

# Die Staudinger-Ligation – ein Geschenk für die Chemische Biologie

Maja Köhn und Rolf Breinbauer\*

## Stichwörter:

Biokonjugate · Bioorganische Chemie · Chemische Biologie · Peptide · Staudinger-Ligation

**O**bwohl die Reaktion von Aziden mit Phosphanen zu Aza-Yliden schon vor mehr als 80 Jahren von Hermann Staudinger entdeckt worden ist und seither in der Organischen Synthese vielfältige Anwendung gefunden hat, wurde ihr Potenzial als eine hoch chemoselektive Ligationmethode zur Herstellung von Biokonjugaten erst vor kurzem erkannt. Dabei sind die beiden Reaktionspartner zu fast allen in biologischen Systemen präsenten funktionellen Gruppen bioorthogonal und reagieren sogar in wässriger Umgebung bei Raumtemperatur. Dies ermöglicht die Anwendung der Staudinger-Ligation auch in der komplexen Umgebung einer lebenden Zelle. Dieser Kurzaufsatz schildert den gegenwärtigen Kenntnisstand zu dieser Reaktion und ihrer Anwendung in der Herstellung von Biokonjugaten und als Ligationmethode in der Chemischen Biologie.

## 1. Einleitung

Bei ihren Untersuchungen von biologischen Systemen stoßen Molekularbiologen oder Chemiker immer wieder auf die Aufgabe, zwei molekulare Einheiten miteinander zu verknüpfen, etwa ein komplexes Kohlenhydrat mit einem Peptid, oder eine kleine molekulare Sonde (Fluoreszenzfarbstoff, Radikalsonde, Affinitätsmarker, etc.) mit einem Biopolymer. Biologische Systeme sind nicht nur strukturell sehr komplex, sondern auch divers in ihrer funktionellen Reaktivität. Daher müssen chemoselektive Ligungsreaktionen entwickelt werden, bei denen zwei ausschließlich miteinander reagierende funktionelle Gruppen in einer (üblicherweise) wässrigen Umgebung zur Reaktion gebracht werden. Diese ausgewählten funktionellen Gruppen sollen nicht nur wechselseitig selektiv sein, sondern auch verschiedenste andere

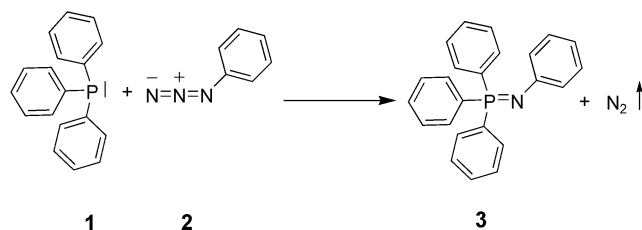
Funktionalitäten tolerieren. Damit sollten sich Schutzgruppen erübrigen und im Idealfall sogar Anwendungen in der anspruchsvollen Umgebung lebender Zellen möglich werden.

Obwohl es einige Ligationstechniken für die In-vitro-Herstellung von Biokonjugaten gibt, bei denen nur

wenige unterschiedliche Funktionalitäten berücksichtigt werden müssen,<sup>[1]</sup> gibt es nur sehr wenige wirklich chemoselektive Ligungsreaktionen. Dies liegt daran, dass die meisten Ligationen auf der Reaktion eines Nucleophils mit einem Elektrophil beruhen. Da biologische Systeme eine Reihe unterschiedlicher elektrophiler und nucleophiler Zentren enthalten, sind nur wenige funktionelle Gruppen mit orthogonaler Reaktivität zu den bereits vorhandenen funktionellen Gruppen verfügbar.<sup>[2]</sup> Kürzlich wurden zwei Reaktionen vorgestellt, die sich der Azidogruppe bedienen und durch folgende Vorteile auszeichnen: 1) Die Azidogruppe tritt in fast keinen natürlich vorkommenden Molekülen auf („bioorthogonal“); 2) trotz ihrer intrinsisch hohen Reaktivität ermöglichen Azide eine selektive Reaktion mit einer sehr begrenzten Zahl von Reaktionspartnern; 3) die Azidogruppe ist klein und kann in biologische Proben eingeführt werden, ohne die Molekülgröße signifikant zu erhöhen. Die „Click-Chemie“-Reaktion von Sharpless et al. ([3+2]-Cycloaddition zwischen Aziden und terminalen Alkinen) erfordert die Zugabe eines Kupferkatalysators.<sup>[3]</sup> Hingegen nutzt die von Bertozzi et al. eingeführte Staudinger-Ligation die glatte Reaktion von Aziden mit Phosphanen zu Phospha-Aza-Yliden. Diese können durch Acylgruppen abgefangen werden, wobei stabile Amidbindungen entstehen.<sup>[4]</sup> Dieser Kurzaufsatz fasst die jüngsten Anwendungen dieser chemoselek-

[\*] Dipl.-Chem. M. Köhn, Dr. R. Breinbauer  
Abteilung für Chemische Biologie  
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie  
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)  
und  
Universität Dortmund  
Fachbereich 3, Organische Chemie  
44227 Dortmund (Deutschland)  
Fax: (+49) 231-133-2499  
E-mail: rolf-peter.breinbauer@mpi-dortmund.mpg.de

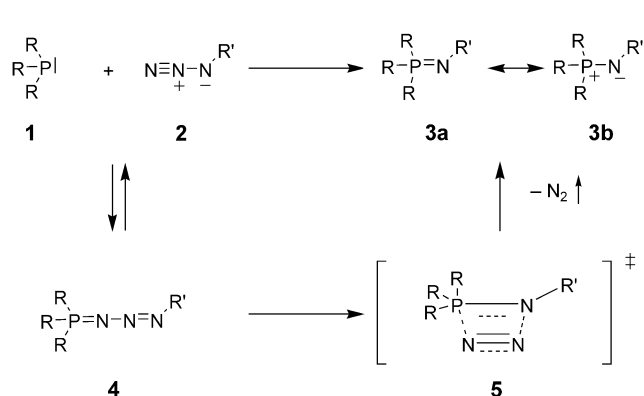
tiven Ligationsmethode zusammen, die sich zweier bioorthogonaler Gruppen bedient.



**Schema 1.** Bildung von Iminophosphoranen durch die Staudinger-Reaktion von Phosphanen mit Aziden.

## 2. Staudinger-Reaktion

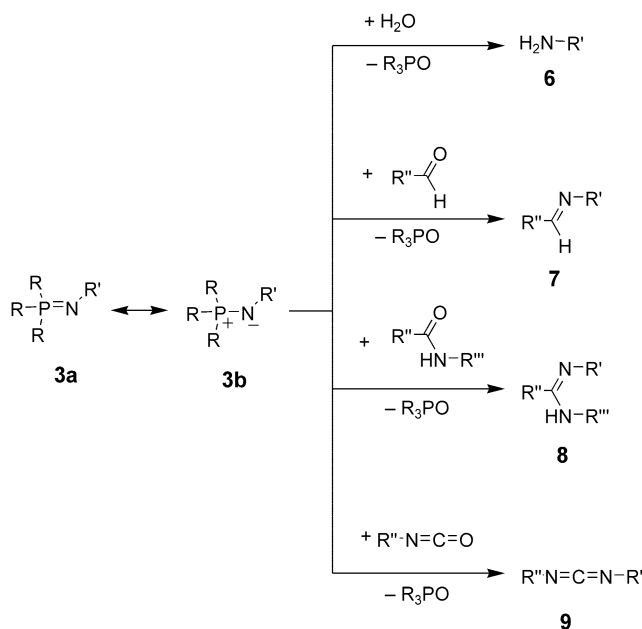
Im Jahre 1919 berichteten Staudinger und Meyer, dass bei der Zugabe von Aziden zu Triarylphosphanen in glatter Reaktion Iminophosphorane gebildet werden (Schema 1).<sup>[5]</sup> Diese Iminierungsreaktion verläuft unter milden Reaktionsbedingungen mit fast quantitativer Ausbeute, ohne dass signifikante Mengen an Nebenprodukten entstehen würden. Detaillierte mechanistische Untersuchungen haben ergeben, dass die Reaktion über mehrere Zwischenstufen verläuft (Schema 2).<sup>[6]</sup> 1 und 2 bilden in einer primären Iminbildungs-



**Schema 2.** Mechanismus der Staudinger-Reaktion.

reaktion das Phosphazid 4, das sich normalerweise während der Reaktion unter Abspaltung von Stickstoff zersetzt. Es ist bemerkenswert, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Bildung von 4 nur von den induktiven Eigenschaften der Reste am Phosphoratom und am Azido-Ende kontrolliert wird, während sterische Einflüsse keine Rolle zu spielen scheinen. Substituenten, die die positive Ladung des Phosphoratoms delokalisieren können und/oder das Phosphoratom in 4 sterisch abschirmen, führen zu Phosphaziden, die in organischen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur stabil sind. Die anschließende Abspaltung von Stickstoff verläuft vermutlich über den viergliedrigen Übergangszustand 5 unter Retention der ursprünglichen Konfiguration am Phosphoratom, ohne dass dabei Radikale oder Nitrene beteiligt wären.

