



Julia Graf (Autor)

# Synthese von fluoreszierenden Calcium-Sensoren und Biomolekülen zur Untersuchung physiologischer Prozesse

Julia Graf

Synthese von fluoreszierenden Calcium-Sensoren und Biomolekülen zur Untersuchung physiologischer Prozesse

+ Ca<sup>2+</sup>

Cuvillier Verlag Göttingen  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7571>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany  
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>



# 1 Synthese fluoreszierender Calcium-Sensoren

## 1.1 Einleitung

Zellen stehen in ständiger Kommunikation mit ihrer Umgebung. Sie reagieren auf extrazelluläre Reize wie Hormone, Neurotransmitter, Licht oder Temperaturunterschiede und wandeln diese in intrazelluläre Signale um, wodurch eine Kaskade von Reaktionen im Zellinneren ausgelöst wird. Dieser als Signaltransduktion bezeichnete Prozess reguliert viele wichtige biologische Vorgänge wie die Zellteilung, Wundheilung, Lichtwahrnehmung, Gentranskription oder Muskelkontraktion.<sup>[12]</sup> Im Inneren der Zellen befinden sich sekundäre Botenstoffe (engl. *second messenger*), die nach dem primären äußeren Signal gebildet werden und dieses innerhalb der Zelle weiterleiten. Zu den *second messengern* gehören z. B. cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Diacylglycerin (DAG), Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Calcium-Ionen (Ca<sup>2+</sup>).<sup>[13]</sup>

Die Untersuchung der Ca<sup>2+</sup>-Aktivität in Zellen ist, aufgrund der essentiellen Bedeutung von Calcium-Ionen als sekundäre Botenstoffe, ein Schwerpunkt der zellbiologischen Forschung. Eine gängige Methode ist die Messung der freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsänderung mittels fluoreszierender Calcium-Sensoren. Dabei handelt es sich um Moleküle, die Calcium-Ionen komplexieren und dadurch ihre optischen Eigenschaften durch Erhöhung der Fluoreszenzintensität oder Verschiebung der Emissions- bzw. Absorptionsmaxima ändern.<sup>[14]</sup> Fluoreszierende Calcium-Sensoren wurden beispielsweise zur Untersuchung der synaptischen Transmission<sup>[15]</sup>, subzellulärer Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungsmechanismen im Nukleus oder Cytosol<sup>[16]</sup> und Organellspezifischen Änderungen der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration verwendet.<sup>[17]</sup>

In diesem Kapitel wird die Synthese und Anwendung von neuartigen Calcium-Sensoren beschrieben. Diese beinhalten einen Azid-Linker wodurch die Verknüpfung mittels der HUISGEN-Reaktion an weitere Moleküle wie z. B. Peptide oder Lipide ermöglicht wird. Dies eröffnet neue Anwendungsmöglichkeiten in der Erforschung Ca<sup>2+</sup>-abhängiger physiologischer Prozesse. In einer ersten Anwendung wird die



Verknüpfung der Calcium-Sensoren an Polyethylenglycol (PEG) zur Untersuchung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität in olfaktorischen Zellen beschrieben.

### 1.2 Die Bedeutung von intrazellulärem Calcium

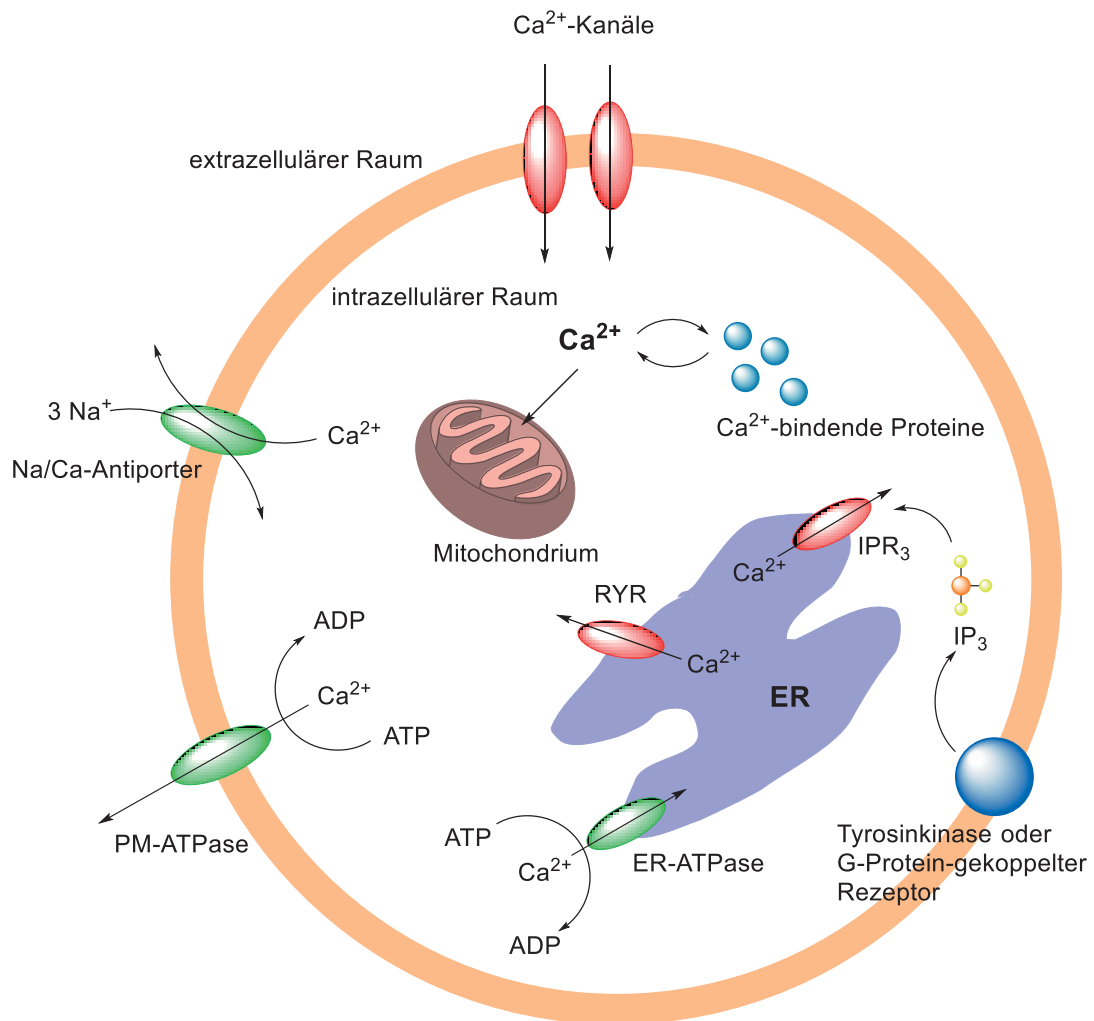
Calcium ist in seiner ionischen Form eines der bedeutendsten Elemente in biologischen Prozessen. Schon im Jahr 1883 konnten RINGER *et al.* zeigen, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine entscheidende Rolle bei der Kontraktion von Herzmuskeln bei Fröschen spielen.<sup>[18]</sup> Seitdem wurden zahlreiche Publikationen veröffentlicht, die Calcium als sekundären Botenstoff beschreiben. Dazu gehören viele grundlegende physiologische Vorgänge, wie die Zellteilung<sup>[19]</sup>, hormonelle Sekretion<sup>[20]</sup>, Befruchtung einer Eizelle<sup>[21,22]</sup>, Sinneswahrnehmungen<sup>[23,24]</sup>, synaptische Transmission<sup>[25–27]</sup> und Apoptose.<sup>[28,29]</sup>

