

Fluoreszenzsonden zur Messung von Kohlenmonoxid in lebenden Zellen**

Lin Yuan, Weiyang Lin,* Li Tan, Kaibo Zheng und Weimin Huang

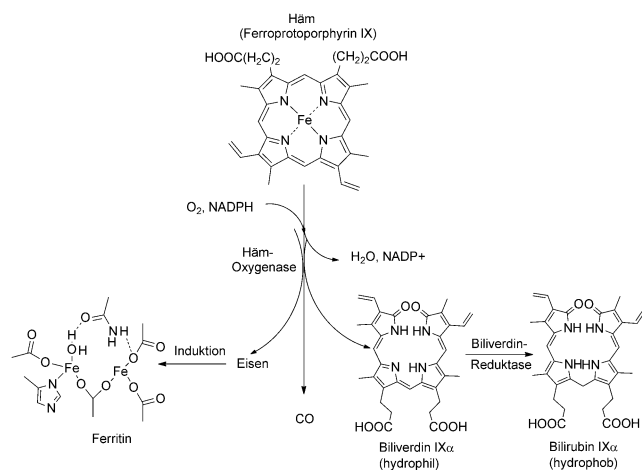
Analysemethoden · Fluoreszenzsonden ·
Imaging-Reagentien · Kohlenmonoxid · Übergangs-
metalle

Kohlenmonoxid (CO) wurde lange Zeit auf seine Rolle als Gift, Abfallstoff oder Umweltschadstoff reduziert, dessen Giftwirkung auf seiner hohen Affinität für Hämoglobin beruht.^[1,2] Als Umweltgift können pathologische Mengen an CO sowohl akute wie chronische Gesundheitsprobleme verursachen.^[3] Andererseits deuten neuere Studien darauf hin, dass CO – ebenso wie Stickstoffmonoxid (NO) und Schwefelwasserstoff (H₂S) – ein essentieller, gasförmiger Sekundärbotenstoff (second messenger) im menschlichen Stoffwechsel ist.^[4] Es ist bekannt, dass CO Signalgebungsprozesse bei physiologischen Vorgängen wie der Gefäßerweiterung (Vasodilatation), der Apoptosehemmung, der Entzündungshemmung und der Zellteilungshemmung sowie der Nervenreizleitung (Neurotransmission) vermittelt.^[5] Die Hauptmenge des endogenen Kohlenmonoxids (86%) im Körper wird durch oxidativen Katabolismus des Häms mittels Häm-oxygenasen (HOs) gebildet (Schema 1).^[3,4,6] Die Wirkungsweise von CO in biologischen Systemen ist weitgehend un-

selektiven Nachweismethoden, die es erlauben, CO in komplexen biologischen Systemen zu verfolgen.

Zu den gegenwärtig zur Verfügung stehenden Methoden zum CO-Nachweis gehören die chromogene Detektion,^[7] die Lasersensor-Infrarotabsorption,^[8] elektrochemische Assays,^[9] die Gaschromatographie^[10] und andere mehr.^[11] Diese Techniken sind jedoch für die nichtinvasive Echtzeit-Detektion physiologischer CO-Mengen in lebenden Zellen nicht oder wenig geeignet. In jüngerer Zeit haben sich Fluoreszenzmessungen und die Fluoreszenz-Bildgebung als leistungsfähigste Methoden zur Analyse der Menge, Lokalisation und Ortsveränderung von Biomolekülen in lebenden Systemen etabliert. Obschon eine Vielzahl von Fluoreszenzsonden für Sekundärbotenstoffe wie H₂S,^[12] NO und H₂O₂^[13] entworfen und mit Erfolg in biologischen Systemen eingesetzt wurde, hinkt die Entwicklung solcher Sonden für CO in biologischen Umgebungen hinterher. In jüngster Zeit wurden nun von den Arbeitsgruppen um He^[14] und Chang^[15] entscheidende Fortschritte erzielt. Die Autoren berichteten unabhängig voneinander über zwei unterschiedliche Arten fluoreszierender CO-Sonden: einen Biosensor und eine niedermolekulare Sonde. In diesem Highlight werden diese bedeutenden Entdeckungen zusammengefasst.

