

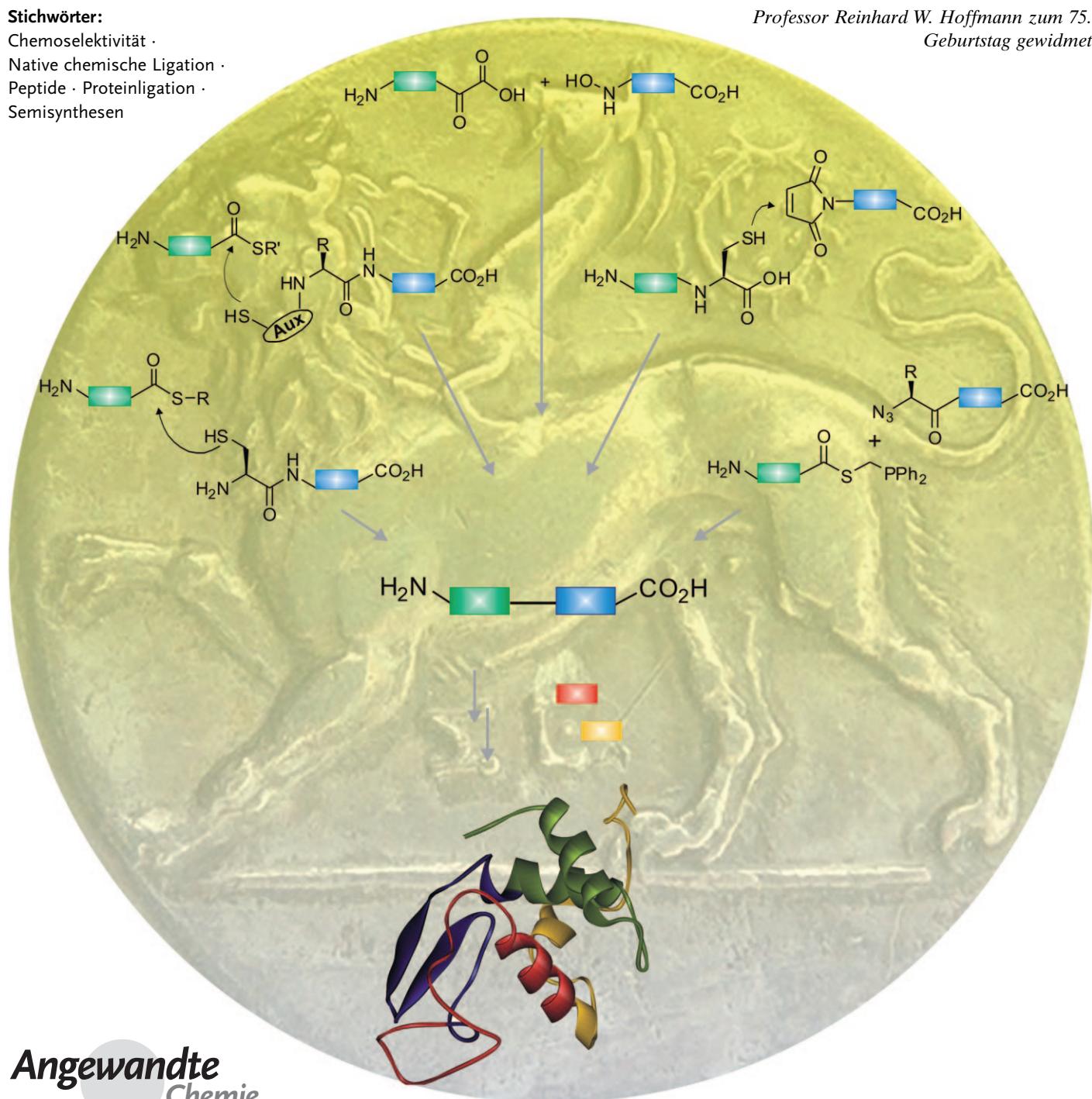
Chemoselektive Ligations- und Modifikationsstrategien für Peptide und Proteine

Christian P. R. Hackenberger* und Dirk Schwarzer*

Stichwörter:

Chemoselektivität ·
Native chemische Ligation ·
Peptide · Proteinligation ·
Semisynthesen

Professor Reinhard W. Hoffmann zum 75.
Geburtstag gewidmet



**Angewandte
Chemie**

Die Untersuchung biologischer Fragestellungen mit chemischen Methoden wird meist als „Chemische Biologie“ bezeichnet und setzt voraus, dass biologisch relevante Makromoleküle, wie Peptide und Proteine, chemisch zugänglich sind. Auf der Festphasensynthese von Peptiden aufbauend wurden viele chemoselektive Ligations- und Modifikationstechniken zur Verknüpfung synthetischer Peptide oder funktionaler Einheiten zu größeren synthetischen, biologisch relevanten Makromolekülen entwickelt. Dieser Aufsatz fasst die aktuellen Entwicklungen auf dem Gebiet der chemoselektiven Ligations- und Modifikationsstrategien zusammen und illustriert ihre Anwendbarkeit an Beispielen aus der chemischen Totalsynthese von Proteinen bis hin zur Semisynthese natürlicher modifizierter Proteine.

„Sie sollen in kurzem erfahren, daß Aufbauen mehr belehrt als Einreißen, Verbinden mehr als Trennen, Todtes beleben mehr als das Getötete noch weiter tödten [...]“^[1]

Johann Wolfgang von Goethe, Wilhelm Meisters Wanderjahre

1. Einführung

Seit langem haben Chemiker Proteine und Peptide als Zielverbindungen für die Entwicklung von Syntheseverfahren identifiziert.^[2] Unzählige Forschungsprojekte wurden dabei von der Motivation angetrieben, ausreichend Protein- oder Peptidmaterial – mit der Möglichkeit, selektiv chemische Funktionalitäten einzuführen – zugänglich zu machen, um die Struktur und biologische Funktion von einzelnen Peptiden und Proteinen zu bestimmen. Dadurch ergänzt diese Herangehensweise andere Verfahren der Proteingewinnung, wie etwa die Isolierung aus natürlichen Quellen und die gängigen biochemischen Exprimierungsverfahren.

Das Feld der Proteinsynthese hat noch einmal zusätzliche Aufmerksamkeit erlangt, als natürlich vorkommende Proteinmodifikationen als die zentralen Elemente für die Steuerung komplexer zellulärer Vorgänge in lebenden Organismen identifiziert wurden.^[3] Deshalb ist es ein besonderes Bestreben unter Wissenschaftlern, die chemische Zusammensetzung einschließlich potenzieller Modifikationen eines jeden Aminosäurebausteins innerhalb der Polypeptidkette zu kontrollieren, um so homogene Proteinstanz zu erhalten, die die Untersuchung komplexer biologischer Systeme ermöglicht.^[3e,f]

Es ist wahrscheinlich nicht notwendig darauf hinzuweisen, dass der derzeitige Stand der Proteinsynthese durch manigfache wichtige Untersuchungen vorangetrieben wurde – alles Meilensteine, die die Grundlage für anschließende Forschungsaktivitäten in diesem Feld bildeten. Begründet wurde das Gebiet mit der ersten Beschreibung des Peptidaufbaus durch Emil Fischer,^[2a] und es wurde durch erste Kondensationsstrategien in Lösung fortgesetzt.^[2b] Nach der Entwicklung orthogonaler Schutzgruppen gelang es Merrifield, die am häufigsten verwendete Methode in der Peptid- und Proteinsynthese einzuführen, nämlich die automatisierte Fest-

Aus dem Inhalt

1. Einführung	10183
2. Chemoselektive Peptidligationen	10185
3. Peptid- und Proteinligationen durch Capture/Rearrangement an cysteinfreien Ligationsstellen	10192
4. Ligationen und Modifikationen von Peptiden und Proteinen durch chemoselektive Reaktionen	10201
5. Chemoselektive Peptidligationen durch Enzymkatalyse	10209
6. Proteinsemisynthese: Ligation von synthetischen mit rekombinanten Peptiden	10211
7. Strategien zur Ligation multipler Fragmente	10215
8. Zusammenfassung	10219

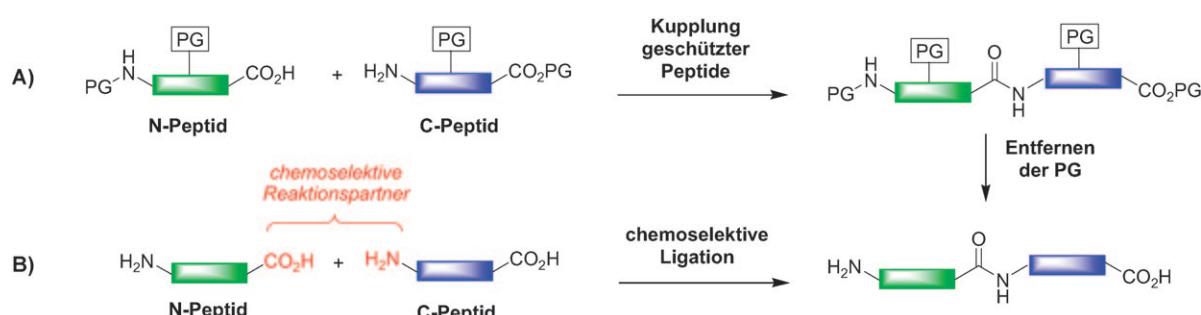
phasenpeptidsynthese (solid phase peptide synthesis, SPPS).^[4] Mit SPPS können verlässlich lineare Peptide einer Kettenlänge von 30 bis 40 Aminosäuren zugänglich gemacht werden, die die Kupplung (mehrerer) Peptidfragmente in das Zentrum anschließender Untersuchungen rückte.^[5] Solche Fragmentkupplungen können auf zwei verschiedene Weisen durchgeführt werden: Im ersten Weg werden partiell geschützte Peptide verknüpft, um so eine selektive kovalente Bindung zwischen den Peptiden herbeizuführen bevor die Schutzgruppen entfernt werden (Schema 1A). Obwohl bereits mehrere Verfahren für diesen Weg beschrieben wurden, insbesondere die häufig verwendete Ag^I-vermittelte Kupplung C-terminaler N-Peptidthioester mit N-terminal ungeschützten Peptiden,^[6] wird diese Strategie durch die Notwendigkeit einer abschließenden Schutzgruppentransformation, mögliche Epimerisierung während der Aktivierung am C-Terminus des N-Peptidfragments und mitunter auftretende Aggregationsphänomene längerer geschützter Peptidfragmente eingeschränkt (zur Erklärung von C- und N-Peptid sowie anderer in diesem Aufsatz verwendeter Begriffe und

[*] Dr. C. P. R. Hackenberger

Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-838-52551
E-Mail: hackenbe@chemie.fu-berlin.de

Dr. D. Schwarzer

Chemische Biologie, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-94793-159
E-Mail: schwarzer@fmp-berlin.de



Schema 1. Strategien zur Fragmentkupplung: A) Kupplung geschützter Peptide. B) Chemoselektive Ligation ungeschützter Peptide.

Symbolen wird auf die Tabelle 1 verwiesen).^[7] Konsequenterweise hat der zweite Weg, nämlich die *chemoselektive Ligation ungeschützter Peptide und Proteine*, größere Aufmerk-

samkeit in der Entwicklung chemischer Verfahren für die Protein- und Peptidsynthese erfahren (Schema 1B).^[8]

In diesem Aufsatz diskutierten wir mehrere wichtige Aspekte chemoselektiver Ligations- und Modifikationstechniken, die vorige hervorragende Übersichtsartikel ergänzen sollen.^[9] Es gibt derzeit viele Herangehensweisen, um chemische Ligationsmethoden weiterzuentwickeln. Diese Forschungen führen nicht nur zu immer neuen methodischen Ansätzen, um die Beschränkungen aktueller Strategien aufzuheben, sondern auch zu faszinierenden Studien, die die genaue biologische Funktion von Proteinen verdeutlichen, indem synthetische Produkte in biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen eingesetzt werden. Es ist daher ein besonderes Anliegen dieses Aufsatzes, die derzeit vorhandenen Methoden (Abschnitte 2–4) mit Beispielen für ihre Anwendung in solchen Untersuchungen (Abschnitte 6 und 7) zu illustrieren.

Zum zweiten entstammen die Methoden, die hier präsentiert werden, sowohl rein organisch-synthetischer Handhabungen (Abschnitte 2–4) als auch molekularbiologischer Verfahren (Abschnitte 2 und 5), was den interdisziplinären Charakter des Forschungsgebiets unterstreicht. Dieser Aufsatz sollte daher dem Wissenschaftler,

Tabelle 1: Legende der in diesem Aufsatz verwendeten Peptidfragmente.

Symbol	Bedeutung	Hinweise
	ungeschütztes Peptid	Aminosäuren oder funktionalisierte Termini, die für ein Schema wichtig sind, werden mit exakter Struktur dargestellt
	geschütztes Peptid	PG steht für eine konventionelle Schutzgruppe in der Fmoc- oder Boc-basierten SPPS
	partiell geschütztes Peptid	nur die spezifische Aminosäure mit Schutzgruppe wird gezeichnet
	N-Peptid	Peptide, die an einer Ligationsreaktion teilnehmen; N-Peptide befinden sich nach der Ligation im N-terminalen Bereich des Ligationsprodukts
	C-Peptid	Peptide, die an einer Ligationsreaktion teilnehmen; C-Peptide befinden sich nach der Ligation im C-terminalen Bereich des Ligationsprodukts
	Enzym	
	Harz	



Christian P. R. Hackenberger, geboren 1976 in Osnabrück, studierte Chemie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg und an der University of Wisconsin/Madison (M.Sc. 1999 bei Prof. Samuel H. Gellman). 2003 promovierte er in der Arbeitsgruppe von Prof. Carsten Bolm an der RWTH Aachen. Nach einem Postdoktorat bei Prof. Barbara Imperiali (2003–2005) am Massachusetts Institute of Technology (MIT) wechselte er 2005 an die Freie Universität Berlin, wo er eine Emmy-Noether-Gruppe leitet. Seit 2008 ist er Sprecher des Graduiertenkollegs „Multivalenz“ innerhalb des SFB 765. Seine Forschungsinteressen gelgen der Entwicklung chemoselektiver Ligationsstrategien und der Synthese modifizierter Peptide und Proteine.



Dirk Schwarzer, geboren 1972 in Schleswig, studierte Chemie an der Philipps-Universität Marburg und promovierte 2002 in der Arbeitsgruppe von Mohamed A. Marahiel. Nach einem Postdoktorat bei Philip A. Cole an der Johns-Hopkins University schloss er sich 2006 der Arbeitsgruppe von Henning D. Mootz an der Technischen Universität Dortmund an. Seit 2007 ist er Leiter einer Emmy-Noether-Arbeitsgruppe am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin. Sein Forschungsschwerpunkt liegt auf der Untersuchung biologischer Fragestellungen mit chemischen Methoden, im Besonderen der Funktionsanalyse von posttranslationalen Proteinmodifikationen.

der daran interessiert ist, Peptide oder Proteine an sein System zu konjugieren oder Proteine mit molekularen Komponenten zu derivatisieren, einen Überblick über die Voraussetzungen und Beschränkungen einzelner Methoden der Peptid- und Proteinkonjugation geben. Da einige dieser Methoden erst kürzlich publiziert worden sind, ist es wichtig darauf hinzuweisen, dass manchmal die Anwendung in der Ligation oder Modifikation längerer Peptide oder sogar von Proteinsequenzen noch nicht bestätigt worden ist. Dennoch haben wir uns dafür entschieden, diese Methoden hier darzustellen, da sie das Potenzial für neue Wege in der chemoselektiven Ligation oder Modifikation mit sich bringen.^[10]

2. Chemoselektive Peptidligationen

2.1. Erste Beobachtungen und Experimente

Der Meilenstein, der zur Entwicklung der meisten Ligationsstrategien geführt hat, war die Einführung eines chemoselektiven Einfangschrittes (im Folgenden wird der Begriff Capture-Schritt verwendet), der zwei Peptidfragmente miteinander verknüpft und an den sich eine finale intramolekulare Umlagerung anschließt. Dieses Konzept, das üblicherweise als Einfang/Umlagerung bzw. Capture/Rearrangement bezeichnet wird, findet sich auch in der nativen chemischen Ligation (NCL) wieder, der am häufigsten verwendeten Ligationsstrategie.

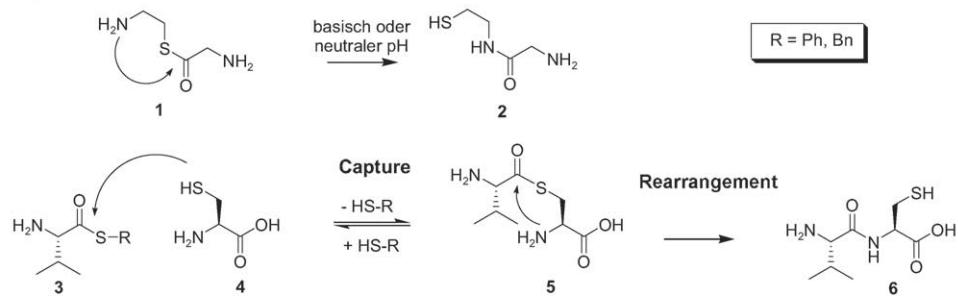
Erste Experimente, die später zur Capture/Rearrangement-Methode führten, wurden 1953 von Wieland und Mitarbeitern publiziert, die in dieser Studie die chemischen Eigenschaften von Aminosäurethioestern untersucht haben.^[11] Zunächst wurde beobachtet, dass Thiophenolthioester eine intermolekulare Aminolyse in Gegenwart von Aminen zur Bildung von Amiden eingehen können. Im Unterschied zu

den Thiophenolthioestern konnte ein Glycinthioester des Cysteamins, **1**, nicht als solcher synthetisiert und unter neutralen pH-Bedingungen isoliert werden. Diese Beobachtung wurde der zusätzlichen Aminogruppe, die im geringen Abstand zur Thiolgruppe lokalisiert ist, zugeschrieben. Die Aminogruppe bewirkte stattdessen eine schnelle intramolekulare S→N-Verschiebung, die das Amid **2** bildete (Schema 2A). Diese Umlagerung lief schon unter milden sauren Bedingungen ab und wurde bei hohen pH-Werten beschleunigt. Die Autoren folgerten, dass die beobachtete Reaktion für die Peptidsynthese verwendet werden könnte. Zu diesem Zweck wurde die zuvor diskutierte intramolekulare Umlagerung mit einem intermolekularen Thiol-Thioester-Austausch kombiniert, wobei der Val-Thiophenolthioester **3** synthetisiert und mit Cystein (**4**) umgesetzt wurde (Schema 2A). Der hochreaktive Arylthioester tauschte schnell mit der Thiolfunktion des Cys aus, was dem Capture-Schritt entspricht. Der entstehende Val-S-Cys-Thioester **5** lagerte schließlich zum Dipeptid Val-Cys (**6**) um, das somit durch eine native Amidbindung verknüpft war.^[11]

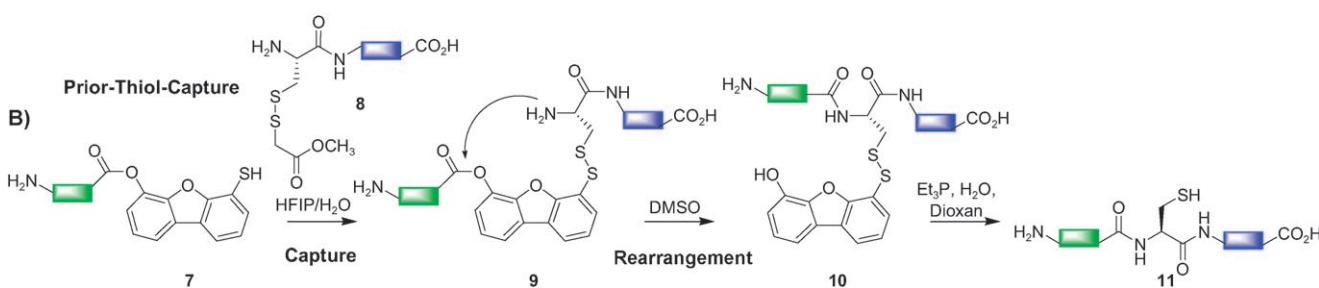
2.2. Prior-Thiol-Capture

Eine der ersten Ligationstechniken, die auf ungeschützte synthetische Peptide angewendet wurde, war die von Kemp et al. entwickelte Prior-Thiol-Capture-Strategie.^[12,13] Zunächst wird das Peptid, das am N-Terminus des Ligationsprodukts vorliegen soll (das N-Peptid, siehe Tabelle 1), an ein Auxiliartemplat geknüpft, z.B. an 6-Hydroxy-4-mercaptopodibenzofuran durch eine Esterbindung in **7** (Schema 2B).^[14] Dabei ist es möglich, das N-Peptid direkt am Templat an der festen Phase mit optimierten Festphasensyntheseverfahren zu synthetisieren. Das „Einfangen“ findet durch einen Disulfidaustausch zwischen dem Cys am N-Terminus des C-Peptids

A) Erste Experimente



B) Prior-Thiol-Capture



Schema 2. A) Aminolyse von Thioestern nach Wieland und B) Prior-Thiol-Capture nach Kemp. DMSO = Dimethylsulfoxid, HFIP = Hexafluorisopropylalkohol.

8 und dem freien Thiol des Templaats **7** statt (Schema 2B). Danach folgt eine intramolekulare O→N-Verschiebung in **9**, die zu einer nativen Peptidbindung zwischen dem N- und C-Peptid in **10** führt. Das Templat erfüllt somit zwei Funktionen: Zum einen platziert es das N- und das C-Peptid in direkte Nachbarschaft, zum anderen fungiert es als milde Aktivierungseinheit, indem es die Elektrophilie des C-Terminus des N-Peptids erhöht. Zum Schluss werden Reduktionsmittel wie Triethylphosphan verwendet, um das Ligationsprodukt **11** vom Templat abzuspalten.^[15]

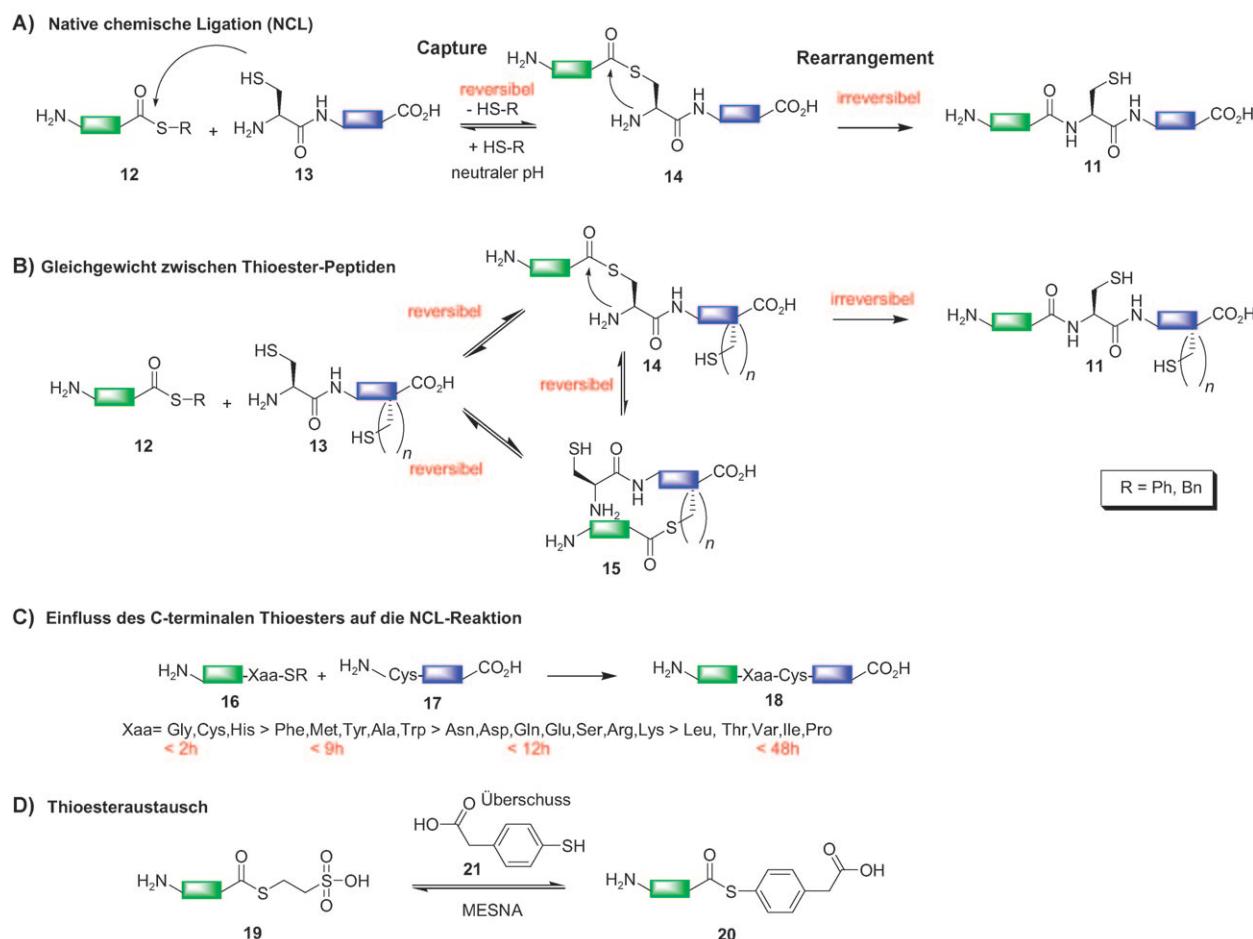
Die Prior-Thiol-Capture-Strategie wurde im Laufe der Jahre weiter optimiert^[15] und in der Ligation verschiedener ungeschützter Peptidsequenzen mit bis zu 39 Aminosäuren verwendet.^[16] Heutzutage findet jedoch das Verfahren der nativen chemischen Ligation routinemäßig in der Peptidligation Anwendung.

2.3. Native chemische Ligation

2.3.1. Entwicklung der Methode und Chemoselektivität

Die native chemische Ligation (NCL) zeigte ihr enormes Potenzial erstmals 1994, als Kent und Mitarbeiter die Reaktion ungeschützter Thioester mit N-terminalen Cys-Peptiden

beschrieben.^[17] Diese Arbeiten belegten, dass die Reaktion chemoselektiv verläuft und somit für die Ligation ungeschützter Peptide geeignet ist (Schema 3A). Heutzutage ist die NCL die am häufigsten verwendete chemoselektive Ligationsmethode auf der Grundlage eines Capture/Rearrangement-Konzepts. Der Einfluss der NCL auf die Chemie und Biochemie dokumentiert sich in der Zahl von ca. 900 Zitaten, die die Originalarbeit bis heute erhalten hat. Der chemoselektive Einfang-Schritt (Capture) besteht aus einem reversiblen Thiol-Thioester-Gleichgewicht zwischen einem elektrophilen (Aryl)-Thioester **12** am C-Terminus des N-Peptids und dem nucleophilen Thiol des Cys-Bausteins am N-Terminus des C-Peptids **13** (Schema 3A). In der nachfolgenden Umlagerung (Rearrangement) geht der Cys-Thioester **14** eine schnelle intramolekulare S→N-Verschiebung über einen fünfgliedrigen Übergangszustand ein, die zu einer nativen Amidbindung zwischen dem C- und N-Peptid im Polypeptid **11** führt.^[18] Sehr wichtig an diesem Verfahren ist die Tatsache, dass zusätzliche Cysteine innerhalb der Peptide nicht mit der Gesamtreaktion interferieren, da die irreversible intramolekulare S→N-Verschiebung nur an dem speziellen N-terminalen Cys ablaufen kann. Weitere interne Cysteine im Peptid bilden einen Thioester **15** und tauschen schnell wieder untereinander aus (Schema 3B).



Schema 3. Native chemische Ligation: A) Mechanismus. B) Gleichgewicht von Peptidthioestern. C) Einfluss der C-terminalen Aminosäuren des N-Peptids. D) Thioesteraustausch mit Arylthiolen. MESNA = Natrium-2-mercaptopropanulfonat.

In der Originalarbeit von 1994 wurde die NCL verwendet, um humanes Interleukin 8 (IL-8) aus zwei synthetischen Peptidfragmenten zu synthetisieren.^[17] Heute gibt es manifache Beispiele für NCL-basierte Peptidligationen mit zahlreichen Anwendungen, einschließlich der Einführung von Proteinmodifikationen oder Tags,^[19] der Totalsynthese posttranslational modifizierter und unmodifizierter Proteine (siehe Abschnitt 2.4)^[20] und der Segmentmarkierung von Proteinen durch Isotopenmarker für die NMR-Spektroskopie.^[21,22] Darüber hinaus können auch andere Biopolymere wie Peptidnucleinsäuren (PNAs)^[23,24] und DNA^[25] für die Konjugation verwendet werden.

2.3.2. Reaktionsbedingungen für die NCL und mechanistische Aspekte

Ein großer Vorteil der NCL sind die milden Reaktionsbedingungen, die es ermöglichen, die Ligation in gepufferten wässrigen Lösungen bei neutralem pH-Wert auszuführen. Dies ist aus zwei Gründen wichtig: Zum einen führen stark basische Bedingungen zu Nebenreaktionen zwischen Thioestern und anderen Aminosäuren wie Lysin, außerdem sind die Thioester nicht stabil unter basischem pH. Andererseits führen saure Bedingungen dazu, dass die Reaktivität des Cys-Thiols und des N-terminalen Amins im C-Peptid verringert wird.^[9g,18]

Ein anderer wichtiger Faktor bei der NCL ist die Aminosäure, die am C-Terminus des Thioesters lokalisiert ist. Dawson und Mitarbeiter haben diesen Sachverhalt genauer untersucht, indem sie 20 Modellpeptide synthetisierten, die abwechselnd alle proteinogenen Aminosäuren am C-terminalen Thioester **16** tragen.^[26] Die Peptide reagierten mit dem N-terminalen Cys des C-Peptids **17** unter Bildung des Produkts **18**, was zeitaufgelöst beobachtet werden konnte (Schema 3C). Die Experimente bewiesen, dass alle 20 Thioester **16** an der NCL teilnehmen können, wobei die Seitenketten die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich beeinflussen. Die schnellste Reaktion wurde mit dem Gly-Thioester beobachtet, der nach vier Stunden quantitativ umgesetzt war. Demgegenüber waren Thioester mit β-verzweigten Aminosäuren oder Prolin sogar nach zwei Tagen nicht quantitativ in das Ligationsprodukt umgewandelt.^[26] Es besteht jedoch die Möglichkeit, die sterisch gehinderten Thioester mithilfe reaktiver Thiole zu ligieren.

Die letzte Beobachtung deutet darauf hin, dass die Art des Thioesters (bzw. des entsprechenden Thioesterderivats) ebenfalls einen großen Einfluss auf die NCL-Reaktion hat.^[27] Dabei muss berücksichtigt werden, dass Alkylthioester generell weniger reaktiv sind als Arylthioester, was erstere bezüglich Synthese und Handhabung attraktiver erscheinen lässt. Allerdings benötigt die NCL einen schnellen Thiol-Thioester-Austausch, der viel effizienter mit Arylthioestern abläuft (Schema 3D). Daher werden Peptidthioester üblicherweise als Alkylderivate **19** synthetisiert, z.B. mit Natrium-2-mercaptopropanulfonat (MESNA), und durch Zugabe eines Überschusses eines Arylthiols, z.B. (4-Carboxymethyl)thiophenol (**21**, MPAA), in situ in die Arylthioester **20** überführt.^[28] Der Thiol-Thioester-Austausch mit konkurrierenden Thiolen wurde anhand der Bildung von Thioestern

unterschiedlicher Reaktivität im Detail untersucht, wobei das Gleichgewicht jeweils von den Eigenschaften der beteiligten Thiolspezies abhängt. Die Zugabe von Arylthiolen zur NCL-Reaktionsmischung hat einen weiteren positiven Effekt: Das N-terminale Cys im C-Peptid, das essenziell für die Reaktion ist, wird in seinem reduzierten Zustand beibehalten.^[29]

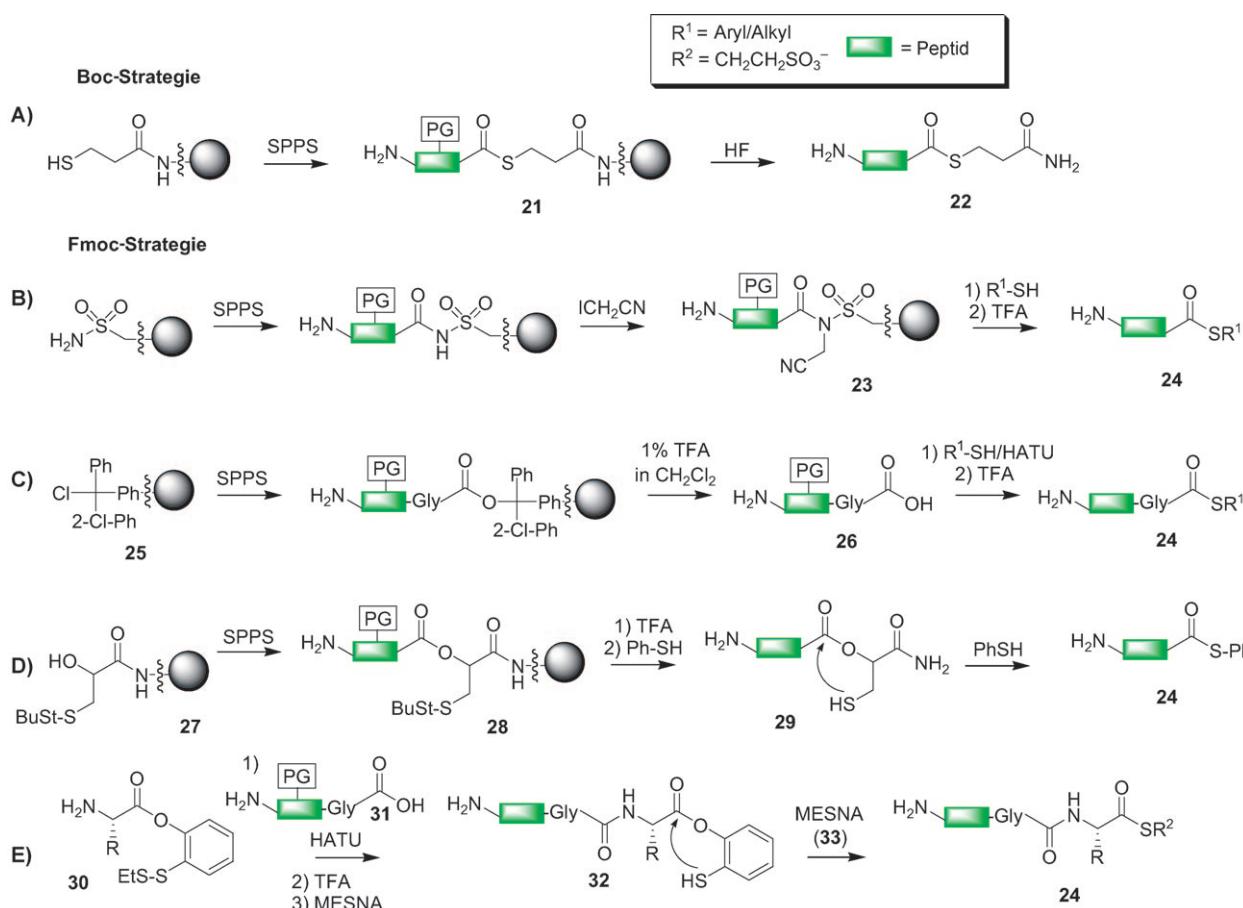
In Anbetracht der oben diskutierten mechanistischen Aspekte verlaufen NCL-Reaktionen üblicherweise ohne Nebenreaktionen und in hohen Ausbeuten. Des Weiteren kann die NCL in Gegenwart von Denaturierungsreagentien wie Harnstoff oder Natriumdodecylsulfonat (SDS) durchgeführt werden, um so unter Standardbedingungen unlösliche N- oder C-Peptide umsetzen zu können. Dieser Vorteil wurde beispielsweise bei der Synthese des Kaliumkanals KcsA genutzt.^[30] Wegen der Hydrophobie der N- und C-Peptide wurde die Reaktion in Gegenwart von 1% SDS ausgeführt, und nach zwei Stunden war ein Umsatz von 80% erreicht.

