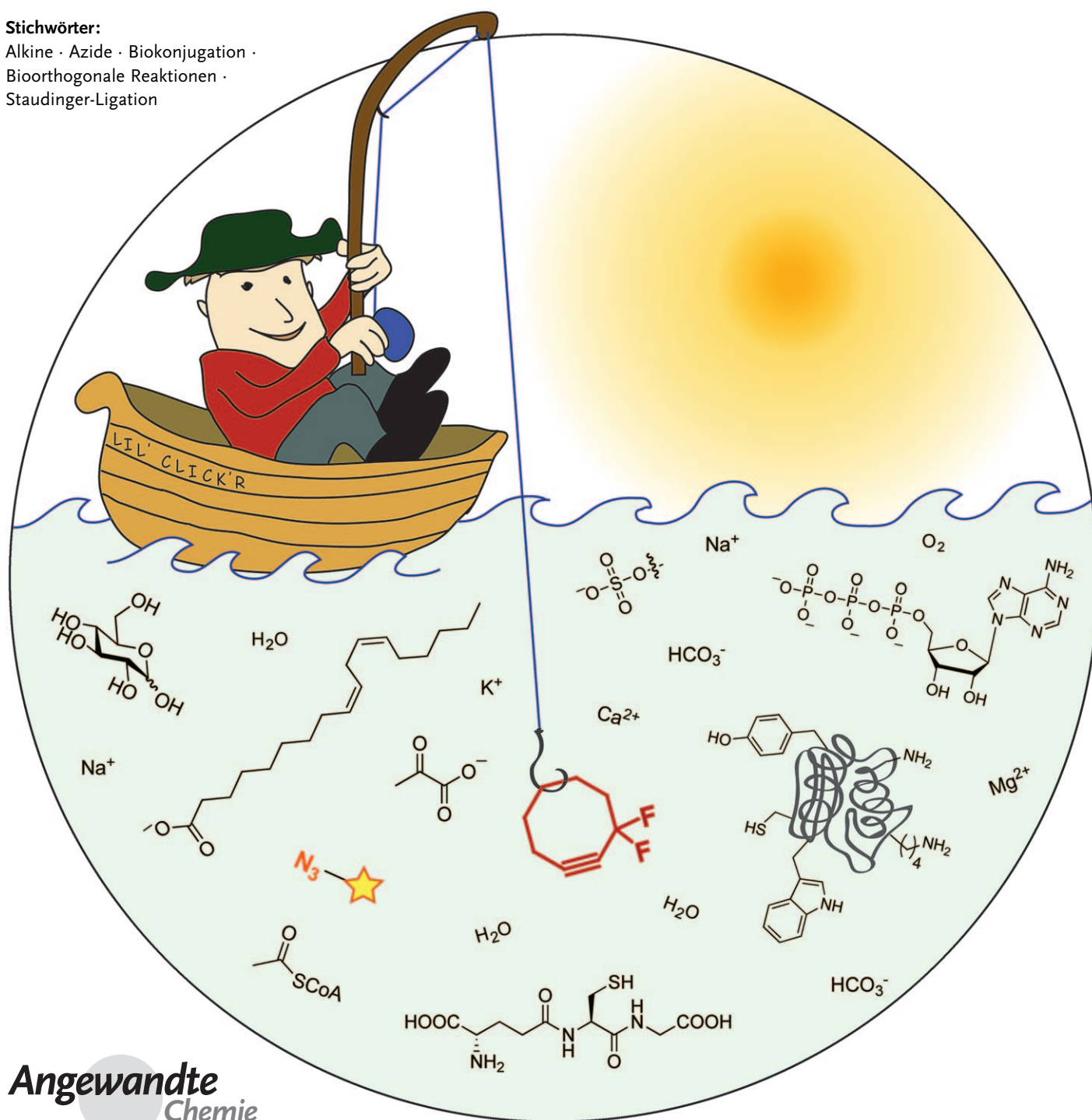


Bioorthogonale Chemie – oder: in einem Meer aus Funktionalität nach Selektivität fischen

Ellen M. Sletten und Carolyn R. Bertozzi*

Stichwörter:

Alkine · Azide · Biokonjugation ·
Bioorthogonale Reaktionen ·
Staudinger-Ligation

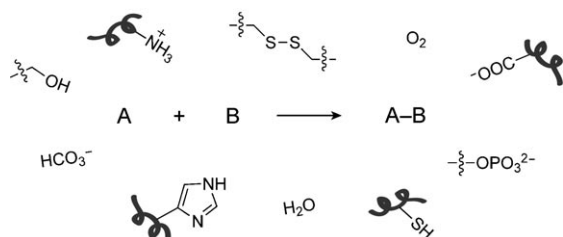


Angewandte
Chemie

Biomoleküle in ihrer natürlichen Umgebung zu erforschen, ist wegen der enormen Komplexität zellulärer Systeme eine anspruchsvolle Aufgabe. In den letzten Jahren entwickelte Methoden zur selektiven Modifizierung biologischer Spezies in lebenden Systemen haben neue Einblicke in zelluläre Prozesse gegeben. Grundlage dieser neuen Techniken sind bioorthogonale chemische Reaktionen, deren Komponenten unter physiologischen Bedingungen in Gegenwart zahlreicher Funktionalitäten, wie sie zur Erhaltung des Lebens notwendig sind, schnell und selektiv miteinander reagieren müssen. Hier beschreiben wir die bisher entwickelten bioorthogonalen chemischen Reaktionen und wie sie zum Studium von Biomolekülen eingesetzt werden können.

1. Einleitung

Chemiker und Biologen teilen das Interesse an der Entwicklung von Methoden für die Erforschung von Biomolekülen in deren natürlicher Umgebung. Ihre gemeinsamen Forschungen führten zu Neuerungen wie den genetisch codierten fluoreszierenden Proteinen (z.B. dem grün fluoreszierenden Protein, GFP), deren weit verbreitete Anwendung und Bedeutung 2008 mit dem Nobelpreis in Chemie anerkannt wurden.^[1,2] Viele Biomoleküle wie Nucleinsäuren, Lipide und Glycane sowie posttranslationale Modifikationen können jedoch nicht mit genetisch codierten Reportern beobachtet werden. Ein aufstrebender Bereich der chemischen Biologie hat sich zum Ziel gesetzt, diese Biomoleküle in lebenden Systemen mithilfe bioorthogonaler chemischer Reaktionen (Reaktionen, die nicht in biologische Prozesse eingreifen) zu erforschen. Solche Reaktionen müssen unter physiologischen Bedingungen mit hoher Geschwindigkeit ablaufen und inert gegenüber den zahlreichen in vivo vorkommenden Funktionalitäten sein (Schema 1).



Schema 1. Eine bioorthogonale chemische Reaktion. Die Reaktion der Verbindungen A und B mit bioorthogonalen funktionellen Gruppen verläuft ungestört in Gegenwart aller anderen in lebenden Systemen vorkommenden Funktionalitäten, von denen einige abgebildet sind.

Hier beschreiben wir die historische Entwicklung der bioorthogonalen Chemie, ausgehend von ihrem Ursprung in der Biokonjugation von Proteinen. Wir besprechen, wie einzigartige Sequenzen natürlicher Aminosäuren entwickelt wurden, um eine orthogonale Funktionalität zur selektiven Proteinmodifizierung in Proben komplexer Zusammensetzung zu schaffen. Anschließend konzentrieren wir uns auf die

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	7109
2. Historischer Hintergrund	7109
3. Bioorthogonalität mithilfe einzigartiger Aminosäuresequenzen	7114
4. Bioorthogonale Reaktionen	7117
5. Anwendungen bioorthogonaler chemischer Reaktionen	7123
6. Perspektiven	7128

Entwicklung bioorthogonaler Umwandlungen, die mit nichtnatürlichen funktionellen Gruppen verbunden sind, und auf Methoden zur Einführung dieser nichtnatürlichen Gruppen in Biomoleküle. Zum Abschluss erörtern wir Wege zu neuen bioorthogonalen chemischen Reaktionen und Möglichkeiten zu ihrer Anwendung für die Aufklärung noch unerforschter biologischer Prozesse.

2. Historischer Hintergrund

Die chemische Modifizierung von Biomolekülen entwickelte sich innerhalb des vergangenen Jahrhunderts von einem Hilfsmittel zur Bestimmung von Zusammensetzungen zu einer hochselektiven Methode für die Beobachtung zellulärer Vorgänge. Proteine mit ihren zahlreichen Seitenkettenfunktionen, komplexen Tertiärstrukturen und verschiedenartigen biologischen Funktionen waren bereits früh Kandidaten für eine chemische Modifizierung, ursprünglich mit dem Ziel, ihre Aminosäurebestandteile zu identifizieren.^[3] Die mechanistische Enzymologie profitierte enorm von den Arbeiten der frühen Proteinchemiker, da die von ihnen entwickelten Methoden eine chemische Veränderung der an der Katalyse beteiligten Seitenketten ermöglichten.^[4] Auch für die Biotechnologie waren die Methoden zur Proteinmodifizierung von Bedeutung. Zu den gängigen Anwendungen gehören die Verknüpfung therapeutisch eingesetzter Proteine mit Polyethylenglycol(PEG)-Gruppen („PEGylierung“), um

[*] Prof. C. R. Bertozzi
Departments of Chemistry and Molecular and Cell Biology und
Howard Hughes Medical Institute, University of California
E-Mail: crb@berkeley.edu
und
The Molecular Foundry, Lawrence Berkeley National Laboratory
Berkeley, CA 94720 (USA)
Fax: (+1) 510-643-2628
E. M. Sletten
Department of Chemistry, University of California
Berkeley, CA 94720 (USA)

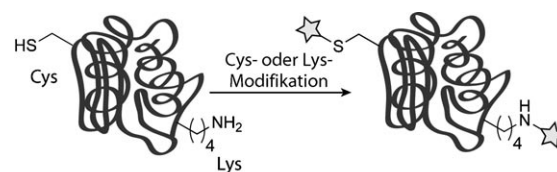
die Serumhalbwertszeit^[5,6] zu erhöhen, und die Bindung von Cytotoxinen oder Imaging-Substanzen an gegen Krebs wirkende Elemente wie monoklonale Antikörper.^[7] Die meisten Beispiele setzen auf herkömmliche gruppenspezifische Methoden zur Proteinmodifizierung, die weiterhin unentbehrliche Hilfsmittel bleiben.

2.1. Klassische Methoden zur Proteinmodifizierung

Die klassische Proteinbiokonjugation umfasst im Wesentlichen einfache Reaktionen zweiter Ordnung, die selektiv auf die Funktionen in den Seitenketten der kanonischen, proteinogenen Aminosäuren wirken.^[3,8–10] Davon sind Cystein und Lysin die am häufigsten modifizierten Reste. Die Thiolgruppe von Cystein kann über Disulfidaustausch gemischte Disulfide bilden (Schema 2, Nr. 1) sowie durch Alkylierung mit Alkylhalogeniden oder Michael-Addition mit α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen Thioether liefern (Schema 2, Nr. 2,3). Als relativ seltene Aminosäure kann Cystein häufig auch zur Single-Site-Modifizierung herangezogen werden. Obwohl sie beträchtlich stärker verbreitet sind als Cysteinreste, sind Lysinreste beliebte Ziele, da eine Vielzahl an Methoden zur Verfügung steht, um selektiv primäre Amine zu modifizieren. Lysin kann mit aktivierten Estern, Sulfonylchloriden, Isocyanaten oder Isothiocyanaten zu Amiden, Sulfonamiden, Harnstoffen bzw. Thioharnstoffen umgesetzt werden (Schema 2, Nr. 4–7). Lysine gehen auch reduktive Aminierungen mit Aldehyden ein.^[3,8–10] Zu bemerken ist, dass diese Reagentien zusätzlich die N-Termini von Proteinen modifizieren können.

Die verbleibenden 18 proteinogenen Aminosäuren werden vergleichsweise wenig zur gruppenselektiven Modifizierung genutzt. Der Phenolrest von Tyrosin wurde durch elektrophile aromatische Substitution mit Diazoniumsalzen, Iod oder salpetriger Säure modifiziert.^[3,10] Glutamat- und Aspartatreste sind für die Biokonjugation durch Kupplung mit Aminen über Carbodiimide^[3,8–10] vorgesehen worden, obwohl die Möglichkeit zur Proteinvernetzung den Nutzen dieser Methode einschränkt. Mithilfe von Pyrocarbonaten konnten auch Histidinreste verändert werden.^[3,8–10]

Mit diesen klassischen Methoden ist die Kupplung von kleinen Molekülsonden, z.B. von Biotin und Fluorophoren, an Proteine routinemäßig möglich. Zur Immobilisierung von



Nr.	Rest	Reagens	Produkt
1	Cys	$R-S-S-\text{Star}$	Protein-S-S-Star
2	Cys	$I-CH_2-C(=O)-NH-\text{Star}$	$\text{Protein-S-CH}_2-C(=O)-NH-\text{Star}$
3	Cys	Maleimid-Star	$\text{Protein-S-Maleimid-Star}$
4	Lys	$\text{N-Hydroxysuccinimid-aktivierter Ester-Star}$	$\text{Protein-NH-C(=O)-R-Star}$
5	Lys	$\text{Sulfonylchlorid-Star}$	$\text{Protein-NH-SO}_2\text{-R-Star}$
6	Lys	O=C=N-Star	$\text{Protein-NH-C(=O)-NH-Star}$
7	Lys	S=C=N-Star	$\text{Protein-NH-C(=S)-NH-Star}$

Schema 2. Klassische Biokonjugationsreaktionen zur Modifizierung von Cys- und Lys-Resten. Cys-Reste können durch Disulfidaustausch, durch Alkylierung mit Iodacetamidreagentien sowie durch Michael-Addition mit Maleimiden modifiziert werden (Nr. 1–3). Lys-Reste können durch Amid-, Sulfonamid-, Harnstoff- und Thioharnstoffbildung mit *N*-Hydroxysuccinimid-aktivierten Estern, Sulfonylchloriden, Isocyanaten bzw. Isothiocyanaten (Nr. 4–7) verändert werden.

Proteinen auf chromatographischen Matrices, löslichen Polymeren, Kunststoffoberflächen und Mikroarray-Chips kommen ähnliche Methoden zur Anwendung.



Ellen Sletten wurde 1984 in New Hampshire (USA) geboren. Sie erhielt ihren B.S. in Chemie 2006 am Stonehill College, wo sie bei Prof. Louis J. Liotta an der Synthese polyhydroxylierter Pyrrolizidine arbeitete. Gegenwärtig arbeitet sie an ihrer Dissertation unter der Anleitung von Prof. Carolyn Bertozzi an der UC Berkeley, wo sie sich mit der Synthese von Cyclooctinreagentien für kupferfreie Klickreaktionen befasst.



Carolyn Bertozzi ist T.Z. und Irmgard Chu Distinguished Professor of Chemistry und Professor of Molecular and Cell Biology an der UC Berkeley und Professor of Molecular and Cellular Biology an der UCSF. Sie ist auch Director of the Molecular Foundry am Lawrence Berkeley National Laboratory und Investigator of the Howard Hughes Medical Institute. Bertozzi erhielt ihren A.B. in Chemie 1988 an der Harvard University und promovierte 1993 an der UC Berkeley bei Prof. Mark Bednarski. Anschließend forschte sie als Postdoktorandin am UCSF bei Prof. Steven Rosen und wechselte 1996 an die Fakultät der UC Berkeley.

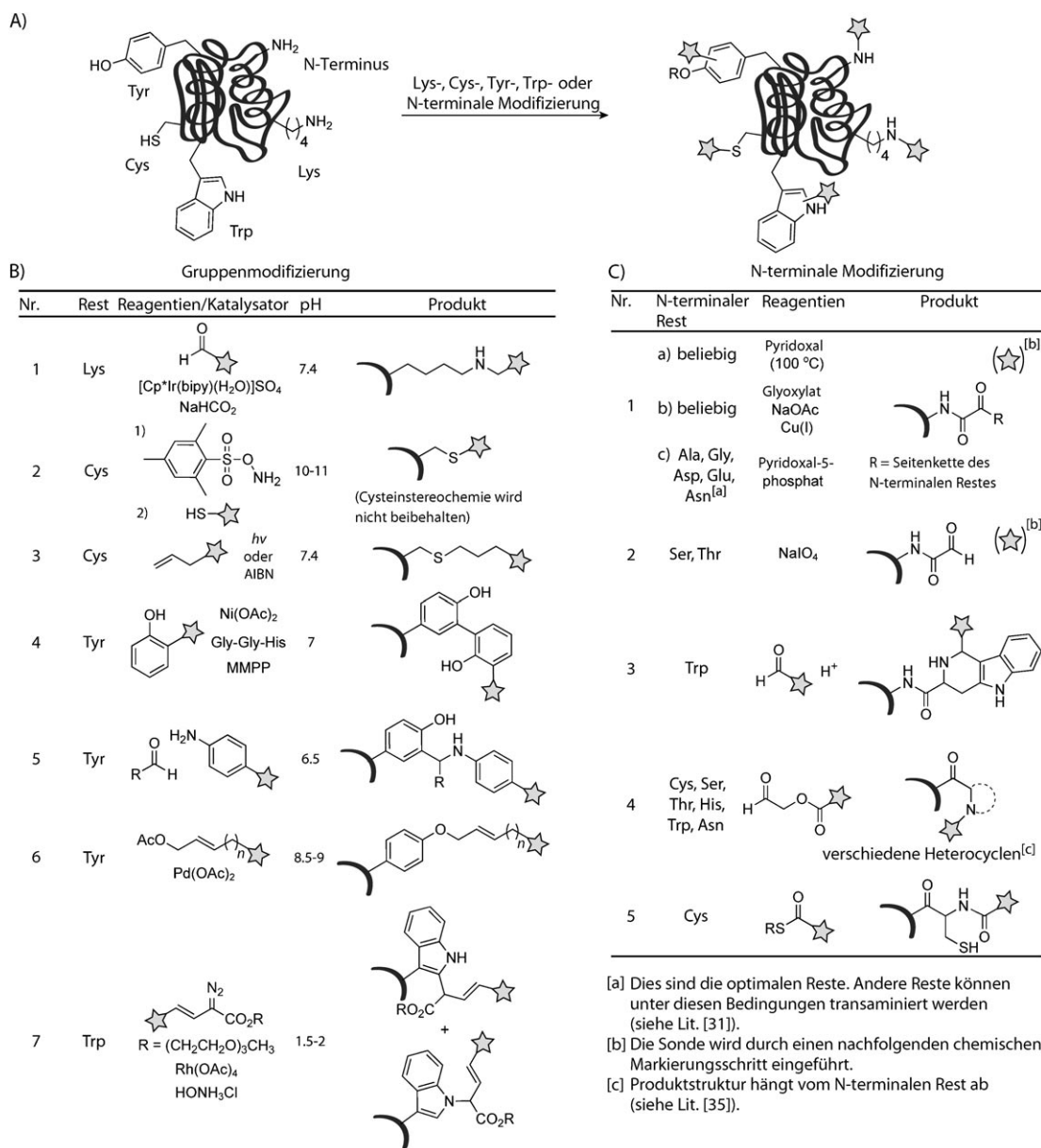
2.2. Moderne Methoden zur Proteinmodifizierung

Zur Modifizierung von Cystein, Lysin, Tyrosin und Tryptophan wurden neue Methoden entwickelt (Schema 3 A), die oft auf metallvermittelten Umwandlungen beruhen.^[11] Zudem hat sich der N-Terminus als beliebtes Ziel für die Proteinmodifizierung herausgestellt (Schema 3 A). Für eine tiefer gehende Diskussion chemoselektiver Methoden zur

Proteinmodifizierung sei auf die neue Übersicht von Hackenberger und Schwarzer verwiesen.^[12]

2.2.1. Lysin- und Cystein-Modifizierungsreaktionen der nächsten Generation

Während die herkömmlichen Methoden der Biokonjugation von Lysin und Cystein weithin Verwendung finden,



Schema 3. Moderne Biokonjugationsreaktionen zur Modifizierung von Proteinen. A) Selektive Modifizierung von Lys, Cys, Tyr, Trp und dem N-Terminus. B) Moderne Methoden zur Modifizierung von Lys, Cys, Tyr und Trp. Lys wird durch reduktive Aminierung mit einem Iridiumhydrid als Reduktionsmittel verändert (Nr. 1; bipy = Bipyridyl, Cp* = C₅Me₅). Cys wird durch eine zweistufige Markierungsreaktion, die die Bildung von Dehydroalanin und nachfolgende Michael-Addition eines Thiols umfasst (Nr. 2), oder durch photochemisch katalysierte Thiol-En-Reaktion (Nr. 3; AIBN = 2,2'-Azobisisobutyronitril) modifiziert. Modifizierungsreaktionen für Tyr sind die Ni^{II}-vermittelte radikalische Kupplung mit Magnesiummonoperoxyphthalat (MMPP) als stöchiometrischem Oxidationsmittel (Nr. 4), eine Dreikomponenten-Mannich-Reaktion mit Aldehyden und Anilinen (Nr. 5) oder die Pd-katalysierte π -Allylierung (Nr. 6). Trp wird unter Verwendung eines Rh-Carbenoids modifiziert (Nr. 7). C) Methoden zur Modifizierung des N-Terminus. N-terminale Modifizierungen gelingen durch Transaminierung mit Aldehyden, Oxidation mit Periodat, Pictet-Spengler-Reaktion eines N-terminalen Tryptophans mit einem Aldehyd, durch bicyclische Lactambildung mit Acyl-Aldehyd-Reagentien oder native chemische Ligation mit Thioestern (Nr. 1–5).

müssen die Methoden für die selektive Umwandlung von Aminen und Thiolen noch entwickelt und optimiert werden. Francis und McFarland beschrieben eine Lysin-spezifische reduktive Alkylierung, die über eine Iridium-katalysierte Transferhydrierung verläuft. Anders als die herkömmliche Reaktion mit Natriumcyanoborhydrid, die einen niedrigen pH-Wert erfordert, erfolgt die Iridium-katalysierte Reaktion bei pH 7.4 mit hohen Ausbeuten (Schema 3 B, Nr. 1).^[13]

Davis et al. entwickelten kürzlich eine zweistufige Methode zur Modifizierung von Cystein (Schema 3 B, Nr. 2).^[14] Die erste Stufe ist die Umwandlung von Cystein in Dehydroalanin durch Umsetzen mit *O*-Mesitylensulfonylhydroxylamin unter basischen Bedingungen. Die Dehydroalaninreste reagieren nachfolgend mit Thiolreagentien in einer Michael-Addition unter Bildung einer Thioetherbindung. Die Michael-Addition verläuft nicht stereospezifisch, weshalb ein Diastereomergemisch der modifizierten Proteine entsteht. Eine weitere neue Technik zur Modifizierung von Cystein, die zu einer Thioetherbindung führt, beruht auf der Thiol-En-Chemie,^[15] wobei ein Thiol über einen Radikalmechanismus in ein Alken inseriert (Schema 3 B, Nr. 3).^[16] Die radikalische Spezies kann durch übliche Initiatoren oder durch Bestrahlen mit Licht^[15] erzeugt werden, wobei die zweite Methode verträglicher mit funktionellen Gruppen ist und kürzere Reaktionszeiten aufweist.^[17] Die Thiol-En-Reaktion wurde an Proteinen durchgeführt, die mit Thiolen^[18] oder Alkenen^[19] funktionalisiert waren. Eine Verwendung für die direkte Modifizierung von Cysteinresten ist jedoch noch nicht beschrieben, vielleicht weil die Bildung eines Protein-gebundenen Thylradikals zu unerwünschten Nebenreaktionen führen könnte.

