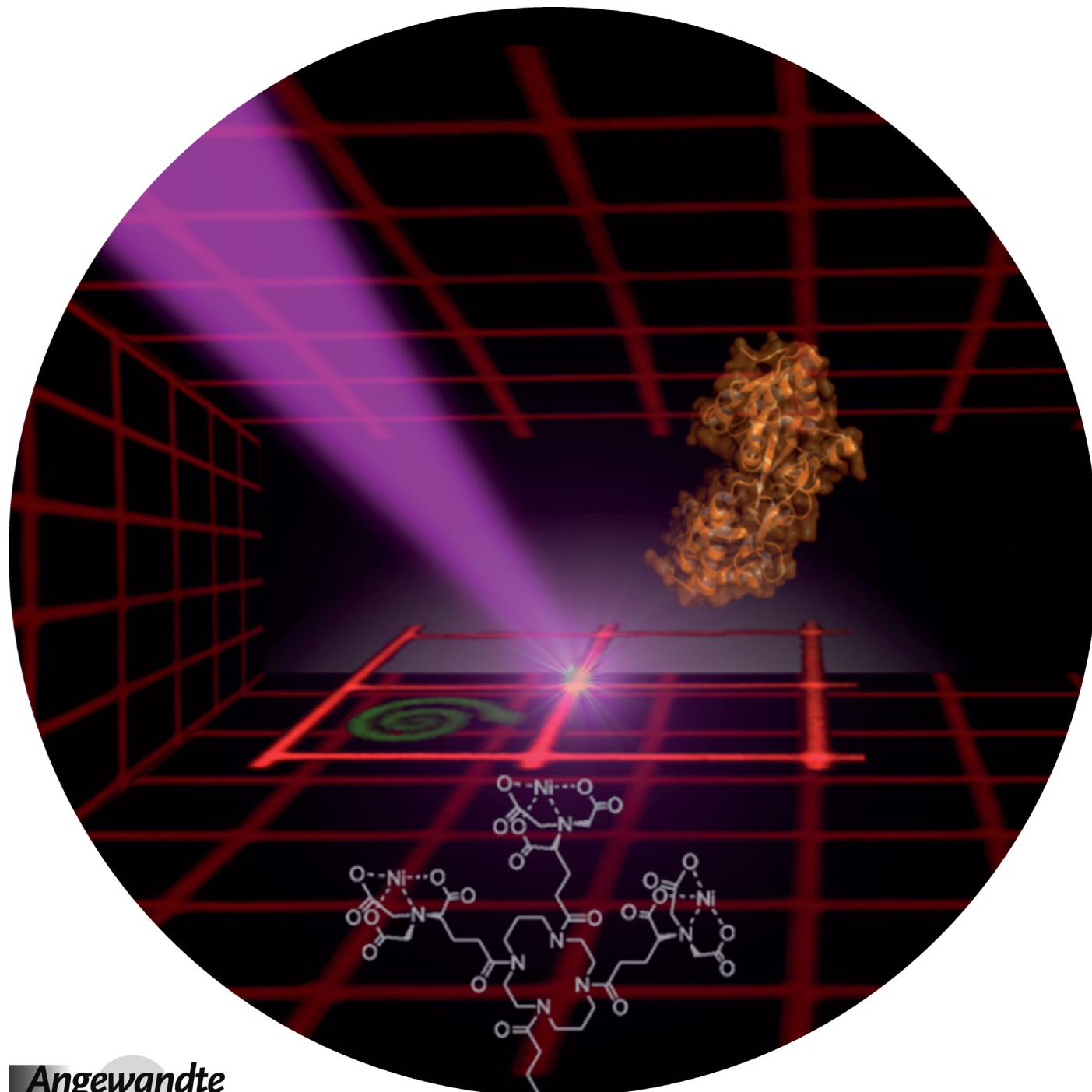


Steuerung von nanomolaren Wechselwirkungen und In-situ-Immobilisierung von Proteinen in vier Dimensionen durch Licht**

Noemi Labòria, Ralph Wieneke und Robert Tampé*



Das Verständnis der Funktion und Wechselwirkung von zellulären Komponenten erfordert effiziente Methoden zum Markieren, Verfolgen und Immobilisieren von Proteinen.^[1] Der ortsspezifische Einbau von chemischen Reportern wie etwa kleinen organischen Farbstoffen, genetisch kodierten fluoreszierenden Aminosäuren^[2] oder autofluoreszierenden Proteinen spiegelt diese Ziele wider. Eine räumliche und zeitliche Kontrolle dieser Modifikationen ist von besonderer Bedeutung, um zelluläre Prozesse möglichst umfassend zu beschreiben. Die geringe Größe, hohe Quantenausbeute und Photostabilität kleiner Fluoreszenzsonden ist dabei von beträchtlichem Vorteil um zelluläre Prozesse zu visualisieren. Im Vergleich zu den Dimensionen von autofluoreszierenden oder photoschaltbaren Proteinen (> 25 kDa) werden organische Fluorophore zudem bevorzugt, da sie die Proteineigenschaften weniger beeinflussen. Lichtaktivierbare Werkzeuge zur Markierung, Verfolgung und Manipulierung der Biomoleküle in den vier Dimensionen von Raum und Zeit sind hierbei vielversprechend.^[3] Licht ist mit biologischen Proben kompatibel, kann präzise in Raum, Zeit und Intensität kontrolliert werden und ist orthogonal zu anderen chemischen Reaktionen. Photoaktivierbare Moleküle profitieren von diesen Eigenschaften und sind ein leistungsstarkes Instrument zur Steuerung von molekularen Wechselwirkungen. Eine Vielzahl von photoaktivierbaren Verbindungen wurde in der Literatur beschrieben,^[4] über das kürzlich beschriebene ebenso wie die Glutathion^[5] bis hin zu genetisch kodierten photoaktivierbaren Aminosäuren.^[6] Das Repertoire der lichtaktivierbaren Verbindungen erweitert sich; und dies ist in empfehlenswerten Übersichtsartikeln festgehalten.^[7]

