

„Covalent Capture“: Verschmelzung von kovalenter und nichtkovalernter Synthese

Leonard J. Prins* und Paolo Scrimin*

Stichwörter:

Dynamische kovalente Chemie ·

Molekulare Erkennung ·

Organische Synthese ·

Supramolekulare Chemie



Dieser Aufsatz befasst sich mit Molekülen auf der Suche nach einem geeigneten Partner, mit dem sie eine Verbindung eingehen können. Ob das erste Treffen in einer festen Bindung endet, hängt von vielen Faktoren ab, z. B. von der Vereinbarkeit von Größe, Form und Reaktivität, von der geeigneten Anordnung der reaktiven Gruppen und von den Einflüssen des Mediums. In gewisser Weise spielt der Chemiker die Rolle des Zeremonienmeisters, der mit einer erfolgreichen Verbindung belohnt wird. Giottos Gemälde „Die Vermählung Mariä“ soll die hierbei beteiligten Prinzipien der supramolekularen Chemie versinnbildlichen.

1. Einführung

Die organische Chemie fußt auf den Prinzipien der kovalenten Synthese, d. h. auf der Erzeugung kovalenter Bindungen zwischen Molekülen durch die Reaktion funktioneller Gruppen.^[1] Dank der supramolekularen Chemie^[2] gelingt es uns heute außerdem, molekulare Strukturen auch mithilfe nichtkovaler Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken,^[3] Koordinationsbindungen,^[4] π - π -Stapelwechselwirkungen^[5] und hydrophoben Wechselwirkungen^[6] aufzubauen. Diesen Ansatz nennt man entsprechend nichtkovaleute Synthese.^[7,8] Kovalente und nichtkovaleute Synthesen sind in vieler Hinsicht orthogonal zueinander, und im Allgemeinen legt die gewünschte Zielstruktur fest, welcher Ansatz der günstigere ist; demzufolge werden beide Ansätze meist als Alternativen betrachtet. In diesem Aufsatz behandeln wir dagegen eine als „Covalent Capture“ bezeichnete, aktuelle Methode der organischen Chemie, die auf der kombinierten Verwendung von kovalenter und nichtkovaleuter Synthese beruht (Abbildung 1).

Die Covalent-Capture-Strategie findet ihr Vorbild in der Natur. Biologische Prozesse umfassen oft einen Vorgang der molekularen Erkennung, an den sich die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen den beiden Komponenten anschließt. Diese Abfolge ermöglicht es, Fehlerkorrekturen vorzunehmen, die Reaktivität von Substraten abzuwandeln oder die Stabilität einer Struktur zu verbessern.

Bei Proteinen kann ein einziger Fehler in der Aminosäuresequenz zur vollständigen Desaktivierung führen,

sodass bei der Peptidsynthese höchste Präzision gefordert ist. Die ribosomale Peptidsynthese beginnt mit der hochselektiven Erkennung des mRNA-Codons durch das Anticodon einer Aminoacyl-tRNA-Einheit in der ribosomalen A-Stelle, an die sich die Bildung der Peptidbindung zwischen der endständigen NH₂-Gruppe und dem aktivierten C-Terminus der in der ribosomalen P-Stelle gebundenen Peptidkette anschließt.^[9] Die hohe Genauigkeit der Peptidsynthese wird durch zwei Mechanismen sichergestellt, die beide auf molekularer Erkennung beruhen:^[10] 1) Die Bildung einer Peptidbindung verlangt die Freisetzung des Verlängerungsfaktors Tu von der Aminoacyl-tRNA, ausgelöst durch die Hydrolyse von GTP zu GDP. Dieser Vorgang benötigt mehrere Millisekunden, entsprechend dem Zeitraum, in dem fehlerhafte Aminoacyl-tRNAs dissoziieren. 2) Die Hydrolyse von GTP führt zu einer Konformationsänderung, die die Wechselwirkung zwischen Codon und Anticodon verändert. Nur fehlerfreie Aminoacyl-tRNA bildet in beiden Konformationen eine starke Wechselwirkung mit der mRNA, fehlerhafte dagegen nicht.

Bei der enzymatischen Katalyse wird oft eine vorübergehende kovalente Bindung zwischen Substrat und Enzym gebildet, was als „kovaleute Katalyse“ bezeichnet wird.^[11] Zum Beispiel bildet sich bei der enzymatischen Decarboxylierung von Acetoacetat zu Aceton und Kohlendioxid eine Schiff-Base zwischen einem Lysinrest und der Carbonylgruppe, wodurch die höchst ungünstige Abspaltung eines stark basischen Enolat-Ions bei neutralem pH-Wert, wie sie im nichtkatalysierten Reaktionsweg stattfindet, umgangen wird.^[12] Bei der nucleophilen Katalyse wird oft ein Serin- oder Histidinrest vorübergehend acyliert. So ziehen Hydrolysereaktionen bevorzugt eine Serin-Hydroxygruppe anstelle eines Wassermoleküls heran, und zwar nicht nur wegen der höheren Nucleophilie des Alkohols, sondern auch wegen des pseudo-intramolekularen und daher entropisch bevorzugten nucleophilen Angriffs. In diesem Zusammenhang sei die kühne Aussage von Zhang und Houk genannt, wonach die hohe katalytische Aktivität von Enzymen in allen Fällen aus

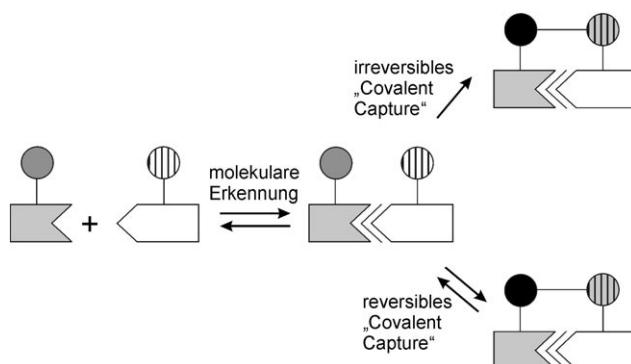


Abbildung 1. Covalent Capture durch irreversible oder reversible Bildung kovalenter Bindungen.

Aus dem Inhalt

1. Einführung	2325
2. Konzept	2326
3. Irreversibles Covalent Capture	2328
4. Reversibles Covalent Capture	2335
5. Zusammenfassung und Ausblick	2341

der Bildung einer kurzlebigen kovalenten Bindung zwischen Substrat und Enzym folgt.^[13] Dieses Konzept ist zwar in Frage gestellt worden,^[14–16] es ist aber zweifellos richtig, dass enzymatische Reaktionen oft einem Reaktionspfad folgen, der zur unkatalysierten Reaktion deutlich verschieden ist und der die Bildung einer kovalent gebundenen Zwischenstufe einschließt.^[17]

Der Vorgang der Proteinfaltung beruht auf einem feinen Zusammenspiel zwischen nichtkovalenten Wechselwirkungen und der Bildung kovalenter Disulfidbrücken.^[18] Die Strukturen nativer Proteine werden durch den Verlust an Konformationsentropie destabilisiert, der mit der Proteinfaltung zwangsläufig verbunden ist.^[19] Die kovalenten Disulfidbindungen dienen als stabilisierender Ausgleich. Zusätzlich erhöhen die Disulfidbindungen die Stabilität der nichtkovalenten Wechselwirkungen in ihrer näheren Umgebung, indem sie die lokale „Konzentration“ an funktionellen Gruppen, die an der molekularen Erkennung beteiligt sind, erhöhen. In diesem Fall implizieren die Disulfidbindungen auch die Entstehung von Reversibilität. In ihrer klassischen Arbeit über Proteinfaltung zeigten Anfinsen und Haber, dass sich denaturierte Ribonuclease mit ihren regellosen Disulfidbindungen bei der Zugabe kleiner Mengen des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol spontan in die thermodynamisch stabilere native Ribonuclease umwandelt.^[20]

Fast zwangsläufig haben Chemiker versucht, das in der Natur so erfolgreiche Covalent-Capture-Prinzip auf künstliche Systeme zu übertragen.^[21]

Dieser Aufsatz soll aufzeigen, dass Covalent-Capture-Strategien in vielen Wissenschaftsfeldern anzutreffen sind und als ein wichtiges Werkzeug in der Chemie dienen können. Die Beispiele dafür sind zu zahlreich, als dass ein umfassender Überblick gegeben werden könnte, sodass wir eine thematische Auswahl anhand zweier Kriterien getroffen haben: 1) Die an der molekularen Erkennung beteiligten Gruppierungen müssen vor und auch nach der Bildung der kovalenten Bindung vorhanden sein. Dies schließt die metallkatalysierte^[22–26] und organokatalytische^[27] Bildung kovalenter Bindungen aus,

ebenso wie die substratgerichtete organische Synthese.^[28,29] In diesen Fällen werden die nichtkovalenten Wechselwirkungen, die die stereo- oder regioselektiven Bindungsbildungen lenken, von instationären Spezies erzeugt (Katalysatoren, dirigierende Gruppen), die nicht Bestandteil des Endprodukts sind. 2) Wir beschränken uns fast ausschließlich auf solche Fälle, in denen *zwei* Moleküle an der molekularen Erkennung beteiligt sind, die sich zu *einem* neuen Molekül vereinigen. Dies schließt die Bildung oligomerer und multimerer Strukturen^[30–32] sowie templatgesteuerte Reaktionen aus.^[33] Faszinierende Beispiele für die letzteren Fälle finden sich in den Gebieten der dynamischen kombinatorischen Chemie^[34,35] und der Selbstreplikation.^[36] Darüber hinaus wollen wir vorrangig solche Beispiele betrachten, die die Vorteile und auch die Herausforderungen des Ansatzes am besten illustrieren.

2. Konzept

Der Aufsatz ist in zwei Hauptabschnitte gegliedert, die die konzeptionell verschiedenen Fälle der irreversibel und reversibel gebildeten kovalenten Bindungen behandeln. Beide Konzepte unterscheiden sich darin, dass die Produktbildung, bei Konkurrenzexperimenten auch die Produktverteilung, durch jeweils andere Parameter bestimmt wird (Abbildung 2).

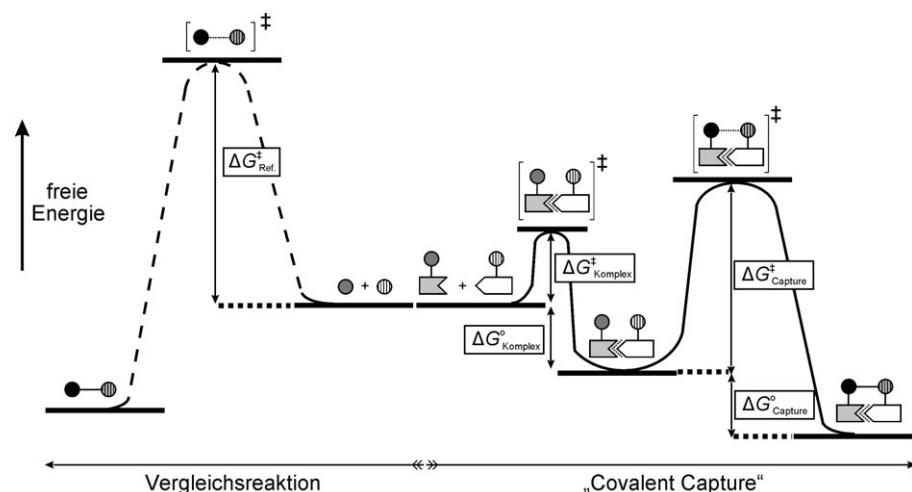


Abbildung 2. Freie Energie einer Covalent-Capture-Reaktion (rechts) sowie der gleichen Reaktion ohne das Erkennungsmotiv (links).



Leonard Prins promovierte 2001 an der Universität Twente, Niederlande, bei David Reinhoudt. Nach Postdoktoraten bei Peter Dervan (Caltech) und Giulia Licini (Padua) ist er zurzeit Assistenzprofessor an der Universität Padua. Seine Forschungsinteressen gelten der Anwendung von Methoden der dynamischen Chemie bei der Suche nach neuen Katalysatoren und der Entwicklung multivalenter, enzymartiger Katalysatoren.



Paolo Scrimin promovierte 1976 an der Universität Padua, wo er heute eine Professur für organische Chemie innehat. Seine Forschungen gelten der supramolekularen Katalyse, vor allem mit multivalenter, kooperativen Systemen. Er ist Autor von mehr als 150 Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Zeitschriften.

Das Prinzip des irreversiblen Covalent Capture besteht darin, dass eine vorausgehende Komplexbildung die Bildung der kovalenten Bindungen gegenüber der bimolekularen Vergleichsreaktion (Ref.) beschleunigt ($\Delta G_{\text{Capture}}^{\ddagger} < \Delta G_{\text{Ref.}}^{\ddagger}$), wobei der Effekt proportional zur Beschleunigung von intragegenüber intermolekularen Reaktionen in vollständig kovalenten Systemen ist. Die Ursache dieser Reaktionsbeschleunigung ist in den letzten Jahrzehnten ausführlich diskutiert worden und ist noch immer Gegenstand der Debatte. Wir wollen diese theoretischen Betrachtungen, die Gegenstand mehrerer Übersichtsartikel gewesen sind,^[13,37-41] hier nicht weiter vertiefen. Der am häufigsten verwendete Parameter, um die Effizienz einer intramolekularen Reaktion zu beschreiben, ist die effektive Molarität (EM).^[42,43] Die EM beziffert die Konzentration der Reagentien (oder eines der Reagentien), bei der die intermolekulare Reaktion mit der gleichen Geschwindigkeit abläuft wie die intramolekulare Reaktion. Mandolini konnte zeigen, dass die effektive Molarität von Ringschlussreaktionen difunktioneller Kettenmoleküle mit der Anzahl der drehbaren Bindungen in der Kette korreliert (bei Abwesenheit von Ringspannung).^[44] Die größtmögliche EM wird für kurze starre Ketten erwartet, die die reaktiven Gruppen in der genau richtigen Position zur Bildung des Übergangszustands anordnen.

Bei pseudo-intramolekularen Reaktionen in Komplexen können Enthalpiebeiträge eine viel wichtigere Rolle für die Bildung kovalenter Bindungen spielen als bei vollständig kovalenten Systemen. So wurden bei vielen supramolekularen Systemen experimentelle EM-Werte gefunden, die deutlich kleiner sind, als man nur unter der Annahme von Entropiebeiträgen berechnen würde.^[45] Ein entscheidender Punkt beim irreversiblen Covalent Capture ist, dass die Komplexgeometrie mit der Bildung des Übergangszustands kompatibel ist. Ohne diese Vereinbarkeit wird der Komplex (partiell) gespalten, und $\Delta G_{\text{Capture}}^{\ddagger}$ wird zwangsläufig um den Enthalpiebeitrag zunehmen, der zur (partiellen) Spaltung der nichtkovalenten Bindungen notwendig ist. Dieser ungünstige Effekt tritt mit größerer Wahrscheinlichkeit bei kurzen starren Ketten in Kombination mit stark gerichteten nichtkovalenten Wechselwirkungen (etwa Wasserstoffbrücken) auf, und er ist dem Entropieeffekt genau entgegen gerichtet. Beim irreversiblen Covalent Capture kann dies zu einem Problem werden, insbesondere bei Anwendungen, in denen ein irreversibles Covalent Capture zum „kovalenten Auslesen“ der Bindungsstärke der nichtkovalenten Wechselwirkung genutzt wird. Es muss erwähnt werden, dass diese Diskussion nur dann gilt, wenn die Bildung der kovalenten Bindungen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist; dies ist bei den meisten der hier diskutierten experimentellen Beispiele auch der Fall. In Ausnahmefällen kann auch die Komplexbildung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein ($\Delta G_{\text{Komplex}}^{\ddagger} > \Delta G_{\text{Capture}}^{\ddagger}$), woraus sich neue Möglichkeiten zur Anwendung der Covalent-Capture-Strategie ergeben (Abschnitt 3.4.1).

