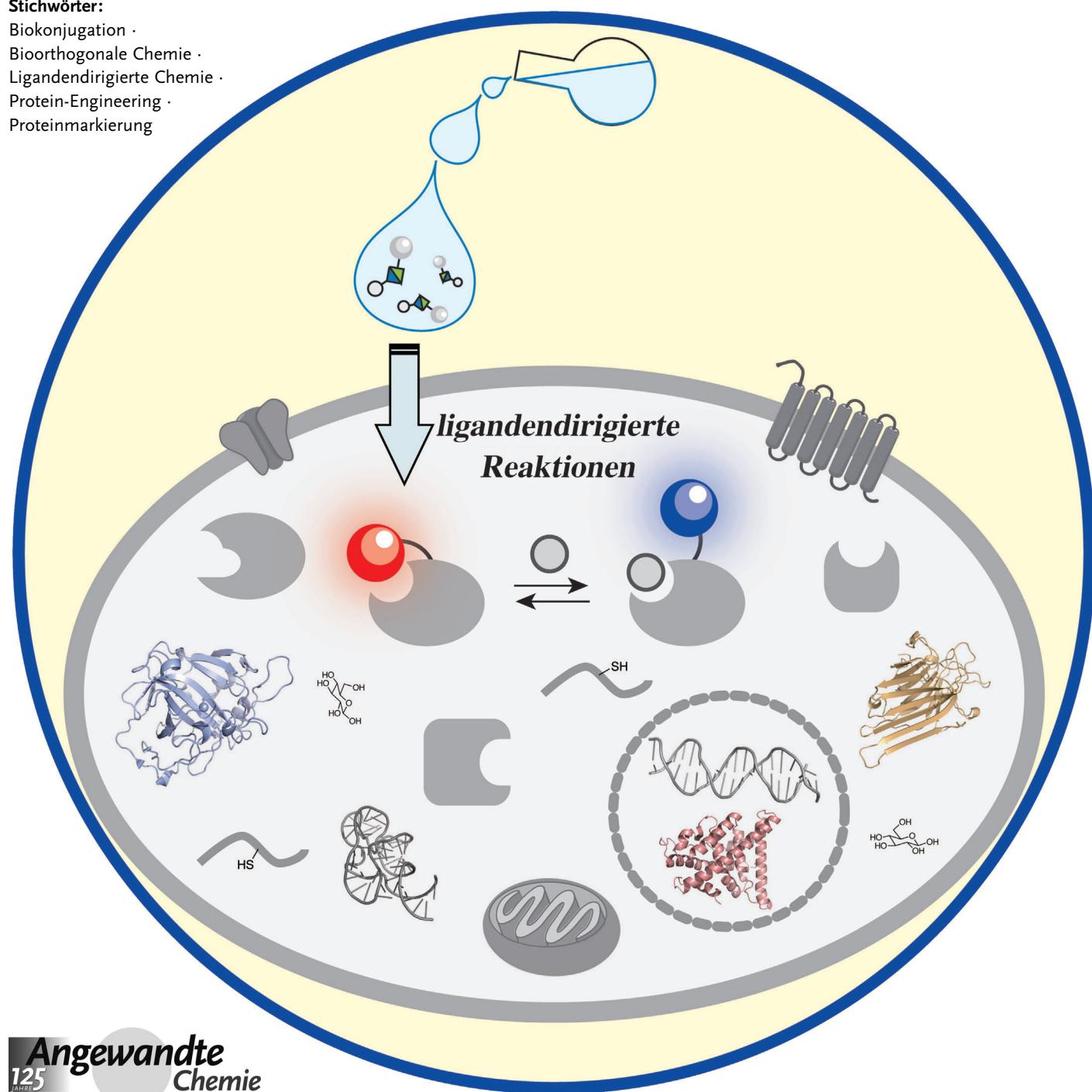


Organische Proteinchemie und ihre Anwendung für Markierungen und Engineering in Lebendzellsystemen

Yousuke Takaoka, Akio Ojida und Itaru Hamachi*

Stichwörter:

Biokonjugation ·
Bioorthogonale Chemie ·
Ligandendirigierte Chemie ·
Protein-Engineering ·
Proteinmarkierung



Die Modifizierung von Proteinen mit synthetischen Sonden kann in vielfältiger Weise zur Aufklärung und Beeinflussung von Proteinfunktionen *in vitro*, in lebenden Zellen oder *in vivo* genutzt werden. Wir stellen hier die jüngsten Fortschritte bei den Methoden zur chemischen Proteinmodifizierung und ihrer Anwendung beim Protein-Engineering vor, wobei wir uns auf vier Strategien konzentrieren: 1) Biokonjugationsreaktionen von Aminosäuren an der Oberfläche natürlicher Proteine, hauptsächlich im Reagenzglas; 2) bioorthogonale Reaktionen von Proteinen mit nichtnatürlichen reaktiven Markergruppen; 3) Kupplung von Erkennungs- und reaktiven Regionen unter Verwendung eines Pairs aus Enzym oder kurzem Peptid mit einem Sondenmarker zur Markierung natürlicher Aminosäuren; 4) ligandendirigierte chemische Reaktionen zur selektiven Markierung endogener Proteine in lebenden Systemen. Zusammengekommen bieten diese Techniken ein nützliches Repertoire von Methoden zur Anwendung in der chemischen Biologie, wobei die drei letztgenannten auf unveränderte (lebende) Systeme anwendbar sind. Die organische Chemie zur Manipulation endogener Proteine ist zwar noch in einer frühen Phase, doch die nachfolgend beschriebenen Anwendungen sind ein lohnendes Ziel für Chemiker.

1. Einleitung

Die Untersuchung der Struktur und Funktion von Proteinen ist von großer Bedeutung nicht nur für die Grundlagenforschung, sondern auch für die Entwicklung biomedizinischer und biotechnologischer Anwendungen. Eine leistungsfähige Methode zur Aufklärung von Proteinfunktionen ist dabei die Modifizierung von Proteinen mit molekularen Sonden.^[1,2] Für die Bildgebung in lebenden Zellen mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen sollten die zu untersuchenden Proteine mit einem Fluoreszenzmarker gekuppelt sein, der eine selektive Bestimmung ihrer Lokalisierung, Bewegung und Aktivität in Echtzeit ermöglicht. Die Modifizierung von Proteinen mit synthetischen Molekülen ist auch eine nützliche Technik, um Proteinfunktionen künstlich zu verändern und so neue Biokatalysatoren und bioanalytische Hilfsmittel verfügbar zu machen. Der aktuelle Trend der chemisch-biologischen Forschung geht dahin, die Proteinmodifizierungen unter Bedingungen durchzuführen, die denen in lebenden Zellen oder in Geweben/Organen näher kommen als die im Reagenzglas (*in vitro*). Um einheitlich mit synthetischen Molekülen modifizierte Proteine zu erhalten, müssen mehrere Bedingungen erfüllt sein, darunter 1) Proteinselektivität, 2) Selektivität für die Markierungsposition, 3) Kontrolle der Zahl der Markierungsstellen und 4) weitere Modifizierung der markierten Aminosäuren. Die neu entwickelten, hochpräzisen Proteinmodifizierungsverfahren können grob in zwei Kategorien unterteilt werden: Die erste beruht auf einer gentechnischen Modifizierung, die einen erweiterten genetischen Code nutzt, und die zweite auf der Markierung exprimierter Proteine (posttranskriptionale Proteinmodifizierung). Die erste Methode wurde von Peter G. Schultz eingeführt und

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	4183
2. Biokonjugation natürlicher Aminosäuren für Proteinmodifizierung und -Engineering	4184
3. Spezifische Proteinmarkierung in Zellen und <i>in vivo</i>	4188
4. Selektive Markierung endogener Proteine in lebenden Zellen	4192
5. Zusammenfassung und Ausblick	4197

besteht aus der direkten Einführung einer nichtnatürlichen Aminosäure, die einen Fluorophor oder andere Funktionalitäten trägt, in ein Zielprotein an der gewünschten Position.^[3–6]

Nachteile dieser Technik sind die be-

grenzte Funktionalität der Sonden, die eingeschränkte Zahl nutzbarer Zelllinien sowie unzureichende Ausbeuten der gentechnisch veränderten Proteine. Die Methode der post-transkriptionalen Modifizierung ist besser geeignet, um die Vielfalt unterschiedlicher Funktionalitäten in synthetischen Molekülen umfassend zu nutzen. Diese Methode, die hauptsächlich chemiegetrieben ist, ermöglicht die flexible und effiziente Modifizierung von Proteinen zu jedem Zeitpunkt und an jeder Position in der Proteinsequenz. Die Proteine können mit einer ganzen Palette funktionaler Moleküle modifiziert werden, darunter lumineszierende Farbstoffe, spinaktive und NMR-aktive Sonden, photoaktivierbare Moleküle und Polymere, wenn die oben genannten Bedingungen erfüllt werden können. Dieser Aufsatz befasst sich mit der posttranskriptionalen Proteinmodifizierung und diskutiert aktuelle Fortschritte, die den Nutzen dieser Methode für die biologische Grundlagenforschung und für Anwendungen vergrößern können (Schema 1).

[*] Dr. Y. Takaoka, Prof. Dr. I. Hamachi
Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry
Kyoto University
Katsura, Nishikyo-Ku, Kyoto 615-8510 (Japan)
E-Mail: ihamachi@sbchem.kyoto-u.ac.jp
Prof. Dr. A. Ojida
Graduate School of Pharmaceutical Sciences
Kyushu University
3-1-1 Maidashi, Higashi-Ku, Fukuoka 812-8582 (Japan)
Prof. Dr. I. Hamachi
Japan Science and Technology Agency (JST), CREST
5 Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokio 102-0075 (Japan)

2. Biokonjugation natürlicher Aminosäuren für Proteinmodifizierung und -Engineering

2.1. Biokonjugation natürlicher Aminosäuren an einer Proteinoberfläche

2.1.1. Klassische Biokonjugationsverfahren für Proteine

Aus Sicht des Chemikers können alle Proteine als gefaltete Polymere mit vielen nucleophilen funktionellen Gruppen an der Oberfläche gelten. Von den zahlreichen natürlich in Proteinen vorkommenden nucleophilen Aminosäureresten wird Cystein mit seiner Thiolgruppe oft für eine ortsspezifische Modifizierung von Proteinen genutzt, weil die Thiolgruppe besonders nucleophil ist und zudem in den meisten Proteinen relativ selten an der Oberfläche vorkommt (genomweit nur 2.3%). Wenn es keinen reaktiven Cysteinrest an der Proteinoberfläche gibt, kann man einen solchen durch gentechnische Punktmutation einführen, eine effiziente Methode für die ortsspezifische Proteinmodifizierung. Die Thiolgruppe von Cystein lässt sich leicht durch Reaktion mit α -Halogenketonen oder Michael-Akzeptoren wie Maleimid-derivaten alkylieren (Schema 2a). Auch die ϵ -Aminogruppe



Yousuke Takaoka wurde 1982 in Shimane (Japan) geboren, promovierte 2010 bei Prof. I. Hamachi an der Kyoto University und forschte anschließend als Postdoktorand an der Tokyo University bei Prof. K. Hirose. 2011 wechselte er als Assistant Professor zur Kyoto University. Er befasst sich mit supramolekularer Chemie, Protein-Engineering, Neurobiologie und chemischer Biologie.



Akio Ojida wurde 1968 in Fukuoka (Japan) geboren und promovierte 1995 an der Kyushu University bei Prof. K. Kanemitsu; dem folgte ein Postdoktorat am Institute for Molecular Science bei Prof. M. Shionoya. 1997–2001 forschte er in den Medicinal Research Laboratories von Takeda Chemical Industries und wurde 2001 Assistant Professor an der Kyushu University. 2003 wechselte er als Assistant Professor an die Kyoto University, wo er 2007 Lecturer wurde. 2010 wurde er Full Professor der Kyushu University. Sein Forschungsgebiet sind niedermolekulare Sonden.



Itaru Hamachi wurde 1960 in Fukuoka (Japan) geboren und promovierte 1988 an der Kyoto University bei Prof. I. Tabushi. Anschließend wechselte er als Assistant Professor zur Kyushu University und wurde ebenda 1992 zum Associate Professor befördert. 2001 wurde er Full Professor und ging schließlich 2005 wieder zur Kyoto University zurück. Er ist CREST Investigator am JST und RSC Fellow. Seine Forschungen gelten der Nanobiowissenschaften, supramolekularen Chemie und chemischen Biologie.

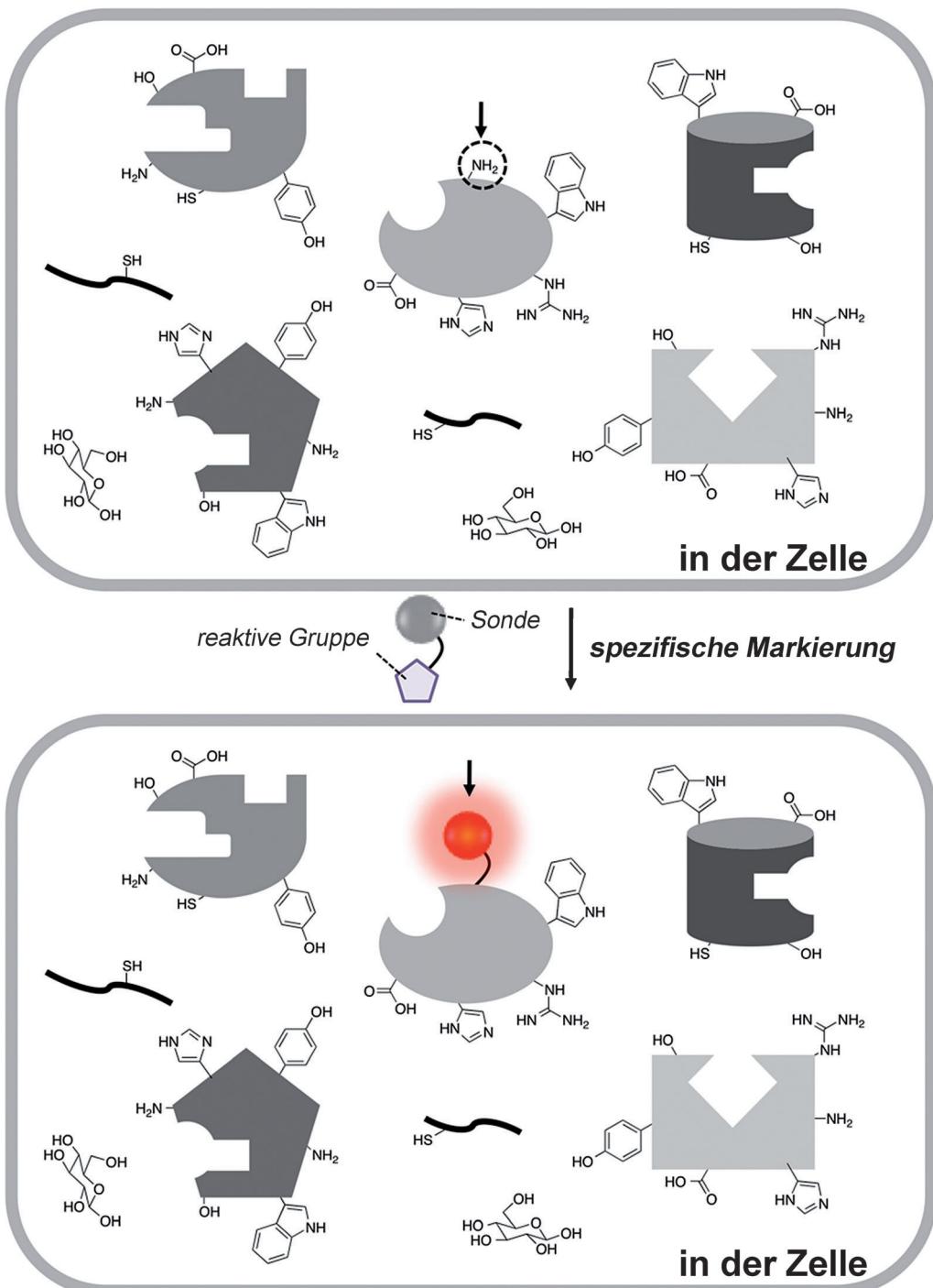
von Lysin ist (obwohl Lysin deutlich häufiger vorkommt als Cystein) ein beliebter Anknüpfungspunkt für Proteinmodifikationen, denn es gibt zahlreiche Methoden für die selektive Derivatisierung primärer Amine.^[7] Lysin kann mit aktivierten Estern, Sulfonylchloriden, Isocyanaten und Isothiocyanaten zu den entsprechenden Amiden, Sulfonamiden, Harnstoffen und Thioharnstoffen reagieren (Schema 2b). Man muss dabei aber beachten, dass diese Reagentien auch den N-Terminus der Proteine modifizieren können.