Native chemische Ligationen laufen normalerweise bei Konzentrationen im unteren millimolaren Bereich ab. In dieser Hinsicht haben sich Template, die die lokale Konzentration durch Bindungs- oder Assoziationsvorgänge erhöhen, als sehr nützlich erweisen: So wurde beispielsweise eine autokatalytische Peptid-Replikase beschrieben, in der ein 32 Aminosäuren langes α-helicales Peptid der Leucin-Zipper-Domäne des Hefe-Transkriptionsfaktors GCN4 seine eigene Bildung über NCL durch Assoziation von zwei Peptidfragmenten beschleunigte.^[31] Dieses Konzept der templatgesteuerten Ligation („template-directed ligation“)^[32] wurde auf eine NCL mit hoher Sequenz- und Diastereoselektivität erweitert, in der eine Reaktionsbeschleunigung um den Faktor 4100 beobachtet wurde,^[33] sowie auf eine Amplifizierung homochiraler Ligationsprodukte, die von racemischen Mischungen der Ligationsfragmente ausgeht.^[34–36]

2.3.3. Chemische Bedingungen und Synthese der Ausgangsmaterialien

Die hohe Stabilität und die leichte Verfügbarkeit der Ausgangsmaterialien sind zwei der Gründe, weshalb sich die NCL zu einer so erfolgreichen Ligationsmethode entwickelt hat. Das „Templat“, das den Einfang- und Umlagerungsschritt ermöglicht, ist nichts anderes als die natürliche Aminosäure Cystein, die einfach zugänglich ist, leicht durch SPPS inkorporiert werden kann und nach Ligation im Produkt verbleibt. Der zweite Baustein ist der C-terminalen Thioester des N-Peptids. Chemische Methoden für die Bildung von Thioestern sind gut etabliert und ermöglichen dabei sowohl Boc- als auch Fmoc-SPPS-Strategien (Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl, Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl).^[37] Boc-Verfahren benötigen allerdings Methoden mit HF zur Abspaltung des ungeschützten Thioesters **22** aus dem harzimobilisierten Thioester **21** (Schema 4A).^[38,39] Trotz der Nachteile einer Verwendung von HF (dessen korrosive und toxische Eigenschaften eine spezielle Laborausrüstung erfordern), sind Boc-Verfahren wegen der hohen Gesamtausbeuten sehr häufig in der Thioestersynthese eingesetzt worden.^[37]

Für die Fmoc-basierte Synthese von Peptidthioestern wurden mehrere Strategien entwickelt, die vor allem der



Schema 4. Strategien für die Synthese von Peptidthioestern. TFA = Trifluoressigsäure, HATU = 2-(1*H*-7-Azabenzotriazol-1-yl), DCM = Dichlormethan.

hohen Elektrophilie der Thioester Rechnung tragen müssen.^[40,41] Ein bekanntes Beispiel ist die Verwendung von Safety-Catch-Alkansulfonamidharzen,^[42] die nach Beendigung der Fmoc-SPPS mit Diazomethan,^[43] Iodacetonitril^[44] oder durch Pd-katalysierte Allylierung^[45] in ein sekundäres Sulfonamid **23** überführt werden. Die anschließende Zugabe von nucleophilen Thiolen führt zur Abspaltung der geschützten Peptide als Thioester **24** (Schema 4 B),^[43,46] die nach globaler Entschützung in der NCL eingesetzt werden können. Alternativ können Peptide auf HMBA(4-Hydroxymethylbenzoësäure)- oder PAM(4-Hydroxymethylphenylacetamido-methylpolystyrol)-Harzen mit Alkylaluminiumthiolaten in Thioester umgewandelt werden.^[47]

Ein anderer häufiger Ansatz für die Thioestersynthese greift auf hochgradig säurelabile TGT^[48] oder 2-Chlortrityl-Harze **25**^[49] zurück, die eine Abspaltung unter leicht sauren Bedingungen zu geschützten Peptiden **26** ermöglichen. Der Thioester wird durch C-terminale Aktivierung des geschützten Peptids in Lösung und anschließende Zugabe eines Thiols erzeugt. Vollständige Entschützung liefert einen ungeschützten Thioester **24**.^[46,50] Die Aktivierung macht die C-terminale Aminosäure allerdings anfällig gegen Racemisierung, was die ansonsten sehr praktikable Route auf C-terminale Gly-Thioester beschränkt oder eine Optimierung der Aktivierungsbedingungen voraussetzt (Schema 4 C).^[51]

Ein weiteres Fmoc-Verfahren für die In-situ-Synthese von Thioestern **24** nutzt den Aufbau eines Carboxyethylesters **29** mit einer anschließenden Ester-Thioester-Umlagerung, wobei das Molekül **29** ein disulfidgeschütztes Thiol in β-Position trägt (Schema 4 D).^[52–54] Die Peptidsynthese wird an der immobilisierten β-Mercapto-α-hydroxypropionsäure **27** ausgeführt. Nach Abspaltung wird **28** erhalten und Thiophenol zugegeben, das die Disulfidgruppe entfernt und einen intramolekularen O→S-Transfer zum Thioester **24** auslöst (Schema 4 D).^[52]

Ein weiteres Syntheseprotokoll verwendet ebenfalls ein Disulfid-geschütztes Thiol in β-Position innerhalb des Phenylesters **32**. Diese Reaktion wird in Lösung durchgeführt und beginnt mit dem Aminosäureester **30**, der mit einem geschützten Peptid **31** verknüpft wird. Nach globaler Entschützung wird ein Überschuss an Thiol zugegeben, der die O→S-Verschiebung und den Thiol-Thioester-Austausch auslöst (Schema 4 E).^[53] In beiden Fällen können die β-Disulfidester als „Thioester-Vorstufen“ angesehen werden, die in reiterativen Reaktionen mehrerer Peptidfragmente eingesetzt werden können (weitere Strategien werden in Abschnitt 7 diskutiert).^[55,56] Diese Verbindungen wurden auch auf die Synthese cyclischer Peptide^[57] und Glycopeptide^[58] sowie auf Peptidligationen an cysteinfreien Verknüpfungsstellen angewendet (siehe Abschnitt 3.3.4).

2.3.4. Alternative Verfahren für Peptidligationen an Cystein-Verknüpfungsstellen

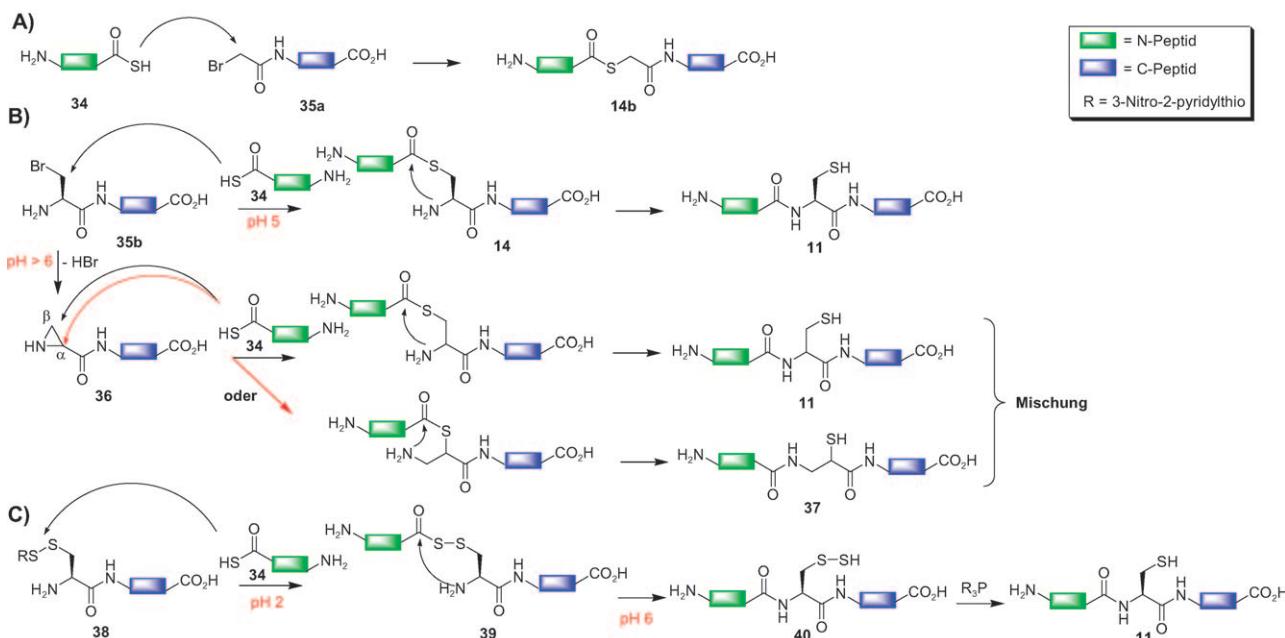
Wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, baut die NCL auf der Umlagerung Thioester-verknüpfter Peptide **14** auf (Schema 3), in denen ein Amin-Nucleophil in der Nähe der Thioesterfunktion positioniert ist. Neben dem Thiol-Thioester-Gleichgewicht kann man einen zweiten Zugang zu Thioestern **14b** postulieren, indem man Peptide mit invertierter Elektrophilie und Nucleophilie verwendet, wie in der Reaktion eines Thiocarbonsäurepeptids **34** mit einem C-Peptid mit bromierter Alkylspezies am N-Terminus **35a** gezeigt wurde (Schema 5A).^[59] In dieser Ligation (obwohl für Cys-haltige Peptide nicht demonstriert) sind saure Bedingungen nicht nur möglich, sondern auch bevorzugt.^[60] Die C-terminale Thiocarbonsäure in **34** führt einen nucleophilen Angriff auf ein elektrophiles β -Bromalanin am N-Terminus des C-Peptids **35b** aus, der zur Bildung des Cys-Thioesters **14** führt (Schema 5B), bevor die abschließende S \rightarrow N-Verschiebung zu **11** stattfindet. Allerdings kann bei pH 6 oder höher das α -Bromalanin eine 1,3-Eliminierung von HBr eingehen, die zur Bildung des Aziridinrings **36** führt. Eine anschließende Ringöffnung durch die Thiocarbonsäure kann somit die Bildung eines Nebenprodukts **37** mit einem α -Thio- β -alanin-Baustein bewirken (Schema 5B). Bei pH 5 oder darunter ist die Bildung des Aziridinrings weitestgehend unterdrückt, was auf die Protonierung der Aminogruppe im α -Bromalanin zurückzuführen ist.

In einem verwandten Prozess kann der Einfangschnitt eines Thiolperthioesterderivats bei noch niedrigerem pH ausgeführt werden (Schema 5C). In diesem Fall führt die Thiocarbonsäure **34** einen nucleophilen Angriff auf das Disulfid **38** aus und bildet den Cys-Perthioester **39**. Nach S \rightarrow N-Verschiebung kann das entstehende Disulfid **40** zum Thiol **11** reduziert werden.^[61] Diese Reaktion kann bei pH < 2 durch-

geführt werden, was auf die aktivierte Eigenschaft der Perthioester und die starke Nucleophilie der Thiocarbonsäuren zurückzuführen ist.

2.4. Ligationsmethoden für rekombinante und synthetische Peptide

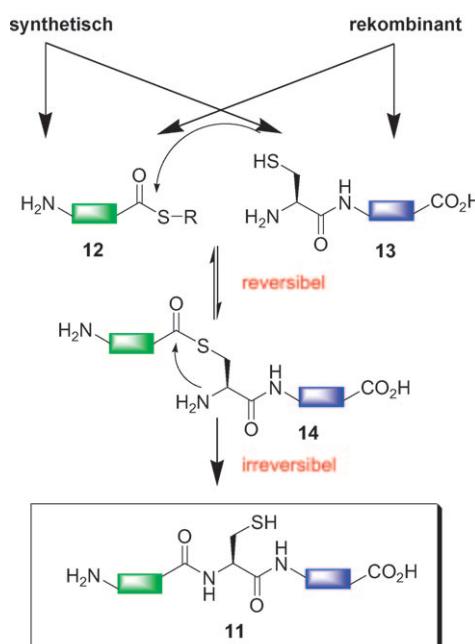
Ligationsprodukte aus (poly-)peptidischen Fragmenten, die synthetischen *und* rekombinanten Quellen entstammen, werden als „semisynthetische“ Peptide bzw. Proteine bezeichnet. Die Semisynthese kombiniert die Vorteile der organischen Synthese und biochemischer Techniken, indem sie ermöglicht, verschiedene nichtnatürliche Funktionalitäten in ein Biopolymer einzubauen. Dabei umgeht die Semisynthese die Einschränkungen der SPPS bezüglich der zugänglichen Peptidkettenlängen. Die Grundlage für die moderne Semisynthese von Proteinen wurde Anfang der 70er Jahre von Offord und Mitarbeitern gelegt.^[62,63] Das hierbei entwickelte Syntheseschema beginnt mit der Reaktion der N-terminalen Aminogruppe von Peptiden, die aus lebenden Organismen gewonnen wurden, mit Edmans Phenylisothiocyanat (PITC). Im nächsten Schritt werden die ϵ -Aminogruppen der Lysine geschützt und die PITC-derivatisierte N-terminalen Aminosäure abgespalten. Die entstehende singuläre α -Aminogruppe kann für die Kupplung mit aktivierten Aminosäuren verwendet werden. Das Verfahren wurde z.B. zum Einbau von Tritium-markiertem Phe als N-terminalen Aminosäure in menschliches Proinsulin angewendet.^[64] Eine beträchtliche Einschränkung des Verfahren besteht allerdings darin, dass die Lys-Seitenketten vor der Ligation geschützt werden müssen. Heute werden zur Verknüpfung von rekombinanten und synthetischen Polypeptiden chemoselektive Ligationstechniken bevorzugt, die nicht dieser Einschränkung unterliegen.



Schema 5. Chemische Ligation mit invertierten nucleophilen und elektrophilen Gruppen. A) Peptid-Thioester-Ligation. B) Thioester-Ligation zur nativen Peptidbindung. C) Cys-Perthioester-Strategie.

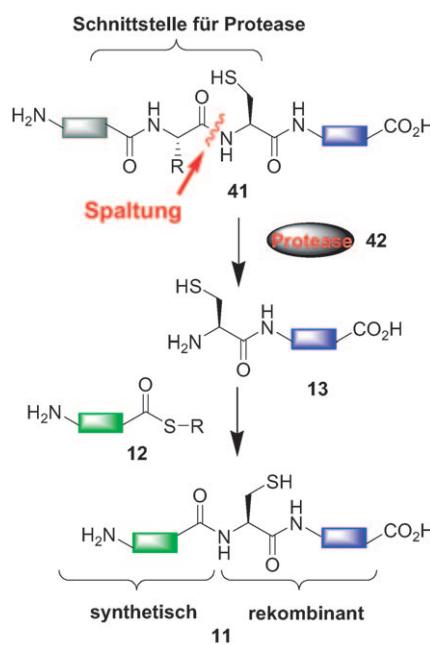
2.4.1. NCL mit rekombinanten Peptidfragmenten

Die NCL ist besonders nützlich für die Proteinsemisynthese, da der Capture/Rearrangement-Prozess durch die natürliche Aminosäure Cystein vermittelt wird.^[9,17,65] Eine Proteinsemisynthese wird oftmals verwendet, um biophysikalische Sonden oder modifizierte Aminosäuren selektiv in ein rekombinantes Protein einzubauen (Schema 6).^[66,67] Um einen synthetischen Thioester **12** mit einem rekombinanten Protein **13** zu ligieren, benötigt letzteres ein N-terminales Cys. Die Einführung N-terminaler Cys-Reste in Proteine wird üblicherweise durch eine Kombination genetischer Methoden wie ortsgerechtete Mutagenese oder kontrollierte Hydrolyse mit Proteasen erreicht.



Schema 6. Das Konzept der Proteinsemisynthese.

In diesem Verfahren wird ein Cys mit der Erkennungssequenz einer spezifischen Protease **42** (z.B. Faktor Xa^[65,68] oder TEV-Protease^[69,70]) am N-Terminus eines Proteins **41** auf genetischer Ebene, normalerweise in Kombination mit einem Reinigungs-Tag, eingeführt.^[68–70] Nach Exprimierung und Aufreinigung wird das rekombinante Protein mit der Protease **42** versetzt und so das N-terminale Cys-Protein **13** freigesetzt (Schema 7). Andere Spaltungsmethoden umfassen die Umlagerung von Intein-Fusionsproteinen^[71] und die durch Cyanogenbromid (CNBr) vermittelte Spaltung zwischen einem Met-Cys-Motiv in einem Protein.^[72] Des Weiteren wurden genetische Konstrukte verwendet, die ein Cys-Codon nach dem ATG(Met)-Startcodon aufweisen, um ein Protein mit einem N-terminalen Cys zu exprimieren. In diesem Fall entfernte eine zelleigene Methioninaminopeptidase das N-terminale Met und setzte das folgende Cys frei.^[73]

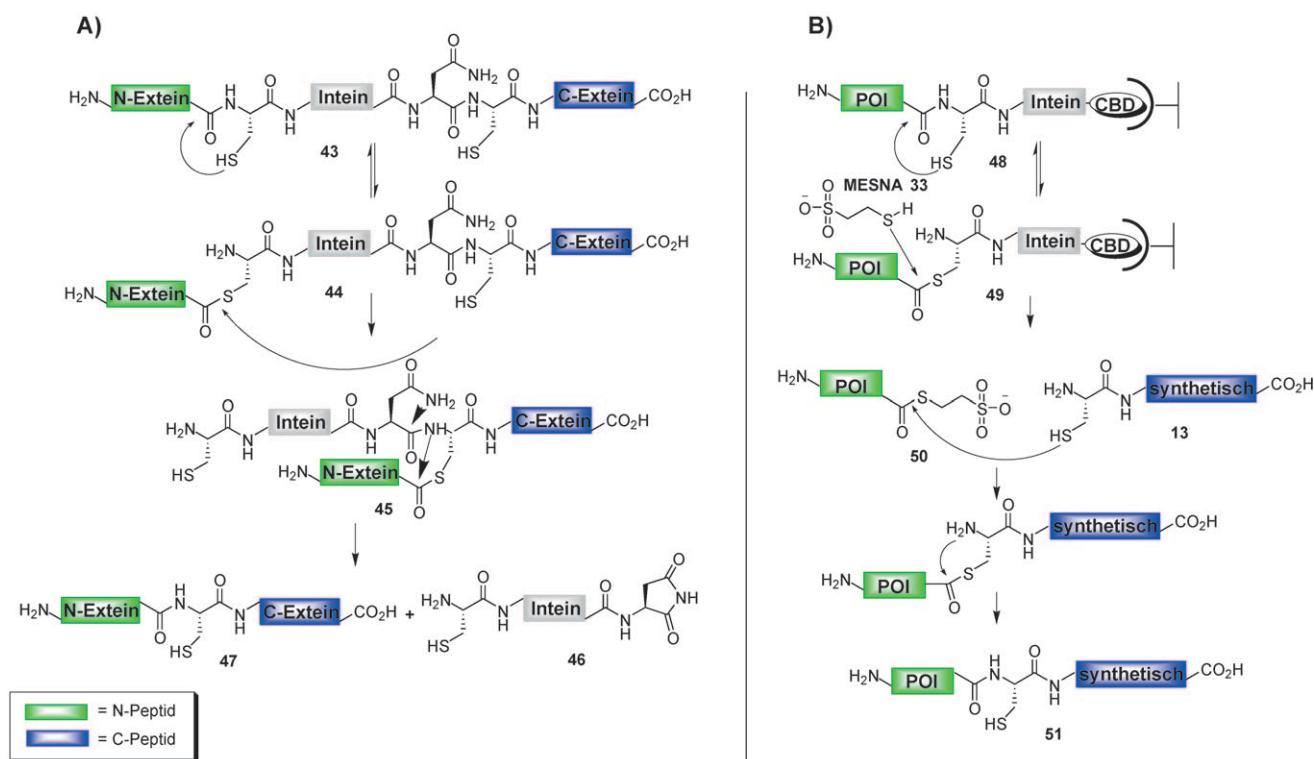


Schema 7. Herstellung rekombinanter Proteine mit N-terminalem Cys.

2.4.2. Ligation exprimierter Proteine

Ein Hindernis für die Semisynthese mit NCL waren die begrenzten chemischen Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinthioestern. Vor diesem Hintergrund haben Muir und Cole eine neue Methode für die Proteinsemisynthese entwickelt, nämlich die Ligation exprimierter Proteine (expressed protein ligation, EPL).^[74] Die EPL-Methode beruht auf dem natürlich vorkommenden enzymatischen Prozess des Protein-Spleißens (protein splicing), bei dem sich eine interne Proteindomäne selbst aus einem Vorstufenpolypeptid „herausschneidet“ und so die flankierenden N- und C-terminalen Fragmente mit einer nativen Peptidbindung verknüpft.^[75–78] In Analogie zum RNA-Spleißen bezeichnet man die interne Proteindomäne als Intein und die flankierenden Regionen als N-Extein bzw. C-Extein. Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass die gesamten enzymatischen Funktionen für diesen Prozess in der Inteindomäne vorhanden ist. Der zugrundeliegende Mechanismus ist in Schema 8A dargestellt. Zunächst durchläuft das N-terminale Cys des Inteins eine N→S-Verschiebung zum Thioester **44** zwischen Intein und N-Extein.^[79] Danach findet eine Transthioveresterung mit einem weiteren Cys – in diesem Fall der ersten Aminosäure im C-Extein – zu **45** statt. Eine intramolekulare Umlagerung mit einem Asn am C-Terminus des Inteins schließt den Prozess des Protein-Spleißens ab und führt zur Bildung des Succinimids **46** am C-Terminus des Inteins und zur nativen Peptidbindung zwischen dem N- und C-Extein im Protein **47**.^[80]

Um diesen Prozess auf die Synthese von Proteinthioestern zu übertragen, wird das in Frage kommende Proteinfragment („protein of interest“, POI) auf genetischer Ebene mit dem Intein fusioniert (Schema 8B). Im vorliegenden Fall ist das POI das N-Extein im Fusionsprotein **48**. Das C-Extein wird durch einen Affinitäts-Tag, z.B. eine Chitinbindungsdomäne



Schema 8. A) Protein-Spleißen. B) Ligation exprimierter Proteine (EPL). POI = „protein of interest“; CBD = Chitinbindungsdomäne.

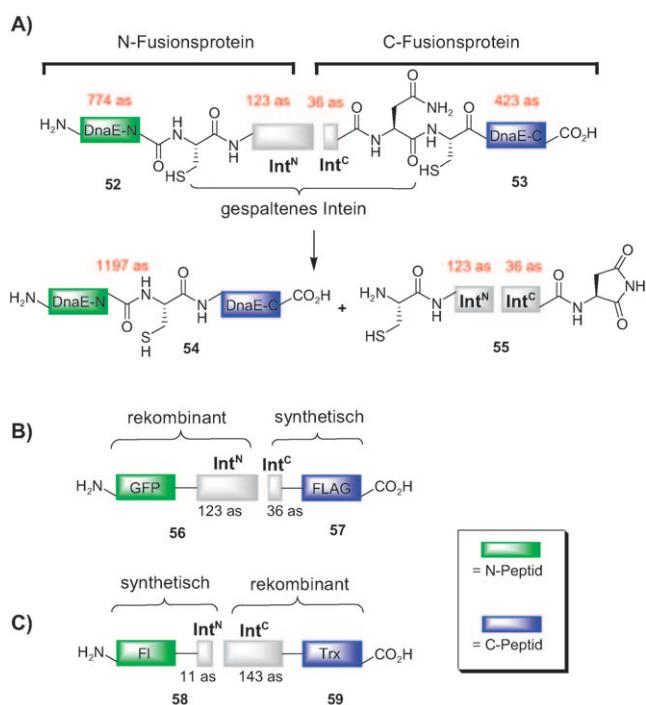
(CBD), für eine nachfolgende Reinigung ersetzt. Das Intein katalysiert nun die reversible N \rightarrow S-Verschiebung zu **49**. Mutationen im Intein verhindern den oben beschriebenen vollständigen Spleiß-Prozess, sodass der Thioester nicht intramolekular übertragen wird. Sobald das Fusionsprotein auf einem Harz durch den Affinitäts-Tag immobilisiert wurde, kann der gewünschte Thioester durch die Zugabe eines Thiols wie MESNA (**33**) über einen Thiol-Thioester-Austausch erhalten werden. Der entstehende Proteinthioester **50** kann durch einfaches Eluieren vom Harz, an den das Intein gebunden bleibt, isoliert werden und anschließend eine NCL mit einem synthetischen C-Peptid **51** eingehen. Alternativ kann das synthetische Peptid auch direkt zum Reaktionsansatz der Thiolspaltung gegeben werden, wodurch das Ligationsprodukt **51** in situ gebildet wird (Schema 8B).

2.4.3. Transspleißen von Proteinen

Eine andere Methode zur Ligation synthetischer und rekombinanter Proteine ist das Transspleißen von Proteinen. Dieses auf der Intein-vermittelten Ligation beruhende Verfahren ist ebenfalls ein enzymkatalysierter Prozess. Beim Transspleißen wird keine Synthese von Thioestern benötigt, vielmehr werden Inteine verwendet, die in zwei Fragmente unterteilt werden. Diese Split-Inteine können dann zu einem vollständig aktiven Komplex reassoziieren und die N- bzw. C-Exteine durch Protein-Spleißen verknüpfen (Schema 9A).

Split-Inteine wurden erstmals im Cyanobakterium *Synechocystis sp.*, Stamm PCC6803 entdeckt, wobei man die katalytische Untereinheit der DNA-Polymerase III in Form zweier getrennter DnaE-Fragmente vorfand (Schema 9A).

Diese Fragmente repräsentierten die N- bzw. C-Exteine eines Split-Intein-Systems, das später zu einem kompletten DnaE-



Schema 9. Transspleißen von Proteinen. A) Transspleißen des Split-Inteins DnaE. B) Transspleißen eines C-terminalen semisynthetischen Proteins. C) Transspleißen eines N-terminalen semisynthetischen Proteins.

Segment (in diesem Fall der Polymerase III) rekonstituiert wurde.^[81] Molekular betrachtet sind die 774 Aminosäuren des N-Terminus von DnaE mit 123 Aminosäuren der N-Fraktion des Split-Inteins (Int^N) im Protein **52** fusioniert. Die übrigen 36 Aminosäuren der C-terminalen Region des Split-Inteins (Int^C) sind an die fehlenden 423 C-terminalen Aminosäuren des DnaE im Fusionsprotein **53** gebunden. Nach dem Transspleißen ist das 1197 Aminosäuren umfassende DnaE **54** in Form eines kovalent verknüpften Polypeptidstrangs wiederhergestellt. Die zweite Komponente, die während des Spleißens entsteht, ist der nichtkovalente Komplex **55** der Int^N- und Int^C-Fragmente (Schema 9A).

Um Split-Inteine für die Proteinsemisynthese zu nutzen, können synthetische Int^C-C-Exteinpeptide mit einem kleinen C-terminalen Inteinfragment durch SPPS erhalten werden und mit einem rekombinanten N-Extein-Int^N-Fusionsprotein reagieren. Die mögliche Anwendung dieses Verfahrens wurde anhand der Ligation eines synthetischen FLAG-Epitops zu einem rekombinanten grün-fluoreszierenden Protein (GFP) nachgewiesen (Schema 9B).^[82] Diese von Muir eingeführte Methode konnte auch in lebenden Zellen verwendet werden und läuft normalerweise mit mittleren mikromolaren Konzentrationen ab. Dafür wurden Zellen, die das GFP-Int^N-Konstrukt **56** exprimierten, mit einem synthetischen Int^C-FLAG-Peptid **57** inkubiert. Das Peptid enthielt zusätzlich ein zellpenetrierendes Peptid, das den Transport in die lebenden Zellen ermöglichte.

Das natürliche Vorkommen von Split-Inteinen hat zu weiteren genetischen und biochemischen Untersuchungen geführt, insbesondere zur Frage, ob reguläre Inteine künstlich gespalten werden können.^[83–86] In diesem Zusammenhang entwickelten Mootz und Mitarbeiter ein Verfahren zum semisynthetischen Transspleißen von Proteinen.^[87] Das artifiziell gespaltene Split-Intein Ssp-DnaB wurde verwendet, um ein Fluorescein(Fl)-konjugiertes Peptid **58** an ein rekombinantes Thioredoxin (Trx) **59** zu binden. Die Stelle, an der das Intein getrennt wurde, ist nur elf Aminosäuren vom N-Terminus des Inteins entfernt (Schema 9C) und kann somit, im Unterschied zum DnaE-System, das nur für Ligationen am C-Terminus geeignet ist, zur Ligation synthetischer Peptide an den N-Terminus rekombinanter Proteine eingesetzt werden. Die geringe Größe des synthetischen Int^N-Fragments **58** von nur elf Aminosäuren (statt 36 wie im Fall von DnaE) ist sehr vorteilhaft für die SPPS ganzer Peptidfragmente: Da die Aminosäuren des Int^N-Fragments nicht im Ligationsprodukt auftauchen, sollte die Kettenlänge so klein wie möglich bleiben, sodass das DnaB-System eine Verbesserung für die Semisynthese von Proteinen mit sich bringt.

3. Peptid- und Proteinligationen durch Capture/Rearrangement an cysteinfreien Ligationsstellen

Wie im Abschnitt 2 beschrieben, ermöglicht die NCL die chemoselektive Konjugation zweier ungeschützter Peptid- oder Proteinfragmente mit einer nativen Amidbindung. Obwohl die Literatur zahlreiche Beispiele aufweist, die die Nützlichkeit der NCL belegen, wird die Methode noch immer dadurch eingeschränkt, dass an der Ligationsstelle ein Cys-

tein vorliegen muss. Cysteine sind insgesamt nur zu 1.7 % in Peptidsequenzen vorhanden,^[88] was oftmals eine retrosynthetische Aufspaltung mittels NCL ausschließt. Außerdem besteht nicht immer die Möglichkeit, dass ein Cystein als kleiner nicht-nativer Baustein eine andere natürlich vorkommende Aminosäure an der Ligationsstelle ersetzen kann, da Cysteine beispielsweise Disulfidbrücken bilden und dann den Proteinfaltungsmechanismus beeinflussen können. Um diese Einschränkung zu umgehen, wurden einige Verfahren entwickelt, die eine chemoselektive Verknüpfung durch Amidbindungen an cysteinfreien Ligationsstellen **60** ermöglichen. Man kann mehrere Herangehensweisen unterscheiden (Schema 10), die im Folgenden vorgestellt werden. Einige Verfahren liefern native Polypeptide mit ausschließlich natürlich vorkommenden Aminosäuren, während andere Verfahren Aminosäureanaloga unter Beibehaltung des α -Aminosäure-Rückgrats erzeugen.

3.1. Ligationen mit anderen Aminosäuren außer Cys

Die erste Herangehensweise verwendet andere nucleophile Aminosäuren als Cys am N-Terminus des C-Peptids, die am oben besprochenen Einfangsschritt teilnehmen (siehe Abschnitt 2) und ein geeignetes Elektrophil angreifen, in den meisten Fällen ein Thioester oder eine verwandte Gruppierung.

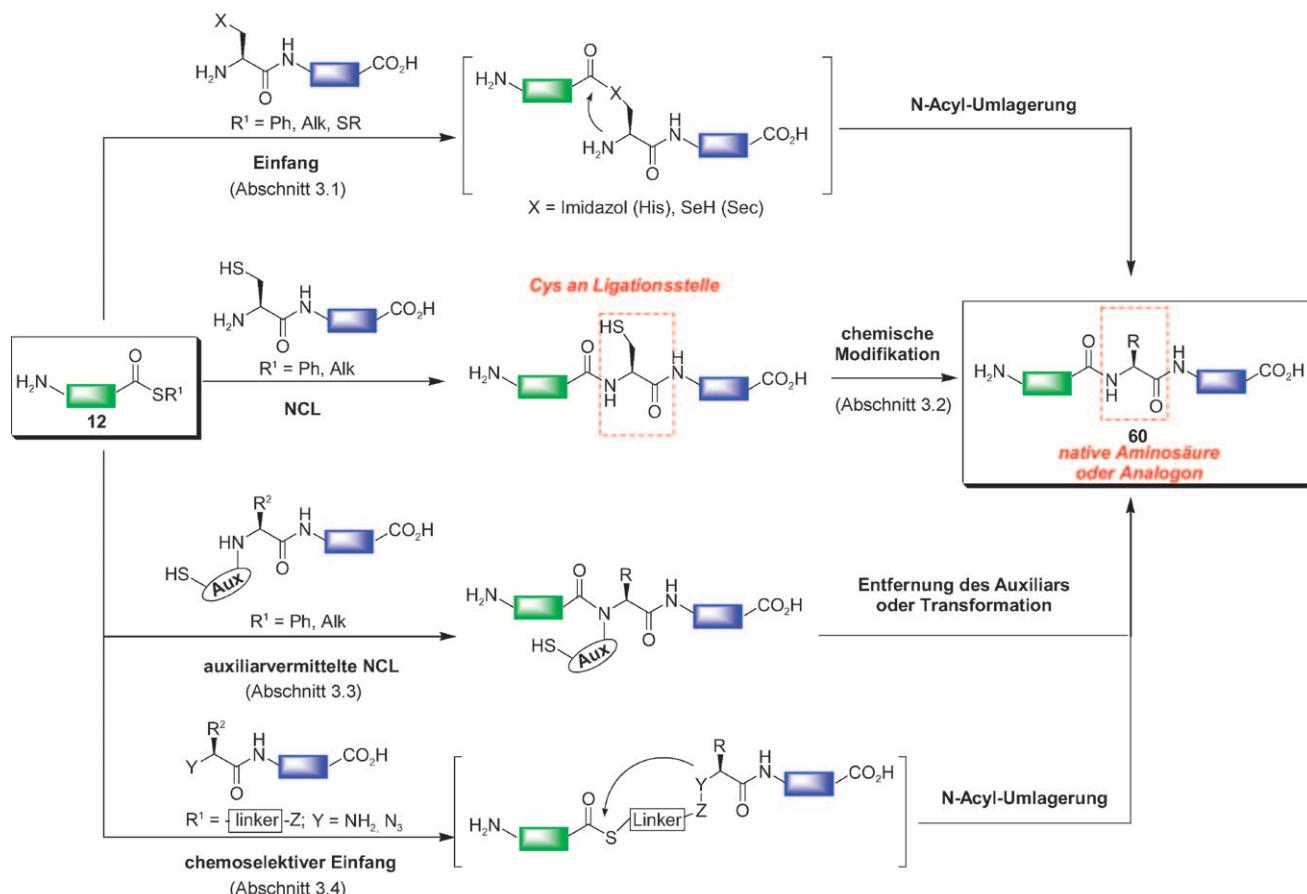
3.1.1. His-Ligation

Das erste Beispiel beruht auf der Verwendung von Histidinen (His) am C-Terminus des N-Peptids **61**. Histidine enthalten ein Imidazol als Nucleophil,^[89] das bekanntermaßen enzymatische Acylverschiebungen unter sauren Bedingungen beschleunigt (Schema 11 A). Mit C-terminalen Peptidthioestern **12** liefert das Verfahren nur geringe Ausbeuten, wird aber unter sauren Bedingungen mit aktiveren Perthioestern (Acyldisulfiden) **62**, die durch Aktivierung von Thiosäuren mit dem Ellman-Reagens erzeugt werden können, effektiver.^[90] Diese Ligation wurde von Tam et al. entwickelt und in der Synthese von His-haltigen Peptiden **63** in Ausbeuten zwischen 60 und 70 % eingesetzt, die allerdings keine zusätzlichen nucleophilen Seitenketten tragen können.^[91]

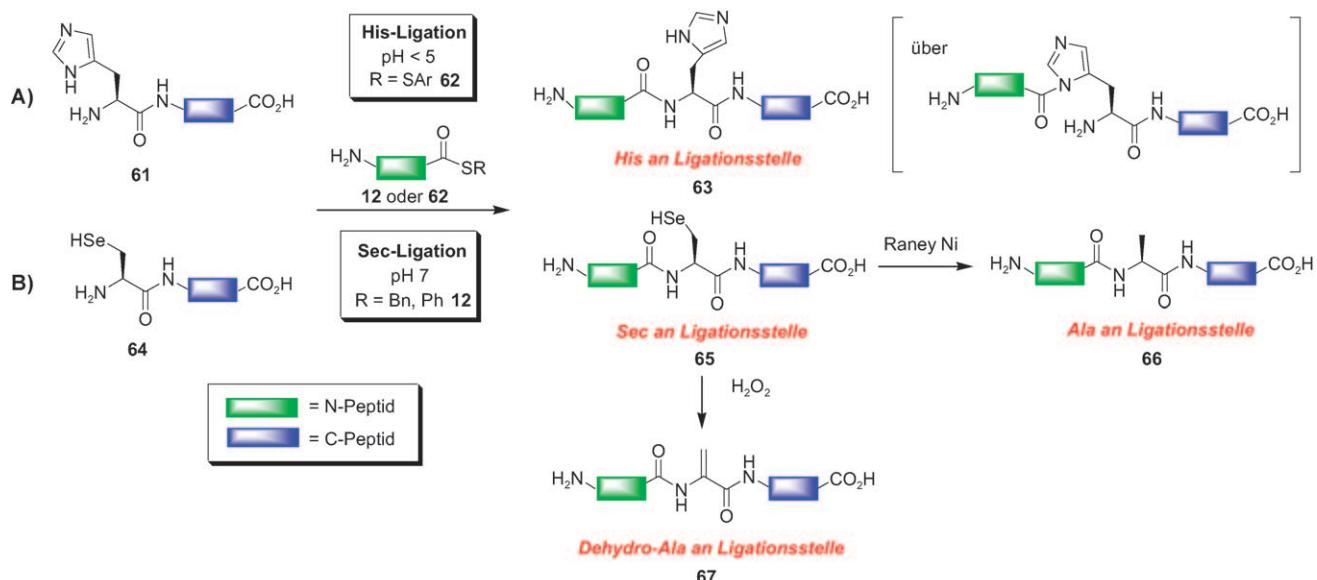
3.1.2. Sec-Ligation

Eine andere Strategie verwendet eine nucleophile Selenolfunktion wie in **64** anstelle einer Thiolfunktion in der NCL, wodurch das entstehende Ligationsprodukt **65** die seltene Aminosäure Selenocystein (Sec) trägt (Schema 11 B).^[92] Da die SeH-Gruppe saurer und nucleophiler ist als die SH-Gruppe, können Sec vermittelte Ligationen sehr schnell sein und hohe Ausbeuten ergeben. Solche Verfahren wurden für die Synthese von Peptiden^[93] und Proteinarchitekturen über EPL verwendet.^[94] Die entstehenden Ligationsprodukte fanden wichtige Anwendungen in der NMR-Spektroskopie^[95] und in mechanistischen Untersuchungen von Proteinen, etwa in Studien der Cu-Bindung des blauen Kupferproteins Azurin.^[96]

Ligationsmethoden



Schema 10. Präparative Zugänge zu cysteinfreien Peptiden und Proteinen.

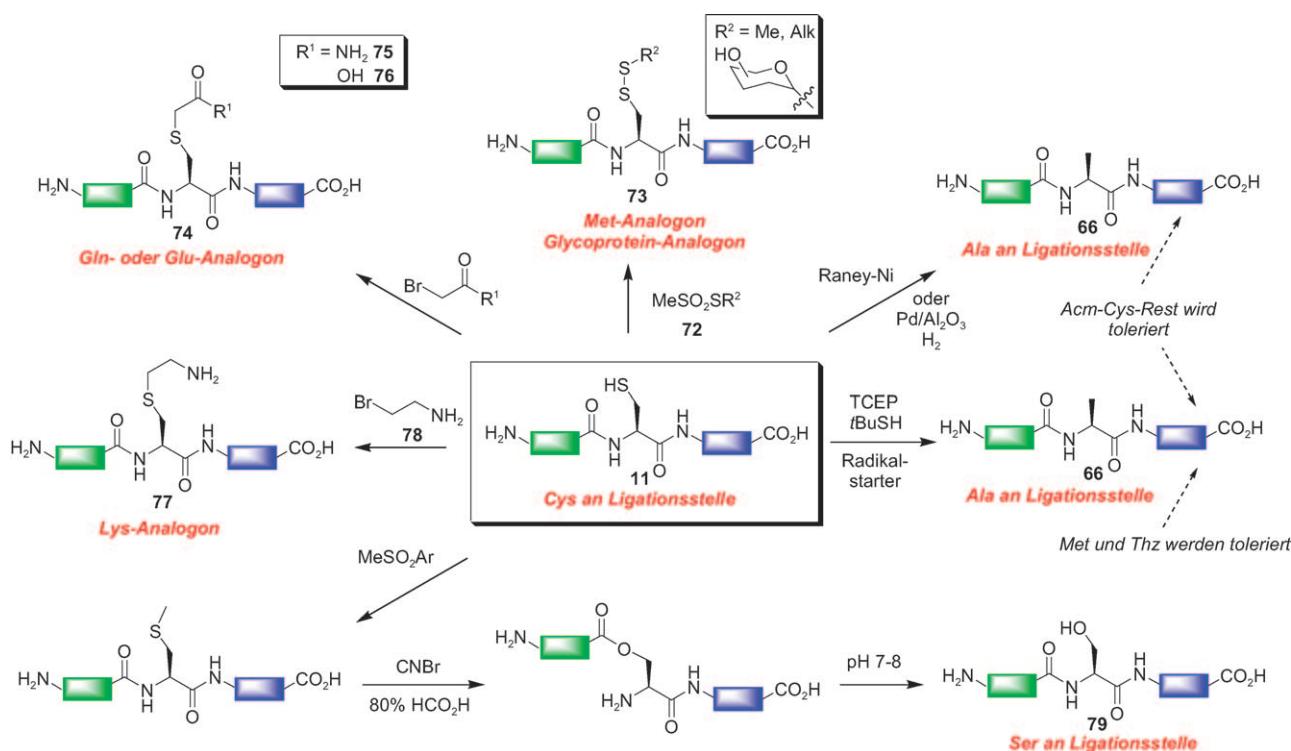


Schema 11. Ligationsen an His- (A) und Sec-Aminosäuren (B).