Obwohl die von He^[14] und Chang^[15] entwickelten Fluoreszenzsonden sehr verschieden scheinen, ist die zugrundeliegende Designstrategie relativ ähnlich: Beide bedienen sich der einzigartigen Bindungsfähigkeit von CO an Übergangsmetallionen. He und Mitarbeiter konstruierten die Fluoreszenzsonde COSer zum Nachweis von CO mithilfe eines genetischen Ansatzes (Scheme 2). Der Biosensor besteht aus einem zirkulär permutierten gelb-fluoreszierenden Protein (cpYFP) als fluoreszierender Reportereinheit und CooA, einem dimeren Hämprotein aus *Rhodospirillum rubrum*, als Erkennungseinheit für CO. Nach 10 min Inkubation mit 10 μ M CO zeigt die Sonde eine Fluoreszenzverstärkung bei $\lambda = 528$ nm um das Zweifache. Verursacht wird die Fluoreszenzverstärkung durch eine Konformationsänderung von CooA durch die Bindung von CO. Die Sonde zeigt eine gute Selektivität für CO gegenüber anderen Häm-liganden wie H₂S, GSH, NO, O₂, CN⁻ und Imidazol. Mittels der COSer-Sonde gelang es schließlich auch, CO-Fluktuationen in lebenden HeLa-Zellen bildgebend darzustellen. Da COSer die erste Fluoreszenzsonde für CO darstellt, sind naturgemäß noch einige Verbesserungen notwendig, bevor ein Einsatz zur

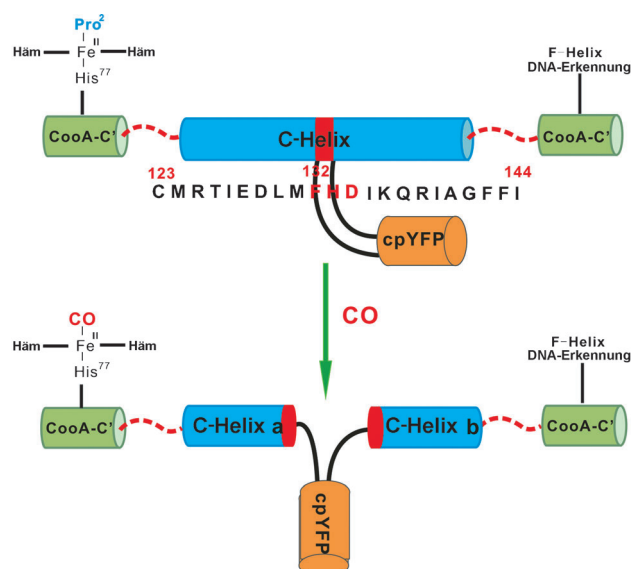


Schema 1. HO-katalysierter Häm-Stoffwechselweg.^[3]

klar, und es besteht somit ein Bedarf an empfindlichen und

[*] L. Yuan, Prof. W. Lin, L. Tan, K. Zheng, W. Huang
State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics
College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University
Changsha, Hunan 410082 (P.R. China)
E-Mail: weiyanglin@hnu.edu.cn

[**] Die Autoren danken dem NSFC (21172063) für Fördermittel.

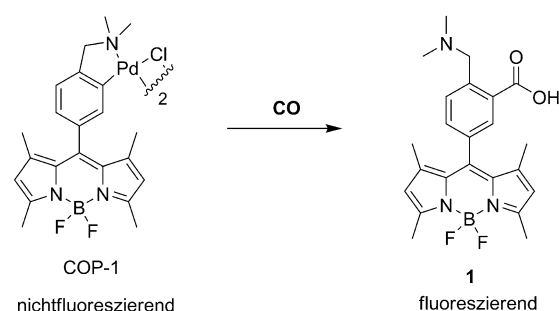


Schema 2. Die Funktionsweise der Sonde COSer für CO. Durch Bindung von CO zerbricht die lange C-Helix des CooA-Moleküls in zwei Teile (C-Helix a und b), die durch die Reste 132 bis 134 verbunden sind.

Untersuchung lebender Systeme möglich ist. Zum Beispiel muss das Signal/Rausch-Verhältnis durch Minimierung der Hintergrundfluoreszenz verbessert werden.

