

# Schnelle, zweifarbige Proteinmarkierung an lebenden Zellen für die hochauflösende Mikroskopie\*\*

Ivana Nikić, Tilman Plass, Oliver Schraadt, Jędrzej Szymański, John A. G. Briggs,  
Carsten Schultz und Edward A. Lemke\*

**Abstract:** Die steigende Nachfrage nach fortschrittlicher Fluoreszenzmikroskopie und hochauflösenden bildgebenden Verfahren (SRM) erfordert die Entwicklung neuer Methoden zum Markieren von Proteinen mit kleinen, photostabilen Fluorophoren, wenn möglich mehrfarbig. Die Technologie zur Erweiterung des genetischen Codes ermöglicht den positionspezifischen Einbau einer nichtnatürlichen Aminosäure (UAS) mit chemisch biokompatibel modifizierbaren funktionellen Gruppen in lebenden Zellen. Wir präsentieren das Design und die Synthese neuer UAS mit gespanntem Alken als nichtnatürlicher Funktionalität, die erhöhte Stabilität und verbesserte Einbauraten bei ausgezeichneter Reaktivität gegenüber Tetrazinen in Diels-Alder-Cycloadditionen (SPIEDAC) aufweisen. Darüber hinaus stellen wir eine fein abgestimmte, selektiv verbesserte SPIEDAC-Variante (seSPIEDAC) vor, die eine zu SPIEDAC orthogonale, effiziente und empfindliche Proteinmarkierung ermöglicht. Eine Kombination aus seSPIEDAC und SPIEDAC ermöglicht es uns, Proteine in lebenden Zellen mit zwei verschiedenen Fluorophoren zu markieren. Wir demonstrieren das Potenzial dieser Methode anhand der Visualisierung des Insulinrezeptors (IR) sowie Virus-ähnlicher Partikel (VLP) mithilfe zweifarbiger, hochauflösender Mikroskopie.

Die Qualität und der Informationsgehalt hochauflösender bildgebender Verfahren (super-resolution microscopy, SRM) hängen stark von den Eigenschaften der verwendeten Fluorophore ab. Die meisten organisch-synthetischen Fluoreszenzfarbstoffe sind fluoreszierenden Proteinen in ihren photophysikalischen Eigenschaften weit überlegen und darüber

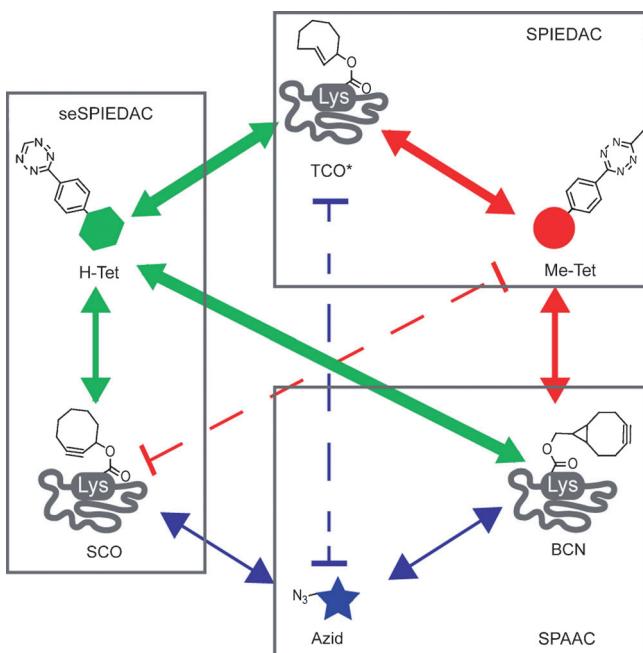
hinaus oft mehr als zwanzigmal kleiner.<sup>[2]</sup> Fortschritte beim Einbau so genannter nichtnatürlicher Aminosäuren (unnatural amino acids, UAS) durch Unterdrückung des Amber-TAG-Stopcodons ermöglichen mittlerweile die positionspezifische Markierung von Proteinen mit einer großen Bandbreite an kleinen und kommerziell erhältlichen Fluorophoren. Durch Verwendung eines modifizierten orthogonalen tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Paars (tRNA/RS) von *Methanosarcina mazei* werden dabei UAS, die als artifizielle Seitengruppe ein stark gespanntes und damit reaktives cyclisches Alkin oder Alken tragen, durch Proteinbiosynthese an der Stelle des TAG-Stopcodons eingebaut.<sup>[3]</sup> Diese Funktionalisierung der Seitenkette vergrößert eine Aminosäure nur um wenige Atome und ermöglicht daher die Installation dieser UAS an einer frei wählbaren Position im Protein, in der Regel, ohne dessen Funktionalität zu beeinflussen. Die auf diese Weise in ein Protein eingeführten reaktiven Gruppen können dann in lebenden Zellen ohne Zuhilfenahme eines Katalysators mithilfe bioorthogonal Klick-Chemie weiter modifiziert werden, beispielsweise durch das Anbringen von Fluorophoren. Die prominentesten Vertreter der Klick-Chemie sind die kupferfreie [3+2]-Huisgen-Cycloaddition von Alkinen mit Aziden (strain-promoted alkyne-azide cycloaddition, SPAAC) und die [4+2]-Diels-Alder-Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf von gespannten Dienophilen mit bestimmten Tetrazinen (Tet) (strain-promoted inverse electron-demand Diels-Alder cycloaddition, SPIEDAC). Alkin- oder Alken-funktionalisierte Proteine können auf diese Weise mit Azid- bzw. Tetrazin-modifizierten organischen Fluoreszenzfarbstoffen reagieren und somit das Protein der fluoreszenzmikroskopischen Visualisierung zugänglich machen (Abbildung 1).<sup>[3c]</sup> Beide Reaktionen sind vollständig biokompatibel und bioorthogonal. SPAAC und SPIEDAC sind zusätzlich bedingt orthogonal zueinander durchführbar, da Azide nur mit Alkinen reagieren, nicht jedoch mit Alkenen.<sup>[3c,4]</sup>

