

Biologische Bildgebung

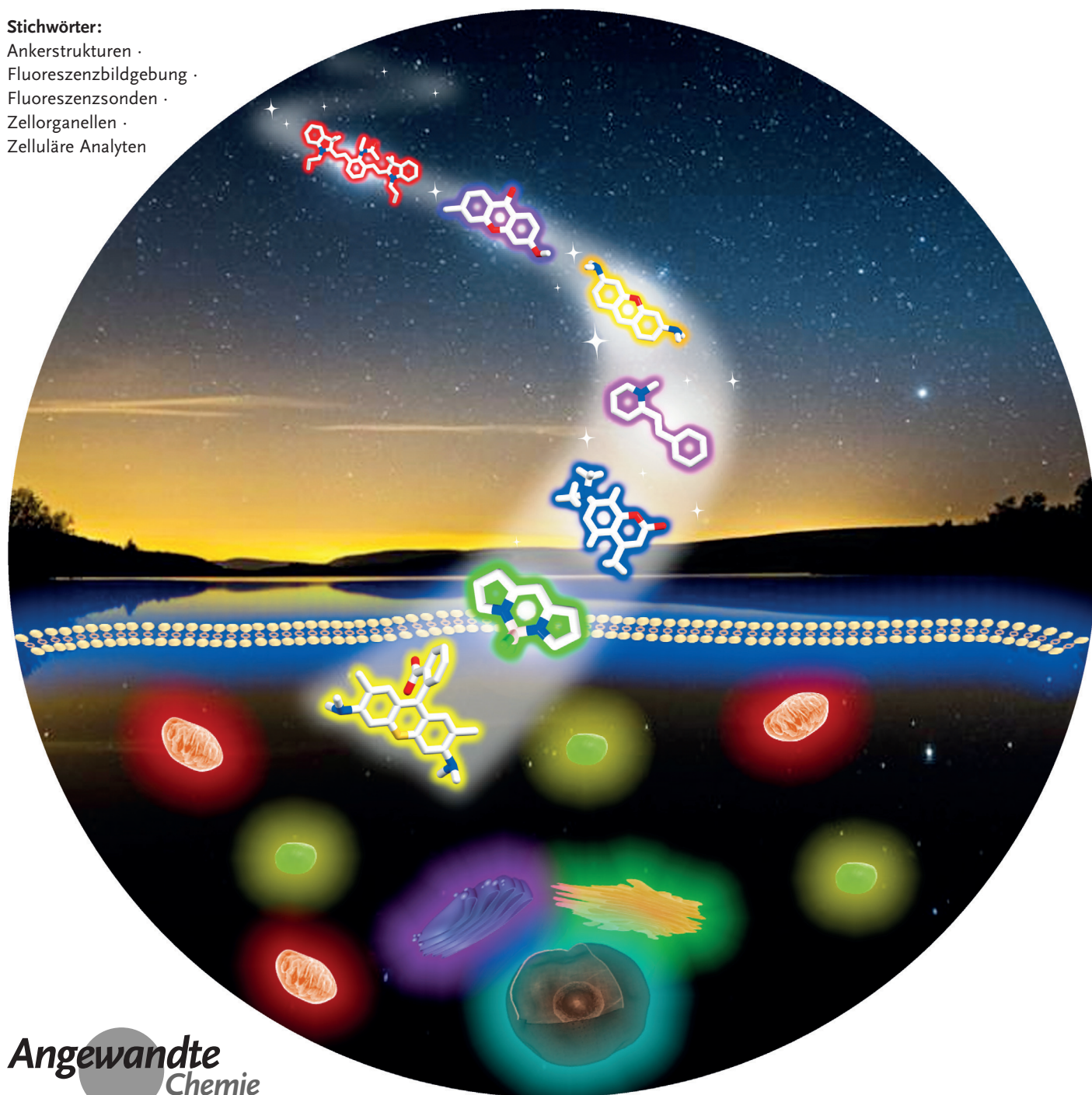
Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201510721
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201510721

Wahrnehmung der chemischen Prozesse in einzelnen Organellen mit niedermolekularen Fluoreszenzsonden

Wang Xu, Zebing Zeng, Jian-Hui Jiang,* Young-Tae Chang* und Lin Yuan*

Stichwörter:

Ankerstrukturen ·
Fluoreszenzbildgebung ·
Fluoreszenzsonden ·
Zellorganellen ·
Zelluläre Analyten



Ohne genau durchdachte Fluoreszenzmarker/-sonden kann auch das fortschrittlichste hochauflösende Mikroskopieverfahren keinen Einblick in subzelluläre Matrices geben. Die Entwicklung der Biologie wurde in zunehmendem Maße durch Fortschritte im Bereich der Chemie vorangetrieben. Ein prominentes Beispiel hierfür sind niedermolekulare Fluoreszenzsonden, die nicht nur die Bildgebung auf zellulärer Ebene ermöglichen, sondern auch subzelluläre Abbildungen. Die meisten chemischen/biologischen Ereignisse finden innerhalb von Zellorganellen statt, sodass diese Substrukturen zunehmend mithilfe von Fluoreszenzverfahren untersucht wurden. Dieser Aufsatz fasst die vorhandenen Fluoreszenzsonden zusammen, die auf chemische/biologische Geschehnisse innerhalb einzelner Organellen zielen. Darüber hinaus werden Strategien zur Verankerung an den Organellen vorgestellt, um das Design neuer Fluoreszenzsonden anzuregen. Abschließend werden die Zukunftsaussichten für weitere Entwicklungen in der chemischen Biologie diskutiert.

1. Einleitung

Zellen sind die fundamentalen Funktionseinheiten jeder Lebensform, und Zellorganellen sind unverzichtbar für ihre Funktion.^[1] Unter den unterschiedlichen Organellen in eukaryotischen Zellen sind die Mitochondrien, die Lysosomen/Endosomen, das endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat und der Zellkern, angeordnet von der Peripherie hin zum Innenbereich. Jede Organelle spielt seine jeweilige Rolle bei der Unterstützung der normalen Zellfunktionen.

Im Inneren der Zellen läuft ein breites Spektrum an unterschiedlichen Reaktionen ab. Zahlreiche chemische Spezies, einschließlich Metallionen/Anionen,^[2] reaktiver Sauerstoff-/Stickstoffspezies (ROS/RNS),^[2,3] Thiolen,^[2] Peptide und Enzyme^[4] nehmen entweder über Signalwege oder Stressantworten aktiv an physiologischen und pathologischen Vorkommnissen teil.^[5] Ob Biomoleküle eine Signalwirkung oder Stress auslösen, hängt nicht nur von ihren Konzentrationen ab, sondern auch vom jeweiligen subzellulären Aufenthaltsort.^[1a] Eine falsche Anordnung chemischer Spezies kann die Zellfunktionen beeinträchtigen. Beispielsweise sind mitochondriales H₂O₂ und NO als wichtige Signalmoleküle an zahlreichen Transduktionsprozessen beteiligt.^[3,6] Zu viel lysosomales H₂O₂ und NO führen hingegen zu lysosomalen Fehlfunktionen, denen Bedeutung bei Autophagozytose oder Zelltod zugemessen wird.^[7] Daher kann eine differenzierte Betrachtung der chemischen Prozesse innerhalb einzelner Organellen zellphysiologische und -pathologische Studien erleichtern und unser Wissen um die grundlegenden Zellfunktionen und die Behandlung von Krankheiten bereichern.

Jüngste Entwicklungen in der analytischen Chemie lehren die Forscher, dass Sonden zur Überwachung von Zellen 1) spezifisch in die Zielorganelle lebender Zellen/von lebendem Gewebe eingeschleust werden sollten, 2) vor Erreichen der Zielorganelle inert sein sollten und 3) selektiv auf den interessierenden Analyten reagieren sollten. Bis heute

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	13859
2. Allgemeine Methoden für den Transport zu Organellen	13861
3. Auf Mitochondrien zielende aktivierbare Fluoreszenzsonden (MitAFPs)	13862
4. Auf das zelluläre Verdauungssystem zielende aktivierbare Fluoreszenzsonden	13874
5. Auf Membranen zielende aktivierbare Fluoreszenzsonden (MemTAFPs)	13882
6. Auf den Zellkern zielende aktivierbare Fluoreszenzsonden (NuTAFPs)	13887
7. Auf das endoplasmatische Retikulum und das Golgi-System zielende aktivierbare Fluoreszenzsonden	13890
8. Zusammenfassung und Ausblick	13895

wurden mithilfe von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Massenspektrometrie, Isotopenmarkierungen usw.^[8] wertvolle zellchemische Informationen erhalten. Solche Methoden sind allerdings ressourcen- und zeitaufwändig. Außerdem sind sie entweder für die Überwachung lebender Biosysteme in situ ungeeignet (HPLC und Massenspektrometrie), oder sie stellen ein potentiellies Risiko dar (Isotopenmarkierung). Daher ist die eindeutige Erkennung der Zellchemie noch immer eine der größten Herausforderungen für Chemiker und Biologen.

Die Fluoreszenzbildgebung hat sich zu einem leistungsstarken Verfahren zur Überwachung der Menge, der Lokali-

[*] Dr. W. Xu, Prof. Dr. Z. Zeng, Prof. Dr. J.-H. Jiang, Prof. Dr. L. Yuan
State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics
College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University
Changsha 410082 (Volksrepublik China)
E-Mail: jianhuijiang@hnu.edu.cn
lyuan@hnu.edu.cn

Dr. W. Xu, Prof. Dr. Y.-T. Chang
Department of Chemistry and Medicinal Chemistry Programme
National University of Singapore, Singapore 117543 (Singapur)
und
Laboratory of Bioimaging Probe Development, A*STAR (Singapur)
E-Mail: chmcyt@nus.edu.sg

Dr. W. Xu
Aktuelle adresse: Department of Chemistry
Stanford University (USA)

sierung und der Bewegung von Biomolekülen auf zellulärer Ebene entwickelt.^[9] Von Bedeutung ist, dass niedermolekulare Fluoreszenzsonden in diversen Bereichen verbreitet zum Einsatz kamen, einschließlich der chemischen Biologie, der klinischen Diagnose und der Wirkstoffentwicklung.^[10] Bisher wurden etliche Fluoreszenzsonden entwickelt, die in vitro als Reaktion auf den interessierenden Analyten ein stark verändertes Emissionsprofil aufwiesen.^[9,11] In praktischer Hinsicht verliert der Forscher allerdings die Kontrolle über die Lokalisierung der Sonden, sobald diese in die Zellmatrix eindringen, da nicht genau konzipierte Verbindungen frei innerhalb der Matrix diffundieren. Demzufolge sollten auf Organellen zielende aktivierbare Fluoreszenzsonden (OTAFPs), die nicht nur auf einen bestimmten Analyten reagieren, sondern auch auf Organellen zielen, die diesen Analyten beherbergen, besser geeignet sein.

Idealerweise befindet sich ein OTAFP vor dem Erreichen der Organelle im ausgeschalteten Zustand, um Hintergrundreaktionen zu minimieren. Beim Erreichen der Zielorganelle löst der interessierende Analyt die Aktivierung des

OTAFPs aus, und es wird ein Fluoreszenzsignal für den angeschalteten Zustand beobachtet. Diese Eigenschaften bieten eine praktische Vorgehensweise zur Verbesserung der subzellulären Darstellung von Biospezies sowie zur Steigerung sowohl der Empfindlichkeit als auch der Selektivität von Fluoreszenzsonden. In Anbetracht all der Vorteile von OTAFPs ist für nützliche OTAFPs allerdings das Design selektiver und potenter auf Organellen zielender Strukturelemente erforderlich, was aufgrund der Unvorhersehbarkeit des Verhaltens chemischer Verbindungen innerhalb einer Zelle deren limitierender Faktor ist.^[12] Außerdem sollten für praktische Anwendungen beim Design von OTAFPs auch noch andere Kriterien berücksichtigt werden: Die Sonden sollten 1) minimale Zytotoxizität aufweisen, 2) den endogenen Metabolismus nicht verändern, 3) die Plasmamembran und die Membran der Organellen (sofern vorhanden) rasch durchdringen können, 4) im Inneren der Zielorganelle verbleiben sowie selektiv und effizient mit dem interessierenden Analyten reagieren, 5) gut synthetisierbar und chemisch stabil sein und 6) messbare Signaländerungen hervorrufen.



Wang Xu wurde in Suzhou in Südostchina geboren. Nach Erwerb eines Bachelors 2010 an der Soochow-Universität und eines Masters promovierte er 2015 unter Anleitung von Professor Young-Tae Chang, wo er hauptsächlich Wasserqualitätskontrollen mithilfe Diversitäts-orientierter Fluoreszenzsonden durchführte. Wang besuchte die Laboratorien von Prof. Lin Yuan an der Hunan-Universität und forscht derzeit als Postdoktorand an der Stanford University.



Young-Tae Chang studierte in POSTECH, Korea, Chemie und promovierte 1997 unter der Anleitung von Professor Sung-Kee Chung. Er forschte als Postdoktorand mit Professor Peter Schultz an der UC Berkeley und The Scripps Research Institute. Er startete 2000 seine akademische Karriere an der New York University und setzte diese 2007 an der National University of Singapore fort, wo er als ordentlicher Professor tätig ist und das Medicinal Chemistry Program der NUS sowie das Lab of Bioimaging Probe Development des SBIC, Biopolis, leitet.



Zebing Zeng promovierte 2012 am Department of Chemistry der NUS unter der Anleitung von Professor Jishan Wu und forschte als Postdoktorand im gleichen Arbeitskreis, bevor er 2015 eine Tätigkeit als Assistenzprofessor am College of Chemistry and Chemical Engineering der Hunan-Universität aufnahm. Seine derzeitigen Forschungen konzentrieren sich auf das Design neuartiger π -konjugierter Materialien mit einzigartigen elektronischen, optischen und magnetischen Eigenschaften.



Lin Yuan erhielt 2006 einen B.Sc. als Chemieingenieur von der Universität Südchina und promovierte 2013 in Chemie an der Hunan-Universität. Er arbeitete als Postdoktorand mit Professor Young-Tae Chang an der NUS und begann 2012 seine akademische Karriere an der Hunan-Universität als Assistenzprofessor. Derzeit ist er Associate Professor und leitet ein Labor an der gleichen Universität, in dem er funktionale Fluoreszenzfarbstoffe/Fluoreszenzsonden im Hinblick auf verschiedene biologische Systeme erforscht.



Jian-Hui Jiang promovierte 1999 an der Hunan-Universität. Im Rahmen von Stipendien war er 2001 als Postdoktorand sowie 2003 als Gastprofessor an der Kwansei-Gakuin-Universität tätig. 2003 wurde er zum ordentlichen Professor des College of Chemistry & Chemical Engineering der Hunan-Universität befördert. Sein Forschungsinteresse umfasst die bioanalytische Chemie, Biosensoren und das Bioimaging. Unter seinen zahlreichen Preisen und Auszeichnungen sind das Outstanding Young Scientists Funding des NSFC, ein RSC-Stipendium Fellow und der 2nd grade National Natural Science Award of China.

Glücklicherweise kann die Selektion effizienter auf Organellen zielender Strukturelemente von den Fortschritten bei Studien zur Wirkstofffreisetzung profitieren.^[6,13] Beispielsweise wurde in der pharmazeutischen Industrie zum Zielen auf Mitochondrien für lange Zeit Triphenylphosphonium (TPP) eingesetzt und in unterschiedliche Wirkstoffe zur Therapie mitochondrialer Fehlfunktionen eingebunden.^[13d-f] Mehrere Aufsätze konzentrieren sich auf Fluoreszenzsonden, die auf Mitochondrien zielen.^[14,19] Die Nachfrage nach einem systematischen Überblick über das gesamte Gebiet der OTAFPs wurde allerdings noch nicht gedeckt. Um ein umfassendes Bild des gegenwärtigen Fortschritts wiederzugeben, haben wir so viele niedermolekulare OTAFPs gesammelt wie möglich und diese gemäß den Organellen kategorisiert, auf die sie zielen: die Mitochondrien, die Lysosomen/Endosomen, die Plasmamembran und den Zellkern sowie das ER/den Golgi-Apparat. Außerdem geben wir eine kurze Einführung in die entsprechenden Funktionen der Organellen. Zusätzlich befassen wir uns mit den OTAFPs, die auf Analyten von Organellen, einschließlich diverser Metallionen, Anionen, Aminosäuren und reaktiver Spezies, sowie zelluläre Abläufe antworten und stellen ihre reagierenden Strukturelemente heraus. Diese OTAFPs ermöglichen eine Visualisierung der Zellchemie und liefern einen tieferen Einblick in die fundamentale Zellbiologie. Insgesamt bemühen wir uns, einen allgemeinen Überblick über die Grundlagen des Designs von OTAFPs zu geben, der hervorhebt, wie das Zielen auf eine Zielorganelle mit der Antwort auf einen Analyten vereint werden kann. Proteinbasierte Fluoreszenzmarker (z.B. das grün fluoreszierende Protein (GFP))^[15] und nanopartikelbasierte Fluoreszenzsonden (z.B. Quantenpunkte)^[16] stellen komplementäre Vorgehensweisen zur Entwicklung von Fluoreszenzsonden für die subzelluläre Bildgebung dar, die jedoch in diesem Aufsatz nicht berücksichtigt werden.

2. Allgemeine Methoden für den Transport zu Organellen

Grundsätzlich wurden bisher zwei Strategien zur Übertragung von Fluoreszenzsonden auf Organellen eingesetzt: die direkte einstufige und die indirekte zweistufige Vorgehensweise. Die einstufige Strategie nutzt OTAFPs, die entweder kovalent an Ankermotive für Organellen gebunden sind oder strukturell dahingehend modifiziert wurden, dass die Ankerelemente für die Organelle in den Fluorophor eingearbeitet sind (Abbildung 1 A). Die Überlegungen beim Design solcher OTAFPs sind einfach: Der Fluorophor muss mit einem Anker ausgestattet werden, der das Molekül in die gewünschte Organelle lenkt; beispielsweise akkumulieren Moleküle, die TPP enthalten, im Inneren der Mitochondrien, während nichtprotonierte Aminbasen lysosomotrop sind.^[17] Bei der Begegnung zwischen dem antwortenden Strukturelement und dem Analyten ändert sich das Emissionsprofil des zunächst maskierten Fluorophors, was zu einem An-/Abschalten der Fluoreszenz führen kann oder zu einem ratiometrischen Muster. Es wurden unterschiedliche auf Organellen zielende Strukturelemente beschrieben, einschließlich aus Proteomikstudien abgeleiteter natürlicher und syn-

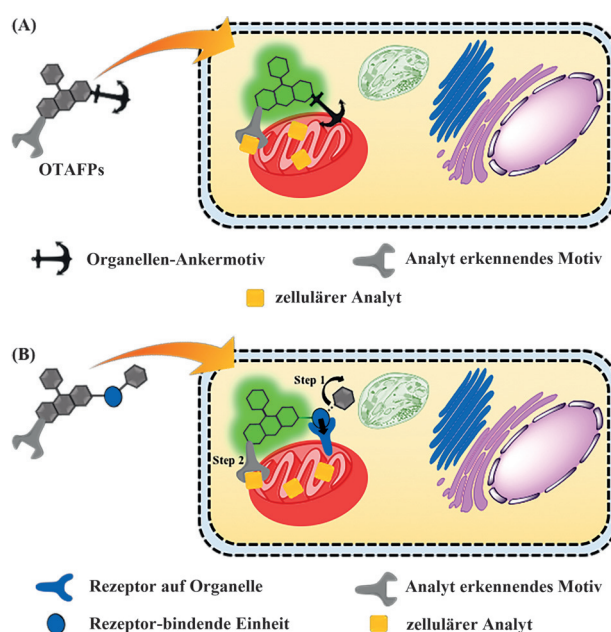


Abbildung 1. A) Auf der direkten einstufigen Strategie basierende OTAFPs. B) Auf der indirekten zweistufigen Strategie basierende OTAFPs.

thetischer Peptide,^[17a,18] ebenso wie kleine organische Marker, die zumeist aus der Pharmaindustrie übernommen wurden.^[17a,19] Tatsächlich haben pharmazeutische Forschungen einen enormen Beitrag zu dem Bereich der Fluoreszenzsonden geliefert, der weiterhin von den Fortschritten bei Untersuchungen zur gezielten Wirkstofffreisetzung profitiert.^[13a,17b,20] Außerdem wurden Fluoreszenzsonden durch den Aufbau und das Screening von Bibliotheken entdeckt, wobei Methoden des Wirkstoff-Screenings imitiert wurden.^[21] Die direkte einstufige Strategie wird detailliert in den folgenden Abschnitten diskutiert.

Neben der direkten einstufigen Strategie wurde auch über eine indirekte zweistufige Strategie zur Entwicklung von OTAFPs berichtet (Abbildung 1 B). Herausragende Beispiele hierfür sind unter anderem HaloTag- und SNAP-AGT-Bio-konjugationen.^[22] Im Prinzip wird zunächst ein Rezeptor mit hoher Affinität oder ein Enzym an einem subzellulären Kompartiment exprimiert; unterdessen kann eine Fluoreszenzsonde mit einem auf Rezeptoren zielenden Strukturelement oder einem enzymatischen Substrat mit dem Rezeptor/Enzym reagieren und mit dem interessierenden Protein eine kovalente Bindung bilden, wodurch sie selektiv innerhalb der Zielorganelle festgehalten wird. Bei dem SNAP-AGT-Verfahren sind die Proteine im Inneren der Zielorganelle mit O₆-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT) vereinigt, und die das Guaninsubstrat enthaltenden Sonden binden unter Abspaltung des Guaninrests kovalent an das Enzym. Außerdem enthält die Fluoreszenzsonde ein auf den Analyten reagierendes Strukturelement, das die Emission des Fluorophors maskiert, und sobald eine Reaktion mit dem Analyten stattfindet, ruft die Sonde ein verändertes Fluoreszenzsignal hervor. Die indirekte zweistufige Strategie ist ein allgemeiner Ansatz, der insbesondere die Übertragung von Fluoreszenz-

sonden auf Organellen ohne auf kleine Moleküle zielende Strukturelemente vereinfacht. Allerdings behindert die proteingebundene Form die freie Verteilung der Sonden. Für Signalmoleküle, die im Zellinneren treiben, ist diese Strategie unter Umständen weniger geeignet. In den folgenden Abschnitten werden wir uns mit der einstufigen direkten Strategie auseinandersetzen und mehrere elegante Beispiele für die zweistufige Strategie vorstellen.

3. Auf Mitochondrien zielende aktivierbare Fluoreszenzsonden (MiTAFPs)

3.1. Chemische Prozesse in Mitochondrien

Mitochondrien sind die wichtigsten Energieerzeuger nahezu aller Lebewesen.^[13d] Über eine Reihe chemischer und biologischer Prozesse, die als oxidative Phosphorylierung bekannt sind, produzieren Mitochondrien Adenosintriphosphat (ATP), das als Coenzym wirkt und diverse Zellaktivitäten antreibt, einschließlich der Biomolekülsynthese, der Zellteilung und des Metabolismus.^[23] Um den Ablauf der komplizierten Funktionen sicherzustellen, nutzen Mitochondrien eine teilisolierte Doppelmembrankonfiguration. Ein Mitochondrium wird von zwei Membranschichten umhüllt, der porösen, permeablen äußeren Membran sowie der stark gewundenen inneren Membran (Abbildung 2).^[24] Unterteilt

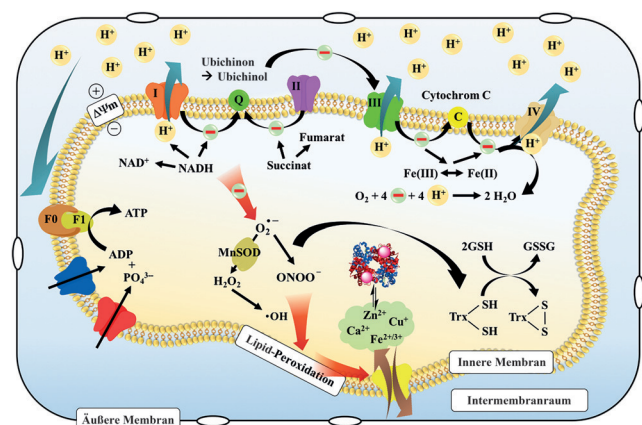


Abbildung 2. Grundlegende Bestandteile und chemische Prozesse von Mitochondrien.

durch die zwei Schichten nutzt der Intermembranraum eine ähnliche chemische Umgebung wie das Cytoplasma, da die äußere Membran für Moleküle kleiner als 6 kD permeabel ist, was einen raschen chemischen Austausch zwischen dem Cytoplasma und den Mitochondrien ermöglicht.^[1a] Dagegen befindet sich in der inneren Membran die isolierte Matrix, in der die meisten mitochondrialen Aktivitäten ablaufen. Die innere Membran der Mitochondrien enthält zahlreiche Proteine, einschließlich Transportern, Oxidoreduktasen, die für Redoxreaktionen und den Transfer von Elektronen zuständig sind, sowie Synthasen für die Synthese von Biomolekülen.^[1a,25]

Die oxidative Phosphorylierung findet über synergistische Effekte zwischen etlichen Proteinen in der inneren Membran statt.^[26] In der mitochondrialen Matrix läuft der Citratzyklus ab, durch den reduziertes Nikotinamidadenindinucleotid (NADH) und Succinat aus den von den Zellen absorbierten Nährstoffen und Wasser hergestellt werden.^[27] NADH und Succinat werden über den Komplex I, die NADH-Dehydrogenase und Komplex II, die Succinat-Dehydrogenase, die beide in die innere Membran eingebettet sind, separat zu NAD und Fumarat oxidiert.^[28] Die Elektronen von NADH und Succinat reduzieren Ubichinon zu Ubichinol, in dem der Chinonrest zu Hydrochinon umgewandelt wurde. Der Komplex III, die Cytochrom-c-Reduktase, überträgt dann die Elektronen vom Ubichinol auf die Hämprotein-Eisenspezies (Fe^{3+} wird zu Fe^{2+} reduziert) von Cytochrom c.^[29] Der Elektronentransfer wird durch den Komplex IV beendet, die Cytochrom-c-Oxidase, die die Hämprotein-Eisenspezies reoxidiert und die Elektronen unter Bildung von Wasser auf Sauerstoff überträgt.^[30]

Es ist anzumerken, dass 1) bei allen Elektronentransferreaktionen Energie freigesetzt wird und 2) mit Ausnahme von Komplex II, bei den drei anderen Komplexen Protonenpumpen involviert sind, die die Protonen in den Intermembranraum leiten. Unter synergistischer Zusammenwirkung erfolgt die Übertragung der freigesetzten Energie auf die ATP-Synthase und die Chemiosmose der herausgepumpten Protonen. Das Herauspumpen von Protonen ruft einen Protonengradienten hervor, der zu einem leicht basischen Milieu im Inneren der Matrix führt. Außerdem induziert der Abfluss positiver Ladungen ein Membranpotential, das deutlich größer ist als das jeder andere Organelle.^[31] Infolge des Membranpotentials und des Anteils isolierter Matrix werden wichtige Stoffe, wie ADP und Phosphatmonomere, von Phosphattransportern und ATP/ADP-Transportern importiert und zu der ATP-Synthase geleitet, wo ADP, Phosphat und Protonen mithilfe der durch die chemiosmotisch weitergeleiteten Protonen übertragenen Energie unter Bildung von ATP reagieren.^[32] Die gesamte oxidative Phosphorylierung, zusammen mit der Produktion von ATP, wird als mitochondriale Atmung verstanden, da sie die normalen Funktionen einer lebenden Zelle – und damit eines lebenden Körpers – aufrecht erhält.^[33] In diesem hochempfindlichen System erfordert es zur Auslösung jedes Reaktionsschritts rechtzeitiger und genau abgestimmter Signale. Zu den wichtigen Signalmolekülen zählen unterschiedliche Metallionen (Ca^{2+} , $\text{Fe}^{2+/\beta+}$, Zn^{2+} und Cu^{+})^[34] sowie reaktive Sauerstoff-/Stickstoff-/Schwefelspezies (ROS/RNS/RSS)^[35] zur Koordination der normalen Funktionen der mitochondrialen Atmung. Die mitochondriale Temperatur^[36] und die Viskosität der Matrix^[37] beeinflussen ebenfalls den Transport und die Funktion von Biomolekülen.

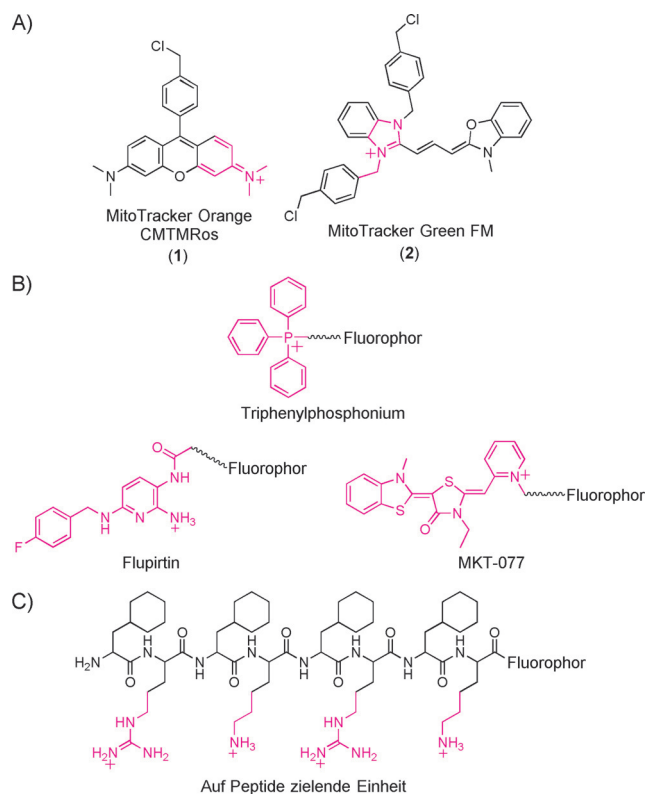
Trotz der entscheidenden Rolle der mitochondrialen Atmung entweichen im Laufe des Elektronentransfers sukzessiv Elektronen, welche die mitochondrialen Funktionen gefährden. Infolge des Elektronenverlusts wird eine Reihe von ROS und RNS gebildet, beginnend mit der Erzeugung von Superoxidradikalen aus Sauerstoff und Elektronen.^[38] Zusätzlich reagieren die Radikale entweder mit Stickstoffmonoxid unter Bildung von Peroxynitrit oder mit Mangan-

Superoxid-Dismutase (MnSOD) unter Erzeugung von Wasserstoffperoxid, das weiter zu hochgiftigen Hydroxylradikalen reduziert wird. Die schwersten von der reaktiven Spezies verursachten Schäden sind die Lipidperoxidation und die Störung der ionischen/biomolekularen Mechanismen, einschließlich des mitochondrialen Permeabilitätsübergangs. Eine Fehlfunktion der Membran und der Reaktionswege führt zur Freisetzung signalgebender Metallionen (Ca^{2+}) oder sogar apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktoren, was auf den programmierten Zelltod hinausläuft. Um den durch die Atmung hervorgerufenen unvermeidbaren oxidativen Stress zu unterbinden, betreiben Mitochondrien eine Reihe von Reduktionsmechanismen, die von Glutathion (GSH) und Thioredoxin (Trx) durchgeführt und beide durch ihre entsprechenden Reduktasen vermittelt werden.

3.2. Allgemeine Methoden zum Design von MiTAFPs

Es ist allgemein anerkannt, dass das durch die mitochondriale oxidative Phosphorylierung ausgelöste Protonenpumpen ein stark negatives Membranpotential von 180–200 mV innerhalb der Matrix zur Folge hat.^[39] Angetrieben von dem Gradienten des Membranpotentials neigen stark lipophile Kationen daher dazu, sich durch die Phospholipid-Doppelschicht der inneren Membran hindurch zu bewegen und in der mitochondrialen Matrix in einem Verhältnis von über 10:1 gegenüber anderen Organellen zu akkumulieren.^[6,40] Die meisten Fluoreszenzsonden mit lipophilen Kationen akkumulieren innerhalb der mitochondrialen Matrix lebender Zellen, und entsprechend üben die Mitochondrien eine starke Anziehungskraft auf viele intrinsisch lipophile kationische Farbstoffe, wie Rhodamine, Indole und Cyanine, aus.^[31,41] Solche Fluorophore wurden zur Anpassung an biologische Studien optimiert und kommerzialisiert. Beispielsweise können die MitoTracker (**1** und **2**, Schema 1 A),^[42] die entlang des lipophilen Gerüsts insgesamt positiv geladen sind, einfach von den Mitochondrien lebender Zellen aufgenommen werden. Sie bieten zahlreiche Optionen für die Emissionswellenlänge und färben andere Organellen nur untergeordnet.

Im Unterschied zu den intrinsisch kationischen und lipophilen Fluorophoren sind die meisten anderen fluoreszierenden Molekülgerüste, nämlich BODIPY, Fluorescein und Cumarin, im unmodifizierten Zustand neutral. Diese Fluorophore zeichnen sich zwar durch herausragende photophysikalische Eigenschaften und diverse Emissionswellenlängen aus, die sich von denen der Rhodamine und Cyanine unterscheiden, sie akkumulieren aber nicht bevorzugt in Mitochondrien. Dieses Problem kann durch Modifikation einer neutralen Fluoreszenzsonde mit einem universellen lipophilen kationischen Rest gelöst werden, der ihren selektiven Transport in die Mitochondrien steuert (Schema 1 B). Inspiriert durch die pharmakologischen Untersuchungen wurde berichtet, dass es sich unter anderem bei TPP,^[20a] Flupirtin-Derivaten^[43] und MKT-077-Derivaten^[44] um die potentesten auf Mitochondrien zielenden Agenzien handelt. TPP, eine große kationische organische Phosphoniumeinheit mit drei lipophilen Phenylgruppen, die ursprünglich zur Übertragung



Schema 1. A) Repräsentative Strukturen kommerzieller MitoTrackers. B) Design der auf Mitochondrien zielenden auf Ankergruppen basierenden Fluoreszenzsonden. C) repräsentative Struktur einer mitochondrialen Prozessierungspeptidase (MPP).

von Wirkstoffen auf Mitochondrien eingesetzt wurde, wurde später in Fluorophore eingebaut und entwickelte sich aufgrund ihrer einfachen Einführung und Anwendbarkeit zu der am häufigsten genutzten lenkenden Einheit für den Transport zu Mitochondrien. TPP kann rasch die mitochondriale Membran passieren und sich mehrere hundertfach innerhalb der mitochondrialen Matrix anreichern.^[20a,45] Durch Anhängen von TPP an gängige Fluorophore wurden etliche die Mitochondrien färbenden Reagentien entwickelt.^[46] Die positive Ladung am TPP kann jedoch das Membranpotential beeinflussen, was zu Membranruptur und einer Störung der Mikroumgebung führt.^[47a,108] Somit sind weitere Verbesserungen der auf Mitochondrien zielenden Strategie erforderlich.

Außer lipophilen kationischen Vektoren wurden auch natürliche oder synthetische Peptide mit auf Mitochondrien zielenden Eigenschaften beschrieben. Beispiele, die den mitochondrialen Importmechanismus nutzen, nämlich Signalepeptide mit einer positiv geladenen amphipatischen am N-Terminus gebildeten α -Helix, erkennen die Translokase der inneren mitochondrialen Membran und ermöglichen den Transport von Frachtmolekülen, für gewöhnlich fluoreszierende Proteine.^[18] Inspiriert durch das natürliche System verfeinerten Forscher die langkettigen Polypeptide, um die funktionellen Strukturelemente herauszuarbeiten, bei denen es sich zumeist um entweder kationische (z. B. Arginin, Lysin) oder hydrophobe (z. B. Phenylalanin, Cyclohexylalanin)

Peptide mit auf Arginin basierenden funktionellen Gruppen handelt (Schema 1 C).^[18,47] Die zahlreichen positiven Ladungen werden durch die lange amphiphile Kette aus Aminosäuren ausgeglichen, und somit ist sowohl die Lipophilie zur Durchquerung der Phospholipid-Doppelschicht als auch die Biokompatibilität sichergestellt.

3.3. MiTAFPs für Metallionen und den pH-Wert

Es gibt zunehmend Belege dafür, dass Metallionen in den Mitochondrien einen tiefgreifenden Einfluss ausüben, was bedeutet, dass es sich bei Kupfer, Eisen, Mangan und Zink um Cofaktoren in Metalloenzymen und Metalloproteinen innerhalb der Mitochondrien handelt.^[48] Eine Störung des Metallhaushalts führt zu einer Unterbrechung der Signalgebung, zur Erzeugung von ROS und mitochondrialer Lipidmembranperoxidation, was die wahrscheinlichsten Beiträge zu verschiedenen Krankheiten wie der Parkinson- und der Alzheimer-Krankheit bei überhöhten Konzentrationen an Metallionen (z.B. Fe^{3+} , Cu^{2+} und Zn^{2+}) darstellen könnte.^[49] Allerdings ist immer noch weitgehend unbekannt, wie Zellen einen optimalen Vorrat an Metallionen zur Aufrechterhaltung mitochondrialer Funktionen konstant halten. Daher besteht dringender Bedarf an Fluoreszenzsonden, die auf Mitochondrien zielen und Metallionen-Konzentrationen in lebenden Zellen messen.

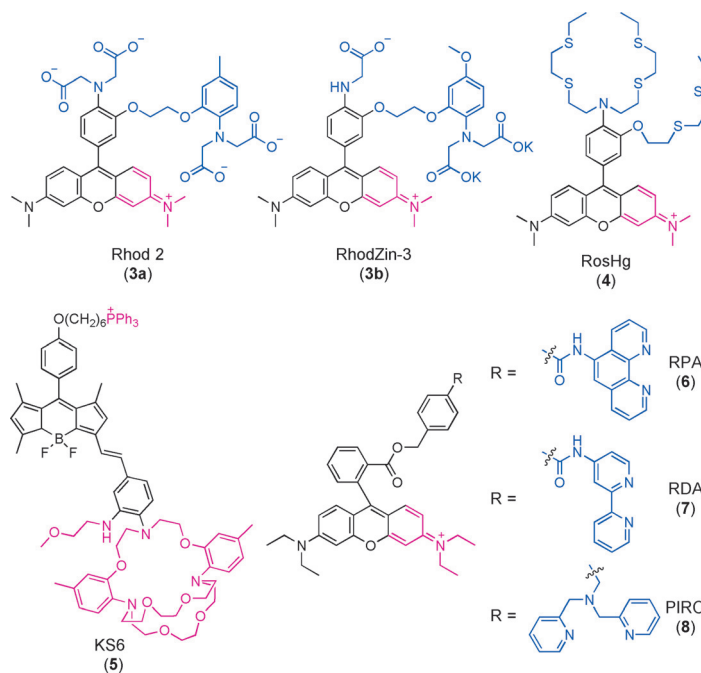
Die frühen Arbeiten zu auf Mitochondrien zielenden Fluoreszenzsonden für Metallionen liegen mehr als zwanzig Jahre zurück, als Tsien et al. 1989 über eine Reihe von Ca^{2+} -Fluoreszenzsonden, die „Rhod-Serie“, berichteten.^[50] Nachfolgende Studien deuteten darauf hin, dass die „Rhod-Sonden“, wie Rhod 2 (**3a**, Schema 2), bevorzugt in Mitochondrien

akkumulieren, während ihre Acetoxymethyl-(AM)-Ester-Derivate (z.B. Rhod 2-AM) bei der Quantifizierung der mitochondrialen Calciumkonzentrationen zur Anwendung kamen.^[51]

Inspiziert durch ihre wegweisenden Arbeiten wurden basierend auf demselben Konzept intrinsisch lipophiler kationische Fluorophore zahlreiche auf Mitochondrien zielende Fluoreszenzsonden für Metallionen beschrieben. Beispielsweise ist das von Gee et al. publizierte RhodZin-3 (**3b**, Schema 2) mittlerweile kommerziell erhältlich.^[52] Vor kurzem beschrieben Taki et al. eine auf Rhodamin basierende Fluoreszenzsonde RosHg (**4**, Schema 2) für die Hg^{2+} -Bildgebung in Mitochondrien.^[53] In Abwesenheit von Hg^{2+} wird die Emission von RosHg durch den photoinduzierten Elektronentransfer (PeT) von dem elektronenreichen Rezeptor (Amin oder Schwefel) auf den Xanthenrest effizient gelöscht ($\Phi < 0.005$), beim Binden an Hg^{2+} wird eine bemerkenswerte Fluoreszenzsteigerung von RosHg beobachtet. Konfokalmikroskopische Experimente veranschaulichten, dass diese Sonde in den Mitochondrien akkumulierte und Änderungen des Hg^{2+} -Gehalts in den Mitochondrien lebender Zellen anzeigen konnte. Erst kürzlich berichteten Meldrum et al. über einen potenten Mitochondrien-spezifischen K^{+} -Sensor KS6 (**5**, Schema 2) zur Verfolgung der K^{+} -Dynamik.^[54] KS6 offenbarte in Gegenwart von K^{+} eine 130-fache Fluoreszenzsteigerung, die zur Untersuchung des Kaliumstroms in lebenden Zellen eingesetzt wurde.

