

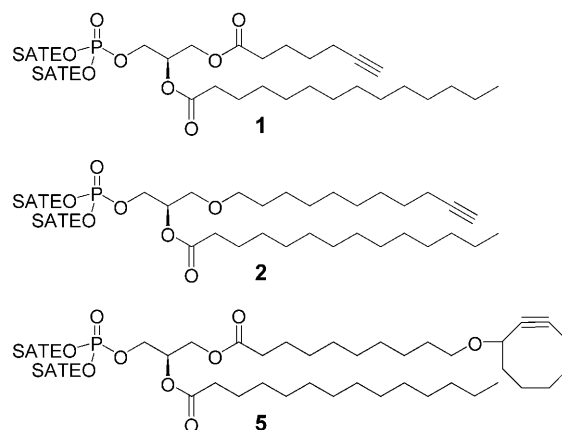
Selektive Fluoreszenzmarkierung von Lipiden in lebenden Zellen**

Anne B. Neef und Carsten Schultz*

Lipide spielen eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Membranfusion und Signaltransduktion, und sie sind an der Bildung und dem Transport von Mikrodomänen beteiligt.^[1] Ihre Analyse in lebenden Zellen wird jedoch durch ihr extrem dynamisches Verhalten erschwert.^[2] Als Intermediate des Stoffwechsels werden sie mit hoher Frequenz in andere Lipidspezies oder freie Fettsäuren umgewandelt.^[3] Sie sind Bestandteile zellulärer Membranen und diffundieren schnell von einem Membrankompartiment zum anderen. Hinzu kommt, dass die Untersuchung von Lipidbewegungen wegen der Ähnlichkeit der Lipidstrukturen oft problematisch ist. Ein beträchtlicher Teil der Forschung stützt sich auf die Verwendung markierter Lipidanaloga. Angesichts der Größe eines durchschnittlichen Lipidmoleküls können allerdings schon kleine Sonden, z.B. Fluorophore, erhebliche Auswirkungen auf die Eigenschaften eines Lipids haben, besonders wenn Lipidtransport und -sortierung untersucht werden sollen.^[2,4] Deshalb sollte das markierte Lipid seinem natürlichen Pendant so ähnlich wie möglich sein. Die Modifikation sollte vorzugsweise eine kleine, hydrophobe Gruppe sein.

Die Strategie, Biomoleküle mit bioorthogonalen chemischen Modifikationen zu versehen und sie dadurch in ihrer natürlichen Umgebung kenntlich zu machen, erfreut sich steigender Beliebtheit. Die Methode umfasst zwei Schritte. Zunächst wird eine einzigartige funktionelle Gruppe in das gewünschte Biomolekül, bevorzugt durch die biosynthetische Maschinerie der Zelle, eingebaut. Im zweiten Schritt wird diese funktionelle Gruppe mit einer von außen zugeführten Sonde durch eine spezifische chemische Reaktion markiert.^[5] Die bisher gebräuchlichsten Reaktionen sind die Reaktion eines Biarsenfarbstoffs mit einem Tetracysteinmotiv,^[5b] die Staudinger-Ligation, die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition und die kupferfreie Azid-Alkin-Cycloaddition mit gespannten Cycloalkinen.^[6] Immer wieder sind so Proteine,^[7] Polynucleotide^[8] und Glycokonjugate^[9] erfolgreich in lebenden oder fixierten Zellen markiert worden. Einige wenige Untersuchungen befassten sich auch mit der Markierung von lipidierten Proteinen durch den Einbau von ω -Azidofettsäuren.^[10] Die Visualisierung der azidoacylierten Proteine durch Staudinger-Ligation war jedoch erst nach

Zelllyse möglich. Bis zum heutigen Tag gibt es keine Studien über die chemische Markierung von Lipiden jedweder Art in lebenden Zellen oder Organismen. Hier berichten wir über die selektive Fluoreszenzmarkierung der alkinmodifizierten Phospholipide **1**, **2** und **5** (SATE = *S*-Acetylthioethyl) in mehreren Zelltypen, und dass eine terminale Dreifachbindung in einer der Fettsäureseitenketten weder die Gesamtstruktur des Lipids noch seine Polarität beeinflussen sollte.



