

Fluoreszenzsonden

DOI: 10.1002/ange.200500751

Eine FRET-Sonde zur Messung der Aktivität von Phospholipase A₂ in Zellen und Organismen**

Oliver Wichmann, Jochen Wittbrodt und Carsten Schultz*

Biochemische Experimente verlagern sich zusehends vom Reagenzglas in lebende Zellen. Diese Entwicklung wird vorwiegend durch neue Fluoreszenzsonden ermöglicht,^[1,2] die vermehrt radioaktive Assays ersetzen. Fluoreszenzsonden erlauben Experimente in Echtzeit und liefern, eine geeignete Lokalisation vorausgesetzt, umfassende räumliche Information über die beobachteten Vorgänge. Dementsprechend hat sich die Nachfrage nach Fluoreszenzsonden in den letzten zehn Jahren wesentlich erhöht, wobei die rasche Entwicklung fluoreszenter Proteine aus Quallen und Korallen die Herstellung genetisch kodierter Sonden vorangetrieben hat.^[3] Sonden, die auf kleinen Molekülen basieren, werden aber weiterhin mit chemischen Methoden hergestellt.^[4]

Die Mehrzahl dieser Sonden misst bislang Änderungen von Ionenkonzentrationen; dagegen wurden bisher nur wenige Substrate, die resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET) messen, hergestellt und zur Bestimmung von Enzymaktivitäten verwendet.^[5] Ein Vorteil solcher Sonden ist ihre Eigenschaft, in Zellen zu akkumulieren. Verbunden mit dem Verstärkungseffekt einer enzymatischen Reaktion ergeben sich so enorm empfindliche Testsysteme, selbst wenn die Substrateigenschaften nur moderat sind.^[5] Ein Nachteil ist allerdings, dass die Sonde im Laufe der Messung verbraucht wird. Dieser Mangel an Reversibilität begrenzt den Nutzen dieser Sonden bei der Beobachtung stark dynamischer Prozesse. Andererseits ermöglichen kleine, auf ihre Aufgabe zugeschnittene Moleküle die Verwendung einer großen Auswahl an Fluorophoren. Diese können ein größeres

[*] O. Wichmann, Dr. C. Schultz
European Molecular Biology Laboratory
Gene Expression Programme
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)
Fax: (+49) 6221-387-206
E-mail: schultz@embl.de

Dr. J. Wittbrodt
European Molecular Biology Laboratory
Developmental Biology Programme
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)

[**] Wir danken Heike Stichnoth und Nicole Heath für die Bereitstellung von Zellen und Erika Grzebiss für Medaka-Eier. Ferner danken wir Prof. Dr. Christina Leslie, University of Colorado, Boulder, für das Plasmid der Phospholipase A₂ gamma und Prof. Dr. Michael Gelb, University of Washington, Seattle, für das Plasmid der Phospholipase A₂ alpha und gereinigtes cPLA₂α-Enzym sowie hilfreiche Diskussionen.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Spektrum an physikalischen Eigenschaften abdecken als fluoreszente Proteine. Ferner ergeben FRET-Sonden auf der Basis kleiner Moleküle meist erheblich größere Änderungen im Emissionsverhältnis (Ratio), da die Fluorophore im Ausgangszustand sehr dicht beieinander liegen. Dies ist insbesondere bei Anwendungen mit begrenzter Empfindlichkeit wichtig, z. B. bei Experimenten im Platereader. Hier stellen wir die Synthese und die biologische Anwendung einer FRET-Sonde für Phospholipase A₂ (PLA₂) vor, die auf einem kleinen Molekül beruht.

Eine Reihe fluoreszenter Assays zur Bestimmung von Phospholipaseaktivitäten ist bekannt, allerdings bieten diese keine Möglichkeit zum Ratio-Imaging.^[6,7] PLA₂s sind eine Gruppe von Schlüsselenzymen in der intrazellulären Signalübertragung, die eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von Entzündungsprozessen spielen. Eine ihrer wichtigsten Funktionen ist die Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden, aus der nachfolgend Prostaglandine und Leukotriene biosynthetisiert werden.^[8,9] Die meisten der PLA₂-Isoformen üben ihre Aktivität an Membranoberflächen aus, insbesondere solchen in der perinuklearen Region.^[10–12]

Das Design der Sonde PENN/SATE (**1**) basierte auf einem Phospholipid (Abbildung 1). Wegen der Vielzahl ver-

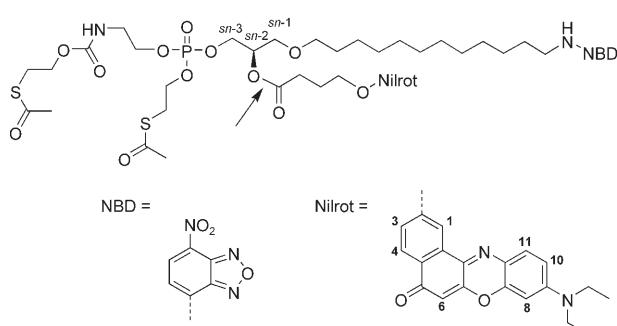


Abbildung 1. Struktur der PLA₂-Sonde PENN/SATE (**1**). Der FRET-Donor NBD ist mit dem Ende der sn-1-Kette verknüpft, der Acceptor Nilrot mit der Buttersäure in der sn-2-Position. Die geladene Kopfgruppe ist mit bioaktivierbaren S-Acetyl-2-thioethyl(SATE)-Gruppen maskiert. Enzymatische Hydrolyse der Thioester und spontane Abgabe von Thiiran setzen die geladenen Gruppen frei.^[13] Der Pfeil zeigt auf die von PLA₂ hydrolysierte Bindung.