3.2. Chemische Modifizierung von NCL-Produkten

Eine wichtige Synthesestrategie, die in diesem Abschnitt vorgestellt wird, beruht auf selektiven Transformationen von NCL-Produkten **11**.^[97] Solche Umsetzungen

werden auch häufig verwendet, um die enzymatische Funktion exprimierter Proteine zu verbessern^[98] oder um ortsspezifisch natürliche Proteinmodifikationen einzuführen.^[99] Der Vorteil dieser chemischen Modifikationsstrategie in Kombination mit NCL besteht darin, dass man die besonderen



Schema 12. Chemische Modifizierung von NCL-Produkten: Alkylierungs- und Desulfurierungsstrategien. TCEP = Tris-[2-carboxyethyl]phosphan; CNBr = Cyanogenbromid.

chemischen Eigenschaften der für die NCL existenziellen Aminosäure, also einem Cys oder Sec, nutzen kann. Allerdings können zusätzliche Thiolfunktionalitäten im Ligationsprodukt die allgemeine Anwendbarkeit dieser Strategie einschränken, da selektive Transformationen ohne zusätzliche Schutzgruppenmanipulationen schwierig durchzuführen sind.

Ein weiteres Problem dieser Herangehensweise ist, dass chemische Transformationen auf das fertige Ligationsprodukt angewendet werden müssen. Neben Überlegungen bezüglich der Chemoselektivität können drastische Reaktionsbedingungen das Ligationsprodukt schädigen und so die Gesamtausbeute verringern oder, noch schlimmer, die Proteinarchitektur durch Aggregationsphänomene beeinflussen.

3.2.1. Desulfurierung

3.2.1.1. Ala-Ligation: Desulfurierung von Cys

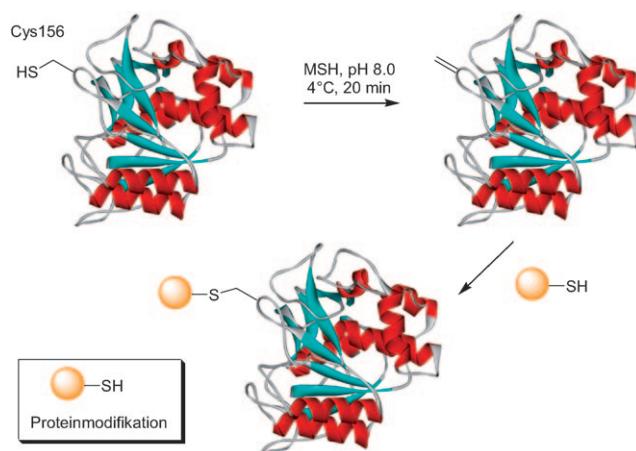
Eine der häufigsten Methoden zur Umwandlung Thiolhaltiger Ligationsprodukte in native Polypeptidanaloga ist der selektive Angriff auf Schwefelfunktionalitäten durch Desulfurierungstechniken, z.B. mit Raney-Nickel oder Ni-Borid (Schema 12). Auf diese Weise können Ala-Aminosäuren anstelle von Cys an der Ligationsstelle **66** erhalten werden. Die Methode wurde von Perlstein et al.^[100] eingeführt und von Dawson und Mitarbeitern, die auch Pd- und Ni-vermittelte Prozesse bezüglich der Bildung von Nebenprodukten verglichen, auf anspruchsvolle Peptidsysteme erweitert.^[101] Dieses Syntheseprotokoll wurde für die Synthese verschiedener Polypeptide verwendet^[102,103] und weiterent-

wickelt, indem ungeschützte Cysteine in Gegenwart Acm-geschützter Cysteine selektiv umgesetzt wurden.^[104] Das Verfahren ermöglicht damit eine Ligation Cys-haltiger Polypeptide an Alanin-Schnittstellen nach einer abschließenden Acm-Entschützung. Ein großer Nachteil ist jedoch die Heterogenität der verwendeten Ni-Katalysatoren, die in bestimmten Systemen zu Aggregationen^[105] und weiteren Nebenreaktionen wie Desulfurierung von Met oder Thiazolidin (Thz) oder zur Epimerisierung von sekundären Alkoholen führen.^[106] Zur Lösung dieses Problems entwickelten kürzlich Danishefsky und Mitarbeiter eine metallfreie radikalische Desulfurierungstechnik, mit der Cysteine in Gegenwart von anderen Aminosäuren wie Met, Acm-geschütztem Cys und Thz in hohen Ausbeuten umgesetzt werden können (Schema 12).^[107]

3.2.1.2. Umwandlung von Cys in Dehydroalanin

Für die Umsetzung eines Cysteins an der Proteinoberfläche in ein Dehydroalanin (Dha) entwickelten Davis et al. eine oxidative Eliminierungsstrategie unter Verwendung von *O*-Mesitylsulfonylhydroxylamin (MSH) (Schema 13).^[108] Die schnelle Reaktion läuft bei 4 °C mit vollständigem Umsatz ab und toleriert die verschiedensten funktionellen Gruppen im Proteinrückgrat, wobei Methionine, deren Thioether zum Iminsulfoniumsalz reagieren könnte, durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) regeneriert werden können. Das entstehende Dehydroalanin kann durch Michael-Additionen chemoselektiv mit Sulfidderivaten reagieren (siehe auch Abschnitt 4.3.1), wodurch beispielsweise

Ligationsmethoden



Schema 13. Chemoselektive oxidative Eliminierung zu Dha-Proteinen nach Davis.

Konjugationen mit Peptiden und Kohlenhydratanaloga möglich sind.^[109] Ebenso können Analoga natürlicher post-translational modifizierter Proteine, z. B. phosphorylierte Proteine, zugänglich gemacht werden, wobei das entstehende Proteinderivat als Diastereomerengemisch an der Additionsstelle vorliegt.

3.2.1.3. Umwandlung von Sec in Ala oder Dha

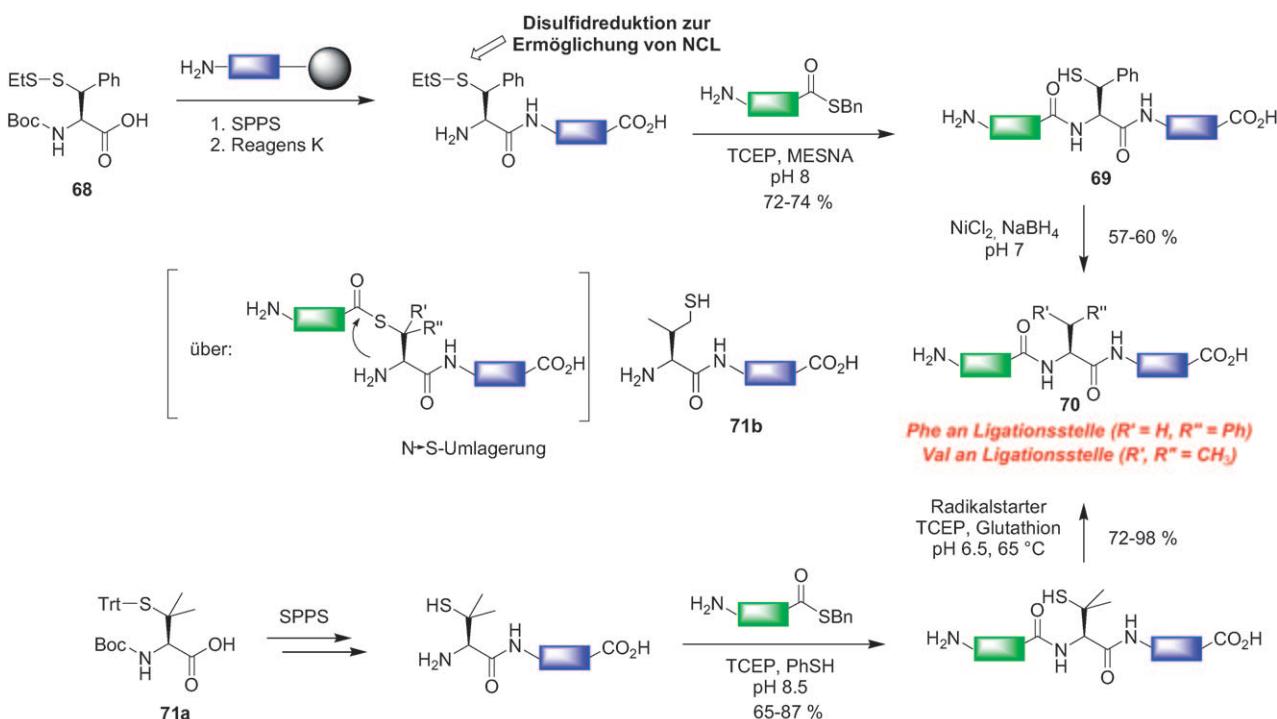
Wie in Abschnitt 3.1.2 erwähnt, können Sec-Ligationsprodukte weiter umgesetzt werden. Behandlung mit Raney-Nickel führt zu einer Deselenierung und der Isolierung von Ala-Derivaten **66**. Die oxidative Eliminierung mit H₂O₂ lie-

fert Dha **67** als Reaktionsprodukt, das weiter derivatisiert werden kann (siehe Abschnitt 3.2.1.2, Schema 11B).^[109–111]

3.2.1.4. Phe- und Val-Ligation: Desulfurierung von β -Mercapto-Bausteinen

In kürzlich erschienenen Veröffentlichungen wurde die NCL auf β -verzweigte Cys-Derivate erweitert, die nach der Ligation und anschließenden Desulfurierung natürliche Aminosäuren an der Ligationsstelle ergeben.^[112] So wurde zum einen β -Mercaptophenylalanin als Templat für die Ligation an Phe-Schnittstellen verwendet (Schema 14, oben).^[113] Dieser Baustein kann über die Disulfidvorstufe **68** an den N-Terminus eines C-Peptids gekuppelt werden. Bei Thiolzugabe wird **69** in situ unter NCL-Bedingungen erzeugt. Die Thiolfunktion in benzylierter Position von Peptid **70** kann dann mit Raney-Nickel entfernt werden. Das Verfahren wurde anhand der Ligation von zwei Pentapeptiden zu einem Decapeptid mit einem Phe an der Ligationsstelle in guten Gesamtausbeuten demonstriert.

In einem ähnlichen Verfahren wurde ein Penicillamin-Baustein **71a** für die Ligation an hydrophoben Schnittstellen eingesetzt, wobei die β,β -Dimethylcysteingruppe überraschend schnell und in hohen Ausbeuten mit einem N-Peptidthioester reagierte (Schema 14, unten).^[114a] Die gebildeten Penicillaminpeptide in Kettenlängen von 11 bis 22 Aminosäuren wurden mit einer optimierten Variante der homogenen Danishefsky-Desulfurierungsmethode in die entsprechenden Val-Peptide überführt. Dieses zweistufige Verfahren konnte Ligationsstellen zwischen verschiedenen Aminosäuren erzeugen, darunter auch zwischen den verzweigten hydrophoben Aminosäuren Leu und Val. In einer erst vor



Schema 14. Native chemische Ligation an Phe- (oben) oder Val-Schnittstellen (unten) mit einem zweistufigen Ligations- und Desulfurierungsprotokoll.

kurzem erschienenen Publikation von Danishefsky et al. wurde ein weiteres System für die Ligation an Valinen beschrieben, das ein (primäres) Thiol an der γ -Position des N-terminalen Val im C-Peptid **71b** verwendet. Dieses Auxiliar lieferte die entsprechenden Peptide in einem analogen zweistufigen Verfahren in sehr guten Ausbeuten, sogar an sterisch höchst anspruchsvollen Thr-Val-Schnittstellen.^[114b]

3.2.2. Alkylierungs- und Thioalkylierungsverfahren

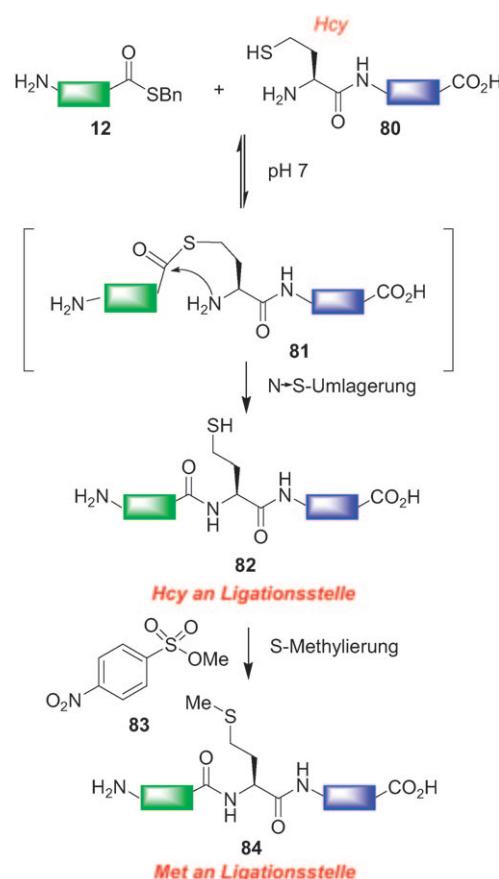
3.2.2.1. Umsetzung von Cys oder Sec in Ser sowie Met-, Gln-, Glu- und Lys-Analoga

Die nucleophilen Eigenschaften der Thiol- oder Selenol-funktion an der Ligationsstelle können auch für Alkylierungs- und Thioalkylierungsreaktionen genutzt werden. Obwohl die hier vorgestellten Beispiele hauptsächlich zur Modifizierung exprimierter Proteine angewendet wurden, sind sie genauso auf NCL-Produkte übertragbar. So können beispielsweise Cysteine in Proteinen durch Thioalkylierung mit Methylmethanthsulfonat (**72**) in Met-Analoga **73**^[115] oder andere wichtige Biokonjugate wie Disulfid-verbrückte Glycokonjugate überführt werden (Schema 12),^[116] die sich wiederum durch chemoselektive Reaktion mit P^{III}-Reagentien in stabile Glycosyl-Thioether-Spezies umwandeln lassen.^[117] Gln- oder Glu-Derivate **74** können durch Reaktion mit α -Iodacetamid (**75**)^[118] bzw. α -Iodessigsäure (**76**, siehe auch Abschnitt 7.2) erhalten werden,^[119] wohingegen Lys-Analoga **77** durch Reaktion mit Aziridinen oder Bromethylamin (**78**) zugänglich sind (Schema 12).^[120] Die Reaktionsprodukte sind nicht-native Proteinanaloga von natürlich vorkommenden Aminosäuren, die aber in einigen biochemischen Studien eine ähnliche biologische Aktivität wie natürliche Substrate aufwiesen.^[119]

In einer erst kürzlich erschienenen Publikation wurde die Methylierung eines Cysteins durch Methyl-4-nitrobenzolsulfonat mit der Aktivierung und intramolekularen Umlagerung mit CNBr in Ameisensäure und abschließendem O→N-Acyltransfer unter leicht basischen Bedingungen (pH 7–8) kombiniert.^[121,122] Diese Syntheseroute ermöglichte die Umsetzung von Cysteinen in NCL-Produkten in Serine, wobei **79** in hohen Ausbeuten gebildet wurde (Schema 12). Das Verfahren besitzt großes Potenzial für die Synthese N-verbrückter Glycoproteine, da diese Asn-Xaa-Ser- bzw. Asn-Xaa-Thr-Konsensussequenzen enthalten (Xaa = beliebige Aminosäure außer Prolin).^[123]

3.2.2.2. Met-Ligation: Ligation von Homocystein (Hcy)

Ein weiteres Ligationsverfahren wurde zur Alkylierung von Homocystein (Hcy) enthaltenden Peptiden entwickelt, die kein Cystein enthalten.^[124,125] Hcy-Polypeptide **82** können in Analogie zur NCL mit einem Hcy am N-Terminus erhalten werden (**80**), wobei der Mechanismus des Umlagerungsschritts in der NCL über einen sechsgliedrigen Übergangszustand **81** verläuft (Schema 15). Die abschließende Alkylierung kann mit Methyl-p-nitrobenzolsulfonat (**83**) unter basischen Bedingungen^[126] oder auch unter neutralen oder sauren Bedingungen zur Überführung in Met-Analoga **84** durchgeführt werden.^[127] In einem ähnlichen Verfahren



Schema 15. Met-Ligation: Alkylierung eines Hcy enthaltenden NCL-Produkts.

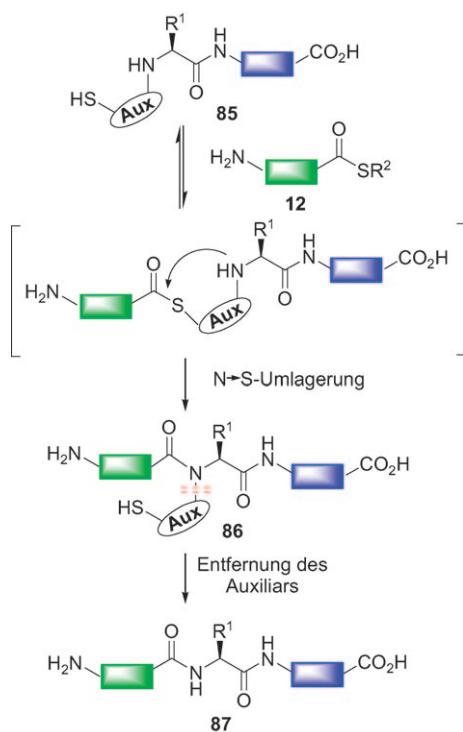
haben Hilvert und Mitarbeiter Selenohomocysteinproteine, die über eine EPL-Strategie erhalten wurden, in Selenomethioninproteine umgesetzt, um so ein Selen-Analogon des Schweinepankreaspolypeptids (bPP) zu erhalten.^[94b]

3.3. Auxiliarmethoden

Die bisher besprochenen Methoden versagen bei Proteinsystemen, die mehrere ungeschützte Cysteine enthalten. In solchen Fällen können Auxiliarmethoden zum Erfolg führen.^[128] Zum Beispiel wurde ein Thiol enthaltendes Auxiliar **85** in der Nähe des N-Terminus des C-Peptids platziert, das mit einem Thioester **12** in einem der NCL ähnelnden Mechanismus reagiert (Schema 16). Das Auxiliar wird danach aus dem entstandenen Peptid **86** in einer abschließenden Transformation entfernt und liefert so das native Peptid bzw. die Proteinsequenz **87**. Für die abschließende Polypeptid-Transformation gilt die gleiche Voraussetzung milder Reaktionsbedingungen, wie in den vorangehenden Abschnitten diskutiert.

3.3.1. (Oxy-)Ethanethiol-Auxiliar

Eines der ersten Auxiliarsysteme verwendete einen Ethanethiol- ($X = \text{CH}_2$, **88**) oder Oxyethanethiol-Substituenten



Schema 16. Mechanismus und Verfahren der auxiliarvermittelten Ligation.

($X = \text{OCH}_2$, **89**) am N-Terminus des C-Peptids (Tabelle 2, Eintrag 1). Das Thiol kann am Thioester-Gleichgewicht teilnehmen und mit einem zweiten Peptidthioester austauschen, bevor das sekundäre Amin die $\text{N} \rightarrow \text{S}$ -Verschiebung ausführen kann. Im Allgemeinen liefert das Ethanthioliiauxiliar bessere Ausbeuten für die Ligation an Gly-Schnittstellen (bis zu 90 %) als das Oxyethanthiolderivat. Während das Ethanthioliiauxiliar nicht vom Peptid entfernt werden kann,^[129] kann die N-O-Bindung des Oxyethanthioliauxiliars unter reduzierenden Bedingungen mit Zn abgespalten werden.^[130] Beide Systeme wurden zur Synthese anspruchsvoller Peptidsubstrate, insbesondere Cyclopeptide, verwendet.^[129,131]

3.3.2. N^{α} -1-Aryl-2-mercaptopethyl-Auxiliar

Im Auxiliarsystem **90** wird der N-Terminus des C-Peptids in ein sekundäres Amin überführt, das sowohl eine Arylgruppe in 1-Position als auch ein Thiol in 2-Position präsentiert (Tabelle 2, Eintrag 2).^[132] Das Auxiliar **90** kann entweder durch Reaktion des entsprechenden primären Amins mit einem α -Bromopeptid oder durch ein „Baustein“-Verfahren mit Boc- oder Fmoc-geschützten N^{α} -(1-Aryl-2-mercaptopethyl)aminoäurederivaten in das Peptid eingeführt werden.^[133] Das Auxiliarsystem ermöglicht sterisch anspruchslose Kupplungen an Gly- und Ala-Schnittstellen in guten Ausbeuten für verschiedene Peptidsysteme (Tabelle 2) – dabei insbesondere Glycopeptide und cyclische Peptide –, auch wenn das Auxiliar unter stark sauren Bedingungen mit HF oder TFA/TMSBr entfernt werden muss.

Tabelle 2: Auxiliarsysteme mit möglichen Ligationschnittstellen und Bedingungen für die Abspaltung des Auxiliars.^[a]

Ligationsstelle	Reaktionsbedingung zur Entfernung des Auxiliars
	keine (für 85)
	Zn, Essigsäure (für 86)
	HF (für $R^2 = \text{H}$) TFA (für $R^2 = \text{OMe}$)
	$h\nu$ (310–365 nm)
	HF (für 92a) TFA (Hg^{2+}) (für 92b)

[a] Dmb = 4,6-Dimethoxy-2-mercaptopbenzylamin, Tmb = 4,5,6-Trimethoxy-2-mercaptopbenzylamin.

3.3.3. Photospaltbare Auxiliare

Besonders bemerkenswert ist eine Methode, die eine milde Freisetzung des auxiliartragenden Peptids ermöglicht. Das Verfahren wurde von den Arbeitsgruppen von Aimoto^[134] und Dawson beschrieben,^[135] die hierzu eine photospaltbare Variante des 1-Aryl-2-mercaptopethyl-Auxiliars **90** entwickelten (Tabelle 2, Eintrag 3). Das photosensitive Auxiliar **91** trägt eine *ortho*-Nitrobenzolgruppe, die effizient zwei Nonapeptide in hohen Ausbeuten vor der photolytischen Abspaltung verknüpft. Trotz der vorteilhaften milden Abspaltungsbedingungen ist anzumerken, dass dieses Auxiliarsystem auf sterisch anspruchslose Ligationsstellen wie Gly-Gly oder Ala-Gly beschränkt ist. Das Verfahren fand kürzlich eine wichtige Anwendung in der Semisynthese eines Histoneptides, in dem das Protein Ubiquitin an eine ϵ -Aminogruppe eines Lys konjugiert ist. Diese Synthese stellt die erste EPL an einer Schnittstelle ohne Cys dar.^[136] In Kombination mit einem zweiten EPL-Schritt kann dieser Prozess

sogar auf die chemische Ubiquitin-Modifizierung von Proteinen erweitert werden. Dafür wurde ein ubiquitiniertes Histon H2B hergestellt, das biologische Aktivität in der Steuerung intranukleosomaler Methylierungen zeigte.^[137]

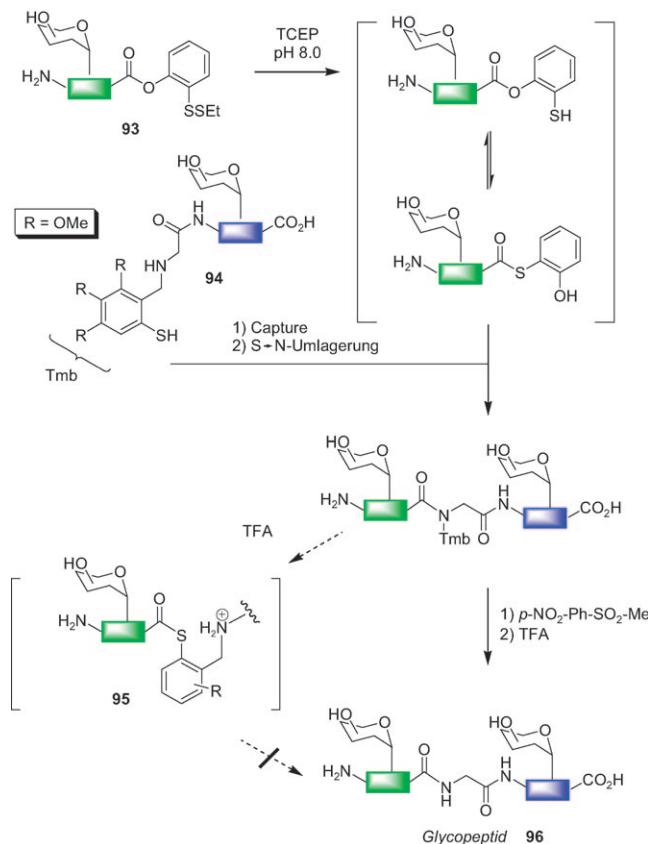
3.3.4. 4,5,6-Trimethoxy-2-mercaptopbenzylamin(Tmb)-Auxiliar

Im Jahr 2000 führten Dawson und Mitarbeiter das 4,6-Dimethoxy-2-mercaptopbenzylamin(Dmb)-Auxiliar **92a** ein, bei dem ein elektronenreiches Arylthiol einen Thioesteraustausch mit einem C-terminalen Peptidthioester eingeht (Tabelle 2, Eintrag 4). Eine anschließende S→N-Verschiebung des sekundären Amins bildet ein tertiäres Amin, das durch die Zugabe von TFA zum sekundären Amin hydrolysiert werden kann.^[138] Optimierungsstudien führten zum 4,5,6-Trimethoxy-2-mercaptopbenzylamin(Tmb)-Auxiliar **92b** mit erhöhter Nucleophilie des Arylthiols und einer ebenfalls erhöhten Säurelabilität des entstehenden tertiären Amins. Dieses Auxiliar wurde erfolgreich in der Ligation von Peptiden eingesetzt, die wenigstens ein Gly an der Ligationsstelle trugen, wobei Kupplungszeiten von 0.5 h (Gly-Gly), 2 h (Lys-Gly) und 5 h (Ala-Gly) benötigt wurden.^[139] **92b** wurde außerdem zur Synthese von Cytochrom b562, einem 106 Aminosäuren umfassenden Protein, verwendet.^[140]

Kürzlich haben Danishefsky et al. das Tmb-Auxiliar in Verbindung mit einem C-terminalen Peptidphenolester **93** mit einem *ortho*-Disulfid (siehe Abschnitt 2.3.3) in sterisch anspruchsvollen Kupplungen zweier Glycopeptide **93** und **94**, die jeweils eine N-verbrückte Chitobiose-Einheit trugen, an einer Gly-Gln-Ligationsstelle eingesetzt.^[141] Hierbei wurde beobachtet, dass saure Bedingungen für die Auxiliarabspaltung zu einer Anreicherung des Thioester-Intermediats **95** durch Protonierung des sekundären Amins führen, was auf eine N→S-Verschiebung schließen lässt.^[18,142] Eine vorgeschaltete Methylierung des Arylthiols verbesserte die Abspaltungsneigung, sodass eine effiziente Synthese des Glycopeptids **96** erhalten wurde (Schema 17).

3.3.5. Zuckerunterstützte Glycopeptidligation

Kürzlich entwickelten Wong und Mitarbeiter eine Ligationsstrategie für Glycopeptide, in denen ein Auxiliar für den Einfangsschritt in das Glycan eingebaut ist; die Methode wird als zuckerunterstützte Glycopeptidligation (sugar-assisted glycopeptide ligation, SAL) bezeichnet (Schema 18A).^[143] Hierfür wird ein Thiol als β-Thioacetamidsubstituent an der C2-Position in einen GalNAc-Baustein (im Fall der O-verbrückten Glycopeptide)^[144] oder einen GlcNAc-Baustein (im Fall der N-verbrückten Glycopeptide **97**) eingeführt.^[145] Es wird angenommen, dass das Thiol zunächst einen Thioester mit einem C-terminalen Peptidthioester **12** bildet. Ein freies Amin am N-Terminus des Glycopeptids kann dann eine S→N-Verschiebung eingehen und so eine native Amidbindung in **98** unter leicht basischen Bedingen erzeugen. Die abschließende Desulfurierung (siehe Abschnitt 3.2.1) liefert das native Glycopeptid **99**. Es wurde gezeigt, dass die SAL Glycopeptide mit bis zu sechs zusätzlichen Aminosäuren N-terminal zur Glycosylierungsstelle toleriert, was eine flexible Justierung der Ligationsstelle und somit sterisch anspruchs-



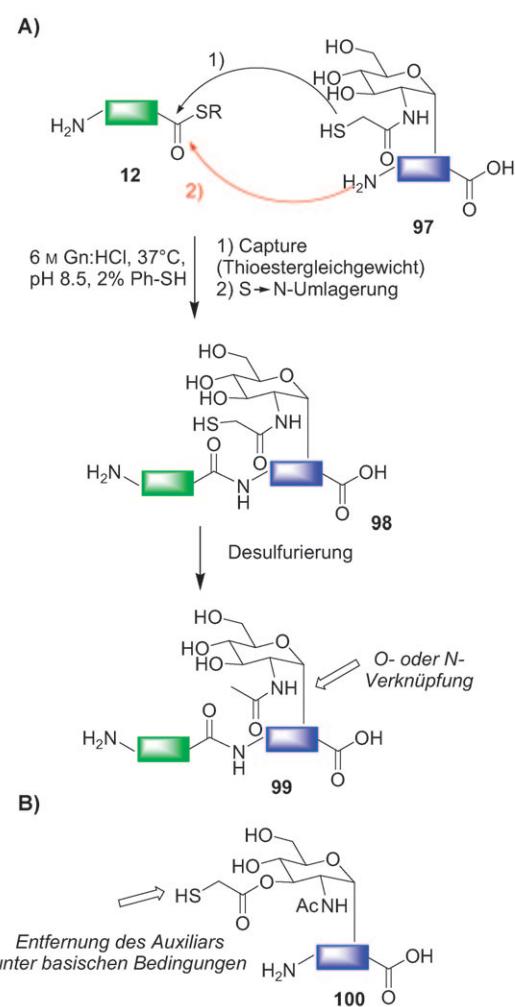
Schema 17. Cys-freie Glycopeptidkupplung mithilfe des Tmb-Auxiliars.

volle Reste in der Nähe des Glycans zulässt.^[146] Ein β-Thioessigsäureester in C3-Position eines GalNAc im Auxiliar **100** kann ebenfalls verwendet werden; in diesem Fall sind basische Abspaltungsbedingungen mit Hydrazin möglich (Schema 18B).^[147]

In einer kürzlich veröffentlichten Studie der gleichen Gruppe wurde ein direktes Aminolyseverfahren beschrieben, das eine Kupplung zwischen einem (Glyco-)Peptidthioester und einem anderen (Glyco-)Peptid an einer Ligationsstelle ohne Cys bzw. Zuckerauxiliar vollzieht.^[148] In dieser Ligation, die auf frühen Beobachtungen von Wieland aufbaut, wurde ein optimierter NMP/HEPES-Puffer mit neutralem bis leicht basischem pH verwendet, der die Amine, dabei insbesondere am N-Terminus des C-Peptids, ausreichend nucleophil werden lässt, um eine Aminolyse mit einem N-Peptidthioester ausführen zu können. Gleichzeitig unterdrückt das Puffersystem die Hydrolyse der N-Peptidthioester. Allerdings müssen bei diesem Verfahren zusätzliche Aminogruppen in Lys-Seitenketten geschützt werden, was die allgemeine Anwendung als chemoselektive Ligationsmethode einschränkt.

3.4. Andere Methoden mit chemoselektivem Einfangsschritt

Die bisher vorgestellten Methoden beruhen auf Varianten der NCL, in denen ein Thioester-Gleichgewicht (oder eine Disulfidbildung) den Einfangsschritt bildet, bevor die abschließende Amidbindung durch eine S→N-Verschiebung erzeugt wird. Die folgenden Methoden verwenden andere



Schema 18. Zuckerunterstützte Ligation mit A) β -Thioacetamid- und B) β -Thioessigsäure-Auxiliar.

chemoselektive Reaktionen für den anfänglichen Einfangsschritt (eine ausführliche Diskussion chemoselektiver Reaktionen wird in Abschnitt 4 gegeben).

3.4.1. Spurlose Staudinger-Ligation

Die spurlose Staudinger-Ligation wurde erstmals im Jahr 2000 durch Raines und Bertozzi beschrieben. Es handelt sich um eine spurlose Variante^[149,150] der zuvor von Bertozzi beschriebenen (nicht-spurlosen) Staudinger-Ligation, die für die chemoselektive Funktionalisierung metabolisch veränderter Azidoglycane in zellulärer Umgebung entwickelt wurde (siehe Abschnitt 4.2.4).^[150,158] Beide Ligations beruhen auf der von Bertozzi als chemoselektiv identifizierten^[150,158] Staudinger-Reaktion, in der ein Azid mit einem Phosphan zu einem Iminophosphoran reagiert.^[151]

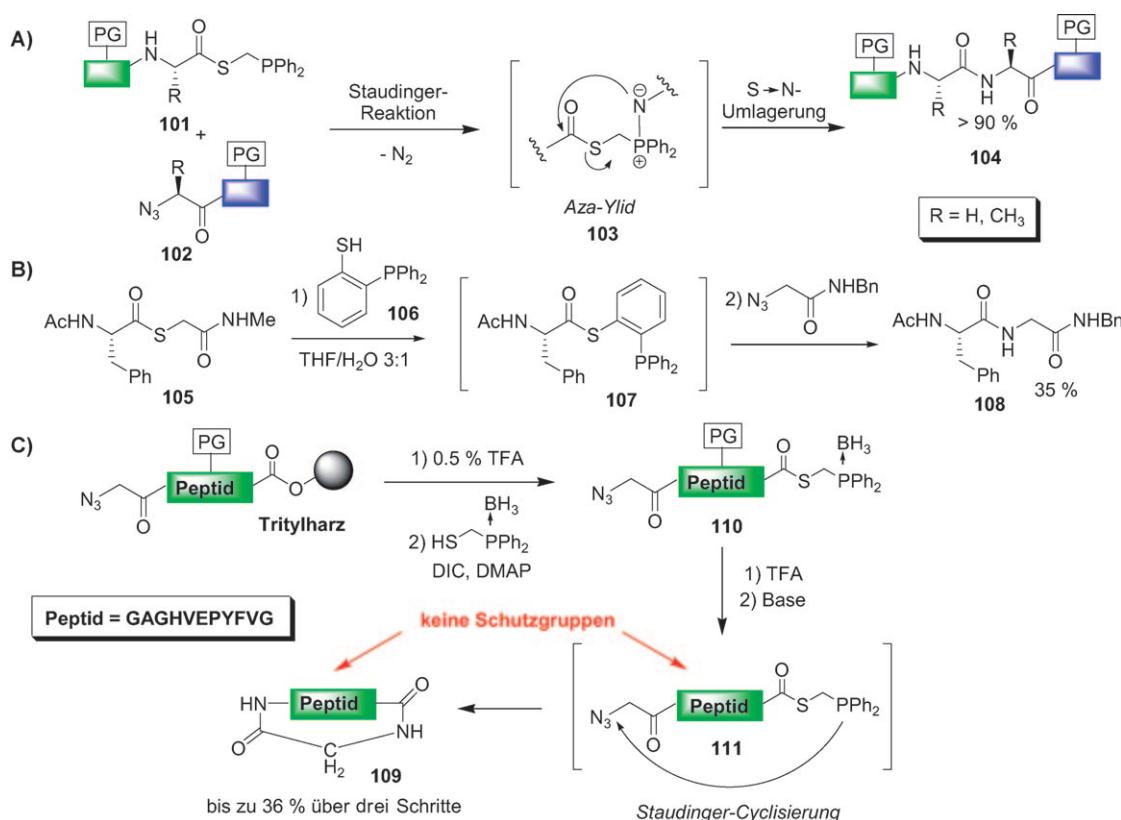
In der spurlosen Staudinger-Ligation kann das Iminophosphoran **103**, das aus einer α -Azidoaminosäure bzw. dem Peptid **101** und einem Phosphanylthioester **102** in einem (chemoselektiven) Einfangsschritt gebildet wird, einen intramolekularen Angriff auf den internen Thioester ausführen und in hohen Ausbeuten eine native Amidbindung an einer

Gly-Gly/Ala-^[149] oder sogar einer Ala-Ala-Ligationsstelle (**104**) vermitteln (Schema 19 A).^[152] In ähnlicher Weise kann ein *ortho*-substituiertes Diphenylphosphanylarylthiol **106** an einem Thioester-Gleichgewicht mit **105** teilnehmen und so *in situ* den Phosphanylthioester **107** bilden, der als Substrat für die Reaktion mit **108** agieren kann (Schema 19 B).^[149a] Anders als die NCL benötigt die spurlose Staudinger-Ligation kein Cys an der Ligationsstelle. Eine wasserlösliche Variante der spurlosen Staudinger-Ligation wurde ebenfalls entwickelt^[153] und ausführlichen mechanistischen Studien unterzogen.^[154] In zahlreichen Anwendungen wurden Peptide ortsspezifisch auf Oberflächen immobilisiert^[155] und Ligations von geschützten (Glyco-)Peptidfragmenten^[156] oder Cyclisierungen von nicht-funktionalisierten Lactamen ausgeführt.^[157] Bis vor kurzem wurde die spurlose Staudinger-Ligation – im Gegensatz zur chemoselektiven oder „bioorthogonalen“ Staudinger-Ligation (siehe Abschnitt 4)^[158] – nur sehr eingeschränkt in Bezug auf ihre chemoselektiven Eigenschaften untersucht.^[156b,c,159] In einer kürzlich erschienenen Studie wurde die spurlose Staudinger-Ligation für die Cyclisierung ungeschützter Peptidsequenzen mit elf Aminosäuren (**109**) verwendet, die alle Aminosäuren des cyclischen Proteins Microcin J25 enthielten (Schema 19 C). Der Beleg, dass alle natürlich vorkommenden Aminosäuren in diesem Verfahren toleriert werden, steht noch aus. Zumindest wurde aber gezeigt, dass Boran-geschützte Peptidazidophosphanylthioester **110** unter sauren Bedingungen mit TFA entschützt werden können. Hierbei wurden in einem Schritt die Schutzgruppen der Peptidseitenkette und die Boranschutzgruppe entfernt und das Phosphoniumsalz **111** erzeugt, das nach Basenzugabe cyclisierte.^[160]

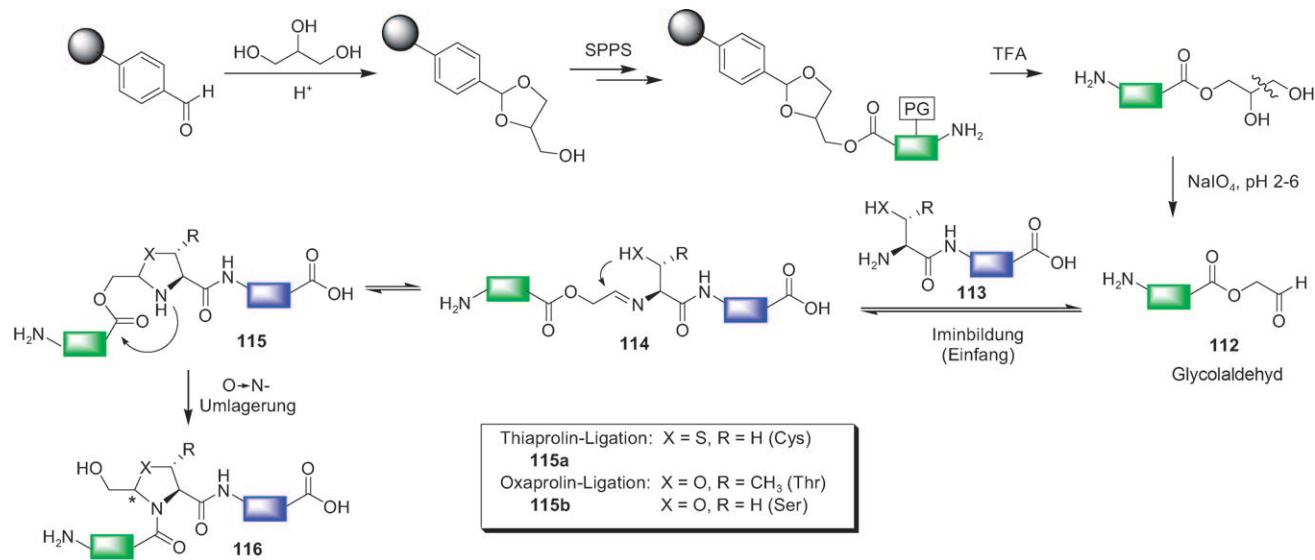
3.4.2. Iminligationen mit anschließender Pseudoprolinbildung

Eine von Tam eingeführte Ligationsmethode liefert ein Pseudoprolin an der Ligationsstelle durch die Reaktion eines C-terminalen Glycolaldehydpeptids **112** mit einem zweiten Peptid **113**, das ein Cys, Thr oder Ser am N-Terminus trägt (Schema 20).^[161] Diese Reaktion wird durch die Bildung des Imins **114** gestartet, an das die Thiol- oder Hydroxyfunktion der N-terminalen Aminosäure unter Bildung des tautomeren Thiazolidins (Thz, **115a**) bzw. Oxazolidins (Oxz, **115b**) addieren kann. Diese Peptidderivate können anschließend eine irreversible O–N-Verschiebung über einen bicyclischen fünfgliedrigen Übergangszustand zu einem Hydroxymethylen-substituierten Pseudoprolin **116** an der Ligationsstelle ausführen, das ein neues stereogenes Zentrum an der C2-Position trägt.^[162] Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass die Thiazolidinbildung in wässrigen Lösungen durchgeführt werden kann, während die Oxazolidinsynthese wasserfreie Bedingungen benötigt.