2.1.2. Neue Methoden zur Modifizierung von Lysin- und Cysteinresten

In der letzten Zeit wurden verschiedene neue Methoden zur selektiven Modifizierung von Aminen und Thiolen entwickelt und verbessert. So berichteten Francis und McFarland von einer lysinspezifischen reduktiven Alkylierung über eine Iridiumkatalysierte Transferhydrierung (Schema 3a).^[8] Im Unterschied zur klassischen reduktiven Alkylierung mit Natriumcyanoborhydrid unter sauren Bedingungen erhält man mit dem Iridiumvermittelten Prozess hohe Ausbeuten des gewünschten Produkts bei neutralem pH-Wert. Von Francis und Scheck wurde auch über eine biomimetische Transamierung des N-Terminus eines Proteins berichtet. Die Methode verläuft über die Kondensation der N-terminalen Aminogruppe des Proteins mit Pyridoxal-5-phosphat und anschließende Hydrolyse zum entsprechenden Pyruvamid (Schema 3b).^[9] Dieses wurde weiter am neu entstandenen Ketonrest mit Aminoxyreagentien umgesetzt. Fukase et al. veröffentlichten eine Methode zur Markierung von Proteinen an Lysinresten auf der Basis einer 6 π -Aza-Elektrocyclisierung (Schema 3c).^[10] Mit diesem Verfahren können kurzlebige PET-Sonden (PET=Positronenemissionstomographie) in die Zielproteine oder -hormone eingebaut werden; sie lassen sich dann für die In-vivo-Bildgebung von Glycanen und Glycokonjugaten einsetzen, weil die Reaktion äußerst schnell verläuft (innerhalb von 30 min bei neutralem pH-Wert).^[10,11] Davis et al. entwickelten ein zweistufiges Modifizierungsverfahren für Cystein (Schema 3d), bei dem im ersten Schritt Cystein mit *O*-Mesitylensulfonylhydroxylamin in Dehydroalanin umgewandelt wird. Dieses wirkt anschließend als Angriffspunkt für weitere Modifizierungen, wie eine Michael-Addition von Thiolen^[12] oder eine Olefin-Kreuzmetathese mit Allylsulfiden in Gegenwart des Hoveyda-Grubbs-Rutheniumkatalysators.^[13]

2.1.3. Biokonjugation an Tyrosin und Tryptophan

Anders als für Cys und Lys gibt es für die übrigen 18 kanonischen Aminosäuren nur wenige Untersuchungen zu ihrer selektiven Modifizierung. Übergangsmetallvermittelte Methoden wurden für die Modifizierung von Tyrosin und Tryptophan entwickelt. Kodadek et al. entwarfen eine wegweisende Methode zur oxidativen Kupplung der Phenolgruppen zweier Tyr-Reste für die Vernetzung zweier Proteine mit einem Ruthenium(II)-Katalysator und einem Cooxidationsmittel.^[14,15] Francis und Mitarbeiter untersuchten die Modifizierung von Tyrosinresten mit einer Drei-Komponenten-Mannich-Reaktion mit Aldehyden und Anilinen (Sche-

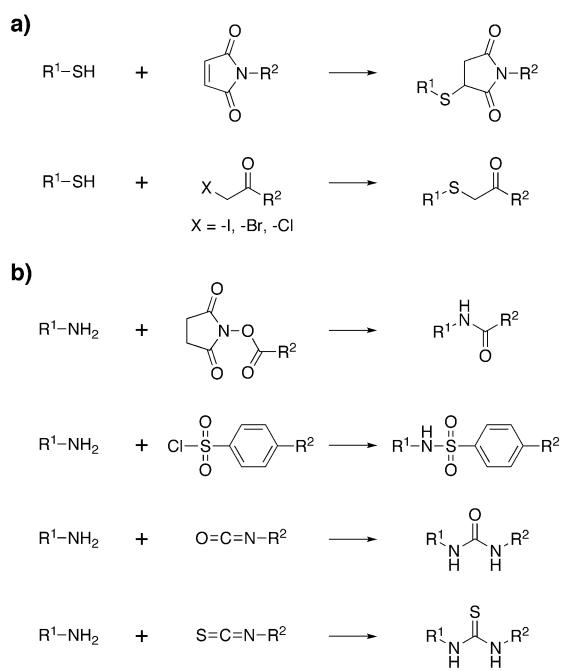


Schema 1. Chemische Reaktionen für die spezifische Modifizierung endogener exprimierter Proteine unter verschiedenen Bedingungen und mit unterschiedlichen reaktiven Molekülen (wie Proteinen, Zuckern und Peptiden).

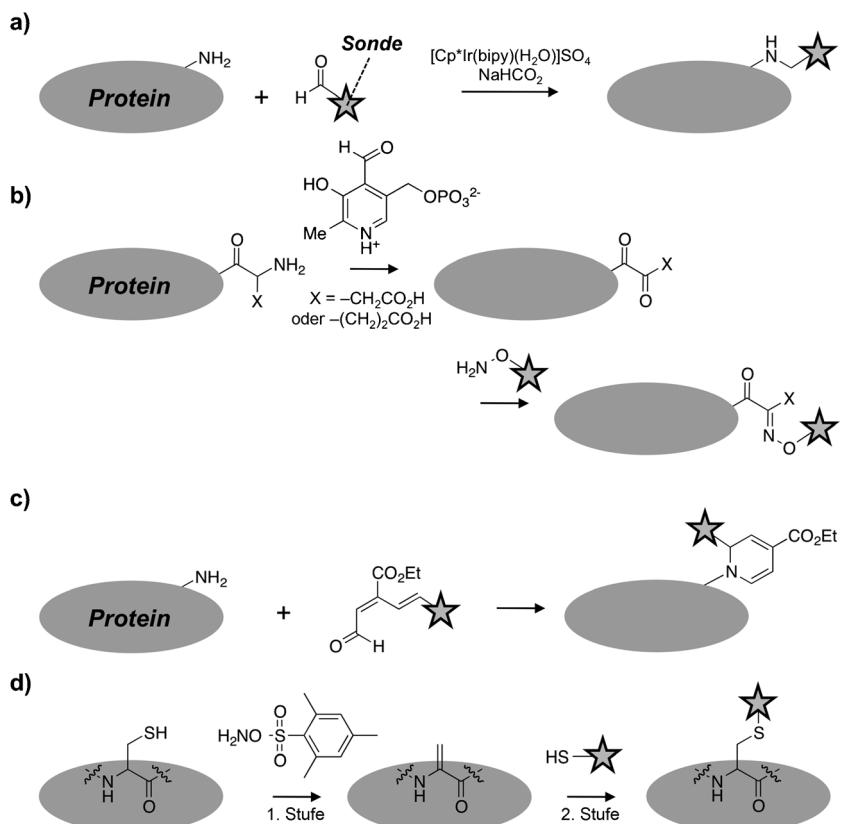
ma 4a).^[16,17] Es gelang ihnen auch, die Tyr-Reste mithilfe von π -Allyl-Palladium-Spezies zu derivatisieren (Schema 4b).^[18] Francis et al. publizierten eine interessante Biokonjugationsreaktion für Tryptophan, die seltenste Aminosäure in Proteinen. An der Reaktion ist ein Rhodiumcarbenoid beteiligt, das *in situ* aus Rhodiumacetat und einer Diazoverbindung generiert wird (Schema 4c).^[19,20]

2.2. Protein-Engineering mithilfe der Biokonjugationsmethode

Die Mehrzahl der Biokonjugationsmethoden beim Protein-Engineering wird in Reagenzgläsern durchgeführt, was eine Reihe von Möglichkeiten zur Manipulation, Verbesserung und Nachahmung von Proteinfunktionen eröffnet. Die Modifizierung von Proteinen mit Polyethylenglycol(PEG)-Gruppen („PEGylierung“) ist eines der bekanntesten Verfahren zur Proteinbiokonjugation.^[21,22] PEG-Protein-Konju-



Schema 2. Klassische Biokonjugationsreaktionen zur Modifizierung von a) Cystein und b) Lysin.

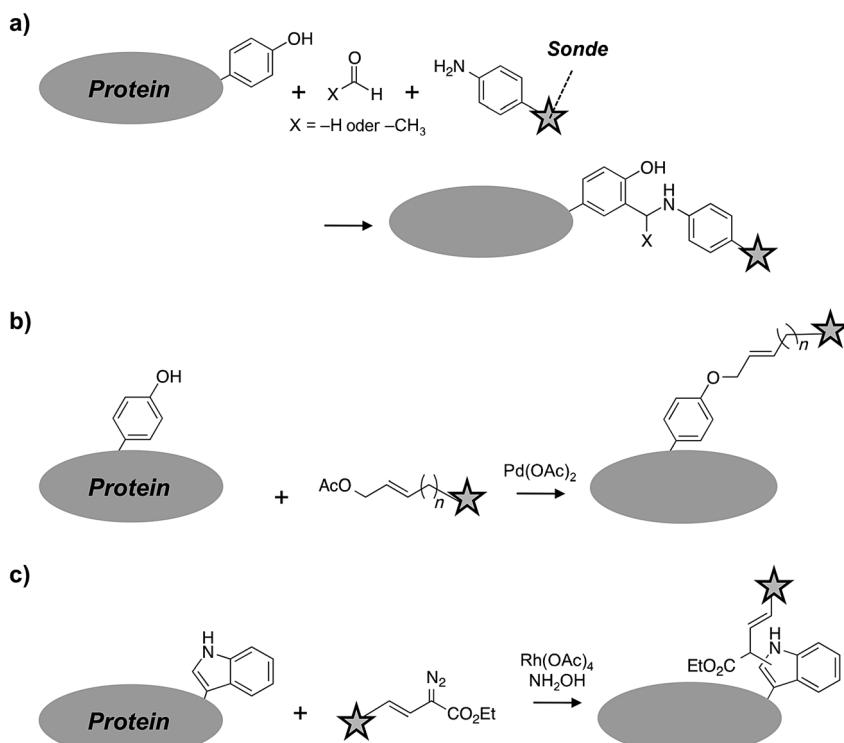


Schema 3. Moderne Biokonjugationsreaktionen zur Proteinmodifizierung an Lysin- und Cysteinresten. a) Iridiumkatalysierte Transferhydrierung für eine lysinspezifische reduktive Alkylierung ($\text{Cp}^* = \text{C}_5\text{Me}_5$, $\text{bipy} = \text{Bipyridyl}$). b) Biomimetische Transaminierung in Form einer N-Terminus-spezifischen Reaktion mit Pyridoxal-5-phosphat und nachfolgende Markierung des neu erzeugten Ketons mit Aminoxyverbindungen. c) 6π -Azaelektrocyclisierung zur lysinspezifischen Modifizierung. d) Umwandlung von Cystein zu Dehydroalanin mit O-Mesitylsulfonylhydroxylamin und nachfolgende Michael-Addition von Thiolreagentien zur cysteinspezifischen Modifizierung.

gate werden meist mit den oben beschriebenen Reaktionen (Cystein-Maleimid, Disulfidbindungsbildung, lysinaktivierte Ester) hergestellt.^[23,24] Die Konjugate haben gegenüber den unmodifizierten Proteinen einige Vorteile, darunter eine verbesserte Löslichkeit, eine längere Verweildauer im Körper, geringerer Abbau durch metabolische Enzyme und eine reduzierte Immunogenität. Diese Eigenschaften können eine wichtige Rolle bei der Freisetzung eines Proteinwirkstoffes^[25] und bei der Entwicklung besserer Therapeutika spielen.^[26]

2.2.1. Proteinbasierte Biosensoren zum Nachweis biologisch aktiver Agentien

Proteinbasierte semisynthetische Biosensoren, die aus einem ligandenbindenden Protein und einer künstlichen Sonde für das Messsignal bestehen, bieten eine hervorragende Möglichkeit, nicht nur eine Reihe wichtiger Substanzen wie Saccharide und verschiedene Chemikalien, sondern auch viele biologische Ereignisse in lebenden Zellen, wie Protein-Protein-Wechselwirkungen, nachzuweisen und zu verfolgen (Schema 5).^[27,28] Der ortsspezifische Austausch eines weniger reaktiven Aminosäurerestes gegen Cystein mit konventionellen Mutagenesetechniken ist der häufigste Weg, um eine synthetische Sonde kovalent an ein ligandenbindendes Protein anzukuppeln. In einer grundlegenden Arbeit beschrieben Hellinga et al. die Umwandlung von bakteriellen periplasmatischen Saccharid-Bindepoteinen (bPBP) in fluoreszierende Biosensoren für den spezifischen Nachweis von Sacchariden (Schema 5b).^[29] Sie entwickelten eine Auswahl von bPBP-basierten fluoreszierenden Biosensoren, indem sie elf bPBP-Gerüste ortsspezifisch mit unterschiedlichen Fluorophoren konjugierten, die auf die Mikroumgebung reagieren (z.B. IANBD; Schema 5c).^[30] Morii et al. entwickelten einen Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃)-Sensor, indem sie die Pleckstrin-homologe (PH)-Domäne von Phospholipase C-δ mit einem auf die Mikroumgebung reagierenden Fluorophor (z.B. Acrylodan; Schema 5c) in der Nähe der IP₃-Bindetasche kuppelten.^[31] Der IP₃-Biosensor wurde mithilfe Arginin-markierter Peptidsequenzen in lebende Zellen eingeführt, wo er eine quantitative Verfolgung der physiologischen IP₃-Produktion in Echtzeit ermöglichte.^[31,32] Hahn und Mitarbeiter entwickelten einen fluoreszierenden Biosensor, der die Aktivierung von endogenem Cdc42 in lebenden Zellen mit einem ratiometrischen Messsignal sichtbar macht.^[33] Eine Domäne des Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteins (WASP), eines Cdc42-Effektorproteins, wurde kovalent über eine In-vitro-Cysteinmodifizierung mit einem lösungsmittelempfind-



Schema 4. Moderne Biokonjugationsreaktionen zur Proteinmodifizierung an Tyrosin- und Tryptophanresten. a) Tyrosinspezifische Dreikomponenten-Mannich-Reaktion mit Aldehyden und Anilinen. b) Tyrosinspezifische Reaktion über ein π -Allyl-Palladium-Intermediat. c) Rhodium-acetat und eine Diazoverbindung für eine tryptophanspezifische Reaktion.

lichen Fluoreszenzfarbstoff markiert (z. B. JPW4039 oder I-SO; Schema 5c).^[34] Die markierte WASP-Domäne wurde mit einem verstärkt grün fluoreszierenden Protein (enhanced green fluorescent protein, EGFP) fusioniert. EGFP erzeugt ein Fluoreszenzsignal, das von der Cdc42-Bindung nicht beeinflusst wird und daher als interner Standard geeignet ist. Nach Injektion in Zellen wurde mit dem ratiometrischen Biosensor die Aktivierung von endogenem Cdc42 unter physiologischen Bedingungen abgebildet.^[33] Später entwickelten Rauh et al. ein neues System zum Screening von Kinasehemmstoffen mithilfe fluorophormarkerter Kinassen.^[35,36] Mit ihren semisynthetischen Biosensoren ließ sich eine wirkstoffähnliche Leitstruktur finden, die an eine eigene Stelle der Adenosin-5'-triphosphat(ATP)-Bindetasche bindet.

