

Fluoreszenzsonden

Innovative affinitätsbasierte Markierungen für die High-End-Mikroskopie

VLADIMIR KHAYENKO, HANS MICHAEL MARIC

RUDOLF VIRCHOW CENTER – CENTER FOR INTEGRATIVE AND TRANSLATIONAL BIOIMAGING, BIOCENTER – BIOTECHNOLOGY AND BIOPHYSICS, UNIVERSITÄT WÜRZBURG

Advanced tissue imaging techniques and super resolution microscopy are opening new avenues of investigations in life sciences. These mainly instrumentation-driven innovations require the development of appropriate molecular labelling tools. Here, we discuss currently used and upcoming manipulation-free protein labelling strategies and their potential for the precise and interference-free visualization of endogenous proteins.

DOI: 10.1007/s12268-021-1672-7
© Die Autoren 2021

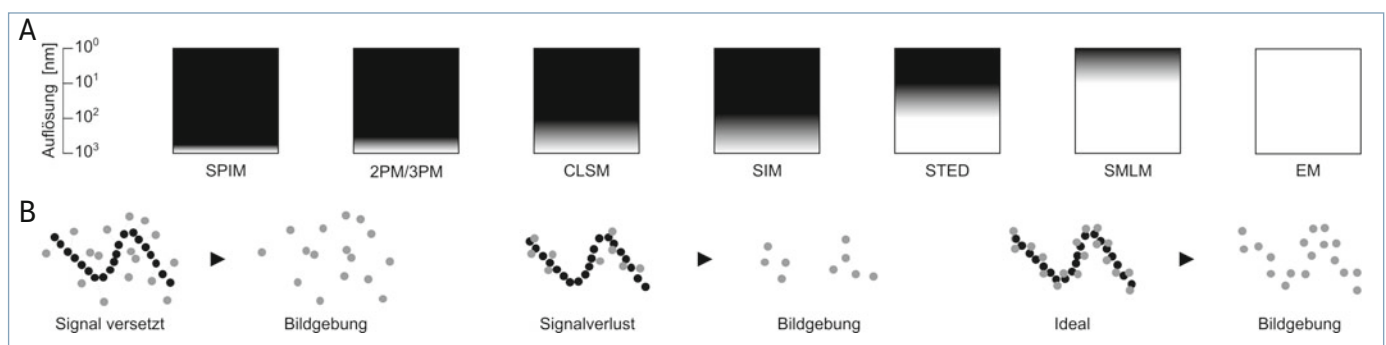
■ Die Zelle und die Gesamtheit ihrer Teilkomponenten, überwiegend Proteine, ist ein fundamentaler Baustein des Lebens. Anders als bei vielen biochemischen Methoden, erlauben moderne bildgebende Verfahren die Untersuchung von Zellen und ihrer Einzelkomponenten im weitgehend intakten Zustand. Für konventionelle Mikroskopieverfahren konnten sich fluoreszierende Protein-Tags und farbstoffmarkierte

Antikörper als die zentralen und nahezu universell einsetzbaren Werkzeuge zur Proteinmarkierung durchsetzen. Anders als Tags wie das grün fluoreszierende Protein können Antikörper als Affinitätssonden – also auch ohne komplexe oder störende genetische Manipulationen – direkt eingesetzt werden. Den Anforderungen neuer hochauflösender Mikroskopieverfahren sowie den Ansprüchen zur Proteinmarkie-

