

Bildgebung von bioorthogonalen Gruppen in ihrem ultrastrukturellen Kontext mittels Elektronenmikroskopie

Daphne M. van Elsland und Sander I. van Kasteren*

Bildgebung · Elektronenmikroskopie · Fluoreszenz ·
Photochemie · Singulett-Sauerstoff

Methoden der bioorthogonalen Chemie haben sich als leistungsfähige Techniken für die Bildgebung von Biomolekülen etabliert, und zwar insbesondere für solche Moleküle, die nicht unter direkter genetischer Kontrolle stehen, wie Glykane, Lipide, Bestandteile bakterieller Zellwände und, so könnte man argumentieren, die DNA selbst.^[1]

Der Trend zu superhochauflösenden Mikroskopietechniken hat kürzlich auch die bioorthogonale Chemie erfasst. Zum Beispiel wurde die Bildgebung von bioorthogonalen Analoga mitochondrieller Lipide mittels STED-Mikroskopie^[2] sowie die Bildgebung von Zelloberflächenglykanen mittels dSTORM beschrieben.^[3] Ein Nachteil superhoher Auflösungen ist jedoch, dass in einem Einzelexperiment nur eine begrenzte Zahl an Fluorophoren parallel abgebildet werden kann. Unter diesem Aspekt bleibt der zelluläre Kontext, in dem sich die bioorthogonalen Gruppen aufhalten, unsichtbar.^[4]

Elektronenmikroskopie (EM) ist die bevorzugte Technik, um morphologische Informationen über (sub)zelluläre Strukturen in Nanometerauflösung zu erhalten.^[5] Allerdings sind die durch EM zugänglichen Informationen schwierig zu gewinnen und zu interpretieren, da die Probenpräparation nicht trivial ist und die untersuchten Biomoleküle und Strukturen schwer zu definieren sind. Klassischerweise nutzte man Antikörper, um die Natur von Biomolekülen, die mit elektronenreichen Markierungen wie z.B. Goldpartikeln konjugiert wurden, aufzuklären.^[6] Allerdings erfordert diese Strategie das Fixieren der Zellen mit Formaldehyd und ihre Permeabilisierung, um den Eintritt von Antikörpern in die Zelle oder das Gewebe zu ermöglichen. Diese Fixierung und Verwendung von Detergentien bedingt jedoch eine erhebliche Störung der zellulären Ultrastruktur. Das alternative Markieren mit Antikörpern nach der Probenpräparation ist ein aufwändiger Prozess mit oftmals geringer Erfolgsrate, da es an funktionellen Antikörpern fehlt.^[7]

Die EM-kompatible Visualisierung von nicht-templatierenden Molekülen ist sogar noch schwieriger. Beschrieben wurde das Anfärben von Kohlenhydraten mit Lectinen, diese Methode leidet aber unter der begrenzten Spezifität und Verfügbarkeit von Lectinen.^[8] Die Entwicklung EM-kompatibler bioorthogonaler Bildgebungstechniken wäre daher von großem Wert, um ultrastrukturelle Informationen über den zellulären Kontext dieser nicht-templatierten Moleküle zu gewinnen.^[9] Auf eine solche Methode musste jedoch lange gewartet werden, da viele Probenpräparationstechniken für die Elektronenmikroskopie auf der thermischen/radikalischen Polymerisation von Harzen innerhalb der Proben basieren und eine solche Operation mit bioorthogonalen chemischen Funktionalitäten nicht kompatibel ist.

