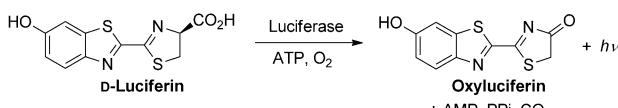


D-Luciferinanaloga: eine vielfarbige Palette für die Biolumineszenzbildgebung**

Yuan-Qiang Sun, Jing Liu, Pi Wang, Jingyu Zhang und Wei Guo*

Luciferasen · Luciferine · Lumineszenz ·
Mehrfarbenbildgebung

Das Leuchten der Glühwürmchen ist ein wunderschönes Beispiel für die Biolumineszenz, die Umwandlung chemischer Energie durch einen lebenden Organismus in Licht. Die Glühwürmchen-Luciferase (Fluc) macht sich die chemische Energie von ATP und Sauerstoff zunutze, um ihr Substrat, D-Luciferin, in angeregtes Oxyluciferin zu überführen. Beim Übergang dieses Moleküls in den Grundzustand wird ein Photon im gelbgrünen Lichtbereich emittiert (Schema 1).^[1]



Schema 1. Bei der Luciferase-katalysierten Oxidation von D-Luciferin wird sichtbares Licht abgegeben. Die Lichtemission erfolgt aus dem angeregten Zustand von Oxyluciferin.

Da Zellen und Gewebe normalerweise keine signifikanten Mengen sichtbarer Photonen emittieren, ist das Signal-Rausch-Verhältnis bei der Biolumineszenz außerordentlich hoch, wodurch sie sich für empfindliche Bildgebungsanwendungen empfiehlt.^[2] In der Tat ist die Biolumineszenz eine der beliebtesten Methoden zur Visualisierung biologischer Prozesse *in vitro*, in lebenden Zellen und in gesamten Organismen.^[3] Die nichtinvasive Biolumineszenzbildgebung in lebenden Organismen wurde beispielsweise zu einer Standardtechnik in der biologischen Krebsforschung zur Beobachtung von Genexpression, Gentransfers, Tumorwachstum, Enzymaktivität, Reaktionen auf neuartige medikamentöse Behandlungen und Protein-Protein-Wechselwirkungen.^[2,4]

Obwohl die Biolumineszenz eine bemerkenswerte Vielseitigkeit aufweist, kann sie bislang nur auf jeweils einen Zelltyp oder eine biologische Eigenschaft angewendet werden. Diese Einschränkung ergibt sich aus der Tatsache, dass nur einige wenige Luciferasen für die biologische Forschung

geeignet sind; erschwerend kommt hinzu, dass fast alle diese Luciferasen auf demselben Substrat basieren (D-Luciferin). Um diese Einschränkungen zu überwinden, braucht es eine große Auswahl lichtemittierender Luciferine mit unterschiedlichen Biolumineszenz-Wellenlängen. Zugleich wären Luciferinanaloga, die im Fern- bis Nah-IR-Bereich (>600 nm) emittieren und somit Lichtabsorption und Lichtstreuung durch das Gewebe verhindern, für Tiefengewebeanalysen sehr nützlich. Die Arbeitsgruppen von Miller,^[5] Moerner^[6] und Prescher^[7] legten jüngst unabhängig voneinander Studien über Alkylaminoluciferine, Aminoselenoluciferin und Luciferine mit Benzimidazolgerüst vor. Die drei Klassen von Luciferinanaloga wurden durch einfache Veränderungen des Hydroxyrests oder des Schwefelatoms im ursprünglichen D-Luciferin erhalten (Abbildung 1). Dabei

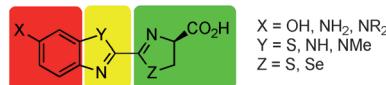


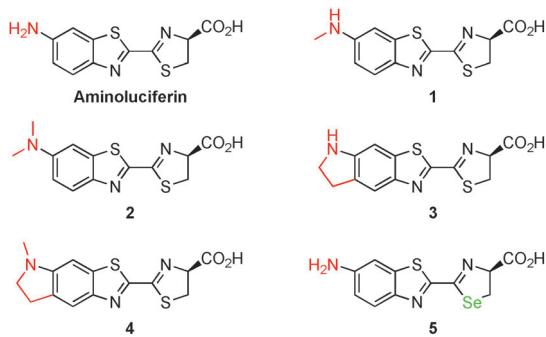
Abbildung 1. Die Komponenten der Luciferinanaloga.

wurde auf Erfahrungen aus der Entwicklung von Fluoreszenzfarbstoffen zurückgegriffen.^[8] Die drei Analoga weisen sowohl ausgezeichnete Biolumineszenzeigenschaften als auch ein enormes Potenzial für die Biolumineszenzbildgebung auf. Im Folgenden werden diese wichtigen Erkenntnisse zusammengefasst.

