

# Bio-orthogonale Ligation im Fokus\*\*

Thomas Kurpiers und Henning D. Mootz\*

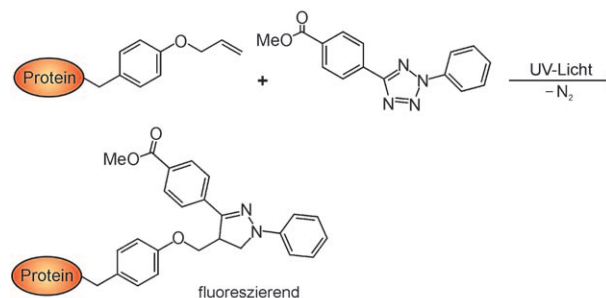
Alkene · Cycloadditionen · Fluoreszenzsonden ·  
Photochemie · Proteinmodifikationen

Strategien zur selektiven und kovalenten chemischen Verknüpfung von synthetischen Markern mit Biopolymeren wie Proteinen, Nucleinsäuren, Lipiden und Glycanen sind der Schlüssel für zahlreiche Anwendungen in der Biotechnologie, der Medizin oder auch der Grundlagenforschung. Die Erfolgsgeschichte des grün fluoreszierenden Proteins (GFP),<sup>[1–3]</sup> im Jahr 2008 durch den Nobelpreis in Chemie geehrt, unterstreicht die Vorteile einer Fluoreszenzmarkierung, die selektiv an einem beliebigen Zielprotein angebracht werden kann, um, wie in diesem Fall, die Lokalisation oder Dynamik eines Proteins zu visualisieren. Das Verwenden solcher genetisch kodierter Proteinfusionen ist jedoch limitiert, wenn man z.B. daran interessiert ist, eine post-translationale Modifikation darzustellen, oder gänzlich ausgeschlossen, wenn Biomoleküle wie Glycane oder Lipide, die nicht genetisch kodiert sind, adressiert werden sollen. In diesen Fällen ist eine bio-orthogonale Ligation zwischen einer funktionellen Gruppe in einem Biomolekül und einer von außen zugegebenen Probe die Methode der Wahl.<sup>[4–6]</sup> Zu diesem Zweck wurden in letzter Zeit mehrere interessante neue Reaktionen beschrieben, darunter auch eine von Lin und Mitarbeitern entwickelte photoinduzierbare 1,3-dipolare Cycloaddition (Schema 1a), die unter anderem für die selektive Funktionalisierung von Proteinen in vitro und in lebenden Zellen verwendet werden konnte.<sup>[7,8]</sup>

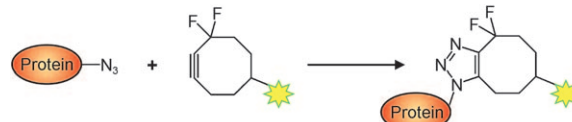
Was sind die charakteristischen Merkmale einer bio-orthogonalen Ligationsreaktion? Zwei funktionelle Gruppen müssen unter milden Bedingungen in biologischem Medium unter Bildung einer stabilen kovalenten Bindung selektiv miteinander reagieren. Wichtig ist, dass die beiden Gruppen unter diesen Bedingungen inert sind, um Reaktionen mit anderen Biomolekülen zu vermeiden. Sie sollten idealerweise auch biokompatibel, also nicht toxisch sein. Außerdem sollte eine bio-orthogonale Reaktion möglichst schnell im Vergleich zum untersuchten biologischen Prozess und unter geringen Reaktantenkonzentrationen ablaufen, um eine hohe zeitliche Auflösung und eine hohe Empfindlichkeit zu erreichen. Bei der Fülle an etablierten organischen Reaktionen

erscheint es verwunderlich, dass sich bis jetzt nur eine Handvoll an Reaktionen für eine bio-orthogonale Ligation durchgesetzt hat. Dazu gehören die nucleophile Addition von Hydraziden oder Hydroxylaminen an Ketone oder Aldehyde,<sup>[9,10]</sup> die Staudinger-Ligation zwischen einem Azid und einem modifizierten Phosphan<sup>[11]</sup> und die 1,3-dipolare Azid-Alkin-Cycloaddition, entweder Cu<sup>I</sup>-katalysiert<sup>[12,13]</sup> oder getrieben durch die Ringspannung von Cyclooctin (Schema 1b).<sup>[14,15]</sup> Der Einbau der einzigartigen funktionellen Gruppe in das biologische Zielmolekül ist dabei oftmals sehr schwierig und wird ebenfalls intensiv erforscht. Zu den am