Die Informationen in der Zelle werden dabei durch einen zeitlich begrenzten Konzentrationsanstieg an intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vermittelt.<sup>[30,31]</sup> Der Grund ist ein hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsgradient zwischen dem Cytosol und dem extrazellulären Raum. Innerhalb der Zelle ist die Konzentration von freiem  $\text{Ca}^{2+}$  mit  $10^{-7}$  M sehr gering, während außerhalb der Zelle eine Konzentration von  $10^{-3}$  M vorliegt.<sup>[30,32]</sup> Solche  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsgradienten existieren auch zwischen dem Cytosol und bestimmten Kompartimenten innerhalb komplexerer Zellen z. B. in Mitochondrien und im Endoplasmatischen Retikulum (ER).<sup>[13,33]</sup>

Wird eine Zelle durch einen primären Stimulus aktiviert, öffnen sich Calcium-Kanäle und die Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Cytosol steigt in Millisekunden auf bis zu  $1\text{--}10^{-6}$  M an.<sup>[24]</sup> Dadurch werden Calcium-bindende Proteine aktiviert, die weitere Prozesse steuern können (siehe Abschnitt 1.2.1).<sup>[34,35]</sup> Die Calcium-Kanäle befinden sich sowohl in der Plasmamembran als auch in der Membran des ERs und werden nach der Art der Aktivierung eingeteilt (Abbildung 1.1).<sup>[36]</sup> Im Allgemeinen werden zwei Arten von Calcium-Kanälen unterschieden. Dazu gehören die Rezeptor-vermittelten Kanäle, die durch spezifische Liganden aktiviert werden und die spannungsabhängigen Calcium-Kanäle. Letztere befinden sich in elektrisch erregbaren Zellen wie z. B. Muskelzellen und Neuronen.<sup>[33]</sup> Die Aktivierung erfolgt dabei durch eine Veränderung der Membranspannung, die z. B. durch eine Depolarisation der Zellmembran hervorgerufen wird und schließlich zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluss in die Zelle führt. Zu den Rezeptor-vermittelten Kanälen gehören



z. B. die Ryanodin-Rezeptor-Kanäle, welche sich in Gegenwart des pflanzlichen Alkaloids Ryanodin öffnen und die Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor-(IP<sub>3</sub>R-) Kanäle.<sup>[37]</sup> Die Aktivität der IP<sub>3</sub>R-Kanäle wird durch Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>)-Moleküle, welche durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und G-Protein gekoppelte Rezeptoren gebildet werden, reguliert.<sup>[28]</sup>



**Abbildung 1.1** Vereinfachte Darstellung der Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung in einer Zelle. Aufgrund des hohen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsgradienten kommt es durch liganden- oder spannungsvermittelten Ca<sup>2+</sup>-Kanälen zu einem Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen in den intrazellulären Raum, wodurch Ca<sup>2+</sup>-bindende Proteine aktiviert werden. Außerdem werden Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus den Ryanodin-Rezeptor (RyR)- und Inositoltriphosphat-Rezeptor (IP<sub>3</sub>R)-vermittelten Kanälen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) in das Cytosol ausgeschüttet. Durch die Na/Ca-Antiporter und Adenosintriphosphatasen (APTasen) der Plasmamembran (PM) und des ER werden die Ca<sup>2+</sup>-Ionen wieder aus dem Cytosol rausbefördert.

Zur Aufrechterhaltung des transmembranen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsgradienten und somit zum Abtransport der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Cytosol dienen verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen.<sup>[38]</sup> Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen spielen eine wichtige Rolle, da eine auf Dauer erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol zur sicheren Apoptose führen würde.<sup>[39]</sup> Zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen gehören die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Adenosintriphosphatasen (ATPasen) und das Natrium/Calcium-Antiport-System (Abbildung 1.1).<sup>[40]</sup> Die Calcium-ATPasen befinden sich sowohl in der Plasmamembran als auch in der Membran des ERs. Die Calcium-ATPase der Plasmamembran pumpt dabei jeweils ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion pro hydrolysiertem Adenosintriphosphat (ATP) in den extrazellulären Raum, wohingegen die ATPase in der Membran des ERs zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen pro ATP in das ER befördert.<sup>[32]</sup> Bei dem Natrium/Calcium-Antiport-System wird durch den Einstrom von drei  $\text{Na}^+$ -Ionen je ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion aus der Zelle rausbefördert.<sup>[41]</sup>

