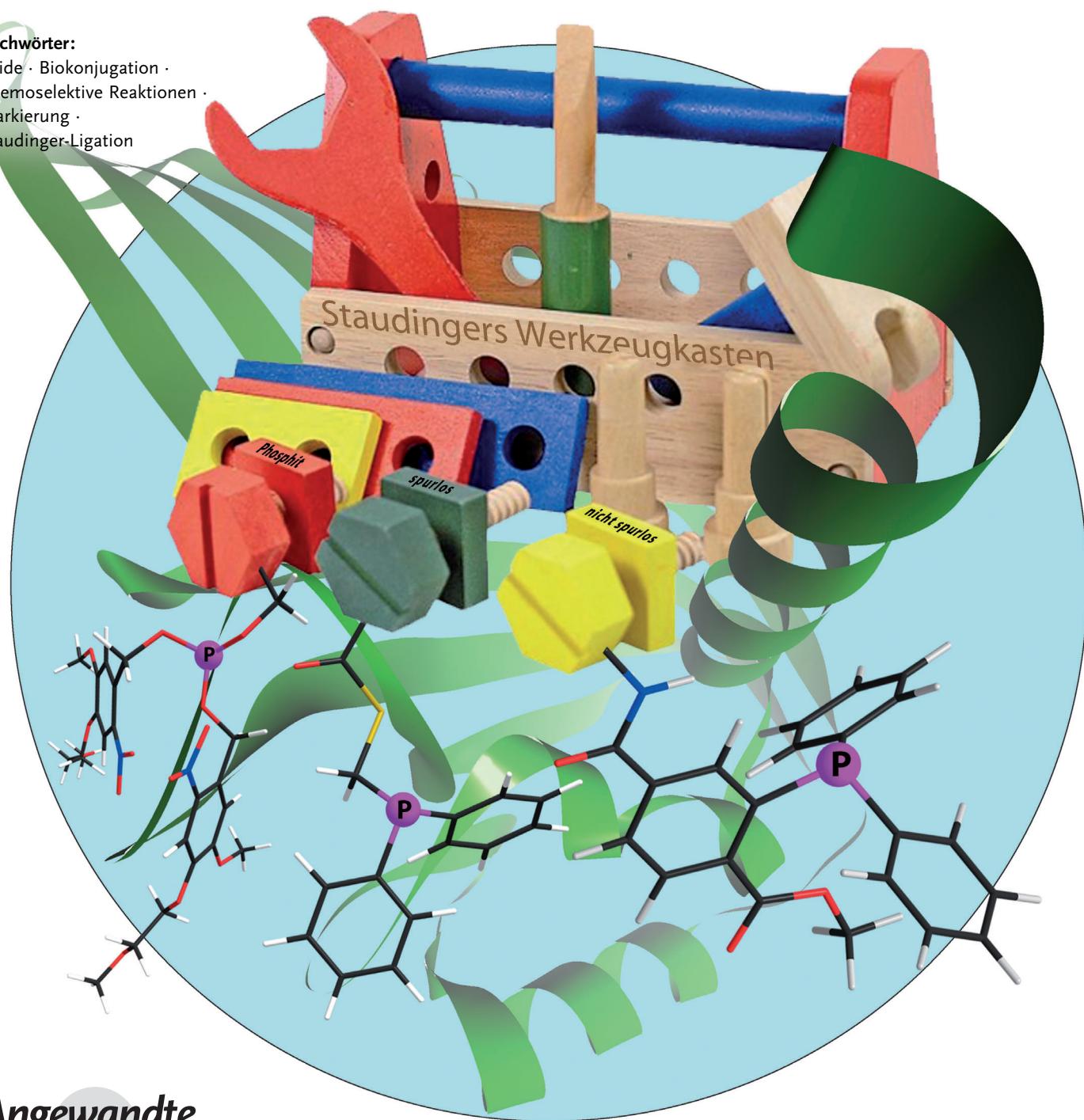


Staudinger-Ligation als Methode zur Biokonjugation

Sander S. van Berkel, Mark B. van Eldijk und Jan C. M. van Hest*

Stichwörter:

Azide · Biokonjugation ·
Chemoselektive Reaktionen ·
Markierung ·
Staudinger-Ligation



Der deutsche Chemiker Hermann Staudinger beschrieb 1919 als erster die Reaktion eines Azids mit einem Phosphan. Es war jedoch erst vor Kurzem, dass Bertozzi et al. das Potenzial dieser Reaktion als Biokonjugationsmethode erkannten und die so genannte Staudinger-Ligation einführten. Wegen des bioorthogonalen Charakters sowohl der Azid- als auch der Phosphan-Funktion ergaben sich für die Staudinger-Ligation zahlreiche Anwendungen in verschiedenen komplexen biologischen Systemen. Die Staudinger-Ligation wird beispielsweise zur Markierung von Glycanen, Lipiden, DNA und Proteinen genutzt. Darüber hinaus wird die Staudinger-Ligation zur Bildung von Glycopeptiden, Mikroarrays und funktionalen Biopolymeren eingesetzt. Im neu entstehenden Gebiet der bioorthogonalen Ligations-Strategien hat die Staudinger-Ligation einen hohen Standard gesetzt, mit dem die meisten neuen Methoden verglichen werden. In diesem Aufsatz werden jüngste Entwicklungen und neue Anwendungen der Staudinger-Ligation zusammengefasst.

1. Einleitung

Über die Jahre wurden mehrere Biokonjugationsmethoden zur kovalenten Bindung von Fluoreszenzsonden, Affinitätsmarkern oder Isotopenmarkierungen an unterschiedliche (Bio-)Moleküle entwickelt. Mit unterschiedlichen Kupplungsstrategien gelang es, unter physiologischen Bedingungen Biomoleküle wie Proteine, Glycane oder DNA damit auszustatten, Zelloberflächen zu markieren und Proteine zu immobilisieren. Im Allgemeinen werden gut eingeführte *In-vitro*-Biokonjugationsverfahren wie die Thiol-Maleimid- oder die Amin-aktivierte Esterkupplung verwendet, um die gewünschten Biokonjugate zu synthetisieren. *In vivo* jedoch hat eine Vielzahl verfügbarer konkurrierender Nucleophile und Elektrophile, die an Proteinen, Glycanen und Tausenden kleiner organischer Metaboliten vorhanden sind, die Verwendung solcher Techniken in komplexen biologischen Systemen erschwert. Um diese Probleme bei der *In-vivo*-Markierung zu umgehen, wurden mehrere ortsspezifische, bioorthogonale^[1] Konjugationsmethoden entwickelt.^[2,3] Die ortsspezifische Konjugation in einer natürlichen Umgebung erfordert eindeutig reagierende funktionelle Gruppen, die in biologischen Systemen nicht vorkommen. Diese spezifisch reaktiven Funktionalitäten – bioorthogonale chemische Reporter – sind nichtnatürliche, nicht störende chemische „Griffe“, die in biologischen Systemen nur durch hochselektive Reaktionen modifiziert werden können.^[4] Die am häufigsten verwendete Reportergruppe, die in mehreren bioorthogonalen Konjugationsmethoden eingesetzt wird, ist die Azidgruppe.^[5] Azide sind chemisch inert, unter physiologischen Bedingungen stabil und kommen äußerst selten in biologischen Systemen vor. Aus diesem Grund werden Azide in mehreren Biokonjugationsstrategien genutzt, einschließlich Staudinger-Ligationen,^[6] Cu¹-katalysierten Azid-Alkin-Cycloadditionen (CuAAC)^[7,8] und seit Kurzem in verschiedenen spannungskatalysierten Cycloadditionen mit beispielsweise Cyclooctinen,^[9,10] Oxanorbornadienen^[11] und Di-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	8969
2. Entwicklung der Staudinger-Ligation	8969
3. Die Staudinger-Ligation als Markierungsmethode	8972
4. Die Staudinger-Ligation als Synthesemethode	8981
5. Neue Synthesekonzepte	8985
6. Schlussfolgerungen und Ausblick	8986

benzocyclooctinen.^[12] Während Azide in den Cycloadditionsreaktionen eine stabile Triazolbindung bilden (Schema 1), führt die Reaktion eines Azids mit einem Phosphanreagens in der Staudinger-Ligation zu einer stabilen Amidbindung. Das Potenzial der Staudinger-Reaktion als chemoselektive, bioorthogonale Reaktion für die Glycobiologie wurde erstmals von Bertozzi et al. erkannt. In einer bahnbrechenden Veröffentlichung zeigten sie, dass azidmodifizierte, Glycan enthaltende Zelloberflächen mit einem fluorogenen Phosphanreagens effizient markiert werden können.^[6]

Mit der Wiederentdeckung der Staudinger-Reaktion als milde und hochselektive Methode für die Biokonjugation haben Bertozzi et al. den Weg für eine Vielzahl von Anwendungen in der chemischen Biologie geebnet. Folglich wird dieser bioorthogonale Reaktionstyp häufig als Bertozzi-Staudinger-Ligation bezeichnet.

Der Fortschritt durch die Staudinger-Ligation als chemoselektive Biokonjugationsreaktion wurde zuletzt 2004 von Köhn und Breinbauer erörtert.^[13] Mit dem rasch expandierenden Gebiet der chemischen Biologie hat jedoch die Zahl der neuen Anwendungen und Entwicklungen bei der Staudinger-Ligation beträchtlich zugenommen. Dies hat uns veranlasst, die jüngsten Weiterentwicklungen der Staudinger-Ligation (ab 2004) in diesem Aufsatz zusammenzufassen und unsere Befunde mitzuteilen. Zudem wird die Staudinger-Ligation mit anderen verfügbaren bioorthogonalen Konjugationsmethoden verglichen und ein kurzer Ausblick gegeben.

[*] Dr. S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk, Prof. Dr. J. C. M. van Hest
Department of Bioorganic Chemistry
Radboud University Nijmegen
Heyendaalseweg 135, NL-6525 AJ Nijmegen (Niederlande)
Fax: (+31) 24-365-3393
E-Mail: J.vanHest@science.ru.nl
Homepage: <http://www.ru.nl/bio-orgchem/>

reaktive Verbindung	Ligationsprodukt	Lit.
		[6]
		[24]
P(OR') ₃		[101]
R'—≡		[7]
		[10]
		[11]
		[12]

Schema 1. Übersicht über die Reaktionen, die ein Azid und einen entsprechenden Reaktanten nutzen.



Sander S. van Berkel erhielt 2003 seinen M.Sc. in organischer Chemie von der Radboud University Nijmegen (Niederlande). Unter der Anleitung von Prof. Floris Rutjes promovierte er 2008 über seine Arbeiten zu Biohybridmaterialien. Nach einem Postdoktorat am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle, wo er Naturstoffsynthese betrieb, wechselte er zurück an die Radboud University, wo er derzeit Postdoktorand in der Gruppe von Jan van Hest ist.

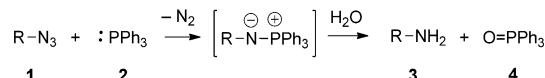


Mark B. van Eldijk erhielt 2010 seinen M.Sc. in molekularen Lebenswissenschaften von der Radboud University Nijmegen (Niederlande). Als Teil seiner M.Sc.-Studien verbrachte er Forschungsaufenthalte in bioorganischer Chemie bei Prof. Jan van Hest an der Radboud University Nijmegen und bei Prof. David Tirrell am California Institute of Technology (USA). Zurzeit promoviert er in der Gruppe von Prof. van Hest über Biopolymer-basierte, stimuliresponsive Materialien.

2. Entwicklung der Staudinger-Ligation

2.1. Staudinger-Reaktion

1919 dokumentierten Staudinger und Meyer die zwischen einem Azid (**1**) und Triphenylphosphan (**2**) ablaufende Reaktion, die unter Abgabe von Stickstoff zur Bildung eines Iminophosphoran-Intermediats führt.^[14] In Gegenwart von Wasser wird diese Zwischenstufe hydrolysiert und ergibt ein primäres Amin (**3**) und Triphenylphosphinoxid (TPPO, **4**) (Schema 2).



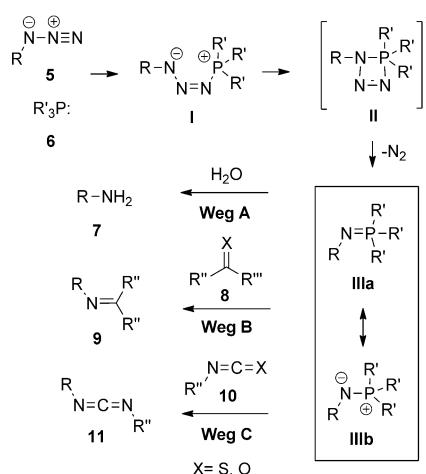
Schema 2. Klassische Staudinger-Reaktion eines Phosphans mit einem Azid.

Der Mechanismus dieser klassischen Staudinger-Reaktion wurde mit verschiedenen experimentellen^[15] sowie computerbasierte Methoden^[16,17] untersucht und verläuft über mehrere Zwischenstufen.^[18,15a] Im ersten Schritt erfolgt ein nucleophiler Angriff des Phosphoratoms von **6** auf den Azidrest in **5** unter Bildung der Phosphazid-Zwischenstufe **I** (Schema 3). Dieses Phosphazid cyclisiert anschließend intramolekular zu einem viergliedrigen Ring als Übergangszustand (d.h. intermediäre Struktur **II**), der durch Abgabe von Stickstoff die Iminophosphoran-Resonanzstrukturen **IIIa** und **IIIb** ergibt.

Die Staudinger-Reaktion kann eine Reaktion erster oder zweiter Ordnung sein, abhängig davon, ob die unimolekulare Zersetzung oder die bimolekulare Bildung des Phosphazids der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.^[15a] In Gegenwart von Wasser wird das Iminophosphoran **III** zu einem Amin **7** und dem stabilen Phosphinoxid hydrolysiert (Schema 3, Reaktionsweg A). Diese Reaktion wird als Staudinger-Reduktion bezeichnet und in der organischen Synthese routinemäßig eingesetzt, um Amine einzuführen.^[15b] Außerdem reagiert das hochnucleophile Stickstoffatom des Iminophosphorans schnell mit vielen elektrophilen Verbindungen zu nützlichen Synthese-Intermediaten. So nutzt die



Jan C. M. van Hest erhielt 1991 seinen M.Sc. in Polymerchemie von der Eindhoven University of Technology (Niederlande) und promovierte 1996 unter Anleitung von Prof. E. W. (Bert) Meijer. Als Postdoktorand untersuchte er bei Prof. David Tirrell an der University of Massachusetts in Amherst (USA) den Einbau künstlicher Aminosäuren in Proteine. Nach einer Zeit bei DSM wurde er 2000 Professor für bioorganische Chemie an der Radboud University Nijmegen (Niederlande). Er erforscht die Übertragung natürlicher Strukturkonzepte auf bioinspirierte Materialien mithilfe moderner organischer und Polymerchemie sowie Protein-Engineering.



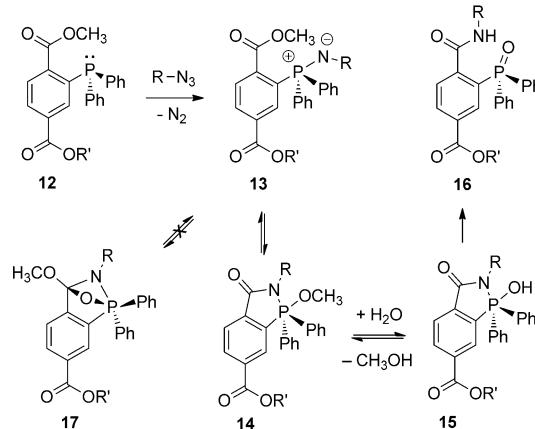
Schema 3. Mechanismus der Staudinger-Reaktion. Addition von H_2O (als Nucleophil) führt zur klassischen Staudinger-Reduktion (Weg A). Die Wahl des Elektrophils bestimmt das Produkt im Fall der Reaktionswege B und C.