Bayley und Cremer entwickelten verschiedene stochastische Sensoren zur Detektion von organischen Molekülen, DNA/RNA und Proteinen mit einer künstlichen, nanoskaligen, transmembranären Protein-Nanopore in einer isolierenden Membran, die den spannungsgetriebenen Ionentransport durch die Pore in Gegenwart von Analyten bestimmen.^[37] In früheren Arbeiten hatten Bayley et al. gezeigt, dass β -Cyclodextrin(β -CD)-Adapter, die nichtkovalent im Lumen einer durch α -Hämolsin (α -HL) gebildeten Nanopore immobilisiert waren, eine signifikante, aber unvollständige Blockierung des Tunnels verursachten.^[38] Um die von der Dissoziation der Adapter verursachten Hintergrundsignale auszuschalten, platzierte die Gruppe um Bayley β -CD

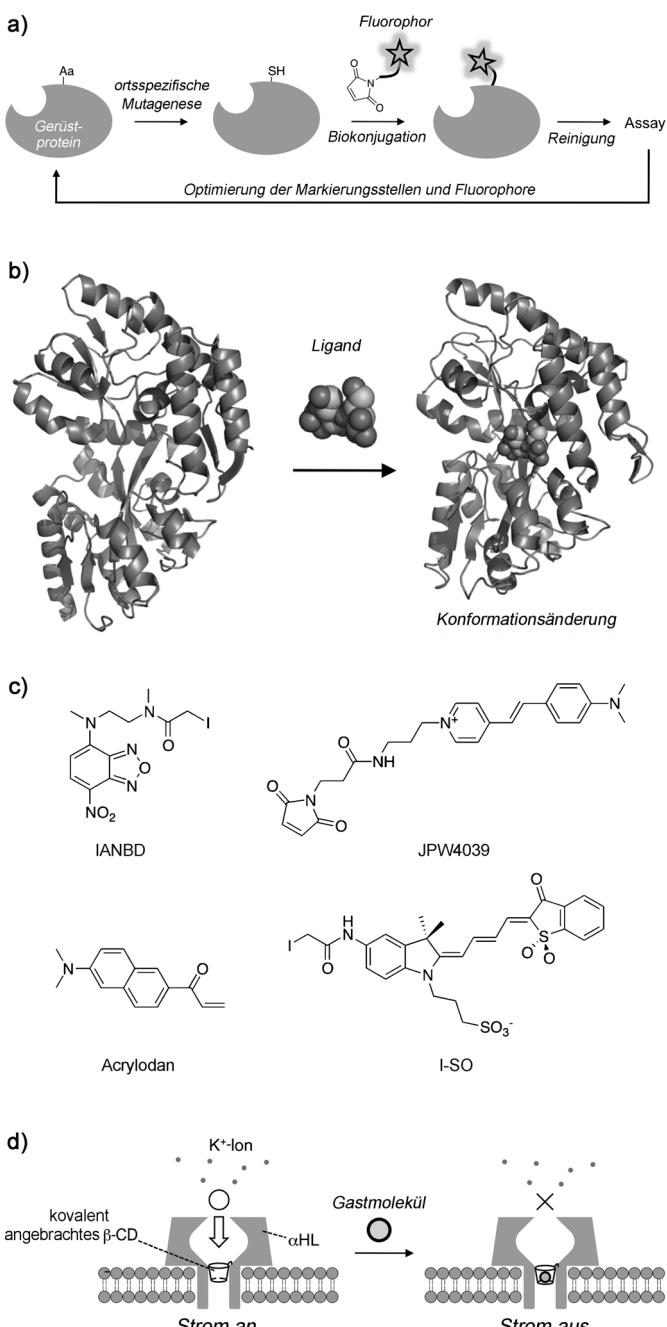
in stabiler Orientierung kovalent in der α -HL-Pore durch Bildung von Disulfidbrücken mit α -HL-Cysteinresten (Schema 5d). Danach wurden Oligo-DNA- und DNA-Aptamere an α -HL konjugiert, um Bioanalytik auf Einzelmolekülebene betreiben zu können.

2.2.2. Andere Beispiele für Protein-Engineering durch Biokonjugation

Francis und Stephanopoulos berichteten über Anwendungen verschiedener modifizierter Proteine, die mit der Biokonjugationsmethode hergestellt wurden. Ein Beispiel ist das modifizierte Virus-capsid.^[39] Die Proteinbausteine (Monomere des Tabakmosaikvirus-Hüllproteins) wurden mit unterschiedlichen Maleimid-gekoppelten funktionalen Molekülen über Cysteinreste modifiziert, darunter PEG, Wirkstoffe, Fluorophore und Porphyrine (Schema 6a). Modifizierte Virus-capside dieses Typs sind vielversprechende Nanomaterialien für die gezielte Abgabe therapeutischer und bildgebender Agentien, für Lichtsammelsysteme und für die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff. Außerdem entwickelte die Gruppe von Francis Protein-Polymer-Hybridmaterialien auf Metallothioneinbasis für die Wasserbehandlung.^[40,41] Metallothioneine sind cysteinreiche Proteine, die toxische Metallionen binden können. Die entstehenden Biokonjugate behielten ihre Selektivität und entfernten effizient Spuren toxischer Metallionen aus Meerwasser unter Schrumpfen des Polymergels.

Biokonjugation ist auch gut geeignet, um semisynthetische Proteinmimetika unter anderem durch posttranskriptionale Modifikation herzustellen. Davis et al. stellten semisynthetische glycosillierte und sulfonierte Proteinmimetika her, indem sie zwei orthogonale Biokonjugationsstrategien anwendeten, nämlich die Azid-Alkin-Klick-Reaktion und die Disulfidbildung an einem Cysteinrest (Schema 6b).^[42] Aus ihren Veröffentlichungen geht klar hervor, dass die Einführung geeigneter chemischer Modifikationen mit entsprechenden räumlichen Anordnungen die Funktion eines nativen Proteins präzise nachahmen kann.

Trauner et al. berichteten über einen besonderen Ansatz, um die Aktivität von Kanalproteinen an der Oberfläche lebender Zellen photoschaltbar zu machen; dabei wurde mit Hilfe einer Michael-Addition ein optischer Azobenzolschalter an einem Cysteinrest eingeführt (Schema 6c). Diese Methode kann möglicherweise auf eine Reihe von Kanalproteinen übertragen werden, z. B. auf den ionotropen Glutamatrezeptor^[43] und den Kaliumkanal.^[44,45] Außerdem lässt sich so die neurale Aktivität mit Licht steuern, und zwar sowohl in lebenden Zebrafischen als auch in Zellkulturen.



3. Spezifische Proteinmarkierung in Zellen und *in vivo*

3.1. Bioorthogonale organische Reaktionen zur Proteinmarkierung

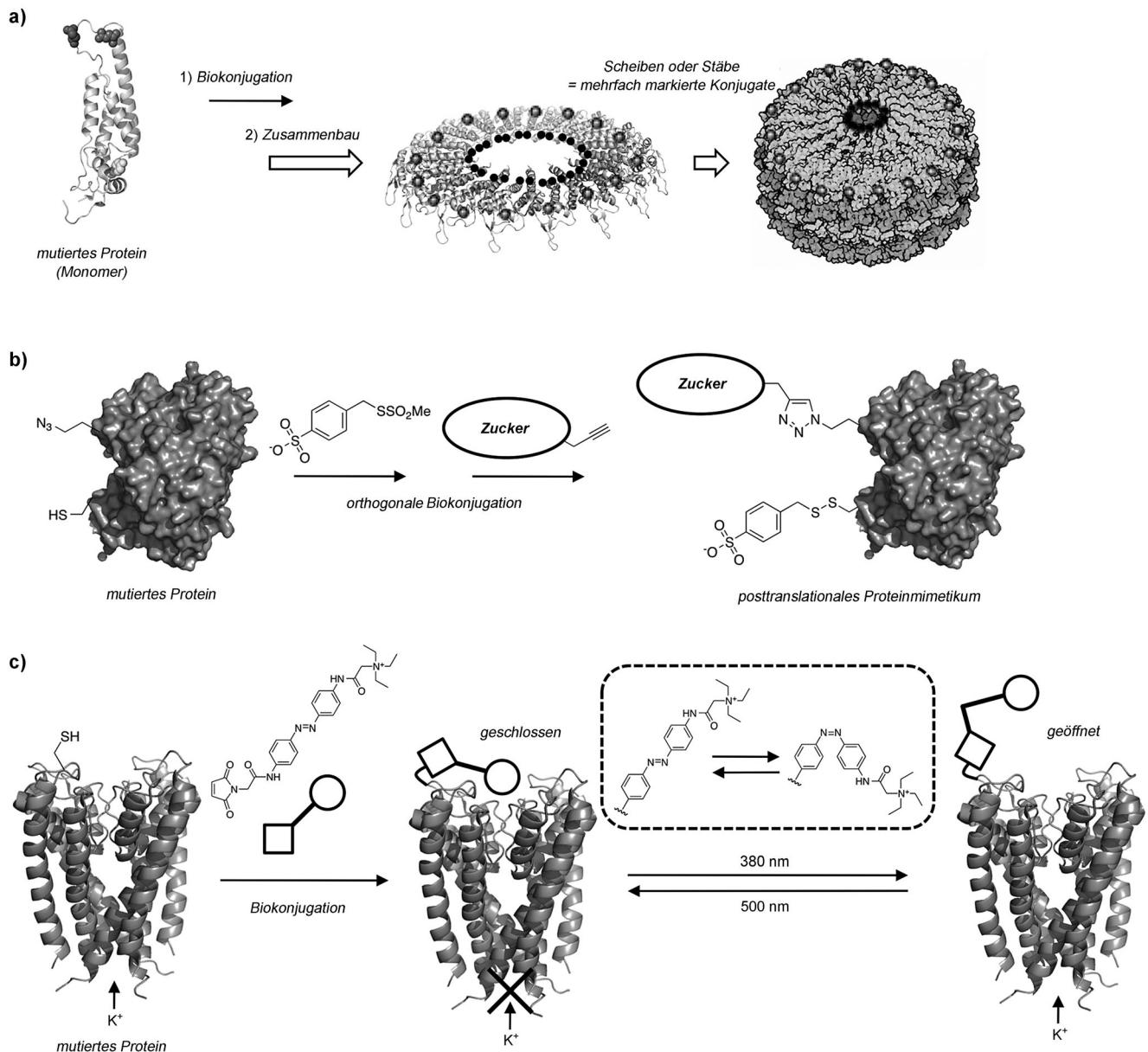
3.1.1. Bioorthogonale Reaktionen mit Aldehyden und Ketonen

Die in Abschnitt 2 beschriebenen Methoden zur Biokonjugation natürlicher Aminosäuren sind zwar für eine Proteinmodifizierung *in vitro* sehr nützlich; eine größere Hürde ist aber die Modifizierung eines spezifischen Proteins in lebenden Zellen, die auch zahlreiche andere Proteine und reaktive Biomoleküle enthalten. Daher wäre es für die hochspezifische chemische Modifizierung eines Proteins in einem biologischen System sehr hilfreich, wenn ein Paar biologisch selten vorkommender reaktiver Gruppen, die ausschließlich miteinander reagieren können, zur Verfügung stünde. Solche bioorthogonalen Reaktionen zwischen nichtnatürlichen reaktiven Gruppen wurden in den letzten Jahren intensiv erforscht.^[2] Keton- und Aldehydfunktionen in einem Protein können als selektive reaktive Angriffspunkte wirken, weil sie normalerweise in Proteinen nicht vorkommen (Schema 7a). Inzwischen wurden mehrere Methoden entwickelt, um Aldehyd- und Ketofunktionen in Zielproteine einzuführen.^[46-48] So berichteten Meijler et al. über den Einbau einer Ketofunktion in einen bakteriellen Rezeptor in lebenden Zellen mithilfe der ortsspezifischen Reaktion eines reaktiven Ligandenmimetikums.^[49] Bertozzi et al. fanden eine enzymatische Methode zur Generierung einer Aldehydfunktion an einem genetisch codierten kurzen Peptidanker mit einem Formylglycin bildenden Enzym („Aldehyd-Tag“).^[50] Sie zeigten auch, wie nützlich diese Methode zur spezifischen Modifizierung rekombinanter, in Säugerzellen produzierter Proteine ist. Es ist bekannt, dass Aldehyd- und Ketofunktionen bioorthogonal Oxime oder Hydrazone durch Reaktion mit den entsprechenden Hydroxylamin- bzw. Hydrazinderivaten bilden können. So können zahlreiche funktionale Moleküle in die derart modifizierten Proteingerüste eingeführt werden.

3.1.2. Bioorthogonale Reaktionen mit Aziden und Alkinen

In lebenden Organismen kommen normalerweise keine Azidverbindungen vor. Außerdem ist die Azidgruppe sehr biokompatibel, weil sie nur eine geringe Reaktivität gegenüber biologischen Substanzen hat und kaum toxisch ist. Konjugationsreaktionen mit einem Azid sind daher ideal für die Proteinmarkierung und gewährleisten ein hohes Maß an Bioorthogonalität. Ein Beispiel ist in der Pionierarbeit von Bertozzi et al. geschildert. Hier wird die klassische, Triarylphosphin-katalysierte Reduktion eines Alkylazids (die Staudinger-Reaktion) zur Proteinmodifizierung in zellulärer Umgebung angewendet (Schema 7b).^[51] Die Autoren fanden, dass Proteine mit Alkylazidgruppe leicht eine Ligation mit Triarylphosphinderivaten eingehen, die eine Esterfunktion an ihren aromatischen Ringen tragen. Dieser Prozess – die Staudinger-Bertozzi-Ligation – wurde oft eingesetzt, um Biomoleküle, vor allem Glycoproteine, in unterschiedlichen zellulären Umgebungen^[52] und in der lebenden Maus^[53] zu untersuchen. Eine andere vielseitige Reaktion, die sich gut

Schema 5. a) Typische Strategie zur Konstruktion eines semisynthetischen Protein-Biosensors mit der Biokonjugationsmethode. b) Konformationsänderungen des Maltosebindeproteins (MBP, PDB-Code: 1OMP und 1ANF) bei Ligandenbindung. c) Chemische Strukturen von auf die Mikroumgebung reagierenden Fluorophoren zur Konstruktion eines semisynthetischen Biosensors. d) Stochastische Sensoren zum Nachweis einzelner organischer Moleküle auf Basis von β -CD-konjugiertem α -Hämolsin nach Bayley und Cremer.^[37]