In der postgenomischen Ära liegt ein besonderes Augenmerk darauf, zelluläre Proteinnetzwerke möglichst global zu analysieren. Hierzu werden neue Strategien benötigt, um das interessierende Protein (protein of interest, POI) mit höherer räumlicher und zeitlicher Auflösung zu verfolgen. Methoden, wie PRIME (probe incorporation mediated by enzymes) oder das Markieren mit Fusionsproteinen, etwa SNAP-, CLIP- und Halo-Tag, haben vielfältige Anwendung gefunden in dem sich rasch entwickelnden Gebiet der chemischen Biologie.^[8] Deren Größe (> 20 kDa) unterscheidet sich allerdings kaum von autofluoreszierenden Proteinen, was deren Verwendung einschränken kann. Das Tetracystein-Motiv,^[9] die *N*-Nitritotriessigsäure^[10] (NTA), oder dessen multivalente Analoga, z.B. trisNTA,^[11] führten zu einem verbesserten Verständnis der molekularen Dynamik, Struktur und zellulären Funktion von Proteinen.^[12] Das trisNTA ermöglicht die ortsspezifische und reversible Markierung von

His-markierten Proteinen mit (sub-)nanomolarer Affinität ($K_d = 0.1 \text{ nm}$).^[11] Es gibt genomische Bibliotheken von His-markierten Proteinen aus nahezu allen Modellorganismen. Die geringe Größe der trisNTA-His-Markierung ist sehr kompatibel mit der Struktur, Funktion, Dynamik und Lokalisation der untersuchten Proteine. Im Unterschied zu NTA bietet trisNTA eine kinetisch stabile Bindung ($k_{\text{off}} = 0.18 \text{ h}^{-1}$), die in Gegenwart von Imidazol, Histidin oder EDTA reversibel ist. Diese Eigenschaft ist für die Regeneration von Fluorophoren in hochauflösender Mikroskopie (Nanoskopie), Einzelmolekülanalyse oder Biosensor-Anwendungen von besonderem Interesse.^[13]

Trotz der aktuellen Fortschritte in der Einzelmolekül-Spektroskopie und Nanoskopie auf zellulärer Ebene besteht eine Nachfrage an verbesserten Markierungsmethoden zur Steigerung der zeitlichen und räumlichen Auflösung. Hier stellen wir eine Serie von photoaktivierbaren trisNTA-Verbindungen (PA-trisNTAs) vor, die hervorragende Selbstaktivierung und Photoaktivierung zeigen. Proteinwechselwirkungen können über mehr als sechs Größenordnungen ausgelöst werden und erlauben die In-situ-Assemblierung von Proteinen in den vier Dimensionen von Raum und Zeit.

Eine Serie von fein abgestimmten PA-trisNTAs wurde entwickelt, um (sub-)nanomolare Wechselwirkungen ausschließlich nach räumlich-zeitlicher Photoaktivierung zu erreichen. Der Aufbau der PA-trisNTAs basiert auf dem multivalen Chelatorkopf trisNTA, der durch einen peptidischen Linker mit einer kumulativen Histidinsequenz verbunden ist (Schema 1A). In Gegenwart von Nickelionen bildet das trisNTA einen intramolekularen Komplex und ist somit selbstaktiviert. Die Aktivierung dieses Miniatur-Schlüssel-Schloss-Elements wird durch die lichtsensitive 3-Amino-3-(2-nitrophenyl)propionsäure (Anp) garantiert. Die strategische Positionierung von Anp gewährleistet die effiziente Fragmentierung durch UV-Licht.^[14] Ein Cystein in der Nähe des N-Terminus ermöglicht eine Oberflächenimmobilisierung oder spezifische Anbringung von Reportermolekülen.

Das PA-trisNTA **1** mit einem relativ langen Linker (11 Aminosäuren; AS) zeigte moderate Selbstaktivierung sowohl in Lösung als auch auf Oberflächen.^[13c] Nach Photoaktivierung waren nur 15 % des befreiten trisNTAs an His-markierte Proteine gebunden. Um eine robustere Selbstaktivierung des trisNTAs sowie eine höhere Bindungskapazität nach der Belichtung zu erzielen, wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen sollte die Verkürzung des Peptidlinkers einen sehr kompakten, selbstaktivierten Komplex ergeben. Zum anderen sollte durch die strategische Platzierung der photosensitiven Aminosäure Anp innerhalb der intramolekularen Histidinsequenz eine erhöhte Photoaktivierung erreicht werden, da die His-Markierung photofragmentiert wird.

