

Die Stärken fluorogener Sonden**

André Nadler und Carsten Schultz*

Chemie in vivo · Fluoreszenzsonden · Klick-Chemie ·

Markierungsreaktionen · Mikroskopie

Wie bei vielen analytischen Methoden ist auch bei der Fluoreszenzmikroskopie das Signal/Rausch-Verhältnis entscheidend für den Erfolg eines Experiments. Im Idealfall sollte vor Beginn des Experiments keine Fluoreszenz detektierbar sein, nach gezielter Manipulation der Sonde sollte die Emission jedoch stark ansteigen. Dieses Szenario wird z.B. erreicht, wenn Biolumineszenz verwendet wird, da hier der Hintergrund auf Autofluoreszenz begrenzt ist. Die Verwendung von Biolumineszenz in Einzelzellexperimenten ist allerdings kaum möglich, einfach weil zu wenige Photonen emittiert werden, um ein aussagekräftiges Bild zu erzeugen. Eine Alternative bieten fluorogene Farbstoffe, und es sind bereits zahlreiche Fluoreszenzsonden entwickelt worden, deren Fluoreszenzintensität als Antwort auf eine zelluläre Zustandsänderung ansteigt.

Ein frühes Beispiel ist der häufig verwendete Calciumsensor Fluo-3, dessen Fluoreszenz im Calcium-freien Zustand durch photoinduzierten Elektronentransfer (PET) gelöscht wird, der aber stark fluoresziert, wenn Calcium gebunden ist.^[1] Wie wir später sehen werden, wurde das gleiche Prinzip in einer aktuellen Arbeit von Bertozzi et al. eingesetzt, in der durch eine chemische Markierungsreaktion PET eliminiert wurde, was zu einem massiven Anstieg der Fluoreszenz führte.^[2] Frühe genetisch kodierte Calciumsensoren sind ebenfalls fluorogen.^[3] Ein weiterer Ansatz, fluorogene fluoreszierende Proteine zu generieren, sind sog. „split GFPs“, bei denen die intakte fluoreszierende Proteinstruktur erst durch die Bildung des intakten β -Barrels gebildet wird. „Split-Proteine“ werden oft eingesetzt, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen, und der Anstieg der Fluoreszenz ist ein Indikator für die erfolgreiche Proteinkomplexbildung.^[4] Fluorogenität ist besonders beim Markieren von Molekülen in einer komplexen biologischen Umgebung gewünscht. Daher wurde kürzlich eine Reihe von Methoden entwickelt, bei denen spezifisch einzelne künstliche Aminosäuren mit einem fluorogenen Farbstoff reagieren.^[5] Besonders bei der Fluoreszenzmarkierung in lebenden Zellen ist es

erwünscht, bioorthogonale reaktive Gruppen direkt am Löschenprozess des Fluorophors zu beteiligen (Abbildung 1a). Die erfolgreiche Markierungsreaktion ergibt schließlich das vollständig fluoreszierende Zielmolekül. 3+2-Cycloadditionen mit und ohne Kupferkatalyse sowie Diels-Alder-Reak-

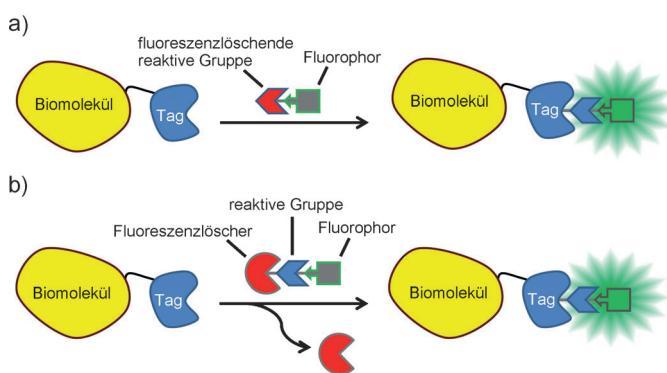


Abbildung 1. Die beiden populärsten Methoden, Biomoleküle fluorogen zu markieren. a) Die für die Markierungsreaktion verwendete Molekülgruppe agiert als Fluoreszenzlöscher, und die Fluoreszenz steigt sprunghaft an, wenn die photophysikalischen Eigenschaften dieser Gruppe durch die Reaktion verändert werden. b) Ein Fluoreszenzlöscher ist kovalent mit der reaktiven Gruppe am Fluorophorkonjugat verknüpft und wird durch die Markierungsreaktion entfernt.