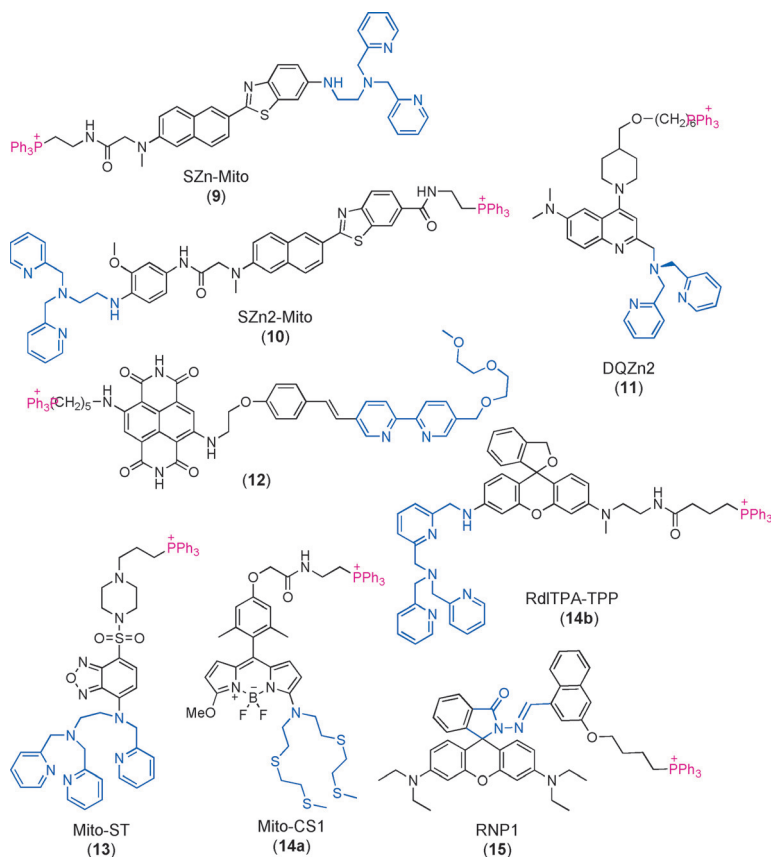
Eisen spielt bei zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Zuviel Eisen führt etwa zur übermäßigen Bildung von ROS und dadurch zu mitochondrialen Fehlfunktionen.^[55] Frühe Arbeiten zur indirekten Verfolgung von mitochondrialem labilem Eisen bezogen sich auf dessen Fähigkeit zur Erzeugung von ROS, die mithilfe der Sonde DHR gemessen werden konnte.^[55b,56] Petrat et al. präsentierten 2002 die auf Rhodamin basierende Sonde RPA (**6**, Schema 2) als selektive Fluoreszenzsonde für mitochondriales Fe^{2+} .^[57] RPA besteht aus Rhodamin B als auf die Mitochondrien zielender Reporter und dem Eisen chelatisierenden 1,10-Phenanthrolin als Rezeptor. Die Emission von RPA wird stöchiometrisch von Fe^{2+} gelöscht. Experimente zur Zellbildgebung deuteten darauf hin, dass RPA selektiv in den Mitochondrien kultivierter Ratten-Hepatozyten akkumuliert. Außerdem ermöglicht die erhebliche Abschwächung der Emission der Sonde die Quantifizierung von mitochondrialem chelatisierbarem Eisen. Später entwickelte dieselbe Gruppe zwei weitere Sonden für mitochondriales Eisen, RDA (**7**) und PIRO (**8**, Schema 2) mit ausgeprägter Bindungsaffinität zu Eisen.^[58] Diese Sonden wurden auch zur Untersuchung chelatisierbarer Eisenvorräte in den Mitochondrien isolierter Rattenleberzellen eingesetzt. Alle zuvor genannten Fluoreszenzsonden für mitochondriales Fe^{2+} beruhen aufgrund der paramagnetischen Beschaffenheit von Fe^{2+} auf Fluoreszenzlöschung.^[110]

Intrinsisch kationische lipophile Fluoreszenzsonden wurden weniger verbreitet angewendet als Sonden mit externen mitochondrialen Zielvektoren wie TPP, da solche Zielvektoren universell an alternative Sonden



Schema 2. Auf Rhodamin basierende Fluoreszenzsonden für mitochondriale Metallionen.

angehängt werden können.^[6] Hier werden einige Sonden für Zn^{2+} -, Cu^{+} - und Fe^{2+} -Ionen vorgestellt. Kim et al. berichteten 2011 über eine Zwei-Photonen-Sonde (SZn-Mito (9), Schema 3) für mitochondriales Zn^{2+} .^[59] Die Sonde nutzte 6-(Benzo[d]thiazol-2-yl)-2-(*N,N*-dimethylamino)naphthalin (BTDAN) als Zwei-Photonen-Reporter, mit TPP als mitochondrialem Vektor und *N,N*-Di-(2-picolyl)ethylendiamin



Schema 3. Auf Mitochondrien zielende Fluoreszenzsonden für Metallionen mit TPP als Zielvektor.

(DPEN) als hochselektivem Zn^{2+} -Chelator. DPEN und die TPP-Gruppen wurden zur Minimierung ihrer Kreuzwechselwirkungen getrennt an den beiden Enden des BTDAN positioniert. Ähnlich dem Fall von RosHg (4) maskiert der PeT vom DPEN die Emission von BTDAN. Bei Zugabe von Zn^{2+} wurde eine siebenfache Steigerung der Emission beobachtet. Außerdem kann SZn-Mito sowohl in Zellen als auch in Hippocampus-Gewebeschnitten von Ratten bei einer Tiefe von 100–200 μm mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie (TPM) mitochondriales Zn^{2+} detektieren.^[59] Nachfolgend beschrieb dieselbe Gruppe eine empfindlichere Zwei-Photonen-Sonde (SZn2-Mito (10), Schema 3) für mitochondriales Zn^{2+} , die auf genau demselben Reporter, Vektor und Zn^{2+} -Chelator basiert, bei der aber die Positionen von Vektor und Chelator am Reporter vertauscht sind.^[60] Tatsächlich werden durch die vertauschten Positionen von DPEN und TPP die HOMO- und LUMO-Niveaus umgestaltet, sodass die Sonde empfindlicher auf den Analyten reagiert. Bei der Zugabe von

Zn^{2+} ist eine 70-fache Steigerung der Fluoreszenz von SZn2-Mito zu beobachten, was eine empfindlichere Zellbildgebung (Abbildung 3) und die Darstellung von mitochondrialem Zn^{2+} in tieferen Bereichen von Rattenhippocampus-Gewebeschnitten ermöglichte.^[60]

Mehrere andere Gruppen untersuchten ebenfalls mitochondriale Zn^{2+} -Sonden. Die Gruppe von Jiang präsentierte 2012 mit DQZn2 (11, Schema 3) eine ratiometrische Zn^{2+} -Sonde, die auf dem Chinolin-Fluorophor basiert.^[61] Bei der Zugabe von Zn^{2+} verhielten die Kationen durch Chelatisierung mit den Aminogruppen, dass die Sonde ihre ursprüngliche Resonanzstruktur einnimmt, und verursachten dadurch eine Blauverschiebung der Emission um 46 nm und eine fünffache ratiometrische Variation unter physiologischen Bedingungen. Der TPP-Vektor lenkte DQZn2 wie gewünscht zu den Mitochondrien in lebenden NIH3T3-Zellen, wo die große ratiometrische Variation die Visualisierung der Änderung des mitochondrialen Zn^{2+} -Gehalts erleichterte. Mithilfe einer Intensitäts-Konzentrations-Standardkurve konnte ungebundenes mitochondriales Zn^{2+} quantifiziert werden, was für die Überwachung von Zn^{2+} -Spezies in lebenden Zellen wichtig ist.^[61] He und Guo et al. wiederum vereinigten ein Sulfamoylbenzoxadiazol-Fluorophor mit einer TPP-Gruppe und dem starken Zn^{2+} -Rezeptor TPEA (*N,N,N'*-Tri(pyridin-2-ylmethyl)ethan-1,2-diamin) zu einer auf Mitochondrien zielenden ratiometrischen Zn^{2+} -Sonde mit doppelter Anregung (Mito-ST, 13, Schema 3),^[62] deren Empfindlichkeit es vereinfachte, die mitochondriale Freisetzung von Zn^{2+} und das Zellverhalten unter Stimulierung durch H_2O_2 und SNOC zu untersuchen.^[62] Davidson und Zhu et al. erhielten die ähnliche ratiometrische Sonde 12 (Schema 3) für Zn^{2+} in Mitochondrien, indem sie einen TPP-Rest an ein diaminosubstituiertes Naphthalindiimid anhängten.^[63]

Kupfer, insbesondere dessen monovalente Form, Cu^{+} , dient als entscheidendes Signalelement in Zellen und kann in zahlreichen Organellen vorliegen. Die Funktionen von Cu^{+} sind jedoch noch immer weitgehend ungeklärt, doch selektive auf Organellen zielende Cu^{+} -Fluoreszenzsonden könnten Abhilfe schaffen. Die Gruppe von Chang entwickelte 2011 die auf Mitochondrien zielende Cu^{+} -Sonde Mito-CS1 (14a, Schema 3) zur Untersuchung aus-

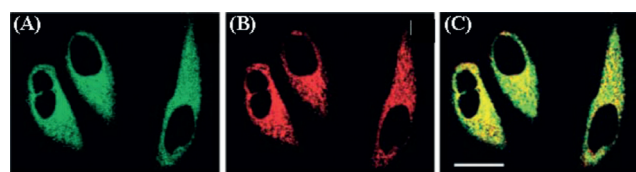


Abbildung 3. Abbildung von mit A) SZn2-Mito (1 μM ; Zwei-Photonen-Mikroskopie) und B) Mitotracker Red FM (1 μM ; Ein-Photonen-Mikroskopie) comarkierten HeLa-Zellen. C) Colokalisierte Abbildung. Maßstab: 20 μm . Die Abbildung wurde mit Erlaubnis der Royal Chemical Society übernommen.

tauschbarer mitochondrialer Kupfervorräte in lebenden Zellen durch den Einbau des TPP-Vektors in eine bekannte Cu^+ -Sonde.^[64] Photophysikalische Untersuchungen zeigten eine selektive (zehnfach gesteigerte) Signalantwort, während ein Cofärbungsexperiment darauf hinwies, dass Mito-CS1 in HEK-293T-Zellen an den Mitochondrien lokalisiert ist (Abbildung 4). Weitere Untersuchungen zur molekularen Bild-

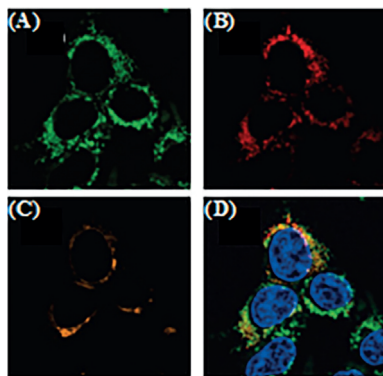


Abbildung 4. Mito-CS1 kolokalisiert mit Mitochondrien in lebenden HEK293T-Zellen. Mit A) 500 nM Mito-CS1, B) 50 nM MitoTracker Deep Red und C) 2.25 μM BODIPY FL C5-Ceramid-BSA-Komplex für 15 min bei 37°C in DPBS angefärbte HEK-Zellen. D) Überlagerung von (A) und (B) mit Hoechst 33342. Die Abbildung wurde mit Erlaubnis der American Chemical Society übernommen.

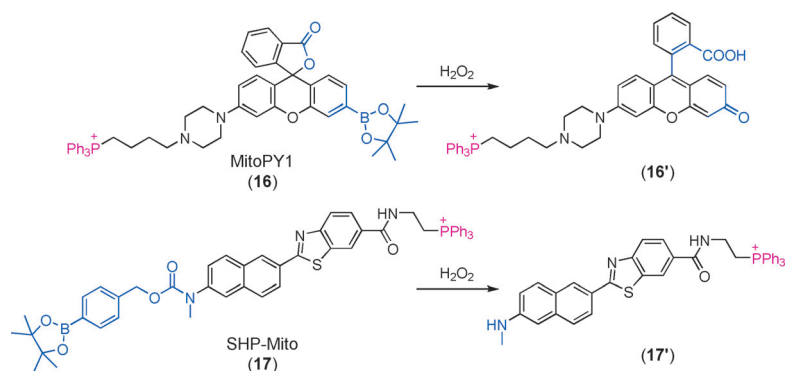
gebung deuteten darauf hin, dass Mito-CS1 sowohl in HEK-293T-Zellen als auch in menschlichen Fibroblasten Konzentrationsänderungen von labilem mitochondrialem Cu^+ detektieren konnte. Außerdem konnte Mito-CS1 angewendet werden, um Mutationen der Cytochrom-c-Oxidase 1 und 2 (SCO1 und SCO2) in menschlichen Fibroblasten anzuzeigen, die Schwankungen des Cu^+ -Gehalts verursachen.^[64] In einem anderen Beispiel kam eine Entschützungsstrategie unter Verwendung eines spirocyclischen Rhodamins zur Entwicklung von auf Mitochondrien zielenden Cu^+ -Sonden zum Einsatz (**14b**, Schema 3).^[65]

Erst kürzlich entwarfen Chen et al. auf der Grundlage des FRET-Mechanismus die ratiometrische Sonde RNP1 (**15**, Schema 3) für mitochondriales Fe^{3+} , in der ein TPP-konjugierter Naphthalin-Chromophor über einen Hydrazin-Linker in eine Rhodamin-Plattform mit einem Spirolactamring eingegliedert wurde.^[66] Bei Zugabe von Fe^{3+} wechselwirkte das Hydrazin mit den Metallspezies, öffnete so den Ring und stellte die konjugierte Struktur des Rhodamin-Gerüsts wieder her. Es erfolgte ein FRET vom Naphthalin auf das Rhodamin, was zu einer Rotverschiebung der Emission führte. In Bildgebungsexperimenten an lebenden Zellen konnte diese Sonde auf empfindliche und selektive Weise mitochondriales Fe^{3+} detektieren.^[66]

3.4. MiTAFPs für ROS/RNS und Redoxgleichgewichte

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind eine Gruppe von radikalischen oder nichtradikalischen sauerstoffhaltigen Spezies, die eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen spielen.^[2,3,67] Mitochondrien setzen die meisten ROS durch oxidative Phosphorylierungen frei. Bei bestimmten ROS (z.B. H_2O_2) handelt es sich um Signalmoleküle, die mit diversen physiologischen Funktionen, wie Transduktionsprozessen, in Zusammenhang stehen, um Marker für oxidativen Stress bei Krankheiten und beim Alterungsprozess sowie um Abwehrstoffe gegen eindringende Pathogene.^[68] Eine übermäßige Produktion und Akkumulation von ROS in Mitochondrien trägt jedoch zu Fehlfunktionen der Organellen bei, die bis zum Zelltod führen und unterschiedlichste Krankheiten zur Folge haben können.^[2,3,141] Die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen der Produktion und dem Abfangen von ROS ist demnach von entscheidender Bedeutung für das Überleben der Zellen; infolgedessen liegt ein wesentliches Forschungsinteresse auf der Bestimmung des ROS-Gehalts innerhalb der Mitochondrien, was mithilfe von MiTAFPs erreicht wird.

Frühe ROS-Sonden machten sich die Vielseitigkeit des TPP-Strukturelements zu Nutze. Robinson et al. berichteten 2006 über MitoSOX zur Messung von ROS, für das sie TPP in die kommerziell verfügbare ROS-Sonde Hydroethidin (HE) einführten.^[69] Seitdem wurden verschiedene MiTAFPs für spezifische ROS/RNS wie H_2O_2 , HClO , NO und hochreaktive Sauerstoffspezies (hROS) bekanntgegeben. Ein herausragendes Beispiel von Dickinson und Chang war auf mitochondriales Wasserstoffperoxid ausgerichtet. Sie hängten TPP an einen Boronat-maskierten Rhodol-Farbstoff mit geschlossenem Ring an und entwarfen so MitoPY1 (**16**, Schema 4) für die Abbildung von mitochondrialem H_2O_2 in



Schema 4. Mechanismus der Detektion von H_2O_2 durch die Verbindungen **16** und **17**.

lebenden Zellen.^[70] Nach der Reaktion mit H_2O_2 öffnete der Rhodol-Farbstoff seinen Ring und setzte das fluoreszierende Produkt **16'** frei, was zu „Turn-On“-Antworten führte. Die Kolokalisierung von MitoPY1 mit MitoTracker Red deutete darauf hin, dass MitoPY1 sich spezifisch in den Mitochondrien verschiedener Säugetierzelltypen anordnet, einschließlich HeLa (Abbildung 5), HEK293, Cos-7 und CHO.K1. Konfokalmikroskopische Experimente bestätigten, dass die

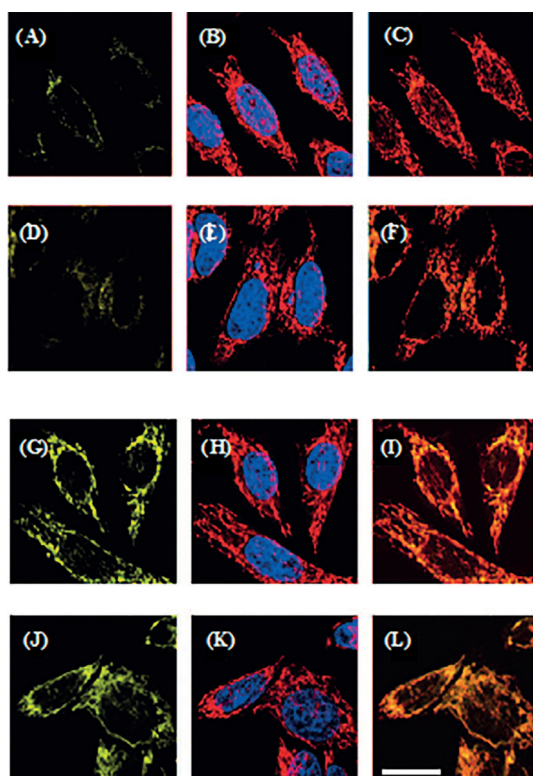


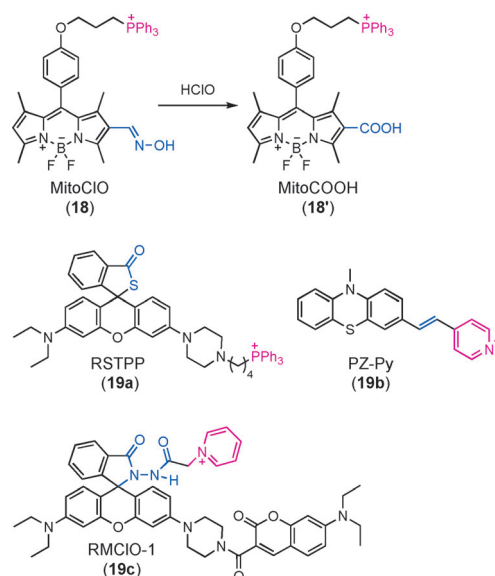
Abbildung 5. Konfokalmikroskopische Fluoreszenzabbildungen lebender HeLa-Zellen unter Verwendung von MitoPY1 bei steigendem mitochondrialen H_2O_2 -Gehalt. Mit $5\text{ }\mu\text{M}$ MitoPY1 für 60 min bei 37°C inkubierte und mit MitoPY1 (A), MitoTracker Red und Hoechst (Überlagerung, B) sowie MitoPY1 mit MitoTracker Red (Überlagerung, C) abgebildete HeLa-Zellen. Mit $5\text{ }\mu\text{M}$ MitoPY1 für 60 min bei 37°C unter Zugabe von $100\text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 für die letzten 40 min inkubierte HeLa-Zellen, abgebildet mit MitoPY1 (G), MitoTracker Red und Hoechst (Überlagerung, H), MitoPY1 und MitoTracker Red (Überlagerung, I). Mit $5\text{ }\mu\text{M}$ MitoPY1 für 60 min bei 37°C inkubierte und mit MitoPY1 (D), MitoTracker Red und Hoechst (Überlagerung, E) sowie MitoPY1 mit MitoTracker Red (Überlagerung, F) abgebildete HeLa-Zellen. Für 24 h mit 1 mM Paraquat inkubierte, dann gewaschene und für 60 min bei 37°C mit $5\text{ }\mu\text{M}$ MitoPY1 inkubierte und mit MitoPY1 (J), MitoTracker Red und Hoechst (Überlagerung, K), MitoPY1 und MitoTracker Red (Überlagerung, L) abgebildete HeLa-Zellen. Maßstab: $20\text{ }\mu\text{m}$. Mit Erlaubnis übernommen von der American Chemical Society.

Sonde die Beurteilung sowohl der endogenen Produktion als auch von Änderungen des H_2O_2 -Gehalts in den Mitochondrien lebender Zellen ermöglichte.^[70]

Nachfolgend setzten Kim et al. ein ähnliches Konzept zur Entwicklung einer auf Mitochondrien zielenden ratiometrischen Zwei-Photonen-Sonde (SHP-Mito, **17**, Schema 4) zur Messung von H_2O_2 ein.^[71] Diese Sonde enthält 6-(Benzo[d]thiazol-20-yl)-2-(*N,N*-dimethylamino)naphthalin als Zwei-Photonen-Fluorophor, eine Boronat-Gruppe als reaktives Zentrum für H_2O_2 und ein das Fluorophor maskierendes Strukturelement mit TPP als Mitochondrien-Vektor. SHP-Mito zeigte als Reaktion auf H_2O_2 eine ratiometrische Verschiebung der Emissionswellenlänge von Blau zu Gelb sowie eine selektive Lokalisierung der Mitochondrien im Vergleich zu anderen Organellen in Raw-264.7-Zellen. Das Zwei-Photonen-Merkmal ermöglichte SHP-Mito den Nachweis von

Veränderungen des mitochondrialen H_2O_2 -Gehalts in lebenden Zellen und lebendem Gewebe bei einer Tiefe von $90\text{--}190\text{ }\mu\text{m}$.^[71] Dasselbe auf H_2O_2 antwortende Strukturelement wurde auch in einem positiv geladenen Styryl-Farbstoff übernommen, der wegen der Bindungsfähigkeit zwischen der Sonde und DNA-Ketten zum Nachweis von Wasserstoffperoxid in der Nähe von mitochondrialer DNA verwendet wurde.^[72]

Erst kürzlich wurde von Peng et al. eine neuartige auf mitochondriales HClO zielende BODIPY-Fluoreszenzsonde entwickelt (MitoCLO, **18**, Schema 5), deren Wirkung auf einer

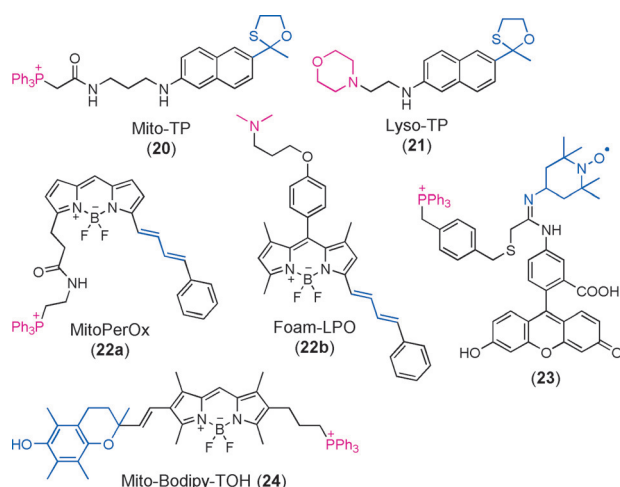


Schema 5. Vorgeschlagener Mechanismus für die Erkennung von HOCl durch MitoCLO und Strukturformeln von RSTPP, PZ-Py und RMCIO-1.

HClO -katalysierten $\text{C}=\text{N}$ -Isomerisierung basiert. Als Lokalisierungsgruppe für die Mitochondrien wurde TPP eingesetzt, während die Oximfunktion in Position 2/6 von BODIPY als reaktives Zentrum für HClO diente (Schema 5).^[73] Bei Zugabe von HClO reagierte die Sonde rasch mit einer starken Fluoreszenzsteigerung. Durch Experimente zur Fluoreszenzbildgebung wurde nachgewiesen, dass MitoCLO selektiv innerhalb der Mitochondrien lebender MCF-7-Zellen akkumuliert und auf endogenes HClO reagiert. Darüber hinaus beschrieb die Gruppe von Ma eine „Turn-On“-Fluoreszenzsonde für mitochondriales HClO (RSTPP, **19a**, Schema 5), die auf der Reaktivität von Thio-spirolacton gegenüber Hypochloriger Säure beruhte.^[74] Bei der Reaktion löste die Ringöffnung des Spiro-Rhodamins eine erhebliche Steigerung der Fluoreszenz aus, die zur Überwachung der HClO -Bildung in Makrophagen im Laufe bakterieller Infektionen zur Anwendung kam.^[74] Außerdem wurden mehrere weitere Beispiele für HClO -Sonden beschrieben, die geladene Pyridinreste oder TPP als auf Mitochondrien zielende Strukturelemente enthalten (z. B. **19b** und **19c**, Schema 5).^[75]

Obwohl HClO sowohl als Signalmolekül als auch für die oxidative Zellabwehr endogen produziert wird, wird der tat-

sächliche Produktionsort noch immer diskutiert. Um diese Problematik anzugehen, entwarfen Yuan et al. zwei Fluoreszenzsonden mit demselben Mechanismus zur Wahrnehmung von Hypochloriger Säure aber unterschiedlichen auf Organellen zielenden Strukturelementen (**20** und **21**, Schema 6).^[76]



Schema 6. Auf Mitochondrien zielende Fluoreszenzsonden für ROS mit TPP als Zielvektor.

Durch Anbringen einer Mercaptoethanol-Schutzgruppe maskierten sie die Emission des Acedan-Fluorophors, die später durch die Reaktion mit HClO wieder hergestellt werden kann. Die auf Mitochondrien und Lysosomen zielenden Strukturelemente wurden ohne Schwierigkeiten an das andere Ende des Fluorophors angefügt, was somit eine leichte Strategie zum Design von OTAFPs repräsentierte. Mithilfe dieser Sonden gelang es, Spuren an HClO im Inneren beider Organellen der stimulierten Makrophagen zu detektieren (Abbildung 6). Mithilfe ähnlicher Designstrategien

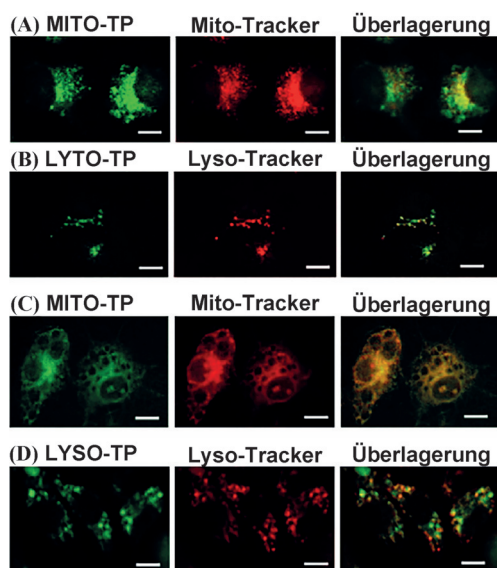
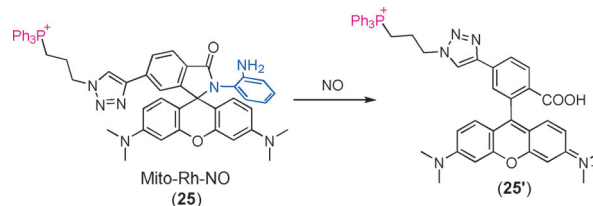


Abbildung 6. Auf Mitochondrien und Lysosomen zielende Mito-TP und Lyso-TP. Mit Erlaubnis übernommen von der American Chemical Society.^[76]

wurden andere mitochondriale ROS-Fluoreszenzsonden weiterentwickelt, beispielsweise MitoPerOx (**22a**) für die Lipidperoxidation,^[77] **23** für freie Radikale sowie Mito-Bodipy-TOH (**24**) für Lipidperoxyradikale (Schema 6).^[78] Wie von der Gruppe von Xiao berichtet wurde, konnte das reaktive Strukturelement von MitoPerOx mühelos an die Überwachung des lysosomalen Peroxidstatus angepasst werden, indem das auf die Organelle zielende Strukturmotiv abgeändert wurde (Foam-LPO, **22b**, Schema 6).^[79]

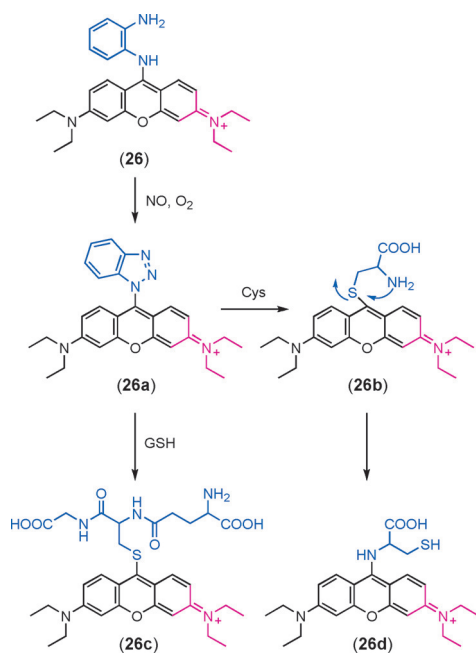
Mit Ausnahme der zahlreichen auf Mitochondrien zielenden Fluoreszenzsonden für ROS gab es wenige Berichte zur Detektion reaktiver Stickstoffspezies (RNS) in Organellen, bis vor kurzem eine auf Mitochondrien zielende „Turn-on“-Fluoreszenzsonde (Mito-Rh-NO, **25**, Schema 7) für NO



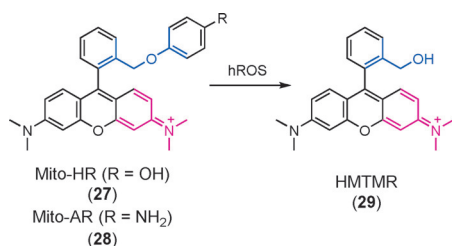
Schema 7. Reaktion von Mito-Rh-NO mit NO.

von der Gruppe von Xiao entwickelt wurde.^[80] Nach Verankerung von TPP an einer Fluoreszenzsonde (mit *o*-Phenylendiamin (OPD) „verriegeltes“ Rhodamin-Spirolactam) für NO mithilfe einer Klick-Reaktion konnte Mito-Rh-NO auf einfache Weise zu den Mitochondrien lebender MCF-7-Zellen befördert werden, was konfokalmikroskopisch belegt wurde.^[80] Außerdem war Mito-Rh-NO in der Lage, die NO-Produktion in Mitochondrien in Echtzeit zu überwachen, und somit dessen Anwendungsbreite für Studien in der chemischen Biologie deutlich auszuweiten. Angeregt durch diese Strategie übernahm die Gruppe von Guo dasselbe OPD-Strukturelement zum Design von Fluoreszenzsonden für mitochondriale NO-Spezies.^[81] Angesichts der Tatsache, dass das OPD-Strukturelement von Aminosäuren, Ascorbinsäure oder sogar pH-Schwankungen beeinträchtigt werden kann, nutzten sie außerdem das in den Mitochondrien reichlich vorhandene Cystein und Glutathion aus (**26**, Schema 8).^[81] Nach der Reaktion bilden NO und OPD eine Benzotriazolfunktion, die ohne weiteres durch die Thiole ersetzt wurde. Ein solcher Mechanismus blockiert die Reaktivität der Sonde und gewährleistet ihre herausragende Selektivität. Zur Demonstration verwendeten die Autoren diese Sonde für die Überwachung der NO-Erzeugung in lebenden Zellen. Darüber hinaus wurde basierend auf einer ähnlichen Designstrategie eine Fluoreszenzsonde für mitochondriale Peroxynitritspezies bekanntgegeben.^[82]

Abgesehen von TPP wurden auch einige lipophile kationische Farbstoffe, einschließlich Rhodamin- und Cyanin-Derivaten, zur Detektion von ROS im Inneren von Mitochondrien eingesetzt. Nagano et al. nutzten diese Vorgehensweise zum Design der Sonden Mito-HR (**27**) und Mito-AR (**28**, Schema 9).^[83] Beide Sonden fluoreszierten infolge des PeT von der 4-Aminophenyl/4-Hydroxyphenylether-Funktion auf



Schema 8. Unter Mitwirkung von Cystein und Glutathion erfolgende selektive Antwort auf NO-Spezies.



Schema 9. Vorgeschlagener Mechanismus zur hROS-Erkennung.

den Xanthenrest in Natriumphosphatpuffer (pH 7.4, 0.1 % DMF) schwach. Hochreaktive Sauerstoffspezies (hROS) wie $\cdot\text{OH}$, ONOO^- und ClO^- konnten die Etherbrücken der Sonden jedoch spalten und das stark fluoreszierende HMTMR freisetzen, sodass die Emission in Gegenwart von hROS deutlich gesteigert war. Bildgebungsstudien zeigten, dass MitoAR im Inneren der Mitochondrien lebender HeLa-Zellen akkumulierte (Abbildung 7) und die Erzeugung von mitochondrialen hROS in Echtzeit anzeigen konnte.

Yuan und Lin et al. beschrieben 2012 einen neuartigen Merocyanin-Farbstoff (HuDa) für den Nahinfrarotbereich mit verbesserten photophysikalischen Eigenschaften im Vergleich zu anderen NIR-Molekülgerüsten. Basierend auf dem neuen Farbstoff wurde NIR-H₂O₂ (30, Schema 10) für die hochselektive Detektion von H₂O₂ in Gegenwart anderer ROS gestaltet.^[84] Nach der Modifizierung der Hydroxygruppe der HuDa-Farbstoffe mit einem H₂O₂-spezifischen Boronat zeigte NIR-H₂O₂ bei einer Anregung bei 690 nm in Phosphatpuffer (pH 7.4, 1 % DMSO) eine vernachlässigbare Emission, da das Maskieren der Hydroxygruppe den elektronischen Push-Pull-Effekt der Farbstoffstruktur störte. Die Zugabe von H₂O₂ veranlasste die Bildung der freien Ver-

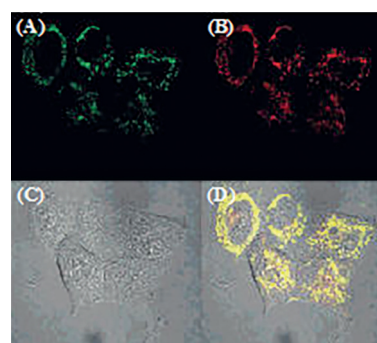
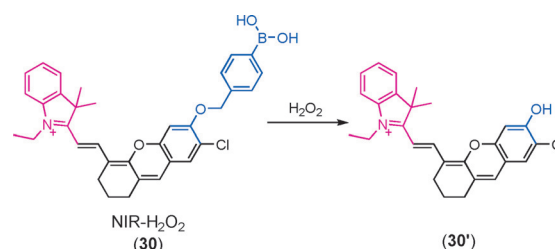


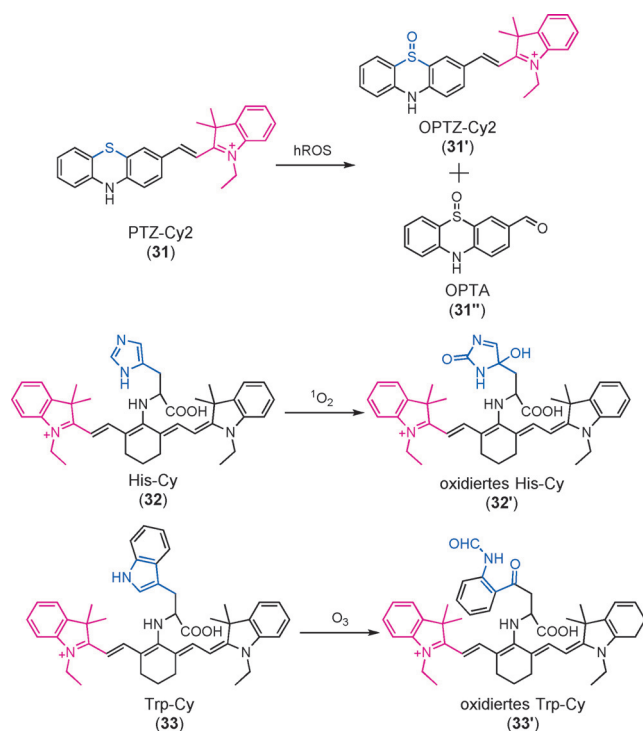
Abbildung 7. Mit MitoAR (1 μM) und MitoTracker Green FM (250 nm) beladene HeLa-Zellen: A) Fluoreszenzbild von MitoTracker Green FM; B) MitoAR; C) Hellfeld-Abbildung; D) zusammengesetzte Abbildung. Mit Erlaubnis übernommen von der American Chemical Society.^[83]



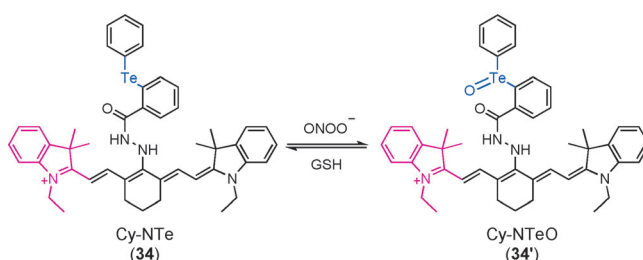
Schema 10. Erkennung von H₂O₂ mithilfe eines Hemicyaninfarbstoffs.

bindung 30' und führte zu einer gesteigerten NIR-Fluoreszenzintensität. Basierend auf den Bildgebungsexperimenten behaupteten die Autoren, dass NIR-H₂O₂ nicht nur endogenes H₂O₂ in Mitochondrien lebender RAW-264.7-Makrophagen detektieren konnte, sondern auch im Peritonealraum von Mäusen bei LPS-induzierten Entzündungsreaktionen.^[84] Allerdings kann eine Störung durch ONOO^- nicht ausgeschlossen werden, da der Fluoreszenzantwort von NIR-H₂O₂ auf ONOO^- in dieser Publikation nicht nachgegangen wurde. Zeitgleich wurde über diverse lipophile kationische Fluoreszenzsonden (z. B. PTZ-Cy2, 31,^[85] His-Cy, 32,^[86] Trp-Cy, 33,^[87] Schema 11) für andere mitochondriale ROS berichtet.

