„Leuchtende Zukunft - Schaltbare Fluoreszenz in der Medizin und Mikrobiologie“

Magali Bel Adasme, Thorsten Cottre und Victoria Engemann

Wäre es nicht schön, mit Hilfe eines chemischen Lichtschalters bestimmte Stoffe oder krankhafte Zellen im Körper sichtbar zu machen? Ob nun zur Früherkennung von Krankheiten, zur Optimierung der Therapie oder zur Vereinfachung der Diagnose, Forscher arbeiten daran, solche Schalter auf unterschiedlichste Weise zu realisieren. Dazu werden Farbstoffe eingesetzt, deren Eigenschaften sensibel auf die Umgebung reagieren, etwa auf die Anwesenheit eines Tumormarkers. Solche Fluoreszenzfarbstoffe, sogenannte Fluorophore, werden durch elektromagnetische Strahlung einer bestimmten Wellenlänge angeregt und strahlen Licht größerer Wellenlänge ab. Das emittierte Licht kann dann entweder mit bloßem Auge sichtbar sein oder mit geeigneten Geräten sichtbar gemacht werden.

Farbstoffe, deren Fluoreszenz durch Umgebungsbedingungen oder chemische Reaktionen geschaltet werden kann, sogenannte Fluorogene, bestehen aus zwei Teilen: dem Sensor, der z.B. auf ein bestimmtes Strukturmerkmal oder Ionen im umgebenden Medium reagiert, und dem eigentlichen Fluorophor, dessen Eigenschaften vom Sensor beeinflusst werden. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Tatsache, dass nicht abreagierte Moleküle nicht entfernt werden müssen, da sie nicht oder deutlich schwächer fluoreszieren.

Der wohl gebräuchlichste Fluoreszenzfarbstoff und die Stammsubstanz vieler schaltbarer Fluorophore ist Fluorescein. Dieses besteht aus einer Benzoesäure- und einer Xanthen-Einheit, die den Fluorophor darstellt. Durch die Anregung mit elektromagnetischer Strahlung wird ein Elektron aus dem höchsten besetzten Molekülrbital (Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO) in das niedrigste unbesetzte Orbital (Lowest Unoccupied Molecular Orbital, LUMO) angehoben. Dieser Zustand ist äußerst kurzlebig: Das angeregte Elektron fällt in der Regel mit einer Halbwertszeit von wenigen Nanosekunden in seinen Grundzustand zurück. Abhängig von der Wahl der Substituenten in Xanthen- und Benzoesäureeinheit kann jedoch auch ein Konkurrenzprozess die Überhand gewinnen. Liegt das HOMO der Benzoesäure-Einheit energetisch höher als das HOMO der Xanthen-Einheit, kommt es zum Photoelektronentransfer (PET), d.h. ein Elektron aus dem HOMO der Benzoesäure fällt strahlungsfrei ins HOMO der Xantheneinheit und das angeregte Elektron in das höchste einfach besetzte der Benzoesäure-Einheit und es wird kein Fluoreszenzlicht emittiert. Nur wenn das HOMO der Benzoesäure-Einheit energetisch niedriger als das HOMO der Fluorophor-Einheit liegt, kommt es zur Fluoreszenz.

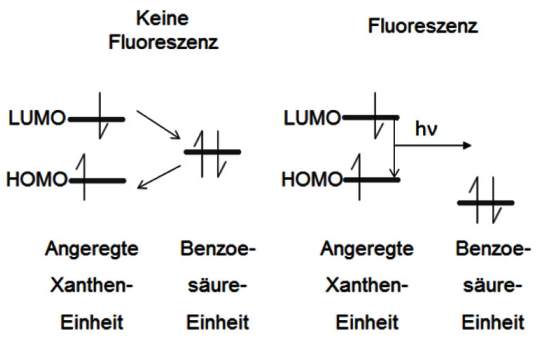

Abbildung 1: Schematische Darstellung des PET als Konkurrenzprozess der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Lage des HOMO in der substituierten Benzoesäureeinheit von Fluorescein.