Während die genetische Codierung und Markierung einer einzelnen UAS relativ einfach gelingt, mangelt es derzeit noch an robusten Methoden zur Markierung verschiedener UAS mit unterschiedlichen Fluorophoren in einer Zelle, um beispielsweise Molekülpopulationen zeitabhängig zu untersuchen. Mindestens zwei verschiedene Strategien für UAS-basierte zweifarbige Markierungsexperimente gefolgt von SRM-Untersuchungen mit unterschiedlichem experimentellem Fokus sind denkbar: 1) Eine Möglichkeit ist der gleichzeitige Einbau von zwei UAS mit zueinander orthogonalen chemischen Funktionalitäten (z.B. SPAAC und SPIEDAC) unter Verwendung zwei verschiedener Codons in einem Protein (z.B. für Förster-Resonanzenergietransfer(FRET)-

[\*] Dr. I. Nikić, Dr. T. Plass, Dr. O. Schraadt, Dr. J. Szymański, Dr. J. A. G. Briggs, Priv.-Doz. Dr. C. Schultz, Dr. E. A. Lemke  
Structural and Computational Biology Unit und  
Cell Biology and Biophysics Unit, EMBL  
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)  
E-Mail: lemke@embl.de

[\*\*] Wir danken S. Rizzoli für Diskussionen, N. Banterle, N. Davey, G. Estrada Girona, C. Köhler, S. Milles, S. Prinz und S. Welsch für technische Unterstützung sowie H. G. Kräusslich für die Influenzavirus-Plasmide. V. VanDelinder und Mitgliedern der Arbeitsgruppe Lemke wird für Korrekturlesen des Manuskriptes und Diskussionen gedankt. Die Autoren deklarieren einen Interessenkonflikt, da einige UAS dieser Arbeit zum Patent angemeldet wurden. Diese Studie wurde technisch unterstützt durch die EMBL-ALMF und -PCF. IN ist ein EMBO-, OS ein kofinanzierter Marie-Curie/EIPOD- und TP war bis April 2013 ein VC-Stipendiat. EAL bedankt sich für die finanzielle Förderung durch das Emmy Noether-Programm und das SPP1623, CS bei dem SPP1623 der DFG.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201309847> zu finden.



**Abbildung 1.** Orthogonalität und Kreuzreaktivität von (se)SPIEDAC und SPAAC zwischen verschiedenen UAS und Aziden (blau) oder Tetrazinen (grün: H-Tet, rot: Me-Tet). Die Stärke der Pfeile korreliert mit der Reaktionsgeschwindigkeit (siehe Abbildung 1 (SI) und Note 2 (SI)). Gestrichelte Linien stellen Reaktanten dar, die unter physiologischen Bedingungen nicht miteinander reagieren. Die drei verschiedenen orthogonalen Klick-Reaktionspaare sind grau umrahmt.

