

# Die Klick-Reaktion in der katalytischen lumineszenten Sensorik von Metallionen und ihre Auswirkungen auf die Biomarkierung

Otto S. Wolfbeis\*

### Stichwörter:

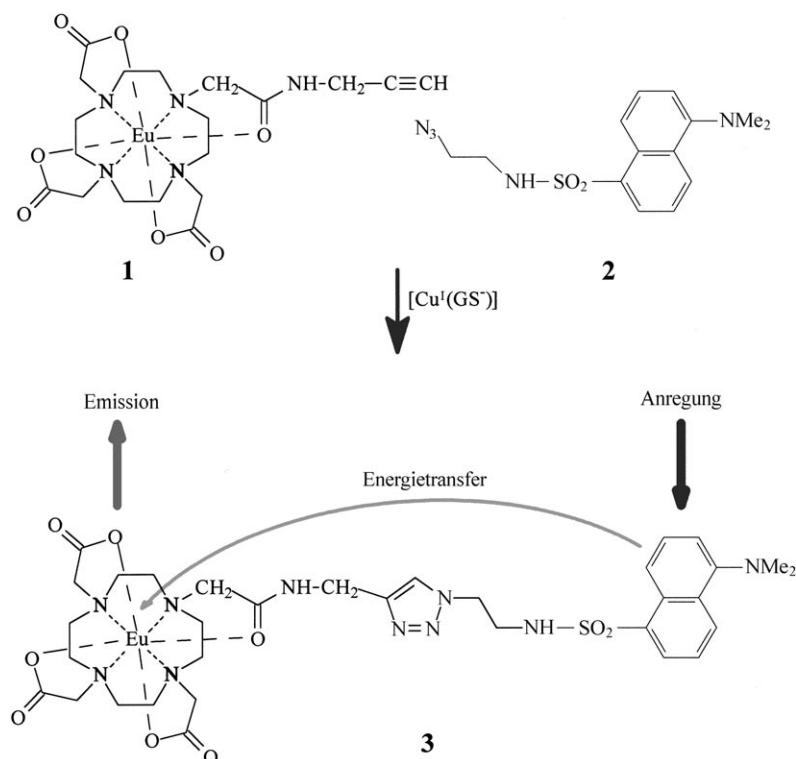
Analytische Methoden · Fluoreszenzsonden ·  
Klick-Chemie · Kupfer · Zellassays

Ein weit verbreiteter Weg zur optisch-sensorischen Erfassung von Metallionen ist die Verwendung metallochromer molekularer Indikatoren (auch als „Sonden“ oder „molekulare Sensoren“ bezeichnet). Binden diese an Ionen, erfahren sie eine messbare Änderung ihrer Eigenfarbe oder auch der Farbe, Intensität oder Abklingzeit ihrer Fluoreszenz. Optische Sonden ermöglichen den (qualitativen) Nachweis bzw. die (quantitative) Bestimmung von Ionen in Proben, bei denen elektroanalytische Methoden nur schwer einsetzbar sind, z.B. in Zellen und in Gewebe; dies trifft vor allem auf ortsaufgelöste oder bildgebende Verfahren zu. Wegen der Bedeutung derartiger Ionen in der Biochemie wird weiterhin intensiv an Methoden zu ihrem Nachweis geforscht. Aktuelle Ansätze beruhen auf dem katalytischen Effekt, den manche Ionen auf bestimmte Reaktionen ausüben.