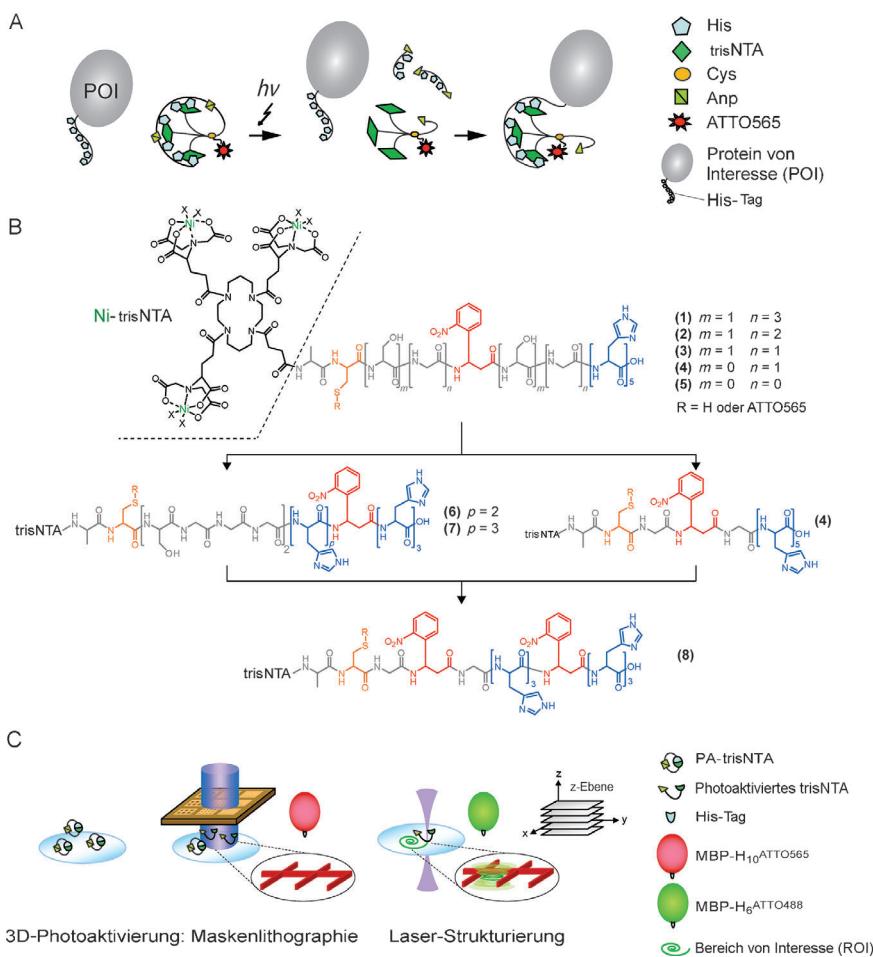
Um diese beiden Aspekte systematisch umzusetzen, verwendeten wir Fmoc-Festphasenchemie zur Synthese der PA-trisNTAs mit unterschiedlichen Linkerlängen und Positionen der photosensitiven Aminosäure Anp. Ausgehend von Histidin-beladenem Tritylharz wurde eine Kettenverlängerung (siehe die Hintergrundinformationen) durch wiederholte Zyklen von Fmoc-Entschützung mittels Piperidinbe-

[*] N. Labòria,^[+] Dr. R. Wieneke,^[+] Prof. R. Tampe
Institut für Biochemie, Biozentrum; Cluster of Excellence Frankfurt,
Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 9, 60438 Frankfurt/M. (Deutschland)
E-Mail: tampe@em.uni-frankfurt.de
Homepage: <http://www.biochem.uni-frankfurt.de>

[+] Beide Autoren haben gleichermaßen beigetragen.

[**] Diese Arbeit wurde unterstützt durch die DFG durch Ta157/9
(SPP 1623), SFB 902 (B7) und ERA-Net-Neuron.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201206698> zu finden.



Schema 1. A) Das PA-trisNTA-Prinzip: Ausgehend von einer effizienten Selbstaktivierung wird nach Photoaktivierung eine Wechselwirkung zwischen PA-trisNTA und His-markiertem Protein ausgelöst. B) Strukturformeln der synthetisierten PA-trisNTAs. C) In-situ-Assemblierung von His-markierten Proteinen an PA-trisNTA-funktionalisierten Hydrogelen. Mithilfe von Maskenlithographie oder Fluoreszenz-Laserrastermikroskopie können durch In-situ-3D-Photoaktivierung Muster geschrieben werden.

handlung und anschließender Kupplung der entsprechenden AS mithilfe von HBTU und DIPEA durchgeführt. *OtBu*-geschütztes trisNTA wurde an den N-Terminus durch Kupplung mit COMU am Harz eingeführt. Die komplette Entschützung und Abspaltung vom Harz erfolgte durch Behandlung mit TFA/TIPS/H₂O/EDT/Phenol über 4 h. Nach Fällung und Reinigung durch RP-C₁₈-HPLC wurden alle Moleküle massenspektrometrisch identifiziert (siehe Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen).

Um die Selbstaktivierung und die Stabilität des auto-inhibierten Komplexes zu verbessern, wurde systematisch der Einfluss der Linkerlänge untersucht. Ausgehend von PA-trisNTA **1** mit 11AS im Linker wurde das Peptidrückgrat zwischen trisNTA und der intramolekularen His₅-Sequenz um jeweils zwei Aminosäuren verkürzt (**1-5**). Bei den Synthesen wurde das Ala-Cys-Paar am N-Terminus und das Anp in der Mitte des Linkers konstant gehalten (Schema 1B). Aus Kostengründen wurde in den Synthesen von **2** bis **5** zunächst die racemische Mischung von Anp verwendet. RP-C₁₈-HPLC-Reinigung lieferte unterschiedliche Retentionszeiten für das

jeweilige Diastereomer, die entsprechend ihrer Elutionszeit (a) oder (b) genannt wurden (Abbildung S1).

Um die Wechselwirkung mit His-markierten Proteinen vor und nach Belichtung (366 nm, Xe/Hg-Lampe, 200 W, 20 min) zu verfolgen, wurden alle PA-trisNTAs mit dem Fluorophor ATTO565 markiert. Das His-markierte Maltose-Bindeprotein (MBP-H_{6/10}) hat sich als ein sehr gutes und weit verbreitetes Modell für Studien zur trisNTA-Wechselwirkung erwiesen.^[15] Die lichtaktivierte Wechselwirkung von PA-trisNTA mit MBP-H_{6/10} (jeweils 5 μ m) wurde durch Gelfiltration (SEC; Abbildung 1A) analysiert. Vor Photoaktivierung, wurde eine verbesserte Selbstaktivierung mit abnehmender Linkerlänge beobachtet (Abbildung 1B). MBP-H₆ und MBP-H₁₀ wurden verwendet, um das Selbstaktivierungspotenzial der PA-trisNTAs zu testen, da sie unterschiedliche Affinitäten zu freiem trisNTA aufweisen (K_d von 2 und 0.1 nm für MBP-H₆ bzw. MBP-H₁₀).^[11] **4b** zeigte eine sehr gute Selbstaktivierung mit weniger als 0.7 % unspezifischer Bindung von MBP-H₁₀ bei Konzentrationen, die 50 000-fach über dem K_d lagen. Der 5AS-Linker von **4a,b** entsprach der kritischen Linkerlänge. **5a,b** mit 3AS-Linker zeigte keine optimale Selbstaktivierung im Vergleich zu MBP-H_{6/10} mit **4a,b** (mit 5AS-Linker). Dies deutet darauf hin, dass das Rückgrat zu kurz ist, um