Zur Bewältigung von oxidativem Stress entwickelten Zellen effektive Maßnahmen zum Ausgleich von ROS in den Mitochondrien, bei denen Reduktionsmittel wie Glutathion (GSH) und Thioredoxin (Trx) die wichtigste Rolle spielen. Folglich ist die mitochondriale Redoxhomöostase eng mit einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse assoziiert. Vor kurzem wurden mehrere OTAFPs beschrieben, die den mitochondrialen Redoxstatus abdecken.^[88] Die Gruppe von Han präsentierte 2013 eine auf Mitochondrien zielende Nahinfrarot-Fluoreszenzsonde Cy-NTe (34, Schema 12), die auf einem kationischen Heptamethin-Cyanin-Gerüst basierte.^[88b] Cy-NTe kann durch die Reaktion mit ONOO^- im reduzierten Zustand und die reversible Reaktion mit GSH im oxidierten Zustand den ONOO^-/GSH -Redoxstatus evaluieren. Diese Sonde zeichnet sich bedingt durch den Te-induzierten PeT durch eine vernachlässigbare Emission im reduzierten Zustand aus und kann leicht durch ONOO^- -Spezies angeschaltet werden. Demzufolge deutet



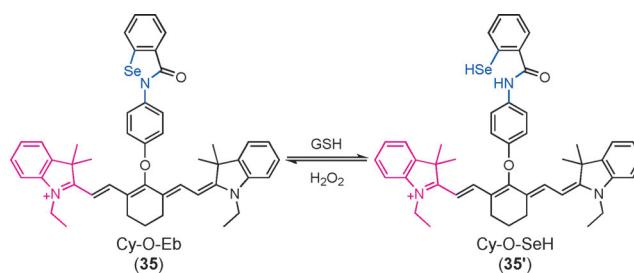
Schema 11. Erkennung von ROS mithilfe von Cyaninderivaten.



Schema 12. Untersuchung der mitochondrialen Redoxhomöostase mit Cy-NTe.

die Fluoreszenzintensität von Cy-NTe auf das Gleichgewicht zwischen ihrem reduzierten und oxidierten Zustand hin, was wiederum das Verhältnis zwischen ONOO^- und GSH widerspiegelt. Diese Sonde wurde erfolgreich zur Echtzeit-Bildgebung der ONOO^-/GSH -Redoxhomöostase in lebenden RAW264.7-Zellen und lebenden Mäusen angewendet.^[88b]

Ein weiteres wichtiges Redoxpaar, die $\text{GSH}/\text{H}_2\text{O}_2$ -Homöostase, wurde 2013 von der Gruppe von Tang behandelt. In ihren Untersuchungen wurde eine auf Cy7 basierende Sonde (Cy-O-Eb, **35**) zur Überwachung der $\text{GSH}/\text{H}_2\text{O}_2$ -Gehalte in vivo entworfen, die auf der Oxidation/Reduktion eines Selen-haltigen fünfgliedrigen Rings beruhte. Auf ähnliche, aber CyNte entgegengesetzte Weise wurde die intrinsische Emission von Cy-O-Eb bedingt durch den PeT-Mechanismus im oxidierten Zustand gelöscht, und nach der Reduktion durch GSH wurde dessen Emission angeregt. Dieser Prozess kann durch Zugabe von H_2O_2 umgekehrt werden (Schema 13).^[88c] Die Colokalisierung von Cy-O-Eb mit MitoTracker Green FM deutete darauf hin, dass sich das lipophile



Schema 13. Untersuchung der mitochondrialen $\text{GSH}/\text{H}_2\text{O}_2$ -Homöostase.

kationische Cy-O-Eb speziell in den Mitochondrien anordnet (Abbildung 8). Zusätzlich wurde diese Sonde erfolgreich zur Überwachung des Redoxstatus während der Apoptose und der H_2O_2 -Produktion am Wundrand in Zebrafischlarven verwendet.^[88c]

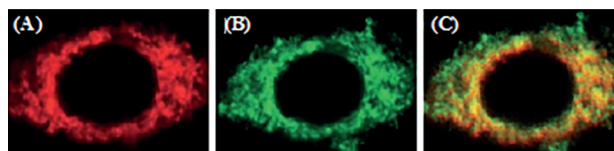
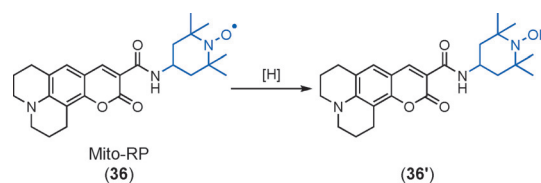


Abbildung 8. Mit $10\ \mu\text{M}$ Cy-O-Eb bei 37°C für 5 min, dann mit $50\ \text{nM}$ MitoTracker Green für 10 min inkubierte Zellen. A) $633\ \text{nm}$ He-Ne-Laser für Cy-O-Eb, B) $488\ \text{nm}$ Argon-Laser für MitoTracker Green, C) überlagerte Abbildung. Mit Erlaubnis übernommen von der Royal Society of Chemistry.^[88c]

Neben auf lipophilen kationischen Farbstoffen oder TPP-Vektoren beruhenden MiTAFPs wurde auch über einige ausgefallene MiTAFPs für ROS basierend auf neutralen Molekülen berichtet.^[89] Beispielsweise entwickelte die Gruppe von Takeoka die TEMPO-konjugierte Fluoreszenz-sonde Mito-RP (**36**, Schema 14)^[89a] zur Überwachung des



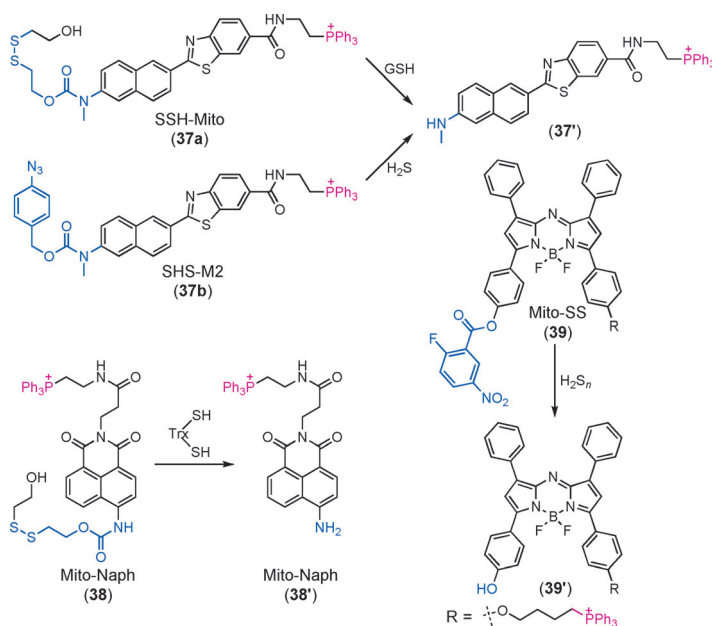
Schema 14. Eine neutrale Sonde für den mitochondrialen Redoxstatus.

mitochondrialen Redoxstatus in lebenden Zellen. Die Co-färbung von Mito-RP mit MitoTracker Red deutete darauf hin, dass diese Sonde selektiv in den Mitochondrien akkumuliert. Bei der Reduktion des Nitroxid-Radikals der TEMPO-Gruppe zu Hydroxylamin in einer reduktiven Umgebung wurde eine deutliche Emissionssteigerung beobachtet. Weitere Experimente legten nahe, dass in den Mitochondrien MitoRP hauptsächlich durch überschüssige Protonen reduziert wurden, die über den Komplex-I-vermittelten

Reaktionsmechanismus beschafft wurden.^[89a] Inwiefern diese Sonde auf Mitochondrien zielen kann, ist jedoch noch unklar.

3.5. MitAFPs für reaktive Schwefelspezies (RSS)

Die Funktion der intrazellulären RSS, wie Cystein (Cys) und Homocystein (Hcy), Glutathion (GSH), Hydrogenpolysulfide (H_2S_n , $n > 1$), Schwefeldioxid (SO_2) und Thioredoxin (Trx), ist die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Redoxhomöostase. Infolgedessen führt ein anormaler Gehalt an mitochondrialen Thiolen direkt zu Fehlfunktionen von Zellen und verschiedenen Krankheiten.^[2,90] Indes ist zum Verständnis der biologischen Rolle von Thiolen deren Überwachung und Quantifizierung auf der Ebene von Organellen von entscheidender Bedeutung. Lim et al. beschrieben die ratiometrische Zwei-Photonen-Sonde SSH-Mito (**37a**, Schema 15)



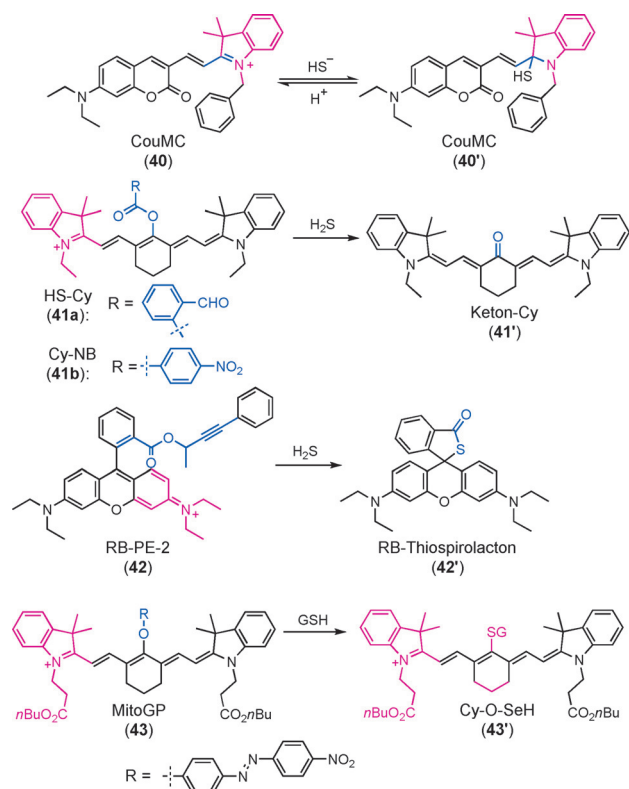
Schema 15. Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus von Sonden für mitochondriale RSS mit TPP als Zielvektor.

zur Detektion von mitochondrialen Thiolen,^[91] für die sie eine gegenüber Thiolen reaktive Disulfidfunktion und eine TPP-Gruppe an die beiden Enden des BT DAN-Fluorophors anfügten. Diese Sonde zeichnet sich durch einen signifikanten Zwei-Photonen-Querschnitt aus sowie durch eine deutliche Verschiebung der Emissionswellenlänge von Blau zu Gelb in Reaktion auf RSH und die Fähigkeit zur Visualisierung mitochondrialer Thiole in lebenden Zellen und lebendem Gewebe bei Tiefen von 90–190 μm .^[91] Unter Verwendung desselben auf Thiole antwortenden Strukturelements fand die Gruppe von Kim heraus, dass die Disulfidfunktion selektiver und schneller auf Trx reagierte als auf andere Thiole (GSH, Cys und Hcy). Von dieser Entdeckung ermutigt, beschrieben sie die mitochondriale Trx-Sonde Mito-Naph (**38**, Schema 15), die selektiv mitochondriales Trx anfärbte.^[92]

Das BT DAN-Fluorophor wurde ebenfalls zur Untersuchung von mitochondrialem H_2S eingesetzt (**37b**, Schema 15).^[93] Bei der Reaktion von SHS-M2 mit H_2S entsteht als einziges Produkt die Verbindung **37'**. Dies führt zu einem Rückgang der Emission bei 425–470 nm und einer Steigerung bei 525–575 nm, woraus eine ratiometrische Fluoreszenzantwort resultiert. Darüber hinaus wurde SHS-M2 zur Bestimmung der Konzentrationsschwankungen von H_2S verwendet, das durch Änderungen des Expressionsniveaus von Cystathionin- β -Synthase (CBS) in Astrozyten/Gehirnschnitten beeinflusst wurde.^[93] Die Gruppe von Chen hingegen beschrieb basierend auf einer ähnlichen Thiol-induzierten Abspaltungsstrategie Mito-SS (**39**, Schema 15) für mitochondriales H_2S_n , das sowohl in Zellen als auch in vivo Polysulfide anzeigen konnte.^[94]

Lipophile kationische Farbstoffe wurden außerdem zur Überwachung mitochondrialer RSS eingesetzt.^[95] Chen et al. berichteten über die auf Mitochondrien zielende ratiometrische H_2S -Fluoreszenzsonde CouMC (**40**, Schema 16) mit Merocyanin-Gerüst.^[95a] Eine selektive nucleophile Addition von HS^- an das C2-Atom der Indolenium-Funktion verändert das konjugierte System von CouMC, was zu einer blauverschobenen Emission führt. Ähnliche Strategien dienten zur Entwicklung anderer auf Mitochondrien zielenden Sonden für SO_2 -Derivate.^[95b,c] Tang et al. wiederum gestalteten die ratiometrische Nahinfrarotsonde HS-Cy (**41a**, Schema 16) auf der Grundlage eines kationischen Cyanins.^[95d] Eine nucleophile Tandem-Addition-Cyclisierung von HS^- setzt das hydroxysubstituierte Cyanin frei, das über eine Keto-Enol-Tautomerisierung weiterreagiert. Infolgedessen wird HS-Cy bei 780 nm rasch gelöscht, und es entsteht allmählich eine neue Emission bei 625 nm. Auf der Grundlage desselben Gerüsts entwickelten Chen et al. außerdem eine Cystein-Sonde (**41b**, Schema 16).^[95e,f]

Basierend auf der Reaktion zwischen H_2S und Alkinestern, bei der eine Spirocyclisierung stattfindet, befasste sich die Gruppe von Han mit einer Reihe neuartiger H_2S -Sonden (RB-PEs; beispielsweise RB-PE-2, **42**, Schema 16).^[95g] Diese Sonden wurden auf der Grundlage kationischer Rhodamine als auf Mitochondrien zielende Fluorophore und Propargylsäureestern als reaktives Zentrum für H_2S entworfen. RB-PEs wies infolge der Bildung eines nichtfluoreszierenden Rhodamin-B-Thiospirolactams einen dosisabhängigen Löscheffekt gegenüber H_2S auf. Konfokalmikroskopische Experimente veranschaulichten, dass alle Sonden selektiv in den Mitochondrien akkumulierten. Mittels Durchflusszytometrie gelang die Quantifizierung des mitochondrialen H_2S -Gehalts. Ein letztes in diese Kategorie gehörendes Beispiel ist ein NIR-Cyanin, das an einen Nitroazorest konjugiert wurde, der als selektives Reaktionszentrum für GSH dient (MitoGP, **43**, Schema 16). Diese Verbindung wurde zur Überwachung von mitochondrialem GSH mit geringer Eigenfluoreszenz eingesetzt.^[95h]



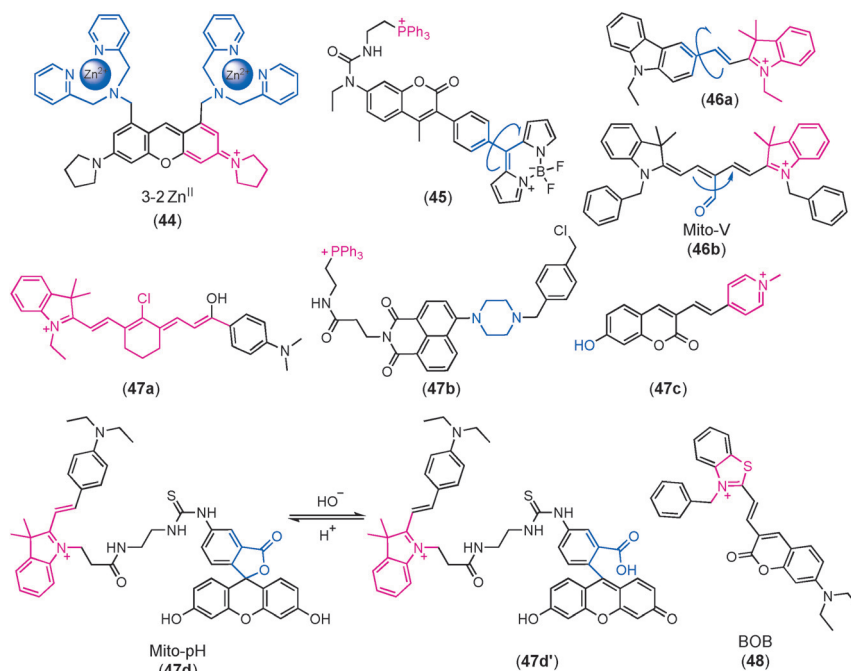
Schema 16. RSS-Fluoreszenzsonden basierend auf lipophilen kationischen Fluorophoren.

3.6. MiTAFPs für andere Analyten

Nucleosidpolyphosphate (NPPs) sind in allen Zelltypen verbreitet und wirken als Energiequelle, Signalelemente und Cofaktoren für Enzyme.^[96] Adenosintri-phosphat (ATP) ist das häufigste NPP (2–3 mM) und wird hauptsächlich in den Mitochondrien produziert.^[97] Zum besseren Verständnis von Erzeugung, Transport und Verbrauch von ATP ist daher eine einfache Überwachung kleiner Schwankungen des ATP-Gehalts wichtig. Die Gruppe von Hamachi beschrieb 2012 die „Turn-on“-Fluoreszenz-sonde 3-2 Zn^{II} (**44**, Schema 17) für die subzelluläre Abbildung von mitochondrialem ATP.^[98a] 3-2 Zn^{II} leitet sich von einem kationischen Rhodamin ab, das sowohl als Zielelement als auch als Reporter dient. Die Zink-chelatisierte Pyridylgruppe nahm eine sterisch anspruchsvolle Konformation ein, die die Konjugation mit dem Xanthenring aufhebt. Die Wechselwirkung mit ATP entlastete die Konformation und stellte die Konjugation wieder her, und demzufolge auch die Fluoreszenz. Bildgebungsexperimente deuteten darauf hin, dass 3-2 Zn^{II}

ATP-Schwankungen in Mitochondrien während der Wirkstoff-induzierten Apoptose detektieren kann.^[98a] Erst kürzlich berichteten Yuan und Chang et al. zudem über eine weitere Fluoreszenzsonde, die die Schwankungen des mitochondrialen ATP-Gehalts im frühen Stadium des Zelltods erfassen kann.^[98b]

Die Viskosität der mitochondrialen Matrix bestimmt die Flussgeschwindigkeiten aller Proteine und Signalmoleküle, und moduliert damit direkt die Diffusion von Metaboliten und beeinflusst die zellulären Vorgänge. Zwei Gruppen befassten sich gleichzeitig mit diesem Thema, wobei Kim et al. sich TPP zunutze machten,^[99] während Peng et al. das kationische Hemicyanin für die Ansteuerung der Mitochondrien einsetzten.^[100] In der selbstkalibrierenden zweiteiligen Viskositäts-sonde **45** der Gruppe von Kim war ein Cumarin-Derivat über einen starren Phenyl-Spacer mit dem BODIPY-Fluorophor verknüpft (Schema 17).^[99] Die Emission des Cumarinrests blieb bei verschiedenen Viskositäten unverändert, während der BODIPY-Substituent aufgrund der rotierenden Bindung zwischen dem Phenyl-Spacer und BODIPY in einer Umgebung höherer Viskosität stärker fluoreszierte. Fluoreszenzmessungen deuteten auf eine lineare Beziehung zwischen dem Verhältnis von BODIPY- zu Cumarin-Emission/Lebensdauer und der Viskosität des Mediums hin. Die Zellbildung demonstrierte, dass die Sonde die durchschnittliche mitochondriale Viskosität maß und Viskositätsänderungen der durch Monensin und Nystatin induzierten Mitochondrien-zentrierten Apoptose detektieren konnte.^[99] Dagegen nutzt die von der Gruppe von Peng entworfene Zwei-Photonen-Fluoreszenzsonde **46a** die Rotation des Hemicyanin-Linkers (Schema 17).^[100] In einer viskoser Umgebung ist die Rotation eingeschränkt, und die Sonde emittiert auf-



Schema 17. Auf Mitochondrien zielende „Turn-on“-Fluoreszenzsonden zur Bestimmung von ATP, Viskosität, pH-Wert und Polarität.

grund der ausgedehnteren Konjugation bei einer höheren Wellenlänge. In einer weniger viskosen Umgebung ist die Emission wegen der unterbrochenen Konjugation blauverschoben. Die ratiometrische Antwort dieser Sonde ermöglicht eine genaue Bestimmung der mitochondrialen Viskosität nicht nur in lebenden Zellen, sondern auch in lebendem Gewebe.^[100] Im Anschluss beschrieb die gleiche Gruppe Mito-V (**46b**), das über den dualen Fluoreszenzmodus (Fluoreszenzverhältnis und -lebensdauer) mitochondriale Viskositätsänderungen während der Apoptose abbilden konnte.^[101]

Mitochondriale Funktionen sind zudem auf einen genau aufrechterhaltenen pH-Wert und ein Polaritätsgleichgewicht innerhalb der Matrix angewiesen. Mitochondrien weisen aufgrund der Protonenausfuhr durch die oxidative Phosphorylierung einen leicht basischen pH-Wert auf.^[102] Die Gruppen von Tang^[102a] und Sessler/Kim et al.^[102b] berichteten 2014 unabhängig voneinander über die Verbindungen **47a** und **47b** als auf Mitochondrien zielende pH-Wert-empfindliche Sonden (Schema 17). **47b** besteht aus einem Piperazin-verknüpften Naphthalinimid als pH-Wert-empfindlichem Reporter und auf Mitochondrien zielendem TPP.^[102b] Die Zellbildgebung bestätigte eine wünschenswerte „Turn-on“-Antwort von **47b** in Echtzeit auf die mitochondriale Ansäuerung, die durch mitochondriale Makrophagie infolge eines Nährstoffmangels bedingt wird.^[102b] Weitere Untersuchungen führten zu zwei weiteren ratiometrischen pH-Fluoreszenzsonden (**47c**^[103] und **47d**).^[104] Das von Guo und He et al. beschriebene Mito-pH (**47d**, Schema 17) nutzt eine FRET-Strategie, um den mitochondrialen pH-Wert ratiometrisch zu überwachen.^[104] Diese Sonde kombiniert Hemicyanin und Fluorescein: Im sauren Milieu liegt das Fluorescein in der nichtkonjugierten Spirolactonform vor, wodurch die Übertragung seiner Energie auf das Hemicyanin blockiert ist: im basischen Milieu invertiert das Fluorescein hingegen zu der konjugierten Xanthenform, was eine FRET-Kopplung ermöglicht. Entsprechend gelang den Forschern mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie mit doppelter Anregung und Emission die Überwachung der pH-Wert-Schwankungen in lebenden Zellen (Abbildung 9).^[104]

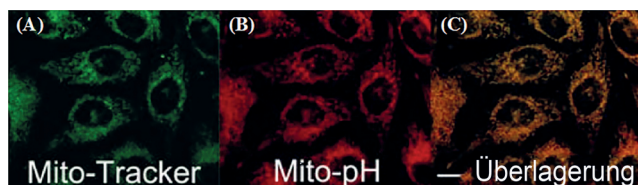


Abbildung 9. In den Kompartimenten der Mitochondrien angesiedeltes Mito-pH. Mit Erlaubnis übernommen von der Royal Chemical Society.

Mitochondriale Aktivitäten wie der Proteintransport und molekulare Wechselwirkungen werden hingegen von der Polarität der Organellen beeinflusst. Zur Untersuchung der mitochondrialen Polarität setzten Peng und Fan et al. eine Sonde ein, die Hemicyanin- und Cumarin-Elemente kombinierte (BOB, **48**, Schema 17).^[105] Mit seinen stark elektro-

nenschiebenden und elektronenziehenden Substituenten weist BOB einen beträchtlichen intramolekularen Ladungstransfer auf, der auf Schwankungen in der Polarität reagiert. Vergleichbar mit Mito-pH weist BOB zwei Anregungspeaks und zwei Emissionspeaks auf, was eine Überwachung mittels Fluoreszenzmikroskopie mit doppelter Anregung und Emission ermöglicht. Unter Verwendung dieser Sonde fanden die Forscher heraus, dass Krebszellen eine geringere Polarität aufweisen als normale Zellen, was eine mögliche Methode zur Unterscheidung von Zelllinien zur Verfügung stellt (Abbildung 10).^[105] Darüber hinaus wurden auch Sonden für die mitochondriale Temperatur^[106] und Fluoridionen^[107] vorgestellt.

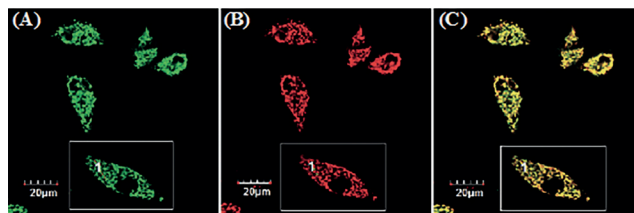


Abbildung 10. Lokalisation der Polaritätssonde innerhalb von Mitochondrien. A) Mito Tracker Green; B) BOB; C) zusammengesetzte Abbildung von A) und B). Mit Erlaubnis übernommen von Wiley.

3.7. Herausforderungen für MiTAFFPs

Die selektive Akkumulation lipophiler kationischer Farbstoffe im Inneren von Mitochondrien ausnutzend, wurden diverse MiTAFFPs entwickelt und umfassend zur Abbildung mitochondrialer Vorgänge angewendet. Obwohl tiefgreifende Fortschritte auf diesem Gebiet erreicht wurden, gibt es gewiss noch viele Herausforderungen, denen sich Forscher stellen sollten:

- 1) Zwar können lipophile kationische Farbstoffe Mitochondrien anfärben, sie können aber immer noch aus der Organelle ausgewaschen werden, sobald das mitochondriale Membranpotential infolge einer medikamentösen Behandlung oder anderer Prozesse eingebüßt wird. Beispielsweise beeinflusst die Behandlung von Zellen mit aldehydischen Fixativen den energetischen Zustand der mitochondrialen Membran, weswegen lipophile kationische Farbstoffe in diesen Fällen nicht funktionieren können.^[42]
- 2) Obwohl TPP und andere Vektoren umfangreich als auf Mitochondrien zielende Strukturelemente eingesetzt wurden, ist deren Zelltoxizität besonders bei der Langzeitüberwachung von Zellen noch immer problematisch. Die Akkumulation von Kationen in den Mitochondrien kann sich ebenfalls auf das Membranpotential auswirken.^[47a, 108a, b]
- 3) Es gibt zahlreiche Analyten in den Mitochondrien, von denen ein großer Teil nur in nanomolaren Mengen vorliegt. Demzufolge muss die Empfindlichkeit von MiTAFFPs deutlich gesteigert werden. MiTAFFPs stehen indes hauptsächlich für Metalle und reaktive Spezies zur Verfügung, vielen anderen Analyten, wie verschiedenartigen

NPPs, Anionen und Peptiden, wurde jedoch noch nicht die erforderliche Beachtung geschenkt. Abgesehen von niedermolekularen Sonden gelang es alternativ mit fluoreszierenden Proteinen und Nanopartikel-basierten Sonden, Fortschritte im Hinblick auf mitochondriale Analyten zu erzielen, dennoch sind weitere Forschungen noch immer gefragt.^[108c-e]

- 4) Die meisten beschriebenen MiTAFFPs basieren auf Änderungen in der Fluoreszenzintensität, diese Signaländerungen können allerdings unter mangelnder Empfindlichkeit oder Interferenzproblemen leiden. Ratiometrische Fluoreszenzsonden können sich selbst kalibrieren, was Ungenauigkeiten beseitigt. Zukünftige Forschungen zur Detektion mitochondrialer Analyten könnten von ratiometrischen Fluoreszenzsonden profitieren.

4. Auf das zelluläre Verdauungssystem zielende aktivierbare Fluoreszenzsonden

4.1. Überblick über das zelluläre Verdauungssystem

Ab und zu hemmen Fremdsubstanzen, obsolete Biomoleküle und nicht richtig arbeitende Organellen das Zellwachstum und die Zellfunktionen. Um mit diesen Abnormalitäten umzugehen, haben Zellen ein vollständiges Einschluss- und Verdauungssystem entwickelt, das die Fremdsubstanzen in niedermolekulare Nahrung umwandelt. Die wichtigsten Bestandteile des zellulären Verdauungssystems sind die Endozytose und die Autophagozytose.^[109] Der zuerst genannte Prozess beinhaltet Endosomen und Lysosomen, die auf Fremdsubstanzen zielen, wohingegen der zuletzt genannte Prozess Autophagosomen und Autolysosomen in der

Hauptrolle hat, die obsolede Zellbestandteile verdauen (Abbildung 11).

Der Mechanismus der Endozytose hilft bei der Beseitigung von Fremdsubstanzen, bei denen es sich hauptsächlich um Proteine handelt oder, im Fall der Phagozytose, um Pathogene.^[109a] Beim Kontakt mit fremden biomolekularen Fremdsubstanzen internalisiert die Plasmamembran aktiv, um die Biomoleküle in Form von Vesikeln einzuhüllen, die dann auf die schwach sauren frühen Endosomen mit einem pH-Wert von 6.5 übertragen werden. In den frühen Endosomen, die abgesondertes Zellmaterial sammeln, werden die Biomoleküle kategorisiert und bezüglich ihres jeweiligen Bestimmungsorts markiert. Beispielsweise werden einige Signalmoleküle über die Vesikel-vermittelte Exozytose aus der Zelle exportiert, während andere Spezies weiter zu den saureren späten Endosomen befördert werden. Die späten Endosomen wirken als Übergabestationen, die sowohl obsolede Biomoleküle von den frühen Endosomen als auch Säurehydrolasen von dem Trans-Golgi-Netzwerk und dem Golgi-Apparat übernehmen.^[110] Erwähnenswert ist, dass die Säurehydrolasen von der Kern-DNA genetisch kodiert, in den Ribosomen auf dem rauen endoplasmatischen Retikulum produziert und zum Golgi-Apparat transportiert werden, wo sie selektiv wirken. Die Säurehydrolasen werden in dem Cis-Golgi-Apparat mit Mannose-6-phosphat(M6P)-Rezeptoren versehen und weiter durch ein M6P-Rezeptor(M6PR)-Protein in dem Trans-Golgi-Apparat geschützt, da die Säurehydrolasen, sobald sie einmal freigesetzt wurden, Zellschädigungen hervorrufen können. Von dem Trans-Golgi-Netzwerk werden die mit M6PR markierten Säurehydrolasen selektiv auf die späten Endosomen übertragen. In dem sauren Medium der späten Endosomen mit einem pH-Wert um 5.5 wird M6PR von dem Hydrolase enthaltenden Vesikel gelöst

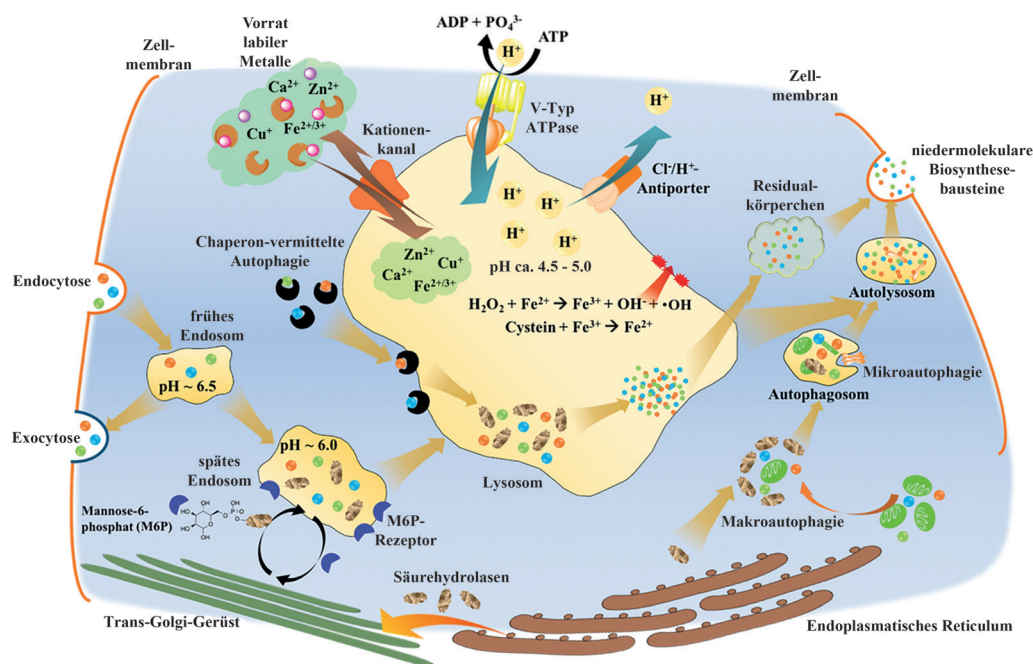


Abbildung 11. Chemische und biologische Prozesse des zellulären Verdauungssystems. Bei den Schlüsselbestandteilen handelt es sich um Lysosomen, Endosomen und Phagosomen.

und in das Vesikel gefüllt, das zur Wiederverwertung zu dem Trans-Golgi-Apparat zurückgeleitet wird.^[111]

Von den späten Endosomen werden die obsoleten Biomoleküle und die Säurehydrolasen auf die Lysosomen, den Zellmagen, übertragen.^[112] Lysosomen sind kugelförmige katabolische Organellen, die in nahezu allen eukaryotischen Zellen vorkommen und hauptsächlich für die Zersetzung biologischer Makromoleküle durch Organellen zuständig sind.^[113] Der niedrige pH-Wert (ca. 4.5) in den Lysosomen, ebenso wie den Endosomen, wird von einer Reihe von Protonenpumpen herbeigeführt, wie der vakuolären H^+ -ATPase, die zur Unterstützung des Imports von Protonen in die Membran von Lysosomen oder Endosomen die Energie von ATP nutzt. Diesem Protonenimport wird von anderen Kanälen entgegengewirkt, einschließlich dem Cl^-/H^+ -Antipporter, der bei gleichzeitigem Protonenexport Chloridionen importiert. Beim Eintritt der Säurehydrolasen in die Lysosomen werden sie durch den niedrigen pH-Wert aktiviert und zersetzen die Biomakromoleküle zu niedermolekularen Materialien für die Biosynthese, die dann aus den Lysosomen exportiert werden.^[114] Die Prozesse in den Lysosomen werden von diversen Signalelementen reguliert, einschließlich Metallionen. Der lysosomale labile Metallvorrat ist über Kationenkanäle mit dem cytosolischen Metallvorrat verbunden, und alle Metallspezies spielen entscheidende Rollen bei der zellulären Signalgebung und der Redoxregulierung.^[115] Beispielsweise werden bei Fehlfunktionen des Eisen-Redoxsystems hochreaktive Hydroxylradikale erzeugt, die die Lysosomenmembran zerstören, was das Austreten von Protonen und Säurehydrolasen zur Folge hat und letztendlich zum Zelltod führt.^[113b]

Neben der Endozytose hilft die Autophagozytose bei der Verdauung von obsoleten Zellbestandteilen oder Zelltrümmern, wie anormalen Mitochondrien. Es gibt drei verschiedene Arten der Autophagozytose: die Makroautophagozytose, die Mikroautophagozytose und die Chaperon-vermittelte Autophagozytose.^[109b] Bei der Chaperon-vermittelten Autophagozytose handelt es sich um einen spezifischen Mechanismus unter Beteiligung des Hitzeschockproteins 8 (hsc70) von 70 kDa. Biomoleküle mit einer Erkennungsstelle für hsc70 können an Chaperon binden, das auf die Lysosomen zielt, und anschließend internalisiert und verdaut werden.^[116] Dagegen sind die Makroautophagozytose und die Mikroautophagozytose häufiger ablaufende Mechanismen, von denen sich die Makroautophagozytose durch die Bildung von Autophagosomen auszeichnet und sich die Mikroautophagozytose hauptsächlich auf Lysosomen und Autophagosomen beschränkt, die die obsoleten Biomoleküle direkt aufnehmen.^[117] Säurehydrolasen enthaltende Vesikel hüllen die Zielorganellen oder -biomoleküle ein und bilden Autophagosomen mit einer Doppelschichtmembran.^[118] Die Autophagosomen fusionieren dann mit Lysosomen zu Autolysosomen, während die Proteine der Lysosomen die Hydrolasen aktivieren und die Verdauung erfolgt.^[119] Ähnlich der Endozytose liefert die Autophagozytose als Endprodukt niedermolekulare Nährstoffe für die Biosynthese und das Überleben der Zelle. Tatsächlich wird in Hungerphasen zum Unterhalt der Zellen eine nichtselektive Makroautophagozytose vollzogen. Demzufolge ist das gesamte zelluläre Verdau-

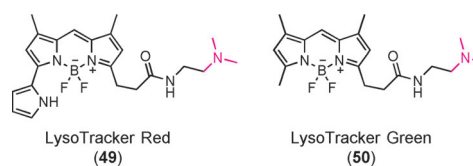
ungssystem von entscheidender Bedeutung für die Viabilität von Lebewesen. Fehlregulierungen ihrer Funktionen verursachen diverse Krankheiten, einschließlich auf einen Hydrolasemangel zurückzuführender lysosomaler Speicherkrankheiten und durch die fehlerhafte Entfernung schädlicher Proteinaggregate bedingte neurodegenerative Erkrankungen.^[120] In Anbetracht der wichtigen biologischen Funktionen und der zahlreichen am Verdauungssystem beteiligten Analyten ist die Entwicklung niedermolekularer Fluoreszenzsonden für deren selektive Bildgebung unabdingbar.

4.1. Allgemeine Methoden zum Design von auf Verdauungsorganellen zielenden Fluoreszenzsonden

Verdauungsorganellen enthalten hydrolytische Enzyme, die ausschließlich unter sauren Bedingungen funktionieren. In Endosomen, Autophagosomen und Lysosomen herrscht aufgrund des Protonenimportmechanismus der ATPasen vom V-Typ ein niedrigerer pH-Wert vor als im Cytoplasma.^[113b,d,121a] Daher ähneln sich die zugrundeliegenden Designstrategien für auf Lysosomen zielende aktivierbare Fluoreszenzsonden (LyTAFPs) und auf Endosomen zielende aktivierbare Fluoreszenzsonden (EndTAFPs) für zahlreiche Analyten stark. Die meisten der beschriebenen LyTAFPs und EndTAFPs machen sich den charakteristischen pH-Wert dieser Verdauungsorganellen zunutze:

Kleine Moleküle unter 1 kDa bewegen sich frei durch das Zellmembransystem.^[121b] Ankersonden für Lysosomen oder andere saure Organellen tragen lipophile schwach basische Reste, sprich lipophile Amine. Sobald solche Sonden in das Innere der sauren Organelle gelangen, werden die Aminogruppen protoniert und die Sonden positiv geladen und aufgrund der Undurchlässigkeit der Membran innerhalb der Organelle festgehalten. Forscher bezeichnen die Anker der Lysosomen als lysosomotrope Mittel, von denen einige eine Anreicherung um das 100-fache in Organellen erreichen können. Diese Agenzien eignen sich für eine Fülle von Verwendungszwecken, beispielsweise als Arzneimittel, zur pH-Messung und, wie hier diskutiert, als Fluoreszenzsonden.^[13b] Sonden für Endosomen und Autophagosomen haben ähnliche Designmerkmale wie Sonden für Lysosomen, sie erfordern wegen der unterschiedlichen pH-Werte dieser Umgebungen aber eine spezielle Anpassung.