Das Iminophosphoran 3 mit seinem stark nucleophilen Stickstoffatom kann mit fast allen elektrophilen Reagentien reagieren, woraus sich eine Fülle synthetisch wichtiger Reaktionen ergibt (Schema 3).<sup>[6,7]</sup> Wird die Staudinger-Reak-



**Schema 3.** Das Aza-Ylid 3b kann mit einer Vielzahl von Elektrophilen abgefangen werden.



Rolf Breinbauer wurde 1970 in Schärding (Österreich) geboren und studierte Chemie in Wien und Heidelberg. Nach seiner Doktorarbeit unter Prof. M. T. Reetz am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim an der Ruhr (Deutschland) ging er als Erwin-Schrödinger-Stipendiat als Postdoc zu Prof. E. N. Jacobsen an die Harvard University. Seit 2000 arbeitet er als Gruppenleiter am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und am Institut für Organische Chemie der Universität Dortmund. Zu seinen Forschungsinteressen zählen kombinatorische Chemie und Chemische Biologie. (Foto: Jürgen Huhn)



Maja Köhn wurde 1975 in Kiel (Deutschland) geboren, wo sie auch Chemie studierte. In ihrer Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. T. K. Lindhorst beschäftigte sie sich mit der Derivatisierung von Kohlenhydraten. Als Forschungsstipendiatin am CSIC in Sevilla arbeitete sie mit Dr. J. M. Garcia Fernandez an der Synthese von Glycoclustern. Seit 2001 ist sie Doktorandin in der Abteilung für Chemische Biologie (Prof. H. Waldmann) am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und an der Universität Dortmund.

tion in einem wässrigen Lösungsmittel durchgeführt, so hydrolysiert das Iminophosphoran **3** sehr schnell und liefert das primäre Amin **6** sowie Phosphan(v)-oxid. Die so genannte Staudinger-Reduktion ist eine glatt ablaufende, häufig angewendete Methode zur Reduktion von Aziden zu Aminen. Staudinger entdeckte auch, dass **3** mit Aldehyden oder Ketonen zu Iminen reagiert.<sup>[8]</sup> Der synthetische Nutzen dieser Aza-Wittig-Reaktion zeigt sich an ihrer Anwendung in vielen Totalsynthesen, z. B. in der Synthese von Croomin, Chinin oder Dendrobin.<sup>[7]</sup> Sogar weniger reaktive Carbonylelektrophile wie Ester oder Amide reagieren mit **3**, besonders wenn der elektrophile Angriff intramolekular erfolgt. Beispielsweise ist die Reaktion von 2-Azidobenzoylchlorid mit einem geeigneten Amid eine hervorragende Methode zur Herstellung von Chinazolin (Eguchi-Protokoll).

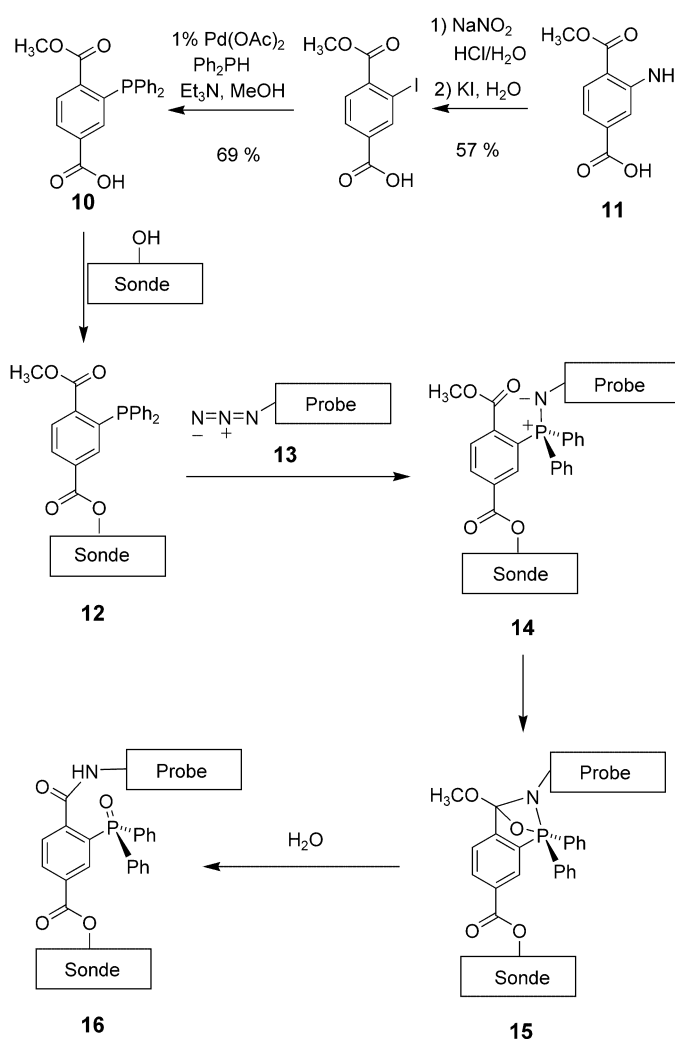
### 3. Staudinger-Ligation

#### 3.1. Nichtspurlose Staudinger-Ligation

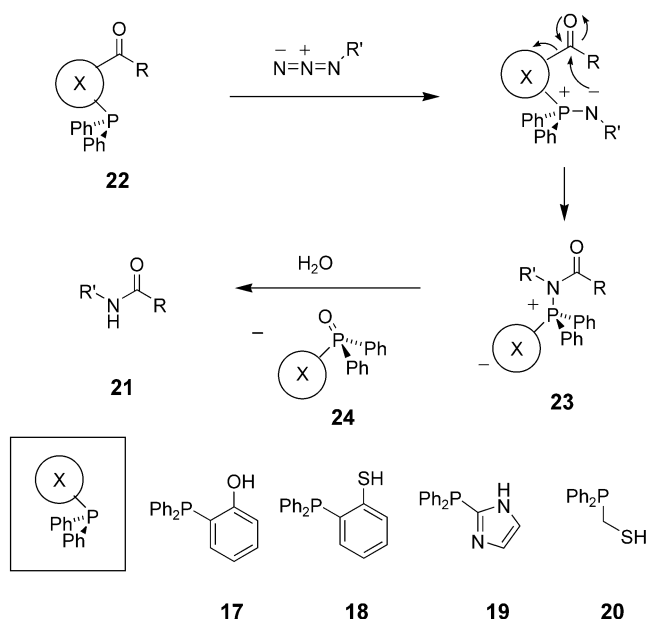
Im Verlauf ihrer richtungsweisenden Arbeiten zur gezielten metabolischen Veränderung von Zelloberflächen mussten Bertozzi et al. die Einschränkungen der von ihnen verwendeten Hydrazonligationsmethode erkennen, bei der Konjugate aus einer hydrazinhaltigen Sonde und einer ketonmodifizierten Probe gebildet werden.<sup>[2]</sup> Die Suche nach einer milderen Reaktion mit zwei wirklich bioorthogonalen Funktionen führte sie zur Staudinger-Reaktion. Wie bereits beschrieben, hydrolysiert das Reaktionsprodukt der Azid-Phosphan-Reaktion, das Aza-Ylid **3**, in wässriger Umgebung spontan und liefert Amin und Phosphanoxid. Bertozzi et al. konstruierten den Liganden **10** gemäß der Überlegung, dass eine innerhalb des Phosphans geeignet positionierte elektrophile Falle, etwa eine Estergruppe, das nucleophile Aza-Ylid **14** durch intramolekulare Cyclisierung abfangen könnte (Schema 4).<sup>[4]</sup> Dieser Vorgang würde letztlich eine stabile Amidbindung liefern, noch ehe die konkurrierende Aza-Ylid-Hydrolyse die Reaktion in eine unerwünschte Richtung lenken könnte. Der noch nicht kommerziell erhältliche Ligand **10** kann sehr einfach aus dem Aminoterephthalsäureester **11** durch Diazotierung, anschließende Iodierung und palladiumkatalysierte Phosphanylierung hergestellt werden.<sup>[4,9]</sup> Standardveresterungs- oder Amidierungsmethoden ermöglichen die Konjugation des Phosphans mit der Sonde. Das dabei entstehende Produkt **12** reagiert in wässriger Lösung mit dem Azid **13**. Mechanistische Studien mithilfe der <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie zeigten, dass das Aza-Ylid **14** und das Oxaphosphetan **15** Intermediate der Ligationsreaktion sind.<sup>[10]</sup>

#### 3.2. Spurlose Staudinger-Ligation

Obwohl die beschriebene Reaktion auch in biologischer Umgebung sehr gut funktioniert, erscheint eine Modifikation, bei der die Amidbindung zwischen den Partnern ohne störende Triarylphosphanoxidgruppe geknüpft werden kann, als noch attraktiver. Kurz nach ihrem ersten Bericht haben



Schema 4. Herstellung von Phosphan **10** und dessen Anwendung in der Staudinger-Ligation.



