

## Fluoreszenzsonden

**Synthese und Anwendung fluoreszenzmarkierter Ras-Proteine in der Bildung lebender Zellen\*\****Reinhard Reents, Melanie Wagner, Jürgen Kuhlmann\* und Herbert Waldmann\**

Die bildgebende Analyse lebender Zellen unter Verwendung von Fluoreszenzsonden zählt zu den bedeutenden Techniken der aktuellen biologischen Forschung.<sup>[1]</sup> Ein wesentlicher Engpass ist dabei die effiziente und spezifische Kupplung der jeweiligen Fluoreszenzmarker an das Zielmolekül.<sup>[2]</sup> Den derzeit bedeutsamsten Lösungsansatz hierfür bieten molekularbiologisch hergestellte Fusionskonstrukte des zu untersuchenden Proteins mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und seinen Abkömmlingen (wie dem cyan fluoreszierenden Protein, CFP).<sup>[3]</sup> Hierbei ergeben sich jedoch Einschränkungen durch den großen biologischen Fluorophor, dessen Masse (etwa 27 kDa) besonders bei In-vivo-Untersuchungen von Protein-Protein-Wechselwirkungen nicht vernachlässigt werden kann. So wurden bei Untersuchungen der Bildung von Tubulstrukturen<sup>[4]</sup> und des sekretorischen Systems in Hefe<sup>[5]</sup> Einschränkungen in der Anwendung von GFP-Markern wegen sterischer Effekte und unspezifischer Wechselwirkungen beschrieben.

Zusätzliche Restriktionen ergeben sich aus der starken Überlappung von Emissions- und Anregungsspektren der fluoreszierenden Proteine, was die Verwendung von Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET)-Anordnungen oder der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie mit zwei Anregungswellenlängen einschränkt. Weiterhin zeigt GFP das Phänomen der flackernden („flickering“) Fluoreszenz, bei der sich Phasen aktiver und inaktiver Fluoreszenzemission abwechseln.<sup>[6]</sup> Hierdurch sind besonders Einzelmolekülanalysen schwierig zu interpretieren. Diese Probleme

können prinzipiell durch semisynthetische Proteine mit kleinen Fluoreszenzmarkern umgangen werden.<sup>[7]</sup>

Solche Konstrukte können bei der Erforschung der biologischen Signaltransduktion über Proteine der Ras-Familie nützlich sein. Hierbei stehen besonders Vorgänge zur Regulierung der zellulären Lokalisation und des Transports dieser kleinen GTP-bindenden Proteine im Vordergrund. Die S-palmitoylierten und S-farnesylierten Ras-Proteine regulieren in vielzelligen Organismen essenzielle biologische Prozesse, wie die Kontrolle von Zellwachstum und Differenzierung. Onkogene Mutanten des Ras-Proteins finden sich in etwa 30 % aller Tumoren des Menschen.<sup>[8]</sup>

Eine Besonderheit der Ras-Proteine besteht darin, dass sie vollständig lipidmodifiziert sein müssen, um biologisch aktiv zu sein und um an die Plasmamembran dirigiert zu werden. Während Verteilungsmuster von GFP- und CFP-markierten Ras-Proteinen bereits in lebenden Zellen beobachtet wurden,<sup>[9]</sup> standen vollständig modifizierte Ras-Konstrukte mit spezifisch eingebauten kleinen Fluorophoren bislang nicht zur Verfügung. In dieser Arbeit berichten wir über die Synthese und erste biologische Charakterisierungen von Ras-Lipoproteinen, die mit einem kleinen Fluoreszenzmarker am C-Terminus ausgestattet wurden. Ihre intrazelluläre Lokalisation kann durch konfokale Laser-Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden.