Aza-Wittig-Reaktion, die zuerst von Staudinger beobachtet wurde, Iminophosphorane, um Imine herzustellen (Schema 3, Reaktionsweg B).^[19] In dieser Reaktion, die große Ähnlichkeit zur Wittig-Reaktion zeigt, wird das Iminophosphoran mit einem Aldehyd, Keton oder Thioketon **8** zu einem Iminoproduct **9** umgesetzt. Die interessantesten Anwendungen dieser Reaktion haben sich bei der Synthese acyclischer und heterocyclischer Verbindungen ergeben.^[20] Iminophosphorane können durch Umsetzung mit Iso(thio)cyanaten (**10**) auch zur Synthese von Carbodiimiden (**11**; Schema 3, Reaktionsweg C) verwendet werden.^[21]

2.2. Nichtspurlose Staudinger-Ligation

Über 80 Jahre nach Entdeckung der Staudinger-Reaktion modifizierten Bertozzi et al. diese Reaktion zu einer nützlichen Biokonjugationsmethode.^[6] Die Staudinger-Reaktion, jetzt als Staudinger-Ligation bezeichnet, wurde speziell zum Studium des metabolischen Engineerings von Zelloberflächen entwickelt. In einer früheren Arbeit hatten Mahal et al. eine chemoselektive Ligationsreaktion für das Zelloberflächen-Engineering eingeführt, die auf der Reaktion eines Ketons mit einer Aminoxy- oder Hydrazidgruppe beruhte.^[22] Diese Methode war zwar geeignet für die Markierung von Zelloberflächen, jedoch begrenzten Wechselwirkungen endogener Metaboliten, die Ketofunktionen enthalten, ihre Verwendung für die intrazelluläre Markierung. Daher wurde nach einer bioorthogonalen Ligationsmethode gesucht, deren reaktive Partner abiotisch sind und unter physiologischen Bedingungen stabile Addukte bilden. Die Staudinger-Reaktion erfüllte die meisten der Kriterien, die für eine selektive bioorthogonale Ligation erforderlich sind. Die Reaktion eines Phosphans mit einem Azid erfolgt glatt in Wasser und bei Raumtemperatur, verläuft quantitativ, und – am wichtigsten – beide Reaktanten sind abiotische bioorthogonale Reporter. Leider wird das Produkt der Staudinger-Reaktion,

das Aza-Ylid, normalerweise rasch zu einem primären Amin und dem zugehörigen Phosphanoxid hydrolysiert. Um diese Hydrolyse zu vermeiden, wurde ein Phosphanreagens mit einer intramolekularen elektrophilen Gruppe entwickelt, um das nucleophile Aza-Ylid-Intermediat durch intramolekulare Cyclisierung abzufangen (Schema 4). Dieser Cyclisierungs-



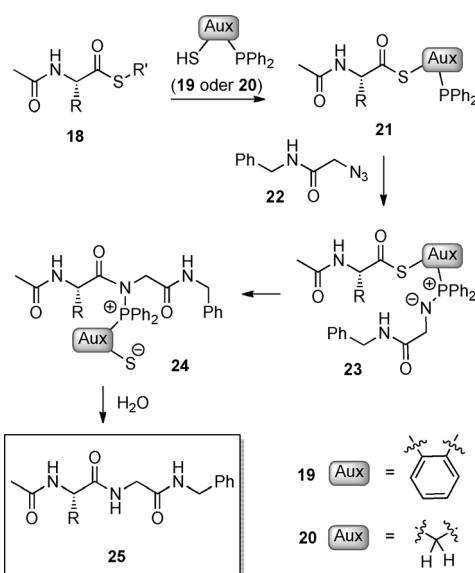
Schema 4. Mechanismus der Staudinger-Ligation.

schrift lieferte eine stabile Amidbindung (**16**) anstelle der Produkte, die durch Hydrolyse des Aza-Ylids erhalten wurden. Nach einer orientierenden, auf ^{31}P -NMR-spektroskopischen Messungen basierenden mechanistischen Studie wurde vorgeschlagen, dass die Staudinger-Ligation über eine Oxaphosphetan-Zwischenstufe **17** (Schema 4) verläuft.^[23] In einer neueren, ausführlicheren Studie wurde jedoch ein anderer Mechanismus beschrieben: Darin wurde **14** als intermediäre Struktur angenommen, die am Schlüsselschritt beteiligt ist (basierend auf ^1H -NMR-, 2D- ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie Röntgenkristallographie). Es wurde auch gezeigt, dass das Sauerstoffatom des Phosphanoxids von einem Wassermolekül stammt.^[24]

2.3. Spurlose Staudinger-Ligation

Bald nach Publikation der nichtspurlosen Staudinger-Ligation beschrieben Raines et al.^[25] und Bertozzi et al.^[26] gleichzeitig die so genannte spurlose Staudinger-Ligation. Der Unterschied zur nichtspurlosen Staudinger-Ligation besteht in der Eliminierung des Phosphanoxids vom Endprodukt im Hydrolyseschritt. Raines et al. belegten, dass die spurlose Staudinger-Ligation als Alternative zur nativen chemischen Ligation für die Kupplung zweier Peptidfragmente verwendet werden kann.^[25] In ihren Studien verwendeten sie 2-(Diphenylphosphanyl)benzathiol (**19**) und (Diphenylphosphanyl)methanthiol (**20**) als Hilfsstoffe, um eine Thioester- und eine Azidkomponente zu verknüpfen.^[25,27] Der erste Schritt dieser Reaktion ist die Thio-Umesterung des Thioesters **18** mit einem Phosphanthiol **19** oder **20**. Der aktivierte Thioester **21** reagiert anschließend mit einem Azid **22** unter Bildung eines Iminophosphorans **23**. Intramolekulare Umlagerung des Iminophosphorans führt zum Amidophos-

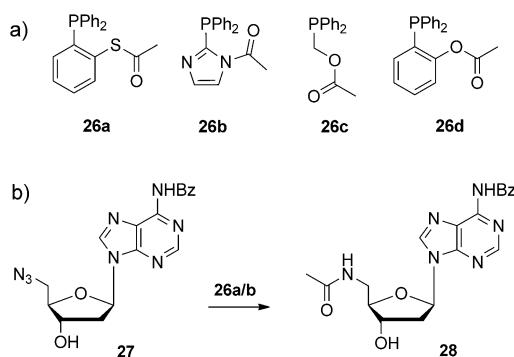
phonium-Salz **24**, das zum Amid **25** hydrolysiert wird (Schema 5).^[28] Raines et al. zeigten überdies, dass **20** wegen seiner hohen Geschwindigkeitskonstante und Chemoselektivität das wirksamste Kupplungsreagens zur Vermittlung der Staudinger-Ligation ist.



Schema 5. Spurlose Staudinger-Ligation nach Raines et al. mit den Thiol-Hilfsstoffen **19** oder **20**. Aux = Hilfsstoff.

vität das wirksamste Kupplungsreagens zur Vermittlung der Staudinger-Ligation ist.

Die von Saxon et al. beschriebene spurlose Staudinger-Methode nutzte verschiedene acylierte Phosphanverbindungen (Schema 6a), die entwickelt wurden, um über ein spaltbares Verbindungssystem eine Amidbindung zu knüpfen.^[26] Eine Strukturvoraussetzung in diesen Verbindungen war das Vorhandensein von zwei aromatischen Phosphansubstituenten, um übermäßige Phosphansoxidation zu verhindern. In einer Modellreaktion wurden die vier acylierenden Phosphanreagentien **26a-d** mit dem Azidonucleosid **27** umgesetzt (Schema 6b). **26a** und **26b** ergaben beide das gewünschte Staudinger-Ligationsprodukt **28** in guten Ausbeuten, während **26c** und **26d** nur die Aza-Ylid-Hydrolyseprodukte lieferten.



Schema 6. a) Bertozzi's spaltbare Linker-Systeme für die spurlose Staudinger-Ligation; b) spurlose Staudinger-Ligation des Azidonucleosids **27** mit den Phosphanerivaten **26a/b**. Bz = Benzoyl.

Eingehende mechanistische Untersuchungen bezüglich der spurlosen und nichtspurlosen Staudinger-Ligation haben wichtige Erkenntnisse zur Reaktionskinetik der unterschiedlichen Kupplungsreagenzien ergeben (Tabelle 1). Zum

Tabelle 1: Reaktionskinetik der Staudinger-Ligation.

Ligationstyp	Solvans	Azid	$k_{obs}^{[b]}$	Lit.
Reduktion				
PPh_3	Benzol	N_3CH_2COEt	10.0	[18]
nichtspurlos^[a]				
$Ph_2P-C_6H_4-CO-O-Me$	$CD_3CN/H_2O(5\%)$	$N_3C_6H_5$	2.0 ± 0.1	[24]
$R-C(=O)-C_6H_4-Ph_2P-CO-O-R'$	$CH_3CN/KH_2PO_4(1:1)$	$N_3C_6H_5$	3.8 ± 0.8	[49]
spurlos				
$Ph_2P-CH_2-S-CO-NH-CO-CH_2-Ph_2P$	DMF/D_2O	$N_3C_6H_5-CO-NHBn$	7.70 ± 0.30	[28]
$Ph_2P-C_6H_4-S-CO-NH-CO-Ph_2P$	DMF/D_2O	$N_3C_6H_5-CO-NHBn$	1.04 ± 0.05	[28]
$Ph_2P-CH_2-S-CO-NH-CO-Ph_2P$	DMF/D_2O	$N_3C_6H_5-CO-NHBn$	0.65 ± 0.01	[28]

[a] R und R' wie in Struktur **48** spezifiziert. [b] $(\times 10^{-3} M^{-1}s^{-1})$.

Beispiel wurden die Einflüsse des Lösungsmittels, der Azidstruktur und der Phosphansubstituenten (sterische Effekte) auf die Reaktionskinetik intensiv untersucht.^[24,28] Mithilfe von Hammett-Korrelationen wurden auch elektronische Effekte verschiedener Phosphan-Analoga auf die Geschwindigkeit der Staudinger-Ligation bestimmt.^[29] Die für die spurlose Staudinger-Ligation erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten reichten von 0.12 bis $7.7 \times 10^{-3} M^{-1}s^{-1}$ (in DMF/ D_2O 6:1), die für die nichtspurlose Staudinger-Ligation von 1.8 bis $2.2 \times 10^{-3} M^{-1}s^{-1}$ (CD_3CN/D_2O 95:5).

3. Die Staudinger-Ligation als Markierungsmethode

In der chemischen Biologie ist die Anbindung niedermolekularer Verbindungen an Biomoleküle eine der wichtigsten Strategien, um biologische Systeme zu erforschen. Die Staudinger-Ligation fand als Konjugationsstrategie breite Anwendung zur Kupplung chemischer Sonden an Biomoleküle. Die Realisierung der Staudinger-Ligation als Biokonjugationsmethode erfordert, dass einer der Reaktionspartner (Phosphan oder Azid) im Biomolekül vorhanden ist. Wegen ihrer Größe und der Stabilität unter physiologischen Bedingungen wird die Azidgruppe bezüglich der Einführung in ein Biomolekül bevorzugt. Zudem kann ein Azidrest über chemische Methoden (z. B. Diazotransfer) oder biosynthetische

Reaktionswege leicht in Glycane, Proteine, Lipide und DNA eingeführt werden. Mit der Vielzahl an geeigneten Aziden, die zur Verfügung stehen, können zahlreiche Anwendungen der Staudinger-Ligation verfolgt werden. In den folgenden Abschnitten wird die Staudinger-Ligation als Markierungsmethode für verschiedene Biomoleküle diskutiert und ihre Verwendung als Synthesemethode auf den Gebieten der Peptidchemie und Materialwissenschaften kurz zusammengefasst.

3.1. Glycanmarkierung

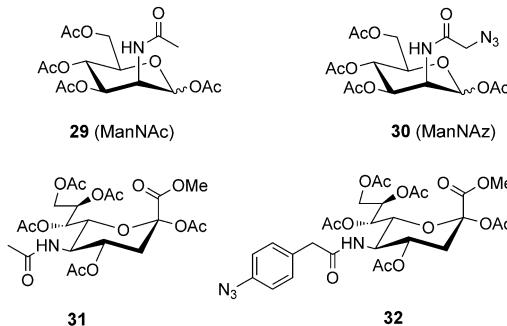
Die molekulare Bildgebung ermöglicht es, Biomoleküle in ihrer natürlichen Umgebung ohne wesentliche Störung sichtbar zu machen. Die In-vivo-Abbildung von Glycanen ist besonders interessant, da diese Biopolymere an vielen biologischen Prozessen, einschließlich Zell-Zell-Wechselwirkungen, Molekültransport, Signalübertragung und Endozytose, beteiligt sind.^[30,31] Die verfügbaren molekularbiologischen Techniken, die zum Profiling und zur Abbildung von Proteinen und DNA verwendet werden, können nicht zur Erforschung der Glycane genutzt werden, da diese nicht direkt über das Genom codiert werden. Glycane können durch Lectine und Antikörper abgebildet werden, wobei die Anwendung dieser Detektionsmethoden in vivo als Folge der geringen Affinität begrenzt ist.^[32] Eine andere Bildgebungs methode für Glycane beruht auf der Bildung von Schiff-Basen mit Aldehyden oder Ketonen. Wegen unspezifischer Bindung an endogene Metaboliten stößt auch diese Methode bei In-vivo-Anwendung auf Schwierigkeiten.^[4,22]

Einen Durchbruch bei der Glycanbildung erreichten Saxon und Bertozzi, indem sie ein Azid-modifiziertes Mannosederivat, *N*-Azidoacetylmannosamin (ManNAz, **30**; Schema 7), als bioorthogonalen chemischen Reporter einsetzen.^[6] Inkubation von Jurkat-Zellen mit Saccharid **30** führte zum Einbau dieser Verbindung in Glycane über den Sialinsäure-Biosyntheseweg (Abbildung 1).^[33] Die eingelagerten ManNAz-Einheiten wurden anschließend durch die Staudinger-Ligation mit einer Phosphan-Biotin-Sonde (**38**, Schema 8) visualisiert.

Nach Behandeln der Biotin-markierten Glycane mit Fluorescein-markiertem Avidin konnte eine Zunahme der Fluoreszenz des Biotin-Avidin-Komplexes beobachtet werden. Andere, sperrigere Analoga des *N*-Acetylmannosamins wurden nicht oder weniger effizient eingebaut. Wie sich herausstellte, war die Aufnahme im Biosyntheprozess infolge geringer Umsetzung der ManNAc-Derivate durch die ManNAc-6-Kinase behindert.^[34] Um diesen spezifischen enzymatischen Schritt zu umgehen, wurde das Sialinsäurederivat **32** eingeführt, das effizient an die Zelloberfläche transportiert wurde.^[35] In einer anschließenden Untersuchung testeten Bertozzi et al. die Staudinger-Ligation an Splenocyten von Mäusen. Injektion von Saccharid **30** in Mäuse lieferte Azid-markierte Splenocyten, die in einem zweiten Schritt (ex vivo) einer Staudinger-Ligation mit der FLAG-Verbindung **37** (dargestellt in Schema 8) unterzogen wurden. Die markierten Splenocyten wurden schließlich mit Durchflusszytometrie detektiert.^[36] Obwohl sowohl das FLAG-Phos-

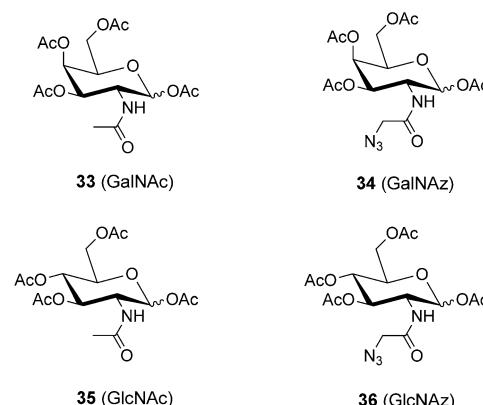
Zelloberflächenmarkierung

natürliches Monosaccharid nichtnatürliches Monosaccharid



Protein-Profilung

natürliches Monosaccharid nichtnatürliches Monosaccharid



Schema 7. Natürliche Monosaccharide und ihre Azid-funktionalisierten Analoga, die in den Glycanbiosynthesewegen akzeptiert werden.

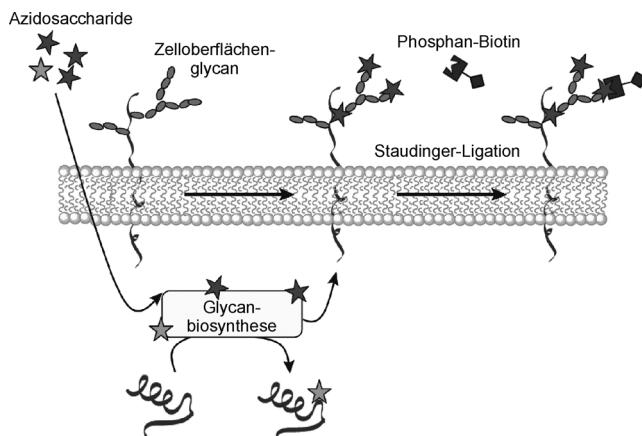
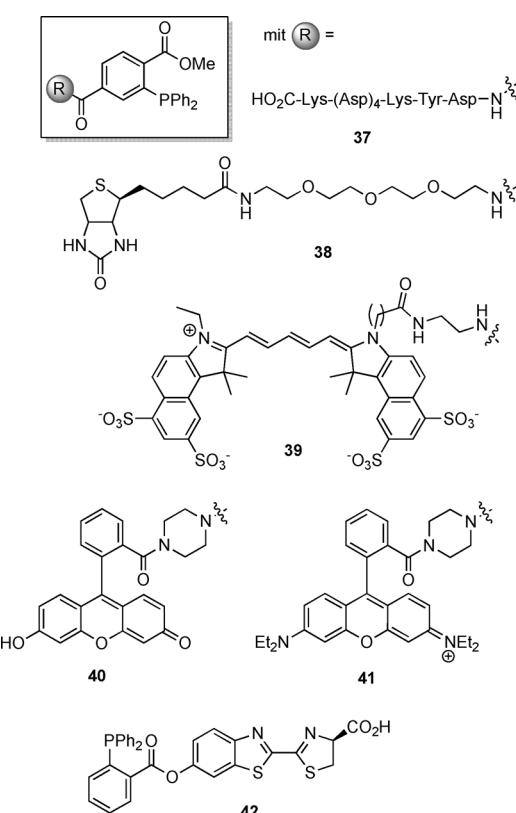


Abbildung 1. Einbau von Azidosacchariden in Glykokonjugate über Biosynthesewege. Adaptiert aus Lit. [4].

phan-Konjugat (**37**) als auch das Biotin-Phosphan-Konjugat (**38**) geeignete Sonden für die Nachverfolgung von Zelloberflächenmarkierungen oder die Analyse von Proteomen sind, kann mit diesen Konjugaten keine In-vivo-Bildgebung von Glycanen durchgeführt werden. Um die Glycanfunkti-



Schema 8. Verschiedene Triarylphosphankonjugate: FLAG- (37), Biotin- (38), Cy5.5- (39), Fluorescein- (40), Rhodamin- (41) und Luciferinkonjugat (42).

onsweise in lebenden Systemen zu visualisieren, wurden mehrere fluoreszenzmarkierte Phosphansonden entwickelt (39–42; Schema 8). Das Cy5.5-Phosphan-Konjugat (39) erwies sich sowohl dem Fluorescein-Phosphan- (40) als auch dem Rhodamin-Phosphan-Konjugat (41) überlegen, eine Folge der geringen Hintergrundfluoreszenz. Dieser Effekt wurde der höheren Ladungsdichte und damit besseren Löslichkeit zugeschrieben, die eine effizientere Entfernung von überschüssigem Phosphankonjugat ermöglicht.^[37]

Neben der Visualisierung von Glycanen mit Azidozuckern als metabolischen Markern und Phosphan-modifizierten Fluoreszenzsonden verwendete die Arbeitsgruppe von Bertozzi ein Luciferin-Phosphan-Konjugat 42 zum Nachweis von Glycanen der Zelloberfläche durch Biolumineszenz.^[38] Nach Staudinger-Ligation des Luciferin-Phosphan-Konjugats mit Azid-haltigen Glycanen diffundiert freigesetztes Luciferin in die Zelle, wo es durch die Luciferase in biolumineszierendes Oxyluciferin umgewandelt wird.