2.2.2. Tyrosin- und Tryptophanmodifizierung

Viele neuere Arbeiten konzentrierten sich auf die Modifizierung von Tyrosin- und Tryptophanresten und nutzten häufig Übergangsmetall-katalysierte Prozesse, die mit wässrigen Bedingungen vereinbar sind.^[11] Diese Reste kommen auf Proteinoberflächen selten vor und bieten daher die Gelegenheit für eine kontrollierte Single-site-Modifizierung.^[20] Das erste Beispiel einer metallkatalysierten Modifizierung von Tyrosin war die oxidative Kupplung zweier Phenolgruppen. Diese Methode wurde zuerst von Kodadek et al. unter Verwendung eines Nickel(II)-Katalysators und eines Cooxidans erforscht, um zwei Proteine zu vernetzen (Schema 3 B, Nr. 4).^[21] Finn et al. prüften diese Methode auf ihre Eignung als Biokonjugationsmethode, indem sie Biotin- und Alkinreagentien an Tyrosinreste auf den Kapsidproteinen eines Viruspartikels kuppelten.^[22] Francis et al. erforschten die Modifizierung von Tyrosinresten durch eine Dreikomponenten-Mannich-Reaktion mit Aldehyden und Anilinen (Schema 3 B, Nr. 5)^[20,23,24] sowie durch Palladium- π -Allyl-Chemie (Schema 3 B, Nr. 6).^[25]

Francis und Antos entwickelten zudem eine Biokonjugationsreaktion für die seltenste Aminosäure, Tryptophan, unter Verwendung eines Rhodiumcarbenoids, das in situ aus $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ und einer Diazoverbindung gebildet wurde (Schema 3 B, Nr. 7).^[26] Diese Reaktion benötigt jedoch saure

Bedingungen ($\text{pH} \approx 2$), wodurch die Struktur einiger Zielproteine beeinflusst werden könnte.

2.2.3. Chemische Modifizierung des N-Terminus

Der N-Terminus eines Proteins hat eine besondere pH-abhängige Reaktivität und ist daher ein vielversprechendes Ziel für eine Single-site-Modifizierung.^[27] Sein relativ zu Aminogruppen der Lysinseitenketten verringerter pK_s -Wert ermöglicht – wenn auch unter Schwierigkeiten – die selektive Acylierung oder Alkylierung in Gegenwart vieler konkurrierender Lysinseitenketten. Transaminierungen haben sich für die selektive N-terminale Modifizierung besonders bewährt. Die erste Transaminierung des N-Terminus reicht zurück bis ins Jahr 1956, zu einem Versuch von Bonetti et al. bei 100 °C, einer Temperatur, bei der Proteine häufig denaturieren (Schema 3 C, Nr. 1 a).^[28] Fast ein Jahrzehnt später führte Dixon mit Glyoxylat, katalytischer Base und Kupfer(I), das die Iminbildung zwischen N-Terminus und Glyoxylat erleichterte, eine Transaminierung bei Raumtemperatur durch (Schema 3 C, Nr. 1 b).^[29]

Auch mit den Fortschritten, die Dixon erreicht hatte, fand die Transaminierung keine größere Beachtung, bis Francis et al. eine biomimetische Transaminierung beschrieben, die unter physiologischen Bedingungen ohne Zusatz von Metallen oder Basen abläuft (Schema 3 C, Nr. 1 c).^[30] Ihre Methode umfasst die Kondensation des N-terminalen Amins mit Pyridoxal-5-phosphat und anschließende Hydrolyse zum Pyruvamid. Das Protein kann danach durch Reaktion der Pyruvamid-Ketogruppe mit Hydrazid- oder Aminoxyreagentien weiter modifiziert werden (Abschnitt 4.1). Eine umfassende Charakterisierung zeigte, dass die Transaminierung am besten verlief, wenn Ala, Gly, Asp, Glu oder Asn die N-terminale Position besetzen. Die Reaktion fand auch mit vielen anderen N-terminalen Resten statt, die Ausbeuten waren allerdings unterschiedlich.^[31]

Andere chemische Methoden zur N-terminalen Modifizierung beruhen auf einem spezifischen Rest am N-Terminus. Zum Beispiel werden N-terminale Serin- oder Threoninreste durch Periodat oxidiert und bilden Glyoxylamide (Schema 3 C, Nr. 2).^[32] Die Aldehydfunktion kann dann mit Hydrazid- oder Aminoxyreagentien weiter modifiziert werden (Abschnitt 4.1). N-terminale Tryptophanreste können in einer Pictet-Spengler-Reaktion selektiv mit Aldehydsonden reagieren (Schema 3 C, Nr. 3).^[33] Es gibt Hinweise, dass diese Reaktion auch verwendet werden kann, um N-terminale Histidinreste umzuwandeln.^[34] Ein Vorteil der Pictet-Spengler-Reaktion liegt darin, dass in einem einstufigen Prozess eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung zwischen Sonde und Protein erhalten wird, während Hydrazid/Aminoxy-basierte Methoden keine irreversible Bindung zwischen der Sonde und dem Protein bilden. Zudem können Aldehydsonden selektiv mit Proteinen, die N-terminale Cysteingruppen (sowie Ser, Thr, Trp, His und Asn) enthalten, unter Bildung verschiedener Heterocyklen konjugiert werden (Schema 3 C, Nr. 4).^[35] Auf N-terminalen Cysteinresten beruht auch eine äußerst erfolgreiche Modifizierungsmethode für Proteine, die als native chemische Ligation bekannt ist (Schema 3 C, Nr. 5).

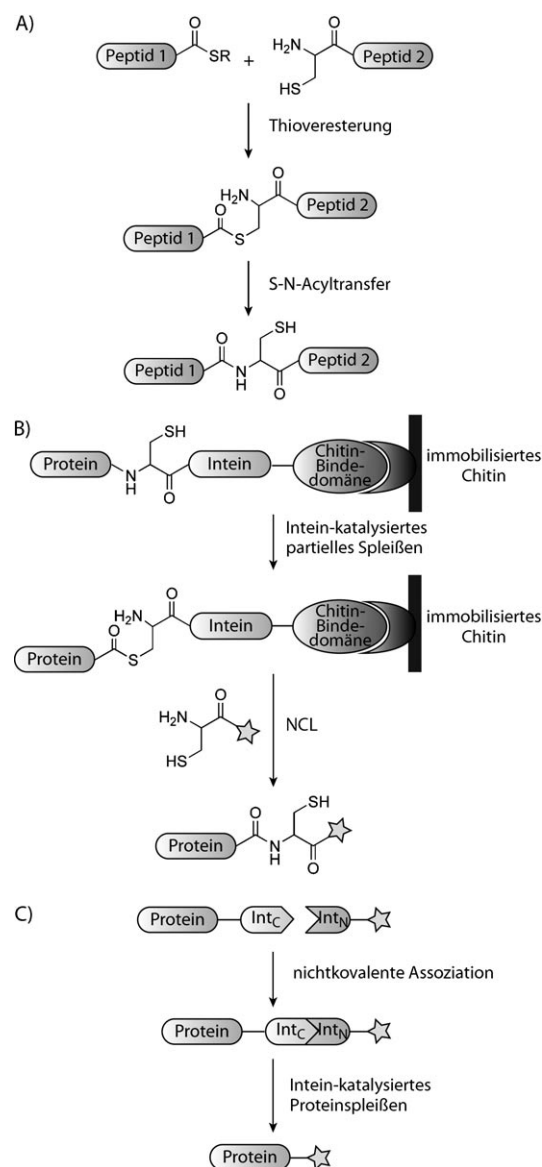
2.2.4. Native chemische Ligation

1994 beschrieben Kent et al. die Ligation von Thioestern mit N-terminalen Cysteinresten zu einer „nativen“ Amidbindung; diese Reaktion wird heute als native chemische Ligation (NCL, Schema 4A) bezeichnet.^[36] Mechanistisch verläuft diese Umwandlung über eine rasche Gleichgewichtseinstellung der Thioester, die durch eine irreversible intramolekulare Reaktion mit dem N-terminalen Amin des Proteins (S-N-Acyltransfer) gestört wird, was schließlich zu einer Amidbindung führt. Der S-N-Acyltransfer wurde zuerst von Wieland et al. 1953 entdeckt, aber erst viel später als Modifizierungsmethode für Proteine angewendet.^[37] NCL kann eingesetzt werden, um unter physiologischen Bedingungen selektiv zwei hoch funktionalisierte Moleküle ohne Verwendung von Schutzgruppen zu ligieren und entwickelte sich daher zu einer leistungsfähigen Methode für die Modifizierung, Synthese und Semisynthese von Proteinen. Mithilfe der NCL ließen sich Proteine mit Größen jenseits der traditionellen Grenzen der Festphasenpeptidsynthese erhalten und untersuchen.^[38] Weiterhin können durch NCL Teile von Proteinen für biologische Strukturstudien^[39,40] oder für die selektive Addition posttranslationaler Modifikationen und chemischer Sonden isotopenmarkiert werden.^[41]

Viele der Anwendungen der NCL wurden durch die Ligation exprimierter Proteine (expressed protein ligation, EPL; Schema 4B) und das *trans*-Spleißen von Proteinen (protein-*trans* splicing, PTS; Schema 4C) verbessert. EPL und PTS beruhen beide auf biologischen Verwandten der NCL: selbstspleißenden Proteinen.^[42] Selbstspleißen ist bei Proteinen ein natürliches Phänomen, wobei eine als Intein bezeichnete Proteindomäne in einem posttranslationalen Vorgang, der mechanistisch einer NCL vergleichbar ist, herausgeschnitten wird. EPL bedeutet Ligation einer chemisch hergestellten Spezies (die häufig ein N-terminales Cystein enthält) mit einem rekombinant exprimierten, Thioester enthaltenden Protein. PTS ähnelt der EPL insoweit, als eine synthetische Verbindung mit einem rekombinant exprimierten Protein über eine native Amidbindung verknüpft werden kann; bei PTS ist das Intein jedoch zwischen dem synthetischen Peptid und dem exprimierten Thioester-haltigen Protein aufgeteilt, und der Wiederausammenbau des Inteins ermöglicht das Spleißen.

EPL nutzt Inteine, um einen C-terminalen Thioester zu erzeugen, der anschließend durch native chemische Ligation verändert werden kann (Schema 4B). Unter Verwendung von Techniken der rekombinanten Expression wird ein gewünschtes Polypeptid mit einem Intein, das mutiert ist und keinen S-N-Acyltransfer mehr eingehen kann, verbunden. Oft wird am C-terminalen Ende des Inteins im Fusionsprotein eine Chitin bindende Domäne angehängt, um die Reinigung zu erleichtern. Das exprimierte Fusionsprotein wird auf einer Chitinaffinitätsmatrix isoliert, und nach Entfernung aller anderen Proteine wird das gewünschte Protein durch NCL mit einem synthetischen Peptid oder einem anderen Molekül mit N-terminalem Cysteinrest von der Chitinmatrix abgespalten.^[43,44]

Die PTS-Methode nutzt die Entdeckung, dass sich Inteine in zwei Polypeptide (Int_C und Int_N) trennen lassen, die durch



Schema 4. Native chemische Ligation und Intein-basierte Methoden.

A) Native chemische Verknüpfung zweier Peptide: Peptid 1 enthält einen C-terminalen Thioester, der mit dem N-terminalen Cystein des Peptids 2 einen neuen Thioester bildet. S-N-Acyltransfer führt zu einer nativen Peptidbindung. B) Ligation exprimierter Proteine: Ein Protein wird rekombinant exprimiert, gebunden an ein mutiertes Intein und eine Chitin-Binde-domäne, um die Reinigung zu erleichtern. Das Intein ist so mutiert, dass es den Thioester bildet, aber keinen S-N-Acyltransfer eingeht. Daher kann das rekombinante Protein durch eine Spezies, die ein N-terminales Cystein enthält, selektiv vom immobilisierten Chitin abgespalten werden. C) Protein-*trans*-Spleißen: Ein Protein wird rekombinant exprimiert, wobei es an einen Intein (Int_C) geknüpft ist. Der komplementäre Intein (Int_N) ist an eine nichtnatürliche chemische Spezies gekuppelt. Wenn die beiden Intein-teile nichtkovalent assoziieren, findet das Spleißen statt, wodurch ein modifiziertes Protein gebildet wird.

nichtkovalente Assoziation ein aktives Intein bilden können, das Peptide spleißen kann (Schema 4C).^[42] PTS hat die Ausweitung der NCL auf lebende Systeme ermöglicht und erleichtert damit die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen,^[45] die Synthese cyclischer Peptide^[46,47]

und die Semisynthese von Proteinen *in vivo*.^[48] Yao et al. haben die herkömmliche NCL in *E. coli* durchgeführt, um mit Thioesterfluorophor-Konjugaten überexprimierte N-terminale Cystein-haltige Proteine nachzuweisen.^[49] In dieser Studie wurden nur die mit dem Thioesterfluorophor modifizierten Proteine detektiert, aber es gibt viele natürliche Thioester-haltige Spezies, darunter Derivate von Coenzym A (CoA) sowie Polyketid- und Fettsäuresynthetasen, die mit den interessierenden Proteinen reagieren könnten. Diese Vielfalt an natürlich vorkommenden Thioestern beschränkt die NCL in erster Linie auf In-vitro-Techniken wie die Herstellung semisynthetischer Proteinproben.

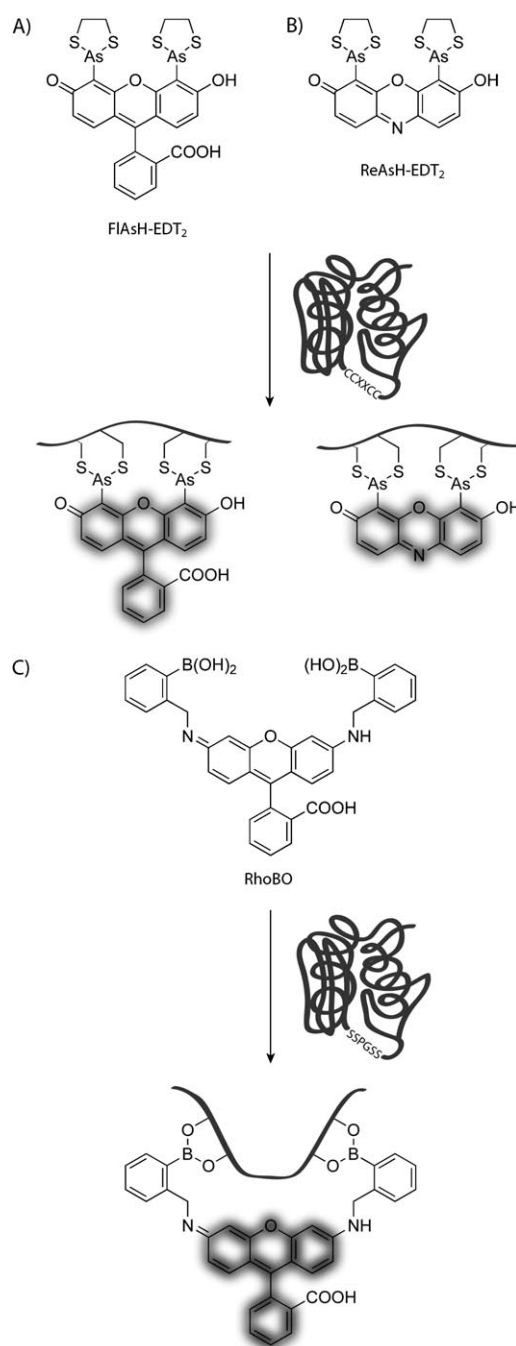
3. Bioorthogonalität mithilfe einzigartiger Aminosäuresequenzen

Außer am N-Terminus ist eine Single-site-Modifizierung bei Proteinen nur schwer zu erreichen, wenn nicht ein einzelner Cystein-, Tyrosin- oder Tryptophanrest auf der Oberfläche des Proteins verändert werden kann. Selbst in diesen Fällen können sich Löslichkeitsprobleme oder eine unerwünschte Dimerisierung des Proteins ergeben. Mehrere Arbeitsgruppen haben jedoch gezeigt, dass Kombinationen von Seitenketten natürlicher Aminosäuren neue Funktionalitäten schaffen können, die einzigartig und für eine selektive chemische oder enzymatische Modifizierung zugänglich sind. Solche Sequenzen können auch genetisch codiert werden, wodurch sie direkt in ein gewünschtes Protein inkorporiert werden können.

3.1. Fluorogene Diarsen- und Diboronsäurereagentien

Fluoreszierende Proteine, vor allem GFP, sind wichtige Hilfsmittel, um Lokalisierung, Dynamik und Wechselwirkungen von Proteinen in lebenden Zellen und Organismen zu untersuchen.^[50–53] Allerdings kann die beträchtliche Größe fluoreszierender Proteine (ca. 200 Reste) die Funktionen der mit ihnen fusionierten Proteine beeinträchtigen.^[54] Daher entwickelten Tsien et al. eine alternative Methode zur Markierung von Proteinen mit Fluorophoren unter Verwendung eines kleineren, genetisch codierten Markers. Sie stellten fest, dass das Tetracysteinmotiv CCXXCC, wenn es sich in einer Haarnadelstruktur befindet, selektiv mit Diarsen-funktionalisierten fluoreszierenden Farbstoffen wie FAsH und ReAsH (Schema 5 A bzw. B; beide als Bis(ethandithiol)(EDT₂)-Addukte dargestellt) reagiert.^[55–57] Zufällig wird durch die Bindung an Proteine die Fluoreszenz der arsenhaltigen Farbstoffe drastisch verstärkt. Da zudem die Hintergrundfluoreszenz gering ist, werden keine umfangreichen Waschschritte benötigt, und eine Echtzeitabbildung kann durchgeführt werden.

Die Diarsenfarbstoffe bringen jedoch auch Probleme mit sich: Sie gehen nichtspezifische hydrophobe Wechselwirkungen sowie Reaktionen mit anderen biologischen Thiolen ein, was die Detektion von in geringer Menge vorhandenen und dispersen Proteinen erschwert.^[57,58] Zur Lösung dieser Probleme entwickelten Tsien et al. einen „Markierungs-



Schema 5. A), B) Fluorogene Diarsenreagentien für die ortsspezifische Markierung rekombinanter Proteine mit Tetracysteinmotiven. A) Arsenhaltiger Fluorescein-Haarnadel-Binder (FAsH). B) Arsenhaltiger Resorufin-Haarnadel-Binder (ReAsH). C) Fluorogenes Diboronsäure-Rhodamin-Reagens (RhoBo) zur Markierung von Proteinen, die Tetracystein-motive enthalten.

cocktail“ mit hydrophoben Molekülen, die um die nichtspezifischen Bindungsstellen konkurrieren, sowie Ethandithiol im Überschuss, das mit thiolhaltigen Biomolekülen konkurrieren kann.^[59] Zudem wurde die Peptidsequenz für eine erhöhte Assoziationskonstante optimiert, wodurch drastischere Waschbedingungen angewendet werden können.^[60]

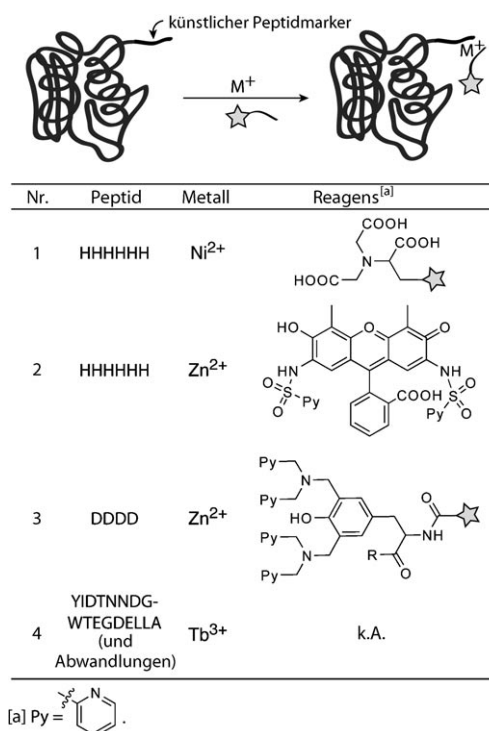
Diese Verbesserungen haben zur breiten Verwendung des Tetracysteinemarkers und der Diarsenfarbstoffe geführt, z. B. bei Untersuchungen zur mRNA-Translation,^[61] zur G-Protein-gekoppelten Rezeptoraktivierung,^[62] zur Amyloidbildung,^[63] zu ATP-gesteuerten P2X-Rezeptoren^[64] und zum intrazellulären Transport von HIV-1-Komplexen.^[65] Schepartz et al. verwendeten ein modifiziertes, zweigeteiltes Tetracysteinmotiv, das sie als „bipartite tetracysteine display“ bezeichneten, um Protein-Protein-Wechselwirkungen und die Proteinfaltung zu untersuchen.^[66] Mit einem ähnlichen zweigeteilten Tetracysteinmotiv wurde die β -Faltblattbildung erforscht.^[67] Die Methode wurde für die Abbildung mit Elektronenmikroskopie,^[68] Pulse-Chase-Experimente,^[61] Western-Blotting^[69] und Affinitätschromatographie^[57] erweitert.

