

Diss. ETH Nr. 8128

ENTWICKLUNG PHOTOAKTIVIERBARER  
FLUORESZIERENDER REAGENZIEN  
ZUR MARKIERUNG  
HYDROPHILER INTRAZELLULÄRER PHASEN

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von  
Peter Andreas Huber  
Dipl. Natw. ETH  
geboren am 15. April 1958  
von Zürich

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. G. Semenza, Referent  
Prof. Dr. H.M. Eppenberger, 1. Korreferent  
PD Dr. J. Brunner, 2. Korreferent



Zürich 1986

ADAG Administration & Druck AG

Diss ETH 8128



Meinen Eltern

# I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

---

	Seite
1. EINLEITUNG	
1.1. Allgemeines	1
1.2. Problemstellung	8
1.3. Zielsetzung	11
2. ABKUERZUNGEN	13
3. MATERIAL, METHODEN UND SYNTHESEN	
3.1. Material	14
3.2. Methoden	15
3.2.1. Präparation von Erythrocytenmembranen	15
3.2.2. Hemmung des Anionentransporters mit DIDS	16
3.2.3. Messung der Lucifer Yellow Aufnahme	16
3.2.4. Photolyseexperimente	17
3.2.5. Bestimmung von Einbauraten	19
3.2.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	20
3.2.7. Proteinbestimmungen	21
3.2.8. Fluoreszenzmikroskopie	22
3.2.9. Elektronenmikroskopie	23
Markierung mit kolloidalem Gold	23
Gefrierfixation	23
Gefrierbruch und Gefriertrocknung	24
Rasterelektronenmikroskopie	24
Transmissionselektronenmikroskopie	25

3.3. Synthesen	26
3.3.1. Allgemeines	27
3.3.2. Synthese von Lucifer Yellow CH	27
3.3.3. Synthese von NAP-Lucifer Yellow	29
3.3.4. Synthese von Diazirin-Lucifer Yellow	31
4. RESULTATE	
4.1. Syntheseplanung	36
4.2. Kommentare zu den Synthesen	42
4.2.1. Synthese von Lucifer Yellow CH	42
4.2.2. Synthese von NAP-Lucifer Yellow	44
4.2.3. Synthese von Diazirin-Lucifer Yellow	46
4.3. Bestimmung der Photolysebedingungen	51
4.3.1. NAP-Lucifer Yellow	51
4.3.2. Diazirin-Lucifer Yellow	53
4.4. Markierung von Modellproteinen	56
4.5. Markierung von Erythrocytenmembranen	60
4.5.1. Membrantransport von Lucifer Yellow	60
4.5.2. Charakterisierung durch SDS-PAGE	62
4.5.3. Fluoreszenzmikroskopie	66
4.5.4. Elektronenmikroskopie	70

5. DISKUSSION	
5.1. Synthese von Lucifer Yellow und seinen Derivaten	78
5.2. Photolyse von Diazirin-LY, Reaktivität seiner Produkte	79
5.3. Photolyse von NAP-LY	83
5.4. Markierungsexperimente	83
5.5. Anwendungsbereiche der neuen Reagenzien	88
5.6. Ausblick	90
6. ZUSAMMENFASSUNG	92
7. SUMMARY	94
8. LITERATURVERZEICHNIS	96
9. LEBENSLAUF	105

## 1. EINLEITUNG

---

### 1.1. Allgemeines

Die Zellen eines vielzelligen Organismus, aber auch Mikroorganismen, sind von einem wässrigen Medium umgeben, das viele tausend Bestandteile aufweist, die meisten davon in äusserst geringen Konzentrationen. Darunter befinden sich zelluläre Bausteine, wie Aminosäuren und Vitamine, von denen alle von jeder Zelle in gewissen Mengen und zu bestimmten Zeiten benötigt werden. Andere Komponenten sind Hormone, die spezielle intrazelluläre Signale auslösen, aber auch Abfallprodukte oder sogar Giftstoffe, die nur von speziell dafür ausgerüsteten Zellen abgebaut werden können. Jede Zelle muss deshalb mit Mechanismen ausgerüstet sein, die es ihr erlauben, aus dem extrazellulären Medium die erwünschten Substanzen aufzunehmen, den Rest jedoch zurückzuweisen. Dieser Filter ist die Plasmamembran, welche die Zelle umgibt und ihren Stoffaustausch mit dem Medium und jeder anderen Zelle des Organismus kontrolliert.

Wie alle biologischen Membranen besteht das Plasmalemma aus einer Lipiddoppelschicht in welcher Proteine eingelagert sind. Diese Proteine haben einen breiten Bereich von Fähigkeiten und Funktionen, beispielsweise die Erleichterung der selektiven Aufnahme von spezifischen wasserlöslichen Substanzen durch die sonst undurchlässige Lipiddoppelschicht. Ionen und kleine wasserlösliche Moleküle wie Aminosäuren und Zucker werden aktiv oder passiv durch spezialisierte Poren oder Transportproteine aufgenommen. Makromoleküle, grosse Komplexe und speziell ausgezeichnete Verbindungen dagegen werden durch einen anderen Prozess in die Zelle hinein-

gebracht, der Endocytose genannt wird. Dieser Mechanismus ist zeit-, temperatur- und energieabhängig und kann biochemisch in drei Klassen gegliedert werden. Diese Unterscheidung hängt von der Art der Interaktion zwischen der Zelloberfläche und dem aufzunehmenden Molekül ab:

- Rezeptor abhängige Endocytose setzt die Wechselwirkung zwischen dem zu internalisierenden Liganden und einem Rezeptor auf der Zelloberfläche voraus. Dieser Rezeptor bindet eine bestimmte Komponente des Mediums, auch wenn diese nur in sehr kleinen Konzentrationen und in einem riesigen Ueberschuss nicht verwandter Moleküle vorkommt. Die Bindung löst dann eine Invagination der Membran aus (coated pit), die zur Bildung von Vesikeln (coated vesicles) führt, welche den so eingeschlossenen Liganden mit sich in die Zelle schleusen.
- Pinocytose setzt keine Bindung der aufzunehmenden Moleküle an die Zellmembran voraus. Sie resultiert in einer unspezifischen Aufnahme extrazellulärer Flüssigkeit. Kleinste Tröpfchen werden von einem eingestülpten Stück Plasmamembran umgeben und in einem Vesikel aufgenommen, wobei alle im Medium gelösten Ionen und kleinen Moleküle in ihrer ursprünglichen Konzentration mitgeführt werden.
- Ein dritter, verwandter Aufnahmemechanismus ist die Phagocytose. Dabei binden sehr grosse Partikel (opsonisierte Bakterien, hochmolekulare Komplexe) an die Zelloberfläche und lösen eine Expansion der Membran um das Objekt herum aus. Dieses wird dann in einem taschenartigen Vesikel, das mehrere Mikrometer Durchmesser haben kann, in die Zelle inkorporiert und abgebaut.

Allen Klassen von Endocytose gemeinsam ist die Tatsache, dass beim Abschnüren der Vesikel neben erwünschten Bestand-



teilen auch alle Ionen und kleinen Moleküle, welche in diese eingeschlossen werden, mit in die Zelle gebracht werden, eine Tatsache, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit noch wichtig sein wird.

Die Funktionen der Endocytose sind vielfältig. Wie bereits erwähnt ist die Endocytose sicherlich bei der Bereitstellung von makromolekularen Nährstoffen beteiligt, wie dies besonders eindrücklich am Beispiel der Amöben (Weisman & Korn, 1967) und der Schleimpilze, welche ganze Bakterien phagocytieren, gezeigt werden konnte. Daneben dient die Endocytose auch der Aufnahme von kleinen Aufbaustoffen wie Eisen (Hemmaplardh & Morgan, 1976; Karin & Mintz, 1981), Vitamin B12 (Newmark et al., 1970) oder Cholesterin (Anderson et al., 1977) in die tierische Zelle.

Endocytose spielt auch eine Rolle in der Hormonantwort, da zahlreiche Hormon-Rezeptor Komplexe auf diese Weise internalisiert werden (Goldstein et al., 1977).

Daneben ist dieser Mechanismus ein wichtiger Bestandteil des Membranverkehrs, der zum Beispiel als indirekte Folge von Hormonwirkungen zu beobachten ist. So scheint die Regulation von Hexose Transportern durch Insulin auf diese Weise gesteuert zu werden. Sie werden je nach metabolischem Zustand ins Plasmalemma eingebaut oder durch Endocytose internalisiert und in intrazellulären Vesikeln gespeichert (Lienhard, 1985; Karnielli et al., 1981; Gibbs et al., 1986). Diese Art der Aufnahme spielt mit Sicherheit auch bei der Entfernung von unerwünschten oder fremden Proteinen aus der Blutbahn und im Immunsystem (Makrophagen) eine zentrale Rolle.

Die Endocytose ist wahrscheinlich auch von grosser Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Membranzusammensetzung, da viele Zellen durch die Ausschüttung von Vesikeln Stoffe sekretieren, ohne dabei ihre Zelloberfläche zu vergrössern. Dies ist nur möglich, wenn sie die Membranteile, die dabei mit dem Plasmalemma fusionieren, wieder von der Zell-

oberfläche entfernen können. Ein besonders offensichtliches Beispiel für dieses Problem ist die regulierte Sekretion an Nervenendigungen (Reichhardt & Kelly, 1983). Daneben ist die Endocytose der Weg, über den Bakterien und viele Hüllviren (Helenius et al., 1980) eine Zelle infizieren und dient auch als Möglichkeit zum Eindringen von Toxinen in die Zelle (Draper & Simon, 1980; Sandvig & Olsnes, 1981).

In Säugetierzellen haben vor allem mikroskopische Untersuchungen von Rezeptor abhängiger Endocytose und Pinocytose zu einem vorläufigen, aber nicht unumstrittenen Verständnis der Morphologie dieser Vorgänge geführt (Goldstein et al., 1979; Helenius et al., 1983; Pastan & Willingham, 1983).

Noch grösser ist die Ungewissheit über die an diesen Vorgängen beteiligten Proteine. Zudem bestehen zum Beispiel widersprüchliche Ansichten bezüglich der Zusammensetzung der vom Plasmalemma abgeleiteten intrazellulären Membranen. Während Burnside & Schneider (1982) und Oshumi et al. (1983) Unterschiede feststellten, fanden Muller et al. (1983) für die Phagolysosomen- und die Plasmamembran die gleichen Proteine.

Ebenso unklar erscheint die Rolle der Endosomen, des Kompartimentes also, in welches die endocytischen Vesikel ihren Inhalt abgeben. Insbesondere interessiert die Frage, ob es sich dabei um stabile Organellen handelt, die mit den sekundären Lysosomen über kleine Vesikel in Verbindung stehen (vesicle shuttle model) oder ob es sich dabei um intermediäre Stufen handelt, die sich selbst zu Lysosomen weiterentwickeln (maturation model).

Daneben wirft vor allem die Art und Weise des Rücktransportes der Membranen an die Zelloberfläche Fragen auf: Wie wird dabei die Abtrennung der pinocytischen Vesikel von ihrem Inhalt bewerkstelligt? Wie ist die Sekretion mit diesen Systemen gekoppelt? Probleme dieser Art können nur mit Experimenten angegangen werden, die sowohl qualitative morphologische, als auch quantitative Informationen liefern.

Einen möglichen Weg zu diesem Ziel stellt die Einführung von Markermolekülen in die Zelle dar. Das ideale Molekül für solche Studien sollte gut löslich sein, die Membran nicht durchdringen können, nicht metabolisiert werden, keine zellulären Aktivitäten modulieren und keine Bindungsaffinität zur Plasmamembran haben. Im weiteren sollte es sowohl im Fluoreszenz-, als auch im Elektronenmikroskop einfach zu visualisieren sein und die Quantifizierung müsste mit hoher Genauigkeit und Sensitivität auf dem Niveau der Einzelzelle aber auch ganzer Populationen möglich sein.

Viele Substanzen befriedigen mindestens einige dieser Anforderungen. Radioaktiv markierte Proteine, Saccharose (Besterman et al., 1981), Inulin und Polyvinylpyrrolidon sind benützt worden um die Pinocytose zu quantifizieren. Allerdings können diese Stoffe intrazellulär nicht direkt sichtbar gemacht werden. Ein zusätzliches Problem ist, dass die meisten Proteine in den Lysosomen relativ rasch abgebaut werden und dass Saccharose eine osmotische Schwellung der sekundären Lysosomen verursacht. Kolloidales Gold auf der anderen Seite ist sehr nützlich als ultrastruktureller Marker, aber seine Aufnahme ist schwierig zu messen und unspezifische Bindung kann nicht völlig ausgeschaltet werden. Solche Probleme können mit der Verwendung von Fluorescein markierten Dextranen (Davis, 1983) zwar umgangen werden, dafür bleiben bei dieser Substanz der komplizierte Nachweis im EM und das rasche Ausbleichen der Fluoreszenz entscheidende Nachteile. Die Verwendbarkeit von Radieschenperoxydase (HRP) (Steinman et al., 1976) ist ebenfalls durch mehrere Umstände eingeschränkt: Sie wird durch Makrophagen, die Mannose Rezeptoren aufweisen, gebunden, was zu absorptiver (d. h. rezeptorabhängiger) Endocytose führt (Sung et al., 1983). Der Marker nimmt in diesem Falle also Einfluss auf den Membranverkehr, was die Beobachtung der natürlicherweise vorkommenden Phänomene erschwert. Auf diese Weise aufgenommene HRP wird zudem direkt zu den Lysosomen

transportiert und dort abgebaut, was die Untersuchung der gekoppelten Exocytose ausschliesst. Schliesslich erlaubt diese Methode keine Beobachtung des Markers in der lebenden Zelle, da diese zu seiner Visualisierung fixiert und aufgeschlossen werden muss. Die gleiche Arbeitsgruppe verwendete zur Analyse der an diesen Vorgängen beteiligten Proteine ein Latex-Peroxydase Iodierungssystem, das allerdings nur für das Studium der Phagozytose von Nutzen ist (Steinman et al., 1981).

In neueren Arbeiten wird das Hauptinteresse auf die in den endocytischen Vesikeln und Lysosomen vorkommenden Proteine gerichtet. Dazu wurden polyklonale Antikörper gegen ganze lysosomale Membranen (Reggio et al., 1984; Lewis et al., 1985), aber auch monoklonale Antikörper gegen ein bestimmtes Protein dieser Membran eingesetzt (Chen et al., 1985; Lippincott-Schwartz & Fambrough, 1986). Dabei wurden zwei stark glykosylierte Proteine identifiziert, denen allerdings noch keine Funktion zugeordnet werden konnte. Auch bei dieser Methode schränkt zudem die Schwierigkeit der Quantifizierung die Anwendbarkeit auf komplexe Probleme ein.

Wesentlich einfacher in der Anwendung und zudem für alle Arten der Endocytose geeignet ist der Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow CH, der erstmals von Miller et al. (1983) zum Nachweis der Pinocytose in Säugetierzellen verwendet wurde. Dieser Farbstoff wurde von Stewart (1981a,b) für neurobiologische Studien entwickelt. Die folgenden Eigenschaften machen Lucifer Yellow CH auch für Untersuchungen des intrazellulären Membranverkehrs besonders attraktiv: Es ist hydrophil, d. h. vor allem als Lithiumsalz sehr gut wasserlöslich und diffundiert deshalb nicht durch Membranen, sondern wird nur durch Endocytose und spezielle Transportsysteme aufgenommen. Es ist ein reiner Fluorophor mit einer sehr hohen Quantenausbeute, was zu einer starken, leicht erkennbaren Fluoreszenz nach der Aufnahme in die Zelle führt. Zudem bleicht es unter Belichtung praktisch nicht

aus, was eine ausgiebige Beobachtung und quantitative Cytofluorometrie wesentlich erleichtert und seine Quantenausbeute ist über einen breiten pH Bereich konstant, was zu vergleichbaren Fluoreszenzintensitäten in Endosomen und azidifizierten Lysosomen führt. Es ist nicht giftig, selbst in Konzentrationen, die viel höher sind, als die zur Markierung von Lysosomen benötigten, und wird in der Zelle nicht abgebaut. Schliesslich ist es auch von relativ kleinem Molekulargewicht, wird deshalb selbst aus nur geringfügig beschädigten Organellen auslaufen und dadurch ungeeignete Präparationsmethoden entlarven. Die Vorteile dieses Farbstoffes konnten in der Anwendung bei Untersuchungen der Pinocytose von Makrophagen (Swanson et al., 1985), kultivierten Nierenzellen (Miller et al., 1983) und *Saccharomyces cerevisiae* (Riezman, 1985a) bestätigt werden.

Im Verlaufe der letzteren Untersuchung stellte sich heraus, dass es einem Bedürfnis entspricht, den in Vesikel eingeschlossenen Farbstoff an die ihn umgebende Membran binden zu können, ergaben sich doch Probleme bei der Präparation für Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie, da bei der Herstellung von Dünnschnitten das kleine Lucifer Yellow Molekül nicht fixiert werden konnte und verloren ging (Riezman, 1985b).

## 1.2. Problemstellung

Um das Auslaufen von Lucifer Yellow aus internalisierten Kompartimenten bei der Präparation für die Mikroskopie zu verhindern, sollten Möglichkeiten gesucht werden, diesen Farbstoff kovalent an die umgebenden Strukturen zu koppeln. Dazu fasste man Mittel und Wege ins Auge, die es erlauben, den Marker unter physiologischen Bedingungen ins biologische System einzuführen und erst dann, zum gewünschten Zeitpunkt an die entsprechenden intrazellulären Membranen zu binden. Aufgrund dieser Forderung war man bei der Evaluation einer geeigneten Derivatisierung eingeschränkt, da es mit konventionellen chemischen Modifizierungsreagenzien (Aryliso-thiocyanate, Carbodiimide, Maleimide; Siegrist & Zahler, 1982) nur schwierig möglich ist, den Zeitpunkt der Reaktion in situ zu kontrollieren, ohne den natürlichen Zustand der Zelle zu verändern. Deshalb entstand der Wunsch, ein geeignetes photoaktivierbares Reagenz zu entwickeln (Bayley, 1983; Brunner, 1986). Derartige Markierungsmoleküle zeichnen sich dadurch aus, dass sie unter physiologischen Bedingungen chemisch inert sind und erst durch die Belichtung mit UV- oder sichtbarer Strahlung zu reaktiven Zwischenstufen zerfallen, welche die gewünschten Zielmoleküle modifizieren. Dies erlaubt es, vorbereitende experimentelle Schritte unter unveränderten Bedingungen durchzuführen, um dann die Reaktion des Photomarkers zum gewünschten Zeitpunkt zu initiieren. Diese Eigenschaft eröffnet vor allem im Hinblick auf die Untersuchung von zeitabhängigen Prozessen vielversprechende Perspektiven, sollte es dadurch doch möglich sein, bestimmte Phasen im intrazellulären Membranzyklus zu fixieren, beteiligte Proteine zu markieren und so den Ablauf dieser Vorgänge zu rekonstruieren. Derartige Marker sind bisher vor allem zur Identifikation von hydrophoben Membranteilen und für die Photoaffinitäts-

markierung verwendet worden. Bei ihrer Entwicklung war man deshalb bestrebt, möglichst reaktive Spezies zu erhalten, die unspezifisch und diffusionskontrolliert mit jenen Molekülen reagieren, die sich im Moment der Belichtung in ihrer unmittelbaren Nachbarschaft befinden. Diese Voraussetzung wird vor allem durch Verbindungen erfüllt, die unter Belichtung zu Carbenen oder Nitrenen zerfallen. Diese beiden hochreaktiven und extrem kurzlebigen Zwischenstufen sind isoelektronische Spezies. Sie besitzen je ein Elektronensextett und zeigen daher mehr oder weniger ausgeprägte Elektrophilie. Aufgrund dieser Charakteristika sind sie für Membrankennzeichnungen von der wässrigen Phase aus nicht geeignet. Sie reagieren augenblicklich auch mit schwachen Nukleophilen in ihrer Umgebung, d. h. auch mit Wasser, was die Modifikation der eigentlichen Zielmoleküle unterdrückt.

Für die hier ins Auge gefasste Versuchsstrategie musste deshalb eine neue Klasse von photoaktivierbaren Reagenzien gesucht werden, die Zwischenstufen von bedeutend tieferer Reaktivität liefern. Dabei kam ein Umstand zu Hilfe, der bei der detaillierten Untersuchung der Photochemie von bekannten Photomarkern beobachtet worden war. Es hatte sich nämlich gezeigt, dass neben den hochreaktiven Spezies durch Isomerisationsreaktionen auch Produkte entstehen, die bedeutend längerlebig, d. h. weniger reaktiv sind und zu gruppenspezifischen Reaktionen führen. Bei Experimenten, für die man bisher solche Reagenzien verwendete, verfälschten diese unerwünschten Modifikationen das eigentliche Markierungsmuster und man versuchte den Effekt dieser Nebenreaktionen zu unterbinden. Da es nicht möglich ist, die Entstehung solcher langlebiger Isomeren auszuschalten, modifizierte man die entsprechenden Vorstufen so, dass diese Nebenprodukte inert wurden und überhaupt keine Reaktivität mehr zeigten (Brunner et al., 1980; Chowdhry et al., 1976).

Für das vorliegende Problem hingegen können die langlebigeren Produkte der Photolyse gezielt benützt werden, indem man

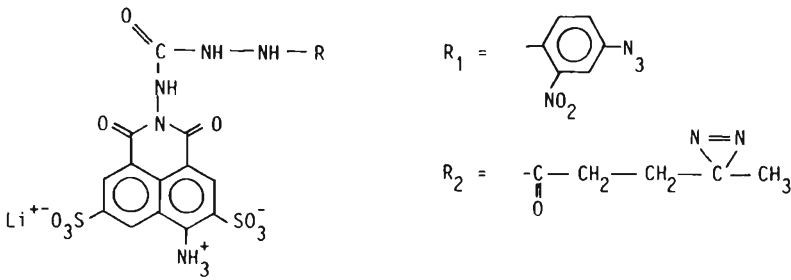
neue photoaktivierbare Gruppen so konzipiert, dass eben solche stabilere Spezies von einer gewünschten intermediären Reaktivität bevorzugt entstehen. Sie sollten langlebig genug sein, um auch in wässrigem Medium eine effiziente Markierung der Zielmoleküle zu gewährleisten, während die bisher relevanten hochreaktiven Produkte sofort intramolekular oder mit schwachen Nukleophilen wie Wasser weiterreagieren und deshalb das erhaltene Markierungsbild nicht stören.

Bei der Auswahl der für diese Zwecke geeigneten Gruppierung aus der reichen Palette bereits gebrauchter (Bayley & Knowles, 1977) und neuer (Church & Weiss, 1970) photoaktivierbarer Verbindungen durften weitere Rahmenbedingungen nicht ausser acht gelassen werden. So musste ihre Photolyse unter Bedingungen ablaufen, die dem biologischen System möglichst keinen Schaden zufügen, das heisst, Belichtung während möglichst kurzer Zeit, mit Licht aus dem sichtbaren oder nahen ultravioletten Bereich. Dieses sollte jedoch nicht mit den Absorptionscharakteristika von Lucifer Yellow interferieren. Zudem sollte die Synthese einfach sein, und die Derivatisierung die physikalischen Eigenschaften (Hydrophilie) von Lucifer Yellow nicht verändern.



### 1.3. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zwei photoaktivierbare Derivate von Lucifer Yellow CH herzustellen (Figur 1) und diese in Bezug auf ihre Eignung für die Markierung



Lucifer Yellow CH ( $\text{R} = \text{H}$ )

Figur 1. Strukturformeln von Lucifer Yellow CH und seinen photoaktivierbaren Derivaten.

von biologischen Membranen von der wässrigen Phase aus zu testen. Dies umfasste neben der Evaluation der optimalen Verbindungen und deren Synthese auch die photochemische Charakterisierung und die Anwendung auf ein einfaches biologisches System. Dabei musste im speziellen abgeklärt werden, ob diese unter Bedingungen möglich ist, welche für die betrachtete Membran unschädlich ist, da aus Arbeiten an Neuronen bekannt war, dass die Kombination von Lucifer Yellow und intensiver Bestrahlung für die Zelle fatale Folgen haben kann (Miller & Selverston, 1979).