Der PET tritt bei Fluorescein nicht auf. Die Fluoreszenz-Quantenausbeute Φ, die als Quotient aus emittierten und absorbierten Photonen berechnet wird und zwischen 0 und 1 liegt, ist mit einem Wert von 0,85 hoch.

$$\Phi = \frac{\text{emittierte Photonen}}{\text{absorbierte Photonen}}$$

Das bedeutet, dass der Großteil des absorbierten Lichts zur Fluoreszenz führt und Konkurrenzprozesse (PET oder Fluoreszenzlöschung durch Stöße mit Molekülen des Lösungsmittels) eine untergeordnete Rolle spielen.

Um die Lage des HOMO der dem Xanthengerüst benachbarten Einheit zu verändern, wurden anstelle der Benzoesäure unterschiedlich große aromatische Systeme an den Fluorophor gebunden, da die Lage des HOMOs von der Ausdehnung des aromatischen Systems abhängt. Man fand heraus, dass bei wenig ausgedehnten aromatischen Systemen mit niedrigem HOMO eine hohe Quantenausbeute zu beobachten war, während bei ausgedehnten Systemen mit höher gelegenem HOMO PET stattfand und damit die Quantenausbeute deutlich niedriger war. [Ueno. 2004] Die Addition von Singulett-Sauerstoff an eine Anthracenyl-Einheit senkt z.B. das HOMO von -8.51 eV auch -9.81 eV und damit unter das Niveau der Benozesäureeinheit (-8.64 eV), so dass eine Anthracen-substituierte Xantheneinheit als Sensor für Singulett-Sauerstoff fungieren kann. Hier wäre also die Anthracenyl-Einheit der Sensor.

Schaltbare fluoreszente Sonden können auch eingesetzt werden, um bestimmte Sequenzen in Peptidstrukturen zu erkennen. Die Fluorescein-Struktur ist dabei über einen Linker mit zwei Maleimid-Gruppen verbunden, die wiederum an die Sulfid-Gruppen von zwei Cysteinen in den Proteinen binden, die durch zwei Helix-Windungen voneinander getrennt sind. Bindet nur eine Maleimid-Gruppe an das Protein, fluoresziert der angebundene Fluorophor nicht aufgrund eines PET durch das freie Maleimid. Für die Fluoreszenz ist also eine Addition von Cysteinseitenketten an beide Maleimid-Gruppen erforderlich. Aufgrund der Lage der zu untersuchenden Helix kann ein Fluoreszenzfarbstoff immer nur an ein Protein binden, es kommt nicht zu Quervernetzungen zwischen Proteinen.

Erstmalig untersucht wurde diese Methode *in vitro* am Protoonkogen Fos. Protoonkogene sind Vorstufen zu den Onkogenen, die Tumorbildung fördern. Durch Mutation können sie in Onkogene umgewandelt werden. Der Nachweis der beiden charakteristischen Cysteinreste in der α-Helix dient also als Erkennung für eine bestimmte Mutation. Wegen der Größe der Fluoresceinstruktur kann es sein, dass die Sonde ihre Bindungsstelle in der Proteinsequenz nicht erreicht, so dass diese Methode nicht auf jedes andere Protein mit gleicher Anordnung von Cysteinresten geeignet ist.