Die Imin-Ligation wurde zum Aufbau Prolin-reicher Analoga des helicalen, antibakteriellen, 59 Aminosäuren enthaltenden Peptides Bactenecin eingesetzt.^[163] Tam und Mitarbeiter verwendeten hier eine Dreisegment-Kondensation, in der die erste Verknüpfung die Bildung des Thiazolidins mit einem Cys-Peptid ist, die schneller abläuft als die entsprechende Oxazolidinbildung eines Thr-Peptids. Als eine weitere Segmentligationsstrategie wurde die oxidative Um-



Schema 19. A) Mechanismus der spurlosen Staudinger-Ligation. B) In-situ-Bildung eines Phosphanylthioesters für die spurlose Staudinger-Ligation. C) Staudinger-Cyclisierung nach saurer Entschützung von Boran-geschützten Phosphanylthiolen. DIC = Diisopropylcarbodiimid.

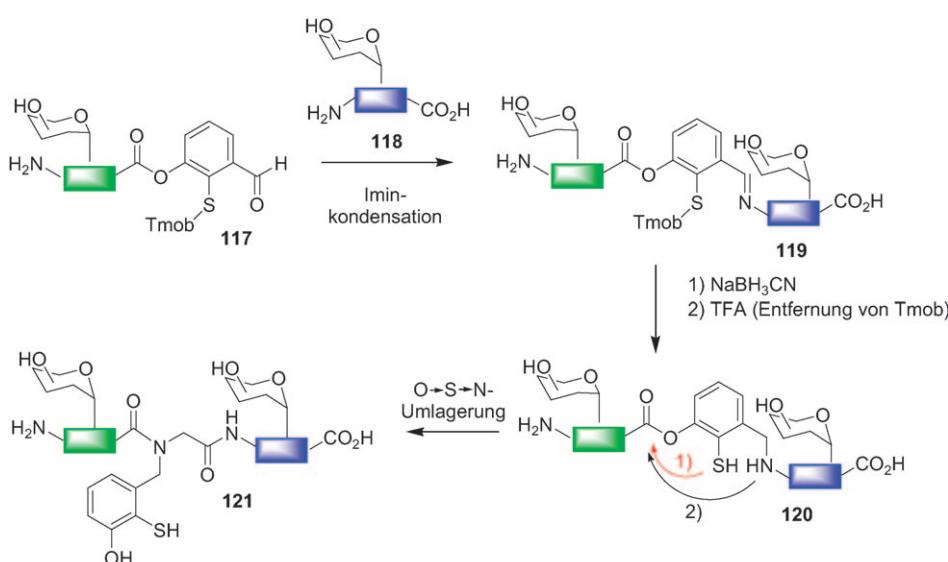


Schema 20. Pseudoprolin-Ligation ungeschützter N-Peptide mit C-terminalen Glycoaldehyd-C-Peptiden.

setzung eines C-terminalen Glycerolesters eines Peptid-dimers zum Glycoaldehyd mit anschließender Bildung des zweiten Pseudoprolins eingesetzt. Die Syntheseprodukte zeigten ähnliche biologische Aktivitäten wie die Naturstoffe, wobei Strukturuntersuchungen auf eine höhere Population der Polyprolinhelix vom Typ II im natürlichen Polypeptid hinwiesen.

3.4.3. Peptidligation durch reduktive Aminierung

Eine andere Cys-freie Ligation basiert auf Danishefskys Phenolester-Strategie mit einem Tmob-geschützten *ortho*-Thiol, die über eine O→S→N-Verschiebung verläuft und Kupplungen zwischen verschiedenen Aminosäuren ermöglicht, von denen eine Gly oder Ala sein sollte (Schema 21).^[164]



Schema 21. Cys-freie Glycopeptidkupplung durch reduktive Aminierung. Tmob = 2,4,6-Trimethoxybenzyl.

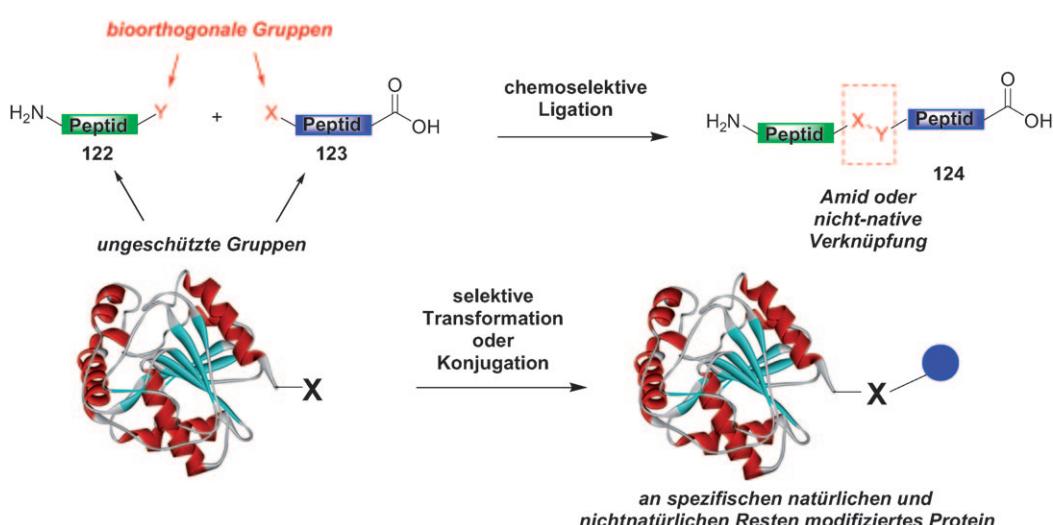
Das Verfahren verwendet einen Aldehyd in *meta*-Position zum Phenolester **117**, welcher eine reduktive Aminierung mit dem N-Terminus eines ungeschützten Peptids **118** als Einfangsschritt zur Bildung von **119** ermöglicht. Entschüttung des *ortho*-Thiols führt zu einer O→S-Verschiebung, bevor das sekundäre Amin eine abschließende S→N-Verschiebung (**120**) ausführen kann. Das Auxiliar in **121** kann unter sauren Bedingungen (in ähnlicher Weise wie das Dawson-Auxiliar) entfernt werden. Davon abgesehen, dass diese Entschüttungsbedingungen glycosidische Bindungen spalten könnten, besteht ein weiterer Nachteil dieser Methode in einer möglichen Epimerisierung an der C-terminalen Aminosäure während der Bildung des Phenolesters (was die Einsatzmöglichkeit auf Gly und Pro begrenzt). Das erste Problem wurde teilweise durch ein Verfahren gelöst, bei dem phenolische Ester über Ag⁺-vermittelte Kupplungen an ein Peptid mit einem freien Amin am N-Terminus verknüpft werden (auxi-

liarfreie Cys-freie Kupplung).^[165] Obwohl auch diese Strategie zur Epimerisierung der Peptidthioester führen kann und nicht chemoselektiv ist, da zusätzliche Nucleophile in den Peptidseitenketten geschützt werden müssen, konnten hochkomplexe Glycopeptide in sehr guten Gesamtausbeuten erhalten werden.

4. Ligations und Modifikationen von Peptiden und Proteinen durch chemoselektive Reaktionen

Chemoselektive Ligationsstrategien ermöglichen den selektiven Aufbau einer kovalenten Bindung zwischen zwei hoch komplexen biologischen Molekülen ohne auf aufwendige Schutzgruppentransformationen zurückgreifen zu müssen. Neben dem zweistufigen Capture/Rearrangement-Konzept (siehe Abschnitte 2 und 3) wurden zahlreiche organische Reaktionen identifiziert, die eine „direkte“ chemoselektive Bildung einer chemischen Bindung wie in **124** ermöglichen (Schema 22). Im Idealfall verlaufen diese chemoselektiven Reaktionen zur Bildung eines nativen Linkers schnell unter physiologisch relevanten Bedingungen (neutraler pH in wässrigen Medien bei Raumtemperatur). Die Bindung wird hierbei aus zwei „bioorthogonalen“^[166] funktionellen Gruppen in **122** und **123** gebildet, die keine Nebenreaktionen mit anderen funktionellen Gruppen einer biologischen Umgebung eingehen.

Chemoselektive Reaktionen wurden nicht nur genutzt, um homogene natürliche oder modifizierte Peptide und Proteine durch Ligation von Peptidsträngen herzustellen,



Schema 22. Chemoselektive Reaktion zur nativen oder nicht-nativen Konjugation von Polypeptiden und zur selektiven Funktionalisierung natürlicher Aminosäuren.

sondern auch um ortsspezifische Funktionalitäten oder natürliche Proteinmodifikationen in Proteinarchitekturen einzubauen.^[167] Diese Anwendungen haben die Lokalisierung und Funktionsstudien von post- oder cotranslational modifizierten Proteinen sogar in zellulärer Umgebung und lebenden Organismen entschieden vorangetrieben. Ein Beispiel ist die ortsspezifische Konjugation biophysikalischer Sonden, z. B. fluoreszenter Markierungen, an Biopolymere (bioorthogonale chemische Reporterstrategie).^[167] In diesem Verfahren wird eine nichtnatürliche chemische Funktionalität unter Zuhilfenahme des zellulären Biosyntheseapparates eingeführt und danach mit einem exogen zugefügten biophysikalischen Markierungsreagens chemoselektiv derivatisiert, was eine Verfolgung von Biomolekülen in nativer Umgebung ermöglicht.^[167b]

Im Folgenden geben wir einen Überblick über solche Beispiele und zeigen Strategien für die Ligation und/oder Funktionalisierung von Proteinen auf. Diese teilweise noch vorläufigen Strategien sind in drei Kategorien unterteilt: chemoselektive Bildung von nativen (Abschnitt 4.1) und nicht-nativen Bindungen, die mitunter auch in komplexen Proteinumgebungen aufgebaut wurden (Abschnitt 4.2), sowie die selektive Umwandlung natürlich vorkommender Aminosäuren (Abschnitt 4.3).

Einige dieser Techniken können auf rekombinante biologische Materialien oder isolierte Naturstoffe angewendet werden, allerdings werden (außer in den in Abschnitt 4.3 dargestellten Reaktionen) spezielle biochemische Verfahren benötigt, um eine geeignete bioorthogonale (nichtnatürliche) Gruppe in das zu modifizierende Molekül einzuführen. Mit anderen Worten wird eine nichtnatürliche funktionelle Gruppe in chemoselektiven Reaktionen verwendet (vor allem bei den in Abschnitt 4.2 erläuterten Fällen), die schon vor der Ligation oder Modifikation in das Protein eingeführt wurde. Auf diese Weise wird eine ortsspezifische Modifikation realisiert, da die nichtnatürliche funktionelle Gruppe gegenüber der natürlich vorkommenden Funktionalität selektiv umgesetzt werden kann.

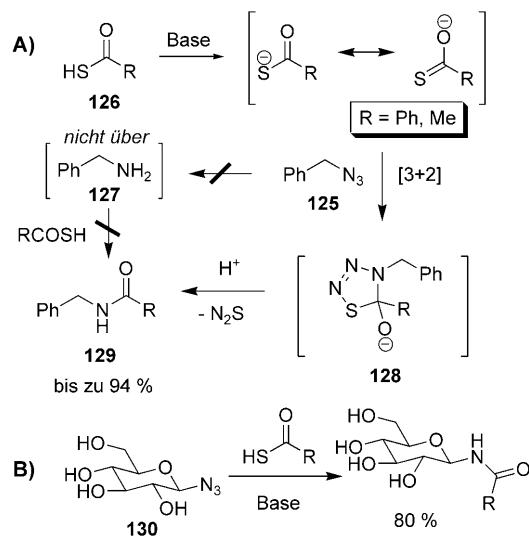
Zur Herstellung modifizierter Proteine mit nichtnatürlichen funktionellen Gruppen existieren mehrere biochemische Methoden, die ausführlich in der Literatur beschrieben sind. Diese Methoden (die fast alle zur Einführung von Aziden in Biopolymere verwendet worden sind) umfassen, wie oben erwähnt, den Einbau nichtnatürlicher Gruppen mithilfe der zellulären Biosynthese, wie z. B. das metabolische Glycan-Engineering durch den nichtnatürlichen Kohlenhydratstoffwechsel,^[166–168] die nichtnatürliche Proteintranslation,^[169] die Exprimierung über auxotrophe Organismen,^[170] die posttranskriptionale^[171a,b] oder enzymatische Modifikation^[171c,d] von Proteinsequenzen oder auch die semisynthetischen Strategien aus Abschnitt 2.3.

4.1. Chemoselektive Reaktionen zur Bildung einer nativen Amidbindung

4.1.1. Thiosäure/Azid-Amidierung

Die Thiosäure/Azid-Amidierung beruht auf der Amidbildung zwischen Aziden **125** und Thiosäuren **126**

(Schema 23), wie sie erstmals in den 80er Jahren von Just und Mitarbeitern beschrieben wurde.^[172] Dieser Prozess zur Bildung von **129** verläuft nicht über eine Reduktion zu Aminen **127**, sondern über eine Bildung eines Thiatriazolinderivats

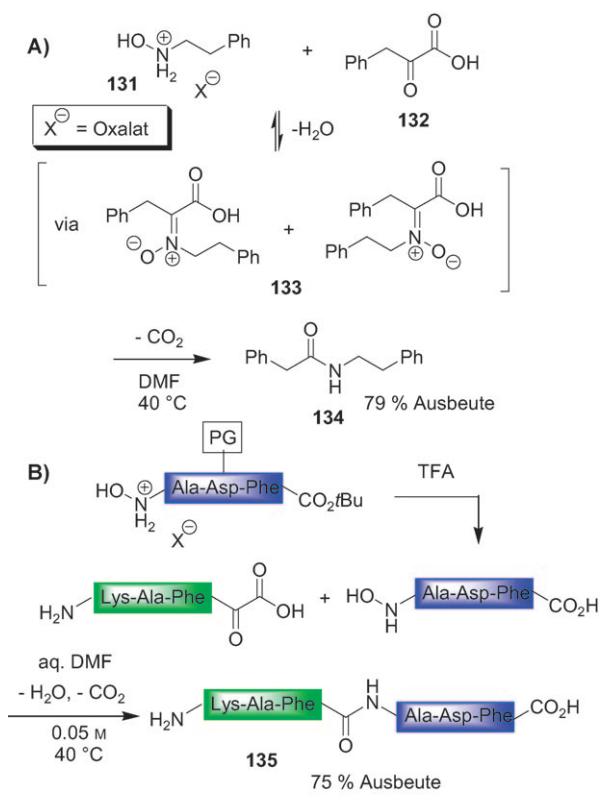


Schema 23. A) Mechanismus der Thiosäure/Azid-Aminierung und B) Anwendung in der Synthese von β-Glycosylamiden.

128 als Ergebnis einer [3+2]-Cycloaddition (Schema 23 A, siehe auch Abschnitt 4.2.1).^[173] Kürzlich wurden detaillierte Untersuchungen vorgenommen, die belegen konnten, dass die Reaktion in verschiedenen polaren und unpolaren organischen Lösungsmitteln und in Wasser verwendet werden kann und viele Substrate wie Glycosylazide **130** toleriert (Schema 23 B).^[174] Darüber hinaus wurde eine RuCl₃-vermittelte Variante mit hohen Ausbeuten für die Umsetzung auch sterisch gehinderter Azide beschrieben.^[175] Auf der Grundlage dieser Reaktion wurden außerdem potenzielle chemoselektive Ligations von Sulfonamidderivaten entwickelt, obgleich die Anwendung zur Ligation längerer Peptide noch aussteht.^[176]

4.1.2. Chemoselektive decarboxylierende Amidligation

Eine sehr vielversprechende Methode von Bode et al. verwendet eine decarboxylierende Kondensation von *N*-Alkylhydroxylaminen **131** mit α-Ketosäuren **132** zum chemoselektiven Aufbau von Amidbindungen **134** (Schema 24 A).^[177] Im Unterschied zu fast allen anderen Amidbildungen umfasst diese Reaktion keinen Additions-Eliminierungs-Mechanismus einer aktivierten Carbonsäure, sondern die Decarboxylierung und Eliminierung von Wasser aus einem Halbaminal. Wie mechanistische Studien belegten, wird das Halbaminal über ein Nitron-Intermediat **133** aus einem Hydroxylamin und einer α-Ketosäure gebildet. Beide Ausgangsverbindungen sind durch Synthesen zugänglich.^[178] Das Hydroxylamin sollte als Oxalatsalz verwendet werden, um Zersetzung zu vermeiden. Optimierungsstudien ergaben, dass die Reaktion bei 40 °C in polaren Lösungsmitteln in sehr guten Ausbeuten (70–80 %) abläuft und keine Epimerisie-



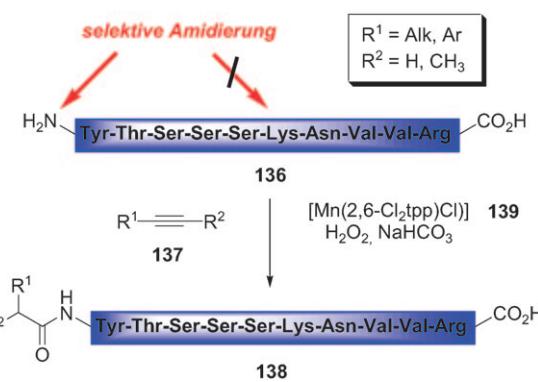
Ligationsstellen: Pro-Ala, Val-Gly, Ala-Ala

Schema 24. Chemoselektive decarboxylierende Amidkondensation:
A) Mechanismus und B) Anwendung in der Synthese eines ungeschützten Hexapeptids.

nung der α -Ketosäuren auftritt. Entscheidend an dieser Reaktion ist aber, dass ungeschützte Peptide mit Lys- und Asp-[¹⁷⁶] sowie Trp-, Tyr- und Arg-Bausteinen[¹⁷⁷] verknüpft werden können, wie mit der Synthese des Hexapeptids **135** demonstriert wurde (Schema 24B). Mögliche Ligationsstellen schließen dabei Phe-Ala, Pro-Ala, Val-Gly und Ala-Ala ein. Auch andere Hydroxylaminderivate wie *N*-Methoxyalkylamine oder Isoxazolidine können als Ausgangsverbindungen in diese Reaktion eingesetzt werden. Das letztgenannte Substrat wurde in der iterativen Kondensation zu β^3 -Oligopeptiden unter wässrigen Bedingungen verwendet.^[179]

4.1.3. Oxidative Umsetzung von N-terminalen Aminen in Peptiden zu Amiden

Die oxidative Umsetzung eines N-terminalen Amins in einem ungeschützten Peptid **136** mit einem Alkin **137** zu einem Amid **138** wurde in einer kürzlich erschienenen Publikation beschrieben (Schema 25).^[180] Die Transformation verwendet einen Porphyrinmangan-Katalysator **139** mit Oxon oder Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel. Wie an mehreren Peptidsubstraten gezeigt wurde, kann der Katalysator eine selektive Umwandlung der N-terminalen α -Aminogruppe in einem Peptid gegenüber anderen Funktionalitäten wie den ϵ -Aminogruppen von Lys-Seitenketten vermitteln. Andere funktionelle Gruppen beeinflussen die Gesamtaus-



Schema 25. Selektive oxidative Amidsynthese aus N-terminalen Aminen in Peptiden. $2,6\text{-Cl}_2\text{tpp}$ = Tetrakis(2,6-dichlorphenyl)porphyrin.

beute bezüglich der Amidbildung nicht, wobei Cys und Met während des Prozesses oxidiert werden und mit Reduktionsmitteln wiederhergestellt werden müssen. Strukturanalysen der Peptide erbrachten Hinweise auf die Ursache dieser bemerkenswerten Selektivität. Neben den elektronischen Eigenschaften der N-terminalen α -Aminogruppe sind demnach Wasserstoffbrücken der Lys-Seitenketten als konformativer Faktor beteiligt.

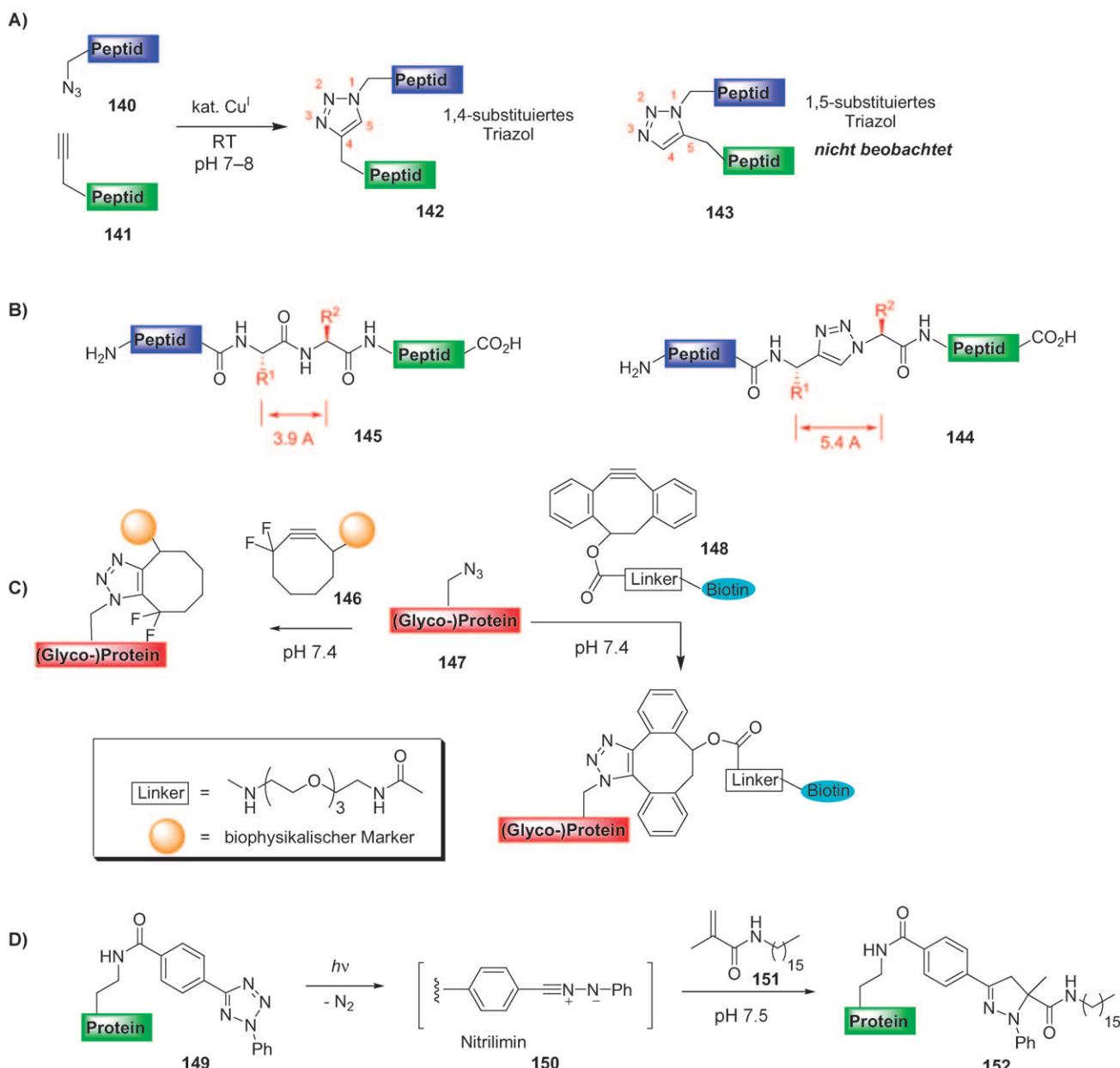
4.2. Chemoselektive Reaktionen zur Bildung nicht-nativer Bindungen

Die nachfolgend beschriebenen Reaktionen zeichnen sich durch ein besonderes Selektivitätsmuster aus: Ihnen ist gemeinsam, dass zwei funktionelle („bioorthogonale“) Gruppen selektiv zur Bildung einer nicht-nativen Bindung in Gegenwart anderer funktioneller Gruppen einer Peptid- oder Proteinumgebung reagieren. Obwohl einige dieser Reaktionen schon zum Standardrepertoire der chemischen Synthese gehören und in der chemischen Biologie häufig eingesetzt werden, sind nach wie vor zahlreiche Forschungsaktivitäten auf die Entwicklung schneller und milder chemoselektiver Reaktionen zur direkten Synthese biologisch aktiver Verbindungen gerichtet, deren biologische Funktion weder durch die nicht-native Bindung noch durch die Reaktionsbedingungen beeinträchtigt wird. Ebenfalls intensive Studien gelten der Einführung bioorthogonaler Funktionalitäten in Biopolymere mithilfe biochemischer Methoden. Diese Verfahren erfordern biologisch inerte funktionelle Gruppen, die biologische Stoffwechselwege überdauern.

4.2.1. 1,3-Dipolare Cycloaddition

4.2.1.1. Cu¹-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition: Klick-Kupplung

Ungefähr 40 Jahre nach der ersten Entdeckung durch Huisgen et al.^[181] haben die Gruppen um Meldal^[182] und Sharpless^[183] eine Cu¹-katalysierte Variante der [3+2]-Cycloaddition von Aziden **140** und Alkinen **141** entwickelt, die gemeinhin als Klick-Reaktion bekannt ist (Schema 26 A).^[184] Die Klick-Reaktion liefert chemoselektiv ein 1,4-substituiertes Triazol, während die unkatalysierte Variante 1,4- und 1,5-



Schema 26. Klick-Kupplung: A) Peptidkupplung über die Cu¹-katalysierte Bildung eines 1,4-substituierten Triazols. B) Abmessung einer Triazolbrücke im Vergleich mit einer nativen Amidbindung. C) Ringspannungsinduzierte Cycloaddition von Azidoproteinen. D) Photoinduzierte 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen 2,5-Diaryl-tetrazol-modifizierten Proteinen und einem Alken.

Isomere (**142** und **143**) in fast gleichen Verhältnissen ergibt.^[185] Des Weiteren läuft die katalytische Reaktion schnell, chemoselektiv gegenüber einer Vielzahl von funktionellen Gruppen, in hohen Ausbeuten und unter milden Bedingungen in einer Reihe von Lösungsmitteln ab, einschließlich physiologischen Puffern. Sie wurde mechanistisch untersucht^[186] und hat zahlreiche Anwendungen in den Material- und Polymerwissenschaften^[187] oder der spezifischen Markierung von Biokonjugaten gefunden,^[188] z.B. beim Monitoring von Enzymaktivitäten.^[189,202b] Die Klick-Reaktion ist schon mehrmals in Übersichtsartikeln dargestellt worden,^[187–193] einmal sogar mit Schwerpunkt auf der Synthese von Peptidomimetika.^[194]

Die verschiedenen Anwendungen der Klick-Reaktion in der Peptidkonjugation beruhen auf dem besonderen räumlichen Aufbau des Triazols **144**, für das hinsichtlich Abmessungen und Planarität eine gewisse Ähnlichkeit mit einer Amidbindung (**145**) postuliert wurde (Schema 26B).^[194] Neben der ersten Anwendung von Meldal für den Aufbau von Peptidbibliotheken in einem Split-and-Mix-Ansatz^[195] wurde die Klick-Kupplung für heterocyclische Modifikationen von Peptidrückgratstrukturen,^[196] für die Synthese von β -Turn-Mimetika^[197] und cyclischen Peptiden^[198] sowie für die Bildung von Surrogaten von *cis*-Peptidbindungen in Proteinen^[199] und von Peptid-Peptid-Konjugaten eingesetzt (Schema 26A).^[200] Die beiden Arten von Reaktionspartnern,

Azide **140** und Alkine **141**, können durch Standardverfahren der SPPS in Peptide eingeführt werden, beispielsweise durch eine abschließende Kupplung einer α -Azidoaminoäure, die durch Cu^{II}-katalysierten Diazo-Transfer aus den entsprechenden α -Aminoäuren zugänglich sind.^[201]

Da sowohl Azide als auch Amine ideale funktionelle Gruppen für einen biochemischen Einbau in Biopolymere sind und die Klick-Reaktion in biologischem Milieu chemoselektiv ausgeführt werden kann, ist es naheliegend, dass die Klick-Reaktion häufig zur Konjugation von Naturstoffen (insbesondere von Proteinen,^[202] nichtribosomalen Peptiden^[203] und anderen Naturstoffen^[204]) sowie zur Immobilisierung von Peptiden und Proteinen auf Oberflächen^[205] eingesetzt wurde. In letzterem Fall wird ein Azid oder Alkin durch EPL am C-Terminus eines Proteins **172** angebracht und zur Verankerung an einer geeignet funktionalisierten Glasoberfläche genutzt (siehe Schema 29B in Abschnitt 4.2.4).^[206,207] Weitere Anwendungen dieser Reaktion schließen die Peptidkonjugation an Polymerarchitekturen,^[208] die Konjugation von Radiotraceren^[209] und die Verknüpfung von Kohlenhydraten^[99,210] oder Lipiden^[211] an Peptid- oder Proteinseitenketten ein.

4.2.1.2. Ringspannungsinduzierte Cycloaddition

Einer der Nachteile der Cu^I-katalysierten Klick-Kupplung ist die Toxizität des Kupfers, die Anwendungen *in vivo* einschränkt.^[212] Als Alternative entwickelten daher Bertozzi et al. eine ringspannungsinduzierte Cycloaddition, die die Ringspannung eines cyclischen Alkins, in diesem Fall eines Cyclooctins **146**, als Triebkraft für die Cycloaddition nutzt.^[213] Die Platzierung von zwei Fluor-substituenten in α -Position des Cycloalkins führte zu einer Beschleunigung der Reaktion und ermöglichte eine schnelle Biokonjugation biophysikalischer oder funktioneller Markierungen an Azido-funktionalisierte (Glyco-)Proteine **147** für Studien in lebenden Zellen^[214] und in Zebrafischen^[215] (Schema 26C). Um die Hydrophilie zu erhöhen und nichtspezifische Adhäsion zu minimieren, wurden kürzlich Dimethoxy-substituierte Azacyclooctine entwickelt.^[216] In einem anderen Beispiel wurden 4-Dibenzocyclooctinole **148** für Markierungs-experimente mit Azidglycobiopolymeren in lebenden Zellen verwendet.^[217] In **148** verstärken zwei aromatische Ringe die Ringspannung (und damit die Reaktivität für die Triazolbildung) und vermindern gleichzeitig die Anfälligkeit der Dreifachbindung gegen nucleophilen Angriff durch biologische Nucleophile.