Um diese Untersuchungen vorzunehmen, wählte man die Membran

menschlicher Erythrocyten. Diese ist nicht nur leicht erhältlich, sondern in Bezug auf ihre Topologie wohl auch am sorgfältigsten studiert. Eine Vielzahl von Reagenzien ist verwendet worden, um ihre Oberflächenkomponenten zu markieren, darunter die Lactoperoxydase katalysierte Iodierung (Mueller & Morrison, 1974), Disulfonatstilbenderivate (Cabantchik & Rothstein, 1972), diazotierte Sulfonate (Juliano & Rothstein, 1971), aber auch photoaktivierbare Marker, wie NAP-Taurin (Staros & Richards, 1974) und 3-Azido-(2,7)-naphtalindisulfonat (Dockter, 1979). Deshalb ist diese Membran sowohl in der Topologie als auch in der Reaktivität ihrer Oberflächenkomponenten gut bekannt und es sollte möglich sein, anhand dieses Modellsystems die Leistungsfähigkeit der neu eingeführten Reagenzien mit Hilfe von SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie abzuschätzen.

## 2. A B K U E R Z U N G E N

---

BSA	Rinderserumalbumin
BSE	Rückstrahlelektronendetektion
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilben-disulfonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
FNAP	4-Fluoro-3-nitrophenylazid
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IR	Infrarot
LY	Lucifer Yellow CH
MES	Morpholinethansulfonat
NAP-Taurin	N-(4-Azido-2-nitrophenyl)-2-aminoethansulfonat
NEM	N-Ethylmaleimid
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	parts per million
Rh	Rhesusfaktor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SE	Sekundärelektronendetektion
SEM	Rasterelektronenmikroskop
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TID	3-Trifluoromethyl-3-(m-iodophenyl)-diazirin
TMS	Tetramethylsilan
UV/Vis	Ultraviolett/Sichtbar

### 3. MATERIAL, METHODEN UND SYNTHESSEN

---

#### 3.1 Material

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei Fluka AG, Buchs bezogen oder bei Merck-Schuchardt (München, BRD) bezogen und waren vom Reinheitsgrad "puriss." oder "p. a.".

Das Reagenz für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976), SDS, Acrylamid, Dowex Ionentauscher und Molekulargewichtsmarker für die Polyacrylamidgelelektrophorese erhielt man bei Bio Rad Laboratories (Richmond, Ca). Brillantsulfoflavin war von Aldrich-Chemie GmbH (Steinheim, BRD).

4-Fluoro-3-nitrophenylazid war von BDH Chemicals Ltd. (Poole, UK), N-(4-Azido-2-nitrophenyl)-2-aminoethylsulfonat (NAP Taurin) von Pierce (Rockford, Ill).

HPLC Lösungsmittel bezog man bei May & Baker Ltd. (Dagenham, UK).

Frischblut vom Serotyp 0 Rh+ mit Heparin als Antikoagulans erhielt man von der Blutspendezentrale des Schweizerischen Roten Kreuzes in Zürich.

Kaninchen Anti-Lucifer Yellow Antiserum wurde freundlicherweise von Dr. H. Riezman (ISREC, Lausanne) zur Verfügung gestellt.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Präparation von Erythrocytenmembranen

Die Herstellung der Erythrocytenmembranen erfolgte im wesentlichen gemäss dem Prozedere von Steck & Kant (1975). Frisches menschliches Blut in Heparin wurde innerhalb von zwei Stunden verarbeitet. Durch die Filtration des mit einem Volumen PBS (150 mM NaCl, 5 mM  $P_i$ , pH 7.4) verdünnten Frischblutes durch eine Säule mit  $\alpha$  und mikrokristalliner Cellulose (1:1, w/w) nach der Vorschrift von Beutler et al. (1976) erreichte man eine nahezu vollständige Entfernung der weissen Zellen von den Erythrocyten.

Die roten Blutkörperchen wurden dann dreimal in PBS gewaschen. Die Sedimentation erfolgte jeweils in einem Sorvall HB 4 Rotor, bei 2500 rpm während 7 Minuten.

Aus den gewaschenen Erythrocyten erhielt man die permeablen Membranen (Ghosts) durch dreimalige Hämolyse in 30 Volumina 5mM  $P_i$ , pH 7.4. Dazwischen zentrifugierte man jeweils 15 Minuten bei 15000 rpm in einem Sorvall SS 34 Rotor (Lutz & Wipf, 1982).

Zur Präparation von nicht mehr durchlässigen, das heisst wieder verschlossenen Membranen wählte man das Verfahren nach Lutz (1986). Gewaschene Membranen wurden dazu in Wasser resuspendiert und 15 Minuten auf Eis stehen gelassen. Danach wurden die folgenden Komponenten zu den angegebenen Endkonzentrationen zugegeben:  $NaP_i$  pH 7.4, 50 mM;  $MgCl_2$  5 mM; NaCl 80 mM; Saccharose 150 mM. Die Saccharosekonzentration wurde so gewählt, dass die Osmolarität 300 mOsm betrug. Diese wurde mit einem Knauer Halbmikroosmometer (Knauer, Berlin BRD) bestimmt. Die so supplementierten Membranen wurden 15 Minuten auf Eis äquilibriert und anschliessend 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Die resultierenden verschlossenen

Membranen wurden zweimal mit PBS gewaschen und direkt für Markierungsexperimente verwendet.

Als alternative Methode zum Versiegeln der Membranen wurde die Methode von Steck (1974) angewandt. Dabei beschränkte man sich auf einen Hämolyse-schritt, der dafür in einem hundertfachen Volumen 5 mM  $\text{NaP}_i$  durchgeführt wurde. Die sedimentierten Membranen wurden dann sofort in 40 Volumina PBS, das auf 37°C vorgewärmt worden war, aufgenommen. Nach einer einstündigen Inkubation bei dieser Temperatur wurden die verschlossenen Membranen wie beschrieben weiterverarbeitet.

### 3.2.2 Hemmung des Anionentransportproteins durch DIDS

Die Blockierung des Anionentransportproteins der Erythrocytenmembran (Bande 3 Protein) erfolgte gemäss Ramjeesingh et al. (1980) mit DIDS (4,4'-Diisothiocyano- 2,2'-stilben-disulfonsäure). Dazu wurden gewaschene Erythrocyten zu 25% Hämatokrit in PBS resuspendiert. Nach der Zugabe von DIDS zu einer Endkonzentration von 15  $\mu\text{M}$  wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS, das zusätzlich 0.5 % (w/v) BSA enthielt, gewaschen, um alles nicht gebundene DIDS zu entfernen. Nach zwei weiteren Waschschritten mit nicht supplementiertem PBS wurden die Erythrocyten nach dem Standardprotokoll weiterverwendet.

### 3.2.3. Messung der Lucifer Yellow Aufnahme

Gewaschene Erythrocyten wurden in PBS zu 10 % Hämatokrit resuspendiert. Davon vermischte man 80  $\mu\text{l}$  mit 20  $\mu\text{l}$  Lucifer Yellow CH (10 mg/ml in PBS) und inkubierte auf Eis oder bei 37°C. Nach definierten Zeiten wurde die Aufnahme durch

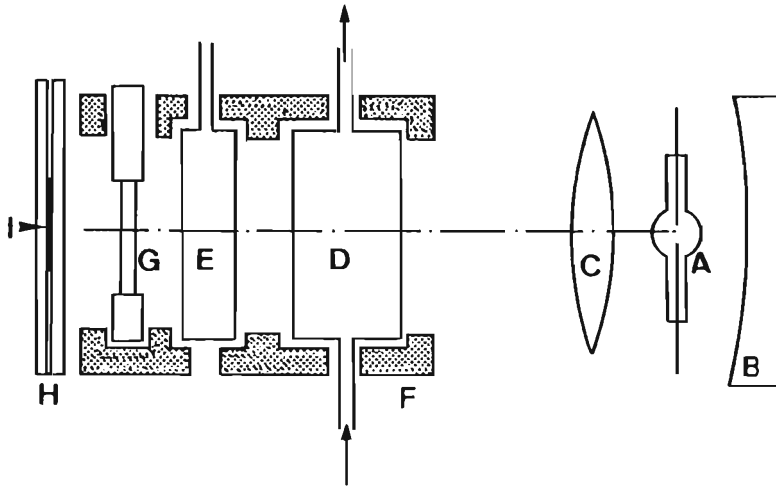
Verdünnen des Reaktionsgemisches mit 900 µl eiskaltem PBS gestoppt. Die Zellen wurden sofort durch dreimaliges Waschen in PBS von freiem Farbstoff getrennt (Sedimentation jeweils 30 Sekunden in Eppendorf Zentrifuge). Man lysierte die Erythrocyten durch die Zugabe von SDS (1 % Endkonzentration), verdünnte zehnfach und bestimmte die aufgenommene Fluoreszenz auf einem Aminco SPF 500 Fluorimeter (Excitation 428 nm, Emission 550 nm). Von den erhaltenen Werten wurde die Fluoreszenz einer Probe die ohne Lucifer Yellow inkubiert worden war, abgezogen. Die Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich mit einer Standardkurve von Lucifer Yellow in PBS mit 0.1 % SDS.

#### 3.2.4. Photolyseexperimente

Für die Photolyse verwendete man eine 350 W Hochdruck-Quecksilberlampe (Typ 350-1008, Illumination Industries Inc., Sunnyvale, Ca), die in eine Apparatur eingebaut war, wie sie in Figur 2 dargestellt ist. Die Lampe A befand sich in einem Gehäuse, das mit einem Parabolspiegel B, einer Kollimatorlinse C, einer wassergefüllten Quarzdurchflusszelle D (Dicke 5 cm) und einer 2 cm dicken Flüssigkeitsfilterzelle E ausgerüstet war. Die Photolyse wurde in einem Sandwich aus zwei Pyrexglasplatten G durchgeführt (15x15x0.5 mm) in welche die Probe I mit einer Pasteur Pipette eingefüllt werden konnte.

Der Abstand der Lichtquelle bis zur Photolysezelle betrug 35 cm, die Kühlung der Probe erfolgte durch Beblasen mit Pressluft. Als Filter verwendete man eine konzentrierte Kupfersulfatlösung. Damit konnte Licht der für die Proteine schädlichen Wellenlängen unter 315 nm absorbiert werden (Katzenellenbogen et al., 1974). Zusätzlich wurden für die Photolyse des Diazirinderivates die Filterplatte eines UV

Leuchttisches vom Typ Chromato-Vue Transilluminator: Model C-29 (Ultra-violet Products Inc., San Gabriel, Ca) oder ein schmalbandiger Interferenzfilter G Modell Filtraflex 3-UV (F) (Balzers AG, FL) eingesetzt.



Figur 2. Schematische Darstellung der Photolyseapparatur.  
A = Lichtquelle, B = Reflektor, C = Kollimator-  
linse, D = UV Filter (fliessendes, kaltes Wasser),  
E = Flüssigkeitsfilter, F = optischer Filter,  
H = Probenbehälter aus zwei Pyrexglasplatten, I =  
Probe, F = Rohr.

Die zu behandelnden Proben enthielten, wenn nicht anders erwähnt, 1 mg/ml Membranprotein und 1 mg/ml des jeweiligen Lucifer Yellow Derivates. Sie waren mit 20 mM MES/NaOH oder Natriumphosphat gepuffert. Die Photolysegemische wurden 30 Minuten auf Eis mit Stickstoff beblasen und dann in die Sandwichzelle eingefüllt.



Als Belichtungsdauer wählte man in der Regel zwei Halbwertszeiten. Danach wurde die Zelle langsam geneigt und die ausfliessende Suspension mit einer Pasteurpipette sorgfältig abgesogen, da direktes Absaugen der Probe aus der Zelle mit einer Spritze mit langer Kanüle zu starker Schädigung der Membranstrukturen (Vesikulierung) führte. Die Membranen wurden in PBS verdünnt und dreimal mit diesem Puffer gewaschen (Sedimentation jeweils 15 Minuten in Eppendorf-zentrifuge).

Anschliessend wurden die Proben für SDS-PAGE, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie vorbereitet.

### 3.2.5. Bestimmung von Einbauraten

Die Charakterisierung der Lucifer Yellow Derivate in Bezug auf pH Abhängigkeit und Pufferbedarf wurde anhand eines vereinfachten Testsystems vorgenommen.

Anstelle der für quantitative Analysen ungeeigneten, weil heterogenen Erythrocytenmembran verwendete man Lösungen von BSA und Ribonuklease in Konzentrationen von 5-10 mg/ml. Der jeweilige pH Wert wurde mit 50 mM Natriumphosphat oder MES/NaOH eingestellt. Die Konzentration an Photoreagenz war 1 mg/ml. Davon photolysierte man Proben von 100  $\mu$ l während zweier Halbwertszeiten. Anschliessend wurde die proteingebundene Lucifer Yellow Fraktion durch eine Gelfiltration an Sephadex G-50 (0.5 x 30 cm) in PBS von freiem Material abgetrennt. Nach der Bestimmung der Totalfluoreszenz in beiden Fraktionen konnte der Prozentsatz des eingebauten Farbstoffes berechnet werden.

### 3.2.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Membranproteine wurden in einem diskontinuierlichen Tris-Glycin Puffersystem in Acrylamid nach Lämmli (1970) aufgetrennt. Man verwendete Plattengele von 15 x 8 cm Grösse und 2 mm Dicke. Konzentration und Vernetzungsgrad waren 8.4 % beziehungsweise 2.7 % (Angabe nach Hjertén, 1962, wobei die erste Zahl der Monomerenkonzentration und die zweite dem Anteil von N,N'-Methylenbisacrylamid in % der Monomerenkonzentration entspricht).

Sammelgel : 67 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1 % SDS, 3.5 % Acrylamid, 0.16 % Ammoniumperoxodisulfat und 0.05 % TEMED

Trenngel : 380 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % SDS, 8.4 % Acrylamid 0.08 % Ammoniumperoxodisulfat und 0.06 % TEMED

Die Proben wurden 30 Minuten bei 37°C in 58 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 5 % Glycerin, 50 mM Dithiothreitol, pH 6.8 denaturiert. Zur Verhinderung von Aggregationen aufgrund von Disulfidbrückenbildung unter den oxidativen Verhältnissen während der Elektrophorese wurden die freien -SH Gruppen alkyliert. Dazu versetzte man die denaturierten Proben mit N-Ethylmaleimid zu einer Endkonzentration von 5 mM und liess diese einige Minuten bei Raumtemperatur stehen, bevor man sie auf das Gel lud oder zum späteren Gebrauch bei -20°C einfrohr. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von maximal 40 mA in folgendem Elektrodenpuffer: 206 mM Glycin, 27 mM Tris, 0.1 % SDS, pH 8.8.

Gele, die fluoreszierendes Material enthielten wurden nach der Beendigung der Elektrophorese 1 Stunde in 7 % Essigsäure, 50 % Methanol fixiert und mit einer Polaroid Land Filmkamera photographiert. Als Lichtquelle diente dabei ein Chromatovue Transilluminator C-29 Leuchttisch. Primärlicht wurde mit

je einem UV- und Orangetfilter absorbiert und die Fluoreszenz auf einen Polaroid Type 665 Film aufgenommen.

Zur Proteinfärbung inkubierte man mindestens eine Stunde in 50 % Methanol, 7 % Essigsäure, 0.1 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg, BRD) und entfärbte in 20 % Methanol, 7 % Essigsäure. Die Molekulargewichte konnten durch den Vergleich mit den empirisch bestimmten  $R_f$ -Werten von Referenzproteinen (Bio Rad) zugeordnet werden.

### 3.2.7. Proteinbestimmungen

Die Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Lowry et al. (1951) mit BSA als Standard durchgeführt. Für rasche Bestimmungen wurde der Bio Rad Assay nach Bradford (1976) mit Rinderglobulin als Referenz verwendet. Dieses Verfahren eignete sich jedoch nicht für Proben, die fluoreszierendes Material enthielten, da die zur Messung verwendete Wellenlänge mit der Excitationswellenlänge von Lucifer Yellow zusammenfällt. Es wurden deshalb mit dieser Bestimmungsmethode Werte erhalten, die rund viermal zu klein waren. Um die beiden Bestimmungsmethoden zu vergleichen gebrauchte man einen von Spiess (1982) ermittelten Umrechnungsfaktor. Durch die Multiplikation des durch die Bio Rad Methode erhaltenen Wertes mit 0.8 erhält man die Proteinkonzentration welche bei Verwendung der Bestimmung nach Lowry zu erwarten gewesen wäre.

### 3.2.8. Fluoreszenzmikroskopie

Sedimentierte Erythrocytenmembranen wurden in 25 Volumina PBS resuspendiert. 20  $\mu$ l davon tropfte man auf einen Objektträger auf und spreitete die Suspension mit einem Deckglas zu einem dünnen Film. Durch Abschliessen mit Nagellack wurden die Präparate haltbar gemacht.

Die Proben wurden in einem Zeiss Standard Mikroskop (Lichtquelle HBO 50) im Phasenkontrast und in der Fluoreszenz (Blauanregung Nr. 31) beobachtet. Man verwendete Objektive vom Typ Neofluar 40/0.85, 40/0.75 und Plan-63/1.25 mit Irisblende (Oelimmersion).

Photographiert wurde mit einer Zeiss C 35 Kamera auf Kodak Plus X 125 ASA Filme. Die Belichtungszeiten betragen in der Regel 2 Sekunden für Aufnahmen im Phasenkontrast und 60 Sekunden für Fluoreszenzbilder.

Für die quantitative Erfassung der Fluoreszenz einzelner Objekte verwendete man ein Zeiss Zytofluorometer (Ruch, 1971). Dieses besteht aus einem Zeiss Universalmikroskop (Quecksilberlampe HBO 100) mit einem Neofluar Plan-63/1.25 Objektiv, einem Mikrophotometeraufsatz 01, einem Photomultiplier (Messverstärker mit stabilisierter Spannungseinheit) und einer Videokamera. Die Präparate wurden auf dem Monitor im Phasenkontrastbild abgesucht, die Membranen auf ein Fadenkreuz zentriert, und die Fluoreszenz im Bereich einer kreisrunden 10  $\mu$ m Blende bestimmt. Die dazu nötige Schaltfolge von Spiegeln, Verschlüssen und Anzeigeeinheit ist automatisch gesteuert und die Fluoreszenzanregung über einen elektronisch gesteuerten Verschluss auf 7 Millisekunden begrenzt. Es wurden jeweils 100 Zellen ausgemessen. Die erhaltenen Werte sind relativ, im Vergleich zu einem internen Standard (Urannglasplättchen). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines direkt angeschlossenen PDP 8E Computers (Digital Equipment Corporation).

### 3.2.9. Elektronenmikroskopie

Die nachfolgend beschriebenen Präparationsschritte entsprechen im wesentlichen dem Prozedere von Walther (1984).

#### Markierung mit kolloidalem Gold

Mit Lucifer Yellow markierte und mehrmals mit PBS gewaschene Erythrocytenmembranen wurden mit 0.2 % Paraformaldehyd in PBS vorfixiert. Anschliessend wurden sie mit 0.5 % Ovalbumin (Sigma) in PBS gesättigt, dreimal mit PBS gewaschen und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer auf eine Million Zellen pro ml verdünnt. 1 ml dieser Verdünnung wurde jeweils mit 5 µl Kaninchen Anti-Lucifer Yellow Antiserum für 1 Stunde bei 20°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Membranen mit 0.02 Volumen Ziegen-anti-Kaninchen Antikörper, der an kolloidales Gold (10 nm) gekoppelt war (GARG 10, Janssen Pharmaceutica, Belgien), für eine Stunde bei 20°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS wurde eine Stunde mit 0.5 % Glutaraldehyd bei 4°C nachfixiert und schliesslich zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen.

#### Gefrierfixation

Aus einer 0.1 mm dicken Kohlefolie (Goodfellow Metals, Cambridge, UK) wurden Plättchen von 3x6 mm ausgeschnitten. Diese wurden beglimmt, bevor man sie in die Membransuspension tauchte und auf einem Filterpapier leicht abtupfte, damit ein möglichst dünner Wasserfilm mit einem Zellmonolayer entstand. Die Proben wurden dann durch Eintauchen in flüssiges Propan möglichst schnell eingefroren und bei -196°C gelagert.

## Gefrierbruch und Gefriertrocknung

Alle Gefrierbruch- und Gefriertrocknungsexperimente wurden in einem Balzers BAF-300 Gefrierätzer durchgeführt, der ein Endvakuum von  $10^{-7}$  mbar erreicht.

Kohle und Platin/Kohle wurden mit Elektronenstrahlverdampfern nach Moor (1973) aufgedampft.

Zur Gefriertrocknung wurden die Proben in einem speziellen Halter auf  $-85^{\circ}\text{C}$  erwärmt und 2 Minuten getrocknet. Danach bedampfte man mit Kohle (5-10 nm aus  $45^{\circ}$ ) und trocknete bei  $-50^{\circ}\text{C}$  während 30 Minuten weiter. Danach wurde der Objektisch langsam erwärmt und der Halter der Apparatur entnommen.

Zur Herstellung von Gefrierbruchreplikas für das TEM wurden die im Propan-Jet eingefrorenen Proben auf  $-150^{\circ}\text{C}$  erwärmt, gebrochen und sofort aus  $45^{\circ}$  mit 2.5 nm Platin/Kohle bedampft. Anschliessend wurden aus  $90^{\circ}$  25 nm Platin/Kohle aufgebracht und die Kammer belüftet. Die Proben wurden auf destilliertem Wasser abflottiert und je 30 Minuten in 10 % Schwefelsäure und 14 % Javellwasser gereinigt.

## Rasterelektronenmikroskopie

Zur Untersuchung der Proben stand ein Hitachi ESM 700 zur Verfügung. Die Erfassung der rückgestreuten Elektronen erfolgte über einen YAG (Yttrium-Aluminium-Granat) Detektor, die Registrierung der sekundären Elektronen über einen konventionellen Everhart-Thornley Detektor.

Die Kohleplättchen mit den goldmarkierten Proben wurden mit Leitkohle auf einen Kohlestift geklebt und auf einen speziellen Probenhalter nach Nagatani & Okua (1977) montiert. Die Photographien wurden auf Kodak Tri-X plan TX 120 Rollfilm aufgenommen und 7.5 Minuten in Kodak HC-110 bei  $20^{\circ}\text{C}$  entwickelt.

### Transmissionselektronenmikroskopie

Gefrierbruchreplikas wurden in einem Phillips EM 301, 100kV Transmissionselektronenmikroskop betrachtet. Man fotografierte auf Agfa Scientia 23D56 Planfilm und entwickelte diesen 3.5 Minuten in Gevatone G5c bei 20°C.

### 3.3. Synthesen

#### 3.3.1. Allgemeines

Für die Säulenchromatographie wurde Silicagel 60 (0.04-0.063, 230 - 400 mesh, ASTM Fluka) verwendet. Dünnschichtchromatographie (TLC) wurde auf Silicagelplatten mit Fluoreszenzindikator (Merck, F254) durchgeführt. Für die Papierchromatographie verwendete man Whatman 3MM Papier.

<sup>1</sup>H-NMR Spektren (300 MHz) wurden auf einem Bruker Spektroskop CXP-300 Gerät aufgenommen. Als internen Standard benützte man TMS (Tetramethylsilan). Zur Interpretation der Spektren gebrauchte man das Tabellenwerk von Pretsch et al. (1981), sowie die im speziellen Teil zitierte Literatur. Die chemischen Verschiebungen werden in ppm angegeben, die Multiplizität der Signale ist wie folgt vermerkt: s= Singulett, d= Doublett, t= Triplett, q= Quadruplett, m= Multiplett.

Infrarotspektren wurden auf einem Perkin Elmer 257 Spektrometer und Ultraviolett/Visible (UV/Vis) Spektren auf einem Pye Unicam SP 1700 oder einem Varian Cary Spektrophotometer aufgenommen. Die Stärke der Signale wird wie folgt angegeben : s= starke, m= mittlere, w= schwache Intensität.



### 3.3.2. Synthese von Lucifer Yellow CH

#### Tetrakalium-4-amino-N-(4-methyl-3,5-disulfophenyl)- naphtalimid-3,6 disulfonat (2)

Die Synthese von Lucifer Yellow CH (5) ausgehend von Brillantsulfoflavin (1) erfolgte gemäss Stewart (1981a). 50 g Brillantsulfoflavin (Aldrich) wurden in 150 ml rauchender Schwefelsäure (Oleum, 25 % freies SO<sub>3</sub>, w/w) gelöst und 24 Stunden bei 130°C mit einem KPG-Rührer gerührt. Die resultierende dickflüssige, braune Lösung wurde bei Raumtemperatur auf 1.5 l Eiswasser ausgegossen und mit 5 g Aktivkohle versetzt. Nach Erhitzen auf 90°C wurde diese Suspension durch eine mit Celite beschichtete Glasfilternutsche abfiltriert. Das Filtrat wurde bei 90°C gerührt und langsam mit 150 g KCl versetzt. Die Lösung wurde dann, unter konstantem Rühren, erst auf Raumtemperatur, dann auf 2°C abgekühlt. Um eine möglichst vollständige Kristallisation zu erreichen, liess man die entstandene Suspension, unter gelegentlichem Umrühren, 2 Tage bei dieser Temperatur stehen. Das kristallisierte Material wurde abfiltriert und mit H<sub>2</sub>O, Ethanol und Diethylether gewaschen.

