

Reversible Fluoreszenzsonden für biologische Redoxzustände

Amandeep Kaur, Jacek L. Kolanowski und Elizabeth J. New*

Biosensoren · Imaging-Substanzen · Fluoreszenz-
sonden · Oxidativer Stress · Redoxchemie

Die Redoxchemie der Zelle ist für deren Funktionstüchtigkeit und Gesundheit von entscheidender Bedeutung. Dementsprechend ist es wichtig, chemische Hilfsmittel für die Untersuchung der Redoxbiologie zu entwickeln. Während Veränderungen im oxidativen Zustand für eine gesunde Zellfunktion wesentlich sind, wird eine chronisch erhöhte oxidative Kapazität mit Krankheiten in Verbindung gebracht. Es ist daher entscheidend, dass Sonden biologischer Redoxzustände zwischen diesen beiden Bedingungen unterscheiden können, indem sie Veränderungen reversibel über die Zeit erfassen. In diesem Kurzaufsatz diskutieren wir die gegenwärtigen Fortschritte bei solchen Sonden und ermitteln die Hauptrichtungen für zukünftige Forschungen auf diesem aufstrebenden Gebiet, das von grundlegendem biologischem Interesse ist.

1. Einleitung

Redoxreaktionen sind für Organismen lebenswichtig. In einer gesunden Zelle kommt es naturgemäß zu einer vorübergehenden Zunahme von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS und RNS), die eine wichtige Rolle bei Signalgebungsprozessen und beim Schutz gegen Krankheitserreger spielen.^[1] Wenn jedoch das Gleichgewicht zwischen oxidierenden und reduzierenden Agentien dauerhaft gestört ist, können die oxidierenden Spezies die Struktur und/oder die Funktion von Proteinen, DNA und Lipiden irreparabel schädigen. Oxidative Schäden werden mit der Entwicklung von verschiedenen Krankheitsbildern, wie Diabetes,^[2] neurodegenerativen^[3] und Herz-Kreislauf-Erkrankungen^[4] sowie Krebs,^[5] in Verbindung gebracht. Somit ist es von entscheidender Bedeutung, in Echtzeit zwischen vorübergehenden und dauerhaften Veränderungen hinsichtlich der oxidativen Kapazität in lebenden Organismen unterscheiden zu können.

In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl von fluoreszenzempfindlichen Sonden zur Untersuchung von Redoxprozessen entwickelt. Die meisten davon nutzen die irreversiblen Reaktionen mit einer spezifischen ROS oder RNS und führen somit zu einer irreversiblen Wechselwirkung

zwischen der Sonde und dem Analyten. Sonden dieses Typs wurden in verschiedenen Artikeln zusammengefasst.^[6] Mit solchen Sonden gelingt jedoch keine Unterscheidung zwischen vorübergehenden, starken Steigerungen der ROS-Produktion, die für physiologische Ereignisse typisch sind,

und einem dauerhaft erhöhten ROS-Niveau, das für krankhaften oxidativen Stress charakteristisch ist (Abbildung 1). Um diesen Unterschied zu erfassen, ist die zeitaufgelöste Erfassung von Veränderungen im Redoxzustand der Zelle unabdingbar. Diese Möglichkeit hängt einzig und allein von der Verwendung reversibler Sonden ab, die im Zuge sukzessiver Oxidations- und Reduktionsprozesse hin- und zurückreagieren können. Gegenüber der Entwicklung irreversibler Sonden, zu denen viele Berichte vorliegen, verlief diejenige von reversiblen Sonden relativ langsam und erfordert sicher noch weitere Untersuchungen. Das Ziel dieses Kurzaufsatzes

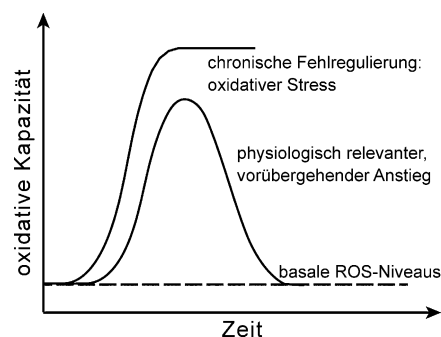


Abbildung 1. Veränderungen im zellulären ROS-Niveau. Vorübergehende Erhöhungen sind für physiologische Funktionen wie die Signalgebung lebenswichtig, während chronische Erhöhungen schädigend wirken und Krankheiten verursachen.

[*] A. Kaur, Dr. J. L. Kolanowski, Dr. E. J. New
School of Chemistry, The University of Sydney
NSW 2006 (Australia)
E-Mail: elizabeth.new@sydney.edu.au

besteht darin, die bisher entwickelten Ansätze zusammenzufassen und vielversprechende Strategien für die weitere Forschung zu ermitteln.

2. Anforderungen an reversible Sonden für zelluläre Redoxzustände

Die Hauptanforderung an solche Sonden besteht darin, dass sie reversibel auf wiederholte Oxidations- und Reduktionszyklen reagieren können. Für die Nutzbarkeit in biologischen Studien muss jedoch noch eine Reihe anderer wichtiger Aspekte betrachtet werden, z.B. die folgenden:

- 1) Selektivität versus globale Antwort: Während reaktionsbasierte (irreversible) Sonden, die gegenüber einer speziellen ROS oder einem redoxaktiven Paar selektiv sind, wertvolle Informationen über die Redoxsignalgebung bei einem speziellen biochemischen Reaktionsweg liefern, geben reversible Sonden, die auf globale oxidative Veränderungen reagieren, Aufschluss über die gesamte oxidative Kapazität einer Zelle und ihre Erholung von Stress (Abbildung 1). Eine Kombination beider Sondenklassen wäre ideal, um die physiologische und pathologische Rolle des zellulären Redoxzustandes umfassend zu beurteilen.
- 2) Eine klare Fluoreszenzreaktion, bei der die Sonde eine hohe Quantenausbeute und ausreichende Stokes-Verschiebungen sowie einen großen Unterschied zwischen den Signalen der oxidierten und der reduzierten Form aufweist. Außerdem gewährleistet eine ratiometrische Antwort, bei der Veränderungen der Emissionswellenlänge statt der Emissionsintensität gemessen werden, eine interne Referenz, die alle durch Konzentration, Hintergrund und Messgeräte bedingten Einflüsse aufhebt.
- 3) Eine schnelle Reaktionskinetik ist entscheidend für eine sofortige Gleichgewichtseinstellung mit dem stationären Zustand der spezifischen ROS/RNS in der lokalen Zellumgebung und für eine maximale räumlich-zeitliche Auflösung des Signals.
- 4) Eine empfindliche Antwort erfordert es, dass die Fluoreszenzänderung durch biologisch relevante Redoxpotentiale oder durch biologisch bedeutsame Konzentrationen von ROS/RNS und Antioxidantien ausgelöst wird.
- 5) Durch die Steuerbarkeit des Redoxpotentials wird die Entwicklung von Sonden möglich sein, die die gesamte Bandbreite der biologisch relevanten Redoxpotentiale abdecken. Solche Potentiale können erheblich differieren. Dies hängt nicht nur vom Entwicklungsstadium der Zelle, vom Zelltyp und der intrazellulären Lokalisation ab, sondern auch von dem betrachteten biologisch relevanten Redoxpaar.
- 6) Die biologische Kompatibilität erfordert die Optimierung von Parametern, z.B. einer ausreichenden zellulären Permeabilität und einer spezifischen subzellulären Lokalisation, um die Beobachtung von oxidativem Stress auf Organellenebene zu ermöglichen. Außerdem müssen (besonders für reversible Sonden, die geeignet sind, Zellen zeitabhängig zu verfolgen) die Sonden ungiftig sein und dürfen nur einen minimalen Einfluss auf die Homöostase der Zelle haben.



Amandeep Kaur beendete ihr Masterstudium an der VIT University (Indien) 2012 und absolvierte am ENSCCF in Frankreich ein Forschungsstudium. 2013 wurde sie mit dem World Scholars Scholarship ausgezeichnet, womit sie ihre Promotion an der University of Sydney bei Dr. Elizabeth New absolviert. Sie arbeitet an der Entwicklung von reversiblen fluoreszierenden Redoxsonden, um die Rolle von oxidativem Stress in der Physiologie und Pathologie aufzuklären.



Jacek Kolanowski erhielt seinen BSc in Biotechnologie und seinen MSc in Chemie von der Adam Mickiewicz University in Posen (Polen). Er erhielt von der Ligue Nationale contre le Cancer ein Promotionsstipendium an der ENS Lyon (Frankreich), wo er 2013 bei Prof. Jens Hasserodt promovierte. 2014–2015 arbeitete er als Postdoktorand bei Dr. Elizabeth New an der University of Sydney (Australien), wo er derzeit Postdoctoral Research and Teaching Associate ist. Sein Interessenschwerpunkt liegt in der Entwicklung chemischer Hilfsmittel für die Bildgebung und Untersuchung biologischer Zielstrukturen.



Elizabeth New studierte an der University of Sydney (Australien) und promovierte 2009 bei Prof. David Parker an der Durham University. 2010–2011 arbeitete sie als Postdoktorandin bei Prof. Chris Chang an der University of California (Berkeley, USA). 2012 kehrte sie als Dozentin für anorganische Chemie an die University of Sydney zurück. Ihr Forschungsschwerpunkt liegt auf der Entwicklung von niedermolekularen Fluoreszenz- und Magnetresonanzsonden für die Untersuchung biologischer Systeme.

Eine Klasse von Sonden, die viele dieser Anforderungen an optimale reversible Sonden erfüllt, ist eine Reihe von redoxresponsiven fluoreszierenden Proteinen. Diese wurden an anderer Stelle detailliert zusammengefasst.^[7] Fluoreszierende Proteine bieten über ihre allgemeinen Vorzüge, wie Photostabilität, Biokompatibilität und leichte intrazelluläre Ansteuerung, hinaus die Möglichkeit, ratiometrische fluoreszierende Proteine zu entwickeln und somit die Eindeutigkeit des detektierten Signals zu gewährleisten. Zum Beispiel reagiert HyPer selektiv und reversibel auf H₂O₂ mit einer ratiometrischen Emissionsänderung.^[8] Sonden dieses Typs werden in einer Reihe von In-vivo-Modellen verwendet und liefern Informationen, die zuvor nicht zugänglich waren. Solche Sonden erfordern jedoch oft eine invasive und normalerweise aufwendige genetische Modifizierung des Systems. Sie können somit bei einer Reihe von Beispielen nicht angewendet werden, noch haben sie das Potential für klinische Anwendungen.

In diesem Zusammenhang sind niedermolekulare Sonden hinsichtlich der Überwindung der intrinsischen Grenzen von genetisch kodierten Sonden sehr vielversprechend. Gegenüber der Literatur zu fluoreszierenden Proteinen gibt es nur

relativ wenige Berichte zu niedermolekularen Redoxsonden, und es fehlt insbesondere an detaillierten biologischen Untersuchungen unter Verwendung solcher Hilfsmittel. Der Fokus dieses Kurzaufsatzes liegt auf den noch immer sehr limitierten Beispielen von reversiblen niedermolekularen Fluoreszenzsonden für Redoxzustände in der Biologie (Ta-

belle 1), wobei das Hauptaugenmerk auf vielversprechenden Entwicklungsmöglichkeiten liegt. Unsere Diskussion ist nach den redoxresponsiven Gruppen gegliedert und zielt darauf ab, die weitere Entwicklung auf diesem Gebiet voranzutreiben, indem die wesentlichen Vorzüge und Grenzen der bisher vorgestellten Ansätze aufgezeigt werden.