schiedener Phospholipasen mit ihren diversen Substratspezifitäten wählten wir ein Phosphatidylethanolamin(PE)-Derivat, bei dem die Esterfunktion in der sn-1-Position in eine nicht hydrolysierbare Etherfunktion abgewandelt wurde. Dies sollte Hydrolyse durch PLA₁ und unspezifische Lipasen in dieser Position ausschließen. Ein weiterer wichtiger Faktor waren die Auswahl und Verknüpfung der beiden fluoreszenden Farbstoffe. Unter der Voraussetzung einer maximalen Überlappung zwischen FRET-Donoremision und Acceptoranregung wählten wir das Paar 7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolamin (NBD) und das 2-Hydroxyderivat von 9-Diethylamino-5H-benzo[a]phenoxazin-5-on (Nilrot). Ihre optischen Eigenschaften sind für unsere Zwecke fast ideal geeignet (Abbildung 2), zumal beide Fluorophore unter physiologischen Bedingungen ungeladen vorliegen und daher

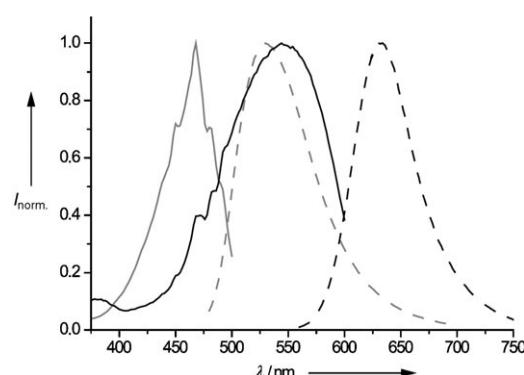


Abbildung 2. Anregungs- (—) und Emissionsspektren (----) von NBD (grau) und Nilrot (schwarz) in Methanol. In Ultraschall-behandelten 3 mm Triton-X-100-Vesikeln aufgenommene Spektren waren fast identisch. Die Überlappung von NBD-Emission und Nilrot-Anregung ist ideal für FRET-Messungen. Emissionsspektren wurden bei Anregung mit 458 (NBD) und 543 nm (Nilrot) aufgenommen. Anregungsspektren wurden bei einer Emission von 540 (NBD) und 640 nm (Nilrot) gemessen.

sehr lipophil sind. Dies ist wichtig, da beide Farbstoffe sich in die Doppelphospholipidschichten der Membranen einlagern sollen.

Nilrot wird in der Histologie zum Färben von Fetttröpfchen eingesetzt. Um chemische Verknüpfungen des Farbstoffs zu ermöglichen, wurden in der Vergangenheit funktionalisierte Derivate mit Hydroxygruppen in der 2- oder 3-Position verwendet.^[14] Wir folgten einem modifizierten Weg zur Synthese des 2-Hydroxynilrot-Ethers der 4-Hydroxybuttersäure (NRBA).^[14] Dieser wurde in die sn-2-Position der Sonde eingebaut. Auf diese Weise wollten wir die Positionen der beiden Fluorophore durch unterschiedliche Kettenlänge aufeinander abstimmen. Ferner sollten die Doppelbindungen von Nilrot jene der Arachidonsäure simulieren.^[15] Zuvor hergestellte Sonden mit identischer Kettenlänge der Fettsäuren hatten zwar effizientes Löschen der Donoremision sowie einen starken Anstieg derselben nach sn-2-Esterhydrolyse gezeigt, allerdings bei nur schwachen Änderungen der Acceptoremission.^[16]

Ein Problem im Umgang mit Phospholipiden in biologischen Experimenten ist ihre Tendenz zur Bildung unlöslicher Aggregate. Zudem befürchteten wir für unsere Experimente, dass die geladenen Phospholipidderivate in der äußeren Seite der Doppelphospholipidschicht stecken bleiben würden, anstatt in die Zelle einzudringen. Da die cytosolischen PLA₂s aber üblicherweise an den perinuklearen Membranen im Inneren der Zelle agieren, war die Synthese membranpermeabler Derivate der Sonde notwendig. Wir maskierten die geladenen Gruppen deshalb mit S-Acetyl-2-thioethyl(SATE)-Gruppen (Abbildung 1). Diese Gruppen wurden bereits häufig als bioaktivierbare Phosphatschutzgruppen verwendet, besonders um die Bioverfügbarkeit antiviraler Nucleotide zu verbessern.^[13,17] SATE-Gruppen können durch vorgefertigte, SATE-geschützte Phosphoramiditreagentien eingeführt werden. Nach Kupplung an den Alkohol werden die entstandenen Phosphorigsäuretriester dann leicht zu den ungeladenen Phosphorsäuretriestern oxidiert.^[18] Mit dieser Methode kann die gesamte Kopfgruppe des Phospholipids in einem Schritt an den Glycerinkörper gekuppelt werden.