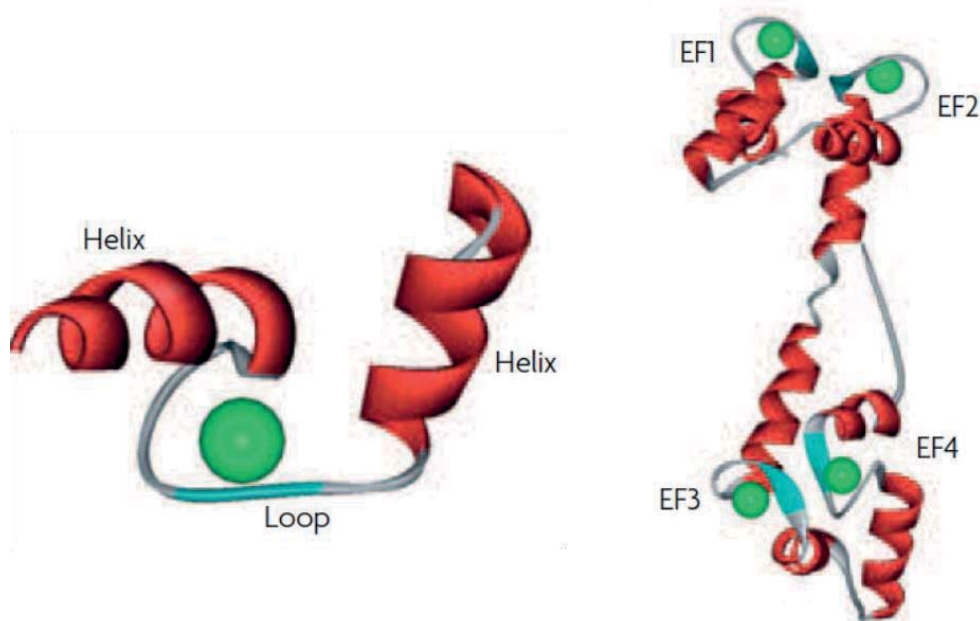
### 1.2.1 $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine

Das am häufigsten vertretene Calcium-bindende Protein in eukaryotischen Zellen ist Calmodulin (CaM), welches zur Familie der EF-Hand-Proteine gehört.<sup>[42,43]</sup> Dabei wird als EF-Hand ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Motiv aus 29 Aminosäuren bezeichnet, das aus einer  $\alpha$ -Helix, einer Schleife (engl. *loop*) und einer weiteren  $\alpha$ -Helix besteht (Abbildung 1.2, links).<sup>[44]</sup> Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion wird von der EF-Hand durch sieben koordinative Bindungen über Sauerstoffatome gebunden. Dieses Motiv wurde erstmals für das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Muskelprotein Parvalbumin beschrieben.<sup>[45]</sup>

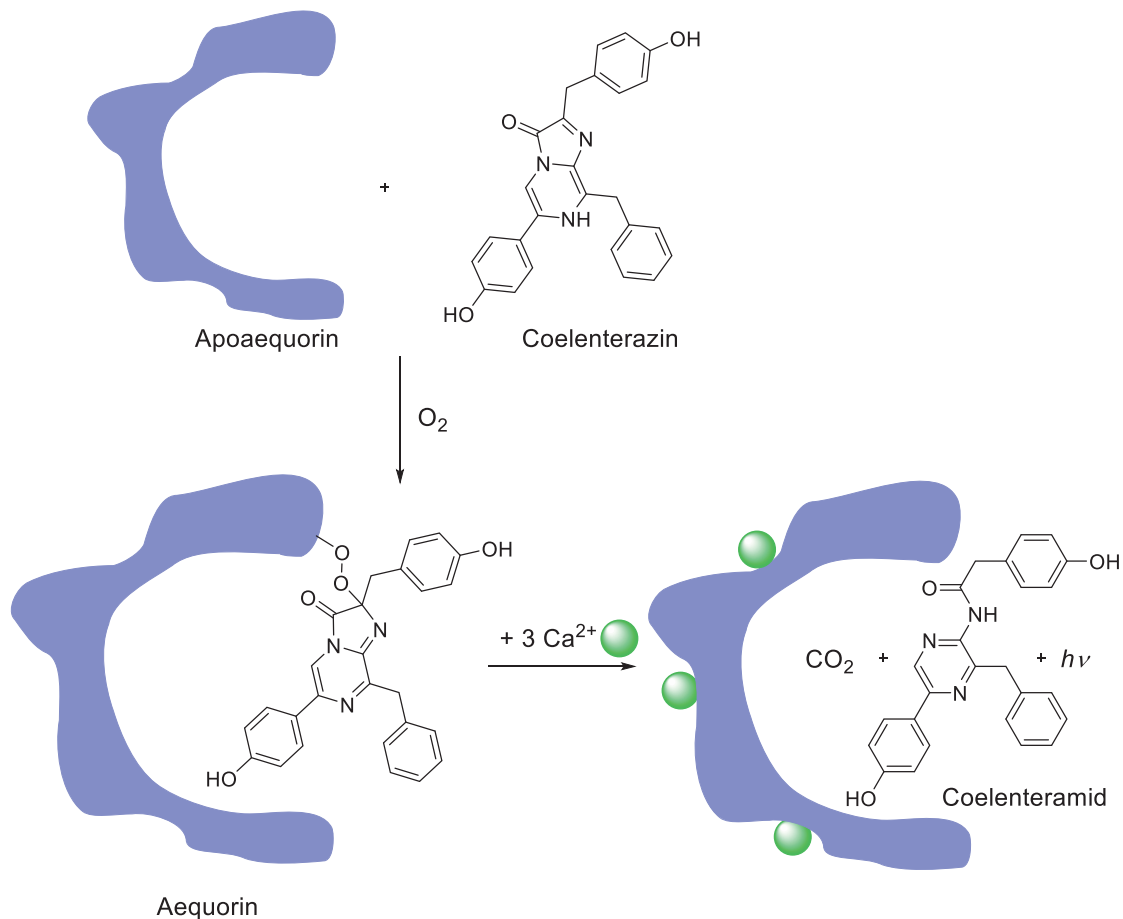
Das CaM wird aktiviert, wenn die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol auf über 500 nM ansteigt. Es besitzt vier EF-Hand-Motive, die jeweils ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion binden können (Abbildung 1.2, rechts). Durch die Komplexbildung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen kommt es zu einer strukturellen Änderung des Proteins, wodurch hydrophobe Oberflächen freigelegt werden und somit zusätzliche Bindungsstellen für weitere Proteine zur Verfügung stehen.<sup>[12]</sup> Durch den CaM- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplex werden z. B. Enzyme wie die Adenylat- und Guanylat-Cyclasen zur Bildung von cAMP und cGMP, die NO-Synthetase, die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen und die NAD-Kinase zur Synthese von NADP aktiviert.<sup>[46]</sup> Ein weiteres bekanntes Beispiel ist die Aktivierung der Calcium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II, die in den Nervenzellen den Energiestoffwechsel sowie die Generierung und Freisetzung von Neurotransmittern reguliert.<sup>[47,48]</sup>