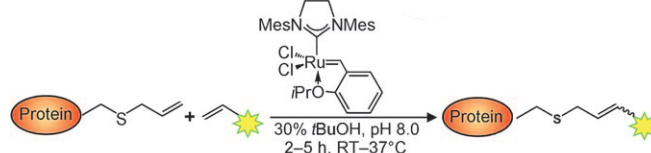
a) Photoinduzierte Cycloaddition eines Diaryltetrazols an ein alkenhaltiges Protein



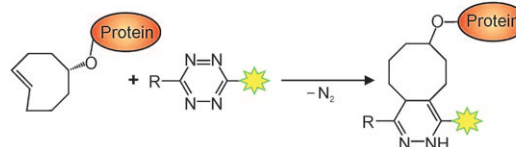
b) Ringspannungsgetriebene und fluoraktivierte Azid-Alkin-Cycloaddition



c) Kreuzmetathese mit Allylsulfiden



d) Diels-Alder-Reaktion eines Tetrazins mit einem *trans*-Cycloocten-Derivat



**Schema 1.** Einige kürzlich entwickelte bio-orthogonale Reaktionen. Mes = 2,4,6-Trimethylphenyl.

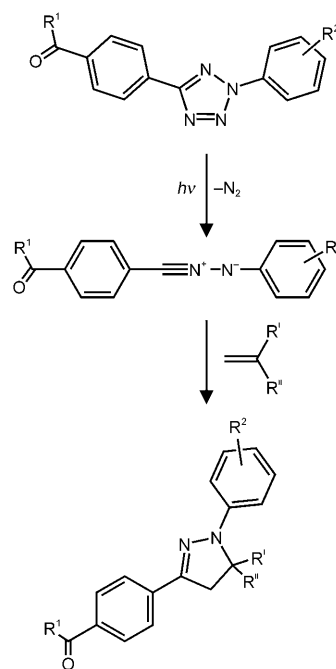
[\*] Dr. T. Kurpiers, Prof. Dr. H. D. Mootz  
Fakultät Chemie/Chemische Biologie, TU Dortmund  
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)  
Fax: (+49) 231-755-5159  
E-Mail: henning.mootz@uni-dortmund.de

[\*\*] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Volkswagen-Stiftung, dem Fonds der Chemischen Industrie und der TU Dortmund für finanzielle Unterstützung.

häufigsten genutzten Techniken zählen das Einschleusen von metabolischen Vorstufen in die Biosynthesewege,<sup>[16–18]</sup> die selektive Biokonjugation natürlicher funktioneller Gruppen, die Mutagenese mit nichtnatürlichen Aminosäuren<sup>[19]</sup> und andere Ligationsreaktionen wie die Ligation exprimierter Proteine (expressed protein ligation, EPL).<sup>[20]</sup>

Warum besteht trotz dieser gut etablierten Reaktionen immer noch ein dringender Bedarf an neuen bio-orthogonalen Ligationsmethoden? Ein Grund ist, dass jede dieser Reaktionen individuelle Vor- und Nachteile hat und nicht für jeden Verwendungszweck optimal einsetzbar ist. So zeichnet sich z. B. die Cu<sup>I</sup>-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition zwar vorteilhafte Robustheit und hohe Reaktionsgeschwindigkeiten aus, die unter anderem in Proteomikansätzen zur Enzymaktivitätsbestimmung in Zelllysaten<sup>[21]</sup> oder zur Visualisierung von Biomolekülen in fixierten Zellen<sup>[22]</sup> genutzt wurden. Wegen der Zytotoxizität des benötigten Kupferkatalysators ist sie jedoch in der Regel für die Verwendung in lebenden Zellen oder Organismen nicht geeignet. Dagegen basiert die Staudinger-Ligation zwar auf nicht-toxischen reaktiven Gruppen, hat aber die Nachteile einer relativ niedrigen Reaktionsgeschwindigkeit und einer konkurrierenden Oxidation des Phosphanreagens.<sup>[23]</sup> Eine vielversprechende Weiterentwicklung, die diese Probleme umgeht, ist die Verwendung gespannter und fluorierter Cyclooctinderivate (Schema 1 b),<sup>[15]</sup> dank derer die Cycloaddition ohne Kupferkatalysator stattfinden kann und sich dabei noch durch Reaktionsgeschwindigkeiten auszeichnet, die deutlich über denen der Staudinger-Ligation liegen. Diese Reagentien ermöglichen eine verbesserte Visualisierung von dynamischen Prozessen in vivo und konnten beispielsweise genutzt werden, um Veränderungen von Glycanmustern in der Entwicklung eines Zebrafischembryos sichtbar zu machen.<sup>[24]</sup> Eine weitere Motivation für die Entwicklung von neuen bio-orthogonalen Reaktionen besteht darin, dass zwei für ein spezifisches Problem geeignete Reaktionen prinzipiell parallel durchgeführt werden könnten. In Analogie dazu werden heutzutage fluoreszierende Proteine unterschiedlicher Farbe<sup>[1,2,25,26]</sup> beispielsweise routinemäßig für die simultane Beobachtung mehrerer Zielproteine oder die Messung eines resonanten Fluoreszenzenergietransfers eingesetzt.