Als Modelllipid wurde Phosphatidsäure gewählt. Sie ist ein Schlüsselintermediat des Phospholipidstoffwechsels und ein wichtiger sekundärer Botenstoff. Phosphatidsäure wird hauptsächlich als Reaktion auf eine Vielzahl von intrazellulären Reizen durch Phospholipase-D-vermittelte Hydrolyse aus Phosphatidylcholin gebildet. Phosphatidsäure reguliert eine Vielzahl von Enzymen, darunter mTOR und Raf-1, Proteinphosphatase-1 sowie cAMP-spezifische Phosphodiesterasen. Sie beeinflusst mannigfaltige zelluläre Funktionen wie Zellproliferation, Stoffwechsel, Umgestaltung des Zytoskeletts und Exozytose.^[11] Methoden, mit denen die Dynamik von Phosphatidsäure und ihre Interaktionen mit Zielproteinen in lebenden Zellen analysiert werden können, könnten weitere Funktionen der Phosphatidsäure in Signaltransduktionswegen aufzeigen oder Erkenntnisse aus In-vitro-Studien bestätigen. Zusätzlich könnte jede Markierungsmethode, die für Phosphatidsäure etabliert wird, durch Variation der Lipidkopfgruppe auf die Untersuchung von anderen, komplexeren Lipiden ausgeweitet werden, um Signaltransduktionskaskaden mit räumlicher Auflösung zu verfolgen.

Die Synthese des Diacylphosphatidsäurederivats **1** verlief in sechs Schritten ausgehend von 6-Heptinsäure mit einer Ausbeute von 50%. Auf die Veresterung von 6-Heptinsäure mit 2,3-*O*-Isopropyliden-*sn*-glycerol folgten Ketalspaltung, Dimethoxytrityl(DMT)-Einführung, Veresterung mit Myristinsäure und DMT-Abspaltung. Das so erhaltene Diacyl-

[*] A. B. Neef, Dr. C. Schultz
Gene Expression Unit, European Molecular Biology Laboratory
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)
Fax: (+49) 6221-387-206
E-Mail: schultz@embl.de

[**] Die Autoren danken Heike Stichnoth für die Bereitstellung von Zellen und Dr. Adrian Neal für TBTA und 3-Azido-7-(diethylamino)cumarin.

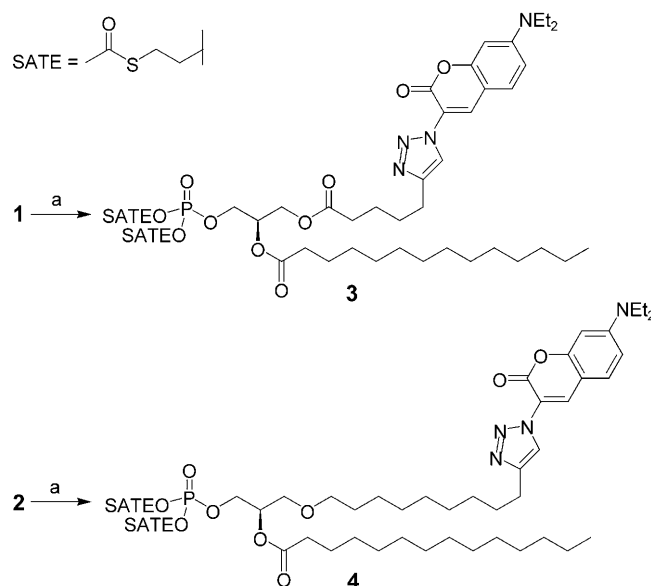
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200805507> zu finden.

glycerolderivat wurde mit Bis(*S*-acetyl-2-thioethyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit zur Phosphatidsäure **1** umgesetzt (siehe Schema S1 in den Hintergrundinformationen). Das Schützen der ansonsten negativ geladenen Phosphatkopfgruppe mit SATE-Gruppen war notwendig, um Membrangängigkeit des Lipids zu bewirken und Lipidaggregation zu verhindern. SATE-geschützte Phosphate sind unter vielen Synthesebedingungen der organischen Chemie stabil, werden aber in lebenden Zellen schnell von Esterasen gespalten, wobei geladene Phosphatgruppen erzeugt werden, welche die Zellmembran nicht mehr verlassen können.^[12]

Um ein nichthydrolysierbares etherverknüpftes ω -Alkin zu erhalten, wurde das Phosphatidsäurederivat **2** ausgehend von 10-Undecin-1-ol in sieben Schritten mit einer Ausbeute von 28% synthetisiert. Auf Appel-Halogenierung von 10-Undecin-1-ol und Veretherung mit 2,3-*O*-Isopropyliden-*sn*-glycerol folgten weitere Schritte analog zur Synthese von **1** (Schema S2).