einen optimalen Kontakt zwischen dem intramolekularen Histidin und der trisNTA-Gruppe herzustellen.

Bemerkenswert ist, dass die Selbstaktivierung auch von der Stereokonfiguration der photospaltbaren AS abhängt. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die PA-trisNTAs **4a** und **4b** de novo mit enantiomerenreinen Anp synthetisiert. Die Protein-Wechselwirkungsanalyse offenbarte, dass (*S*)-Anp gegenüber der *R*-konfigurierten Aminosäure bevorzugt wird (Abbildung 1B). Vor der Photoaktivierung wurde ein deutlicher Unterschied zwischen **4a(R)** und **4b(S)** beobachtet. Für **4b(S)** wurden weniger als 0.7 % Wechselwirkung mit MBP-H₁₀ detektiert, wo hingegen über 15 % von **4a(R)** an MBP-H₁₀ binden. Zusammenfassend sind der 5AS-Linker und das Stereozentrum der photospaltbaren AS für die Bildung eines kompakten, selbstaktivierten trisNTA-Histidin-Komplexes kritisch.

Nach Photoaktivierung wechselwirkten nur 15 % von **1** mit MBP-H₆ (Abbildung 1B). Eine Erklärung könnte sein, dass die abgespaltene Oligohistidin-Sequenz um die trisNTA-Bindungsstelle mit anderen His-markierten Proteinen

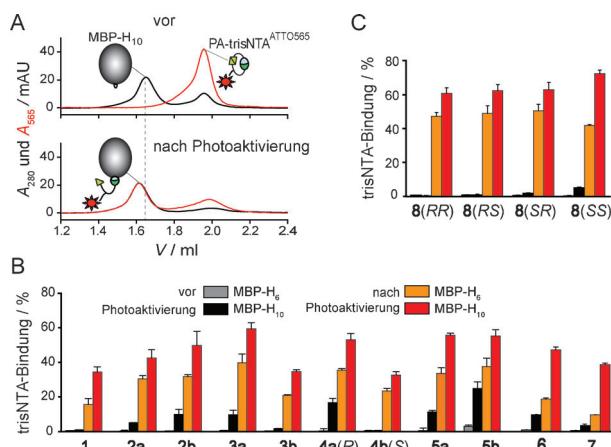


Abbildung 1. SEC-Analyse der In-situ-Wechselwirkung von PA-trisNTAs vor und nach Photoaktivierung in Gegenwart von His-markierten Proteinen. A) Größenausschlusschromatographie (SEC) von PA-trisNTA **8(RR)** und MBP-H₁₀ vor und nach Photoaktivierung. Die In-situ-Wechselwirkung findet nur nach Lichtaktivierung statt. Es wurden keine Wechselwirkungen in Gegenwart von 100 mM Imidazol beobachtet (Abbildung S3). In allen Experimenten wurden ATTO565 markierte PA-trisNTAs verwendet. B) Selbstanaktivierung und Photoaktivierung von PA-trisNTAs mit unterschiedlichen Peptidlinkern und photospaltbaren His-Markierungen. C) Verbesserte PA-trisNTAs mit dem optimalen Linker (5 AS) und zwei lichtaktivierbaren Anp in S- oder R-Konfiguration. In allen Experimenten wurden jeweils 5 μ M PA-trisNTA und MBP-H_{6/10} verwendet.

konkurriert. Um die Multivalenz der freigesetzten His-Markierung nach Belichtung zu reduzieren, wurde die photospaltbare AS innerhalb der selbstanaktivierenden Histidinsequenz eingefügt. Aus früheren Studien wissen wir, dass fünf Histidine für die Selbstanaktivierung erforderlich sind und dass Anp die intramolekulare Komplexbildung der trisNTA-His-Markierung nicht stört.^[13c,16] Die PA-trisNTAs **6** und **7** (beide in S-Konfiguration; Schema 1B) spalten eine Sequenz von drei Histidinen nach Photoaktivierung ab, während zwei bzw. drei intramolekulare Histidine in **6** bzw. **7** verbleiben. Die SEC-Analyse zeigte sowohl eine deutlich erhöhte Selbstanaktivierung als auch eine verbesserte Proteininteraktion für **6** und **7** (Abbildung 1B). Vor der Photoaktivierung interagiert MBP-H₁₀ mit beiden Verbindungen, was darauf hindeutet, dass die trisNTA-Histidin-Komplexe nicht ausreichend selbstanaktiviert sind. Bis zu 15% unspezifische MBP-H₁₀-Bindung an Verbindung **6** (mit fünf intramolekularen Histidinen) wurde beobachtet, wohingegen **7** mit sechs intramolekularen Histidinen nur 10% Verdrängung durch MBP-H₁₀ zeigte. Mit steigender Anzahl intramolekularer Histidine erhöht sich die Kompaktheit des selbstanaktivierenden Komplexes. Die nach der Photospaltung verbliebenen zwei bzw. drei intramolekularen Histidine von **6** und **7** binden an die trisNTA-Einheit und stören dadurch die Wechselwirkung mit MBP-H_{6/10} (Abbildung S2). Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Analysen erhärteten dieses Ergebnis. In **7** ist dieser Effekt noch deutlicher ausgeprägt als bei **6**. Dies ist auf die erhöhte Anzahl der verbleibenden intramolekularen Histidine zurückzuführen. Wir nehmen daher eine synergistische Wirkung der Linkerlänge und Anp-Position an. Zudem

hindert jedes verbleibende intramolekulare Histidin eine stabile Komplexbildung mit His-markierten Proteinen.