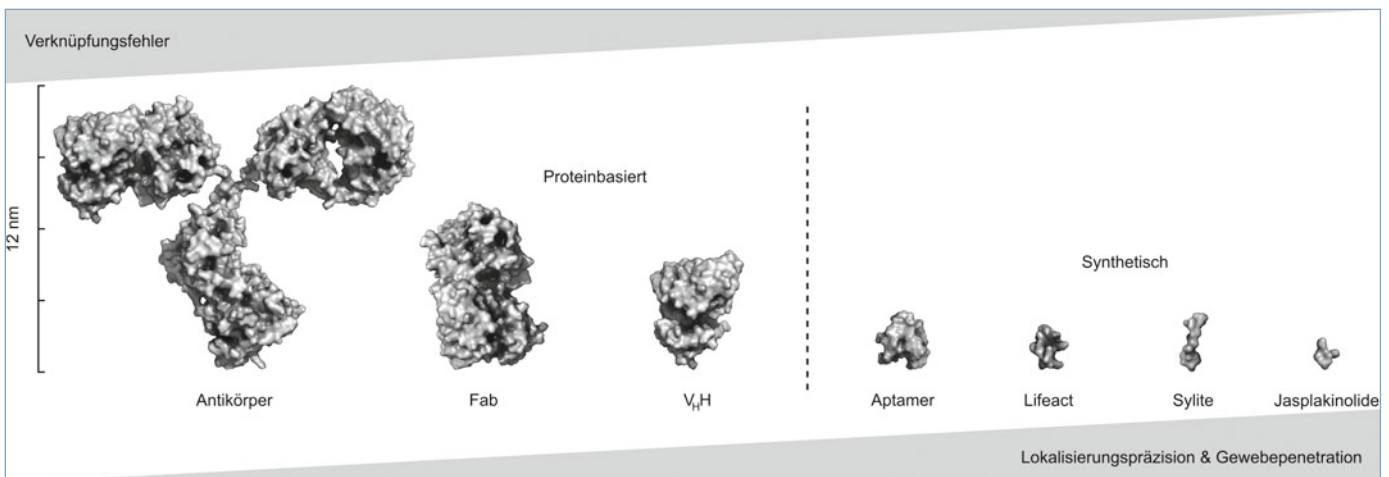
rung im Gewebe werden Antikörper jedoch nicht mehr gerecht.

Grenzen herkömmlicher Markierungswerkzeuge in der modernen Nanoskopie

Zwar konnte die klassische Fluoreszenzmikroskopie bedeutend zum Verständnis zellulärer und biochemischer Prozesse sowie von Krankheiten beitragen, ihre Auflösung war jedoch lange durch die Wellenlänge des verwendeten Lichts, etwa 250 Nanometer, begrenzt. Das ist genug, um Proteine zellulären Organellen zuzuordnen, aber unzureichend für die Erforschung vieler zellulärer Ultrastrukturen oder gar einzelner Proteinkomplexe. Neue, supraauflösende Mikroskopietechniken erlaubten es, diese Barriere zu umgehen und ermöglichen heute nanoskopische Studien, also im Bereich weniger Nanometer, und damit nahe der Größe von Proteinen (**Abb. 1A**). Für die hochauflösende Bildgebung bildeten die herkömmlichen Markierungswerkzeuge, also Antikörper und Protein-Tags, jedoch neue Grenzen: Durch ihre eigene Größe erzeugen sie sowohl einen deutlichen Signalversatz als auch einen Signalverlust (**Abb. 1B**). Dies führt zu Bildge-



▲ **Abb. 1:** Auflösung verschiedener Mikroskopieverfahren und Affinitätssonden-abhängiger Auflösungsverlust. **A,** Auflösungsbereich häufig eingesetzter moderner Mikroskopieverfahren. SPIM: *selective/single plane illumination microscopy*, 2PM/3PM: *2/3-photon microscopy*, CLSM: *confocal laser scanning microscopy*, SIM: *structured illumination microscopy*, STED: *stimulated emission depletion microscopy*, SMLM: *single-molecule localization microscopy*, EM: *electron microscopy*. **B,** Auflösungsbeschränkungen konventioneller Affinitätsmarkierungen. Affinitätsmarker, einschließlich Antikörper und Nanobodies, versetzen den eingesetzten fluoreszierenden Marker gegenüber dem eigentlichen Zielprotein. Der damit verbundene Fehler zwischen dem nativen zellulären Zielprotein und dem abgebildeten Farbstoff verringert die Bildauflösung. Die Markierungsdichte ist für Antikörper und Nanokörper im Allgemeinen auch durch die Zugänglichkeit von Epitopen und sterische Beschränkungen begrenzt. Die resultierende begrenzte Bindungseffizienz führt zu erheblichen Informationsverlusten in der Bildgebung. Affinitätssonden mit idealer Größe, Affinität und Selektivität markieren das Zielprotein mit hoher Dichte und Verschieben den eingesetzten Fluorophor nur minimal. Die Daten bilden die tatsächliche Struktur ab.