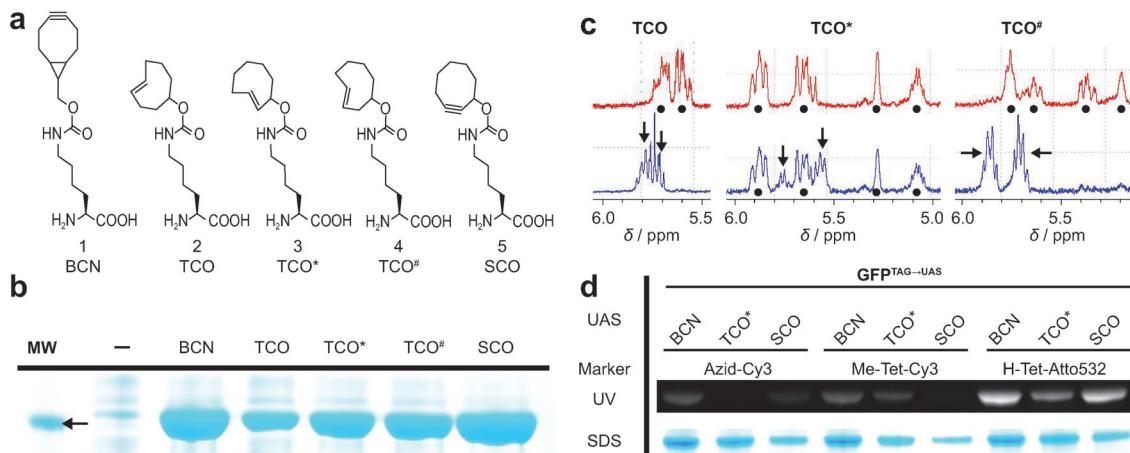
Studien). Trotz der Fortschritte bei der gleichzeitigen Unterdrückung von zwei verschiedenen Codons vor allem in Prokaryoten<sup>[5]</sup> ist es bis zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich, zwei effiziente und zueinander komplementäre tRNA/RS-Systeme zur Codierung von zwei verschiedenen gespannten UAS, z.B. cyclischen Alkinen (für SPAAC) und Alkenen (für SPIEDAC), für die In-vivo-Markierung von Proteinen in Säugetierzellen zu verwenden. 2) Eine zweite Möglichkeit ist der zeitlich getrennte Einbau zweier chemisch orthogonaler UAS unter Verwendung desselben Codons und tRNA/RS-System. Dies kann mit einem Pulse-Chase-Ansatz realisiert werden, wobei die erste UAS zum Nährmedium gegeben wird (Pulse) und später durch eine zweite, zur ersten UAS chemisch orthogonale UAS ersetzt wird (Chase). Solch eine Methode könnte beispielsweise angewendet werden, um die Sortierung und den Transport von Proteinen zu visualisieren. Das üblicherweise verwendete Screening-Verfahren von RS-Mutanten-Bibliotheken zielt jedoch meist darauf ab, den Wirkungsgrad eines bestimmten tRNA/RS-Paars zu optimieren, anstatt ein System mit gleicher Spezifität für zwei verschiedene UAS zu finden.<sup>[6]</sup> In der hier vorgestellten Arbeit haben wir die Strategie verfolgt, ein promiskuitives tRNA/RS-System zum Pulse-Chase-Einbau zweier gegenseitig chemisch orthogonaler UAS zu entwickeln.

Ausgehend von unseren vorherigen Studien, in denen wir den effizienten Einbau von Bicyclononin-Lysin (BCN) und den nur unbefriedigenden Einbau eines *trans*-Cyclooct-4-en-Lysins (TCO) mithilfe einer Doppelmutante (Y306A, Y384F) der Pyrrolysyl-tRNA-Synthetase (PylRS<sup>AF</sup>) von *M. mazei* beobachteten,<sup>[3a,c]</sup> begannen wir mit der Entwicklung eines

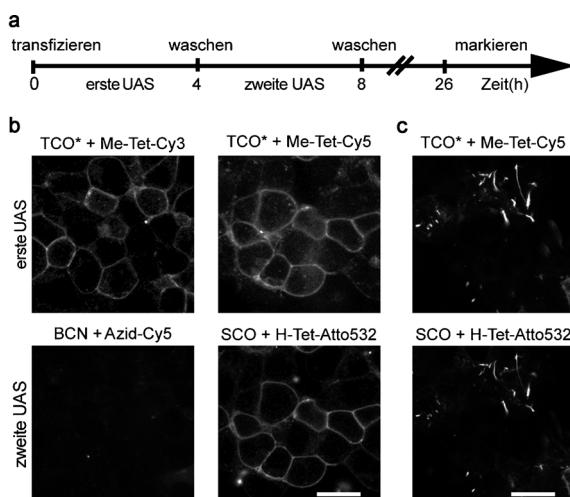
promiskuitiven Systems. Anhand der PylRS<sup>AF</sup>-Kristallstruktur und der bereits per PylRS<sup>AF</sup> erfolgreich genetisch codierten UAS vermuteten wir,<sup>[3,7]</sup> dass ein Screening verschiedener TCO-Isomere mit unterschiedlichem Ringsubstitutionsmuster eine TCO-Variante liefern könnte, die ein genauso gutes Substrat für PylRS<sup>AF</sup> darstellt wie BCN. Daher synthetisierten wir die beiden in Abbildung 2a gezeigten, neuen TCO-Isomere (Note 1 in den Hintergrundinformationen (SI)): das *trans*-Cyclooct-2-en-Lysin TCO\* und das *trans*-Cyclooct-3-en-Lysin TCO#. Testexpressionen mit einem GFP-Reporterkonstrukt mit Amber-Mutation an Position Y39 (GFP<sup>TAG</sup>), bei dem GFP-Fluoreszenz nur bei erfolgreicher und effizienter TAG-Unterdrückung auftritt, ergaben, dass TCO\* und TCO# etwa dreimal besser von dem tRNA<sup>Pyl</sup>/PylRS<sup>AF</sup>-Paar akzeptiert werden als das bereits publizierte TCO (Abbildung 2b; siehe Tabelle S1 (SI) für die massenspektrometrische Bestätigung). Pro Liter *E. coli*-Expressionskultur wurden etwa 10 mg GFP<sup>TAG-UAS</sup>-Protein gewonnen. Abbildung 2(SI) zeigt, dass alle drei TCO-Varianten ähnliche Reaktivitäten in SPIEDAC-Reaktionen aufweisen. Der literaturbekannte Nachteil von *trans*-Cyclooctenen wie in TCO ist ihre mangelnde chemische Stabilität, da sie besonders in Gegenwart von Thiolen zur Rückisomerisierung in ihre um Größenordnungen unreaktivere *cis*-Konfiguration tendieren.<sup>[8]</sup> Da Thiole im Cytosol von Säugetierzellen allgemeinwährend sind, können diese Bedingungen die Biostabilität von *trans*-Cyclooctenen und damit die allgemeingültige Einfachbarkeit von SPIEDAC beeinträchtigen, besonders während langer Expressions- oder Inkubationszeiten. NMR-spektroskopische Untersuchungen (Abbildung 2c sowie Abbildung 2(SI)) zeigen, dass TCO\* eine mindestens zehnmal höhere Stabilität gegenüber Thiolen aufweist als TCO und TCO#. Vermutlich spielt die effizientere Abschirmung der *trans*-Doppelbindung von TCO\* vor nukleophilen Angriffen durch die Nähe der Carbamatbindung dabei eine Rolle. Daher wurde in allen nachfolgenden Experimenten nur TCO\* verwendet.

