesos sinápticos a partir de estímulos puntuales.

Sin embargo, la foto-genética presenta ciertas limitaciones (Kasparov and Herlitze, 2013) (Packer, Roska and Häusser, 2013) como la necesidad de integrar genes externos usando la transferencia viral con poca especificidad sin un control adecuado de la modificación genética. Además, la respuesta neuronal generada por los mutantes de la rodopsina no coincide perfectamente con el comportamiento endógeno de las neuronas *wild type*.

2.2. Fotofarmacología

La fotofarmacología escapa de las barreras de la fotogenética con el uso de moléculas químicas fotoactivas diseñadas **específicamente** para un tipo receptor o canal iónico endógeno (Kramer, Mourots and Adesnik, 2013). Permitiendo el control exógeno a partir de la luz de la actividad farmacológica del compuesto regulando su actividad como antagonista/bloqueador o agonista/activador del receptor o canal iónico, sin necesidad de modificar genéticamente para sobre expresar proteínas de opsina en la membrana celular (Fehrentz, Schönberger and Trauner, 2011).

Encontramos dos estrategias generales basadas en la utilidad de moléculas químicas:

2.2.1. Caged ligands

Caged ligands (CL) o ligandos encarcelados es el método más simple y antiguo (Ellis-Davies, 2007), consiste en incorporar un grupo protector **fotolábil** a la molécula que impida su acción farmacológica pero que quede desplazado con la acción de la luz (Gorostiza and Isacoff, 2008).

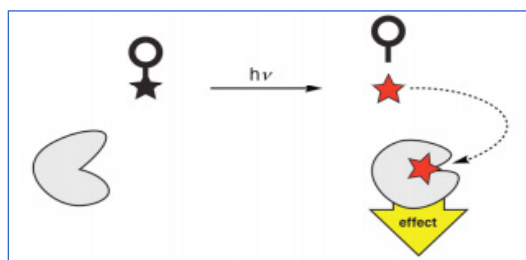


Figura 2. *Caged ligand*. Adaptado de Hüll, Morstein and Trauner, 2018.

La **poca resolución** espacial y temporal limita mucho la interpretación de los resultados ya que el porcentaje de neurotransmisores desprotegidos está determinado por la velocidad de la fotólisis y la resolución espacial del sistema iluminado (Matsuzaki *et al.*, 2001). Además, el hecho de convivir en el espacio sináptico con el neurotransmisor endógeno limita los resultados.

A pesar de su gran utilidad en la neurociencia para estudiar las diferentes conexiones neuronales a partir de neurotransmisores encarcelados, este método tiene muchas limitaciones (Fehrentz, Schönberger and Trauner, 2011). En primer lugar, es un método **irreversible**, por lo que volver a encarcelar el neurotransmisor es muy complicado. Por lo tanto, tendremos una activación o inhibición sostenida del receptor, hasta que el ligando quede fuera de la zona activa por difusión o hasta que se elimine mediante una bomba de reaceptación o por la acción de una enzima.

Por otro lado, la molécula encarcelada puede **perder especificidad** hacia la diana “target” y presentar actividad hacia otro tipo de receptor. Además, la inestabilidad del conjugado no nos garantiza la totalidad del estado desactivado en las condiciones determinadas. Por último, la fotólisis genera subproductos que pueden llegar a ser **tóxicos**.

La solución a estos problemas es la utilización de otros métodos como los *photochromic ligand* (PCL) y *photochromic tethered ligand* (PTL). En ambos casos, un ligando biológicamente activo está unido covalentemente a un *photoswitch* (fotomodulador) de forma que a partir de la luz se modula la rápida y reversible conversión de los dos isómeros conformacionales, *cis* y *trans* de la molécula condicionando su actividad (Mourot *et al.*, 2011).

2.2.2. Photochromic ligand

PCL es un método más complejo que el anterior, ya que añadimos al diseño de la molécula un **cromóforo** que a partir de la absorción lumínica presenta un cambio en su estructura que acaba condicionando la actividad del compuesto hacia uno de los dos isómeros geométricos (Fehrentz, Schönberger and Trauner, 2011) (Figura 3).

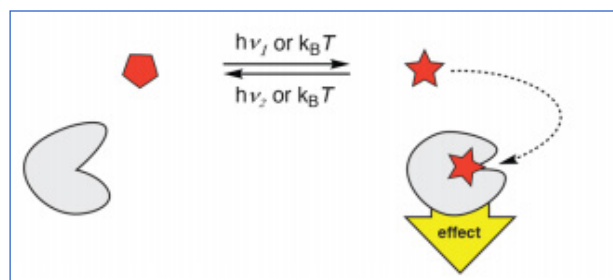


Figura 3. *Photochromic ligand*. Adaptado de Hüll, Morstein and Trauner, 2018.

La principal ventaja respecto a los CL es la **reversibilidad**, que es controlada con la irradiación y, por lo tanto, la desactivación no depende de procesos de difusión ni de la cinética de eliminación de la molécula (Matthew Volgraf *et al.*, 2006). Este hecho incrementa la resolución temporal y espacial del fotomodulador teniendo en cuenta que la reacción fotoquímica es un proceso muy rápido y limpio que no crea subespecies químicas con riesgo de toxicidad.

Esta nueva visión nos aporta otras oportunidades para controlar la excitabilidad neuronal como el receptor de kainato del glutamato con el diseño de un PCL basado en el glutamato.

Este método permite su utilización en receptores endógenos sin la necesidad de modificaciones genéticas aportando nuevas estrategias para solventar los problemas del CL, aunque también presenta ciertos inconvenientes. El principal problema es la **poca especificidad** de los ligandos, ya que los receptores muestran mucha similitud en lugar de acción de la diana con la molécula, incluso en algunos casos son estructuras conservadas (Bregestovski, Maleeva and Gorostiza, 2018).

2.3. Farmacología fotogenética

La farmacología fotogenética combina la fotoquímica con la genética simultáneamente para solventar los problemas de la baja especificidad del ligando. De esta idea nace este nuevo método, en donde el ligando fotosensible es unido covalentemente a la proteína determinada donde buscamos su actividad regulada por la luz (Gorostiza and Isacoff, 2008). El punto innovador de esta técnica es la posibilidad que nos brinda la modificación genética de la diana consiguiendo **una especificidad total** de la molécula y la alta precisión que nos permite la regulación con la luz.

2.3.1. Photochromic tethered ligands

El sistema *photochromic tethered ligand* o PTL requiere tres unidades funcionales: el ligando activo, el fotomodulador y un grupo reactivo que permita la unión covalente con la diana (Figura 4). La mayoría de PTL están enlazados con residuos de cisteína cercanos al centro activo de la proteína que pueden estar introducidos genéticamente o ser endógenos (Kramer, Mourrot and Adesnik, 2013).

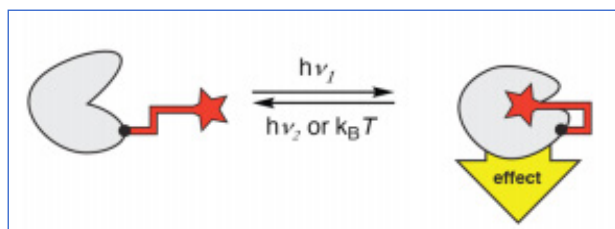


Figura 4. *Photochromic tethered ligand*. Adaptado de Hüll, Morstein and Trauner, 2018.

En general, esta técnica requiere la síntesis química de los PTL y la **mutagénesis** del *target* identificando el sitio idóneo para permitir una fotomodulación óptima, ya que los cambios geométricos de la isomerización reversible de la molécula alejan y acercan el ligando del sitio de unión donde ejercerá su función condicionada por la interacción molecular. Esto ofrece la ventaja de activar o inhibir únicamente la proteína a la que está unido el ligando. Por otro lado, el hecho de necesitar, en algunos casos, la mutación de estas proteínas limita y dificulta su uso en modelos *in vivo* animal y humano (Bregestovski, Maleeva and Gorostiza, 2018).

Uno de los objetivos de este trabajo es la optimización del diseño y síntesis de un PTL basado en el glutamato para estudiar la función de los receptores de kainato. Por eso, nos centraremos en esta técnica para entender el *background* del proyecto (Figura 5).

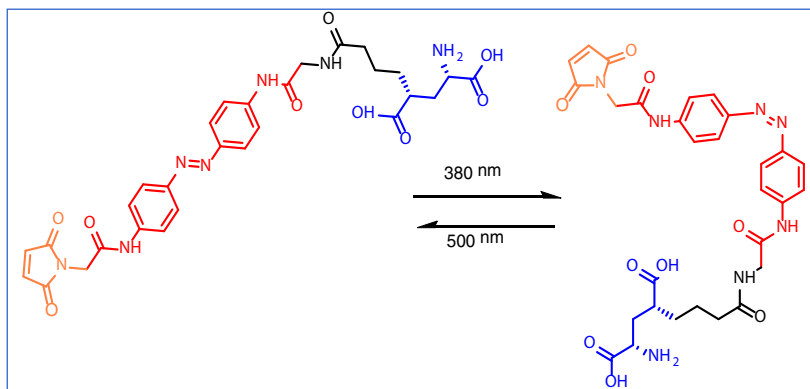


Figura 5. PTL de glutamato (MAG)

MAG, es el compuesto inicial de la primera generación de PTL basados en la unión del un derivado de azobenceno (fotomodulador) mediante un grupo reactivo a una cisteína exógena introducida genéticamente al receptor inotrópico GluK2 que mediante la luz condiciona la actividad de su ligando, el glutamato (Volgraf *et al.*, 2006).