Im letzten Jahrzehnt hat sich das Gebiet der dynamischen kovalenten Chemie etabliert, das mit der Bildung reversibler kovalenter Bindungen befasst ist.^[46] Die dynamische kovalente Chemie vereinigt die Vorteile der nichtkovalenten Erkennung (Selbstorganisation, Fehlerkorrektur) mit der hohen Stabilität kovalenter Bindungen. Die Anwendung von dyna-

misch-kovalenter Chemie eröffnet dem Covalent-Capture-Ansatz völlig neue Perspektiven. Die Verwendung reversibler kovalenter Bindungen beim reversiblen Covalent Capture setzt voraus, dass das System thermodynamisch kontrolliert ist. Unter dieser Bedingung ist die Stabilität von Übergangszuständen (und damit die Reaktionsbeschleunigung) nicht länger wichtig. Stattdessen wird die Produktverteilung nun von den relativen Stabilitäten der thermodynamischen Grundzustände der freien Komponenten, d.h. des Komplexes ($\Delta G_{\text{Komplex}}^{\circ}$) und des reversibel „eingefangenen“ Komplexes ($\Delta G_{\text{Komplex}}^{\circ} + \Delta G_{\text{Capture}}^{\circ}$), bestimmt. Für die Planung ist dies ein Vorteil, da keine genaueren Kenntnisse über die Beschaffenheit der Übergangsstrukturen nötig sind. Das „gefangene“ Produkt wird aber auch beim reversiblen Covalent Capture nicht direkt mit der Stabilität des Anfangskomplexes in Beziehung stehen, und zwar aus dem einfachen Grund, weil die geometrischen Beschränkungen der kovalenten Bindung mit der nichtkovalenten Wechselwirkung unvereinbar sein können. Reversibles Covalent Capture kann nur dann zur quantitativen Bestimmung der Bindungsstärke im Anfangskomplex genutzt werden, wenn das System sorgfältig entworfen ist und die Ergebnisse genau analysiert werden, ähnlich wie auch beim irreversiblen Covalent Capture.

Reversibles Covalent Capture wird auf zwei verschiedene Weisen experimentell genutzt. Die erste Anwendung dient dazu, Komplexgleichgewichte in Richtung der Produkte zu verschieben. Unter Bedingungen, bei denen $\Delta G_{\text{Komplex}}^{\circ}$ zu klein ist, um signifikante Mengen des Komplexes zu liefern (beispielsweise hohe Verdünnung, stark polare Lösungsmittel), kann das Gleichgewicht durch die Bildung reversibler kovalenter Bindungen ($\Delta G_{\text{Komplex}}^{\circ} + \Delta G_{\text{Capture}}^{\circ}$) in Richtung der Komplexbildung verschoben werden. Im zweiten Fall wird reversibles Covalent Capture verwendet, um Unterschiede in der thermodynamischen Stabilität kovalenter Addukte zu ermitteln. Unter der Annahme isoenergetischer kovalenter Bindungen wird in diesen Fällen die Produktverteilung in Gemischen von der Stärke der nichtkovalenten Wechselwirkung im Addukt bestimmt.

Die beiden Covalent-Capture-Strategien stellen unterschiedliche Anforderungen an die verwendete chemische Reaktion. Für die beim irreversiblen Covalent Capture eingesetzten Reaktionen gibt es keine besonderen Einschränkungen, außer dass sie generell mit den Erkennungseinheiten und dem Medium vereinbar sein müssen. In der Praxis wird die Auswahl durch das Kriterium eingeschränkt, dass die Bildung der kovalenten Bindung in Abwesenheit des molekularen Erkennungsvorgangs nur sehr langsam verlaufen darf. Die hohen Konzentrationen der Bausteine, wie sie bei schwachen Komplexen notwendig sind, erfordern typischerweise Reaktionen zwischen schwachen Nucleophilen (-OH, -NH₂ oder -SH) und elektrophilen Akzeptoren wie Epoxiden, Anhydriden, Maleimiden und α,β -ungesättigten Aldehyden. In Fällen, in denen die Komplexe auch bei sehr niedrigen Konzentrationen beständig bleiben, können auch hochreaktive funktionelle Gruppen verwendet werden, da nun die Hintergrundreaktion zweiter Ordnung bei hoher Verdünnung sehr langsam verläuft (siehe Abschnitt 3.4.1).

Beim dynamischen Covalent Capture muss die Bildung der kovalenten Bindungen unter den gegebenen experimen-

stellen Bedingungen reversibel sein. Es sind viele reversible kovalente Reaktionen bekannt, z.B. Umesterungen, Aldolaustausch, Michael/Retro-Michael-Reaktionen, Diels-Alder/Retro-Diels-Alder-Reaktionen und Alkenmetathese.^[34] Die zwei meistgenutzten reversiblen Reaktionen sind Disulfid austausch und Transiminierungen. Beide Austauschreaktionen sind schnell, verlaufen unter milden Bedingungen und sind mit anderen funktionellen Gruppen und der Verwendung polarer Medien (einschließlich Wasser) ausgezeichnet vereinbar. Als weiterer wichtiger Punkt kann die Reversibilität durch Ansäuern oder durch Reduktion „abgeschaltet“ werden, um die Charakterisierung des „eingefangenen“ Produkts zu ermöglichen.

3. Irreversibles Covalent Capture

3.1. Künstliche Enzyme

Die Entwicklung von Katalysatoren, die bezüglich Aktivität und Selektivität den Enzymen nahekommen, bleibt eine der größten Herausforderungen in der Chemie.^[38,47–50] Das Covalent-Capture-Konzept kann naturgemäß keinen Katalysator hervorbringen, da die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen Katalysator und Substrat definitionsgemäß den Katalysator zerstört, solange nicht eine schnelle Weiterreaktion die Vervollständigung des Katalysezyklus ermöglicht (ein anderer Ansatz wird in Abschnitt 3.4.2 erwähnt). Dennoch ist die Covalent-Capture-Methode ein wichtiges Verfahren zur Modellierung kovalent katalysierender Enzyme und insbesondere der Reaktionsschritte, die zur Bildung des kovalent modifizierten Enzymintermediats führen. In der Literatur sind viele Beispiele hierfür zu finden, wir wollen uns aber hauptsächlich auf die klassischen Cyclodextrinkatalysatoren beschränken. Die Einfachheit dieser Katalysatoren hat Strukturuntersuchungen ermöglicht, die

grundlegende Aspekte der Covalent-Capture-Strategie aufzeigen.

Cyclodextrine (CDs) sind wasserlösliche cyclische Oligomere der α -D-Glucose mit einem hydrophoben Hohlraum, dessen Rand von Hydroxygruppen besetzt ist (Abbildung 3a).^[51] Die leicht erhältlichen Cyclodextrine α -CD, β -CD und γ -CD unterscheiden sich in der Anzahl der α -D-Glucoseeinheiten (6, 7 bzw. 8). Der Hohlraum ist auf der Seite der sekundären Hydroxygruppen etwas breiter, während die primären 6'- CH_2OH -Gruppen eine gewisse sterische Behinderung darstellen. Gemeinsam führt dies dazu, dass kleine organische Moleküle durch die breitere Öffnung in den Hohlraum eintreten. Bereits in den 60er Jahren beschrieben Bender und Mitarbeiter, dass nach Einschluss von *m*-Nitrophenylacetat in β -CD die Übertragung der Acetatgruppe auf die Hydroxygruppe des Cyclodextrins etwa 100-mal schneller abläuft als die Hydrolyse unter den gleichen Reaktionsbedingungen.^[52] Mechanistisch ähnelt die Acetat-Übertragung dem ersten Schritt einer Serinproteaseaktivität, bei der ein Acyltransfer des Substrats auf eine Serin-Hydroxygruppe des Enzyms stattfindet. Bender et al. stellten außerdem fest, dass der Hammett-Plot für Cyclodextrin-katalysierte Transacylierungen mehrerer substituierter Benzoate nichtlinear ist, was darauf hinweist, dass die Reaktionsbeschleunigung nicht allein durch die elektronischen Eigenschaften der Substrate bestimmt wird.^[53] In einer späteren Molecular-Modeling-Studie fanden Breslow und Mitarbeiter, dass die Bildung des tetraedrischen Intermediats ein partielles Herausziehen der Substrate aus dem Hohlraum erfordert.^[54] Das bedeutet, dass die geometrische Anordnung der Ester- und β -CD-Hydroxygruppen alles andere als optimal ist, sodass bei der Bildung des Übergangszustands ein großer Teil der günstigen Bindungsenergie zwischen Wirt und Gast verloren geht. Dies wird durch den Unterschied der Acylübertragungsgeschwindigkeiten der Adamantan- bzw. Ferrocen-substituierten *p*-Nitrophenylester **1** und **2** illustriert (Abbildung 3b).^[55,56]

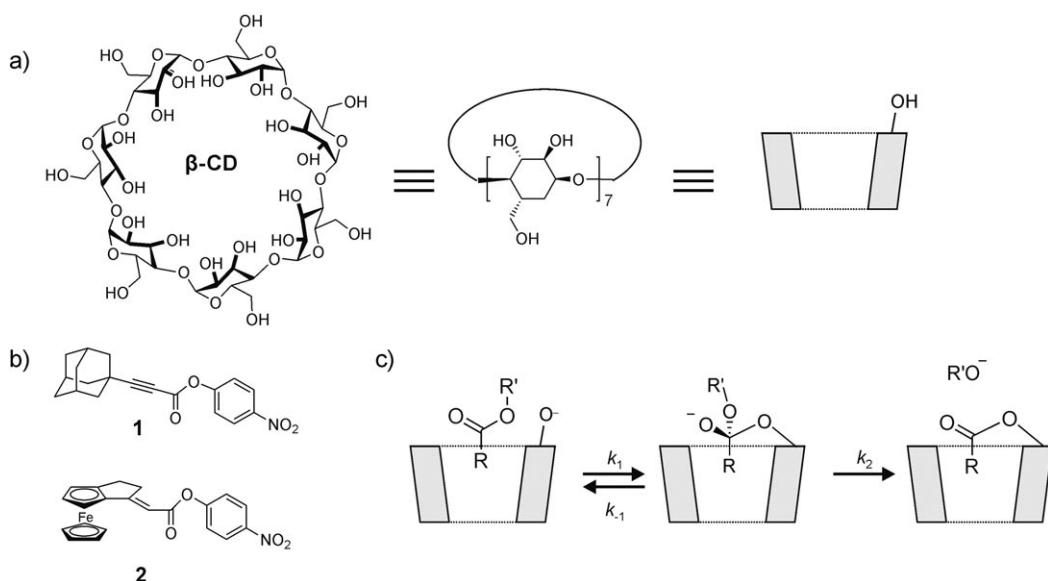


Abbildung 3. a) Struktur von β -Cyclodextrin. b) Substrate **1** und **2**. c) Acylübertragung von einem im CD-Hohlraum gebundenen Ester auf eine Hydroxyeinheit des CD.

Obwohl der Komplex zwischen dem Adamantanderivat **1** und β -CD wesentlich stärker ist als der Komplex zwischen dem Ferrocenderivat **2** und β -CD ($K_{\text{ass}} = 3300$ bzw. 175 M^{-1}), ist die Desacetylierung von **1** um mehrere Größenordnungen langsamer ($k_{\text{kat}}/k_{\text{unkat}} = 2150$ gegenüber 5.9×10^6). Die für **2** beobachtete starke Reaktionsbeschleunigung weist darauf hin, dass der Übergangszustand genauso stark wie das Substrat gebunden ist, was auch durch Molecular Modeling bestätigt wurde.

Die Bedeutung der Geometrie wurde weiter durch Arbeiten von Breslow^[56] und Menger^[57] unterstrichen, die eine starke Verlangsamung der Desacetylierung bei weniger aktivierte Substraten beobachteten. Bei schlechten Abgangsgruppen wird die Abspaltung der Abgangsgruppe (k_2) zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt anstelle des Hydroxyangriffs bei aktivierte Substraten (k_1 , Abbildung 3c). Daher entsteht bei schwach aktivierte Substraten der Übergangszustand *nach* der Bildung des tetraedrischen Intermediats anstatt *davor*. Die dafür erforderliche Drehung der Esterbindung erfordert wegen der Starrheit des Systems einen hohen Energieaufwand. Tatsächlich konnte das Problem durch Einführen einer drehbaren Einheit in das Substrat gelöst werden.^[58]

Diese Beispiele zeigen, dass die Effizienz der Produktbildung nicht nur von der Assoziationskonstanten der beiden Komponenten abhängt, sondern auch von der Stabilisierung der Übergangstrukturen. Ein wichtiger Punkt ist die Bildung des produktiven Komplexes, bei dem die reaktiven Gruppen zur Bildung kovalenter Bindungen optimal orientiert sind. Nur in diesem Fall führt die Präorganisation der reaktiven Gruppen in einem Komplex auch zum maximalen Nutzen. Ein entropischer Vorteil ist also wichtig, muss aber nicht genügen, um das Covalent Capture des bezüglich Bindungsstärke „besten“ Substrats sicherzustellen. All diese Untersuchungen zeigen, dass EM-Werte zwangsläufig auch einen Enthalpiebeitrag enthalten (wenn auch zu unterschiedlichem Maß).

3.2. Strukturstabilisierung von supramolekularen Aggregaten und Foldameren

Als Selbstorganisation bezeichnet man die spontane Zusammenlagerung von Molekülen zu einer definierten Struktur infolge schwacher Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken, koordinativer Bindungen, elektrostatischer oder hydrophober Wechselwirkungen.^[59–62] In den letzten zwei Jahrzehnten hat sich die Selbstorganisation als die beste Strategie zur Herstellung molekularer Architekturen mit Nanometerabmessungen entwickelt. Wichtige Merkmale der Selbstorganisationsstrategie sind der geringe präparative Aufwand zur Herstellung der Baueinheiten, die Möglichkeit zur Fehlerkorrektur während des Organisationsvorgangs und die Adaptierbarkeit des erhaltenen Aggregats an äußere Stimuli.^[34,35] Andererseits führt die Schwäche der nichtkovalenten Wechselwirkungen oft zu einer geringen kinetischen Stabilität der Aggregate. Als Erweiterung der Synthese mit Templaten^[63] hat sich das Covalent Capture dynamischer Aggregate, oft als „kovaleute Postmodifizierung“ bezeichnet,

zu einem eleganten Werkzeug zur Umwandlung der Aggregate zu kinetisch inerten Strukturen entwickelt.^[64]

Als Veranschaulichung diskutieren wir eine Arbeit von Ghadiri et al., die ein Aggregat aus zwei cyclischen Peptiden mithilfe einer Ringschlussmetathese kovalent fixierten (Abbildung 4).^[65,66] Im cyclischen Peptid **3** sind acht Aminosäuren

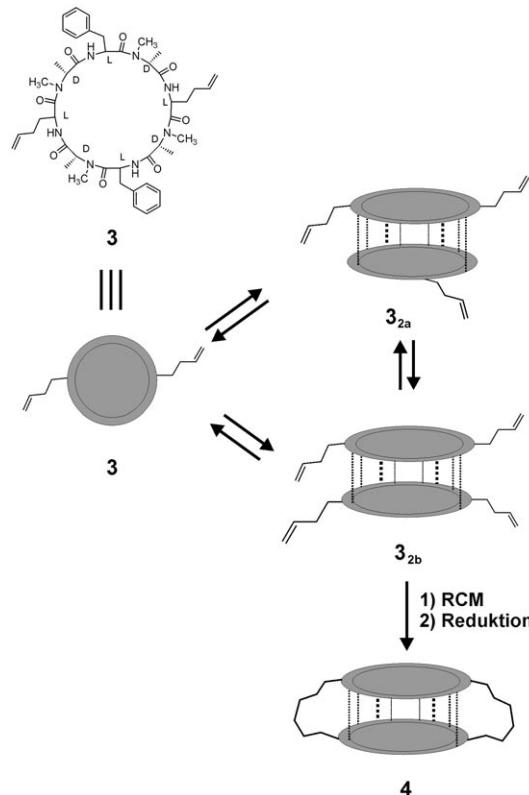


Abbildung 4. Durch Wasserstoffbrücken vermittelte Dimerisierung des cyclischen Peptids **3**, gefolgt von einem Covalent Capture mithilfe einer Ringschlussmetathese und der Reduktion zum kovalenten Produkt **4**.

abwechselnd mit entgegengesetzter Konfiguration angeordnet, wodurch die Amidbindungen für intermolekulare Wasserstoffbrücken prädisponiert sind.^[67] Durch selektive *N*-Methylierung des Amidrückgrats wird erreicht, dass nur das Dimer **3**₂ als Aggregationsprodukt möglich ist; andernfalls werden oligomere, zylindrische Nanoröhren erhalten. Das Peptid **3** verfügt über zwei L-Homoallylglycylreste für eine Olefinmetathese. Wegen der *C*₂-Symmetrie von **3** existiert das Dimer **3**₂ in zwei Diastereomeren, gegenseitig umwandelbaren Formen, **3**_{2a} und **3**_{2b}, von denen nur **3**_{2b} die Allyleinheiten so trägt, dass sie für das Covalent Capture passend sind. Trotz einer niedrigen Assoziationskonstanten in CDCl_3 ($99 \pm 1 \text{ M}^{-1}$) ergab die Ringschlussmetathese mit anschließender Reduktion der Doppelbindungen eine eindrucksvolle Ausbeute des Dimers **4** von 65 % nach 48 Stunden Reaktionszeit. Versuche zum Covalent Capture in polaren Lösungsmitteln lieferten keine Metatheseprodukte, was darauf hinweist, dass die durch Wasserstoffbrücken induzierte Dimerisierung zur Erhöhung der lokalen Alkenkonzentration tatsächlich notwendig ist. Durch 2D-ROESY-Experimente und FT-IR-Spektroskopie

wurde nachgewiesen, dass die Wasserstoffbrücken in **4** erhalten bleiben.

