



Hochauflöste Visualisierung des Golgi-Apparats in lebenden Zellen mit einem bioorthogonalen Ceramid**

Roman S. Erdmann, Hideo Takakura, Alexander D. Thompson, Felix Rivera-Molina, Edward S. Allgeyer, Joerg Bewersdorf, Derek Toomre* und Alanna Schepartz*

Abstract: Wir berichten über eine Lipid-basierte Strategie zur Visualisierung von Struktur und Dynamik des Golgi-Apparats in lebenden Zellen mithilfe hochauflösender Mikroskopie. Die Methode basiert auf zwei neuen Reagentien: einem *trans*-Cycloocten enthaltenden Ceramid-Lipid (Cer-TCO) und einem hoch reaktiven, Tetrazin-markierten Nah-IR-Farbstoff (SiR-Tz). Diese beiden Komponenten reagieren in einer extrem schnellen Tetrazin-Klick-Reaktion zu Cer-SiR, einer sehr photostabilen Verbindung, welche die Visualisierung des Golgi-Apparats sowohl mit 3D-Konfokalmikroskopie als auch mit hochauflösender Mikroskopie über eine längere Zeitspanne ermöglicht. Cer-SiR ist nicht toxisch bis zu einer Konzentration von 2 μ m und stört weder die Mobilität von Enzymen innerhalb des Golgi-Apparats noch den Transport von Fracht vom Endoplasmatischen Retikulum durch den Golgi-Apparat zur Plasmamembran.

Hochauflösende „Nanoskope“ können Lichtmikroskope in ihrem Auflösungsvermögen deutlich übertreffen, wodurch neue Details zur Struktur, Funktion und Dynamik von Organellen in lebenden Zellen aufgedeckt werden können.^[1] Die komplexen Anforderungen für Nanoskopie bringen jedoch einige Herausforderungen bezüglich Fluorophor-Design und Markierungsstrategie mit sich: Der Fluorophor muss hell, photostabil und kompatibel mit lebenden Zellen sein. Die Markierungsmethode muss zu einer hohen Fluorophordichte führen, die jedoch die Funktion des Organells nicht beeinflussen darf. Während Nanoskope eine Auflösung im

Bereich von einigen zehn Nanometern^[2] ermöglichen, gibt es immer noch einen wesentlichen Bedarf an Molekülen, welche die Grenzen der Organellen mit einer hohen Dichte markieren und eine genügende Photostabilität^[3] aufweisen, um Studien zur Dynamik der Organellen zu ermöglichen.^[4] Die meisten Nanoskopieanwendungen beruhen auf markierten Proteinen,^[5] allerdings bietet der Einsatz von Lipiden eine vielversprechende komplementäre Markierungsmöglichkeit,^[6] da Lipide ungefähr hundertmal häufiger vorkommen als Proteine und weil sie die tatsächlichen Grenzen eines Organells darstellen. Käufliche fluoreszierende Lipide wie BODIPY FL C₅-ceramide (BODIPY-Cer)^[7] sind zellgängig und wurden oft zur Markierung des Golgi-Apparats verwendet; sie bleichen jedoch bei Aufnahmen über eine längere Zeitspanne oder während hochauflösender Mikroskopie zu schnell aus. Photostabile Fluorophore wie die kommerziell erhältlichen Atto 647N und STAR 635,^[8] die typischerweise für STED-Mikroskopie (STED = stimulated emission depletion) verwendet werden, gehen oft nichtspezifische Wechselwirkungen ein^[9] oder sind nicht zellgängig und deshalb für die STED-Mikroskopie von intrazellulären Strukturen wie dem Golgi-Apparat in lebenden Zellen ungeeignet.

Hier berichten wir über eine Strategie zur hochauflösten Visualisierung der Golgi-Struktur und -Dynamik in lebenden Zellen mithilfe von neuen Lipid-basierten fluoreszierenden Molekülen als Kontrastmittel. Die Markierungsstrategie beruht auf zwei neuen Reagentien: einem *trans*-Cycloocten enthaltenden Ceramid-Lipid (Cer-TCO) und einem hoch reaktiven, Tetrazin-markierten Nah-IR-Farbstoff (SiR-Tz). Diese beiden Komponenten reagieren in einer extrem schnellen Tetrazin-Klick-Reaktion^[10] zu Cer-SiR, einem zellgängigen Farbstoff, dessen äußerst hohe Photostabilität Aufnahmen von lebenden Zellen über eine längere Zeit mithilfe von 3D-Konfokal- und STED-Mikroskopie ermöglicht (Abbildung 1). Cer-SiR ist nicht toxisch bis zu einer Konzentration von 2 μ m und stört weder die Mobilität von Enzymen innerhalb des Golgi-Apparats noch den Transport von Fracht vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch den Golgi-Apparat zur Zellmembran. Cer-TCO wurde in sechs Stufen synthetisiert, und SiR-Tz wurde in Analogie zu einer zuvor publizierten Synthese von SiR-Me-Tz hergestellt (Schema S1-2; S: Hintergrundinformationen).^[11]