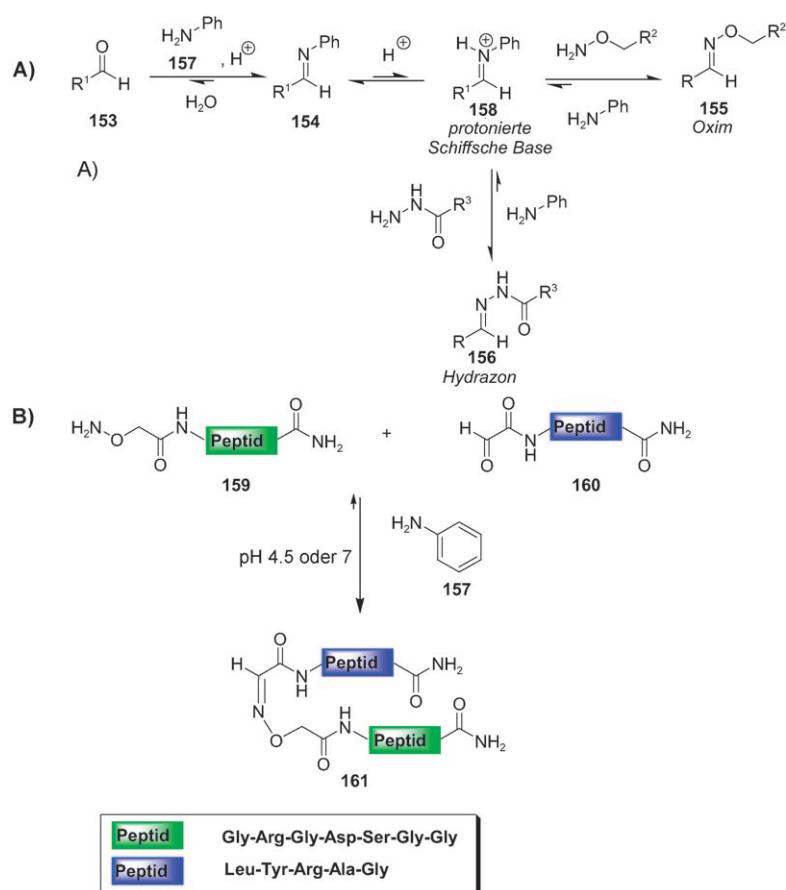
4.2.1.3. Photoinduzierte 1,3-dipolare Cycloaddition

In einer erst kürzlich erschienenen Studie wurde eine photoinduzierte 1,3-dipolare Cycloaddition beschrieben (Schema 26D).^[218] In dieser Reaktion wird ein Diaryl-substituiertes Tetrazolderivat in **149**, das in ein Protein eingebaut werden kann, einer Cycloreversion nach UV-Bestrahlung unterworfen, wodurch in situ ein Nitrilimin **150** gebildet wird. Dieser 1,3-Dipol kann mit einem elektronenarmen Alken wie **151** zu einem Pyra-

zolincycloaddukt wie **152** reagieren. Die chemoselektive Reaktion zu **152** verläuft in gepufferter Lösung bei Raumtemperatur sehr schnell (1 min), was eine Lipidierungsstrategie durch Reaktion mit einem geeigneten Lipid-Dipolarophil **151** ermöglicht. Allerdings muss die Anwendung in bioorthogonalen Kupplungen für In-vivo-Studien noch demonstriert werden, da die Tetrazol-Einheit bisher durch chemische Methoden in Biopolymere eingeführt werden musste (im Unterschied zu den sehr gut etablierten Verfahren für Azide^[212a]). In der Originalpublikation wurde das Tetrazol entweder direkt an oberflächenexponierte Lys-Nucleophile eines GFP-Proteins gekuppelt oder mithilfe einer Semisynthesestrategie erhalten.^[219]

4.2.2. Oxim- und Hydrazonkondensation durch nucleophile Amin-Katalyse

Die Iminkondensation von Ketonen und Aldehyden **153** mit primären Aminen als Nucleophilen hat besondere Aufmerksamkeit auf dem Gebiet der Biokonjugation erlangt (Schema 27; siehe auch Schema 21).^[220] Die Reaktion mit primären Aminen verläuft bevorzugt unter sauren Bedingungen unter reversibler Bildung eines Imins **154**.^[221] Um eine nicht-hydrolyzable Bindung zu erhalten, kann das Imin mit NaCNBH₃ reduziert werden. Alternativ kann ein Amin-Nucleophil mit einer elektronenreichen Gruppe in α -Position



Schema 27. A) Oxim- und Hydrazonbildung mit B) anschließender Peptidligation durch nucleophile Amin-Katalyse.

verwendet werden, wie etwa in der Bildung eines Oxims **155** oder Hydrazons **156**. Dieses Konzept wurde zur ortsspezifischen Modifikation von Proteinen sowohl *in vitro*^[222] als auch *in vivo* genutzt,^[171,223,224] wobei ein Keton mithilfe der Amber-Suppressor-tRNA-Methode oder durch metabolisches Glycan-Engineering in ein Protein eingebaut und mit Hydrazin-Fluorophoren zur Reaktion gebracht wurde.^[225] Das Konzept der nucleophilen Amin-Katalyse für die Bildung von Halbcarbazonen^[226] wurde durch Dawson et al. kürzlich auf bekannte Oxim- und Hydrazonligationen übertragen, um eine nicht-hydrolysierbare Bindung unter physiologischen Bedingungen aufzubauen.^[227,228] Die Synthese verwendete Anilin (**157**) als Katalysator, der die protonierte Schiff-Base **158** sogar bei pH 7 in signifikanten Mengen lieferte. Die Schiff-Base kann dann schnell in das Oxim oder Hydrazon weiterreagieren (Schema 27A). Beide Reaktionen wurden zur Ligation von Peptiden aus zwei Vorstufenfragmenten verwendet (wie in Schema 27B für die Oximbildung in **161** bei pH 4.5 bzw. 7 dargestellt) und dürften zukünftig in Proteinderivatisierungen und Ligationsstrategien Anwendungen finden.^[227b]

4.2.3. Peptidligation durch Diels-Alder-Reaktionen

Für Umsetzungen der Maleimidogruppe haben Waldmann und Mitarbeiter kürzlich die [4+2]-Cycloaddition als eine chemoselektive Reaktion für die Konjugation von Peptiden und die Funktionalisierung von Proteinen identifiziert (Schema 28A).^[229] In diesem Fall reagiert ein Maleimid-substituiertes Peptid **162** als Dienophil mit einem N-Peptid mit C-terminalem Dien **163** zu einem *endo*-Diels-Alder-Produkt **164**. Die Dieneinheit kann in das Peptid durch normale Thioestersyntheserouten eingeführt werden (siehe Abschnitt 2.3.3). Die Diels-Alder-Reaktion sollte unter leicht sauren Bedingungen (pH 5.5–6.5) ausgeführt werden, um die

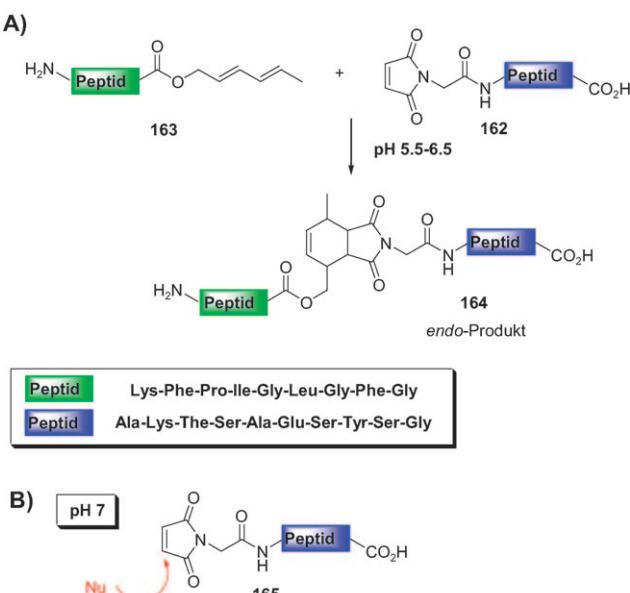
konjugierte Addition an **165** durch Amin-Nucleophile bei neutralem pH zu verhindern (Schema 28B). Diese Reaktionsbedingungen können in chemoselektiven Kupplungen von Vorteil sein, die nicht unter den Bedingungen der EPL funktionieren. Dies wurde z. B. anhand der ortsspezifischen Modifikation des Rab7-Proteins gezeigt.

4.2.4. Staudinger-Ligation

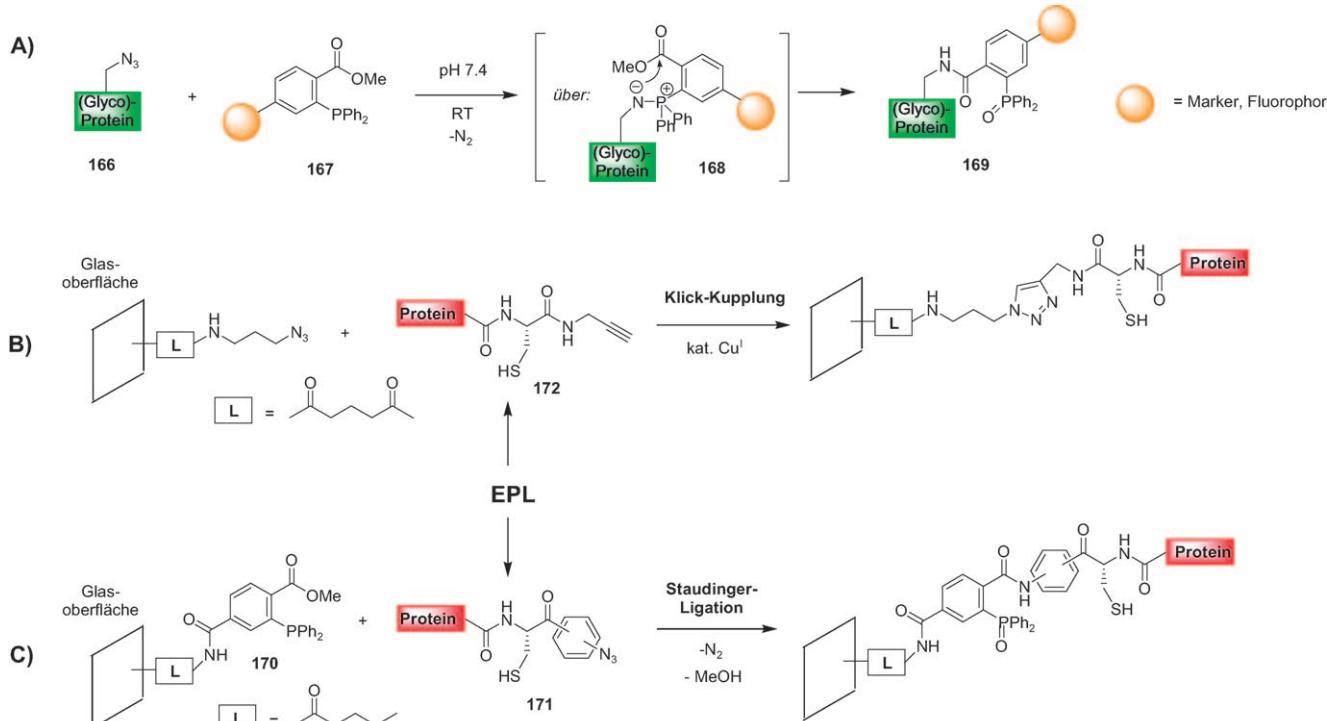
Eine der ersten chemoselektiven Reaktionen für die ortsspezifische Funktionalisierung von Biopolymeren war die von Bertozzi entwickelte Staudinger-Ligation.^[158a,230] In ihrer nicht-spurlosen Variante wird ein Iminophosphoran **168** (siehe Abschnitt 3.4.1) aus einem Azidobiopolymer **166** und einem Phosphanylaryl **167** gebildet (Schema 29 A). Das Iminophosphoran **168** kann einen intramolekularen Angriff mit einem *ortho*-substituierten Ester als internem Elektrophil (das die konkurrierende Staudinger-Reduktion unterdrückt) zur Bildung eines Amids im Konjugat **169** ausführen, das nun eine Phosphinoxidgruppe trägt. In der ersten bahnbrechenden Anwendung wurde die Staudinger-Ligation für die selektive Markierung von Sialinsäuren eingesetzt, die zuvor durch metabolisches Glycan-Engineering mit Aziden versehen wurden.^[150,158a,231] Dieser Prozess zeigte erneut das enorme Potenzial der Strategie bioorthogonalen Reporter auf. Einer der Vorteile der Staudinger-Ligation gegenüber der Klick-Reaktion besteht darin, dass kein Metall für die Umsetzung der Azide benötigt wird. Die Staudinger-Ligation wurde in einigen sehr wichtigen Markierungsverfahren eingesetzt und insbesondere auch für Reaktionen in lebenden Organismen verwendet.^[232] Allerdings können die unerwünschte Oxidation des Phosphans sowie die konkurrierende Staudinger-Reduktion die Effizienz dieser Reaktion mindern.^[233] Durch Verwendung der Staudinger-Ligation wurden DNA,^[234b,e] Proteine und Proteinmodifikationen ortsspezifisch funktionalisiert,^[166,168a,234] und Peptide^[235] und Proteine^[236] wurden auf Phosphan-funktionalisierten Glasoberflächen **170** immobilisiert, wobei die Azidgruppe durch EPL in das Protein **171** eingeführt wurde (Schema 27C).

4.2.5. Oxidative Modifikation von Anilinen in Proteinen

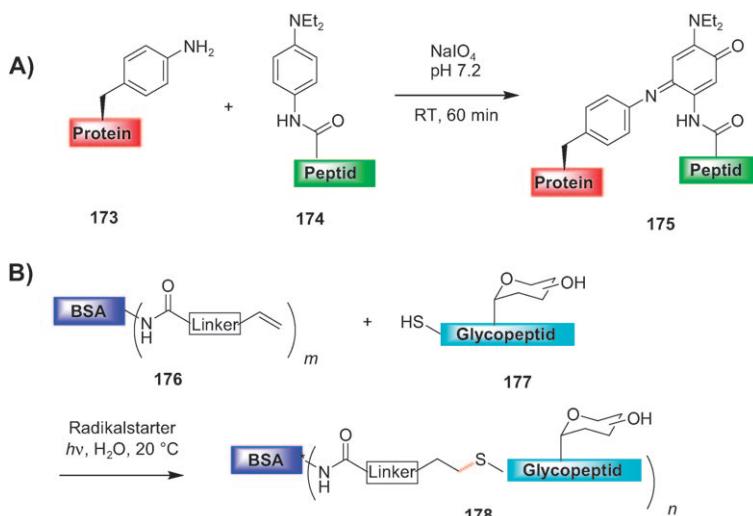
Oxidative Transformationen mit NaIO₄ haben zahlreiche Anwendungen in Proteinaktivierungsprozessen gefunden, insbesondere in der oxidativen Spaltung N-terminaler Serine,^[237] in Aldehydbildungen in Glycanen^[238a–c] und in Vernetzungsreaktionen.^[238d] Derartige Transformationen interferieren nur mit schwefelhaltigen Aminosäuren.^[238e] Ein weiteres chemoselektives Verfahren mit NaIO₄ ermöglicht die Kupplung von Anilinen zu Phenylendiaminen in geringen Konzentrationen bei pH 6.5.^[239] Diese Reaktion wurde zur Modifikation von Proteinen **173**, in die das Anilin durch Expressierung nichtnatürlicher Proteine^[240] oder Semisynthese eingebaut wurde, sowie zur Funktionalisierung von viralen Capsiden mit Phenylendiaminpeptiden **174** unter Bildung der Peptid-Protein-Konjugate **175** verwendet (Schema 30 A).^[241]



Schema 28. A) Diels-Alder-Konjugation von Peptiden; B) Nebenreaktion bei neutralem pH.



Schema 29. A) Mechanismus der Staudinger-Ligation. B,C) Protein-Immobilisierung durch Klick-Kupplung (B) und Staudinger-Ligation (C).



Schema 30. A) Oxidative Peptidkupplung Anilin enthaltender Proteine. B) Glycopeptidkonjugation an Proteinträgern durch radikalinduzierte Thioetherbildung.

4.2.6. Radikalinduzierte Thioetherbildung

Eine gängige Biokonjugationsmethode, die vor allem zur Konjugation von Glycanen Anwendung fand,^[242] ist die Bildung von Thioether aus Thiolen und Alkenen unter radikalischen Bedingungen.^[243] Die Reaktionen können photochemisch oder durch Radikalstarter wie AIBN ausgelöst werden. In einer kürzlich erschienenen Studie von Kunz et al. wurde die radikalinduzierte Thioetherbildung auf die Funktionalisierung von Proteinsystemen übertragen, da die vielen funktionellen Gruppen in Peptiden und Proteinen toleriert und

nur Disulfide als Nebenprodukte gebildet werden.^[244] Die Reaktion läuft unter milden Bedingungen ab (entweder durch thermisch oder photochemisch induzierte Radikalbildung) und liefert immunkompatible Thioether, sodass sie zur Herstellung synthetischer Vakzine **178** geeignet war. Hierzu wurden Glycopeptide **177** an Rinderserumalbumin **176** als Proteinträger konjugiert, das zuvor nichtspezifisch mit Alken-Endgruppen funktionalisiert worden war. Die Reaktion hat großes Potenzial für die selektive Modifizierung von Alken-funktionalisierten Proteinen und auch für die Funktionalisierung von Cysteinen in Proteinen, was direkt in den nächsten Abschnitt überleitet.

4.3. Selektive Umwandlung von natürlichen Aminosäuren

Ein besonderer Vorteil der im Folgenden beschriebenen chemischen Biokonjugationstechniken besteht darin, dass natürlich vorkommende Aminosäuren verwendet werden können, sodass man auf aufwendige biochemische Techniken zum Einbau nichtnatürlicher Funktionalitäten für chemoselektive Reaktionen verzichten kann (siehe Abschnitt 4.2). Wie schon in Abschnitt 3.2 beschrieben, kann die chemische Funktionalisierung von Cysteinen die Funktionsweise eines Proteins beeinflussen. In den folgenden Beispielen wurden chemoselektive Strategien entwickelt, um Peptide an ein Proteinrückgrat zu heften und dadurch dem Biopolymer neue Funktionen zu geben. Die Umsetzungen verlaufen

aminoäureselektiv und unterscheiden sich dadurch von anderen, nichtselektiven Markierungverfahren, wie etwa der Reaktion nucleophiler Seitenketten mit Succinimidestern. Nichtsdestotrotz muss man sich bei den hier vorgestellten Methoden (im Gegensatz zu denen des vorherigen Abschnitts) auf die räumliche Zugänglichkeit der Proteinarchitektur verlassen, um ein Protein mit einer einzigen oberflächenexponierten Aminosäure ortsspezifisch funktionalisieren zu können.

Es gibt noch zahlreiche andere Biokonjugationstechniken, die eine ortsspezifische Markierung von rekombinannten Proteinen ermöglichen: Modifikation durch spezifische Chelatierung, etwa durch Bindung von biarsenischen Fluorophoren (z. B. FIAAsH) an Tetracysteinmotive^[245] oder Lanthanoidbindungsmarker (LBTs),^[246] enzymkatalysierte Markierung durch posttranskriptionale Modifikation (z. B. durch Carrier-Protein-Marker)^[247] oder Selbstmarkierung (z. B. durch die SNAP-Technik).^[248] Das Gebiet wurde in hervorragenden Übersichtsartikeln zusammengefasst.^[249]

4.3.1. Konjugierte Addition von Schwefel-Nucleophilen: MIC-Strategie

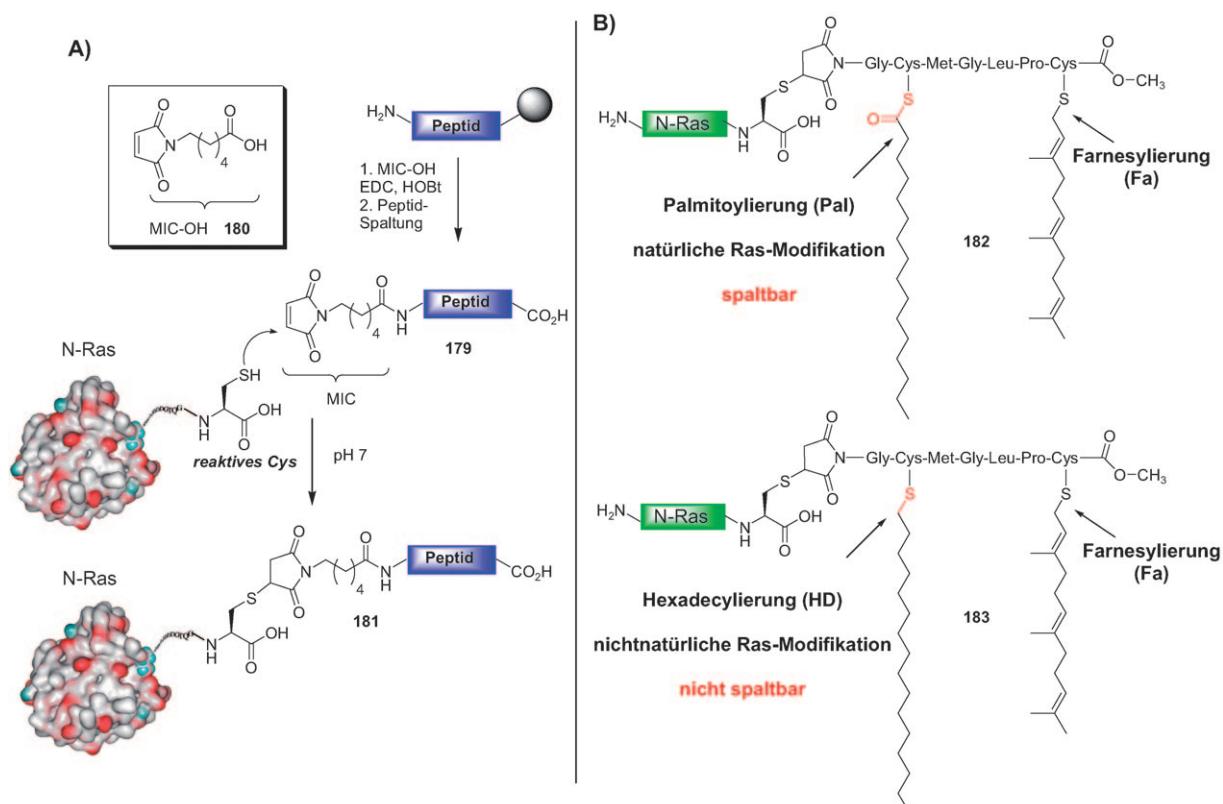
Die chemoselektive Michael-Addition von Schwefel-Nucleophilen an α,β -ungesättigte Carbonylderivate wie Maleimide ist eine bewährte Konjugationstechnik, die üblicherweise zur Verankerung von Fluorophoren unter physiologischen Bedingungen (pH 7, Raumtemperatur) an biologisch relevante Moleküle verwendet wird. Die Reaktion wurde

auch als Ligationstechnik eingesetzt, wobei ein Maleimidocaproyl(MIC)-Peptid **179** als Elektrophil für ein Cys in einem Protein fungierte (Schema 31A).^[250] MIC-Bausteine **180** („MIC-OH“) können durch SPPS in einfacher Weise und sogar in empfindliche lipidierte Peptide^[251] eingeführt oder mit photoaktivierbaren Gruppen wie Benzophenon kombiniert werden.^[252] Obwohl die Ortsspezifität dieser Reaktion durch andere Cysteine im Molekül potenziell beeinträchtigt wird, hat diese Reaktion breite Anwendung^[253] für selektive Funktionalisierungen von Proteinen gefunden, die nur ein solvensexponiertes Cys aufweisen. Ein Beispiel ist die Synthese der Ras-Proteine **181**, die eine spezifische Proteinmodifikation tragen (Schema 31B) (siehe die ausführliche Diskussion dieses Beispiels in Abschnitt 6.3).

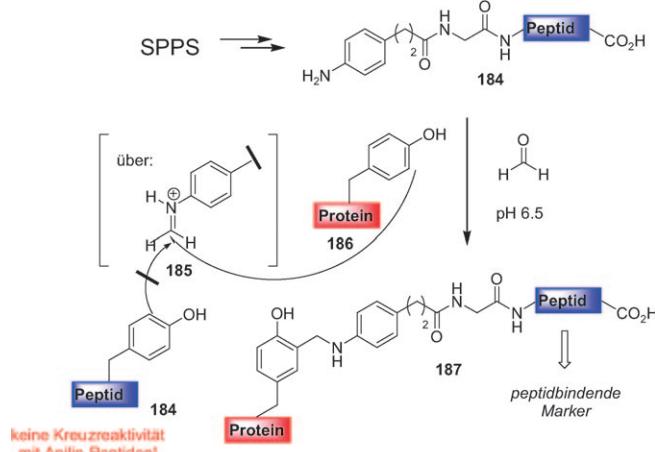
4.3.2. Mannich-Peptidkonjugation an Tyrosine in Proteinen

Tyrosin weist aufgrund der phenolischen Gruppe besondere nucleophile und elektrophile Eigenschaften auf. Des Weiteren sind Tyrosine wegen ihres amphiphilen Verhaltens oft an der Oberfläche von Proteinen exponiert, was sie als ideale Verankerungspunkte für selektive Konjugationsstrategien erscheinen lässt.

Eine derartige selektive Konjugation von Peptiden an Proteine wurde mithilfe der Mannich-Kupplung erreicht.^[254] Hierbei reagiert ein Anilin am N-Terminus eines Peptids **184** bei pH 6.5 mit einem Überschuss an Formaldehyd zu einem Iminsalz **185** (Schema 32).^[255] **185** kann eine elektrophile aromatische Substitution an einem Tyr in einem Protein **186**



Schema 31. Konjugierte Thioladdition: A) MIC-Strategie und B) lipidierte Ras-Analoga. EDC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, HOBt = N-Hydroxybenzotriazol, MIC = Maleimidocaproyl.



Schema 32. Mannich-Konjugation von Peptiden an Proteine.

eingehen und zu einer kovalenten Bindung in **187** führen. Diese Konjugation, die auch Trp-Aminosäuren in Proteinen funktionalisieren kann,^[256,257] wurde auf die Verankerung von Peptidbindungsmarkern, insbesondere von FLAG-Epitopen^[258] und LBTs,^[246] an das Protein Chymotrypsinogen verwendet. Im Allgemeinen wurden Umsätze bis 84 % bei Peptiden mit mehreren Gly-Aminosäuren am Anilinmarker erzielt, was auf die notwendige Voraussetzung einer flexiblen Region für die Tyr-Funktionalisierung hinweist. Der Gesamtumsatz der Mannich-Konjugationen war bei Proteinsubstraten höher als bei Peptiden oder niedermolekularen Verbindungen, und es wurde keine Kreuzreaktivität (Dimerisierung) mit Tyrosinen des Anilinpeptids **184** beobachtet.

Andere Ansätze zur selektiven Funktionalisierung von Tyrosinen schließen Alkylierungen mit π -Allylpalladium-Komplexen ein, die bei pH 8.5–9 in wässrigen Puffern ablaufen.^[259] In einer Anwendung dieses Verfahrens wurde Chymotrypsinogen A in ein lipidiertes (farnesyliertes) Analogon überführt, das in Lipiddoppelschichten eingebettet wurde. Schließlich wurden Tyr-Aminosäuren in einem zweistufigen Prozess bestehend aus der Reaktion mit einem Diazoniumderivat und einer Diels-Alder-Reaktion^[260] oder einer Oximbildung^[261] modifiziert. Das Konzept wurde in der Oberflächenfunktionalisierung eines Tabakvirus und eines Bakteriophagen demonstriert.^[262]

5. Chemoselektive Peptidligationen durch Enzymkatalyse

Das Capture/Rearrangement-Konzept hat sich als äußerst erfolgreich für die chemoselektive Ligation von Peptiden erwiesen. Es gibt jedoch auch Alternativen, die die inhärente Chemoselektivität von Enzymen für Ligationsverfahren nutzen. Die bekanntesten Methoden sind die bereits angesprochene Verwendung von Split-Inteinen zum Transspleißen von Proteinen (Abschnitt 2.4.3), die Umkehr der proteasekatalysierten Peptidspaltung („reverse Proteolyse“) und die Verwendung der Transpeptidase Sortase A.

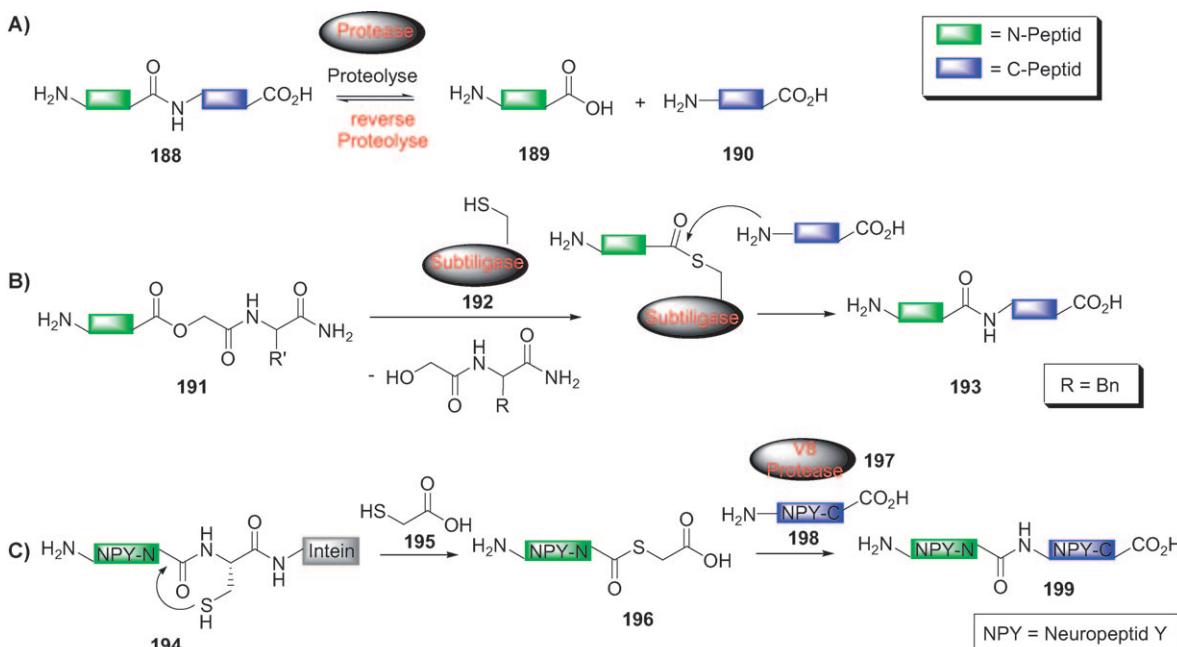
5.1. Reverse Proteolyse

Enzyme, die die Ligation von Polypeptiden katalysieren (Peptidligasen), kommen in der Natur relativ selten vor, im Gegensatz zu Proteasen, die die Peptidspaltung katalysieren. Als evolutionär optimierte Enzyme sind die Proteasen in der Lage, mit hoher Präzision Proteine an definierten Positionen zu spalten.^[263] Um Proteasen für die chemoselektive Ligation von Peptiden nutzbar zu machen, müssen sie durch Inversion der Proteolyseaktivität in Peptidligasen umgewandelt werden (siehe Schema 30A). Eine umfassende Übersicht über die Anwendung von Proteasen in Peptidligationen würde den Rahmen dieses Aufsatzes übersteigen, weshalb wir uns im Folgenden auf die Erläuterung der grundlegenden Konzepte beschränken. Auf detaillierte Übersichten über die Grundlagen und Anwendungen dieser Technik wird verwiesen.^[263,266]

Wie fast alle Biokatalysatoren können auch Proteasen ihre Umkehrreaktion, also eine reverse Proteolyse, katalysieren. Allerdings liegt unter physiologischen Bedingungen das Gleichgewicht zwischen den Spaltprodukten (**189** und **190**) und dem Ligationsprodukt (**188**) weit auf der Seite der Spaltprodukte (Schema 33). Um Proteasen dennoch als Peptidligasen nutzen zu können, gibt es zwei grundlegende Strategien: den thermodynamisch kontrollierten und den kinetisch kontrollierten Ansatz.

Der thermodynamisch kontrollierte Ansatz entspricht einer echten Umkehr der Peptidspaltung durch Verschieben der Gleichgewichtsreaktion. Unter physiologischen Bedingungen ist die reverse Proteolyse aufgrund der notwendigen Energie unterdrückt, die für den initialen Transfer eines Protons vom Nucleophil des C-Peptids auf das Carboxylat des N-Peptids aufgebracht werden muss. Diese Barriere wird durch den Transfer eines Protons vom nucleophilen Amin auf das elektrophile Carboxylat repräsentiert.^[263,265] Durch Zusatz organischer Lösungsmittel zum Reaktionsansatz kann die Dielektrizitätskonstante des Mediums und damit die Azidität der Carboxylgruppe gesenkt werden. Infolgedessen sind Proteasen in organischen oder wässrigen Lösungsmitteln zur Katalyse von Peptidkupplungen fähig, jedoch ist es meist erforderlich, optimierte Reaktionsbedingungen sowie eigens modifizierte Proteasen zu verwenden.^[263,267,268]

Im Falle der kinetisch kontrollierten reversen Proteolyse bleibt die Gleichgewichtslage unverändert. Das Prinzip dieses Ansatzes ist die schnelle Anreicherung einer elektrophilen (N-Peptid)-Protease-Konjugats als Zwischenstufe, die mit der α -Aminogruppe des C-Peptids reagieren kann.^[264] Dieser Ansatz kann nur mit Serin oder Cysteinproteasen ausgeführt werden, deren Katalysezyklus eine kovalent verknüpfte Enzym-Peptid-Zwischenstufe durchläuft. Die Acylierung der Protease wird durch Verwendung aktiverter N-Peptide erreicht, die normalerweise über einen C-terminalen Ester **191** (oder einen Thioester) als Abgangsgruppe verfügen (Schema 33B). Da die Gleichgewichtslage bei der kinetisch kontrollierten reversen Proteolyse unverändert bleibt, muss die Reaktion gestoppt werden sobald der Acyldonor **191** aufgebraucht ist, um zu verhindern, dass das Ligationsprodukt **193** wieder gespalten wird. In diesem Zusammenhang ist die Entwicklung von Substratmimetika, bei denen die spezifi-



Schema 33. A) Allgemeines Konzept der proteasevermittelten Peptidligation. B) Subtiligasevermittelte Peptidligation. C) Exprimierte enzymatische Ligation (EEL).

tätsvermittelnden chemischen Funktionen in der Abgangsgruppe lokalisiert sind, ein wichtiger Fortschritt, da in diesem Fall die Erkennungsstelle der Protease im Ligationsprodukt nicht mehr vorhanden ist.^[269–271]

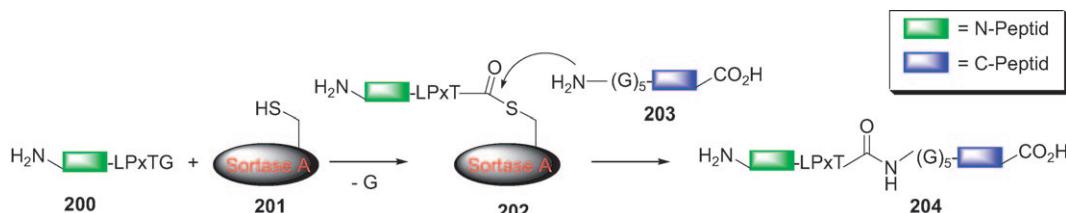
Um Proteasen für die reverse Proteolyse zu optimieren, werden sie häufig gezielten Modifikationen unterzogen. Das bekannteste Beispiel ist die Subtiligase, die eine vom bakteriellen Subtilisin BPN' (**192**) abgeleitete Doppelmutante ist (Schema 33B).^[272] Bei den beiden Mutationen handelt es sich um den Austausch des katalytischen Serins durch Cystein, wodurch das Spaltungs/Ligations-Verhältnis verbessert werden konnte, sowie um den Austausch eines Prolin durch Alanin, wodurch das aktive Zentrum aufgeweitet wurde.^[272]

Proteasevermittelte Ligationsketten können mit anderen chemoselektiven Ligationsmethoden wie EPL kombiniert werden. Ein solcher Ansatz ist die von Beck-Sickinger et al. entwickelte exprimierte enzymatische Ligation (EEL), die für die Synthese des Prähormons Neuropeptid Y (**199**; 69 Aminosäuren) aus zwei Peptidfragmenten verwendet wurde (Schema 33C).^[273] Das N-Fragment **196** (NPY-N) wurde als C-terminaler Thioester durch Thiolysis des Inteinfusionsproteins **194** mit 2-Sulfanylsäure (**195**) hergestellt. Der resultierende Peptidthioester diente als Substratmimetikum für die V8-Protease **197**, die im Folgenden die Ligation mit dem C-

Fragment **198** (NPY-C) katalysiert. Der Vorteil von EEL gegenüber EPL-Reaktionen ist, dass Proteasen nicht notwendigerweise auf Cys als N-terminale Aminosäure des C-Peptids angewiesen sind. Dies wurde in diesem Fall für die „Cys-freie“ Ligation mit dem NPY-C-Peptid genutzt, das den natürlichen Rest Ser als N-terminale Aminosäure enthielt.

5.2. Sortasevermittelte Peptidligation

Es gibt nur wenige Enzyme, die von Natur aus Peptidligationen katalysieren. Das bekannteste Beispiel ist die Transpeptidase Sortase A (**201**), die für chemoselektive Peptidligationen eingesetzt werden konnte (Schema 34). Sortase A katalysiert die Bindung von Oberflächenproteinen **200** an die Zellwand Gram-positiver Bakterien wie dem pathogenen *Staphylococcus aureus*.^[274] Die zu verknüpfenden Proteine **200** verfügen über ein C-terminales „Sorting“-Signal, dass ein hoch konserviertes LPxTG-Motiv enthält. Das Motiv wird von Sortase A nach dem Threoninrest gespalten, wobei ein kovalentes Acylintermediat **202**, dass an den Cysteinrest im aktiven Zentrum der Sortase A gebunden ist, gebildet wird.^[275] Dieser Acylierungsschritt ist mit dem der Serin- und Cysteinproteasen vergleichbar, allerdings wird bei der Sor-



Schema 34. Sortasevermittelte Ligation.

tasereaktion die α -Aminogruppe der Pentaglycin-Einheit der bakteriellen Peptidglycanschicht als desacylierendes Nucleophil bevorzugt (Schema 34). Um die Sortase A für chemoselektive Ligationen zu nutzen, muss zum einen das N-Peptid über das LPxTG-Motiv am C-Terminus verfügen und zum anderen das C-Peptid **203** zumindest einen Gly-Rest am N-Terminus aufweisen.^[276] Nach der Zugabe der Sortase A wird das Sorting-Motiv des N-Peptids gespalten und dann mit dem N-terminalen Gly des C-Peptids verknüpft. Die erfolgreiche Anwendung der Sortase A für die Herstellung von Ligationsprodukten **204** konnte in mehreren Fällen gezeigt werden.

Beispielsweise wurde rekombinantes grün-fluoreszierendes Protein (GFP), das über ein C-terminales LPxTG-Motiv verfügte, mit einem Folat-konjugierten Peptid mit drei N-terminalen Gly-Resten ligiert.^[276] In einem weiteren Fall wurde Peptidnucleinsäure (PNA) mit zellpenetrierenden Peptiden verknüpft, die den Transport des Ligationsprodukts in lebende Zellen ermöglichen.^[277] Schließlich wurde Sortase A auch genutzt, um fluoreszenzmarkierte Peptide mit Proteinen zu ligieren, die auf Zelloberflächen präsentiert wurden und über das LPxTG-Motiv verfügten.^[278]

Enzymvermittelte Peptidligationen wie reverse Proteolyse oder Sortaseligationen haben in letzter Zeit viel Aufmerksamkeit erlangt.^[263, 276–278] Einige Kompromisse müssen allerdings auch hier in Kauf genommen werden, wie beispielsweise die Verwendung aktivierter Peptide bei der kinetisch kontrollierten reversen Proteolyse oder das Verbleiben des LPxTG-Motivs in Ligationsprodukten der Sortase A. Trotz dieser Einschränkungen sind enzymvermittelte Ligationen eine gute Alternative zu konventionellen Ligationsmethoden nach dem Capture/Rearrangement-Konzept (siehe auch Abschnitt 7.6).