Lin und Mitarbeiter berichteten kürzlich über eine bio-orthogonale Ligationsreaktion, die mit ihrer Photoinduzierbarkeit über ein zusätzliches Steuerungselement verfügt und zu einer wichtigen Ergänzung des derzeitigen Reaktionsrepertoires werden könnte.<sup>[7,8]</sup> Diese erstmals von Huisgen et al. beschriebene Reaktion<sup>[27]</sup> ist eine 1,3-dipolare Cycloaddition eines Nitrilimins mit einem dipolarophilen Alken und führt zur Bildung eines Pyrazolin-Cycloadduktes (Schema 2). Dabei wird das Nitrilimin in situ durch Photolyse mit UV-Licht aus einem Diaryltetrazol erzeugt, das unter Cycloreversion Stickstoff abspaltet. Erste Untersuchungen ergaben, dass die Erzeugung des Nitrilimins mit einer Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung von  $k_1 = 0.14 \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 5.1 \text{ s}$ ) sehr schnell abläuft und nur kurze Bestrahlungszeiten von wenigen Minuten erfordert. Die folgende Cycloaddition verläuft nach einer Reaktionskinetik zweiter Ordnung mit einer Geschwindigkeitskonstanten  $k_2$  von bis zu  $11.0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  je nach Reagens. Sie kann somit wesentlich schneller sein als die



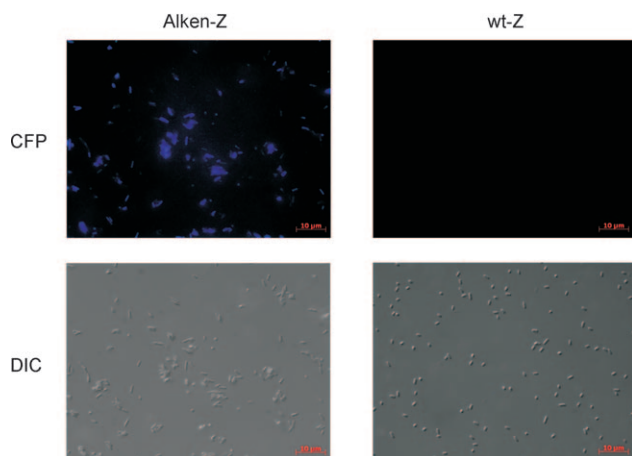
**Schema 2.** Photoaktivierte 1,3-dipolare Cycloaddition eines Diaryltetrazols mit einem substituierten Alken.

Staudinger-Ligation oder die optimierte ringspannungsgetriebene 1,3-Cycloaddition ( $0.2$  bzw.  $7.6 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  <sup>[15,23]</sup>). Interessanterweise ist das gebildete Pyrazolinaddukt fluoreszierend, mit Emissionsmaxima von  $487$  bis  $538 \text{ nm}$  und einer hohen Quantenausbeute, was direkt zur Verfolgung des Reaktionsfortschritts genutzt werden kann. Andererseits könnte das fluoreszierende Produkt auch problematisch sein, wenn es nämlich mit anderen Fluorophoren im Experiment interferiert.

Um die Selektivität der Reaktion im Kontext von Proteinen zu zeigen, wurde die Tetrazoleinheit sowohl in Lysozym durch Acylierung von Lysinseitenketten als auch regio-selektiv in GFP durch Protein-Semisynthese mithilfe von EPL eingebaut.<sup>[7]</sup> Anschließend wurden verschiedene, auf Acrylamid basierende Reagentien zugegeben, und die spezifische Reaktion wurde durch eine kurze Belichtung mit UV-Licht ausgelöst. Alternativ konnte auch alkenmodifiziertes Lysozym durch eine Markierung mit Methacrylanhydrid erhalten werden, das anschließend selektiv mit Tetrazolliganden modifiziert werden konnte, die z. B. eine Polyethylenglycoleinheit trugen.<sup>[7]</sup>