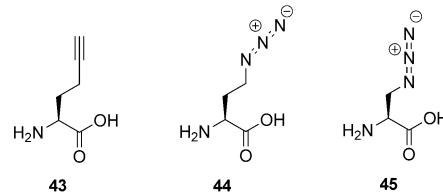
3.2. Proteinmarkierung

Zur Proteinmarkierung mithilfe der Staudinger-Ligation muss das Protein spezifisch mit einer Phosphan- oder Azid-markierung funktionalisiert werden. Da der Phosphanrest in wässrigen Lösungen in hohem Ausmaß oxidiert wird, bevorzugt man dafür das Azid. Ein Azid kann in ein Protein chemisch über einen Diazotransfer^[39] oder biochemisch einge-

führt werden, entweder durch Verwendung der Gentechnik, um Azid-haltige Aminosäuren in Proteine einzubauen,^[40] oder durch posttranskriptionale Modifizierungen. Das letztere Konzept nutzten die Arbeitsgruppen von Tirrell und Bertozzi in einer gemeinsamen Arbeit.^[41]

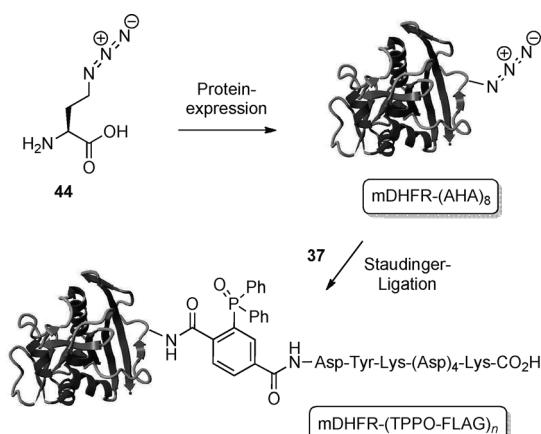
3.2.1. Nichtnatürliche Aminosäuren

Aminosäureanaloga können in vitro (d.h. in *E. coli*-, Hefe- und Säugetierzellen) durch den Translationsapparat der Zelle entweder ortsspezifisch oder restspezifisch in Proteine eingebaut werden. Dieser Einbau wird durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (aaRS), die für die Kupplung von Aminosäuren an tRNAs verantwortlich sind, strengstens kontrolliert. Zum Beispiel können Strukturanaloga von Methionin, dargestellt in Schema 9, durch die Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS) restspezifisch in Proteine eingeführt werden.



Schema 9. Methioninanaloge 43–45 für den Einbau durch MetRS.

Die Expression von Proteinen mit nichtnatürlichen Aminosäuren in einem Methionin-auxotrophen Stamm von *E. coli*^[42] wurde von Bertozzi, Tirrell und Mitarbeitern elegant umgesetzt. Der In-vitro-Einbau Azid-haltiger Methioninanaloge wurde für die beiden Azid-funktionalisierten Aminosäuren Azidohomoalanin 44 (AHA) und Azidoalanin 45 (AAL) nachgewiesen. Diese beiden nichtproteinogenen Aminosäuren wurden als Substrate für MetRS getestet. Anschließend wurde die Biosynthese von Murindihydrofolat-Reduktase (mDHFR) in Methionin-auxotrophen *E. coli* in einem Methionin-armen Medium, das mit den nichtnatürlichen Aminosäuren 44 oder 45 angereichert war, untersucht. Die Ergebnisse der beiden Ansätze zeigten, dass 44 ein hervorragender Ersatz für Methionin ist, da 95 % der Methioninreste durch AHA ausgetauscht wurden. Die Aufnahme von AHA in mDHFR ergab mDHFR-(AHA)₈. Die Reaktivität der Azide in mDHFR-(AHA)₈ wurde durch Staudinger-Ligation mit dem Triarylphosphan-FLAG-Konjugat 37 erforscht (Schema 10). Die Produkte der Staudinger-Ligation wurden mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließendem Western-Blot mit Anti-FLAG-Antikörpern analysiert. Es zeigte sich, dass durchschnittlich fünf der acht Azide in mDHFR-(AHA)₈ mit dem FLAG-Phosphan 37 reagiert hatten. Die unvollständige Modifizierung der acht Stellen in mDHFR-(AHA)₈ wurde auf eine Reduktion der Azide zurückgeführt.^[41] In einem ergänzenden Experiment wurde die Staudinger-Ligation am rohen Zell-Lysat durchgeführt. Auch hier verlief die Staudinger-Ligation erfolgreich, was darauf schließen lässt, dass

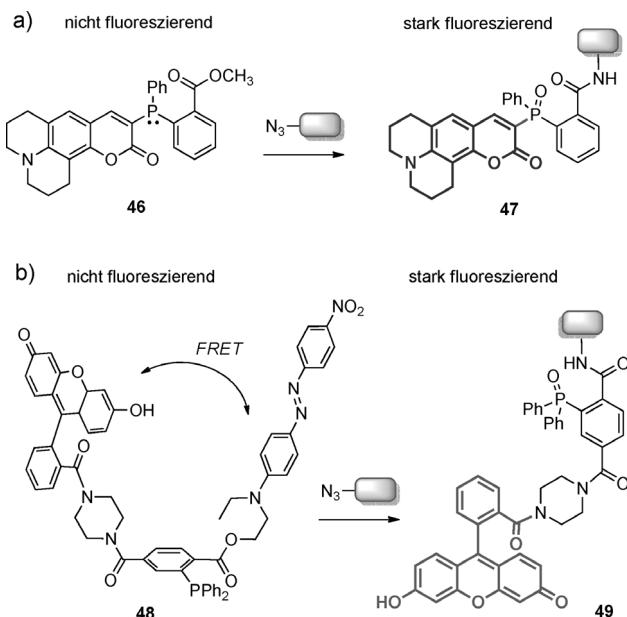


Schema 10. Einlagerung von Azidohomoalanin (**44**) in mDHFR unter Bildung von mDHFR-(AHA)₈ und anschließende Staudinger-Ligation mit Triarylphosphan-FLAG-Konjugat **37** ($n \leq 5$).

diese Ligationsmethode sogar für intrazelluläre Markierungszwecke genutzt werden kann.

Ein ortsspezifischer Einbau Azid-haltiger Aminosäuren kann mit der von Schultz et al. entwickelten Strategie erreicht werden.^[43] Diese Methode beruht auf der Bildung eines einzigartigen Codon-tRNA-Paares und der entsprechenden Aminoacyl-tRNA-Synthetase. Zunächst wird eine orthogonale tRNA synthetisiert, die durch keine natürliche Aminoacyl-Synthetase erkannt wird. Folglich wird nur ihre verwandte Aminosäure als Antwort auf das Amber-Nonsense-Codon inseriert. Als nächstes wird eine Synthetase gebildet, die diese einzigartige tRNA spezifisch erkennt. Die Substratspezifität dieser Synthetase wird anschließend so entwickelt, dass sie nur die gewünschte nichtnatürliche Aminosäure und keine endogene Aminosäure erkennt. Diese Methode kann eingesetzt werden, um mithilfe von *E. coli*, Hefe oder Säugetierzellen eine Vielzahl nichtnatürlicher Aminosäuren effizient in Proteine einzubauen.^[44] Die Einführung Azid-haltiger Aminosäuren auf diesem Weg, mit anschließender Staudinger-Ligation, wurde von verschiedenen Forschergruppen erfolgreich durchgeführt.^[45,46] Ein elegantes Beispiel beschrieben Yokoyama et al., die das Amber-Stopp-Codon verwendeten, um *p*-Azido-L-phenylalanin einzuführen. Nach Einbau der nichtnatürlichen Aminosäure gelang die Modifizierung der Azideinheit durch Staudinger-Ligation.^[47]

Die Staudinger-Ligation, wie oben beschrieben, erfordert ein zweistufiges Verfahren zur Visualisierung der Zielverbindung. Durch die Entwicklung einer Staudinger-Sonde mit fluorogenem Cumarinrest (**46**) konnte dieser Prozess zu einem einstufigen Verfahren vereinfacht werden.^[48] Vor der Ligation ist der Cumarin-Phosphan-Farbstoff nichtfluoreszierend, da der angeregte Zustand des Fluorophors durch das freie Elektronenpaar am Phosphoratom gelöscht wird (Schema 11a). Durch Reaktion mit einem Azid wird das Phosphoratom oxidiert und damit die Fluoreszenzmarkierung aktiviert (Struktur **47**). Diese Methode wurde durch Ligation der Sonde **46** mit einem Azidmodell und anschließend mit mDHFR-(AHA)₈ evaluiert. Markierungsexperimente zeigten, dass durch Oxidation des Phosphans die



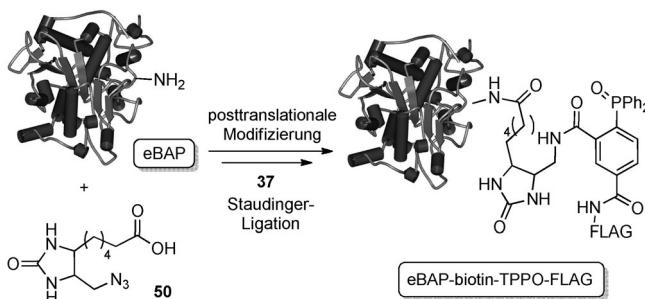
Schema 11. Darstellung der fluorogenen Phosphanfarbstoffe **46** und **48**, die durch die Staudinger-Ligation aktiviert werden. a) Löschen des fluorogenen Phosphanfarbstoffs **46** durch ein freies Elektronenpaar; b) FRET-basierte Löschung des fluorogenen Phosphanfarbstoffs **48**; FRET = resonanter Fluoreszenzenergietransfer.

Fluoreszenz auf das 60fache erhöht wird. Die unspezifische Oxidation des Phosphans durch Luft schien jedoch ein Nachteil dieser Methode zu sein. Um dieses Problem zu umgehen, wurde das fluorogene Phosphanreagens **48** entwickelt, das einen Ester gebundenen Quencher für den resonanten Fluoreszenzenergietransfer enthält (Schema 11b). Durch Staudinger-Ligation des Phosphanreagens **48** mit Aziden wurde die Esterbindung gespalten und damit der Quenchvorgang unterbunden.^[49] Hier wird die Effizienz der FRET-Lösung nicht durch die unspezifische Oxidation gestört. Die Effizienz dieser Staudinger-Sonde wurde durch Ligation an mDHFR-(AHA)₈ getestet. Die Leistungsfähigkeit von **48** in diesem Markierungsexperiment veranlasste die Autoren, diesen Fluoreszenzmarker zum Anfärben einer Azid-markierten Zelloberfläche in lebenden HeLa-Zellen einzusetzen. Zudem wurde durch Verwendung eines frühen Apoptosemarkers gezeigt, dass **48** nicht cytotoxisch wirkt und somit für In-vivo-Untersuchungen verwendet werden kann.

3.2.2. Protein modifizierende Enzyme

Ein weiterer Zugang zur ortsselektiven Markierung von Proteinen über die Staudinger-Ligation beruht auf der post-translationalen Modifizierung mit Protein-modifizierenden Enzymen. Hier wird eine Azid-haltige Markierung über Protein modifizierende Enzyme, die eine spezifische Aminosäuresequenz erkennen, kovalent an ein Zielprotein gebunden. Ting et al. verwendeten Biotin-Ligase aus *P. horikoshii*, um das Azid enthaltende Biotinanalogon **50** ortsselektiv an ein endogenes Biotinzeptorprotein (eBAP) zu kuppeln. Nach enzymatischer Kupplung von **50** an das Akzeptorprotein wurde eine Staudinger-Ligation mit Triaryl-

phosphan-FLAG-Konjugat **37** durchgeführt (Schema 12). Das Produkt wurde anschließend über Immunblotting mit Anti-FLAG-Antikörpern nachgewiesen.^[50]



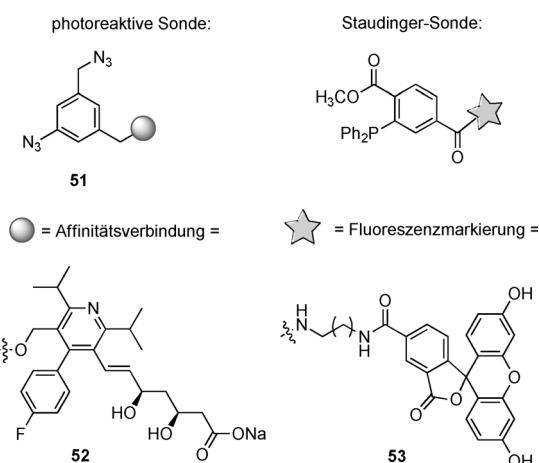
Schema 12. Posttranskriptionale Modifizierung der eBAP mit dem Azid-haltigen Biotin-Analogon **50** und nachfolgende Markierung mit FLAG-Phosphan **37**.

3.2.3. Aktivitäts-basierte Proteinprofile

Mechanismus-basierte Sonden sind entscheidende Hilfsmittel für die Evaluierung enzymatischer Aktivitäten von Enzymfamilien in komplexen Proteomen und können verwendet werden, um niedermolekulare Inhibitoren zu charakterisieren. Diese Sonden bestehen typischerweise aus einem besonderen chemischen Gerüst für die Bindungsaffinität und einer reaktiven funktionellen Gruppe für die Vernetzung. Die reaktive funktionelle Gruppe kann ein Elektrophil sein, das mit einem Nucleophil im aktiven Zentrum reagiert, oder eine photovernetzbare Gruppe, die unter UV-Bestrahlung eine kovalente Bindung an das Zielprotein ermöglicht.^[51] Der Markierungsgrad korreliert direkt mit der in der Probe vorhandenen Menge an aktivem Protein. Um aber die Effizienz der Markierung zu quantifizieren, ist es nötig, den Inhibitor mit einem detektierbaren Marker auszustatten. Eine Azidgruppe als funktionale Anknüpfungsstelle auf einem Inhibitor ermöglicht die Einführung einer Detektionseinheit über die Staudinger-Ligation. Durch Verwendung passender Affinitätsmarker können die Protein-Inhibitor-Komplexe erfasst werden. Im Allgemeinen wird ein biotinyliertes Phosphan oder ein Triarylphosphan-FLAG-Konjugat als Affinitätsmarker eingesetzt.^[51] Azid-modifizierte, kovalente Inhibitoren in Kombination mit der Staudinger-Ligation wurden verwendet, um verschiedene Enzymfamilien-Cluster zu identifizieren. Diese Studien haben zu mehreren Inhibitoren für Proteasen,^[52] Cystein-Proteasen^[53] und Glycosidasen geführt.^[54]

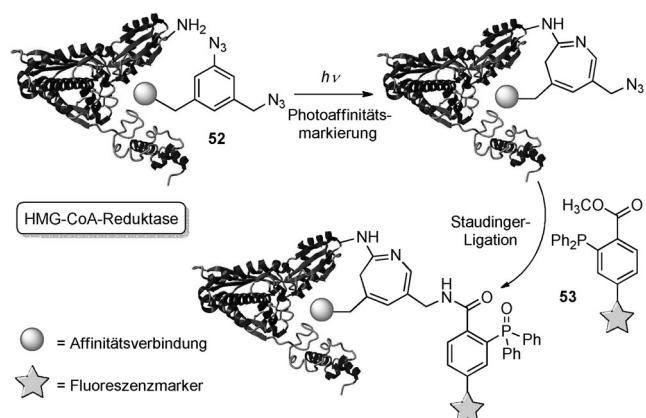
Ein anderer Typ des Aktivitäts-basierten Protein-Profilings (ABPP) ist die Photoaffinitätsmarkierung (PAL). Hier wird die kovalente Verknüpfung einer photovernetzbaren Gruppe genutzt, um Zielproteine zu identifizieren und ihre Bindungsstellen aufzuklären. Zu diesem Zweck werden photoreaktive funktionelle Gruppen oft mit Radioisotopen kombiniert. Hosoya et al. entwickelten eine neue Radioisotop-freie Methode zur PAL. Dazu wurde die photoreaktive Verbindung **51** synthetisiert, die ein Azidobenzylazidgerüst enthält, das in einer späteren Stufe zur Staudinger-Ligation

mit dem Fluorescein-verankerten Triarylphosphanderivat **53** verwendet werden kann (Schema 13).