Tabelle 1: Fluoreszenz und Redoxeigenschaften von reversiblen Redoxsonden, die in Zell- oder Tiermodellstudien verwendet wurden. Die Sonden sind entsprechend ihrer redoxresponsiven Bausteine sortiert und in der Reihenfolge ihrer Erscheinung im Text angeordnet.^[a]

Sonde	Selektivität	Ex/Em [nm]	berichtete Fluoreszenz- änderung	biologisches System – Behandlung oder Stimulus
Nitroxide				
TMB ^[19]	n.a.	491/507	10-fache Zunahme	HepG2-Zellen – H ₂ O ₂
R2c ^[26]	n.a.	683/ca. 700	2.5- bis 5-fache Zunahme	HeLa-Zellen – Ascorbat
TEtNO-Anthracen und TEtNO-Fluorescein ^[21]	n.a.	465/480 490 (970) ^{TP} / 511	70-fache Zunahme 7-fache Zunahme	CHO-Zellen – H ₂ O ₂ , CellROX tiefrot
Fluorescein-TEMPO ^[22]	O ₂ ^{•-} und NO [•]	492/514	2.2–2.7-fache Zunahme	hTERT-immortalisierte Fibroblasten – 2DG und Rotenon
MitoRP ^[23]	n.a.	460/495	3-fache Zunahme	HeLa-Zellen, isolierte Mitochondrien – NADH, Rotenon, Succinat und Malonat
ME-TRN ^[27]	O ₂ ^{•-}	556/590	N/A	Albino-Sprague-Dawley-Ratten – akute retinale Ischämie-Reperfusion – Lutein
ORCAFluor ^[28]	Ascorbat und GSH	640/730	2- bis 3.5-fache Zunahme	Mäuse – endogene Ascorbatniveaus
mCy-TemOH und Cy-TemOH ^[24]	HOBr	445 und 610/ 550 und 632 702/755	632/550 2.5-fache Abnahme 6-fache Abnahme	RAW 264.7-Zellen – H ₂ O ₂ , EPO, KBr und GST
Chinone				
RF-1 ^[29]	n.a.	490/503	> 50-fache Zunahme	HEK29 – H ₂ O ₂
Rh-Q, Rh-QOMe ^[30]	n.a.	566/592	6-fache, 4-fache Abnahme	HeLa-Zellen – keine Reaktion von [Cu(phen) ₂] ²⁺ oder H ₂ O ₂
DA-Cy ^[31]	H ₂ O ₂ und •OH/ GSH und zelluläre Thiole	630/755	ca. 20-fache Abnahme	HL-7702-Zellen – H ₂ O ₂ , NEM; HepG2-Zellen – H ₂ O ₂ RAW 264.7-Zellen – PMA, GST, α-Liponsäure Hippocampusgewebe von Ratten – H ₂ O ₂ , NEM, α-Liponsäure
TCA ^[32]	O ₂ ^{•-}	491 (800) ^{TP} / 515	> 1000-fache Zunahme	HL 7702-Zellen – PMA, Tiron HepG2-Zellen – PMA, GSH, BSO Zebrafisch, Mäuseleber – ischämische Reperfusionsschäden
PY-CA ^[33]	O ₂ ^{•-}	405 (800) ^{TP} / 520	> 1000-fache Zunahme	4T1-Zellen – 2ME, Ascorbinsäure, Tiron, melanomes Tumorgewebe von Mäusen <i>C. elegans</i> – Paraquat, Tiron
Chalkogenide				
RSe-N ^[34]	GSH	525/530- 640	ca. 6-fache Zunahme	HepG2, HL7702 – keine
Cy-O-Eb ^[35]	H ₂ O ₂	768/794	ca. 8-fache Zunahme	HepG2-Zellen – GSH/H ₂ O ₂ -Redoxzyklen HepG2, HL7702 – BSO-induzierte Apoptose Zebrafischlarven - Schwanz-Flossen-Verletzung

Tabelle 1: (Fortsetzung)

Sonde	Selektivität	Ex/Em [nm]	berichtete Fluoreszenz-änderung	biologisches System – Behandlung oder Stimulus
FSeSeF ^[36]	GSH	488/514	4-fache Abnahme	HeLa – H ₂ O ₂ , α -Liponsäure und NEM
Chalkogenoxide				
Cy-PSe ^[37]	ONOO ⁻	758/775	23.3-fache Zunahme	RAW 264.7 – SIN-1, GST, LPS, IFN- γ , PMA, NOC-5 und TEMPO
MPh-Se-BOD ^[38]	⁻ OCI	460/475–650	5-fache Zunahme	RAW 264.7 – PMA, Taurin, Xanth./Xanth.-Oxidase
HcSe ^[39]	⁻ OCI	510/526	138-fache Zunahme	RAW 264.7 – NaOCl und GSH
NI-Se ^[40]	⁻ OCI	420/523	12-fache Zunahme	RAW 264.7 – LPS, PMA und SHA Mäuse – LPS
diMPhSe-BOD ^[41]	HOBr	610/635, 700	230-fache Zunahme	RAW 264.7 – H ₂ O ₂ , EPO, KBr und H ₂ S
Bis(BODIPY)diselenid ^[42]	O ₂ ⁻	504/514	30-fache Zunahme	MCF-7/ADR-Zellen – PMA
2 Me TeR ^[43]	-OCI (⁻ OH), (ONOO ⁻)	600/669	200-fache Zunahme	HL-60-Zellen – H ₂ O ₂ und ABAH
Cy-NTe ^[44]	ONOO ⁻	793/820	ca. 80-fache Zunahme	RAW 264.7 – LPS, IFN- γ , PMA, AG, Paraquat, NOC-5 und NaOCl BALB/c-Mäuse – L-Cystein, LPS, IFN- γ , PMA, AG, GST
[Ru(bpy) ₃] ²⁺ -PTZ ^[45]	HOCl	450/605	ca. 7-fache Zunahme	Mäuse – NaOCl, H ₂ S und PABA
FO-PSe ^[46]	HOCl	415 (800) ^{TP} /520	ca. 40-fache Zunahme	RAW 264.7 – PMA, ABAH Zebrafisch – Zymosan und Mäuseabdomen
Flavine				
CMFL-BODIPY ^[47]	n.a.	450/512	ca. 9-fache Zunahme	HeLa – Na ₂ S ₂ O ₄ und H ₂ O ₂
NpFR1 ^[48]	global	405/545	125-fache Zunahme	3T3-L1 Präadipozyten und differenzierte Adipozyten – Glucose und H ₂ O ₂
NpFR2 ^[49]	global	488/545	115-fache Zunahme	Knochenmark, Thymus und Milz von Mäusen – H ₂ O ₂ und Mitotracker tiefrot
FCR1 ^[50]	global	820 ^{TP} /470, 520	520/470 6-fache Zunahme	HeLa – NAC und H ₂ O ₂
Verschiedene				
RHyCy5 ^[51]	n.a. (O ₂ -Niveaus)	596/641	7- bis 8-fache Abnahme	A549-Zellen – an der Luft und unter Deckglas
Ox-PS-NP ^[52]	O ₂ -Niveaus	635/670, 800	800/670 4-fache Abnahme	MH-S-Makrophagen – O ₂ in Atm.; NMRI-Fox1-Mäuse mit AsPC-1-Zellentumor, Na ₂ SO ₃
Ru-Py ^[53]	O ₂ -Niveaus	450/595	ca. 10-fache Abnahme	A549-Zellen – O ₂ in Atm.; BALB/cSlc-Mäuse – Ligatur im Bein
Resorufin-TFB ^[54]	n.a.	571/583	11-fache Zunahme	Makrophagen – NaSH, dann Glucose + GOx oder NaOH

[a] ABAH = Aminobenzoessäure-Hydrazid, AG = Aminoguanidin, BSO = Buthioninsulfoximin, DETA/NO = Diethylentriamin/Stickoxid-Addukt, 2DG = 2-Desoxy-D-glucose, EPO = eosinophile Peroxidase, GSH = Glutathion (reduziert), GST = Glutathion-S-Transferase, HRP = Meerrettichperoxidase, IFN- γ = Interferon gamma, LPS = Lipopolysaccharid, 2-ME = 2-Methoxyestradiol, NAC = N-Acetylcystein, NEM = N-Ethylmaleimid, NOC-5 = 3-Aminopropyl-1-hydroxy-3-isopropyl-2-oxotriazen, PABA = *para*-Aminobenzoessäure, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, SHA = Salicylhydroxamsäure, SIN-1 = 3-Morpholinosydnonimin, TP = zwei Photonen, Xanth. = Xanthin.

3. Sonden auf Nitroxidbasis

Nitroxylradikale sind ungewöhnlich langlebige freie Radikale, die wegen ihres Paramagnetismus schon lange als Spinmarker für die Elektronenspinresonanz/paramagnetische Elektronenresonanz (ESR/EPR) verwendet werden.^[9] In biologischen Systemen ist bei Nitroxylradikalen eine Redoxschaltung zwischen dem diamagnetischen (geschlossene Schale) und dem paramagnetischen (Radikal-)Zustand zu beobachten (Abbildung 2a), und sie wurden als Sonden für

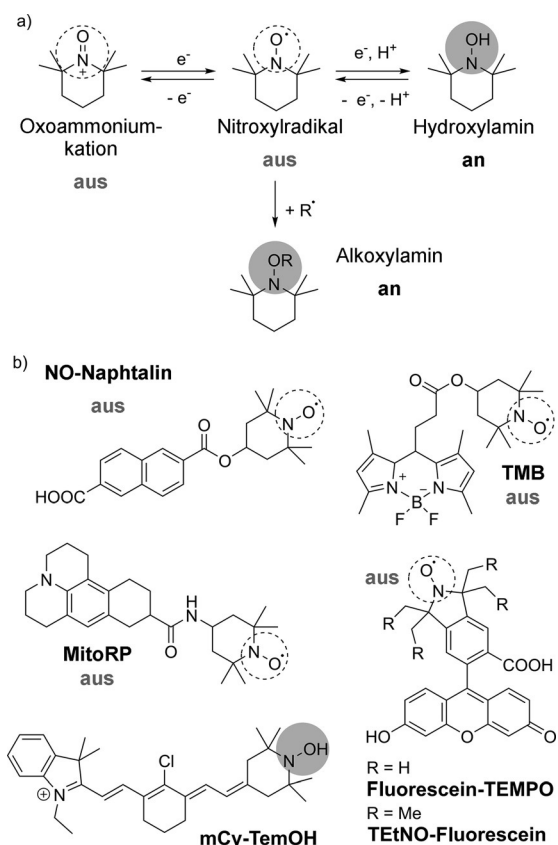


Abbildung 2. a) Mögliche Redoxreaktionen von Nitroxylradikalen in biologischen Medien. Kreise kennzeichnen redoxresponsive Stellen, gestrichelte Kreise fluoreszenzlöschende Motive und grau hinterlegte Kreise Motive, die Fluoreszenz ermöglichen. b) Ausgewählte Beispiele von Nitroxid-basierten redoxresponsiven Fluoreszenzsonden, wobei das fluoreszenzlöschende Nitroxylradikal durch einen gestrichelten Kreis gekennzeichnet ist.^[13, 19, 21–24]

EPR^[10] und Magnetresonanztomographie (MRI) erforscht.^[10, 11] Um die Fluoreszenzdetektion zu ermöglichen, kann der Nitroxidbaustein über ein geeignetes Verbindungselement kovalent an einen gewählten Fluorophor gebunden werden. Das freie Nitroxylradikal löscht die Fluoreszenz des Fluorophors,^[12] die entweder durch reversible Reduktion zum diamagnetischen Hydroxylamin oder durch irreversible Bildung von Alkoxyaminderivaten wiederhergestellt werden kann (Abbildung 2a). Da die Fluoreszenz mittels Reduktion aktiviert wird, werden diese Sonden oft als profluoreszierende Nitroxide bezeichnet, in Analogie zu Propharmaka.