Basierend auf diesem Mechanismus wurden diverse Fluoreszenzsonden entworfen, wie LysoTracker Red und LysoTracker Green, die die gleichen lipophilen Aminoreste, aber unterschiedliche Emissionswellenlängen aufweisen (Schema 18).^[42]



Schema 18. Die Strukturen von LysoTracker Red und LysoTracker Green. Das auf Lysosomen zielende Strukturelement ist markiert.

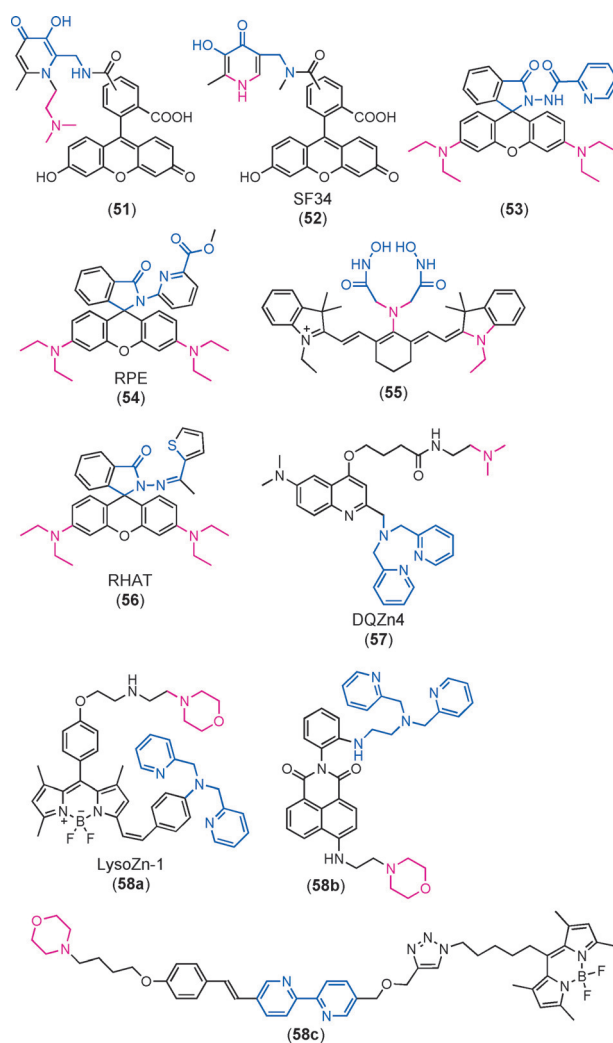
Üblicherweise ist das Design einer Fluoreszenzsonde unter Verwendung lysosomotroper Mittel oder anderer Anker-elemente für saure Organellen einfach: Ein maskierter Fluorophor wird mit einer schwachen Base als Zielelement und einer durch den interessierenden Analyten aktivierbaren Funktion verknüpft. Sobald das Aktivierungselement auf den Analyten trifft, wird der Fluorophor durch die Wechselwirkung demaskiert, und das Fluoreszenzsignal tritt in Erscheinung. Bei den meisten LyTAFPs handelt es sich in Wirklichkeit um UND-Logikgatter, die nur dann fluoreszieren, wenn sie sowohl von Protonen (H^+) als auch vom interessierenden Analyten aktiviert werden.

Es wurden auch Fluoreszenzsonden beschrieben, die nicht auf lysosomotropen Mitteln oder schwach basischen Ankern beruhen, sondern auf Wechselwirkungen, die nur unter sauren Bedingungen erfolgen. Im Idealfall verbleibt die Sonde zur Minimierung der Hintergrundreaktionen und zur Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses vor dem Erreichen der Zielorganellen im ausgeschalteten Zustand. Beim Erreichen der sauren Zielorganellen wird das Aktivierungselement von dem interessierenden Analyten protonenkatalysiert aktiviert, wobei der unmaskierte Fluorophor entsteht. Außerdem gibt es Berichte, in denen die Endozytose oder die Autophagozytose für den selektiven Transport von OTAFPs genutzt werden.

4.2. LyTAFPs und EndTAFPs für Metallionen

Lysosomen sind an verschiedenen Aspekten des Metall-metabolismus beteiligt. Metalle vermitteln beispielsweise die Regulierung der lysosomalen ATPase vom V-Typ, einem wichtigen Protonenpumpenkanal, der das saure Milieu der Lysosomen aufrechterhält.^[120,122] Außerdem wirken Metalle an Transport und Aktivierung der lysosomalen Enzyme mit.^[123] Daher ist es wünschenswert, LyTAFPs zu entwickeln, die Metallionen in lebenden Zellen visualisieren. Einige Forschungsgruppen haben über elegante Untersuchungen zu LyTAFPs für Metallionen, einschließlich Fe^{3+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} , berichtet.

Lysosomen spielen eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Regulierung und der Eisen-Homöostase.^[123a,124] Zunehmende Belege deuten darauf hin, dass sich der wesentliche intrazelluläre Vorrat an labilen redoxaktiven Eisenspezies im Inneren von Lysosomen befinden könnte.^[125] Außerdem kontrolliert das lysosomale Eisen die Oxidationsempfindlichkeit der Zelle; so verursacht ein zu hohes Aufkommen an labilem Eisen Zellschäden.^[125,126] Fakih et al. synthetisierten 2008 eine „Turn-off“-Fluoreszenzsonde (**51**, Schema 19) für endosomales/lysosomales Eisen, indem sie einen basischen 1-Dimethylethylamin-Substituenten in eine Fe^{3+} -Sonde einbauten.^[127] Konfokalmikroskopische Abbildungen offenbarten, dass diese Sonde die hochempfindliche Bestimmung des lysosomalen Eisenzustands ermöglichte, und zwar als Antwort auf klinisch angewendete Chelatoren wie Deferipron, Desferrioxamin und Deferasirox.^[64] Die daraus hervorgegangene und 2009 von derselben Gruppe synthetisierte Sonde SF34 (**52**, Schema 19)^[128] erwies sich als noch empfindlicher. Ähnlich ihrem Vorgänger überwacht SF34 labile



Schema 19. Die Strukturen der auf Lysosomen zielenden Fluoreszenzsonden für Metallionen.

Eisenvorräte in den Endosomen/Lysosomen. Mittels Durchflusszytometrie und konfokalmikroskopischer Experimente wurde demonstriert, dass diese Sonde die Änderung intrazellulärer Eisenkonzentrationen beim Einsatz von Eisenchelatoren wahrnehmen kann.^[128]

Aufgrund der paramagnetischen Beschaffenheit von $Fe^{2+/3+}$, die zur Fluoreszenzlöschung führt, gab es keine auf Lysosomen zielenden „Turn-on“-Fluoreszenzsonden für $Fe^{2+/3+}$, bis vor kurzem der Ringöffnungsprozess von Rhodamin zum Design von Eisensonden genutzt wurde. Beispielsweise war die Fluoreszenz der freien Sonde **53** in der Molekülstruktur mit geschlossenem Ring vernachlässigbar. In Gegenwart von Fe^{3+} koordinierten die Eisenspezies an den Diacetylhydrazid-Substituenten, was die Umwandlung der Sonde in die komplexierte Form mit geöffnetem Ring begünstigte.^[129] Der an dem Xanthengerüst hängende Phenylaminrest ermöglicht dieser Sonde die Lokalisierung in den Endosomen oder Lysosomen lebender HeLa-Zellen. Von den Autoren selbst wurde allerdings eingestanden, dass die intrazelluläre „Turn-on“-Fluoreszenzantwort sowohl von endogenem labilem Fe^{3+} als auch vom H^+ -Überschuss in den

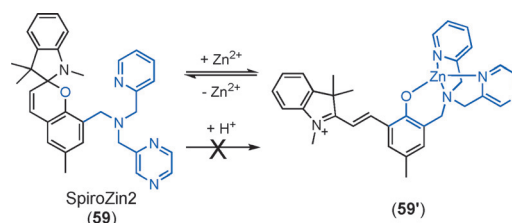
sauren Organellen (Lysosomen/Endosomen) stammen könnte, da Messungen *in vitro* offenbarten, dass schon ein niedriger pH-Wert die Ringöffnung auslösen kann. Später berichteten Guo et al. über die „Turn-on“-Fluoreszenzsonde RPE (**54**, Schema 19) zur Abbildung von labilem lysosomalem Fe^{3+} bei subzellulärer Auflösung.^[130] Nach Kontrollexperimenten behaupteten die Autoren, dass RPE nur normale Lysosomen mit reichlich Fe^{3+} anfärbte, aber keine mit zell-permeablen Fe^{3+} -spezifischen Chelatoren behandelten Zellen.

Zusätzlich zum Eisenmetabolismus sind Lysosomen auch an der Physiologie und Pathologie des Kupfers beteiligt.^[115,131] Eine übermäßige Akkumulation von Kupfer in den Lysosomen führt zur lysosomalen Lipidperoxidoxidation, dem Abfluss von Säurehydrolasen und dann weiter zur Nekrose von Hepatozyten.^[132] Tang et al. entwarfen 2011 basierend auf dem Gerüst von Cy7 eine „Turn-on“-NIR-Fluoreszenzsonde (**55**, Schema 19) zur Detektion und Abbildung von Cu^{2+} .^[133] Die Aminoreste von **55** lenkten die Sonde hauptsächlich in die Lysosomen lebender Zellen. Außerdem war die Sonde in saurem Milieu optisch stabil und reagierte sowohl in Zell- als auch Gewebeproben empfindlich auf Cu^{2+} . Nachfolgend berichtete dieselbe Gruppe über eine weitere Lysosomen-spezifische Cu^{2+} -Fluoreszenzsonde, RHAT (**56**, Schema 19), mit Rhodamin als auf Lysosomen zielendem Fluorophor und unter der Berücksichtigung, dass der pK_a -Wert der *N,N*-Diethylaminophenyl-Gruppe in der spirocyclischen Form (mit geschlossenem Ring) des Fluorophors zu dem pH-Wert von Lysosomen passt.^[134] Der Thiophen-substituierte Hydrazidrest ermöglichte eine selektive Antwort auf Cu^{2+} , und Bildgebungsexperimente demonstrierten, dass RHAT effizient in Lysosomen normaler Leber- und Hepatomzelllinien akkumulierte. Die hohe Empfindlichkeit der Öffnung des Rhodaminrings ermöglichte die Abbildung von Wirkstoff-induzierten Schwankungen des Cu^{2+} -Gehalts in lebenden Zellen.

Zinkionen vermitteln die Autophagozytose/den autolyso-somalen Mechanismus, während eine Überladung mit Zink die enzymatischen Funktionen der Lysosomen stört, was zur Akkumulation von Proteinen mit Fehlfunktionen führt.^[135] Typische Erkrankungen sind die Alzheimer-Krankheit und die Parkinson-Krankheit. Demnach könnte die Überwachung des Zinks in Lysosomen dem Verständnis diverser pathologischer Prozesse zugutekommen. Jiang und Mitarbeiter stellten 2012 die auf Lysosomen zielende Fluoreszenzsonde DQZn4 zur Detektion von Zn^{2+} vor (**57**, Schema 19).^[136] Bestehend aus einem Chinolingerüst als Fluoreszenzreporter und einer Dimethylaminogruppe als Lysosomen-Anker antwortet DQZn4 auf Zn^{2+} und bewirkt sowohl eine Fluoreszenzsteigerung aufgrund des photoinduzierten Elektronentransfers als auch ein ratiometrisches Signal mit einer Blauverschiebung um 47 nm wegen der Änderung der intramolekular angeregten Zustände. DQZn4 war in saurem wässrigen Milieu stabil (pH 5.2), und konfokalmikroskopische Experimente belegten, dass DQZn4 bereitwillig in Lysosomen lokalisierte und eine ratiometrische Reaktion auf lysosomale Zn^{2+} -Änderungen in Gegenwart von exogenem oder endogenem Zn^{2+} ergab.^[136]

Erst kürzlich berichtete die Gruppe von Peng über eine auf Lysosomen zielende ratiometrische Fluoreszenzsonde für Zn^{2+} , LysoZn-1 (**58a**, Schema 19).^[137] Diese Sonde wurde durch Anhängen einer auf Lysosomen zielenden 2-Morpholinoethylamin-Funktion an ein Styryl-BODIPY-DPA-Gerüst (eine bekannte Zn^{2+} -Sonde) konstruiert. Beim Binden von Zn^{2+} löste LysoZn-1 eine offensichtliche Steigerung der Fluoreszenz bei 578 nm aus sowie eine Verschiebung der Wellenlänge von 680 nm auf 578 nm. Darüber hinaus konnte LysoZn-1 das infolge einer Stimulation durch H_2O_2 freigesetzte Zn^{2+} detektieren, was deren enormes Potenzial für weitere Untersuchungen von lysosomalem Zn^{2+} widerspiegelt. Später wurden zudem die Zwei-Photonen-Sonde **58b**^[138] und die FRET-basierte Sonde **58c**^[139] zur Abbildung von Zinkionen in Lysosomen beschrieben. **58b** wurde erfolgreich zur Abbildung endogener Zinkionen in Lysosomen von NIH-3T3-Zellen sowie hippocampalen Gewebeschichten von Mäusen mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie bei einer Anregung von 900 nm verwendet.^[138]

Tatsächlich nutzt die Mehrheit der beschriebenen Metall-Fluoreszenzsonden einen photoinduzierten Elektronentransfer (PeT), um eine Fluoreszenz einzuschalten. Obgleich es sich um eine ausgereifte Methode handelt, neigen die Elektronendonoren der am PeT beteiligten Strukturelemente zur Wechselwirkung mit Protonen, was zu einem Einschalten der Fluoreszenz führt und falsch-positive Ergebnisse verursacht. Solche Probleme sind in den sauren Lysosomen noch gravierender. Lippard et al. berichteten jedoch vor kurzem über eine auf einer Chelatisierung beruhende Zn^{2+} -Sonde (SpiroZin2, **59**, Schema 20), die nicht auf Protonen antwor-



Schema 20. Der Zn^{2+} -Antwortmechanismus von SpiroZin2.

tete.^[140] SpiroZin2 bildete im ungebundenen Zustand einen Spirocyclus, wobei ein Hydroxy-Arm des Chelators an dem Spirocyclus beteiligt war. Aufgrund der schwachen Wechselwirkung konnten Protonen die Hydroxygruppen nicht anziehen, um den Ring zu öffnen; dagegen konnte Zn^{2+} starke Chelate mit den Armen bilden, und infolgedessen setzte das SpiroZin2 sein Hemicyanin-Fluorophor frei. Die langwellige Emission von SpiroZin2 ermöglichte nicht nur die Untersuchung endogener Zn^{2+} -Spezies in lebenden Zellen (Abbildung 12), sondern auch von Zink-reichen Faserstrukturen lebender hippocampaler Gewebeproben.

4.3. LyTAFPs für reaktive Spezies und Thiole

Es wurde festgestellt, dass Stickstoffmonoxid (NO) die autophagozytotischen Prozesse in Lysosomen beeinflusste.^[141]

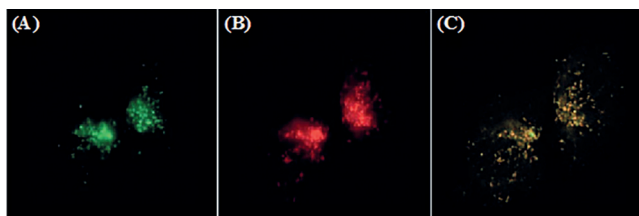
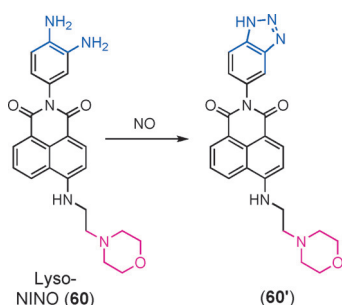


Abbildung 12. Untersuchung der Lokalisierung von SpiroZin2 in der Zelle. A) Mit 2 μM Lyso Tracker Green, B) 5 μM SpiroZin2 und 30 μM Zinkpyrithion behandelte HeLa-Zellen; C) Überlagerung von (A) und (B). Mit Erlaubnis übernommen von der Royal Chemical Society.

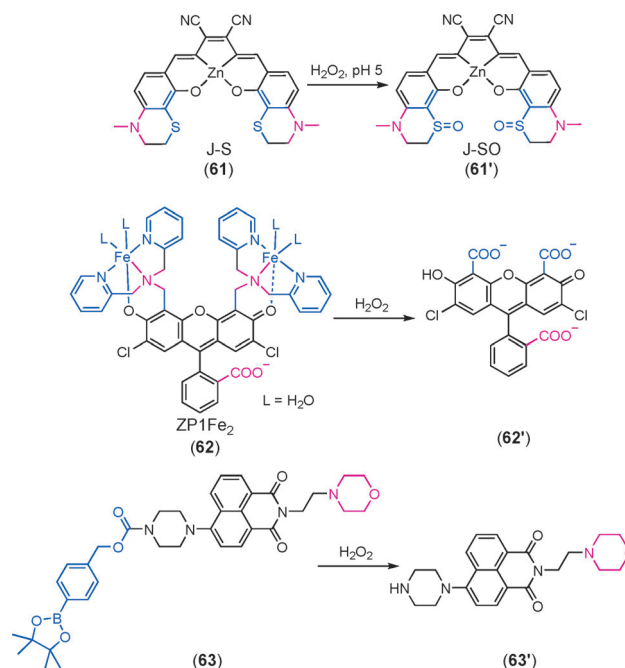
Zur Echtzeit-Überwachung der lysosomalen NO-Aktivitäten entwickelte die Gruppe von Xiao die aktivierbare Zwei-Photonen-Fluoreszenzsonde Lyso-NINO (**60**, Schema 21) für die lysosomale Abbildung von NO.^[142] Diese Sonde wurde durch den Zusammenschluss von *o*-Phenylendiamin zum



Schema 21. Mechanismus der Reaktion von Lyso-NINO mit NO.

Abfangen von NO, auf Lysosomen zielendem (Aminoethyl)morpholin und dem Zwei-Photonen-Fluorophor Naphthalinimid gestaltet. Die chemische Transformation wurde deshalb gewählt, weil aromatische vicinale Diamine auch in Gegenwart von Disauerstoff mit NO reagieren. Lyso-NINO wies aufgrund des PeT von der *o*-Diaminophenyl-Gruppe auf die Naphthalinimid-Funktion bei dem pH-Wert der Lysosomen eine vernachlässigbare Fluoreszenz auf, offenbarte aber eine selektive „Turn-on“-Antwort auf NO gegenüber anderen reaktiven Sauerstoffspezies. Durch diese hohe Reaktivität erzielte Lyso-NINO eine nanomolare Nachweisgrenze, sodass es sich zum Abfangen von endogenem NO in makrophagischen Lysosomen eignete.

Als weitere wichtige reaktive Spezies hängt lysosomales H_2O_2 eng mit der Autophagozytose und der Apoptose in normalen und pathologischen Prozessen zusammen.^[143] Zur Untersuchung ihrer zellulären Funktionen beschrieben Jing und Zhang J-S (**61**, Schema 22) als eine neue Zwei-Photonen-Sonde zur Abbildung von lysosomalem H_2O_2 in lebenden Zellen basierend auf der Reaktivität zwischen J-S und H_2O_2 unter sauren Bedingungen.^[144] In Gegenwart von Myeloperoxidase (MPO) offenbarte J-S eine selektive „Turn-on“-Fluoreszenzantwort auf H_2O_2 , die nur unerheblich durch andere häufige biologische ROS beeinträchtigt wurde. Die Kolo-kalisierung von J-S in Lysosomen wurde durch MPO ebenfalls unterstützt. Ohne das Enzym verteilte sich die

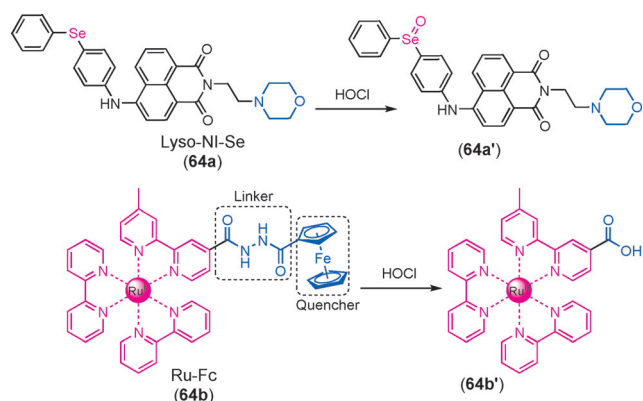


Schema 22. Veranschaulichung des Mechanismus der Reaktion von LyTAFPs mit H_2O_2 .

Sonde im Cytosol. Die schnelle Reaktion auf Thiomorpholin ermöglichte der Sonde die Visualisierung von in den Lysosomen eingeschlossenem exogenem oder endogenem H_2O_2 .^[144] Song et al. wiederum berichteten über die in den Lysosomen lokalisierte „Turn-on“-Fluoreszenzsonde ZP1Fe₂ (**62**, Schema 22) für H_2O_2 , für die sie eine Bioredoxreaktion zur Spaltung des Eisenkomplexes am Xanthenring einführten.^[145] Bei der auf die Lysosomen zielenden Gruppe handelt es sich wahrscheinlich um den Amino-chelator und die schwach basischen Phenolsäurereste, was allerdings weiterer Abklärung bedarf. Erst vor kurzem entwarf die Gruppe von Yoon eine auf Naphthalinimid basierende H_2O_2 -Sonde mit (Aminoethyl)morpholin als Lysosomen-Anker und einem Boronat-Rest als auf H_2O_2 reagierendes Strukturmotiv (**63**, Schema 22).^[146] Diese Sonde wurde zur Detektion von sowohl exogen zugeführten als auch endogen erzeugten reaktiven Spezies genutzt, wobei durch die Zugabe eines H_2O_2 -Abfängers die Fluoreszenz gelöscht wurde.

Hypochlorige Säure (HOCl) ist eines der Endprodukte des H_2O_2 -Metabolismus und wirkt sowohl als Signalmolekül und als Abfänger von Zelltrümmern. Während die wahre Identität von HOCl noch immer diskutiert wird, ist dessen Detektion ohne Zweifel von großer Bedeutung ihrer Aufgaben in Zellen. Li et al. berichteten 2015 über eine Fluoreszenzsonde (**64a**, Schema 23) für lysosomales HOCl auf der Grundlage eines Selenid-Schalters.^[147] Konfokalmikroskopische Untersuchungen deuteten darauf hin, dass **64a** in Lysosomen akkumulierte und exogenes HOCl abbilden konnte. Ein anderes Beispiel stammt von Yuan et al.: Ihre Verbindung **21** (Schema 6) konnte endogenes lysosomales HOCl in stimulierten Makrophagen abbilden (Abbildung 6).^[76]

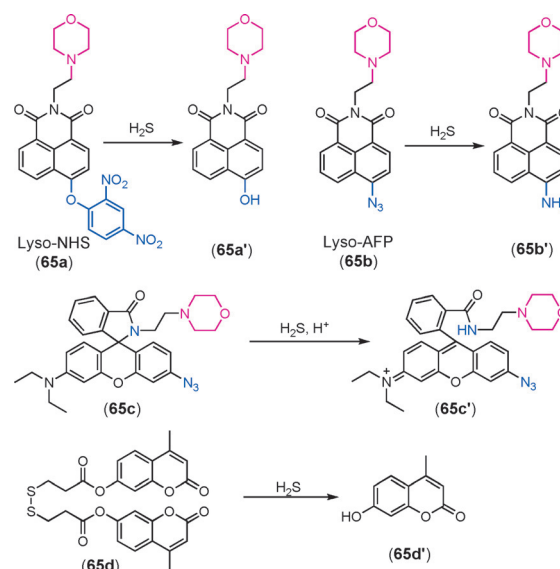
Erst vor kurzem entwarfen Zhang und Yuan eine auf einem Ruthenium(II)-Komplex basierende Sonde (Ru-Fc,



Schema 23. Auf Lysosomen zielende Fluoreszenzsonden zur Detektion von HOCl.

64b, Schema 23), die präzise auf lysosomale HOCl-Spezies zielte.^[148] Ohne Wechselwirkung mit HOCl fluoreszierte die Sonde aufgrund des PeT von dem Ferrocen-Fluoreszenzlöcher auf den Rutheniumkomplex schwach; indes konnte HOCl den Linker zwischen Ferrocen und Ruthenium brechen und somit die Emission des Komplexes wieder herstellen. Von Bedeutung ist, dass Ru-Fc aufgrund seiner relativen Größe nicht durch freie Diffusion in den Lysosomen lokalisierte, sondern durch die von Caveolae vermittelte Endozytose, was anhand von Assays zur Inhibierung der Endozytose bestätigt wurde. Ein solches Design stellt eine praktische und neuartige Vorgehensweise zum Zielen auf Lysosomen zur Verfügung, die keine lipophilen schwach basischen Anker benötigt. Darüber hinaus wurde Ru-Fc erfolgreich zur Visualisierung endogener HOCl-Spezies in lebenden Makrophagen sowie in lebenden Großen Wasserflöhen und Zebrafischen eingesetzt. Zudem wurden auch Anstrengungen unternommen, andere Prozesse unter Beteiligung lysosomaler ROS, wie die Lipidperoxidation,^[79] und Nitroxylsäure (HNO)^[149] zu untersuchen.

Zwar handelt es sich bei H₂S um einen für zahlreiche physiologische Prozesse wichtigen Transmitter und einen mit mehreren Krankheiten zusammenhängenden Indikator, seine Verteilung in den Organellen und dessen zelluläre Funktionen werden aber noch immer diskutiert.^[150] Zur Klärung der Rolle von H₂S in Lysosomen führten Xu et al. 2013 die auf Naphthalinimid basierende Sonde Lyso-NHS (**65a**, Schema 24) ein, die quantitativ H₂S-Spezies in Lysosomen lebender Zellen bestimmen konnte. Lyso-NHS lokalisiert Lysosomen über die Morpholin-Funktion und antwortet unter physiologischen Bedingungen basierend auf einer raschen Thiolyse des Dinitrophenylethers, bei dem es sich um einen starken Fluoreszenzlöcher handelt, auf H₂S.^[151] Später beschrieb dieselbe Gruppe eine andere auf Lysosomen zielende Sonde (Lyso-AFP, **65b**, Schema 24) auf der Grundlage der durch H₂S geförderten Reduktion eines Azidrests.^[152] Außerdem wurden andere auf Lysosomen zielende H₂S-Sonden (**65c**^[153a] und **65d**,^[153b] Schema 24) separat behandelt.



Schema 24. Reaktion von lysosomalem H₂S mit H₂S-Sonden.

4.4. LyTAFPs für die lysosomale Viskosität, die Temperatur, Esterasen und pH-Wert-Messungen

Die lysosomale Viskosität hängt eng mit dem Gesundheitszustand sowie den Funktionen von Lysosomen zusammen und beeinflusst den molekularen Transport sowie Enzymaktivitäten.^[120] Vor kurzem berichtete die Gruppe von Xiao über Lyso-V (**66**, Abbildung 13) als eine neue Sonde zur Überwachung der lysosomalen Viskosität in lebenden Zellen.^[154a] Diese Sonde bestand aus einem typischen molekularen BODIPY-Rotor, der mit einem auf Lysosomen zielenden Morpholin-Rest verknüpft war. Die freie Rotation um die das BODIPY-Gerüst und die Phenylgruppe verbindende Einfachbindung reagiert empfindlich auf Viskositätsänderungen, und der PeT-Prozess von dem Morpholin- auf den BODIPY-Rest sorgt dafür, dass die Sonde zudem auf Änderungen des pH-Werts reagiert. Lyso-V steigerte bei sinkendem pH-Wert und/oder zunehmender Viskosität die Fluoreszenz und ist demzufolge für eine direkte Fluoreszenzbildgebung ungeeignet.^[154a] Für eine uneingeschränkte Anwendbarkeit dieser Sonde führten Xiao et al. Messungen zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer durch und stellten fest, dass der PeT die Lebensdauer nicht beeinflusste. Infolgedessen und obwohl Lyso-V aufgrund der Beeinträchtigung durch Änderungen des pH-Werts für eine direkte optische Quantifizierung der lysosomalen Viskosität nicht geeignet war, reagierte die Fluoreszenzlebensdauer von Lyso-V nur auf Änderungen der Viskosität empfindlich und war vom pH-Wert und der Polarität unabhängig. Daher wurde diese Sonde erfolgreich zur Echtzeit-Quantifizierung der lysosomalen Viskosität mittels Abbildung der Fluoreszenzlebensdauer angewendet.^[154a] Zusätzlich wurde basierend auf einer ähnlichen Strategie von Wang et al. über ein auf Lysosomen zielendes Fluoreszenzthermometer berichtet.^[154b]

Als wichtigste Verdauungsorganelle in Zellen enthält ein Lysosom mehr als 50 verschiedene Enzyme, die unter sauren Bedingungen aktiv funktionieren.^[120,122] Zur Überwachung

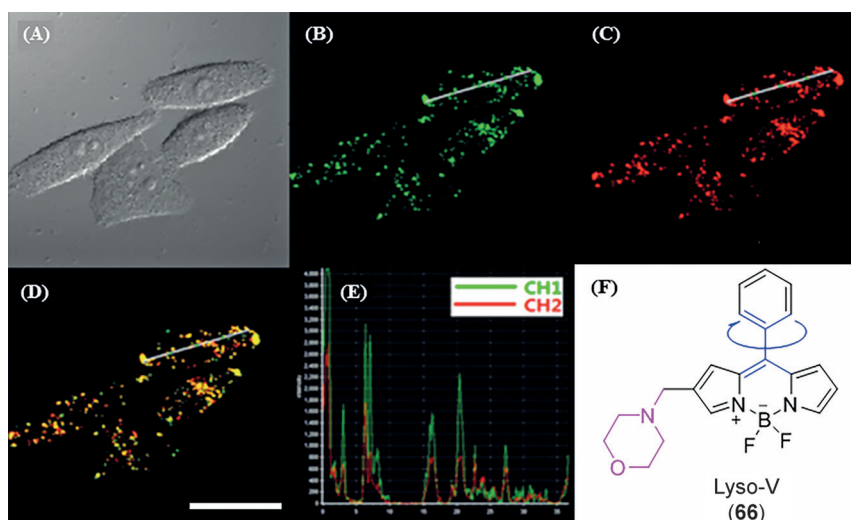
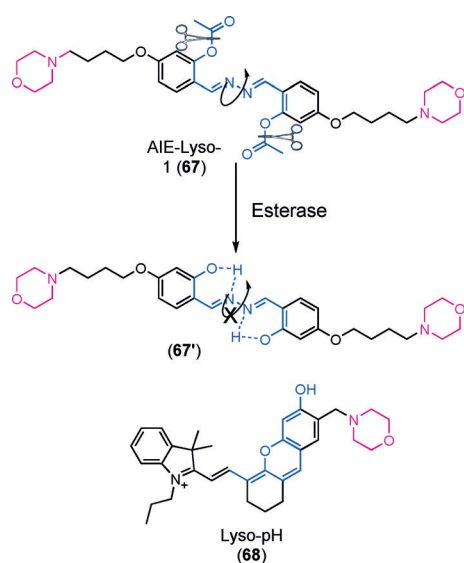


Abbildung 13. Colokalisierung von mit 5.0 μM Lyso-V und 5.0 μM NR für 3 min bei 37°C angefärbten MCF-7-Zellen. A) Hellfeld-Abbildung. B) Konfokale Abbildung von Lyso-V auf Kanal 1 ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 515\text{--}545 \text{ nm}$). C) Konfokale Abbildung von NR auf Kanal 2 ($\lambda_{\text{ex}} = 559 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 585\text{--}610 \text{ nm}$). D) Zusammengesetzte Abbildung der Kanäle 1 und 2. E) Intensitätsprofil der interessierenden Bereiche kreuzen MCF-7-Zellen. F) Struktur von Lyso-V. Mit Erlaubnis übernommen von der American Chemical Society.

lysosomaler Enzyme entwarfen Tang und Liu et al. eine einfache Fluoreszenzsonde (AIE-Lyso-1, **67**, Schema 25), die unter sauren Bedingungen spezifisch mit Esterasen reagieren konnte.^[155] Die Sonde besteht aus Morpholin als Anker für Lysosomen und nutzt einen durch Aggregation induzierten



Schema 25. Mechanismus der auf AIE-Lyso-1 zielenden lysosomalen Esterasen und die Struktur von Lyso-pH.

Emissionsprozess als fluorogenen Mechanismus. In Abwesenheit von Esterasen konnte die Sonde frei rotieren und baut auf diese Weise die Anregungsenergie ab, während in Gegenwart von Esterasen die an der Sonde befindlichen Acetoxygruppen abgespalten wurden; dieser Prozess hinterließ

Hydroxyfunktionen, die Wasserstoffbrücken zu der Hydrazinfunktion bilden und somit die Struktur verriegeln konnten. Auf diese Weise wurde die Sonde in Lysosomen Kompartiment zum Leuchten gebracht, was anhand von Abbildungen lebender Zellen demonstriert wurde. Während die meisten Enzyme in Lysosomen zum einwandfreien Funktionieren ein saures Milieu benötigen, sind Schwankungen des lysosomalen pH-Werts in der Regel das Ergebnis von Erkrankungen. Demzufolge könnte eine Echtzeit-Überwachung des lysosomalen pH-Werts die Diagnose von Krankheiten unterstützen.^[155]

Der pH-Wert von Lysosomen ist ein lebenswichtiger Parameter zur Aufrechterhaltung von deren normalen Verdauungsfunktionen, und geringe Schwankungen des pH-Werts können viele physiologische Prozesse beeinflussen.^[120,122,156] Daher wurde eine Reihe an LyTAFPs für pH-Werte abgedeckt.^[157]

Ein herausragendes Beispiel aus der Gruppe von Ma ist eine auf den pH-Wert reagierende Sonde basierend auf einer Hemicyanin-Xanthen-Kombination (Lyso-pH, **68**, Schema 25).^[157a] Bei höherem pH-Wert wurde die Xanthen-Funktion deprotoniert, was zu einer längeren Konjugation und somit einer Emission bei höherer Wellenlänge führte, und umgekehrt. Daher konnte diese Sonde auf einfache empfindliche ratiometrische Weise den lysosomalen pH-Bereich (Abbildung 14) bestimmen.^[157a] Unter Verwendung dieser Sonde veranschaulichten die Forscher, dass sich, wahrscheinlich aufgrund der Permeabilisierung der lysosomalen Membran, der lysosomale pH-Wert während eines Hitzeschocks deutlich erhöhte.

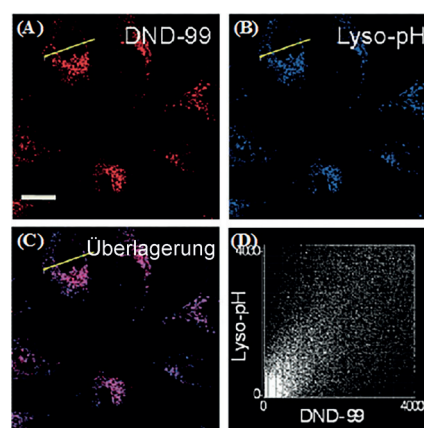
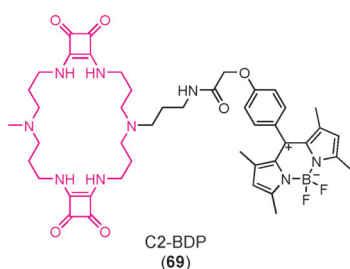


Abbildung 14. Auf Lysosomen zielende Auswirkungen von Lyso-pH in MCF-7-Zellen. A) Abbildungen der Colokalisierung von mit DND-99 (50 nm, roter Kanal) und B) Lyso-pH (50 nm, blauer Kanal) angefärbten MCF-7-Zellen; C) zusammengesetzte Abbildung von (A) und (B); D) Korrelation der Intensitäten von Lyso-pH und DND-99. Mit Erlaubnis übernommen von Wiley.

4.5. Auf Endosomen, Phagosomen und Autolysosomen zielende Fluoreszenzsonden

Das Zielen niedermolekularer Sonden auf Endosomen hat sich als schwierig erwiesen, da Endosomen ähnliche Eigenschaften wie Lysosomen aufweisen. Der geringfügig höhere endosomale pH-Wert hat zur Folge, dass diese deutlich weniger lipophile Basen anziehen als Lysosomen, weswegen gängige lysosomale Sonden für Endosomen ungeeignet sind. Endosomen spielen allerdings eine unerlässliche Rolle für das zelluläre Verdauungssystem, was ihre einfache Überwachung zu einem entscheidenden Ziel macht. Erst vor kurzem berichteten Costa und Rotger über eine Endosomen-spezifische Sonde (C2-BDP, **69**, Schema 26), die selektiv in



Schema 26. Struktur der auf Endosomen zielenden Fluoreszenzsonde.

den späten Endosomen lokalisiert.^[158] Anstatt nach Sonden zu suchen, die die endosomale Matrix erkennen, nutzten die Forscher auf elegante Weise die Endozytose aus, indem sie ein makrocyclisches Di(quadratsäureamid) entwarfen, das an negativ geladene Phosphatrezeptoren der Zellmembran band. Die Wechselwirkung löste dann eine endozytotische Internalisierung aus, und das Di(quadratsäureamid)-Strukturelement blieb in den späten Endosomen eingelagert, was durch konfokalmikroskopische Abbildung mit BODIPY als Reporter an dem Di(quadratsäureamid) nachgewiesen wurde (Abbildung 15).^[158] Obwohl es sich hierbei nicht um eine auf spezifische Analyten zielende Sonde handelt, glauben wir, dass diese Strategie ein perfektes Beispiel für zukünftige auf Endosomen ausgerichtete Forschungen setzt.