Die genetische Codierung fluoreszierender Proteine ist eine sehr verbreitete Vorgehensweise bei der biologischen Bildgebung mittels Fluoreszenz. Allerdings kann die relativ hohe Molekülgröße fluoreszierender Proteine mit der Struktur oder Funktion des Proteins, mit dem es fusioniert wird, interferieren. Niedermolekulare Fluoreszenzsonden bieten demgegenüber die Vorteile der geringen Größe, der Membrangängigkeit, einer geringen Hintergrundfluoreszenz und der Einfachheit der Anwendung.

Fast gleichzeitig zur Veröffentlichung von He und Mitarbeitern^[14] beschrieben Chang und Mitarbeiter die erste niedermolekulare Fluoreszenzsonde, COP-1, zum optischen Nachweis von CO in lebenden Zellen (Schema 3).^[15] Die Funktion von COP-1 beruht auf einer Palladium-vermittelten Carbonylierung. Bei der Entwicklung der Sonde wurde von der Annahme ausgegangen, dass die unbeladene Sonde aufgrund von elektronischen Effekten des schweren Palladiumatoms eine niedrige intrinsische Fluoreszenz aufweist. Durch Reaktion mit CO würde COP-1 dann in die Verbindung **1** überführt werden, die stark fluoresziert, weil das Palladiumatom freigesetzt wird. Tatsächlich zeigt COP-1 in Dulbeccos phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) bei pH 7.4



Schema 3. Struktur der Sonde COP-1 und Mechanismus der CO-Erkennung.

($\lambda_{em} = 503 \text{ nm}$, $\Phi = 0.01$) fast keine intrinsische Fluoreszenz,^[15] während in Gegenwart von CO ein zehnfacher Fluoreszenzanstieg beobachtet wurde. Der Fluoreszenzanstieg ist konzentrationsabhängig, und die Sonde kann CO bis zur Konzentration von $1 \mu\text{M}$ nachweisen. COP-1 zeigt keine Reaktivität mit anderen biologisch relevanten Sauerstoff-, Stickstoff- und Schwefelverbindungen wie H_2O_2 , *tert*-Butylhydroperoxid (*t*BuOOH), Hypochlorit (OCl^-), Superoxid (O_2^-), NO, Peroxynitrit (ONOO^-) und H_2S . Bedeutsam ist weiterhin der Umstand, dass die palladiumhaltige Sonde ungiftig und biokompatibel ist und sich daher zur CO-Messung in lebenden Zellen eignet. Eine Einschränkung dieser niedermolekularen Sonde besteht darin, dass die Ansprechzeit vergleichsweise lang ist. Es dauert etwa eine Stunde, bis der Maximalwert der Fluoreszenzverstärkung erreicht wird. Dies lässt den Einsatz bei Echtzeit-Messungen transienten Kohlenmonoxids in lebenden Zellen schwierig erscheinen.

Die Eigenschaften der genetisch codierten Fluoreszenzsonde COSer und der niedermolekularen Sonde COP-1 sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Obwohl beide Sonden in der Lage sind, CO in lebenden Zellen zu verfolgen, haben sie jeweils spezifische Vor- und Nachteile. Die niedermolekulare Fluoreszenzsonde COP-1 weist gegenüber der genetisch codierten Fluoreszenzsonde COSer eine größere Fluoreszenzverstärkung auf (10-fach bzw. 2-fach). Hingegen besitzt COSer gegenüber COP-1 eine viel kürzere Ansprechzeit. Ein weiterer signifikanter Unterschied liegt darin, dass COSer nach einem reversiblen Mechanismus arbeitet, wohingegen die Funktion von COP-1 auf einer irreversiblen Reaktion beruht. Die reversible COSer-Sonde ist daher für die Echtzeit-Detektion von CO besser geeignet, während sich die irreversible COP-1-Sonde eher für die Messung geringer CO-Mengen anbietet, weil sich das Signal über die Zeit akkumuliert.

Tabelle 1: Übersicht über Fluoreszenzsonden zur Detektion von CO.