Obwohl an Aminoluciferinen erst in den letzten Jahren aktiv geforscht wurde, haben White, McElroy et al. schon 1966 festgestellt, dass die 6'-Hydroxygruppe von D-Luciferin durch eine Aminogruppe ersetzt werden kann.^[9] Aminoluciferin emittiert mit der Glühwürmchen-Wildtyp-Luciferase Licht bei einer größeren Wellenlänge als D-Luciferin (593 gegenüber 557 nm).^[10] Miller et al. entwickelten kürzlich auf diesem Konzept aufbauend vier Alkylaminoluciferine (**1–4**, Schema 2).^[5] Deren Emission mit der Glühwürmchen-Wildtyp-Luciferase ist noch weiter rotverschoben (Tabelle 1), allerdings ist damit eine signifikante Verringerung der Lichtleistung verbunden. Nach Meinung der Autoren ist die geringe Intensität der Lichtemission auf kinetische Gründe (geringerer enzymatischer Umsatz oder Produktinhibierung) oder auf eine inhärent geringere Effizienz der Lichterzeugung (geringere Quantenausbeute oder es wird kein Oxyluciferin

[*] Y.-Q. Sun, J. Liu, P. Wang, J. Zhang, Prof. W. Guo
School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University
92 Wucheng Road, Taiyuan 030006 (China)
E-Mail: guow@sxu.edu.cn

[**] Die Autoren danken für die finanzielle Unterstützung ihrer Forschungstätigkeit durch die Natural Science Foundation of China (Nr. 21172137).



Schema 2. Strukturen von Aminoluciferin und den Luciferinanalogen 2–5.

Tabelle 1: Emissionsmaxima der Luciferinsubstrate mit Wildtyp-Luciferase und Ultra-Glo sowie ihre Anwendung in der Biolumineszenzbildgebung.

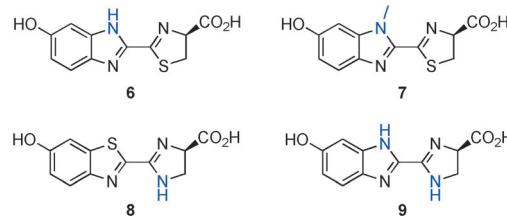
Substrat	λ_{max} [nm] Wildtyp	Detektion in vivo
	Ultra-Glo	
d-Luciferin	557	ja
Aminoluciferin	594	ja
1	609	nein
2	623	nein
3	599	nein
4	607	nein
5	600	nicht bestimmt
6	578	nicht bestimmt
7	460	nicht bestimmt

erzeugt) oder auf beides zurückzuführen. Mit Ultra-Glo-Luciferase (einer stark mutierten Luciferase-Form, die entworfen wurde, um eine höhere Stabilität und Widerstandsfähigkeit gegenüber Inhibition während Hochdurchsatzverfahren zu erreichen) in P450-Glo-Puffer wiesen **3** und **4** allerdings eine drastisch erhöhte Leistung über einen weiten Konzentrationsbereich (1–100 μM) auf.^[5] Beispielsweise emittierte **3**, bei einer Konzentration von 1 μM , 5.7-mal so viel Licht wie Aminoluciferin und 3.2-mal so viel wie d-Luciferin. Leider ist Ultra-Glo aber nicht als genetisches Konstrukt erhältlich, das in lebende Organismen zur Biolumineszenzbildgebung eingeführt werden könnte.

Durch Kombination des Elektronendonoreffekts einer Aminogruppe mit dem polaren Effekt eines Selenatoms^[11] gelangten Moerner et al. zu einem Selen-Analogon von d-Luciferin (**5**, Schema 2) mit einer relativ zum Schwefel-Analogon rotverschobenen Biolumineszenz.^[6] In Gegenwart von ATP, Mg^{2+} und Sauerstoff emittiert **5** mit gereinigtem nativem Fluc ein rotes Biolumineszenzsignal. Dieses Signal kann problemlos vom gelbgrünen Biolumineszenzsignal von d-Luciferin und vom orangefarbenen Biolumineszenzsignal von Aminoluciferin unterschieden werden. Der Anteil integrierter Biolumineszenzemission über 600 nm (ein wichtiges Kriterium für das Durchdringen von Gewebe bei der In-vivo-Biolumineszenzbildgebung) beträgt 55 % für **5** und ist damit höher als für d-Luciferin und Aminoluciferin (23 % bzw. 41 %). Das Analogon **5** wurde zur Biolumineszenzbildgebung in humanen Brustadenokarzinomzellen (MDA-MB-468) und

in Nacktmäusen mit einer subkutanen xenotransplantierten Tumorzelllinie (MDA-MB-468) verwendet, die beide FLuc konstitutiv exprimieren.