Das tRNA<sup>Pyl</sup>/PylRS<sup>AF</sup>-System ermöglicht die genetische Codierung von TCO\* und BCN in Abhängigkeit vom Amber-Stopcodon und damit die Proteinmarkierung mithilfe von SPIEDAC bzw. SPAAC (Abbildungen 2d und 1). Um das Potenzial dieser UAS-Kombination für zweifarbig Markierungsexperimente mit lebenden Zellen zu untersuchen, nutzten wir sie für die Pulse-Chase-Markierung des Insulinrezeptors (IR). Die Funktion und das Recycling des IR sind Themen von großer aktueller Bedeutung wegen ihrer zentralen Rolle bei Diabetes und neu entdeckter Funktionen bei der Genregulation.<sup>[9]</sup> Wir wählten eine Position auf der extrazellulären Seite des Proteins (K676) für die TAG-Mutation und exprimierten IR<sup>TAG</sup> in HEK293T-Zellen in Gegenwart eines Plasmids mit dem tRNA<sup>Pyl</sup>/PylRS<sup>AF</sup>-System.

Als nächstes führten wir ein Pulse-Chase-Experiment durch (Abbildung 3a). Das Nährmedium wurde zuerst 4 h mit UAS (TCO\*) versetzt (Pulse), bevor anschließend ein 4-h-Chase mit der zweiten UAS (BCN) folgte. Lebende, IR<sup>TAG-UAA</sup>-exprimierende Zellen wurden anschließend nacheinander jeweils 10 min zunächst mit Azid-Cy5 und nachfolgend mit Me-Tet-Cy3 markiert. Wie aus Abbildung 3b (erste Spalte) ersichtlich, wurde mit konfokalem Bildgebungsver-



**Abbildung 2.** a) Strukturformeln der UAS mit b) zugehörigem Coomassie-gefärbtem SDS-PAGE-Gel von gereinigtem  $\text{GFP}^{\text{TAG-UAS}}$  in Ab- (-) oder Anwesenheit der UAS nach Expression in *E. coli* (Pfeil zeigt auf einen Marker von 35 kDa Molekulargewicht (MW)). c) Der Graph zeigt relevante chemische Verschiebungen zum Zeitpunkt  $t = 0$  h bei Raumtemperatur (rot) und nach  $t = 24$  h bei 60°C (blau) für die verschiedenen TCO-Isomere gemessen in Gegenwart von Cysteamin-HCl. Die schwarzen Punkte markieren die Signale der *trans*-Doppelbindung und zum Teil die CHO-Protonen der *trans*-Form. Die schwarzen Pfeile (unten) markieren die Signale der entsprechenden *cis*-Isomere, die durch Thiol- und Hitzeeinwirkung entstanden sind (Details siehe Abbildung 2 (SI)). TCO\* zeigt eine stark verbesserte Stabilität: Ca. 80% des *trans*-Isomers sind nach 24 h bei 60°C noch vorhanden. d) Aufgereinigte  $\text{GFP}^{\text{TAG-UAS}}$ -Proteine (200 nm UAS) wurden getrennt mit zwei verschiedenen fluoreszierenden Tetrazinen (15  $\mu\text{M}$ , 20 min, 37°C) und einem Azidfluorophor (45  $\mu\text{M}$ , 10 h, 37°C) versetzt. Dargestellt sind das Ergebnis eines UV-Scans sowie das eines Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gels.