Zur Untersuchung, ob der Golgi-Apparat selektiv mit Cer-SiR markiert werden kann, verwendeten wir eine stabile HeLa-Zelllinie, die das Fusionsprotein aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und *N*-Acetylgalactosaminyltransferase 2 (GalNAcT2) exprimiert (GalNAcT2 ist ein Transmembranprotein, das mit hoher Spezifität im Golgi-Apparat lokalisiert ist).^[12] Die Zellen wurden mit 2 μ m Cer-

[*] Dr. R. S. Erdmann,^[+] A. D. Thompson, Prof. Dr. A. Schepartz
Department of Chemistry, Yale University
225 Prospect Street, New Haven CT 06511 (USA)
E-Mail: alanna.schepartz@yale.edu
Dr. R. S. Erdmann,^[+] Dr. H. Takakura,^[+] Dr. E. S. Allgeyer,
Prof. Dr. J. Bewersdorf, Prof. Dr. D. Toomre
Department of Cell Biology
Yale University School of Medicine
333 Cedar Street, New Haven, CT 06520 (USA)
E-Mail: derek.toomre@yale.edu

[+] R.S.E. und H.T. haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] Diese Studie wurde von der Wellcome Trust Foundation und von den NIH GM83257 (A.D.T. and A.S.) unterstützt. R.S.E. wurde durch ein Stipendium des Schweizerischen Nationalfonds unterstützt. H.T. wurde durch ein JSPS postdoctoral fellowship for research abroad unterstützt. Wir bedanken uns bei Kai Johnsson (EPFL) für die Spende von SiR-OH und SiR-BG sowie bei Brian Storrie (UAMS) für die GalNAcT2-GFP-Zelllinie.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201403349> zu finden.

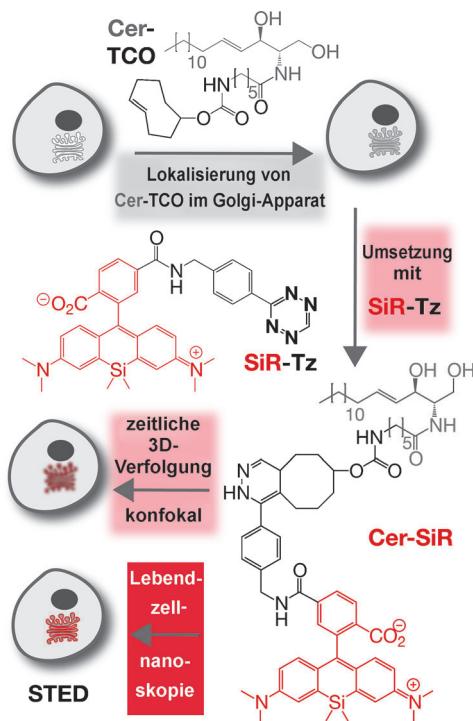


Abbildung 1. Zweistufige Markierung des Golgi-Apparats in lebenden Zellen mit hoher Dichte. Zellen werden mit Cer-TCO, einem *trans*-Cycloocten enthaltenden Ceramid-Lipid, behandelt und nachfolgend mit SiR-Tz, einem Tetrazinderivat eines sehr photostabilen Siliciumrhodaminfarbstoffes, umgesetzt. Cer-SiR, das Produkt der Reaktion (nur ein Isomer gezeigt), ermöglicht ausgiebige Visualisierungen mithilfe von 3D-Konfokal- und hochauflösender Mikroskopie.

TCO behandelt (5 min), 60 min bei 19.5 °C gehalten, um das Lipid im Golgi-Apparat anzureichern,^[13] nachfolgend 2 μM SiR-Tz (30 min) ausgesetzt und zuletzt mithilfe konfokaler Mikroskopie visualisiert (Abbildung 2 A). Wie erwartet zeigt GalNAcT2-GFP eine halbmondförmige Lokalisierung nahe dem Zellkern unabhängig von der Zugabe von Cer-TCO oder SiR-Tz (Abbildungen 2 B und S3). Die Behandlung von Zellen mit Cer-TCO und nachfolgend mit SiR-Tz führte zu einer intensiven roten Markierung der Golgi-Region (Abbildungen 2 C,D und S2).^[14] Die Signale von GalNAcT2-GFP und Cer-SiR colokalisierten mit einem Pearsons-Koeffizienten von 0.50 ± 0.02 . Der entsprechende Wert für GalNAcT2-GFP und SiR-Tz war 0.08 ± 0.01 ($p < 0.0001$; Abbildung S5), was die effektive Lokalisation von Cer-TCO im Golgi-Apparat sowie seine effiziente Reaktion mit SiR-Tz belegt. Zuvor gemischte Lösungen aus SiR-Tz und Cer-TCO sind ungeeignet für die Markierung des Golgi-Apparats, wahrscheinlich wegen der schlechten Zellgängigkeit von Cer-TCO (Details siehe Abbildung S4).