▲ Abb. 2: Größenvergleich proteinbasierter und synthetischer Affinitätssonden. Die Größe der verwendeten Sonde korreliert direkt mit der Lokalisierungspräzision und der Eindringtiefe im Gewebe. Proteinbasierte Affinitätssonden (links) versetzen den eingesetzten fluoreszierenden Farbstoff um 6 bis 12 nm gegenüber dem eigentlichen Zielprotein. Der damit verbundene Fehler zwischen dem nativen zellulären Zielprotein und dem abgebildeten Farbstoff verringert die Bildauflösung. Darüber hinaus beschränken die resultierenden sterischen Beschränkungen die Bindungseffizienz, was zusätzlich zu erheblichen Informationsverlusten führt. Synthetische Affinitätssonden (rechts) markieren das Zielprotein potenziell stöchiometrisch und mit hoher Dichte. Sie verschieben den eingesetzten Fluorophor nur minimal; die Fluoreszenzsignale können die tatsächliche Struktur auflösen und erlauben darüber hinaus quantitative Aussagen über das Zielprotein.

bungsartefakten und begrenzt die Auflösung erheblich [1]. Zur Markierung in hochauflösenden bildgebenden Verfahren sind klassische Antikörper daher nicht mehr das Mittel der Wahl.

Proteinbasierte Affinitätssonden

Die Nachfrage nach geeigneten Sonden führte zu neuen konkurrierenden proteinbasierten Affinitätssonden wie den *antibody-derived antigen-binding fragments*, den *single chain variable fragments* sowie den Nanobodies (V_HH) (**Abb. 2**) und einer Reihe von alternativen molekularen Gerüsten wie der Fibronectin-Typ-III-Domäne. Im Vergleich zu Antikörpern haben diese Protein-Affinitätssonden eine kleinere Größe, die den *signal offset* reduziert und eine Auflösungsverstärkung und eine bessere Lokalisierungspräzision [2] ermöglicht. Da die neuen Affinitätssonden auf Proteinbasis häufig nicht mehr auf ein oxidierendes Milieu angewiesen sind, lassen sie sich, nach einer Transfektion oder Transduktion, auch als Marker in lebenden Zellen einsetzen.

Auch wenn diese Sonden einen deutlichen Auflösungsgewinn brachten, so leiden sie doch noch immer unter den gleichen schwerwiegenden Einschränkungen: Die Sonden auf Proteinbasis können nur nach genetischen Manipulationen eingesetzt werden, um intrazelluläre Komponenten in intakten lebenden Zellen oder Gewebeschnitten sichtbar zu machen. Diese Verfahren erlauben jedoch häufig keine stöchiometrische Mar-

kierung, was sie für quantitative Studien ungeeignet macht. Darüber hinaus sind ihre Entwicklung, Produktion und Validierung komplex und umfassen häufig noch immer Tierversuche.

Synthetische Affinitätssonden

Eine Alternative zu Antikörpern und klassischen proteinbasierten Sonden sind rein synthetische Affinitätssonden. Ihre physikalische Größe ist, mit Ausnahme von Aptameren, deutlich kleiner, was zu einer drastischen Auflösungsverbesserung und maximierten Lokalisierungspräzision führt. Synthetische Sonden umfassen dabei sowohl Peptide und peptidomimetische Verbindungen, wie Lifeact, Sylite [3] und Sir-Actin [4], als auch Oligonukleotid-basierte Moleküle (Aptamere). Insbesondere die peptidischen Sonden haben – dank ihrer geringeren Größe und leicht anpassbaren Eigenschaften (Ladung und Hydrophobizität) – das Potenzial, Proteine auch in lebenden Zellen ohne genetische Manipulationen zu markieren [2, 4].