**Abbildung 3.** a) Schema der zweifarbigem Markierung von  $\text{IR}^{\text{TAG}}$ . b) Konfokale Bilder des mit verschiedenen Kombinationen von UAS und Fluorophoren zweifarbig markierten IR. Die linke Spalte zeigt eine Kombination von SPIEDAC ( $\text{TCO}^*/\text{Me-Tet-Cy3}$ ) und SPAAC ( $\text{BCN}/\text{Azid-Cy5}$ ). Die rechte Spalte zeigt eine Kombination von seSPLIEDAC ( $\text{TCO}^*/\text{Me-Tet-Cy5}$ ) und SPIEDAC ( $\text{SCO}/\text{H-Tet-Atto532}$ ). c) Virus-ähnliche Partikel (VLP) mit zweifarbigem Markierung mithilfe von seSPLIEDAC ( $\text{TCO}^*/\text{Me-Tet-Cy5}$ ; oben) und SPIEDAC ( $\text{SCO}/\text{H-Tet-Atto532}$ ; unten). Maßstab = 20  $\mu\text{m}$ .

fahren nur die Färbung der Membran mit Me-Tet-Cy3 beobachtet, was auf eine erfolgreich an  $\text{IR}^{\text{TAG-TCO}^*}$  verlaufende SPIEDAC-Reaktion schließen lässt. Die kurze Inkubationszeit mit Azid-Cy5 führte hingegen erwartungsgemäß zu keiner detektierbaren Markierung von  $\text{IR}^{\text{TAG-BCN}}$ . Grund dafür ist die um ca. 3–4 Größenordnungen geringere Reaktionsgeschwindigkeit von SPAAC gegenüber der von SPLIEDAC (siehe Abbildung 3 (SI) für eine detailliertere Be- trachtung). Wegen dieser Limitation setzten wir uns nun das

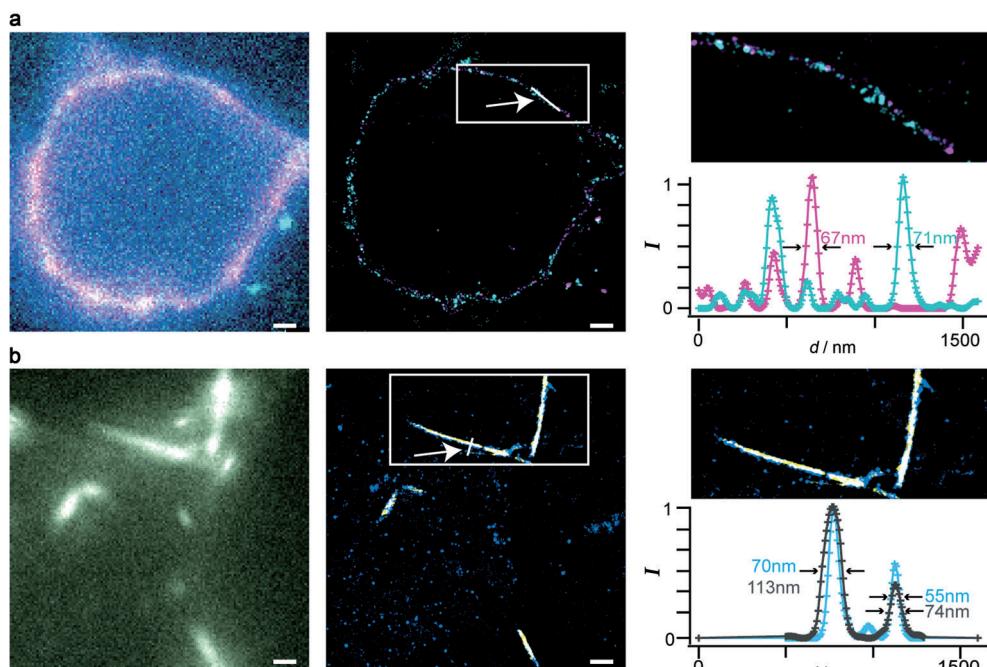
Ziel, eine weitere sehr schnelle, orthogonale Klick-Reaktion zu entwickeln, um damit zweifarbig Markierungen in an- spruchsvollen Systemen praktikabel zu machen.