Zur Bestätigung, dass der Golgi-Apparat in mit Cer-TCO und SiR-Tz behandelten Zellen seine Funktion aufrechterhält, haben wir den Transport durch den und im Golgi-Apparat untersucht. Zuerst nutzten wir Hela-Zellen, die vorübergehend das Fusionsprotein TfRc-F_M4-pH exprimieren, das aus dem Transferrinrezeptor (TfRc), vier F36M-FKBP(FM)-Domänen und pHlorin,^[15] einer pH-empfindli-

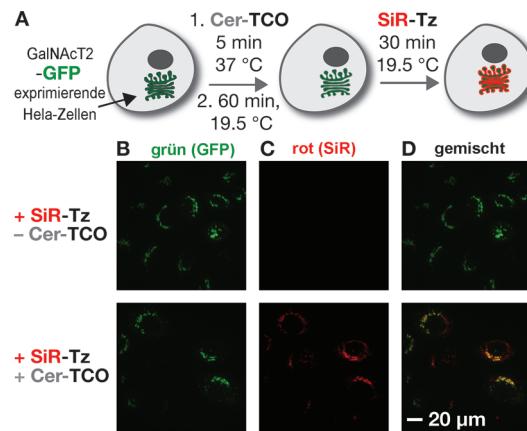


Abbildung 2. Cer-TCO wird im Golgi-Apparat angereichert und reagiert mit SiR-Tz zur Visualisierung des Golgi-Apparats. A) HeLa-Zellen, die das Golgi-Reporterprotein GalNAcT2-GFP exprimieren, wurden mit Cer-TCO (2 μM) behandelt, einer Temperaturblockade unterzogen, um das Ceramid-Lipid im Golgi-Apparat anzureichern, und dann mit SiR-Tz (2 μM) markiert. B–D) Ausschließliche Inkubation mit SiR-Tz markiert die Zellen nicht, die Behandlung mit Cer-TCO und SiR-Tz führt hingegen zum Reaktionsprodukt (rot), das mit GalNAcT2-GFP (grün) colokalisiert (siehe auch Abbildung S2).

chen Variante von GFP, zusammengesetzt ist.^[16] Fusionsproteine mit vier FM-Domänen aggregieren und bleiben im ER gefangen,^[17] lösen sich jedoch bei der Zugabe von „D/D“-solubilizer,^[18] einem Analogon eines Rapamycinfragments, (Clontech #635054) schnell auf (Abbildung 3 A). Expression von TfRc-F_M4-pH in Hela-Zellen führt zu starker GFP-Fluoreszenz nahe dem Zellkern in großen Aggregaten im ER (Abbildung 3 B, 0 min, links). Wie erwartet führte die Zugabe von „D/D“-solubilizer zum Transport von TfRc-F_M4-pH durch den Golgi-Apparat zur Plasmamembran, wo es an der Zelloberfläche durch Immunfärbung mit Alexa-568-markiertem anti-GFP-Antikörper detektiert wurde (Abbildung 3 B, 60 min, links). Die Zugabe von Cer-TCO und SiR-Tz (wie oben beschrieben) führte zu keinen offensichtlichen Veränderungen im Transport von TfRc-F_M4-pH durch den Golgi-Apparat und zur Plasmamembran (Abbildung 3 B, 60 min, rechts).

Um quantitativ zu bestimmen, ob unterschiedliche Konzentrationen von Cer-TCO/SiR-Tz den Transport von TfRc-F_M4-pH durch den Golgi-Apparat beeinflussen, nutzten wir dieses Experiment, um den Anteil an TfRc-F_M4-pH zu untersuchen, der die Plasmamembran in An- und Abwesenheit von Cer-TCO/SiR-Tz erreicht. Wir verglichen die gesamte Fluoreszenz von TfRc-F_M4-pH (grüner Kanal) in mehreren Zellen mit derjenigen auf den Zelloberflächen (Alexa-568-anti-GFP-Antikörper, roter Kanal) jeweils 0 und 60 min nach der Zugabe von „D/D“-solubilizer. Dieses Experiment ist intern kontrolliert, da es die Verteilung eines einzelnen Proteins (TfRc-F_M4-pH) mithilfe zweier Kanäle ermittelt. Dies ist ein Vorteil gegenüber einer Untersuchung der Verteilung von zwei verschiedenen Proteinen, deren Expressionen niveaus variieren können. Zellen wurden mit 0, 2 oder 5 μM Cer-TCO und SiR-Tz behandelt, und die Menge an TfRc-F_M4-pH nach 0 min (sofort nach der Zugabe von „D/D“-sol-

