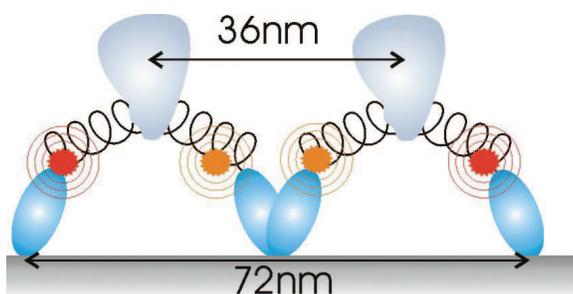


Fluoreszierende Proteine zeigen den Weg durch die Zelle

Die Fluoreszenzmikroskopie ist heute in der Lage, die Dynamik einzelner Biomoleküle zu verfolgen. Fluoreszierende Proteine machen Transportprozesse in lebenden Zellen sichtbar.

● Die Aussendung von Licht von einem Atom, Ion oder Molekül nach vorangegangener elektronischer Anregung heißt Fluoreszenz.¹⁾ Analytische Wissenschaften nutzen die Sensitivität, die Spezifität und die gute örtliche und zeitliche Auflösung der Fluoreszenzmessung. Für die Bioanalytik ist von besonderer Bedeutung, dass nur wenige biologische Moleküle oder Molekülbauteile fluoreszieren. So kann die Tryptophanfluoreszenz Konzentrationen oder den Faltungszustand von Proteinen anzeigen. Sie hilft sogar in transienten Messungen, wie der Bindung von ATP oder Liganden.

Abb. 1: Beide Arme des Myosin V sind mit Farbstoffmolekülen markiert. Der Proteinschwerpunkt bewegt sich um 36 nm, der eine Farbstoff um 72 nm. Der andere Farbstoff bleibt in der Position unverändert.



Limitierungen der Messdauer

● In der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzte Laser erfordern Farbstoffe, die sowohl im Anregungs- als auch im Emissionsspektrum gut voneinander trennbar sind. Außerdem spielt die Photostabilität (Bleichverhalten) der Farbstoffe eine große Rolle. Moderne Experimente sind häufig sehr sensitiv, das heißt sie arbeiten mit immer weniger Farbstoffmolekülen bis hin zum Nachweis der Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls. So verschwinden Details der Dynamik von Biomolekülen nicht durch Mittelung.

Ein Fluoreszenzexperiment ist in jedem Fall vorbei, wenn durch einen photochemischen Prozess die Fluoreszenz erlischt. Daher ist die mögliche Zahl von Anregungszyklen ein ganz entscheidendes Kriterium für die Wahl des Farbstoffmoleküls. Photobleichen limitiert alle bislang entwickelten Farbstoffmoleküle. Nach einer Messung von maximal einer Million Photonen erlischt das Molekül. Die Lichtmenge, die bis zum Bleichen von etwa einer Million Farbstoffmolekülen ausgeht, entspricht der Lichtmenge, die eine Glühbirne in einer Millionstel Sekunde abgibt.

Einen Ausweg aus der begrenzten Messdauer bieten wahrscheinlich Quantenpunkte.²⁾ Ein Quantenpunkt ist eine nur wenige Nanometer grosse Struktur aus Halbleitermaterial, die aufgrund von Rekombination von Ladungsträgern (Elektronen und Löcher) Fluoreszenzlicht aussendet. Eine passivierende Hülle verhindert das schnelle Bleichen der Quantenpunkte und chemischen Modifikationen dieser Hülle gelingt es, die Quantenpunkte gezielt an Proteine oder DNA-Moleküle zu binden.