Nach Auswertung aller vorherigen Ergebnisse wurde eine Serie von optimierten PA-trisNTAs synthetisiert, die eine ideale Linkerlänge und zwei lichtspaltbare AS enthalten. Die erste photospaltbare Aminosäure sorgt für die komplettete Abspaltung der Oligohistidin-Sequenz und die zweite für die Photofragmentierung derselben (Schema 1A; **8**). Die Stereochemie des Anps wurde ebenfalls berücksichtigt, da diese einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Selbstanaktivierung und Photoaktivierung zeigte. Insgesamt wurden vier verschiedene PA-trisNTAs synthetisiert und ihre Wechselwirkung mit His_{6/10}-markierten Proteinen analysiert (Abbildung 1C). Vor der Photoaktivierung wurde eine verbesserte Selbstanaktivierung der PA-trisNTAs **8(RR)**, **8(RS)**, und **8(SR)** mit weniger als 1% unspezifischer Bindung mit MBP-H₁₀ (**8** und MBP-H₁₀, je 5 μ M) detektiert. Im Vergleich dazu zeigte **8(RR)** die stabilste Komplexbildung und die besten Selbstanaktivierungseigenschaften mit weniger als 0.3% Bindung. Selbst bei einem 25-fachen molaren Überschuss von MBP-H₁₀ konnte keine Wechselwirkung mit **8(RR)** nachgewiesen werden (Abbildung S3). Nach Photoaktivierung zeigten alle PA-trisNTAs **8** Bindungswerte im Bereich von 40% bis 50% für MBP-H₆ und bis zu 60% für MBP-H₁₀.

Das ausgezeichnete Verhalten von **8(RR)** in Bezug auf Selbstanaktivierung und lichtgetriebener Aktivierung wurde mit SPR-Spektroskopie durch Vergleich mit **4b(S)** bestätigt (Abbildung 2). Die oberflächenimmobilisierten PA-trisNTAs wurden mit steigenden Konzentrationen von MBP-H₁₀ (bis zu 5 μ M) hinsichtlich ihrer Selbstanaktivierung untersucht (Abbildung 2, oben). Nach Belichtung wurde eine 50-fach nied-

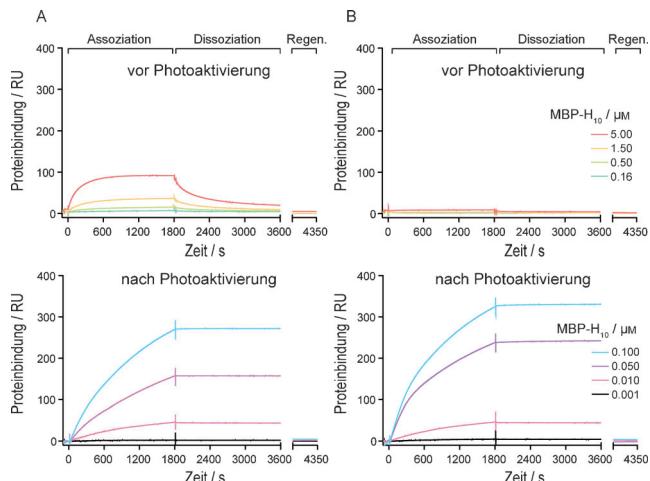


Abbildung 2. SPR-Analyse der Assoziations- und Dissoziationskinetik von MBP-H₁₀ mit oberflächenimmobilisierten **4b(S)** (A) und **8(RR)** (B) vor und nach Photoaktivierung. Es wurde eine hervorragende Selbstanaktivierung von **8(RR)** selbst bei 5 μ M des MBP-H₁₀ beobachtet. Nach Photoaktivierung ist die Proteinbindung vergleichbar mit immobilisierten freien trisNTA (Abbildung S4). In Gegenwart von EDTA oder Imidazol (Regeneration) wurden keine Wechselwirkungen mit His-markierten Proteinen detektiert, was die Spezifität der Wechselwirkung beweist. Die Dissoziationskonstanten der photoaktivierten PA-trisNTA **4b(S)** und **8(RR)** wurden auf 0.9 nm ($\chi^2=18$) und 1.3 nm ($\chi^2=124$) ermittelt. Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem freien trisNTA ($K_d=0.1$ nm).^[15b]

rigere Konzentration von MBP-H₁₀ verwendet, um die Wechselwirkung des trisNTAs mit dem His-markierten Protein zu analysieren (Abbildung 2, unten). Darüber hinaus wurde die Wechselwirkung der Verbindungen mit MBP-H₆ und als interne Kontrolle freies trisNTA untersucht (Abbildung S4). Das optimierte **8(RR)** zeigte sowohl eine komplett Selbstaktivierung als auch den kleinsten Beitrag an unspezifischer Bindung. Auch bei der höchsten Konzentration His-markierter Proteine (> 1000-fach über dem K_d -Wert) konnte keine Interaktion detektiert werden, während **4b(S)** eine transiente Bindung mit ansteigenden Konzentrationen von MBP-H₁₀ aufwies. Nach Photoaktivierung wurden für **8(RR)** und **4b(S)** vergleichbare spezifische und stabile Proteinbindungen mit sehr langsam Dissoziationskinetiken erhalten. Dieses Verhalten ist in sehr guter Übereinstimmung mit dem freien trisNTA (Abbildung S4). Es ist anzumerken, dass die photospaltbare Oligohistidin-Sequenz durch Waschschriften entfernt wurde und somit 100 % Bindung von MBP-H_{6/10} erhalten wurden. PA-trisNTA **8(RR)** zeigte eine ausgezeichnete Selbstaktivierung in Lösung und an Oberflächen, da selbst bei extrem hohen lokalen Konzentrationen von His-markierten Proteinen keine Interaktion im inaktivierten Zustand zu erkennen war. Eine erhöhte Photoaktivierung und eine reduzierte Multivalenz der intramolekularen His-Markierung wurden durch den Einbau einer zweiten photospaltbaren Aminosäure erzielt.