Affinitätssonden in der Gewebebildgebung

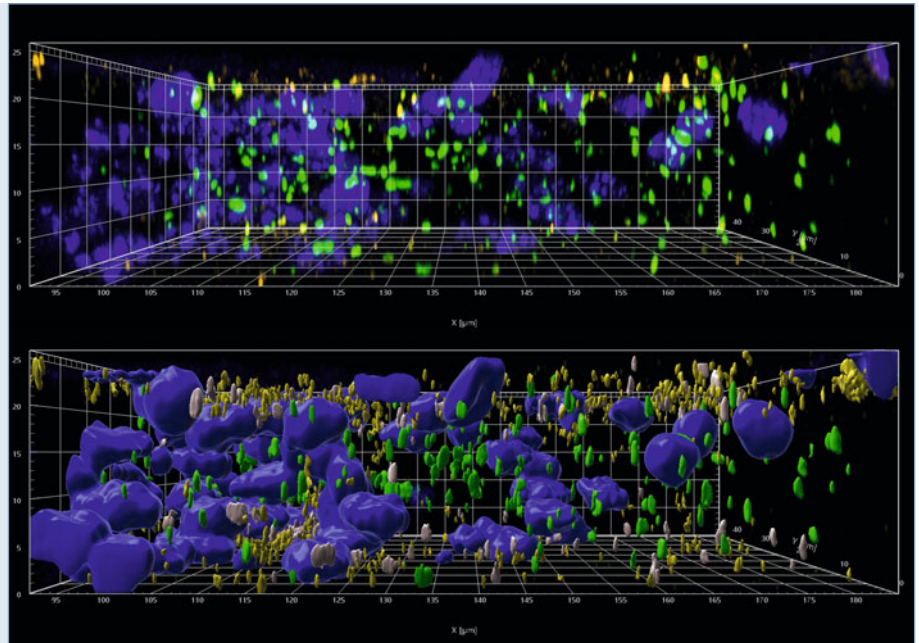
Neue KI-Deep-Learning-Algorithmen gepaart mit verbesserten Gewebereinigungsansätzen haben das Potenzial, die Kartierung einzelner menschlicher Organe bis hin zu vollständigen Tieren auf zellulärer Ebene zu ermöglichen. Optimierte Verfahren erlauben bereits die Kartierung von Proteinen in bis

zu 1,5 Zentimeter dicken Gewebsschnitten [5]. Der Einsatz synthetischer kleiner Affinitätssonden kann einerseits deutlich größere Eindringtiefen ermöglichen, andererseits auch wesentlich zur Verbesserung der Markierungseffizienz beitragen. Während Antikörper bei der Anwendung in Zellkulturen normalerweise eine gute Markierungseffizienz erreichen, leidet diese häufig im Gewebe unter ihrer Größe und Tendenz zur Vernetzung [6]. So zeigte die Antikörpervalidierung im Rahmen des Human-Protein-Atlas-Projekts, welche auf der Basis von Western Blots und Gewebe-Mikroarrays durchgeführt wurde, dass über die Hälfte der über 5.000 getesteten kommerziellen Antikörper bei Gewebeanwendungen versagen [7]. Demgegenüber erreichen kleine synthetische Affinitätssonden aufgrund ihrer reduzierten Größe häufig eine schnellere und größere Eindringtiefe in das Gewebe und dementsprechend eine höhere Markierungseffizienz (**Abb. 3**, [7]). Darüber hinaus sind die kleinen synthetischen Sonden weniger empfindlich gegenüber den eingesetzten Gewebereinigungsansätzen und Fixierungsmethoden, was eine wesentlich einfachere Gewebehandlung ermöglichen kann.