Die Covalent-Capture-Methode wird oft verwendet, um die Strukturstabilität von Foldameren zu erhöhen. Foldamere sind Oligomere, die in Lösung spontan eine Sekundärstruktur annehmen, die durch nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen nichtbenachbarten Untereinheiten stabilisiert wird.^[68–70] Die am häufigsten untersuchten Foldamere sind α -helicale Peptide und β -Faltblätter. Durch kovalente Stabilisierung eines Foldamers können Sekundärstrukturen sogar in sehr kurzen Sequenzen und auch außerhalb eines Proteinkontextes aufrechterhalten bleiben. Die wichtigsten Strategien sind die Vernetzung von Peptidseitenketten^[71–73] und das Ersetzen von Wasserstoffbrücken durch kovalente Bindungen.^[74–76] Letztere Strategie hat den Vorteil, dass die lösungsmittelexponierte Oberfläche der α -Helix intakt bleibt und keine Seitenkettenfunktionalitäten „geopfert“ werden müssen. Neben der Strukturstabilisierung bietet das Covalent Capture auch den Vorteil, dass die Proteolysestabilität im Vergleich zum freien Analogon verbessert ist.^[77]

3.3. Kovalente Modifizierung biologischer Moleküle

3.3.1. Ortsselektive DNA-Alkylierung

Moleküle, die in die Genexpression eingreifen können, haben größten therapeutischen Wert.^[78] Auf der Grundlage der Naturstoffe Distamycin und Netropsin entwickelten Dervan et al. eine neue Klasse von Polyamiden auf Pyrrol-Imidazol-Basis, die auf vorhersehbare Weise und mit nanomolarer Affinität in die kleine Furche der DNA binden können.^[79] Die gute Bindungsselektivität beruht auf einer Kombination von Wasserstoffbrücken mit den Hoogsteen-Kanten der DNA-Basenpaare und der guten sterischen Passform. Dass Polyamide in vitro und auch in vivo in die DNA-Expression eingreifen können, ist durch viele Beispiele belegt.^[80,81] Neben anderen Verbindungen sind auch Polyamide verwendet worden, um die Genexpression durch Binden an Promotor- und Verstärkerregionen zu hemmen und so die Bildung der Transkriptionsmaschinerie zu blockieren.^[82] Polyamide verhindern aber nicht die Strangverlängerung durch die RNA-Polymerase, wenn sie an die codierende Region des Gens binden,^[83] denn bei der Transkription der DNA spaltet die RNA-Polymerase jedes nichtkovalent gebundene Molekül einfach ab. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass dieses Problem durch Konjugation des Polyamids an ein DNA-Al-

kylierungsmittel, z. B. Chlorambucil, gelöst werden kann.^[84–86] In diesem Fall wird das Polyamid mit einer irreversiblen kovalenten Bindung an einem genau bestimmten Ort der DNA befestigt. Das Molekül kann dann nicht mehr abgespalten werden und kann so die Genexpression hemmen.

Bei diesen Studien beobachteten Dervan et al. zufällig auch, dass eine vergleichsweise kleine Strukturänderung des Polyamid-Chlorambucil-Konjugats die Arretierung der Krebsproliferation in Mäusen drastisch verändern kann.^[87,88] Die beiden Polyamid-Chlorambucil-Konjugate **5-Chl** und **6-Chl** sind Konstitutionsisomere, die sich in der Gruppierung an der Haarnadelkehre unterscheiden (α - bzw. γ -Diaminobuttersäure) (Abbildung 5a). Die Zielsequenz des Polyamidfragments, die anschließend durch die Chlorambucilgruppe alkyliert wird, ist die Sequenz 5'-WWGGWGW-3' (W=A oder T) in der codierenden Region des Histon-H4c-Gens der humanen Darmkrebs-Zelllinie SW620 (Abbildung 5b). Das Polyamid **5** bindet mit einer Assoziationskonstanten von $K_{ass} = 6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ an die Zielsequenz, entsprechend einer 94- bzw. 26-fachen Selektivität gegenüber zwei Zielsequenzen mit Einzelbasenfehlpaarung. Im Vergleich zum Polyamid **5** ermöglicht die γ -Kehre des Polyamids **6** eine bessere Faltung des Polyamids in der kleinen Furche der DNA, was zu einer 2.4-fach höheren Affinität für die Zielsequenz führt ($K_{ass} = 1.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$). Dagegen ist die Selektivität gegenüber den Fehlpaarungssequenzen deutlich schwächer (15- bzw. 6-fach).

Das Alkylierungsverhalten der Konjugate **5-Chl** und **6-Chl** ist sowohl hinsichtlich der Spezifität als auch der Aktivität völlig verschieden. Bis zu einer Konzentration von 30 nm alkyliert das Konjugat **5-Chl** ausschließlich die Zielsequenz, während **6-Chl** unspezifisch ist und schon bei geringen Konzentrationen von 3 nm sowohl die Zielsequenz als auch Fehlpaarungssequenzen alkyliert. In einer Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Alkylierung reagierte **5-Chl** unter gleichen Bedingungen 120-mal langsamer als **6-Chl**, eine erstaunliche Beobachtung, wenn man die Ähnlichkeit der Strukturen bedenkt. Schließlich ergaben In-vivo-Untersu-

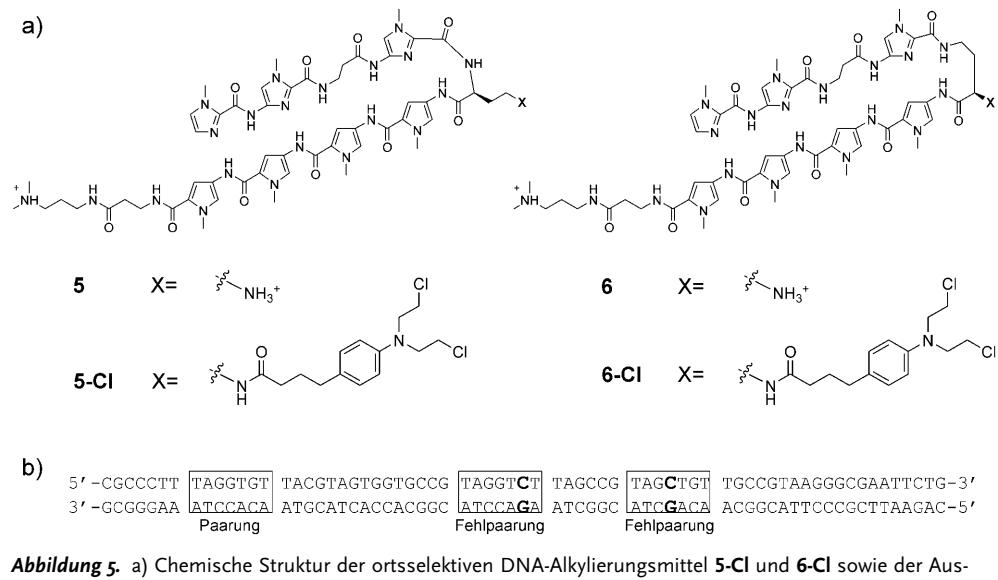


Abbildung 5. a) Chemische Struktur der ortsselektiven DNA-Alkylierungsmittel **5-Cl** und **6-Cl** sowie der Ausgangsverbindungen **5** und **6** ohne Chlorambucilgruppe. b) Stelle mit Paarung der Polyamide und zwei Stellen mit Fehlpaarung jeweils eines Basenpaares.

chungen an einem SW620-Xenograft-Tumormodell in Nacktmäusen, dass **5-Chl** das Krebswachstum arretiert, während **6-Chl** für die Mäuse tödlich war. Die Ursache für diese unterschiedliche Wirkung ist noch nicht ermittelt, zumindest weiß man aber nun, dass der erfolgreiche Covalent-Capture-Vorgang von einer hohen Bindungsselektivität und, gegen jede Intuition, einer wenig effizienten kovalenten Bindungsbildung bestimmt wird.

3.3.2. Irreversible Enzyminhibitoren

Moleküle, die irreversibel an das aktive Zentrum von Enzymen binden, können als Arzneimittel, Insektizide oder Pestizide sowie zur Ermittlung von Aktivitätsprofilen oder als mechanistische Sonden verwendet werden. Tatsächlich ist die Entwicklung und Anwendung von Enzyminhibitoren das größte und wirtschaftlich bedeutendste Forschungsgebiet, auf dem die Covalent-Capture-Strategie angewendet wird. Die ersten Beispiele dafür stammen bereits aus den 60er Jahren.^[89,90]

Bei der Reaktion eines irreversiblen, am aktiven Zentrum wirkenden Inhibitors, auch als Affinitätsmarker bezeichnet, wird zuerst ein Enzym-Inhibitor-Komplex gebildet, gefolgt von der Bildung einer kovalenten Bindung. Diese Abfolge entspricht dem ersten Schritt jeder enzymatischen Umwandlung, mit dem wichtigen Unterschied, dass die Reaktion damit beendet ist und somit der Katalysator (d.h. das Enzym) nicht regeneriert wird. Die Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration entspricht einem typischen Michaelis-Menten-Mechanismus, die Reaktion folgt also einer Sättigungskinetik.^[11]

Für die Inhibition ist charakteristisch, dass die Enzym-Inaktivierung durch den Affinitätsmarker durch konkurrierende reversible Inhibitoren und Substrate verlangsamt wird, dass die Geschwindigkeit der Enzym-Inhibitor-Komplexbildung eine ähnliche pH-Abhängigkeit wie die Geschwindigkeit der katalytischen Umwandlung aufweist und dass der Inhibitor einen kovalenten 1:1-Komplex mit dem Enzym bildet. Die hauptsächlichen reaktiven Gruppen in Proteinen sind Nucleophile (die OH-Gruppe von Serin, Tyrosin und Threonin; die NH₂-Gruppe von Lysin; der Imidazolring von Histidin; die SH-Gruppe von Cystein), die nötigenfalls über allgemeine Basenkatalyse aktiviert werden. Daher sind Affinitätsmarker oft Elektrophile wie Epoxide, Anhydride, Maleimide, Aldehyde und Halogenalkane. Die Reaktivität ist im Allgemeinen nicht besonders hoch, weil andernfalls eine nichtselektive Bildung kovalenter Bindungen resultieren würde. Die geringe Reaktivität wird dadurch ausgeglichen, dass die Bildung der kovalenten Bindung im aktiven Zentrum pseudo-intramolekular verläuft, wie es für Covalent Capture charakteristisch ist.

Sehr hohe Selektivitäten sind erzielbar, wenn die katalytischen Eigenschaften des Target-Enzyms zur Erzeugung der reaktiven Spezies genutzt werden.^[91,92] Diese Art von Inhibitoren wird als Suizidinhibitoren bezeichnet. Ein wirkungsvoller Suizidinhibitor zeichnet sich dadurch aus, dass er in Abwesenheit des Enzyms chemisch inert ist, dass er vom Enzym spezifisch aktiviert wird und dass nach der Aktivierung die Bildung einer kovalenten Bindung schneller verläuft

als die Dissoziation. Ein Lehrbuchbeispiel ist die Suizidinhibition des Enzyms β -Hydroxydecanoyldehydrase durch 3-Decinoyl-N-acetylcysteamin (7; Abbildung 6).^[93] Das Substrat wird vom Enzym durch Abstraktion eines Protons aktiviert, dabei entsteht ein hochreaktiver Michael-Akzeptor, der dann am Histidinrest des aktiven Zentrums zum kovalenten Addukt **E-7** alkyliert wird.

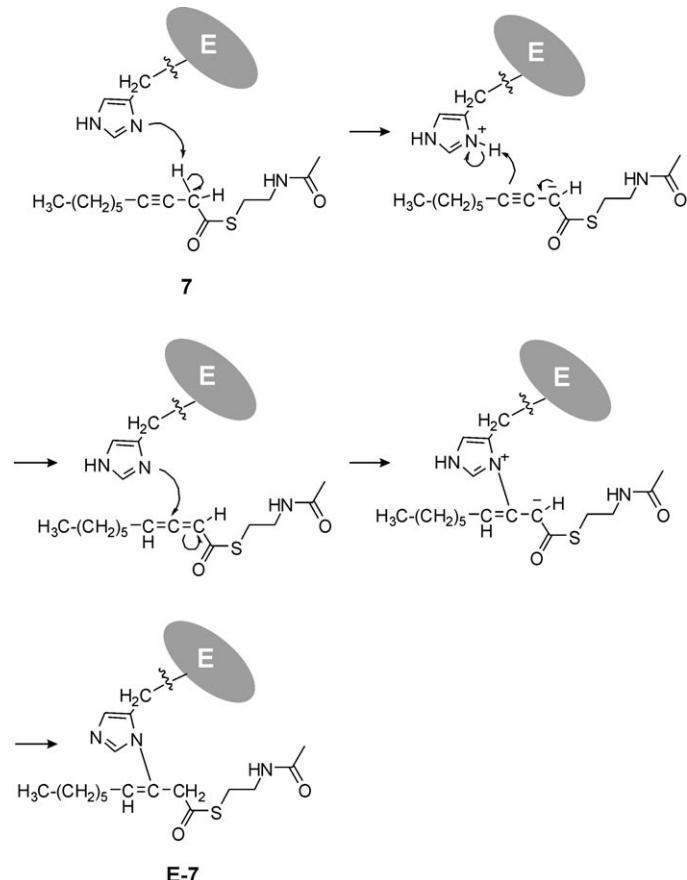


Abbildung 6. Mechanismus der Suizidinhibition des Enzyms β -Hydroxydecanoyldehydrase (E) durch 3-Decinoyl-N-acetylcysteamin (7).

Neben pharmazeutischen Anwendungen wird der Covalent-Capture-Ansatz auch in der Proteomik verwendet.^[94] Beim aktivitätsbasierten Protein-Profiling (activity-based protein profiling; ABPP) werden kovalent bindende Sonden eingesetzt, um ein Funktionsprofil der Enzyme in einem komplexen Proteom, d.h. der Gesamtheit der von einem prokaryotischen oder eukaryotischen Genom exprimierten Proteine, zu ermitteln (Abbildung 7 a).^[95-97] Typischerweise gilt das Interesse der Untersuchung ganzer Enzymklassen und nicht einzelner Enzyme. ABPP-Sonden zeigen die gleichen Merkmale wie irreversible Inhibitoren, enthalten aber eine zusätzliche Markierung, über die der Covalent-Capture-Vorgang detektiert werden kann (Abbildung 7 b). Für diesen Zweck werden oft Fluorophore, Biotin oder inerte chemische Gruppen (Azide und Alkine für Klick-Reaktionen oder Staudinger-Reaktionen) verwendet. Cravatt et al. stellten eine Reihe von Fluorophosphonat(FP)-Sonden her, die mit Fluorescein oder Biotin funktionalisiert sind und zur Visua-

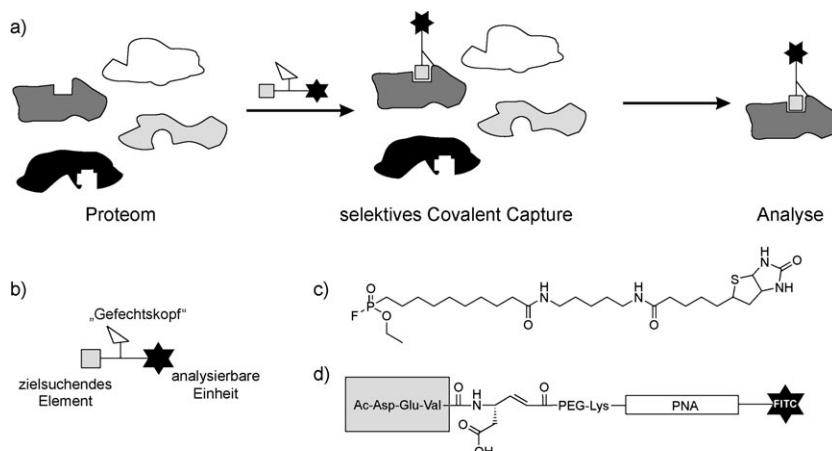


Abbildung 7. a) Prinzip des aktivitätsbasierten Protein-Profilings. Ein Proteom wird gegen eine Aktivitätssonde exponiert, die mit dem Zielprotein selektiv reagiert. Die Markierung, z.B. Biotin oder ein Fluorophor, dient zur Isolierung bzw. Visualisierung. b) Eine Aktivitätssonde besteht aus einem zielsuchenden Element für die selektive Bindung, einem „Gefechtskopf“ zur Bildung des kovalenten Addukts (oftmals ein Michael-Akzeptor) und einer analysierbaren Einheit. c,d) Beispiele für Aktivitätssonden nach Cravatt et al. [98] und Schultz et al. [99].

lisierung katalytisch aktiver Serinhydrolasen in Proteomen dienen (Abbildung 7c).^[98] Diese Sonden bewirken eine kovalente Markierung aktiver Serinhydrolasen, indem die nucleophile OH-Gruppe des Serins am Phosphorzentrum angreift. Cystein-, Aspartyl- und Metallohydrolasen reagieren dagegen nicht mit der FP-Einheit, sodass eine selektive Markierung der aktiven Serinhydrolasen resultiert. Durch Vergleich der Profile phosphorylierter Proteine aus Extraktten verschiedener Rattenorgane wurde die Fähigkeit der ABPP-Methode zur Auflösung komplexer Proteinmuster demonstriert. Dabei wurde unerwartet auch in der Prostata eine Serinhydrolase entdeckt.