Laut Schepartz et al. bindet ein Diboronsäure-Rhodamin-Farbstoff (RhoBo; Schema 5C) mit einem K_d -Wert im nanomolaren Bereich an ein Tetraserin-Motiv.^[70] Wie FIAsh und ReAsH ist RhoBo fluorogen und zellgängig, enthält aber weder das cytotoxische Element Arsen noch führt es zur Hintergrundfluoreszenz durch Thiolaustausch. RhoBo wurde zunächst für den Nachweis von Monosacchariden entwickelt,^[71] bindet aber mit einem deutlich höheren K_d -Wert an Monosaccharide als an Peptide mit SSPGSS-Motiven und kann daher in Gegenwart von Kohlenhydraten selektiv Proteine markieren.^[70] Einige endogene Proteine enthalten jedoch SSXXSS-artige Sequenzen, die in zellbasierten Systemen zu Off-Target-Markierung führen können.

3.2. Nachweis von Peptidmarkern durch Bildung von Übergangsmetallchelaten

Das Hexahistidinpeptid, ein gängiger Reinigungsmarker, wurde zur Markierung von Proteinen in zellulären Systemen eingesetzt. Die Imidazolgruppe chelatisiert das Nickelzentrum von Nickelnitrilotriacetat (Ni-NTA) mit hoher Affinität.^[72] Rhodaminderivate,^[73] Cyaninfarbstoffe^[74] oder Fluorescein^[75] wurden mit Ni-NTA konjugiert und zur Abbildung von Proteinen mit His₆- oder His₁₀-Sequenzen verwendet (Schema 6, Nr. 1). Die Verwendung von Nickel bringt allerdings zwei Nachteile mit sich: Das paramagnetische Verhalten von Nickel(II) führt oft zur Fluoreszenzlöschung,^[76] und Nickel(II) kann toxisch sein.^[77] Bezüglich des ersten Nachteils haben Lippard et al. ein chloriertes Fluoresceinanalogon beschrieben, dessen Fluoreszenz durch Nickel(II) nicht gelöscht wird,^[76] der zweite aber bleibt bestehen. Hauser und Tsien konnten diese mit Polyhistidinchelatoren verbundenen Probleme hinsichtlich Toxizität und Fluoreszenzlöschung lösen, indem sie von Nickel(II) zu Zink(II) wechselten. Der Fluoreszenzmarker, genannt HisZiFit (Schema 6, Nr. 2), wurde entwickelt, um Zn^{II}-abhängig His₆ zu binden, wodurch seine Fluoreszenz aktiviert wird. Dieses Reagens wurde verwendet, um das mit dem Bindegewebe wechselwirkende Molekül STIM1 zu untersuchen.^[78]

Zur Entwicklung chelatbildender Sonden, die Tetraaspartatsequenzen erkennen, haben Hamachi et al. ebenfalls auf Zink(II) zurückgegriffen (Schema 6, Nr. 3).^[79] Mehrkernige Zinkkomplexe wurden synthetisiert, an Fluorescein und Cyaninfarbstoffe konjugiert und anschließend verwendet, um



Schema 6. Ortsspezifische Proteinmodifizierung – Nachweis künstlicher Peptidmarker über Chelatisierung eines Metallzentrums mit chemischen Reagentien. Polyhistidinpeptide koordinieren chelatförmig an Ni^{II} und werden mit Ni-NTA-Reagentien (Nr. 1) detektiert, oder sie bilden ein Chelat mit Zn^{II} und werden mit dem fluorogenen Farbstoff HisZiFit sichtbar gemacht (Nr. 2). Tetraaspartatpeptide werden mit mehrkernigen Zinkkomplexen aufgespürt (Nr. 3). Peptide, die entwickelt wurden, um Tb^{III} zu binden, können nach Chelatisierung wegen der Lumineszenz von Tb^{III} visualisiert werden (Nr. 4).

den muscarinischen Acetylcholinrezeptor in Ovarien des chinesischen Hamsters (Chinese hamster ovary, CHO) abzubilden. Zwei Strategien wurden erforscht, um bei diesen Zinkkomplexen nach Bindung an das Protein Fluoreszenz auszulösen. Die erste beruhte auf einem Asp₄GlyAsp₄-Marker und einem Pyrenchromophor; wenn beide Tetraaspartatmotive chelatartig an einen solchen Zinkkomplex gebunden waren, bildeten die Pyrene einen Excimerkomplex mit veränderten Fluoreszenzeigenschaften.^[80] Die zweite Methode basierte auf einem Fluorophor, dessen spektroskopische Eigenschaften sich mit dem pH-Wert ändern. Das Tetraaspartatmotiv erzeugt eine lokal saure Umgebung, die sich in der Fluoreszenz des gebundenen Farbstoffs widerspiegelt.^[81] Vor kurzem wurde ein Zinkreagens mit einer Chloracetamidgruppe entwickelt, um einen Cysteinrest in der Nähe des Tetraaspartatmotivs zu alkylieren.^[82] Dieses Reagens erweiterte den Anwendungsbereich des Farbstoffs auf Western-Blotting- und Affinitätsreinigungs-Verfahren, die robustere Proteinkonjugationsreaktionen erfordern.

Zur Proteinabbildung in komplexen Systemen wurden weitere metallbasierte Peptidmarker entwickelt. Beim Durchmustern von Bibliotheken entdeckten Imperiali et al. Peptide, die lumineszierende Komplexe mit Terbium(III) bilden (Schema 6, Nr. 4).^[83,84] Diese Lanthanoid bindenden Sequenzen wurden eingesetzt, um markiertes Ubiquitin in Zelllysaten^[85] nachzuweisen und durch resonanten Lumines-

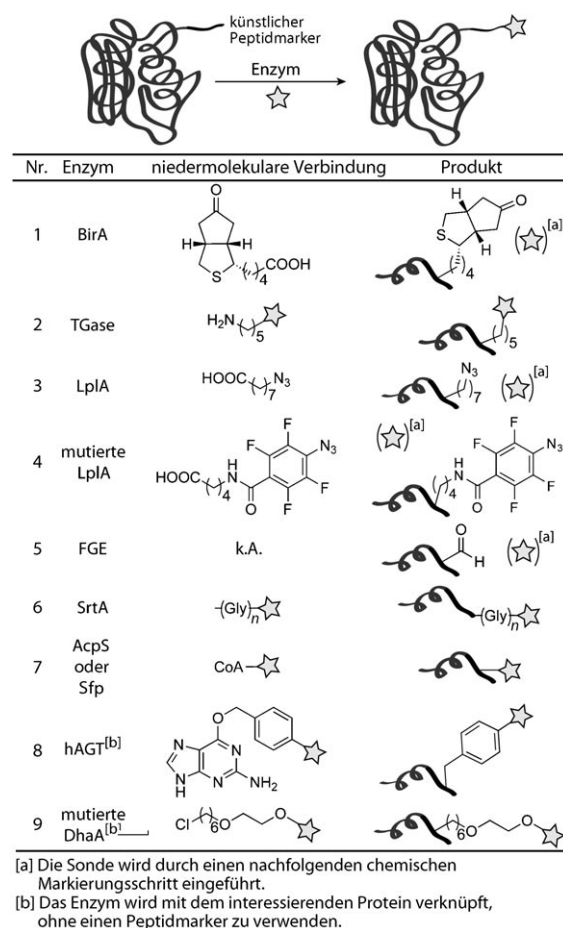
zenzenenergietransfer Peptid-Protein-Wechselwirkungen zwischen Phosphopeptiden und Src-Homologie-2-Domänen zu erforschen.^[86] Bisher haben sich die Anwendungen von Lanthanoid bindenden Markierungssequenzen auf In-vitro-Studien konzentriert; Gründe hierfür sind die Impermeabilität der Zellen für diese Metalle sowie deren mögliche Toxizität, sollten sie die Zellmembran einmal durchdringen.^[87] Diese Hindernisse könnten jedoch mit Chelatoren, die die Metalle zu ihren In-vivo-Zielstrukturen transportieren, überwunden werden.

3.3. Enzymatische Modifizierung von Peptidmarkern

Die Natur stellt ein Repertoire von Enzymen bereit, die Proteine kovalent mit niedermolekularen Cofaktoren modifizieren, und viele dieser Enzyme erkennen kurze Peptidsequenzen, die in heterologe Proteine transportiert werden können.^[88, 89] In einigen Fällen werden die Enzyme nichtnatürliche Modifikationen an ihren niedermolekularen Substraten erkennen, wodurch die Einführung bioorthogonaler funktioneller Gruppen oder neuer Reste (z. B. biophysikalischer Sonden) möglich wird. Diese Methoden finden immer mehr Verbreitung für die selektive Veränderung von Proteinen in lebenden Zellen.

Ting et al. setzten zu diesem Zweck Biotin-Ligase ein. Die Biotin-Ligase aus *E. coli*, BirA, biotinyliert einen Lysinrest innerhalb eines Acceptorpeptids aus 15 Resten (Schema 7, Nr. 1), das orthogonal zu dem Peptid ist, das durch Biotin-Ligasen von Säugetieren erkannt wird.^[90] Folglich ließen sich mit dem BirA-Erkennungsmotiv markierte Säugetierproteine selektiv biotinylieren und mit Streptavidin-konjugierten Quantenpunkten sichtbar machen.^[91] Ting et al. zeigten auch, dass BirA ein Keton-haltiges Analogon von Biotin, genannt Ketobiotin, als Substrat akzeptiert.^[90] Nach der enzymatischen Übertragung auf das gewünschte Protein kann das Ketobiotin kovalent mit Hydrazid- oder Aminoxyverbindungen markiert werden (Abschnitt 4.1). Die Toleranz von BirA für nichtnatürliche Substrate war auf konservativ modifizierte Biotinisostere beschränkt. Ligasen aus *P. horikoshii* und Hefe konnten jedoch die Übertragung von Azido- und Alkinylbiotinanaloga auf Proteine katalysieren und ermöglichen damit die Detektion durch Staudinger-Ligation oder 1,3-dipolare Azid-Alkin-Cycloaddition (Abschnitte 4.2 bzw. 4.3).^[92]

Der Erfolg der Biotin-Ligase-Methode veranlasste Ting et al., andere enzymvermittelte Strategien zur Proteinmarkierung in Erwägung zu ziehen. Sie konzentrierten sich zunächst auf die Transglutaminase (TGase; Schema 7, Nr. 2),^[93] die früher für die In-vitro-Modifizierung Glutamin-markierter Proteine mit Amin-konjugierten Sonden eingesetzt worden war.^[94,95] Ting und Lin erweiterten ihre Anwendung auf die Markierung von Proteinen in lebenden Zellen.^[93] Des Weiteren verwendeten Ting et al. Liponsäure-Ligase (LplA), um Proteine ortsspezifisch mit kurzkettigen Azidofettsäuren zu modifizieren (Schema 7, Nr. 3).^[96] Eine LplA-Mutante übertrug Arylazide auf Proteine zur Photovernetzung (Schema 7, Nr. 4).^[97] Liponsäure-Ligase und Biotin-Ligase wurden auch schon verwendet, um zwei unabhängige Proteine in derselben Zelle orthogonal zu markieren.^[96]



Schema 7. Proteinmodifizierung durch enzymatischen Einbau von Peptidmarkern. Die Biotin-Ligase (BirA) katalysiert die Anbindung von Biotin (nicht gezeigt) oder Ketobiotin an Proteine, die das passende Peptidsubstrat enthalten (Nr. 1). Die Transglutaminase (TGase) katalysiert die Bindung von Sonden, die ein primäres Amin enthalten, an Proteine, die mit Polyglutaminsequenzen markiert sind (Nr. 2). Liponsäure-Ligase (LplA) oder eine mutierte LplA katalysieren die Verknüpfung eines Alkyl- (Nr. 3) oder Arylazidoliponsäurederivats (Nr. 4) mit Proteinen, die das geeignete Peptidsubstrat aufweisen. Das Formylglycin generierende Enzym (FGE) vermittelt in Proteinen mit einem CXPXR-Motiv die Umwandlung eines Cys-Restes in ein Formylglycin (Nr. 5). Sortase A (SrtA) katalysiert die Bindung einer Polyglycin-haltigen Sonde an Proteine, die nahe am N-Terminus ein LPXTG-Motiv enthalten (Nr. 6). Phosphopantetheinyl-Transferasen (AcpS oder Sfp) verknüpfen eine CoA-Sonde mit Proteinen, die das entsprechende Protein/Peptid-Substrat enthalten (Nr. 7). Ein Protein wird unter Verknüpfung mit dem humanen Reparaturprotein O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT) rekombinant exprimiert. Das Enzym hAGT wird durch Entfernen der Benzylgruppe und Sonde von O⁶-Benzylguanosinderivaten alkyliert (Nr. 8). Ein Protein wird unter Verknüpfung mit einer mutierten Halogenalkan-Dehalogenase (DhaA) rekombinant exprimiert. Das veränderte DhaA-Enzym wird kovalent durch Alkylchloridsonden modifiziert (Nr. 9).

Einige posttranslationale Modifizierungen haben eine intrinsische orthogonale Reaktivität, die eine direkte Markierung eines Proteins an der modifizierten Stelle ermöglicht. Dies ist der Fall für den Aldehyd-haltigen Formylglycin-(FGly)-Rest, der durch das Formylglycin generierende Enzym (FGE) gebildet wird.^[98, 99] FGE erkennt ein Motiv aus sechs Resten, in dem ein Cysteinrest zu FGly oxidiert ist. Das

Motiv kommt normalerweise in Typ-I-Sulfatasen vor, kann aber in heterologe Proteine transportiert werden, wo es dennoch durch FGE erkannt wird. Wir haben die FGE-Konsensussequenz als genetisch codierten Aldehydmarker zur ortsspezifischen Proteinmodifizierung genutzt (Schema 7, Nr. 5).^[100–102] Die Coexpression des markierten Proteins neben FGE ergibt direkt das Aldehyd-funktionalisierte Protein. Der Aldehyd kann z.B. durch Kondensation mit Aminoxy- oder Hydrazidsonden weiter umgesetzt werden (Abschnitt 4.1).^[100] Während die meisten Organismen endogene FGE-Aktivität aufweisen, bestätigten Carrico et al., dass die Umwandlung von Cystein zu FGly erhöht ist, wenn FGE überexprimiert wird (wodurch mehr Enzym für die Oxidation von Cysteinresten zu FGly zur Verfügung steht). Der Aldehydmarker wurde angewendet, um in *E. coli* und in Sägetierzellen exprimierte Proteine zu modifizieren, einschließlich sekretierter, cytosolischer und membrangebundener Proteine.^[103]

Eine ortsspezifische Proteinmodifizierung gelang auch durch die Verwendung bakterieller Sortasen (Schema 7, Nr. 6). Sortase A (SrtA), das am häufigsten verwendete Enzym, katalysiert normalerweise die Konjugation von Proteinen an die bakterielle Zellwand.^[104] Das Enzym erkennt eine Peptidsequenz (LPXTG) nahe dem C-Terminus seiner Zielstruktur, spaltet die Thr-Gly-Bindung und bildet eine Amidbindung zwischen dem neuen C-terminalen Threonin und dem N-terminalen Glycin einer Polyglycinspezies.^[105] SrtA benötigt die Polyglycinsequenz, toleriert aber heterologe Sequenzen (oder nichtnatürliche Reste) über das LPXTG-Motiv hinaus. SrtA wurde für viele In-vitro-Anwendungen, einschließlich Peptid-, Protein- und Kohlenhydrat-Peptid-Ligationen, eingesetzt.^[106,107] 2007 beschrieben Ploegh et al. die erste Modifizierung von Proteinen in lebenden Zellen durch Sortase.^[108] In ihrem Bericht wurde das MHC-H-2K^b-Protein mit verschiedenen Oligoglycinsonden, darunter Biotin, Fluorescein, Tetramethylrhodamin, ein Arylazid und eine *ortho*-Nitrophenylverbindung, modifiziert. In einer späteren Arbeit verwendeten Nagamune et al. SrtA für lebende Zellen, um den extrazellulären C-Terminus des Membranproteins ODF mit Biotin und Alexa Fluor 488 zu markieren. Die Ligation von GFP und ODF gelang ebenfalls mit SrtA.^[109] Der Vorteil der Markierung mit Sortase ist, dass es keine beobachtete Beschränkung bezüglich der Größe der eingeführten Modifikation gibt, wodurch auf Zwei-Stufen-Strategien verzichtet werden kann. Mit dieser Methode sind jedoch nur C-terminale Modifizierungen möglich.

Mit Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTasen) aus *E. coli* (AcpS) und *B. subtilis* (Sfp) sind Zelloberflächenproteine selektiv modifiziert worden. PPTasen katalysieren die Addition einer CoA-aktivierten Phosphopantetheingruppe an das Serin eines Acyl- oder Peptidyl-Carrier-Proteins (Schema 7, Nr. 7).^[110] AcpS und Sfp reagieren nicht mit Carrier-Proteinen aus Säugtieren; daher können diese Enzyme und ihre komplementären bakteriellen Carrier-Proteine orthogonal in Sägetiersystemen verwendet werden.^[111] Diese Enzyme sind hoch promiskuitiv und können unterschiedliche Funktionalitäten, einschließlich Biotin und Cyaninfarbstoffe, in Proteine einführen.^[112,113] Mit PPTasen wurden der intrazelluläre Transport des Transferrinrezeptors 1^[114] und des

Hefe-Zellwandproteins Sag1 untersucht.^[115] In der zweiten Arbeit wurde eine Zwei-Farben-Markierung verwendet, die den Vorteil der Pseudoorthogonalität von AcpS und Sfp nutzt. Sfp ist nicht selektiv für den Carrier-Protein-Typ, den es markiert, während AcpS nur Acyl-Carrier-Proteine modifiziert. Wenn daher eine Zelle erschöpfend mit AcpS markiert und anschließend Sfp ausgesetzt wird, können zwei separate Proteine selektiv markiert und gleichzeitig untersucht werden.^[115]

Das PPTase-System hat das gleiche Problem wie GFP, insofern als die Carrier-Proteine (80–120 Reste) das zu untersuchende Protein häufig beträchtlich stören können. Um diese Einschränkung zu umgehen, führten Walsh et al. Phagen-Display-Selektionen durch und erhielten so ein Peptid mit elf Resten (als ybbR bezeichnet), das selektiv durch Sfp modifiziert wird.^[116] Ein Phagen-Display-Screening offenbarte zudem zwei besonders geeignete Peptidsequenzen, eine für Sfp und eine für AcpS. Die beiden neuen Peptide (S6 bzw. A1) enthalten beide zwölf Reste und werden effizienter als ybbR modifiziert. Zusätzlich zeigen diese Peptide orthogonale Reaktivität zueinander, da A1 selektiv durch AcpS und S6 selektiv durch Sfp modifiziert wird.^[117] Dies vereinfacht die ursprünglich von Johnsson et al.^[115] beschriebene Zwei-Farben-Markierung.

Johnsson et al. entwickelten eine Proteinmarkierungsstrategie, die auf dem humanen DNA-Reparaturprotein O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT) beruht.^[118,119] Dieses Enzym repariert Guanosinreste, die an der 6-Oxo-Position alkyliert sind, durch Übertragung der Alkylgruppe auf ein vorhandenes Cystein. Die Forschergruppe stellte fest, dass bei Einführung von O⁶-Benzylguanosinderivaten in Zellen die Benzylgruppe rasch auf hAGT übertragen wird. Wird daher hAGT an ein bestimmtes Protein gebunden, können Guanosinderivate verwendet werden, um das gewünschte Protein spezifisch zu markieren (Schema 7, Nr. 8).^[119,120] Diese Methode wird als „SNAP-Tag“ bezeichnet. Eine neuere Anpassung, genannt „CLIP-Tag“, beruht auf einem orthogonalen Enzym, das auf modifizierte Cytosinreste wirkt.^[121] Des Weiteren hat Promega ein „HaloTag“ entwickelt, in dem das Zielprotein mit einer bakteriellen Halogenalkan-Dehalogenase (DhaA) fusioniert wird, deren katalytisches Zentrum mutiert wurde, um das kovalent gebundene Intermediat abzufangen. Das gewünschte Protein kann anschließend mit Alkylchloridsonden markiert werden (Schema 7, Nr. 9).^[122]

4. Bioorthogonale Reaktionen

Genetisch verschlüsselte Peptidmarker haben das Repertoire an Proteinen erweitert, die in zellulären Systemen untersucht werden können. Die anderen Biomoleküle aber – Glycane, Lipide, Nucleinsäuren und verschiedene Metaboliten – sind mit diesen genetisch codierten Markern nicht zugänglich. Stattdessen können sie durch metabolische Markierung mit bioorthogonalen chemischen Reportern erforscht werden, d.h. mithilfe funktioneller Gruppen, die eine einzigartige Reaktivität orthogonal zur Reaktivität der natürlichen Biomoleküle aufweisen.^[123] Der Prozess verläuft in zwei

Schritten: Zuerst werden Zellen (oder Organismen) mit einer metabolischen Vorstufe inkubiert, die eine einzigartige funktionelle Gruppe – den chemischen Reporter – enthält. Der Metabolit kann ein Monosaccharid zur Markierung von Glycanen, ein Nucleosid zur DNA-Markierung, eine Aminosäure zur Proteinmarkierung oder eine Fettsäure zur Markierung von Lipiden sein. Sobald der chemische Reporter in das Zielbiomolekül aufgenommen ist, wird er im zweiten Schritt mit einem Sondenmolekül, das eine komplementäre bioorthogonale Funktion trägt, umgesetzt.