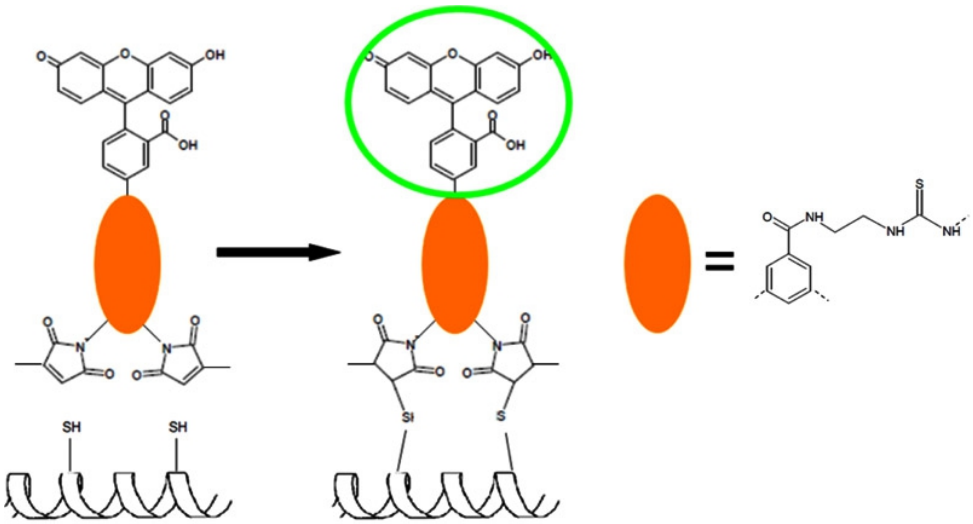

Abbildung 2: Markierung eines Proteins durch Fluorescein

Eine weitere Variante der schaltbaren Fluorophore wird zur Modifizierung von Glycoproteinen auf der Oberfläche von z.B. Krebszellen eingesetzt. Dazu wird ein spezieller Zucker an die Zellen verfüttert, der eine Alkingruppe trägt. Dieser wird in Glykanstrukturen auf der Oberfläche eingebaut, und das Alkin reagiert spezifisch mit einem Azid-substituierten Fluorescein unter Ausbildung eines Triazolrings. Diese Reaktion ist als Click-Reaktion bzw. Huisgen-Cycloaddition bekannt. Das azidsubstituierte Fluorescein ist aufgrund des PET zunächst nicht fluoreszent. Durch die Reaktion wird das HOMO der Benzoesäure-Einheit soweit abgesenkt, dass kein Elektronentransfer mehr stattfinden kann und die Anregungsenergie in Form von Fluoreszenz abgegeben wird. Um mit diesem Verfahren den Einbau bestimmter Zuckerderivate in Zellen zu verfolgen, wird Azidofluorescein zu den Zellen gegeben, nachdem sie mit dem alkinmodifizierten Zucker umgesetzt wurden. Da die Quantenausbeute nach der Alkin-Azid-Cycloaddition drastisch erhöht ist, wird nur die Fluoreszenz des gekuppelten Fluorophors auf der Zelloberfläche detektiert, nicht die des nicht abreagierten Reagenz im Medium. Die Alkin-Azid-Clickreaktion braucht Kupfer als Katalysator, der für Zellen in in vitro Versuchen toxisch wäre. In lebenden Zellen werden daher vorgespannte Cyclooktine eingesetzt, die ohne Kupferkatalyse mit Aziden reagieren.

Fluoreszenzsonden, basierend auf der kupferkatalysierten Azid-Alkin-Clickreaktion, können hingegen auch gezielt eingesetzt werden, um Kupferionen im Organismus oder in klinischen Proben nachzuweisen. Erhöhte Konzentrationen an Kupfer können neurologische Störungen wie Alzheimer (Ablagerung fehlerhaft gefalteter Peptide im Gehirn), Parkinson (Absterben der Dopamin-produzierenden Nervenzellen im Mittelhirn), das Menkes-Syndrom (Verminderung der Aktivität kupferabhängiger Enzyme) oder die Wilson-Krankheit (Erhöhter Kupferspiegel im Blut, Ablagerung in Organen) nach sich ziehen. Doch auch die Permeabilität von Membranen, die Protein-Biosynthese und die Aktivität von Enzymen können durch Kupfer gestört werden.
Daher könnte man Fluoreszenzfarbstoffe als Nachweisreagenzien für diese Metall-Ionen im Körper einsetzen, um mögliche Krankheiten, die mit veränderten Kupferkonzentrationen einhergehen, zu verhindern oder zumindest frühzeitig zu entdecken und zu behandeln. Die beiden am häufigsten verwendeten Fluorogene basieren auf Coumarin- bzw. Rhodaminstrukturen.