Zunächst stellten wir semisynthetische Ras-Proteine in Anlehnung an bereits bekannte Methoden her,<sup>[10]</sup> indem wir Mant-, NBD- oder Bodipy-Fluorophore in die Isopreneinheit des Moleküls einbauten. Um die Eignung der resultierenden Lipoproteine als Substrat des zellulären Palmitoylierungsapparats zu überprüfen, wurde im C-Terminus ein entsprechendes S-acylierbares Cystein vorgelassen. Werden solche Proteine in PC12-Zellen mikroinjiziert, kann das freie Cystein palmitoyliert werden. Das infolge der intrazellulären Modifikation doppelt lipidierte Ras induziert eine Änderung des Phänotyps der Zellen. Die hierbei eingeleitete Bildung neuritenartiger Ausläufer lässt sich quantitativ erfassen und signalisiert die korrekte Einlagerung des Lipoproteins in seine Zielmembran.<sup>[10]</sup> Entsprechende Analysen zeigten jedoch, dass Modifizierungen am Farnesylanker zu Ras-Konstrukten führten, die jeweils nur eines von zwei geforderten Kriterien erfüllten: Entweder waren die Proteine im Differenzierungsexperiment biologisch aktiv, erlaubten aber wegen unzureichender Leistung des Fluorophors keine Visualisierung in der mikroskopischen Betrachtung (Mant, Dansyl), oder die Chimären lieferten zufriedenstellende Aufnahmen in der konfokalen Mikroskopie, verloren aber die Fähigkeit zur Auslösung des Neuritenwachstums (NBD, Bodipy).

Trotz der geschilderten Einschränkung belegten diese Experimente, dass Bodipy-Fluorophore für unser Vorhaben die günstigsten optischen Eigenschaften hatten, sodass dieser Farbstoff für die folgenden Untersuchungen eingesetzt wurde. Ausgehend von der Annahme, dass der in allen natürlichen Ras-Proteinen vorkommende endständige Methylester vorrangig zur Erhöhung des lipophilen Charakters des Ras-C-Terminus beiträgt,<sup>[11,12]</sup> wurden an dieser Stelle funktionelle Gruppen mit Bodipy-FL- und Bodipy-TR-Fluorophoren eingeführt. Um sterische Effekte zu minimieren,

[\*] Dr. M. Wagner, Dr. J. Kuhlmann  
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie  
Abteilung Strukturelle Biologie  
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)  
Fax: (+49) 231-133-1435  
E-mail: juergen.kuhlmann@mpi-dortmund.mpg.de

Dr. R. Reents, Prof. Dr. H. Waldmann  
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie  
Abteilung Chemische Biologie  
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland) und  
Universität Dortmund, Fachbereich 3, Organische Chemie  
Fax: (+49) 231-133-2499  
E-mail: herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de

[†] Beide Autoren trugen gleichwertig zu dieser Arbeit bei.

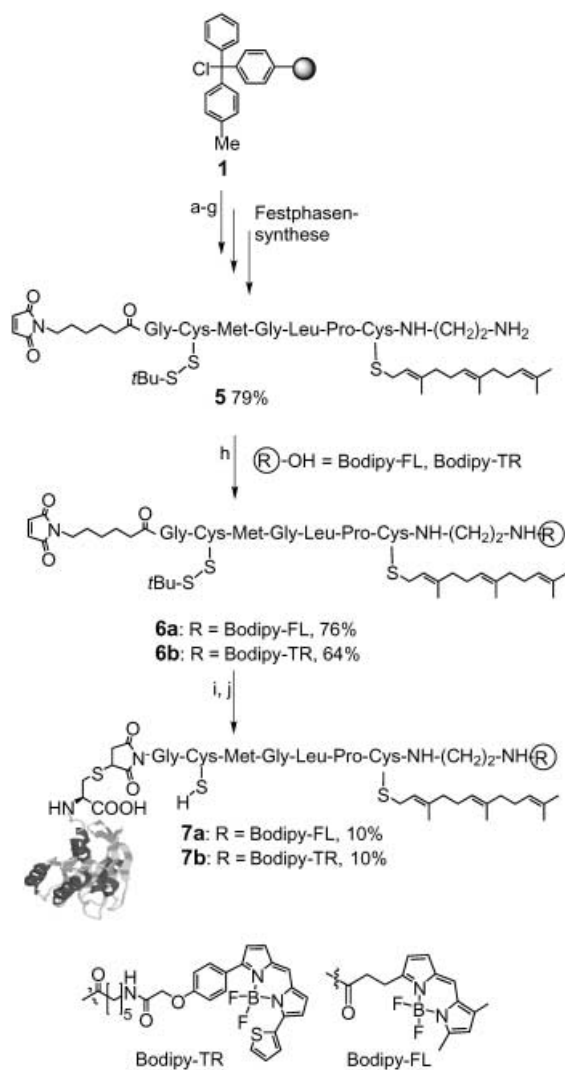
[\*\*] Unsere Arbeiten wurden durch den Fonds der Chemischen Industrie, die Max-Planck-Gesellschaft und die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

wurden die Fluoreszenzfarbstoffe und das Protein über Ethylendiamin verknüpft.

Die Synthese der fluoreszenzmarkierten Ras-Peptide und ihre Kupplung an N-Ras-Mutanten ist in Schema 1 gezeigt. Peptid **5** wurde an einem Polystyrolharz aufgebaut, das mit dem 4-Methyltritylanker **1** versehen war. Nach Anknüpfen der Fmoc-geschützten Ethylendiaminogruppe **2** und Abspaltung der Fmoc-Gruppe, wurde das Peptid aus ebenfalls Fmoc-geschützten Aminosäurebausteinen **3** synthetisiert, wobei auch ein *S*-farnesyliertes Fmoc-Cystein eingebaut wurde.<sup>[13]</sup> Nach N-terminaler Entschützung des endständigen Glycins



**Schema 1.** Synthese fluoreszenzmarkierter Ras-Proteine (**7**): a) Fmoc-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (**2**), *i*Pr<sub>2</sub>NEt; b) 20% Piperidin in DMF; c) 4 Äquiv. Fmoc-AS-OH (**3**), HBTU, HOBT, *i*Pr<sub>2</sub>NEt, DMF, 90 min; für jede Aminosäureeinheit wiederholt; d) Ac<sub>2</sub>O; e) 20% Piperidin in DMF; f) Maleimidocaprinsäure (**4**), HBTU, HOBT, *i*Pr<sub>2</sub>NEt, DMF, 90 min; g) 1% TFA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: **5** (79%); h) EDC, HOBT, Bodipy-TR oder Bodipy-FL, Triethylamin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: **6a** (76%), **6b** (64%); i) N-Ras, Puffer pH 8.5, Triton-X114, 4°C, j) DTE, Puffer pH 8.5, 37°C; **7a** (10%), **7b** (10%). DTE = Dithioerythritol, EDC = 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimid, HBTU = 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, HOBT = 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol, TFA = Trifluoressigsäure.

wurde Maleimidocaprinsäure (**4**) an den N-Terminus angehängt. Peptid **5**, das die sieben C-terminalen Aminosäuren des nativen N-Ras-Proteins nach zellulärer Prozessierung enthält, wurde durch Behandlung mit verdünnter Trifluoressigsäure von der Festphase abgelöst. Unter diesen Bedingungen bleiben die säurelabile Farnesylgruppe und die *S*-*t*Bu-Disulfid-Schutzfunktion am zweiten Cystein unversehrt. Abschließend wurden die Bodipy-FL- und Bodipy-TR-Marker mit EDC/HOBT als Kondensationsreagens an Peptid **5** gekuppelt. Die resultierenden fluoreszenzmarkierten Peptide **6a** und **6b** wurden in hohen Ausbeuten erhalten.

Die Peptide **6a** und **6b** wurden an das N-Ras-Protein über die Maleimidfunktion entsprechend Lit. [10] gekuppelt. Hierbei kam eine onkogene G12-V-Mutante von N-Ras zum Einsatz, die durch Einführung zweier Stoppcodons an den Positionen 182 und 183 in die N-Ras-cDNA mit dem Cystein 181 endete. Nach Klonierung in einen ptac-Expressionsvektor wurde das Protein im *E. coli*-Stamm CK600 K synthetisiert. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass das C-terminale Cystein der Ras-Mutante die einzige oberflächenexponierte Thiolgruppe des Proteins aufweist. Bei Zugabe des maleimidmodifizierten Peptids in Triton-X114-haltigem Puffer wurde Cys181 chemoselektiv an die Doppelbindung addiert. Das Produkt wurde durch Erwärmung auf 37°C und Separation in eine detergensreiche und eine detergensarme Phase isoliert. Das Lipoprotein reichert sich in der Tritonphase an, während die Ausgangsverbindung in der wässrigen Phase bleibt. Abschließend wurden die Proben über Ionenaustauschchromatographie gereinigt und mit SDS-PAGE analysiert (Abbildung 1). Für biophysikalische Untersuchungen

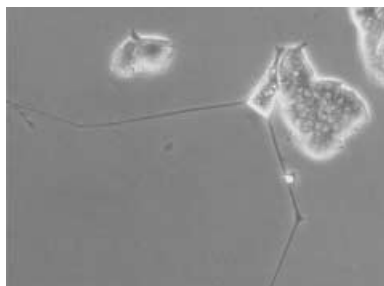


**Abbildung 1.** Synthese und Reinigung des semisynthetischen Ras-Proteins **7a**. Das Proteinedukt wurde vom Lipoproteinprodukt durch Extraktion mit Triton-X114 getrennt. Zur Abtrennung des Edukts aus der Tritonphase wurde diese mit wässrigem Puffer gewaschen. Die Proben wurden mit SDS-PAGE analysiert. Gezeigt ist die Überlagerung einer Coomassiefärbung (grau) mit einer Fluoreszenzabbildung des Elektrophoresegels (grün). 1) verkürztes N-Ras (1–181), M: Molekulargewichtsstandard, 2) Reaktionsansatz nach 16 h Inkubation, 3) Tritonphase nach Extraktion, 4) wässrige Phase nach Extraktion, 5) Tritonphase nach Reextraktion, 6) wässrige Phase nach Reextraktion mit tritonangereichertem Puffer, 7) Kupplungsprodukt nach DEAE-Ionenaustauschchromatographie.

folgte zusätzlich eine Größenausschlusschromatographie, mit der das Lipoprotein in einer Reinheit > 95% erhalten wurde. Massenspektrometrische Analytik bestätigte die Kupplung eines Lipopeptidmoleküls an das Ras-Protein. In den Kupplungsansätzen wurden äquimolare Mengen von Peptid und N-Ras eingesetzt. Mehrere Milligramm fluoreszenzmarkiertes Ras-Lipoprotein wurden bei Ausbeuten um 10% gewonnen. Die nach der Kupplung noch am Produkt verbliebene

*S*-*t*Bu-Disulfidschutzgruppe in den Peptiden **6a** und **6b** wurde abschließend durch Behandlung mit Dithioerythritol (DTe) bei 37°C abgespalten.

Die biologischen Aktivität des mit Bodipy-FL ausgestatteten **7a** wurde evaluiert. Nach Mikroinjektion in PC12-Zellen induzierte das onkogene Konstrukt den differenzierten Phänotyp. Dies belegt, dass das Protein von der zellulären Palmitoylierungsmaschinerie akzeptiert wird (Abbildung 2).



**Abbildung 2.** Differenzierung von PC12-Zellen nach Mikroinjektion von Bodipy-FL-markiertem Ras-Protein **7a**. Die Bildung neuritenartiger Ausläufer belegt die biologische Aktivität der Konstrukte.

Die ermittelte maximale Differenzierungsrate der behandelten Zellen von 76 % liegt dabei in dem Bereich, der auch für das analoge semisynthetische Ras-Protein mit einem Methyl-ester am C-Terminus (88 %) oder im komplett von der Zelle prozessierten onkogenen Ras mit der vollständigen Peptidkette (Aminosäuren 1–189) beobachtet wurde (84 %).

Aufbauend auf dem Befund, dass das Lipoprotein **7a** die geforderte biologische Aktivität aufwies, überführten wir das Konstrukt durch Mikroinjektion in MDCK- und CoS7-Zellen und verfolgten die zelluläre Lokalisation im konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 3). Wegen der exzellenten optischen Eigenschaften des Bodipy-FL-Fluorophors reichten bereits Proteinkonzentrationen von 10 µM in der Injektion aus, um eine ausreichende Signalintensität für die Visualisierung zu erzielen.

Etwa eine Stunde nach der Mikroinjektion verteilte sich **7a** in den Endomembranstrukturen der Zellen, wobei der Zellkern vollständig ausgeschlossen blieb. Nach weiterer Inkubation (3–4 h, 37°C) war eine deutliche Anfärbung der Plasmamembran bei MDCK- und CoS7-Zellen zu beobachten. Hierbei blieb die vorrangige Einlagerung in Endomembranen erhalten.

Diese Ergebnisse belegen, dass eine mit Bodipy ausgestattete Ras-Chimäre biologisch aktiv ist und mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie bei vergleichsweise niedrigen Konzentrationen visualisiert werden kann. Mit ihrem niedermolekularen Fluorophor Bodipy-FL sind die hier vorgestellten Ras-Lipoproteine besonders für solche biochemischen und biophysikalischen Analysen geeignet, bei denen es auf ein kontinuierliches Fluoreszenzsignal ankommt. Dies gilt beispielsweise für Rekonstitutions- und Wechselwirkungsstudien in artifiziellen Membranen. Für zelluläre Versuche in der medizinisch-chemischen Forschung ist es besonders wichtig, dass die Konzentration der semisynthetischen Lipoproteine kontrolliert werden kann. Dies ist mit Transfektionstechniken in dieser Form nicht möglich. Weiterhin ermöglicht der Einsatz gereinigter Lipoproteine die Korrelation von Daten zellulärer Testsysteme mit Ergebnissen aus In-vitro-Untersuchungen. Die chemisch-synthetische Herstellung des Lipopeptidanteils ermöglicht die Steuerung der Struktur der Lipidmodifikation und der eingebrachten Fluorophore. So können auch Membrananker erzeugt werden, die über den zellulären Syntheseapparat nicht herstellbar sind.<sup>[10]</sup>

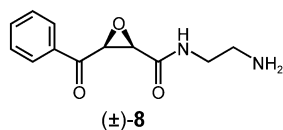
Als Beispiel für den Einsatz unserer Ras-Sonden wurden Lokalisationsexperimente mit Ceruleninanaloga durchgeführt. Cerulenin inhibiert die Biosynthese von Fettsäuren durch Blockierung des Fettsäuresynthase-Komplexes.<sup>[14]</sup> Smith et al. konnten zeigen, dass die Behandlung von T24-Zellen aus einem humanen Blasenkarzinom mit dem Naturstoff oder mit Derivaten die Palmitoylierung von H- und N-Ras-Protein unterbindet.<sup>[15]</sup> Der hierfür verantwortliche zelluläre Angriffspunkt dieser elektrophilen Verbindungen konnte bislang nicht identifiziert werden. Da nicht palmitoylierte H- und N-Ras-Proteine nicht an die Plasmamembran



**Abbildung 3.** Verteilung von Bodipy-FL-markiertem Ras-Protein **7a** nach Mikroinjektion einer 50 µM Proteinstammlösung in a) CoS7-Zellen und b) MDCK-Zellen. Die Zellen wurden nach Mikroinjektion über 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Bodipy-FL-Fluorophor mit einem Ar-Ionen-Laser (488 nm) angeregt. In beiden Zelltypen lässt sich die selektive Anfärbung von Plasmamembran und Golgi-Apparat beobachten. Die Golgi-Lokalisation wurde durch Einfärbung mit dem Golgi-Marker Ceramid-Bodipy-TR verifiziert. In c) wurden MDCK-Zellen mit einer Lösung von 50 µM Protein **7a** und 2 µM des Ceruleninanalogs **8** mikroiinjiziert. Auch nach 7 h Inkubationszeit fehlt die Markierung der Plasmamembran gegenüber den Kontrollen ohne Inhibitor fast vollständig.

transloziert werden können, sollte sich dieser Effekt mit unseren fluoreszenzmarkierten Lipoproteinen visualisieren lassen.

Das Ceruleninanalogen **8** (Synthese siehe Hintergrundinformationen) wurde im PC12-Testsystem<sup>[10]</sup> charakterisiert.



Hierbei verminderte Verbindung **8** die Differenzierung der PC12-Zellen durch onkogenes, S-palmitoylierbares, semisynthetisches Ras-Protein signifikant gegenüber der Kontrolle ohne Inhibitor (Daten nicht gezeigt), was auf eine starke Beeinflussung der biologischen Funktion von Ras durch den Wirkstoff hinweist. Um zu prüfen, ob dabei die Translokation von Ras an die Plasmamembran betroffen war, wurde das fluoreszenzmarkierte Lipoprotein **7a** mit dem Ceruleninanalogen in MDCK-Zellen co-injiziert. Eine Untersuchung der Zellen durch konfokale Fluoreszenzspektroskopie zeigte eine Akkumulation des Proteins in cytoplasmatischen Strukturen, während die Markierung der Plasmamembran gegenüber der Kontrolle stark herabgesetzt war (Abbildung 3c).

Eingegangen am 5. November 2003,  
veränderte Fassung am 23. Februar 2004 [Z53265]

**Stichwörter:** Fluoreszenzmikroskopie · Lipoproteine · Protein-Design · Signaltransduktion · Zellvisualisierung

- Tebbe, M. Wagner, K. Uwai, M. Völkert, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2655–2658; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2546–2550; d) M. Völkert, K. Uwai, A. Tebbe, B. Popkova, M. Wagner, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12749–12758.
- [11] H. Hofemeister, K. Weber, R. Stick, *Mol. Biol. Cell* **2000**, *11*, 3233–3246.
- [12] a) C. A. Hrycyna, S. K. Sapperstein, S. Clarke, S. Michaelis, *EMBO J.* **1991**, *10*, 1699–1709; b) C. A. Hrycyna, S. Clarke, *J. Cell Sci.* **1990**, *10*, 5071–5076.
- [13] B. Ludolph, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3683–3691.
- [14] S. Omura, *Bacteriol. Rev.* **1976**, *40*, 681–697.
- [15] D. S. Lawrence, J. T. Ziffou, C. D. Smith, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4932–4941.

- [1] F. S. Wouters, P. J. Verveer, P. I. H. Bastiaens, *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, 203–211.
- [2] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, **1996**; zit. Lit.
- [3] M. Zimmer, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 759–781.
- [4] C. L. Thomas, A. J. Maule, *J. Gen. Virol.* **2000**, *81*, 1851–1855.
- [5] I. Kunze, G. Hensel, K. Adler, J. Bernard, B. Neubohn, C. Nilsson, R. Stoltenburg, S. D. Kohlwein, G. Kunze, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1410*, 287–298.
- [6] F. Malvezzi-Campeggi, M. Jahnz, K. G. Heinz, P. Dittrich, P. Schwillie, *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1776–1785.
- [7] J. Zheng, R. E. Campbell, A. C. Ting, R. Y. Tsien, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 906–918; zit. Lit.
- [8] a) H. Waldmann, A. Wittinghofer, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4360–4383; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4192–4214; b) M. Malumbres, M. Barbacid, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 459–465 (Correction: *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 708); c) J. Downward, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 11–22.
- [9] a) A. Apolloni, I. A. Prior, M. Lindsay, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 2475–2487; b) Q. Dai, E. Choy, V. Chiu, J. Romano, S. R. Slivka, S. A. Steitz, S. Michaelis, M. R. Phillips, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15030–15034; c) I. A. Prior, A. Harding, J. Yan, J. Sluimer, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 368–375; d) I. A. Prior, J. F. Hancock, *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 1603–1608.
- [10] a) B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*, 223–226; b) K. Kuhn, D. J. Owen, B. Bader, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1023–1035; c) J. Kuhlmann, A.