Nach dem Trocknen am Wasserstrahl- und am Hochvakuum erhielt man 33.4 g der Verbindung (2). Dies entspricht einer Ausbeute von 62.3 % (Literatur : 90 %)

#### Dikalium-4-amino-3,6-disulfonaphtalinanhydrid (3)

Eine Lösung von 17.6 g der Verbindung (2) in 352 ml 3 % KOH wurde 10 Minuten bei 50°C gehalten, mit HCl auf pH 2 gebracht, 10 Minuten bei dieser Temperatur gerührt und mit KOH wieder auf pH 12,5 gebracht. Dieser Zyklus zwischen sauren und basischen Bedingungen wurde dreimal

wiederholt. Schliesslich wurde erneut auf pH 2 angesäuert und die viskose Suspension 3 Tage bei Raumtemperatur weitergerührt. Der pH wurde mit KOH auf 4.5 gehoben, das Produkt gesammelt und mit 5 % KCl, H<sub>2</sub>O, Ethanol und Diethylether gewaschen. Nach dem Trocknen bei Hochvakuum im auf 90°C geheizten Exsikkator wog das Produkt 10.1 g, was 99 % der Theorie entspricht (Literatur 98 %).

Das Material für die spektroskopische Analyse wurde einmal aus 100 Volumina kochendem Wasser umkristallisiert.

UV/Vis (0.1 M Essigsäure): 282 nm ( $\epsilon = 27000$ ), 432 nm ( $\epsilon = 10150$ )  
(0.1 M NaOH) : 274 nm ( $\epsilon = 21000$ ), 353 nm ( $\epsilon = 7200$ )

Dikalium-4-amino-N-((hydrazinocarbonyl)amino)naphtalimid-3,6-disulfonat (4)

4 g Carbohydrazid (Fluka) wurden in 88 ml 5 % Essigsäure gelöst. Dazu gab man langsam 2 g des Anhydrids (3). Diese Suspension wurde auf 60°C erwärmt und bei dieser Temperatur über Nacht langsam gerührt. Die resultierende homogene Lösung wurde stärker gerührt und langsam mit 0.44 g KCl versetzt. Unter konstantem Rühren wurde erst auf Raumtemperatur, dann auf 2°C abgekühlt und bei dieser Temperatur über Nacht vollständig auskristallisiert.

Das Produkt wurde in einer Glasfilternutsche gesammelt, mit eiskalter 0.5 % KCl Lösung, Eiswasser, Ethanol und Ether gewaschen und bei 60°C am Hochvakuum getrocknet. Das Produkt, ein dunkelgelbes feines Pulver wog 1.2g, was 52 % der Theorie entspricht (Literatur 92 %).

UV/Vis(H<sub>2</sub>O) : 280 nm ( $\epsilon = 25000$ ), 430 nm ( $\epsilon = 11900$ ).

Dilithium-4-amino-N-((hydrazinocarbonyl)amino)naphtalimid-3,6-disulfonat, Lucifer Yellow CH (5)

Das Kaliumsalz von Lucifer Yellow CH wurde in Wasser zu einer konzentrierten Lösung aufgenommen und über eine Dowex 50W-X2 Kationentauschersäule (1 x 5 cm), die vorher mit Säure und Base behandelt und in die Lithiumform gebracht worden war, laufen gelassen. Die eingesetzte Menge an Ionentauscher entsprach dabei einem fünffachen molaren Ueberschuss. Die gefärbten Fraktionen wurden gesammelt und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 99 %, was genau dem in der Literatur angegebenen Wert entspricht.

UV/Vis (H<sub>2</sub>O) : 282 nm,  $\epsilon$  = 24200; 426 nm,  $\epsilon$  = 11500.

Elementar-      Berechnet: C, 24.94; H, 1.74; N, 13.43; S, 12.29  
analyse :      Gefunden : C, 30.61; H, 2.52; N, 11.26; S, 11.99

3.3.3. Synthese von NAP-Lucifer Yellow

Dilithium-4-amino-N-((N'-2'-nitro-4'-azidophenyl)-hydrazinocarbonyl)amino)naphtalimid-3,6-disulfonat, NAP-Lucifer Yellow (6)

4-Fluoro-3-nitrophenylazid wurde vor dem Umsatz mit Lucifer Yellow aus Petrolether 40-60°C umkristallisiert (Fleet et al., 1972). 1 g dieser Substanz wurde zunächst in ungefähr 150 ml gelöst und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Abfiltrieren wurde die Lösung unter Stickstoff bei Siedetemperatur auf zirka 20 % des ursprünglichen Volumens eingengt und dann über Nacht stehen gelassen. Es fielen grosse, rote Nadeln aus, sodass die Mutterlauge direkt mit einer Pasteurpipette abgesogen werden konnte. Die Kristalle

wurden kurz am Hochvakuum getrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt. Zur Kopplung von FNAP an Lucifer Yellow CH wählte man eine Modifikation des von Hosang (1982) zur Synthese von NAP- $\beta$ -alanin angewandten Verfahrens.

45.7 mg Lucifer Yellow CH (100  $\mu$ M) wurden in 1 ml DMSO gelöst. Dazu gab man 16.5  $\mu$ l (150  $\mu$ M) N-Methylmorpholin. Im Dunklen oder bei Rotlicht gab man 91 mg FNAP (500  $\mu$ M) zu, was zu einer homogenen, tiefroten Lösung führte. Dieses Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 60°C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel bei derselben Temperatur unter Stickstoff verdunstet und der trockene Rückstand in Wasser aufgenommen. Das nicht gekoppelte FNAP wurde durch zweimalige Extraktion mit Ether entfernt und die wässrige Phase lyophilisiert.

Eine weitere Reinigung war nur durch Ionenpaar-reverse phase-HPLC (Staros, 1982) möglich. Dazu verwendete man eine HPLC Apparatur von Kontron, die mit zwei Pumpen vom Typ LC Pump 410 ausgerüstet war, und Lichrosorb RP 18 oder Zorbax ODS (Du Pont Instruments) Säulen. Grössere Mengen (>1mg) trennte man auf einer präparativen Octadecylsäule von Serva auf (Si 100: Polyol: RP 18). Als Laufmittelsystem verwendete man 10 mM Tetrabutyl - ammoniumformat pH 4/ Methanol mit Gradienten von 20 - 50 % Methanol in 15 Minuten. Während das Edukt nach einer Retentionszeit von 27 Minuten eluierte, erschien NAP Lucifer Yellow erst nach einer Umstellung auf 100 % Methanol und konnte somit sauber abgetrennt werden. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt, in Wasser aufgenommen und über Dowex 50W-X2 in die Dilithiumform gebracht. Schliesslich wurde über eine Bio Gel P2 Säule (0.5 x 10 cm) entsalzt und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 14 mg was 30.6 % der Theorie entspricht. Das so erhaltene Material wurde als wässrige Lösung von 10 mg/ml durch ein Millex-HA sterile filter unit (Millipore, Molsheim, F) sterilfiltriert und eingefroren.

UV/Vis (H<sub>2</sub>O) : 232 nm ( $\epsilon = 30750$ ), 280 nm ( $\epsilon = 34860$ ), 436 nm ( $\epsilon = 14000$ ).

IR (KBr) : 3400 cm<sup>-1</sup> (s), 2850 cm<sup>-1</sup> (m), 2120 cm<sup>-1</sup> (w),  
1700 cm<sup>-1</sup> (s), 1600 cm<sup>-1</sup> (s), 1380 cm<sup>-1</sup> (s),  
1200 cm<sup>-1</sup> (m).

### 3.3.4. Synthese von Diazirin-Lucifer Yellow

#### 4-Diaziridinovaleriansäure (7)

4-Diazirinovaleriansäure wurde aus Lävulinsäure gemäss Church & Weiss (1970) hergestellt. Dazu wurden vorerst 100 ml Ammoniak in einem mit Methanol/Trockeneis gekühlten Kolben kondensiert. Dazu gab man 7.54 g (65 mM) Lävulinsäure. Nach abgeschlossener Zugabe wurde das Methanol/Trockeneis Kühlbad durch Eis/Kochsalz ersetzt, worauf Ammoniak bei -20°C unter Rückfluss zu kochen begann. Nach 3 Stunden wurde das Reaktionsgemisch wieder auf -60°C abgekühlt und während 30 Minuten eine Lösung von 8 g Hydroxylamin-O-sulfonsäure in 50 ml Methanol zugetropft. Nach erneutem Wechsel des Kühlmittels wurde nochmals während einer Stunde bei -20°C unter Rückfluss gekocht.

Danach wurden Kühlbad und Kühler entfernt und das Ammoniak über Nacht abgedampft. Der Rückstand wurde abfiltriert und der Festkörper mit total 150 ml Methanol gewaschen. Die Methanol-auszüge wurden vereinigt und auf 30 ml eingeeengt. Diese Lösung wurde direkt und ohne weitere Charakterisierung zur Oxidation zum entsprechenden Diazirin verwendet.

4-Diazirinovaleriansäure (8)

Die methanolische Lösung der 4- Diaziridinovaleriansäure (7) wurde mit 40 ml Methanol verdünnt, auf Eis gekühlt und mit 10 ml Triethylamin versetzt. Zu dieser Lösung gab man unter Rühren langsam kleine Iodkristalle bis die dadurch erhaltene rote Färbung nicht mehr verschwand. Man erwärmte auf Raumtemperatur und gab nochmals eine Spur Iod zu, bis die Färbung bestehen blieb.

Darauf konzentrierte man auf 45 ml und verdünnte mit 150 ml 3 M NaCl. Diese Lösung brachte man mit konzentrierter Salzsäure auf pH 3 und extrahierte sie viermal mit je 50 ml Ether. Die organischen Auszüge wurden vereinigt und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotavapor verblieb ein Rückstand von 8.1 g eines rotbraunen Oels.

Dünnschichtchromatographie (Ether-Hexan-Essigsäure 60 : 40 : 5) zeigte Produkt bei  $R_f = 0.33$ , aber auch noch nicht oxidiertes Diaziridin ( $R_f = 0.21$ ). Das Diazirin wurde mittels Vakuumdestillation gereinigt. Die Hauptkomponente ging bei 72°C (0.08 torr) über, blieb aber weiterhin leicht rot gefärbt.

Man erhielt 3,7 g reine 4-Diazirinovaleriansäure (45 %).

UV/Vis (H<sub>2</sub>O) : 348 nm ( $\epsilon = 59.3$ )

IR (KBr) : 3020 cm<sup>-1</sup> (m), 1715 cm<sup>-1</sup> (s), 1586 cm<sup>-1</sup> (w)

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta = 2.2$  (t, 2H), 1.63 (t, 2H), 1.0 (s, 3H)

#### N-Hydroxysulfosuccinimid (9)

Die Herstellung von N-Hydroxysulfosuccinimid (9) erfolgte nach Staros (1982).

1.24 g (1.02 äq.)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (Natriumpyrosulfit) wurden in 17 ml Wasser, das 10 Minuten mit Stickstoff beblasen worden war, gelöst. 1.45 g N-Hydroxymaleimid löste man in 40 ml Ethanol, der ebenfalls 10 Minuten mit Stickstoff behandelt worden war. Diese Lösung wurde unter kräftigem Stickstoffstrom zur stark gerührten Pyrosulfitlösung zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde dann unter Stickstoff gasdicht verschlossen und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Alkohol wurde durch Destillation am Rotavapor, Wasser durch Lyophilisation entfernt. Das Lyophilisat wusch man in Diethylether und trocknete es am Hochvakuum. Die Rohausbeute von 2.77 g entsprach 100 % der Theorie (Lit. 100 %).

Dieses sehr hygroskopische Material wurde unter Vakuum aufbewahrt und ohne weitere Reinigung zur Aktivierung der 4-Diazirinovaleriansäure verwendet.

#### 4-Diazirinovaleriansäure-N-hydroxysulfosuccinimidester (10)

203 mg N-Hydroxysulfosuccinimid (9) (1 mMol) und 225 mg Dicyclohexylcarbodiimid (1.1 mMol) wurden trocken gemischt, ausgiebig getrocknet (2h, Hochvakuum) und unter Stickstoff in 2 ml DMF gelöst. Dazu gab man 130 mg (1 mMol) Diazirinovaleriansäure und rührte über Nacht bei Raumtemperatur. Der entstehende Dicyclohexylharnstoff wurde während 3 h bei 2°C vollständig ausgefällt und durch Filtration entfernt. Das Filtrat verdünnte man mit 25 Volumina Essigsäureethylester und fällte das Produkt während 3 Stunden bei -20°C. Der feine Niederschlag wurde durch Zentrifugation gewonnen (10 Minuten, 10000 rpm, HB 4 Rotor). Der Ueberstand wurde verworfen, der Niederschlag mit kaltem Essigester gewaschen, wie oben

sedimentiert und 2 Stunden am Hochvakuum getrocknet. Die Rohausbeute betrug 254 mg (80 % der Theorie).

IR (H<sub>2</sub>O) : 3500 cm<sup>-1</sup> (m), 1800 cm<sup>-1</sup> (s), 1740 cm<sup>-1</sup> (s),  
1585 cm<sup>-1</sup> (w), 1220 cm<sup>-1</sup> (s), 1055 cm<sup>-1</sup> (s),

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O) : δ 3.22 (s, 2H), 2.75 (t, 2H), 1.86 (t, 2H),  
1.1 (s, 3H)

Dilithium-4-amino-N-(((N'-4'-diazirinovaleriansäureamid)hydrazinocarbonyl)amino)naphtalimid-3,6-disulfonat,  
Diazirin-Lucifer Yellow (11)

28 mg Lucifer Yellow CH (5) (50 µMol) wurden in 2 ml 50 mM Natriumkarbonat pH 7 gelöst. Dazu gab man langsam unter Rühren 50 mg (125 µMol) frisch gefällten Diazirinovaleriansäure-N-hydroxysulfosuccinimidester (10) und rührte während 8 Stunden bei Raumtemperatur. Danach senkte man den pH mit HCl auf 3 und extrahierte die überschüssige Säure zweimal mit Ether. Die Wasserphase wurde lyophilisiert, das Lyophilisat in wenig Wasser aufgenommen und N-Hydroxysulfosuccinimid durch Gelfiltration an Bio Gel P2 (30 x 2cm) in 100 mM NH<sub>4</sub>COOH abgetrennt. Die gelb gefärbten Fraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert, in Wasser zu einer konzentrierten Lösung aufgenommen und über Dowex 50W-X2 in die H<sup>+</sup>-Form gebracht. Dadurch konnten mit der nachfolgenden Lyophilisation HCl und HCOOH entfernt werden. Nach erneutem Ionentausch über Dowex 50W-X2 wurden 27 mg des Lithiumsalzes von Diazirin-Lucifer Yellow (11) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 78%. Dieses Material wurde in Wasser gelöst, sterilfiltriert und als Stocklösung von 10 mg/ml bei -20°C eingefroren.



Spektroskopische Daten:

UV/Vis (H<sub>2</sub>O) : wie Spektrum von Lucifer Yellow CH (5).

IR (KBr) : 3350/3450 cm<sup>-1</sup> (m), 1640/1680 cm<sup>-1</sup> (s),  
1585 cm<sup>-1</sup> (m), 1200 cm<sup>-1</sup> (s), 1050cm<sup>-1</sup> (s)

<sup>1</sup>H-NMR (H<sub>2</sub>O) : δ 8.96 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.76 (s, 1H),  
2.32 (t, 2H), 1.76 (t, 2H), 1.06 (s, 3H).

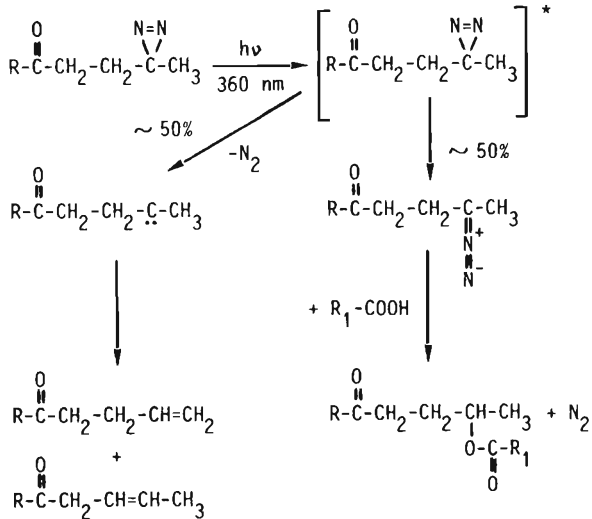
## 4. R E S U L T A T E

---

### 4.1. Syntheseplanung

Bei der Planung der Synthesen galt es, Wege zu photoaktivierbaren Gruppen zu formulieren, die sich unter Belichtung unter anderem zu Spezies einer mittleren Reaktivität umwandeln, zu Zwischenstufen also, die einerseits langlebig genug sind, um nicht durch Wasser abgefangen zu werden und andererseits doch so reaktiv sind, um in einer experimentell nützlichen Frist mit den stärkeren Nukleophilen der erwünschten Zielmoleküle zu reagieren. Wie erwähnt entstehen solche Spezies zum Beispiel bei der Photolyse von Diazirinen und Aziden.

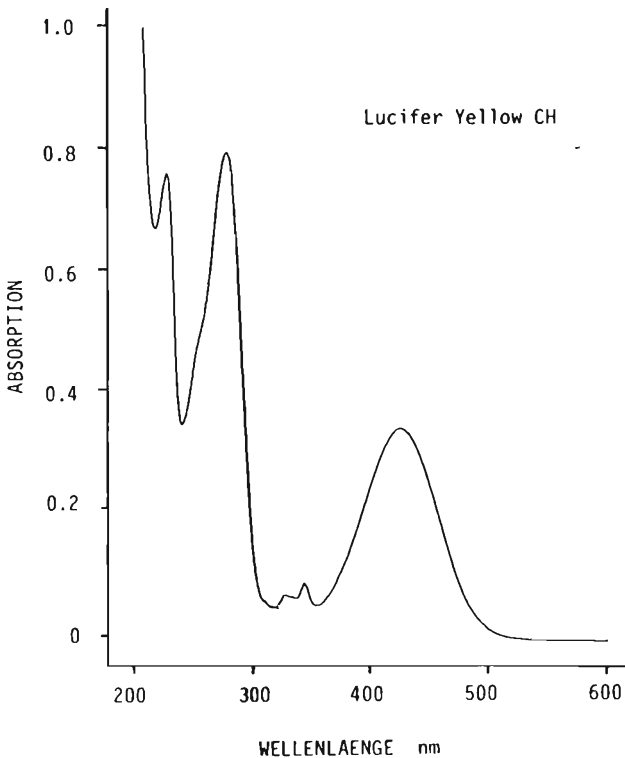
Die Diazirine wurden erst um 1960 von Schmitz & Ohme (1961) erstmals beschrieben. Unterdessen sind Vertreter dieser Verbindungsklasse zu den wichtigsten Photomarkern vor allem für die Untersuchung der apolaren Phase von Membranen geworden. Sie sind im Dunklen bemerkenswert stabile Verbindungen, die der Behandlung mit starken Säuren und Laugen widerstehen und durch milde Reduktionsmittel wie Natriumborhydrid und Thiole nicht reduziert werden. Bei ihrer Photolyse entstehen unterschiedliche Anteile zweier Produkte (Figur 3). Einerseits läuft eine Fragmentierung zum Carben, andererseits eine Photoisomerisation zur linearen Diazo-Verbindung ab, welche in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse ist (Smith & Knowles, 1975, Frey, 1966; Bradley et al., 1977). Stoffe dieses Typs sind recht instabil und reagieren bei Erwärmung und unter schwach sauren Bedingungen mit Nukleophilen, also auch mit den funktionellen Gruppen von Proteinen (Regitz, 1977). Besonders stark ausgeprägt ist



Figur 3. Photochemie von aliphatischen Diazirinen; Reaktion mit Carboxylgruppen.

diese Thermo- und Säurelabilität bei Diazoalkanen, da bei diesen Molekülen die negative Ladung auf dem Kohlenstoffatom nicht durch elektronenakzeptierende Substituenten delocalisiert werden kann, wodurch dessen Basizität besonders ausgeprägt wird. Die Alkylreste führen sogar zu einer besonders schnellen Stickstoffabspaltung. Durch die Photolyse von aliphatischen Diazirinen gelingt es demnach, zum gewünschten Zeitpunkt Diazoverbindungen freizusetzen, die aufgrund ihrer Reaktivität in schwacher Säure nicht als solche ins biologische System hätten eingeführt werden können. Es besteht also die Möglichkeit, die erwünschten

Eigenschaften von Diazirinen (Stabilität, milde Photolysebedingungen) mit denjenigen der Diazoverbindungen (relativ lange Lebensdauer, Spezifität für Carboxyl- und Sulfhydrylgruppen) zu kombinieren (Wilcox, 1977; Means & Feeney, 1971). Diazirine weisen ein typisches Absorptionsmaximum in der Region um 360 nm auf, das für ihre Photolysierbarkeit

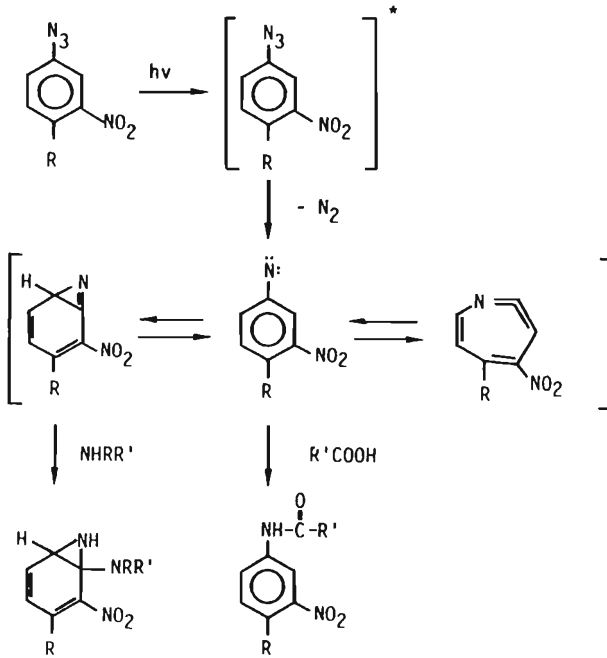


Figur 4. UV/Vis Spektrum von Lucifer Yellow CH (30  $\mu$ M in H<sub>2</sub>O).

verantwortlich ist. Für die aliphatischen Vertreter dieser Klasse sind die Extinktionskoeffizienten allerdings um rund eine Größenordnung kleiner als diejenigen der bisher verwendeten 3-Aryl-3-alkyl (H) -Diazirine und die angestrebte milde Photolyse ist nur dann möglich, wenn keine Ueberlagerung durch Fremddabsorptionen auftritt. Deshalb ist es ein überaus wichtiger Umstand, dass das sehr stark gefärbte Lucifer Yellow in dieser Region einen Bereich geringer Absorption aufweist und deshalb die photolyseaktive Strahlung nicht unterdrückt (Figur 4).

Zur Synthese von Diazirinoalkanen verwendet man üblicherweise die Hydroxylamin-O-sulfonsäure Methode von Schmitz & Ohme (1961), die eine direkte Umwandlung von der entsprechenden Carbonylverbindung zum Diaziridin erlaubt. Dieses kann dann mit Silberoxid oder mit Iod zum Diazirin oxidiert werden. Neben der Ketogruppe sollte das Ausgangsmaterial auch eine Funktionalität aufweisen, die es erlaubt, das Diazirin an die Carbohydrazideinheit von Lucifer Yellow zu koppeln. Man wählte deshalb als Edukt die Lävulinsäure (4-Oxo-valeriansäure). Zur Kopplung kann die Carboxylgruppe dieser Säure durch die Veresterung mit N-Hydroxysulfosuccinimid aktiviert werden. Gleichzeitig erhöht dies die Hydrophilie dieses Reaktanden, sodass erwartet werden konnte, dass die Kondensation mit dem Carbohydrazid, dessen Reaktivität mit der eines Amins vergleichbar sein sollte, unter mildem Bedingungen in wässriger Lösung glatt abläuft.