2.4. Fotomoduladores

La base de la fotofarmacología es la introducción de un grupo fotomodulador en la estructura molecular de un compuesto bioactivo que regula su actividad. Este grupo tiene la capacidad de absorber fotones que inducen un cambio **reversible** hacia una de las dos estructuras conformacionales, a lo que se le llama fotocromismo (Brieke *et al.*, 2012) (Klán *et al.*, 2013). Estas dos formas estructurales tienen diferencias en sus propiedades químicas y físicas (García-Amorós and Velasco, 2012) como el potencial redox, intensidad fluorescente, fuerza ácido base, momento dipolar, etc.

Los sistemas fotocromáticos se clasifican en dos categorías diferentes dependiendo de la estabilidad térmica del isómero generado (García-Amorós and Velasco, 2012):

Los isómeros excitados del grupo llamado **tipo T (thermally reversible type)** tienen cierta inestabilidad térmica y la isomerización se puede revertir espontáneamente hacia la forma inicial estable. Dentro de este tipo tienen gran énfasis los azobencenos siendo, probablemente, los fotomoduladores más estudiados (Figura 6, a).

En cambio, cuando el isómero generado es estable no se induce térmicamente la reversibilidad del proceso son los llamados **tipo P (photochemically reversible type)**, como por ejemplo los diariletanos (Figura 6, b).

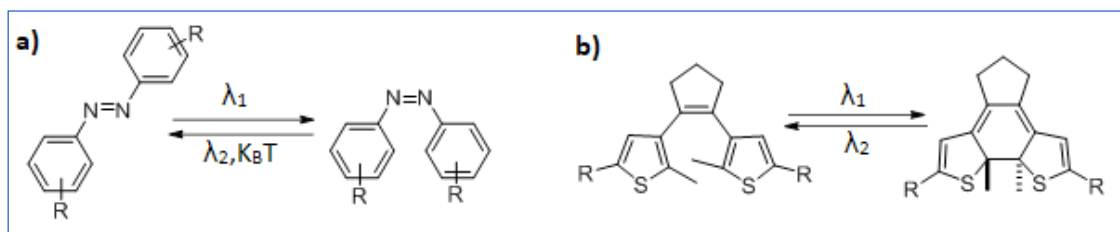


Figura 6. a) Fotoisomerización de azobenceno (*cis-trans*) b) Fotoisomerización de diariletanos (anillo abierto-cerrado).

La fotoisomerización del **azobenceno** induce un cambio en la geometría que se traduce en una **diferencia de polaridad**, ya que el momento dipolar cambia unos 3 D. La relajación hacia el estado termodinámico más estable se puede conseguir con una irradiación a una determinada longitud de onda o se puede producir **espontáneamente**. El tiempo de reversión depende de la estabilidad de la isoforma *cis* (Velema, Szymanski and Feringa, 2014).

2.5. Azobencenos

El azobenceno es un sistema fotocromático de tipo T que se basa en la reversible isomerización entre la forma *trans* y *cis* de la molécula con diferentes estabilidades y propiedades, en consecuencia de un cambio en la organización electrónica y de la estructura nuclear de la molécula sin la ruptura ni formación de enlaces (Velema, Szymanski and Feringa, 2014).

La molécula de azobenceno está formada por dos anillos de fenilo unidos entre sí mediante un enlace *azo*, al tener un doble enlace, existen dos isómeros geométricos. La forma *trans* del azobence-

no es 10-12 kcal/mol y más estable que la forma *cis*, por lo que en la oscuridad el equilibrio se desplaza hacia el isómero dominante en un 99,99% (Samanta and Woolley, 2011). Para aumentar la proporción de la forma *cis* es necesaria la irradiación en una longitud de onda de **340 nm** y para revertir el cambio se puede llevar a cabo mediante una relajación térmica espontánea en la oscuridad o induciéndolo con la irradiación a **450 nm** (Beharry and Woolley, 2011).

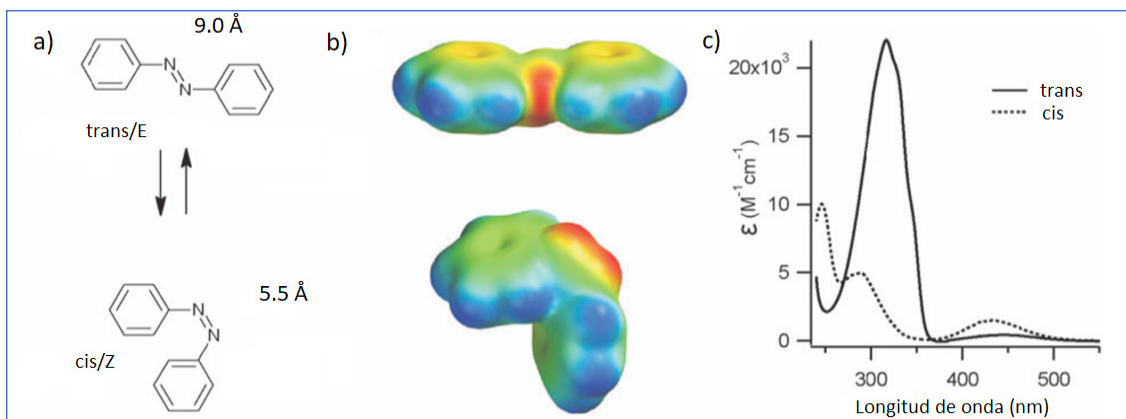


Figura 7. a) Longitud de los isómeros *trans-cis* de azobenceno. **b)** Potencial electrostático del azobenceno (rojo negativo-azul positivo) **c)** Espectro de absorción de los isómeros de azobenceno en etanol. Adaptado de Beharry and Woolley, 2011.

Una de las diferencias que más influyen en las propiedades farmacológicas es el cambio geométrico de la estructura que condiciona el **momento dipolar** y la **longitud** de la molécula. La forma *trans* es una conformación plana que tiene una polaridad prácticamente nula (Takemasa Tsuji *et al.*, 2001) (Figura 7, a b).

En cambio la forma *cis* tiene un momento dipolar aproximadamente de 3 D y por el cambio estructural los fenilos salen fuera del plano unos 55° respecto al enlace azo. Esto se refleja en la distancia entre las posiciones *para* del azobenceno que varía en 3,5 Å entre la forma *trans* y la forma *cis* (Heike Fliegl *et al.*, 2003).

Otra diferencia que además nos permite distinguirlos y detectarlos es el **espectro de absorción** de cada isómero (Beharry and Woolley, 2011) (Figura 7, c). En el caso de la forma *trans* se observa una banda cercana a 440nm propia de la transición electrónica n- π^* y una destacada absorción cercana a 320nm propia de la transición π - π^* .

Respecto a la forma *cis*, también encontramos una banda de absorción cercana a 440nm que refleja la transición electrónica de n- π^* que solaparía con la de la forma *trans* pero en este caso es la absorción más predominante. También se observa a longitudes de onda superiores cercanas a 280nm y 250nm.

2.6 Diseño del azobenceno

Podemos variar la estructura del azobenceno con la finalidad de determinar ciertas características esenciales para mantener parámetros importantes del control cinético de la molécula, como el **tiempo de semivida** del isómero y la **longitud de onda** que absorbe el sistema.

Por una banda, para conseguir la energía necesaria para que se lleve a cabo la isomerización, el sistema debe absorber la longitud de onda determinada que no cause **daños celulares**, con **buena penetración** en los tejidos y que no sea absorbida por cromóforos endógenos.

Variando los sustituyentes *orto/para* del anillo del azoderivado podemos influir en la zona del **espectro de absorción** e intensidad de las bandas.

De esta manera encontramos dos estructuras generales de azobenceno (Beharry and Woolley, 2011).