Auf die Verteidigung des Körpers spezialisierte Zellen wie Neutrophile und Makrophagen greifen eindringende Mikroben an, indem sie diese einhüllen und verdauen. Bei diesem Prozess bilden sich im Inneren der Verteidigerzellen mit Hydrolasen und reaktiven Spezies gefüllte Phagosomen, die auf die Mikroben antworten. Der nächste Schritt der Autophagozytose besteht aus der Zusammenführung von Phagosomen und Lysosomen zu Autolysosomen, in denen die Fähigkeit zur Verdauung weiter erhöht ist. Demzufolge könnte die Detektion reaktiver Spezies in den Phagosomen und den Autolysosomen zum besseren Verständnis dieser Zellverteidigungssysteme führen, dennoch fehlen spezifische auf Phagosomen/Autolysosomen zielende Strukturelemente. Vor kurzem gestalteten Sumimoto et al. eine Phagosomen-spezifische Fluoreszenzsonde basierend auf der Markierung mit einem SNAP-Tag. Sie exprimierten ein SNAP-Tag auf der Oberfläche von Makrophagen und inkubierten die Zellen mit

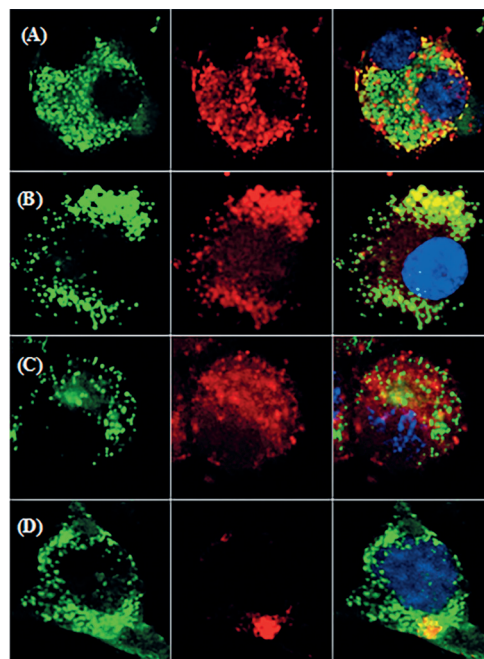
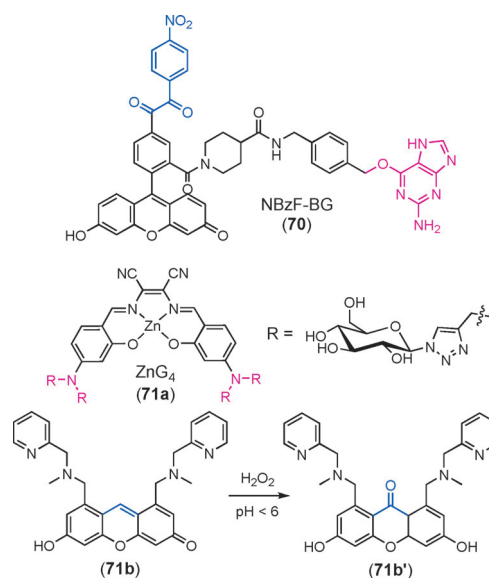


Abbildung 15. Konfokale Abbildung von für 1 h mit 10 μM C2-BDP behandelten U87MG-Zellen und BacMam-RFP-spezifische Sonden für A) frühe Endosomen, B) späte Endosomen, C) Lysosomen und D) den Golgi-Apparat. Linke Spalte: C2-BDP (grün), mittlere Spalte: RFP-Sonden (rot) und rechte Spalte: Überlagerung (orange) mit DAPI-gefärbten Zellkernen (blau). Mit Erlaubnis übernommen von der American Chemical Society.

ihrer H_2O_2 -Sonde NBzF-BG (**70**, Schema 27).^[159a] Während der Aktivierung visualisierten die Autoren eindeutig Fluoreszenzsignale in den Zellen, die durch Zugabe von Ebselen, einem H_2O_2 -Abfänger, und Diphenyliodonium, einem NADPH-Oxidase-Inhibitor, verringert werden konnten.



Schema 27. Strukturen der auf Phagosomen zielenden und auf der SNAP-Tag-Technologie basierenden H_2O_2 -Sonde sowie der auf Autolysosomen zielenden Sonde für die Autophagozytose.

Diese Vorgehensweise konnte auf andere Organellen erweitert werden, für die spezifische Sonden fehlen. Weiterhin entwarfen Zhang und Xu et al. eine metallgebundene Fluoreszenzsonde (ZnG_4 , **71a**, Schema 27), die spezifisch innerhalb der sauren Vakuolen lokalisierte.^[159b] ZnG_4 fluoreszierte nur in Hungerphasen oder während der chemisch induzierten Autophagozytose. Untersuchungen mit Cofärbungen deuteten darauf hin, dass diese Sonde hauptsächlich in saure Vakuolen eindrang, wie Autolysosomen oder möglicherweise das Netzwerk aus späten Endosomen/Lysosomen. Diese Sonde konnte als nützliches Hilfsmittel zur Überwachung der Autophagozytose in Krankheitsmodellen dienen.^[159b] Später wurde auch eine ratiometrische Fluoreszenzsonde (**71b**, Schema 27) zur Abbildung der Bildung von Autolysosomen eingesetzt, die einfach die vorhandenen H_2O_2 -Spezies unter sauren Bedingungen detektierte.^[159c]

4.6. Herausforderungen für auf das zelluläre Verdauungssystem zielende Sonden

Obwohl gewisse Fortschritte bei LyTAFPs erzielt wurden, die diverse Analyten in den Lysosomen basierend auf ihrer einzigartigen sauren Matrix abdecken, gibt es im Zusammenhang mit vier Gesichtspunkten noch immer Herausforderungen:

- 1) Aufgrund fehlender geeigneter auf Analyten antwortender Strukturelemente oder dem Konflikt zwischen dem reagierenden Molekülrest und der auf Lysosomen zielenden Funktion, gibt es für zahlreiche reaktive Biomoleküle (z.B. Ca^{2+} , Mg^{2+} und verschiedene Hydrolasen) keine LyTAFPs. Bei diesen Biomolekülen handelt es sich um Schlüsselemente für die Funktionen von Lysosomen und das Überleben der Zellen, und demnach könnten entsprechende LyTAFPs Aufschluss über diese Spezies geben. Abgesehen von LyTAFPs sind einige Versuche zur Entwicklung von fluoreszierenden Proteinen und Nanopartikeln zum Zielen auf Verdauungssysteme, insbesondere die Autophagozytose, zu verzeichnen. Diese könnten sicherlich die fehlenden niedermolekularen Sonden ergänzen.^[159d–f]
- 2) Die meisten beschriebenen LyTAFPs zielen mithilfe der freien Diffusion und des Einfangens lipophiler basischer Anker auf Lysosomen. Die Langzeit-Inkubation dieser basischen Reste im Inneren von Lysosomen könnte jedoch einen Anstieg des pH-Werts hervorrufen und über eine Alkalisierung der Lysosomen zum Zelltod führen.^[42] Darüber hinaus verhalten sich auf dieser Strategie basierende LyTAFPs eher „selektiv“ als „spezifisch“, da basische Reste auch mit anderen sauren Bereichen des Organismus wechselwirken können.^[159g] Außerdem belegen frühere Studien, dass LyTAFPs sogar anfällig für Zersetzung durch in Lysosomen erheblich vorhandenen Hydrolasen sind. Somit sind sie für Anwendungen in lebenden Zellen unzulänglich.^[159h]
- 3) Die meisten der beschriebenen LyTAFPs reagieren empfindlich auf Änderungen des pH-Werts, da die aminofunktionalisierten schwach basischen Zielelemente über PeTs mit den Fluorophoren wechselwirken.

- 4) Entscheidend ist, dass es, außer für Lysosomen, für keine weiteren Bestandteile des zellulären Verdauungssystems, einschließlich der (frühen, späten) Endosomen, Autophagosomen und Autolysosomen, Fluoreszenzsonden gibt. Das Design solcher Sonden könnte sich von der einzigartigen Endozytose oder Autophagozytose ableiten.

5. Auf Membranen zielende aktivierbare Fluoreszenzsonden (MemTAFPs)

5.1. Überblick über die Zellmembran und das Design von MemTAFPs

Bei der äußeren Zellmembran oder Plasmamembran handelt es sich um eine biologische Glycerophospholipid-Doppelschicht, die das Zellinnere von dem extrazellulären Milieu trennt (Abbildung 16). Sie fungiert innerhalb eines

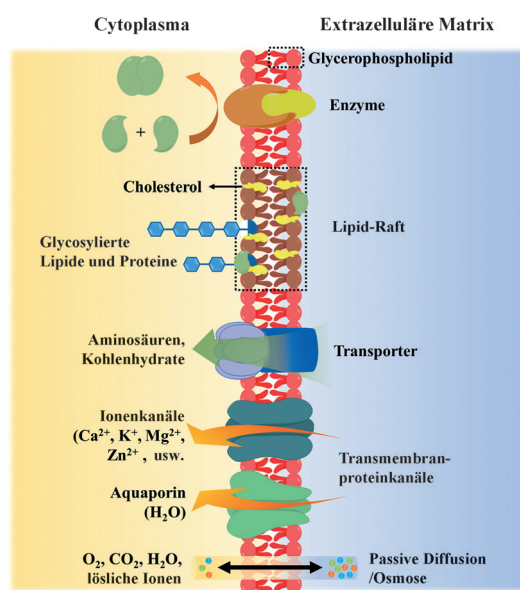


Abbildung 16. Allgemeine Bestandteile und die chemischen/biologischen Prozesse in der Zellmembran.

umfangreichen Endomembransystems, das die Endosomen/Lysosomen, das Endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Apparat und den Zellkern umfasst. Die Plasmamembran ist jedoch einzigartig, da sie anstelle spezifischer Organellen die gesamte Zelle umschließt und deren Bestandteile schützt.^[1a] Die Glycerophospholipid-Moleküle bilden das Gerüst der Plasmamembran: In ihnen bildet Glycerol das Rückgrat, das das hydrophile Phosphat mit den lipophilen Fettsäureketten verknüpft und somit der Plasmamembran amphipathische Eigenschaften verleiht.^[37a] Die amphipathische Beschaffenheit stützt die Zellstrukturen innerhalb des wässrigen Milieus und erlaubt gleichzeitig den Durchtritt wasserlöslicher Materialien. Tatsächlich wirkt die Plasmamembran als Hauptportal für die zelluläre Kommunikation.^[160] Die Konzentrationsänderungen vieler Biomoleküle in der Membran oder in

der Nähe der Plasmamembran sind für viele Signalprozesse und Krankheiten von entscheidender Bedeutung.^[161]

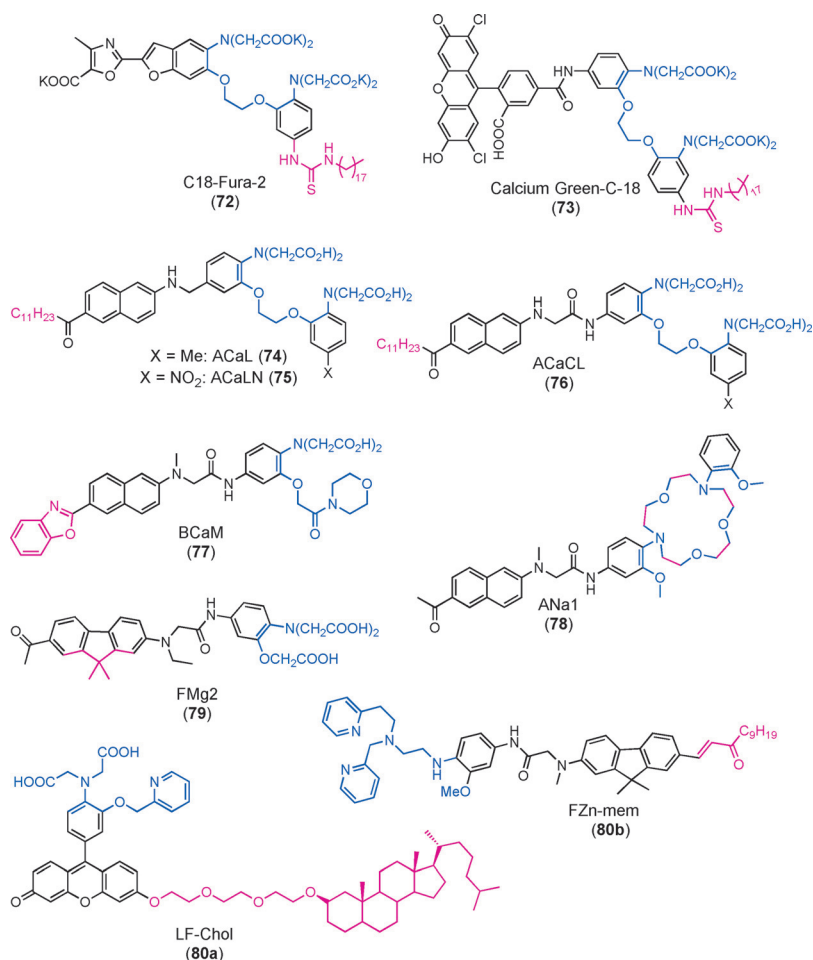
Die passive Diffusion von niedermolekularen wasserlöslichen Verbindungen und Gasen durch die Plasmamembran hält das Gleichgewicht zwischen dem Cytosol und der extrazellulären Matrix aufrecht und dient als grundlegende zelluläre Kommunikationsstruktur.^[162] Der Molekülaustausch erfolgt osmotisch, das heißt, die Plasmamembran dient als Filter, durch den Spezies von der Seite höherer Konzentration auf die Seite niedrigerer Konzentration fließen können. Eine passive Diffusion reicht jedoch nicht zur Versorgung mit allen Nährstoffen und Biomaterialien für zelluläre Aktivitäten aus, weswegen diverse Transmembrankanäle und -transporter die Versorgung der Zellen unterstützen.^[163] Herausragende Beispiele umfassen die Aquaporine, die den raschen Import von Wasser vereinfachen, sowie Metallionenkanäle, die zur Vermittlung zahlreicher Signal- und Gestaltungsprozesse die cytosolischen Metallvorräte mit der extrazellulären Matrix verknüpfen. Im Fall von Aminosäuren, Peptidketten und Kohlenhydraten, die die Plasmamembran nicht passieren können, setzen Transporter ATP für die Beförderung dieser unabdingbaren Spezies in die Zelle ein. Im Unterschied zu Transportern und Kanälen können Rezeptoren und Enzyme kovalent an die Membran binden.^[164] Wichtig ist, dass es sich bei diesen Proteinen um Schlüsselemente der zellulären Signalgebung und Funktionen handelt. Viele von ihnen existieren in den Lipid-Rafts, Mikrodomänen der Plasmamembran aus hochglycosylierten Lipiden und Proteinen, die Moleküldurchtritt und Signalprozesse vermitteln.^[165]

Es wurden zahlreiche Fluoreszenzsonden beschrieben, die auf die verschiedenen Bestandteile der Plasmamembran zielen. Da Lipiddoppelschichten die Hauptkomponente der Plasmamembran darstellen, besteht die allgemeinste Methode zum Design von MemTAFPs aus der Eingliederung eines Membranankers, für gewöhnlich eine lipophile Kohlenstoffkette wie eine Fettsäurekette, in eine bekannte Fluoreszenzsonde über einen Linker. Gemäß dieser Methode wurden viele MemTAFPs entworfen und synthetisiert.^[42, 166] Außer der lipophilen Kohlenstoffkette können auch spezifische Bestandteile der Plasmamembran, wie Rezeptoren, als Zielelemente beim Design von Sonden verwendet werden.

5.2. MemTAFPs für Metallionen

Die unterschiedlichen Metallionen (Ca^{2+} , Zn^{2+} , K^{+} und Mg^{2+} , usw.) diffundieren entweder frei durch die Plasmamembran oder werden selektiv durch Transmembranprotein-Kanäle transportiert und wirken dabei als Signalelemente

oder enzymatische Cofaktoren. Zunehmende Belege deuten darauf hin, dass in der Nähe der Membran eine höhere Ca^{2+} -Konzentration vorliegt als im Cytosol. Da der Import und Export von zellulärem Ca^{2+} als Signal für zahlreiche zelluläre Prozesse dient, einschließlich der Endozytose/Exozytose, Aktivitäten von Ionenkanälen und sensorischen Transduktionen usw.,^[167] ist die Entwicklung von auf Membranen zielenden Bildgebungssonden für die Ca^{2+} -Aktivitäten von großer Bedeutung. In den frühen 1990er Jahren wurde über mehrere Membran-assoziierte Fluoreszenzsonden berichtet (z. B. C18-Fura-2, Verbindung **72**, und Calcium Green-C18, **73**, Schema 28), für die eine lipophile Alkylkette an die Ca^{2+} -Sonden Fura-2 oder Calcium Green-1 konjugiert wurde.^[168]



Schema 28. Strukturen von MemTAFPs für Metallionen.

Experimente zur Zellbildgebung deuteten darauf hin, dass diese Sonden in der Plasmamembran lokalisieren und empfindlich auf Schwankungen der Ca^{2+} -Konzentration reagieren.^[168, 169]

Um die Schwierigkeiten bezüglich der Eindringtiefe der Ein-Photonen-Mikroskopie zu umgehen und Ca^{2+} in tiefen Gewebeschichten überwachen zu können, entwickelte die Gruppe von Cho 2009 die Zwei-Photonen-Fluoreszenzsonde AcaL (**74**, Schema 28) zur Visualisierung von membran-nahem Ca^{2+} in lebenden Zellen und lebendem Gewebe.^[170]

Diese Sonde besteht aus BAPTA-5-Me als Ca^{2+} -Chelator, 2-Dimethylamino-6-laurylnaphthalin (Laurdan) als Zwei-Photonen-Chromophor und einer Dodecanoyl-Gruppe als Membrananker, wobei BAPTA-5-Me und die Dodecanoyl-Gruppe zur Vermeidung von Kreuzwechselwirkungen separat an den beiden Enden von Laurdan angeordnet wurden. Als Antwort auf Ca^{2+} wurde der PeT vom BAPTA auf das Laurdan blockiert, und ACaL zeigte eine 10-fache TPEF-Steigerung mit einer Dissoziationskonstante von $0.041 \pm 0.005 \text{ mM}$.^[170] Abgeleitet von ACaL entwickelten Cho et al. anschließend eine weitere Zwei-Photonen-Fluoreszenzsonde für membrannahes Ca^{2+} , für die sie einen Amid-Linker zwischen BAPTA und Laurdan anbrachten (ACaCL, **76**, Schema 28).^[171] Dieselbe Gruppe berichtete 2011 basierend auf ACaL über eine verbesserte Zwei-Photonen-Sonde (ACaLN, **75**, Schema 28).^[172] Diese Sonde zeigte als Antwort auf Ca^{2+} eine 13-fache Steigerung der Fluoreszenz nach Zwei-Photonen-Anregung (TPEF) mit einer Dissoziationskonstante von $1.9 \pm 0.2 \text{ }\mu\text{M}$, was im Vergleich zu ACaL ein deutlich besseres Ergebnis darstellte. Mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie wurde gezeigt, dass alle drei Sonden zur Langzeit-Visualisierung von membranahem Ca^{2+} in lebenden Zellen für mehr als 1500 Sekunden und in lebendem Gewebe bei einer Tiefe von $120 \text{ }\mu\text{m}$ verwendet werden konnten, repräsentiert durch ACaL (Abbildung 17), ohne von anderen Metallionen gestört zu werden.^[170]

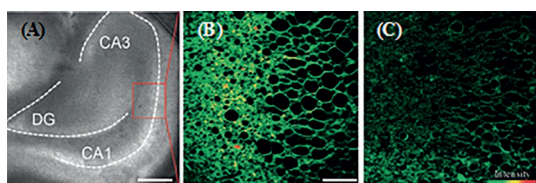


Abbildung 17. Abbildungen von mit $10 \text{ }\mu\text{M}$ ACaL markierten frischen Hippocampus-Schichten von Ratten. A) Die CA1- und CA3-Bereiche sowie den Gyrus dentatus (DG) bei 10-facher Vergrößerung zeigende Hellfeld-Abbildungen. Weiß gepunktete Linien kennzeichnen die pyramidalen Neuronschichten. B) Zwei-Photonen-Mikrographen des rot markierten Bereichs bei einer Tiefe von ca. $120 \text{ }\mu\text{m}$ bei 100-facher Vergrößerung. C) Zwei-Photonen-Mikrographen desselben Bereichs nach Zugabe von $200 \text{ }\mu\text{M}$ EGTA zu (B). Die Abbildungen wurden bei $360\text{--}620 \text{ nm}$ nach Anregung bei 780 nm mit fs-Pulsen gesammelt. Maßstäbe: $300 \text{ }\mu\text{m}$ (A), $30 \text{ }\mu\text{m}$ (B, C). Mit Erlaubnis übernommen von der Royal Society of Chemistry.

Cho et al. wiederum erforschten auf anderen Fluorophoren und Rezeptoren basierende Ca^{2+} -Sonden. 2010 berichteten sie über BCaM (**77**, Schema 28) als eine auf Membranen zielende Zwei-Photonen-Sonde für Ca^{2+} . Diese Sonde leitete sich von MOBHA als Ca^{2+} -Rezeptor und 6-(Benzo[d]oxazol-2'-yl)-2-(*N,N*-dimethylamino)naphthalin als Reporter ab.^[173] Zwei-Photonen-Mikrographen von HeLa-Zellen deuteten darauf hin, dass BCaM trotz fehlender lipophiler Alkylketten ausschließlich die Plasmamembran färbte. Diese Sonde wurde nicht nur allein zur Überwachung der Ca^{2+} -Verteilung in der Plasmamembran eingesetzt, sondern auch in Verbindung mit anderen Metallsonden zur Untersuchung der Funktion von Metallen in der Membran. Beispielsweise er-

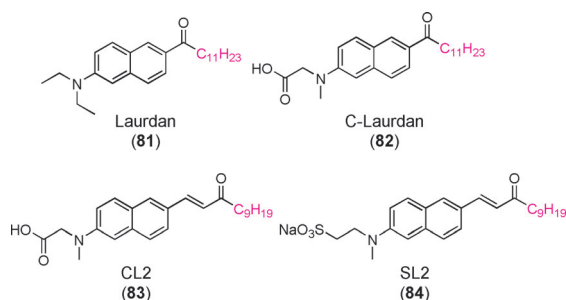
möglichte die Verwendung von BCaM in Kombination mit ANa1 (**78**)^[173] oder FMg2 (**79**)^[174] die zweifarbige Abbildung der Aktivitäten von $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ oder $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ in lebenden Zellen und der $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ - oder $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Verteilungen in lebendem Gewebe. Solche Sondenkombinationen haben sich für die chemische Biologie als sehr nützlich erwiesen.

Außer für Ca^{2+} entwickelten Taki et al. 2011 die Fluoreszenzsonde LF-Chol (**80a**, Schema 28) zur ortsspezifischen Detektion von Zn^{2+} -Ionen an der Plasmamembran. LF-Chol basierte auf der Fluorescein-Plattform mit einer auf die Membran zielenden in das Fluorophor eingegliederten TEG-Cholesterol-Markierung.^[175a] Die freie Sonde fluoreszierte aufgrund des effizienten Löschens durch den Chelator mittels eines PeT-Mechanismus sehr schwach ($\Phi < 0.005$). In Gegenwart von Zn^{2+} inhibierte die Komplexbildung zwischen dem Chelator und Zn^{2+} den PeT, was zu einer starken „Turn-on“-Fluoreszenzantwort (bis zu 45-fach) und einer starken Emission der Sonde führte ($\Phi = 0.18$). Konfokalmikroskopische Experimente demonstrierten, dass diese Sonde spezifisch an der Zellmembran lokalisierte und als Antwort auf extrazelluläres Zn^{2+} in der Nähe der Plasmamembran fluoreszierte. Zusätzlich beschrieb die Gruppe von Cho auch eine Zn^{2+} -Zwei-Photonen-Sonde FZn-mem (**80b**, Schema 28) zur Überwachung des membranahen Zinkflusses, basierend auf der Schlussfolgerung, dass aufgrund des Effluxes durch die Membrankanäle das membranahes Zn^{2+} höher konzentriert sein sollte als das cytosolische Zn^{2+} .^[175b] Diese Sonde wurde zur Überwachung von Zn^{2+} -Spitzen und Zn^{2+} -Exportprozessen in der Nähe der Membran eingesetzt.

5.3. MemTAFPs für Lipid-Rafts

Bei Lipid-Rafts handelt es sich um in die Plasmamembran eingebettete Strukturen, die reich an Cholesterol- und Sphingolipid-Domänen sind, ebenso wie an glycosylierten Proteinen und Lipiden. Es wird angenommen, dass Lipid-Rafts an diversen zellulären Prozessen beteiligt sind, einschließlich der Homöostase von Cholesterol, der Signaltransduktion, dem Membrantransport und der Invasion von Pathogenen, dem Sortieren von Proteinen, neurodegenerativen Erkrankungen und der Angiogenese, ihre eindeutigen Funktionen werden aber noch immer diskutiert.^[165a, 176] Daher ist die Entwicklung von Fluoreszenzsonden, die mittels optischer Bildgebung die Funktionen von Lipid-Rafts enträtseln können, von entscheidender Bedeutung. Vor 2000 wurden in der Literatur einige Ein-Photonen- und Zwei-Photonen-Fluoreszenzsonden für Lipid-Rafts beschrieben (z.B. Laurdan (**81**, Schema 29)^[177] und BODIPY-GM1)^[178] für die eine lange Kohlenstoffkette als Membrananker in lösungsmittel-empfindliche Farbstoffe zur Detektion von Lipidstrukturen und Raft-Domänen eingeführt wurde, deren Polarität sich eindeutig von der anderer Membranbereiche unterscheidet.^[179] Diese Strukturen sind allerdings stark lipophil und folglich schlecht wasserlöslich, was ihre Anwendungsmöglichkeiten einschränkt.

Cho et al. berichteten 2007 über C-Laurdan (CL, **82**, Schema 29), eine Zwei-Photonen-Sonde für die Membranpolarität zur Detektion von Lipid-Rafts. Sie führten dazu eine



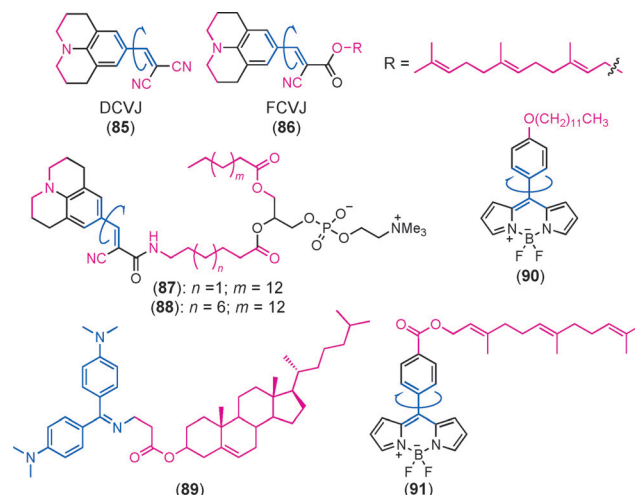
Schema 29. Strukturen von MemTAFPs für Lipid-Rafts.

Carbonsäurefunktion in Laurdan ein, die dessen Wasserlöslichkeit deutlich verbesserte (3.0 μM in Wasser).^[180] Spektroskopische Messungen deuteten darauf hin, dass die Emissionswellenlänge entsprechend der Lösungsmittelpolarität in der Reihenfolge Cyclohexan < DMF < EtOH < H₂O einen bathochromen Effekt aufwies, der auf den ICT-Mechanismus zurückzuführen war. Von Bedeutung ist, dass die Ergänzung von CL durch die Carbonsäurefunktion dessen Empfindlichkeit gegenüber der Polarität des Lösungsmittels im Vergleich zu Laurdan steigerte, wohingegen Zwei-Photonen-Mikroskopie zeigte, dass CL zur Visualisierung von Lipid-Rafts auf der Zelloberfläche genutzt werden konnte. Anschließend modifizierte dieselbe Gruppe den Membrananker von CL und entwickelte eine weitere Zwei-Photonen-, „Turn-on“-Sonde, CL2 (**83**, Schema 29), zur Abbildung der Lipid-Rafts. Diese Sonde zeichnete sich durch einen größeren Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt und eine größere Empfindlichkeit gegenüber der Polarität der Umgebung aus als CL, das heißt, sie ließ in den Lipid-Raft-Domänen eine höhere Zwei-Photonen-Fluoreszenz erkennen als in den Nicht-Raft-Domänen.^[181] Als Nachweis hierfür wurde CL2 erfolgreich für die selektive Visualisierung der Lipid-Rafts auf lebenden Zellmembranen und den pyramidalen Neuronenschichten in lebendem Gewebe bei einer Tiefe von 100–250 μm eingesetzt. Leider neigte CL2 dazu, nach einer längeren Inkubation in das Cytoplasma zu internalisieren, was unscharfe Bilder mit vermindertem Kontrast verursachte. Um dieses Problem zu lösen, entwarfen Cho et al. eine neue Zwei-Photonen-, „Turn-on“-Sonde (SL2, **84**, Schema 29), in der sie die Carbonsäure-Kopfgruppe von CL2 durch eine wasserlösliche Natriumsulfonatgruppe ersetzten.^[182] Eine solche Modifikation resultierte in der stabilen Akkumulation von SL2 innerhalb der Plasmamembran und einer helleren Emission in den Lipid-Raft-Domänen. Zukünftige Untersuchungen könnten sich eher auf die innerhalb der Lipid-Rafts ablaufenden chemischen Prozesse konzentrieren. Außerdem könnten zusätzliche Rezeptoren für weitere Analyten in die Lipid-Raft-Sonden eingegliedert werden.

5.4. MemTAFPs für die Membranviskosität

Die Membranviskosität ist ein Schlüsselfaktor der Zellphysiologie. Sie beeinflusst die zelluläre Signalübertragung, den Transport von Biomolekülen und die Funktion von Proteinen.^[183–185] Zur Bestimmung der Membranviskosität ent-

warfen Forscher eine Reihe von Indikatoren. Beispielsweise handelt es sich bei molekularen Rotoren um eine Gruppe fluoreszierender Moleküle, die bei Anregung verdrehte intramolekulare Charge-Transfer (TICT)-Zustände bilden; außerdem nimmt ihre interne Rotation in einem viskoserem Milieu ab. Demzufolge hängen die Emissionseigenschaften molekularer Rotoren stark von der Viskosität des Lösungsmittels ab, was deren Verwendung als empfindliche Viskositätssonden ermöglicht.^[186] Von diesen wurde 9-(Dicyanvinyl)julolidin (DCVJ, **85**, Schema 30) umfassend zur Detek-



Schema 30. MemTAFPs für die Membranviskosität.

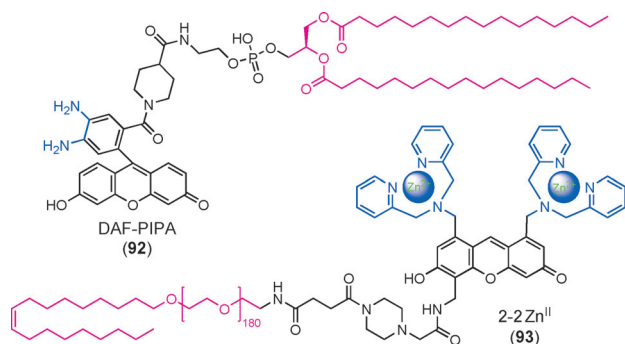
tion der biologischen Viskosität in unterschiedlichen Milieus eingesetzt, einschließlich der Messung der Membranviskosität in Liposomen und Mizellen.^[187] Allerdings kann DCVJ in das Cytoplasma diffundieren, was seine Empfindlichkeit reduziert und zu unzuverlässigen Daten bei der Bestimmung der Viskosität der Zellmembran führt.^[188, 189]

Zur Steigerung der Zuverlässigkeit von DCVJ berichteten Haidekker et al. 2001 über eine Serie an Fluoreszenzsonden (z. B. FCVJ, **86**, Schema 30), für die sie Kohlenwasserstoffketten unterschiedlicher Längen (z. B. Farnesylester) an DCVJ anfügten. Die Fluoreszenzbildgebung deutete darauf hin, dass FCVJ in der äußeren Plasmamembran lokalisierte, und als Antwort auf eine biomechanische Stimulierung (Schubspannung) war die relative Emission 20-fach höher.^[188] Weitere Untersuchungen veranschaulichten, dass FCVJ Änderungen in der Membranviskosität mittels fluoreszenzspektroskopischer Echtzeit-Messungen genau wiedergeben konnte.^[189] Die Farnesylester-Funktion am FCVJ konnte dessen Migration in das Zellinnere allerdings nicht vollständig verhindern.^[190a] Zur weiteren Steigerung der Kapazität des Membranankers entwarfen dieselbe Gruppe sowie andere Wissenschaftler 2002 mehrere neue molekulare Rotoren (**87–91**, Schema 30). So gelang die Synthese der Verbindungen **87** und **88** durch Anhängen von DCVJ an das hydrophobe Ende von Phosphatidylcholin über einen Polymethylen-Linker.^[190a–d] Die Zellbildgebung ließ erkennen, dass diese Sonden ausschließlich in der Plasmamembran lokalisi-

sieren und empfindlich auf Viskositätsschwankungen reagieren.

5.5. MemTAFPs für ATP und NO

ATP ist die Hauptenergiequelle für zelluläre Aktivitäten und unterstützt diverse an der Plasmamembran befindliche Proteinkanäle und Enzyme. Zunehmende Belege deuten zudem darauf hin, dass die Calcium-ATPase auf der Plasmamembran für die Erzeugung von NO verantwortlich sein könnte.^[191] Daher könnte eine Überwachung dieser beiden Spezies an der Plasmamembran einen tieferen Einblick in zelluläre Aktivitäten bringen. Kojima et al. gaben 2006 eine als Membrananker wirkende Fluoreszenzsonde (DAF-PIPA, **92**, Schema 31) zur Detektion von NO bekannt.^[192] Diese



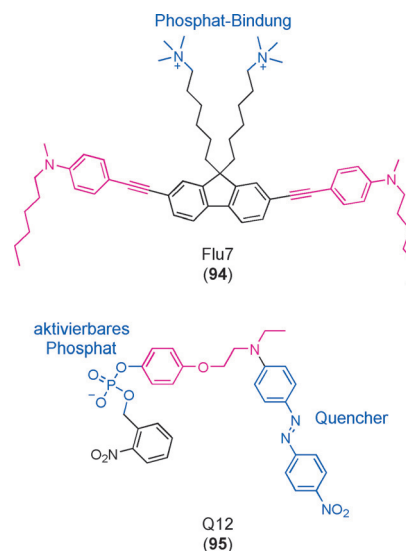
Schema 31. Strukturen von MemTAFPs für ATP und NO.

Sonde wurde durch die Einführung einer langen Kohlenstoffkette als das Membrananker-Strukturmotiv in eine NO-Sonde, Diamino-Fluorescein, über einen Phospholipid-Linker konstruiert. Die freie Sonde fluoreszierte nur schwach, emittierte nach der Reaktion mit NO aber stark. Konfokalmikroskopische Experimente deuteten darauf hin, dass die Sonde an den Zellmembranen lokalisierte und offenbarte eine deutliche Steigerung der Emission in Gegenwart eines NO-Donors.

Die Gruppe von Hamachi wiederum beschrieb 2012 eine „Turn-on“-Fluoreszenzsonde (2-2Zn^{II}, **93**, Schema 31) für ATP-Spezies der Plasmamembran und publizierte in derselben Arbeit eine Sonde für mitochondriales ATP (siehe Abschnitt 3.6).^[98] Durch die Einführung eines biokompatiblen BAM-Rests als Lipidanker in eine bekannte Sonde für ATP gelang es, die Färbung in die Richtung der Plasmamembran zu steuern, was mittels konfokalmikroskopischer Verfahren zur Fluoreszenzbildgebung bestätigt wurde. 2-2Zn^{II} konnte zur Visualisierung von ATP auf Plasmamembran-Oberflächen eingesetzt werden, während eine zweifarbige Bildgebung der intrazellulären ATP-Verbreitung in sowohl den Mitochondrien als auch der Plasmamembran unter gleichzeitiger Verwendung von 2-2Zn^{II} und der roten, auf Mitochondrien zielenden Sonde 3-2Zn^{II} gelang (Schema 17), was die Produktion und die Nutzung von ATP offenlegte.^[98]

5.6. MemTAFPs für Membranenzyme

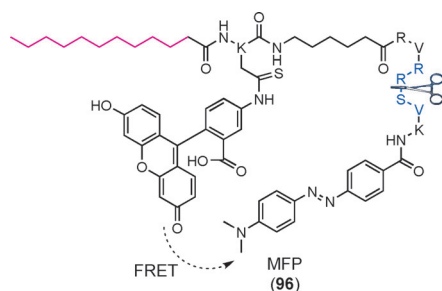
Auf der Plasmamembran existieren zahlreiche Proteinkanäle, die die Zellstrukturen und die Schlüsselaktivitäten unterstützen. Unter ihnen sind die Rezeptor-ähnlichen Protein-Tyrosin-Phosphatasen (RPTPs), die für die meisten Aktivitäten der in der Nähe der Plasmamembran lokalisierten Proteinphosphatasen verantwortlich sind.^[193] Fehlregulierungen der RPTPs wurden mit verschiedenen menschlichen Krankheiten in Verbindung gebracht.^[194] Erst vor kurzem beschrieb die Gruppe von Yao ein FRET-Sondensystem bestehend aus einer Kombination aus Flu7 und Q12 (**94** und **95**, Schema 32) zur Abbildung der membranassoziierten RPTP-



Schema 32. MemTAFP für die Tyrosin-Phosphatase.

Aktivität.^[195] In diesem System färbte Flu7, das quartäre Ammonium-Kopfgruppen mit einer sechsgliedrigen Kohlenstoffkette enthielt, spezifisch und mit deutlicher Zwei-Photonen-Fluoreszenz (eingeschalteter Zustand) die Plasmamembran. Q12 wiederum war mit einem starken Fluoreszenzlöcher und einer lichtaktivierbaren Einheit ausgestattet, die beide an eine Phosphatgruppe gebunden waren. Bei der Zugabe von Q12 zu den Zellen wechselwirkte Flu7 über die Anziehung zwischen dem Ammonium- und dem Phosphatrest elektrostatisch mit Q12. Die Fluoreszenz von Flu7 in der gefärbten Membran wurde somit über einen intermolekularen FRET mit Q12 nahezu vollständig gelöscht (ausgeschalteter Zustand). Anschließend wurden die Zellen mit UV-Strahlung behandelt und die deaktivierende 2-Nitrobenzyl-Gruppe unter Freilegung des Tyrosin-Phosphat-Rests entfernt. In Gegenwart Membran-assoziiierter RPTPs wurde der Fluoreszenzlöcher gespalten und die Emission von Flu7 wiederhergestellt. Ein solches kombiniertes FRET-System wurde erfolgreich zur Quantifizierung des Gehalts an endogenen RPTPs in unterschiedlichen Säugetierzellen ohne physikalische Abtrennung der Plasmamembranen angewendet.

Erst vor kurzem berichteten Liu und Xing et al. über eine weitere FRET-Sonde (MFP, **96**, Schema 33) für membran-gebundene proteolytische Enzyme.^[196a] Auf ähnliche Weise kombinierten sie ein über eine Peptidkette mit dem Fluoreszenzlöcher DabcyI verknüpft Fluorescein. Der Lipid-



Schema 33. Struktur und Mechanismus der Fluoreszenzsonde für proteolytische Membranenzyme.

membrananker konnte die Sonde einfach auf die Zelloberfläche übertragen, wo proteolytische Enzyme die Peptidkette spalteten und das freie Fluorescein freisetzen. Unter Verwendung dieser Sonde gelang den Forschern die Visualisierung enzymatischer Aktivitäten in lebenden Zellen.