6. Proteinsemisyntese: Ligation von synthetischen mit rekombinanten Peptiden

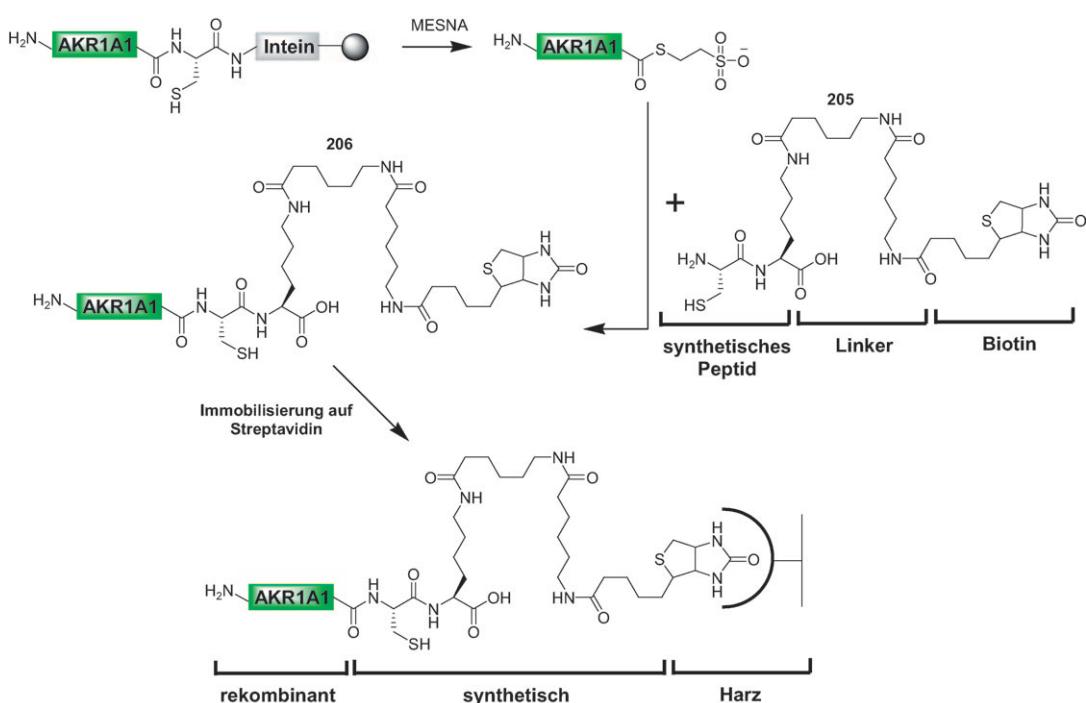
Eine besonders praktische Anwendung chemoselektiver Ligationen ist die Verknüpfung synthetischer Peptide mit rekombinanten Proteinen („Proteinsemisyntese“; siehe auch Abschnitt 2.4).^[3, 9, 279–281] Dieser Ansatz vereinigt die vorteilhaften Eigenschaften organischer Synthesen mit denen rekombinanter Proteintechniken: Zum einen unterliegen rekombinante Proteine keiner Größenbeschränkung, zum anderen sind synthetische Peptide nicht auf die 20 proteinogenen Aminosäuren beschränkt. Somit können Modifikationen gezielt in Proteine eingebaut werden, indem man ein großes Fragment rekombinant in Bakterien produziert und ein kleineres Fragment, das die gewünschte Modifikation enthält, durch SPPS herstellt. Durch Ligation der beiden Fragmente kann das modifizierte Protein in voller Größe rekonstituiert werden und steht im Anschluss für biophysikalische oder funktionsbezogene Untersuchungen zur Verfügung. Dabei können mit Proteinsemisyntese sowohl natürliche Modifikationen wie Phosphorylierungen,^[74, 282, 283] Acetylierungen oder Methylierungen,^[105] Glycosylierungen^[284, 285] und Lipidierungen^[286] sowie auch nichtnatürliche Modifikationen oder Aminosäuren wie Aminophenylalanin,^[287] Fluortyro-

sin,^[288] ATP-verknüpftes Phenylalanin,^[289] D-Aminosäuren^[290] oder Phosphoaminoäuremimetika^[291] in Proteine integriert werden. Weiterhin ist die Installation von Fluorophoren und Affinitätsmarkern in definierter und homogener Weise möglich, was ein entscheidender Vorteil gegenüber konventionellen Proteinmarkierungsmethoden ist, die häufig eine geringere Spezifität aufweisen.

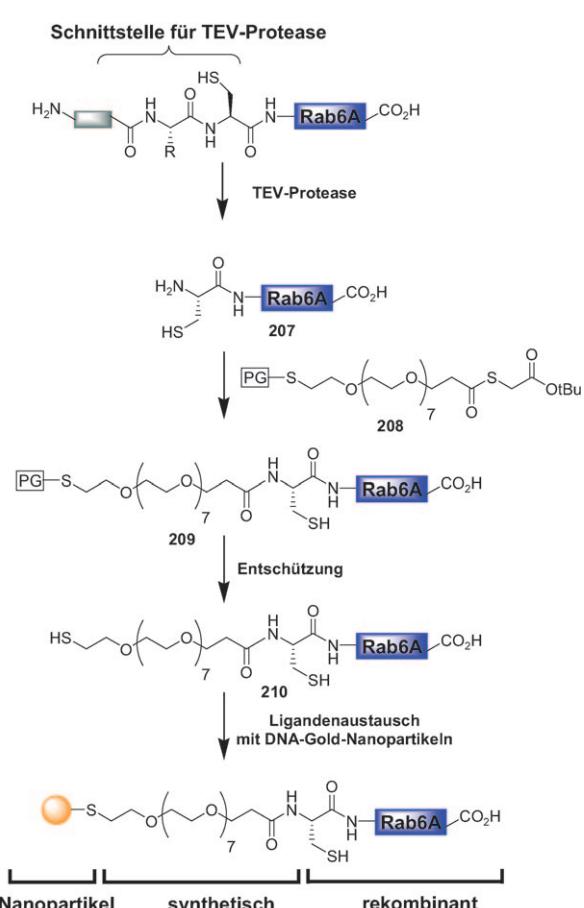
6.1. Protein-Immobilisierung

Eine wichtige Anwendung ist der definierte Einbau funktioneller Gruppen in Proteine, um diese gezielt auf Trägeroberflächen oder Nanopartikeln zu verankern (siehe auch Schema 27).^[292, 293] Beispielsweise sind Proteine, die auf Mikroarrays immobilisiert sind, wichtige Werkzeuge zur Untersuchung der Proteinaktivität oder -inhibition in sehr kleinem Maßstab und mit hohem Probendurchsatz. Die Art der Immobilisierung ist dabei entscheidend für die Qualität solcher Mikroarrays.^[294] Konventionelle Methoden zur Protein-Immobilisierung nutzen oberflächenexponierte funktionelle Gruppen, die mit der Trägeroberfläche konjugiert werden. Ein großer Nachteil dieser Vorgehensweise ist die rein zufällige Orientierung der immobilisierten Proteine, die zu inhomogenen Enzymaktivitäten führt. Eine Lösung dieses Problems ist die definierte Installation einer singulären funktionellen Gruppe oder eines Affinitätsmarkers mithilfe der Proteinsemisyntthese. Die Vorteile einer exakt positionierenden Protein-Immobilisierung durch Semisyntthese konnten an mehreren Beispielen, wie dem Maltose-bindenden Protein (MBP), der Glutathion-S-Transferase (GST) und der Aldo/Ketoreduktase AKR1A1,^[295, 296] aufgezeigt werden. In diesen Fällen wurde die hochaffine Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin für die Protein-Immobilisierung genutzt. Dazu wurde Biotin zusammen mit einem Linker in **206** eingebaut, indem das biotinkonjugierte Peptid **205** durch EPL an den C-Terminus der rekombinanten Proteine ligiert wurde.^[295, 296] Im Anschluss erfolgte die Immobilisierung auf mit Streptavidin beschichteten Glasträgern in definierter Orientierung (homogene Protein-Immobilisierung). Der Vorteil der homogene Protein-Immobilisierung konnte am Beispiel des Proteins AKR1A1 demonstriert werden. Das Enzym wurde entweder durch EPL-vermittelte Installation von Biotin spezifisch modifiziert oder durch Konjugation von oberflächenexponierten Gruppen biotinyliert (Schema 35). Die kinetischen Eigenschaften der spezifisch und unspezifisch biotinylierten Proteine wurden in Lösung und auf Streptavidinträgern untersucht. Beide Proteine zeigten in Lösung ähnliche kinetische Aktivitäten, vergleichbar mit der Aktivität von unmodifiziertem AKR1A1. Nach der Immobilisierung auf streptavidinbeschichteten Trägern war die Aktivität des unspezifisch biotinylierten Proteins zehnfach reduziert, wohingegen das spezifisch biotinylierte Protein eine unveränderte Aktivität aufwies.^[296]

Ein anderes häufiges Ziel von Protein-Immobilisierungen für biotechnologische Anwendungen sind Nanopartikel. Genau wie bei Immobilisierungen auf Glasträgern führen unspezifische Konjugationstechniken für Nanopartikel zu einer zufälligen Orientierung. Die Proteinsemisyntthese kann



Schema 35. Protein-Immobilisierung auf Trägeroberflächen am Beispiel von AKR1A1.



Schema 36. Konjugation von Rab6A an Gold-Nanopartikel.

auch hier genutzt werden, um Homogenität bei der Konjugation zu ermöglichen, wie es kürzlich anhand der selektiven Konjugation der GTPase Rab6A an Gold-Nanopartikel gezeigt wurde (Schema 36).^[297] Weitere Vorteile resultieren, wenn man einen definierten Linker zwischen den Proteinen und dem Nanopartikel einfügt. Um diese beiden Vorgaben zu erfüllen, wurde ein Polyethylenglycol(PEG)-Linker **208** durch NCL an den N-Terminus von Rab6A ligiert (**207**). Im folgenden Entschützungsschritt wurde ein Thiol **209** freigesetzt, das die Konjugation mit dem Gold-Nanopartikel ermöglichte. Nach der Immobilisierung von **210** stellte sich heraus, dass dieses hoch exponierte Thiol die bevorzugte Bindestelle war (Schema 36). Nach erfolgreicher Konjugation durch eine Ligandenaustauschreaktion zeigten biochemische Untersuchungen, dass das gebundene Rab6A-Protein die erwartete GTPase-Aktivität aufwies, im Gegensatz zu Rab6A-Proteinen, die durch eine unspezifische Konjugation über oberflächenexponierte Thiole immobilisiert worden waren.^[297]

6.2. Proteinphosphorylierung

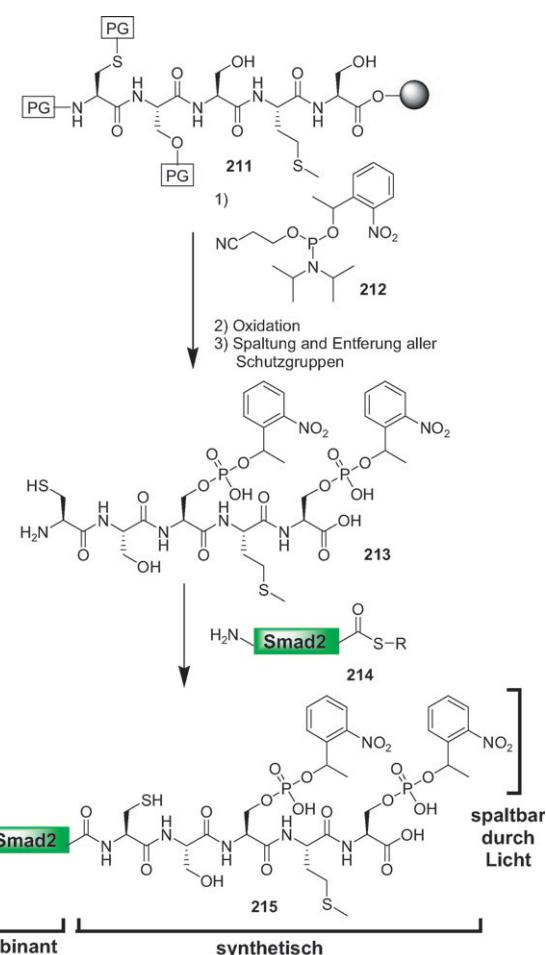
Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet der Proteinsemisynthese ist die Einführung von natürlichen Modifikationen in Proteine. Viele post- oder cotranslationale Modifikationen treten in lebenden Organismen auf und haben meist wichtige Funktionen bei der Regulation enzymatischer Aktivität sowie für die Proteinstabilität oder -lokalisierung.

Die häufigsten Modifikationen von Proteinen sind Phosphorylierungen von Ser-, Thr- oder Tyr-Resten, und die Aufklärung der jeweiligen physiologischen Funktion ist ein

wichtiges Forschungsziel.^[298] Die Proteinkinasen, die diese Phosphorylierungen vermitteln, sind häufig unbekannt oder biochemisch nicht zugänglich sind, weshalb man die Proteinsemisynthese als eine wichtige Methode etabliert hat, um selektive Phosphorylierungen vorzunehmen.^[283, 299] Die Proteinsemisynthese kann auch genutzt werden, um chemische Gruppierungen einzufügen, die eine selektive Maskierung und Demaskierung der Proteinphosphorylierung ermöglichen.

Ein aktuelles Beispiel, dass das Potenzial der Semisynthese von modifizierten Proteinen belegt, ist die Herstellung von phosphorylierten Smad2-Proteinen mit die biologische Funktion maskierenden photolabilen Schutzgruppen (Caginggruppen). Smad2 ist ein Signalprotein, das nach der Rezeptorbindung des transformierenden Wachstumsfaktors β aktiviert wird.^[300] Die Aktivierung von Smad2 wird durch die Phosphorylierung zweier Serinreste in der C-terminalen Region des Proteins vermittelt und führt zur Trennung vom zytosolischen Bindungspartner SARA, gefolgt von der Translokation in den Zellkern, wo Smad2 als transkriptioneller Aktivator fungiert.^[300] Um diese phosphorylierungsabhängige Translokation zu beobachten, muss man die Gegenwart oder Abwesenheit der Modifikation auf einer sehr kurzen Zeitskala steuern. Dieses Ziel wurde durch die Proteinsemisynthese erreicht, indem zwei photolabile Phosphoserinreste an den beiden Phosphorylierungsstellen von Smad2 installiert wurden.^[301] Die photolabilen Gruppen sind in der Lage, die Gegenwart der Modifikation zu verbergen, bis sie durch Bestrahlung mit UV-Licht entfernt werden.^[302, 303] Zwei Arten von Caging-Strategien wurden auf Smad2 angewendet.^[301, 304] Im ersten Fall wurden beide photogeschützten Serinreste individuell durch EPL eingebaut (Schema 37). Die Synthese begann mit einem kurzen synthetischen Peptid **211**, dessen Sequenz den fünf C-terminalen Aminosäuren von Smad2 entsprach. Mit 2-Nitrophenylethyl (NEP) geschützte Phosphatgruppen wurden an den orthogonal entschützten Serinresten durch Reaktion mit dem entsprechenden Phosphoramidit **212** installiert. Im Anschluss wurde das entschützte Peptid **213** mit einem rekombinanten Smad2-Fragment **214** durch EPL ligiert. Das resultierende Phospho-Smad2-Protein **215** wurde biochemischen Studien unterzogen, die belegen, dass **215** mit den photolabilen Schutzgruppen die Eigenschaften des nicht phosphorylierten Smad2-Proteins widerspiegelt und einen Komplex mit dem SARA-Protein bildet. Durch Bestrahlung mit UV-Licht konnten die photolabilen Gruppen entfernt und aktiviertes phosphoryliertes Smad2 freigesetzt werden.

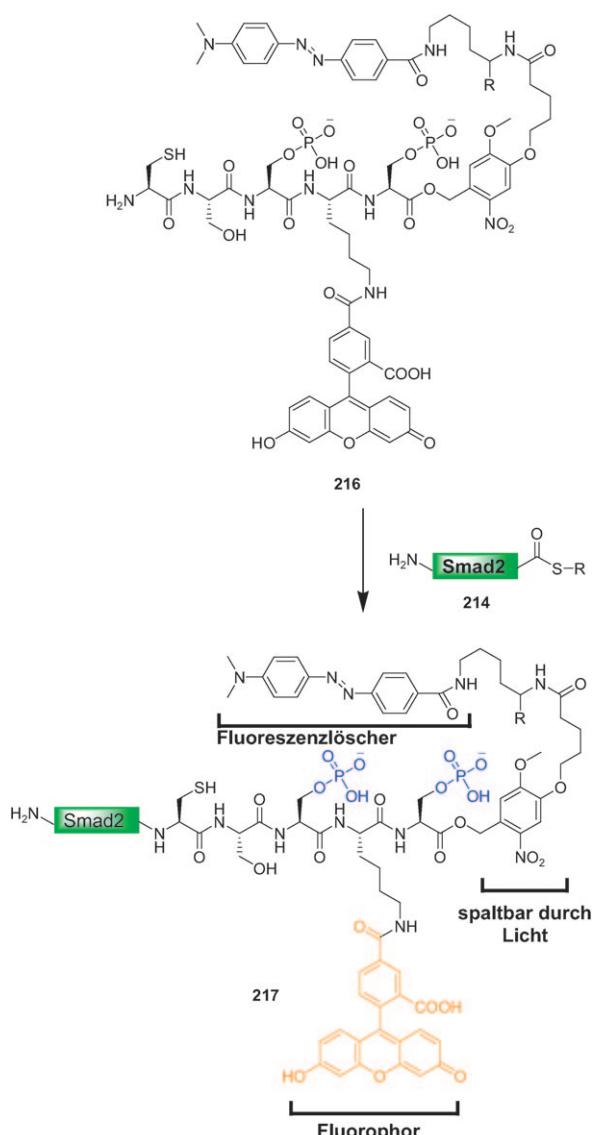
In einer weiteren Studie wurde der Caging-Ansatz erweitert, indem C-terminal phosphoryliertes Smad2 (**217**) durch Ligation mit **216** hergestellt wurde, das einen Fluorophor und einen lichtspaltbaren Fluoreszenzlöscher enthielt (Schema 38).^[304] Der Fluoreszenzlöscher erfüllte zwei Aufgaben: Zum einen unterdrückte er effizient die Fluoreszenz des Fluorophors, zum anderen verbarg er die Gegenwart der beiden Phosphatgruppen an den C-terminalen Serinresten (genau wie im Fall der individuell installierten photolabilen NEP-Gruppen). Daraus resultierte, dass die Freisetzung (Photoaktivierung) von Smad2 zwei simultane Effekte zur Folge hatte: die Freisetzung der beiden Phosphoserinreste



Schema 37. Synthese eines Smad2-Proteins mit photolabilen Gruppen.

und die Emission eines Fluoreszenzsignals. Dieser erweiterte Caging-Ansatz stellt sich als sehr nützlich heraus, um die Eigenschaften des modifizierten und unmodifizierten Proteins zu vergleichen, wie Studien mit einem nichtphosphorylierten Smad2-Analogon demonstrierten (Schema 39). Das nichtphosphorylierte Vergleichsprotein enthielt einen Fluorophor, der bei einer anderen Wellenlänge fluoreszierte. Eine Mischung beider Proteine wurde in lebende Zellen injiziert und bestrahlt, was zur simultanen Photoaktivierung beider Proteine führte, die anhand der Fluoreszenz beider Fluorophore verfolgt werden konnte. Erwartungsgemäß wurde das freigesetzte Phospho-Smad2 in den Zellkern importiert, während das nichtphosphorylierte Smad2 seine zytosolische Lokalisation beibehielt.^[304]

Die Untersuchung von Proteinphosphorylierungen kann durch den dynamischen Charakter dieser Modifikation beeinträchtigt werden. Das Gleichgewicht zwischen dem phosphorylierten und nichtphosphorylierten Zustand wird durch das Zusammenspiel der zugehörigen Kinasen und Phosphatasen gesteuert.^[298] Diese beiden Klassen von Proteinen werden häufig selbst phosphoryliert. Die Untersuchung von Phosphorylierungen von Phosphatasen ist oft schwierig, weil diese Enzyme meist in der Lage sind, sich selbst zu dephosphorylieren.



Schema 38. Synthese fluoreszierender Smad2-Proteine.

phorylieren.^[305] Zur Lösung dieses Problems wurden Proteinsemisynthesen verwendet, um nichtspaltbare Mimetika von Phosphaten an den Modifizierungsstellen zu installieren (Schema 40 A).^[306,307] Ein Zielprotein in dieser Beziehung ist die LMW-PTP (low molecular weight protein tyrosine phosphatase), die am PDGFr-vermittelten (platelet-derived growth factor receptor) Signaltransduktionsweg beteiligt ist.^[308] Von der LMW-PTP ist bekannt, dass sie an zwei benachbarten Tyrosinresten phosphoryliert wird, die in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert sind. Die Proteinsemisynthese nach der EPL-Strategie wurde verwendet, um Phosphonomethylenphenylalanin (**219**, Pmp), ein nichtspaltbares Analogon des Phosphotyrosins **218**, an den entscheidenden Positionen in **220** zu integrieren (Schema 40 A und B).^[309]

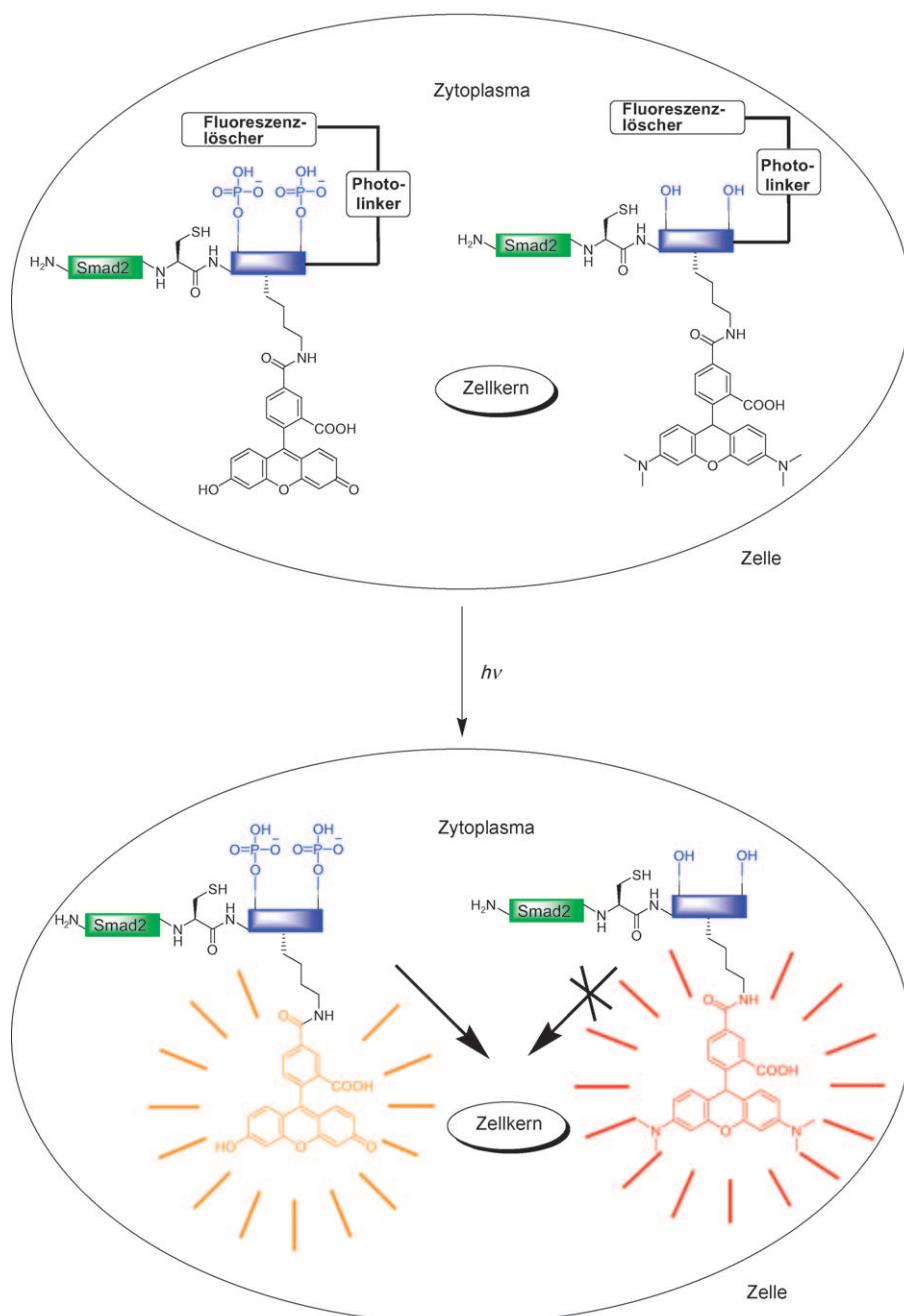
Die resultierenden irreversibel phosphorylierten Proteine wurden mit biochemischen und zellbiologischen Methoden

untersucht, wobei sich herausstellte, dass durch die Installation von Pmp die Phosphataseaktivität verringert wurde, was die regulierenden Eigenschaften dieser Modifikationen bezüglich der Enzymaktivität implizierte.

6.3. Proteinlipidierung

Die Konjugation mit Lipiden ist eine wichtige Proteinmodifikation, die häufig eine Assoziation mit der Zellmembran vermittelt. Bekannte Beispiele sind die GTPasen der Ras-Familie,^[310] die wichtige Regulatoren vieler zellulärer Prozesse sind. H-Ras und N-Ras sind zwei Isoformen der Ras-Proteine, die am C-Terminus farnesyliert sowie mono- oder dipalmitoyliert sind (Struktur **182** in Schema 31).^[310] Während die Farnesylierung (Fa) eine irreversible Modifikation (Thioetherbindung) ist, ist die Palmitoylgruppe (Pal) über einen Thioester gebunden und kann wieder abgespalten werden (Schema 31 B). Aus diesem Grund geht die Pal-Modifikation häufig bei der Isolierung aus lebenden Organismen verloren. Die MIC-Ligation (siehe Abschnitt 4.1.3) konnte erfolgreich eingesetzt werden, um dieses Problem zu umgehen und homogen lipidierte Ras-Proteine für biochemische und biophysikalische Untersuchungen zu gewinnen.^[311] Eine verkürzte Form des Ras-Proteins mit einem solvensexponierten Cys-Rest wurde zu diesem Zweck bakteriell exprimiert. Danach wurden MIC-modifizierte Peptide, die in der Sequenz dem Ras-C-Terminus entsprachen und unterschiedliche Lipidierungsmuster aufwiesen, synthetisiert und an das Protein konjugiert.^[312] Die so erhaltenen Ras-Proteine **183** konnten für biophysikalische und zellbiologische Studien verwendet werden, und es stellte sich heraus, dass die Proteine trotz der nichtnatürlichen Verknüpfung ihre volle biologische Aktivität beibehielten. Ein weiterer Vorteil dieses Ansatzes bestand darin, dass der spaltbare Palmitoylthioester durch eine nichtspaltbare thioetherverknüpfte Hexadecyl(HD)-Gruppe ersetzt werden konnte (siehe Schema 31 B). Solche irreversibel palmitoylierten Ras-Proteine konnten weiterhin für die Untersuchung der zellulären Zirkulation der Ras-Proteine verwendet werden.^[313]

Man war lange davon ausgegangen, dass Ras-Proteine nur aktiv sind, wenn sie durch die Lipidierung an der Plasmamembran (PM) verankert sind. Neuere Studien deuten jedoch darauf hin, dass es auch einen Pool an Ras-Proteinen gibt, der am Golgi-Apparat lokalisiert ist und eine unabhängige Signalplattform für zelluläre Prozesse darstellen könnte. Ras-Proteine erreichen die PM durch den sekretorischen Weg und können zum Golgi-Apparat zurückkehren, nachdem die Palmitoylgruppe abgespalten wurde. Die Reinstallation des Palmitoylrestes im Golgi-Apparat lenkt das Ras-Protein zurück an die PM, wodurch ein Desacylierungs-/Reacylierungszyklus entsteht, der den PM- und den Golgi-Pool an Ras aufrechterhält. Detaillierte Untersuchungen, in denen der Ras-Zyklus entdeckt wurde, nutzten durch MIC generierte Ras-Proteine, die mit der thioetherverknüpften HD-Gruppe anstelle der spaltbaren Pal-Gruppe modifiziert waren (Schema 31 B). Durch die irreversible Natur dieser Modifizierung konnten diese Ras-Proteine nicht am Desacylierungs-/Reacylierungszyklus teilnehmen.^[313]



Schema 39. Funktionelle Analyse phosphorylierter Smad2-Proteine in lebenden Zellen.

7. Strategien zur Ligation mehrerer Fragmente

Wie bereits diskutiert, haben chemoselektive Ligations-techniken das Größenlimit der SPPS deutlich erweitert. Allerdings sind die Produkte, die bei der Ligation zweier Fragmente entstehen, immer noch kleiner als die meisten natürlichen vorkommenden Proteine.^[314,315] Die Proteinsemisynthese kann genutzt werden, um synthetische Peptide mit Proteinen zu verknüpfen, allerdings beschränkt sich die chemische Kontrolle ausschließlich auf die Reste des kleinen, synthetischen Fragments. Aus diesem Grund wurden Synthesestrategien entwickelt, die Totalsynthesen von Proteinen aus

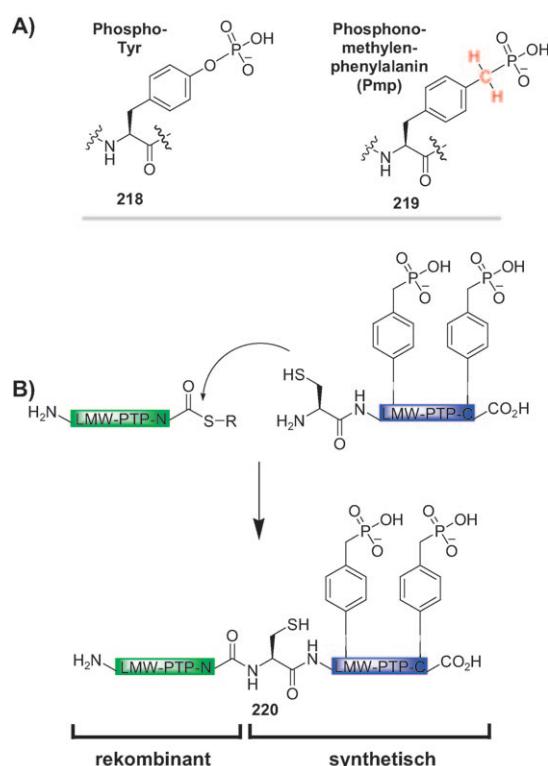
multiplen Fragmenten ermöglichen. Dieses Vorgehen erfordert zusätzliche Schutzgruppenoperationen, um eine sequenzielle Kupplung von Segmenten zu ermöglichen und Nebenreaktionen zu unterdrücken.

7.1. Synthetisches H-Ras

Die Totalsynthese des 166 Aminosäuren umfassenden Protoonkogens H-Ras **225** gelang Engelhard et al. mithilfe einer Dreisegmentligation.^[316] Das Protein verfügt über drei natürliche Cys-Reste (an Positionen 51, 80 und 118), die sich als Ligationsstellen anbieten, ohne die Aminosäuresequenz des Proteins zu verändern. Die Synthesestrategie nutzte zwei dieser Cys-Reste und begann mit der Ligation des C-terminalen Fragments **221**, das Cys118 als N-terminalen Rest enthält, mit dem zentralen Fragment **222**, das über einen C-terminalen Thioester verfügt (Schema 41). Das N-terminale Cys51 des zentralen Fragments war ein weiterer natürlicher Rest des H-Ras, der während der Ligation mit Acetamidomethyl (Acm) geschützt war. Die orthogonale Entsicherung der Acm-Gruppe in **224** erfolgte durch Behandlung mit Hg^{II} nach der Ligation.^[317] Schließlich wurde das N-terminale Fragment **223** gekuppelt und das synthetische H-Ras-Protein in voller Länge erhalten. Nach anschließender Faltung und biochemischer Charakterisierung zeigte sich, dass die katalytischen Eigenschaften des synthetischen H-Ras mit denen des biologisch hergestellten Proteins identisch waren.

7.2. Synthetisches EPO

Eine Viersegmentligation, bei der weitere Modifikationsverfahren (siehe Abschnitt 3.2) zum Einsatz kamen, wurde kürzlich in der Totalsynthese eines PEGylierten Analogon des Glycoproteinhormons Erythropoetin (EPO) beschrieben (Schema 42).^[119,318] Natürlich glycosyliertes EPO stimuliert die Proliferation von Erythrozyten. Zwei der vier Segmente wurden vor der Ligation mit verzweigten, negativ geladenen Polymeren mit definierter Länge durch Oxim-

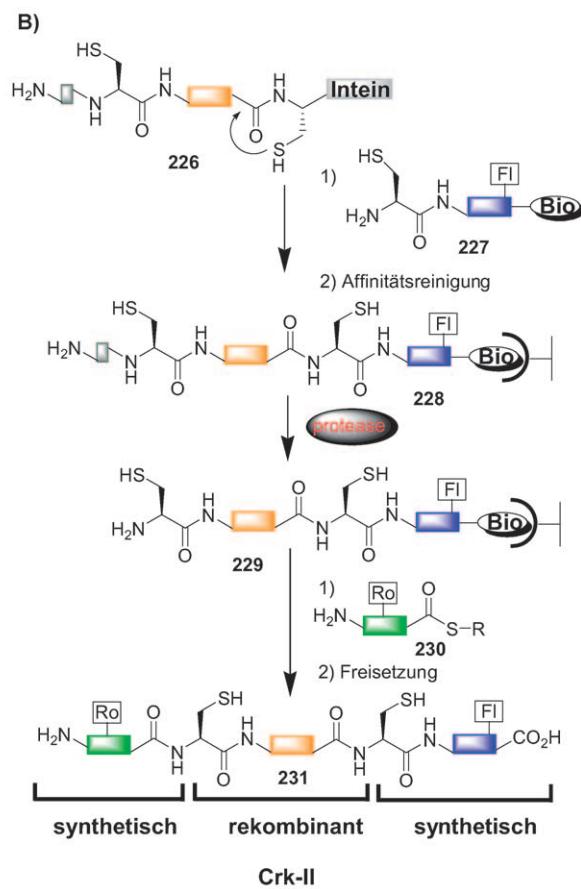
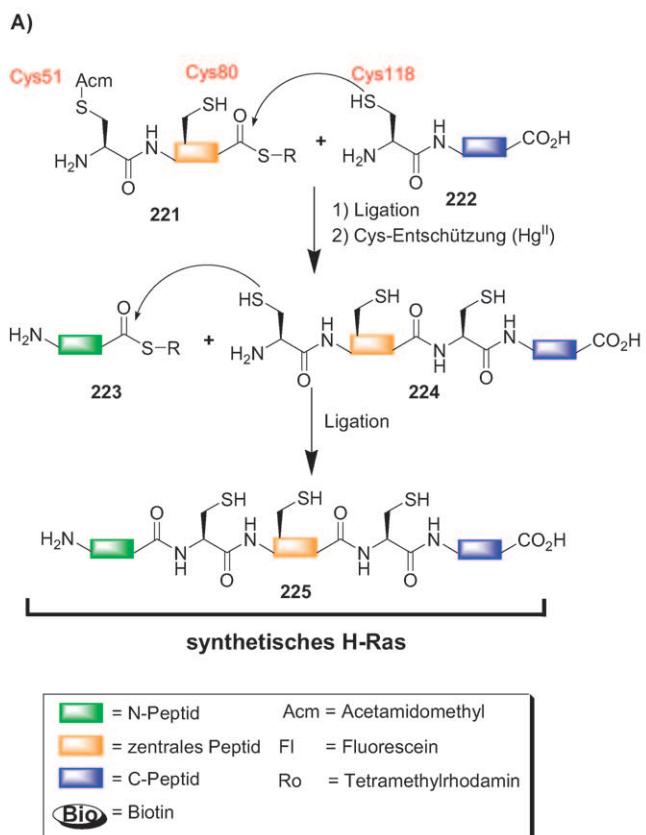


Schema 40. A) Phosphotyrosin (218) und Pmp (219). B) Semisynthese der LMW-PTP.

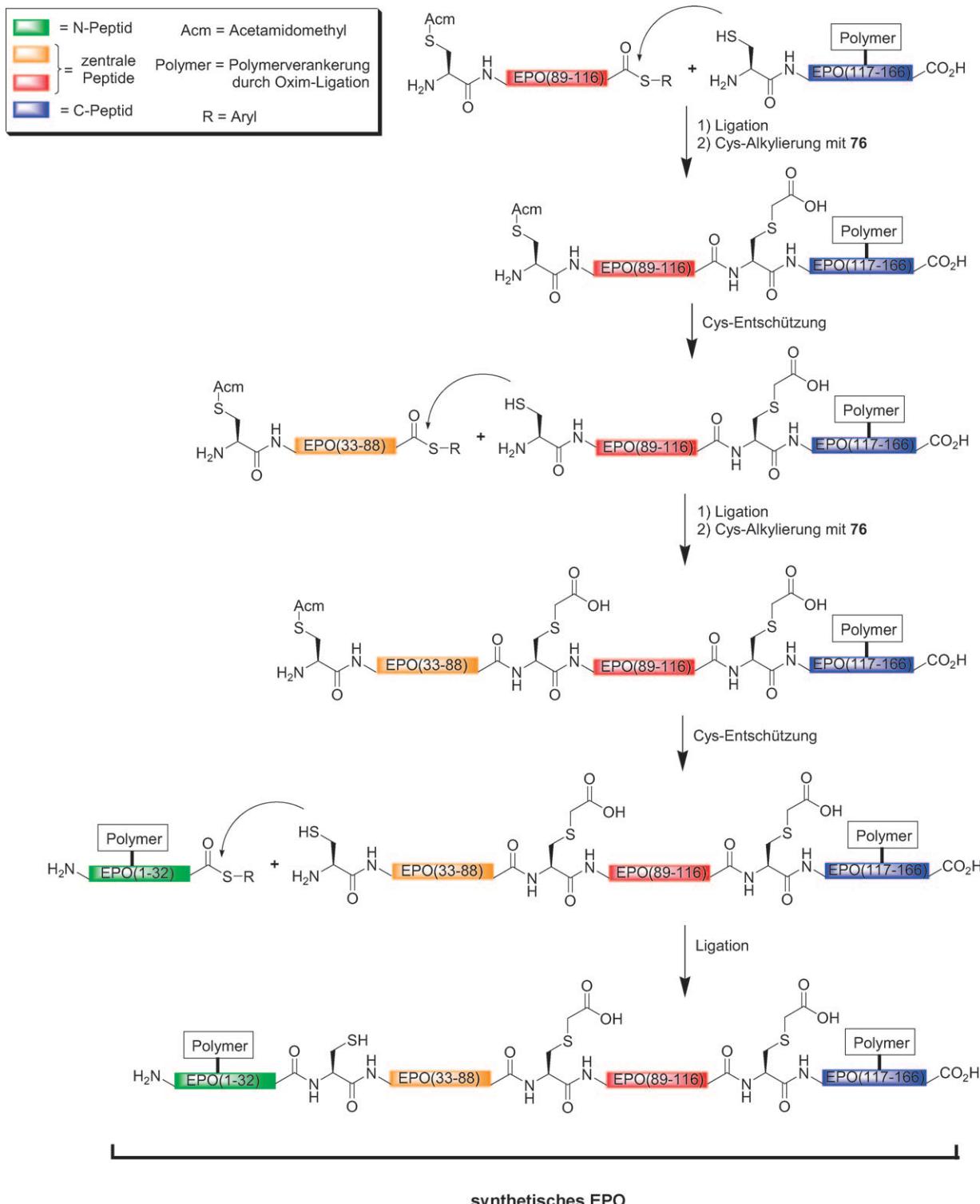
ligation modifiziert. Diese Polymere ersetzen Glycosylierungen, die natürlicherweise an diesen Positionen vorkommen. Damit gelang es, das Problem der inhomogenen Glycosylierung zu umgehen, wie man sie häufig bei natürlichen Glycoproteinen vorfindet. Die Epo-Synthese erfolgte ähnlich wie die Synthese von H-Ras vom C- zum N-terminalen Fragment mithilfe der oben beschriebenen Acm-Schutzgruppenstrategie. Allerdings verfügt Epo nicht an allen Ligationsstellen über natürlich vorkommende Cys-Reste, und somit wurden die zusätzlich eingefügten Cys-Reste mit Bromessigsäure (**76**) zu Analoga von Glutamat alkyliert, derjenigen Aminosäure, die sich natürlicherweise an diesen Positionen befindet (siehe Abschnitt 3.2.2.1). Die biologische Aktivität des synthetischen Epo war vergleichbar mit der des natürlichen Epo, allerdings zeigte das synthetische PEGylierte Hormon nach der Injektion in Ratten eine zwei- bis dreifach höhere Plasmakonzentration über viele Stunden.^[319]

7.3. Exprimierte Festphasenproteinligation (SPPL)

Ligationstechniken mit multiplen Fragmenten können auch rekombinante Peptide verwenden, wie Muir et al. mit der Synthese eines doppelt fluoreszenzmarkierten Crk-II-Proteins durch EPL und NCL demonstrierten.^[320] Crk-II ist ein Adapterprotein, das aus einer Src-homologen Domäne 2 (SH2) und zwei Src-homologen Domänen 3 (SH3) besteht. Das Protein wird durch Tyr-Phosphorylierung reguliert, die



Schema 41. Strategien zur Ligation multipler Fragmente: A) synthetisches H-Ras, B) exprimierte Festphasenproteinligation.