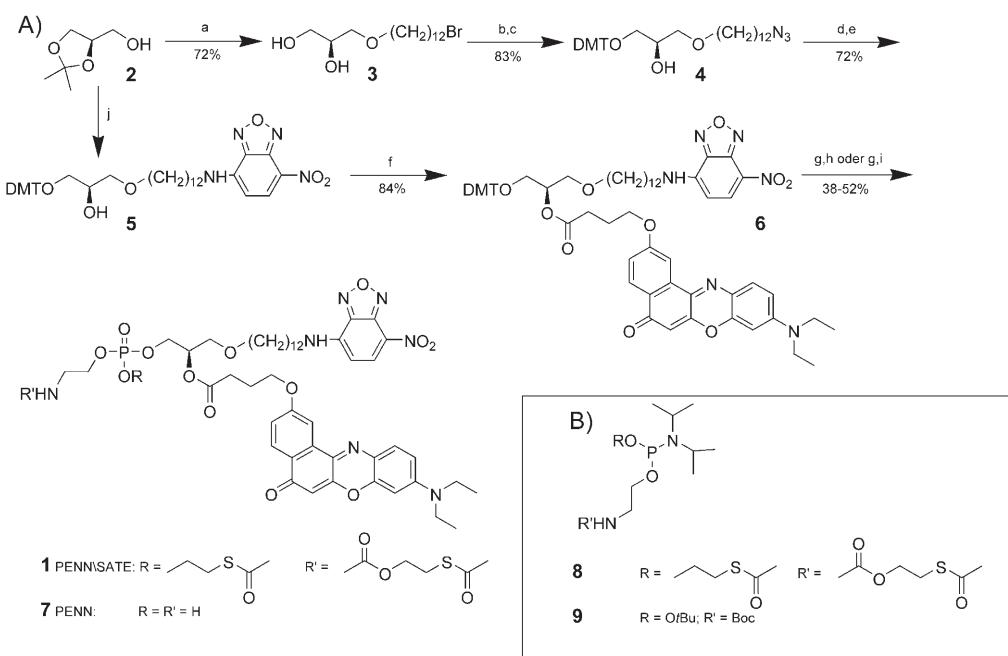
Diese Methode hat Vorteile gegenüber anderen Prodrug-Methoden, wie der Maskierung mit Acetoxymethylestern, die nicht nur harschere Synthesebedingungen benötigen,^[19] sondern auch zu Modifikationen des Nilrot-Farbstoffs führen können.^[20]

Die Synthese ging von enantiomerenreinem 2,3-O-Iso-propyliden-sn-glycerin (**2**) aus (Schema 1). Die sn-1-Hydroxygruppe wurde mit 1,12-Dibromdodecan alkyliert und das Ketal anschließend in einer Eintopfreaktion entfernt, wie zuvor beschrieben.^[16] Das verbleibende Bromid wurde durch Azid ersetzt, und der primäre Alkohol wurde mit einer 4,4-Dimethoxytrityl(DMT)-Gruppe geschützt. Das daraus resultierende **4** wurde mit Lithiumaluminiumhydrid in Tetrahydrofuran (THF) zur Aminoverbindung reduziert (92% Ausbeute nach Chromatographie), um anschließend NBD anzuknüpfen (→**5**).

Alternativ führten wir die Reduktion am Triphenylphosphin-beladenen Harz durch. Durch eine Staudinger-Reaktion wurde hierbei das Azid zunächst an die feste Phase gebunden, sodass alle Nebenprodukte weggewaschen werden konnten. Das reine Amin wurde dann mit feuchtem Methanol eluiert. Diese Vorgehensweise war für die Synthese kleiner Mengen von Vorteil, während das Batch-Verfahren für größere Ansätze geeigneter war. Nach erfolgreicher Kupplung des NBD wurde **5** mit Nilrot-Oxybuttersäure in Gegenwart von 1-(2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol (TPSNT) und Methylimidazol (MeIm) in Dichlormethan verestert. Diese Methode war mit Ausbeuten von bis zu 87%

der klassischen Reaktion mit Carbodiimid überlegen. Das so erhaltene, doppelt markierte **6** wurde anschließend mit Dowex 50 WX-8 in Dichlormethan entschützt. Eine Wanderung der *sn*-2-Esterfunktion auf die entstehende primäre Hydroxygruppe musste unterdrückt werden, weshalb die Dichlormethanlösung rasch durch Kieselgel filtriert wurde, um Nebenprodukte aus der DMT-Hydrolyse zu entfernen. Das Eluat wurde getrocknet, und die Phosphylierung in DMF wurde sofort begonnen. (Eine Probe des primären Alkohols wurde zu Analysezwecken gereinigt.) Phosphoramidit **8** und 4,5-Dicyanimidazol wurden unter Argon zugegeben. Nach 16 Stunden wurde die Lösung drei Stunden mit *t*BuOOH umgesetzt. Abschließend wurde PENN/SATE (**1**) auf Kieselgel gereinigt. Mittels Phosphylierung/Oxidation/Entschützen mit einer Boc-geschützten Aminogruppe und einer *tert*-Butylgruppe am Phosphoramidit **9**^[16] wurde die Variante ohne bioaktivierbare Schutzgruppen (PENN, **7**) hergestellt (Schema 1). PENN wurde verwendet, um die optischen Eigenschaften der Sonde in einem Micellentestsystem zu messen.