Einschränkungen neuer Affinitätssonden

Im Vergleich zu dem riesigen Repertoire verfügbarer Antikörper ist die Anzahl verfügbarer proteinbasierter und synthetischer Affinitätssonden noch überschaubar. Bisher

► **Abb. 3:** Synthetische Affinitätssonden vereinfachen und verbessern Proteinmarkierungen im Gewebe. Maus-Hippocampus-Gewebefärbung mit Zellkernmarker DAPI (blau), Synapsenfärbung mit Anti-Gephyrin mAb3B11 (gelb) und der peptidbasierten Fluoreszenzsonde Sylite (grün). In weiß gezeigt sind die Synapsen, die sowohl mit Sylite als auch mAb3B11 markiert werden konnten. Oben: 3D-Rekonstruktion des Hippocampus-Schnitts. Unten: volumetrische Darstellung des rekonstruierten Abschnitts. Die Verteilung vom Sylite ist im gesamten Gewebe homogen, während der Antikörper hauptsächlich an Schnittkanten beobachtet wird. Außerdem ist eine unspezifische Antikörpermarkierung sichtbar, wie die Aggregation auf und im Zellkern in der oberen rechten Ecke.



ist insbesondere die Entwicklung synthetischer Sonden ein komplexer und noch nicht vollständig standardisierter Prozess, der die Affinitätsreifung des anfänglichen Liganden und seine Konjugation an geeignete organische Fluorophore beinhaltet. Neben universellen Ansätzen für ihre Entwicklung und Produktion fehlt es auch an einer umfassenden Charakterisierung und Validierung der neuen Sonden. Für die peptidbasierten Sonden ist eine Verbesserung zu erwarten, da ihre Entwicklung und Synthese nach gut standardisierbaren Verfahren stattfinden kann.

Im Vergleich zu Antikörpern, bei denen das Signal – häufig unvermeidbar – durch überstoichiometrische Zweitantikörperbindung oder Fluorophorkonjugation deutlich verstärkt wird, tragen synthetische affinitätsbasierte Sonden normalerweise eine feste Anzahl von Fluorophoren, häufig einen einzigen. Zwar ermöglicht eine stöchiometrische Markierung eine genaue Quantifizierung des Zielproteins, sie reduziert aber gleichzeitig deutlich die Ausleseintensität und damit Sensitivität der Detektion.

Visualisierung endogener Proteine in der lebenden Zelle

Eine besondere Herausforderung für Affinitätssonden ist ihre Anwendung auf lebenden Zellen ohne genetische Manipulation. Anders als proteinbasierte Sonden sind synthetische Sonden aufgrund ihrer geringen Größe nach geeigneten Anpassungen durchaus zellmem-

brängig und damit direkt auf lebenden Zellen anwendbar. Ein häufig genannter Kritikpunkt ist jedoch die potenzielle Störung von Proteinfunktionen. Tatsächlich adressieren niedermolekulare und peptidbasierte Liganden vielfach Proteinoberflächen, welche *in vivo* kritische Proteininteraktionen vermitteln oder sie sind sogar selbst Fragmente oder Mimetika endogener Bindungspartner [8].

Perspektive

Affinitätsbasierte Markierungsmethoden sind ideal für die effektive und präzise Markierung endogener Proteine in fixierten und lebenden Zellen und insbesondere in Geweben. Neue, rein synthetische Affinitätssonden helfen, das volle Potenzial hochauflösender Bildgebungsverfahren zur zuverlässigen Untersuchung von nativem Gewebe, ohne weitere genetische Manipulationen zu entfalten. Bisher sind diese Werkzeuge nur für eine begrenzte Anzahl von Proteinen verfügbar und ihre Auswirkungen auf die Funktion der markierten Proteine sind teilweise noch unzureichend beschrieben. Die Kombination verbesserter virtueller Vorhersage [9] mit neuen Büchereitechnologien auf Basis biologisch-synthetischer Phagen [10] oder Hochdurchsatzsynthese und Ausleseverfahren [11, 12] könnte die Anzahl verfügbarer synthetischer Affinitätssonden in den nächsten Jahren drastisch steigern. Mittel- bis langfristig könnten synthetische Affinitätssonden damit zumindest für High-End-Mikroskopieverfahren und beim Studium nativer Zellen

und Gewebe zu einem unentbehrlichen Werkzeug werden.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die DFG gefördert (MA6957/1-1).