Schema 13. Links: Photoreaktive Sonde **51**, ausgestattet mit einer Affinitätsverbindung (z. B. Cerivastatinderivat **52**); rechts: Staudinger-Sonde mit einer Fluoreszenzmarkierung (z. B. dem Fluorescein-verankerten Triarylphosphan **53**).

Um das Konzept der PAL zu prüfen, synthetisierten Hosoya et al. die Cerivastatin-funktionalisierte photoreaktive Sonde **52** und erforschten damit die Bindung von Cerivastatin an die humane 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) wie in Schema 14 veranschaulicht.^[55] Vor kurzem demonstrierten Overkleef et al. die Effizienz der Staudinger-Ligation in einer zweistufigen ABPP-Methode, indem sie eine Azid-modifizierte Bodipy-Sonde und ein Phosphan-Biotin-Konjugat (ähnlich der Sonde **38**) einsetzten.^[56] Aus ihren Befunden schlossen sie, dass die Effizienz von der Reaktivität der Affinitätsmarkierung gegenüber dem Zielprotein und nicht von der verwendeten chemoselektiven Ligation (d.h. Staudinger-Ligation) abhängt. In einer neueren Arbeit synthetisierten Overkleef et al. trifunktionelle Aktivitäts-basierte Proteinsonden, die



Schema 14. Konzept der Photoaffinitätsmarkierung. Eine konsekutive Staudinger-Ligation wird verwendet, um einen detektierbaren Marker einzuführen.

eine elektrophile Falle, eine photoreaktive Gruppe und eine bioorthogonale Ligationsstelle (d.h. Staudinger-Sonde) enthalten. Diese Sonden wurden anschließend zur kovalenten und irreversiblen Modifizierung proteasomaler katalytischer Stellen und nachfolgend zur Photovernetzung sowie Visualisierung der resultierenden Konjugate über die Staudinger-Ligation verwendet.^[57]

ABPP ist zwar eine robuste Methode, jedoch könnten durch die Einführung der photoreaktiven Gruppe die Bindungseigenschaften beeinflusst werden. Zudem könnte die Analyse durch SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen zum Verlust an Strukturinformationen eines Zielproteins führen. Um diese Nachteile zu überwinden, entwarfen Wagner et al. eine alternative Methode zur Analyse eines komplexen Proteoms unter nativen Bedingungen.^[58] Im „nichtkovalenten Aktivitäts-basierten Protein-Profilng“ wird ein Zielprotein-Sonden-Komplex über die Staudinger-Ligation selektiv mit einem Fluorophor markiert. In einem späteren Schritt wird das Rohlysat unter nichtdenaturierenden Bedingungen analysiert, wobei nur das Zielprotein identifiziert wird (Abbildung 2). Als Beispiel bestimmten die Autoren die GyrB-Untereinheit der DNA-Gyrase, indem sie diese mit Azido-Novobiocin komplexierten. Im nächsten Schritt wurde der Komplex mit einem Rhodamin-Phosphan-Marker versehen. Der Komplex aus Zielmolekül, Sonde und Marker (GyrB-Novo-Rhod-Komplex) konnte unter nichtdenaturierenden Bedingungen identifiziert werden, was die Leistungsfähigkeit dieser Methode illustriert.

Um den Lymphocytentransport zu beobachten, entwickelten Tanaka et al. ein zweistufiges Verfahren zur Markierung und Visualisierung von Gliomazellen.^[59] Erste Studien konzentrierten sich auf das Markieren von Proteinen mit einem Azidrest nach der neu entwickelten Azaelektroncyclisierungsmethode.^[60] Unter Anwendung dieser Methode wurde das Proteinmodell HSA mit der Azaelektroncyclisierungsvorstufe **54** umgesetzt. Nach der Cyclisierung wurde das HSA-Produkt mit unterschiedlichen Phosphanreagentien (Biotin (**38**) oder *N*-Glycankonjugate (**55** und **56**)) behandelt, um die chemische Biokonjugation durch Staudinger-Ligation abzuschließen (Schema 15). In Ratten-C6-Gliomazellen führte diese Methode zum Zelltod aufgrund der hohen Konzentration der vorhandenen Reaktanten. Daher kehrten die Autoren die Reaktionsfolge um und führten zuerst die Staudinger-Ligation und anschließend die Azaelektroncyclisierung durch. Über diese Vorgehensweise wurden die Zellen erfolgreich markiert, und das Ausgangsmaterial wurde inaktiviert (Aldehydredaktion und Phosphanoxidation). Die Visualisierung der markierten Gliomazellen wurde durch Inkubation mit Rhodamin-markiertem Avidin (komplementär zu Biotin) oder Rhodamin-markiertem SNA-Lectin (komplementär zu *N*-Glycanen) erreicht. In einem anschließenden Experiment wurden Lymphocyten fluoreszenzmarkiert und in Mäuse mit einem humanen DLD-1-

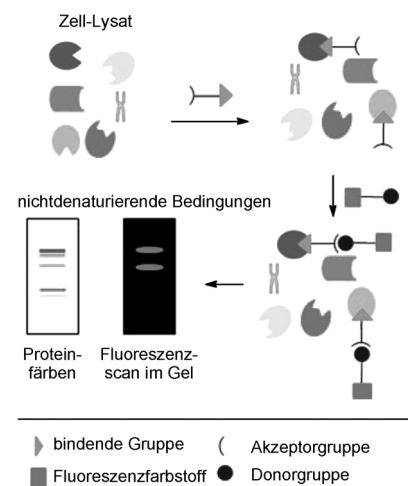
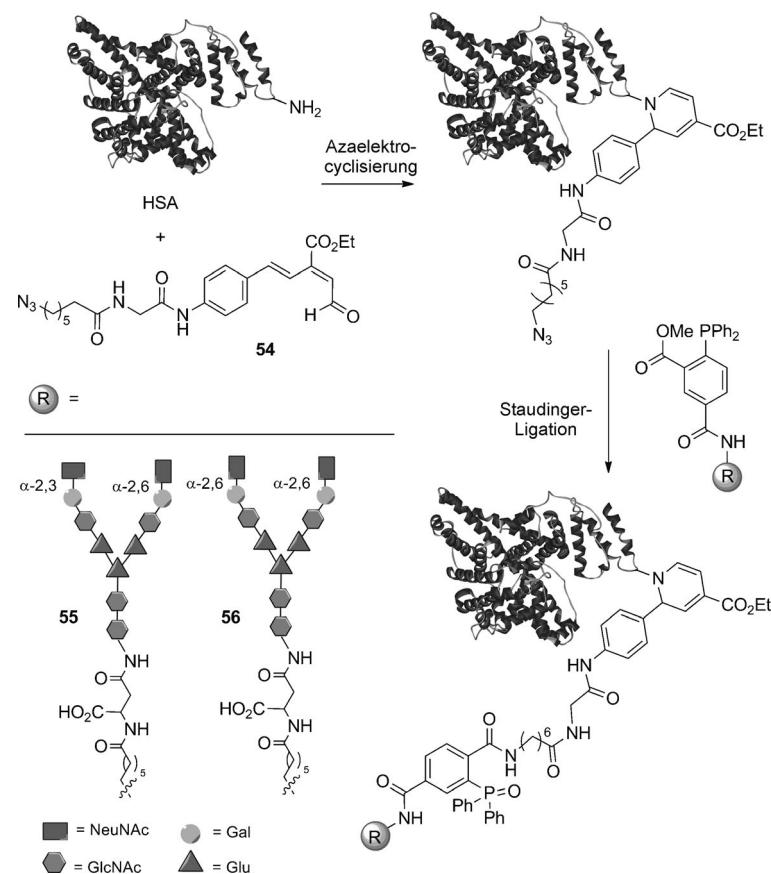


Abbildung 2. Zielidentifizierung über nichtkovalentes Aktivitäts-basiertes Protein-Profilng und nichtdenaturierende Analyse. Adaptiert aus Lit. [58].

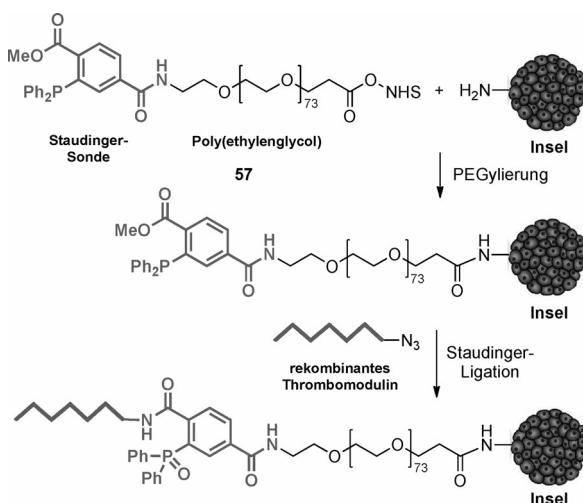
Dickdarmkarzinom injiziert. Die Überwachung der Lymphozytenbewegung zeigte keine Akkumulation an der Tumorphosition. Überraschenderweise wurde nach Comarkierung der fluoreszierenden Lymphocyten mit *N*-Glycanen



Schema 15. Proteinmodifizierung über ein sequenzielles Verfahren aus Azaelektroncyclisierung und Staudinger-Ligation.

unter Verwendung der Azalektrocyclisierung nach einer Woche eine verstärkte Lokalisierung der Lymphocyten in der Tumorzelle beobachtet.

Für die Markierung oder chemische Modifizierung ganzer Zellen wurden kürzlich mehrere hervorragende Beispiele beschrieben. An humanen Langerhans-Inseln wurde vorbildliche Arbeit geleistet, um sie in die Leber von Patienten mit Typ-1-Diabetes zu transplantieren. Diese Inseln sind jedoch häufig Ziel der blutvermittelten Proteine, wodurch eine Entzündungsreaktion verursacht wird. Durch Verringerung der Insel-vermittelten Thrombogenität und Erhöhung der Produktion an aktiviertem Protein C kann eine Abschwächung dieser Immunantwort erreicht werden. Zu diesem Zweck modifizierte Chaikof et al. die Oberfläche der Langerhans-Inseln und erhielten bioaktive Inseln mit reduzierter Thrombogenität.^[61] In einem zweistufigen Verfahren wurde rekombinant modifiziertes Azidothrombomodulin an mit Polyethylen glycol modifizierte (PEGylierte) Inseloberflächen gebunden (Schema 16). Die PEGylation der Inseln wurde mit difunktionellem Polyethylen glycol 57, das aus einem *N*-Hydroxysuccinimid(NHS)-Ester und der Triphenylphosphansonde 12 besteht, durchgeführt. Die Staudinger-Ligation mit Azidothrombomodulin und den PEGylierten Langerhans-Inseln lieferte technisch veränderte Inseln mit einer verringerten Immunreaktion.



Schema 16. PEGylation und nachfolgende Staudinger-Ligation zwischen rekombinantem Azidothrombomodulin und einem PEG-Phosphan-Anker.^[61]

3.3. Lipidmarkierung

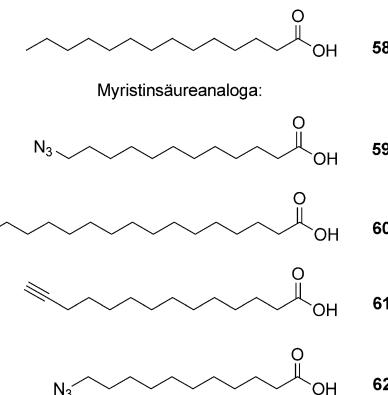
Proteolipide sind lipidmodifizierte Proteine mit einer breiten Vielfalt an Funktionen. Die Lipidierung erfolgt im Allgemeinen cotranslational oder posttranslational. *N*-Myristoylierung, *S*-Palmitoylierung und Prenylierung sind die drei Haupttypen der Lipidierung. Die Bindung gesättigter Fettsäuren an Proteine in Eukaryoten erleichtert die Wechselwirkung eines Proteins mit Membranen und anderen Proteinen. Diese Lipidierung von Proteinen beeinflusst letztlich die Signalübertragung, die subzelluläre Lokalisie-

itung und die enzymatische Aktivität. Da Lipide sekundäre Metaboliten sind, können sie nicht über genetisch codierte Reporter erforscht werden. Ähnlich der Methode zur Untersuchung der Glycanbiosynthese können bioorthogonal markierte Lipide metabolisch eingelagert werden. Diese Methode beruht auf der Substratttoleranz der Enzyme im biosynthetischen Lipidierungsweg.

3.3.1. Profile der *N*-Myristoylierung und *S*-Palmitoylierung

Die beiden wichtigsten Typen der Proteinacylierung sind die *N*-Myristoylierung N-terminaler Glycin-Reste und die *S*-Palmitoylierung von Cysteinresten. Beide Modifikationen spielen in vielen biologischen Prozessen wie Apoptose, Tumorgenese und Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle.^[62] Um diese Prozesse aufzuklären, wurden radiomarkierte Fettsäuren verwendet, wobei sich die langen Autoradiogramm-Aufnahmezeiten und die Verwendung gefährlicher hochenergetischer ¹²⁵I-Radioisotope als Nachteil erwiesen.^[63]

In einer Machbarkeitsstudie zeigten Ploegh et al., dass die ω -Azidofettsäuren 59 und 60 (Schema 17) durch Säugetierzellen effizient metabolisiert werden können und als selektive Sonden zur Visualisierung der *N*-Myristoylierung oder *S*-Palmitoylierung wirken.^[64] Nach der In-vitro-Lipidierung wurde das Azid in einer Staudinger-Ligation mit dem biotinylierten Phosphanmarker 38 umgesetzt. Berthiaume et al. verwendeten diese Methode später, um die *S*-Palmitoylierung mitochondrialer Proteine und die *N*-Myristoylierung von Proteinen während der Apoptose zu untersuchen.^[65,66]



Schema 17. ω -Azidofettsäuren, die durch Säugetierzellen effizient metabolisiert werden.

Tate et al. erweiterten diese Methode, indem sie eine allgemeine Vorschrift zur Markierung rekombinanter Proteine entwickelten. Darin wurde ein rekombinantes Protein in *E. coli* mit dem Myristoyl-CoA-Protein *N*-Myristoyl-Transferase (NMT) coexprimiert, gefolgt von einer direkten, cotranslationalen Markierung. NMT katalysiert die konstitutive cotranslationale *N*-Myristoylierung, die in allen eukaryotischen Zellen vorkommt, indem sie Myristinsäure (58) von Coenzym A auf das N-terminale Glycin eines Proteins überträgt. Erste Experimente belegten die Toleranz der NMT aus *Candida albicans* gegenüber der Tetradec-13-inoysäure (61)

und der ω -Azidofettsäure **62**. Nachfolgend zeigten Tate et al., dass ein rekombinantes Protein mit einem N-terminalen Myristoylierungsmotiv der Sequenz GXXXS (X = beliebige Aminosäure) durch Coexpression mit NMT aus *Candida albicans* effizient mit einem der bioorthogonalen Reporter **61** oder **62** acyliert werden konnte (Abbildung 3). Weitere Synthese- oder Reinigungsschritte waren nicht notwendig, da sowohl die Bildung des Acyl-CoA-Thioesters als auch die Proteinmarkierung cotranslational stattfanden.^[67]

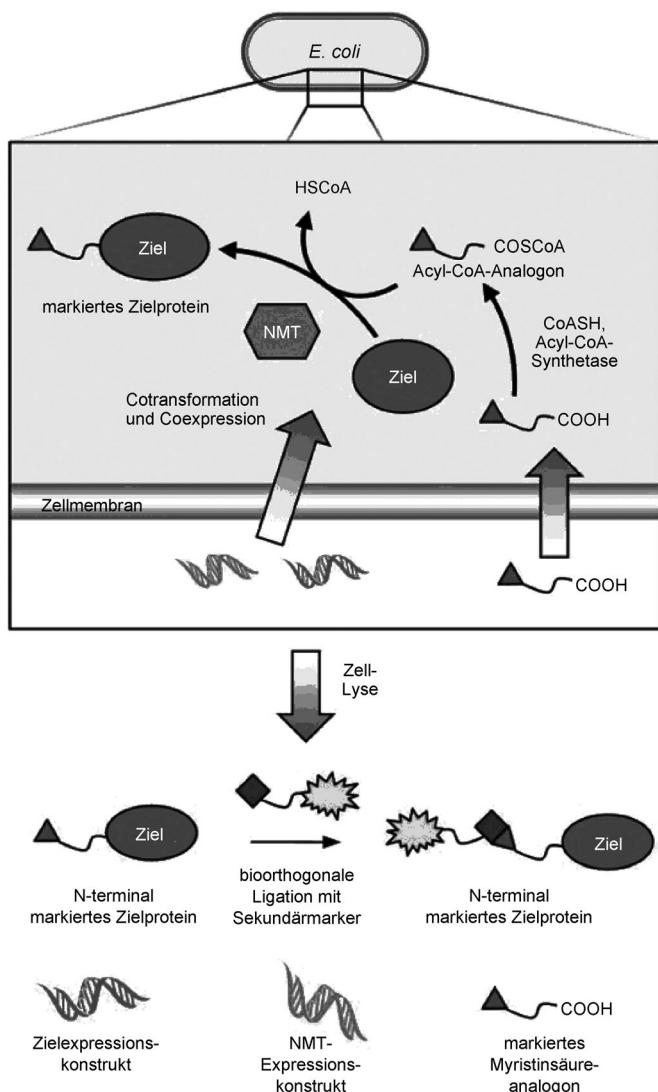
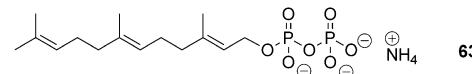


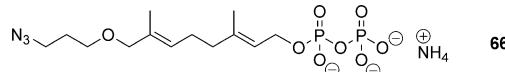
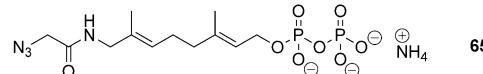
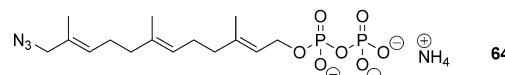
Abbildung 3. Überblick über das *E. coli*-Coexpressionssystem zur N-Myristoylierung von Proteinen mit anschließender bioorthogonaler Staudinger-Ligation. Adaptiert aus Lit. [67a].

