

Zelluläre Bildgebung von Wasserstoffperoxid, dem „notwendigen Übel“ in der Zelle

Wei Zhao*

Bildgebungsverfahren · Fluoreszenzsonden ·
Lebende Zellen · Mitochondrien · Wasserstoffperoxid

2008 war ein aufregendes Jahr für die „Imaging-Community“, wurde doch der Chemie-Nobelpreis für die Entdeckung und Weiterentwicklung eines Fluoreszenzproteins vergeben, das Vorgänge in lebenden Zellen sichtbar macht. Kürzlich sorgte nun auch noch ein Bericht von Chang et al.^[1] für Furore, der eine neue Fluoreszenzsonde zur Visualisierung von mitochondrialem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in lebenden Zellen beschreibt.

H_2O_2 entfaltet in der Zelle sowohl schädliche als auch, wie in jüngerer Zeit entdeckt, förderliche Aktivitäten.^[1-5] Aufgrund dieses doppeldeutigen Charakters wurde H_2O_2 deswegen auch als ein „notwendiges Übel“ für Zellen bezeichnet.^[2] Als eine der wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) in lebenden Organismen kann überproduziertes mitochondriales H_2O_2 die Entwicklung von schweren Krankheiten wie Krebs oder Neuropathien wie der Parkinson- und Alzheimer-Krankheit fördern.^[1,3] Einer jüngeren Studie zufolge soll H_2O_2 für die Antikrebs-Aktivität von Vitamin C ausschlaggebend sein.^[5] Als sekundärer Botenstoff beeinflusst H_2O_2 die Lebenserwartung^[4] und spielt bei der intrazellulären, auf Redoxprozessen beruhenden Signalweitergabe eine wesentliche Rolle.^[2,4] Als „ROS der Signalwege“ entfaltet H_2O_2 seine spezifische biologische Aktivität in doppelter Weise sowohl als Mediator beim Zellwachstum als auch in der Apoptose. Wie Giorgio et al.^[4] ausführen, kann die Spezifität von H_2O_2 auf drei Arten bestimmt werden: Erstens durch die Untersuchung der Pro-oxidans-Intensität, zweitens durch die Lokalisierung von intrazellulär gebildetem H_2O_2 und drittens durch die Bestimmung der lokalen Schwankungen der H_2O_2 -Konzentration, die für die Aktivierung spezifischer Zielstrukturen entscheidend sein könnten. Die Autoren vertraten allerdings die Meinung, dass eine genaue Lokalisierung von H_2O_2 und eine Quantifizierung des H_2O_2 -Flusses in lebenden Zellen mit den verfügbaren Techniken nicht möglich sei.^[4] Jetzt aber, nach dem Durchbruch von Chang et al.^[1] und der Entwicklung neuer multifunktioneller Fluoreszenzsonden, könnte das

Geheimnis der H_2O_2 -Spezifität in den Mitochondrien bald gelüftet werden.

Seit der Entdeckung von H_2O_2 im Jahr 1818 sind in unzähligen Studien Fluoreszenzsonden für dieses Molekül entwickelt worden, angefangen bei den klassischen Dihydro-Verbindungen wie Dihydrorhodamin und 2',7'-Dichlordihydrofluorescein^[1,6] bis zu den jüngsten Nanomaterialien wie Kohlenstoff-Nanoröhren.^[7] Die klassischen Fluoreszenzsonden sind zum fluorometrischen Nachweis von H_2O_2 weit verbreitet, sie sind aber nicht spezifisch für H_2O_2 und sprechen merklich auf andere ROS an. In jüngster Zeit wurden einige neue Fluoreszenzsonden entwickelt, die selektiv auf H_2O_2 ansprechen, z. B. Pentafluorbenzolsulfonylfluorescein, Peroxyfluor-1, mit dem Butandiolester eines Dihydroxyborylbenzyloxycarbonyl-Derivats maskiertes Aminocumarin, 7-Hydroxy-2-oxo-N-(2-(diphenylphosphanyl)ethyl)-2H-chromen-3-carboxamid und ein Eu³⁺-Tetracyclin-Komplex.^[6] Einige dieser Sonden wurden bereits zur Überwachung von intrazellulären H_2O_2 -Konzentrationen verwendet.^[6]

