

Fluoreszenzsonden zum Nachweis von Schwefelwasserstoff in biologischen Systemen**

Weimin Xuan, Chunquan Sheng,* Yanting Cao, Wenhan He und Wei Wang*

Azide · Fluorescein · Fluoreszenzsonden · Schwefelwasserstoff · Rhodamin

Schwefelwasserstoff kennt man als toxisches Gas mit dem unangenehmen Geruch von faulen Eiern. Dies ändert jedoch nichts an der Tatsache, dass es auch im menschlichen Körper und in anderen biologischen Systemen vorkommt, und zwar mit einer typischen Konzentration von $10\text{--}100\text{ }\mu\text{m}$ im Blut.^[1] Dies lässt auf eine biologische Funktion schließen. So gilt H_2S inzwischen neben Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenmonoxid (CO) als drittes gasförmiges Signalmolekül im Körper.^[2] Dass dem endogen produzierten Schwefelwasserstoff eine große Bedeutung zukommt, wurde in einer Reihe von physiologischen und pathologischen Prozessen wie der Regulierung des Zellwachstums,^[3] dem kardiovaskulären Schutz,^[4] der Stimulierung der Angiogenese^[5] und im Zusammenhang mit antioxidativen Effekten aufgeklärt.^[6] Eine Deregulierung von H_2S wurde dagegen mit verschiedenen Symptomen wie der Alzheimer-Krankheit,^[7] dem Down-Syndrom,^[8] Diabetes^[9] und Leberzirrhose^[10] in Verbindung gebracht. Weil wir von einem genauen Verständnis der biologischen Funktionen enorm profitieren würden, findet die jüngere Forschung an H_2S derzeit große Beachtung.^[11] Dementsprechend wertvoll sind daher empfindliche und selektive Methoden, mit denen die Verteilung und die Funktion von H_2S in komplizierten biologischen Systemen erfasst werden können.

Zu den derzeit verfügbaren Nachweismethoden für H_2S gehören kolorimetrische,^[12] elektrochemische^[13] und gaschromatographische Verfahren.^[14] Diese sind jedoch nicht auf eine zeitliche und räumliche Nachverfolgung von reaktivem

und kurzlebigem H_2S ausgelegt; zudem erfordern sie eine langwierige und komplizierte Probenvorbereitung. Bildgebende Fluoreszenzverfahren standen wegen ihrer hohen Empfindlichkeit und der Möglichkeit zur Echtzeitbeobachtung deshalb ganz oben auf der Wunschliste, aber bis vor Kurzem wurde noch keine entsprechende Fluoreszenzsonde entwickelt (eine bereits beschriebene Sonde konnte die Anforderungen bei Weitem nicht erfüllen^[15]). Nun haben drei Forschungsgruppen um Chang,^[16] Wang^[17] und Xian^[18] unabhängig voneinander und nahezu zeitgleich wichtige neue Ergebnisse veröffentlicht, zu denen dieses Highlight eine Zusammenfassung geben wird.^[19,20]

Die Funktionsweise der drei Sonden beruht auf einer Veränderung ihrer Fluoreszenzeigenschaften (z. B. der Intensität) entweder durch Reduktion mit H_2S oder durch eine nukleophile Reaktion mit H_2S . In den ersten beiden Ansätzen^[16,17] reduziert H_2S jeweils ein mit einem Fluorophor verbundenes Azid zu einem Amin und löst so einen Fluoreszenzanstieg aus. Chang und Mitarbeiter verwenden als Sonde ein mit einer Azidgruppe maskiertes Rhodaminanalogon, das in der Form mit geschlossenem Lactonring nicht fluoresziert (Schema 1).^[16] In der Gegenwart von H_2S wird das Azid selektiv und unter gleichzeitiger Öffnung des Lactonrings zum Amin reduziert, wodurch eine stark fluoreszierende konjugierte Form entsteht. Eine *tert*-Butoxycarbonyl(Boc)-Gruppe oder ein Morphilincarbamat schützt die zweite Aminogruppe dieses Rhodaminderivats. Durch dieses bildgebende Verfahren kann H_2S in wässriger Lösung und in lebenden Zellen