Schultz, Harris et al. beschrieben eine Methode, mit der die Enzymaktivität durch Messung der von einem Inhibitor inaktivierten Enzymmenge quantifiziert werden kann.^[99] Multifunktionelle Aktivitätssonden wurden entwickelt, die aus einem kleinen Peptid zur Cysteinproteaseinhibition, einer Acrylateinheit für das Covalent Capture, einer Peptidnucleinsäure (PNA) zur Codierung und einem Fluorophor zur optischen Auslesung zusammengesetzt waren (Abbildung 7d). Bei Exposition von rohem Zell-Lysat gegen die Sonden wurde die aktive Cysteinprotease inaktiviert, wobei anschließend die nicht umgesetzten Sonden mithilfe eines Größenausschlussfilters entfernt wurden. Die „gefangenen“ Enzyme wurden durch PNA-DNA-Hybridisierung an spezifische Abschnitte eines Oligonucleotid-Mikroarrays gelenkt, und die Menge an Cysteinprotease wurde durch Fluoreszenzauslesung der codierten Bereiche bestimmt.

Obwohl theoretische (Abschnitt 2) und experimentelle Modellstudien (Abschnitt 3.1) zeigen, dass keine direkte Beziehung zwischen der Bindungsstärke und der Bildungsgeschwindigkeit kovalenter Bindungen existiert, stellt dies für die Anwendung von ABPP-Methoden kein Problem dar. Die aktiven Zentren und Katalysemechanismen sind bei unterschiedlichen Enzymklassen so verschieden, dass das Risiko,

ein nicht zur Zielgruppe gehörendes Enzym anzusteuern, sehr niedrig ist. Tatsächlich zeigte der Affinitätsmarker der von Schultz, Harris et al. identifizierten Sonde eine eindeutige Inhibition des lymphozytenvermittelten Zelltods.

3.3.3. Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Biomakromolekülen

Die Aufklärung der Wechselwirkung zwischen Biomakromolekülen (Protein-Protein und Protein-DNA/RNA) ist für das Verständnis biologischer Vorgänge und die Entwicklung neuer Arzneimittel von größter Bedeutung.^[100] Protein-Protein-Wechselwirkungen sind im Allgemeinen schwer zu erfassen, und die Covalent-Capture-Strategie scheint hierfür erfolgversprechend zu sein.^[101,102] In der einfachsten Form werden dabei exogene nichtspezifische Vernetzungsreagentien zu einem Proteingemisch gegeben, sodass komplexe Gemische gekoppelter Proteine erhalten werden. Die Komplexität kann stark verringert werden, indem das Vernetzungsreagens zunächst an das (gegebenenfalls manipulierte) Protein gekuppelt wird, das dann den

Bindungspartner kovalent bindet. Komplikationen entstehen dadurch, dass viele Protein-Protein-Wechselwirkungen durch posttranskriptionale Modifikationen (PTMs, „post-translational modifications“) reguliert werden, die kurzlebig sind und substoichiometrisch auftreten. Beispielsweise bildet das Smad2-Signalprotein stabile Homotrimere als Reaktion auf die rezeptorvermittelte Phosphorylierung von Ser⁴⁶⁵ und Ser⁴⁶⁷, während die Monophosphorylierung von Ser⁴⁶⁵ zu einem Homotrimer mit geringerer Stabilität führt.^[103,104] Das Homotrimer wird durch Zugabe der Smad-Bindedomäne des SARA-Proteins (SARA-SBD) wieder gespalten. Muir et al. zeigten an diesem System, dass eine PTM-vermittelte Protein-Protein-Wechselwirkung mithilfe eines photoaktiven Aminosäurevernetzers und eines phosphorylierten Ser⁴⁶⁵-Rests in der MH2-Domäne des Smad2-Proteins durch einen Covalent-Capture-Vorgang kovalent fixiert werden kann.^[105] Der kovalente „Einfang“ des Homotrimers wurde dadurch nachgewiesen, dass die Bestrahlung des Komplexes zu Spezies mit Molekulargewichten von dimerem und trimerem Smad2 führte. Ohne Bestrahlung und im Kontrollprotein waren diese Spezies gerade noch nachweisbar. Außerdem nahm die Menge an gebildeten Dimeren und Trimeren stark ab, wenn die Proteine mit einem Überschuss von SARA-SBD vorbehandelt wurden; dies belegt, dass das Covalent Capture tatsächlich mit der Bildung von Trimeren einhergeht.

Kürzlich veröffentlichten Arndt et al. eine elegante Anwendung der Covalent-Capture-Methode zum Nachweis eines Protein/RNA/Ligand-Komplexes (Abbildung 8).^[106] Thiostrepton ist ein Antibiotikum mit subnanomolarer Affinität für die 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms.^[107] Gebundenes Thiostrepton fixiert die Konformation des flexiblen ribosomalen Proteins L11 auf der ribosomalen 23S-rRNA und blockiert die Wirkung ribosomaler GTPasen. Die Wirkung und die Molekülstruktur von Nosiheptid sind ähnlich wie die von Thiostrepton, die genaue Anordnung und die

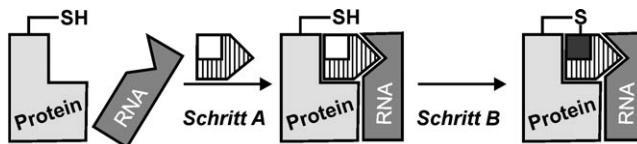


Abbildung 8. Covalent Capture bei einem Protein/RNA/Ligand-Komplex.

molekulare Struktur des Komplexes sind aber noch nicht bekannt. In diesem Zusammenhang ist die Covalent-Capture-Methode ein vielversprechender Ansatz, um Einblicke in die Reaktionsmechanismen zu gewinnen. Sowohl Thiostrepton als auch Nosiheptid enthalten Dehydroalanineinheiten, die als Michael-Akzeptoren für ein nucleophiles Thiol wirken können. Durch Austausch einzelner Cysteine mit ortsgerichteter Mutagenese wurde eine Reihe von Mutanten des L11-Proteins hergestellt und deren Reaktivität gegen Thiostrepton und Nosiheptid in Gegenwart von 23S-rRNA bestimmt. Während auf L11 vier mit Thiostrepton reagierende Positionen gefunden wurden, bildete Nosiheptid nur mit zwei Mutanten kovalente Addukte. Vermutlich liegt dies daran, dass Nosiheptid nur über einen Michael-Akzeptor verfügt, Thiostrepton dagegen über drei. Aus dem Reaktivitätsmuster des Covalent Capture kann auf die Orientierung des Liganden in der Bindungsstelle geschlossen werden, und zusammen mit anderen Messmethoden (NMR-Spektroskopie, Röntgenkristallographie, Molecular Modeling) bietet die Covalent-Capture-Strategie eine faszinierende Untersuchungsmethode.

3.4. Irreversible kombinatorische Chemie

3.4.1. Organische Synthese mit DNA-Matrizen

Die organische Synthese mit DNA-Matrizen (DTS; „DNA-templated organic synthesis“) erfährt seit einigen Jahren wieder verstärkte Aufmerksamkeit.^[108] Die Eleganz der DTS liegt in ihrer Direktheit, einfach indem die Hybridisierung mit einem DNA-Strang genutzt wird, um die effektive Molarität reaktiver Gruppen zu erhöhen. Dadurch gelingt es, gewöhnliche organische Reaktionen bei nanomolaren Konzentrationen zu untersuchen, die ohne Matrize extrem langsam wären. Von allen bekannten Selbstorganisationssystemen kann die DNA-Hybridisierung am besten gesteuert und programmiert werden. Die hohe Genauigkeit und die Robustheit der DNA-Hybridisierung erlaubt die vollständige Kontrolle der relativen Position beider DNA-Stränge und bietet daher die Möglichkeit, die Positionen der reaktiven Gruppen systematisch zu variieren.

Studien, in denen die Reaktionsgeschwindigkeiten vielfältiger organischer Reaktionen als Funktion der Anzahl der funktionellen Gruppen separierenden Nucleotide untersucht wurden, lieferten überraschende Ergebnisse (Abbildung 9a).^[109,110] Aus der effektiven Molarität wäre zu erwarten, dass die Geschwindigkeit der Bindungsbildung mit zunehmendem Abstand abnimmt. Für viele Reaktionen (beispielsweise Bildung von Amidbindungen, Nitro-Aldol-Addition, Wittig-Olefinierung, Heck-Kupplung) wurde aber beobachtet, dass die Bindungsgeschwindigkeit vom Abstand der reaktiven Gruppen unabhängig ist (0 bis 10 Basen, bei der Addition von Thiol an Maleimid oder α -Iodacetamid sogar 30 Basen). Als Erklärung wurde vorgeschlagen, dass nicht die Bildung der kovalenten Bindungen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, sondern das Annealing der beiden DNA-Stränge. Dies wurde durch die Befunde bestätigt, dass die Bildung der kovalenten Bindungen einer Kinetik zweiter Ordnung folgt (jeweils erster Ordnung pro DNA-Strang) und dass die Bindungsbildung bei Verringerung der Konzentration beider Stränge langsamer wird. Diese Beobachtung führte zu einem Modellvorschlag, demzufolge bei kleinen Abständen der funktionellen Gruppen die Doppelstrangbildung der DNA der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, sodass die kovalente Bindungsbildung mit konstanter Reaktionsgeschwindigkeit verläuft (Abbildung 9a).^[110] Mit zunehmendem Abstand nimmt dann die effektive Molarität der reaktiven

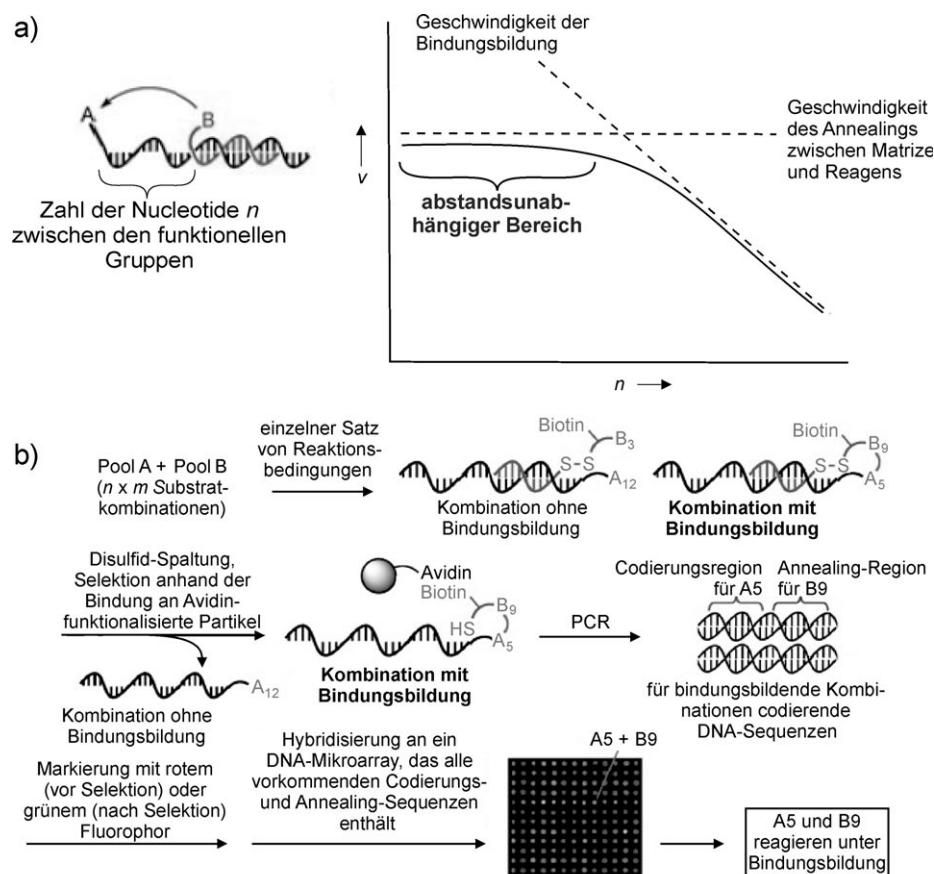


Abbildung 9. a) Erklärung für die beobachtete Abstandsabhängigkeit bei der Bildung kovalenter Bindungen in der DTS. b) Kombinatorische Anwendung der DTS.

Gruppen solange kontinuierlich ab, bis die Bildung der kovalenten Bindungen zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird (wodurch eine Abstandsabhängigkeit resultiert).

Für die DTS ist eine Abstandsabhängigkeit ungünstig, da sie die reagenscodierenden Positionen auf einer DNA-Matrize beschränkt. Das Problem wurde durch Verwendung einer so genannten Omega(Ω)-Matrize gelöst, die einige Nucleotide (3–5) am reaktiven 5'-Ende enthält, die komplementär zu einem überhängenden Bereich am reaktiven 3'-Ende des Reagens sind.^[111,112] Die Zahl der Basenpaare ist für eine Doppelstrangbildung zu klein, und diese findet nur dann statt, wenn das Reagens eine zusätzliche Codierungsregion enthält, die zu einer entfernt befindlichen Codierungsregion der Matrize komplementär ist. So entsteht eine Auswölbung (Ω) der Matrize, die die beiden reaktiven Gruppen in enge Nachbarschaft zueinander bringt. Mit diesem Aufbau verließen abstandsabhängige 1,3-dipolare Cycloadditionen und reduktive Aminierungen sogar dann effektiv, wenn die Codierungsregion 15 bis 25 Basen von den reaktiven Enden entfernt war.

Das enorme Potenzial der DTS zur Aufklärung organischer Reaktionen zeigte sich bei der Untersuchung der Bildung kovalenter Bindungen in einer 144 Verbindungen enthaltenden kombinatorischen Bibliothek, die durch Mischen zweier Reagentienpools A und B mit jeweils zwölf Substraten erhalten wurde (Abbildung 9b).^[113] Die Substrate aus Pool A wurden an den 5'-Terminus eines DNA-Strangs gebunden, der eine Codierungsregion für das spezifische Substrat enthielt. Die DNA-Stränge enthielten außerdem eine Region zur Doppelstrangbildung mit den Reagentien aus Pool B. Die Substrate aus Pool B wurden über einen Biotin-Linker an den 3'-Terminus eines DNA-Strangs gebunden, der eine Codierungsregion für das befestigte Substrat enthielt. Durch Mischen der Pools A und B wurden 144 Heteropaare erhalten, die anschließend auf produktive Kombinationen untersucht wurden, d.h. auf Substratkombinationen, die zur Bildung kovalenter Bindungen führen. Der Covalent-Capture-Vorgang resultierte in einem Transfer der Biotineinheit auf die A-Substrate, die dann mithilfe magnetischer Streptavidinkügelchen nacheinander fixiert und durch Polymerasekettenreaktion (PCR) mit einem den Cyanin-Fluorophor Cy3 enthaltenden DNA-Primer verstärkt wurden. Die aktiven Substratkombinationen wurden mithilfe eines DNA-Mikroarrays, das alle vorkommenden Codierungs- und Annealing-Sequenzen enthielt, identifiziert. Das Verfahren führte unter anderem zur Entdeckung einer neuen Pd^{II} -vermittelten Alkin-Alken-Makrocyclisierung.