Um die generelle Eignung für Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloadditionen zu testen, wurden **1** und **2** mit dem fluorogenen 3-Azido-7-(diethylamino)cumarin^[13] *in vitro* umgesetzt, wobei die entsprechenden fluoreszierenden Triazolderivate **3** und **4** nahezu quantitativ erhalten wurden (Schema 1). Die beiden Verbindungen haben Anregungsmaxima um 410 nm und Emissionsmaxima um 500 nm. Sie wurden auf lebende Zellen appliziert, und ihre zeitliche und räumliche Verteilung wurde verfolgt (Abbildung S1). RAW-Makrophagen erwiesen sich als ein für die Visualisierung von Lipiden gut geeigneter Zelltyp, da ihre kugelförmige Morphologie es ermöglichte, einzelne Membrankompartimente zu unterscheiden. Kurz nach der Zugabe färbten beide Verbindungen vor allem die Plasmamembran, doch anschließend verteilten sie sich schnell auf intrazelluläre Membranen. Vor allem im Fall von **4** fluoreszierte eine kleine, intrazelluläre Region besonders stark.

Die membrangängigen, alkin-modifizierten Phosphatidsäurederivate **1** und **2** wurden auf ähnliche Weise in lebenden Zellen angewendet und mit 3-Azido-7-(diethylamino)cumarin,^[13] Kupfer(II)-sulfat, Natriumascorbat und Tris(benzyltriazolylmethyl)amin (TBTA) fluoreszenzmarkiert. Da Kupfer(I)-Ionen toxisch sind, mussten die Zellen vor der Markierung fixiert werden. Dazu wurde Paraformaldehyd gewählt, um durch Immobilisierung der lipidbindenden Proteine laterale und vesikuläre Lipidbewegungen zu beschränken. Bereits nach zehn Minuten fluoreszierten die Zellmembranen stark. Negative Kontrollzellen, die nicht mit modifizierten Lipiden versetzt, sonst aber



Schema 1. Synthese der fluoreszierenden Phosphatidsäurederivate **3** und **4**. Reagentien und Bedingungen: a) 3-Azido-7-(diethylamino)-cumarin, CuSO₄, Natriumascorbat, EtOH/H₂O (1:1).

identisch behandelt worden waren, zeigten auch nach längeren Reaktionszeiten nahezu keine Fluoreszenz (Abbildung 1). Mithilfe unterschiedlicher Zelltypen, wie HeLa- und MDCK-Zellen, wurde gezeigt, dass die Markierungsreaktion allgemein einsetzbar ist (Abbildung S2).