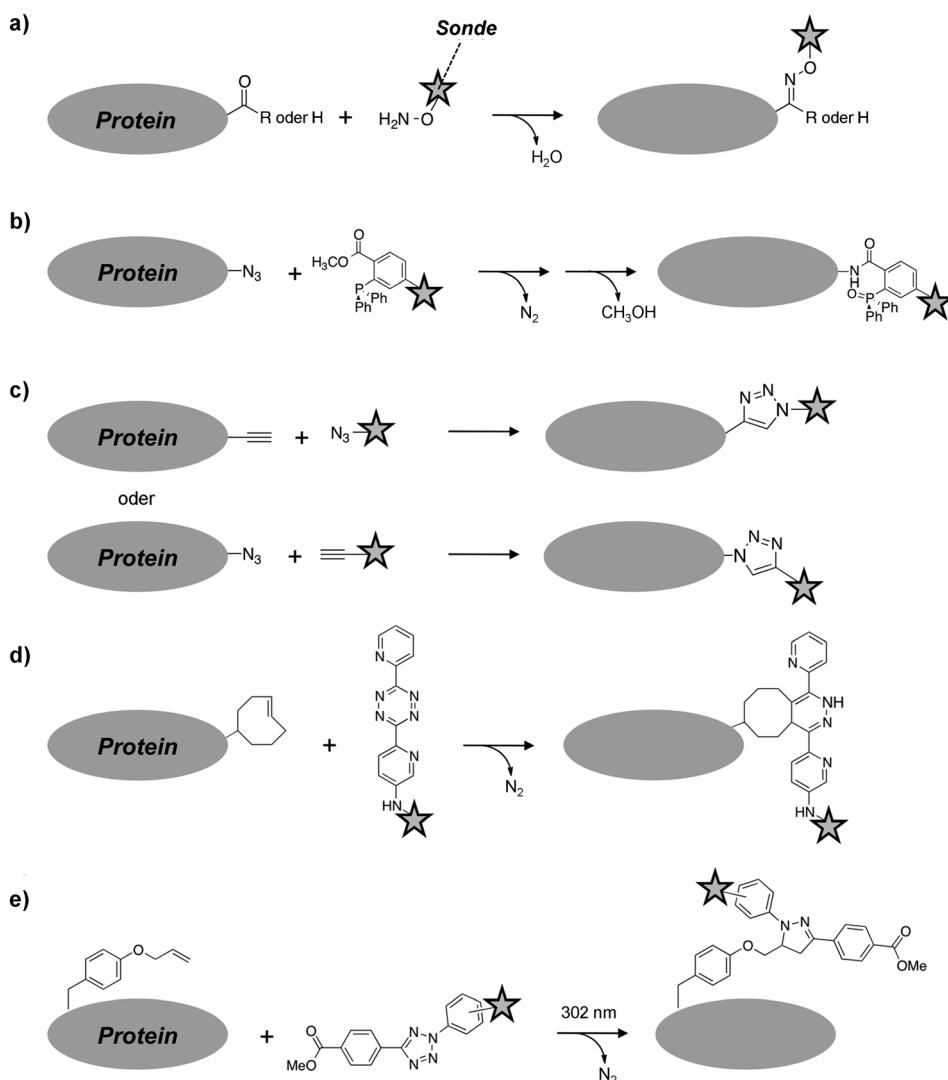
Schema 6. Typische Anwendungsbeispiele für Bioconjunktionsmethoden. a) Selbstorganisation eines biotinylierten Hüllproteins des Tabakmosaikvirus (PDB-Code: 1E17 und 3KML) in Scheiben und Stäbe (Francis et al.^[39–41]). b) Konstruktion posttranslational modifizierter Proteinmimetika durch orthogonale Bioconjunktionsreaktionen (Davis et al.^[42]; PDB-Code: 1GOW). c) Lichtschaltbare Affinitätsmarkierung (PAL), um native K⁺-Kanäle lichtempfindlich zu machen (Trauner et al.^[43]; PDB-Code: 2A9H).

für eine Proteinmodifikation eignet und ebenfalls die hohe Bioorthogonalität der Azidgruppe nutzt, ist die Azid-Alkin-[3+2]-Cycloaddition (Huisgen-Cycloaddition; Schema 7c). Der Nutzen dieser Reaktion wurde erstmals von Sharpless, Finn et al. im Rahmen ihrer „Klick-Chemie“-Forschung nachgewiesen.^[54,55] Unabhängig davon entwickelten Meldal et al. diese Reaktion für die ortsspezifische Peptidmodifizierung.^[56] Die Reaktion kann bei Raumtemperatur durchgeführt werden und ergibt durch die katalytische Wirkung eines Cu¹-Salzes eine Triazolverbindung. Bertozzi et al. gelang später auch eine kupferfreie Huisgen-Cycloaddition mit gespannten Cyclooctinen,^[57,58] wodurch sich die Verwendung von toxischem Cu¹ vermeiden ließ. Auf diese Weise ließ sich

der Einsatzbereich dieser Ligationsreaktion in komplexen biologischen Systemen, darunter Zellkulturen,^[59] Zebrafischembryonen^[60] und lebende Mäuse,^[61] wesentlich erweitern.

3.1.3. Andere reaktive Gruppen für bioorthogonale Reaktionen

Nach den oben beschriebenen Erfolgen wurde eine Reihe weiterer bioorthogonaler Reaktionen mit nichtnatürlichen reaktiven Gruppen entwickelt.^[62–64] Fox et al. berichteten über eine Proteinbioconjunktionsreaktion auf der Basis einer Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf zwischen einem gespannten *trans*-Cycloocten und einem Tetrazinderi-



Schema 7. Bioorthogonale Reaktionen zur selektiven Proteinmarkierung. a) Reaktionen von Aldehyden und Ketonen mit Hydroxylaminen. b) Staudinger-Ligation von Aziden mit Triarylphosphinen. c) Klick-Reaktion von Alkinen mit Aziden. d) Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf von *trans*-Cyclooctenen mit Dipyrindyltetrazinen. e) Photoklickreaktion von *O*-Allyltyrosin mit Diaryltetrazolen.

vat.^[65] Diese Reaktion verlief ungewöhnlich schnell (typischerweise innerhalb von 5 min bei Raumtemperatur) quantitativ zum chemisch modifizierten Protein (Schema 7 d). Vor kurzem publizierten Bertozzi et al. eine andere Cycloaddition zur Proteinmodifizierung: die Quadricyclan-Ligation.^[66,67] Sie zeigten, dass die [2+2+2]-Cycloaddition des hochgespannten Quadricyclans mit Ni-Bis(dithiolen) in wässrigem Medium ähnlich schnell wie eine Cyclooctin-Azid-Cycloaddition abläuft. Außerdem wiesen sie nach, dass die Quadricyclanligation mit der ringspannungsgtriebenen Azid-Alkin-Cycloaddition und der Oximligation kompatibel und zu ihnen orthogonal ist.^[67] Palladiumkatalysierte Kreuzkupplungen wie die Suzuki-Miyaura-Kupplung sind eine andere nützliche Gruppe von Reaktionen zur Proteinmodifizierung. Davis et al. lieferten Beiträge zur Entwicklung der Palladiumchemie auf Proteinoberflächen und beschrieben 2-Amino-4,6-dihydroxypyrimidin als einfachen Katalysator für die Suzuki-

blizierten Popik et al. auch eine lichtausgelöste Klick-Reaktion eines Azids mit einem gespannten Cycloalkin.^[72]

3.2. Selektive Proteinmarkierung mit einer Enzym- oder Peptidgruppe, die an eine niedermolekulare Sonde bindet

3.2.1. Enzyme als Markierungen für die Modifizierung von Proteinen

Für die meisten bisher beschriebenen bioorthogonalen Reaktionen ist eine spezielle Vorbehandlung unumgänglich, um das Zielprotein mit einer biologisch einzigartigen nichtnatürlichen reaktiven Gruppe wie Azid, Alkin oder Keton zu dekorieren. Diese Modifizierungen gelingen durch metabolische Markierung, gentechnischen Einbau und ortsselektive Biokonjugation. Diese mühevollen Vorbehandlungen verhindern allerdings manchmal die Proteinselektivität und

Miyaura-Kupplung von 4-Iodphenylalanin an der Proteinoberfläche.^[68,69] Jüngst entwickelten Geierstanger et al. eine Methode zur ortspezifischen Modifizierung eines Proteins über die nichtnatürliche Aminosäure Pyrrolincarboxylysin (Pcl).^[70] Pcl kann in viele Proteine gentechnisch mithilfe des *amber*-Codons (TAG) hoch effizient eingeführt werden. Die reversiblen bioorthogonalen Konjugationsreaktionen von Pcl mit Aminobenzaldehyd und 2-Aminoacetophenon verlaufen effizient bei neutralem pH-Wert zu den entsprechenden funktionalisierten Proteinen.

Lichtinduzierte organische Reaktionen bieten die einzige Möglichkeit, die Markierungsprozesse von Proteinen räumlich und zeitlich zu steuern, vor allem in zellulären Systemen. Lin et al. berichteten von lichtinduzierten 1,3-dipolaren Cycloadditionen von Alkenen mit Tetrazolderivaten, auch als „Photoklick-Chemie“ bekannt (Schema 7 e).^[71] Durch UV-Bestrahlung wurde die Bildung eines Nitrilimins aus den Tetrazolen induziert; das Nitrilimin durchlief anschließend eine Cycloaddition zu einem Pyrazolocycloaddukt. Diese Reaktion wurde auch auf ein Protein mit nichtnatürlichen Aminosäuren wie *O*-Allyltyrosin in *E. coli*-Zellen und in Pufferlösungen angewendet. Jüngst pu-

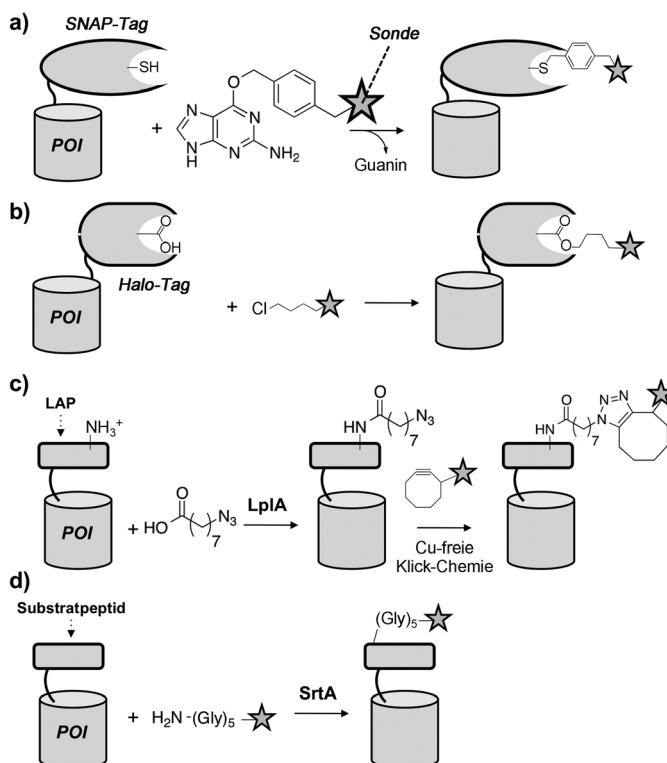
schränken die Auswahl der nutzbaren Zelllinien ein. Daher wäre eine andere Strategie wünschenswert, mit der man Proteine, die aus natürlichen Aminosäuren bestehen, direkt modifizieren kann. Eine Reihe enzymkatalysierter Proteinmarkierungsverfahren wurde in den letzten Jahren zu diesem Zweck entwickelt, die auf strenger Enzym-Substrat-Erkennung beruhen. Johnsson et al. haben auf diesem Feld Pionierarbeit geleistet. Für ihr Verfahren wird eine Mutante der humanen O^6 -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT) verwendet. Diese trägt ein Enzym, das spezifisch mit einem O^6 -Benzylguaninderivat zu einem kovalent markierten Protein reagiert (Schema 8a).^[73] Dieses Markierungsverfahren wird als SNAP-Tag-Technik bezeichnet und für zahlreiche biologische Anwendungen eingesetzt.^[73–75] Ein anderes praktisches Enzym zur Markierung wurde von Promega unter dem Namen Halo-Tag entwickelt (Schema 8b).^[76] Diese vielseitige Technik wird häufig nicht nur für die spezifische Markierung von Proteinen in zellulärer Umgebung, sondern auch für Proteinreinigung^[77] und -immobilisierung^[78] sowie für den Einbau von Abbausignalen in Zielproteine^[79] eingesetzt. Die Substratkonjugationsstrategie ist eine andere Art enzymkatalysierter Markierung als jene Methoden; sie greift auf ein kurzes Peptid oder eine kleine Proteindomäne zurück, die an das Zielprotein als Enzymsubstrat fusioniert wurde. Ting et al. veröffentlichten den enzymvermittelten Einbau von Sonden (probe incorporation mediated by enzymes, PRIME), ein Proteinmarkierungsverfahren, das durch Li-

ponsäureligase katalysiert wird (LplA; Schema 8c).^[80,81] Sie stellten ein mutiertes LplA her, das ein Substrat vom Cu-mariotyp erkennt und seine kovalente Konjugation an ein 13 Aminosäuren langes LlpA-Akzeptorpeptid (LAP) als Markierungsgruppe katalysiert. Dieser Fluoreszenzmarkierungsprozess läuft in lebenden Zellen innerhalb von 10 min ab und ist für das mit der LAP-Gruppe fusionierte Protein gegenüber allen anderen endogenen Säugerproteinen hochspezifisch. Auch verschiedene andere enzymkatalysierte Markierungsverfahren wurden entwickelt (Schema 8d), und ihre Anwendung wurde bei der Markierung von Proteinen in lebenden Zellen ebenso demonstriert wie *in vitro*.^[82–84]

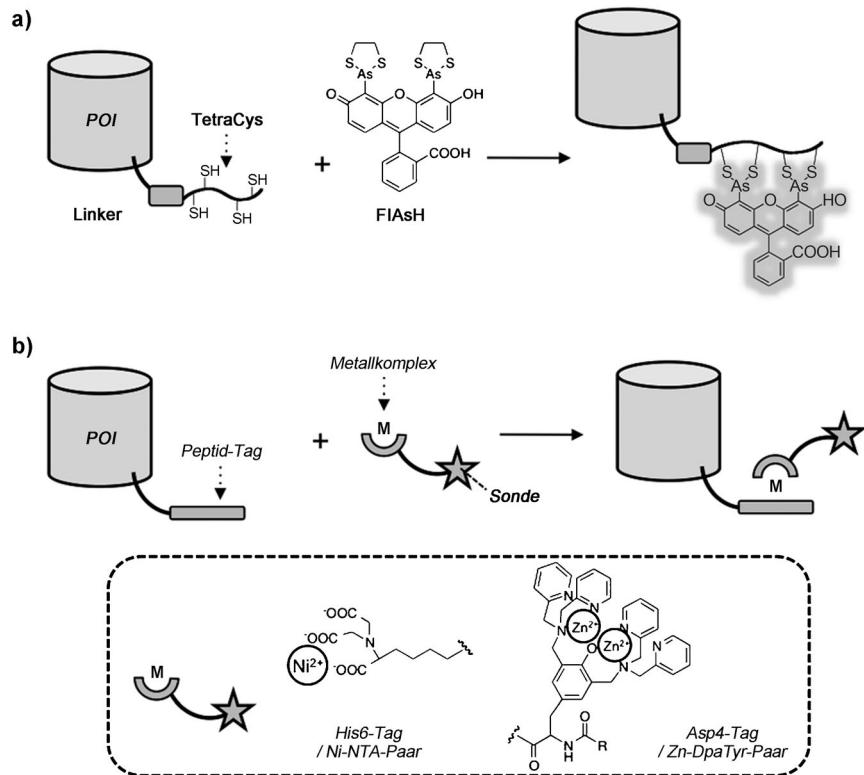
3.2.2 Kurze Peptide für die Proteinmodifizierung