So wurde berichtet, dass das Kupfer(I)-Ion bereits in mikromolaren Konzentrationen die vor langer Zeit von Huisgen entdeckte 1,3-dipolare Cycloaddition von Alkinylgruppen an Azidogruppen katalysiert, was zur schnellen Bildung eines Triazols führt (Schema 1).<sup>[1]</sup> Konkret wurde die Alkinylgruppe des Eu<sup>3+</sup>-Tetraazacyclodekan-komplexes **1** mit der Azidogruppe des

Fluorophors **2** umgesetzt, was zum Konjugat **3** führte, das infolge eines Ligand-Metall-Energietransfers (LMET) rot fluoresziert. Die katalytische Wirkung von Cu<sup>+</sup> auf diese Huisgen-Reaktion war unabhängig voneinander in den Arbeitsgruppen von Meldal<sup>[2]</sup> und Sharpless<sup>[3]</sup> entdeckt worden und wird oft als Klick-Reaktion bezeichnet. Be merkenswerterweise sind die eingesetzten Reagenzien in vergleichsweise wenigen Syntheseschritten zugänglich.

Die Bildung von **3** wurde anhand des Anstieges der Lumineszenzintensität des Eu<sup>3+</sup>-Ions mit einem Maximum bei 616 nm über eine Stunde verfolgt. Die Signaländerung kann darauf zurückgeführt werden, dass als Folge der Cycloaddition der 5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonyl(Dansyl)-Fluorophor (der als optische Antenne fungiert) und das zentrale Eu<sup>3+</sup>-Ion einen Abstand einnehmen, der innerhalb jenes Bereiches liegt, in dem ein LMET auftreten



**Schema 1.** Die Geschwindigkeit der Cycloaddition von Alkin **1** an das Azid **2** wird durch die Konzentration des katalytisch aktiven Cu<sup>+</sup>-Glutathion(GSH)-Komplexes bestimmt. Das Produkt **3** zeigt bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm eine charakteristische rosafarbene Lumineszenz, die bei den Startreagentien nicht gefunden wird.

[\*] Prof. Dr. O. S. Wolfbeis  
Institut für Analytische Chemie  
Chemo- und Biosensorik  
93040 Regensburg (Deutschland)  
Fax: (+49) 941-943-4064  
E-Mail:  
otto.wolfbeis@chemie.uni-regensburg.de  
Homepage: <http://www.wolfbeis.de>

kann. Die Reaktion verläuft unter physiologischen Bedingungen (also in wässriger Lösung, bei annähernd neutralen pH-Werten und bei Raumtemperatur)<sup>[4]</sup> und kann deshalb zum Nachweis von Cu<sup>+</sup> in Zellen eingesetzt werden. Dieses Ion wird (auch in seiner zweiwertigen Form) in fast 20 bekannten enzymatisch katalysierten Reaktionen als Cofaktor benötigt.

Erfreulicherweise führt die Reaktion zu einem Anstieg (und nicht zu einer Abnahme) der Lumineszenzintensität. Interessanterweise wurde bei einer ähnlichen Verbindung<sup>[5]</sup> eine Lumineszenzlösung (und nicht ein Anstieg) beobachtet. Dieser Befund unterstreicht den starken Einfluss, den der Abstand zwischen zwei Fluorophoren auf die photophysikalischen und lumineszenzoptischen Eigenschaften eines solchen Systems haben kann.

Die in Schema 1 gezeigte Reaktion wird nicht nur durch freies Cu<sup>+</sup>, sondern auch durch glutathiongebundenes Cu<sup>+</sup> katalysiert. Damit unterscheidet sich dieser Ansatz deutlich von Methoden,<sup>[6]</sup> die auf der Verwendung von chelatbildenden Indikatoren beruhen und die oft nur Ionen nachweisen können, die dem Lösungsmittel ausgesetzt sind, nicht aber solche, die im Biomolekül „vergraben“ oder an dieses gebunden sind. Dies ist im Hinblick auf die intrazellulär nachweisbaren Ionenkonzentrationen von großer Bedeutung. So liegt z. B. die effektive Konzentration von freien Kupferionen im Cytoplasma unter einem einzigen(!) Ion pro Zelle, hingegen jene des gebundenen Kupfers in der Größenordnung von 1 μM.