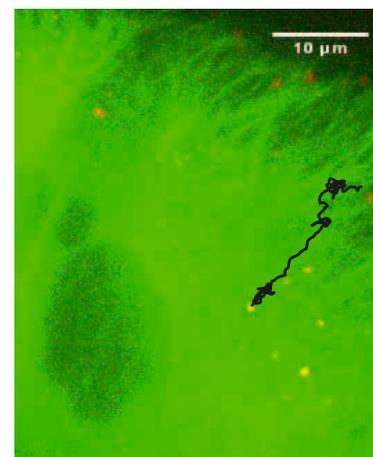


Abb. 2: Ausschnitt einer Weitfeld-mikroskopischen Aufnahme einer Huh7-Zelle mit GFP markiertem Mikrotubuli-Cytoskelett und Cy5-markierten Polyplexen. Die Trajektorie eines Polyplexes ist blau eingezeichnet.

Fluoreszierende Proteine wie das Grün fluoreszierende Protein GFP (siehe Infokasten auf Seite 1225) können Proteine und Strukturen in lebenden Zellen nicht-invasiv markieren. Eine Zelle kann solche Proteine selbst herstellen: Die Zielstruktur

Fluoreszierende Proteine

● Fluoreszierende Proteine wie das Grün fluoreszierende Protein GFP (siehe Infokasten auf Seite 1225) können Proteine und Strukturen in lebenden Zellen nicht-invasiv markieren. Eine Zelle kann solche Proteine selbst herstellen: Die Zielstruktur

tur ist genetisch markiert und eine externe Manipulation nicht notwendig.

Um ein bestimmtes Protein in der Zelle fluoreszent zu markieren, wird das zugehörige Gen an die Gensequenz eines fluoreszierenden Proteins gekoppelt (genetische Fusion). Bringt man das modifizierte Gen in die Zelle (Transfektion), exprimiert die Zelle das Fusionsprotein aus Zielprotein und Fluorophor. Die Fluoreszenzmikroskopie kann nun zeigen, wo sich das Protein innerhalb der Zelle befindet.

Es sollten fluoreszierende Proteine in verschiedenen Spektralbereichen zur Verfügung stehen, um mehrere Proteine gleichzeitig in einer Zelle markieren oder FRET-Messungen durchführen zu können. Die Intensität des Fluorescence resonance energy transfer (FRET) zeigt unter anderem den Abstand zweier Fluorophore an. In Kombination mit GFP bieten sich vor allem Proteine mit Anregung und Emission im langwelligeren Spektrumsbereich an: Langwelligeres Licht ist schonender für Zellen und kann tiefer in Gewebe eindringen als kurzwelliges.

Punktmutationen haben zu einem breiten Spektrum von GFP-artigen Proteinen mit einem breiten Eigenschaftsspektrum geführt (siehe Tabelle auf Seite 1224). Inzwischen gibt es eine große Palette von fluoreszierenden Proteinen, die nahezu das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichts abdecken. Die Emission mancher Proteine ist durch Lichtanregung sogar verschiebbar oder schaltbar. Ferner entdeckte man fluoreszierende Proteine, die spezifische Eigenschaften, wie pH-, Chlorid- oder Redox-Sensitivität besitzen.⁵⁾

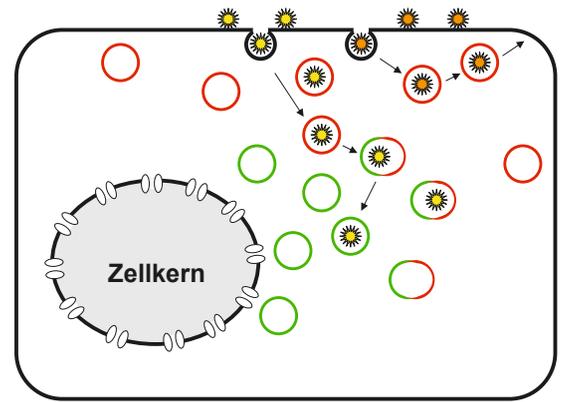
Bewegung von Proteinmolekülen

● Misst man die Aktivität einzelner fluoreszenzmarkierter Proteine direkt im optischen Mikroskop, kann man beispielsweise die Bewegung des Motorproteins Myosin V entlang von Aktinpolymeren beobachten: Jeder „Arm“ des Myosins erhält dafür ein Farbstoffmolekül. Mit der Fiona-