- **Azobencenos activados:** Los sustituyentes del anillo son grupos donadores como por ejemplo un grupo amino en la posición *para* o *orto*. Este cambio provoca un batocromismo de la transición $\pi-\pi^*$ hacia la zona del espectro visible que solapa parcialmente con la banda de absorción de la transición $n-\pi^*$. El tiempo de semivida del isómero *cis* en este caso se encuentra en una escala de minutos, ya que el paso de *cis* a *trans* se acelera en respecto a la molécula de azobenceno estándar.
- **Azobencenos push-pull:** Con la incorporación de un grupo donador en la posición *para* y un grupo atrayente en la otra posición *para* del azobenceno, se consigue un batocromismo en las transiciones $\pi-\pi^*$ y $n-\pi^*$ hacia la zona del infrarrojo del espectro, por lo que reciben el nombre de *red-shift*. La teoría que explica este efecto mantiene que el estado excitado tiene un momento dipolar mucho mayor que el relajado. Esta gran diferencia de polaridad entre los dos isómeros se refleja en un tiempo de semivida del isómero excitado a escala de segundos o milisegundos, ya que la relajación térmica está muy acelerada en consecuencia de la fuerte substitución *push-pull* de la molécula.

Por otra banda el **tiempo de semivida** del isómero excitado aumenta con respecto a la simetría electrónica de la molécula. De esta manera, la forma *cis* de los azobencenos *push-pull* presenta poca estabilidad teniendo una energía de *cis* a *trans* de escala de milisegundos. El *push-pull* de la molécula permite pasar de *trans* a *cis* con una energía de radiación menor en respecto al azobenceno, suficiente con la absorción de longitudes de onda superiores, con el compromiso de la pérdida de estabilidad de la forma *cis* que se refleja en una semivida más baja en respecto al azobenceno.

También gracias al *push-pull* electrónico, estas moléculas son capaces de absorber dos fotones de igual energía para pasar al estado excitado, la absorción de dos fotones tiene ciertas ventajas respecto a la absorción de un fotón.

2.7. Two-photon absorption

La absorción de dos fotones (*two-photon*) fue analizada teóricamente en 1930 por Göpper Mayer aunque hasta que no se creó el primer laser en 1961 no fue demostrado científicamente (Kaiser and Garrett, 1961). Este proceso es fácil de investigar con laser de pulsaciones a escala de subpicosegundos que fueron disponibles en el año 1990. Webb y sus compañeros inventaron el microscopio de fluorescencia, la rápida adaptación de esta técnica fue un gran paso para estudiar todo tipo de procesos multifotónicos. La absorción de dos fotones es un proceso **no lineal** en el que dos fotones son absorbidos simultáneamente por la misma molécula.

La principal diferencia entre la absorción *one-photon* y *two-photon*, es que en esta última es necesaria la interacción de dos fotones y eso se incrementa con la intensidad de la luz al cuadrado, mientras que la absorción de un fotón es un proceso lineal respecto la intensidad de la luz. Esa es la razón por la que solo se observa este proceso con láseres de gran intensidad, en concreto laser de pulsación que generan picos de elevada densidad fotónica (Bort *et al.*, 2013).

Cuando la molécula absorbe los dos fotones de igual energía, pasa de su estado relajado S_0 al excitado S_1 con el paso por un **estado virtual**, que tiene un tiempo de semivida infinitamente bajo, en el que la energía corresponde a la mitad de la energía final del estado excitado. Por ese motivo es muy difícil que se lleve a cabo ese proceso sin la utilización de láseres con gran intensidad de flujo fotónico y el diseño de moléculas capaces de absorber dos fotones simultáneos.

La mayoría de moléculas orgánicas no tienen la capacidad de absorción simultánea de dos fotones, las características que tienen que cumplir son (Pawlicki *et al.*, 2009):

- Se requiere un sistema de **conjugaciones** π largo y plano.
- Presencia de grupos **donadores** y **activadores** en el sistema para promover la transferencia energética interna.
- Mantener una **simetría** electrónica (Donador- π - π -Donador).
- Incorporación de estructuras ramificadas u oligoméricas.

Pese a la especificidad del diseño molecular, este proceso presenta grandes ventajas respecto a la absorción de un fotón:

- Aumenta la **penetración** en los tejidos: Estos sistemas absorben longitudes de onda del espectro NIR entre 750-1100 nm, estas frecuencias penetran muy bien en los tejidos con poca absorción de los cromóforos biológicos endógenos y poca dispersión de la luz (Bort *et al.*, 2013).
- Reduce el **daño celular**: Pocos sistemas biológicos son capaces de absorber dos fotones, por lo tanto el uso de esta técnica, al evitar longitudes de onda cortas, reduce el daño inducido por la luz (Bort *et al.*, 2013).
- La gran **resolución espacial**: Cuando hablamos de la absorción de un fotón la densidad de excitación en el punto focal del laser es proporcional a la intensidad local, mientras que la densidad en la absorción de dos fotones es proporcional al cuadrado de la intensidad por ese motivo la densidad de excitación se concentra justo en el foco de manera que cuando se aleja del centro focal ésta disminuye muy rápidamente. Este hecho hace que el volumen focal sea muy pequeño y la resolución de la técnica sea muy exacta y precisa (Pawlicki *et al.*, 2009).

3. Discusión

3.1. Optimización de MAG

3.1.1. Estructura activa

Los receptores de glutamato son los principales conductores excitadores del sistema nervioso central de los mamíferos y están involucrados en diferentes procesos fisiológicos como el desarrollo del cerebro, la plasticidad neuronal, la memoria, el dolor, la excitotoxicidad y en las enfermedades degenerativas (Gonzalez *et al.*, 2015) (Zhuo, 2017). Desordenes en la transmisión glutamatérgica induce el descontrol de la inhibición-excitación nerviosa perjudicando como consecuencia a las células neuronales y a la transmisión nerviosa.

Estos receptores son unos de los primeros objetivos para el desarrollo de reguladores fotomoduladores. **MAG** es el primer PTL diseñado para los receptores de glutamato, está formado por tres componentes: Maleimida (grupo reactivo), azobenceno (fotomodulador) y glutamato (ligando). El grupo Maleimida, permite unir covalentemente la molécula al receptor Gluk2 de kainato gracias a la substitución de la lisina endógena de la posición 439 por una cisteína cercana al sitio de unión del glutamato (Bregestovski, Maleeva and Gorostiza, 2018).

Este tipo de receptor llamado **LiGluR** (*light-activated ionotropic glutamate receptor*) es activado cuando la isomerización de *trans* a *cis* de **MAG** es inducida bajo la iluminación a 380 nm, en la forma *cis* el glutamato queda cerca del *binding site* de la proteína y ejerce su función de agonista abriendo el canal de kainato con el consecuente flujo de iones de potasio, sodio y calcio. La relajación térmica de la molécula ($t_{1/2} \sim 25$ min) o la exposición a una iluminación de 500 nm provoca la reisomerización hacia la forma *trans*, más estable, y por lo tanto, la desactivación o el cierre del canal, evitando el flujo de iones y la conducción eléctrica neuronal (Matthew Volgraf *et al.*, 2006) (Figura 8).

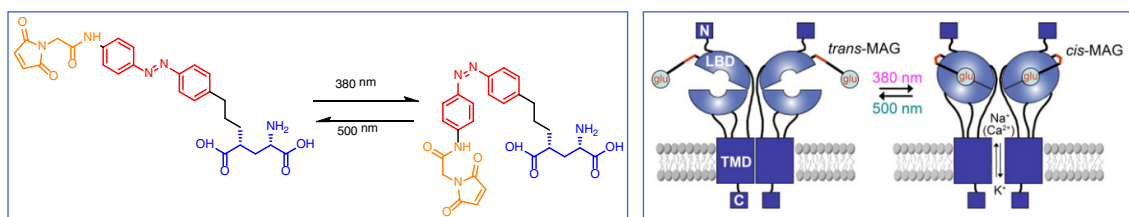


Figura 8. a) Estructura de **MAG**. **b)** Simulación del mecanismo de abertura del canal por la isomerización de **MAG**.

3.1.2 Propiedades de MAG

El Dr. Pau Gorostiza y sus colaboradores examinaron las propiedades de **MAG** en neuronas postnatales del hipocampo, las cuales fueron transfectadas con una construcción de GFP y el receptor iGluR (L439C) (Szobota *et al.*, 2007). En la imagen podemos ver la expresión de fluorescencia de estas neuronas (Figura 9, c). Primero estudiaron la toxicidad de **MAG** hacia las neuronas después de ser conjugado al receptor, se puede apreciar en la grafica que no hay diferencia entre el control y la exposición a concentraciones crecientes del compuesto después de 12 horas de incubación (Figura 9, d).

Como podemos observar en la imagen, las diferentes pulsaciones de luz a las longitudes de onda de isomerización de *trans* a *cis* (380nm) provocan la despolarización de las neuronas por la **abertura** del canal dada la activación de MAG, en cambio cuando se induce la reisomerización de *cis* a *trans* (500nm) la neurona se repolariza (Figura 9, a). Mientras que las neuronas que no fueron transfectadas no responden a los cambios de luz, ya que la ausencia de la cisteína en la posición 439 no permite la unión covalente de **MAG** en la óptima posición que permite la activación-desactivación por el cambio geométrico de la molécula (Figura 9, b).