Aus unseren früheren Studien wussten wir, dass be- stimmte Tetrazine sowohl mit gespannten Alken-UAS als auch mit gespannten Alkin-UAS reagieren können (Abbil- dung 1).<sup>[3a,c]</sup> Wegen der signifikant unterschiedlichen Reakti- onseigenschaften von gespannten Alkenen und Alkinen ver- muteten wir,<sup>[4a]</sup> dass es möglich sein sollte, eine Tetrazin- UAS-Kombination zu finden, die eine weitere orthogonale Markierung ermöglicht. Das zuvor in unseren Laboren ent- wickelte einfache Cyclooctin-Lysin (SCO; Abbildung 2a) wird vom gleichen tRNA<sup>Py1</sup>/PylRS<sup>AF</sup>-Paar und in vergleich- barer Effizienz eingebaut wie TCO\*.<sup>[3b]</sup> Während TCO\* in vitro mit H-Tet und Me-Tet mit Reaktionsgeschwindig- keiten von  $>1000\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  reagierte, wies SCO keine Reakti- vität gegenüber Me-Tet auf (Abbildung 1 (SI) sowie Abbil- dungen 2d und 1). Dennoch reagierte SCO über SPIEDAC um zwei Größenordnungen schneller mit H-Tet als wie oben beschrieben BCN über SPAAC mit einem Azid.<sup>[3a,10]</sup> Wir wiederholten daher das Pulse-Chase-Experiment mit TCO\* als erster UAS und SCO als zweiter UAS und nachfolgender schrittweiser Markierung mit zuerst Me-Tet-Cy5 und an- schließend H-Tet-Atto532 für jeweils 10 min. Die Aufnahmen in Abbildung 3b zeigen eine erfolgreiche und effiziente Markierung des IR in der Plasmamembran für beide Fluorophore. SCO reagierte unter den vorgegebenen Bedingun- gen selektiv mit H-Tet, nicht jedoch mit Me-Tet. Das Reak- tionspaar SCO/H-Tet ist somit orthogonal zur SPIEDAC von TCO\*/Me-Tet, und daher nennen wir diese neue Teilreaktion „selektiv verbesserte (selectively enhanced) SPIEDAC“ (se- SPLIEDAC; Abbildung 1). Wir weisen darauf hin, dass TCO\* hochreaktiv mit Me-Tet und H-Tet ist und es damit experi- mentell gewährleistet werden muss, dass im ersten Markie-

rungsschritt alles TCO\* aufgebraucht wird (siehe auch Abbildung 4(SI) für detaillierte Hinweise). Darüber hinaus zeigen wir in Abbildung 2d sowie in Abbildung 4(SI), dass keine weitere Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit von seSPIEDAC durch Ersetzen von SCO mit dem stärker gespannten und damit reaktiveren BCN möglich ist, da BCN eine nicht vernachlässigbare Reaktivität gegenüber Me-Tet aufweist (siehe auch Abbildung 1 sowie Note 2(SI)).

Da Cy5 und Atto532 häufig für SRM mithilfe von Lokalisierungsverfahren eingesetzt werden, unternahmen wir zweifarbig SRM-Messungen mit diesen beiden Fluorophoren.<sup>[11]</sup> Die Konfokal- (Abbildung 3) und Weitfeldbilder zeigen einander überlappende Plasmamembranmarkierungen des IR für beide Farbkanäle nach der zweifarbigem Markierung von TCO\* und SCO. Allerdings enthüllte SRM eine heterogene Verteilung von IR-Clustern an der Membran (Abbildung 4a) – eine Beobachtung, die auch bei der Analyse anderer Rezeptoren und Wachstumsfaktoren mithilfe von SRM-Verfahren gemacht wurde.<sup>[12]</sup>

Um die allgemeine Anwendbarkeit unseres Verfahrens zu demonstrieren, markierten wir virusähnliche Partikel (virus-like particles, VLP) von Influenza, die mittels Koexpression von Matrixprotein 1 (M1) und Hämaggglutinin (HA) hergestellt wurden (Literaturübersicht siehe Lit. [13]). Virale Genome sind kompakt und weisen oftmals einander überlappende Gene auf – eine Eigenschaft, die das Einfügen genetisch codierbarer Fluoreszenzmarkierungen anspruchsvoll bis unmöglich macht. Wir klonierten eine HA-Mutante mit



**Abbildung 4.** SRM-Bilder von IR- und VLP-exprimierenden Zellen nach Markierung mithilfe von SPIEDAC und seSPIEDAC. a) Weitfeld- (links) und SRM-Bilder (Mitte) von zweifarbig markiertem IR<sup>TAG</sup> (siehe Abbildung 3 a,b; Atto532: magenta, Cy5: blau). Rechts ein vergrößerter Ausschnitt und ein Liniendiagramm der mit einem Pfeil markierten Region. Die Breite der markierten Signale wird als Halbwertsbreite (FWHM) angegeben. b) Weitfeld- (links) und SRM-Bilder (Mitte) von VLP sowie die Intensitätsverteilung von einer in der mittleren Abbildung markierten Linie mittels Liniendiagramm (Atto532: blau, Cy5: grau) analog zu (a). In den Zellbildern wird Atto532 in Blau und Cy5 in Gelb dargestellt; überlagernde Regionen erscheinen weiß. Die SRM-Bilder sind mit einer Auflösung von 45 nm dargestellt, wie durch Fourier-Ring-Korrelation<sup>[11]</sup> (FRC; siehe Supplementary Methods in den Hintergrundinformationen) bestimmt. Maßstab = 1 μm.