Weitere bekannte  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine sind Troponin C<sup>[49]</sup>, welches eine wichtige Rolle bei der Muskelkontraktion spielt, und das biolumineszierende Photoprotein Aequorin aus der Qualle *Aequorea victoria*.<sup>[50]</sup> Aequorin besteht aus dem Apoprotein Apoaequorin mit insgesamt drei Calcium-bindenden EF-Hand-Motiven und dem organischen Kofaktor Coelenterazin als Chromophor.<sup>[51]</sup> Bei der Komplexierung von drei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an das Aequorin ändert sich die Konformation des Proteins und das Coelenterazin wird durch eine intramolekulare Reaktion zu Coelenteramid oxidiert, was in einer Emission von blauem Licht (465 nm) resultiert (Schema 1.1).<sup>[52]</sup> Aufgrund dieser Eigenschaft war Aequorin einer der ersten Calcium-Sensoren, die verwendet wurden, um intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zu untersuchen.<sup>[53–55]</sup> Heutzutage dienen vor allem kleine chemische Moleküle als Calcium-Sensoren, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden.



**Abbildung 1.2** Links: EF-Hand Motiv mit der typischen Helix-Loop-Helix Struktur. Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion (grüne Kugel) wird von Aminosäuren über Sauerstoffatome komplexiert. Rechts: Kristallstruktur des Calmodulins mit vier EF-Hand Motiven, die jeweils ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion gebunden haben. Abbildung entnommen aus BURGOYNE.<sup>[35]</sup>



**Schema 1.1** Schematische Darstellung der Oxidation von Coelenterazin zu Coelenteramid durch das Protein Aequorin.

### 1.3 Fluoreszierende Calcium-Sensoren

Aufgrund der großen Bedeutung von intrazellulärem Calcium in biologischen Prozessen wurden zahlreiche Methoden zur Analyse der  $Ca^{2+}$ -Aktivität in Zellen entwickelt. Eine weit verbreitete und am häufigsten verwendete Methode ist der Einsatz von chemisch synthetisierten, fluoreszierenden Calcium-Sensoren. Diese ändern in Anwesenheit von Calcium-Ionen ihre optischen Eigenschaften wie z. B. durch Erhöhung der Fluoreszenzintensität oder Verschiebung der Emissions- oder Absorptionswellenlänge. Ein weiteres wichtiges Kriterium ist, dass der Sensor eine hohe Selektivität gegenüber  $Ca^{2+}$ -Ionen aufweisen muss und gegenüber anderen Ionen wie z. B.  $Mg^{2+}$  keine oder sehr geringe Empfindlichkeiten zeigen darf. Fast alle modernen Calcium-Sensoren sind Derivate von Bis(o-aminophenoxy)-ethan- $N,N,N',N'$ -



tetraessigsäure (BAPTA) (siehe Abschnitt 1.3.1), einem selektiven Calcium-Chelator.

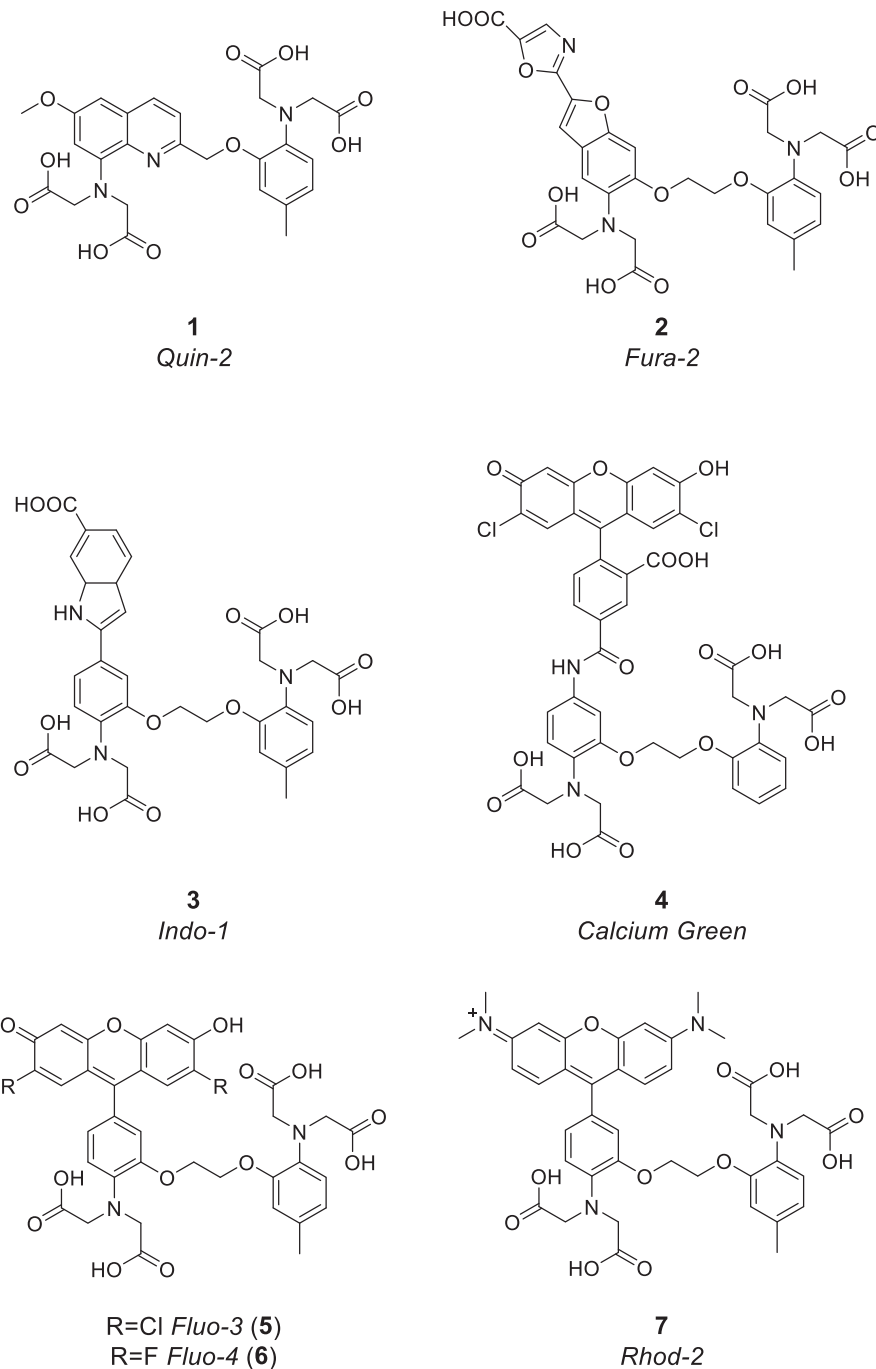
*Quin-2* (**1**) war der erste von TSIEN *et al.* entwickelte auf BAPTA basierende Calcium-Sensor, der für biologische intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen eingesetzt wurde (Abbildung 1.3).<sup>[56,57]</sup> Nach einer Anregung bei 365 nm zeigt **1** einen fünf bis sechsfachen Anstieg der Emission bei der Komplexierung von Calcium-Ionen. Allerdings wird **1** heutzutage aufgrund des kleinen Extinktionskoeffizienten, der geringen Quantenausbeute und der hohen Photobleichung kaum verwendet.<sup>[58]</sup>