3.4.2. Identifizierung von Peptidkatalysatoren

Die schwierige Aufgabe einer rationalen Katalysatorenentwicklung kann durch Methoden der kombinatorischen Synthese ersetzt werden.^[114] Allerdings ist auch diese Strategie nicht unproblematisch, da das Screeningprotokoll eine katalytische Aktivität und nicht etwa nur eine statische Moleküleigenschaft wie die Bindungsaffinität nachweisen muss. Erfolgreiche Verfahren zum Screening von partikelfixierten Katalysatoren beruhen auf IR-Thermographie,^[115] der Bildung unlöslicher gefärbter Reaktionsprodukte,^[116] fluoreszierenden pH-Indikatoren^[117] oder der Verwendung von Gelen, die die Produktdiffusion unterbinden.^[118,119]

Zur Anwendung der Covalent-Capture-Strategie im Rahmen eines Katalysatorscreenings wurde ein kombinatorisches System in der Weise entworfen, dass eine kovalente Bindung nur dann gebildet wird, wenn eine Peptidsequenz katalytische Aktivität zeigt. Tanaka, Barbas et al. erzeugten durch Phagendisplay eine Peptidbibliothek aus 6.4×10^7 Komponenten, indem sechs Aminosäuren wahllos an den C-Terminus eines 18 Aminosäuren langen, α -helicalen Peptids gebunden wurden, das die Decarboxylierung von Oxalessigsäure katalysiert.^[120,121] Die Selektion der Peptide wurde in der Weise durchgeführt, dass diejenigen Peptide, die mit Rinderserumalbumin(BSA)-markierten 1,3-Diketonen ein stabiles Enaminon bilden konnten, durch Covalent Capture fixiert wurden. Die selektierten Peptide beschleunigten Aldol- und Retroaldolreaktionen um Faktoren bis 1400 ($k_{\text{kat}}/k_{\text{unkat}}$).

Wennemers et al. entwickelten ein elegantes Screeningverfahren, um niedermolekulare Peptide als Katalysatoren für die asymmetrische Aldolreaktion zu identifizieren. Das Prinzip des Verfahrens beruht darauf, dass der Katalysator und eines der Reagentien an Harzkügelchen co-immobilisiert werden (Abbildung 10a).^[122] Durch codierte Split-Mix-Synthese wurde eine Bibliothek bestehend aus 3375 potenziellen Tripeptidkatalysatoren hergestellt, die anschließend über

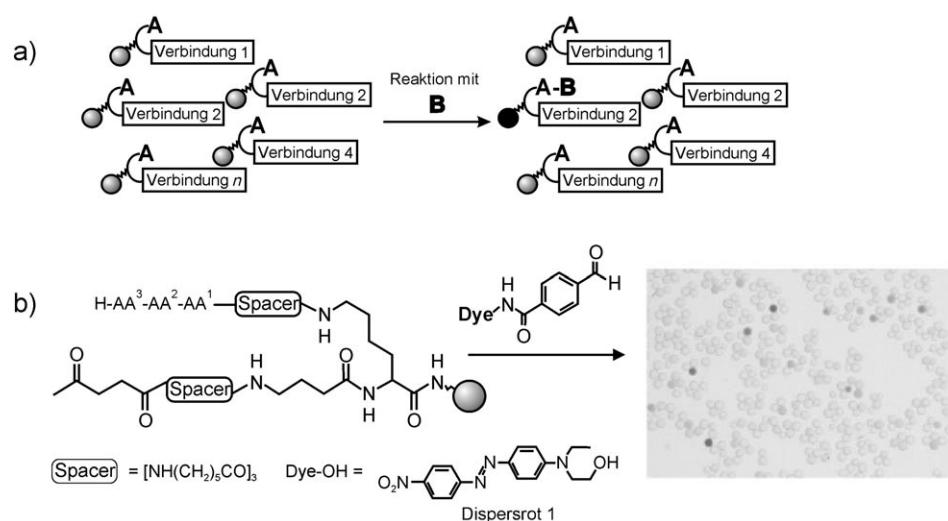


Abbildung 10. a) Prinzip der gemeinsamen Immobilisierung von Katalysator und Substrat zur Suche nach neuen Katalysatoren. b) Anwendung der in (a) skizzierten Strategie zur Suche nach neuen Peptidkatalysatoren für Aldolreaktionen.

einen Abstandhalter („spacer“) mit einem Reagens **A** (einem von Lävulinsäure abgeleiteten Keton) verknüpft wurden.^[123] Ein zugefügtes Reagens **B** (ein farbstoffmarkierter Benzaldehyd) wurde nur dann am Harz fixiert, wenn das Peptid katalytisch aktiv war (Abbildung 10b). Nach Isolierung und Analyse der gefärbten Kugelchen wurden zwei signifikante Konsensussequenzen entdeckt, von denen eine, H-L-Pro-L-Pro-L-Asp-NH₂, in der asymmetrischen Aldolreaktion katalytisch aktiver als L-Pro war. Vom Konzept her bedeutet dieses Verfahren ein wesentlicher Fortschritt, da es keine Informationen über den Reaktionsmechanismus und die beteiligten Intermediate erfordert.

4. Reversible Covalent Capture

4.1. Selbstorganisation durch Wasserstoffbrücken in wässriger Lösung

Die durch Wasserstoffbrücken vermittelte Selbstorganisation von Molekülen in Wasser bleibt eine der großen Herausforderungen in der nichtkovalenten Synthese. Synthetische Selbstorganisationen erreichen bei Weitem noch nicht die Komplexität biologischer Selbstorganisationsvorgänge, die oft mit vielzähligen Wasserstoffbrücken verbunden sind. Die hauptsächlichen Erfolge bei der Bildung von Wasserstoffbrücken in Wasser wurden mit der Erzeugung von hydrophoben Mikroumgebungen erzielt, beispielsweise von Micellen^[124,125] oder stabförmigen Polymerstapeln.^[126,127]

Erst kürzlich zeigten Gong et al., dass durch ein Zusammenspielen von Wasserstoffbrücken und dynamischen kova-

lenten Bindungen spontan diskrete Strukturen in Wasser entstehen können, bei denen die Wasserstoffbrücken eine Sequenzselektivität erzeugen.^[128,129] Die Oligoamide **8** und **9** aggregieren in nichtpolaren Medien zu dem sehr stabilen Doppelstrang **8-9**, der von sechs Wasserstoffbrücken zusammengehalten wird (Abbildung 11). Die komplementären Anordnung von Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren in **8** (DADDAD) und **9** (ADAADA) stellt sicher, dass der Heterodoppelstrang **8-9** das einzige Produkt ist. Ähnlich bilden die Oligoamide **10** (DDAADD) und **11** (AADAAA) ausschließlich den Heterodoppelstrang **10-11**. In wässrigen Medien genügen die Wasserstoffbrücken alleine nicht, um den Dimeren eine ausreichende thermodynamische Stabilität zu verleihen. Die ausschließliche Bildung des Doppelstrangs **8-9** wurde erst beobachtet, wenn die Wasserstoffbrückenbildung mit einer reversiblen Disulfidbildung kombiniert wurde, indem ein äquimolares Gemisch von **8** und **9** in einem 9:1-Gemisch von H₂O und THF mit Iod behandelt wurde. Es stellt sich die naheliegende Frage, zu welchem Maß die Doppelstrangbildung von der Bildung von Wasserstoffbrücken getrieben wird. In Kontrollexperimenten wurde gezeigt, dass sowohl Strang **8** als auch Strang **9** in Abwesenheit des komplementären Strangs eine homocyclische Struktur mit intramolekularer Disulfidbindung bilden. Das Oligoamid **10**, das eine zu **8** und **9** nichtkomplementäre Anordnung von Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren aufweist, störte die Bildung des Doppelstrangs **8-9** nicht. Andererseits ergab die Umsetzung von **10** mit seinem komplementären Partner **11** ausschließlich den Doppelstrang **10-11**.

Die Bedeutung des Erkennungsvorgangs wurde in einem Folgeexperiment bestätigt, bei dem sechs Oligoamide (in der

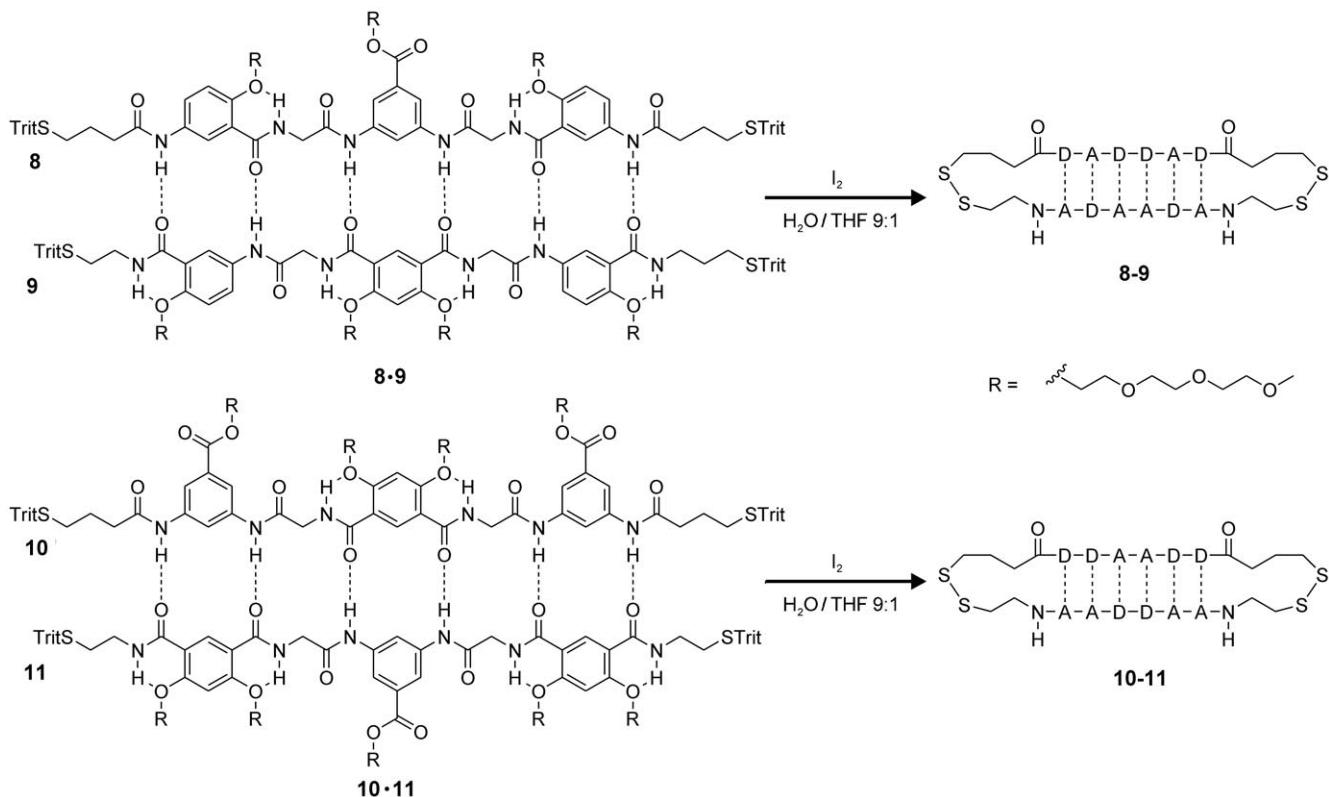


Abbildung 11. Sequenzspezifische Assoziation von Oligoamiden in wässrigen Medien.

Form von drei Paaren komplementärer Stränge mit der Fähigkeit zur Bildung von zwei, vier oder sechs Wasserstoffbrücken) in äquimolarem Verhältnis gemischt wurden.^[129] Im thermodynamischen Gleichgewicht war jeder Strang ausschließlich mit seinem komplementären Partner dimerisiert, obwohl rein statistisch gesehen eine Vielzahl von Doppelsträngen hätte entstehen können. Diese Erscheinung wird als „Selbstsortierung“ bezeichnet und beschreibt eine Situation, in der ein System unter thermodynamischer Kontrolle eine nichtstatistische Zusammensetzung einnimmt.^[130,131] In diesem speziellen System beruht die Selbstsortierung auf der Kombination von nichtkovalenten und dynamischen kovalenten Bindungen. Es kommt zur Selbstsortierung, weil die Bindungspartner eine größtmögliche Anzahl von Wasserstoffbrücken und kovalenten Bindungen anstreben.

Wie bedeutend die räumliche Anordnung der reaktiven Gruppen und der Erkennungsmodule für die thermodynamische Stabilität eines Systems ist, wurde auch von Philp und Bennes sehr eindrucksvoll gezeigt. In einem einfachen Modellsystem führten sie eine reversible Diels-Alder-Reaktion zwischen dem Dien **12** und den Dienophilen **13–15** mit Abstandhaltern verschiedener Länge durch (Abbildung 12a).^[132,133] Die reversible kovalente Bindung wird von der Bildung zweier Wasserstoffbrücken zwischen den Amidopyridin- und Carbonsäureeinheiten begleitet. Alle Diels-Alder-Produkte **16–18** werden von Wasserstoffbrücken stabilisiert, am stärksten jedoch das Produkt **17**, bei dem die Länge des Abstandhalters die optimale Geometrie zur Bildung von Wasserstoffbrücken ermöglicht (Figure 12b). Ähnlich wie bei den Ergebnissen von Gong und Mitarbeitern war also die Stärke der nichtkovalenten Bindungen der bestimmende Faktor für die thermodynamische Stabilität des Produkts.

Die Arbeit von Philp und Bennes ist noch auch aus einem anderen Grund interessant, indem sie einen grundlegenden Unterschied zwischen irreversiblem und reversiblem Covalent Capture aufdeckt. Neben der thermodynamischen Sta-

bilität untersuchten die Autoren auch den Einfluss des Erkennungsvorgangs auf die Produktbildungsgeschwindigkeit und fanden dabei eine andere Rangfolge: Die schnellste Reaktion findet nicht mit dem Dienophil **14**, sondern mit **13** statt, das den kürzesten Abstandhalter aufweist. Eine Erklärung wäre, dass der aus nur einem C-Atom bestehend Abstandhalter den schnellsten Zugang zum Diels-Alder-Übergangszustand bietet, dabei aber nicht flexibel genug ist, um die Bildung von zwei Wasserstoffbrücken im Endprodukt zuzulassen. Das führt dazu, dass **13** schneller reagiert als **14**, während **17** das stabilste Produkt ist. Demzufolge ist **16** das kinetisch bevorzugte Produkt des Modellsystems, während **17** die thermodynamisch stabilste Verbindung darstellt. Es ist wichtig zu erkennen, dass die Bildung des kinetischen Produkts völlig äquivalent zu einem irreversiblen Covalent-Capture-Vorgang ist (Abschnitt 3). Mit anderen Worten hätte im Modellsystem von Philp und Bennes irreversibles Covalent Capture die Verbindung **16** als Hauptprodukt ergeben, während unter reversiblen Bedingungen das thermodynamische Produkt **17** dominiert. Der Vorgang der nichtkovalenten Erkennung ist für beide der gleiche.