5.7. Herausforderungen für MemTAFPs

Im Vergleich zu MiTAFPs und LyTAFPs sind MemTAFPs aufgrund der mangelnden Spezifität bei der Verankerung der Sonden an der Plasmamembran deutlich weniger erforscht. Die Funktionen und der Aufbau der Plasmamembran sind nach wie vor ungeklärt, und die Optimierung von MemTAFPs muss dringend verfolgt werden. Einige Herausforderungen, denen sich Forscher stellen müssen, werden hier aufgeführt:

- 1) Es stellte sich heraus, dass viele MemTAFPs bei einer längeren Inkubation aufgrund der eingeschränkten Wasserlöslichkeit in das Cytoplasma internalisieren, was ihr Leistungsvermögen bei der Bildgebung beeinträchtigt. Für hervorragende MTAFPs spielen somit sowohl die Größe der Kohlenwasserstoffkette als auch die für die Wasserlöslichkeit zuständige funktionelle Gruppe eine wichtige Rolle.
- 2) Schlüsselemente der Plasmamembran, wie die verschiedenartigen Proteinkanäle, die Enzyme und die Lipid-Rafts wurden nicht ausreichend erforscht. Anstatt sich auf die membran-nahen Metallionen (z. B. Na^+ , K^+ und Mg^{2+}) zu konzentrieren, könnte weniger intensiv verfolgten Bereichen größere Aufmerksamkeit gewidmet werden. Auf fluoreszierenden Proteinen basierende Sensoren konnten auf einfache Weise an der Membran angebracht werden und erwiesen sich als leistungsstarker Ansatz zur Bestimmung der Membranspannung und anderer Vorgänge.^[196b,c]
- 3) Anders als MiTAFPs und LyTAFPs, die sich frei innerhalb der Organellen ausbreiten, sind die meisten beschriebenen MemTAFPs in der Lipiddoppelschicht verankert, was

zu einer lokalen Akkumulation von Fluorophoren führen könnte und deren optische Eigenschaften beeinflusst. Hiergegen könnte mithilfe ratiometrischer Sonden angegangen werden, die selbstkalibrierende Strukturelemente enthalten. Außerdem sind MemTAFPs mit einer Anregung und Emission bei höherer Wellenlänge erforderlich, um den durch die Autofluoreszenz zahlreicher Biomakromoleküle verursachten Hintergrund zu reduzieren.

6. Auf den Zellkern zielende aktivierbare Fluoreszenzsonden (NuTAFPs)

6.1. Überblick über die Funktionen des Zellkerns und die Strategie zum Zielen auf den Zellkern

Der Zellkern ist das Herz der Zelle. Er ist von einer Doppelschichtmembran umhüllt, die zu dem Endomembransystem gehört. Die primäre Organelle enthält die Erbinformation, oder DNA, und kontrolliert Proteinexpression sowie Zellwachstum und -reproduktion (Abbildung 18).^[160] Es wurden zahlreiche Untersuchungen zur Enthüllung der Struktur und des Aufbaus des Zellkerns unternommen. Auf der äußeren Membran des Zellkerns, der Kernhülle, sind hunderte Kernporen verteilt, sowie ein spezifisches Proteinsynthetisierendes Element, das als Ribosom bezeichnet wird.^[197] Eng mit dem Zellkern verknüpft ist das ER, das ebenfalls Teil des Endomembransystems ist. Die von dem Zellkern produzierten Ribosomen werden auf das ER übertragen und führen dort die Proteinsynthese aus. Die Kernporen bestehen aus mehreren Proteinen, den Nucleoporinen. Die komplexe Struktur der Kernporen ermöglicht den ungehinderten Durchgang kleiner wasserlöslicher Spezies, wie Calciumionen und Wasserstoffperoxid, die wichtige Signalfunktionen erfüllen. Anders als kleine Moleküle benötigen große Biomoleküle, einschließlich Nukleinsäuren, Proteinen

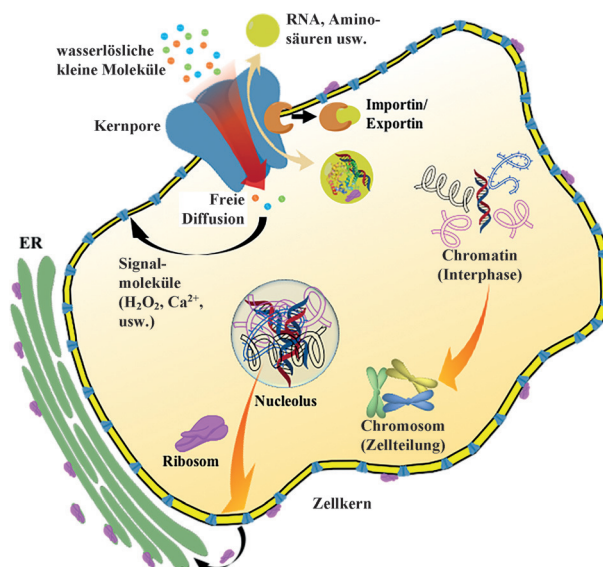
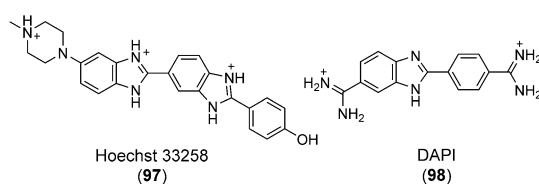


Abbildung 18. Allgemeine Bestandteile und die chemischen/biologischen Prozesse innerhalb des Zellkerns.

und Ribosomen, Energie und Transporter zur Durchquerung der Kernhülle. Alle Transporter zusammengefasst sind als Karyopherin-Familie bekannt, wobei die Proteine, die die Einfuhr von Biomolekülen aus dem Cytoplasma in den Zellkern ermöglichen als Importine bezeichnet werden und die umgekehrt wirkenden als Exportine.

Die Kernhülle ummantelt alle Bestandteile des Zellkerns, einschließlich des Nucleolus und verschiedenen genetischen Materialien.^[5] Der Nucleolus belegt das Zentrum des Zellkerns und produziert Ribosomen, die für die Proteinsynthese zum ER transportiert werden. Ein Nucleolus besteht aus Proteinen und RNA mit unbedeutenden Mengen an DNA. Die Transkription von präribosomaler RNA ist für die Anordnung der Ribosomen verantwortlich, während andere RNA-Moleküle an der Produktion von Signalerkennungspartikeln mitwirken, wie denjenigen, die zellulären Stress wahrnehmen. Dagegen liegen die genetischen Materialien, hauptsächlich verschiedene DNA-Ketten, im Ruhezustand der Zelle – der Interphase – in lockeren Strukturen vor. Die beweglichen Ketten werden Chromatin genannt und ermöglichen den Zugang von RNA- und DNA-Polymerasen zur Transkription und Replikation von DNA-Sequenzen. Im Laufe der Metaphase und der Anaphase der Zellteilung verdichten sich die DNA-Ketten und nehmen eine scherenförmige Konformation um die Knotenpunkte der Zentromere herum an. Die gepackte genetische Struktur, die als Chromosom bezeichnet wird, ist durchmischt und rekombiniert, um die genetische Vielfalt während der Zellteilung zu gewährleisten. Eine Störung des genetischen Materials kann zum Zelltod oder zur Entwicklung von Krebs führen.

Zur Visualisierung des Zellkerns geeignete Fluoreszenzsonden sind von enormem Interesse. Da der Zellkern mit negativ geladener DNA gefüllt ist, die elektrostatisch an kationische Farbstoffe binden kann, wurden zahlreiche entsprechende Reagenzien zur Abbildung des Zellkerns entwickelt.^[198] Es wird angenommen, dass bekannte Reagenzien, wie Hoechst 33258 und DAPI (97 und 98, Schema 34), in die kleine Furche doppelsträngiger DNA binden. Allgemeine physikochemische Merkmale solcher Reagenzien sind ihre kationische Beschaffenheit, kurze hydrophobe Ketten und ein planares aromatisches System oberhalb einer Mindestgröße, die deren schwache Bindung an Proteine und Lipide nach sich ziehen und somit deren ungestörtes Eindringen in Zellen und den Zellkern ermöglichen.^[198,199] Bis heute wurden die meisten beschriebenen NuTAFPs für doppelsträngige DNA (ds-DNA) entwickelt, und die Mehrheit von ihnen enthält mindestens zwei kationische Zentren.^[42,190,200a] Außerdem wurden als Kernlokalisierungssignale (NLS) bezeichnete Peptidketten als potente Zellkernanker entwickelt,

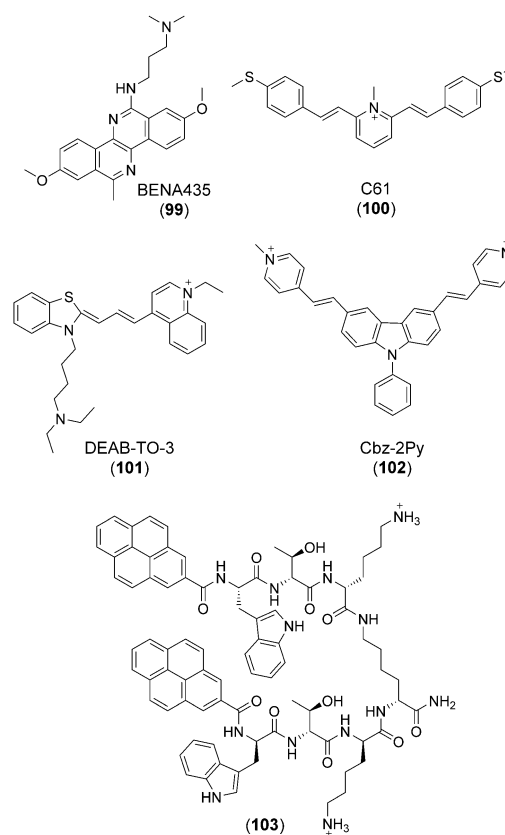


Schema 34. Strukturen von Hoechst 33258 und DAPI.

die auf eine starke Wechselwirkung mit Importin zurückzuführen waren. Beim Binden an Importin konnten die NLS-haltigen Vehikel aktiv durch die Kernporen in den Zellkern transportiert werden.^[200b,c] Obwohl viele auf fluoreszierenden Proteinen basierende Sonden zur Untersuchung enzymatischer Aktivitäten NLS nutzen, gibt es wenige Berichte zu niedermolekularen Sonden auf der Grundlage von NLS.^[200d,e]

6.2. NuTAFPs zur Detektion von Doppelstrang-DNA und ribosomaler RNA

Seit der Entwicklung der Hoechst-Serie wurden diverse Fluoreszenzsonden für ds-DNA in der Literatur bekanntgegeben.^[200–203] Allerdings gibt es noch immer sehr wenige Sonden mit niedriger Toxizität, und viele durchbringen nicht den Kern lebender Zellen.^[204] Die Gruppe von Popov berichtete 2006 über die zellmembranpermeable Fluoreszenzsonde BENA435 (99, Schema 35) zur Detektion der Kern-ds-DNA in lebenden Zellen.^[205] BENA435 zeichnete sich durch eine bevorzugte Bindung von ds-DNA gegenüber RNA aus sowie eine Absorption und Emission bei maximal 435 und 484 nm nach Chelatisierung mit der ds-DNA. Die Emission dieser Sonde stand in quantitativer Beziehung zu der Menge an ds-DNA, mit der sie wechselwirkte, und kann somit zur Quantifizierung von DNA in Zellen eingesetzt werden. Nachfolgend entdeckte die Gruppe von Chang durch das Screening von Bibliotheken aus Fluoreszenzsonden die grün

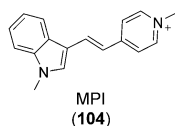


Schema 35. Strukturen von NuTAFPs für die ds-DNA.

färbende DNA-selektive Sonde C61 (**100**, Schema 35) zur Detektion von Kern-ds-DNA in lebenden Zellen.^[206] C61 steigerte beim Binden an ds-DNA die Fluoreszenz merklich und konnte sowohl in lebenden als auch fixierten Zellen Kern-ds-DNA sichtbar machen, wenngleich die Maxima der Anregung und Emission noch immer im relativ kurzwelligen Bereich liegen ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 425/540 \text{ nm}$).

Peng et al. entwickelten 2011 ein TO-3-Analog DEAB-TO-3 (**101**, Schema 35, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 626/649 \text{ nm}$) mit einem (Diethylamino)butyl-Substituenten als Rot fluoreszierende Sonde zur Abbildung und Quantifizierung von DNA in lebenden Zellen.^[207] Diese Sonde steigert beim Binden in die Furche nativer DNA die Fluoreszenz deutlich (97,3-fach) bei einer ausgeprägten Bevorzugung gegenüber totaler RNA (sechsfacher Unterschied) und BSA (vernachlässigbare Reaktion). Untersuchungen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung deuteten darauf hin, dass der (Diethylamino)butyl-Substituent der Sonde eine große Rolle für die hohe DNA-Selektivität und die Permeabilität lebender Zellen spielt. Bildgebungsexperimente an lebenden Zellen deuteten darauf hin, dass DEAB-TO-3 sowohl *in vitro* als auch bei der Zellkernspezifischen Bildgebung und der Quantifizierung von DNA *in vivo* ein vielversprechender Kandidat für die hochempfindliche DNA-Detektion sein könnte.^[207] Außerdem wurde eine weitere ähnlich gestaltete Phenylcarbazol-Fluoreszenzsonde für Duplex- und Quadruplex-Konformationen beschrieben (**102**, Schema 35).^[201a]

Darüber hinaus berichtete die Gruppe von Schmuck 2012 über die Pyren-funktionalisierte Sonde **103**, die zur Erkennung von ds-DNA kationische Oligopeptide enthielt (Schema 35).^[201b] Bei der Wechselwirkung mit ds-DNA änderte sich die Konformation von einer gefalteten hin zu einer gestreckten Form, was die Fluoreszenz von einer Excimer-Emission zu einer Monomer-Emission umschaltete. Die Zellbildgebung demonstrierte, dass diese Sonde einfach von Zellen aufgenommen werden und Kern-DNA visualisieren konnte.^[201b] Da die Struktur aber eher komplex wirkt, werden einfachere chemische Sonden benötigt. Mit einer auf Indol basierenden positiv geladenen Cyanin-Sonde (MPI, **104**, Schema 36) gelang Wong et al. die hochselektive Abbildung von ribosomaler RNA (rRNA) im Nucleolus lebender Zellen mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie.^[208] Diese niedermolekulare Sonde konnte bedingt durch ihre geringe Größe und



Schema 36. Struktur der Fluoreszenzsonde für Kern-rRNA.

die relative Hydrophilie tief in den Zellkern eindringen, während die konjugierte positive Ladung die Wechselwirkung mit der RNA-Kette ermöglicht. Abbildungen lebender Zellen weisen eindeutig die Lokalisierung der Sonde im Inneren des Nucleolus nach (Abbildung 19). Diese kleine Sonde ist ein gutes Beispiel für ein einfaches Design, das zu herausragenden Funktionen führt.

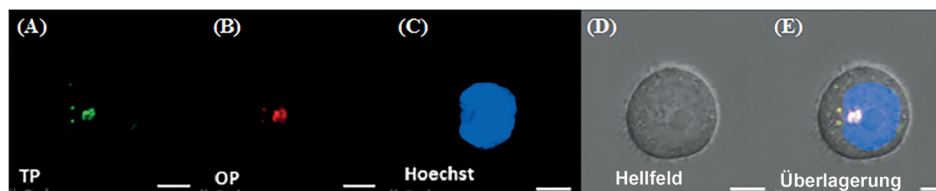
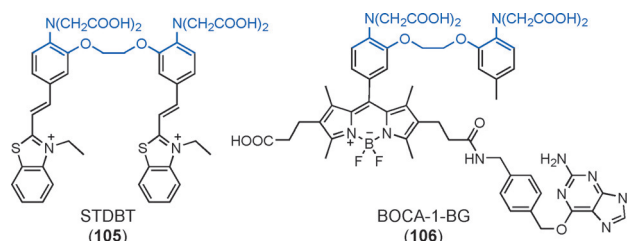


Abbildung 19. A) Zwei-Photonen-Abbildung und B) Ein-Photonen-Abbildung der rRNA-Sonde MPI in HeLa-Zellen. Die MPI-Konzentration beträgt $23 \mu\text{M}$. C) Hoechst-Färbung; D) Hellfeld-Abbildung; E) Überlagerung von (A) bis (D). Maßstab: $10 \mu\text{m}$. Mit Erlaubnis übernommen von der American Chemical Society.

6.3. NuTAFPs für Signalmoleküle (Ca^{2+} und H_2O_2)

Innerhalb des Zellkerns existieren verschiedenartige Signalmoleküle, die dessen Aufgaben vermitteln, wie die Mitose und das Kodieren von Proteinen. Vor kurzem berichtete die Gruppe von Zhang über STDBT, eine Fluoreszenzsonde für Ca^{2+} im Zellkern und im Cytosol lebender Zellen (**105**, Schema 37).^[209] Diese Sonde setzt sich aus zwei



Schema 37. Strukturen von auf Calcium reagierenden NuTAFPs.

Benzothiazolium-Hemicyanin-Fluorophoren und einem BAPTA-Derivat als Chelator zusammen. Bei der Ca^{2+} -Koordination erfolgt eine deutliche Blauverschiebung der Absorption/Anregung der Sonde bei einem merklichem Anstieg der Emissionsintensität, da die Wechselwirkung den ICT-Prozess zwischen BAPTA und dem Fluorophor hemmte. Experimente zur Zellbildgebung deuteten darauf hin, dass der Acetoxymethyl(AM)-Ester von STDBT die Zellmembran durchdrang und sich sowohl im Cytosol als auch dem Zellkern verteilte, mit einer sehr eindeutigen Grenze zwischen den beiden Kompartimenten. Diese Sonde wurde erfolgreich zur simultanen Abbildung von Ca^{2+} des Cytoplasmas und des Zellkerns angewendet.^[209] Außerdem entwarfen Kamiya und Johnsson eine SNAP-Tag-Hybridsonde für Ca^{2+} , die aus Calcium-empfindlichem BOCA-1-BG (**106**, Schema 37) und einem SNAP-Tag-Fusionsprotein bestand, das *in vivo* an BOCA-1-BG band und den Guanidinrest abspaltete.^[210] Auf ähnliche Weise konnte die Sonde sowohl in den Zellkernen als auch dem Cytosol lebender CHO-K1-Zellen Ca^{2+} -Schwankungen messen (Abbildung 20).^[210]

Chang et al. entwickelten 2011 die im Zellkern lokalisierende H_2O_2 -Fluoreszenzsonde NucPE1 (**107a**, Schema 38).^[211] Konfokalmikroskopische Experimente deuteten auf eine spezifische Akkumulation der Sonde im Zellkern verschiedener Säugetierzelllinien hin. Darüber hinaus

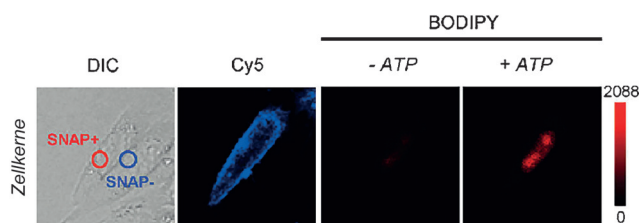
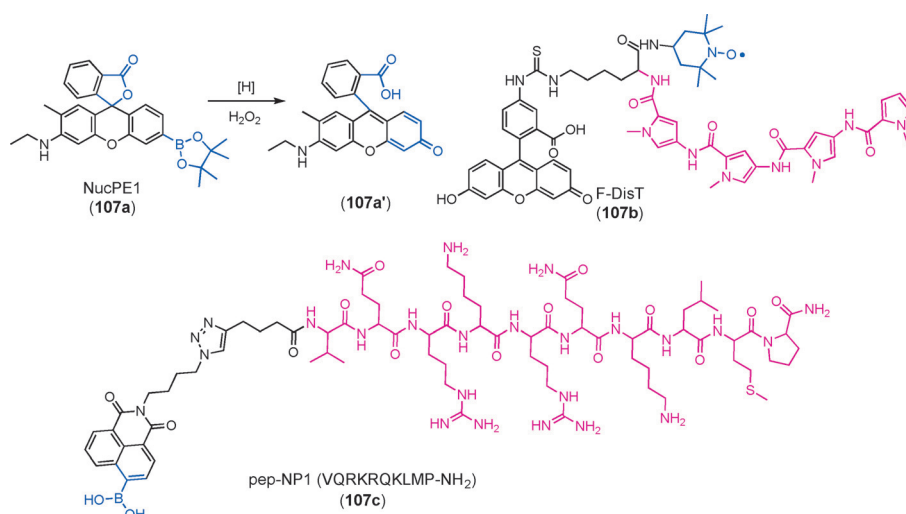


Abbildung 20. SNAP-Tag in Zellkernen exprimierende CHO-K1-Zellen wurden durch „Bead“-Befüllung und nachfolgender Inkubation für 1.5 h mit BOCA-1-BG beladen. Von links nach rechts: Differentialinterferenzkontrast(DIC)-Abbildungen, Cy5-Fluoreszenzabbildungen (CLIP-GPI dient als Transfektionsmarker) und BODIPY-Fluoreszenzabbildungen vor (–ATP) und nach der Stimulation durch ATP (+ATP). Mit Erlaubnis übernommen von der American Chemical Society.

eignet sich NucPE1 nicht nur zur Überwachung subzellulärer H_2O_2 -Änderungen in lebenden Zellen, sondern auch in dem Modellorganismus *C. elegans*. Es wurde auch gezeigt, dass Änderungen der Fluoreszenz ihren Ursprung in den H_2O_2 -Strömen des Zellkerns hatten, da NucPE1 nach seiner Entschüttung innerhalb des Cytoplasmas oder anderer Organellen nicht länger im Zellkern lokalisierte. Daher könnte sich diese Sonde als nützliches Hilfsmittel zur Visualisierung der Aktivitäten von H_2O_2 im Zellkern erweisen. Beispielsweise entdeckten die Autoren mittels Bildgebung mit NucPE1 in vivo eine Verbindung zwischen Sirtuin – einem Protein, das eine lange Lebensdauer fördert – und einer gesteigerten Regulierung nukleärer ROS-Vorräte.^[211a] Sämtliche durchgeführten Experimente wiesen nach, dass der Boronatrest in NucPE1 für das Zielen auf den Zellkern unabdingbar ist, wenngleich der detaillierte molekulare Mechanismus noch immer unklar ist. Darüber hinaus konnten zellgängige Peptide und deren Analoga ebenfalls als Alternativen zu kleinmolekularen auf den Zellkern zielenden Anker-Motiven dienen. Beispielsweise bauten Nakagawa und Miyata et al. 2010 ein auf den Zellkern zielendes Peptidanalogen in eine TEMPO-konjugierte Fluorescein-Sonde ein und benutzten diese zur Visualisierung von oxidativem Stress im Zellkern (**107b**, Schema 38).^[211b] Erst vor kurzem ver-



Schema 38. Strukturen von auf H_2O_2 reagierenden NuTAFPs.

wendeten Yi et al. ein im Kern lokalisierendes Signalpeptid und führten erfolgreich eine Naphthalinimid-Sonde für H_2O_2 in den Zellkern ein (**107c**, Schema 38).^[211c]

6.4. Herausforderungen für NuTAFPs

Es wurde angenommen, dass NuTAFPs einfach durch Anhängen eines Hoechst-Derivats an Fluoreszenzsonden verknüpft werden konnten, dennoch gibt es nur spärliche Berichte zu dieser Vorgehensweise.^[212] Die Selektivität von Sonden für den Zellkern wird durch deren konkurrenzfähige Akkumulation im Zellkern verglichen mit anderen Organellen kontrolliert. Indes deuteten viele Berichte darauf hin, dass tatsächlich sogar geringe Änderungen der Struktur auf den Zellkern zielender Reagenzien deren Selektivität vollständig aufheben konnten und somit die Situation verkomplizieren.^[41h,213] Sowohl Experimente als auch Modelle zur quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehung (QSAR) wiesen nach, dass die Selektivität von Reagenzien zur Abbildung des Zellkerns durch die Zahl positiver Ladungen, die Länge der hydrophoben Kette, die Größe des planaren aromatischen Systems sowie die Molekülgröße und -form kontrolliert wird.^[199] Daher sollten die zuvor genannten Schwierigkeiten bei der Entwicklung hervorragender NuTAFPs berücksichtigt werden. Außerdem sind nicht nur bei den niedermolekularen Sonden, sondern auch bei auf den Zellkern zielenden Fluoreszenzproteinen und Nanomaterialien wesentliche Fortschritte erzielt worden.^[214a–c]

7. Auf das endoplasmatische Retikulum und das Golgi-System zielende aktivierbare Fluoreszenzsonden

7.1. Überblick über das ER und das Golgi-System

Diverse Proteine sind essentiell für zelluläre Strukturen und Funktionen. Zwar haben die Proteine ihren Ursprung in der Kern-DNA, sie werden aber in dem rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) produziert und über den Golgi-Apparat auf ihre entsprechenden Positionen verteilt (Abbildung 21).^[5] Sowohl das ER als auch der Golgi-Apparat weisen geöffnete Strukturen mit einem Netzwerk aus gekrümmten Membranen auf, die als Zisternen bezeichnet werden. Außer bei der Synthese großer Mengen an Proteinen (z.B. Verdauungsenzymen und Enzymvorstufen), Kohlenhydraten und Lipiden spielt das ER eine wesentliche Rolle beim Zellmetabolismus.^[215] Gemäß der elektronenmikroskopisch beobachteten Oberflächenmorphologie kann das ER in zwei Kategorien eingeteilt werden: das glatte ER und das raue ER.

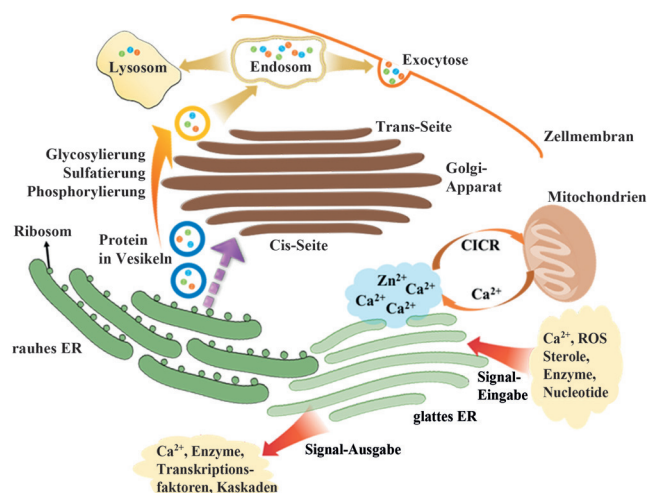


Abbildung 21. Allgemeine Bestandteile und chemische/biologische Prozesse des Systems aus ER und Golgi-Apparat.

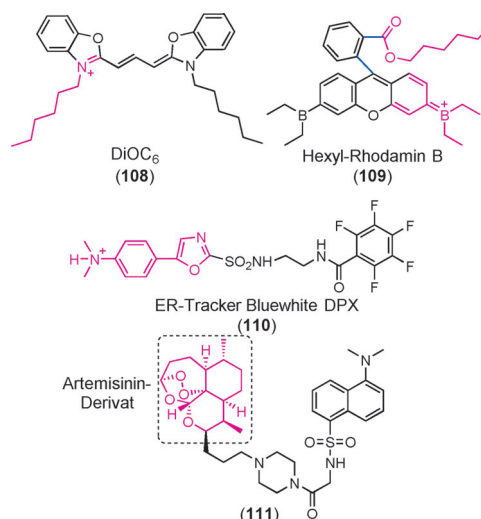
Die Kernhülle kann als Erweiterung des rauen ER angesehen werden. Das glatte ER wirkt hauptsächlich als Signalstation, das heißt, eine herausragende Funktion des glatten ERs ist die Calcium-Signalgebung, da es einen der größten Calcium-Vorräte innerhalb der Zelle enthält.^[216] Auf die Ankunft von Calcium aus den Mitochondrien oder anderen Organellen reagiert das glatte ER mit dem Prozess der Calcium-induzierten Calcium-Freisetzung (CICR), der einen Ausgleich des Calcium-Gehalts auslöst oder andere Abläufe einleitet, wie die Bewegung von Muskelzellen. Andere Signalmoleküle, die das ER entgegennimmt, sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Sterine, verschiedene Enzyme und Nucleotide. Dementsprechend stößt es Transkriptionsfaktoren, Kaskaden ebenso wie Aminosäuren aus.^[217]

Dagegen ist das raue ER von einer Schicht aus Ribosomen zur Produktion von Biomolekülen umgeben. Die Ribosomen binden über Translokone, an die Zisternen des rauen ERs. Translokone sind lose an Ribosomen bindenden Proteine, die zudem als Transporter zur Überführung von Polypeptiden in die Zisternen des rauen ERs wirken, was die Proteinsynthese zu einem hochdynamischen Prozess macht.^[1a] Ribosomen bestehen aus einer kleinen und einer großen Untereinheit, wobei die kleine Untereinheit mRNA-Signale des Zellkerns wahrnimmt, während die große basierend auf diesen Signalen aus Aminosäuren Polypeptide synthetisiert. Nach dem Aufbau der Polypeptide werden diese innerhalb des Ribosoms zu dreidimensionalen Proteinstrukturen gefaltet. Sobald die Proteine produziert sind, werden sie in von einer Doppelschichtmembran umgebene Vesikel eingewickelt und zum Golgi-Apparat befördert. Es sei angemerkt, dass die Cis-Seite des Golgi-Apparats in die Richtung des ER zeigt, während die Trans-Seite davon abgewandt ist.^[218] Sobald die Proteine den Golgi-Apparat erreichen, durchlaufen sie innerhalb der Zisternen von der Cis-Seite hin zur Trans-Seite zahlreiche Markierungsmaßnahmen, einschließlich der Glycosylierung der Sulfatierung und der Phosphorylierung.^[219] Bei den Modifikationen handelt es sich um Positionsmarker, die es den Proteinen ermöglichen, ihre entsprechenden Bestimmungsorte anzuvisieren. Beispiels-

weise werden die Proteine im Fall lysosomaler Säurehydrolasen mit Mannose-6-phosphat (M6P) und dem M6P-Rezeptor versehen, was die Übergabe an Endosomen und dann Lysosomen erlaubt.^[220] Zusammengefasst stellen das raue ER und der Golgi-Apparat somit die Synthese und den Transport von Biomakromolekülen sicher.

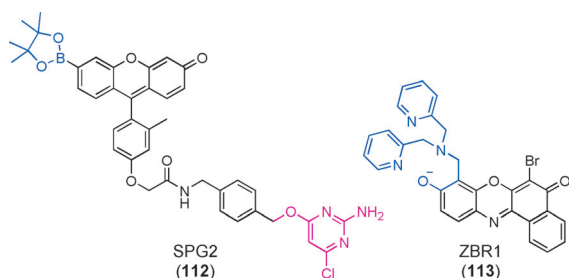
7.2. Auf das ER zielende aktivierbare Fluoreszenzsonden

Wie anhand von ER-Trackern beobachtet, weisen selektive ER-Reagenzien gemeinsame Eigenschaften auf: Es handelt sich bei ihnen um amphipathische, lipophile kationische Farbstoffe mit einem konjugierten System mäßiger Größe (z. B. DiOC₆ (**108**), Hexylrhodamin B (**109**) und der ER-Tracker Bluewhite DPX (**110**), Schema 39).^[221] Die Gruppe von Che entwickelte 2010 das neue ER-Reagenz **111**, das aus einem an einen fluoreszierenden Dansylrest konjugierten cytotoxischen Artemisinin-Derivat bestand (Schema 39).^[222] Die perinukleäre und retikuläre Fluoreszenzbildgebung deutete darauf hin, dass diese Sonde am ER lokalisierte. Ob Artemisinin und dessen Derivate spezifisch auf das ER zielen können oder nicht, ist allerdings noch immer umstritten.



Schema 39. Repräsentative ER-Tracker und auf das ER zielende Reagenzien.

SNAP-Tag enthaltende Fluoreszenzsonden könnten das Problem der Lokalisierung teilweise lösen. Beispielsweise berichtete die Gruppe von Chang 2010 über eine Klasse von auf Organellen (einschließlich dem ER) zielenden Fluoreszenzsonden für H₂O₂ auf der Grundlage der SNAP-Tag-Technologie unter Verwendung von Sonden mit einem desaktivierenden Boronat-Einheit.^[22d] Von diesen kann SPG2 (**112**, Schema 40) präzise zur Membranstruktur des ER von HEK293T-Zellen transportiert werden, die für die transiente Expression von SNAP-KDEL kodiert waren. (KDEL ist ein Signalpeptid zur Zurückhaltung des Protein im ER.) Infolgedessen kann diese Sonde zur Überwachung lokaler Ände-

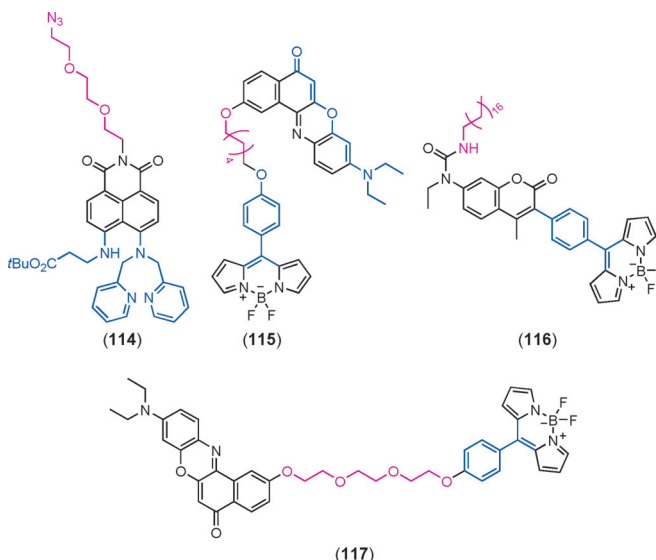


Schema 40. SPG2 zur Detektion von H_2O_2 des ERs basierend auf der SNAP-Tag-Technologie und ZBR1 für Zn^{2+} des ER.

ungen des H_2O_2 -Gehalts verwendet werden, wenngleich die Komplexität dieser Technologie und die regionale Begrenzung von SPG2 weitere Aufmerksamkeit und Untersuchungen erfordern.

Für die Funktionen des ER sind Metallionen wie Ca^{2+} und Zn^{2+} erforderlich. Vor kurzem berichteten Lippard et al. über eine neue Familie Rot emittierender Fluoreszenzsonden (ZBR1, **113**, Schema 40) zur Überwachung des mobilen Zn^{2+} im ER, die auf einem mit Pyridin- und Pyrazin-haltigen Metallchelatoren funktionalisierten Benzoresorufin-Fluorophor basierte.^[223] Die freien Sonden fluoreszierten aufgrund des PeT der Zn^{2+} -Chelatoren nicht, beim Binden steigerte sich ihre Emission aber enorm. Ein Vergleich der Kolo-kalisierung von ZBR1 mit organellenspezifischen Farbstoffen zeigte, dass das ER der wichtigste subzelluläre Ort für die Akkumulation von ZBR1 in HeLa-, RAW 246.7-Zellen und NSCs war. Darüber hinaus wurde ZBR1 erfolgreich zur direkten Beobachtung des Peroxynitrit-induzierten Abbaus von labilem Zink innerhalb des ER neuraler Stammzellen eingesetzt.

Erst vor kurzem berichtete die Gruppe von Kim über eine auf das ER zielende Fluoreszenzsonde für Cu^{2+} -Spezies.^[224] Die Forscher nutzten die Fähigkeit lipophiler oder glycosylierter Verbindungen zur spezifischen Lokalisierung im ER, indem sie eine Ethylenglykolkette in ein Naphthalinimid-Fluorophor einbauten (**114**, Schema 41). Cofärbungen lebender Zellen deuteten darauf hin, dass diese Sonde im ER lokalisierte und nicht in anderen Organellen (Abbildung 22).^[224] Außerdem fanden die Forscher mithilfe dieser Sonde heraus, dass das ER als Cu^{2+} -Reservoir diente, das die Zellen im Falle einer Überladung mit Kupfer schützte. Zusätzlich nutzte dieselbe Gruppe die Fähigkeit lipophiler Ketten zum Zielen auf das ER zum Design einer weiteren Fluoreszenzsonde für die Viskosität und die Polarität des ER.^[225] Die Forscher übernahmen *meso*-Phenyl-BODIPY als molekularen Rotor und Nilrot mit einer konjugierten Push-Pull-Struktur als Polaritätssonde und verknüpften diese über eine lipophile Kette (**115**, Schema 41).^[225a] Unter Verwendung dieser Sonde mit Doppelfunktion konnten sie auf einfache Weise den Anstieg der Viskosität und der Polarität bei induziertem ER-Stress überwachen. Auf ähnliche Weise wurden über dieselbe Strategie der lipophilen Kette zwei weitere auf das ER zielende ratiometrische Fluoreszenzsonden für ER-Stress entwickelt (**116** und **117**, Schema 41). Beide Sonden werden während der ratiometrischen Reaktion auf die Änderungen der ER-Viskosität bei induziertem Stress an der ER-Membran verankert.^[225b,c] Diese Arbeiten stellten



Schema 41. Auf das ER zielende Fluoreszenzsonden für Cu^{2+} und die Viskosität/Polarität.

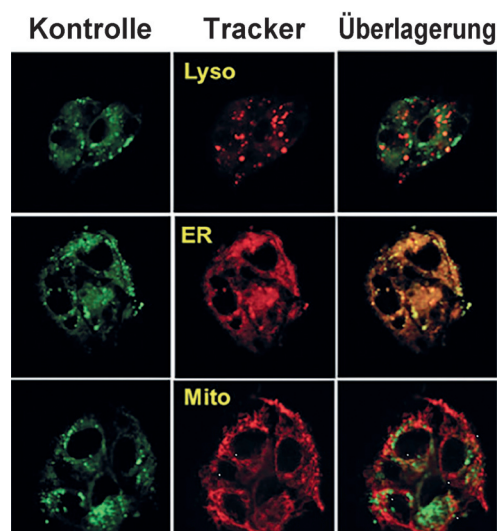
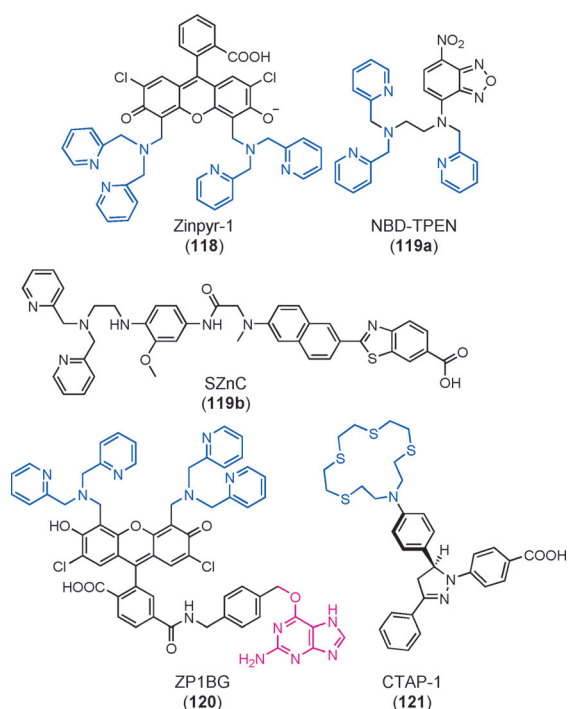


Abbildung 22. Für 10 min mit der Sonde **114** (1 mM) und dann mit Organellen-Markern (0.5 μM LysoTracker Red, 0.1 μM ER Red beziehungsweise 0.1 μM MitoTracker Deep Red) angefärbte HepG2-Zellen. Mit Erlaubnis übernommen von der Royal Chemical Society.

sehr solide Untersuchungen zu auf das ER zielenden Fluoreszenzsonden zur Verfügung.