Es gibt jedoch auch mögliche Nachteile bei den enzymatischen Markierungsverfahren. Sie können die Proteinfunktion negativ beeinflussen, da die Enzymeinheiten ein großes Molekulargewicht haben (hAGT: 20 kDa, Halo-Tag-Dehydrogenase: 33 kDa), das mit der grün fluoreszierenden Proteine (GFPs; 27 kDa) vergleichbar ist. Es gab allerdings verschiedene Berichte über die Zerstörung einer korrekten Proteinassoziation durch Fusion mit GFP in einer Bildgebungsuntersuchung.^[85] Zur Umgehung dieses Problems wurde eine andere Markierungsstrategie vorgeschlagen. Dabei wurde ein komplementäres Erkennungspaar aus einem kurzen Peptidanhänger und einer kleinen molekularen Sonde verwendet. In einer Pionierarbeit von 1998 zeigten Tsien et al., dass eine zwei Arsenatome enthaltende Sonde wie FlAsH selektiv an ein Tetracysteinmotiv (CCXXCC) mit bemerkenswert hoher Affinität ($100 \text{ pm} > K_d$) bindet.^[86] Außerdem verursachte die Bindung der Sonde eine starke Zunahme der Fluoreszenz (Schema 9a). Diese Markierungs methode wurde auch auf die Fluoreszenzabbildung von Proteinen innerhalb und außerhalb lebender Zellen angewendet,^[87] z. B. für die Bestimmung der Lebenszeit eines Proteins mit Vielfarben-Fluoreszenz-Pulse-Chase^[88] und für chromophorunterstützte Lichtinaktivierung (CALI, chromophor-assisted light inactivation) zur räumlichen und zeitlichen Inaktivierung von Proteinen.^[89] Später entwickelte die gleiche Gruppe einen arsenhaltigen Calciumindikator (Calcium Green FlAsH) zur Abbildung regionaler Calciumkonzentrationsänderungen in der Nachbarschaft der mit der Markierung fusionierten Proteine in Zellen.^[90] Außer diesen Anwendungen bei der Bildgebung wurde die FlAsH-Methode auch bei anderen Untersuchungen eingesetzt, darunter dem Studium von Protein-Protein-Wechselwirkungen, dem Verfolgen der Proteinfaltung und der Kontrolle der Enzymaktivität im Reagenzglas.^[91–93]

Die Oligohistidin-Markierung („His-Tag“), die ursprünglich von F. Hoffmann-La Roche als Affinitätsgruppe für die Proteinreinigung entwickelt worden war,^[94] wurde auch auf die selektive Proteinmarkierung übertragen. Vogel et al. und Piehler et al. berichteten unabhängig voneinander von einem Proteinmarkierungssystem mit einem konventionellen Bindepaar aus einem His-Tag und einer Ni^{II} -Nitrilo-triacetat(NTA-)Sonde (Schema 9b). Vogel und Mitarbeiter wiesen die Machbarkeit ihres Ansatzes nach, indem sie Ni^{II} -NTA-Chromophor-Konjugate an einen durch Liganden ver-



Schema 8. a, b) Enzym-Tags zur Markierung rekombinanter Proteine. a) SNAP-Tag mit einer Benzylguaninsonde. b) Halo-Tag mit einer Alkylchloridsonde. c, d) Enzymatische Proteinmarkierung durch Fusion mit einem Peptid-Tag. c) Liponsäureligase (LplA) mit dem Akzeptorpeptid (LAP). d) Sortase A (SrtA) mit dem Substratpeptid. POI = untersuchtes Protein.



Schema 9. Ein Paar aus Peptid-Tag und Sonde zur Markierung rekombinanter Proteine. a) Tetra-Cystein-Tag mit einer FlAsH-Sonde. b) His6-Tag mit einer Ni-NTA-Sonde und Asp4-Tag mit einer Zn-DpaTyr-Sonde.

sperrten Ionenkanal und einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) banden, von denen jeder eine His-Tag-Sequenz enthielt. Der ionotrope 5-Hydroxytryptamin(5HT)-Rezeptor wurde selektiv mit Ni^{II}-NTA-Sonden für Fluoreszenzmessungen markiert, um Struktur und Plasmamembranverteilung des Rezeptors auf der Oberfläche lebender Zellen zu bestimmen.^[95] Die Gruppe um Pieler entwickelte eine effiziente Methode für die selektive und stabile nicht-kovalente Markierung His-Tags tragender Proteine mit multivalenten Tris-Ni^{II}-NTA-Sonden.^[96] Die Fluoreszenzmarkierung mit Tris-Ni^{II}-NTA-Fluorophorkonjugaten wurde eingesetzt, um die Bildung von Multiproteinkomplexen in Lösung und auf Oberflächen in Echtzeit zu verfolgen. In einer anderen Arbeit entwickelten Tsien et al. HisZnFiT als neuen fluoreszierenden Zn^{II}-Komplex, der mit hoher Affinität ($K_d \approx 40 \text{ nm}$) an ein His6-Tag bindet, um damit die starke Fluoreszenzlösung und die Cytotoxizität des Nickelions in den Ni^{II}-NTA-Sonden zu umgehen.^[97] Hamachi et al. veröffentlichten kürzlich den Einsatz vielkerniger Zinkkomplexe als selektive Fluoreszenzsonden für die Abbildung His-Tag tragender GPCRs auf der Oberfläche lebender Zellen.^[98,99]

Im Allgemeinen erweist sich die De-novo-Entwicklung von komplementären Erkennungssystemen aus kleinen Molekülen und Peptiden mit einer starken und selektiven Bindungsaffinität als äußerst anspruchsvoll. Trotz der Hürden dieser Strategie wurden in den letzten Jahren verschiedene neue Erkennungspaares publiziert, darunter eines aus einem Tetraserinmotiv und einer Borsäuresonde^[100] sowie eines aus

einer Lanthanoid bindenden Gruppe und einem Tb^{III}-Ion.^[101] Ein weiteres Erkennungssystem, das aus einem Oligoaspartatpeptid (D4-Tag, DDDD) und einem zweikernigen Zn^{II}-Komplex (Zn^{II}-DpaTyr) besteht und eine Komplexbildung nutzt, wurde von Hamachi et al. entwickelt (Schema 9b).^[102] Das Paar wurde bei der Fluoreszenzbildgebung eines GPCR-Proteins, das mit einer dreifach wiederholten D4-Gruppe [(D4)₃] fusioniert war und an der Zelloberfläche exprimiert wurde, eingesetzt. In der Folge vervollständigten Hamachi et al. ihr System zur kovalenten Proteinmarkierung mit diesem Erkennungspaar weiter und entwickelten eine Markierung und eine Sonde, die speziell dazu dienen, eine spezifische nucleophile Reaktion im Bindekompex zwischen einem Cysteinrest, der in die D4-Gruppe eingebaut wurde, und der α -Chloracetylgruppe der Zn^{II}-DpaTyr-Sonde zu durchlaufen.^[103] Die schnelle Markierung (10–30 min) von GPCRs wie dem Bradykinin-B2-Rezeptor (B2R) und dem Acetylcholinrezeptor (M1R) verlief selektiv mit Zn^{II}-DpaTyr-Sonden, die verschiedene funktionelle Gruppen tragen,^[104] und ermöglichte die Sichtbarmachung von GPCRs auf HEK-293-Zelloberflächen sowie von jeder Änderung ihrer Lokalisation mithilfe von Fluoreszenz.

Diese nichtenzymatischen Markierungsverfahren haben gegenüber enzymkatalysierten Verfahren mehrere mögliche Vorteile: 1) Man muss keine große Enzym-/Proteindomäne in das Zielprotein einbauen; 2) es gibt vielfältige Markierungsreagentien ohne die strukturelle Einschränkung, als Enzymsubstrat geeignet sein zu müssen; 3) die Markierungsbedingungen sind nicht von den Enzymeigenschaften abhängig.

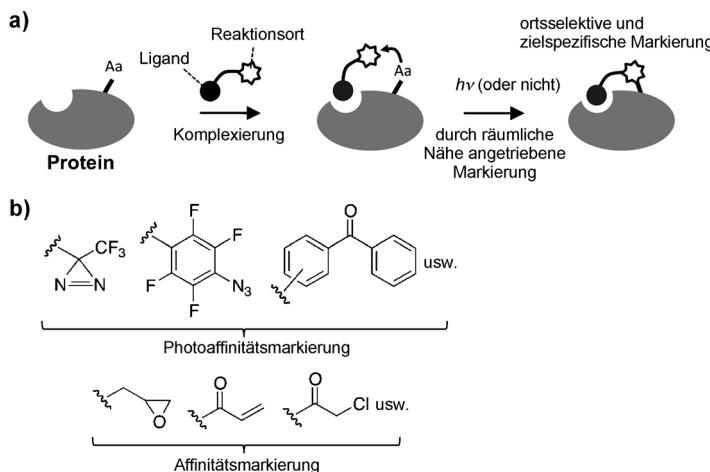
4. Selektive Markierung endogener Proteine in lebenden Zellen

Mithilfe der bioorthogonalen Reaktionen oder der oben beschriebenen Enzym- und Peptid-Tags ist die spezifische Markierung von Proteinen auch unter den chemisch wenig definierten Bedingungen in Zellen und *in vivo* möglich. Der Einbau einer reaktiven Struktur (bioorthogonale nichtnatürliche reaktive Struktur oder Enzym-/Peptidmarkierungsgruppe) in das Zielprotein durch gentechnische Manipulation ist allerdings notwendig für diese Strategie. Als Folge werden die Zielproteine nicht länger endogen gebildet, sondern überexprimiert. Die spezifische Markierung eines natürlichen Proteins, das im typischen Umfeld eines lebenden Systems endogen exprimiert wird, ist ein ideales Szenario für die genaue und quantitative intrazelluläre Proteinanalyse. Die Affinitätsmarkierung gab uns einen wichtigen Hinweis, wie eine solche spezifische Markierung eines endogenen Zielproteins erreicht werden kann. Verschiedene chemische Methoden wurden in diesem Zusammenhang in der letzten Zeit vorgeschlagen.^[105] Vielleicht werden solche Methoden auch in

künftigen medizinischen Anwendungen eine selektive Therapie auf molekularer Basis ermöglichen.

4.1. Selektive Affinitätsmarkierung endogener Proteine

Die Affinitätsmarkierung, bei der das Zielprotein mit einer reaktiven ligandengekoppelten Gruppe markiert wird, wurde vielfach zur Identifizierung und Charakterisierung endogen exprimierter Proteine eingesetzt (Schema 10).^[106-109]



Schema 10. a) (Photo-)Affinitätsmarkierung zur zielspezifischen Proteinmarkierung. b) Chemische Strukturen der reaktiven Gruppen, die allgemein zur (Photo-)Affinitätsmarkierung verwendet werden.

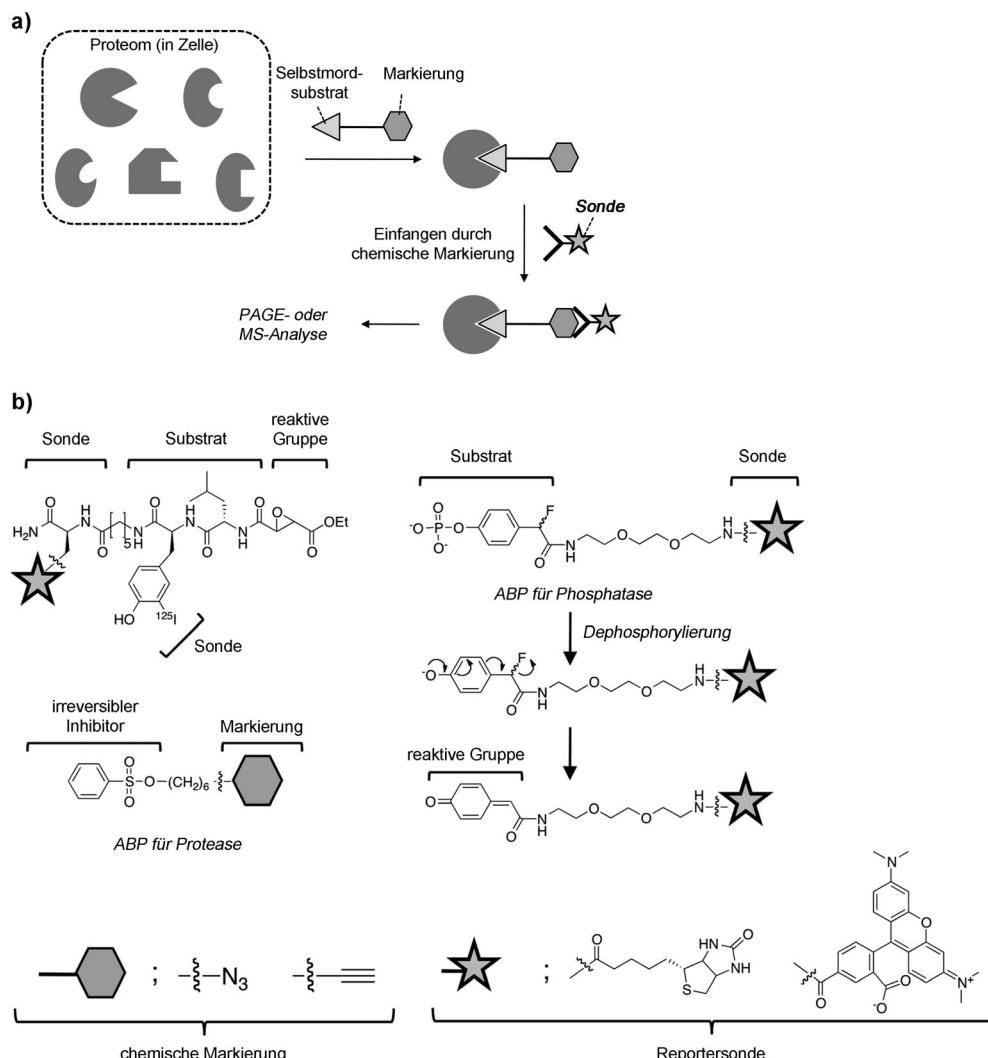
Verbindet man diese Technik mit der modernen Massenspektrometrie, lassen sich zusätzliche Informationen über Struktur und Funktion des Zielproteins gewinnen, z. B. über die Aminosäurereste im aktiven Zentrum sowie über die Stöchiometrie und Ortsspezifität biomolekularer Wechselwirkungen. Seit der ersten Publikation über Affinitätsmarkierung in den frühen 1960er Jahren wurde viel Arbeit in die Optimierung der chemischen Strukturen investiert, mit deren reaktiven Gruppen sich Proteine markieren lassen, bis man zu exzellenten Selektivitäten im gesamten Proteom lebender Zellen gelangte. Am häufigsten beruhen Affinitätsmarkierungen auf verschiedenen photoaktivierbaren Gruppen wie Diazirin, Phenylazid und Benzophenon. Diese lichtgetriebenen Reaktionen können an allen natürlichen Aminosäuren an der Oberfläche von Proteinen ablaufen, jedoch ist die Markierungseffizienz wegen der kurzen Lebensdauer der reaktiven Carbene und Nitrene in wässriger Lösung allgemein niedrig. Anstelle von Photoaffinitätsmarkierungen wurden in neuerer Zeit thermische chemische Reaktionen weiterentwickelt, die nur relativ moderate Reaktivität erfordern und die geeignet sind, effizient hohe Selektivitäten bei der Proteinmarkierung zu erreichen. Sames et al. berichteten von einem neuen Markierungsreagens mit einer Epoxygruppe, die sehr effizient und ortsselektiv gereinigte humane Carboanhydrase II (hCAII) in vitro und in Zelllysaten umsetzt.^[110] Eine systematische Untersuchung ergab, dass die Epoxygruppe die besondere Kombination aus Stabilität und Reak-

tivität aufweist, die erforderlich ist, um stabil in Gegenwart von gelösten Proteinen und zugleich reaktiv in der Nachbarschaft zum aktiven Zentrum zu bleiben.