Methode hat man nun gezeigt, dass Myosin V sich fortbewegt, indem es abwechselnd einen Arm vor den anderen setzt (siehe Infokasten Seite 1223).³⁾ Jeder Arm macht dabei eine Bewegung von ungefähr 72 nm mit einer Verlagerung des Proteinschwerpunktes um die Hälfte der Distanz (Abbildung 1). So ist es möglich, ein einzelnes Molekül zu beobachten und damit direkt die Dynamik einzelner Proteine zu verfolgen. Die optische Mikroskopie dringt somit in Längenskalen vor, die bislang der Elektronenmikroskopie oder Rastersondenverfahren vorbehalten waren.

Künstliche Viren – neue Wege für die Pharmazie

● Mit Farbstoffmolekülen markierte Viren lassen sich auf dem Weg in den Zellkern beobachten: Man sieht das Andocken an die Zellmembran, die Fusion, den intrazellulären Transport entlang des Zytoskeletts, Diffusionsbewegungen und letztlich den Zellkerneintritt. Ein genaues



Wissen über den Infektionsweg erlaubt nicht nur die gezielte Bekämpfung von Viren, sondern auch die Entwicklung „künstlicher Viren“, von denen man sich eine große Bedeutung für die Gentherapie verspricht.

Bei der Gentherapie versucht man, fehlende oder defekte Gene künstlich mit Hilfe von Transportpartikeln wieder in Organismen einzuführen. Die einfachsten solcher

Abb. 3: Zelle mit frühen und späten Endosomen, die spezifisch mit fluoreszierenden Proteinen markiert sind. Kollationsstudien zeigen, dass Cargo A über frühe Endosomen und transiente Intermediate in späte Endosomen gelangt. Cargo B wird aus frühen Endosomen wieder zur Zelloberfläche befördert.

● Fiona verfolgt auch Nanometerschritte

Fiona steht für Fluoreszenzabbildung mit einem Nanometer Genauigkeit (Fluorescence Imaging with One Nanometer Accuracy).³⁾ In der optischen Mikroskopie ist die Auflösung aufgrund der Welleneigenschaften des für die Abbildung verwendeten Lichts auf ca. die Hälfte der Wellenlänge begrenzt. Benutzt man jedoch ein einzelnes Farbstoffmolekül oder einen einzelnen Quantenpunkt als lokale Lichtquelle, so sind Veränderungen in der Position der Lichtquelle sehr viel feiner aufzulösen. Die Genauigkeit, mit der man das Fluoreszenzobjekt lokalisieren kann, ist dann nur noch vom experimentellen Signal und dem Rauschen abhängig. Das bedeutet, dass man sehr kleine Schritte für längere Integrationszeiten und damit auch bessere Signal/Rausch-Verhältnisse beobachten kann.

In einer Erweiterung der Methode ist es auch möglich, den Abstand zwischen zwei Farbstoffmolekülen zu messen, so lange diese photo-physikalisch unterscheidbar sind (z. B. auf Grund unterschiedlicher Emission).⁴⁾ Die Abbildung zeigt das Fluoreszenzsignal eines Quantenpunkts, der in Schritten von ca. 30 nm bewegt wird. Die Schrittgröße beträgt etwa ein Zehntel des Auflösungsvermögens des Mikroskops, dennoch ist jeder einzelne Schritt zu erkennen.

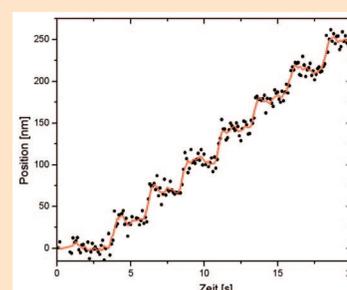
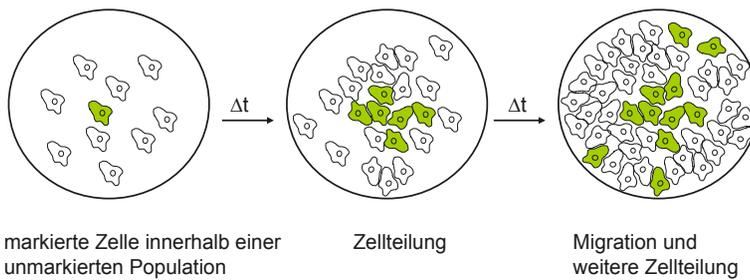