7.3. Auf den Golgi-Apparat zielende aktivierbare Fluoreszenzsonden

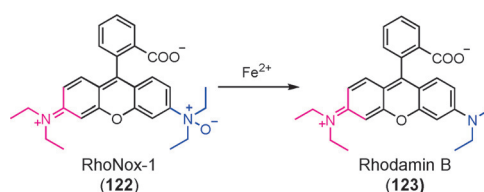
Die Hauptfunktionen des Golgi-Apparats sind die Markierung und der Transport von Proteinen, es wurde allerdings auch dessen Vermittlung des intrazellulären Transports und der Aufbewahrung von Metallionen beschrieben.^[226] Anfang 2000 berichteten Tsien et al. über die zellpermeable „Turn-on“-Fluoreszenzsonde Zinpyr-1 (**118**, Schema 42), die sich



Schema 42. Auf den Golgi-Apparat zielende Fluoreszenzsonden für Zn^{2+} und Cu^{+} .

hauptsächlich im Golgi-Apparat oder in dem Golgi-Apparat zugeordneten Vesikeln ansiedelte.^[227] Die Gruppe von Guo entwickelte 2009 ebenfalls eine Zn^{2+} -spezifische „Turn-on“-Fluoreszenzsonde, NBD-TPEN (**119a**, Schema 42), die sich selektiv in den Lysosomen und dem Golgi-Apparat verteilt.^[228] Diese Sonde wurde zur Detektion der subzellulären Zn^{2+} -Verteilung in lebenden Zellen und Zebrafischen angewendet. Erst vor kurzem beschrieb die Gruppe von Kim die Golgi-Apparat-spezifischere ratiometrische Zwei-Photonen-Sonde SZnC (**119b**, Schema 42) für Zn^{2+} .^[229] Diese Sonde kann zur Echtzeit-Überwachung von Schwankungen des Zink-Gehalts genutzt werden und zur Erstellung eines dreidimensionalen Verteilungsdiagramms innerhalb des Golgi-Apparats.

Darüber hinaus entwarf die Gruppe von Lippard durch die Kombination mit einer O6-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase-(AGT)-Markierung die organelnspezifische Zn^{2+} -Sonde ZP1BG (**120**, Schema 42), die aus einer Zn^{2+} -Sonde ZP1 und dem AGT-Substrat Benzylguanin bestand.^[230] Durch die Expression der Alkyltransferase am Golgi-Apparat gelang es diesem Molekül-Protein-



Schema 43. Auf den Golgi-Apparat zielende Fluoreszenzsonde für Fe^{2+} .

Hybridreporter, den Zn^{2+} -Fluss in dem Golgi-Apparat zu überwachen.

Andere wichtige Sonden für Metalle im Golgi-Apparat sind die Cu^{+} -Sonde CTAP-1 (**121**, Schema 42) der Gruppe von Fahrni^[231] und die *N*-Oxid-basierte Fe^{2+} -Sonde RhoNox-1 (**122**, Schema 43) der Gruppe von Nagasawa.^[232] Eine zusätzliche Cofärbung deutete darauf hin, dass das körnige Färbungsmuster von RhoNox-1 mit einer Verteilung im Golgi-Apparat übereinstimmte (Abbildung 23).^[232] Der Mechanismus der Lokalisierung von sowohl CTAP-1 als auch RhoNox-1 bleibt jedoch unklar, und aus den beschriebenen Sonden für den Golgi-Apparat können keine gemeinsamen Merkmale abgeleitet werden.

Im Unterschied dazu wurden die lebenswichtigen Funktionen des Golgi-Apparats als Proteine/Enzyme transportierendes und sezernierendes Element seit langem erforscht. Der Golgi-Apparat erhält ohne Zweifel ein subtiles Konzentrationsgleichgewicht aller Biomoleküle aufrecht. Im Krankheitsfall werden allerdings einige Proteine überexprimiert, was bedeutet, dass die Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Krebszellen übermäßig häufig vorzufinden ist.^[233] Daher wird eine Echtzeit-Überwachung ausgewählter Proteine/Enzyme im Golgi-Apparat die Forschungen zu entsprechenden Krankheiten stark unterstützen. Vor kurzem entwarf die Gruppe von Peng die „Turn-on“-Fluoreszenzsonde ANQ-

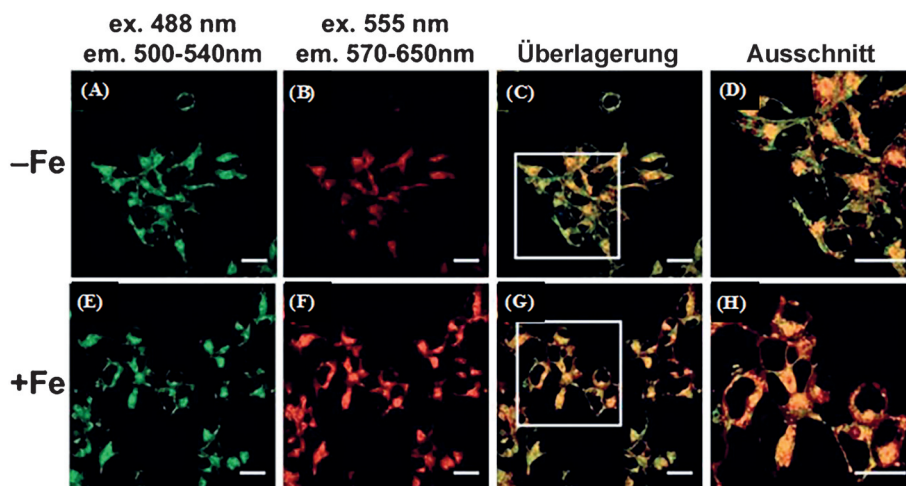
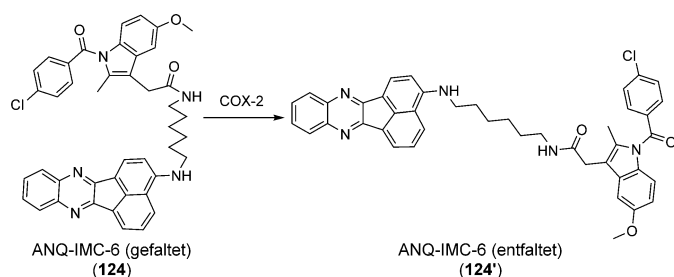


Abbildung 23. Fluoreszenzmikroskopische Abbildungen von mit RhoNox-1 (5 μM) behandelten und mit dem BODIPY-FL-Ceramid-BSA-Komplex cogefärbten HepG2-Zellen. A–D) Nicht mit Fe^{2+} behandelte und E–H) mit Fe^{2+} behandelte Zellen. A, E) Durch einen Bandbreitenfilter von 500–540 nm bei einer Anregung von 488 nm erhaltene Abbildungen (Signale des den Golgi-Apparat anfärbenden Farbstoffs). B, F) Durch einen Bandbreitenfilter von 570–650 nm bei einer Anregung von 555 nm erhaltene Abbildungen. C, G) Zusammengesetzte Abbildungen der Kanäle bei 500–540 nm und 570–650 nm. Die weißen Kästen kennzeichnen die in D, H) gezeigten vergrößerten Bereiche. Die Maßstabskalen kennzeichnen 20 μm . Mit Erlaubnis übernommen von der Royal Society of Chemistry.



Schema 44. Struktur der auf den Golgi-Apparat zielende Fluoreszenzsonde für Enzymaktivitäten.

IMC-6 (**124**, Schema 44) für die Abbildung von COX-2 im Golgi-Apparat von Krebszellen.^[234] Das Design war relativ anspruchsvoll: Sie verknüpften Indomethacin (IMC), einen starken COX-2-Inhibitor, über einen Hexandiamin-Spacer mit dem Fluorophor Acenaphtho[1,2-*b*]-chinoxalin (ANQ).^[234] Als Ergebnis lag freies ANQ-IMC-6 hauptsächlich in einer gefalteten Konformation vor, da ANQ und IMC schwache π - π -Wechselwirkungen eingingen, und die Fluoreszenz wurde durch den PeT vom IMC auf das ANQ gelöscht. Beim Binden an COX-2 wurde IMC jedoch gebunden, während die Konformation der Sonde sich entfaltete und dadurch den PeT und die Fluoreszenz verhinderte. Angesichts der Selektivität für COX-2 lokalisierte ANQ-IMC-6 bevorzugt im Golgi-Apparat (Abbildung 24) der verschiedenen getesteten Krebszelllinien und wurde erfolgreich zur Unterscheidung der Krebszellen von normalen Zellen mittels Durchflusszytometrie oder Ein-/Zwei-Photonen-Fluoreszenzbildgebung eingesetzt.^[234]

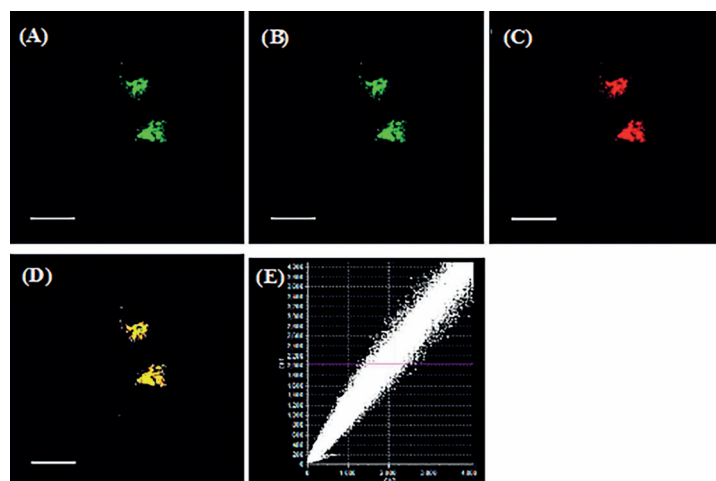


Abbildung 24. Fluoreszenzabbildungen von ANQ-IMC-6 (5.0 μm) und BODIPY TR C5-Ceramid (5.0 μm) in HeLa-Zellen. A und B, angefärbt mit ANQ-IMC-6. A) Anregungswellenlänge = 800 nm, Scanbereich = 530–570 nm. B) Anregungswellenlänge = 488 nm, Scanbereich = 530–570 nm. C) Angefärbt mit BODIPY TR C5-Ceramid, Anregungswellenlänge = 543 nm, Scanbereich = 600–640 nm. D) Zusammengesetzte Abbildung von (B) und (C). E) Graphische Darstellung der Intensitätskorrelation von angefärbtem ANQ-IMC-6 und BODIPY TR C5-Ceramid. Die Maßstabsbalken kennzeichnen 3.0 μm . Bei den Abbildungen und Daten handelt es sich um repräsentative Wiederholungsexperimente ($n = 5$). Mit Erlaubnis übernommen von der American Chemical Society.

7.4. Herausforderungen von auf das ER/den Golgi-Apparat zielenden aktivierbaren Fluoreszenzsonden

Zwar wurden einige Tracker und Sonden entwickelt, die auf das ER und den Golgi-Apparat zielen, und es wurden einige Regeln zusammengefasst, denen diese Sonden folgen, der molekulare Mechanismus der Lokalisierung ist aber noch immer unklar. Für das Design zuverlässiger und reproduzierbarer auf das ER/den Golgi-Apparat zielender Agenzien sind weitere Studien erforderlich. Im Allgemeinen spielt bei der Entwicklung einer auf Organellen zielenden Fluoreszenzsonde ein spezifisch auf die Organelle reagierendes Zielelement die Schlüsselrolle bei der Steuerung der Sonde zum Ziel. Im Fall des ER und des Golgi-Apparats konnten durch Anhängen ihrer bekannten Zielagenzien – ER-Tracker Blue/White DPX und Golgi-Apparat-Tracker red – keine Erfolge verzeichnet werden, was teilweise darauf zurückzuführen war, dass diese Strukturelemente nach dem Anhängen an andere Fluorophore ihre Spezifität verloren hatten. Mehrere neue Beispiele könnten einige Hinweise liefern. Beispielsweise berichtete die Gruppe von Peng über ein spezifisches ER-Markierungsreagenz, in dem erstmals eine Chloridfunktion zur ER-Lokalisierung verwendet wurde.^[235] Ein solches Gestaltungsprinzip kann direkt an das Design von auf das ER/den Golgi-Apparat zielenden aktivierbaren Fluoreszenzsonden angepasst werden. Zusätzlich wurden Fluoreszenzsonden mit auf spezifische ER-Esterasen reagierenden Strukturmotiven eingesetzt, wie vor kurzem anhand einer Arbeit der Gruppe von Hakamata zu auf Carboxylesterasen des ER zielenden Fluoreszenzsonden demonstriert.^[236a] Eine weitere auf das ER zielende Cystein-Sonde wurde von der Gruppe von Zhang zur Untersuchung der Funktionen von Thiolen innerhalb dieser Organelle vorgestellt.^[236b]

Bioorthogonale Chemie wurde ebenfalls zur Golgi-Apparat-spezifischen Markierung eingesetzt, wobei die Zellen mit einem auf den Golgi-Apparat zielenden Ceramid behandelt wurden, gefolgt von der Zugabe eines Fluorophorderivats, das mit dem Ceramid reagiert. Die Gruppe von Schepartz nutzte diese Vorgehensweise zur Überführung einer Rhodamin-Verbindung in den Golgi-Apparat und untersuchte die Strukturen der Organelle im Detail mittels supraauflösender Bildgebung.^[237] Solche Gestaltungsprinzipien können zukünftig beim Design von auf das ER/den Golgi-Apparat zielenden aktivierbaren Fluoreszenzsonden genutzt werden. Außerdem entdeckte die Gruppe von Chang in Verbindungsbibliotheken mit Tausenden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen eine auf das ER zielende Sonde, die Temperaturschwankungen innerhalb dieser Organelle wahrnehmen konnte.^[238a] Entsprechend könnte das durch die Wirkstoffentwicklung inspirierte Screening die Entwicklung von Sonden alternativ zu der rationalen Vorgehensweise ebenfalls vorantreiben. Neben niedermolekularen Sonden bieten auch umfangreiche Entwicklungen bei auf Fluoreszenzproteinen basierenden Sensoren für das ER/den Golgi-Apparat eine

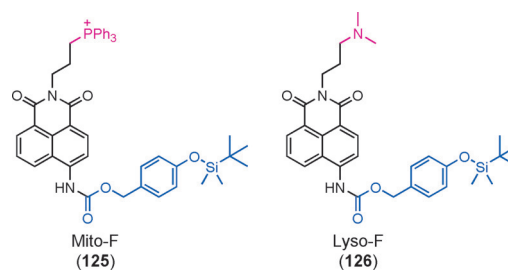
nützliche Alternative, die weiterer Beiträge und Anwendungen harrrt.^[238b-e]

8. Zusammenfassung und Ausblick

Fluoreszenzsonden und die Fluoreszenzbildgebung haben sich zu einem der leistungsstärksten Verfahren zur Überwachung der Lokalisierung, der Konzentration und der Aktivitäten von Biomolekülen im Zusammenhang mit lebenden Systemen entwickelt. OTAFPs bestehen aus einer Klasse von Sonden-/Sensorsystemen, die eine Änderung des Signals für die Fluoreszenzemission/die Verschiebung der Wellenlänge ausschließlich innerhalb der Zielorganellen erzeugen. Sie sollten bestimmte Eigenschaften aufweisen, wie eine hohe Selektivität und Empfindlichkeit gegenüber sowohl den Organellen als auch den Analyten sowie eine rasche Antwort und Biokompatibilität. Signifikante Fortschritte wurden beim Design diverser OTAFPs erzielt, und es wurden umfangreiche Untersuchungen im Bereich der chemischen Biologie auf der Grundlage von OTAFPs durchgeführt. In diesem Aufsatz haben wir die allgemeinen Grundsätze des Designs von OTAFPs basierend auf den entsprechenden Strukturen und Funktionen jeder Organelle vorgestellt. Zudem haben wir die neuesten Fortschritte bei der Entwicklung von OTAFPs und ihrer Anwendung zur Überwachung verschiedener Biomoleküle wie Metallkationen, ROS/RNS, Thiolen und andere Zellfunktionen *in vitro* und *in vivo* zusammengefasst, die von uns und von anderen Gruppen entwickelt worden sind.

Obwohl diese OTAFPs vielversprechende Fortschritte im Hinblick auf biologische Studien im Vergleich zu konventionellen Fluoreszenzsonden veranschaulichten, bleiben nach wie vor große Herausforderungen bestehen. Auf der Grundlage der Vor- und Nachteile der präsentierten OTAFPs werden hier mehrere zukünftige Ausrichtungen aufgelistet, die zu OTAFPs mit einzigartigen Eigenschaften führen könnten:

- 1) Vom pharmakokinetischen Gesichtspunkt aus betrachtet ist die Entwicklung eines Transporters, der auf einfache Weise seine Fracht zu der Zielorganelle befördert, zur Maximierung der Anwendbarkeit und Minimierung der Belastung bei der Entwicklung von Sonden vorteilhaft. Ein solcher Bedarf wurde teilweise für Mitochondrien und Lysosomen gedeckt, bleibt aber, was andere Organellen angeht, bestehen. Die Gruppe von Tang entwarf erst kürzlich durch eine Abwandlung von lediglich der auf die Organelle zielenden Gruppe eine Reihe von Fluoridsonden, die entweder auf Mitochondrien oder Lysosomen zielen (**125** und **126**, Schema 45).^[239] Sie demonstrierten ein elegantes Beispiel dafür, wie wichtig eine potente Ankergruppe sein kann und wie einfach das gesamte Design werden kann. Daher sollten nun neue auf Organellen zielende Strukturelemente mit reduzierter Cytotoxizität und verbesserter Selektivität erforscht werden, und zwar insbesondere für den Zellkern, die Membran, das ER und den Golgi-Apparat.
- 2) Ein Hauptproblem bei der biologischen Bildgebung ist das Signal-Rausch-Verhältnis, wobei die Autofluoreszenz in Zellen reichlich vorhandener endogener Moleküle (z. B.



Schema 45. Das einfache Design von auf mitochondriale und lysosomale F⁻-Spezies zielenden Fluoreszenzsonden, die sich einzig in dem Anker für die Organellen unterscheiden.

NADH und FADH₂) ein deutliches Rauschen verursacht. Viele der bisher entwickelten OTAFPs absorbieren und emittieren bei relativ kleinen Wellenlängen, die auch Biomoleküle anregen können. Die optimalen Anregungs- und Emissionswellenlängen zum Umgehen der Autofluoreszenz und zur Bildgebung *in vivo* sollten im tiefroten bis nahinfraroten Bereich liegen (650–950 nm). Dieser Wellenlängenbereich verbindet die Vorteile einer guten Gewebedurchdringung und einer minimierten Autofluoreszenz. Außerdem offenbart die Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie, die Nahinfrarotphotonen mit niedrigerer Energie als Anregungsquelle nutzt, die ähnlichen Vorteile einer höheren Eindringtiefe (> 500 µm) sowie weitere Vorteile wie eine längere Beobachtungszeit. Eine ratiometrische Signalantwort wiederum, die vor und nach der Reaktion mit dem Analyten unterschiedliche Wellenlängen für die Emission wählt, könnte die Genauigkeit der Detektion durch In-situ-Kalibrierung anhand von zwei Emissionspeaks deutlich steigern, wodurch falsche Signale von den reinen „Turn-on“-Sonden vermieden würden. Entsprechend könnte es sich bei über die Zwei-Photonen-Mikroskopie angeregten OTAFPs, die im NIR-Bereich absorbieren und emittieren und ratiometrische Signaländerungen anzeigen, um optimale Ziele handeln.

- 3) Die meisten OTAFPs waren auf die Bildgebung auf zellulärer Ebene ausgelegt, und einige erreichten lebendes Gewebe. Tatsächlich könnten sich OTAFPs für die Bildgebung in lebenden Tieren mit subzellulärer Auflösung als noch aufschlussreicher erweisen. Hierbei handelt es sich jedoch um noch ungelöste Problemstellungen, da die meisten OTAFPs im sichtbaren Bereich emittieren, der von tierischem Gewebe und der Haut blockiert wird. Entsprechend sollten OTAFPs, die entweder im Nahinfrarot emittieren oder andere Verfahren zur tiefen Gewebedurchdringung berücksichtigen nützliche Hilfsmittel für Forschungen im Bereich der chemischen Biologie *in vivo*, in der klinischen Diagnostik ebenso wie beim Screening und der Entdeckung potentieller Wirkstoffe bilden.
- 4) Neben den hier erläuterten Organellen ziehen zahlreiche Organellen, die noch nicht vollständig erforscht wurden, kontinuierlich das Interesse von Forschern auf sich. Zwei herausragende Beispiele sind die Mikrotubuli und die Lipidtropfen. Mikrotubuli sind faserartige Bestandteile des Zytoskeletts, die an der Zellbewegung und anderen

Abläufen beteiligt sind.^[240] Lipidtropfen wiederum setzen sich aus einem Lipidester-Grundkörper und einer Phospholipid-Monoschicht zusammen, beherbergen Proteine und sind am Zellmetabolismus beteiligt.^[241] Wegweisende Forschungen offenbarten die Existenz von Mikrotubuli^[242] und Lipidtropfen^[243] in intakten lebenden Zellen. Weitere Studien sind aber wünschenswert, und zwar nicht nur zum Zielen auf diese Organellen, sondern auch zur Untersuchung ihrer Physiologie.

Fluoreszenzsonden, die spezifische Organellen erreichen, haben bereits zum tieferen Verständnis zellulärer Prozesse beigetragen, und es ist zu erwarten, dass die Arbeiten auf diesem Gebiet noch viele Jahre fortgesetzt werden. Chemische, biologische und pharmazeutische Fortschritte werden zu Verbesserungen von OTAFPs führen, die wiederum die Entwicklung dieser Schlüsselfelder antreiben werden.

Danksagung

Diese Arbeit wurde finanziell von der NSFC (21302050, 21502049), der Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (14JJ2047) und dem Hunan University Fund for Multidisciplinary Developing (2015JCA04) gefördert. Die Arbeiten am A*STAR (Agency for Science, Technology and Research, Singapur) wurden vom A*STAR Biomedical Research Council und vom Joint Council Office (JCO) Development Programme, A*STAR (1334k00083) unterstützt. W.X. bedankt sich außerdem für die Unterstützung durch das Stipendium des Singapore-Peking-Oxford Research Enterprise (SPORE, COY-15-EWI-RCFSA/N197-1).

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13658–13699
Angew. Chem. **2016**, *128*, 13858–13902

- [1] a) B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 5. Aufl., Garland Science, New York, **2008**; b) C. P. Satori, M. M. Henderson, E. A. Krautkramer, V. Kostal, M. D. Distefano, E. A. Arriaga, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2733–2811.
- [2] C. E. Paulsen, K. S. Carroll, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4633–4679.
- [3] C. C. Winterbourn, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 278–286.
- [4] J. M. B. L. Stryer, J. L. Tymoczko, *Biochemistry*, 5. Aufl., W. H. Freeman, San Francisco, **2002**.
- [5] H. F. Lodish, *Molecular Cell Biology*, 6. Aufl., W. H. Freeman and Co., New York, **2008**.
- [6] R. A. Smith, R. C. Hartley, M. P. Murphy, *Antioxid. Redox Signaling* **2011**, *15*, 3021–3038.
- [7] R. J. West, S. T. Sweeney, *Autophagy* **2012**, *8*, 284–285.
- [8] a) A. Zhang, H. Sun, P. Wang, Y. Han, X. Wang, *Analyst* **2012**, *137*, 293–300; b) K. J. Olson, H. Ahmadzadeh, E. A. Arriaga, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 906–917; c) A. Amantonico, P. L. Urban, R. Zenobi, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 2493–2504.
- [9] a) J. W. Lichtman, J. A. Conchello, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 910–919; b) P. P. Ghoroghchian, M. J. Therien, D. A. Hammer, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2009**, *1*, 156–167; c) P. Verwilst, K. Sunwoo, J. S. Kim, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5556–5571.
- [10] a) J. A. Cotruvo, Jr., A. T. Aron, K. M. Ramos-Torres, C. J. Chang, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4400–4414; b) R. A. Benson, I. B. McInnes, J. M. Brewer, P. Garside, *Nat. Rev. Rheumatol.* **2015**, *11*, 357–367; c) X. Qian, Z. Xu, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4487–4493.
- [11] a) Y. Yang, Q. Zhao, W. Feng, F. Li, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 192–270; b) L. Yuan, W. Lin, K. Zheng, S. Zhu, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 1462–1473; c) H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620–2640; d) L. Y. Niu, Y. Z. Chen, H. R. Zheng, L. Z. Wu, C. H. Tung, Q. Z. Yang, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 6143–6160; e) Z. Lou, P. Li, K. Han, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1358–1368; f) H. M. Kim, B. R. Cho, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 5014–5055; g) X. Sun, T. D. James, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 8001–8037; h) J. Wu, B. Kwon, W. Liu, E. V. Anslyn, P. Wang, J. S. Kim, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 7893–7943; i) S. T. Manjare, Y. Kim, D. G. Churchill, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2985–2998; j) S. Lee, K. K. Yuen, K. A. Jolliffe, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1749–1762; k) J. F. Zhang, Y. Zhou, J. Yoon, J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3416–3429; l) Y. Zhou, Z. Xu, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2222–2235; m) Y. Zhou, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 52–67; n) M. H. Lee, J. S. Kim, J. L. Sessler, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4185–4191; o) K. P. Carter, A. M. Young, A. E. Palmer, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4564–4601.
- [12] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Aufl., Springer, Singapur, **2006**.
- [13] a) M. C. Garnett, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *53*, 171–216; b) A. M. Kaufmann, J. P. Krise, *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 729–746; c) N. M. Sakhrani, H. Padh, *Drug Des. Dev. Ther.* **2013**, *7*, 585–599; d) R. A. J. Smith, R. C. Hartley, H. M. Cocheme, M. P. Murphy, *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 341–352; e) M. P. Murphy, *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 326–330; f) M. F. Ross, G. F. Kelso, F. H. Blaikie, A. M. James, H. M. Cocheme, A. Filipovska, T. Da Ros, T. R. Hurd, R. A. J. Smith, M. P. Murphy, *Biochemistry* **2005**, *70*, 222–230.
- [14] S. G. Wang, N. Li, W. Pan, B. Tang, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2012**, *39*, 3–37.
- [15] a) Y. Qin, P. J. Dittmer, J. G. Park, K. B. Jansen, A. E. Palmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 7351–7356; b) J. L. Vinkenborg, T. J. Nicolson, E. A. Bellomo, M. S. Koay, G. A. Rutter, M. Merkx, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 737–740; c) M. F. Abad, G. Di Benedetto, P. J. Magalhaes, L. Filippin, T. Pozzan, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 11521–11529; d) Y. G. Ermakova, D. S. Bilan, M. E. Matlashov, N. M. Mishina, K. N. Markvicheva, O. M. Subach, F. V. Subach, I. Bogeski, M. Hoth, G. Enikolopov, V. V. Belousov, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5222, DOI: 10.1038/ncomms6222; e) E. Quatresous, C. Legrand, S. Pouvreau, *J. Gen. Physiol.* **2012**, *140*, 567–570.
- [16] a) T. T. Chen, X. Tian, C. L. Liu, J. Ge, X. Chu, Y. F. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 982–989; b) L. M. Yang, N. Li, W. Pan, Z. Z. Yu, B. Tang, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 3678–3684; c) J. Qiao, Z. Liu, Y. Tian, M. Wu, Z. W. Niu, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 3641–3644; d) B. B. Wang, Y. F. Wang, H. Wu, X. J. Song, X. Guo, D. M. Zhang, X. J. Ma, M. Q. Tan, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 49960–49963; e) F. K. Du, Y. H. Min, F. Zeng, C. M. Yu, S. Z. Wu, *Small* **2014**, *10*, 964–972; f) A. Chakraborty, N. R. Jana, *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 2888–2895; g) Y. H. Li, Y. R. Zhao, W. H. Chan, Y. J. Wang, Q. H. You, C. H. Liu, J. Zheng, J. S. Li, S. Yang, R. H. Yang, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 584–591; h) J. M. Hu, G. H. Liu, C. Wang, T. Liu, G. Y. Zhang, S. Y. Liu, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 4293–4301; i) M. Chen, X. X. He, K. M. Wang, D. G. He, X. H. Yang, H. Shi, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2014**, *58*, 120–129; j) W. Wang, H. Q. Fang, L. Groom, A. W. Cheng, W. R. Zhang, J. Liu, X. H. Wang, K. T. Li, P. D. Han, M. Zheng, J. H. Yin, W. D. Wang, M. P. Mattson, J. P. Y. Kao, E. G. Lakatta, S. S. Sheu, K. F. Ouyang, J. Chen, R. T. Dirksen, H. P. Cheng, *Cell* **2008**, *134*, 279–290; k) M. Gutsch, A. L. Pauleau, L. Marty, T. Brach, G. H. Wabnitz, Y. Samstag, A. J. Meyer, T. P. Dick, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 553–559.

- [17] a) B. C. Dickinson, D. Srikun, C. J. Chang, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 50–56; b) A. M. V. Giraldo, H. Appelqvist, T. Ederth, K. Ollinger, *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 1460–1464.
- [18] K. Okamoto, P. S. Perlman, R. A. Butow, *Methods Cell Biol.* **2001**, *65*, 277–283.
- [19] H. M. Kim, B. R. Cho, *Oxid. Med. Cell. Longevity* **2013**, DOI: 10.1155/2013/323619.
- [20] M. P. Murphy, R. A. Smith, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *47*, 629–656.
- [21] S. W. Yun, N. Y. Kang, S. J. Park, H. H. Ha, Y. K. Kim, J. S. Lee, Y. T. Chang, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1277–1286.
- [22] a) A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86–89; b) A. Keppler, H. Pick, C. Arrivoli, H. Vogel, K. Johnsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9955–9959; c) A. Keppler, M. Kindermann, S. Gendreizig, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Methods* **2004**, *32*, 437–444; d) D. Srikun, A. E. Albers, C. I. Nam, A. T. Iavarone, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4455–4465; e) M. Bannwarth, I. R. Correa, M. Sztrettye, S. Pouvreau, C. Fellay, A. Aebischer, L. Royer, E. Rois, K. Johnsson, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 179–190.
- [23] P. Bodin, G. Burnstock, *Neurochem. Res.* **2001**, *26*, 959–969.
- [24] K. Henze, W. Martin, *Nature* **2003**, *426*, 127–128.
- [25] J. M. Herrmann, W. Neupert, *Curr. Opin. Microbiol.* **2000**, *3*, 210–214.
- [26] P. R. Rich, *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 1095–1105.
- [27] H. A. Krebs, J. Kay, P. D. J. Weitzman, *Krebs' citric acid cycle: half a century and still turning*, Biochemical Society, London, **1987**, S. 25.
- [28] a) T. Friedrich, B. Bottcher, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2004**, *1608*, 1–9; b) G. Cecchini, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 77–109.
- [29] A. R. Crofts, *Annu. Rev. Physiol.* **2004**, *66*, 689–733.
- [30] S. Yoshikawa, K. Muramoto, K. Shinzawa-Itoh, H. Aoyama, T. Tsukihara, K. Shimokata, Y. Katayama, H. Shimada, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2006**, *1757*, 1110–1116.
- [31] Z. Liu, W. R. Bushnell, R. Brambl, *Plant Physiol.* **1987**, *84*, 1385–1390.
- [32] R. K. Nakamoto, J. A. B. Scanlon, M. K. Al-Shawi, *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *476*, 43–50.
- [33] C. Chinopoulos, V. Adam-Vizi, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2010**, *1802*, 221–227.
- [34] L. A. Finney, T. V. O'Halloran, *Science* **2003**, *300*, 931–936.
- [35] a) M. T. Lin, M. F. Beal, *Nature* **2006**, *443*, 787–795; b) X. Y. Li, P. Fang, J. T. Mai, E. T. Choi, H. Wang, X. F. Yang, *J. Hematol. Oncol.* **2013**, *6*:19.
- [36] H. Guderley, J. S. St-Pierre, *J. Exp. Biol.* **2002**, *205*, 2237–2249.
- [37] a) S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* **1972**, *175*, 720–731; b) G. Deliconstantinos, V. Villiotou, J. C. Stavrides, *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49*, 1589–1600.
- [38] K. P. Mahon, T. B. Potocky, D. Blair, M. D. Roy, K. M. Stewart, T. C. Chiles, S. O. Kelley, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 923–930.
- [39] a) M. P. Murphy, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *977*, 123–141; b) B. Kadenbach, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2003**, *1604*, 77–94.
- [40] R. A. Smith, M. P. Murphy, *Discovery Med.* **2011**, *11*, 106–114.
- [41] a) J. Han, M. S. Han, C. H. Tung, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2013**, *1830*, 5130–5135; b) L. V. Johnson, M. L. Walsh, L. B. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 990–994; c) A. Baracca, G. Sgarbi, G. Solaini, G. Lenaz, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2003**, *1606*, 137–146; d) S. Onoe, T. Temma, Y. Shimizu, M. Ono, H. Saji, *Cancer Med.* **2014**, *3*, 775–786; e) S. Wu, Q. Cao, X. Wang, K. Cheng, Z. Cheng, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 8919–8922; f) S. Q. Wu, Y. L. Song, Z. Li, Z. S. Wu, J. H. Han, S. F. Han, *Anal. Methods* **2012**, *4*, 1699–1703; g) Y. K. Kim, H. H. Ha, J. S. Lee, X. Z. Bi, Y. H. Ahn, S. Hajar, J. J. Lee, Y. T. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 576–579; h) W. G. Yang, P. S. Chan, M. S. Chan, K. F. Li, P. K. Lo, N. K. Mak, K. W. Cheah, M. S. Wong, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3428–3430; i) J. Y. Han, T. H. Lee, C. H. Tung, D. Y. Lee, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 9793–9796; j) W. Zhang, R. T. Kwok, Y. Chen, S. Chen, E. Zhao, C. Y. Yu, J. W. Lam, Q. Zheng, B. Z. Tang, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 9022–9025.
- [42] I. Johnson, M. T. Z. Spence, *The Molecular Probes Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies*, 11. Aufl., Life Technologies, Carlsbad, **2010**.
- [43] a) G. Zimmer, M. Balakirev, K. Zwicker, M. Hofmann, B. G. Woodcock, G. Pergande, *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *123*, 1154–1158; b) T. Schlüter, H. Struy, P. Schonfeld, *FEBS Lett.* **2000**, *481*, 42–46.
- [44] K. Koya, Y. Li, H. Wang, T. Ukai, N. Tatsuta, M. Kawakami, T. Shishido, L. B. Chen, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 538–543.
- [45] S. E. Brown, M. F. Ross, A. Sanjuan-Pla, A. R. Manas, R. A. Smith, M. P. Murphy, *Free Radical Biol. Med.* **2007**, *42*, 1766–1780.
- [46] a) Q. L. Hu, M. Gao, G. X. Feng, B. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14225–14229; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 14449–14453; b) C. W. T. Leung, Y. N. Hong, S. J. Chen, E. G. Zhao, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 62–65; c) H. S. Jung, J. Han, J. H. Lee, J. H. Lee, J. M. Choi, H. S. Kweon, J. H. Han, J. H. Kim, K. M. Byun, J. H. Jung, C. Kang, J. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3017–3023; d) A. R. Sarkar, C. H. Heo, H. W. Lee, K. H. Park, Y. H. Suh, H. M. Kim, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5638–5641; e) B. Liu, M. Shah, G. Zhang, Q. Liu, Y. Pang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 21638–21644.
- [47] a) L. F. Yousif, K. M. Stewart, K. L. Horton, S. O. Kelley, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2081–2088; b) K. L. Horton, K. M. Stewart, S. B. Fonseca, Q. Guo, S. O. Kelley, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 375–382; c) L. F. Yousif, K. M. Stewart, S. O. Kelley, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1939–1950; d) R. J. Radford, W. Chyan, S. J. Lippard, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 4512–4516.
- [48] a) S. Passarella, F. Palmieri, E. Quagliariello, *FEBS Lett.* **1973**, *38*, 91–95; b) F. Pierrel, P. A. Cobine, D. R. Winge, *Biometals* **2007**, *20*, 675–682; c) D. J. Eide, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2006**, *1763*, 711–722.
- [49] a) K. M. Dean, Y. Qin, A. E. Palmer, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2012**, *1823*, 1406–1415; b) L. Rossi, M. F. Lombardo, M. R. Ciriolo, G. Rotilio, *Neurochem. Res.* **2004**, *29*, 493–504.
- [50] A. Minta, J. P. Kao, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8171–8178.
- [51] D. R. Trollinger, W. E. Cascio, J. J. Lemasters, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *236*, 738–742.
- [52] S. L. Sensi, D. Ton-That, J. H. Weiss, A. Rothe, K. R. Gee, *Cell Calcium* **2003**, *34*, 281–284.
- [53] M. Taki, K. Akaoka, S. Iyoshi, Y. Yamamoto, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 13075–13077.
- [54] X. Kong, F. Su, L. Zhang, J. Yaron, F. Lee, Z. Shi, Y. Tian, D. R. Meldrum, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12053–12057; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 12221–12225.
- [55] a) C. Funke, S. A. Schneider, D. Berg, D. B. Kell, *Neurochem. Int.* **2013**, *62*, 637–652; b) H. Glickstein, R. Ben El, M. Shvartsman, Z. I. Cabantchik, *Blood* **2005**, *106*, 3242–3250.
- [56] H. Glickstein, R. Ben El, G. Link, W. Breuer, A. M. Konijn, C. Hershko, H. Nick, Z. I. Cabantchik, *Blood* **2006**, *108*, 3195–3203.
- [57] F. Petrat, D. Weisheit, M. Lensen, H. de Groot, R. Sustmann, U. Rauen, *Biochem. J.* **2002**, *362*, 137–147.
- [58] U. Rauen, A. Springer, D. Weisheit, F. Petrat, H. G. Korth, H. de Groot, R. Sustmann, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 341–352.
- [59] G. Masanta, C. S. Lim, H. J. Kim, J. H. Han, H. M. Kim, B. R. Cho, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5698–5700.