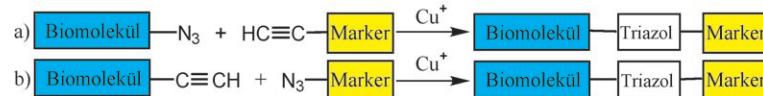
Die LMET-Methode ist ein neuer Ansatz zur Bestimmung von Cu<sup>+</sup>; darüber hinaus ist sie wahrscheinlich auf alle Ionen übertragbar, die eine organische chemische Reaktion katalysieren können und unterscheidet sich damit grundsätzlich von Methoden, die auf der Verwendung klassischer Indikatoren beruhen. Sie ist vergleichbar mit einer von Anslyn und Zhu<sup>[7]</sup> beschriebenen Methode einer Signalverstärkung, die auf der Auslösung eines resonanten Fluoreszenzenergietransfers (FRET) beruht. Dabei bestimmt ein „regulatives Element“ (z. B. ein Katalysator oder ein Inhibitor) einer chemischen Reaktion den Umsatz und kann auf diese Weise analytisch erfasst werden. Wenn die

beiden Partner dieser Reaktion (deren Geschwindigkeit durch das „regulative Element“ gesteuert wird) fluoreszenzmarkiert sind, kann die Reaktion zu einem Produkt führen, das einen Fluoreszenzdonor und einen Fluoreszenzakzeptor enthält, was wiederum zu einem messbaren FRET führen kann. Dies wurde für eine Klick-Reaktion tatsächlich nachgewiesen.<sup>[7]</sup>

Ein interessanter Aspekt der LMET- und der FRET-Methode ist der Umstand, dass beide selbstreferenziert sind. Dies ist bei Anwendungen in den Biowissenschaften von besonderem Interesse, da solche Methoden die Kalibrierung wesentlich erleichtern. Die Eu-basierte LMET-Methode dürfte sich auch in zeitaufgelösten Messungen einsetzen lassen, während das FRET-System wahrscheinlich auch als ratiometrische Zwei-Wellenlängen-Methode ausgeführt werden kann.

Die LMET-Methode wurde für den spezifischen Nachweis des Cu<sup>+</sup>-Ions eingesetzt,<sup>[8]</sup> hat aber im Hinblick auf die Detektion von Metallionen ein weitaus größeres Potenzial. Vorstellbar ist auch ihre Anwendung auf:

- a) alkinylierte Fluorophore mit unterschiedlicher Farbe, Abklingzeit, Polarisierbarkeit oder Solvatochromie, die an Donor- oder Akzeptor-Fluorophore gekuppelt werden, die eine Azidogruppe tragen; dies würde die Einstellung verschiedener Absorptions- und Emissionswellenlängen, Abklingzeiten und Polarisationsgrade ermöglichen;
- b) andere katalytisch aktive Ionen, die in den Biowissenschaften von Interesse sind, vorausgesetzt, dass diese katalytischen Reaktionen unter physiologischen Bedingungen ablaufen;
- c) organische Katalysatoren (vorzugsweise, wenn sie in sehr niedrigen Konzentrationen katalytisch aktiv sind), z. B. Anilin,<sup>[9]</sup> Harnstoffderivate<sup>[10]</sup> und andere organische Verbindungen.<sup>[11]</sup>



**Abbildung 1.** Möglichkeiten zur Biokonjugation auf der Grundlage der Klick-Reaktion. Wahrscheinlich ist ein Einbau von Abstandshaltern zwischen dem Biomolekül und den Alkinyl- oder Azidogruppen sinnvoll. Die Art des Markers ist nicht auf Fluoreszenzmarker beschränkt.

Wenn diese Reaktionen unter physiologischen Bedingungen erfolgen, ermöglichen sie die In-vivo-Detektion von Metallionen, vorausgesetzt, die verwendeten Sonden sind zellpermeabel. Man muss aber im Auge behalten, dass diese Verfahren irreversibel sind. Dies steht im Gegensatz zu vielen reversiblen Methoden, die auf der Verwendung von Farbindikatoren beruhen. Es sei an dieser Stelle auch vermerkt, dass viele der „alten“ Tüpfeltests, die von Feigl<sup>[12]</sup> beschrieben wurden und oft auf katalytischen Reaktionen beruhen, eine Wiederbelebung und eine Erweiterung ihres Anwendungsbereiches erfahren könnten.