tionen mit umgekehrtem Elektronenbedarf liefern fluoreszierende Farbstoffe, bei denen die reaktiven Gruppen am Farbstoff (Azid oder Tetrazin) gleichzeitig die Fluoreszenz der Fluorophore löschen (Abbildung 2a–c).^[6] Ähnliche Resultate werden mit sog. FLAsH-Markierungen erzielt, bei denen die Reaktion und gleichzeitige Fixierung der beiden Bisarsenitgruppen einen starken Anstieg der effektiven Fluoreszenz des Xanthenfarbstoffs, dessen Fluoreszenz zuvor gelöscht war, hervorruft (Abbildung 2d).^[7] Eine alternative Methode des In-vivo-Proteinmarkierens basiert auf der Fusion einer Selbstalkylierungs- oder Selbstacylierungseinheit mit dem Zielprotein.^[8] Die kleinen Proteine SNAP-Tag und CLIP-Tag reagieren spontan mit Benzylguanin- oder Benzylcytosin-Fuorophor-Konjugaten. Auch wenn Benzylguanin selbst oft ein moderater Fluoreszenzlöscher ist, erzeugt die Konjugation mit einem geeigneten Fluoreszenzlöscher (Abbildung 1b) volle Fluorogenität (Abbildung 2e).^[9] Auf ähnliche Weise acyliert sich das β -Lactamase-basierte TEM-Tag selbst. Dabei wird von einem β -Lactamsubstrat unter β -Eli-

[*] Dr. A. Nadler, Priv.-Doz. Dr. C. Schultz

Cell Biology & Biophysics Unit
European Molecular Biology Laboratory
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)
E-Mail: schultz@embl.de

[**] Der AK Schultz wird finanziell unterstützt durch das EMBL, den ESF (EuroMembraneTraPPs, Schu 943/7-1), die DFG (Transregio 83, SPP1623), den FCI, die Helmholtz-Gemeinschaft (LungSysII), das Deutsche Zentrum für Lungenforschung (DZL) und die EU (Integrated Project LIVIMODE, ITN Sphingonet).