- [60] N. Y. Baek, C. H. Heo, C. S. Lim, G. Masanta, B. R. Cho, H. M. Kim, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 4546–4548.
- [61] L. Xue, G. Li, C. Yu, H. Jiang, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 1050–1054.
- [62] Z. Liu, C. Zhang, Y. Chen, W. He, Z. Guo, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 8365–8367.
- [63] K. Sreenath, J. R. Allen, M. W. Davidson, L. Zhu, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 11730–11732.
- [64] S. C. Dodani, S. C. Leary, P. A. Cobine, D. R. Winge, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 8606–8616.
- [65] M. Taki, K. Akaoka, Y. Yamamoto, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2014**, 19, S413.
- [66] W. D. Chen, W. T. Gong, Z. Q. Ye, Y. Lin, G. L. Ning, *Dalton Trans.* **2013**, 42, 10093–10096.
- [67] E. T. Chouchani, V. R. Pell, E. Gaude, D. Aksentijevic, S. Y. Sundier, E. L. Robb, A. Logan, S. M. Nadtochiy, E. N. J. Ord, A. C. Smith, F. Eyassu, R. Shirley, C. H. Hu, A. J. Dare, A. M. James, S. Rogatti, R. C. Hartley, S. Eaton, A. S. H. Costa, P. S. Brookes, S. M. Davidson, M. R. Duchon, K. Saeb-Parsy, M. J. Shattock, A. J. Robinson, L. M. Work, C. Frezza, T. Krieg, M. P. Murphy, *Nature* **2014**, 515, 431–435.
- [68] a) S. G. Rhee, *Science* **2006**, 312, 1882–1883; b) M. Reth, *Nat. Immunol.* **2002**, 3, 1129–1134; c) B. D'Autréaux, M. B. Toledano, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8, 813–824.
- [69] K. M. Robinson, M. S. Janes, M. Pehar, J. S. Monette, M. F. Ross, T. M. Hagen, M. P. Murphy, J. S. Beckman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 15038–15043.
- [70] B. C. Dickinson, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9638–9639.
- [71] G. Masanta, C. H. Heo, C. S. Lim, S. K. Bae, B. R. Cho, H. M. Kim, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3518–3520.
- [72] Y. Wen, K. Liu, H. Yang, Y. Liu, L. Chen, Z. Liu, C. Huang, T. Yi, *Anal. Chem.* **2015**, 87, 10579–10584.
- [73] G. Cheng, J. Fan, W. Sun, K. Sui, X. Jin, J. Wang, X. Peng, *Analyst* **2013**, 138, 6091–6096.
- [74] J. Zhou, L. H. Li, W. Shi, X. H. Gao, X. H. Li, H. M. Ma, *Chem. Sci.* **2015**, 6, 4884–4888.
- [75] a) J. T. Hou, K. Li, J. Yang, K. K. Yu, Y. X. Liao, Y. Z. Ran, Y. H. Liu, X. D. Zhou, X. Q. Yu, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 6781–6784; b) H. D. Xiao, J. H. Li, J. Zhao, G. Yin, Y. W. Quan, J. Wang, R. Y. Wang, *J. Mater. Chem. B* **2015**, 3, 1633–1638; c) H. D. Xiao, K. Xin, H. F. Dou, G. Yin, Y. W. Quan, R. Y. Wang, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 1442–1445; d) G. Y. Li, Q. Lin, L. N. Ji, H. Chao, *J. Mater. Chem. B* **2014**, 2, 7918–7926.
- [76] L. Yuan, L. Wang, B. K. Agrawalla, S. J. Park, H. Zhu, B. Sivaraman, J. Peng, Q. H. Xu, Y. T. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 5930–5938.
- [77] T. A. Prime, M. Forkink, A. Logan, P. G. Finichiu, J. McLachlan, P. B. L. Pun, W. J. Koopman, L. Larsen, M. J. Latter, R. A. Smith, M. P. Murphy, *Free Radical Biol. Med.* **2012**, 53, 544–553.
- [78] a) S. Ban, H. Nakagawa, T. Suzuki, N. Miyata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 2055–2058; b) K. Krumova, L. E. Greene, G. Cosa, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 17135–17143.
- [79] X. F. Zhang, B. L. Wang, C. Wang, L. C. Chen, Y. Xiao, *Anal. Chem.* **2015**, 87, 8292–8300.
- [80] H. Yu, X. Zhang, Y. Xiao, W. Zou, L. Wang, L. Jin, *Anal. Chem.* **2013**, 85, 7076–7084.
- [81] Y. Q. Sun, J. Liu, H. X. Zhang, Y. Y. Huo, X. Lv, Y. W. Shi, W. Guo, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 12520–12523.
- [82] a) H. Zhang, J. Liu, Y. Q. Sun, Y. Huo, Y. Li, W. Liu, X. Wu, N. Zhu, Y. Shi, W. Guo, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 2721–2724; b) X. Zhou, Y. Kwon, G. Kim, J. H. Ryu, J. Yoon, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 64, 285–291.
- [83] Y. Koide, Y. Urano, S. Kenmoku, H. Kojima, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10324–10325.
- [84] L. Yuan, W. Y. Lin, S. Zhao, W. S. Gao, B. Chen, L. W. He, S. S. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 13510–13523.
- [85] F. Liu, T. Wu, J. F. Cao, H. Zhang, M. M. Hu, S. G. Sun, F. L. Song, J. L. Fan, J. Y. Wang, X. J. Peng, *Analyst* **2013**, 138, 775–778.
- [86] K. H. Xu, L. L. Wang, M. M. Qiang, L. Y. Wang, P. Li, B. Tang, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 7386–7388.
- [87] K. H. Xu, S. X. Sun, J. Li, L. Li, M. M. Qiang, B. Tang, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 684–686.
- [88] a) A. Kaur, K. W. Brigden, T. F. Cashman, S. T. Fraser, E. J. New, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 6686–6689; b) F. Yu, P. Li, B. Wang, K. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 7674–7680; c) K. Xu, M. Qiang, W. Gao, R. Su, N. Li, Y. Gao, Y. Xie, F. Kong, B. Tang, *Chem. Sci.* **2013**, 4, 1079–1086.
- [89] a) S. Hirose, S. Arai, S. Takeoka, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 4845–4847; b) N. B. Yapici, S. Jockusch, A. Moscatelli, S. R. Mandalapu, Y. Itagaki, D. K. Bates, S. Wiseman, K. M. Gibson, N. J. Turro, L. Bi, *Org. Lett.* **2012**, 14, 50–53.
- [90] a) M. Marí, A. Morales, A. Colell, C. García-Ruiz, J. C. Fernández-Checa, *Antioxid. Redox Signaling* **2009**, 11, 2685–2700; b) A. E. Damdimopoulos, A. Miranda-Vizuete, M. Pelto-Huikko, J. A. Gustafsson, G. Spyrou, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 33249–33257; c) R. Zhou, A. Tardivel, B. Thorens, I. Choi, J. Tschoopp, *Nat. Immunol.* **2010**, 11, 136–140; d) M. C. Gruhlke, A. J. Slusarenko, *Plant Physiol. Biochem.* **2012**, 59, 98–107.
- [91] C. S. Lim, G. Masanta, H. J. Kim, J. H. Han, H. M. Kim, B. R. Cho, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 11132–11135.
- [92] M. H. Lee, J. H. Han, J. H. Lee, H. G. Choi, C. Kang, J. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 17314–17319.
- [93] S. K. Bae, C. H. Heo, D. J. Choi, D. Sen, E. H. Joe, B. R. Cho, H. M. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 9915–9923.
- [94] M. Gao, F. Yu, H. Chen, L. Chen, *Anal. Chem.* **2015**, 87, 3631–3638.
- [95] a) Y. Chen, C. Zhu, Z. Yang, J. Chen, Y. He, Y. Jiao, W. He, L. Qiu, J. Cen, Z. Guo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 1688–1691; *Angew. Chem.* **2013**, 125, 1732–1735; b) W. Xu, C. L. Teoh, J. J. Peng, D. D. Su, L. Yuan, Y. T. Chang, *Biomaterials* **2015**, 56, 1–9; c) Y. Liu, K. Li, M. Y. Wu, Y. H. Liu, Y. M. Xie, X. Q. Yu, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 10236–10239; d) X. Wang, J. Sun, W. Zhang, X. Ma, J. Lv, B. Tang, *Chem. Sci.* **2013**, 4, 2551–2556; e) L. Yuan, Q. P. Zuo, *Chem. Asian J.* **2014**, 9, 1544–1549; f) K. Yin, F. B. Yu, W. W. Zhang, L. X. Chen, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 74, 156–164; g) X. Chen, S. Wu, J. Han, S. Han, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 5295–5299; h) S. Y. Lim, K. H. Hong, D. I. Kim, H. Kwon, H. J. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 7018–7025.
- [96] a) G. Burnstock, *Pharmacol. Rev.* **2006**, 58, 58–86; b) W. G. Junger, *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, 11, 201–212.
- [97] M. McKenzie, D. Liolitsa, S. Sisodiya, N. Wood, M. Duchon, M. Hanna, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2004**, 1657, 41.
- [98] a) Y. Kurishita, T. Kohira, A. Ojida, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 18779–18789; b) L. Wang, L. Yuan, X. Zeng, J. Peng, Y. Ni, J. C. Er, W. Xu, B. K. Agrawalla, D. Su, B. Kim, Y. T. Chang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 1773–1776; *Angew. Chem.* **2016**, 128, 1805–1808.
- [99] Z. Yang, Y. He, J. H. Lee, N. Park, M. Suh, W. S. Chae, J. Cao, X. Peng, H. Jung, C. Kang, J. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 9181–9185.
- [100] F. Liu, T. Wu, J. Cao, S. Cui, Z. Yang, X. Qiang, S. Sun, F. Song, J. Fan, J. Wang, X. Peng, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 1548–1553.
- [101] N. Jiang, J. L. Fan, S. Zhang, T. Wu, J. Y. Wang, P. Gao, J. L. Qu, F. Zhou, X. J. Peng, *Sens. Actuators B* **2014**, 190, 685–693.
- [102] a) P. Li, H. Xiao, Y. Cheng, W. Zhang, F. Huang, W. Zhang, H. Wang, B. Tang, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 7184–7187; b) M. H. Lee, N. Park, C. Yi, J. H. Han, J. H. Hong, K. P. Kim, D. H. Kang, J. L. Sessler, C. Kang, J. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 14136–14142.

- [103] M. Y. Wu, K. Li, Y. H. Liu, K. K. Yu, Y. M. Xie, X. D. Zhou, X. Q. Yu, *Biomaterials* **2015**, *53*, 669–678.
- [104] Y. C. Chen, C. C. Zhu, J. J. Cen, Y. Bai, W. J. He, Z. J. Guo, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 3187–3194.
- [105] N. Jiang, J. L. Fan, F. Xu, X. J. Peng, H. Y. Mu, J. Y. Wang, X. Q. Xiong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2510–2514; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 2540–2544.
- [106] a) S. Arai, M. Suzuki, S. J. Park, J. S. Yoo, L. Wang, N. Y. Kang, H. H. Ha, Y. T. Chang, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 8044–8047; b) M. Homma, Y. Takei, A. Murata, T. Inoue, S. Takeoka, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6194–6197.
- [107] S. Zhang, J. Fan, S. Zhang, J. Wang, X. Wang, J. Du, X. Peng, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 14021–14024.
- [108] a) S. Zhang, T. Wu, J. Fan, Z. Li, N. Jiang, J. Wang, B. Dou, S. Sun, F. Song, X. Peng, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 555–558; b) J. Trnka, M. Elkalaf, M. Anděl, *PLoS One* **2015**, *10*, e0121837; c) Y. Zhao, J. Jin, Q. Hu, H.-M. Zhou, J. Yi, Z. Yu, L. Xu, X. Wang, Y. Yang, J. Loscalzo, *Cell Metab.* **2011**, *14*, 555–566; d) X. Wang, H. Peng, L. Yang, F. You, F. Teng, L. Hou, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12471–12475; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 12679–12683; e) J. Cho, K. Kushihiro, Y. Teramura, M. Takai, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 2012–2018.
- [109] a) G. J. Doherty, H. T. McMahon, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 857–902; b) C. He, D. J. Klionsky, *Annu. Rev. Genet.* **2009**, *43*, 67–93.
- [110] I. Mellman, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 575–625.
- [111] J. Rink, E. Ghigo, Y. Kalaidzidis, M. Zerial, *Cell* **2005**, *122*, 735–749.
- [112] J. P. Luzio, B. A. Rous, N. A. Bright, P. R. Pryor, B. M. Mullock, R. C. Piper, *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 1515–1524.
- [113] a) Q. Liang, X. Ouyang, L. Schneider, J. Zhang, *Mol. Neurodegener.* **2011**, *6*, 37; b) L. Schneider, J. Zhang, *Mol. Neurodegener.* **2010**, *5*, 14; c) L. F. Panchenko, G. A. Asoian, A. M. Gerasimov, O. S. Komarov, L. N. Ushenkova, *Vopr. Med. Khim.* **1976**, *22*, 778–784; d) E. Holtzmann, *Lysosomes*, Plenum Press, New York, **1989**, S. 456.
- [114] J. A. Mindell, *Annu. Rev. Physiol.* **2012**, *74*, 69–86.
- [115] A. C. Havelaar, I. L. de Gast, S. Snijders, C. E. Beerens, G. M. Mancini, F. W. Verheijen, *FEBS Lett.* **1998**, *436*, 223–227.
- [116] C. Peracchio, O. Alabiso, G. Valente, C. Isidoro, *J. Ovarian Res.* **2012**, *5*, 22.
- [117] S. Kobayashi, *Biol. Pharm. Bull.* **2015**, *38*, 1098–1103.
- [118] N. Mizushima, Y. Ohsumi, T. Yoshimori, *Cell Struct. Funct.* **2002**, *27*, 421–429.
- [119] D. J. Klionsky, E. L. Eskelinen, V. Deretic, *Autophagy* **2014**, *10*, 549–551.
- [120] M. Huizing, A. Helip-Wooley, W. Westbroek, M. Gunay-Aygun, W. A. Gahl, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2008**, *9*, 359–386.
- [121] a) A. Terman, T. Kurz, B. Gustafsson, U. T. Brunk, *IUBMB Life* **2006**, *58*, 531–539; b) X. Tekpli, E. Rivedal, M. Gorria, N. E. Landvik, M. Rissel, M.-T. Dimanche-Boitrel, G. Baffet, J. A. Holme, D. Lagadic-Gossman, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, *242*, 231–240.
- [122] J. Stinchcombe, G. Bossi, G. M. Griffiths, *Science* **2004**, *305*, 55–59.
- [123] a) T. Kurz, A. Leake, T. von Zglinicki, U. T. Brunk, *Biochem. J.* **2004**, *378*, 1039–1045; b) T. Kurz, A. Terman, B. Gustafsson, U. T. Brunk, *Histochem. Cell Biol.* **2008**, *129*, 389–406.
- [124] H. L. Persson, T. Kurz, J. W. Eaton, U. T. Brunk, *Biochem. J.* **2005**, *389*, 877–884.
- [125] Z. Yu, H. L. Persson, J. W. Eaton, U. T. Brunk, *Free Radical Biol. Med.* **2003**, *34*, 1243–1252.
- [126] T. Kurz, A. Terman, B. Gustafsson, U. T. Brunk, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2008**, *1780*, 1291–1303.
- [127] S. Fakih, M. Podinovskaia, X. Kong, H. L. Collins, U. E. Schaible, R. C. Hider, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4539–4552.
- [128] S. Fakih, M. Podinovskaia, X. Kong, U. E. Schaible, H. L. Collins, R. C. Hider, *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 2212–2226.
- [129] J. D. Chartres, M. Busby, M. J. Riley, J. J. Davis, P. V. Bernhardt, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 9178–9183.
- [130] Y. Wei, Z. Aydin, Y. Zhang, Z. Liu, M. Guo, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1569–1573.
- [131] J. B. Gross, Jr., B. M. Myers, L. J. Kost, S. M. Kuntz, N. F. LaRusso, *J. Clin. Invest.* **1989**, *83*, 30–39.
- [132] D. Klein, J. Lichtmanegger, U. Heinzmann, J. Muller-Hocker, S. Michaelsen, K. H. Summer, *Eur. J. Clin. Invest.* **1998**, *28*, 302–310.
- [133] P. Li, X. Duan, Z. Chen, Y. Liu, T. Xie, L. Fang, X. Li, M. Yin, B. Tang, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7755–7757.
- [134] P. Li, H. Zhou, B. Tang, *J. Photochem. Photobiol. A* **2012**, *249*, 36–40.
- [135] S. J. Lee, J. Y. Koh, *Mol. Brain* **2010**, *3*, 30.
- [136] L. Xue, G. Li, D. Zhu, Q. Liu, H. Jiang, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 10842–10849.
- [137] H. Zhu, J. Fan, S. Zhang, J. Cao, K. Song, D. Ge, H. Dong, J. Wang, X. Peng, *Biomater. Sci.* **2014**, *2*, 89–97.
- [138] H. J. Lee, C. W. Cho, H. Seo, S. Singha, Y. W. Jun, K. H. Lee, Y. Jung, K. T. Kim, S. Park, S. C. Bae, K. H. Ahn, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 124–127.
- [139] K. Sreenath, Z. Yuan, J. R. Allen, M. W. Davidson, L. Zhu, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 867–874.
- [140] P. Rivera-Fuentes, A. T. Wrobel, M. L. Zastrow, M. Khan, J. Georgiou, T. T. Luyben, J. C. Roder, K. Okamoto, S. J. Lippard, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1944–1948.
- [141] S. Sarkar, V. I. Korolchuk, M. Renna, S. Imarisio, A. Fleming, A. Williams, M. Garcia-Arencibia, C. Rose, S. Q. Luo, B. R. Underwood, G. Kroemer, C. J. O’Kane, D. C. Rubinstein, *Mol. Cell* **2011**, *43*, 19–32.
- [142] H. Yu, Y. Xiao, L. Jin, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17486–17489.
- [143] a) L. Yin, R. Stearns, B. Gonzalez-Flecha, *J. Cell. Biochem.* **2005**, *94*, 433–445; b) C. S. Chen, *BMC Cell Biol.* **2002**, *3*, 21.
- [144] J. Jing, J.-L. Zhang, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 2947–2952.
- [145] D. Song, J. M. Lim, S. Cho, S. J. Park, J. Cho, D. Kang, S. G. Rhee, Y. You, W. Nam, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5449–5451.
- [146] D. Kim, G. Kim, S. J. Nam, J. Yin, J. Yoon, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8488.
- [147] Z. J. Qu, J. X. Ding, M. Y. Zhao, P. Li, *J. Photochem. Photobiol. A* **2015**, *299*, 1–8.
- [148] L. Cao, R. Zhang, W. Zhang, Z. Du, C. Liu, Z. Ye, B. Song, J. Yuan, *Biomaterials* **2015**, *68*, 21–31.
- [149] X. Jing, F. Yu, L. Chen, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 14253–14256.
- [150] K. Kashfi, K. R. Olson, *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 689–703.
- [151] T. Liu, Z. Xu, D. R. Spring, J. Cui, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2310–2313.
- [152] Q. L. Qiao, M. Zhao, H. J. Lang, D. Q. Mao, J. N. Cui, Z. C. Xu, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 25790–25794.
- [153] a) S. Yang, Y. Qi, C. H. Liu, Y. J. Wang, Y. R. Zhao, L. L. Wang, J. S. Li, W. H. Tan, R. H. Yang, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 7508–7515; b) X. J. Zou, Y. C. Ma, L. E. Guo, W. X. Liu, M. J. Liu, C. G. Zou, Y. Zhou, J. F. Zhang, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13833–13836.
- [154] a) L. Wang, Y. Xiao, W. Tian, L. Deng, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2903–2906; b) H. Wang, Y. Q. Wu, Y. L. Shi, P. Tao, X. Fan, X. Y. Su, G. C. Kuang, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 3219–3223.
- [155] M. Gao, Q. L. Hu, G. X. Feng, B. Z. Tang, B. Liu, *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 3438–3442.
- [156] X. Chen, Y. Bi, T. Wang, P. Li, X. Yan, S. Hou, C. E. Bammert, J. Ju, K. M. Gibson, W. J. Pavan, L. Bi, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9004.

- [157] For examples, see: a) Q. Wan, S. Chen, W. Shi, L. Li, H. Ma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10916–10920; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11096–11100; b) Q. Wang, L. Zhou, L. Qiu, D. Lu, Y. Wu, X. B. Zhang, *Analyst* **2015**, *140*, 5563–5569; c) J. T. Zhang, M. Yang, C. Li, N. Dorh, F. Xie, F. T. Luo, A. Tiwari, H. Y. Liu, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 2173–2184; d) G. K. Vegesna, J. Janjanam, J. H. Bi, F. T. Luo, J. T. Zhang, C. Olds, A. Tiwari, H. Y. Liu, *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 4500–4508; e) X. L. Shi, G. J. Mao, X. B. Zhang, H. W. Liu, Y. J. Gong, Y. X. Wu, L. Y. Zhou, J. Zhang, W. H. Tan, *Talanta* **2014**, *130*, 356–362; f) H. Zhu, J. L. Fan, Q. L. Xu, H. L. Li, J. Y. Wang, P. Gao, X. J. Peng, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11766–11768; g) D. G. Smith, B. K. McMahon, R. Pal, D. Parker, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8520–8522; h) J. L. Fan, H. J. Dong, M. M. Hu, J. Y. Wang, H. Zhang, H. Zhu, W. Sun, X. J. Peng, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 882–884; i) D. D. He, W. Liu, R. Sun, C. Fan, Y. J. Xu, J. F. Ge, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 1499–1502.
- [158] A. Sampedro, R. Villalonga-Planells, M. Vega, G. Ramis, S. F. de Mattos, P. Villalonga, A. Costa, C. Rotger, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1537–1546.
- [159] a) M. Abo, R. Minakami, K. Miyano, M. Kamiya, T. Nagano, Y. Urano, H. Sumimoto, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5983–5990; b) J. J. Chen, J. Jing, H. Chang, Y. Rong, Y. Hai, J. Tang, J. L. Zhang, P. Xu, *Autophagy* **2013**, *9*, 894–904; c) I. Takashima, R. Kawagoe, I. Hamachi, A. Ojida, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 2038–2044; d) J. F. Lovell, C. S. Jin, E. Huynh, H. Jin, C. Kim, J. L. Rubinstein, W. C. W. Chan, W. Cao, L. V. Wang, G. Zheng, *Nat. Mater.* **2011**, *10*, 324–332; e) M. Tantama, Y. P. Hung, G. Yellen, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10034–10037; f) H. Katayama, T. Kogure, N. Mizushima, T. Yoshimori, A. Miyawaki, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1042–52; g) N. J. Dolman, J. A. Kilgore, M. W. Davidson, *Curr. Protoc. Cytom.* **2013**, Chapter 12:Unit 12.30; h) J. P. Luzio, P. R. Pryor, N. A. Bright, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 622–632.
- [160] G. M. Cooper, R. E. Hausman, *The Cell: A Molecular Approach*, 6. Aufl., Boston University, Sinauer Associates, Sunderland (MA), **2013**.
- [161] C. W. Cairo, J. A. Key, C. M. Sadek, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 57–63.
- [162] J. Lombard, *Biol. Direct* **2014**, *9*:32.
- [163] B. E. Goodman, *Adv. Physiol. Educ.* **2002**, *26*, 146–157.
- [164] T. L. Steck, *J. Cell Biol.* **1974**, *62*, 1–19.
- [165] a) S. Munro, *Cell* **2003**, *115*, 377–388; b) S. Mukherjee, F. R. Maxfield, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2004**, *20*, 839–866.
- [166] a) L. S. Loura, J. P. P. Ramalho, *Biophys. Rev.* **2009**, *1*, 141–148; b) L. M. Loura, J. P. Ramalho, *Molecules* **2011**, *16*, 5437–5452; c) H. M. Kim, B. R. Cho, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 863–872; d) S. A. Sánchez, E. Gratton, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 469–477.
- [167] a) A. B. Parekh, *J. Physiol.* **2008**, *586*, 3043–3054; b) M. J. Berridge, M. D. Bootman, P. Lipp, *Nature* **1998**, *395*, 645–648; c) M. D. Bootman, M. J. Berridge, P. Lipp, *Cell* **1997**, *91*, 367–373.
- [168] a) E. F. Etter, M. A. Kuhn, F. S. Fay, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10141–10149; b) Q. P. Lloyd, M. A. Kuhn, C. V. Gay, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 22445–22451.
- [169] Y. Tojyo, A. Tanimura, Y. Matsumoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *240*, 189–195.
- [170] P. S. Mohan, C. S. Lim, Y. S. Tian, W. Y. Roh, J. H. Lee, B. R. Cho, *Chem. Commun.* **2009**, 5365–5367.
- [171] Y. N. Shin, C. S. Lim, Y. S. Tian, W. Y. Rho, B. R. Cho, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, *31*, 599–605.
- [172] C. S. Lim, M. Y. Kang, J. H. Han, I. A. Danish, B. R. Cho, *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 2028–2033.
- [173] H. J. Kim, J. H. Han, M. K. Kim, C. S. Lim, H. M. Kim, B. R. Cho, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6786–6789; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6938–6941.
- [174] X. Dong, J. H. Han, C. H. Heo, H. M. Kim, Z. Liu, B. R. Cho, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 8110–8113.
- [175] a) S. Iyoshi, M. Taki, Y. Yamamoto, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4558–4561; b) K. Rathore, C. S. Lim, Y. Lee, H. J. Park, B. R. Cho, *Asian J. Org. Chem.* **2014**, *3*, 1070–1073.
- [176] a) L. J. Pike, *J. Lipid Res.* **2003**, *44*, 655–667; b) R. G. Anderson, K. Jacobson, *Science* **2002**, *296*, 1821–1825.
- [177] T. Parasassi, E. Gratton, W. M. Yu, P. Wilson, M. Levi, *Biophys. J.* **1997**, *72*, 2413–2429.
- [178] P. W. Janes, S. C. Ley, A. I. Magee, *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 447–461.
- [179] K. Gaus, E. Gratton, E. P. Kable, A. S. Jones, I. Gelissen, L. Kritharides, W. Jessup, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15554–15559.
- [180] H. M. Kim, H. J. Choo, S. Y. Jung, Y. G. Ko, W. H. Park, S. J. Jeon, C. H. Kim, T. Joo, B. R. Cho, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 553–559.
- [181] H. M. Kim, B. H. Jeong, J. Y. Hyon, M. J. An, M. S. Seo, J. H. Hong, K. J. Lee, C. H. Kim, T. Joo, S. C. Hong, B. R. Cho, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4246–4247.
- [182] C. S. Lim, H. J. Kim, J. H. Lee, Y. S. Tian, C. H. Kim, H. M. Kim, T. Joo, B. R. Cho, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 392–395.
- [183] D. Zakim, J. Kavecansky, S. Scarlata, *Biochemistry* **1992**, *31*, 11589–11594.
- [184] P. Yeagle, *The Membranes of Cells*, Academic Press, San Diego, **1993**.
- [185] T. Koike, G. Ishida, M. Taniguchi, K. Higaki, Y. Ayaki, M. Saito, Y. Sakakihara, M. Iwamori, K. Ohno, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1998**, *1406*, 327–335.
- [186] a) M. A. Haidekker, E. A. Theodorakis, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1669–1678; b) M. A. Haidekker, E. A. Theodorakis, *J. Biol. Eng.* **2010**, *4*, 11.
- [187] C. E. Kung, J. K. Reed, *Biochemistry* **1989**, *28*, 6678–6686.
- [188] M. A. Haidekker, T. Ling, M. Anglo, H. Y. Stevens, J. A. Frangos, E. A. Theodorakis, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 123–131.
- [189] M. E. Nipper, S. Majd, M. Mayer, J. C. Lee, E. A. Theodorakis, M. A. Haidekker, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2008**, *1778*, 1148–1153.
- [190] a) M. A. Haidekker, T. Brady, K. Wen, C. Okada, H. Y. Stevens, J. M. Snell, J. A. Frangos, E. A. Theodorakis, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3627–3636; b) I. López-Duarte, T. T. Vu, M. A. Izquierdo, J. A. Bull, M. K. Kuimova, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 5282–5284; c) K. Yasuhara, Y. Sasaki, J. Kikuchi, *Colloids Surf. B* **2008**, *67*, 145–149; d) J. A. Levitt, M. K. Kuimova, G. Yahioğlu, P. H. Chung, K. Suhling, D. Phillips, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 11634–11642.
- [191] W. J. Duan, J. F. Zhou, W. Li, T. Zhou, Q. Q. Chen, F. Y. Yang, T. T. Wei, *Protein Cell* **2013**, *4*, 286–298.
- [192] H. Kojima T. Nagano, T. Osaki, Membrane-Anchoring Fluorescent Probe. US Patents, US20080281104 A1, **2008**.
- [193] N. K. Tonks, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 833–846.
- [194] A. Östman, C. Hellberg, F. D. Böhmer, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 307–320.
- [195] L. Li, X. Shen, Q. H. Xu, S. Q. Yao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 424–428; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 442–446.
- [196] a) J. Mu, F. Liu, M. S. Rajab, M. Shi, S. Li, C. Goh, L. Lu, Q. H. Xu, B. Liu, L. G. Ng, B. Xing, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14357–14362; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 14585–14590; b) J. Patti, E. Y. Isacoff, *Cold Spring Harbor Protoc.* **2013**, *7*, 606–613; c) Y. Shen, M. Rosendale, R. E. Campbell, D. Perrais, *J. Cell Biol.* **2014**, *207*, 419–432.
- [197] P. L. Paine, L. C. Moore, S. B. Horowitz, *Nature* **1975**, *254*, 109–114.
- [198] R. W. Horobin, J. C. Stockert, F. Rashid-Doubell, *Histochem. Cell Biol.* **2006**, *126*, 165–175.
- [199] M. L. Zheng, K. Fujita, W. Q. Chen, N. I. Smith, X. M. Duan, S. Kawata, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 52–55.

- [200] a) B. Dumat, G. Bordeau, E. Faurel-Paul, F. Mahuteau-Betzer, N. Saettel, M. Bombled, G. Metge, F. Charra, C. Fiorini-Debuisschert, M. P. Teulade-Fichou, *Biochimie* **2011**, *93*, 1209–1218; b) M. Cokol, R. Nair, B. Rost, *EMBO Rep.* **2000**, *1*, 411–415; c) A. Lange, R. E. Mills, C. J. Lange, M. Stewart, S. E. Devine, A. H. Corbett, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 5101–5105; d) C. D. Harvey, A. G. Ehrhardt, C. Cellurale, H. Zhong, R. Yasuda, R. J. Davis, K. Svoboda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 19264–19269; e) D. Lodygin, F. Odoardi, C. Schlägger, H. Körner, A. Kitz, M. Nosov, J. van den Brandt, H. M. Reichardt, M. Haberl, A. Flügel, *Nat. Med.* **2013**, *19*, 784–790.
- [201] J. Wu, Y. Zou, C. Li, W. Sicking, I. Piantanida, T. Yi, C. Schmuck, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1958–1961.
- [202] E. Dultz, S. Huet, J. Ellenberg, *Biophys. J.* **2009**, *97*, 1891–1897.
- [203] a) P. E. Mozdziak, P. M. Pulvermacher, E. Schultz, K. Schell, *Cytometry* **2000**, *41*, 89–95; b) H. A. Crissman, G. T. Hirons, *Methods Cell Biol.* **1994**, *41*, 195–209.
- [204] a) Y. N. Hong, S. J. Chen, C. W. T. Leung, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *Chem. Asian J.* **2013**, *8*, 1806–1812; b) B. Chazotte, *CSH Protoc.* **2008**, pdb.prot4950; c) X. J. Feng, P. L. Wu, F. Bolze, H. W. C. Leung, K. F. Li, N. K. Mak, D. W. J. Kwong, J. F. Nicoud, K. W. Cheah, M. S. Wong, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2194–2197; d) R. M. Martin, H. Leonhardt, M. C. Cardoso, *Cytometry Part A* **2005**, *67*, 45–52.
- [205] A. Erve, Y. Saoudi, S. Thiriot, C. Guetta-Landras, J. C. Florent, C. H. Nguyen, D. S. Grierson, A. V. Popov, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e43.
- [206] S. Feng, Y. K. Kim, S. Yang, Y. T. Chang, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 436–438.
- [207] X. Peng, T. Wu, J. Fan, J. Wang, S. Zhang, F. Song, S. Sun, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4180–4183; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4266–4269.
- [208] L. Guo, M. S. Chan, D. Xu, D. Y. Tam, F. Bolze, P. K. Lo, M. S. Wong, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1171–1175.
- [209] B. Zhu, H. Jia, X. Zhang, Y. Chen, H. Liu, W. Tan, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 1245–1250.
- [210] M. Kamiya, K. Johnsson, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6472–6479.
- [211] a) B. C. Dickinson, Y. Tang, Z. Chang, C. J. Chang, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 943–948; b) M. Ikeda, H. Nakagawa, S. Ban, H. Tsumoto, T. Suzuki, N. Miyata, *Free Radical Biol. Med.* **2010**, *49*, 1792–1797; c) Y. Wen, K. Liu, H. Yang, Y. Li, H. Lan, Y. Liu, X. Zhang, T. Yi, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 9970–9976.
- [212] a) A. Nakamura, K. Takigawa, Y. Kurishita, K. Kuwata, M. Ishida, Y. Shimoda, I. Hamachi, S. Tsukiji, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 6149–6152; b) G. Lukinavičius, C. Blaukopf, E. Pershagen, A. Schena, L. Reymond, E. Derivery, M. Gonzalez-Gaitan, E. D'Este, S. W. Hell, D. W. Gerlich, K. Johnsson, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8497. DOI: 10.1038/ncomms9497.
- [213] a) E. De Meulenaere, W. Q. Chen, S. Van Cleuvenbergen, M. L. Zheng, S. Psilodimitrakopoulos, R. Paesen, J. M. Taymans, M. Ameloot, J. Vanderleyden, P. Loza-Alvarez, X. M. Duan, K. Clays, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 984–995; b) X. B. Shen, Q. Jiang, J. Y. Wang, L. R. Dai, G. Z. Zou, Z. G. Wang, W. Q. Chen, W. Jiang, B. Q. Ding, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11301–11303.
- [214] a) R. B. P. Elmes, K. N. Orange, S. M. Cloonan, D. C. Williams, T. Gunnlaugsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15862–15865; b) K. Okabe, N. Inada, C. Gota, Y. Harada, T. Funatsu, S. Uchiyama, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 705; c) A. Banach-Latapy, M. Dardalhon, M. E. Huang, *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1228*, 159–169.
- [215] a) A. Y. Cheung, C. Y. H. Chen, R. H. Glaven, B. H. J. de Graaf, L. Vidali, P. K. Hepler, H. M. Wu, *Plant Cell* **2002**, *14*, 945–962; b) J. Mandl, T. Meszaros, G. Banhegyi, L. Hunyady, M. Csala, *Trends Endocrinol. Metab.* **2009**, *20*, 194–201.
- [216] M. P. Mattson, F. M. LaFerla, S. L. Chan, M. A. Leissring, P. N. Shepel, J. D. Geiger, *Trends Neurosci.* **2000**, *23*, 222–229.
- [217] a) G. Lur, L. P. Haynes, I. A. Prior, O. V. Gerasimenko, S. Feske, O. H. Petersen, R. D. Burgoyne, A. V. Tepikin, *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 1648–1653; b) R. Rizzuto, P. Pinton, W. Carlington, F. S. Fay, K. E. Fogarty, L. M. Lifshitz, R. A. Tuft, T. Pozzan, *Science* **1998**, *280*, 1763–1766.
- [218] K. J. Day, L. A. Staehelin, B. S. Glick, *Histochem. Cell Biol.* **2013**, *140*, 239–249.
- [219] C. B. Hirschberg, P. W. Robbins, C. Abeijon, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 49–69.
- [220] M. F. Coutinho, M. J. Prata, S. Alves, *Mol. Genet. Metab.* **2012**, *105*, 542–550.
- [221] a) J. Colston, R. W. Horobin, F. Rashid-Doubell, J. Pediani, K. K. Johal, *Biotechnol. Histochem.* **2003**, *78*, 323–332; b) M. Terasaki in *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity* (Hrsg.: W. T. Mason), Academic Press, London, **1993**, S. 120–123; c) M. Terasaki in *Cell Biology, A Laboratory Handbook*, 2. Aufl. (Hrsg.: J. E. Celis), Academic Press, San Diego, **1998**, S. 501–506; d) C. Cruz, E. Cairrao, S. Silvestre, L. Breitenfeld, P. Almeida, J. A. Queiroz, *PLoS One* **2011**, *6*, e27078.
- [222] Y. Liu, C. N. Lok, B. C. Ko, T. Y. Shum, M. K. Wong, C. M. Che, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1420–1423.
- [223] W. Lin, D. Buccella, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13512–13520.
- [224] Y. H. Lee, N. Park, Y. B. Park, Y. J. Hwang, C. Kang, J. S. Kim, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3197–3200.
- [225] a) Z. Yang, Y. He, J. H. Lee, W. S. Chae, W. X. Ren, J. H. Lee, C. Kang, J. S. Kim, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11672–11675; b) H. Lee, Z. Yang, Y. Wi, T. W. Kim, P. Verwilt, Y. H. Lee, G.-i. Han, C. Kang, J. S. Kim, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 2474–2480; c) Z. Yang, Y. Wi, Y.-M. Yoon, P. Verwilt, J. H. Jang, T. W. Kim, C. Kang, J. S. Kim, *Chem. Asian J.* **2016**, *11*, 527–531.
- [226] G. E. Shull, M. L. Miller, V. Prasad, *Biofactors* **2011**, *37*, 150–158.
- [227] G. K. Walkup, S. C. Burdette, S. J. Lippard, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5644–5645.
- [228] F. Qian, C. L. Zhang, Y. M. Zhang, W. J. He, X. Gao, P. Hu, Z. J. Guo, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1460–1468.
- [229] H. Singh, H. W. Lee, C. H. Heo, J. W. Byun, A. R. Sarkar, H. M. Kim, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 12099–12102.
- [230] E. Tomat, E. M. Nolan, J. Jaworski, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15776.
- [231] L. Yang, R. McRae, M. M. Henary, R. Patel, B. Lai, S. Vogt, C. J. Fahrni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 11179–11184.
- [232] T. Hirayama, K. Okuda, H. Nagasawa, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1250–1256.
- [233] D. Wlodkowic, J. Skommer, D. McGuinness, C. Hillier, Z. Darzynkiewicz, *Leuk. Res.* **2009**, *33*, 1440–1447.
- [234] H. Zhang, J. Fan, J. Wang, S. Zhang, B. Dou, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11663–11669.
- [235] H. Zhang, J. L. Fan, H. J. Dong, S. Z. Zhang, W. Y. Xu, J. Y. Wang, P. Gao, X. J. Peng, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 5450–5455.
- [236] a) W. Hakamata, S. Tamura, T. Hirano, T. Nishio, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 321–325; b) Q. Meng, H. Jia, P. Succar, L. Zhao, R. Zhang, C. Duan, Z. Zhang, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *74*, 461–468.
- [237] R. S. Erdmann, H. Takakura, A. D. Thompson, F. Rivera-Molina, E. S. Allgeyer, J. Bewersdorf, D. Toomre, A. Schepartz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10242–10246; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 10407–10412.
- [238] a) S. Arai, S. C. Lee, D. T. Zhai, M. Suzuki, Y. T. Chang, *Sci. Rep.* **2014**, *4*:6701; b) J. Birk, T. Ramming, A. Odermatt, C. Appenzeller-Herzog, *Front. Genet.* **2013**, *4*, 108; c) E. Avezov, B. C. Cross, G. S. K. Schierle, M. Winters, H. P. Harding, E. P. Melo, C. F. Kaminski, D. Ron, *J. Cell Biol.* **2013**, *201*, 337–349;

- d) J. Llopis, J. M. McCaffery, A. Miyawaki, M. G. Farquhar, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6803–6808;
e) M. Kneen, J. Farinas, Y. Li, A. S. Verkman, *Biophys. J.* **1998**, 74, 1591–1599.
- [239] Z. Wu, X. Tang, *Anal. Chem.* **2015**, 87, 8613–8617.
- [240] R. D. Vale, *Cell* **2003**, 112, 467–480.
- [241] T. Fujimoto, R. G. Parton, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2011**, 3, a004838.
- [242] H. Zhang, C. Wang, T. Jiang, H. Guo, G. Wang, X. Cai, L. Yang, Y. Zhang, H. Yu, H. Wang, K. Jiang, *Anal. Chem.* **2015**, 87, 5216–5222.
- [243] a) A. Goel, A. Sharma, M. Kathuria, A. Bhattacharjee, A. Verma, P. R. Mishra, A. Nazir, K. Mitra, *Org. Lett.* **2014**, 16, 756–759; b) J. Y. Zhai, Y. W. Zhang, C. Y. Yang, Y. M. Xu, Y. Qin, *Analyst* **2014**, 139, 52–54; c) P. Greenspan, E. P. Mayer, S. D. Fowler, *J. Cell Biol.* **1985**, 100, 965–973.

Eingegangen am 18. November 2015
Online veröffentlicht am 29. August 2016
Übersetzt von Dr. Farina Schill, Göttingen