Schema 5. Spurlose Staudinger-Ligation.

Bertozzi et al.<sup>[11]</sup> und Raines et al.<sup>[12]</sup> eine spurlose Staudinger-Ligation vorgestellt, bei der die Phosphanoxeinheit im Hydrolyseschritt abgespalten wird (Schema 5).

Bei dieser Reaktion werden die Phosphane **17–20** zunächst acyliert und mit dem Azid zur Reaktion gebracht. Das nucleophile Stickstoffatom des Aza-Ylids greift die Carbonylgruppe an und spaltet so die Bindung zur Phosphoniumgruppe. Hydrolyse des umgelagerten Produkts **23** liefert das Amid **21**, wobei das Phosphanoxid **24** freigesetzt wird. Unter den getesteten Phosphanen zeigten 2-Diphenylphosphanylphenol **17** (einfach durch palladiumkatalysierte Reaktion von 2-Iodphenol und Diphenylphosphan herstellbar)<sup>[11]</sup> und Diphenylphosphanylmethanthiol **20** (mittlerweile kommerziell erhältlich) das beste Reaktivitätsprofil; beide Reagentien haben in der Folge breite Anwendung gefunden (siehe unten). **20** wird wegen seines Alkylsubstituenten leicht an Luft oxidiert und am besten als BH<sub>3</sub>-Addukt gehandhabt, aus dem es mit einem starken Aminnucleophil wie DABCO freigesetzt werden kann.

## 4. Anwendungen

### 4.1. Peptidligation

Die Totalsynthese von Proteinen erfordert chemoselektive Ligationmethoden, mit denen kürzere Peptidfragmente (die durch Festphasenpeptidsynthese (SPPS) hergestellt werden) zum fertigen Protein kombiniert werden können.<sup>[13]</sup> Die häufigste verwendete Ligationmethode, die „native chemische Ligation“ von Wieland und Kent, erfordert einen Cys-Rest am N-Terminus der Verknüpfungsstelle.<sup>[14]</sup> Raines et al. haben die Staudinger-Ligation als eine Peptidverknüpfungsmethode vorgeschlagen, die nicht von einer bestimmten Aminosäureseitenkette abhängt (Schema 6).<sup>[12b]</sup> In einem

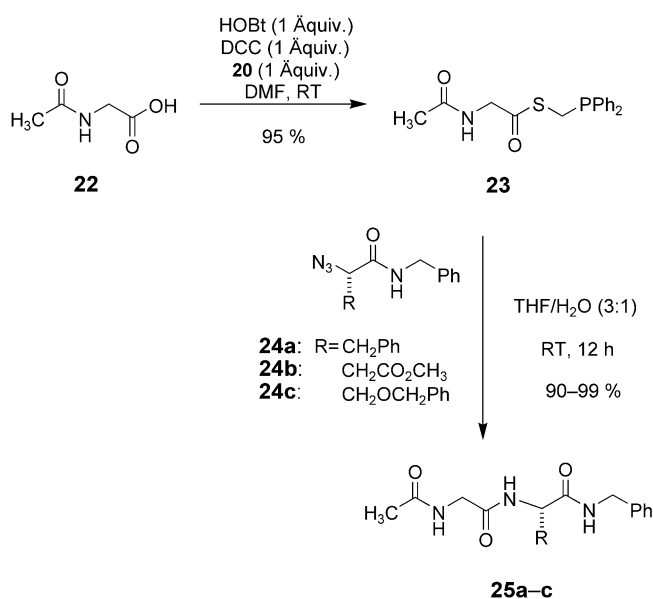
Proof-of-Principle-Experiment wandelten sie *N*-Acetylglycin (**22**) in den Thioester **23** um, der in wässrigem THF glatt mit den geschützten Azidoaminosäuren **24a–c** zu den Dipeptiden **25a–c** in sehr guter Ausbeute und ohne erkennbare Epimerisierung reagiert. Die erforderlichen Azidoaminosäuren können einfach nach der Diazotransfer-Methode von Roberts und Wong aus den entsprechenden Aminosäuren hergestellt werden.<sup>[15,16]</sup>

In einer Arbeit, die eindrucksvoll den Nutzen orthogonaler chemischer Ligationmethoden belegt, haben Raines et al. durch die Verknüpfung von drei Fragmenten die Totalsynthese von Ribonuclease A (**31**, RNase A, 124 Aminosäuren) durchgeführt (Schema 7).<sup>[17]</sup> RNase A(110–111) wurde als C-terminaler Phosphanylthioester FmocCys(Trt)-Glu(O<sup>*t*</sup>Bu)SCH<sub>2</sub>PPh<sub>2</sub> (**26**) mithilfe eines Safety-Catch-Linkers vom Kenner-Typ hergestellt. RNase A(112–124) wurde als N-terminales Azid N<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>C(O)Asn(Trt)ProTyr(*t*Bu)Val-ProValHis(Trt)PheAsp(O<sup>*t*</sup>Bu)AlaSer(*t*Bu)Val (**27**) über eine Standard-Fmoc-Strategie auf PEGA-Harz synthetisiert. Die beiden Peptidfragmente wurden noch auf dem Harz durch Staudinger-Ligation verknüpft. Nach Abspaltung vom Harz und Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen, wurde RNase A(110–124)(**29**) in 61 % Ausbeute erhalten. Der N-terminale Cys-Rest des Fragments ermöglicht die Anknüpfung an den biosynthetisch hergestellten RNase A(1–109)-Thioester (**30**) durch native chemische Ligation. Das dabei gebildete Protein **31** erwies sich nach Faltung als vollständig aktive RNase A.

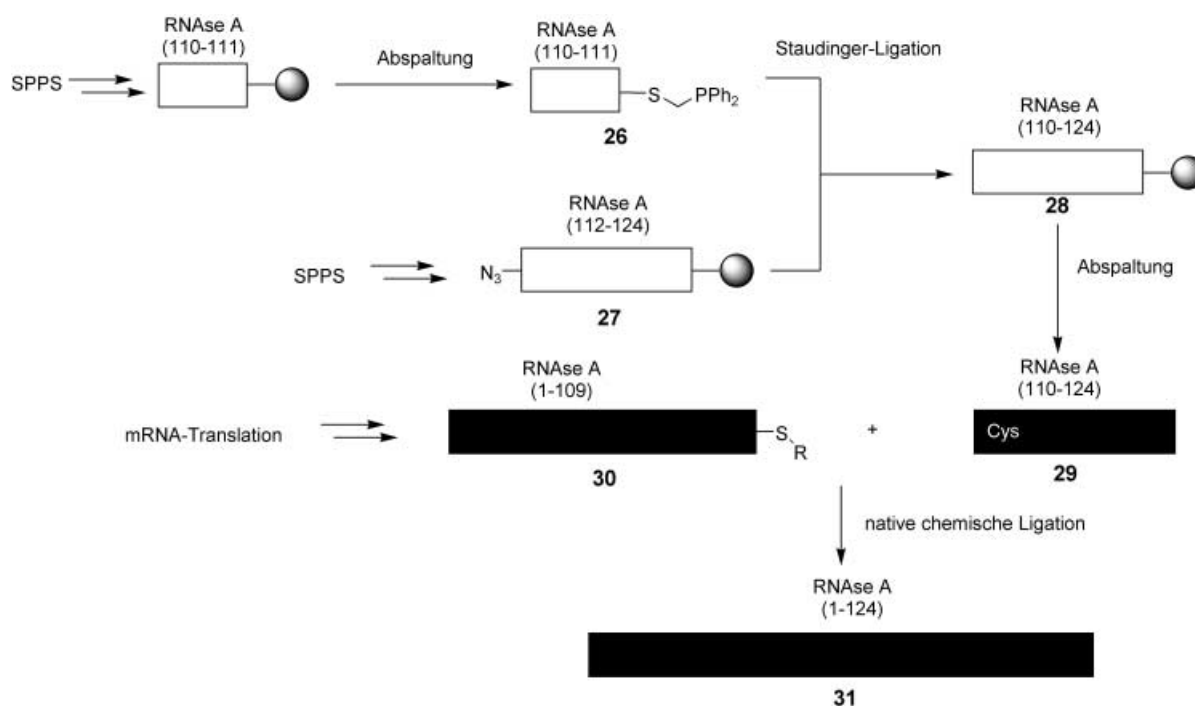
Dieses eindrucksvolle Ergebnis sollte aber nicht von der Tatsache ablenken, dass Anwendungen der Staudinger-Ligation in der Peptidchemie noch limitiert sind. Zukünftige Arbeiten müssen darauf zielen, kompliziertere Peptidfragmente zu verknüpfen und die Frage beantworten, ob der Schutz von Seitenketten erforderlich ist.