Jüngst haben Prescher et al. zwei Arten von Luciferinanaloga beschrieben, die Luciferine **6** und **7** mit Benzimidazolgerüst sowie **8** und **9** mit Imidazolingerüst, in denen die Benzothiazol- oder die Thiazolineinheit von d-Luciferin durch eine Benzimidazol- bzw. Imidazolineinheit ersetzt ist (Schema 3).^[7] Werden **6** und **7** bei pH 7.4 mit dem Enzym,



Schema 3. Strukturen der Luciferinanaloge **6–9**.

ATP und Coenzym A (um die Produktinhibierung zu verringern) inkubiert, resultiert eine starke Emission. Dagegen wurde keine Lichtemission bei **8** und nur eine sehr geringe bei **9** beobachtet. Dies kann auf eine schlechte Bindung an Fluc, eine geringere Effizienz bei der Lichterzeugung oder eine Kombination dieser beiden sowie weiterer Faktoren zurückgeführt werden. Es ist bemerkenswert, dass **7** unter den bekannten Fluc-Substraten die intensivste Blaulichtemission aufweist, was darauf hindeutet, dass sich **7** als nützlich in Mehrkomponentenbildgebungsverfahren erweisen könnte, da seine Emission problemlos von denen anderer Luciferine durch den Einsatz geeigneter Filter unterschieden werden kann. Experimente in Fluc exprimierenden HEK-293-Zellen ergaben, dass die Benzimidazolgerüste ausreichend kompatibel für bildgebende Untersuchungen an Zellen sind.

Während die oben erwähnten hydroxy- oder aminosubstituierten Luciferinanalogon starke Emittoren sind, wurde kein Licht emittiert, sobald die 6'-Hydroxy- bzw. 6'-Aminogruppe durch Methoxy-, Ethoxy- oder N-Acetylaminogruppen ersetzt war.^[12] Diese Befunde ermöglichen die einfache Entwicklung einer Vielzahl von Anschalt-Biolumineszenzsonden.

Abbildung 2 zeigt den allgemeinen Aufbau einer Anschalt-Biolumineszenzsonde. Durch die Modifizierung von (Amino)luciferin mit einem Schalter an der 6'-Hydroxy- oder 6'-Aminogruppe wird die Lichtemission unterbunden. Sobald der Schalter entfernt wird, steht (Amino)luciferin für Folgereaktionen mit Glühwürmchen-Luciferase zur Verfügung, und ein Photon wird erzeugt. Dieser Ansatz sollte es er-

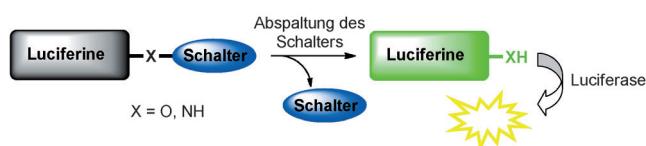


Abbildung 2. Allgemeiner Mechanismus modularer Anschalt-Biolumineszenzsonden.

möglichen, mithilfe der Erfahrungen aus der Entwicklung von Fluoreszenzsonden nützliche Biolumineszenzsonden zu erhalten.^[13] So berichteten die Gruppen von Kindermann,^[14a] Rao^[14b] und Chang^[14c] unabhängig voneinander über luciferinbasierte Biolumineszenzsonden zur Abbildung der Caspase-1-Aktivität, der β-Lactamase-Aktivität bzw. der Wasserstoffperoxiderezeugung.