Um das volle Potenzial dieses Ansatzes auszuschöpfen, bedarf es allerdings genereller wie auch spezifischer Methoden, um entweder das Diaryltetrazol oder das Alken in ein Biopolymer einzubringen. In einem ersten wichtigen Schritt nutzten Lin und Mitarbeiter einen schon zuvor beschriebenen *E. coli*-Stamm, durch den mithilfe der Methode der tRNA-Suppression ortsspezifisch *O*-Allyltyrosin in Proteine eingebaut werden kann.<sup>[28]</sup> Auf diese Weise konnte ein alkenhaltiges Z-Domänen-Protein gewonnen und durch die photoinduzierbare Cycloaddition selektiv modifiziert werden (Schema 1 a).<sup>[8]</sup> Darüber hinaus konnte diese Reaktion auch in *E. coli*-Zellen angewendet werden, die das alkenhaltige Protein

produzierten. Dagegen wurden in einem Kontrollexperiment solche *E.-coli*-Zellen, die das unveränderte Wildtyp(wt)-Z-Domänen-Protein produzierten, nicht markiert (Abbildung 1). Diese Befunde lassen darauf schließen, dass die



**Abbildung 1.** Selektive Funktionalisierung eines alkenhaltigen Z-Domänen-Proteins mit Tetrazol (siehe Schema 1a) in *E.-coli*-Zellen: CFP-Kanal- (oben) und DIC-Kanal-Bilder (unten) von Bakterienzellen, die nach Zugabe von 100 µm Tetrazol entweder das Alken-Z- oder das Wildtyp-Z-Domänen-Protein exprimierten; CFP: cyan fluoreszierendes Protein, DIC: Phasenkontrast (differential interference contrast). Wiedergabe aus Lit. [8].

Reaktion auch für Experimente in lebenden Zellen genutzt werden kann, wobei sicherlich eines der dringlichsten nächsten Ziele die Übertragung dieser Methode auch auf höhere Organismen wie Hefe oder Säugetierzellen sein wird. Ein anderer Weg für den Einbau einer der beiden funktionellen Gruppen könnte eventuell beschritten werden, indem Aminosäuren mit einer Doppelbindung zugegeben werden,<sup>[29]</sup> die mithilfe des Proteinbiosyntheseapparates prozessiert werden. Ähnliches wäre denkbar für geeignete metabolische Vorstufenmoleküle von Lipid- und Glycanbiosynthesewegen. Schließlich könnte auch eine der beiden funktionellen Gruppen über eine fusionierte Proteinsequenz eingeführt werden, die für selektive chemische Modifizierungen zugänglich ist.<sup>[30–32]</sup>

Eine weitere wichtige Beobachtung von Lin und Mitarbeitern war, dass die Reaktion mit der Alkeneinheit des *O*-Allyltyrosins deutlich langsamer abläuft als mit den entsprechenden Acrylamidderivaten.<sup>[8]</sup> Die Autoren schlugen als Erklärung vor, dass die niedrigere LUMO-Energie des Acrylamids zu einer besseren Überlappung mit dem HOMO des Nitrilamins führt. Somit könnte die Wahl eines geeigneten Nitrilamin-Alken-Paars auch das Potenzial für weitere Optimierungen bergen.

Das herausragende Merkmal der hier vorgestellten Reaktion ist ihre Lichtabhängigkeit. Diese Eigenschaft könnte für eine präzise räumliche und zeitliche Steuerung der Ligationsreaktion genutzt werden und könnte somit äußerst nützlich für Anwendungen in der Zellbiologie sein. Umgekehrt bedeutet dies aber auch, dass die Ligationsreaktion nur in Medien und biologischem Material durchgeführt werden

kann, die bei der entsprechenden Wellenlänge transparent sind. Durch eine Variation der Substituenten am Tetrazol konnte das Absorptionsmaximum bereits von 302 zu 365 nm verschoben werden,<sup>[33]</sup> was für Zellen weniger schädlich ist.

Jüngste Forschungsarbeiten haben zu wichtigen Fortschritten auf dem Gebiet der selektiven Proteinmodifikationen und der bio-orthogonalen Ligationsreaktionen geführt, die das Anwendungsgebiet dieser Reaktionen erweitern werden. Auch zwei weitere aktuelle Beispiele beruhen auf der Reaktion einer Alkeneinheit: Die Arbeitsgruppe von Davis hat begonnen, das Potenzial der Kreuzmetathese für die Modifizierung von Proteinen zu nutzen, die zunächst mit Allylsulfiden funktionalisiert wurden (Schema 1c),<sup>[34]</sup> während Fox und Mitarbeiter von der äußerst schnellen Diels-Alder-Reaktion von Tetrazin mit *trans*-Cycloocten zur Proteinmodifizierung berichteten (Schema 1d).<sup>[35]</sup> Es scheint somit eine spannende Zukunft für die selektive chemische Proteinmodifizierung zu geben.