Die gebräuchlichsten Photomarkierungsreagenzien zur Erzeugung von Nitrenen sind Arylazide (Bayley, 1983). Auch bei ihrer Photolyse entstehen Nebenprodukte von geringerer Reaktivität wie die bityklischen Aziridine (Huisgen et al., 1958) und das von Chapman & LeRoux erstmals untersuchte 1,2,4,6 Azacycloheptatetraen (Figur 5). Solche Nebenprodukte können dank ihrer höheren Lebensdauer in wässriger Lösung ebenfalls zur Markierung von biologischen Strukturen führen, wenngleich eingeschränkt werden muss, dass diese Zwischenstufen in



**Figur 5.** Vereinfachtes Schema der Photochemie von Nitrophenylaziden. Beispiele möglicher Reaktionen mit funktionellen Gruppen von Proteinen.

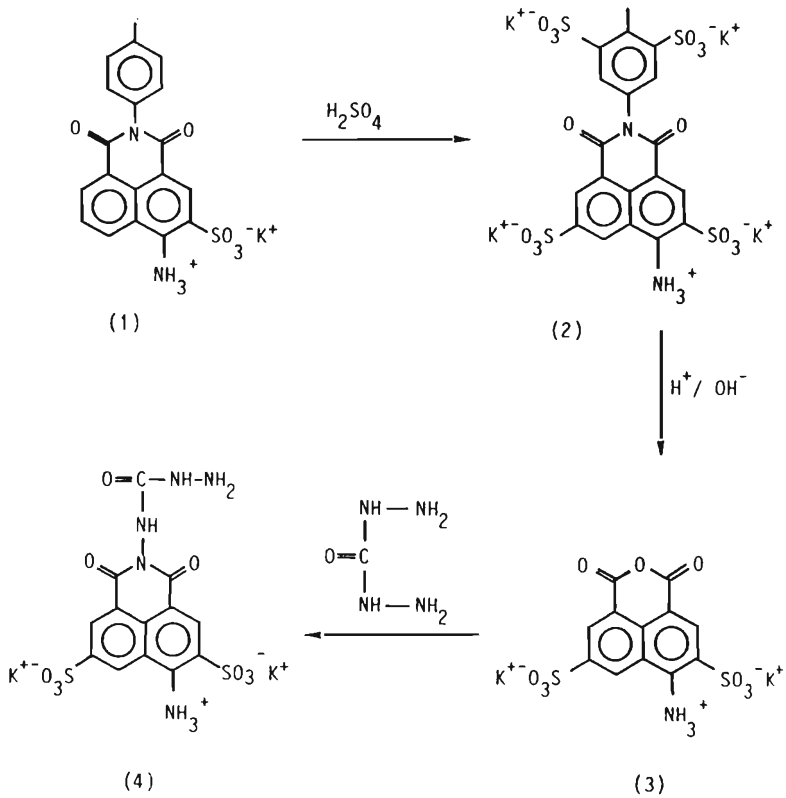
Arylaziden, die am Aromaten elektronenakzeptierende Substituenten aufweisen, nicht oder nur in kleinerem Ausmass entstehen (Dunkin & Thomson, 1982). Es hat sich zudem herausgestellt, dass auch Arylnitrene selber, entgegen der ursprünglich vertretenen Auffassung keine Insertion in aliphatische Seitenketten zeigen, also ähnlich wie Diazoverbindungen hauptsächlich mit nukleophilen funktionellen Gruppen reagieren (Bayley & Knowles, 1978; Gupta et al.,

1979; Brunner & Richards, 1980). Diese Eigenschaft wird noch verstärkt durch die Einführung von elektronenakzeptierenden Substituenten am aromatischen Kern, was sowohl zu erhöhter Reaktivität des Arylnitrens als auch, nach seiner Umwandlung in den Triplettzustand, zu erhöhter Affinität gegenüber nukleophilen Reaktionspartnern führt (Mc Robbie et al., 1976). Auch von dieser Spezies kann somit ein Anteil an gruppenspezifischer Markierung von Proteinen erwartet werden. Dagegen erscheinen die spektralen Eigenschaften der Nitroazidophenylgruppierung, im Hinblick auf die Photolyse zusammen mit Lucifer Yellow, nicht unproblematisch, da ihre Hauptabsorptionen sowohl im sichtbaren, als auch im ultravioletten Bereich nicht weit von dessen Maxima entfernt liegen. Gegenseitige Ueberschneidungen die zu erhöhten Belichtungszeiten führen könnten, müssen deshalb einkalkuliert werden.

Bei der Planung der Synthese dieses Derivates musste berücksichtigt werden, dass die NAP Gruppe recht hitzelabil ist und nie über 60°C erwärmt werden sollte, was die Möglichkeiten bei der Wahl der Syntheseschritte stark einschränkt. Als Ausgangsprodukt für die Einführung dieser Gruppe wählte man 4-Fluoro-3-nitrophenylazid (FNAP). Dieses ist kommerziell erhältlich und ist das Standardreagenz für die Synthese von Azidoaffinitätsmarkern. Da mit dem Fluorid eine gute Abgangsgruppe am aromatischen Kern zur Verfügung steht, kann diese Gruppe über eine nukleophile Substitution am Aromaten direkt mit dem Carbohydrazidteil von Lucifer Yellow verbunden werden. Die  $S_N$  Reaktion wird durch die Nitrogruppe in ortho Position zusätzlich begünstigt. In so aktivierten Aromaten lassen sich Halogene bereits unter milden Bedingungen durch nukleophile Agenzien austauschen, sodass die Kopplung an den Farbstoff unter milden Bedingungen, das heisst wie gefordert bei mässiger Erwärmung möglich sein sollte.

## 4.2. Kommentare zu den Synthesen

### 4.2.1. Synthese von Lucifer Yellow CH



Figur 6. Schema der Synthese von Lucifer Yellow CH (4).

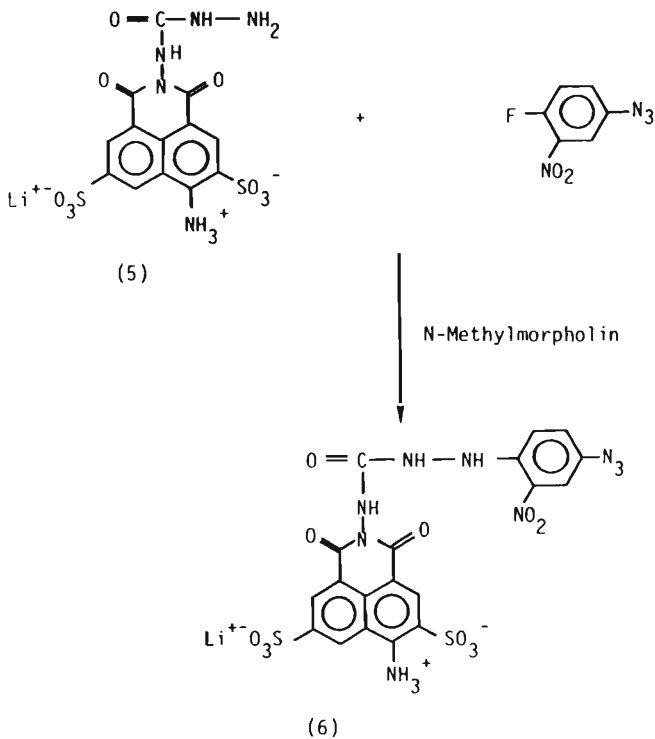


Die Präparation von Lucifer Yellow CH (Figur 6) wurde vor allem durch die Tatsache erschwert, dass dieser Farbstoff, als sehr gut wasserlösliche Verbindung, mit herkömmlichen Methoden (TLC, Papierchromatographie, Gelfiltration etc.) nicht gereinigt werden konnte. Unkontrollierbare Affinitäten zu den Trägermaterialien führten unweigerlich zu "Verschmieren" und damit zum Ueberlappen verschiedener Komponenten eines Gemisches. Ionenpaar reverse phase HPLC war im Verlaufe dieser Arbeit die einzige befriedigende Methode um Reaktionsgemische zu analysieren. Aufgrund der sehr limitierten Kapazität war diese Methode für präparative Zwecke jedoch nicht geeignet.

Es wurde erkannt, dass bei der Anwendung des von Stewart (1981b) beschriebenen Syntheseweges keine reinen Produkte erhalten werden, sondern schlecht charakterisierte Gemische von mehreren, allerdings vermutlich sehr ähnlichen Komponenten. Dies war auch dann der Fall, wenn das kristallisierte Material ausgiebig mit Wasser und Ethanol gewaschen wurde, wobei massive Verluste in der Ausbeute in Kauf genommen werden mussten. Es zeigte sich, dass die in der erwähnten Arbeit angegebenen Reinheitskriterien (Elementaranalyse, UV/Vis Spektroskopie) in diesem Zusammenhang nicht genügen, da die einzelnen Komponenten nicht nur eine sehr ähnliche Struktur haben dürften, also mindestens den Naphtalimidteil gemeinsam haben, sondern dementsprechend auch sehr ähnliche spektroskopische Charakteristika aufweisen. Diese Tatsache fällt indessen in der üblichen Anwendung dieser Substanz, als reiner Farbstoff, nicht ins Gewicht, da alle Bestandteile die für die Fluoreszenz entscheidende Anregungsabsorption bei 430 nm aufweisen. Dagegen war es für eine chemische Derivatisierung wichtig, gut definiertes Material von abschätzbarer Reaktivität zur Verfügung zu haben. Kleine Mengen LY wurden deshalb mittels HPLC gereinigt. In einigen Experimenten verwendete man Material von Fluka.

#### 4.2.2. Kopplung von FNAP an LY

Aromatische Azide sind chemisch recht stabil und können daher selbst für mehrstufige Synthesen verwendet werden, solange sie nicht hohen Temperaturen oder stark oxidierenden oder



Figur 7. Schema der Synthese von NAP-Lucifer Yellow (6).

reduzierenden Bedingungen ausgesetzt werden (Bayley & Knowles, 1977; Patai, 1971). Allerdings sind die Verbindungen dieser Klasse sehr hitze- und lichtempfindlich. Sie müssen deshalb mit Vorsicht umkristallisiert werden, um temperaturabhängigen Zerfall zu verhindern. Sie wurden auf maximal 60°C erwärmt. Zudem wurden alle NAP - Verbindungen nur im Rot- oder Gelblicht bearbeitet, obwohl gefunden wurde, dass kurzes Belichten, vor allem von festen Substanzen, keinen beträchtlichen Zerfall bewirkte.

Das zentrale Problem bei der Verknüpfung dieser photolabilen Einheit mit dem Fluoreszenzfarbstoff (Figur 7) war die Suche nach einem Lösungsmittel, welches es erlaubt, das extrem hydrophile LY mit dem aromatischen, das heisst hydrophoben Azid in ein homogenes System zu bringen. So führte zum Beispiel die Verwendung des Wasser - Ethanol Gemisches von Jeng & Guillory (1975) nicht zum Erfolg, da es nicht gelang, die beiden Komponenten in einem sinnvollen Volumen zu lösen, was zu rascher Hydrolyse von FNAP und deshalb zu schlechten Umsätzen führte. Auch in DMF - Wasser konnte kein Umsatz erhalten werden, da ebenfalls stark verdünnt werden musste.

Ein deutlicher Fortschritt wurde dagegen durch die Umwandlung von LY vom Lithium- zum Tetrabutylammoniumsalz über Dowex Ionentauscher erzielt. Dadurch wurde seine Löslichkeit in Methanol und Ethanol deutlich erhöht. Trotzdem konnte in alkoholischen Lösungen auch unter diesen Bedingungen keine Kopplung erhalten werden, was unter Umständen auf die Solvolyse von FNAP durch diese protischen Lösungsmittel zurückzuführen ist.

Man versuchte, die Löslichkeitsprobleme zu umgehen, indem man FNAP zuerst mit Carbohydrazid reagieren liess und das dann gut wasserlösliche Produkt in einem zweiten Schritt mit dem Lucifer Yellow Anhydrid (3) zu koppeln versuchte. Beide Stufen führten jedoch zu mehreren Nebenprodukten, was den Einsatz dieser Strategie unvorteilhaft werden liess, nicht zuletzt wegen der bereits erwähnten Schwierigkeiten, LY und

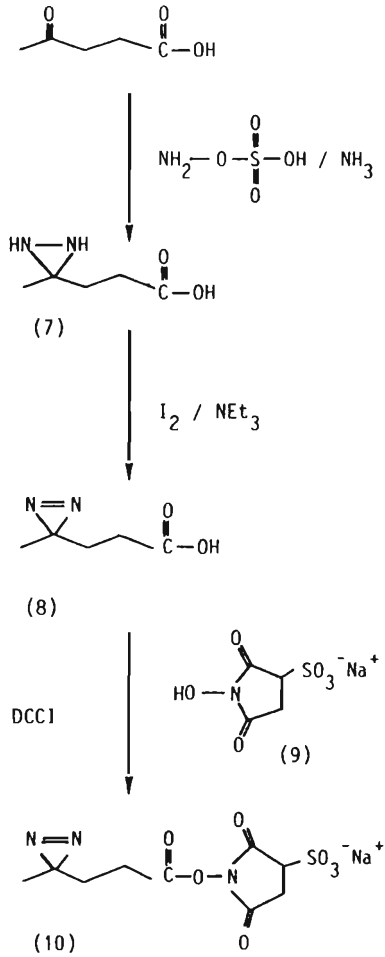
seine Derivate zu reinigen. Ein zweiter alternativer Weg, die Einführung von  $\beta$ -Alanin als Kopplungseinheit, führte unerklärlicherweise ebensowenig zum Erfolg, da es nicht gelang, NAP- $\beta$ -Alanin mit LY zu verbinden selbst dann nicht, wenn dieses durch die Veresterung mit N-Hydroxysuccinimid aktiviert wurde.

Als beste Variante stellte sich deshalb die direkte Kopplung in DMSO heraus, wie sie bereits von Hosang (1981) für eine ähnliche Reaktion angewandt worden war. Dieses Lösungsmittel erlaubt eine Reaktion unter konzentrierten Bedingungen und einen verhältnismässig guten Umsatz. Dafür muss es anschliessend auf recht zeitraubende Art und Weise entfernt werden, da es in diesem Falle nicht gelang, das Produkt zu präzipitieren.

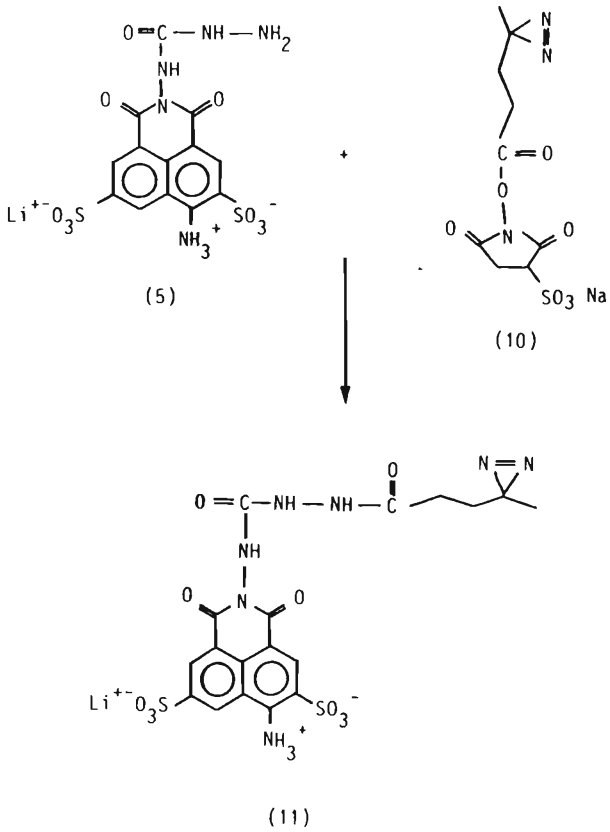
#### 4.2.3. Diazirin - Lucifer Yellow

Die klassische Methode zur Herstellung von Diazirinen nach Schmitz & Ohme (1961) erwies sich für die Synthese von 4-Diazirinovaleriansäure als nicht geeignet. Durch die ausgeprägte Hygroskopie der Lävulinsäure gelangte Wasser ins Reaktionsgemisch, was vor allem bei grösseren Ansätzen zu schwerlöslichen, gummiartigen Rückständen führte, aus denen die Produkte nicht mehr extrahiert werden konnten. Zudem führte die nachfolgende Oxidation mit Silberoxid regelmässig zu einer Vielzahl von Produkten.

Versuche, diese Probleme durch die Verwendung des Tertiärbutylesters der Lävulinsäure zu umgehen, waren ebenfalls nicht erfolgreich, da sowohl bei der Diaziridinbildung, als auch bei der Oxidation und der nachfolgenden Verseifung so viele Produkte entstanden, dass eine Reinigung nicht mehr zweckmässig erschien.



Figur 8. Schema der Synthese von 4-Diazirinovaleriansäure-N-hydroxysulfosuccinimidester (10).



Figur 9. Schema der Synthese von Diazirin-Lucifer Yellow (11).

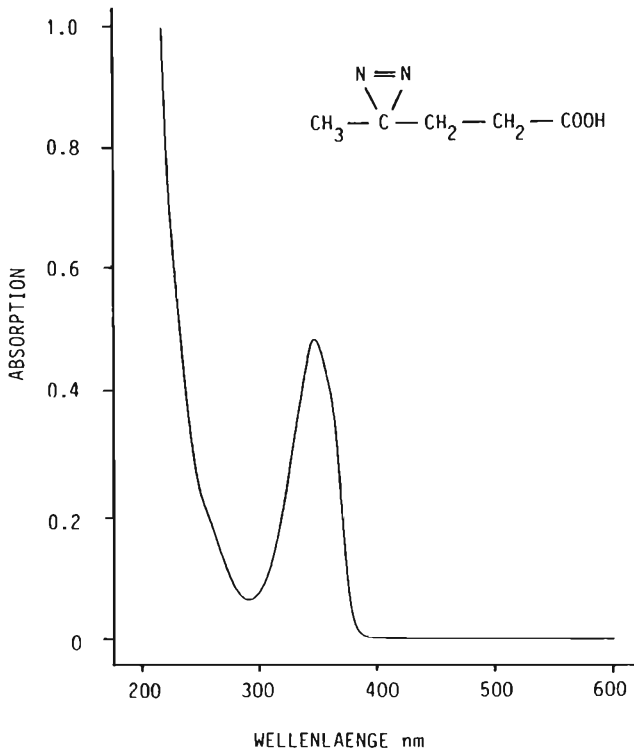
Die Methode nach Church & Weiss (1970), welche eine Modifikation der Hydroxylamin-O-sulfonsäure Reaktion von Schmitz & Ohme darstellt (Figur 8), führte dagegen, nach der mit Iod titrierten Oxidation, glatt zur 4-Diazirinovaleriansäure.

Die Verknüpfung mit LY stellt bei diesem Derivat kein Problem dar, gelang sie doch, nach Aktivierung mit N-Hydroxysulfosuccinimid, unter milden Bedingungen (RT, pH 7) und mit hohen Ausbeuten (Figur 9).

Die Abtrennung des überschüssigen N-Hydroxysulfosuccinimid war aufgrund unspezifischer Interaktionen auf Silikagel- und Sephadexsäulen nicht möglich. Dagegen gelang sie durch Gelfiltration auf Bio Gel P2. Dieses Material basiert auf Polyacrylamid, das offenbar sehr viel weniger Affinität zu Lucifer Yellow aufweist. Allerdings musste beachtet werden, dass bei der Elution die Ionenstärke grösser als 100 mM war, und dass die Laufgeschwindigkeit tief gehalten wurde. Um eine möglichst reine Präparation zu erhalten sammelte man überdies nur die konzentriertesten Fraktionen.

Da der Unterschied der Molekulargewichte von Lucifer Yellow und den verwendeten Salzen klein ist, war es nicht möglich, das Produkt durch eine Gelfiltration zu entsalzen. Die Tatsache, dass Lucifer Yellow selbst ein Salz ist verunmöglichte auch die Verwendung der üblichen kombinierten Ionentauschersysteme. Dies musste bei der Wahl sowohl des Kopplungspuffers als auch des Puffers für die Gelfiltration berücksichtigt werden. Man entschied sich für Karbonat- bzw. Formatsalze. Beide können nach dem Austausch ihrer Kationen über Dowex 50W-X2 durch Lyophilisation entfernt werden. Alle Arbeiten mit Diazirinen wurden unter Kunstlicht vorgenommen, das keine UV - Strahlung enthält. Zur Abklärung der chemischen Stabilität wurde eine Lösung der 4-Diazirinovaleriansäure in 1 M HCl hergestellt und mehrere Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. Es trat keine sichtbare Veränderung des UV/Vis Spektrums auf, was die exzellente

Säurestabilität dieser Verbindung unterstreicht. Es zeigte sich auch, dass das Diazirin die erwartete UV Absorption bei 350 nm aufweist, also das Spektrum von Lucifer Yellow tatsächlich in idealer Weise komplementiert (Figur 10).



Figur 10. UV/Vis Spektrum von 4-Diazirinovaleriansäure (10 mM in H<sub>2</sub>O).

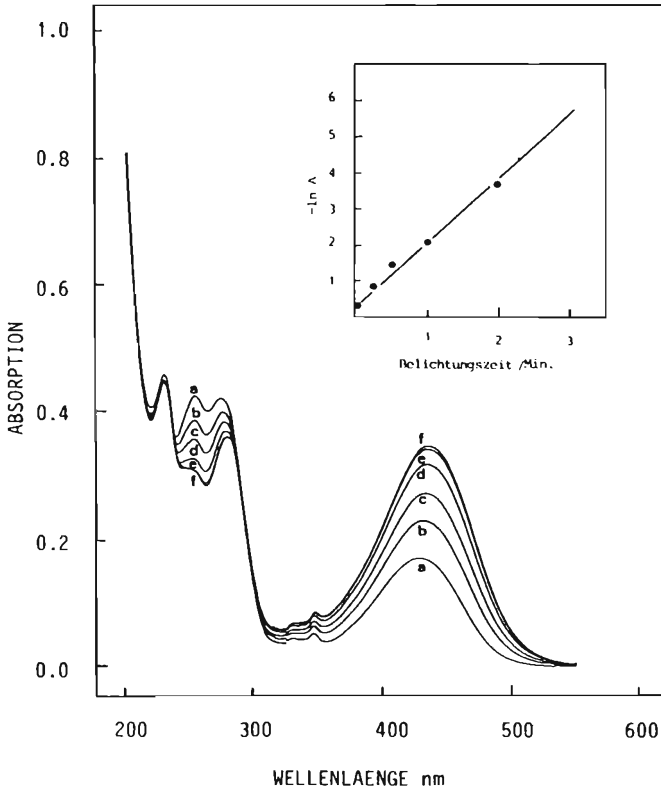


### 4.3. Bestimmung der Photolysebedingungen

#### 4.3.1. NAP - Lucifer Yellow

Obwohl die photochemischen Eigenschaften der NAP-Gruppierung in verschiedenen Verbindungen bereits genauer worden waren (Bayley, 1983), konnten keine Voraussagen über das Verhalten von NAP-LY gemacht werden, weil es sich gezeigt hatte, dass die Natur der angekoppelten Gruppen, aber auch die Konzentrationsverhältnisse, einen grossen Einfluss auf die photoinduzierten Veränderungen des UV/Vis Spektrums haben können. So konnte zum Beispiel Hosang (1981) für den Fall von NAP- $\beta$ -alanin-phlorizin das Verschwinden einer Bande bei 480 nm beobachten, während bei der Belichtung von NAP-Taurin die Entstehung einer neuen Absorption um 510 nm auffällt. Voraussagen waren für NAP-LY vor allem deshalb ungewiss, weil die UV/Vis Spektren beider Teile ähnlich sind und mit Ueberlappungen und entsprechenden Veränderungen der Eigenschaften gerechnet werden musste. Das Spektrum der NAP-Gruppe in wässriger Lösung zeigt starke Absorption bei 263 nm ( $\epsilon = 20000$ ) und eine schwächere Bande im sichtbaren Bereich bei 480 nm ( $\epsilon = 4500$ ). In beiden Regionen weist allerdings auch LY starke Absorptionen auf, insbesondere um 280 nm ( $\epsilon = 25000$ ). Für die Photolyse kommt deshalb in erster Linie die Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Frage, obwohl Matheson et al. (1977) gezeigt haben, dass dank der höheren Quantenausbeute und der entsprechend verkürzten Belichtung auch UV-Licht angewandt werden könnte, ohne dass eine merkliche Schädigung des biologischen Systems auftritt. Deshalb wählte man für dieses Derivat eine Filterkombination aus zwei Flüssigkeitsfiltern, wobei der eine mit fliessendem Wasser und der andere mit einer gesättigten Kupfersulfatlösung gefüllt war.