[*] W.-M. Xuan, Y.-T. Cao, W.-H. He, Prof. Dr. W. Wang

Department of Chemistry & Chemical Biology

University of New Mexico

MSC03 2060, Albuquerque, NM 87131-0001 (USA)

E-Mail: wwang@unm.edu

Prof. Dr. C.-Q. Sheng

Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy

Second Military Medical University

325 Guohe Road, Shanghai 200433 (China)

E-Mail: shengcq@hotmail.com

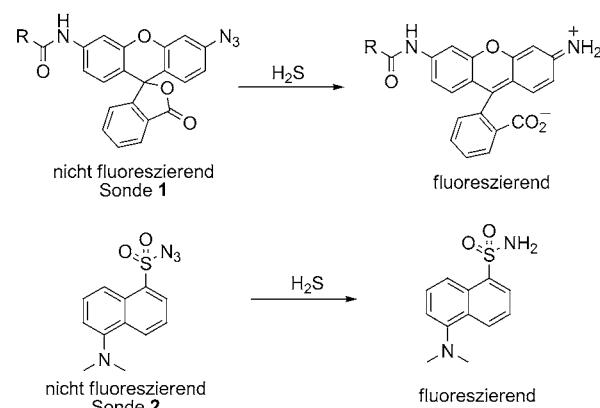
Prof. Dr. W. Wang

School of Pharmacy

East China University of Science & Technology

130 Mei-Long Road, Shanghai 200237 (China)

[**] Wir danken der National Science Foundation (CHE-1057569), dem China 111 Project (Grant B07023) und der East China University of Science & Technology für die finanzielle Unterstützung unserer Forschungsarbeiten.

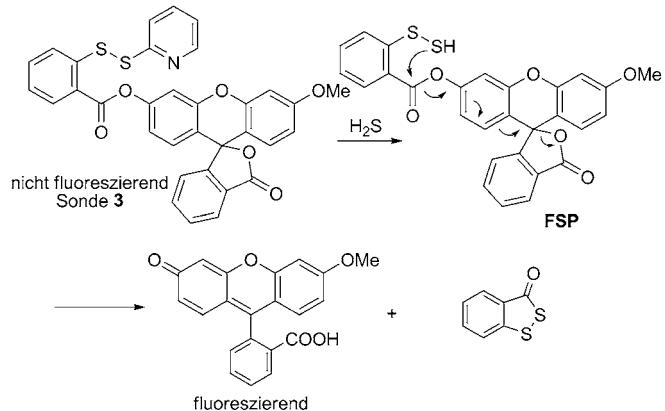


Schema 1. Azid-maskierte Fluorophore als Sonden für H_2S .

nachgewiesen werden. In vitro ließen sich noch H_2S -Konzentrationen bis zu 5–10 μM detektieren. Nachteilig ist jedoch zum einen die Zeitdauer von einer Stunde, die bis Erreichen der maximalen Fluoreszenz benötigt wird. Echtzeitmessungen von H_2S könnten daher problematisch werden, denn das Molekül wird sehr rasch metabolisiert. Zum anderen können bei Messungen über eine längere Zeit hinweg auch andere reaktive Spezies mit dem Azid reagieren, was sich deutlich auf die Selektivität auswirkt. So spricht die Sonde z. B. auch auf Superoxid (O_2^-) an. Durch Modifizierungen an der Sonde könnte jedoch ein nützliches bildgebendes System entwickelt werden, das auch in der Praxis anwendbar ist.