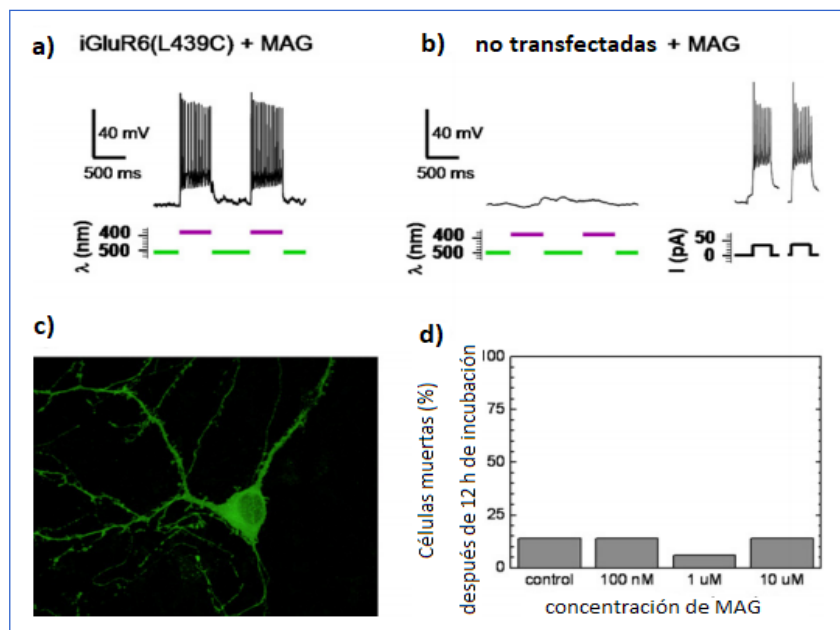


Figura 9. a) Respuestas fotoinducidas de células que expresan el receptor iGluR6(L439C) **b)** Ausencia de respuesta en células no transfectadas **c)** Neuronas del hipocampo identificadas por fluorescencia por la expresión del gen GFP **d)** Porcentaje de células muertas después de la incubación de MAG. Adaptado de Szobota *et al.*, 2007.

El siguiente estudio fue un ensayo *in vivo* en peces cebras con la expresión transgénica del gen LiGluR6 (L439C) bajo el promotor UAS que dirigía la mutación hacia la cabeza (ganglio trigeminal, ganglio vagal y parte posterior del cerebro) y el tronco (neuronas dorsales de la medula espinal), también se vio la expresión del gen en la boca y el corazón de los peces.

Las larvas tenían una capacidad de nadar y una respuesta motor normal, por lo tanto el transgen no perturbó el desarrollo de la función del sistema nervioso central. Además, mantuvieron una respuesta de escape por estímulos mecánicos similar a la de las larvas *wild-type*.

Las larvas fueron incubadas con 125 mM de MAG en 5% DMSO, este tratamiento no influía en sus capacidades de respuesta ni en su supervivencia. Cuando el medio quedaba iluminado bajo una longitud de onda de 365 nm (*trans-cis*) el 25% de las larvas quedaba **paralizado** y no escapaban cuando eran estimuladas mecánicamente con una punta de pipeta. Cuando se utilizó la longitud de onda de 488nm (*cis-trans*) el 82% de esas larvas respondían escapando del estímulo, por lo tanto se **revertió** la respuesta, ya que **MAG** dejaba de interaccionar con el centro activo del receptor. (**Figura 10**).

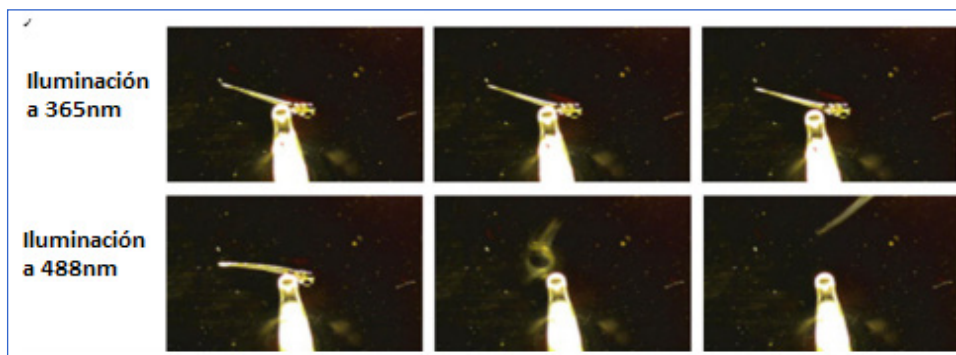


Figura 10. Respuesta de escape de las larvas bajo la irradiación a 365nm y 488nm. Adaptado de Szobota *et al.*, 2007.

Se cree que las larvas no respondían al estímulo local porque no podía ser detectado por la gran actividad de las células sensoriales inducida por la activación de **MAG**. Este experimento muestra la utilidad de la luz para **reproducir y revertir** las manipulaciones en la actividad de neuronas que expresan LiGluR, ya que la reisonerización del compuesto inducía su desactivación. El diferente comportamiento de las larvas depende de la identidad de las neuronas que expresan el gen, por lo tanto podemos estudiar el papel de determinadas neuronas y de circuitos neuronales en las distintas funciones fisiológicas del comportamiento.

Este estudio presenta una serie de dificultades, como la necesidad de expresar **niveles suficientes** de receptor para que influyan en la actividad *in vivo* del organismo y también la **especificidad** de expresión del gen necesaria para poder discernir entre diferentes circuitos neuronales con la finalidad de relacionar la función de cada uno de ellos. Otra limitación es el uso de longitudes de onda del espectro UV que causan **daño celular** y **poca penetración** en los tejidos que podemos evitar optimizando el diseño de **MAG** (Bregestovski, Maleeva and Gorostiza, 2018).

3.1.3 Derivados de MAG absorción 2P NIR

Con el objetivo de solucionar el problema de la utilización de longitudes de onda que causan daño celular y poca penetración en los tejidos, el Dr. Kienzler y sus colaboradores diseñaron un derivado de **MAG**, llamado **MAG₄₆₀ push-pull** con la substitución del grupo acetamido de la posición *4-para* del anillo por una dialquilamina, esto incrementa la densidad electrónica y provoca un **batocromismo** en la

absorción hacia NIR (Kienzler *et al.*, 2013) they have not yet been incorporated into a powerful method to control protein function: the photoswitchable tethered ligand (PTL (Figura 11).

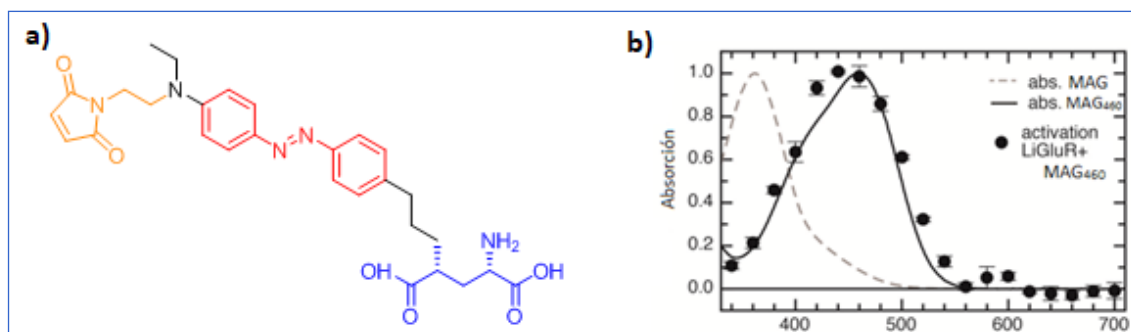


Figura 11: Estructura de MAG_{460} . Espectro de absorción de MAG, MAG_{460} y la activación de LiGluR después de la incubación con MAG_{460} . Adaptado de Kienzler *et al.*, 2013.

El fuerte *push-pull* de la molécula incrementó la absorción a 460 nm respecto a **MAG**. Aunque como consecuencia del cambio estructural, la relajación térmica de *cis* **MAG**₄₆₀ es 2200 veces más rápida por la pérdida de la simetría siendo el tiempo de semivida de 0,71s.

Con la finalidad de aumentar la poca penetración en los tejidos y la baja resolución espacio-temporal de la absorción de un fotón, se establecieron diferentes estrategias de diseño para conseguir la absorción de *two-photon*.

Se sintetizaron derivados de **MAG**_{2P} que incorporan en su estructura molecular un fotosensibilizador que es capaz de absorber luz del espectro NIR vía 2P y por un proceso de **transferencia electrónica** hacia el azobenceno se consigue una energía suficiente para excitar la molécula (Gascón-Moya *et al.*, 2015).

De este modo se sintetizaron dos compuestos que forman parte de una nueva familia de derivados llamados **MAGA**₁ y **MAGA**₂ (Figura 12).