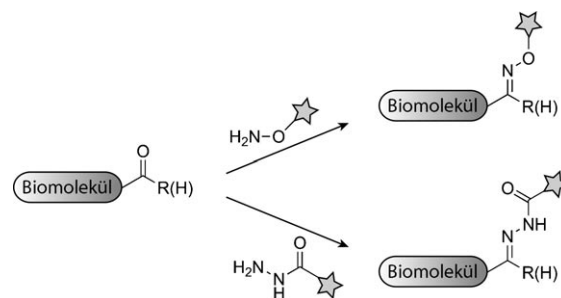
Entscheidend ist dabei eine hohe Selektivität des chemischen Reporters und des Sondenmoleküls, doch ebenso wichtig ist die intrinsische Kinetik der chemischen Reaktion. Die meisten Reaktionen, die zur selektiven Markierung von Biomolekülen eingesetzt werden, folgen einer Kinetik zweiter Ordnung, und folglich sind ihre Geschwindigkeiten abhängig von den Konzentrationen der beiden Reaktanten und der Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung. Bei Durchführung *in vitro* können die Konzentrationen der markierten Spezies einigermaßen kontrolliert werden, *in vivo* sind die markierten Biomoleküle jedoch häufig in geringen Konzentrationen vorhanden. Biologische Markierungsmittel wie monoklonale Antikörper binden ihre Antigene normalerweise mit biomolekularen Geschwindigkeitskonstanten, die sich der Diffusionsgrenze nähern (ca. $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^[124] Folglich können solche Reagentien bei sehr geringen Konzentrationen verwendet werden und binden ihre Zielmoleküle noch relativ schnell. Die meisten chemischen Reaktionen zweiter Ordnung haben dagegen Geschwindigkeitskonstanten, die 8–15 Größenordnungen kleiner sind,^[125] und die hier besprochenen Reaktionen weisen Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von 10^{-4} bis $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf.^[126, 127] Diese Geschwindigkeitskonstanten machen eine recht hohe Konzentration (häufig hohe μM - bis mM -Werte) an sekundärem Reagens nötig, wenn bioorthogonale chemische Reaktionen *in vivo* genutzt werden, weshalb es erforderlich ist, die Löslichkeit und Toxizität bei der Entwicklung des Markierungsreagens zu berücksichtigen. Dies zeigt, wie wichtig es ist, die intrinsische Kinetik der bioorthogonalen Reaktion zu optimieren, um die zur *In-vivo*-Markierung benötigten Konzentrationen zu verringern.

In Abschnitt 4 diskutieren wir die Reaktionen, die für die Strategie der bioorthogonalen chemischen Reporter entwickelt wurden, und in Abschnitt 5 werden Anwendungen auf spezielle Klassen von Biomolekülen vorgestellt. Zu den Reaktionen gehören die Kondensation von Aldehyden und Ketonen mit Aminoxy- und Hydrazidsonden (Abschnitt 4.1), die Staudinger-Ligation von Triarylphosphanen und Aziden (Abschnitt 4.2) sowie verschiedene Reaktionen von Aziden und Alkenen (Abschnitt 4.3). Bioorthogonale Reaktionen mit Alkenen sind im Kommen (Abschnitt 4.4), wenngleich ihre Verwendung in komplexen biologischen Systemen noch nicht abzusehen ist.

4.1. Kondensation von Ketonen/Aldehyden mit Amino-Nucleophilen

Ketone und Aldehyde reagieren mit Aminen, deren Nucleophilie durch den α -Effekt verstärkt ist. Prototypische

Beispiele sind Aminoxy- und Hydrazidverbindungen, die unter physiologischen Bedingungen Oxim- bzw. Hydrazonbindungen bilden (Schema 8). Während biologische Nucleo-



Schema 8. Bioorthogonale Reaktionen für Aldehyde/Ketone. Aldehyde und Ketone können mit Aminoxy- (oben) oder Hydrazidverbindungen (unten) zu stabilen Oximen bzw. Hydrazonen kondensiert werden.

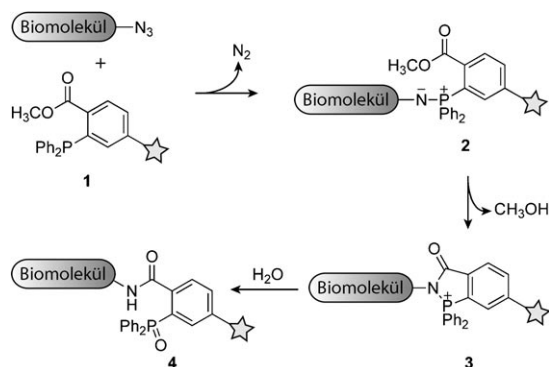
phile – Amine, Thiole und Alkohole – auch mit Ketonen und Aldehyden reagieren, liegt das Gleichgewicht in Wasser im Allgemeinen auf der Seite der Carbonylverbindung.^[128] Entsprechend haben Ketone und Aldehyde auf dem Gebiet der Proteinmodifizierung eine reichhaltige Geschichte.^[100, 129–131] Diese Carbonylverbindungen sind eher selten zur Markierung von Biomolekülen in Zellen oder lebenden Organismen verwendet worden, zum Teil wegen der Konkurrenz mit endogenen Aldehyden und Ketonen, darunter denjenigen in Glucose und Pyruvat. (Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass Schultz et al. die intrazelluläre Markierung eines ketofunktionalisierten Proteins beschrieben haben.^[132]) Aldehyde und Ketone sind jedoch nicht auf den Zelloberflächen präsent und können daher in dieser Umgebung als einzigartige chemische Reporter fungieren. Beispielsweise konnten wir zeigen, dass bestimmte Ketozucker von Zellen metabolisiert und in Glycane der Zelloberfläche integriert werden, wo sie mit Aminoxy- und Hydrazidsonden reagieren können.^[133, 134] Paulson et al. führten Aldehyde durch milde Periodatoxidation in Sialinsäurereste der Zelloberfläche ein und fingen die modifizierten Glycoproteine durch Reaktion mit Aminoxybiotin und anschließende Streptavidin-Chromatographie ab.^[135] In diesem Fall beschleunigte Anilin als Katalysator^[135, 136] die Reaktion bei neutralen Bedingungen, ein Vorteil gegenüber dem Arbeiten unter den typisch sauren Bedingungen, die für die Oximbildung genutzt werden.^[128] Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, wurden sowohl Biotin-Ligase^[90] als auch Aldehydmarker^[100] zur Markierung von Zelloberflächenproteinen mit Ketonen bzw. Aldehyden verwendet.

4.2. Staudinger-Ligation von Aziden mit Triarylphosphanen

Das Azid hat sich als besonders leistungsfähige chemische Reportergruppe herausgestellt. Anders als Aldehyde und Ketone kommen Azide in biologischen Systemen nicht vor^[137] und weisen zugleich eine orthogonale Reaktivität zur Mehrzahl der biologischen funktionellen Gruppen auf. Die Azidfunktion ist klein^[138–140] und wirkt daher nur minimal störend

in einem modifizierten Substrat. Diese günstigen Eigenschaften konnten in biologischen Systemen jedoch nicht genutzt werden, bis ein geeigneter reaktiver Partner für das Azid entwickelt wurde. Mit der Entwicklung der Staudinger-Ligation wurde das Azid im Jahr 2000 als chemische Reportergruppe eingeführt.^[141]

Die Staudinger-Ligation ist eine Abwandlung der klassischen Staudinger-Reduktion von Aziden mit Triphenylphosphan.^[142] Wie in Schema 9 gezeigt, kann durch die strategische



Schema 9. Staudinger-Ligation von Aziden und Triarylphosphanen. Das Triarylphosphan **1** greift das Azido-Biomolekül an, gibt über einen vierfach koordinierten Übergangszustand Stickstoff ab und liefert das Aza-Ylid **2**, das intramolekular am Ester angreift und durch Abspaltung von Methanol zum Bicyclus **3** führt. Nach Hydrolyse, Phosphanoxidation und Bildung der Amidbindung entsteht das Ligationsprodukt **4**.

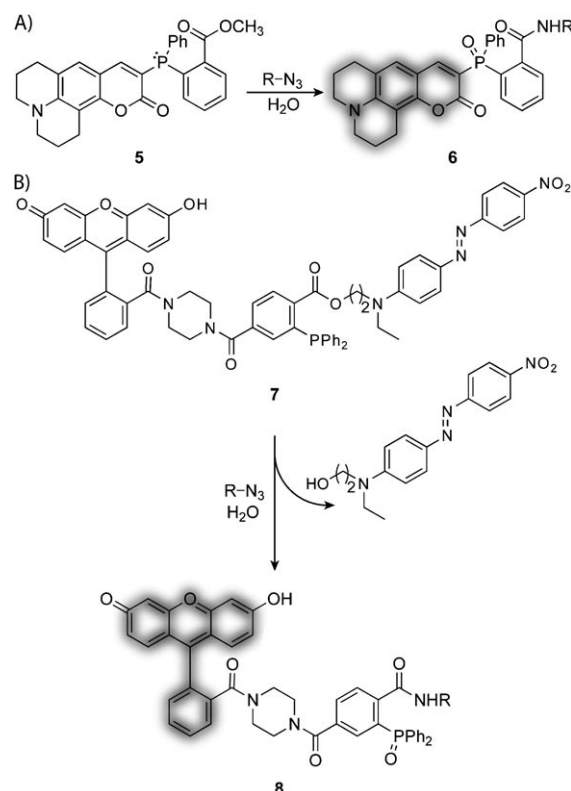
Platzierung einer Esterfunktion auf einem der Arylsubstituenten des Phosphans (**1**) das intermediäre Aza-Ylid (**2**) eine intramolekulare Amidbindung unter Bildung von **3** eingehen. Dieser Schritt ist entscheidend für die Reaktion, weil sonst die Aza-Ylid-Zwischenstufe einfach zum entsprechenden Amin und Phosphanoxid hydrolysieren würde. Die Hydrolyse der Zwischenstufe **3** ergibt jedoch ein stabiles Ligationsprodukt **4**, welches das Phosphanoxid in seiner Struktur enthält.

Die Bioorthogonalität der Reagentien für die Staudinger-Ligation verdient eine eingehendere Diskussion. Azide und Phosphane haben eine potenzielle Kreuzreaktivität mit Thiolen bzw. Disulfiden. Thiole können Alkyl- und Arylazide reduzieren, besonders unter basischen Bedingungen, und Dithiole wie Dithiothreitol sind in dieser Hinsicht besonders reaktiv.^[143–145] Die Reduktion von Alkylaziden verläuft bei physiologischem pH-Wert relativ langsam, es gibt allerdings Hinweise, dass cytosolisches Glutathion das Azid in 3'-Azidothymidin reduzieren kann.^[146] Wir befassten uns mit diesem Problem im Zusammenhang mit der Markierung von Glycanen mit Azidozuckern.^[147] Jurkat-Zellen, die Azidozucker in ihren Zelloberflächenglycanen enthalten, wurden nacheinander mit einem Staudinger-Ligationsreagens oder Tris(2-carboxyethyl)phosphan (TCEP) – einem Trialkylphosphan, das bekanntermaßen schnell Disulfide reduziert^[148] – und mit einer aminreaktiven Biotinsonde behandelt. Die Aminmenge auf der Zelloberfläche wurde anschließend durch Inkubation mit einem fluoreszierenden Avidinreagens und nachfolgende Durchflusszytometrie gemessen. Mit Azidozuckern markierte Zellen zeigten geringfügig höhere Grade an Zelloberflä-

chenaminen als unmarkierte Zellen, was darauf hindeutet, dass einige Azide in situ reduziert worden waren. Allerdings war die Menge an Zelloberflächenaminen bei mit TCEP behandelten Zellen deutlich höher, was darauf hindeutet, dass die Mehrzahl der Azide nicht durch zelluläre Thiole reduziert wurde.

Prinzipiell können Phosphane Disulfidbindungen reduzieren,^[148,149] jedoch sind Triarylphosphane unter physiologischen Bedingungen gewöhnlich nicht dazu in der Lage, (in biologischen Systemen vorkommende) Alkyldisulfide zu reduzieren.^[150] Wir bestätigten diese Beobachtung in einer biologischen Umgebung, indem wir Jurkat-Zellen mit einem Triarylphosphan behandelten und die Menge der freien Sulfhydrylgruppen auf der Zelloberfläche mit einem Thiol-spezifischen Biotinreagens quantifizierten.^[141] Es wurde keine Zunahme der freien Sulfhydrylgruppen beobachtet. TCEP dagegen bewirkte eine deutliche Zunahme dieser Gruppen.

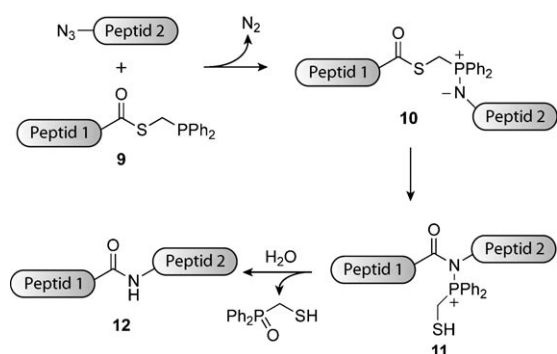
Eine Besonderheit der Staudinger-Ligation ist, dass sich ihr Mechanismus für die Entwicklung fluorogener Reagentien zur Abbildung von Biomolekülen in Echtzeit eignet. 2003 beschrieben Lemieux et al. ein fluorogenes Phosphan, in dem einer der Arylringe durch einen Cumarinfarbstoff (**5**; Schema 10 A) ersetzt wurde.^[151] Die Fluoreszenz von **5** wird durch das freie Elektronenpaar am Phosphoratom gelöscht. Phosphanoxidation während der Staudinger-Ligation schwächt die Löschwirkung und liefert ein stark fluoreszierendes, Biomolekül-gebundenes Produkt (**6**). Ein Problem bei dieser Sonde



Schema 10. Fluorogene Phosphane für die Staudinger-Ligation. A) Fluorogene Cumarinphosphane, die nach Phosphanoxidation fluoreszieren. B) Fluorogene Phosphane auf FRET-Basis, die nach Abspaltung des Lösers fluoreszieren.

war die Hintergrundfluoreszenz, die durch geringfügige Luft-oxidation des Phosphans verursacht wurde. Um dieses Problem zu umgehen, machten wir Gebrauch von einem anderen Schritt der Staudinger-Ligation – der Esterspaltung.^[152] Wie in Schema 10B gezeigt, lieferte der Einbau einer den resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET) löschenden Gruppe an der Esterposition in **7** ein alternatives Mittel zur Fluoreszenzaktivierung nach der Staudinger-Ligation, das unempfindlich gegen eine Phosphanoxidation war.

Die Staudinger-Ligation wurde auch für weitere Anwendungen angepasst, besonders für die Proteinsynthese. „Spurlose“ Versionen der Staudinger-Ligation wurden entwickelt, um Amidbindungen zu knüpfen, ohne den Phosphanoxidrest einzubeziehen.^[153] Raines et al. verbanden dieses Konzept mit der Thioesterchemie (die an die NCL erinnert), um eine spurlose Staudinger-Ligation für Peptidkupplungen zu realisieren (Schema 11).^[154–156] Diese spurlose Staudinger-Peptid-



Schema 11. Peptidkupplung über eine spurlose Staudinger-Ligation. Das Phosphan, das über einen C-terminalen Thioester (**9**) an Peptid 1 angebracht ist, greift – analog zur ursprünglichen Staudinger-Ligation – das Azid an Peptid 2 an, wobei das Iminophosphoran **10** gebildet wird, das sich zu **11** umlagert. Hydrolyse von **11** ergibt das Kupplungsprodukt **12** und ein Phosphanoxid als Nebenprodukt.

kupplung umfasst den Angriff eines Peptids, das einen C-terminalen Phosphanylthioester (**9**) enthält, auf ein azidmarkiertes Peptid. Der Angriff des Phosphans in **9** auf das Azid ergibt ein Iminophosphoran **10**, das sich zu **11** umlagert. Hydrolyse von **11** erleichtert die Verknüpfung der beiden Peptide über eine native Amidbindung (**12**). Anders als die Standard-NCL-Methode benötigt die Methode von Raines keinen Cysteinrest an der Verknüpfungsstelle.^[154,155] Für die spurlose Staudinger-Ligation wurden weitere Reagentien synthetisiert, einschließlich einer Ester-verknüpften Version.^[157] Auch wurden die Phosphanreagentien hinsichtlich sterischer, elektronischer und Coulomb-Faktoren optimiert.^[158,159]

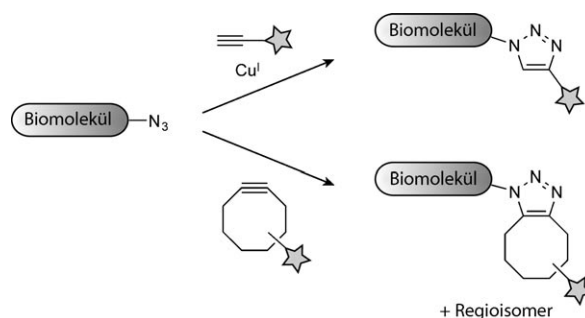
Die ausgezeichnete Bioorthogonalität von Aziden und Triarylphosphanen ermöglichte es, die Staudinger-Ligation zur Erforschung von Biomolekülen in vielen zellulären Umgebungen sowie in lebenden Tieren einzusetzen.^[147,160] Doch – wie jede Reaktion – unterliegt die Staudinger-Ligation Einschränkungen: Sie hat eine relativ langsame Reaktionskinetik und erfordert hohe Konzentrationen an Triarylphosphan (>250 μM). Durch eine Reihe kinetischer Studien wurde festgestellt, dass die Staudinger-Ligation in Reaktionen mit

Alkylaziden einer Kinetik zweiter Ordnung folgt ($k = 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), was darauf schließen lässt, dass der Angriff des Phosphans auf das Azid der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.^[161] Ungünstigerweise führten alle Versuche, die Kinetik durch Erhöhung der Nucleophilie der Phosphanreagentien (z.B. durch Anbringen elektronenschiebender Gruppen an den Arylsubstituenten oder Austausch von Aryl- gegen Alkylsubstituenten) zu verbessern, auch zu einer größeren Anfälligkeit gegen eine Phosphanoxidation an Luft, was die gewünschte Ligation unterbindet.^[162] Die Kinetik kann für den Erfolg von In-vivo-Markierungsstudien an Biomolekülen entscheidend sein. Folglich besteht beträchtliches Interesse an der Entwicklung schnellerer Azidreaktionen.

4.3. Reaktionen von Aziden mit Alkinen

Eine andere Reaktionsmöglichkeit für das Azid ist seine Beteiligung in einer [3+2]-Cycloaddition mit Alkenen und Alkinen als 1,3-Dipol. Diese Reaktion war im späten 19. Jahrhundert zuerst beschrieben worden,^[163] und seit den 1950ern, als Rolf Huisgen das Konzept der 1,3-dipolaren Cycloadditionen einführte,^[164] geht man davon aus, dass sie über eine konzertierte Cycloaddition abläuft. Die für eine Cycloaddition von Aziden mit den meisten Dipolarophilen erforderlichen hohen Temperaturen oder Drücke sind mit lebenden Systemen nicht vereinbar,^[165] allerdings erkannte man das enorme Potenzial dieser Umwandlung, besonders der Cycloaddition von Aziden und Alkinen, für die Synthese aromatischer Triazole ($\Delta G^\circ \approx -61 \text{ kcal mol}^{-1}$).^[166,167]

Unabhängig voneinander entdeckten Sharpless et al. und Meldal et al., dass die formale 1,3-dipolare Cycloaddition von Aziden mit terminalen Alkinen zu 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazolen effizient durch Kupfer(I) katalysiert wird (Schema 12, oben).^[168,169] Diese heute als kupferkatalysierte 1,3-dipolare Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) bezeichnete Reaktion nutzt die Bildung eines Kupferacetylids zur Aktivierung terminaler Alkine für die Reaktion mit Aziden. Die Kupfer(I)-katalysierte Cycloaddition verläuft um annähernd sieben Größenordnungen schneller als die unkatalysierte^[166] und kann durch Verwendung spezieller Liganden für



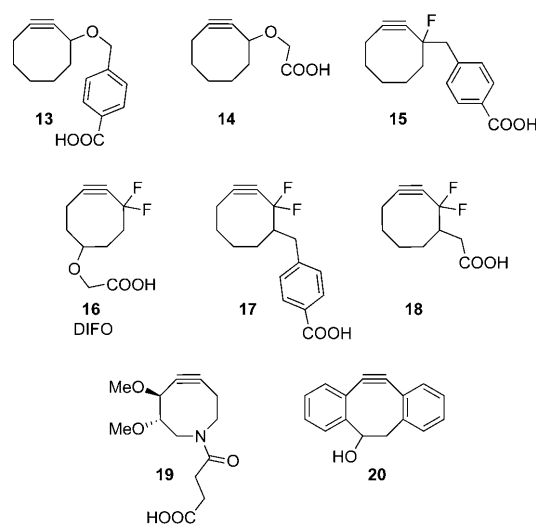
Schema 12. Bioorthogonale [3+2]-Cycloadditionen von Aziden und Alkinen zu Triazolen. Terminale Alkine gehen nach Aktivierung durch Cu^{I} unter physiologischen Bedingungen Cycloadditionen mit Aziden ein (oben). Cyclooctine reagieren mit Aziden über spannungskatalysierte [3+2]-Cycloaddition (unten).

Kupfer(I) weiter beschleunigt werden.^[170,171] Die CuAAC hat alle Eigenschaften einer Klickreaktion (einschließlich Effizienz, Einfachheit und Selektivität), wie von Sharpless et al. definiert.^[172] Tatsächlich ist sie zum Inbegriff der Klickreaktion geworden und wird oft einfach als „Klickchemie“ bezeichnet. CuAAC findet breite Anwendung in der organischen Synthese, kombinatorischen Chemie, Polymerchemie, Materialchemie und chemischen Biologie.^[173–182] Die formale Cycloaddition zwischen Aziden und terminalen Alkinen kann auch durch Ruthenium(II) katalysiert werden, um 1,5-disubstituierte 1,2,3-Triazole zu erhalten,^[183] allerdings wird diese Reaktion weit weniger häufig verwendet als die CuAAC. Die erste Verwendung der CuAAC für die Biokonjugation beschrieben Finn et al. mit der Anlagerung von Farbstoffen an das Augenbohnen-Mosaikvirus.^[184]

Bisher wurde die Verwendung der CuAAC in lebenden Systemen durch die Toxizität von Kupfer(I) verhindert.^[185] Bakterien- und Säugetierzellen sowie Zebrafischembryonen sind Klickchemie-Bedingungen ausgesetzt worden. *E.-coli*-Bakterien, die proteingebundene Azide exprimieren, wurden binnen 16 h mit 100 μM CuBr markiert; sie überlebten die Markierung, konnten sich aber nicht mehr teilen.^[186,187] Ähnlich können Säugetierzellen geringe Kupfer(I)-Konzentrationen (unter 500 μM) 1 h überstehen.^[162] Wenn jedoch die optimierten CuAAC-Bedingungen mit 1 mM Kupfer(I) angewendet wurden,^[188] trat in beträchtlichem Umfang Zelltod ein.^[162] Zebrafischembryonen zeigten eine ähnliche Empfindlichkeit gegen Kupfer(I). Wenn die Embryonen mit 1 mM CuSO_4 , 1.5 mM Natriumascorbat und 0.1 mM Tris(benzyltriazolylmethyl)amin-Ligand behandelt wurden,^[171] starben alle Embryonen innerhalb von 15 min.^[162] CuAAC kann also nur begrenzt zur Markierung von Biomolekülen in lebenden Systemen verwendet werden.