Seit der Einführung von *Quin-2* wurde eine Vielzahl an fluoreszierenden Calcium-Sensoren entwickelt.<sup>[59–64]</sup> Eine generelle Einteilung kann in ratiometrische und nicht-ratiometrische Sensoren erfolgen. Ratiometrische Sensoren weisen in Abhängigkeit von der  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen oder ungebundenen Form eine Verschiebung des Emissions- oder Absorptionsmaximums mit einer gleichzeitigen Erhöhung der Signalintensität auf.<sup>[65]</sup> Die Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen wird demzufolge als Änderung im Verhältnis (Ratio) der Fluoreszenz gemessen. Ein populärer ratiometrischer Calcium-Sensor ist *Fura-2* (**2**).<sup>[61,66,67]</sup> Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ungebundene Form von **2** weist ein breites Absorptionsspektrum von 300–400 nm mit einem Maximum bei ungefähr 370 nm auf. Bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexierung steigt die Intensität des Absorptionsmaximums und verschiebt sich zu kürzeren Wellenlängen (340 nm) (Abbildung 1.4, links). Wird der Sensor **2** bei 340 nm angeregt, steigt folglich die Emissionsintensität bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexierung, während ein Abnehmen der Emissionsintensität bei einer Anregung mit 380 nm beobachtet wird. Nach einer schnellen nacheinander folgenden Anregung bei 340 und 380 nm kann das Verhältnis der jeweiligen Fluoreszenzsignale für die Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verwendet werden.<sup>[68]</sup> Die Emission wird dabei konstant bei 510 nm gemessen. Im Gegensatz dazu zeigt *Indo-1* (**3**) (Abbildung 1.3) eine Verschiebung und Zunahme des Emissionsmaximums von 485 nm auf 410 nm bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexierung, während das Absorptionsmaximum (338 nm) unverändert bleibt (Abbildung 1.4, rechts).<sup>[61,69]</sup>

Der Vorteil von ratiometrischen Messungen ist, dass das Verhältnis der Emissionssignale nicht von der Änderung der Sensorkonzentration, resultierend aus dem Ausschleusen des Sensors aus der Zelle oder der



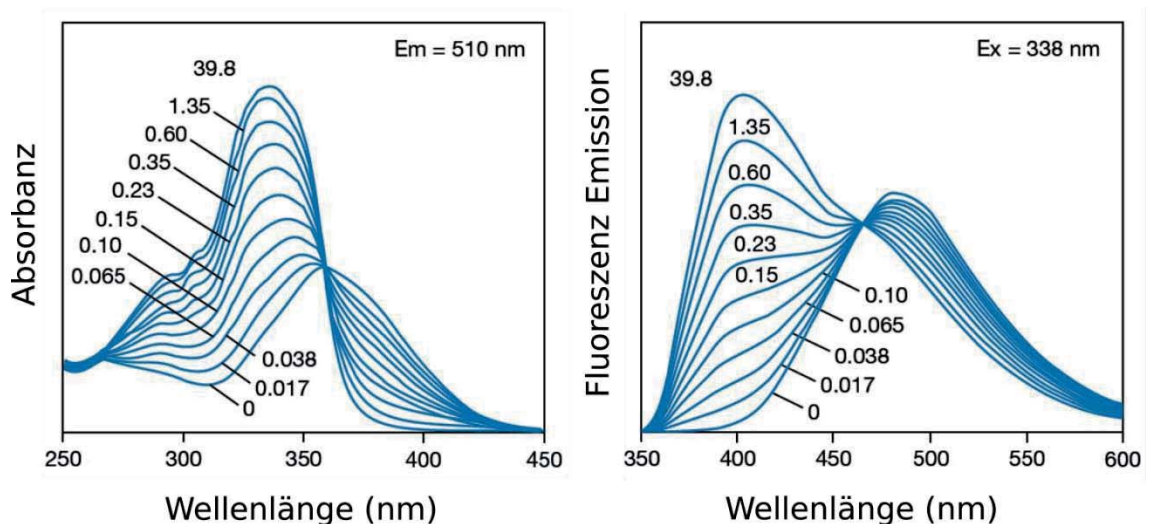
Photobleichung, abhängig.<sup>[68]</sup> Ein Nachteil ist, dass die ratiometrischen Sensoren mit UV-Licht angeregt werden, welches eine zellschädigende Wirkung hat.



**Abbildung 1.3** Übersicht über die populärsten Calcium-Sensoren. *Quin-2* (1), *Fura-2* (2) und *Indo-1* (3) gehören zu den ratiometrischen Calcium-Sensoren und werden im UV-Bereich angeregt. *Calcium Green* (4), *Fluo-3* (5), *Fluo-4* (6) und *Rhod-2* (7) sind nicht-ratiometrische Sensoren, die im sichtbaren Bereich absorbieren bzw. emittieren.



Nicht-ratiometrische Sensoren basieren hauptsächlich auf BAPTA und Fluorescein- und Rhodamin-Derivaten als Fluorophor. Folglich findet die Anregung und Emission im sichtbaren Wellenlängenbereich statt. Bekannte Beispiele sind *Calcium Green* (4)<sup>[70]</sup>, *Fluo-3* (5), *Fluo-4* (6) und *Rhod-2* (7) (Abbildung 1.3).<sup>[62]</sup> Die Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgt dabei direkt aus der Änderung der Fluoreszenzintensität, welche sich bei der Komplexbildung von Calcium-Ionen erhöht. Dadurch ist die Interpretation der Messungen simpler als bei ratiometrischen Messungen, allerdings spielt die gleichmäßige Verteilung des Sensors in der Zelle eine größere Rolle. Die genaue Funktionsweise und Calcium-Affinität von nicht-ratiometrischen Sensoren wird in den Abschnitten 1.3.2 und 1.3.3 behandelt.