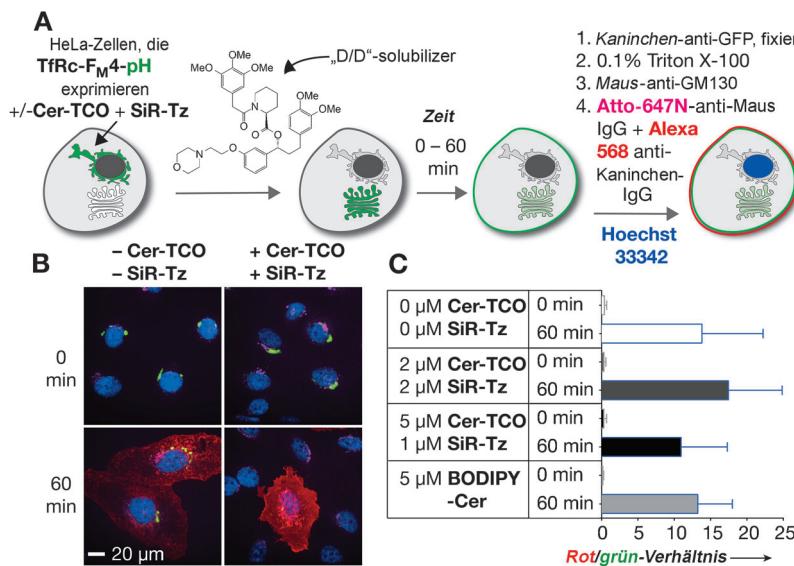


Abbildung 3. A) Experiment mithilfe von TfRc-FM4-pH und „D/D“-solubilizer zur Unterscheidung von Fracht, welche die Plasmamembran erreicht hat, und Fracht innerhalb der Zelle. B) HeLa-Zellen, die TfRc-FM4-pH (grün) exprimieren, wurden mit Cer-TCO und SiR-Tz behandelt und 0 oder 60 min nach der Zugabe von „D/D“-solubilizer fixiert. Dieser induziert die Freisetzung von TfRc-FM4-pH vom ER. Zellen wurden immunmarkiert, um den Golgi-Apparat (magenta) und TfRc-FM4-pH auf der Zelloberfläche (rot) zu visualisieren. Nach 0 min befindet sich TfRc-FM4-pH (grün) im ER, nach 60 min hingegen an der Zelloberfläche. Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) angefärbt. C) Das Verhältnis des roten und grünen Kanals zeigt den Anteil der Fracht (TfRc-FM4-pH), welche die Zellmembran erreicht hat.

ubilizer) und nach 60 min in der Zelle und an deren Oberfläche wurde durch Integration des grünen und roten Signals in ImageJ^[19] quantifiziert (Abbildung 3C). Die graphischen Darstellungen der GFP- (grün) und Alexa-568-Rohsignale (rot; Abbildung S6) oder das Rot/grün-Verhältnis (Abbildung 3C) sind nahezu identisch, unabhängig von einer Behandlung der Zellen mit Cer-TCO und SiR-Tz (Zellen mit einer hohen Überexprimierung wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt). Das Resultat dieses Experiments ist ein starkes Indiz, dass Cer-TCO und SiR-Tz keine Auswirkung auf den Anteil von TfRc-FM4-pH haben, der vom ER über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert wurde.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Kombination von Cer-TCO und SiR-Tz den Transport innerhalb des Golgi-Apparats beeinflusst. Dazu wurde die stabile HeLa-Zelllinie verwendet, die GalNAcT2-GFP^[12] exprimiert. Wir beobachteten die intra-organelle Mobilität in einem „fluorescence recovery after photobleaching“(FRAP)-Experiment (Abbildung 4A).^[20] Ein kleiner rechteckiger Bereich des Golgi-Apparats (ca. 2.2 µm breit) wurde mit einem Laser der Wellenlänge 488 nm ausgebleicht, und anschließend wurde der Wiederanstieg der Fluoreszenz über 490 s beobachtet (Abbildung 4). Sowohl der $t_{1/2}$ -Wert des Wiederanstiegs als auch der relative Wiederanstieg waren unabhängig von einer vorhergehenden Behandlung der Zellen mit Cer-TCO allein oder einer Kombination aus 5 µM Cer-TCO und 1 µM SiR-Tz (Abbildung 4C). Daraus folgt, dass die Behandlung der Zellen mit Cer-TCO alleine oder Cer-TCO und SiR-Tz zu

keinem detektierbaren Unterschied in der Diffusion von GalNAcT2-GFP innerhalb des Golgi-Apparats führt.

In den oben beschriebenen Experimenten wurden Zellen nur eine kurze Zeit mit Cer-TCO und SiR-Tz behandelt. Um zu untersuchen, ob diese Markierungsstrategie längerfristige Auswirkungen (mehrere Stunden) aufgrund von Zell- oder Phototoxizität hat, wurden HeLa-Zellen mit Cer-TCO/SiR-Tz oder BODIPY-Cer^[7] behandelt. Anschließend wurden innerhalb von 6–10 h alle 10 min Phasenkontrast- und konfokale Aufnahmen der lebenden Zellen gemacht. Diese zeigten keine negativen Auswirkungen auf Zellstruktur und -zahl bei Zellen, die zuvor mit 2 µM Cer-TCO/SiR-Tz behandelt worden waren. Im Unterschied dazu rundeten sich Zellen, die zuvor mit 5 µM BODIPY-Cer behandelt worden waren, nach etwa 6 h und verloren ihre Haftung (Abbildung 4D). Diese Beobachtung verdeutlicht, dass bei längeren Experimenten mit BODIPY-Cer Vorsicht geboten ist. Zusammengenommen belegen die Resultate dieser drei Experimente, dass weder eine der Reaktionskomponenten noch ihr Produkt einen signifikanten Einfluss auf Zellmorphologie (Abbildung 4D), Mobilität der Proteine (GalNAcT2-GFP) innerhalb des Golgi-Apparats (Abbildung 4A–C) oder Transport von Fracht vom ER durch den Golgi-Apparat zur Plasmamembran (Abbildung 3) hat.