Coumarin ist ein bizyklisches Lacton, dessen Derivate vielfältig einsetzbar sind, interessant sind aber vor allem die optischen Eigenschaften. So können Coumarin und seine Derivate als optische Aufheller und in Farbstofflasern eingesetzt werden. Dies ist auf einen intramolekularen Ladungstransfer von einer Elektronendonorgruppe auf eine Elektronenakzeptorgruppe zurückzuführen.

Rhodamine gehören zu den synthetisch hergestellten Triphenylmethan-Farbstoffen. Sie unterscheiden sich strukturell nur wenig von Fluorescein. Auch sie besitzen eine Xanthen- und eine Benzol-Einheit. Jedoch absorbieren Rhodamin-Derivate bei wesentlich höheren Wellenlängen als Fluorescein-Derivate, was Autofluoreszenz des umliegenden Gewebes verhindert.

Beim Nachweis von Kupferkationen mit Coumarin- als auch Rhodamin-basierten Fluorogenen macht man sich die bereits oben beschriebene kupferkatalysierte „Click“-Reaktion zunutze. In Anwesenheit kleiner Mengen von Kupfer wird aus einem Azid und einem alkinsubstituierten Coumarin oder Rhodamin ein Triazol-Ring gebildet, was eine Veränderung der Elektronendichte im aromatischen System und damit eine Farbänderung von grün nach rot bewirkt.

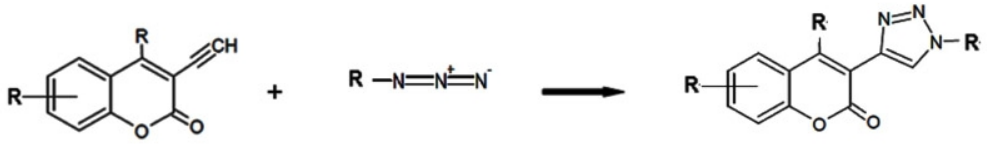

Abbildung 3: Kupfernachweis durch kupferkatalysierte Click-Reaktion: Einsatz einer elektronenziehenden Gruppe an Position 3 bzw. einer elektronenschiebenden Gruppe an Position 7 erhöht die Intensität der Fluoreszenz

Rhodamin Q ist dagegen ein reversibler Chemosensor für Kupferionen, was ihn für den Nachweis von Kupfer äußerst interessant macht. Es reagiert auf Kupfer in einer Gleichgewichtsreaktion, bei der eine gelb fluoreszierende Verbindung entsteht, die mit dem bloßen Auge sichtbar ist.

Zur Anregung der Fluorophore kann man sich den Zwei-Photonen-Transfer zunutze machen. Bei diesem wird die Anregungsenergie nicht von einem, sondern von zwei Photonen geliefert. Dabei kann der Fluorophor mit langwelliger Strahlung angeregt werden. Diese dringt tiefer ins Gewebe ein, ohne es zu schädigen, während kurzwellige (hochenergetische) Strahlung Gewebsverletzungen mit sich ziehen kann. Außerdem wird mit dem langwelligen Licht weniger Autofluoreszenz der im Gewebe enthaltenen aromatischen Systeme angeregt.

Die optischen Eigenschaften von Fluoreszenzfarbstoffen sind vielseitig nutzbar. Der Einsatz als Nachweisreagenz von erhöhten Kupferkonzentrationen für die Früherkennung physiologischer Störungen scheint vielversprechend. Auch die Detektion von veränderten Proteinen aufgrund mutierter Gensequenzen könnte ein Hilfsmittel in der Diagnostik werden. Welche dieser Techniken zum Standard werden, bleibt abzuwarten, da die meisten Methoden bisher nur *in vitro* durchgeführt werden konnten. Doch mit weiterer Forschung auf dem Gebiet der schaltbaren Fluoreszenz könnte der Einsatz von Fluorogenen die Diagnostik revolutionieren.