4.2. Aktivitätsbasierte Proteinmarkierung zum Proteom-Profilng

Ausgehend von den Verfahren zur Affinitätsmarkierung wurden aktivitätsbasierte Sonden (activity-based probes, ABPs) in Form von Selbstmordsubstraten für die entsprechenden Enzyme entwickelt.^[111,112] Mit stark verbesserten ABPs gelang Cravatt et al. und Bogyo et al. unabhängig voneinander ein aktivitätsbasiertes Proteom-Profilng (ABPP) als leistungsfähige proteomische Strategie für die direkte Charakterisierung der „aktiven Form“ eines Enzyms in nativer biologischer Umgebung (Schema 11).^[108,113,114] ABPP-Reagentien werden allgemein als Selbstmordsubstrate für die Zielenzyme konzipiert und bestehen meist aus drei grundlegenden Elementen: 1) einer reaktiven Gruppe, die im aktiven Zentrum des Enzyms bindet und es kovalent modifiziert; 2) einer Linker-Region; 3) einer Reportergruppe, z. B. einem Fluorophor oder einem Biotinmolekül, zum Nachweis und zur Isolierung der sondenmarkierten Enzyme aus Proteomen. Später berichteten Cravatt et al. über die Anwendung einer bioorthogonalen chemischen Gruppe für ABPP, die eine Nachweisgruppe überflüssig macht, die die Effizienz des Einbaus in Zellen und die intrazelluläre Verteilung der Reagentien einschränken würde. Zunächst verwendeten sie ein azidfunktionalisiertes Phenylsulfonat, das Serinhydrolasen angreift.^[115] Die

Azidsonden wurden in lebende Zellen eingeführt, in denen sie die aktiven Enzyme kovalent modifizierten. Die Zelllysate wurden hergestellt und anschließend mit einer Alkin-Rhodamin-Gruppe in einer kupferkatalysierten Klick-Reaktion umgesetzt. Damit konnten verschiedene Enzymklassen, darunter Glutathion-S-Transferase, Enoyl-CoA-Hydratase und Aldehyd-Dehydrogenase, analysiert und aufgeklärt werden.^[116-118] Bogyo et al. untersuchten auch verschiedene ABPP-Sonden zur Darstellung von Cysteinproteasen in lebenden Zellen.^[119] In den letzten zehn Jahren haben mehrere Forschergruppen eine Reihe von ABPP-Sonden zur kovalenten Bindung im aktiven Zentrum entworfen, die den Nachweis zahlreicher Enzymklassen in komplexen Proteomen ermöglichen, darunter Metalloproteasen,^[120] Kinasen,^[121] Phosphatasen,^[122] Glycosidasen^[123] und Oxidoreduktasen.^[124] Wenig später veröffentlichten Cravatt et al. auch einen Bericht über die Verwendung von 1,2,3-Triazolharnstoff als vielseitiger chemischer Verbindung für die selektive Hemmung von Serinhydrolasen.^[125] 1,2,3-Triazolharnstoff-derivate zeigten ihre Hemmwirkung durch eine kovalente Carbamoylierung der reaktiven Serinreste der Hydrolaseenzyme. Die Forscher konnten nachweisen, dass schnelle Leitstruktur-Optimierung und kompetitives aktivitätsbasiertes Profiling durch ABPP möglich sind, um selektive Inhibitoren für verschiedene Serinhydrolasen, darunter Peptidasen, Lipasen und nicht charakterisierte Hydrolasen, mit hoher Wirksamkeit in Zellen und Mäusen zu identifizieren. Diese



Schema 11. a) Aktivitätsbasiertes Proteom-Profilierung (ABPP). b) Chemische Strukturen typischer aktivitätsbasiertes Sonden (ABP).

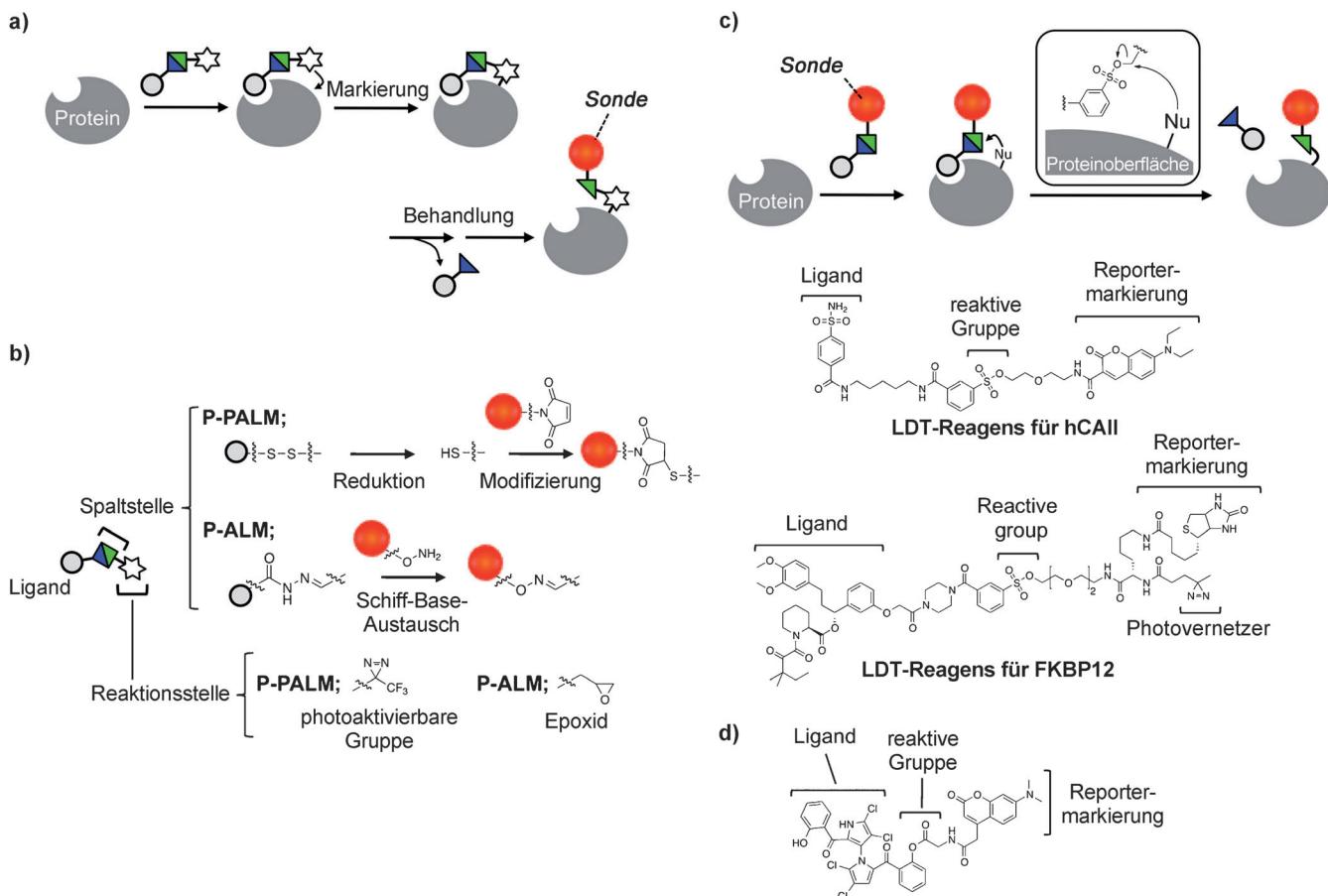
Arbeit ist ein eindrucksvolles Beispiel für den Einsatz einer Markierungsreaktion für endogene Proteine, um damit einen mechanismusbasierten, irreversiblen Inhibitor zu finden. In einem Versuch, die Reichweite der ABPP-Strategie auszuloten, modifizierten Yao et al. die Methode, indem sie einen photovernetzbaren Rest in die ABPP-Reagentien einführten.^[126,127]

4.3. Ligandendirigierte und spurlose chemische Markierung zum Protein-Engineering in lebenden Zellen

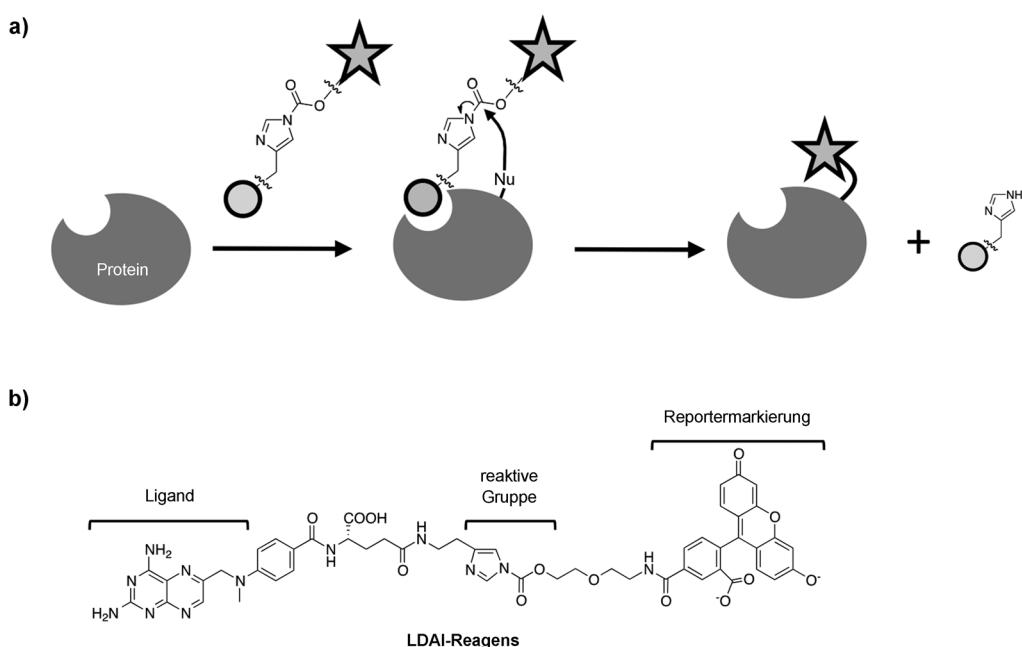
Aktivitätsmarkierungen, darunter auch die ABPP-Ansätze, sind wichtige Hilfsmittel zur spezifischen Markierung von Proteinen und zur Proteomanalyse unter verschiedenen Bedingungen. Die eingesetzten Sonden inaktivieren jedoch meist die Zielproteine und schränken so den Wert für viele mögliche Anwendungen wie die Echtzeitverfolgung von Proteinaktivitäten in der Zelle ein. Für jegliche nachfolgenden funktionellen Untersuchungen an den markierten Pro-

teinen ist die Wiederherstellung der ursprünglichen Funktionen des Proteins unverzichtbar. Hamachi et al. entwickelten mehrere Ansätze, um solch eine spurlose Proteinmarkierung zu erreichen.^[128] In frühen Arbeiten griffen sie auf Disulfid- oder Hydrazon-Linker als Spaltstellen für die Entfernung der Liganden nach der Proteinmarkierung zurück (Schema 12a,b). Disulfid-Linker lassen sich mit Dithiothreitol behandeln (Postphotoaffinitätsmarkierung; post-photoaffinity labeling method, P-PALM),^[129,130] während Hydrazon-Linker mit einem Überschuss an Hydroxylamin in ein unschädliches Oxim umgewandelt werden können (Postaffinitätsmarkierung; post-affinity labeling method, P-ALM).^[131,132] Diese Verbesserungen der Affinitätsmarkierung reichen jedoch wegen der geringen Bioorthogonalität nicht aus, um die Methoden in lebenden Systemen anzuwenden. Vor kurzem entwickelten Hamachi et al. eine neue Markierungsstrategie, die ligandendirigierte „Tosyl“-Chemie (LDT-Chemie), in der ein Phenylsulfonat-Linker zwischen Ligand und Sonde gleichzeitig als reaktive Gruppe fungiert (Schema 12c).^[133,134] In einer typischen S_N2 -Reaktion der Sulfonsäureesterfunktion mit einem (natürlichen) nucleophilen Aminosäurerest während der Markierungsreaktion wird der Ligandenrest freigesetzt und die Proteinaktivität wiederhergestellt. Dieses Verfahren ermöglicht die effiziente und hochspezifische Proteinmarkierung in lebenden Zellen, in Geweben und sogar in lebenden Mäusen ebenso wie *in vitro*. Der Vorteil der LDT-Chemie ist, dass endogene Proteine in proteinbasierte Biosensoren im Zellinneren umgewandelt werden können. Den Machbarkeitsnachweis erbrachte ein Experiment, bei dem ein intrazellulärer ^{19}F -NMR-Biosensor in humanen Erythrozyten auf der Basis der endogen exprimierten Carboanhydrase I (CAI) konstruiert wurde,^[133,135] der die Ligandenbindung an CAI anhand einer Veränderung der chemischen Verschiebung eines ^{19}F -Signals nachweist. Später wurden die ligandenbeladenen und unbefüllten Strukturen der ^{19}F -markierten CAI vollständig durch Röntgenstrukturanalyse vermessen. Erstmals konnte ein quantitativer Vergleich der Proteindynamik in Erythrozyten und *in vitro* mit ^{19}F -EXSY-NMR-Spektroskopie (EXSY = Austauschspektroskopie) durchgeführt werden.^[136]

Angesichts der Vorteile der Modularität der LDT-Reagentien lässt sich vorhersagen, dass diese Markierungstechnik auf die spezifische Modifizierung vielfältiger endogener



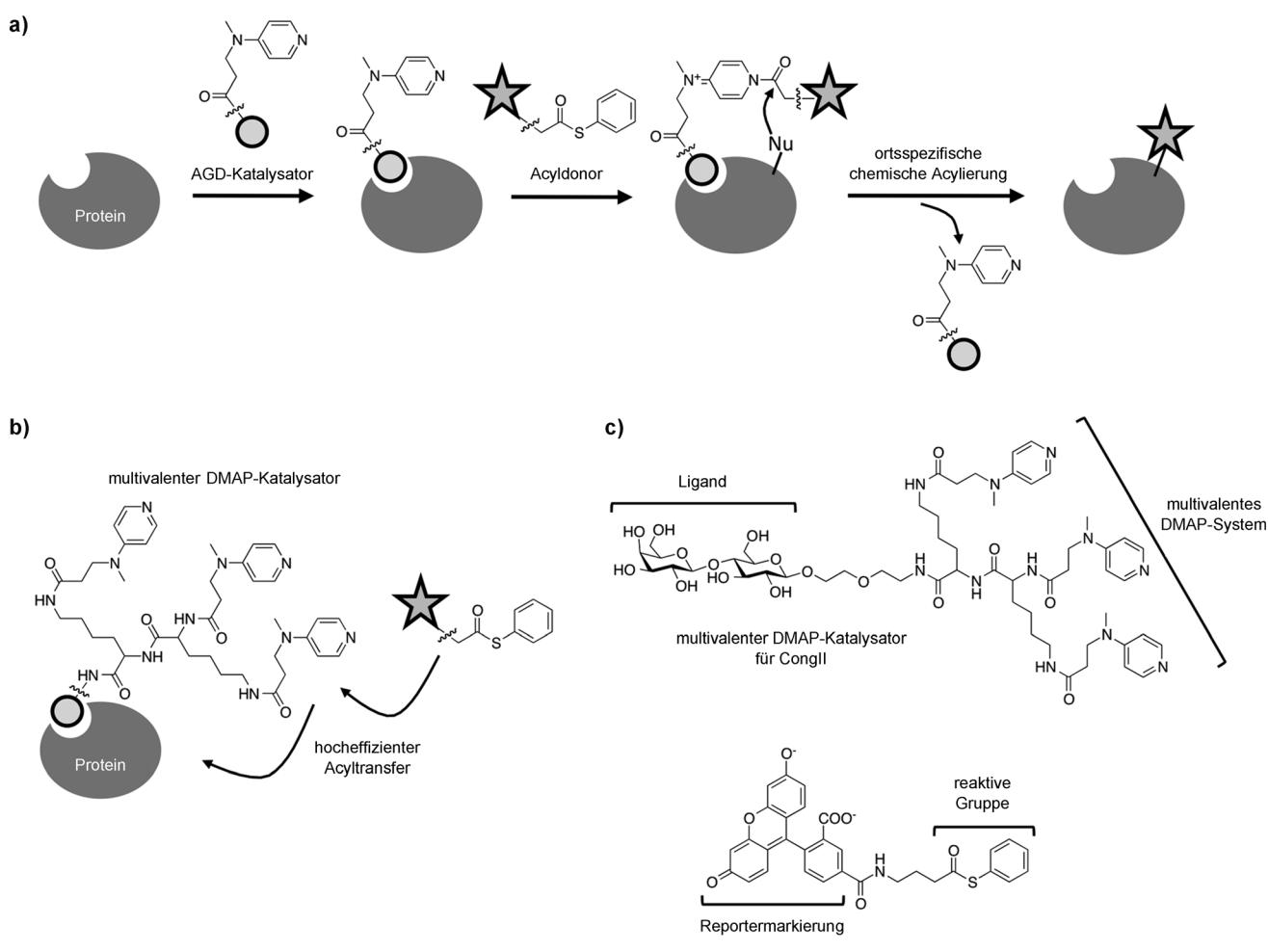
Schema 12. a) Post(photo)affinitätsmarkierung (P-(P)ALM). b) Molekularer Aufbau der P-PALM- und P-ALM-Reagentien. c) LDT-Chemie und chemische Strukturen von LDT-Reagentien für die Markierung von hCAII und das Engineering von FKBP12. d) Chemische Struktur des mit Marrinopyrrol beladenen Markierungsreagens vom Acylphenoltyp.^[140]



Schema 13. a) Ligandendirigierte Acylimidazol(LDAI-)Chemie; Nu = Nucleophil. b) Chemische Struktur des LDAI-Reagens für die FR-Markierung.