Als nächstes verglichen wir die relative Photostabilität von Cer-TCO/SiR-Tz mit der von BODIPY-Cer und SiR-SNAP-Rab6. Letzteres ist das Reaktionsprodukt aus dem SNAP-markierten Golgi-Protein Rab6^[21] und einem Benzylguaninderivat von SiR (SiR-BG)^[11] und enthält deshalb denselben Nah-IR-Fluorophor wie SiR-Tz (Abbildung 5). Hela-Zellen wurden mit Cer-TCO/SiR-Tz und BODIPY-Cer behandelt, und Hela-Zellen, die vorübergehend Rab6-SNAP exprimierten, mit SiR-BG. Anschließend wurden 120–500 aufeinanderfolgende 3D-Aufnahmen mithilfe von konfokaler Spinning-Disk-Mikroskopie gemacht. Die 3D-Visualisierung verminderte Fluoreszenzfluktuationen, die durch eine axiale Verschiebung der Zellen unter dem Mikroskop erfolgen können. In allen Fällen wurden 120 und 500 3D-Stapel von 22 optischen Querschnitten lebender oder fixierter Zellen aufgenommen (Abbildung 5 A–C). Das Fluoreszenzsignal von BODIPY-Cer in lebenden Zellen nahm nach weniger als 15 3D-Stapeln sogar unter optimalen Bedingungen auf 50% ab. Dagegen verringerte sich das Fluoreszenzsignal im Verlauf der Aufnahme von 120 3D-Stapeln von mit 2 µM Cer-TCO/SiR-Tz behandelten Zellen nur um 10%. Das Signal von Rab6-SNAP-SiR und Cer-SiR wurde in fixierten Zellen aufgenommen. Nach 500 3D-Stapeln war das Signal von Cer-SiR um 16% reduziert und jenes von Rab6-SNAP-SiR um 84%. Bemerkenswert ist, dass die durchschnittliche Anfangsintensität pro Zelle der Cer-SiR- und Rab6-SNAP-SiR-Signale sowohl in lebenden als auch in fixierten Zellen sehr ähnlich war. Dennoch war Cer-SiR wesentlich photostabiler. Die