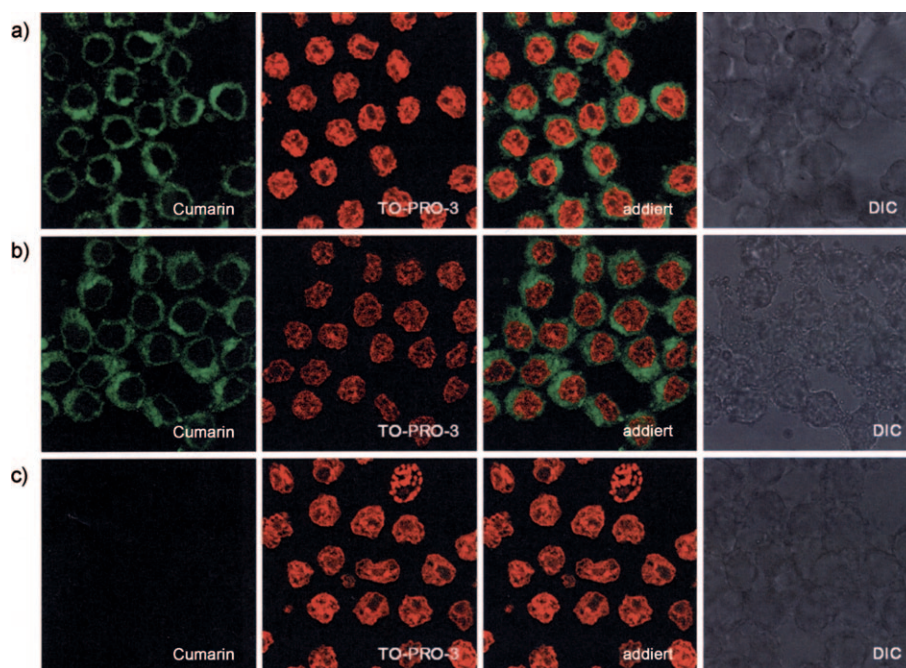


Abbildung 1. Fluoreszenzmikroskopische Abbildungen von fixierten RAW-Makrophagen, die 1 h mit den Phosphatidsäurederivaten **1** oder **2** und 30 min mit 3-Azido-7-(diethylamino)cumarin, CuSO₄, Natriumascorbat und TBTA behandelt wurden. a) Zellen, die mit **1** und dem Kernmarker TO-PRO-3 behandelt wurden. b) Zellen, die mit **2** und dem Kernmarker TO-PRO-3 behandelt wurden. c) Negative Kontrollzellen, die nur mit 3-Azido-7-(diethylamino)cumarin, CuSO₄, Natriumascorbat und TBTA behandelt wurden. DIC: differentieller Interferenzkontrast.

Anders als die fluoreszenzmarkierten Lipide **3** und **4** färbten die Phosphatidsäurederivate **1** und **2** alle zellulären Membranen mehr oder weniger gleichmäßig. Während Derivat **4** eine perinukleäre Region besonders intensiv markierte, schien Derivat **2** gleichmäßig verteilt zu sein, was belegt, dass oft fälschlich eine Lokalisierung von fluorophormarkierten Lipidanaloga angenommen wird. Wir zeigten durch FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching), dass die Fixierung mit Paraformaldehyd zur vollständigen Lipidimmobilisierung führte, da auch nach 30 min keine Wanderung von fluoreszierenden Molekülen in gebleichte Regionen der Zellen beobachtet werden konnte (Abbildung S3). Aus diesen Ergebnissen folgt, dass die intrazelluläre Lokalisation der markierten Phosphatidsäurederivate nicht durch das Fluorophor dirigiert wird, sondern die Verteilung zum Zeitpunkt der Fixierung widerspiegelt. Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Esterbindungen von **1** vor der Markierungsreaktion gespalten werden. In-vivo-Markierung von Heptinsäure resultierte jedoch in einem leicht veränderten Markierungsmuster (Abbildung S4).

Wegen der Toxizität von Kupferionen mussten die Zellen vor der Markierung fixiert werden. Dieses Fixieren verhindert jedoch die Untersuchung von dynamischen Prozessen. Aus diesem Grund verwendeten wir das Cyclooctin-modifizierte Phosphatidsäurederivat **5**, um Lipide durch ringspannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition^[14] in lebenden Zellen zu markieren. Eine Cyclooctin enthaltende Fettsäure wurde ausgehend von Cyclohepten in drei Schritten mit einer Ausbeute von 39 % hergestellt. Alle weiteren Syntheseschritte verliefen analog zur Synthese von **1** und lieferten **5** nach sechs Schritten mit einer Ausbeute von 46 % (Schema S3). **5** wurde anschließend auf lebende RAW-Makrophagen appliziert. Innerhalb von drei Stunden gelang sowohl in fixierten (Abbildung S5) als auch in lebenden Zellen (Abbildung 2) die Markierung mit 3-Azido-7-(diethylamino)-cumarin^[13] ohne jegliche Zusätze. Das Anfärbungsmuster war in beiden Fällen sehr ähnlich. Auch nach mehreren Stunden

konnte keinerlei Zelltoxizität festgestellt werden, und es trat weiterhin Mitose auf.

Wir haben hier die erste erfolgreiche chemische Markierung von Lipiden durch Azid-Alkin-Cycloaddition in fixierten und lebenden Zellen vorgestellt. Die Lokalisationsunterschiede beim Austausch der Ester- gegen eine Etherbindung und, noch wesentlicher, die unterschiedliche Verteilung von in vitro und in vivo markierten Lipiden beweisen die Bedeutung der Methode. Wir gehen davon aus, dass eine terminale Dreifachbindung die biophysikalischen Eigenschaften eines Membranlipids vernachlässigbar beeinträchtigt, doch es bleibt zu ermitteln, inwiefern die Cyclooctinylgruppe einen Einfluss auf Lipiddiffusion und -lokalisierung hat. Künftig werden reaktivere Dreifachbindungen Markierungsreaktionen im Minutenbereich möglich machen.^[14b,c] Mit der hier vorgestellten Markierungsmethode sollte Lipiddynamik in fixierten und lebenden Zellen verfolgt sowie neue Einblicke in intrazelluläre Verteilung, Lipidinteraktionspartner und Lipidverhalten als Reaktion auf endogene oder exogene Reize gewonnen werden können.