Die Micellen bestanden aus ca. 140 Triton-X-100-Molekülen und wurden mit Ultraschall nach einem Standardverfahren erzeugt.^[20] PENN (**7**) wurde in solchen Mengen zugegeben, dass im Mittel jede zehnte Micelle ein Sondenmolekül enthielt. Unter diesen Bedingungen wurde die grüne NBD-Fluoreszenz im Fluoresenzspektrum vollständig gelöscht; gleichzeitig zeigte sich eine erhebliche Emission bei 620 nm, typisch für Nilrot-Emission. Dies ließ auf einen



Schema 1. A) Syntheseweg zur geschützten Sonde PENN/SATE (**1**) und der ungeschützten Probe PENN (**7**). a) 1,12-Dibromdodecan (Überschuss), NaH, DMF, RT, 16 h, 2. TFA, MeCN, H₂O, RT, 2 h; b) NaN₃ (Überschuss), DMSO, 85 °C, 3 h; c) DMT-Cl, Et₃N, DMAP, DMF, RT, 16 h; d) LiAlH₄, THF, 0 °C, 2 h; e) NBD-Cl, DIPEA, Methanol, 0 °C → RT, 4 h; f) 4-(Nilrot)-Oxybuttersäure, TPSNT, MeIm, CH₂Cl₂, RT, 14 h; g) Dowex 50 WX-8, CH₂Cl₂, RT, 3 h; h) 1. Phosphoramidit **8**, 4,5-Dicyanimidazol, DMF, 0 °C → RT, 2. *t*BuOOH (Überschuss), 0 °C, 3 h, 38–52% (für g–h); i) 1. Phosphoramidit **9**, 4,5-Dicyanimidazol, DMF, 0 °C → RT, 2. *t*BuOOH (Überschuss), 0 °C, 30 min, 3. 5% TFA, CH₂Cl₂, RT, 1 h; j) 1. 1,12-Dibromdodecan (Überschuss), NaH, DMF, RT, 16 h, 2. NaN₃ (Überschuss), DMSO, 85 °C, 3 h, 3. Festphasen-gebundenes Ph₃P, THF, 24 h, 4. MeOH/H₂O (9:1), 24 h, 5. TFA, MeCN, H₂O, RT, 3 h, 6. DMT-Cl, Et₃N, DMAP, DMF, RT, 14 h. B) Phosphylierungsmittel mit enzymatisch (**8**) und chemisch (**9**) spaltbaren Schutzgruppen. TFA = Trifluoressigsäure, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, DIPEA = Diisopropylethylamin, Boc = *tert*-Butoxycarbonyl.

vollständigen Energietransfer schließen (Abbildung 3 A). Die Quantenausbeuten für PENN in Ethanol lagen bei 0.12, während NBD-markierte Undecansäure allein eine Quantenausbeute von 0.36 hatte.^[21] Der Wert für PENN war

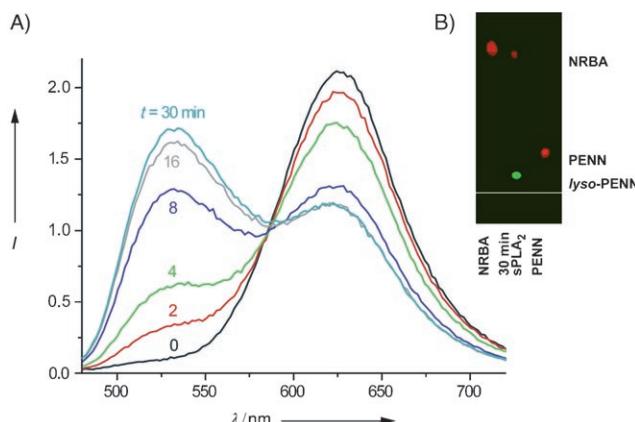


Abbildung 3. A) Zugabe von Bienengift-PLA₂ zu einer 1 μM Lösung von PENN in Triton-X-100-Micellen (3 mM) bei pH 7.5 führte zu einem Anstieg der NBD-Fluoreszenz und einer Verminderung der Nilrot-Fluoreszenz. Die Anregungswellenlänge betrug 440 nm. Das Emissionsverhältnis änderte sich um den Faktor 30. Beschallung mit Ultraschall nach dem Ende der Reaktion ergab keine weitere Veränderung. B) DC-Analyse einer parallel durchgeführten Reaktion nach 30 Minuten sowie entsprechende Referenzsubstanzen.

identisch zu dem der vorher verwendeten FRET-Sonde^[16] mit den gleichen Fluorophoren (siehe Hintergrundinformationen für Details). Ferner wurde die Photostabilität von PENN in Micellen und in HeLa-Zellen bestimmt. Während in vitro kein Photobleichen beobachtet werden konnte, blieb NBD in Zellen mit ungefähr 1.5% pro Belichtung (siehe Hintergrundinformationen für Details).