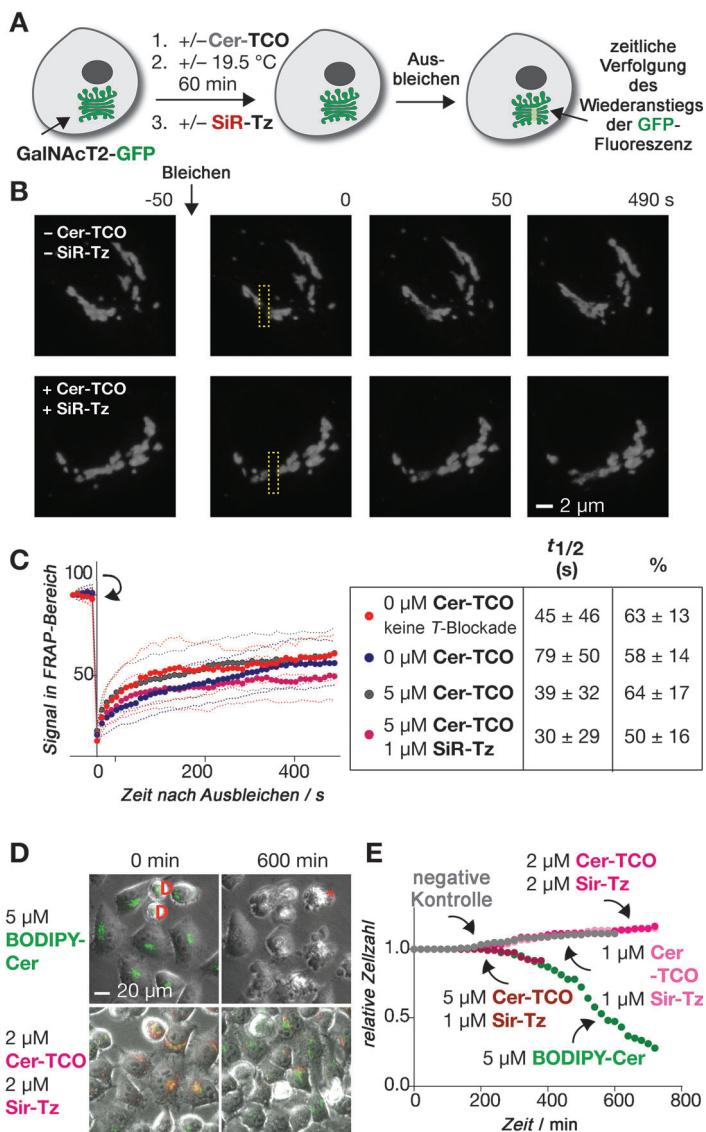


Abbildung 4. Die Proteinmobilität innerhalb des Golgi-Apparats wird nicht durch Cer-TCO und SiR-Tz beeinflusst. A) GalNAcT2-GFP (grün) exprimierende Zellen wurden mit Cer-TCO und SiR-Tz behandelt und ausgebleicht; im Anschluss wurde der zeitliche Wiederanstieg der Fluoreszenz verfolgt. B) Beispiele des Wiederanstiegs der Fluoreszenz während 490 s nach dem Ausbleichen von Zellen mit oder ohne Cer-TCO/SiR-Tz-Behandlung. C) Die graphische Darstellung zeigt, dass der Wiederanstieg der Fluoreszenz mit einer ähnlichen Geschwindigkeit und einem ähnlichen Ausmaß unabhängig von der zuvor erfolgten Behandlung geschieht. D) Unterschiedliche Effekte bei andauernder Aufnahme von GalNAcT2-GFP-Zellen (grün), die mit BODIPY-Cer (grün) oder Cer-TCO und SiR-Tz (rot) markiert wurden. D: sich teilende Zellen; *: sterbende Zellen. E) Die Quantifizierung der Daten aus (D) zeigt die relative Zahl von gesunden Zellen über die Zeit unter unterschiedlichen Bedingungen.

genaue Aufklärung des für die höhere Photostabilität von Cer-SiR verantwortlichen Mechanismus erfordert noch weitere Untersuchungen, das Nettoergebnis ist aber jedenfalls eine Verbindung, die 3D-Aufnahmen der Golgi-Dynamik über eine längere Zeitspanne ermöglicht.^[22]

Die extrem hohe Photostabilität von Cer-SiR macht es besonders gut geeignet für die STED-Mikroskopie, die kon-

fokales, linienweises Lesen mit einem leistungsstarken, Donut-förmigen Abreicherungslaser kombiniert, um eine hohe Auflösung zu erreichen. Prinzipiell sind die meisten Fluorophore für STED geeignet; die hohe Laserintensität, die für das schnelle und wiederholte Wechseln der Moleküle zwischen ihrem Grundzustand und ihrem angeregten Zustand benötigt wird, treibt die Fluorophore jedoch in Triplettzustände oder andere energetisch höher gelegene Zustände, die schnell ausbleichen. „Antibleich“-Triplettzustand-Quencher wie Trolox und Cyclooctatetraen^[23] können diesen Effekt abschwächen, sind aber toxisch für lebende Zellen. SiR ist ein bemerkenswerter Fluorophor für STED-Mikroskopie von lebenden Zellen, da es zellgängig ist und eine ähnliche Photostabilität wie die besten STED-Farbstoffe, z.B. Atto 647N, aufweist.^[11]

Um die Vorteile von Cer-SiR für hochauflösende STED-Mikroskopie des Golgi-Apparats zu untersuchen, wurden GalNAcT2 exprimierende Hela-Zellen mit Cer-TCO und SiR-Tz markiert (wie oben beschrieben) und anschließend mithilfe von Konfokal- und STED-Mikroskopie auf einem kommerziellen Instrument von Leica visualisiert. Wie erwartet sind die STED-Aufnahmen schärfer, wie die Linienprofile durch den Golgi-Apparat zeigen. Diese Beobachtung demonstriert den Nutzen von Cer-SiR für die STED-Mikroskopie. Als nächstes führten wir einen direkten Vergleich der relativen Photostabilität von Cer-SiR und SiR-SNAP-Rab6 in fixierten Zellen durch. Dazu nutzten wir ein selbstgebautes STED-Mikroskop, das für schnelle Aufnahmen optimiert wurde (Abbildung 6B). Die Aufnahmen von Zellen (0.52 Bilders⁻¹ für 29 min) mit Cer-SiR zeigten, dass die Signalintensität über 900 Bilder stabil blieb, während das Signal in den Aufnahmen von Zellen, die mit SiR-SNAP-Rab6 markiert waren, bereits nach 300 Bildern die Hälfte seiner Intensität einbüßte. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit den Resultaten der 3D-Konfokalmikroskopie (Abbildung 5). Schlussendlich ermöglichen die außergewöhnliche Auflösung und Photostabilität, die mit Cer-SiR erreicht wurden, die Visualisierung von Vesikeln, die sich am Golgi-Apparat bilden und ihn nachfolgend verlassen (Abbildung 6C und Video 1)

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass die beiden neuen Reagenzien die hochauflösende Visualisierung von Golgi-Struktur und -Dynamik ermöglichen. Die zwei Reagenzien – ein *trans*-Cycloocten enthaltendes Ceramid-Lipid (Cer-TCO) und ein hoch reaktiver, Tetrazin-markierter Nah-IR-Farbstoff (SiR-Tz) – reagieren in einer äußerst schnellen Tetrazin-Klick-Reaktion zu Cer-SiR, einer Verbindung, welche die Visualisierung des Golgi-Apparats sowohl mithilfe der 3D-Konfokalmikroskopie als auch durch hochauflösende Mikroskopie ermöglicht. Cer-SiR ist außergewöhnlich photostabil und sollte weitere Studien der Golgi-Dynamik in primären Zellen und Geweben stark vereinfachen.