Nahezu zeitgleich berichteten Wang und Mitarbeiter von einer interessanten Sonde zum Nachweis von H_2S , deren Wirkungsprinzip ebenfalls die Reduktion eines Azids zu einem Amin ist (Schema 1),^[17] nur dass sich hier die Azideinheit direkt an der Sulfonylgruppe eines Dansylfluorophors befindet. Das Dansylazid selbst fluoresziert nicht. Während des Nachweises wandelt H_2S selektiv und hochspezifisch **2** in das stark fluoreszierende Dansylsulfonamid um (Schema 1). Bemerkenswert ist, dass die Sonde nicht mit anderen gängigen Biothiolen wie Cystein und Glutathion reagiert. Weder kommt es zu Austauschreaktionen mit Aminogruppen oder anderen nucleophilen Anionen, noch wird die Sonde von reduzierenden Spezies angegriffen, selbst bei hohen Konzentrationen (1.0 mM). Zudem ist der Fluoreszenzanstieg beträchtlich. Bei 25 μM H_2S wird in phosphatgepufferter Lösung eine 40-fache Verstärkung der Fluoreszenz beobachtet. Die Sonde erfasst H_2S bis hinunter zu Konzentrationen von 1 μM mit messbarer Änderung der Fluoreszenzintensität (bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1). Anders als **1** reagiert **2** auf H_2S prompt. In Rinderserum wurde bei 30 μM H_2S eine maximale Fluoreszenzverstärkung innerhalb von Sekunden beobachtet. Grund für die hohe Geschwindigkeit ist wahrscheinlich eine Verringerung der Elektronendichte am Azid durch die benachbarte, elektronenziehende Sulfonylgruppe, die die Reaktivität gegen H_2S erhöht. Zwischen der Verstärkung des Fluoreszenzsignals und der Konzentration von H_2S besteht zudem eine gute Linearität sowohl in Pufferlösung als auch in Rinderserum. In beeindruckender Weise wies die Sonde die H_2S -Konzentration in Mausblut quantitativ und in guter Übereinstimmung des Ergebnisses [$(31.9 \pm 9.4) \mu\text{M}$] mit Daten aus anderen Methoden nach.^[20] Diese Merkmale und dazu die einfache Probenvorbereitung machen die Sonde für die Bestimmung der Verteilung und Funktion von H_2S in biologischen Systemen sehr interessant. Das Potenzial für praktische Anwendungen ist enorm.

Die dritte Sonde (**3**; Schema 2), die von Xian und Mitarbeitern entwickelt wurde, folgt in ihrer Funktionsweise einem anderen Reaktionsmechanismus.^[18] Bei diesem Verfahren



Schema 2. Wirkungsweise einer H_2S -Sonde durch Demaskierung von Fluorescein mit H_2S .

wird H_2S als Nukleophil eingesetzt, um eine S-S-Pyridin-Einheit mit einer S-SH-Gruppe zu substituieren. Durch Cyclisierung entsteht anschließend ein fluoreszierendes Molekül. In Schema 2 ist der Fluorescein-Fluorophor dargestellt, der durch eine Esterfunktion mit benachbarter Disulfidbrücke maskiert ist und in dieser Form nicht fluoresziert. Durch nukleophile Substitution von H_2S an der Disulfidbindung entsteht eine Zwischenstufe, die spontan unter Spaltung des Esters und Freisetzung von Fluorescein cyclisiert. Zwischen der Fluoreszenzintensität und der H_2S -Konzentration (sofern diese $< 10 \mu\text{M}$ ist) besteht eine gute Linearität. Die Sonde **3** wurde bereits zum Nachweis von H_2S in komplexen biologischen Medien wie Rinderblutplasma und zur Visualisierung von H_2S in lebenden Zellen eingesetzt. Leider wurden aber mit **3** keine Experimente durchgeführt, um endogen produziertes H_2S räumlich und zeitlich nachzuverfolgen. Gründe hierfür sind wahrscheinlich die begrenzte Empfindlichkeit und die eher lange Reaktionszeit (eine Stunde bis zum Erreichen der maximalen Fluoreszenzintensität). Ein ganz wesentlicher Nachteil bei diesem System sind auch Nebenreaktionen von Biothiolen (Cysteinderivaten) mit **3**. Durch ähnliche nukleophile Substitutionen bilden sich Nebenprodukte, die zwar selbst nicht fluoreszieren, aber kompetitiv zu H_2S mit **3** reagieren. Damit sinkt die Empfindlichkeit, und zum Erreichen des gewünschten Signals muss die Konzentration von **3** erhöht werden. Außerdem kann in biologischen Systemen die Labilität der Esterbindung, die von Proteasen und Esterasen ebenfalls unter Bildung von Fluorescein gespalten wird, zu einem starken Hintergrundrauschen führen. Letztlich setzt also die Komplexität der nukleophilen Substitution die Empfindlichkeit von **3** herab. In Tabelle 1 sind die Ei-