Proteine in unterschiedlichen zellulären Milieus anwendbar sein wird. So wurde das FK506 bindende Protein 12 (FKBP12) in Sägerzellen erfolgreich mit optimierten LDT-Reagentien markiert, die eine photoreaktive Sonde enthielten; die UV-induzierte kovalente Vernetzung von FKBP12 mit seinen wechselwirkenden Proteinen (FRB oder Calcineurin) wurde in lebenden Zellen durchgeführt (Schema 12 c).^[137] Auch andere Gruppen haben für selektive Proteinmarkierung und -charakterisierung auf die LDT-Chemie zurückgegriffen. Shin et al. zeigten so, dass das kleine Molekül Apoptozol (Az) in der ATP-Bindetasche des mit dem molekularen Chaperon Hsp70 verwandten Proteins Hsc70 (heat shock cognate 70) gebunden wird.^[138] Ohkanda et al. berichteten von der Phosphopeptid-abhängigen ortsspezifischen Fluoreszenzmarkierung des 14-3-3 δ -Proteins mit einem LDT-Reagens, das als Ligand das Diterpen Fusicoccin A (FC) trägt.^[139] Diese beiden Arbeiten demonstrieren die Leistungsfähigkeit der LDT-Chemie zur Charakterisierung von Zielprotein und ligandenbindender Tasche. Der Erfolg ist ein Resultat der strengen Ortsselektivität der Technik.

Auch andere Verfahren zur chemischen Markierung endogener Proteine in zellulärer Umgebung wurden mit reaktiven Gruppen durchgeführt, deren Reaktivität sorgfältig eingestellt worden war. So verwendeten Fenical et al. beispielsweise einen „Acylphenolrest“ (2-Hydroxybenzoylrest) als reaktive Gruppe, um das Zielprotein Marrinopyrrol A, einen in lebenden Zellen tumorhemmend wirkenden Naturstoff, zu identifizieren (Schema 12 d).^[140] Ganz aktuell ist die Veröffentlichung eines neuen Typs ligandendirigierter Chemie, bekannt als ligandendirigierte Acylimidazol(LDAI)-Chemie (Hamachi et al.; Schema 13).^[141] Ein moderat reaktives Alkyloxyacylimidazol (AI) ermöglichte, unterstützt durch die Ligandenbindung, die selektive Modifizierung natürlicher Proteine wie des endogenen Folatrezeptors (FR) auf der Oberfläche lebender Zellen, die mit der LDT-Chemie nicht effizient markiert werden konnten. Interessanterweise wirkte der Fluorescein-markierte FR als Fluoreszenzbiosensor auf der Zelloberfläche; mit diesem konnte erstmals *in situ* die Ligandenbindungskinetik des FR analysiert werden.



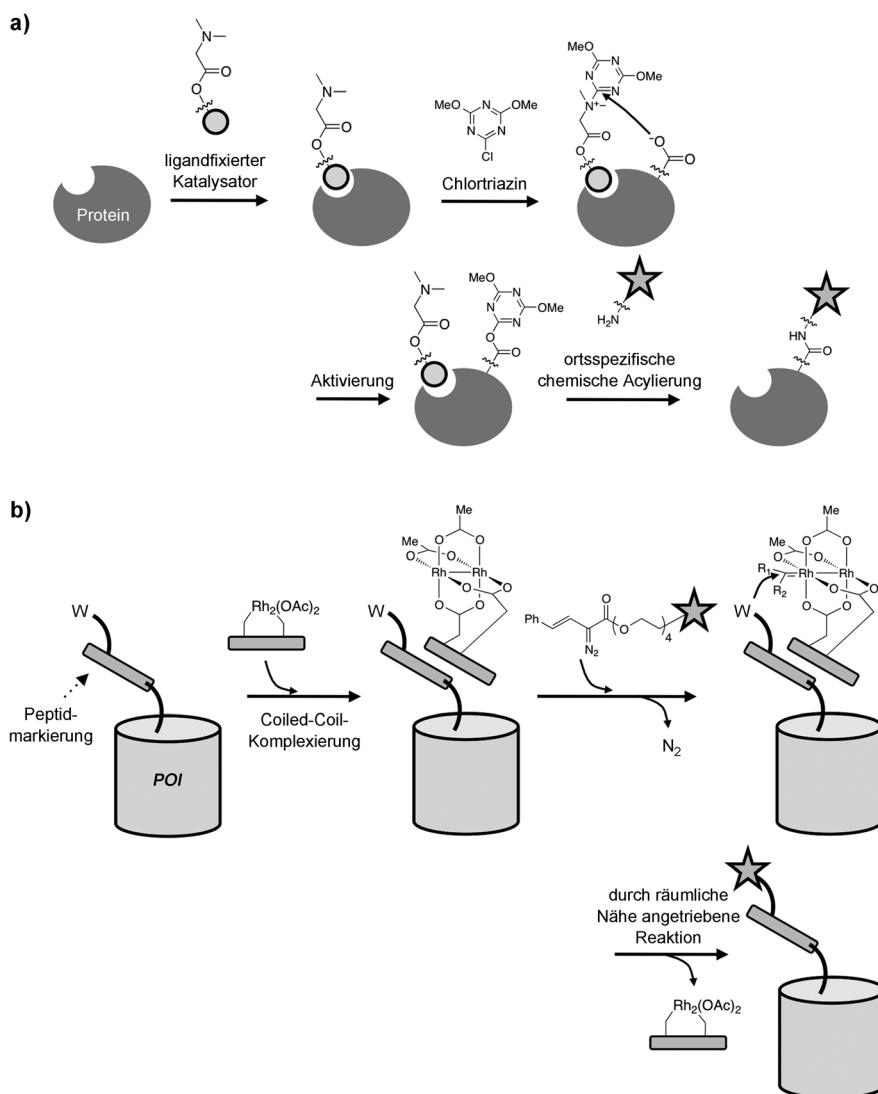
Schema 14. a, b) AGD-Katalysator-vermittelte selektive chemische Proteinmarkierung. a) Zugrundeliegende Strategie. b) Multivalentes DMAP-System für eine effiziente Markierung. c) Chemische Struktur des AGD-Katalysators vom Lactosetyp zur Markierung von CongII und des Acyldonors vom Fluoresceintyp.

4.4. Ligandengebundene Katalysatoren zur spurlosen Proteinmarkierung auf Zelloberflächen

Eine andere Strategie zur Markierung endogener Proteine wurde ebenfalls von Hamachi und Mitarbeitern eingeführt. Sie setzten einen Katalysator ein, der eine Gruppe trug, die ihm eine spezifische Affinität für das Zielprotein verlieh.^[142] 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) wird als organischer Katalysator für eine Vielzahl von Acyltransferreaktionen in der organischen Synthese eingesetzt. Hamachi et al. entwickelten affinitätsgeleitete DMAP-Katalysatoren (AGD-Katalysatoren, affinity-guided DMAP catalysts) aus einer DMAP-Einheit und einem Affinitätsliganden (Schema 14a,b). Die selektive Bindung des AGD-Katalysators an das Zielprotein erleichtert die Acyltransferreaktion einer Thioester-sonde in der Nachbarschaft des aktiven Zentrums des Proteins. Die Aussagekraft dieser Chemie wurde mit Lectinen, zuckerbindenden Proteinen wie Congerin II (CongII), Concanavalin A (ConA) und Weizenkeimagglutinin (WGA, wheat germ agglutinin) sowie ligandenbindenden Proteinen wie der SH2-Domäne und FKBP12 nachgewiesen.^[142-144] Wenig später erkannte man, dass die Markierungsreaktion durch Einführung mehrerer DMAP-Gruppen in den Ligand-Katalysator-Komplex deutlich beschleunigt werden konnte.^[144]

Mit der hohen Effizienz und Selektivität der Proteinmarkierung auf Basis multivalenter AGD-Katalysatoren gelang die Markierung von B2R auf der Zelloberfläche mit 85 % Ausbeute in 30 min. Das fluoreszenzmarkierte B2R ermöglicht einen Ligandenbindungstest mit einem bimolekularen Fluoreszenzlöschungs- und Wiederherstellungssystem (bimolecular fluorescence quenching and recovery, BFQR) auf der Oberfläche der lebenden Zelle. Bis heute sind etwa 50 % aller modernen Pharmazeutika gegen GPCRs gerichtet. Vor diesem Hintergrund ist die Entwicklung einer effizienten und robusten Screening-Plattform für Wirkstoffe gegen GPCRs von großer Bedeutung für die pharmazeutische Chemie und die Wirkstoffsuche.

Als weiteren Typ eines affinitätsgeleiteten Katalysators schlugen Kunishima et al. ein biotinbeladenes Chlortriazin zur Avidinmarkierung vor (Schema 15a).^[145] Ball et al. publizierten eine neue Markierungsmethode mit Rhodium(II)-Metallopeptiden und funktionalisierten Diazoverbindungen (Schema 15b).^[146,147] Die ortsspezifische, durch räumliche Nähe angetriebene Proteinmodifizierung gelingt mithilfe



Schema 15. a) Ligandengebundenes Chlortriazin zur Proteinmarkierung.^[145] b) Durch räumliche Nähe angetriebene Proteinmodifizierung mit Rhodium(II)-Metallopeptiden und einer Diazoverbindung.^[146,147]

einer Kombination aus peptidbasiertem molekularer Erkennung und einem Rhodiumkatalysator, der viele Aminosäureseitenketten in Zellsäften und *in vitro* modifizieren kann.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In aktuellen Forschungsarbeiten sind bedeutsame Fortschritte bei der selektiven Proteinmodifizierung mit synthetischen Molekülen erzielt worden. In diesem Aufsatz wurden vier Hauptstrategien dargestellt:

- 1) die Biokonjugation natürlicher Aminosäuren (überwiegend in *In-vitro*-Ansätzen);
- 2) die bioorthogonale chemische Reaktion nichtnatürlicher Aminosäuren;
- 3) die Kombination von selektiver Erkennung und Reaktivität unter Verwendung eines Paares aus einem Enzym oder kurzem Peptid sowie einem Sondenmarker;

Tabelle 1: Ligandgerichtete Reaktionen zur spezifischen Proteinmarkierung.

	reaktive Gruppe	modifiziertes Protein	markierte Aminosäure	Bedingungen	Lit.
P-PALM	Trifluormethylidiazirin	ConA	Tyr	Reagenzglas	[129, 130]
P-ALM	Epoxid	hCAII	His	Reagenzglas	[131]
LDT	Phenylensulfonat	hCAI, hCAII, SH2-Domäne, FKBP12, CongII, 14-3-3 δ , Hsc70	His, Tyr, Glu	Reagenzglas lebende Zellen <i>In vivo</i>	[133–139]
LDAI	Acylimidazol	DHFR, FR	Lys	Reagenzglas lebende Zellen	[141]
Acylfarbstoffübertragung	Acylphenol	Actin	Lys	Reagenzglas lebende Zellen	[140]
AGD-DMAP	DMAP/ Thioester	CongII, ConA, WGA, SH2-Domäne, FKBP12, FR, B2R	Lys, Tyr	Reagenzglas Zellysate lebende Zellen	[142–144]
AGD-Chlorthiazin	Trimethoxychlorthiazin	Avidin	Glu	Reagenzglas	[145]
Rh-Diazo	Rhodium(II)/Diazoverb.	Doppelwendel, SH3-Domäne	Trp, Tyr, Phe, Asn, Gln, Asp, Glu, Arg, Cys	Reagenzglas Zellysate	[146, 147]

4) der Einsatz ligandendirigierter Markierungsreaktionen für endogene Proteine.

Diese Methoden stellen ein nützliches Repertoire für die chemische Biologie bereit,^[148–151] wobei die drei letzten Verfahren besonders gut für Rohextrakte oder lebende Systeme geeignet sind. Die komplementäre oder kombinierte Verwendung dieser Methoden sollte die Leistungsfähigkeit chemischer Verfahren für die biologische Forschung demonstrieren. Um einige der ungelösten Probleme in Zellbiologie, pharmazeutischer Forschung und medizinischen Wissenschaften anzugehen, wird die Entwicklung neuer Methoden zur Proteinmodifizierung für lebende Systeme erforderlich sein. Alle künftigen Entwicklungen sollten die Analyse riesiger Proteinkomplexe erleichtern, Zielproteine für neue Medikamente identifizieren sowie den rationalen Entwurf irreversibler Hemmstoffe und das Aufspüren und die Diagnose von Krebs *in vivo* ermöglichen. Der Einsatz organischer Reaktionen für die Manipulation endogener natürlicher Proteine in ihrem natürlichen Umfeld befindet sich gegenwärtig noch in einem frühen Stadium (Tabelle 1), und die Entwicklung neuer chemischer Verfahren, die in lebenden Systemen genutzt werden können, ist ein lohnendes Ziel für die organische Chemie.