Wie Figur 11 zeigt, entspricht die Veränderung der spektralen Eigenschaften dieser neuen Verbindung tatsächlich nicht den



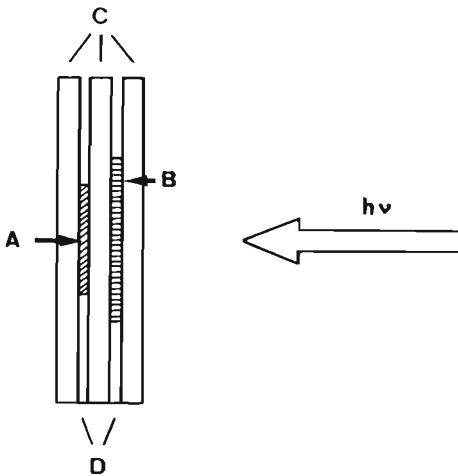
Figur 11. Photolyse von NAP-Lucifer Yellow. UV/Vis Spektren nach einer Belichtung von: a, 0" ; b, 15"; c, 30"; d, 60"; e, 120"; f, 240".  
Eingesetzte Graphik: Kinetik der Absorptionsabnahme bei 258 nm bei Belichtung durch Wasser- und Kupfer-sulfatflüssigkeitsfilter.

bisher bekannten Resultaten. Das verschiedentlich beobachtete Verschwinden der Bande bei 480 nm lässt sich nicht verfolgen, da diese Absorption durch diejenige von LY überdeckt wird. Eine Zunahme der Rotfärbung ist ebenfalls nicht festzustellen, dafür nimmt unter Belichtung die Absorption um 430 nm zu. Dies dürfte auf die Bildung von neuen Chromophoren zurückzuführen sein, die wahrscheinlich aus einer Dimerisierungsreaktion resultieren (Azoverbindungen). Hinweise darauf bilden die Tatsachen, dass die Erhöhung der Extinktion dieser Bande stark konzentrationsabhängig ist und nach einer Kinetik höherer Ordnung erfolgt. Für die Bestimmung der Halbwertszeit der photolabilen Gruppe fiel die Analyse dieses Bereiches des Spektrums deshalb ausser Betracht, da für eine solche einfache Zerfallsreaktion eine Kinetik erster Ordnung gefordert werden muss. Damit man das Verschwinden der NAP Gruppe dennoch verfolgen konnte, suchte man nach einer Wellenlänge, bei der die Absorptionsveränderung diesen kinetischen Forderungen entspricht. Dies ist beispielsweise für die Extinktion bei 258 nm der Fall, wie die eingesetzte Graphik in Figur 11 illustriert. Die daraus abgeleitete Halbwertszeit beträgt 30 Sekunden und ist somit sogar wesentlich kürzer als diejenige von NAP- $\beta$ -Alanin, die Hosang (1981) mit 90 Sekunden bestimmte.

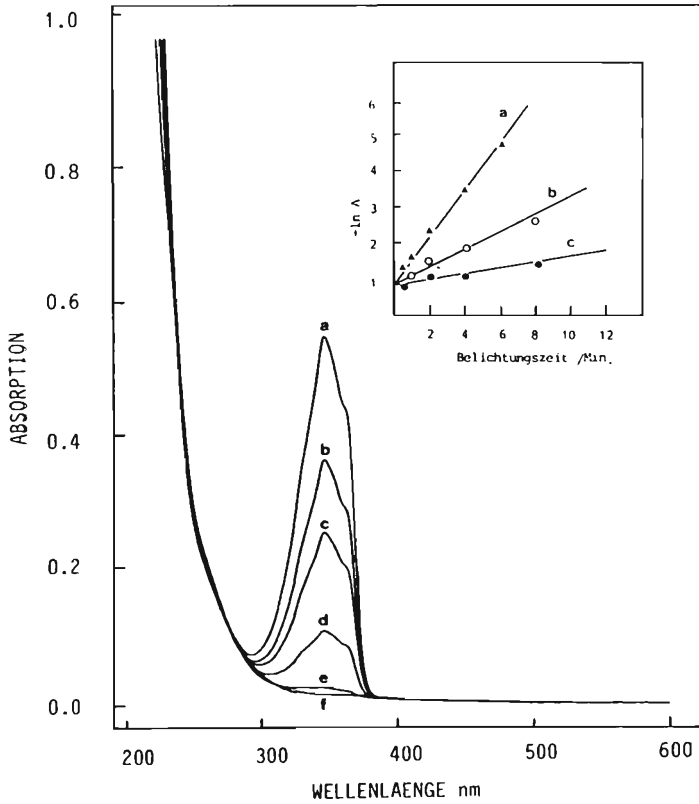
#### 4.3.2. Diazirin - Lucifer Yellow

Wie alle Diazirine besitzt auch diese Verbindung die typische Absorptionsbande im nahen Ultraviolett (348 nm). Allerdings ist der Extinktionskoeffizient mit  $\epsilon = 48$  erheblich kleiner als die Werte für die bisher gebräuchlichen aromatischen Verbindungen. Es musste deshalb mit einer empfindlichen Verlängerung der Halbwertszeit gerechnet werden. Da LY ungleich höhere Absorptionen aufweist und die Diazirinbande

völlig überdeckt, konnte das Photolyseverhalten nicht am Endprodukt untersucht werden. Als Modell verwendete man deshalb die Photolyse von 4-Diazirinovaleriansäure, wobei man durch das Einschleiben eines äquimolaren LY Flüssigkeitsfilters gleicher Dicke den Einfluss dieses Teils des Moleküls simulierte (Figur 12). Für die Halbwertszeit konnten unter diesen Bedingungen 45 Sekunden bestimmt werden (Figur 13), was die erwartete Erhöhung dieses Wertes gegenüber den aromatischen Diazirinen, wie zum Beispiel Trifluoromethyliodophenyldiazirin (TID), für das 7 Sekunden gefunden wurden (Brunner & Semenza, 1981), bestätigt.



Figur 12. Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Bestimmung der Photolyseeigenschaften von 4-Diazirinovaleriansäure in Anwesenheit von LY:  
A = Lucifer Yellow CH, 10 mM in H<sub>2</sub>O.  
B = 4-Diazirinovaleriansäure, 10 mM in H<sub>2</sub>O.  
C = Pyrexglasplatten.  
D = Teflonabstandhalter.



**Figur 13.** Photolyse von 4-Diazirinovaleriansäure. UV/Vis Spektren nach einer Belichtung von : a, 0"; b, 15"; c, 30"; d, 60"; e, 120"; f, 240". Belichtungsbedingungen wie in Fig. 12 dargestellt. Eingesetzte Graphik: Kinetik der Absorptionsabnahme bei 348 nm bei Belichtung. Abhängigkeit von den verwendeten Filterkombinationen:  
a)  $H_2O$ ,  $CuSO_4$ .  
b)  $H_2O$ ,  $CuSO_4$ , Chromato Vue C 29 UV Filter.  
c)  $H_2O$ ,  $CuSO_4$ , Balzers Filtraflex R-UV (F).

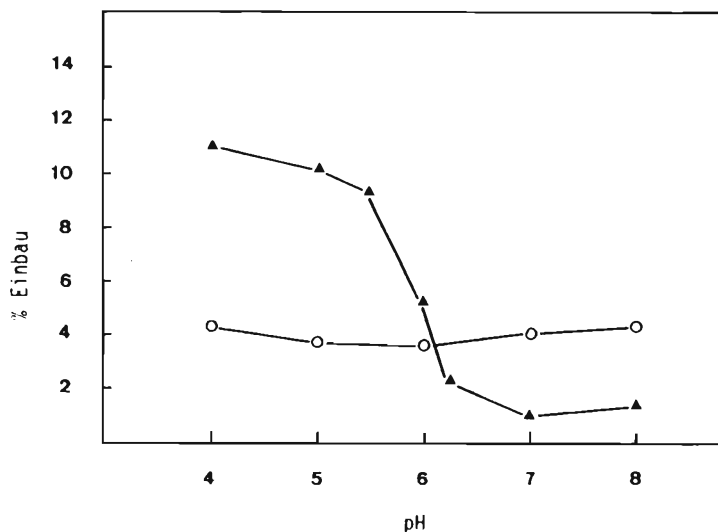
Die Abnahme der beobachteten Absorptionsbande erfolgt nach der Kinetik einer Reaktion erster Ordnung, wie es für einen monomolekularen photolytischen Zerfall erwartet werden kann (eingesetzte Graphik in Figur 13). Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass selbst ausgedehnte Belichtung keinen Einfluss auf das Absorptionsspektrum von Lucifer Yellow hat. Anhand dieses Kriteriums darf es demzufolge als photochemisch inert betrachtet werden.

Um die photoinduzierten Schädigungen an den verwendeten Membranen auf ein Minimum zu reduzieren, wurde das eingesetzte Licht durch den Einsatz von Interferenzfiltern von Kontron (Chromato Vue C 29) und Balzers (Filtraflex R-UV (F), Wellenlänge 252 nm, Transmission 30 %, Halbwertsbreite 22 nm) weiter eingeschränkt. Offensichtlich wurde dabei aber auch ein grosser Anteil der für die Photolyse aktiven Strahlung absorbiert, was sich in stark verkleinerten Geschwindigkeitskonstanten manifestiert (eingesetzte Graphik in Figur 13). Die entsprechenden Halbwertszeiten betragen unter diesen Bedingungen 2 bzw. 15 Minuten, was den Einsatz dieser Filter für die Untersuchung zeitabhängiger Prozesse praktisch verunmöglicht.

#### 4.4. Markierung von Modellproteinen

Für die Markierung durch das Diazirinderivat von LY ist die durch Photoisomerisation entstandene Diazoverbindung verantwortlich. Bekannte Substanzen diese Typs (Diazoacetate, Phenyldiazomethan) zeigen eine ausgeprägte pH Abhängigkeit ihrer Stabilität. Oberhalb pH 6 sind sie relativ stabil, reagieren aber bei pH 3.5 praktisch augenblicklich (Offord, 1969; Means & Feeney, 1971). Es musste deshalb abgeklärt werden, ob sich die aliphatische Verbindung ähnlich verhält. Dazu markierte man BSA im homogenen System mit Diazirin-LY.

Freies LY trennte man durch eine Gelfiltration vom proteingebundenen Material. Die Einbauraten bestimmte man durch den Vergleich der Fluoreszenz dieser beiden Fraktionen. Figur 14 demonstriert, dass der neue Marker in der Tat mit den bekannten Diazoverbindungen vergleichbar ist, zeigt



Figur 14. pH Abhängigkeit der Einbauraten von Diazirin-LY in BSA (Dreiecke) und NAP-LY (leere Kreise) in RNase. Markerkonzentration 1 mg/ml; BSA/RNase 10 mg/ml. Photolyse: Diazirin-LY, 90" in 50 mM MES/NaOH. NAP-LY, 60" in 50 mM NaP<sub>i</sub>.

Auftrennung von proteingebundenem und freiem LY durch Gelfiltration an Sephadex G-50 (0.5 x 30 cm) in PBS. Die Prozentsätze für die unbelichteten Kontrollen waren pH unabhängig und kleiner 1 %. Die angegebenen Werte sind entsprechend korrigiert (Mittelwerte von 3 Messungen Standardabweichungen in der Grösse der verwendeten Symbole).

die Verbindung doch eine starke Abnahme der Markierungseffizienz um pH 6. Dieses Phänomen war unabhängig von den verwendeten Zielmolekülen, konnte es doch sowohl bei der Markierung von Erythrocytenmembranen, als auch bei der Insertion in reine Proteine wie BSA oder Ribonuklease beobachtet werden.

Dagegen zeigte NAP-Lucifer Yellow wie erwartet keine pH-Abhängigkeit seiner Markierungsrate (Figur 14). Diese konnte für den Fall dieses Derivates jedoch nicht am Beispiel von BSA ermittelt werden, weil man auch in den unbelichteten Kontrollen erhöhte Fluoreszenz der Proteinfraction feststellen konnte. Eventuell ist dies auf eine nicht kovalente Bindung der NAP-Gruppe an die hydrophobe Tasche von BSA zurückzuführen. Dieser Effekt konnte durch die Verwendung von Ribonuklease als Zielmolekül umgangen werden. Unter diesen Bedingungen erhielt man sowohl für unbelichtete Kontrollen von NAP-LY und Diazirin-LY, als auch für belichtete und unbelichtete Proben von LY identische Hintergrundswerte. Sie waren kleiner als 1 % und nicht vom pH Wert des Photolysegemisches abhängig.

Bei der Bestimmung dieser Abhängigkeiten stellte es sich heraus, dass es wichtig ist, die Photolysegemische wirksam zu puffern. Dazu dürfen jedoch keine carboxylischen Puffer, wie zum Beispiel Acetat, verwendet werden, da sie mit der entstehenden Diazoverbindung reagieren und die Markierung des eigentlichen Zielmoleküls drastisch verringern (Tabelle 1). Den gleichen Effekt beobachtet man, wenn die Photolysemischung Reagenzien mit Sulfhydrylgruppen enthält (DTE). Auch sie wirken als Scavenger und unterdrücken die beobachtbare gruppenspezifische Markierung der Zielproteine. Für den untersuchten Bereich wählte man deshalb MES (Morpholinethansulfonsäure) als Puffersystem. Die Verwendung von Phosphatpuffern war nicht möglich, wie der Vergleich von MES und Phosphatpuffern gleicher Konzentration zeigt, ergibt sich doch eine dreimal höhere Einbaureate für das erste



Puffer	NaCl	DTE	Einbaurrate
5 mM Phosphat	-	-	4.9 $\pm$ 0.2 %
50 mM Phosphat	-	-	4.8 $\pm$ 0.35 %
50 mM MES/NaOH	-	-	11.6 $\pm$ 0.25 %
50 mM NaAc	-	-	2.3 $\pm$ 0.2 %
5 mM Phosphat	150 mM	-	4.6 $\pm$ 0.25 %
5 mM Phosphat	150 mM	2 mM	3.1 $\pm$ 0.1 %

Tabelle 1. Abhängigkeit des Einbaus von Diazirin-LY in BSA unter variablen Puffer-, Salz- und DTE Bedingungen.

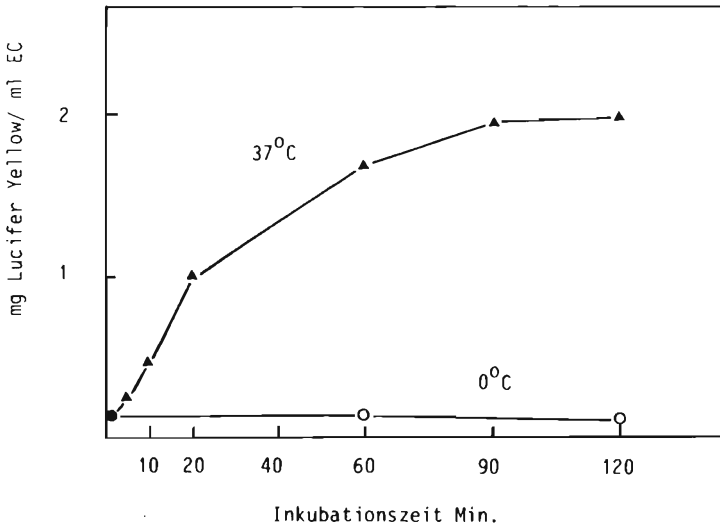
BSA 10 mg/ml; Diazirin-LY 2 mg/ml; pH 5 in allen Proben.

System, was bestätigt, dass mit Phosphatpuffern üblicher Konzentration der pH Wert der Lösung nicht während der ganzen Reaktion konstant gehalten werden kann (Tabelle 1).

#### 4.5. Markierung von Erythrocytenmembranen

##### 4.5.1. Membrantransport von Lucifer Yellow

Als mehrfach geladenes Anion kann Lucifer Yellow die Lipid-doppelschicht einer Membran nicht passieren. Eine Liposomenmodellmembran stellt somit für diese Verbindung eine Barriere dar. Dies braucht indessen für eine biologische Membran nicht notwendigerweise der Fall zu sein, wie das Beispiel von NAP-Taurin (Staros et al., 1978) zeigt. Dieser Marker weist ähnliche Charakteristika wie LY auf. Beide Verbindungen sind relativ klein und tragen neben der hydrophoben photoaktivierbaren Gruppe auch negative Ladungen. Diese Eigenschaften machen auch LY zu einem potentiellen Substrat für Anionentransportproteine wie das Bande 3 Protein der Erythrocytenmembran. Um diese Vermutung zu bestätigen bestimmte man die Aufnahme von LY in intakte Erythrocyten. Die Zellen wurden für bestimmte Zeiten mit dem Farbstoff inkubiert, gewaschen, aufgeschlossen und die aufgenommene Fluoreszenz bestimmt. Figur 15 zeigt, dass LY tatsächlich transportiert wird. Der Influx ist zeit- und temperaturabhängig und erfolgt auch, wenn ATP-verarmte Zellen verwendet werden, was auf einen energieunabhängigen Prozess (erleichterte Diffusion) schliessen lässt. Durch den Vergleich mit einer Standardkurve kann die aufgenommene Farbstoffmenge quantifiziert und zum Volumen der verwendeten Zellen in Relation gesetzt werden. Wenn man vereinfachend das verfügbare Innenvolumen dem Totalvolumen der Erythrocyten gleichsetzt, erhält man daraus im Innern der Zelle eine Endkonzentration, die mit der Anfangskonzentration im Medium



Figur 15. Aufnahme von Lucifer Yellow CH durch intakte Erythrocyten in Abhängigkeit von der Zeit und der Temperatur. LY Konzentration 2 mg/ml; EC Hämatokrit 8% in PBS;

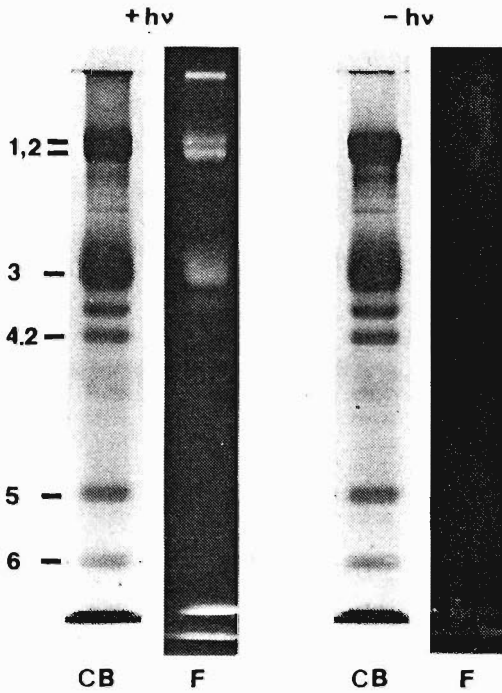
identisch ist. Die Aufnahme von LY erfolgt also passiv bis zum Konzentrationsgleichgewicht. Diese Eigenschaften deuten stark darauf hin, dass tatsächlich das Bande 3 Protein für diesen Transport verantwortlich ist.

#### 4.5.2. Charakterisierung der Proteinmarkierungsmuster durch SDS-PAGE

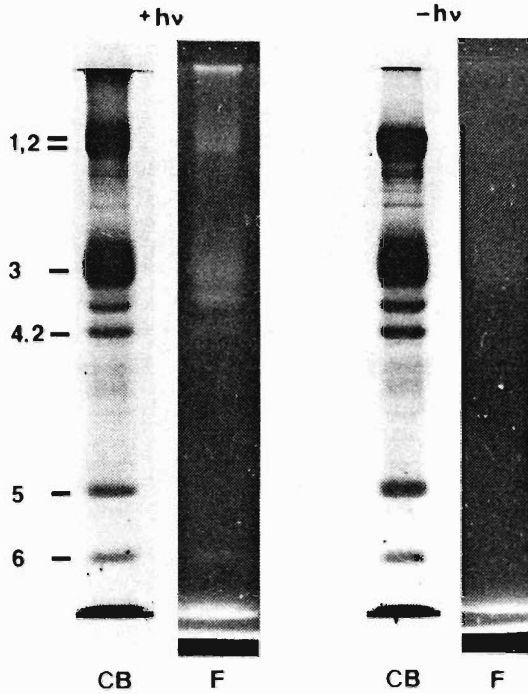
Mittels SDS-PAGE sollte untersucht werden, welche Proteine in welcher Intensität durch die gruppenspezifischen Modifikationsreagenzien markiert werden. Um ein möglichst aussagekräftiges Bild über diese Markierung zu erhalten, versuchte man, die Membran differenziell nur von aussen, nur von innen, und von beiden Seiten zu markieren. Es war nicht möglich dazu intakte Erythrocyten zu verwenden, da das stark absorbierende Hämoglobin sich schon nach kurzer Belichtungszeit bräunlich verfärbte und sich bei der nachfolgenden Präparation der Membranen nicht mehr durch blosse Hämolyse von diesen trennen liess, was auf unkontrollierbare photoinduzierte Vernetzungsreaktionen hinweist. Es wurde deshalb versucht, Markierungen an offenen und an wiederverschlossenen Membranen vorzunehmen, wobei der Marker je nach Versuch ein- oder ausgeschlossen wurde. Da festgestellt worden war, dass Lucifer Yellow durch das Bande 3 Protein transportiert wird, wurden in einigen Experimenten Membranen von Erythrocyten verwendet, deren Anionentransporter durch die Behandlung mit DIDS irreversibel gehemmt worden war. Zudem wurde bei diesen Experimenten auf Eis gearbeitet.

Die Figuren 16 und 17 zeigen, dass sowohl mit NAP-LY, als auch mit Diazirin-LY eine deutliche Markierung der wichtigsten Erythrocytenmembranproteine (Spektrin, Banden 3, 4.1, 4.2, 6) erhalten werden konnte. Aus dem Vergleich von Proteinfärbung und relativer Fluoreszenzintensität kann geschlossen werden, dass beim Diazirin-LY keine auffallende Bevorzugung eines bestimmten Proteins auftritt (Figur 16). Hingegen führt das NAP Derivat zu einer überproportional starken Markierung der Banden 4.1 und 6 (Figur 17).

Bei der Analyse einer ganzen Reihe von Versuchen fiel ausserdem auf, dass gewisse Proteine nach der Belichtung eine



Figur 16. SDS-PAGE von mit Diazirin-LY markierten versiegelten Erythrocytenmembranen (50 µg Protein pro Bahn). + hv, belichtete Probe; - hv, Dunkelkontrolle. CB = Coomassie Brilliant Blue Proteinfärbung. F = Fluoreszenzphotographie derselben Probe. Photolyse 90"; Diazirin-LY 1 mg/ml; EC Membranprotein 1 mg/ml; 20 mM MES/NaOH, pH 5. Bezeichnung der Hauptbanden gemäss der Numerierung von Steck (1974).



Figur 17. SDS-PAGE von mit NAP-LY markierten versiegelten Erythrocytenmembranen (50 µg Protein pro Bahn). + hv, belichtete Probe; - hv, Dunkelkontrolle. CB = Coomassie Brilliant Blue Proteinfärbung. F = Fluoreszenzphotographie derselben Probe. Photolyse 60"; NAP-LY 1 µg/ml; EC Membranprotein 1 µg/ml; 20 mM Phosphat, pH 7.4.

besonders starke Neigung zur Aggregatbildung aufweisen. Dies gilt vor allem für Spektrin I und II, die bei allen belichteten Proben in der Proteinfärbung deutlich schwächer erscheinen, eine Abnahme die offensichtlich mit der Zunahme der Aggregate am Start von Sammel- und Trenngel korreliert. Dieser Effekt konnte auch durch die Verwendung von Licht schmalere Bandbreite nicht zum Verschwinden gebracht werden. Die zusätzlich verwendeten optischen Filter führten lediglich zu erheblich erhöhten Photolysezeiten, jedoch nicht zu einer signifikanten Abnahme der photoinduzierten Aggregation. Dies kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass Lucifer Yellow die eingestrahlte Lichtenergie via "energy transfer" auf die Proteine überträgt und somit indirekt die beobachteten Veränderungen auslöst. Einen gewissen Hinweis auf diese Möglichkeit stellt die Tatsache dar, dass auch die Anwesenheit von nicht derivatisiertem LY nach Belichtung zu Aggregaten von Proteinen führt. Es handelt sich demnach nicht um eine direkte Wirkung der photoaktivierbaren Gruppe etwa im Sinne einer photoinduzierten Vernetzung, sondern um einen nicht genauer abgeklärten sekundären Effekt der Belichtung auf gewisse periphere Proteine.