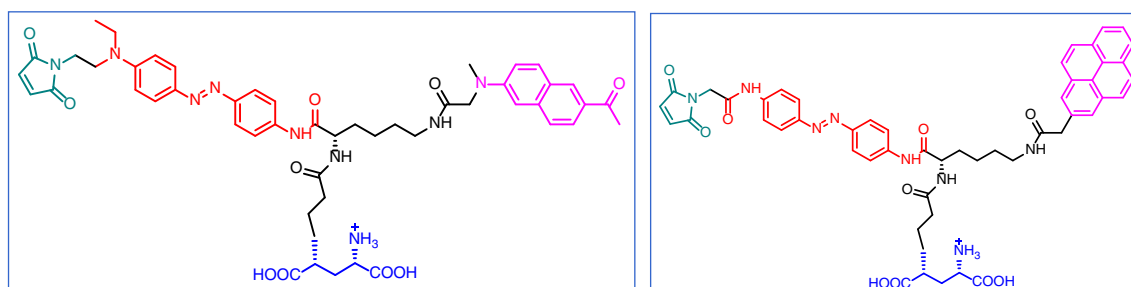


Figura 12: Estructura de **MAGA**₁ y **MAGA**₂.

Estos se diferencian principalmente en los sustituyentes del azobenceno y el fotosensibilizador. En el azobenceno **MAGA**₁ (*push-pull*) se eligió un derivado del **naftaleno** como antena, por sus propiedades de absorción de 2P que además siendo una molécula de pequeño tamaño evita el impedimento estérico para la libre interacción del glutamato en el *binding site* y principalmente porque el largo espectro de emisión de la antena se sobrepone al espectro de absorción del amino-azobenceno. Es imprescindible este solapamiento entre el espectro de absorción del sistema y el espectro de emisión de la antena para que se lleve a cabo la transferencia electrónica.

En el caso del **MAGA**₂, al cambiar los sustituyentes del azobenceno también varía el espectro de absorción, más **hipsocromismo** con respecto a **MAGA**₁. Por lo tanto, se utiliza un derivado del

pireno, ya que su espectro de emisión a 390nm se superpone al rango del espectro de absorción de la transición de π - π^* de *trans* 4,4'-diamidoazobenzene (370nm).

La isomerización de **MAGA₁** se estudió conjuntamente con **MAG_{2p}**, en el experimento se utilizó la excitación bajo un fotón ya que el uso de NIR está indicada para ensayos biológicos en laboratorios bien equipados. Podemos extrapolar los resultados a la absorción de dos fotones cercana a la IR, ya que se ha estudiado extensamente las propiedades ópticas no lineales de las antenas utilizadas (Izquierdo-Serra *et al.*, 2014).

En la Figura 13 a podemos observar cómo influye la sustitución del azobenceno en el batocromismo de absorción de los derivados respecto a **MAG**. La incorporación de la antenna afecta al comportamiento intrínseco de **MAGA₁**, ya que encontramos una nueva banda de absorción sobre los 380nm propia del derivado de naftaleno.

En la Figura 13 b vemos que el espectro de emisión del derivado de naftaleno se superpondría al espectro de absorción de **MAGA₁**. También la diferencia de fluorescencia de la antenna y del compuesto demuestra la eficiente transmisión electrónica, proceso que garantiza la excitación de *trans* **MAGA₁**. Por lo tanto, bajo una irradiación selectiva de la antenna a 355nm por la RET se consigue un 60% de aumento en la foto-conversión de *trans* a *cis* de **MAGA** respecto a **MAG_{2p}** (Figura 13 c).

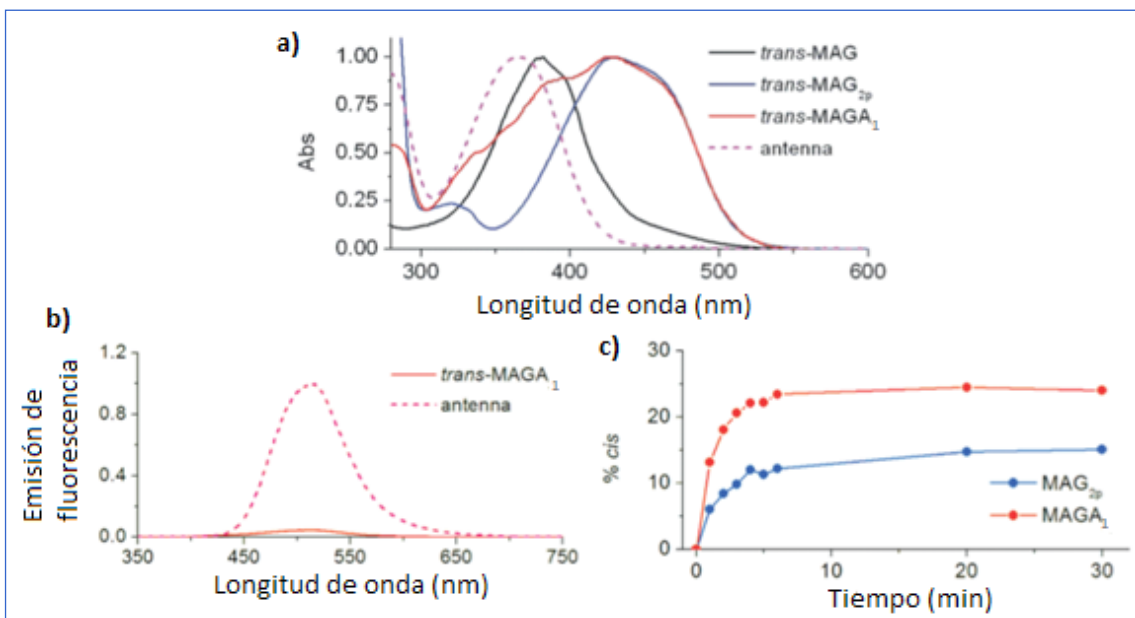


Figura 13: a) Espectro de absorción en DMSO de *trans*-MAG, *trans*-MAG_{2p}, *trans*-MAGA₁ y el derivado de naftaleno (antenna) b) Espectro de emisión de fluorescencia de *trans*-MAGA₁ y la antenna c) Fotoconversión *trans*-*cis* de *trans*-MAGA₁ y *trans*-MAG_{2p} bajo la irradiación a 355nm. Adaptado de Gascón-Moya *et al.*, 2015.

A partir de este derivado se comprueba el correcto funcionamiento de la estrategia de incorporación de una antenna, que por RET permite la absorción de 2P del azocompuesto pero éste presenta una estabilidad térmica muy baja como consecuencia del *push-pull* de la molécula. A temperatura de 298K el tiempo de semivida se reduce a 265ms y la actividad del conjugado se ve reducida

Con el objetivo de mantener la fotoactivación, con luz NIR, prolongada de receptores de glutamato para aplicaciones en la neurociencia se pensó en el diseño de un azobenceno simétrico que garantice un mayor tiempo de semivida de la forma *cis*, de esta forma se sintetizó **MAGA₂**. (Gascón-Moya *et al.*, 2015)

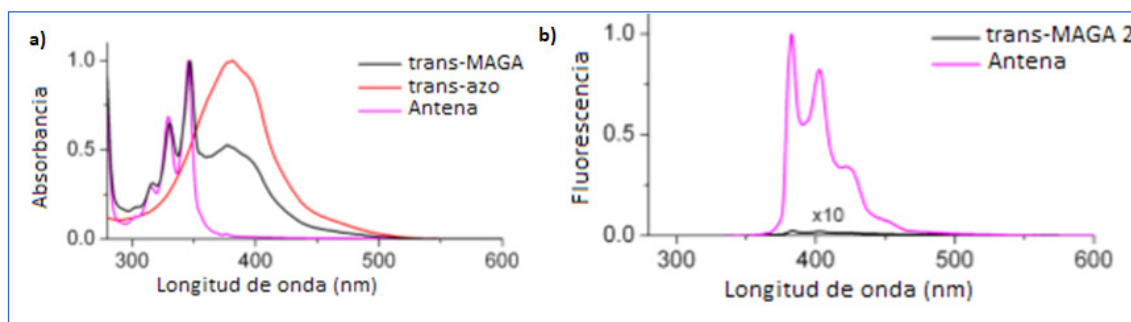


Figura 14: a) Espectro de absorción en DMSO de *trans*-MAGA, *trans*-4-4'-bis(acetalamino)azobenceno (*trans*-azo) y el derivado de pireno (antena) b) Espectro de emisión de fluorescencia de *trans*-MAGA 2 y de la antenna en DMSO. Adaptado de Gascón-Moya *et al.*, 2015.

El gráfico a) de la Figura 14 muestra el espectro de absorción de **MAGA₂** comparado con un derivado de pireno y 4-4'-bis (acetalamino)azobenceno para poder comparar las diferentes bandas de absorción. Como podemos ver hay tres picos de absorción del pirano en 315, 330 y 345 nm que también se observan en **MAGA₂** y no en el azobenceno base, esto demuestra la incorporación de la antenna en el compuesto y que interfieren electrónicamente con la forma *trans* del ligando.