Um die Biokompatibilität der Azid-Alkin-Cycloaddition zu verbessern, versuchten wir, die Alkine ohne Metallkatalyse zu aktivieren, und zwar durch Ringspannung (Schema 12, unten). Die Geschichte der spannungskatalysierten Azid-Cycloadditionen reicht zurück bis zur Feststellung von Alder und Stein, dass bei Reaktionen mit Aziden Dicyclopentadien beträchtlich schneller reagiert als Cyclopentadien.^[189,190] Studien mit gespannten Alkenen und Alkinen wurden in den 1960er Jahren fortgesetzt, und während dieser Zeit beschrieben Wittig und Krebs, dass Cyclooctin, das kleinste stabile Cycloalkin, „explosionsartig“ reagierte, als es mit Phenylazid vermischt wurde.^[191] Auf dieser klassischen Literatur aufbauend, synthetisierten wir ein Biotinkonjugat von Cyclooctin **13** und wiesen nach, dass es Azide in Zelloberflächenglycanen tatsächlich ohne erkennbare cytotoxische Wirkungen markierte.^[192] Diese Arbeit führte zu einer Reihe von Cyclooctinen (**14–20**; Schema 13), welche die Detektion von Aziden in lebenden Systemen durch spannungskatalysierte [3 + 2]-Cycloaddition ermöglichen.^[193–196]

Noch war die erste Generation der spannungskatalysierten Cycloaddition nicht schneller als die Staudinger-Ligation ($k = 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[192] und deutlich langsamer als die CuAAC. Zur Verbesserung der Geschwindigkeit wurde eine Reihe von Verbindungen mit elektronenziehenden Fluoratomen an der Propargylposition hergestellt. Die Addition eines Fluoratoms (Cyclooctin **15**) erhöhte die Geschwindigkeit etwas (ca. 4-



Schema 13. Cyclooctinreagentien für kupferfreie Klickreaktionen.

fach),^[194] eine *gem*-Difluorgruppe hingegen brachte eine drastische, 60-fache Erhöhung ($k = 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^[195] Dieses difluorierte Cyclooctin (**16**, abgekürzt „DIFO“) ergab bei Markierungsexperimenten mit Biomolekülen vergleichbare Reaktionsgeschwindigkeiten wie CuAAC, was uns veranlasste, seine Reaktion mit Aziden „kupferfreie Klickchemie“ zu nennen. DIFO-Fluorophor-Konjugate haben sich als außergewöhnliche Reagentien zur Abbildung azidmarkierter Biomoleküle in komplexen biologischen Systemen, einschließlich lebender Zellen,^[195] *C. elegans*^[162] und Zebrafischembryonen,^[197] mit sehr niedriger Hintergrundfluoreszenz erwiesen. In Proteinmarkierungsexperimenten wird bei einer Western-Blot-Analyse jedoch manchmal eine Hintergrundmarkierung beobachtet, vielleicht wegen nichtspezifischer hydrophober Wechselwirkungen oder bisher nicht charakterisierter Reaktionen mit Proteinfunktionalitäten.^[162]

Seit der Beschreibung von DIFO wurde eine Reihe weiterer Cyclooctinreagentien synthetisiert. So wurden z. B. zwei leichter präparativ lenkbare DIFO-Analoga **17** und **18** synthetisiert, die die kupferfreie Klickchemie für Forscher im Bereich der chemischen Biologie hoffentlich zugänglicher machen werden. Wir haben auch ein besser wasserlösliches Azacyclooctin (**19**) synthetisiert, um andere Attribute der Cyclooctinreagentien, wie die pharmakokinetischen Eigenschaften, zu verbessern.^[196] Boons et al. haben das Dibenzylocyclooctinol **20** zur Verwendung für kupferfreie Klickreaktionen eingeführt.^[198] Dieses Reagens ist nicht toxisch, zeigt Reaktionskinetiken ähnlich denen von DIFO und ist relativ leicht herstellbar. Neuere theoretische Studien von Houk et al. haben Rahmenbedingungen geschaffen, innerhalb derer die Reaktivität von Cyclooctinen vorhergesagt und optimiert werden kann.^[199] Auf dieser theoretischen Basis sollten sich reaktivere Kongenere für die Synthese planen lassen.

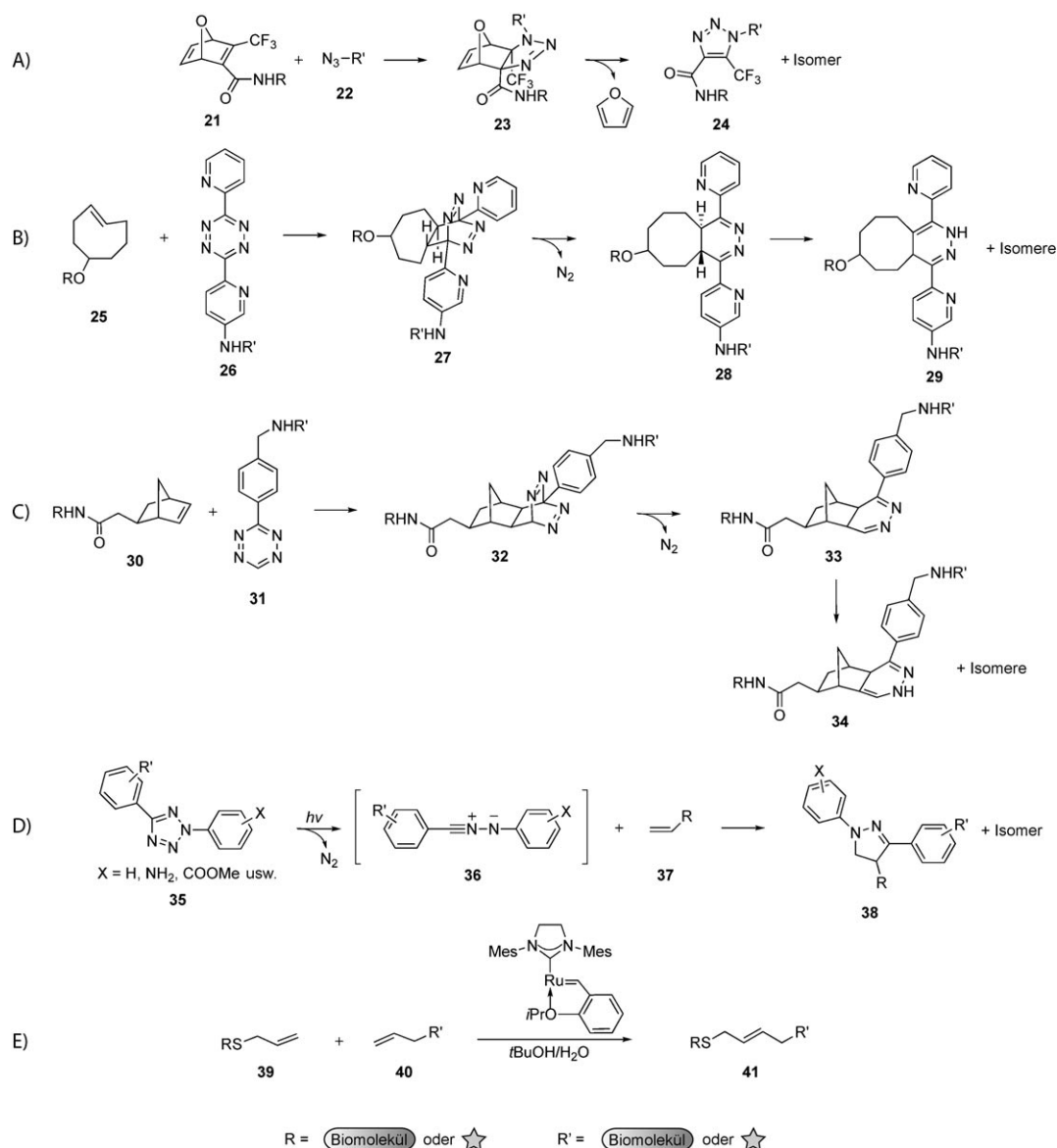
4.4. Bioorthogonale Reaktionen mit Alkenen

Auch Alkene wurden in durch Ringspannung oder Licht aktivierten Cycloadditionen mit 1,3-Dipolen und Dienen

eingesetzt (Schema 14). Als Produkt einer Azid-Alken-Cycloaddition entsteht ein Triazolin, das instabiler als ein aromatisches Triazol ist und damit für Anwendungen, bei denen ein Ligationsprodukt gewünscht wird, nicht zweckmäßig ist.^[167] Rutjes et al. umgingen dieses Problem, indem sie Oxanorbornadiene (**21**), die elektronenarme Doppelbindungen enthalten, als Substrate wählten. **21** geht eine [3+2]-Cycloaddition mit einem Azid **22** ein, die **23** liefert, das anschließend über eine Diels-Alder-Reaktion unter Abspaltung von Furan ein Triazolprodukt **24** ergibt (Schema 14 A).^[127,200] Diese Reagentien lassen sich einfach synthetisieren, ergeben aber relativ niedrige Reaktionsgeschwindigkeiten ($k = 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Dagegen verläuft die von Fox et al. beschriebene Reaktion von Tetrazinen mit gespannten Alkenen sehr schnell.^[126] Die Autoren beschrieben eine Diels-Alder-Reaktion mit in-

versem Elektronenbedarf, bei der *trans*-Cycloocten **25** mit dem Dipyridyltetrazin **26** zum Ligationsprodukt **29** reagiert (Schema 14 B). Die Reaktion verläuft über das Intermediat **27**, das rasch N_2 abspaltet und Intermediat **28** ergibt, das schließlich zum endgültigen Ligationsprodukt **29** isomerisiert. Diese Reaktion erfolgt in Wasser sehr schnell ($k = 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Unabhängig entwickelten Hilderbrand et al. die Reaktion von Norbornen **30** mit Tetrazin **31** (Schema 14 C).^[201] Diese Reaktion folgt dem gleichen Mechanismus, ist aber nicht so schnell wie die Tetrazinligation von Fox et al. Auch normale Diels-Alder-Reaktionen wurden in Zusammenhang mit Bio-konjugationsreaktionen untersucht, benötigen aber häufig Dienophile, die zugleich Michael-Akzeptoren (z. B. Maleimide) sind.^[202–205] Konkurrierende Michael-Additionen der biologischen Nucleophile verringern daher die Selektivität dieser Reaktionen stark.



Schema 14. Bioorthogonale Reaktionen mit Alkenen. A) Reaktion von Oxanorbornadienen mit Aziden zu Triazolen. B) Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf von Dipyridyltetrazinen und *trans*-Cyclooctenen. C) Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf von Monoaryl-tetrazinen und Norbornenen. D) Photoinduzierte 1,3-dipolare Cycloaddition von Tetrazolen und Alkenen. E) Ru-katalysierte Kreuzmetathese zweier Alkene in Wasser.

Lin et al. haben eine photochemische 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen Diaryltetrazolen (**35**) und einfachen Alkenen (Schema 14D) unter Bildung von Pyrazolinen entwickelt.^[206] Die ursprüngliche Synthesevorschrift erforderte Licht von 302 nm, um den Nitril-Imin-Dipol **36** zu erzeugen. Um mögliche Schädigungen lebender Systeme durch Licht zu verringern, modifizierten Lin et al. die Arylgruppen am Tetrazol anschließend derart, dass die Reaktion durch Bestrahlung bei 365 nm erfolgen kann.^[207] Diese Reaktion erfordert kein aktiviertes Alken, was ihre Anwendung in lebenden Systemen leichter macht, da es für die metabolische Markierung von Biomolekülen mit einfachen Alkenen schon Beispiele gibt (siehe Abschnitt 5). Tatsächlich wurden Alken enthaltende Proteine in *E. coli* mit Diaryltetrazolen modifiziert.^[208] Ein weiterer Vorteil dieser Reaktion besteht darin, dass die entstehenden Pyrazolincycloaddukte **38** fluoreszieren.

Die chemoselektive Modifizierung von Alkenen durch Kreuzmetathese zeichnet sich als bioorthogonale Reaktion ab. Die Ruthenium-katalysierte Olefinmetathese ist bemerkenswert gut verträglich mit funktionellen Gruppen und wird seit einiger Zeit mit Biomolekülsubstraten, gewöhnlich in organischen Lösungsmitteln, angewendet.^[209–212] In den vergangenen Jahren haben viele Arbeitsgruppen versucht, wasserlösliche Katalysatoren für die Olefinmetathese zu entwickeln.^[213–216] Eine Kreuzmetathese mit diesen Katalysatoren war jedoch besonders schwierig, und nur wenige Substrate führten zum Erfolg. Davis et al. haben kürzlich Allylsulfidhaltige Proteine **39** durch Kreuzmetathese in *tert*-Butylalkohol/Wasser mit dem Hoveyda-Grubbs-Katalysator der zweiten Generation modifiziert (Schema 14E).^[217] Die hohe Selektivität der Kreuzmetathese und ihre Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen, in Verbindung mit der einfachen Einführung von Alkenen in Biomoleküle, prädestinieren diese Methode für den weiteren Einsatz in der Biologie.

5. Anwendungen bioorthogonaler chemischer Reaktionen

Die Verwendung bioorthogonaler chemischer Reporter erfordert den Einbau einer reaktiven Komponente in die Zielmoleküle innerhalb von Zellen oder Organismen. Proteine, Glycane, Lipide und Nucleinsäuren sind bereits alle umfassend oder ortsspezifisch mit bioorthogonalen funktionellen Gruppen ausgestattet worden.

5.1. Proteine

5.1.1. Metabolische Markierung (gruppenspezifische Modifizierung)

Von Tirrell et al. stammt eine einfache Methode zur Einführung chemischer Reporter in zelluläre Proteine: Zellen werden einer nichtnatürlichen Aminosäure ausgesetzt, die vom Translationsapparat, vor allem den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (aaRSs) toleriert wird (Schema 15A).^[218–221] Das Konzept reicht in die 1950er Jahre zurück, als gezeigt wurde, dass nach Zugabe von Selenome-

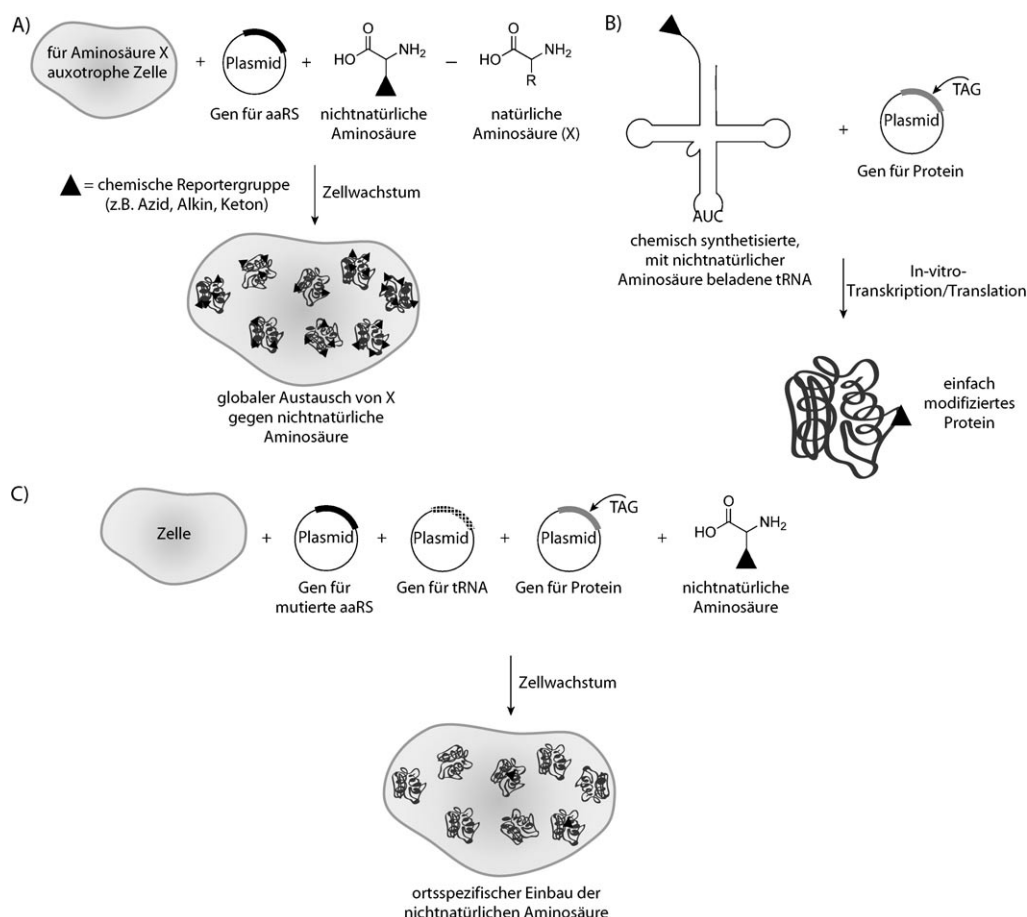
thionin zu methioninarmen Wachstumsmedien Methioninreste durch ihre Selenanaloge ersetzt wurden.^[222] Wir wissen heute, dass Surrogate für Methionin, Leucin, Tryptophan oder Phenylalanin in *E. coli*-exprimierte Proteine eingebaut werden können. (Allerdings sind für den Austausch fast jeder Aminosäure gegen nichtnatürliche Derivate Berichte zu finden.) Die Ausbeuten sind optimal, wenn der *E. coli*-Stamm auxotroph für die auszutauschende Aminosäure gemacht wird, und auch eine Überexprimierung der benötigten aaRS kann hilfreich sein.

Mit dieser Methode wurden verschiedenartige bioorthogonale funktionelle Gruppen in Proteine von *E. coli*- und Säugetierzellen eingeführt. Zum Beispiel wurden die Methioninsurrogate Homopropargylglycin (**42**, Hpg), Homoallylglycin (**43**, Hag) und Azidohomoalanin (**44**, Aha) verwendet (Schema 16), um effizient Alkine, Alkene bzw. Azide in Proteine einzuschleusen.^[187,223] Mit Hpg wurden neu synthetisierte Proteine in Bakterien^[224] und Säugetieren^[225] über eine CuAAC mit einem Azidocumarinfarbstoff markiert. Ähnlich wurde Aha eingesetzt, um neu synthetisierte Proteine durch Markierung mithilfe der CuAAC und^[186] Staudinger-Ligation^[226] und seit kurzem auch durch Cyclooctinsonden zu untersuchen.^[227] Diese Methode wurde auch zur Proteomanalyse neu synthetisierter Proteine verwendet, ein als bioorthogonale Markierung mit nichtkanonischen Aminosäuren (bioorthogonal noncanonical amino acid tagging, BONCAT) bezeichnetes Verfahren.^[228] Ferner wurden Aha und Hpg zusammen eingesetzt, um zwei verschiedene Proteinpopulationen gleichzeitig abzubilden.^[229] Durch Austausch von Methioninresten gegen Aha und Hpg wurden Azide und Alkine auch in virusartige Kapside eingebaut.^[230] Erste Daten lassen darauf schließen, dass Allylcystein ebenfalls als Methioninsurrogat aufgenommen und danach möglicherweise durch Kreuzmetathese modifiziert werden kann.^[217]

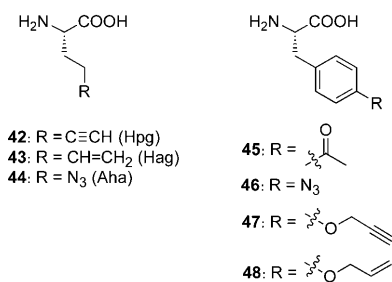
Einige nichtnatürliche Aminosäuren weichen in ihrer Struktur zu sehr von ihren natürlichen Analoga ab, um durch natürliche aaRS-Enzyme erkannt zu werden. In solchen Fällen können die aaRS durch rationale strukturbasierte^[231,232] oder selektionsbasierte^[233] Methoden so mutiert werden, dass sie die nichtnatürlichen Substrate akzeptieren. Solche Strategien wurden eingesetzt, um eine Mutante der Phenylalanin-tRNA-Synthetase (ePheRS)^[231] zu erzeugen und eine Aminosäure mit Ketofunktion, *para*-Acetylphenylalanin (**45**), in Proteine einzuführen.^[231,234] Mit der gleichen ePheRS wurden auch *para*-Azido-, *para*-Brom- und *para*-Iodphenylalanine in Proteine eingebaut.^[235,236] Das Azid ermöglichte eine Modifizierung mit Phosphanen oder Alkinen, während die Halogenderivate mithilfe von Pd-katalysierten Kreuzkupplungen modifiziert wurden.^[237,238]

5.1.2. Genetische Codierung (ortsspezifische Modifizierung)

Die ortsspezifische Einführung nichtnatürlicher Aminosäuren in Proteine wurde zuerst Ende der 1980er Jahre als eine In-vitro-Technik^[239,240] beschrieben und seither hauptsächlich von Schultz et al., auf In-vivo-Anwendungen ausgeweitet.^[241] Diese Methode nutzt das Codon UAG (das Amber-Stopcodon), das normalerweise die Proteinsynthese termi-



Schema 15. Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren in Proteine. A) Allgemeine Aufnahme einer nichtnatürlichen Aminosäure unter Verwendung auxotropher Zelllinien und promiskuitiver Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (aaRS). B) Ortsspezifische Einführung einer nichtnatürlichen Aminosäure in vitro unter Verwendung eines Transkriptions/Translations-Systems, einer chemisch synthetisierten, mit der nichtnatürlichen Aminosäure beladenen tRNA und dem Gen für das interessierende Protein, das an der Modifizierungsstelle mutiert ist. C) Ortsspezifischer Einbau einer nichtnatürlichen Aminosäure in vivo unter Verwendung von mutierter tRNA und aaRS sowie dem Gen für das entsprechende Protein, das an der Modifizierungsstelle mutiert ist.