Das Markierungsmuster zeigt keine Abhängigkeit von der Art der verwendeten Membranpräparation. Wieder verschlossene Membranen, bei denen der Marker von aussen zugegeben worden war, zeigten wie die offenen Membranen eine starke Markierung von Spektrin. Dieser Umstand konnte auch durch die Verwendung von mit DIDS behandelten Membranen und das Arbeiten auf Eis nicht eliminiert werden. Offensichtlich gelingt es durch die beschriebenen Massnahmen nicht, den Farbstoff am Eindringen ins Zellinnere zu hindern. Dagegen konnte auf den Gelen eine deutliche Abhängigkeit von der Salzkonzentration während der Photolyse festgestellt werden. Die Verwendung von offenen Membranen in Hämolysepuffer ohne Salze führte zu einer deutlichen Zunahme der Aggregate am Startpunkt der Gele (nicht gezeigt).

Wie bereits früher festgestellt (Brunner et al., 1980; Patai, 1971) sind Diazirine und NAP Verbindungen im Dunklen bemerkenswert stabil. Dies wird bestätigt durch die Feststellung, dass die Kontrollen ohne Belichtung keine Markierung ergaben. Unspezifische Signale (lichtunabhängige Reaktionen, Bindungseffekte) können also ausgeschlossen werden.

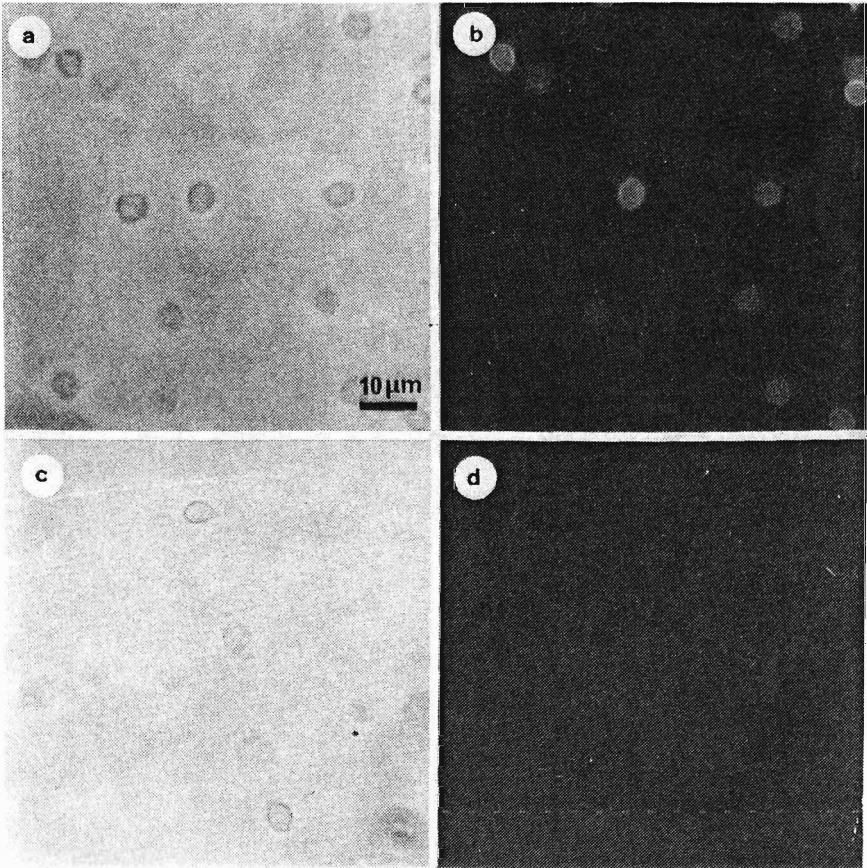
#### 4.5.3. Fluoreszenzmikroskopie

Durch die Analyse im Fluoreszenzmikroskop sollte abgeklärt werden, ob die aufgrund der kovalenten Markierung erhaltene Fluoreszenzintensität stark genug ist, um ein aussagekräftiges Bild von der Verteilung des Modifizierungsreagenz im Präparat zu erhalten. Zudem war es durch den Vergleich von belichteten und unbelichteten Proben im Phasenkontrastbild möglich, eventuelle schädliche Auswirkungen des Markierungsschrittes auf die biologische Struktur zu untersuchen.

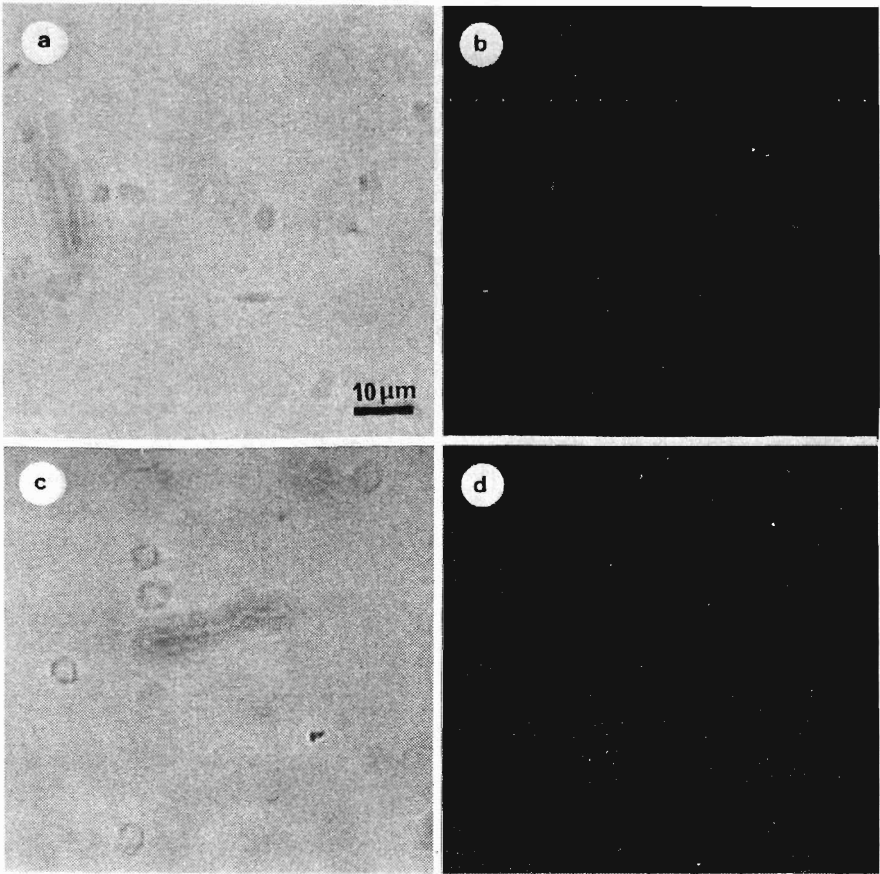
Figur 18 zeigt, dass Membranen, die mit Diazirin-LY markiert wurden, die eingangs aufgestellte Forderung erfüllen. Die Fluoreszenz ist gut erkennbar und offensichtlich am Rand der Membransäcke am stärksten, ein deutliches Indiz dafür, dass der Farbstoff tatsächlich an die Membran gebunden ist, und die beobachtete Fluoreszenz nicht etwa auf lediglich eingeschlossenes Reagenz zurückgeführt werden kann.

Figur 19 illustriert, dass die nach Modifikation mit NAP-Lucifer Yellow erhaltene Fluoreszenzintensität deutlich schwächer erscheint und stellenweise nur unbefriedigend vom Hintergrund zu unterscheiden ist. Diese Unterschiede in der sichtbaren Markierung konnten durch die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität mittels Cytofluorometrie bestätigt (Tabelle 2) werden. Während die unbelichteten Kontrollen in beiden Fällen praktisch nicht vom leeren Feld zu unter-





Figur 18. Fluoreszenzmikrophotographie von mit Diazirin-LY markierten versiegelten Erythrocytenmembranen.  
a, Phasenkontrastbild belichtete Probe.  
b, Fluoreszenzbild belichtete Probe.  
c, Phasenkontrastbild unbelichtete Kontrolle.  
d, Fluoreszenzbild unbelichtete Kontrolle.  
Photolyse 90"; EC Membranen 1 mg Protein/ml;  
Diazirin-LY 1 mg/ml; 20 mM MES/NaOH, pH 5.



**Figur 19.** Fluoreszenzmikrophotographie von mit NAP-LY markierten versiegelten Erythrocytenmembranen.  
a, Phasenkontrastbild belichtete Probe.  
b, Fluoreszenzbiid belichtete Probe.  
c, Phasenkontrastbild unbelichtete Kontrolle.  
d, Fluoreszenzbiid unbelichtete Kontrolle.  
Photolyse 60"; EC Membranen 1 ng Protein/ml;  
NAP-LY 1 ng/ml; 20 mM Phosphat, pH 7.4.

scheiden sind, zeigen die mit Diazirin-LY bzw. NAP-LY markierten Proben einen Unterschied von rund einer Grössenordnung. Mögliche Gründe für diese Diskrepanz werden in der Diskussion besprochen.

Probe	Belichtung	relative Fluoreszenz
Diazirin-LY	+	412.0 $\pm$ 11
Diazirin-LY	-	38.8 $\pm$ 4
Hintergrund	-	24.4 $\pm$ 2
NAP-LY	+	106.0 $\pm$ 27
NAP-LY	-	19.2 $\pm$ 4
Hintergrund	-	9.4 $\pm$ 2

Tabelle 2. Fluoreszenzintensitäten von belichteten und unbelichteten Erythrocytenmembranen. Die Werte beziehen sich auf einen willkürlichen, internen Standard und stellen den Durchschnitt von jeweils 100 Messungen dar.

Die Phasenkontrastbilder beider Präparate zeigen, dass die Belichtung auf lichtmikroskopischer Ebene zu keiner sichtbaren Veränderung der Membranstruktur führt. Dies gilt jedoch nur für Experimente mit wieder verschlossenen Membranen in Gegenwart von physiologischem Puffer. Die Belichtung von vollständig durchlässigen Membranen in Hämolysepuffer führte zu Aggregaten von Membranen und zu Strukturen, die an sichelzellanämische Erythrocyten erinnern. Offensichtlich

kommt es unter diesen Bedingungen zu erheblichen Veränderungen des Cytoskelettes, eine Tatsache, die gut mit den auf SDS-Gelen zu beobachtenden Spektrin Aggregaten übereinstimmt.

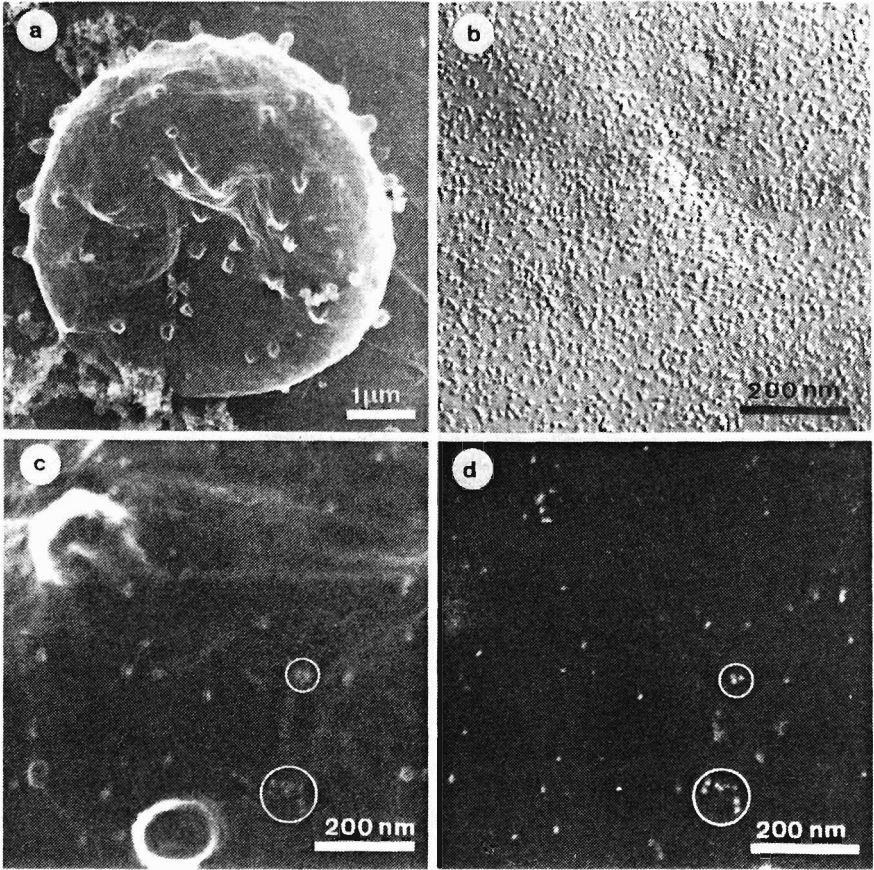
#### 4.5.4. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Studien sollten einerseits demonstrieren, dass es möglich ist, die kovalent an die Membran gebundenen LY Moleküle mit einem spezifischen Antikörper und kolloidalem Gold nachzuweisen. Voraussetzung dafür war, dass ein Antiserum gegen den Naphtalimidteil von LY zur Verfügung stand. Die an den Farbstoff gebundenen primären Antikörper konnten dann durch einen zweiten Antikörper (Ziegen-anti-Kaninchen Ig G), an den kolloidales Gold gekoppelt war, sichtbar gemacht werden. Andererseits bot sich eine weitere Möglichkeit den Einfluss der Photolyse auf die biologische Struktur zu untersuchen. Man verwendete zu diesem Zweck die Rasterelektronenmikroskopie (SEM). Im Gegensatz zur Dünnschnitttransmissionselektronenmikroskopie erlaubt diese eine dreidimensionale Analyse der Verhältnisse auf der Zelloberfläche, auch von voluminöseren Proben. Ein Nachteil des SEM, die schlechte Auflösung, kann durch neue Strahlerzeugungssysteme soweit verbessert werden, dass auch Dimensionen unter 10 nm darstellbar sind (Detektion der sekundären Elektronen; vermittelt ein Bild der gesamten Struktur). Zudem ist es jetzt möglich, Marker wie kolloidales Gold von dieser Grösse durch die Zusatzinformation, die man durch die Erfassung rückgestreuter Elektronen erhält, von den biologischen Strukturen gleicher Grösse, zu unterscheiden, da bei diesem materialabhängigen Bild (BSE - Modus) lediglich die Goldpartikel, nicht jedoch organische Moleküle sichtbar werden. Somit wird es möglich, auch in

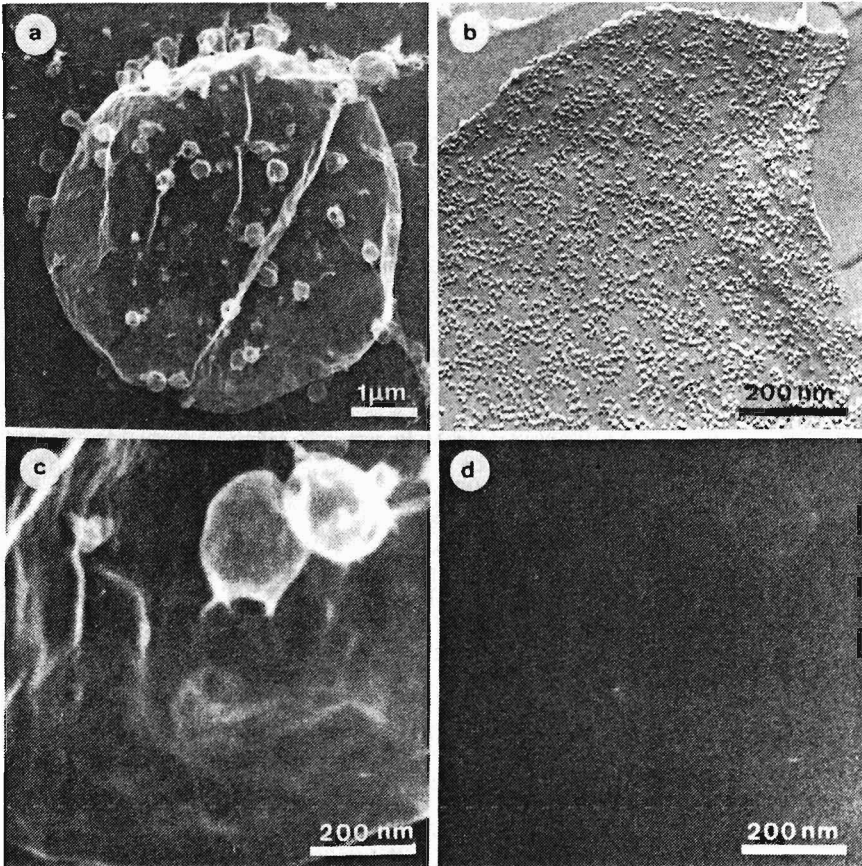
hochauflösenden Bildern, eine unzweideutige und präzise Lokalisation von Oberflächenantigenen, wie in unserem Falle des gebundenen LY, vorzunehmen. Zu diesem Zweck wurden die markierten Proben, sowie die unbelichteten Kontrollen nach dem Prozedere von Walther (1984) für die Analyse im Elektronenmikroskop präpariert. Durch die Herstellung von Gefrierbrüchen und die Betrachtung der plasmatischen Bruchfläche erhielt man Gelegenheit, die laterale Verteilung der in die Membran eingelagerten Proteine zu untersuchen. Dieser Parameter wird allgemein als Mass für die Erhaltung der nativen Struktur betrachtet.

Der Vergleich der Uebersichtsbilder (Figuren 20a, 21a) von belichteten und unbelichteten Proben zeigt, dass sich auf dieser Ebene keine signifikanten strukturellen Veränderungen ergeben. Der auffallenste Aspekt, die Bildung von Ausstülpungen an der Oberfläche ist nicht von der Belichtung abhängig. Es handelt sich dabei vielmehr um die erste Stufe einer Abschnürung von spektrinfreien Vesikeln nach ATP Verarmung, die bereits von Lutz et al. (1977) beim in vitro Alterungsprozess von ganzen Erythrocyten festgestellt wurde. Solche Veränderungen sind also von den Bedingungen während der Präparation und während des Verschliessens der Membranen abhängig und bereits vor der Markierung festzustellen.

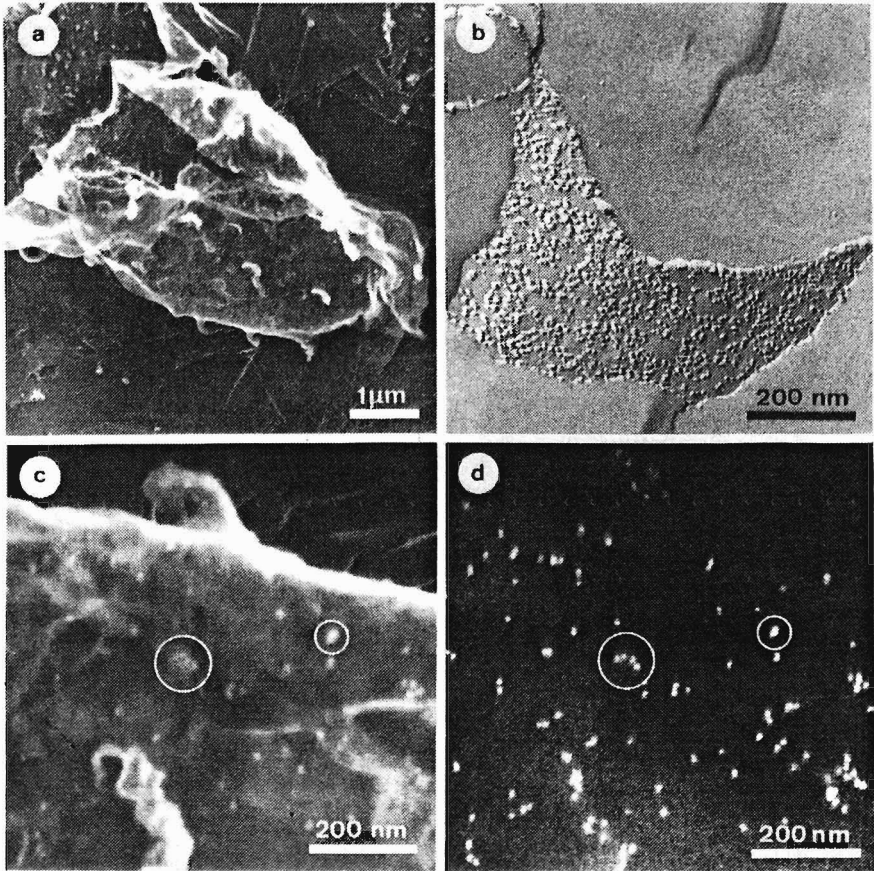
Für die Markierung musste die Probe mit Diazirin-LY bei pH 5 inkubiert werden, während die Belichtung von NAP-LY unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden konnte. Die Dunkelkontrollen dieser beiden Proben unterscheiden sich nur in diesem Parameter. Sie konnten deshalb verwendet werden um den möglichen Effekt der pH Senkung auf die Strukturhaltung abzuschätzen. Der Vergleich der entsprechenden Uebersichten (21a, 23a) zeigt, dass eine derartige Abhängigkeit nicht zu beobachten ist, was darauf hindeutet, dass man den pH Wert einer Probe kurzfristig absenken kann, ohne sichtbare Artefakte zu produzieren. Auch die nach dem Gefrierbruch erhaltenen Bilder (Figuren 20-23b) zeigen keine auffallende



Figur 20. Elektronenmikroskopie von mit Diazirin-LY markierten versiegelten Erythrocytenmembranen.  
a, Uebersicht ganze Membran im SEM.  
b, Gefrierbruch (plasmatische Bruchseite).  
c, Oberflächenausschnitt SE-Modus.  
d, Oberflächenausschnitt BSE-Modus.  
Photolyse 90"; EC Membranen 1 mg Protein/ml; Diazirin-LY 1 mg/ml; 20 mM MES/NaOH, pH 5.

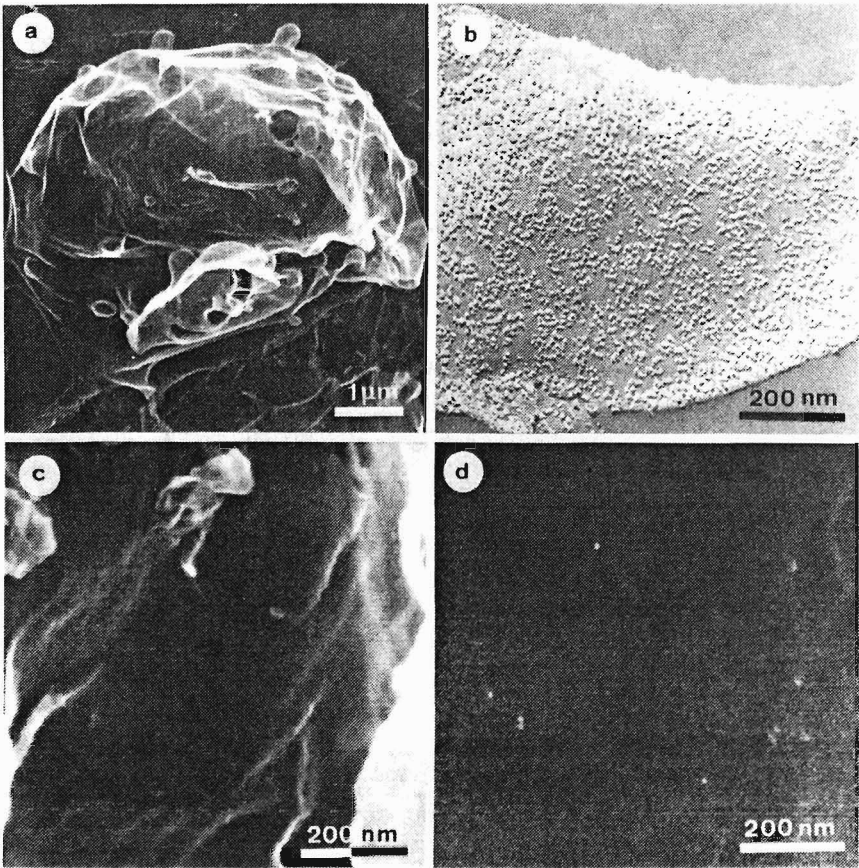


Figur 21. Elektronenmikroskopie von mit Diazirin-LY markierten versiegelten Erythrocytenmembranen; Dunkelkontrolle; Probenzusammensetzung wie in Fig. 20 a, Uebersicht ganze Membran im SEM. b, Gefrierbruch (plasmatische Bruchseite). c, Oberflächenausschnitt SE-Modus. d, Oberflächenausschnitt BSE-Modus.