Liskamp et al. leiteten derartige Untersuchungen ein, indem sie die Kupplung von Peptidfragmenten untersuchten, die ohne Glycin an der Verknüpfungsstelle auskommen.<sup>[18]</sup> Ausgehend von N-terminalen  $\alpha$ -Azidopeptiden und C-terminalen Peptid-*ortho*-(diphenylphosphanyl)phenylestern (leicht aus Phosphan **17** herstellbar) konnten sie Tetra- und Pentapeptide in 6–36 % Ausbeute in nichtwässrigen Lösungsmitteln herstellen. Die Kupplung eines ungeschützten Peptids mit einem Lys-Rest lieferte nicht nur das erwünschte Produkt sondern auch das Aminolyseprodukt, das durch nucleophilen Angriff der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lys-Rests entsteht. Kinetische Untersuchungen zeigten, dass das Aza-Ylid-Intermediat in allen Fällen sehr schnell gebildet wurde. Die oftmals langsame Weiterreaktion zum Ligrationsprodukt kann eine Folge der sterisch gehinderten Zwischenprodukte sein oder durch die Gegenwart der Aminosäureseitenketten innerhalb der Peptidfragmente zustande kommen.

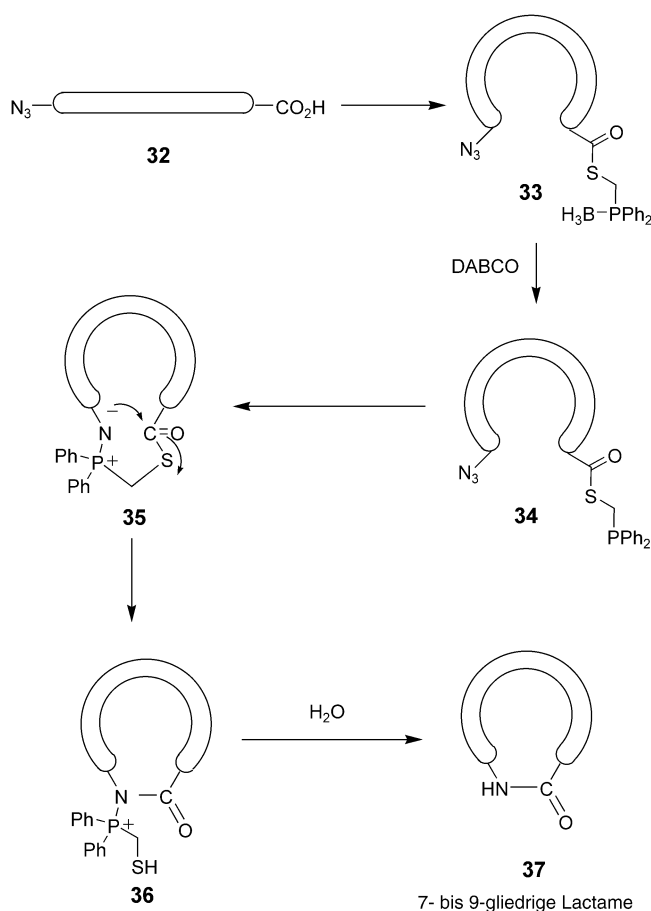
Eine interessante Anwendung der Amidknüpfungseigenschaft der Staudinger-Ligation wurde von Maarseveen et al. vorgestellt, die eine Lösung zu dem noch wenig zufriedenstellend gelösten Problem des Ringschlusses zu mittleren Lactamen vorstellten.<sup>[19]</sup> Die Reaktionssequenz ist in Schema 8 dargestellt. Die offenkettige Azidocarbonsäure **32** wird in den borangeschützten Phosphanylthioester **33** umgewandelt. Durch Entschützung mit DABCO erhält das Phosphor-



**Schema 6.** Peptidbildung durch die spurlose Staudinger-Ligation nach Raines et al.



**Scheme 7.** Totalsynthese von RNase A mit drei verschiedenen chemoselektiven Ligationsmethoden durch Raines et al.



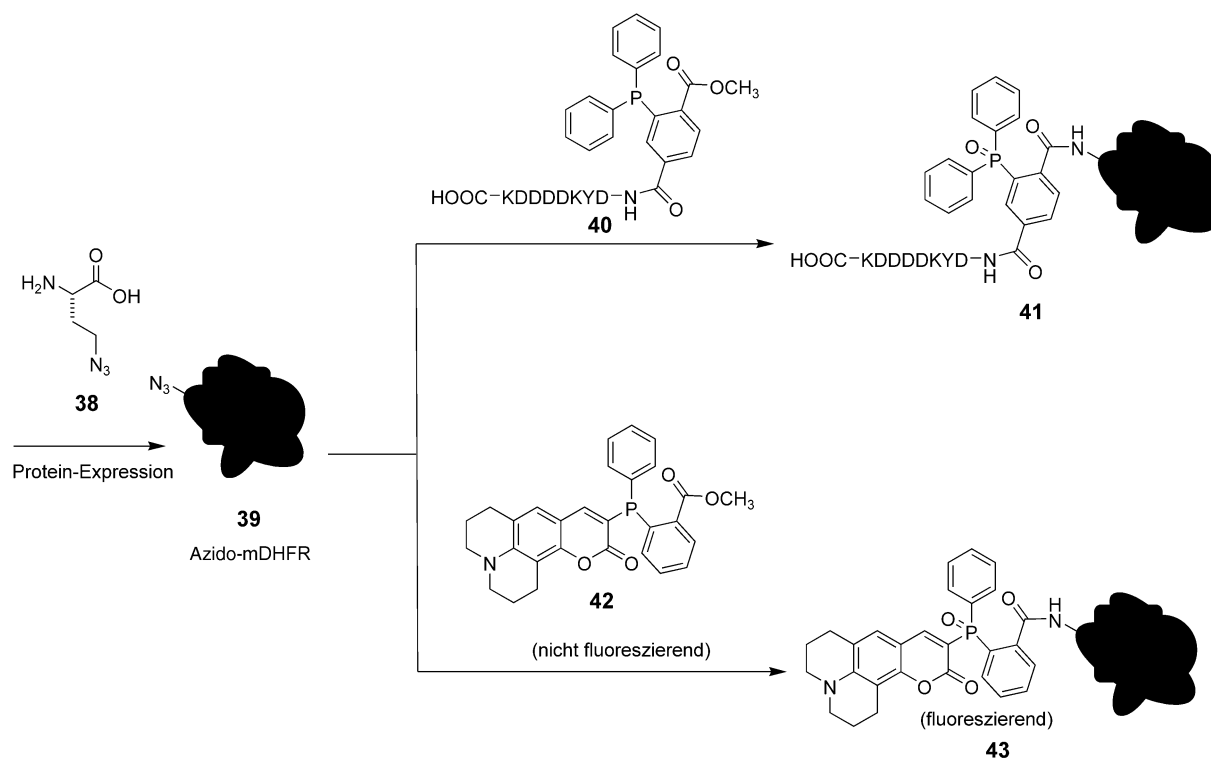
**Scheme 8.** Eine generelle Strategie zur Herstellung von sieben- bis neungliedrigen Lactamen.

atom seine nucleophile Reaktivität zurück und kann das Azid unter Bildung des Aza-Ylids **35** angreifen. Elektrophiles Abfangen des Ylids durch die Thioesterseinheit verkleinert die Ringgröße um drei Atome. Bei dieser Reaktion kompensiert der Enthalpiegewinn bei der Amidbildung den sonst energetisch unvorteilhaften Aufbau der hohen, intrinsischen Spannung von mittelgroßen Ringen. Nach Hydrolyse werden die sieben- bis neungliedrigen Lactame **37** in Ausbeuten erhalten, die meist höher sind als bei etablierten Lactamisierungsmethoden.