4.2. Messung von Stabilität und Ordnung in biologischen Strukturen

4.2.1. Peptide

Die Aufklärung der Kräfte und Vorgänge, die die Faltung von Peptidsträngen zu Proteinen bestimmen, ist von größter Bedeutung für das Verständnis von Erkrankungen, die mit Faltungsfehlern von Proteinen verbunden sind, und für die Entwicklung von künstlichen Peptidkonstrukten.^[134–136] Zur Erfassung von Proteinfaltungsvorgängen werden im Allgemeinen Änderungen eines spektroskopischen Indikators der höher geordneten Struktur unter Bedingungen beobachtet, die zur Denaturierung des Proteins führen (Konzentration, Temperatur, Ionenstärke). Ein mögliches Problem besteht

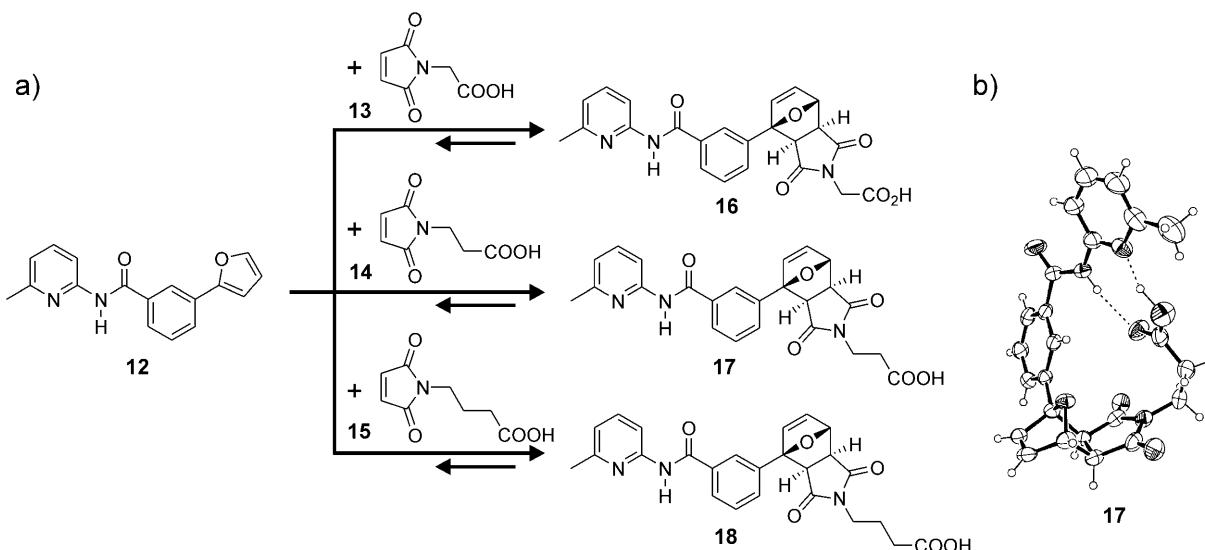


Abbildung 12. a) Reversible Diels-Alder-Reaktion zwischen dem Dien **12** und den Dienophilen **13–15**. b) Röntgenkristallstruktur des Diels-Alder-Addukts **17**.

darin, dass die intrinsischen Stabilitäten der Grenzkonformationen, also nativ und vollständig denaturiert, von den experimentellen Bedingungen beeinflusst werden könnten.

Vor diesem Hintergrund entwickelten Gellman et al. die neue Strategie des Thioesteraustauschs im Proteinrückgrat („backbone thioester exchange“, BTE), die eine bedingungsunabhängige Messung der Stabilität des geordneten Zustands von Polypeptiden ermöglicht.^[137] Beim BTE-Ansatz wird eine Amidbindung in der Hauptkette des Polypeptids durch einen Thioester ersetzt, der in wässriger Lösung bei neutralem pH-Wert einen Thioester-Thiol-Austausch eingehen kann (Abbildung 13). Die Methode wurde zunächst am

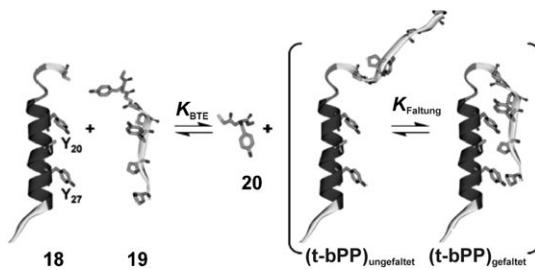


Abbildung 13. Thermodynamisches Gleichgewicht beim Thioester-Austausch im Proteinrückgrat. Der entscheidende Parameter ist die Gleichgewichtskonstante K_{Faltung} , die mit der freien Bindungsenergie zwischen den beiden Peptidfragmenten **18** und **19** in Beziehung steht.

Beispiel des Rinderpankreaspolypeptids (bPP) getestet. Das Protein bPP besteht aus nur 36 Aminosäuren und weist eine definierte Tertiärstruktur auf, bei der das N-terminale Polyprolin-II-Segment **19** auf das C-terminale α -helicale Segment **18** zurückgefaltet ist. Als auszutauschende Amidbindung wurde die Bindung zwischen den Aminosäuren 9 und 10 gewählt, die in einer Schleife angeordnet und nicht an intramolekularen Wasserstoffbrücken beteiligt ist. Nach Zusatz des Thiols **20** (Thioglycoyltyrosin-N-methylamid) stellte sich ein Gleichgewicht ein, in dem das Thiol mit dem C-terminalen Segment um die Bildung eines Thioesters mit dem N-terminalen Segment konkurriert. Unter der Annahme, dass das Referenzthiol keine tertiäre Wechselwirkung mit dem N-terminalen Segment eingeht und dass die beiden Thioesterverbindungen isoenergetisch sind, kann eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten von t-bPP direkt mit einer günstigen tertiären Wechselwirkung zwischen den N- und C-terminalen Segmenten in Verbindung gesetzt werden. Diese Argumentation ist natürlich nur dann stichhaltig, wenn die Stabilität der α -Helix im C-terminalen Segment von der Tertiärstruktur unabhängig ist. Dies wiederum bedeutet, dass Systeme, bei denen Sekundär- und Tertiärstrukturen synergistisch gebildet werden, für eine solche Analyse zu kompliziert sind. Bei bPP, bei dem auch ohne die Tertiärstruktur die α -Helix großteils erhalten bleibt, ist dies nicht der Fall.

Mit diesem eleganten Ansatz kann der Einfluss von Einzelmutationen in der Polypeptidkette auf die Stabilität der gefalteten Struktur schnell untersucht werden. Für bPP wurden in einem solchen Experiment die K_{BTE} -Werte bei Ala-Substitution der Reste Tyr₂₀ und Try₂₇ untersucht, für die aus NMR-Messungen bekannt ist, dass sie eine entscheidende

Rolle bei der Bildung der Tertiärstruktur spielen. Die positiven Werte von $\Delta G_{\text{Faltung/BTE}}$ weisen darauf hin, dass durch das Entfernen der Tyrosinreste günstige Kontakte verloren gingen.

Die gleiche Arbeitsgruppe verwendete den BTE-Ansatz weiterhin, um die Auswirkungen einer Substitution von Phe durch F₅-Phe auf die Konformationsstabilität der Kopf-Subdomäne von Hühnervillin (cVHP) zu untersuchen^[138] und um bevorzugte Seitenkettenkonstellationen an antiparallelen Coiled-Coil-Grenzflächen zu identifizieren.^[139] Für den letzteren Fall hatten bereits Ghadiri et al. in ihrer klassischen Veröffentlichung über die chiroselektive Replikation von Peptiden den gleichen dynamischen Ansatz verwendet, um die Stereospezifität der Coiled-Coil-Bildung zu zeigen.^[140] Die (größere) Stabilität eines homochiralen Coiled-Coils im Vergleich zu seinem heterochiralen Analogon wurde anhand zweier Experimente studiert: durch langsame Oxidation eines racemischen Gemisches von gewundenen Peptiden **21^{DD}-SH** und **21^{LL}-SH** und anhand der Beschleunigung des Disulfidaustauschs in einem Glutathion-Redoxpuffer, wobei von einem heterochiralen Dimer **21^{DD}-S-S-21^{LL}** ausgegangen wurde (Abbildung 14a). Rein statistisch wäre ein 1:1-Verhältnis von homochiralen (**21^{DD}-S-S-21^{DD}**, **21^{LL}-S-S-21^{LL}**) und heterochiralen (**21^{DD}-S-S-21^{LL}**) Coiled-Coils zu erwarten. In beiden Experimenten wurde jedoch durch HPLC-Analyse das völlige Fehlen des heterochiralen Dimers **21^{DD}-S-S-21^{LL}** im thermodynamischen Gleichgewicht gezeigt (Abbildung 14b). Auch Kumar et al. beobachteten die Selbstsortierung von Coiled-Coils, die ein Kohlenwasserstoff- oder Fluorkohlenwasserstoffmotiv enthielten.^[141]

Ebenfalls Gellman et al.^[142] dehnten den BTE-Ansatz kürzlich auf sekundäre Peptidstrukturen aus, im Besonderen

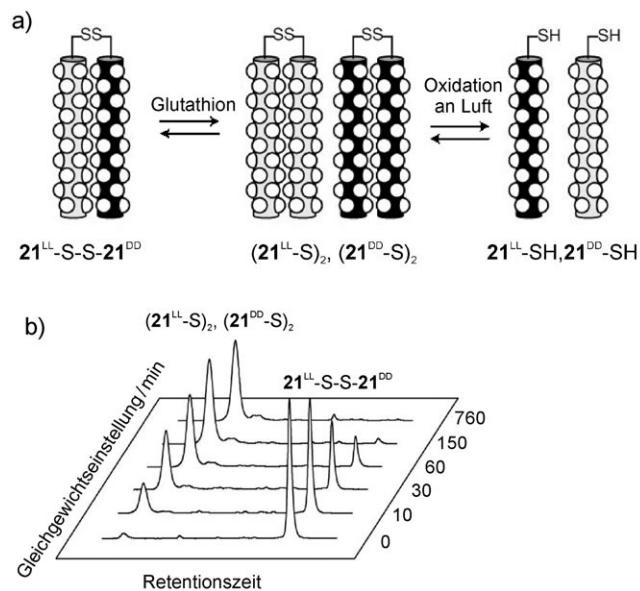


Abbildung 14. a) Bei der langsamen Oxidation eines racemischen Gemisches gewundener Peptide **21^{DD}-SH** und **21^{LL}-SH** an Luft sowie auch bei einem vom heterochiralen Dimer **21^{DD}-S-S-21^{LL}** ausgehenden Disulfidaustausch in einem Glutathion-Redoxpuffer werden ausschließlich die homochiralen Dimere **(21^{LL}-S)₂** und **(21^{DD}-S)₂** gebildet wie durch HPLC-Analyse (b) nachgewiesen wurde.

auf die Bildung von β -Faltblättern. Eine konzeptionell verwandte Studie hatten zuvor schon Balasubramanian et al.^[143] publiziert, die darin das thermodynamische Gleichgewicht zwischen den beiden Peptiden **22** und **23** mit einer bzw. vier Leu-Lys-Wiederholungssequenzen, die Peptide zur Bildung von β -Faltblättern prädisponieren (Abbildung 15), unter-

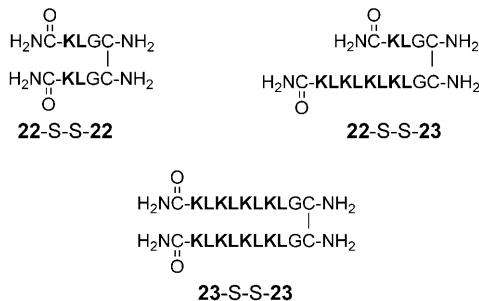


Abbildung 15. Mögliche Dimerisierungsprodukte eines Gemischs von **22-SH** und **23-SH**.

suchten. Bei konventionellem Disulfidaustausch wurde eine deutliche Bevorzugung des dimeren Peptids **23-S-S-23** gegenüber den anderen möglichen dimeren Peptiden (**22-S-S-23**, **22-S-S-22**, **22-S-S-G** und **23-S-S-G**, wobei **G** für die reduzierte Form des Glutathion-Redoxpuffers steht) beobachtet. Mit 2D-NMR-Spektroskopie wurden Kontakte zwischen den beiden Peptidsträngen nachgewiesen und so die Vermutung bestätigt, dass die Ursache der höheren thermodynamischen Stabilität des Dimers **23-S-S-23** in der Bildung eines β -Faltblatts zu suchen ist. Der gleiche Ansatz wurde später auch zum Prüfen von Peptid-Nucleinsäuren auf Sekundärstrukturen verwendet.^[144]

4.2.2. Doppelschichtmembranen

Die Hypothese, dass sich in fluiden biologischen Membranen Cluster (oder Domänen) von Lipiden mit geordneter, nichtstatistischer Verteilung der Lipide bilden, war Gegenstand einer kontrovers geführten Debatte. Etliche Arbeiten weisen darauf hin, dass solche Cluster, die auch als „Lipiddlöße“ (lipid rafts) bezeichnet werden, eine wichtige Rolle bei der Steuerung verschiedener zellulärer Vorgänge spielen könnten, z. B. bei der Signalweiterleitung und beim Transport durch die Membran.^[145] Außerdem wurden sie mit der Produktion und dem Zelleintritt von Viruspartikeln in Verbindung gebracht.^[146] Eine Hauptkomponente der Zellmembranen von Säugern ist Cholesterin, dessen strukturelle Rolle bei der Bildung kondensierter, fluider Membranen rätselhaft bleibt, trotz zahlreicher Studien zu Cholesterin und Phospholipide enthaltenden Membranen.

Regen et al. entwickelten ein „nearest-neighbour recognition“ (NNR) genanntes Verfahren, bei dem die Fähigkeit der einzelnen Lipidmoleküle, mit den nächsten Nachbarn zu reagieren, als Basis zur quantitativen Beschreibung der Tendenz von Lipiden zur Clusterbildung genutzt wird. Das Verfahren beruht auf dem reversiblen Covalent Capture von zwei benachbarten Lipiden (oder Lipid und Cholesterin) über die

reversible Bildung einer Disulfidbrücke.^[147,148] Das Prinzip der Methode ist einfach: Wenn die Lipide **A** und **B** über eine reversible Bindung miteinander verknüpft sind, bildet sich durch Gleichgewichtseinstellung ein Gemisch von Homodimeren (**AA** und **BB**) und Heterodimeren (**AB**). Ohne thermodynamische Bevorzugung ist die Gleichgewichtsverteilung **AA/BB/AB** gleich 1:1:2, entsprechend der Gleichgewichtskonstanten $K=4$ (Abbildung 16). Eine Verschiebung des

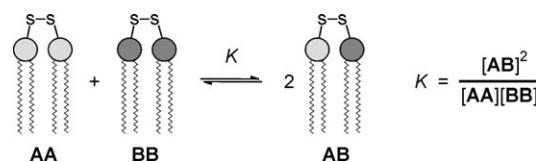


Abbildung 16. Prinzip der NNR-Methode: Zwei Homodimere **AA** und **BB** äquilibrieren zu einem Gemisch der Homodimere und Heterodimere **AB**.

Gleichgewichts zugunsten der Hetero- oder Homodimere zeigt eine nichtstatistische Verteilung in der fluiden Doppelschicht an. Die Autoren konnten NMR-spektroskopisch nachweisen, dass Cholesterin bevorzugt an Lipide mit langen Kohlenwasserstoffketten (C_{16} und C_{18}) bindet, wenn die Sterinkonzentration biologisch relevante Niveaus erreicht. Das Experiment stützt die Theorie, dass Cholesterin und Lipide in biologischen Membranen „Komplexe“ bilden.^[149,150] Darüber hinaus wurden Hinweise für die „kondensierende“ Wirkung des Cholesterins auf Lipiddoppelschichten gefunden. Dies impliziert, dass die flexiblen Acylketten der Phospholipide formkomplementär zu benachbarten Cholesterinmolekülen sind, sodass eine enge Packung mit zahlreichen hydrophoben Kontaktentstehen. Cholesterin scheint also als eine starre hydrophobe Matrize für die Membranlipide zu wirken, um so ihre Wechselwirkungen zu maximieren.

4.3. Reversible kombinatorische Chemie

4.3.1. Wirkstoffsuche

In den oben beschriebenen Beispielen für reversibles Covalent Capture wurden Systeme mit nur wenigen Spezies und Gleichgewichten untersucht. In diesem Abschnitt wird gezeigt, dass dynamisches Covalent Capture auch eine exzellente Strategie für die kombinatorische Suche nach neuen Wirkstoffen und Katalysatoren sein kann.