Figur 22. Elektronenmikroskopie von mit NAP-LY markierten versiegelten Erythrocytenmembranen.  
a, Uebersicht ganze Membran im SEM.  
b, Gefrierbruch (plasmatische Bruchseite).  
c, Oberflächenausschnitt SE-Modus.  
d, Oberflächenausschnitt BSE-Modus.  
Photolyse 60"; EC Membranen 1 mg Protein/ml; NAP-LY 1 mg/ml; 20 mM Phosphat, pH 7.4.





Figur 23. Elektronenmikroskopie von mit NAP-LY markierten versiegelten Erythrocytenmembranen; Dunkelkontrolle. Frobenzusammensetzung wie in Fig. 22.  
a, Uebersicht ganze Membran im SEM.  
b, Gefrierbruch (plasmatische Bruchseite).  
c, Oberflächenausschnitt SF-Modus.  
d, Oberflächenausschnitt BSE-Modus.

Veränderung der Partikelverteilung in der Membran, wie die Abbildung der plasmatischen Bruchfläche (plasmic fracture phase) zeigt. Die leichte Neigung zur Bildung von lateralen Proteinaggregaten ist ein bei dieser Präparationsmethode häufig zu beobachtendes und auch an intakten Erythrocyten vorkommendes Phänomen, das wahrscheinlich auf Segregationsvorgänge während des Einfrierens zurückzuführen ist. Diese Veränderungen der Verteilung müssen deshalb nicht mit den experimentellen Eingriffen während der Markierung in Zusammenhang gebracht werden.

Die Markierung mit kolloidalem Gold kann auf den Bildern des BSE Modus verglichen werden. Die Figuren 20d und 22d zeigen, dass die Markierung sowohl durch NAP-Lucifer Yellow, als auch durch Diazirin-Lucifer Yellow stark genug ist, um ein deutliches Bild der markierten Oberfläche zu erzeugen. Die Dunkelkontrollen (Figuren 21d, 23d) dagegen zeigen praktisch keine gebundenen Goldpartikel. Offensichtlich ist jedoch, dass die NAP-LY Markierung gegenüber derjenigen von Diazirin-LY zu einem leicht erhöhten Hintergrundsignal führt. Dies dürfte auf die bedeutend höhere Lichtsensitivität dieser Verbindung zurückzuführen sein, da bei einigen experimentellen Schritten eine gewisse minimale Belichtung nicht vermieden werden kann. Andererseits kann auch die nicht kovalente Bindung an die Membran durch hydrophobe Interaktion der aromatischen, photolabilen Einheit nicht völlig ausgeschlossen werden, doch scheint diese Möglichkeit sehr viel weniger wahrscheinlich. Unspezifische Bindung von primärem und sekundärem Antikörper konnten definitiv ausgeschlossen werden, da die entsprechenden Signale in der in dieser Beziehung identisch behandelten Diazirin-LY Dunkelkontrolle fehlen. Dies verdeutlicht auch, dass der elektronenmikroskopische Nachweis eindeutig der sensitivste ist, konnten doch weder im Fluoreszenzmikroskop noch auf dem SDS-Gel Markierungen auf den Dunkelkontrollen gefunden werden.

Der Vergleich von SE- und BSE-Modus (Figuren 20c,d bzw. 22b,d) illustriert, dass die Verteilung der Goldpartikel zufällig ist, das heisst, es erfolgt keine Bevorzugung bestimmter Strukturen, sondern eine korrekte Wiedergabe der erwarteten homogenen Verteilung der Proteine in der Membran.

Zusammenfassend darf festgestellt werden, dass es die Markierung mit LY erlaubt, im elektronenmikroskopischen Bild ein aussagekräftiges Muster der markerexponierten Membranen zu erhalten, ohne dass dabei sichtbare Veränderungen der biologischen Strukturen in Kauf genommen werden müssen. Kovalent gebundenes LY kann mit den etablierten Methoden der Elektronenmikroskopie genauso nachgewiesen werden, wie ein konventionelles Antigen einer Membran.

## 5. DISKUSSION

---

### 5.1. Synthesen von Lucifer Yellow und seinen Derivaten

Die Synthese der Lucifer Yellow Derivate gestaltete sich wesentlich aufwendiger als erwartet, obwohl bei der Wahl der Synthesestrategie möglichst einfache Wege mit wohlbekannteren Reaktionstypen berücksichtigt worden waren. Die Hauptschwierigkeiten lagen jedoch nicht bei den eigentlichen Reaktionsschritten, sondern vielmehr bei der Reinigung der entsprechenden Produkte. Dies gilt vor allem für die Synthese von Lucifer Yellow aus Brillantsulfoflavin. Es hatte sich aufgedrängt, diese Synthese selbst an die Hand zu nehmen, da die kommerziell erhältlichen Präparationen dieser Verbindung sehr teuer und von unbefriedigender Reinheit sind. Bei der Ausführung dieser Schritte gemäss Stewart (1981b) gelang es jedoch bei keiner Stufe durch Kristallisation reine Produkte zu erhalten. Die einzige Alternative, der Einsatz von Ionenpaar HPLC ist für präparative Zwecke zu aufwendig und deshalb nicht geeignet. Man ging deshalb im Verlaufe dieser Arbeiten schliesslich dennoch dazu über, kommerziell erhältliches Material zu verwenden, das anhand der dabei verwendeten Kriterien (HPLC) zu über 90 % rein war.

Die gleichen Probleme ergaben sich auch bei der Reinigung der photoaktivierbaren Derivate, da die neu eingeführten Gruppen zu keiner merklichen Änderung der physikalischen Eigenschaften dieser Verbindungen führten. Zusätzliche Schwierigkeiten bereitete dabei die Forderung nach Lichtabschluss während der dazu benötigten Schritte. Man verzichtete deshalb darauf, nicht umgesetztes LY vom Produkt zu trennen. Die Anteile an verbleibendem LY waren unterschiedlich. Während im Falle des Diazirins nur zirka 5% LY nicht modifiziert

wurden, blieben beim NAP Derivat rund 40 % des Farbstoffes frei. Trotzdem verwendete man die gesamte gefärbte Fraktion für die Markierungsexperimente. Dies war möglich, da angenommen werden konnte, dass LY selbst nicht, oder nur sehr schwach mit biologischen Proben reagiert. Seine Reaktivität beschränkt sich auf Aldehydgruppen, die bekanntlich natürlicherweise in Zellen nicht vorkommen. Die unbeleuchteten Kontrollen der Markierungsexperimente bestätigten denn auch, dass Lucifer Yellow keine lichtunabhängige Markierung hervorruft.

Dagegen wurde sorgfältig darauf geachtet, dass andere Reaktanden (4-Diazirinovaleriansäure) und Salze vollständig von der Markerpräparation abgetrennt wurden, da diese Substanzen die Bedingungen (pH, Ionenstärke) bei der anschliessenden Photolyse unkontrollierbar beeinflussen würden. Dies führte vor allem beim Diazirin-LY zu einer recht aufwendigen Reinigung. Deren Erfolg kontrollierte man durch die Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten der Produkte und deren Vergleich mit den Literaturwerten.

Trotz dieser Vereinfachungen bei der Reinigung ist der Gesamtaufwand der beschriebenen Synthesen recht beträchtlich. Während bei der Herstellung des NAP-LY vor allem die Forderung nach Lichtausschluss einige Mehrarbeit verursacht, erfordert beim zweiten Derivat die Herstellung des Diazirins einige experimentelle Erfahrung. Zudem muss hier auch für die Reinigung einige Zeit einkalkuliert werden.

## 5.2. Photolyse von Diazirin LY, Reaktivität der Produkte

Die Photochemie von Carbenen und Diazoverbindungen ist komplex und in den Einzelheiten nur schlecht verstanden (Turro, 1979). So weiss man wenig über die Geschwindigkeiten derjenigen Reaktionen, die zur Markierung von biologischen Proben führen.

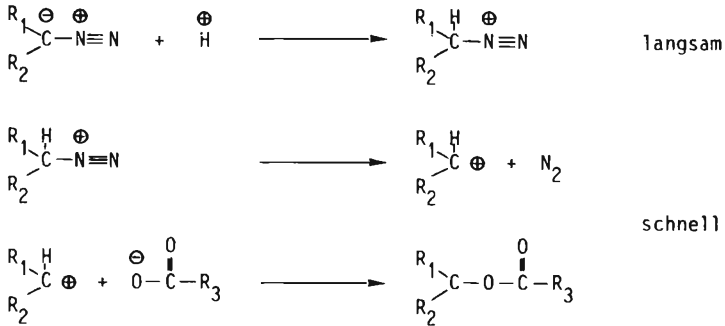
Der Vergleich mit einigen bekannten Charakteristika von Diazirinen lässt indessen den Schluss zu, dass die neu entwickelte Verbindung den Erwartungen entspricht. So wurde zum Beispiel eine photolytische Halbwertszeit erhalten, die rund siebenmal grösser ist, als diejenige von TID. Das Verhältnis der photochemischen Zerfallsraten ist somit recht genau umgekehrt proportional zum Quotienten der Extinktionskoeffizienten dieser beiden Verbindungen, was bestätigt, dass für dieses Derivat der Einfluss von Lucifer Yellow Absorptionen vernachlässigt werden kann, sofern man gleiche Quantenausbeuten voraussetzt. Es konnten Hinweise dafür erhalten werden, dass es sich bei der für die Markierung wichtigen Spezies tatsächlich um die durch Photoisomerisation entstandene Diazoverbindung handelt. Es gelang nämlich, die Markierung von Erythrocytenmembranen, aber auch von löslichen Proteinen (BSA, Ribonuklease) durch die Zugabe von carboxylischen Puffern und DTT zu unterdrücken. Offensichtlich liegt also eine Gruppenspezifität vor, wie sie für das entsprechende Carben nicht beobachtet werden könnte. Die Einbauraten von ungefähr 10 % nach Belichtung während einer Halbwertszeit sind mit dem erwarteten Anteil an Photoisomerisation von mindestens 50 - 70 % (Bradley et al., 1977) vereinbar, wenn man einkalkuliert, dass ein beträchtlicher Anteil der Diazoverbindung mit Wasser reagieren dürfte. Die kurze Halbwertszeit der Diazozwischenstufe zeigt sich in der Tatsache, dass die Zugabe von Essigsäure unmittelbar nach der Belichtung die Markierungseffizienz nicht mehr zu verringern vermag. Wie erwartet ist diese Spezies also instabil und reagiert sofort weiter, wobei diese Folgereaktion chemisch kontrolliert ist und nicht mehr von der Belichtung abhängt. Dagegen erstaunt die ausgesprochene pH - Abhängigkeit der Insertionsreaktion. Dieser Effekt ist zwar für stabilere Verbindungen wie Diazoacetat (Means & Feeney, 1971) und Phenyl diazomethan (Offord, 1969) bekannt, konnte jedoch

aufgrund der fehlenden Stabilisierung durch Elektronenakzeptoren für eine aliphatische Diazoverbindung nicht unbedingt erwartet werden.

Bei der Beurteilung der Reaktivität von Diazoverbindungen müssen jedoch zwei prinzipiell verschiedene Mechanismen in Erwägung gezogen werden: der thermische und der säurekatalysierte Zerfall.

Während der thermische Zerfall vor allem bei Verbindungen von Bedeutung ist, welche nicht durch elektronenakzeptierende Gruppen stabilisiert sind, spielt der säureabhängige Zerfall bei aryl- und carboxyl-substituierten Diazoverbindungen die wichtigere Rolle. Für 4-Diazovaleriansäure hatte man aufgrund dieser Unterscheidung und seiner Verwandtschaft mit Diazomethan erwartet, dass der säureunabhängige Zerfall massgebend ist. Die Resultate bestätigen jedoch den Schluss von More O'Ferrall (1962), der fand, dass der Vergleich der Eigenschaften von Diazoalkanen nur bedingt möglich ist, da die Merkmale ihrer Reaktivität je nach Zielmolekül und Lösungsmittel wechseln können. Unter den hier gewählten Bedingungen (RT, wässriger Puffer) ist offenbar der säurekatalysierte Zerfall schneller, obwohl die 4-Diazovaleriansäure thermolabiler ist, als die meisten Vertreter dieser Klasse (Regitz, 1977).

Um die beobachtete starke pH Abhängigkeit erklären zu können, muss zudem angenommen werden, dass die Protonierung zum Diazoniumion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Tatsächlich fand Warren (1961) für allerdings anders substituierte sekundäre Diazoalkane, dass sie über einen  $A-S_E2$  Mechanismus zerfallen (Nomenklatur nach Long & Paul, 1957). Dieser umfasst eine langsame bimolekulare elektrophile Substitution (in diesem Falle: Protonierung) mit anschliessender schneller Fragmentierung zum Carbokation. Danach erfolgt die Reaktion mit Nukleophilen (Figur 24).



Figur 24. Schema des Reaktionsmechanismus des säurekatalysierten Zerfalls von sekundären Diazoalkanen (A-S<sub>2</sub>); Reaktion mit einer Carboxylgruppe (O-Alkylierung).<sup>E</sup>

Doscher & Wilcox (1961) kamen im weiteren zum Schluss, dass bei Modifikationsreaktionen dieses Typs die protonierten Carboxylgruppen das massgebende Substrat zu sein scheinen, während die Reaktivität der ionisierten Säuregruppen, wie sie unter physiologischen Bedingungen vorkommen, 1 - 2 Grössenordnungen kleiner ist. Dies deutet darauf hin, dass die pH Abhängigkeit der Proteinmarkierung nicht nur eine Eigenschaft eines speziellen Reagens ist, sondern auch von den Eigenschaften (pK der Carboxylgruppen) des Zielmoleküls abhängen könnte.

Hingegen konnte kein Einfluss von nicht carboxylischen Salzen ( Chlorid ) auf die Markierungsausbeute beobachtet werden. Dies ist im Widerspruch zu den Resultaten von Fraenkel (1907), der für den Fall der allerdings wesentlich stabileren Diazoacetate in Anwesenheit dieser Komponenten erhöhte Zerfallsraten fand.



### 5.3. Photolyse von NAP - Lucifer Yellow

Das auffallendste Merkmal bei der Photolyse von NAP - LY, ist die starke Absorptionszunahme im Bereich um 430 nm während der Belichtung. Offenbar entstehen durch die Photolyse Produkte, die im selben Bereich wie LY selbst absorbieren. Diese Tatsache verunmöglicht nicht nur das Verfolgen der Abnahme der NAP Absorption bei 480 nm, sondern hat auch schwerwiegende Konsequenzen auf das Fluoreszenzverhalten des gebundenen Materials. Durch die erhöhte Absorption geht ein grosser Teil des excitatorischen Lichtes von 420 - 440 nm verloren. Dies führt zu einer Verschlechterung der Quantenausbeute für die Fluoreszenz um einen Faktor 5. Dies konnte ermittelt werden, indem man die Fluoreszenz von LY und einer belichteten Probe von NAP-LY bestimmte. Durch die Messung der entsprechenden Absorptionen konnte die Fluoreszenz auf eine gleiche Menge Farbstoff standardisiert und verglichen werden. In Verbindung mit der an sich schon niedrigen Markierungseffizienz setzt diese unerwünschte Eigenschaft den Nutzen dieser Verbindung deutlich herab. Die Sensitivität wird dadurch so gering, dass unter den verwendeten Bedingungen sowohl auf dem SDS-Gel, als auch im Fluoreszenzmikroskop die Markierung nur noch schwer von den entsprechenden Kontrollen zu unterscheiden ist.

### 5.4. Markierungsexperimente

Sowohl SDS - PAGE, als auch Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie zeigen, dass Diazirin-LY und, mit den erwähnten Einschränkungen, NAP-LY geeignete Verbindungen sind, um Proteine von biologischen Membranen gruppenspezifisch zu markieren. Hingegen erwies sich das Modell der Erythrocyten-

membran als nicht ideal, da bestimmte Proteine (Spektrin), durch ihre Tendenz zu aggregieren, das Ergebnis sowohl auf dem SDS-Gel, als auch in der Lichtmikroskopie verfälschten. Die auf den Gelen zu beobachtende Korrelation zwischen Aggregaten und der Abnahme der Spektrin Bande deutet darauf hin, dass es sich bei den Veränderungen nach der Belichtung nicht um allgemein auftretende photoinduzierte Schädigungen handelt, sondern vielmehr um eine unerwünschte Eigenschaft eines bestimmten Proteins dieses Modellsystems. Dementsprechend muss dieses Phänomen nicht als generell zu setzende Einschränkung dieser Methode betrachtet werden, vor allem, weil Spektrin bekanntlich lediglich membranassoziiert ist und nicht ein Membranprotein im klassischen Sinne darstellt. Versuche, diese Probleme durch die Verwendung von wieder verschlossenen Membranen zu umgehen, scheiterten, da es nicht gelang, das Einfließen von LY in die Membranen zu verhindern, selbst dann nicht, wenn das Anionentransportprotein durch DIDS irreversibel gehemmt worden war und man alle Arbeiten konsequent auf Eis ausführte. Die Aufnahme von LY muss deshalb darauf zurückgeführt werden, dass es nicht möglich war, die einmal osmotisch lysierten Membranen wieder vollständig impermeabel zu machen. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Daten von Lieber & Steck (1982a, b). Sie vertreten ein neues Konzept der hämolytischen Löcher und beschreiben diese nicht mehr als mechanischen Riss in der Membran, der in warmer Kochsalzlösung wieder vollständig verschliesst, sondern bevorzugen die Vorstellung einer diskreten dynamischen und kontinuierlich variablen Struktur. Sie fanden, dass selbst frisch präparierte Membranen, die sofort in isotonischer Kochsalzlösung wieder verschlossen wurden, immer noch Löcher in der Grössenordnung von 0.7 nm aufweisen, wodurch sie für kleine Moleküle wie Saccharose (Stokes Radius 0.5 nm) oder LY durchlässig bleiben. Dieser Befund bestätigt die eingangs erwähnte Fähigkeit dieses Moleküls, auch kleinste Beschädigungen der biologischen Membran zu offenbaren.

Im Lichte dieser neuen Auffassungen überraschen auch die Resultate von Staros et al. (1975). Ihnen gelang es, Erythrocytenmembranen von innen, von aussen und von beiden Seiten zusammen mit NAP-Taurin zu markieren. Dieses Reagenz ist von der gleichen Grössenordnung wie LY und es müsste erwartet werden, dass die wiederverschlossenen Membranen auch für diesen Marker durchlässig bleiben. Trotzdem wurden in diesen Arbeiten differentielle Markierungsmuster erhalten. Allerdings weisen die dabei verwendeten, nach einem anderen Prozedere präparierten, Membranen noch erhebliche Mengen an Hämoglobin auf. Ihre Qualität muss mit gewissen Vorbehalten versehen werden. Sie dürften noch einen gewissen Anteil an intakten Zellen aufweisen und können nicht mit denjenigen verglichen werden, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Zudem wurde gefunden, dass NAP-Taurin die Eigenschaften eines Detergens aufweist, weil sein photoaktivierbarer Teil sehr gut lipidlöslich ist. Das Molekül wird dadurch zum grössten Teil an die Membran gebunden, was erklärt, weshalb Spektrin nicht markiert wird.

Hingegen stehen die hier erhaltenen Resultate in Einklang mit den Ergebnissen von Dockter (1979), der bei der Markierung von offenen Membranen mit 3-Azido(2,7)-naphtalin-disulfonat vergleichbare Markierungsmuster erhielt, insbesondere die typischen starken Signale im Bereich von Spektrin I und II, sowie relativ starke Aggregate am Anfang des Trenngels. Dagegen wird dieses Reagenz erstaunlicherweise vom Bande 3 Protein nicht transportiert. Sein Anwendungsbereich wird durch die Tatsache eingeschränkt, dass es erst fluoresziert, wenn es belichtet worden ist. Es kann also vor der Photolyse in der lebenden Zelle nicht beobachtet werden. Zudem sind unter den beschriebenen Bedingungen relativ lange Photolysezeiten erforderlich (5 Minuten als Minimum), was es zum Gebrauch beim Studium von zeitabhängigen Phänomenen weniger geeignet macht. Schliesslich stehen bis heute keine Antikörper gegen diese Verbindung zur Verfügung, was ihren

Nachweis im Elektronenmikroskop verunmöglicht. Dieser Marker kann deshalb lediglich für den Nachweis von markierten Proteinen auf SDS-Gelen verwendet werden, ist also in seinen Möglichkeiten im Vergleich mit den Lucifer Yellow Derivaten recht beschränkt.

Die Untersuchungen im Fluoreszenzmikroskop bestätigten die vorzügliche Eignung von Lucifer Yellow. Weil kein Ausbleichen auftritt können die Präparate ohne Zeitdruck sorgfältig analysiert werden. Für die Dokumentation durch Photographie war die Fluoreszenz allerdings recht schwach. Im Hinblick auf die Anwendung auf die Endocytose muss ausserdem berücksichtigt werden, dass dann die Membran nur noch von einer Seite markiert werden kann, was die Intensität der zu erwartenden Fluoreszenz nochmals um 50 % erniedrigt. Für solche Experimente wäre es deshalb empfehlenswert, höhere Konzentrationen der Photomarker zu verwenden. Dies gilt vor allem für die Verwendung von NAP-LY. Vom Einsatz dieses Reagenzes für die Fluoreszenzmikroskopie an Dünnschnitten ist in Anbetracht der deutlichen Verringerung der Sensitivität durch die intramolekulare Fluoreszenzunterdrückung gänzlich abzuraten.

Bemerkenswert ist die ausgeprägte Abhängigkeit der Struktur-erhaltung von den Salzbedingungen. Diese hängt offenbar mit dem Einfluss der Ionen auf das Zytoskelett zusammen, das im Hämolysepuffer teilweise aufgelöst wird, wodurch die cytoplasmatischen Seiten der Membran in Kontakt kommen. Durch die Photolyse und die dadurch ausgelösten chemischen Vernetzungsreaktionen wird dieser veränderte Zustand fixiert, was zu den beobachteten unnatürlichen Formen führt. Nach dem Versiegeln in PBS in Anwesenheit von divalenten Kationen dagegen wird das Zytoskelett in seiner natürlichen Kon-figuration stabilisiert, wodurch die anschliessende Modi-fikationsreaktion keine mikroskopisch sichtbaren Schädigungen verursacht.

Durch die Untersuchung der Markierung im Rasterelektronenmikroskop konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der durch die kovalente Markierung eingeführten LY Moleküle gross genug ist, um im BSE Modus ein aussagekräftiges Bild zu erhalten. Zudem kann nicht gekoppeltes Material so vollständig entfernt werden, dass der unspezifische Hintergrund mit demjenigen vergleichbar ist, der bei Kontrollversuchen ohne primären Antikörper erhalten wird. Bei der Beurteilung der Intensität der erhaltenen Signale muss einkalkuliert werden, dass in diesem Falle lediglich die an die äussere Membranseite gekoppelten LY Moleküle widerspiegelt werden, da die zur Visualisierung verwendeten Antikörper nicht in der Lage sind, in die wiederverschlossenen und vorfixierten Membranen einzudringen. Deshalb kann direkt auf die zu erwartende Markierung auf Dünnschnitten umgerechnet werden. Wenn man dazu Schnitte einer Dicke von 50 nm verwendet (sogenannte silberne Schnitte), so ergibt dies für ein Endosom mit 300 nm Durchmesser ungefähr 20 (Diazirin-LY) bis 40 (NAP-LY) Goldpartikel, was eine eindeutige Unterscheidung von der Dunkelkontrolle (0 - 1 Goldkörner) auch bei dieser Präparationsmethode erwarten lässt. Es ist wichtig zu bemerken, dass die Lokalisation von NAP-LY im EM durch die intramolekulare Unterdrückung nicht betroffen ist, da diese nur von der Anzahl der gebundenen Moleküle abhängt. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die schwachen Signale im Lichtmikroskop und auf dem SDS-Gel tatsächlich auf dieses optische Phänomen und nicht auf eine weniger effiziente Markierungsreaktion zurückzuführen ist.

Sowohl die im Rasterelektronenmikroskop erhaltenen Bilder, als auch die Gefrierbrüche demonstrieren, dass die zur Markierung notwendigen experimentellen Eingriffe auch auf dieser Ebene zu keinen sichtbaren Veränderungen der biologischen Struktur führen. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass kovalent gebundenes Lucifer Yellow auf

einer Membran genauso behandelt und nachgewiesen werden kann, wie ein natürlicherweise vorkommendes Oberflächenantigen.