Keine der genannten Fluoreszenzsonden ist aber in der Lage, mitochondriales H_2O_2 in lebenden Zellen spezifisch zu detektieren. Chang und Mitarbeiter synthetisierten eine ganze Reihe von Sonden auf der Basis von Boronsäure, z. B. das rot fluoreszierende Peroxyresorufin-2, das grün fluoreszierende Peroxyfluor-1 und das blau fluoreszierende Peroxy-anthon-1,^[6] deren Selektivität für H_2O_2 auf einer ausschließlich durch H_2O_2 vermittelten Umwandlung einer Arylboronatgruppe in eine Phenolgruppe beruht (Abbildung 1). Eine jüngste Studie ergab, dass diese Boronat-Fluoreszenzsonden die einzigen Kontrastmittel sind, die Wasserstoffperoxid hochspezifisch in physiologischen Konzentrationen nachweisen können.^[8] Wegen der geringen Gewebegängigkeit der Sondenmoleküle war eine In-vivo-Bildgebung bislang aber nur sehr begrenzt möglich.^[8] Das *Molecular Probes Handbook*^[9] nennt neun im Handel verfügbare molekulare Fluoreszenzsonden für H_2O_2 und dreißig mitochondriale Fluoreszenzsonden, von denen jedoch keine spezifisch für mitochondriales H_2O_2 ist.

Um diese Lücke zu schließen, entwickelten Chang und Mitarbeiter die Fluoreszenzsonde „Mitochondria peroxy yellow 1“ (MitoPY1), mit der mitochondriales H_2O_2 in lebenden Zellen selektiv nachgewiesen werden kann.^[1] Es handelt sich um einen difunktionellen Farbstoff, der zwei besondere Strukturmerkmale aufweist: eine lipophile kationische Triphenylphosphonium-Kopfgruppe, die selektiv Mi-

[*] Prof. W. Zhao

Department of Chemistry, University of Arkansas at Little Rock
2801 South University Avenue, Little Rock, AR 72204 (USA)
Fax: (+1) 501-569-8838
E-Mail: wxzhao@ualr.edu
Homepage: <http://www.ualr.edu/wxzhao>

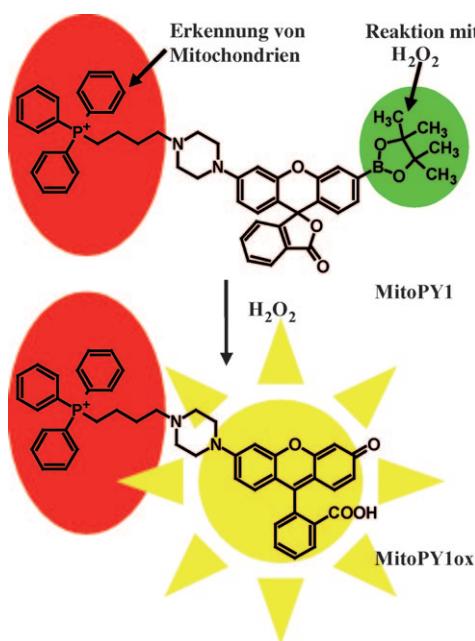


Abbildung 1. Struktur der multifunktionellen Fluoreszenzsonde MitoPY1. Das Molekül trägt eine Phosphoniumgruppe für die Erkennung von Mitochondrien und einen Peroxid-responsive Boronatschalter. Durch selektive Reaktion mit mitochondrialem H_2O_2 wird MitoPY1 in MitoPY1ox umgewandelt und ein Fluoreszenzanstieg ausgelöst.