TAG-Stopcodon und exprimierten diese zusammen mit M1 und dem tRNA<sup>PyL</sup>/PylRS<sup>AF</sup> in HEK293T-Zellen. Wir verwendeten das oben beschriebene Pulse-Chase-Verfahren mit TCO\* und SCO als UAS sowie Me-Tet-Cy5 und H-Tet-Atto532 als Fluoreszenzfarbstoffen. Abbildung 3c zeigt, dass mit Atto532 und Cy5 faserartige Protrusionen entsprechend den zusammengesetzten VLP visualisiert werden können.

Wir haben hier gezeigt, dass mithilfe neuer UAS genetisch codierte SPIEDAC-Reaktionen in vivo und orthogonal zueinander durchgeführt werden können. Diese Methode ermöglicht die effiziente Proteinmarkierung in zwei Farben in lebenden Zellen und erweitert in diesem Sinne das Repertoire an biokompatiblen Klick-Reaktionen für Markierungsexperimente unter Verwendung genetisch codierter chemischer Funktionalitäten von SPAAC und SPIEDAC zu SPI-EDAC, seSPIEDAC und SPAAC. Der Grund für das hohe Ausmaß an Orthogonalität zwischen seSPIEDAC und SPI-EDAC ist Gegenstand weiterer Untersuchungen, z.B. in Form von Rechnungen.<sup>[4a]</sup> Die beiden sehr schnellen und effizienten (se)SPIEDAC-Reaktionen ermöglichen zweifarbig Markierungsexperimente mit SRM-kompatiblen Fluorophoren in lebenden Säugetierzellen, wohingegen sich die geringe Reaktivität von SPAAC-Reaktionen als unzureichend für solche zeitkritischen Anwendungen erwies.

Bemerkenswert sind die stark verbesserte Einbaurate und deutlich erhöhte Stabilität von TCO\* gegenüber dem ursprünglich beschriebenen TCO. TCO\* reagiert sehr schnell mit verschiedenen Tetrazinen (unter anderem Me-Tet, H-Tet), wohingegen BCN deutlich geringere Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Reaktion mit eher unreaktiven Tetrazinen wie Me-Tet aufweist. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen reagierte SCO hingegen ausschließlich mit H-Tet. Die Markierung mit zwei verschiedenen Fluorophoren wurde mithilfe eines promiskuitiven tRNA/RS-Paares und eines Pulse-Chase-Verfahrens erreicht. Der Markierungsschritt wird dabei in lebenden Zellen ausgeführt und eröffnet somit neue Möglichkeiten zur Analyse der Proteinfunktion mit sehr hoher Auflösung. Eine Kombination unseres Verfahrens mit genetischen Schaltern, z.B. temperaturempfindlichen Mutanten oder durch Promotorsteuerung, sollte die Markierung unterschiedlicher Proteine ermöglichen. Die hier vorgestellten Markierungsreaktionen sind all-

gemein anwendbar und können daher in Zukunft auch direkt zur zweifarbigen Markierung unterschiedlicher Proteine eingesetzt werden, sobald die spezifische genetische Codierung der hier beschriebenen UAS über zwei verschiedene Codons in Säugetierzellen möglich wird. Dafür müssen allerdings zwei zueinander orthogonale tRNA-Synthetasen entwickelt werden, die die für seSPIEDAC und SPIEDAC erforderlichen, gespannten Seitenketten getrennt in Proteine einbauen können.

Die geringe Größe der UAS-Modifikation gegenüber der anderer genetisch codierbarer Fluoreszenzmarkierungen ist besonders für Studien von komplexen Proteinanordnungen, wie dem IR oder HA, von großem Vorteil, da fundamentale Wechselwirkungen mit anderen Proteinen oder beispielsweise Lipiden leicht durch größere Marker in unvorhersehbarer Weise beeinflusst werden können. Besonders die meist sehr kompakten Virusgenome tolerieren an vielen Stellen keinen Einbau größerer Reporterproteine (wie GFP). Da bei der Amber-Unterdrückungsmethode nur ein einziges Codon des gesamten Proteins geändert werden muss, erhöht sich die Chance beträchtlich, eine geeignete, funktional irrelevante Position zur Installation einer Fluoreszenzmarkierung zu finden.