Die erste Machbarkeitsstudie für einen Fluorophor auf Nitroxylbasis wurde mit NO-Naphtalin geführt (Abbildung 2b).^[13] Dieses zeigt bei Reduktion eine zehnfache Zunahme der Fluoreszenzquantenausbeute. Anfänglich wurden sowohl Fluoreszenz- als auch Paramagnetismusdaten (EPR) von NO-Dansyl- und NO-Perylsonden gesammelt.^[14] Seitdem werden profluoreszierende Nitroxidsonden (PFNs) verwendet, um Radikale in einer Vielzahl von biologischen und nichtbiologischen Anwendungen zu detektieren,^[15] sei es für die Untersuchung von Partikelproben^[16] oder für die Bewertung der Stabilität von Polymeren.^[17] Sie wurden an anderer Stelle zusammengefasst.^[18] Daher werden wir uns in diesem Kurzaufsatz nur auf einige subjektiv ausgewählte Beispiele konzentrieren, die auf die Detektion des Redoxzustandes in biologischen Systemen abzielen. Eine der Sonden, mit denen das Problem der begrenzten Anwendbarkeit von PFNs mit Anregungen im kurzwelligen Bereich in biologischen Untersuchungen gemeistert werden konnte, ist TMB (Abbildung 2b), ein grün emittierender BODIPY-Fluorophor mit einem Nitroxidbaustein, der bei Reduktion eine sechsfache Zunahme der Emission zeigt.^[19] Diese Sonde konnte H₂O₂-induzierten oxidativen Stress in den hepatozellulären Hep2G-Karzinomzellen detektieren und war in vitro 60 min stabil gegen die hydrolytische Aktivität von Trypsin.^[20]

Auch wenn durch Konjugation des TEMPO-Radikals an ein Styryl-BODIPY, Nilrot oder einen Ruthenium-Polypyridyl-Komplex eine weitere Rotverschiebung der Anregungs- und Emissionswellenlängen erreicht werden konnte, verhinderten geringe Quantenausbeuten (0.002–0.050) und relativ kleine Dynamikbereiche (zwei- bis achtfache Änderungen) doch eine Anwendung dieser Sonden in der Biologie.^[25] In einer anderen Untersuchung wurde ein wasserunlösliches profluoreszierendes Nitroxid auf Silicat-Phthalocyanin-Basis (R2c) mit einer Emission bei $\lambda = 700$ nm in Liposome eingekapselt und zur Quantifizierung des Ascorbinsäuregehaltes in HeLa-Zellen verwendet.^[26]

Es kann auch eine Anregung im Nah-IR-Bereich durch Zwei-Photonen-Anregung realisiert werden. Zu diesem Zweck wurde auf Grundlage verschiedener Fluorophore eine Reihe von profluoreszierenden Radikalen hergestellt, und es wurden die Fluoreszenzsignale gemessen.^[21] Bei der Reduktion war zusätzlich zu einer bis zu 70-fachen Zunahme der Fluoreszenz auch eine Erhöhung der Fluoreszenzlebensdauer um bis zu zwei Größenordnungen zu verzeichnen. Die beiden Radikale TETNO-Anthracen und TETNO-Fluorescein (Abbildung 2b) wurden auf der Grundlage ihrer signifikanten Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitte für biologische Experimente ausgewählt. Bei Experimenten mit linearer und Zwei-Photonen-Absorptions-Fluoreszenzmikroskopie an Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) wurde festgestellt, dass diese Sonden ungiftig sind und dass exogen zugeführtes H₂O₂ erfasst werden kann.

Während das Nitroxylradikal/Hydroxylamin-Redoxpaar reversibel ist, wird für Sonden auf Nitroxidbasis im Allgemeinen keine Reversibilität beschrieben. Eine Reversibilität der Reaktion konnte für Fluorescein-TEMPO (Abbildung 2b) nachgewiesen werden, bei dem die Ein-Elektronen-Reduktion durch einen Überschuss an Hydrazin-Hydrat zu einer Zunahme der Fluoreszenz führte, was sich durch Re-

oxidation mit Luft umkehren ließ.^[22] Zwar hielt diese Redoxoxidation über drei Redoxzyklen an, allerdings war mit jedem Zyklus eine leichte Zunahme der Grundfluoreszenzintensität zu verzeichnen, was auf eine irreversible Zerstörung eines Teils des Radikals schließen lässt. Mittels Durchflusszytometrie und molekularer Bildgebung in hTERT-immortalisierten menschlichen Fibroblasten wurde das Potential der Sonde für die Echtzeitmessung von globalen Redoxveränderungen in der Zellumgebung nachgewiesen. Erst kürzlich wurde durch ein verwandtes Rhodamin-Nitroxid-Konjugat, ME-TRN, die Echtzeitmessung von oxidativem Stress auf der Retina von lebenden Ratten möglich,^[27] womit ein neuer Weg für eine breitere In-vivo-Anwendung von PFN-Redoxsonden geebnet wurde. Während es bislang noch keine Beispiele für Zielstruktur-gerichtete Nitroxidsonden gibt, zeigte die Sonde MitoRP (Abbildung 2b), die auf Cumarin 343 basiert, eine bevorzugte Lokalisation in den Mitochondrien.^[23]

Erst kürzlich wurde über MRI-Fluoreszenz-„Flaschenbürsten“-Polymersonden, die Nitroxylradikale enthalten (ORCAFluors), berichtet.^[28] Der Einbau eines Cyaninfarbstoffes in räumlicher Nähe zu den Radikalen führte zu einer partiellen Fluoreszenzlöschung. In Gegenwart von Ascorbat oder Ascorbat/GSH führte eine Reaktion mit Nitroxylradikalen zu einer 2- bzw. 3,5-fachen Zunahme der Nah-IR-Fluoreszenz. Die Sonden wurden in vivo eingesetzt, um in Mäusen die gewebeabhängige Inhomogenität der Ascorbatkonzentration zu untersuchen.

Ein interessanter alternativer Nitroxid-basierter Detektionsmechanismus wird anhand von mCy-TemOH (Abbildung 2b) und Cy-TemOH gezeigt, bei denen ein Oxoammoniumkation statt eines paramagnetischen Nitroxylradikals verwendet wird (Abbildung 2a). Diese Sonden gehen eine Zwei-Elektronen-Umwandlung ein, die selektiv und reversibel ablaufen werden kann, indem statt der globalen Redoxumgebung das Redoxpaar aus hypobromiger Säure und Ascorbinsäure genutzt wird.^[24] mCy-TemOH zeigt ein ratiometrisches Verhalten, mit einem redoxresponsiven Signal bei $\lambda = 632$ nm und einem redoxunempfindlichen Signal bei $\lambda = 550$ nm, und wurde angewendet, um die Zyklen einer Behandlung mit Ascorbat und hypobromiger Säure in RAW264.7-Makrophagen zu visualisieren.^[24]

4. Chinone

Das reversible Redoxpaar Chinon/Hydrochinon wird seit fast hundert Jahren umfassend erforscht^[55] und bietet sich somit für die Gestaltung von redoxresponsiven optischen Sonden an.

Eine der am häufigsten verwendeten Verbindungen für die Untersuchung von Redoxveränderungen in biologischen Systemen ist Dichlorfluorescein (DCF; Abbildung 3a). Es wurde ursprünglich entwickelt, um H_2O_2 zu detektieren,^[56] reagiert aber auf ROS nicht selektiv und hat Vielzahl Einschränkungen (die an anderer Stelle zusammengefasst sind).^[57,6b,g] Die Oxidation des schwach fluoreszierenden DCFH führt zur fluoreszierenden semichinoiden DCF-Struktur mit einem Push-pull-Fluoreszenzmechanismus, allerdings ist der Prozess irreversibel und wird daher in diesem

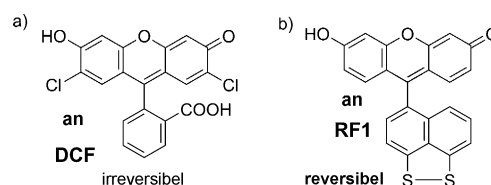


Abbildung 3. a) Oxidierte Form der irreversiblen DCF-Sonde. b) Reversible Redoxsonde RF1 vom Fluoresceintyp.^[29]

Kurzaufsatz nicht betrachtet. Durch die Einführung eines Naphthyl-disulfid-Bausteins in RF1 (Redoxfluor 1; Abbildung 3b) gelang es, die Redoxreaktion eines Fluorescein-artigen Fluorophors reversibel zu gestalten. Dies war auch das erste Beispiel für eine niedermolekulare fluoreszierende Redoxsonde, die Reversibilität in Zellen zeigte, aber es wurde kein Reduktionspotential veröffentlicht.^[29]

Bei nachfolgenden Sonden auf Chinonbasis wurde eine Lumineszenzlösungsstrategie bei einem photoinduzierten Elektronentransfer vom Luminophor im angeregten Zustand zum elektronenarmen Chinonbaustein genutzt (Abbildung 4a), wie sie des Öfteren auch für Systeme auf Porphyrinbasis berichtet wurde.^[58] Im Zusammenhang mit dieser

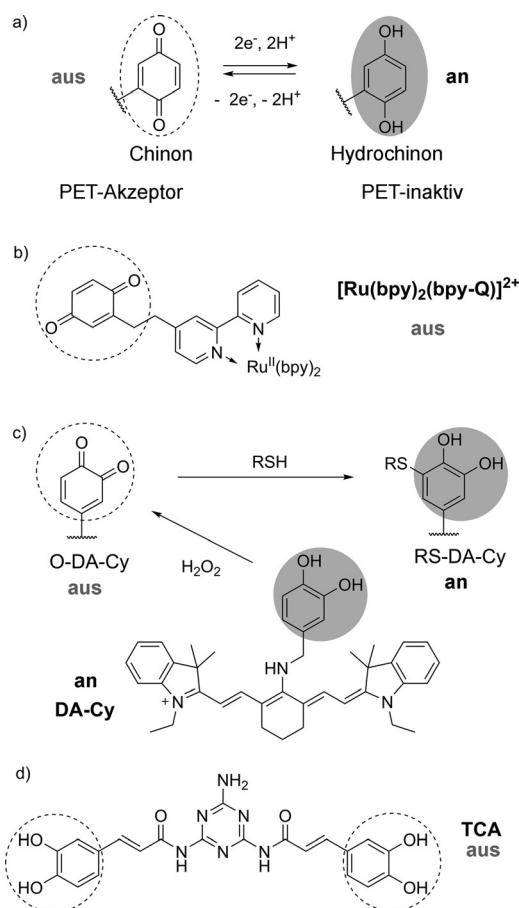


Abbildung 4. a) Reversible Redoxreaktivität des Chinon/Hydrochinon-Paars. b) Beispiel eines Ruthenium-basierten redoxkontrollierten Lumineszenzschalters.^[59] c) Mechanismus der intrazellulären Reaktion der Da-Cy-Sonde mit dem H_2O_2 /Thiol-Redoxpaar.^[31] d) Reduzierte nicht-fluoreszierende Form der TCA-Sonde.^[32]