Zugabe der kommerziell erhältlichen Phospholipase A₂ aus Bienengift führte zu einem raschen Anstieg der grünen Fluoreszenz bei gleichzeitigem Abfallen der roten Fluoreszenz. Änderungen des Emissionsverhältnisses um maximal den Faktor 30 wurden innerhalb von 15–30 Minuten erreicht (Abbildung 3 A). Eine Reorganisation der Micellen durch weitere Ultraschallbehandlung ergab keine weitere Änderung des Emissionsverhältnisses. Dies wies darauf hin, dass die beiden Fluorophore bereits räumlich getrennt waren. Die verbleibende Nilrot-Fluoreszenz sollte daher durch die direkte Anregung von Nilrot mit der Donoranregungswellenlänge verursacht sein. Dünnenschichtchromatographie (DC) von PENN 30 Minuten nach PLA₂-Behandlung zeigte, dass mehr als 90% der Probe gespalten waren (Abbildung 3 B). Die starke Änderung des Emissionsverhältnisses in der Probe macht diese besonders geeignet für Anwendungen in lebenden Zellen.

Phosphatidylethanolamino sind über alle internen Zellmembranen und die Innenseite der Plasmamembran verteilt. Die cytosolische PLA₂-Aktivität hingegen ist vorwiegend an Membranen der perinuklearen Region zu finden.^[11,22,23] Daher war es wesentlich, zu zeigen, dass die Sonde in der Lage war, dieses Zellkompartiment zu erreichen. Inkubation von HeLa- oder MDCK-II(Maden Darby canine kidney)-

Epithelzellen zeigte, dass die Probe sich vorwiegend am Golgi-Apparat, der Kernmembran und bei höheren Dosen im endoplasmatischen Reticulum anreicherte (Abbildung 4). Die Plasmamembran blieb interessanterweise frei von Farb-

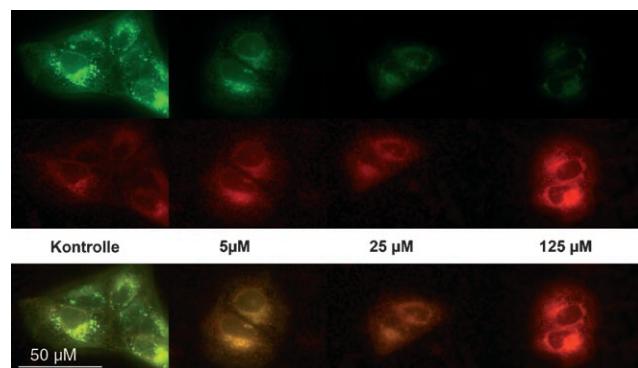


Abbildung 4. PENN/SATE-Hydrolyse durch endogene Enzyme in MDCK-II-Epithelzellen wurde dosisabhängig durch MAFP inhibiert. Obere Reihe: NBD-Fluoreszenz, mittlere Reihe: Nilrot-Fluoreszenz, untere Reihe: Überlagerung.

stoff. Diese spezifische Lokalisierung ist wahrscheinlich auf den Nilrot-Farbstoff zurückzuführen. Experimente mit einfachen Nilrot-markierten Fettsäuren zeigten eine Anreicherung in denselben Regionen, während unmodifiziertes Nilrot kleine Vesikel oder Fetttröpfchen färbte (Daten nicht gezeigt). Andere aromatische Farbstoffe wie NBD und Lissamin scheinen im Übrigen ebenfalls an sie gebundene Verbindungen in perinukleare Membranen zu dirigieren.

Mit 3 μM PENN/SATE (**1**) beladene MDCK-II-Zellen wurden mit einem Weitfeldmikroskop untersucht (Zeiss Axiovert 200M). Die endogene PLA₂-Aktivität der Zellen wurde durch fötiales Kälberserum (FCS) initiiert und spaltete die Sonde innerhalb von 30–60 Minuten (Abbildung 4, Kontrolle). Fluoreszenzanregung trat bei 435–485 nm für die NBD-Fluoreszenz und bei 540–580 nm für Nilrot auf. Emission wurde bei 515–555 nm (NBD) und 600–660 nm (Nilrot) gemessen. Das Emissionsverhältnis (Donor-/Acceptor-Fluoreszenz) ergab einen direkten Ausdruck für den Status der Sonde: Niedrige Werte des Emissionsverhältnisses stammten von einer intakten Probe und hohe von einer gespaltenen Probe. In Abbildung 4 sind die Fluoreszenzintensitäten von Nilrot in Rot und die von NBD in Grün dargestellt (Falschfarben). Das Überlagern der beiden Bilder vereinigt die gesamte Information in einer Abbildung und zeigt die Lokalisierung der Farbstoffe.

Anschließend wurde die Inhibition der PLA₂ durch Standardinhibitoren wie Methylarachidonylfluorophosphat (MAFP) und Bromenollacton (BEL) untersucht. HeLa-Zellen wurden in rechteckigen 4er Kammern (20 \times 9 mm pro Kammer) plattierte und 30 Minuten mit 3 μM PENN/SATE sowie Inhibitor oder Kontrollsubstanz behandelt. Abbildungen des Emissionsverhältnisses (nicht gezeigt) ergaben eine dosisabhängige Inhibition der PLA₂-Aktivität mit einer IC₅₀ von ca. 5 μM für den kovalent bindenden Inhibitor MAFP und nur minimale Inhibition durch BEL (Abbildung 5).^[24,25]