Schema 16. Ausgewählte Aminosäuren, die in vivo ortsspezifisch in Proteine eingebaut wurden.

niert, um eine nichtnatürliche Aminosäure, die an eine komplementäre tRNA gebunden ist, zu codieren. Die Toleranz des Ribosoms gegenüber nichtnatürlichen Aminosäuren lässt deren Einbau in Proteine während der normalen Translation zu (Schema 15B,C).

Zum In-vitro-Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren in Proteine (Schema 15B) wird zuerst das Gen mutiert, das für das gewünschte Protein codiert, sodass das Amber-Stopcodon

an der gewünschten Modifikationsstelle liegt, und alle anderen Amber-Stopcodons werden von der Sequenz entfernt. Es wird eine tRNA synthetisiert, die ein komplementäres Anticodon sowie eine kovalent gebundene nichtnatürliche Aminosäure am 3'-Ende enthält. Nach Zugabe dieser künstlichen tRNA sowie des Gens, das für das mutierte Protein codiert, zu einem *E. coli*-In-vitro-Transkriptions/Translations-System wird das modifizierte Protein synthetisiert.^[239] Viele nichtnatürliche Aminosäuren sind nach dieser Methode bereits in Proteine eingebaut worden. Nachteile sind geringe Ausbeuten und der Aufwand für die Synthese der aminoacylierten tRNA.^[242] Trotz dieser Einschränkungen wurde die In-vitro-Technik zur Erforschung verschiedener Proteine angewendet. Um die Beiträge der Rückgrat-Amidbindungen zur Proteinstruktur zu untersuchen, wurden Reste in α -Helices und β -

Faltblättern gegen Esteranaloga ausgetauscht.^[243–245] Zusätzlich wurde der Beitrag von Kation- π -Wechselwirkungen zur Proteinstabilität mithilfe nichtnatürlicher Aminosäuren analysiert.^[246] Eine bemerkenswerte Erweiterung des Systems war die Mikroinjektion gentechnisch hergestellter mRNA und aminoacylierter tRNA in *Xenopus*-Oocyten.^[247,248] Dougherty, Lester und Mitarbeiter verwendeten diese Methode, um den Mechanismus von Neurorezeptoren durch Elektrophysiologie aufzuklären, und bauten dafür über 100 nichtnatürliche Aminosäuren in *Xenopus*-Ionenkanäle ein.^[333] Die In-vitro-Methode, gekoppelt mit Mikroinjektion, eignet sich wegen der sehr niedrigen Menge an Protein, die mithilfe der Elektrophysiologie detektiert werden kann, ideal für diese Anwendungen.

Um die Einschränkungen der In-vitro-Methode zu überwinden, haben Schultz et al. ein In-vivo-System für die ortsspezifische Mutagenese durch nichtnatürliche Aminosäuren geschaffen (Schema 15C). Den Durchbruch brachte die Selektion orthogonaler tRNAs und aaRS-Enzyme, die das Amber-Stopcodon bzw. die nichtnatürliche Aminosäure erkannten.^[241] Die Expression der entsprechenden Gene in

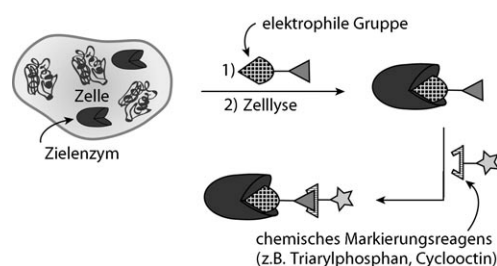
einem heterologen Wirt zusammen mit dem Gen, das für das gewünschte Protein mit der Amber-Mutation codiert, lieferte das modifizierte Protein. Typischerweise wird das Zellkulturmedium mit der nichtnatürlichen Aminosäure ergänzt, aber ein *E. coli*-Stamm, der entwickelt worden war, um *para*-Aminophenylalanin zu produzieren, konnte diese „21. Aminosäure“ vollständig biosynthetisch einbauen.^[249] Die In-vivo-Mutagenese durch nichtnatürliche Aminosäuren konnte auch auf Hefe-^[250,251] und Säugetierzellen^[252–254] erweitert werden.

Dutzende nichtnatürlicher Aminosäuren wurden unter Verwendung der In-vivo-Amber-Stopcodon-Methode in Proteine eingeführt; die meisten basieren auf einem aromatischen Kern (Tyrosin oder Phenylalanin).^[241] Aminosäuren mit Aziden (**44**, **46**),^[255] Alkinen (**42**, **47**),^[256] Ketonen (**45**)^[132,257] und Alkenen (**43**, **48**)^[258] wurden eingebaut, um die Weiterreaktion mit bioorthogonalen chemischen Reportern zu ermöglichen (Schema 16). Andere Funktionen, die in Proteine eingeführt wurden, waren Aniline,^[259,260] Arylhalogenide,^[261] Boronsäuren,^[262] photoisomerisierbare und vernetzende Gruppen,^[263,264] posttranslationale Modifikationen,^[265,266] photoaktivierbare (caged) Versionen von Aminosäuren zur Maskierung mutmaßlich wichtiger Reste^[267–269] und sogar ganze Fluorophore.^[270,271]

5.1.3. Aktivitätsbasierte Enzymmarkierung

Die aktivitätsbasierte Proteinprofilierung (ABPP) ermöglicht es, spezifische Enzymklassen auf Grundlage ihrer Katalysemechanismen zu untersuchen, häufig durch Verwendung großer Moleküle, die eine Sonde (ein Fluorophor oder Biotin) enthalten, die mit einer funktionellen Gruppe konjugiert ist, die so entworfen wurde, dass sie mit Resten im aktiven Zentrum des Zielenzyms reagiert (ein mechanismusbasierter Inhibitor). Die Strategie der bioorthogonalen chemischen Reporter hat die ABPP verbessert, indem sie die Verwendung einer großen chemischen Sonde während des kovalenten Markierungsprozesses unnötig machte (Schema 17).^[272,273] In der ursprünglichen Form wurde für die ABPP eine elektrophile Gruppe [bekannt als „Sprengkopf“ („warhead“)] verwendet,^[239] die die gewünschte Enzymklasse kovalent modifiziert und an die Affinitätssonde wie Biotin oder ein Fluorophor konjugiert wird. Solch große Sonden sind zwar durchaus brauchbar für die Markierung aktiver Enzyme aus Zelllysaten, haben jedoch häufig mangelhafte pharmakokinetische Eigenschaften, die ihre Verwendung in vivo verhindern.^[274] Folglich konnten Enzymaktivitäten nicht in den natürlichen Umgebungen untersucht werden.

2003 beschrieben Cravatt et al. und Overkleeft et al. unabhängig die Verwendung bioorthogonaler Reaktionen für die ABPP. Cravatt et al. verwendeten ein Azid-funktionalisiertes Phenylsulfonat, das auf Serin-Hydrolasen anspricht, während Overkleeft et al. ein Azid-funktionalisiertes Vinylsulfon für Proteasome einsetzten.^[188,275] Die Azidsonden wurden in lebende Zellen eingeschleust, wo sie die Zielenzyme kovalent modifizierten. Zelllysate wurden hergestellt und anschließend mit einer Alkin-Rhodamin-Sonde über CuAAC (Cravatt) oder mit einer biotinylierten Triarylphosphan-Sonde über Staudinger-Ligation (Overkleeft) umge-

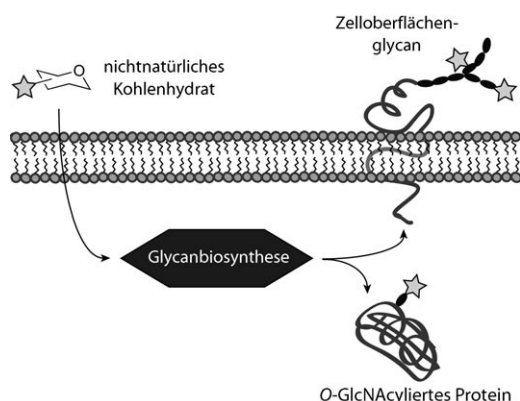


Schema 17. Aktivitätsbasierte Proteinprofilierung unter Verwendung bioorthogonaler chemischer Reporter. Eine elektrophile „Sprengkopf“-Gruppe wird mit einem chemischen Reporter funktionalisiert und in Zellen eingeführt. Nach Zelllyse erleichtert ein chemisches Markierungsreagens die Identifizierung oder Visualisierung des modifizierten Enzyms.

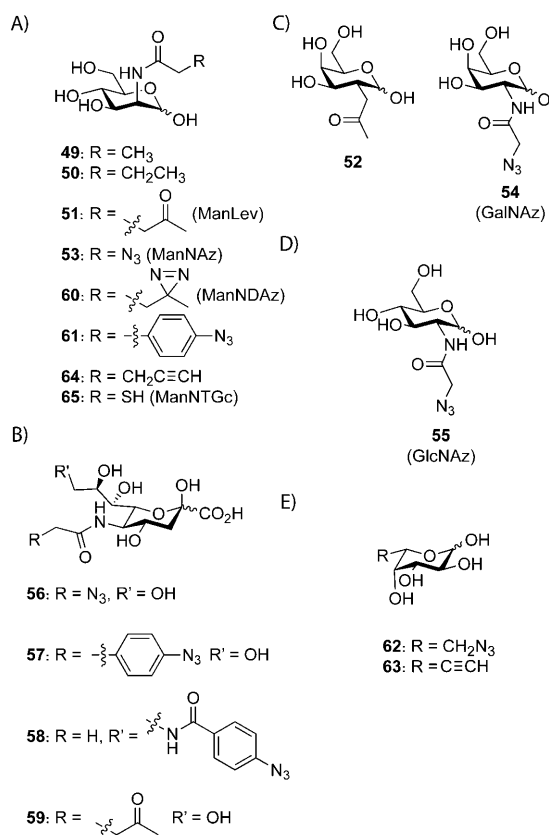
setzt. Cravatt et al. demonstrierten weiter, dass dieser zweistufige Prozess die Übertragung der ABPP auf lebende Mäuse ermöglicht.^[188] Seit dem ursprünglichen Bericht haben Cravatt et al. mithilfe dieser Strategie Brustkrebszellen^[276] und Cytochrom P450^[277] profiliert und haben zudem festgestellt, dass das Cu^I-katalysierte Markierungsverfahren effizienter ist, wenn das Alkin an den elektrophilen Fänger gebunden ist und die Detektion mit einer Azidosonde erfolgt.^[276] Des Weiteren haben Ploegh et al. einen Azido-Epoxid-„Sprengkopf“, eine Triarylphosphan-Biotin-Sonde und Streptavidin-Alexa Fluor 647 zur Visualisierung von Cathepsin-Proteasen in lebenden Zellen verwendet.^[278]

5.2. Glycane

Proteine können gentechnisch (Amber-Stopcodon-Methoden und die Addition von Peptidsequenzen), biosynthetisch (metabolische Einführung nichtnatürlicher Aminosäuren bei Auxotrophen) und durch aktivitätsbasierte Proteinprofilierung modifiziert werden. Viele dieser Methoden sind nicht bei Glycanen anwendbar, weil diese Biopolymere kein genetisches Templat und keine Enzymaktivitäten aufweisen. Glycane können aber durch metabolische Markierung mit Biosynthesestufen markiert werden (Schema 18).^[279] Bislang wurden nichtnatürliche Sialinsäure(Sia)-, *N*-Acetylgalactosamin(GalNAc)-, *N*-Acetylglucosamin(GlcNAc)- und Fucose(Fuc)-Reste in Glycane über Wiederverwertungsmechanismen (salvage pathways) oder, wie im Fall der Sialinsäure, durch De-novo-Biosynthese eingeführt (Schema 19). Diese Technik, die als metabolisches Oligosaccharid-Engineering bekannt ist, wurde zuerst von Reutter et al. verwendet, um die Acylseitenketten von Sialinsäuren auf der Zelloberfläche lebender Zellen und Tiere mit den *N*-Acetylmannosamin(ManNAc)-Derivaten **49** und **50** als metabolischen Vorstufen zu verändern.^[280,281] Diese nichtnatürlichen Sialinsäuren wurden eingesetzt, um Wirt-Virus-Wechselwirkungen,^[282] neuronale Zelldifferenzierung^[283] und Polysialinsäure^[284] zu erforschen. Darauf aufbauend nutzten wir metabolische Wege, um bioorthogonale funktionelle Gruppen in sialylierte Glycane einzuführen. Zu diesem Zweck wurde gezeigt, dass ein ManNAc-Derivat mit Ketofunktion (**51**), bekannt als *N*-Lävulinoylmannosamin (ManLev), in ver-



Schema 18. Metabolisches Oligosaccharid-Engineering. Nichtnatürliche Kohlenhydratmetaboliten werden von Zellen aufgenommen und in Oberflächenglycane und/oder cytosolische O-GlcNAcylierte Proteine eingebaut.



Schema 19. Nichtnatürliche Kohlenhydratmetaboliten für das metabolische Oligosaccharid-Engineering. A) N-Acetylmannosamin (ManNAc)-, B) Sialinsäure (Sia)-, C) N-Acetylgalactosamin (GalNAc)-, D) N-Acetylglucosamin (GlcNAc)- und E) Fucose (Fuc)-Metaboliten.

schiedenen Zelllinien metabolisiert wird.^[133,285,286] Die Keto-Gruppen reagierten anschließend mit Biotinhydrazid und wurden durch Western Blot oder Durchflussscytometrie nachgewiesen. Die zweite Methode wurde auch eingesetzt, um Gentransfer und adenovirale Aufnahme zu fördern, indem ein Anti-Adenovirus-Antikörper auf Keton-haltige Glycane gerichtet wurde.^[287]

Die Enzyme des GalNAc-Wiederverwertungsmechanismus erwiesen sich als weniger tolerant als die Enzyme für die

Sialinsäure-Biosynthese, da N-Lävulinoylgalactosamin (Gal-Lev) in Säugetierzellen nicht signifikant metabolisiert wurde. Um Ketogruppen in GalNAc-haltige Glycane einzuführen, wurde das Ketonisoster **52** synthetisiert.^[134] **52** wurde erfolgreich in Glycane eingebaut, die in IdID-CHO-Zellen vorkommen, denen die UDP-Gal/UDP-GalNAc-4-Epimerase fehlt und die daher kein eigenes GalNAc biosynthetisieren können.^[288]

Im Jahr 2000 beschrieben wir, dass durch Behandeln von Zellen mit dem ManNAc-Derivat **53**, N-Azidoacetylmannosamin (ManNAz), Azide in Sialinsäure-haltige Glycane eingebaut werden können.^[141] Mit diesem Bericht wurde zugleich die Staudinger-Ligation eingeführt, da die Azidosialinsäurereste über Triarylphosphan-Biotin-Sonden mit nachfolgender durchflussscytometrischer Analyse detektiert wurden. Anders als die Lävulinderivate ließen sich die Azidderivate leicht auf die GalNAc- und GlcNAc-Wiederverwertungswege [mit GalNAz (**54**) bzw. GlcNAz (**55**)] übertragen, was die Analyse mucinartiger O-verknüpfter Glycane und O-GlcNAcylierter Proteine mithilfe der Staudinger-Ligation oder der spannungskatalysierten [3+2]-Cycloaddition erleichterte.^[289–291] Außerdem demonstrierten wir, dass mit ManNAz oder GalNAz als metabolischen Vorstufen Azide in Glycane von Maus und Zebrafisch eingebaut werden können.^[160,197,292] Für In-vivo-Studien können die Azidoglycane entweder durch Staudinger-Ligation^[160] oder durch kupferfreie Klickreaktion^[195] identifiziert werden. Alternativ können sie ex vivo mithilfe beliebiger Azidreaktionen analysiert werden.

Sialinsäureanaloge wurden direkt verwendet, um Azide und andere nichtnatürliche Gruppen in Oberflächen-Sialinsäurereste einzuführen. Modifikationen der 5-N-Acyl- und 9-OH-Position von Sialinsäure werden gut toleriert, und zahlreiche nichtnatürliche Gruppen wurden an diesen Positionen eingebaut, um Sialinsäure-Bindungsereignisse aufzuklären.^[293] Alkyl- und Arylazide wurden durch Sialinsäurevorstufen, die an der 5- und 9-Position modifiziert waren (**56–58**), in Zelloberflächenglycane eingebaut.^[294,295] Zur Untersuchung des Glycanliganden für CD22 wurde die Sialinsäure **58** photovernetzt.^[295] Kohler und Tanaka führten ähnliche Photovernetzungsstudien mit dem Diazirin-haltigen ManNAc-Derivat **60** (ManNDAz) durch.^[296] Luchansky et al. verwendeten die Sialinsäuren **56**, **57** und **59** zusammen mit den jeweiligen ManNAc-Vorstufen **53**, **61** bzw. **51**, um zu zeigen, dass das Umgehen des ersten Schritts des Sialinsäure-Biosynthesewegs häufig die Ausbeute an Oberflächenglycanen erhöht. Bemerkenswerterweise erwies sich für den Einbau von Aziden in Sialinsäurereste der Sialinsäure-Biosyntheseweg als ebenso effizient wie der Wiederverwertungsweg, wenn ManNAz (**53**) und die entsprechende Azidosialinsäure **56** als Substrate verwendet wurden.^[294]

Fucosylierte Glycane wurden mit 6-Azidofucose **62** markiert.^[297,298] Fucose **62** erwies sich jedoch in vielen Säugetierzelllinien als toxisch und wurde nicht an lebende Tiere verabreicht. Wong et al. verwendeten 6-Alkynylfucose **63**, die weniger giftig ist als ihr Azidanalogon.^[299] Sie markierten auch Zelloberflächen-Sialinsäuren mit der Alkynyl-ManNAc-Vorstufe **64**,^[299] und Wu et al. verwendeten den gleichen Metaboliten, um Zelloberflächenglycane in Mäusen zu mar-

kieren.^[300] Der metabolische Markierungsgrad bei Sialinsäuren ist mit Alkynyl-ManNAc höher als mit ManNAz;^[300] das Alkin muss aber mithilfe der CuAAC detektiert werden, was wegen der Toxizität von Kupfer(I) für den Nachweis von Glycanen in einem lebenden System nicht ideal ist. Yarema et al. beschrieben die metabolische Markierung von Sialinsäure auf Stammzellen mit dem Thio-ManNAc-Analogon **65** (ManNTGc) und zeigten, dass dieses nichtnatürliche Glycan die Differenzierung beeinflusste.^[301]

Das Vermögen, Glycane mit bioorthogonalen funktionellen Gruppen metabolisch zu markieren, hat diese Biopolymere zum ersten Mal für die molekulare Bildgebung zugänglich gemacht. Dazu verwendeten Chang et al. Triarylphosphan-Fluorophor-Konjugate, um azidmarkierte Glycane auf kultivierten Zellen zu visualisieren.^[302] Die gleiche Arbeit ergab, dass durch Einführung von Ketonen in einen Glycantyp und von Aziden in einen anderen zwei Glycansubtypen gleichzeitig abgebildet werden konnten. Azidmarkierte Glycane wurden auch durch Staudinger-Ligation mit dem fluorogenen Phosphan **7** sichtbar gemacht.^[152] Unter Verwendung von Triarylphosphanen konnten Zelloberflächenglycane profiliert werden; die niedrige Geschwindigkeit der Staudinger-Ligation verhinderte jedoch die Beobachtung von Ereignissen mit größerer Dynamik. Später untersuchten Baskin et al. den intrazellulären Glycantransport unter Verwendung azidmarkierter Glycane mit DIFO-Fluorophor-Konjugaten, um Einblick in die Geschwindigkeit und Trajektorie der Internalisierung ausgehend von der Membran zu gewinnen.^[195] DIFO-Fluorophor-Konjugate wurden mit großem Erfolg zur Markierung von Glycanen im sich entwickelnden Zebrafisch eingesetzt; dies ist das erste Beispiel für die molekulare Bildgebung von Glycanen in einem lebenden Organismus.^[197] Eine Raum-Zeit-Analyse GalNAz-markierter Glycane offenbarte dynamische Aspekte von Mucinglycoproteinen durch das gesamte Entwicklungsprogramm dieses Organismus hindurch. Kürzlich wurden auch Carbocyaninfarbstoffe mit Dreifachbindungen (Absorption im Nah-IR-Bereich) eingesetzt, um Azidoglycane in Säugetierzellen mithilfe der CuAAC zu visualisieren.^[303]

Das steigende Interesse an chemischen Reportern, die in Glycane eingebettet sind, zur Proteomanalyse der Glycosylierung kann letztlich zu neuen Biomarkern für Krankheiten führen. Zum Beispiel konnten wir zeigen, dass mit GalNAz behandelte Zellen den nichtnatürlichen Metaboliten in Mucinglycoproteine einbauen und dass diese identifiziert werden können, indem sie mit einer Phosphan-basierten Affinitäts-sonde umgesetzt werden und anschließend abgefangen, eluiert, einem Trypsinverdau unterzogen und massenspektrometrisch detektiert werden.^[162] Mithilfe dieses Verfahrens entdeckten wir, dass GalNAz auch O-GlcNAcylierte Proteine markiert, vermutlich durch Umwandlung von UDP-GalNAz zu UDP-GlcNAz durch das Enzym UDP-Glc/GalNAc-C-4-Epimerase. Zhao et al. analysierten O-GlcNAc-modifizierte Proteine aus dem Cytosol und dem Nucleus über eine metabolische Markierung mit GlcNAz und nachfolgende Reaktion mit einer Phosphan-sonde, Anreicherung und massenspektrometrische Identifizierung.^[304,305] Auf ähnliche Weise untersuchten Lemoine et al. das O-GlcNAc-Proteom.^[306] Unter Verwendung der metabolischen Vorstufe Alkynyl-

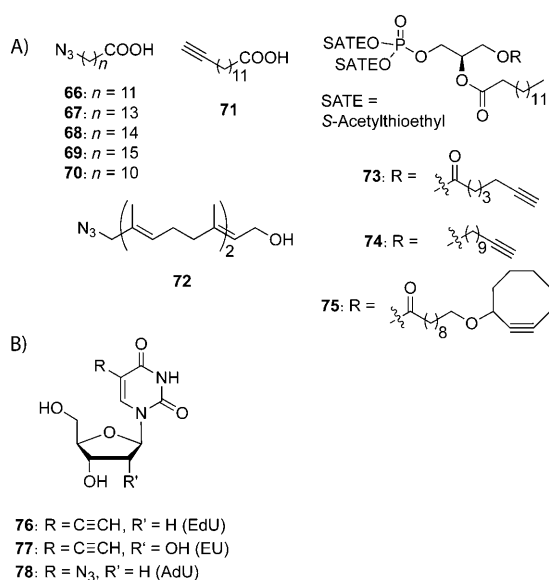
ManNAc (**64**) isolierten Wong et al. sialylierte Glycoproteine, indem sie Lysate mit einer Azidobiotinsonde durch CuAAC umsetzten, das markierte Protein auf Streptavidin-konjugierten Perlen abfingen und die Proteine direkt von den Perlen mit Trypsin verdauten, wodurch eine angereicherte Probe für die massenspektrometrische Analyse erhalten wurde. Mithilfe dieser Methode wurden über 200 Glycoproteine identifiziert, von denen die Mehrzahl sialylierte N-verknüpfte Glycane trug.^[307] Diese Beispiele stellten eine Plattform für vergleichende glycoproteomische Studien zur Verfügung, in denen versucht wird, Änderungen der Glycoproteinmenge oder der Strukturen anhängender Glycane, die mit Krankheit korrelieren, zu identifizieren.