Tabelle 1: Fluoreszenzsonden zum Nachweis von H_2S .^[a]

Sonde	Mechanismus, Zeit	Medium, Nachweisgrenze	Fluoreszenzverstärkung	Nachweis in lebenden Zellen	Nachweis von endogenem H_2S
1	Reduktion von Azid, 1 h	HEPES, 5–10 μM	7–9-fach bei 100 μM	ja	nein
2	Reduktion von Azid, Sekunden	Rinderserum, 1 μM	40-fach bei 100 μM	N/A	ja
3	nukleophile Substitution, 1 h	PBS/MeCN, ca. 2.5 μM	55–77-fach bei 50 μM	ja	nein

[a] HEPES = 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure, N/A = keine Angabe, PBS = phosphatgepufferte Kochsalzlösung.

genschaften der Fluoreszenzsonden **1–3** einander gegenübergestellt.

Diese drei Studien haben Möglichkeiten aufgezeigt, H_2S durch Fluoreszenz nachzuweisen. Wichtiger noch als der bloße Nachweis von H_2S ist jedoch die Aussicht, mit den neuen Techniken die biomedizinischen Funktionen und Eigenschaften von H_2S in biologischen Systemen zu untersuchen. Es darf erwartet werden, dass ausgehend von den hier beschriebenen Strategien bald neue und verbesserte Sonden für spezifische Forschungszwecke und praktische Anwendungen entwickelt werden.

Eingegangen am 4. Oktober 2011,
veränderte Fassung am 10. November 2011
Online veröffentlicht am 25. Januar 2012