Strategie wurde über eine Reihe von reversiblen Chinonhaltigen Redoxsonden auf der Basis von Rutheniumkomplexen berichtet. Zum Beispiel führte die rot lumineszierende Sonde $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy}-\text{Q})]^{2+}$ (Abbildung 4b; bpy = 2,2'-Bipyridin) bei der elektrochemischen Reduktion in Acetonitril zu einer vierfachen Erhöhung der Lumineszenz ($E_{\text{red}} = -0.2 \text{ V}$).^[59] Während die elektrochemische Reduktion des $[\text{Ru}(\text{terpy})]^{2+}$ -artigen (terpy = 2,2';6',2''-Terpyridin) Komplexes RQ, der ein starr gebundenes Chinon enthält, nur bei geringen Temperaturen zu einer Zunahme der Lumineszenz führte,^[60] zeigte $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PAIDH})]^{2+}$ (PAIDH = 2-Pyridyl-1*H*-anthra[1,2-*d*]imidazol-6,11-dion) bei Raumtemperatur eine elektrochemisch induzierte 600-fache Zunahme der Lumineszenz (Quantenausbeute (QY) = 0.02; $E_{\text{red}} = -0.5 \text{ V}$).^[61] Trotz der elektrochemischen Reversibilität bei nahezu biologisch relevanten Potentialen und einer signifikanten Lumineszenzreaktion wurde keiner dieser Komplexe unter biologisch relevanteren wässrigen Bedingungen untersucht, noch wurde die chemische Reversibilität demonstriert.

Um redoxresponsive Sonden für die Biologie zu entwickeln, wurde der Chinonbaustein kovalent an eine Reihe von organischen Fluorophoren gebunden. Die BODIPY/Chinon-Gruppe mit einem starren Phenyl-Linker (BD-PQ) weist eine stabile elektrochemische Reversibilität und bei der Reduktion eine 2,5-fache Zunahme der Fluoreszenz ($E_{\text{red}} = -0.46 \text{ V}$) auf.^[62] Die chemische Reversibilität wurde durch die sequentielle Umsetzung mit H_2O_2 und Ascorbat nachgewiesen, wobei ein Teil der beobachteten Fluoreszenzänderung (10–30 %) den irreversiblen Redoxreaktionen am BODIPY-Farbstoff zugeordnet wurde.

In einem anderen Ansatz wurde Rhodamin an zwei verschiedene Hydrochinone gebunden, um so nachzuweisen, dass das Redoxpotential gesteuert werden kann.^[30] 1,4-Benzochinon/Rhodamin(Rh-Q)- und 2-Methoxy-1,4-benzochinon/Rhodamin(Rh-QOMe)-Sonden zeigen bei der Oxidation durch einen Überschuss von $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ (phen = 1,10-Phenanthrolin) eine sechsfache bzw. vierfache Abnahme der Fluoreszenz. Diese Veränderungen wurden schnell durch die Zugabe von Cystein umgekehrt. Während sie von HeLa-Zellen effizient internalisiert wurden, konnte in der Zelle selbst bei oxidativer Anregung keine Oxidation beobachtet werden, was wahrscheinlich auf die Reduktion der Sonde durch intrazelluläres GSH zurückzuführen ist. Die Autoren mutmaßen jedoch, dass dem begegnet werden kann, indem das Redoxpotential der Sonde durch Modifizierung des Hydrochinonbausteins verringert wird.

Um in einem biologischen System eine redoxabhängige Fluoreszenz zu garantieren, wurde ein intrazelluläres redoxaktives Dopamin direkt an einen Cyaninfarbstoff gebunden (DA-Cy; Abbildung 4c), woraus eine An-aus-an-Sonde resultierte.^[31] Die H_2O_2 -Oxidation des 1,2-Hydrochinonbausteins von Dopamin führte zu einer 20-fachen Fluoreszenzlöschung. Diesem Effekt konnte in einem irreversiblen Prozess durch die Zugabe von Thiolen entgegengewirkt werden. Das Verschwinden der DA-Cy-Fluoreszenz bei oxidativem Stress und die anschließende Thiol-abhängige Regenerierung in HL-7702-, HepG2- und RAW264.7-Zellen sowie in Hippocampusgewebeschnitten von Ratten zeigen, dass DA-Cy für die Untersuchung des H_2O_2 /Thiol-Redoxpaars biologisch

geeignet ist. Aufgrund der irreversiblen Reduktion bei der Thiolzugabe ist jedoch die Möglichkeit ausgeschlossen, mehr als einen Oxidations/Reduktions-Zyklus abzubilden.

Die Gruppe um Tang berichtete über eine Sonde auf Triazinbasis, TCA (Abbildung 4d), die durch ein oder zwei Photonen anregbar ist und die reversibel und selektiv durch Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) unter Bildung von TCAO oxidiert werden kann. Es wurde gezeigt, dass TCAO bei der Ein- und Zwei-Photonenanregung eine 1000- bzw. 3-mal höhere Fluoreszenz aufweist.^[32] TCAO konnte durch Glutathion reduziert werden und mehr als drei Redoxzyklen durchlaufen. Die Autoren untersuchten die Reversibilität der TCA-Fluoreszenz, indem HepG2-Zellen sequenziell mit dem ROS-Auslöser Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und dem Reduktionsmittel Glutathion behandelt wurden. Außerdem verwendeten die Autoren TCA, um Redoxveränderungen bei Zebrafischen und Mäusen bildlich darzustellen. Die Gruppe hat kürzlich eine andere Sonde mit einer ähnlichen Strategie veröffentlicht, und PY-CA kann selektiv durch $\text{O}_2^{\cdot-}$ unter Bildung des fluoreszierenden PY-CAO oxidiert werden.^[33] Wie TCA hat auch diese Sonde nachweislich mehr als drei $\text{O}_2^{\cdot-}$ /GSH-Redoxzyklen durchlaufen und wurde für In-vivo-Bildgebung in Zellen und Tumoren von Mäusen verwendet.

Kürzlich lieferte der Einbau des redoxresponsiven Resorcinbausteins (1,3-Dihydroxyphenol) in das Hemiporphyrizingerüst eine Sonde mit Redoxschaltung und Fluoreszenz im Nah-IR-Bereich. Ihre oxidierte, nah-IR-fluoreszierende, aza-chinoide Form konnte bis zu siebenmal durch ein NaBH_4 /2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon(DDQ)-Paar reversibel zu einer nichtfluoreszierenden Resorcinstruktur umschalten.^[63] Diese für optoelektronische Anwendungen entwickelte Schaltung wurde jedoch nur in Chloroform demonstriert und ist somit für biologische Systeme nicht nutzbar.

5. Fluoreszierende Redoxsonden auf Chalkogenbasis

Eine umfangreiche Klasse von reversiblen Redoxsonden enthält Schwefel, Selen und Tellur. Diese Sonden können weiter unterteilt werden in jene, bei denen die Oxidation durch die Bildung einer Disulfid-, Diselenid- oder Ditelluridbrücke (Dichalkogenide: Abschnitt 5.1; Abbildung 5a) abläuft, und jene, bei denen die Oxidation des Chalkogens selbst zur Oxidform erfolgt (Abschnitt 5.2; Abbildung 6a).

5.1. Dichalkogenide

Die Sulfid-Disulfid-Oxidation (veranschaulicht durch die Oxidation von Cystein zu Cystin) steht im Zentrum zahlloser biologischer Vorgänge und Strukturen (Abbildung 5a). Das Thiol/Disulfid-Verhältnis (sei es GSH/GSSG oder Cystein/Cystin) innerhalb der Zellen ist bekanntermaßen ein guter Indikator für zellulären oxidativen Stress,^[64] was bedeutet, dass Disulfid ein geeigneter Baustein für die Entwicklung von fluoreszierenden Redoxsonden ist. Gleichmaßen spielt die Selenid-Diselenid-Oxidation in der Biologie eine wichtige Rolle, z. B. am katalytischen Zentrum der Glutathion-Per-

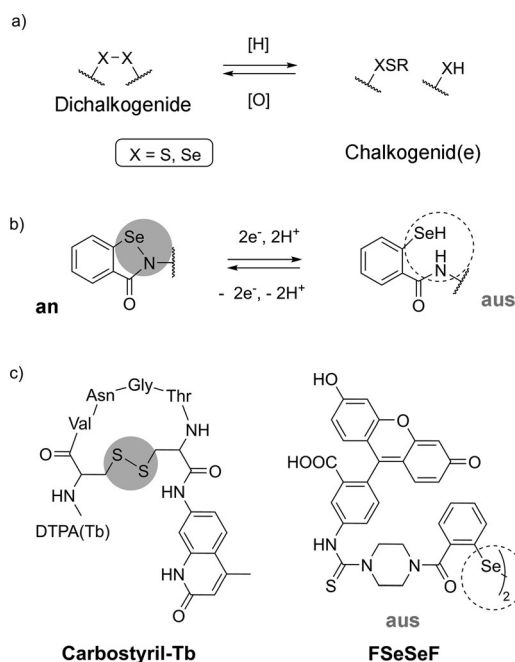


Abbildung 5. Reversible Redoxumwandlungen von Dichalkogenid (a) und einem Baustein vom Ebselentyp (b). c) Ausgewählte Beispiele von Sonden des Dichalkogenidtyps; DTPA = Diethylentriaminpentaessigsäure.^[29, 36, 66]

oxidase (GPx).^[65] Diese Redoxschalter wurden bei der Entwicklung von einer begrenzten Anzahl von Sonden verwendet, die in der Folge diskutiert werden sollen. Bei einer der ersten veröffentlichten reversiblen Redoxsonden auf Disulfidbasis, dem Carboxystyryl-Tb, ist ein Carboxystyrylchromophor enthalten, der über einen Hexapeptid-Linker mit einem Terbiumkomplex verbunden ist (Abbildung 5c).^[66] Bei der Oxidation bilden die beiden Cysteinreste im Linker eine Disulfidbrücke, die das Carboxystyryl und das Tb nahe genug zusammenbringt, um eine sensibilisierte Lumineszenz mit einer konstanten Emissionsintensität bei $\lambda = 400$ nm und damit ein ratiometrisches Signal zu ermöglichen. Das Reduktionspotential dieser Sonde beträgt -0.243 mV, was sich gut im biologischen Bereich einordnet. Diese Sonde wurde zwar nicht in biologischen Systemen getestet, jedoch haben die Autoren gezeigt, wie leicht das Reduktionspotential durch Modifikation des Linkers gesteuert werden kann.