**Schema 42.** Chemische Totalsynthese von EPO.

eine intramolekulare Umordnung, bedingt durch die Assoziation der SH2-Domäne mit dem phosphorylierten Tyr-Rest, auslöst. Um diese intramolekulare Umordnung durch resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET) zu untersuchen, wurde ein geeignetes FRET-Paar an den N- und C-Terminus von Crk-II ligiert (Schema 41 B). Das zentrale Segment dieser

Dreikomponentenligation wurde als Inteinfusionsprotein **226** in Bakterien produziert. Der C-terminale Thioester des zentralen Fragments wurde mit EPL hergestellt und im Anschluss mit dem C-terminalen Peptid **226** ligiert, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff verknüpft war. Die notwendige Schützung des N-terminalen Cys-Restes wurde dadurch ge-

währleistet, dass der Rest in die Erkennungsstelle für die Protease Faktor Xa eingebettet wurde (Schema 41B). Im Anschluss wurde das Ligationsprodukt **228** mit der Protease versetzt, wodurch das N-terminale Cys des Proteins **229** freigesetzt wurde, um dann mit dem Tetramethylrhodamin-konjugierten Peptidthioester **230** ligiert zu werden. Als vorteilhaft stellte sich die Synthese an einem Trägermaterial heraus, die durch eine Biotin-Einheit des C-Peptids ermöglicht wurde. Die Synthesestrategie ähnelt dem Konzept der SPPS und wurde entsprechend als exprimierte Festphasenproteinligation (SPPL, solid-phase expressed protein ligation) bezeichnet. Nach der Abspaltung vom Träger bestätigten biochemische Untersuchungen, dass das doppelt markierte Crk-II **231** wie erwartet eine Änderung des FRET-Signals in Abhängigkeit von der Phosphorylierung zeigt und somit als Reporter für den Phosphorylierungszustand von Crk-II geeignet war.

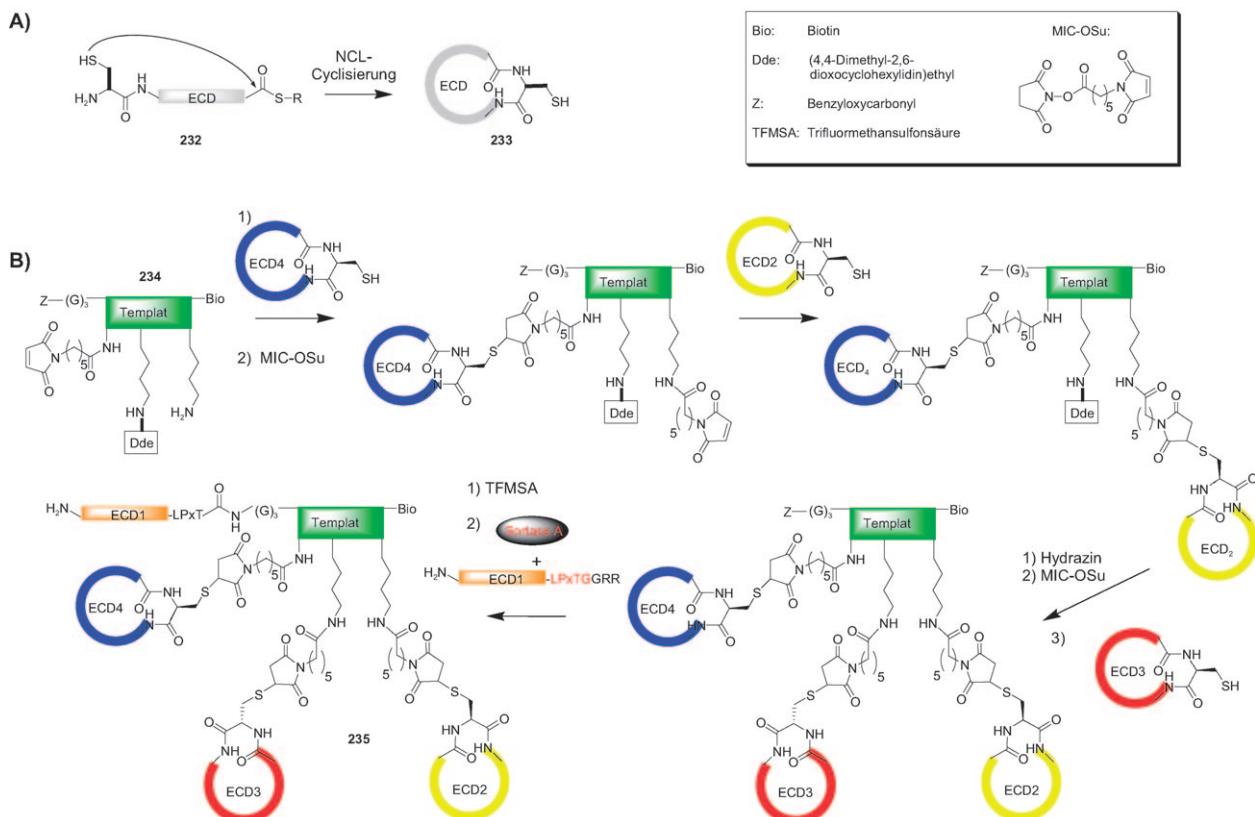
7.4. Synthetische Ribonuclease A

Neben den am häufigsten verwendeten Verfahren, NCL und EPL, wurden noch weitere Strategien zur Ligation multipler Fragmente eingesetzt. Das wohl bekannteste Beispiel ist die enzymatische Synthese voll funktionsfähiger Ribonuclease A aus sechs Fragmenten mithilfe der Subtiligase (siehe auch Abschnitt 5.1).^[321] Wie im Fall der NCL mussten auch hier die N-Terminalen der Peptidfragmente geschützt werden, um Selbstligationen zu vermeiden. Dies geschah

durch Einführen der Isonicotinyl(iNOC)-Gruppe an den α -Aminogruppen, die selektiv unter milden reduktiven Bedingungen entfernt werden kann. Der C-Terminus der Peptidfragmente wurde mit Glycolatphenylalaninamid verestert, um eine effektive Alkylierung der Subtiligase zu ermöglichen. Ribonuclease A wurde unter Subtiligasekatalyse vom C-terminalen zum N-terminalen Fragment hin aufgebaut, wobei nach jeder Ligation die Entschützung der iNOC-Gruppe erfolgte. Die synthetische Ribonuclease zeigte volle Aktivität, ähnlich wie rekombinante RNase A oder synthetische Enzyme, die mit anderen chemoselektiven Ligationstechniken hergestellt wurden. Hier sollte noch erwähnt werden, dass die Ribonuclease A ein klassisches Modellenzym für Proteinsyntheseverfahren ist. Es war das erste Enzym, das Ende der 60er Jahre durch SPPS komplett hergestellt wurde.^[322] Weiterhin gibt es Synthesemethoden, um die nativen Glycosylierungsmuster zu installieren.^[41] Eine Totalsynthese der Ribonuclease A aus sechs Fragmenten mithilfe von NCL wurde ebenfalls beschrieben.^[323]

7.5. Kombinierte rekombinante, enzymatische und chemische Synthesestrategie (CRECS)

In einer aktuellen Studie beschreiben Beyermann et al. die Anwendung von mehreren der in diesem Aufsatz beschriebenen Ligationstechniken zur Herstellung eines synthetischen Proteins, das die extrazelluläre Region eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR, Schema 43) nach-



ahmt.^[324] GPCRs binden ihre Liganden durch extrazelluläre Bindungsdomänen (ECDs), bestehend aus einer N-terminalen Region (ECD1) und drei Schleifen (ECD2–4), die die transmembranären Helices miteinander verknüpfen. Im Fall des Rezeptors 1 des Corticotrophin freisetzenden Faktors (CRF1) ist Urocortin 1 ein natürlicher Peptidagonist, der ausschließlich an die lösliche N-terminale ECD1 bindet.^[325] Im Unterschied dazu benötigt ein weiter bekannter Agonist, Sauvagin, den gesamten CRF1-Rezeptor, um hochaffin zu binden, was impliziert, dass die drei Schleifen (ECD2–4) eine wichtige Rolle bei der Bindung dieses Liganden spielen.^[326]

Um diese Vermutung näher zu untersuchen, wurden die Binedomänen ECD1–4 nacheinander auf ein synthetisches Peptidtemplat^[327] ligiert, das als Gerüst für die räumliche Anordnung der extrazellulären Fragmente von CRF1 diente. Das Templat wurde auf der Basis eines verzweigten Peptids konstruiert, das eine MIC-Gruppe (siehe Abschnitt 4.3.1), ein Dde-geschütztes Lys, ein ungeschütztes Lys und letztlich eine Triglycin-Einheit enthielt, die Ligationen mithilfe der Sortase A ermöglichte (siehe Abschnitt 5.2). Die weiteren Reste des Templat dienten zur Justierung des Abstands der funktionellen Gruppen und zur Vermittlung der Löslichkeit der Konstrukte. Synthetische cyclische Peptide **233**, die die drei Schleifenregionen des CRF1-Rezeptors (ECD2–4) nachahmen, wurden durch intramolekulare NCL der linearen Vorläuferpeptide **232** hergestellt (Schema 43A). Für die Synthese wurde zunächst der Cys-Rest des cyclischen ECD4 durch die MIC-Strategie (siehe Abschnitt 4.3.1) mit dem Templat konjugiert (Bildung von **234**). In analoger Weise wurden die zweite und dritte Domäne ECD2 und ECD3 konjugiert, nachdem weitere MIC-Gruppen installiert worden waren, zunächst durch Reaktion von MIC-OSu mit dem ungeschützten Lys und danach in gleicher Weise nachdem die Dde-Gruppe mit Hydrazin entfernt worden war. Parallel dazu wurde der N-Terminus von CRF1 (ECD1) in *E. coli* hergestellt. Dabei war die ECD1-Domäne C-terminal mit der Erkennungssequenz der Sortase A versehen und wurde mit der Triglycin-Einheit des Templat unter Sortasekatalyse ligiert (siehe Abschnitt 5.2), wodurch das erwünschte Proteinanalogon der extrazellulären Fraktion von CRF1, **235**, entstand (Schema 43B). Im Anschluss folgten Bindungsstudien mit dem synthetischen CRF1-Rezeptor und dem Peptidagonisten Sauvagin. Nur der synthetische CRF1-Rezeptor konnte diesen Liganden binden, weder ECD1 allein noch ein Kontrollkonstrukt, dem ECD1 fehlte, waren hierzu in der Lage. Dieses Ergebnis belegte, dass die Schleifen an der Bindung zwischen CRF1 und Sauvagin beteiligt sein müssen. Dieser als kombinierte rekombinante, enzymatische und chemische Synthesestrategie (CRECS) bezeichnete Ansatz kann also zur Herstellung synthetischer GPCRs herangezogen werden, die für Bindungsstudien mit den natürlichen Agonisten geeignet sind.^[324]

7.6. Konvergente Strategien zur Ligation mehrerer Fragmente

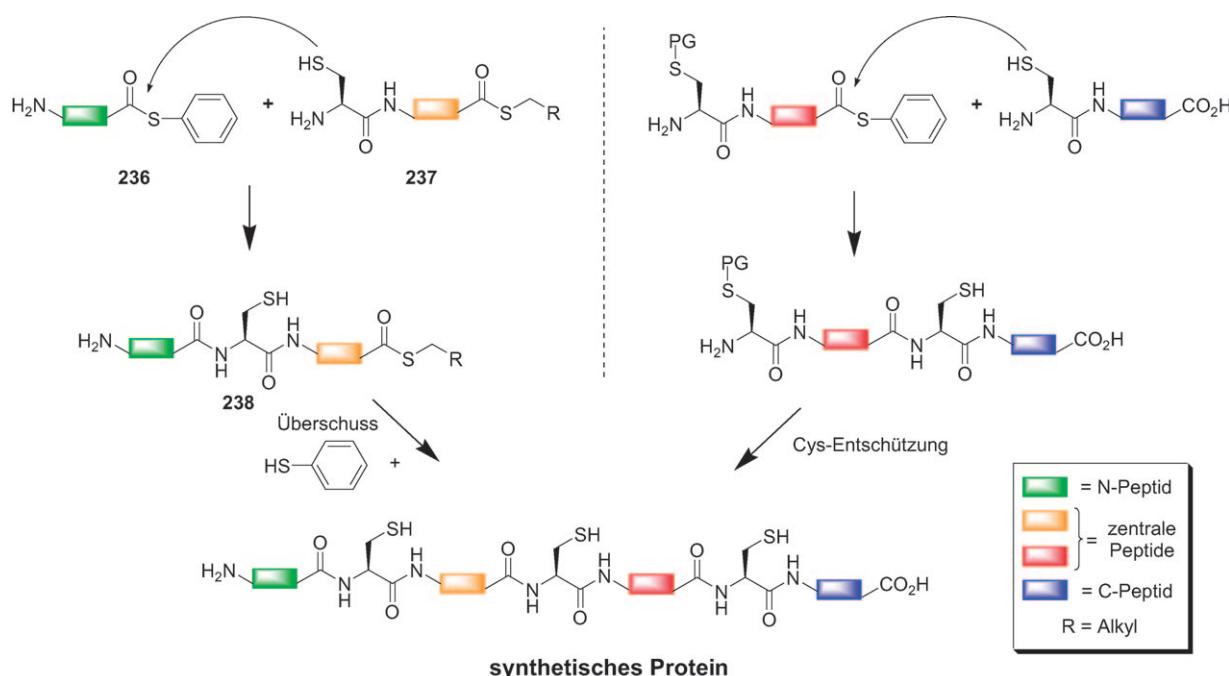
Alle soweit besprochenen Strategien bedürfen der schrittweisen Ligation der einzelnen Fragmente vom C- zum N-Terminus. Zur Herstellung vollständiger synthetischer

Proteine ist allerdings eine konvergente Synthese, bei der mehrere Fragmente parallel ligiert werden können, erstrebenswert. Eine konvergente Strategie setzt jedoch eine doppelte Schützung der zentralen Fragmente am N-terminalen Cys und am C-terminalen Thioester voraus. In diesem Zusammenhang wurden von Danishefsky phenolische Ester eingeführt, die wesentlich unreaktiver sind als die entsprechenden Thioester und zusätzlich über ein disulfidgeschütztes benachbartes Thiol verfügen.^[53] Die phenolischen Ester können durch Zugabe eines Überschusses an Thiolen in Thioester überführt werden, indem die Disulfide reduziert und somit eine O→S-Umlagerung induziert wird (siehe Schema 4E und Schema 15).

Eine andere Strategie, die als kinetisch kontrollierte Ligation bezeichnet wird, wurde von Kent und Mitarbeitern entwickelt.^[328] Dieses Verfahren nutzt die unterschiedlichen Reaktivitäten von Alkyl- und Arylthiolen für konvergente Proteinsynthesen.^[329] Dabei sind Alkylthioester ausreichend unreaktiv und nehmen nicht an Ligationsreaktionen teil, wenn konkurrierende Arylthirole vorhanden sind, und sie tolerieren sogar ungeschützte N-terminale Cys-Reste ohne signifikante Selbstligation. Durch Zugabe von überschüssigen Arylthiolen können sie jedoch durch einen Thiol-Thioester-Austausch in reaktive Arylthioester überführt werden. Bei kinetisch kontrollierten Ligationen wird das zentrale Fragment **237**, das über ein N-terminales Cys und einen C-terminalen Alkylthioester verfügt, über das N-terminale Cys mit einem Arylthioester **236** verknüpft. Danach wird der C-terminalen Alkythioester des Ligationsprodukts **238** über einen Thiol-Thioester-Austausch in einen Arylthioester überführt und kann so am nächsten Ligationsschritt teilnehmen (Schema 44). Diese Methode ermöglicht die parallele Ligation mehrerer Fragmente und somit eine vollständig konvergente Synthese von Proteinen. Die Anwendbarkeit dieses Verfahrens wurde am Beispiel der konvergenten Synthese der Proteine Crambin und Lysozym demonstriert (Schema 44).^[327,330] In letzterem Falle wurde das 130 Aminosäuren umfassende Lysozym aus vier Fragmenten hergestellt. Das gefaltete synthetische Enzym zeigte volle enzymatische Aktivität und seine Röntgenkristallstruktur war identisch mit der des biologisch produzierten Lysozyms.

8. Zusammenfassung

Das heute verfügbare Repertoire an chemoselektiven Ligations- und Modifikationstechniken bildet die Grundlage bedeutender Fortschritte in der chemischen Biologie, da solche Methoden die Möglichkeit bieten, funktionelle Auswirkungen molekularer Veränderungen in Proteinen zu beobachten, und das sogar im zellulären Zusammenhang. Dabei ist es sowohl die Qualität als auch die schiere Zahl an chemischen Methoden (oder mit anderen Worten eine prallgefüllte Werkzeugkiste), die dieses Gebiet entscheidend vorangebracht haben. Obwohl viele dieser Methoden bereits Anwendungen fanden, sind Chemiker und Biologen weiterhin an der Entdeckung und Entwicklung neuer chemoselektiver Verfahren zur Herstellung modifizierter Proteine interessiert. Besonderes Augenmerk gilt hier der Verwendung



Schema 44. Konvergente Ligation multipler Fragmente durch kinetisch kontrollierte Ligation.

leicht verfügbarer Ausgangsverbindungen sowie milden Reaktionsbedingungen, die auch Anwendungen *in vivo* erlauben.

Die große Zahl an beschriebenen Ligationsmethoden in Kombination mit konvergenten Synthesestrategien stellt alle Schlüsselemente für eine chemische Totalsynthese von natürlichen oder nichtnatürlichen Proteinen mit noch zu erforschenden Eigenschaften bereit. Es erscheint wahrscheinlich, dass synthetische Proteine in naher Zukunft weit mehr als reine Beweise der Machbarkeit sein werden und sich vielmehr als wichtige Hilfsmittel für biomedizinische oder biochemische Untersuchungen aller Art etablieren.^[331]

Die Autoren danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Förderung im Rahmen des Emmy-Noether-Programms (HA 4468/2-1 und SCHW 1163/3-1) und des SFB 765, dem BMBF und dem Fonds der Chemischen Industrie (FCI). Dr. Constantin Czekelius, Dr. Karl-Christian Mittermüller, Dr. Remigiusz Serwa, Dr. Verena Böhresch und Michaela Mühlberg wird für sorgfältige Korrekturen und hilfreiche Diskussionen während der Erstellung des Manuskripts gedankt. Wir danken Prof. Herbert Waldmann für die Grafik des Ras-Proteins in Schema 31 A und Nico Rind für die Erstellung der Vortitelgrafik.

Eingegangen am 18. März 2008

- [1] J. W. von Goethe, *Goethes Werke*, Weimarer Ausgabe, I. Abtheilung, 25. Band, S. 89.
- [2] a) E. Fischer, E. Fourneau, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 2868–2879; b) eine exzellente historische Übersicht über Peptidsynthesen und Ligationsstrategien: T. Kimmerlin, D. Seebach, *J. Pept. Res.* **2005**, *65*, 229–260.
- [3] a) C. T. Walsh in *Posttranslational Modifications of Proteins*, Roberts, Colorado, **2003**; b) B. G. Davis, *Science* **2004**, *303*, 480–482; c) F. Wold, *Annu. Rev. Biochem.* **1981**, *50*, 783–814; d) C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto, Jr., *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7508–7539; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7342–7372; e) D. P. Gamblin, S. I. van Kasteren, J. M. Calker, B. G. Davis, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *275*, 1949–1959; f) J.-P. Pellois, T. W. Muir, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 487–491.
- [4] a) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154; b) Nobelvortrag: R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 801–812; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 799–810.
- [5] a) M. Bodanszky in *Principles of Peptide Synthesis*, Springer, Berlin, **1984**; b) N. Seewald, H.-D. Jakubke in *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [6] H. Hojo, Y. Matsumoto, Y. Nakahara, E. Ito, Y. Suzuki, M. Suzuki, A. Suzuki, Y. Nakahara, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13720–13725.
- [7] Die Begriffe C- und N-Peptid werden in Anlehnung an die von Tam eingeführte Terminologie verwendet: J. P. Tam, J. Xu, K. D. Eom, *Biopolymers* **2001**, *60*, 194–205.
- [8] Aktueller Übersichtsartikel über schutzgruppenfreie Naturstoffsynthesen: R. W. Hoffmann, *Synthesis* **2006**, 3531–3541.
- [9] a) T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249–289; b) J.-P. Pellois, T. W. Muir, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 487–491; c) T. Durek, C. F. W. Becker, *Biomol. Eng.* **2005**, *22*, 153–172; d) B. L. Nilsson, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 91–118; e) O. Seitz, *Org. Synth. Highl. V* **2003**, *5*, 368–383; f) D. Rauh, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 840–844; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 826–829; g) C. Haase, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1575–1579; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1553–1556; h) J. Rademann, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4654–4656; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4554–4556.
- [10] Aktuelle Übersicht über Strategien der Amidbildung: J. W. Bode, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2006**, *9*, 765–775.
- [11] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *583*, 129–149.
- [12] a) D. S. Kemp, S. L. Leung, D. J. Kerkman, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 181–184; b) D. S. Kemp, D. J. Kerkman, *Tetrahedron*

- Lett.* **1981**, *22*, 185–186; c) D. S. Kemp, N. G. Galakatos, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1821–1829; d) D. M. Coltart, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3449–3491.
- [13] Diese Methode ist eine Erweiterung der vorher beschriebenen Prior-Amine-Capture-Strategie: a) D. S. Kemp, J. A. Grattan, J. Reczek, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 3465–3466; b) D. S. Kemp, D. J. Kerkman, S.-L. Leung, G. Hanson, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 490–498; c) D. S. Kemp, *Biopolymers* **1981**, *20*, 1793–1804; d) eine neuere Anwendung in Amin-Capture-Strategien durch Chinolinthioestersalze: S. Leleu, M. Penhoat, A. Bouet, G. Dupas, C. Papamicael, F. Marsais, V. Levacher, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15668–15669.
- [14] D. S. Kemp, N. G. Galakatos, B. Bowen, K. Tam, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1829–1843.
- [15] a) N. Fotoohi, N. G. Galakatos, D. S. Kemp, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2803–2817; b) D. S. Kemp, R. I. Carry, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2845–2848.
- [16] D. S. Kemp, R. I. Lary, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2216–2222.
- [17] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
- [18] N→S-Verschiebungen wurden unter sauren Bedingungen in der Synthese von (Glyco-)Peptidthioestern beschrieben: F. Nagaike, Y. Onuma, C. Kanazawa, H. Hojo, A. Ueki, Y. Nakahara, Y. Nakahara, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4465–4468. Ein weiteres Beispiel ist in Abschnitt 3.3.4 beschrieben. Diese Ergebnisse implizieren, dass die S→N-Verschiebung in der NCL zur Bildung des Amids nicht generell als irreversibel betrachtet werden kann. Jedoch führen die schnellen Umlagerungskinetiken zu einer schnellen Gleichgewichtseinstellung und daher zur Bildung des thermodynamisch bevorzugten Amids. In der Literatur wird der S→N-Acyltransfer gemeinhin als irreversibel bezeichnet, was wir hier der Konsistenz wegen fortführen werden.
- [19] Ausgewählte Beispiele finden sich in Abschnitt 6.
- [20] P. E. Dawson, S. B. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923–960; siehe auch die Abschnitte 6 und 7.
- [21] J. A. Camarero, A. Shekhtman, E. A. Campbell, M. Chlenov, T. M. Gruber, D. A. Bryant, S. A. Darst, D. Cowburn, T. W. Muir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 8536–8541.
- [22] D. Cowburn, T. W. Muir, *Methods Enzymol.* **2001**, *339*, 41–54.
- [23] C. Dose, O. Seitz, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4365–4368.
- [24] S. Ficht, C. Dose, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2098–2103.
- [25] M. Lovrinovic, C. M. Niemeyer, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 61–67.
- [26] T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10068–10073.
- [27] P. E. Dawson, M. J. Churchill, M. R. Ghadiri, S. B. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4325–4329.
- [28] Eine systematische Studie: E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6640–6646.
- [29] Eine neuere Anwendung in der kinetisch kontrollierten Segmentligation ist in Abschnitt 7 beschrieben. Einige NCL-Ligationen verwenden auch Tris(2-carboxyethyl)phosphorhydrazochlorid (TCEP) als thiolfreies Reduktionsmittel.
- [30] F. I. Valiyaveetil, R. MacKinnon, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9113–9120.
- [31] D. H. Lee, J. R. Granja, J. A. Martinez, K. Severin, M. R. Ghadiri, *Nature* **1996**, *382*, 525.
- [32] K. Severin, D. H. Lee, J. A. Martinez, M. R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1017–1024; Übersichtsartikel: R. Issac, Y.-W. Ham, J. Chmielewski, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 458–463.
- [33] K. Severin, D. H. Lee, A. J. Kennan, M. R. Ghadiri, *Nature* **1997**, *389*, 706–709.
- [34] A. Saghatelyan, Y. Yokobayashi, K. Soltani, M. R. Ghadiri, *Nature* **2001**, *409*, 797–801.
- [35] Ein kürzliches Beispiel für die Anwendung einer DNA-templatkontrollierten NCL: C. Dose, S. Ficht, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5495–5499; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5369–5373, zit. Lit.
- [36] Ein Beispiel einer NCL-Selbstreplikation mit fluorierten Peptiden: C. Jäckel, M. Salwigek, B. Koksch, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4305–4309; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4198–4203.
- [37] Übersichtsartikel: J. A. Camarero, A. R. Mitchell, *Protein Pept. Lett.* **2005**, *12*, 723–728.
- [38] L. Zhang, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3311–3320.
- [39] L. E. Canne, S. M. Walker, S. B. Kent, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1217–1220.
- [40] Ein Fmoc-Entschüttungsprotokoll mit nicht-nucleophilen Basen als Ersatz für Piperidin: a) X. Li, T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8669–8672; b) A. B. Clippongale, C. J. Barrow, J. D. Wade, *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 225–234.
- [41] Synthese von Glycopeptidthioestern mithilfe einer doppelten Linker-Strategie: S. Mezzato, M. Schaffrath, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1677–1681; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1650–1654.
- [42] G. W. Kenner, J. R. McDermott, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1971**, 636–637.
- [43] R. Ingenito, E. Bianchi, D. Fattori, A. Pessi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11369–11374.
- [44] a) B. J. Backes, A. A. Virgilio, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3055–3056; b) B. J. Backes, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322–2330.
- [45] Y. He, J. P. Wilkins, L. L. Kiessling, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2483–2485.
- [46] Y. Shin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11684–11698. Bezuglich einer Selbstreinigungsstrategie von Thioestern mit dem Safety-Catch-Linker siehe: F. Mende, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4661–4665; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4577–4580.
- [47] a) A. Sewing, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3503–3505; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3395–3396; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3395–3396; b) D. Swinnen, D. Hilvert, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2439–2442.
- [48] A. R. Mezo, R. P. Cheng, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3885–3891.
- [49] a) S. Futaki, K. Sogawa, J. Maruyama, T. Asahara, M. Niwa, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6237–6240; b) S. Biancalana, D. Hudson, M. F. Songster, S. A. Thompson, *Lett. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 291–297; c) R. von Eggelkraut-Gottanka, A. Klose, A. G. Beck-Sickinger, M. Beyermann, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3551–3554.
- [50] C. P. R. Hackenberger, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2291–2295.
- [51] a) Y. Kajihara, A. Yoshihara, K. Hiranoa, N. Yamamoto, *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1333–1340; b) A. C. Nagalingam, S. E. Radford, S. L. Warriner, *Synlett* **2007**, 2517–2520.
- [52] P. Botti, M. Villain, S. Manganiello, H. Gaertner, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4861–4864.
- [53] J. D. Warren, J. S. Miller, S. J. Keding, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6576–6578.
- [54] A. P. Tofteng, K. J. Jensen, T. Hoeg-Jensen, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2105–2107.
- [55] B. Wu, J. D. Warren, J. Chen, G. Chen, Z. Hua, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5219–5223.
- [56] Bezuglich eines konzeptionell ähnlichen Verfahrens mit Cys-Pro-Estern als Autoaktivierungseinheiten siehe: T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1903–1905.
- [57] J. Chen, J. D. Warren, B. Wu, G. Chen, Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1969–1972.
- [58] a) B. Wu, Z. Tan, G. Chen, J. Chen, Z. Hua, Q. Wan, K. Ranaganathan, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8009–

- 8011; b) J. Chen, G. Chen, B. Wu, Q. Wan, Z. Tan, Z. Hua, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 8013–8016.
- [59] Ein wegweisender Bericht zur Anwendung dieser Strategie in der Synthese einer nicht-nativen HIV-Proteinase mit einer Thioester-Einheit im Rückgrat: M. Schnoelzer, S. B. H. Kent, *Science* **1992**, 256, 221–225.
- [60] J. P. Tam, Y. A. Lu, C. F. Liu, J. Shao, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 12485–12489.
- [61] C. F. Liu, C. Rau, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 933–936.
- [62] R. E. Offord, *Nature* **1969**, 221, 37–40.
- [63] F. Borrás, R. E. Offord, *Nature* **1970**, 227, 716–718.
- [64] R. M. Jones, K. Rose, R. E. Offord, *Biochem. J.* **1987**, 247, 785–788.
- [65] D. A. Erlanson, M. Chytil, G. L. Verdine, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 981–991.
- [66] W. Zheng, Z. Zhang, S. Ganguly, J. L. Weller, D. C. Klein, P. A. Cole, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 1054–1057.
- [67] A. Romanelli, A. Shekhtman, D. Cowburn, T. W. Muir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 6397–6402.
- [68] M. A. Shogren-Knaak, C. L. Peterson, *Methods Enzymol.* **2003**, 375, 62–76.
- [69] T. J. Tolbert, D. Franke, C. H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 909–915.
- [70] T. J. Tolbert, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2275–2278; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2171–2174.
- [71] a) C. P. R. Hackenberger, M. Chen, B. Imperiali, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 5043–5048; b) S. Mathys, T. C. Evans, Jr., I. C. Chute, H. Wu, S. Chong, J. Benner, X.-Q. J. Liu, M.-Q. Xu, *Gene* **1999**, 231, 1–13.
- [72] D. Macmillan, L. Arham, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9530–9531.
- [73] I. E. Gentle, D. P. De Souza, M. Baca, *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 658–663.
- [74] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6705–6710.
- [75] T. C. Evans, Jr., J. Benner, M. Q. Xu, *Protein Sci.* **1998**, 7, 2256–2264.
- [76] T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72, 249–289.
- [77] R. David, M. P. Richter, A. G. Beck-Sickinger, *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 663–677.
- [78] C. J. Noren, J. Wang, F. B. Perler, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 458–476; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 450–466.
- [79] L. Saleh, F. B. Perler, *Chem. Rec.* **2006**, 6, 183–193.
- [80] Inteine ähneln evolutionär betrachtet der Autoprozessierungsdomäne von Hedgehog-Proteinen, die diesen Prozess für die intermolekulare Verknüpfung einer Cholesterin-Einheit mit dem C-Terminus der Hedgehog-Signaldomäne verwenden. Ein Übersichtsartikel hierzu: R. K. Mann, P. A. Beachy, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2000**, 1529, 188–202.
- [81] H. Wu, Z. Hu, X. Q. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 9226–9231.
- [82] I. Giriati, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7180–7181.
- [83] W. Sun, J. Yang, X. Q. Liu, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 35281–35286.
- [84] S. Brenzel, T. Kurpiers, H. D. Mootz, *Biochemistry* **2006**, 45, 1571–1578.
- [85] M. W. Southworth, E. Adam, D. Panne, R. Byer, R. Kautz, F. B. Perler, *EMBO J.* **1998**, 17, 918–926.
- [86] K. V. Mills, B. M. Lew, S. Jiang, H. Paulus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 3543–3548.
- [87] C. Ludwig, M. Pfeiff, U. Linne, H. D. Mootz, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5343–5347; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5218–5221.
- [88] P. McCaldon, P. Argos, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1988**, 4, 99–122.
- [89] T. Wieland, G. Schneider, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, 580, 159–168.
- [90] G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, 82, 70–77.
- [91] L. Zhang, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3–6.
- [92] Übersichtsartikel zum Einbau von Sec in Proteine: R. J. Hondal, *Protein Pept. Lett.* **2005**, 12, 757–764.
- [93] a) R. Quaderer, A. Sewing, D. Hilvert, *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 1197–1206; b) M. D. Gieselmann, L. Xie, W. A. van der Donk, *Org. Lett.* **2001**, 3, 1331–1334.
- [94] a) M. D. Gieselmann, Y. Zhu, H. Zhou, D. Galonic, W. A. van der Donk, *ChemBioChem* **2002**, 3, 709–716; b) G. Roelfes, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 2377–2379; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2275–2277; c) R. J. Hondal, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5140–5141.
- [95] N. P. Luthra, R. C. Costello, J. D. Odom, *J. Biol. Chem.* **1981**, 257, 1142–1144.
- [96] a) S. M. Berry, M. D. Gieselmann, M. J. Nilges, W. A. van der Donk, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2084–2085; b) M. Ralle, S. M. Berry, M. J. Nilges, M. D. Gieselmann, W. A. van der Donk, Y. Lu, N. J. Blackburn, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7244–7256.
- [97] Übersichtsartikel zur chemischen Modifizierung von Proteinen: a) D. Qi, C.-M. Tann, D. Haring, M. D. Distefano, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 3081–3111; b) C.-M. Tann, D. Qi, M. D. Distefano, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 696–704; c) D. R. W. Hodgson, J. M. Sanderson, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 422–430; d) B. G. Davis, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, 14, 379–386; erste Beispiele zur chemischen Modifizierung von Aminosäuren in aktiven Zentren: e) K. E. Neet, D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1966**, 56, 1606–1611; f) L. Polgar, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 3153–3154; g) P. I. Clark, G. Lowe, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, 923–924.
- [98] Bezuglich der Verwendung ortsspezifischer Modifikationen in der dirigierten molekularen Evolution von Enzymkatalysatoren siehe: a) M. T. Reetz, *Tetrahedron* **2002**, 58, 6595–6602; b) M. T. Reetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 5716–5722.
- [99] Ein kürzlich beschriebenes Beispiel einer ortsspezifischen Glycosylierung: S. I. van Kasteren, H. B. Kramer, H. H. Jensen, S. J. Campbell, J. Kirkpatrick, N. J. Oldham, D. C. Anthony, B. G. Davis, *Nature* **2007**, 446, 1105–1109.
- [100] M. T. Perlstein, M. Z. Atassi, S. H. Cheng, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct.* **1971**, 236, 174–182.
- [101] L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 526–533.
- [102] a) A. Brikk, Y. Y. Yang, S. Ficht, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 5626–5627; b) D. Bang, G. I. Makhatadze, V. Tereshko, A. A. Kossiakoff, S. B. H. Kent, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 3920–3924; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3852–3856; c) D. Bang, A. V. Gribenko, V. Tereshko, A. A. Kossiakoff, S. B. H. Kent, G. I. Makhatadze, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 139–143; d) M. J. Bayro, J. Mukhopadhyay, G. V. T. Swapna, J. Y. Huang, L. C. Ma, E. Sineva, P. E. Dawson, G. T. Montelione, R. H. Ebright, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12382–12383.
- [103] Bezuglich der Desulfurierung in der zuckerunterstützten Liganden nach Wong et al. siehe Abschnitt 3.3.5.
- [104] B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Org. Lett.* **2007**, 9, 687–690.
- [105] S. He, D. Bauman, J. S. Davis, A. Loyola, K. Nishioka, J. L. Gronlund, D. Reinberg, F. Meng, N. Kelleher, D. G. McCafferty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 12033–12038.
- [106] a) K. Nishide, Y. Shigeta, K. Obata, T. Inoue, M. Node, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 2271–2274; b) M. Node, K. Nishide, Y. Shigeta, K. Obata, H. Shiraki, H. Kunishige, *Tetrahedron* **1997**, 53, 12883–12894.
- [107] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 9408–9412; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 9248–9252.
- [108] G. J. L. Bernardes, J. M. Chalker, J. C. Errey, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5052–5053.