Neben der oben erwähnten einfachen Auswechslung einzelner Atome des ursprünglichen D-Luciferins bietet der Ersatz des gesamten Benzothiazolkerns von D-Luciferin durch eine Chinolin-, Naphthalin- oder Cumarineinheit einen alternativen Weg zu Luciferinanalogen.^[15a] In einer 2010 veröffentlichten Arbeit berichten Nagano et al. über eine Klasse von Luciferinanalogen, die eine Aminogruppe an ihrem Benzothiazol-, Chinolin-, Naphthalin- oder Cumaringerüst tragen.^[15b] Diese Analoga emittieren Biolumineszenz in unterschiedlichen Farben: rot, orange, gelb und grün. Die Autoren verwendeten eines dieser Analoga, Cumarylaminoluciferin, als energielieferndes Substrat und das gelb fluoreszierende Protein (YFP) als energieaufnehmendes Fluorophor, um ein Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer(BRET)-System mit der roten Luciferase des Schnellkäfers (CBRluc) zu schaffen, wobei ein deutlich bimodales Bioluminesenzspektrum erhalten wurde.

In diesem Highlight fassten wir die jüngsten Fortschritte bei stark emittierenden Luciferinanalogen zusammen. Diese Analoga dürften bei der Entwicklung von Biolumineszenzsonden für eine Vielzahl biologischer Anwendungen, wie der Detektion wichtiger Spezies und der Abbildung biologisch wichtiger Prozesse, zum Einsatz kommen.

Eingegangen am 9. Mai 2012

Online veröffentlicht am 13. Juli 2012

- [1] a) H. Fraga, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 146; b) V. R. Viviani, F. G. C. Arnoldi, A. J. S. Neto, T. L. Oehlmeyer, E. J. H. Bechara, Y. Ohmiya, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 159.
- [2] R. S. Dothager, K. Flentie, B. Moss, M.-H. Pan, A. Kesarwala, D. Piwnica-Worms, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, *20*, 45.
- [3] a) C. H. Contag, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2007**, *2*, 277; b) J. A. Prescher, C. H. Contag, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 80.

- [4] a) C. T. Chan, R. Paulmurugan, O. S. Gheysens, J. Kim, G. Chiosis, S. S. Gambhir, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 216; b) C. H. Contag, M. H. Bachmann, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2002**, *4*, 235; c) A. Dragulescu-Andrasi, C. T. Chan, A. De, T. F. Massoud, S. S. Gambhir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 12060; d) A. Dragulescu-Andrasi, G. Liang, J. Rao, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1660.
- [5] G. R. Reddy, W. C. Thompson, S. C. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13586.
- [6] N. R. Conley, A. Dragulescu-Andrasi, J. Rao, W. E. Moerner, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 3406; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3350.
- [7] D. C. McCutcheon, M. A. Paley, R. C. Steinhardt, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7604.
- [8] M. Sauer, J. Hofkens, J. Enderlein, *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*, Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, S. 35–48.
- [9] E. H. White, H. Wörther, H. H. Seliger, W. D. McElroy, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 2015.
- [10] R. Shinde, J. Perkins, C. H. Contag, *Biochemistry* **2006**, *45*, 11103.
- [11] a) M. R. Detty, P. N. Prasad, D. J. Donnelly, T. Ohulchanskyy, S. L. Gibson, R. Hilf, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2537; b) B. Calitree, D. J. Donnelly, J. J. Holt, M. K. Gannon, C. L. Nygren, D. K. Sukumaran, J. Autschbach, M. R. Detty, *Organometallics* **2007**, *26*, 6248.
- [12] J. L. Denburg, R. T. Lee, W. D. McElroy, *Arch. Biochem. Biophys.* **1969**, *134*, 381.
- [13] a) M. Kamiya, Y. Urano, N. Ebata, M. Yamamoto, J. Kosuge, T. Nagano, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5575; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5439; b) L. Cui, Y. Zhong, W. Zhu, Y. Xu, Q. Du, X. Wang, X. Qian, Y. Xiao, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 928; c) A. R. Lippert, E. J. New, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10078.
- [14] a) M. Kindermann, H. Roschitzki-Voser, D. Caglić, U. Repnik, C. Miniejew, P. R. E. Mittl, G. Kosec, M. G. Grüter, B. Turk, K. U. Wendt, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 999; b) H. Yao, M.-K. So, J. Rao, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7161; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7031; c) G. C. Van de Bittner, E. A. Dubikovskaya, C. R. Bertozzi, C. J. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 21316.
- [15] a) B. R. Branching, M. M. Hayward, S. Bamford, P. M. Brennan, E. J. Lajiness, *Photochem. Photobiol.* **1989**, *49*, 689; b) H. Takakura, K. Sasakura, T. Ueno, Y. Urano, T. Terai, K. Hanaoka, T. Tsuboi, T. Nagano, *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 2053.