Aufgrund ihrer einfachen Herstellung und mechanischen Eigenschaften finden Hydrogele eine breite Anwendung in der Biotechnologie.^[17] Dank ihrer biokompatiblen Eigenschaften werden Hydrogele aus Polyethylenglycol (PEG)^[18] bevorzugt gegenüber natürlichen Hydrogelen, wie Agarose, Kollagen, Hyaluronsäure usw., eingesetzt. Gemischte (hybride) Hydrogele mit immobilisierten Biomolekülen, wie Peptiden oder Proteinen bieten zudem die Möglichkeit, Zellverhalten und zelluläre Prozesse zu untersuchen. Trotz dieser Vorteile ist die räumlich und zeitlich kontrollierte Assemblierung von Biomolekülen in Hydrogelen noch selten, und bis heute existieren nur wenige Ansätze.^[12a, 19] Basierend auf dem Konzept der lichtaktivierbaren PA-trisNTAs präsentieren wir nachfolgend eine neue Methode zur In-situ-Assemblierung von Proteinen in Hydrogelen.

Das optimierte PA-trisNTA **8(RR)** wurde zuerst an eine Maleimid-Polyvinylalkohol(PVA)-Vorläufersubstanz kovalent gebunden (Schema 1C). Nach anschließender Polymerisation wurde das PA-trisNTA-funktionalisierte Hydrogel durch Masken-Lithographie (366-nm-LED-Lampe, 185 mW cm⁻², 1 min) photoaktiviert, um ein regelmäßiges Muster mit unterschiedlichen Dimensionen zu generieren. Die Bindung von MBP-H₁₀^{ATTO565} (10 nm) an die photoaktivierten trisNTA-Moleküle wurde mittels konfokaler Raster-lasermikroskopie (CLSM) verfolgt. Die Assemblierung der His-markierten Proteine fand nur in den photoaktivierten Bereichen statt (Abbildung 3A; Film S1). Das hervorragende Signal-Rausch-Verhältnis bestätigt die hohe Spezifität des Prozesses.

Die In-situ-Photoaktivierung hat das Potential, Reaktionen mit hoher räumlicher und zeitlicher Kontrolle für die Mikrofertigung, das Gewebe-Engineering und die Rezeptor-Clusterbildung zu steuern. Strukturen mit verschiedenen

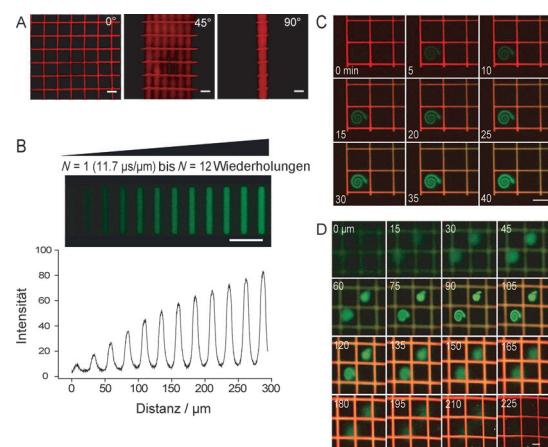


Abbildung 3. In-situ-Assemblierung von Proteinen in vier Dimensionen. A) Maskenstrukturierung bei 366 nm mit anschließender Inkubation von MBP-H₁₀^{ATTO565} (10 nm). Die Photostrukturierung erfolgte durch das gesamte Volumen des Hydrogels mit hoher räumlicher Auflösung (Film S1). B) Um das beste Signal-Rausch-Verhältnis und die minimal benötigte Zeit der Photoaktivierung zu bestimmen, wurden iterativ rechteckige Bereiche mit dem 405-nm-Laser geschrieben und Arrays mit verschiedenen Proteindichten erzeugt. Eine gute Korrelation zwischen Aktivierungszeit und Proteindichte konnte somit bestimmt werden. Eine sehr gute Proteinstrukturierung wurde bereits nach einer Iteration (11.7 $\mu\text{s } \mu\text{m}^{-1}$) beobachtet. C) Frei gestaltete Bereiche (ROI: Schlange) wurden durch In-situ-Photoaktivierung mit einem 405 nm Laser-Scan (Film S2) erzeugt. 1.5 nm von MBP-H₆^{ATTO488} wurde verwendet. Alle 5 min wurden CLSM-Bilder bei ex/ern 488/520 und 543/570 nm für MBP-H₆^{ATTO488} und MBP-H₁₀^{ATTO565} aufgenommen. D) In-situ-Photoaktivierung und Proteinassemblierung in drei Dimensionen. Die Photoaktivierung in einem kleinen fokussierten Volumen wurde durch Aufnahmen von z-Stapeln im Abstand von 15 μm demonstriert (Film S3). Maßstabsbalken: 50 μm .