3.3.2. Prenylierungs-Profilierung

Ähnlich wie ω -Azidofettsäuren wurden Azid-haltige Farnesylanaloga für die Prenylierung, die dritte Hauptklasse der Lipidierung, entwickelt. 2004 verwendeten Zhao et al. Azidofarnesyl-diphosphat (**64**; Schema 18) in vitro zur Proteomanalyse farnesylierter Proteine.^[68] Im ersten Schritt wurde **64** an spezifische Zielproteine der Farnesyltransferase



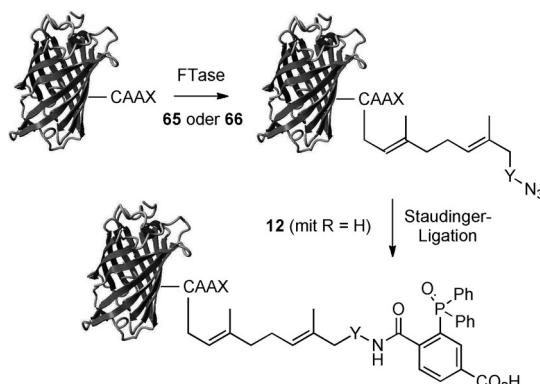
Farnesyl-diphosphatanaloga:



Schema 18. Natürliches Farnesyl-diphosphat (**63**) und Azidofarnesyl-diphosphatderivate **64–66**.

(FTase) gebunden. Dieses Protein modifizierende Enzym verknüpft eine Farnesylgruppe kovalent mit dem Cystein in der CAAX-Sequenz (C ist Cystein, A ist eine aliphatische Aminosäure und X kann eine Vielzahl von Aminosäuren sein) nahe dem C-Terminus. Nach der Lipidierung wurde die biotinylierte Staudinger-Sonde **38** verwendet, um die farnesylierten Proteine für eine spätere Detektion zu markieren.^[68]

Waldmann et al. führten im Anschluss eine gründliche Studie zur Substrattoleranz der FTase im Hinblick auf ortspezifische Proteinmodifizierung durch.^[69] Sie zeigten, dass mehrere Azid enthaltende Analoga von Farnesyl-diphosphat **64** (Schema 18) durch FTase an den Cysteinrest in der CAAX-Erkennungssequenz gebunden werden konnten. Nach Konjugation eines Azid enthaltenden Farnesyl-derivats an ein Protein wurde dieses mit der Phosphansonde **12** umgesetzt (Schema 19). Die Kupplung dieser beiden Fragmente erfolgte innerhalb einiger Stunden und wurde massenspektrometrisch nachgewiesen.



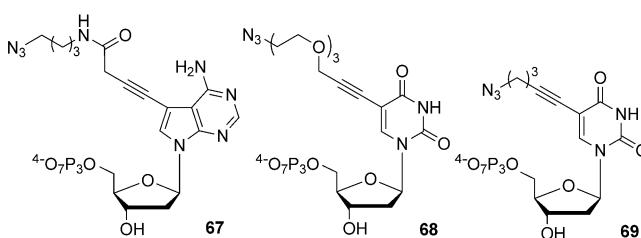
Schema 19. Prenylierung eines Proteins mit der CAAX-Erkennungssequenz und anschließende Staudinger-Ligation. Für die Ankergruppen siehe **64–66** in Schema 18.

3.4. DNA-Markierung

Außer für Anwendungen zur Glycan- und Proteinmodifizierung wurde die Staudinger-Ligation auch zur Konjugation kleiner Moleküle an DNA genutzt. Die DNA-Markierung ist von großem Wert für die DNA-basierte molekulare Diagnostik und die Nanotechnologie. Häufige Methoden zur DNA-Modifizierung sind der Einbau Azid-modifizierter Nucleotide in die DNA-Stränge sowie die Einführung eines chemischen Reporters durch enzymatische Modifizierung der DNA.

3.4.1. Nichtnatürliche Nucleinsäuren

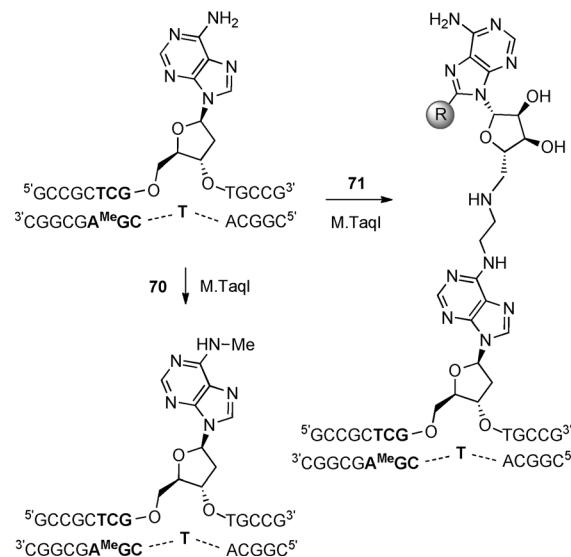
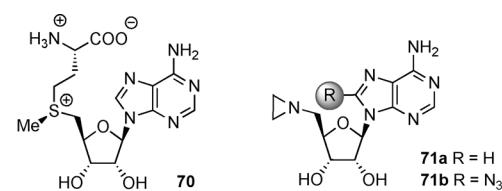
Die Nutzung chemischer Reporter zur selektiven DNA-Markierung erfordert die Funktionalisierung von Nucleinsäuren mit einem bioorthogonalen funktionalen „Griff“. Es wurden sowohl Acetylen- als auch Azid-haltige Analoga von Thymidin entwickelt und eingesetzt, um gleichmäßig markierte DNA zu erhalten. Weisbrod und Marx erkannten das Potenzial, das die Verwendung modifizierter Nucleinsäurebausteine birgt, und synthetisierten Azid-haltige Nucleinsäuren zur DNA-Modifizierung durch die Staudinger-Ligation. Daher wurde das Azido-2'-desoxyadenosin-5'-O-triphosphat(dATP)-Analogon **67** synthetisiert und enzymatisch durch die DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* (*Pwo*) eingebaut.^[70] Zusätzlich wurden zwei weitere Azid-modifizierte 2'-Desoxythymidin-5'-O-triphosphat(dTTP)-Analoga (**68** und **69** in Schema 20) entwickelt, die von der DNA-Polymerase ebenfalls akzeptiert wurden. Nach Einbau dieser Azid-modifizierten Bausteine konnte an den DNA-Fragmenten eine Staudinger-Ligation durchgeführt werden.^[71]



Schema 20. Struktur des Azido-dATP-Analogons **67** und der Azido-dTTP-Analoga **68** und **69**.

3.4.2. DNA modifizierende Enzyme

Bei verschiedenen Gelegenheiten wurden DNA modifizierende Enzyme zur selektiven Markierung von DNA genutzt. Es erwies sich, dass die Aktivität dieser Enzyme, z. B. der S-Adenosyl-L-methionin-abhängigen Methyltransferase, durch eine Änderung des Cofaktors beeinflusst wird.^[71] In der Natur wird die Methylgruppe des Cofaktors S-Adenosyl-L-methionin (**70**) auf die exocyclische Aminogruppe von 2'-Desoxyadenosin innerhalb der Doppelstrang-5'-TCGA-3'-DNA-Sequenz übertragen (Schema 21). Eine solche Transferreaktion erfolgt auch mit *N*-Adenosylaziridin (**71a**) anstelle von **70**, wie Comstock und Rajski demonstrierten.^[72]



Schema 21. Methyltransferase (M.TaqI) katalysiert die Methylierung von DNA an der Erkennungsstelle und kann in Kombination mit Cofaktor **71b** als Azidonucleosidyl-Transferase verwendet werden. Fettgedruckte Buchstaben stehen für die M.TaqI-Erkennungsstelle.

Nach Umwandlung von Cofaktor **71a** in die Azid-haltige Verbindung **71b** konnte die DNA elegant mit Aziden markiert werden (Schema 21). Nach der ortsspezifischen Markierung der DNA konnte diese über eine Staudinger-Ligation biotinyliert und dementsprechend analysiert werden.^[73] In einer Folgestudie dehnten Comstock und Rajski diese Methode auf eine Methyltransferase-gerichtete Spaltung des DNA-Strangs nach Staudinger-Ligation mit einem Kupferkomplexierenden Phosphanliganden aus.^[74]

Eine einfache zelluläre RNA-Detectionsstrategie verfolgten, entwickelten Franzini und Kool eine Sonde für die Templat-vermittelte Fluoreszenzaktivierung.^[75] Die so genannten „quenched Staudinger-triggered α -azidoether release“(Q-STAR)-Sonden sind Fluorophor enthaltende DNA-Sonden mit einer Quenchereinheit, die über einen α -Azidoetheranker gebunden ist (Abbildung 4). Reduktion des Azido-Rests durch Triphenylphosphan löst den Quencher vom DNA-Strang, was zur Wiederherstellung der Fluoreszenz führt. Als Folge der günstigen Kinetik und hohen Bioorthogonalität der Templat-vermittelten Staudinger-Reduktion konnte diese Methode zum sequenzselektiven Nachweis von Nucleinsäuren sowohl in vitro als auch direkt in prokaryotischen Zellen eingesetzt werden.

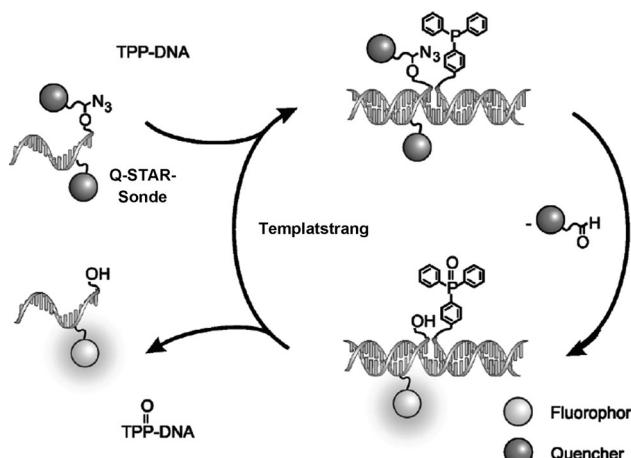


Abbildung 4. Q-STAR-Prinzip. Wiedergabe aus Lit. [75].

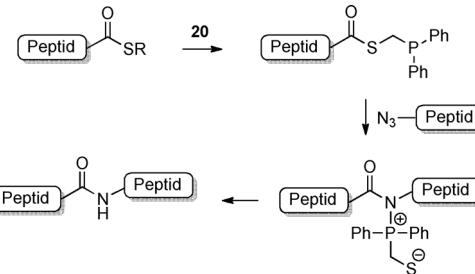
4. Die Staudinger-Ligation als Synthesemethode

4.1. Peptid- und Cyclopeptidkonjugate

Ein hervorragendes Beispiel für eine hochselektive Reaktion zur Anordnung von Polypeptidstrukturen ist die native chemische Ligation, die von Wieland et al.^[76] entdeckt und durch Kent et al. weiterentwickelt wurde.^[77] Diese chemoselektive Reaktion ermöglicht die Kupplung zweier ungeschützter Peptidfragmente unter physiologischen Bedingungen unter Bildung eines einzigen Produkts in hoher Ausbeute. Die native chemische Ligation ist daher – nicht überraschend – eine der am häufigsten genutzten Methoden zur Ligation von Peptidfragmenten, um synthetische Proteine herzustellen.^[2,78] Das Grundprinzip dieser Ligationsmethode ist die Reaktion eines C-terminalen Thioesters des einen Peptidfragments mit einem N-terminalen Cysteinrest des anderen Peptidfragments. Die Notwendigkeit eines Cysteinrests an der Ligationsstelle bedeutet eine Einschränkung für diese Reaktion. Zudem sind freie Cysteinreste in Proteinen, wo sie hauptsächlich in Form von Disulfidbrücken vorliegen, recht selten. Die moderne Peptidsynthese ist auf Peptide beschränkt, die bis zu 50 Reste enthalten, was die vollständige chemische Synthese eines Proteins ausschließt.^[25,27] Raines et al. erkannten das Potenzial der Staudinger-Ligation, aus einem Azid und einem Thioester Peptidbindungen zu bilden, was die Synthese langer Peptidfragmente zulässt (Schema 22).

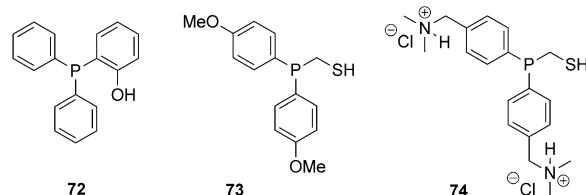
Das Prinzip der Polypeptidsynthese über die spurlose Staudinger-Ligation wurde durch Kupplung verschiedener Peptidfragmente elegant demonstriert.^[25,27] Weitere Synthesearbeiten führten durch Kombination einer Ligation exprimierter Proteine (EPL) und einer spurlosen Staudinger-Ligation zum vollständigen Aufbau des RNase-A-Proteins. Im ersten Schritt wurden zwei Peptidfragmente, die über Festphasenpeptidsynthese erhalten worden waren, über Staudinger-Ligation verknüpft. Das Produkt wurde anschließend durch native chemische Ligation an ein Peptid, das in *E. coli* exprimiert wurde, gebunden.^[79]

Die anfänglich vorgeschlagene spurlose Staudinger-Ligation zur Peptidverknüpfung verlief bei Verwendung von



Schema 22. Spurlose Staudinger-Ligation zur Peptidkonjugation.

Phosphan **20** zur Bildung eines Dipeptids nur mit einem Glycinrest an der Verknüpfungsstelle in hohen Ausbeuten. Liskamp et al. entwickelten eine Route mit *ortho*-2-(Diphenylphosphoran)phenol (**72**; Schema 23) anstelle von Phosphan

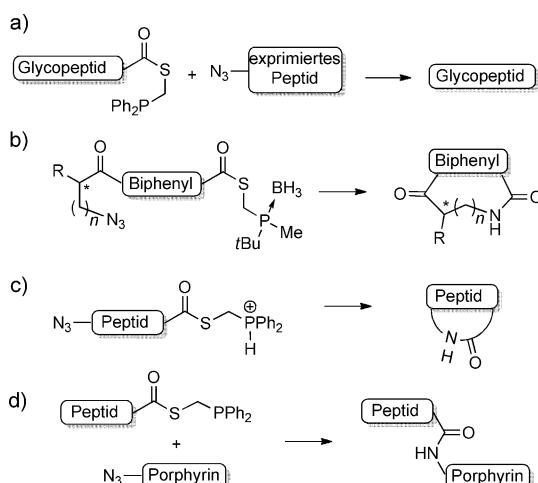


Schema 23. Staudinger-Sonden für die spurlose Staudinger-Ligation von Peptiden.