Eingegangen am 1. September 2012
Online veröffentlicht am 12. März 2013

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] A. N. Glazer, *Annu. Rev. Biochem.* **1970**, *39*, 101–130.
- [2] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
- [3] A. M. Wu, P. D. Senter, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1137–1146.
- [4] J. M. Antos, M. B. Francis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 253–262.
- [5] L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 34–68; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 34–66.
- [6] A. J. Link, M. L. Mock, D. A. Tirrell, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 603–609.
- [7] I. Johnsson, M. T. Z. Spence, *The Molecular Probes Handbook*, 11. Aufl., **2010**, Teil I.
- [8] J. M. McFarland, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13490–13491.
- [9] R. A. Scheck, M. B. Francis, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 247–251.
- [10] 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.
- [11] K. Tanaka, M. Kitadani, K. Fukase, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5346–5349.
- [12] G. J. L. Bernardes, J. M. Chalker, J. C. Errey, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5052–5053.
- [13] Y. A. Lin, J. M. Chalker, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16805–16811.
- [14] C. Denison, T. Kodadek, *J. Proteome Res.* **2004**, *3*, 417–425.
- [15] T. Kodadek, I. Duroux-Richard, J. C. Bonnafous, *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 210–217.
- [16] N. S. Joshi, L. R. Whitaker, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15942–15943.
- [17] T. L. Schlick, Z. Ding, E. W. Kovacs, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3718–3723.
- [18] S. D. Tilley, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1080–1081.
- [19] J. M. Antos, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10256–10257.
- [20] J. M. Antos, J. M. McFarland, A. T. Lavarone, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6301–6308.
- [21] A. Abuchowski, T. V. Es, N. C. Palczuk, F. F. Davis, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3578–3581.
- [22] A. Abuchowski, J. R. McCoy, N. C. Palczuk, T. V. Es, F. F. Davis, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3582–3586.
- [23] J. M. Harris, R. B. Chess, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 214–221.
- [24] M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 459–476.
- [25] F. M. Veronese, G. Pasut, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 1451–1458.
- [26] S. R. Adams, A. T. Harootunian, Y. J. Buechler, S. S. Taylor, R. Y. Tsien, *Nature* **1991**, *349*, 694–697.
- [27] H. Wang, E. Nakata, I. Hamachi, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2560–2577.
- [28] M. A. Dwyer, H. W. Hellinga, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 495–504.
- [29] J. S. Marvin, E. E. Corcoran, N. A. Hattangadi, J. V. Xhang, S. A. Gere, H. W. Hellinga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4366–4371.
- [30] R. M. de Lorimier, J. J. Smith, M. A. Dwyer, L. L. Looger, K. M. Sali, C. D. Paavola, S. S. Rizk, S. Sadigov, D. W. Conrad, L. Loew, H. W. Hellinga, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 2655–2675.

- [31] K. Sugimoto, M. Nishida, M. Otsuka, K. Makino, K. Ohokubo, Y. Mori, T. Morii, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 475–485.
- [32] R. Sakaguchi, K. Tainaka, N. Shimada, S. Nakano, M. Inoue, S. Kiyonaka, Y. Mori, T. Morii, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2196–2199; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2150–2153.
- [33] P. Nalbant, L. Hodgson, V. Kraynov, A. Toubchikine, K. M. Hahn, *Science* **2004**, *305*, 1615–1619.
- [34] A. Toubchikine, V. Kraynov, K. Hahn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4132–4145.
- [35] J. R. Simard, S. Klüter, C. Grütter, M. Getlik, M. Rabiller, H. B. Rode, D. Rauh, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 394–396.
- [36] J. R. Simard, M. Getlik, C. Grütter, V. Pawar, S. Wulfert, M. Rabiller, D. Rauh, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13286–13296.
- [37] H. Bayley, P. S. Cremer, *Nature* **2001**, *413*, 226–230.
- [38] L. Movileanu, S. Howorka, O. Braha, H. Bayley, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1091–1095.
- [39] N. Stephanopoulos, M. B. Francis, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 876–884.
- [40] T. L. Schlick, Z. Ding, E. W. Kovacs, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3718–3723.
- [41] R. A. Miller, A. D. Presley, M. D. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3104–3109.
- [42] S. I. van Kasteren, H. B. Kramer, H. H. Jensen, S. J. Campbell, J. Kirkpatrick, N. J. Oldham, D. C. Anthony, B. G. Davis, *Nature* **2007**, *446*, 1105–1109.
- [43] M. Volgraf, P. Gorostiza, R. Numano, R. H. Kramer, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 47–52.
- [44] D. L. Fortin et al., *Nat. Methods* **2008**, *5*, 331–338.
- [45] C. Wyart, F. D. Bene, E. Warp, E. K. Scott, D. Trauner, H. Baier, E. Y. Isacoff, *Nature* **2009**, *461*, 407–411.
- [46] Y. Zeng, T. N. C. Ramya, A. Dirksen, P. E. Dawson, J. C. Paulson, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 207–209.
- [47] A. Banerjee, T. D. Panosian, K. Mukherjee, R. Ravindra, S. Gal, D. L. Sackett, S. Bane, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 777–785.
- [48] Siehe Lit. [46].
- [49] J. Rayo, N. Amara, P. Krief, M. M. Meijler, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7469–7475.
- [50] I. S. Carrico, B. L. Carlson, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 321–322.
- [51] Staudinger-Reaktion: E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.
- [52] S. T. Laughlin, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 12–17.
- [53] J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873–877.
- [54] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [55] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192–3193.
- [56] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [57] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [58] J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486–11493.
- [59] K. E. Beatty, J. Szychowski, J. D. Fisk, D. A. Tirrell, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2137–2139.
- [60] S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, *320*, 664–667.
- [61] 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.
- [62] K. Kodama, S. Fukuzawa, H. Nakayama, T. Kigawa, K. Sakamoto, T. Yabuki, N. Matsuda, M. Shirouzu, K. Takio, K. Tachibana, S. Yokoyama, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 134–139. Erratum in: *ChemBioChem* **2007**, *8*, 159.
- [63] A. Ojida, H. Tsutsumi, N. Kasagi, I. Hamachi, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3301–3305.
- [64] T. Sasaki, K. Kodama, H. Suzuki, S. Fukuzawa, K. Tachibana, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4550–4553.
- [65] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518–13519.
- [66] M. T. Taylor, M. L. Blackman, O. Dmitrenko, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9646–9649.
- [67] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17570–17573.
- [68] Siehe Lit. [13].
- [69] J. M. Chalker, C. S. C. Wood, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16346–16347.
- [70] W. Ou, T. Uno, H.-P. Chiu, J. Grünwald, S. E. Cellitti, T. Crossgrove, X. Hao, Q. Fan, L. L. Quinn, P. Patterson, L. Okach, D. H. Jones, S. A. Lesley, A. Brock, B. H. Geierstanger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 10437–10442.
- [71] Photoklick-Reaktionen: W. Song, Y. Wang, J. Qu, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9654–9655.
- [72] A. A. Poloukhtine, N. E. Mbua, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, V. V. Popik, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15769–15776.
- [73] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86–89.
- [74] A. Gautier, A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Corrêa, M. Kindermann, F. Beaujols, K. Johnsson, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 128–136.
- [75] D. Maurel, L. C. Agrar, C. Brock, M.-L. Rives, E. Bourrier, M. A. Ayoub, H. Bazin, N. Tinel, T. Durroux, L. Prezeau, E. Trinquet, J.-P. Pin, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 561–567.
- [76] G. V. Los et al., *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373–382.
- [77] R. F. Ohana, L. P. Encell, K. Zhao, D. Simpson, M. R. Slater, M. Urh, K. V. Wood, *Protein Expression Purif.* **2009**, *68*, 110–120.
- [78] M. Urh, D. Hartzell, J. Mendez, D. H. Klaubert, K. Wood, *Methods Mol. Biol.* **2008**, *421*, 191–210.
- [79] T. K. Neklesa, H. S. Tae, A. R. Schneekloth, M. J. Stulberg, T. W. Corson, T. B. Sundberg, K. Raina, S. A. Holley, C. M. Crews, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 538–543.
- [80] M. Fernández-Suárez, H. Baruah, L. Martínez-Hernández, K. T. Xie, J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, A. Y. Ting, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1483–1487.
- [81] C. Uttamapinant, K. A. White, H. Baruah, S. Thompson, M. Fernández-Suárez, S. Putthenveetil, A. Y. Ting, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 10914–10919.
- [82] I. Chen, M. Howarth, W. Lin, A. Y. Ting, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 99–104.
- [83] M. W. Popp, J. M. Antos, G. M. Grotenbreg, E. Spooner, H. L. Ploegh, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 707–708.
- [84] T. Tanaka, T. Yamamoto, S. Tsukiji, T. Nagamune, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 802–807.
- [85] C. S. Lisenbee, S. K. Karnik, R. N. Trelease, *Traffic* **2003**, *4*, 491–501.
- [86] B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, *281*, 269–272.
- [87] S. R. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6063–6076.
- [88] G. Gaietta, T. J. Deerinck, S. A. Adams, J. Bouwer, O. Tour, D. W. Laird, G. E. Sosinsky, R. Y. Tsien, M. H. Ellisman, *Science* **2002**, *296*, 503–507.
- [89] O. Tour, R. M. Meijer, D. A. Zacharias, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1505–1508.
- [90] O. Tour, S. R. Adams, R. A. Kerr, R. M. Meijer, T. J. Sejnowski, R. W. Tsien, R. Y. Tsien, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 423–431.
- [91] B. Liu, C. T. Archer, L. Burdine, T. G. Gillette, T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12348–12349.
- [92] Z. Ignatova, B. Krishnan, J. P. Bombardier, A. M. C. Marcelino, J. Hong, L. M. Giersch, *Pept. Sci.* **2007**, *2*, 157–163.
- [93] K. W. Marek, G. W. Davis, *Neuron* **2002**, *36*, 805–813.

- [94] E. Hochuli, H. Dobeli, A. Schacher, *J. Chromatography* **1987**, *411*, 177–184.
- [95] E. G. Guignet, R. Hovius, H. Vogel, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 440–444.
- [96] S. Lata, M. Gavutis, R. Tampé, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2365–2372.
- [97] C. T. Hauser, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 3693–3697.
- [98] S. Fujishima, H. Nonaka, S. Uchinomiya, Y. A. Kawase, A. Ojida, I. Hamachi, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 594–596.
- [99] S. Uchinomiya, H. Nonaka, S. Fujishima, S. Tsukiji, A. Ojida, I. Hamachi, *Chem. Commun.* **2009**, *39*, 5880–5882.
- [100] T. L. Halo, J. Appelbaum, E. M. Hobert, D. M. Balkin, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 438–439.
- [101] B. R. Sculimbrene, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7346–7352.
- [102] A. Ojida, K. Honda, D. Shinmi, S. Kiyonaka, Y. Mori, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10452–10459.
- [103] H. Nonaka, S. Tsukiji, A. Ojida, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15777–15779.
- [104] H. Nonaka, S. Fujishima, S. Uchinomiya, A. Ojida, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9301–9309.
- [105] H. Kiefer, J. Lindstrom, E. S. Lennox, S. J. Singer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *67*, 1688–1694.
- [106] V. Chowdhry, F. H. Westheimer, *Annu. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 293–325.
- [107] J. Das, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4405–4417.
- [108] M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279–3301.
- [109] A. M. Sadaghiani, S. H. L. Verhelst, M. Bogryo, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 20–28.
- [110] G. Chen, A. Heim, D. Riether, D. Yee, Y. Milgrom, M. A. Gawinowicz, D. Sames, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8130–8133.
- [111] C.-M. Kam, A. S. Abuelyaman, Z. Li, D. Hudig, J. C. Powers, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 560–567.
- [112] A. S. Abuelyaman, D. Hudig, S. L. Woodard, J. C. Powers, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 400–405.
- [113] Y. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14694–14699.
- [114] D. Greenbaum, K. F. Medzihradzky, A. Burlingame, M. Bogyo, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 569–581.
- [115] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535–546.
- [116] K. Tsuboi, D. A. Bachovchin, A. E. Speers, T. P. Spicer, V. Fernandez-Vega, P. Hodder, H. Rosen, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16605–16616.
- [117] D. Leung, C. Hardouin, D. L. Boger, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 687–691.
- [118] N. Jessani, M. Humphrey, W. H. McDonald, S. Niessen, K. Masuda, B. Gangadharan, J. R. Yates III, B. M. Mueller, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13756–13761.
- [119] G. Blum, S. R. Mullins, K. Keren, M. Fonovic, C. Jedeszko, M. J. Rice, B. F. Sloane, M. Bogyo, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 203–209.
- [120] A. Saghatelyan, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10000–10005.
- [121] M. P. Patricelli, A. K. Szardenings, M. Liyanage, T. K. Normanbhoy, M. Wu, H. Weissig, A. Aban, D. Chun, S. Tanner, J. W. Kozarich, *Biochemistry* **2007**, *46*, 350–358.
- [122] L.-C. Lo, T.-L. Pang, C.-H. Kuo, Y.-L. Chiang, H.-Y. Wang, J.-J. Lin, *J. Proteome Res.* **2002**, *1*, 35–40.
- [123] C.-S. Tsai, Y.-K. Li, L.-C. Lo, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3607–3610.
- [124] G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 805–809.
- [125] A. Adibekian, B. R. Martin, C. Wang, K.-L. Hsu, D. A. Bachovchin, S. Niessen, H. Hoover, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 469–478.
- [126] E. W. S. Chan, S. Chattopadhyaya, R. C. Panicker, X. Huang, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14435–14446.
- [127] H. Shi, X. Cheng, S. K. Sze, S. Q. Yao, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11306–11308.
- [128] T. Hayashi, I. Hamachi, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1460–1469.
- [129] I. Hamachi, T. Nagase, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12065–12066.
- [130] E. Nakata, Y. Koshi, E. Koga, Y. Katayama, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13253–13261.
- [131] Y. Takaoka, H. Tsutsumi, N. Kasagi, E. Nakata, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3273–3280.
- [132] H. Wakabayashi, M. Miyagawa, Y. Koshi, Y. Takaoka, S. Tsukiji, I. Hamachi, *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 1134–1139.
- [133] S. Tsukiji, M. Miyagawa, Y. Takaoka, T. Tamura, I. Hamachi, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 341–343.
- [134] S. Tsukiji, H. Wang, M. Miyagawa, T. Tamura, Y. Takaoka, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9046–9054.
- [135] Y. Takaoka, Y. Sun, S. Tsukiji, I. Hamachi, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 511–520.
- [136] Y. Takaoka et al. unveröffentlichte Ergebnisse.
- [137] T. Tamura, S. Tsukiji, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2216–2226.
- [138] H. J. Cho, H. Y. Gee, K.-H. Baek, S.-K. Ko, J.-M. Park, H. Lee, N.-D. Kim, M. G. Lee, I. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20267–20276.
- [139] M. Takahashi, A. Kawamura, N. Kato, T. Nishi, I. Hamachi, J. Ohkanda, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 524–527; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 509–512.
- [140] C. C. Hughes, Y.-L. Yang, W.-T. Liu, P. C. Dorrestein, J. L. Clair, W. Fenical, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12094–12096.
- [141] S. Fujishima, R. Yasui, T. Miki, A. Ojida, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3961–3964.
- [142] Y. Koshi, E. Nakata, M. Miyagawa, S. Tsukiji, T. Ogawa, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 245–251.
- [143] Y. Sun, Y. Takaoka, S. Tsukiji, M. Narazaki, T. Matsuda, I. Hamachi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4393–4396.
- [144] H. Wang, Y. Koshi, D. Minato, H. Nonaka, S. Kiyonaka, Y. Mori, S. Tsukiji, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12220–12228.
- [145] M. Kunishima, S. Nakanishi, J. Nishida, H. Tanaka, D. Morisaki, K. Hioki, H. Nomoto, *Chem. Commun.* **2009**, *37*, 5597–5599.
- [146] Z. Chen, B. V. Popp, C. L. Bovet, Z. T. Ball, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 920–925.
- [147] Z. Chen, F. Vohidov, J. M. Coughlin, L. J. Stagg, S. T. Arold, J. E. Ladbury, Z. T. Ball, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10138–10145.
- [148] S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153–1158.
- [149] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. L. Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, *313*, 1642–1645.
- [150] V. N. Belov, C. A. Wurm, V. P. Boyarskiy, S. W. Hell, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3598–3602; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3520–3523.
- [151] K. Kolmakov, V. N. Belov, J. Bierwagen, C. Ringemann, V. Muller, C. Eggeling, S. W. Hell, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 158–166.