Ein auf einer Anbindungsstrategie („tethering strategy“) beruhendes, kombinatorisches Screening wurde bei Sunesis Pharmaceuticals zur Suche nach proteinbindenden Liganden verwendet (Abbildung 17a).^[151–153] Die Methode nutzt einen Disulfidaustausch zwischen einem Cysteinrest in der Nähe des Bindungszentrums des Proteins und einer kleinen Bibliothek disulfidhaltiger Liganden. Hierbei wird angenommen, dass die meisten Moleküle in der Bibliothek keine intrinsische Affinität für das Protein aufweisen und dass sich die Disulfidbindung zwischen Ligand und Protein leicht reduzieren lässt. Bindende Wechselwirkungen zwischen einem Liganden und dem Bindungszentrum des Proteins stabilisieren nun aber die Disulfidbindung und verschieben das ther-

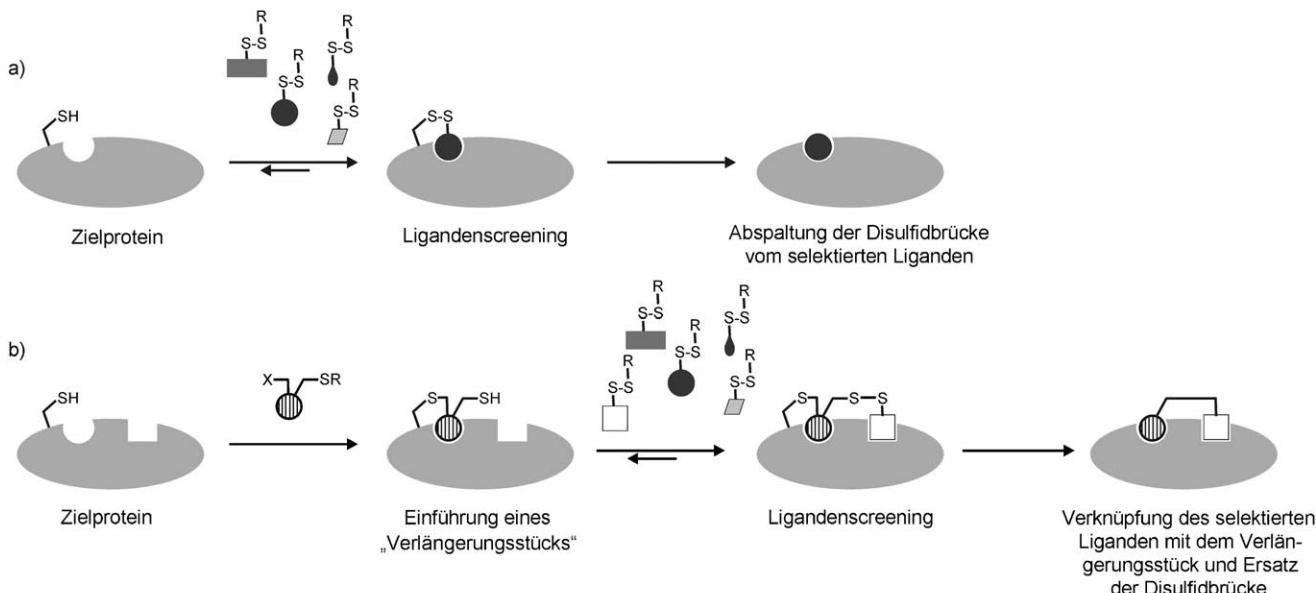


Abbildung 17. a) Prinzip der Anbindungsstrategie und b) der erweiterten Anbindungsstrategie für die Wirkstoffsuche.

modynamische Gleichgewicht hin zum modifizierten Protein. Indem man die Zusammensetzung im thermodynamischen Gleichgewicht bestimmt, kann nun dasjenige Moleköl der Bibliothek ermittelt werden, das die größte Affinität für das Zielprotein zeigt.

Die Methode wurde am Beispiel der Thymidylatsynthase (TS) validiert, die einen Cysteinrest im aktiven Zentrum trägt.^[151] TS ist an der Synthese von Thymidinmonophosphat (dTMP) beteiligt und ist daher ein wichtiges Target von tumortherapeutischen Wirkstoffen. Mögliche Liganden wurden in Zehnergruppen gescreent und massenspektrometrisch identifiziert. Die Anbindungsexperimente wurden mit einem Überschuss an 2-Mercaptoethanol durchgeführt, um reduzierende Bedingungen und somit Reversibilität zu erzielen. Das Screening von insgesamt 1200 disulfidhaltigen Fragmenten resultierte in einer starken Selektion von *N*-Arylsulfonamidprolin-Derivaten, wie z.B. *N*-Tosyl-D-prolin. Auch hier ist entscheidend, dass die thermodynamische Stabilität von der nichtkovalenten Wechselwirkung zwischen dem Liganden und dem Protein bestimmt wird. Als Beleg hierfür gilt, dass die beobachtete Verteilung der kinetischen Produkte (ohne Reduktionsmittel) von der Zusammensetzung im thermodynamischen Gleichgewicht völlig verschieden ist und nur eine mäßige Selektion von *N*-Tosyl-D-prolin zeigt. Die hohe Empfindlichkeit dieser Methode zum Nachweis schwacher Wechselwirkungen wird durch den sehr hohen Wert illustriert, der für die Dissoziationskonstante ermittelt wurde (1.1 mM).

Zwei weiterentwickelte Varianten der Anbindungsstrategie sind die Fragment-Assemblierung^[154] und die erweiterte Anbindungsmethode.^[155] Bei der Fragment-Assemblierung wird der letztendliche Wirkstoff durch Zusammenfügen von in verschiedenen Screeningexperimenten ermittelten Fragmenten erhalten.^[156] Die Bindung von Interleukin-2 (IL-2) an seinen Rezeptor induziert die Proliferation von T-Zellen und

ist ein wichtiges Target zur Behandlung von Immunstörungen. Eine Reihe von IL-2-Mutanten wurde hergestellt, indem Cysteinreste in der Umgebung der an der Rezeptorbindung beteiligten Proteinstelle eingeführt wurden. Ein Screening der Mutanten gegen eine Bibliothek von 7000 disulfidhaltigen Fragmenten selektierte mehrere strukturell verwandte Fragmente mit einer Affinität für den Bereich um die Rezeptorbindungsstelle. Im nächsten Schritt wurde ein fokussierter Satz von 20 Fragmenten präpariert, die mit einem bekannten, durch konventionelle Wirkstoffsuche entwickelten Inhibitor von IL-20 zusammengefügt wurden. Inhibitionsexperimente ergaben bei 8 der 20 Verbindungen eine 5- bis 50-fache Zunahme der Affinität im Vergleich zu dem ursprünglichen Inhibitor, wodurch der IC_{50} -Wert in den nanomolaren Bereich gedrückt werden konnte.

Bei der erweiterten Anbindungsmethode wird ein Cysteinrest in der Nähe des aktiven Zentrums eingeführt und dann mit einem „Verlängerungsstück“, das ist ein kleines Moleköl mit einer geschützten Thiolgruppe und einer Affinität für das Protein, kovalent modifiziert (Abbildung 17b). Das Entfernen der Schutzgruppe setzt einen Thiolrest frei, der für ein dynamisches Screening genutzt werden kann. Die selektierten Fragmente werden anschließend mit dem Verlängerungsstück durch kovalente Bindung zum fertigen Wirkstoff zusammengefügt. Mithilfe der erweiterten Anbindungsstrategie wurde ein neuer Inhibitor für Caspase-3 entdeckt.

Die Ergebnisse von Erlanson et al. und anderen^[157,158] machen deutlich, wie erfolgreich reversibles Covalent Capture in der Wirkstoffentwicklung eingesetzt werden kann. Der Hauptvorteil der Anbindungsstrategie liegt darin, dass auch sehr schwache Wechselwirkungen zwischen dem Zielprotein und Molekülen der Bibliothek erfasst werden. Besonders vielversprechende Varianten sind die Fragment-Assemblierung, bei der schwach bindende Fragmente zu einem

einzelnen, nun hochaffinen Molekül zusammengefügt werden, sowie die erweiterte Anbindungsmethode zur Verbesserung der Bindungsaffinität bekannter Inhibitoren durch Anfügen selbstselektierter Fragmente.

4.3.2. Katalysatorsuche

Bei der Suche nach neuen Katalysatoren bietet die dynamische Chemie einen schnellen Zugang zu Ligandensystemen ohne aufwändige Syntheseprozeduren. So wurde in letzter Zeit viel über selbstorganisierte Katalysatorsysteme geforscht, bei denen der Zusatz des Metallions zu einem dynamischen Ligandensystem die Zusammensetzung zugunsten des Katalysators verschiebt. Beispielsweise wurde durch Zusatz eines Rh-Ions zu einem 2-Pyridon/2-Hydroxypyridin-Tautomersystem mit Diphenylphosphanliganden das Gleichgewicht vollständig zum unsymmetrischen Dimer hin verschoben, bei dem es sich um das nichtkovalente Äquivalent eines herkömmlichen kovalenten zweizähnigen Liganden handelt.^[159] Diese Strategie wurde auch zur schnellen Herstellung und zum Screening von Bibliotheken supramolekularer Katalysatoren eingesetzt.^[160,161]

Unsere Arbeitsgruppe hat erst kürzlich gezeigt, dass reversibles Covalent Capture zur Suche nach neuen Katalysatoren verwendet werden kann (Abbildung 18a).^[162] Hierzu wurde eine zehnteilige Hydrazinbibliothek auf Komponenten gescreent, die mit einem Phosphonat, das ist ein Übergangszustandsanalogon der basischen Esterhydrolyse, wechselwirken können (Abbildung 18b). Funktionelle Gruppen, die mit der Phosphonatgruppe stabilisierend wechselwirken, sollten auch den Übergangszustand stabilisieren und daher die Esterhydrolyse beschleunigen. Das Screening liefert ein direktes

Ergebnis, da stabilisierende Wechselwirkungen die thermodynamische Stabilität des entsprechenden Hydrazons erhöhen und zu einer erhöhten Konzentration im Vergleich zu einem Kontrollmolekül ohne Targetgruppe führen. Änderungen in der Zusammensetzung eines solchen dynamischen Systems können mit $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektroskopie anhand der charakteristischen Imin-Signale gut verfolgt werden. Im Ergebnis wurde eine Korrelation gefunden zwischen der thermodynamisch getriebenen Anreicherung einer Komponente und der Effizienz, mit der die selektierte chemische Funktion die intramolekulare Katalyse unterstützt. Zum Beispiel wurde das Hydrazon **24**, das eine Ammoniumgruppe enthält, am stärksten angereichert, und die Estereinheit in **25** wurde 60-mal schneller hydrolysiert als eine Referenzverbindung. Kontrollexperimente lieferten starke Hinweise dafür, dass die Reaktionsbeschleunigung von der Stabilisierung des Übergangszustands verursacht wird. Selbstverständlich konnte diese Arbeit keinen „echten“, funktionsfähigen Katalysator liefern, da die Esterbindung in intramolekularer Form vorliegen musste. Dennoch ist davon auszugehen, dass der Ansatz in Kombination mit einer unabhängigen Suche nach Substrataffinitäten oder zur Verbesserung bekannter Katalysatoren sehr nützlich sein wird.

Eine weitergehende Untersuchung dieses Systems zeigte aber auch die experimentellen Grenzen der reversiblen Covalent-Capture-Methode auf.^[164] So wurde beobachtet, dass die thermodynamisch getriebene Anreicherung bei hohen Probenkonzentrationen und hohem Hydrazidüberschuss verschwindet. Dies wurde damit erklärt, dass unter diesen Bedingungen die intermolekulare anstelle der intramolekularen Wechselwirkung bevorteilt ist.

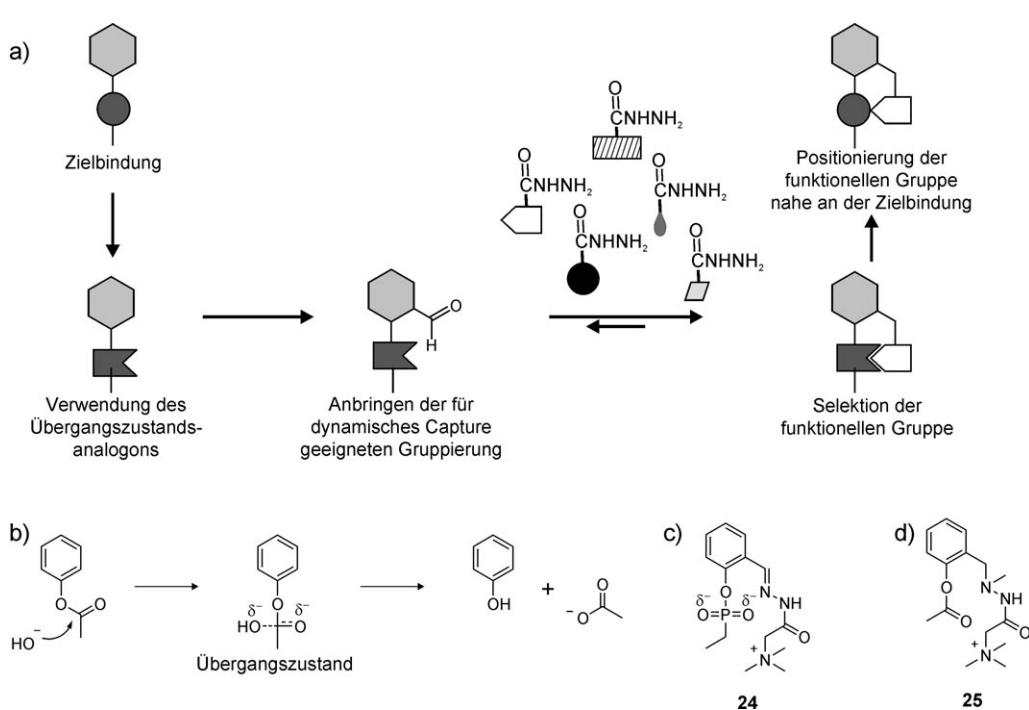


Abbildung 18. a) Anwendung von dynamischem Covalent Capture zur Suche nach neuen Katalysatoren. b) Zielreaktion. c) Selektion der funktionellen Gruppe mithilfe des Phosphonat-Übergangszustandsanalogons. d) Anordnung der selektierten Gruppe in der Nähe der Zielbindung.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Covalent-Capture-Strategien spielen in vielen verschiedenen Forschungsgebieten eine Rolle. In seiner irreversiblen Form wird Covalent Capture hauptsächlich verwendet, um Informationen über die Stärke molekularer Erkennungsvorgänge zu gewinnen. Hierbei kann es sich um einfache Wirt-Gast-Wechselwirkungen, Substrat-Enzym- oder auch Protein-Protein-Wechselwirkungen handeln. In neueren Studien wurde irreversibles Covalent Capture außerdem vermehrt zum „Einfrieren“ dynamischer Selbstorganisationsprodukte genutzt.

In der ursprünglichen Fassung ist die Covalent-Capture-Strategie ein kinetisch kontrollierter Ansatz, der darauf beruht, dass die Bildungsgeschwindigkeit kovalenter Bindungen durch eine Komplexbildung erhöht wird. Erst die Entwicklung der dynamischen kovalenten Chemie hat zur Anwendung von Covalent-Capture-Strategien unter thermodynamisch kontrollierten Bedingungen geführt. In jedem Fall hängt der Erfolg einer Covalent-Capture-Methode stark davon ab, zu welchem Maß die Bildung der kovalenten Bindungen mit der Komplexbildung kompatibel ist. Die in diesem Aufsatz diskutierten Beispiele zeigen, dass das kovalent fixierte Produkt, sei es nun unter kinetischer oder thermodynamischer Kontrolle erhalten worden, nicht unbedingt dem stärksten nichtkovalenten Komplex entspricht. Dieser Punkt muss bei der Anwendung der Covalent-Capture-Strategie besonders beachtet werden.

Der besondere Erfolg der Covalent-Capture-Strategie bei Proteinsystemen ist in der intrinsisch hohen Substratselektivität der Proteine begründet. Diese hohe Selektivität wiegt suboptimale Capture-Wechselwirkungen, wie sie z. B. aus geometrischen Gründen auftreten können, weitgehend auf. Die im Allgemeinen geringere Selektivität synthetischer Systeme macht es schwieriger, das fixierte Produkt mit der Stärke des Ausgangskomplexes in Beziehung zu setzen. Bei synthetischen Systemen entwickelt sich daher die reversible Covalent-Capture-Methode immer mehr zur dominierenden Strategie, da hier die Stärke der nichtkovalenten Wechselwirkung im kovalenten Produkt von Interesse ist. Anders ausgedrückt misst man die interessierenden Verbindungen direkt, während die Wechselbeziehung mit dem Ausgangskomplex im Allgemeinen nicht mehr beachtet wird. Damit wird reversibles Covalent Capture zu einer erfolgversprechenden Methode für die Entwicklung selbstorganisierter Systeme, für die Bestimmung von Stabilitätskonstanten und für die Selbstselektion katalytischer Einheiten. Unserer Meinung nach bietet sowohl der reversible als auch der irreversible Covalent-Capture-Ansatz völlig neue Möglichkeiten zur Entwicklung und Analyse komplexer chemischer Systeme.