En el gráfico b) de la Figura 14 podemos observar como el espectro de emisión de fluorescencia del pireno se solaparía con el espectro de absorción de **MAGA₂**, esto es un requisito indispensable para garantizar el proceso de RET de la antenna hacia el azobenceno. También se aprecia que la gran emisión detectada del derivado de pireno con un rendimiento cuántico de fluorescencia de 0,30 disminuye con la incorporación del ligando a 0,007, esta reducción se asocia a un gradiente electrónico intrínseco de emisión del cromóforo unido al azobenceno.

Para analizar la estabilidad térmica del isómero *cis*, se estudió la isomerización espontánea de *cis* a *trans* de **MAGA₂** y el derivado azobenceno (*trans*-azo). Se midió la absorción a 380 nm que es una banda de absorción única de la forma *trans*, después de la excitación de los derivados. Como podemos ver en la gráfica la absorción va en aumento, ya que la isomerización *trans* ocurre espontáneamente en la oscuridad.

En concreto el tiempo de semivida de **MAGA₂** y el azobenceno es de 8,7 y 6,8 h respectivamente, lo que nos confirma que este parámetro está influenciado por los sustituyentes del azobenceno (Figura 15).

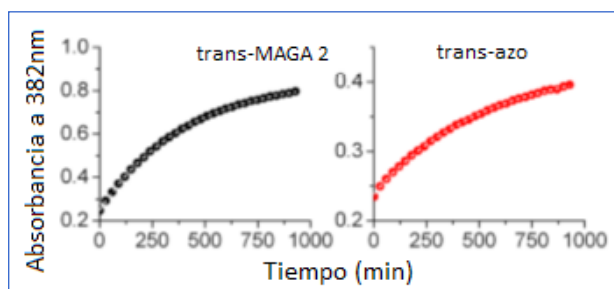


Figura 15: Variación de la absorción en DMSO a 382nm de MAGA 2 y 4-4'-bis(acetalamino)azobenceno. Adaptado de Gascón-Moya *et al.*, 2015.

Es cierto que estos derivados absorben 2P de luz cercana al IR gracias a la RET electrónica de la absorción de la antenna. Pero también presentan ciertas limitaciones, la **actividad biológica** de los compuestos se ve comprometida, ya que la incorporación de un grupo lipófilo como el naftaleno o el derivado del pireno disminuye mucho la **solubilidad** en agua, también afecta a la **conjugación** sobre

la cisteína del receptor Gluk2 reduciendo la afinidad del glutamato al sitio de unión de la proteína (Cabré *et al.*, 2019).

3.1.4 Derivados de MAG absorción 2P NIR con estabilidad térmica

A razón de estos problemas, se diseñó un derivado de **MAG** con alta actividad biológica mediante la absorción de 2P de luz cercana al infrarrojo y con un largo tiempo de semivida del isómero *cis*. Para llegar a este objetivo se seleccionaron sustituciones precisas en el núcleo azoaromático del sistema que permitan la asimetría electrónica con la finalidad de absorber NIR pero sin que repercuta en la estabilidad térmica del isómero *cis* (Cabré *et al.*, 2019).

Se ha visto que la manera más eficiente de aumentar la sección transversal de absorción de los azobencenos en la absorción de 2P radica en la sustitución *push-pull* del núcleo aromático, aunque la introducción de grupos donadores y/o aceptores de electrones acelera la reisolomerización de *cis* a *trans* en la oscuridad, ya que la estabilidad depende de la simetría electrónica.

Por lo tanto en la búsqueda de derivados azo con valores altos de absorción 2P y de tiempo de semivida de *cis*, se diseñaron racionalmente una serie de modelos de fotocromos azoaromáticos calculando la absorción de 2P y la estabilidad térmica de *cis* a partir de la teoría del funcional de la densidad tiempo-dependiente para tratar sistemas excitados.

El diseño de fotocromos azoaromáticos ligeramente asimétricos electrónicamente con donadores y aceptores mesoméricos débiles aumenta la absorción de 2P y el tiempo de semivida de la isoforma *cis*. Con la incorporación de un donador inductivo fuerte en el anillo aromático surgen candidatos ideales para la preparación de interruptores con alta actividad 2P para aplicaciones biológicas.

Alentados por los resultados teóricos, se diseñaron dos PTL con el cromóforo azoico de los modelos de **Azo1** y **Azo2** para la preparación de MAG_{2P}^{slow} y MAG_{2P-F}^{slow} , respectivamente (Figura 16). Empleando enlaces similares a los utilizados en **MAG** para unir el grupo de maleimida y el glutamato al núcleo de azobenceno. De esta forma, se favorece la accesibilidad sintética, la excitación selectiva del isómero *trans* y la replicación de su control por la luz de LiGluR.

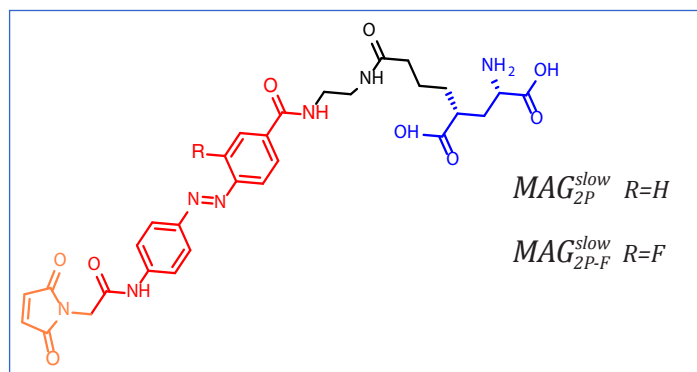


Figura 16: Estructura de MAG_{2P}^{slow} y MAG_{2P-F}^{slow}

Como podemos ver en las siguientes gráficas, el espectro de absorción de estos derivados son similares a los de **MAG** en cambio difieren con el de MAG_{2P} , ya que no se mantiene el fuerte *push-pull* de esta molécula, lo que se refleja en el largo tiempo de semivida de la isoforma *cis* de estos nuevos compuestos (Figura 17 a b).

Se comprobó la actividad fisiológica de MAG_{2P}^{slow} y MAG_{2P-F}^{slow} en células modificadas genéticamente para la expresión del receptor GluK2-L439C y una proteína fluorescencia que regula su intensidad según la concentración de calcio que permite visualizar su actividad intrínseca. En la figura 17

c se muestra la respuesta de *calcium imaging* en estas células después de la conjugación con **MAG**, **MAG_{2P}^{slow}** y **MAG_{2P-F}^{slow}**, posteriormente el cultivo se sometió a dos ciclos consecutivos de fotoestimulación con luz violeta (405 nm) seguidos de dos ciclos de excitación 2P con radiación NIR (780 nm). Después de cada estimulación, LiGluR se desactivó con la irradiación de luz verde (405 nm).

En caso de **MAG**, bajo la irradiación de NIR, no se observaron señales de fluorescencia, ya que no se produjo la activación de los receptores LiGluR por la nula fotoisomerización *trans-cis* de la molécula a causa de la deficiente absorción de 2P del sistema.

Con los compuestos **MAG_{2P}^{slow}** y **MAG_{2P-F}^{slow}** se observó actividad intracelular bajo la irradiación de luz NIR por la eficiente absorción de 2P de los sistemas, debido a la asimetría electrónica, **MAG_{2P}^{slow}** presenta el valor de σ_2 más alto. Se comprobó que la estimulación de LiGluR tras la conjugación con este compuesto era reproducible y repetitiva con una variación insignificante en la respuesta de imagen de calcio después de cuatro ciclos consecutivos de luz, lo que demuestra el bajo fotodaño celular de esta técnica.