Eingegangen am 14. März 2014
Online veröffentlicht am 31. Juli 2014

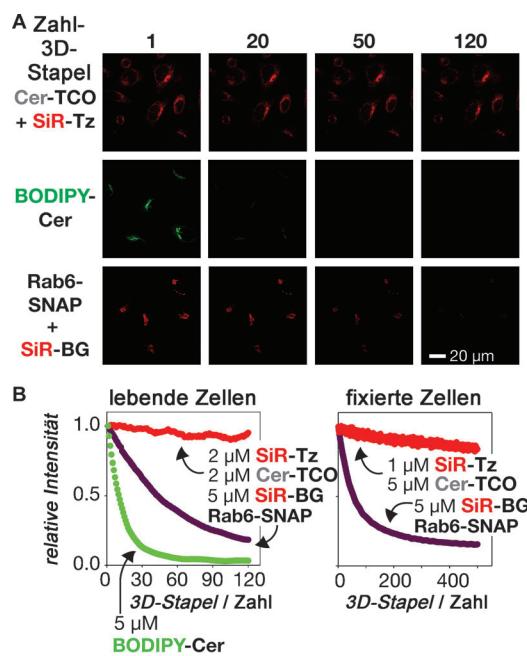


Abbildung 5. Golgi-Apparate, die mit Cer-SiR markiert wurden, sind sehr photostabil bei längeren Aufnahmen mithilfe konfokaler Spinning-Disk-Mikroskopie. A) Aufnahmen zeigen Zellen, die mit Cer-SiR, BODIPY-Cer oder dem SiR-modifizierten Protein Rab6-SNAP (Rab6-SNAP + SiR-BG) markiert wurden, nach Aufnahme von 1–120 3D-Bildstapeln (22 Bilder pro Stapel). B) Graphische Darstellung der relativen durchschnittlichen Intensität pro Zelle mit unterschiedlichen Markierungsstrategien als Funktion der Zahl der aufgenommenen 3D-Stapel.

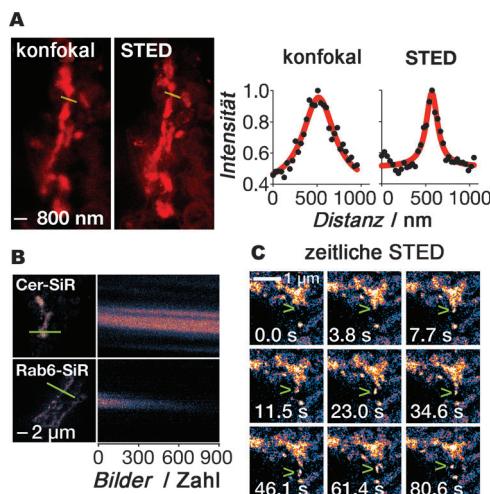


Abbildung 6. Hohauflösende Mikroskopie des Golgi-Apparats in lebenden Zellen mit Cer-SiR. A) Konfokale und STED-Aufnahmen des Golgi-Apparats in einer lebenden Zelle, die mit Cer-TCO und SiR-Tz behandelt wurde. Die Linienprofile durch den Golgi-Apparat (gelb) zeigen die stark verbesserte Auflösung mittels STED (rechts). B) Kymographie (Linienprofil gegen die Zeit) von fixierten Zellen im STED-Modus von Zellen, die mit Cer-SiR oder SiR-SNAP-Rab6 (ein im Golgi-Apparat lokalisiertes Protein) markiert wurden, belegen, dass das Signal der proteinmarkierten Zellen wesentlich schneller abnimmt. C) Standbilder eines STED-Videos, das die Bildung und Abtrennung eines Vesikels (grüne Pfeile) vom Golgi-Apparat zeigt.

Stichwörter: Bioorthogonale Chemie · Fluorophore · Klick-Chemie · Membranen · STED