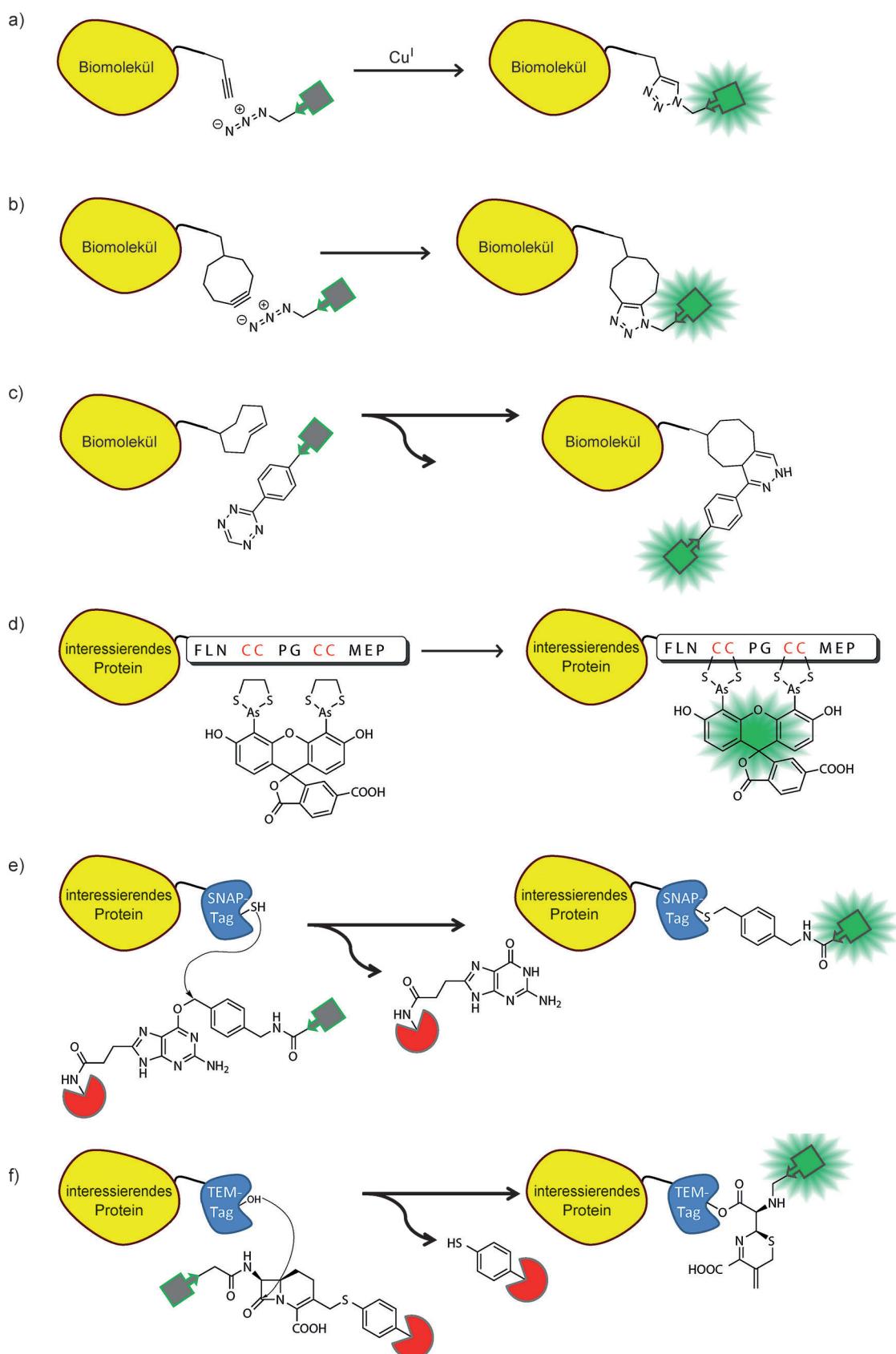
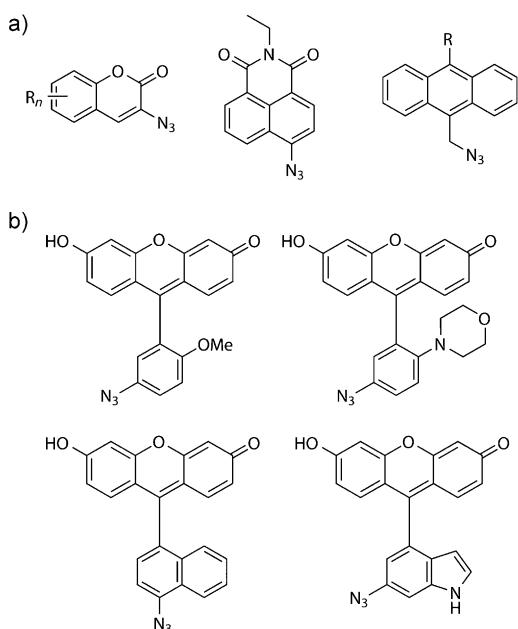


Abbildung 2. Beispiele für Biomolekülmarkierung mit fluorogenen Farbstoffen. a) Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition. b) Durch Ringspannung induzierte Alkin-Azid-Cycloaddition. c) Durch Ringspannung induzierte Alken-Tetrazin-Cycloaddition vom Diels-Alder-Typ. d) FlAsH-Markierung eines Tetracysteinmotivs. e) SNAP-Tag-Markierung mit einem Fluorophor-Benzylguanin-Konjugat, dessen Fluoreszenz gelöscht ist. f) TEM-Tag-Markierung mit einem Fluorophor- β -Lactam-Konjugat, dessen Fluoreszenz gelöscht ist.