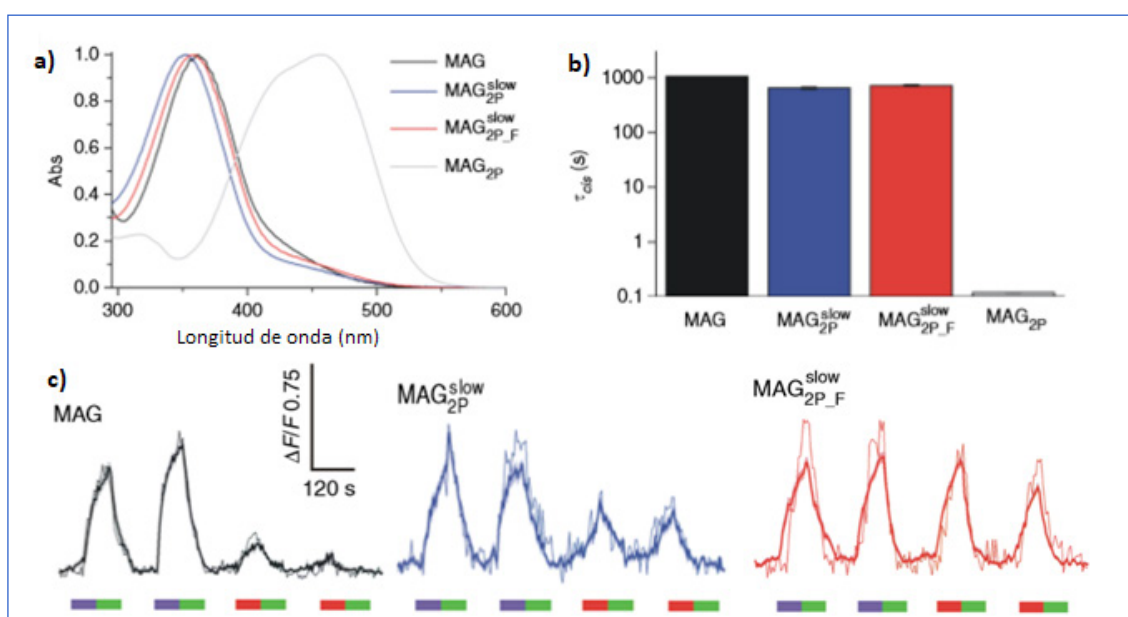


Figura 17: **a)** Espectro de absorción de *trans*-MAG, *trans*-MAG_{2P}^{slow}, *trans*-MAG_{2P-F}^{slow} y *trans*-MAG 2P **b)** Tiempo de semivida de *cis*-MAG, *cis*-MAG_{2P}^{slow}, *cis*-MAG_{2P-F}^{slow} y *cis*-MAG 2P **c)** *Calcium imaging fluorescence* de células (HEK293) que expresan Gluk2-L439C. Adaptado de Cabré *et al.*, 2019.

A pesar de todas las ventajas que aporta la absorción 2P de luz NIR en los ensayos biológicos, esta técnica presenta una limitación importante. El hecho de requerir la **manipulación genética** para expresar una cisteína, en este caso, que sirva como punto de unión entre el receptor y el ligando es un problema, ya que la expresión en la membrana del receptor puede ser poca, lenta, no uniforme o incluso, que no sea posible llevarla a cabo en algunos organismos. Además la sobreexpresión de proteína exógenas puede interrumpir la maquinaria de expresión celular e interferir en la fisiología normal de las células, incluso pueden causar respuestas inmunes contra esta proteína exógena.

3.1.5 Targeted covalent photoswitches

Para conseguir la unión covalente entre el PTL y la diana **endógena**, es necesario un grupo reactivo con gran electrofilia que permita la interacción entre grupos hidroxilos y aminas, presentes en las cadenas de numerosos aminoácidos. Sin embargo, estos grupos también están presentes en diversos li-

gandos incluyendo los neurotransmisores, por lo que la estabilidad del PTL se vería comprometida por su fuerte tendencia a reaccionar entre ellos.

Para solucionar este problema se ha diseñado una nueva estrategia llamada *targeted covalent photoswitches* (TCP's). En el que se mantiene la estabilidad del PTL con un grupo de corta vida altamente reactivo para conseguir la unión covalente con la proteína. En esta estrategia de *click chemistry* separa en dos el PTL diseñado para el receptor de kainato. Por un lado tenemos la cabeza de la molécula que incluye el ligando, el linker y el fotomodulador, y por el otro lado tenemos la cola, con el segundo linker y el grupo reactivo (Izquierdo-Serra *et al.*, 2016).

De esta forma se diseñó una librería de compuestos para estudiar la versatilidad de esta nueva estrategia y buscar la mejor combinación *head-tail* (el grupo reactivo óptimo y la longitud de la molécula adecuada) (Figura 18).

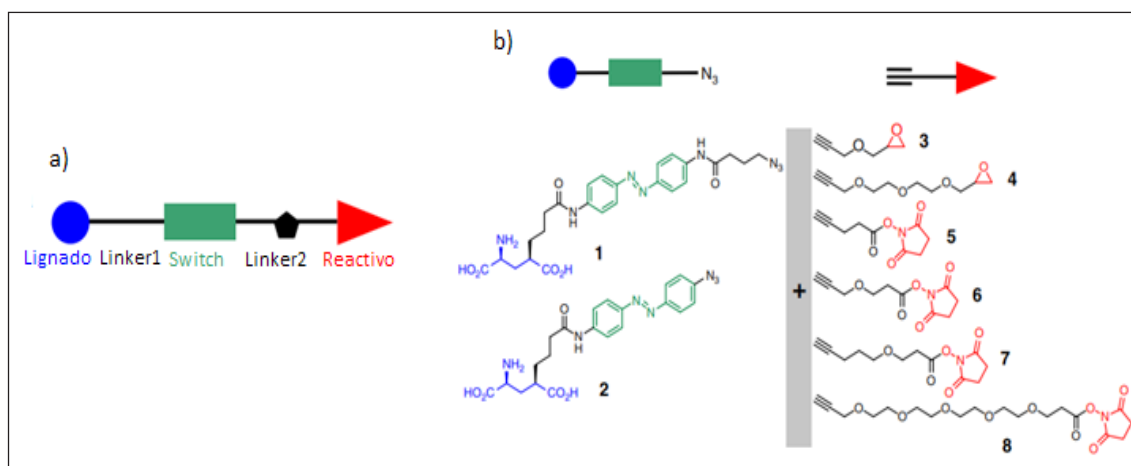


Figura 18: a) Esquema de la click chemistry b) Diferentes combinaciones de los compuestos estudiados. Adaptado de Izquierdo-Serra *et al.*, 2016.

Este set de PTL difiere en la longitud de los aductos con la proteína, los linkers y los grupos reactivos que se refleja en los sitios de conjugación con el receptor de kainato.

Estos grupos reactivos son inestables en medio acuoso por lo que los compuestos PTL se prepararon instantáneamente antes de ser ensayados en células que expresan GluK1 que se incubaron con concentraciones de los compuestos entre 12- 25 μ M durante 2-10 min. Después del lavado, las células fueron viables y se procedió a la incubación con concanavalina A para bloquear la desensibilización de GluK1, seguidamente se evaluó la conjugación del PTL con la perfusión de agonistas, antagonistas competitivos y ciclos de iluminación violeta y verde para provocar las fotocorrientes. Se estudió si los electrófilos seleccionados permitían una conjugación eficiente con GluK1 en las condiciones experimentales.

Los PTL que tenían epóxidos como grupos reactivos no producían corrientes dependientes de la luz lo que refleja la deficiente conjugación con el receptor. En cambio, los demás PTL acabados con el grupo succinimida permitían el fotocontrol de las corrientes de GluK1, en concreto los compuestos 9 y 10 (figura 18, 9=1+6; 10=2+8) mostraban intensos estímulos bajo el fotocontrol que permanecían invariables a lo largo del experimento a pesar del lavado de la incubación, lo que sugiere la fuerte unión covalente del PTL con el receptor (Figura 19 a).

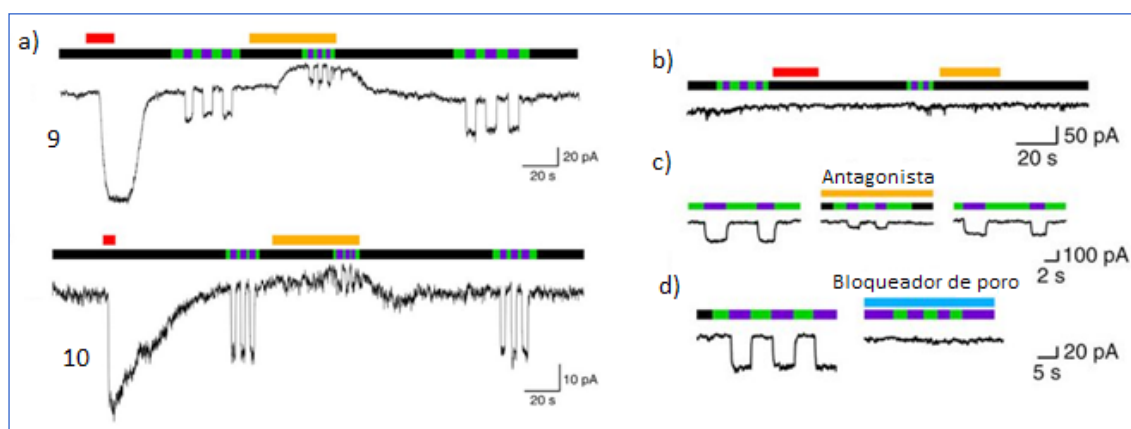


Figura 19: a) Fotocorrientes celulares de células que expresan el receptor Gluk1 después de la incubación de **9** y **10**, los canales se abren y cierran a partir de la irradiación de luz lila (380nm) y verde (500nm), respectivamente. La barra negra indica que no hay iluminación, la roja indica la perfusión de 300 μ M de glutamato y la amarilla la perfusión de 1mM de DNQX b) Ausencia de respuesta de células que no expresan Gluk1 c) Fotocorriente inducida por el compuesto **10** revertidas después del lavado del antagonista d) Efecto del bloqueador de poros en la medida de fotocorrientes inducidas por el compuesto **9**. Adaptado de Izquierdo-Serra *et al.*, 2016.