Trotz umfassender Forschung zur Entwicklung von Selenhaltigen Antioxidantien auf Ebselenbasis (Abbildung 5b) ist die Verwendung von Selen in Fluoreszenzsonden noch relativ neu. Das erste Beispiel einer solchen Sonde basierte auf Rhodamin mit einer redoxaktiven Se-N-Bindung (RSe-N) und wurde, ohne weitere Untersuchung seiner Reversibilität, als eine Thiolsonde beschrieben.^[34] Erst kürzlich berichteten Tang und Mitarbeiter über Cy-O-Eb, eine Redoxsonde mit einem Ebselenbaustein, der an einen Cyaninfarbstoff gebunden ist.^[35] In umfassenden Untersuchungen wurde die Reversibilität von Cy-O-Eb gegenüber dem GSH/ H_2O_2 -Redoxpaar gezeigt, und die Sonde wurde verwendet, um den Peroxidgehalt in verletzten Zebrafischen zu visualisieren. Die Selektivität für Peroxid gegenüber allen anderen ROS ist

noch unklar, da Ebselen auch mit Peroxynitrit reagieren kann.^[67]

Im Unterschied dazu kommt bei der Sonde FSeSeF, die aus zwei über eine Diselenbrücke verbundenen Fluoresceinmolekülen besteht (Abbildung 5c), ein Ansatz zur Anwendung, welcher der Sulfid-Disulfid-Oxidation ähnelt.^[36] Die Diselenidbindung im schwach fluoreszierenden FSeSeF kann durch zelluläre Thiole, wie Glutathion und Cystein, reduziert werden, was zur Spaltung der Diselenidbrücke führt, wobei zwei separate fluoreszierende Moleküle entstehen: eines, das eine Selenylsulfidgruppe (FSeSG) enthält, sowie ein Selenol (FSeH). Die Antwortreaktion von FSeSeF auf Glutathion verlief viermal schneller als die der zuvor beschriebenen Sonden. Die Autoren zeigten, dass die Produkte der reduzierten Sonde (FSeSG und FSeH) durch H_2O_2 reversibel oxidiert werden können, sowohl in vitro als auch in vivo, jedoch ist die Reversibilität in zellulären Systemen stark durch die zufällige Verteilung dieser Moleküle eingeschränkt, da es unwahrscheinlich ist, dass sie sich im Fall einer Oxidation ausreichend nahe beieinander befinden.

5.2. Chalkogenoxide

Eine andere Strategie zur Entwicklung von fluoreszierenden Redoxsonden besteht in der Verwendung von Chalkogenen (S, Se und Te), die leicht und reversibel zu den entsprechenden Chalkogenoxiden (Sulfoxiden, Selenoxiden und Telluroxiden; Abbildung 6a) oxidiert werden können.

5.2.1. Selenide

Die Strategie der Chalkogen-Chalkogenoxid-Oxidation wurde von der Gruppe um Han entwickelt, nachdem die katalytischen Zentren von GPx entschlüsselt worden waren. Selen reagiert an den katalytischen Zentren mit ROS unter Bildung von Selenoxiden.^[65] Die erste derartige Sonde, der Nah-IR-Emitter Cy-PSe, basierte auf einem photoinduzierten Elektronentransfer (PET) zwischen einem Cyaninsignalgeber und einem Phenylselenmodulator.^[37] Bei der Oxidation zu Se=O wird die PET-Löschung abgeschwächt und so die Fluoreszenz angeschaltet. Es wurde berichtet, dass Cy-PSe von Peroxynitrit selektiv oxidiert und von Glutathion und Cystein reduziert wird. Die Sonde wurde dafür verwendet, um Peroxynitrit in aktivierten Mausemakrophagen zu messen, und erwies sich als reversibel in biologischen Systemen. Die Gruppe entwickelte anschließend MPhSe-BOD, das den BODIPY-Fluorophor enthält und selektiv für die Oxidation durch OCI^- ist.^[38]

Auf der Grundlage dieser Strategie wurde eine Reihe von zusätzlichen Sonden entwickelt. HCSe enthält ein BODIPY-Gerüst, an das ein Diphenylselenid gebunden ist, und geht mit OCI^- eine reversible Oxidation zum grün fluoreszierenden HCSeO ein. Es sind jedoch keine Angaben hinsichtlich der Selektivität für Reduktionsmittel verfügbar.^[39] NI-Se enthält einen 1,8-Naphthalimidfluorophor und ist gegenüber dem $\text{OCI}^-/\text{H}_2\text{S}$ -Redoxpaar reaktiv.^[40] Diese Sonde reagiert über einen verdrehten intramolekularen Ladungstransfer (TICT), bei dem das bei der Oxidation gebildete Selenoxid die interne

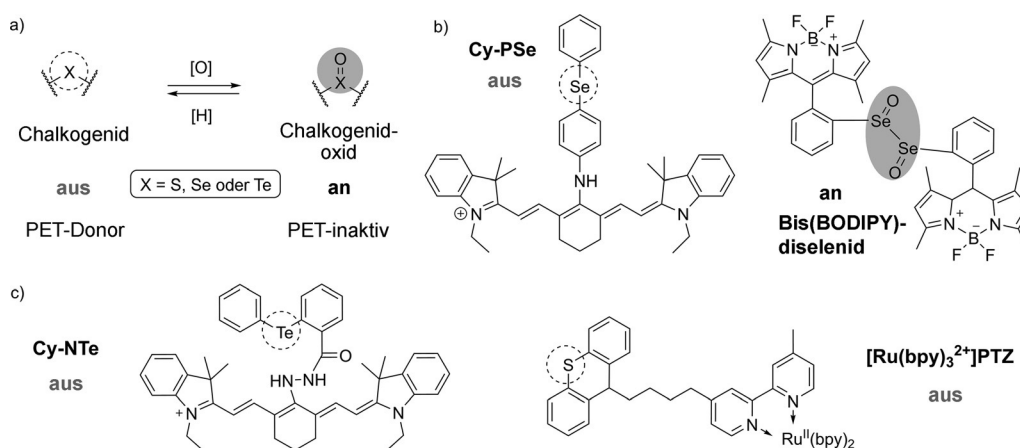


Abbildung 6. a) Reaktivität des reversiblen Chalkogenid/Chalkogenoxid-Redoxpaars. Ausgewählte Beispiele von dieser Art Sonde auf der Basis von Se^[37,42] (b) und entweder Te^[44] oder S^[45] (c).

Rotation des Moleküls einschränkt, was zu einer erhöhten Fluoreszenzemission führt.

Han et al. verwendeten die Selenredoxchemie auch zur Entwicklung von diMPhSe-BOD, einer Sonde für hypobromige Säure (HOBr).^[41] Im Unterschied zu den vorherigen, intensitätsbasierten Selenoxidsonden war dies die erste ratiometrische Sonde dieser Art mit einer Blauverschiebung bei der Oxidation, als Resultat der elektronenziehenden Wirkung von Selenoxiden. Im Unterschied zu anderen Sonden auf Selenbasis, die durch Thiole nichtselektiv reduziert werden, wird diMPhSe-BOD durch H₂S selektiv reduziert. Die biologische Anwendbarkeit von diMPhSe-BOD wurde in RAW 264.7-Zellen nachgewiesen.

Ein weiterer Beitrag zu Sonden auf Selenbasis wurde von der Gruppe um Churchill mit der Entwicklung von Bis(BODIPY)diselenid (Abbildung 6b) geleistet, bei dem zwei BODIPY-Gerüste über eine Diselenidbrücke verbunden sind.^[42] Es wurde berichtet, dass die Selenide in der Sonde in Gegenwart von Superoxid (O₂^{•-}), im Unterschied zu anderen ROS, eine selektive Oxidation eingehen, was zur Monooxidation beider Selenzentren und einer Fluoreszenzantwort führt; diese kann durch Biothiole umgekehrt werden.

Eine weitere Sonde, die auf der Selenstrategie beruht, wurde von der Gruppe um Tang veröffentlicht, die FO-PSe entwickelt haben. Die Selenatome von FO-PSe können durch HOCl selektiv zu Se=O oxidiert werden, wobei das grün fluoreszierende FO-PSeO gebildet wird. Das oxidierte FO-PSeO kann durch GSH zu FO-PSe reduziert werden, und für den O₂^{•-}/GSH-Redoxzyklus ließen sich drei oder mehr Zyklen verfolgen. FO-PSe wurde in umfassenden biologischen Untersuchungen erprobt, um HOCl-Niveaus in PMA-stimulierten Makrophagen, in zymosanbelasteten Zebrafischen sowie im Abdomen von Mäusen zu untersuchen.^[46]

5.2.2. Telluride

Die Verwendung von Tellur in fluoreszierenden Redoxsonden wurde durch Befunde angeregt, die darauf hindeuteten, dass Diaryltelluride in Gegenwart eines Sensibilisators mit Singulett-Sauerstoff eine selektive und schnelle Oxidati-

on eingehen.^[68] Die erste veröffentlichte Tellur-haltige Redoxsonde war 2MeTeR, in dem das Xanthen-O10 von Rhodamin durch Tellur ersetzt wurde, woraus infolge des Schweratomeffekts ein nichtfluoreszierendes Molekül resultiert.^[43] Es hat sich gezeigt, dass das Organotellurzentrum durch das Hydroxylradikal (•OH), Peroxynitrit (ONOO⁻) und Hypochlorit (OCl⁻) oxidiert wird, wobei das entsprechende Telluroxid entsteht, das im Nah-IR-Bereich emittiert. Diese Oxidation ist bei Umsetzung mit GSH reversibel. Es wurden interessante biologische Untersuchungen unter Verwendung von 2MeTeR in HL-60-Zellen, die unterschiedliche Niveaus des antioxidativen Enzyms Myeloperoxidase aufwiesen, durchgeführt.

Zwei Jahre später wurden neue Sonden auf der Basis von anelliertem BODIPY, das entweder an Selenid oder an Tellurid gebunden war, veröffentlicht.^[69] Beide Analoga konnten mittels Hypochlorit zu den jeweiligen Oxiden oxidiert werden, was in einem blockierten PET-Prozess und verbesserten Fluoreszenzeigenschaften mündete. Bei diesen Sonden wurde festgestellt, dass die Oxidation des Organotellurids durch Hypochlorit außerordentlich empfindlich und schnell ist und von verschiedenen biologischen Thiolen umgekehrt werden kann.

Eine neuere Tellur-basierte Redoxsonde, Cy-NTe (Abbildung 6c), enthält ein Diaryltellur, das in ein Cyaningerüst integriert ist.^[44] Interessanterweise verläuft die Oxidation bei der Umsetzung mit Peroxynitrit (ONOO⁻) selektiv, wobei ein Produkt entsteht, das im Nah-IR-Bereich fluoresziert und durch zelluläre Thiole wieder reduziert werden kann. Die Autoren haben die redoxresponsiven Eigenschaften und die Reversibilität von Cy-NTe in Mäusemodellen klar nachgewiesen.