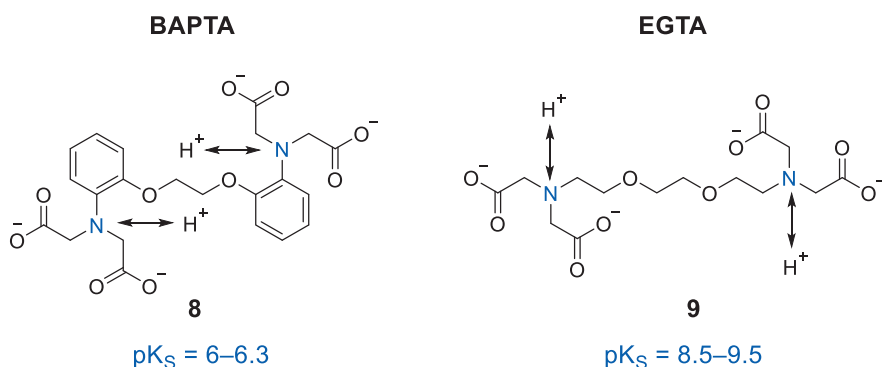


**Abbildung 1.4** Links: Absorptionsspektrum von *Fura-2* (2), rechts: Fluoreszenzspektrum von *Indo-1* (3) in Abhängigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0–39.8  $\mu\text{M}$ .<sup>[71]</sup>

### 1.3.1 BAPTA als Calcium Chelator

Die Entwicklung von BAPTA durch ROGER Y. TSIEN hat die Forschung an intrazellulärem Calcium weit vorangebracht.<sup>[11]</sup> Die Struktur von BAPTA ist ähnlich zu dem Chelator Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (EGTA) und bietet aufgrund der tertiären Amine erhebliche Vorteile für die Calcium-Komplexierung (Abbildung 1.5). Zwar hat EGTA, genauso wie BAPTA, eine höhere Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  und  $\text{K}^{+}$ , aber die  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexierung ist im

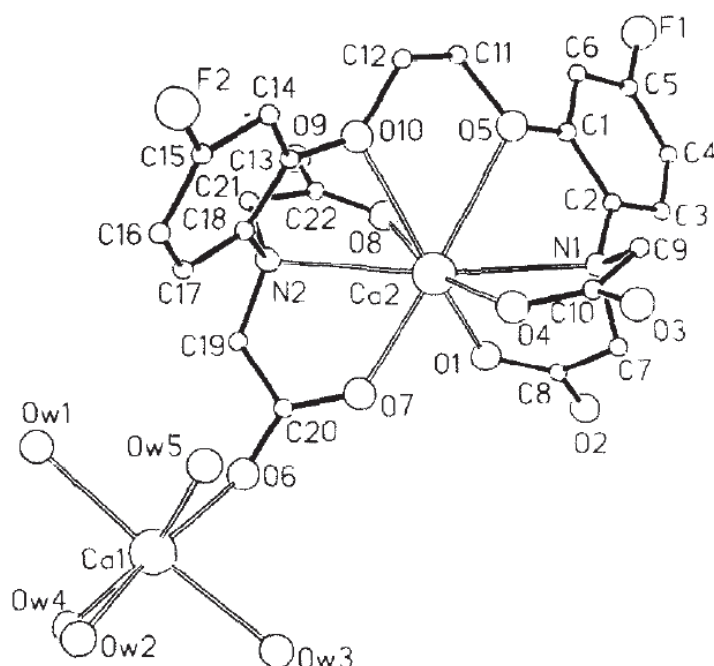
physiologischen Bereich wegen der höheren Basizität der aliphatischen Stickstoffatome stark pH-abhängig.<sup>[72]</sup> Die aliphatischen Amine von EGTA haben pK<sub>s</sub>-Werte zwischen 8.5–9.5 während die pK<sub>s</sub>-Werte von BAPTA zwischen 6–6.3 liegen. Durch die geringeren pK<sub>s</sub>-Werte liegen die tertiären Amine von BAPTA im physiologischen pH-Bereich deprotoniert vor und sind unempfindlich gegenüber geringen Änderungen des pH-Werts. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Calcium Aufnahme und Abgabe bei BAPTA schneller erfolgt. Beim EGTA liegen die aliphatischen Amine bei pH = 7 protoniert vor, so dass erst die Protonen dissoziieren müssen bevor Ca<sup>2+</sup> aufgenommen werden kann. Die Aufnahme erfolgt dabei um zwei bis drei Größenordnungen langsamer als bei unblockierten Liganden.<sup>[72]</sup>



**Abbildung 1.5:** Vergleich der Calcium-Chelatoren BAPTA und EGTA.

Angeht die oben genannten Vorteile basiert der größte Teil der heutzutage verwendeten Calcium-Sensoren auf BAPTA. Die Calcium-Affinität dieser Sensoren kann durch Modifizierung des aromatischen BAPTA-Gerüsts mit elektronenziehenden bzw. -schiebenden Gruppen beeinflusst werden. Bei der Substitution mit elektronenschiebenden Gruppen wie z. B. einer Methylgruppe wird die Calcium-Affinität verstärkt. Bei einer elektronenziehenden Gruppe wie F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> oder NO<sub>2</sub><sup>-</sup> wird die Calcium-Affinität verringert.<sup>[73]</sup>

Die Struktur des Ca<sup>2+</sup>-BAPTA-Komplexes wurde von GERIG *et al.* anhand des 5,5-difluorierten BAPTA-Derivats aufgeklärt.<sup>[74]</sup> Dabei konnte anhand der Kristallstruktur (Abbildung 1.6) gezeigt werden, dass Ca<sup>2+</sup> achtfach koordiniert vorliegt. Demnach wird ein Ca<sup>2+</sup>-Ion durch die vier Carboxylgruppen, die beiden Sauerstoffatome der Ethylenglycolbrücke und die beiden Stickstoffatome komplexiert.