Proteindichten können erzeugt werden.^[16, 20] Hier nutzen wir die Aktivierungseigenschaft von PA-trisNTA **8(RR)** mit dem 405-nm-Laser des CLSM, um frei definierte Bereiche (ROI) in das transparente Hydrogel zu schreiben (Abbildung 3B). Unter variierenden Belichtungszeiten wurde das PA-trisNTA **8(RR)** mit einem 40 \times Objektiv und konstanter Lichtstärke (25 mW) aktiviert (1 bis 12 Scan-Wiederholungen; 11.7 bis 141.3 $\mu\text{s } \mu\text{m}^{-1}$). Die sich erhöhenden Proteindichten wurden mit einem sehr guten Signal-Rausch-Verhältnis und einer Konzentration von 1.5 nm MBP-H₆^{ATTO488} (1.5 nm) erreicht. Selbst nach 12 Wiederholungen wurden keine unscharfen Ränder beobachtet. Daher wurde dieser Modus gewählt, um freigestaltete ROIs zu schreiben.

Protein-Arrays, die die simultane Analyse von unterschiedlichen Proteinfunktionen ermöglichen, vermeiden mühsame Wiederholungen der Experimente und sichern gleiche experimentelle Bedingungen für alle Proben. Zwei-farbexperimente sind ein sehr guter Beweis für die räumlich-zeitliche Aktivierung und Kontrolle der Proteindichte und simultane Analyse. Zur Realisation solcher Experimente wurde eine Kombination von Masken- und In-situ-Laserlithographie zur multiplexen Assemblierung gewählt (Abbildung 1C). Als erstes wurde das **8(RR)**-funktionalisierte Hydrogel mit einer Maske bei 366 nm photoaktiviert, um ein dreidimensionales Gitter aus MBP-H₁₀^{ATTO565} (bei 10 nm) zu erhalten. Als nächstes wurde eine In-situ-Strukturierung mit

dem 405-nm-Laser vorgenommen, um MBP-H₆^{ATTO488} (1.5 nm) in ausgewählten photoaktivierten Zonen in dem Hybrid-Hydrogel anzutragen (Abbildung 3C). Die Bereiche (Schlange) wurden unter Verwendung eines 40 × Objektivs, der optimalen Belichtungszeit von 141.3 $\mu\text{s}\mu\text{m}^{-1}$ und einer konstanten Lichtintensität von 25 mW geschrieben. Die Bindung von MBP-H₆^{ATTO488} an das Hydrogel wurde dabei in Echtzeit verfolgt (Abbildung 3C; Film S2). Sofort nach Photoaktivierung kann das Proteinmuster visualisiert werden. Definierte Strukturen mit hervorragendem Signal-Rausch-Verhältnis wurden nach 10 bis 15 min beobachtet. Durch die In-situ-Photoaktivierung von PA-trisNTA **8(RR)** konnte eine schnelle und effiziente Assemblierung von Proteinen realisiert werden. Die hohe Spezifität und Affinität des photoaktivierten trisNTAs wird auch durch den hervorragenden Kontrast wiedergegeben. Der Grund, weshalb MBP-H₆^{ATTO488} auch in anderen Bereichen beobachtet wird, kann sowohl durch die noch freien Bindungsstellen von trisNTAs als auch das Bleichen von gebundenen MBP-H₁₀^{ATTO565} mit der Zeit erklärt werden (siehe rechter Rand in Abbildung 3D). MBP-H₁₀^{ATTO565} wurde in sehr niedriger Konzentration angeboten, um die hohe Spezifität der trisNTA-Histidin-Wechselwirkung zu beweisen. Insgesamt ermöglicht dieser „Multiplexing“-Ansatz das schnelle sequenzielle Schreiben und Auslesen von komplexen Strukturen.

Definierte *z*-Stapel wurden über und unter dem Fokus der photoaktivierten ROIs aufgenommen. Bemerkenswerterweise fand die In-situ-Photoaktivierung in der Fokusebene mit einer Auflösung von 0.5 μm in der *xy*-Ebene und einer *z*-Auflösung von etwa 50 μm statt (Abbildung 3D; Film S3). Die Bilder sind in der Fokusebene scharf und werden nach oben und unten schnell unscharf. Die Einzelphoton-Anregung erlaubt somit die In-situ-Assemblierung von Proteinen in der Fokusebene und in vier Dimensionen auf eine einfache und schnelle Art. Trotz der geringen Auflösung in *z*-Richtung ahmt dieser Ansatz eine Mehrphotonenanregung unter Verwendung eines Standard-Laserrastermikroskop nach.^[21] Für eine noch höhere räumliche Auflösung, insbesondere in der *z*-Dimension untersuchen wir derzeit neue photospaltbaren Verbindungen für die Zweiphotonenanregung.

Zusammengefasst haben wir eine Serie von feinabgestimmten PA-trisNTAs entwickelt, die durch systematische Variationen im Peptidlinker sowie der Position und Anzahl der photospaltbaren Aminosäuren zu einem PA-trisNTA mit hervorragenden Photoeigenschaften führten. Die Linkerlänge konnte von 11 auf 5 AS verkürzt werden, um einen kompakten, selbstinaktivierten Komplex zu erzeugen. Ein weiteres Anp verhinderte die erneute Anbindung der abgespaltenen Oligohistidin-Sequenz durch Photofragmentierung. Außerdem konnten wir zeigen, dass die Stereochemie der photoaktivierbaren Aminosäure eine wichtige Rolle bei der Selbstinaktivierung spielt. Die Optimierung dieser Parameter konvergierte in die Generierung von PA-trisNTA **8(RR)**, das eine überragende Selbstinaktivierung und Photoaktivierung aufweist, die durch SEC- und SPR-Analyse bewiesen wurden.