20, um Ester statt Thioester zu bilden und so die Nachteile zu beseitigen.^[80] Ihnen gelang die durch spurlose Staudinger-Ligation vermittelte Synthese von Tetra- und Pentapeptiden. Die Verwendung von Phosphan **72** zur Peptidligation ergab jedoch niedrige Ausbeuten. Raines et al. demonstrierten später die Kompatibilität des Thioesterphosphans mit Nicht-glycylaminosäureresten, indem sie die Elektronendichte am Phosphoratom genau einstellten, was zum *p*-Methoxy-substituierten Diphenylphosphanylmethanthon **73** führte.^[81] Eine Staudinger-Ligation mit Phosphan **73** ergab das gewünschte Produkt mit hoher Chemoselektivität, d.h. minimaler unspezifischer Aminolyse, und in hoher Ausbeute (> 80%). Ferner entwickelten Raines et al. das wasserlösliche Phosphoniumsalz **74** (Schema 23), um die Ligation unter physiologischen Bedingungen zu ermöglichen. Die Kompatibilität von **74** wurde durch seine Verwendung zur Ligation exprimierter Proteine elegant nachgewiesen.

Der Phosphanylthioester konnte am C-Terminus der Ribonuclease (RNase A) aus Rinderpankreas eingebaut werden.^[82] Neuere Untersuchungen zeigten, dass durch Einführung kationischer Reste in Phosphan **72** oder Variation der kationischen Gruppe von Phosphanylthiol **74** die Fähigkeit dieser Phosphansonden zur Vermittlung der spurlosen Staudinger-Ligation in Wasser deutlich verbessert wurde.^[83,84]

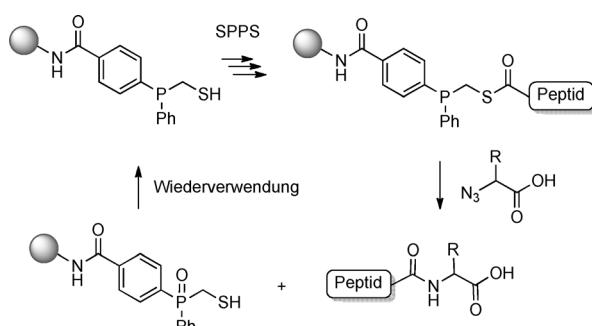
Für die spurlose Staudinger-Ligation wurden in den letzten Jahren mehrere Anwendungsmöglichkeiten auf dem Gebiet der Peptidforschung erschlossen.^[83] So demonstrierten Liu et al. die konvergente Kupplung von Glycopeptiden mit rekombinant hergestellten Peptidsegmenten unter Bildung von Glycopolypeptiden (Schema 24a).^[85] Ein weiteres ele-



Schema 24. Die spurlose Staudinger-Ligation zum Aufbau verschiedener Peptidkonjugate.

gantes Beispiel für Peptidverknüpfung ist die intramolekulare Staudinger-Cyclisierung von van Maarseveen et al.^[86] Sie entwickelten eine Strategie, bei der sie ein luftstables Boran-geschütztes Phosphanylthiolauxiliar nutzten, um Biaryl-makrolactame herzustellen (Schema 24b). Diese Methode wurde später von Kleineweischede et al. aufgegriffen, die zeigten, dass die Staudinger-basierte Peptidligation in Gegenwart oder Abwesenheit von Schutzgruppen an den Peptidseitenketten durchgeführt werden kann, wenn maskierte Phosphanylthioester eingesetzt werden.^[87] Mit protoniertem oder Boran-geschütztem Phosphanylthiol erhielten die Autoren unter milden Reaktionsbedingungen cyclische Peptide in guten Ausbeuten (Schema 24c). Die Anwendung der Staudinger-Ligation oder der Kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin-Reaktion an Azid-funktionalisierten Porphyrinen und Peptidthioestern lieferte verschiedene Peptid-Porphyrin-Konjugate in guten Ausbeuten (Schema 24d).^[88]

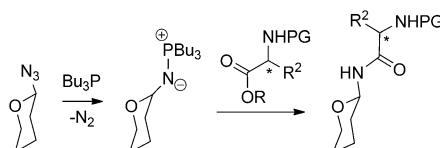
Um die mühsame Aufarbeitung zu umgehen, die nach einer Peptidsynthese über Staudinger-Ligation häufig notwendig ist, haben Kim et al. eine Festphasenstrategie für die Staudinger-Ligation zur Synthese kleiner Peptide entwickelt (Schema 25).^[89] Unter Verwendung eines HiCore-Harzes konnte die Staudinger-Ligation durchgeführt werden, und nach Regeneration ließ sich der feste Träger ohne Verringerung der Leistung bis zu fünf Mal wiederverwenden.



Schema 25. Staudinger-Ligations-basierte Festphasenpeptidsynthese (SPPS).

4.2. Glycopeptidkonjugate

Die unbestrittene Bedeutung von Glycopeptiden und -proteinen in biologischen Systemen forderte Chemiker dazuheraus, leistungsfähige Methoden zur Kupplung von Glycosylresten mit Aminosäuren zu erschließen. Hier erwies sich die Staudinger-Ligation wiederum als nützliche Methode zum Aufbau von Glycoaminosäuren (siehe unten) und Konjugaten von Kohlenhydrathaptopen an immunogenen Protein-Carriern.^[90] Davis et al. führten die Dreikomponenten-Staudinger-Ligation zur Synthese N-verknüpfter Glycoaminosäuren ein (Schema 26).^[91] Diese Methode konnte auf eine Reihe von Kohlenhydraten übertragen werden und war kompatibel mit verschiedenen Peptidfragmenten, was den Aufbau biologisch relevanter N-verknüpfter Glycopeptide ermöglichte. Die Verwendung von Trialkylphosphan-Verbindungen (z.B. PBu_3) kann jedoch möglicherweise eine Kontraktionsreaktion vermitteln, in deren Verlauf ein einzelnes Schwefelatom eines Disulfidglycoproteins unter Bildung des entsprechenden S-verknüpften Glycoproteins abgespalten wird.^[92] Dennoch nutzten die Arbeitsgruppen von Green und Davis die Dreikomponenten-Staudinger-Reaktion gemeinsam zur Herstellung von Kohlenhydrat-funktionalisierten einwandigen Kohlenstoffnanoröhren (Glycol-SWNTs).^[93] In Anbetracht der Schwierigkeiten, die mit dem Nachweis dieser funktionalisierten Nanostrukturen verbunden sind, setzten die Autoren Iod-markierte Kohlenhydrate ein, um die Funktionalisierung der SWNTs nachzuweisen.

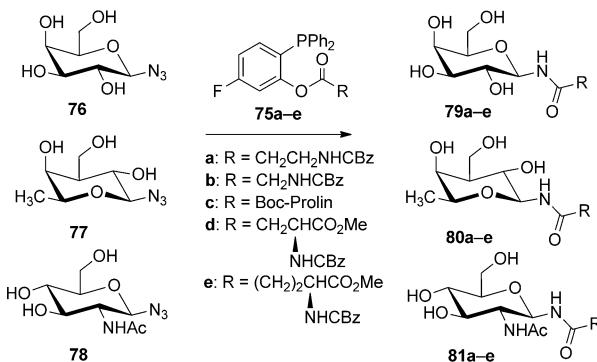


Schema 26. Dreikomponenten-Staudinger-Ligation bei der Synthese von Glycoaminosäure. PG = Schutzgruppe.

Mit der Dreikomponenten-Staudinger-Ligation gelang Lindhorst et al. vor Kurzem der Zugang zu Amid-verknüpften Glycomimetika wie *N*-Mannosyloxyethyl- und *N*-Glycosyloctanamid-Aminosäuren sowie zu dreiwertigen Glycocluster-Aminosäuren.^[94] Außerdem beschrieben Burés et al.^[95] die Synthese verschiedener Dipeptide unter Verwendung der Dreikomponenten-Staudinger-Ligation. Abweichend vom Davis-Verfahren wurde in dieser besonderen Methode katalytisches PhSeSePh zur Aktivierung der Carbonsäure eingesetzt.

Bernardi et al. untersuchten die Kupplung von Aminosäuren an ungeschützte α - und β -Glycosylazide unter Verwendung der fluorierten Phosphanester **75a–e** (Schema 27).^[96] Zuerst wurde 2-(Diphenylphosphanyl)-5-fluorophenol an den Carbonsäurerest einer α - oder β -Aminosäure gebunden. Im zweiten Schritt lieferte die Staudinger-Ligation mit den ungeschützten α - und β -Glycosylaziden **76–78** Glycosylaminosäuren (d.h. **79a–e** bis **81a–e**) in guten Ausbeuten. Diese Methode funktioniert besonders gut mit ungeschützten β -Aziden der *gluco*-, *galacto*- und *fuco*-Reihe,

Staudinger-Ligation



Schema 27. Dreikomponenten-Staudinger-Ligation bei der Synthese von Glycoaminosäuren. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl.

während α -Glucosylazide und modifiziertes GluNAc weniger gut reagieren.

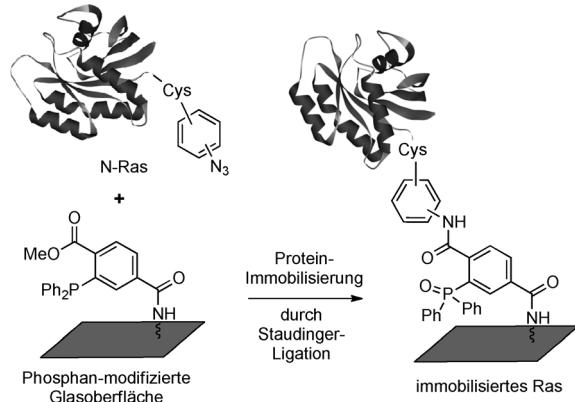
4.3. Oberflächenmodifikationen

Das wachsende Interesse an der ortsspezifischen Immobilisierung von Peptiden und Proteinen auf Oberflächen zeigt sich durch die wachsende Zahl an Publikationen in den vergangenen Jahren.^[97] Nicht überraschend ist die Staudinger-Ligation von zentraler Bedeutung für die kovalente Anbindung von Biomolekülen an Oberflächen.^[98] Die ersten Beispiele für Oberflächenmodifizierungen mit der Staudinger-Ligation wurden gleichzeitig von Raines et al.^[99] und den Arbeitsgruppen von Breinbauer, Niemeyer und Waldmann^[100] beschrieben.

Beide Beispiele belegten die Leistungsfähigkeit der spurlosen Staudinger-Ligation hinsichtlich der Immobilisierung von Peptiden und Proteinen auf Glasoberflächen. Raines et al. demonstrierten unlängst die ortsspezifische Immobilisierung von RNase A auf Phosphanylthioester-haltigen Goldoberflächen (Schema 28).^[101] Die kovalente Anbindung wurde durch primäre Antikörper der anti-RNase A aus Ka-

nichen, Immunassay und ellipsometrische Messungen verifiziert.

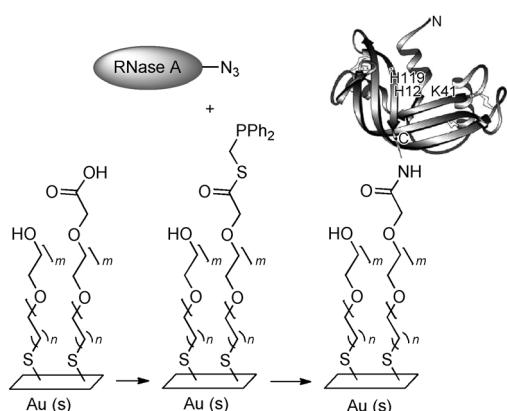
In einer gemeinsamen Arbeit immobilisierten die Gruppen um Waldmann und Goody ein Azid-markiertes Ras-Protein ortsspezifisch auf einer Phosphan-funktionalisierten Glasoberfläche.^[102] Das modifizierte Ras-Protein wurde durch Ligation exprimierter Proteine (EPL) hergestellt, während der Phosphanrest durch Peptidkupplung an mit Poly(amiidoamin)(PAMAM)-Dendrimer bedeckten Glasplatten eingeführt wurde. Die Staudinger-Ligation wurde anschließend eingesetzt, um das Ras-Protein auf der Glasoberfläche ortsspezifisch zu immobilisieren (Schema 29).



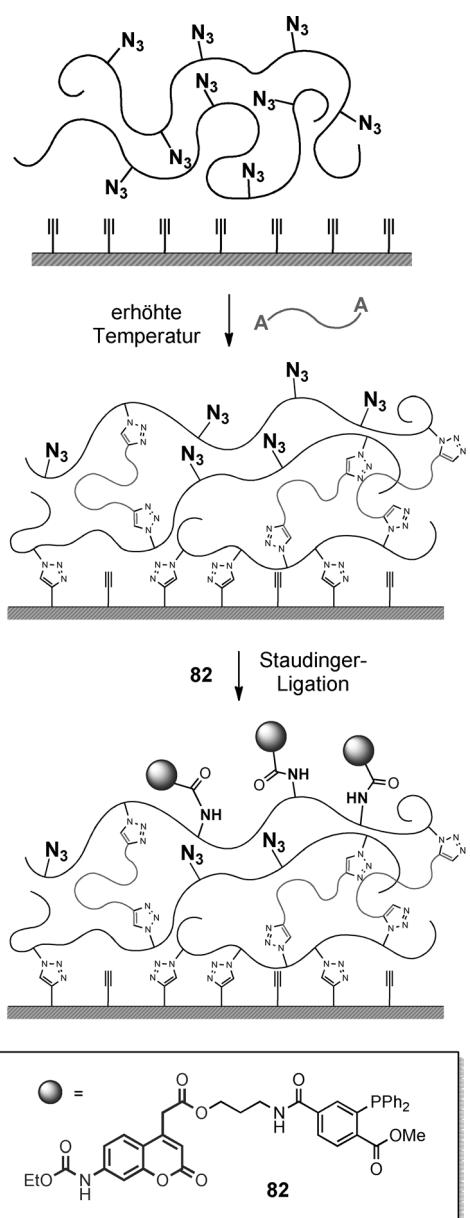
Schema 29. Ortsspezifische Immobilisierung des Ras-Proteins auf einer Phosphan-modifizierten Glasoberfläche. Adaptiert aus Lit. [102].

Gauchet et al. kombinierten die Strategie der posttranskriptionalen Proteinmodifizierung und der Immobilisierung an Phosphan-modifizierten Oberflächen und demonstrierten damit die regio- und chemoselektive Immobilisierung von Proteinen auf Glasoberflächen.^[103] Basierend auf dem Farnesytransferase-Assay von Zhao et al.^[68] wurde ein Azido-farnesylderivat posttranskriptional eingelagert, um Azido-GFP und Azido-GST (GFP = grün fluoreszierendes Protein, GST = Glutathion-S-Transferase) zu erhalten, während Phosphan-derivatisierte Glasplatten für die Staudinger-Ligationen nach der Vorschrift von Raines et al.^[99] vorbereitet wurden.

Van Hest et al. beschrieben eine Methode zur kupferfreien Bildung Azid-haltiger Oberflächen zur Immobilisierung funktioneller Moleküle.^[104] Über thermische Vernetzung eines Azid-haltigen Polymers mit passenden vernetzenden Agentien wurden Beschichtungen erhalten, die für weitere Modifizierungen geeignet waren. In einem folgenden Schritt wurde die Reaktivität der Beschichtung gegenüber verschiedenen fluoreszenzmarkierten Sonden getestet (einschließlich der reaktiven Verbindungen wie in Schema 1 dargestellt). Die Reaktivität der Staudinger-Sonde **82** gegenüber Oberflächenmodifizierung erwies sich als mäßig verglichen mit jener der Dibenzocyclooctin- und Oxanorbornadien-Gegenstücke (Schema 30).



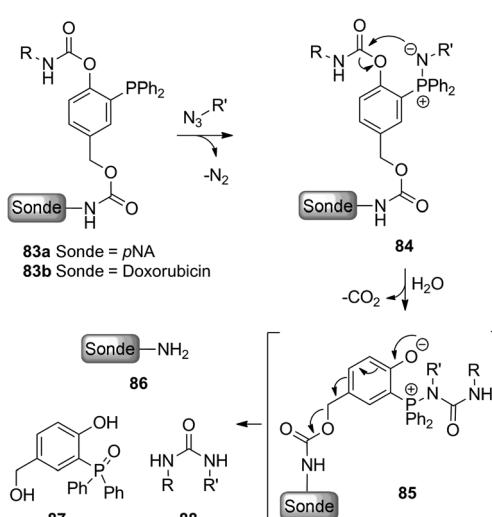
Schema 28. Ortsspezifische Immobilisierung Azid-modifizierter RNase A auf einer mit Phosphanylthioestern bedeckten Goldoberfläche. Adaptiert aus Lit. [101].



Schema 30. Synthese funktioneller, Azid-haltiger Schichten. Der Azidgehalt wurde über die fluoreszenzmarkierte Staudinger-Sonde **82** bestimmt.

4.4. Biomedizinische Anwendungen

Eine interessante biomedizinische Anwendung der Staudinger-Ligation beschrieben Florent et al. Sie erforschten die Verwendung dieser Methode als Auslöser für die Wirkstoff-Freisetzung.^[105] Zu diesem Zweck entwickelten sie Phosphansonden **83** mit einer modifizierten elektrophilen Falle, die als System zur Propharmakon-Freisetzung fungieren könnte. In einer Modellreaktion wurde die Freisetzung von 4-Nitroanilin (*p*NA, **86a**) untersucht und damit die Wirksamkeit des Freisetzungsmechanismus nachgewiesen. In einer nachfolgenden Studie wurde die Freisetzung des Antikrebsmittels Doxorubicin beobachtet (Schema 31). Nach Behandlung des Propharmakons **83b** mit einem Azid wurde das Aza-



Schema 31. Durch Staudinger-Ligation ausgelöste Wirkstofffreisetzung.