Online veröffentlicht am 15. Januar 2009

- [1] B. N. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science* **2006**, 312, 217.
- [2] J. Lippincott-Schwartz, G. H. Patterson, *Science* **2003**, 300, 87.
- [3] G. U. Nienhaus, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 9130; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8992.
- [4] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1, 13.
- [5] K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Nat. Methods* **2007**, 4, 822.
- [6] J. M. Antos, M. B. Francis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 253.
- [7] W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 2874; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2832.
- [8] W. Song, Y. Wang, J. Qu, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9654.
- [9] A. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 7743; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7581.
- [10] D. Rideout, *Science* **1986**, 233, 561.
- [11] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, 287, 2007.
- [12] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596.
- [13] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057.
- [14] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046.
- [15] 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.
- [16] A. J. Link, M. L. Mock, D. A. Tirrell, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, 14, 603.
- [17] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 19.
- [18] N. Budisa, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 6586; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6426.
- [19] L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 34–68; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 34.
- [20] T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72, 249.
- [21] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4686.
- [22] K. E. Beatty, J. C. Liu, F. Xie, D. C. Dieterich, E. M. Schuman, Q. Wang, D. A. Tirrell, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 7524; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7364.
- [23] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2686.

- [24] S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, 320, 664.
- [25] Z. Zhou, P. Cironi, A. J. Lin, Y. Xu, S. Hrvatin, D. E. Golan, P. A. Silver, C. T. Walsh, J. Yin, *ACS Chem. Biol.* **2007**, 2, 337.
- [26] A. Gautier, A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Correa, Jr., M. Kindermann, F. Beaufils, K. Johnsson, *Chem. Biol.* **2008**, 15, 128.
- [27] J. S. Clovis, R. Eckell, R. Huisgen, R. Sustmann, *Chem. Ber* **1967**, 100, 60.
- [28] Z. Zhang, L. Wang, A. Brock, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2964; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2840.
- [29] Y. Tang, D. A. Tirrell, *Biochemistry* **2002**, 41, 10635.
- [30] I. Chen, A. Y. Ting, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, 16, 35.
- [31] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 86.
- [32] T. Kurpiers, H. D. Mootz, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 5327; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 5234.
- [33] Y. Wang, W. J. Hu, W. Song, R. K. Lim, Q. Lin, *Org. Lett.* **2008**, 10, 3725.
- [34] Y. A. Lin, J. M. Chalker, N. Floyd, G. J. Bernardes, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9642.
- [35] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 13518.





Zankl, H.  
**Irrwitziges aus der Wissenschaft**  
**Von Leuchtkaninchen bis Dunkelbirnen**  
 2008. 270 S. m. 30 Abb. Geb.  
 € 24,90. ISBN 978-3527-32114-8

Augenzwinkernd erläutert Heinrich Zankl die bevorzugten Löwenfang-Methoden der Mathematiker, die unbestreitbaren Vorzüge des »Null-Hirn«-Managements und die faszinierenden Rituale des Volks der Nacirema. Neugierig auf mehr? Dann treten Sie ein ins Kuriositätenkabinett!

Glaser, R.  
**Heilende Magnete – strahlende Handys**  
**Bioelektromagnetismus: Fakten und Legenden**  
 2008. 360 S. m. 10 Abb. Geb.  
 € 24,90. ISBN 978-3527-40753-8

Hat Wasser ein Gedächtnis? Schaden Handys der Gesundheit? Roland Glaser, Biophysiker und langjähriger Forscher auf dem Gebiet des Bio-magnetismus, gibt Antworten und schlägt eine Schneise durch das Dickicht von Fakten und Legenden.




Synwoldt, C.  
**Mehr als Sonne, Wind und Wasser**  
**Energie für eine neue Ära**  
 2008. 232 S. m. 79 Abb. u. 18 Tab. Geb.  
 € 24,90. ISBN 978-3527-40829-0

Kann Erdöl auf Dauer der Schmierstoff der Welt- und Energiewirtschaft sein? Was passiert, wenn die Vorräte zur Neige gehen? Christian Synwoldt

\*Der Euro-Preis gilt nur in Deutschland



**WILEY-VCH**  
 WILEY-VCH · Postfach 101161 · D-69451 Weinheim  
 Fax: +49 (0) 6201-60 6184 · service@wiley-vch.de  
[www.wiley-vch.de/erlebnis-wissenschaft](http://www.wiley-vch.de/erlebnis-wissenschaft)