- [1] a) S. van de Linde, M. Heilemann, M. Sauer, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, *63*, 519–540; b) D. Toomre, J. Bewersdorf, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, *26*, 285–314; c) B. Huang, M. Bates, X. W. Zhuang, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 993–1016; d) S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153–1158.
- [2] F. Göttfert, C. A. Wurm, V. Müller, S. Berning, V. C. Cordes, A. Honigmann, S. W. Hell, *Biophys. J.* **2013**, *105*, L1–L3.
- [3] H. Shroff, C. G. Galbraith, J. A. Galbraith, E. Betzig, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 417–423.
- [4] a) L. Carlini, S. Manley, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2643–2648; b) S. H. Shim, C. Xia, G. Zhong, H. P. Babcock, J. C. Vaughan, B. Huang, X. Wang, C. Xu, G. Q. Bi, X. Zhuang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 13978–13983.
- [5] M. J. Hinner, K. Johnsson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 766–776.
- [6] a) J. Yang, J. Seckute, C. M. Cole, N. K. Devaraj, *Angew. Chem. 2012*, *124*, 7594–7597; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7476–7479; b) C. Thiele, C. Papan, D. Hoelper, K. Kusserow, A. Gaebler, M. Schoene, K. Piotrowitz, D. Lohmann, J. Spandl, A. Stevanovic, A. Shevchenko, L. Kuerschner, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 2004–2011; c) H. C. Hang, J. P. Wilson, G. Charron, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 699–708; d) A. B. Neef, C. Schultz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1526–1529; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1498–1500; e) C. Y. Jao, M. Roth, R. Welti, A. Salic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 15332–15337.
- [7] a) D. L. Marks, R. Bittman, R. E. Pagano, *Histochem. Cell Biol.* **2008**, *130*, 819–832; b) R. E. Pagano, O. C. Martin, H. C. Kang, R. P. Haugland, *J. Cell Biol.* **1991**, *113*, 1267–1279.
- [8] a) K. Kolmakov, C. A. Wurm, R. Hennig, E. Rapp, S. Jakobs, V. N. Belov, S. W. Hell, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 12986–12998; b) C. A. Wurm, K. Kolmakov, F. F. Göttfert, H. Ta, M. Bossi, H. Schill, S. Berning, S. Jakobs, G. Donnert, V. N. Belov, S. W. Hell, *Opt. Nanosc.* **2012**, *1*, 1–7.
- [9] L. D. Hughes, R. J. Rawle, S. G. Boxer, *PLoS One* **2014**, *9*, e87649.
- [10] a) J. C. T. Carlson, L. G. Meimetis, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 7055–7058; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6917–6920; b) J. Yang, M. R. Karver, W. L. Li, S. Sahu, N. K. Devaraj, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 5312–5315; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5222–5225; c) M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2263–2270; d) N. K. Devaraj, S. Hilderbrand, R. Upadhyay, R. Mazitschek, R. Weissleder, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2931–2934; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2869–2872; e) M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518–13519.
- [11] G. Lukinavicius, K. Umezawa, N. Olivier, A. Honigmann, G. Y. Yang, T. Plass, V. Müller, L. Reymond, I. R. Correa, Jr., Z. G. Luo, C. Schultz, E. A. Lemke, P. Heppenstall, C. Eggeling, S. Manley, K. Johnsson, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 132–139.
- [12] B. Storrie, J. White, S. Rottger, E. H. K. Stelzer, T. Saganuma, T. Nilsson, *J. Cell Biol.* **1998**, *143*, 1505–1521.
- [13] a) J. P. Simon, I. E. Ivanov, M. Adesnik, D. D. Sabatini, *J. Cell Biol.* **1996**, *135*, 355–370; b) R. Kuliawat, P. Arvan, *J. Cell Biol.* **1992**, *118*, 521–529; c) G. Griffiths, S. Pfeiffer, K. Simons, K. Matlin, *J. Cell Biol.* **1985**, *101*, 949–964.
- [14] Ein Cer-SiR-Signal wird auch in der perinukleären Region beobachtet. Diese Lokalisierung ist nicht unerwartet, weil De-novo-Ceramidbiosynthese im ER stattfindet; a) E. C. Mandon, I. Ehses, J. Rother, G. Vanechten, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 11144–11148; b) D. K. Perry, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2002**, *1585*, 146–152.

- [15] G. Miesenböck, D. A. De Angelis, J. E. Rothman, *Nature* **1998**, *394*, 192–195.
 - [16] F. Rivera-Molina, D. Toomre, *J. Cell Biol.* **2013**, *201*, 673–680.
 - [17] V. M. Rivera, X. R. Wang, S. Wardwell, N. L. Courage, A. Volchuk, T. Keenan, D. A. Holt, M. Gilman, L. Orci, F. Cerasoli, J. E. Rothman, T. Clackson, *Science* **2000**, *287*, 826–830.
 - [18] T. Clackson, W. Yang, L. W. Rozamus, M. Hatada, J. F. Amara, C. T. Rollins, L. F. Stevenson, S. R. Magari, S. A. Wood, N. L. Courage, X. D. Lu, F. Cerasoli, M. Gilman, D. A. Holt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 10437–10442.
 - [19] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675.
 - [20] N. B. Cole, C. L. Smith, N. Sciaky, M. Terasaki, M. Edidin, J. Lippincott-Schwartz, *Science* **1996**, *273*, 797–801.
 - [21] a) C. Antony, C. Cibert, G. Geraud, A. S. Maria, B. Maro, V. Mayau, B. Goud, *J. Cell Sci.* **1992**, *103*, 785–796; b) B. Goud, A. Zahraoui, A. Tavitian, J. Saraste, *Nature* **1990**, *345*, 553–556.
 - [22] Die relative Fluoreszenz von SiR(Carboxy) ist höher als jene von SiR-Tz und SiR-Cer (Details siehe Tabelle S1 und Abbildung S1).
 - [23] R. Dave, D. S. Terry, J. B. Munro, S. C. Blanchard, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 2371–2381.
-