5.3. Lipide

Wie Glycane sind Lipide sekundäre Metaboliten und posttranslationale Modifikationen, die nicht direkt mit genetisch codierten Reportern untersucht werden können. Bioorthogonale chemische Reporter haben sich als besonders nützlich erwiesen, um Lipide in zellulären Systemen zu erforschen (Schema 20 A).

Myristoylierung und Palmitoylierung sind die zwei vorherrschenden Arten der Fettsäureacylierung auf Proteinen.^[308] Beide wurden mit Azidolipidanaloga in Zellkultursystemen erforscht. Ploegh et al. zeigten, dass die azidmarkierte Fettsäure **66** in situ in ihr CoA-Analogon überführt wird und an Myristoylierungsstellen auf endogenen Proteinen übertragen wird. Die längerkettigen Fettsäuren **67–69** werden dagegen an Proteinstellen angebracht, die normalerweise durch Palmitoylierung modifiziert sind.^[309] Die N-Myristoylierung wurde zudem in vitro und in *E. coli* untersucht, wobei die Azido- und Alkynylfettsäuren **70** und **71** Verwendung fanden, die metabolisch eingeführt und später über CuAAC detektiert wurden.^[310,311] Berthiaume et al. haben mit der Azidofettsäure **66** und der Staudinger-Ligation die Rolle der Myristoylierung bei der Apoptose aufgeklärt.^[312] Dieselbe Arbeitsgruppe hat mit ähnlichen Methoden neue palmitoylierte Proteine in der Leber identifiziert.^[313]

Im Unterschied zu Myristoyl- und Palmitoylgruppen leiten sich Farnesylgruppen (sowie Geranylgeranylgruppen) von Isoprenoiddiphosphaten ab.^[308] Proteine mit einer C-terminalen CAAX-Sequenz (A = aliphatisch, X = Met, Ser, Phe) werden am Cysteinrest durch Protein-Farnesyltransferasen (PFTases) farnesyliert.^[314] Verschiedenartige Diphosphatfarnesylvorstufen mit nichtnatürlichen funktionellen Gruppen (z. B. Alkinen, Aziden, Ketonen) wurden synthetisiert und zur Modifizierung von Proteinen in vitro eingesetzt.^[315–319] Bei einem In-vivo-Experiment bauten Zhao et al. durch die Einführung des Azidoisoprenols **72** als metabolische Vorstufe Azide in Farnesylgruppen ein. Anschließend erfolgte eine Anreicherung mithilfe der Staudinger-Ligation, wodurch schließlich massenspektrometrisch neue farnesylierte Proteine ermittelt werden konnten. Die Autoren gaben auch an, dass diese Methode erfolgreich bei der Markierung geranylgeranylierter Proteine war.^[320] Erwähnenswert ist auch, dass einige Arbeitsgruppen die Proteinfarnesylierung als eine Methode zur enzymvermittelten ortsspezifischen



Schema 20. Nichtnatürliche Metaboliten mit bioorthogonalen funktionellen Gruppen. A) Fettsäure- und Isoprenolmetaboliten für die metabolische Markierung von Lipiden. B) Nucleinsäuremetaboliten zur Einführung von Alkinen und Aziden in RNA und DNA.

Proteinmodifizierung (Abschnitt 3.3) eingesetzt haben, wobei die konservierte Sequenz Verwendung fand, die PFTasen erkennen.^[321]

Neef und Schultz erweiterten vor kurzem die Strategie der bioorthogonalen chemischen Reporter auf die Untersuchung der Dynamik von Phospholipiden in Doppelschichten.^[322] Die Alkin-modifizierten Phosphatidsäuren **73–75** wurden synthetisiert und in Säugetierzellen eingebracht. Die *S*-Acetylthioethylgruppen erleichterten die Penetration der Zellmembran und wurden im Cytosol durch Esterasen gespalten. Das terminale, Alkin-funktionalisierte Phospholipid **73** und die nicht hydrolysierbare Version **74** wurden auf fixierten Zellen durch CuAAC mit einem Azidocumarinfarbstoff visualisiert. Das Cyclooctinlipid **75** ermöglichte die direkte Abbildung von Lipiddoppelschichten an lebenden Zellen durch kupferfreie Klickreaktionen. Diese Studie kennzeichnet die erste Integration eines Cyclooctins in ein Biomolekül für zellbasierte Untersuchungen.

5.4. Nucleinsäuren

Mit bioorthogonalen funktionellen Gruppen ausgestattete Nucleinsäuren wurden synthetisiert und für unterschiedliche Zwecke eingesetzt (Schema 20B),^[323] vor allem als Methode zur Bildgebung von Zellen, die eine DNA-Synthese und -Replikation durchlaufen.^[324] Salic und Mitchison haben beschrieben, dass 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (**76**, EdU) während der Replikation metabolisch in DNA eingebaut und später mithilfe eines Azido fluorophors durch CuAAC detektiert werden kann. Die Alkine können in lebenden Zellen nachgewiesen werden, wenn ein zellgängiger Fluorophor verwendet wird, obwohl die Lebensfähigkeit von Zellen nach der Einwirkung von Kupfer beeinträchtigt ist. Mit diesem Verfahren kann neu synthetisierte DNA schnell und mit guter

Empfindlichkeit unter milderen Bedingungen als mit der herkömmlichen Methode [mit 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) und einem entsprechenden Antikörper] visualisiert werden.^[324,325] EdU eignet sich sogar für die Visualisierung DNA synthetisierender Mäusezellen.^[324] Unlängst wurde durch Verwendung von 5-Ethynyluridin (**77**, EU) und fluoreszierenden Aziden nach einer analogen Methode die RNA-Synthese sichtbar gemacht.^[326]

Das Azidanalogon von EdU, 5-Azido-2'-desoxyuridin (**78**, AdU) wurde ebenfalls beschrieben, aber die Detektion von AdU über CuAAC hatte einen beträchtlich höheren Hintergrund als die EdU-Markierungsmethode.^[324] AdU war nicht der erste Fall, bei dem ein Azid in eine Nucleinsäure eingebaut wurde: Arylazidonucleotide waren als photovernetzende Agentien eingesetzt worden, um Wechselwirkungen zwischen DNA oder RNA und anderen Biomolekülen zu erforschen.^[327] Rajski et al. synthetisierten S-Adenosyl-L-methionin(SAM)-Derivate mit Aziden und Alkinen, um die Aktivität der DNA-Methyltransferase zu messen.^[328–330]

6. Perspektiven

Im Laufe des letzten Jahrzehnts sind die bioorthogonalen Reaktionen unentbehrlich für die chemische Biologie geworden. Sie haben neue Wege für biologische Untersuchungen geebnet und zu grundlegenden Entdeckungen auf so verschiedenen Gebieten wie der Proteinbiophysik, der Neurophysiologie, der Entwicklungs- und Stammzellenbiologie sowie der Krebserkennung geführt. Es besteht weiterhin Bedarf an zusätzlichen orthogonalen funktionellen Gruppen sowie an der Verbesserung der Kinetik und Selektivität bereits vorhandener Reaktionen. Das Durchforsten des Periodensystems und der klassischen organischen Literatur sind zwei vielversprechende Wege. Die Gruppe 15 hat sich im Hinblick auf bioorthogonale Reaktionen als besonders einträglich erwiesen, und vielleicht können die schwereren Elemente dieser Gruppe, Bismut und Antimon, ähnlich nutzbringend sein. Zudem bleiben noch neue Kombinationen von Phosphor und Schwefel zu erforschen. Pericyclische Reaktionen scheinen für biologische Anwendungen geeignet zu sein, da ihre Geschwindigkeiten in polaren Lösungsmitteln häufig zunehmen und ihre konzertierten Mechanismen kaum durch biologische Nucleophile und Elektrophile gestört werden sollten. Biologisch verträgliche Energieformen können strategisch eingesetzt werden, um ansonsten ruhende Reaktionen in lebenden Systemen zu begünstigen. Licht wurde schon genutzt,^[206] und fokussierter Ultraschall ist eine andere Energiequelle, die für bioorthogonale Chemie *in vivo* ausgeschöpft werden kann.

Der Einsatz chemischer Reporter zum Studium niedermolekularer Metaboliten ist eine andere vielversprechende Forschungsrichtung. Cofaktoren und Cholesterin scheinen erstklassige Ziele für die Anlagerung chemischer Reporter zu sein. Die Arbeitsgruppen von Burkart und Marquez haben die Strategie der bioorthogonalen chemischen Reporter schon auf die Analyse der Pantetheincofaktoren^[331] bzw. des Wirkmechanismus der Flavon-8-essigsäure^[332] ausgedehnt. Das Feld bietet noch viel Raum für die Erforschung biologi-

scher Zielstrukturen, die konventionellen Untersuchungsmethoden nicht zugänglich waren, mithilfe innovativer chemischer Reaktionen.

Wir danken J. M. Baskin, K. E. Beatty, K. W. Dehnert, J. C. Jewett und S. T. Laughlin für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Eingegangen am 18. Februar 2009,
veränderte Fassung am 21. Mai 2009

Übersetzt von Dr. Margit Knauer, Bensheim

- [1] http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/web.
- [2] G. U. Nienhaus, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9130; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8992.
- [3] A. N. Glazer, *Annu. Rev. Biochem.* **1970**, *39*, 101.
- [4] E. T. Kaiser, D. S. Lawrence, S. E. Rokita, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 565.
- [5] F. M. Veronese, G. Pasut, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 1451.
- [6] S. M. Ryan, G. Mantovani, X. X. Wang, D. M. Haddleton, D. J. Brayden, *Expert Opin. Drug Delivery* **2008**, *5*, 371.
- [7] A. M. Wu, P. D. Senter, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1137.
- [8] M. B. Francis in *Chemical Biology* (Hrsg.: S. L. Schreiber, T. Kapoor, G. Wess), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, S. 593.
- [9] S. D. Tilley, N. S. Joshi, M. B. Francis in *The Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* (Hrsg.: T. Begley), Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [10] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 1. Aufl., Academic Press, San Diego, CA, **1996**.
- [11] J. M. Antos, M. B. Francis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 253.
- [12] C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030.
- [13] J. M. McFarland, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13490.
- [14] G. J. L. Bernardes, J. M. Chalker, J. C. Errey, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5052.
- [15] A. Dondoni, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8995.
- [16] G. Triola, L. Brunsveld, H. Waldmann, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3646.
- [17] L. M. Campos, K. L. Killops, R. Sakai, J. M. J. Paulusse, D. Damiron, E. Drockenmuller, B. W. Messmore, C. J. Hawker, *Macromolecules* **2008**, *41*, 7063.
- [18] S. Wittrock, T. Becker, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5319; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5226.
- [19] P. Jonkhøj, D. Weinrich, M. Koehn, H. Engelkamp, P. C. M. Christianen, J. Kuhlmann, J. C. Maan, D. Nuesse, H. Schroeder, R. Wacker, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4493; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4421.
- [20] N. S. Joshi, L. R. Whitaker, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15942.
- [21] T. Kodadek, I. Duroux-Richard, J. C. Bonnafous, *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 210.
- [22] S. Meunier, E. Strable, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 319.
- [23] J. M. McFarland, N. S. Joshi, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7639.
- [24] D. W. Romanini, M. B. Francis, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 153.
- [25] S. D. Tilley, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1080.
- [26] J. M. Antos, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10256.
- [27] H. B. F. Dixon, *J. Protein Chem.* **1984**, *3*, 99.
- [28] C. Cennamo, B. Carafoli, E. P. Bonetti, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 3523.
- [29] H. B. F. Dixon, *Biochem. J.* **1964**, *92*, 661.
- [30] J. M. Gilmore, R. A. Scheck, A. P. Esser-Kahn, N. S. Joshi, M. B. Francis, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5433; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5307.
- [31] R. A. Scheck, M. T. Dedeo, A. T. Lavarone, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11762.
- [32] K. F. Geoghegan, J. G. Stroh, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 138.
- [33] X. F. Li, L. S. Zhang, S. E. Hall, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4069.
- [34] N. de La Figuera, S. Fiol, J. C. Fernandez, P. Forn, D. Fernandez-Fornier, F. Albericio, *Synlett* **2006**, 1903.
- [35] J. P. Tam, Q. T. Yu, Z. W. Miao, *Biopolymers* **1999**, *51*, 311.
- [36] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clarklewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776.
- [37] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, 583, 129.
- [38] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923.
- [39] J. A. Camarero, A. Shekhtman, E. A. Campbell, M. Chlenov, T. M. Gruber, D. A. Bryant, S. A. Darst, D. Cowburn, T. W. Muir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 8536.
- [40] T. Yamazaki, T. Otomo, N. Oda, Y. Kyogoku, K. Uegaki, N. Ito, Y. Ishino, H. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5591.
- [41] D. Schwarzer, P. A. Cole, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 561.
- [42] V. Muralidharan, T. W. Muir, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 429.
- [43] T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249.
- [44] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6705.
- [45] T. Ozawa, S. Nogami, M. Sato, Y. Ohya, Y. Umezawa, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5151.
- [46] C. P. Scott, E. Abel-Santos, M. Wall, D. C. Wahnnon, S. J. Benkovic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13638.
- [47] T. C. Evans, D. Martin, R. Kolly, D. Panne, L. Sun, I. Ghosh, L. X. Chen, J. Benner, X. Q. Liu, M. Q. Xu, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9091.
- [48] I. Giriat, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7180.
- [49] D. S. Y. Yeo, R. Srinivasan, M. Uttamchandani, G. Y. J. Chen, Q. Zhu, S. Q. Yao, *Chem. Commun.* **2003**, 2870.
- [50] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509.
- [51] N. C. Shaner, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 905.
- [52] J. Lippincott-Schwartz, G. H. Patterson, *Science* **2003**, *300*, 87.
- [53] N. C. Shaner, G. H. Patterson, M. W. Davidson, *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 4247.
- [54] M. Andresen, R. Schmitz-Salue, S. Jakobs, *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 5616.
- [55] B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, *281*, 269.
- [56] H. S. Cao, Y. J. Xiong, T. Wang, B. W. Chen, T. C. Squier, M. U. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8672.
- [57] S. R. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6063.
- [58] K. Stroffekova, C. Proenza, K. G. Beam, *Pfluegers Arch.* **2001**, *442*, 859.
- [59] B. A. Griffin, S. R. Adams, J. Jones, R. Y. Tsien, *Methods Enzymol.* **2000**, *327*, 565.
- [60] B. R. Martin, B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1308.
- [61] A. J. Rodriguez, S. M. Shenoy, R. H. Singer, J. Condeelis, *J. Cell Biol.* **2006**, *175*, 67.
- [62] C. Hoffmann, G. Gaietta, M. Bunemann, S. R. Adams, S. Oberdorff-Maass, B. Behr, J. P. Vilardaga, R. Y. Tsien, M. H. Eisman, M. J. Lohse, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 171.
- [63] M. J. Roberti, C. W. Bertoni, R. Klement, E. A. Jares-Erijman, T. M. Jovin, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 345.

- [64] S. Chaumont, B. S. Khakh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 12063.
- [65] N. Arhel, A. Genovesio, K. A. Kim, S. Miko, E. Perret, J. C. Olivo-Marin, S. Shorte, P. Charneau, *Nat. Methods* **2006**, 3, 817.
- [66] N. W. Luedtke, R. J. Dexter, D. B. Fried, A. Schepartz, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 779.
- [67] B. Krishnan, L. M. Gierasch, *Chem. Biol.* **2008**, 15, 1104.
- [68] G. Gaietta, T. J. Deerinck, S. R. Adams, J. Bouwer, O. Tour, D. W. Laird, G. E. Sosinsky, R. Y. Tsien, M. H. Ellisman, *Science* **2002**, 296, 503.
- [69] Y. Taguchi, Z.-D. Shi, B. Ruddy, D. W. Dorward, L. Greene, G. S. Baron, *Mol. Biol. Cell* **2008**, 20, 233.
- [70] T. L. Halo, J. Appelbaum, E. M. Hobert, D. M. Balkin, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 438.
- [71] K. K. Kim, J. O. Escobedo, N. N. St. Luce, O. Rusin, D. Wong, R. M. Strongin, *Org. Lett.* **2003**, 5, 5007.
- [72] K. Terpe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 60, 523.
- [73] E. G. Guignet, R. Hovius, H. Vogel, *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 440.
- [74] A. N. Kapanidis, Y. W. Ebright, R. H. Ebright, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12123.
- [75] S. Lata, A. Reichel, R. Brock, R. Tampe, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10205.
- [76] C. R. Goldsmith, J. Jaworski, M. Sheng, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 418.
- [77] M. Valko, H. Morris, M. T. D. Cronin, *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 1161.
- [78] C. T. Hauser, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 3693.
- [79] A. Ojida, K. Honda, D. Shinmi, S. Kiyonaka, Y. Mori, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10452.
- [80] K. Honda, S. H. Fujishima, A. Ojida, I. Hamachi, *ChemBioChem* **2007**, 8, 1370.
- [81] K. Honda, E. Nakata, A. Ojida, I. Hamachi, *Chem. Commun.* **2006**, 4024.
- [82] H. Nonaka, S. Tsukiji, A. Ojida, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 15777.
- [83] M. Nitz, K. J. Franz, R. L. Maglathlin, B. Imperiali, *ChemBioChem* **2003**, 4, 272.
- [84] L. L. Martin, B. R. Sculimbrene, M. Nitz, B. Imperiali, *QSAR Comb. Sci.* **2005**, 24, 1149.
- [85] K. J. Franz, M. Nitz, B. Imperiali, *ChemBioChem* **2003**, 4, 265.
- [86] B. R. Sculimbrene, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 7346.
- [87] S. P. Fricker, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 524.
- [88] I. Chen, A. Y. Ting, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, 16, 35.
- [89] T. L. Foley, M. D. Burkart, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, 11, 12.
- [90] I. Chen, M. Howarth, W. Y. Lin, A. Y. Ting, *Nat. Methods* **2005**, 2, 99.
- [91] M. Howarth, K. Takao, Y. Hayashi, A. Y. Ting, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 7583.
- [92] S. A. Slavoff, I. Chen, Y. A. Choi, A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 1160.
- [93] C. W. Lin, A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4542.
- [94] H. Sato, M. Ikeda, K. Suzuki, K. Hirayama, *Biochemistry* **1996**, 35, 13072.
- [95] A. Dutton, S. J. Singer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, 72, 2568.
- [96] M. Fernandez-Suarez, H. Baruah, L. Martinez-Hernandez, K. T. Xie, J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, A. Y. Ting, *Nat. Biotechnol.* **2007**, 25, 1483.
- [97] H. Baruah, S. Puthenveetil, Y. A. Choi, S. Shah, A. Y. Ting, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 7126; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 7018.
- [98] T. Dierks, B. Schmidt, L. V. Borissenko, J. H. Peng, A. Preusser, M. Mariappan, K. von Figura, *Cell* **2003**, 113, 435.
- [99] B. L. Carlson, E. R. Ballister, E. Skordalakes, D. S. King, M. A. Breidenbach, S. A. Gilmore, J. M. Berger, C. R. Bertozzi, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 20117.
- [100] I. S. Carrico, B. L. Carlson, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 321.
- [101] T. Dierks, M. R. Lecca, P. Schlotterhose, B. Schmidt, K. von Figura, *EMBO J.* **1999**, 18, 2084.
- [102] J. S. Rush, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 12240.
- [103] P. Wu, W. Shui, B. L. Carlson, N. Hu, D. Rabuka, J. Lee, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 3000.
- [104] S. K. Mazmanian, G. Liu, T. T. Hung, O. Schneewind, *Science* **1999**, 285, 760.
- [105] L. A. Marraffini, A. C. DeDent, O. Schneewind, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, 70, 192.
- [106] S. Samantaray, U. Marathe, S. Dasgupta, V. K. Nandicoori, R. P. Roy, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 2132.
- [107] H. Y. Mao, S. A. Hart, A. Schink, B. A. Pollok, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2670.
- [108] M. W. Popp, J. M. Antos, G. M. Grotenbreg, E. Spooner, H. L. Ploegh, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 707.
- [109] T. Tanaka, T. Yamamoto, S. Tsukiji, T. Nagamune, *ChemBioChem* **2008**, 9, 802.
- [110] N. Johnsson, N. George, K. Johnsson, *ChemBioChem* **2005**, 6, 47.
- [111] A. K. Joshi, L. Zhang, V. S. Rangan, S. Smith, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 33142.
- [112] J. Yin, F. Liu, X. H. Li, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7754.
- [113] N. George, H. Pick, H. Vogel, N. Johnsson, K. Johnsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8896.
- [114] J. Yin, A. J. Lin, P. D. Buckett, M. Wessling-Resnick, D. E. Golan, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2005**, 12, 999.
- [115] L. Vivero-Pol, N. George, H. Krumm, K. Johnsson, N. Johnsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12770.
- [116] J. Yin, P. D. Straight, S. M. McLoughlin, Z. Zhou, A. J. Lin, D. E. Golan, N. L. Kelleher, R. Kolter, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 15815.
- [117] Z. Zhou, P. Cironi, A. J. Lin, Y. Q. Xu, S. Hrvatin, D. E. Golan, P. A. Silver, C. T. Walsh, J. Yin, *ACS Chem. Biol.* **2007**, 2, 337.
- [118] A. E. Pegg, *Mutat. Res.* **2000**, 462, 83.
- [119] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 86.
- [120] A. Keppler, H. Pick, C. Arrivoli, H. Vogel, K. Johnsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 9955.
- [121] A. Gautier, A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Correa, M. Kindermann, F. Beaufils, K. Johnsson, *Chem. Biol.* **2008**, 15, 128.
- [122] G. V. Los, C. Zimprich, M. G. McDougall, N. Karassina, R. Learish, D. H. Klaubert, A. Darzins, R. F. Bulleit, K. Wood, *J. Neurochem.* **2005**, 94, 15.
- [123] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1, 13.
- [124] E. W. Voss, *J. Mol. Recognit.* **1993**, 6, 51.
- [125] N. J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, Benjamin-Cummings, Menlo Park, CA, **1978**.
- [126] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 13518.
- [127] S. S. van Berkel, A. T. J. Dirks, M. F. Debets, F. L. van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, F. P. J. T. Rutjes, *ChemBioChem* **2007**, 8, 1504.
- [128] W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 475.
- [129] V. W. Cornish, K. M. Hahn, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8150.
- [130] K. Rose, J. Vizzavona, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7034.
- [131] D. J. Oshannessy, M. J. Dobersen, R. H. Quarles, *Immunol. Lett.* **1984**, 8, 273.
- [132] Z. W. Zhang, B. A. C. Smith, L. Wang, A. Brock, C. Cho, P. G. Schultz, *Biochemistry* **2003**, 42, 6735.