Vor kurzem fanden nun Ngo et al.^[10] eine elegante Lösung für das Problem der Instabilität bioorthogonaler Gruppen während der Harz-basierten Probenpräparation. Der entscheidende Kniff dieser Methode ist, die bioorthogonale Modifizierung und Visualisierung vor der Probenpräparation durchzuführen. Um dies zu erreichen, verwendeten Ngo et al. eine Photoumwandlungsstrategie: Sie ligierten Fluorophore an ihre bioorthogonalen Gruppen, die befähigt sind, Triplettsauerstoff in Singulett-Sauerstoff umzuwandeln, der wiederum genutzt werden kann, um Diaminobenzidin (DAB) in der Umgebung des Fluorophors zu einem unlöslichen Präzipitat zu polymerisieren. Das resultierende Polymer hat eine sehr hohe Affinität für Osmiumtetroxid, was dazu führt, dass die Position der ursprünglichen bioorthogonalen Gruppe in einem EM-Bild dunkel erscheint (Figure 1A).^[11] Die Methode wurde ursprünglich zur Visualisierung von Gen-Tags entwickelt – z. B. mini-SOG^[12] und das auf dem Tetracystein-Tag basierende FLASH/ReASH.^[11] Durch die Einführung des Fluorophors vor der Fixierung, Dehydratation und Harzpolymerisation wird die Inkompatibilität der bioorthogonalen Gruppen mit dem Arbeitsablauf überwunden. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Permeabilisierung der Zellen überflüssig wird, da die Hilfsreagentien, die für die Kontrasterzeugung benötigt werden, kleine Moleküle sind, die leicht durch fixierte Zellmembranen permeieren, was den Gesamtprozess enorm vereinfacht. Das bedeutet, dass die Ultrastruktur der Zellen erhalten bleibt. Die Auflösung ist ebenfalls sehr gut, da gezeigt wurde, dass die photooxidationsbasierte Polymerisation von DAB, welche die markierten Strukturen mit dem

[*] D. M. van Elsland, S. I. van Kasteren
Leiden Institute of Chemistry/Institute of Chemical Immunology,
Bioorganic Synthesis, Leiden University
Einsteinweg 55, 2333 CC Leiden (Niederlande)
E-Mail: s.i.van.kasteren@chem.leidenuniv.nl

 Die Identifikationsnummer(n) (ORCID) des Autors/der Autoren ist unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201604672> zu finden.

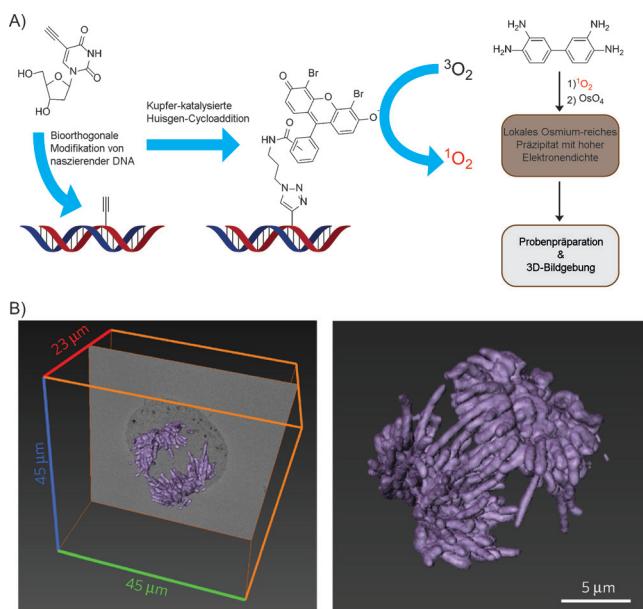


Abbildung 1. Detektion von bioorthogonalen Gruppen in Harz-eingebetteten EM-Proben: A) Zuerst wird ein bioorthogonales Uridin-Analogon in naszierende DNA metabolisch eingebaut. Diese Funktionalitäten („handle“) wird mit Dibromfluorescein modifiziert, das Triplet-Sauerstoff in Singulett-Sauerstoff effizient umwandeln kann. Der Singulett-Sauerstoff kann anschließend 3,3'-Diaminobenzidin in ein unlösliches Polymer überführen, das eine hohe Affinität für Osmium besitzt. Osmium besitzt eine hohe Elektronendichte und visualisiert dadurch die Gegenwart der ursprünglichen bioorthogonalen Gruppe. B) Ein Beispiel für die dreidimensionale Rekonstruktion einer bioorthogonal markierten DNA im Zellkern einer sich teilenden Zelle (aus Lit. [10]).

osmiophilen Produkt konturiert, innerhalb von 4 nm zur ursprünglichen Photokonversionsreaktion stattfindet.

Ngo et al. setzten diese Technik zur Bildgebung neu synthetisierter DNA ein, indem sie den Einbau eines bioorthogonalen DNA-Analogons, Ethynyldeoxyuridin (EdU), visualisierten.^[13] Sie kombinierten die Methode mit der seriellen Block-Face-Rasterelektronenmikroskopie (SBEM), einer Technik, bei der sequenziell 60 nm dünne Schnitte aus dem Probenblock für die EM-Bildgebung entnommen werden. Aus der so generierten Bilderserie lässt sich ein dreidimensionales Bild der Zelle rekonstruieren. Als ein anschauliches Beispiel wurde die Methode genutzt, um die Auf trennung der DNA in der Anaphase einer sich teilenden Zelle zu zeigen (Abbildung 1B).