5.2.3. Sulfide

Während in den letzten Jahren eine große Zahl an Chalkogen-Chalkogenoxid-Sonden auf Selen- und Tellurbasis entwickelt worden ist, wurde die biologisch relevantere Schwefel-Sulfoxid-Oxidation bei fluoreszierenden Redoxsonden nicht richtig ausgeschöpft. Bislang ist das einzige

Beispiel die reversible lumineszierende Redoxsonde $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ PTZ, die Phenothiazin (PTZ) enthält, einen Schwefel-haltigen Baustein mit reversiblen Redoxeigenschaften, der an einen luminogenen Rutheniumtris(bipyridyl)-Komplex gebunden ist (Abbildung 6c).^[45] Der Schwefel im Phenothiazingerüst wird selektiv durch Hypochlorit (OCl^-) oxidiert, wodurch die Lumineszenz signifikant zunimmt; diese Oxidation kann in Gegenwart von H_2S umgekehrt werden. Die reversiblen Redoxreaktionszyklen konnten mindestens 12-mal wiederholt werden, und $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ PTZ wurde verwendet, um Redoxzyklen in lebenden Mäusen abzubilden.

Es ist anzunehmen, dass die merklichen Selektivitätsunterschiede bei der Oxidation und/oder Reduktion der Selen-, Tellur- und Schwefelsonden von unterschiedlichen Strukturbesonderheiten herrühren.^[70] Die Bestimmung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung wäre für die zukünftige Gestaltung von Sonden mit der erwünschten Selektivität sehr wertvoll. Dennoch bieten diese Sonden eine interessante Demonstration dafür, wie Redoxsonden hinsichtlich verschiedener biologischer Redoxpaare abgestimmt werden können.

6. Nicotinamide und Flavine

In biologischen Systemen finden komplexe Mechanismen zur Redoxregulierung statt, wobei bei der Mehrzahl der Regulierungssysteme Derivate von Mitgliedern der Vitamin-B-Gruppe zum Einsatz kommen, d.h. Nicotinamide und Flavine. Diese Vitamine, und besonders deren Nucleotidderivate Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) bzw. Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)/Flavinmononukleotid (FMN), fungieren als redoxaktive Cofaktoren und Coenzyme in zellulären Redoxreaktionen. Solche Gruppen sind naturgemäß biokompatibel, und ihre Reduktionspotentiale sind auf zelluläre Redoxreaktionen eingestellt, weshalb sie geeignete Kandidaten für die Verfolgung von Redoxprozessen sind (Abbildung 7a,b). Bei der ersten veröffentlichten Verwendung solcher Vitamine in Redoxsonden handelte es sich um einen PET-basierten molekularen Redoxschalter aus einem an Nicotinamid gebundenen Perylengerüst, Perylen-NAD (Abbildung 7c), der bei der Oxidation eine zehnfache Emissionszunahme zeigt.^[71] Dieser molekulare Schalter kann mit *p*-Chloranil oxidiert und für bis zu drei Zyklen durch NaBH_3CN reversibel reduziert werden, jedoch ist dieser Prozess für diese Oxidations- und Reduktionsmittel nicht selektiv. Umfassende (spektro)elektrochemische Untersuchungen geben einen Einblick in das Reduktionspotential dieser Sonde sowie die plausiblen Elektronentransfermechanismen und unterstreichen den Wert dieser Untersuchungen für alle Redoxsonden. Leider gibt es keine weiteren Veröffentlichungen zu fluoreszierenden Redoxsonden auf Nicotinamidbasis, da Forscher das Potential der reversiblen Redoxeigenschaften von Nicotinamid zu unterschätzen scheinen.

Eine der ersten Veröffentlichungen zu den reversiblen Redoxeigenschaften von Flavinen stammt von Aoki und Yamada, die Zn^{2+} -Tetraazacyclododecan-Komplexe mit Lumiflavin und Tryptophan entwickelten.^[72] Obwohl diese Komplexe für die Verwendung als DNA-Photolyase-Mime-

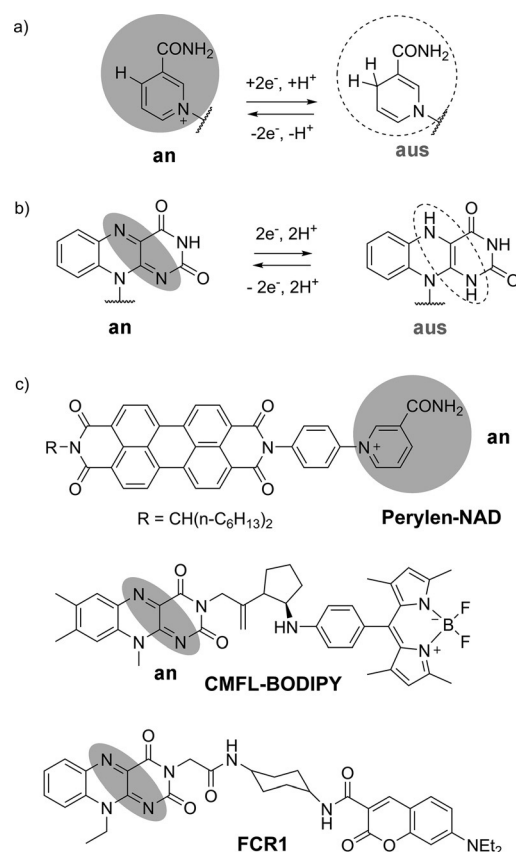


Abbildung 7. Reversible Redoxumwandlungen von a) Nicotinamid und b) der Flavineinheit. c) Ausgewählte Beispiele von Sonden, die auf der Basis dieser redoxresponsiven Gruppen entwickelt wurden.^[47,50,71]

tika entwickelt worden waren, werden in der Untersuchung die Photochemie und die Redoxeigenschaften des Flavingerüsts hervorgehoben. Später berichtete dieselbe Gruppe über CMFL-BODIPY, das Carboxymethylflavin (Abbildung 7c) enthält. Diese Sonde konnte durch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert werden, was mit einer neunfachen Verringerung der Fluoreszenzemission einherging.^[47] Das Reduktionspotential dieser Sonde beträgt -240 mV, was dem der zellulären Flavine ähnlich ist. Auch wenn nichts über die Reversibilität und Selektivität der Sonde berichtet wurde, haben Untersuchungen in HeLa-Zellen doch das Potential dieser Sondenstrategie aufgezeigt.

Nachfolgende Untersuchungen mit Redoxsonden auf Flavinbasis führten zu NpFR1; dieses Naphthalimid-Flavin-Konjugat zeigt eine leicht rotverschobene Fluoreszenz gegenüber derjenigen von intrazellulären Flavinen, womit die mit der zellulären Autofluoreszenz verbundenen Probleme ausgeräumt sind,^[48] sowie gegenüber derjenigen des auf Mitochondrien gerichteten Analogons NpFR2.^[49] Beide Sonden erfahren bei der Reduktion eine mehr als 100-fache Verringerung der Fluoreszenz und verhalten sich gegenüber einer Reihe von Oxidationsmitteln hervorragend reversibel. NpFR1 wurde dafür verwendet, den Einfluss von Glucose auf den oxidativen Stress in 3T3-L1-Adipozyten zu untersuchen, während NpFR2 in durchflusszytometrischen Studien Anwendung fand, um zwischen Zellpopulationen mit verschie-

denen mitochondrialen oxidativen Kapazitäten innerhalb des Knochenmarks, des Thymus und der Milz von Mäusen zu unterscheiden. Unsere Gruppe hat auch FCR1, eine ratiometrische Redoxsonde der zweiten Generation (Abbildung 7c), veröffentlicht, die aus Cumarin/Flavin, einem Donor-Akzeptor-FRET-Paar besteht.^[50] In der oxidierten Form führt ein Förster-Resonanzenergietransfer(FRET)-Prozess zu einer grünen Emission des Flavinakzeptors, während bei der Reduktion der Energietransfer gehemmt ist, was in einer blauen Donoremission resultiert. FCR1 wurde nicht nur bei der Fluoreszenzmikroskopie und der Durchflusszytometrie eingesetzt, sondern lieferte auch Informationen über die zelluläre oxidative Kapazität mittels Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie (FLIM).

7. Andere Ansätze

Eine der am häufigsten verwendeten Sonden für zelluläre Redoxzustände ist Dihydroethidin (DHE), ein blau fluoreszierendes Produkt, das durch Zwei-Elektronen-Reduktion des rot fluoreszierenden DNA-Farbstoffs Ethidiumbromid gebildet wird.^[73] DHE und seine Analoga Mito-HE und MitoSOX wurden für die Detektion von Superoxid verwendet, das in einer Reihe von biologischen Systemen gebildet wird, angefangen von der Abbildung einzelner Zellen bis hin zu der ganzer Tiere. Seine spezifische Wirksamkeit gegenüber Superoxid, die Reversibilität, Stabilität und die Disproportionierungsprodukte sind Gegenstand umfangreicher Diskussionen.^[74]

Bei einem anderen originellen Ansatz wird ein redoxaktiver Kupfer-Thiacyclam-Komplex genutzt, der kovalent an einen Anthracenbaustein (Cu-Anthracen) gebunden ist,^[75] wodurch das elektrochemisch reversible Umschalten zwischen dem fluoreszierenden Cu^I und der fluoreszenzlöschenden Cu^{II}-Form in MeCN möglich ist. Jedoch verhindern die nicht bewiesene Stabilität der beiden Formen der Sonde in biologischen Medien und ein Reduktionspotential (> 1 V), das deutlich außerhalb des biologisch relevanten Bereichs liegt, die Anwendbarkeit der Metall-Redoxpaar-Strategie auf biologische Systeme.

Des Weiteren wurde ein Redoxschalter auf PET-Basis mit einer an Anthracen gebundenen Tetrathiafulvalen(TTF)-Einheit veröffentlicht, bei dem die elektronenschiebenden und -ziehenden Eigenschaften des TTF-Gerüsts genutzt werden.^[76] Die Oxidation des Moleküls durch Fe(ClO₄)₃ führt zu einer gesteigerten blauen Fluoreszenz. Auch wenn elektrochemische Untersuchungen auf eine reversible Oxidation in zwei Schritten schließen lassen, liegen die *E*_{1/2}-Werte von –660 und –890 mV jedoch außerhalb des biologisch relevanten Bereichs. Ähnliche potentielle Sonden unter Verwendung eines an Pyren^[77] und Perylendiimid^[78] gebundenen Ferrocen-Redoxschalters haben ebenso beschränkte Anwendungsmöglichkeiten. Wenn es jedoch gelingt, die Redoxeigenschaften dieser hochreversiblen Schalter abzustimmen, könnten sie sich zu vielversprechenden biologischen Sonden entwickeln.