Abb. 4:
GFP-markierte Zelle
innerhalb einer un-
markierten Popula-
tion. Nach mehr-
eren Zellteilun-
gen lassen sich die
Nachkommen der
Ursprungszelle über
ihre Fluoreszenz
identifizieren und
die Wanderung der
Zellen innerhalb
des Verbunds ver-
folgen.



Transportpartikel bestehen aus DNA und Polyethylenimid (Polyplexe). Um die Interaktion der Partikel mit der Zelle zu untersuchen, wird die in den Polyplexen enthaltene DNA kovalent mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt.⁶⁾ Mit Langzeitaufnahmen, für die eine gute Photostabilität der Farbstoffe entscheidend ist, wird dann die Aufnahme der Partikel in die Zelle verfolgt (Abbildung 2). Fiona kann die Bewegung der Polyplexe charakterisieren und den Transport entlang des Zytoskeletts zeigen.

Dynamische Prozesse

● Für die räumliche und zeitliche Untersuchung komplexer dynamischer Prozesse in lebenden Zellen ist es wichtig, unterschiedliche Zellkompartimente gezielt mit unterscheidbaren fluoreszierenden Proteinen markieren zu können.

Ein Beispiel ist die Untersuchung der Endocytose, bei der die Zelle Stoffe aufnimmt und an bestimmte Zellteile weiterleitet. Durch spezifische Proteinfusionen können Proteine markiert werden, die nur in frühen oder späten Endosomen – den bei der Endozytose beteiligten

Kompartimenten – auftreten. Ein dritter, künstlicher Farbstoff dient zur Markierung von unterschiedlichem Frachtgut. Dessen Aufnahme und Sortierung innerhalb der Zelle sowie der Transport in frühe und späte Endosomen ist nun über Kollokalisierung der Farbstoffe in Echtzeit zu sehen (Abbildung 3).

Entsprechende Experimente haben gezeigt, dass in der Zelle Endosomen mit verschiedenen Aufgaben existieren, die sich nur durch ihre Dynamik unterscheiden lassen.⁷⁾

Beobachtung über mehrere Zellzyklen

● Durch die genetische Kodierung der Fluoreszenz von mit fluoreszierenden Proteinen markierten Zellen bleibt die Markierung auch nach Zellteilung in den Tochterzellen erhalten. Damit lassen sich Nachkommen einer Zelle über viele Generationen hinweg verfolgen (Abbildung 4).

Eine wichtige medizinische Anwendung ist die Untersuchung spezieller Hirntumore, die über große Distanzen im Gehirn zu wandern. Daher ist es schwierig, den Tumor chirurgisch zu entfernen. Die spezi-

fische Markierung dieser wandernden Zellen mit fluoreszierenden Proteinen und die anschließende Injektion der Zellen in Ratten hat erstmals das Migrationsverhalten im Detail gezeigt.⁸⁾ Damit war es auch möglich, die Metastasenbildung im Zusammenhang mit der Migration zu untersuchen.

Schaltbare Reporter in lebenden Zellen

● Genetische Veränderungen an GFP haben zu einem Protein geführt, dessen Fluoreszenz sich reversibel an- und ausschalten lässt. Beleuchtet man das grün fluoreszierende Protein Dronpa mit blauem Licht hoher Intensität (490 nm), erlischt die Fluoreszenz; violettes Licht (400 nm) aktiviert die Fluoreszenz.