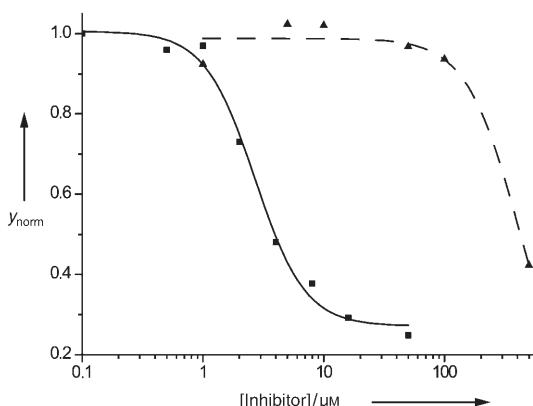


Abbildung 5. Dosis-Antwort-Kurven, gewonnen durch Experimente mit HeLa-Zellen, zeigten unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber PLA₂-Inhibitoren; y_{norm} = normalisiertes Emissionsverhältnis (515–555 nm/620 + nm), MAFP —, BEL -----. Dies lässt vermuten, dass die Sonde gegenüber bestimmten PLA₂-Isoformen empfindlicher ist als gegenüber anderen.

Der Inhibitor BEL gilt als recht spezifischer Inhibitor der Calcium-unabhängigen PLA₂-Isoformen (iPLA₂).^[25] MAFP-Empfindlichkeit weist auf ein Serin im katalytischen Zentrum hin. Demzufolge kommen in HeLa-Zellen Isoformen der Gruppen IV und VI–VIII als endogene PLA₂s infrage.^[8] Der Vergleich der IC₅₀-Werte für MAFP mit Literaturdaten zeigte ähnliche Ergebnisse für Experimente im Reagenzglas und in lebenden Zellen.^[26] Dies bedeutet, dass PENN/SATE geeignet ist, zellbasierte Assays nach PLA₂-Inhibitoren zu durchmustern. Deshalb wurde für die Methode eine Anwendung im Platereader gesucht, was Experimente mit relativ hohem Durchsatz ermöglicht. Erste Experimente mit einem EnVision Platereader (Perkin Elmer) lieferten vielversprechende Ergebnisse. HeLa-Zellen wurden in einer 96er Mikrotiterplatte plattiert und 30 Minuten mit 5–50 μM PENN/SATE behandelt, wonach die Zellen dreimal mit HEPES-Puffer, pH 7.4, gewaschen wurden. Der Einfachheit halber wurde nur die Zunahme der FRET-Donor-Fluoreszenz (dequenching) als Resultat des sich nach der enzymatischen Hydrolyse entfernenden Acceptors gemessen. Es wurden verschiedene Stufen der Zellkonfluenz zwischen 30 und 100% untersucht. Wie erwartet, ergaben Zellen höherer Konfluenz ein stärkeres Fluoresenzsignal. Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit einer Konfluenz unter 80% waren nicht für die Detektion der Enzymaktivitäten geeignet. Vertiefungen, die während der Inkubation mit MAFP behandelt wurden, zeigten Werte auf dem Niveau des Rauschens. Dies bedeutet, dass die Sonde nicht gespalten wurde und daher keine Zunahme der FRET-Donorfluoreszenz messbar war.

Außer der Analyse und dem Screening von PLA₂-Inhibitoren waren wir auch daran interessiert, den Beginn der PLA₂-Aktivität in lebenden Embryonen während der Embryonalentwicklung sichtbar zu machen. Ähnliche Experimente waren zuvor schon im gastrointestinalen Trakt von Zebrafischembryonen durchgeführt worden.^[27] Solche Experimente sollten Aufschluss geben, ob die Sonde 1. in ganzen Organismen verwendet werden kann, 2. für mehrere Tage dauernde Experimente geeignet ist und 3. toxisch für lebende

Organismen ist. Wir injizierten PENN/SATE, gelöst in Phosphat- oder „balanced salt solution“(BSS)-Puffer (pH 7.4 mit bis zu 10% DMSO/Pluronic) unter einen drei Stunden alten Medaka-Fischembryo, ohne die Dottermembran zu verletzen. Der Embryo wurde anschließend mit einem Binokular mit Fluoreszenzdetektion beobachtet. Innerhalb von 2–7 Stunden wurde die Sonde vollständig vom Embryo aufgenommen (Abbildung 6 A). Dies demonstriert die Effizienz