#### 4.2. Synthese von Biokonjugaten

Im Mittelpunkt der Chemischen Biologie steht die Herstellung von Biokonjugaten, in denen eine Reportergruppe (Farbstoff, Spinsonde, Affinitätsmarker oder Erkennungsmotiv) an eine biologische Probe oder ein Biopolymer angeknüpft wird.<sup>[1]</sup>

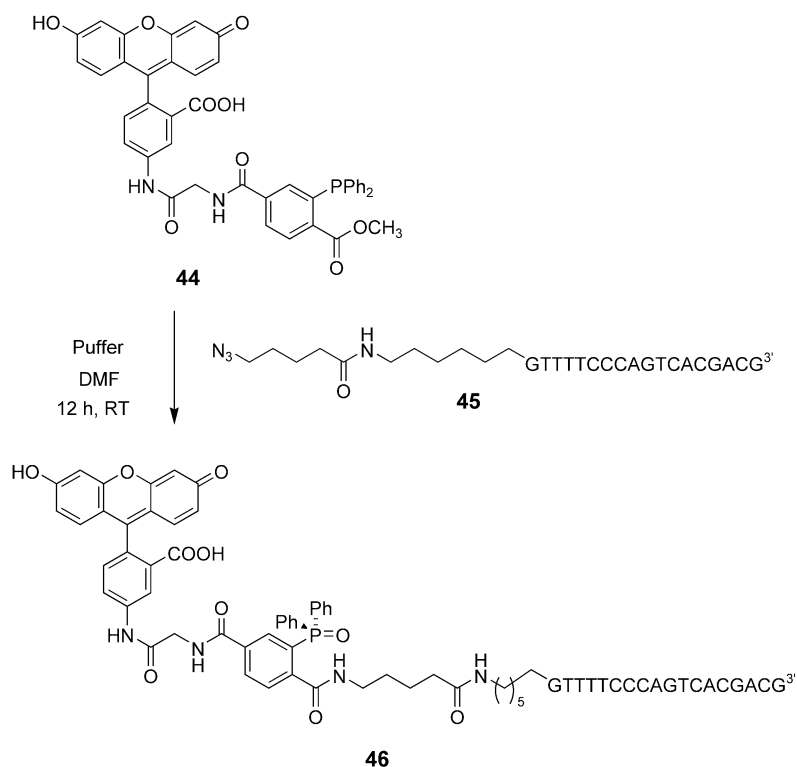
Die Arbeitsgruppen von Tirrell und Bertozzi haben eine allgemein anwendbare Strategie vorgestellt, mit der Azide in rekombinante Proteine für eine nachfolgende chemoselektive Modifikation mithilfe der Staudinger-Ligation eingebaut werden können.<sup>[20]</sup> Azidohomoalanin (**38**) wird durch die Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS) von *Escherichia coli* aktiviert und ersetzt Methionin in Proteinen, die in methioninfreien Bakterienkulturen exprimiert werden. In einem Proof-of-Principle-Experiment haben sie murine Dihydrofolatreduktase (mDHFR) in einem *E.-coli*-Methioninauxotroph in einem mit Azidohomoalanin-Zusatz ergänztem Reaktionsmedium exprimiert. Aminosäureanalyse des gereinigten Proteins **39** zeigte, dass  $95 \pm 2\%$  aller Methioninreste ersetzt wurden. Das gereinigte Protein wurde in der Stau-



**Schema 9.** Rekombinante Expression von azidmodifizierten Proteinen und deren Markierung mit Staudinger-Sonden **40** und **42**.

dinger-Ligation mit zwei unterschiedlichen Sondenmolekülen eingesetzt (Schema 9). Azido-mDHFR (**39**) reagierte bei 47°C in 6 h in einem Puffer mit 250 µM Phosphan **40**, das das FLAG-Peptid (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys) enthält. Das markierte Protein **41** wurde durch Inkubation mit einem FITC-anti-FLAG-Antikörper oder durch tryptischen Verdau mit anschließender MALDI-TOF-Analyse charakterisiert. Obwohl die Staudinger-Ligation an mehreren Reaktionszentren stattgefunden hat, konnte eine vollständige Modifikation aller acht möglichen Stellen nicht beobachtet werden. Wahrscheinlich hatte bereits eine gewisse Reduktion der Azideinheit des Azidohomoalanins stattgefunden. Interessanterweise funktioniert die Markierung auch mit rohem Zelllysats. Um einen zweistufigen Markierungsprozess zu verkürzen, haben Bertozzi et al. den fluoreszenten Coumarin-Phosphan-Farbstoff **42** hergestellt, der nicht selbst fluoresziert, sondern durch die Staudinger-Ligation mit Aziden aktiviert wird.<sup>[21]</sup> Reaktion von **42** mit Azido-mDHFR **39** führte zur spezifischen Markierung des Azidoproteins. Anders als bei den bereits genannten Experimenten mit dem FLAG-Konjugat konnte das markierte Protein **43** ohne nachfolgenden Western-Blot oder sekundäre Markierungsschritte nachgewiesen werden.

Ju et al. haben die ortsspezifische Markierung von DNA durch Staudinger-Ligation vorgestellt.<sup>[22]</sup> Ein am 5'-Ende mit einer Azidogruppe versehenes Oligonucleotidfragment (**45**) wurde unter wässrigen Bedingungen selektiv mit fluoresceinmodifiziertem Phosphan (Fam) **44** zum Fam-markierten Oligonucleotid **46** in ca. 90 % Ausbeute umgesetzt (Schema 10). Das entstandene fluoreszente Oligonucleotid



**Schema 10.** Herstellung eines fluoreszenzmarkierten DNA-Oligonucleotids.

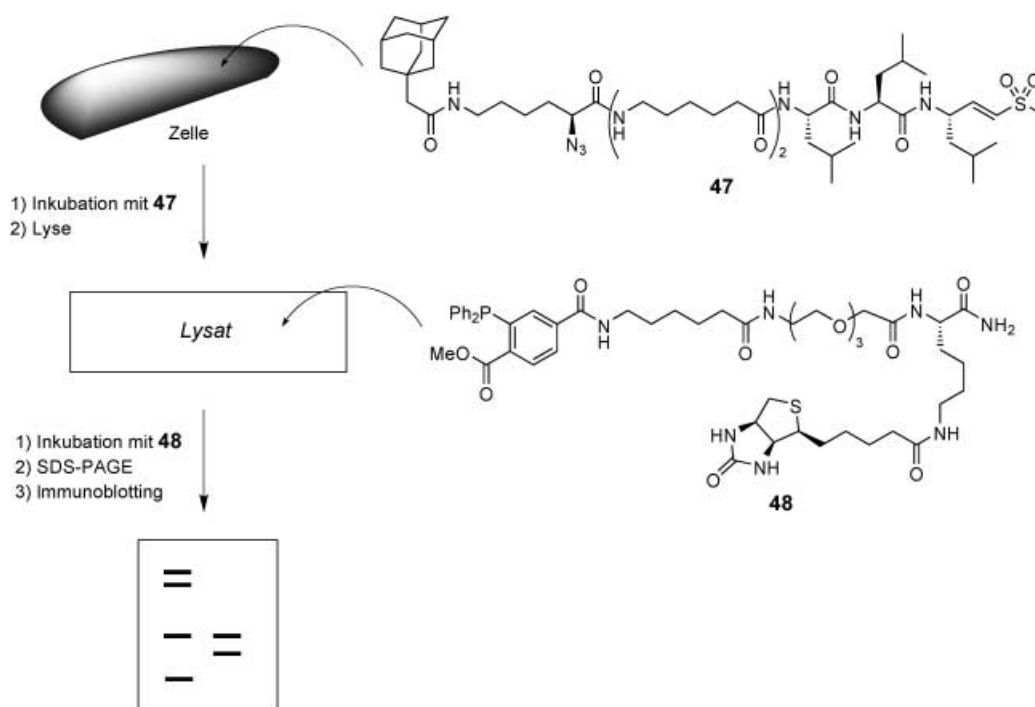
wurde als Primer in der Sanger-Didesoxysequenzierung eingesetzt, wo es fluoreszierende DNA-Verlängerungsfragmente lieferte, die mithilfe eines Fluoreszenz-Elektrophorese-DNA-Sequenzierers analysiert wurden.

Chemiebasierte Ansätze zur funktionellen Proteomik beruhen auf synthetischen Verbindungen, die eine ausgewählte Untergruppe von Proteinen kovalent und irreversibel modifizieren können. Irreversible Proteaseinhibitoren wurden schon bei der vergleichenden Untersuchung von Serin- oder Cysteineproteasen verwendet.<sup>[23]</sup> Overkleeft et al. haben den azidofunktionalisierten Inhibitor **47** konstruiert, der alle katalytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten des konstitutiven und des Interferon- $\gamma$ -induzierbaren Immunoproteasoms inhibiert.<sup>[24]</sup> EL-4-Zellen wurden über Nacht mit **47** inkubiert. Nach Lyse wurde der Zellextrakt mit der biotinylierten Phosphonsonde **48** versetzt (Schema 11). Nach Auftrennung durch SDS-PAGE und Immunoblotting konnten die unterschiedlichen Untereinheiten des Proteasoms sichtbar gemacht werden. In diesem Experiment erwies sich die In-vivo-Markierung gegenüber dem entsprechenden In-vitro-Experiment als überlegen.