- [133] L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, 276, 1125.
- [134] H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1242.
- [135] Y. Zeng, T. N. C. Ramya, A. Dirksen, P. E. Dawson, J. C. Paulson, *Nat. Methods* **2009**, 6, 207.
- [136] A. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 7743; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7581.
- [137] R. J. Griffin, *Prog. Med. Chem.* **1994**, 31, 121.
- [138] S. B. Hendricks, L. Pauling, *J. Am. Chem. Soc.* **1925**, 47, 2904.
- [139] N. V. Sidgwick, L. E. Sutton, W. Thomas, *J. Chem. Soc.* **1933**, 406.
- [140] I. E. Knaggs, *Nature* **1935**, 135, 268.
- [141] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, 287, 2007.
- [142] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, 2, 635.
- [143] I. L. Cartwright, D. W. Hutchinson, V. W. Armstrong, *Nucleic Acids Res.* **1976**, 3, 2331.
- [144] J. V. Staros, H. Bayley, D. N. Standring, J. R. Knowles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, 80, 568.
- [145] J. E. Reardon, R. C. Crouch, L. St. John Williams, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 15999.
- [146] A. L. Handlon, N. J. Oppenheimer, *Pharm. Res.* **1988**, 5, 297.
- [147] E. Saxon, S. J. Luchansky, H. C. Hang, C. Yu, S. C. Lee, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14893.
- [148] J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2648.
- [149] O. Dmitrenko, C. Thorpe, R. D. Bach, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 8298.
- [150] R. E. Humphrey, A. L. McCrary, R. M. Webb, *Talanta* **1965**, 12, 727.
- [151] G. A. Lemieux, C. L. de Graffenried, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4708.
- [152] M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 2428; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2394.
- [153] M. B. Soellner, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 8820.
- [154] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, 2, 1939.
- [155] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2001**, 3, 9.
- [156] M. B. Soellner, A. Tam, R. T. Raines, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 9824.
- [157] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2141.
- [158] A. Tam, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 1173.
- [159] A. Tam, R. T. Raines, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 1055.
- [160] J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, 430, 873.
- [161] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. Van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2686.
- [162] C. R. Bertozzi, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [163] A. Michael, *J. Prakt. Chem.* **1893**, 48, 94.
- [164] R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, 75, 604; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, 2, 565.
- [165] L. W. Hartzel, F. R. Benson, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 667.
- [166] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 210.
- [167] A. Padwa, *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, Vol. 1*, 1. Aufl., Wiley-Interscience Publication, New York, **1984**.
- [168] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596.
- [169] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057.
- [170] V. O. Rodionov, S. I. Presolski, D. D. Diaz, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 12705.
- [171] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, 6, 2853.
- [172] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2056; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004.
- [173] J. F. Lutz, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 1036; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1018.
- [174] Siehe gesamtes Heft: K. B. Sharpless, E. van der Eycken, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, 26, 1110.
- [175] P. Wu, V. V. Fokin, *Aldrichimica Acta* **2007**, 40, 7.
- [176] G. C. Tron, T. Pirali, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Sorba, A. A. Genazzani, *Med. Res. Rev.* **2008**, 28, 278.
- [177] V. V. Fokin, *ACS Chem. Biol.* **2007**, 2, 775.
- [178] D. Fournier, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1369.
- [179] V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 51.
- [180] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today* **2003**, 8, 1128.
- [181] R. Breinbauer, M. Kohn, *ChemBioChem* **2003**, 4, 1147.
- [182] A. Dondoni, *Chem. Asian J.* **2007**, 2, 700.
- [183] L. Zhang, X. G. Chen, P. Xue, H. H. Y. Sun, I. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, G. C. Jia, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15998.
- [184] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3192.
- [185] F. Wolbers, P. ter Braak, S. Le Gac, R. Luttge, H. Andersson, I. Vermes, A. van den Berg, *Electrophoresis* **2006**, 27, 5073.
- [186] A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11164.
- [187] A. J. Link, M. K. S. Vink, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10598.
- [188] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4686.
- [189] K. Alder, G. Stein, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1933**, 501, 1.
- [190] K. Alder, G. Stein, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1931**, 485, 211.
- [191] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, 94, 3260.
- [192] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046.
- [193] J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 11486.
- [194] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, 1, 644.
- [195] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 16793.
- [196] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2008**, 10, 3097.
- [197] S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, 320, 664.
- [198] X. H. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G. J. Boons, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 2285; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2253.
- [199] D. H. Ess, G. O. Jones, K. N. Houk, *Org. Lett.* **2008**, 10, 1633; F. Schoenebeck, D. H. Ess, G. O. Jones, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 8121.
- [200] S. S. van Berkel, A. J. Dirks, S. A. Meeuwissen, D. L. L. Pingen, O. C. Boerman, P. Laverman, F. L. van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, F. P. J. T. Rutjes, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1805.
- [201] N. K. Devarah, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 2297.
- [202] A. D. de Araujo, J. M. Palomo, J. Cramer, O. Seitz, K. Alexandrov, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 6095.
- [203] A. D. de Araujo, J. M. Palomo, J. Cramer, M. Kohn, H. Schroder, R. Wacker, C. Niemeyer, K. Alexandrov, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 302; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 296.
- [204] X. L. Sun, L. C. Yang, E. L. Chaikof, *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 2510.
- [205] V. Steven, D. Graham, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 3781.
- [206] W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 2874; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2832.

- [207] Y. Wang, W. J. Hu, W. Song, R. K. V. Lim, Q. Lin, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3752.
- [208] W. Song, Y. Wang, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9654.
- [209] S. J. Miller, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5855.
- [210] T. D. Clark, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12364.
- [211] H. E. Blackwell, R. H. Grubbs, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3469; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3281.
- [212] H. D. Maynard, S. Y. Okada, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1275.
- [213] S. H. Hong, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3508.
- [214] J. P. Jordan, R. H. Grubbs, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5244; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5152.
- [215] J. B. Binder, J. J. Blank, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4885.
- [216] L. Gulajski, A. Michrowska, J. Naroznik, Z. Kaczmarzka, L. Rupnicki, K. Grela, *ChemSusChem* **2008**, *1*, 103.
- [217] Y. A. Lin, J. M. Chalker, N. Floyd, G. J. L. Bernardes, B. G. I. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9642.
- [218] A. J. Link, M. L. Mock, D. A. Tirrell, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 603.
- [219] N. Budisa, *Engineering the Genetic Code: Expanding the Amino Acid Repertoire for the Design of Novel Proteins*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [220] T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 147.
- [221] N. Budisa, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6586; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6426.
- [222] D. B. Cowie, G. N. Cohen, *Biochim. Biophys. Acta* **1957**, *26*, 252.
- [223] J. C. M. van Hest, K. L. Kiick, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1282.
- [224] K. E. Beatty, F. Xie, Q. Wang, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14150.
- [225] K. E. Beatty, J. C. Liu, F. Xie, D. C. Dieterich, E. M. Schuman, Q. Wang, D. A. Tirrell, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7524; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7364.
- [226] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 19.
- [227] A. J. Link, M. K. S. Vink, N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, D. A. Tirrell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 10180.
- [228] D. C. Dieterich, A. J. Link, J. Graumann, D. A. Tirrell, E. M. Schuman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 9482.
- [229] K. E. Beatty, D. A. Tirrell, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *18*, 5995.
- [230] E. Strable, D. E. Prasuhn, A. K. Udit, S. Brown, A. J. Link, J. T. Ngo, G. Lander, J. Quispe, C. S. Potter, B. Carragher, D. A. Tirrell, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 866.
- [231] P. Kast, H. Hennecke, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 99.
- [232] M. Ibba, P. Kast, H. Hennecke, *Biochemistry* **1994**, *33*, 7107.
- [233] S. Kothakota, T. L. Mason, D. A. Tirrell, M. J. Fournier, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 536.
- [234] D. Datta, P. Wang, I. S. Carrico, S. L. Mayo, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5652.
- [235] N. Sharma, R. Furter, P. Kast, D. A. Tirrell, *FEBS Lett.* **2000**, *467*, 37.
- [236] K. Kirshenbaum, I. S. Carrico, D. A. Tirrell, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 235.
- [237] K. Kodama, S. Fukuzawa, H. Nakayama, T. Kigawa, K. Sakamoto, T. Yabuki, N. Matsuda, M. Shirouzu, K. Takio, K. Tachibana, S. Yokoyama, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 134.
- [238] K. Kodama, S. Fukuzawa, H. Nakayama, K. Sakamoto, T. Kigawa, T. Yabuki, N. Matsuda, M. Shirouzu, K. Takio, S. Yokoyama, K. Tachibana, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 232.
- [239] C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Science* **1989**, *244*, 182.
- [240] J. D. Bain, C. G. Glabe, T. a. Dix, a. R. Chamberlin, E. S. Diala, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8013.
- [241] L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 34; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 34.
- [242] J. Ellman, D. Mendel, S. Anthony-Cahill, C. J. Noren, P. G. Schultz, *Methods Enzymol.* **1991**, *202*, 301.
- [243] J. A. Ellman, D. Mendel, P. G. Schultz, *Science* **1992**, *255*, 197.
- [244] J. T. Koh, V. W. Cornish, P. G. Schultz, *Biochemistry* **1997**, *36*, 11314.
- [245] E. Chapman, J. S. Thorson, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7151.
- [246] A. Y. Ting, I. Shin, C. Lucero, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7135.
- [247] D. A. Dougherty, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1642.
- [248] D. A. Dougherty, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 645.
- [249] R. A. Mehl, J. C. Anderson, S. W. Santoro, L. Wang, A. B. Martin, D. S. King, D. M. Horn, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 935.
- [250] J. W. Chin, T. A. Cropp, J. C. Anderson, M. Mukherji, Z. W. Zhang, P. G. Schultz, *Science* **2003**, *301*, 964.
- [251] T. S. Young, I. Ahmad, A. Brock, P. G. Schultz, *Biochemistry* **2009**, *48*, 2643.
- [252] W. S. Liu, A. Brock, S. Chen, S. B. Chen, P. G. Schultz, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 239.
- [253] C. Kohrer, L. Xie, S. Kellerer, U. Varshney, U. L. RajBhandary, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 14310.
- [254] S. X. Ye, C. Kohrer, T. Huber, M. Kazmi, P. Sachdev, E. C. Y. Yan, A. Bhagat, U. L. RajBhandary, T. P. Sakmar, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 1525.
- [255] J. W. Chin, S. W. Santoro, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9026.
- [256] A. Deiters, P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1521.
- [257] L. Wang, Z. W. Zhang, A. Brock, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 56.
- [258] Z. W. Zhang, L. Wang, A. Brock, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2964; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2840.
- [259] S. W. Santoro, L. Wang, B. Herberich, D. S. King, P. G. Schultz, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1044.
- [260] Z. M. Carrico, D. W. Romanini, R. A. Mehl, M. B. Francis, *Chem. Commun.* **2008**, 1205.
- [261] L. Wang, J. M. Xie, A. A. Deniz, P. G. Schultz, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 174.
- [262] E. Brustad, M. L. Bushey, J. W. Lee, D. Groff, W. Liu, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8344; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8220.
- [263] J. W. Chin, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11020.
- [264] M. Bose, D. Groff, J. M. Xie, E. Brustad, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 388.
- [265] Z. W. Zhang, J. Gildersleeve, Y. Y. Yang, R. Xu, J. A. Loo, S. Uryu, C. H. Wong, P. G. Schultz, *Science* **2004**, *303*, 371.
- [266] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1436.
- [267] E. A. Lemke, D. Summerer, B. H. Geierstanger, S. M. Brittain, P. G. Schultz, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 769.
- [268] N. Wu, A. Deiters, T. A. Cropp, D. King, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14306.
- [269] A. Deiters, D. Groff, Y. H. Ryu, J. M. Xie, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2794; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2728.
- [270] D. Summerer, S. Chen, N. Wu, A. Deiters, J. W. Chin, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 9785.
- [271] J. Y. Wang, J. M. Xie, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8738.
- [272] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 41.
- [273] M. Uttamchandani, J. Q. Li, H. Sun, S. Q. Yao, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 667.
- [274] M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279.
- [275] H. Ova, P. F. van Swieten, B. M. Kessler, M. A. Leeuwenburgh, E. Fiebig, A. M. C. H. van den Nieuwendijk, P. J. Ga-

- lardy, G. A. van der Marel, H. L. Ploegh, H. S. Overkleeft, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3754; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3626.
- [276] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535.
- [277] A. T. Wright, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 1043.
- [278] H. C. Hang, J. Loureiro, E. Spooner, A. W. M. van der Velden, Y. M. Kim, A. M. Pollington, R. Maehr, M. N. Starnbach, H. L. Ploegh, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 713.
- [279] O. T. Keppler, R. Horstkorte, M. Pawlita, C. Schmidts, W. Reutter, *Glycobiology* **2001**, *11*, 11R.
- [280] H. Kayser, R. Zeitler, C. Kannicht, D. Grunow, R. Nuck, W. Reutter, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16934.
- [281] O. T. Keppler, P. Stehling, M. Herrmann, H. Kayser, D. Grunow, W. Reutter, M. Pawlita, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1308.
- [282] M. Herrmann, C. W. von der Lieth, P. Stehling, W. Reutter, M. Pawlita, *J. Virol.* **1997**, *71*, 5922.
- [283] C. Schmidt, P. Stehling, J. Schnitzer, W. Reutter, R. Horstkorte, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 19146.
- [284] L. K. Mahal, N. W. Charter, K. Angata, M. Fukuda, D. E. Koshland, C. R. Bertozzi, *Science* **2001**, *294*, 380.
- [285] K. J. Yarema, L. K. Mahal, R. E. Bruehl, E. C. Rodriguez, C. R. Bertozzi, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31168.
- [286] C. L. Jacobs, S. Goon, K. J. Yarema, S. Hinderlich, H. C. Hang, D. H. Chai, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **2001**, *40*, 12864.
- [287] J. H. Lee, T. J. Baker, L. K. Mahal, J. Zabner, C. R. Bertozzi, D. F. Wiemer, M. J. Welsh, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 21878.
- [288] D. M. Kingsley, K. F. Kozarsky, L. Hobbie, M. Krieger, *Cell* **1986**, *44*, 749.
- [289] D. J. Vocadlo, H. C. Hang, E. J. Kim, J. A. Hanover, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9116.
- [290] H. C. Hang, C. Yu, D. L. Kato, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 14846.
- [291] S. T. Laughlin, N. J. Agard, J. M. Baskin, I. S. Carrico, P. V. Chang, A. S. Ganguli, M. J. Hangauer, A. Lo, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Methods Enzymol.* **2006**, *415*, 230.
- [292] D. H. Dube, J. A. Prescher, C. N. Quang, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 4819.
- [293] C. Oetke, R. Brossmer, L. R. Mantey, S. Hinderlich, R. Isecke, W. Reutter, O. T. Keppler, M. Pawlita, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 6688.
- [294] S. J. Luchansky, S. Goon, C. R. Bertozzi, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 371.
- [295] S. Han, B. E. Collins, P. Bengtson, J. C. Paulson, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 93.
- [296] Y. Tanaka, J. J. Kohler, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3278.
- [297] D. Rabuka, S. C. Hubbard, S. T. Laughlin, S. P. Argade, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12078.
- [298] M. Sawa, T. L. Hsu, T. Itoh, M. Sugiyama, S. R. Hanson, P. K. Vogt, C. H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 12371.
- [299] T. L. Hsu, S. R. Hanson, K. Kishikawa, S. K. Wang, M. Sawa, C. H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2614.
- [300] P. V. Chang, X. Chen, C. Smyrniotis, A. Xenakis, T. Hu, C. R. Bertozzi, P. Wu, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4090; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4030.
- [301] S. G. Sampathkumar, A. V. Li, M. B. Jones, Z. H. Sun, K. J. Yarema, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 149.
- [302] P. V. Chang, J. A. Prescher, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8400.
- [303] F. W. Shao, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2487.
- [304] A. Nandi, R. Sprung, D. K. Barma, Y. X. Zhao, S. C. Kim, J. R. Falck, Y. M. Zhao, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 452.
- [305] R. Sprung, A. Nandi, Y. Chen, S. C. Kim, D. Barma, J. R. Falck, Y. M. Zhao, *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 950.
- [306] C. Gurcel, A. S. Vercoutter-Edouart, C. Fonbonne, M. Mor-tuaire, A. Salvador, J. C. Michalski, J. Lemoine, *Anal. Biochem.* **2008**, *390*, 2089.
- [307] S. R. Hanson, T. L. Hsu, E. Weerapana, K. Kishikawa, G. M. Simon, B. F. Cravatt, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7266.
- [308] M. D. Resh, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 584.
- [309] H. C. Hang, E. J. Geutjes, G. Grotenbreg, A. M. Pollington, M. J. Bijlmakers, H. L. Ploegh, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2744.
- [310] W. P. Heal, S. R. Wickramasinghe, R. J. Leatherbarrow, E. W. Tate, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2308.
- [311] W. P. Heal, S. R. Wickramasinghe, P. W. Bowyer, A. A. Holder, D. F. Smith, R. J. Leatherbarrow, E. W. Tate, *Chem. Commun.* **2008**, 480.
- [312] D. O. Martin, G. L. Vilas, J. A. Prescher, G. Rajaiah, J. R. Falck, C. R. Bertozzi, L. G. Berthiaume, *FASEB J.* **2008**, *22*, 797.
- [313] M. A. Kostiuik, M. M. Corvi, B. O. Keller, G. Plummer, J. A. Prescher, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, G. Rajaiah, J. R. Falck, L. G. Berthiaume, *FASEB J.* **2008**, *22*, 721.
- [314] Y. Reiss, S. J. Stradley, L. M. Gierasch, M. S. Brown, J. L. Goldstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 732.
- [315] M. W. Rose, J. H. Xu, T. A. Kale, G. O'Doherty, G. Barany, M. D. Distefano, *Biopolymers* **2005**, *80*, 164.
- [316] G. R. Labadie, R. Viswanathan, C. D. Poulter, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9291.
- [317] J. H. Xu, A. J. DeGraw, B. P. Duckworth, S. Lenevich, C. M. Tann, E. C. Jensen, S. J. Gruber, G. Barany, M. D. Distefano, *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *68*, 85.
- [318] C. Gauchet, G. R. Labadie, C. D. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9274.
- [319] U. T. T. Nguyen, J. Cramer, J. Gomis, R. Reents, M. Gutierrez-Rodriguez, R. S. Goody, K. Alexandrov, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 408.
- [320] Y. Kho, S. C. Kim, C. Jiang, D. Barma, S. W. Kwon, J. K. Cheng, J. Jaunbergs, C. Weinbaum, F. Tamanoi, J. Falck, Y. M. Zhao, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12479.
- [321] B. P. Duckworth, Z. Y. Zhang, A. Hosokawa, M. D. Distefano, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 98.
- [322] A. B. Neef, C. Schultz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1526; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1498.
- [323] P. M. E. Gramlich, S. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8478; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350.
- [324] A. Salic, T. J. Mitchison, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2415.
- [325] H. G. Gratzner, *Science* **1982**, *218*, 474.
- [326] C. Y. Jao, A. Salic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15779.
- [327] L. A. Sylvers, J. Wower, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 411.
- [328] L. R. Comstock, S. R. Rajski, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 1644.
- [329] R. L. Weller, S. R. Rajski, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2141.
- [330] L. R. Comstock, S. R. Rajski, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1425.
- [331] J. L. Meier, A. C. Mercer, H. Rivera, M. D. Burkart, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12174.
- [332] K. Malolanarasimhan, C. C. Lai, J. A. Kelly, L. Iaccarino, D. Reynolds, H. A. Young, V. E. Marquez, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2717.
- [333] S. C. R. Lummis, D. L. Beene, L. W. Lee, H. A. Lester, R. W. Broadhurst, D. A. Dougherty, *Nature* **2005**, *438*, 248; X. Xiu, N. L. Puskar, J. A. P. Shanata, H. A. Lester, D. A. Dougherty, *Nature* **2009**, *458*, 534.