tochondrien erkennt (in Abbildung 1 rot markiert), und eine Boronsäureeinheit als das Peroxid-responsive Element (grün in Abbildung 1). Die Einführung der lipophilen kationischen Phosphoniumgruppe löst das Problem der Membrangängigkeit. Das Molekül erhält dadurch eine niedrige Aktivierungsenergie zur Überwindung der hydrophoben Schranke zur inneren Mitochondrienmembran und kann sich leicht durch die Phospholipid-Doppelschicht bewegen. Für den Transport werden keine zusätzlichen Ionentransporter benötigt, und infolge des membranären Potentialgefälles akkumuliert die Sonde in den Mitochondrien.^[10] Gleichzeitig reagiert die chemospezifische Boronatgruppe selektiv mit H_2O_2 , nicht aber mit anderen ROS wie Superoxid, Hydroxylradikal und Stickoxid.^[1,6] Die selektive Reaktion mit mitochondrialem H_2O_2 löst die Umwandlung des MitoPY1 in MitoPY1ox aus (Abbildung 1), die mit einer Fluoreszenzverstärkung einhergeht. Bei Anregung mit $\lambda = 510 \text{ nm}$ steigt das Fluoreszenzsignal bei $\lambda = 528 \text{ nm}$ an.

Chang et al. testeten die synthetische MitoPY1-Sonde in vier Zelllinien (Gebärmutterhalskrebs-HeLa, Cos-7, HEK-293 und CHO.K1).^[1] Um zu prüfen, ob die Sonde die Mitochondrien erreicht, wurde der kommerziell erhältliche mitochondriale Indikator MitoTracker Deep Red 633 als Kontrolle eingesetzt. Ein zweiter, lysosomaler Indikator, Lyso-Tracker Red, demonstrierte, dass die neue Sonde selektiv für Mitochondrien ist. Dass die Zellen im Experimentverlauf lebten, zeigten Chang et al. durch Hellfeldmessungen und Kernfärbung mit Hoechst 33342. Kontrollexperimente mit der Produktspezies MitoPY1ox, die bei Zugabe von H_2O_2 keinen Fluoreszenzanstieg in lebenden Zellen hervorrief, belegten die Spezifität von MitoPY1 als selektive Sonde für mitochondriales H_2O_2 .

Um die Spezifität von MitoPY1 für Mitochondrien noch deutlicher zu machen, wurde als Kontrolle eine Fluoreszenzsonde ohne das Mitochondrien-spezifische Kation ContPY1 hergestellt (Abbildung 2). Dazu wurde die Phosphoni-

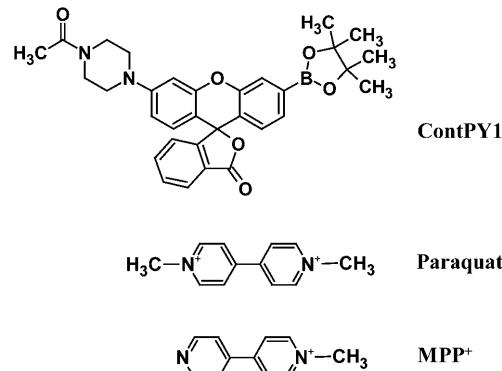


Abbildung 2. Chemische Strukturen von ContPY1, Paraquat und MPP^+ .

um-Kopfgruppe gegen eine Acetylgruppe ausgetauscht. Die Sonde zeigte eine positive Fluoreszenzreaktion in lebenden Zellen, weil der Boronat-Schalter funktionierte, allerdings wurde keine besondere Spezifität für die Mitochondrien beobachtet. Eine weitere Bestätigung der Selektivität von MitoPY1 für mitochondriales H_2O_2 erbrachten komplementäre Durchflusszytometriestudien an einer größeren Population lebender Zellen.

Chang et al.^[1] setzten die neue Sonde ein, um die durch das Pestizid Paraquat (1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium; Abbildung 2) ausgelöste endogene Produktion von mitochondrialem H_2O_2 in lebenden HeLa-Zellen nachzuweisen. Paraquat ist ein potenzielles Nervengift, das mit der Parkinson-Krankheit in Zusammenhang gebracht wird und in seiner chemischen Struktur dem 1-Methyl-4-phenylpyridinium-Ion (MPP^+ ; Abbildung 2) ähnelt. MPP^+ ist das eigentliche toxische Stoffwechselprodukt, das für die Wirkung der Parkinsonismus verursachenden Substanz 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) verantwortlich ist. Aus der chemischen Ähnlichkeit zwischen Paraquat und MPP^+ lässt sich schließen, dass Paraquat als potenzielles Umweltgift auch an der Entstehung der Parkinson-Krankheit beteiligt sein könnte.^[11] Chang et al. zeigten, dass MitoPY1 empfindlich genug ist, um in lebenden HeLa-Zellen nach Exposition von 1 mm Paraquat – das ist eine niedrigere Paraquat-Konzentration als die halbmaximale inhibitorisch wirkende Konzentration von 1.02 mm – den Anstieg von mitochondrialem H_2O_2 nachzuweisen. Anhand dieser Ergebnisse sollte die MitoPY1-Sonde zur Untersuchung von oxidativem Stress geeignet sein, der bei H_2O_2 -verursachten Krankheiten durch Umweltgifte entsteht.

Zur Frage der biologischen Spezifität von H_2O_2 ^[4] wird durch die vorliegende Arbeit eine Möglichkeit geschaffen, in lebenden Zellen H_2O_2 exakt zu lokalisieren und sein Flussverhalten zu quantifizieren. Dies besorgen Fluoreszenzsonden mit gezielt ausgewählten funktionellen Gruppen, die zu einer spezifischen und präzisen Erkennung subzellulärer Bereiche befähigt sind. H_2O_2 hat als „ROS der Signalwege“

ein Reduktionspotential von 0.32 V, womit es in der O₂-Reduktionskette unter den biologisch relevanten ROS am wenigsten reaktiv ist. Es besitzt mit einer Halbwertszeit von 10⁻⁵ s jedoch die höchste Stabilität und kommt in der höchsten intrazellulären Konzentration vor, die vier Größenordnungen überstreichen kann, nämlich von 10⁻⁸ M während der Proliferationsphase bis 10⁻⁴ M während der Apoptose.^[4] Darauf wird dringend nach einer empfindlichen und spezifischen Sonde gesucht, mit der dieses Signalmolekül nicht nur quantitativ, sondern auch dynamisch erfasst werden kann.^[2] Die momentan verfügbaren Sonden konnten bislang nur einzelne Voraussetzungen bezüglich Photostabilität, Selektivität, Spezifität und Stabilität unter physiologischen Bedingungen erfüllen. Auf der Basis des hier beschriebenen Durchbruchs könnten nun neue Sonden entwickelt werden, die zusätzlich ein schnelles Ansprechverhalten haben, einen großen dynamischen Konzentrationsbereich abdecken und reversibel sind.

Online veröffentlicht am 22. Januar 2009

-
- [1] B. C. Dickinson, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9638–9639.
 - [2] S. G. Rhee, *Science* **2006**, *312*, 1882–1883.
 - [3] M. T. Lin, M. F. Beal, *Nature* **2006**, *443*, 787–795.
 - [4] M. Giorgio, M. Trinei, E. Migliaccio, P. G. Pelicci, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 722–728.
 - [5] Q. Chen, M. G. Espey, A. Y. Sun, C. Pooput, K. L. Kirk, M. C. Krishna, D. B. Khosh, J. Drisko, M. Levine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11105–11109.
 - [6] N. Soh, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 532–543.
 - [7] Y. Xu, P. E. Pehrsson, L. Chen, W. Zhao, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10054–10055.
 - [8] D. Lee, S. Khaja, J. C. Velasquez-Castano, M. Dasari, C. Sun, J. Petros, W. R. Taylor, N. Murthy, *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 765–769.
 - [9] *A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Invitrogen: <http://probes.invitrogen.com/handbook>.
 - [10] M. P. Murphy, R. A. J. Smith, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *47*, 629–656.
 - [11] A. L. McCormack, M. Thiruchelvam, A. B. Manning-Bog, C. Thiffault, J. W. Langston, D. A. Cory-Slechta, D. A. Di Monte, *Neurobiol. Dis.* **2002**, *10*, 119–127.