Wenn ein übliches fluoreszierendes Protein an ein in der Zelle weit verbreitetes Protein gebunden ist, leuchtet die gesamte Zelle. Mit dem Protein Dronpa kann man nun global die Fluoreszenz ausschalten und dann lediglich Proteine in einem bestimmten Bereich wieder zum Leuchten bringen. Diese Eigenschaft kann zum Beispiel zur Beobachtung des Transports bestimmter Proteine vom Cytoplasma in den Zellkern (und umgekehrt) dienen. Durch reversibles An- und Ausschalten der Fluoreszenz im Cytoplasma (oder im Kern) kann so in derselben Zelle die Kinetik des Transports im Zusammenhang mit der Stimulierung durch andere Faktoren untersucht werden.⁹⁾

Tabelle:
Fluoreszierende
Proteinen.

Protein	Anregung [nm]	Emission [nm]	Besonderheiten	Literatur
mPlum	590	649	tiefrot	5)
mDsRed	556	586	rot	5)
mOrange	548	562	orange	5)
EYFP	514	527	gelb	5)
EGFP	488	507	grün	5)
Cerulean	433	475	blau	5)
Keima	440	620	Protein mit dem größten Stokes-Shift	11)
Dronpa	488	503	Fluoreszenz ist schaltbar	12)
EosFP	505	516	Belichtung mit 400 nm führt zur Photokonversion der Fluoreszenz von grün nach rot	12)
Redoxsensitives GFP	400 vs. 490	~510	Fluoreszenz ist vom Oxidationszustand abhängig	13)

Jens Michaelis, Nadia Ruthardt
Department Chemie und Biochemie
Ludwig-Maximilians Universität
München
jens.michaelis@cup.uni-muenchen.de

- 1) G. G. Stokes, Phil. Trans. 1853, 143, 385–396.
- 2) J. K. Jaiswal, S.M. Simon, Trends Cell Biology 2004, 14, 497–504.
- 3) A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, P. R. Selvin, Science 2003, 300, 2061–2065.
- 4) D. M. Warshaw, G. G. Kennedy, S. Work, E. B. Kremensova, S. Beck, K. M. Trybus, Biophys. J. 2005, 88, L30–32.

- 5) N. C. Shaner, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien, *Nature Methods* 2005, 2, 905–909
- 6) R. Bausinger, K. von Gersdorff, K. Braeckmans, M. Ogris, E. Wagner, Ch. Bräuchle, A. Zumbusch, *Angew. Chem.* 2006, 118, 1598–1602
- 7) M. Lakadamyali, M. J. Rust, X. Zhuang, *Cell* 2006, 124, 997–1009
- 8) A. Farin, S. O. Suzuki, M. Weiker, J. E. Goldman, J. N. Bruce, P. Canoll, *Glia* 2006, 53, 799–808
- 9) R. Ando, H. Mizuno, A. Miyawaki, *Science* 2004, 306, 1370–1373
- 10) R. Y. Tsien, *Annu Rev Biochem* 1998, 67, 509–544
- 11) T. Kogure, S. Karasawa, T. Araki, K. Saito, M. Kinjo, A. Miyawaki, *Nature Biotechnol.* 2006, 24, 577–581
- 12) K. A. Lukyanov, D. M. Chudakov, S. Lukyanov, V. V. Verkhusha, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005, 6, 885–891
- 13) G. T. Hanson, R. Aggeler, D. Oglesbee, M. Cannon, R. A. Capaldi, R. Y. Tsien., S. J. Remington, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 13044–12053

● Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP)

Das wohl bekannteste fluoreszierende Protein ist das vor über vierzig Jahren entdeckte GFP aus der Qualle *Aequorea victoria*.¹⁰⁾ Aufmerksamkeit erregte es allerdings erst 1994 nach Klonierung und heterologer Expression. Chromophore in GFP-ähnlichen Proteinen reifen und falten sich autokatalytisch ohne Enzyme oder Cofaktoren. Einzig molekularer Sauerstoff ist für die Reifung nötig, der unter Standard-Zellkulturbedingungen allerdings kein limitierender Faktor ist. Das eigentliche Chromophor besteht aus drei Aminosäuren (Serin, Tyrosin und Glycin), die nach Faltung als Heterozyklus vorliegen. Es handelt sich in der Urform um ein p-Hydroxybenzylidenimidazolinon. Das Chromophor und seine lokale Umgebung sind in den letzten Jahren genetisch verändert worden, wodurch eine Vielzahl von fluoreszierenden Proteinen mit unterschiedlichen Eigenschaften entstand (siehe Tabelle auf Seite 1224).