Die hervorragenden Eigenschaften des PA-trisNTAs **8(RR)** wurden genutzt, um photoaktivierbare Hybrid-Hydrogele für die In-situ-Proteinassemblierung zu erzeugen. Verschiedene Proteinmuster konnten sequenziell mit sehr

guter zeitlicher und räumlicher Auflösung photostrukturiert werden. Die Photoaktivierung ist leicht einstellbar, extrem schnell (ca. 140 $\mu\text{s}\mu\text{m}^{-1}$) und führt zu unterschiedlichen Dichten. Im konfokalen Volumen konnten Bereiche mithilfe eines 405-nm-Lasers frei geschrieben werden. Die fein abgestimmten PA-trisNTAs ebnen somit den Weg für verschiedene Anwendungen in der chemischen Biologie, um Protein-Protein-Wechselwirkung zu verfolgen und zu steuern. Da die His-Markierung als weitverbreitete Reinigungsstrategie in fast jedem Labor verwendet wird, wird unser Ansatz der photoaktivierbaren trisNTAs neue Anwendungen zur Evaluierung von zellulären Signalwegen in Zeit und Raum finden.

Eingegangen am 18. August 2012,
veränderte Fassung am 10. Oktober 2012

Stichwörter: 3D-Photostrukturierung · Molekulare Erkennung · Photoaktivierung · Proteinassemblierung

- [1] a) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998; b) J. A. Preischer, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21; c) K. M. Marks, G. P. Nolan, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 591–596.
- [2] D. Summerer, S. Chen, N. Wu, A. Deiters, J. W. Chin, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 9785–9789.
- [3] T. Fehrentz, M. Schonberger, D. Trauner, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12362–12390; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12156–12182.
- [4] a) D. Puliti, D. Warther, C. Orange, A. Specht, M. Goeldner, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1023–1029; b) S. Gug, F. Bolze, A. Specht, C. Bourgogne, M. Goeldner, J. F. Nicoud, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9667–9671; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9525–9529.
- [5] V. Gatterdam, T. Stoess, C. Menge, A. Heckel, R. Tampé, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4027–4030; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3960–3963.
- [6] N. Wu, A. Deiters, T. A. Cropp, D. King, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14306–14307.
- [7] a) H. M. Lee, D. R. Larson, D. S. Lawrence, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 409–427; b) D. S. Lawrence, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 570–575; c) G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619–628; d) C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8572–8604; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476; e) M. Goeldner, R. Givens, *Dynamic Studies in Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [8] a) G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohane, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Balleit, K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373–382; b) A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86–89; c) A. Gautier, A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Correa, M. Kindermann, F. Beaufils, K. Johnsson, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 128–136; d) C. Uttamapinant, A. Tangpeerachaikul, S. Grecian, S. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee, A. Y. Ting, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 5954–5958; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5852–5856.
- [9] B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, *281*, 269–272.
- [10] B. R. Hart, K. J. Shea, *Macromolecules* **2002**, *35*, 6192–6201.
- [11] S. Lata, A. Reichel, R. Brock, R. Tampé, J. P. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10205–10215.

- [12] a) E. G. Guignet, R. Hovius, H. Vogel, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 440–444; b) C. Orange, A. Specht, D. Puliti, E. Sakr, T. Furuta, B. Winsor, M. Goeldner, *Chem. Commun.* **2008**, 1217–1219.
- [13] a) C. Grunwald, K. Schulze, G. Giannone, L. Cognet, B. Lounis, D. Choquet, R. Tampé, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8090–8093; b) G. Giannone, E. Hosy, F. Levet, A. Constals, K. Schulze, A. I. Sobolevsky, M. P. Rosconi, E. Gouaux, R. Tampé, D. Choquet, L. Cognet, *Biophys. J.* **2010**, *99*, 1303–1310; c) Č. Grunwald, K. Schulze, A. Reichel, V. U. Weiss, D. Blaas, J. Piehler, K. H. Wiesmuller, R. Tampé, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 6146–6151.
- [14] a) L. L. Parker, J. W. Kurutz, S. B. H. Kent, S. J. Kron, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6470–6473; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6322–6325; b) M. Toebe, M. Coccoris, A. Bins, B. Rodenko, R. Gomez, N. J. Nieuwkoop, W. van de Kasteele, G. F. Rimmelzwaan, J. B. A. G. Haanen, H. Ovaa, T. N. M. Schumacher, *Nat. Med.* **2006**, *12*, 246–251.
- [15] a) A. Tinazli, J. Tang, R. Valiokas, S. Picuric, S. Lata, J. Piehler, B. Liedberg, R. Tampé, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5249–5259; b) S. Lata, J. Piehler, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1096–1105.
- [16] M. Bhagawati, S. Lata, R. Tampé, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5932–5933.
- [17] a) A. R. Hirst, B. Escuder, J. F. Miravet, D. K. Smith, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8122–8139; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8002–8018; b) N. A. Peppas, J. Z. Hilt, A. Khademhosseini, R. Langer, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1345–1360; c) I. Yoshimura, Y. Miyahara, N. Kasagi, H. Yamane, A. Ojida, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12204–12205.
- [18] J. M. Zhu, *Biomaterials* **2010**, *31*, 4639–4656.
- [19] a) C. A. DeForest, K. S. Anseth, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1852–1855; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1816–1819; b) C. A. DeForest, K. S. Anseth, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 925–931; c) S. H. Lee, J. J. Moon, J. L. West, *Biomaterials* **2008**, *29*, 2962–2968; d) J. C. Hoffmann, J. L. West, *Soft Matter* **2010**, *6*, 5056–5063; e) K. A. Kilian, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4975–4979; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4891–4895; f) Y. Luo, M. S. Shoichet, *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 249–253; g) R. G. Wylie, S. Ahsan, Y. Aizawa, K. L. Maxwell, C. M. Morshead, M. S. Shoichet, *Nat. Mater.* **2011**, *10*, 799–806.
- [20] M. Álvarez, J. M. Alonso, O. Filevich, M. Bhagawati, R. Etchenique, J. Piehler, A. del Campo, *Langmuir* **2011**, *27*, 2789–2795.
- [21] M. S. Hahn, J. S. Miller, J. L. West, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 2679–2684.