RHyCy5 ist eine reversible Sonde im Nah-IR-Bereich für die Visualisierung von Hypoxie. Bei dieser Sonde werden das

Cyanin Cy5 als ein FRET-Donor und das Rhodaminderivat QSY-21 als ein FRET-Akzeptor (Abbildung 8) verwendet.^[51] RHyCy5 macht das starke Absorptionsvermögen von QSY-21 in den Fern-IR- und Nah-IR-Bereichen nutzbar; dieses

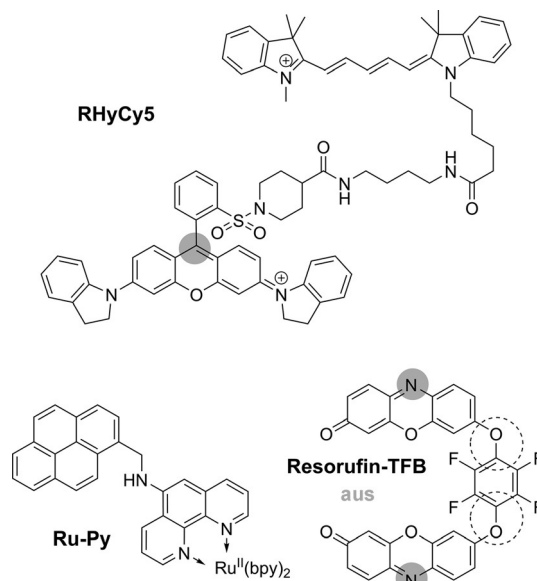


Abbildung 8. Strukturen von anderen Sonden, die auf verschiedenen Strategien basieren.^[51, 53–54]

verringert sich bei der enzymatischen Ein-Elektronen-Reduktion unter hypoxischen Bedingungen. Die Autoren bestätigten die Bildung eines stabilen Radikals bei der enzymatischen Reduktion und die Reversibilität des Prozesses bei Normoxie/Hypoxie-Zyklen in menschlichen A549-Brustkrebszellen. Bei anderen zur Bildgebung von Hypoxie genutzten Sonden auf der Basis von Metallchelaten von hydrophoben Liganden, z.B. Porphyrinen (Ox-PS-NP)^[52] und Phenanthrolinen (Ru-Py; Abbildung 8),^[53] wird die sauerstoffvermittelte Löschung von Lumineszenzeigenschaften der Komplexe nutzbar gemacht. Aufsehenerregende Ergebnisse für einzelne Zellen und Mäuse zeigen die Möglichkeit auf, solche Komplexe für die Abbildung des Sauerstoffgehalts in Zellen zu verwenden.

In einer jüngeren Untersuchung wurde eine difunktionale Sonde beschrieben, die für die sequentielle Thioldektion und die Redoxhomöostase auf der Grundlage von zwei *para*-substituierten Resorufineinheiten an Tetrafluorbenzol (Resorufin-TFB; Abbildung 8) geeignet ist.^[54] Die Thiol-vermittelte Spaltung der Tetrafluorphenylgruppe führt zur Freisetzung von fluoreszierenden Resorufineinheiten, die anschließend reversibel zum nichtfluoreszierenden Dihydroresorufin reduziert werden können. Dieser Bericht ist ein einzigartiges Beispiel dafür, dass eine einzige Sonde dafür verwendet werden kann, sowohl intrazelluläre Thiole als auch Redoxhomöostase zu visualisieren. Die Anwendbarkeit in Makrophagen wurde nachgewiesen, allerdings variiert das Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von verschiedenen Thiolen.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Wir haben in diesem Kurzaufsatz die Perspektiven des aufstrebenden Forschungsgebiets der reversiblen fluoreszierenden Redoxsonden aufgezeigt. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von vielversprechenden Strategien erarbeitet, und es wurden anspruchsvolle Sonden entwickelt, mit denen biologische Redoxzustände selbst in Tieruntersuchungen erfasst werden können. Jede einzelne hier aufgeführte allgemeine Strategie, unter Verwendung von Nitroxylradikalen, Chinonen und Thiochaltern bis hin zu Sonden auf Vitaminbasis, hat sich als wertvoller Ansatz für die Erfassung von biologischen Redoxzuständen erwiesen. Dabei ist es sinnvoll, mehrere Klassen von Sonden parallel zu verwenden, da jede Sonde eine andere Selektivität, Empfindlichkeit und Elektrochemie aufweist und somit in der Lage ist, verschiedene Fragen zu beantworten. Interessanterweise leiten sich die meisten der hier diskutierten Detektionsmechanismen von Vorbildern aus der Natur ab, wobei nicht nur die hochentwickelten Redoxdetektionsprozesse aus der Biologie nutzbar gemacht, sondern auch die biologische Kompatibilität und die Relevanz der so entwickelten Sonden gewährleistet werden.

Auf Grundlage dieser Übersicht lassen sich die vielversprechendsten Eigenschaften von derzeit verfügbaren Sonden identifizieren und Forschungsfelder mit zukünftigem Potential ermitteln. Die aktuelle Entwicklung von Nah-IR-Emittern ermöglicht die Anwendung von Sonden bei In-vivo-Untersuchungen. Die Natur der Fluoreszenzänderung bei der Oxidation/Reduktion ist entscheidend für die biologische Nutzbarkeit einer Sonde. Bei (intensitätsbasierten) Turn-on-Sonden ist es wichtig zu berücksichtigen, ob das Signal bei der Reduktion (wie bei Nitroxid-basierten Sonden) oder bei der Oxidation (wie bei den meisten anderen Sondenklassen) verstärkt wird. Im erstgenannten Fall sind die Sonden wahrscheinlich am besten für die Untersuchung von Hypoxie oder der Wirksamkeit von Antioxidantien geeignet, während im zweitgenannten Fall die Sonden Aufschluss über neue Möglichkeiten von ROS/RNS geben können. Noch vielversprechender sind jedoch ratiometrische Sonden, bei denen sowohl die oxidierte als auch die reduzierte Form visualisiert werden können. Zusätzlich zur Minimierung von durch Hintergrundeffekte, z. B. die Sondenkonzentration, ausgelösten Interferenzen bieten ratiometrische Sonden die Möglichkeit, das relative oder absolute Reduktionspotential zu quantifizieren, auch wenn an der Umsetzung noch gearbeitet werden muss.

Die bisherigen Sonden sind zwar bereits sehr vielversprechend, jedoch wurde bislang wenig an der Entwicklung von Sonden für spezifische Zelltypen oder subzelluläre Organellen gearbeitet. Da die Redoxumgebung in Zellen stark kompartimentiert ist, sind Sonden gefragt, die Aufschluss über ortsspezifische Veränderungen des Redoxzustandes geben können. Zudem wird die Fähigkeit, das Redoxpotential einer Sonde abzustimmen, die Entwicklung von einer Auswahl an Sonden ermöglichen, mit denen sich die Reduktionspotentiale innerhalb der Zelle genau ermitteln lassen (analog zur Verwendung von einer Reihe von pH-Indikatoren zur Bestimmung der Acidität). Auch wenn dieses Ziel bisher

noch nicht erreicht worden ist, sollte doch jede der hier beschriebenen redoxresponsiven Einheiten durch Strukturveränderungen in ihren Redoxeigenschaften steuerbar sein.

Wir haben hier auch Unstimmigkeiten zwischen Verfahren zur Sondenvalidierung aufgezeigt. Während die Fluoreszenzantwort routinemäßig erfasst wird, werden in vielen Untersuchungen nicht die Reversibilität der Reaktion, die biologische Empfindlichkeit und die biologische Kompatibilität bewertet. Diese Informationen sind jedoch essentiell: Eine reversible Sonde, die nicht in Zellen eindringt, dürfte für die Untersuchung des intrazellulären Redoxzustandes nicht hilfreich sein, ebenso wenig wie eine Sonde, deren Redoxpotential außerhalb des physiologisch relevanten Bereichs liegt. Es ist ein umfassender Ansatz zur Probestestung nötig – nicht nur, um aussagekräftige Vergleiche zwischen den Sonden zu ermöglichen, sondern auch, um Forscher in die Lage zu versetzen, die am besten für ihre Zwecke geeigneten Sonden zu identifizieren. Wesentliche zu erfassende Daten sind: Reversibilität über wiederholte Oxidations-/Reduktionszyklen, Reaktion auf eine Reihe von oxidierenden und reduzierenden Agentien (zur Überprüfung von Selektivität oder globaler Antwort), Stabilität des Signals in Gegenwart von möglichen Störgrößen (z. B. Metallionen, Proteinen oder pH-Wertänderungen), Einflüsse auf die Zellviabilität, Empfindlichkeit gegenüber biologisch relevanten Redoxveränderungen sowie die zeitabhängige Stabilität, Retention und Photostabilität der Sonde bei Zellstudien. Zudem wird eine breitere Anwendung von fluoreszierenden Redoxsonden möglich werden, sobald verifiziert ist, dass Sonden nicht nur mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie, sondern auch mit anderen Verfahren arbeiten können, wie der Durchflusszytometrie und Plattenleser-Assays.

Wenngleich noch viel Arbeit vor uns liegt, werden die bislang identifizierten, vielversprechenden Strategien höchstwahrscheinlich zu reversiblen Fluoreszenzsonden für Redoxzustände führen und können dafür verwendet werden, chronischen oxidativen Stress von physiologischen oxidativen Bursts nicht nur in kultivierten Zellen, sondern auch bei In-vivo-Untersuchungen zu unterscheiden. Es bleibt die Aufgabe, diese Sonden bestmöglich zu nutzen und sie nicht nur in dem Labor zu verwenden, wo sie entwickelt wurden, sondern sie vielmehr zu wertvollen Hilfsmitteln für die Redoxbiologie zu machen.

Danksagung

Die Autoren erklären ein konkurrierendes finanzielles Interesse durch die Kommerzialisierung von NpFR1 und FCR1. Wir danken der University of Sydney für die Unterstützung durch ein World-Scholars-Stipendium (A.K.), für das Postdoctoral Outgoing Fellowship SAE von der Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (J.L.K.), dem Australian Research Council für einen Discovery Early Career Researcher Award (E.J.N.) und der Ramaciotti Foundation für ein Establishment Grant.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 1602–1613
Angew. Chem. **2016**, 128, 1630–1643