In einer weiteren Anwendung wurden Cholin-haltige Lipide und bioorthogonal markierte Zellwände von *Listeria monocytogenes* markiert und visualisiert. In letzterem Experiment wurde die hohe Auflösung der Technik genutzt, um extrazelluläres Peptidoglykan von seinen intrazellulären Zwischenstufen zu unterscheiden (die nur 7 nm voneinander entfernt sind).

Mit ihrer Methode bekräftigen Ngo et al. die Leistungsfähigkeit der bioorthogonalen Chemie für die Bildgebung nicht-templatierter Moleküle. Diese neuen EM-Techniken ermöglichen die Abbildung dieser funktionellen Gruppen im

ultrastrukturellen Kontext. Die Methode ergänzt eine andere kürzlich beschriebene Technik, bei der bioorthogonale Funktionalitäten in EM-Schnitten nach Probenpräparation mittels korrelativer Rasterelektronenmikroskopie visualisiert werden, wobei ein Fluoreszenzbild eines 100 nm dicken Schnitts mit einem EM-Mikrographen des gleichen Schnitts überlagert wird. In diesem Fall wurde das Problem der chemischen Inkompatibilität dadurch gelöst, dass die einzige Präparationsmethode genutzt wurde, die kein Polymerharz für die Probenpräparation einsetzt – die Proben werden stattdessen tiefgefroren und bei ultratiefen Temperaturen geschnitten.^[14] Zusammengenommen haben diese beiden Veröffentlichungen die Elektronenmikroskopie ein ganzes Stück vorangebracht und mit der Fähigkeit ausgestattet, bioorthogonale Gruppen in ihrem zellulären Kontext abzubilden.

Danksagung

S.I.v.K. dankt dem ERC für ein Starting Grant (Grant Number 639005).

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, –
Angew. Chem. **2016**, *128*, –

- [1] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666–676.
- [2] R. S. Erdmann, H. Takakura, A. D. Thompson, F. Rivera-Molina, E. S. Allgeyer, J. Bewersdorf, D. Toomre, A. Schepartz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10242–10246; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 10407–10412.
- [3] S. Letschert, A. Göhler, C. Franke, N. Bertleff-Zieschang, E. Memmel, S. Doose, J. Seibel, M. Sauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10921–10924; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11101–11104.
- [4] B. O. Leung, K. C. Chou, *Appl. Spectrosc.* **2011**, *65*, 967–980.
- [5] K. R. Porter, A. Claude, E. F. Fullam, *J. Exp. Med.* **1945**, *81*, 233–246.
- [6] J. Roth, *Histochem. Cell Biol.* **1996**, *106*, 1–8.
- [7] G. Griffiths, J. M. Lucocq, *Histochem. Cell Biol.* **2014**, *142*, 347–360.
- [8] J. Roth, *J. Histochem. Cytochem.* **1983**, *31*, 987–999.
- [9] D. M. van Elsland, E. Bos, H. S. Overkleeft, A. J. Koster, S. I. van Kasteren, *J. Chem. Biol.* **2015**, *8*, 153–157.
- [10] J. T. Ngo, S. R. Adams, T. J. Deerinck, D. Boassa, F. Rodriguez-Rivera, S. F. Palida, C. R. Bertozzi, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 459–465.
- [11] G. Gaietta, T. J. Deerinck, S. R. Adams, J. Bouwer, O. Tour, D. W. Laird, G. E. Sosinsky, R. Y. Tsien, M. H. Ellisman, *Science* **2002**, *296*, 503–507.
- [12] X. Shu, V. Lev-Ram, T. J. Deerinck, Y. Qi, E. B. Ramko, M. W. Davidson, Y. Jin, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *PLOS Biol.* **2011**, *9*, e1001041.
- [13] F. Chehrehasa, A. C. B. Meedeniya, P. Dwyer, G. Abrahamsen, A. Mackay-Sim, *J. Neurosci. Methods* **2009**, *177*, 122–130.
- [14] D. M. van Elsland, E. Bos, W. de Boer, H. S. Overkleeft, A. J. Koster, S. I. van Kasteren, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 752–758.

Eingegangen am 13. Mai 2016
Online veröffentlicht am 27. Juni 2016