- [109] Zu einem Verfahren, das Dha-Proteine für die Synthese acetylierter und methylierter Lys-Analoga verwendet, siehe: J. Guo, J. Wang, J. S. Lee, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6499–6501; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6465–6468. Andere chemoselektive Modifikationen von Dha: a) Z. A. Knight, B. Schilling, R. H. Row, D. M. Kenski, B. W. Gibson, K. M. Shokat, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1047–1054; b) F. Rusnak, J. Zhou, G. Hathaway, *J. Biomol. Tech.* **2002**, *13*, 228–237.
- [110] R. Quaderer, D. Hilvert, *Chem. Commun.* **2002**, 2620–2621.
- [111] Ein anderer Zugang zu Dha-Proteinen beruht auf der Einführung von Phenylselenocystein durch Exprimierung nichtnatürlicher Proteine und anschließende Eliminierung mit H_2O_2 : J. Wang, S. M. Schiller, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6973–6975; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6849–6851.
- [112] Eine vorherige Diskussion bezüglich der Verwendung von Thiol-haltigen Analoga natürlicher Aminosäuren an Ligationsstellen findet sich in Lit. [101].
- [113] D. Crich, A. Banerjee, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10064–10065.
- [114] a) C. Haase, H. Rohde, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6912–6915; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6807–6810; b) J. Chen, Q. Wan, Y. Yuan, J. Zhu, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8649–8652; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8521–8524.
- [115] a) G. L. Kenyon, T. W. Bruice, *Methods Enzymol.* **1977**, *47*, 407–430; b) R. Wynn, F. M. Richards, *Methods Enzymol.* **1995**, *251*, 351–356; c) G. DeSantis, P. Berglund, M. R. Stabile, M. Gold, J. B. Jones, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5968–5973; d) G. DeSantis, X. Shang, J. B. Jones, *Biochemistry* **1999**, *38*, 13391–13397.
- [116] Zur chemoselektiven Funktionalisierung von Cysteinen zu Disulfid-verbrückten Glykonjugaten mit Glycomethan- oder Phenylthiosulfonaten, siehe: a) B. G. Davis, M. A. T. Maughan, M. P. Green, A. Ullman, J. B. Jones, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 245–262; b) D. P. Gamblin, P. Garnier, S. J. Ward, N. J. Oldham, A. J. Fairbanks, B. G. Davis, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3642–3644. Eine Strategie mit Glycoselenylsulfiden: c) D. P. Gamblin, P. Garnier, S. van Kasteren, N. J. Oldham, A. J. Fairbanks, B. G. Davis, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 846–851; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 828–833; d) G. J. L. Bernardes, D. P. Gamblin, B. G. Davis, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4111–4115; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4007–4011.
- [117] G. J. L. Bernardes, E. L. Grayson, S. Thompson, J. M. Chalker, J. C. Errey, F. E. Oualid, T. D. W. Claridge, B. G. Davis, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2276–2279; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2244–2247.
- [118] D. A. Bochar, L. Tabernero, C. V. Stauffacher, V. W. Rodwell, *Biochemistry* **1999**, *38*, 8879–8883.
- [119] G. G. Kochendoerfer, S. Y. Chen, F. Mao, S. Cressman, S. Traviglia, H. Shao, C. L. Hunter, D. W. Low, E. N. Cagle, M. Carnevali, V. Gueriguian, P. J. Keogh, H. Porter, S. M. Stratton, M. C. Wiedeke, J. Wilken, J. Tang, J. J. Levy, L. P. Miranda, M. M. Crnogorac, S. Kalbag, P. Botti, J. Schindler-Horvat, L. Savatski, J. W. Adamson, A. Kung, S. B. Kent, J. A. Bradburne, *Science* **2003**, *299*, 884–887.
- [120] a) H. B. Smith, F. C. Hartman, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 4921–4925; b) C. E. Hopkins, P. B. O'Connor, K. N. Allen, C. E. Costello, D. R. Tolan, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 1591–1599.
- [121] R. Okamoto, Y. Kajihara, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5482–5486; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5402–5406.
- [122] Bezuglich einer Ester-Amid-Migration unter leicht basischen Bedingungen in der Synthese „schwieriger“ Peptidsequenzen siehe: a) I. Coin, R. Dölling, E. Krause, M. Bienert, M. Beyermann, C. Dan Sferdean, L. A. Carpino, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6171–6177; b) L. A. Carpino, E. Krause, C. Dan Sferdean, M. Schümann, H. Fabian, M. Bienert, M. Beyermann, *Tetra-*
- hedron Lett.* **2004**, *45*, 7519–7523; c) Y. Sohma, M. Sasaki, Y. Hayashi, T. Kimura, Y. Kiso, *Chem. Commun.* **2004**, 124–125; d) M. Mutter, A. Chandravarkar, C. Boyat, J. Lopez, S. Dos Santos, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Patiny, L. Saucède, G. Tuchscherer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4267–4273; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4172–4178.
- [123] Natürlich vorkommende Met-Aminosäuren, die mit dieser Strategie interferieren, können als Sulfoxide geschützt und in die Thioether zurückverwandelt werden. Siehe auch Lit. [50].
- [124] J. P. Tam, Q. Yu, *Biopolymers* **1998**, *46*, 319–327. Bezuglich einer Desulfurierung von Hcy zu α -Aminoisobuttersäure (Abu) siehe Lit. [101].
- [125] Eine NCL mit einem Isocystein anstelle eines Cys zum Einbau von β -Aminosäuren in das Peptidrückgrat: C. Dose, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 59–65.
- [126] R. L. Heinrikson, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 4090–4096.
- [127] F. R. Naider, J. M. Becker, *Biopolymers* **1997**, *43*, 3–14.
- [128] Ein Highlight-Artikel über cysteinfreie Ligationen: D. Macmillan, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7830–7834; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7668–7672.
- [129] Bezuglich einer Anwendung in der Synthese Disulfid-verbrückter Proteinanaloga siehe: S. J. Bark, S. B. H. Kent, *FEBS Lett.* **1999**, *460*, 67–76.
- [130] L. E. Canne, S. J. Bark, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5891–5896.
- [131] a) W. D. F. Meutermans, S. W. Golding, G. T. Bourne, L. P. Miranda, M. J. Dooley, P. F. Alewood, M. L. Smythe, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9790–9796; b) Y. Shao, W. Lu, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3911–3914.
- [132] a) P. Botti, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1831–1833; b) C. Marinzi, S. J. Bark, J. Offer, P. E. Dawson, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2323–2328.
- [133] a) D. L. J. Clive, S. Hisaindee, D. M. Coltart, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9247–9254; b) S. Tchertchian, O. Hartley, P. Botti, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 9208–9214; c) D. Macmillan, D. W. Anderson, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4659–4662.
- [134] T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6059–6061.
- [135] C. Marinzi, J. Offer, R. Longhi, P. E. Dawson, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2749–2757.
- [136] C. Chatterjee, R. K. McGinty, J.-P. Pellois, T. W. Muir, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2872–2876; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2814–2818. Bezuglich eines Highlight-Artikels, insbesondere zur Relevanz ubiquitinierter Proteine, siehe: C. P. R. Hackenberger, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1221–1223.
- [137] R. K. McGinty, J. Kim, C. Chatterjee, R. G. Roeder, T. W. Muir, *Nature* **2008**, *453*, 812–816.
- [138] J. Offer, P. E. Dawson, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 23–26.
- [139] J. Offer, C. N. C. Boddy, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4642–4646.
- [140] D. W. Low, M. G. Hill, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, P. Botti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6554–6559.
- [141] B. Wu, J. Chen, J. D. Warren, G. Chen, Z. Hua, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4222–4231; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4116–4125.
- [142] Diese Umlagerung wurde bereits vorher beobachtet und angewendet: J. Vizzavona, F. Dick, T. Vorherr, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1963–1965. Anwendung in der Thioester-Synthese: T. Kawakami, M. Sumida, K. Nakamura, T. Vorherr, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8805–8807.
- [143] A. Brik, C.-H. Wong, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 5670–5675.
- [144] a) A. Brik, Y.-Y. Yang, S. Ficht, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5626–5627; b) Y.-Y. Yang, S. Ficht, A. Brik, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7690–7701.
- [145] A. Brik, S. Ficht, Y.-Y. Yang, C. S. Bennett, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15026–15033.

- [146] R. J. Payne, S. Ficht, S. Tang, A. Brik, Y.-Y. Yang, D. A. Case, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13527–13536.
- [147] S. Ficht, R. J. Payne, A. Brik, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6079–6083; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5975–5979.
- [148] R. J. Payne, S. Ficht, W. A. Greenberg, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4483–4487; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4411–4415.
- [149] a) B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939–1941; b) E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141–2143; c) B. L. Nilsson, L. L. Kiesling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 9–12.
- [150] Übersichtsartikel: M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3168–3178; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106–3116.
- [151] J. Meyer, H. Staudinger, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635–646.
- [152] M. B. Soellner, A. Tam, R. T. Raines, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9824–9830.
- [153] A. Tam, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11421–11430.
- [154] M. B. Soellner, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8820–8828.
- [155] a) M. B. Soellner, K. A. Dickson, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11790–11791; b) M. Köhn, R. Wacker, C. Peters, H. Schroeder, L. Soulere, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6010–6014; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5830–5834; c) A. Watzke, M. Gutierrez-Rodriguez, M. Köhn, R. Wacker, H. Schroeder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6288–6306; d) A. Watzke, M. Köhn, M. Gutierrez-Rodriguez, R. Wacker, H. Schroeder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1436–1440; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1408–1412.
- [156] a) B. L. Nilsson, R. J. Hondal, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5268–5269; b) L. Liu, Z.-Y. Hong, C.-H. Wong, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 429–432; c) R. Merkx, D. T. S. Rijkers, J. Kemkink, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4515–4518.
- [157] a) O. David, W. J. N. Meester, H. Bieräugel, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4509–4511; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4373–4375; b) G. Masson, T. den Hartog, H. E. Schoemaker, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Synlett* **2006**, 865–868.
- [158] a) E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010; b) N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644–648.
- [159] Zur Konjugation ungeschützter Zuckerderivate an Proteineinträger durch die spurlose Staudinger-Ligation: C. Grandjean, A. Boutonnier, C. Guerreiro, J.-M. Fournier, L. A. Mular, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7123–7132.
- [160] R. Kleineweischede, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6073–6077; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5984–5988.
- [161] a) C. F. Liu, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4149–4153; b) C. F. Liu, J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 6584–6588.
- [162] J. P. Tam, Z. Miao, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9013–9022.
- [163] J. P. Tam, Z. Miao, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4253–4260.
- [164] G. Chen, J. D. Warren, J. Chen, B. Wu, Q. Wan, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7560–7562.
- [165] G. Chen, Q. Wan, Z. Tan, C. Kan, Z. Hua, K. Ranganathan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7527–7531; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7383–7387.
- [166] Der Begriff „Bioorthogonalität“ wurde von C. R. Bertozzi eingeführt: G. A. Lemieux, C. L. de Graffenreid, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4708–4709. Übersichtsartikel: D. D. Dube, C. R. Bertozzi, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 616–625.
- [167] a) H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 727–736; b) J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21.
- [168] a) C. P. R. Hackenberger, S. Hinderlich, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1763–1765; b) C. T. Campbell, S. G. Sampathkumar, K. J. Yarema, *Mol. BioSyst.* **2007**, *3*, 187–194; c) O. T. Keppler, R. Horstkorte, M. Pawlita, C. Schmidt, W. Reutter, *Glycobiology* **2001**, *11*, 11R–18R; d) Beispiel für eine Modifikation lipiderer Biopolymere: Y. Kho, S. C. Kim, C. Jiang, D. Barma, B. Deb, S. W. Kwon, J. Cheng, J. Jaunbergs, C. Weinbaum, F. Tamanoi, J. Falck, Y. Zhao, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12479–12484.
- [169] Übersichtsartikel: a) L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 34–68; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 34–66; b) D. A. Dougherty, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 645–652; c) J. Xie, P. G. Schultz, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 548–554.
- [170] A. J. Link, M. L. Mock, D. A. Tirrell, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 603–609.
- [171] a) I. Chen, M. Howarth, W. Lin, A. Y. Ting, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 99–104; b) M. Howarth, A. Y. Ting, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 534–545; c) T. Dierks, B. Schmidt, L. Borissenko, J. Peng, A. Preusser, M. Mariappan, K. von Figura, *Cell* **2003**, *113*, 435–444; d) I. S. Carrico, B. L. Carlson, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 321–322; siehe auch Lit. [247] und [248].
- [172] G. Hosein Hakimelahi, G. Just, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 2119–2122.
- [173] Elektronenarme Azide können Thiatriazoline über einen schrittweisen Prozess bilden. Eine detaillierte mechanistische Diskussion hierzu: R. V. Kolakowski, N. Shangguan, R. R. Sauers, L. J. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5695–5702.
- [174] N. Shangguan, S. Katukojvala, R. Greenberg, L. J. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7754–7755. Ein ähnlicher Prozess mit Selenocarboxylaten anstelle von Thiosäuren: a) X. Wu, L. Hu, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8401–8405; b) X. Wu, L. Hu, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 765–774.
- [175] F. Fazio, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9083–9085.
- [176] a) R. Merkx, A. J. Brouwer, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1125–1128; b) K. N. Barlett, R. V. Kolakowski, S. Katukojvala, L. J. Williams, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 823–826.
- [177] J. W. Bode, R. M. Fox, K. D. Baucom, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1270–1274; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1248–1252.
- [178] Eine konfigurationserhaltende Synthese C-terminaler α -Keto-säurepeptide durch oxidative Spaltung von Cyanoschwefelyldien: L. Ju, A. R. Lippert, J. W. Bode, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4253–4255.
- [179] N. Carrillo, E. A. Davalos, J. A. Russak, J. W. Bode, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1452–1453.
- [180] W.-K. Chan, C.-M. Ho, M.-K. Wong, C.-M. Che, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14796–14797.
- [181] R. Huisgen, G. Szeimies, L. Moebius, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 2494–2507.
- [182] C. W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [183] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [184] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [185] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128–1137.
- [186] C. Nolte, P. Mayer, B. F. Straub, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2147–2149; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2101–2103.

- [187] J.-F. Lutz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1036–1043; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1018–1025.
- [188] P. Wu, V. V. Fokin, *Aldrichimica Acta* **2007**, *40*, 7–17.
- [189] a) C. M. Salisbury, B. F. Cravatt, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1229–1238; b) S. A. Sieber, B. F. Cravatt, *Chem. Commun.* **2006**, 2311–2319.
- [190] R. Breinbauer, M. Köhn, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1147–1149.
- [191] V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51–68.
- [192] M. V. Gil, M. J. Arevalo, J. Lopez, *Synthesis* **2007**, 1589–1620.
- [193] S. Dedola, S. A. Nepogodiev, R. A. Field, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1006–1017.
- [194] Y. L. Angell, K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1674–1689.
- [195] C. W. Tornoe, S. J. Sanderson, J. C. Mottram, G. H. Coombs, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 312–324.
- [196] W. S. Horne, M. K. Yadav, C. D. Stout, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15366–15367.
- [197] a) K. Oh, Z. Guan, *Chem. Commun.* **2006**, 3069–3071; b) Y. Angell, K. Burgess, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9595–9598.
- [198] a) V. D. Bock, R. Perciaccante, T. P. Jansen, H. Hiemstra, J. H. V. Maarseveen, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 919–922; b) V. D. Bock, D. Speijer, H. Hiemstra, J. H. V. Maarseveen, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 971–975; c) R. A. Turner, A. G. Oliver, R. S. Lokey, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5011–5014; d) M. Roice, I. Johannsen, M. Meldal, *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *23*, 662–673.
- [199] A. Tam, U. Arnold, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12670–12671.
- [200] a) V. Aucagne, D. A. Leigh, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4505–4507; b) R. Franke, C. Doll, J. Eichler, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4479–4482.
- [201] a) C. J. Cavender, V. J. Shiner, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3567–3569; b) A. Vasella, C. Witzig, J.-L. Chiara, M. Martin-Lomas, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 2073–2077; c) P. B. Alper, S.-C. Hung, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6029–6032; d) P. T. Nyffeler, C.-H. Liang, K. M. Koeller, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10773–10778; e) J. T. Lundquist, J. C. Pelletier, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 781–783; f) S. Yekta, V. Prisyazhnyuk, H.-U. Reissig, *Synlett* **2007**, 2069–2072. Ein kürzlich beschriebenes Eintopfverfahren für Diazo-Transfers und die Azid-Alkin-Cycloaddition: H. S. G. Beckmann, V. Wittmann, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1–4.
- [202] Beispiele: a) Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192–3193; b) A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4686–4687; c) D. C. Dieterich, J. J. Lee, A. J. Link, J. Graumann, D. A. Tirrell, E. M. Schuman, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 532–540; d) L. Merkel, H. S. G. Beckmann, V. Wittmann, N. Budisa, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1220–1224; e) R. E. Connor, K. Piatkov, A. Varshavsky, D. A. Tirrell, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 366–369.
- [203] H. N. Lin, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13998–14003.
- [204] M. Carmen Galan, E. McCoy, Sarah E. O'Connor, *Chem. Commun.* **2007**, 3249–3251.
- [205] Übersichtsartikel: N. K. Devaraj, J. P. Collman, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1253–1260.
- [206] P.-C. Lin, S.-H. Ueng, M.-C. Tseng, J.-L. Ko, K.-T. Huang, S.-C. Yu, A. K. Adak, Y.-J. Chen, C.-C. Lin, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4392–4396; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4286–4290.
- [207] Eine Immobilisierungsstrategie mit nichtnatürlichen Aminosäuren: C. Gauchet, G. R. Labadie, C. D. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9274–9275.
- [208] a) A. J. T. Dirks, S. S. van Berkel, N. S. Hatzakis, J. A. Opsteen, F. L. van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, A. E. Rowan, J. C. M. van Hest, F. P. J. T. Rutjes, R. J. M. Nolte, *Chem. Commun.* **2005**, 4172–4174; b) B. Parrish, R. B. Breitenkamp, T. Emrick, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7404–7410; c) P. Wu, A. K. Feldman, A. K. Nugent, C. J. Hawker, A. Scheel, B. Voit, J. Pyun, J. M. J. Frechet, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4018–4022; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3928–3932; d) D. T. S. Rijkers, G. W. van Esse, R. Merkx, A. J. Brouwer, H. J. F. Jacobs, R. J. Pieters, R. M. J. Liskamp, *Chem. Commun.* **2005**, 4581–4583.
- [209] T. L. Mindt, H. Struthers, L. Brans, T. Anguelov, C. Schweinsberg, V. Maes, D. Tourwe, R. Schibli, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15096–15097.
- [210] a) A. Dondoni, P. P. Giovannini, A. Massi, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2929–2932; b) B. H. M. Kuijpers, S. Groothuys, A. R. Keeuwreer, P. J. L. M. Quaedflieg, R. H. Blaauw, F. L. van Delft, F. P. J. T. Rutjes, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3123–3126; c) S. Groothuys, B. H. M. Kuijpers, P. J. L. M. Quaedflieg, H. C. P. F. Roelen, R. W. Wiertz, R. H. Blaauw, F. L. v. Delft, F. P. J. T. Rutjes, *Synthesis* **2006**, 3146–3152; d) H. Lin, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13998–14003; e) Q. Wan, J. Chen, G. Chen, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8244–8249; f) E. Kaltgrad, M. K. O'Reilly, L. Liao, S. Han, J. C. Paulson, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4578–4579.
- [211] H.-J. Musiol, S. Dong, M. Kaiser, R. Bausinger, A. Zumbusch, U. Bertsch, L. Moroder, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 625–628.
- [212] a) J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1211–1219; b) J.-F. Lutz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2212–2214; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2182–2184.
- [213] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047. Eine ältere Publikation zur ringspannungsinduzierten Triazolsynthese: G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260–3275.
- [214] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16793–16797.
- [215] S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, *320*, 664–667.
- [216] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3097–3099.
- [217] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2285–2287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253–2255.
- [218] W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2874–2877; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2832–2835.
- [219] In der Originalarbeit wurde erwähnt, dass Alkine genauso effizient umgesetzt werden können wie elektronenarme Alkene, was eine einfachere Anwendung in bioorthogonalen chemischen Reporterstrategien ermöglichen würde.
- [220] a) H. F. Gaertner, K. Rose, R. Cotton, D. Timms, R. Camble, R. E. Offord, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 262–268; b) K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30–33; c) L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, *276*, 1125–1128; d) L. E. Canne, A. R. Ferre-D'Amare, S. K. Burley, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2998–3007; e) Y. Singh, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1359–1362; f) S. E. Cervigni, P. Dumy, M. Mutter, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1325–1328; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1230–1232. Übersichtsartikel: J. A. Borgia, G. B. Fields, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 243–251.
- [221] E. H. Cordes, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 832–837.
- [222] V. W. Cornish, K. M. Hahn, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8150–8151.
- [223] Z. Zhang, B. A. C. Smith, L. Wang, A. Brock, C. Cho, P. G. Schultz, *Biochemistry* **2003**, *42*, 6735–6746.
- [224] L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, *276*, 1125–1128.
- [225] Bezüglich der Exprimierung von Proteinen mit *para*-Benzoyl-L-Phe siehe: W. Liu, L. Alfanta, A. V. Mack, P. G. Schultz,

- Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6185–6187; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6073–6075.
- [226] E. H. Cordes, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 826–831.
- [227] a) A. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7743–7746; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7581–7584; b) eine kürzliche Anwendung in der ¹⁸F-Markierung von Proteinen: R. R. Flavell, P. Kothari, M. Bar-Dagan, M. Synan, S. Vallabhajosula, J. M. Friedman, T. W. Muir, G. Ceccarini, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9106–9112.
- [228] A. Dirksen, S. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15602–15603.
- [229] a) A. D. de Araújo, J. M. Palomo, J. Cramer, M. Köhn, H. Schröder, R. Wacker, C. Niemeyer, K. Alexandrov, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 302–307; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 296–301; b) A. D. de Araújo, J. M. Palomo, J. Cramer, O. Seitz, K. Alexandrov, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6095–6109.
- [230] Eine detaillierte mechanistische Studie hierzu: F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686–2695.
- [231] S. T. Laughlin, C. R. Bertozzi, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2930–2944.
- [232] J. A. Prescher, D. H. Dube, A. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873–877.
- [233] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644–648.
- [234] a) K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 19–24; b) R. A. Chandra, E. S. Douglas, R. A. Mathies, C. R. Bertozzi, M. B. Francis, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 910–915; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 896–901; c) M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2428–2431; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2394–2397; d) M.-L. Tsao, F. Tian, P. G. Schultz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2147–2149; e) S. C. Hsiao, A. K. Crow, W. A. Lam, C. R. Bertozzi, D. A. Fletcher, M. B. Francis, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8601–8605; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8473–8477.
- [235] M. Köhn, R. Wacker, C. Peters, H. Schroeder, L. Soulere, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6010–6014; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5830–5834.
- [236] A. Watzke, M. Köhn, M. Gutierrez-Rodriguez, R. Wacker, H. Schroeder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1436–1440; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1408–1412.
- [237] Ein aktuelles Beispiel: O. Avrutina, H.-U. Schmoldt, D. Gabrijelcic-Geiger, A. Wentzel, H. Frauendorf, C. P. Sommerhoff, U. Diederichsen, H. Kolmar, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 33–37.
- [238] a) L. S. Forsberg, J. H. Pazur, *Carbohydr. Res.* **1979**, *75*, 129–140; b) A. M. D'Alessandro, G. D'Andrea, A. Oratore, *Clin. Chim. Acta* **1998**, *274*, 189–197; c) D. J. O'shannessy, R. H. Quarles, *J. Appl. Biochem.* **1985**, *7*, 347–355; d) B. Liu, L. Burdine, T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15228–15235; e) Ein Protokoll zur Minimierung der Schwefeloxidation durch Zugabe von Methionin: J. H. Chen, W. G. Zeng, R. Offord, K. Rose, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 614–618.
- [239] J. M. Hooker, A. P. Esser-Kahn, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10256–10257.
- [240] R. A. Mehl, J. C. Anderson, S. W. Santoro, L. Wang, A. B. Martin, D. S. King, D. M. Horn, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 935–939.
- [241] Z. M. Carrico, D. W. Romanici, R. A. Mehl, M. B. Francis, *Chem. Commun.* **2008**, 1205–1207.
- [242] a) C. Kieburg, M. Dubber, T. K. Lindhorst, *Synlett* **1997**, 1447–1449; b) D. Ramos, P. Rollin, W. Klaffke, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2948–2956; c) P. B. van Seeventer, J. A. L. M. van Dorst, J. F. Siemerink, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegenthart, *Carbohydr. Res.* **1997**, *300*, 369–373; d) T. Buskas, E. Söderberg, P. Konradsson, B. Fraser-Reid, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 958–963; e) C. D. Heidecke, T. K. Lindhorst, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9056–9067; f) J. L. de Paz, C. Noti, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2766–2767.
- [243] T. Posner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1905**, *38*, 646–657.
- [244] S. Wittrock, T. Becker, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5319–5323; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5226–5230.
- [245] a) B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, *281*, 269–272; b) S. A. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6063–6076; c) G. Gaietta, T. J. Deerick, S. R. Adams, J. Bouwer, O. Tour, D. W. Laird, G. E. Sosinsky, R. Y. Tsien, M. H. Ellisman, *Science* **2002**, *296*, 503–507; d) A. B. Griffin, S. R. Adams, J. Jones, R. Tsien, *Methods Enzymol.* **2000**, *327*, 565–578.
- [246] a) K. J. Franz, M. Nitz, B. Imperiali, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 265–271; b) M. Nitz, K. J. Franz, R. L. Maglathlin, B. Imperiali, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 272–276; c) B. R. Sculimbrene, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7346–7352.
- [247] a) N. George, H. Pick, H. Vogel, N. Johnsson, K. Johnsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8896–8897; b) J. Yin, F. Liu, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7754–7755; siehe auch Lit. [171 a,b].
- [248] a) A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86–89; b) G. V. Los, A. Darzins, N. Karassina, C. Zimprich, R. Learish, M. G. McDougall, L. P. Encell, R. Friedman-Ohana, M. Wood, G. Vidugiris, K. Zimmerman, P. Otto, D. H. Klaubert, K. V. Wood, *Promega Cell Notes* **2005**, *11*, 2–6.
- [249] a) H. M. O'Hare, K. Johnsson, A. Gautier, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 488–494; b) A. Dragulescu-Andrasi, J. Rao, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1099–1101; c) E. A. Jares-Erijman, T. M. Jovin in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (Hrsg.: T. W. J. Gadella), Elsevier, **2009**, Kap. 12.
- [250] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*, 223–226.
- [251] K. Kuhn, D. J. Owen, B. Bader, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1023–1035.
- [252] M. Völkert, K. Uwai, A. Tebbe, B. Popkirova, M. Wagner, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12749–12758.
- [253] G. T. Hermanson in *Bioconjugation Techniques*, Academic Press, San Diego, **1996**.
- [254] N. S. Joshi, L. R. Whitaker, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15942–15943.
- [255] D. W. Romanini, M. B. Francis, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 153–157.
- [256] Zur selektiven Derivatisierung von Trp-Aminosäuren in Proteinen mit Rhodiumcarbenoiden siehe: J. M. Antos, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10256–10257.
- [257] J. M. McFarland, N. S. Joshi, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7639–7644.
- [258] A. Einhauer, A. Jungbauer, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, *49*, 455–465.
- [259] S. D. Tilley, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1080–1081. Übersichtsartikel zu Pd-Kupplungen in Wasser: a) J. P. Genet, M. Savignac, *J. Organomet. Chem.* **1999**, *576*, 305–317; b) B. H. Lipshutz, S. Ghosal, *Aldrichim. Acta* **2008**, *41*, 59–72.
- [260] J. M. Hooker, E. W. Kovacs, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3718–3719.
- [261] T. L. Schlick, Z. Ding, E. W. Kovacs, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3718–3723.
- [262] Zur oxidativen Umsetzung von Tyr-Aminosäuren in Proteinen siehe: a) S. Meunier, E. Strable, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 319–326; b) D. A. Fancy, C. Denison, K. Kim, Y. Xie, T.

- Holdeman, F. Amini, T. Kodadek, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 697–708.
- [263] F. Bordusa, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4817–4867.
- [264] V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1440–1452; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1437–1449.
- [265] H.-D. Jakubke, P. Kuhl, A. Könnecke, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 79–87; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 85–93.
- [266] R. Smits, B. Koksch, *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1483–1498.
- [267] S. Rival, J. Saulnier, J. Wallach, *J. Biocatal. Biotrans.* **2000**, *17*, 417–429.
- [268] Y-H. Ye, G.-L. Tian, G.-W. Xing, D.-C. Dai, G. Chen, C.-X. Li, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 12585–12596.
- [269] R. Günther, S. Thust, H.-J. Hofmann, F. Bordusa, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 3496–3501.
- [270] N. Wehofsky, N. Koglin, S. Thust, F. Bordusa, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6126–6133.
- [271] H. Sekizaki, K. Itoh, E. Toyota, K. Tanizawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *4*, 1585–1587.
- [272] L. Abrahmsen, J. Tom, J. Burnier, K. A. Butcher, A. Kossiakoff, J. A. Wells, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4151–4159.
- [273] Z. Machova, R. von Eggelkraut-Gottanka, N. Wehofsky, F. Bordusa, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5065–5067; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4916–4918.
- [274] S. K. Mazmanian, G. Liu, H. Ton-That, O. Schneewind, *Science* **1999**, *285*, 760–763.
- [275] H. Ton-That, G. Liu, S. K. Mazmanian, K. F. Faull, O. Schneewind, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12424–12429.
- [276] H. Mao, A. H. Scott, A. Schink, B. A. Pollok, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2670–2671.
- [277] S. Pritz, Y. Wolf, O. Kraetke, J. Klose, M. Bienert, M. Beyer-
mann, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3909–3912.
- [278] M. W. Popp, J. M. Antos, G. M. Grotengreg, E. Spooner, H. L. Ploegh, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 707–708.
- [279] J. P. Pellois, T. W. Muir, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 487–491.
- [280] R. S. Goody, K. Alexandrov, M. Engelhard, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 399–403.
- [281] D. Schwarzer, P. A. Cole, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 561–569.
- [282] M. A. Shogren-Knaak, C. J. Fry, C. L. Peterson, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 15744–15748.
- [283] a) M. Shogren-Knaak, H. Ishii, J. M. Sun, M. J. Pazin, J. R. Davie, C. L. Peterson, *Science* **2006**, *311*, 844–847; b) E. M. Vogel, B. Imperiali, *Protein Sci.* **2007**, *16*, 550–556; siehe auch Beispiele in Abschnitt 6.2.
- [284] a) D. Macmillan, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1379–1383; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1355–1359; b) C. P. R. Hackenberger, C. T. Friel, S. E. Radford, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12882–12889; c) C. F. W. Becker, X. Liu, D. Olszewski, R. Castelli, R. Seidel, P. H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8215–8219; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8215–8219.
- [285] Übersichtsartikel zur Glycoproteinsynthese: a) M. J. Grogan, M. R. Pratt, L. A. Marcaurelle, C. R. Bertozzi, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 593–634; b) B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579–601; c) L. Liu, C. S. Bennett, C.-H. Wong, *Chem. Commun.* **2006**, 21–33; d) C. Haase, O. Seitz, *Top. Curr. Chem.* **2006**, *267*, 1–36.
- [286] a) A. Rak, O. Pylypenko, T. Durek, A. Watzke, S. Kushnir, L. Brunsved, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *Science* **2003**, *302*, 646–650; b) O. Pylypenko, A. Rak, T. Durek, S. Kushnir, B. E. Dursina, N. H. Thomae, A. T. Constantinescu, L. Brunsved, A. Watzke, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alex-
androv, *EMBO J.* **2006**, *25*, 13–23.
- [287] M. C. Y. Chang, C. S. Yee, D. G. Nocera, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16702–16703.
- [288] a) M. R. Seyedsayamdst, C. S. Yee, J. Stubbe, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1225–1235; b) C. S. Yee, M. C. Chang, J. Ge, D. G. Nocera, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10506–10507.
- [289] K. Shen, P. A. Cole, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16172–16173.
- [290] a) F. I. Valiyaveetil, M. Sekedat, R. Mackinnon, T. W. Muir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17045–17049; b) F. I. Valiyaveetil, M. Leonetti, T. W. Muir, R. Mackinnon, *Science* **2006**, *314*, 1004–1007.
- [291] a) Z. Zhang, K. Shen, W. Lu, P. A. Cole, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4668–4674; b) W. Zheng, D. Schwarzer, A. Lebeau, J. L. Weller, D. C. Klein, P. A. Cole, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 10462–10467.
- [292] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4254–4287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128–4158.
- [293] L. Cao, L. van Langen, R. A. Sheldon, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 387–394.
- [294] Q. Xu, K. S. Lam, *J. Biomed. Biotechnol.* **2003**, *2003*, 257–266.
- [295] M. L. Lesaicherre, R. Y. Lue, G. Y. Chen, Q. Zhu, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8768–8769.
- [296] K. Holland-Nell, A. G. Beck-Sickinger, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1071–1076.
- [297] C. F. Becker, Y. Marsac, P. Hazarika, J. Moser, R. S. Goody, C. M. Niemeyer, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 32–36.
- [298] T. Hunter, *Cell* **2000**, *100*, 113–127.
- [299] Ein Beispiel hierzu: J. W. Wu, M. Hu, J. Chai, J. Seoane, M. Huse, C. Li, D. J. Rigotti, S. Kyin, T. W. Muir, R. Fairman, J. Massagué, Y. Shi, *Mol. Cell* **2001**, *8*, 1277–1289.
- [300] P. M. Siegel, J. Massagué, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 807–821.
- [301] M. E. Hahn, T. W. Muir, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5924–5927; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5800–5803.
- [302] D. M. Rothman, M. D. Shults, B. Imperiali, *Trends Cell Biol.* **2005**, *15*, 502–510.
- [303] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020–5042; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 4900–4921.
- [304] M. E. Hahn, J. P. Pellois, M. Vila-Perelló, T. W. Muir, *Chem-BioChem* **2007**, *8*, 2100–2105.
- [305] P. Bouchard, Z. Zhao, D. Banville, F. Dumas, E. H. Fischer, S. H. Shen, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 19585–19589.
- [306] W. Lu, D. Gong, D. Bar-Sagi, P. A. Cole, *Mol. Cell* **2001**, *8*, 759–769.
- [307] K. Shen, A. C. Hines, D. Schwarzer, K. A. Pickin, P. A. Cole, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2005**, *1754*, 65–78.
- [308] G. Raugei, G. Ramponi, P. Chiarugi, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 941–949.
- [309] D. Schwarzer, Z. Zhang, W. Zheng, P. A. Cole, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4192–4193.
- [310] a) L. Brunsved, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, A. Wittinghofer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6774–6798; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6622–6646; b) D. Olszewski, C. F. W. Becker, *Mol. Biosyst.* **2008**, *4*, 730–733.
- [311] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*, 223–226.
- [312] D. Kadereit, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 144–169.
- [313] O. Rocks, A. Peyker, M. Kahms, P. J. Verveer, C. Koerner, M. Lumbierres, J. Kuhlmann, H. Waldmann, A. Wittinghofer, P. I. Bastiaens, *Science* **2005**, *307*, 1746–1752.
- [314] T. W. Muir, P. E. Dawson, S. B. Kent, *Methods Enzymol.* **1997**, *289*, 266–298.
- [315] G. S. Beligere, P. E. Dawson, *Biopolymers* **1999**, *51*, 363–369.
- [316] C. F. Becker, C. L. Hunter, R. Seidel, S. B. Kent, R. S. Goody, M. Engelhard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5075–5080; weitere Beispiele von Dreisegmentligationen: a) D. Bang, N. Chopra, S. B. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1377–1383; b) D. Bang, S. B. Kent, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2588–2592; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2534–2538.

- [317] D. F. Veber, J. D. Milkowski, S. L. Varga, R. G. Denkewalter, R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 5456–5461.
- [318] K. Jacobs, C. Shoemaker, R. Rudersdorf, S. D. Neill, R. J. Kaufman, A. Mufson, J. Seehra, S. S. Jones, R. Hewick, E. F. Fritsch, M. Kawakita, T. Shimizu, T. Miyakeet, *Nature* **1985**, *313*, 806–810.
- [319] Die Arbeitsgruppe Danishefsky hat mehrere Strategien zur Glycopeptidligation entwickelt, die die Synthese von natürlich glycosyliertem EPO zum Ziel haben. Siehe Lit. [53, 107, 141, 164, 165].
- [320] G. J. Cotton, T. W. Muir, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 253–261.
- [321] D. Y. Jackson, J. Burnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, *266*, 243–247.
- [322] a) B. Gutte, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 501–502; b) R. G. Denkewalter, D. F. Veber, F. W. Holly, R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 502–503.
- [323] D. J. Boerema, V. A. Tereshko, S. B. Kent, *Biopolymers* **2008**, *90*, 278–286; eine andere EPL-basierte Synthesestrategie modifizierter RNase A: U. Arnold, M. P. Hinderaker, B. L. Nilsson, B. R. Huck, S. H. Gellman, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8522–8523.
- [324] S. Pritz, O. Kraetke, A. Klose, J. Klose, S. Rothmund, K. Fechner, M. Bienert, M. Beyermann, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3698–3701; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3642–3645.
- [325] M. H. Perrin, W. H. Fischer, K. S. Kunitake, A. G. Craig, S. C. Koerber, L. A. Cervini, J. E. Rivier, J. C. Groppe, J. Greenwald, S. Møller Nielsen, W. W. Vale, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31528–31534.
- [326] J. Klose, K. Fechner, M. Beyermann, E. Krause, N. Wendt, M. Bienert, R. Rudolph, S. Rothmund, *Biochemistry* **2005**, *44*, 1614–1623.
- [327] Die Verwendung topologischer Template für die selektive Instillation von Strukturelementen zur Herstellung synthetischer Proteine wurde durch Mutter et al. eingeführt (Konzept der Templat-assoziierten synthetischen Proteine (TASP)): M. Mutter, S. Vuilleumier, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 551–571.
- [328] D. Bang, B. L. Pentelute, S. B. Kent, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4089–4092; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3985–3988.
- [329] Eine direkt am Harzträger ablaufende Synthese von Peptid-phenylthioestern: D. Bang, B. L. Pentelute, Z. P. Gates, S. B. Kent, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1049–1052.
- [330] T. Durek, V. Y. Torbeev, S. B. Kent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 4846–4851.
- [331] Während der Fertigstellung dieses Manuskripts sind mehrere Publikationen erschienen, die von besonderer Wichtigkeit für diesen Aufsatz sind. Beschrieben wurden z.B. die licht- und proteaseaktivierte O→N-Acyl-Migration im Protein-Spleißen (M. Vila-Perelló, Y. Hori, M. Ribó, T. Muir, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7878–7881; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7764–7767), die Anwendung der wässriger Kreuzmetathese in der Proteinmodifizierung (Y. A. Lin, J. M. Chalker, N. Floyd, G. J. L. Bernardes, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9642–9643), die Semisynthese eines GPI-verankerten Prion-Proteins (siehe Lit. [284c]), die chemoselektive Markierung von Sulfensäure-modifizierten Proteinen in lebenden Zellen (K. G. Reddie, Y. H. Seo, W. B. Muse III, S. E. Leonard, K. S. Caroll, *Mol. Biosyst.* **2008**, *4*, 447–464), die Herstellung einer FRET-markierten Serotonin-N-Acetyltransferase durch eine Tandemligationsstrategie (L. M. Szewczuk, M. K. Tarrant, V. Sample, W. J. Drury III, J. Zhang, P. A. Cole, *Biochemistry* **2008**, *47*, 10407–10419) und die chemoselektive Biokonjugation mit Tetrazinen über eine Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518–13519).