Die Autoren danken der Universität Padua (CPDA054893) und dem italienischen Forschungsministerium (MIUR, PRIN2006) für finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 23. Juli 2008
Online veröffentlicht am 13. Februar 2009
Übersetzt von Dr. Thomas Steiner, Neu-Ulm

- [1] K. C. Nicolaou, E. J. Sorensen, *Classics in Total Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **1996**.
- [2] J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, Wiley-VCH, Weinheim, **1995**.
- [3] L. J. Prins, D. N. Reinhoudt, P. Timmerman, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2446–2492; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2382–2426.
- [4] S. Leininger, B. Olenyuk, P. J. Stang, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 853–907.
- [5] C. G. Claessens, J. F. Stoddart, *J. Phys. Org. Chem.* **1997**, *10*, 254–272.
- [6] A. H. Fuhrhop, T. Y. Wang, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2901–2937.
- [7] G. M. Whitesides, E. E. Simanek, J. P. Mathias, C. T. Seto, D. N. Chin, M. Mammen, D. M. Gordon, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 37–44.
- [8] D. N. Reinhoudt, M. Crego-Calama, *Science* **2002**, *295*, 2403–2407.
- [9] K. H. Nierhaus, D. N. Wilson, *Protein Synthesis and Ribosome Structure*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [10] R. C. Thompson, D. B. Dix, A. M. Karim, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 4868–4874.
- [11] A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Structure*, 3. Aufl., Freeman, New York, **1999**.
- [12] G. A. Hamilton, F. H. Westheimer, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 6332–6333.
- [13] X. Y. Zhang, K. N. Houk, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 379–385.
- [14] V. L. Schramm, *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *433*, 13–26.
- [15] T. C. Bruice, P. Y. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12478–12479.
- [16] T. C. Bruice, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3119–3139.
- [17] Ein Vergleich enzymkatalysierter Reaktionen mit den entsprechenden unkatalysierten Referenzreaktionen ist immer kompliziert, da sich die beiden Systeme unterschiedlich verhalten. Dies hat zu einigen Kontroversen geführt, so etwa, in einem sehr prominenten Fall, zwischen D. J. Cram und R. Breslow (siehe den Briefwechsel in *Chem. Eng. News* **1983**, 11. April).
- [18] C. B. Anfinsen, *Science* **1973**, *181*, 223–230.
- [19] K. A. Dill, *Biochemistry* **1985**, *24*, 1501–1509.
- [20] C. B. Anfinsen, E. Haber, *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 1361–1363.
- [21] J. D. Hartgerink, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 604–609.
- [22] *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 989–1421 (Themenheft zur Verwendung von Übergangsmetallen in der organischen Synthese)
- [23] *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2793–3442 (Themenheft zur Verwendung von Münzmetallen in der organischen Synthese).
- [24] A. R. Dick, M. S. Sanford, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 2439–2463.
- [25] F. Kakiuchi, S. Murai, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 826–834.
- [26] V. Ritleng, C. Sirlin, M. Pfeffer, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1731–1769.
- [27] *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5413–5883 (Themenheft zur Organokatalyse).
- [28] Aktuelle Beispiele: a) C. Rein, P. Demel, R. A. Outten, T. Netscher, B. Breit, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8824–8827; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8670–8673; b) D. Itami, J. Yoshida, *Synlett* **2006**, 157–180.
- [29] A. H. Hoveyda, D. A. Evans, G. C. Fu, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1307–1370.
- [30] J. D. Hartgerink, E. Beniash, S. I. Stupp, *Science* **2001**, *294*, 1684–1688.
- [31] O. Shoji, S. Okada, A. Satake, Y. Kobuke, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2201–2210.
- [32] G. Wulff, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1–27.
- [33] R. Hoss, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 389–398; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 375–384.
- [34] P. T. Corbett, J. Le Claire, L. Vial, K. R. West, J. L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3652–3711.

- [35] J. M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2455–2463.
- [36] N. Paul, G. F. Joyce, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 634–639.
- [37] M. I. Page, W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 1678–1683.
- [38] A. J. Kirby, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 770–790; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 706–724.
- [39] F. M. Menger, *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18*, 128–134.
- [40] T. C. Bruice, F. C. Lightstone, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 127–136.
- [41] R. Pascal, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1813–1824.
- [42] G. Illuminati, L. Mandolini, B. Masci, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6308–6312.
- [43] A. J. Kirby, *Adv. Phys. Org. Chem.* **1981**, *17*, 183–278.
- [44] L. Mandolini, *Adv. Phys. Org. Chem.* **1987**, *22*, 1–111.
- [45] R. Cacciapaglia, S. Di Stefano, L. Mandolini, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 113–122.
- [46] S. J. Rowan, S. J. Cantrill, G. R. L. Cousins, J. K. M. Sanders, J. F. Stoddart, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 938–993; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 898–952.
- [47] Y. Murakami, J. Kikuchi, Y. Hisaeda, O. Hayashida, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 721–758.
- [48] W. B. Motherwell, M. J. Bingham, Y. Six, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4663–4686.
- [49] R. L. Breslow, *Artificial Enzymes*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [50] E. A. C. Davie, S. M. Mennen, Y. J. Xu, S. J. Miller, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5759–5812.
- [51] G. Wenz, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 851–870; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 803–822.
- [52] R. L. VanEtten, G. A. Clowes, J. F. Sebastian, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 3253–3262.
- [53] R. L. VanEtten, J. F. Sebastian, G. A. Clowes, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 3242–3253.
- [54] H.-J. Thiem, M. Brandl, R. L. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8612–8616.
- [55] R. L. Breslow, M. F. Czarniecki, J. Emert, H. Hamaguchi, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 762–770.
- [56] R. L. Breslow, G. Trainor, A. Ueno, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2739–2744.
- [57] F. M. Menger, M. Ladika, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3145–3146.
- [58] R. Breslow, S. Chung, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 631–634.
- [59] J. M. Lehn, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1347–1362; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1304–1319.
- [60] J. S. Lindsey, *New J. Chem.* **1991**, *15*, 153–180.
- [61] G. M. Whitesides, J. P. Mathias, C. T. Seto, *Science* **1991**, *254*, 1312–1319.
- [62] D. Philp, J. F. Stoddart, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1242–1286; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1154–1196.
- [63] S. Anderson, H. L. Anderson, J. K. M. Sanders, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 469–475.
- [64] J. A. Thomas, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 856–868.
- [65] T. D. Clark, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12364–12365.
- [66] T. D. Clark, K. Kobayashi, M. R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 782–792.
- [67] D. T. Bong, T. D. Clark, J. R. Granja, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1016–1041; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 988–1011.
- [68] S. H. Gellman, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173–180.
- [69] D. J. Hill, M. J. Mio, R. B. Prince, T. S. Hughes, J. S. Moore, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3893–4011.
- [70] G. Licini, L. J. Prins, P. Scrimin, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 969–977.
- [71] D. Y. Jackson, D. S. King, J. Chmielewski, S. Singh, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9391–9392.
- [72] H. E. Blackwell, R. H. Grubbs, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3469–3472; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3281–3284.
- [73] C. E. Schafmeister, J. Po, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5891–5892.
- [74] E. Cabezas, A. C. Satterthwait, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3862–3875.
- [75] R. N. Chapman, G. Dimartino, P. S. Arora, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12252–12253.
- [76] J. Liu, D. Wang, Q. Zheng, M. Lu, P. S. Arora, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4334–4337.
- [77] D. Y. Wang, W. Liao, P. S. Arora, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6683–6687; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6525–6529.
- [78] P. G. Baraldi, D. Preti, F. Frutterolo, M. A. Tabrizi, R. Romagnoli, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 17–35.
- [79] P. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2215–2235.
- [80] J. M. Belitsky, S. J. Leslie, P. S. Arora, T. A. Beerman, P. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3313–3318.
- [81] T. P. Best, B. S. Edelson, N. G. Nickols, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12063–12068.
- [82] L. A. Dickinson, R. J. Gulizia, J. W. Trauger, E. E. Baird, D. E. Mosier, J. M. Gottesfeld, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12890–12895.
- [83] J. M. Gottesfeld, J. M. Belitsky, C. Melander, P. B. Dervan, K. Luger, *J. Mol. Biol.* **2002**, *321*, 249–263.
- [84] N. R. Wurtz, P. B. Dervan, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 153–161.
- [85] K. Shinohara, S. Sasaki, M. Minoshima, T. Bando, H. Sugiyama, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 1189–1195.
- [86] T. Bando, H. Sugiyama, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 935–944.
- [87] L. A. Dickinson, R. Burnett, C. Melander, B. S. Edelson, P. S. Arora, P. B. Dervan, J. M. Gottesfeld, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1583–1594.
- [88] S. M. Tsai, M. E. Farkas, C. J. Chou, J. M. Gottesfeld, P. B. Dervan, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 307–316.
- [89] B. R. Baker, W. W. Lee, E. Tong, L. O. Ross, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 3713–3714.
- [90] L. Wofsy, H. Metzger, S. J. Singer, *Biochemistry* **1962**, *1*, 1031–1039.
- [91] R. R. Rando, *Science* **1974**, *185*, 320–324.
- [92] R. H. Abeles, A. L. Maycock, *Acc. Chem. Res.* **1976**, *9*, 313–319.
- [93] K. Bloch, *Acc. Chem. Res.* **1969**, *2*, 193–202.
- [94] A. Pandey, M. Mann, *Nature* **2000**, *405*, 837–846.
- [95] M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279–3301.
- [96] H. Ovaa, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 613–620.
- [97] A. M. Sadaghiani, S. H. L. Verhelst, M. Bogyo, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 20–28.
- [98] Y. S. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14694–14699.
- [99] N. Winssinger, S. Ficarro, P. G. Schultz, J. L. Harris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11139–11144.
- [100] S. Jones, J. M. Thornton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13–20.
- [101] R. Kluger, A. Alagic, *Bioorg. Chem.* **2004**, *32*, 451–472.
- [102] E. M. Phizicky, S. Fields, *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 94–123.
- [103] J. W. Wu, M. Hu, J. J. Chai, J. Seoane, M. Huse, C. Li, D. J. Rigotti, S. Kyin, T. W. Muir, R. Fairman, J. Massague, Y. G. Shi, *Mol. Cell* **2001**, *8*, 1277–1289.
- [104] J. J. Ottesen, M. Huse, M. D. Sekedat, T. W. Muir, *Biochemistry* **2004**, *43*, 5698–5706.
- [105] M. Vila-Perello, M. R. Pratt, F. Tulin, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8068–8069.
- [106] S. Baumann, S. Schoof, S. D. Harkal, H. D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5664–5666.
- [107] E. Cundliffe, *The Ribosome. Function and Evolution*, American Society for Microbiology Press, Washington, **1990**.
- [108] X. Y. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4956–4979; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4848–4870.

- [109] Z. J. Gartner, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6961–6963.
- [110] Z. J. Gartner, M. W. Kanan, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1874–1878; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1796–1800.
- [111] Z. J. Gartner, R. Grubina, C. T. Calderone, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1408–1413; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1370–1375.
- [112] T. M. Snyder, B. N. Tse, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1392–1401.
- [113] M. W. Kanan, M. M. Rozenman, K. Sakurai, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Nature* **2004**, *431*, 545–549.
- [114] M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 292–320; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 284–310.
- [115] S. J. Taylor, J. P. Morken, *Science* **1998**, *280*, 267–270.
- [116] A. Berkessel, D. A. Herault, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 99–102; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 102–105.
- [117] G. T. Copeland, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4306–4307.
- [118] M. Müller, T. W. Mathers, A. P. Davis, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3929–3931; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3813–3815.
- [119] R. F. Harris, A. J. Nation, G. T. Copeland, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11270–11271.
- [120] F. Tanaka, R. Fuller, C. F. Barbas, *Biochemistry* **2005**, *44*, 7583–7592.
- [121] F. Tanaka, C. F. Barbas, *Chem. Commun.* **2001**, 769–770.
- [122] P. Krattiger, C. McCarthy, A. Pfaltz, H. Wennemers, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1763–1766; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1722–1724.
- [123] P. Krattiger, R. Kovasy, J. D. Revell, S. Ivan, H. Wennemers, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1101–1103.
- [124] J. S. Nowick, J. S. Chen, G. Noronha, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7636–7644.
- [125] M. G. J. ten Cate, M. Crego-Calama, D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10840–10841.
- [126] J. Hirschberg, L. Brunsved, A. Ramzi, J. Vekemans, R. P. Sijbesma, E. W. Meijer, *Nature* **2000**, *407*, 167–170.
- [127] L. Brunsved, J. Vekemans, J. Hirschberg, R. P. Sijbesma, E. W. Meijer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 4977–4982.
- [128] M. F. Li, K. Yamato, J. S. Ferguson, B. Gong, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12628–12629.
- [129] M. F. Li, K. Yamato, J. S. Ferguson, K. K. Singarapu, T. Szybierski, B. Gong, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 491–500.
- [130] A. X. Wu, L. Isaacs, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4831–4835.
- [131] P. Mukhopadhyay, A. X. Wu, L. Isaacs, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6157–6164.
- [132] R. Bennes, D. Philp, N. Spencer, B. M. Kariuki, K. D. M. Harris, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1087–1090.
- [133] R. M. Bennes, D. Philp, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3651–3654.
- [134] W. Dauer, S. Przedborski, *Neuron* **2003**, *39*, 889–909.
- [135] C. M. Dobson, *Nature* **2003**, *426*, 884–890.
- [136] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 333–366.
- [137] M. G. Woll, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11172–11174.
- [138] M. G. Woll, E. B. Hadley, S. Mecozzi, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15932–15933.
- [139] E. B. Hadley, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16444–16445.
- [140] A. Saghatelian, Y. Yokobayashi, K. Soltani, M. R. Ghadiri, *Nature* **2001**, *409*, 797–801.
- [141] B. Bilgicer, X. Xing, K. Kumar, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11815–11816.
- [142] E. B. Hadley, A. M. Witek, F. Freire, A. J. Peoples, S. H. Gellman, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7186–7189; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7056–7059.
- [143] Y. Krishnan-Ghosh, S. Balasubramanian, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2221–2223; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2171–2173.
- [144] Y. Krishnan-Ghosh, A. M. Whitney, S. Balasubramanian, *Chem. Commun.* **2005**, 3068–3070.
- [145] R. B. Gennes, *Biomembranes: Molecular Structure and Function*, Springer, New York, 1989.
- [146] A. Ono, E. O. Freed, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13925–13930.
- [147] S. M. K. Davidson, S. L. Regen, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1269–1279.
- [148] S. L. Regen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 729–735.
- [149] M. Sugahara, M. Uragami, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4253–4256.
- [150] N. Tokutake, B. W. Jing, H. H. Cao, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15764–15766.
- [151] D. A. Erlanson, A. C. Braisted, D. R. Raphael, M. Randal, R. M. Stroud, E. M. Gordon, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9367–9372.
- [152] J. A. Wells, D. Erlanson, W. DeLano, A. Braisted, D. Raphael, M. Randal, M. Arkin, B. Raimundo, J. Oslob, R. Stroud, E. Gordon, *FASEB J.* **2002**, *16*, A135–A135.
- [153] D. A. Erlanson, J. A. Wells, A. C. Braisted, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, *33*, 199–223.
- [154] A. C. Braisted, J. D. Oslob, W. L. Delano, J. Hyde, R. S. McDowell, N. Waal, C. Yu, M. R. Arkin, B. C. Raimundo, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3714–3715.
- [155] D. A. Erlanson, J. W. Lam, C. Wiesmann, T. N. Luong, R. L. Simmons, W. L. DeLano, I. C. Choong, M. T. Burdett, W. M. Flanagan, D. Lee, E. M. Gordon, T. O'Brien, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 308–314.
- [156] P. J. Hajduk, J. Greer, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 211–219.
- [157] T. Obita, T. Muto, T. Endo, D. Kohda, *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 495–504.
- [158] T. Saitoh, M. Igura, T. Obita, T. Ose, R. Kojima, K. Maenaka, T. Endo, D. Kohda, *EMBO J.* **2007**, *26*, 4777–4787.
- [159] B. Breit, W. Seiche, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6608–6609.
- [160] B. Breit, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6976–6986; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6816–6825.
- [161] M. J. Wilkinson, P. van Leeuwen, J. N. H. Reek, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2371–2383.
- [162] G. Gasparini, L. J. Prins, P. Scrimin, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2509–2513; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2475–2479.
- [163] G. Gasparini, B. Vitorge, P. Scrimin, D. Jeannerat, L. J. Prins, *Chem. Commun.* **2008**, 3034–3036.
- [164] G. Gasparini, M. Martin, L. J. Prins, P. Scrimin, *Chem. Commun.* **2007**, 1340–1342.