Eingegangen am 11. November 2008

Online veröffentlicht am 14. Januar 2009

Stichwörter: Alkine · Fluoreszenzsonden · Klick-Chemie · Phospholipide

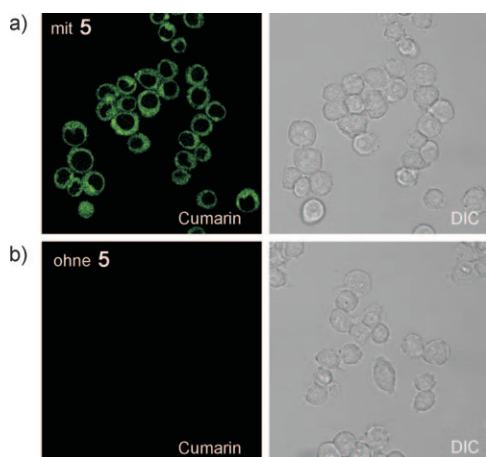


Abbildung 2. Fluoreszenzmikroskopische Abbildung von lebenden RAW-Makrophagen. a) Zellen, die 1 h mit **5** und 3 h mit 3-Azido-7-(diethylamino)cumarin behandelt wurden. b) Negative Kontrollzellen, die nur 3 h mit 3-Azido-7-(diethylamino)cumarin behandelt wurden.

- [1] R. Woscholski, *Signal Transduction* **2006**, 6, 77–79.
- [2] O. Maier, V. Oberle, D. Hoekstra, *Chem. Phys. Lipids* **2002**, 116, 3–18.
- [3] J. van der Waal, R. Habets, P. Varnai, T. Balla, K. Jalink, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 15337–15344.
- [4] R. D. Klausner, D. E. Wolf, *Biochemistry* **1980**, 19, 6199–6203.
- [5] a) J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1, 13–21; b) S. R. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6063–6076.
- [6] V. V. Fokin, *ACS Chem. Biol.* **2007**, 2, 775–778.
- [7] a) K. E. Beatty, J. C. Liu, F. Xie, D. C. Dieterich, E. M. Schuman, Q. Wang, D. A. Tirrell, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 7524–7527; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7364–7367; b) A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 535–546.
- [8] a) A. Salic, T. J. Mitchison, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 2415–2420; b) C. Y. Jao, A. Salic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 15779–15784.
- [9] a) L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, 276, 1125–1128; b) D. Rabuka, S. C. Hubbard, S. T. Laughlin, S. P. Argade, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 12078–12079; c) M. Sawa, T.-L. Hsu, T. Itoh, M. Sugiyama, S. R. Hanson, P. K. Vogt, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 12371–12376; d) T.-L. Hsu, S. R. Hanson, K. Kishikawa, S.-K. Wang, M. Sawa, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 2614–2619.
- [10] a) Y. Kho, S. C. Kim, C. Jiang, D. Barma, S. W. Kwon, J. Cheng, J. Jaunbergs, C. Weinbaum, F. Tamanoi, J. Falck, Y. Zhao, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 12479–12484; b) H. C. Hang, E.-J. Geutjes, G. Grotenbreg, A. M. Pollington, M. J. Bijlmakers, H. L. Ploegh, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2744–2745; c) M. A. Kostiuik, M. M. Corvi, B. O. Keller, G. Plummer, J. A. Prescher, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, G. Rajaiah, J. R. Falck, L. G. Berthiaume, *FASEB J.* **2008**, 22, 721–732.
- [11] a) M. N. Hodgkin, T. R. Pettitt, A. Martin, R. H. Michell, A. J. Pemberton, M. J. O. Wakelam, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, 23,

- 200–204; b) K. Athenstaedt, G. Daum, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 266, 1–16; c) X. Wang, S. P. Devaiah, W. Zhang, R. Welte, *Prog. Lipid Res.* **2006**, 45, 250–278; d) C. L. Stace, N. T. Ktistakis, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2006**, 1761, 913–926.
- [12] a) I. Lefebvre, C. Périgaud, A. Pompon, A.-M. Aubertin, J.-L. Girardet, A. Kirn, G. Gosselin, J.-L. Imbach, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 3941–3950; b) O. Wichmann, J. Wittbrodt, C. Schultz, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 522–527; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 508–512.
- [13] K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Org. Lett.* **2004**, 6, 4603–4606.
- [14] a) N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046–15047; b) J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 16793–16797; c) X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 2285–2287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2253–2255.
-