Sonde	Sondentyp	Detektiionsmechanismus/ Nachweisgrenze	Fluoreszenzverstärkung in vitro/ Zeitspanne	Fluoreszenzverstärkung in der lebenden Zelle
COSer	Genetisch codiert	Reversible Bindung an CooA/ $0.5 \mu\text{M}$	2-fach bei $10 \mu\text{M}$ CO bei pH 7.4 in MOPS/10 min	58% nach Inkubation mit $5 \mu\text{M}$ CO-RM2 (einem CO-Donor)
COP-1	Niedermolekulare Verbindung	Irreversible Carbonylierung/ $1 \mu\text{M}$	10-fach bei $50 \mu\text{M}$ CORM-3 (einem CO-Donor) bei pH 7.4 in DPBS bei $37^\circ\text{C}/60 \text{ min}$	1.8 (2.5)-fach nach Inkubation mit 5 (50) μM CORM-3

Ungeachtet der hier vorgestellten Fortschritte verbleiben signifikante Herausforderungen für die Entwicklung von Fluoreszenzsonden für endogenes CO in lebenden Zellen, Geweben oder gar im Tiermodell. Die nächste Generation von Fluoreszenzsonden für CO sollte verbesserte Eigenschaften wie kürzere Ansprechzeiten, größere dynamische Messbereiche, hohe Selektivität und Reversibilität aufweisen. Nicht zu vergessen ist ferner auch die Entwicklung von Fluoreszenzsonden für den Nachweis von CO-Gas in anderen Umgebungen wie Automobilen und Industrieanlagen.

Eingegangen am 17. Oktober 2012

Online veröffentlicht am 13. Dezember 2012

-
- [1] C. G. Douglas, J. S. Haldane, J. B. Haldane, *J. Physiol.* **1912**, *44*, 275.
- [2] J. B. Haldane, *Biochem. J.* **1927**, *21*, 1068.
- [3] L. Y. Wu, R. Wang, *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 585.
- [4] M. Bilban, A. Haschemi, B. Wegiel, B. Y. Chin, O. Wagner, L. E. Otterbein, *J. Mol. Med.* **2008**, *86*, 267.
- [5] S. W. Ryter, J. Alam, A. M. K. Choi, *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 583.
- [6] B. E. Mann, *Top. Organomet. Chem.* **2010**, *32*, 247.
- [7] a) M. E. Moragues, J. Esteban, J. V. Ros-Lis, R. Martínez-Máñez, M. D. Marcos, M. Martínez, J. Soto, F. Sancenón, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15762; b) J. Esteban, J. V. Ros-Lis, R. Martínez-Máñez, M. D. Marcos, M. Moragues, J. Soto, F. Sancenón, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5054; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4934; c) S. Heylen, J. A. Martens, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7794; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7629.
- [8] Y. Morimoto, W. Durante, D. G. Lancaster, J. Klattenhoff, F. K. Tittel, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2001**, *280*, H483.
- [9] Y. Lee, J. Kim, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7669.
- [10] G. S. Marks, H. J. Vreman, B. E. McLaughlin, J. F. Brien, K. Nakatsu, *Antioxid. Redox Signaling* **2002**, *4*, 271.
- [11] Beispiele: a) J.-M. Barbe, G. Canard, S. Brandès, F. Jérôme, G. Dubois, R. Guillard, *Dalton Trans.* **2004**, 1208; b) J.-M. Barbe, G. Canard, S. Brands, R. Guillard, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2118; c) K. S. Davidge, G. Sanguinetti, C. H. Yee, A. G. Cox, C. W. McLeod, C. E. Monk, B. E. Mann, R. Motterlini, R. K. Poole, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 4516.
- [12] Übersichtsartikel zu H₂S: a) W. Xuan, C. Sheng, Y. Cao, W. He, W. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2282; b) V. S. Lin, C. J. Chang, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 595.
- [13] Übersichtsartikel zu NO und H₂O₂: a) E. W. Miller, C. J. Chang, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 620; b) X. Chen, X. Tian, I. Shin, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4783; c) L. E. McQuade, S. J. Lippard, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 43; d) L. Yuan, W. Lin, K. Zheng, L. He, W. Huang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, DOI: 10.1039/c2cs35313j.
- [14] J. Wang, J. Karpus, B. S. Zhao, Z. Luo, P. R. Chen, C. He, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 9790; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9652.
- [15] B. W. Michel, A. R. Lippert, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15668.
-