Ylid **84** gebildet. Durch intramolekulare Umlagerung wurde die Phenolatzwischenstufe **85** erzeugt, die über 1,6-Chinon-Methid-Umlagerung die aktive Substanz (Doxorubicin, **86b**) freisetzte.

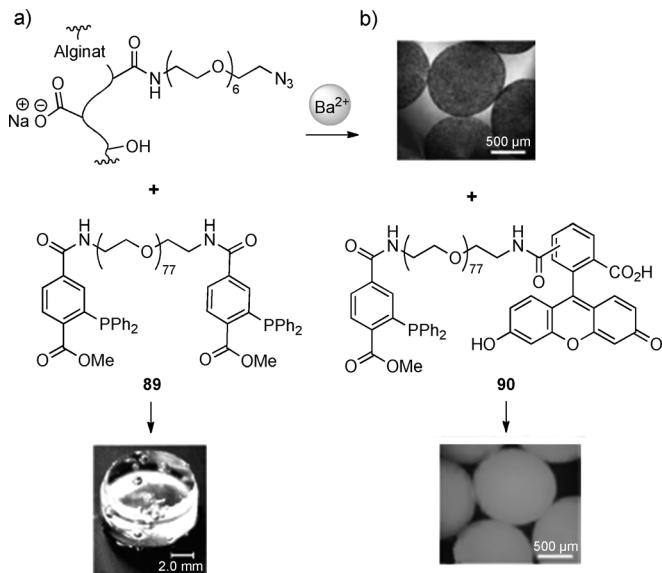
In einem weiteren biomédizinischen Beispiel zeigten Zhang et al. die leistungsfähige und chemoselektive Funktionalisierung von Liposomoberflächen mithilfe der Staudinger-Ligation.^[106] Eine Phosphan-markierte Liposomoberfläche wurde unter biologisch verträglichen Reaktionsbedingungen mit Azidolactose umgesetzt, wobei ein Glycoliposom gebildet wurde, das sich zur Bindung von Lectinen eignet. Die Staudinger-Ligation erwies sich als gute Alternative zu allen üblichen Verfahren für die Funktionalisierung von Liposomoberflächen. Mit der Funktionalisierung nanogroßer Liposome verwandt ist die Modifizierung viraler Hüllproteine mithilfe der Staudinger-Ligation.^[45] Die ortsspezifische Einlagerung der nichtnatürlichen Aminosäure *p*-Azidophenylalanin in das Hüllprotein der Z-Domäne eines Phagensystems konnte in der Staudinger-Ligation über die Reaktion mit Fluorescein-gebundenen Phosphanen genutzt werden. Die Ligation erfolgte mit hoher Effizienz, ohne das Phagensystem zu beeinträchtigen. Überdies wurde der Aufbau eines nicht-viralen Gentransportsystems unter Verwendung der Staudinger-Ligation verfolgt.^[107] Dazu wurde die Bildung diskreter Nanopartikel durch Komplexierung eines DNA-Nucleotids mit einem kationischen Polyamidoamin untersucht. Zur besseren Aufnahme in die Zelle wurde das Azid enthaltende kationische Polymer sowohl vor als auch nach der Partikelbildung mit einem Phosphan-haltigen RGD-Peptid umgesetzt. Die Komplexierung danach verlief besser und lieferte stabile Partikel.

4.5. Polymer-basierte Staudinger-Ligation

Neben den zahlreichen Anwendungen der Staudinger-Ligation in der chemischen Biologie gibt es auch eine zunehmende Zahl an Verwendungsmöglichkeiten dieser Konjugationsstrategie für biomakromolekulare Materialien.

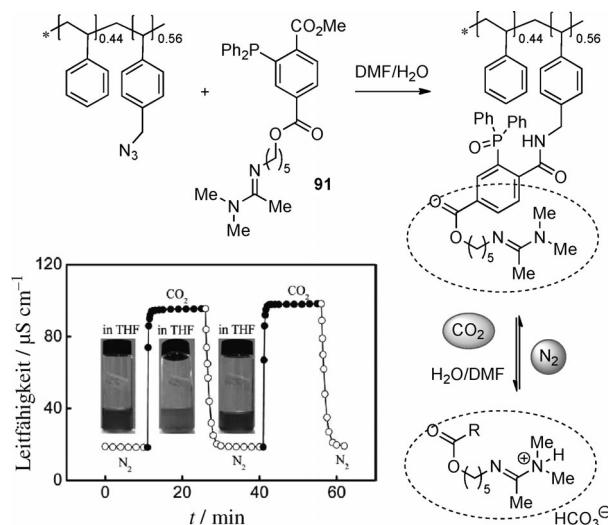
Kürzlich wurde die Staudinger-Ligation elegant eingesetzt, um Alginat zu vernetzen und zu funktionalisieren. Dieses biokompatible, Hydrogel bildende Material wurde als zellstabilisierende Matrix und als Biosensor-Schutzschicht verwendet.

Alginat kann nach Behandlung mit mehrwertigen Kationen (Ba^{2+} oder Ca^{2+}) Hydrogele bilden. Gattás-Asfura und Stabler zeigten, dass die Modifizierung von Alginat mit Azidfunktionalisiertem Ethylenglycololigomer und anschließender Vernetzung mit Phosphan enthaltenden PEG-Vernetzern **89** die Bildung stabiler Hydrogele zur Folge hat (Schema 32 a).^[108] Die Autoren demonstrierten zudem, dass Azidmodifiziertes Alginat bei Behandlung mit Ba^{2+} noch Hydrogele bilden kann und durch Staudinger-Ligation mit einem Carboxyfluorescein-markierten Phosphanmarker **90** effizient visualisiert werden kann (Schema 32 b).



Schema 32. a) Hydrogelbildung von Azidoalginat über Staudinger-vermittelte PEG-Vernetzung. b) Hydrogelbildung mit Ba^{2+} -Ionen und nachfolgende Fluoreszenzmarkierung. Wiedergabe aus Lit. [108] mit Genehmigung.

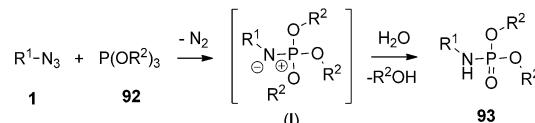
Eine weitere interessante Anwendung auf dem Gebiet der Polymerwissenschaften beschrieben Zhou et al. Sie entwickelten ein neutral-geladen-neutral-schaltbares Polymer, basierend auf der Bildung von Amidiniumkationen nach Behandeln einer wässrigen Amidin-haltigen Polymerlösung mit CO_2 -Gas (Schema 33).^[109] Dazu wurde mit der Staudinger-Ligation ein Amidinmotiv an ein PAMS-*co*-PS-Copolymer (PAMS = Poly(*p*-azidomethylstyrol), PS = Polystyrol) gehetet. Unter den verschiedenen Methoden zum Einbau der Amidinfunktion in das Copolymer erwies sich die Staudinger-Ligation mit Phosphan **91** am geeignetsten. Das erhaltene funktionelle Polymer konnte in Lösung beim Durchperlen von CO_2 - oder N_2 -Gas reversibel zwischen einem neutralen und einem geladenen Zustand wechseln (Einschub in Schema 33).



Schema 33. Synthese und Anwendung schaltbarer Polymere durch Behandlung mit CO_2 oder N_2 . Wiedergabe aus Lit. [109].

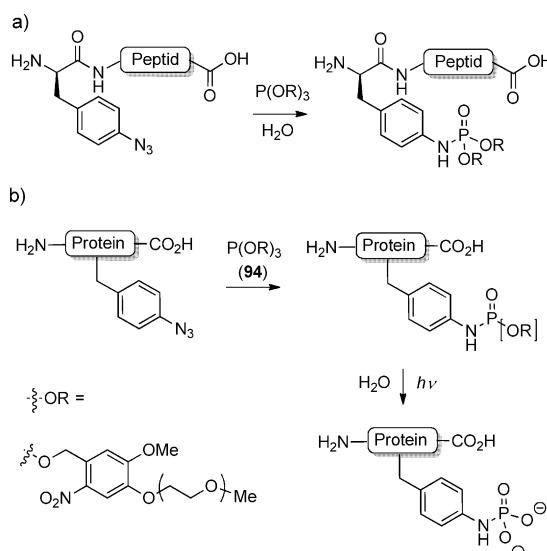
5. Neue Synthesekonzepte

Hackenberger et al. führten 2009 die Staudinger-Phosphit-Reaktion zur chemoselektiven Modifizierung von Proteinen ein.^[110] Die erstmals von Kabachnik und Gilyarov^[111] beschriebene Umsetzung beruht auf einer modifizierten Staudinger-Reaktion, in der in einem zweistufigen Prozess zwischen einem Phosphit **92** und einem Azid **1** ein Phosphoramidat **93** gebildet wird (Schema 34). Nachdem das Konzept der Staudinger-Phosphit-Reaktion getestet war, wurde die chemoselektive Modifizierung Azid-haltiger Peptide und Proteine verfolgt (Schema 35 a,b).



Schema 34. Staudinger-Phosphit-Reaktion eines Phosphits mit einem Azid.

In einem Beispiel (Schema 35 b) belegten die Autoren die Anwendbarkeit der Staudinger-Phosphit-Reaktion zur selektiven Phosphorylierung des Modellproteins SecB. Mit dem photospaltbaren Phosphit **94** konnte eine quantitative Phosphorylierung erreicht werden, indem das Phosphoramidat durch Bestrahlen des Proteins *in situ* hydrolysiert wurde. Dieses Konzept wurde unter Verwendung unsymmetrischer Phosphite weiter erforscht.^[146] Während die Synthese unsymmetrischer Phosphitreaktanten gelang, ergab die Anwendung solcher Verbindungen Phosphoramiditgemische. Trotzdem wurde ein Azidproteinmodell biotinyliert und ergab eine ausreichende Umwandlung in das gewünschte Produkt, was durch Western-Blot-Analyse gezeigt wurde. Kürzlich beschrieben Hackenberger et al. die effiziente PEGylierung eines Azid-haltigen Proteins.^[112] Unter Verwendung symmetrischer PEG-Phosphite gelang die Staudinger-Phosphit-Re-



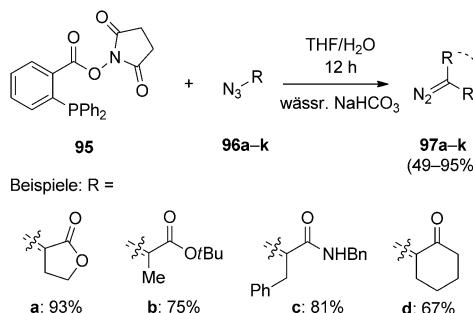
Schema 35. Anwendungen der Staudinger-Phosphit-Reaktion.

aktion mit *E.-coli*-Lysat. Dieselbe Arbeitsgruppe verwendete die Staudinger-Phosphit-Methode zur Festphasensynthese Phosphoramidat-haltiger Peptide.^[113] Diese Methode wurde auf die Synthese Phosphoramidat-verknüpfter Glycopeptide ausgedehnt.^[114] In einer zweistufigen Synthesestrategie wurden zunächst Serin enthaltende Peptide durch Phosphitylierung mit Phosphoramiditen in Phosphitpeptide überführt. Im zweiten Schritt wurden diese Phosphitpeptide mit Glycosylaziden behandelt, wobei sich Phosphoramidat-gebundene Glycopeptide bildeten. Bei der Abspaltung vom festen Träger mit Trifluoressigsäure wurden jedoch mehrere Nebenprodukte gebildet, darunter Phosphotriester und Dehydroalaninreste.

Als Alternative zur Staudinger-Ligation demonstrierten Raines und Myers die Brauchbarkeit der Phosphane vom Staudinger-Typ für die Umsetzung mit Aziden zu Diazoverbindungen.^[115] Die Bedeutung der Diazoverbindungen in der organischen Synthese zeigt sich in der Vielfalt der Reaktionen, bei denen dieser Verbindungstyp auftritt, z.B. bei Cyclopropanierungen, Ylidbildung und säurekatalysierten Cyclisierungen. Raines et al. stellten fest, dass die Verwendung des Phosphan-derivatisierten *N*-Hydroxysuccinimylesters **95**, eines hochreaktiven Acylierungsreagens, bei der Behandlung verschiedener Azide **96a–k** die Bildung von Acyltriazinenverbindungen katalysiert. In einer nachfolgenden Desimidogierung konnten die entsprechenden Diazoverbindungen **97a–k** in ausgezeichneten Ausbeuten erhalten werden (Schema 36). Es wird erwartet, dass diese Vorgehensweise das Gebiet der präparativen organischen Chemie stark beeinflussen wird, da sie, ausgehend von leicht zugänglichen Ausgangsmaterialien, unter milden Bedingungen Diazoverbindungen liefert.

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Bioorthogonale Konjugationsmethoden sind von allgemeinem Interesse sowohl für Biologen als auch für Chemiker.



Schema 36. Phosphan-vermittelte Umwandlung von Aziden in Diazoverbindungen.

Dieses recht neue Gebiet der Chemie expandiert rasch und hat breite Anwendung im Bereich der Systembiologie gefunden. Zudem ermöglichen neue Konjugationsstrategien die Modifizierung komplexer biologischer Zielmoleküle, die mit früher vorhandenen Methoden nicht untersucht werden konnten.^[116] Die Staudinger-Ligation wurde als eine der ersten Reaktionen eingeführt, die die Kriterien der bioorthogonalen Ligationschemie erfüllten.^[6] Folglich hat sich die Staudinger-Ligation als besonders nützlich für die Markierung von Biomolekülen in deren natürlicher Umgebung erwiesen. Außer als effizientes Markierungsverfahren hat sich die Staudinger-Ligation auch zur tauglichen Methode für die Oberflächenmodifizierung und zum Aufbau von Polypeptiden, Glycopeptiden und Glycoproteinen entwickelt.

Obwohl die spurlose Staudinger-Reaktion über die letzten Jahre deutliche Aufmerksamkeit auf sich gezogen hat, wird sie nicht so häufig angewendet wie ihr nichtspurloses Gegenstück, wegen der Schwierigkeiten, die bezüglich der Orthogonalität mit verschiedenen Nucleophilen auftreten. Mit diesen Selektivitätsproblemen haben sich Liskamp et al. befasst; sie zeigten, dass bei Pentapeptidbildung mit ungeschützten Peptiden eine unspezifische Aminolyse erfolgt.^[80] Überdies verringert sterische Hinderung an der Ligationsstelle (wie in Nichtglycylkupplungen) die Ausbeute der Ligation beträchtlich. Schließlich können zwei strukturelle Nachteile der spurlosen Staudinger-Ligation unterschieden werden: Erstens ist das elektronenreiche Phosphan anfällig gegen Oxidation,^[117] und zweitens sind die wenig stabilen Thioester nicht immer einfach zu synthetisieren.

Außer der Staudinger-Ligation wurden in letzter Zeit noch andere Strategien zur selektiven und kontrollierten Konjugation entwickelt. 2005 wurde die kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition eines Azids mit einem Alkin als neue Biokonjugationsmethode vorgestellt. Entwicklung und Anwendungen dieser kupferkatalysierten Cycloaddition wurden mehrfach beschrieben.^[8, 118] Die beiden einzigartigen chemischen Anker (Azide und Alkine) können ohne weiteres in vivo eingeführt werden und nach Zell-Lyse noch für Konjugationszwecke verwendet werden. In vielen der oben beschriebenen Anwendungen der Staudinger-Ligation wurde die Konjugation an Zell-Lysaten durchgeführt und könnte daher auch durch die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) ersetzt werden. Die Hauptvorteile der CuAAC gegenüber der Staudinger-Ligation sind die höhere

Reaktionsgeschwindigkeit und die Möglichkeit, sowohl Azid als auch Alkin als chemische Reporter einzusetzen. Diese Reaktion eignet sich vor allem für die Konjugation von Biomolekülen in vitro, da Kupfer in lebenden Systemen toxisch wirkt.