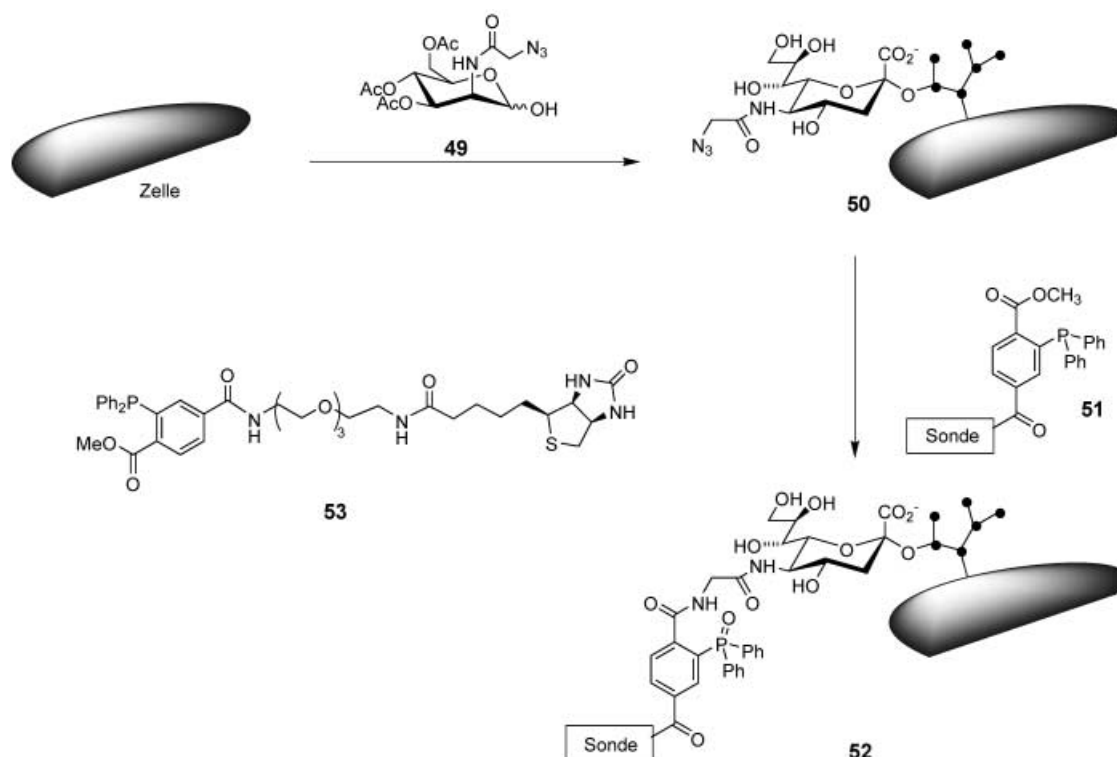
#### 4.3. Metabolisches Zell-Engineering

Die auf der Oberfläche einer Zelle auftretenden Wechselwirkungen sind von entscheidender Bedeutung für den Zellzyklus und die Kommunikation der Zellen in komplexen Geweben, etwa der Zell-Zell-Adhäsion oder Virus-Zell-Wechselwirkungen. Dabei spielen Kohlenhydrate eine zentrale Rolle. Die gezielte Abschaltung der Glycosylierung hat eine Reihe wichtiger Informationen über die Funktion und die Diversität von Kohlenhydraten geliefert, dennoch ist dieser Ansatz mit vielen Einschränkungen behaftet, wie der embryonalen Lethalität oder der Hochregulierung von kompensierenden Reaktionswegen.<sup>[9]</sup> Es

besteht daher ein großes Interesse an der Entwicklung chemischer Methoden, die Moleküle der Zelloberfläche so verändern, dass ihre Funktion in der interzellulären Kommunikation überprüft werden kann. Die Arbeitsgruppe von Bertozzi verwendete dazu eine Methode, bei der nichtnatürliche biosynthetische Vorläufermoleküle zu nichtnatürlichen Oberflächenpolysacchariden mit veränderten biologischen Funktionen umgebaut werden.<sup>[4,9,10]</sup> Besonders interessant für die Anwendung der Staudinger-Reaktion ist dabei, dass Säugetierzellen, die mit peracetyliertem Azidoacetylmannosamin ( $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$ , **49**) inkubiert werden, dieses Substrat aufnehmen und daraus in ihrem eigenen Sialinsäurebiosyntheseweg Azidoacetylsialinsäure (SiaNAz) produzieren. Diese wird statt Sialinsäure in die Zelloberflächenglycokonjugate **50** eingebaut (Schema 12). Die an der Zelloberfläche exponierten Azideinheiten reagieren mit der Phosphonsonde **51** (z. B. biotinyliertem Phosphan **53** oder FLAG-Phosphan **40**), sodass diese nach Staudinger-Ligation kovalent an das Oberflächenglycoprotein angeknüpft sind. Damit sind sie mithilfe der Flow-Cytometrie für quantitative Messungen zugänglich. In Vergleichsexperimenten mit der ebenfalls von ihnen entwickelten Zelloberflächenketon-Hydrazin-Reaktion konnte die Arbeitsgruppe von Bertozzi zeigen, dass die Staudinger-Reaktion in mehreren Punkten vorteilhaft ist: a) Nach Zellmetabolisierung zum Sialinsäurederivat führte die Staudinger-Ligation gegenüber der Keton-Hydrazin-Reaktion zu einem zweifach höheren Fluoreszenzanstieg; b) anders als ein Keton hat ein Azid wegen seiner abiotischen Natur im zellulären Kontext eine einzigartige Reaktivität; c) die Ausbeute in der Staudinger-Ligation scheint in einem relativ großen Bereich (5–8.5) pH-unabhängig zu sein, wogegen die Keton-Hydrazin-Reaktion bei pH 7.0 langsam ist und



**Scheme 11.** Detektion des aktiven Proteasoms mithilfe einer irreversiblen Inhibitorsonde, die durch Staudinger-Ligation derivatisiert wird.



**Schema 12.** Metabolisches Zelloberflächen-Engineering durch biosynthetisch hergestellte azidmodifizierte Glycoproteine.

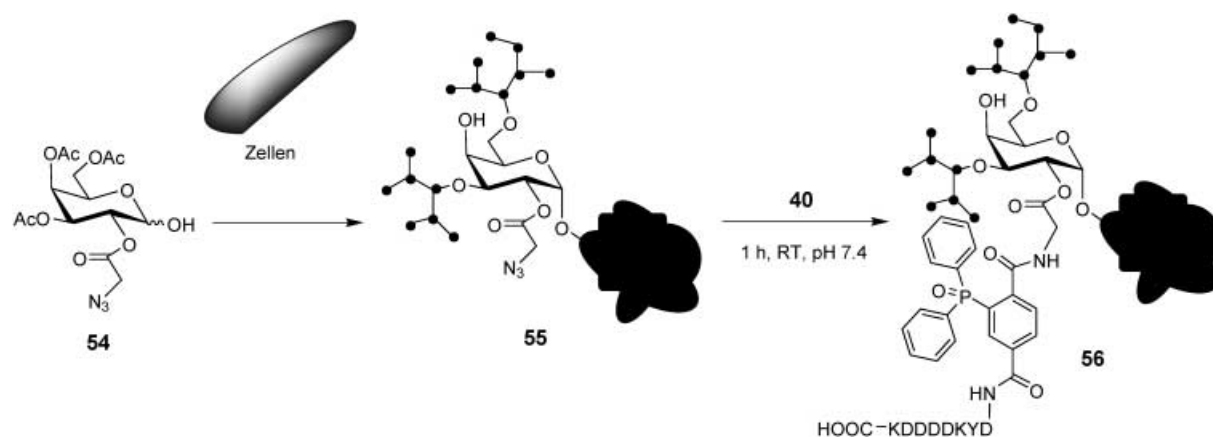
ihr Reaktivitätsoptimum bei pH 6.5 hat, wo partiell schon Zelltod ausgelöst wird. Weitere Kontrollexperimente zeigten, dass weder Azidreduktion durch endogene Monothiole (wie Glutathion) noch die Reduktion von Disulfiden an der Zelloberfläche durch das Sondenphosphan stattfindet, sodass keine verfälschenden Nebenreaktionen auftreten.