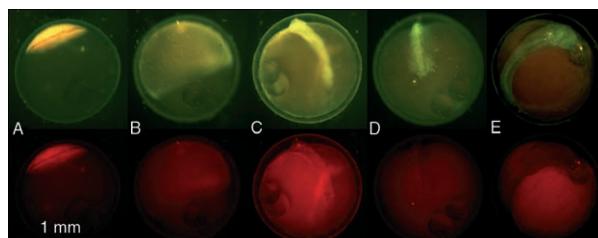


Abbildung 6. Anwendung von PENN/SATE zur Untersuchung der PLA₂-Expression in Medaka-Fischembryonen. Die obere Bildeiste zeigt die überlappende rote und grüne Fluoreszenz, die untere nur den roten Kanal zum Vergleich. A) Der Embryo (Alter 3 h) nahm die Probe innerhalb von 2–7 h auf. B) Nach 19 h zeigt sich der partiell gebildete Keimring. C) Nach 27 h zeigt der Embryo weiterhin erheblichen FRET, wie man anhand der gelben Farbe sehen kann. D) + E) Nach 37 h und 48 h erscheint der Embryo durch die Färbung des NBD-markierten Lysophosphatidylethanolamins ausschließlich grün, während Nilrot-Buttersäure in den fettrichen Ei dotter diffundiert ist. Dies bedeutet, dass die PLA₂-Aktivität im Embryo nun begonnen hat. Der hier dargestellte Beginn der PLA₂-Enzymaktivität ist in guter Übereinstimmung mit publizierten Resultaten von Zeitverläufen in Zebrafisch-Embryoextrakten.^[15] Die Embryonen konnten weitere fünf Tage bis zum Schlüpfen des Jungfisches beobachtet werden. Dies macht deutlich, dass die Sonde keinen feststellbaren toxischen Effekt hat. Die Fluoreszenz blieb im Spezimen bis zum Schlüpfen erhalten.

der bioaktivierbaren Schutzgruppen. Nach 27 Stunden war der Embryo deutlich gewachsen und zeigte gelbe Fluoreszenz (Abbildung 6C), typisch für die überlappende grüne und rote Fluoreszenz der intakten Probe. Nach 37 Stunden hatte sich der Embryo jedoch grün verfärbt, während der Dotter sich nun leuchtend rot zeigte (Abbildung 6D,E). Dies bedeutet, dass die Sonde nun gespalten war. Das grün fluoreszierende Lipidgerüst mit seiner nichthydrolysierbaren Etherbindung in der sn-1-Position verblieb im Fisch, während die durch Hydrolyse abgespaltene Nilrot-Buttersäure in das fettriche Eigelb diffundiert war. Dadurch wurden die beiden Fluorophore räumlich getrennt, und der FRET wurde unterbrochen.

Es bleibt nachzuweisen, welche Isoform der PLA₂ für die Spaltungsreaktion sowohl in kultivierten Zellen als auch im Fischembryo verantwortlich war. In-vitro-Experimente mit isolierter rekombinanter cPLA₂ α zeigten keine Spaltung von PENN. Durch Überexpression von cPLA₂ α und cPLA₂ γ konnte die Probe ebenfalls nicht gespalten werden. Alle bisherigen Experimente deuten auf PAF-AH II (Gruppe VII PLA₂) als das verantwortliche Enzym für die Spaltung von PENN in HeLa-Zellen hin. Dieses Ergebnis wird durch kürzlich veröffentlichte Daten für *C. elegans* gestützt, nach denen PAF-AH II essenziell für die Epithelialmorphogenese ist.^[28] Für eine sichere Zuordnung sind allerdings Experimente mit gereinigter PAF-AH II erforderlich.

Die PLA₂-Sonde PENN/SATE ist hoch membrangängig und akkumuliert in Zellen dort, wo auch die PLA₂-Aktivität gefunden wird. Die Sonde ist nützlich, um Enzymaktivitäten in Kulturzellen und kleinen Organismen anzuzeigen. Ferner hat die Methode das Potenzial für die Anwendung in zellbasierten Hochdurchsatzexperimenten auf der Suche nach PLA₂-Inhibitoren. Dabei kommt zugute, dass FRET-Sonden, basierend auf kleinen, im Chemielabor hergestellten Molekülen, viel größere Änderungen des Emissionsverhältnisses zeigen als genetisch kodierte FRET-Proben. Daher sollten diese Verfahren in Zukunft intensiver untersucht werden, besonders falls die resultierenden Sonden membrangängig und damit geeignet für die Behandlung von großen Zellpopulationen oder von Geweben sind.

Experimentelles

Ausgewählte physikalische Daten für **1**: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C, TMS): δ = 8.48 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, NBD-H), 8.25 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H, Nilrot H⁴), 8.06 (d, ⁴J = 2.5 Hz, 1H, Nilrot H¹), 7.62 (d, ³J = 9.1 Hz, 1H, Nilrot H¹¹), 7.19 (dd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, Nilrot H³), 6.70 (dd, ³J = 9.1 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, Nilrot H¹⁰), 6.48 (d, ⁴J = 2.5 Hz, 1H, Nilrot H⁸), 6.35 (s, 1H, Nilrot H⁶), 6.16 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, NBD-H), 5.53 (t, ³J = 4.5 Hz, 0.5H, NH Carbamat), 5.48 (t, ³J = 4.5 Hz, 0.5H, NH Carbamat), 5.30–5.20 (m, 1H, sn-2 CH), 4.37–4.10 (m, 12H, Nilrot OCH₂, POCH₂ (3 ×), NHCOOCH₂), 3.61 (d, ³J = 5.1 Hz, 1H, sn-1 CH₂), 3.56–3.40 (m, 10H, sn-1 OCH₂, NBD-NH-CH₂, Nilrot NCH₂ (2 ×), OOCNHCH₂), 3.20 (t, 2.67, ³J = 6.3 Hz, 2H, COSCH₂), 3.15 (t, ³J = 6.4 Hz, 2H, COSCH₂), 2.69 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, OOCCH₂), 2.38 (s, 3H, CH₃COS), 2.37 (s, 3H, CH₃COS), 2.26 (qi, ³J = 6.7 Hz, 2H, Nilrot O-CH₂CH₂), 1.79 (qi, ³J = 7.2 Hz, 2H, NBDNH-CH₂CH₂), 1.60–1.19 ppm (m, 26H, Nilrot NCH₂CH₃ (2 ×), CH₂ Kette (10 ×)).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 183.21, 161.50, 152.13, 150.89, 146.88, 136.49, 134.10, 131.10, 130.87, 128.80, 127.80, 125.74, 124.74, 118.22, 109.68, 106.61, 105.21, 96.28, 71.79, 70.96, 68.34, 67.03, 66.34, 66.18, 63.35, 45.10, 44.07, 41.40, 38.74, 31.92, 30.80, 30.56, 30.37, 29.69, 29.48, 29.43, 29.37, 29.32, 29.15, 29.06, 28.93, 28.45, 28.25, 26.91, 25.99, 12.61 ppm.