minierung ein geeigneter Fluoreszenzlöscher entfernt (Abbildung 2 f).^[10]

Für das PET-Löschen der Fluoreszenz von Fluorophoren sind stark delokalisierte Elektronensysteme besonders geeignet. Einfache, aber wirkungsvolle Beispiele sind Azido-gruppen, die direkt an Farbstoffen wie Cumarienen oder Lucifer Yellow angebracht sind (Schema 1a).^[6b,11] Im Falle von Xanthenfarbstoffen ist dies allerdings schwierig zu erreichen.



Schema 1. Fluorogene Farbstoffe, deren Fluoreszenz durch Azidogruppen gelöscht wird. a) Typische Beispiele. b) Beispiele der neu vorgestellten, rationell entworfenen Xanthenderivate.

Bisher wurde nur das Beispiel eines fluorogenen Oregon-Green-Tetrazin-Konjugats publiziert, das für In-vivo-Markierungsreaktionen mithilfe einer Diels-Alder-Reaktion mit *trans*-Cycloocteneinheiten eingesetzt werden kann.^[6c] Die Bertozzi-Gruppe nahm sich dieses Problems kürzlich an, indem sie einen rationalen DFT-basierten (DFT = Dichtefunktionaltheorie) Ansatz von Nagano et al. anwendete.^[12] Kurz zusammengefasst wurde die Korrelation zwischen der E_{HOMO} -Energie ($\text{HOMO} =$ höchstes besetztes Molekülorbital) eines an den Farbstoff konjugierten Arens mit der jeweiligen Quantenausbeute des Farbstoffs theoretisch und experimentell untersucht. Arylringe mit niedrigem E_{HOMO} -Wert wiesen dabei eine stark fluoreszenzlöschende Wirkung auf. Diesem Ansatz folgend postulierten Bertozzi und Mitarbeiter, dass Azidoaryl-xanthenderivate wegen des niedrigen E_{HOMO} -Werts fast völlig nichtfluoreszierend, die entsprechenden Triazolprodukte der [2+3]-Cycloaddition mit einem Alkin jedoch hochfluoreszierend sein sollten.

Die Autoren synthetisierten einen Satz von Azidoaryl-xanthenen (Schema 1b) und analysierten die Änderungen der photophysikalischen Eigenschaften infolge der Klick-Reaktion. Nach Triazolbildung wurde ein bis zu 34-facher Anstieg der Fluoreszenz gemessen, ein Wert, der hoch genug ist, um einen starken Kontrast bei In-vivo-Experimenten zu

erzielen. Bemerkenswert ist, dass die Reduktion des Azids zum Amin keine fluoreszierenden Spezies generiert. Damit ist diese stark störende Nebenreaktion im reduzierenden intrazellulären Milieu hier kein Problem. Ferner erzielten die Autoren mit ihrem rationalen Ansatz um die 50% fluoreogene Verbindungen – eine wesentlich bessere Quote als beim typischen Zufalls-Screening.

Als experimentelle Anwendung der Azidoaryl-xanthene wurden fluorogene Proteinmarkierungen sowie waschfreies Markieren von Alkin-modifizierten Glycoproteinen von oberflächenfixierten Zellen demonstriert. Der neue Satz fluorogener Xanthenfarbstoffe erweitert die verfügbare Farbpalette für In-vivo-Markierungen erheblich. Es wäre wünschenswert, diese Farbstoffe in Zukunft auch innerhalb intakter Zellen einsetzen zu können. Dies sollte wegen der intrinsischen Zellpermeabilität der neuen Azidoaryl-xanthene ohne weiteres möglich sein. Dabei wird insbesondere die negative Ladung der Farbstoffe helfen, diese im Zytosol zu halten und die bei den meisten anderen fluorogenen Farbstoffen vorhandene Tendenz zur Membranabsorption zu vermeiden. In intakten Zellen wird die Fluorogenität helfen, das Problem der unspezifischen Färbung durch unvollständige Markierungsreaktionen zu umgehen.