Durch Zugabe von bekannten Glycosylierungsinhibitoren konnte die Art des Glycoproteins identifiziert werden, in dem SiaNAz auf der Zelloberfläche auftritt. Inkubation mit Tunicamycin (einem Inhibitor, der komplett die N-verknüpfte Glycosylierung von Proteinen verhindert) führte im Vergleich zu Kontrollexperimenten zu einem steilen Abfall der Azid-expression an der Zelloberfläche. Daraus kann geschlossen werden, dass sich das Metabolisierungsprodukt von Ac<sub>4</sub>ManNAz in N-verknüpften Oligosacchariden befindet. Ein Inkubationsexperiment mit Desoxymannojirimycin (einem Inhibitor der Mannosidase I, der zu terminal verkürzten Glycanen führt) zeigte, dass die Oberflächenazide in den endständigen Zuckern von N-verknüpften Glycanen wie Sialinsäure zu finden sind.

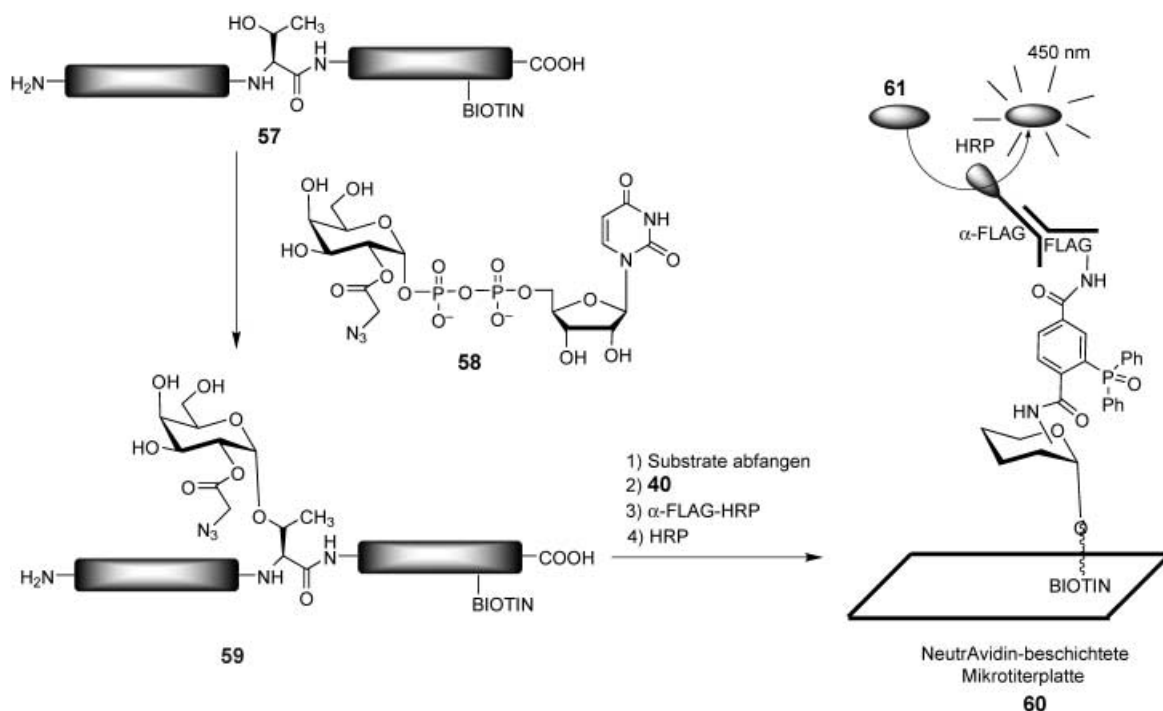
Die O-verknüpfte Proteinglycosylierung (an Ser- oder Thr-Reste) ist der zweite wichtige Typ von Proteinglycosylierung. Der vorherrschende Typ der O-verknüpften Glycosylierung ist der Mucintyp, charakterisiert durch einen *N*-Acetylgalactosamin(GalNAc)-Rest,  $\alpha$ -verknüpft an die Hydroxygruppe der Thr- oder Ser-Seitenketten. Bertozzi et al. haben eine Strategie zur Markierung solcher O-verknüpfter Glycoproteine des Mucintyps mithilfe eines bioorthogonalen Azid-Tags vorgestellt, das ein gemeinsames Merkmal dieser Glycoproteine nutzt: die konservierten GalNAc-Reste.<sup>[25]</sup> Die

Strategie umfasst, dass CHO-Zellen mit dem peracetylierten GalNAc-Analogon **54** (Tetraacetyl-*N*-azidoacetyl-galactosamin, Ac<sub>4</sub>GalNAz) gefüttert werden, das metabolisch in die O-verknüpften Glycoproteine des Mucintyps **55** eingebaut wird. Diese reagieren in einer Staudinger-Ligation mit der Sonde **40** und liefern die markierten Glycoproteine **56**. Die Methode ist empfindlich genug, um die in endogener Menge in Säugetierzellen exprimierten Glycoproteine in komplexen Zelllysaten nachzuweisen (Schema 13).

Eine Herausforderung in der Glycobiologie besteht darin, die Substrate und die Funktion der Glycosyltransferasen innerhalb der Kompartimente herauszufinden, die das Glycan aufbauen. Die Polypeptid-*N*- $\alpha$ -acetylgalactosaminyl-Transferasen (ppGalNAcTs) (eine Familie mit ca. 24 Isoformen) spielen eine entscheidende Rolle bei der Biosynthese O-verknüpfter Glycoproteine des Mucintyps, indem sie den ersten GalNAc-Baustein an die Ser- oder Thr-Reste des Polypeptids anknüpfen. UDP-*N*-Acetylgalactosamin (UDP-GalNAc) dient dabei als Glycosyldonor. Bertozzi et al. haben dafür einen Azido-ELISA-Assay vorgestellt (Schema 14). Darin wird das biotinylierte Proteinsubstrat **57** durch ppGalNAcTs mithilfe von UDP-GalNAz (**58**) glycosyliert.<sup>[26]</sup> Die Reaktionsmischung wird auf einer mit NeutrAvidin beschichteten 96er Mikrotiterplatte adsorbiert, zu der das FLAG-Phosphan **40** und eine anti-FLAG-Antikörper-Chimäre mit Meerrettichperoxidase (HRP) gegeben werden. Zur Quantifizierung wird der Umsatz von zugesetztem HRP-Substrat **61** bei 450 nm gemessen. Diese Strategie ermöglicht es, ein Profil der Substratspezifität einer ganzen Enzymfamilie herzustellen.



**Schema 13.** Metabolische Strategie zur Markierung von O-verknüpften Glycoproteinen des Mucintyps.



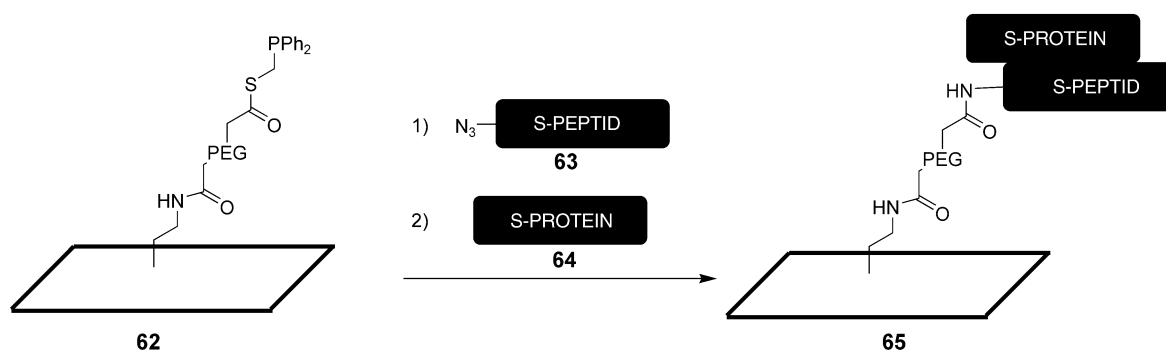
**Schema 14.** Der Azido-ELISA ermöglicht die parallele Untersuchung der Aktivität von Glycosyl-Transferasen.