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, 25 °C, H₃PO₄): δ = -1.1 ppm.
HR-FAB-MS (NBA, Positivionenmodus): [M+H⁺] ber.: 1212.4398; [M+H⁺] gef.: 1212.4366.

Eingegangen am 28. Februar 2005,
veränderte Fassung am 9. Juli 2005
Online veröffentlicht am 2. Dezember 2005

Stichwörter: Bioorganische Chemie · Fluoreszenzsonden · FRET (Resonanter Fluoreszenzenergietausch) · Phospholipide · Signaltransduktion

[1] J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting, R. Y. Tsien, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 906–918.

- [2] F. S. Wouters, P. J. Verveer, P. I. H. Bastiaens, *Trends Cell Biol.* **2001**, 11, 203–211.
- [3] A. Miyawaki, A. Sawano, T. Kogure, *Nat. Cell Biol.* **2003**, 5, S1–S7.
- [4] N. Johnsson, K. Johnsson, *ChemBioChem* **2003**, 4, 803–810.
- [5] G. Zlokarnik, P. A. Negulescu, T. E. Knapp, L. Mere, N. Burres, L. X. Feng, M. Whitney, K. Römer, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, 279, 84–88.
- [6] H. S. Hendrickson, *Anal. Biochem.* **1994**, 219, 1–8.
- [7] H. S. Hendrickson, E. K. Hendrickson, I. D. Johnson, S. A. Farber, *Anal. Biochem.* **1999**, 276, 27–35.
- [8] I. Kudo, M. Murakami, *Prostaglandins Other Lipid Mediators* **2002**, 68–69, 383–399.
- [9] C. D. Funk, *Science* **2001**, 294, 1871–1875.
- [10] S. Das, W. Cho, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 23838–23846.
- [11] S. Grewal, S. Ponnambalam, J. H. Walker, *J. Cell Sci.* **2003**, 116, 2303–2310.
- [12] J. H. Evans, D. M. Spencer, A. Zweifach, C. C. Leslie, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 30150–30160.
- [13] S. Benzarria, H. Pelicano, R. Johnson, G. Maury, J. L. Imbach, A. M. Aubertin, G. Obert, G. Gosselin, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 4958–4965.
- [14] M. S. J. Briggs, I. Bruce, J. N. Miller, C. J. Moody, A. C. Simmonds, E. Swann, *Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 1051–1058.
- [15] S. A. Farber, E. S. Olson, J. D. Clark, M. E. Halpern, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 19338.
- [16] O. Wichmann, C. Schultz, *Chem. Commun.* **2001**, 2500–2501.
- [17] M. Shafiee, S. Deferme, A. L. Villard, D. Egron, G. Gosselin, J. L. Imbach, T. Lioux, A. Pompon, S. Varay, A. M. Aubertin, G. Van den Mooter, R. Kinget, C. Perigaud, P. Augustijns, *J. Pharm. Sci.* **2001**, 90, 448–463.
- [18] C. Dinkel, O. Wichmann, C. Schultz, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 1153–1155.
- [19] C. Schultz, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 885–898.
- [20] Y. A. Hannun, C. R. Loomis, R. M. Bell, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 10039–10043.
- [21] H. Du, R. C. A. Fuh, J. Z. Li, L. A. Corkan, J. S. Lindsey, *Photochem. Photobiol.* **1998**, 68, 141–142.
- [22] A. Matsuzawa, K. Hattori, J. Aoki, H. Arai, K. Inoue, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 32315–32320.
- [23] K. Asai, T. Hirabayashi, T. Houjou, N. Uozumi, R. Taguchi, T. Shimizu, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 8809–8814.
- [24] J. Balsinde, E. A. Dennis, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 6758–6765.
- [25] J. Balsinde, I. D. Bianco, E. J. Ackermann, K. Condefriboes, E. A. Dennis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 8527–8531.
- [26] M. A. Balboa, I. Varela-Nieto, K. K. Lucas, E. A. Dennis, *FEBS Lett.* **2002**, 531, 12–17.
- [27] S. A. Farber, M. Pack, S. Y. Ho, L. D. Johnson, D. S. Wagner, R. Dosch, M. C. Mullins, H. S. Hendrickson, E. K. Hendrickson, M. E. Halpern, *Science* **2001**, 292, 1385–1388.
- [28] T. Inoue, A. Sugimoto, Y. Suzuki, M. Yamamoto, M. Tsujimoto, K. Inoue, J. Aoki, H. Arai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 13233–13238.
- [29] C. Dinkel, C. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse.