

Nahinfrarot-Fluoreszenzsonden für die molekulare Bildgebung: die Suche nach dem Idealsystem**

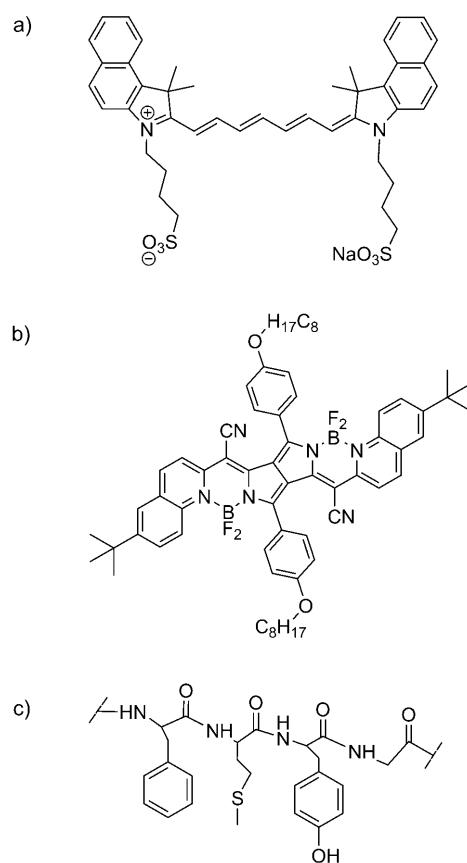
Samuel Achilefu*

Biolumineszenz · Energietransfer · Fluoreszierende Proteine · Nahinfrarot-Farbstoffe · Quantenpunkte

Strategien zur Entwicklung molekularer Sensoren und Reportersysteme haben Wissenschaftler seit Jahrhunderten in ihren Bann gezogen. Diese molekularen Sonden haben bei vielen bahnbrechenden Entdeckungen in der Chemie, der Biologie und der Medizin entscheidend mitgewirkt. Bis vor kurzem waren die meisten erhältlichen Farbstoffe im sichtbaren Wellenlängenbereich photoaktiv, und analytische Instrumente wurden für ihre Anwendung in diesem Bereich hin optimiert.

Obwohl sichtbare Farbstoffe weiterhin eine gewichtige Rolle in den verschiedensten Forschungsfeldern spielen, führt das Aufkommen der optischen Bildgebung molekularer Prozesse in lebenden Organismen zu einem steigenden Interesse an molekularen Sonden, die im nahinfraroten (NIR) Bereich arbeiten (typischerweise zwischen 700 und 900 nm). In diesem Spektralfenster weisen viele intrinsische Gewebechromophore, Makromoleküle und Organellen niedrige Lichabsorption, Autofluoreszenz und Lichtstreuung auf. Dies bedeutet, dass Nahinfrarotlicht viel tiefer in Gewebe eindringen kann als sichtbares Licht, sodass molekulare und physiologische Vorgänge mehrere Gewebschichten tief untersucht werden können. Um die Vorteile von NIR-Techniken nutzbar zu machen, wurden im letzten Jahrzehnt vermehrt Anstrengungen zur Entwicklung neuer NIR-Bildgebungsverfahren und molekularer Sonden unternommen (Schema 1).

Der Farbstoff Indocyaningrün (ICG) wurde wegen seiner herausragenden spektralen Eigenschaften im NIR-Bereich und seiner Eignung für die Applikation im Menschen zum Standard für die optische Lebendbildgebung. Zur Erforschung spezifischer molekularer Prozesse wurde eine Reihe von ICG-Derivaten hergestellt, die mit Peptiden, Antikörpern



Schema 1. a,b) Die NIR-fluoreszierenden Farbstoffe Indocyaningrün (ICG, a) und Diketopyrrolopyrrolcyanin (b); c) chromophorbildende Peptidreste von NIR-fluoreszierenden Proteinen (mNeptun, Katushka, Katushka-9-5, eqFP650 und eqFP670).^[4]

[*] Prof. Dr. S. Achilefu
Department of Radiology
Washington University School of Medicine
4525 Scott Avenue, St. Louis, MO 63110 (USA)
Fax: (+1) 314-362-8599
E-Mail: achilefus@mir.wustl.edu
Homepage: <http://www.orl.wustl.edu>

[**] S.A. dankt dem National Institute of Biological Imaging and Bioengineering (NIBIB R01 EB008111, R01 EB008458, R01 EB007276) und dem National Cancer Institute (NCI R33 CA123537, U54 CA136398) der US National Institutes of Health für die finanzielle Unterstützung sowie Sharon Bloch für das Korrekturlesen des Manuskripts.

pern und anderen biologisch relevanten Molekülen konjugiert werden können.^[1,2] Ein großes Problem bei receptorgerichteten molekularen Sonden ist die Zeitverzögerung zwischen der Aufnahme in das Zielgewebe und der Clearance aus dem umgebenden Gewebe. Um dieses Manko auszugleichen, hat man aktivierbare NIR-Sonden zur Verwendung in vivo entworfen,^[3] die idealerweise nur ein Fluoreszenzsignal als Reaktion auf ein bestimmtes molekulares Ereignis emittieren. Allerdings bestanden frühe aktivierbare Sonden aus polymeren Materialien, die nur schwer an intrazelluläre Enzyme herangelten. Zudem gab es Bedenken bezüglich

der Reproduzierbarkeit der Produkte und der langsamen Signalerzeugung. In der Folge wurden einfachere Sonden entwickelt, die auf resonantem Fluoreszenzenergietransfer (FRET) anstelle von Selbstlöschungsmechanismen basieren. Die Effizienz der Fluoreszenzlösung dieser einfachen FRET-Sonden ist immer noch nicht optimal, und es gibt Bemühungen zur Optimierung der Fluoreszenzlösung und der spezifischen Aktivierung durch Enzyme.

Obwohl stetig neue NIR-Fluoreszenzfarbstoffe, Quantenpunkte und fluoreszierende Nanopartikel entwickelt werden, bleibt das ganze große Thema der optischen Bildgebung die Zielspezifität der Sonden. Hier beginnt sich nun eine neue Generation von fluoreszierenden und biolumineszierenden molekularen Sonden abzuzeichnen, die durch eine nahtlose Einbindung von Reportergenen in die Wirtzelle eine bei spiellose Spezifität aufweisen. Die transfizierten Zellen werden entweder direkt für die zelluläre Bildgebung verwendet oder in lebende Tiere injiziert, um spezifische molekulare Vorgänge und deren Dynamik abzubilden. Natürlich haben fluoreszierende und biolumineszierende Proteine unterschiedliche Signalerzeugungsmechanismen – sie emittieren aber beide Licht im sichtbaren Bereich. Die Erkenntnis, dass spektrale NIR-Signaturen für die nichtinvasive In-vivo-Bildgebung nützlich sind, schuf einen Bedarf für die Entwicklung neuartiger NIR-emittierender Proteine. Bisherige Arbeiten in diese Richtung konzentrierten sich hauptsächlich auf die Mutation des Fluorophors in Proteinen und führten kürzlich zur Entwicklung von NIR-fluoreszierenden Proteinen mit Emissionen > 650 nm.^[4,6] Bei biolumineszierenden Proteinen andererseits beruht die Signalerzeugung auf biochemischen Reaktionen zwischen einem Enzym und seinem Substrat. Deshalb hängt die Emissionswellenlänge – anders als bei fluoreszierenden Proteinen – nicht vom Chromophorsystem des Enzyms ab. Versuche, die Emission durch Modifizierung des Substrats hin zu längeren Wellenlängen zu verschieben, sind weitgehend erfolglos geblieben, weil Strukturänderungen die Enzym-Substrat-Erkennung stören.

Der Durchbruch für NIR-biolumineszierende Proteine kam mit der Entwicklung einer resonanten Biolumineszenzenergietransfer(BRET)-Methode basierend auf der Verwendung von Quantenpunkten (QDs).^[7] BRET wurde ursprünglich eingeführt, um molekulare Wechselwirkungen zu beobachten.^[8] Hierbei wird die Biolumineszenzenergie auf ein fluoreszierendes Protein oder einen organischen Farbstoff mit guter spektraler Überlappung, aber rotverschobener Fluoreszenz übertragen. Allerdings erschwert die geringe Stokes-Verschiebung der organischen Proteinfluorophore die Datenanalyse, weil die Biolumineszenz von der resultierenden Fluoreszenz separiert werden muss. Demgegenüber sind QDs ideal für diese Strategie, weil sie breite Absorptionsspektren und große Stokes-Verschiebungen aufweisen. Da zahlreiche QDs mit NIR-Emission zur Verfügung stehen, steht einer Erforschung von BRET-Verfahren mit NIR-emittierenden QDs für die In-vivo-Bildgebung nichts im Wege. Ein Ansatz bestand darin, QDs mit einem biolumineszierenden Protein (Luciferase) zu markieren, sodass nach Zugabe des Luciferasesubstrats BRET erzeugt wird. Die Luciferase-gekoppelten QDs wurden z.B. für das Zelltracking in Nagern eingesetzt.^[7] Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass sich die Größe

und optischen Eigenschaften der QDs unabhängig voneinander optimieren lassen, bevor sie mit dem Enzym konjugiert werden.

Ma et al.^[9] berichteten vor kurzem über eine neue raffinierte Methode für die Synthese von QDs, die sich die Tatsache zunutze macht, dass Proteine wie Albumin in der Herstellung von QDs verwendet werden. In diesem unkonventionellen Ansatz wurde Luciferase in die QD-Synthese integriert (Abbildung 1), wobei das Enzym einen doppelten

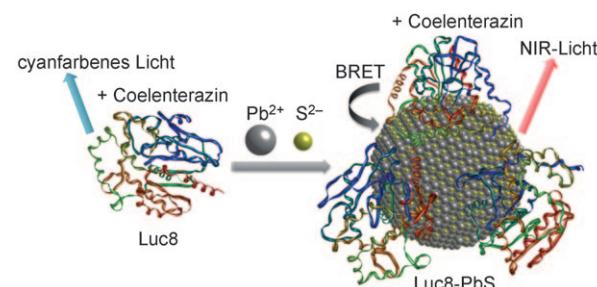


Abbildung 1. Luciferingestützte Synthese von Quantenpunkten mit resonantem Biolumineszenzenergietransfer.^[9]

Zweck erfüllt: Erstens vermittelt es das Wachstum der QDs und stabilisiert diese (wie es auch für andere, nichtlumineszierende Proteine gezeigt wurde). Zweitens dient die Luciferase als Lichtquelle für den BRET. Beeindruckenderweise behielt das Enzym seine katalytischen Fähigkeiten auch nach der QD-Synthese bei. Dies wurde dadurch möglich, dass die Autoren Luc8, eine stabilere Luciferasemutante aus *Renilla reniformis*, verwendeten. QDs mit einem mittleren Durchmesser von 4 nm und einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 20 nm zeigten eine ausgezeichnete NIR-Lumineszenz. Die kleinen BRET-QDs können extravasieren und in Zielgewebe außerhalb der Blutgefäße gelangen. Die Studie zeigt das Potential funktionell aktiver Biomoleküle für die Nanopartikelsynthese auf. Die Synthesemethode macht nachfolgende Konjugationen entbehrlich und ermöglicht eine gezielte Einführung von biologischen Funktionen, optischen Eigenschaften und Stabilitätseigenschaften. Darüber hinaus bietet die Strategie einzigartige Perspektiven für die Anwendung anderer Biomoleküle wie Antikörper, diagnostische Enzyme und Proteinrezeptoren in der Nanopartikelherstellung.

Eine offensichtliche Einschränkung der Methode ist der vergleichsweise hohe Bedarf an Enzym. Der Ansatz beschränkt sich daher auf Biomoleküle, die in großen Mengen und zu vertretbaren Kosten verfügbar sind. Ein weiteres Problem könnte sein, dass die weitere Funktionalisierung der QDs nach der enzymgestützten Synthese mit Schwierigkeiten verbunden ist. Werden Veränderungen an der Nanopartikeloberfläche vorgenommen, um zusätzliche Funktionalisierungsschritte zu ermöglichen, kann dies die Enzymaktivität beeinflussen. Außerdem sind manche bioaktiven Moleküle sehr empfindlich, z. B. gegen hohe Temperaturen, bestimmte Reaktanten und das Reaktionsmedium, wie sie für die Herstellung der Nanopartikel benötigt werden. Sofern keine stabileren Mutanten zur Verfügung stehen, kann deshalb ein

Wildtyp-Protein seine biologische Aktivität im BRET-Produkt verlieren. Für die In-vivo-Bildgebung molekularer Prozesse können zusätzliche Modifikationen erforderlich sein, um ein Ansprechverhalten auf bestimmte biologische Prozesse zu erzielen. Anders als bei BRET-Verfahren mit fluoreszierenden Proteinen können QDs nicht in zelluläre DNA integriert werden, sodass ein großer Vorteil von biolumineszierenden und fluoreszierenden Proteinen verloren geht. Glücklicherweise könnte die jüngste Entwicklung eines NIR-fluoreszierenden Proteins zu einem BRET-Verfahren für die NIR-Fluoreszenzbildgebung genetisch kodierter molekularer Systeme führen.

Die Studie von Ma et al.^[9] hat eine neue Richtung in der Synthese von biologisch aktiven proteingestützten Nanopartikeln aufgezeigt. Sie zeigt für den Fall der Luciferase, dass ein Biomolekül, das zunächst nur als Stabilisator für einen QD verwendet wird, auch seine biologische Funktion beibehalten kann. Zweifelsohne eröffnen sich neue Möglichkeiten für die Gestaltung raffinierter Nanopartikel, die Komponenten molekularer Reportersysteme für spezifische zelluläre und physiologische Prozesse integrieren. Die Suche nach den perfekten molekularen NIR-Sonden wird sich in nächster Zukunft fortsetzen. Hierbei ist zu vermuten, dass ein einzelner Ansatz oder ein einzelnes molekulares System den vielfältigen Anforderungen an eine In-vivo-Bildgebung nicht gerecht werden kann. Künftige Entwicklungen bei molekularen NIR-

Sonden werden sich an spezifischen biologischen Anforderungen orientieren und bedürfen gleichermaßen dem Einfallsreichtum von Chemikern, Biochemikern, Materialwissenschaftlern und Molekularbiologen.

Eingegangen am 10. September 2010
Online veröffentlicht am 18. November 2010

-
- [1] S. Achilefu, *Technol. Cancer Res. Treat.* **2004**, *3*, 393.
 - [2] S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 71.
 - [3] C. H. Tung, U. Mahmood, S. Bredow, R. Weissleder, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 4953.
 - [4] D. Shcherbo, I. I. Shemiakina, A. V. Ryabova, K. E. Luker, B. T. Schmidt, E. A. Souslova, T. V. Gorodnicheva, L. Strukova, K. M. Shidlovskiy, O. V. Britanova, A. G. Zaraisky, K. A. Lukyanov, V. B. Loschenov, G. D. Luker, D. M. Chudakov, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 827.
 - [5] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science* **2005**, *307*, 538.
 - [6] R. Y. Tsien, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5721; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5612.
 - [7] M. K. So, C. Xu, A. M. Loening, S. S. Gambhir, J. Rao, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 339.
 - [8] K. D. Pfleger, K. A. Eidne, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 165.
 - [9] N. Ma, A. F. Marshall, J. Rao, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6884.