Literatur

- [1] Lelek M, Gyparaki MT, Beliu G et al. (2021) Single-molecule localization microscopy. *Nat Rev Methods Prim* 1: 39
- [2] Choquet D, Sainlos M, Sibarita JB (2021) Advanced imaging and labelling methods to decipher brain cell organization and function. *Nat Rev Neurosci* 22: 237–255
- [3] Khayenko V, Schulte C, Reis SL et al. (2021) Sylites: multipurpose markers for the visualization of inhibitory synapses. *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.05.20.444651>
- [4] Lukinavičius G, Reymond L, D'Este E et al. (2014) Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nat Methods* 11: 731–733
- [5] Zhao S, Todorov MI, Cai R et al. (2020) Cellular and molecular probing of intact human organs. *Cell* 180: 796–812
- [6] Chamma I, Letellier M, Butler C et al. (2016) Mapping the dynamics and nanoscale organization of synaptic adhesion proteins using monomeric streptavidin. *Nat Commun* 7: 10773
- [7] Berglund L, Björling E, Oksvold P et al. (2008) A genecentric human protein atlas for expression profiles based on antibodies. *Mol Cell Proteomics* 7: 2019–2027
- [8] Flores LR, Keeling MC, Zhang X et al. (2019) Lifeact-GFP alters F-actin organization, cellular morphology and biophysical behaviour. *Sci Rep* 9: 1–13
- [9] Tsaban T, Varga J, Avraham O et al. (2021) Harnessing protein folding neural networks for peptide-protein docking. *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.08.01.454656>
- [10] Simonetti L, Ivarsson Y (2020) Genetically encoded cyclic peptide phage display libraries. *ACS Cent Sci* 6: 336–338
- [11] Schulte C, Khayenko V, Gupta AJ et al. (2021) Low-cost synthesis of peptide libraries and their use for binding studies via temperature-related intensity change. *STAR Protoc* 2: 100605
- [12] Schulte C, Khayenko V, Nordblom NF et al. (2020) High-throughput determination of protein affinities using unmodified peptide libraries in nanomolar scale. *iScience* 24: 101898

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Hans Michael Maric
 Rudolf Virchow Center – Center for Integrative
 and Translational Bioimaging
 Biocenter – Biotechnology and Biophysics
 Universität Würzburg
 Josef-Schneider-Straße 2
 D-97080 Würzburg
 Hans.maric@virchow.uni-wuerzburg.de

AUTOREN



Vladimir Khayenko

2011–2015 Pharmaziestudium, Hebräische Universität Jerusalem, Israel. 2015–2017 M.Sc. Pharmazie, Spezialisierung Medizinische Chemie, Hebräische Universität Jerusalem, Israel. 2018–2022 Promotion, Graduate School of Life Sciences, Universität Würzburg. 2020 Gastwissenschaftler am Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) am Institute of Biology (IBENS), Paris, Frankreich.



Hans Michael Maric

Chemiestudium und Promotion, Universität Würzburg. 2012–2015 Postdoktor am Institut für Drug Design and Pharmacology der Universität Kopenhagen, Dänemark. 2015–2017 Assistant Professor am Center for Biopharmaceuticals, Kopenhagen, Dänemark. 2018–2021 Nachwuchsgruppenleiter am Lehrstuhl Biotechnologie und Biophysik des Biozentrums Würzburg. Seit 2021 Emmy-Noether-Gruppenleiter am Rudolf-Virchow-Zentrum der Universität Würzburg.