Trotz dieser Fortschritte ist die Wunschliste von Mikroskopieanwendern immer noch recht umfangreich. Bessere Photostabilität, fehlendes Blinken und Membranpermeabilität sind die meistgewünschten Eigenschaften. Das ultimative Ziel ist die Entwicklung fluorogener Farbstoffe, die für die hochauflösende Mikroskopie geeignet sind.

Eingegangen am 5. Dezember 2012
Online veröffentlicht am 21. Januar 2013

- [1] A. Minta, J. P. Y. Kao, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8171–8178.
- [2] P. Shieh, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17428–17431.
- [3] a) J. Nakai, M. Ohkura, K. A. Imoto, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 137–141; b) T. Nagai, A. Sawano, E. S. Park, A. Miyawaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 3197–3202.
- [4] C.-D. Hu, Y. Chinenov, T. K. Kerppola, *Mol. Cell* **2002**, *9*, 789–798.
- [5] a) T. Plass, S. Milles, C. Koehler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3964–3967; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3878–3881; b) T. Plass, S. Milles, C. Koehler, J. Szymański, R. Mueller, M. Wießler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem. 2012*, *124*, 4242–4246; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4166–4170; c) K. Lang, L. Davis, J. Torres-Kolbus, C. Chou, A. Deiters, J. W. Chin, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 298–304.
- [6] a) Z. Zhou, C. J. Fahrni, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8862–8863; b) K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4603; c) N. K. Devaraj, S. Hilderbrand, R. Upadhyay, R. Mazitschek, R. Weissleder, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2931–2934; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2869–2872; d) A. B. Neef, C. Schultz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1526–1529; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1498–1500.
- [7] B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, *281*, 269–272.
- [8] a) A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86–89; b) A. Gautier, A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Corrêa, Jr., M. Kindermann, F. Beaufils, K. Johnsson, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 128–136; aktuelle Übersicht

- über Proteinmarkierung: c) M. J. Hinner, K. Johnsson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 766–776.
 [9] T. Komatsu, K. Johnsson, H. Okuno, H. Bito, T. Inoue, T. Nagano, Y. Urano, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6745–6751.
 [10] S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Hori, K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5016–5017.
 [11] 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.
 [12] a) T. Miura, Y. Urano, K. Tanaka, T. Nagano, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8666–8671; b) M. Kamiya, H. Kobayashi, Y. Hama, M. Bernardo, T. Nagano, P. L. Choyke, Y. Urano, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3918.

Das Standardwerk der Mechanik

 **WILEY-VCH**



mit DVD und Software
„Mechanicus“



FRIEDHELM KUYPERS

Klassische Mechanik

Mit über 300 Beispielen und Aufgaben mit Lösungen

9., erweiterte Aufl.

ISBN: 978-3-527-40989-1

2010 740 S. mit 348 Abb., davon 16 in Farbe,
und 8 Tab. Broschur € 49,90

Die 9. Auflage dieses modernen Lehrbuchs liefert eine Einführung in die klassische nicht-relativistische Punktmechanik und die Mechanik des starren Körpers. Alle grundlegenden Aussagen werden durch anschauliche Beispiele illustrativ verdeutlicht. Die zahlreichen Aufgaben sind eng an den Stoff angelehnt und haben am Ende des Buches detaillierte Lösungen.

Neu ist die DVD mit der MATLAB-basierten Software „Mechanicus“ zum interaktiven Experimentieren – mit 52 Systemen, einige davon sind nicht im Buch enthalten.

Aus einer aktuellen Buchbesprechung:

„... Dieses Buch von Kuypers stellt eine wesentliche Bereicherung der Literatur zur klassischen Mechanik dar.“

Chemie Ingenieur Technik

Besuchen Sie uns unter
www.wiley-vch.de

Wiley-VCH • Postfach 10 11 61 • D-69451 Weinheim
Tel. +49 (0) 62 01-60 64 00 • Fax +49 (0) 62 01-60 61 84 • E-mail: service@wiley-vch.de
Irrtum und Preisänderungen vorbehalten. Stand der Daten: November 2012