Para descartar efectos relacionados con la membrana u otros efectos inespecíficos, se verificó que no se observaron respuestas después de incubar los compuestos en células que no expresan GluK1 (Figura 19 b). Además, las fotocorrientes fueron reducidas por el bloqueo del receptor con el antagonista competitivo 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-dion (DNQX) (Figura 19 c) y por el bloqueador de poros filantoxina-433 (PhTX-433) (Figura 19 d) que impedía la inducción de fotorepuestas por el compuesto **9**. Después del lavado de estos compuestos, las fotocorrientes se llevaban a cabo sin ningún compromiso en la actividad del receptor. Todos estos resultados demuestran que las respuestas eran provocadas por PTL unidos covalentemente a receptores Gluk1 *wild type*.

Con la finalidad de identificar el PTL que genera una respuesta óptima en función de la longitud de los compuestos, se analiza la fotocorriente normalizada a 500 y 380 nm para cada molécula. Se mide el cambio de la actividad de los receptores ($\Delta_{380-500}$) y el corriente basal (500nm) en función de la longitud de la molécula determinada por los enlaces.

El incremento de respuesta aumenta notoriamente con la mida de los compuestos, siendo una longitud óptima entre 28-35 enlaces, dentro de este intervalo encontramos los compuestos **9** y **10** (Figura 20).

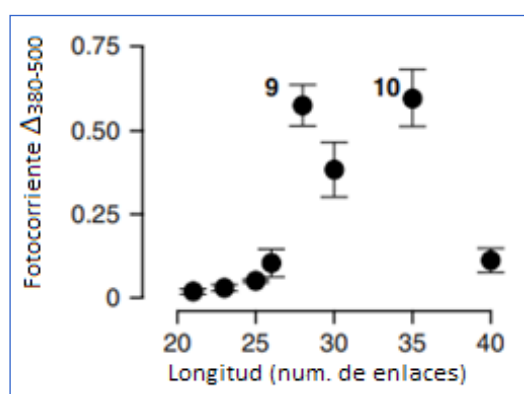


Figura 20: Fotocorriente en función de la longitud. Adaptado de Izquierdo-Serra *et al.*, 2016.

4. Conclusiones

A continuació, se exponen les següents conclusions del treball:

- El fotocontrol neuronal és una nova eina que aporta **gran resolució espacio-temporal** amb un ampli abanec de aplicacions en assaigs biològics per determinar la funcionalitat de determinats receptors en les distintes connexions neuronals.
- És imprescindible tres elements moleculars per garantir la selectivitat de la molècula i el òptim foto control de la seva activitat: el **ligand** que interacciona amb el centre actiu de la diana, el **fotomodulador** que regula a partir de la llum la activitat del compost i un **grup reactiu** que permeti la unió amb la proteïna *target*.
- El procés d'optimització del disseny d'un compost fotoactiu és llarg i multidisciplinari, necessari per entendre cada element de la molècula que es sintetitza i tenir la capacitat d'**innovació** en cerca de noves metes i oportunitats de millora.

5. Bibliografia

- BEHARRY, A. A. and WOOLLEY, G. A. (2011) 'Azobenzene photoswitches for biomolecules', *Chemical Society Reviews*. The Royal Society of Chemistry, 40(8), p. 4422.
- BORT, G. *et al.* (2013) 'From One-Photon to Two-Photon Probes: "Caged" Compounds, Actuators, and Photoswitches', *Angewandte Chemie International Edition*. John Wiley & Sons, Ltd, 52(17), pp. 4526-4537.
- BOYDEN, E. S. *et al.* (2005) 'Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 8(9), pp. 1263-1268.
- BREGESTOVSKI, P., MALEEVA, G. and GOROSTIZA, P. (2018) 'Light-induced regulation of ligand-gated channel activity', *British Journal of Pharmacology*, 175(11), pp. 1892-1902.
- BRIEKE, C. *et al.* (2012) 'Light-Controlled Tools', *Angewandte Chemie International Edition*, 51(34), pp. 8446-8476.
- CABRÉ, G. *et al.* (2019) 'Rationally designed azobenzene photoswitches for efficient two-photon neuronal excitation', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 10(1), p. 907.
- ELLIS-DAVIES, G. C. R. (2007) 'Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology', *Nature Methods*, 4(8), pp. 619-628.
- FEHRENTZ, T., SCHÖNBERGER, M. and TRAUNER, D. (2011) 'Optochemical Genetics', *Angewandte Chemie International Edition*. John Wiley & Sons, Ltd, 50(51), pp. 12156-12182.
- GARCÍA-AMORÓS, J. and VELASCO, D. (2012) 'Recent advances towards azobenzene-based light-driven real-time information-transmitting materials', *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. Beilstein-Institut, 8(1), pp. 1003-1017.
- GASCÓN-MOYA, M. *et al.* (2015) 'An Optimized Glutamate Receptor Photoswitch with Sensitized Azobenzene Isomerization', *The Journal of Organic Chemistry*. American Chemical Society, 80(20), pp. 9915-9925.
- GONZALEZ, J. *et al.* (2015) 'NMDARs in neurological diseases: a potential therapeutic target', *International Journal of Neuroscience*, 125(5), pp. 315-327.
- GOROSTIZA, P. and ISACOFF, E. Y. (2008) 'Optical Switches for Remote and Noninvasive Control of Cell Signaling', *Science*, 322(5900), pp. 395-399.
- HEIKE Fliegl, *,† *et al.* (2003) 'Ab Initio Calculation of the Vibrational and Electronic Spectra of trans- and cis-Azobenzene'. American Chemical Society.
- HÜLL, K., MORSTEIN, J. and TRAUNER, D. (2018) 'In Vivo Photopharmacology', *Chemical Reviews*. American Chemical Society, 118(21), pp. 10710-10747.
- IZQUIERDO-SERRA, M. *et al.* (2014) 'Two-Photon Neuronal and Astrocytic Stimulation with Azobenzene-Based Photoswitches', *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 136(24), pp. 8693-8701.

- IZQUIERDO-SERRA, M. *et al.* (2016) 'Optical control of endogenous receptors and cellular excitability using targeted covalent photoswitches', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7(1), p. 12221.
- KAISER, W. and GARRETT, C. G. B. (1961) 'Two-Photon Excitation in Ca^{2+} : Eu^{2+} ', *Physical Review Letters*. American Physical Society, 7(6), pp. 229-231.
- KASPAROV, S. and HERLITZE, S. (2013) 'Optogenetics at a crossroads?', *Experimental Physiology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 98(5), pp. 971-972.
- KIENZLER, M. A. *et al.* (2013) 'A Red-Shifted, Fast-Relaxing Azobenzene Photoswitch for Visible Light Control of an Ionotropic Glutamate Receptor', *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 135(47), pp. 17683-17686.
- KLÁN, P. *et al.* (2013) 'Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy', *Chemical Reviews*, 113(1), pp. 119-191.
- KRAMER, R. H., MOUROT, A. and ADESNIK, H. (2013) 'Optogenetic pharmacology for control of native neuronal signaling proteins', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 16(7), pp. 816-823.
- MATSUZAKI, M. *et al.* (2001) 'Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons', *Nature Neuroscience*, 4(11), pp. 1086-1092.
- MATTHEW VOLGRAFF, $\dagger$ *et al.* (2006) 'Reversibly Caged Glutamate: A Photochromic Agonist of Ionotropic Glutamate Receptors'. American Chemical Society .
- MOUROT, A. *et al.* (2011) 'Tuning Photochromic Ion Channel Blockers', *ACS Chemical Neuroscience*, 2(9), pp. 536-543.
- PACKER, A. M., ROSKA, B. and HÄUSSER, M. (2013) 'Targeting neurons and photons for optogenetics', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 16(7), pp. 805-815.
- PAWLICKI, M. *et al.* (2009) 'Two-Photon Absorption and the Design of Two-Photon Dyes', *Angewandte Chemie International Edition*, 48(18), pp. 3244-3266.
- SAMANTA, S. and WOOLLEY, G. A. (2011) 'Bis-azobenzene crosslinkers for photocontrol of peptide structure', *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. NIH Public Access, 12(11), pp. 1712-23.
- SZOBOTA, S. *et al.* (2007) 'Remote Control of Neuronal Activity with a Light-Gated Glutamate Receptor', *Neuron*, 54(4), pp. 535-545.
- TAKEMASA Tsuji *et al.* (2001) 'Effects of Molecular Structure on the Stability of a Thermotropic Liquid Crystal. Gas Electron Diffraction Study of the Molecular Structure of Phenyl Benzoate'. American Chemical Society .
- VELEMA, W. A., Szymanski, W. and Feringa, B. L. (2014) 'Photopharmacology: Beyond Proof of Principle'.
- VOLGRAFF, M. *et al.* (2006) 'Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch', *Nature Chemical Biology*, 2(1), pp. 47-52.
- ZHUO, M. (2017) 'Ionotropic glutamate receptors contribute to pain transmission and chronic pain', *Neuropharmacology*, 112(Pt A), pp. 228-234.