#### 4.4. Herstellung von Arrays

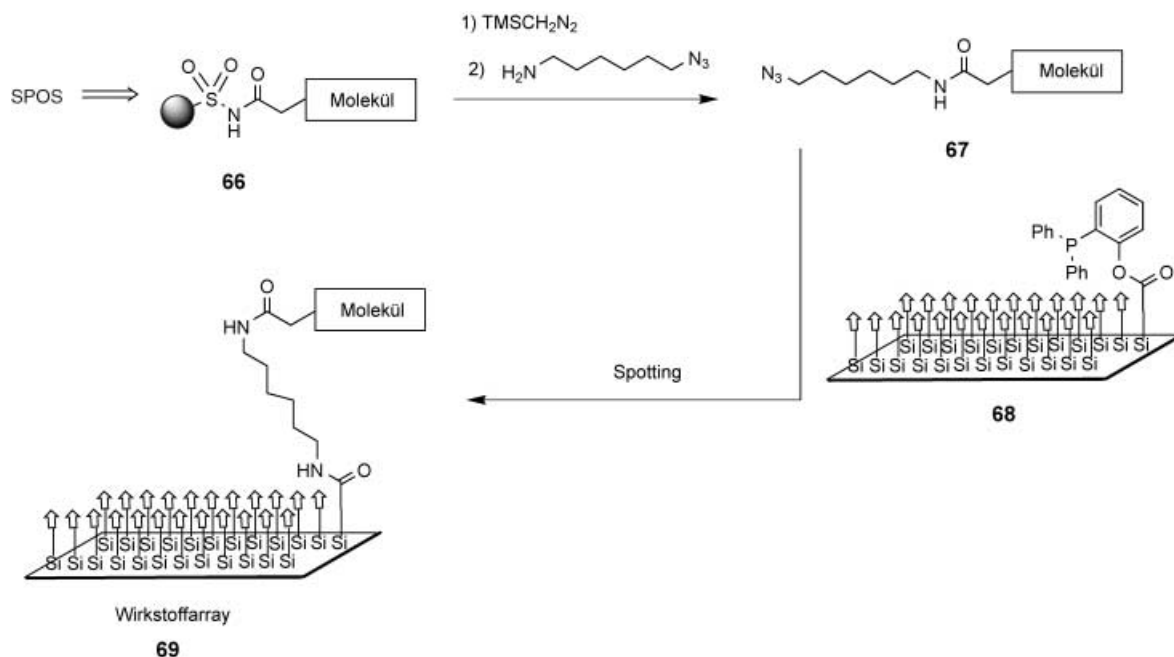
Die Staudinger-Ligation bietet sich durch ihre einzigartige Chemoselektivität als Immobilisierungsmethode zur Herstellung von Protein- oder Wirkstoffarrays an. Raines et al. haben eine Aminopropylsilan-funktionalisierte Glasoberfläche mit einem bifunktionellen Polyethylenglycol-(PEG)-Spacer modifiziert und daran Phosphan **20** geknüpft.<sup>[27]</sup> Das azidfunktionalisierte N-terminale Ende des S-Peptides (Reste 1–15 der RNase A) **63** wird kovalent mit dem Phosphanylthioester-derivatisierten Glaträger **62** verknüpft. Inkubation mit S-Protein (Reste 21–124 der RNase A) **64** bildet das Addukt **65**, das wegen seiner Ribonukleaseaktivität sowie durch Immunfärbung nachgewiesen

werden kann (Schema 15). Damit wurde in einem Proof-of-Concept-Experiment nachgewiesen, dass die spurlose Staudinger-Ligation zur Herstellung von Proteinarrays verwendet werden kann.

In einer Zusammenarbeit verwendeten die Arbeitsgruppen von Breinbauer, Niemeyer und Waldmann das Phosphan **17** für die spurlose Immobilisierung von Wirkstoffmolekülen, die durch kombinatorische Festphasensynthese mit dem Kenner-Safety-Catch-Linker **66** hergestellt werden können.<sup>[28]</sup> Die Azidfunktionalitäten werden dabei im Zuge der Abspaltungsreaktion von der festen Phase eingeführt. Staudinger-Ligation der azidmodifizierten Verbindungen **67** mit den phosphanderivatisierten dendrimerbeschichteten Glasoberflächen **68** führte zur kovalenten Anknüpfung der Pro-



**Schema 15.** Ortspezifische Immobilisierung von Proteinen durch Staudinger-Ligation.



**Schema 16.** Herstellung einer Bibliothek von azidterminierten Substanzen und deren anschließende Immobilisierung auf phosphanmodifizierten Glasoberflächen zur Herstellung von Wirkstoffarrays.

benmoleküle. Die so hergestellten Wirkstoffarrays **69** wurden auf ihre Fähigkeit zur Bindung fluoreszenzmarkierter Proteine überprüft (Schema 16). Gegenüber vielen anderen für die Herstellung von Wirkstoff-Arrays eingesetzten Ligationsmethoden hat die Staudinger-Ligation den Vorteil außerordentlicher Chemoselektivität, sodass eine größere Zahl funktioneller Gruppen toleriert wird, die für eine effiziente Ligand-Target-Bindung notwendig sein könnten.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Obwohl die Staudinger-Ligation erst drei Jahre alt ist, beweisen die vielen in diesem Kurzaufsatz beschriebenen Beispiele ihre bereits große praktische Bedeutung in der chemischen und biologischen Forschung. Besonders das von Bertozzi et al. eingeführte Phosphanreagens **10** hat seine Praktikabilität nicht nur in Modellexperimenten, sondern

auch in echten Anwendungen biologischer Untersuchungen bewiesen. Zwar führt es nicht zu einer spurlosen Ligation, dennoch erscheint es wegen seiner Luftstabilität und der bewährten Toleranz gegen funktionelle Gruppen als das gegenwärtig am besten geeignete Reagens. Zurzeit ist die Staudinger-Ligation die vermutlich mildeste Ligation mit der besten Chemoselektivität. Daher sollte sie immer dann berücksichtigt werden, wenn es darum geht, Biokonjugate herzustellen, oder wenn chemische Reaktionen in der komplexen Umgebung einer lebenden Zelle durchgeführt werden sollen.

*Unsere Arbeiten wurden von der DFG, der Max-Planck-Gesellschaft, der Universität Dortmund (Forschungsband „Molekulare Grundlagen der Biowissenschaften“), dem Land Nordrhein-Westfalen und dem Fonds der Chemischen Industrie (Liebig-Stipendium für R.B.) unterstützt. R.B. möchte Prof. H. Waldmann und Prof. C. M. Niemeyer für die frucht-*

bare und andauernde Zusammenarbeit danken. C. Banks sei für die kritische Durchsicht des englischsprachigen Manuskripts gedankt.

Eingegangen am 26. Januar 2004 [M1744]

Online veröffentlicht am 12. Mai 2004

- [1] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, **1996**.
- [2] H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 727–736.
- [3] a) W. G. Lewis, L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radic, P. R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1053–1057; b) V. V. Rostovtsev, L. G. Freen, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599; c) C. W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064; d) F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397–14402; e) Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192–3193; f) R. Breinbauer, M. Köhn, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1147–1149.
- [4] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.
- [5] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635–646.
- [6] Umfassende Übersichtsartikel: a) Y. G. Gololobov, I. N. Zhmurova, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 437–472; b) Y. G. Gololobov, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1353–1406.
- [7] P. M. Fresnada, P. Molina, *Synlett* **2004**, 1–17.
- [8] H. Staudinger, E. Hauser, *Helv. Chim. Acta* **1921**, *4*, 861.
- [9] S. Luchansky, H. C. Hang, E. Saxon, J. R. Grunwell, C. Yu, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Methods Enzymol.* **2003**, *362*, 249–272.
- [10] E. Saxon, S. Luchansky, H. C. Hang, C. Yu, S. C. Lee, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14893–14902.
- [11] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141–2143.
- [12] a) B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939–1941; b) B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 9–12; c) M. B. Soellner, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4993–4996.
- [13] G. J. Cotton, T. W. Muir, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R247–R256.
- [14] a) T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, 583, 129–149; b) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
- [15] a) J. Zaloom, D. C. Roberts, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 5173–5176; b) J. T. Lundquist IV, J. C. Pelletier, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 781–783; c) P. T. Nyffeler, C.-H. Liang, K. M. Koeller, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10773–10778.
- [16] Umfassender Übersichtsartikel über Herstellungsmethoden für Azide: E. F. V. Scriven, K. Turnbull, *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 297–368.
- [17] B. L. Nilsson, R. J. Hondal, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5268–5269.
- [18] R. Merckx, D. T. S. Rijkers, J. Kemmink, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4515–4518.
- [19] O. David, W. J. N. Meester, H. Bieräugel, H. E. Schoemaker, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4509–4511; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4373–4375.
- [20] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 19–24.
- [21] G. A. Lemieux, C. L. de Graffenried, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4708–4709.
- [22] C. C.-Y. Wang, T. S. Seo, Z. Li, H. Ruparel, J. Ju, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 697–701.
- [23] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 41–47.
- [24] H. Ovaa, P. F. van Swieten, B. M. Kessler, M. A. Leeuwenburgh, E. Fiebigler, A. M. C. H. van den Nieuwendijk, P. J. Galardy, G. A. van der Marel, H. L. Ploegh, H. S. Overkleeft, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3754–3757; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3626–3629.
- [25] H. C. Hang, C. Yu, D. L. Kato, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 14846–14851.
- [26] H. C. Hang, C. Yu, M. R. Pratt, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6–7.
- [27] M. B. Soellner, K. A. Dickson, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11790–11791.
- [28] M. Köhn, R. Wacker, C. Peters, H. Schröder, L. Souler, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6010–6014; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5830–5834.