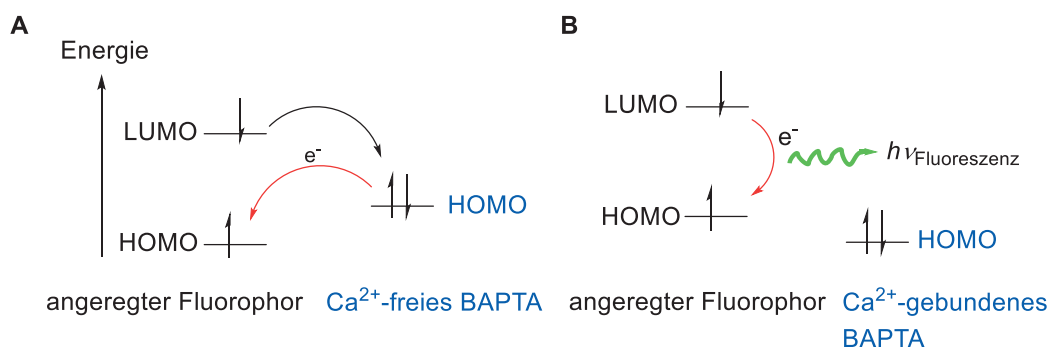
**Abbildung 1.6** Kristallstruktur des 5,5-difluorierten BAPTA. Ein dezentrales  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion ( $\text{Ca1}$ ) liegt sechsfachkoordiniert durch ein Carboxylsauerstoff und fünf  $\text{H}_2\text{O}$  vor.<sup>[74]</sup>

### 1.3.2 Funktionsweise nicht-ratiometrischer Calcium-Sensoren

Der Mechanismus, der dem Anstieg der Fluoreszenz bei der Komplexierung von Calcium-Ionen von BAPTA-basierenden nicht-ratiometrischen Sensoren zugrunde liegt, wird als Photoinduzierter Elektronentransfer (PET-Mechanismus) bezeichnet.<sup>[10,75–77]</sup> PET-Sensoren kombinieren eine Elektronen-donierende Gruppe, im Fall von BAPTA Anilin, mit dem konjugierten, aromatischen System des Fluorophors. Durch die Anregung des Fluorophors mit elektromagnetischer Strahlung erfolgt der Übergang eines Elektrons aus dem *highest occupied molecular orbital* (HOMO, engl.) in das *lowest unoccupied molecular orbital* (LUMO, engl.) des Fluorophors. In der Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen hat BAPTA aufgrund der Konjugation mit dem Elektronenpaar des Stickstoffs eine hohe Elektronendichte. Dadurch liegt das HOMO des BAPTA energetisch höher und gibt ein Elektron an den Fluorophor ab, wodurch die Lücke im HOMO des Fluorophors wieder gefüllt wird und eine Fluoreszenzlöschung stattfindet, weil das angeregte Elektron nicht mehr in den Grundzustand relaxieren kann (Abbildung 1.7 A).<sup>[58,78]</sup> Dieser Vorgang wird als PET bezeichnet.

Im Gegensatz dazu kann  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenes BAPTA kein Elektron abgeben, weil das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion zum einen als Lewis-Säure fungiert und die Elektronendichte elektrostatisch anzieht und zum anderen wird durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  das freie Elektronenpaar der Stickstoffatome durch einen sterischen Twist um ca.  $90^\circ$  vom Rest des Moleküls entkoppelt, wodurch die freien Elektronenpaare der Stickstoffatome nicht mehr mit dem BAPTA konjugiert vorliegen.<sup>[58]</sup> Die Folge ist die Erniedrigung der Energie vom HOMO der Donorgruppe wodurch ein Elektronentransfer unterbunden wird. Das Elektron kann so aus dem angeregtem Zustand unter Emission von Licht wieder in den Grundzustand übergehen (Abbildung 1.7 B).

Der PET-Mechanismus und die damit verbundene Fluoreszenzlöschung ist umso effizienter je kürzer die Verlinkung zwischen dem Fluorophor und dem BAPTA ist. Deswegen zeigen Sensoren wie *Fluo-4* und *Rhod-2*, bei welchen die Verlinkung zwischen BAPTA und dem Fluorophor nur aus einer Bindung besteht, die geringste Quantenausbeute bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Form und drastische Erhöhung der Fluoreszenz bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexierung.<sup>[78]</sup>



**Abbildung 1.7** Energiediagramme zur Erklärung des Fluoreszenzanstiegs bei BAPTA-basierenden Calcium-Sensoren. **A:** In der Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  findet eine Fluoreszenzlöschung durch das BAPTA aufgrund des PETs statt. **B:** Wenn  $\text{Ca}^{2+}$  an BAPTA gebunden ist, ist der PET energetisch nicht mehr vorteilhaft. Abbildung modifiziert nach TSIEN.<sup>[73]</sup>

### 1.3.3 Calcium-Affinität nicht-ratiometrischer Calcium-Sensoren

Um quantitative  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen durch Fluoreszenzintensitätsmessungen zu bestimmen, muss eine Kalibrierung erfolgen.<sup>[65]</sup> Eine der wichtigsten Betrachtungen ist hierbei die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsaffinität, die sich in der Dissoziationskonstante  $K_D$  des  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensors-Komplexes



widerspiegelt. Dabei beschreibt  $K_D$  den Zerfall eines Komplexes in die einzelnen Bestandteile. Im Falle vom Calcium-Sensor-Komplex zu den Calcium-Ionen und dem freien Sensor:



Aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich folglich für  $K_D$ :

$$K_D = \frac{[\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{Sensor}]}{[\text{Ca}^{2+} - \text{Sensor} - \text{Komplex}]}$$

Je kleiner die Dissoziationskonstante ist, desto stabiler ist der gebildete Komplex. Die zu bestimmende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sollte innerhalb des Bereichs  $0.1$  bis  $10 \times K_D$  liegen.<sup>[65]</sup> Idealerweise liegt die Dissoziationskonstante nah an der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.<sup>[79]</sup> Wenn  $K_D$  zu groß ist, bleibt der Calcium-Sensor insensitiv gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Bei einem zu kleinem  $K_D$  und einer hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration würde es zu einer Sättigung des Sensors und damit zu ungenauen Messergebnissen kommen. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante erfolgt in den meisten Fällen durch eine *in vitro* Kalibrierung. Dazu werden Fluoreszenzkurven bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA-Puffer durchgeführt.<sup>[65]</sup> Die Calcium-Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]$  hängt dabei folgendermaßen von der Dissoziationskonstante  $K_D$  ab:<sup>[80]</sup>