Die hier vorgestellte Methode zur Proteinmarkierung über eine Erweiterung des genetischen Codes ist ein zweistufiger Prozess. Im ersten Schritt werden dabei die bioorthogonal modifizierbaren UAS SCO oder TCO\* in vivo durch Proteinbiosynthese eingebaut, um anschließend zu jedem beliebigen Zeitpunkt und an jedem beliebigen Ort in der Zelle markiert werden zu können. Erst in diesem zweiten Schritt findet die Markierung der in Proteine eingebauten UAS mit Fluorophoren mit den gewünschten photophysikalischen Eigenschaften statt. Da die meisten aktuell verwendeten und membrangängigen Fluorophore sehr hydrophob sind, neigen sie zur unspezifischen und nachteiligen Anhaftung an verschiedene Zellstrukturen. Dieses Problem tritt jedoch bei allen Markierungsstrategien mit kleinen organischen Fluorophoren auf, unabhängig von der Markierungsmethode. Diesen Nachteil umgingen wir dadurch, dass wir uns auf Proteine beschränkten, die die reaktive UAS auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran eingebaut haben. Nun konnten wir unter Verwendung hydrophiler und nicht membrangängiger Fluorophore in vivo die Proteine auf Zelloberflächen fluoreszenzmarkieren. Die immer rasantere Entwicklung neuer, besserer Fluorophore<sup>[14]</sup> verspricht Farbstoffe, die wenig bis keine Hintergrundfärbung in lebenden Zellen verursachen und die idealerweise bald auch kommerziell als Tetrazinkonjugate erhältlich sein werden. Da die hier beschriebene Technik auf dem generischen Verknüpfungsmechanismus von zwei genau aufeinander abgestimmten SPIEDAC-Reaktionstypen beruht, werden Neuentwicklungen von Fluorophoren zur intrazellulären Markierung in vivo sofort kompatibel und anwendbar sein. Profitieren können davon auch andere Disziplinen und Techniken, die eine positionsspezifische Markierung erfordern, beispielsweise MRI oder PET.

Eingegangen am 12. November 2013  
Online veröffentlicht am 28. Januar 2014

**Stichwörter:** Aminosäuren · Cycloadditionen · Klick-Chemie · Protein-Engineering · Viruspartikel

- [1] a) N. Banterle, K. H. Bui, E. A. Lemke, M. Beck, *J. Struct. Biol.* **2013**, *183*, 363–367; b) R. P. Nieuwenhuizen, K. A. Lidke, M. Bates, D. L. Puig, D. Grunwald, S. Stallinga, B. Rieger, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 557–562.
- [2] S. van de Linde, M. Heilemann, M. Sauer, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, *63*, 519–540.
- [3] a) A. Borrman, S. Milles, T. Plass, J. Dommerholt, J. M. Verkade, M. Wiessler, C. Schultz, J. C. van Hest, F. L. van Delft, E. A. Lemke, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2094–2099; b) 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; c) T. Plass, S. Milles, C. Koehler, J. Szymanski, R. Mueller, M. Wiessler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4242–4246; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4166–4170; d) K. Lang, L. Davis, S. Wallace, M. Mahesh, D. J. Cox, M. L. Blackman, J. M. Fox, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10317–10320; e) S. Schneider, M. J. Gattner, M. Vrabel, V. Flugel, V. Lopez-Carrillo, S. Prill, T. Carell, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 2114–2118.
- [4] a) Y. Liang, J. L. Mackey, S. A. Lopez, F. Liu, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17904–17907; b) M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 944–946; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 920–922.
- [5] a) W. Wan, Y. Huang, Z. Y. Wang, W. K. Russell, P. J. Pai, D. H. Russell, W. R. Liu, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3279–3282; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3211–3214; b) H. Neumann, K. H. Wang, L. Davis, M. Garcia-Alai, J. W. Chin, *Nature* **2010**, *464*, 441–444; c) W. Niu, P. G. Schultz, J. Guo, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1640–1645.
- [6] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 413–444.
- [7] T. Yanagisawa, R. Ishii, R. Fukunaga, T. Kobayashi, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1187–1197.
- [8] J. Yang, J. Seckute, C. M. Cole, N. K. Devaraj, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7594–7597; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7476–7479.
- [9] a) K. Siddle, *J. Mol. Endocrinol.* **2011**, *47*, R1–10; b) R. Sarfstein, H. Werner, *Endocrinology* **2013**, *154*, 1672–1679.
- [10] M. F. Debets, S. S. van Berkel, J. Dommerholt, A. T. Dirks, F. P. Rutjes, F. L. van Delft, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 805–815.
- [11] a) M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schuttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6266–6271; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6172–6176; b) M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey, X. Zhuang, *Science* **2007**, *317*, 1749–1753; c) J. Fölling, M. Bossi, H. Bock, R. Medda, C. A. Wurm, B. Hein, S. Jakobs, C. Eggeling, S. W. Hell, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 943–945.
- [12] S. Wilmes, M. Staufenbiel, D. Lisse, C. P. Richter, O. Beutel, K. B. Busch, S. T. Hess, J. Piehler, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4952–4955; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4868–4871.
- [13] J. S. Rossman, R. A. Lamb, *Virology* **2011**, *411*, 229–236.
- [14] a) G. Lukinavičius, K. Umezawa, N. Olivier, A. Honigmann, G. Yang, T. Plass, V. Mueller, L. Reymond, I. R. Corrêa, Jr., Z. G. Luo, C. Schultz, E. A. Lemke, P. Heppenstall, C. Eggeling, S. Manley, K. Johnsson, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 132–139; b) J. C. Carlson, L. G. Meimetis, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 7055–7058; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6917–6920.