Zum Beispiel könnten Fluorophore in Zukunft in der Krebsdiagnostik Einsatz finden. Da Krebszellen einen erhöhten Energiebedarf haben, kann man diese mit Fluorogenen füttern, die an spezielle Nährstoffe oder Cofaktoren gekoppelt sind, um durch deren Verstoffwechselung die Fluoreszenz einzuschalten. Bisher gelang das Anfärben von Krebszellen nur mit nicht schaltbaren Fluorogenen, was häufig mit unspezifischen Hintergrundsignalen einhergeht. Die Entwicklung von Fluorogenen, die durch charakteristische Enzyme von Krebszellen angeschaltet werden können, ist daher attraktiv. Auf jeden Fall zeigen sich schon jetzt vielversprechende Tendenzen bezüglich des Einsatzes von Fluoreszenzfarbstoffen auf den verschiedensten Bereichen.

Take Home Messages

- Bei Fluorogenen führt erst die Reaktion mit dem Zielmolekül (z.B. mit einem Metall-Ion) zu einer fluoreszierenden Spezies.
- Der Photoelektronentransfer stellt einen strahlungsfreien Konkurrenzprozess zur Fluoreszenz dar; bei Fluorescein kann er beispielsweise durch Substitution der Benzoesäureeienheit und die damit verbundene Veränderung der energetischen Lage des HOMOs begünstigt oder unterbunden werden.
- Fluoresceinderivate können auf verschiedenen Wegen als schaltbare Fluoreszenzsonde eingesetzt werden, z.B. durch Schalten der Fluoreszenz in einer Click-Reaktion mit Azidofluorescein oder der Bindung eines Bis-Maleimid-Fluoresceins an eine Peptidsequenz mit zwei Cysteinen.

Kontakt:

Der Artikel wurde im Rahmen des Studienprojektes HighChem des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt verfasst (s. Woche 2).

Die Autoren, Magali Bel Adasme, Thorsten Cottre, Victoria Engemann sind Studierende des Bachelorstudiengangs Chemie an der TU Darmstadt

(E-Mail: magali.bel_adasme@stud.tu-darmstadt.de,

thorsten.cottre@stud.tu-darmstadt.de und victoria.engemann@gmx.de).

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Katja Schmitz (E-Mail: schmitz@biochemie-tud.de).

Schlauer Fuchs

Unsere Schlaue-Fuchs-Frage zu diesem Beitrag lautete:

Welche Folgen können erhöhte Konzentrationen an Kupfer im Körper nach sich ziehen?

Literatur:

[1] GUY, J., CASTONGUAY, R., CAMPOS-REALES PINEDA, N. B., JACQUIER, V., CARON, K., MICHNICK, S. W. & KEILLOR, J. W. 2010. De novo helical peptides as target sequences for a specific, fluorogenic protein labelling strategy. *Mol Biosyst*, 6, 976-87.

[2] LE DROUMAGUET, C., WANG, C. & WANG, Q. 2010. Fluorogenic click reaction. *Chem Soc Rev*, 39, 1233-9.

[3] PHAM, A. N., XING, G., MILLER, C. J. & WAITE, T. D. 2013. Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. *Journal of Catalysis*, 301, 54-64.

[4] SHIEH, P., HANGAUER, M. J. & BERTOZZI, C. R. 2012. Fluorogenic azidofluoresceins for biological imaging. *J Am Chem Soc*, 134, 17428-31.

[5] SUN, Y. F., WANG, H. P., CHEN, Z. Y. & DUAN, W. Z. 2013. Solid-state Fluorescence Emission and Second-Order Nonlinear Optical Properties of Coumarin-based Fluorophores. *J Fluoresc*, 23, 123-30.

[6] TANAKA, K., MIURA, T., UMEZAWA, N., URANO, Y., KIKUCHI, K., HIGUCHI, T. & NAGANO, T. 2001. Rational design of fluorescein-based fluorescence probes. Mechanism-based design of a maximum fluorescence probe for singlet oxygen. *J Am Chem Soc*, 123, 2530-6.

[7] WANG, J., LONG, L., XIE, D. & SONG, X. 2013. Cu2+-selective “Off–On” chemsensor based on the rhodamine derivative bearing 8-hydroxyquinoline moiety and its application in live cell imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 177, 27-33.