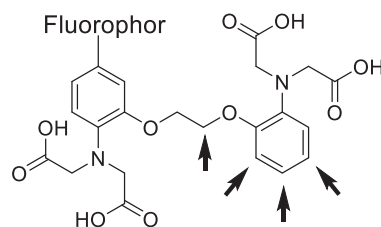
$$[\text{Ca}^{2+}] = K_D \frac{(F - F_{\min})}{(F_{\max} - F)}$$

$F$  ist die experimentell gemessene Fluoreszenzintensität bei der jeweiligen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration,  $F_{\min}$  die Fluoreszenzintensität bei der Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und  $F_{\max}$  die Intensität bei der Konzentration des an  $\text{Ca}^{2+}$  gesättigten Sensors. Der  $K_D$ -Wert hängt stark von den Umgebungsbedingungen ab. Dazu gehören Temperatur, pH-Wert, Viskosität, ionische Stärke und andere Metallionen.<sup>[70,81-83]</sup> Deswegen kann sich der *in vitro* bestimmte  $K_D$ -Wert von dem tatsächlichen  $K_D$ -Wert in den Zellen unterscheiden.<sup>[65]</sup>

## 1.4 Kriterien und Designstrategien neuer Calcium-Sensoren

Die meisten heutzutage kommerziell erhältlichen Fluorophore enthalten eine Funktionalität, die es erlaubt Peptide, Proteine, Oligonukleotide, Lipide und andere Biomoleküle zu markieren, um biologische Prozesse fluoreszenzmikroskopisch untersuchen zu können. Zu den Funktionalitäten gehören z. B. Azide und Alkine, die durch eine 1,3-dipolare Cycloaddition (HUISGEN-Reaktion) addiert werden oder Amine und Carboxylgruppen, welche durch eine Amidbindung an das Biomolekül gekoppelt werden können.<sup>[5]</sup> Funktionalisierte Calcium-Sensoren sind bisher nicht kommerziell erhältlich. Das Ziel dieses Projektes ist es, Calcium-Sensoren zu entwickeln, die einen Linker mit einer Funktionalität enthalten, so dass der Sensor durch eine effiziente chemische Reaktion mit weiteren Molekülen verknüpft werden kann. Die Sensoren sollen auf BAPTA (siehe Abschnitt 1.3.1) basieren wobei der Linker die Fluoreszenz-eigenschaften und Calcium-Komplexierung nicht beeinflussen darf.

Auf BAPTA basierende Calcium-Sensoren bestehen aus einem aromatischen System mit vier Carboxylgruppen als Calcium-Chelatoren und einem Fluorophor. Für die Position des zusätzlichen Linkers sind demzufolge zwei Möglichkeiten denkbar, die keinen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatisierung haben sollten. Die erste Möglichkeit wäre die Anbringung des Linkers an der Ethylenglycolbrücke und die zweite an den Aromaten. Dabei sollte sich der Linker möglichst weit entfernt von den chelatisierenden Gruppen und dem Fluorophor befinden. Die bevorzugten Positionen sind in Abbildung 1.8 dargestellt.

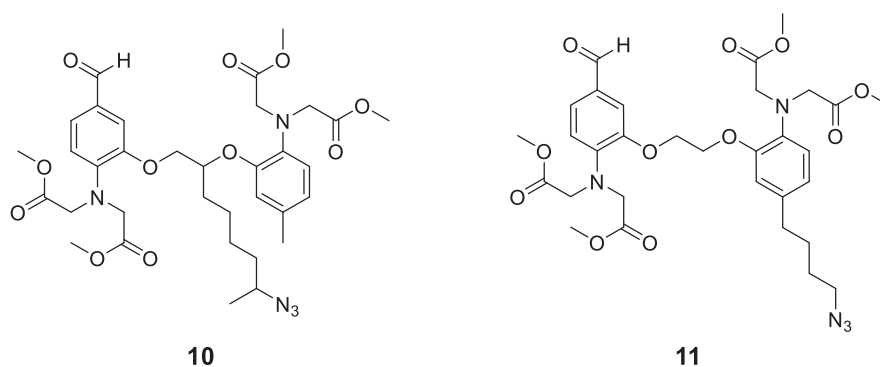


**Abbildung 1.8** Struktur eines auf BAPTA basierenden Calcium-Sensors. Die bevorzugten Positionen zur Modifikation mit einem Linker sind mit Pfeilen markiert.



Zielmoleküle sind zwei verschiedene BAPTA-Derivate, die als Vorstufen für die Calcium-Sensoren gewählt wurden. Das BAPTA-Derivat **10** wurde von MALLETT *et al.* beschrieben und enthält einen Azid-Linker an der Ethylenglycolbrücke (Abbildung 1.9, links).<sup>[84,85]</sup>

Das BAPTA-Derivat **11** wurde im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelt. Als Kupplungsreaktion wurde die HUISGEN-Reaktion gewählt, da diese viele Vorteile bietet.<sup>[8,86,87]</sup> Die Reaktion ist schnell und quantitativ, kann in Wasser ablaufen und ist unempfindlich gegenüber dem pH-Wert. Außerdem ist sie stark selektiv, weil die Reaktion nur zwischen einem Alkin und Azid abläuft. Als Funktionalität wurde ebenfalls eine Azidfunktionalität gewählt, welche über eine *n*-Butylgruppe mit dem aromatischen System verbunden ist (Abbildung 1.9, rechts). Eine Azidfunktion hat dabei im Gegensatz zu einem Alkin mehrere Vorteile. Zum einen sind Azide resistent gegenüber Hydrierungen, die bei der Synthese der BAPTA-Derivate unumgänglich sind, zum anderen können Azide mit einem geeigneten Reduktionsmittel zu Aminen reduziert werden. Dadurch kann der Sensor nicht nur über die HUISGEN-Cycloaddition an Alkine gekuppelt werden, sondern auch über eine Peptidbindung zwischen dem Amin und einer aktivierten Säuregruppe z. B. eines NHS-Esters.



**Abbildung 1.9** Strukturen der geplanten BAPTA-Derivate als Calcium-Sensor-Vorstufen. Das BAPTA-Derivat **10**<sup>[84,85]</sup> enthält einen Azid-Linker an der Ethylenglycolbrücke und das BAPTA-Derivat **11** einen Azid-Linker am aromatischen Ringsystem.