### 5.5. Anwendungsmöglichkeiten

NAP - Lucifer Yellow und Diazirin - Lucifer Yellow sind wasserlösliche, fluoreszierende, gruppenspezifische und photoaktivierbare Markierungsreagenzien, die überall dort Anwendungen finden können, wo es darum geht, Proteine von topologisch oder funktionell zusammenhängenden Membranen kovalent zu markieren, seien dies nun extrem entfernte Teile eines gemeinsamen Plasmalemmas (Axone von Nervenzellen) oder aber Membranen von verschiedenen Kompartimenten innerhalb einer Zelle, die einmal temporär fusionierten.

Dabei müssen allerdings gewisse Einschränkungen gemacht werden, die sich aus den oben besprochenen Resultaten ergeben.

Für den Fall von NAP-LY ist die Limite vor allem durch die beschränkte Sensitivität dieses Reagenz gesetzt. Da die Markierungseffizienz recht tief ist und die Fluoreszenz zudem intramolekular teilweise unterdrückt wird, kann es nicht für Probleme eingesetzt werden, die eine starke Diskriminierung erfordern. Dies gilt im speziellen für die Herstellung von Präparaten für die Fluoreszenzmikroskopie (Dünnschnitte), in denen die Fluoreszenz vermutlich nicht mehr sichtbar wäre, während sie für die Beobachtung einer ganzen Zelle knapp genügt. Aufgrund dieser Einschränkung ist die Anwendung dieses Derivates vor allem für elektronenmikroskopische Studien empfehlenswert.

Die Anwendbarkeit von Diazirin-LY dagegen ist vor allem durch die starke pH-Abhängigkeit eingeschränkt. Eine Markierung kann nur dann effizient erfolgen, wenn es gelingt, den pH Wert in einem Kompartiment kurzfristig auf unter 6 zu

bringen, etwa durch Inkubation und Endocytose in einem entsprechend gepufferten Medium. Dafür eröffnet diese Eigenschaft interessante Perspektiven bei der Markierung von lysosomalen Kompartimenten, in denen die erwähnte Voraussetzung vom der Zelle selbst geboten wird. Dadurch ergibt sich zum Beispiel die Möglichkeit, LY-Derivate via den Endosomen Weg in die Zelle einzuschleusen, zu verschiedenen Zeiten zu belichten und trotzdem Markierung erst in jenem Moment zu erhalten, in dem die Transportvesikel mit den Lysosomen fusionieren. Durch Variation der extrazellulären pH Verhältnisse kann somit, in Kombination mit den intrazellulären Gradienten, eine differentielle Markierung von endosomaler und endosomal - lysosomaler Mischmembran erzielt werden.

Zudem liefert Diazirin-LY unter optimierten Bedingungen eine starke Färbung, die problemlose Analyse auf dem SDS Gel und im Fluoreszenzmikroskop erlauben. Sowohl Diazirin-LY als auch NAP-LY zeichnen sich überdies durch günstige photochemische Eigenschaften aus. Sie lassen sich mit langwelligem UV- bzw. sichtbarem Licht glatt photolysieren. Die dazu benötigten Belichtungszeiten sind mehr als eine Größenordnung kleiner als die Recyclingszeit von Transportvesikeln, die von Karin & Mintz (1981) für den Fall des Transferrin Rezeptors mit 20 Minuten bestimmt wurde. Es bestünde also die Möglichkeit den zeitlichen Ablauf eines solchen Vorganges in mindestens zehn diskreten Bildern festzuhalten.

Bei der Anwendung dieser Art von Reagenzien auf neue biologische Systeme ist jedoch Vorsicht geboten. Es ist gezeigt worden, dass sie vom Bande 3 Protein der Erythrocytenmembran als Substrat akzeptiert werden. Es muss deshalb in jeder Anwendung abgeklärt werden, ob nicht verwandte Anionentransportsysteme vorhanden sind (Hoffmann, 1986), welche die Kompartimentierung des Markers durchbrechen und die Unterschiede im Markierungsmuster verwischen.

Weder im Fluoreszenzmikroskop noch auf den elektronenmikros-

kopischen Präparaten konnten unter optimalen Bedingungen Veränderungen der Strukturen durch die Belichtung festgestellt werden. Ein gewisser minimaler Photoschaden tritt indessen in jedem Falle auf, worauf die Proteinaggregate auf den SDS-Gelen hindeuten. Definitive Schlüsse auf die Schwere dieser Einflüsse können hier nicht gezogen werden. Erst die Anwendung auf bedeutend sensitivere Systeme, wie lebende Zellen wird endgültige Klarheit darüber verschaffen, ob so ernste Schädigungen, wie sie von Miller & Selverston (1979) beschrieben wurden, vermieden werden können.

## 6. Ausblick

Das Studium der Endocytose hat sich traditionellerweise auf den Inhalt von Endosomen und endocytotischen Vakuolen konzentriert, das heisst auf die extrazelluläre Flüssigkeit und die darin gelösten Stoffe. Entsprechend verwendete man dazu Flüssigphasenmarker; typische Beispiele dafür sind Ferritin, Radieschenperoxydase, fluoresceinierte Dextrane, radioaktiv markierte Saccharose, oder eben Lucifer Yellow. Diese Zugänge ermöglichen zwar quantitative Analysen der Endocytose, sie gestatten jedoch nicht, die an diesen Vorgängen beteiligten Membranen und deren Proteine zu charakterisieren.

Erste Fortschritte in diese Richtung gelangen in Arbeiten mit Antikörpern (Chen et al., 1985), in denen einzelne Komponenten solcher Membranen markiert werden konnten und bei der Anwendung eines Latex-Peroxydase Iodierungssystems auf Makrophagen, die vollständige Markierungsmuster der zugänglichen Membranproteine lieferte (Muller et al., 1980). Allerdings ist die Anwendbarkeit der letzteren Methode auf die Phagocytose beschränkt und zudem in der Durchführung recht aufwendig und fehleranfällig.



Photoaktivierbare Derivate von Lucifer Yellow dagegen können im Prinzip bei jeder Art von Plasmalemmainternalisation angewandt werden, das heisst sowohl bei Phagozytose und Pinozytose als auch bei der Rezeptor abhängigen Endocytose. Zudem ergibt sich im Vergleich zu Flüssigphasenuntersuchungen kaum experimenteller Mehraufwand.

Durch die Einführung einer kovalent modifizierenden Gruppe ist es nun möglich, mit demselben Molekül quantitative Studien der Pinozytose (Riezman, 1985a), aber auch Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie und die Markierung der Proteine beteiligter Membranen durchzuführen. Die eigentliche Stärke der neu entwickelten Photoreagenzien liegt also darin, dass sie erlauben, die Möglichkeiten von typischen Flüssigkeitsphasenmarkern und Fluoreszenzfarbstoffen mit denjenigen von klassischen Proteinmodifikationsreagenzien zu kombinieren.

Es bleibt zu hoffen, dass solche und ähnliche Methoden Arbeiten ermöglichen werden, die uns zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen und Zusammenhänge führen, welche den vesikulären Verkehr und die Membranspezifität kontrollieren, denn ohne Zweifel wird die Aufklärung des intrazellulären Membrankreislaufs unsere zellbiologischen Konzepte in erheblichem Masse beeinflussen und möglicherweise auch verändern.

## 6. Z U S A M M E N F A S S U N G

---

Lucifer Yellow CH ist ein sehr gut wasserlöslicher, ungiftiger Fluoreszenzfarbstoff mit einer hohen Quantenausbeute. Seine Fluoreszenz ist pH unabhängig und bleicht unter Belichtung praktisch nicht aus. Es ist deshalb als Flüssigphasenmarker für die Untersuchung der Endocytose sehr geeignet, im speziellen für quantitative Messungen und die Fluoreszenzmikroskopie an ganzen Zellen. Hingegen ist für seine Lokalisation an Dünnschnitten im Licht- und im Elektronenmikroskop eine kovalente Bindung an die biologische Struktur nötig.

Es wurden deshalb zwei photoaktivierbare Derivate dieser Verbindung synthetisiert, die eine Nitroazidophenyl- bzw. eine Diazirinegruppe enthalten. Sie können nach Belichtung die Proteine endocytischer Membranen, im speziellen deren Carboxyl- und Sulfhydrylfunktionen, kovalent modifizieren.

Am Modellsystem der Erythrocytenmembran wurde gezeigt, dass sich die so markierten Proteine auf SDS-Polyacrylamidgelen problemlos identifizieren lassen. Im Fluoreszenzmikroskop sind die gebundenen Farbstoffmoleküle als leuchtender Kranz an der Membran erkennbar. Im Elektronenmikroskop gelingt der Nachweis mit Hilfe eines Antiserums gegen Lucifer Yellow und eines sekundären Antikörpers, der an kolloidales Gold gekoppelt ist.

Die Anwendung dieser Marker ist jedoch durch folgende Eigenschaften eingeschränkt: Die Photolyseprodukte von NAP-Lucifer Yellow absorbieren einen grossen Teil des zur Excitation der Fluoreszenz benötigten Lichtes, was zu schwächerer Intensität und entsprechend verringerter Sensitivität führt. Diazirin-LY auf der anderen Seite modifiziert Proteine nur dann effizient, wenn der pH Wert des entsprechenden Kompartimentes unter 6 liegt. Dies

schränkt die Anwendungsmöglichkeiten dieses Reagenz ein, macht es andererseits jedoch besonders interessant für den Einsatz in natürlicherweise acidifizierten Organellen (Lysosomen). Lucifer Yellow ist zwar als geladenes Teilchen nicht in der Lage, die Lipiddoppelschicht einer Membran zu passieren, es wird jedoch vom Bande 3 Protein, dem Anionentransporter der Erythrocytenmembran, als Substrat akzeptiert. Die Anwendung seiner Derivate kommt darum nur in Systemen in Frage, in denen das Vorkommen dieses oder verwandter Proteine ausgeschlossen werden kann.

NAP-LY und Diazirin-LY sind wasserlösliche, gruppenspezifische und photoaktivierbare Fluoreszenzmarker, die, mit den erwähnten Einschränkungen, überall dort eingesetzt werden können, wo es darum geht, Kompartimente und Proteine zu markieren, die über die Mechanismen des intrazellulären Membranverkehrs mit dem die Zelle umgebenden Medium in Beziehung stehen.

## 7. S U M M A R Y

---

Lucifer Yellow is a highly water-soluble, non-toxic fluorescent dye with an extraordinarily high quantum yield. Its fluorescence is not dependent on the pH and does not bleach rapidly upon illumination. Therefore it is a suitable fluidphase label for the investigation of endocytosis; in particular for quantitative measurements and for the fluorescence microscopy of whole cells. For the localization on thin sections in the light and the electron microscope however, a covalent attachment of the label to the biological structure is required.

Therefore two photoactivatable derivatives of this compound were synthesized, containing a nitroazidophenyl- and a diazirino group respectively. Upon illumination they modify the carboxyl- and sulfhydryl groups of the proteins of endocytic membranes covalently.

The human erythrocyte membrane was chosen as a model system to show, that the labeled proteins can easily be identified on SDS polyacrylamide gels. In the fluorescence microscope the bound dye molecules can be seen as a shining circle along the membrane. In the electron microscope the label can be detected by using an antiserum against Lucifer Yellow and a second antibody coupled to colloidal gold.

However the application of these marker molecules is limited by the following properties: The photolysis products of NAP-LY absorb a considerable part of the light needed for the excitation of the fluorescence, thus leading to a weaker intensity and a strongly decreased sensitivity of this approach. Diazirine-LY on the other hand is only able to modify the proteins efficiently, if the pH of the corresponding compartment is below 6. This fact severely limits the range of application of this reagent, however it

makes it particularly promising for its use on naturally occurring acidified organelles like lysosomes. Lucifer Yellow is, as a charged molecule, not capable to penetrate the lipid bilayer of a biological membrane; it is however accepted as a substrate by the band 3 protein, the anion transporter of the erythrocyte membrane. The application of its derivatives is therefore only possible, if the existence of this or related proteins in the system under investigation, can be ruled out. NAP-LY and Diazirine-LY are water-soluble, groupspecific and photoactivatable fluorescent labels that can potentially yield quantitative and morphological evidence about the mechanisms of the intracellular membrane traffic, as well as information concerning the proteins of the compartments involved therein.

8. L I T E R A T U R

---

- Anderson, R. G. W., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1977),  
Cell, 10, 351-364.
- Bayley, H. & Knowles, J. R. (1977) in: Methods in Enzymology  
(Jakoby, W.B. & Wilchek, M., Eds.) 46, 69-114.
- Bayley, H. & Knowles, J. R. (1978) Biochemistry, 17, 2414-2419.
- Bayley, H. (1983) "Photogenerated Reagents in Biochemistry and  
Molecular Biology " North Holland, Elsevier, Amsterdam.
- Besterman, J. M., Airhart, J. A., Woodsworth, R. C. & Low, R. B.  
(1981) J. Cell Biol., 91, 716 -727.
- Beutler, E., West, C. & Blume, K. G. (1976) J. Lab. Clin. Med,  
88, 328-333.
- Bradford, M. M. (1976) Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Bradley, G. F., Evans, W. B. L. & Stevens, I. D. R. (1977) J.  
Amer. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1214-1220.
- Brunner, J. & Richards, F. M. (1980) J. Biol. Chem., 255, 3319-  
3329.
- Brunner, J. & Semenza, G. (1981) Biochemistry, 20, 7174-7179.
- Brunner, J., Senn, H. & Richards, F. M. (1981) J. Biol. Chem.  
255, 3313-3318.

- Brunner, J. (1986) Habilitationsschrift ETH Zürich.
- Burnside, J. & Schneider, D. L. (1982) *Biochem. J.* 204, 525-234.
- Cabantchik, Z. I. & Rothstein, A. (1972) *J. Membr. Biol.*, 10, 311-330.
- Chapman, O. L. & LeRoux J.-P. (1978) *J. Amer. Chem. Soc.*, 100, 282.
- Chen, J. W., Murphy, T., Willingham, M. C., Pastan, I. & August, J. T. (1985) *J. Cell Biol.*, 101, 85-95.
- Chowdry, V., Vaughan. R. & Westheimer, F. M. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 1406.
- Church, R. F. R. & Weiss, M. J. (1970) *J. Org. Chem.*, 35, 2465-2471.
- Davis, B. H. (1983) *J. Cell Biol.*, 97, 103a.
- Davis, B. H., Mc Cabe, E. & Langweiler, M. (1986) *Cytometry*, 7, 251-262.
- Dockter, M. E. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 2161-2164.
- Doscher, M. & Wilcox, P. E. (1961) *J. Biol. Chem.*, 236, 1328-1336.
- Draper, R. K. & Simon, M. I. (1980) *J. Cell Biol.*, 87, 849-854.
- Dunkin, I. R. & Thomson, P. C. P. (1982) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1192.

- Fleet, G. W. J., Knowles, J. R. & Porter, R. R. (1972) *Biochem. J.*, 128, 499-508.
- Fraenkel, W. (1907) *Z. Physik. Chem.*, 60, 202.
- Frey, H. M. (1966) *Adv. in Photochem.*, 4, 225-255.
- Gibbs, E. M., Lienhard, G. E., Appleman, J. R., Lane, M. D. & Frost, S. C. (1986) *J. Biol. Chem.*, 261, 3944-3951.
- Goldstein, J. L., Anderson, R. G. W. & Brown, M. S. (1979) *Nature*, 279, 679-685.
- Gupta, C. M., Radhakrishnan, R., Gerber, G. E., Olsen, W.L., Quay, S. C. & Khorana, H. G. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 2595.
- Helenius, A., Mellman, I., Wall, D. & Hubbard, A. (1983) *Trends Biochem. Sci.*, 8, 245-250.
- Hemmaplaardh, D. & Morgan, E. H. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 426, 385-398.
- Hiertén, S. (1962) *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.*, 1, 147-151.
- Hoffmann, E. K. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, 864, 1-32.
- Hosang, M. (1981) *Dissertation ETH Zürich*, Nr. 6874.
- Huisgen, R., Vossius, D. & Appl. M. (1958) *Chem. Ber.*, 91, 1.
- Jeng, S. J. & Guillory, R. J. (1975) *J. Supramol. Struct.*, 3, 448-468.



- Juliano, R. L. & Rothstein, A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 249, 227-235.
- Karin, M. & Mintz, B. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 3245-3252.
- Karnielli, E., Jarnowski, M. J., Hissin, P. J., Simpson, I. A., Salans, L. B. & Cushman, S. W. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 4772-4777.
- Katzenellenbogen, J. A., Johnson, H. J., Carlson, K. E. & Myers, H. N. (1974) *Biochemistry*, 13, 2986-2994.
- Lämmler, U. K. (1970) *Nature*, 227, 680-685.
- Lewis, V., Green, J. A., Marsha, M., Vihko, P., Helenius, A. & Mellman, I. (1985) *J. Cell Biol.*, 100, 1839-1847.
- Lieber, M. R. & Steck, T. L. (1982a) *J. Biol. Chem.*, 257, 11651-11659.
- Lieber, M. R. & Steck, T. L. (1982b) *J. Biol. Chem.*, 257, 11660-11666.
- Lienhard, G. E. (1983) *Trends Biochem. Sci.*, 8, 125-127.
- Lippincott-Schwartz, J. & Fambrough, D. M. (1986) *J. Cell Biol.*, 102, 1593-1605.
- Long, W. H. & Paul, J. (1957) *Chem. Rev.*, 57, 935-1004.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Lutz, H. U., Liu, S. C. & Palek, J. (1977) *J. Cell Biol.*, 73, 548-560.

- Lutz, H. U. & Wipf, G. (1982) J. Immunol., 128, 1695-1699.
- Lutz, H. U. (1986), persönliche Mitteilung.
- Matheson, R. R., van Wart, H. E., Burgess, A. W., Weinstein, L. I. & Scheraga, H. A. (1977) Biochemistry, 16, 396.
- Mc Robbie, I. M., Meth Cohn, O. & Suschitzki, H. (1976) Tetrahedron Lett., 925.
- Means, G. & Feeney, M. (1971) "Chemical Modification of Proteins", Holden Day Inc., San Francisco, USA.
- Miller, J. P. & Selverston, A. I. (1979) Science, 206, 702-704.
- Miller, D. K., Griffith, E., Lenard, J. & Firestone R. A. (1983) J. Cell Biol., 97, 1841-1851.
- Moor, H. (1973) Evaporation and electron guns, in "Freeze-etching technique and applications" (Benedetti, E. L. & Favard, P., Eds.) Société Française de microscopie électronique, Paris.
- More O'Ferrall, R. A. (1967) Adv. Phys. Org. Chem., 5, 331.
- Mueller, T. J. & Morrison, M. (1974) J. Biol. Chem., 249, 7568-7573.
- Muller, W. A., Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. (1980) J. Cell Biol. 86, 292-303.
- Muller, W. A., Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. (1983) J. Cell Biol. 96, 29-36.

- Nagatani, T. & Omura, A. (1977) *Scanning Electronmicroscopy*, I, 695-702.
- Newmark, P., Newman, G. E. & O'Brien, J. R. P. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.*, 141, 121-130.
- Offord, R. E. (1969) *Nature*, 221, 37.
- Ohsumi, Y., Ishikawa, T. & Kato, K. (1983) *J. Biochem. (Tokyo)*, 93, 547-556.
- Pastan, I. & Willingham, M. C. (1983) *Trends Biochem. Sci.*, 8, 250-254.
- Patai, S. (1971) "The Chemistry of the Azido Group", Wiley (Interscience), New York.
- Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J. & Simon, W. (1981) "Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen". Springer Verlag, Berlin.
- Ramjeesingh, M., Gaarn, A. & Rothstein, A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, 599, 127-139.
- Reggio, H., Bainton, D., Harms, E., Coudrier, E. & Louvard, D. (1984) *J. Cell Biol.*, 99, 1511-1526.
- Regitz, M. (1977) in "Diazoalkane", Georg Thieme, Stuttgart.
- Reichardt, L. F. & Kelly, R. B. (1983) *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 871-926.

- Riezman, H. (1985a) *Cell*, 40, 1001-1009.
- Riezman, H. (1985b) persönliche Mitteilung.
- Ruch, F. (1970) in "Introduction to quantitative cytochemistry II"  
(Wied, G. L. & Bahr, G. F., Eds.) Academic Press, New York.
- Sandvig, K. & Olsnes, S. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 9063- 9076.
- Schmitz, E. & Ohme, R. (1961) *Chem. Ber.*, 94, 2166.
- Singh, A., Thornton, E. R. & Westheimer, F. M. (1962) *J. Biol. Chem.*, 237, 3006.
- Smith, R. A. G. & Knowles, J. R. ( 1975) *J. Chem. Soc. Trans II*, 686-694.
- Spiess, M. (1982) Dissertation ETH Zürich, Nr. 7134.
- Staros, J. V. & Richards, F. M. (1974) *Biochemistry*, 13, 2720-2726.
- Staros, J. V. , Richards, F. M. & Haley, B. E. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 8174-8178.
- Staros, J. V. (1982) *Biochemistry*, 21, 3950-3955.
- Steck, T. L. (1974) *J. Cell Biol.*, 62. 1.
- Steck, T. L. (1974) in: "Methods in Membrane Biology", Vol 2,  
(Korn, E. D., Ed ), Plenum Press, New York.
- Steck, T. L. & Kant, J. A. (1974) *Methods Enzymol.*, 31, 287-300.

- Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. (1972) *J. Cell Biol.*, 55, 186-204.
- Steinman, R. M., Brodie, S. E. & Cohn, Z. A. (1976) *J. Cell Biol.* 68, 665.
- Steinman, R. M., Mellman, I. S., Muller, W. A. & Cohn, Z. A. (1983) *J. Cell Biol.*, 96, 1-27.
- Stewart, W. W. (1978) *Cell*, 14, 741-759.
- Stewart, W. W. (1981a) *Nature*, 292, 17-21.
- Stewart, W. W. (1981b) *J. Amer. Chem. Soc.*, 103, 7615-7619.
- Sung, S.-S. J., Nelson, R. S. & Silverstein, S. C. (1983) *J. Cell Physiol.*, 116, 21-25.
- Swanson, J. A., Yirinec, B. D. & Silverstein, S. C. (1985) *J. Cell Biol.* , 100, 851-859.
- Turro, N. (1979) "Modern Molecular Photochemistry" Benjamin/Cummins, Menglo Park, California.
- Walther, P. (1984) Dissertation ETH Zürich, Nr. 7647.
- Walther, P. & Müller, M. (1985) in: "Proceedings of the 43rd Annual Meeting of the Electron Microscopy Society of America". (Bailey, G. W., Ed.), San Francisco Press Inc., Ca, USA.
- Warren, K. D. (1961) *J. Chem. Soc.*, 2561.
- Weisman, R. A. & Korn, E. D. (1967) *Biochemistry*, 6, 485-497.

Wilcox, P. E. (1967) *Methods Enzymol.*, 11, 605.

D A N K

---

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Semenza für die Leitung und ausdauernde Unterstützung meiner Arbeit und PD Dr. Sepp Brunner für seine vorzügliche Betreuung und seine wertvolle Hilfe in theoretischen wie in praktischen Fragen. Dr. Paul Walther danke ich für die Ausführung der elektronenmikroskopischen Arbeiten, Dr. R. Gebert für die Hilfe bei der Fluoreszenzmikroskopie.

Schliesslich danke ich allen Kolleginnen und Kollegen für interessante Gespräche und stimulierende fachliche Diskussionen, aber auch für die herzliche Atmosphäre im Labor, die viel zum relativen Gelingen dieser Arbeit beitrug, im speziellen Frau Cordula Harter, Frau Carmen Zugliani, aber auch Frl. Ulrike Zilian, die mich im Dschungel der Administration nie allein liess.

Last and least gilt mein Dank auch Dott. Giulia Baldini und Brigitte O'Neill für ihre wohlmeinende, abbauende Kritik und ihre spontane Hilfe in allen Lebensfragen.

9. L E B E N S L A U F

---

Ich wurde am 15. April 1958 in St. Gallen geboren und bin Bürger von Zürich. Die Primar- und die Sekundarschule besuchte ich in Bischofszell, die Mittelschule in Frauenfeld, wo ich 1977 mit der Matura Typus C abschloss. Darauf begann ich an der ETH mit dem Studium der Biochemie, welches ich 1982 mit der Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. G. Semenza und Dr. J. Brunner abschloss. Nach einer kurzen wissenschaftlichen Tätigkeit am Institut für Zellbiologie der ETH (Prof. Dr. Th. Koller) und der militärischen Ausbildung zum Offizier der Flab Truppen kehrte ich 1983 ans Laboratorium für Biochemie zurück und arbeitete seither unter der Leitung von Prof. Dr. G. Semenza an der vorliegenden Arbeit.

September 1986

Peter A. Huber