Um die Verwendung von Kupfer zu umgehen, wurden durch Spannung begünstigte Cycloadditionen als neuer Typ bioorthogonaler Konjugationsmethoden entwickelt. Diese Cycloadditionen erfordern ein Azid und ein gespanntes cyclisches Gegenstück (z.B. Oxanorbornadiene, Cyclooctine und Dibenzocyclooctine).^[5a] Es wurden mehrere Cyclooctintypen mit variierenden Eigenschaften entworfen. Am vielversprechendsten sind die difluorierten Cyclooctine (DIFO),^[10c,d] die Bicyclononine (BCN),^[11g] Dibenzocyclooctinole^[12] und die Azadibenzocyclooctine (DIBAC).^[120] Großes Potenzial bergen die durch Spannung begünstigte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) und die Cycloaddition von Tetrazinen und *trans*-Cyclooctenen, die zur Markierung lebender Krebszellen eingesetzt wird.^[121] Die genannten Cycloadditionen können wegen ihrer höheren Reaktionsgeschwindigkeiten günstiger sein als die Staudinger-Ligation. In letzter Zeit erschienen mehrere Übersichten, die sich mit der Entwicklung und den Anwendungen dieser und anderer bioorthogonaler Reaktionen befassten.^[122]

Auch wenn einige dieser aufstrebenden Strategien hervorragende Eigenschaften aufweisen, bleibt die Staudinger-Ligation eine interessante Biokonjugationsmethode und wird noch häufig in der chemischen Biologie verwendet. Ihre Etabliertheit zeigt sich anhand der kommerziellen Verfügbarkeit des Triarylphosphan-FLAG-Konjugats. Zudem setzt die Staudinger-Ligation einen hohen Standard, mit dem die meisten neuen Biokonjugationstechniken häufig verglichen werden.^[10b] Dies wurde durch einen jüngsten Kopf-an-Kopf-Vergleich der nichtspurlosen Staudinger-Sonde mit verschiedenen Cyclooctinen hinsichtlich der In-vivo-Markierung Azid enthaltender Splenocytes veranschaulicht. Trotz der inhärent niedrigeren Reaktionsgeschwindigkeit der Staudinger-Sonde bezüglich der Azide im Vergleich zu Cyclooctinen erwies sie sich als die robustere Markierungsstrategie.^[123] Die ideale bioorthogonale Konjugationsmethode hängt daher von der Versuchsanordnung ab. Wird ein bewährtes In-vivo-Verfahren gewünscht, ist die Staudinger-Ligation eine äußerst geeignete Methode. Umgekehrt kann für schnelle Zellmarkierung ex vivo die spannungsvermittelte Cycloaddition eine zuverlässiggere Methode sein.^[10c]

Bei allen bioorthogonalen Reaktionen ist zu beachten, dass die native Situation durch die Einführung eines kleinen, physiologisch stabilen, nichtnatürlichen chemischen Reporters verändert wird. Dieser kleine Eingriff in die native Umgebung kann die Struktur und damit die Aktivität, Lokalisation und Stabilität eines Biomoleküls beeinflussen. Daher wird die Suche nach anderen bioorthogonalen und biomimetischen chemischen Reportern, die das Azid als chemischen Griff umgehen, eine stetige Herausforderung bleiben.

Eingegangen am 22. Dezember 2010
Übersetzt von Dr. Margit Knauer, Bensheim

- [1] J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, 26, 1211–1219.
- [2] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 7108–7133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6974–6998.
- [3] C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 10182–10228.
- [4] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1, 13–21.
- [5] a) M. F. Debets, C. W. J. van der Doelen, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *ChemBioChem* **2010**, 11, 1168–1184; b) S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmerman, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 5320–5374; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5188–5240.
- [6] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, 287, 2007–2010.
- [7] Gleichzeitig zuerst beschrieben von: a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596–2599; b) C. W. Törnøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057–3064.
- [8] Für Übersichten siehe die themenbezogene Ausgabe: *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1221–1408.
- [9] Eine hervorragende Übersicht: J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, *Aldrichimica Acta* **2010**, 43, 15–23.
- [10] Kritische Artikel: a) N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046–15047; b) N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, 1, 644–648; c) J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 16793–16797; d) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2008**, 10, 3097–3099.
- [11] a) S. S. van Berkel, A. 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, 1504–1508; b) S. S. van Berkel, A. J. Dirks, S. A. Meeuwissen, D. L. L. Pingel, O. C. Boerman, P. Laverman, F. L. van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, F. P. J. T. Rutjes, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1805–1815.
- [12] X. H. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G. J. Boons, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 2285–2287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2253–2255.
- [13] M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3168–3178; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3106–3116.
- [14] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, 2, 635–646.
- [15] a) Y. G. Gololobov, L. N. Zhmurova, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1981**, 37, 437–472; b) Y. G. Gololobov, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1992**, 48, 1353–1406.
- [16] W. Q. Tian, Y. A. Wang, *J. Chem. Theory Comput.* **2005**, 1, 353–362.
- [17] C. Widauer, H. Grützmacher, I. Shevchenko, V. Gramlich, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 1659–1664.
- [18] J. E. Leffler, R. D. Temple, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 5235–5246.
- [19] H. Staudinger, E. Hauser, *Helv. Chim. Acta* **1921**, 4, 861–886.
- [20] a) P. Molina, E. Aller, A. Lorenzo, P. Lopez-Cremades, I. Rioja, A. Ubeda, M. C. Terencio, M. J. Alcaraz, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 1011–1014; b) F. Palacios, C. Alonso, M. Rodriguez, E. M. de Marigorta, G. Rubiales, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 1795–1804.
- [21] F. Palacios, C. Alonso, D. Aparicio, G. Rubiales, J. M. de Los Santos, *Tetrahedron* **2007**, 63, 523–575.
- [22] L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, 276, 1125–1128.
- [23] E. Saxon, S. J. Luchansky, H. C. Hang, C. Yu, S. C. Lee, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14893–14902.
- [24] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2686–2695.
- [25] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, 2, 1939–1941.
- [26] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2141–2143.

- [27] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 9–12.
- [28] M. B. Soellner, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8820–8828.
- [29] A. Tam, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1173–1175.
- [30] K. Ohtsubo, J. D. Marth, *Cell* **2006**, *126*, 855–867.
- [31] J. R. Bishop, M. Schuksz, J. D. Esko, *Nature* **2007**, *446*, 1030–1037.
- [32] S. T. Laughlin, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 12–17.
- [33] Eine vorausgehende Arbeit: H. Kayser, R. Zeitler, C. Kanchnit, D. Grunow, R. Nuck, W. Reutter, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16934–16938.
- [34] C. L. Jacobs, S. Goon, K. J. Yarema, S. Hinderlich, H. C. Hang, D. H. Chai, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **2001**, *40*, 12864–12874.
- [35] S. J. Luchansky, S. Goon, C. R. Bertozzi, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 371–374.
- [36] J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873–877.
- [37] P. V. Chang, J. A. Prescher, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8400–8401.
- [38] A. S. Cohen, E. A. Dubikovskaya, J. S. Rush, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8563–8565.
- [39] a) S. F. M. van Dongen, R. L. M. Teeuwen, M. Nallani, S. S. van Berkel, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, J. C. M. van Hest, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 20–23; b) S. Schoffelen, M. B. van Eldijk, B. Rooijakkers, R. Rajmakers, A. J. R. Heck, J. C. M. van Hest, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 701–705.
- [40] A. J. de Graaf, M. Kooijman, W. E. Hennink, E. Mastrobattista, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1282–1295.
- [41] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 19–24.
- [42] J. C. M. van Hest, D. A. Tirrell, *FEBS Lett.* **1998**, *428*, 68–70.
- [43] C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Science* **1989**, *244*, 182–188.
- [44] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 413–444.
- [45] M.-L. Tsao, F. Tian, P. G. Schultz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2147–2149.
- [46] V. Böhrsch, R. Serwa, P. Majkut, E. Krause, C. P. R. Hackenberger, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3176–3178.
- [47] T. Yanagisawa, R. Ishii, R. Fukunaga, T. Kobayashi, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1187–1197.
- [48] G. A. Lemieux, C. L. de Graffenreid, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4708–4709.
- [49] M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2428–2431; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2394–2397.
- [50] S. A. Slavoff, I. Chen, Y. A. Choi, A. A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1160–1162.
- [51] A. S. Raghavan, H. C. Hang, *Drug Discovery Today* **2009**, *14*, 178–184.
- [52] H. Ovaa, P. F. van Swieten, B. M. Kessler, M. A. Leeuwenburgh, E. Fiebiger, A. van den Nieuwendijk, P. J. Galardy, G. A. van der Marel, H. L. Ploegh, H. S. Overkleef, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3754–3757; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3626–3629.
- [53] 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*, 713–723.
- [54] K. A. Stubbs, A. Scaffidi, A. W. Debowski, B. L. Mark, R. V. Stick, D. J. Vocadlo, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 327–335.
- [55] T. Hosoya, T. Hiramatsu, T. Ikemoto, M. Nakanishi, H. Aoyama, A. Hosoya, T. Iwata, K. Maruyama, M. Endo, M. Suzuki, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 637–641.
- [56] M. Verdoes, B. I. Florea, U. Hillaert, L. I. Willem, W. A. van der Linden, M. Sae-Heng, D. V. Filippov, A. F. Kissel, G. A. van der Marel, H. S. Overkleef, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1735–1738.
- [57] P. P. Geurink, B. I. Florea, G. A. van der Marel, B. M. Kessler, H. S. Overkleef, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 9052–9054.
- [58] G. Budin, M. Moune Dimala, V. Lamour, P. Oudet, C. Mioskowski, S. Meunier, L. Brino, A. Wagner, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 79–82.
- [59] K. Tanaka, K. Minami, T. Tahara, E. R. O. Siwu, K. Koyama, S. Nozaki, H. Onoe, Y. Watanabe, K. Fukase, *J. Carbohydr. Chem.* **2010**, *29*, 118–132.
- [60] a) K. Tanaka, T. Masuyama, K. Hasegawa, T. Tahara, H. Mizuma, Y. Wada, Y. Watanabe, K. Fukase, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 108–111; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 102–105; b) K. Tanaka, Y. Fujii, K. Fukase, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2392–2397.
- [61] a) C. L. Stabler, X. L. Sun, W. Cui, J. T. Wilson, C. A. Haller, E. L. Chaikof, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1713–1715; b) J. T. Wilson, C. A. Haller, Z. Qu, W. Cui, M. K. Urlam, E. L. Chaikof, *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 1895–1903.
- [62] M. D. Resh, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 584–590.
- [63] S. M. Peseckis, I. Deichaite, M. D. Resh, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 5107–5114.
- [64] H. C. Hang, E. J. Geutjes, G. Grotenbreg, A. M. Pollington, M. J. Bijlmakers, H. L. Ploegh, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2744–2745.
- [65] D. D. O. Martin, G. L. Vilas, J. A. Prescher, G. Rajaiah, J. R. Falck, C. R. Bertozzi, L. G. Berthiaume, *FASEB J.* **2008**, *22*, 797–806.
- [66] M. A. Kostiuk, 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*, 721–732.
- [67] a) W. P. Heal, S. R. Wickramasinghe, P. W. Bowyer, A. A. Holder, D. F. Smith, R. J. Leatherbarrow, E. W. Tate, *Chem. Commun.* **2008**, 480–482; b) W. P. Heal, S. R. Wickramasinghe, R. J. Leatherbarrow, E. W. Tate, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2308–2315.
- [68] 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*, 12479–12484.
- [69] U. T. T. Nguyen, J. Cramer, J. Gomis, R. Reents, M. Gutierrez-Rodriguez, R. S. Goody, K. Alexandrov, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 408–423.
- [70] S. H. Weisbrod, A. Marx, *Chem. Commun.* **2007**, 1828–1830.
- [71] A. Baccaro, S. H. Weisbrod, A. Marx, *Synthesis* **2007**, 1949–1954.
- [72] L. R. Comstock, S. R. Rajski, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1425–1428.
- [73] L. R. Comstock, S. R. Rajski, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 1644–1652.
- [74] L. R. Comstock, S. R. Rajski, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14136–14137.
- [75] R. M. Franzini, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16021–16023.
- [76] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Liebigs Ann. Chem.* **1953**, 583, 129–149.
- [77] a) M. Schnölzer, S. B. H. Kent, *Science* **1992**, *256*, 221–225; b) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clarklewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
- [78] Exzellente praxisbezogene Übersicht: S. B. H. Kent, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 338–351.
- [79] B. L. Nilsson, R. J. Hondal, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5268–5269.
- [80] R. Merkx, D. T. S. Rijkers, J. Kemmink, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4515–4518.

- [81] M. B. Soellner, A. Tam, R. T. Raines, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9824–9830.
- [82] A. Tam, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11421–11430.
- [83] S. H. Weisbrod, A. Marx, *Synlett* **2010**, 787–789.
- [84] A. Tam, R. T. Raines, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1055–1063.
- [85] L. Liu, Z. Y. Hong, C. H. Wong, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 429–432.
- [86] G. Masson, T. den Hartog, H. E. Schoemaker, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Synlett* **2006**, 865–868.
- [87] a) R. Kleineweischede, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6073–6077; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5984–5988; b) M. Mühlberg, D. M. M. Jaradat, R. Kleineweischede, I. Papp, D. Dechtrirat, S. Muth, M. Broncel, C. P. R. Hackenberger, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3679–3686.
- [88] N. Umezawa, N. Matsumoto, S. Iwama, N. Kato, T. Higuchi, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6340–6350.
- [89] H. Kim, J. K. Cho, S. Aimoto, Y.-S. Lee, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1149–1151.
- [90] C. Grandjean, A. Boutonnier, C. Guerreiro, J.-M. Fournier, L. A. Mulard, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7123–7132.
- [91] K. J. Doores, Y. Mimura, R. A. Dwek, P. M. Rudd, T. Elliott, B. G. Davis, *Chem. Commun.* **2006**, 1401–1403.
- [92] G. J. L. Bernardes, E. J. Grayson, S. Thompson, J. M. Chalker, J. C. Errey, F. El-Oualid, T. D. W. Claridge, B. G. Davis, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2276–2279; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2244–2247.
- [93] S. Y. Hong, G. Tobias, B. Ballesteros, F. El Oualid, J. C. Errey, K. J. Doores, A. I. Kirkland, P. D. Nellist, M. L. H. Green, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10966–10967.
- [94] A. Schierholt, H. A. Shaikh, J. Schmidt-Lassen, T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 3783–3789.
- [95] J. Burés, M. Martín, F. Urpí, J. Vilarrasa, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2203–2206.
- [96] F. Nisic, M. Andreini, A. Bernardi, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5744–5751.
- [97] P.-C. Lin, D. Weinrich, H. Waldmann, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211*, 136–144.
- [98] M. Köhn, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 393–397.
- [99] M. B. Soellner, K. A. Dickson, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11790–11791.
- [100] M. Köhn, R. Wacker, C. Peters, H. Schröder, L. Soulere, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6010–6014; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5830–5834.
- [101] J. Kalia, N. L. Abbott, R. T. Raines, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1064–1069.
- [102] A. Watzke, M. Köhn, M. Gutierrez-Rodriguez, R. Wacker, H. Schröder, R. Breinbauer, J. Kuhlman, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1436–1440; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1408–1412.
- [103] C. Gauchet, G. R. Labadie, C. D. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9274–9275.
- [104] L. A. Canalle, S. S. van Berk, L. T. de Haan, J. C. M. van Hest, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 3464–3470.
- [105] M. Azoulay, G. Tuffin, W. Sallem, J. C. Florent, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3147–3149.
- [106] H. Zhang, Y. Ma, X.-L. Sun, *Chem. Commun.* **2009**, 3032–3034.
- [107] S. M. Parkhouse, M. C. Garnett, W. C. Chan, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6641–6650.
- [108] K. M. Gattás-Asfura, C. L. Stabler, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 3122–3129.
- [109] K. Zhou, J. Li, Y. Lu, G. Zhang, Z. Xie, C. Wu, *Macromolecules* **2009**, *42*, 7146–7154.
- [110] R. Serwa, I. Wilkening, G. Del Signore, M. Mühlberg, I. Claußnitzer, C. Weise, M. Gerrits, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8382–8387; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8234–8239.
- [111] M. I. Kabachnik, V. A. Gilyarov, *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci. (Engl. Transl.)* **1956**, *5*, 809–816.
- [112] R. Serwa, P. Majkut, B. Horstmann, J.-M. Swiecicki, M. Gerrits, E. Krause, C. P. R. Hackenberger, *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 596–602.
- [113] R. A. Serwa, J.-M. Swiecicki, D. Homann, C. P. R. Hackenberger, *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 563–567.
- [114] D. M. M. Jaradat, H. Hamouda, C. P. R. Hackenberger, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 5004–5009.
- [115] E. L. Myers, R. T. Raines, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2395–2399; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2359–2363.
- [116] T. K. Tiefenbrunn, P. E. Dawson, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2010**, *94*, 95–106.
- [117] Y. He, R. J. Hinklin, J. Chang, L. L. Kiessling, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4479–4482.
- [118] a) A. J. Dirks, J. J. L. M. Cornelissen, F. L. van Delft, J. C. M. van Hest, R. J. M. Nolte, A. E. Rowan, F. P. J. T. Rutjes, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1200–1210; b) J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249–1262; c) C. R. Becer, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4998–5006; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4900–4908.
- [119] J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422–9425.
- [120] M. F. Debets, S. S. van Berk, S. Schoffelen, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, F. L. van Delft, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97–99.
- [121] N. K. Devaraj, R. Upadhyay, J. B. Haun, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7147–7150; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7013–7016.
- [122] Übersichten: a) M. D. Best, *Biochemistry* **2009**, *48*, 6571–6584; b) T. Kurpiers, H. D. Mootz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1757–1760; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1729–1731; c) R. K. V. Lim, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1589–1600.
- [123] P. V. Chang, J. A. Prescher, E. M. Sletten, J. M. Baskin, I. A. Miller, N. J. Agard, A. Lo, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1821–1826.