- [1] a) R. Hyšpler, A. Ticha, M. Indrova, Z. Zadak, L. Hysplerova, J. Gasparic, J. Churacek, *J. Chromatogr. B* **2002**, *770*, 255; b) Y.-H. Chen, W.-Z. Yao, B. Geng, Y.-L. Ding, M. Lu, M.-W. Zhao, C.-S. Tang, *Chest* **2005**, *128*, 3205; c) H. Jiang, H. Wu, Z. Li, B. Geng, C. Tang, *J. First Mil. Med. Univ.* **2005**, *25*, 951; d) L. Li, M. Bhatia, Y. Z. Zhu, R. D. Ramnath, Z. J. Wang, F. B. M. Anuar, M. Whiteman, M. Salto-Tellez, P. K. Moore, *FASEB J.* **2005**, *19*, 1196; e) L. R. Goodwin, D. Francom, F. P. Dieken, J. D. Taylor, M. W. Warenciak, R. J. Reiffenstein, G. Dowling, *J. Anal. Toxicol.* **1989**, *13*, 105; f) J. C. Savage, D. H. Gould, *J. Chromatogr. Biomed.* **1990**, *526*, 540.
- [2] a) C. Szabó, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 917; b) E. Lowicka, J. Beltowski, *Pharmacol. Rep.* **2007**, *59*, 4; c) L. Li, P. Rose, P. K. Moore, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2011**, *51*, 169.
- [3] R. Baskar, J. Bian, *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *656*, 5.
- [4] a) D. J. Lefer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17907; b) G. Szabó, G. Veres, T. Radovits, D. Gerö, K. Módus, C. Miesel-Gröschel, F. Horkay, M. Karck, C. Szabó, *Nitric Oxide* **2011**, *25*, 201.
- [5] A. Papapetropoulos, A. Pyriochou, Z. Altaany, G. Yang, A. Marazioti, Z. Zhou, M. G. Jeschke, L. K. Branski, D. N. Hemandon, R. Wang, C. Szabó, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 21972.
- [6] C. Yang, Z. Yang, M. Zhang, Q. Dong, X. Wang, A. Lan, F. Zeng, P. Chen, C. Wang, J. Feng, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21971.
- [7] K. Eto, T. Asada, K. Arima, T. Makifuchi, H. Kimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293*, 1485.
- [8] P. Kamoun, M.-C. Belardinelli, A. Chabli, K. Lallouche, B. Chadeaux-Vekemans, *Am. J. Med. Genet. Part A* **2003**, *116*, 310.
- [9] W. Yang, G. Yang, X. Jia, L. Wu, R. Wang, *J. Physiol.* **2005**, *569*, 519.
- [10] S. Fiorucci, E. Antonelli, A. Mencarelli, S. Orlandi, B. Renga, G. Rizzo, E. Distrutti, V. Shah, A. Morelli, *Hepatology* **2005**, *42*, 539.
- [11] a) R. Wang, *FASEB J.* **2002**, *16*, 1792; b) P. K. Moore, M. Bhatia, S. Moochhala, *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 609; c) E. Blackstone, M. Morrison, M. B. Roth, *Science* **2005**, *308*, 518; d) A. Martelli, L. Testai, M. C. Breschi, C. Blandizzi, A. Virdis, S. Tedde, V. Calderone, *Med. Res. Rev.* **2011**, DOI: 10.1002/med.20234.
- [12] a) W. Lei, P. K. Dasgupta, *Anal. Chim. Acta* **1989**, *226*, 165; b) D. Jiménez, R. Martínez-Manez, F. Sancenón, J. V. Ros-Lis, A. Benito, J. Soto, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9000; c) M. N. Hughes, M. N. Centelles, K. P. Moore, *Free Radical Biol. Med.* **2009**, *47*, 1346.
- [13] a) C. J. Richardson, E. A. M. Magee, J. H. Cummings, *Clin. Chim. Acta* **2000**, *293*, 115; b) D. G. Searcy, M. A. Peterson, *Anal. Biochem.* **2004**, *324*, 269; c) J. E. Doeller, T. S. Isbell, G. Benavides, J. Koenitzer, H. Patel, R. P. Patel, J. R. Lancaster, V. M. Darley-Usmar, D. W. Kraus, *Anal. Biochem.* **2005**, *341*, 40.
- [14] a) J. Radford-Knoery, G. A. Cutter, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 976; b) P. R. Bérubé, P. D. Parkinson, E. R. Hall, *J. Chromatogr. A* **1999**, *830*, 485.
- [15] Diese Sonde für H_2S funktioniert durch Fluoreszenzlösung von kationischen Derivaten von 6-Methoxychinolin und Acridin mit Schwermetallkationen und H_2S : O. S. Wolfbeis, W. Trettnak, *Spectrochim. Acta A* **1987**, *43*, 405.
- [16] A. R. Lippert, E. J. New, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10078.
- [17] H. Peng, Y. Cheng, C. Dai, A. L. King, B. L. Predmore, D. J. Lefer, B. Wang, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9846; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9672.
- [18] C. Liu, J. Pan, S. Li, Y. Zhao, L. Y. Wu, C. E. Berkman, A. R. Whorton, M. Xian, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10511; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10327.
- [19] Nachdem dieses Highlight zur Veröffentlichung angenommen wurde, wurden zwei neue Fluoreszenzsonden für H_2S beschrieben: a) Y. Qian, J. Karpus, O. Kabil, S.-Y. Zhang, H.-L. Zhu, R. Banerjee, J. Zhao, C. He, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 495; b) K. Sasakura, K. Hanaoka, N. Shibuya, Y. Mikami, Y. Kimura, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, H. Kimura, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18003.
- [20] L. Li, M. Bhatia, Y. Z. Zhu, Y. C. Zhu, R. D. Ramnath, Z. J. Wang, F. B. M. Anuar, M. Whiteman, M. Salto-Tellez, P. K. Moore, *FASEB J.* **2005**, *19*, 1196.