Die LMET-Methode könnte auch eine Reihe von Anwendungen im Bereich der Biokonjugation und Oberflächenmodifizierung finden. So können Klick-Reaktionen z. B. eingesetzt werden, um fluoreszenz- oder anderweitig markierte Biomoleküle herzustellen. Da in den meisten Zellen so gut wie keine Azide und Alkine vorhanden sind, kann eine solche Verknüpfung sehr selektiv sein. Erste entsprechende Arbeiten wurden bereits veröffentlicht: Wang et al.<sup>[13]</sup> haben z. B. einen Marker (der eine Alkinylgruppe trägt) kovalent an ein Protein (das mit einer Azidogruppe versehen ist) konjugiert (Abbildung 1). Die Reaktion wurde durch Zugabe von katalytischen Mengen an Cu<sup>+</sup>-Ionen bewirkt. Die Autoren merkten allerdings an, dass der zur Stabilisierung des Cu<sup>+</sup> verwendete chelatisierende Ligand eine entscheidende Rolle spielt. Auf der Grundlage dieses Ansatzes sind auch noch andere Markierungsmethoden denkbar.<sup>[14]</sup>

Bertozzi et al.<sup>[15]</sup> demonstrierten, dass man Zelloberflächen genetisch so modifizieren kann, dass sie Saccharid-Einheiten mit daran hängenden Azido-gruppen enthalten. Link und Turell<sup>[16]</sup> haben weiterhin gezeigt, dass man Zelloberflächen mithilfe der Klick-Reaktion markieren kann, wenn die rekombinante, äußere Zellmembran von *E. coli* in Gegenwart der unnatürlichen

Aminosäure Azidohomoalanin exprimiert wird, die als Ersatz für die natürliche Aminosäure Methionin fungiert. Die Azidogruppen auf der Oberfläche wurden danach mithilfe der Klick-Reaktion an Biotin konjugiert, und die Biotineinheit konnte schlussendlich mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin angefärbt werden.

In einer weiteren Modifizierung der Methode konnten Zhou und Fahrni<sup>[17]</sup> die Elektronendonoreigenschaften des in der Klick-Reaktion gebildeten Triazolringes zur Steuerung der Fluoreszenzintensität eines Cumarin-Fluorophors verwenden – die Intensität steigt stark, wenn der Fluorophor über die Klick-Reaktion an ein Azid konjugiert wird. Die Arbeitsgruppe von Tirrell<sup>[18]</sup> nutzte die Klick-Chemie zur Fluoreszenzvisualisierung eines synthetischen Proteins durch seine Markierung mit einem Azidocumarin. Carell et al.<sup>[19]</sup> demonstrierten, dass Alkin-modifizierte DNA-Oligomere postpräparativ durch die Klick-Reaktion mit einem leicht zugänglichen Azido-modifizierten Fluorescein markiert werden können. Das Potenzial der Klick-Reaktion zur Modifizierung von Oberflächen und für die Materialwissenschaften wurde kürzlich zusammengefasst.<sup>[20]</sup> Ein weiteres aussichtsreiches Anwendungsgebiet sind der Mikrokontaktdruck und die Mustergestaltung fester Array-Oberflächen.<sup>[21]</sup>

Aus den vorgestellten Arbeiten ergeben sich neuartige und aussichtsreiche Möglichkeiten zur Markierung (und damit zur Visualisierung) von Biomolekülen, Zelloberflächen und Partikeln, wie kürzlich für den Fall von Goldnanopartikeln gezeigt wurde,<sup>[22]</sup> deren Oberfläche durch Klick-Reaktion mit Enzymen<sup>[22]</sup> bzw. mit funktionellen chemischen Gruppen<sup>[23]</sup> Klick-modifiziert wurde. Signalverstärkung und Signalübersetzung kann auch durch photokatalysierte fluorogene Reaktionen bewirkt werden, die wiederum eine Klick-Reaktion auslösen.<sup>[24]</sup>

Die Fluoreszenzmarkierung ist nur eine (wenngleich sehr wichtige) Methode der Markierung. Weitere Möglichkeiten bieten radioaktive Marker, NMR-Kontrastmittel (aus denen sich

neue Ansätze in der Magnetresonanztomographie ergeben können), Isotope (die in der massenspektroskopischen Bioanalytik von Bedeutung sind) sowie enzymatische Markierungsverfahren, die in Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISAs) von Bedeutung sind.

Zukünftige Verfahren zum Fluoreszenznachweis intrazellulärer Ionen werden folgende Kriterien erfüllen müssen:

- 1) Es muss eine ausreichende Spezifität für das jeweilige Ion gegeben sein,
- 2) die Helligkeit der Sonde (*Bs*; definiert als das Produkt der molaren Absorbanz bei der Wellenlänge der Anregung und der Quantenausbeute) muss ausreichend hoch sein, um in Biowissenschaften von praktischem Nutzen zu sein (der *Bs*-Wert liegt idealerweise bei über  $30000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ),
- 3) die Sonden müssen zellpermeabel sein,
- 4) es müssen Anregungswellenlängen gefunden werden, bei denen die intrinsische Hintergrundlumineszenz des biologischen Systems nicht so störend ist wie bei Anregung im nahen und – stärker noch – im Fern-UV-Bereich.

Online veröffentlicht am 6. März 2007

- [7] L. Zhu, E. V. Anslyn, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1208; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1190.
- [8] Molekulare Sonden (Indikatoren) wurden zuletzt (fälschlicherweise) auch als Sensoren bezeichnet. Sensoren sind aber per Definition mehr als nur molekulare Sonden (siehe www.probes.com) – vielmehr erwartet man von ihnen, dass sie in der Lage sind, die Konzentration eines Analyten in kontinuierlicher und reversibler Weise abzubilden, z.B. in fließenden Systemen wie Blut und Trinkwasser oder in chemischen bzw. Bioreaktoren. Auf die Mehrzahl jener „Sensoren“, die in Nicht-Sensor-Zeitschriften beschrieben wurde, trifft diese Definition nicht zu.
- [9] A. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7743; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7581.
- [10] A. Berkessel, K. Roland, J. M. Neudörfl, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4195.
- [11] M. Raj, Vishnumaya, S. K. Ginotra, V. K. Singh, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4097.
- [12] F. Feigl, *Spot Tests in Organic Analysis*, Elsevier, Amsterdam, **1975**.
- [13] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192.
- [14] J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873.
- [15] R. A. Chandra, E. S. Douglas, R. A. Mathies, C. R. Bertozzi, M. B. Francis, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 910; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 896.
- [16] A. J. Link, D. A. Turell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164.
- [17] Z. Zhou, C. J. Fahrni, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8862.
- [18] K. E. Beatty, J. C. Liu, F. Xie, D. C. Dieterich, E. M. Schuman, Q. Wang, D. A. Tirrell, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7524; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7364.
- [19] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639.
- [20] W. H. Binder, C. Kluger, *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 1791.
- [21] D. I. Rozkiewicz, D. Janczewski, W. Verboom, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5418; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5292.
- [22] J. L. Brennan, N. S. Hatzakis, T. R. Tshikhudo, N. Dirvianskyte, V. Razumas, S. Patkar, J. Vind, A. Svendsen, R. J. M. Nolte, A. E. Rowan, M. Brust, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1373.
- [23] D. A. Fleming, C. J. Thode, M. E. Williams, *Chem. Mat.* **2006**, *18*, 2327.
- [24] S. C. Ritter, B. Koenig, *Chem. Commun.* **2006**, 4694.