Kurz notiert

Biochip mit Hefezelle

● Am Institute for Analytical Sciences in Dortmund ist es gelungen, eine Zelle für mehrere Stunden in einem Chip am Leben zu halten. Die Hefezelle hat sich in ihrer „Einzelzelle“ so wohl gefühlt, dass sie sich sogar mehrmals geteilt hat. Ein zu dem Chip passendes Aggregat, das die Temperatur reguliert, schafft kontrollierte Bedingungen für die gefangene Zelle. Im Rahmen des Integrated-Cell-Analysis-Projekts fängt die Apparatur einzelne Zellen als Vorbereitung für die weitere Analyse.

Biochip für humane Antikörper

● Das Fraunhofer-Institut für Zuverlässigkeit und Mikrointegration entwickelt einen Biochip, der in einem Diagnosesystem für humane Antikörper bis zu 100 Immuntests parallel durchführen soll. Das System besteht aus einem Assayprozessor und einem Fluoreszenz-Reader. Die Biochip-Kartusche ist als Mikrofluidiksystem mit integriertem Chipfeld für die serologisch relevanten Antigen-Dots konzipiert. Der Einwegartikel hat nur die Größe einer Scheckkarte.

Metrologie in der Chemie – Interessenten gesucht

● Das Institut für Referenzmaterialien und -messungen der Gemeinsamen Forschungsstelle der Europäischen Kommission erstellt eine Liste von Einrichtungen, die Berichte über Fragen zu chemischen Messungen erarbeiten wollen. Es geht um Rückverfolgbarkeit, Ungenauigkeit und Validierung von Messungen, um Vergleiche zwischen Laboratorien oder um Referenzmessungen und -materialien. Der vollständige Wortlaut der Ausschreibung ist im Internet abrufbar.

ted.europa.eu/udl?request=seek-deliver&language=de&docid=147597-2006

Biochip als Test auf genetisch veränderte Lebensmittel

● Die Eppendorf Biochip Systems hat ein Nachweisverfahren für gentechnisch veränderte Organismen (GVO) entwickelt. Die Technik kann spezifische DNA-Elemente detektieren, die nur in GVO-Pflanzen vorkommen. Das Verfahren weist gleichzeitig viele einzelne Elemente einer Genbibliothek nach. Die spezifischen Muster befinden sich auf dem Biochip, werden sichtbar gemacht und mit einer dazugehörigen Software ausgewertet.

Schwingender Biochip

● Wissenschaftler im Bonner Forschungszentrum Caesar haben das Biosensorsystem S-sens entwickelt, das ohne fluoreszierende oder radioaktive Marker Schadstoffe im Wasser oder Viren im Blut messen kann. Die Oberfläche des Sensorchips mit Rezeptormolekülen schwingt. Analyt ist eine Flüssigkeit, die über den Chip läuft. Befinden sich die gesuchten Stoffe in der Probe, verbinden sich die entsprechenden Moleküle mit den Rezeptoren und die Masse der Chipoberfläche nimmt zu. Dies verändert das Schwingungsverhalten des Sensorchips.

KATRIN, der Koloss, geht auf die Reise

● Im Forschungszentrum Karlsruhe entsteht mit KATRIN (Karlsruher Tritium Neutrino Experiment) die präziseste Neutrino-Waage der Welt. Sie ist 70 Meter lang und besteht aus einer Tritium-Quelle, zwei Spektrometern sowie einem Detektor. Ende September 2006 begann der Koloss seine 8800 Kilometer lange Seereise vom bayerischen Deggendorf ins 400 Kilometer entfernte badische Karlsruhe. Der Landweg ist bei der Geräte-Größe ausgeschlossen. Mitte Dezember soll der größte Kran Europas den 200 Tonnen schweren Behälter in seine endgültige Position heben.

mb