- [1] a) B. D'Autr aux, M. B. Toledano, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8, 813–824; b) T. Finkel, *J. Cell Biol.* **2011**, 194, 7–15; c) C. Angeloni, T. Maraldi, D. Vauzour, *BioMed Res. Int.* **2014**, 1–2.
- [2] D. Jay, H. Hitomi, K. K. Griendling, *Free Radical Biol. Med.* **2006**, 40, 183–192.
- [3] K. Jomova, D. Vondrakova, M. Lawson, M. Valko, *Mol. Cell. Biochem.* **2010**, 345, 91–104.
- [4] N. R. Madamanchi, M. S. Runge, *Free Radical Biol. Med.* **2013**, 61, 473–501.
- [5] a) T. Finkel, M. Serrano, M. A. Blasco, *Nature* **2007**, 448, 767–774; b) D. Trachootham, J. Alexandre, P. Huang, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, 8, 579–591; c) M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, 39, 44–84.
- [6] a) A. Gomes, E. Fernandes, J. L. F. C. Lima, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2005**, 65, 45–80; b) P. Wardman, *Free Radical Biol. Med.* **2007**, 43, 995–1022; c) L. E. McQuade, S. J. Lippard, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14, 43–49; d) J. Chan, S. C. Dodani, C. J. Chang, *Nat. Chem.* **2012**, 4, 973–984; e) J. F. Woolley, J. Stanicka, T. G. Cotter, *Trends Biochem. Sci.* **2013**, 38, 556–565; f) H. Guo, H. Aleyasin, B. Dickinson, R. Haskew-Layton, R. Ratan, *Cell Biosci.* **2014**, 4, 64–73; g) C. C. Winterbourn, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2014**, 1840, 730–738; h) X. Chen, X. Tian, I. Shin, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 4783–4804; i) B. C. Dickinson, C. J. Chang, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 504–511; j) T. F. Brewer, F. J. Garcia, C. S. Onak, K. S. Carroll, C. J. Chang, *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, 84, 765–790.
- [7] a) A. J. Meyer, T. P. Dick, *Antioxid. Redox Signaling* **2010**, 13, 621–650; b) K. A. Lukyanov, V. V. Belousov, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, 1840, 745–756; c) D. Ezeri a, B. Morgan, T. P. Dick, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2014**, 73, 43–49.
- [8] V. V. Belousov, A. F. Fradkov, K. A. Lukyanov, D. B. Staroverov, K. S. Shakhbazov, A. V. Tersikh, S. Lukyanov, *Nat. Methods* **2006**, 3, 281–286.
- [9] a) T. J. Stone, T. Buckman, P. L. Nordio, H. M. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1965**, 54, 1010–1017; b) E. F. Ullman, J. H. Siecki, D. G. B. Boocock, R. Darcy, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 7049–7057.
- [10] F. Hyodo, R. Murugesan, K.-i. Matsumoto, E. Hyodo, S. Subramanian, J. B. Mitchell, M. C. Krishna, *J. Magn. Reson.* **2008**, 190, 105–112.
- [11] F. Hyodo, K.-i. Matsumoto, A. Matsumoto, J. B. Mitchell, M. C. Krishna, *Cancer Res.* **2006**, 66, 9921–9928.
- [12] S. A. Green, D. J. Simpson, G. Zhou, P. S. Ho, N. V. Blough, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 7337–7346.
- [13] N. V. Blough, D. J. Simpson, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 1915–1917.
- [14] E. Lozinsky, V. V. Martin, T. A. Berezina, A. I. Shames, A. L. Weis, G. I. Likhtenshtein, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1999**, 38, 29–42.
- [15] a) S. M. Dyar, E. A. Margulies, N. E. Horwitz, K. E. Brown, M. D. Krzyaniak, M. R. Wasielewski, *J. Phys. Chem. B* **2015**; b) E. M. Giacobbe, Q. Mi, M. T. Colvin, B. Cohen, C. Ramanan, A. M. Scott, S. Yeganeh, T. J. Marks, M. A. Ratner, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 3700–3712.
- [16] F. Hedayat, S. Stevanovic, B. Miljevic, S. Bottle, Z. D. Ristovski, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* **2015**, 21, 201–210.
- [17] C. Coenjarts, O. Garc a, L. Llauger, J. Palfreyman, A. L. Vienne, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 620–621.
- [18] J. P. Blinco, K. E. Fairfull-Smith, B. J. Morrow, S. E. Bottle, *Aust. J. Chem.* **2011**, 64, 373–389.
- [19] Y. Liu, S. Liu, Y. Wang, *Chem. Lett.* **2009**, 38, 588–589.
- [20] Y. Liu, M. Zhu, J. Xu, H. Zhang, M. Tian, *Analyst* **2011**, 136, 4316–4320.
- [21] H.-Y. Ahn, K. E. Fairfull-Smith, B. J. Morrow, V. Lussini, B. Kim, M. V. Bondar, S. E. Bottle, K. D. Belfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 4721–4730.
- [22] B. J. Morrow, D. J. Keddie, N. Gueven, M. F. Lavin, S. E. Bottle, *Free Radical Biol. Med.* **2010**, 49, 67–76.
- [23] S. Hirose, S. Arai, S. Takeoka, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 4845–4847.
- [24] F. B. Yu, P. Song, P. Li, B. S. Wang, K. L. Han, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 7735–7737.
- [25] B. Bogn r, J. Jek , T. K lai, K. Hideg, *Dyes Pigm.* **2010**, 87, 218–224.
- [26] K. Ishii, K. Kubo, T. Sakurada, K. Komori, Y. Sakai, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 4932–4934.
- [27] C. L. Rayner, G. A. Gole, S. E. Bottle, N. L. Barnett, *Exp. Eye Res.* **2014**, 129, 48–56.
- [28] M. A. Sowers, J. R. McCombs, Y. Wang, J. T. Paletta, S. W. Morton, E. C. Dreaden, M. D. Boska, M. F. Ottaviani, P. T. Hammond, A. Rajca, J. A. Johnson, *Nat. Commun.* **2014**, 5, 5460.
- [29] E. W. Miller, S. X. Bian, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 3458–3459.
- [30] R. M. Kierat, B. M. B. Thaler, R. Kr mer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 1457–1459.
- [31] F. Yu, P. Li, P. Song, B. Wang, J. Zhao, K. Han, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 4980–4982.
- [32] W. Zhang, P. Li, F. Yang, X. Hu, C. Sun, W. Zhang, D. Chen, B. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 14956–14959.
- [33] W. Zhang, X. Wang, P. Li, F. Huang, H. Wang, W. Zhang, B. Tang, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 9710–9713.
- [34] B. Tang, Y. Xing, P. Li, N. Zhang, F. Yu, G. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11666–11667.
- [35] K. H. Xu, M. M. Qiang, W. Gao, R. X. Su, N. Li, Y. Gao, Y. X. Xie, F. P. Kong, B. Tang, *Chem. Sci.* **2013**, 4, 1079–1086.
- [36] Z. Lou, P. Li, X. Sun, S. Yang, B. Wang, K. Han, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 391–393.
- [37] F. Yu, P. Li, G. Li, G. Zhao, T. Chu, K. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 11030–11033.
- [38] B. Wang, P. Li, F. Yu, P. Song, X. Sun, S. Yang, Z. Lou, K. Han, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 1014–1016.
- [39] S.-R. Liu, S.-P. Wu, *Org. Lett.* **2013**, 15, 878–881.
- [40] Z. Lou, P. Li, Q. Pan, K. Han, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 2445–2447.
- [41] B. Wang, P. Li, F. Yu, J. Chen, Z. Qu, K. Han, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 5790–5792.
- [42] S. T. Manjare, S. Kim, W. D. Heo, D. G. Churchill, *Org. Lett.* **2014**, 16, 410–412.
- [43] Y. Koide, M. Kawaguchi, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Komatsu, M. Abo, T. Teraia, T. Nagano, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3091–3093.
- [44] F. Yu, P. Li, B. Wang, K. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 7674–7680.
- [45] F. Liu, Y. Gao, J. Wang, S. Sun, *Analyst* **2014**, 139, 3324–3329.
- [46] W. Zhang, W. Liu, P. Li, J. Kang, J. Wang, H. Wang, B. Tang, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 10150–10153.
- [47] Y. Yamada, Y. Tomiyama, A. Morita, M. Ikeita, S. Aoki, *ChemBioChem* **2008**, 9, 853–856.
- [48] J. Yeow, A. Kaur, M. D. Anscomb, E. J. New, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 8181–8184.
- [49] A. Kaur, K. W. L. Brigden, T. F. Cashman, S. T. Fraser, E. J. New, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 6686–6689.
- [50] A. Kaur, M. A. Haghighatbin, C. F. Hogan, E. J. New, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 10510–10513.
- [51] S. Takahashi, W. Piao, Y. Matsumura, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, T. Kamachi, M. Kohno, T. Nagano, K. Hanaoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 19588–19591.
- [52] J. Napp, T. Behnke, L. Fischer, C. W rth, M. Wottawa, D. M. Katschinski, F. Alves, U. Resch-Genger, M. Sch ferling, *Anal. Chem.* **2011**, 83, 9039–9046.

- [53] H. Komatsu, K. Yoshihara, H. Yamada, Y. Kimura, A. Son, S.-i. Nishimoto, K. Tanabe, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 1971–1977.
- [54] T. Ma, H. Ding, H. Xu, Y. Lv, H. Liu, H. Wang, Z. Tian, *Analyst* **2015**, *140*, 322–329.
- [55] L. F. Fieser, *J. Am. Chem. Soc.* **1928**, *50*, 439–465.
- [56] A. S. Keston, R. Brandt, *Anal. Biochem.* **1965**, *11*, 1–5.
- [57] M. Wrona, K. Patel, P. Wardman, *Free Radical Biol. Med.* **2005**, *38*, 262–270.
- [58] a) D. Gust, T. Moore, in *Photoinduced Electron Transfer III*, Bd. 159 (Hrsg.: J. Mattay), Springer, Berlin, Heidelberg, **1991**, S. 103–151; b) M. R. Wasielewski, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 435–461.
- [59] V. Goulle, A. Harriman, J.-M. Lehn, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1034–1036.
- [60] A. C. Benniston, G. M. Chapman, A. Harriman, S. A. Rostron, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 4029–4036.
- [61] Y.-X. Yuan, Y. Chen, Y.-C. Wang, C.-Y. Su, S.-M. Liang, H. Chao, L.-N. Ji, *Inorg. Chem. Commun.* **2008**, *11*, 1048–1050.
- [62] A. C. Benniston, G. Copley, K. J. Elliott, R. W. Harrington, W. Clegg, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 2705–2713.
- [63] A. Muranaka, S. Ohira, D. Hashizume, H. Koshino, F. Kyotani, M. Hirayama, M. Uchiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 190–193.
- [64] B. Palmieri, V. Sblendorio in *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*, Bd. 594 (Hrsg.: D. Armstrong), Humana, Totowa, **2010**, S. 3–17.
- [65] J. T. Rotruck, A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D. G. Hafeman, W. G. Hoekstra, *Nutr. Rev.* **1980**, *38*, 280–283.
- [66] K. Lee, V. Dzubeck, L. Latshaw, J. P. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13616–13617.
- [67] T. Schewe, *Gen. Pharmacol.* **1995**, *26*, 1153–1169.
- [68] M. Oba, Y. Okada, M. Endo, K. Tanaka, K. Nishiyama, S. Shimada, W. Ando, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 10680–10686.
- [69] S. T. Manjare, J. Kim, Y. Lee, D. G. Churchill, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 520–523.
- [70] Z. Lou, P. Li, K. Han, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1358–1368.
- [71] P. Yan, M. W. Holman, P. Robustelli, A. Chowdhury, F. I. Ishak, D. M. Adams, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *109*, 130–137.
- [72] Y. Yamada, S. Aoki, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 1007–1023.
- [73] a) I. J. Fidler, R. Heicappell, I. Saiki, M. G. Grutter, M. A. Horisberger, J. Nuesch, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 2020–2027; b) P. L. Olive, *Br. J. Cancer* **1989**, *60*, 332–338.
- [74] J. Zielonka, B. Kalyanaraman, *Free Radical Biol. Med.* **2010**, *48*, 983–1001.
- [75] G. De Santis, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, C. Mangano, D. Sacchi, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 3581–3582.
- [76] G. Zhang, D. Zhang, X. Guo, D. Zhu, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1209–1212.
- [77] R. Martínez, I. Ratera, A. Tárraga, P. Molina, J. Veciana, *Chem. Commun.* **2006**, 3809–3811.
- [78] R. Zhang, Z. Wang, Y. Wu, H. Fu, J. Yao, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3065–3068.

Eingegangen am 9. Juli 2015

Online veröffentlicht am 2. Dezember 2015

Übersetzt von Katrin Harder, Hoppegarten